

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

---



**Vi Thị Kim Chi**

**NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC CHỦNG XẠ KHUẨN SINH LACCASE CÓ  
KHẢ NĂNG LOẠI MÀU THUỐC NHUỘM TỪ ASO, THỪA THIÊN  
HUẾ VÀ DỰ ĐOÁN, CHÚ GIẢI CÁC GEN LIÊN QUAN ĐẾN QUÁ  
TRÌNH PHÂN HUỶ CÁC HỢP CHẤT Ô NHIỄM XENOBIOTIC  
TRONG GENOME CHỦNG CHỌN LỌC**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

*Hà Nội - 2024*

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



**Vi Thị Kim Chi**



**NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC CHỦNG XẠ KHUẨN SINH LACCASE CÓ  
KHẢ NĂNG LOẠI MÀU THUỐC NHUỘM TỪ ASO, THỪA THIÊN  
HUỆ VÀ DỰ ĐOÁN, CHÚ GIẢI CÁC GEN LIÊN QUAN ĐẾN QUÁ  
TRÌNH PHÂN HUỶ CÁC HỢP CHẤT Ô NHIỄM XENOBIOTIC  
TRONG GENOME CHỦNG CHỌN LỌC**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Ngành: Sinh học thực nghiệm**

**Mã số: 8420114**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:**

1. TS. Đào Thị Ngọc Ánh 
2. TS. Hồ Ngọc Anh 

*Hà Nội - 2024*

## LỜI CAM ĐOAN

*Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.*

*Hà Nội, ngày 11 tháng 11 năm 2024*

**Tác giả luận văn**



**Vi Thị Kim Chi**

## LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến TS. Đào Thị Ngọc Ánh - Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã hướng dẫn và hỗ trợ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện đề tài luận văn. Nhờ có sự hỗ trợ của cô, tôi đã có được nền tảng vững chắc để thực hiện luận văn này.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc đến TS. Hồ Ngọc Anh và các cô ở phòng Công nghệ sinh học môi trường - Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện thuận lợi trong suốt quá trình nghiên cứu.

Tôi cũng xin cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ và giải đáp các thắc mắc trong suốt quá trình học tập để luận văn được hoàn thành.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến gia đình, bạn bè và những người thân yêu đã luôn động viên và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình làm khóa luận này. Những lời động viên và tình cảm của họ đã giúp tôi vượt qua những thời điểm khó khăn và tiếp tục đi đến thành công.

Trong quá trình nghiên cứu, tìm hiểu và thực hiện đề tài, tôi hiểu rằng bản thân vẫn còn nhiều thiếu sót. Vì vậy, tôi luôn sẵn sàng lắng nghe những nhận xét, góp ý của quý thầy cô trong hội đồng đề luận văn của tôi được hoàn thiện hơn.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

*Hà Nội, ngày 11 tháng 11 năm 2024*

**Học viên cao học**



**Vi Thị Kim Chi**

## MỤC LỤC

MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	3
1.1. Xạ khuẩn.....	3
1.1.1. Giới thiệu chung về xạ khuẩn.....	3
1.1.2. Ứng dụng của xạ khuẩn.....	3
1.1.3. Một số đặc điểm trong hệ gen của xạ khuẩn.....	5
1.2. Giới thiệu chung về laccase.....	6
1.2.1. Đặc điểm của laccase.....	6
1.2.2. Cấu trúc của laccase.....	7
1.2.3. Cơ chế xúc tác của laccase.....	9
1.2.4. Nguồn thu nhận laccase.....	10
1.2.5. Ứng dụng của laccase.....	11
1.2.6. Khả năng loại màu thuốc nhuộm tổng hợp của laccase.....	12
1.3. Giới thiệu chung về xenobiotic.....	13
1.3.1. Đặc điểm của các hợp chất xenobiotic.....	13
1.3.2. Phân loại các hợp chất xenobiotic.....	14
1.3.3. Ô nhiễm xenobiotic và các biện pháp xử lý.....	14
1.3.4. Các gen tham gia vào quá trình phân huỷ xenobiotic.....	15
1.4. Ứng dụng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới trong nghiên cứu genome.....	17
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	19
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	19
2.2. Hoá chất và dụng cụ.....	19
2.2.1. Thiết bị.....	19
2.2.2. Dụng cụ.....	19
2.2.3. Hoá chất.....	19
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	20
2.3.1. Phương pháp sàng lọc các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme laccase.....	20
2.3.2. Phương pháp xác định hoạt tính enzyme laccase.....	20
2.3.3. Đánh giá khả năng loại màu thuốc nhuộm của dịch nuôi cấy các chủng xạ khuẩn tuyển chọn.....	21
2.3.4. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả loại màu thuốc nhuộm của chủng lựa chọn.....	21

2.3.5. Giải trình tự, phân tích chú giải các gen trong genome tham gia vào quá trình phân huỷ các hợp chất xenobiotic và loại màu thuốc nhuộm.....	22
2.3.6. Xử lý số liệu .....	23
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ .....	24
3.1. Sàng lọc các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme laccase.....	24
3.2. Đánh giá khả năng loại màu thuốc nhuộm của dịch nuôi cấy các chủng xạ khuẩn tuyển chọn .....	26
3.3. Tối ưu điều kiện phản ứng loại màu thuốc nhuộm đối với ba chủng lựa chọn .....	29
3.3.1. Ảnh hưởng của pH đến hoạt động của enzyme.....	29
3.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động của enzyme .....	30
3.3.3. Ảnh hưởng của chất trung gian đến hoạt động của enzyme .....	32
3.3.4. Ảnh hưởng của nồng độ chất trung gian đối với hoạt động enzyme .....	33
3.4. Các đặc điểm hệ gen chủng xạ khuẩn X3.....	34
3.4.1. Đánh giá và tiền xử lý trình tự .....	34
3.4.2. Kết quả lắp ráp hệ gen .....	36
3.4.3. Kết quả phân tích taxonomy.....	36
3.4.4. Dự đoán gen và chú giải chức năng .....	37
3.5. Kết quả tìm kiếm các gen mã hoá enzyme laccase và tham gia vào phân huỷ xenobiotic, loại màu thuốc nhuộm.....	39
3.5.1. Các gen tham gia vào phân huỷ xenobiotic.....	39
3.5.2. Gen mã hoá laccase .....	43
3.5.3. Gen mã hoá enzyme tham gia loại màu thuốc nhuộm .....	44
CHƯƠNG 4: THẢO LUẬN .....	46
4.1. Sàng lọc các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme laccase.....	46
4.2. Khả năng loại màu thuốc nhuộm của dịch enzyme từ các chủng xạ khuẩn ...	46
4.3. Tối ưu điều kiện phản ứng loại màu thuốc nhuộm.....	47
4.4. Phân tích chú giải các gen trong genome của chủng xạ khuẩn tham gia vào quá trình phân huỷ các hợp chất xenobiotic và loại màu thuốc nhuộm .....	48
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	50
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO .....	51
PHỤ LỤC.....	61

**DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT**

2,4,5-T	2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid
aa	Amino acid
CDS	Coding sequence - trình tự mã hóa chính xác
IN13	Acid Blue 113
MLST	Multilocus sequence typing
MCO	Multicopper oxidase
NGS	Next Generation Sequencing - Giải trình tự thế hệ mới
NY1	Acid Red 299
NY3	Acid Blue 62
NY5	Acid Blue 281
RBBR	Remazol Brilliant Blue R
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon
smBGC	Các nhóm gen sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp
ViO	Violuric acid
WGS	Whole genome sequencing - Giải trình tự toàn bộ hệ gen
HBT	1-hydroxybenzotriazole
SA	Syringaldehyde

**DANH MỤC CÁC BẢNG**

		<b>Trang</b>
Bảng 2.1	Tổng hợp các màu nhuộm được sử dụng và bước sóng tương ứng (nm)	19
Bảng 3.1	Kết quả hoạt độ enzyme laccase của 30 chủng xạ khuẩn trong 10 ngày nuôi cấy (U/L)	24
Bảng 3.2	Kết quả đánh giá khả năng loại màu đối với 17 màu thuốc nhuộm của chủng X3 (%)	27
Bảng 3.3	Kết quả đánh giá khả năng loại màu đối với 17 màu thuốc nhuộm của chủng X8.5 (%)	27
Bảng 3.4	Kết quả đánh giá khả năng loại màu đối với 17 màu thuốc nhuộm của chủng X9.1 (%)	28
Bảng 3.5	Thông tin dữ liệu thô	34
Bảng 3.6	Thông tin dữ liệu sau tinh sạch	35
Bảng 3.7	Kết quả đánh giá chất lượng lắp ráp	36
Bảng 3.8	Thông tin hệ gen tham chiếu trên NCBI	36
Bảng 3.9	Kết quả phân loại taxonomy bằng Kraken2	36
Bảng 3.10	Kết quả phân tích subtype	36
Bảng 3.11	Kết quả chú giải hệ gen	37
Bảng 3.12	Thống kê số lượng các gen liên quan tới chức năng	38
Bảng 3.13	Thống kê các gen liên quan đến quá trình phân huỷ và chuyển hoá các hợp chất xenobiotic	39
Bảng 3.14	Kết quả tìm kiếm gen laccase	43



## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

		<b>Trang</b>
Hình 1.1	Cấu trúc hoá học của một số hợp chất xenobiotic	3
Hình 1.2	Trung tâm hoạt động của laccase ở <i>Trametes versicolor</i> và các phản ứng được xúc tác trong chu trình oxi hóa khử	7
Hình 1.3	Cấu trúc ba chiều của laccase ở <i>Melanocarpus albomyces</i>	8
Hình 1.4	Các kiểu xúc tác của laccase: (a) oxy hóa cơ chất trực tiếp; (b) oxy hóa cơ chất với sự tham gia của chất trung gian hóa học; (c) tái sinh cofactor kết hợp đa enzyme	9
Hình 3.1	Hoạt độ enzyme laccase của 3 chủng lựa chọn trong 10 ngày (U/L)	26
Hình 3.2	Khảo sát ảnh hưởng của pH trong phản ứng loại màu IN13	29
Hình 3.3	Khảo sát ảnh hưởng của pH trong phản ứng loại màu NY3	30
Hình 3.4	Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ trong phản ứng loại màu IN13	31
Hình 3.5	Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ trong phản ứng loại màu NY3	31
Hình 3.6	Khảo sát ảnh hưởng của chất trung gian trong phản ứng loại màu IN13	32
Hình 3.7	Khảo sát ảnh hưởng của chất trung gian trong phản ứng loại màu NY3	33
Hình 3.8	Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ VIO trong phản ứng loại màu IN13	34
Hình 3.9	Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ VIO trong phản ứng loại màu NY3	34
Hình 3.10	Chất lượng dữ liệu trước và sau tinh sạch	35
Hình 3.11	Kết quả BLAST trình tự 16S rRNA lên NCBI	37

## MỞ ĐẦU

Công nghiệp hoá kéo theo sự tích tụ chất thải và các hợp chất độc hại như các chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy gây ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng xấu tới sức khỏe con người. Ví dụ như thuốc nhuộm tổng hợp nhóm azo thường được phát hiện trong nước thải từ các hoạt động sản xuất công nghiệp là một trong những tác nhân chính gây nên ô nhiễm nguồn nước.

Trong bối cảnh này, sự phân hủy các hợp chất ô nhiễm bởi vi sinh vật được coi là phương pháp hiệu quả và thân thiện nhất. Các vi sinh vật có tiềm năng dị hóa đáng chú ý khi mang gen và enzyme có liên quan đến quá trình phân hủy sinh học. Một số xạ khuẩn như chi *Streptomyces* đã được phân lập cho thấy khả năng phân hủy nhiều hợp chất phenolic bằng enzyme laccase sinh tổng hợp được. Enzyme này được nghiên cứu và ứng dụng ngày càng phổ biến nhờ khả năng chuyển hóa các hợp chất xenobiotic thành các sản phẩm không hoặc ít độc hại hơn.

Ngoài ra những năm gần đây, các phương pháp giải trình tự hiện đại kết hợp với phân tích tin sinh học được sử dụng ngày càng phổ biến để xác định các gen trong genome của vi sinh vật tham gia vào quá trình phân hủy sinh học các chất ô nhiễm. Sự hiểu biết về các gen, nhóm gen khác nhau của chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy, loại bỏ các hợp chất ô nhiễm có thể đem lại thông tin hữu ích nhằm ứng dụng chủng tiềm năng trong thực tế và tăng cường hiệu suất của quá trình phân hủy.

Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài: **“Nghiên cứu sàng lọc chủng xạ khuẩn sinh laccase có khả năng loại màu thuốc nhuộm từ Aso, Thừa Thiên Huế và dự đoán, chú giải các gen liên quan đến quá trình phân huỷ các hợp chất ô nhiễm xenobiotic trong genome chủng chọn lọc”**.

### 1. Mục đích nghiên cứu

Tuyển chọn được chủng xạ khuẩn có khả năng sinh laccase và loại màu thuốc nhuộm và xác định được các gen liên quan đến quá trình phân hủy sinh học các hợp chất ô nhiễm xenobiotic trong hệ gen của chủng tuyển chọn.

### 2. Nội dung nghiên cứu

*Nội dung 1:* Sàng lọc 2-3 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme laccase.

*Nội dung 2:* Đánh giá khả năng loại 4-5 màu thuốc nhuộm của một số chủng xạ khuẩn tuyển chọn.

*Nội dung 3:* Giải trình tự, phân tích chú giải, nghiên cứu các đặc điểm của các gen được chú giải thuộc quá trình phân hủy các hợp chất xenobiotic và loại màu thuốc

nhuộm trong genome chủng xạ khuẩn lựa chọn.

### 3. Những đóng góp của luận văn

- Sàng lọc được 3 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp laccase ngoại bào mạnh.

- Laccase sau tối ưu có khả năng phân hủy nhanh màu của một số loại thuốc nhuộm tổng hợp với hiệu suất 80% sau 20 phút. Kết quả chứng minh tính ứng dụng cao của laccase trong xử lý các hợp chất hữu cơ gây ô nhiễm môi trường.

- Giải trình tự toàn bộ hệ gen của chủng *Streptomyces* sp. X3

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. Xạ khuẩn

#### 1.1.1. Giới thiệu chung về xạ khuẩn

Xạ khuẩn là vi khuẩn dạng sợi Gram dương, chủ yếu là hiếu khí thuộc ngành Actinobacteria. Ban đầu chúng được coi là sinh vật có chung đặc điểm hình thái với cả vi khuẩn và nấm, do đó được định nghĩa là dạng chuyển tiếp giữa hai nhóm [1].

Xạ khuẩn có khả năng sống sót ở nhiều môi trường sống khác nhau và phân bố rộng rãi trong các hệ sinh thái tự nhiên. Một số loài xạ khuẩn tham gia vào quá trình phân hủy các hợp chất phức tạp như polyme trong thực vật, động vật và nấm chết góp phần hình thành mùn và tái chế vật liệu sinh học. Xạ khuẩn cũng có thể cố định nitơ trong các mối quan hệ cộng sinh với thực vật hoặc tham gia vào các tương tác phức tạp khác có liên quan đến sinh thái [2].

Đặc điểm nổi bật ở xạ khuẩn là tiềm năng sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp. Việc phát hiện ra kháng sinh đầu tiên có nguồn gốc từ xạ khuẩn (actinomycin) đã thúc đẩy việc phân lập chúng từ nhiều nguồn khác nhau. Kể từ "Thời đại hoàng kim" của việc khám phá kháng sinh (những năm 1940–1960), một số hợp chất kháng khuẩn và các hợp chất có giá trị khác đã được phát hiện từ xạ khuẩn. Các hợp chất này đã được phát triển thành các sản phẩm thương mại, bao gồm hóa chất nông nghiệp và dược phẩm. Do đó, xạ khuẩn là một trong những nguồn tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học quan trọng và phong phú nhất [3].

#### 1.1.2. Ứng dụng của xạ khuẩn

Xạ khuẩn tạo ra một số lượng đa dạng các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học, đáng chú ý là kháng sinh, hoạt tính chống ung thư, chống viêm và enzyme. *Streptomyces* là chi được phân lập phổ biến nhất của bộ Actinomycetales do tầm quan trọng to lớn của nó trong nhiều lĩnh vực khác nhau.

Xạ khuẩn có nhiều ứng dụng trong xử lý ô nhiễm môi trường với khả năng hoạt động như chất làm sạch môi trường thông qua việc giải phóng các enzyme tiềm năng và loại bỏ các chất gây ô nhiễm.

##### 1.1.2.1. Xạ khuẩn phục hồi sinh học

Xạ khuẩn có khả năng phân hủy sinh học hiệu quả, giúp xử lý các chất ô nhiễm như thuốc trừ sâu, xenobiotic, hydrocarbon dầu mỏ và kim loại nặng. Nhờ quá trình phân hủy các hợp chất phức tạp và sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học, chúng đóng vai trò quan trọng trong chu trình sinh địa hóa tự nhiên của kim loại.

Xạ khuẩn còn có khả năng phân hủy polymer phức tạp, giúp tái chế carbon hữu cơ trong môi trường. Theo một số nghiên cứu, các chủng *Streptomyces* có khả năng phân hủy hydrocarbon, sản xuất enzyme phân hủy cellulose và peroxidase, và chịu được môi trường nhiễm dầu. Do đó, xạ khuẩn là ứng viên tiềm năng trong việc xử lý sinh học đất ô nhiễm [4].

#### **1.1.2.2. Xạ khuẩn loại bỏ các chất ô nhiễm dầu trong môi trường**

Dầu thô là một chất lỏng tự nhiên, sệt và chứa khoảng 30% các hydrocarbon thơm đa vòng (PAH) - một hỗn hợp phức tạp với nhiều hợp chất khác nhau về khối lượng phân tử. Các PAH như naphthalene, acenaphthene, phenanthrene, fluoranthene và pyrene là các chất gây ô nhiễm được EPA (Cơ quan Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ) ưu tiên kiểm soát do tính chất gây ung thư, đột biến và dị tật bẩm sinh của chúng. PAH xuất hiện phổ biến trong môi trường và có thể tích tụ trong thực phẩm như ngũ cốc, dầu mỡ, rau củ. Do đó, việc loại bỏ PAH là một vấn đề quan trọng. Hiện nay, các chủng vi khuẩn và nấm có thể phân hủy PAH hiệu quả bằng phương pháp xử lý sinh học trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí [5].

Các chủng xạ khuẩn từ các chi như *Mycobacterium*, *Rhodococcus* và *Gordonia* có khả năng phân hủy các hydrocarbon thơm đa vòng (PAH) trong đất. Một số chủng xạ khuẩn mới như *Sphingomonas paucimobilis* BA2, *Gordonia sp.* BP9 và *Mycobacterium sp.* VF1 có thể sử dụng các hợp chất như anthracene, pyrene và fluoranthene làm nguồn carbon duy nhất, giúp phân hủy các PAH có cấu trúc từ ba đến bốn vòng. *Rhodococcus* và *Gordonia* được coi là có tiềm năng lớn trong việc xử lý các PAH trong môi trường đất và nước. *Rhodococcus erythropolis* và một số chủng khác còn có khả năng loại bỏ lưu huỳnh từ các hợp chất hữu cơ phức tạp, giúp giảm thiểu ô nhiễm không khí từ các sản phẩm đốt cháy nhiên liệu hóa thạch [6].

#### **1.1.2.3. Xạ khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu**

Tại Ấn Độ, với nhu cầu cao về thuốc trừ sâu để bảo vệ nông sản, các vi khuẩn như *Arthrobacter atrocyaneus* và *Bacillus megaterium* đã được sử dụng để phân hủy Monocrotophos (MCP) - một loại thuốc trừ sâu độc hại, với hiệu suất đến 93% và 83%. Một số vi khuẩn khác, như *Arthrobacter chlorophenolicus* và *Arthrobacter ureafaciens*, có khả năng phân hủy các chất ô nhiễm khó phân hủy như 4-chlorophenol và các hợp chất triazine từ thuốc trừ cỏ [7].

Ngoài ra, *Streptomyces spp.* VITDDK3 và *Rhodococcus chlorophenolicus* cũng có khả năng kháng kim loại nặng, phân hủy thuốc nhuộm và các hợp chất chứa clo thông qua enzyme. Các chủng *Streptomyces* khác như LS166, LS177 và LS182

có khả năng phân hủyalachlor - một loại thuốc diệt cỏ độc hại. Có thể thấy, các xạ khuẩn đóng vai trò quan trọng trong việc giảm thiểu ô nhiễm từ thuốc trừ sâu và các hợp chất xenobiotic, giúp bảo vệ môi trường đất, nước [7].

#### **1.1.2.4. Xạ khuẩn phân hủy thuốc nhuộm tổng hợp**

Các loại thuốc nhuộm tổng hợp, đặc biệt là nhóm azo, được sử dụng phổ biến trong ngành dệt may, gây ra lượng lớn nước thải màu, làm giảm nồng độ oxy hòa tan, cản trở quang hợp và gây ảnh hưởng xấu đến hệ sinh thái. Các loại thuốc nhuộm này rất khó xử lý tại các nhà máy xử lý nước thải.

Một số xạ khuẩn như *Streptomyces spp.* và *Thermobifida fusca* có khả năng phân hủy thuốc nhuộm thông qua các enzyme như lignin peroxidase, laccase và tyrosinase. *Streptomyces spp.* có thể phân hủy và khử màu các thuốc nhuộm như azo blue, azo orange và Reactive Blue-59 [8]. Ngoài ra, phương pháp hấp phụ bằng sinh khối chết của xạ khuẩn cũng được áp dụng để xử lý nước thải chứa thuốc nhuộm. Điều này góp phần quan trọng trong việc giảm thiểu tác động môi trường do nước thải từ ngành công nghiệp dệt may.

#### **1.1.3. Một số đặc điểm trong hệ gen của xạ khuẩn**

Kể từ khi giải trình tự toàn bộ bộ gen của chủng xạ khuẩn đầu tiên - *Streptomyces coelicolor* A3, hàng trăm bộ gen xạ khuẩn đã được giải trình tự và chú thích. Những dữ liệu này cho thấy các bộ gen mã hóa cho một số cụm gen sinh tổng hợp (BGC). Tuy nhiên, chỉ một số ít BGC được biểu hiện ở điều kiện phòng thí nghiệm tiêu chuẩn. Do đó, tiềm năng sinh tổng hợp của nhiều xạ khuẩn vẫn chưa được khai thác [9].

Việc nghiên cứu các đặc điểm và chú giải hệ gen xạ khuẩn đặc biệt là chi *Streptomyces* được tập trung nghiên cứu trên thế giới với số lượng genome đăng ký trên các cơ sở dữ liệu ngày càng tăng. Đến năm 2021 đã có hơn 1100 *Streptomyces* genome đã được xác định với các nền tảng giải trình tự như Illumina, 454, PacBio, và MinION [10, 11]. Mặc dù vậy, việc giải trình tự hoàn thiện hệ gen của *Streptomyces* vẫn là thách thức do độ lớn của hệ gen (6-12 Mbp), tỷ lệ G+C cao, các trình tự lặp lại và nhiễm sắc thể dạng thẳng của *Streptomyces* [10, 12]

Đặc điểm khác biệt nhất của hệ gen *Streptomyces* là mức độ mất ổn định nhiễm sắc thể cao, dẫn đến việc xóa và sắp xếp lại một cách tự phát và thường xuyên, đặc biệt là ở phần cuối của nhiễm sắc thể. Tính dễ thay đổi của nhiễm sắc thể này dẫn đến mức độ biến đổi cao trong các nhóm gen sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp

(smBGC), có thể thu được thông qua sao chép gen và chuyển gen ngang với vi khuẩn hoặc các loài *Streptomyces* khác [13].

Giải trình tự thế hệ mới (NGS) đã cách mạng hóa lĩnh vực này và cho phép tăng mạnh số lượng hệ gen được công bố của *Streptomyces* kể từ năm 2013. Theo cơ sở dữ liệu RefSeq, tổng cộng 1.749 hệ gen của *Streptomyces* đã được đăng ký kể từ ngày 6 tháng 2 năm 2020 và hơn 73% hệ gen đã được giải trình tự bằng các kỹ thuật NGS [10].

Dự đoán smBGC bằng cách sử dụng hệ gen cấp độ contig thường không phù hợp vì các gen trong smBGC thường được dự đoán sẽ phân tán ở một số contig khác nhau. Đảm bảo trình tự hệ gen *Streptomyces* hoàn thiện cao là một thách thức do độ chính xác thấp của các kỹ thuật giải trình tự hiện tại khi xử lý các trình tự lặp lại và G + C cao. Hơn nữa, do nhiễm sắc thể dạng thẳng nên rất khó để đánh giá sự hoàn chỉnh của hệ gen khi so sánh với các vi khuẩn khác có nhiễm sắc thể vòng. Vào năm 2016, tính đầy đủ của hệ gen của 653 hệ gen *Streptomyces* đã được phân tích bằng BUSCO, cho thấy khoảng 36% hệ gen của *Streptomyces* có độ hoàn thiện kém. Chỉ thị *Streptomyces* BUSCO được sử dụng trong phân tích đánh giá này chỉ bao gồm 40 gen và thực tế là số lượng gen sao chép đơn lẻ trong hệ gen *Streptomyces* hiện là 352, do đó tính đầy đủ của hệ gen *Streptomyces* đã được công bố cũng cần phải được đánh giá lại [10].

Ngoài tính hoàn chỉnh của việc lắp ráp hệ gen, chất lượng của trình tự hệ gen (nghĩa là chất lượng của các bases) cũng rất quan trọng để xác định smBGC, ở khía cạnh dự đoán trình tự mã hóa chính xác (CDS). Vì hầu hết các smBGC bao gồm các gen sinh tổng hợp lõi có kích thước dài (>5 kb) chứa các trình tự lặp lại, do đó, trình tự hệ gen không chính xác thường dẫn đến lỗi khung đọc trong quá trình dự đoán CDS trong các smBGC. Dự đoán CDS chính xác thường cải thiện chú thích chức năng của gen. Tuy nhiên, chú thích chức năng của hệ gen *Streptomyces* chất lượng cao vẫn tạo ra một lượng protein giả định đáng kể, do số lượng gen được xác thực bằng thực nghiệm trong cơ sở dữ liệu là có hạn. Khoảng 24% tổng số gen *S. clavuligerus* và 25% gen mã hóa smBGC được chú thích là gen chưa biết. Những chú thích chức năng không đầy đủ này đã cản trở việc khai thác hệ gen chính xác của smBGC và sự hiểu biết về sinh tổng hợp chất chuyên hóa thứ cấp. Việc cập nhật cơ sở dữ liệu smBGC thường xuyên và hiệu quả với sự hỗ trợ của các nghiên cứu hệ gen chức năng sẽ giảm thiểu những vấn đề này [10].

## **1.2. Giới thiệu chung về laccase**

### **1.2.1. Đặc điểm của laccase**

Laccase (EC 1.10.3.2, p-diphenol: dioxygen oxyoreductases) là các protein đa đồng sử dụng phân tử oxy để oxy hóa nhiều loại hợp chất thơm và không thơm bằng cơ chế phản ứng xúc tác gốc. Enzyme này tham gia vào khả năng gây bệnh, khả năng miễn dịch và hình thành hình thái của sinh vật và tham gia vào quá trình trao đổi chất của các chất hữu cơ phức tạp như lignin [14].

Laccase thuộc về một nhóm enzyme được gọi là blue-multicopper oxidase, bao gồm ascorbate oxidase thực vật, protein huyết tương động vật có vú ceruloplasmin và bilirubin oxidase, cùng nhiều loại khác [15].

Laccase là một trong số ít enzyme đã được nghiên cứu từ thế kỷ 19. Yoshida lần đầu tiên mô tả laccase vào năm 1883 từ dịch chiết của cây sơn mài Nhật Bản, *Rhus vernicifera*. Sau đó 13 năm, cả Bertrand và Laborde đều chứng minh laccase là một enzyme của nấm. Mặc dù cũng được tìm thấy ở các loài thực vật khác, côn trùng và vi khuẩn nhưng laccase chủ yếu có ở nấm với hơn 60 chủng nấm khác nhau thuộc Basidiomycetes, Ascomycetes và Deuteromycetes [16].

Đặc trưng với phổ oxy hoá rộng, độ đặc hiệu cơ chất thấp và dùng O<sub>2</sub> làm chất nhận điện tử, laccase cho thấy tiềm năng trong các quy trình xử lý sinh học như tẩy trắng sinh học, khử màu thuốc nhuộm, chế biến thực phẩm, vv... [17]

### 1.2.2. Cấu trúc của laccase

Ở dạng đơn phân, enzyme laccase có khối lượng phân tử dao động từ 50-130 kDa với hàm lượng carbohydrate 10-25% ở nấm và 20-45% ở thực vật. Laccase của nấm thường xuất hiện dưới dạng isoenzyme mà oligomer hóa để tạo thành phức hợp đa phân tử [14].

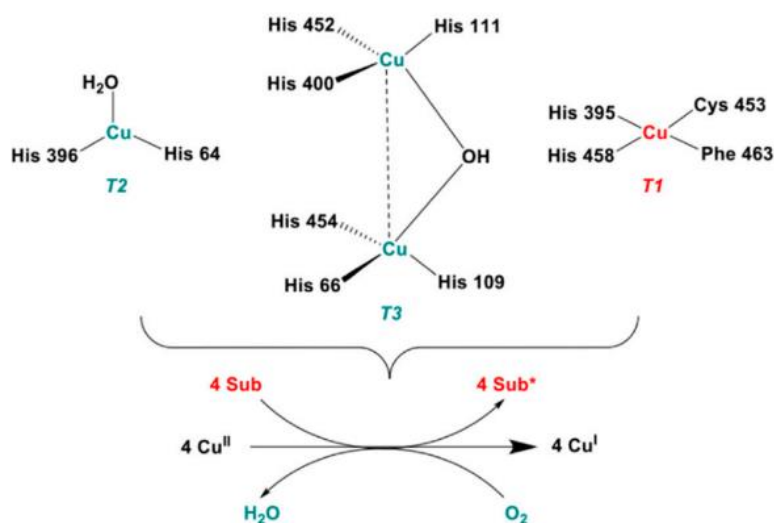
Mỗi loại sinh vật có thể tổng hợp nhiều loại enzyme laccase khác nhau (các isozyme). Các isozyme thường khác nhau về trình tự axit amin và thông số động học nhưng xúc tác cho cùng một phản ứng hóa học. Nấm đảm *Trametes hirsute* có đến 4 loại isozyme laccase với trọng lượng phân tử khác nhau không đáng kể nên có thể giả định rằng những biến đổi như vậy có liên quan đến quá trình glycosyl hóa khác nhau của các enzyme [18].

Phân tử laccase tồn tại ở dạng holoenzyme hoạt động, là một glycoprotein dimeric hoặc tetrameric thường chứa bốn nguyên tử đồng trên mỗi monome. Những nguyên tử đồng này được chia thành ba nhóm: loại I (T1), loại II (T2) và loại III (T3) dựa theo đặc tính quang phổ và thuận từ của chúng [19].

Nguyên tử đồng T1 liên kết cộng hoá trị với cysteine và hấp thụ quang ở bước sóng 610nm tạo ra màu xanh lục đặc trưng cho laccase. Cặp nguyên tử đồng T3 và



nguyên tử đồng T2 phối hợp với nhau bởi 8 histidine tạo thành cụm ba - nơi diễn ra quá trình khử oxy phân tử và giải phóng nước. Liên kết phản sắt từ mạnh giữa hai nguyên tử đồng T3 được duy trì bằng cầu hydroxyl [14, 20] (Hình 1.2).



Hình 1.2. Trung tâm hoạt động của laccase ở *Trametes versicolor* và các phản ứng được xúc tác trong chu trình oxi hóa khử [21]



Hình 1.3. Cấu trúc ba chiều của laccase ở *Melanocarpus albomyces* [22]

Miền A, B, C lần lượt kí hiệu đỏ, xanh lá cây, xanh dương

Cấu trúc ba chiều của enzyme laccase gồm 3 miền (A, B và C) (Hình 1.3). Trung tâm một nguyên tử đồng nằm hoàn toàn trong miền C và trung tâm ba nguyên tử đồng nằm ở bề mặt chung của miền A và C. Vị trí liên kết cơ chất nằm ở khe giữa

miền B và C. Phần lớn các laccase thông thường chứa ba miền cupredoxin tương tự nhau, chỉ có số ít laccase được tìm thấy bao gồm hai miền cupredoxin và cấu trúc ba chiều đã được xác định đều từ vi khuẩn [20].

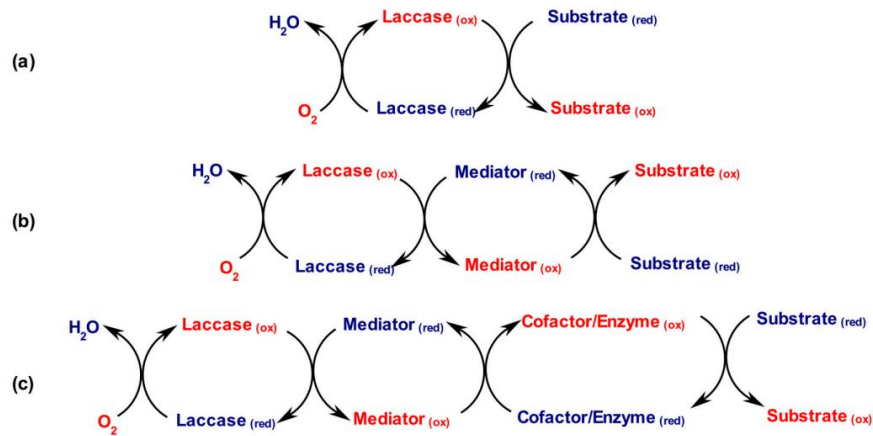
### 1.2.3. Cơ chế xúc tác của laccase

Cơ chế xúc tác của laccase bao gồm ba bước chính: 1. Khử nguyên tử đồng T1 bằng cách khử chất nền; 2. Sự chuyển electron bên trong từ nguyên tử đồng T1 sang cụm ba nguyên tử đồng T2 và T3; 3. Khử O<sub>2</sub> (thành nước) ở đồng T2 và T3 [16].

Cụ thể, laccase phản ứng oxy hóa chất khử bằng cách tách một electron qua trung gian T1 Cu<sup>2+</sup>. Kết quả là một gốc tự do (cation) được hình thành. Gốc này có thể tiếp tục trải qua quá trình oxy hóa được xúc tác bởi laccase (ví dụ: phenol thành quinone) hoặc các phản ứng không có enzyme (ví dụ: hydrat hóa hoặc trùng hợp).

Laccase hoạt động như một cực pin, lưu trữ các electron từ các phản ứng oxy hóa riêng lẻ nhằm khử oxy phân tử. Do đó, quá trình oxy hóa bốn phân tử cơ chất khử là cần thiết để khử hoàn toàn oxy phân tử thành nước. Mỗi electron được tách ra từ bốn quá trình oxy hóa đơn điện tử ở vị trí T1 được chuyển đến trung tâm ba nguyên tử đồng nơi O<sub>2</sub> liên kết. Do đó, vị trí T2 và T3 là vị trí xảy ra quá trình khử oxy phân tử và giải phóng nước [19].

Bên cạnh đó, có thể chia cơ chế xúc tác của laccase theo 3 kiểu chính (Hình 1.4). Khi cơ chất quan tâm có thể oxy hóa khử thích hợp, laccase có thể oxy hóa trực tiếp thành các gốc hữu cơ tương ứng (3a). Tuy nhiên, nếu các phân tử cơ chất "cồng kềnh" hoặc có thể khử cao thì cần sử dụng các chất hoá học trung gian. Các chất này sẽ tiếp xúc với trung tâm phản ứng của laccase và bị laccase oxy hóa thành dạng gốc tự do. Sau đó hợp chất hoá học trung gian ở dạng oxy hóa nhận một điện tử của cơ chất và trở thành dạng khử, tiếp tục tham gia vào chu kỳ xúc tác (3b). Ngoài ra hệ thống này cũng có thể được áp dụng để tái tạo các cofactor trong các phép biến đổi oxy hóa khử kết hợp đa enzyme (3c) [23].



Hình 1.4. Các kiểu xúc tác của laccase: (a) oxy hóa cơ chất trực tiếp; (b) oxy hóa cơ chất với sự tham gia của chất trung gian hóa học; (c) tái sinh cofactor kết hợp đa enzyme [21]

## 1.2.4. Nguồn thu nhận laccase

### 1.2.4.1. Laccase thực vật

Năm 1883, Yoshida phát hiện ra rằng loài đầu tiên có chứa laccase là cây sơn mài Trung Quốc *Rhus vernicifera*. Mười năm sau, Gabriel Bertrand đã phân lập được enzyme này từ *R. succedanea* và các loài thuộc họ Anacardiaceae [24].

Bligny và Douce (1983) đã phát hiện laccase trong dịch bài tiết của tế bào cây *A. pseudoplatanus*. Enzyme này cũng được tìm thấy trong các mạch gỗ của các loài *P. taeda*, *P. euramericana*, *N. tabaccum* và từ lá của cây *Aesculus parviflora* [25].

Trọng lượng phân tử của laccase thực vật thường dao động trong khoảng từ 60 đến 130 kDa với thành phần trung bình từ 500 đến 600 aa. Giá trị pH tối ưu chủ yếu thay đổi trong khoảng pH 5–7 và điểm đẳng điện (pI) nằm trong khoảng từ 5 đến 9,6; các enzyme được glycosyl hóa cao (22% – 45%) [26].

### 1.2.4.2. Laccase nấm

Hầu hết laccase được nghiên cứu là protein ngoại bào, mặc dù laccase nội bào đã được phát hiện ở một số loại nấm và côn trùng. Laccase của nấm có điểm đẳng điện (pI) nằm trong khoảng từ 3 đến 7, trong khi giá trị pI của laccase thực vật dao động đến 9. Sự khác biệt chính giữa hai enzyme là enzyme của nấm có độ pH tối ưu trong khoảng pH 3,6 và 5,2, trong khi laccase từ *Rhus vernicifera* có điểm đẳng điện, độ pH tối ưu trong khoảng từ 6,8 đến 7,4. Độ pH tối ưu của enzyme nấm có thể là do chúng thích nghi tốt để phát triển trong điều kiện axit, trong khi laccase thực vật nội bào có độ pH tối ưu gần với phạm vi sinh lý hơn [27].

Enzyme của nấm chịu trách nhiệm trong cơ chế loại bỏ phenol độc hại khỏi môi trường mà các loại nấm này phát triển trong điều kiện tự nhiên, trong khi enzyme thực vật tham gia vào quá trình tổng hợp như hình thành lignin [28].

Ngoài ra, laccase từ *M. albomyces* cho thấy khả năng chịu nhiệt cao và có độ pH tối ưu ở mức trung tính. Những đặc điểm này rất hiếm ở các loại laccase của nấm, khiến cho *M. albomyces* laccase trở thành một loại enzyme thú vị cho các ứng dụng khác nhau [22].

#### **1.2.4.3. Laccase vi khuẩn**

Enzyme có hoạt tính laccase được phát hiện lần đầu tiên ở *Azospirillum lipoferum* được phân lập từ rễ cây lúa vào năm 1993. Một số vi khuẩn sinh laccase điển hình như vi khuẩn Gram dương và Gram âm trong đất, vi khuẩn thủy sinh thuộc ngành  $\alpha$ - và  $\gamma$ -proteobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria, Aquificae và Deinococcus-Thermus, cũng như các thành viên của Archaea [29].

Protein CotA là laccase được biết đến nhiều nhất ở vi khuẩn *Bacillus*, như: *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*. Tuy nhiên, hầu hết các laccase và protein tương tự laccase được tìm thấy ở vi khuẩn đều hiện diện ở nội bào, chỉ có một số trực khuẩn và xạ khuẩn dạng sợi chứa laccase ngoại bào [30].

### **1.2.5. Ứng dụng của laccase**

#### **1.2.5.1. Công nghiệp thực phẩm**

Laccase có thể được sử dụng để loại bỏ các phenolic gây hoá nâu, hình thành bã và độ đục trong nước trái cây, bia và rượu vang. Ngoài ra còn được sử dụng để tăng cường hoặc sửa đổi màu sắc của thực phẩm hoặc đồ uống, cũng như để tạo liên kết chéo các biopolymer trong quá trình làm bánh [31].

Aflatoxin là chất chuyển hóa thứ cấp nguy hiểm của nấm thường xuyên gây hại cho cây trồng như ngô, gạo, lúa mì và đậu phộng. Aflatoxin được sản xuất bởi chi *Aspergillus* và có khả năng gây ung thư, do vậy ô nhiễm aflatoxin là mối lo ngại lớn về an toàn thực phẩm. Marco Zaccaria và cộng sự đã sử dụng laccase từ *Trametes versicolor* để xử lý sinh học aflatoxin, trong đó tập trung vào aflatoxin B1 (AFB1) và AFG2. Mặc dù còn nhiều hạn chế trong việc phân huỷ AFB1 nhưng nghiên cứu đã thu về kết quả khả quan với việc xử lý hoàn toàn AFG2 trong vòng 96h [32].

#### **1.2.5.2. Công nghiệp giấy và bột giấy**

Laccase có thể được sử dụng để thay thế các phương pháp tẩy trắng dựa trên clo bằng cách sử dụng hệ thống laccase-trung gian (LMS) để loại bỏ lignin trong bột

giấy. Bằng cách tạo ra các phân tử gốc trong lignin, laccase sửa đổi các sợi gỗ qua đó cải thiện tính chất cơ học và hóa học của các sản phẩm sợi [33].

Khả năng này có thể được sử dụng trong tương lai để gắn các hợp chất linh hoạt về mặt hóa học vào bề mặt sợi, có thể tạo ra vật liệu sợi có các đặc tính hoàn toàn mới như tính kỵ nước hoặc điện tích [19].

#### **1.2.5.3. Công nghiệp dệt may**

Laccase có thể được sử dụng để tẩy trắng và nhuộm các chất dệt, cũng như để khử màu và giảm độc tính của nước thải chứa thuốc nhuộm. Laccase cũng có thể được sử dụng để tổng hợp các chất màu mới bằng cách sử dụng các chất nền tự nhiên hoặc tổng hợp.

Nghiên cứu của Almeida và cộng sự đã sử dụng các phụ phẩm nông-công nghiệp như vỏ cà phê, bột citric trong sản xuất enzyme laccase từ nấm *Lentinus crinitus* để khử màu thuốc nhuộm và đem lại lợi ích kinh tế mang tính bền vững với môi trường. Kết quả thử nghiệm khả năng khử màu RBBR với chiết xuất enzyme cho kết quả lên tới 74.4-76% [34].

#### **1.2.5.4. Các ứng dụng khác**

Laccase có khả năng xúc tác cho các phản ứng chuyển điện tử mà không cần thêm các cofactor nên cũng đã được nghiên cứu sử dụng trong các cảm biến sinh học để phát hiện các hợp chất phenolic, oxy hoặc azide khác nhau. Micropatterning là một phương pháp hiệu quả để cố định laccase trên bề mặt rắn nhằm phát triển cảm biến sinh học đa chức năng. Việc cố định có ảnh hưởng quan trọng đến độ nhạy của cảm biến, đem lại hiệu quả cao.

Một nghiên cứu đã phân lập được các xạ khuẩn biến sinh laccase và kiểm tra khả năng đẩy nhanh tốc độ phân hủy sinh học của polyethylene bằng enzyme laccase trong 30 ngày cho thấy tỷ lệ phân hủy sinh học là 9,36%, cao hơn sáu lần so với tỷ lệ phân hủy sinh học của vật liệu không được xử lý [35].

Hydrocarbon thơm đa vòng (PAH) cùng với các xenobiotic khác là nguồn gây ô nhiễm chính trong đất, do đó, sự phân hủy của chúng có tầm quan trọng lớn đối với môi trường. Đặc tính xúc tác của laccase có thể được sử dụng để phân hủy các hợp chất đó.

#### **1.2.6. Khả năng loại màu thuốc nhuộm tổng hợp của laccase**

Laccase có thể xúc tác cho quá trình liên kết và trùng hợp các sản phẩm tạo ra từ quá trình khử màu thuốc nhuộm cũng như các anilin thay thế halogen, alkyl và

alkoxy khác nhau. Quá trình polyme hóa anilin bằng enzyme đã được nghiên cứu để loại bỏ các amin thơm và các hợp chất thơm khỏi nước thải. Các cấu trúc polyme được hình thành có thể kết tủa một cách tự nhiên khỏi dung dịch do độ hòa tan thấp và có thể được loại bỏ khỏi nước thải trong quá trình xử lý tiếp theo hoặc được tái sử dụng trong công nghiệp, tùy thuộc vào đặc tính của sản phẩm polyme được hình thành [36].

Các laccase được sử dụng nhiều nhất trong xử lý nước thải dệt có nguồn gốc từ nấm bởi hiệu quả cao. Tuy nhiên, hiện nay ứng dụng thương mại các laccase từ nấm để loại bỏ thuốc nhuộm từ nước thải bị hạn chế chủ yếu do nấm phát triển tương đối chậm và nguồn nitơ phải được kiểm soát [37].

Ngược lại với laccase nấm, laccase vi khuẩn khác phục được nhược điểm về tính không ổn định, thay vào đó hoạt động mạnh và ổn định hơn nhiều ở nhiệt độ và pH cao [38].

Laccase có thể tham gia vào quá trình loại màu hoặc phân hủy nhiều loại thuốc nhuộm có cấu trúc khác nhau với phổ cơ chất rộng. Tuy nhiên, một số chất màu không dễ bị oxy hóa hoặc chỉ bị oxy hóa một phần. Điều này có thể là do cấu trúc của chúng quá cồng kềnh hoặc do thế oxy hóa khử cao đến mức chúng không thể gắn kết với trung tâm hoạt động của laccase. Trong trường hợp này, laccase cần có chất môi giới để hoàn thành nhiệm vụ xúc tác. Đã được chứng minh rằng một số hợp chất có chứa vòng phenol tự nhiên, chẳng hạn như acetosyringone và syringaldehyde, có thể gắn kết laccase để thể hiện khả năng của nó trong loại màu thuốc nhuộm. Mặc dù khối lượng phân tử của những sản phẩm phân hủy nhỏ hơn, nhưng chúng vẫn độc tính so với hợp chất ban đầu [39].

Năm 2022, Lê Thị Kim Thoa và cộng sự đã nghiên cứu tiềm năng phân hủy thuốc nhuộm tổng hợp Malachite Green (MG) bằng enzyme laccase thô có nguồn gốc từ chủng nấm *Fusarium oxysporum* HUIB02. Bài báo cho thấy sau 20h ủ ở 40°C, enzyme thành công loại bỏ  $\geq 80\%$  màu MG. Bên cạnh đó khi bổ sung thêm các chất trung gian như syringaldehyde (SA), 1-hydroxybenzotriazole (HBT) và vanillin (VA) đã cải thiện quá trình phân hủy MG lên tới 99%. Đồng thời khi kiểm tra khả năng khử độc đã xác nhận việc vô hiệu hóa độc tính MG trên vi sinh vật sau khi xử lý bằng enzyme [40].

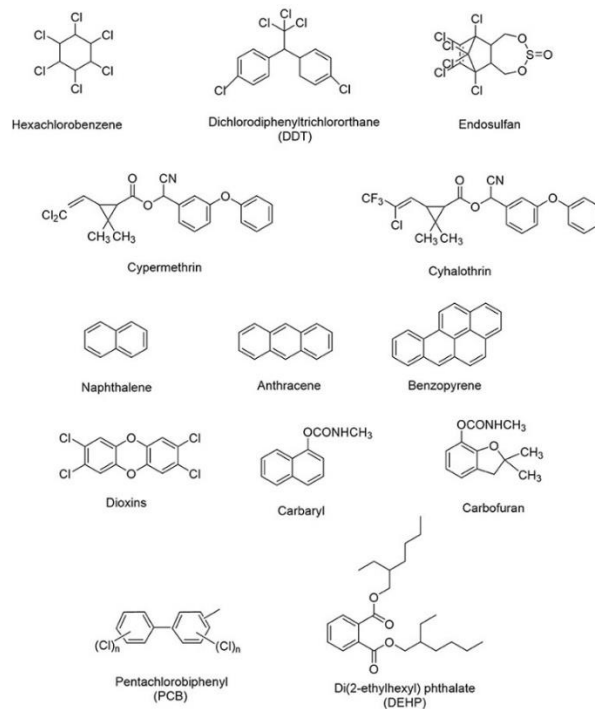
### **1.3. Giới thiệu chung về xenobiotic**

#### **1.3.1. Đặc điểm của các hợp chất xenobiotic**

Thuật ngữ 'xenobiotic' có nguồn gốc từ tiếng Hy Lạp, trong đó 'xeno' có nghĩa là kỳ lạ hoặc không tự nhiên và 'biotic' có nghĩa là liên quan đến sự sống. Nói cách khác, xenobiotic là các chất hóa học được tổng hợp nhân tạo, không được sản xuất tự nhiên và được sử dụng rộng rãi với khối lượng lớn cho mục đích công nghiệp, nông nghiệp và sinh hoạt [41]. Đây là những chất gây ô nhiễm môi trường và có thể gây ra tác động trực tiếp hoặc gián tiếp đến thực vật, động vật và con người.

### 1.3.2. Phân loại các hợp chất xenobiotic

Các hợp chất xenobiotic bao gồm nhiên liệu, dung môi, thuốc diệt cỏ, kháng sinh, alkane, polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), thuốc nhuộm azo tổng hợp, hợp chất polyaromatic, các chất ô nhiễm như polychlorinated biphenyl và dioxin, hợp chất clo hóa và hợp chất nitroaromatic [42]. Nguồn chính của hầu hết các chất độc xenobiotic là cặn rắn thải ra từ các ngành công nghiệp như hóa chất, nông nghiệp, nhựa, dược phẩm, công nghiệp giấy, dệt cùng với nước thải và các chất thải khác như hydrocarbon, phenol, thuốc trừ sâu, nước thải sơn, thuốc nhuộm, v.v.[43, 44]



Hình 1.1. Cấu trúc hoá học của một số hợp chất xenobiotic [45]

### 1.3.3. Ô nhiễm xenobiotic và các biện pháp xử lý

Các hợp chất xenobiotic như dioxin, 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT), polychlorinated biphenyl (PCB), polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) và nitroaromatic là mối đe dọa chính đối với hệ sinh thái đất của các quốc gia phát triển. Các hoạt động công nghiệp, đốt nhiên liệu, sử dụng thuốc trừ sâu, phân

bón và cải tạo đất trong các hoạt động nông nghiệp năng suất cao là nguyên nhân chính tạo ra các hợp chất xenobiotic độc hại và khó phân huỷ [46, 47].

Nước thải từ các hoạt động sản xuất công nghiệp là một trong những tác nhân chính gây nên ô nhiễm nguồn nước. Các hợp chất xenobiotic như PAH, phthalate hay thuốc nhuộm azo tổng hợp thường được phát hiện. Thông qua quá trình dẹt, 10-15% lượng thuốc nhuộm đã sử dụng tồn đọng trong nước thải gây ảnh hưởng trực tiếp đến hệ sinh thái nước, làm nước bị đổi màu và ngăn cản ánh sáng mặt trời đi qua. Ngoài ra sản phẩm phụ của quá trình khử liên kết azo trong thuốc nhuộm như các amin thơm có độc tính cao và có khả năng gây ung thư cho con người [48, 49].

Xenobiotic cũng gây ra các tác động lên động, thực vật như: ảnh hưởng đến các đặc điểm sinh lý và hình thái của cây trồng, thay đổi sinh lý ở động vật bằng cách thay đổi chức năng miễn dịch, chỉ số tim mạch hoặc cơ quan. Đặc biệt, con người tiếp xúc với nhiều loại xenobiotic, chẳng hạn như thuốc và các chất ngoại sinh không thiết yếu qua việc ăn, thở, tiếp xúc qua da hoặc bất kỳ phơi nhiễm qua đường tĩnh mạch đều có thể gây nguy hiểm cho sức khỏe [50].

Trước đây, nhiều phương pháp xử lý vật lý và hóa học khác nhau đã được nghiên cứu để xử lý xenobiotic như lọc, đông tụ, oxy hóa, kết tủa hóa học, hấp phụ, điện phân, ozon hóa và khử halogen. Những phương pháp này thường phức tạp và tốn kém khi thực hiện ở quy mô lớn. Bên cạnh đó còn thường tạo ra một lượng lớn bùn và các chất ô nhiễm độc hại thứ cấp [51].

Xử lý ô nhiễm xenobiotic bằng sinh học có thể khắc phục những nhược điểm của các phương pháp thông thường nhưng vẫn hiệu quả, thân thiện với môi trường và tiết kiệm chi phí. Phương pháp này tận dụng khả năng trao đổi chất của vi sinh vật để phân huỷ chất độc thành các sản phẩm vô hại, từ đó khôi phục môi trường. Quá trình xử lý sinh học hoàn toàn phụ thuộc vào vi khuẩn tấn công các chất độc bằng enzyme và chuyển hoá chúng thành các sản phẩm không độc hại [51].

#### **1.3.4. Các gen tham gia vào quá trình phân huỷ xenobiotic**

Các phương pháp tiếp cận dựa trên “omics” như: metagenomics, metatranscriptomics, metaproteomics,... được sử dụng nhiều trong những năm trở lại đây có thể giúp nghiên cứu hệ gen, sự phiên mã, các protein và quá trình chuyển hóa của các sinh vật đơn lẻ cũng như cộng đồng hỗn hợp, từ đó mở ra những cơ hội mới để giải mã các cơ chế phân tử của sự suy thoái xenobiotic trong môi trường bị ô nhiễm.



Vi khuẩn được biết đến với khả năng nhân lên nhanh chóng với số lượng lớn và chịu được các điều kiện môi trường khắc nghiệt. Các nghiên cứu về hệ gen gần đây của các chủng vi khuẩn tiêu hóa xenobiotic cho thấy chúng tiến hóa bằng cách tích lũy các gen để phá hủy xenobiotic [52].

Oxidoreductase có thể phân hủy các chất xenobiotic độc hại, chẳng hạn như thông qua quá trình trùng hợp, đồng trùng hợp với các cơ chất khác nhau hoặc liên kết với các chất humic. Trong đó, oxygenase chủ yếu được sử dụng để loại bỏ các hợp chất thơm. Ví dụ như De Menezes và cộng sự đã tìm ra sự tiếp xúc của các cộng đồng vi sinh vật đất với phenanthrene dẫn đến sự gia tăng phong phú bản sao các gen liên quan đến dioxygenase - phản ứng căng thẳng và giải độc [53].

Thomas C. Jeffries và cộng sự đã chứng minh *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Koribacter* và *Acidomicrobium* là những chi có nhiều nhất trong đất ô nhiễm thuốc trừ sâu. Nghiên cứu này cũng báo cáo sự phong phú của các gen mã hóa phosphodiesterase có vai trò quan trọng trong việc phân hủy photpho hữu cơ [54].

Fang và cộng sự đã nghiên cứu con đường phân hủy sinh học của thuốc trừ sâu khó phân hủy có trong hệ sinh thái trầm tích biển và nước ngọt. Báo cáo phân tích DNA metagenomic để xác định các gen phân hủy sinh học (BDGs) liên quan đến sự phân hủy của ba loại thuốc trừ sâu là DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane), HCH (hexachlorocyclohexane) và ATZ (atrazine). Kết quả cho thấy các gen *lip* và *mnp* mã hóa peroxidase và gen *carA* mã hóa laccase được phát hiện là các gen trội trong quá trình phân hủy các chất ô nhiễm hữu cơ. Đồng thời 69 chi được xác định có khả năng phân hủy các chất ô nhiễm hữu cơ chủ yếu liên quan đến *Proteobacteria* (49,3%) và *Actinobacteria* (21,7%) [55].

Phân tích metagenomic của một trầm tích ao bị nhiễm lindane được Negi và Lal thực hiện thông qua so sánh genomics. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy sự biến đổi gen có trong trầm tích ao với các enzyme phân hủy (hydrolase, isomerase, lyase và oxidoreductase) liên quan đến quá trình phân hủy sinh học của hexachlorocyclohexane và chlorobenzen (ko00361) và các hợp chất xenobiotic khác. Các gen liên quan đến quá trình chuyển hóa lindane, được làm giàu với trình tự *linA* và *linB*, cũng được tìm thấy trong metagenome trầm tích ao [56].

*Pseudomonas putida* có hoạt tính azoreductase đã được báo cáo là có khả năng loại bỏ thuốc nhuộm azo [57]. Russ và cộng sự (2000) đã báo cáo rằng flavinreductase từ chủng *Sphingomonas* sp. BN có liên quan đến sự phân hủy thuốc nhuộm azo [58]. Ngoài ra, một số enzyme oxy hóa trong vi khuẩn như lignin peroxidase, laccase và tyrosinase có liên quan đến quá trình khử màu và phân hủy thuốc nhuộm azo. Phương

pháp Metaproteomic được sử dụng bởi Xuejiao An và cộng sự đã chỉ ra sự điều hòa của 430 protein chủ yếu liên quan đến quá trình khử độc thuốc nhuộm azo Direct Black G, chẳng hạn như peroxidase, aldehyde dehydrogenase và oxidoreductase [59].

Vùng khởi động của gen mã hóa laccase chứa nhiều vị trí nhận biết khác nhau dành riêng cho xenobiotic và kim loại nặng. Các hợp chất xenobiotic và kim loại nặng này có thể liên kết với các vị trí nhận biết của gen khi có mặt trong môi trường, từ đó sản sinh laccase. Cho đến nay, phần lớn các laccase đặc trưng được lấy từ nấm. Tuy nhiên các gen mã hoá laccase được thể hiện rộng rãi trong hệ gen metagenome của vi khuẩn.

#### 1.4. Ứng dụng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới trong nghiên cứu genome

Trước đây, giải trình tự DNA hầu như chỉ được thực hiện bằng phương pháp Sanger, có độ chính xác tuyệt vời và độ dài đọc hợp lý nhưng thông lượng rất thấp. Giải trình tự Sanger đã được sử dụng để có được trình tự đồng thuận đầu tiên của hệ gen người [60] và trình tự lưỡng bội đầu tiên của cá thể người [61]. Ngay sau đó, hệ gen cá thể hoàn chỉnh thứ hai đã được giải trình tự bằng công nghệ thế hệ tiếp theo, đánh dấu hệ gen người đầu tiên được giải trình tự bằng công nghệ NGS mới [62].

Một số phương pháp NGS được phát triển gần đây cho phép giải trình tự DNA quy mô lớn hơn. Số lượng lớn trình tự đọc ngắn từ NGS đang tăng theo cấp số nhân. Hiện nay, có năm nền tảng NGS đang được thương mại hóa, bao gồm Roche GS-FLX 454 Genome Sequencer, Illumina Genome Analyzer, ABI SOLiD analyzer, Polonator G.007 và các nền tảng Helicos HeliScope. Các thiết bị NGS này tạo ra các chiều dài đọc base khác nhau, các tỷ lệ lỗi khác nhau và các cấu hình lỗi khác nhau so với dữ liệu giải trình tự Sanger và so với nhau. Các công nghệ NGS đã tăng tốc độ và khả năng xử lý thông lượng của giải trình tự DNA, do đó giảm đáng kể tổng chi phí giải trình tự [63].

Có nhiều ứng dụng cho NGS và các phương pháp mới đang liên tục được phát triển. Một trong số đó là ứng dụng trong nghiên cứu genome. Cụ thể là để xây dựng một hệ gen mới từ các sinh vật chưa biết, các nhà nghiên cứu sử dụng giải trình tự de novo với lắp ráp. Việc lắp ráp hệ gen de novo này đòi hỏi một công cụ gọi là "assembler". Assembler ghép các đoạn DNA bị phân mảnh lại với nhau giống như trò chơi xếp hình bằng cách căn chỉnh các vùng có chồng chéo để xây dựng trình tự hệ gen [64].

Các nghiên cứu đi đầu trong việc giải trình tự và phân tích hệ gen của *Streptomyces coelicolor* A3(2) [65] và *Streptomyces avermitilis* [66] cho thấy xạ

khuẩn sở hữu một lượng lớn các cụm gen sinh tổng hợp sản phẩm tự nhiên, do đó có tiềm năng tạo ra nhiều hợp chất hơn so với suy nghĩ trước đây. Điều này dẫn đến phương pháp tiếp cận "khai thác hệ gen" để khám phá sản phẩm tự nhiên, trong đó phân tích tin sinh học được sử dụng để ước tính khả năng sinh tổng hợp và tính mới của chất chuyển hóa tiềm năng của một sinh vật trước khi phân tích sâu rộng trong phòng thí nghiệm. Khai thác hệ gen của xạ khuẩn và các vi sinh vật khác giúp khám phá ra nhiều con đường sinh tổng hợp và chất chuyển hóa mới chưa được phát hiện [67].

Illumina HiSeq X Ten là nền tảng đầu tiên trên thế giới giải trình tự đầy đủ hệ gen người với giá dưới 1.000\$. Được thiết kế nhằm mục đích giải trình tự toàn bộ hệ gen của con người ở quy mô dân số, HiSeq X Ten có thể sắp xếp trình tự của hàng chục nghìn mẫu hàng năm với trình tự có độ bao phủ và chất lượng cao. Illumina HiSeq X Ten bao gồm 10 hệ thống giải trình tự thông lượng cực cao, mỗi hệ thống tạo ra tới 1,8 terabase (Tb) dữ liệu giải trình tự trong vòng chưa đầy ba ngày hoặc lên tới 600 gigabase (Gb) mỗi ngày trên mỗi hệ thống.

Các ứng dụng chính của HiSeq X Ten bao gồm giải trình tự toàn bộ hệ gen (WGS) ở quy mô dân số và nhiều dịch vụ khác hướng đến các dự án về y sinh và môi trường. Ngoài con người, hệ thống này đặc biệt thích hợp để phân tích các hệ gene phức tạp như của xạ khuẩn.

## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Bộ chủng gồm 30 chủng xạ khuẩn được lưu giữ tại phòng Công nghệ sinh học môi trường có nguồn gốc từ các mẫu đất thu thập tại khu vực sân bay quân sự cũ Aso, huyện A Lưới, Thừa Thiên Huế.
- Bảo quản và lưu trữ mẫu: tủ lạnh 4°C.

### 2.2. Hoá chất và dụng cụ

#### 2.2.1. Thiết bị

- Box cấy, cân phân tích, tủ nuôi, máy lắc, nồi khử trùng, lò vi sóng.
- Máy quang phổ UV- VIS 752.

#### 2.2.2. Dụng cụ

- Các loại pipet, ống đong, đĩa cấy, que cấy...
- Các loại bình tam giác 100ml, 250ml; chai trung tính 250ml, 500ml, 1000ml.

#### 2.2.3. Hoá chất

- Môi trường Gause (g/L): KNO<sub>3</sub> 2,6; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,45; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,56; NaCl 1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1; FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,01; Tinh bột 4.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là  $7 \pm 0,2$  ở 25°C

- Các loại màu thuốc nhuộm được sử dụng:

*Bảng 2.1. Tổng hợp các màu nhuộm được sử dụng và bước sóng tương ứng (nm)*

STT	Màu nhuộm	Bước sóng (nm)
1	Nova Yellow S3R	418,00
2	Megafix Turquoise BES	430,00
3	Nova Yellow FN2R	430,00
4	HT Drimaren Yellow CLRR	440,00
5	Sirius Direct Searlet BY	490,00
6	NY1	520,00
7	HT Drimaren Red CL5B	540,00

8	Megafix Red EBR	540,00
9	IN13	560,00
10	Terasil Red FBN	592,00
11	NY3	595,00
12	Direct Black CLS	600,00
13	NY5	600,00
14	Megafix Navy FBN XN5	602,00
15	Acid green 27	620,00
16	Nova Navy SG	620,00
17	Methyl Orange	620,00

- Các loại hoá chất, dung môi khác:
  - + ABTS (98% - Merck)
  - + Glycine, sodium acetate trihydrate,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$
  - + HCl đặc (37%), glacial acetic acid (99.7%).

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Phương pháp sàng lọc các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme laccase

Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Gause lỏng ở 30°C, lắc ở tốc độ 150 vòng/phút trong 10 ngày. Dịch nuôi cấy được thu nhận sau mỗi 24 giờ, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Lấy phần dịch nổi sau ly tâm để xác định hoạt độ enzyme laccase. Các chủng có hoạt độ enzyme laccase cao được sử dụng để tiến hành các bước nghiên cứu tiếp theo.

#### 2.3.2. Phương pháp xác định hoạt tính enzyme laccase

Hoạt độ laccase được xác định dựa trên sự oxy hóa ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) tạo thành hợp chất được hấp thụ ánh sáng mạnh tại bước sóng 420 nm. Hỗn hợp phản ứng chứa 1 mM ABTS, 20 mM đệm sodium acetate pH 3 và dịch enzyme. Hỗn hợp được đặt ở nhiệt độ phòng trong 2 phút và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 420nm [68].

Hoạt độ enzyme laccase được tính theo công thức:

$$U = \frac{(A_t - A_0) \cdot V_M \cdot 10^6 \cdot D_f}{V_E \cdot t \cdot \epsilon}$$

Trong đó:

U: Hoạt độ enzyme (U/L)

$\epsilon$ : Hệ số hấp thụ ánh sáng của sản phẩm

$V_M$ : Tổng thể tích phản ứng

$V_E$ : Thể tích enzyme

$A_t$ : Giá trị độ hấp thụ ánh sáng đo được tại thời điểm t

$A_0$ : Giá trị độ hấp thụ ánh sáng đo được tại thời điểm t = 0

$D_f$ : Độ pha loãng

t: Thời gian phản ứng

Chủng xạ khuẩn có hoạt độ enzyme laccase cao nhất được tuyển chọn cho bước tiếp theo.

### **2.3.3. Đánh giá khả năng loại màu thuốc nhuộm của dịch nuôi cấy các chủng xạ khuẩn tuyển chọn**

Tiến hành nuôi lỏng xạ khuẩn trong môi trường Gause ở 30°C, lắc ở tốc độ 150 vòng/phút từ 3-10 ngày để đạt hàm lượng enzyme laccase cao nhất. Dịch nuôi cấy được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Hỗn hợp phản ứng chứa 20 mM đệm sodium acetate pH 4, màu thuốc nhuộm (nồng độ 10 mg/L) và dịch laccase thô (nồng độ ban đầu 200 U/L). Hỗn hợp được đặt ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ và độ hấp thụ được đo ở bước sóng tương ứng với từng màu nhuộm (bảng 2.1) tại thời điểm 20 phút và 24 giờ để đánh giá khả năng khử màu. Mẫu đối chứng được thực hiện tương tự nhưng bổ sung dịch nuôi khử trùng thay thế cho dịch enzyme. Thí nghiệm được lặp lại 2 lần.

Khả năng khử màu được xác định như sau:

Khả năng khử màu (%) = ((Độ hấp thụ ban đầu) - (Độ hấp thụ cuối cùng))/(Độ hấp thụ ban đầu) × 100% [69].

### **2.3.4. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả loại màu thuốc nhuộm của chủng lựa chọn**

#### ***2.3.4.1. Khảo sát ảnh hưởng của pH đến khả năng loại màu***

Ảnh hưởng của các giá trị pH được nghiên cứu bằng cách sử dụng dung dịch đệm trong khoảng pH từ 2 đến 7 bao gồm đệm: glycine-HCL pH 2-3, Sodium acetate

pH 4-5, potassium phosphate pH 6-7 và với dịch enzyme và màu thuốc nhuộm trong phản ứng loại màu ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Mỗi phép đo được lặp lại 2 lần.

#### ***2.3.4.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ khả năng loại màu***

Trong phản ứng loại màu thuốc nhuộm, ảnh hưởng của nhiệt độ được nghiên cứu bằng cách khảo sát hiệu suất loại màu khi ủ dịch enzyme thô, đệm sodium acetate pH 4 và màu thuốc nhuộm ở các nhiệt độ khác nhau từ 30 đến 60°C trong 20 phút để tìm nhiệt độ thích hợp. Mỗi phép đo được lặp lại 2 lần.

#### ***2.3.4.3. Khảo sát ảnh hưởng của chất trung gian đến khả năng loại màu***

Một số chất trung gian đặc hiệu thường được sử dụng đối với enzyme laccase là: 1-hydroxybenzotriazole (HBT), syringaldehyde (SA), VIO. Hỗn hợp phản ứng bao gồm màu thuốc nhuộm (nồng độ 10 mg/L), chất trung gian (1 mM) và dịch laccase thô trong dung dịch đệm ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Đối chứng là hỗn hợp phản ứng tương tự nhưng không bao gồm chất trung gian. Mỗi phép đo được lặp lại 2 lần.

#### ***2.3.4.4. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất trung gian đối với hiệu quả loại màu***

Khảo sát ảnh hưởng của chất trung gian lựa chọn được từ thí nghiệm trước với nồng độ trong khoảng 10 - 1000  $\mu$ M. Hỗn hợp phản ứng bao gồm màu thuốc nhuộm (nồng độ 10 mg/L), chất trung gian (1 mM) và dịch laccase thô (40 U/ mL) trong dung dịch đệm ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Đối chứng là hỗn hợp phản ứng tương tự nhưng không bao gồm chất trung gian. Mỗi phép đo được lặp lại 2 lần.

### **2.3.5. Giải trình tự, phân tích chú giải các gen trong genome tham gia vào quá trình phân huỷ các hợp chất xenobiotic và loại màu thuốc nhuộm**

#### ***2.3.5.1. Phương pháp tách chiết DNA và giải trình tự hệ gen***

DNA tổng số của chủng lựa chọn được tách chiết theo hướng dẫn của bộ kit tách E.Z.N.A Bacterial DNA Kit. DNA tổng số sau đó được định lượng và xác định các chỉ số A260/280, A260/230 bằng máy đo quang phổ nanodrop. DNA genome đủ chất lượng và số lượng được giải trình tự bằng phương pháp paired-end trên nền tảng giải trình tự thế hệ mới Illumina HiSeqXten sequencing 150PE.

#### ***2.3.5.2. Đánh giá và tiền xử lý trình tự***

Dữ liệu giải trình tự thô được đánh giá chất lượng bằng phần mềm FastQC (Babraham Bioinformatics, 2023), sau đó được tinh sạch nhằm loại bỏ những đoạn trình tự có chất lượng thấp và độ dài ngắn, sử dụng phần mềm Trimmomatic [70].

### **2.3.5.3. Phân loại taxonomy dữ liệu giải trình tự**

Để đánh giá khả năng bị nhiễm của dữ liệu. Dữ liệu đọc trình tự được phân loại sử dụng công cụ Kraken2 [71] trên cơ sở dữ liệu miniKraken2 ver 2 (08/04/2022). Kraken2 là một công cụ phân loại dành cho các đoạn đọc DNA ngắn. Phần mềm sẽ kiểm tra các k-mers trong một trình tự đọc và truy vấn vào cơ sở dữ liệu của các k-mers đó. Cơ sở dữ liệu này chứa bản đồ gán nhãn của mọi k-mer trong thư viện hệ gen của Kraken tới tổ tiên chung thấp nhất (LCA) trong cây phân loại của tất cả các hệ gen chứa k-mer đó. Tập hợp các đơn vị phân loại LCA tương ứng với k-mers trong một trình tự đọc sau đó được phân tích để tạo một nhãn phân loại duy nhất cho trình tự.

### **2.3.5.4. Lắp ráp de novo hệ gen**

Dữ liệu sau tinh sạch được dùng để lắp ráp de novo hệ gen bằng phần mềm SPAdes (Galaxy version 3.12.0) với chỉ số k-mer được lựa chọn tự động. Hệ gen sau khi lắp ráp sẽ được đánh giá chất lượng dựa trên các tiêu chí: kích thước hệ gen tổng số, độ dài contig lớn nhất và chỉ số N50 bằng phần mềm QUAST.

### **2.3.5.5. Dự đoán gen và chú giải chức năng**

Hệ gen sau khi lắp ráp de novo được dự đoán gen và chú giải chức năng bằng phần mềm Prokka. Prokka là một phần mềm chú giải và xác định gen chuyên nghiệp và nhanh chóng dành cho hệ gen của sinh vật nhân sơ (prokaryotes). Prokka tích hợp các công cụ dự đoán và chú giải gen hiện có, bao gồm Prodigal, RNAmmer, Aragorn, SignalP, Infernal để có thể chú thích đầy đủ và tin cậy về trình tự hệ gen của vi khuẩn [72].

### **2.3.5.6. Xác định thông tin MLST**

Phân tích MLST (Multilocus sequence typing) được thực hiện bằng công cụ MLST typing. Hồ sơ MLST từ hệ gen của mỗi chủng được ánh xạ in silico bằng các trình tự marker có sẵn từ cơ sở dữ liệu PubMLST bằng phương pháp Pasteur nhằm xác định Sequence Type (ST) của mỗi chủng. PubMLST là cơ sở dữ liệu mở, tích hợp dữ liệu trình tự và thông tin về nguồn gốc và kiểu hình của hơn 100 loài và chi vi sinh vật khác nhau. PubMLST hiện bao gồm thông tin của 717,216 genomes và 980,981 isolates (11/2022).

## **2.3.6. Xử lý số liệu**

Các thí nghiệm được lặp lại 2 lần và sự khác biệt giữa các mẫu được xác định thông qua hàm T-test với  $p \leq 0,05$ .



## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ

### 3.1. Sàng lọc các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme laccase

Bộ chủng xạ khuẩn gồm 30 chủng khác nhau đem nuôi lỏng trong môi trường Gause ở 30°C, lắc ở tốc độ 150 vòng/phút trong 10 ngày. Dịch nuôi cấy được thu nhận sau mỗi 24 giờ, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Lấy phần nước trong của dung dịch sau ly tâm để xác định hoạt độ enzyme laccase.

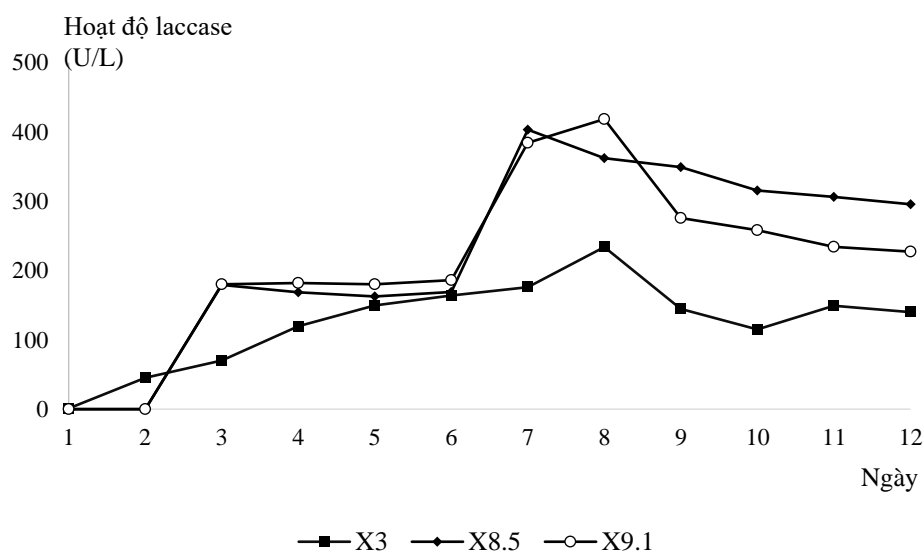
Kết quả hoạt độ enzyme laccase được xác định thông qua phản ứng màu với cơ chất ABTS được trình bày trong bảng 3.1. Phần lớn các chủng đều cho giá trị hoạt độ enzyme thấp (dưới 10 U/L) và không biến động trong quá trình thí nghiệm.

Qua tuyển chọn khả năng sinh tổng hợp enzyme laccase dựa vào phản ứng màu với cơ chất ABTS, thu được 3/30 chủng có hoạt độ enzyme cao trên 100 U/L lần lượt là X3, X8.5, X9.1, trong đó chủng X9.1 có hoạt độ cao nhất. Dựa vào Hình 3.2 thấy hoạt độ enzyme laccase của chủng xạ khuẩn X9.1 tăng dần và đạt cực đại vào khoảng ngày thứ 8 (418,75 U/L) và giảm dần ngay sau đó. Tương tự, 2 chủng X3 và X8.5 đều đạt giá trị hoạt độ enzyme cao nhất lần lượt vào ngày 8 (234,03 U/L) và ngày 7 (403,54 U/L), sau đó giảm dần. Do vậy, 3 chủng xạ khuẩn X3, X8.5 và X9.1 được lựa chọn cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

*Bảng 3.1. Kết quả hoạt độ enzyme laccase của 30 chủng xạ khuẩn trong 10 ngày nuôi cấy (U/L)*

Ngày Chủng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
X1.1	1,81	2,29	2,50	1,74	1,46	2,01	2,08	2,57	3,19	2,85
X1.2	1,74	2,15	1,88	1,74	2,64	1,53	1,32	1,67	1,39	1,60
X1.3	1,60	2,15	0,90	1,39	1,11	1,04	0,90	0,83	0,63	1,04
X1.4	1,39	1,60	1,18	1,04	0,97	0,97	0,56	0,83	0,83	1,74
X1.5	0,07	0,07	1,18	0,63	0,69	0,69	1,39	1,60	0,42	0,56
X1.6	0,00	0,07	1,11	0,35	0,76	0,69	1,39	2,29	4,03	3,82
X2	1,25	2,01	1,60	1,67	1,32	1,74	1,60	1,74	1,46	1,74
X3	1,04	45,14	70,49	119,79	149,65	164,24	176,04	234,03	144,44	115,28
X4	0,00	0,14	35,97	56,25	34,03	50,69	78,47	77,08	84,03	93,75

X5	0,07	0,14	1,74	1,32	1,60	1,74	2,71	2,50	2,50	2,50
X6	0,00	0,14	1,81	1,25	1,39	1,53	2,29	2,15	2,50	2,01
X7	0,07	0,14	1,88	1,67	1,67	1,88	3,19	2,57	2,36	2,08
X8.1	0,00	0,00	0,97	0,76	0,90	1,04	1,67	1,32	1,53	1,32
X8.2	0,07	0,07	1,67	1,32	1,25	1,67	2,78	2,22	2,15	1,94
X8.3	0,00	0,07	1,60	1,39	1,60	1,81	3,13	2,57	2,64	2,64
X8.4	0,00	0,00	1,04	0,83	0,76	0,76	0,90	0,56	0,63	0,63
X8.5	0,00	0,00	179,17	168,75	162,50	168,96	403,54	362,50	349,51	315,68
X9.1	0,00	0,00	180,21	182,29	180,21	186,46	384,38	418,75	275,96	258,33
X9.2	1,11	7,92	1,04	0,63	1,04	0,69	1,11	0,35	0,97	0,28
X10.1.1	1,11	3,06	1,81	1,74	1,67	2,50	3,54	4,65	5,76	7,99
X10.1.2	1,18	1,60	1,60	0,83	1,46	1,39	0,83	15,42	1,32	1,18
X10.2.1	0,56	0,56	0,07	0,35	0,28	0,28	0,00	0,00	0,42	0,00
X10.2.2	1,04	0,07	0,21	0,14	0,21	0,14	0,00	0,49	0,00	0,07
X10.3.1	1,74	2,99	2,71	3,61	2,22	2,01	2,57	1,32	2,15	2,57
X10.3.2	1,11	2,08	1,53	1,94	1,67	1,67	1,81	1,88	1,81	0,28
X10.3.3	0,07	0,07	2,36	2,22	1,74	1,88	30,07	64,65	62,29	47,22
X10.4.1	0,00	0,07	1,53	1,39	1,74	1,88	3,40	2,99	3,33	3,19
X10.4.2	0,00	0,21	2,36	2,15	2,43	2,50	3,82	2,85	3,06	2,50
X10.5	-0,07	0,14	2,08	1,74	1,94	2,15	3,26	2,92	3,13	2,29
X10.4.1'	1,18	2,15	1,53	1,67	2,08	1,81	1,60	1,53	1,60	1,46



Hình 3.1. Khả năng sinh tổng hợp laccase của 3 chủng lựa chọn trong 10 ngày nuôi cấy (U/L)

### 3.2. Đánh giá khả năng loại màu thuốc nhuộm của dịch nuôi cấy các chủng xạ khuẩn tuyển chọn

Tiến hành nuôi lỏng 3 chủng xạ khuẩn vừa sàng lọc được trong môi trường Gause trong 7-8 ngày để đạt hàm lượng enzyme laccase cao nhất tương ứng với mỗi chủng.

Dịch nuôi cấy của 3 chủng thu được sẽ đưa về nồng độ laccase 200 U/L và lần lượt tiến hành thí nghiệm loại màu với 17 màu thuốc nhuộm khác nhau (phụ lục 1). Với mỗi màu thuốc nhuộm tiến hành phân tích lặp lại hai lần, tính kết quả trung bình. Khả năng khử màu được thể hiện qua hiệu suất loại màu được tính toán theo công thức, hiệu suất càng cao thì có nghĩa là khả năng khử màu thuốc nhuộm đó càng tốt. Phản ứng loại 17 màu thuốc nhuộm của dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn X9.1 được

Các kết quả cho thấy cả 3 chủng xạ khuẩn đều có khả năng loại một số màu thuốc nhuộm khác nhau với hiệu suất loại màu sau 20 phút thấp hơn hẳn so với 24 giờ. Trong đó chủng X3 có khả năng loại màu thấp nhất với 5/17 màu thuốc nhuộm, hiệu suất loại màu cao nhất sau 24 giờ đối với màu IN13 (71,53%) và thấp nhất là 1,13% đối với màu Nova Navy SG. Bên cạnh đó, khả năng loại màu NY3 và NY5 là tương đương nhau với ~20%. Mặt khác, phần trăm loại màu tăng lên đáng kể sau 24 giờ ủ, cụ thể đối với màu IN13 tăng từ 14,86 lên 71,53%.

*Bảng 3.2. Kết quả đánh giá khả năng loại màu đối với 17 màu thuốc nhuộm của chủng X3 (%)*

STT	Màu nhuộm	Bước sóng (nm)	Hiệu suất loại màu sau 20 phút (%)	Hiệu suất loại màu sau 24 giờ (%)	Thay đổi màu sắc
1	Nova Yellow S3R	418	0	0	Không thay đổi
2	Megafix Turquoise BES	430	0	0	Không thay đổi
3	Nova Yellow FN2R	430	0	0	Không thay đổi
4	HT Drimaren Yellow CLRR	440	0	0	Không thay đổi
5	Sirius Direct Searlet BY	490	0	0	Không thay đổi
6	NY1	520	2,15	48,98	Nhạt màu
7	HT Drimaren Red CL5B	540	0	0	Không thay đổi
8	Megafix Red EBR	540	0	0	Không thay đổi
9	IN13	560	14,86	71,53	Nhạt màu
10	Terasil Red FBN	592	0	0	Không thay đổi
11	NY3	595	2,33	26,90	Nhạt màu
12	Direct Black CLS	600	0	0	Không thay đổi
13	NY5	600	0	20,31	Nhạt màu
14	Megafix Navy FBN XN5	602	1,64	0	Không thay đổi
15	Acid green 27	620	0	0	Không thay đổi
16	Nova Navy SG	620	0	1,13	Không thay đổi
17	Methyl Orange	620	0	0	Không thay đổi

*Bảng 3.3. Kết quả đánh giá khả năng loại màu đối với 17 màu thuốc nhuộm của chủng X8.5 (%)*

STT	Màu nhuộm	Bước sóng (nm)	Hiệu suất loại màu sau 20 phút (%)	Hiệu suất loại màu sau 24 giờ (%)	Thay đổi màu sắc
1	Nova Yellow S3R	418	0	39,72	Nhạt màu
2	Megafix Turquoise BES	430	0	0	Không thay đổi
3	Nova Yellow FN2R	430	25,27	28,52	Nhạt màu
4	HT Drimaren Yellow CLRR	440	0	0	Không thay đổi
5	Sirius Direct Searlet BY	490	0	0	Không thay đổi
6	NY1	520	20,81	37,56	Nhạt màu
7	HT Drimaren Red CL5B	540	0	16,59	Nhạt màu
8	Megafix Red EBR	540	0	16,05	Nhạt màu
9	IN13	560	51,81	68,33	Nhạt màu
10	Terasil Red FBN	592	1,39	1,74	Nhạt màu
11	NY3	595	12,29	71,25	Nhạt màu
12	Direct Black CLS	600	0	13,65	Nhạt màu
13	NY5	600	0	35,71	Nhạt màu
14	Megafix Navy FBN XN5	602	9,00	16,24	Nhạt màu
15	Acid green 27	620	0	30,85	Nhạt màu
16	Nova Navy SG	620	0	4,25	Nhạt màu

17	Methyl orange	620	0	6,03	Nhạt màu
----	---------------	-----	---	------	----------

*Bảng 3.4. Kết quả đánh giá khả năng loại màu đối với 17 màu thuốc nhuộm của chủng X9.1 (%)*

STT	Màu nhuộm	Bước sóng (nm)	Hiệu suất loại màu sau 20 phút (%)	Hiệu suất loại màu sau 24 giờ (%)	Thay đổi màu sắc
1	Nova Yellow S3R	418	0	65,60	Nhạt màu
2	Megafix Turquoise BES	430	0	0	Không thay đổi
3	Nova Yellow FN2R	430	24,01	27,62	Nhạt màu
4	HT Drimaren Yellow CLRR	440	0	0	Không thay đổi
5	Sirius Direct Searlet BY	490	0	0	Không thay đổi
6	NY1	520	16,97	31,56	Nhạt màu
7	HT Drimaren Red CL5B	540	0	16,59	Nhạt màu
8	Megafix Red EBR	540	0	17,21	Nhạt màu
9	IN13	560	44,31	58,06	Nhạt màu
10	Terasil Red FBN	592	0	2,43	Nhạt màu
11	NY3	595	13,51	70,76	Nhạt màu
12	Direct Black CLS	600	10,53	12,76	Nhạt màu
13	NY5	600	0	37,28	Nhạt màu
14	Megafix Navy FBN XN5	602	6,43	12,03	Nhạt màu
15	Acid green 27	620	0	0	Không thay đổi
16	Nova Navy SG	620	0	4,53	Nhạt màu
17	Methyl orange	620	0	7,76	Nhạt màu

Với cùng điều kiện phản ứng, dịch laccase thô của chủng X8.5 và X9.1 cho khả năng loại màu tốt hơn hẳn so với chủng X3 sau 24 giờ. Cụ thể, chủng X8.5 cho khả năng loại được 15/17 màu thuốc nhuộm và chủng X9.1 loại 13/17 màu thuốc nhuộm.

Đối với chủng X8.5, sau 24 giờ hiệu suất loại màu cao nhất đối với màu NY3 là 71,25% và tỷ lệ này thấp hơn một chút đối với IN13 (68,33%), các màu còn lại cho hiệu suất loại màu thấp hơn 50%. Khi so sánh phần trăm loại màu giữa hai thời điểm sau 20 phút và 24 giờ, nhận thấy không có sự thay đổi đáng kể đối với màu IN13 (51,81 và 68,33%). Ngược lại, tỷ lệ loại màu NY3 tăng tới gần 60% sau 24 giờ phản ứng.

Kết quả bảng 3.4 cho thấy tỷ lệ loại màu NY3 của chủng X9.1 là cao nhất với 70,76%. Hiệu suất loại màu Nova Yellow S3R và IN13 thấp hơn một chút lần lượt là 65,6 và 58,06%, trong khi ở các màu còn lại tỷ lệ này đạt dưới 50%. Tương tự với chủng X8.5, hiệu suất loại màu NY3 và Nova Yellow S3R ở chủng X9.1 sau 24 giờ

cao hơn từ 60 - 70% so với thời điểm 20 phút từ lúc tiến hành thí nghiệm. Đồng thời không có sự khác biệt đáng kể trong số liệu giữa 2 thời điểm đo đối với màu IN13.

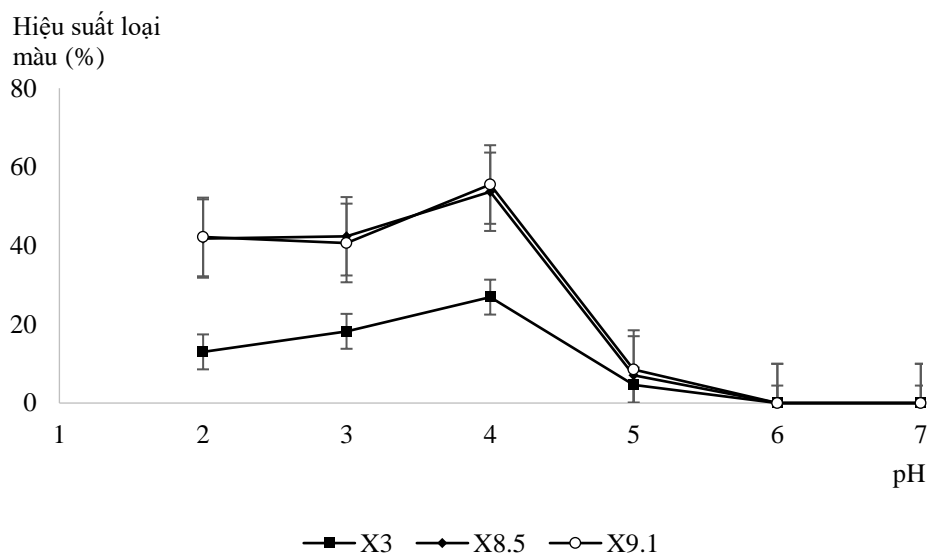
Tóm lại, cả ba chủng xạ khuẩn đều cho khả năng loại màu lên tới hơn 70% sau 24 giờ đối với một số màu thuốc nhuộm như IN13, NY3 hay Nova Yellow S3R. Tuy nhiên đối với thời điểm 20 phút, hiệu suất loại màu là khá thấp. Do vậy, bước tiếp theo của thí nghiệm là tiến hành tối ưu các điều kiện phản ứng để tăng hiệu suất loại màu sau 20 phút của ba chủng xạ khuẩn đối với 2 màu thuốc nhuộm là IN13 và NY3.

### 3.3. Tối ưu điều kiện phản ứng loại màu thuốc nhuộm đối với ba chủng lựa chọn

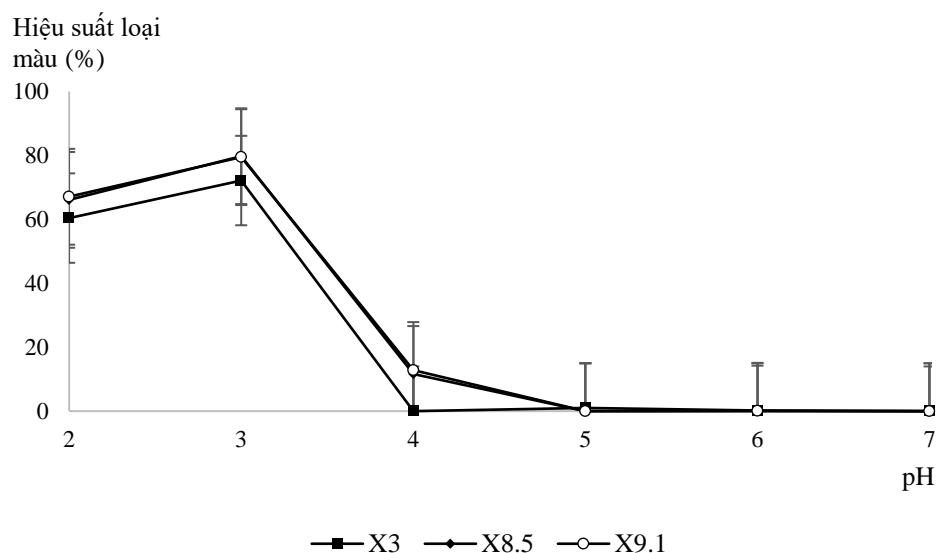
#### 3.3.1. Ảnh hưởng của pH đến hoạt động của enzyme

Xét về tốc độ tăng trưởng chung và khả năng thích nghi với môi trường, vi khuẩn có khả năng sinh sôi nhanh và thích nghi với độ pH từ thấp tới cao. Đối với enzyme laccase, pH tối ưu thường dao động trong khoảng 3,0 - 7,0. Khi pH nằm ngoài khoảng tối ưu này thì cấu trúc của enzyme có thể bị biến đổi, làm giảm hoạt tính của enzyme.

Ảnh hưởng của pH đến hoạt động enzyme laccase của ba chủng xạ khuẩn được khảo sát trong khoảng từ 2,0 - 7,0, lấy kết quả sau 20 phút. Kết quả được thể hiện trong hình 3.2 và 3.3.



Hình 3.2. Khảo sát ảnh hưởng của pH trong phản ứng loại màu IN13



Hình 3.3. Khảo sát ảnh hưởng của pH trong phản ứng loại màu NY3

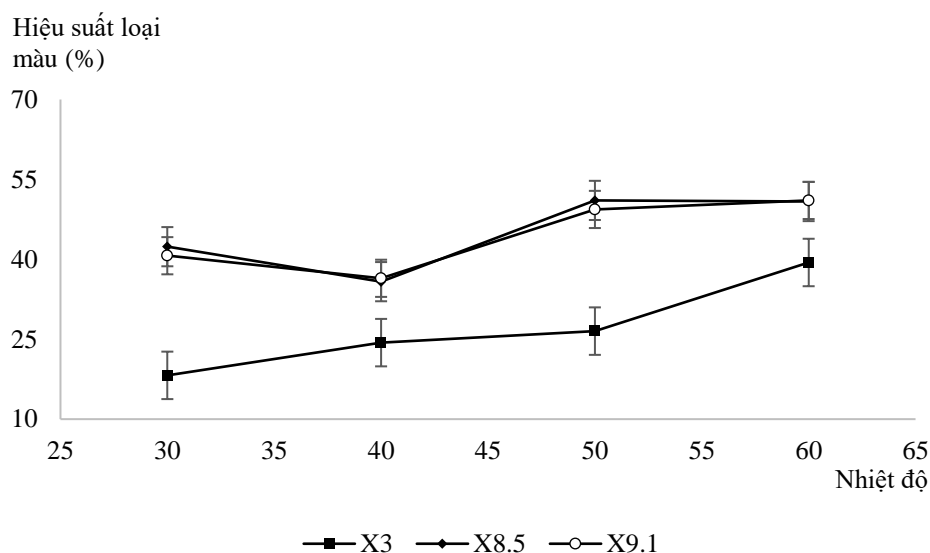
Nhìn chung, môi trường acid pH thấp cho khả năng loại màu tốt nhất, cụ thể là nằm ở giá trị 4,0 đối với màu IN13 và 3,0 đối với màu NY3. Trước hết, hiệu suất loại màu IN13 của chủng X9.1 ở pH 4,0 đạt 55,52%, đồng nhất với kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng loại màu ban đầu. Ngược lại, hiệu suất loại màu NY3 của ba chủng X3, X8.5, X9.1 tăng lên đáng kể ở pH 3,0; lần lượt đạt 72,14; 79,77 và 79,47%, cao hơn so với thí nghiệm ban đầu tại pH 4,0.

Điều này có sự khác biệt với các nghiên cứu trước đây cho thấy khoảng pH tối ưu cho hoạt động của enzyme laccase đối với quá trình phân huỷ các loại thuốc nhuộm tổng hợp là 4.0 - 7.0.

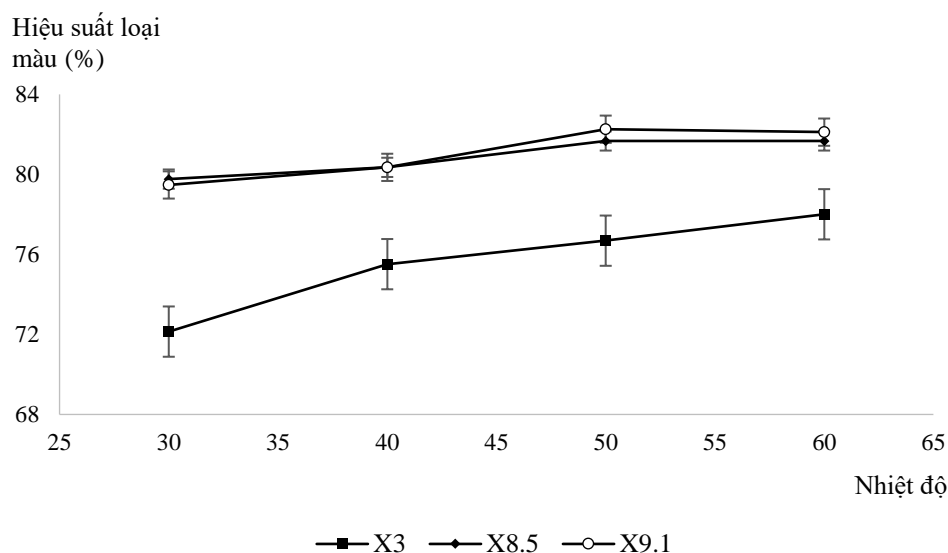
### 3.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động của enzyme

Nhiệt độ cũng là một trong các yếu tố quan trọng ảnh hưởng trực tiếp tới hiệu quả hoạt động của enzyme laccase trong quá trình xử lý màu nhuộm. Những nghiên cứu trước đây đã chỉ ra nhiệt độ tối ưu cho enzyme laccase từ xạ khuẩn thường nằm trong khoảng từ 40 đến 50°C. Do đó khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất loại màu thuốc nhuộm của chủng xạ khuẩn X3, X8.5 và X9.1 đã được tiến hành trong khoảng từ 30 đến 60°C, pH 3 và thời gian khảo sát là 20 phút.

Kết quả thu được cho thấy, cả X8.5 và X9.1 đều đạt hoạt tính cao nhất tại 50°C và 60°C đối với cả 2 màu thuốc nhuộm. Đồng thời, không có sự khác biệt rõ ràng khi tăng nhiệt độ phản ứng từ 50°C đến 60°C. Như vậy, nhiệt độ 50°C là nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của enzyme laccase thu được từ 2 chủng này với hiệu suất loại màu IN13 và NY3 lần lượt ~50 và 82%.



Hình 3.4. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ trong phản ứng loại màu IN13



Hình 3.5. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ trong phản ứng loại màu NY3

Chủng X3 có chiều hướng khác biệt với hoạt tính enzyme tăng dần theo nhiệt độ phản ứng và đạt cao nhất ở 60°C. Trong khoảng nhiệt độ 30 - 60°C, hiệu suất loại màu của chủng X3 tăng từ 18,22% lên 39,41% với màu IN13 và tăng nhẹ từ 72,14% lên 78,01%.

Như vậy, X8.5 và X9.1 bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ tương đương nhau, trong khi X3 có nhiệt độ tối ưu cao hơn. Đồng thời khi so sánh với những công bố trước đó không có sự khác biệt quá lớn.



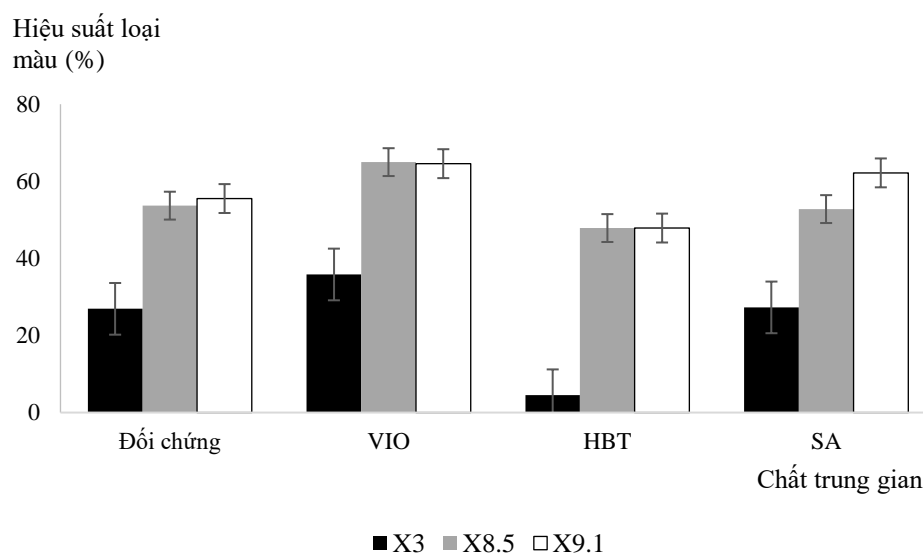
### 3.3.3. Ảnh hưởng của chất trung gian đến hoạt động của enzyme

Các chất trung gian đóng vai trò quan trọng trong việc mở rộng phạm vi các chất nền mà enzyme laccase có thể oxy hoá. Nghiên cứu tiến hành khảo sát một số chất trung gian thường dùng như 1-hydroxybenzotriazole (HBT), syringaldehyde (SA), VIO ở nồng độ 1000  $\mu\text{M}$  với đệm pH 4 trong thời gian 20 phút. Một số hình ảnh trong tối ưu phản ứng loại màu thuốc nhuộm với các chất trung gian được thể hiện chi tiết trong phụ lục 2.

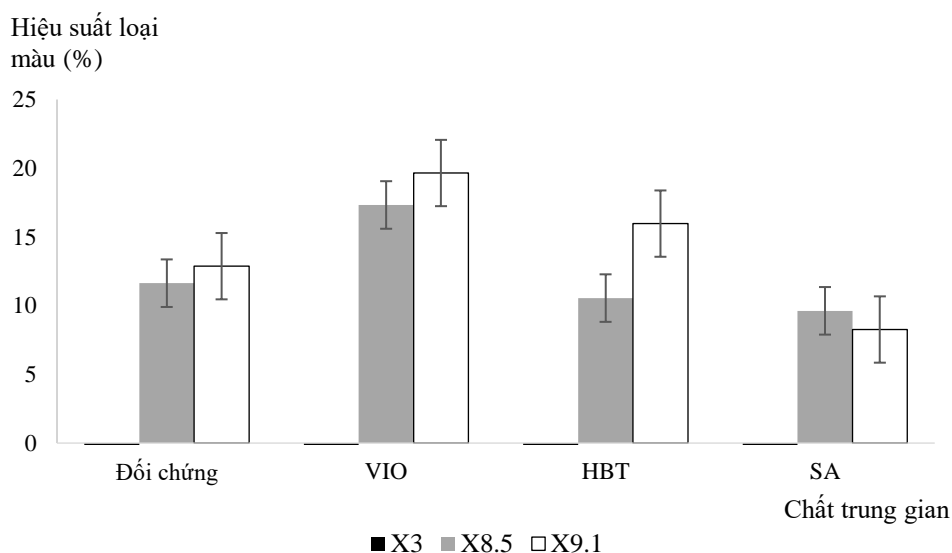
Kết quả cho thấy, VIO là chất trung gian hiệu quả nhất, giúp tăng cường hiệu suất loại màu của enzyme laccase. Đối với màu IN13, việc bổ sung VIO giúp hiệu suất khử màu tăng lên khoảng 10%. Tuy nhiên tỷ lệ này chỉ khoảng 0-5% với màu nhuộm NY3.

Như vậy có thể thấy, mặc dù việc bổ sung chất trung gian VIO có tác dụng cải thiện hoạt động của enzyme laccase, nhưng không có thay đổi lớn khi so sánh với mẫu đối chứng. Do vậy cần tiến hành khảo sát nồng độ chất trung gian VIO để tối ưu hoạt động của enzyme từ các chủng xạ khuẩn lựa chọn.

Tại Việt Nam, một số nghiên cứu trước đây cũng cho thấy VIO là chất trung gian hiệu quả nhất được sử dụng để loại màu thuốc nhuộm.



Hình 3.6. Khảo sát ảnh hưởng của chất trung gian trong phản ứng loại màu IN13



Hình 3.7. Khảo sát ảnh hưởng của chất trung gian trong phản ứng loại màu NY3

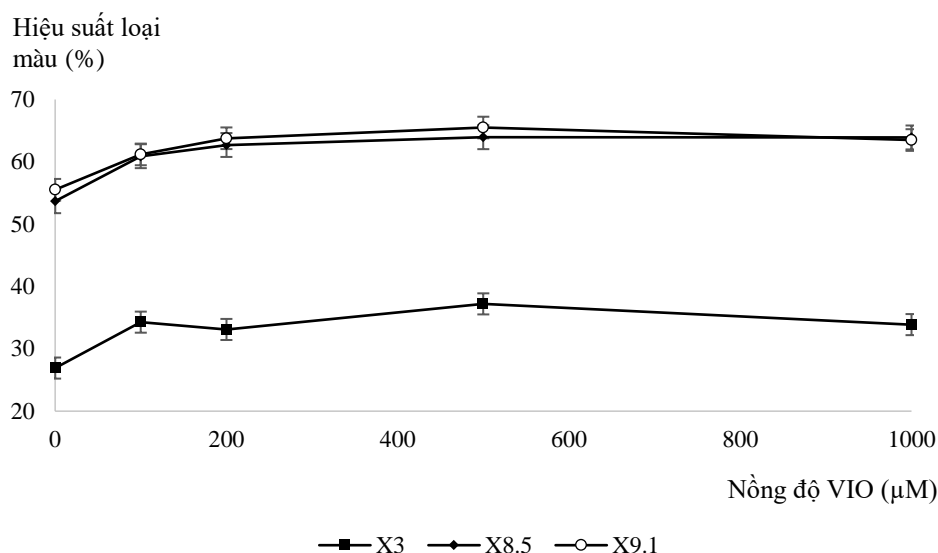
### 3.3.4. Ảnh hưởng của nồng độ chất trung gian đối với hoạt động enzyme

Tiến hành thí nghiệm loại màu với dịch laccase thô của ba chủng xạ khuẩn nhưng bổ sung thêm chất trung gian VIO với nồng độ trong khoảng từ 0 - 1000  $\mu\text{M}$  và đo ở thời điểm 20 phút, lặp lại thí nghiệm hai lần.

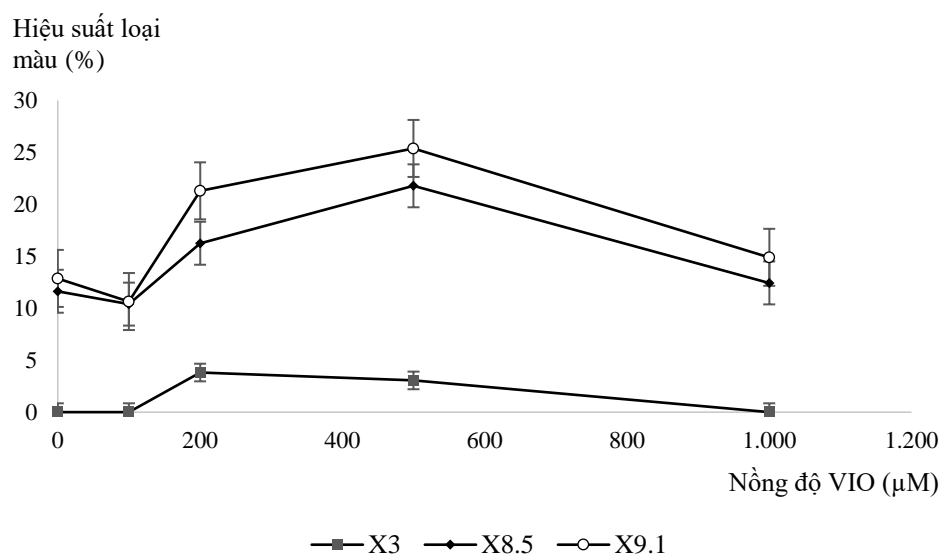
Kết quả thu được ở Hình 3.8 và 3.9 cho thấy chủng X8.5 và X9.1 có hiệu suất loại hai màu tương tự nhau. Cụ thể, hiệu suất loại màu IN13 và NY3 đạt cực đại tại nồng độ VIO 500  $\mu\text{M}$ , sau đó giảm khi tăng lên 1000  $\mu\text{M}$  VIO.

Chủng X3 có hiệu suất loại màu IN13 cao nhất tại nồng độ VIO 500  $\mu\text{M}$ , tuy nhiên đối với màu NY3, chỉ cần 200  $\mu\text{M}$  VIO đã cho hiệu suất loại màu cực đại.

Như vậy, việc thay đổi nồng độ VIO không đem lại hiệu quả rõ rệt về hiệu suất loại màu so với việc không bổ sung chất trung gian trong phản ứng. Tuy nhiên, sự khác biệt này vẫn có tính chất thống kê nên nồng độ VIO 500  $\mu\text{M}$  là nồng độ tối ưu đối với cả hai màu ở chủng X8.5 và X9.1. Với chủng X3, nồng độ tối ưu cho loại màu IN13 và NY3 lần lượt là 500 và 200  $\mu\text{M}$  VIO.



Hình 3.8. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ VIO trong phản ứng loại màu IN13



Hình 3.9. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ VIO trong phản ứng loại màu NY3

### 3.4. Các đặc điểm hệ gen chủng xạ khuẩn X3

#### 3.4.1. Đánh giá và tiền xử lý trình tự

Dữ liệu trình tự hệ gen của chủng XAS3 được giải trình tự bằng phương pháp Paired-end với nền tảng giải trình tự Illumina HiSeqXten sequencing 150PE. Các thông tin về dữ liệu ban đầu được trình bày ở bảng 3.5.

Bảng 3.5. Thông tin dữ liệu thô

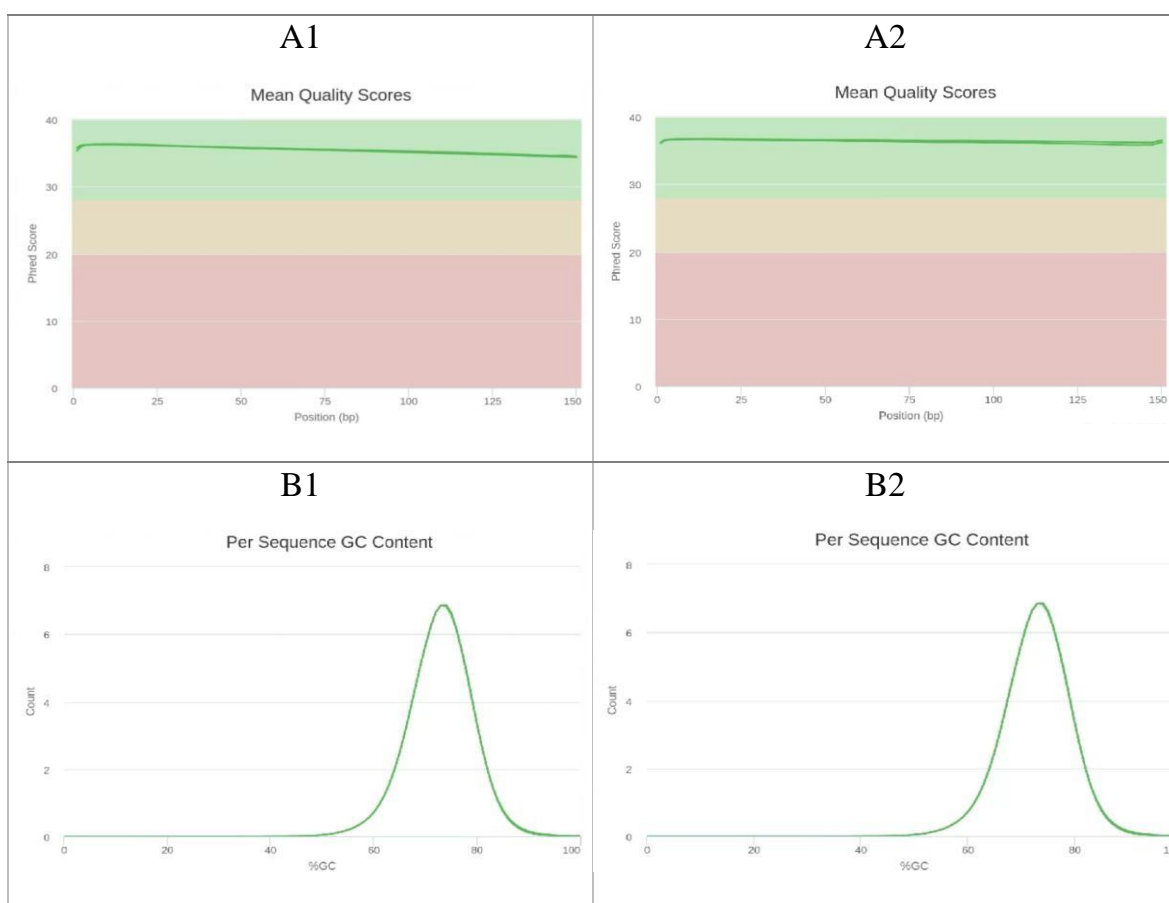
Mẫu	Tổng số trình tự	%GC trước tinh sạch
X3	5,994,003	72%

Kết quả kiểm tra chất lượng dữ liệu thô bằng FastQC cho thấy chất lượng dữ liệu đọc hai chiều với điểm chất lượng trung bình đều trên 30. Tổng dữ liệu reads là 5,994,003. Về sự phân bố %GC trung bình theo số lượng reads, không thấy có sự bất thường do chỉ tồn tại một đỉnh GC. Không phát hiện dữ liệu có trình tự adapter cần tinh sạch.

Sau đó, các trình tự ngắn và các trình tự adapter bị nhiễm trong dữ liệu thô được loại bỏ bằng công cụ Trimmomatic. Các vị trí trong read có chất lượng nhỏ hơn 25 và các read có độ dài nhỏ hơn 70bp sẽ bị loại bỏ. Kết quả sau khi cắt được trình bày ở bảng 3.6.

*Bảng 3.6. Thông tin dữ liệu sau tinh sạch*

Mẫu	Số trình tự	%GC	Độ dài reads
X3_forward	4,644,235	71%	70-150
X3_reverse	4,644,235	72%	70-150



*Hình 3.10. Chất lượng dữ liệu trước và sau tinh sạch*

*A1: Điểm chất lượng trung bình trước tinh sạch; A2: Điểm chất lượng trung bình sau tinh sạch; B1: Tỷ lệ %GC trước tinh sạch; B2: Tỷ lệ %GC sau tinh sạch*

### 3.4.2. Kết quả lắp ráp hệ gen

Hệ gen sau đó được lắp ráp sử dụng công cụ SPAdes với các tham số mặc định. Các contig kích thước dưới 500bp được loại bỏ khỏi bản lắp ráp. Kết quả lắp ráp hệ gen được đánh giá bởi phần mềm QUAST. Các thống kê chất lượng hệ gen lắp ráp được trình bày trong Bảng 3.7. Chiều dài tích lũy các contigs của hệ gen X3 và độ phủ sâu của các contigs được thể hiện trong phụ lục 3.

*Bảng 3.7. Kết quả đánh giá chất lượng lắp ráp*

Mẫu	Số contigs	Kích thước hệ gen	Contig lớn nhất	GC (%)	N50
X3	139	9,738,355	538,030	72.15%	163,278

Kết quả đánh giá cho thấy mẫu X3 được lắp ráp với chất lượng tốt (Số lượng contig ít, kích thước hệ gen phù hợp và chỉ số N50 lớn). Kết quả này có sự khác biệt không lớn so với kích thước hệ gen và tỉ lệ GC đã công bố của các loài tham chiếu tương ứng đã công bố trên NCBI (Bảng 3.8).

*Bảng 3.8. Thông tin hệ gen tham chiếu trên NCBI*

NCBI reference	Kích thước hệ gen (Mb)	GC (%)
<i>Streptomyces albulus</i>	9.9	71.5%

### 3.4.3. Kết quả phân tích taxonomy

Kết quả phân tích taxonomy các trình tự dữ liệu gốc sử dụng cơ sở dữ liệu miniKraken2 được trình bày ở Bảng 3.9.

*Bảng 3.9. Kết quả phân loại taxonomy bằng Kraken2*

Mẫu	Chi chiếm tỉ lệ lớn nhất (%)	Loài chiếm tỉ lệ lớn nhất (%)	Không xác định (%)
X3	<i>Streptomyces</i> (91.55%)	<i>Streptomyces albulus</i> (89.35%)	8.26%

Kết quả phân loại taxonomy bằng Kraken2 cho thấy mẫu X3 có độ tinh sạch cao và thuộc chi *Streptomyces*. Tương tự, kết quả định danh subtype bằng công cụ MLST cho thấy mẫu X3 thuộc về loài *Streptomyces albulus* với PubMLST scheme name là *streptomyces*.

*Bảng 3.10. Kết quả phân tích subtype*

Mẫu	Scheme name	ST	Allele IDs					
X3	<i>streptomyces</i>	-	16S (~47)	atpD (63?)	gyrB (~59)	recA (~58)	rpoB (~59)	trpB (~65)

Trình tự 16S rRNA của mẫu X3 tương đồng với trình tự 16S rRNA của loài *Streptomyces noursei* khi BLAST lên cơ sở dữ liệu NCBI với độ che phủ và độ tương đồng đạt 100% (Hình 3.11). Trình tự tương đồng thứ tư "*Streptomyces albulus*" được phân loại là *Streptomyces noursei*, giống với một nghiên cứu đề xuất *Streptomyces albulus* là một từ đồng nghĩa dị loại muộn hơn của *Streptomyces noursei* [73].

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">Streptomyces noursei strain CK-15 chromosome, complete genome</a>	<a href="#">Streptomyces...</a>	2819	19728	100%	0.0	100.00%	9336218	<a href="#">CP026094.1</a>
<a href="#">Streptomyces noursei strain C27 chromosome, complete genome</a>	<a href="#">Streptomyces...</a>	2819	19584	100%	0.0	100.00%	9627936	<a href="#">CP119144.1</a>
<a href="#">Streptomyces noursei strain JFO14147 chromosome, complete genome</a>	<a href="#">Streptomyces...</a>	2819	19728	100%	0.0	100.00%	9223378	<a href="#">CP104098.1</a>
<a href="#">Streptomyces albulus strain NK660, complete genome</a>	<a href="#">Streptomyces...</a>	2819	19698	100%	0.0	100.00%	9360281	<a href="#">CP007574.1</a>
<a href="#">Streptomyces albulus ZPM, complete genome</a>	<a href="#">Streptomyces...</a>	2808	24172	100%	0.0	99.87%	9784577	<a href="#">CP006871.1</a>
<a href="#">Streptomyces yunnanensis strain P86 chromosome, complete genome</a>	<a href="#">Streptomyces...</a>	2796	19565	100%	0.0	99.74%	9982274	<a href="#">CP095749.1</a>
<a href="#">Streptomyces sp. 769, complete genome</a>	<a href="#">Streptomyces...</a>	2796	19567	100%	0.0	99.74%	10100774	<a href="#">CP003987.1</a>
<a href="#">Streptomyces chattanoogaensis strain HLY-8 16S ribosomal RNA gene, par...</a>	<a href="#">Streptomyces...</a>	2793	2793	99%	0.0	99.80%	1521	<a href="#">KC292488.1</a>
<a href="#">Streptomyces sp. strain P86 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Streptomyces...</a>	2785	2785	99%	0.0	99.74%	1521	<a href="#">OQ504821.1</a>
<a href="#">Streptomyces sp. MOE7, complete genome</a>	<a href="#">Streptomyces...</a>	2758	19292	100%	0.0	99.28%	8399509	<a href="#">CP019779.1</a>
<a href="#">Streptomyces lydicus strain A02, complete genome</a>	<a href="#">Streptomyces...</a>	2758	16549	100%	0.0	99.28%	9307519	<a href="#">CP007699.2</a>
<a href="#">Streptomyces lydicus strain GS93 isolate 23, complete genome</a>	<a href="#">Streptomyces...</a>	2758	19301	100%	0.0	99.28%	8243179	<a href="#">CP019457.1</a>

Hình 3.11. Kết quả BLAST trình tự 16S rRNA lên NCBI

### 3.4.4. Dự đoán gen và chú giải chức năng

#### 3.4.4.1. Chú giải hệ gen sau lắp ráp

Kết quả dự đoán và chú giải chức năng gen được thực hiện bằng phần mềm Prokka. Số lượng các CDS, rRNA, tRNA, tmRNA được trình bày trong Bảng 3.11. Kết quả đánh giá độ toàn vẹn hệ gen được kiểm tra bằng phần mềm BUSCO cho thấy mẫu X3 có hệ gen lắp ráp với độ toàn vẹn cao (trên 99.4%).

Bảng 3.11. Kết quả chú giải hệ gen

Mẫu	CDS	rRNA	tmRNA	tRNA	repeat_region	Độ toàn vẹn BUSCO
X3	8466	5	1	99	3	99.4%

#### 3.4.4.3. Kết quả KEGG

Sử dụng Prokka để chú giải và xác định các gen chức năng trong trình tự hệ gen của chủng *Streptomyces* sp. X3. Dựa vào kết quả ở bảng 3.12 có thể thấy chiếm tỷ lệ lớn nhất tới 11,4% các gen có chức năng trong hệ gen là các gen liên quan đến quá trình chuyển hoá carbohydrate. Ngược lại, các gen liên quan tới quá trình phân huỷ và chuyển hoá các hợp chất ô nhiễm xenobiotic chỉ chiếm 1,4%. Chú giải các CDS tham gia vào con đường chuyển hóa xenobiotic được thể hiện chi tiết tại phụ lục 4.

*Bảng 3.12. Thống kê số lượng các gen liên quan tới chức năng*

<b>Các nhóm gen</b>	<b>Số lượng gen</b>
Chuyển hoá carbohydrate	315
Các họ protein: quá trình truyền tín hiệu và tế bào	271
Các họ protein: quá trình thông tin di truyền	268
Không phân loại: chuyển hoá	218
Chuyển hoá acid amin	213
Xử lý thông tin di truyền	205
Xử lý thông tin môi trường	201
Chuyển hoá cofactor và vitamin	135
Chuyển hoá năng lượng	128
Chuyển hoá nucleotide	106
Các họ protein: chuyển hoá	97
Chuyển hoá lipid	89
Chuyển hoá terpenoid và polyketide	71
Các quá trình tế bào	55
Sinh tổng hợp và chuyển hoá glycan	44
Không phân loại: quá trình truyền tín hiệu và tế bào	42
Không phân loại: xử lý thông tin di truyền	42
Phân huỷ và chuyển hoá xenobiotic	39
Sinh tổng hợp các chất chuyển hoá thứ cấp khác	33

Chuyển hoá các acid amin khác	31
Hệ thống sinh vật	11
Không phân loại	147
Tổng	2761

### 3.5. Kết quả tìm kiếm các gen mã hoá enzyme laccase và tham gia vào phân huỷ xenobiotic, loại màu thuốc nhuộm

#### 3.5.1. Các gen tham gia vào phân huỷ xenobiotic

Kết quả ở bảng 3.13 cho thấy phần lớn các gen này liên quan đến quá trình phân huỷ các hợp chất benzoate. Chú giải các CDS tham gia vào con đường phân huỷ và chuyển hóa xenobiotic được thể hiện chi tiết tại phụ lục 5.

*Bảng 3.13. Thống kê các gen liên quan đến quá trình phân huỷ và chuyển hoá các hợp chất xenobiotic*

	Số lượng gen
Phân huỷ benzoate	16
Phân huỷ aminobenzoate	14
Phân huỷ fluorobenzoate	3
Phân huỷ chloroalkane and chloroalkene	4
Phân huỷ chlorocyclohexane and chlorobenzene	1
Phân huỷ toluene	3
Phân huỷ xylene	5
Phân huỷ nitrotoluene	3
Phân huỷ ethylbenzene	1
Phân huỷ styrene	5
Phân huỷ atrazine	4
Phân huỷ caprolactam	4
Phân huỷ bisphenol	1
Phân huỷ dioxin	3
Phân huỷ naphthalene	3



Phân huỷ polycyclic aromatic hydrocarbon	2
Phân huỷ steroid	11
Chuyển hoá xenobiotic bởi cytochrome P450	3
Chuyển hoá thuốc - cytochrome P450	3
Chuyển hoá thuốc - các enzyme khác	13

Dưới đây là phân tích và chú giải một số gen trong hệ gen của chủng X3 mã hoá cho enzyme tham gia vào các con đường phân huỷ hợp chất xenobiotic. Trình tự của các gen này được trình bày chi tiết ở phụ lục 6.

a. MKPKKLHM\_00765 - Alcohol dehydrogenase

CDS MKPKKLHM\_00765 mã hoá cho enzyme alcohol dehydrogenase của *Streptomyces noursei* WP\_038517680.1 với độ che phủ 99% và tương đồng 100%. Protein này dài 346aa, trong đó vùng 4...338 tương ứng với enzyme Cinnamyl alcohol dehydrogenases (CAD).

Cinnamyl Alcohol Dehydrogenases (CAD) là một enzyme thuộc nhóm dehydrogenase, có vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp lignin ở thực vật. CAD xúc tác phản ứng khử aldehyde của các hợp chất cinnamyl (như coniferaldehyde, sinapaldehyde) thành các rượu tương ứng (như coniferyl alcohol, sinapyl alcohol), đây là bước cuối cùng trong quá trình tạo thành monolignol, một thành phần cơ bản của lignin. Lignin là một polymer phenolic giúp cung cấp độ bền cơ học và khả năng kháng lại các tác động từ môi trường cho thành tế bào thực vật.

Các nghiên cứu tập trung vào vai trò của CAD trong việc điều chỉnh cấu trúc và tính chất của lignin, ảnh hưởng đến chất lượng và ứng dụng của gỗ, cũng như khả năng biến đổi gen để thay đổi thành phần lignin cho mục đích sản xuất sinh học.

b. MKPKKLHM\_08374 - 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase

CDS MKPKKLHM\_08374 mã hoá cho enzyme 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase của *Streptomyces noursei* WP\_038524121.1 với độ che phủ 99% và tương đồng 100%. Protein này dài 341 aa tương ứng với enzyme 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase (HOVA).

4-Hydroxy-2-oxovalerate aldolase (HOVA) là một loại enzyme tham gia vào quá trình dị hóa các hợp chất thơm, đặc biệt là quá trình phân huỷ các phân tử như homogentisate, có nguồn gốc từ quá trình phân huỷ các axit amin như tyrosine và phenylalanine.

HOVA nổi bật bởi khả năng phân hủy các hợp chất thơm độc hại như xenobiotic có trong đất và nước bị ô nhiễm. Hiểu biết về HOVA và các enzyme liên quan có thể cung cấp thông tin chi tiết về quá trình tiến hóa của các con đường chuyển hóa để phân hủy hợp chất thơm ở vi khuẩn.

c. MKPKKLHM\_01904 - Putative aldehyde dehydrogenase AldA

CDS MKPKKLHM\_01904 mã hoá cho protein họ aldehyde dehydrogenase của *Streptomyces noursei* WP\_016575466.1 với độ che phủ 99% và tương đồng 100%. Protein này dài 476aa, trong đó vùng 5...474 tương ứng với enzyme ALDH\_F16 (Aldehyde dehydrogenase family 16A1-like).

ALDH\_F16 giống như các ALDH khác, có vai trò quan trọng trong quá trình chuyển đổi các aldehyde thành acid carboxylic. Trong quá trình này, aldehyde bị oxy hóa với sự tham gia của NAD<sup>+</sup> hoặc NADP<sup>+</sup> làm chất nhận electron. ALDH đóng vai trò quan trọng trong việc khử độc các aldehyde. Aldehyde là các chất trung gian độc hại trong nhiều quá trình trao đổi chất, bao gồm cả sự chuyển hóa ethanol và các hợp chất xenobiotic.

d. MKPKKLHM\_00149 - Protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha chain

CDS MKPKKLHM\_00149 mã hoá cho protein protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit alpha của *Streptomyces noursei* WP\_016571884.1 với độ che phủ 99% và tương đồng 99,49%. Protein này dài 195aa tương ứng với enzyme protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit alpha.

Protocatechuate 3,4-dioxygenase (PCD) là một loại enzyme tham gia vào quá trình phân hủy các hợp chất thơm, đặc biệt là trong các con đường dị hóa của nhiều loại vi khuẩn và nấm. Nó đóng vai trò trong quá trình phân hủy protocatechuate (3,4-dihydroxybenzoate), một hợp chất có nguồn gốc từ quá trình phân hủy lignin và các chất thơm khác.

Trong nhiều trường hợp, PCD là một loại enzyme dị oligome, nghĩa là nó bao gồm nhiều tiểu đơn vị có chức năng khác nhau. Tiểu đơn vị alpha thường có hoạt tính xúc tác và tham gia vào quá trình liên kết và hoạt hóa oxy phân tử.

Enzyme PCD rất quan trọng đối với quá trình phân hủy các hợp chất thơm, thường là các chất gây ô nhiễm dai dẳng hoặc các phân tử hữu cơ phức tạp như xenobiotic. Các sản phẩm phân hủy có thể được chuyển hóa thành các hợp chất đơn giản hơn, dễ đồng hóa hoặc bài tiết hơn. PCD có giá trị trong việc phát triển các phương pháp xử lý chất thải và chất gây ô nhiễm trong môi trường công nghiệp.

e. MKPKKLHM\_07912 - hypothetical protein

CDS MKPKKLHM\_07912 mã hoá cho họ protein dienelactone hydrolase family protein của *Streptomyces noursei* MEW1678607.1 với độ che phủ 99% và tương đồng 100%. Protein này dài 251aa tương ứng với họ protein dienelactone hydrolase.

Các protein thuộc họ Dienelactone hydrolase là một nhóm enzyme tham gia vào quá trình thủy phân dienelactone - este vòng có nguồn gốc từ quá trình phân hủy các hợp chất thơm. Quá trình thủy phân dienelactone thường liên quan đến việc sử dụng một phân tử nước để phá vỡ liên kết este trong vòng lactone. Phản ứng này rất cần thiết để chuyển đổi các hợp chất có khả năng gây hại hoặc bền thành các dạng đơn giản hơn, dễ phân hủy hơn.

Dienelactone hydrolase được sử dụng trong các quy trình cải tạo sinh học để phân hủy các chất gây ô nhiễm môi trường, đặc biệt là các hợp chất thơm khó phân hủy như xenobiotic. Do đó được ứng dụng vào việc làm sạch đất và nước bị ô nhiễm. Trong công nghiệp, có thể sử dụng enzyme này để chuyển đổi các hợp chất hóa học thành các dạng hữu ích hơn hoặc ít độc hại hơn.

f. MKPKKLHM\_07699 Putative amidase AmiA2

CDS MKPKKLHM\_07699 mã hoá cho protein amidase của *Streptomyces noursei* WP\_038522902.1 với độ che phủ 99% và tương đồng 99,80%. Protein này dài 506 aa tương ứng với enzyme amidase, cụ thể vùng 22...493 là PRK06061 (amidase).

Amidase là một nhóm enzyme quan trọng được tìm thấy trong nhiều sinh vật khác nhau, bao gồm vi khuẩn, thực vật và động vật. Enzyme này xúc tác quá trình thủy phân liên kết amide, chuyển đổi amide thành axit và amin tương ứng của chúng bằng cách thêm một phân tử nước.

Amidase có thể tác động lên nhiều loại cơ chất, bao gồm các amit aliphatic đơn giản, amit thơm và thậm chí là các hợp chất phức tạp hơn chứa amit như một số loại thuốc và chất gây ô nhiễm môi trường. Amidase tham gia vào quá trình chuyển hóa nitơ bằng cách phân hủy amit thành amoniac và axit cacboxylic, sau đó có thể được cơ thể sử dụng hoặc chuyển hóa thêm. Amidase giúp giải độc các chất lạ (hợp chất lạ) bằng cách phân hủy các amit độc hại thành các sản phẩm ít gây hại hơn. Điều này đặc biệt quan trọng trong quá trình chuyển hóa một số loại thuốc và thuốc trừ sâu.

Amidasen được sử dụng trong sản xuất công nghiệp một số hóa chất, trong đó chúng cung cấp một giải pháp thay thế xanh cho quá trình tổng hợp hóa học bằng

cách xúc tác các phản ứng trong điều kiện nhẹ nhàng. Do khả năng phân hủy các chất ô nhiễm, amidase được sử dụng trong các quy trình cải tạo sinh học để làm sạch môi trường bị ô nhiễm.

### 3.5.2. Gen mã hoá laccase

Dựa vào kết quả dự đoán và chú giải chức năng gen, một số gen quan tâm như gen laccase được tìm kiếm và phát hiện dựa vào sự giống nhau về tên gọi (Bảng 3.14).

Bảng 3.14. Kết quả tìm kiếm gen laccase

Mẫu	Chi	Tên protein (gen) cần thiết	Số lượng gen
X3	<i>Streptomyces</i>	Laccase	Không phát hiện
		Small laccase ( <i>AmLac</i> , <i>ScLac</i> , <i>SvLac</i> , <i>ssl1</i> )	Không phát hiện
		Multicopper oxidases	2
		Laccase-like multicopper oxidases	Không phát hiện

Hai CDS có ký hiệu MKPKKLHM\_01005 và MKPKKLHM\_05648 được chú giải mã hóa cho enzyme Multicopper oxidase MmcO laccase (Phụ lục 7). Hai CDS này có độ tỷ lệ tương đồng 74%.

CDS MKPKKLHM\_01005 mã hoá cho enzyme trùng khớp với protein họ multicopper oxidase của *Streptomyces noursei* WP\_044373005.1 với độ che phủ 99% và tương đồng 100%. Protein này dài 539aa, trong đó vùng 83...533 tương ứng với enzyme *SufI*.

Phân tích vị trí các vùng bảo thủ CDS MKPKKLHM\_01005 cho thấy protein có thể được chia thành ba vùng chính, mỗi vùng chứa nhiều miền: vùng đầu N có các miền CuRO\_1 (Copper-Related Oxidase 1) chi phối; vùng trung tâm chứa các miền CuRO\_2; vùng đầu C chủ yếu là các miền CuRO\_3. Protein cũng chứa một số miền copper\_res\_A (đồng kháng A) xen kẽ trong toàn bộ trình tự. Bên cạnh đó có nhiều miền chuyên biệt khác, bao gồm: Cu-oxidase\_3; CuRO\_1\_Diphenol\_Ox (có khả năng liên quan đến hoạt động của diphenol oxidase); CuRO\_1\_2DMCO\_NIR\_like (có khả năng liên quan đến nitrite reductase); CuRO\_6\_ceruloplasmin (tương tự như protein liên kết đồng ceruloplasmin). Các siêu họ được xác định bao gồm: siêu họ copper\_res\_A, siêu họ Cu-oxidase\_3, siêu họ PLN02191, siêu họ SufI, siêu họ Cupredoxin.

Trình tự gen MKPKKLHM\_05648 cũng mã hoá cho enzyme trùng khớp với protein họ multicopper oxidase của *Streptomyces noursei* WP\_044380647 với độ che phủ 99% và tương đồng 98,55%. Protein này dài 550aa, trong đó vùng 60..548 tương ứng với enzyme *SufI*.

Phân tích vị trí các vùng bảo thủ CDS MKPKKLHM\_05648 cho thấy protein lại được chia thành ba vùng chính, mỗi vùng chứa nhiều miền: vùng đầu N chiếm ưu thế bởi các miền CuRO\_1, vùng trung tâm chứa các miền CuRO\_2 và vùng đầu C chủ yếu là các miền CuRO\_3 và Cu-oxidase\_2. Protein cũng có các miền copper\_res\_A xen kẽ trong toàn bộ trình tự. Các miền chuyên biệt khác bao gồm: Cu-oxidase\_3, CuRO\_1\_Diphenol\_Ox, CuRO\_1\_2DMCO\_NIR\_like, CuRO\_6\_ceruloplasmin. Các siêu họ được xác định bao gồm: siêu họ Cupredoxin, siêu họ PKK10965, siêu họ copper\_res\_A, siêu họ SufI, siêu họ Cu-oxidase\_3 và siêu họ Cu-oxidase\_2.

So với enzyme multicopper oxidase MmcO được mã hoá bởi vùng bảo thủ của CDS MKPKKLHM\_01005, protein của MKPKKLHM\_05648 có miền Cu-oxidase\_2 ở đầu C-terminal và có một số điểm khác biệt trong cách sắp xếp cũng như các loại miền cụ thể, đặc biệt là ở vùng trung tâm và vùng C-terminal. Siêu họ PKK10965 và Cu-oxidase\_2 cũng chỉ có ở protein của MKPKKLHM\_05648.

### 3.5.3. Gen mã hoá enzyme tham gia loại màu thuốc nhuộm

Một CDS (MKPKKLHM\_02613) được chú giải là gen mã hóa dye-decolorizing peroxidase, là một enzyme tham gia vào quá trình loại màu (phụ lục 8). Trình tự protein suy diễn của CDS MKPKKLHM\_02613 tương đồng với Dyp-type peroxidase của *Streptomyces noursei* ATCC 11455 và Dye-decolorizing peroxidase *Streptomyces lydicus* A01, tuy nhiên độ tương đồng không cao, lần lượt đạt 88,33% và 85,29%.

Dyp-type peroxidase thường tham gia vào quá trình phân giải lignin - một hợp chất chính của thành tế bào thực vật, rất bền vững và khó phân hủy. Enzyme này cũng có thể phá vỡ các hợp chất phenol, chất màu tổng hợp và các hợp chất hữu cơ khác.

Dye-decolorizing peroxidase có khả năng phân hủy mạnh các hợp chất màu hữu cơ phức tạp như thuốc nhuộm azo, anthraquinon và phenolic dyes ngay cả trong các điều kiện khắc nghiệt như môi trường acid hay các quá trình xử lý sinh học. Ưu điểm của enzyme này là có thể oxy hóa các hợp chất không phải phenol, khác với nhiều loại peroxidase khác.

Nhìn chung 2 enzyme này có thể xử lý chất thải công nghiệp, đặc biệt là các chất thải có chứa phẩm nhuộm và các hợp chất hữu cơ khó phân hủy với khả năng phá vỡ những liên kết hóa học phức tạp của các chất màu, giúp loại bỏ màu sắc và giảm độc hại của chất thải. Nhờ vào khả năng xúc tác mạnh mẽ và tính linh hoạt, Dyp-type peroxidase và Dye-decolorizing peroxidase đều có tiềm năng ứng dụng cao trong xử lý ô nhiễm môi trường.

## CHƯƠNG 4: THẢO LUẬN

### 4.1. Sàng lọc các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme laccase

Xạ khuẩn là nhóm vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp đa dạng các chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học cùng với nhiều loại enzyme có giá trị. Các công bố gần đây trên thế giới cho thấy nhóm xạ khuẩn được tập trung nghiên cứu bởi khả năng sinh tổng hợp enzyme laccase, như chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. LAO được phân lập từ các mẫu gỗ mục nát có khả năng sản xuất laccase tối ưu ở 84 giờ với hoạt tính  $40,58 \pm 2,35$  U/mL [74].

Đất ô nhiễm chất diệt cỏ/dioxin tại Việt Nam là nguồn vi sinh vật đặc thù với nhiều tiềm năng ứng dụng trong xử lý sinh học môi trường, mặc dù vậy, nhóm xạ khuẩn chưa được tập trung khai thác. Phần lớn các nghiên cứu tại Việt Nam vẫn tập trung chủ yếu vào laccase có nguồn gốc từ nấm, như chủng nấm *Trametes polyzona* TĐ16 thu được từ Vườn quốc gia Tam Đảo cho hoạt tính laccase đạt 8,135 U/ml trên môi trường MT2 chứa 0,0625mM CuSO<sub>4</sub> sau 7 ngày nuôi cấy ở 37°C và pH 5,0 [75].

Trong nghiên cứu này, nguồn đất ô nhiễm từ sân bay A So, Thừa Thiên Huế cho thấy sự có mặt của các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh enzyme laccase, tuy nhiên tỷ lệ chủng thể hiện hoạt tính cao trên 100 U/L chỉ chiếm 3/30. Mặc dù vậy, hoạt tính của ba chủng này cao hơn khi so sánh với một số chủng xạ khuẩn phân lập được từ đất ô nhiễm chất diệt cỏ tại sân bay Biên Hòa trong một nghiên cứu trước đây khi hoạt tính enzyme sàng lọc chỉ dao động từ 0,38 U/L đến 0,8 U/L. [76].

### 4.2. Khả năng loại màu thuốc nhuộm của dịch enzyme từ các chủng xạ khuẩn

Các công bố trước đây cho thấy enzyme laccase thô từ một số chủng xạ khuẩn có khả năng loại các màu thuốc nhuộm tổng hợp như *Streptomyces sviceps* có khả năng khử 69% màu thuốc nhuộm azo Congo red-21 sau 48 giờ [77]. Dịch enzyme của chủng *Streptomyces albidofavus* 3MGH có khả năng khử màu và phân hủy ba loại thuốc nhuộm azo khác nhau, cụ thể là Reactive Orange 122 (RO 122), Direct Blue 15 (DB 15) và Direct Black 38 (DB 38) với hiệu suất lần lượt là 60,74%, 61,38% và 53,43% trong vòng 5 ngày ở nồng độ 0,3 g/L.

Một nghiên cứu khác cho thấy khả năng phân hủy tới 98% thuốc nhuộm azo và Reactive red 5B của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* spp. VITDDK3 - một Actinomycete chịu muối đã được phân lập và sàng lọc từ đất ngập mặn [78]. Laccase từ *Streptomyces cyaneus* được biểu hiện trên bề mặt tế bào nấm men với thành tế bào laccase được cố định trong các hạt dopamine-alginate. Enzyme này đã khử màu Amido Black 10B, Reactive Black 5, Evans Blue và Remazol Brilliant Blue với hiệu

suất 100% và sau mười vòng sử dụng nhiều lần vẫn giữ được hiệu suất khử màu là 90% với Evans Blue và 61% với Amido Black [79].

So sánh với các nghiên cứu trước đây, việc sử dụng dịch enzyme laccase thô thu được từ ba chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1 thể hiện khả năng loại màu vượt trội tới 70% sau 24 giờ ủ ở 30°C đối với 2 loại thuốc nhuộm IN13 - đại diện cho nhóm azo và NY3 - đại diện cho nhóm anthraquinone có màu xanh.

### 4.3. Tối ưu điều kiện phản ứng loại màu thuốc nhuộm

Độ pH tối ưu của laccase ba chủng X3, X8.5 và X9.1 nằm trong khoảng 3 - 4, thấp hơn một chút so với laccase của *Streptomyces cyaneus* (độ pH 4,5) [80], *S. lavendulae* (độ pH 4,5) [81] và hầu hết các laccase vi khuẩn được mô tả có độ pH tối ưu là axit. Đặc điểm này tạo điều kiện thuận lợi cho những ứng dụng đòi hỏi sự ổn định ở độ pH axit như trong ngành công nghiệp rượu vang cần loại bỏ polyphenol ở pH khoảng 2,5–4,0 [27], tuy nhiên sẽ giới hạn hoạt động trong công nghiệp bởi pH kiềm [82]. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu lại tìm thấy enzyme laccase tối ưu ở mức pH kiềm là 8–9 [83]. Hay laccase nhỏ từ *Streptomyces coelicolor* thể hiện hoạt tính cao nhất ở pH 9,4 với 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) làm chất nền [84].

Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy khoảng pH tối ưu cho hoạt động của enzyme laccase đối với quá trình phân huỷ các loại thuốc nhuộm tổng hợp là 4.0 - 7.0. Enzyme laccase thô thu được từ ba chủng xạ khuẩn X3, X8.5, X9.1 thể hiện khả năng loại màu với pH thấp hơn, khi hiệu suất loại màu tối ưu ở pH 4 với thuốc nhuộm nhóm azo và ở pH 3 với nhóm anthraquinone. *Streptomyces psammoticus* cho thấy khả năng loại màu cao trong khoảng pH 4 -7 [85], cụ thể là pH 6.0 trong nghiên cứu của Niladevi và Prema. Hay *Streptomyces cyaneus* hoạt động tối ưu nhất tại pH 7.0 trong việc xử lý màu nhuộm xanh methylene [86].

Hầu hết laccase vi khuẩn hoạt động tối ưu trong khoảng từ 45 đến 60°C. Enzyme laccase của ba chủng X3, X8.5 và X9.1 có nhiệt độ tối ưu trong khoảng là 50-60°C, tương tự với nhiệt độ trung bình của laccase vi khuẩn là 55°C [82]. Nhiệt độ tối ưu 50°C tương tự cũng được quan sát thấy đối với laccase nấm *Pycnoporus coccineus* [81]. Ngược lại, laccase vi khuẩn được nghiên cứu nhiều nhất, CotA, từ nội bào tử *Bacillus subtilis*, là một ngoại lệ với hoạt động tối ưu ở 75 °C [87]. Nhiệt độ tối ưu tương đối cao đối với laccase sản xuất từ các chủng X3, X8.5, X9.1 có lợi cho một số ứng dụng công nghiệp.

Một nghiên cứu trước đây cho thấy syringaldehyde và acetosyringone là hai trong số các chất trung gian oxy hóa khử tự nhiên tốt nhất để sử dụng để khử màu



thuốc nhuộm [88]. Enzyme laccase tái tổ hợp từ *Streptomyces coelicolor* cho thấy khả năng khử màu Indigo carmine trên 85% sau 20 phút ủ có syringaldehyde ở 45°C, còn khi ủ với enzyme nhưng không có syringaldehyde chỉ khử màu 8% sau 60 phút trong cùng điều kiện [30].

José M. Molina-Guijarro và cộng sự đã sản xuất enzyme laccase tái tổ hợp từ *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 và đánh giá khả năng loại màu thuốc nhuộm Orange II khi bổ sung acetosyringone. Kết quả cho thấy riêng laccase tái tổ hợp không thể làm mất màu thuốc nhuộm loại azo Orange II. Tuy nhiên, màu của thuốc nhuộm giảm 90% sau 4 giờ ủ với laccase - acetosyringone, tương ứng với việc giảm nồng độ thuốc nhuộm từ 50 xuống 5  $\mu\text{M}$  [89].

Một loại oxidase đồng đa miền (MCO) tái tổ hợp có nguồn gốc từ *Streptomyces griseorubens* JSD-1 nồng độ 100 mU/mL có hiệu suất khử màu thuốc nhuộm indigo (25  $\mu\text{M}$ ) tới 90% khi ủ 20 phút ở 45°C, pH 9 với syringaldehyde làm chất trung gian. Trong cùng điều kiện, chỉ riêng MCO cũng có thể khử màu thuốc nhuộm nhưng hiệu suất thấp hơn nhiều (7,0% trong vòng 60 phút) [90].

Tuy nhiên kết quả khảo sát một số chất trung gian thường dùng như 1-hydroxybenzotriazole (HBT), syringaldehyde (SA), VIO trong phản ứng loại màu cho thấy vai trò của các chất trung gian này đối với hoạt động của enzyme nghiên cứu là không lớn. Như vậy, có thể thấy bước đầu việc tối ưu điều kiện pH thấp và nhiệt độ cao đã đem lại hiệu quả đáng kể: phản ứng loại màu diễn ra nhanh với hiệu suất loại màu IN13 trên 65% và NY3 trên 80%. Kết quả đã đóng góp vào hướng nghiên cứu ứng dụng laccase trong xử lý loại màu thuốc nhuộm và các hợp chất xenobiotic trong điều kiện môi trường pH thấp, nhiệt độ cao.

#### **4.4. Phân tích chú giải các gen trong genome của chủng xạ khuẩn tham gia vào quá trình phân huỷ các hợp chất xenobiotic và loại màu thuốc nhuộm**

Từ kết quả thống kê contig cho thấy mẫu xạ khuẩn X3 có kích thước hệ gen (9738355bp) và %GC (72,15) phù hợp với chi *Streptomyces* - nhiễm sắc thể hoàn chỉnh dao động từ 5,9 đến 12,7 Mbp và hàm lượng G + C trung bình là 71,7% [91]. Một số chủng *Streptomyces* có kích thước tương đồng như *Streptomyces albulus* kích thước hệ gen 9,304,371 bp và hàm lượng G + C trung bình là 72,25%; *Streptomyces albulus* kích thước hệ gen 9,372,401 bp và hàm lượng G + C trung bình là 72,32% [92]. Ngoài ra, có những chủng có kích thước hệ gen nhỏ hơn như *Streptomyces* sp. 7144310 bp và hàm lượng G + C trung bình là 72,6%; *Streptomyces albidoflavus* MGMM6 6.932.303 bp với hàm lượng G+C trung bình là 73,5%, không có bất kỳ

contig plasmid nào [93]. Nói chung, kích thước hệ gen lớn và hàm lượng G+C cao là các đặc điểm tiêu biểu cho hệ gen của *Streptomyces*.

Nhìn vào số lượng gen chức năng được chú thích trong hệ gen chủng X3 có thể thấy phần lớn là các gen liên quan đến quá trình chuyển hoá carbohydrate, 1,4% là các gen liên quan tới quá trình phân huỷ và chuyển hoá các hợp chất ô nhiễm xenobiotic. Một số gen được tìm thấy mã hóa các enzyme như dye-decolorizing peroxidase, dioxygenase, MCO, monooxygenase cytochrome P450,... tương tự với một nghiên cứu về hệ gen của chủng *Streptomyces albidoflavus* MGMM6 [93]. Chủng này có khả năng khử màu và phân huỷ thuốc nhuộm triphenylmethane thơm, đặc biệt là Blue Brilliant G250, từ nước thải lên đến  $98 \pm 0,15\%$ .

Khả năng sử dụng chất thơm làm nguồn cacbon và năng lượng duy nhất có liên quan đến sự hiện diện của các gen như cytochrome P450 monooxygenase (P450s), oxidase, peroxidase, dioxygenase và MCO [94]. Các gen trên cũng được tìm thấy trong hệ gen của *Streptomyces* sp. X3, cho thấy khả năng phân huỷ các hợp chất thơm xenobiotics tương tự chủng A7-9 của *S. albidoflavus* [95].

Hai CDS MKPKKLHM\_01005 và MKPKKLHM\_05648 mã hoá cho enzyme *SufI* - một multicopper oxidase (MCO) với ba miền cupredoxin (bao gồm protein phân chia tế bào FtsP và protein vỏ bào tử CotA) tham gia kiểm soát chu kỳ tế bào, phân chia tế bào, phân chia nhiễm sắc thể, vận chuyển và chuyển hóa ion vô cơ. Các nghiên cứu trước đây đã xác định, mô tả và phân loại enzyme loại CotA mới từ *Bacillus pumilus* là laccase bởi có trình tự giống 98% với laccase và gán nó là bilirubin oxidase [67]. Kết luận tương tự cũng được xác định đối với laccase từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* CotA.

Hiện nay chưa có nghiên cứu ở Việt Nam đi sâu vào việc phân tích, chú giải các gen trong genome của xạ khuẩn chi *Streptomyces* tham gia vào quá trình phân huỷ và chuyển hoá các hợp chất xenobiotic. Với khả năng loại màu thuốc nhuộm và sự hiện diện của các gen liên quan nói trên, *Streptomyces* sp. X3 có tiềm năng trong ứng dụng phân huỷ sinh học các hợp chất ô nhiễm xenobiotic khó loại bỏ ngoài môi trường.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

1. Từ 30 chủng xạ khuẩn được lưu giữ tại phòng Công nghệ sinh học môi trường có nguồn gốc từ các mẫu đất thu thập tại khu vực sân bay quân sự cũ Aso, huyện A Lưới, Thừa Thiên Huế, đã sàng lọc được 3 chủng có khả năng sinh tổng hợp enzyme laccase cao nhất đó là X3, X8.5 và X9.1. Các chủng này có hoạt tính laccase thô tương ứng lần lượt là 234,08; 403,54; 418,75 U/L trên môi trường Gause sau 8, 7 và 8 ngày nuôi cấy.

2. Các chủng xạ khuẩn chọn lọc có khả năng loại màu trên 70% sau 24 giờ đối với một số màu thuốc nhuộm IN13 và NY3. Điều kiện thích hợp cho phản ứng loại màu với màu nhuộm IN13 sau 20 phút phản ứng là pH 4; nhiệt độ 60°C và 500  $\mu$ M chất trung gian VIO. Điều kiện thích hợp cho phản ứng loại màu với màu nhuộm NY3 sau 20 phút phản ứng là pH 3; nhiệt độ 50°C và 500  $\mu$ M chất trung gian VIO (chủng X8.5; X9.1), 200  $\mu$ M VIO (chủng X3).

5. Chủng X3 có kích thước hệ gen 9.738.355bp và GC chiếm 72,15% với độ hoàn thiện 99,4%. Chủng X3 được phân loại thuộc chi *Streptomyces*; subtype thuộc về loài *Streptomyces albulus*; dữ liệu được lưu tại Sequence Read Archive (SRA), NCBI, thông tin có thể truy cập tại BioProject mã số PRJNA1049313. Thống kê được 2761 gen chức năng trong trình tự hệ gen của chủng *Streptomyces* sp. X3, trong đó có 1,4% các gen liên quan tới quá trình phân huỷ và chuyển hoá các hợp chất ô nhiễm xenobiotic; hai gen mã hóa enzyme laccase và một gen mã hoá cho dye-decolorizing peroxidase liên quan đến khả năng loại màu thuốc nhuộm.

### KIẾN NGHỊ

1. Tối ưu môi trường nuôi cấy xạ khuẩn giúp tăng khả năng sinh tổng hợp enzyme cũng như tăng hiệu suất loại màu thuốc nhuộm và ứng dụng trong thực tế.

2. Khai thác các gen tham gia vào con đường chuyển hoá và phân huỷ các hợp chất xenobiotic đóng góp vào phát triển các phương pháp xử lý ô nhiễm môi trường.

**DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Nouioui I., Carro L., García-López M., Meier-Kolthoff J.P., Woyke T., Kyrpides N.C., et al., 2018, Genome-Based Taxonomic Classification of the Phylum Actinobacteria, *Frontiers in microbiology*, 9, 2007.
2. Bhatti A.A., Haq S., Bhat R.A., 2017, Actinomycetes benefaction role in soil and plant health, *Microbial Pathogenesis*, 111, 458-467.
3. Robertsen H.L., Musiol-Kroll E.M. Actinomycete-Derived Polyketides as a Source of Antibiotics and Lead Structures for the Development of New Antimicrobial Drugs. *Antibiotics* [Internet]. 2019; 8(4).
4. Anders R. Johnsen, Anne Winding, Ulrich Karlson, Peter Roslev, 2002, Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of <sup>13</sup>C-labeled cell lipids, *Applied and environmental microbiology*, 68(12), 6106-6113.
5. Lara-Severino R.d.C., Camacho-López M.Á., García-Macedo J.M., Gómez-Oliván L.M., Sandoval-Trujillo Á.H., Isaac-Olive K., et al., 2016, Determination of the residual anthracene concentration in cultures of haloalkalitolerant actinomycetes by excitation fluorescence, emission fluorescence, and synchronous fluorescence: comparative study, *Journal of analytical methods in chemistry*, 2016(1), 6287931.
6. Kästner M., Breuer-Jammali M., Mahro B., 1994, Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 267-273.
7. Bhadbhade B.J., Sarnaik S.S., Kanekar P.P., 2002, Biomineralization of an organophosphorus pesticide, Monocrotophos, by soil bacteria, *Journal of applied microbiology*, 93(2), 224-234.
8. Mane U.V., Gurav P.N., Deshmukh A.M., Govindwar S.P., 2008, Degradation of textile dye reactive navy-blue Rx (Reactive blue-59) by an isolated Actinomycete *Streptomyces krainskii* SUK-5, *Malaysian Journal of Microbiology*, 4(2), 1-5.
9. Baral B., Akhgari A., Metsä-Ketelä M., 2018, Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges, *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3(3), 163-178.

10. Lee Y., Lee N., Hwang S., Kim W., Jeong Y., Cho S., et al., 2020, Genome-scale determination of 5' and 3' boundaries of RNA transcripts in *Streptomyces* genomes, *Scientific Data*, 7(1), 436.
11. Sharma A., Salwan R., Kaur R., Sharma R., Sharma V., 2022, Characterization and evaluation of bioformulation from antagonistic and flower inducing *Trichoderma asperellum* isolate UCRD5, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 43, 102437.
12. Salwan R., Sharma A., Kaur R., Sharma R., Sharma V., 2022, The riddles of *Trichoderma* induced plant immunity, *Biological Control*, 174, 105037.
13. Zhou Z., Gu J., Li Y.-Q., Wang Y., 2012, Genome plasticity and systems evolution in *Streptomyces*, *Journal*, 13(Suppl 10), S8.
14. Claus H., 2004, Laccases: structure, reactions, distribution, *Micron (Oxford, England : 1993)*, 35(1-2), 93-96.
15. Alcalde M., 2007, Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications, *Industrial Enzymes*, 461-476.
16. Gianfreda L., Xu F., Bollag J.-M., 1999, Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes, *Bioremediation Journal*, 3(1), 1-26.
17. Blanquez A., Rodriguez J., Brissos V., Mendes S., Martins L.O., Ball A.S., et al., 2019, Decolorization and detoxification of textile dyes using a versatile *Streptomyces* laccase-natural mediator system, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(5), 913-920.
18. Savinova O.S., Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Chulkin A.M., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V., et al., 2019, Evolutionary Relationships Between the Laccase Genes of Polyporales: Orthology-Based Classification of Laccase Isozymes and Functional Insight From *Trametes hirsuta*, *Front Microbiol*, 10, 152.
19. Rodriguez Couto S., Toca Herrera J.L., 2006, Industrial and biotechnological applications of laccases: a review, *Biotechnology Advances* 24(5), 500-513.
20. Hakulinen N., Rouvinen J., 2015, Three-dimensional structures of laccases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(5), 857-868.
21. Riva S., 2006, Laccases: blue enzymes for green chemistry, *Trends in biotechnology*, 24(5), 219-226.

22. Hakulinen N., Kiiskinen L.L., Kruus K., Saloheimo M., Paananen A., Koivula A., et al., 2002, Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site, *Nature Structural Biology*, 9(8), 601-605.
23. Bassanini I., Ferrandi E.E., Riva S., Monti D., 2020, Biocatalysis with Laccases: An Updated Overview, *Catalysts*, 11(1).
24. Harvey B.M., 1997, *Laccases in Higher Plants* [Master's Thesis], Christchurch, New Zealand, University of Canterbury.
25. Wosilait Wd Fau - Nason A., Nason A Fau - Terrell A.J., Terrell A.J., 1954, Pyridine nucleotide-quinone reductase. II. Role in electron transport, *Journal of Biological Chemistry*, 206, 271-282.
26. Wang J., Feng J., Jia W., Chang S., Li S., Li Y., 2015, Lignin engineering through laccase modification: a promising field for energy plant improvement, *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 8, 145.
27. Madhavi V., Lele S., 2009, Laccase: properties and applications, *BioResources*, 4(4).
28. Benfield G., Bocks, S. M., Bromley, K., & Brown, B. R., 1964, Studies of fungal and plant laccases, *Phytochemistry*, 3, 79-88.
29. Janusz G., Pawlik A., Swiderska-Burek U., Polak J., Sulej J., Jarosz-Wilkolazka A., et al., 2020, Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution, *Int J Mol Sci*, 21(3), 966.
30. Dubé E., Shareck F., Hurtubise Y., Daneault C., Beaugard M., 2008, Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye, *Applied microbiology and biotechnology*, 79(4), 597-603.
31. Nordlund E., Buchert J., Hopia A., Kruus K., K A., 2006, Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs, *Journal of Cereal Science*, 43(2), 152-159.
32. Zaccaria M., Dawson W., Russel Kish D., Reverberi M., Bonaccorsi di Patti M.C., Domin M., et al., 2023, Experimental-theoretical study of laccase as a detoxifier of aflatoxins, *Scientific reports*, 13(1), 860.
33. Felby C., Hassingboe J., Lund M., 2002, Pilot-scale production of fiberboards made by laccase oxidized wood fibers: Board properties and evidence for cross-linking of lignin, *Enzyme and Microbial Technology*, 31(6), 736-741.

34. Almeida P.H., Oliveira A.C.C., Souza G.P.N., Friedrich J.C., Linde G.A., Colauto N.B., et al., 2018, Decolorization of remazol brilliant blue R with laccase from *Lentinus crinitus* grown in agro-industrial by-products, *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 90(4), 3463-3473.
35. Bhelose D., Malik N., 2023, Application of laccase produced by marine actinomycetes in accelerating the rate of biodegradation of polyethylene, *The holistic approach to environment*, 14(1), 1-11.
36. Thiele S., Fernandes E., Bollag J.M., 2002, Enzymatic transformation and binding of labeled 2,4,6-trinitrotoluene to humic substances during an anaerobic/aerobic incubation, *Journal of environmental quality*, 31(2), 437-444.
37. Anastasi A., Parato B., Spina F., Tigini V., Prigione V., Varese G.C., 2011, Decolourisation and detoxification in the fungal treatment of textile wastewaters from dyeing processes, *Nature Biotechnology*, 29(1), 38-45.
38. Sharma P., Goel R., Capalash N., 2006, Bacterial laccases, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 823-832.
39. Liu Y., Yan M., Geng Y., Huang J., 2015, ABTS-modified silica nanoparticles as laccase mediators for decolorization of indigo carmine dye, *Journal of Chemistry*, 1-8.
40. Thoa L.T.K., Thao T.T.P., Hung N.B., Khoo K.S., Quang H.T., Lan T.T., et al., 2022, Biodegradation and Detoxification of Malachite Green Dye by Extracellular Laccase Expressed from *Fusarium oxysporum*, *Waste and Biomass Valorization*, 13(5), 2511-2518.
41. Atashgahi S., Sánchez-Andrea I., Heipieper H.J., Meer J.R.v.d., Stams A.J.M., Smidt H., 2018, Prospects for harnessing biocide resistance for bioremediation and detoxification, *Science (New York, NY)*, 360(6390), 743-746.
42. Atashgahi S., Shetty S.A., Smidt H., Vos W.M.d., 2018, Flux, Impact, and Fate of Halogenated Xenobiotic Compounds in the Gut, *Frontiers in Physiology*, 9, 888.
43. Donner E., Eriksson E., Holten-Lützhøft H.-C., Scholes L., Revitt M., Ledin A., 2010, Identifying and Classifying the Sources and Uses of Xenobiotics in Urban Environments, In: Fatta-Kassinos D. B.K., Kümmerer K., editor., *Xenobiotics in the urban water cycle: Mass flows, environmental processes and mitigation strategies*, Springer Science+Business Media, Environmental Pollution Volume, 27-50.

44. Mathew B.B., Singh H., Biju V.G., Krishnamurthy N.B., 2017, Classification, Source, and Effect of Environmental Pollutants and Their Biodegradation, *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 36(1), 55-71.
45. Mishra S., Lin Z., Pang S., Zhang W., Bhatt P., Chen S., 2021, Recent Advanced Technologies for the Characterization of Xenobiotic-Degrading Microorganisms and Microbial Communities, *Front Bioeng Biotechnol*, 9, 632059.
46. Alkorta I., Garbisu C., 2001, Phytoremediation of organic contaminants in soils, *Bioresource Technology*, 79(3), 273-276.
47. Samanta S.K., Singh O.V., Jain R.K., 2002, Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation, *Trends in Biotechnology*, 20(6), 243-248.
48. Bras R., Gomes A., Ferra M.I., Pinheiro H.M., Goncalves I.C., 2005, Monoazo and diazo dye decolourisation studies in a methanogenic UASB reactor, *Journal of Biotechnology*, 115(1), 57-66.
49. Pinheiro H.M., Touraud E., Thomas O., 2004, Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters, *Dyes and Pigments*, 61(2), 121-139.
50. Korrapati M.C., Mehendale H.M., 2005, Xenobiotics, In: Wexler P., editor., *Encyclopedia of Toxicology*, 2nd ed, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 469-470.
51. Rathore S., Varshney A., Mohan S., Dahiya P., 2022, An innovative approach of bioremediation in enzymatic degradation of xenobiotics, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 38(1), 1-32.
52. Miglani R., Parveen N., Panda A.K., Bisht S.S., Kumar A., Ansari M.A., et al., 2022, Degradation of Xenobiotic Pollutants: An Environmentally Sustainable Approach, *Metabolites*, 12(9), 818.
53. Menezes A.d., Clipson N., Doyle E., 2012, Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil, *Environmental Microbiology*, 14(9), 2577-2588.
54. Jeffries T.C., Rayu S., Nielsen U.N., Lai K., Ijaz A., Nazaries L., et al., 2018, Metagenomic functional potential predicts degradation rates of a model



organophosphorus xenobiotic in pesticide contaminated soils, *Frontiers Microbiology*, 9, 147.

55. Fang H., Cai L., Yang Y., Ju F., Li X., Yu Y., et al., 2014, Metagenomic analysis reveals potential biodegradation pathways of persistent pesticides in freshwater and marine sediments, *The Science of the total environment*, 470-471, 983-992.

56. Negi V., Lal R., 2017, Metagenomic Analysis of a Complex Community Present in Pond Sediment, *Journal of genomics*, 5, 36-47.

57. Whangsuk W., Toewiwat N., Dubbs J., Sallabhan R., Mongkolsuk S., Loprasert S., 2018, Identification of a repressor and an activator of azoreductase gene expression in *Pseudomonas putida* and *Xanthomonas oryzae*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 502(1), 9-14.

58. Russ R., Rau J., Stolz A., 2000, The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria, *Applied and environmental microbiology*, 66(4), 1429–1434.

59. An X., Chen Y., Chen G., Feng L., Zhang Q., 2020, Integrated metagenomic and metaproteomic analyses reveal potential degradation mechanism of azo dye-Direct Black G by thermophilic microflora, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 196, 110557.

60. Lander E.S., Linton Lm Fau - Birren B., Birren B Fau - Nusbaum C., Nusbaum C Fau - Zody M.C., Zody Mc Fau - Baldwin J., Baldwin J Fau - Devon K., et al., 2001, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, 409, 860-921.

61. Levy S., Sutton G., Ng P.C., Feuk L., Halpern A.L., Walenz B.P., et al., 2007, The Diploid Genome Sequence of an Individual Human, *PLoS biology*, 5(e254).

62. Wheeler D.A., Srinivasan M Fau - Egholm M., Egholm M Fau - Shen Y., Shen Y Fau - Chen L., Chen L Fau - McGuire A., McGuire A Fau - He W., et al., 2008, The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing, *Nature*, 452, 872-876.

63. Zhang J., Chiodini R., Badr A., Zhang G., 2011, The impact of next-generation sequencing on genomics, *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 38, 95-109.

64. Park S.A.-O., Kim J., 2016, Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing, *International neurology journal*, 20(Suppl 2), S76–S83.
65. Bentley S.D., Chater Kf Fau - Cerdeño-Tárraga A.M., Cerdeño-Tárraga Am Fau - Challis G.L., Challis Gl Fau - Thomson N.R., Thomson Nr Fau - James K.D., James Kd Fau - Harris D.E., et al., 2002, Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Nature*, 417, 141–147.
66. Ikeda H., Ishikawa J Fau - Hanamoto A., Hanamoto A Fau - Shinose M., Shinose M Fau - Kikuchi H., Kikuchi H Fau - Shiba T., Shiba T Fau - Sakaki Y., et al., 2003, Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*, *Nature biotechnology*, 21, 526–531.
67. Challis G.L., 2014, Exploitation of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) genome sequence for discovery of new natural products and biosynthetic pathways, *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 41, 219–232.
68. Childs R.E., & Bardsley, W. G., 1975, The Steady-State Kinetics of Peroxidase with 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as Chromogen, *The Biochemical journal*, 145, 93-103.
69. Huy N.D., Ha D.T.T., Khoo K.S., Lan P.T.N., Quang H.T., Loc N.H., et al., 2020, Synthetic dyes removal by *Fusarium oxysporum* HUIB02 and stimulation effect on laccase accumulation, *Environmental Technology & Innovation*, 19, 101027.
70. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B., 2014, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
71. Wood D.E., Salzberg S.L., 2014, Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments, *Genome Biology*, 15(3), R46.
72. Seemann T., 2014, Prokka: rapid prokaryotic genome annotation, *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069.
73. Butdee W., Muangham S., Chonudomkul D., Duangmal K., 2023, *Streptomyces rhizoryzae* sp. nov., isolated from paddy rhizosphere soil and formal proposal to reclassify *Streptomyces albulus* as a later heterotypic synonym of *Streptomyces noursei*, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 73(1), 005639.

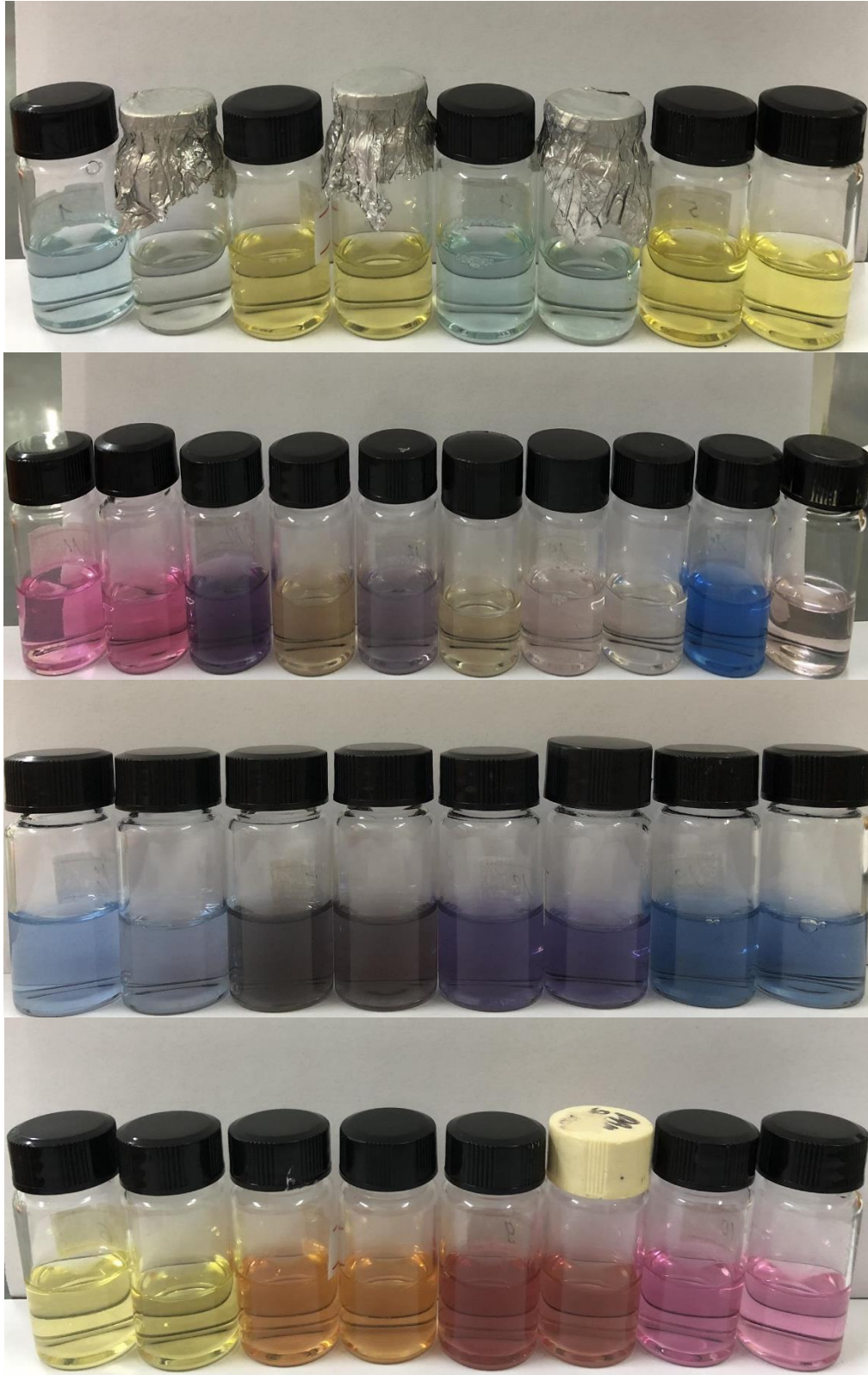
74. Gogotya A., Nnolim N.E., Digban T.O., Okoh A.I., Nwodo U.U., 2021, Characterization of a thermostable and solvent-tolerant laccase produced by *Streptomyces* sp. LAO, *Biotechnol Lett*, 43(7), 1429-1442.
75. Trịnh Thu Thủy, Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Ngọc Bằng, Phạm Thu Trang, 2015, Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm mốc sinh tổng hợp enzyme laccase từ gỗ mục, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, tập 13, 1173-1178.
76. Nguyễn Quang Huy, Nguyễn Bá Hữu, Nguyễn Thị Thanh Ngân, Đặng Thị Cẩm Hà, 2012, Sinh enzym ngoại bào peroxidaza, laccaza và phân hủy các hợp chất vòng thơm của chủng xạ khuẩn XKBH1, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50(3), tr. 285-295.
77. Chakravarthi B., Mathkala V., Palempalli U.M.D., 2021, Degradation and Detoxification of Congo Red azo dye by Immobilized Laccase of *Streptomyces sviveus*, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(2), 864-876.
78. Lakshmipathy T.D., Prasad A.S.A., Kannabiran K., 2010, Production of Biosurfactant and Heavy Metal Resistance Activity of *Streptomyces* Sp. VITDDK3- a Novel Halo Tolerant Actinomycetes Isolated from Saltpan Soil, *Advances in Biological Research* 4, 108-115.
79. Popović N., Pržulj D., Mladenović M., Prodanović O., Ece S., Ilić Đurđić K., et al., 2021, Immobilization of yeast cell walls with surface displayed laccase from *Streptomyces cyaneus* within dopamine-alginate beads for dye decolorization, *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 1072-1080.
80. Arias M.E., Arenas M.a., Rodríguez J., Soliveri J., Ball A.S., Hernández M., 2003, Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, *Applied Environmental Microbiology*, 69(4), 1953-1958.
81. Suzuki T., Endo K., Ito M., Tsujibo H., Miyamoto K., Inamori Y., 2003, A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression, *Bioscience, biotechnology, biochemistry*, 67(10), 2167-2175.
82. Strong P., Claus H., 2011, Laccase: a review of its past and its future in bioremediation, *Critical Reviews in Environmental Science Technology*, 41(4), 373-434.

83. Chandra R., Chowdhary P., 2015, Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes, *Environmental science Processes & impacts*, 17, 326–342.
84. Machczynski M.C., Vijgenboom E., Samyn B., Canters G.W., 2004, Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity, *Protein science*, 13(9), 2388-2397.
85. Vasudev P.G., et al, 2011, Decolorization of Azo Dyes by Laccase from *Streptomyces psammoticus*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38, 1-7.
86. Shraddha R., et al, 2011, Characterization of Laccase from *Streptomyces cyaneus* and its Application in Decolorization of Dye Methylene Blue, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(840-850).
87. Martins L.O., Soares C.M., Pereira M.M., Teixeira M., Costa T., Jones G.H., et al., 2002, Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat, *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18849-18859.
88. Susana Camarero, David Ibarra, María Jesús Martínez, Martínez A.T., 2005, Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1775-1784).
89. Molina-Guijarro J.M., Pérez J., Muñoz-Dorado J., Guillén F., Moya R., Hernández M., et al., 2009, Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*, *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 12(1), 13-21.
90. Feng H., Zhang D., Sun Y., Zhi Y., Mao L., Luo Y., et al., 2015, Expression and Characterization of a Recombinant Laccase with Alkalistable and Thermostable Properties from *Streptomyces griseorubens* JSD-1, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(2), 547-562.
91. Shiba Y., Koyama T., Wang C., Zhang Q., Okamura A., Aoki S., et al., 2003, Culture of porcine hepatocytes using radial flow bioreactor system, *Journal*, 133-137.
92. Kiepas A., Hoskisson P., Pritchard L., 2023, *16S rRNA phylogeny and clustering is not a reliable proxy for genome-based taxonomy in Streptomyces.*

93. Diabankana R.G.C., Frolov M., Keremli S., Validov S.Z., Afordoanyi D.M., 2023, Genomic Insights into the Microbial Agent *Streptomyces albidoflavus* MGMM6 for Various Biotechnology Applications, *Microorganisms*, 11(12).
94. Jaouadi B., Rekik H., Badis A., Jaouadi N.Z., Belhoul M., Hmidi M., et al., 2014, Production, purification, and characterization of a highly thermostable and humic acid biodegrading peroxidase from a decolorizing *Streptomyces albidoflavus* strain TN644 isolated from a Tunisian off-shore oil field, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90, 36-44.
95. Seo J.S., Keum Ys Fau - Li Q.X., Li Q.X., 2009, Bacterial degradation of aromatic compounds, *International journal of environmental research and public health*, 6, 278-309.

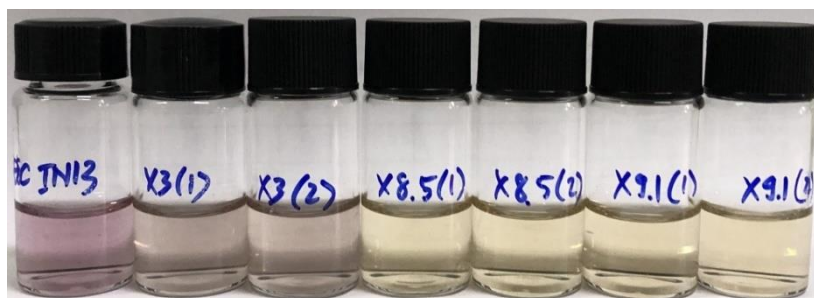
## PHỤ LỤC

### Phụ lục 1. Phản ứng loại 17 màu thuốc nhuộm của dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn X9.1

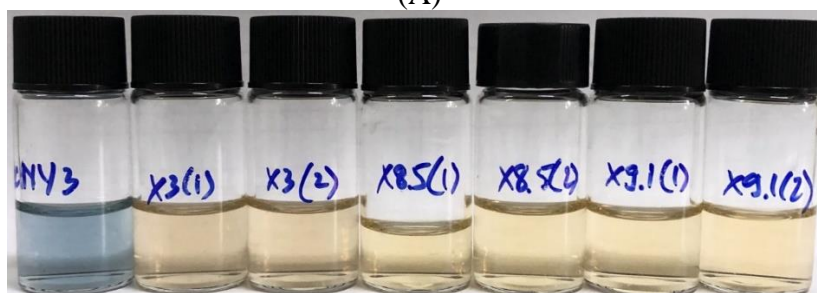


**Phụ lục 2. Một số hình ảnh phản ứng loại màu thuốc nhuộm IN13 (A) và NY3 (B) của ba chủng X3, X8.5 và X9.1**

**Bổ sung 1000  $\mu$ M chất trung gian HBT**



(A)

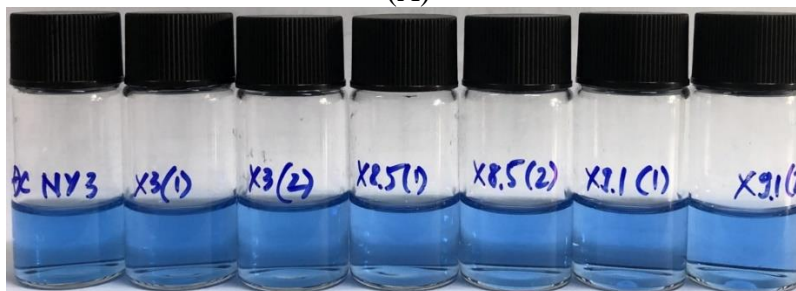


(B)

**Bổ sung 1000  $\mu$ M chất trung gian SA**



(A)



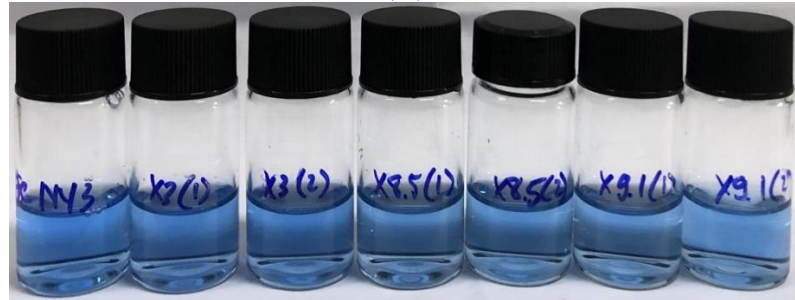
(B)

**Bổ sung 200  $\mu$ M chất trung gian VIO**





(A)



(B)

**Bổ sung 400  $\mu$ M chất trung gian VIO**

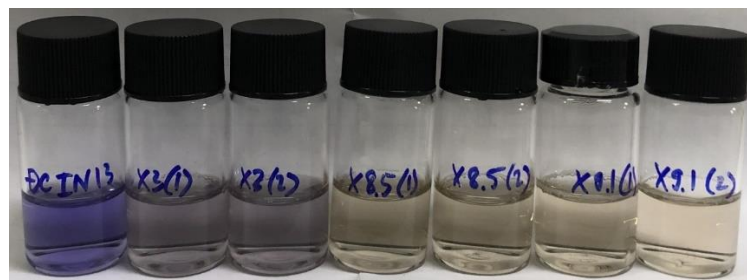


(A)



(B)

**Bổ sung 600  $\mu$ M chất trung gian VIO**



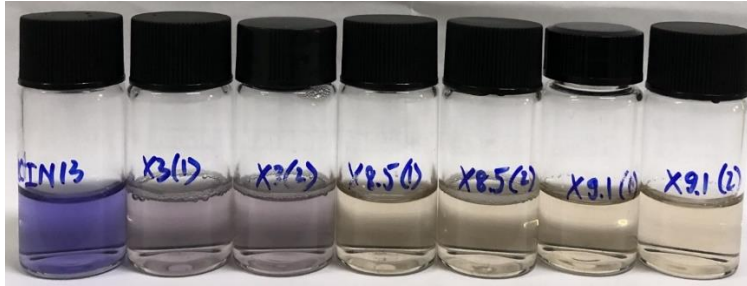
(A)





(B)

**Bổ sung 800  $\mu\text{M}$  chất trung gian VIO**

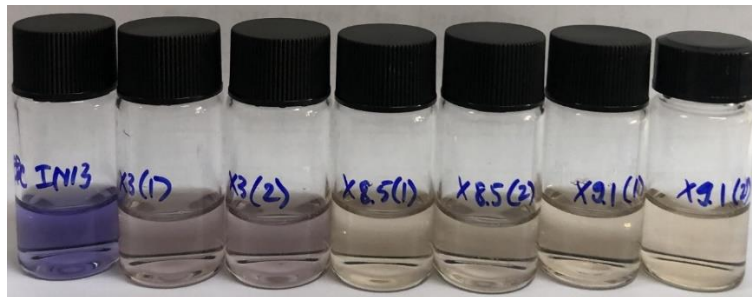


(A)

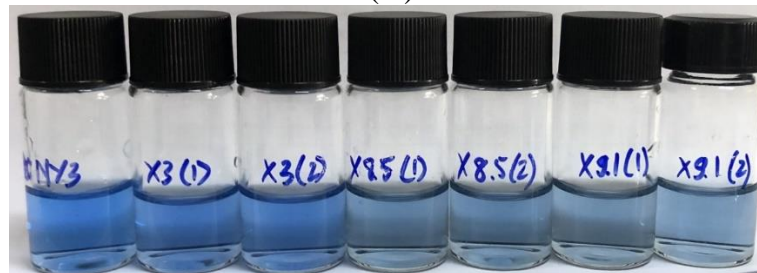


(B)

**Bổ sung 1000  $\mu\text{M}$  chất trung gian VIO**

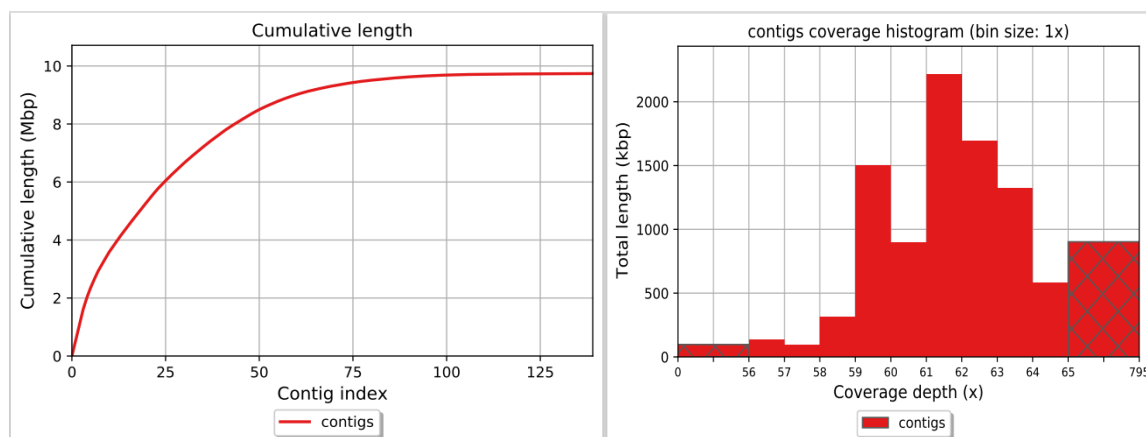


(A)



(B)

### Phụ lục 3. Chiều dài tích lũy các contigs của hệ gen X3 (A) và độ phủ sâu của các contigs (B)



### Phụ lục 4. Chú giải các CDS tham gia vào con đường chuyển hóa xenobiotic

Query (GFIT)	KO	Annotation
MKPCKLHM_00765	K00001	E1.1.1.1, adh; alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]
MKPCKLHM_05341	K00001	E1.1.1.1, adh; alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1]
MKPCKLHM_00005	K00055	E1.1.1.90; aryl-alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.90]
MKPCKLHM_00285	K00055	E1.1.1.90; aryl-alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.90]
MKPCKLHM_01058	K00074	paaH, hbd, fadB, mmgB; 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.157]
MKPCKLHM_02762	K00074	paaH, hbd, fadB, mmgB; 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.157]
MKPCKLHM_04289	K00074	paaH, hbd, fadB, mmgB; 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.157]
MKPCKLHM_04623	K00074	paaH, hbd, fadB, mmgB; 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.157]
MKPCKLHM_04999	K00074	paaH, hbd, fadB, mmgB; 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.157]
MKPCKLHM_02779	K00088	IMPDH, guaB; IMP dehydrogenase [EC:1.1.1.205]
MKPCKLHM_02780	K00088	IMPDH, guaB; IMP dehydrogenase [EC:1.1.1.205]
MKPCKLHM_05570	K00121	frmA, ADH5, adhC; S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]
MKPCKLHM_06537	K00121	frmA, ADH5, adhC; S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]
MKPCKLHM_01904	K00128	ALDH; aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3]
MKPCKLHM_02510	K00128	ALDH; aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3]

MKPKKLHM_03191	K00128	ALDH; aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3]
MKPKKLHM_05317	K00128	ALDH; aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3]
MKPKKLHM_05569	K00128	ALDH; aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3]
MKPKKLHM_08184	K00128	ALDH; aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3]
MKPKKLHM_02239	K00141	xylC; benzaldehyde dehydrogenase (NAD) [EC:1.2.1.28]
MKPKKLHM_05524	K00252	GCDH, gcdH; glutaryl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.8.6]
MKPKKLHM_06969	K00254	DHODH, pyrD; dihydroorotate dehydrogenase [EC:1.3.5.2]
MKPKKLHM_00149	K00448	pcaG; protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit [EC:1.13.11.3]
MKPKKLHM_02173	K00448	pcaG; protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit [EC:1.13.11.3]
MKPKKLHM_00148	K00449	pcaH; protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit [EC:1.13.11.3]
MKPKKLHM_02174	K00449	pcaH; protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit [EC:1.13.11.3]
MKPKKLHM_05567	K00451	HGD, hmgA; homogentisate 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.5]
MKPKKLHM_02171	K00481	pobA; p-hydroxybenzoate 3-monooxygenase [EC:1.14.13.2]
MKPKKLHM_03999	K00481	pobA; p-hydroxybenzoate 3-monooxygenase [EC:1.14.13.2]
MKPKKLHM_08222	K00481	pobA; p-hydroxybenzoate 3-monooxygenase [EC:1.14.13.2]
MKPKKLHM_03163	K00626	ACAT, atoB; acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]
MKPKKLHM_04070	K00626	ACAT, atoB; acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]
MKPKKLHM_04303	K00626	ACAT, atoB; acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]
MKPKKLHM_05857	K00626	ACAT, atoB; acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]
MKPKKLHM_06190	K00626	ACAT, atoB; acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]
MKPKKLHM_08177	K00626	ACAT, atoB; acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]
MKPKKLHM_02245	K00632	fadA, fadI; acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]
MKPKKLHM_06542	K00632	fadA, fadI; acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]
MKPKKLHM_01919	K00758	deoA, TYMP; thymidine phosphorylase [EC:2.4.2.4]
MKPKKLHM_08089	K00760	hprT, hpt, HPRT1; hypoxanthine phosphoribosyltransferase [EC:2.4.2.8]
MKPKKLHM_05153	K00857	tdk, TK; thymidine kinase [EC:2.7.1.21]
MKPKKLHM_04473	K00876	udk, UCK; uridine kinase [EC:2.7.1.48]
MKPKKLHM_05722	K00940	ndk, NME; nucleoside-diphosphate kinase [EC:2.7.4.6]
MKPKKLHM_07912	K01061	E3.1.1.45; carboxymethylenebutenolidase [EC:3.1.1.45]
MKPKKLHM_01264	K01075	E3.1.2.23; 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase [EC:3.1.2.23]

MKPKKLHM_00432	K01426	E3.5.1.4, amiE; amidase [EC:3.5.1.4]
MKPKKLHM_05360	K01426	E3.5.1.4, amiE; amidase [EC:3.5.1.4]
MKPKKLHM_05577	K01426	E3.5.1.4, amiE; amidase [EC:3.5.1.4]
MKPKKLHM_07188	K01426	E3.5.1.4, amiE; amidase [EC:3.5.1.4]
MKPKKLHM_07699	K01426	E3.5.1.4, amiE; amidase [EC:3.5.1.4]
MKPKKLHM_07749	K01426	E3.5.1.4, amiE; amidase [EC:3.5.1.4]
MKPKKLHM_07756	K01426	E3.5.1.4, amiE; amidase [EC:3.5.1.4]
MKPKKLHM_01751	K01428	ureC; urease subunit alpha [EC:3.5.1.5]
MKPKKLHM_02387	K01428	ureC; urease subunit alpha [EC:3.5.1.5]
MKPKKLHM_01750	K01429	ureB; urease subunit beta [EC:3.5.1.5]
MKPKKLHM_01749	K01430	ureA; urease subunit gamma [EC:3.5.1.5]
MKPKKLHM_07695	K01431	UPB1, pydC; beta-ureidopropionase [EC:3.5.1.6]
MKPKKLHM_07690	K01464	DPYS, dht, hydA; dihydropyrimidinase [EC:3.5.2.2]
MKPKKLHM_01920	K01489	cdd, CDA; cytidine deaminase [EC:3.5.4.5]
MKPKKLHM_00060	K01512	acyP; acylphosphatase [EC:3.6.1.7]
MKPKKLHM_02440	K01512	acyP; acylphosphatase [EC:3.6.1.7]
MKPKKLHM_05048	K01519	rdgB, ITPA; XTP/dITP diphosphohydrolase [EC:3.6.1.66]
MKPKKLHM_07058	K01520	dut, DUT; dUTP diphosphatase [EC:3.6.1.23]
MKPKKLHM_02893	K01555	FAH, fahA; fumarylacetoacetase [EC:3.7.1.2]
MKPKKLHM_00350	K01576	mdlC; benzoylformate decarboxylase [EC:4.1.1.7]
MKPKKLHM_04383	K01576	mdlC; benzoylformate decarboxylase [EC:4.1.1.7]
MKPKKLHM_08374	K01666	mhpE; 4-hydroxy 2-oxovalerate aldolase [EC:4.1.3.39]
MKPKKLHM_02293	K01692	paaF, echA; enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]
MKPKKLHM_04346	K01692	paaF, echA; enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]
MKPKKLHM_01068	K01721	nthA; nitrile hydratase subunit alpha [EC:4.2.1.84]
MKPKKLHM_03164	K01782	fadJ; 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3]
MKPKKLHM_01022	K01821	praC, xylH; 4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]
MKPKKLHM_00150	K01857	pcaB; 3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.2]
MKPKKLHM_02054	K01951	guaA, GMPS; GMP synthase (glutamine-hydrolysing) [EC:6.3.5.2]
MKPKKLHM_08372	K02554	mhpD; 2-keto-4-pentenoate hydratase [EC:4.2.1.80]
MKPKKLHM_00003	K03186	ubiX, bsdB, PAD1; flavin prenyltransferase [EC:2.5.1.129]

MKPKKLHM_02931	K03186	ubiX, bsdB, PAD1; flavin prenyltransferase [EC:2.5.1.129]
MKPKKLHM_02057	K03333	choD; cholesterol oxidase [EC:1.1.3.6]
MKPKKLHM_00208	K03782	katG; catalase-peroxidase [EC:1.11.1.21]
MKPKKLHM_04865	K03863	vanB; vanillate monooxygenase ferredoxin subunit
MKPKKLHM_06444	K04110	badA; benzoate-CoA ligase [EC:6.2.1.25]
MKPKKLHM_08384	K05898	kstD; 3-oxosteroid 1-dehydrogenase [EC:1.3.99.4]
MKPKKLHM_00352	K05913	dad; 2,4'-dihydroxyacetophenone dioxygenase [EC:1.13.11.41]
MKPKKLHM_06108	K06281	hyaB, hybC; hydrogenase large subunit [EC:1.12.99.6]
MKPKKLHM_06107	K06282	hyaA, hybO; hydrogenase small subunit [EC:1.12.99.6]
MKPKKLHM_02298	K08295	abmG; 2-aminobenzoate-CoA ligase [EC:6.2.1.32]
MKPKKLHM_02305	K09461	E1.14.13.40; anthraniloyl-CoA monooxygenase [EC:1.14.13.40]
MKPKKLHM_01095	K10680	nemA; N-ethylmaleimide reductase [EC:1.-.-.-]
MKPKKLHM_03962	K10680	nemA; N-ethylmaleimide reductase [EC:1.-.-.-]
MKPKKLHM_00222	K13953	adhP; alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]
MKPKKLHM_07813	K13953	adhP; alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]
MKPKKLHM_02386	K14048	ureAB; urease subunit gamma/beta [EC:3.5.1.5]
MKPKKLHM_03791	K14338	cypD_E, CYP102A, CYP505; cytochrome P450 / NADPH-cytochrome P450 reductase [EC:1.14.14.1 1.6.2.4]
MKPKKLHM_03957	K14519	aldH; NADP-dependent aldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.4]
MKPKKLHM_02172	K14727	pcaL; 3-oxoadipate enol-lactonase / 4-carboxymuconolactone decarboxylase [EC:3.1.1.24 4.1.1.44]
MKPKKLHM_07715	K14727	pcaL; 3-oxoadipate enol-lactonase / 4-carboxymuconolactone decarboxylase [EC:3.1.1.24 4.1.1.44]
MKPKKLHM_00410	K14731	mlhB, chnC; epsilon-lactone hydrolase [EC:3.1.1.83]
MKPKKLHM_08176	K15981	CYP125A; cholest-4-en-3-one 26-monooxygenase [EC:1.14.15.29]
MKPKKLHM_08375	K15982	kshA; 3-ketosteroid 9alpha-monooxygenase subunit A [EC:1.14.15.30]
MKPKKLHM_08377	K15983	kshB; 3-ketosteroid 9alpha-monooxygenase subunit B [EC:1.14.15.30]
MKPKKLHM_08379	K16047	hsaA; 3-hydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione monooxygenase [EC:1.14.14.12]
MKPKKLHM_03395	K16048	hsaB; 3-hydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione monooxygenase reductase component [EC:1.5.1.-]
MKPKKLHM_08382	K16048	hsaB; 3-hydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione monooxygenase reductase component [EC:1.5.1.-]

MKPKKLHM_08381	K16049	hsaC; 3,4-dihydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione 4,5-dioxygenase [EC:1.13.11.25]
MKPKKLHM_08380	K16050	hsaD; 4,5:9,10-diseco-3-hydroxy-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-diene-4-oate hydrolase [EC:3.7.1.17]
MKPKKLHM_04446	K16051	tesI; 3-oxo-5alpha-steroid 4-dehydrogenase [EC:1.3.99.5]
MKPKKLHM_03413	K18687	fadD3; HIP---CoA ligase [EC:6.2.1.41]
MKPKKLHM_06182	K18687	fadD3; HIP---CoA ligase [EC:6.2.1.41]
MKPKKLHM_01069	K20807	nthB; nitrile hydratase subunit beta [EC:4.2.1.84]
MKPKKLHM_00467	K21802	vdh; vanillin dehydrogenase [EC:1.2.1.67]

### Phụ lục 5. Các CDS của X3 tham gia vào các con đường chuyển hóa các hợp chất xenobiotic

KEGG Orthology	Mã CDS	Số lượng
<b>Benzoate degradation</b>		<b>16</b>
K00074	MKPKKLHM_01058, MKPKKLHM_02762, MKPKKLHM_04289, MKPKKLHM_04623, MKPKKLHM_04999	
K00252	MKPKKLHM_05524	
K00448	MKPKKLHM_00149, MKPKKLHM_02173	
K00449	MKPKKLHM_00148, MKPKKLHM_02174	
K00481	MKPKKLHM_02171, MKPKKLHM_03999, MKPKKLHM_08222	
K00626	MKPKKLHM_03163, MKPKKLHM_04070, MKPKKLHM_04303, MKPKKLHM_05857, MKPKKLHM_06190, MKPKKLHM_08177	
K00632	MKPKKLHM_02245, MKPKKLHM_06542	
K01075	MKPKKLHM_01264	
K01666	MKPKKLHM_08374	
K01692	MKPKKLHM_02293, MKPKKLHM_04346	
K01782	MKPKKLHM_03164	
K01821	MKPKKLHM_01022	
K01857	MKPKKLHM_00150	
K02554	MKPKKLHM_08372	
K04110	MKPKKLHM_06444	
K14727	MKPKKLHM_02172, MKPKKLHM_07715	
<b>Aminobenzoate degradation</b>		<b>14</b>
K00141	MKPKKLHM_02239	
K01426	MKPKKLHM_00432, MKPKKLHM_05360, MKPKKLHM_05577, MKPKKLHM_07188, MKPKKLHM_07699, MKPKKLHM_07749, MKPKKLHM_07756	
K01512	MKPKKLHM_00060, MKPKKLHM_02440	
K01576	MKPKKLHM_00350, MKPKKLHM_04383	
K01692	MKPKKLHM_02293, MKPKKLHM_04346	
K01721	MKPKKLHM_01068	
K03186	MKPKKLHM_00003, MKPKKLHM_02931	
K03863	MKPKKLHM_04865	

<b>KEGG Orthology</b>	<b>Mã CDS</b>	<b>Số lượng</b>
K04110	MKPKKLHM_06444	
K08295	MKPKKLHM_02298	
K09461	MKPKKLHM_02305	
K14338	MKPKKLHM_03791	
K20807	MKPKKLHM_01069	
K21802	MKPKKLHM_00467	
<b>Fluorobenzoate degradation</b>		<b>3</b>
K01061	MKPKKLHM_07912	
K01721	MKPKKLHM_01068	
K20807	MKPKKLHM_01069	
<b>Chloroalkane and chloroalkene degradation</b>		<b>4</b>
K00001	MKPKKLHM_00765, MKPKKLHM_05341	
K00121	MKPKKLHM_05570, MKPKKLHM_06537	
K00128	MKPKKLHM_01904, MKPKKLHM_02510, MKPKKLHM_03191, MKPKKLHM_05317, MKPKKLHM_05569, MKPKKLHM_08184	
K13953	MKPKKLHM_00222, MKPKKLHM_07813	
<b>Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation</b>		<b>1</b>
K01061	MKPKKLHM_07912	
<b>Toluene degradation</b>		<b>3</b>
K00055	MKPKKLHM_00005, MKPKKLHM_00285	
K00141	MKPKKLHM_02239	
K01061	MKPKKLHM_07912	
<b>Xylene degradation</b>		<b>5</b>
K00055	MKPKKLHM_00005, MKPKKLHM_00285	
K00141	MKPKKLHM_02239	
K01666	MKPKKLHM_08374	
K01821	MKPKKLHM_01022	
K02554	MKPKKLHM_08372	
<b>Nitrotoluene degradation</b>		<b>3</b>
K06281	MKPKKLHM_06108	
K06282	MKPKKLHM_06107	
K10680	MKPKKLHM_01095, MKPKKLHM_03962	
<b>Ethylbenzene degradation</b>		<b>1</b>
K00632	MKPKKLHM_02245, MKPKKLHM_06542	
<b>Styrene degradation</b>		<b>5</b>
K00451	MKPKKLHM_05567	
K01426	MKPKKLHM_00432, MKPKKLHM_05360, MKPKKLHM_05577, MKPKKLHM_07188, MKPKKLHM_07699, MKPKKLHM_07749, MKPKKLHM_07756	
K01555	MKPKKLHM_02893	
K01721	MKPKKLHM_01068	
K20807	MKPKKLHM_01069	
<b>Atrazine degradation</b>		<b>4</b>
K01428	MKPKKLHM_01751, MKPKKLHM_02387	
K01429	MKPKKLHM_01750	

<b>KEGG Orthology</b>	<b>Mã CDS</b>	<b>Số lượng</b>
K01430	MKPCKLHM_01749	
K14048	MKPCKLHM_02386	
<b>Caprolactam degradation</b>		<b>4</b>
K01692	MKPCKLHM_02293, MKPCKLHM_04346	
K01782	MKPCKLHM_03164	
K14519	MKPCKLHM_03957	
K14731	MKPCKLHM_00410	
<b>Bisphenol degradation</b>		<b>1</b>
K05913	MKPCKLHM_00352	
	Dioxin degradation	3
K01666	MKPCKLHM_08374	
K01821	MKPCKLHM_01022	
K02554	MKPCKLHM_08372	
<b>Naphthalene degradation</b>		<b>3</b>
K00001	MKPCKLHM_00765, MKPCKLHM_05341	
K00121	MKPCKLHM_05570, MKPCKLHM_06537	
K13953	MKPCKLHM_00222, MKPCKLHM_07813	
<b>Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation</b>		<b>2</b>
K00448	MKPCKLHM_00149, MKPCKLHM_02173	
K00449	MKPCKLHM_00148, MKPCKLHM_02174	
<b>Steroid degradation</b>		<b>11</b>
K03333	MKPCKLHM_02057	
K05898	MKPCKLHM_08384	
K15981	MKPCKLHM_08176	
K15982	MKPCKLHM_08375	
K15983	MKPCKLHM_08377	
K16047	MKPCKLHM_08379	
K16048	MKPCKLHM_03395, MKPCKLHM_08382	
K16049	MKPCKLHM_08381	
K16050	MKPCKLHM_08380	
K16051	MKPCKLHM_04446	
K18687	MKPCKLHM_03413, MKPCKLHM_06182	
<b>Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450</b>		<b>3</b>
K00001	MKPCKLHM_00765, MKPCKLHM_05341	
K00121	MKPCKLHM_05570, MKPCKLHM_06537	
K13953	MKPCKLHM_00222, MKPCKLHM_07813	
<b>Drug metabolism - cytochrome P450</b>		<b>3</b>
K00001	MKPCKLHM_00765, MKPCKLHM_05341	
K00121	MKPCKLHM_05570, MKPCKLHM_06537	
K13953	MKPCKLHM_00222, MKPCKLHM_07813	
<b>Drug metabolism - other enzymes</b>		<b>13</b>
K00088	MKPCKLHM_02779, MKPCKLHM_02780	
K00758	MKPCKLHM_01919	
K00760	MKPCKLHM_08089	
K00857	MKPCKLHM_05153	



KEGG Orthology	Mã CDS	Số lượng
K00876	MKPKKLHM_04473	
K00940	MKPKKLHM_05722	
K01431	MKPKKLHM_07695	
K01464	MKPKKLHM_07690	
K01489	MKPKKLHM_01920	
K01519	MKPKKLHM_05048	
K01520	MKPKKLHM_07058	
K01951	MKPKKLHM_02054	
K03782	MKPKKLHM_00208	

## Phụ lục 6. Trình tự một số gen tham gia vào phân huỷ xenobiotic

### Trình tự số 1:

>MKPKKLHM\_00765 Alcohol dehydrogenase

ATGAGCAGCTACCGAGTCGCGCAGGTCGGTGCCGCCGCGCGCCCTTCGAGATCGTTCGAGC  
GTGAGGTGCCGCGGCCGGCCGGGGCACGTCCGGGTCACCGTGGACGCCTGCGGGATCTG  
CCACAGCGACGCCATGTTTCGTTCGACGGTTCGCGCTGCCGGGCGTCCGGTTCCTCGTGGTACC  
GGCCACGAGATCGCCGGCCGGATCGCGGAGGTCGGCGAGCGCACCAACGGCCGGTGGAAAGG  
TCGACGACCGGGTTCGCGGTCGGTTCGGTTCGGCGGCAGCTGTCACCACTGCACCCCTGCCG  
GCAGGGGGACTTCATCGTGTGCGAGCACTTGAAGGTGCCGGGCTGGGCGTACGACGGCGGG  
TTCGGCGAAACGGTGATCGCCCCGGCCGATGCGCTGGCGCGGATCCCCGACGGCCTGGCAG  
CGGCGGACGCCGGCCCGATGGCGTGCGCCGGGGTACCACCTACAACGGGCTGCGGGCGCAG  
CTCGGCCCGGCCGGGCGACCTGGTTCGCCGTCCTGGGCCCTCGGCGGCCTGGGGCACTTGGGC  
GTGCAGTTCGCCGTGGCGATGGGCTTCGAGACGGTTCGCGATCGCCCCGCGGTGCCGACAAGG  
CGGACTTCGCCAAGCAGTTGGGCGCGCACCACTACGTCGACAGCACCGCCGGCACCTCCGT  
CGCAAACGCCCTGCAGTCCCTGGGCGGGCGCCGGGTGGTGCTGGCCACCGCCTCCAACCTCC  
GCCGCCATCTCGGCGACCGTGGAGGGATTGGCGCACCGCGGTGAGCTGGTGGTTCATCGGTG  
CGGACACCGAACCCTGGCGATCAGTCCGACGCAGCTGCTGATGCGGGCCCGGGTGGTCCG  
CGGCCATCCGTCCGGCACCGCGCAGGACGTCCAGGACACGATGGCGTTCTGTGCGCTCCAG  
GGCATCCGGCCGATGATCGAGACGATGCCGCTGGAGCACGCAACGAGGCGTACGGGAAGA  
TGCTGGCCGGCACGGCCCGGTTCCGGATGGTGCTCACCCACACGGAAGCCGGACGCACGCG  
CTGA

### Trình tự số 2:

>MKPKKLHM\_08374 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase

ATGAAGAGCTATTCCGACACCCTCGACATCCGCGTCACCGACTCCTCGCTGCGCGACGGCT  
CGCACGCCAAGCGGCACCAGTTCACCGTTCGAGGACGTCCGGTCCGTGCTCGCTGCGCTGGA  
CGACGCCGGCGGTGCCGGTTCATCGAGGTCACCCACGGCGACGGGCTGGGCGGTTCCCTCGTTC  
ACCTACGGCTTCTCCAGGACGCCCGAGCAGGATCTGATCAAGACCGCCGTGGAGACCGCCC  
GGCAGGCGAAGATCGCGTTCCTGATGCTGCCCGGCTCGGCGTCAAGGACGACATCCGCGC  
CGCGCACGGCAACGGTTCGACCGTCTGCCGGATCGCCACGCACTGCACCGAGGCCGACATC  
TCCGTCCAGCACTTCGGGCTGGCGCGGGACATGGGGCTGGAGACCGTCCGGTTCCTGATGA  
TGGCGCACTCCACCACCCCGAGGCGCTCGCCCGGCGAGGGCCGCATCATGGCGGACGCCGG  
CTGCCAGTGGTCTACGTGCTCGACTCGGCCGGCGCCATGGTGATGGACGACGTCACCCAG  
CGCGTCCAGGCACTGGTTCGCTGAGCTCGGCGAGGACGCCAGGTCGGCTTCACGGCCACG

AGAACCTGGCCCTGGGCACCGGCAACTCCATCGCCGCGATCCAGGCCGGCGCCCGCCAGAT  
 CGACGGTTCCACCCGCGGGCTGGGCGCCGGCGCCGGCAACACCGCCGTCGAGGCGCTGGTC  
 GCGGTCTGCGCCAAGATGGGGATCCGCACCGGCATCGACGTCCTGAAGATCATCGACGCGG  
 CGGAGGACGTGGTCCGCCCGGTGATGGACGAGGAGTGCCAACTCGACCGGCTGGCCCTCCT  
 CATGGGCCACGCAGGGGTCTACTCCAGCTTCCCTCAAGCACGCCTTCCGGCAGGGCGAGCGG  
 TACGGCGTGTCCGCCGCGCAGATCCTGCTGCGCGCCGGCGAACGCCGGCTCGTCGGCGGCC  
 AGGAGGACCAGCTCATCGACATCGCCGTCGAACTCGCGGCGCAGAAGTAG

### **Trình tự số 3:**

>MKPKKLHM\_01904 Putative aldehyde dehydrogenase AldA

ATGACCTTTGACTACGCACCGGCGCCCGAGTCGCGCGCCGTTGGTGGACCTCGCGTCCTCCT  
 ACGGGCTGTTTCATCGACGCGGAGTTCACCGAGGGCGCGGGCGGCGCCCTGCGCAAGACCGT  
 CTCGCCCCGCCACCGAAGAGGTGCTGGCCGAGTACACCCAGGGCACCGCCGACGACGTCGAC  
 CGCGCGGTCAAGGCGGCCCGTGC GGCGTTCGAGAAGTGGTCGGCGCTGCCGGGCGCCGAGC  
 GCGCCAAGTACCTCTTCCGGATCGCCGGATCATCCAGGAGCGCTCCCGCGAGCTGGCCGT  
 CCTGGAGACCCTGGACAACGGCAAGCCGATCCGCGAGGGCGCGGGACGCCGACCTGCCGCTG  
 GTGGCCGCGCACTTCTTCTACTACGCGGGCTGGGCGGACAAGCTCGACCACGCGGGCCTCG  
 GCCGAACCCGCGCCCGCTGGGCGTGGCCGGCCAGGTTCATCCCGTGGAACTTCCCGCTGCT  
 GATGCTGGCGTGGAAAGGTGCGCGCGGCGTGGCCTGCGGCAACACCGTTCGTCCTCAAGCCG  
 GCCGAGACCACCCGCTGTCCGCGTGTCTTTCGCGGACATCTGCCGCCAGGCCGGGCTGC  
 CCAAGGGCGTTCGTC AACATCGTCACCGGTGACGGCTCGACCGGCGCGGCGCTGGTGGCCCA  
 CCCGGGCATCGACAAGGTGCGGTTACCGGCTCCACCGAGGTGGGCAAGGCGATCGCCCGT  
 ACGGTGCGCGGCACGGACAAGAAGTCCACCTCGAACTGGGCGGCAAGGCGGCCAACATCG  
 TCTTCGACGACGCCCCGATCGACCAGGCCGTCGAGGGGATCGTCAACGGGATCTTCTTCAA  
 CCAGGGGCACGTGTGCTGCGCGGGTTCGCCGCTGCTGGTCCAGGAGTCGGTCCAGGACGAG  
 CTGCTGGACGCGCTCAAGCGGCGGATGGCCACCCTGCGGGTTCGGCGACCCGCTGGACAAGA  
 ACACCGACATCGGCGCGATCAACTCCGCGGAGCAGCTGGCCCGGATCACCGAGCTGGCCGA  
 CGCGGGCGAGGCCGAGGGCGCCGAGCGCTGGGCCCGGCGTGC GAACTGCCCGGCGCCGGC  
 TACTGGTTTCGCGCCGACGCTGTTACCGGCGTACCCAGGCCACCGGATCGCCCGGAGG  
 AGGCTTTCGGCCCCGCTGCTGTCCGTGCTGACCTTCCGCACGCCGAGGAGGGCGGTGGCCAA  
 GGCCAACAACACGCCCTACGGCCTGTCGGCGGGCATCTGGACCGAGAAGGGCTCGCGCATG  
 CTGTGGATGGCGAGCAAGCTGCGGGCCGGCGTTCATCTGGTCCAACACGTTCAACAAGTTCCG  
 ACCCGACCTCGCCGTTTCGGCGGCTACAAGGAGTCGGGCTTCGGCCGCGAGGGCGGCCGGCA  
 CGGTCTGGAGGCGTACCTCAATGTCTGA

### **Trình tự số 4:**

>MKPKKLHM\_00149 Protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha chain

GTGACGACCCCTCCGCACGGCCACGCCCGCCAGACGGTCGGCCCGTTCCACGGATGCG  
 CCCTGCCGTTCCCGGGCGGCGGTGACGCGGCCCGGCGGGCCATCCGGACACCCTCGTCCT  
 CCACGGCCACGTCCGCGACGGCGGGGCGCCCCGTCCCGGACGCGCTGCTGGAATTCTGG  
 GGACCGGGCCCGGACGGCGAACTGCCGCGAGCCACCGGATCGTTGCGCCGCGACCCGATGA  
 CCGGTGGCTTCCCTCGGCCGGGACGGTATCGGTTTACCGGTTTCGCCCGGGTTGCGACCGA  
 TGCGGACGGCCACTGGGCGGTCCGCACCCTCCGCCCGGGCGCCCGCGGGCGGGCACGCGCCC  
 CACCTCGCGGTCTGCGTCTTCGCCCGGGCCTGACCCGGCACCTGTTACCCGGGTGTACC  
 TGCCGGCGGGCGGACCGGGAGCCGATCACCGACCCGCTGCTGGCCGCACTGCCACCCGAACG

GCGCGGACCCCTGGTGGCGGTGCGCCGAGCCGCGGGGCAGTCATCGCTTCGACATCCGATTG  
CAGGGTGCGGCGGAGACGGTGTTCCTGGAGTTCGCATGA

### **Trình tự số 5:**

>MKPKKLHM\_07912 hypothetical protein

ATGACCCCTGTGCACGGTGCATCACTCGACCTCCCCACTCCGGACGGGACCGCCGACGCCT  
ACTTCGCCACCCCGACGACGGCGCTCCGCACCCCGGAGTCTTGCTCTACATGGACGCCTT  
CGGCCTCCGGCCCTCGTTGGAGGCGATGGCCAGGCGACTGGCCGGGCACGGCTACGCGGTG  
CTGGTGCCAACGTCCTCTACCGCGCCGGGCGCGCTCCCCTCGTGGAGCTTCCCGAACACG  
TCTCCCCCGCCGACCGGCCCGAGATCTTACCCAGCTTTCCTCCCTGATCCGCGCGCTGAC  
CCCCGAAGTGGCGATGCGGGACGCCGGGACGTACCTCGACTGGCTGGCCGCCTCGCCGCAG  
GTCGCCGACGGCCCCGTGGGAACCACCGGTTACTGCATGGGCGGCGTCCTCGCGCTCCGCA  
CGGCAGCGGCCTTCCCGACCGGATCGCGGCCGTGGGCGCGTCCACGCCGGCAACCTCAT  
CACCGACGCGGGCGGACAGTCCGCACCTGCTCCTCGACCGCATCACGGCAGAGCTGTACTTC  
GGCCACGCCGACCAGGACCACTCGATGTCGGCCGAGCAGATCGAGCAGCTGGAGCGGGCGT  
TGGACGCCCGGGGCTCCGGTACCGCAGCGAACTGTACGAAGGGGCCAGCACGGGTACAC  
CCAGGTCGACACCGCCATGTACGACGCCGAGGCGAACGAACGTCACTGGCGGGCGCTGGTG  
GACCTCTTCGGCCGGACGCTCTGA

### **Trình tự số 6:**

>MKPKKLHM\_07699 Putative amidase AmiA2

GTGAGCGTTGACGAGAGCCAGGAACGCCGGACCGGATCGTCCCCGGAACGCCCCGCCGCC  
CGGCGTCCGCCGCCCCGGCCGGGAACCTGGACGGACAGTGGGAGGGGCTCGCCGATCAGGC  
CCGGGCACTGGCCGACGGGCGGGTCAACGCCCTCCGCCGGTCCGGGCCGAGGCCGCGCTCG  
ATCGCCGCCACCCAGGAGAGTGTCAACGCCTTCCGCCGGTCCGGGCCGAGGCCGCGCTCG  
CCGAGGCCGCGGAGGCGGACCGCCGGCTCGCCGACGGGGAACGGCTGCCGCTGCTGGGGGT  
GCCGGTCGCGGTCAAGGACGACACCGACGTGGCGGGCGAACCCACCGCGTTCGGCTGCGCC  
GGGGTGTTCCCGCCCAAGCCGCACGACGCCGAGGTGCTCCGGCGGCTGCGCGCGGGCCGGCG  
CGGTCATCGTCCGTAAGACCAACGCCTGCGAACTCGGGCAGTGGCCGTTACCGAGGGCCC  
GGCCTTCGGCGACACCCGCAACCCCTGGAACCTCGCGCACACCCCGGCGGCTCCTCCGGT  
GGCTCGGCCGCCGCGGTGCGCCGCCGACTGGTCCCCGCCCACTCGGCACCGACGGCGCCG  
GCTCGGTCCGGATCCCCGCCGCTGGTCCCACCTCGTCCGCATCAAACCGCAGCGCGGCCG  
GATCTCTACCTGGCCGGACCCCGAGGCGTTCCAAGGCATCACCGGCATCGGCCCGCTGGCC  
CGCACGGTCCAGGACGCCGCACTGCTGCTGGACGTGCCAGCGGCAACCACGCCGGCGACC  
TGCACCGGCCACCGGCCATCGCGGCCACGAGGCGGCGGCCGGGACCCCGGGAAGCTGCG  
CATCGCGCTCGCCTGGAAGGCCCCACACCTTACCCGCAAACCCCTGCACCCCGACGTG  
CGGAGCGCGGTACCGCGGTGGCCCGCACCCCTGGCCGGCCTGGGCCACTTCGTCGAGGAGG  
CCGAACCGGACTACGGGCTGGTCCGACTGGCCTTCGTCCCGCGCGCCACGGCCGGGGTGGG  
CGAGTGGGCCGCCGGGTCCCCGACCCCGGCTGCTGGACCGCCGCACCCGGGAGGCGGCG  
CGGCTGGGCCGCTGCTCGGCGGACCGGTGCTGCGCCGCGCCCGGGCCGCGGAACGGCGCC  
AGCAGAGCCGCATCGGCGCGCTGTTCCGGCCGCTACGACGTGCTGCTGACGCCGACCACCGC  
GACCCCGCCGCCGCGCGTGGGCACCCCTGGCCGGCTCAGCGGCTGGCAGACCGACCGGGCC  
ATGATCGCGGCCTGCCCGTACGCCTGGCCGTGGAACGTGCTGGGCTGGCCGGGCATCAGCG  
TCCCGGCCGGCTTCAGCGCCGACGGTCTGCCGCTGGGCGCGCAACTGCTCGGCCCGGCGCA  
CGGCGAACCGCGGTTGATCTCACTGGCCGCCAGTTGCAGGACGCCCTGCGGTGGCACGAG  
CGGCACCCCGAACCGCACCCCGTACCGGACGCCGGCCTCAGCCAGGAGGCCGATGA

## Phụ lục 7. Trình tự hai gen multicoper oxidase

### Trình tự số 1:

>MKPKKLHM\_01005 Multicopper oxidase MmcO  
 ATGTCCACACTCCAGACGCGCCCTGCTCGGCGCGGGTATCGCCGCCGCCGGCAGCGGTCTGCTG  
 GCCACCGGGGCCAGCGCCCTGGACGCCAAGACCGGCAGGCATCGCTCCCGCGGCACGCCGACCCC  
 CCTGACGCGCACGACGGCCCCGGCTCGCCGGGACCCACGGCCACGACACCGCGTCCCACTACGTC  
 TCTCCGCACGGTCCCGAGGTCATCAAAGCGGAGAAGTACCGGGGGTCCGGGCCCGTTCGCCGCTTC  
 AAGTTGACCGCCAGCGCGGCCAAGTTCGACATCGGCGGCCGGATCGTCAACACCTGGGCGTACGGC  
 GACCGGTGCCCGGCAAGGAGATCCGGGTCAACGCGGGCGACAAGGTGCCCGTGAGCTTCCACAAC  
 CGTCTCCCGCACTCCACCACCGTCCACTGGCACGGGGTGCAGATCCGCAACGACATGGACGGTTTCG  
 CCCGACATCACCAGCGCAGCGTGAAGGCCGGCCGCTCCTTCGACTACACCTTCGCGGTTCGACAGG  
 CCCGGCACGCACTGGTTCATCCGCACGTGGCGTGCAGCTCGACCGCGGGGTGTACGCGCCGTTG  
 ATCGTTCGAGGACCCCGCGAGCCCTCTCGTACGACCAGAGTGGGTGCTCCTGATCGATGACTGG  
 CTCGACGGGGTTCGACGGAATGACCCCGGACGCGATGCTGGCCGAGCTGAACAAGAACAAGCCCGGT  
 GGAGCCAGCGCCACGGCGGCATGCAAGGACACGGCGGCCGGTTCGGTTCGCGCCGCGGCCTCCAG  
 TGGCGCAGGCGTGCAGGCACCTGCTGTCCGACGACCCCTCAGACAGCATCGAGCATCCGTTCCAC  
 CTGATCAACGGCCGGGCGGCCAAGGACCGGGAGACCTTCCGCGCAAACCGGGCGACCGCATCCGG  
 ATCCGCCCTCATCAACGCGGCCGCCGCCACCGCCTACCGCGTTCGCGCTCGGCGGTTCACAACATGACC  
 GTGACGCACACCGACGGCTACCCGGTGAAGCACAAGACGACCGACAGCCTGCTCATCGCGATGGGC  
 GAGCGCTTCGACGTACTGGTACGGCGAAGGACGGCGTCTTCCCGCTCACCGCGCTCTCCGCGGGC  
 AGCAAGAACCAGACCGCACAGGCCCTCCTGCGGACCGGTGACGGCGAGGCGCCCAACGAGAAGATC  
 CGCCCCGACGGAGCTGAGGAGCGGGGGGCTGAGCGCGGACAAGTTCAAGGCAGCGGCGTCCGTACGG  
 CTCTCGGACAGCAAGCCGGACCGCACCATCAAGATGGACCTCACCGGCTCCATGAAGGACTGGGAC  
 TGGGCGATCAACGGAAGGCCGTTACGGAACCCAGCGGTACGCCGTGCACCAAGGGGAGCGGGTG  
 CGGATCATCTTCCACAACAAGACCAGATGTGGCACCCGATGCACCTGCACGGACACACCTTCGCG  
 CTGCCCAACGGCGGCCCCCGCAAGGACACCACCATCGTCCTGCCGGACAAGAAGGTTCGCGGTGGAC  
 TTCGACGCCGACAACCCCGGTCTGTGGATGCTGCACTGCCACAACATCTACCACTCGGAGTCGGGG  
 ATGATGACCGTCTCGGCTACAAGACGAGGCGATGA

### Trình tự số 2:

>MKPKKLHM\_05648 Multicopper oxidase MmcO  
 ATGAAGACCATCGATCGACGCGCCGTCTGCTGGCGGGGCTGGGCGCGGCGGGCTCCGGC  
 CTGCTCGCCGGCTGTTCCACGGACGCCGCGGGCCCCGCGGCCCGAGGCGGCTCCGGCCCC  
 ACCCTGGTTCAGCCCGTCCGGGGCGGCCGTGGCGGCCGCCGAGAAGAAGCGCCACCCTCC  
 GGTCGGGAACGCCGTTCAAGCTGACCGCGACCGCCGGTGCCTCGATCTGGGCGCCGGG  
 AAGACCGTCCGGACCTGGAGCTTCGACGGTTCGGTTCGCCGGGCGGGAACTCCGGGTACC  
 GCGGGCGACACGCTCGTCGCCGAGCTCGCCAACCACCTGCCGACGCCACCTCGATCCAC  
 TGGCACGGCCTCGCCCTGCGCAACGACATGGACGGCGTCCCGCCCGTCAACCAGCGGGCG  
 GTGGCGGCCGGCGGGGCGTTCACCTACCGGTTTCGTCGCCGAGACGCCCGGCACCTACTGG  
 TTCCATCCGCACGTCGGGGTCCAGTTGGACCGTGGCCTGTACGGCCCGCTGATCGTTCGAG  
 GACCCGCACGAACCGTGGGGTACGACGACGAGTGGGTGCTGGTGTTCGACGACTGGCTC  
 GACGGCGTACCGGCACTCCGGAGCAGGCGCTCGCCGCGCTGCGACGGGGCATGGGCCCCG  
 GACCACGGTGCCACGCCGCACGACGGGAAGGACGGCTCACCCGGCGGTACCGGAGGCATG  
 GGCGGCATGGGCGGCATGGGCGGCATGGGAGGGATGGGCGGCATGCAGGGCATGGGACGC  
 TCAGCTGACCTGCCGGGGATGCCGGGGATGGCCGGCACGGACGACCCCTTCATGCTGATG  
 GCGCGACACGACCCCTGCTGGGCGGGCGACGCCGGTTCGCTGAAGTACCCGTAACCTC  
 GTCAACGGCCGGGTGCCGGCCGCGCCCGCCACGTACCGGGGCAAGCCCGGCCACAGGCTC  
 CGGCTGCGGATCGTCAACGCCGGCGGGGACACCGCGTTCGGGTTCGCCCTCGGCGGCCAC  
 CGGCTCACCGTCAACCACACCGACGGCTACCCCGTTCGCCACGAACCGGCCGACGCCCTG

CTGATCGGCCCCGGCGAACGGTACGACGCGCTGGTGACGTTGGGCGACGGCGTGTTCCCG  
 CTCGTCGCCCTGGCCGAGGGCAAGGGGGCGGCCGACTGGCCCTGGTGCGCACCGGCTCC  
 GGCCGCGCCCCGTCCGCCGCCGTCCGGCCACGGAGCTCAACGGCCGGATCCCGGTGCGC  
 GCGCCCTGCGGGCCGTGAGGGCGTCCGCCCTCGCGTCCCGTCGGCCGGACGTCACCCAC  
 CGCATCGCGTTGACCGGGGGGATGGCGAAGTACGACTGGGCGCTCAACGGCCGGCGGTTT  
 GCCATGAACGCCGCGGACGCCCACCCCTTACCCTCGGCAGCGGCCAACGGGTGCGCCTG  
 CGGTTTCGTCAACACCACCGACATGTGGCACCCGATGCACCTGCACGGGCACACCTACCAA  
 CTCGGCGCCGCCGGCCCCCGGAAGGACACCGTCATCGTCCTGCCGGGCTCAACGGTCAGC  
 TGCGACTTCGATGCCGACAACCCGGGCCGGTGGCTGATCCACTGCCACAACGCCTACCAC  
 GGCGAAAGCGGAATGATGGGGCTGCTGGCCTACGACGCCTGA

### **Phụ lục 8. Trình tự gen dye-decolorizing peroxidase**

>MKPKLHM\_02613 Dye-decolorizing peroxidase  
 ATGAGCAAGCAGCAGGACGCCACCGCCACCCCGCCCGACGACGCCCCCGCACCCGGCCC  
 GAACCGGCCGCGGACGGCACCCGCCCGCAGCTGTCCCGCCGCCGCTCCTGGGGACCGTC  
 GCGCGGGCCGGCGCGGCCGGGCTGGTCGTCGGCGGGCCGGCGGGCGCGCTCGGTGCCTCG  
 GCCGCGCAGGGCGACGCCCCGGCGGCGCTGACCACGATCGGGGCGACCGAGGTCCCCTTC  
 CGCACGGCGGGCGCCAAGCACCAGGCCGGCATCACCACCCCGCTCCAGGCCAGCGGCCAC  
 CTCGTGCGCTTCGACCTGGCGCCCGGGCGCCGGCCGCACGGAGGCCGCCGCGCTGCTGCGC  
 CGCTGGTCGACAGCGGCCCGGGAGCTGATGGCCGGGCGTACCCCGCAGGCCGACACCGAC  
 GTGGCGCGGGACGCCGGCCCGTCTCGCTGACCGTCACCTTCGGGTTGGGCCGCGGCTTC  
 TTCGACCGGACCGGCCTGACCGCGCGCCGCCGGTCCAGCTCGACCCGCTGCCCGCCTTC  
 TCCAACGACGCCCTCGACCCGCGGCGCTCCGACGGCGACCTGTGGATCCAGGTCCGTGCC  
 GACGACGCGCTGGTCGCCTTCCACGCCCTGCGCGCGCTGCAGAAGGAGGCGGCGGGGCC  
 GCCCGGCTGCGCTGGCAGATGAACGGCTTCAACCGCACGCCGGGCGCCACCGCGCGCCCG  
 ATGACCGCCCGCAACCTGATGGGCCAGGTCGACGGCACCAACAACCCCAAGCCGTCCGAC  
 CCGGACTTCGACCGGCGGATCTTCGTGCGCGGACACCGCGCAGGAGTGGATGCGCGGC  
 GGCTCGTACGCGGTGGTGCGCCGGATCCGGATGCTGCTCGACGACTGGGAGAAGCGCCCG  
 CGCACCGAGCAGGAGCGGGTCATAGGCCGGCGCAAGGACAGCGGCGCCCCGCTGACCGGC  
 GGCACCGAGACCACCCGATGAAACTGGACGCCACCGGCCCGACGGGCTCCCGGTATC  
 CCCGCCAACGCGCACGCCCGGATCGCCGCCCGGAGGCCAACAGGGCGCGGCGCTGCTG  
 CGCCGCCCGTTCTCCTTCCACGACGGCTTCCGCGACGACGGCGCCCCGGACGCCGGGCTG  
 CTCTTCGTCTGCTGGCAGGCCGACCCGCTGCGCGCCTTACCCAGATCCAGCGGAAGCTG  
 GACCGCGGGCGACGCGCTGTCGCCGTTCTGCGGCACGAGGCCAGCGGTCTGTACGCGGTG  
 CCGCCGGCGCCCTCGGACGGCGACTACGTGGCCAGCCGCTGCTGGAGGGCTGA