

SINH ENZIM NGOẠI BÀO PEROXIDAZA, LACCAZA VÀ PHÂN HỦY CÁC HỢP CHẤT VÒNG THƠM CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN XKBH1

Nguyễn Quang Huy, Nguyễn Bá Hữu, Nguyễn Thị Thanh Ngân,
Đặng Thị Cẩm Hà*

Viện Công nghệ sinh học, Viện KHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

*Email: dangcha80@gmail.com, dangcha80@yahoo.com

Đến Toà soạn: 15/9/2011; Chấp nhận đăng: 17/11/2012

TÓM TẮT

Bốn chủng xạ khuẩn gồm XKBH1, XKBH2, XKBH3 và XKBH5 đã được phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ tại sân bay Biên Hòa. Các chủng này sinh laccaza với hoạt tính ban đầu thấp. Dựa trên phân tích trình tự gen 16S rARN, chủng XKBH1 được phân loại thuộc chi *Streptomyces* và đặt tên là *Streptomyces* sp. XKBH1. Trình tự gen 16S rARN (khoảng 1489 bp) được đăng ký trên GeneBank với mã số GQ 204110. Chủng XKBH1 sinh trưởng trên môi trường KG và SH1 có chứa dioxin, 2,4,5-T, pyren và Anthracen. Sau 7 ngày nuôi cấy, chủng này phân hủy được 72 % pyren, 48,3 % anthracen trên môi trường KG và 63,3 % pyren, 55,8 % anthracen trên môi trường SH1 với nồng độ ban đầu của mỗi chất là 100 ppm. Chủng này cũng sinh tổng hợp laccaza trên cả 2 môi trường KG và SH1 có chứa dioxin, 2,4,5-T, pyren và anthracen. Khả năng sinh laccaza của chủng XKBH1 trên môi trường KG cao hơn trên môi trường SH1 với hoạt tính laccaza là 2,7 U/l. Chủng này cũng sinh tổng hợp laccaza, lignin peroxidaza (LiP) và mangan peroxidaza (MnP) trên môi trường SH1 chứa dioxin và 2,4,5-T là chất cảm ứng. Hoạt tính MnP cao nhất đạt 15,7 U/l trong môi trường SH1 chứa 2,4,5-T. Hoạt tính laccaza được xác định tại pH 3 tăng gấp 74 lần so với tại pH 5. Đa số các chất cảm ứng đều làm tăng hoạt tính laccaza của chủng XKBH1 và hoạt tính laccaza cao nhất (1073 U/l) trong môi trường KG chứa veratryl alcohol nồng độ ban đầu 0,5 mM.

Từ khóa: *Streptomyces*, laccaza, peroxidaza, 16S rARN, chất cảm ứng

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ba enzym quan trọng trong hệ enzym phân hủy lignin gồm có lignin peroxidaza – LiP (EC 1.11.1.14), mangan peroxidaza -MnP (EC 1.11.1.13) và laccaza (EC 1.10.3.2) đã được nghiên cứu và chứng minh đóng vai trò quan trọng trong các quá trình phân hủy sinh học [1, 2]. Cả ba enzym đều có khả năng phân hủy, khoáng hóa rất nhiều hợp chất mạch vòng như phenol, polyphenol, hydrocarbon thơm đa nhân (PAHs), chất diệt cỏ, chất màu công nghiệp, thuốc nhuộm v.v. với mức độ khác nhau [1]. Ở Việt Nam, trong quá trình xử lý tẩy độc đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại điểm nóng Đà Nẵng, bằng các kỹ thuật sàng lọc hiện hành Đặng Thị Cẩm

Hà và Cộng sự đã phát hiện ra sự có mặt của nấm sợi, xạ khuẩn và vi khuẩn sinh laccaza, LiP và MnP. Các chủng nấm sợi chủ yếu thuộc chi *Aspergillus*, xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* và vi khuẩn thuộc chi *Brevibacillus* [3, 4]. Tại sân bay Biên Hòa, nơi có độ ô nhiễm 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD); 2,4,5-trichlorophenoxyacetic (2,4,5-T); 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) ở mức độ tương đối cao trên phạm vi rộng [3]. Ngoài ra một lượng lớn trichlorophenol (TCP), dichlorophenol (DCP), hợp chất hữu cơ đa vòng thơm (PAH) cũng đã được phát hiện. Chính vì vậy, để chuẩn bị công nghệ tốt nhất cho quy mô xử lý 3384 m³ đất nhiễm chất độc hóa học tại điểm nóng này chúng tôi đã khảo sát và tìm kiếm các vi sinh vật có khả năng sinh các enzym LiP, MnP và laccaza.

Xạ khuẩn chiếm số lượng lớn với độ đa dạng cao trong đất tại điểm nóng này. Vậy, xạ khuẩn đóng vai trò gì trong quá trình phân hủy sinh học, chúng có khả năng sinh các enzym ngoại bào này không? Để trả lời cho câu hỏi này, chúng tôi đã nghiên cứu khả năng sinh trưởng, phân hủy một số hợp chất ô nhiễm và khả năng sinh laccaza, MnP và LiP của bốn chủng xạ khuẩn phân lập được. Đồng thời khảo sát pH và chất cảm ứng ảnh hưởng đến hoạt tính cũng như khả năng sinh tổng hợp laccaza của chủng xạ khuẩn XKBH1.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin được thu thập từ các vị trí khác nhau của sân bay Biên Hoà. Đất được lấy và giữ trong các bình vô trùng. Đây là nguồn nguyên liệu chính để phân lập và sàng lọc các chủng vi sinh vật sinh laccaza, LiP và MnP.

2.1. Môi trường nuôi cấy

Các môi trường Gause nghèo (KG), SH1 [5] được sử dụng để nghiên cứu khả năng sinh trưởng, sinh enzym và phân hủy các hợp chất hữu cơ đa vòng thơm của chủng xạ khuẩn.

2.2. Nghiên cứu khả năng sử dụng các chất đa vòng thơm

Các môi trường SH1 (đánh giá khả năng phân hủy chất ô nhiễm theo cơ chế đồng trao đổi chất) và môi trường KG (đánh giá khả năng sử dụng chất ô nhiễm làm nguồn carbon và năng lượng duy nhất) đã được sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy dịch chiết đất chứa dioxin (DCD), dibenzofuran, 2,4,5-T, anthracen và pyren của chủng xạ khuẩn XKBH1. Khả năng sử dụng các hợp chất đa vòng thơm được đánh giá thông qua sự thay đổi màu môi trường nuôi cấy, sinh khối và sự biến mất của các tinh thể các hợp chất vòng thơm. Sau 7 ngày nuôi lắc ở 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút, hàm lượng PAH trong môi trường dịch thể được xác định theo phương pháp đo quang phân tử [6].

2.3. Xác định hoạt tính enzym ngoại bào

Chủng xạ khuẩn được nuôi lắc 4 ngày trên môi trường KG chứa dịch chiết đất (trên 90 % hàm lượng 2,3,7,8-TCDD và các chất ô nhiễm khác), 2,4,5-T, anthracen và pyren để xác định khả năng sinh enzym ngoại bào. Hoạt tính laccaza được xác định theo phương pháp của Han và đồng tác giả [7] sử dụng ABTS làm cơ chất. Xác định hoạt tính enzym lignin peroxidaza dựa trên sự oxy hóa 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) của enzym tạo thành sản phẩm có độ hấp thụ mạnh tại bước sóng 510 nm [8]. Xác định hoạt tính mangan peroxidaza (MnP) dựa trên sự oxy hóa phenol đỏ của enzym MnP tạo thành hợp chất hấp thụ mạnh ở bước sóng 610 nm [9].

2.4. Xác định trình tự đoạn gen 16S rARN

Tách chiết ADN tổng số, nhân đoạn gen mã hóa 16S rARN của chủng xạ khuẩn sử dụng cặp môi 27F và 14927R, gắn sản phẩm PCR vào vector pT257R/T và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* TOP10. Trình tự đoạn gen 16S rARN được xác định trên máy ABI PRISM 3100 Avant Data Analyzer, xử lý và so sánh bằng các chương trình tin sinh học Bioedit, Clustal X, Blast, NJ và đăng ký trên GenBank.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzym ngoại bào

Enzim LiP, MnP và laccaza ngày càng thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học và công nghệ do tiềm năng của chúng trong xử lý các chất ô nhiễm hữu cơ chứa vòng thơm. Do có tính đặc hiệu cơ chất thấp nên ngoài khả năng phân hủy lignin, các enzym peroxidaza và Laccaza còn có khả năng chuyển hóa nhiều hợp chất hữu cơ phenol và không phải phenol khó phân hủy khác, do đó chúng là những enzym rất có ý nghĩa trong xử lý môi trường [1, 2]. Phân lập, sàng lọc và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzym ngoại bào từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại sân bay Biên Hòa đã được tiến hành trong nghiên cứu này.

Bốn chủng xạ khuẩn XKBH1, XKBH2, XKBH3 và XKBH5 được phân lập từ các mẫu đất nghiên cứu. Sau 7 ngày nuôi lác trên môi trường KG lỏng, hoạt tính enzym laccaza, MnP và LiP đã được xác định.

Bảng 1. Hoạt tính enzym laccaza, LiP và MnP của 4 chủng xạ khuẩn nghiên cứu

Chủng xạ khuẩn	laccaza (U/l)	LiP (U/l)	MnP (U/l)
XKBH1	0,8	0,57	-
XKBH2	0,38	-	-
XKBH3	0,49	-	-
XKBH5	0,62	-	-

Chú thích: - chưa phát hiện

Như vậy, cả 4 chủng xạ khuẩn phân lập được từ đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Biên Hòa đều có khả năng sinh enzym laccaza, dao động từ 0,38 U/l đến 0,8 U/l. Chưa phát hiện được khả năng sinh MnP của các chủng xạ khuẩn trên. Ngoài ra, hoạt tính LiP mới chỉ được phát hiện ở chủng XKBH1 (0,57 U/l). Chủng XKBH1 đã được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo bởi khả năng sinh không chỉ laccaza cao hơn các chủng khác mà nó còn có khả năng sinh LiP.

3.2. Khả năng phân hủy các chất ô nhiễm và sinh tổng hợp enzym ngoại bào của chủng XKBH1

Đất tại “điểm nóng” sân bay Biên Hòa và Đà Nẵng vẫn bị ô nhiễm 2,4,5-T; 2,4-D, 2,3,7,8-TCDD và PAH. Kết quả đánh giá khả năng sinh trưởng và sinh enzym ngoại bào trên hai môi trường KG và SH1 chứa các nguồn chất độc như 2,4,5-T; dịch chiết đất chứa dioxin, anthracene và pyrene cho thấy, chủng XKBH1 sinh trưởng tốt trên cả 2 môi trường có chứa các chất ô nhiễm khác nhau (bảng 2).

Bảng 2. Khả năng sinh trưởng của chủng xạ khuẩn XKBH1 trên môi trường chứa các nguồn ô nhiễm

Nguồn ô nhiễm	KG	SH1
Dịch chiết đất chứa dioxin	++	+
2,4,5- T	+++	++
Anthracene	++	++
Pyrene	++	++

Chú thích: + sinh trưởng yếu, ++ sinh trưởng trung bình, +++ sinh trưởng tốt

Tuy nhiên, chủng này sinh trưởng trên môi trường KG tốt hơn trên môi trường CNSH1 và sinh trưởng tốt nhất trên môi trường KG chứa 2,4,5-T. Hiện nay, mới chỉ có một số công bố về khả năng sử dụng 2,4,5-T và dioxin của các chủng vi sinh vật như là nguồn carbon và năng lượng duy nhất. Chủng xạ khuẩn XKBH1 sinh trưởng được trên hai môi trường KG và SH1 chứa các chất ô nhiễm cấu trúc đa nhân. Hai môi trường này có chứa tinh bột và một số axit hữu cơ, nên có thể chủng xạ khuẩn XKBH1 sử dụng các chất ô nhiễm theo con đường đồng trao đổi chất. Tuy nhiên, cần có thêm các phân tích bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) đối với 2,4,5-T hoặc sắc kí khí khối phổ (GC/MS) đối với dioxin để khẳng định hiệu quả sử dụng và con đường chuyển hóa các chất ô nhiễm bằng các mẫu đánh dấu carbon.

3.3. Khả năng phân hủy anthracene và pyrene của chủng XKBH1

Một lượng nhỏ các PAH đã được phát hiện trong đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại các căn cứ quân sự cũ của Mỹ [3]. Các PAH này có nguồn gốc từ dầu để hòa tan chất diệt cỏ chứa dioxin. Do vậy, loại bỏ các PAH trong đất ô nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin cũng là một ưu tiên của quá trình tẩy độc đất ô nhiễm bằng phân hủy sinh học. Hai loại PAH là anthracene có 3 vòng thơm và pyrene có bốn vòng thơm đã được nhiều nhà khoa học quốc tế lựa chọn làm mô hình nghiên cứu và cũng được sử dụng trong nghiên cứu khả năng phân hủy PAH của chủng XKBH1 (bảng 3).

Bảng 3. Khả năng phân hủy các PAH của chủng XKBH1 trên môi trường KG và SH1

Môi trường	PAH	Phân hủy (%)
KG	Anthracene	48,3 %
	Pyrene	72 %
SH1	Anthracene	55,8 %
	Pyrene	63,3 %

Chủng XKBH1 đã phân hủy 72 % pyrene và 48,3 % anthracene trên môi trường KG; 55,8 % anthracene và 63,3 % pyrene trên môi trường SH1. Hiện nay, có nhiều nghiên cứu ở Việt Nam và quốc tế về phân hủy sinh học các PAH [1, 4, 10]. Chủng vi khuẩn *Sphingomonas yanoikuyae* MXL-9 phân lập từ cặn dầu thô mỏ Bạch Hổ phân hủy 64,5 % phenanthrene và 61,4 % anthracene sau 7 ngày nuôi cấy ở nồng độ thấp [10]. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKDN12 cũng được phân lập từ đất nhiễm chất độc hóa học tại Đà Nẵng sau 7 ngày nuôi cấy phân hủy được 32,72 % phenanthrene, 39,01 % anthracene, 23,32 % fluoranthene và 32,1 % dibenzofuran với hàm lượng ban đầu lần lượt là 375,5 ppm, 127,8 ppm, 76,5 ppm và 594 ppm [5].

So với một số chủng kể trên, xạ khuẩn XKBH1 phân hủy anthracene và pyrene ở mức trung bình. Tuy nhiên, chủng này có thể sử dụng được cả 2,4,5-T và dịch chiết đất chứa dioxin cũng như khả năng sinh enzym ngoại bào nên có thể xem đây cũng là nguồn nguyên liệu quý phục vụ xử lý ô nhiễm theo hướng bổ sung giống vi sinh vật.

3.4. Khả năng sinh tổng hợp LiP, MnP và laccaza của chủng xạ khuẩn XKBH1

Nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp enzym ngoại bào do XKBH1 trên môi trường chứa các chất ô nhiễm như dịch chiết đất chứa dioxin, 2,4,5-T, pyrene và anthracene đã được tiến hành (bảng 4).

Bảng 4. Hoạt tính enzym của chủng XKBH1 trên các môi trường có các chất độc khác nhau

Nguồn ô nhiễm	KG (U/l)			SH1 (U/l)		
	laccaz a	LiP	MnP	laccaz a	LiP	MnP
DCD	0,9	-	-	0,28	1,5	5,73
2,4,5-T	1,0	-	-	1,0	0,23	15,7
Pyrene	2,7	1,52	-	0,5	-	-
Anthracene	0,1	-	4,9	0,14	-	-

Chú thích: - chưa phát hiện được.

Trên môi trường KG và SH1 có chứa các chất ô nhiễm khác nhau chủng XKBH1 đều có khả năng sinh laccaza với hoạt tính không cao. Trong đó đáng chú ý, trên môi trường KG chủng XKBH1 sinh laccaza cao hơn không nhiều so với môi trường SH1. Đặc biệt trên môi trường KG chứa pyrene, XKBH1 sinh enzym tốt hơn cả (2,7 U/l) và khả năng phân hủy cũng tốt nhất (72 % pyrene được loại bỏ sau 7 ngày nuôi cấy). Trên môi trường SH1 chứa 2,4,5-T chủng này sinh laccaza cao hơn so với khi nuôi cấy trên cùng môi trường nhưng có các chất ô nhiễm khác (1 U/l) song đáng tiếc là không được phân tích khả năng phân hủy. Khả năng sinh laccaza trên môi trường KG có chứa pyrene (2,7 U/l) tốt hơn trên môi trường SH1 chứa pyrene (0,5 U/l), trên môi trường SH1 chứa anthracene sinh laccaza (0,14 U/l) cao hơn trên môi trường KG chứa anthracene (0,1 U/l).

Chủng FDNR40 đã được chúng tôi nghiên cứu trên môi trường SH1 chứa các chất ô nhiễm là DC, 2,4,5-T, anthracene và pyrene đều có khả năng sinh ra enzym laccaza. Đặc biệt hoạt tính laccaza cao nhất khi môi trường SH1 chứa có 100 ppm 2,4,5-T (0,49U/l) [4]. Trong khi đó,

chủng XKBH1 có khả năng sinh laccaza khi có 2,4,5-T là 1,0 U/l, cao hơn so với chủng FDNR40. Trên môi trường SH1 có các chất ô nhiễm là anthracene và pyrene, chủng XKBH1 không sinh LiP, còn trên môi trường có chứa DC và 2,4,5-T lại có khả năng sinh LiP và cao nhất trên DC (1,5 U/l). Trên môi trường SH1 có chứa 2,4,5 –T sinh MnP cao tới 15,7 U/l. Như vậy chủng XKBH1 có khả năng sinh tổng hợp laccaza và enzym peroxidaza trên môi trường có các chất ô nhiễm với hoạt tính không cao, đặc biệt trên môi trường SH1 có chứa 2,4,5 –T chủng này sinh cả 3 loại enzym và có sự chuyển màu rất rõ.

Không giống như hai loại enzym peroxidaza, laccaza có khả năng tham gia xúc tác nhiều phản ứng khác nhau không cần đến H₂O₂ trong quá trình phân hủy hay khoáng hóa chất hữu cơ mạch vòng gây ô nhiễm và có triển vọng được ứng dụng nhiều trong công nghiệp công nghệ sinh học nhằm tạo ra nguyên liệu cho công nghệ sản xuất nhiên liệu sinh học. Chính vì vậy nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính laccaza và làm tăng khả năng sinh tổng hợp enzym này là rất cần thiết. Hai yếu tố trước tiên được nghiên cứu là ảnh hưởng của pH đến hoạt tính laccaza và ảnh hưởng của các chất cảm ứng đến khả năng sinh laccaza của chủng XKBH1.

3.5. Ảnh hưởng pH đến hoạt tính enzym laccaza của chủng XKBH1

Từ những dấu hiệu rất rõ ràng khi chọn lọc ban đầu với chất chỉ thị đặc hiệu là guaiacol thì chủng XKBH1 thể hiện khả năng sinh laccaza và peroxidaza tương đối tốt hơn so với các chủng cũng đã được phân lập khác. Tuy nhiên những kết quả xác định hoạt tính các enzym cho thấy hoạt lực không cao. Nhận thấy pH dung dịch đệm là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hoạt tính enzym trong quá trình xác định hoạt tính. Vậy, pH của các dung dịch đệm đang sử dụng có phải là nguyên nhân kỹ thuật dẫn đến hoạt tính các enzym rất thấp? Để trả lời câu hỏi này nghiên cứu ảnh hưởng của pH khi đo hoạt tính laccaza ở dung dịch nuôi cấy chủng XKBH1 đã được tiến hành.

Chủng XKBH1 được nuôi trên môi trường KG với chất cảm ứng là 100 ppm pyrene. Sau 4 ngày, dịch nuôi cấy được thu lại và ly tâm loại sinh khối tế bào. Dịch nổi được sử dụng để xác định hoạt tính laccaza sử dụng dung dịch đệm natri axetat 20 mM với khoảng pH nghiên cứu từ 2 – 6 (bảng 5).

Bảng 5. Ảnh hưởng của pH hoạt tính laccaza của chủng XKBH1

pH thử nghiệm	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6
Hoạt tính laccaza (U/l)	418,2	126	15,2	1,7	0

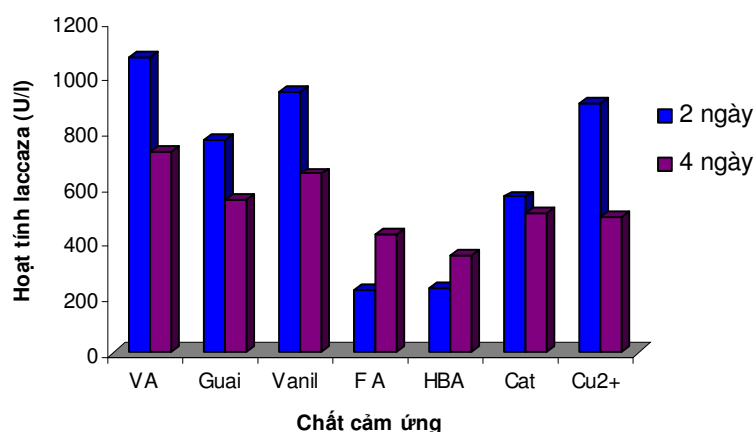
Như vậy, pH của dung dịch đệm đã ảnh hưởng rất lớn đến hoạt tính laccaza của chủng XKBH1. Hoạt tính laccaza đo được cao nhất là 418,2 U/l ở pH 2 và 126 U/l ở pH 3, hoạt tính ở pH 5 chỉ còn 1,7 U/l và không phát hiện thấy hoạt tính enzym ở pH 6. Mặc dù ở pH 2 hoạt tính laccaza gấp 3,3 lần pH 3 song theo một số công bố trên thế giới thì ở pH này ABTS đã bị oxy hóa một phần và sẽ ảnh hưởng đến giá trị hoạt độ enzym. Mặt khác, đã có rất nhiều nghiên cứu đã xác định hoạt tính Laccaza sử dụng ABTS làm cơ chất và dung dịch đệm có pH 3. Vì vậy, để thuận tiện hơn trong việc so sánh và đánh giá kết quả thu được trong nghiên cứu của chúng tôi pH 3 đã được chọn để xác định hoạt tính laccaza trong các nghiên cứu tiếp theo nhằm dễ dàng so sánh với các công bố quốc tế khác.

Theo nhiều nghiên cứu đã công bố, nếu sử dụng syringaldazin làm cơ chất để xác định hoạt tính laccaza thì pH của dung dịch đệm từ 5-7 là thích hợp nhất. Đối với cơ chất là ABTS thì

dung dịch đệm có pH thích hợp là 3 – 5. Hoạt tính laccaza của chủng XKBH1 đo tại pH 3 tăng khoảng 74 lần so với ở pH 5. Như vậy, những kết quả nghiên cứu trước đó cho thấy laccaza từ chủng XKBH1 có hoạt tính khá thấp là do chúng tôi xác định hoạt tính laccaza theo Han và đồng tác giả [7]. ABTS đã được sử dụng làm cơ chất và dung dịch đệm axetat ở pH 5. Đây không phải là pH thích hợp để xác định hoạt tính laccaza từ chủng xạ khuẩn XKBH1. Bởi chủng này được phân lập từ đất bị ô nhiễm chất độc hóa học tại sân bay Biên Hòa. Đất ở đây có pH axit đến axit yếu, như vậy rất có thể laccaza của chủng sinh ra hoạt động tốt ở pH này thì sẽ phân hủy các chất độc hóa học có trong đất tốt nhất. Tuy nhiên cần có thêm nghiên cứu để tách chiết tinh sạch và nghiên cứu một số đặc điểm quan trọng gồm trọng lượng phân tử, điểm đẳng điện, độ bền pH và bền nhiệt của laccaza từ chủng XKBH1 để minh chứng cho những giả thuyết trên.

3.6. Nghiên cứu khả năng sinh enzym laccaza của chủng XKBH1 trên môi trường có các chất cảm ứng khác nhau

Ngoài thành phần môi trường, các chất cảm ứng đóng vai trò rất quan trọng đến khả năng sinh enzym laccaza của vi sinh vật. Do đó, 7 chất cảm ứng đã được sử dụng trong nghiên cứu này là Veratryl Alcohol (VA), Guaiacol (Guai), 4-Hydroxyl axit Benzoic (HBA), Catechol (Cat), Vanillin (Vanil), axit Ferulic (F A), CuSO_4 (Cu^{2+}) với nồng độ thử nghiệm ban đầu là 0,5mM. Khả năng sinh enzym laccaza của chủng XKBH1 trên các nguồn chất cảm ứng khác nhau được theo dõi trong 2 và 4 ngày nuôi cấy (hình 1).



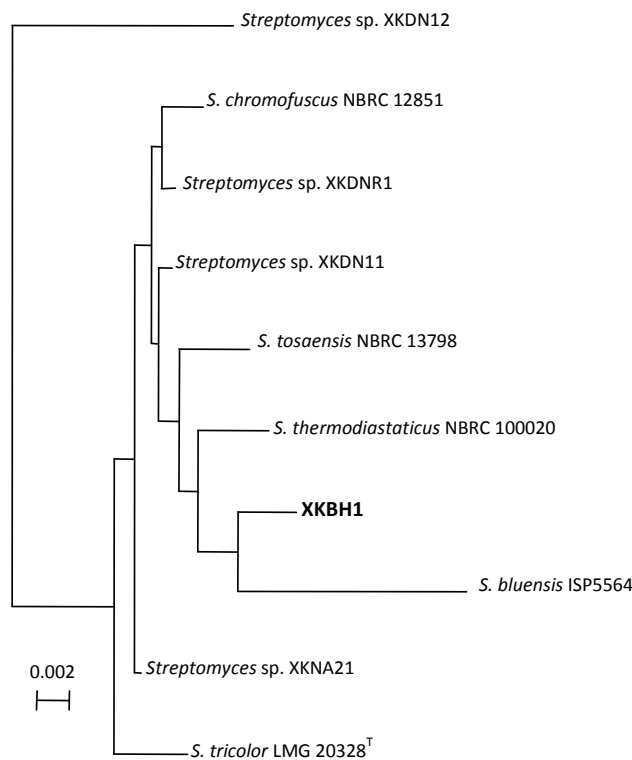
Hình 1. Hoạt tính enzym của chủng XKBH1 trên các chất cảm ứng khác nhau

Cả 7 chất cảm ứng khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy đều làm tăng mạnh hoạt tính laccaza của chủng XKBH1. Hoạt tính laccaza của chủng XKBH1 cao nhất khi nuôi trên môi trường có bổ sung VA (1073 U/l) và Vanillin (945,2 U/l) sau 2 ngày nuôi cấy. Đối với các chất cảm ứng là Cu^{2+} , Guaiacol, Catechol thì hoạt tính laccaza của chủng XKBH1 cũng ở mức tương đối cao và hoạt tính cao nhất sau 2 ngày như Cu^{2+} (905 U/l), Guaiacol (770,3 U/l), Catechol (565 U/l). Hai chất cảm ứng là axit Ferulic và HBA cho hoạt tính thấp hơn chỉ từ 225 – 234,6 U/l sau 2 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, đến ngày thứ 4 hoạt tính laccaza trên môi trường chứa hai chất cảm ứng này lại tăng lên với axit Ferulic là 430,3 U/l và HBA là 350,5 U/l. Như vậy, các chất cảm ứng khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến quá trình sinh tổng hợp laccaza cũng như thời gian sinh laccaza có hoạt tính cao nhất của chủng XKBH1.

VA là tiền chất tạo nên lignin từ thực vật, nó có cấu trúc tương tự lignin. Do đó VA đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong quá trình cảm ứng sinh laccaza từ vi sinh vật để phân hủy lignin. Đối với chủng XKBH1 thì khả năng sinh laccaza tốt nhất khi sử dụng VA làm chất cảm ứng. Tuy nhiên cần có thêm nghiên cứu về nồng độ VA thích hợp cho khả năng sinh tổng hợp laccaza của chủng xạ khuẩn này.

Một số nghiên cứu trước đây cho thấy, bổ sung CuSO_4 có thể làm tăng tốc quá trình sinh tổng hợp laccaza cũng như tăng hoạt tính của enzym này. Sadhasivam và Cộng sự công bố khi bổ sung CuSO_4 vào môi trường nuôi *T. harzianum* WL1 với nồng độ 1 mM đã thu được hoạt tính laccaza là 4360 U/l [11]. Như vậy, nồng độ CuSO_4 bổ sung trong nghiên cứu tuy làm tăng hoạt tính laccaza của chủng XKBH1 lên 905 U/l nhưng có thể đây vẫn chưa phải là nồng độ tối ưu để chủng XKBH1 sinh tổng hợp enzym laccaza. Do vậy, cần có thêm nghiên cứu về ảnh hưởng của nồng độ Cu^{2+} đến khả năng sinh enzym laccaza của chủng XKBH1. Các nghiên cứu về ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng (VA, Cu^{2+}), ảnh hưởng nồng độ ion kim loại, nhiệt độ nuôi cấy, điều kiện lên men v.v. làm tăng hiệu quả sinh tổng hợp laccaza của chủng XKBH1 sẽ được tiếp tục nghiên cứu tiếp.

3.7. Phân loại chủng XKBH1 dựa trên trình tự đoạn gen 16S rARN



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại của chủng xạ khuẩn XKBH1

Đoạn gen 16S rARN của chủng XKBH1 (1489 bp) đã được xác định và so sánh với các trình tự gen 16S rARN của các chủng xạ khuẩn đã công bố trên các GenBank, EMBL, DDBJ,

BPD. Kết quả so sánh các trình tự gen 16S rARN cho thấy chủng XKBH1 có mức tương đồng cao với các chủng xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* (hình 2). Chủng xạ khuẩn XKBH1 có sự tương đồng trên 98 % với nhiều chủng khác nhau của chi xạ khuẩn *Streptomyces*. Dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc, bào tử và so sánh trình tự gen 16S rARN của chủng XKBH1 có thể được xếp vào chi *Streptomyces* và có tên là *Streptomyces* sp. XKBH1. Trình tự đoạn gen 16S rARN của chủng xạ khuẩn XKBH1 được đăng ký trên GenBank với mã số là GQ 204110.

Chi *Streptomyces* là chi chiếm số lượng lớn trong đất và có vai trò rất quan trọng đối với hệ sinh thái đất. Một số chủng thuộc chi *Streptomyces* có khả năng sinh enzym Lac tương đối tốt. Chủng *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 có khả năng sinh enzym Lac với hoạt độ 1.200 U/l sau 8 ngày nuôi cấy [1]. Hai chủng *S. viridosporus* T7A và *S. badius* 252 ngoài khả năng sinh enzym ngoại bào còn có khả năng phân hủy lignin tương đối tốt.

Các chủng xạ khuẩn đại diện có quan hệ gần gũi với chủng XKBH1 như *S. thermodiastaticus* NBRC 100020; *S. tosaensis* NBRC 13798; *S. chromofuscus* NBRC 12851; *S. tricolor* LMG 20328^T tuy chưa được phát hiện khả năng sinh Lac và phân hủy các PAH nhưng các chủng này đều có khả năng loại bỏ các hợp chất vòng thơm.

Chủng *Streptomyces* sp. XKBH1 ngoài khả năng sinh Lac (1073 U/l), LiP và MnP (15,7 U/l) còn phân hủy tốt PAH ba vòng thơm anthracene và PAH bốn vòng thơm như pyrene. Đây là các đặc tính để lựa chọn các chủng vi sinh vật nhằm xây dựng tập đoàn vi sinh vật phục vụ mục đích xử lý các chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy hoặc một số chất ô nhiễm môi trường khác trong các điều kiện có thể kiểm soát được. Kết quả trong nghiên cứu này góp phần khẳng định sự đa dạng của vi sinh vật nói chung và nhóm *Streptomyces* nói riêng trong đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin cũng như sự đa dạng của các vi sinh vật sinh enzym ngoại bào.

4. KẾT LUẬN

Chủng xạ khuẩn XKBH1 có khả năng sinh tổng hợp laccaza và LiP tốt nhất trong số 4 chủng xạ khuẩn phân lập từ đất nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin tại sân bay Biên Hòa. Chủng XKBH1 sinh trưởng và sinh laccaza trên cả hai môi trường KG và SH1 chứa các chất ô nhiễm khác nhau gồm có dịch chiết đất chứa dioxin; 2,4,5-T, anthracene và pyrene. Hoạt tính laccaza của chủng trên môi trường KG tốt hơn trên môi trường SH1 là 2,7 U/l với chất cảm ứng là pyrene. Trên môi trường SH1 có dioxin hoặc 2,4,5-T, chủng XKBH1 có khả năng sinh tổng hợp cả 3 enzym ngoại bào là LiP, MnP và laccaza. Đặc biệt hoạt tính MnP của chủng cao nhất (15,7 U/l) trên môi trường SH1 chứa 2,4,5-T. Sau 7 ngày nuôi cấy, chủng XKBH1 đã phân hủy 72 % pyrene và 48,3 % anthracene trên môi trường KG; 55,8 % anthracene và 63,3 % pyrene trên môi trường SH1 với nồng độ ban đầu là 100 ppm. Hoạt tính laccaza của chủng XKBH1 xác định tại pH 3 là 126 U/l, gấp 74 lần pH 5 (1,7 U/l). Cả 7 chất cảm ứng đều làm tăng hoạt tính laccaza của chủng XKBH1 trong đó 0,5 mM Veratryl Alcohol là chất cảm ứng cho hoạt tính cao nhất là 1073 U/l sau 2 ngày nuôi cấy. Dựa trên trình tự gen 16S rARN, chủng xạ khuẩn này được xếp vào chi *Streptomyces* và đặt tên là *Streptomyces* sp. XKBH1 (trình tự trên GenBank: GQ204110).

Lời cảm ơn. Công trình này thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài Độc lập cấp nhà nước “Nghiên cứu công nghệ sản xuất enzyme ngoại bào laccazase, manganese peroxidase, lignin peroxidase từ vi sinh vật phục vụ xử lý các chất ô nhiễm đa vòng thơm”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Levin L., Viale A., Forchiassin A. - Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*, Int. Biodeter. Biodegra **52** (2003) 1-5.
2. Arias M. E., Maria A., Juana R., Juan S., Andrew S. B., Manuel H. – Kraft Pulp Bleaching and Mediated Oxidation of a Nonphenolic Substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, Appl. Environ. Microbiol **169** (4) (2003) 1953-1958.
3. Đặng Thị Cẩm Hà, Nguyễn Bá Hữu, Mai Anh Tuấn, Nguyễn Đương Nhã, Nguyễn Quốc Việt, Nguyễn Nguyên Quang - Khảo sát vi sinh vật trong vùng nhiễm chất diệt cỏ chứa dioxin ở khu vực sân bay Đà Nẵng và khử độc đất nhiễm ở điều kiện phòng thí nghiệm, Tạp chí công nghệ sinh học **6** (4A) (2008) 837- 846.
4. Đặng Thị Cẩm Hà, Trần Thị Như Hòa, Nguyễn Bá Hữu, Nguyễn Nguyên Quang, Đàm Thúy Hằng, Nguyễn Quang Huy - Phân hủy hydrocarbon thơm đa nhân và sinh tổng hợp peroxidase, laccase của chủng vi khuẩn BDNR10 và chủng nấm sợi FDNR40, Tạp chí Độc học **14** (8) (2010) 8-13.
5. Nguyễn Đương Nhã, Nghiêm Ngọc Minh, Nguyễn Ngọc Bảo, Đặng Thị Cẩm Hà - Khả năng phân hủy hydrocarbon thơm đa nhân và dibenzofuran của chủng xạ khuẩn XKDN12, Tạp chí Công nghệ Sinh học **3** (1) (2005) 123-132.
6. Nguyễn Ngọc Bảo, Đàm Thúy Hằng, Vũ Đức Lợi, Đặng Thị Thu, Đặng Thị Cẩm Hà - Phân hủy sinh học hydrocarbon thơm đa vòng của một số chủng vi khuẩn phân lập từ nước thải nhiễm dầu, Tạp chí khoa học và công nghệ **46** (6) (2008) 67-75.
7. Han M. J., Choi H. T. and Song H. G. - Purification and characterization of laccase from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*. Microbio **43** (6) (2005) 555-560.
8. Crawford D. L, Ramachandra M. - Bacterial extracellular lignin peroxidase. United States Patent: 5200338 (1993).
9. Derry K. M., Iqbal M., Miller P. G. G., Mccarthy J. A. - Screening *Actinomycetes* for extracellular peroxidase activity, Appl. Environ. Microbiol **62** (6) (1996) 2186 - 2190.
10. La Thị Thanh Phương, Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà - Phân hủy sinh học hydrocarbon thơm đa nhân (PAHs) bởi chủng vi khuẩn MXL-9 phân lập từ cặn dầu thô của mỏ Bạch Hổ Vũng Tàu, Tạp chí Công nghệ sinh học **1**(1) (2003) 109 - 117.
11. Sadhasivam S., Savitha S., Swaminathan K., Lin F. H. - Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1, Process. Biochem **43** (2008) 736-742.

ABSTRACT

PEROXIDASE, LACCASE EXTRACELLULAR ENZYME PRODUCTION AND DEGRADATION OF AROMATIC COMPOUNDS BY ACTINOMYCETE XKBH1 STRAIN

Nguyen Quang Huy, Nguyen Ba Huu, Nguyen Thi Thanh Ngan, Dang Thi Cam Ha*

Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi

*Email: dangcha80@gmail.com or dangcha80@yahoo.com

Four actinomycete strains include XKBH1, XKBH2, XKBH3, XKBH5 were isolated from herbicide contaminated soil at Bien Hoa Airport. They showed ability to produce laccase with initial activity was low. The XKBH1 strain was identified as *Streptomyces* sp. based on 16S rRNA coding gene sequence analysis. The sequence of 16S rRNA gene (approximately 1489 bp) was deposited in the GeneBank with assession number GQ 204110. Strain XKBH1 could grow in KG and SH1 media containing dioxin, 2,4,5-T, pyrene and anthracene. After 7 days of inoculation, this strain degraded 72 % pyrene, 48.3 % anthracene in KG medium and 63.3 % pyrene, 55.8 % anthracene in SH1 medium with 100 ppm initial concentration of each PAHs. This strain also showed ability in production of laccase in broth KG and SH1 media containing dioxin, 2,4,5-T, pyrene, anthracene. Laccase production by XKBH1 strain on KG medium was higher than in SH1 medium with activity was 2.7 U/l containing pyrene. This strain also produced laccase, LiP and MnP in SH1 medium with dioxin and 2,4,5-T as inducers. The highest MnP activity was 15.7 U/l in SH1 medium containing 2,4,5-T. Laccase activity measured at pH 3 increased approximative 74 fold in comparision to pH 5. Almost inducers enhancing laccase activity of XKBH1 strain and showed highest laccase activity (1073 U/l) in KG medium containing Veratryl Alcohol with initial concentration of 0.5 mM.

Keywords: *Streptomyces*, laccase, peroxidase, 16S rRNA, inducers