



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0024053

(51)⁷ C12N 1/00

(13) B

(21) 1-2018-01154

(22) 21/03/2018

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/05/2018 362A

(73) VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC, VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG
NGHỆ VIỆT NAM (VN)

Nhà A10, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Đặng Thị Cẩm Hà (VN); Phùng Khắc Huy Chú (VN); Lê Việt Hưng (VN).

(54) CHỦNG XẠ KHUẨN STREPTOMYCES SP. XKBIR929 THUẦN KHIẾT VỀ
MẶT SINH HỌC VÀ CHẤT XÚC TÁC SINH HỌC THU ĐƯỢC TỪ CHỦNG
NÀY

(57) Sáng chế đề cập tới chủng xạ khuẩn Streptomyces sp. XKBiR929 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh tổng hợp hợp chất giống laccaza (CGLaccaza), nhưng không có bản chất protein trên môi trường GauseM chứa dịch chiết đất gồm các chất ô nhiễm chính là 2,3,7,8-TCDD, 2,4,5-T, 2,4-D, DBF, PAH; trong đó chủng xạ khuẩn này có trình tự 16S rARN được đăng ký trên GenBank với mã số MG243364. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập tới chất xúc tác sinh học thu được từ chủng xạ khuẩn này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực sinh học. Cụ thể, sáng chế đề cập tới chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBiR929 thuần khiết về mặt sinh học phân lập được, có khả năng sinh tổng hợp chất giống laccaza (laccase – like). Sáng chế còn đề cập tới chất xúc tác sinh học thu được từ chủng xạ khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Laccaza (benzenediol-oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) được nhận thấy ở thực vật, côn trùng, vi khuẩn và nấm và trong tự nhiên, enzym này phản ứng với các hợp chất phenol (Ramos et al., 2011). Sự phân bố rộng rãi của laccaza ở nấm và sự đa dạng của chúng, đặc biệt là ở nấm đảm đã góp phần vào những nghiên cứu sâu về những nguồn enzym mới được cải tiến (Haibo et al. 2009). Mặc dù trung tâm xúc tác chứa đồng là tương tự nhau ở tất cả các laccaza của nấm, nhưng những điểm khác nhau đáng kể đã được mô tả dựa trên các đặc tính động học và nhiệt học của chúng (de Oliveira et al. 2009).

Laccaza thuộc về nhóm enzym polyphenol oxidaza có chứa đồng trong trung tâm xúc tác và thường được gọi là enzym oxidaza đa đồng. Chúng sử dụng oxy phân tử để oxy hóa rất nhiều các hợp chất thơm và không thơm thông qua cơ chế xúc tác gốc tự do và tạo thành phân tử nước là sản phẩm phụ duy nhất. Do đó, chúng được coi là các chất xúc tác sinh học xanh và được quan tâm ngày càng nhiều. Thêm vào đó, laccaza từ nấm hầu hết là enzym ngoại bào nên dễ dàng được tinh chế. Hơn thế nữa, laccaza sử dụng đồng làm đồng tác nhân (cofactor), mà chất này có thể thu được một cách dễ dàng từ các nguồn cung cấp là những muối đồng rẻ tiền. Tất cả những ưu thế này đã làm cho chất xúc tác laccaza có tiềm năng đối với các quá trình công nghiệp. Ứng dụng của laccaza có thể được chia thành 6 nhóm chính bao gồm bảo vệ môi trường, tổng hợp hữu cơ, cảm biến sinh học và thông tin sinh học (bioreporter), y tế, thực phẩm và các ngành kỹ thuật (Xu, 2005). Tuy nhiên, giá thành thương mại của laccaza tinh sạch cao đã hạn chế việc khai thác nhằm ứng dụng trong công nghiệp của chúng.

Laccaza được phân lập từ nấm đảm (*Basidiomycetes*), nấm sợi (*Ascomycetes*) và nấm bất toàn (*Deuteromycetes*) (Aisemberg et al., 1989). Đặc biệt, nấm đảm được coi là những sinh vật sản sinh ra laccaza có hiệu quả (Ravankar and Lele 2006, Sadhasivam et al., 2008) và cho đến nay cũng là sinh vật duy nhất có khả năng phân hủy các thành phần của gỗ như lignin, xenluloza, hemixenluloza. Hầu hết các loài nấm mục trắng được ghi nhận sản sinh laccaza ở các mức độ khác nhau (Hatakka 2001). Trong số này, *Trametes versicolor* (trước đây gọi là *Coriolus versicolor* hoặc *Polyporus versicolor*) được nghiên cứu nhiều nhất về khả năng sản xuất laccaza ở mức công nghiệp. Ngoài ra, các loài khác trong chi này như *T. pubescens*, *R. hirsuta*, *T. gallica* (Galhaup et al 2002; Rodríguez-Couto et al., 2003; Dong et al. 2005) cũng sinh tổng hợp laccaza với hoạt tính khác nhau.

Laccaza của nấm thường là những đa isoenzym được biểu hiện trong các vật chủ khác nhau dưới các điều kiện sinh trưởng khác nhau. Đã có rất nhiều các nghiên cứu được thực hiện để cải thiện việc sản xuất laccaza, như tối ưu hóa điều kiện môi trường, phân lập và nhân giống những chủng có hoạt tính laccaza cao, sử dụng các chất cảm ứng và biểu hiện các gen laccaza đã được tái tổ hợp (Wang et al. 2013). Hơn nữa, hầu hết laccaza là những enzym cảm ứng ngoại bào, tốc độ tổng hợp và hoạt tính của chúng phụ thuộc rất lớn vào sự có mặt của các chất cảm ứng thích hợp làm tăng hiệu suất sinh enzym (Kocyigit et al. 2012). Laccaza được quan tâm đặc biệt về những ứng dụng công nghiệp tiềm năng của chúng do khả năng oxy hóa của chúng đối với hàng loạt các chất ô nhiễm và các chất độc bao gồm các hydrocarbon thơm mạch vòng có nguồn gốc từ dầu mỏ, thuốc nhuộm, thuốc bảo vệ thực vật, các chất ô nhiễm nồng độ thấp v.v.. Sinh tổng hợp laccaza được điều hòa cao bởi thành phần môi trường. Vì vậy, tối ưu hóa thành phần môi trường đã trở thành một trong những phương pháp chính để tăng cường khả năng sản xuất laccaza. Nguồn cacbon và ion đồng là hai yếu tố quan trọng nhất trong quá trình cải thiện hoặc kích thích quá trình sinh tổng hợp laccaza (Wang et al. 2014; Passarini et al., 2015). Laccaza có thể oxy hóa hàng loạt các hợp chất hữu cơ và vô cơ bao gồm mono, di, polyphenol, aminophenol, methoxyphenol cũng như nhiều hỗn hợp của kim loại cho nên laccaza trở thành ứng cử viên nặng ký trong ứng dụng công nghệ sinh học. Nấm sinh trưởng ở các môi trường rất bất lợi nên chúng cũng sinh ra các enzym rất lạ có khả năng hoạt động trong các phản ứng hóa học rất khó xảy ra ở điều kiện bình thường. Ngoài những ứng dụng trên thì laccaza còn làm chất thêm cho sản xuất thực phẩm, đồ uống, chuẩn đoán bệnh trong y tế, và đóng vai trò là chất gắn trong kết cấu của sản xuất nhiên liệu. Gen laccaza và gen enzym oxy hóa giống laccaza (laccase-like) đa nhân

chứa đồng đã được đề xuất (laccase multicopper oxidase - LMCO) cùng với protein tương ứng đã được chứng minh tham gia sinh tổng hợp rất nhiều các chất phục vụ y tế, làm sạch môi trường ô nhiễm các chất vòng thơm và các chất không phải là hữu cơ, chính bản thân laccaza có thể tạo nên thuốc chữa ung thư, tạo các cảm biến để phát hiện ma túy, các chất hữu cơ ô nhiễm, khử độc nhanh các chất hữu cơ nồng độ thấp (là các chất phá hỏng hệ nội tiết, dẫn đến giảm sức đề kháng), v.v.. Do laccaza có phổ cơ chất rất đa dạng và hoạt động như một chất xúc tác cần có O_2 và phản ứng cuối cùng tạo ra nước nên tiềm năng ứng dụng rất cao trong rất nhiều lĩnh vực của đời sống kinh tế. Laccaza được chú trọng nghiên cứu bởi nó được sử dụng hiệu quả trong việc phát triển các cảm biến sinh học và tế bào nhiên liệu. Hơn thế nữa, nhóm enzym laccaza còn là các chất xúc tác hiệu quả trong chuyển hóa các chất xenobiotic (chất khó phân hủy sinh học) trong tái tạo môi trường ô nhiễm bởi các chất nguy hiểm nêu trên.

Như đã trình bày ở phần trên, laccaza là các enzym oxy hóa 3 thành phần có chứa đồng, enzym này có thể lấy một điện tử của 4 phân tử cơ chất và khử oxy nguyên tử thành nước. Ngày nay, có nhiều enzym đã được xác định có cấu tạo và cơ chế hoạt động sử dụng oxy giống laccaza, nhưng nó không thể hiện có cơ chất đặc hiệu hướng tới quá trình benzendiol (quá trình gắn gốc OH vào vòng benzen). Những enzym này thường có hoạt tính không ổn định và không dễ để phân loại, vì việc phân loại laccaza thường dựa trên loại phản ứng hóa học và tính chất vật lý của cơ chất, nên thuật ngữ oxy hóa giống laccaza (laccase-like) đa nhân chứa đồng đã được đề xuất (laccase multicopper oxidase - LMCO).

Cấu trúc phân tử của LMCO đã được nghiên cứu bởi Messerschmidt và cộng sự trong rất nhiều công bố từ năm 1989 đến 1993. Tới tháng 7 năm 2014, đã có khoảng 30 cấu trúc tinh thể LMCO khác nhau đã được đăng ký trong ngân hàng protein, trong đó có cấu trúc laccaza của loài *B. subtilis* CotA. Tuy nhiên, cấu trúc phân tử LMCO này vẫn có bản chất là protein. LMCO thường ổn định nhiệt độ với nhiệt độ phản ứng tối ưu trên $45^{\circ}C$, có thể kể đến LMCO được sinh tổng hợp từ nấm *Pycnoporus cinnabarinus* khi ủ 2 giờ ở nhiệt độ $80^{\circ}C$ thì hoạt tính giảm đi một nửa và khi ủ ở $37^{\circ}C$ sau 245 ngày vẫn còn hoạt tính.

Gần đây, việc nghiên cứu ứng dụng các hoạt chất sinh học được sinh tổng hợp bởi chủng nấm trên toàn thế giới để ứng dụng trong công nghiệp chế biến thức ăn và dược phẩm ngày càng được tăng lên, các sản phẩm này đã trở thành lĩnh vực quan trọng của công nghệ sinh học hiện nay. Các hoạt chất này là các protein, polysacarit

hoặc hỗn hợp polysacarit và protein có nguồn gốc nội và ngoại bào, có khối lượng phân tử thấp (Low Molecular Weight- LMS). Khi phân tích thành phần hóa học của các chất này, thì thấy có sự xuất hiện của các loại đường và các hợp chất phenolic. Trong quá trình nuôi cấy loài nấm đảm *Cerena unicolor* trên môi trường lỏng, phát hiện thấy hoạt chất có khối lượng phân tử thấp khoảng 10kDa, chất này có hoạt tính oxy hóa mạnh, bằng hoặc cao hơn khi so sánh với trolox và axit ascorbic.

Một số nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả quá trình phân hủy sinh học lignin không cao nếu chỉ có vai trò enzym thuộc họ lignin, mà ở đó có sự tham gia của một số hoạt chất có kích thước nhỏ có khả năng thể khuếch và đóng vai trò khởi động quá trình phân hủy lignin. Glycopeptit có khối lượng 1 đến 5 kDa được sinh tổng hợp từ loài *Phanerochaete chrysosporium*, gọi là tác nhân Pc, chất này có thể xúc tác phản ứng khử để tạo thành gốc OH^* và khử Fe^{3+} thành Fe^{2+} . Hiện nay, những nghiên cứu về mối quan hệ giữa tác nhân Pc với các enzym ligninolytic và vai trò trong quá trình phân hủy lignin đang được tiếp tục nghiên cứu. Quá trình tinh sạch tác nhân Pc được thực hiện như sau: dịch enzym ngoại bào thô của chủng *P. Chrysosporium* ME-446 ATCC 34541 được siêu lọc qua màng 5 kDa, các thành phần sau quá trình lọc được tinh sạch qua cột Sephadex G-10, sau đó được tinh sạch tiếp theo qua thiết bị HPLC TSK với cột GEL G2500PW. Tiếp theo, tác nhân Pc tinh sạch đã được xác định cấu trúc với hàng loạt peptides bằng phương pháp trên thiết bị MALDI-TOF cũng như phân tích axit amin. Qua đó khối lượng phân tử của tác nhân Pc được xác định trong khoảng 0,5 đến 1,0 kDa.

Tác nhân Pc của loài *P. Chrysosporium* có thể oxy hóa chất 2,6-DMP mà không có sự tham gia của Mn^{2+} và H_2O_2 trong khi MnP được sinh tổng hợp bởi chủng này thì không thể oxy hóa được 2,6-DMP nếu không có Mn^{2+} và H_2O_2 . Phần hoạt tính này của *P. Chrysosporium* có khối lượng phân tử dưới 5 kDa, chứng tỏ vai trò trong phản ứng oxy hóa của các chất trao đổi chất từ loài *P. Chrysosporium* không chỉ là MnP hoặc laccaza.

Tác nhân Pc có thể oxy hóa 2,6-DMP ở nhiệt độ trong khoảng từ 30 đến 80°C và nó rất bền nhiệt, nó có thể không mất hoạt tính nếu đun ở 100°C trong 30 phút, tính chất này rất khác so với enzym. Tác nhân Pc có hoạt tính oxy hóa trong môi trường pH khoảng từ 3-9 và hoạt tính vẫn duy trì ổn định trong khoảng pH kiềm yếu. Khi nghiên cứu ảnh hưởng của các ion kim loại, theo đó hoạt tính oxy hóa của tác nhân Pc được tăng lên khi có mặt các ion Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} và Fe^{2+} và nồng độ của các cation này ảnh hưởng lên hoạt tính của tác nhân Pc khác nhau. Ở nồng độ rất thấp ion Cu^{2+}

và Fe^{2+} đã làm tăng hoạt tính của tác nhân Pc, nhưng khi nồng độ tăng lên thì gây ức chế hoạt tính của nó.

Theo một nghiên cứu khác, một loại peptide đặc biệt có khối lượng phân tử thấp được đặt tên là tác nhân Gt được phân lập và tinh sạch từ dịch chiết sau khi nuôi cấy loài nấm nâu *Gloeophyllum trabeum* bằng sắc ký khí lỏng cao áp (HPLC). Tác nhân này có ái lực cao và khả năng tạo phức với Fe^{3+} và khử Fe^{2+} . Khi có oxy phân tử nó có thể tạo thành OH^* . Tác nhân Gt có thể bẻ gãy liên kết hydro bên trong và bên ngoài chuỗi cellulosa bằng cơ chế liên kết của gốc OH^* , kết quả tạo thành các sản phẩm khử, không khử và làm cho xenluloza dễ bị phân hủy hơn ở các giai đoạn tiếp theo. Quá trình này tương đối khác với quá trình thủy phân bởi các enzym cellulaza, tác nhân Gt này đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy cellulosa bởi nấm nâu.

Như vậy, các tác nhân Gt, Pc được đặt tên xuất phát từ tên của loài nấm sinh tổng hợp ra nó. Ngoài ra, còn có tác nhân SFGF được sinh tổng hợp trong quá trình hình thành sợi nấm, tác nhân này có một số tính chất giống tác nhân Pc và Gt như khả năng oxy hóa tăng lên khi có mặt của các ion Fe^{2+} , Cu^{2+} và bị ức chế bởi EDTA và N_2 , tuy nhiên nó cũng có sự khác biệt khi nào cần H_2O_2 để tạo ra gốc OH^* trong quá trình oxy hóa trong khi tác nhân Pc không tạo ra gốc OH^* . Khả năng oxy hóa của tác nhân Pc vẫn được duy trì ở các pH kiềm yếu trong khi tác nhân SFGF và Gt lại không có khả năng oxy hóa này. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng có khoảng 57 loài nấm phân hủy lignin thuộc 34 chủng nấm trắng, nâu và nấm mềm có thể sinh tổng hợp các peptit có khối lượng phân tử thấp (<5kDa) có hoạt tính oxy hóa. Tuy nhiên, các công bố về cơ chế hoạt động của những peptides này còn ở mức rất hạn chế do rất khó để tinh sạch và hoạt tính oxy hóa không ổn định. Nhiều nghiên cứu đã không triển khai tiếp được bởi khả năng không ổn định của các chất có khối lượng phân tử thấp từ nấm phân hủy lignin. Các chất có hoạt tính sinh học với khối lượng phân tử thấp như mô tả ở trên được gọi là các tác nhân Pc, Gt, SFGF hiện nay chưa có thêm thông tin liên đến đặc tính cũng như cấu trúc phân tử và thành phần cấu tạo.

Chi *Streptomyces* là chi chiếm số lượng lớn trong đất và có vai trò quan trọng đối với hệ sinh thái đất. Một vài đại diện thuộc chi *Streptomyces* (theo khóa phân loại hiện đại xác định trình tự gen mã hóa 16S rRNA thì chi này vẫn được xếp là vi khuẩn, nhưng theo hình thái thì chúng vẫn được gọi là xạ khuẩn) có khả năng sinh hợp chất giống laccaza, nhưng vẫn có bản chất là protein thuộc LMCO.

Một số nghiên cứu ở Việt Nam cũng đã chỉ ra sự tồn tại của hoạt chất sinh học có tính chất xúc tác giống laccaza, chúng không có bản chất protein được thể hiện ở khả năng bền nhiệt cao, oxy hóa ABTS chuyển thành màu xanh, oxy hóa guanicol sang màu đỏ giống laccaza thật (từ nấm đảm, nấm sợi, vi khuẩn, v.v.), hợp chất đề cập ở sáng chế này được sinh tổng hợp từ các chủng xạ khuẩn, nấm sợi được phân lập từ đất ô nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Đà Nẵng và sau này là sân bay Biên Hòa. Từ những nghiên cứu trước cho thấy chủng *Streptomyces* sp. XKDN12 đã được phân lập từ mẫu đất ô nhiễm chất diệt cỏ/dioxin ở Đà Nẵng, chủng có khả năng sinh chất giống laccaza và có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường chứa hydrocarbon đa vòng thơm, sau 7 ngày nuôi cấy phân hủy được 32,72% phenanthran, 39,01% anthracen. Một số chủng *Streptomyces* khác như *Streptomyces* sp. XKBH1, *Streptomyces* sp. XKBH13, *Streptomyces* sp. XKDN12 đều được phân lập tại các khu vực bị ô nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Biên Hòa và Đà Nẵng đã thể hiện khả năng sinh tổng hợp chất giống laccaza. Theo nghiên cứu nghiên cứu trước đây thì chủng xạ khuẩn XKDNR1 được phân lập từ khu xử lý sinh học (bioreactor) xử lý chất diệt cỏ/dioxin trong đất tại "điểm nóng" Đà Nẵng nuôi trên môi trường có dịch chiết đất ô nhiễm nặng chất diệt cỏ/dioxin (DCĐ), hoạt tính CGlaccaza cao nhất là 21,53 U/l sau 4 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu chi tiết về bản chất hóa học như tách chiết, tinh sạch và các đặc điểm sinh học khác của nhóm chất mới rất lý thú này.

Trong tự nhiên ngoài quá trình sinh trưởng, phát triển của mình, vi sinh vật ngoài khả năng sinh tổng hợp các enzym có bản chất protein thì chúng còn có khả năng khác nữa là sinh tổng hợp một số tác nhân sinh học (chất xúc tác sinh học) có khối lượng phân tử thấp, tên gọi các chất này phụ thuộc vào nguồn gốc nó được sinh ra. Các tác nhân này có khả năng oxy hóa giống laccaza nhưng đặc điểm hóa-sinh khác xa với laccaza thật. Các hợp chất này không có cấu tạo protein mà chỉ là các đoạn peptide hay hợp chất có hoạt tính oxy hóa cao. Một số nghiên cứu ở Việt Nam đã chỉ ra sự tồn tại của chất có hoạt tính sinh học như trên được sinh tổng hợp bởi các chủng xạ khuẩn, nấm sợi được phân lập từ đất ô nhiễm nặng chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Biên Hòa, Đà Nẵng. Tuy nhiên, nghiên cứu chi tiết để tìm hiểu đặc tính hóa-sinh cũng như khả năng ứng dụng của chúng trong loại màu thuốc nhuộm, phân hủy các hợp chất hữu cơ mạch vòng và đặc biệt là dioxin còn rất hạn chế. Vì vậy, để phân biệt với những tên gọi và thuật ngữ của các nghiên cứu trước đây và thuận tiện trong việc gọi tên trong sáng chế này, hoạt chất mới được phát hiện sẽ được gọi là

”C*Glacc*aza”. Cũng có thể sau này khi có đủ minh chứng thì sẽ được đặt tên mới. Ví dụ là SDL (từ *Streptomyces*, phân lập từ đất nhiễm dioxin và sinh chất giống laccaza).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Chủng XKBiR929 theo sáng chế được phân lập từ mẫu đất ô nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại khu vực mới được phát hiện và đất đã được khử độc của sân bay Biên Hòa, thuộc chi *Streptomyces*, có khả năng phân bố rộng và chúng có thể có khả năng tham gia vào quá trình phân hủy và chuyển hóa các chất diệt cỏ/dioxin cũng như các hợp chất đa vòng thơm khác. Ngoài ra, những chủng này còn có khả năng sinh C*Glacc*aza trong đất ô nhiễm là đặc tính mang nhiều ý nghĩa nhằm sử dụng trong phân hủy sinh học. Đây là những phát hiện mới và có thể từ đây tạo ra sản phẩm gồm nhiều chủng sinh các chất tương tự laccaza này để xử lý các loại hình ô nhiễm thuộc hợp chất các chất hữu cơ khó phân hủy (POPs) trong các môi trường có độ pH rất khác nhau. Các kết quả thu được cho thấy các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp C*Glacc*aza (laccase-like) có bản chất không phải là protein, vì sau khi đun sôi dịch nuôi cấy bởi các chủng xạ khuẩn vài giờ vẫn có thể loại bỏ hydrocacbon đa vòng thơm. Nguồn xạ khuẩn sinh bào tử và sinh tổng hợp chất có tính xúc tác C*Glacc*aza đã phân lập và bảo tồn được từ chính nơi đất ô nhiễm nặng chất diệt cỏ/dioxin, đất được xử lý khử độc bằng công nghệ phân hủy sinh học tại sân bay Biên Hòa sẽ trở thành nguồn nguyên liệu di truyền phục vụ xử lý và tái tạo môi trường ô nhiễm các chất đang gây hiệu quả xấu nhất với sức khỏe của con người.

Cho đến nay, chưa có nghiên cứu sâu sắc đề cập đến khả năng sinh tổng hợp chất xúc tác oxy hóa C*Glacc*aza, cũng như khả năng xúc tác phân hủy chuyển hóa các hợp chất vòng thơm, đặc biệt là các chất diệt cỏ/dioxin sẽ làm sáng tỏ trong sáng chế bởi đại diện thuộc chi *Streptomyces*.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện đặc điểm hình thái khuẩn lạc chủng xạ khuẩn XKBiR929

Hình 2 là cây phát sinh chủng loại chủng XKBiR929

Hình 3 là biểu đồ thể hiện khả năng sinh tổng hợp C*Glacc*aza theo thời gian của chủng XKBiR929 trên môi trường chứa DCĐ (A); DBF (B); 2,4,5-T (C); 2,4-D (D); PAHs (E)

Hình 4 là biểu đồ thể hiện kết quả tinh sạch CGLaccaza sinh tổng hợp bởi chủng XKBiR929. Hoạt tính qua cột sắc ký lọc gel Sephadex G75 (A) và qua cột trao đổi ion trên hệ thống Hitrap QHP (B)

Hình 5 là hình ảnh thể hiện kết quả thử nghiệm phản ứng oxy hóa của CGLaccaza tinh sạch với ABTS trong đệm KCl-HCl, độ pH = 1 sau 2 phút (A), 1 phút (B) và không có (C).

Hình 6 là biểu đồ thể hiện sự ảnh hưởng của độ pH lên hoạt tính (A) và độ bền (B); động học xúc tác (C, D) và ảnh hưởng của chất ức chế (E) và ion kim loại (G) lên CGLaccaza tinh sạch của XKBiR929.

Hình 7 là biểu đồ và hình ảnh thể hiện khả năng loại màu thuốc nhuộm MN.FBN bằng CGLaccaza của chủng XKBiR929. (A)-VIO; (B)-HBT; (D)-Enz; (C)-đối chứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Xạ khuẩn được phân lập theo phương pháp làm giàu và cấy chuyển nhiều lần sang môi môi trường Gause M dịch thể và thạch chứa dịch chiết đất (DCĐ). DCĐ có độ độc > 4000 ngTEQ/ml, chiết từ đất ô nhiễm nặng chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Biên Hoà chứa các đồng loại độc của dioxin trong đó có đồng loại độc nhất là 2,3,7,8-TCDD với tổng độ độc chiếm hơn 90% và các chất diệt cỏ 2,4,5-T, 2,4-D, polyphenol TCP, DCP, các chất hữu cơ đa vòng thơm PAH và các chất trao đổi chất khác từ các hợp chất clo trên.

Chuyên gia trong lĩnh vực vi sinh vật có thể dễ dàng thực hiện việc chọn môi trường và các thao tác nuôi cấy các chủng nấm trong quá trình phân lập này. Môi trường để nuôi cấy và xác định khả năng sinh tổng hợp CGLaccaza được đề cập ở đây là môi trường Gause M (môi trường cơ bản đã thay đổi thành phần, giảm nguồn C và thay bằng các hỗn hợp các chất độc hữu cơ đa vòng thơm chứa clo và không chứa clo) có thành phần như sau: KNO₃ 2 g/L, MgSO₄ 0,45 g/L, KH₂PO₄ 0,15 g/L, Na₂HPO₄ 0,35 g/L, NaCl 1 g/L, K₂HPO₄ 0,25 g/L, FeSO₄ 0,01 g/L, cao nấm men 0,2 g/L, cao malt 3 g/L, tinh bột 3 g/L; thạch 15 g/L. Phụ thuộc vào tính chất cần nghiên cứu sẽ bổ sung thêm các nguồn cacbon khác.

Chủng vi sinh vật phân lập được được xác định hình thái và phân loại bằng cách xác định trình tự 16S rARN bằng kỹ thuật PCR. Sau khi thực hiện phân loại,

chủng xạ khuẩn thu được đã xác định là thuộc chi *Streptomyces* sp. và được định danh là *Streptomyces* sp. XKBiR929.

Bào tử của chủng xạ khuẩn này được bảo quản và lưu giữ trong 50% glycerol ở -80°C hoặc trong dầu khoáng ở nhiệt độ $25 - 30^{\circ}\text{C}$ hay nước cất vô trùng tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBiR929 thu được được nuôi cấy để thu chất xúc tác giống laccaza. Chất xúc tác giống laccaza thu được từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBiR929 được xác định hoạt tính, đặc biệt là khả năng loại màu thuốc nhuộm và khả năng phân hủy đồng phân dioxin 2,3,7,8-TCDD. Chất giống laccaza tinh sạch từ *Streptomyces* sp. XKBiR929 với hoạt tính 105.900 U/L ở độ pH = 1, ở độ pH thấp từ 1 đến dưới 3 hoạt tính cao nhất, rất bền nhiệt ngay cả ở 100°C trong vòng 3 giờ mà hoạt tính không thay đổi; giá trị động học V_{max} là 142.857 $\mu\text{M/phút}$ và K_m là 0,43 μM nên khả năng oxy hóa cao ở độ pH thấp. Bị ức chế bởi các chất ức chế là L-lys, EDTA, SDS và cũng bị ức chế bởi các ion kim loại Co^{2+} , Mn^{2+} , K^{+} , Na^{+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} và Cu^{2+} ở nồng độ 2, 5 và 20 mM. Còn Fe^{2+} gây ra sự ức chế mạnh nhất ở các nồng độ từ 2-20 mM. Chất giống laccaza loại được 75,8% màu thuốc nhuộm hoạt tính MN.FBN sau 5 giờ ở nồng độ ban đầu 100 mg/L trong môi trường độ pH = 1 với sự có mặt của chất gắn kết là ViO.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập xạ khuẩn và phân loại chủng xạ khuẩn thu được

Tiến hành: Cân 10 g đất nhiễm nặng chất diệt cỏ/dioxin tại khu vực mới được phát hiện và đất đã được khử độc của sân bay Biên Hòa, mẫu đất được bảo quản cẩn thận và được dùng để phân lập chỉ sau 24 giờ. Sau khi lấy mẫu cho vào bình tam giác chứa 90ml nước muối sinh lý đã khử trùng sẵn. Sau đó, đưa bình tam giác vào máy lắc ở 30°C với tốc độ lắc 200 vòng/ phút, trong vòng 30 phút, thu được dịch có độ pha loãng 10^{-1} . Lắc đều rồi hút 0,5 ml dung dịch 10^{-1} cho vào ống nghiệm chứa 4,5 ml nước muối sinh lý vô trùng, thu được dung dịch pha loãng nồng độ 10^{-2} . Tiếp tục pha loãng như thế ta được dung dịch nồng độ 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , v.v..

Hút 40-50 μL dung dịch ở mỗi nồng độ pha loãng, gạt lên đĩa petri có chứa môi trường Gause M thạch chứa dịch chiết đất (DCĐ), là dịch chiết từ đất ô nhiễm nặng chất diệt cỏ/dioxin tại sân bay Biên Hòa chứa các chất chứa. DCĐ chứa hơn 90% 2,3,7,8 TCDD và các chất khác như 2,4-D; 2,4,5-T, TCP, DCP, PAHs và các chất trao đổi chất của chúng v.v.. Dùng que trang trải đều khắp trên mặt thạch. Sau đó, nuôi các

đĩa này trong tủ nuôi 30 °C từ 3-7 ngày. Tiến hành kiểm tra sau mỗi ngày nuôi cấy. Tách khuẩn lạc riêng và cấy chuyển cho đến khi thu được chủng xạ khuẩn thuần khiết. Cuối cùng, cấy giống sang ống thạch nghiêng để tạm bảo quản và nghiên cứu các đặc điểm sinh học của xạ khuẩn. Còn giữ giống lâu dài phải giữ ở dạng bào tử. Muốn không mất hoạt tính phân hủy thì môi trường luôn luôn phải gồm các cơ chất tương ứng.

Một trong những chủng xạ khuẩn thuần khiết phân lập được là chủng XKBiR929. Chủng này sau đó được xác định các đặc điểm hình thái, định danh và xác định các đặc tính sinh hợp chất giống laccaza mong muốn.

Các đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn đã khảo sát bằng cách quan sát bằng mắt thường và kính hiển vi điện tử quét JEOL-Nhật Bản với độ phóng đại 10.000 lần. Hình thái khuẩn lạc các chủng xạ khuẩn được quan sát sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường Gause M thạch ở 30°C. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc chủng xạ khuẩn XKBiR929 quan sát được được thể hiện trong Bảng 1 và trên Hình 1.

Bảng 1 – Đặc điểm hình thái khuẩn lạc chủng xạ khuẩn XKBiR929

Đặc điểm	Chủng XKBiR929
Hình thái	Bề mặt bông xốp, khuẩn lạc đều nhô cao, nhẵn ở tâm, khuẩn ty khí sinh phát triển tốt
Kích thước	Đường kính khuẩn lạc 3 – 4 mm
Màu sắc	Khuẩn ty khí sinh có màu nâu, khuẩn ty cơ chất không có màu.
Bào tử	Bào tử hình trứng, có gai, kết dính với nhau tạo thành hình xoắn móc, đường kính 1 đến 1,16 µm

Sau đó, phân loại chủng xạ khuẩn thu được bằng cách xác định trình tự gen 16S rARN. ADN tổng số của chủng xạ khuẩn được tách chiết theo các bước sau: Thu sinh khối xạ khuẩn vào ống eppendorf bằng cách ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C; Bổ sung H₂O để rửa sinh khối, ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C; Bổ sung 400 µl dung dịch đệm phân giải, vortex đều; Bổ sung 50 µl lysozym 10 mg/ml, ủ ở 37°C trong 30-45 phút; Bổ sung 20 µl proteinaza K ủ ở 56°C trong 1 giờ; Bổ sung C:I (24:1) với tỷ lệ 1:1 (v:v), vortex, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C; Hút phần dịch nổi phía trên sang ống eppendorf mới; Bổ sung isopropanol với tỉ lệ 1:1 về thể tích, ủ ở 4°C qua đêm; Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu tủa; Bổ sung etanol 100% tỷ lệ 1:1 (v:v); Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu tủa, rửa tiếp bằng etanol 70%; Làm khô tủa; Hòa trong TE, bảo quản ở 4°C. Sau

khi thu được ADN tổng số, thực hiện khuếch đại đoạn gen mã hoá 16S rARN bằng kỹ thuật PCR. Đoạn gen mã hóa 16S rARN được khuếch đại bằng cặp mồi 27F (5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3') và 1492R (5' – TAC GGG TAC CTT GTT ACG ACT T – 3') (Baker, 2003; Bourne, 2005).

Xạ khuẩn được phân loại dựa trên trình tự đoạn gene mã hóa 16S rRNA. DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Vijay Kumar và cộng sự (Vijay 2010) và làm sạch bằng kit Qiaquick® Mini Columns (Qiagen - Đức). Hỗn hợp phản ứng PCR chứa: 3 µl buffer taq (5X); 3 µl Mg^{2+} ; 3 µl dNTP; 1 µl 27F; 1 µl 1492R; 0,15 µl taq polymerase; 1 µl DNA khuôn và bổ sung nước loại ion đến 30 µl.

Thành phần phản ứng PCR như sau:

Thành phần	Thể tích (µl)	Nồng độ cuối
Đệm Taq 10X	2,5	1X
dNTPs 2 mM	2,5	0,2 mM
MgSO ₄ 20 mM	2,5	2 mM
Mồi 27F 10 µM	1	0,4 µM
Mồi 1492R 10 µM	1	0,4 µM
Taq Polymeraza 5 U/ µl	0,2	1 U/25 µl
ADN khuôn	1	-
ddH ₂ O	14,3	-
Tổng thể tích	25 µl	-

Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR như sau:

Bước	Nhiệt độ/thời gian	Số chu kỳ
Biến tính	94°C/5 phút	1
Biến tính	94°C/1 phút	30

Gắn môi	55°C/1 phút	
Kéo dài chuỗi	72°C /1 phút 30 giây	
Kéo dài chuỗi	72 °C /7 phút	1
Ổn định	4 °C	Giữ ổn định

Trình tự gen của chủng nghiên cứu được so sánh với dữ liệu trình tự gen các chủng trên GenBank. Sử dụng phần mềm Finch TV và MEGA6 để xây dựng cây phát sinh chủng loại, kết quả được thể hiện trên Hình 2.

Trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng XKBiR929 được so sánh với các trình tự gen tương ứng của các vi sinh vật nhân sơ đã được công bố trên GenBank. Chủng xạ khuẩn XKBiR929 có mức độ tương đồng 99% với loài xạ khuẩn *S. albogriseolus* sp.NBE40, đây là chủng được phân lập từ đất ô nhiễm của khu vực nhà máy sản xuất giấy ở Ấn Độ, tương đồng 97% với chủng xạ khuẩn *S. sp.* C39 được phân lập từ đất ô nhiễm các thuốc trừ sâu ở Argentina và chủng có khả năng sinh trưởng và phát triển trên môi trường chứa thuốc trừ sâu là lindan (HCH) và methoxychlor, tương đồng 97% với chủng *S. albogriseolus* GhS-A9-1, chủng này được phân lập từ trầm tích rừng ngập mặn ở Hải Nam, Trung Quốc có khả năng sinh tổng hợp chất có hoạt tính sinh học để giết các loại giun sán có hại. Cuối cùng trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng xạ khuẩn của sáng chế này tương đồng 97% với chủng *S. albogriseolus* NBE40 hiện nay chủng này chưa có nhiều thông tin về nguồn gốc phân lập cũng như đặc tính sinh học.

Dựa trên các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, bào tử và so sánh trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA, chủng XKBiR929 được xếp vào chi *Streptomyces* và được đặt tên *Streptomyces* sp. XKBiR929. Mã số đăng ký trên Genbank của chủng *Streptomyces* sp. XKBiR929 là MG243364.

Ví dụ 2: Khả năng sinh tổng hợp CGLaccaza của XKBiR929 trên môi trường chứa các chất hữu cơ clo khác nhau

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBiR929 có khả năng sinh CGLaccaza đã phân lập từ chính nơi đất ô nhiễm nặng chất diệt cỏ/dioxin, đất được xử lý khử độc bằng công nghệ phân hủy sinh học tại sân bay Biên Hòa, cũng đã được nuôi cấy trên các môi trường chứa các chất hữu cơ clo khác nhau. Sau 7 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C

lắc ở tốc độ 120 vòng/phút, chủng XKBiR929 có khả năng sinh trưởng mạnh trên môi trường chứa các chất ô nhiễm là dịch chiết đất (DCĐ), 2,4,5-T; 2,4-D; (dibenzofuran) DBF và PAHs, các kết quả được thể hiện trên Hình 3.

Chủng XKBiR929 có khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp CGLaccaza trên môi trường Gause M có chứa từ 4% đến 16% theo thể tích DCĐ. Hoạt tính giống laccaza cao nhất tạo ra bởi XKBiR929 là 803 U/l ở ngày thứ 13 với thể tích DCĐ là 8% và giảm dần ở các tỷ lệ bổ sung là 12 và 16% trong môi trường nuôi cấy.

Sau 4 ngày nuôi cấy, chủng XKBiR929 sinh tổng hợp CGLaccaza với hoạt tính cao nhất là 803 U/l ở nồng độ 200 ppm 2,4,5-T sau 13 ngày nuôi cấy và hoạt tính giảm dần khi nồng độ 2,4,5-T tăng dần.

Chủng XKBiR929 có hoạt tính cao nhất là 566U/l sau 13 ngày nuôi cấy ở 100 ppm và 200 ppm 2,4-D trong môi trường. Hoạt tính CGLaccaza giảm dần theo thời gian khi nồng độ 2,4-D cao hơn.

Trên môi trường Gauss M chứa DBF, hoạt tính CGLaccaza do XKBiR929 sinh tổng hợp cao nhất là 814 U/l ở nồng độ là 200 ppm với thời gian nuôi cấy là 15 ngày. Trên môi trường Gauss M chứa 200 ppm PAHs thì hoạt tính CGLaccaza cao nhất thu được đối với XKBiR929 là 867 U/l sau 15 ngày nuôi cấy.

Như vậy có thể thấy rằng chủng XKBiR929 có khả năng sinh tổng hợp CGLaccaza khá tốt, tuy nhiên cần tiếp tục nghiên cứu khảo sát các điều kiện nuôi cấy phù hợp như nhiệt độ, chất cảm ứng, độ pH và các nguồn cơ chất bổ sung khác, v.v. để thu được CGLaccaza có hoạt tính cao nhất. Bên cạnh đó là nghiên cứu khả năng ứng dụng trong phân hủy, chuyển hóa các chất ô nhiễm hữu cơ clo trong môi trường.

Cho đến nay, chưa có nhiều nghiên cứu đề cập đến khả năng sinh tổng hợp CGLaccaza, cũng như khả năng xúc tác phân hủy chuyển hóa của CGLaccaza từ các đại diện thuộc chi *Streptomyces* trong môi trường có các hợp chất vòng thơm, đặc biệt là các chất diệt cỏ/dioxin đã được sử dụng trong sáng chế này. Tinh sạch và tìm hiểu đặc tính của CGLaccaza mà các chủng xạ khuẩn phân lập được từ khu vực ô nhiễm nặng chất diệt cỏ/dioxin sinh tổng hợp có tính mới và không trùng lặp ở sáng chế này. Sáng chế đã đánh giá khả năng tinh sạch và đặc tính hóa-lý của hoạt chất sinh học sau khi được tinh sạch.

Ví dụ 3: Tinh sạch CGLaccaza từ xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBiR929

Quá trình tinh sạch đã được thực hiện bởi các bước sau đây:

a) Tinh sạch bằng cột lọc gel

Đối với dịch CGLaccaza thô của chủng XKBiR929 được cô bằng thiết bị cất quay ở nhiệt độ 80°C và áp suất 0,8 atm. Dịch CGLaccaza sau khi cô được đưa lên cột sắc ký lọc gel Sephadex G-10 với thể tích 2 ml/lần. Cột có kích thước 1,2x50 cm được cân bằng với đệm 20 mM natri axetat; độ pH = 5,5; tốc độ dòng chảy là 20 ml/giờ. Thu 35 phân đoạn từ lúc dịch enzym ở độ cao ½ cột, thể tích mỗi phân đoạn 1 ml. Hàm lượng protein và hoạt tính enzym được xác định trong mỗi phân đoạn.

b) Tinh sạch bằng cột trao đổi ion

Dịch enzym sau khi qua cột sephadex G-75, G-10, chọn những phân đoạn có hoạt tính laccaza cao được đưa tiếp lên cột sắc ký trao đổi ion Q - anion với tổng thể tích là 10 ml. Cột có kích thước 1 x 5 cm được cân bằng với đệm 20mM natri axetat, độ pH = 5,5. Thôi mẫu bằng muối 0,05 - 0,5 M NaCl, bước nhảy giữa các nồng độ là 0,05 M; mỗi nồng độ thu 10 phân đoạn với thể tích 1 ml/phân đoạn. Tốc độ dòng chảy là 1 ml/phút khi cân bằng cột và load mẫu; 1,5 ml/ phút khi thôi mẫu. Hàm lượng protein và hoạt tính enzym được xác định ở mỗi phân đoạn.

c) Xác định hàm lượng protein tổng số

Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp Bradford (1976). Phương pháp này dựa trên nguyên tắc: các protein khi phản ứng với thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue sẽ hình thành phức hợp màu có khả năng hấp thụ ánh sáng mạnh nhất ở bước sóng 595 nm, cường độ màu tỉ lệ thuận với nồng độ protein trong dung dịch. Hàm lượng protein tổng số được xác định dựa vào đồ thị chuẩn protein từ dung dịch BSA (Bovin Serum Albumin).

Dung dịch chuẩn BSA có nồng độ stock 100 µg/ml được sử dụng để xây dựng đường chuẩn protein. Sử dụng nước khử ion để pha loãng các nồng độ BSA khác nhau 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 và 70 µg/mL. Giá trị OD được xác định ở bước sóng 595 nm. Thí nghiệm được tiến hành trong đĩa 96 giếng. Nồng độ protein được xác định dựa trên đường chuẩn BSA. Quá trình tinh sạch, dịch CGLaccaza thô được đưa qua cột sắc ký lọc gel, hoạt tính thu được tăng lên 1,26 lần (từ 3.192 U/L đến 4.028 U/L), nồng độ protein giảm đi từ 0,0357 mg/ml xuống còn 0,0116 mg/ml.

Hoạt tính CGLaccaza và hàm lượng chất thu được của mỗi phân đoạn khi qua cột sắc ký lọc gel đều được xác định (Hình 4 A, B). Phân đoạn có hoạt tính cao nhất sau quá trình sắc ký lọc gel sẽ được đưa qua cột sắc ký trao đổi ion Hitrap QHP, chất qua cột thu được rửa giải ở nồng độ muối NaCl 0,1M với hiệu suất 69,7% và nồng độ chất thu được đạt 6,93 U/mg.

Ví dụ 4: Xác định trọng lượng phân tử

Để xác định khối lượng phân tử và độ tinh sạch của CGLaccaza được xác định bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit. Quá trình điện di được thực hiện với dòng điện có hiệu điện thế là 90V đối với bản điện di gel cô và 120 V đối với bản điện di gel tách. Thành phần của gel điện di gồm

Thành phần	Gel tách 12,5%	Gel cô 4,5%
H ₂ O	0,67 ml	0,11 ml
Tris HCl 1,5 M (pH 8,8)	1,375 ml	-
Tris HCl 0,5 M (pH 6,8)	-	0,5 ml
Glycerol 50%	1,1 ml	-
Bis/acrylamit	2,31 ml	0,35 ml
SDS 10%	55 µl	10 µl
APS	37 µl	20 µl
TEMED	4 µl	3 µl

Xác định trọng lượng phân tử bằng điện di trên gel polyacrylamit 15-20% (SDS-PAGE) để kiểm tra độ tinh sạch của enzym. Quan sát điện di đồ không thấy xuất hiện chất tạo thành đã được tinh sạch giống như laccaza thật. Như vậy, phương pháp xác định sự tồn tại của CGLaccaza theo phương pháp tinh sạch protein thông thường đã không xác định được trọng lượng phân tử của CGLaccaza từ xạ khuẩn. Số liệu thu được cho thấy trọng lượng phân tử của CGLaccaza từ loài xạ khuẩn này nhỏ hơn 10kDa.

CGLaccaza kiểu mới này là sản phẩm được tạo ra bởi các chủng xạ khuẩn và không có bản chất protein. Một thí nghiệm đơn giản đã được thực hiện, sau khi đun sôi dịch nuôi cấy 3 và 4 giờ, dịch này được cho phản ứng với ABTS thì sản phẩm

năng oxy hóa ABTS vẫn xác định được, chất trao đổi chất vẫn chuyển thành màu xanh. Thử nghiệm CGLaccaza tinh sạch với ABTS trong đệm KCl-HCl, độ pH = 1 sau 2 phút (A), 1 phút (B) và không có (C), được thể hiện trên Hình 5. Như vậy chất trao đổi chất trong dịch nuôi cấy đã tham gia phản ứng oxy hóa ABTS.

Ví dụ 5: Đặc tính hóa-lý của CGLaccaza tinh sạch

Ảnh hưởng pH và độ bền pH:

Dịch CGLaccaza tinh sạch được ủ với cơ chất ABTS pha trong dải đệm có độ pH từ 1 đến 6, bao gồm đệm: KCl-HCl với độ pH= 1; glycin-HCl với độ pH từ 2-3; natri axetat với độ pH từ 4-5 và kali phosphat với độ pH từ 6-7. Để đánh giá độ bền pH, CGLaccaza được ủ với các đệm có độ pH dao động trong khoảng từ 2-7 trong thời gian 7 giờ ở nhiệt độ 30°C. Kết quả được thể hiện trên Hình 6 A, B.

Số liệu thu được cho thấy, CGLaccaza tinh sạch có hoạt tính cao nhất ở độ pH = 1, giảm nhanh hoạt tính và gần như mất hoàn toàn hoạt tính ở độ pH = 3. Sau 4 giờ, hoạt tính CGLaccaza tinh sạch của chủng XKBiR929 giảm 57,46% trong khi ở độ pH = 2, hoạt tính giảm chậm hơn đo được là 64,53%. Hoạt tính CGLaccaza tinh sạch bền nhất ở độ pH = 1. Đây là một đặc tính rất khác biệt và lần đầu tiên xác nhận được đặc điểm của tác nhân sinh học này do vi sinh vật tổng hợp trong quá trình sinh trưởng.

Ảnh hưởng nhiệt độ và độ bền nhiệt:

Hỗn hợp phản ứng bao gồm dịch CGLaccaza, cơ chất ABTS, đệm pH thích hợp được ủ ở các nhiệt độ khác nhau trong khoảng từ 30 - 100°C để tìm nhiệt độ phản ứng thích hợp. Để xác định độ bền nhiệt của CGLaccaza từ chủng xạ khuẩn này, dịch CGLaccaza đã tinh sạch được ủ ở các nhiệt độ khác nhau từ 30 - 100°C, sau các khoảng thời gian: 20, 60, 100, 140 và 180 phút. Hoạt tính còn lại của CGLaccaza được xác định theo phương pháp đã nêu với thời gian phản ứng là 2 phút ở nhiệt độ phản ứng tương ứng.

Tương tự các nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng lên protein của các enzym khác thì nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng lên CGLaccaza tinh sạch từ chủng xạ khuẩn XKBiR929 đã tìm ra sự khác biệt giữa laccaza (thật) và CGLaccaza được mô tả ở Hình 6. Khi đun sôi dịch CGLaccaza tinh sạch của chủng XKBiR929 trong thời gian tới 3 giờ, hoạt tính của chúng hầu như không giảm. Thậm chí, khi cất quay ở nhiệt độ 80°C với áp suất 0,8 atm (81,06 kPa), hoạt tính của CGLaccaza từ chủng này vẫn

không giảm hoạt tính đo được 105.900 U/L ở độ pH = 1. Như vậy, CGLaccaza tạo ra từ chủng XKBiR929 rất bền nhiệt.

Xác định hằng số Michaelis-Menten (K_m) và V_{max} :

Dịch GCLaccaza tinh sạch được cho phản ứng với cơ chất ABTS có nồng độ khác nhau: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 và 0,5 mM. Ứng với mỗi nồng độ cơ chất được khảo sát ở thời gian 2 phút, phản ứng được thực hiện ở 30°C, xác định hoạt tính CGLaccaza. 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 K_m và V_{max} .

Ảnh hưởng của chất cảm ứng lên hoạt tính CGLaccaza tính toán được giá trị V_{max} là 142.857 $\mu\text{M}/\text{min}$ và K_m là 0,43 μM . Với giá trị V_{max} và K_m như vậy cho thấy khả năng oxy rất cao của CGLaccaza ở giá trị pH thấp. Đây là một đặc tính rất đáng lưu ý của hoạt chất này mà sáng chế này đã tìm thấy ở xạ khuẩn XKBiR929.

Kết quả được thể hiện trên Hình 6 C, D.

Ảnh hưởng của các chất ức chế và ion kim loại:

Dịch CGLaccaza được ủ cùng với muối của các kim loại: Ni^{2+} , K^+ , Na^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ở nồng độ 0,5; 1, 2, 3, 4 và 5 mM. Một số chất ức chế (Cl^- , EDTA, SDS, arginine) được sử dụng ở nồng độ 2, 5 và 10 mM. Sau 30 phút, hoạt tính còn lại của enzyme được xác định. Hỗn hợp phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ 60°C và độ pH = 4. Mẫu đối chứng không có mặt của ion kim loại hoặc chất ức chế. Hoạt tính được biểu diễn bằng phần trăm hoạt tính còn lại hoặc % bị ức chế. Hoạt tính CGLaccaza mẫu đối chứng được coi là 100%. Mỗi phép đo được lặp lại 2 lần.

Chất ức chế hoạt tính CGLaccaza mạnh nhất là L-lys, ở nồng độ 10 mM hoạt tính CGLaccaza chỉ còn lại 14%, tiếp đến là EDTA hoạt tính còn lại là 66,7% và SDS có ảnh hưởng ít nhất đến hoạt tính, CGLaccaza còn lại đo được là 83,6%. Khi sử dụng 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ để kết tủa dịch CGLaccaza tinh sạch, hoạt tính còn lại là 62%. Từ minh chứng này cho phép khẳng định sự khác biệt rất lớn của CGLaccaza so với laccaza thật từ nấm đảm. Tuy không phải là protein nhưng với các chất ức chế đã khảo sát thì vai trò của các chất này đã thực sự ức chế được hoạt tính CGLaccaza ở mức độ khác nhau một cách rất rõ ràng. Kết quả được thể hiện trên Hình 6 E.

Hoạt tính CGLaccaza bị ức chế bởi các ion kim loại Co^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} và Cu^{2+} ở nồng độ 2 mM, 5 mM và 20 mM. Ở nồng độ 10 mM thì các ion kim loại trên không ảnh hưởng thậm chí còn làm tăng hoạt tính so với đối chứng. Như vậy với các ion kim loại này đã làm tăng hoạt tính từ 2 đến 9,9% so với hoạt tính khi không bổ sung các ion. Cụ thể, ion Co^{2+} làm tăng 9,9%, Mn^{2+} làm tăng 5,2%, Mg^{2+} làm tăng 7,3%, Ca^{2+} làm tăng 7,3%, Ni^{2+} làm tăng 2% và Cu^{2+} làm tăng hoạt tính CGLaccaza 3,3%. Còn Fe^{2+} gây sự ức chế mạnh lên hoạt tính của CGLaccaza ở tất cả các nồng độ nghiên cứu. Kết quả thể hiện trên Hình 6 G. So với ảnh hưởng của các ion kim loại của laccaza thật từ chủng nấm đảm FBV40 cho thấy đây là một đặc tính hết sức đặc biệt và khác biệt của CGLaccaza từ chủng xạ khuẩn XKBiR929 so với laccaza từ nấm đảm.

Với kết quả thu được của sáng chế liên quan đến đặc tính của CGLaccaza được xạ khuẩn tạo ra, đây là những kết quả đầu tiên thu được khi khảo sát đặc tính cơ bản của chất thu được ra sau tinh sạch trên đã cho chúng ta thấy những đặc điểm nổi bật của CGLaccaza do xạ khuẩn phân lập được từ đất nhiễm nặng chất diệt cỏ/dioxin ở Việt Nam.

Ví dụ 6: Loại màu thuốc nhuộm hoạt tính MN.FBN bởi CGLaccaza tinh sạch

Vậy CGLaccaza hoạt động ra sao đối với thuốc nhuộm hoạt tính là loại màu rất khó phân hủy (Hình 7). Nồng độ thuốc nhuộm tiến hành thí nghiệm là 100mg/l, chất gắn kết đã được sử dụng là HBT, ViO với nồng độ cuối là 400 μM , sử dụng đệm KCl-HCl có pH 1. Tổng thể tích thí nghiệm là 5 ml, mẫu được để tĩnh trong điều kiện nhiệt độ phòng.

Để xác định khả năng loại màu thuốc nhuộm của các nghiên cứu trên, mẫu nghiên cứu đều được xác định sau mỗi khoảng thời gian xác định, mẫu được ly tâm ở 12.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 5 phút để xác định khả năng loại màu theo thời gian trên máy đo quang theo nguyên lý đo độ hấp phụ màu bằng máy OD/Jasco Nhật Bản ở các bước sóng 602 λ_{nm} , đồng thời tiến hành đo hoạt tính laccaza theo thời gian. Mẫu đối chứng là mẫu được bổ sung dịch laccase tinh sạch bất hoạt ở 80°C trong 10 phút. Thí nghiệm được lặp lại 2 lần. Khả năng loại màu được xác định bằng phần trăm hấp thụ theo công thức:

$$D = 100 * (A_i - A_t)/A_i \quad (\text{CT2})$$

Trong đó:

D: phần trăm loại màu thuốc nhuộm (%)

A_i : Độ hấp thụ ban đầu

A_t : Độ hấp thụ tại thời gian t

Bên cạnh nghiên cứu đặc tính và khả năng sinh tổng hợp CGLaccaza của chủng xạ khuẩn phân lập được. Để đánh giá khả năng của CGLaccaza trong phân hủy, chuyển hóa các hợp chất hữu cơ đa vòng thơm, thì sáng chế đã xác định được hiệu suất loại màu thuốc nhuộm hoạt tính thương mại MN.FBN đã được thực hiện ở điều kiện môi trường độ pH = 1 với sự có mặt của các chất gắn kết ViO và HBT.

Ở độ pH = 1, CGLaccaza tinh sạch từ chủng XKBiR929 khi có mặt chất gắn kết ViO đã loại được 76,3% màu MN.FBN sau 23 giờ, nhưng chỉ sau 5 giờ, CGLaccaza đã loại được 75,8% với nồng độ thuốc nhuộm ban đầu là 100 mg/L, tương ứng loại được là 0,381 mg thuốc nhuộm. Trong khi đó, nếu không có CGK thì hiệu suất loại màu trong cùng khoảng thời gian đạt 54,3% sau 23 giờ và sau 5 giờ đạt được 53,8%, tương ứng loại được là 0,27 và 0,269 mg. Khi sử dụng CGK khác là HBT, khả năng loại màu sau 23 giờ đạt 54,7% và sau 5h đạt 54,0%. Như vậy, có thể thấy CGLaccaza từ chủng XKBiR929 có thể loại màu thuốc nhuộm hoạt tính MN.FBN ở điều kiện môi trường có độ pH thấp. Vai trò của CGK ViO đối với CGLaccaza chủng XKBiR929 trong loại màu thuốc nhuộm không lớn (chỉ tăng hiệu suất thêm được 22%), với CGK HBT chỉ làm tăng hiệu suất loại màu thêm 0,2 đến 0,4%. Đây là kết quả đầu tiên đánh giá khả năng loại màu thuốc nhuộm của CGLaccaza đã được nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam trong nghiên cứu loại màu thuốc nhuộm trong điều kiện môi trường có độ pH thấp. Kết quả nghiên cứu đã mở ra hướng nghiên cứu ứng dụng CGLaccaza trong xử lý loại màu hoặc các hợp chất hữu cơ đa vòng thơm khác trong điều kiện môi trường có độ pH thấp.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đã phân lập được chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBiR929 có khả năng sinh tổng hợp hợp chất giống laccaza (CGLaccaza) với nhiều đặc tính hữu ích. Hợp chất giống laccaza thu được từ chủng xạ khuẩn này loại được 75,8% màu thuốc nhuộm hoạt tính MN.FBN sau 5 giờ ở nồng độ ban đầu 100 mg/L trong môi trường có độ pH = 1 với sự có mặt của chất gắn kết là ViO và có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ đa vòng thơm, đặc biệt là đồng loại dioxin độc nhất là 2,3,7,8-TCDD.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBiR929 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh tổng hợp chất xúc tác sinh học là hợp chất giống laccaza (CGLaccaza), nhưng không có bản chất protein trên môi trường Gause M chứa dịch chiết đất chứa 2,3,7,8-TCDD, 2,4,5-T, 2,4-D, DBF, PAH; trong đó chủng xạ khuẩn này có trình tự 16S rARN được đăng ký trên GenBank với mã số MG243364.

2. Chất xúc tác sinh học thu được từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. XKBiR929 như theo điểm 1 yêu cầu bảo hộ, trong đó chất xúc tác sinh học này có khả năng loại được màu thuốc nhuộm hoạt tính MN.FBN với sự có mặt của chất gắn kết HBH và ViO; 75,8% màu thuốc nhuộm sau 5 giờ ở nồng độ ban đầu 100 mg/L trong môi trường có độ pH = 1 với ViO và có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ đa vòng thơm và có các đặc điểm như sau:

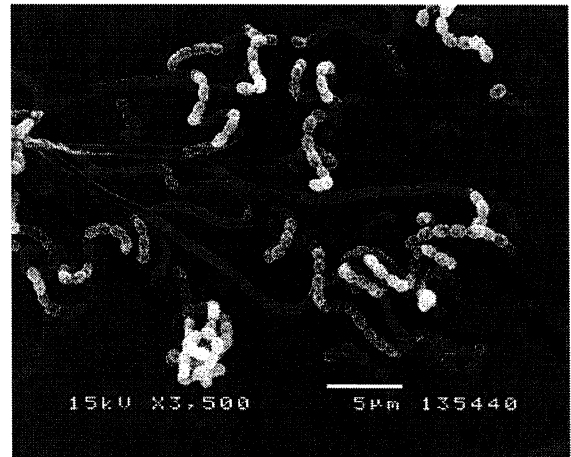
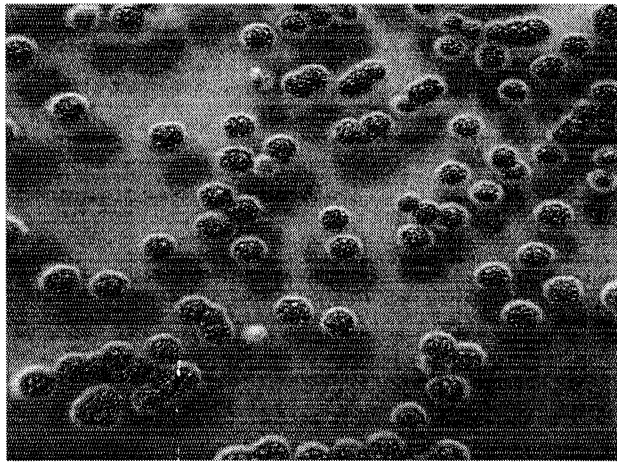
hoạt tính 105.900 U/L ở độ pH = 1;

đạt hoạt tính cao nhất ở độ pH thấp từ 1 đến dưới 3;

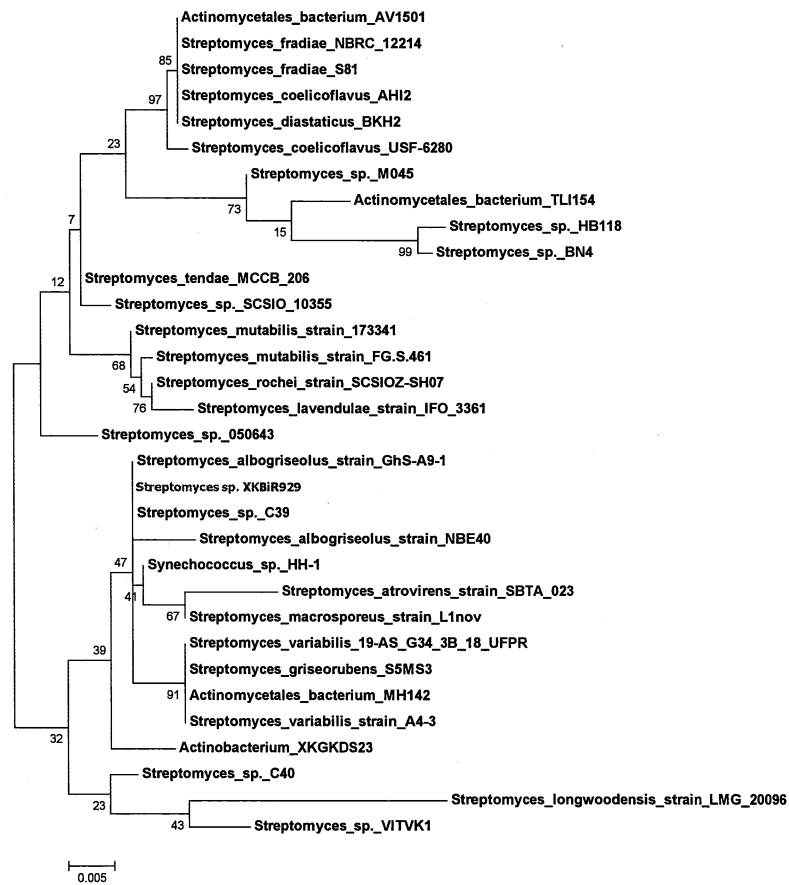
rất bền nhiệt;

có khả năng oxy hóa cao ở độ pH thấp với giá trị động học V_{max} là 142.857 $\mu\text{M/phút}$ và K_m là 0,43 μM nên; và

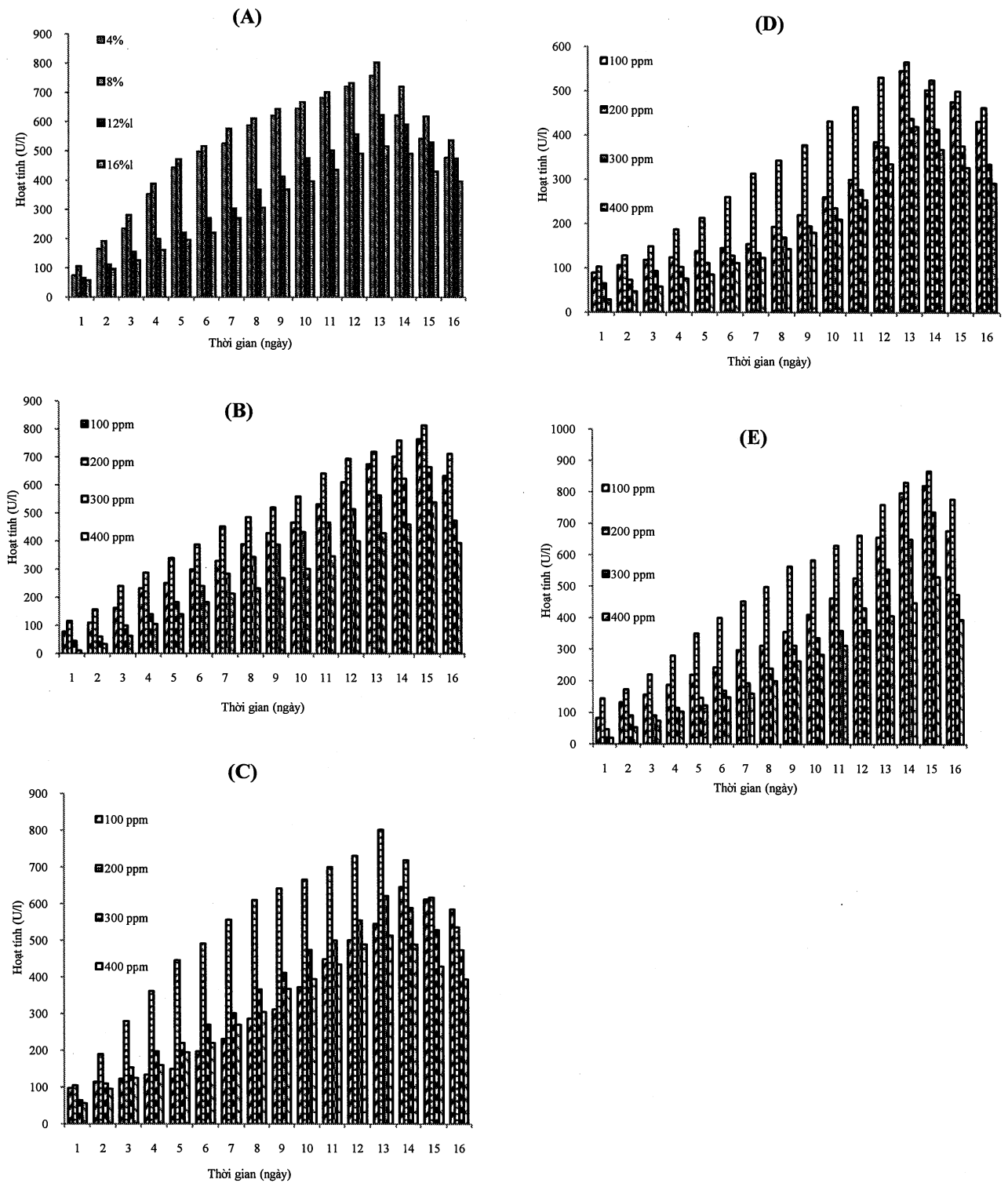
bị ức chế bởi các chất ức chế là L-lys, EDTA, SDS, các ion kim loại Co^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} và Cu^{2+} ở nồng độ 2, 5 và 20 mM và Fe^{2+} gây ra sự ức chế mạnh nhất ở các nồng độ từ 2 - 20 mM.



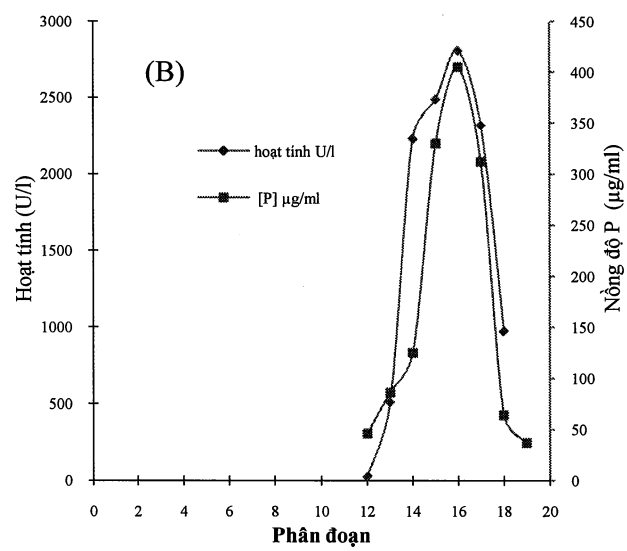
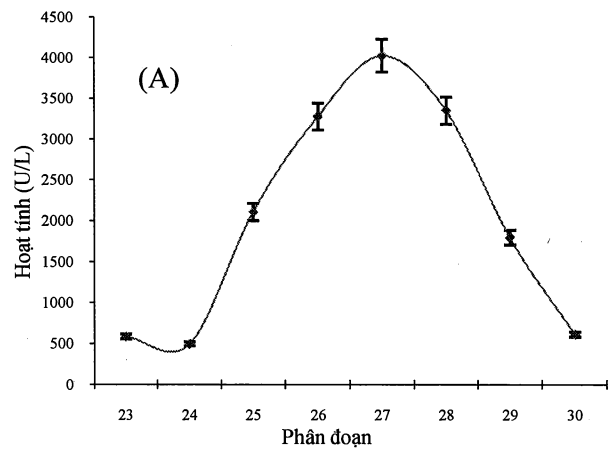
Hình 1



Hình 2



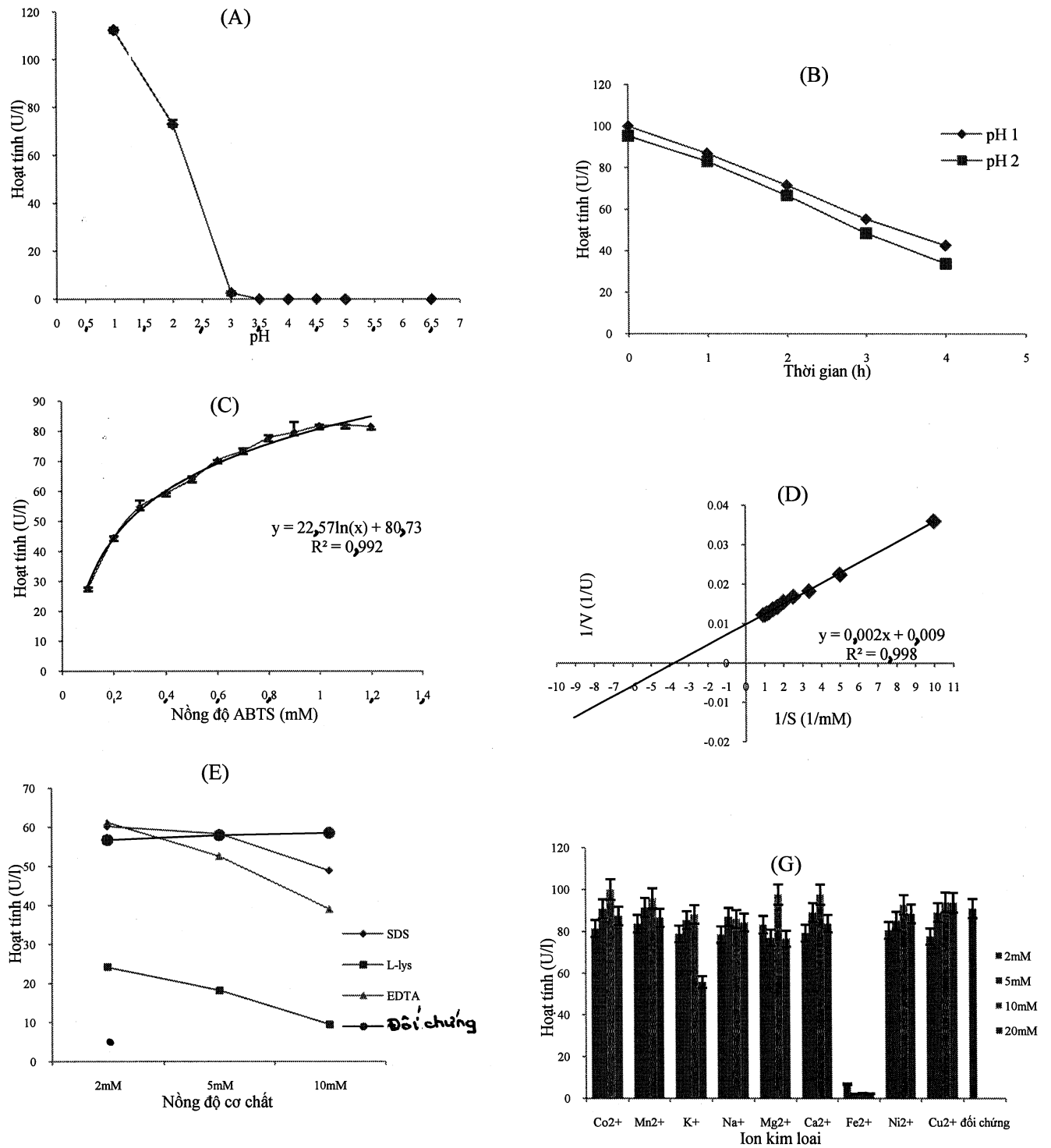
Hình 3



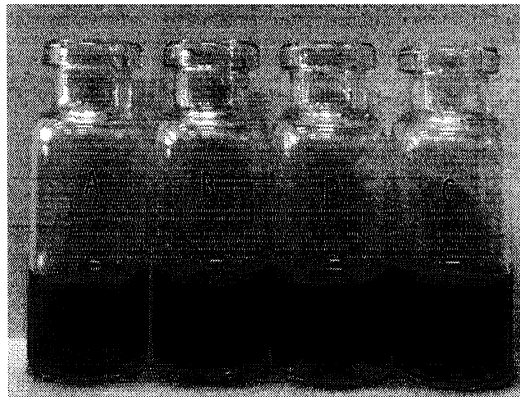
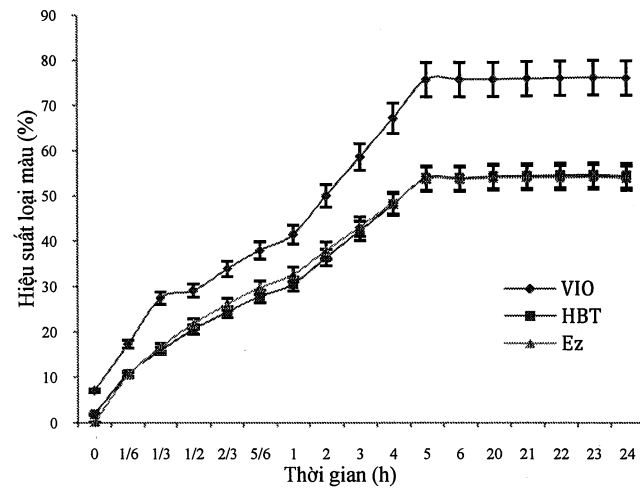
Hình 4



Hình 5



Hình 6



Hình 7