

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

**TRỊNH ĐÌNH KHÁ**

**TINH SẠCH VÀ NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH CỦA  
CELLULASE TỰ NHIÊN VÀ TẠO CELLULASE TÁI TỔ  
HỢP TỪ NẤM SỢI TẠI VIỆT NAM**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**THÁI NGUYÊN - 2015**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

**TRỊNH ĐÌNH KHÁ**

**TINH SẠCH VÀ NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH CỦA  
CELLULASE TỰ NHIÊN VÀ TẠO CELLULASE TÁI TỒ  
HỢP TỪ NẤM SỢI TẠI VIỆT NAM**

**Chuyên ngành: HÓA SINH HỌC**

**Mã số: 62 42 01 16**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS. TS. Quyền Đình Thi  
2. PGS. TS. Nghiêm Ngọc Minh**

**THÁI NGUYÊN - 2015**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của PGS. TS. Quyên Đình Thi và PGS. TS. Nghiêm Ngọc Minh. Một số kết quả cùng cộng tác với các đồng tác giả. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả. Phần còn lại chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Mọi trích dẫn đều ghi rõ nguồn gốc.

Thái Nguyên, ngày tháng 7 năm 2015

*Tác giả*

**Trịnh Đình Khả**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc tới PGS. TS. Quyền Đình Thị, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đã định hướng nghiên cứu, tận tình hướng dẫn, sửa luận án, biên tập bản thảo bài báo và tạo mọi điều kiện hóa chất, thiết bị, cũng như kinh phí để tôi có thể hoàn thành Bản luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc tới PGS. TS. Nghiêm Ngọc Minh, Viện nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đã chỉ bảo, định hướng nghiên cứu, hướng dẫn, sửa luận án và động viên tôi trong suốt thời gian nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn Phòng Đào tạo, Ban Giám hiệu trường Đại học Khoa học, Ban Đào tạo - Đại học Thái Nguyên đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi hoàn thành mọi thủ tục cần thiết trong quá trình làm nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn tập thể Phòng Công nghệ sinh học Enzyme, Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã chỉ bảo, giúp đỡ tận tình cho tôi trong quá trình thực nghiệm cũng như chia sẻ những kinh nghiệm chuyên môn quý báu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới Ban Chủ nhiệm Khoa, các thầy cô giáo trong khoa Khoa học Sự sống, trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã luôn quan tâm, giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi trong suốt thời gian tôi thực hiện đề tài luận án.

Cuối cùng tôi xin cảm ơn những người thân trong gia đình và bạn bè đã giúp đỡ, tạo điều kiện và động viên tôi trong suốt thời gian học tập.

Thái Nguyên, ngày      tháng 7 năm 2015

*Tác giả*

**Trịnh Đình Khả**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
MỤC LỤC .....	iii
DANH MỤC NHỮNG TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT .....	viii
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	x
DANH MỤC CÁC HÌNH .....	xi
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	<b>1</b>
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu .....	3
4. Những đóng góp mới của luận án .....	3
5. Ý nghĩa khoa học thực tiễn của luận án .....	4
5.1. Ý nghĩa khoa học .....	4
5.2. Ý nghĩa thực tiễn .....	4
<b>Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	<b>5</b>
1.1. Cellulase .....	5
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại.....	5
1.1.2. Cơ chất cellulose .....	7
1.1.3. Cấu trúc của cellulase .....	8
1.1.4. Tinh sạch và đánh giá tính chất của cellulase .....	14
1.1.4.1. Tinh sạch cellulase.....	14
1.1.4.2. Tính chất của cellulase .....	15
1.2. Ứng dụng của cellulase .....	18
1.2.1. Ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm.....	18
1.2.2. Ứng dụng trong công nghiệp sản xuất thức ăn chăn nuôi.....	19
1.2.3. Ứng dụng trong công nghiệp sản xuất dung môi hữu cơ.....	21
1.2.4. Trong công nghiệp sản xuất giấy và bột giấy.....	21

1.2.5. Ứng dụng trong công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa và công nghệ xử lý rác thải.....	22
1.3. Nghiên cứu tạo cellulase tái tổ hợp.....	23
1.3.1. Biểu hiện gen mã hóa cellulase trong <i>E. coli</i> .....	23
1.3.2. Biểu hiện gen mã hóa cellulase trong nấm men .....	24
1.3.3. Biểu hiện gen mã hóa cellulase trong <i>Bacillus</i> .....	25
1.3.4. Biểu hiện gen mã hóa cellulase trong nấm mốc .....	25
1.3.5. Biểu hiện gen mã hóa cellulase trong động vật và thực vật.....	26
1.3.5.1. Trong thực vật.....	26
1.3.5.2. Trong động vật .....	27
1.3.6. Nghiên cứu cellulase và biểu hiện gen cellulase ở Việt Nam.....	27
1.4. Nấm <i>Peniophora</i> sp. và <i>Aspergillus niger</i> .....	29
1.4.1. <i>Peniophora</i> sp.....	29
1.4.2. <i>Aspergillus niger</i> .....	30
<b>Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	32
2.1. Vật liệu, hóa chất và địa điểm nghiên cứu .....	32
2.1.1. Vật liệu .....	32
2.1.2. Hóa chất, dung dịch và môi trường thí nghiệm.....	32
2.1.2.1. Hóa chất.....	33
2.1.2.2. Dung dịch và đệm .....	33
2.1.2.3. Môi trường .....	33
2.1.3. Địa điểm nghiên cứu.....	33
2.2. Thiết bị thí nghiệm .....	33
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	34
2.3.1. Các phương pháp vi sinh vật.....	34
2.3.2. Các phương pháp sinh học phân tử.....	34
2.3.2.1. Tách chiết DNA tổng số của nấm mốc .....	34
2.3.2.2. Tách chiết DNA tổng số nấm men.....	35
2.3.2.3. Tách DNA plasmid .....	35

2.3.2.4. Cắt plasmid bằng enzyme giới hạn .....	35
2.3.2.5. Tinh sạch phân đoạn DNA.....	36
2.3.2.6. Nhân bản gen bằng PCR .....	36
2.3.2.7. Phản ứng nối ghép gen.....	37
2.3.3.8. Biến nạp bằng sốc nhiệt .....	38
2.3.3.9. Biến nạp bằng xung điện.....	38
2.3.2.10. Giải trình tự nucleotide .....	39
2.3.3. Các phương pháp hóa sinh.....	39
2.3.3.1. Xác định hoạt tính cellulase theo đường kính thủy phân trên đĩa thạch .....	39
2.3.3.2. Xác định hoạt độ cellulase .....	40
2.3.3.3. Tinh sạch cellulase tự nhiên.....	40
2.3.3.4. Tinh sạch protein tái tổ hợp .....	41
2.3.3.5. Điện di gel polyacrylamide (PAGE).....	41
2.3.2.6. Điện di SDS-PAGE nhuộm hoạt tính .....	42
2.3.2.7. Xác định hàm lượng protein tổng số.....	42
2.3.2.8. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố lý hóa lên hoạt tính và độ bền của endoglucanase tự nhiên và tái tổ hợp .....	43
2.3.2.9. Xác định sản phẩm thủy phân bằng kỹ thuật TLC .....	44
2.4. Phương pháp xử lý số liệu.....	44
<b>Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>46</b>
3.1. Tinh sạch và nghiên cứu đặc tính của cellulase tự nhiên từ nấm sợi tại Việt Nam .....	46
3.1.1. Tuyển chọn và phân loại chủng nấm sợi sinh tổng hợp cellulase.....	46
3.1.2. Tối ưu điều kiện môi trường nuôi cấy sinh tổng hợp cellulase .....	49
3.1.2.1. Thời gian nuôi cấy thích hợp .....	49
3.1.2.2. Ảnh hưởng của pH ban đầu của môi trường và nhiệt độ nuôi cấy ....	50
3.1.2.3. Ảnh hưởng của chất cảm ứng .....	52
3.1.2.4. Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết khoai tây bổ sung .....	53

3.1.2.5. Ảnh hưởng của nguồn cacbon .....	53
3.1.2.6. Ảnh hưởng của nguồn nitơ .....	55
3.1.2.7. Ảnh hưởng của một số nguồn khoáng .....	56
3.1.2.8. So sánh khả năng sinh tổng hợp enzyme trong môi trường tối ưu và chưa tối ưu .....	57
3.1.3. Tinh sạch và đánh giá tính chất cellulase của chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01 .....	58
3.1.3.1. Tinh sạch cellulase .....	58
3.1.3.2. Động học cơ chất của cellulase.....	59
3.1.3.3. Đặc hiệu cơ chất của cellulase .....	61
3.1.3.4. Sản phẩm thủy phân cơ chất của cellulase .....	62
3.1.3.5. Nhiệt độ phản ứng tối ưu và độ bền nhiệt độ của endoglucanase .....	63
3.1.3.6. pH phản ứng tối ưu và độ bền pH của endoglucanase .....	64
3.1.3.7. Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính endoglucanase.....	65
3.1.3.8. Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ và chất tẩy rửa đến hoạt tính endoglucanase .....	66
3.2. Nhân dòng và biểu hiện gen <i>meGlA</i> từ chủng <i>Aspergillus niger</i> VTCC- F021 trong <i>Pichia pastoris</i> .....	68
3.2.1. Nhân dòng gen <i>meGlA</i> .....	69
3.2.2. Thiết kế vector biểu hiện <i>meGlA</i> .....	72
3.2.3. Biểu hiện <i>rmEglA</i> trong <i>P. pastoris</i> GS115.....	73
3.2.3.1. Xây dựng hệ thống biểu hiện <i>P. pastoris</i> GS115/ <i>pPmeGlA</i> .....	73
3.2.3.2. Sàng lọc các dòng <i>P. pastoris</i> GS115/ <i>pPmeGlA</i> sinh tổng hợp <i>rmEglA</i> mạnh.....	75
3.2.4. Tối ưu một số thành phần môi trường và điều kiện lên men sản xuất <i>rmEglA</i> .....	76
3.2.4.1. Lựa chọn môi trường thích hợp .....	76
3.2.4.2. Nồng độ cao nấm men tối ưu.....	76
3.2.4.3. Nồng độ peptone tối ưu .....	77
3.2.4.4. pH ban đầu của môi trường .....	78



3.2.4.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ.....	79
3.2.4.6. Ảnh hưởng của nồng độ methanol cảm ứng.....	80
3.2.4.7. Ảnh hưởng của thời gian đến năng suất biểu hiện rmEglA.....	80
3.2.4.8. So sánh năng suất biểu hiện rmEglA trong môi trường tối ưu và chưa tối ưu.....	81
3.2.5. Tinh sạch rmEglA.....	82
3.2.6. Tính chất của rmEglA .....	83
3.2.6.1. Động học cơ chất của rEglA.....	83
3.2.6.3. Xác định tính đặc hiệu cơ chất của rmEglA .....	85
3.2.6.4. Sản phẩm thủy phân của rmEglA .....	85
3.2.6.5. Nhiệt phản ứng tối ưu và độ bền nhiệt độ của rmEglA .....	86
3.2.6.6. pH phản ứng tối ưu và độ bền pH của rmEglA .....	87
3.2.6.7. Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính của rmEglA.....	88
3.2.6.8. Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ và chất tẩy rửa.....	89
<b>Chương 4. THẢO LUẬN.....</b>	<b>92</b>
4.1. Tinh sạch và nghiên cứu đặc tính của cellulase tự nhiên từ nấm sợi tại Việt Nam .....	92
4.2. Nhân dòng và biểu hiện gen <i>megla</i> từ chủng <i>Aspergillus niger</i> VTCC- F021 trong <i>Pichia pastoris</i> .....	99
<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ .....</b>	<b>103</b>
Kết luận.....	103
Đề nghị.....	104
<b>CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN .....</b>	<b>105</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>105</b>
<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>128</b>

## DANH MỤC NHỮNG TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
BLAST	Basic local alignment search tool	
bp	Base pair	Cặp bazơ nitơ
cDNA	Complement DNA	DNA bổ sung
CMC	Carboxymethyl cellulose	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
DNase	Deoxyribonuclease	
dNTP	2'-Deoxynucleoside 5'-triphosphate	
ĐC		Đối chứng
đtg		Đồng tác giả
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	
<i>eglA</i>		Gen mã hóa endoglucanase A chứa peptide tín hiệu
EglA	Endoglucanase A	Endoglucanase A chứa peptide tín hiệu
EtBr	Ethidium bromide	
M	Marker	
NBB	Native Binding Buffer	Đệm gắn mẫu
NEB	Native Elution Buffer	Đệm thôi mẫu
NWB	Native Wash Buffer	Đệm rửa
kb	Kilo base	
kDa	Kilo Dalton	
<i>meglA</i>		Gen mã hóa endoglucanase A không chứa peptide tín hiệu
mEglA	Mature endoglucanase A	Endoglucanase A không chứa peptide tín hiệu

OD	Optical density	Mật độ quang
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi tổng hợp
RNA	Ribonucleic acid	
RNase	Ribonuclease	
rEglA	Recombinant endoglucanase A	Endoglucanase A chứa peptide tín hiệu tái tổ hợp
rmEglA	Recombinant mature endoglucanase A	Endoglucanase A không chứa peptide tín hiệu tái tổ hợp
rpm	Revolutions per minute	Số vòng/phút
SDS	Sodium dodecyl sulfate	
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	Điện di trên gel polyacrylamide có SDS
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	
TBE	Tris-boric-acid EDTA	
TE	Tris - EDTA	
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng
v/v	Volume/volume	Thể tích/thể tích
w/v	Weight/volume	Khối lượng/thể tích

---

## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Các cặp mồi sử dụng trong phản ứng PCR nhân gen.....	36
Bảng 2.2. Thành phần PCR.....	37
Bảng 3.1. Thông số kỹ thuật các bước tinh sạch cellulase từ chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01 .....	59
Bảng 3.2. Hằng số động học cơ chất của cellulase tinh sạch từ <i>Peniophora</i> sp. NDVN01 .....	60
Bảng 3.3. Đặc hiệu cơ chất của cellulase từ chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01 ..	61
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của ion kim loại và một số thuốc thử đến hoạt tính endoglucanase của chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01 .....	66
Bảng 3.5. Hoạt tính rmEglA của các dòng <i>P. pastoris</i> GS115/pPmeglA tái tổ hợp .	75
Bảng 3.6. Thông số kỹ thuật các bước tinh sạch rmEglA.....	82
Bảng 3.7. Hằng số động học cơ chất của rmEglA tinh sạch.....	84
Bảng 3.8. Mức độ đặc hiệu cơ chất của rmEglA .....	85
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính rmEglA .....	88
Bảng 3.10. So sánh một số đặc điểm của rmEglA và rEglA .....	91
Bảng PL2.1. Các hóa chất thí nghiệm chính.....	128
Bảng PL2.2. Thành phần các loại đệm và dung dịch.....	128
Bảng PL.2.3. Các môi trường thí nghiệm .....	130
Bảng PL.2.4. Các thiết bị thí nghiệm.....	132
Bảng PL3.1. Hoạt tính cellulase của các chủng nấm.....	132
Bảng PL3.2. Trình tự nucleotide đoạn gen rRNA của chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01 .....	134

## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh mô hình sự sắp xếp các chuỗi cellulose trong thành tế bào thực vật.....	8
Hình 1.2. Hình ảnh cấu trúc phân tử của một số cellulase.....	9
Hình 1.3. Hình ảnh mô hình cấu trúc không gian và trung tâm xúc tác của Cel12A từ <i>H. grisea</i> .....	10
Hình 1.4. Trình tự amino acid tương ứng với cấu trúc bậc 2 của Cel12A từ một số chủng vi sinh vật .....	11
Hình 1.5. Cấu trúc vùng CBD của Cel12A từ <i>Humicola grisea</i> .....	12
Hình 1.6. Hai cơ chế xúc tác của phức hệ cellulase.....	13
Hình 1.7. Cơ chế thủy phân phân tử cellulose và phức hệ cellulose .....	14
Hình 2.1. Cấu trúc vector tách dòng pJET1.2/blunt và vector biểu hiện pPICZ $\alpha$ A .....	32
Hình 2.2. Mô hình hội nhập gen <i>meglA</i> vào genome của <i>P. pastoris</i> .....	39
Hình 3.1. Hoạt tính cellulase của một số chủng nấm sợi nghiên cứu.....	46
Hình 3.2. Hình ảnh điện di DNA nhân gen mã hóa rRNA .....	47
Hình 3.3. Cây phân loại của chủng NDVN01 dựa vào trình tự gen mã hóa rRNA....	49
Hình 3.4. Đồ thị ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy và pH ban đầu của môi trường đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01.....	50
Hình 3.5. Đồ thị ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy; Biểu đồ so sánh ảnh hưởng nguồn cơ chất cảm ứng đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01 .....	51
Hình 3.6. Đồ thị ảnh hưởng của nồng độ bột giấy và nồng độ dịch chiết khoai tây đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01.....	52
Hình 3.7. Biểu đồ ảnh hưởng của một số nguồn cacbon và đồ thị ảnh hưởng của nồng độ rom lúa đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng nấm <i>Peniophora</i> sp. NDVN01.....	54

Hình 3.8. Biểu đồ ảnh hưởng của nguồn nitơ và đồ thị ảnh hưởng của nồng độ ammonium hydrogen phosphate đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01 .....	56
Hình 3.9. Biểu đồ ảnh hưởng của một số nguồn khoáng và năng suất sinh tổng hợp cellulase của chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01 trong môi trường tối ưu và chưa tối ưu .....	57
Hình 3.10. Sắc ký đồ tinh sạch cellulase trên cột Biogel-P100 và hình ảnh điện di protein sản phẩm tinh sạch, điện di hoạt tính .....	59
Hình 3.11. Phương trình động học Lineweaver-Burk đối với cơ chất CMC và cơ chất $\beta$ -glucan lúa mạch .....	61
Hình 3.12. Hình ảnh phổ chạy sắc ký TLC sản phẩm thủy phân cơ chất CMC của cellulase tinh sạch từ chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01 ...	62
Hình 3.13. Đồ thị ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng và độ bền nhiệt độ của cellulase từ chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01 .....	63
Hình 3.14. Đồ thị ảnh hưởng của pH phản ứng và độ bền pH của endoglucanase từ chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01 .....	65
Hình 3.15. Biểu đồ so sánh ảnh hưởng của dung môi hữu cơ và chất tẩy rửa đến hoạt tính endoglucanase của chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01 .	67
Hình 3.16. Hình ảnh kết quả phân tích trình tự peptide tín hiệu của EglA bằng phần mềm SignalP 4.1 Server .....	69
Hình 3.17. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen <i>meglA</i> , plasmid tái tổ hợp pJmeglA và sản phẩm cắt pJmeglA bằng <i>EcoRI/XbaI</i> .....	70
Hình 3.18. Trình tự gen <i>meglA</i> và trình tự amino acid suy diễn của mEglA từ chủng <i>A. niger</i> VTCC-F021.....	71
Hình 3.19. Hình ảnh điện di sản phẩm thổi gel, plasmid pPmeglA, sản phẩm cắt pPmeglA bằng <i>EcoRI</i> và <i>XbaI</i> , sản phẩm cắt pPmeglA bằng <i>SacI</i> .....	72
Hình 3.20. Trình tự nucleotide của cấu trúc biểu hiện pPmeglA .....	73
Hình 3.21. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu 3'-5' AOX1; điện di protein tổng số dịch lên men chủng <i>P. pastoris</i>	

GS115/pP <i>meglA</i> ; điện di nhuộm hoạt tính dịch lên men chủng <i>P. pastoris</i> GS115/pP <i>meglA</i> .....	74
Hình 3.22. Biểu đồ so sánh ảnh hưởng của loại môi trường và đồ thị ảnh hưởng nồng độ cao nấm men đến năng suất biểu hiện rmEglA .....	77
Hình 3.23. Đồ thị ảnh hưởng của nồng độ peptone và pH ban đầu của môi trường đến năng suất biểu hiện rmEglA .....	78
Hình 3.24. Biểu đồ so sánh ảnh hưởng của nhiệt độ và đồ thị ảnh hưởng của nồng độ methanol đến năng suất biểu hiện rmEglA.....	79
Hình 3.25. Đồ thị ảnh hưởng của thời gian lên men và biểu đồ so sánh năng suất biểu hiện rmEglA trong môi trường và điều kiện tối ưu .....	81
Hình 3.26. Hình ảnh điện di các phân đoạn tinh sạch rmEglA, điện di so sánh rEglA với rmEglA và điện di nhuộm hoạt tính .....	83
Hình 3.27. Đồ thị phương trình động học cơ chất Lineweaver-Burk của rmEglA.....	84
Hình 3.28. Phổ chạy sắc ký TLC sản phẩm thủy phân cơ chất CMC của rmEglA ....	86
Hình 3.29. Nhiệt độ phản ứng tối ưu và độ bền nhiệt độ của rmEglA .....	86
Hình 3.30. pH phản ứng tối ưu và độ bền pH của rmEglA .....	87
Hình 3.31. Biểu đồ so sánh ảnh hưởng của dung môi hữu cơ và chất tẩy rửa đến hoạt tính của rmEglA .....	90

## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học hiện đại, công nghệ enzyme đã có bước phát triển vượt bậc, ngày càng có nhiều thành tựu và được ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp, đem lại lợi ích to lớn cho con người. Trong số các enzyme đang được ứng dụng hiện nay, cellulase là một trong những enzyme có nhiều ứng dụng trong thực tiễn. Cellulase xúc tác cho phản ứng thủy phân liên kết  $\beta$ -1,4-glycoside trong phân tử cellulose và các dẫn xuất tạo thành glucose và các đường đơn giản. Do đó, cellulase được ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, sản xuất thức ăn chăn nuôi, sản xuất bia, bột giấy, ngành công nghiệp chất tẩy rửa, ngành công nghiệp dệt may, nhiên liệu và hóa chất, quản lý chất thải và xử lý ô nhiễm môi trường.

Cellulase là một phức hệ enzyme gồm 3 loại enzyme chính gồm: endoglucanase, exoglucanase và  $\beta$ -glucosidase. Trong đó, endoglucanase là loại enzyme có khả năng thủy phân mạnh phân tử cellulose ở vùng vô định hình, có nhiều tiềm năng ứng dụng trong thực tiễn và được tập trung nghiên cứu nhiều nhất hiện nay. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về cellulase, những nghiên cứu về cellulase chủ yếu tập trung vào việc tách dòng gen mã hoá cellulase, tinh sạch và nghiên cứu đặc điểm hoá sinh của cellulase, tối ưu những điều kiện nuôi cấy thu nhận chế phẩm enzyme từ các loài nấm mốc, vi khuẩn và xạ khuẩn. Nhiều công ty trên thế giới đã tạo ra những chế phẩm cellulase thương mại và ứng dụng vào thực tiễn. Ở Việt Nam đã có những nghiên cứu về tinh sạch, nghiên cứu đặc điểm hoá sinh từ một số chủng nấm sợi như: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*; xạ khuẩn *Actinomyces* được công bố. Tuy nhiên, việc khai thác ứng dụng cellulase từ nguồn tự nhiên gặp nhiều hạn chế do năng lực sinh tổng hợp của chủng giống, không chủ động nguồn enzyme, khó can thiệp thay đổi tính chất về động học enzyme, độ bền



hiệt độ và pH, khả năng hoạt động trong những điều kiện nồng độ cao chất tẩy rửa và dung môi hữu cơ.

Bằng các kỹ thuật tái tổ hợp DNA đã cho phép các nhà công nghệ sinh học phân lập và khuếch đại một gen đơn từ hệ gen của một sinh vật để có thể nghiên cứu, biến đổi và chuyển nó vào cơ thể sinh vật khác tạo protein tái tổ hợp. Sản xuất enzyme bằng con đường tái tổ hợp có thể chủ động về nguồn nguyên liệu cung cấp enzyme ban đầu ; nâng cao năng suất , chất lượng enzyme ; dễ dàng công nghệ hóa quá trình sản xuất và giảm giá thành sản phẩm.

Trên thế giới, đã có nhiều phương pháp được đưa ra để nâng cao năng suất cellulase như là tuyển chọn các chủng có khả năng sinh tổng hợp cellulase cao, tối ưu hóa các điều kiện lên men nhằm thu được lượng lớn enzyme này. Đặc biệt với sự phát triển của công nghệ, một số gen mã hóa cellulase của vi sinh vật và thực vật đã được tách dòng và biểu hiện ở các hệ biểu hiện khác nhau (biểu hiện ở *E. coli*, nấm men, nấm sợi). Ở Việt Nam, việc nghiên cứu cellulase chủ yếu dừng ở việc phân lập tuyển chọn các chủng vi sinh vật sản xuất enzyme cao và đánh giá một số tính chất của enzyme để ứng dụng trong công nghệ sinh học và xử lý môi trường. Việc nghiên cứu tạo chế phẩm cellulase tái tổ hợp và ứng dụng các chế phẩm này còn hạn chế.

Xuất phát từ những lý do trên chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài:

**“Tinh sạch và nghiên cứu đặc tính của cellulase tự nhiên và tạo cellulase tái tổ hợp từ nấm sợi tại Việt Nam”.**

## **2. Mục tiêu nghiên cứu**

(i) Tinh sạch và đánh giá được đặc tính của cellulase tự nhiên từ chủng nấm sợi tuyển chọn;

(ii) Tạo được endoglucanase tái tổ hợp không chứa peptide tín hiệu từ nguồn gen đã được phân lập từ chủng nấm sợi tuyển chọn tại Việt Nam.

### 3. Nội dung nghiên cứu

3.1. Nghiên cứu tuyển chọn chủng nấm sợi có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh trong bộ sưu tập từ nhiều nguồn khác nhau;

3.2. Nghiên cứu tối ưu thành phần môi trường, điều kiện lên men quy mô phòng thí nghiệm phù hợp với chủng nấm sợi tuyển chọn làm cơ sở sản xuất cellulase tự nhiên;

3.3. Tinh sạch và phân tích tính chất lý hóa của cellulase tinh sạch từ chủng nấm sợi chọn lọc tại Việt Nam;

3.4. Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa endoglucanase không chứa peptide tín hiệu từ chủng nấm sợi *Aspergillus niger* VTCC-F021 trong *Pichia pastoris* GS115 và tối ưu môi trường lên men phù hợp để sản xuất endoglucanase tái tổ hợp không chứa peptide tín hiệu;

3.5. Tinh sạch và phân tích tính chất lý hóa của endoglucanase tái tổ hợp không chứa peptide tín hiệu.

### 4. Những đóng góp mới của luận án

(i) Endoglucanase từ chủng nấm sợi *Peniophora* sp. NDVN01 tuyển chọn tại Việt Nam được tinh sạch có kích thước khoảng 32 kDa. Endoglucanase có độ bền cao trong khoảng nhiệt độ 30-37°C và pH 4,0-7,0. Enzyme này bền đối với dung môi acetone ở nồng độ 1-20%; ethanol và n-butanol ở nồng độ 1-5%; isopropanol ở nồng độ 1-15% và độ bền cao đối với chất tẩy rửa Tween 20, Tween 80, Triton X-100 và triton X-114.

(ii) Gen mã hóa endoglucanase A không chứa peptide tín hiệu (*megIA*) từ chủng *A. niger* VTCC-F021 đã được biểu hiện thành công trong *P. pastoris* GS115. Endoglucanase A tái tổ hợp (rmEgIA) tinh sạch có kích thước khoảng 32 kDa. Enzyme hoạt động tối ưu ở nhiệt độ 50°C, pH 3,5, bền ở 30-37°C và rất bền trong khoảng pH 3,0-8,0. Enzyme có độ bền cao đối với chất tẩy rửa Tween 20, Tween 80, Triton X-100 và triton X-114.

## **5. Ý nghĩa khoa học thực tiễn của luận án**

### **5.1. Ý nghĩa khoa học**

Kết quả nghiên cứu góp phần làm sáng tỏ đặc điểm hóa sinh của endoglucanase có nguồn gốc từ nấm sợi thuộc chi *Peniophora* và góp phần làm sáng tỏ ảnh hưởng của peptide tín hiệu đến tính chất endoglucanase của chủng *A. niger* VTCC-F021 biểu hiện trong nấm men *Pichia pastoris*.

Kết quả tạo endoglucanase tái tổ hợp không chứa peptide tín hiệu đã củng cố thêm cơ sở khoa học trong hướng cải biến hoạt tính và tính chất enzyme tái tổ hợp bằng cách cắt bỏ đoạn peptide tín hiệu.

Các bài báo khoa học công bố trên tạp chí khoa học chuyên ngành quốc tế và trong nước cùng với trình tự gen công bố trên cơ sở dữ liệu Ngân hàng gen Quốc tế là những tài liệu có giá trị tham khảo trong nghiên cứu và giảng dạy.

### **5.2. Ý nghĩa thực tiễn**

Endoglucanase từ chủng nấm sợi *Peniophora* sp. NDVN01 và endoglucanase tái tổ hợp không chứa peptide tín hiệu có tính chất phù hợp với hướng ứng dụng sản xuất chế phẩm bổ sung vào thức ăn chăn nuôi để chuyển hóa hợp chất glucan nâng cao hiệu quả sử dụng thức ăn và tăng trọng vật nuôi. Đồng thời, hai enzyme này có thể sử dụng trong chuyển hóa sinh học nguyên liệu, chất thải nông nghiệp giàu cellulose thành đường sử dụng trong công nghiệp lên men.

Thành phần môi trường và điều kiện lên men tối ưu đối với chủng nấm sợi *Peniophora* sp. NDVN01 và chủng nấm men *P. pastoris* tái tổ hợp có thể được sử dụng để lên men lượng lớn, phù hợp để sản xuất chế phẩm endoglucanase tự nhiên và tái tổ hợp trong điều kiện thực tiễn tại Việt Nam.

## Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Cellulase

#### 1.1.1. Nguồn gốc và phân loại

##### 1.1.1.1. Nguồn gốc

Cellulase là nhóm enzyme thủy phân có khả năng cắt mỗi liên kết  $\beta$ -1,4-O-glycoside trong phân tử cellulose, oligosaccharide, disaccharide và một số cơ chất tương tự khác.

Cellulase có thể được tổng hợp từ rất nhiều nguồn khác nhau trong tự nhiên, trong đó vi sinh vật được xem là nguồn cung cấp enzyme với nhiều ưu điểm nổi bật và có tính chất độc đáo vượt xa so với enzyme có nguồn gốc từ động vật, thực vật. Quá trình phân giải cellulose bởi vi sinh vật là một trong những chu trình quan trọng nhất của tự nhiên. Trong tự nhiên có rất nhiều chủng vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm sợi và một số loại nấm men có khả năng sinh tổng hợp cellulase [24].

Nấm sợi là một trong những vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất. Nhiều chủng nấm sợi thuộc các chi *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Phanerochaete* đã được nghiên cứu cho thấy có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh như: *A. niger* [50], [52], *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* [63], *A. oryzae* [124], *A. awamori* [126], *T. reesei* [135], *Penicillium* sp. DTQH-K1 [13], *Penicillium persicinum*, *P. brasilianum* [76], *Phanerochaete chrysosporium* [77].

Bên cạnh nấm sợi, vi khuẩn cũng được xem là một trong những đối tượng có khả năng sinh tổng hợp cellulase khá phong phú với ưu thế chu kỳ sinh trưởng trong thời gian ngắn. Nhiều loài vi khuẩn hiếu khí đã được nghiên cứu là có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh như *Acidothamus cellulobuticus* [37], *Bacillus pumilis* [68], *Cellulomonas flavigena*, *C. udai* [30], *Pseudomonas fluorescens* [104]. Không chỉ có các vi khuẩn hiếu khí mà một số vi khuẩn kỵ khí cũng có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh như *Clostridium* [156].

Nhiều chủng xạ khuẩn thuộc chi *Actinomyces*, *Streptomyces* cũng có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh như: *Actinomyces griseus* [16], *Streptomyces reticuli* [168]. Năm 1955, hoạt động phân giải cellulose bởi vi sinh vật sống cộng sinh trong dạ cỏ của các động vật nhai lại đã được chứng minh [36]. Đến năm 1971, người ta đã phân lập được một số loài vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose trong dạ cỏ. Trong đó có hai chủng được nghiên cứu kỹ hơn cả là *Ruminococcus albus* và *R. flavefaciens* [24]. Ngoài ra, cellulase còn được sinh tổng hợp ở thực vật *Arabidopsis* [40], ở động vật nguyên sinh và một số động vật không xương sống khác như mối [171], ở động vật thân mềm như vẹm xanh *Mytilus edulis* [178].

#### 1.1.1.2. Phân loại

Theo Ủy ban danh pháp của Hiệp hội Hóa sinh và Sinh học phân tử Quốc tế, cellulase thuộc lớp 3 (hydrolase): các enzyme xúc tác phản ứng thủy phân; tổ 2 (glycosidase): các enzyme thủy phân các liên kết glycoside; nhóm 1: các enzyme thủy phân liên kết O- và S-glycoside [189].

Cellulase là một phức hệ gồm nhiều loại enzyme khác nhau. Tùy theo quan điểm của từng tác giả mà các enzyme thuộc phức hệ cellulase được xếp thành các nhóm khác nhau. Trước đây, cellulase được chia làm hai nhóm: nhóm enzyme  $C_1$  và nhóm enzyme  $C_x$ . Các enzyme  $C_1$  có khả năng thủy phân sợi cellulose tự nhiên, có tính đặc hiệu không rõ ràng. Các enzyme  $C_x$  được chia thành hai loại: exo  $\beta$ -1,4-glucanase (E.C.3.2.1.21) xúc tác cho phản ứng cắt đứt gốc glucose từ đầu không khử của chuỗi cellulose; endo  $\beta$ -1,4-glucanase (E.C.3.2.1.4) hoạt động tùy tiện hơn, xúc tác phản ứng thủy phân liên kết bên trong phân tử cellulose. Hiện nay, cellulase được chia làm ba dạng: Endo- $\beta$ -(1,4)-glucanase (hay còn gọi là endocellulase (1,4- $\beta$ -D-glucanohydrolase); CMCCase hoặc  $C_x$ ) (E.C.3.2.1.4) thủy phân liên kết  $\beta$ -1,4-glycoside bên trong chuỗi của cellulose và một số loại polysaccharide tương tự một cách ngẫu nhiên.

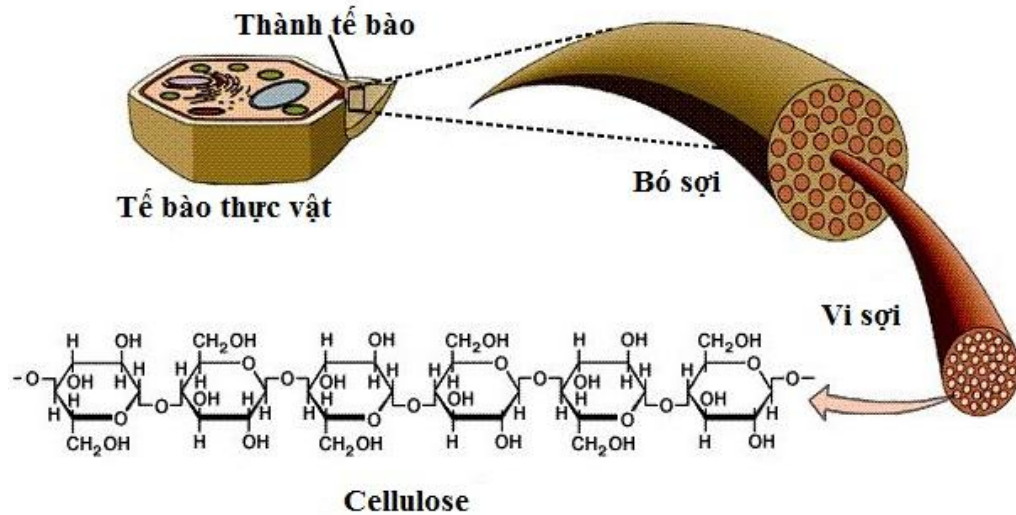
Sản phẩm thủy phân là các oligosaccharide phân tử lượng thấp, cellodextrin và một số đường khử. Endo- $\beta$ -(1,4)-glucanase thủy phân dễ dàng cellulose vùng vô định hình nhưng tác dụng rất yếu ở vùng cellulose kết tinh và không phân giải cellobiose. Exo- $\beta$ -(1,4)-glucanase (hay còn gọi là exocellulase; 1,4- $\beta$ -D-glucancellobiohydrolase hoặc  $C_1$ ) (E.C.3.2.1.91) phân cắt cellulose từ đầu khử và đầu không khử giải phóng ra các oligosaccharide, cellobiose và glucose.  $C_1$  có tính chất không đặc hiệu. Dưới tác dụng của  $C_1$ , các loại cellulose bị hấp thụ nước, trương lên và chuẩn bị cho sự tác động của các enzyme khác. Nếu tách riêng  $C_1$  cho hoạt động độc lập thì tác dụng này lại không rõ ràng.  $\beta$ -(1,4)-glucosidase hay cellobiase (E.C.3.2.1.2) thủy phân các phân tử cellobiose và cellooligosaccharide mạch ngắn tạo thành glucose, nhưng không có tác dụng đối với cellulose và cellulose dextrin cao phân tử [62], [148], [154].

### **1.1.2. Cơ chất cellulose**

Cellulose là một polymer mạch thẳng không cuộn xoắn, được tạo nên từ các đơn vị  $\beta$ -glucose thông qua liên kết  $\beta$ -1,4-O-glycoside. Mức độ polymer hóa được đánh giá dựa vào số phân tử glucose trong chuỗi. Đối với cellulose tự nhiên, con số này khoảng 10000-14000 và khối lượng phân tử của cả chuỗi là  $1,5 \times 10^6$  Da, dài 5  $\mu$ m [64]. Các phân tử glucose trong chuỗi polymer có dạng ghế bành, phân tử này quay  $180^\circ$  so với phân tử kia. Các nhóm  $\beta$ -OH glycoside đều nằm trên mặt phẳng ngang của các phân tử glucose [51].

Bằng phương pháp phân tích sử dụng tia rơnghen, người ta đã tìm ra cấu trúc của cellulose trong tế bào thực vật có dạng sợi. Đơn vị nhỏ nhất của cellulose có đường kính vào khoảng 3 nm. Các sợi sơ cấp hợp lại thành sợi hay còn gọi là micelle. Mỗi micelle thường có khoảng 60 phân tử cellulose, có đường kính từ 10-40 nm, dài 100-40000 nm. Các micelle này hợp lại thành từng bó sợi to hơn nằm đan xen vào nhau có thể quan sát được dưới kính hiển vi quang học. Các bó sợi cellulose liên kết với lớp polysaccharide trong thành tế

bào thực vật tạo nên một phức hệ bền vững đóng vai trò như lớp kết dính sinh học trong thành tế bào thực vật (hình 1.1) [120].



**Hình 1.1. Hình ảnh mô hình sự sắp xếp các chuỗi cellulose trong thành tế bào thực vật [120]**

Cellulose có cấu trúc không đồng nhất gồm hai vùng:

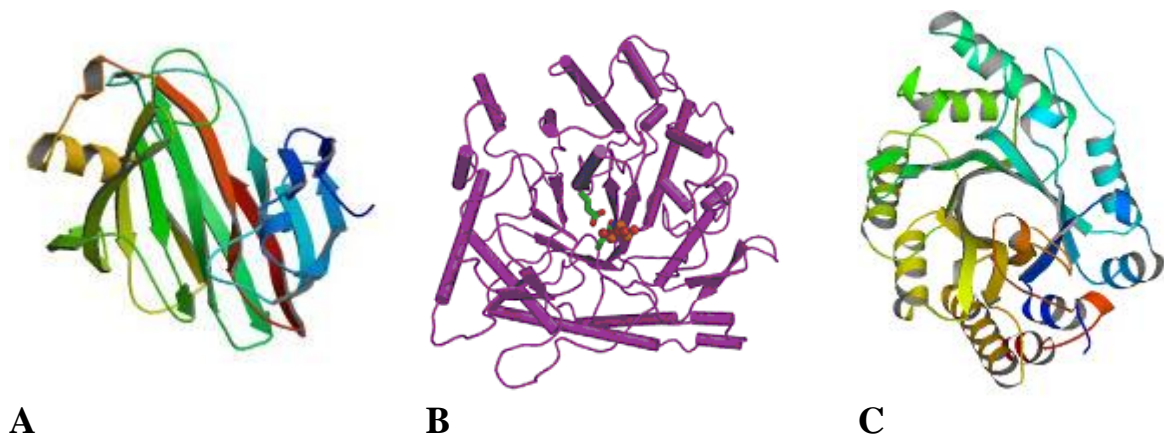
- Vùng kết tinh có trật tự cao.

- Vùng vô định hình có cấu trúc không chặt chẽ, các mạch tập hợp với nhau nhờ lực Van der Waals, dễ bị tác động bởi các yếu tố bên ngoài. Khi gặp nước chúng có thể hấp thu nước và trương phồng lên, nhờ vậy cellulase rất dễ tác động. Trong khi đó, ở vùng kết tinh, các mạch cellulose liên kết với nhau theo một trật tự đều đặn nhờ liên kết hydrogen nối nhóm  $-OH$  thứ nhất của mạch này với nhóm  $-OH$  ở  $C_3$  của mạch khác nên đã ngăn cản được sự trương này. Nhờ đó mà enzyme cũng như nhiều phân tử khác khó có thể xâm nhập vào được bên trong phân tử cellulose để phân hủy [85].

### 1.1.3. Cấu trúc của cellulase

Cellulase từ các nguồn gốc khác nhau có thành phần cấu tạo và cấu trúc khác nhau. Sự khác nhau đó thể hiện trước hết ở sự đa dạng về khối lượng phân tử, thành phần và trật tự sắp xếp của các amino acid trên chuỗi polypeptide. Chúng *A. oryzae* KBN616 sinh tổng hợp hai loại endoglucanase là CelA và

CelB. Phân tử protein CelA gồm 239 amino acid, khối lượng phân tử 31 kDa, được xếp vào họ cellulase H. Trong khi đó, CelB được xếp vào họ cellulase C gồm 416 amino acid và khối lượng phân tử 53 kDa [106]. Endoglucanase từ *A. aculeatus* bao gồm 410 amino acid với khối lượng phân tử 43,7 kDa [163]. Các endoglucanase từ *A. niger* Z10 có khối lượng phân tử 83 kDa và 50 kDa [50], từ *A. terreus* là 25 kDa [63], từ *T. reesei* là 48 kDa và 55 kDa [98, 116], từ *Bacillus* sp. D04 có khối lượng 35 kDa [153]. Endoglucanase từ *A. niger* là EglC có kích thước 50,9 kDa gồm 858 amino acid [28], từ *A. aculeatus* là 45 kDa [121].



**Hình 1.2. Hình ảnh cấu trúc phân tử của một số cellulase**

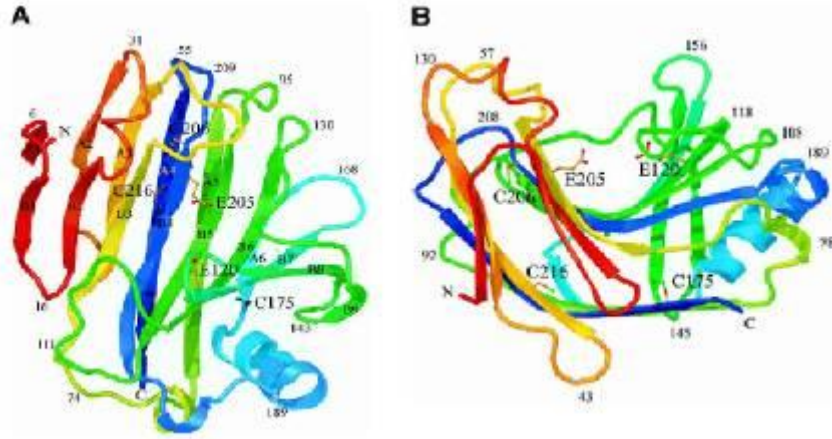
*A: endoglucanase của A. niger [102]; B:  $\beta$ -glucosidase của Trichoderma reesei [89]; C: Exoglucanase của Cellulomonas fimi [173]*

Sandgren và đtg (2003) đã có những nghiên cứu chi tiết về cấu trúc Cel12A thuộc họ 12 (GH 12) endoglucanase từ nấm sợi chịu nhiệt *Humicola grisea*. Cel12A của *H. grisea* là một chuỗi polypeptide gồm 224 amino acid cấu tạo nên các chuỗi  $\alpha$ ,  $\beta$  và các vùng nối (hình 1.3). Sự khác nhau về cấu trúc của các enzyme còn thể hiện ở sự sắp xếp trong không gian các chuỗi polypeptide, các trung tâm xúc tác và các vùng liên kết cơ chất. Chính nhờ sự khác nhau về cấu trúc không gian của các enzyme dẫn tới sự khác nhau về các tính chất hóa lý của chúng. Phân tử Cel12A của *H. grisea* cấu tạo bởi 1 chuỗi  $\alpha$ , 2 chuỗi  $\beta$  (A và B). Chuỗi  $\beta$ -A được cấu tạo bởi 6 dải xoắn  $\beta$  ( $A_1$ - $A_6$ ), chuỗi  $\beta$ -B được cấu tạo bởi 9 dải xoắn  $\beta$  ( $B_1$ - $B_9$ ). Các dải xoắn  $\beta$  được nối với nhau bởi các vùng nối, có 4 vùng nối lớn 29-32, 40-47, 92-96, và 165-169 nối tương ứng các dải xoắn  $\beta$ :  $B_2$ - $A_2$ ,  $A_2$ - $A_3$ ,  $A_5$ - $B_5$  và  $A_6$ - $B_7$  (Hình 1.3A) [152].



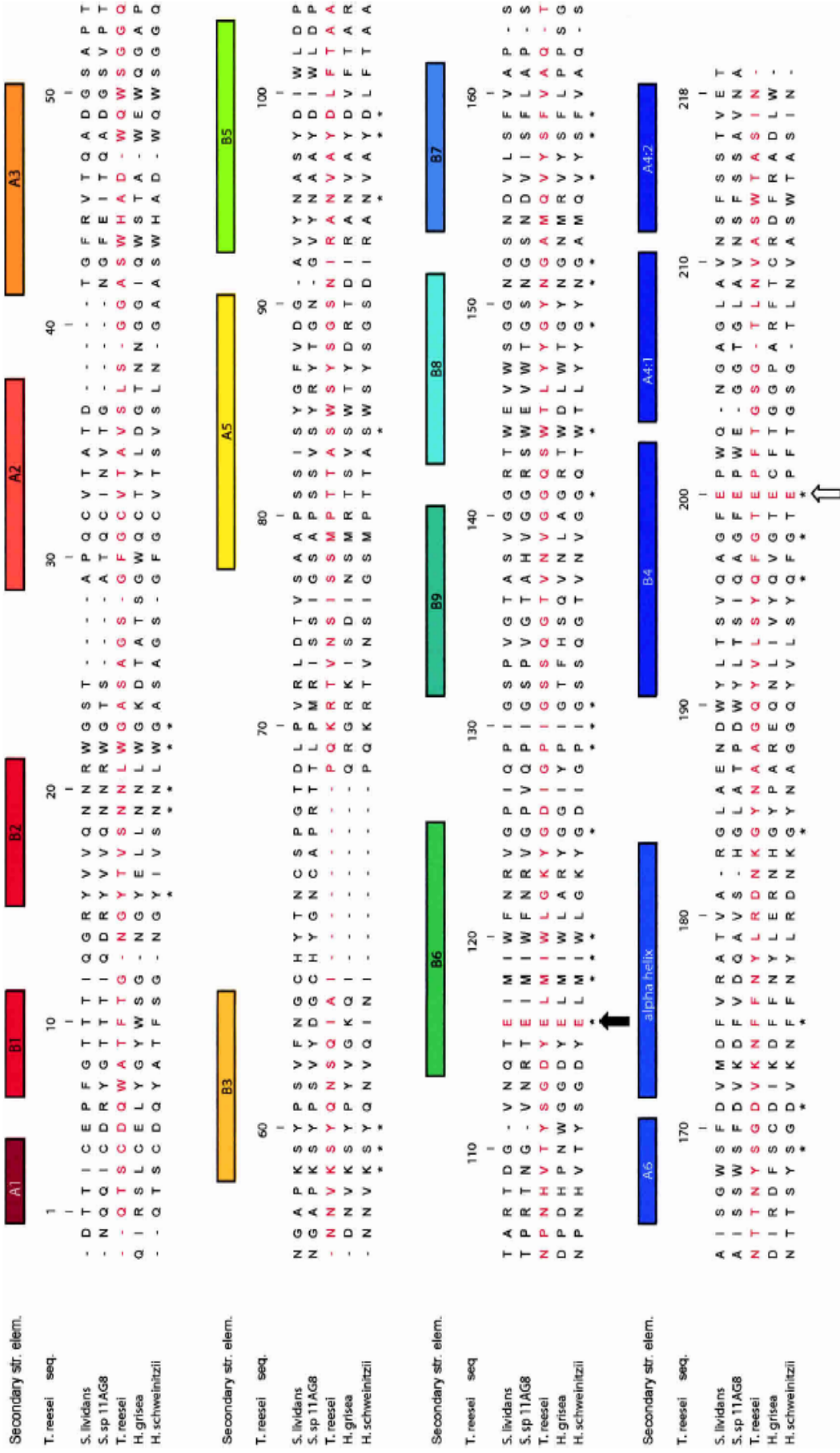
**\* Cấu trúc của trung tâm xúc tác và vùng liên kết cơ chất**

Trung tâm xúc tác của Cel12A từ *H. grisea* gồm 2 amino acid glutamic E-120 và E-205 (hình 1.3B), còn ở Cel12A từ *T. reesei* là E-116 và E-200 [152].

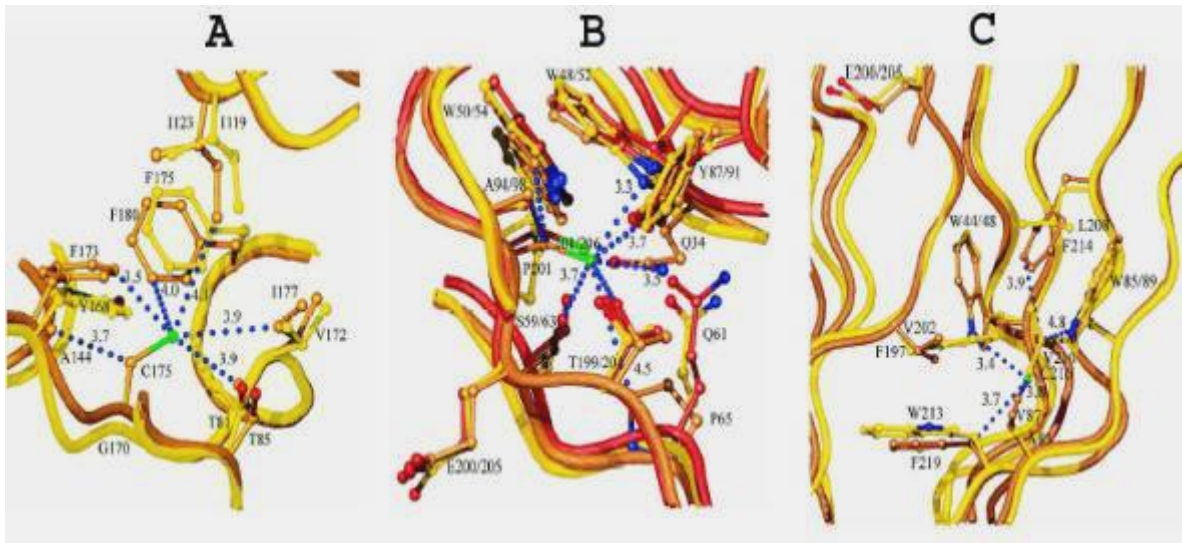


**Hình 1.3. Hình ảnh mô hình cấu trúc không gian (A) và trung tâm xúc tác (B) của Cel12A từ *H. grisea* [152]**

Vai trò liên kết cơ chất khi tham gia xúc tác thủy phân cellulose của các cellulase được thực hiện nhờ các vùng liên kết đặc hiệu cellulose binding domain (CBD). Các CBD có thể nằm trong trung tâm hoạt động của enzyme hoặc không. Tùy thuộc vào từng loại enzyme mà vùng liên kết này có cấu tạo hóa học và cấu trúc không gian khác nhau. Cel12A từ *H. grisea* có 3 vùng liên kết với sự tham gia của các amino acid, trong đó cysteine (C175, C206, C216) đóng vai trò trung tâm. CBD1 với C175 làm trung tâm nằm trên dải xoắn  $\beta$ -A<sub>6</sub> liên kết yếu với các amino acid T85, I123, A144, F173, I177 và F180 bằng tương tác van der Waals. Liên kết giữa các amino acid trong CBD1 có kích thước 3,5 đến 4,1 Å (hình 1.5A). CBD2 với C206 làm trung tâm nằm trên dải xoắn  $\beta$ -B<sub>4</sub> liên kết với các amino acid Q34, W52, W54, S63, P65, Y91, A98 và T204. Liên kết giữa các amino acid trong CBD2 có kích thước 3,3 đến 4,9 Å và CBD2 chứa trung tâm hoạt động (Glu 205) (hình 1.5B). CBD3 với C216 làm trung tâm nằm trên dải xoắn  $\beta$ -A<sub>4</sub> liên kết với các amino acid W48, V87, W89, F214 và F219. Liên kết giữa các amino acid trong CBD3 có kích thước 3,3 đến 4,8 Å (hình 1.5C) [152].



**Hình 1.4. Trình tự amino acid tương ứng với cấu trúc bậc 2 của Cel12A từ một số chủng vi sinh vật [152]**



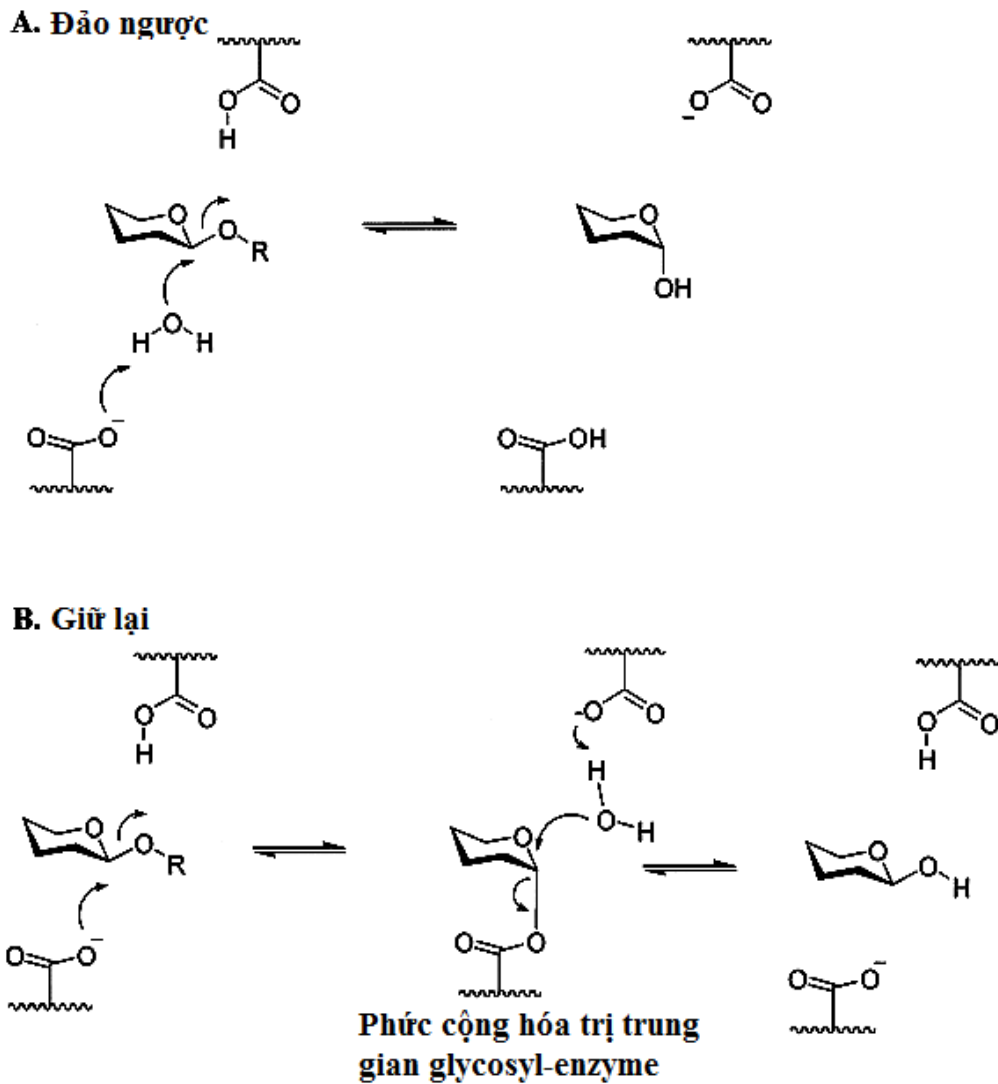
**Hình 1.5. Cấu trúc vùng CBD của Cel12A từ *Humicola grisea* [152]**

*A: CBD 1; B: CBD 2; C: CBD 3*

**\* Cơ chế xúc tác của cellulase**

Khi nghiên cứu cơ chế thủy phân cellulose, nhiều tác giả đã trình bày cơ chế tác động của cellulase theo các cách khác nhau. Reese (1950) là người đầu tiên đề xuất cơ chế thủy phân cellulose hòa tan bởi enzyme  $C_1$  và  $C_x$ . Theo Reese thì  $C_1$  là yếu tố tiền thủy phân, nó chỉ có tác dụng làm trương nở cellulose tự nhiên tạo thành cellulose hoạt động có mạch ngắn hơn. Sau đó,  $C_x$  sẽ tiếp tục phân cắt các chuỗi này tạo thành các đường tan và cuối cùng tạo thành glucose [149]. Eriksen và Goksoyr (1977) đã đưa ra cơ chế tác dụng phối hợp của endoglucanase; exoglucanase và  $\beta$ -glucosidase. Đầu tiên, những vùng có mức độ kết tinh thấp trong sợi cellulose bị các endoglucanase tấn công tạo các đầu tự do. Tiếp đó, exoglucanase sẽ bắt đầu phân cắt từ các đầu tự do để tạo thành các cellobiose; celooligosaccharide và glucose.  $\beta$ -Glucosidase sẽ thủy phân tiếp và cuối cùng tạo thành glucose [62].

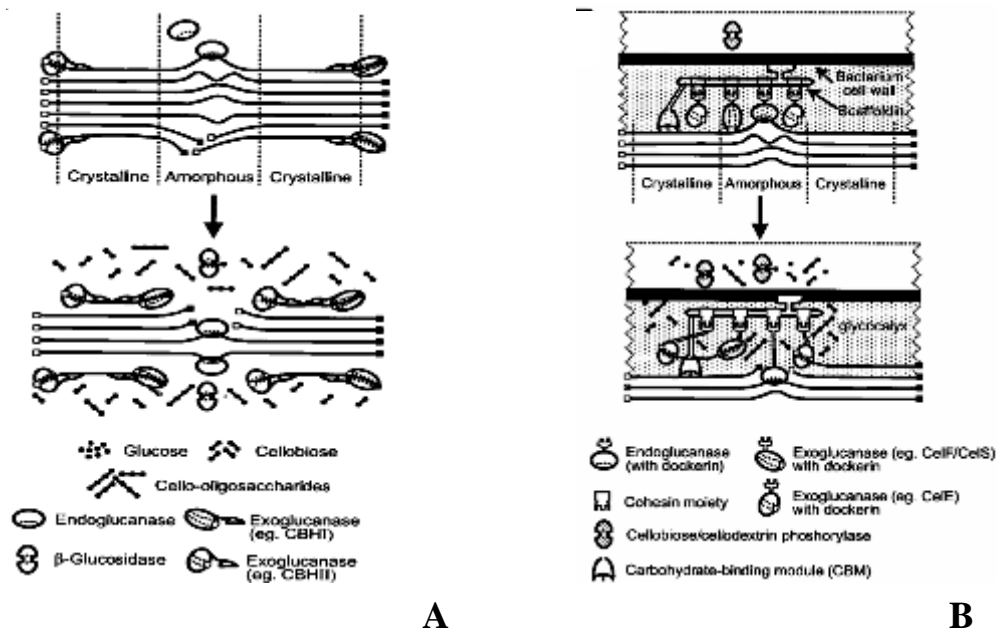
Theo nghiên cứu của Martin (2000), cellulase là phức hệ gồm hai nhóm enzyme là endoglucanase (EC 3.2.1.4) và cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) thủy phân liên kết  $\beta$ -1,4-O-glycoside trong phân tử cellulose theo hai cơ chế đảo ngược và giữ lại (hình 1.6) [117].



**Hình 1.6. Hai cơ chế xúc tác của phức hệ cellulase [117]**

Năm 2002, Lee và đtg đã đưa ra cơ chế phản ứng của phức hệ cellulase. Mỗi dạng enzyme trong phức hệ cellulase tham gia thủy phân phân tử cơ chất theo một cơ chế riêng. Tuy nhiên, những enzyme này thường phối hợp hoạt động để thủy phân hoàn toàn phân tử cơ chất thành sản phẩm đơn giản nhất là glucose.

Endoglucanase tham gia thủy phân các liên kết  $\beta$ -1,4-glycoside ở bên trong các phân tử cellulose và một số loại polysaccharide tương tự khác. Sản phẩm phân cắt là các oligosaccharide. Exoglucanase thủy phân các liên kết ở đầu khử và đầu không khử của phân tử cơ chất, giải phóng các oligosaccharide, cellobiose và glucose.  $\beta$ -Glucosidase thủy phân các phân tử cellodextrin và cellobiose tạo thành các phân tử glucose (hình 1.7) [111].



Hình 1.7. Cơ chế thủy phân phân tử cellulose (A) và phức hệ cellulose (B) [111]

#### 1.1.4. Tinh sạch và đánh giá tính chất của cellulase

##### 1.1.4.1. Tinh sạch cellulase

Trong sản xuất chế phẩm enzyme thì việc giữ được hoạt tính enzyme là một trong những yêu cầu hàng đầu. Thông thường qua mỗi bước tinh sạch thì một phần enzyme cũng như hoạt độ của chế phẩm bị mất đi, giá thành tăng cao do chi phí về thiết bị, nguyên liệu, công sức và do mất hoạt độ. Để hạn chế tối đa sự giảm hoạt độ enzyme trong quá trình tinh sạch cần chọn dung dịch chiết rút enzyme thích hợp, vừa cho hiệu suất chiết xuất enzyme cao, vừa không làm biến tính enzyme. Với mục đích đó, việc tìm được những phương pháp tách và tinh chế enzyme phù hợp là rất quan trọng.

Các cellulase từ các chủng *Aspergillus* được tinh sạch qua các bước như rửa ammonium sulfate, rửa dung môi và qua cột sắc kí (lọc gel, trao đổi ion, tương tác kỵ nước, ...). Cellulase được tinh sạch từ các chủng *A. niger* có nguồn gốc khác nhau rất khác nhau về kích thước: 31 kDa [140], 24 kDa [118], 26 kDa [180], 37 kDa [81], 40 kDa [26], [185], 50 và 83 kDa [50], 90,5 kDa [74], 78-80 kDa (*A. terreus* [123]), 24 và 39 kDa (*A. aculeatus* SM-L22 [45]), 32 kDa (*A. awamori* VTCC-F099 [127]), 36 kDa (*A. oryzae* VTCC-F045 [124]).

Các cellulase từ *A. terreus* M11 được tinh sạch 18 lần với hiệu suất thu hồi 14% và hoạt tính đặc hiệu đạt 67 U/mg protein [63], từ *A. terreus* DSM 826 sạch 27 lần với hiệu suất đạt 10,5% [60] và từ *A. terreus* NA<sub>1</sub> sạch 40 lần với hiệu suất đạt 1,32% [123].

#### **1.1.4.2. Tính chất của cellulase**

Giá trị  $K_m$  và  $V_{max}$  đặc trưng cho tính đặc hiệu của một enzyme với một cơ chất,  $K_m$  bé thì ái lực của enzyme với cơ chất lớn và ngược lại.  $K_m$  của  $\beta$ -glucanase từ *S. sclerotium* (8,7 mg/ml) [169],  $K_m$  của  $\beta$ -glucanase từ *A. niger* (52-80 mg/ml) [84],  $K_m$  của  $\beta$ -glucanase từ *M. verrucaria* (0,5 mg/ml) [73] và từ *A. awamori* VTCC-F099 (5,83 mg/ml) [127].  $V_{max}$  của  $\beta$ -glucanase tinh sạch từ *A. terreus* AN1 là 200 U/mg protein [123] và từ *A. awamori* VTCC-F099 (333,33 U/mg) [127], từ *A. terreus* DSM 826 là 4,35 U/mg protein khi sử dụng cơ chất CMC [60].

Nhiệt độ và pH phản ứng ảnh hưởng mạnh mẽ đến hoạt tính xúc tác của enzyme, mỗi enzyme có một nhiệt độ và pH phản ứng thích hợp. Trong giới hạn nhiệt độ chưa làm biến tính enzyme, hoạt tính enzyme tăng khi nhiệt độ tăng. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng quá giới hạn thì hoạt tính của enzyme lại giảm. Nguyên nhân có thể do khi nhiệt độ tăng cao đã làm đứt gãy một số liên kết yếu trong phân tử protein enzyme, làm thay đổi cấu trúc của phân tử này, đặc biệt là cấu trúc trung tâm hoạt động của enzyme, từ đó ảnh hưởng tới hoạt tính xúc tác của enzyme [4].

Nhiệt độ và pH tối ưu cho hoạt động của  $\beta$ -glucanase từ *A. niger* VTCC-F021 là 55°C và pH 5. Hầu hết các  $\beta$ -glucanase từ các chủng *Aspergillus* từ nhiều nghiên cứu trước cũng có nhiệt độ tối ưu (50-70°C) và pH tối ưu (3,5-5). Nhiệt độ và pH tối ưu của  $\beta$ -glucanase từ *A. terreus* DSM 826 [60] và *A. awamori* VTCC-F099 [127] là 50°C và pH 4,8-5, từ *A. oryzae* VTCC-F045 là 55°C và pH 5,5 [124], cellulase từ *A. niger* NRRL-363 là 50°C và pH 5,5 [14].

Các  $\beta$ -glucanase từ *A. niger* IFO31125 là 70°C và pH 6-7 [27], từ *A. terreus* M11 là 60°C và pH 2 [63], từ *A. terreus* AN<sub>1</sub> là 60°C và pH 4 [123], từ *A. niger* Z10 lại hoạt động tốt ở nhiệt độ 40°C và pH 4,5-7,5 [50]

Endoglucanase từ *A. niger* VTCC-F021 bền ở dưới 50°C và pH từ 5-6. Độ bền nhiệt và pH của endoglucanase từ *A. niger* VTCC-F021 cũng giống với endoglucanase từ *A. awamori* VTCC-F099 và *A. oryzae* VTCC-F045. Theo Nguyen và Quyên, endoglucanase từ *A. awamori* VTCC-F099 bền ở dưới 40°C và dải pH từ 4,5-5,5, hoạt tính còn hơn 80% sau 36 giờ ủ ở 30-40°C và pH 4,5-5,5 [127], endoglucanase từ *A. oryzae* VTCC-F045 bền ở dưới 55°C và pH 5-6, hoạt tính tăng từ 21-27% sau 4 giờ ủ ở 30-55°C và còn 72% sau 1 giờ ủ ở pH 5-6 [124].

Theo Elshafei và đtg (2009) endoglucanase tinh sạch từ *A. terreus* DSM 826 vẫn giữ nguyên hoạt tính khi ủ ở 50°C trong 1 giờ, nhưng chỉ còn 56% hoạt tính khi ủ ở 80°C trong 5 phút [60], endoglucanase (celA) từ chủng *A. oryzae* KBN616 bền ở dưới 55°C sau 20 giờ ủ và mất hoạt tính ở trên 60°C và CelB thì bền ở dưới 50°C và mất hoạt tính ở trên 55°C và cả CelA và CelB đều bền ở pH 3-7 [106]. Các endoglucanase từ *A. terreus* M11 bền ở pH 2-5 và còn hơn 60% hoạt tính khi ủ 1 giờ ở 70°C [63], từ *A. terreus* AN<sub>1</sub> bền ở 50°C và pH 3-5 [123]. Theo Akiba và đtg (1995) endoglucanase từ *A. niger* IFO31125 lại bền ở dải pH cao hơn (5-10) và không làm mất hoạt tính enzyme sau 2 giờ ủ ở 60°C [27].

Các ion kim loại đóng vai trò quan trọng trong việc định hình cấu trúc không gian của phân tử enzyme hoặc trong một vài trường hợp nó là nhân tố cần thiết trong trung tâm hoạt động của enzyme. Do đó ion kim loại có ảnh hưởng lớn tới khả năng hoạt động của enzyme.

Các ion kim loại Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> và EDTA làm tăng hoạt tính  $\beta$ -glucanase A từ *A. niger* VTCC-F021 lên 12-52%, trong khi các ion Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> và Ni<sup>2+</sup> lại làm giảm mạnh hoạt tính endoglucanase ở ngay nồng độ thấp, còn các ion K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>,

$\text{Co}^{2+}$  và  $\text{Ag}^+$  làm giảm 18-54% hoạt tính ở nồng độ 15 mM [140]. Nghiên cứu của Nguyen và đtg (2010) cho thấy, các ion  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  và EDTA làm tăng hoạt tính endoglucanase từ *A. awamori* VTCC-F099 lên tới 55%, còn các ion  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  lại làm giảm hoạt tính enzyme [127]. Trong khi đó, các ion kim loại và EDTA đều làm ức chế mạnh hoạt tính của endoglucanase từ *A. oryzae* VTCC-F045 [124].

Chen và đtg (2001) cho thấy  $\text{Fe}^{2+}$  kích thích hoạt tính của cả 5 loại CMCCase (EG II-1, EG II-2, EG III-1, EG III-2 và EG IV) từ *A. aculeatus* SM-L22 [44]. Hoạt tính endoglucanase từ *A. terreus* DSM 826 tăng 83% và 25% khi ủ với  $\text{Co}^{2+}$  25 mM và  $\text{Zn}^{2+}$  50 mM, nhưng  $\text{Hg}^{2+}$  lại làm giảm 50-71% hoạt tính khi ủ với  $\text{Hg}^{2+}$  25 và 50 mM [60].  $\text{Cu}^{2+}$  và  $\text{Hg}^{2+}$  ở nồng độ 2 mM ức chế hoạt tính endoglucanase từ *A. terreus* M11 từ 59-77% [63]. Hoạt tính của  $\beta$ -glucanase từ *A. niger* IFO31125 bị ức chế bởi  $\text{Hg}^{2+}$  và  $\text{Cu}^{2+}$ , nhưng lại không bị ảnh hưởng bởi các chất ức chế khác như p-chloromercuribenzoate và N-ethylmaleimide [27]. Như vậy,  $\text{Fe}^{2+}$  hoạt hóa các  $\beta$ -glucanase từ *A. niger* VTCC-F021, *A. awamori* VTCC-F099, *A. aculeatus* SM-L22. Còn  $\text{Cu}^{2+}$  có ảnh hưởng hỗn hợp lên endoglucanase, hoạt hóa endoglucanase từ *A. niger* VTCC-F021, *A. awamori* VTCC-F099 [127], nhưng lại ức chế endoglucanase từ *A. terreus* M11 [63], *A. niger* IFO31125 [27], *A. oryzae* VTCC-F045 [124].

Các dung môi hữu cơ và chất tẩy rửa thường sử dụng để biến tính protein và hòa tan các cơ chất kỵ nước trong phản ứng của enzyme. Endoglucanase có khả năng kháng cao với methanol và ethanol ở 10-20% (v/v) và giữ lại được hơn 86% (7,15-7,81 U/mg) hoạt tính so với đối chứng. Các nghiên cứu của Nguyen và Quyen (2010) cũng cho thấy các endoglucanase từ *A. awamori* VTCC-F099 và *A. oryzae* VTCC-F045 đều kháng cao với các dung môi hữu cơ isopropanol, acetone, methanol và butanol và giữ được hơn 80% so với đối chứng [124], [127].



Endo- $\beta$ -1,4-glucanase từ *A. niger* VTCC-F021 có sức kháng cao với Tween 20 và Tween 80 ở 0,5-2% (v/v) và giữ được hơn 80% hoạt tính so với đối chứng. Kết quả này cũng giống với nghiên cứu của các tác giả trước. Các endoglucanase từ *A. awamori* VTCC-F099 có sức kháng cao với Tween 20, Tween 80 và Triton X-100 ở nồng độ 10-20% (v/v) [127] và từ *A. oryzae* VTCC-F045 kháng cao với Tween 20 ở 0,4-0,8% (v/v) [124].

## 1.2. Ứng dụng của cellulase

Các cellulase được ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp như: công nghiệp thực phẩm, công nghiệp sản xuất thức ăn gia súc, công nghiệp sản xuất dung môi hữu cơ, sản xuất chất tẩy rửa, công nghiệp giấy và bột giấy, đặc biệt trong công nghệ xử lý rác thải sản xuất phân bón vi sinh.

### 1.2.1. Ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm

Sử dụng các chế phẩm enzyme có thể coi là một trong những phương hướng tiên bộ có triển vọng nhất của sản xuất nước quả và nước uống không cồn. Dịch quả sau khi ép chiết thường chứa các thành phần tế bào thịt quả và các chất xơ có bản chất polysaccharide làm cho dịch có độ nhớt cao và màu đục. Glucanase thường được sử dụng để phá vỡ thành tế bào, thủy phân các polysaccharide làm giảm độ nhớt của dịch quả tạo thuận lợi cho quá trình tách chiết và làm trong. Glucanase kết hợp với các hemicellulase, pectinase trong chế phẩm enzyme Viscozyme 1201 được ứng dụng chủ yếu để xử lý phá vỡ màng tế bào đậu tương [22]. Trong quá trình sản xuất nước cà rốt thường sử dụng endoglucanase xử lý ở giai đoạn dịch hóa đã tạo ra nhiều pectin hơn.

Trong công nghệ sản xuất bia, dịch lên men ngoài các thành phần đường, protein còn có một lượng không nhỏ các phân tử trọng lượng cao cellulose và  $\beta$ -glucan ảnh hưởng xấu đến quá trình lọc và chất lượng sản phẩm. Người ta thường sử dụng  $\beta$ -glucanase để loại bỏ những thành phần này. Các chế phẩm như Finizym 200 L gồm các cellulase từ *A. niger*,  $\beta$ -glucanase từ

*Bacillus subtilis*, *Disporotrichum dimorphosporum* đã được sử dụng trong sản xuất bia [107].

Cà phê Việt Nam chủ yếu được sản xuất bằng phương pháp khô, cho chất lượng cà phê không tốt. Để nâng cao chất lượng cà phê, phương pháp lên men đã được áp dụng. Đó là quá trình sử dụng phức hệ enzyme cellulase và pectinase để xử lý bóc vỏ cà phê và làm tăng khả năng li trích dịch quả. Trong khâu bóc vỏ, cellulose gây hiện tượng thâm mầu, làm giảm bớt chất lượng sau khi sấy, đồng thời cản trở cho việc bóc vỏ. Khi sử dụng chế phẩm *A. niger* có hoạt tính pectinase và cellulase cho thấy, lượng cà phê được bóc vỏ tăng, hạt cà phê được bóc vỏ bằng chế phẩm không còn nhót như hạt không sử dụng chế phẩm enzyme và hiệu suất bóc vỏ khá cao [16].

Ngoài ra, cellulase còn được sử dụng trong công nghệ sản xuất bánh mì, bánh biskuit và thực phẩm chức năng. Cellulase từ *Humicola insolens* được ứng dụng trong sản xuất bánh mì, làm tăng độ mềm và xốp cho bánh mì. Cellulase từ *T. reesei*, *A. niger* được ứng dụng trong sản xuất fructooligosaccharide. Đây là một trong số các oligosaccharide chức năng (prebiotic) được sản xuất để bổ sung vào khẩu phần ăn. Các phế phụ phẩm nông nghiệp như lõi ngô, bã mía, bã sắn, vỏ trấu là cơ chất lý tưởng cho việc sản xuất các oligosaccharide. Các enzyme tốt nhất sử dụng cho quá trình này chủ yếu có nguồn gốc từ nấm mốc [154].

### **1.2.2. Ứng dụng trong công nghiệp sản xuất thức ăn chăn nuôi**

Cho đến nay, các enzyme được dùng nhiều để bổ sung vào thức ăn chăn nuôi và cho hiệu quả cao là các enzyme phân giải polysaccharide không phải tinh bột của lúa mì, lúa mạch, yến mạch. Các chất này được xem là các chất kháng dinh dưỡng, vì khi ở dạng hòa tan nó làm tăng độ dính trong ruột non của động vật, do đó làm giảm mức độ và tốc độ tiêu hóa các chất dinh dưỡng. Thức ăn gia súc, gia cầm được chế biến từ các loại ngũ cốc chứa nhiều cellulose và glucan. Những thành phần này thường không được tiêu hóa triệt

đề, làm tăng độ nhớt của dịch dạ dày. Do đó chúng đã hạn chế sự hấp thu các chất dinh dưỡng, làm giảm khả năng tiêu hóa của động vật. Bổ sung  $\beta$ -glucanase vào thức ăn sẽ làm tăng khả năng phân giải các hợp chất trên, giải phóng glucose và các oligosaccharide, làm giảm độ nhớt, tăng khả năng hấp thu và chuyển hóa thức ăn [22].

Nhiều nghiên cứu cho thấy, khi bổ sung glucanase độc lập hoặc kết hợp với các enzyme khác vào thức ăn chăn nuôi làm tăng đáng kể tốc độ tăng trưởng và giảm thiểu bệnh tật cho vật nuôi. Omogbenigun và đtg (2004) cho thấy, khi bổ sung tổ hợp chế phẩm glucanase và một số enzyme khác (amylase, invertase, protease, phytase, xylanase) xử lý thức ăn cho lợn con 25 ngày tuổi có tác dụng nâng cao khả năng tiêu hóa so với đối chứng là khẩu phần cơ sở không bổ sung enzyme như sau: khả năng tiêu hóa tinh bột tăng 86,7-94,2%, các polysaccharide khác tăng 10,1-17,6%, phytate tăng 59-70% [133].

Tiềm năng ứng dụng to lớn của glucanase trong chăn nuôi đã thu hút sự quan tâm của nhiều công ty chế biến thức ăn gia súc và gia cầm. Một số chế phẩm là tổ hợp các enzyme khác nhau có thể kể đến như: Rovazyme G2 (DSM Nutritional Products Ltd, Thụy Sĩ) là tổ hợp của 3 loại enzyme (cellulase,  $\beta$ -glucanase và xylanase); Roxazyme G (DSM Nutritional Products Ltd, Thụy Sĩ) là tổ hợp của 7 loại enzyme (cellulase, glucanase, protease, amylase, pectinase, xylanase và hemicellulase); Natugrain (tập đoàn BASF, Đức) là hỗn hợp của endoxylanase và endoglucanase; Rhodizyme-CF (Rampart-Power Bangladesh Ltd) là tổ hợp của 5 loại enzyme (cellulase, amylase, protease, lipase và pectinase). Chế phẩm SSF của Mỹ hiện đang bán tại thị trường Việt Nam là tổ hợp của 6 loại enzyme:  $\beta$ -glucanase (200 BGU/g), phytase (1000 PU/g),  $\alpha$ -amylase (30 FAU/g), pectinase (4000 AJDU/g), protease (700 HUT/g) và xylanase (100 XU/g) [3].

Ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu về ứng dụng enzyme trong chăn nuôi như: Chu Thị Thanh Bình và đtg (2002) đã nghiên cứu ứng dụng các chủng nấm

men trong chế biến bã thải từ hoa quả giàu chất xơ làm thức ăn cho gia súc. Còn hầu hết các nghiên cứu chỉ dừng lại ở mức độ nghiên cứu về tác động của các enzyme nhập khẩu lên sự sinh trưởng của vật nuôi [2].

### ***1.2.3. Ứng dụng trong công nghiệp sản xuất dung môi hữu cơ***

Sử dụng glucanase xử lý nguyên liệu giàu cellulose, glucan trước khi lên men đã làm tăng hiệu suất thu hồi dung môi lên trung bình là 1,5%. Nhiều chế phẩm enzyme đã được sử dụng trong ngành công nghiệp này như Neutrase 0,5L có chứa cellulase sử dụng trong công nghiệp sản xuất ethanol. Cellulase được sử dụng trong quá trình đường hóa các nguyên liệu lignocellulose như bã mía, rơm rạ, cỏ switch, mùn cưa. Sản phẩm của quá trình đường hóa này được tinh lọc và sử dụng lên men sản xuất ethanol sinh học [107]. Đồng thời, nhiều chủng vi sinh vật kỵ khí trong chi *Clostridium* sinh tổng hợp glucanase được sử dụng trong công nghệ lên men sản xuất dung môi hữu cơ, acetic acid [46], sản xuất acetone, butanol và isopropanol [57].

### ***1.2.4. Trong công nghiệp sản xuất giấy và bột giấy***

Trong công nghiệp sản xuất giấy và bột giấy, nguyên liệu ban đầu được nghiền cơ học và xử lý hóa học để các sợi gỗ được tách riêng khỏi nhau chuyển thành bột giấy chứa các sợi và bột mịn. Trong quy trình sản xuất giấy cần loại bỏ lignin khỏi bột giấy, còn cellulose thì được giữ lại. Phương pháp thông thường là bổ sung dung dịch chlor hoặc chlordiocide. Đây là một phương pháp tốn kém và thường gây ô nhiễm môi trường do thành phần chlor tồn dư trong nước thải. Vì thế, trong những năm gần đây một giải pháp mới được đưa ra để thay thế phương pháp truyền thống, đó là sử dụng các chế phẩm enzyme trong đó có glucanase để xử lý bột giấy [23].

Glucanase thường được bổ sung vào công đoạn nghiền bột giấy để làm thay đổi nhẹ cấu hình của sợi cellulose, tăng khả năng nghiền và tiết kiệm khoảng 20-40% năng lượng cho quá trình nghiền cơ học [107]. Đồng thời xử lý glucanase trước khi xử lý hóa chất nghiền bột hóa học sẽ làm phá vỡ lớp vỏ ngoài của gỗ, làm tăng khả năng khuếch tán của hóa chất vào phía trong gỗ, tăng

hiệu quả khử lignin [22], [23]. Đặc biệt trong công nghệ tái chế giấy, glucanase được sử dụng để tẩy mực in bám trên giấy. Kỹ thuật này đã mở ra triển vọng đầy hứa hẹn cho ngành công nghiệp sản xuất giấy và bột giấy tái sinh [83].

#### ***1.2.5. Ứng dụng trong công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa và công nghệ xử lý rác thải***

Cùng với protease, lipase, amylase, cellulase và hemicellulase được ứng dụng để sản xuất chất tẩy rửa. Cellulase có khả năng làm thay đổi cấu trúc sợi cellulose để thay đổi giá trị cảm quan và độ sáng màu của sợi vải. Cellulase sẽ thủy phân các tơ sợi của sợi vải là nơi bám của các phân tử bụi bẩn, loại bỏ chúng khỏi quần áo [107]. Tính đến năm 2002 đã có nhiều cellulase được sản xuất dùng cho bột giặt như: endoglucanase và exoglucanase từ *Thermomyces lanuginous* [132].

Sử dụng enzyme trong xử lý chất thải, công nghệ tái sử dụng phế thải, chuyển các phế thải thành sản phẩm có ích là một hướng quan trọng trong xử lý chống ô nhiễm môi trường. Trong nhiều năm qua trên thế giới và cả ở Việt Nam, các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp enzyme phân hủy cellulose đã được ứng dụng rất có hiệu quả để xử lý rác thải sinh hoạt. Nguyễn Lan Hương và Hoàng Đình Hòa (2003) đã phân lập và tuyển chọn được các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có hoạt tính cellulase, sau đó bổ sung vào bể ủ rác thải đã rút ngắn được chu kỳ xử lý rác thải sinh hoạt từ 5-7 ngày [10]. Nhiều chủng vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm đã được nghiên cứu và ứng dụng có hiệu quả trong quá trình xử lý rác thải ở Việt Nam. Nhiều chế phẩm vi sinh trong đó chứa hệ sinh vật sinh tổng hợp cellulase đã được nghiên cứu và sản xuất để xử lý rác thải. Trong đó, chế phẩm Micromix 3 khi bổ sung vào bể ủ rác thải có thời kỳ đã rút ngắn được 15 ngày ủ, giảm một nửa thời gian lên men so với đối chứng. Đồng thời, lượng mùn tạo thành khi xử lý rác bằng chế phẩm Micromix 3 cao hơn 29% và các chất dinh dưỡng cao hơn 10% so với đối chứng. Sản phẩm của quá trình xử lý rác thải được phối trộn và bổ sung một số vi sinh vật có ích cố định đạm tạo thành

phân bón vi sinh, được sử dụng rộng rãi trong nông nghiệp đã góp phần nâng cao năng suất cây trồng, giảm thiểu được nguồn và nguy cơ gây ô nhiễm môi trường [1], [5], [8], [15], [22].

### 1.3. Nghiên cứu tạo cellulase tái tổ hợp

Cho đến nay, trên thế giới đã có khá nhiều tác giả nghiên cứu về tạo cellulase tái tổ hợp bằng cách biểu hiện gen mã hóa cellulase trong nhiều hệ thống biểu hiện khác nhau. Những nghiên cứu này tập trung biểu hiện gen mã hóa cellulase có nguồn gốc từ sinh vật nhân sơ và nhân chuẩn trong hệ biểu hiện vi khuẩn, nấm men và nấm mốc. Ngoài ra, các nghiên cứu còn thử nghiệm biểu hiện trong tế bào thực vật và động vật.

#### 1.3.1. Biểu hiện gen mã hóa cellulase trong *E. coli*

Do vi khuẩn *E. coli* sinh trưởng nhanh, thuận tiện cho các thao tác sinh học phân tử nên nó thường được chọn để biểu hiện gen dùng cho những mục đích nghiên cứu khác nhau. Với mong muốn sản xuất ra một lượng lớn  $\beta$ -glucanase, người ta đã sử dụng *E. coli* để biểu hiện các gen mã hóa  $\beta$ -glucanase.

Yang và đtg (2010) đã nhân dòng và biểu hiện cellulase bền nhiệt từ chủng *Bacillus subtilis* 15 trong *E. coli* BL21 (DE3). Hoạt tính cellulase tái tổ hợp đạt 6,78 U/ml, cao hơn nhiều so với enzyme ban đầu (đạt 2,82 U/ml). Nhiệt độ và pH tối ưu là 60°C và pH 6, hoạt tính còn hơn 90% sau khi ủ 2 giờ ở 65°C [181]. Năm 2011, Peng và đtg đã biểu hiện thành công gen mã hóa cellulase bền nhiệt từ *Clostridium thermocellum* trong *E. coli*. Hoạt tính enzyme tái tổ hợp đạt 6,4 U/ml, tăng 1,5 lần so với chủng tự nhiên [138].

Không chỉ có gen mã hóa  $\beta$ -glucanase từ prokaryote được biểu hiện trong *E. coli* mà những gen mã hóa  $\beta$ -glucanase từ eukaryote cũng được biểu hiện trong *E. coli*. Một số gen như *egl* tách từ *Rhizopus stolonifer* var. *reflexus* TP-02 và  $\beta$ -glucanase I, II, III tách từ *Trichoderma reesei* QM9414 đã được biểu hiện trong *E. coli* với hoạt tính enzyme tái tổ hợp đạt 0,715 U/ml [165] và hoạt tính

đặc hiệu với cơ chất CMC của EG I, II, III tái tổ hợp tương ứng là 65, 49 và 15 U/mg [122].

Tuy nhiên, các  $\beta$ -glucanase do gen mã hóa có nguồn gốc từ eukaryote được biểu hiện trong *E. coli* còn tồn tại một số vấn đề như chúng không hình thành được đúng cấu trúc giống trong tự nhiên và các protein được biểu hiện thường ở dạng không tan. Thêm vào đó, quá trình sửa đổi sau dịch mã rất cần thiết để hình thành các protein có hoạt tính đã không xảy ra ở *E. coli*. Vì vậy để giải quyết vấn đề này người ta đi theo hướng đưa các protein tái tổ hợp tiết ra ngoài môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng các promoter, trình tự tín hiệu và các vật chủ khác nhau để biểu hiện ở một số điều kiện hoặc biểu hiện cùng các chaperone giúp hình thành các protein có hoạt tính. Ngoài ra, protein ngoại bào còn có một số thuận lợi so với protein nội bào như là hầu hết nó ở dạng hòa tan, có hoạt tính sinh học và ít bị phân cắt bởi protease. Quan trọng hơn là việc tinh sạch protein ngoại bào đơn giản và ít tốn kém hơn nội bào [47].

### **1.3.2. Biểu hiện gen mã hóa cellulase trong nấm men**

Để có thể đưa enzyme vào sử dụng trong các lĩnh vực thực tiễn, người ta đã cố gắng giảm chi phí bằng cách nâng cao hoạt tính và sản lượng enzyme. Một số  $\beta$ -glucanase từ nấm mốc đã được biểu hiện thành công ở mức độ cao trong nấm men *P. pastoris* và *S. cerevisiae* [172], [175], [185].

Năm 2001, Hong và đtg đã phân lập gen mã hóa  $\beta$ -glucanase từ *A. niger* IF031125 và biểu hiện trong nấm men. Hoạt tính của enzyme tái tổ hợp còn lại 56% sau khi ủ 1 giờ ở 80°C, hoạt tính tối ưu ở 70°C [81]. Gutierrez-Nava và đtg (2003) đã biểu hiện *CelcflB* (một gen mã hóa  $\beta$ -glucanase) từ *Cellulomonas flavigena* và đánh giá tính chất lý hóa của enzyme thu được. Gen này được chuyển vào vector pQE30, biểu hiện  $\beta$ -glucanase có khối lượng phân tử khoảng 58 kDa [69].

Để nâng cao hiệu quả biểu hiện của endoglucanase tái tổ hợp, Zhao và đtg đã sử dụng phương pháp tối ưu hóa codon gen *eng1* từ *A. niger* IFO31125 thu được

gen *syn-egl* bị thay đổi 193 nucleotide, thành phần G+C giảm từ 54% xuống 44%. Sau đó gen này được chèn vào vector pPIC9K, biểu hiện trong hệ biểu hiện *P. pastoris* GS115. Kết quả hoạt tính của enzyme tái tổ hợp đạt 3,3 U/ml với cơ chất CMC sau 96 giờ nuôi cấy và 120 U/ml với cơ chất  $\beta$ -glucan, hoạt động tối ưu trong môi trường pH 5 và nhiệt độ tối thích ở 70°C [185].

F1-CMCCase của *A. aculeatus* đã biểu hiện trong *S. cerevisiae* với vector pYEC91 dưới sự điều khiển của promoter GAP (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Hoạt tính của enzyme tái tổ hợp đạt 60 U/l sau 48 giờ biểu hiện ở 30°C [134]. Năm 2012, Shi và đtg đã biểu hiện thành công gen *Aucell12A* mã hóa endoglucanase từ *A. usamii* E001 trong *P. pastoris*. Hoạt tính cao nhất đạt 240 U/ml sau 96 giờ nuôi cấy ở 30°C. Enzyme tái tổ hợp hoạt động tốt nhất ở 60°C và pH 5, bền ở 55°C và pH 3,5-7 [157].

### **1.3.3. Biểu hiện gen mã hóa cellulase trong *Bacillus***

Để thu được số lượng lớn cellulase, một hệ biểu hiện được quan tâm đó là hệ biểu hiện *Bacillus*. Người ta đã đưa gen mã hóa cellulase phân lập từ một số loài vi khuẩn thuộc các chi *Pyrococcus* và *Clostridium* biểu hiện trong *Bacillus*. Các gen này đã biểu hiện tốt để thu được lượng cellulase cao hơn nhiều so với biểu hiện trong *E. coli* và so với chủng tự nhiên [66], [100]. Kashima và đtg (2004) khi nghiên cứu biểu hiện cellulase chịu nhiệt từ *P. horikoshii* trong *B. brevis* đã thu được năng suất biểu hiện enzyme tái tổ hợp đạt khoảng 100 mg/l môi trường, cao hơn 300 lần so với sản xuất enzyme tái tổ hợp trong *E. coli*, đặc biệt khả năng sinh enzyme tái tổ hợp tăng 20 lần khi chèn thêm một amino acid alanine hoặc valine trong phân tử protein ở vị trí giữa đầu C của peptide tín hiệu và đầu N của đoạn cellulase chính [100].

### **1.3.4. Biểu hiện gen mã hóa cellulase trong nấm mốc**

Một số gen mã hóa  $\beta$ -glucanase từ nấm mốc sau khi phân lập được đưa vào hệ biểu hiện chính nó [163] hoặc loài khác [147] đã thu được năng suất cao hơn gấp nhiều lần so với chủng tự nhiên. Các chủng nấm mốc *A. niger* và *A. oryzae*



thường được dùng làm hệ biểu hiện gen mã hóa  $\beta$ -glucanase sử dụng trong thương mại [150], [164]. Bên cạnh đó, *T. reesei* cũng được phát triển thành vật chủ để biểu hiện có hiệu quả các protein ngoại lai trong đó có cellulase [70].

Rashid và đtg (2008) đã biểu hiện F1-CMCCase (24 kDa, 221 aa) từ *A. aculeatus* trong *A. oryzae* D300. Hoạt tính enzyme tái tổ hợp đạt cao nhất (18,3 U/ml) sau 120 giờ biểu hiện trong môi trường chứa nguồn tinh bột. Nhiệt độ và pH tối ưu là 50°C và 4,5, bền ở pH 2-9 và dưới 45°C [147]. Năm 2002, Rose và Zyl đã biểu hiện thành công  $\beta$ -glucanase I từ *T. reesei* trong *A. niger* D15 dưới sự kiểm soát của promoter glyceraldehyde-6-phosphate dehydrogenase (GDP) và terminator *glaA*. Enzyme tái tổ hợp hoạt động tối ưu trong môi trường pH 5, ở 60°C. Hoạt tính enzyme còn trên 80% sau khi ủ ở 50°C trong 3 giờ [150].

Năm 1998, Takashima và đtg đã biểu hiện cellulase từ *T. reesei* trong *A. oryzae* dưới sự điều khiển của promoter *Taka-amylase*. Cellulase tái tổ hợp hoạt động tốt nhất ở 50-70°C và pH 4-5, hoạt tính đạt cao nhất sau 3-4 ngày nuôi biểu hiện [164]. Todaka và đtg (2010) đã biểu hiện gen mã hóa  $\beta$ -glucanase từ một loài cộng sinh (*Reticulitermes speratus*) ở môi trường trong *A. oryzae* cho biết enzyme tái tổ hợp tinh sạch có hoạt tính riêng 769,6 U/mg và  $V_{max}$  đạt 603  $\mu$ mol/mg/min cao hơn so với  $\beta$ -glucanase tái tổ hợp trong *T. reesei* [166].

### **1.3.5. Biểu hiện gen mã hóa cellulase trong động vật và thực vật**

#### **1.3.5.1. Trong thực vật**

Bên cạnh việc đưa gen mã hóa  $\beta$ -glucanase từ các vi sinh vật biểu hiện trong vi khuẩn, nấm men, nấm mốc, một số tác giả đã biểu hiện các gen mã hóa  $\beta$ -glucanase từ vi sinh vật trong thực vật nhằm cung cấp cho vật nuôi thức ăn đã có sẵn  $\beta$ -glucanase mà không cần phải bổ sung. Sun và đtg (2007) đã biểu hiện gen mã hóa endoglucanase E1 từ *Acidothermus cellulolyticus* trong bèo tấm. Enzyme biểu hiện trong bèo tấm đã thể hiện hoạt tính sinh học và mức độ biểu hiện đạt 0,24% tổng lượng protein hòa tan. Hoạt tính endoglucanase E1 tái tổ hợp đạt 0,2 U/mg, enzyme có nhiệt độ phản ứng tối ưu 80°C và pH tối ưu 5,0

[162]. Năm 2011, Jiang và đtg đã biểu hiện thành công gen mã hóa cellulase E2, E3 và dạng lai E2-E3 từ vi khuẩn bền nhiệt trong cây thuốc lá. Cây thuốc lá chuyển gen biểu hiện cellulase E2 có hoạt tính cao hơn 1,5 lần so với chủng tự nhiên và bền ở nhiệt độ dưới 65°C [90].

#### 1.3.5.2. Trong động vật

Xa hơn nữa, các nhà khoa học còn có ý tưởng tạo ra các loài động vật có khả năng biểu hiện  $\beta$ -glucanase để tiêu hóa  $\beta$ -glucan mà không cần bổ sung bất kỳ một nguồn  $\beta$ -glucanase nào từ vi sinh vật. Nếu ý tưởng đó thành hiện thực, thì giá thành thức ăn chăn nuôi sẽ giảm và kéo theo là giá thực phẩm sẽ hạ xuống. Do đó, một số nghiên cứu đã thực hiện đưa gen mã hóa  $\beta$ -glucanase của vi khuẩn vào biểu hiện trong các tế bào động vật [71]. Zhang và đtg (1999) đã biểu hiện thành công gen mã hóa endoglucanase của *B. subtilis* trong tuyến tụy của chuột. Enzyme tái tổ hợp được tiết vào trong ruột non và thể hiện hoạt tính sinh học đồng thời có khả năng kháng protease thủy phân [184]. Li và đtg (2010) đã biểu hiện thành công  $\beta$ -glucanase III từ *T. viride* trong tế bào tằm MmN và ấu trùng tằm. Enzyme tái tổ hợp hoạt động tốt ở 50°C và pH 8, bền ở 40-60°C và pH 5-9 [114]. Trong tương lai, gia cầm và lợn chuyển gen có thể tự sản xuất được  $\beta$ -glucanase từ hệ tiêu hóa của chính bản thân chúng nhằm tăng cao khả năng thủy phân cellulose có trong thức ăn.

#### 1.3.6. Nghiên cứu cellulase và biểu hiện gen cellulase ở Việt Nam

Năm 1999, Tăng Thị Chính và đtg đã nghiên cứu các điều kiện lên men và ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến sinh tổng hợp cellulase của một số chủng vi khuẩn ưa nhiệt được phân lập từ bể ủ rác thải. Kết quả cho thấy, các chủng vi sinh vật nghiên cứu có khả năng chịu được nhiệt độ 80°C, nhiệt độ lên men tối ưu từ 45°C đến 55°C, pH môi trường ban đầu thích hợp nhất là 8. Nguồn cacbon tốt nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của các chủng vi khuẩn nghiên cứu là glucose và CMC; nguồn nitrogen là peptone và cao nấm men. Các tác giả cũng

đã nghiên cứu động thái của quá trình sinh tổng hợp cellulase và kết quả cho thấy, thời gian tích lũy cao nhất ở 48 giờ lên men [5].

Nguyễn Đức Lượng và đtg (1999) cho biết khả năng sinh tổng hợp cellulase của *Actinomyces griseus* cao nhất ở 58°C, pH ban đầu là 6,7, độ ẩm ban đầu là 55% với thời gian nuôi cấy là 72 giờ và nguồn lignocellulose thích hợp là bã mía hoặc mùn cưa [16]. Cũng trong năm này, Phạm Thị Ngọc Lan và đtg đã tuyển chọn được một số chủng xạ khuẩn ưa ẩm phân lập từ mùn rác ở một số nơi có khả năng phân giải cellulose mạnh. Trong số 195 chủng xạ khuẩn nghiên cứu thì các chủng xạ khuẩn phân lập được từ các mẫu rơm mục và đất chân đồng rơm có khả năng phân giải cellulose và CMC mạnh nhất [15].

Trong số các loài vi sinh vật, nấm sợi là một trong những đối tượng có khả năng sinh tổng hợp cellulase cao. Việc tìm ra các chủng nấm sợi có khả năng phân hủy cellulose cao và tối ưu điều kiện sinh tổng hợp cellulase của chúng đã và đang được nhiều tác giả quan tâm. Năm 2003, Hoàng Quốc Khánh và đtg đã nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp và đặc điểm của cellulase từ chủng *A. niger* NRRL-363. Qua nghiên cứu, tác giả đã tìm ra được một số thông tin và điều kiện cơ bản cho sự tổng hợp cellulase của chủng này trên môi trường trấu xay và một số chất thải công nghiệp như mật rỉ đường [14].

Trần Đình Mẫn và đtg (2009) đã sàng lọc các chủng *Geobacillus* sinh cellulase bền nhiệt phân lập từ Tuyên Quang cho thấy, các chủng này sản xuất cellulase bền nhiệt tốt nhất ở 75°C. Hoạt tính cellulase đạt từ 84-105 U/ml sau 48 giờ nuôi cấy ở 65°C [167]. Phan Thị Tuyết Minh và đtg (2010) đã nghiên cứu các tính chất của CMCase tạo ra từ chủng *Bacillus* sp. VLSH08 để ứng dụng trong sản xuất cồn nhiên liệu. CMCase hoạt động tốt nhất trên môi trường chứa 5% cám gạo và 0,25% cao nấm men (đạt 14 U/ml). Nhiệt độ và pH tối ưu là 60°C và 5,8 [19].

Ở Việt Nam, hầu hết các nghiên cứu mới chỉ quan tâm đến  $\beta$ -glucanase tự nhiên, có ít các nghiên cứu đề cập đến  $\beta$ -glucanase tái tổ hợp. Năm 2010, Nguyen và đtg đã nhân dòng gen mã hóa  $\beta$ -glucosidase từ *A. niger* PBC và biểu

hiện thành công trong *P. pastoris* SMD1168 với hệ vector biểu hiện là pPIC 9. Hoạt tính  $\beta$ -glucosidase tự nhiên đạt cao nhất (44 U/mg) ở 60°C, pH 4-5, trong khi đó,  $\beta$ -glucosidase tái tổ hợp lại hoạt động tốt nhất ở 50°C và pH 5,5 [125]. Trần Đình Mẫn và đtg (2010) dựa trên kỹ thuật megaprimer, đã gắn thành công đoạn gen mã hóa exoglucanase (1450 bp) từ *Cellulomonas fimi* ATCC484 và promoter (180 bp) từ *B. subtilis* và biểu hiện trong *E. coli* có hoạt tính 0,25 U/ml [17]. Năm 2011, Phạm Thị Hòa và đtg đã nhân dòng và biểu hiện thành công gen *eglA* mã hóa endoglucanase thuộc họ 12 từ chủng *A. niger* VTCC-F021 trong nấm men *P. pastoris* GS115. Endoglucanase tái tổ hợp (rEglA) hoạt động cao nhất ở 55°C và pH 5, bền ở 30-37°C và pH 3,5-4,5. rEglA có ái lực cao với  $\beta$ -glucan ( $K_{cat}/K_m$  với cơ chất  $\beta$ -glucan là 505,05  $\text{min}^{-1}$ ).  $\text{Cu}^{2+}$  và EDTA hoạt hóa rEglA. Các ion kim loại khác đều làm giảm hoạt tính của rEglA. rEglA giữ được 70-98% khi ủ với ethanol, acetone 10-20% (v/v) và Tween 20, Tween 80 0,5-2% (v/v) [141].

#### **1.4. Nấm *Peniophora* sp. và *Aspergillus niger***

##### **1.4.1. *Peniophora* sp.**

*Peniophora* là một chi nấm có khả năng gây bệnh trên thực vật. Các loài trong chi này thuộc họ Peniophoraceae, bộ Russulales, lớp Nấm tán Agaricomycetes, ngành phụ Nấm đảm Basidiomycota, Giới Nấm Fungi. *Peniophora* là một chi nấm tương đối phổ biến có khoảng 62 loài [105]. Chi này được mô tả lần đầu tiên bởi Mordecai Cubitt Cooke vào năm 1879. Loài điển hình là *Peniophora quercina*, ban đầu có tên là *Thelephora quercina* do Christian Hendrik Persoon đề xuất vào năm 1801 trước khi được xếp vào chi *Peniophora* bởi Cooke vào năm 1879 [49]. Năm 1996, Hallenbegg và đtg đã phân loại 24 loài trong chi *Peniophora* dựa vào trình tự ITS trong vùng gen mã hóa rRNA [72]. Hiện nay có khoảng 83 trình tự gen mã hóa rRNA dùng trong phân loại các loài trong chi *Peniophora* đã được công bố và khoảng 83 loài đã được công bố trên cơ sở dữ liệu Taxonomy (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=peniophora>).

Một số nghiên cứu cơ bản và ứng dụng các loài chi *Peniophora* đã được công bố. Năm 1980, Gerber và đtg đã nghiên cứu cấu trúc và hoạt tính kháng khuẩn của hai kháng sinh Peniophorin A và B từ chủng *Peniophora affinis* Burt [65]. Năm 2004, Bannwarth và ĐTG đã nghiên cứu, xây dựng mô hình cấu trúc phân tử enzyme Pyranose 2-Oxidase của *Peniophora* sp. [34]. Gen mã hóa Pyranose 2-Oxidase từ *Peniophora gigantean* đã được nhân dòng và biểu hiện trong *E. coli* [35]. Năm 2005, Jordaan đã phân lập, phân tích đặc điểm xúc tác và độ bền nhiệt của laccase từ *Peniophora* sp. strain UD4 [93]. Năm 2010, hoạt tính laccase từ chủng *Peniophora* sp. CBMAI 1063 đã được khảo sát, gen mã hóa laccase từ chủng này đã được nhân dòng và phân tích trình tự [38]. Năm 2012, Poojary và đtg đã tối ưu thành phần môi trường cho sản xuất laccase từ chủng *Peniophora* sp. hpF04 bằng phương pháp tối ưu toán học đáp ứng bề mặt [143].

Ngoài enzyme laccase đã được nghiên cứu và công bố, phytase từ các chủng *Peniophora* đã được nghiên cứu. Gen mã hóa phytase từ chủng *P. lycii* đã được nhân dòng và biểu hiện, phytase tái tổ hợp đã được đánh giá các đặc tính lý hóa [110]. Năm 2006, Xiong và đtg đã biểu hiện cao gen mã hóa phytase từ chủng *P. lycii* trong nấm men *P. pastoris* [177]. Chủng nấm *P. cinerea* còn được ghi nhận có khả năng sản xuất ethanol theo nghiên cứu của Okamoto năm 2010 [131].

Tuy nhiên, những nghiên cứu về enzyme cellulase từ các loài thuộc chi *Peniophora* rất hạn chế trên thế giới. Hghley đã nghiên cứu ảnh hưởng một số nguồn cac bon đến khả năng sinh tổng hợp cellulase ( $C_x$  và  $C_1$ ) của chủng *Peniophora* “G,”. Nguồn polysaccharide, gỗ thích hợp sinh tổng hợp đối với enzyme  $C_x$  là cellulose và gỗ thông; đối với  $C_1$  là cellulose và gỗ cây hoàn diệt. Nguồn ni tơ thích hợp đối với sinh tổng hợp hai loại enzyme là cao nấm men [79]. Ở Việt Nam chưa có công trình nào công bố liên quan đến loài nào thuộc chi *Peniophora* và cellulase có nguồn gốc từ các loài thuộc chi này.

#### **1.4.2. *Aspergillus niger***

*A. niger* là một trong những loài nấm phổ biến nhất thuộc chi *Aspergillus*. *A. niger* gây ra bệnh mốc đen trên một số loại trái cây và rau quả. *A. niger* phân bố

phổ biến trong đất, tuy nhiên bào tử loài này có thể phát tán trong không khí nhờ gió. *A. niger* được sử dụng sản xuất nhiều chất trong công nghiệp. Các chủng khác nhau của *A. niger* được sử dụng trong việc sản xuất axit citric (E330) và axit gluconic (E574) được Tổ chức Y tế Thế giới đánh giá là an toàn thực phẩm. Nhiều enzyme hữu ích được sản xuất bằng cách lên men công nghiệp chủng *A. niger*. Glucoamylase sản xuất bởi *A. niger* được sử dụng trong sản xuất si rô fructose ngô và pectinase được sử dụng trong rượu táo và rượu vang. Alpha-galactosidase, một enzyme phân hủy một số loại đường phức tạp, là một thành phần trong các sản phẩm làm giảm đầy hơi. Các enzyme protease có nguồn gốc từ *A. niger* và được sử dụng để sản xuất các phụ gia Clarity-FERM. Sản phẩm này đang được sử dụng trong ngành công nghiệp sản xuất bia để giảm hàm lượng gluten lúa mạch và lúa mạch [142].

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu công bố về cellulase từ nấm *A. niger*. Những nghiên cứu tập trung vào sản xuất cellulase từ *A. niger* trên các nguồn cơ chất khác nhau [25], [55], [67], [87], [94], [137]; tinh sạch và đánh giá tính chất của cellulase tự nhiên từ *A. niger* [55], [63], [91]; nhân dòng và biểu hiện cellulase tái tổ hợp [144], [158]. Ở Việt Nam đã có những nghiên cứu về cellulase từ *A. niger* [14], [21]. Phạm Thị Hòa và đtg đã tuyển chọn chủng *A. niger* VTCC-F021 có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất trong số những chủng *A. niger* do Bảo tàng Giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam cung cấp, tối ưu môi trường lên men, tinh sạch và đánh giá tính chất của endoglucanase tự nhiên [139], [140]. Đồng thời, tác giả đã nhân dòng và biểu hiện gen *eglA* mã hóa cho endoglucanase A có chứa peptide tín hiệu trong *P. pastoris* GS115. Gen *eglA* từ chủng *A. niger* VTCC-F021 có chiều dài 720 bp. Enzyme tái tổ hợp (rEglA) đã được tinh sạch và đánh giá tính chất. Tuy nhiên, năng suất biểu hiện enzyme tái tổ hợp còn thấp, một số tính chất của enzyme như pH phản ứng tối ưu, độ bền pH chưa phù hợp tối ưu với hướng ứng dụng bổ sung vào thức ăn chăn nuôi [141]. Điều này đã đặt ra yêu cầu cần có sự cải biến để nâng cao năng suất biểu hiện của hệ biểu hiện và thay đổi một số tính chất của enzyme.

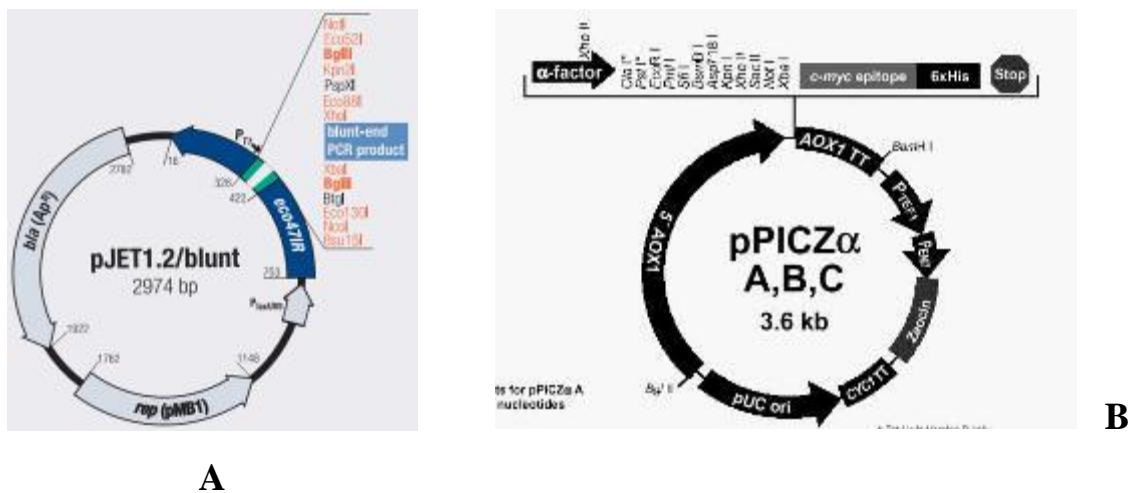
## Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu, hóa chất và địa điểm nghiên cứu

#### 2.1.1. Vật liệu

Bộ sưu tập 42 chủng nấm sợi do phòng Công nghệ sinh học enzyme - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Phòng thí nghiệm sinh học - Khoa Khoa học Sự sống - Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên cung cấp dùng để tuyển chọn chủng nấm sợi có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh và sàng lọc cellulase có tính chất mới làm nguyên liệu để tạo cellulase tái tổ hợp.

Tế bào *E. coli* DH5 $\alpha$  được sử dụng để nhân dòng gen, tế bào *P. pastoris* GS115 được sử dụng để biểu hiện. Vector pJET1.2/blunt (hãng Fermentas cung cấp) được dùng để tách dòng gen, vector pPICZ $\alpha$ A (hãng Invitrogen cung cấp) được dùng để biểu hiện gen *megLA*.



Hình 2.1. Cấu trúc vector tách dòng pJET1.2/blunt (A) và vector biểu hiện pPICZ $\alpha$ A (B)

Vector *pJegLA* mang gen mã hóa endoglucanase A có chứa peptide tín hiệu từ chủng *A. niger* VTCC-F021 do phòng Công nghệ sinh học enzyme - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

## **2.1.2. Hóa chất, dung dịch và môi trường thí nghiệm**

### **2.1.2.1. Hóa chất**

Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm đều ở dạng tinh khiết được cung cấp bởi các hãng chuyên cung cấp hóa chất phân tích uy tín trên thế giới. Một số hóa chất chính được liệt kê ở bảng phụ lục PL2.1.

### **2.1.2.2. Dung dịch và đệm**

Các loại dung dịch và đệm dùng cho thí nghiệm được pha theo hướng dẫn của các bài thí nghiệm chuẩn có thành phần và nồng độ được tóm tắt trong bảng phụ lục PL2.2.

### **2.1.2.3. Môi trường**

Các môi trường AMM, BMM, BMMY, LB, LB low salt, YP, YPGS [78] và Czapek [6] được sử dụng nghiên cứu. Thành phần của các môi trường được liệt kê ở bảng PL2.3.

## **2.1.3. Địa điểm nghiên cứu**

Các thí nghiệm được thực hiện từ tháng 7 năm 2009 tại Phòng Công nghệ sinh học enzyme và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen thuộc Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Công trình được hoàn thành tại Khoa Khoa học Sự sống - Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên.

## **2.2. Thiết bị thí nghiệm**

Các thiết bị được sử dụng làm thí nghiệm đều mới, hiện đại và có độ chính xác cao thuộc phòng Công nghệ sinh học enzyme và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (bảng PL.2.4).



## 2.3. Phương pháp nghiên cứu

### 2.3.1. Các phương pháp vi sinh vật

*Nuôi cấy hoạt hóa nấm sợi:* Các chủng nấm sợi từ các ống giống được nuôi cấy trên môi trường Czapek lỏng ở 30°C, pH 6,5, lắc 200 rpm trong 48 giờ [6].

*Nuôi cấy nấm sợi thu enzyme:* Các chủng nấm sợi sau khi hoạt hóa được nuôi cấy chìm trong môi trường CPY với cơ chất CMC 1% (w/v), ở 30°C, lắc 200 rpm. Sau 120 giờ nuôi cấy, dịch nuôi cấy được ly tâm loại sinh khối tế bào và thu dịch enzyme thô [13].

*Nuôi cấy E. coli:* Chủng *E. coli* bảo quản ở -84°C được hoạt hóa trên đĩa thạch, ủ ở 37°C qua đêm. Một khuẩn lạc riêng rẽ trên đĩa thạch được nuôi vào 2 ml LB lỏng, lắc 200 rpm ở 37°C qua đêm. Các chủng tái tổ hợp được nuôi trong các môi trường tương ứng bổ sung ampicillin (nồng độ cuối cùng 100 µg/ml) [151].

*Nuôi biểu hiện:* Chủng nấm men *P. pastoris* được nuôi lắc trong môi trường YP bổ sung glycerol 1% (w/v), lắc 200 rpm ở 30°C qua đêm, sau đó chuyển sang môi trường YP và tiếp methanol 1% (v/v) hàng ngày để cảm ứng biểu hiện *megIA*.

### 2.3.2. Các phương pháp sinh học phân tử

#### 2.3.2.1. Tách chiết DNA tổng số của nấm mốc

Tế bào nấm được nuôi cấy trong 100 ml môi trường Czapek ở 30°C, lắc 200 rpm, sau 72 giờ dịch canh trường được ly tâm 10000 rpm trong 10 phút. Sinh khối tế bào (2 g) được nghiền nhanh trong nitor lỏng bằng cối chày sứ, sau đó được bổ sung 600 µl đệm phá tế bào và lắc nhẹ. Sau đó, 25 µl protease K được bổ sung và ủ ở 56°C trong 2-3 giờ. Bổ sung tiếp hỗn hợp chloroform:isoamyl alcohol (24:1) với thể tích tương đương, trộn đều trong 5 phút, sau đó ly tâm 12000 rpm trong 15 phút. Hút 500 µl dịch nổi chứa DNA sang ống eppendorf mới và bổ sung 500 µl isopropanol lạnh. Hỗn hợp được đảo nhẹ và tủa DNA ở -20°C trong 30 phút. Tủa sau khi ly tâm được rửa bằng 500

μl ethanol 70% để loại muối và isopropanol. Sau khi ly tâm 12000 rpm trong 10 phút, tủa được làm khô, hòa trong 40 μl đệm TE và bảo quản ở -20°C [48].

#### 2.3.2.2. Tách chiết DNA tổng số nấm men

Tế bào nấm men được nuôi cấy trong 5 ml môi trường YPG qua đêm ở 30°C, lắc 200 rpm. Dịch nuôi được ly tâm 5 phút với 8000 rpm, thu cặn tế bào. Bổ sung vào cặn tế bào 300 μl dung dịch phá tế bào nấm và lắc nhẹ cho tan. Hỗn hợp được ủ 15 phút ở -84°C sau đó cho ngay vào 95°C ủ 1 phút, lặp lại 3 lần. Hỗn hợp được bổ sung tiếp 250 μl chloroform: isoamyl alcohol (24:1), lắc kỹ và ly tâm 20 phút với 12500 rpm. Dịch trên được thu sang ống mới, bổ sung 300 μl ammonium acetate, để lạnh 15 phút sau đó ly tâm 12500 rpm trong 10 phút thu dịch trên. DNA được tủa bằng 600 μl isopropanol lạnh, ủ 10 phút ở -84°C và ly tâm 10 phút với 12500 rpm. Tủa được rửa với ethanol 70%, ly tâm thu tủa, để khô ở 37°C. Sau đó, tủa được hòa trong 30 μl TE và 0,25 μl RNase, và ủ 15 phút ở 37°C [78].

#### 2.3.2.3. Tách DNA plasmid

Tế bào vi khuẩn được nuôi trong 1,5 ml môi trường LB lỏng bổ sung ampicillin (100 μg/ml) ở 37°C qua đêm. Dịch nuôi được ly tâm 8000 rpm trong 5 phút. Tủa được bổ sung 150 μl dung dịch I trộn đều bằng máy lắc rung, 150 μl dung dịch II, lắc nhẹ và giữ trong đá lạnh 3 phút, và 150 μl dung dịch III, lắc đều. Sau đó, hỗn hợp được bổ sung tiếp 450 μl chloroform : isoamyl alcohol (24:1), trộn đều và ly tâm 12000 rpm trong 10 phút. Dịch trên được chuyển sang ống eppendorf mới, bổ sung 320 μl isopropanol, trộn đều và ủ ở -20°C trong 30 phút hoặc -80°C trong 5 phút. Sau khi ly tâm 12000 rpm trong 15 phút, tủa được rửa bằng cồn 70%, làm khô và được hòa trong 20 μl TE. Điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8 % [151].

#### 2.3.2.4. Cắt plasmid bằng enzyme giới hạn

Để kiểm tra plasmid lựa chọn có mang sản phẩm mong muốn hay không, plasmid tái tổ hợp từ các khuẩn lạc được cắt bằng các enzyme giới hạn. Trình tự

nhận biết của các enzyme này được thiết kế ở hai đầu của đoạn gen ngoại lai. Hỗn hợp phản ứng cắt được trộn với tỉ lệ sử dụng theo hướng dẫn của hãng sản xuất. Phản ứng được ủ trong 2-3 giờ ở 37°C, sau đó điện di kiểm tra [151].

#### 2.3.2.5. Tinh sạch phân đoạn DNA

Phân đoạn DNA được tinh sạch bằng kit tinh sạch của hãng Qiagen. Mẫu DNA được chạy điện di trên gel agarose 0,8% để thu phân đoạn cần tinh sạch. Bổ sung 3 lần thể tích dung dịch liên kết (thể tích được qui đổi 1 g gel cho 1 ml). Hỗn hợp được ủ ở 55°C trong 15 phút cho gel tan hoàn toàn. Dịch DNA được cho lên cột, để 2 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm 13000 rpm trong 1 phút để loại dịch lỏng. Cột gắn DNA được rửa 2 lần với 500 µl dung dịch rửa và ly tâm 13000 rpm trong 1 phút. DNA được thổi bằng nước cất tiệt.

#### 2.3.2.6. Nhân bản gen bằng PCR

**Bảng 2.1. Các cặp môi sử dụng trong phản ứng PCR nhân gen**

Tên môi	Trình tự (5'→3')	Sản phẩm	Kích thước (bp)	Nguồn gốc/cơ sở
ITS1	5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3'	gen mã hóa rRNA	1200	[80]
NL4	5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'			
GpPICF	5'-GC <u>GAA TTC</u> AAG CTC <u>YCH DTG</u> RCA CTT-3'	Nhân gene <i>eglA</i> để biểu hiện với vector pPICZαA	720	Thiết kế dựa trên vùng bảo thủ của họ 12 glycoside hydrolase
GpPICR	5'- GC <u>TCT AGA</u> GC GTT <u>GAC ACT</u> RGC RGT CCA-3'			
pPmeGlAF	5'-GC <u>CGA ATT CCA</u> GAC <u>AAT GTG</u> CTC TAG-3'	Gen <i>meGlA</i> để biểu hiện với vector	672	Thiết kế dựa trên phân tích trình tự peptide tín hiệu và vùng bảo thủ của họ 12 glycoside hydrolase
GpPICR	5'-GC <u>TCT AGA</u> GC GTT <u>GAC ACT</u> RGC RGT CCA-3'	pPICZαA		

(Y: C hoặc T, H: A hoặc C, D: A hoặc G hoặc T, R: A hoặc G)

*Nguyên tắc:* PCR là phương pháp dùng enzyme khuếch đại chọn lọc một đoạn DNA theo luật số mũ. Phản ứng nhân gen được thực hiện với DNA

polymerase chịu nhiệt, 2 môi tổng hợp và 4 loại deoxyribonucleotide (dATP, dGTP, dCTP và dTTP).

*Tiến hành:* Gen rRNA và *meqIA* được nhân bản với các cặp môi tương ứng (bảng 2.1) trong phản ứng PCR có thành phần như trong bảng 2.2 và chu trình nhiệt như sau: 95°C/5', 30x (95°C/45", 55°C/45", 72°C/1'); 72°C/10'.

**Bảng 2.2. Thành phần PCR**

Thành phần	Nồng độ	Thể tích (µl)
Đệm	10x	2,0
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	1,2
dNTP	2 mM	2,0
Môi xuôi	10 pmol/µl	1,0
Môi ngược	10 pmol/µl	1,0
Taq-polymerase	5 U/µl	0,2
DNA khuôn	50-100 ng/µl	1,0
H <sub>2</sub> O khử ion vô trùng		10,6
Tổng thể tích		20,0

#### 2.3.2.7. Phản ứng nối ghép gen

Phản ứng gắn dính sản phẩm PCR vào vector pJET 1.2/blunt được thực hiện theo protocol của hãng Fermentas. Hỗn hợp bao gồm: 2 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl đệm 2x reaction, 0,5 µl DNA blunting enzyme, 1,5 µl sản phẩm PCR. Hỗn hợp được trộn đều và ủ ở 70°C trong 15 phút. Sau đó, bổ sung tiếp 0,5 µl vector pJET1.2/blunt và 0,5 µl T<sub>4</sub>-DNA ligase. Phản ứng gắn dính được thực hiện ở 22°C trong 2-3 giờ để tạo vector tái tổ hợp.

Phản ứng gắn dính phân đoạn DNA tinh sạch vào vector biểu hiện bao gồm 1 µl đệm gắn dính 10x, 0,5 µl DNA plasmid, 2 µl phân đoạn chèn DNA, 0,5 µl T<sub>4</sub> ligase, 6 µl H<sub>2</sub>O cất vô trùng, tổng thể tích 10 µl phản ứng. Trộn hỗn hợp phản ứng cẩn thận và ủ qua đêm ở 22°C.

### 2.3.3.8. Biến nạp bằng sốc nhiệt

*Biến nạp plasmid vào E. coli DH5 $\alpha$* : Dịch nối ghép được ủ với tế bào khả biến trong đá 30 phút và shock nhiệt 45 giây ở 42°C rồi chuyển nhanh vào đá. Sau 5 phút ủ ở đá, dịch shock nhiệt được bổ sung 250  $\mu$ l LB lỏng, lắc 200 rpm ở 37°C trong 1 giờ. Dịch biến nạp được trải trên đĩa thạch chứa kháng sinh phù hợp với vector sử dụng. Đĩa thạch sau đó được ủ 37°C qua đêm [151].

### 2.3.3.9. Biến nạp bằng xung điện

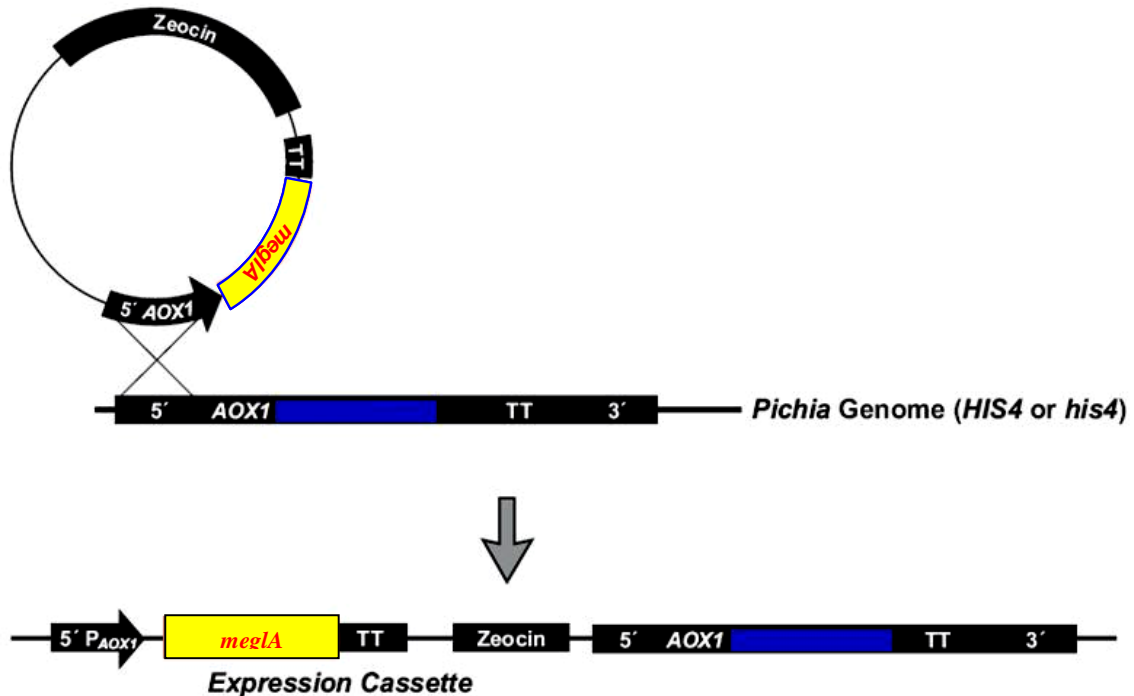
Vector tái tổ hợp được biến nạp bằng xung điện vào *P. pastoris* GS115 và hội nhập với genome của nấm men tại điểm AOX1 (hình 2.2).

*Chuẩn bị tế bào khả biến P. pastoris GS115*: Chủng *P. pastoris* được nuôi cấy trong môi trường YPG lỏng, lắc 200 rpm ở 30°C qua đêm. Tiếp giống 0,2% trong 20 ml YPG lỏng và nuôi lắc trong vòng 16-18 giờ, OD<sub>600 nm</sub> đạt 1,4-1,6. Dịch nuôi được để lạnh 30 phút cho ổn định, ly tâm 5000 rpm trong 5 phút thu tế bào. Tế bào được rửa lần 1 bằng nước khử ion, lần 2 bằng sorbitol 1 M. Tế bào sạch được hòa tan trong 100  $\mu$ l sorbitol 1 M chuẩn bị cho biến nạp [78].

*Chuẩn bị pPmegLA mở vòng*: Để biến nạp vector pPmegLA vào *P. pastoris* GS115, vector tái tổ hợp được cắt mở vòng tại vùng AOX1 bằng *SacI*. Hỗn hợp phản ứng 500  $\mu$ l (gồm 200  $\mu$ l plasmid (5  $\mu$ g), 50  $\mu$ l đệm 10x *SacI*, 10  $\mu$ l *SacI* (50 U), 240  $\mu$ l H<sub>2</sub>O) được ủ 37°C qua đêm. pPmegLA mở vòng được tinh sạch bằng cách chiết isopropanol và chuẩn bị cho biến nạp [78].

*Biến nạp plasmid vào P. pastoris G115*: dịch tế bào khả biến được bổ sung dịch plasmid tái tổ hợp đã được xử lý bằng *SacI*. Để ổn định 15 phút, chuyển sang cuvette để xung điện. Chế độ: 1,5 kV, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ . Bổ sung ngay 1 ml sorbitol 1 M và để lạnh 15 phút. Chuyển toàn bộ dịch biến nạp sang ống falcon 15 ml và ủ ở 30°C trong 1-2 giờ. Dịch biến nạp sau đó được trải trên đĩa thạch YPGS đặc chứa 100  $\mu$ g/ml zeocin, ủ ở 30°C trong 3-5 ngày. Khuẩn lạc mọc trên

đĩa thạch chứa gen kháng zeocin được nuôi trong môi trường YPG bổ sung 100  $\mu\text{g/ml}$  zeocin để tách DNA kiểm tra gen chèn [78].



Hình 2.2. Mô hình hội nhập gen *meglA* vào genome của *P. pastoris* [78]

#### 2.3.2.10. Giải trình tự nucleotide

Plasmid tái tổ hợp mang gen mã hóa rRNA của *Peniophora* sp. NDVN01, plasmid nhân dòng pJmeglA và plasmid biểu hiện pPmeglA được tinh sạch theo phương pháp chuẩn dùng làm khuôn chạy PCR để đọc trình tự theo phương pháp giải trình tự tự động. Mẫu được gửi cho hãng MacroGen của Hàn Quốc đọc trình tự.

### 2.3.3. Các phương pháp hóa sinh

#### 2.3.3.1. Xác định hoạt tính cellulase theo đường kính thủy phân trên đĩa thạch

Hoạt tính cellulase được xác định tương đối theo phương pháp khuếch tán enzyme trên đĩa thạch. Đĩa thạch chứa cơ chất CMC 0,5% (w/v) trong đệm acetate 100 mM pH 5, dày khoảng 0,5 cm được đục lỗ với đường kính 0,5 cm. 50  $\mu\text{l}$  dịch enzyme được bổ sung vào lỗ rồi ủ 12 giờ ở 4°C cho enzyme khuếch tán đều xung quanh. Sau khi ủ tiếp 8 giờ ở 37°C, mẫu được nhuộm bằng dung

dịch lugol 1% (w/v) và đo đường kính vòng phân giải cơ chất. Hoạt tính tương đối của enzyme tỷ lệ thuận với đường kính vòng phân giải cơ chất: Hoạt tính =  $D - d$  (với  $D$  là đường kính vòng ngoài và  $d$  là đường kính lỗ) [6].

### 2.3.3.2. Xác định hoạt độ cellulase

*Nguyên tắc:* Dựa trên sự thủy phân CMC bằng dịch cellulase sau đó bất hoạt enzyme và tạo phản ứng màu bằng DNS. Lượng glucose tạo ra được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm theo phương pháp của Miller (1959) [119].

#### Tiến hành

*Ống thí nghiệm:* 0,1 ml dịch enzyme được cho vào ống nghiệm, thêm 0,4 ml dung dịch CMC 1% (w/v) trong đệm acetate 100 mM, pH 5. Hỗn hợp được lắc đều và ủ ở 55°C trong 5 phút, sau đó bổ sung ngay 1,25 ml dung dịch DNS và đun sôi cách thủy 5 phút.

*Ống đối chứng:* 0,1 ml dịch enzyme được cho vào ống nghiệm, thêm 1,25 ml dung dịch DNS, ủ trong 5 phút, bổ sung 0,4 ml dung dịch CMC 1% (w/v). Hỗn hợp được lắc đều và ủ ở 55°C trong 5 phút, sau đó đun sôi cách thủy 5 phút. Hỗn hợp sau phản ứng được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 540 nm. Độ hấp thụ quang phổ được đối chiếu với đồ thị chuẩn nồng độ glucose để suy ra hàm lượng đường khử tương đương được giải phóng ra.

*Đơn vị hoạt tính:* Một đơn vị hoạt tính (U) được định nghĩa là lượng enzyme làm thủy phân cơ chất (CMC) thành đường khử tương đương 1  $\mu$ mol glucose trong một phút ở điều kiện thí nghiệm.

### 2.3.3.3. Tinh sạch cellulase tự nhiên

Dịch enzyme (15 ml) sau khi ly tâm ở 10000 rpm trong 10 phút được rửa với 90% (6,675 g) ammonium sulfate bão hòa và để ở 4°C qua đêm. Sau khi ly tâm 12500 rpm, ở 4°C. Rửa được hòa với đệm acetate 100 mM pH 5,0 và thẩm

tích loại muối. Dịch tủa sau khi loại muối (8 ml) được đưa qua cột sắc ký lọc gel Sephadex G75 (2,6 x 60 cm) đã được cân bằng với đệm acetate 50 mM, pH 4,5. Tốc độ chảy là 25 ml/giờ. Thể tích mỗi phân đoạn là 1,5 ml. Những phân đoạn có hoạt tính mạnh được thu hồi và đưa qua cột sắc ký lọc gel Biogel P100 (2,6x60 cm) đã được cân bằng với đệm acetate 50 mM, pH 4,5. Tốc độ chảy là 25 ml/giờ. Thể tích mỗi phân đoạn là 1,5 ml. Hàm lượng protein và hoạt tính enzyme được xác định trong mỗi phân đoạn, sau đó điện di trên gel 12,5% polyacrylamide để kiểm tra độ tinh sạch.

#### 2.3.3.4. Tinh sạch protein tái tổ hợp

*Nguyên lý:* Protein tái tổ hợp được tinh sạch bằng cột resin gắn nickel chuyên dùng cho các protein tái tổ hợp có đuôi polyhistidine. Trong đó, resin là chất mang dạng agarose liên kết chéo, chứa thụ thể iminodiacetic acid và chất này làm cầu nối với  $Ni^{2+}$ . Cột resin-nickel có ái lực cao với đuôi polyhistidine. Việc gắn kết hình thành thông qua liên kết giữa ion  $Ni^{2+}$  và đuôi 6xHis trong phân tử protein. Tinh sạch protein được thực hiện dưới các điều kiện biến tính, không biến tính và hỗn hợp theo mô tả của Invitrogen. Protein liên kết với resin được thôi bằng đệm pH thấp hoặc bằng đệm chứa muối imidazole.

*Tiến hành:* 8 ml dịch nuôi biểu hiện rMEglA ở nấm men được sử dụng trực tiếp để đưa lên cột chứa 2 ml resin đã được cân bằng bằng đệm gắn NBB. Sau đó, mẫu được ủ với resin trong cột khoảng 45 phút, lắc đảo nhẹ nhiều lần. Cột được rửa 3 lần với 8 ml đệm NWB. Cuối cùng mẫu được thôi bằng 8-10 ml đệm NEB (1 ml cho mỗi phân đoạn) [86].

#### 2.3.3.5. Điện di gel polyacrylamide (PAGE)

*Nguyên tắc:* Gel polyacrylamide được sử dụng để điện di protein polyacrylamide với nồng độ 12,5% theo phương pháp điện di biến tính của Lemmli 1970 [109]. Bản gel được đổ hai lớp, lớp dưới là gel tách được đổ cách



mặt trên 1,5 cm, để đông 30 phút, cài lược rồi đổ tiếp lớp gel cô ở trên, để 30 phút cho gel đông hoàn toàn và ổn định.

*Điện di:* Bản điện di được lắp vào hệ thống điện di và chạy với cường độ dòng điện 20 mA cho lớp gel cô và 30 mA cho lớp gel tách trong 45 phút. Sau điện di, bản gel được tách khỏi phiến kính rồi nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue (cellulase tự nhiên) trong 1-3 giờ và bản gel được tẩy màu bằng dung dịch tẩy, hoặc nhuộm bằng  $\text{AgNO}_3$  0,1% (w/v) (rmEgIA). Các protein dưới dạng monomer tinh sạch xuất hiện một băng duy nhất.

#### 2.3.2.6. Điện di SDS-PAGE nhuộm hoạt tính

Để phát hiện băng protein thể hiện hoạt tính endoglucanase, mẫu được chạy điện di trên gel polyacrylamide nồng độ 10% có chứa 0,2% CMC với đệm mẫu có chứa SDS và mercapthoethanol nhưng không biến tính nhiệt độ. Sau quá trình chạy điện di, bản gel được cắt làm hai phần. Phần một nhuộm bạc hoặc Coomassie Brilliant Blue. Phần hai nhuộm hoạt tính theo phương pháp được mô tả bởi Yamabhai M. và đtg (2008) có cải tiến [179]. Gel được loại SDS bằng cách rửa trong nước deion hai lần trong 30 phút, rửa trong dung dịch 1% Triton - X100 trong 1h, rửa bằng đệm acetate 0,1M pH 4,5 trong 30 phút. Bản gel được ủ trong đệm acetate 0,1M pH 4,5 qua đêm ở 37°C. Sau đó bản gel được rửa nước deion hai lần và nhuộm đặc hiệu bằng dung dịch đỏ Congo 1% trong 30 phút. Băng thủy phân cơ chất CMC được hiện hình bằng cách rửa bản gel trong dung dịch 1M NaCl trong 15 phút.

#### 2.3.2.7. Xác định hàm lượng protein tổng số

Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp Bradford [39]. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc: các protein khi phản ứng với Coomassie Brilliant Blue sẽ hình thành phức hợp màu có khả năng hấp thụ ánh sáng mạnh nhất ở bước sóng 595 nm, cường độ màu tỉ lệ thuận với nồng độ protein trong dung dịch. Hàm lượng protein tổng số được xác định dựa vào đồ thị chuẩn protein từ dung dịch albumin huyết thanh bò.

### 2.3.2.8. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố lý hóa lên hoạt tính và độ bền của endoglucanase tự nhiên và tái tổ hợp

#### **Động học của phản ứng enzyme**

Để xác định ảnh hưởng của nồng độ cơ chất, enzyme tinh sạch được phản ứng với cơ chất CMC và cơ chất barley  $\beta$ -glucan. Động học cơ chất của enzyme đối với cơ chất CMC và  $\beta$ -glucan được xác định qua hằng số Michaelis-Menten,  $K_m$ , và vận tốc phản ứng tối đa  $V_{max}$  [4].

*Nguyên tắc:* Để xác định hằng số  $K_m$  dựa vào phương trình Lineweaver Burk:

$$\frac{1}{v_0} = \left( \frac{K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Trong đó:} \quad \begin{array}{l} V_0 \text{ là vận tốc ban đầu} \\ V_{max} \text{ là vận tốc cực đại} \end{array}$$

Đường biểu diễn cắt trục tung ở điểm  $1/V_{max}$  và cắt trục hoành ở điểm  $-1/K_m$ . Từ đó có thể tính được các giá trị  $V_{max}$ ,  $K_m$ .

#### **Nhiệt độ và pH tối ưu**

Nhiệt độ và pH tối ưu của cellulase tự nhiên và rEglA được xác định bằng cách đo hoạt tính enzyme theo phương pháp đã mô tả ở trên sử dụng đệm acetate 100 mM (pH 3,0-5,5) và đệm phosphate 100 mM (pH 5,5-8,0), nhiệt độ thay đổi trong khoảng 30-85°C tại pH 5 và pH thay đổi từ 3,0-8,0 ở 37°C.

#### **Độ bền nhiệt và độ bền pH**

Để đánh giá độ bền nhiệt và độ bền pH của cellulase tự nhiên và cellulase tái tổ hợp, dịch enzyme đã tinh sạch (0,53  $\mu$ g cho mỗi phản ứng) được ủ ở các nhiệt độ khác nhau từ 30°C đến 55°C ở pH 5,0 và pH khác nhau từ 3,0-8,0 (pH 3,0-6,0 với đệm acetate; pH 6,0-8,0 với đệm phosphate) ở 37°C, sau các khoảng thời gian 2-24h (cellulase tự nhiên) và từ 1- 8h (cellulase tái tổ hợp). Hoạt tính còn lại của enzyme được xác định.

#### **Ảnh hưởng của ion kim loại, chất tẩy rửa và dung môi hữu cơ**

Dịch endoglucanase tự nhiên tinh sạch (0,53  $\mu$ g cho mỗi phản ứng) được ủ với ion kim loại 2-10 mM ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ag^+$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,

Mg<sup>2+</sup>), EDTA và mercaptoethanol; với dung môi hữu cơ 1-20% (v/v) (acetone, ethanol, isopropanol, methanol và n-butanol) và với chất tẩy rửa 1-20% (v/v) (Tween 20, Tween 80, SDS, Triton X-100 và Triton X-114) ở 37°C. Sau 1 giờ ủ, hoạt tính còn lại của enzyme được xác định.

Dịch rmEglA tinh sạch (1,5 µg cho mỗi phản ứng) được ủ với ion kim loại 2-10 mM (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>), EDTA và mercaptoethanol; với dung môi hữu cơ 1-20% (v/v) (acetone, ethanol, isopropanol, methanol và n-butanol) và với chất tẩy rửa 1-20% (v/v) (Tween 20, Tween 80, SDS, Triton X-100 và Triton X-114) ở 37°C. Sau 1 giờ ủ, hoạt tính còn lại của enzyme được xác định.

#### 2.3.2.9. Xác định sản phẩm thủy phân bằng kỹ thuật TLC

Để xác định sản phẩm thủy phân, 1,6 mg endoglucanase tinh sạch đã được ủ với cơ chất CMC 1% ở 37°C trong 72h. Sản phẩm thủy phân đã được chạy sắc ký lớp mỏng (TLC) (bản 20×20 cm silicagel 60, Merck), thực hiện với một pha động của n-butanol/acetic acid/nước (2:1:1, v/v/v). Các tiểu phân thủy phân đã được hiện hình bằng cách phun các bản TLC với 10% (v/v) acid sulfuric trong ethanol và ủ ở 120°C trong 15 phút. Mẫu được so sánh với chất chuẩn gồm glucose (G1), cellobiose (G2), cellotriose (G3) và cellotetraose (G4) [129].

### 2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm hóa sinh được tiến hành lặp lại 3 lần. Số liệu thu được được xử lý thống kê sinh học tính các tham số thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel [18].

- Giá trị trung bình ( $\bar{X}$ ): 
$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

- Độ lệch chuẩn ( $\delta$ ): 
$$\delta = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

- Sai số m: 
$$m = \pm \frac{\delta}{\sqrt{n}}$$

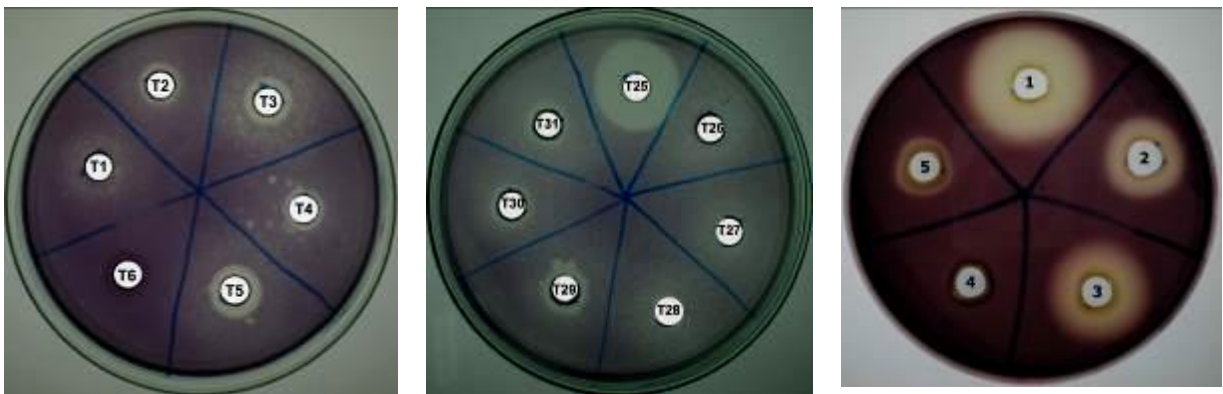
Chương trình DNASTar được dùng để phân tích, so sánh trình tự nucleotide và xây dựng cây phân loại chủng nấm nghiên cứu. Phần mềm trực tuyến SignalP 4.1 Server [188] để phân tích trình tự peptide tín hiệu, phần mềm trực tuyến NetOGlyc 4.0 Server phân tích điểm O-glycosyl hóa [187], phần mềm trực tuyến NetNGlyc 1.0 Server [186] phân tích điểm N-glycosyl.

### Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Tinh sạch và nghiên cứu đặc tính của cellulase tự nhiên từ nấm sợi tại Việt Nam

##### 3.1.1. Tuyển chọn và phân loại chủng nấm sợi sinh tổng hợp cellulase

Các chủng nấm sợi (42 chủng) được lên men lỏng trên một trường CPY bổ sung CMC cho sinh tổng hợp cellulase, sau 96 h nuôi cấy thu dịch enzyme thô. Sử dụng phương pháp khuếch tán enzyme trên thạch và phương pháp đo hoạt tính cellulase thông qua lượng đường khử tạo thành theo Miller cho thấy 37 chủng nấm *Trichoderma* sp. có hoạt tính cellulase thấp hoặc không có. Trong 5 chủng nấm sợi thuộc ngành phụ Nấm đảm có 4 chủng có hoạt tính cellulase cao. Trong đó chủng nấm sợi NDVN01 có hoạt tính cao nhất đạt 1,47 U/ml (Bảng PL3.1; hình 3.1). Chủng NDVN01 được chọn để tiến hành những nghiên cứu tiếp theo.



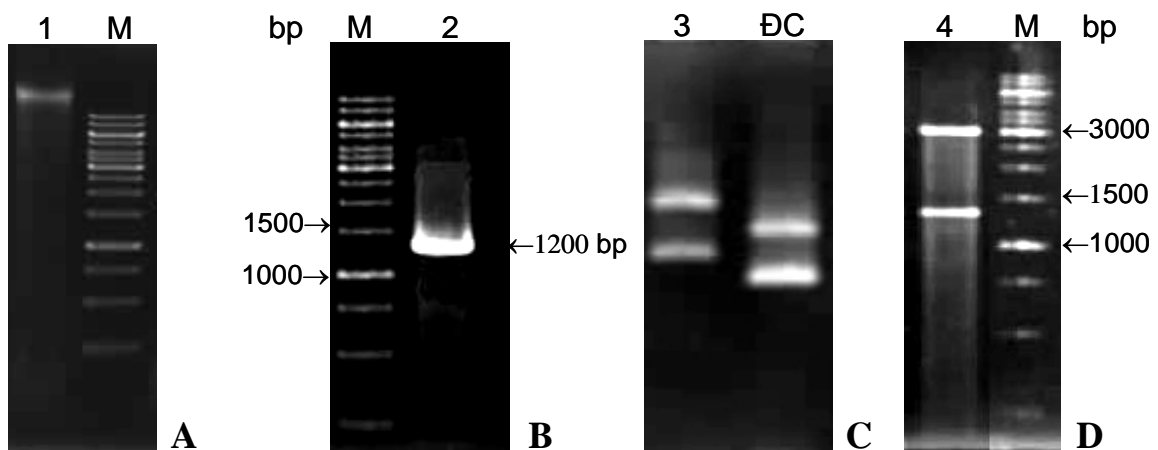
**Hình 3.1. Hoạt tính cellulase của một số chủng nấm sợi nghiên cứu**

(T1-T31: một số chủng nấm *Trichoderma*; 1: *Peniophora* sp. NDVN01; 2: *Pleurotus sajor-caju*; 3: *Pleurotus ostreatus*; 4: *Ganoderma lucidum*; 5: *Flammulina velutipes*)

Chủng NDVN01 được phân loại dựa vào trình tự nucleotide gen mã hóa rRNA. DNA tổng số của chủng NDVN01 được tách chiết, tinh sạch và điện di kiểm tra (hình 3.2A). Kết quả cho thấy băng điện di DNA tổng số gọn, không bị đứt gãy đảm bảo chất lượng cho phản ứng PCR nhân dòng gen. Phản ứng PCR khuếch đại gen mã hóa rRNA được tiến hành với cặp mồi ITS1 và NL4. Sau khi

điện di kiểm tra, sản phẩm PCR có kích thước khoảng 1200 bp tương ứng với tính toán lý thuyết (hình 3.2 B).

Sản phẩm PCR sau đó được gắn vào vector pJET 1.2/blunt tạo plasmid tái tổ hợp và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 $\alpha$ . Các khuẩn lạc được chọn lọc và nuôi cấy để tách plasmid. Plasmid tái tổ hợp mang gen ngoại lai nên có kích thước lớn hơn plasmid đối chứng (hình 3.2C). Plasmid tái tổ hợp được cắt kiểm tra bằng *Xba*I và *Xho*I. Sản phẩm cắt được điện di kiểm tra cho thấy xuất hiện 2 băng kích thước tương ứng với đoạn DNA thuộc gen mã hóa rRNA (~ 1200 bp) và pJET1.2/blunt (~3 kb) (hình 3.2D).



Hình 3.2. Hình ảnh điện di DNA nhân gen mã hóa rRNA

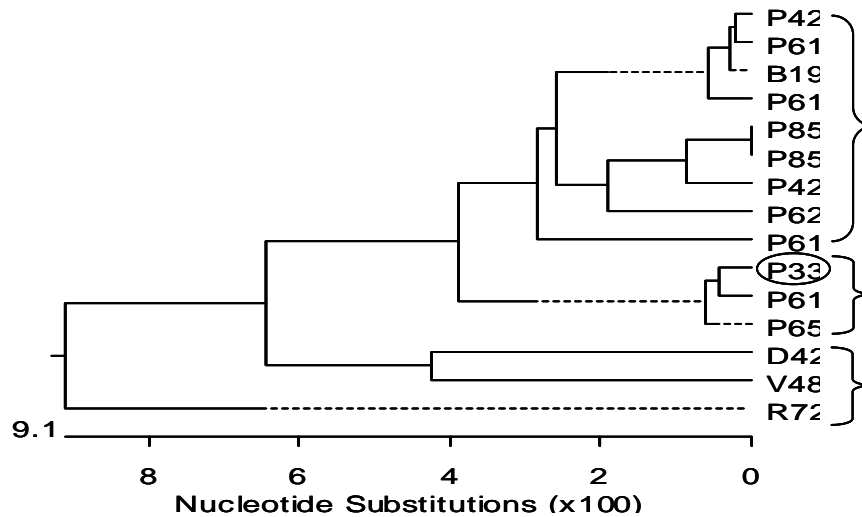
*DNA tổng số (A-1); Sản phẩm PCR nhân gen mã hóa rRNA từ khuôn DNA tách chiết từ chủng NDVN01 (B-2); Plasmid tái tổ hợp (C-3); Sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp/*Xba*I và *Xho*I (D-4); Marker 1 kb (M); pJET1.2 (C-ĐC)*

Plasmid tái tổ hợp được tinh sạch và gửi đọc trình tự tại hãng Macrogen - Hàn Quốc. Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy đoạn DNA của gen mã hóa rRNA của chủng NDVN01 có chiều dài 1255 bp gồm một phần gen 18S; toàn bộ trình tự ITS1, gen 5,8S và trình tự ITS2; một phần gen 28S (bảng PL3.2). Đoạn DNA của gen mã hóa rRNA của chủng NDVN01 có 316

nucleotide loại A (25,18%), 343 nucleotide loại G (27,33%), 296 nucleotide loại T (23,59%) và 300 nucleotide loại C (23,9%). Tổng số nucleotide loại A và T là 612 (48,76%) và tổng số nucleotide loại G và C là 643 (51,24%). Tỷ lệ A+T/G+C bằng 0,952.

So sánh trình tự gen mã hóa rRNA của chủng nấm sợi nghiên cứu với một số trình tự đã công bố trên GenBank bằng phần mềm Blast trực tuyến cho thấy, chủng NDVN01 có quan hệ họ hàng gần với một số đại diện thuộc chi nấm sợi *Peniophora*. Phân tích số liệu bằng phần mềm DNASTar cho thấy trình tự nucleotide gen mã hóa rRNA của chủng NDVN01 có độ tương đồng 93,7-99,2% với các chủng thuộc chi *Peniophora*, trong đó tương đồng cao nhất (99,2%) với chủng *Peniophora* sp. M104-3B (mã số GenBank: HM595611) và *Peniophora pini* (mã số GenBank: EU118651). Cây phân loại của chủng nấm sợi NDVN01 đã được dựng bằng phần mềm DNASTar và được thể hiện ở hình 3.3. Trên hình 3.3 cho thấy, chủng NDVN01 và một số chủng có trình tự nucleotide tương đồng thuộc chi nấm sợi *Peniophora* được chia thành ba nhóm. Trong đó, chủng NDVN01 và hai chủng có độ tương đồng cao nhất (*Peniophora* sp. M104-3B (P611) và *Peniophora pini* (P651)) được xếp vào cùng nhóm. Trình tự gen mã hóa rRNA của chủng NDVN01 đã được đăng ký trong GenBank với mã số JF925333 và chủng đã được đặt tên là *Peniophora* sp. NDVN01. Đặc điểm phân loại như sau:

Giới Nấm	Fungi
Ngành phụ Nấm đảm	Basidiomycota
Lớp Nấm tán	Agaricomycetes
Bộ	Russulales
Họ	Peniophoraceae
Chi	Peniophora
Loài	<i>Peniophora</i> sp. NDVN01



**Hình 3.3. Cây phân loại của chủng NDVN01 dựa vào trình tự gen mã hóa rRNA**

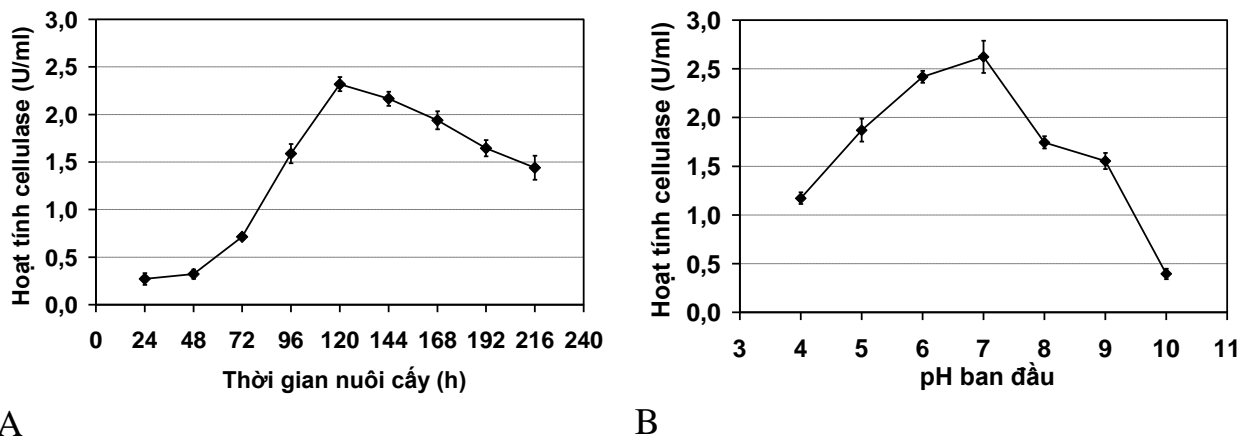
P424: *Peniophora cinerea* (AF506424); P617: *Peniophora clone* (JF449617);  
 B198: uncultured Basidiomycota clone bas07110 (HQ433198); P612:  
*Peniophora* sp. M126-1 (HM595612); P853: *Peniophora* sp. MLB-2010  
 (HQ604853); P854: *Peniophora aurantiaca* (HQ604854); P425: *Peniophora*  
*incarnata* (AF506425); P622: *Peniophora* sp. TW06-13 (AB672622); P610:  
*Peniophora* sp. M161 (HM595610); P333: *Peniophora* sp. NDVN01  
 (JF925333); P611: *Peniophora* sp. M104-3B (HM595611); P651: *Peniophora*  
*pini* (EU118651); D428: *Dichostereum aff. Pallescens* (AF506428); V484:  
*Vararia investiens* (AF506484); R726: Russuloid isolate BB1 (AF283726)

### 3.1.2. Tối ưu điều kiện môi trường nuôi cấy sinh tổng hợp cellulase

#### 3.1.2.1. Thời gian nuôi cấy thích hợp

Để đánh giá khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào theo thời gian, chủng NDVN01 được nuôi cấy trong môi trường cơ bản ở 30°C, lắc 200 vòng/phút. Dịch môi trường được thu ở các giờ khác nhau xác định hoạt tính. Kết quả cho thấy, hoạt tính cellulase ngoại bào tăng chậm từ 24h (12%) đến 72h (31%) nuôi cấy, sau 72h khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào tăng tuyến tính và đạt cực đại ở 120h nuôi cấy với hoạt tính đạt 2,32 U/ml, sau đó giảm dần còn 62% (1,44 U/ml) ở 216h (hình 3.4A).





A

B

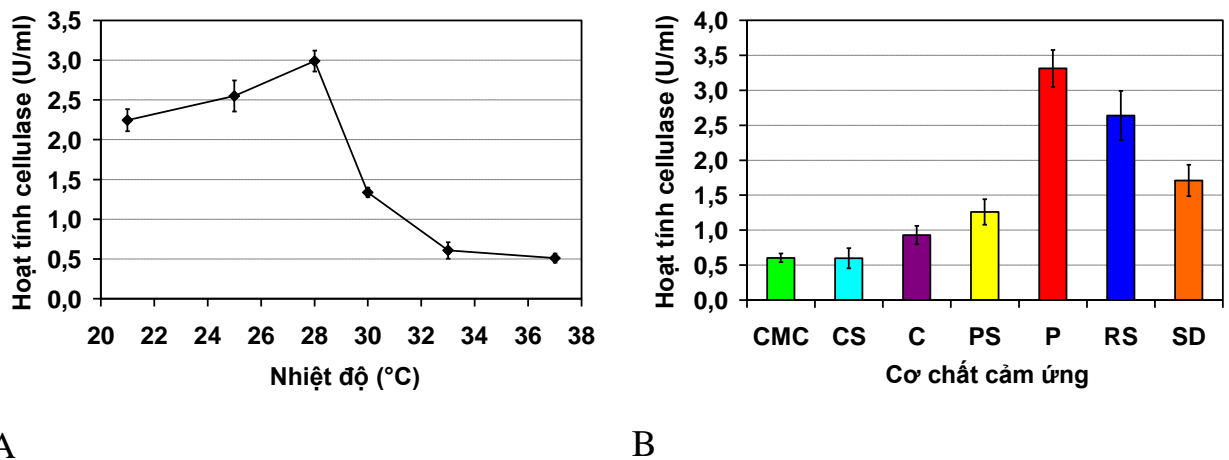
**Hình 3.4. Đồ thị ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy (A) và pH ban đầu của môi trường (B) đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01**

Những nghiên cứu trước đây trên một số chủng nấm sợi thuộc ngành phụ Nấm đảm cho thấy chủng nấm rom *Volvariella volvacea* sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất sau 5 ngày nuôi cấy [41], nhưng chủng *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 sinh tổng hợp mạnh nhất sau 6 ngày và chủng *Pycnoporus sanguineus* CEIBMD01 sau 8 ngày nuôi cấy [145]. Trong điều kiện lên men rắn, chủng nấm hương *L. edodes* sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất sau 30 ngày [97]; chủng *Fomitopsis* sp. RCK2010 sau 11 ngày [54]. Như vậy, chủng nấm *Peniophora* sp. NDVN01 có thời gian sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất tương đương hoặc ngắn hơn so với một số chủng sợi thuộc ngành phụ Nấm đảm đã công bố.

### 3.1.2.2. Ảnh hưởng của pH ban đầu của môi trường và nhiệt độ nuôi cấy

pH ban đầu của môi trường là một trong những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của vi sinh vật. Chủng *Peniophora* sp. NDVN01 sinh tổng hợp cellulase tăng dần từ 1,17 U/ml (pH 4,0) lên 2,62 U/ml (đạt 100%) ở pH ban đầu của môi trường bằng 7,0, sau đó khả năng sinh tổng hợp cellulase giảm nhanh chóng chỉ đạt 0,39 U/ml (bằng 15% so với cực đại) ở pH 10,0 (hình 3.4B). So sánh với những nghiên cứu đã công bố cho thấy, chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có pH ban đầu thích hợp tương đương với chủng nấm đảm phân lập từ gỗ [161]. Tuy nhiên, những chủng nấm đảm khác lại sinh tổng hợp cellulase tối ưu trong điều kiện pH môi trường

ban đầu thấp hơn như: chủng *B. adusta* và *P. sanguineus* thích hợp ở pH 5,0 [146]; chủng *V. volvacea* thích hợp ở pH 6,0 [41]; chủng *Fomitopsis* sp. RCK2010 sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất trong môi trường có pH ban đầu bằng 5,5 [54]. Như vậy, chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất trong điều kiện pH trung tính, khác biệt so với các chủng nấm sợi khác thường sinh tổng hợp cellulase trong điều kiện pH ban đầu của môi trường thường nghiêng về phía acid.



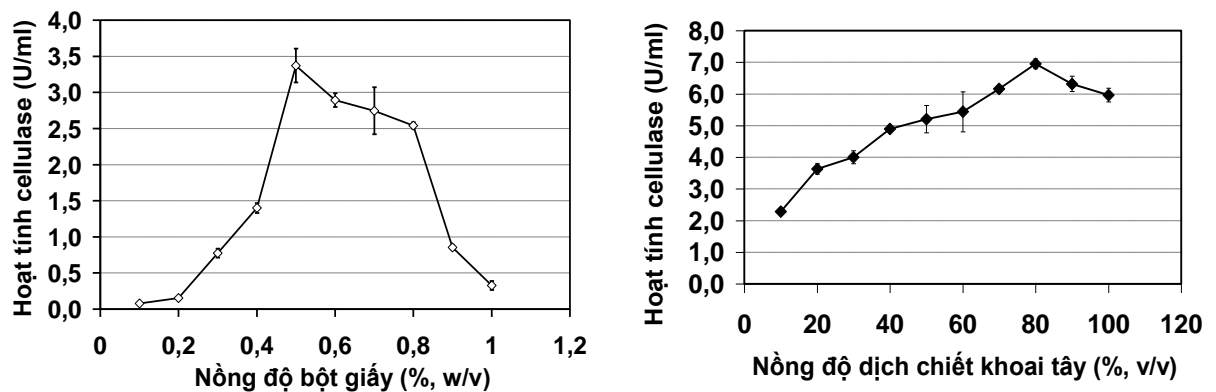
**Hình 3.5. Đồ thị ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy (A); Biểu đồ so sánh ảnh hưởng nguồn cơ chất cảm ứng (B) đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01**

*CMC*: carboxymethyl cellulose; *DTG*: vỏ cà phê; *C*: xơ dừa; *PS*: vỏ lạc; *P*: bột giấy; *RS*: rơm lúa; *SD*: mùn cưa

Chủng *Peniophora* sp. NDVN01 sinh tổng hợp cellulase tăng dần từ 2,25 U/ml (75%) ở nhiệt độ 22°C lên 2,99 U/ml (100%) ở 28°C và sau đó giảm mạnh khi tăng nhiệt độ chỉ đạt 20% so với cực đại (0,61 U/ml) ở 33°C (hình 3.5A). Như vậy, chủng *Peniophora* sp. NDVN01 thuộc chủng ưa ấm. Kết quả này trùng với nhiệt độ tối ưu cho sinh tổng hợp cellulase của chủng *B. adusta* và *P. sanguineus* [146] nhưng thấp hơn so với chủng *Fomitopsis* sp. RCK2010 (thích hợp ở 30°C) và chủng *V. volvacea* (thích hợp ở 37°C) [41], [54].

### 3.1.2.3. Ảnh hưởng của chất cảm ứng

Cơ chất cảm ứng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của các chủng nấm. Chủng *Peniophora* sp. NDVN01 được lên men trong môi trường chứa các nguồn cơ chất lignocellulose khác nhau ở nồng độ 0,6% (w/v). Kết quả cho thấy cơ chất bột giấy có khả năng cảm ứng sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất đạt 3,31 U/ml, cao hơn 5 lần so với cơ chất CMC (chỉ đạt 0,6 U/ml) (hình 3.5B). Chủng *Peniophora* sp. NDVN01 sinh tổng hợp cellulase tăng dần khi tăng nồng độ bột giấy cảm ứng và đạt cực đại ở nồng độ 0,5% (w/v) với hoạt tính cellulase ngoại bào đạt 3,37 U/ml. Khi nồng độ bột giấy tiếp tục tăng thì khả năng sinh tổng hợp cellulase lại giảm dần chỉ còn 0,33 U/ml (10% so với cực đại) ở nồng độ 1% bột giấy (hình 3.6A).



A

B

**Hình 3.6. Đồ thị ảnh hưởng của nồng độ bột giấy (A) và nồng độ dịch chiết khoai tây đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01**

Những nghiên cứu trước đây cho thấy, cơ chất cảm ứng thích hợp đối với chủng *A. niger* VTCC-F021 và *A. awamori* VTCC-F099 là CMC với nồng độ tương ứng là 1 và 2% [126], [139]. Chủng nấm rơm *V. volvacea* có cơ chất cảm ứng thích hợp là cellulose kết tinh (Avicel) ở nồng độ 1% [41], chủng nấm sò *Pleurotus sajior-caju* có cơ chất cảm ứng thích hợp là lõi ngô [11], nhưng bột giấy lại không có tác dụng cảm ứng sinh tổng hợp cellulase của chủng nấm đảm phân lập từ vùng sa mạc Sonoran - Mỹ [161]. Như vậy, các loài khác nhau có nguồn cơ chất và nồng độ cảm ứng sinh tổng hợp cellulase khác nhau phụ thuộc vào đặc điểm di truyền của loài.

#### 3.1.2.4. Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết khoai tây bổ sung

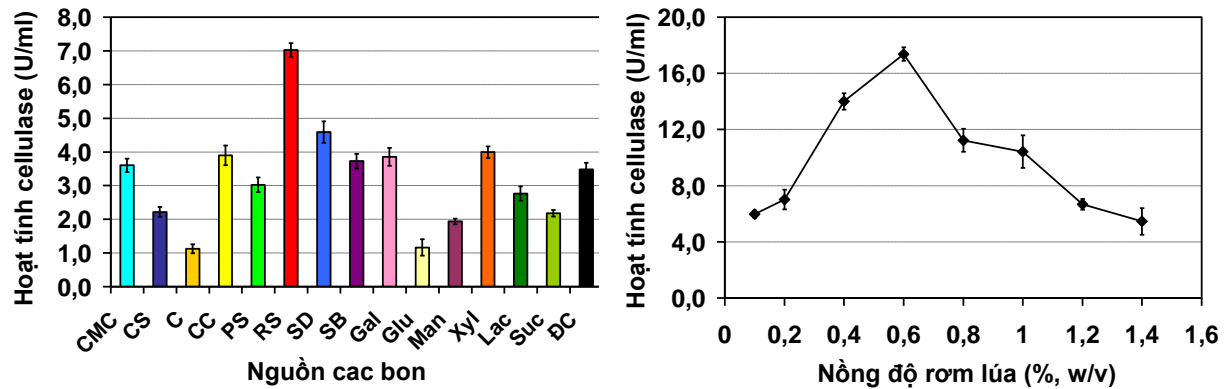
Đối với nấm sợi, dịch chiết khoai tây có ảnh hưởng lớn tới khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme. Để tìm môi trường thích hợp sản xuất cellulase trong điều kiện Việt Nam, chủng *Peniophora* sp. NDVN01 được lên men trong môi trường có bổ sung nồng độ dịch chiết khoai tây khác nhau. Kết quả cho thấy khả năng sinh tổng hợp cellulase tăng dần khi tăng nồng độ dịch chiết khoai tây và đạt cực đại ở nồng độ 80% (v/v) với hoạt tính cellulase ngoại bào đạt 6,95 U/ml. Khi nồng độ dịch chiết khoai tây tiếp tục tăng thì khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 lại giảm dần chỉ còn 83% (5,97 U/ml) so với cực đại ở nồng độ 100% dịch chiết khoai tây.

#### 3.1.2.5. Ảnh hưởng của nguồn cacbon

Để khảo sát ảnh hưởng của nguồn cacbon đến khả năng sinh tổng hợp cellulase, chủng *Peniophora* sp. NDVN01 đã được lên men trong môi trường chứa 80% (v/v) dịch chiết khoai tây, 0,5% (w/v) bột giấy làm cơ chất cảm ứng và 0,2% (w/v) của một nguồn bổ sung cacbon (CMC, vỏ cà phê, xơ dừa, lõi ngô, vỏ lạc, rom rạ, mùn cưa, bã mía, galactose, glucose, mannose, xylose, lactose, và sucrose). Kết quả được thể hiện ở hình 3.7.

Qua hình 3.7 cho thấy, nguồn cacbon rom lúa có khả năng làm tăng năng suất sinh tổng hợp cellulase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 mạnh nhất lên hơn hai lần (7,02 U/ml) so với đối chứng không bổ sung thêm nguồn cacbon (3,48 U/ml). Các nguồn cacbon phức tạp khác (CMC, mùn cưa, lõi ngô, bã mía) có vai trò làm tăng nhẹ năng suất sinh tổng hợp cellulase từ 3-4%. Đa số các nguồn cacbon vô cơ khảo sát đều làm giảm năng suất sinh tổng hợp cellulase của chủng nấm, trong đó glucose làm giảm mạnh nhất chỉ còn 33% so với đối chứng không bổ sung thêm nguồn cacbon (hình 3.7A). Điều này được giải thích là do trong các nguồn cacbon phức tạp cellulose được tổng hợp bởi các đường đơn liên kết với nhau bằng các glycoside, để có nguồn đường sử dụng cung cấp cho quá trình trao đổi năng lượng chủng nấm đã phải sinh tổng hợp hàm lượng

cellulase cao để thủy phân. Do đó, đa số các nguồn cacbon phức tạp có vai trò làm tăng năng suất sinh tổng hợp cellulase và rơm lúa được chọn để tối ưu nồng độ bổ sung thích hợp.



A

B

**Hình 3.7. Biểu đồ ảnh hưởng của một số nguồn cacbon (A) và đồ thị ảnh hưởng của nồng độ rơm lúa (B) đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng nấm *Peniophora* sp. NDVN01**

CMC: carboxymethyl cellulose; CS: vỏ cà phê; C: xơ dừa; CC: lõi ngô; PS: vỏ lạc; RS: rơm lúa; SD: mùn cưa; SB: bã mía; Gal: galactose; Glu: glucose; Man: mannose; Xyl: xylose; Lac: lactose; Suc: sucrose; ĐC: đối chứng

Kết quả phân tích cho thấy việc bổ sung rơm lúa làm tăng năng suất cellulase bởi *Peniophora* sp. NDVN01 lên đáng kể từ 5,97 U/ml (34%) trong môi trường có chứa 0,1% (w/v) rơm lúa đến tối đa 17,37 U/ml (100%) trong môi trường có chứa 0,6% (w/v) rơm lúa, sau đó giảm dần còn 5,46 U/ml (31%) trong môi trường có chứa 1,4% (w/v) của rơm lúa (hình 3.7B).

Trong số các nguồn cacbon khác nhau được thử nghiệm (lõi ngô, thân cây ngô, rơm lúa mạch, cám lúa mạch) cám lúa mạch cho sản xuất tối đa cellulase bởi *Fomitopsis* sp. RCK2010 [54]. Cám lúa mạch cũng là nguồn cacbon thích hợp cho sản xuất cellulase cao bởi hai chủng nấm đảm phân lập từ sa mạc Sonoran [161]. CMC cho năng suất sinh tổng hợp cellulase cao nhất, tiếp theo là cellobiose và avicel trong số các nguồn khác nhau: glucose, xylose, CMC, cellulose kết tinh (avicel) và cellobiose được khảo sát để đánh giá là nguồn

cacbon thích hợp cho sản xuất cellulase của chủng nấm hoại sinh *Phlebia gigantea* [128]. Các chất thải của quá trình sản xuất ethanol từ lúa mạch, vỏ quýt là nguồn cacbon thích hợp nhất cho quá trình sản xuất cellulase của các chủng nấm đảm *Fomes fomentarius* IBB, *Pseudotremella gibbosa* IBB 22 [59].

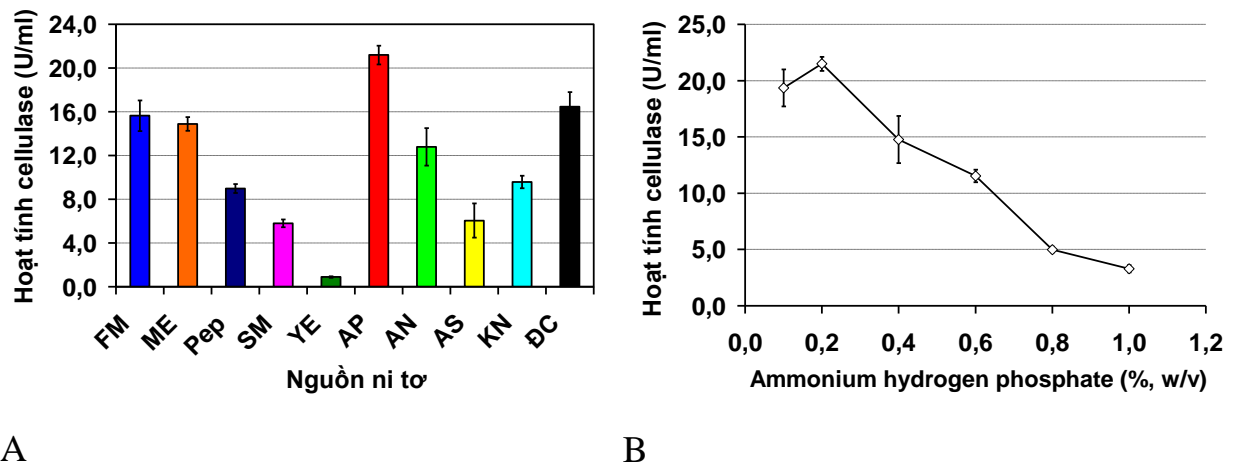
### 3.1.2.6. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Cùng với nguồn cacbon, nitơ là một trong những yếu tố dinh dưỡng ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp cellulase của chủng nấm trong điều kiện lên men. Chủng *Peniophora* sp. NDVN01 được lên men trong môi trường có bổ sung các nguồn nitơ vô cơ và hữu cơ khác nhau. Kết quả cho thấy, ammonium hydrogen phosphate làm tăng năng suất sinh tổng hợp cellulase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 tới 21,19 U/ml, tăng 29% so với đối chứng không bổ sung nguồn nitơ. Nguồn nitơ hữu cơ (bột cá và cao thịt) làm giảm nhẹ từ 5-10% năng suất sinh tổng hợp cellulase, những nguồn nitơ khác làm giảm mạnh năng suất sinh tổng hợp enzyme, đặc biệt là cao nấm men làm giảm chỉ còn 5% (0,89 U/ml) so với đối chứng (hình 3.8A).

Để xác định nồng độ thích hợp, chủng *Peniophora* sp. NDVN01 được lên men trong môi trường có bổ sung ammonium hydrogen phosphate với nồng độ từ 0,1-1,0% (w/v). Kết quả cho thấy, việc bổ sung 0,2% (w/v) của ammonium hydrogen phosphate là tối ưu cho việc sản xuất cellulase bởi *Peniophora* sp. NDVN01 đạt 21,5 U/ml và sự gia tăng hơn nữa ammonium hydrogen phosphate trong môi trường lên men làm giảm năng suất sinh tổng hợp cellulase chỉ còn 3,29 U/ml (15% so với cực đại) ở nồng độ 1% (hình 3.8B).

Những nghiên cứu trước đây cho thấy, khả năng sinh tổng hợp cellulase của nấm phụ thuộc khác nhau vào nguồn nitơ tùy thuộc vào đặc điểm di truyền và loại nitơ. Chủng nấm đảm *Fomitopsis* sp. RCK2010 sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất với nguồn nitơ ure [54]. Chủng *Aspergillus ornatus* sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất với 0,2% ammonium hydrogen phosphate [182], peptone là nguồn nitơ thích hợp đối với chủng *Sporotrichum thermophile* LAR5 [32] và

chủng *Pleurotus dryinus* IBB 903, còn đối với chủng *Funalia trogii* IBB 146 nguồn  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  thích hợp nhất trong khoảng nồng độ 10-20 mM [95]. Như vậy, nguồn nitơ thích hợp đối với chủng *Peniophora* sp. NDVN01 tương đồng với chủng *Aspergillus ornatus* nhưng có sự khác biệt so với các loài nấm khác đã công bố.



A

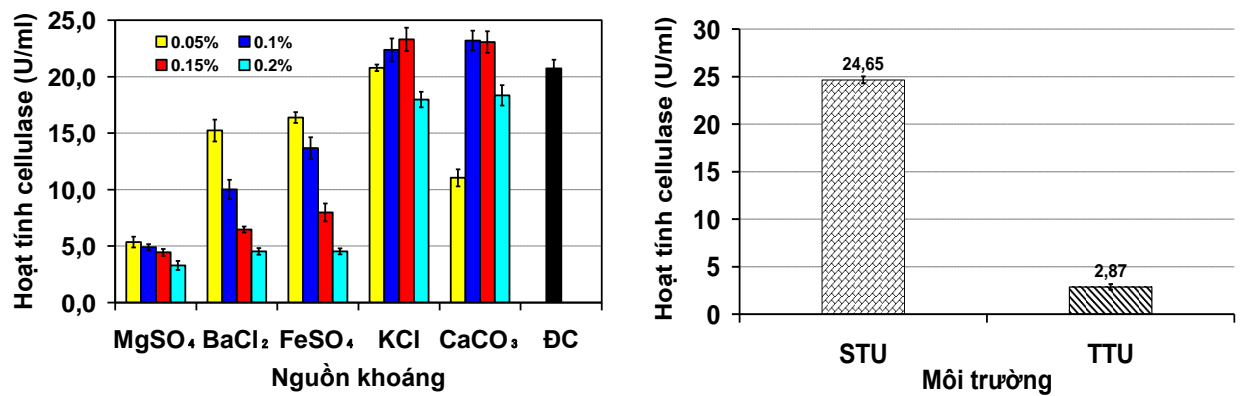
B

**Hình 3.8. Biểu đồ ảnh hưởng của nguồn nitơ (A) và độ thị ảnh hưởng của nồng độ ammonium hydrogen phosphate (B) đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01**

FM: bột cá; ME: cao thịt; Pep: peptone A; SM: Bột đậu tương; YE: cao nấm men;  
AP:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; AN:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; AS:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; KN:  $\text{KNO}_3$ ; ĐC: đối chứng

### 3.1.2.7. Ảnh hưởng của một số nguồn khoáng

Để khảo sát ảnh hưởng của một số nguồn khoáng, chủng *Peniophora* sp. NDVN01 được lên men trong môi trường với các thành phần và điều kiện đã tối ưu được có bổ sung một số nguồn khoáng với nồng độ từ 0,05-0,2% (w/v). Kết quả cho thấy, việc bổ sung KCl và  $\text{CaCO}_3$  với nồng độ 0,1-0,15% làm tăng năng suất sinh tổng hợp cellulase của chủng nấm lên 12%, nhưng ở nồng độ 0,2% thì hoạt tính cellulase ngoại bào lại giảm. Các nguồn khoáng khác như  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$  đều làm giảm khả năng sinh tổng hợp cellulase, nồng độ khoáng càng tăng thì năng suất sinh tổng hợp cellulase càng giảm (hình 3.9A).



**A** **B**  
**Hình 3.9. Biểu đồ ảnh hưởng của một số nguồn khoáng (A) và năng suất sinh tổng hợp cellulase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 trong môi trường tối ưu và chưa tối ưu (B)**

*STU: sau tối ưu; TTU: trước tối ưu*

Nguồn khoáng là một trong những yếu tố vừa có vai trò kích thích và ức chế khả năng sinh tổng hợp enzyme. Các ion kim loại có thể tham gia vào trung tâm hoạt động của enzyme trong các chu trình sinh hóa trong tế bào nấm nhưng cũng có thể ức chế hoạt tính của các enzyme dẫn đến làm giảm khả năng sinh tổng hợp enzyme. Nghiên cứu trước đã chỉ ra rằng, tất cả các nguồn khoáng khảo sát (FeSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOCu, PbCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl) làm giảm năng suất sinh tổng hợp cellulase của *Rhizopus oryzae* [99].

### 3.1.2.8. So sánh khả năng sinh tổng hợp enzyme trong môi trường tối ưu và chưa tối ưu

Để đánh giá ảnh hưởng tổng hợp của các yếu tố đã tối ưu đến khả năng sinh tổng hợp cellulase, chủng *Peniophora* sp. NDVN01 đã được lên men trong môi trường có thành phần và điều kiện lên men tối ưu. Kết quả cho thấy, năng suất sinh tổng hợp cellulase đạt 24,65 U/ml, cao hơn 8,6 lần so với môi trường cơ bản ban đầu chưa tối ưu (hình 3.9B). Như vậy, thành phần môi trường tối ưu có chứa 80% (v/v) dịch chiết khoai tây, 0,6% rom lúa; 0,2% (w/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5% (w/v) bột giấy làm cơ chất cảm ứng, 0,15% KCl và 0,1% CaCO<sub>3</sub>. Điều



kiện lên men thích hợp ở 28°C, pH ban đầu của môi trường bằng 7,0, thời gian lên men 120 giờ.

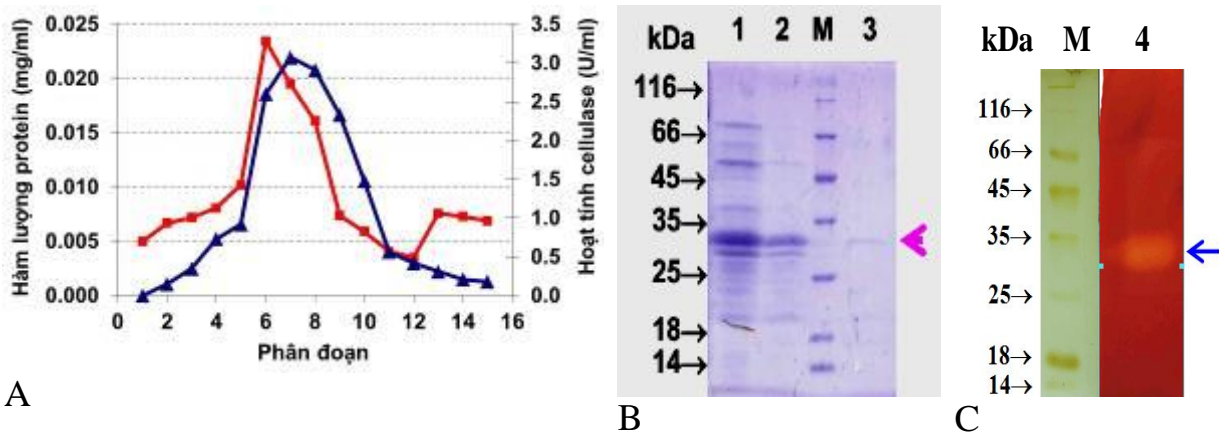
Năng suất sinh tổng hợp cellulase trong điều kiện tối ưu của chủng nấm rơm *V. volucae* đạt 18,7 U/ml [41], chủng *A. niger* đạt 3,9 U/ml [55], chủng nấm sò trắng *P. ostreatus* đạt 7,08 U/ml, chủng nấm sò tím *P. sajor-caju* là 2,2 U/ml [103]. Như vậy, chủng *Peniophora* sp. NDVN01 sinh tổng hợp cellulase mạnh hơn so với một số chủng nấm khác đã công bố.

### **3.1.3. Tinh sạch và đánh giá tính chất cellulase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01**

#### **3.1.3.1. Tinh sạch cellulase**

Chủng *Peniophora* sp. NDVN01 được lên men trong môi trường tối ưu. Sau thời gian lên men canh trường được ly tâm 10000 vòng/phút thu dịch enzyme thô và được rửa bằng 90% (w/v) ammonium sulphate bão hòa. Dịch sau thẩm tích loại muối được tinh sạch qua cột lọc gel Sephadex-G75 thu 15 phân đoạn. Các phân đoạn 5-11 có hoạt tính mạnh được thu hồi tiến hành qua cột lọc gel Biogel-P100 thu 15 phân đoạn.

Kết quả cho thấy, ở các phân đoạn 6, 7, 8, 9, 10 có hoạt tính cellulase mạnh (hình 3.10A). Mức độ tinh sạch và khối lượng phân tử tương đối của cellulase được xác định trên gel polyacrylamide sử dụng marker protein chuẩn. Điện di đồ (hình 3.10B, giếng 3) cho một băng protein duy nhất có khối lượng phân tử khoảng 32 kDa. Kết quả điện di hoạt tính khẳng định băng tinh sạch thu được là cellulase (hình 3.10C). Sau khi rửa bằng ammonium sulfate, qua cột sắc ký lọc gel Sephadex G75 và cột Biogel-P100, cellulase có độ sạch 2,34 lần so với dịch enzyme thô ban đầu, hoạt tính riêng đạt 146,42 U/mg nhưng hiệu suất thu hồi thấp chỉ đạt 4,33% (bảng 3.1). Như vậy, *Peniophora* sp. NDVN01 sinh tổng hợp cellulase có khối lượng phân tử 32 kDa.



**Hình 3.10. Sắc ký đồ tinh sạch cellulase trên cột Biogel-P100 (A) và hình ảnh điện di protein sản phẩm tinh sạch (B), điện di hoạt tính (C)**

*M*: marker protein (Fermentas); 1: phổ điện di dịch enzyme thô; 2: phổ điện di dịch enzyme qua cột Sephadex-G75; 3: phổ điện di dịch enzyme qua cột Biogel-P100 (dịch tinh sạch); 4: Phổ điện di nhuộm hoạt tính đặc hiệu; (■): Hàm lượng protein; (▲): Hoạt tính cellulase của các phân đoạn

**Bảng 3.1. Thông số kỹ thuật các bước tinh sạch cellulase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01**

Bước tinh sạch	Protein (mg/ml)	Tổng protein (mg)	Tổng hoạt tính (U)	Hoạt tính riêng (U/mg)	Hiệu suất thu hồi (%)	Độ sạch (lần)
Enzyme thô	0,1964	19,64	1424	72,48	100	1,0
Tủa muối (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,172	7,396	722	97,62	50,69	1,35
Lọc gel Sephadex G-75	0,048	2,474	369	149,15	25,93	2,06
Lọc gel Biogel P-100	0,014	0,364	61,67	169,42	4,33	2,34

### 3.1.3.2. Động học cơ chất của cellulase

Các hằng số động học  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_{cat}$  và  $K_{cat}/K_m$  là những đại lượng đặc trưng cho phương trình động học cơ chất của một enzyme. Cellulase tinh sạch

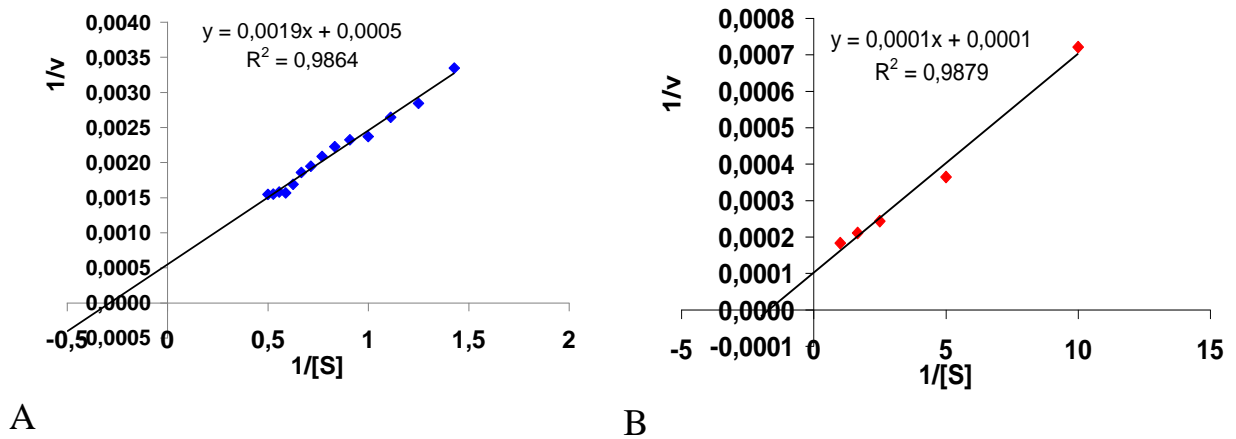
của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 đã được xác định các hằng số động học đối với cơ chất CMC và  $\beta$ -glucan lúa mạch (barley  $\beta$ -glucan) thông qua phương trình Lineweaver-Burk (hình 3.11). Kết quả được thể hiện ở bảng 3.2.

Bảng 3.2 cho thấy động học đối với cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch của cellulase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có  $K_m$  thấp hơn,  $K_{cat}$  và  $K_{cat}/K_m$  cao hơn so với cơ chất CMC. Điều này chứng tỏ ái lực của cellulase đối với cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch cao hơn so với cơ chất CMC, hay cellulase dễ dàng thủy phân cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch hơn. Vận tốc cực đại của phản ứng do cellulase xúc tác đối với cơ chất CMC đạt 1825 U/mg, còn đối với cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch đạt 9804 U/mg.

**Bảng 3.2. Hằng số động học cơ chất của cellulase tinh sạch từ *Peniophora* sp. NDVN01**

Cơ chất	$K_m$ (mg/ml)	$V_{max}$ (U/mg protein)	$K_{cat}$ ( $min^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m$
$\beta$ -glucan lúa mạch	5,9	9804	$6,14 \times 10^5$	$1,04 \times 10^5$
CMC	34,8	1825	$1,14 \times 10^5$	$0,33 \times 10^4$

Những nghiên cứu trước đã chỉ ra: hằng số động học  $K_m$ ,  $K_{cat}$  và  $K_{cat}/K_m$  của cellulase từ chủng nấm đảm *L. sulphureus* var. *miniatus* đối với cơ chất  $\beta$ -glucan và CMC lần lượt là 0,67-3,7 mg/ml, 13,5-5,3  $s^{-1}$ , và 20,1-1,45 mg/ml/s [77]. Năm 2009, Nazir và đtg đã xác định giá trị  $K_m$ ,  $K_{cat}$  và  $K_{cat}/K_m$  của cellulase từ chủng *A. terreus* đối với cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch và CMC lần lượt là 0,654-14,2 mg/ml,  $19,1 \times 10^5$ - $2,1 \times 10^5$   $min^{-1}$  và  $29,7 \times 10^5$ - $0,15 \times 10^5$ . Vận tốc cực đại của phản ứng do enzyme xúc tác đối với cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch, xyloglucan và CMC được xác định là  $1,9 \times 10^4$ ,  $0,79 \times 10^4$ , and  $0,2 \times 10^4$   $\mu mol/mg$  protein [123]. Như vậy, cellulase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có giá trị  $K_m$  cao hơn và các giá trị  $K_{cat}$  và  $K_{cat}/K_m$  thấp hơn so với một số cellulase tinh sạch từ một số chủng nấm đã công bố.



**Hình 3.11. Phương trình động học Lineweaver-Burk đối với cơ chất CMC (A) và cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch (B)**

### 3.1.3.3. Đặc hiệu cơ chất của cellulase

Mức độ đặc hiệu cơ chất của cellulase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 đã được xác định bằng cách cho enzyme thủy phân một số cơ chất có cùng kiểu liên kết O-glycoside trong phân tử. Kết quả cho thấy, cellulase có tính đặc hiệu cao đối với cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch và CMC, trong đó mạnh nhất đối với  $\beta$ -glucan lúa mạch. Đối với cơ chất xylan, LBG và avicel, cellulase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 không có tác dụng thủy phân (bảng 3.3).

**Bảng 3.3. Đặc hiệu cơ chất của cellulase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01**

Cơ chất (1% w/v)	Đơn vị cấu tạo	Liên kết	Hoạt tính tương đối (%)
$\beta$ -glucan lúa mạch	$\beta$ -glucose	$\beta$ -1,4-O-glycoside	456
CMC	$\beta$ -glucose	$\beta$ -1,4-O-glycoside	100
Xylan	$\beta$ -xylose	$\beta$ -1,4-O-glycoside	0
	$\beta$ -mannose	$\beta$ -1,4-O-glycoside	
LBG		1,6-O-glycoside	0
Avicel	$\beta$ -glucose	$\beta$ -1,4-O-glycoside	0

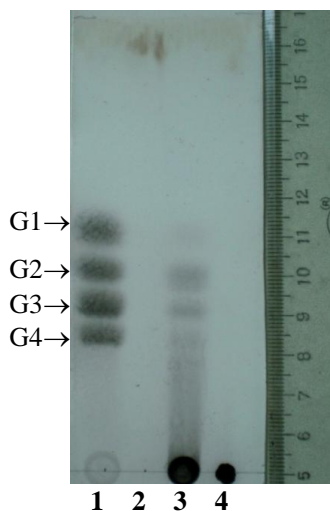
Năm 2009, Nazir và đtg đã xác định endoglucanase của chủng *A. terreus* có hoạt tính xúc tác mạnh theo thứ tự giảm dần đối với các cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch, xyloglucan, lichenin và CMC [123]. Endoglucanase của chủng *Neisseria sicca* SB có hoạt tính thủy phân mạnh đối với cơ chất CMC và xylan, hoạt tính thủy phân yếu đối với cơ chất cellulose đã tiền xử lý acid nhưng không có hoạt

tính đối với cơ chất avicel [108]. Năm 2009, Hong và đtg nghiên cứu đã chỉ ra rằng endoglucanase của chủng nấm đảm *L. sulphureus* var. *miniatus* có hoạt động thủy phân mạnh đối với cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch, lichenan và CMC, nhưng hoạt động thấp đối với  $\beta$ -glucan tinh thể như cellulose, rơm rạ, và avicel [82]. Như vậy tính đặc hiệu cơ chất của cellulase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 tương đồng với tính đặc hiệu của một số endoglucanase từ một số chủng nấm đảm và vi nấm đã công bố.

#### 3.1.3.4. Sản phẩm thủy phân cơ chất của cellulase

Carboxymethyl cellulose đã được thủy phân bởi cellulase tinh sạch từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01, các sản phẩm thủy phân được phân tách và phát hiện bằng phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC). Kết quả cho thấy, sản phẩm thủy phân chủ yếu của CMC là cellobiose (G2) và cellotriose (G3), tiếp theo là cellotetrose (G4) và các oligomer lớn hơn G4. Glucose (G1) là sản phẩm thu được ít nhất (hình 3.12).

Những nghiên cứu trước đã chỉ ra endoglucanase từ *A. terreus* thủy phân cơ chất CMC và  $\beta$ -glucan thu được các sản phẩm chính là cellobiose và cellotriose [123]. Sản phẩm thủy phân của endo-1,4-glucanase từ chủng *Neisseria sicca* SB đối với cơ chất cellulose acetate chủ yếu là G2, G3, G4 và các oligomer lớn hơn G4, không thu được G1 [108].

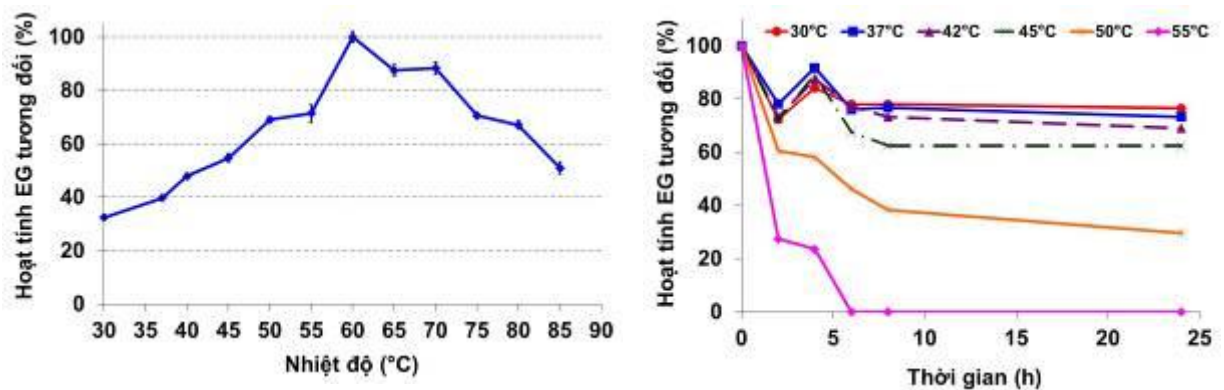


**Hình 3.12. Hình ảnh phổ chạy sắc ký TLC sản phẩm thủy phân cơ chất CMC của cellulase tinh sạch từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01**

1: Phổ chạy chất chuẩn; 2: phổ chạy dịch cellulase tinh sạch; 3: phổ chạy dịch thủy phân; 4: phổ chạy cơ chất CMC; G1: glucose; G2: cellobiose; G3: cellotriose, G4: cellotetrose

### 3.1.3.5. Nhiệt độ phản ứng tối ưu và độ bền nhiệt độ của endoglucanase

Để xác định nhiệt độ phản ứng tối ưu, phản ứng giữa enzyme tinh sạch và cơ chất CMC được tiến hành trong khoảng nhiệt độ từ 30-85°C. Kết quả cho thấy hoạt tính cellulase tăng dần từ 32% ở nhiệt độ 30°C lên cực đại ở 60°C (100%). Sau đó khi tăng nhiệt độ thì hoạt tính của enzyme giảm dần chỉ còn 51% ở 85°C (hình 3.13A).



A

B

**Hình 3.13. Đồ thị ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng (A) và độ bền nhiệt độ (B) của endoglucanase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01**

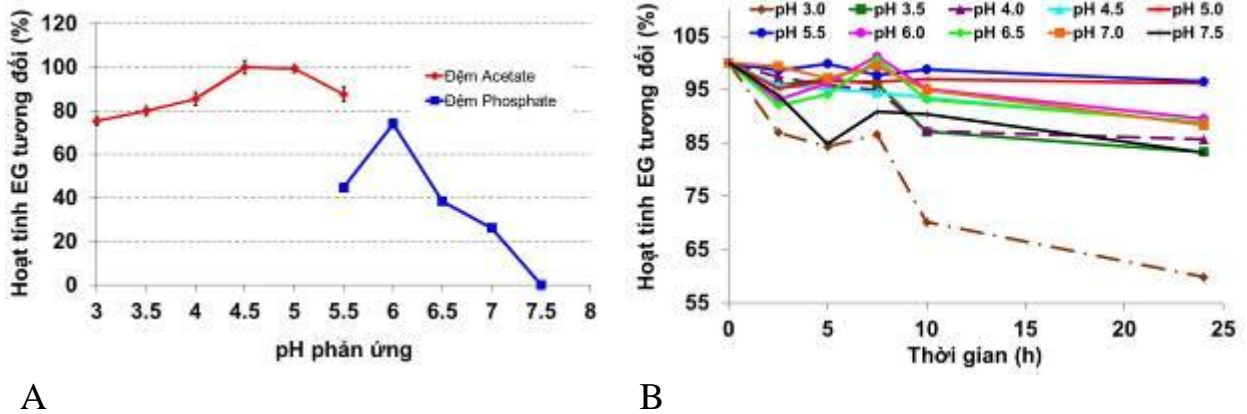
Endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 vẫn giữ được hoạt tính ở nhiệt độ 45°C, hoạt tính tương đối còn lại trong khoảng 62-76% sau 24 giờ xử lý tại 30-45°C. Tuy nhiên, khi xử lý ở nhiệt độ cao 50-55°C thì hoạt tính của enzyme giảm mạnh (hình 3.13B). Năm 2009, Hong và đtg đã xác định được endoglucanase tinh sạch từ chủng nấm đảm *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* giữ được 50% hoạt tính tại 70°C và 75°C sau 15 giờ và 22 giờ xử lý [82]. Hai endoglucanase từ *Trichoderma* sp. (*shmosaTri*) có thể chịu được 60 phút ở 50°C mà không mất hoạt động enzyme. CMCCase I và II giữ lại 14,0 và 26,5% hoạt tính tại 70°C sau 90 phút [58]. Endoglucanase tinh sạch từ *Aspergillus terreus* ổn định ở nhiệt độ 40 và 50°C ở pH 3-5, nhưng mất 14, 39, và 31% hoạt tính khi

xử lý 1h ở 60°C trong đệm có pH 3, 4 và 5 [123]. Như vậy, endoglucanase tinh sạch từ *Peniophora* sp. NDVN01 tương đối bền trong khoảng nhiệt độ 30-45°C.

### 3.1.3.6. pH phản ứng tối ưu và độ bền pH của endoglucanase

Hoạt tính endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 tăng dần từ 75% ở pH 3,0 đến tối đa 100% ở pH 4,5 và sau đó giảm dần chỉ còn 26% ở pH 7,0 và mất hoạt tính ở pH 7,5 (Hình 3.14A). pH phản ứng tối ưu của endoglucanase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 trong khoảng 4,5-5,0. Nghiên cứu tính chất của một số endoglucanase từ chủng nấm đảm cho thấy pH tối ưu trong khoảng 4,0-7,5. Endoglucanase từ *Laetiporus sulphureus* var. *Miniatus* hoạt động tối ưu ở pH 4,0 [82]. Endoglucanase từ *Fomitopsis pinicola* KMJ812 có pH tối ưu là 4,5 [92]. pH tối ưu cho endoglucanase từ *P. byssoides* và *Volvariella volvacea* được xác định là 6,0 và 7,5 [42], [56]. Như vậy, pH thích hợp của endoglucanase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 và một số chủng nấm khác thường nghiên về phía acid.

Endoglucanase từ *Peniophora* sp. NDVN01 có độ bền cao trong khoảng pH từ 4,0-7,0 với hoạt tính tương đối còn lại trên 90% sau 24h ủ trong đệm ở nhiệt độ 37°C. Trong khoảng pH từ 6,0-7,5 hoạt tính tương đối của enzyme vẫn còn từ 83-89% sau 24h xử lý (Hình 3.14B). Hai endoglucanase từ *Trichoderma* sp. (shmosaTri) bền trong khoảng pH dao động từ 3,0-9,0. CMCCase I vẫn hoạt động ở nhiệt độ phòng sau 24 giờ trên một phạm vi pH rộng (3,0-9,0), trong khi CMCCase II tương đối ổn định trong phạm vi pH từ 4,0-6,0 [58]. Endoglucanase từ *Aspergillus terreus* hoạt động ổn định ở pH (3,0-5,0) và ở nhiệt độ 40-60°C sau 4 h [123]. Như vậy, endoglucanase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có độ bền pH cao trong dải pH rộng từ 4,0-7,0. Đây là một đặc tính ưu việt để có thể ứng dụng chế phẩm enzyme trong những điều kiện pH khác nhau và thuận lợi trong quá trình tinh sạch, bảo quản enzyme.



A

B

**Hình 3.14. Đồ thị ảnh hưởng của pH phản ứng (A) và độ bền pH của endoglucanase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01**

### 3.1.3.7. Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính endoglucanase

Ion kim loại là một trong những yếu tố có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính enzyme. Tác động của ion kim loại có thể làm tăng cường hoặc kìm hãm hoạt tính enzyme [4]. Do đó, xác định ảnh hưởng của ion kim loại là một trong những cơ sở định hướng ứng dụng và bảo quản enzyme. Ảnh hưởng của các ion kim loại và một số thuốc thử đến hoạt tính của endoglucanase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 đã được phân tích (Bảng 3.4).

Kết quả cho thấy rằng hoạt tính của enzyme đã được tăng cường với sự hiện diện của  $\text{Ni}^{2+}$  trong khoảng 2-10 mM,  $\text{Ca}^{2+}$  ở nồng độ 2 mM,  $\text{Zn}^{2+}$  ở nồng độ 2 mM,  $\text{Ba}^{2+}$  ở nồng độ 4 mM và mercaptoethanol trong khoảng nồng độ 2-6 mM. Trong đó, ion  $\text{Ni}^{2+}$  tăng cường mạnh mẽ hoạt động của enzyme, làm tăng hoạt tính tương đối lên 168% ở nồng độ 2 mM. Tuy nhiên, hoạt tính cellulase đã hoàn toàn bị ức chế bởi việc bổ sung các ion  $\text{Ag}^+$  và  $\text{Cu}^{2+}$  ở nồng độ 4-10 mM. Sự hiện diện của  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  và EDTA làm giảm các hoạt tính enzyme từ 3-39% ở nồng độ khác nhau từ 2-10 mM. Sự gia tăng hoạt tính enzyme khi bổ sung mercaptoethanol chứng tỏ không có nhóm thiol trong cấu trúc phân tử và hoạt tính enzyme bị ức chế khi bổ sung EDTA cho thấy hoạt động của enzyme có thể phụ thuộc vào các hoạt động hóa học và trong cấu trúc có thể chứa các nhóm vô cơ, trong đó hình thành phức hợp không hoạt động với EDTA [33].



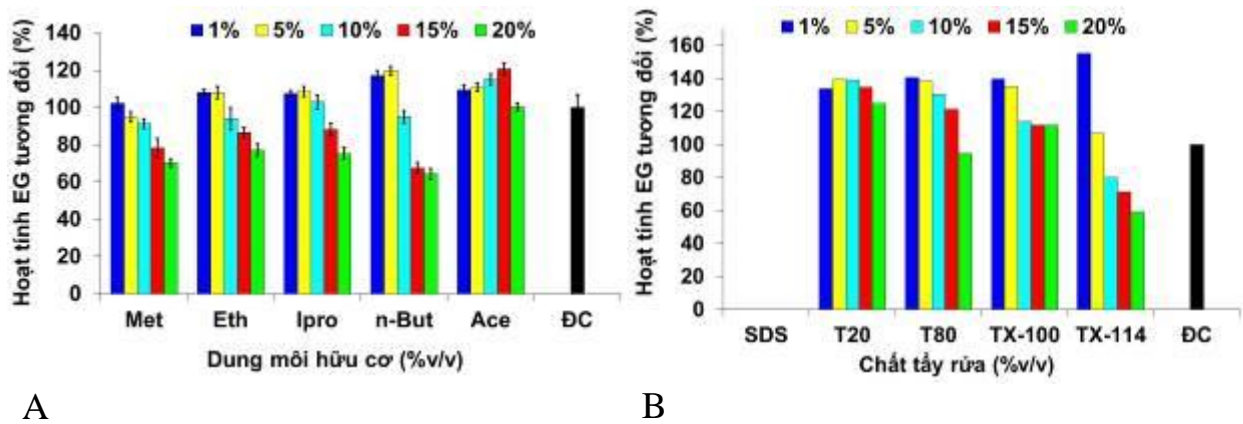
**Bảng 3.4. Ảnh hưởng của ion kim loại và một số thuốc thử đến hoạt tính endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01**

Ion kim loại và một số thuốc thử (mM)	Hoạt tính tương đối (%)				
	2mM	4mM	6mM	8mM	10mM
K <sup>+</sup>	91,5 ± 3,0	93,8 ± 2,6	92,8 ± 3,1	93,7 ± 3,3	91,5 ± 3,0
Na <sup>+</sup>	86,4 ± 5,8	85,5 ± 1,8	80,8 ± 3,5	94,2 ± 2,8	97,4 ± 3,0
Ag <sup>+</sup>	<b>71,8 ± 2,0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>
Fe <sup>2+</sup>	69,9 ± 2,8	76,9 ± 3,2	91,8 ± 2,4	93,3 ± 2,6	101,3 ± 2,5
Ni <sup>2+</sup>	<b>168,5 ± 1,6</b>	<b>147,3 ± 1,4</b>	<b>108,5 ± 3,1</b>	<b>105,3 ± 3,1</b>	<b>104,3 ± 2,6</b>
Mn <sup>2+</sup>	65,1 ± 3,2	84,4 ± 2,4	95,5 ± 2,6	94,8 ± 3,2	97,0 ± 3,2
Ca <sup>2+</sup>	102,3 ± 2,3	100,4 ± 2,9	98,8 ± 2,0	91,7 ± 2,4	86,3 ± 2,8
Zn <sup>2+</sup>	105,9 ± 2,8	97,4 ± 2,5	99,2 ± 2,9	98,8 ± 1,8	98,7 ± 1,2
Ba <sup>2+</sup>	97,6 ± 4,8	115,4 ± 1,4	93,4 ± 3,5	91,9 ± 3,2	90,6 ± 2,1
Cu <sup>2+</sup>	<b>52,8 ± 2,2</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>
Mg <sup>2+</sup>	78,6 ± 2,8	73,9 ± 3,4	78,5 ± 2,3	80,1 ± 2,5	78,7 ± 3,1
EDTA	61,3 ± 1,1	64,6 ± 2,4	65,8 ± 3,0	71,0 ± 2,2	67,1 ± 3,1
2-Mercaptoethanol	114,6 ± 2,6	108,1 ± 3,2	103,1 ± 2,3	100,2 ± 2,5	93,7 ± 1,2
Đối chứng	100 ± 6,9				

### 3.1.3.8. Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ và chất tẩy rửa đến hoạt tính endoglucanase

Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ đến hoạt động của cellulase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 đã được phân tích. Việc bổ sung dung môi methanol (1% v/v), ethanol (1-5%), isopropanol (1-10%), n-butanol (1-5%) và acetone (1-15%) tăng cường hoạt động của enzyme, nhưng khi ở nồng độ cao dung môi methanol (5-20%), ethanol (10-20%), isopropanol (15-20%) và n-butanol (10-20%) ức chế hoạt động của enzyme. Trong đó, dung môi acetone ở nồng độ 15% (v/v) làm tăng hoạt tính cellulase mạnh nhất với hoạt tính tương đối đạt 121% so với đối chứng không bổ sung dung môi. Dung môi n-butanol với nồng

độ từ 10-20% (v/v) ức chế mạnh hoạt tính enzyme, hoạt tính tương đối còn lại 39-41% so với đối chứng (hình 3.15A).



A

B

**Hình 3.15. Biểu đồ so sánh ảnh hưởng của dung môi hữu cơ (A) và chất tẩy rửa (B) đến hoạt tính endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01**

*Met: Methanol; Eth: Ethanol; Ipro: Isopropanol; n-But: n-Butanol; Ace: Acetone; T20: Tween 20; T80: Tween 80; TX-100: Triton X-100; TX-114: Triton X-114; ĐC: Đối chứng*

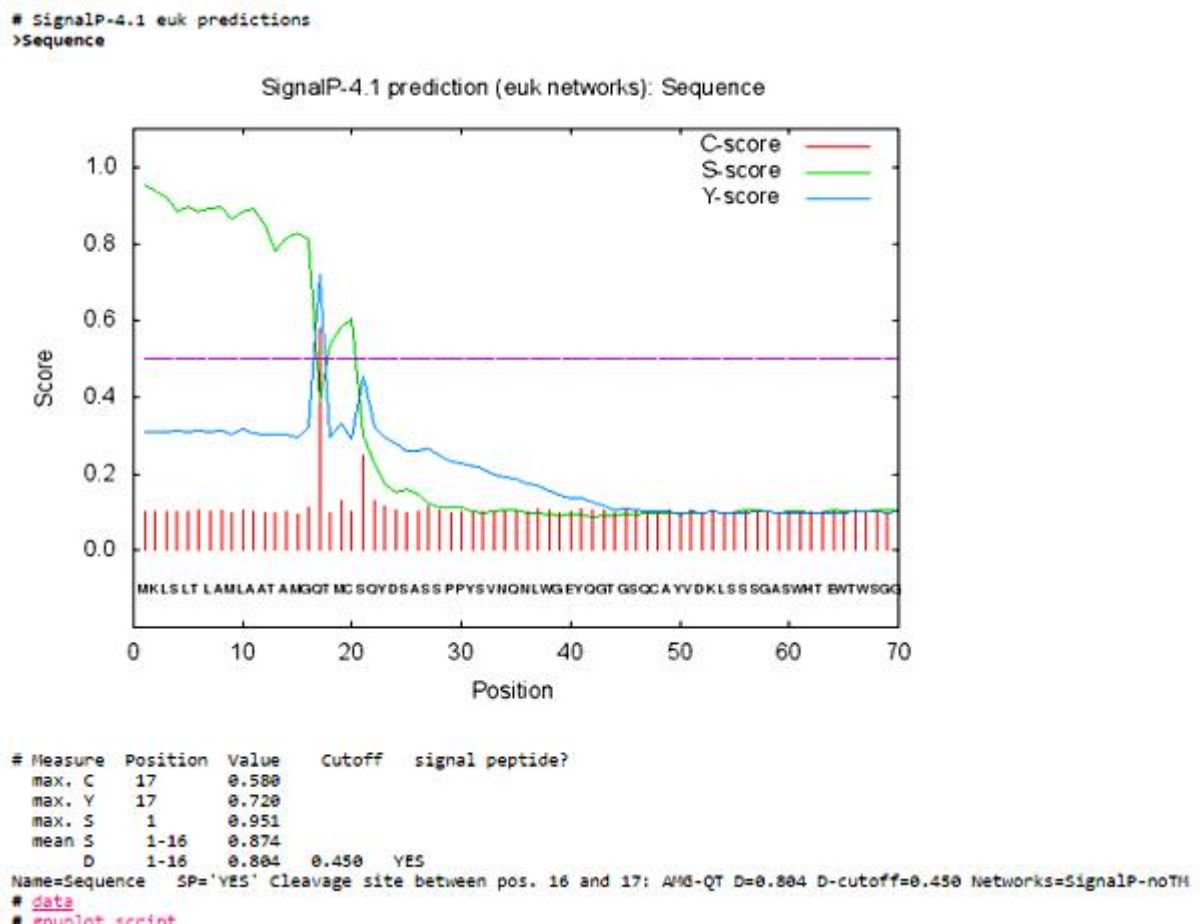
Chất tẩy rửa làm tăng sức căng bề mặt của dung dịch do đó ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme. Khi bổ sung 1-20 (v/v) của các chất tẩy rửa Tween 20, Tween 80 và Triton X-100 làm tăng cường các hoạt động của endoglucanase từ *Peniophora* sp. NDVN01 với hoạt tính tương đối đạt 112-155%. Bổ sung các Triton X-114 tại nồng độ 1% (v/v) tăng cường mạnh nhất hoạt động của enzyme, nhưng ở nồng độ từ 10-20% Triton X-114 ức chế hoạt động enzyme. Trong số các chất tẩy rửa khảo sát, SDS ức chế hoàn toàn hoạt tính của enzyme, điều này có thể liên quan đến việc anion hóa phân tử enzyme khi các phân tử SDS bao quanh phân tử enzyme (hình 3.15B). Năm 2008, Jianmin và đtg khi nghiên cứu ảnh hưởng của chất tẩy rửa đến hoạt tính của endo- $\beta$ -1,4-glucanase từ *A. terreus* đã xác định được enzyme hoàn toàn bị ức chế bởi việc bổ sung Tween 100 và SDS ở nồng độ 1% (w/v) [91]. chất tẩy rửa SDS ở nồng độ 10 mM cũng làm giảm hoạt động của endoglucanase từ chủng *A. terreus* với hoạt tính tương đối chỉ còn 13,7% [123]. Như vậy, endoglucanase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 là một enzyme khá bền với chất tẩy rửa.

### 3.2. Nhân dòng và biểu hiện gen *megIA* từ chủng *Aspergillus niger* VTCC-F021 trong *Pichia pastoris*

Chủng *A. niger* VTCC-F021 có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất đã được tuyển chọn trong số những chủng *A. niger* do Bảo tàng Giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam cung cấp. Chủng *A. niger* VTCC-F021 đã được tối ưu môi trường lên men thích hợp, tinh sạch và đánh giá tính chất của cellulase tự nhiên do chủng *A. niger* VTCC-F021 sinh tổng hợp [139], [140]. Năm 2011, Phạm và đtg đã nhân dòng và biểu hiện gen *eglA* có chiều dài 720 bp mã hóa cho endoglucanase A chứa peptide tín hiệu từ chủng *A. niger* VTCC-F021 trong *P. pastoris* GS115. Endoglucanase A tái tổ hợp (rEglA) có kích thước khoảng 33-34 kDa, hoạt tính riêng 16,2 U/mg protein. rEglA hoạt động cao nhất ở 55°C và pH 5, bền ở 30-37°C và pH 3,5-4,5. rEglA có ái lực cao với  $\beta$ -glucan. Ion  $\text{Cu}^{2+}$  và EDTA hoạt hóa rEglA. Các ion kim loại khác đều làm giảm hoạt tính của rEglA. Enzyme rEglA giữ được 70-98% khi ủ với ethanol, acetone 10-20% (v/v) và Tween 20, Tween 80 0,5-2% (v/v). Chủng *P. pastoris* GS115/pPegIA tái tổ hợp có năng suất biểu hiện endoglucanase A thấp, chỉ đạt 1,67 U/ml [9], [141]. Peptide tín hiệu là đoạn peptide nằm ở đầu N của chuỗi polypeptide có vai trò trong quá trình tiết protein qua màng và được cắt bỏ bởi peptidase khu trú bề mặt phía ngoài của màng tạo ra phân tử protein có hoạt tính sinh học [4], [7]. Việc biểu hiện đồng thời cả peptide tín hiệu có thể làm giảm năng suất biểu hiện, ảnh hưởng đến hoạt tính và tính chất của enzyme tái tổ hợp. Do đó, biểu hiện endoglucanase tái tổ hợp không chứa peptide tín hiệu tự nhiên có thể nâng cao năng suất biểu hiện enzyme tái tổ hợp và thay đổi một số tính chất của enzyme tái tổ hợp. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành biểu hiện gen *megIA* mã hóa endoglucanase A tái tổ hợp không chứa peptide tín hiệu (rmEglA) của chủng *A. niger* VTCC-F021 trong *P. pastoris* GS115 với mục đích nhằm cải thiện năng suất biểu hiện và thay đổi tính chất của enzyme tái tổ hợp phù hợp với định hướng ứng dụng.

### 3.2.1. Nhân dòng gen *meglA*

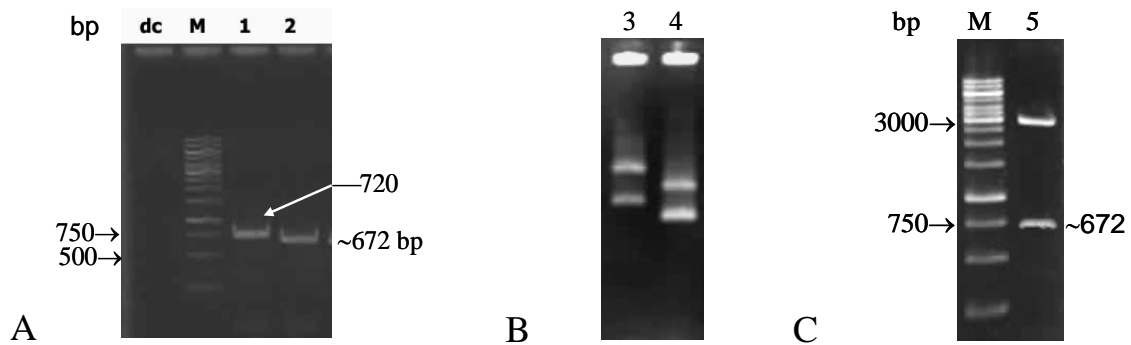
Dựa trên trình tự protein suy diễn và sử dụng phần mềm phân tích trực tuyến SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) đã xác định được peptide tín hiệu của endoglucanase A từ chủng *A. niger* VTCC-F021 gồm 16 amino acid ở đầu N của chuỗi polypeptide (hình 3.16). Cặp mồi đặc hiệu (pPmeglAF/GpPICR (bảng 2.1)) đã được thiết kế để thực hiện phản ứng PCR nhân dòng gen *meglA* mã hóa cho rmEglA từ plasmid pJeglA. Theo tính toán lý thuyết sau khi cắt bỏ đoạn mã hóa peptide tín hiệu (48 bp), gen *meglA* có chiều dài 672 bp.



**Hình 3.16. Hình ảnh kết quả phân tích trình tự peptide tín hiệu của EglA bằng phần mềm SignalP 4.1 Server**

Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose cho thấy đã nhân được một băng DNA đặc hiệu có kích thước khoảng gần 700 bp. Khi so sánh

với sản phẩm PCR nhân gen *eglA* (đối chứng dương) thấy kích thước nhỏ hơn (hình 3.17A). Gen *megLA* được nhân dòng trong vector pJET1.2/blunt tạo thành plasmid tái tổ hợp pJmegLA (hình 3.17B). Sản phẩm cắt pJmegLA cho 2 băng tương ứng với gen *megLA* (672 bp) và pJET1.2 (~3 kb) (hình 3.17C).



**Hình 3.17. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen *megLA* (A), plasmid tái tổ hợp pJmegLA (B) và sản phẩm cắt pJmegLA bằng *EcoRI/XbaI* (C)**

*dc*: sản phẩm PCR đối chứng âm (không có khuôn DNA); 2: sản phẩm PCR nhân gen *eglA* (đối chứng dương); 3: sản phẩm PCR nhân gen *megLA*; 3: plasmid pJmegLA; 4: plasmid pJET1.2 (đối chứng); 5: sản phẩm cắt pJmegLA bằng *EcoRI/XbaI*

Để xác định trình gen *megLA*, plasmid pJmegLA mang gen *megLA* được sử dụng làm khuôn chạy PCR đọc trình tự theo phương pháp giải trình tự tự động tại Hãng Macrogen - Hàn Quốc. Trình gen *megLA* được nhân dòng có chiều dài 672 nucleotide (hình 3.18).

Phân tích bằng phần mềm DNASTar cho thấy trình tự amino acid suy diễn của rmEgLA dài 223 amino acid. Trong đó có 9 amino acid mang tính bazơ mạnh (K, R), 2 amino acid mang tính bazơ yếu (H), 19 amino acid mang tính acid mạnh (D, E), 97 amino acid kỵ nước hoặc không phân cực (A, I, L, F, W, V, M, G, P) và 96 amino acid phân cực (N, C, Q, S, T, Y). Enzyme rmEgLA có khối lượng tính toán theo lý thuyết khoảng 24,24 kDa với pI bằng 4,24. So với rEgLA,

thành phần amino acid thay đổi: giảm 1 amino acid có tính bazơ mạnh (K, R), giảm 11 amino acid kỵ nước hoặc không phân cực (A, I, L, F, W, V, M, G, P) và giảm 3 amino acid phân cực (N, C, Q, S, T, Y). Enzyme rmEglA có khối lượng giảm khoảng 1,5 kDa và pI giảm 0,129 so với rEglA.

cagacaatgtgctctcagtatgacagtgccctcgagccccccataactcagtgaaaccagaac	60
Q T M C S Q Y D S A S S P P Y S V N Q N	20
ctctggggcgagtagccaaggcaccggcagccagtggtgcatatgtcgacaaactctccagc	120
L W G E Y Q G T G S Q C A Y V D K L S S	40
agtgggtgcatcctggcacaccgaatggacctggagcgggtggtgagggaaacagtgaaaagc	180
S G A S W H T E W T W S G G E G T V K S	60
tactctaactctggcgttacatttaacaagaagctcgtgagtgatgtatcaagcatcccc	240
Y S N S G V T F N K K L V S D V S S I P	80
acctcgggtggaatggaagcaggacaacaccaacgtcaacgccgatgtcgcgatgatctt	300
T S V E W K Q D N T N V N A D V A Y D L	100
ttcaccgcggcgaatgtggaccatgccacttctagcggcgactatgaactgatgatttg	360
F T A A N V D H A T S S G D Y E L M I W	120
cttgcccgcctacggcaacatccagcccattggcaagcaaattgccacggccacagtgggga	420
L A R Y G N I Q P I G K Q I A T A T V G	140
ggcaagtccctgggaggtgtggtatggcagcaccacccaggccgggtgaggagcagaggaca	480
G K S W E V W Y G S T T Q A G A E Q R T	160
tacagctttgtgtcggaagccctatcaactcatacagtggggacatcaatgcatttttc	540
Y S F V S E S P I N S Y S G D I N A F F	180
agctatctcactcagaaccaaggctttcccgccagctctcagtagtacttgatcaatctgcag	600
S Y L T Q N Q G F P A S S Q Y L I N L Q	200
tttggaactgagggcgttcaccggggggcccggaaccttcacgggttgacaactggaccgcc	660
F G T E A F T G G P A T F T V D N W T* A	220
agtgtcaactag	672
S V N -	223

**Hình 3.18. Trình tự gen *meglA* và trình tự amino acid suy diễn của mEglA từ chủng *A. niger* VTCC-F021**

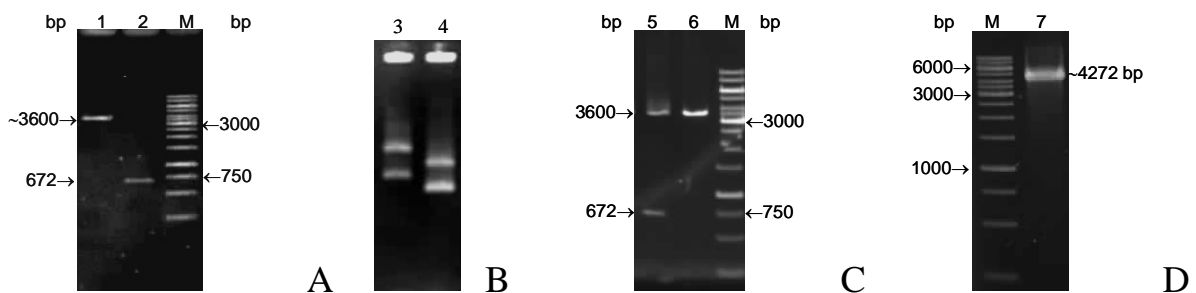
*T\**: vị trí Threonine có thể xảy ra glycosyl hóa

Sử dụng phần mềm trực tuyến NetOGlyc 4.0 Server phân tích điểm glycosyl hóa (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) xác định được trên chuỗi polypeptide của mrEglA có thể xảy ra O-glycosyl hóa tại vị trí của amino acid Threonine-219 (T\*) (hình 3.18). Tuy nhiên, khi phân tích bằng phần mềm trực tuyến NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) không phát hiện được vị trí có thể xảy ra quá trình N-glycosyl. Quá trình

glycosyl hóa gắn vào chuỗi polypeptide những phân tử đường. Tùy thuộc vào loài và hệ biểu hiện, loại đường và số lượng phân tử có sự khác nhau có thể là đường mannose, glucose, galactose, .... hoặc một số loại cùng được gắn vào chuỗi polypeptide. Điều này, làm tăng khối lượng phân tử của phân tử protein enzyme và thay đổi một số tính chất của enzyme [136].

### 3.2.2. Thiết kế vector biểu hiện *megA*

Plasmid *pJmegA* mang gen *megA* và vector *pPICZ $\alpha$ A* cùng được cắt bằng *EcoRI* và *XbaI*. Gen *megA* và *pPICZ $\alpha$ A* mở vòng được tinh sạch bằng kit thôi gel, được điện di kiểm tra (hình 3.19A).



**Hình 3.19. Hình ảnh điện di sản phẩm thôi gel (A), plasmid *pPmegA* (B), sản phẩm cắt *pPmegA* bằng *EcoRI* và *XbaI* (C), sản phẩm cắt *pPmegA* bằng *SacI* (D)**

1: *pPICZ $\alpha$ A* mở vòng; 2: gen *megA*; 3: *pPmegA*; 4: *pPICZ $\alpha$ A* (đối chứng); 5: *pPmegA* cắt bằng *EcoRI* và *XbaI*; 6: *pPICZ $\alpha$ A* bằng *EcoRI* và *XbaI* (đối chứng); 7: *pPmegA* cắt bằng *SacI*

Sau đó, được nối với nhau bằng T4 ligase tạo plasmid tái tổ hợp *pPmegA*. Dịch lai được biến nạp vào *E. coli* DH5 $\alpha$  bằng sốc nhiệt. Sau khi biến nạp dịch nuôi được lắc phục hồi rồi trải trên đĩa thạch LB Low salt bổ sung kháng sinh zeocine, ủ 37°C qua đêm. Một số khuẩn lạc mọc được nuôi, tách plasmid và điện di kiểm tra trên gel agarose. Plasmid có đoạn chèn có kích thước lớn hơn, nên nằm cao hơn so với vector không có đoạn chèn (hình 3.19B).

Plasmid tái tổ hợp pPmeglA tinh sạch được cắt bằng *EcoRI* và *XbaI* cho hai băng là pPICZ $\alpha$ A (~3,6 kb) và gen *meglA* (672 bp) (hình 3.19C). pPmeglA được đọc trình tự để kiểm tra cấu trúc biểu hiện trước khi biến nạp và biểu hiện ở *P. pastoris* GS115. Cấu trúc biểu hiện đúng khung đọc, gen *meglA* được chèn vào đúng vị trí mong muốn, đủ điều kiện để đưa vào biểu hiện trong *P. pastoris* GS115 (hình 3.20).

<b>ATGAGATTTT</b>	CTTCAATTTT	TACTGCTGTT	TTATTTCGCAG	CATCCTCCGC	ATTAGCTGCT	60
CCAGTCAACA	CTACAACAGA	AGATGAAACG	GCACAAATTC	CGGCTGAAGC	TGTCATCGGT	120
TACTCAGATT	TAGAAGGGGA	TTTCGATGTT	GCTGTTTTGC	CATTTTCCAA	CAGCACAAAT	180
AACGGGTTAT	TGTTTATAAA	TACTACTATT	GCCAGCATTG	CTGCTAAAGA	AGAAGGGGTA	240
TCTCTCGAGA	AAAGAGAGGC	TGAAGCT <b>GAA TTC</b> ca	gacaaa	tgtgctctca	gtatgacagt	300
<i>EcoRI</i>						
gcctcgagcc	cccataactc	agtgaaccag	aacctctggg	gcgagtacca	ggcaccggca	360
gccagtgtgc	atatgtcgac	aaactctcca	gcagtgggtgc	atcctggcac	accgaatgga	420
cctggagcgg	tggtgagggg	acagtgaaaa	gctactctaa	ctctggcggt	acatttaaca	480
agaagctcgt	gagtgatgta	tcaagcatcc	ccacctcggt	ggaatggaag	caggacaaca	540
ccaacgtcaa	cgccgatgtc	gcgtatgata	ttttcaccgc	ggcgaatgtg	gaccatgcca	600
cttctagcgg	cgactatgaa	ctgatgattt	ggcttgcccg	ctacggcaac	atccagccca	660
ttggcaagca	aattgccacg	gccacagtgg	gaggcaagtc	ctgggaggtg	tggtatggca	720
gcaccaccca	ggccggtgcg	gagcagagga	catacagctt	tgtgtcggaa	agccctatca	780
actcatacag	tggggacatc	aatgcatttt	tcagctatct	cactcagaac	caaggctttc	840
ccgccagctc	tcagtacttg	atcaatctgc	agtttggaac	tgaggcggtc	accggggggc	900
cggcaacctt	cacggttgac	aactggaccg	ccagtgtca	acGCT <b>TCTAGA</b>	ACAAAAACTC	960
<i>XbaI</i>						
ATCTCAGAAG	AGGATCTGAA	TAGCGCCGTC	GAC <b>CATCATC ATCATCATCA</b> T	TGA		1014
6x Histidine						

### Hình 3.20. Trình tự nucleotide của cấu trúc biểu hiện pPmeglA

(Từ nucleotide 1 đến 267 mã hóa cho  $\alpha$ -signal của vector, từ 274 đến 942 mã hóa cho *mEglA* từ *A. niger* VTCC-F021)

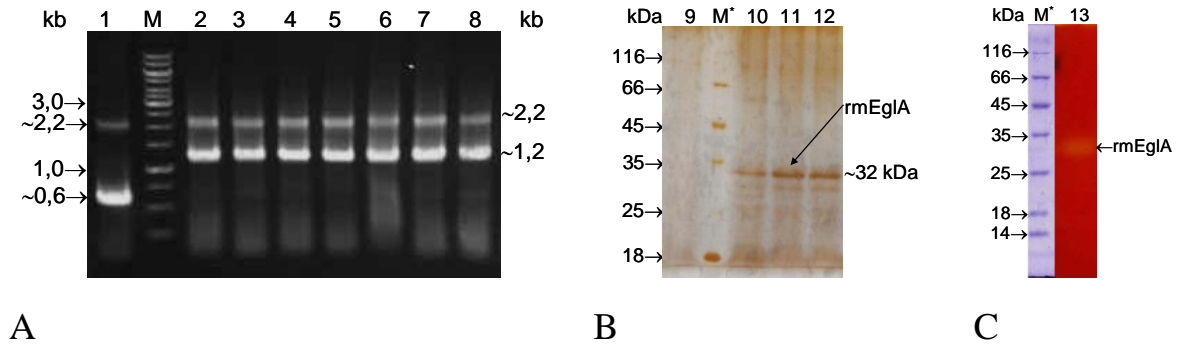
#### 3.2.3. Biểu hiện *rmEglA* trong *P. pastoris* GS115

##### 3.2.3.1. Xây dựng hệ thống biểu hiện *P. pastoris* GS115/pPmeglA

Để biểu hiện *meglA*, plasmid tái tổ hợp pPmeglA được cắt mở vòng bằng *SacI* (hình 3.19D) và được biến nạp vào tế bào *P. pastoris* GS115 khả biến bằng xung điện. Gen mã hóa endoglucanase được sát nhập vào genome của *P. pastoris* GS115 theo hai phương thức: chèn gen hoặc thay thế gen tạo hệ biểu hiện *P. pastoris* GS115/pPmeglA. Do chiến lược sử dụng là tái tổ hợp tương đồng tại vị trí promoter AOX1 nên đa phần các thể biến nạp có sự chèn gen, do



đó gen *AOX1* vẫn tồn tại trong bộ gen của nấm men. Tuy nhiên do sự tái tổ hợp mà gen *AOX1* có thể mất đi. Vì vậy, DNA bộ gen của các dòng tuyển chọn được kiểm tra bằng phương pháp PCR với cặp mồi 5'-3' *AOX1*.



**Hình 3.21. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu 3'-5' *AOX1* (A); điện di protein tổng số dịch lên men chủng *P. pastoris* GS115/pPmegLA (B); điện di nhuộm hoạt tính dịch lên men chủng *P. pastoris* GS115/pPmegLA (C)**

1: PCR genome *P. pastoris* GS115/pPicZα (đối chứng); 2-8: PCR genome *P. pastoris* GS115/pPmegLA; 9: dịch lên men dòng *P. pastoris* GS115/pPICzαA (đối chứng); 10-12: dịch lên men một số dòng *P. pastoris* GS115/pPmegLA; 13: nhuộm hoạt tính *rmEglA*

Kết quả điện di sản phẩm PCR của DNA bộ gen chủng *P. pastoris* GS115/pPmegLA tái tổ hợp cho thấy 2 băng: một băng có kích thước 1,3 kb tương ứng với kích thước gen *AOX1* có chèn gen *megLA* của vector pPmegLA và một băng có kích thước 2,2 kb tương ứng với gen *AOX1* của chủng *P. pastoris* GS115 (Hình 3.21A). Như vậy, ở chủng *P. pastoris* GS115/pPmegLA tái tổ hợp có khả năng gen *megLA* đã được chèn vào bộ gen, đồng thời gen *AOX1* của nấm men vẫn hiện diện trong genome. Do đó, kiểu hình của chủng tái tổ hợp có thể là Mut<sup>+</sup>. Các chủng *P. pastoris* GS115/pPmegLA có mang gen *megLA* được tuyển chọn, lên men để xác định hoạt tính endoglucanase.

### 3.2.3.2. Sàng lọc các dòng *P. pastoris* GS115/pPmegLA sinh tổng hợp rmEgLA mạnh

Để kiểm tra kết quả và mức độ biểu hiện rmEgLA, 39 dòng tái tổ hợp có genome mang gen *megLA* được nuôi biểu hiện trong môi trường YP bổ sung methanol 1% sau mỗi 24 giờ. Sau 72 giờ cảm ứng thu được 35 dòng biểu hiện có hoạt tính endoglucanase, 4 dòng không có hoạt tính. Trong đó, dòng số 14 có hoạt tính cao nhất (đạt 1,95 U/ml) (bảng 3.5).

**Bảng 3.5. Hoạt tính rmEgLA của các dòng *P. pastoris* GS115/pPmegLA tái tổ hợp**

Dòng	HT (U/ml)	Dòng	HT (U/ml)	Dòng	HT (U/ml)
1	1,459 ± 0,038	14	<b>1,952 ± 0,058</b>	27	1,556 ± 0,066
2	0,961 ± 0,057	15	0,496 ± 0,066	28	0,497 ± 0,005
3	0	16	1,513 ± 0,091	29	1,513 ± 0,073
4	0,680 ± 0,061	17	1,133 ± 0,034	30	0
5	0,876 ± 0,043	18	0,757 ± 0,043	31	0,817 ± 0,058
6	1,525 ± 0,086	19	1,506 ± 0,083	32	0,919 ± 0,041
7	0	20	0,969 ± 0,056	33	0,538 ± 0,041
8	0,333 ± 0,034	21	1,727 ± 0,045	34	0,59 ± 0,021
9	1,618 ± 0,013	22	1,872 ± 0,062	35	0,527 ± 0,003
10	0	23	1,241 ± 0,051	36	1,219 ± 0,043
11	1,729 ± 0,093	24	1,739 ± 0,053	37	0,779 ± 0,029
12	1,135 ± 0,042	25	1,489 ± 0,074	38	0,698 ± 0,027
13	1,127 ± 0,064	26	0,623 ± 0,031	39	1,462 ± 0,045

Năm 2011, Phạm và đtg đã biểu hiện gen *egLA* mã hóa endoglucanase có chứa peptide tín hiệu từ *A. niger* VTCC-F021 trong *P. pastoris* GS115 trong cùng điều kiện với nghiên cứu này nhưng năng suất biểu hiện chỉ đạt 1,59 U/ml [141]. Như vậy, việc cắt bỏ peptide tín hiệu có thể đã làm tăng năng suất biểu

hiện 22,6% so với biểu hiện có chứa peptide tín hiệu trong hệ biểu hiện *P. pastoris* GS115. Dòng *P. pastoris* GS115/pPmeglA/14 được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Sau 72 giờ biểu hiện, dịch ngoại bào được điện di trên gel polyacrylamide nhuộm bạc và nhuộm hoạt tính bằng dung dịch congo đỏ. Kết quả cho thấy rmEglA đã được biểu hiện và kích thước protein tái tổ hợp khoảng 32 kDa (hình 3.21B,C). Như vậy, rmEglA đã bị glycosyl hóa làm kích thước phân tử tăng khoảng 8 kDa (33%) so với tính toán lý thuyết khi không bị glycosyl hóa (24,2 kDa). Năm 1997, Heimo và đtg khi biểu hiện gen mã hóa vùng domain xúc tác của glucoamylase từ chủng *A. awamori* trong hệ *P. pastoris* thu được enzyme tái tổ hợp kích thước phân tử lớn hơn so với gốc khoảng 20 kDa. Trong đó 10 kDa do quá trình N-glycosyl hóa và khoảng 10 kDa do quá trình O-glycosyl hóa với khoảng 20-30 gốc mannose được gắn vào phân tử protein tái tổ hợp [75].

### **3.2.4. Tối ưu một số thành phần môi trường và điều kiện lên men sản xuất rmEglA**

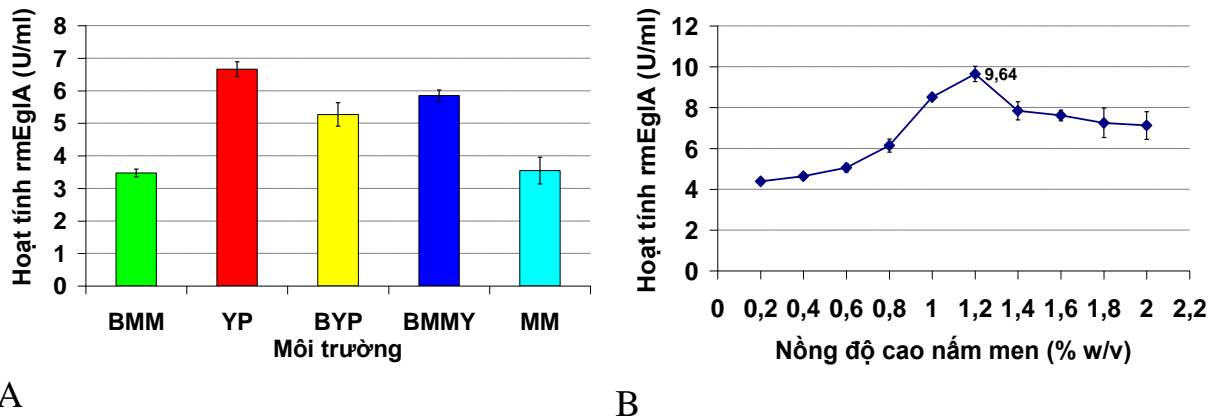
#### **3.2.4.1. Lựa chọn môi trường thích hợp**

Để khảo sát mức độ biểu hiện rmEglA trên các môi trường khác nhau, dòng *P. pastoris* GS115/pPmeglA/14 được nuôi biểu hiện trong các môi trường khác nhau tiếp methanol hàng ngày. Kết quả cho thấy môi trường YP là môi trường thích hợp nhất trong số các môi trường khảo sát cho lên men sản xuất rmEglA với năng suất biểu hiện đạt 6,66 U/ml ở 96 h cảm ứng 1% methanol (hình 3.22A). Kết quả này trùng với nghiên cứu khi biểu hiện endoglucanase có signal nhưng năng suất biểu hiện cao hơn khoảng 4 lần [9].

#### **3.2.4.2. Nồng độ cao nấm men tối ưu**

Cao nấm men là một trong những thành phần dinh dưỡng quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của nấm men. Để xác định ảnh hưởng của cao nấm men, dòng *P. pastoris* GS115/pPmeglA/14 được lên men trong môi trường

YP nhưng có thành phần cao nấm men thay đổi từ 0,2-2,0% (w/v). Kết quả cho thấy khi nồng độ cao nấm men tăng dần thì hiệu suất sinh tổng hợp rmEgIA tăng lên và đạt cực đại 9,64 U/ml ở nồng 1,2% cao nấm men. Sau đó, khi nồng độ nấm men tăng quá thì hiệu suất sinh tổng hợp lại giảm chỉ còn 7,12 U/ml ở nồng độ 2% cao nấm men (hình 3.22B).



**Hình 3.22. Biểu đồ so sánh ảnh hưởng của loại môi trường (A) và đồ thị ảnh hưởng nồng độ cao nấm men (B) đến năng suất biểu hiện rmEgIA**

Như vậy, so với biểu hiện trong môi trường YP ban đầu, nồng độ cao nấm men có ảnh hưởng tăng cường sự biểu hiện rmEgIA của dòng *P. pastoris* GS115/pPmegIA/14. Năm 1997, Sreekrishna và đtg khi nghiên cứu tối ưu tổng hợp protein bằng hệ thống biểu hiện *P. pastoris* cho rằng cao nấm men là thành phần quan trọng và thường làm tăng cường quá trình biểu hiện protein [160].

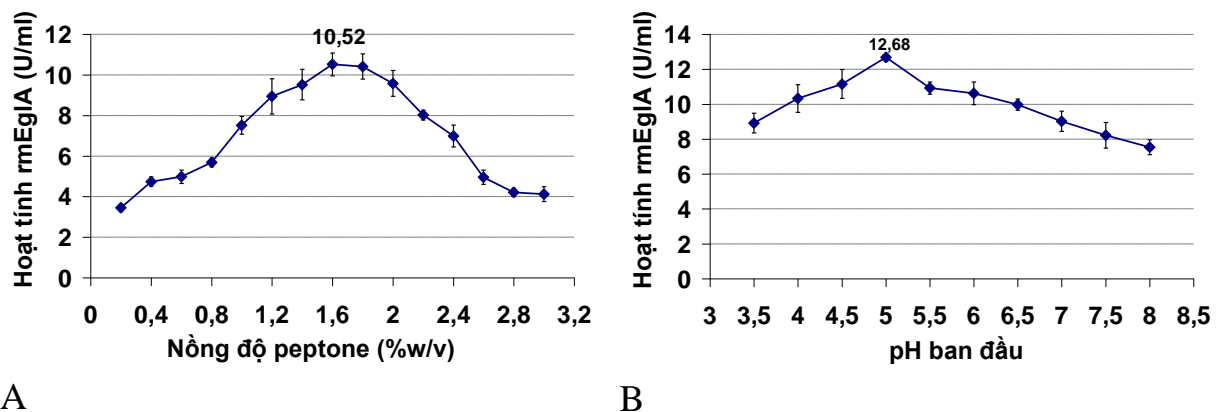
#### 3.2.4.3. Nồng độ peptone tối ưu

Cùng với cao nấm men, peptone là thành phần dinh dưỡng quan trọng trong môi trường nuôi cấy. Dòng *P. pastoris* GS115/pPmegIA/14 biểu hiện rmEgIA năng suất cao nhất đạt 10,52 U/ml ở nồng độ 1,6% peptone. Khi tăng nồng độ peptone lên cao thì năng suất biểu hiện lại giảm (hình 3.23A). So với biểu hiện trong môi trường YP ban đầu (với 2% peptone) thì dòng *P. pastoris* GS115/pPmegIA/14 biểu hiện mạnh enzyme tái tổ hợp trong điều kiện nồng độ thấp hơn. Theo Kang và Chen, các nguồn dinh dưỡng như cao nấm men,

peptone ảnh hưởng đến sự biểu hiện protein là do ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và khả năng tồn tại của tế bào nấm men [43], [96].

#### 3.2.4.4. pH ban đầu của môi trường

pH tối ưu là yếu tố rất quan trọng trong quá trình lên men các chủng vi sinh vật. Để tìm pH ban đầu của môi trường thích hợp cho quá trình lên men, dòng *P. pastoris* GS115/pPmeG1A/14 được nuôi cấy trong môi trường có pH ban đầu khác nhau. Kết quả cho thấy, năng suất biểu hiện rmEg1A tăng dần khi tăng pH ban đầu của môi trường và đạt cực đại ở pH 5,0 với năng suất biểu hiện đạt 12,68 (U/ml). Khi pH tiếp tục tăng thì năng suất biểu hiện giảm chỉ đạt 7,54 (U/ml) khi lên men trong môi trường có pH ban đầu 8,0 (Hình 3.23B).



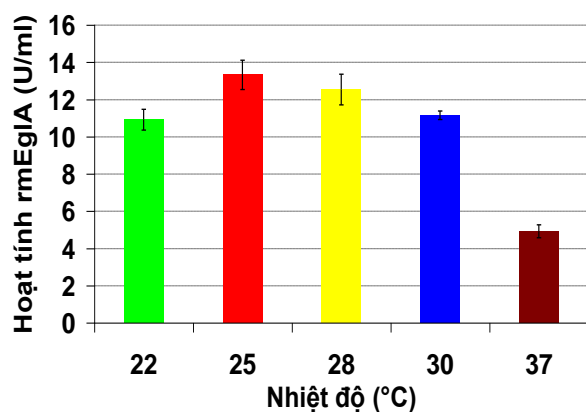
**Hình 3.23. Đồ thị ảnh hưởng của nồng độ peptone (A) và pH ban đầu của môi trường (B) đến năng suất biểu hiện rmEg1A**

Theo Soden, pH là một trong những yếu tố rất quan trọng cho sự tăng trưởng của tế bào, sự tạo thành protein và độ bền của protein. pH thường được chọn trong quá trình tối ưu hệ thống biểu hiện *P. pastoris* [159]. Jahic và đtg đã chỉ ra rằng khi giảm pH từ 5,0 xuống 4,0 của môi trường trong bình lên men làm tăng khả năng biểu hiện phức hợp protein CBM (vùng liên kết cellulose)-CALB (cellulose 6A và lipase B) của *P. pastoris* tái tổ hợp từ 40-90% [88]. Trong quá trình biểu hiện laccase của *Trametes versicolor* trong *P. pastoris*, khi bổ sung alanine để ổn định pH của môi trường ở mức 3 dẫn đến mức độ biểu hiện enzyme cao hơn so với không bổ sung alanine ổn định pH môi trường. Từ đó

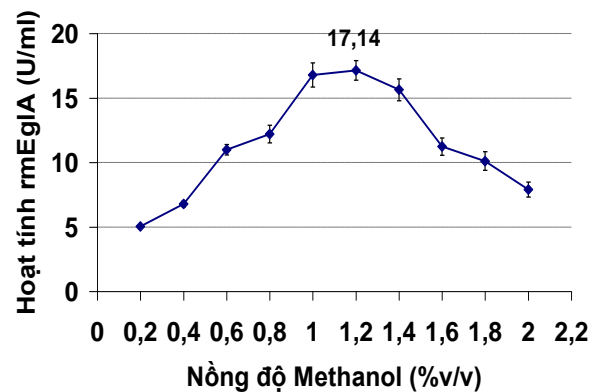
người ta cho rằng trong quá trình biểu hiện protein bằng *P. pastoris* nên tiến hành lên men chủng trong môi trường có pH thấp ở định [130]. Tuy nhiên, khi biểu hiện lactoferrin tái tổ hợp trong *P. pastoris*, tăng pH ban đầu của môi trường nuôi cấy lên 6,0-7,0 dẫn đến những cải thiện đáng kể, và mức độ biểu hiện có thể đạt tới 12 mg/l [170]. Như vậy, pH có ảnh hưởng khác nhau đến mức độ biểu hiện protein của *P. pastoris* phụ thuộc vào từng loại protein biểu hiện. Do đó, để xác định được pH thích hợp, các nhà nghiên cứu đều cho rằng phải tiến hành khảo sát quá trình lên men trong những điều kiện pH khác nhau.

#### 3.2.4.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Cùng với pH, nhiệt độ là một trong những điều kiện lên men ảnh hưởng lớn đến tăng trưởng và năng suất biểu hiện của chủng nấm men. Kết quả khảo sát cho thấy dòng *P. pastoris* GS115/pPmeg1A/14 biểu hiện rmEg1A mạnh nhất trong điều kiện nhiệt độ lên men 25°C với năng suất biểu hiện đạt 13,33 U/ml, càng tăng nhiệt độ thì năng suất biểu hiện rmEg1A càng giảm chỉ đạt 4,93 U/ml ở 37°C (hình 3.24A).



A



B

**Hình 3.24. Biểu đồ so sánh ảnh hưởng của nhiệt độ (A) và đồ thị ảnh hưởng của nồng độ methanol (B) đến năng suất biểu hiện rmEg1A**

Những công bố về ảnh hưởng của nhiệt độ đến năng suất biểu hiện protein tái tổ hợp của chủng *P. pastoris* cho thấy khoảng nhiệt độ thích hợp trong

khoảng 20-25°C [112]. Trong *P. pastoris*, nhiệt độ thích hợp cho biểu hiện protein laccase tái tổ hợp là 20°C [130], cho phức hợp protein CBM (vùng liên kết cellulose)-CALB (cellulase 6A và lipase B) là 22°C [88], cho hAFP là 23°C [113], cho Galactose oxidase và SAG2 là 25°C [115], [174].

#### 3.2.4.6. Ảnh hưởng của nồng độ methanol cảm ứng

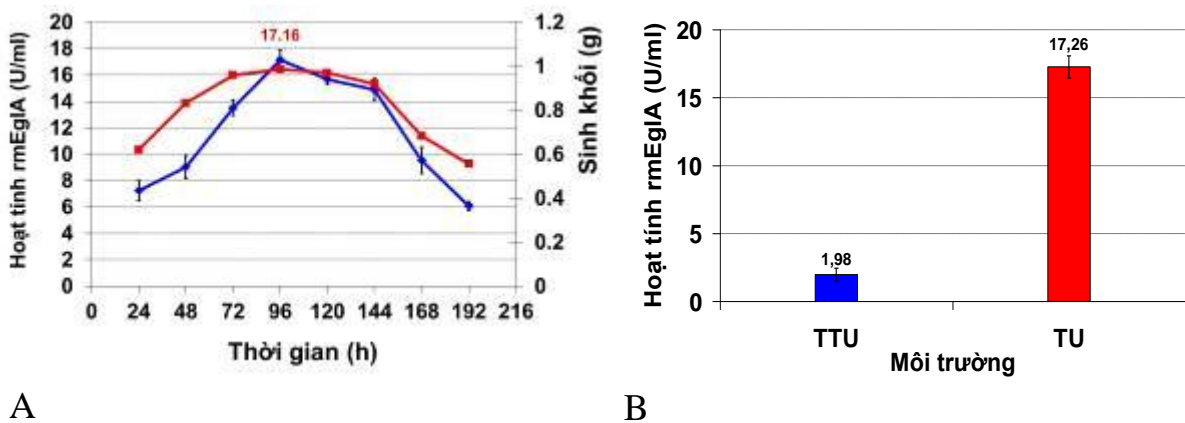
Methanol là yếu tố cảm ứng quan trọng trong việc biểu hiện protein tái tổ hợp bằng chủng *P. pastoris*. Sự biểu hiện protein liên quan đến hoạt động của gen AOX1 và AOX2, đồng thời chủng *P. pastoris* GS115 có khả năng sinh trưởng trong điều kiện nồng độ methanol cao hơn so với các chủng *P. pastoris* còn lại dùng biểu hiện [112]. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ methanol đến năng suất biểu hiện rmEglA của dòng *P. pastoris* GS115/pPmeglA/14 cho thấy khi tăng nồng độ methanol làm tăng năng suất biểu hiện và đạt cực đại 17,13 (U/ml) ở nồng độ 1,2% (v/v) sau 96h cảm ứng (hình 3.24B).

Năm 2012, Phạm Thị Hòa khi nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ 0-2,0% methanol đến năng suất biểu hiện rEglA của chủng *P. pastoris* GS115/pPeglA thu được 1% methanol là thích hợp nhất [9]. Ling và đtg khi nghiên cứu biểu hiện SAG2 trong *P. pastoris* xác định được nồng độ methanol thích hợp là 1%, khi tăng nồng độ lên 2% thì năng suất biểu hiện giảm mạnh [115]. Nhìn chung, việc biểu hiện protein tái tổ hợp trong *P. pastoris* liên quan chặt chẽ đến sự kiểm soát nồng độ methanol. Ở một nồng độ thích hợp sẽ cảm ứng promoter AOX hoạt động điều khiển sự biểu hiện gen ngoại lai. Nhưng ở nồng độ cao, methanol dư thừa có thể gây độc cho tế bào, làm giảm hoạt động của promoter AOX, thậm trí có thể gây chết tế bào [115].

#### 3.2.4.7. Ảnh hưởng của thời gian đến năng suất biểu hiện rmEglA

Dòng *P. pastoris* GS115/pPmeglA/14 được lên men trong các bình tam giác khác nhau. Dịch nuôi biểu hiện theo giờ được ly tâm thu sinh khối, xác định theo phương pháp cân khối lượng và xác định hoạt tính enzyme (hình 3.25A).

Theo thời gian, sinh khối và biểu hiện enzyme tăng dần, tuy nhiên do giới hạn điều kiện môi trường các vi sinh vật chỉ phát triển tới mức độ nhất định, đồng thời biểu hiện đạt cực đại ở một thời điểm nhất định. Khi nuôi cấy đến 96 giờ, sinh khối tế bào và năng suất biểu hiện rmEgIA đạt cực đại 17,16 U/ml. Khi thời gian tiếp tục tăng thì có sự suy giảm sinh khối tế bào và hoạt tính enzyme. Như vậy, thời gian biểu hiện tối ưu là 96 h.



**Hình 3.25. Đồ thị ảnh hưởng của thời gian lên men (A) và biểu đồ so sánh năng suất biểu hiện rmEgIA trong môi trường và điều kiện tối ưu (B)**

TTU: Môi trường và điều kiện trước tối ưu; TU: Môi trường và điều kiện tối ưu; (◆): Hoạt tính rmEgIA; (■) sinh khối (g)

#### 3.2.4.8. So sánh năng suất biểu hiện rmEgIA trong môi trường tối ưu và chưa tối ưu

Sau khi tối ưu một số thành phần môi trường và điều kiện lên men, để đánh giá hiệu quả của môi trường tối ưu dòng *P. pastoris* GS115/pPmegIA/14 được lên men với thành phần môi trường, điều kiện lên men tối ưu (1,6% peptone; 1,2% cao nấm men; 1,2% methanol cảm ứng sau 24h; pH ban đầu 5,0; nhiệt độ lên men 25°C và thời gian lên men 96h lắc 200 vòng/phút) và môi trường, điều kiện ban đầu (chưa tối ưu). Kết quả cho thấy, năng suất biểu hiện rmEgIA trong môi trường và điều kiện tối ưu đạt 17,26 U/ml, tăng 8,8 lần so với lên men trong môi trường và điều kiện ban đầu chưa tối ưu (1,98 U/ml) (hình 3.25B). Năm



2012, Phạm Thị Hòa đã đánh giá năng suất biểu hiện rEglA của chủng *P. pastoris* GS115/pPeglA tái tổ hợp sau khi tối ưu một số thành phần và điều kiện lên men đạt 1,67 U/ml [9]. Như vậy, năng suất biểu hiện rmEglA của dòng *P. pastoris* GS115/pPmeglA/14 cao hơn so với biểu hiện rEglA.

### 3.2.5. Tinh sạch rmEglA

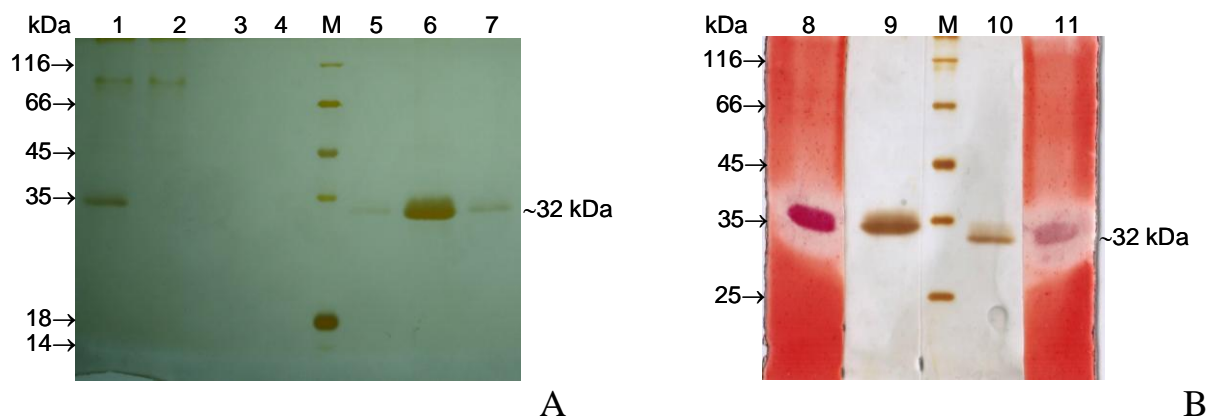
Dịch lên men dòng *P. pastoris* GS115/pPmeglA/14 sau 96 h cảm ứng methanol được ly tâm loại bỏ sinh khối thu dịch enzyme thô. rmEglA biểu hiện có thêm đuôi 6x histidine để tinh sạch enzyme dễ dàng và hiệu quả cao. rmEglA tinh sạch qua cột ProBond<sup>TM</sup> resin (Invitrogen). Kết quả được thể hiện ở bảng 3.6 và hình 3.26A.

**Bảng 3.6. Thông số kỹ thuật các bước tinh sạch rmEglA**

Mẫu	Protein tổng số (mg)	Hoạt tính tổng (U)	Hoạt tính riêng (U/mg)	Độ sạch	Hiệu suất thu hồi (%)
Dịch nổi	1,91	60,75	31,81	1	100
Dịch qua cột	0,79	12,53	15,86		20,63
Dịch rửa 1	0,72	7,21	10,01		11,87
<b>Dịch tinh sạch</b>	<b>0,16</b>	<b>30,64</b>	<b>191,5</b>	<b>6,02</b>	<b>50,44</b>

Bảng 3.6 và hình 3.26A cho thấy, dịch tinh sạch từ *P. pastoris* GS115/pPmeglA cho 1 băng đậm duy nhất có kích thước khoảng 32 kDa, rmEglA tinh sạch có hoạt tính riêng 191,5 (U/mg), độ sạch đạt 6 lần và hiệu suất thu hồi enzyme đạt 50,44%. Enzyme rEglA (chưa cắt bỏ peptide tín hiệu) tinh sạch bằng phương pháp tương tự có hoạt tính riêng đạt 16,24 (U/mg), độ sạch đạt 2,69 lần và hiệu suất thu hồi enzyme đạt 49,8% [9]. Như vậy so với quá trình tinh sạch rEglA, rmEglA tinh sạch có hoạt tính riêng và độ sạch cao hơn, hiệu suất thu hồi enzyme tương đương.

Để đánh giá mức độ sạch của chế phẩm rmEglA, khối lượng phân tử và so sánh với khối lượng endoglucanase chưa cắt bỏ peptide tín hiệu dịch enzyme tinh sạch của rEglA và rmEglA được phân tích điện di trên gel polyacrylamide, nhuộm bạc và điện di hoạt tính enzyme. Kết quả được thể hiện trên hình 3.26B cho thấy rmEglA có độ sạch cao và có khối lượng khoảng 32 kDa thấp hơn so với khối lượng của rEglA. Đồng thời, qua kết quả điện di hoạt tính cho thấy băng protein tinh sạch được là endoglucanase và có hoạt tính mạnh hơn so với rEglA.



**Hình 3.26. Hình ảnh điện di các phân đoạn tinh sạch rmEglA (A), điện di so sánh rEglA với rmEglA và điện di nhuộm hoạt tính (B)**

1: dịch lên cột; 2: dịch qua cột; 3-4: dịch rửa; 5-7: các phân đoạn tinh sạch; 8: nhuộm hoạt tính rEglA; 9: rEglA tinh sạch; 10: rmEglA tinh sạch; 11: nhuộm hoạt tính rmEglA; M: marker

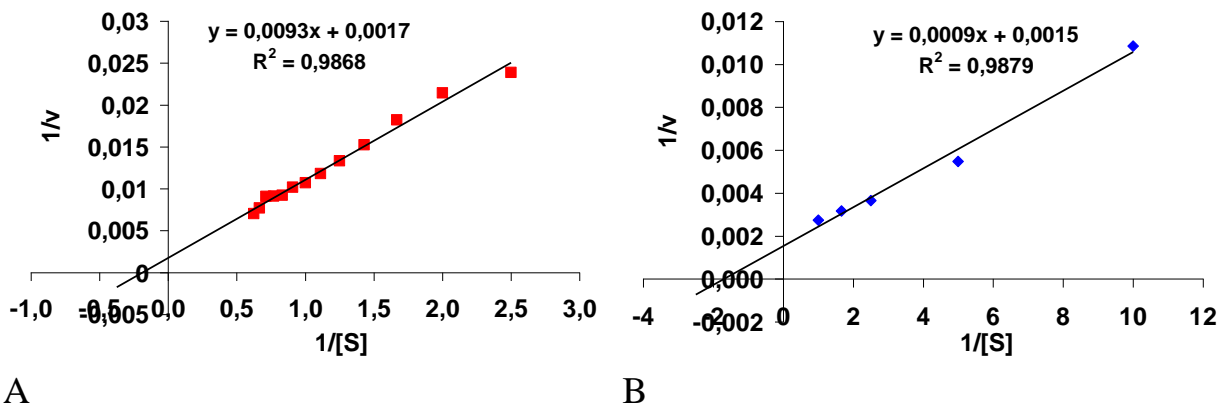
### 3.2.6. Tính chất của rmEglA

#### 3.2.6.1. Động học cơ chất của rEglA

Các hằng số động học  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_{cat}$  và  $K_{cat}/K_m$  là những đại lượng đặc trưng cho phương trình động học cơ chất của một enzyme. Phương trình động học Lineweaver-Burk của rmEglA đối với cơ chất CMC và  $\beta$ -glucan lúa mạch (barley  $\beta$ -glucan) đã được xác định bằng thực nghiệm (hình 3.27).

Từ phương trình Lineweaver-Burk đã tính ra được các hằng số động học. Động học đối với cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch của rmEglA có  $K_m$  thấp hơn,  $K_{cat}$

và  $K_{cat}/K_m$  cao hơn so với cơ chất CMC. Điều này chứng tỏ ái lực của enzyme với cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch cao hơn so với cơ chất CMC. Vận tốc cực đại của phản ứng do rmEglA xúc tác đối với cơ chất CMC đạt 588,2 U/mg, còn đối với cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch đạt 666,67 U/mg. Khi so sánh với các hằng số động học của endoglucanase chưa cắt bỏ peptide tín hiệu (rEglA) đã nghiên cứu trước nhận thấy có sự thay đổi lớn trong hằng số động học.  $K_m$  giảm,  $V_{max}$  và  $K_{cat}/K_m$  đều tăng đối với cơ chất CMC và  $\beta$ -glucan lúa mạch. Điều này chứng tỏ việc cắt bỏ peptide tín hiệu đã làm tăng ái lực của rmEglA đối với cơ chất hơn so với rEglA. Như vậy, việc cắt bỏ peptide tín hiệu đã dẫn đến những thay đổi về mặt cấu trúc của phân tử protein enzyme theo hướng thuận lợi cho hoạt tính xúc tác. Những tương tác giữa các nhóm chức trong phân tử enzyme cũng thay đổi.



Hình 3.27. Đồ thị phương trình động học cơ chất Lineweaver-Burk của rmEglA

A: cơ chất CMC; B: cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch

Bảng 3.7. Hằng số động học cơ chất của rmEglA tinh sạch

Enzyme	Cơ chất	$K_m$ (mg/ml)	$V_{max}$ (U/mg protein)	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m$
rmEglA	$\beta$ -glucan lúa mạch	0,60	666,67	1388,89	2314,81
	CMC	5,47	588,2	1225,49	224,01
rEglA [9]	$\beta$ -glucan lúa mạch	4,04	102,04	2040,82	505,05
	CMC	10,17	28,99	579,71	57,01

### 3.2.6.3. Xác định tính đặc hiệu cơ chất của rmEglA

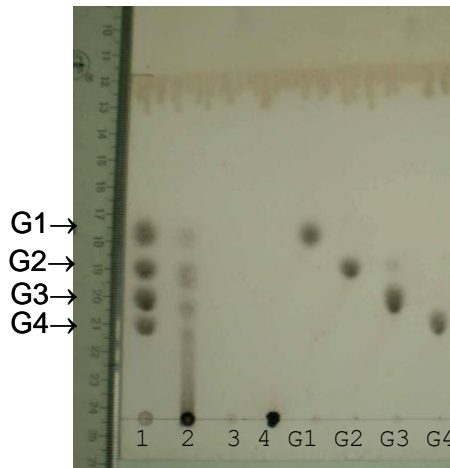
Để xác định mức độ đặc hiệu cơ chất, rmEglA được thử nghiệm chuyển hóa các cơ chất khác nhau. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.8. rmEglA có tính đặc hiệu cao đối với cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch (hoạt tính tương đối đạt 217,6% so với chuyển hóa cơ chất CMC) và CMC (hoạt tính tương đối 100%), khả năng thủy phân cơ chất cellulose kết tinh (avicel) rất thấp (1,7%) và không có khả năng thủy phân cơ chất xylan, LBG và tinh bột. Như vậy, rmEglA thủy phân liên kết  $\beta$ -1,4-O-glycoside do các phân tử  $\beta$ -glucose liên kết với nhau nhưng có cấu trúc vô định hình.

**Bảng 3.8. Mức độ đặc hiệu cơ chất của rmEglA**

Cơ chất (1% w/v)	Đơn vị cấu tạo	Liên kết	Hoạt tính tương đối (%)
$\beta$ -glucan lúa mạch	$\beta$ -glucose	$\beta$ -1,4-O-glycoside	217,6
CMC	$\beta$ -glucose	$\beta$ -1,4-O-glycoside	100
Xylan	$\beta$ -xylose	$\beta$ -1,4-O-glycoside	0
LBG	$\beta$ -mannose	$\beta$ -1,4-O-glycoside 1,6-O-glycoside	0
Avicel	$\beta$ -glucose	$\beta$ -1,4-O-glycoside	1,7
Tinh bột	$\alpha$ -glucose	$\alpha$ -1,4-O-glycoside	0

### 3.2.6.4. Sản phẩm thủy phân của rmEglA

Để xác định sản phẩm thủy phân, carboxymethyl cellulose đã được thủy phân bởi rmEglA tinh sạch. Các sản phẩm thủy phân được phân tách và phát hiện bằng phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC). Kết quả cho thấy, sản phẩm thủy phân CMC chủ yếu của enzyme là cellobiose (G2) và cellotriose (G3), tiếp theo là cellotetrose (G4) và các oligomer lớn hơn G4. Glucose (G1) là sản phẩm thu được ít nhất (hình 3.28). Như vậy, sản phẩm thủy phân cơ chất của rmEglA là một hỗn hợp các đường (G2, G3, G4) và các oligomer lớn hơn G4.

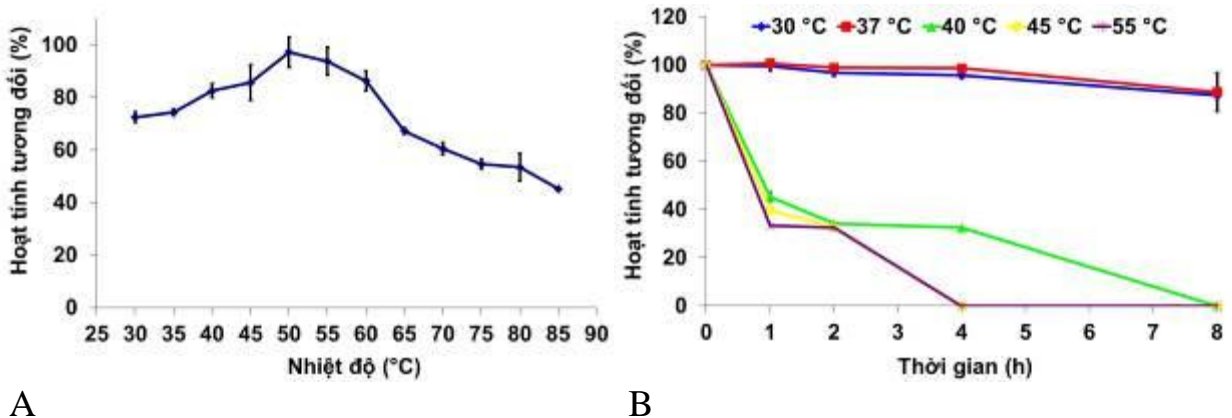


**Hình 3.28. Phổ chạy sắc ký TLC sản phẩm thủy phân cơ chất CMC của rmEgIA**

1: Phổ chạy hỗn hợp chất chuẩn; 2: phổ chạy dịch thủy phân; 3: phổ chạy dịch cellulase tinh sạch; 4: phổ chạy cơ chất CMC; G1: glucose; G2: cellobiose; G3: celotriose, G4: cellotetrose

### 3.2.6.5. Nhiệt phản ứng tối ưu và độ bền nhiệt độ của rmEgIA

Để khảo sát nhiệt độ phản ứng tối ưu, rmEgIA được phản ứng với cơ chất CMC ở những điều kiện nhiệt độ khác nhau. Kết quả được thể hiện ở hình 3.29A.



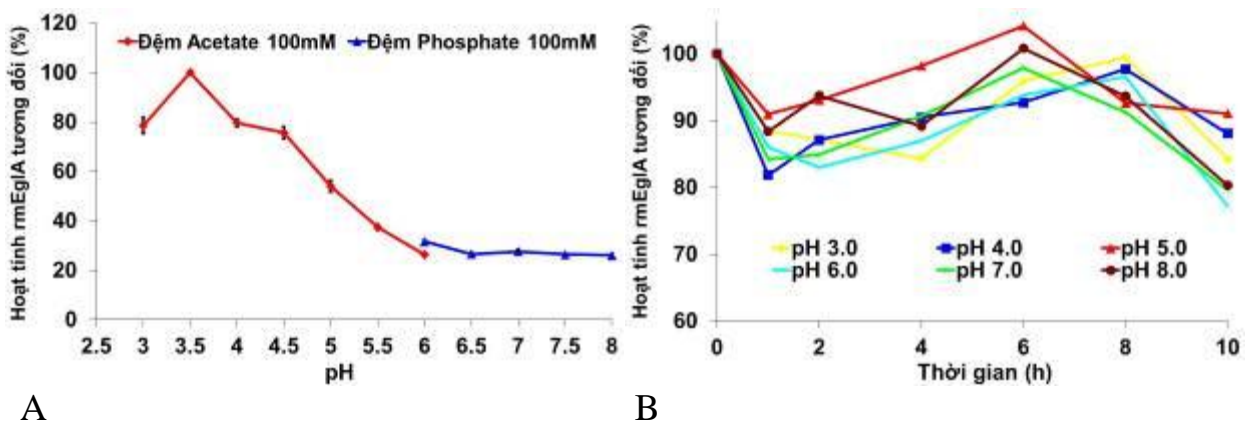
**Hình 3.29. Nhiệt độ phản ứng tối ưu (A) và độ bền nhiệt độ của rmEgIA**

Khi tăng nhiệt độ phản ứng từ 30-50°C thì hoạt tính của rmEgIA tăng dần và đạt cực đại ở 50°C. Sau đó, nhiệt độ tăng thì hoạt tính rmEgIA giảm dần chỉ còn 45,25% so với cực đại ở 85°C. Năm 2012, Phạm Thị Hòa đã biểu hiện rEgIA (có chứa peptide tín hiệu) trong cùng điều kiện và đánh giá tính chất đã xác định nhiệt độ thích hợp đối với enzyme là 55°C [9]. Như vậy, nhiệt độ tối ưu của rmEgIA (cắt peptide tín hiệu) giảm so với chưa cắt bỏ peptide tín hiệu (rEgIA).

rmEglA có độ bền cao trong khoảng nhiệt độ 30-37°C, sau 8h xử lý hoạt tính tương đối còn lại khoảng 88%. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ cao 45-55°C enzyme mất hoạt tính nhanh (hình 3.29B). So với độ bền nhiệt độ của enzyme chưa cắt peptide tín hiệu thì rmEglA có khoảng nhiệt độ bền tương đương (30-37°C) nhưng độ bền thì cao hơn. rEglA sau 8h xử lý ở 30-37°C hoạt tính tương đối còn lại 40-60% [9].

### 3.2.6.6. pH phản ứng tối ưu và độ bền pH của rmEglA

rmEglA có pH phản ứng tối ưu là 3,5, khi pH tăng thì hoạt tính của enzyme giảm mạnh chỉ còn 26% so với hoạt tính cực đại ở pH 8,0 (hình 3.30A). Nghiên cứu của Phạm Thị Hòa năm 2012 cho thấy, pH thích hợp đối với endoglucanase tái tổ hợp chưa cắt peptide tín hiệu là 5,0 và khi tăng pH môi trường phản ứng lên 7,0 thì enzyme mất hoạt tính [9]. Như vậy, đối với endoglucanase từ chủng *A. niger* VTCC-F021 biểu hiện trong *P. pastoris* GS115 cắt bỏ peptide tín hiệu đã làm giảm pH phản ứng tối ưu về phía acid. Đặc biệt, rmEglA hoạt động trong khoảng pH rộng hơn so với rEglA. Điều này có thể liên quan đến việc cắt bỏ peptide tín hiệu làm giảm 01 amino acid có tính bazơ mạnh, trong khi số amino acid có tính acid mạnh không bị mất (phân tích ở mục 3.2.1) từ đó làm giảm pH tối ưu của phản ứng.



**Hình 3.30. pH phản ứng tối ưu (A) và độ bền pH (B) của rmEglA**

Kết quả khảo sát độ bền pH của enzyme cho thấy rmEglA rất bền pH. Trong khoảng pH rộng từ 3,0-8,0, sau 10 h xử lý hoạt tính tương đối của enzyme vẫn còn 77%. Đặc biệt, ở khoảng pH từ 3,0-5,0 hoạt tính tương đối của

rmEglA vẫn còn 84-91% (hình 3.30B). So sánh với độ bền pH của endoglucanase chưa cắt peptide tín hiệu (rEglA) có sự khác biệt lớn. rEglA tương đối bền trong khoảng pH 3,5-4,5 với hoạt tính tương đối còn lại khoảng 50-70% sau 8 h xử lý. Nhưng ở pH 5,5 sau 8h xử lý rEglA mất hoàn toàn hoạt tính [9]. Trong khi rmEglA bền trong khoảng pH 3,0-8,0, hoạt tính tương đối vẫn còn 77% sau 10 h xử lý. Như vậy, việc cắt bỏ peptide tín hiệu đã làm thay đổi độ bền pH của enzyme.

### 3.2.6.7. Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính của rmEglA

Ion kim loại có ảnh hưởng trực tiếp và gián tiếp đến hoạt tính của enzyme. Tác động của ion kim loại có thể thông qua làm cầu nối giữa enzyme và cơ chất, làm thay đổi thể oxy hóa - khử, làm bền phân tử protein enzyme [4]. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính rmEglA được thể hiện ở bảng 3.9.

**Bảng 3.9. Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính rmEglA**

Kim loại	Nồng độ			Kim loại	Nồng độ		
	5 mM	10 mM	15 mM		5 mM	10 mM	15 mM
K <sup>+</sup>	118,1 ± 1,2	109,0 ± 2,4	104,4 ± 2,1	Ni <sup>2+</sup>	120,5 ± 2,7	107,3 ± 1,3	103,2 ± 1,8
Ag <sup>+</sup>	56,0 ± 1,6	42,5 ± 2,0	41,7 ± 0,7	Mn <sup>2+</sup>	115,1 ± 2,8	83,7 ± 1,5	73,6 ± 1,7
Ca <sup>2+</sup>	129,1 ± 3,6	119,5 ± 3,2	112,2 ± 1,5	Cu <sup>2+</sup>	131,6 ± 3,3	115,2 ± 2,8	100,5 ± 2,4
Ba <sup>2+</sup>	129,3 ± 2,3	123,5 ± 2,7	123,2 ± 2,1	Co <sup>2+</sup>	153,0 ± 1,7	158,7 ± 1,9	154,2 ± 2,6
Mg <sup>2+</sup>	130,1 ± 4,3	67,9 ± 2,9	63,8 ± 2,5	Pb <sup>2+</sup>	37,2 ± 0,7	0,0	0,0
Zn <sup>2+</sup>	132,6 ± 1,8	109,6 ± 2,5	97,1 ± 1,7	Al <sup>3+</sup>	60,9 ± 0,9	0,0	0,0
Fe <sup>2+</sup>	86,3 ± 1,6	72,5 ± 1,4	69,9 ± 2,2	EDTA	88,6 ± 1,2	86,0 ± 1,9	85,3 ± 2,0
Hg <sup>2+</sup>	57,0 ± 1,3	0,0	0,0	Đôi chúng		100,0 ± 2,8	

Bảng 3.9 cho thấy, ở nồng độ từ 5-15 mM các ion  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  làm tăng hoạt tính của rmEglA. Các ion  $Fe^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  ức chế mạnh mẽ hoạt tính rmEglA. Trong đó,  $Ba^{2+}$  làm tăng hoạt tính enzyme mạnh nhất lên 123-129% so với đối chứng. Ion  $Pb^{2+}$  ức chế mạnh nhất, ở nồng độ 5 mM hoạt tính tương đối còn 37,2% so với đối chứng, khi tăng lên 10 mM thì enzyme mất hoàn toàn hoạt tính. EDTA là chất ức chế đặc trưng với metalloenzyme có vai trò ức chế hoạt tính rmEglA với hoạt tính tương đối giảm còn 85-88% so với đối chứng ở nồng độ 5-15 mM.

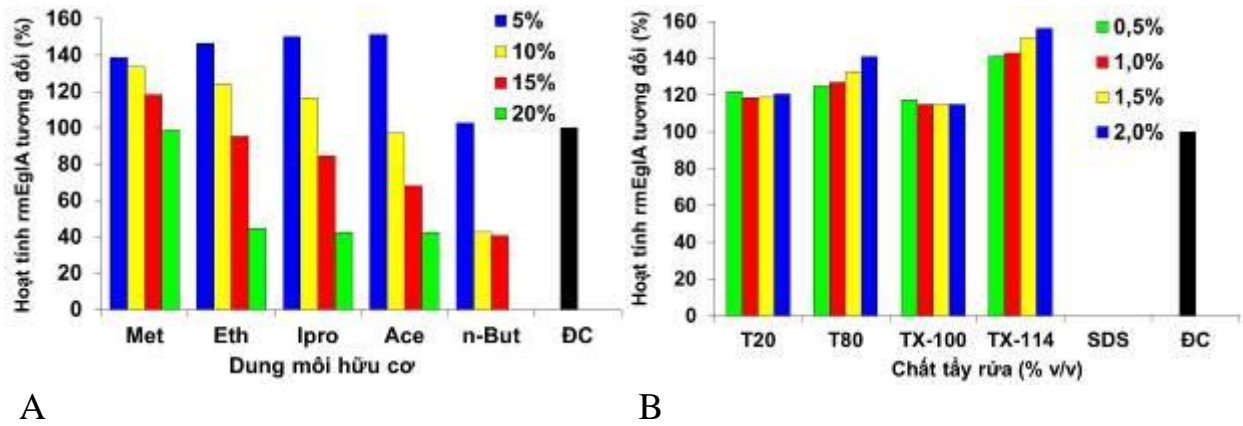
#### 3.2.6.8. Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ và chất tẩy rửa

Các dung môi hữu cơ có ảnh hưởng khác nhau đến hoạt tính rmEglA. Ở nồng độ 5% các dung môi đều có vai trò làm tăng hoạt tính enzyme, trong đó isopropanol và acetone có làm tăng mạnh nhất với hoạt tính tương đối đạt 150%. Khi tăng nồng độ dung môi hữu cơ thì hoạt tính rmEglA giảm dần. Trong các dung môi khảo sát, methanol không làm giảm hoạt tính enzyme, n-butanol ức chế mạnh nhất ở 20% làm mất hoàn toàn hoạt tính enzyme (hình 3.31A).

Ở nồng độ khảo sát từ 0,5-2,0%, các chất tẩy rửa Tween 20, Tween 80, Triton X-100, Triton X-114 đều làm tăng hoạt tính enzyme từ 14,9-56,3% so với đối chứng. Trong đó, Triton X-114 làm tăng hoạt tính enzyme mạnh nhất. Triton X-114 và Tween 80 ảnh hưởng có xu hướng tăng dần khi tăng nồng độ. SDS làm ức chế hoàn toàn hoạt tính enzyme (hình 3.31B).

Năm 2012, Phạm Thị Hòa đánh giá tính chất của rEglA (enzyme chưa cắt bỏ peptide tín hiệu) đã xác định được các dung môi hữu cơ (methanol, ethanol, isopropanol, acetone, n-butanol) và các chất tẩy rửa (Tween 20, Tween 80, Triton X-100, Triton X-114, SDS) đều ức chế hoạt tính enzyme với mức độ khác nhau phụ thuộc vào nồng độ [9], [141]. Như vậy, ảnh hưởng của dung môi hữu cơ đối với rmEglA có sự khác biệt lớn so với rEglA. Việc cắt bỏ peptide tín hiệu đã làm thay đổi khả năng kháng dung môi và chất tẩy rửa của rmEglA.





A

B

**Hình 3.31. Biểu đồ so sánh ảnh hưởng của dung môi hữu cơ (A) và chất tẩy rửa (B) đến hoạt tính của rmEgIA**

*Met: methanol; Eth: ethanol; Ipro: Isopropanol; Ace: acetone; n-But: n-butanol; T20: Tween 20; T80: Tween 80; TX-100: Triton X-100; TX-114: Triton X-114; SDS: Sodium dodecyl sulphate; ĐC: đối chứng*

Peptide tín hiệu có vai trò quan trọng trong quá trình tiết protein và sự vận chuyển protein qua hệ thống màng sinh học. Tuy nhiên, biểu hiện đồng thời peptide tín hiệu có thể ảnh hưởng đến hoạt tính và tính chất của enzyme. Do đó, việc cắt bỏ peptide tín hiệu có thể thay đổi hoạt tính và một số tính chất của enzyme. Sự khác biệt về tính chất của endoglucanase tái tổ hợp có chứa peptide tín hiệu và không chứa peptide tín hiệu từ chủng *A. niger* VTCC-F021 biểu hiện trong *P. pastoris* GS115 được thể hiện ở bảng 3.10.

Bảng 3.10. cho thấy có sự thay đổi lớn về tính chất của rmEgIA so với rEgIA. Hằng số động học  $K_m$  của rmEgIA đối với cơ chất CMC và  $\beta$ -glucan đều giảm so với rEgIA. Điều này chứng tỏ việc cắt bỏ peptide tín hiệu đã làm thay đổi động học cơ chất của enzyme, làm tăng ái lực của enzyme đối với cơ chất. Nhiệt độ và pH phản ứng tối ưu của rmEgIA đều giảm so với rEgIA. Độ bền pH của rmEgIA cao hơn và khoảng pH bền rộng hơn so với rEgIA. Ảnh hưởng của ion kim loại có sự thay đổi lớn, các ion  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  làm tăng hoạt tính của rmEgIA nhưng hầu hết các ion kim loại khảo sát đều làm giảm hoạt tính của rEgIA. Độ bền dung môi của rmEgIA tăng hơn so với rEgIA, đặc biệt rmEgIA rất bền với các chất tẩy rửa Tween 20, Tween 80, Triton X-100,

Triton X-114 (đều có vai trò làm tăng hoạt tính trong khoảng nồng độ khảo sát 0,5-2%) nhưng lại ức chế hoạt tính đối với rEglA.

**Bảng 3.10. So sánh một số đặc điểm của rmEglA và rEglA**

<b>Đặc điểm</b>	<b>rmEglA</b>	<b>rEglA [9]</b>
Khối lượng	Khoảng 32 kDa	Khoảng 33-34 kDa
$K_m$	0,6 mg/ml đối với $\beta$ -glucan 5,47 mg/ml đối với CMC	4,04 mg/ml đối với $\beta$ -glucan 10,17 mg/ml đối với CMC
$V_{max}$	666,67 U/mg đối với $\beta$ -glucan 588,2 U/mg đối với CMC	102,04 U/mg đối với $\beta$ -glucan 28,99 U/mg đối với CMC
Nhiệt độ tối ưu	50°C	55°C
pH tối ưu	3,5	5,0
Độ bền nhiệt độ	30-37°C, hoạt tính tương đối còn 88% sau 8h xử lý	30-37°C, hoạt tính tương đối còn 40-60% sau 8h xử lý
Độ bền pH	3,0-8,0	3,5-4,5
Anh hưởng của ion kim loại	$K^+$ , $Ca^{2+}$ , $Ba^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Co^{2+}$ làm tăng hoạt tính. Các ion $Fe^{2+}$ , $Hg^{2+}$ , $Pb^{2+}$ , $Al^{3+}$ ức chế mạnh mẽ hoạt tính	EDTA và $Cu^{2+}$ hoạt hóa nhẹ ở nồng độ 5 và 10 mM. Các ion kim loại khác đều ức chế
Anh hưởng của dung môi hữu cơ	methanol không làm giảm hoạt tính enzyme, n-butanol ức chế mạnh nhất ở 20% làm mất hoàn toàn hoạt tính enzyme	Các dung môi đều làm giảm hoạt tính
Anh hưởng chất tẩy rửa	Tween 20, Tween 80, Triton X-100, Triton X-114 đều làm tăng hoạt tính, SDS làm mất hoạt tính	Các chất tẩy rửa đều làm giảm hoạt tính

## Chương 4. THẢO LUẬN

### 4.1. Tinh sạch và nghiên cứu đặc tính của cellulase tự nhiên từ nấm sợi tại Việt Nam

*Peniophora* sp. NDVN01 là chủng nấm đảm phân lập ở Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh đã được tuyển chọn. Môi trường với những thành phần dễ kiếm ở Việt Nam đã được tối ưu. Chủng *Peniophora* sp. NDVN01 sinh tổng hợp cellulase mạnh nhất trong môi trường tối ưu gồm 80% (v/v) dịch chiết khoai tây, 0,5% (w/v) bột giấy, 0,6% (w/v) rom lúa, 0,1% (w/v) CaCO<sub>3</sub> và 0,15 % (w/v) KCl đạt 24,65 U/ml. Những nghiên cứu trước đây đã công bố, năng suất sinh tổng hợp cellulase trong điều kiện tối ưu của một số chủng nấm đảm và vi nấm từ 2,2 - 18,7 U/ml. Chủng nấm rom *V. volvacaе* đạt 18,7 U/ml [41], chủng nấm sò trắng *P. ostreatus* đạt 7,08 U/ml, chủng nấm sò tím *P. sajor-caju* là 2,2 U/ml [103], chủng *A. niger* đạt 3,9 U/ml [55], chủng *Penicillium* DTQ-HK1 đạt 5,09 U/ml [13]. Như vậy, chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có năng suất sinh tổng hợp cellulase mạnh hơn so với một số chủng nấm khác đã công bố. Thành phần môi trường và điều kiện tối ưu có thể được sử dụng để lên men sản xuất chế phẩm cellulase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 trong điều kiện Việt Nam.

Cellulase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 đã được tinh sạch bằng tủa muối ammonium sulphate và phương pháp lọc gel có khối lượng phân tử khoảng 32 kDa. Những nghiên cứu đã công bố cho thấy, cellulase của một số chủng nấm đảm đã được tinh sạch bằng các phương pháp tương tự (tủa bằng ammonium sulphate, sắc ký lọc gel: Sephadex-G75, Sephadex-G100, sắc ký trao đổi ion: DEAE-Sephadex) có trọng lượng phân tử khác nhau 26-42 kDa khi điện di trên gel SDS-PAGE. Cellulase tinh sạch từ *Phanerochaete chrysosporium* có khối lượng 26 kDa [82]. Cellulase tinh sạch từ *Laetiporus sulphureus* var *miniatus* có khối lượng 28 kDa, hoạt tính riêng đạt 29 U/mg, hiệu suất tinh sạch đạt 5% và độ sạch đạt 16 lần [77]. Cellulase tinh sạch từ chủng nấm rom

*Volvarella volvacea* có khối lượng khoảng 42 kDa, hoạt tính riêng đạt 324 U/mg, hiệu suất đạt 1,5% và độ sạch đạt 42 lần [56]. Chao và đtg đã tinh sạch cellulase từ chủng nấm đảm *Periconia byssoidea* thu được enzyme có khối lượng 35 kDa, hoạt tính riêng đạt 44 U/mg, hiệu suất đạt 27% và độ sạch đạt 4,5 lần [42]. Cellulase từ chủng *Aspergillus terreus* được tinh sạch có khối lượng 78 kDa, hoạt tính riêng đạt 60 U/mg, độ sạch đạt 40 lần nhưng hiệu suất tinh sạch chỉ đạt 1,3% [123]. Năm 2010, El-Zawahry và đtg đã tinh sạch được hai cellulase từ chủng nấm *Trichoderma* sp. (shmosaTri) có khối lượng lần lượt là 58 và 34 kDa, độ sạch 3,43 và 3,35 lần, hiệu suất đạt 1,9 và 2,14%, hoạt tính riêng đạt 170,53 và 166,51 U/mg [58]. Năm 2013, Bai và đtg đã tinh sạch cellulase từ chủng nấm *Penicillium simplicissimum* H-11 có khối lượng 33,2 kDa, độ sạch đạt 2,27 lần và hiệu suất tinh sạch đạt 33,2% [31]. Cellulase từ chủng *A. aculeatus* SM-L22 có khối lượng 24 và 39 kDa [45], 36 kDa là khối lượng của cellulase từ chủng *A. oryzae* VTCC-F045 [124]. Chủng *Penicillium* DTQ-HK1 sinh tổng hợp hai loại cellulase có kích thước khoảng 36 và 58 kDa [12]. Như vậy, so với kích thước của các cellulase đã tinh sạch từ các chủng nấm đảm và vi nấm đã công bố, cellulase của *Peniophora* sp. NDVN01 có sự khác biệt lớn. Do đó, cellulase có kích thước 32 kDa của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 lần đầu tiên được tinh sạch và nghiên cứu từ chi *Peniophora* có thể là một cellulase mới.

Cellulase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có tính đặc hiệu cao đối với cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch và CMC; không có tác dụng thủy phân cơ chất xylan, LBG, avicel. Tính đặc hiệu này tương đồng với tính đặc hiệu cơ chất của endoglucanase của một số chủng nấm đảm và vi nấm đã công bố như: năm 2009, Nazir và đtg đã xác định endoglucanase của chủng *A. terreus* có hoạt tính xúc tác mạnh theo thứ tự giảm dần đối với các cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch, xyloglucan, lichenin và CMC [123]. Endoglucanase của chủng *Neisseria sicca* SB có hoạt tính thủy phân mạnh đối với cơ chất CMC và xylan, hoạt tính thủy phân yếu đối với cơ chất cellulose đã tiền xử lý acid nhưng không có hoạt tính đối với cơ chất avicel [108]. Endoglucanase của chủng nấm đảm *L. sulphureus*

*var. miniatus* có hoạt động thủy phân mạnh đối với cơ chất  $\beta$ -glucan lúa mạch, lichenan và CMC, nhưng hoạt động thấp đối với  $\beta$ -glucan tinh thể như cellulose, rom rạ, và avicel [82]. Sản phẩm thủy phân CMC của cellulase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 chủ yếu là cellobiose (G2) và cellotriose (G3), tiếp theo là cellotetrose (G4) và các oligomer lớn hơn G4. Kết quả này tương tự endoglucanase từ *A. terreus* thủy phân cơ chất CMC và  $\beta$ -glucan thu được các sản phẩm chính là cellobiose và cellotriose [123]. Sản phẩm thủy phân của endo-1,4-glucanase từ chủng *Neisseria sicca* SB đối với cơ chất cellulose acetate chủ yếu là G2, G3, G4 và các oligomer lớn hơn G4, không thu được G1 [108]. Trong ba loại cellulase: endoglucanase cho sản phẩm thủy phân là các đường khử (chủ yếu gồm G2, G3, G4) và các oligomer lớn hơn G4, exoglucanase cho sản phẩm thủy phân chủ yếu là cellobiose,  $\beta$ -glucosidase cho sản phẩm thủy phân chủ yếu là glucose [51], [62], [64], [148], [176]. Như vậy, từ kết quả nghiên cứu động học cơ chất, tính đặc hiệu cơ chất và sản phẩm thủy phân cơ chất của enzyme có thể nhận định cellulase tinh sạch từ *Peniophora* sp. NDVN01 là một endoglucanase.

Nhiệt độ phản ứng ảnh hưởng mạnh mẽ đến hoạt tính xúc tác của enzyme, mỗi enzyme có một khoảng nhiệt độ phản ứng thích hợp. Trong giới hạn nhiệt độ chưa làm biến tính enzyme, hoạt tính enzyme tăng khi nhiệt độ tăng. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng quá giới hạn thì hoạt tính của enzyme lại giảm. Nguyên nhân có thể do khi nhiệt độ tăng cao đã làm đứt gãy một số liên kết yếu trong phân tử protein enzyme, làm thay đổi cấu trúc của phân tử này, đặc biệt là cấu trúc trung tâm hoạt động của enzyme, từ đó ảnh hưởng tới hoạt tính xúc tác của enzyme [4]. Endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có nhiệt độ phản ứng tối ưu là 60°C và tương đối bền trong khoảng 30-45°C với hoạt tính tương đối còn lại 62-76% sau 24h xử lý. Nhiệt độ phản ứng tối ưu của một số endoglucanase từ các chủng nấm đảm đã được xác định trong khoảng 50-75°C. Nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của endoglucanase tinh sạch từ *Volvariella volvacea* là 55°C [56], từ *Periconia byssoidea* là 50°C [42],

từ *Flammulina velutipes* là 60°C [101] và từ *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* là 75°C [82]. Endoglucanase tinh sạch từ một số chủng vi nấm có nhiệt độ tối ưu trong khoảng 50-60°C. Nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của enzyme tinh khiết từ *Trichoderma harzianum* CECT 2413 được xác định tại 50°C [53]; từ *Beltraniella portoricensis* là 55°C [183], từ *Aspergillus terreus* là 60°C [123] và từ *Trichoderma* sp. (shmosaTri) tại 50°C [58]. Như vậy, nhiệt độ phản ứng tối ưu của endoglucanase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 tương đương với endoglucanase chủng *Flammulina velutipes* và *Aspergillus terreus*; cao hơn nhiệt độ tối ưu của endoglucanase một số chủng nấm khác đã công bố. Năm 2009, Hong và đtg đã xác định được endoglucanase tinh sạch từ chủng nấm đảm *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* giữ được 50% hoạt tính tại 70°C và 75°C sau 15 giờ và 22 giờ xử lý [82]. Hai endoglucanase từ *Trichoderma* sp. (shmosaTri) có thể chịu được 60 phút ở 50°C mà không mất hoạt động enzyme. CMCCase I và II giữ lại 14,0 và 26,5% hoạt tính tại 70°C sau 90 phút [58]. Endoglucanase tinh sạch từ *Aspergillus terreus* ổn định ở nhiệt độ 40 và 50°C ở pH 3-5, nhưng mất 14, 39, và 31% hoạt tính khi xử lý 1h ở 60°C trong đệm có pH 3, 4 và 5 [123]. Như vậy, endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 bền trong điều kiện nhiệt độ thấp hơn so với những nghiên cứu đã công bố.

Endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có pH phản ứng tối ưu là 4,5 và rất bền trong khoảng pH 4,0-7,0 với hoạt tính tương đối còn lại hơn 90% sau 24h xử lý trong đệm ở nhiệt độ 37°C. Hai endoglucanase từ *Trichoderma* sp. (shmosaTri) bền trong khoảng pH dao động từ 3,0-9,0. CMCCase I vẫn hoạt động ở nhiệt độ phòng sau 24 giờ trên một phạm vi pH rộng (3,0-9,0), trong khi CMCCase II tương đối ổn định trong phạm vi pH 4,0-6,0 [58]. Endoglucanase từ *Aspergillus terreus* hoạt động ổn định ở pH (3,0-5,0) và ở nhiệt độ 40-60°C sau 4 h [123]. Endoglucanase của chủng *A. oryzae* VTCC-F045 bền trong khoảng pH 5,0-6,0 hoạt tính tương đối còn 71% sau 1h xử lý [124]. Endoglucanase của *A. awamori* VTCC-F099 bền trong khoảng pH 4,5-5,5

với hoạt tính tương đối còn lại 80% sau 36h xử lý [127]. Endoglucanase từ *A. terreus* M11 bền ở pH 2-5, còn hơn 60% hoạt tính khi ủ 1 giờ ở 70°C [63]. Như vậy so với các nghiên cứu đã công bố, endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có độ bền pH cao trong khoảng pH khá rộng (4,0-7,0). Đây là tính chất ưu việt để có thể ứng dụng chế phẩm endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 trong những điều kiện khác nhau và thuận lợi trong quá trình tinh sạch, bảo quản enzyme.

Các ion kim loại đóng vai trò quan trọng trong việc định hình cấu trúc không gian của phân tử enzyme hoặc trong một vài trường hợp nó là nhân tố cần thiết trong trung tâm hoạt động của enzyme. Do đó ion kim loại có ảnh hưởng lớn tới khả năng hoạt động của enzyme. Hoạt tính của endoglucanase từ *Peniophora* sp. NDVN01 đã được tăng cường với sự hiện diện của  $\text{Ni}^{2+}$  trong khoảng nồng độ 2-10 mM,  $\text{Ca}^{2+}$  ở nồng độ 2 mM,  $\text{Zn}^{2+}$  ở nồng độ 2 mM,  $\text{Ba}^{2+}$  ở nồng độ 4 mM và mercaptoethanol trong khoảng nồng độ 2-6 mM. Tuy nhiên, hoạt tính cellulase đã hoàn toàn bị ức chế bởi việc bổ sung các ion  $\text{Ag}^+$  và  $\text{Cu}^{2+}$  ở nồng độ 4-10 mM. Sự hiện diện của  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  và EDTA làm giảm các hoạt tính enzyme từ 3-39% ở nồng độ khác nhau từ 2-10 mM. Kết quả này có sự khác biệt so với những nghiên cứu về ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính endoglucanase của các chủng nấm đã công bố như: Hong và đtg (2009) đã nghiên cứu chỉ ra rằng, bổ sung các ion  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  có vai trò tăng cường các hoạt động của endoglucanase từ chủng nấm đảm *L. sulphureus* var. *miniatus*, trong khi các ion  $\text{Mn}^{2+}$  và  $\text{Cu}^{2+}$  ức chế hoạt động của enzyme [82]. Endoglucanase tinh sạch từ *A. terreus* cho thấy hoạt động được tăng cường khi bổ sung  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , DTT và mercaptoethanol, trong khi đó ion  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , SDS và EDTA, giảm các hoạt động của enzyme lần lượt là 26,4; 7,0; 13,6; 8,5; 13,7; và 4,8% [123]. Chen và đtg (2001) đã xác định ion  $\text{Fe}^{2+}$  kích thích hoạt tính của cả 5 loại CMCCase (EG II-1, EG II-2, EG III-1, EG III-2 và EG IV) từ *A. aculeatus* SM-L22 [44]. Hoạt tính endoglucanase từ *A. terreus* DSM 826 tăng 83% và 25% khi ủ với  $\text{Co}^{2+}$  25 mM và  $\text{Zn}^{2+}$  50 mM, nhưng  $\text{Hg}^{2+}$  lại làm giảm 50-71% hoạt tính khi ủ với  $\text{Hg}^{2+}$  25 và 50 mM [61].

EDTA là chất ức chế đặc trưng của enzyme kim loại, thường được dùng để phân biệt enzyme kim loại và các nhóm enzyme khác [4]. Endoglucanase của *Peniophora* sp. NDVN01 bị ức chế từ 29-39% hoạt tính tương đối khi tăng nồng độ EDTA từ 2-10 mM. Do đó, endoglucanase của *Peniophora* sp. NDVN01 có thể là một metalloenzyme. 2-mecaptoethanol là hợp chất được dùng để khử liên kết disulfide và có thể phản ứng như là một chất chống oxy hóa bằng cách cắt các gốc hydroxyl của các chất khác. 2-mecaptoethanol có thể làm biến tính protein bằng khả năng phân cắt liên kết disulfide của chất này [22]. Khi khảo sát ảnh hưởng của 2-mecaptoethanol đối với endoglucanase của *Peniophora* sp. NDVN01 nhận thấy 2-mecaptoethanol ở nồng độ 2-8 mM không làm mất hoạt tính enzyme, ở nồng độ 2 mM làm tăng 15% hoạt tính tương đối của enzyme so với đối chứng. Điều này chứng tỏ endoglucanase của *Peniophora* sp. NDVN01 là một monomer hoặc trong cấu trúc phân tử không có sự hiện diện của liên kết disulfide.

Các dung môi hữu cơ và chất tẩy rửa thường sử dụng để biến tính protein và hòa tan các cơ chất kỵ nước trong phản ứng của enzyme [22]. Endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có độ bền cao đối với dung môi acetone ở nồng độ 1-20%; ethanol và n-butanol ở nồng độ 1-5%; isopropanol ở nồng độ 1-15% với hoạt tính tương đối tăng 21% so với đối chứng ở nồng độ 15% acetone. Những nghiên cứu trước cho thấy, các dung môi hữu cơ methanol, ethanol, acetone, isopropanol và n-butanol đều làm giảm hoạt tính endoglucanase của chủng *A. niger* VTCC-F021. Trong đó, ở nồng độ 10-20% dung môi methanol và ethanol hoạt tính tương đối của enzyme còn lại hơn 86%; Hoạt tính endoglucanase còn giữ được 1/3 so với đối chứng khi bổ sung acetone, butanol và isopropanol 10-20% (v/v) sau 2 giờ ủ ở 37°C [140]. Các dung môi hữu cơ methanol, ethanol, acetone, isopropanol và n-butanol cũng đều làm giảm hoạt tính của endoglucanase của *A. niger* VTCC-F099 và *A. oryzae* VTCC-F045 [124], [127].



Endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có độ bền cao đối với Tween 20, Tween 80, Triton X-100 và triton X-114. Ở nồng độ 1-20% các chất tẩy rửa Tween 20, Tween 80, Triton X-100 đều làm tăng hoạt tính tương đối của enzyme từ 12-40%. Triton X-114 ở nồng độ từ 1-5% làm tăng hoạt tính tương đối của enzyme từ 6-55%, tuy nhiên ở nồng độ 10-20% lại làm giảm hoạt tính tương đối từ 20-41% so với đối chứng. Nhưng nghiên cứu về ảnh hưởng của chất tẩy rửa đến hoạt tính endoglucanase của các chủng nấm đã công bố cho thấy sự khác biệt lớn so với endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01. Năm 2008, Jianmin và đtg khi nghiên cứu ảnh hưởng của chất tẩy rửa đến hoạt tính của endo- $\beta$ -1,4-glucanase từ *A. terreus* đã xác định được enzyme hoàn toàn bị ức chế bởi việc bổ sung Tween 100 và SDS ở nồng độ 1% (w/v) [91]. chất tẩy rửa SDS ở nồng độ 10 mM cũng làm giảm hoạt động của endoglucanase từ chủng *A. terreus* với hoạt tính tương đối chỉ còn 13,7% [123]. Các chất tẩy rửa Tween 20, Tween 80, Triton X-100 và SDS đều làm giảm hoạt tính của endoglucanase từ chủng *A. niger* VTCC-F099, *A. oryzae* VTCC-F045 và *A. niger* VTCC-F021 [124], [127], [140].

Như vậy endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 hoạt động tốt nhất ở điều kiện 60°C, pH 4,5 trong đệm acetate. Enzyme có độ bền nhiệt độ tương đối trong khoảng 30-37°C nhưng rất bền pH trong khoảng 4,0-7,0. Enzyme có thể có cấu trúc monomer và có thể thuộc nhóm metalloenzyme. Endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có độ bền cao với dung môi hữu cơ acetone, isopropanol và các chất tẩy rửa Tween 20, Tween 80, Triton X-100 và triton X-114 (1-5%). Từ sự khác biệt về khối lượng phân tử và tính chất lý hóa của enzyme cho thấy, endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có thể là một enzyme mới có nhiều tính chất ưu việt, có tiềm năng ứng dụng cao trong chăn nuôi và chuyển hóa sinh khối. Chủng *Peniophora* sp. NDVN01 là một nguồn cung cấp gen mã hóa endoglucanase để tạo enzyme tái tổ hợp.

#### 4.2. Nhân dòng và biểu hiện gen *meGlA* từ chủng *Aspergillus niger* VTCC-F021 trong *Pichia pastoris*

Theo nghiên cứu của một số tác giả trước, Zhao và đtg đã sử dụng phương pháp tối ưu hóa codon, gen *syn-eglI* (948 bp, thuộc họ 5 glycosyl hydrolase) bị thay đổi 193 nucleotide, thành phần G+C giảm từ 54% xuống 44% và tương đồng 78,8% so với trình tự gốc (*eglI* từ *A. niger* IFO31125). Sau đó được chèn vào vector pPIC9K và biểu hiện trong *P. pastoris* GS115. Hoạt tính của enzyme tái tổ hợp đạt 3,3 U/ml với cơ chất CMC sau 96 giờ nuôi cấy và 120 U/ml với cơ chất  $\beta$ -glucan, hoạt động tối ưu trong môi trường pH 5 và nhiệt độ tối thích ở 70°C [185].

Năm 2012, Shi và đtg đã biểu hiện thành công gen *Aucell12A* (672 bp) mã hóa endoglucanase không chứa peptide tín hiệu từ *A. usamii* trong *P. pastoris* GSCel2-1. Hoạt tính enzyme tái tổ hợp đạt cao nhất sau 96 giờ nuôi cấy ở 30°C, tiếp 2% methanol cảm ứng. rAucell12A hoạt động tốt nhất ở 60°C và pH 5, bền ở dưới 55°C và pH 3,5-7 [157]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, gen *meGlA* (672 bp) mã hóa endoglucanase không chứa peptide tín hiệu từ *A. niger* VTCC-F021 được biểu hiện thành công trong *P. pastoris* GS115 với hoạt tính enzyme tái tổ hợp đạt cao nhất sau 96h lên men ở 25°C, tiếp 1,2% methanol cảm ứng sau 24h trong môi trường chứa 1,6% peptone; 1,2% cao nấm men; pH ban đầu 5,0.

rmEglA tinh sạch có khối lượng phân tử 32 kDa, với hoạt tính riêng đạt 191,5 U/mg, độ sạch đạt 6,02 lần và hiệu suất thu hồi 50,44%. Hoạt tính riêng và độ sạch cao hơn so với endoglucanase tái tổ hợp có chứa peptide tín hiệu (16,2 U/mg protein và 2,7 lần [141]). Khối lượng phân tử của rmEglA (32 kDa) cao hơn so với kích thước lý thuyết theo trình tự amino acid suy diễn (24,2 kDa) và thấp hơn so với rEglA (33-34 kDa [141]). Sử dụng chương trình NetOGlyc 4.0 Server cho thấy, threonine ở vị trí 219 (T\*) được dự đoán là vị trí O-glycosyl hóa trong trình tự mEglA. Như vậy, quá trình O-glycosyl đã làm tăng kích thước của rmEglA so với lý thuyết và đoạn peptide tín hiệu được cắt bỏ đã làm giảm kích thước của rmEglA so với kích thước của rEglA.

Động học cơ chất CMC và  $\beta$ -glucan được xác định để tính giá trị  $K_m$ ,  $V_{max}$  và  $K_{cat}$ . Giá trị  $K_m$  của rmEglA từ *P. pastoris*/pPmeglA/14 là 5,47 mg/ml CMC và 0,6 mg/ml  $\beta$ -glucan thấp hơn giá trị  $K_m$  của rEglA (10,17 mg CMC/ml và 4,04 mg  $\beta$ -glucan [141]). Điều đó có thể do việc cắt bỏ peptide tín hiệu đã làm thay đổi cấu trúc không gian của protein. Sự thay đổi này dẫn tới làm tăng ái lực của enzyme tái tổ hợp đối với cơ chất CMC và  $\beta$ -glucan. Khi so sánh với enzyme tự nhiên của chủng *A. niger* VTCC-F021, giá trị  $K_m$  của rmEglA thấp hơn giá trị  $K_m$  của endoglucanase dạng tự nhiên (8,582 mg/ml [140]). Điều này chứng tỏ endoglucanase tái tổ hợp cắt bỏ peptide tín hiệu có ái lực với cơ chất CMC cao hơn so với endoglucanase tự nhiên. Endoglucanase tự nhiên cũng là dạng enzyme không có peptide tín hiệu. Vậy sự khác biệt này có thể là do sự khác biệt về quá trình glycosyl hóa trong *A. niger* VTCC-F021 và hệ biểu hiện *P. pastoris* dẫn đến cấu trúc của phân tử protein enzyme có sự thay đổi làm thay đổi ái lực của enzyme đối với cơ chất.

Nhiệt độ và pH tối ưu của rmEglA là 50°C và 3,5. Zhao và đtg (2010) cho biết nhiệt độ và pH tối ưu của endoglucanase từ *A. niger* biểu hiện trong *P. pastoris* là 70°C và pH 5 [185]. Các endoglucanase từ chủng *A. niger* IFO31125 biểu hiện trong *S. cerevisiae* hoạt động tốt nhất ở 70°C và pH 6 [81], từ chủng *A. terreus* có nhiệt độ tối thích ở 60°C và pH 2 [63] và từ *A. aculeatus* biểu hiện trong *A. oryzae* có nhiệt độ tối thích ở 50°C và pH 4,5 [147]. Như vậy, các endoglucanase tái tổ hợp khác nhau có nhiệt độ và pH tối ưu khác nhau. Sự khác nhau đó có thể do trình tự amino acid khác nhau, thuộc các họ khác nhau hoặc cơ chế hoạt động khác nhau giữa các hệ thống biểu hiện.

Việc xác định độ bền nhiệt và pH của enzyme có ý nghĩa quan trọng trong quá trình thu nhận chế phẩm enzyme, tinh sạch và nghiên cứu enzyme. Đồng thời, giúp cho việc sử dụng chế phẩm enzyme đạt hiệu quả cao hơn. rmEglA bền ở 30-37°C và pH 4,0-7,0. Hoạt tính rmEglA còn 88% sau 8 giờ ủ ở 30-37°C. So sánh với độ bền nhiệt độ của endoglucanase tái tổ hợp có chứa peptide tín hiệu

(rEglA) thì rmEglA có cùng khoảng nhiệt độ bền (30-37°C) nhưng khả năng suy giảm hoạt tính chậm hơn (88% so với 40-60%). Theo nghiên cứu của Zhao và đtg (2010) thì endoglucanase từ *A. niger* biểu hiện trong *P. pastoris* còn hơn 95% hoạt tính sau khi ủ 30 phút ở 60°C và hơn 90% ở 70°C, nhưng chỉ còn 20% hoạt tính khi ủ ở 80°C sau 30 phút [185], endoglucanase tái tổ hợp từ *A. terreus* giữ được hơn 60% hoạt tính khi ủ ở 70°C trong 1 giờ [63]. Eng1 (endoglucanase 1) từ *A. niger* biểu hiện trong *S. cerevisiae* vẫn giữ được 56% hoạt tính sau 1 giờ ủ ở 80°C [81]. Độ bền nhiệt của endoglucanase từ *A. aculeatus* biểu hiện trong *A. oryzae* là dưới 45°C [147].

Endoglucanase tái tổ hợp không chứa peptide tín hiệu có độ bền pH cao, sau 10h xử lý trong các đệm có pH 4,0-8,0 hoạt tính tương đối của enzyme còn lại 77%. So với endoglucanase tái tổ hợp có chứa peptide tín hiệu (rEglA) thì rmEglA có độ bền pH cao hơn hẳn, hoạt tính tương đối của rEglA còn 40-60% sau 8h ủ ở trong đệm pH 3,5-4,5 [141]. Sự khác biệt này có thể là do việc cắt bỏ peptide tín hiệu đã làm giảm 1 amino acid có tính bazơ mạnh (K, R), giảm 11 amino acid kỵ nước hoặc không phân cực (A, I, L, F, W, V, M, G, P) và giảm 3 amino acid phân cực (N, C, Q, S, T, Y) của rmEglA so với rEglA. Enzyme rmEglA có pI giảm 0,129 so với rEglA. Theo những nghiên cứu trước đã công bố, endoglucanase tái tổ hợp từ *A. terreus* bền trong dải pH từ 2-5 [63]. Eng1 (endoglucanase 1) từ *A. niger* biểu hiện trong *S. cerevisiae* bền trong dải pH từ 3-10 [81]. Độ bền pH của endoglucanase từ *A. aculeatus* biểu hiện trong *A. oryzae* trong khoảng 2,0-9,0 [147]. Như vậy, sự khác biệt về độ bền pH của rmEglA so với rEglA có thể là do việc cắt bỏ peptide tín hiệu làm thay đổi thành phần amino acid.

rmEglA có độ bền dung môi hữu cơ cao hơn so với rEglA. Trong các dung môi khảo sát, methanol không làm giảm hoạt tính enzyme, các dung môi khác (ethanol, isopropanol, acetone) ở nồng độ 5-10% có vai trò hoạt hóa enzyme, n-butanol ức chế mạnh nhất ở 20% làm mất hoàn toàn hoạt tính của rmEglA.

Trong khi các dung môi tương tự đều làm giảm hoạt tính tương đối của rEglA với hoạt tính tương đối còn lại 70-80% [141]. rmEglA rất bền với chất tẩy rửa (Tween 20, Tween 80, Triton X-100, Triton X-114) so với rEglA. Ở nồng độ khảo sát từ 0,5-2,0%, các chất tẩy rửa Tween 20, Tween 80, Triton X-100, Triton X-114 đều làm tăng hoạt tính enzyme từ 14,9-56,3% so với đối chứng. Trong khi ở cùng nồng độ, các dung môi trên đều làm giảm hoạt tính của endoglucanase vẫn chứa peptide tín hiệu (rEglA) [141]. Năm 2008, Jianmin và đtg khi nghiên cứu ảnh hưởng của chất tẩy rửa đến hoạt tính của endo- $\beta$ -1,4-glucanase từ *A. terreus* đã xác định được enzyme hoàn toàn bị ức chế bởi việc bổ sung Tween 100 và SDS ở nồng độ 1% (w/v) [91]. chất tẩy rửa SDS ở nồng độ 10 mM cũng làm giảm hoạt động của endoglucanase từ chủng *A. terreus* với hoạt tính tương đối chỉ còn 13,7% [123]. Các chất tẩy rửa Tween 20, Tween 80, Triton X-100 và SDS đều làm giảm hoạt tính của endoglucanase từ chủng *A. niger* VTCC-F099, *A. oryzae* VTCC-F045 và *A. niger* VTCC-F021 [124], [127], [140]. Như vậy, endoglucanase tái tổ hợp cắt bỏ peptide tín hiệu rất bền với chất tẩy rửa Tween 20, Tween 80, Triton X-100, Triton X-114.

Phân tích trình tự amino acid suy diễn của rmEglA bằng phần mềm DNASTAR cho thấy thành phần amino acid của rmEglA có 9 amino acid mang tính bazơ mạnh (K, R), 2 amino acid mang tính bazơ yếu (H), 19 amino acid mang tính acid mạnh (D, E), 97 amino acid kỵ nước hoặc không phân cực (A, I, L, F, W, V, M, G, P) và 96 amino acid phân cực (N, C, Q, S, T, Y). Enzyme rmEglA có khối lượng tính toán theo lý thuyết khoảng 24,24 kDa với pI bằng 4,24. Khi so sánh với endoglucanase tái tổ hợp có chứa peptide tín hiệu (rEglA) [9], [141], thành phần amino acid của rmEglA có sự thay đổi: giảm 1 amino acid có tính bazơ mạnh (K, R), giảm 11 amino acid kỵ nước hoặc không phân cực (A, I, L, F, W, V, M, G, P) và giảm 3 amino acid phân cực (N, C, Q, S, T, Y). Enzyme rmEglA có khối lượng giảm khoảng 1,5 kDa và pI giảm 0,129 so với rEglA. Như vậy, sự khác biệt về tính chất của rmEglA và rEglA có thể là do sự thay đổi về thành phần amino acid do việc cắt bỏ peptide tín hiệu.

## KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### Kết luận

1. Chủng nấm đảm *Peniophora* sp. NDVN01 có khả năng sinh tổng hợp cellulase cao đã được tuyển chọn từ 42 chủng nấm sợi tại Việt Nam. Đoạn gen mã hóa rRNA phân lập từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 đã được đăng ký trình tự trên GenBank với mã số JF925333.
2. Thành phần môi trường lên men sinh tổng hợp cellulase phù hợp trong điều kiện Việt Nam đã được tối ưu gồm: 80% (v/v) dịch chiết khoai tây, 0,6% rơm lúa, 0,5% (w/v) bột giấy làm cơ chất cảm ứng, 0,2% (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,15% KCl và 0,1%  $\text{CaCO}_3$ . Điều kiện lên men thích hợp ở 28°C, pH ban đầu của môi trường bằng 7,0, thời gian lên men 120 giờ, lắc 200 vòng/phút.
3. Endoglucanase tinh sạch từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có khối lượng phân tử khoảng 32 kDa, hoạt tính riêng đạt 169,42 U/mg, độ sạch đạt 2,34 lần. Enzyme hoạt động tối ưu ở nhiệt độ 60°C, pH 4,5, bền ở 30-45°C và pH 4,0-7,0. Enzyme bền đối với dung môi acetone ở nồng độ 1-20%; ethanol và n-butanol ở nồng độ 1-5%; isopropanol ở nồng độ 1-15% và độ bền cao đối với chất tẩy rửa Tween 20, Tween 80, Triton X-100 và triton X-114.
4. Gen *meglA* có kích thước 672 nucleotide mã hóa endoglucanase A gồm 223 amino acid không chứa peptide tín hiệu từ chủng *A. niger* VTCC-F021 được biểu hiện thành công trong *P. pastoris* GS115. Thành phần môi trường lên men sinh tổng hợp endoglucanase A tái tổ hợp phù hợp với chủng *P. pastoris* GS115/pP*meglA*/14 gồm: 1,6% peptone; 1,2% cao nấm men; 1,2% methanol cảm ứng sau 24h; pH ban đầu 5,0; nhiệt độ lên men 25°C và thời gian lên men 96h, lắc 200 vòng/phút.
5. rmEglA tinh sạch có kích thước khoảng 32 kDa, hoạt tính riêng đạt 191,5 U/mg, độ sạch đạt 6,02 lần và hiệu suất thu hồi 50,44%. Enzyme hoạt động tối ưu ở nhiệt độ 50°C, pH 3,5, bền ở 30-37°C và rất bền trong khoảng pH

3,0-8,0. Enzyme có độ bền cao với một số chất tẩy rửa Tween 20, Tween 80, Triton X-100 và triton X-114.

### **Đề nghị**

Nghiên cứu lên men fed-batch chủng nấm men tái tổ hợp *P. pastoris* GS115/pPmeglA/14 biểu hiện endoglucanase A năng suất cao. Xây dựng quy trình sản xuất endoglucanase A tái tổ hợp và thử nghiệm lên men quy mô lớn sản xuất tạo chế phẩm enzyme bổ sung vào thức ăn chăn nuôi và chuyển hóa sinh khối.

## CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Dinh Kha Trinh, Dinh Thi Quyen, Thi Tuyen Do, Thi Thu Huong Nguyen, Ngoc Minh Nghiem, 2013. Optimization of culture conditions and medium components for Carboxymethyl Cellulase (CMCase) production by a novel basidiomycete strain *Peniophora* sp. NDVN01, *Iranian Journal of Biotechnology*, 11(4): pp. 251-259. (SCI-E)
2. Dinh Kha Trinh, Dinh Thi Quyen, Thi Tuyen Do, Ngoc Minh Nghiem, 2013. Purification and characterization of a novel detergent and organic solvent resistant endo-beta-1,4-glucanase from a newly isolated basidiomycete *Peniophora* sp. NDVN01, *Turkish Journal of Biology*, 37: pp. 377-384. (SCI-E)
3. Trình Đình Khá, Quyền Đình Thi, Nghiêm Ngọc Minh, 2012. Nhân dòng và phân tích trình tự gen 28S rRNA của chủng nấm đảm sinh tổng hợp cellulase. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Thái Nguyên*, Tập 96, Số 8: tr. 115-118.
4. Trình Đình Kha, Quyen Dinh Thi, Nghiem Ngoc Minh, 2012. Optimization of carboxymethyl cellulase production by Basidiomycete *Peniophora* sp. NDVN01 under solid state fermentation. Proceedings The Second Academic conference on Natural Science for Master and PhD Students from Cambodia - Laos - Malaysia – Vietnam, Publishing House for Science and Technology: pp. 445-450
5. Trình Đình Khá, Quyền Đình Thi, Nghiêm Ngọc Minh, 2011. Tối ưu sinh tổng hợp carboxymethyl cellulase từ chủng nấm đảm *Peniophora* sp. NDVN01 ở các điều kiện lên men rắn. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, Tập 9, Số 4: tr. 845-852.

### Trình tự gen đã đăng ký trên GenBank

Quyen, D. T., Trình, D. K. and Nghiem, N. M., 2011. *Peniophora* sp. NDVN01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence (GenBank: JF925333).



**TÀI LIỆU THAM KHẢO****Tiếng Việt**

1. Lý Kim Bảng, Lê Gia Hy, Tăng Thị Chính, Phan Tuyết Minh, Lê Thanh Xuân, Trần Quang Huy, Đào Ngọc Quang, Phạm Thị Cúc (1999), "Sử dụng vi sinh vật có hoạt tính phân giải cellulose cao để nâng cao chất lượng phân hủy rác thải sinh hoạt và nông nghiệp", *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 546-551.
2. Chu Thị Thanh Bình, Nguyễn Lâm Dũng, Lương Thùy Dương (2002), "Phân lập, tuyển chọn và nghiên cứu các chủng nấm men có khả năng phân giải cellulose nhằm ứng dụng trong xử lý bã thải hoa quả làm thức ăn chăn nuôi", *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng*, 2, tr. 34-36.
3. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2006), "Danh mục thức ăn chăn nuôi, nguyên liệu thức ăn chăn nuôi được nhập khẩu vào Việt Nam", Số 01/2006/QĐ-BNN.
4. Phạm Thị Trân Châu, Phan Tuấn Nghĩa (2006), *Công nghệ sinh học tập 3 - Enzyme và ứng dụng*, Nxb Giáo dục, Hà Nội.
5. Tăng Thị Chính, Lý Kim Bảng, Lê Gia Hy (1999), "Nghiên cứu sản xuất cellulase của một số chủng vi sinh vật ưa nhiệt phân lập từ bể ủ rác thải", *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 790-797.
6. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đăng Đức, Đặng Hồng Miên, Nguyễn Vĩnh Phước, Nguyễn Đình Quyển, Nguyễn Phùng Tiến, Phạm Văn Ty (1976), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật tập 2 và 3*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
7. Glick B. R., Pasternak J. J., (Nguyễn Mộng Hùng - Chủ biên dịch) (2007), *Công nghệ sinh học phân tử - Nguyên lý và ứng dụng của DNA tái tổ hợp*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

8. Đặng Minh Hằng (1999), "Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của một số chủng vi sinh vật để xử lý rác", *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 333-339.
9. Phạm Thị Hòa (2012), *Phân lập, biểu hiện gen mã hóa endo- $\beta$ -1,4-glucanase từ *Aspergillus niger* và nghiên cứu tính chất của enzyme tái tổ hợp*, Luận án tiến sĩ Sinh học, Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội.
10. Nguyễn Lan Hương, Hoàng Đình Hòa (2003), "Hệ vi khuẩn có hoạt tính thủy phân tinh bột, protein, cellulose hoặc dầu ô liu trong quá trình phân hủy chất thải hữu cơ", *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 288-291.
11. Trịnh Đình Khả, Nguyễn Thị Huyền (2012), "Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sản xuất cellulase của chủng nấm sò *Pleurotus sajor-caju* trong điều kiện lên men xốp", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Thái Nguyên*, 90, tr. 31-36.
12. Trịnh Đình Khả, Quyền Đình Thi, Nguyễn Sỹ Lê Thanh (2007), "Tinh sạch sơ bộ và đánh giá tính chất hoá lý của cellulase từ chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 5, tr. 47-54.
13. Trịnh Đình Khả, Quyền Đình Thi, Nguyễn Sỹ Lê Thanh (2007), "Tuyển chọn và nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 5, tr. 355-362.
14. Hoàng Quốc Khánh, Ngô Đức Duy, Nguyễn Duy Long (2003), "Khả năng sinh tổng hợp và đặc điểm cellulase của *Aspergillus niger* RNNL-363", *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 304-307.
15. Phạm Thị Ngọc Lan, Phạm Thị Hòa, Lý Kim Bảng (1999), "Tuyển chọn một số chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose từ mùn rác", *Báo*

- cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Hà Nội, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, tr. 177-182.
16. Nguyễn Đức Lượng, Đặng Vũ Bích Hạnh (1999), "Khả năng sinh tổng hợp cellulase của *Actinomyces griseus*", *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 804-809.
  17. Trần Đình Mẫn, Nguyễn Quốc Việt, Nguyễn Kim Thoa, Bùi Thanh Mai (2010), "Tách dòng và tái tổ hợp gen mã hóa cho exoglucanase từ *Cellulomonas fimi* với hệ thống biểu hiện bằng phương pháp megaprimer", *Báo cáo khoa học, Hội nghị khoa học kỷ niệm 35 năm Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, Nxb Khoa học Tự nhiên và Công nghệ quốc gia, Hà Nội, tr. 192-197.
  18. Chu Văn Mẫn (2001), *Ứng dụng tin học trong sinh học*, Nxb Đại học Quốc gia, Hà Nội.
  19. Phan Thị Tuyết Minh, Nguyễn Ngọc An, Nguyễn Quốc Việt, Trần Đình Mẫn (2010), "Xác định các tính chất của carboxymethyl cellulase (CMCase) được tạo ra từ chủng *Bacillus* sp. VLSH08", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 8, tr. 865-870.
  20. Trần Thanh Phong, Hoàng Quốc Khánh, Võ Thị Hạnh, Lê Bích Phượng, Nguyễn Duy Long, Lê Tấn Hưng, Trương Thị Hồng Vân (2007), "Thu nhận enzyme cellulase của *Trichoderma reesei* trên môi trường bán rắn", *Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ - ĐHQG Tp. HCM*, 10, tr. 17-24.
  21. Lê Hồng Phú, Nguyễn Đức Lượng, Đỗ Đại Nghĩa (2008), "Nghiên cứu chế tạo chế phẩm Biocoffee-1 từ *Aspergillus niger* và ứng dụng lên men các loại cà phê", *Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ - ĐHQG Tp. HCM*, 11, tr. 53-60.
  22. Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Xuân Sâm (2004), *Công nghệ enzyme*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
  23. Hồ Sĩ Tráng (2006), *Cơ sở hoá học gỗ và Xenluloza - tập 2*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

24. Lê Ngọc Tú, La Văn Chúc, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Lâm Dũng (1982), *Enzyme vi sinh vật, tập I, II*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

### Tiếng Anh

25. Acharya P. B., Acharya D. K., Modi H. A. (2008), "Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate", *Afr. J. Biotechnol.*, 7, pp. 4147-4152.
26. Akiba S., Kimura Y., Yamamoto K., Kumagai H. (1995), "Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*", *J. Ferment. Bioeng.*, 79, pp. 125-130.
27. Akiba S., Yamamoto K., Kumagai H. (1995), "Effects of size of carbohydrate chain on protease digestion of *Aspergillus niger* endo-beta-1,4-glucanase", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, pp. 1048-1051.
28. Alinda A. H., Ester D., Marc M., Peter J. I. V., Leo H. G. (2002), "EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan", *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, pp. 1556-1560.
29. Azzaz H. H., Murad H. A., Kholif A. M., Hanfy M. A., Abdel Gawad M. H. (2012), "Optimization of culture conditions affecting fungal cellulase production", *Res. J. Microbiol.*, 7, pp. 23-31.
30. Bagnara C., Toci R., Gaudin C., Bélaïch J. P. (1985), "Isolation and characterization of a cellulolytic microorganism, *Cellulomonas fermentans*, sp. nov", *J. Syst. Bacteriol.*, 35, pp. 502-507.
31. Bai H., Wang H., Sun J., Irfan M., Han M., Huang Y., Han X., Yang Q. (2013), "Purification and characterization of beta 1,4-glucanases from *Penicillium simplicissimum* H-11", *BioResour.*, 8, pp. 3657-3671.
32. Bajaj B. K., Sharma M., Rao R. S. (2014), "Agricultural residues for production of cellulase from *Sporotrichum thermophile* LAR5 and its application for saccharification of rice straw", *J. Mater. Environ.*, 5, pp. 1454-1460.

33. Bakare M. K., Adewale I. O., Ajayi A., Shonukan O. O. (2005), "Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*", *Afr. J. Biotechnol.*, 4, pp. 898-904.
34. Bannwarth M., Bastian S., Heckmann-Pohl D., Giffhorn F., Schulz G. E. (2004), "Crystal structure of pyranose 2-oxidase from the White-Rot fungus *Peniophora* sp." *Biochem.*, 43, pp. 11683-11690.
35. Bannwarth M., Bastian S., Heckmann-Pohl D., Giffhorn F., Schulz G. E. (2005), "Engineering of pyranose 2-oxidase from *Peniophora gigantea* towards improved thermostability and catalytic efficiency", *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, pp. 654–663.
36. Bentley O. G., Johnson R. R., Hershberger T. V., Cline J. H., Moxon A. L. (1955), "Cellulolytic factor activity of certain short-chain fatty acids for rumen micro-organism *in vitro*", *J. Nutr.*, 57, pp. 389-400.
37. Bergquist P. L., Gibbs M. D., Morris D. D., Teo V. S. J., Saul D. J., Morgan H. W. (1999), "Molecular diversity of thermophilic cellulolytic and hemicellulolytic bacteria", *FEMS Microbiol. Ecol.*, 28, pp. 99-110.
38. Bonugli-santos R. C., Durrant L. R., Sette L. D. (2010), "Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes", *Fungal Biol.*, 114, pp. 863-872.
39. Bradford M. M. (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, 72, pp. 248-254.
40. Campillo E. D. (1999), "Multiple endo-1,4-b-D-glucanase (cellulase) genes in *Arabidopsis*", *Curr. Top. Dev. Biol.*, 46, pp. 39-61.
41. Chang S. C., Steinkraus K. H. (1982), "Lignocellulolytic enzymes produced by *Volvariella volvacea*, the edible straw Mushroom", *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, pp. 440-446.

42. Chao L., Yang J., Sun H., Huang X., Wang R., Zhang K. Q. (2007), "Purification and characterization of b-1,3-glucanase from the novel mycoparasite *Periconia byssoides*", *Biotechnol. Lett.*, 29, pp. 617–622.
43. Chen D. C., Wang B. D., Chou P. Y., Kuo T. T. (2000), "Asparagine as nitrogen source for improving the secretion of mouse  $\alpha$ -amylase in the *Saccharomyces cerevisiae* protease A deficient strains", *Yeast*, 16, pp. 207-217.
44. Chen G., Du J., Zhuang L., Gao P. (2001), "Purification and properties of endoglucanases from *Aspergillus aculeatus* SM-L22", *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 41, pp. 469-474.
45. Chen G., Du J., Zhuang L., Gao P. (2001), "Purification and properties of endoglucanases from *Aspergillus aculeatus* SM-L22", *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 41, pp. 469-474.
46. Cheryan M. S., Shah P. M., Witjitra K. (1997), "Production of acetic acid by *Clostridium thermoaceticum*", *Adv. Appl. Microbiol.*, 43, pp. 1-33.
47. Choi J. H., Lee S. Y. (2004), "Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *E. coli*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, pp. 625-635.
48. Coleman A. W., Mai J. C. (1997), "Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness", *J. Mol. Evol.*, 45, pp. 168-177.
49. Cooke M. C. (1879), "On Peniophora", *Grevillea*, 8, pp. 17-21.
50. Coral G., Burhan A., Ünaldi M. N., Güvenmez H. (2002), "Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain", *Turk. J. Biol.*, 26, pp. 209-213.
51. Coughlan M. P., Folan M. A. (1979), "Cellulose and cellulase: food for thought, food for future", *Int. J. Biochem.*, 10, pp. 103-168.
52. Dahot M. U., Noomrio M. H. (1996), "Microbial production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* using wheat straw as a carbon source", *J. Islamic Acad. Sci.*, 9, pp. 119-124.

53. de la Cruz J., Antonio L. (1999), "Purification and properties of a basic endo-b-1,6-glucanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*", *Eur. J. Biochem.*, 265, pp. 145-151.
54. Deswal D., Khasa Y. P., Kuhad R. C. (2011), "Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation", *Bioresour. Technol.*, 102, pp. 6065-6072.
55. Devi M. C., Kumar M. S. (2012), "Production, optimization and partial purification of cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes", *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 2, pp. 120-128.
56. Ding S. J., Wei G., Buswel J. A. (2001), "Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea* purification, characterization, cloning and expression", *Eur. J. Biochem.*, 268, pp. 5687–5695.
57. Dürre P. (1998), "New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, pp. 639-648.
58. El-Zawahry Y. A., El-Mougith A. A., El-Saadani M. A., Hafez E. E., Soliman S. A. (2010), "Partial purification and characterization of two endo- $\beta$ -1, 4-glucanase from *Trichoderma* sp. (Shmosa tri)", *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 4, pp. 4559-4568.
59. Elisashvili V., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Khardziani T., Agathos S. N. (2009), "Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia", *world J. Microbiol. Biotechnol.*, 25, pp. 331-339.
60. Elshafei A. M., Hassan M. M., Haroun B. M., Abdel-Fatah O. M., Atta H. M., Othman A. M. (2009), "Purification and properties of an endoglucanase of *Aspergillus terreus* DSM 826", *J. Basic Microbiol.*, 49, pp. 426-432.
61. Elshafei A. M., Mohamed M. H., Bakry M. H., Osama M. A., Housam M. A., Abdelmageed M. O. (2009), "Purification and properties of an

- endoglucanase of *Aspergillus terreus* DSM 826", *J. Basic Microbiol.*, 49, pp. 426-432.
62. Eriksen J., Goksoyr J. (1977), "Cellulases from *Chaetomium thermophile* var. *dissitum*", *Eur. J. Biochem.*, 77, pp. 445-450.
63. Gao J., Weng H., Xi Y., Zhu D., Han S. (2008), "Purification and characterization of a novel endo-b-1,4-glucanase from the thermoacidophilic *Aspergillus terreus*", *Biotechnol. Lett.*, 30, pp. 323–327.
64. Gascoigne J., Gascoigne M. M. (1960), "Biological degradation of cellulose", *Butterwozch and Co. Ltd, London*, pp. 17-21.
65. Gerber N. N., Shaw S. A., Lechevalier H. A. (1980), "Structures and antimicrobial activity of Peniophorin A and B, two polyacetylenic antibiotics from *Peniophora affinis* Burt", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 17, pp. 636-641.
66. Ghangas G. S., Wilson D. B. (1987), "Expression of a thermomonospora fusca cellulase gene in *Streptomyces lividans* and *Bacillus subtilis*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, pp. 1470-1475.
67. Gokhale D. V., Patil S. G., Bastawde K. B. (1991), "Optimization of cellulase production by *Asperginus niger* NCIM 1207", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 30, pp. 99-109.
68. Gordon R. E., Haynes W. C., Pang C. H. N. (1973), *The genus Bacillus*, Agriculture handbook N° 427, USDA, Washington DC.
69. Gutierrez-Nava A., Herrera-Herrera A., Mayorga-Reyes L., Salgado L. M., Ponce-Noyola T. (2003), "Expression and characterization of the *celcflB* gene from *Cellulomonas flavigena* encoding an endo-beta-1,4-glucanase", *Med. Nov.*, 47, pp. 359-363.
70. Gyalai-Korpos M., Nagy G., Mareczky Z., Schuster A., Réczey K., Schmoll M. (2010), "Relevance of the light signaling machinery for cellulase expression in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*)", *BMC Res. Notes*, 3, pp. 330-340.



71. Hall J., Hirst B. H., Hazlewood G. P., Gilbert H. J. (1992), "The use of chimeric gene constructs to express a bacterial endoglucanase in mammalian cells", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1130, pp. 259-266.
72. Hallenbegg N., Larsson E., Mahlapuu M. (1996), "Phylogenetic studies in *Peniophora*", *Mycol. Res.*, 100, pp. 179-187.
73. Halliwell G. (1965), "Hydrolysis of fibrous cotton and reprecipitated cellulose by cellulolytic enzymes from soil microorganisms", *Biochem. J.*, 95, pp. 270-275.
74. Hasper A. A., Dekkers E., van Mil M., van de Vondervoort P. J., de Graaff L. H. (2002), "EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan", *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, pp. 1556-1560.
75. Heimo H., Palmu K., Suominen I. (1997), "Expression in *Pichia pastoris* and purification of *Aspergillus awamori* glucoamylase catalytic domain", *Prot. Exp. Pur.*, 10, pp. 70-79.
76. Henning J., Morkeberg A., Krogh K. B. R., Olsson L. (2005), "Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis", *Enzyme Microb. Technol.*, 36, pp. 42-48.
77. Henriksson G., Nutt A., Henriksson H., Pettersson B., Stahlberg J., Johansson G., Pettersson G. (1999), "Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase", *Eur. J. Biochem.*, 259, pp. 88-95.
78. Higgins D. R., Cregg J. M. (1998), *Pichia Protocols*, in *Methods in Molecular Biology*, Editor: Walker J.M., ed. Humana Press, Totowa, NJ.
79. Highley T. L. (1973), "Influence of source on cellulase activity of white-rot and brown-rot fungi", *Wood and Fiber Sci.*, 5, pp. 50-58.
80. Hinrikson H. P., Hurst S. F., Lott T. J., Warnock D. W., Morrison C. J. (2005), "Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets

- for molecular identification of medically important *Aspergillus* species", *J. Clin. Microbiol.*, 45, pp. 2092–2103.
81. Hong J., Tamaki H., Akiba S., Yamamoto K., Kumagai H. (2001), "Cloning of a gene encoding a highly stable endo-beta-1,4-glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast", *J. Biosci. Bioeng.*, 92, pp. 434-441.
  82. Hong M. R., Kim Y. S., Joo A. R., Lee J. K., Kim Y. S., Oh D. K. (2009), "Purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -1,3-1,4-Glucanase from *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*", *J. Microbiol. Biotechnol.*, 19, pp. 818–822.
  83. Howard R., Abotsi E., Rensburg E., Howard S. (2003), "lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production", *African J. Biotechnol.*, 2, pp. 602-619.
  84. Hurst P. L., Nelson J., Sullivan P. A., Shepherd M. G. (1977), "Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*", *Biochem. J. Gr. Br.*, 165, pp. 33-41.
  85. Hurst P. L., Sullivan P. A. (1978), "Substrate specificity and wode of action of cellulase from *Aspergillus niger*", *Biochem. J.*, 169, pp. 389-396.
  86. Invitrogen (2004), *ProBond purification system for purification of polyhistidine-containing recombinant proteins*, Invitrogen Corporation, USA.
  87. Ja'afaru M. I., Fagade O. E. (2010), "Optimization studies on cellulase enzyme production by an isolated strain of *Aspergillus niger* YL128 ", *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4, pp. 2635-2639.
  88. Jahic M., Gustavsson M., Jansen A. K., Martinelle M., Enfors S. O. (2003), "Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes", *J Biotechnol.*, 102,, pp. 45-53.
  89. Jenga W. Y., Wang N. C., Lin M. H., Lin C. T., Liaw Y. C., Chang W. J., Liu C. I., Liang P. H., Wang A. H. J. (2011), "Structural and functional analysis of three b-glucosidases from bacterium *Clostridium*

- cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*", *J. Struct. Biol.*, 173, pp. 46-56.
90. Jiang X. R., Zhou X. Y., Jiang W. Y., Gao X. R., Li W. L. (2011), "Expressions of thermostable bacterial cellulases in tobacco plant", *Biotechnol. Lett.*, 33, pp. 1797-803.
  91. Jianmin G., Haibo W., Yu X., Daheng Z., Shaoyin H. (2008), "Purification and characterization of a novel endo-b-1,4-glucanase from the thermoacidophilic *Aspergillus terreus*", *Biotechnol. Lett.*, 30, pp. 323-327.
  92. Joo A. R., Marimuthu J., Lee K. M., Sim W. I., Kim J. S., Kim I. W., Kim Y. S., Oh D. K., Paramasamy G., Lee J. K. (2009), "Purification and characterization of a  $\beta$ -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Fomitopsis pinicola*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 83, pp. 285–294.
  93. Jordaan J. (2005), *Isolation and characterization of a novel thermostable and catalytically efficient laccase from Peniophora sp. strain UD4*, Degree Doctor of Philosophy, Rhodes University, South Africa.
  94. Juwaied A. A., Al-amiery A. A. H., Abdumuniem Z., Anaam U. (2011), "Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* using sugar cane waste", *J. Yeast Fungal Res.*, 2, pp. 19-23.
  95. Kachlishvili E., Penninckx M. J., Tsiklauri N., Elisashvili V. (2006), "Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 22, pp. 391-397.
  96. Kang H. A., Choi E. S., Hong W. K., Kim J. Y., Ko S. M., Sohn J. H. (2000), "Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, pp. 575-582.
  97. Kapoor S., Khanna P. K., Katyal P. (2009), "Effect of supplementation of Wheat straw on growth and lignocellulolytic enzyme potential of *Lentinus edodes*", *WJAS*, 5, pp. 328-331.

98. Karisson J., Saloheimo M., Siika-aho M., Tenkanen M., Penttilä M., Tjerneld F. (2001), "Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*", *Eur. J. Biochem.*, 268, pp. 6498-6507.
99. Karmakar M., Ray R. R. (2011), "Production of extra cellular endoglucanase by hyper productive pellets of *Rhizopus oryzae*", *World J. Sci. Technol.*, 1, pp. 26-32.
100. Kashima Y., Udaka S. (2004), "High-level production of hyperthermophilic cellulase in the *Bacillus brevis* expression and secretion system", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, pp. 235-237.
101. Kenji F., Michika H., Sadaki A., Ikichi A., Mitsuo S., Tadasu U. (2008), "Purification and characterization of a novel exo-b-1,3-1,6-glucanase from the fruiting body of the edible Mushroom enoki (*Flammulina velutipes*)", *bisci. Biotechnol. Biochem.*, 72, pp. 3107-3113.
102. Khademi S., Zhang D., Swanson S. M., Wartenberg A., Witte K., Meyer E. F. (2002), "Determination of the structure of an endoglucanase from *Aspergillus niger* and its mode of inhibition by palladium chloride", *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 58, pp. 660-667.
103. Khalil M. I., Hoque M. M., Basunia M. A., Alam N., Khan M. A. (2011), "Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass", *Turk. J Agric. For.*, 35, pp. 333-341.
104. Kim B. H. (1987), "Carbohydrate catabolism in cellulolytic strains of *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, and *Nocardia*", *Korean J. Microbiol.*, 25, pp. 28-33.
105. Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W., Stalpers J. A. (2008), *Dictionary of the Fungi (10th ed.)*, Wallingford, UK: CABI.
106. Kitamoto N., Go M., Shibayama T., Kimura T., Kito Y., Ohmiya K., Tsukagoshi N. (1996), "Molecular cloning, purification and

- characterization of two endo-1,4-beta-glucanases from *Aspergillus oryzae* KBN616", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, pp. 538-544.
107. Kuhad R. C., Gupta R., Singh A. (2011), "Microbial cellulases and their Industrial applications", *Enzyme res.*, 2011, Doi: 10.4061/2011/280696, 10 pages.
  108. Kuniyoshi M., Takashi O., Tatsuhiko O., Kiyofumi S. (2002), "Purification and characterization of an endo-1,4-b-glucanase from *Neisseria sicca* SB that hydrolyzes b-1,4 linkages in cellulose acetate", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, pp. 508-515.
  109. Laemmli U. K. (1970), "Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>", *Nature*, 227, pp. 680-685.
  110. Lassen S. F., Breinholt J., Østergaard P. R., Brugger R., Bischoff A., Wyss M., Fuglsang C. C. (2001), "Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, pp. 4701–4707.
  111. Lee R. L., Weimer P. J., Vanzyl W. H., Pretorius I. S. (2002), "Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, pp. 506-577.
  112. Li P., Anumanthan A., Gao X. G., Ilangovan K., Suzara V. V., Düzgüneş N., Renugopalakrishnan V. (2007), "Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 142, pp. 105-124.
  113. Li P., Gao X. G., Arellano R. O., Renugopalakrishnan V. (2001), "Glycosylated and phosphorylated proteins expression in yeast and oocytes of *Xenopus*: prospects and challenges-relevance to expression of thermostable proteins", *Protein Expr. Purif.*, 22, pp. 369-380.
  114. Li X. H., Zhang P., Wang M. X., Zhou F., Malik F. A., Yang H. J., Bhaskar R., Hu J. B., Sun C. G., Miao Y. G. (2010), "Expression of *Trichoderma viride* endoglucanase III in the larvae of silkworm, *Bombyx*

- mori L. and characteristic analysis of the recombinant protein", *Mol. Biol. Rep.*, 38, pp. 3897-902.
115. Ling L. Y., Ithoi I., Yik F. M. (2010), "Optimization for high level expression in *Pichia pastoris* and purification of truncated and full length recombinant SAG2 of toxoplasma gondii for diagnostic use", *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 41, pp. 507-513.
  116. Macarrón R., Acebal C., Castiilón M. P., Domínguez J. M., Manta I. D. L. (1993), "Mode of action of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*", *Biochem. J.*, 289, pp. 867-873.
  117. Martin S. (2000), "Protein engineering of cellulases", *Biochim. Biophys. Acta*, 1543, pp. 239-252.
  118. Master E. R., Zheng Y., Storms R., Tsang A., Powlowski J. (2008), "A xyloglucan-specific family 12 glycosyl hydrolase from *Aspergillus niger*: recombinant expression, purification and characterization", *Biochem. J.*, 411, pp. 161-70.
  119. Miller G. (1959), "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars", *Anal Chem*, 31:, pp. 426-428.
  120. Moore R., Clark W. D., Stern K. R., Vodopich D. (1998), *Botany*, William C Brown Pub, IN, U.S.A.
  121. Naika G. S., Kaul P., Prakash V. (2007), "Purification and characterization of a new endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*", *J. Agric. Food Chem.*, 55, pp. 7566-7572.
  122. Nakazawa H., Okada K., Kobayashi R., Kubota T., Onodera T., Ochiai N., Omata N., Ogasawara W., Okada H., Morikawa Y. (2008), "Characterization of the catalytic domains of *Trichoderma reesei* endoglucanase I, II, and III, expressed in *Escherichia coli*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81(4), pp. 681-689.
  123. Nazir A., Rohit S., Saini H. S., Manhas R. K., Chadha B. S. (2009), "Purification and characterization of an endoglucanase from *Aspergillus*

- terreus* highly active against barley b-glucan and xyloglucan", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25, pp. 1189–1197.
124. Nguyen H. Q., Quyen D. T. (2010), "Purification and properties of an endoglucanase from *Aspergillus oryzae* VTCC-F045", *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 4, pp. 6217-6222.
  125. Nguyen T. X. S., Truong Q. P., Do B. C., Do T. H., To K. A. (2010), "Cloning, expression and characterization of *Aspergillus niger* PBC beta-glucosidase", *World congress on industrial Biotechnology and Bioprocessing*, Washington, DC, 24.
  126. Nguyen V. T., Quyen D. T. (2010), "Optimizing culture conditions for the production of endo-b-1,4-glucanase by *Aspergillus awamori* strain Vietnam Type Culture Collection (VTCC)-F099", *Afr. J. Biotechnol.*, 9, pp. 6337-6344.
  127. Nguyen V. T., Quyen D. T. (2010), "Purification and properties of a novel thermoactive endoglucanase from *Aspergillus awamori* VTCC-F099", *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 4, pp. 6211-6216.
  128. Niranjane A. P., Madhou P., Stevenson T. W. (2007), "The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*", *Enzyme Microb. Technol.*, 40, pp. 1464-1468.
  129. Nishida Y., Suzuki K., Kumagai Y., Tanaka H., Inoue A., Ojima T. (2007), "Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*", *Biochimie*, 89, pp. 1002-1011.
  130. O'Callaghan J., O'Brien M. M., McClean K., Dobson A. D. W. (2002), "Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*", *J Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 29, pp. 55-59.
  131. Okamoto K., Imashiro K., Akizawa Y., Onimura A., Yoneda M., Nitta Y., Maekawa N., Yanase H. (2010), "Production of ethanol by the white-rot basidiomycetes *Peniophora cinerea* and *Trametes suaveolens*", *Biotechnol. Lett.*, 32, pp. 909-913.

132. Ole K., Borchert T. V., Fuglsang C. C. (2002), "Industrial enzyme applications", *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, pp. 345-351.
133. Omogbenigun F. O., Nyachoti C. M., Slominski B. A. (2004), "Dietary supplementation with multienzyme preparations improves nutrient utilization and growth performance in weaned pigs", *J. Anim. Sci.*, 82, pp. 1053-1061.
134. Ooi T., Minamiguchi K., Kawaguchi T., Okada H., Murao S., Arai M. (1994), "Expression of the cellulase (FI-CMCase) gene of *Aspergillus aculeatus* in *Saccharomyces cerevisiae*", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, pp. 954-956.
135. Palonen H., Tenkanen M., Linder M. (1999), "Dynamic interaction of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases Cel6A and Cel7A and cellulose at equilibrium and during hydrolysis", *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, pp. 5229-5233.
136. Patrick S. M., Fazenda M. L., McNeil B., Harvey L. M. (2005), "Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system", *Yeast*, 22, pp. 249-270.
137. Paul L. H., Patrick A. S., Maxwell G. S. (1977), "Chemical modification of a cellulase from *Aspergillus niger*", *Biochem. J.*, 167, pp. 549-556.
138. Peng J., Wang W., Jiang Y., Liu M., Zhang H., Shao W. (2011), "Enhanced soluble expression of a thermostable cellulase from *Clostridium thermocellum* in *Escherichia coli*", *Curr. Microbiol.*, 63, pp. 523-530.
139. Pham T. H., Quyen D. T., Nghiem N. M. (2010), "Optimization of endoglucanase production by *Aspergillus niger* VTCC-F021", *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 6, pp. 4151-5157.
140. Pham T. H., Quyen D. T., Nghiem N. M. (2012), "Purification and properties of a novel endoglucanase from *Aspergillus niger* VTCC-F021", *Turk. J. Biol.*, pp. 694-701.



141. Pham T. H., Quyen D. T., Nghiem N. M., Vu T. D. (2011), "Cloning, expression, purification, and properties of an Endoglucanase gene (Glycosyl hydrolase family 12) from *Aspergillus niger* VTCC-F021 in *Pichia pastoris*", *J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, pp. 1012-1020.
142. Polaina J., P. MacCabe A. P. (2007), *Industrial enzymes: Structure, function and applications*, Springer Science & Business Media, Spain.
143. Poojary H., Mugeraya G. (2012), "Optimization of critical medium components using response surface methodology for laccase production by *Peniophora* sp. hpF04", *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 2, pp. 46-56.
144. Quay D. H. X., Bakar F. D. A., Rabu A., Said M., Illias R. M., Mahadi N. M., Hassan O., Murad A. M. A. (2011), "Overexpression, purification and characterization of the *Aspergillus niger* endoglucanase, EglA, in *Pichia pastoris*." *Afr. J. Biotechnol.*, 10, pp. 2101-2111.
145. Quiroz-Castañeda R. E., Balcázar-López E., Dantán-González E., Martínez A., Folch-Mallol J., Anaya C. M. (2009), "Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium", *Electron. J. Biotechnol.*, 12, pp. 1-8.
146. Quiroz-Castañeda R. E., Pérez-Mejía N., Martínez-Anaya C., Acosta-Urdapilleta L., Folch-Mallol J. (2011), "Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*", *Biodegradation*, 22, pp. 565–572.
147. Rashid M. H., Javed M. R., Kawaguchi T., Sumitani J., Arai M. (2008), "Improvement of *Aspergillus oryzae* for hyperproduction of endoglucanase: expression cloning of *cmc-1* gene of *Aspergillus aculeatus*", *Biotechnol. Lett.*, 30, pp. 2165-2172.
148. Reese E. T. (1963), *Advances in enzymatic hydrolysis of cellulose and related material*, Pergamon press, London.

149. Reese E. T., Siu R. G. H., Levinson S. H. (1950), "The biological degradation of soluble cellulose derivatives and relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis", *J. Biotechnol.*, 59, pp. 485-479.
150. Rose S. H., Zyl W. H. (2002), "Constitutive expression of the *Trichoderma reesei*  $\beta$ -1,4-xylanase gene (*xyn2*) and the  $\beta$ -1,4-endoglucanase gene (*egl*) in *Aspergillus niger* in molasses and defined glucose media", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, pp. 461-468.
151. Sambrook J., Russell D. W. (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
152. Sandgren M., Gualfetti P. J., Christian P., Sigrid P., Shaw A., Gross L. S., Saldajeno M., Berglund G. I., Jones T. A., Mitchinson C. (2003), "The *Humicola grisea* Cel12A enzyme structure at 1.2 Å resolution and the impact of its free cysteine residues on thermal stability", *Protein Sci.*, 12, pp. 2782-2793.
153. Sang J. H., Yong J. Y., Hyen S. K. (1995), "Characterization of a bifunctional cellulase and its structural gene. The cel gene of *Bacillus* sp. D04 has exo- and endoglucanase activity", *J. Biol. Chem.*, 270, pp. 26012-26019.
154. Saranraj P., Stella D., Reetha D. (2012), "Microbial cellulases and its applications: a review", *Int. J. Biochem. & Biotech. Sci.*, 1, pp. 1-12.
155. Sharada R., Venkateswarlu G., Venkateshwar S., Anand Rao M. (2013), "Production of cellulase", *Int. J. Pharm., Biol and Chem. Sci.*, 3, pp. 1070-1090.
156. Sharma V. K., Hagen J. C. (1995), "Isolation and characterization of *Clostridium hobsonii* comb. nov", *Bio. Technol.*, 51, pp. 61-74.
157. Shi H., Yin X., Wu M., Tang C., Zhang H., Li J. (2012), "Cloning and bioinformatics analysis of an endoglucanase gene (Aucel12A) from *Aspergillus usarii* and its functional expression in *Pichia pastoris*", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39, pp. 347-357.

158. Shumiao Z., Huang J., Zhang C., Deng L., Hu N., Liang Y. (2010), "High level expression of an *Aspergillus niger* endo- $\beta$ -1,4-glucanase in *Pichia pastoris* through gene codon optimization and synthesis." *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20, pp. 467-473.
159. Soden D. M., O'Callaghan J., Dobson A. D. W. (2002), "Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host", *Microbiol. J.*, 148, pp. 4003-4014.
160. Sreekrishna K., Brankamp R. G., Kropp K. E., Blankenship D. T., Tsay J. T., Smith P. L., Wierschke J. D., Subramaniam A., Birkenberger L. A. (1997), "Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*", *Gene*, 190, pp. 55-62.
161. Sreenath H. K., Yang V. W., Burdsall J. H. H., Jeffries T. W. (1996), "Toner removal by alkaline-active cellulases from desert basidiomycetes", *Enzymes for pulp and paper processing ACS Symposium Series 655 Proceedings, 211th ACS national meeting of the Cellulose, Paper, and Textile Division*, New Orleans, LA. Washington, DC, 1996, March 24-28. American Chemical Society, pp. 267-279.
162. Sun Y., Cheng J. J., Himmel M. E., Skory C. D., Adney W. S., Thomas S. R., Tisserat B., Nishimura Y., Yamamoto Y. T. (2007), "Expression and characterization of *Acidotherrmus cellulolyticus* E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627", *Bioresour Technol.*, 98, pp. 2866-2872.
163. Takada G., Kawasaki M., Kitawaki M., Kawaguchi T., Sumitani J., Izumori K., Arai M. (2002), "Cloning and transcription analysis of the *Aspergillus aculeatus* No. F-50 endoglucanase 2 (*cmc2*) gene", *J. Biosci. Bioeng.*, 94, pp. 482-485.
164. Takashima S., Iikura H., Nakamura A., Hidaka M., Masaki H., Uozumi T. (1998), "Overproduction of recombinant *Trichoderma reesei* cellulases by

- Aspergillus oryzae* and their enzymatic properties", *J. Biotechnol.*, 65, pp. 163-171.
165. Tang B., Pan H., Zhang Q., Ding L. (2009), "Cloning and expression of cellulase gene EG1 from *Rhizopus stolonifer* var. *reflexus* TP-02 in *Escherichia coli*", *Bioresour. Technol.*, 100, pp. 6129-6132.
166. Todaka N., Lopez C. M., Inoue T., Saita K., Maruyama J., Arioka M., Kitamoto K., Kudo T., Moriya S. (2010), "Heterologous expression and characterization of an endoglucanase from a symbiotic protist of the lower termite, *Reticulitermes speratus*", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160, pp. 1168-1178.
167. Tran D. M., Nguyen Q. V., Nguyen T. T., Phan T. M., Bui T. T., Doan T. H. (2009), "Screening bacterial strains producing thermostable cellulase from hot springs for biomass hydrolysis", *Bioethanol: Status and Future*, Hanoi University of Technology, pp. 19-20.
168. Wachinger G., Bronnenmeier K., Staudenbauer W. L., Schrempf H. (1989), "Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, pp. 2653-2657.
169. Waksman G. (1991), "Purification and characterization of two endo-1-4-beta-D-glucanases from *Sclerotinia sclerotium*", *Biochem. Biophys. Acta.*, 1073, pp. 49-55.
170. Wang S. H., Yang T. S., Lin S. M., Tsai M. S., Wu S. C., Mao S. J. (2002), "Expression, characterization and purification of recombinant porcine lactoferrin in *Pichia pastoris*", *Protein Expr. Purif.*, 25, pp. 41-49.
171. Watanabe H., Tokuda G. (2001), "Animal cellulases", *Cell Mol. Life Sci.*, 58, pp. 1167-1178.
172. Wei X. M., Qin Y. Q., Qu Y. B. (2010), "Molecular cloning and characterization of two major endoglucanases from *Penicillium decumbens*", *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20, pp. 265-270.

173. White A., Withers S. G., Gilkes N. R., Rose D. R. (1994), "Crystal structure of the catalytic domain of the beta-1,4-glucanase cex from *Cellulomonas fimi*", *Biochem.*, 33, pp. 12546-12552.
174. Whittaker M. M., Whittaker J. W. (2000), "Expression of recombinant galactose oxidase by *Pichia pastoris*", *Protein Expr. Purif.*, 20, pp. 105-111.
175. Wonganu B., Pootanakit K., Boonyapakron K., Champreda V., Tanapongpipat S., Eurwilaichitr L. (2008), "Cloning, expression and characterization of a thermotolerant endoglucanase from *Syncephalastrum racemosum* (BCC18080) in *Pichia pastoris*", *Protein Expr. Purif.*, 58, pp. 78-86.
176. Wood T. M., McCrae S. I. (1977), "Cellulase from *Fusarium solani*: purification and properties of the C1 component", *Carbohydr. Res.*, 57, pp. 117-133.
177. Xiong S. A., Yao H. Q., Peng R. H., Zhang Z., Xu F., Liu J. G., Han P. L., Chen J. M. (2006), "High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, pp. 1039-1047.
178. Xu B., Janson J. C., Sellos D. (2001), "Cloning and sequencing of a molluscan endo-b-1,4-glucanase gene from the blue mussel, *Mytilus edulis*", *Eur. J. Biochem.*, 268, pp. 3718-3727.
179. Yamabhai M., Emrat S., Sukasem S., Pesatcha P., Jaruseranee N., Buranabanyat B. (2008), "Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems", *J. Biotechnol.*, 133, pp. 50-57.
180. Yamane Y., Furita J., Izuwa S., Fukuchi K., Shimizu R., Hiyoshi A. (2002), "Properties of cellulose-degrading enzymes from *Aspergillus oryzae* and their contribution to material utilization and alcohol yield in sake mash fermentation", *Biosci. Bioeng.*, 95, pp. 479-484.

181. Yang D., Weng H., Wang M., Xu W., Li Y., Yang H. (2010), "Cloning and expression of a novel thermostable cellulase from newly isolated *Bacillus subtilis* strain I15", *Mol. Biol. Rep.*, 37, pp. 1923-1929.
182. Yasmin T., Umbrin I. (2014), "Optimization of cellulase production by *Aspergillus ornatus* by the solid state fermentation of *Cicer arietinum*", *American J. Res. Commun.*, 2, pp. 125-141.
183. Yuko B., Atsushi S., Jinichiro K., Koichiro M., Hidetoshi K., Toshiaki K. (2005), "Purification and characterization of a new endo-1,4-b-glucanase from *Beltraniella portoricensis*", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, pp. 1198-1201.
184. Zhang J. X., Meidinger R., Forsberg C. W., Krell P. J., Phillips J. P. (1999), "Expression and processing of a bacterial endoglucanase in transgenic mice", *Arch. Biochem. Biophys.*, 367, pp. 317-321.
185. Zhao S., Huang J., Zhang C., Deng L., Hu N., Liang Y. (2010), "High-level expression of an *Aspergillus niger* endo- $\beta$ -1,4-glucanase in *Pichia pastoris* through gene codon optimization and synthesis", *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20, pp. 467-473.

### Website

186. ZZ1. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>
187. ZZ2. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>
188. ZZ3. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
189. ZZ. <http://afmb.cnrs-mrs.fr/pedro/CAZY/db.html>

## PHỤ LỤC

**Bảng PL2.1. Các hóa chất thí nghiệm chính**

<b>Tên hóa chất</b>	<b>Hãng sản xuất (nước)</b>
Acrylamide, chloroform, isoamyl alcohol, EDTA, imidazole, sodium acetate, Triton X-100	Merck (Darmstadt, Đức)
Agarose	Rockland (Mỹ)
Ampicillin	Mekopha (Việt Nam)
Cao nấm men, peptone, Tris-base, Tween 20, Tween 80	Bio Basic Inc. (New York, Mỹ)
CMC (carboxyl methyl cellulose)	Prolabo (Pháp)
3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (Fluka), $\beta$ -D-glucan, SDS	Sigma-Aldrich Co., (St. Louis, Mỹ)
<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Ehe</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Xba</i> I, <i>Xho</i> I, RNase, T4 ligase, <i>Pfu</i> DNA polymerase, <i>Taq</i> polymerase, Protease K, ethidium bromide, thang DNA, protein chuẩn, pJET1.2/blunt	Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Mỹ)
môi, Probond™ resin, pPICZ $\alpha$ A, zeocin	Invitrogen Corp. (Carlsbad, Mỹ)
Sephadex G100	Pharmacia (Thụy Điển)
Biogel P100	Bio-Rad (Mỹ)

**Bảng PL2.2. Thành phần các loại đệm và dung dịch**

<b>Dung dịch</b>	<b>Thành phần, nồng độ (w/v)</b>
Dung dịch APS	Ammonium persulfate 10%
Dung dịch Bradford gốc	100 ml ethanol 95% (v/v), 350 mg serva blue G, 200 ml phosphoric acid 88% (v/v)
Dung dịch Bradford working	425 ml H <sub>2</sub> O, 15 ml ethanol 95% (v/v), 30 ml phosphoric acid 88% (v/v), 30 ml dung dịch Bradford gốc
Dung dịch A	Đệm Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8
Dung dịch B	Đệm Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8
Dung dịch C	Acrylamide 30%, bis-acrylamide 0,8%
Dung dịch D	SDS 10 %
Dung dịch imidazole	Imidazole 3 M, NaCl 500 mM, sodium phosphate 20 mM, pH 6
Dung dịch DNS	DNS 1%, NaOH 0,99%, KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> 15,3%, Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 0,415%, phenol 0,38% (v/v)
Dung dịch I	Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0
Dung dịch II	NaOH 0,2 N, SDS 1%
Dung dịch III	kali acetate 60%, acid acetic 11,5% (v/v)
Dung dịch nhuộm DNA	ethidium bromide 0,1 µg/ml
Dung dịch nhuộm gel	coomassie brilliant blue 0,1%, methanol 30% (v/v), acid acetic 10%
Dung dịch tẩy gel	Methanol 30% (v/v), acid acetic 10% (v/v)
Dung dịch muối A	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20%, C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> KNa.4H <sub>2</sub> O 2,5%, NaHCO <sub>3</sub> 2%, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2,5%
Dung dịch muối B	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 15%, vài giọt H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đặc
Dung dịch muối AB	Muối A: Muối B (25:1)



Đệm điện di protein	Tris-HCl 20 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,8
Đệm 5x tra mẫu protein	brommophenol blue 0,05%, glycerol 50% pha trong đệm Tris-HCl 1 M, pH 6,8
Đệm TE	Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8
Đệm 10x TBE	EDTA 20 mM, Tris-borate 900 mM, pH 8
Đệm 6x tra mẫu DNA	brommophenol blue 0,09%, xylene xyanol 0,09%, glycerol 60%
Đệm rửa DNA	Ethanol 70% (v/v)
Đệm gắn Native Binding Buffer (NBB)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 250 mM, NaCl 2,5 M và imidazol 10 mM, pH 8
Đệm rửa Native Wash Buffer (NWB)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 250 mM, NaCl 2,5 M và imidazol 20 mM, pH 8
Đệm thôi Native Elution Buffer (NEB)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 250 mM, NaCl 2,5 M và imidazol 250 mM, pH 8

**Bảng PL.2.3. Các môi trường thí nghiệm**

<b>Môi trường</b>	<b>Thành phần (w/v)</b>
AMM	NaNO <sub>3</sub> 0,06%, KCl 0,052%, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,152%, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,052%, 1 ml MNS, sucrose 2%.
BMM	YNB 1,34%, đệm phosphate 0,1 M, pH 6, methanol 1% (v/v)
BMMY	YP; YNB 0,34%, 4x10 <sup>-5</sup> biotin, đệm phosphate 0,1 M, pH 6, methanol 1%
Czapek	NaNO <sub>3</sub> 0,2%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1%, MgSO <sub>4</sub> 0,05%, KCl 0,05%, sucrose 2%, pH 6,5. Môi trường đặc bổ sung agar 2%.
LB	Peptone 1%, yeast extract 0,5%, sodium chloride 1%.
LB low salt	Peptone 1%, yeast extract 0,5%, sodium chloride 0,5%.
YP	Peptone 2%, yeast extract 1%.
YPG	Peptone 2%, yeast extract 1%, D- glucose 2%.
YPGS	Peptone 2%, yeast extract 1%, D-glucose 2%, sobitol 1 M.

**Bảng PL.2.4. Các thiết bị thí nghiệm**

<b>Tên thiết bị</b>	<b>Xuất xứ</b>
Bể ôn nhiệt VS-1205CW	Vision (Hàn Quốc)
Box cấy vi sinh vật Clean bench TCV.02-1	Việt Nam
Bộ xung điện Gen Pulser II	Bio-Rad (Mỹ)
Hệ thống chụp ảnh Dolphin-Doc	Wealtec (Đài Loan)
Hệ thống điện di đứng	Biometra (Đức)
Máy đo pH-827	Metrohm (Thụy Sĩ)
Máy lắc rung Provocell™	Esco (Mỹ)
Máy ly tâm lạnh Hettich Mikro 22R	Hettich (Đức)
Máy nuôi lắc Certomat® HK	Sartorius (Đức)
Máy quang phổ UV 2500	Labomed (Mỹ)
Máy PCR Thermocycler Personal	Eppendorf (Đức)
Nồi khử trùng ES-315	Tomy (Nhật)
Tủ ôn nhiệt MIR-162	Sanyo (Nhật)
Tủ lạnh sâu -84°C MDF-192	Sanyo (Nhật)

**Bảng PL3.1. Hoạt tính cellulase của các chủng nấm sợi**

STT	Tên chủng	Hoạt tính (U/ml)	STT	Tên chủng	Hoạt tính (U/ml)
1	T1	0,24 ± 0,02	22	T22	0,54 ± 0,034
2	T2	0,32 ± 0,021	23	T23	0,62 ± 0,031
3	T3	0,38 ± 0,032	24	T24	0,37 ± 0,021
4	T4	0,26 ± 0,041	25	T25	0,98 ± 0,026
5	T5	0,42 ± 0,048	26	T26	0,25 ± 0,013
6	T6	0,35 ± 0,012	27	T27	0,27 ± 0,032
7	T7	0,25 ± 0,018	28	T28	0,23 ± 0,031
8	T8	0,17 ± 0,011	29	T29	0,28 ± 0,033
9	T9	0,21 ± 0,024	30	T30	0,23 ± 0,018
10	T10	0,45 ± 0,032	31	T31	0,26 ± 0,015
11	T11	0,38 ± 0,031	32	T32	0,23 ± 0,017
12	T12	0,65 ± 0,045	33	T33	0,54 ± 0,019
13	T13	0,21 ± 0,012	34	T34	0,52 ± 0,021
14	T14	0,72 ± 0,034	35	T35	0,34 ± 0,024
15	T15	0,63 ± 0,023	36	T36	0,45 ± 0,025
16	T16	0,55 ± 0,031	37	T37	0,31 ± 0,021
17	T17	0,49 ± 0,037	38	1	1,47 ± 0,023
18	T18	0,68 ± 0,032	39	2	0,42 ± 0,021
19	T19	0,34 ± 0,021	40	3	0,86 ± 0,032
20	T20	0,56 ± 0,025	41	4	0,18 ± 0,012
21	T21	0,43 ± 0,023	42	5	0,34 ± 0,017

(T1-T37: các chủng nấm *Trichoderma*; 1: *Peniophora* sp. NDVN01; 2: *Pleurotus sajor-caju*; 3: *Pleurotus ostreatus*; 4: *Ganoderma lucidum*; 5: *Flammulina velutipes*)

