

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN VĂN TUÂN

**TUYỂN CHỌN, NUÔI CẤY CHỦNG *ASPERGILLUS AWAMORI*
SINH TỔNG HỢP ENDO- β -1,4-GLUCANASE VÀ ĐÁNH GIÁ
TÍNH CHẤT LÝ HÓA CỦA ENDO- β -1,4-GLUCANASE**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC SINH HỌC

THÁI NGUYÊN- 2009

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN VĂN TUÂN

**TUYỂN CHỌN, NUÔI CẤY CHỦNG *ASPERGILLUS AWAMORI*
SINH TỔNG HỢP ENDO- β -1,4-GLUCANASE VÀ ĐÁNH GIÁ
TÍNH CHẤT LÝ HÓA CỦA ENDO- β -1,4-GLUCANASE**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60. 42. 30

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

TS. Quyền Đình Thi

Thực hiện tại: Viện Công nghệ Sinh học-
Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÁI NGUYÊN - 2009

LỜI CẢM ƠN!

Trước hết tôi xin gửi lời cảm sâu sắc tới TS. Quyền Đình Thi, Trưởng phòng Công nghệ Sinh học Enzyme, Phó viện trưởng Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đã định hướng nghiên cứu, hướng dẫn thí nghiệm, sửa luận văn và tạo mọi điều kiện về hoá chất cũng như trang thiết bị nghiên cứu để tôi hoàn thành luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn tập thể cán bộ Phòng Công nghệ Sinh học Enzyme, Viện Công nghệ Sinh học đã giúp đỡ tôi tận tình trong suốt quá trình làm luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn Khoa Sinh học, Khoa Sau đại học, trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên cùng các thầy cô giáo đã nhiệt tình giảng dạy và tạo điều kiện cho tôi hoàn thành khoá học.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn Bộ môn Hoá- Sinh học, Ban chủ nhiệm khoa Khoa học Cơ bản, Trường đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên đã tạo điều kiện cho tôi đi học.

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

Thái Nguyên tháng 9 năm 2009

Học viên

Nguyễn Văn Tuấn

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

APS	Ammonium persulphate
BSA	Bovine serum albumin
CMC	Carboxyl methyl cellulose
cs	Cộng sự
DNA	Deoxyribonucleic acid
DEAE	Diethylaminoethyl
ĐC	Đối chứng
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
IU	International unit
kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria and Bertani
M	Marker
Nxb	Nhà xuất bản
OD	Optical density
PCR	Polymerase chain reaction
rRNA	Ribosome ribonucleic acid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBE	Tris base-Boric acid-EDTA
TE	Tris-EDTA
v/v	Volume/volume
w/v	Weight/volume

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1 KHÁI NIỆM VỀ CELLULASE VÀ ENDO- β -1,4-GLUCANASE	3
1.2 NGUỒN GỐC VÀ PHÂN LOẠI ENDO- β -1,4-GLUCANASE.....	4
1.2.1 Nguồn gốc	4
1.2.2 Phân loại.....	6
1.3 CẤU TRÚC CỦA ENDO- β -1,4-GLUCANASE	7
1.3.1 Cấu trúc bậc một.....	7
1.3.2 Cấu trúc không gian.....	9
1.3.3 Cấu trúc của trung tâm xúc tác và vùng liên kết cơ chất.....	9
1.4 CƠ CHẾ XÚC TÁC CỦA ENDO- β -1,4-GLUCANASE.....	11
1.5 ỨNG DỤNG CỦA ENDO- β -1,4-GLUCANASE.....	12
1.5.1 Trong công nghiệp thực phẩm	12
1.5.2 Trong công nghiệp sản xuất thức ăn gia súc.....	13
1.5.3 Trong công nghiệp sản xuất dung môi hữu cơ.....	15
1.5.4 Trong công nghiệp sản xuất giấy và bột giấy	15
1.5.5 Trong công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa.....	16
1.5.6 Trong công nghệ xử lý rác thải sản xuất phân bón vi sinh.....	16
1.6 ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN MÔI TRƯỜNG ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENDO- β -1,4-GLUCANASE.....	17
1.7 TÍNH CHẤT LÝ HÓA CỦA ENDO- β -1,4-GLUCANASE	20
1.8 MỘT SỐ NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN Ở VIỆT NAM.....	22
CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	25
2.1 NGUYÊN LIỆU VÀ HÓA CHẤT.....	25
2.1.1 Chủng nấm	25
2.1.2 Thiết bị thí nghiệm	25
2.1.3 Hóa chất	26
2.1.4 Môi trường	26

2.1.5	Dung dịch và đệm.....	27
2.2	PHƯƠNG PHÁP	28
2.2.1	Nuôi cấy vi sinh vật.....	28
2.2.2	Xác định hoạt tính endoglucanase.....	28
2.2.3	Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố lên khả năng sinh tổng hợp endoglucanase	30
2.2.4	Tinh sạch enzyme	32
2.2.5	Điện di SDS-PAGE	33
2.2.6	Xác định tính chất lý hóa của endoglucanase	34
2.2.7	Xác định hàm lượng protein tổng số.....	35
2.2.8	Các phương pháp sinh học phân tử	36
2.2.9	Xử lý số liệu.....	41
	CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	42
3.1	TUYỂN CHỌN VÀ PHÂN LOẠI CHỦNG <i>ASPERGILLUS AWAMORI</i> SINH TỔNG HỢP ENDOGLUCANASE CAO	42
3.1.1	Tuyển chọn.....	42
3.1.2	Phân loại chủng nấm sợi dựa vào phân đoạn gene 28S rRNA	43
3.2	TỐI ƯU CÁC ĐIỀU KIỆN SINH TỔNG HỢP ENDOGLUCANASE....	45
3.2.1	Khả năng sinh tổng hợp endoglucanase theo thời gian.....	45
3.2.2	Nhiệt độ nuôi cấy	47
3.2.3	Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất cảm ứng	48
3.2.4	Ảnh hưởng của nguồn carbon và nồng độ nguồn carbon.....	50
3.2.5	Ảnh hưởng của nguồn nitrogen và nồng độ nguồn nitrogen	52
3.2.6	pH môi trường nuôi cấy ban đầu.....	54
3.3	TINH SẠCH ENDOGLUCANASE	55
3.3.1	Tinh sạch qua cột sắc ký lọc gel sephadex G-100	55
3.3.2	Tinh sạch qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE.....	56
3.4	NHỮNG TÍNH CHẤT LÝ HÓA CỦA ENDOGLUCANASE	57
3.4.1	Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất	57

3.4.2	Nhiệt độ phản ứng tối ưu	58
3.4.3	pH phản ứng tối ưu	60
3.4.4	Độ bền nhiệt độ	61
3.4.5	Độ bền pH	63
3.4.6	Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ	64
3.4.7	Ảnh hưởng của ion kim loại	65
3.4.8	Ảnh hưởng của một số chất tẩy rửa	67
	KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	69
	TÀI LIỆU THAM KHẢO	71
	PHỤ LỤC	79

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Các thiết bị chính được sử dụng trong thí nghiệm	25
Bảng 2.2. Danh sách hóa chất chính được sử dụng trong thí nghiệm	26
Bảng 2.3. Danh sách dung dịch và đệm sử dụng trong thí nghiệm.....	27
Bảng 2.4. Thành phần gel điện di biến tính protein	33
Bảng 3.1. Hoạt tính endoglucanase của 26 chủng <i>A. awamori</i>	43
Bảng 3.2. Trình tự nucleotide đoạn gene 28S rRNA chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099	79
Bảng 3.3. Khả năng sinh tổng hợp endoglucanase theo thời gian	79
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy	80
Bảng 3.5. Ảnh hưởng nồng độ cơ chất cảm ứng	80
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của nguồn carbon.....	50
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của nồng độ lõi ngô	80
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen	52
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của nồng độ ammonium acetate	81
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy ban đầu	81
Bảng 3.11. Hoạt tính endoglucanase các phân đoạn qua cột Sephadex G-100	81
Bảng 3.12. Hoạt tính endoglucanase các phân đoạn qua cột sắc ký DEAE	82
Bảng 3.13. Tóm tắt quá trình tinh sạch endoglucanase từ chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099	57
Bảng 3.14. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến hoạt tính endoglucanase	82
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hoạt tính endoglucanase	82
Bảng 3.16. Ảnh hưởng của pH hỗn hợp phản ứng đến hoạt tính endoglucanase	83
Bảng 3.17. Độ bền nhiệt độ của endoglucanase.....	83
Bảng 3.18. Độ bền pH của endoglucanase.....	84
Bảng 3.19. Độ bền pH theo thời gian của endoglucanase	85
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ đến hoạt tính endoglucanase.....	86
Bảng 3.21. Ảnh hưởng của ion kim loại	66
Bảng 3.22. Ảnh hưởng của một số chất tẩy rửa đến hoạt tính endoglucanase	86

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Sơ đồ thủy phân liên kết β -1,4-O-glucoside của cellulase.....	3
Hình 1.2. Trình tự amino acid tương ứng với cấu trúc bậc 2 của Cel12A từ một số chủng vi sinh vật	8
Hình 1.3. Mô hình cấu trúc không gian (A); Sơ đồ trung tâm xúc tác (B) của Cel12A từ <i>H. grisea</i>	9
Hình 1.4. Cấu trúc vùng CBD của Cel12A từ <i>Humicola grisea</i>	10
Hình 1.5. Cơ chế thủy phân phân tử cellulose (A) và phức hệ cellulose (B) của các enzyme thuộc phức hệ cellulase.....	11
Hình 2.1. Đường chuẩn nồng độ glucose.....	30
Hình 2.2. Quy trình tinh sạch endoglucanase từ chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099.	33
Hình 2.3. Đường chuẩn Bradford dùng BSA làm chuẩn.....	36
Hình 3.1. Hoạt tính endoglucanase của 26 chủng <i>A. awamori</i> nghiên cứu.....	42
Hình 3.2. Điện di đồ DNA tổng số (A); Sản phẩm PCR (B): với khuôn DNA tách chiết từ chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099; Sản phẩm cắt vector tái tổ hợp bằng <i>Xba</i> I và <i>Xho</i> I (C).	44
Hình 3.3. Cây phân loại chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099	45
Hình 3.4. Khả năng sinh tổng hợp endoglucanase theo thời gian của chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099	46
Hình 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp endoglucanase của chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099.....	48
Hình 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ CMC đến khả năng sinh tổng hợp endoglucanase của chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099	49
Hình 3.7. Ảnh hưởng của nồng độ lõi ngô đến khả năng sinh tổng hợp endoglucanase của chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099.....	51
Hình 3.8. Ảnh hưởng của nồng độ ammonium acetate đến khả năng sinh tổng hợp endoglucanase của chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099.....	53

Hình 3.9. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp endoglucanase của chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099.....	54
Hình 3.10. Điện di đồ trên gel polyacrylamide sản phẩm tinh sạch endoglucanase từ chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099 qua cột Sephadex G-100	56
Hình 3.11. Điện di đồ sản phẩm tinh sạch endoglucanase trên gel polyacrylamide.....	57
Hình 3.12. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất lên hoạt tính endoglucanase từ chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099	58
Hình 3.13. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng lên hoạt tính endoglucanase từ chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099	60
Hình 3.14. Ảnh hưởng của pH phản ứng lên hoạt tính endoglucanase từ chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099	61
Hình 3.15. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên độ bền endoglucanase từ chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099	62
Hình 3.16. Ảnh hưởng của pH tới độ bền endoglucanase từ chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099	63
Hình 3.17. Ảnh hưởng của pH tới độ bền endoglucanase từ chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099 theo thời gian.....	64
Hình 3.18. Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ lên hoạt tính endoglucanase từ chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099.....	65
Hình 3.19. Ảnh hưởng của chất tẩy rửa lên hoạt tính endoglucanase từ chủng <i>A. awamori</i> VTCC-F-099.....	68