

**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 TỔ 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:**

<b>1. PGS. TS. Quyền Đình Thi</b>
-----------------------------------

  
**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. Quyền 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 02 tháng 10 năm 2015*

**Tác giả**

***Trịnh Đình Khả***

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc tới PGS. TS. Quyền Đình Thi, 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 02 tháng 10 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 .....	42
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>45</b>
3.1. Tinh sạch và nghiên cứu đặc tính của cellulase tự nhiên từ nấm sợi tại Việt Nam .....	45
3.1.1. Tuyển chọn và phân loại chủng nấm sợi sinh tổng hợp cellulase.....	45
3.1.2. Tối ưu điều kiện môi trường nuôi cấy sinh tổng hợp cellulase .....	48
3.1.2.1. Thời gian nuôi cấy thích hợp .....	48
3.1.2.2. Ảnh hưởng của pH ban đầu của môi trường và nhiệt độ nuôi cấy ....	49
3.1.2.3. Ảnh hưởng của chất cảm ứng .....	51
3.1.2.4. Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết khoai tây bổ sung .....	52

3.1.2.5. Ảnh hưởng của nguồn cacbon .....	52
3.1.2.6. Ảnh hưởng của nguồn nitơ .....	54
3.1.2.7. Ảnh hưởng của một số nguồn khoáng .....	55
3.1.2.8. So sánh khả năng sinh tổng hợp enzyme trong môi trường tối ưu và chưa tối ưu .....	56
3.1.3. Tinh sạch và đánh giá tính chất cellulase của chủng <i>Peniophora</i> sp. NDVN01 .....	57
3.1.3.1. Tinh sạch cellulase .....	57
3.1.3.2. Động học cơ chất của cellulase.....	58
3.1.3.3. Đặc hiệu cơ chất của cellulase .....	60
3.1.3.4. Sản phẩm thủy phân cơ chất của cellulase .....	61
3.1.3.5. Nhiệt độ phản ứng tối ưu và độ bền nhiệt độ của endoglucanase .....	62
3.1.3.6. pH phản ứng tối ưu và độ bền pH của endoglucanase .....	63
3.1.3.7. Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính endoglucanase.....	64
3.1.3.8. Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ và chất tẩy rửa đến hoạt tính endoglucanase .....	65
3.2. Nhân dòng và biểu hiện gen <i>meGlA</i> từ chủng <i>Aspergillus niger</i> VTCC- F021 trong <i>Pichia pastoris</i> .....	67
3.2.1. Nhân dòng gen <i>meGlA</i> .....	68
3.2.2. Thiết kế vector biểu hiện <i>meGlA</i> .....	71
3.2.3. Biểu hiện <i>rmEglA</i> trong <i>P. pastoris</i> GS115.....	72
3.2.3.1. Xây dựng hệ thống biểu hiện <i>P. pastoris</i> GS115/ <i>pPmeGlA</i> .....	72
3.2.3.2. Sàng lọc các dòng <i>P. pastoris</i> GS115/ <i>pPmeGlA</i> sinh tổng hợp <i>rmEglA</i> mạnh.....	73
3.2.4. Tối ưu một số thành phần môi trường và điều kiện lên men sản xuất <i>rmEglA</i> .....	75
3.2.4.1. Lựa chọn môi trường thích hợp .....	75
3.2.4.2. Nồng độ cao nấm men tối ưu.....	75
3.2.4.3. Nồng độ peptone tối ưu .....	76
3.2.4.4. pH ban đầu của môi trường .....	77



3.2.4.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ.....	78
3.2.4.6. Ảnh hưởng của nồng độ methanol cảm ứng.....	79
3.2.4.7. Ảnh hưởng của thời gian đến năng suất biểu hiện rmEglA.....	79
3.2.4.8. So sánh năng suất biểu hiện rmEglA trong môi trường tối ưu và chưa tối ưu.....	80
3.2.5. Tinh sạch rmEglA.....	81
3.2.6. Tính chất của rmEglA .....	82
3.2.6.1. Động học cơ chất của rEglA.....	82
3.2.6.3. Xác định tính đặc hiệu cơ chất của rmEglA .....	83
3.2.6.4. Sản phẩm thủy phân của rmEglA .....	84
3.2.6.5. Nhiệt phản ứng tối ưu và độ bền nhiệt độ của rmEglA .....	85
3.2.6.6. pH phản ứng tối ưu và độ bền pH của rmEglA .....	86
3.2.6.7. Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính của rmEglA.....	87
3.2.6.8. Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ và chất tẩy rửa.....	88
<b>Chương 4. THẢO LUẬN.....</b>	<b>91</b>
4.1. Tinh sạch và nghiên cứu đặc tính của cellulase tự nhiên từ nấm sợi tại Việt Nam .....	91
4.2. Nhân dòng và biểu hiện gen <i>meGlA</i> từ chủng <i>Aspergillus niger</i> VTCC-F021 trong <i>Pichia pastoris</i> .....	98
<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ .....</b>	<b>102</b>
Kết luận.....	102
Đề nghị.....	103
<b>CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN .....</b>	<b>104</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>104</b>
<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>127</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