

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**

Chuyên ngành: Hóa sinh học

Mã số: 62.42.01.16

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2015

Công trình được hoàn thành tại:

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC - ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC - VIỆN HÀN LÂM KHOA
HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

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

Người phản biện 1:

.....

Người phản biện 2:

.....

Người phản biện 3:

.....

**Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Đại học
Hợp tại: TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC - ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

Vào hồi giờ ngày tháng năm 2015

Có thể tìm hiểu luận án tại:

Thư viện Quốc gia

Trung tâm học liệu Đại học Thái Nguyên

Thư viện Trường Đại học Khoa học Thái Nguyên

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÓ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI

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”, *Turk J Biol*, 37, pp. 377-384. (SCI-E)
3. Trịnh Đình Khả, Quyền Đình Thi, NghiêM Ngọc Minh (2012), “Nhân dòng và phân tích trình tự gene 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, pp. 115-118.
4. Trinh Dinh 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. Trịnh Đình Khả, 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, pp. 845-852.
6. Trình tự gen đăng ký trên GenBank: mã số JF925333

MỞ ĐẦU

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.

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, khó can thiệp thay đổi tính chất về động học enzyme, độ bền nhiệt độ và pH, khả năng hoạt động trong những điều kiện nồng độ cao chất tẩy rửa và dung môi hữu cơ.

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 đưa vào biểu hiện mức độ lớn ở các hệ biểu hiện khác nhau (biểu hiện trong E. coli, trong nấm men, trong nấm mốc). 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 luận án: **“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 tuyển chọn làm cơ sở ứng dụng và tạo cellulase tái tổ hợp.

(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 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 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 chọn lọc tại Việt Nam;

3.4. Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa endoglucanase không chứa peptide tín hiệu từ chủng nấm *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 *Peniophora* sp. NDVN01 tuyển chọn tại Việt Nam lần đầu tiên 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 butanol-1 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 (*meg1A*) từ chủng *A. niger* VTCC-F021 đã được biểu hiện thành công trong *P. pastoris* GS115. Endoglucanase A tái tổ hợp (*rmEglA*) 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 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 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 *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 *Peniophora* sp. NDVN01 và chủng *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.

* **Bố cục của Luận án**

Luận án gồm 126 trang (không kể phụ lục), mở đầu 4 trang, tổng quan tài liệu 27 trang; vật liệu và phương pháp nghiên cứu 13 trang; kết quả 46 trang; thảo luận 11 trang; kết luận và đề nghị 2 trang. Luận án có 18 bảng thể hiện kết quả nghiên cứu, 31 hình ảnh minh họa, 189 tài liệu tham khảo, trong đó có 24 tài liệu tiếng Việt và 161 tài liệu tiếng Anh và 04 địa chỉ trang web.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Luận án đã tham khảo 24 tài liệu tiếng Việt và 161 tài liệu tiếng Anh và 04 địa chỉ trang web chuyên ngành để tổng kết các nội dung có liên quan bao gồm: (1) Cellulase; (2) Ứng dụng của cellulase; (3) Nghiên cứu tạo cellulase tái tổ hợp; (4) Nấm sợi *Peniophora* sp., *Aspergillus niger*.

Cellulase là nhóm enzyme thủy phân có khả năng cắt môi liên kết β -1,4-O-glycoside trong phân tử cellulose, oligosaccharide, disaccharide và một số cơ chất tương tự khác (Saranraj và đtg, 2012). 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 (Kuhad và đtg, 2011; Sharada và đtg, 2013).

Cho đến nay, trên thế giới đã có khá nhiều tác giả nghiên cứu về biểu hiện cellulase trong nhiều hệ thống biểu hiện. Yang và đtg (2010) đã nhân dòng và biểu hiện cellulase bền nhiệt từ chủng *Bacillus subtilis* 15 trong *E. coli* BL21 (DE3). Năm 2011, Peng và đtg đã biểu hiện thành công gen mã hóa cellulase bền nhiệt từ

Clostridium thermocellum trong *E. coli*. Năm 2001, Hong và đtg đã phân lập gen mã hóa β -glucanase từ *A. niger* IF031125 và biểu hiện trong nấm men. Zhao và đtg đã sử dụng phương pháp tối ưu hóa codon gen *egl1* 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 được chèn vào vector pPIC9K, đặt trong hệ biểu hiện *P. pastoris* GS115. Rashid và CS (2008) đã biểu hiện F1-CMCase (24 kDa, 221 aa) từ *A. aculeatus* trong *A. oryzae* niaD300. 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.

Ở Việt Nam, hầu hết các nghiên cứu mới chỉ quan tâm đến β -glucanase tự nhiên, có ít các nghiên cứu đề cập đến β -glucanase tái tổ hợp. Năm 2010, Nguyen và đtg đã nhân dòng gen mã hóa β -glucosidase từ *A. niger* PBC và biểu hiện thành công trong *P. pastoris* SMD1168 với hệ vector biểu hiện là pPIC9. 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. 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. Tuy nhiên, năng suất biểu hiện của chủng tái tổ hợp thấp và tính chất chưa phù hợp định hướng ứng dụng trong chăn nuôi.

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 do phòng Công nghệ sinh học enzyme - Viện công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ

Việt Nam, phòng thí nghiệm sinh học - Khoa Khoa học Sự sống - Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên cung cấp.

2.1.2. Hóa chất

Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm đều ở dạng tinh khiết do các hãng uy tín chuyên cung cấp hóa chất phân tích của Mỹ, Đức, Tây Ban Nha cung cấp.

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 Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Các phương pháp vi sinh vật

Nuôi cấy hoạt hóa nấm mốc; Nuôi cấy nấm thu enzyme; Nuôi cấy *E. coli*; Nuôi biểu hiện Chủng *P. pastoris* tái tổ hợp.

2.3.2. Các phương pháp sinh học phân tử

2.3.2.1. Tách chiết DNA tổng số của nấm mốc

2.3.2.2. Tách chiết DNA tổng số nấm men

2.3.2.3. Tách DNA plasmid theo Sambrook và Rusel

2.3.2.4. Cắt plasmid bằng enzyme giới hạn

2.3.2.5. Tinh sạch phân đoạn DNA

2.3.2.6. Nhân bản gen bằng PCR

2.3.2.7. *Phản ứng nối ghép gen*

2.3.2.8. *Biến nạp bằng sốc nhiệt*

2.3.2.9. *Biến nạp bằng xung điện*

2.3.2.10. *Giải trình tự nucleotide theo phương pháp giải trình tự tự động*

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*

2.3.3.2. *Xác định hoạt độ cellulase theo phương pháp của Miller 1959*

2.3.3.3. *Tinh sạch cellulase tự nhiên bằng sắc ký lọc gel*

2.3.3.4. *Tinh sạch protein tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực*

2.3.3.5. *Điện di gel polyacrylamide (SDS-PAGE) theo Lemmli 1970*

2.3.3.6. *Điện di SDS-PAGE nhuộm hoạt tính*

2.3.3.7. *Xác định hàm lượng protein tổng số theo Bradford 1976*

2.3.3.8. *Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố lý hóa lên hoạt tính và độ bền của cellulase tự nhiên và tái tổ hợp*

Động học của phản ứng enzyme

Nhiệt độ và pH tối ưu

Độ bền nhiệt và độ bền pH

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

2.3.3.9. *Xác định sản phẩm thủy phân bằng kỹ thuật TLC*

2.4. Xử lý số liệu

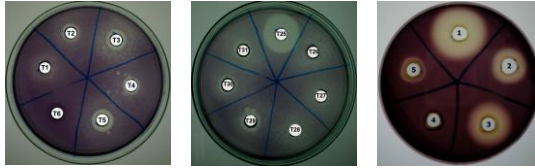
Phần mềm Microsoft Excel sử dụng để xử lý số liệu thu được trong quá trình thực nghiệm và tính giá trị của các tham số thống kê sinh học (Chu Văn Mẫn 2001). Chương trình Blast, DNASTAR được dùng để phân tích, so sánh trình tự nucleotide và xây dựng cây phân loại chủng nấm nghiên cứu. Chương trình SignalP 4.1 Server dùng để phân tích signal peptide, NetOGlyc 4.0 Server dùng để phân tích điểm O-glycosyl hóa, NetNGlyc 1.0 Server dùng để phân tích điểm N-glycosyl hóa.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

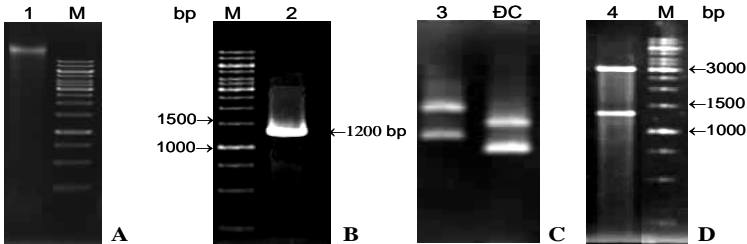
3.1.1. Tuyển chọn và phân loại chủng nấm sợi sinh tổng hợp cellulase

Đã tuyển chọn được chủng NDVN01 có hoạt tính mạnh nhất (1,47 U/ml) trong số 37 chủng nấm *Trichoderma* và 5 chủng nấm đảm.



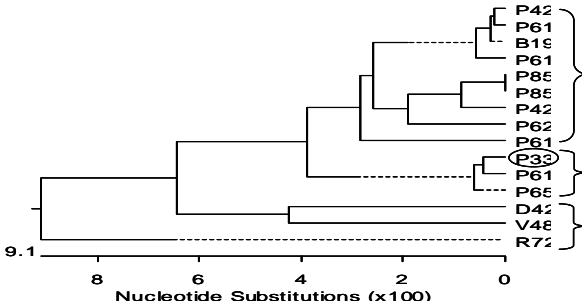
Hình 3.1. Hoạt tính cellulase của một số chủng nấm sợi
(T1-T31: một số chủng nấm *Trichoderma*; 1: *Peniophora* sp. NDVN01; 2: *Pleurotus sajor-caju*; 3: *Pleurotus ostreatus*; 4: *Ganoderma lucidum*; 5: *Flammulina velutipes*)

Đã nhân dòng và xác định trình tự nucleotide của gene mã hóa rRNA gồm một phần gen 18S; toàn bộ trình tự ITS1, gen 5,8S và trình tự ITS2; một phần gen 28S của chủng NDVN01 có chiều dài 1255 bp.



Hình 3.2. Hình ảnh điện di 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)

So sánh trình tự có độ tương đồng cao (>99%) với một số loài thuộc chi *Peniophora*. 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.

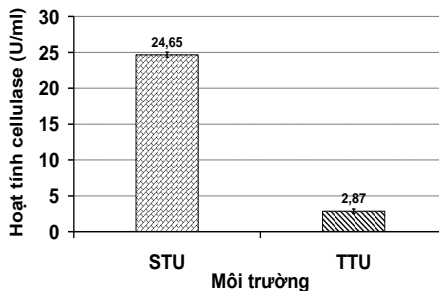


Hình 3.3. Cây phân loại chủng NDVN01 dựa vào trình tự gen mã hóa rRNA

P333: *Peniophora* sp. NDVN01 (JF925333); P611: *Peniophora* sp. M104-3B (HM595611); P651: *Peniophora pini* (EU118651)

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

Chủng *Peniophora* sp. NDVN01 đã được tối ưu các điều kiện: thời gian lên men, pH ban đầu của môi trường, nhiệt độ lên men, cơ chất cảm ứng, nồng độ dịch chiết khoai tây, nguồn carbon, nguồn nitrogen và một số nguồn khoáng.



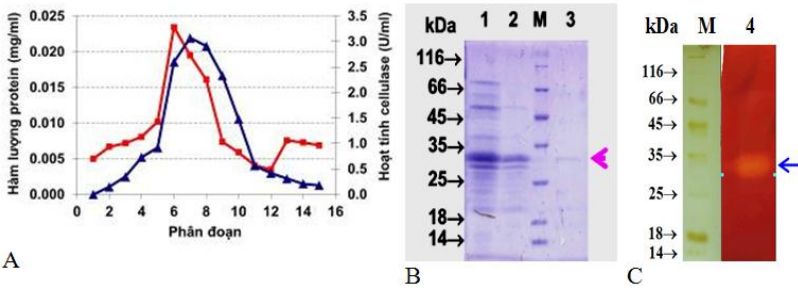
Hình 3.9. Năng suất sinh tổng hợp cellulase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 trong môi trường tối ưu và chưa tối ưu

STU: sau tối ưu; TTU: trước tối ưu

Kết quả tối ưu 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. Như vậy, thành phần môi trường tối ưu có chứa 80% (v/v) của truyền khoai tây, 0,6% rom lúa; 0,2% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ và 0,5% (w/v) bột giấy làm cơ chất cảm ứng. Điều kiện lên men thích hợp ở 28°C, pH ban đầu của môi trường bằng 7,0, thời gian lên men 120 giờ.

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

3.1.3.1. Tinh sạch cellulase



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

Tinh sạch bằng tủa ammonium sulfate, qua cột sắc ký lọc gel Sephadex G75 và cột Biogel-P100 thu được 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 một cellulase (hình 3.10).

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%.

3.1.3.2. Động học cơ chất của cellulase

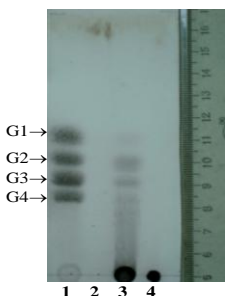
Động học đối với cơ chất β -glucan lúa mạch của cellulase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01 có K_m thấp hơn, K_{cat} và K_{cat}/K_m cao hơn so với cơ chất CMC. Vận tốc cực đại của phản ứng do cellulase xúc tác đối với cơ chất CMC đạt 1825 U/mg, còn đối với cơ chất β -glucan lúa mạch đạt 9804 U/mg.

3.1.3.3. Đặc hiệu cơ chất của cellulase

Kết quả cho thấy, cellulase có tính đặc hiệu cao đối với cơ chất β -glucan lúa mạch và CMC, trong đó mạnh nhất đối với β -glucan lúa mạch với hoạt tính tương đối đạt 456% so với cơ chất CMC. Đối với cơ chất xylan, LBG và avicel, cellulase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 không có tác dụng thủy phân.

3.1.3.4. Sản phẩm thủy phân cơ chất của cellulase

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). Như vậy, kết hợp với kết quả phân tích động học cơ chất, đặc hiệu cơ chất có thể khẳng định cellulase tinh sạch từ *Peniophora* sp. NDVN01 là một endo 1,4-glucanase.

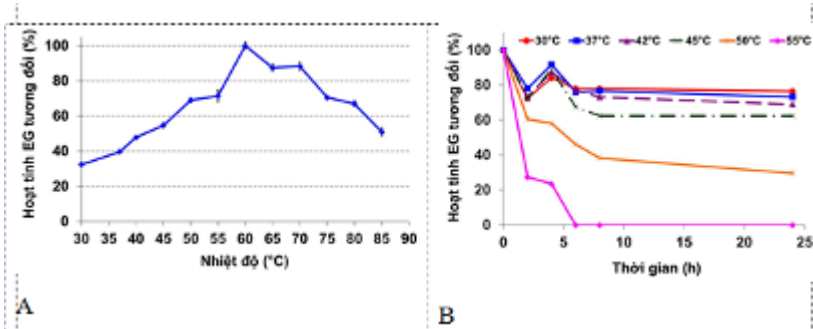


Hình 3.12. Hình ảnh phổ chạy sắc ký TLC sản phẩm thủy phân cơ chất CMC của cellulase tinh sạch từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01

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

Kết quả cho thấy hoạt tính endoglucanase 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).

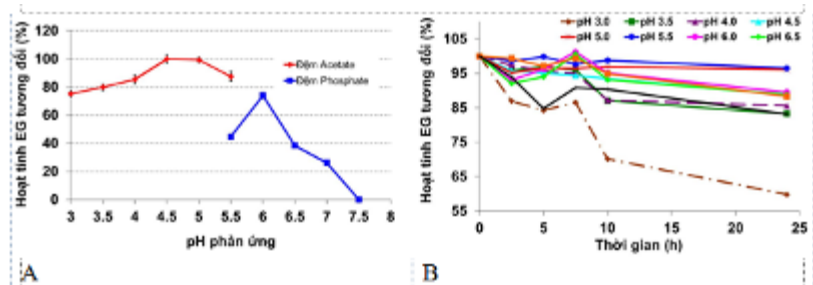


Hình 3.13. Đồ thị ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng (A) và độ bền nhiệt độ (B) của endoglucanase từ chủng *Peniophora* sp. NDVN01

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).

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

pH phản ứng tối ưu của endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01 trong khoảng 4,5-5,0. Endoglucanase từ *Peniophora* sp. NDVN01 có độ bền cao trong khoảng pH từ 4,0-5,5 với hoạt tính tương đối còn lại trên 90% sau 24h ủ trong đệm ở nhiệt độ 37°C.



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

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

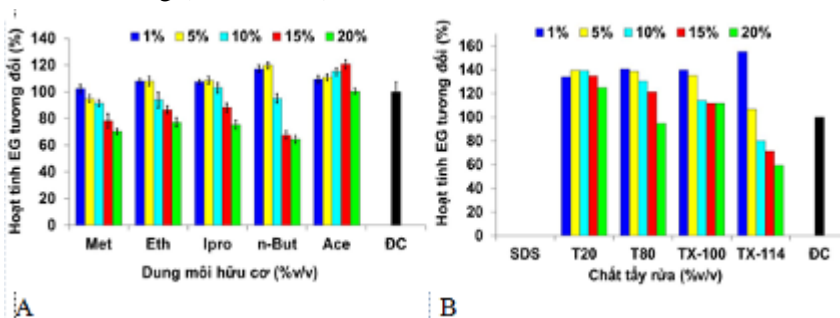
Ion kim loại và một số thuốc thử (mM)	Hoạt tính tương đối (%)				
	2mM	4mM	6mM	8mM	10mM
K ⁺	91,5 ± 3,0	93,8 ± 2,6	92,8 ± 3,1	93,7 ± 3,3	91,5 ± 3,0
Na ⁺	86,4 ± 5,8	85,5 ± 1,8	80,8 ± 3,5	94,2 ± 2,8	97,4 ± 3,0
Ag ⁺	71,8 ± 2,0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Fe ²⁺	69,9 ± 2,8	76,9 ± 3,2	91,8 ± 2,4	93,3 ± 2,6	101,3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

Kết quả cho thấy rằng hoạt tính của enzyme đã được tăng cường với sự hiện diện của Ni²⁺ trong khoảng 2-10 mM, Ca²⁺ ở nồng độ 2 mM, Zn²⁺ ở nồng độ 2 mM, Ba²⁺ ở nồng độ 4 mM và mercaptoethanol trong khoảng nồng độ 2-6 mM. Trong đó, ion Ni²⁺ 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 Ag⁺ và Cu²⁺ ở nồng độ 4-10 mM.

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

Việc bổ sung dung môi methanol (1% v/v), ethanol (1-5%), isopropanol (1-10%), butanol-1 (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 butanol-1 (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 butanol-1 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).



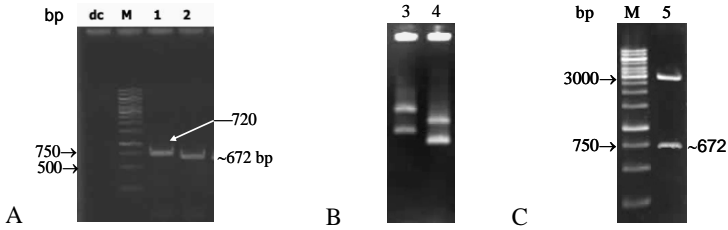
Hình 3.15. Biểu đồ so sánh ảnh hưởng của dung môi hữu cơ (A) và chất tẩy rửa (B) đến hoạt tính endoglucanase của chủng *Peniophora* sp. NDVN01

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

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. SDS ức chế hoàn toàn hoạt tính của enzyme.

3.2. Nhân dòng và biểu hiện gen *meq1A* từ chủng *Aspergillus niger* VTCC-F021 trong *Pichia pastoris*

3.2.1. Nhân dòng gen *meq1A*



Hình 3.17. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen *megA* (A), plasmid tái tổ hợp *pJmegA* (B) và sản phẩm cắt *pJmegA* 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 *megA*; 3: plasmid *pJmegA*; 4: plasmid *pJET1.2* (đối chứng); 5: sản phẩm cắt *pJmegA* bằng *EcoRI/XbaI*

Trình tự gen *megA* được nhân dòng và giải trình tự với chiều dài 672 nucleotide.

```

cagacaatgtgctctcagatgatgacagtgccctcgagccccccatactcagtggaaccagaac      60
Q T M C S Q Y D S A S S P P Y S V N Q N      20
ctctggggcgcagtagtaaccaaggcaccggcagccagtgatgatgacgacaaactctccagc      120
L W G E Y Q G T G S Q C A Y V D K L S S      40
agtgggtgcactcctggcacaccgaatggacctggagcgggtggtaggggaacagtgaaaagc      180
S G A S W H T E W T W S G G E G T V K S      60
tactctaactctggcggttacatttaacaagaagctcgtgagtgatgatcaagcatcccc      240
Y S N S G V T F N K K L V S D V S S I P      80
acctcggtggaatggaagcaggacaacaccaacgtcaacgcggatgtcgcgatatgatctt      300
T S V E W K Q D N T N V N A D V A Y D L      100
ttcaccgcggcgaatgtggaccatgcccacttctagcggcgaactatgaactgatgatttg      360
F T A A N V D H A T S S G D Y E L M I W      120
cttgcccgtacggcaacatccagcccattggcaagcaaatggccacggccacagtgggga      420
L A R Y G N I Q P I G K Q I A T A T V G      140
ggcaagtctgggaggtgtggtatggcagcaccacccaggccgggtgaggagcagaggaca      480
G K S W E V W Y G S T T Q A G A E Q R T      160
tacagctttgtgctcggaagccctatcaactcatacagtggggacatcaatgcatttttc      540
Y S F V S E S P I N S Y S G D I N A F F      180
agctatctcactcagaaccaaggcttccccgccagctctcagtgacttgatcaatctgcag      600
S Y L T Q N Q G F P A S S Q Y L I N L Q      200
tttggaaactgagggcgttcaccggggggccggcaaccttcacgggttgacaactggaccgc      660
F G T E A F T G G P A T F T V D N W T* A      220
agtgtcaactag
S V N -      223

```

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

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

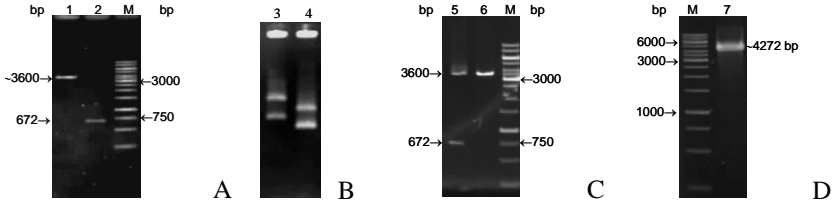
Phân tích bằng phần mềm DNASTar cho thấy trình tự amino axit suy diễn của rEglA dài 223 amino acid. Trong đó có 9 amino acid mang tính bazơ mạnh (K, R), 19 amino acid mang tính axit mạnh (D, E), 68 amino axit kỵ nước (A, I, L, F, W, V) và 96 amino axit phân cực (N, C, Q, S, T, Y). Enzyme rEglA có khối 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 axit có tính bazơ mạnh (K, R), giảm 9 amino axit kỵ nước (A, I, L, F, W, V) và giảm 3 amino axit phân cực (N, C, Q, S, T, Y). Enzyme rEglA có khối lượng giảm khoảng 1,5 kDa và pI giảm 0,129 so với rEglA. 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 rEglA có thể xảy ra O-glycosyl hóa tại vị trí của amino axit 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 hóa.

3.2.2. Thiết kế vector biểu hiện *megLA*

Plasmid pJ*megLA* mang gen *megLA* và vector pPICZ α A cùng được cắt bằng EcoRI và XbaI. Sau đó, được nối với nhau bằng T4 ligase tạo plasmid tái tổ hợp pP*megLA*. Plasmid có đoạn chèn có kích thước lớn hơn, nên nằm cao hơn so với vector không có đoạn chèn (hình 3.19A).

Plasmid tái tổ hợp pP*megLA* tinh sạch được cắt bằng EcoRI và XbaI cho hai băng là pPICZ α A (~3,6 kb) gen *megLA* (672 bp) (hình 3.19B).

pP*megLA* 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, *megLA* được chèn vào đúng vị trí mong muốn, đủ điều kiện để đưa vào biểu hiện trong *P. pastoris* GS115.

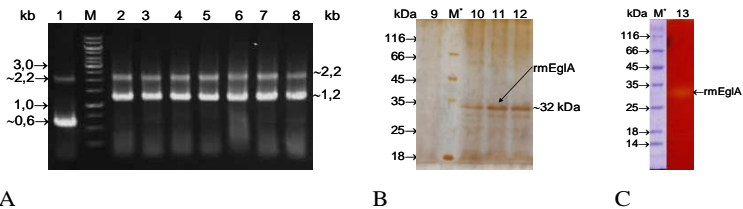


Hình 3.19. Hình ảnh điện di sản phẩm thô gel (A), plasmid pPmeglA (B), sản phẩm cắt pPmeglA bằng *EcoRI* và *XbaI* (C), sản phẩm cắt pPmeglA bằng *SacI* (D)

1: pPICZ α A mở vòng; 2: gen meglA; 3: pPmeglA; 4: pPICZ α A (đối chứng); 5: pPmeglA cắt bằng *EcoRI* và *XbaI*; 6: pPICZ α A bằng *EcoRI* và *XbaI* (đối chứng); 7: pPmeglA cắt bằng *SacI*

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

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



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/pPicZ α (đối chứng); 2-8: PCR genome *P. pastoris* GS115/pPmeglA; 9: dịch lên men dòng *P. pastoris* GS115/pPICZ α A (đối chứng); 10-12: dịch lên men một số dòng *P. pastoris* GS115/pPmeglA; 13: nhuộm hoạt tính rmEglA

Để biểu hiện gen 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. Các dòng tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường YPG bổ sung zeocine qua đêm, tách DNA, sau đó PCR với cặp mồi đặc hiệu AOX1 để kiểm tra. Một số khuẩn lạc (giếng 2-8) (hình 3.21A) chứa đoạn DNA ngoại lai có kích thước tương ứng với gen *megLA*. Như vậy, có thể kết luận các chủng *P. pastoris* tái tổ hợp có chứa đoạn gen mã hóa mEgLA.

3.2.3.2. Sàng lọc các dòng *P. pastoris* GS115/pPEgLA tái tổ hợp

Để kiểm tra kết quả và mức độ biểu hiện rmEgLA, 39 dòng tái tổ hợp có genome mang đoạn chèn được nuôi biểu hiện trong môi trường YP bổ sung methanol 1% sau mỗi 24 giờ. Đã tuyển chọn được dòng số 14 có năng suất biểu hiện cao nhất (1,95 U/ml) để 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).

3.2.4. Tối ưu một số thành phần và điều kiện lên men sản xuất rmEgLA

3.2.4.1. Lựa chọn môi trường thích hợp

3.2.4.2. Nồng độ cao nấm men tối ưu

3.2.4.3. Nồng độ peptone tối ưu

3.2.4.4. pH ban đầu của môi trường

3.2.4.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ

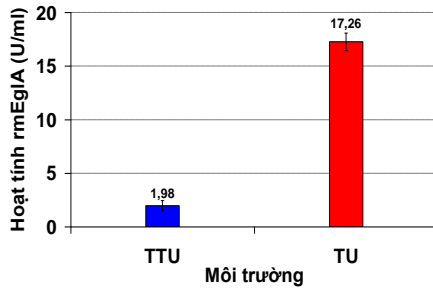
3.2.4.6. Ảnh hưởng của nồng độ methanol cảm ứng

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

3.2.4.8. So sánh năng suất biểu hiện rmEgLA 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/pPmegLA/14 được lên men với thành phần môi trường, điều

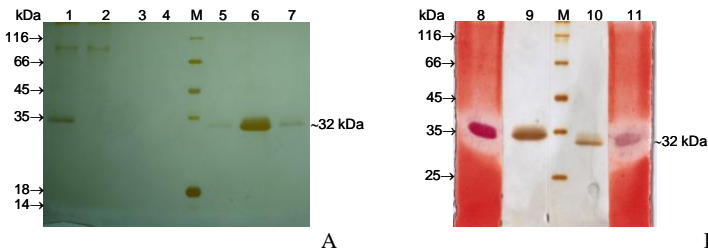
kiện lên men tối ưu (1,6% peptone; 1,2% cao nấm men; 1,2% methanol cảm ứng sau 24h; pH ban đầu 5,0; nhiệt độ lên men 25°C và thời gian lên men 96h lắc 200 vòng/phút) và môi trường, điều kiện ban đầu (chưa tối ưu). Kết quả cho thấy, năng suất biểu hiện rmEgIA trong môi trường và điều kiện tối ưu đạt 17,26 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 3.25. 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

3.2.5. Tinh sạch rmEgIA



Hình 3.26. Hình ảnh điện di các phân đoạn tinh sạch rmEgIA (A), điện di so sánh rEgIA với rmEgIA 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 rEgIA; 9: rEgIA tinh sạch; 10: rmEgIA tinh sạch; 11: nhuộm hoạt tính rmEgIA; M: marker

Kết quả điện di thể hiện trên hình 3.26 cho thấy rmEgIA có độ sạch cao và có khối lượng khoảng 32 kDa thấp hơn so với khối lượng của rEgIA. 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 rEgIA.

Bảng 3.6. Thông số kỹ thuật các bước tinh sạch rmEgIA

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
Dịch tinh sạch	0,16	30,64	191,5	6,02	50,44

3.2.6. Đánh giá tính chất lý hóa của rmEgIA

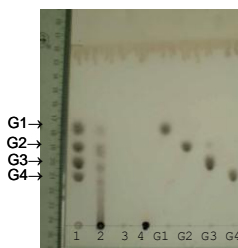
3.2.6.1. Động học enzyme

Động học đối với cơ chất β -glucan lúa mạch của rmEgIA 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 β -glucan lúa mạch cao hơn so với cơ chất CMC. Vận tốc cực đại của phản ứng do rmEgIA xúc tác đối với cơ chất CMC đạt 588,2 U/mg, còn đối với cơ chất β -glucan lúa mạch đạt 666,67 U/mg

3.2.6.2. Đặc hiệu cơ chất

rmEgIA có tính đặc hiệu cao đối với cơ chất barley β -glucan (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.

3.2.6.3. Sản phẩm thủy phân



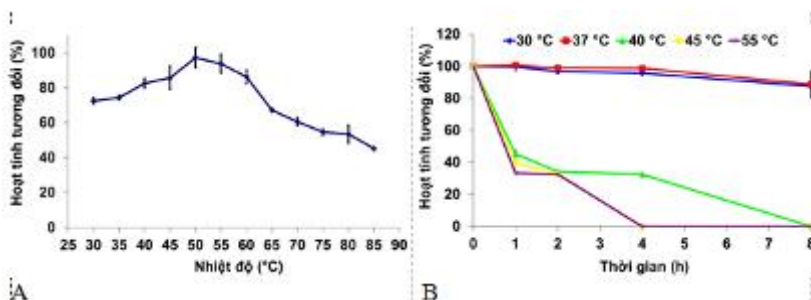
Hình 3.28. Phổ chạy sắc ký TLC sản phẩm thủy phân cơ chất CMC của rmEgIA

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: cellotriose, G4: cellotetrose

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).

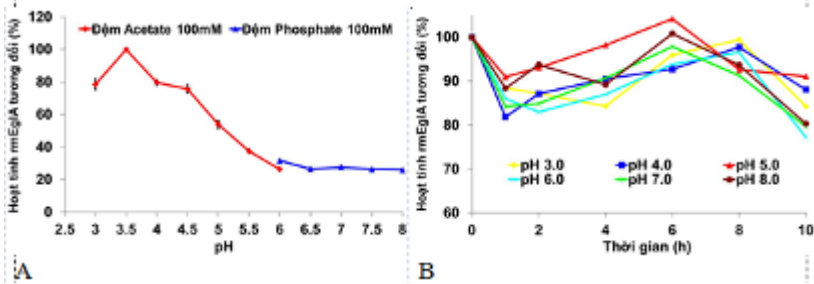
3.2.6.4. Nhiệt phản ứng tối ưu và độ bền nhiệt độ của rmEgIA

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. rmEgIA 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 3.29).



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

3.2.6.5. pH phản ứng tối ưu và độ bền pH của rmEglA



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

3.2.6.6. Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính của rmEglA

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 ⁺	118,1 ± 1,2	109,0 ± 2,4	104,4 ± 2,1	Ni ²⁺	120,5 ± 2,7	107,3 ± 1,3	103,2 ± 1,8
Ag ⁺	56,0 ± 1,6	42,5 ± 2,0	41,7 ± 0,7	Nm ²⁺	115,1 ± 2,8	83,7 ± 1,5	73,6 ± 1,7
Ca ²⁺	129,1 ± 3,6	119,5 ± 3,2	112,2 ± 1,5	Cu ²⁺	131,6 ± 3,3	115,2 ± 2,8	100,5 ± 2,4
Ba ²⁺	129,3 ± 2,3	123,5 ± 2,7	123,2 ± 2,1	Co ²⁺	153,0 ± 1,7	158,7 ± 1,9	154,2 ± 2,6
Mg ²⁺	130,1 ± 4,3	67,9 ± 2,9	63,8 ± 2,5	Pb ²⁺	37,2 ± 0,7	0,0	0,0
Zn ²⁺	132,6 ± 1,8	109,6 ± 2,5	97,1 ± 1,7	Al ³⁺	60,9 ± 0,9	0,0	0,0
Fe ²⁺	86,3 ± 1,6	72,5 ± 1,4	69,0 ± 2,2	EDTA	88,6 ± 1,2	86,0 ± 1,9	85,3 ± 2,0
Hg ²⁺	57,0 ± 1,3	0,0	0,0	Đôi chứng		100,0 ± 2,8	

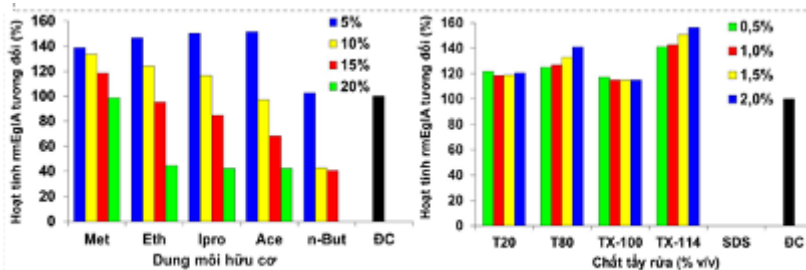
Nồng độ từ 5-15 mM các ion K⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ làm tăng hoạt tính của rmEglA. Các ion Fe²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, Al³⁺ ức chế mạnh mẽ hoạt tính rmEglA. Trong đó, Ba²⁺ làm tăng hoạt tính enzyme mạnh nhất lên 123-129% so với đối chứng. Ion Pb²⁺ ức chế mạnh nhất, ở

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 (bảng 3.9).

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

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%. 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).



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

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

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

1. Chúng nấm đảm *Peniophora* sp. NDVN01 có khả năng sinh tổng hợp cellulase cao đã được tuyển chọn từ 42 chủng nấm tại Việt

Nam. Gen mã hóa rRNA phân lập từ *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% 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 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 tái tổ hợp phù hợp với chủng *P. pastoris* GS115/p*PmeglA*/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/p*PmeglA*/14 biểu hiện endoglucanase A năng suất cao. Xây dựng quy trình sản xuất endoglucanase 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.