

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

MA THỊ TRANG

**NGHIÊN CỨU TẠO CHỨNG *ESCHERICHIA COLI*
CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT VANILLIN
TỪ AXIT FERULIC**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Thái Nguyên - 2016

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

MA THỊ TRANG

**NGHIÊN CỨU TẠO CHỨNG *ESCHERICHIA COLI*
CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT VANILLIN
TỪ AXIT FERULIC**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 60.42.02.01

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Người hướng dẫn khoa học: TS. Dương Văn Cường

Thái Nguyên - 2016

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan bản luận văn là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của TS. Dương Văn Cường tại bộ môn Sinh học phân tử và công nghệ gen, Viện Khoa học sự sống, Đại học Thái Nguyên. Các số liệu, kết quả trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào.

Mọi thông tin trích dẫn trong luận văn này được ghi rõ nguồn gốc

Thái Nguyên, ngày 14 tháng 5 năm 2016

Tác giả luận văn

Ma Thị Trang

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới TS. Dương Văn Cường đã hướng dẫn và chỉ bảo tận tình trong suốt quá trình nghiên cứu, thực hiện và hoàn thành đề tài luận văn thạc sĩ.

Tôi xin chân thành cảm ơn ban lãnh đạo Viện Khoa học sự sống, các thầy cô tại bộ môn Sinh học phân tử và công nghệ gen đã tạo điều kiện giúp đỡ tốt nhất để tôi hoàn thành luận văn.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô giáo khoa Khoa học sự sống, trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi trong thời gian tôi học tập và hoàn thành khóa học này.

Cuối cùng, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới gia đình, đồng nghiệp và bạn bè đã luôn động viên, khích lệ, chia sẻ khó khăn cùng tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu hoàn thiện luận văn này.

Thái nguyên, ngày 14 tháng 10 năm 2016

Tác giả luận văn

Ma Thị Trang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC TỪ, CỤM TỪ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	viii
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu của đề tài	2
3. Nội dung nghiên cứu.....	2
4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài	3
4.1. Ý nghĩa khoa học	3
4.2. Ý nghĩa thực tiễn.....	3
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Giới thiệu về vanillin.....	4
1.1.1. Nguồn gốc	4
1.1.2. Cấu trúc, đặc điểm lí hóa.....	5
1.1.3. Đặc tính sinh học.....	6
1.1.4. Vai trò vanillin trong công nghiệp và đời sống	8
1.2. Các con đường sinh tổng hợp vanillin	10
1.2.1. Con đường sinh tổng hợp vanillin trong thực vật	10
1.2.2. Con đường sinh tổng hợp vanillin từ axit ferulic trong vi sinh vật	10
1.3. Các phương pháp sản xuất vanillin	15
1.3.1. Phương pháp tách chiết vanillin từ thực vật	15
1.3.2. Sản xuất vanillin bằng tổng hợp hoá học	16
1.3.3. Sản xuất vanillin bằng ứng dụng công nghệ sinh học	18
1.4. Tiềm năng ứng dụng công nghệ ADN tái tổ hợp trong sản xuất vanillin	21
1.4.1. Các gene mã hóa các enzyme sinh tổng hợp vanillin từ axit ferulic	21

1.4.2. Vi khuẩn E. coli và khả năng sử dụng làm vật chủ sản xuất vanillin.	23
1.5. Tình hình nghiên cứu sản xuất vanillin bằng ứng dụng công nghệ ADN tái tổ hợp trong nước và ngoài nước.....	26
1.5.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	26
1.5.2. Các nghiên cứu trong nước	29
Chương 2: VẬT LIỆU, NỘI DUNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.	30
2.1. Vật liệu nghiên cứu	30
2.1.1 . Các chủng vi sinh vật	30
2.1.2. Các vector tách dòng và biểu hiện nền tảng.....	30
2.1.3. Môi khuếch đại các gene gltA, fcs và ech.	35
2.1.4. Hóa chất.....	36
2.1.5. Thiết bị	37
2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	37
2.3. Nội dung nghiên cứu	38
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	38
2.4.1. Quy trình tách dòng gene và thiết kế vector biểu hiện	38
2.4.2. Nhân gene đích bằng PCR	41
2.4.3. Điện di trên gel agarose.....	42
2.4.4. Tách chiết ADN plasmid.....	43
2.4.5. Lập bản đồ giới hạn.....	44
2.4.6. Thu nhận ADN từ gel agarose	45
2.4.7. Nối ADN bằng ADN ligase	46
2.4.8. Chuẩn bị tế bào khả biến.....	46
2.4.9. Biến nạp ADN vào E. coli khả biến.....	47
2.4.10. Xác định trình tự nucleotide.....	47
2.4.11. Phân tích trình tự gene đã tách dòng.....	48
2.4.12. Nuôi E. coli sinh tổng hợp vanillin từ axit ferulic	48
2.4.13. Lên men sinh tổng hợp vanillin từ cơ chất axit ferulic	49
2.4.14. Phân tích vanillin và axit ferulic bằng HPLC	50
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	51
3.1. Tách dòng và giải trình tự các gene mã hóa các enzyme xúc tác con đường sinh tổng hợp vanillin từ axit ferulic.....	51

3.1.1. Tách dòng và giải trình tự gene <i>gltA</i> từ <i>E. coli</i> DH5 α	51
3.1.2. Tách dòng và giải trình tự gene <i>ech</i> từ <i>Pseudomonas fluorescens</i> VTCC-B-668	55
3.1.3. Tách dòng và giải trình tự gene <i>fcs</i> từ <i>Amycolatopsis sp.</i> HR104 .	60
3.2. Thiết kế vector biểu hiện chứa 3 gene <i>gltA</i> , <i>ech</i> , <i>fcs</i> trên nền tảng vector pET22b+	65
3.2.1. Chuyển gene <i>gltA</i> từ pTZ- <i>gltA</i> sang pET22b+ tạo vector tái tổ hợp pET22-G	65
3.2.2. Chuyển gene <i>ech</i> từ pTZ- <i>ech</i> sang pET22-G tạo vector tái tổ hợp pET22-GE	68
3.2.3. Chuyển gene <i>fcs</i> từ pTZ- <i>fcs</i> sang pET22-GE tạo vector tái tổ hợp pET22-GEF	71
3.3.1. Chuyển gene <i>fcs</i> từ pTZ- <i>fcs</i> sang vector pRSET tạo vector pRSET-F ..	72
3.3.2. Chuyển cụm hai gene <i>gltA</i> và <i>ech</i> từ pET22-GE sang pRSET-F tạo vector tái tổ hợp pRSET-GEF	73
3.4. Sinh tổng hợp vanillin từ axit ferulic sử dụng <i>E. coli</i> tái tổ hợp làm tế bào chủ.....	75
3.4.1. Ảnh hưởng của nồng độ axit ferulic đến sinh trưởng của <i>E. coli</i> ..	75
3.4.2. Xác định axit ferulic tồn dư và vanillin được tổng hợp bởi hệ thống pET22.....	76
3.5. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy lên năng suất sinh tổng hợp vanillin	77
3.5.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy	77
3.5.2. So sánh các môi trường LB, M9 và 2YT	78
3.5.3. Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng IPTG.....	79
3.6. So sánh hiệu suất sinh tổng hợp vanillin giữa hai hệ vector pET22 và pRSET	80
Chương 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	82
4.1. Kết luận	82
4.2. Kiến nghị.....	82
TÀI LIỆU THAM KHẢO	83

DANH MỤC CÁC TỪ, CỤM TỪ VIẾT TẮT

4-CL	: 4-hydroxycinnamate-CoA ligase
ATP	: Adenosine triphosphate
Bp	: Base pair
CCl ₄	: Carbon tetrachloride
CoA	: Coenzyme Acetoacetyl
ĐHQGHN	: Đại học quốc gia Hà Nội
ADN	: Deoxyribonucleic acid
ADN-PK	: ADN protein kinase
ADN-PK	: ADN protein kinase
dNTP	: Deoxyribonucleotide triphosphate
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilenduamin tetraacetic acid
HCLC	: 4-hydroxycinnamate CoA-hydratase/lyase
IPTG	: Isopropy Thyogalactoside
Kb	: Kilo base
LB	: Lauria Broth
NCBI	: NationCenter for Biotechnology Information
PCR	: Polymerase Chain Reaction
SDS	: Sodium doecyl sulfat
TAE	: Tris acetate EDTA
TCA	: Tricarboxylic acid
VAO	: Vanillyl alcohol oxidase
X-gal	: 5-bromo-4chloro-3indoly-β-D-galactoside

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1: Các đặc tính hóa lí của vanillin	5
Bảng 2.2: Mức độ sử dụng vanillin trong các hạng mục thực phẩm	8
Bảng 2.3: Hàm lượng vanillin có trong các mặt hàng thực phẩm và mỹ phẩm	9
Bảng 2.4: Các chủng vi sinh vật với khả năng sản xuất vanillin trên.....	20
Bảng 3.1: Các thành phần của vector pTZ57R/T	32
Bảng 3.2: Các thành phần của vector pRSET – A.....	33
Bảng 3.3: Các thành phần của vector pET22b (+).....	34
Bảng 3.4: Trình tự môi khuếch đại gene.....	35
Bảng 3.5: Danh mục các thiết bị	37
Bảng 3.6: Thành phần phản ứng PCR.....	41
Bảng 3.7: Thành phần phản ứng cắt enzyme	45
Bảng 3.8: Thành phần phản ứng nối	46
Bảng 3.9: Chương trình chạy HPLC phân tích axit ferulic và vanillin	50

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1: Sơ đồ phân bố vanilla trên thế giới	4
Hình 1.2: Công thức cấu tạo của vanillin và vanillin dạng bột	5
Hình 1.3: Con đường Non- β -oxidative deacetylation (CoA dependent).....	11
Hình 1.4: Con đường β -oxidative deacetylation (CoA-dependent).....	12
Hình 1.5: Con đường Non-oxidation decarboxylataion.....	13
Hình 1.6: Con đường CoA-Independent Deacetylation.....	14
Hình 1.7: Con đường Side-Chain Reductive	15
Hình 1.8: Thứ tự các phản ứng tổng hợp vanillin từ guaiacol (Kirk & Othmer, 1983)	17
Hình 1.9: Con đường phân hủy axit ferulic trong <i>Pseudomonas fluorescens</i> BF13 (Calisti et al., 2008).....	23
Hình 1.10: Con đường sinh tổng hợp vanillin từ axit ferulic (Yoon et al., 2005)	24
Hình 1.11: Sơ đồ con đường tái sử dụng CoA từ acety-CoA (Lee et al., 2009)	25
Hình 2.1: Cấu trúc vector tách dòng pTZ57R/T	30
Hình 2.2: Sơ đồ cấu trúc vector pRSET-A	32
Hình 2.3: Cấu trúc vector biểu hiện pET22b(+)	33
Hình 2.4: Sơ đồ quy trình tách dòng các gene <i>gltA</i> , <i>ech</i> , <i>fcs</i> từ <i>E.coli</i> DH5 α ,.....	39
Hình 2.5: Sơ đồ quy trình thiết kế vector biểu hiện chứa các gene	40
Hình 2.6: Chu trình nhiệt của phản ứng PCR khuếch đại gene <i>ech</i>	41
Hình 2.7: Chu trình nhiệt của phản ứng PCR khuếch đại gene <i>fcs</i>	42
Hình 3.1: Sản phẩm PCR gene <i>gltA</i> (A), sản phẩm PCR sau khi tinh sạch (B) và ADN plasmid các dòng khuẩn lạc màu trắng	51
Hình 3.2: Plasmid tái tổ hợp có khả năng mang gene <i>gltA</i> được cắt bằng enzyme <i>NcoI</i>	53
Hình 3.3: Kết quả xác định trình tự gene <i>gltA</i>	54
Hình 3.4: Kết quả PCR khuếch đại gene <i>ech</i>	55
Hình 3.5: Kết quả sàng lọc các dòng mang vector pTZ- <i>ech</i>	56
Hình 3.6: (A) Thiết kế in silico vector pTZ- <i>ech</i> ; (B) Kết quả cắt kiểm tra vector tái tổ hợp đồng thời bằng <i>SacI</i> và <i>EcoRI</i>	57