

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

LÊ TRỌNG TÀI

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN CAO GEN MÃ HÓA PECTINASE
TRONG *Bacillus subtilis* NHẪM ỨNG DỤNG TRONG CÔNG
NGHIỆP XỬ LÝ VẢI BÔNG**

**Chuyên ngành: Hóa sinh thực nghiệm
Mã số: 60 42 01 14**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: TS. LÊ VĂN TRƯỜNG

Hà Nội - 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cùng cộng tác với các đồng sự khác. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn là trung thực.

Hà Nội, ngày tháng năm 2015

Tác giả

Lê Trọng Tài

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Lê Văn Trường, là người thầy đã hướng cho tôi những ý tưởng khoa học, tận tình hướng dẫn, truyền đạt kiến thức, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành bản luận văn này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn tập thể phòng Di truyền Vi sinh vật - Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (nay là Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen vi sinh vật) đã tạo điều kiện cho tôi hoàn thành khóa học và bản luận văn.

Tôi xin cảm ơn tất cả các thầy cô giáo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã chia sẻ, động viên, giúp tôi vượt qua mọi khó khăn để hoàn thành tốt công việc nghiên cứu của mình.

Cuối cùng, tôi xin tỏ lòng biết ơn đến gia đình và bè bạn - những người luôn bên tôi, động viên, góp ý và tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Tác giả

Lê Trọng Tài

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC BẢNG	vi
DANH MỤC HÌNH	vii
MỞ ĐẦU	1
TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Sơ lược về <i>Bacillus subtilis</i>	3
1.2. Hệ biểu hiện <i>Bacillus subtilis</i>	4
1.3. Pectin	5
1.4. Pectinase	6
1.4.1. Khái niệm pectinase.....	6
1.4.2. Phân loại và cơ chế hoạt động của pectinase.....	6
1.5. Pectinase của <i>Bacillus subtilis</i>	10
1.6. Ứng dụng của pectinase kiềm.....	11
1.6.1. Cấu tạo sợi bông tự nhiên	11
1.6.2. Ứng dụng pectinase kiềm trong công nghiệp xử lý vải bông	12
1.6.3. Ứng dụng trong công nghiệp sản xuất bột giấy	13
1.6.4. Ứng dụng pectinase kiềm trong chiết xuất dầu thực vật, trong chế biến cà phê và trà ..	13
1.7. Tình Hình nghiên cứu pectinase tái tổ hợp trên thế giới và Việt Nam.....	13
VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	14
2.1. Vật liệu	14
2.1.1. Các chủng vi khuẩn	14
2.1.2. Hóa chất thí nghiệm	15
2.1.3. Các vector sử dụng	15
2.1.4. Trình tự môi	15
2.2. Môi trường nuôi cấy	16
2.3. Phương pháp nghiên cứu	17
2.3.1. Sàng lọc các chủng <i>B. subtilis</i> có hoạt tính pectinase trên môi trường thạch đĩa	17
2.3.2. Thu nhận pectinase ngoại bào từ các chủng <i>B. subtilis</i> tự nhiên.....	17
2.3.3. Thu nhận pectinase ngoại bào từ các chủng tái tổ hợp.....	17
2.3.4. Định lượng protein theo phương pháp Bradford [11].....	17
2.3.5. Xác định hoạt tính pectinase bằng phương pháp đường khử (Bernfeld 1955)[10].....	19
2.3.6. Xác định hoạt tính pectinase bằng phương pháp phát hiện liên kết đôi	21

2.3.7. Tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn <i>B. subtilis</i>	22
2.3.8. Tách chiết DNA plasmid từ <i>E. coli</i>	23
2.3.9. Tách chiết DNA plasmid từ <i>B. subtilis</i>	23
2.3.10. Các phương pháp thao tác trong sinh học phân tử.....	23
2.3.11. Biến nạp plasmid vào <i>E. coli</i> bằng phương pháp xung điện.....	26
2.3.12. Biến nạp pMSE3/BaP-pel vào <i>B. subtilis</i> 168	26
2.3.13. Phương pháp điện di protein SDS-PAGE (Laemmli, 2009)	27
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	28
3.1. Sàng lọc các chủng <i>B. subtilis</i> phân lập từ trong nước có hoạt tính pectinase cao	28
3.1.1. Sàng lọc chủng <i>B. subtilis</i> có hoạt tính pectinase trên đĩa thạch.....	28
3.1.2. Nghiên cứu khả năng phân cắt pectin ở pH kiềm bởi dịch enzyme ngoại bào của các chủng nghiên cứu.....	29
3.1.3. Xác định hoạt tính pectinase bằng phương pháp phát hiện liên kết đôi	31
3.2. Tách dòng gen pectinase trong <i>E. coli</i>	32
3.2.1. Tách chiết DNA tổng số của các chủng <i>B. subtilis</i>	32
3.2.2. Nhân gen pectinase bằng PCR	33
3.2.3. Tách dòng các gen <i>pel</i> vào <i>E. coli</i>	34
3.2.4. Giải trình tự các gen pectinase.....	36
3.3. Tạo chủng <i>B. subtilis</i> tái tổ hợp sản sinh pectinase	38
3.3.1. Thiết kế vector biểu hiện gen pectinase trong <i>B. subtilis</i>	38
3.3.2. Nghiên cứu chuyển gen pectinase vào <i>B. subtilis</i>	43
3.3.3. Biểu hiện chủng tái tổ hợp BSM sản sinh pectinase trên môi trường lỏng	44
3.4. So sánh tính chất của enzyme pectinase tái tổ hợp với enzyme pectinase sinh ra từ chủng tự nhiên.....	47
3.4.1. So sánh ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt tính pectinase tái tổ hợp và pectinase từ chủng tự nhiên.....	47
3.4.2. So sánh ảnh hưởng của pH tới hoạt tính pectinase tái tổ hợp và pectinase từ chủng tự nhiên	48
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	49
4.1. Kết luận	49
4.2. Kiến nghị	49
TÀI LIỆU THAM KHẢO	50
Tài liệu tiếng Việt.....	50
Tài liệu tiếng Anh.....	50

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

a.a	:	Amino acid
APS	:	Ammonium persulfate
<i>B. subtilis</i>	:	<i>Bacillus subtilis</i>
BMM	:	Môi trường khoáng chất Belisky
BSA	:	Bovine serum albumin
DEAE	:	Diethylethanolamine
DNA	:	Deoxyribonucleic axit
DNSA	:	3,5-Dinitrosalicylic axit
<i>E. coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic axit
HTAB	:	Hexadecyl trimethyl trimethyl trimethyl trimethyl ammonium bromide
ISO	:	International standards organization
kDa	:	Kilo Dalton
LB	:	Luria bertani
M	:	Mole
OD	:	Optical density
PCR	:	Polymerase chain reaction
<i>pel</i>	:	Gen pectinase
Pel	:	Enzyme pectinase
RR	:	Rhuthenium red
<i>rPel</i>	:	Pectinase tái tổ hợp
SDS	:	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	:	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	:	Tetramethylethylenediamine
U	:	Unit

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Phân loại các pectinolytic enzyme	7
Bảng 1.2. Các thành phần cấu tạo sợi bông	11
Bảng 2.1. Thành phần phản ứng nhân gen	23
Bảng 2.2. Chương trình nhân gen bằng PCR	23
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng cắt pKTH/pUC bằng <i>Hind</i> III	24
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng cắt pJET/pel bằng <i>Hind</i> III.....	24
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng gắn gen <i>pel</i> với promoter	24
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng nhân gen dung hợp BaP-pel	24
Bảng 3.1. Kết quả sàng lọc các chủng <i>B. subtilis</i> có khả năng phân hủy pectin trên đĩa thạch.	28
Bảng 3.2. Hoạt tính pectinase ở điều kiện pH phản ứng tối ưu của các chủng nghiên cứu	30
Bảng 3.3. Hoạt tính pectinase của các enzyme thu được	31

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của một đoạn pectin.....	6
Hình 1.2. Thủy phân pectin bởi pectin methylesterases	8
Hình 1.3. Sự thủy phân polygalacturonate bởi endo- và exopolygalacturonase	8
Hình 1.4. Sự phân cắt polygalacturonate bởi pectinase.....	9
Hình 1.5. Sự kết nối giữa cellulose và các chất không phải cellulose trong lớp thứ cấp của sợi bông. Pectin được tồn tại ở hai loại: pectin axit và esterified pectin.....	11
Hình 2.1 Đồ thị đường chuẩn protein	18
Hình 2.2. Sơ đồ phản ứng khử 3,5 dinitrosalicylic axit thành 3 amino, 5-nitrosalicylic axit..	19
Hình 2.3. Đường chuẩn glucose	20
Hình 2.4. Sơ đồ phản ứng cắt pectin axit của pectinase	21
Hình 3.1. Hình ảnh một số chủng <i>B. subtilis</i> tạo vòng thủy phân pectin trên đĩa thạch LB 0,2% pectin.	29
Hình 3.2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng phân hủy pectin của các pectinase từ các chủng nghiên cứu	31
Hình 3.3. Điện di DNA tổng số của các chủng <i>B. subtilis</i>	33
Hình 3.4. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân gen pectinase	34
Hình 3.5. Khuẩn lạc các thể biến nạp <i>E. coli</i> DH5 α mang pJET/pel trên môi trường chọn lọc LB, 100 μ g/ml ampicillin	34
Hình 3.6. Điện di sản phẩm cắt pJET/pel bằng <i>Hind</i> III	35
Hình 3.7. Điện di sản phẩm cắt pJET/pel bằng <i>Hind</i> III	35
Hình 3.8. So sánh theo hàng trình tự amino acid của Pel từ 4 chủng <i>B. subtilis</i> phân lập ở Việt Nam với Pel từ <i>B. subtilis</i> 168.....	37
Hình 3.9. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện <i>pel</i> trong <i>B. subtilis</i>	39
Hình 3.10. Điện di sản phẩm cắt pKTH/pUC bằng <i>Hind</i> III.	40
Hình 3.11. Thu nhận <i>pel</i> từ pJET/pel..	40
Hình 3.12. Sơ đồ nhân gen dung hợp BaP-pel bằng PCR.	41
Hình 3.13. Nhân gen dung hợp BaP-pel bằng PCR.	42
Hình 3.14. Kiểm tra gen dung hợp BaP-pel trong pMSE/BaP-pel.....	42
Hình 3.15. Kiểm tra pMSE/BaP-pel trong tế bào <i>B. subtilis</i> 168 tái tổ hợp.	44
Hình 3.16. Điện di SDS-PAGE dịch enzyme ngoại bào của chủng <i>B. subtilis</i> tái tổ hợp đa copy trên môi trường LB+Kan..	45
Hình 3.17. Kiểm tra sự biểu hiện pectinase của các thể biến nạp đa copy trong tế bào <i>B. subtilis</i> 168 sau 24 giờ nuôi cấy..	45

Hình 3.18. Kiểm tra hoạt tính pectinase của thể biến nạp đa copy BSM và chủng <i>B. subtilis</i> 168 trên cơ chất pectin axit.....	46
Hình 3.19. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt tính enzyme.....	47
Hình 3.20. Ảnh hưởng của pH tới hoạt tính enzyme.....	48

MỞ ĐẦU

Ngành công nghiệp dệt may Việt Nam đang phát triển mạnh, chiếm vị trí quan trọng trong nền kinh tế quốc. Nếu phát triển bông thực hiện đúng tiến độ theo Quyết định số 36/2008/QĐ-TTg của Thủ tướng Chính phủ thì đến năm 2015 sản xuất bông trong nước là 40 ngàn tấn, đáp ứng được 10% nhu cầu và đến 2020 là 60 ngàn tấn đáp ứng được 12% nhu cầu bông xơ tiêu thụ trong nước. Để “chiến lược phát triển ngành công nghiệp Dệt may Việt Nam đến năm 2015, định hướng đến năm 2020” thành công thì ngoài việc thúc đẩy tăng năng xuất và diện tích trồng bông ra chúng ta cần phải cải tiến công nghệ, ứng dụng công nghệ enzyme trong quá trình sản xuất vải bông để tạo ra sản phẩm vải bông chất lượng cao, giá thành rẻ và có thể cạnh tranh được trên thị trường quốc tế.

Sợi bông tự nhiên được cấu tạo bao gồm 95% là cellulose và 5% là không phải cellulose. Vải bông mộc sau khi dệt còn chứa nhiều chất không phải cellulose. Trong quá trình nhuộm vải, nếu không loại các chất không phải cellulose đi thì chúng sẽ làm cản trở thuốc nhuộm thâm nhập vào vải, dẫn đến giảm chất lượng của vải nhuộm. Thông thường để loại bỏ các chất này, vải mộc phải qua bước nấu kiềm (alkaline scouring) để tẩy loại chúng đi, đây là công nghệ đơn giản nhưng nảy sinh vấn đề vừa làm giảm sự rắn chắc của sợi bông do tác động của chất kiềm tới cấu trúc của cellulose, vừa làm ô nhiễm môi trường và tiêu hao rất lớn năng lượng. Để giải quyết vấn đề này, những năm gần đây các nhà công nghệ trên thế giới đã sử dụng enzyme pectinase, một loại enzyme pectinase kiềm để phân hủy pectin trong sợi bông, thay vì sử dụng hóa chất kiềm độc hại. Xử lý vải bông bằng pectinase làm tăng khả năng thấm nước của vải bông, vải mịn và trơn nhẵn hơn, do đó mang lại hiệu quả cao cho quá trình tẩy trắng (bleaching) và nhuộm màu (dyeing), làm cho chất lượng vải tốt hơn.

Việc ứng dụng enzyme pectinase kiềm trong công nghệ xử lý vải bông mới phát triển khoảng 10 năm gần đây. Nhưng được nhiều nhà công nghệ quan tâm vì ích lợi to lớn của chúng trong việc nâng cao chất lượng vải bông, rút ngắn