

NHÂN DÒNG, ĐỌC TRÌNH TỰ VÀ BIỂU HIỆN TRONG *P.pastoris* MỘT cDNA XYLANASE MỚI VỪA ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ

A.awamori

Yinan Yang¹, Kuixian Shan², Lifeng Ping³ và Jingmei Lu³

Đại Học Đông Bắc, Trường Xuân, Trung Quốc.

Đại Học Nông Nghiệp Cát Lâm, Trường Xuân, Trung Quốc.

Viện Tiêu Chuẩn và Chất Lượng Nông Sản, Viện Khoa Học Nông Nghiệp Chiết Giang, Hàng Châu, Trung Quốc.

Chủng SH-2016 có thể sinh ra xylanase được phân lập và nhận ra là *Aspergillus awamori*. Dựa vào đặc điểm sinh lý và hóa sinh của chúng cũng như kết quả phân tích trình tự gen ITS rDNA. Từ chủng *A. awamori* mới phân lập này nhân dòng gen xylanase có kích thước 591bp và trình tự ORF (open reading frame) được dự đoán mã hóa cho một protein có 196 axit amin với trọng lượng khoảng 21kDa. Một plasmid biểu hiện mang gen dưới sự kiểm soát của methanol được điều khiển bởi một promotor điều khiển gen oxidase rượu (AOX1) đã được đưa vào *P.pastoris* và gen xylanase đã được biểu hiện thành công trong môi trường sử dụng methanol như là chất cảm ứng. Xylanase đã được tinh sạch sử dụng cột NI2+-NTA. Các đặc điểm của xylanase tinh sạch đã được khảo sát.

Từ khóa: *Aspergillus awamori*, cDNA, nhân dòng, xylanase, biểu hiện ở sinh vật nhân chuẩn, purification and characterization (tinh sạch và phân tích)

MỞ ĐẦU

Xylanase là các glycosidases, xúc tác cho phản ứng nội thủy phân liên kết 1,4- β -D-xylosidic trong xylan. Xylanase có nguồn gốc từ nấm, vi khuẩn đã thu hút được nhiều sự chú ý trong những năm gần đây do tiềm năng công nghệ sinh học của chúng trong nhiều quá trình công nghiệp khác nhau. Chúng được sản xuất trên quy mô công nghiệp ứng dụng để tẩy trắng giấy và công nghiệp tẩy trắng bột giấy (Polizeli et al., 2005). Cùng với glucanase, pectinase, protease, amylase, phytase, Lypase, Glucanase cũng được sử dụng rộng rãi làm biến tính arabinoxylans trong thành phần của thức ăn, khử độ nhớt của nguyên liệu thô và cải biến chất dinh dưỡng (Silversides et al., 2006). Trong công nghiệp thực phẩm, chúng được sử dụng như những phụ gia trong bột bánh mì cho việc cải biến bột nhào tạo điều kiện thuận lợi và làm tăng chất lượng sản phẩm nướng. Trong nghiệp lên men, sự thêm xylanase từ bên ngoài trong quá trình nghiền đã có ảnh hưởng quan trọng đến giải quyết các vấn đề về arabinoxylans như là độ nhớt của cây cỏ, màng đệm và đã làm giảm tỉ lệ lọc (Lu et al 2005).

Sản xuất xylanase trên quy mô công nghiệp dựa trên tổng hợp sinh học nhờ vi sinh vật. Nấm sợi đã chứng tỏ là có một khả năng lớn tiết ra một

lượng ngẫu nhiên xylanase, với các chủng *Aspergillus* (Shah and Madamwar, 2005), *Penicillium* (Li et al., 2007a, 2007b) *Tricodema* (Azin et al 2007) hầu hết đã được nghiên cứu rộng rãi và được kiểm tra lại khả năng sinh tổng hợp xylanase. Có hai môi trường cho nuôi cấy chủng vi sinh vật sinh xylanase: nuôi cấy chìm và nuôi cấy trên môi trường rắn. hiện nay, 80%-90% xylanase thương phẩm được sản xuất bằng nuôi cấy chìm bởi vì chúng có khả năng tăng cường biểu hiện cao hơn và mức độ tự động hóa cao hơn (Polizeli et al., 2005). Nhiều gen xylanase đã được nhân dòng và biểu hiện trong *E.coli* hoặc *P.pastoris*: một số xylanase tái tổ hợp đã được khảo sát và ứng dụng rộng rãi. Để đáp ứng những ứng dụng rộng rãi và những nhu cầu đặc biệt của thương trường nhiều chủng mới có thể sản xuất ra xylanase đang được tìm kiếm hoặc nhân dòng và biểu hiện gen xylanase với những đặc điểm mới trở thành những hướng đi nóng trong những nghiên cứu về xylanase (Hessing et al., 1994; Polizeli et al., 2005).

Trong bài báo này trình bày một gen mới mã hóa cho xylanase mới được phân lập từ *A.awamoris* và đã được nhân dòng và biểu hiện trong *P.pastoris* X33. Sau đó tối ưu nhiệt độ và pH và ổn định nhiệt độ tinh sạch xylanase đã được xác định để nghiên cứu khả năng ứng dụng trong công nghiệp của chúng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP CHỦNG GIỐNG VÀ NUÔI CẤY

Aspergillus sp SH-2016 đã được chọn lọc từ những chủng thu thập từ các địa phương. Môi trường nuôi cấy gồm có: NH_4Cl , 9 gl -1; K_2SO_4 , 1 gl -1; Na_2NO_3 , 1 gl -1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,3 gl -1; yeast extract, 1 gl -1. pH ban đầu được điều chỉnh đến 8. cho 50 ml môi trường vào bình tam giác (loại 250ml) được ủ với 1ml (1×10^6 bào tử/ml) dịch huyền phù được chuẩn bị từ một ống thạch nghiêng *Aspergillus* sp SH-2016 nuôi ở 30°C lắc 150 vòng/phút.

E.coli JM109 đã được sử dụng như tế bào chủ để biến nạp vector plasmid pMD18-T-xynA và pPICZaA-xynA. *E.coli* biến nạp được nuôi trong môi trường LB lỏng (Luria-Bertani). *P.pastoris* được sử dụng như tế bào chủ cho sự biểu hiện của pPICZaA-xynA. *P.pastoris* X33 đã được biến nạp được nuôi trên môi trường (YPDS) chọn lọc rắn: cao nấm men (1% v/v), pepton 2%(w/v) dextrose (D-glucose, 2% w/v), Sorbitol 1%(w/v) và Zeocin (100 mg ml⁻¹).

Môi trường BMGGY. [5g cao nấm men, 10 g peptone, 50ml KPO_4 1M đệm pH=6.0, 1,7g bazo nito nấm men, 5g amoni sunfat (NH_4)₂SO₄, 5ml glyxerol được khử trùng ở 121°C trong 30 phút và làm lạnh xuống đến nhiệt độ phòng, thêm vào môi trường Biotin (500x1ml) và Histidine

(96x5,2ml)] được sử dụng để nuôi cấy *P.pastoris* tái tổ hợp chứa xylanase. Môi trường BMMY [5g cao nấm men, 10g peptone, 50ml KPO₄ 1M đệm pH6.0, 1,7g base nitơ nấm men và 5g amoni sunfat (NH₃)₂SO₄ được hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút, và để nguội xuống đến nhiệt độ phòng thêm vào môi trường 2,4ml methanol, Biotin (500x1ml) và Histidin (96x5,2ml) được sử dụng cho cảm ứng và biểu hiện xylanase ở *P.pastoris*.

PHÂN LẬP CHỦNG SẢN XUẤT XYLANASE

Các chủng khác nhau bao gồm *Aspergillus* sp. SH-2016 được phân lập từ các mẫu đất, phương thức phân lập chi tiết thực hiện theo phương pháp đã được Abrusci mô tả (Abrusci et al 2005).

XÁC ĐỊNH CHỦNG *Aspergillus* sp, SH-2016

Xác định chủng dựa vào phân tích đặc điểm hình thái chuẩn, phân tích trình tự nucleotide ITS rDNA mã hóa cho enzyme đã được khuếch đại, và vùng ITS (internal transcribed spacer) bao gồm 5.8 S rDNA. Phân tích đặc điểm hình thái của chủng nuôi cấy bằng quan sát trên cùng một kính hiển vi quang học và trên cùng một kính hiển vi điện tử quét. Phân tích trình tự, DNA nhuộm sắc thể được phân lập theo phương pháp Doyle(1987). Sự khuếch đại đã được thực hiện với mỗi thiết kế pITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3') và pITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') trong máy chu trình nhiệt (máy PCR) (Bio-Rad, USA) dưới điều kiện cho phép: 95°C, 3 phút; 35 chu kỳ 95°C, 30 giây; 53°C, 30 giây; 72°C, 2 phút và cuối cùng giữ 10 phút ở 72°C. Mỗi phản ứng PCR lấy 5µl sản phẩm đem kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% ở 70V trong 2 giờ. Đệm TAE [0,4 M tris; 50mM NaOAc (natrioxaloacetat); 10mM EDTA; pH=7,8] và được quan sát tia UV sau khi đã nhuộm ethidiumbromide (0,5µg/ml). sản phẩm PCR được nối với vector pMD18-T (Takara-Nhật Bản) theo phương pháp Liu và Sun (2004). Vector thiết kế đã được chuyển vào tế bào *E.coli* khả biến theo phương pháp Chung (Chung et al., 1989). Sau đó cấy trải trên môi trường LB có chứa Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase), IPTG (isopropyl-1-thio-β-D-galactoside) và ampicillin (50µg/ml). tiếp theo, chủng mà đã chuyển thành công được gọi là *E.coli* JM109/pMD18-T-ITS. **DNA ITS đã được đọc trình tự bằng cả hai bộ kits [**

Trình tự nhận được đã khảo sát và so sánh với các trình tự trong cơ sở dữ liệu ngân hàng gen (Genbanks) sử dụng chương trình BLAST. Phân tích trình tự được thực hiện nhờ sử dụng các chương trình SEQBOOT,

NEIGHBOR-JOIN và DNASENSE của Philips (phiên bản 3.572) sau đó được sử dụng để thành lập cây quan hệ di truyền. Xác minh hệ thống dữ liệu Microseq và so sánh với các trình tự khác thường được sử dụng trong các hệ thống DDJB/EMBL/GenBank.

CHUẨN BỊ RNA TỔNG SỐ CỦA *Aspergillus* sp. SH-2016

Các tế bào thu nhận được thông qua lọc, được rửa hai lần với đệm muối phosphate (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄.7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄ pH=7.3) Sau đó, làm lạnh trong nitơ lỏng, **ground** và chuyển vào một ống nghiệm sạch chứa đệm ly giải (6 M guanidinium hydrochloride, 37.7 M axit xitric, 0.75 M N-lauroyl sarcosine sodium, 0.15 M β-sulfhydryl ethanol), và acid guanidium phenol chlorofol theo phương pháp của Chomozynsky và Sachi (1987) đã được sử dụng để phân lập RNA tổng số từ *Aspergillus* sp.SH-2016. poly (A⁺) RNA đã được chọn lọc từ RNA tổng số bằng cách sử dụng oligo-dT30 (Promega, Madison, USA).

TỔNG HỢP cDNA và KHUẾCH ĐẠI PCR

Mạch cDNA đầu tiên được tổng hợp nhờ RT-PCR với oligo(dT)15 sử dụng mRNA được phân lập từ *Aspergillus* sp.SH-2016 theo **manufacture's protocol** (Clontech, mountain view, CA, USA). cDNA của *Aspergillus* sp.SH-2016 mã hóa cho xylanase đã được khuếch đại nhờ đầu 3' race(Rapid application of cDNA ends) với mỗi 5'-GCTCCTGTGCCGGAACCTG-3' và oligo(dT)15 đã được thiết kế dựa trên trình tự của đầu tận cùng -NH₂ và cDNA mã hóa cho xylanase đã được công bố trên ngân hàng gen quốc tế (NCBI). Và cấu trúc của mRNA và mạch cDNA thứ nhất đều lần lượt được sử dụng như mạch khuôn. PCR đã được thực hiện trong 50μl sử dụng máy chu trình nhiệt (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Sản phẩm PCR đã được quan sát trên gel sau khi đã nhuộm ethidium bromide 1.5%. kết quả là các đoạn DNA được nối với pMD18-T(takara, Otsu, Shiga, Nhật Bản) nhờ sử dụng phương pháp nhân dòng T/A. vector đã thiết kế được chuyển vào tế bào *E.coli* khả biến theo phương pháp của Chung (Chung et al.,1989) và sau đó cấy trải trên môi trường LB có chứa X-gal, IPTG và ampicillin (50μgml⁻¹). Tieepstheo, các chủng dương tính, được nhận ra là *E.coli* JM109/pMD18-T-xynA đã được thu nhận. DNA đã được đọc trình tự. Trình tự đã được thu nhận được phân tích nhờ sử dụng phần mềm DNAMEN (bản 4.0 Lynnon, Biosoft, CANADA) sau đó được khảo sát và so sánh với các trình tự trong cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen sử dụng chương trình BLAST.

THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN CỦA cDNA MÃ HÓA CHO XYLANASE

guanidinium hydrochloride Đoạn ORF của xylanase được thu nhận nhờ sử dụng DNA polymerase chịu nhiệt (Takara, Otsu, Shiga, Nhật Bản) với sự có mặt của các mồi 5'ATTGAATTCGCACCTGTTTCCTGAGCCTG-3' (có vị trí nhận biết của E.coR I) và 5'-GGTCTCGAGTGATGAAATTGTAACGGAG-3'(có vị trí nhận biết của XhoI) được thiết kế theo trình tự của vector pMD18-T-xynA. Sản phẩm PCR và vector pPICZaA (Novogen, New Canaan, CT, USA) đã được xử lý với enzyme giới hạn E.coR I và XhoI, và thu hồi lại nhờ điện di trên gel agarose sau đó được nối lại nhờ T4-DNA ligase. Plasmid pPICZaA đã nối được biến nạp vào E.coli JM109.chọn lọc những khuẩn lạc đơn và chuyển sang môi trường LB lỏng(3ml) với 100µg ampicillin và ủ qua đêm ở 37°C lắc mạnh 200 vòng/phút. Giống nuôi cấy được sử dụng để tách plasmid trong môi trường kiềm yếu (Sambrock et al.,2001). Plasmid đã được xử lý với E.coR I và XhoI với mục đích nhận biết các plasmid tái tổ hợp đã được tái tổ hợp thành công. Sau đó một plasmid mang đoạn gen cDNA (pPICZaA-xynA) được thu được, plasmid đã tái tổ hợp được tạo dòng và chuyển vào P.pastoris X33 nhờ tạo lỗ bằng điện (electroporation), chủng đã biến nạp được chọn lọc trên môi trường YPDS.

THAO TÁC DNA và BIẾN NẠP

Thao tác DNA, phân lập plasmid, và điện di trên gel agarose được thực hiện theo Sambrock (Sambrock et al.,2001). Biến nạp vào E.coli được thực hiện theo Chung (Chung et al.,1989).

TINH SẠCH và BIỂU HIỆN PROTEIN

Tất cả các bước tinh sạch được thực hiện ở 4°C . Môi các khuẩn lạc đơn được chọn lựa chuyển vào 5ml BMGY trước khi nuôi cấy, và được ủ qua đêm ở 30°C. Sau đó, ly tâm 6000 vòng trong 10 phút. Các tế bào được chuyển vào môi trường BMMY 25ml vừa cho cảm ứng và biểu hiện (for 3 d) thêm vào môi trường 250µl methanol, 3 lần một ngày. Sau khi biểu hiện, dịch lên men lỏng được ly tâm ở 8000 vòng/10 phút ở 4°C. Phần dịch nổi có chứa protein xylanase thô được chuyển vào cột NI2+-NTA. Phương pháp rửa và thổi cột được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Protein đã tinh sạch được bảo quản ở -80°C trước khi điện di SDS-PAGE và phân tích các đặc điểm hóa sinh. Nồng độ protein được thực hiện theo phương pháp Bradford (Bradford, 1976) sử dụng abumin huyết thanh bò làm chuẩn.

CÁC PHÂN TÍCH HOẠT ĐỘ XYLANASE

Hoạt độ xylanase được xác định bằng cách đo lượng đường khử được giải phóng từ thủy phân xylan lúa mì, yến mạch (1% w/v) sử dụng phương pháp axit dinitrosalisilic (Miller, 1959). Hỗn hợp phản ứng gồm có 1ml dung dịch hòa tan xylan lúa mì yến mạch 1% trong đệm nitrate 50mM, pH=5 thêm vào 1ml enzyme tinh sạch ở dạng lỏng; ủ ở 50°C trong 30 phút. Một đơn vị xylanase được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để phân giải 1µmol xylose từ xylan trong vòng một phút dưới điều kiện phòng thí nghiệm.

ĐĂNG KÝ TRÌNH TỰ

Trình tự nucleotide được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số EU846238 và EU846238.

KẾT QUẢ

NHẬN BIẾT CHỦNG *Aspergillus* sp.SH-2016 SINH XYLANASE

Nhận biết chủng *Aspergillus* sp.SH-2016 trên cơ sở phân tích chi tiết các đặc điểm hình thái sinh lý và trình tự gen ITS rDNA (gen có mã số đăng ký trên ngân hàng: EU846237). Kết quả phân tích đã chỉ ra rằng chủng này giống với chủng *A. awamori* (tương đồng, 99%/582bps, dựa trên ITS rDNA. //theo phân tích các đặc điểm hình thái sinh lý cũng như so sánh trình tự gen ITS rDNA thấy rằng chủng *Aspergillus* sp.SH-2016 rất giống với chủng *Aspergillus awamori* nên đặt tên là *Aspergillus awamori* SH-2016.

RT-PCR và KHUẾCH ĐẠI cDNA

Sản phẩm được khuếch đại với mỗi 5'-GCTCCTGTGCCGAACCTG-3' và oligo(dT)15 được dùng điện di trên gel agarose. Các đoạn này được khôi phục và nối với plasmid pMD18-T-xynA và được chuyển vào tế bào *E. coli* JM109 khả biến. một số dòng dương tính (khuẩn lạc không màu) đã được thu nhận. ba dòng trong số đó đã được thu nhận để chuẩn bị mạch đơn cho đọc trình tự. **Kết quả thu được một trình tự khoảng 1.6 kb.** Phân tích trình tự sử dụng phần mềm DNAMEN (phiên bản 4.0, Lynnon Biosoft, CANADA) đã chỉ ra rằng đoạn được khuếch đại chứa một khung đọc mở đầy đủ gồm 591bp mã hóa cho 196 axit amin. So sánh trình tự tương đồng thấy rằng trình tự này giống với một số gen xylanase đã được công bố (X78115, D14848). **Alignment result also suggested that the part of cDNA not containing the upstream sequence has been obtained.** Tuy

nhien về mặt khách quan đã nhân dòng được gen cDNA cấu trúc mã hóa cho xylanase. Phương pháp này dễ dàng hơn và rẻ tiền hơn là thiết kế thư viện cDNA. Tiếp theo, cặp môi với điểm nhận biết của E.coR I và XhoI lần lượt được thiết kế và khuếch đại PCR đã được điều khiển để chọn lựa vector tái tổ hợp pMD18-T-xynA và kết quả là, sản phẩm PCR đã được dùng cho gel agarose và được đọc trình tự.

SỰ BIỂU HIỆN và TINH SẠCH XYLANASE

Rất nhiều protein cần phải hình thành các cầu nối disulfide ổn định để các nếp gấp tạo thành dạng nguyên thể. Nếu không có sự hình thành các cầu nối disulfide ổn định, những protein này có bị đào thải hoặc tích lũy như những thể ẩn nhập (thể vùi). Đó là điều không dễ dàng biểu hiện gen của sinh vật nhân chuẩn trong tế bào sinh vật nhân sơ. Thậm chí nếu gen này có thể biểu hiện thì các sản phẩm này thường không hòa tan và không thành dạng hoạt động trong môi trường nội bào. Để tạo điều kiện thuận lợi cho sự biểu hiện của xylanase trong các tế bào chủ không đồng nhất (tế bào có nguồn gốc khác nhau) chúng tôi đã biểu hiện xylanase này trong *P.pastoris*. Đồng thời, pPICZaA vector với trình tự tín hiệu là nhân tố α đã được sử dụng cho sự biểu hiện. Các sản phẩm được biểu hiện trong tế bào chủ có thể được vận chuyển ra môi trường và trình tự tín hiệu cắt nhờ hệ thống nhận biết tín hiệu của tế bào chủ sau đó sản phẩm được biểu hiện sau khi protein tái tạo lại các nếp gấp thành dạng hoạt động. Cấu trúc của gen xylanase (được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số: EU846238) đã được xử lý với enzyme giới hạn được nhân dòng sử dụng vector biểu hiện pPICZaA. Bản đồ plasmid tái tổ hợp được chỉ ra trong hình 4. sau đó, plasmid này được chuyển vào các tế bào *E.coli* JM109 khả biến và được nhân dòng. Sau khi ly trích, plasmid tái tổ hợp chứa đựng cấu trúc gen mã hóa xylanase đã được nhân dòng. Kết quả đọc trình tự plasmid tái tổ hợp đã chỉ ra rằng gen đích đã được thu nhận. cuối cùng plasmid pPICZaA-T-xynA đã được tạo dòng nhờ Sac I và được chuyển vào *P.pastoris* X33 và một số chủng biến nạp thành công đã được thu nhận trên môi trường chọn lọc những khuẩn lạc đơn được chuyển sang môi trường BMMY sau đó ủ khoảng 24 giờ rồi thu nhận tế bào nhờ ly tâm 6000 vòng trong 5 phút. Các tế bào được tái sinh lơ lửng trong môi trường BMGY và được cảm ứng bởi 250 μ l methanol thêm vào ba lần trên một ngày. Sau cảm ứng, ta thu dịch nổi nhờ ly tâm 6000 vòng và hoạt độ của enzyme đã được xác định. Kết quả chỉ ra trong bảng 1. Kết quả này chỉ ra rằng hoạt tính của xylanase đã được biểu hiện thành công trong nghiên cứu này. Sau khi biểu hiện xylanase đã được tinh sạch sử dụng cột NI2+-NTA. Enzyme đã được giữ ở 4°C trong glycerol 20 % trong vài tuần. điện di

SDS-PAGE enzyme tinh sạch đã thu được một băng có kích thước xấp xỉ 21kDa.

ẢNH HƯỞNG CỦA pH TỚI HOẠT TÍNH CỦA XYLANASE

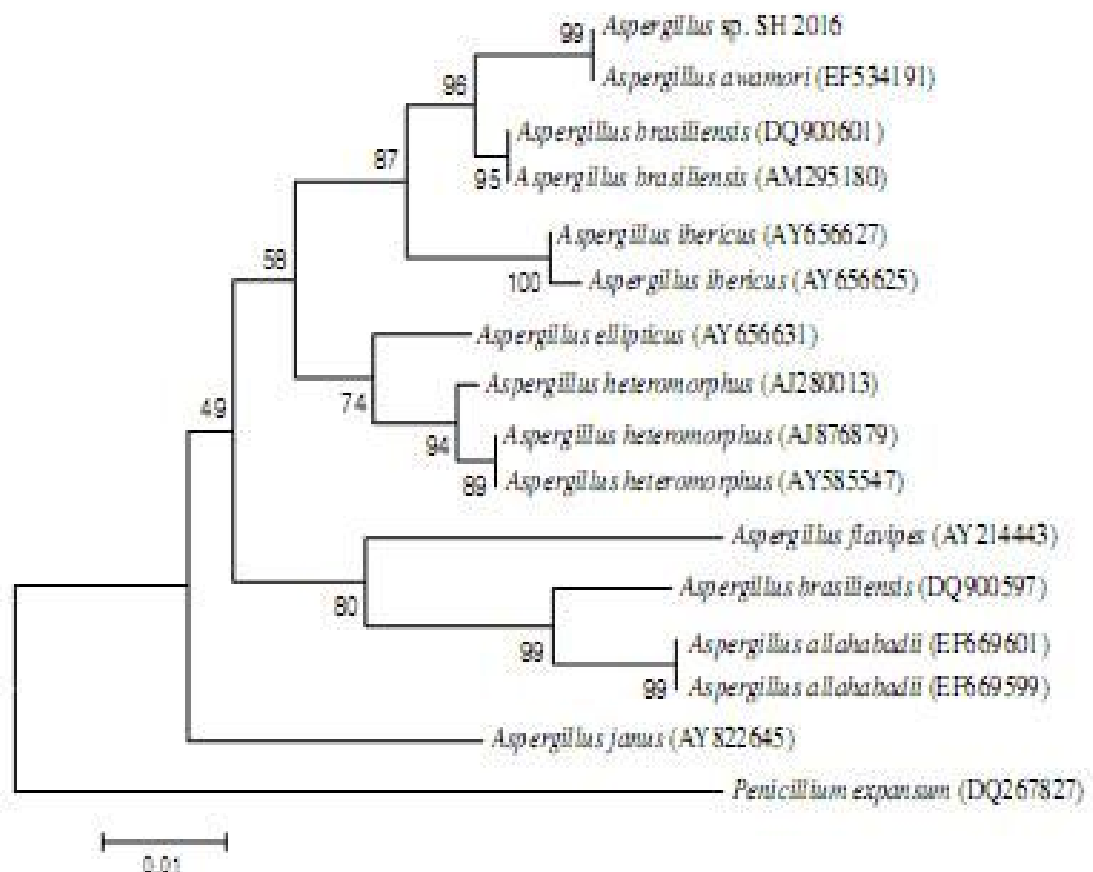


Figure 1. The phylogenetic dendrogram for *Aspergillus* sp. SH 2016 and related strains based on the ITS rDNA sequence. Numbers in parentheses are accession numbers of published sequences. Bootstrap values were based on 1000 replicates. *Penicillium expansum* was used as the outgroup.

Các phần giống nhau của enzyme tinh sạch được hòa tan trong các đệm khác nhau

Sau đó đo hoạt độ tương đối còn lại để đánh giá sự ảnh hưởng của pH trong các điều kiện thí nghiệm chuẩn. Trong thí nghiệm này đệm gồm có axit xitric NaHPO (pH 3.4-8.0) và Tris-HCl (pH=7.2-9.1) với nồng độ 100mM sử dụng cho mỗi lần. sau khi ủ với các đệm pH khác nhau đã khám phá ra rằng xylanase thể hiện trong khoảng pH=3-8 nhưng thể hiện hoạt tính cao nhất ở pH=4. Kết quả chi tiết ở hình 6.

ẢNH HƯỞNG CỦA NHIỆT ĐỘ TỚI HOẠT TÍNH CỦA XYLANASE

Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính của enzyme, enzyme đã được sử lý trước ở các nhiệt độ khác nhau từ 20-85°C. Hoạt tính dư (còn lại) tương đối đã được xác định trong các điều kiện chuẩn phòng thí nghiệm. Hoạt tính của enzyme mà đã thử nghiệm dưới các điều kiện phản ứng gần như là 100%. Hoạt tính của enzyme giảm chậm từ 20-60°C, giảm mạnh ở 70°C, và gần như mất hoạt tính ở 85°C. như vậy enzyme này đã nhạy cảm với nhiệt độ. Chi tiết xem hình 7.

ẢNH HƯỞNG CỦA ION KIM LOẠI VÀ CÁC TÁC NHÂN KHÁC ĐẾN HOẠT TÍNH CỦA XYLANASE

Những ảnh hưởng của các ion kim loại khác nhau và các tác nhân khác đến hoạt tính của xylanase tinh sạch đã được kiểm tra bằng cách ủ những enzyme này với sự có mặt của các tác nhân ở 40°C trong 1 giờ. Hoạt tính tương đối đã được khảo sát theo phương pháp chuẩn. Hoạt tính của xylanase tinh sạch đã bị ức chế bởi một số ion kim loại như Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ag^{+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , và Zn^{2+} . Tuy nhiên, Ca^{2+} và Mg^{2+} có thể tác động tới xylanase. Xylanase đã bị ảnh hưởng mạnh nhất bởi EDTA, kìm hãm 83.4%. Kết quả chi tiết chỉ ra trong bảng 2.

XÁC ĐỊNH CÁC THÔNG SỐ ĐỘNG HỌC

Giá trị k_m cân bằng Michaelis và V_{max} của xylanase đã được xác định bởi thử nghiệm enzyme tinh sạch với gia tăng ngẫu nhiên nồng độ xylan lúa mì từ 0,5-0,8mg.nhiệt độ, pH, và lượng enzyme đã được giữ cùng điều kiện như hoạt tính enzyme chuẩn đã được mô tả ở trên. Giá trị k_m và V_{max} cho xylanase đã được tính toán dựa trên đồ thị Lineweaver-Burk (từ 1979). Các giá trị k_m và V_{max} đã được tính toán là 6.6mg/ml và 982 μ mol khử đường xylose min^{-1} , mg^{-1} , protein theo thứ tự . trong sự thủy phân xylan lúa mì.

THẢO LUẬN

Xylanase là polimer sinh học giàu thứ hai chỉ sau cellulose. Và là một loại polysaccharide hemicellulose chính được tìm thấy ở thành tế bào thực vật (Timell, 1967).xylanase đã thu hút được nhiều nghiên cứu bởi vì tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp của chúng. VD: xylanase được sử dụng để làm tăng chất lượng và tăng kết cấu của các sản phẩm bánh mì, khử được một lượng Clo cần thiết để làm trắng bột giấy và làm gia tăng chất lượng dinh dưỡng trong khẩu phần ăn của gia cầm (Gilbert và Hazewood, 1993).

Nghiên cứu này nhằm mục tiêu phân lập các chủng vi sinh vật có thể sản xuất xylanase cho nhu cầu công nghiệp. Các chủng vi sinh vật khác nhau được phân lập từ mẫu đất nhờ nuôi cấy làm giàu. Chủng *Aspergillus awamori* SH-2016 có khả năng sinh một lượng lớn xylanase đã được phân lập và lựa chọn như là một chủng tốt nhất cho những nghiên cứu tiếp theo của chúng tôi. Nói chung, các vi sinh vật được giống nhau trong những đặc điểm hình thái.

```
1      ATGGCACCTGTTCTGAGCCTGTTTTAGTTTCAAGATCTGCTGGCATTAAATTACGTACAA
1      M A P V P E P V L V S R S A G I N Y V Q
61     AACTACAACGGTAATCTAGGTGATTTCACTTACGATGAAAGTGCCGGCACATTTTCAATG
21     N Y N G N L G D F T Y D E S A G T F S M
121    TATTGGGAGGATGGCGTTTCTTCCGATTTTGTCTGTTGGATTGGGTTGGACAACAGGTTCA
41     Y W E D G V S S D F V V G L G W T T G S
181    AGTAACGCTATCACCTATTCAGCAGAGTACTCAGCCAGTGGCTCTTCATCTTACCTTGCC
61     S N A I T Y S A E Y S A S G S S S Y L A
241    GTATATGGGTGGGTGAACTATCCACAAGCCGAGTATTACATAGTGGAGGATTACGGAGAT
81     V Y G W V N Y P Q A E Y Y I V E D Y G D
301    TACAACCCCTGCAGTTCGCAACTAGTCTTGGAAGTGTCTACTCAGACGGATCTACTTAC
101    Y N P C S S A T S L G T V Y S D G S T Y
361    CAAGTCTGTACAGATACTAGAACTAATGAGCCATCCATCACAGGTACTTCCACGTTTACC
121    Q V C T D T R T N E P S I T G T S T F T
421    CAATACTTCTCTGTTAGAGAGTCCACGAGAACGTCCGGCACGGTTACCGTAGCTAACCAC
141    Q Y F S V R E S T R T S G T V T V A N H
481    TTTAATTTCTGGGCCCAACATGGATTTGGTAACAGTGATTTCAATTACCAGGTGATGGCT
161    F N F W A Q H G F G N S D F N Y Q V M A
541    GTTGAAGCCTGGAGTGGCGCAGGTTCAGCCTCCGTTACAATTTTCATCATAG
181    V E A W S G A G S A S V T I S S *
```

Figure 2. Nucleotide sequence of xylanase and its deduced amino acid.

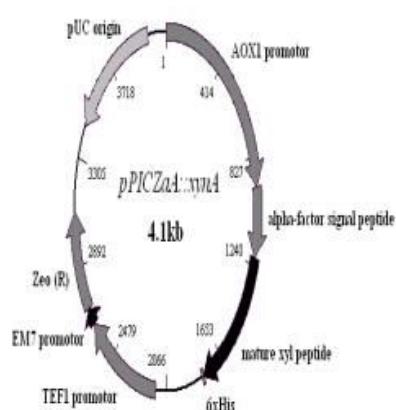


Figure 3. Schematic diagram of expression construct.

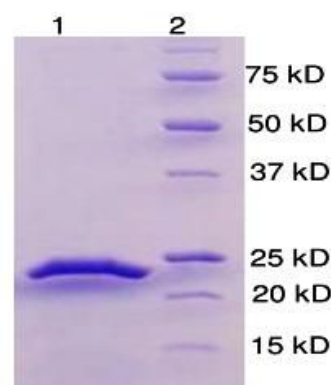


Figure 5. SDS-PAGE analysis of purified xylanase. 1. The purified xylanase. 2. Molecular mass marker proteins.

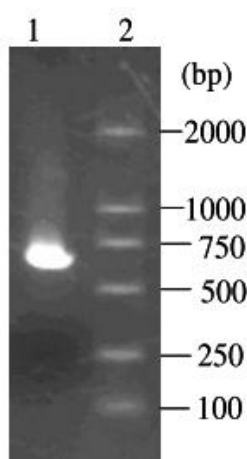


Figure 4. Agarose gel electrophoresis of resulting PCR fragment (Lane 1). Lane 2: Molecular weight

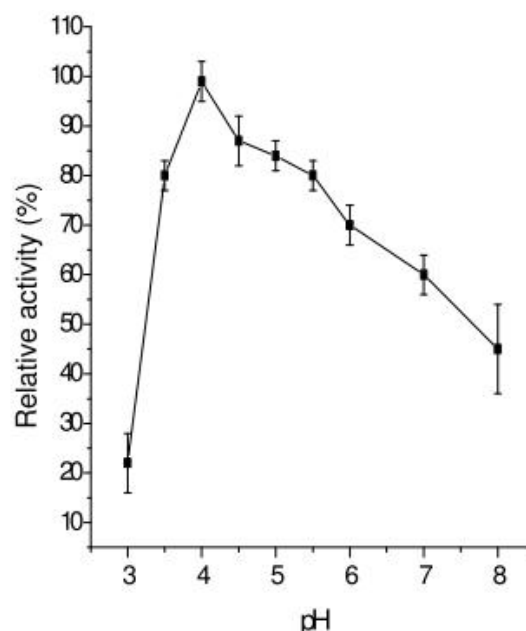


Figure 6. The influence of pH on xylanase activity.

Table 1. Activity of recombinant xylanase.

Strains/plasmid/inducer	Activity(U/mL)
<i>P. pastoris</i>	0
<i>P. pastoris</i> /pPICZαA-xynA	10.08
<i>P. pastoris</i> /pPICZαA-xynA/methanol	121.24
<i>P. pastoris</i> /pPICZαA-xynA/methanol	109.31

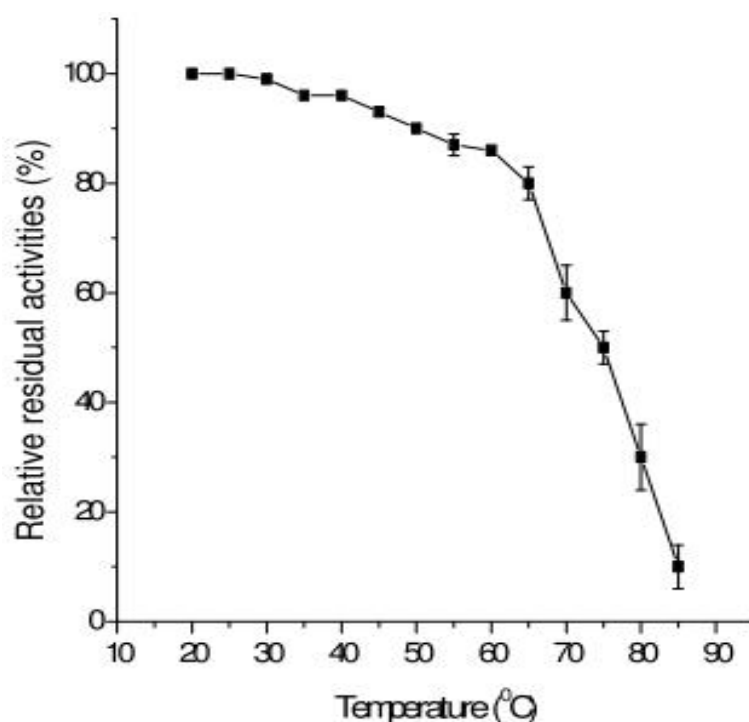


Figure 7. The influence of temperature on xylanase activity.

Table 2. Effect of metal ions and some chemicals on xylanase activity*.

Chemicals	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None		100
EDTA	1	16.6
CoCl ₂	1	98.7
FeCl ₂	1	71.33
CaCl ₂	1	115.33
MgCl ₂	1	110.76
MnSO ₄	1	74.54
ZnSO ₄	1	98.42
AgNO ₃	1	33.9
Hg ₂ Cl ₂	1	26.5
CuSO ₄	1	90.25

*Enzymes activities were determined in the presence of an additional test chemical substance under the standard assay conditions.

Tuy nhiên, những phương pháp nhận biết này thường là có vấn đề vì có thể có sự khác nhau hình thái/biotypes (morpho/biotypes) trong cùng một loài duy nhất. người ta cũng mất nhiều thời gian và kỹ năng cần thiết. phương pháp phân tích trình tự DNA là một phương pháp khách quan, **reproducible**, và là phương pháp nhận biết nhanh chóng vì vậy được người ta sử dụng rộng rãi. Trong cách tiếp cận sinh học phân tử này, chiến lược của chúng tôi đã nhận biết được sợi nấm khử trùng nhờ kết quả so sánh trình tự rDNA cũng như phân tích cây phát sinh được thực hiện trong một số pha của các giải pháp phân loại khác nhau (Liu et al., 2008).

Phương pháp PCR đã được sử dụng rộng rãi cho việc phân tích vùng riboxom đặc trưng của các loài nấm khác nhau (Gardes và Bruns, 1993). Cấu trúc riboxom của cả thực vật và nấm là cụm những vùng gen lặp lại (Erland et al., 1994). Tách vùng ITS từ gen 17S và 25S có thể được khuếch đại nhờ các môi đặc hiệu được neo hai đơn vị này. Đa hình vùng ITS hay được sử dụng để phân loại nhưng ngày nay nó thường được sử dụng để nhận biết các loài nấm giống nhau. trong nghiên cứu này chúng tôi đã kết hợp phương pháp so sánh đặc điểm hình thái, sinh lý để nhận ra vị trí di truyền của các chủng sinh xylanase được phân lập. ngày nay, có nhiều gen xylanase đã được phân lập và được phân tích đặc điểm (Ghost et al., 1993; Haltrich et al., 1996; Ito et al., 1993; Ziaie-Shikolaei et al., 2008). Hơn nữa một số sinh học phân tử của những enzyme này đã được nghiên cứu (Alam et al., 1994; Eliger et al., 1994; Patel và Ray et al 1994; Tsujibo et al., 1990; Wang et al., 1993; Moreau et al., 1994; Kulkarni et al., 1999). Trong nghiên cứu này, một chủng mới *A. awamori* SH-2016 mới được phân lập và nhận ra là có thể sinh xylanase, gen mã hóa xylanase đã được nhân dòng và biểu hiện thành công, gen mã đã sinh một lượng lớn xylanase.

Một số ion có thể ảnh hưởng đến hoạt tính của xylanase, một số ion kim loại đã chỉ ra rằng có ảnh hưởng bền vững trong các phản ứng có mặt xylanase xúc tác. Một trong các đặc điểm thú vị của enzyme này là pH tốt nhất cho xylanase tái tổ hợp khoảng 5.0. khi đó có hoạt động thủy phân hiệu quả, lúa mì gần 4.5. ở pH này là khoảng hoạt động tốt nhất của xylanase đã được phân lập từ vi khuẩn. điều này đã gợi ý một lần nữa rằng xylanase từ *Aspergillus awamori* SH-2016 có thể có lợi để tiêu hóa lượng xylan dư có trong dạ dày động vật dưới điều kiện acid. Đồng thời enzyme này nhạy cảm với nhiệt độ. Để cải thiện tính chịu nhiệt và hoạt tính của xylanase ứng dụng trong công nghiệp xylanase có thể được cải biến nhờ thiết kế hợp lý protein hoặc cải biến trực tiếp sự tiến hóa phân tử của protein (Miyazaki et al., 2006; Liu et al., 2006) đang được tiếp tục trong các nghiên cứu tiếp theo của chúng

tôi. Các thí nghiệm xác định đặc điểm đã thu được một lượng lớn thông tin liên quan đến sinh hóa của xylanase này đã đưa ra một khả năng cho loại xylanase này có thể ứng dụng trên công nghiệp.

Có nhiều loại nấm men trong công nghiệp đã được sử dụng như những hệ thống tái tổ hợp để sản xuất xylanase (Damaso et al., 2003). Những loại sinh vật này có thể thao tác di truyền dễ dàng với khả năng thực hiện nhiều cải biến sau dịch mã trong nhiều sinh vật nhân chuẩn (Cereghino et al., 2002). Một trong những hệ thống thường được sử dụng là nấm men *Pichia pastoris*. Những sinh vật này chiếm tỉ lệ phân bố trong tế bào chủ để cho biểu hiện và sản xuất xylanase (Berrin et al., 2000). Quan trọng nhất nó có thể phát triển thuận lợi trong môi trường đơn giản và rẻ tiền và không tiết bất kỳ một loại xylanase nội bào nào (Berrin et al., 2000). Trong thí nghiệm này, xylanase từ *A. awamori* SH-2016 đã được nhân dòng và biểu hiện thành công ở *Pichia pastoris*. Sự biểu hiện quá mức của loại xylanase này sẽ làm cho sự hiểu biết về cấu trúc của enzyme được dễ dàng hơn và có thể dẫn đến sản xuất một lượng lớn xylanase xúc tác sinh học hiệu quả.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được sự hỗ trợ của chương trình nghiên cứu của sở khoa học công nghệ tỉnh Cát Lâm (No[Số]. 2000567-1) và Quỹ Khoa học tự nhiên của Tỉnh Chiết Giang (số Y506136).

LỜI NGƯỜI DỊCH:

Đây là lần đầu tiên, mình dịch tạp chí chắc hẳn có rất nhiều lỗi và nhiều chỗ chưa đạt và lại kiến thức tiếng anh của mình còn rất hạn chế vì vậy rất mong được sự góp ý nhận xét của các bạn, anh chị, thầy cô...

Những chỗ mà mình dịch chưa được ưng ý đã có đánh dấu bằng màu khác. Mọi ý kiến đóng góp xin gửi về:

Email: huaducthai@gmail.com

Hoặc: Vietnam.biotechnology@gmail.com

Cảm ơn các bạn !
