

**VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**BÁO CÁO NHIỆM VỤ HỢP TÁC HỢP TÁC QUỐC TẾ
VỀ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

Tên đề tài:

**PHÂN LẬP MỘT SỐ VI KHUẨN VÀ NẤM Ở VIỆT NAM
CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP LIPASE MỚI,
NGHIÊN CỨU TÁI TỔ HỢP VÀ ỨNG DỤNG CHÚNG
TRONG CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

Thuộc nghị định thư với Cộng hòa Liên bang Đức

Mã số: VNB04/B05

7714
12/02/2010

Hà Nội 1/2009

I. BÁO CÁO TÓM TẮT	1
1 Tóm tắt đề cương	1
2 Nguyên vật liệu và phương pháp	4
2.1 Hóa chất	4
2.2 Chủng giống và hóa chất	4
2.3 Các phương pháp nghiên cứu	4
2.3.1 Các phương pháp vi sinh vật	4
2.3.2 Các phương pháp hóa sinh	4
2.3.3 Các phương pháp sinh học phân tử	5
3 Các kết quả chính	5
3.1 Phân lập các chủng vi sinh vật có hoạt tính lipase	5
3.2 Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và xác định tính chất hóa lý của lipase tự nhiên (Nội dung 3-4)	7
3.2.1 Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và xác định tính chất hóa lý của lipase từ chủng nấm <i>Geotrichum sp. DTQ-26.3</i>	7
3.2.2 Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và xác định tính chất hóa lý lipase từ chủng vi sinh vật <i>Ralstonia sp. M1</i>	8
3.3 Nhân dòng và biểu hiện các gene mã hóa lipase (Nội dung 5)	9
3.3.1 Nhân dòng gene mã hóa <i>Gcl</i> từ chủng <i>Geotrichum sp. DTQ-26.3</i>	9
3.3.2 Nhân dòng gene mã hóa lipase <i>Fgl4</i> và <i>Fgl5</i> từ chủng <i>Fusarium</i>	11
3.3.3 Nhân dòng gene mã hóa enzyme thủy phân dầu <i>EstR</i>	12
3.3.4 Phá bỏ gene mã hóa lipase <i>Fgl12</i> và <i>Fgl13</i> từ <i>Fusarium</i>	12
3.4 Các nội dung 6-9	14
3.4.1 Đào tạo cử nhân (Nội dung 6)	14
3.4.2 Gửi sinh viên sang Hamburg (Nội dung 7)	14
3.4.3 Gửi cán bộ sang Hamburg thực tập (Nội dung 8)	14
3.4.4 Công bố (Nội dung 9)	15
4 Kết luận	15
II. BÁO CÁO ĐẦY ĐỦ	17
1 Mở đầu	17
1.1 Đại cương về lipase	17
1.1.1 Định nghĩa	17
1.1.2 Nguồn gốc	17
1.1.3 Cấu trúc	18
1.1.4 Cơ chế xúc tác	21
1.1.5 Một số phản ứng đặc trưng	22
1.2 Chaperone	23
1.3 Ứng dụng của lipase	25
1.3.1 Trong công nghiệp chất tẩy rửa	26
1.3.2 Trong công nghiệp thực phẩm	26
1.3.3 Trong tổng hợp hữu cơ	27
1.3.4 Trong công nghiệp hóa dầu	27
1.3.5 Trong công nghiệp bột giấy	28
1.3.6 Một số ứng dụng khác	28
1.4 Lipase tái tổ hợp	28
1.4.1 Nghiên cứu liên quan	28

1.4.2	<i>Lipase và chaperone của Ralstonia sp. M1</i>	31
1.5	Lý do hợp tác	32
2	Vật liệu và phương pháp	38
2.1	Phân lập các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp lipase	38
2.2	Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và xác định tính chất hóa lý của lipase tự nhiên	40
2.2.1	<i>Lipase tự nhiên chủng Geotrichum sp. DTQ-26.3</i>	40
2.2.1.1	Nguyên liệu	40
2.2.1.2	Tế bào và môi trường nuôi cấy	40
2.2.1.3	Hóa chất	40
2.2.1.4	Nhân dòng phân đoạn 26S rRNA	40
2.2.1.5	Phân tích phân đoạn 26S rRNA	41
2.2.1.6	Định tính lipase	41
2.2.1.7	Xác định hoạt tính	41
2.2.1.8	Động thái sinh trưởng	41
2.2.1.9	Cơ chất cảm ứng và nồng độ cơ chất cảm ứng	41
2.2.1.10	Nhiệt độ và pH môi trường nuôi cấy	42
2.2.1.11	Nguồn nitơ	42
2.2.2	<i>Lipase tự nhiên chủng Ralstonia sp. M1</i>	42
2.2.2.1	Hóa chất	42
2.2.2.2	Chủng vi khuẩn, các điều kiện nuôi cấy	42
2.2.2.3	Điện di SDS-PAGE	43
2.2.2.4	Định lượng hoạt tính lipase	43
2.2.2.5	Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, dung môi hữu cơ, chất tẩy rửa và ion kim loại lên hoạt tính lipase và độ bền	44
2.2.2.6	Xác định đặc hiệu cơ chất	44
2.3	Nhân dòng và biểu hiện các gene mã hóa lipase	44
2.3.1	<i>Nhân dòng gene mã hóa Gcl</i>	44
2.3.1.1	Chủng vi sinh vật	44
2.3.1.2	Mồi và vector nhân dòng	44
2.3.1.3	Hóa chất	45
2.3.1.4	Các phương pháp nhân dòng	45
2.3.1.5	Xác định và phân tích trình tự nucleotide	45
2.3.1.6	Phương pháp biểu hiện	45
2.3.2	<i>Nhân dòng gene mã hóa estR</i>	46
2.3.2.1	Hóa chất	46
2.3.2.2	Các plasmid, chủng vi khuẩn và điều kiện nuôi cấy	46
2.3.2.3	Các thao tác DNA	46
2.3.2.4	Xây dựng plasmid và nhân dòng phụ	46
2.3.2.5	Biểu hiện gene	47
2.3.2.6	Tinh sạch enzyme và xác định hàm lượng protein	47
2.3.2.7	Đánh giá hoạt tính esterase	47
2.3.2.8	Điện di gel	48
2.3.2.9	Các kết nối trình tự DNA và amino acid	48
2.3.3	<i>Nhân dòng gene mã hóa lớp Fgl4 và Fgl5</i>	48
2.3.3.1	Nuôi cấy E. coli	48
2.3.3.2	Xác định hoạt tính lipase	49
2.3.3.3	Tách chiết plasmid	49
2.3.3.4	Điện di gel agarose	50
2.3.3.5	Cắt DNA bằng enzyme giới hạn	50

2.3.3.6	Tách phân đoạn DNA từ agarose.....	50
2.3.3.7	Gắn dính DNA.....	50
2.3.3.8	Biến nạp plasmid.....	50
2.3.3.9	Khuếch đại PCR.....	51
2.3.3.10	Điện di polyacrylamide.....	51
2.3.3.11	Định lượng protein tổng số.....	52
2.3.4	<i>Phá bỏ gene mã hóa lipase</i>	52
2.3.4.1	Nguyên liệu.....	52
2.3.4.2	Hóa chất và môi trường biến nạp.....	53
2.3.4.3	Thiết kế cassette promotorFgl-Hyg-terminatorFgl.....	53
2.3.4.4	Biến nạp vào nấm sợi <i>F. graminearum</i>	54
2.3.4.5	Tách DNA từ nấm sợi.....	55
2.3.4.6	Lai Southern.....	56
2.3.5	<i>Tạo chế phẩm lipase</i>	57
2.3.5.1	Lên men lipase.....	57
2.3.5.2	Tạo chế phẩm thô.....	58
2.3.5.3	Tạo chế phẩm tinh sạch.....	58
3	Kết quả và thảo luận.....	59
3.1	Phân lập các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp lipase (Nội dung 1-2).....	59
3.2	Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và xác định tính chất hóa lý của lipase tự nhiên (Nội dung 3-4).....	63
3.2.1	<i>Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và xác định tính chất hóa lý của lipase</i> <i>Geotrichum sp. DTQ-26.3</i>	63
3.2.1.1	Hình thái khuẩn lạc.....	63
3.2.1.2	Phân tích trình tự 26S rRNA.....	64
3.2.1.3	Động học sinh trưởng và sinh tổng hợp lipase.....	65
3.2.1.4	Cơ chất cảm ứng và nhiệt độ cơ chất cảm ứng.....	65
3.2.1.5	Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến sinh tổng hợp lipase.....	66
3.2.1.6	Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sinh tổng hợp lipase.....	67
3.2.1.7	Nguồn nitrogen.....	67
3.2.1.8	Thảo luận.....	67
3.2.1.9	Kết luận.....	68
3.2.1.10	Cơ chất đặc hiệu.....	69
3.2.1.11	Nhiệt độ tối ưu.....	69
3.2.1.12	Độ bền nhiệt.....	70
3.2.1.13	pH tối ưu.....	70
3.2.1.14	Độ bền pH.....	71
3.2.1.15	Ảnh hưởng của ion kim loại.....	71
3.2.1.16	Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ.....	72
3.2.1.17	Ảnh hưởng của chất tẩy rửa.....	73
3.2.1.18	Thảo luận.....	73
3.2.1.19	Kết luận.....	75
3.2.2	<i>Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và xác định tính chất hóa lý của lipase Ralstonia</i> <i>sp. M1</i>	76
3.2.2.1	Ảnh hưởng của nguồn carbon lên sinh tổng hợp lipase.....	76
3.2.2.2	Ảnh hưởng của nguồn nitơ lên sinh tổng hợp lipase.....	77
3.2.2.3	Lên men lượng lớn <i>Ralstonia sp. M1</i>	77
3.2.2.4	Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính lipase và độ bền.....	78
3.2.2.5	Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính lipase và độ bền.....	79

3.2.2.6	Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ lên hoạt tính lipase	81
3.2.2.7	Ảnh hưởng của các ion và chất ức chế lên hoạt tính lipase	82
3.2.2.8	Ảnh hưởng của các chất tẩy rửa lên độ bền lipase	84
3.2.2.9	Đặc hiệu cơ chất	84
3.2.2.10	Đặc hiệu các cơ chất tự nhiên	86
3.2.2.11	Kết luận	87
3.3	Nhân dòng và biểu hiện các gene mã hóa lipase (Nội dung 5)	88
3.3.1	<i>Nhân dòng gene mã hóa Gcl</i>	88
3.3.1.1	Nhân dòng gene lipase	88
3.3.1.2	Phân tích trình tự gene lipase	88
3.3.1.3	Xây dựng hệ thống biểu hiện	89
3.3.1.4	Thiết kế plasmid biểu hiện	90
3.3.1.5	Biểu hiện lipase ở <i>P. pastoris</i>	90
3.3.1.6	Điện di PAGE và SDS-PAGE	92
3.3.1.7	Thảo luận	92
3.3.1.8	Kết luận	93
3.3.2	<i>Nhân dòng gene mã hóa estR</i>	94
3.3.2.1	Phân tích gene mã hóa esterase estR từ <i>Ralstonia sp. M1</i>	94
3.3.2.2	Phân tích trình tự EstR	95
3.3.2.3	So sánh trình tự của EstR với các esterase khác	95
3.3.2.4	Biểu hiện và tinh sạch esterase	96
3.3.2.5	Đặc hiệu cơ chất	97
3.3.2.6	Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính esterase	97
3.3.2.7	Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính esterase	98
3.3.2.8	Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ lên hoạt tính esterase	99
3.3.2.9	Ảnh hưởng của các ion và các chất ức chế lên hoạt tính esterase	100
3.3.2.10	Ảnh hưởng của các chất tẩy rửa lên hoạt tính esterase	100
3.3.2.11	Thảo luận	101
3.3.3	<i>Nhân dòng gene mã hóa lipase Fgl4 và Fgl5</i>	104
3.3.3.1	Thiết kế plasmid chọn dòng trung gian	104
3.3.3.2	Xây dựng các plasmid biểu hiện pGAF4 và pGAF5	104
3.3.3.3	Biểu hiện lipase Fgl4 và Fgl5 tái tổ hợp	107
3.3.3.4	Một số tính chất của hai lipase tái tổ hợp Fgl4 và Fgl5	108
3.3.4	<i>Phá bỏ gene mã hóa lipase</i>	110
3.3.4.1	Nhân cassette PHygT	110
3.3.4.2	Biến nạp vào <i>F. graminearum</i> và chọn lọc các thể biến nạp	110
3.3.4.3	Phân tích thể biến nạp bằng PCR	111
3.3.4.4	Các thể biến nạp của Fgl12	112
3.3.4.5	Các thể biến nạp của Fgl13	112
3.3.4.6	Các thể biến nạp của Fgl14	113
3.3.4.7	Kiểm tra các thể đột biến bằng Southern blot	113
3.3.4.8	Kiến nghị	115
4	Kết luận và kiến nghị	115
5	Tài liệu tham khảo	117

I. BÁO CÁO TÓM TẮT

1 Tóm tắt đề cương

Bảng 2: Danh mục sản phẩm khoa học và công nghệ

TT	Tên sản phẩm	Số lượng	Chi tiêu kinh tế - kỹ thuật hoặc yêu cầu khoa học	T gian h. thành
1	Gene vi sinh vật mã hóa lipase	2 gene	Đăng ký GenBank	6/2008
2	Giống vi sinh vật tái tổ hợp sinh tổng hợp lipase	2 chủng	Tinh sạch, xác định tên chủng, đăng ký GenBank	6/2008
3	Bột lipase dạng thô	10 g	Bột lipase thô có hoạt tính cao 30 unit/ml	6/2007
4	Lipase hoang dại	10 mg	Tinh sạch thành một băng đồng nhất	6/2007
5	Lipase tái tổ hợp	10 mg	Tinh sạch thành một băng đồng nhất	12/2007
6	Phương pháp nhân dòng bằng PCR suy biến	1 Phương pháp	Nắm bắt kỹ thuật thiết kế mồi và PCR suy biến	12/2007
7	Chủng nấm hồng gene lipase	1 chủng	Chủng nấm không còn gene lipase hoạt động	12/2008

Bảng 3: Nội dung và kết quả năm thứ nhất (2006)

TT	Các nội dung, công việc cụ thể	Sản phẩm phải đạt	T gian h thành
1	Phân lập các chủng vi sinh vật có hoạt tính lipase Phân lập trên môi trường LB + 1% dầu đậu nành Phân lập trên môi trường Tauson + 1% dầu đậu nành Phân lập trên môi trường MT5 + 1% dầu olive Phân lập trên môi trường LB + 0,2% tributyrin	5 chủng nấm và 20-50 chủng vi sinh vật có hoạt tính lipase	1-6/2006
2	Xác định và phân loài các vi sinh vật: Nhân dòng các trình tự gene 16S rRNA Nhân dòng các trình tự gene 26S rRNA Đọc trình tự, phân tích trình tự Đăng ký GenBank	Một số trình tự 16S rRNA Một số trình tự 26S rRNA Mã số GenBank	1-12/2006
3	Tối ưu điều kiện nuôi cấy Xác định động thái sinh trưởng và sinh tổng hợp lipase, Tối ưu nhiệt độ nuôi cấy Tối ưu pH môi trường nuôi cấy Tối ưu nguồn carbon Tối ưu nguồn nitơ Tối ưu cơ chất cảm ứng	Số liệu (bảng biểu, hình ảnh minh họa) về động thái sinh trưởng, sinh tổng hợp lipase, các điều kiện nuôi cấy tối ưu (nhiệt độ, pH, nguồn carbon, nguồn nitơ, nguồn cơ chất cảm ứng) đối với sinh trưởng và sinh tổng hợp lipase	7/2006-6/2007
4	Xác định các tính chất hóa lý của lipase tự nhiên Xác định nhiệt độ và pH tối ưu Xác định độ bền nhiệt và pH	Số liệu về tính chất hóa lý của lipase tự nhiên (nhiệt độ và pH tối ưu,	7/2006-6/2007

	Xác định ảnh hưởng của ion kim loại Xác định ảnh hưởng của dung môi hữu cơ Xác định ảnh hưởng của chất tẩy rửa	độ bền nhiệt và pH, ảnh hưởng của ion kim loại, dung môi hữu cơ, ảnh hưởng của chất tẩy rửa)	
5	Nhân dòng các gene lipase mới ở Hamburg Thiết kế môi Chạy PCR Cắt enzyme hạn chế Gắn dính vào vector Đọc trình tự Gắn dính vào vector biểu hiện Biến nạp vào <i>E. coli</i> hoặc <i>P. pastoris</i> Biểu hiện, tinh sạch	1-2 gene mã hóa lipase mới	1/2006-6/2008
6	Đào tạo cử nhân nghiên cứu về lipase	Cử nhân công nghệ sinh học	6/2006
7	Gửi sinh viên sang Viện Thực vật Đại cương (Hamburg, Đức) thực hiện đề tài nghiên cứu sinh	Tiến sỹ	đến 12/2008
8	Gửi cán bộ sang Viện Thực vật Đại cương (Hamburg, Đức) thực hiện một số công việc nghiên cứu	Thực tập sinh	6/2006
9	Viết 1-2 bản thảo bài báo	1-2 bài báo	12/2006

Bảng 4: Nội dung và kết quả năm thứ hai (2007)

TT	Các nội dung công việc cụ thể	Sản phẩm phải đạt	T gian h thành
1	Tối ưu điều kiện nuôi cấy Xác định động thái sinh trưởng và sinh tổng hợp lipase, Tối ưu nhiệt độ nuôi cấy Tối ưu pH môi trường nuôi cấy Tối ưu nguồn carbon Tối ưu nguồn nitơ Tối ưu cơ chất cảm ứng	Số liệu (bảng biểu, hình ảnh minh họa) về động thái sinh trưởng, sinh tổng hợp lipase, các điều kiện nuôi cấy tối ưu (nhiệt độ, pH, nguồn carbon, nguồn nitơ, nguồn cơ chất cảm ứng) đối với sinh trưởng và sinh tổng hợp lipase	7/2006-6/2007
2	Xác định các tính chất hóa lý của lipase tự nhiên Xác định nhiệt độ và pH tối ưu Xác định độ bền nhiệt và pH Xác định ảnh hưởng của ion kim loại Xác định ảnh hưởng của dung môi hữu cơ Xác định ảnh hưởng của chất tẩy rửa	Số liệu về tính chất hóa lý của lipase tự nhiên (nhiệt độ và pH tối ưu, độ bền nhiệt và pH, ảnh hưởng của ion kim loại, dung môi hữu cơ, ảnh hưởng của chất tẩy rửa)	7/2006-6/2007
3	Nhân dòng các gene lipase mới ở Hamburg Thiết kế môi Chạy PCR Cắt enzyme hạn chế Gắn dính vào vector Đọc trình tự Gắn dính vào vector biểu hiện Biến nạp vào <i>E. coli</i> hoặc <i>P. pastoris</i>	1-2 gene mã hóa lipase mới	1/2006-6/2008

	Biểu hiện, tinh sạch		
4	Gửi hai cán bộ sang Viện Thực vật Đại cương (Hamburg, Đức) thực hiện một số công việc nghiên cứu	Thực tập sinh	12/2007
5	Viết 1-2 bản thảo bài báo	1-2 bài báo	12/2007

Bảng 5: Nội dung và kết quả năm thứ ba (2008)

TT	Các nội dung công việc cụ thể	Sản phẩm phải đạt	T gian h thành
1	Nhân dòng các gene lipase mới ở Hamburg Thiết kế môi Chạy PCR Cắt enzyme hạn chế Gắn dính vào vector Đọc trình tự Gắn dính vào vector biểu hiện Biến nạp vào <i>E. coli</i> hoặc <i>P. pastoris</i> Biểu hiện, tinh sạch	1-2 gene mã hóa lipase mới	1/2006-6/2008
2	Xác định tính chất của lipase mới Xác định nhiệt độ và pH tối ưu Xác định độ bền nhiệt và pH Xác định ảnh hưởng của ion kim loại Xác định ảnh hưởng của dung môi hữu cơ Xác định ảnh hưởng của chất tẩy rửa	1-2 lipase tái tổ hợp mới, 1-2 chủng vi sinh vật tái tổ hợp có hoạt tính lipase cao: Số liệu về tính chất hóa lý của lipase tự nhiên (nhiệt độ và pH tối ưu, độ bền nhiệt và pH, ảnh hưởng của ion kim loại, dung môi hữu cơ, ảnh hưởng của chất tẩy rửa)	1/2008-12/2008
3	Tạo cây chuyển gene và nấm chuyển gene và đột biến mất gene ở Hamburg	Chủng nấm hồng gene	1/2008-12/2008
4	Báo cáo nghiệm thu ở Hà Nội và Hamburg		6-12/2008
5	Báo cáo nghiên cứu sinh	Bằng tiến sỹ	12/2008
6	Viết 1-2 bản thảo bài báo	1-2 bài báo	12/2008

2 Nguyên vật liệu và phương pháp

2.1 Hóa chất

2.2 Chủng giống và hóa chất

Các chủng vi sinh vật được phân lập từ các mẫu nước thải, nước ao hồ tù đọng, nước thải lò mổ.

2.3 Các phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Các phương pháp vi sinh vật

1. Lấy mẫu đất, nước thải, làm giàu và phân lập vi sinh vật
2. Xác định động thái sinh trưởng
3. Tối ưu nồng độ cơ chất cảm ứng
4. Khảo sát nguồn nitrogen
5. Tối ưu pH nuôi cấy ban đầu
6. Tối ưu nhiệt độ nuôi cấy
7. Nuôi cấy biểu hiện và cảm ứng

2.3.2 Các phương pháp hóa sinh

1. Định lượng protein
2. Điện di poyacrylamide
3. Định tính lipase
4. Định lượng lipase
5. Xác định đặc hiệu cơ chất
6. Tối ưu pH phản ứng
7. Tối ưu nhiệt độ phản ứng
8. Khảo sát độ bền nhiệt
9. Khảo sát độ bền pH
10. Khảo sát ảnh hưởng dung môi hữu cơ
11. Khảo sát ảnh hưởng ion kim loại

12. Khảo sát ảnh hưởng các chất tẩy rửa

2.3.3 Các phương pháp sinh học phân tử

1. Tách chiết DNA tổng số, DNA plasmid, RNA
2. Khuếch đại DNA, RT-PCR
3. Điện di agarose
4. Điện di acrylamide
5. Cắt DNA
6. Gắn dính DNA
7. Biến nạp plasmid tái tổ hợp
8. Đọc trình tự DNA
9. Phân tích trình tự DNA
10. Phương pháp Southern
11. Phương pháp knock-out gene

3 Các kết quả chính

3.1 Phân lập các chủng vi sinh vật có hoạt tính lipase

10 chủng vi sinh vật biển và 95 vi sinh vật đất có hoạt tính lipase. Từ các chủng vi sinh vật này chủng nấm DTQ-26.3, chủng vi khuẩn M1 có hoạt tính lipase cao nhất được chọn để sinh tổng hợp lipase và thực hiện các nghiên cứu về hình thái, tính chất lý hóa.

Bảng 1. Các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp lipase.

TT	Tên mẫu	Hoạt tính				Nơi lấy mẫu	TT	Tên mẫu	Hoạt tính				Nơi lấy mẫu
		LB + 1% DĐN	Tauson + 1% DĐN	MT5 + 1% D ₈ NĐ	LB + 0,2 Tri				LB + 1% DĐN	Tauson + 1% DĐN	MT5 + 1% D ₈ NĐ	LB + 0,2 Tri	
1	LP1.1			+	+		80	LP12.8					
2	LP1.2				+		81	LP13.1					
3	LP1.3				+		82	LP13.2					
4	LP1.4				+		83	LP13.3					
5	LP1.5				+		84	LP14.1					
6	LP1.6				+		85	LP15.1		+			
7	LP1.7	+		+	+		86	LP15.2		+			
8	LP2.1				+		87	LP15.3					
9	LP2.2				+		88	LP15.4			+		
10	LP2.3				+		89	LP15.5			+		
11	LP2.4				+		90	LP15.6					
12	LP2.5				+		91	LP15.7	+				
13	LP2.6				+		92	LP15.8					
14	LP2.7		+		+		93	LP16.1		+			
15	LP3.1	+		+	+		94	LP16.2		+			
16	LP3.2	+			+		95	LP16.3		+			
17	LP3.3				+		96	LP16.4					
18	LP3.4				+		97	LP16.5					
19	LP3.5				+		98	LP16.6		+			
20	LP3.6	+		+	+		99	LP16.7		+			
21	LP3.7		+		+		100	LP16.8			+		
22	LP3.8		+		+		101	LP17.1		+			
23	LP3.9		+		+		102	LP17.2		+			
24	LP4.1				+		103	LP17.3		+			
25	LP4.2	+			+		104	LP17.4					
26	LP4.3	+			+		105	LP17.5					
27	LP4.4				+		106	LP17.6		+			
28	LP4.5	+		+	+		107	LP17.7			+		
29	LP4.6				+		108	LP17.8			+		
30	LP4.7		+		+		109	LP18.1		+			
31	LP4.8		+		+		110	LP18.2					
32	LP5.1				+		111	LP18.3					
33	LP5.2				+		112	LP18.4		+			
34	LP5.3				+		113	LP18.5			+		
35	LP5.4				+		114	LP19.1		+			
36	LP5.5				+		115	LP19.2		+			
37	LP5.6				+		116	LP19.3		+			
38	LP6.1	+			+		117	LP19.4		+			
39	LP6.2				+		118	LP19.5			+		
40	LP6.3				+		119	LP20.1			+		
41	LP6.4				+		120	LP20.2			+		

42	LP6.5				+		121	LP20.3			+		
43	LP6.6	+			+		122	LP20.4					
44	LP6.7		+		+		123	LP20.5					
45	LP6.8		+		+		124	LP20.6					
46	LP6.9		+		+		125	LP20.7					
47	LP7.1				+		126	LP20.8		+			
48	LP7.2				+		127	LP20.9					
49	LP7.3				+		128	LP20.10			+		
50	LP7.4				+		129	LP20.11			+		
51	LP7.5	+			+		130	LP21.1			+		
52	LP7.6				+		131	LP22.1			+		
53	LP7.7		+		+		132	LP22.2			+		
54	LP8.1						133	LP22.3			+		
55	LP8.2	+					134	LP22.4			+		
56	LP8.3						135	LP22.5			+		
57	LP8.4						136	LP23.1			+		
58	LP8.5						137	LP23.2			+		
59	LP8.6			+			138	LP23.3			+		
60	LP8.7						139	LP24.1			+		
61	LP8.8		+				140	LP24.2			+		
62	LP8.9		+				141	LP24.3			+		
63	LP8.10		+				142	LP25.1			+		
64	LP9.1						143	LP26.1			+		
65	LP9.2						144	LP26.2			+		
66	LP9.3			+			145	LP26.3			+		
67	LP10.1						146	LP27.1			+		
68	LP10.2						147	LP27.2			+		
69	LP10.3						148	LP28.1			+		
70	LP11.1						149	LP28.2			+		
71	LP11.2			+			150	LP29.1			+		
72	LP11.3						151	LP29.1			+		
73	LP12.1	+					152	LP29.2			+		
74	LP12.2						153	LP31.1			+		
75	LP12.3						154	LP31.2			+		
76	LP12.4	+					155	LP20.11			+		
77	LP12.5	+					156	LP27.2			+		
78	LP12.6						157	LP21.1			+		
79	LP12.7												

3.2 Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và xác định tính chất hóa lý của lipase tự nhiên (Nội dung 3-4)

3.2.1 Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và xác định tính chất hóa lý của lipase từ chủng nấm *Geotrichum sp. DTQ-26.3*

Từ các mẫu nước thải có nhiều dầu mỡ thu thập ở lò mổ, ao hồ ở Hà Nội và một số vùng ven biển Việt Nam, 193 chủng vi sinh vật được phân lập, trong đó, 10 chủng vi

sinh vật biển và 95 chủng vi sinh vật đất có hoạt tính lipase. Chủng nấm ký hiệu DTQ-26.3 có hoạt tính lipase cao nhất được xác định hình thái khuẩn lạc và trình tự gen 26S rRNA và tối ưu một số điều kiện nuôi cấy. Trình tự phân đoạn gen 26S rRNA của chủng DTQ-26.3 cho thấy, chủng này thuộc chi *Geotrichum* và được đăng ký trong GenBank với tên gọi là *Geotrichum* sp. DTQ-26.3, mã số DQ640273. Sinh trưởng và sinh tổng hợp lipase của chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 đạt tối ưu (45,9 mg/ml và 2,64 U/ml) sau 48 h nuôi cấy trong môi trường LB. Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng và sinh tổng hợp lipase là 30°C (hoạt tính 34,5 U/ml). pH tối ưu cho sinh trưởng và sinh tổng hợp lipase là 5,0 (145,2 mg/ml và 37,9 U/ml). Nguồn nitrogen tốt nhất để sinh trưởng và sinh tổng hợp lipase là peptone (37,9 U/ml). *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 cho hoạt tính lipase cao nhất khi nuôi trong môi trường LB có bổ sung 0,5% dầu olive ở 37°C, pH 5,0 (34,5 U/ml).

Để có thể áp dụng lipase trong công nghiệp, một số tính chất hóa lý của lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 đã được xác định. Lipase ngoại bào chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 có hoạt tính cao nhất ở nhiệt độ 40°C, pH thích hợp cho enzyme hoạt động là 8 - 8,5. Enzyme bền ở nhiệt độ 30°C và ở pH 8,0. Lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 ưa thủy phân dầu olive nhất trong số các loại dầu thương mại được khảo sát. Nói chung, các ion kim loại đều ức chế lipase, hoạt tính mất đi một nửa đến một phần tư, đặc biệt hoạt tính lipase mất gần hết với 10 mM Pb^{2+} . Riêng ion kim loại Ca^{2+} với nồng độ 1 mM đã kích thích lipase, làm tăng 6% hoạt tính lipase. Dung môi hữu cơ khảo sát đều làm giảm hoạt tính lipase. Tween 20 có tác dụng hoạt hóa lipase, làm tăng 11% hoạt tính. Chất tẩy rửa SDS với nồng độ 1% kìm hãm lipase hoàn toàn.

3.2.2 Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và xác định tính chất hóa lý lipase từ chủng vi sinh vật *Ralstonia* sp. M1

Chủng vi sinh vật được phân lập ở Việt Nam *Ralstonia* sp. M1 sinh tổng hợp ra một lipase ngoại bào và các tính chất hóa lý được đánh giá. Sinh tổng hợp lipase trong môi trường tối ưu trong nồi lên men 5 lít đạt 3,2 U/ml đối với dầu olive. Điện di nhuộm lipase/esterase cho một băng duy nhất ở dịch nổi. Lipase có hoạt tính tối ưu ở 55-60°C và pH 10 và bền tới 75°C và ở khoảng pH kiềm 7,5-11. Enzyme bền trong

nhiều dung môi hữu cơ. Tween 80, Tween 60 và Tween 40 tăng hoạt tính, tuy nhiên Triton X-100, X-45 và SDS ức chế nhẹ lipase. Các ion kim loại có tác dụng ức chế nhưng các chất ức chế bao gồm DEPC, EDTA, PMSF và 2-mercaptoethanol có tác dụng trái ngược nhau. Lipase thủy phân triglyceride của các chuỗi acyl ngắn (C4, C6, và C8) và p-nitrophenyl ester của các chuỗi acyl dài (C14 và C8). Enzyme xúc tác phản ứng thủy phân dầu hạt bông, dầu cọ, dầu dừa và dầu lúa mì tốt hơn so với dầu olive.

3.3 Nhân dòng và biểu hiện các gene mã hóa lipase (Nội dung 5)

3.3.1 Nhân dòng gene mã hóa *Gcl* từ chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3

Gene mã hóa lipase từ chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 được nhân dòng T/A trong vector nhân dòng pTZ57R/T bằng cặp mồi đặc hiệu GclF và GclR. Trình tự nucleotide có mức độ tương đồng 82,2% đến 99,8% so với các trình tự nucleotide mã hóa lipase trong GenBank. Trình tự aa suy diễn lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 có mức độ tương đồng cao từ 83,8 đến 99,6% so với các trình tự aa suy diễn từ các trình tự nucleotide trong GenBank. Gene mã hóa lipase chèn vào vector biểu hiện pPICZ α A sau khi cắt mở vòng bằng enzyme giới hạn *MssI* được đưa vào *Pichia pastoris* GS115. Nồng độ methanol thích hợp là 1%, thời gian nuôi cấy 96 giờ hoạt tính dịch nổi chưa tinh sạch đạt 5 IU/ml.

caggccccacggcgttcttaatggcaacgaggtcatctctggtgtccttgagggaag
 Q A P T A V L N G N E V I S G V L E G K
 61 gttgataccttcaaggggaatcccatgtgaccctcctgttggtgacttgcggttcaag
 V D T F K G I P F A D P P V G D L R F K
 121 cacccccagcctttcactggatcctaccaggggtcttaaggccaacgacttcagctctgct
 H P Q P F T G S Y Q G L K A N D F S S A
 181 tgtatgcagcttgatcctggcaatgccttttcttgcttgacaaagtagtgggcttgga
 C M Q L D P G N A F S L L D K V V G L G
 241 aagattcttcctgataaccttagaggccctctttatgacatggcccagggtagtctcc
 K I L P D N L R G P L Y D M A Q G S V S
 301 atgaatgaggactgtctctaccttaacgttttccgccccgctggcaccaagcctgatgct
 M N E D C L Y L N V F R P A G T K P D A
 361 aagctccccgtcatggtttggatttacggtggtgcctttgtgtttggttcttctgcttct
 K L P V M V W I Y G G A F V F G S S A S
 421 taccctggtaacggctacgtcaaggagagtgtggaaatgggcccagcctgttggtttgtt
 Y P G N G Y V K E S V E M G Q P V V F V
 481 tccatcaactaccgtaccggccccctatggattcttgggtggtgatgccatcaccgctgaa
 S I N Y R T G P Y G F L G G D A I T A E
 541 ggcagcaccaacgctgggtctgcacgaccagcgcaaggggtctcgagtgggttagcgacaac
 G S T N A G L H D Q R K G L E W V S D N
 601 attgccaaactttgggtgatcccgacaaggatcatgatttccggtgagtcgcgtggtgcc
 I A N F G G D P D K V M I F **G E S A G** A
 661 atgagtgttgctcaccagcttgttgctacggaggtgacaacacctacaacggaagcag
 M S V A H Q L V A Y G G D N T Y N G K Q
 721 cttttccactctgccattcttcagctctggcggtcctcttcttactttgactctacttct
 L F H S A I L Q S G G P L P Y F D S T S
 781 gttggtcccgagagtgcctacagcagatttgctcagtatgccggatgtgacaccagtgcc
 V G P E S A Y S R F A Q Y A G C D T S A
 841 agtgataatgacactctggcttgtctccgcagcaagtccagcgatgtcttgacagtgcg
 S D N D T L A C L R S K S S D V L H S A
 901 cgaactcgtatgatcttaaggacctgtttgggtctgctccctcaattccttggtttggt
 Q N S Y D L K D L F G L L P Q F L G F G
 961 cccagacccgacggcaacattattcccgatgccgcttatgagctctaccgcagcggtaga
 P R P D G N I I P D A A Y E L Y R S G R
 1021 tacgccaaaggttccctacattactggcaaccaggaggatgaggggtactattcttggcccc
 Y A K V P Y I T G N Q E D E G T I L A P
 1081 gttgctattaatgctaccactactccccatgtaagaagtgggtgaagtacattttagc
 V A I N A T T T P H V K K W L K Y I C S
 1141 caggcttctgacgcttcgcttgatcgtgtttgtcgtcttaccgggctcttgggtcggag
 Q A S D A S L D R V L S L Y P G S W S E
 1201 gggtcaccattccgcactgggtattcttaatgctcttaccctcagttcaagcgattgct
 S P F R T G I L N A L T P Q F K R I A
 1261 gccattttcactgatttgctgttccagtcctcctcgctggttatgcttaacgctaccaag
 A I F T D L L F Q S P R R V M L N A T K
 1321 gacgtcaaccgctggacttaccttgccacccagctccataacctcgttccatttttgggt
 D V N R W T Y L A T Q L H N L V P F L G
 1381 actttccatggcagtgatcttctttttcaatactacgtggaccttggcccatcttctgct
 T F H G S D L L F Q Y Y V D L G P S S A
 1441 taccgcccgtactttatctcgtttgccaaccaccacgaccccaacgttggtaccaactc
 Y R R Y F I S F A N H H D P N V G T N L
 1501 caacagcgggatatgtacactgatgcaggcaaggagatgcttcagattcatatgattggt
 Q Q R D M Y T D A G K E M L Q I H M I G
 1561 aactctatgagaactgacgactttagaatcgaggaatctcgaactttgagtctgacgtt
 N S M R T D D F R I E G I S N F E S D V
 1621 actctcttcggt
 T L F G

Hình 1. Trình tự nucleotide và amino acid của lipase từ chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.

3.3.2 Nhân dòng gene mã hóa lipase *Fgl4* và *Fgl5* từ chủng *Furasium*

Các bộ môi dùng để khuếch đại gene *fgl4* và *fgl5* được thiết kế chứa các điểm cắt *SacII*+*XbaI* và *EcoRI*+*KpnI*, tương ứng. Các sản phẩm PCR của gene *fgl4* và *fgl5* từ chủng *Furasium* được khuếch đại có kích thước ~1600 bp và được chèn vào vector nhân dòng pGEM-T và cho các plasmid tái tổ hợp pGEF4 và pGEF5 tương ứng.

Các plasmid pGEF4 và pGEF5 nhân dòng trung gian được cắt lần lượt với cặp enzyme *SacII*+*XbaI* và *EcoRI*+*KpnI*, cho các băng tương ứng đúng với tính toán lý thuyết. Vector pGEM-T khoảng 3.000 bp còn *fgl4*[*SX*] và *fgl5*[*EK*] khoảng 1600 bp. Các plasmid nhân dòng trung gian pGEF4 và pGEF5 tinh sạch được cắt bằng cặp enzyme *SacII*+*XbaI* hoặc *EcoRI*+*KpnI* tương ứng. Các sản phẩm cắt hạn chế *fgl4*[*SX*] và *fgl5*[*EK*] tinh sạch được chèn vào vector pGAPZ α A tạo ra các plasmid mới pGAF4 và pGAF5. Dịch gắn dính được biến nạp vào *E. coli* TOF 10F. Một số khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch chứa zeocin được kiểm tra sự có mặt của các đoạn gene *fgl4* và *fgl5* với các cặp môi đã thiết kế ở trên bằng PCR.

Sau khi chọn ngẫu nhiên các thể biến nạp, các dòng mang đúng plasmid tái tổ hợp pGAF4 và pGAF5 được chọn ra và cắt kiểm tra với cặp enzyme tương ứng *SacII*+*XbaI* và *EcoRI*+*KpnI*. Sản phẩm cắt mở vòng pGAPZ α A[P], pGAF4[P] và pGAF5[P] bởi enzyme *PagI* được biến nạp vào nấm *P. pastoris*. Sau 2 ngày, một số khuẩn lạc trắng mọc trên đĩa biến nạp, một số khuẩn lạc trắng được chọn ngẫu nhiên để tách DNA của nấm và chạy PCR để kiểm tra sự có mặt của các đoạn gene *fgl4* và *fgl5*.

Tế bào tái tổ hợp thu được từ 100 μ l dịch nuôi cấy sau các thời gian 0; 24; 48; 72; 96; 144 và 168 giờ được biến tính và điện di trên gel 12,5% polyacrylamide để đánh giá năng suất biểu hiện lipase. Kết quả điện di protein tổng số được thể hiện trên điện di đồ SDS-PAGE. Dựa theo đường chuẩn Bradford thì hàm lượng protein tổng số của *Fgl4* là 0,848 mg/ml dịch biểu hiện tươi và của *Fgl5* là 1,206 mg/ml. Dịch nuôi cấy sau 168 giờ của các chủng tái tổ hợp *Pichia pastoris*/pGAF4.1 và *Pichia pastoris*/pGAF15.17 có hoạt tính lipase được ly tâm 10 phút với 10000 rpm. Dịch nổi được sử dụng để xác định một số tính chất của các lipase tái tổ hợp *Fgl4* và *Fgl5*.

Đối với Fgl4 thì hoạt tính tương đối đạt cao nhất đối với C12 (100%), và sau đó đối với C10 (88%). Đối với Fgl5 thì cơ chất đặc hiệu lại là C8 và hoạt tính đối với C6 (86%) và C12 (92%) cũng rất cao so với C8. Để xác định các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính của các enzyme tái tổ hợp biểu hiện Fgl4 và Fgl5 thì cơ chất được sử dụng tương ứng là C12 và C8.

Đồ thị hoạt tính tương đối của cả hai enzyme đối với nhiệt độ thay đổi rất giống nhau, đều có nhiệt độ tối thích là 37°C. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa pH phản ứng và hoạt tính tương đối của cả hai lipase tái tổ hợp Fgl4 và Fgl5 rất tương tự nhau. Chúng đều có pH tối ưu ở 7,0.

3.3.3 Nhân dòng gene mã hóa enzyme thủy phân dầu EstR

Một gene mới từ chủng *Ralstonia* sp. M1, mã hóa esterase, được nhân dòng ở *Escherichia coli* và trình tự nucleic acid được phân tích. Phân đoạn chèn 1,6 kb cho thấy một khung đọc mở ORF, mã hóa một esterase (320 aa, 34,1 kDa) với pI 9,86. EstR chứa một lỗ oxyanion dự đoán H³⁶G³⁷, một vùng pentapeptide bảo thủ G¹⁰³HSLG¹⁰⁷, và các amino acid xúc tác bảo thủ His²⁶⁵ và Asp²³⁷. Trình tự EstR có 64-70% và 44-48% mức độ tương đồng với các hydrolase/acetyltransferase từ các chủng *Burkholderia* và từ *Ralstonia*, tương ứng, 44% và 38% mức độ tương đồng với esterase đặc hiệu lactone từ *Pseudomonas fluorescens* và *Mesorhizobium loti*, tương ứng. Esterase EstR được biểu hiện với mức độ cao 41 mg/g tế bào tươi. Esterase EstR tinh sạch bằng Ni-NTA cho thấy hoạt tính tối ưu ở dãy nhiệt độ 60-65°C và dãy pH 7,5-9,0 đối với p-nitrophenyl caproate. Enzyme được tìm thấy là chịu được các dung môi hữu cơ, đặc biệt được kích thích bởi ethanolamine. Các ion kim loại cho thấy một tác dụng nhẹ đối với hoạt tính esterase. Chất ức chế phenylmethanesulfonyl fluoride ức chế mạnh esterase. Triton X-45 cảm ứng hoạt hóa EstR, nhưng các chất tẩy rửa làm giảm nhẹ tới mạnh hoặc ức chế hoàn toàn. Trong các p-NP ester được thử, caproate là cơ chất ưa thích nhất của esterase này.

3.3.4 Phá bỏ gene mã hóa lipase Fgl12 và Fgl13 từ *Fusarium*

Đã phá bỏ gene mã hóa lipase Fgl12 và Fgl13 từ *Fusarium* bằng cách thay thế gene mã hóa lipase bằng gene mã hóa enzyme kháng kháng sinh hygromycin.

GATCCGCGCCGGCAAGGCGTCGATCGCCACCGATGAAATCGCCCGCTTCACTCCCGCCGG 60
 CCTGCAGCTCAAGAGCGGCGAGCATCTCGATGCAGACGTGGTCGTACGGCCACGGGGCT 120
 CAAGCTGAAGGTGCTGGGTGGGCGTCCATCAGCGTCGACGGACGTGCGGTGAACCTGGC 180
 TGACACCGTGTCTACAAGGGCATGATGTACAGCGGCGTGCCGAACCTGGCGTCGTCTT 240
 CGGCTACACCAACGCGTCGTGGACGCTCAAGGCCGAGCTGATCGCGCAGTACGTGTGCCG 300
 GCTGCTGAACCACATGCGCTCGGGCGGCTTCGACACCTGCATGCCGCGTCTGGACGATGA 360
 GGCCATGGGCCGCGAGCCGGCCGTCGATCTGACGTCGGGCTATATCCAGCGTGTGCCAG 420
 CATCTGCCAAAGCAGGGCAGGAAGCAGCCGTGGAAGTCGTATCAGAATTACGCGCGTGA 480
 CCTGATGATGCTGAAGTTCGGCTCGCTGGCTGACAGCGCCATGCAGTTCGAGCGCCGCGC 540
 -35
 GCAACCGATGGGCGCGGCACAAGCCGCTTAACGTCACGGGGGCATCGT**GATCCAGACCGT** 600
 -10 V I Q T V 5
 -----Rme----->
CCTGATTGCCGTCGCGCTCGTGATCGCAGCGCCGGTGGCGTTTACCTTTGTCTATCGCACG 660
 L I A V A L V I A A P V A F T F V I A R 25
 GCGCGTAACCAAGGCGTTTCCGCCCGAAGGCAAGTTCATCGATATCGGGGCCGACCGCGT 720
 R V T K A F P P E G K F I D I G A D R V 45
 AACTACACCGACCGCGGCCAGGGTCCTGCCATCGTGTTCTGTCATGGCCTATGCGGAAA 780
 H Y T D R G Q G P A I V F V (H G) L C G N 65
 CCTGCGCAACTTCGCTACCTCGATCTGGAGCGGCTGGCGCAATCGCACCGCGTGATCGT 840
 L R N F A Y L D L E R L A Q S H R V I V 85
 GATCGACCGGCCCGGCTCCGGACGCTCGCTGCGCGGGGCGGCCTCGACGGCGAACATATA 900
 I D R P G S G R S L R G A A S T A N I Y 105
 CGCGCAGGCACGCACAGTCGCCAGTGCATCCAAAACTGGGCCTCGACCAACCGGTGCT 960
 A Q A R T V A Q C I Q K L G L D Q P V L 125
 GGTCCGGGCACTCgCTGGGCGGtGCgATCGcgCTGGcGGTGGGGCTGAATCAtCCGCAGTC 1020
 V G H [S] L G G A I A L A V G L N H P Q S 145
 GGTTCGTGGCTTGCGCTCGTTGCGCCGCTCACGCACAACGAGCACGCGCCCGCCGGTGC 1080
 V R R L A L V A P L T H N E H A P P G A 165
 GTTCAAGGGCTTGGCGTTGACGTCGCCGCTGGCGCGCAGGCTGGTGTCTGGACGCTGGC 1140
 F K G L A L T S P L A R R L V S W T L A 185
 CGTTCCGCTGTCTGATCCTCAACTCGCGCAAGGCGATTGCAGCCGTGTTTTCGCCCCGAGGC 1200
 V P L S I L N S R K A I A A V F A P E A 205
 CATGCCGGAGGATTTCCCGTTCAAGGGCGGCGGCCTGCTGGGGCTGCGTCCGCACGTGTT 1260
 M P E D F P F K G G G L L G L R P H V F 225
 CTATGCGGCATCGTCGGATCTCGTGCCGCGCCGGAAGACCTGCCCGACATGGAACGCCG 1320
 Y A A S S D L V A A P E D L P D M E R R 245
 CTATGCCTCGATGACGGTGCCCGTCGACGTGCTGTACGGCCGGGGCGACCGCATCCTGAA 1380
 Y A S M T V P V D V L Y G R G [D] R I L N 265
 CGTCAAGCGCCAGGGCGAAGCGCTCAAGCAGAAGCTCGAGCGCGTGAACCTGCGGGTGGT 1440
 V K R Q G E A L K Q K L E R V N L R V V 285
 TGACGGCGGGCACATGCTGCCCCTGACGCAGCCGCGCTGACGACGGACTGGATACTCGG 1500
 D G G [H] M L P V T Q P A L T T D W I L G 305
 Primer Rme81R
 TGTGGCCGCCGCGGTGCCCATACAAGCC**GAAGCCGCGCTCAGCC**TAGCCGCGCCGCAC 1560
 V A A A V P I Q A E A A A S A * 320
 Ccagatc 1567

Hình 2. Trình tự nucleotide và amino acid của EstR từ chủng *Ralstonia* sp. M1.

3.4 Các nội dung 6-9

3.4.1 Đào tạo cử nhân (Nội dung 6)

1. Cử nhân Trương Thị Bích Huệ, sinh viên hệ đại học chính quy Khóa 47, thuộc Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội đã thực hiện luận văn tốt nghiệp với đề tài: “***Phân lập một số chủng vi sinh vật biển sinh tổng hợp lipase và đánh giá tính chất hóa lý***”, bảo vệ 5/2006 với kết quả xuất sắc.
2. Phạm Thị Phương, Đại học Nông nghiệp: “***Thiết kế plasmid tái tổ hợp, biểu hiện lipase tái tổ hợp của chủng Geotrichum DTQ-26.3***”, bảo vệ 9/2007.

3.4.2 Gửi sinh viên sang Hamburg (Nội dung 7)

TS Nguyễn Nam Long đã thực hiện đề tài nghiên cứu ở Hamburg từ 7/2005 đến 9/2008: ***Importance of secreted lipases for virulence of the phytopathogen fungus Fusarium graminearum***. Dissertation. A thesis submitted to the Fachbereich Biologie, Universität Hamburg for the degree of doctor rerum naturalium by Nguyen, Nam Long, Hanoi, Vietnam. Hamburg 2008.

NCS Lê Thị Thu Giang đang làm luận án tiến sỹ ở Hamburg theo học bổng BMBF từ 8/2007-8/2010.

NCS Nguyễn Văn Thuật đang làm luận án tiến sỹ ở Hamburg theo học bổng 322 do Thanh Hóa cấp từ 4/2009 đến 4/2013.

3.4.3 Gửi cán bộ sang Hamburg thực tập (Nội dung 8)

1. Cử nhân Đào Thị Tuyết đã thực tập tại Fachbereich Biologie, Universität Hamburg, 6-10/2006: Nhân dòng gene mã hóa Fgl4 và Fgl5 và đánh giá tính chất của hai enzyme tái tổ hợp.
2. Thạc sỹ Nguyễn Thị Thảo đã thực tập tại Fachbereich Biologie, Universität Hamburg, 7-9/2007: Phá bỏ gene mã hóa lipase Fgl12, Fgl13 và Fgl14 của nấm *Fusarium*.
3. TS Quyền Đình Thi đã sang Hamburg trao đổi khoa học tháng 9/2007.

3.4.4 Công bố (Nội dung 9)

1. [Quyên DT](#), Dao TT, Nguyen SLT (2007) A novel esterase from *Ralstonia* sp. M1: gene cloning, sequencing, high-level expression and characterization. [Prot Expr Purif 51\(2\) 133-140.](#)
2. Quyên DT, Le TTG, Nguyen TT (2007) Production and properties of an extracellular alkaline, thermostable, highly organic-solvent-resistant and detergent-inducible lipase from *Ralstonia* sp. M1. *ASEAN JST*, 24(3).
3. Nguyễn SLT, Quyền ĐT (2007) Một số tính chất hóa lý của lipase ngoại bào chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3. *Tạp chí CNSH* 5(1): 31-40.
4. Nguyễn SLT, Quyền ĐT, Trương TBH (2006) Tối ưu một số điều kiện nuôi cấy chủng nấm *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 sinh tổng hợp lipase. *Tạp chí CNSH* 4(4): 455-462.
5. Nguyễn SLT, Quyền ĐT (2009) Nhân dòng, phân tích trình tự và biểu hiện gene mã hóa lipase từ chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3. Bản thảo.

4 Kết luận

Đề tài hoàn thành nhiệm vụ đăng ký, có một số chỉ tiêu vượt mức.

Bảng 2. Danh mục sản phẩm khoa học và công nghệ.

TT	Tên sản phẩm	Số lượng	Chỉ tiêu kinh tế - kỹ thuật hoặc yêu cầu khoa học	Thời gian hoàn thành	Thực hiện
1	Gene vi sinh vật mã hóa lipase	2 gene	Đăng ký GenBank	6/2008	Lipase từ <i>Geotrichum</i> sp. DTQ-26.3 EF061458, esterase từ <i>Ralstonia</i> sp. M1: AY320282
2	Giống vi sinh vật tái tổ hợp sinh tổng hợp lipase	2 chủng	Tinh sạch, xác định tên chủng, đăng ký GenBank	6/2008	1 dòng <i>E. coli</i> và 3 dòng <i>P. pastoris</i> sinh tổng hợp lipase Gel và esterase EstR
3	Bột lipase dạng thô	10 g	Bột lipase thô có hoạt tính cao 30 unit/ml	6/2007	Hoàn thành
4	Lipase hoang dại	10 mg	Tinh sạch thành một băng đồng nhất	6/2007	Hoàn thành
5	Lipase tái tổ hợp	10 mg	Tinh sạch thành một băng đồng nhất	12/2007	Hoàn thành

6	Phương pháp nhân dòng bằng PCR suy biến	1 Phương pháp	Nấm bất kỹ thuật thiết kế mồi và PCR suy biến	12/2007	Hoàn thành
7	Chủng nấm hồng gene lipase	1 chủng	Chủng nấm không còn gene lipase hoạt động	12/2008	2 chủng nấm <i>Fusarium</i> hồng gene Fgl12 và Fgl13

II. BÁO CÁO ĐẦY ĐỦ

1 Mỗi đầu

1.1 Đại cương về lipase

1.1.1 Định nghĩa

Lipase (triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) thủy phân các liên kết ester trong tri-, di-, và monoacylglycerol để tạo ra sản phẩm là các acid béo, diacylglycerol, monoacylglycerol và glycerol.

Hai enzyme lipase và esterase đều phân giải liên kết ester, nhưng lipase là một enzyme hoạt động ở bề mặt phân pha giữa cơ chất là các triacylglycerol mạch dài và nước, còn esterase cũng có tác dụng phân giải các cơ chất này nhưng không có hoạt tính bề mặt.

Một lipase thực thụ sẽ cắt các ester huyền phù của glycerine với các acid béo chuỗi dài như triolein và tripalmitin. Lipase là serine hydrolase. Lipase biểu thị một ít hoạt tính trong các dịch nước chứa cơ chất hòa tan. Ngược lại, esterase biểu thị động học Michaelis-Menten bình thường trong dung dịch. Trong tế bào nhân chuẩn, lipase tham gia vào các bước khác nhau của quá trình đồng hóa lipid bao gồm cả tiêu hóa mỡ, hấp thụ, tạo cấu trúc và đồng hóa lipoprotein (Balashev *et al.*, 2001).

1.1.2 Nguồn gốc

Lipase phân bố rộng rãi từ vi sinh vật, thực vật, đến động vật có vú. Ở động vật có vú, lipase đóng vai trò chìa khóa trong quá trình tiêu hóa lipid (lipase ở tuyến tụy, dạ dày), trong quá trình đồng hóa và dị hóa (lipase ở ruột, gan, lysosome và lipoprotein). Ngoài ra các lipase động vật được chia làm ba nhóm dựa vào sự phân bố và hoạt tính của chúng là các lipase được tiết vào trong đường ruột bởi các tổ chức chuyên hóa (các lipase trong tiêu hóa thực phẩm), các lipase tuyến sữa và của mô.

Trong thực vật, lipase được tìm thấy ở các mô dự trữ của các hạt chứa dầu như: hạt thầu dầu, hạt ngũ cốc, hạt hướng dương, và chủ yếu được tìm thấy trong quá trình nảy mầm. Trong quá trình ngủ nghỉ, lipase không hoạt động của hạt thầu dầu, có hoạt động ngay cả trong quá trình nghỉ.

Lipase vi sinh vật phân bố rộng rãi từ vi khuẩn, nấm men đến nấm. Hầu hết lipase ứng dụng thương mại có nguồn gốc vi khuẩn. Vi sinh vật tổng hợp lipase được tìm thấy trong các môi trường phong phú như nước thải công nghiệp, nhà máy chế biến dầu thực vật, sữa, đất lẫn dầu, hạt cọ dầu, thực phẩm thối giữa (Sztajer *et al.*, 1988), đồng phân, than đá, và suối nước nóng (Wang *et al.*, 1995).

1.1.3 Cấu trúc

Khối lượng phân tử

Dựa trên khối lượng phân tử, lipase có thể được chia thành enzyme khối lượng phân tử nhỏ và lớn (Bảng 1.1).

Bảng 1.1. Đặc điểm của một số lipase vi sinh vật.

Vi sinh vật	Khối lượng phân tử (kDa)	pH tối thích	Nhiệt độ tối thích (°C)	Hoạt tính riêng (U/mg)
<i>Aspergillus niger</i>	38	5,6	25	9,02
<i>C. curcata</i>	195	5,0-8,0	60	4
<i>C. deformans</i>	207	7,0	80	19
<i>Candida cylindracea</i>	120	7,2	45	53,22
<i>Chromobacterium viscosum</i>	30	6,5-7,0	70	22,75
<i>Geotrichum candidum</i>	55	6,6	40	14,20
<i>Humicola lanuginosa</i>	27,5	8,0	60	5,16
<i>Mucor michei</i>		8,0	40	3,25
<i>P. fluorescens</i>	32	7,0	50-55	3,05
<i>Pseudomonas</i> sp.	32	7,8	47	7,80
<i>R. delemar</i>	41,3	5,6	35	2,20
<i>Rhizopus arrhizus</i>	43	8,0		16,08

Lipase khối lượng phân tử nhỏ không có gốc glycosyl và vào khoảng 30 kDa (Dartois *et al.*, 1994). Với vi khuẩn, lipase có khối lượng phân tử lớn được tạo thành từ hai tiểu đơn vị trong khi loại thấp chỉ cho một đơn vị duy nhất.

Đối với nhiều động vật có vú, lipase dịch tụy có khối lượng phân tử xấp xỉ 50 kDa. Lipase của ngô có khối lượng phân tử 65 kDa, của hạt thầu dầu là 76 kDa còn lipase của đậu Hà lan là 62 kDa. Với vi khuẩn, khi lọc gel, người ta phát hiện hai loại cao và thấp tương ứng là 120 và 27 kDa. Kết quả điện di cho thấy loại cao được tạo thành từ hai tiểu đơn vị 80 và 50 kDa trong khi loại thấp chỉ cho một đơn vị duy nhất. Lipase từ các vi khuẩn *Pseudomonas* có khối lượng phân tử khoảng 33 kDa trừ lipase của *Pseudomonas fluorescences* có khối lượng phân tử lên tới 45 kDa.

Trình tự amino acid

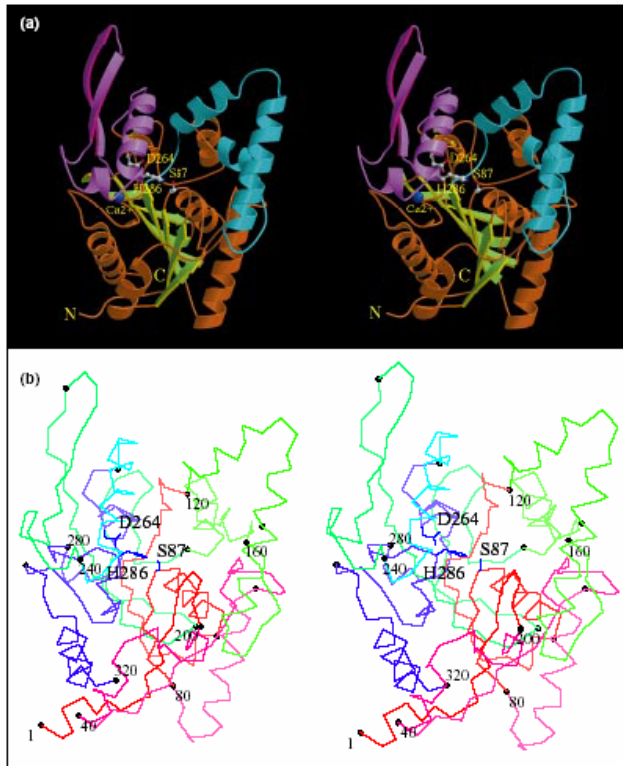
Nhiều trình tự amino acid của lipase được suy ra từ trình tự gene lipase đã tách dòng cho thấy có những điểm tương đồng giữa những cấu trúc không gian của lipase vi sinh vật và động vật có vú, tuy nhiên vẫn có rất ít những trình tự giống nhau hoàn toàn, ngoại trừ những trình tự vùng quanh trung tâm hoạt động. Khi so sánh trình tự amino acid vùng quanh trung tâm hoạt động của nhóm gồm ba enzyme xúc tác protease, lipase, cutinase với esterase, người ta thấy sự tồn tại của trình tự bảo thủ Gly-X1-Ser-X2-Gly (X là một amino acid bất kỳ). Khác biệt duy nhất đã biết với trình tự bảo thủ trên là sự thay thế của alanine cho glycine thứ hai trong subtilisin. Không một trình tự bảo thủ nào được tìm thấy quanh gốc histidine hoặc glutamic acid của trung tâm hoạt động trừ trường hợp trong các enzyme tương đồng từ các loài họ hàng rất gần.

Cấu trúc không gian ba chiều

Việc làm sao để xác định được cấu trúc không gian ba chiều của lipase là một vấn đề quan trọng. Vì nó được coi là cơ sở để hiểu được động học phản ứng, cơ chất đặc hiệu và hoạt tính bề mặt của lipase. Mô hình cấu trúc không gian ba chiều còn cho phép dự đoán các tính chất sinh hóa cũng như cung cấp cơ sở để biến đổi lipase nhằm cải tiến tính bền của lipase. Điều quan trọng trong việc xác định cấu trúc enzyme là phải tinh thể hóa được chúng. Vào năm 1990, cấu trúc tinh thể đầu tiên của hai lipase khác nhau đã được xác định: một enzyme tách từ nấm *Rhizomucor miehei*, một enzyme tiêu hóa của người là lipase tuyến tụy. Sau này cấu trúc không gian ba chiều của rất nhiều lipase đã được chứng minh bằng tinh thể học tia X như lipase của *Geotrichum candidum* (Schrage *et al.*, 1991), *Fusarium solani* (Martinez *et al.*, 1992), *Candida rugosa* (Grochulski *et al.*, 1993), *Pseudomonas glumae* (Noble *et al.*, 1993), *Humicola lanuginosa* (Lawson *et al.*, 1994), *Pseudomonas cepacia* (Kim *et al.*, 1997; Schrage *et al.*, 1997).

Lipase từ các nguồn gốc khác nhau, thường rất khác nhau về kích thước phân tử và có rất ít các trình tự tương đồng. Tuy nhiên trong các lipase đã được kết tinh và nghiên cứu đều cho thấy rằng hầu hết chúng là những protein có cấu trúc α/β với một trung tâm là các gấp nếp β được bao quanh bởi một số dải xoắn helix α (Hình 1.1). Trung tâm xúc tác được tạo bởi bộ ba Ser, His, Asp/Glu, tương tự như ở protease serine và

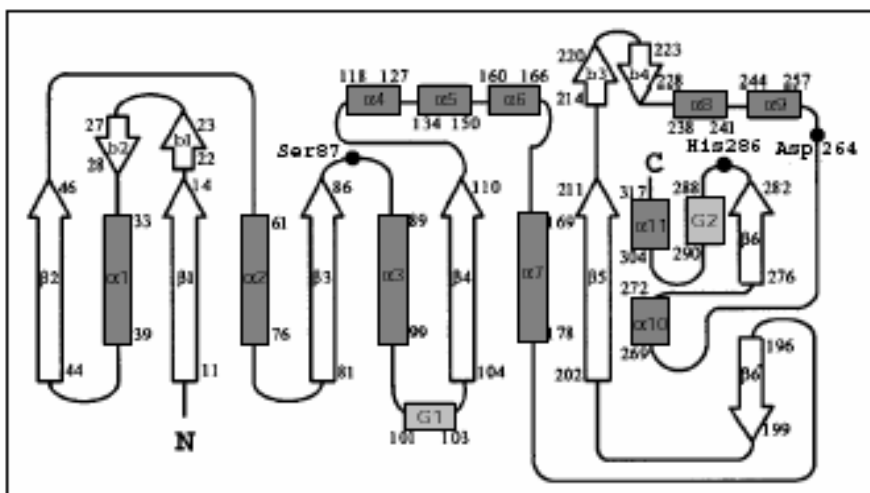
che đậy bằng một cấu trúc giống như cái “nắp” gồm một hoặc hai chuỗi xoắn α (Misset *et al.*, 1994).



Hình 1.1. Cấu trúc không gian ba chiều của lipase chủng *Burkholderia cepacia*. Có cấu trúc α/β với trung tâm là các gập nếp β được bao quanh bởi một số dải xoắn α . Trung tâm xúc tác được tạo bởi bộ ba Ser87, His286 và Asp264 (a) và (b) (Kim *et al.*, 1997).

lượng cầu disulfide không cố định mà thay đổi tùy theo loại lipase có nguồn gốc khác nhau.

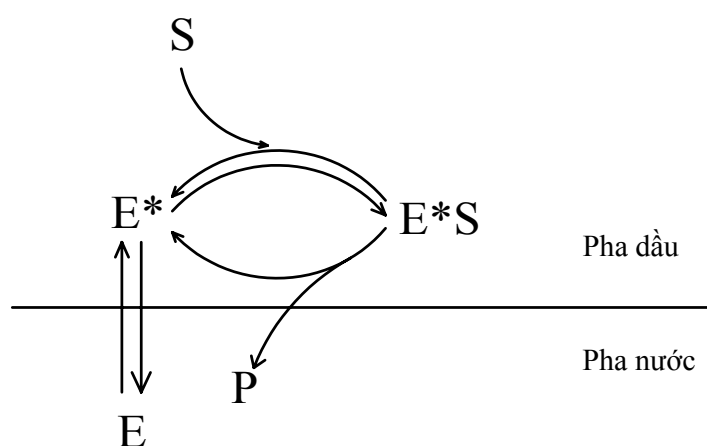
Bình thường trung tâm xúc tác không bộc lộ ra bên ngoài môi trường, nhưng khi tương tác với cơ chất ở bề mặt tiếp xúc giữa dầu và nước thì dạng cấu trúc thay đổi và trung tâm hoạt động lại bộc lộ ra bên ngoài (Misset *et al.*, 1994). Trong cấu trúc của lipase còn có một trình tự bảo thủ Gly-X₁-Ser-X₂-Gly (X là một amino acid bất kỳ) cũng tương tự như ở protease, trình tự này nằm trong phần trung tâm hoạt tính nhưng nó lại tham gia vào việc nhận biết lipid khi enzyme hoạt động ở bề mặt. Cấu trúc cuộn xoắn của lipase được giữ vững bằng các cầu disulfide và nhờ mạng lưới liên kết hydro. Số



Hình 1.2. Cấu trúc α/β của lipase chủng *Burkholderia cepacia* với trung tâm gấp nếp β (các mũi tên), các dải xoắn helix α và dải xoắn helix 3_{10} (G1 và G2) (hình chữ nhật) và trung tâm xúc tác Ser87, Asp264 và His286 (chấm đen to tròn).

1.1.4 Cơ chế xúc tác

Trong quá trình xúc tác, một đặc điểm quan trọng của lipase là có sự thay đổi về dạng không gian của vùng hoạt động. Điều này thể hiện ở “cái nắp” che đậy trung tâm hoạt động. Nó vẫn bao quanh vùng hoạt động trong suốt quá trình xúc tác, nhưng rất linh hoạt để có thể mở ra cho cơ chất đi vào trung tâm phản ứng và sau đó cho sản phẩm đi ra. Sự đóng mở này được giữ vững bằng các tương tác kỵ nước, các liên kết hydro giữa phần nắp và phần còn lại của phân tử protein (Woolley, Peterson, 1994).



Hình 1.3. Mô hình cơ chế xúc tác của lipase ở bề mặt tiếp xúc giữa pha dầu-nước.

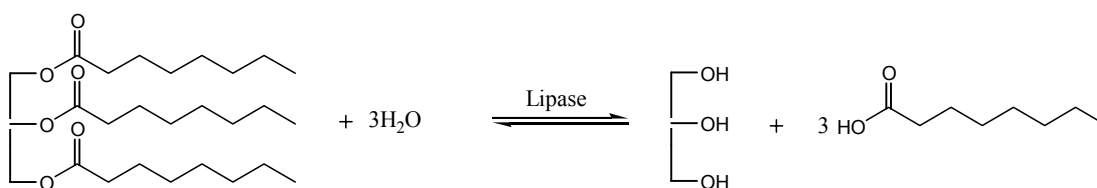
E là lipase hòa tan có hoạt tính, E* là lipase hoạt động được hấp thu, S là cơ chất không tan trong nước, E*S là các phức hệ cơ chất lipase, P là sản phẩm thủy phân.

Lipase xúc tác cho một phản ứng hóa học qua hai bước (Hình 1.3) (Martinelle, Hult, 1994). Bước 1: lipase liên kết với bề mặt tiếp xúc giữa pha dầu và pha nước, đây

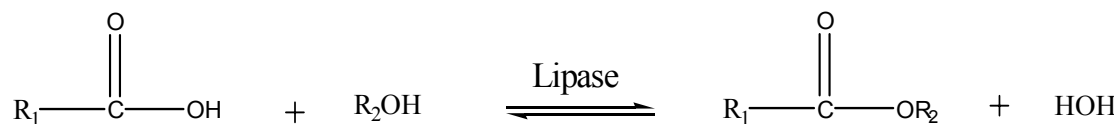
có thể là bước hoạt hóa enzyme. Bước 2: lipase liên kết với cơ chất trên bề mặt để hình thành phức hợp enzyme - cơ chất.

1.1.5 Một số phản ứng đặc trưng

Lipase có thể tham gia xúc tác cho rất nhiều phản ứng hóa học khác nhau. Phản ứng thủy phân là một phản ứng đặc trưng với sự tham gia của lipase. Phản ứng thủy phân được bắt đầu khi nguyên tử O của serine tấn công vào nguyên tử C của nhóm carboxyl tham gia trong liên kết ester để hình thành phức hợp tứ diện trung gian. Tham gia vào việc tạo thành phức hợp trung gian này còn có sự tham gia của gốc histidine. Tiếp đó phức trung gian được phân giải thành phức hệ acyl-enzyme. Cuối cùng nhờ có sự tham gia của phân tử nước, lipase tự do được giải phóng cùng một acid béo. Quá trình thủy phân sẽ tạo thành acid béo và glycerol (Hình 1.4A). Phản ứng ester hóa (Hình 1.4B) là phản ứng giữa một acid béo và rượu tạo ra ester.

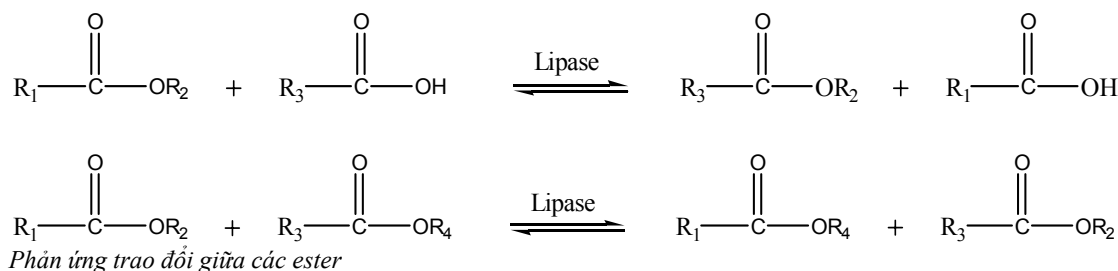


Hình 1.4A. Phản ứng thủy phân.



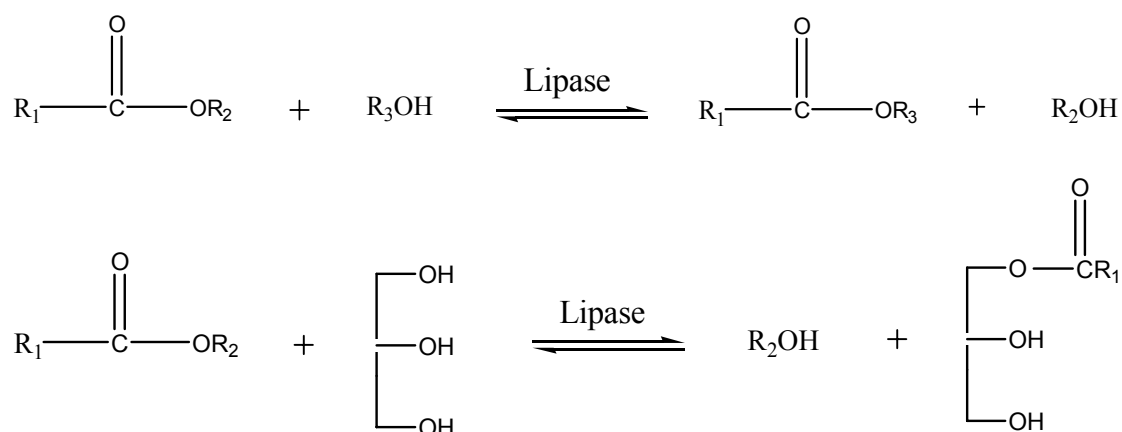
Hình 1.4B. Phản ứng ester hóa.

Phản ứng trao đổi giữa các ester (Hình 1.4C) là phản ứng trao đổi giữa các ester hoặc giữa ester và acid béo.



Hình 1.4C. Phản ứng trao đổi giữa các ester.

Phản ứng chuyển ester (Hình 1.4D) là phản ứng giữa ester với rượu hoặc glycerol.



Hình 1.4D. Phản ứng chuyển ester.

1.2 Chaperone

Một trong những vấn đề hay gặp khi biểu hiện protein ở nội bào của tế bào *E. coli* là chúng thường tạo thành thể vùi (inclusion bodies). Mặc dù biểu hiện protein dưới dạng thể vùi cũng có một số ưu điểm nhất định nhưng protein tạo ra thường bị mất hoạt tính sinh học và quá trình tái tạo cấu trúc tương đối phức tạp và tốn kém. Có nhiều cách để hình thành cấu trúc bậc ba đúng của protein ngoại lai như biểu hiện gene ngoại lai tiến hành song song với việc biểu hiện chaperone phân tử hoặc sử dụng chủng vi khuẩn thiếu hụt thioredoxin để duy trì khả năng oxy hóa thích hợp, làm giảm tỷ lệ tổng hợp protein, nuôi cấy tế bào ở nhiệt độ thấp, hoặc biểu hiện protein quan tâm ở dạng lai với chuỗi polypeptide có khả năng tan tốt trong tế bào chủ. Trong các cách trên, cách biểu hiện protein song song với biểu hiện phân tử chaperone được xem như cách tối ưu để làm tăng khả năng tiết của protein và đảm bảo quá trình hình thành cấu trúc của protein diễn ra chính xác. Tuy nhiên, cách này chỉ thành công với một số protein nhất định. Nếu protein được biểu hiện quá mạnh trong tế bào thì dù có biểu hiện cùng với chaperon, phân tử protein tạo ra vẫn có nguy cơ hình thành cấu trúc sai lệch hoặc thiếu hụt cầu disulfide.

Protein sau khi được tổng hợp muốn trở thành protein có hoạt tính sinh học thì chúng ta phải có cấu trúc không gian đúng. Quá trình hình thành cấu trúc đúng phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố. Có nhiều bằng chứng cho rằng quá trình hình thành cấu trúc protein *in vivo* có sự tham gia tích cực của phân tử chaperone. Các phân tử chaperone được biết rõ nhất hiện nay là hệ thống GroEL-GroES (Hình 1.5), DnaK-

[illegible]

DnaK nhận biết chuỗi heptamer của amino acid chứa 4-5 gốc kỵ nước. Trung bình cứ 36 amino acid kế tiếp lại có một trình tự được nhận biết bởi DnaK. DnaJ liên kết tự do với phức hợp trung gian đang hình thành cấu trúc, hoạt hóa DnaK làm cho DnaK liên kết chặt chẽ hơn và định hướng DnaK đến vùng có ái lực cao. GrpE là nhân tố làm biến đổi phức hợp: các protein được giải phóng ra có thể có cấu trúc cuộn xoắn đúng hoặc có thể được giữ bởi DnaK-DnaJ hoặc được chuyển xuôi chiều cho phức GroEL-GroES. GroEL là phân tử lớn có khối lượng 800 kDa bao gồm hai chuỗi heptamer xếp chồng lên nhau. GroEL liên kết với protein và GroES. Sau đó phức trung gian của protein đang hình thành cấu trúc được đưa vào khe của GroEL. Tại đây protein có thể cuộn xoắn hình thành cấu trúc. Có bằng chứng cho rằng việc tạo protein ngoại lai song song với tổng hợp DnaK-DnaJ hoặc GroEL-GroES thì protein được tạo ra có khả năng tan. Tuy nhiên điều này cũng còn phụ thuộc vào dạng tự nhiên của protein biểu hiện.

Một số chức năng của chaperone trong tế bào: a) Tạo cấu trúc của các protein mới sinh; b) Trợ giúp quá trình tập hợp cấu trúc của protein; c) Tái tạo cấu trúc của các

protein bị biến tính; d) Vận chuyển các protein qua màng tế bào; e) Đích tấn công của nó là các protein bị giảm hoạt tính; f) Ngăn cản sự vón cục của các protein.

1.3 Ứng dụng của lipase

Bảng 1.2. Những ứng dụng công nghiệp của lipase vi khuẩn (Vulfson, 1994).

Công nghiệp	Phản ứng xúc tác	Sản phẩm hay ứng dụng
Bột giặt	Thủy phân dầu mỡ	Tẩy các vết dầu mỡ
Sữa	Thủy phân mỡ sữa, làm chín pho mát, biến đổi bơ	Tạo mùi thơm cho sữa, phomat và bơ
Bánh	Tạo mùi vị	Kéo dài thời gian sử dụng
Thức ăn chữa bệnh	Chuyển ester	Thức ăn chữa bệnh
Dầu mỡ, bơ	Chuyển ester, thủy phân	Bơ, acid béo, glycerol, mono- và diglycerin
Hóa chất	Sàng lọc đồng phân, tổng hợp	Hợp chất đồng phân, hóa chất
Dược phẩm	Chuyển ester, thủy phân	Lipid đặc biệt, thuốc trợ tiêu hóa
Mỹ phẩm	Tổng hợp	Chất nhũ, chất giữ ẩm.
Thuộc da	Thủy phân	Sản phẩm da
Giấy	Thủy phân	Giấy chất lượng cao
Làm sạch	Thủy phân	Tẩy mỡ

Lipase đã được ứng dụng trong các qui trình hóa hữu cơ, sản xuất chất tẩy, tổng hợp chất hoạt động bề mặt, dầu bôi trơn, tổng hợp hóa chất tinh khiết, công nghiệp hóa dầu ăn, công nghiệp sữa, công nghiệp nông hóa, sản xuất giấy, dinh dưỡng, mỹ phẩm và bào chế thuốc (Quyền Đình Thi *et al.*, 2002; Quyền Đình Thi, 2004b). Lipase có thể được sử dụng để đẩy nhanh quá trình phân hủy mỡ thải và polyurethane. Những ứng dụng chính của lipase được tóm tắt trong bảng 1.2. Hầu hết lipase công nghiệp có nguồn gốc từ vi khuẩn và nấm (Bảng 1.3).

Bảng 1.3. Một số lipase vi khuẩn thương mại (Jaeger, Reetz, 1998).

Dạng	Nguồn	Ứng dụng	Công ty sản xuất
Nấm	<i>C. rugosa</i>	Tổng hợp hữu cơ	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>C. antarctica</i>	Tổng hợp hữu cơ	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>T. lanuginosus</i>	Phụ gia bột giặt	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
Vi khuẩn	<i>R. miehei</i>	Chế biến thức ăn	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
	<i>B. cepaccia</i>	Tổng hợp hữu cơ	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>P. alcaligenes</i>	Phụ gia bột giặt	Genencor
	<i>P. mendocina</i>	Phụ gia bột giặt	Genencor
	<i>Ch. viscosum</i>	Tổng hợp hữu cơ	Asahi, Biocatalysts

1.3.1 Trong công nghiệp chất tẩy rửa

Nhờ khả năng thủy phân mỡ, mà lipase có ứng dụng chính làm phụ gia trong công nghiệp chất tẩy rửa và bột giặt gia đình. Lipase bột giặt được lựa chọn đặc biệt để thỏa mãn các yêu cầu chính sau: (1) hoạt tính đặc hiệu cơ chất thấp, nghĩa là có khả năng thủy phân các dạng mỡ khác nhau; (2) có khả năng chịu được các điều kiện giặt khắt khe (pH 10-11, 30-60°C); (3) có khả năng chịu được các chất hoạt động bề mặt gây phân hủy và các enzyme [ví dụ các alkyl benzene sulfonate (LAS) và protease], mà chúng là các thành phần quan trọng của nhiều loại bột giặt. Lipase với những đặc tính mong muốn nhận được qua một tổ hợp sàng lọc liên tục và protein engineering.

Năm 1994, Novo Nordisk đã đưa ra thị trường lipase tái tổ hợp thương mại, Lipolase, có nguồn gốc từ nấm *T. lanuginosus* và được biểu hiện ở *A. oryzae*. Năm 1995, hai loại lipase vi khuẩn được đưa vào thị trường là Lumafast từ *P. mendocina* và Lipormax từ *P. alcaligenes* bởi công ty Genencor International. Gerritse *et al.* (1998) đã công bố một loại lipase kiềm, sinh tổng hợp từ *P. alcaligenes* M-1, có khả năng tẩy các vết dầu mỡ trong điều kiện máy giặt (Gerritse *et al.*, 1998).

1.3.2 Trong công nghiệp thực phẩm

Dầu và mỡ là những thành phần quan trọng của thực phẩm. Giá trị dinh dưỡng, thẩm mỹ và các tính chất vật lý của một triglyceride bị ảnh hưởng lớn bởi các yếu tố như vị trí acid béo trong khung glycerol, độ dài chuỗi và độ không no của acid béo. Lipase cho phép biến đổi các tính chất của lipid bằng cách thay đổi vị trí của chuỗi acid béo và thay thế một hoặc nhiều acid béo bằng các acid mới. Con đường này, lipid ít mong muốn và tương đối rẻ có thể được biến đổi thành mỡ có giá trị cao.

Trong công nghiệp chế biến sữa người ta dùng lipase tinh sạch hoặc các loại vi sinh vật có khả năng phân giải mỡ để phân giải một số lipid của sữa trong quá trình làm phomat nhằm làm tăng hương vị, tăng tốc độ chín của phomat và sản xuất những sản phẩm giống phomat. Việc bổ sung lipase vào trong sữa để sản xuất phomat đã tạo ra các acid béo tự do, chính các acid này đã làm mềm phomat và tạo ra những mùi vị đặc trưng. Các acid béo tự do mạch ngắn (chủ yếu là 4C và 6C) làm tăng vị nồng, hắc. Trong khi các acid béo tự do mạch trung bình (12C, 14C) đem lại vị ngọt, độ mềm, xốp cho sản phẩm. Các acid béo này cùng với các vi sinh vật đã khởi đầu cho sự tổng

hợp các hương vị khác nhau như: acetoacetate, acid β -keto, methionyl ketone, các ester và các lactone. Nguồn lipase truyền thống làm tăng hương vị của phomat là từ các mô của động vật, đặc biệt là tuyến tụy của bò, lợn và các tuyến trên dạ dày của động vật nhai lại lúc còn non như dê con, cừu non, bê. Hiện nay, lipase vi sinh vật cũng đã được sử dụng trong công nghiệp phomat để làm tăng hương vị và tăng quá trình chín của phomat như là lipase từ *Mucor miehei*, *Aspergillus niger* và *A. oryzae*.

Người ta đã đưa lipase vào để khắc phục những nhược điểm của phương thức hóa học. Lipase được sử dụng để cải biến triacylglycerol, nâng cao chất lượng các dầu thực vật rẻ tiền, chất lượng thấp, bằng cách thay thế các acid béo no bởi các acid béo không no, trong dung môi hiếm nước.

1.3.3 Trong tổng hợp hữu cơ

Sử dụng lipase trong tổng hợp hữu cơ đang trở nên quan trọng. Lipase được sử dụng để xúc tác một loạt các chuyển hóa đặc hiệu đồng phân, đặc hiệu vùng và đặc hiệu hóa học. Phần lớn lipase được sử dụng như là các chất xúc tác trong hóa hữu cơ có nguồn gốc vi khuẩn. Những enzyme này hoạt động ở giao diện hydrophilic-lipophilic và chịu đựng được các dung môi hữu cơ trong hỗn hợp phản ứng. Sử dụng lipase trong tổng hợp các hợp chất đồng phân (Berglund, Hutt, 2000).

Enzyme xúc tác phản ứng thủy phân triglyceride không hòa trong nước tại giao diện nước-dầu. Dưới các điều kiện cho trước, hàm lượng nước trong hỗn hợp phản ứng sẽ quyết định hướng phản ứng được xúc tác bởi lipase. Khi không có hoặc có ít nước, chỉ có ester hóa và chuyển ester xảy ra. Phản ứng thủy phân là phản ứng ưu ái hơn khi có dư nước. Phản ứng xúc tác lipase trong các dung môi tới hạn (Turner *et al.*, 2001).

1.3.4 Trong công nghiệp hóa dầu

Sử dụng lipase trong qui trình hóa dầu tiết kiệm năng lượng và giảm thiểu phân hủy do nhiệt trong các phản ứng alcoholysis, acidolysis, thủy phân và glycerolysis. Mặc dù lipase được thiết kế bởi thiên nhiên để bẻ gãy thủy phân các liên kết ester của triacylglycerol, lipase có thể xúc tác phản ứng ngược (tổng hợp ester) trong môi trường ít nước. Thủy phân và ester hóa có thể xảy ra đồng thời trong một quá trình được biết như trao đổi ester. Phụ thuộc vào cơ chất, lipase có thể xúc tác acidolysis (ở

đó có một nửa acyl được thay thế giữa một acyl glycerol và một carboxylic acid), alcoholysis (ở đó một nửa acyl được thay thế giữa một acyl glycerol và một alcohol), và chuyển ester hóa (trong đó hai nửa acyl được trao đổi giữa hai acylglycerols) (Balcao *et al.*, 1996).

1.3.5 Trong công nghiệp bột giấy

Dầu hắc ín hay các hợp chất kỵ nước trong bột gỗ (chủ yếu là triglyceride và sáp), gây ra nhiều khó khăn trong sản xuất bột giấy và giấy. Lipase được sử dụng để tẩy dầu hắc ín trong bột giấy (Jaeger, Reetz, 1998). Công ty giấy Nhật bản, Nippon Paper Industries, đã phát triển một phương pháp sử dụng lipase *Candida rugosa* để loại dầu hắc ín, thủy phân tới 90% triglyceride có trong gỗ.

1.3.6 Một số ứng dụng khác

Ngoài các ứng dụng trên ra, lipase còn được ứng dụng trong nhiều ngành khác như chuyển hóa sinh học trong môi trường nước và hữu cơ, trong phân giải acid và cồn đồng phân, trong acyl hóa đặc hiệu vùng, trong tổng hợp ester.

Lipase là một enzyme đa dạng được ứng dụng rộng rãi. Lipase trở nên quan trọng hơn trong các ứng dụng có giá trị cao trong công nghiệp hóa dầu và tổng hợp tinh khiết. Lipase có khả năng chuyển hóa sinh học đặc hiệu đồng phân và đặc hiệu vùng và cho phép phân giải hỗn hợp đồng phân. Lipase với các tính chất cải thiện được sinh tổng hợp bởi chọn lọc tự nhiên và công nghệ protein để tiếp tục nâng cao ứng dụng của các enzyme này. Đồng thời, những tiến bộ được tạo ra trong lò phản ứng sinh học và công nghệ phản ứng để sử dụng lipase có hiệu quả.

1.4 Lipase tái tổ hợp

1.4.1 Nghiên cứu liên quan

Gene lipase đã được nhân dòng và đọc trình tự từ năm 1991 và vẫn tiếp tục thu hút được sự chú ý. Gene lipase của nhiều vi sinh vật cũng như sinh vật bậc cao đã được nhân dòng. Đây chính là một trọng tâm nghiên cứu về lipase hiện nay, mục đích là để dễ dàng thu lipase hơn so với việc tách và tinh chế từ các chủng tự nhiên.

Gene cấu trúc lipase của *Aci. calcoaceticus* BD413 được Kok *et al.* nhân dòng trong *E. coli* phage M13 vào năm 1995. Phân tích trình tự phân đoạn gene 2,1 kb

nhằm sắc thể lộ ra một khung đọc mở hoàn chỉnh, *lipA*, mã hóa cho một protein thuần thực với kích thước phân tử dự đoán 32 kDa (Kok *et al.*, 1995).

Một gene lipase ưa nhiệt của chủng *B. thermoleovorans* ID-1 được nhân dòng và đọc trình tự vào năm 2000 (Cho *et al.*, 2000). Gene lipase này mã hóa lipase gồm 416 gốc amino acid, chứa vùng bảo thủ pentapeptide Ala-X-Ser-X-Gly, như các *Bacillus* lipase khác. Để biểu hiện lipase trong *E. coli*, gene lipase đã được nhân dòng trong vector pET22b(+) có promoter T7 mạnh.

Một hệ thống biểu hiện có hiệu quả cao cho lipase ưa nhiệt *B. thermoautotrophicus* Lipase II, được biểu hiện chủ yếu trước đây, được phát triển cho biểu hiện lipase năng suất cao trong *E. coli* (Rua *et al.*, 1997). Bằng việc sử dụng plasmid biểu hiện pT1-OmpABTL2, mức độ biểu hiện lipase đã đạt 54000 U/g tế bào, việc biểu hiện này phụ thuộc vào chủng *E. coli* đặc hiệu được sử dụng. Sau đó, Quyen *et al.* cũng biểu hiện gene lipase này trong nấm *P. pastoris*, mức độ biểu hiện là 309000 U/ml dịch lên men (Quyen *et al.*, 2003b).

Lipase kiềm của chủng *P. aeruginosa* IGB83 cũng được nhân dòng và biểu hiện trong *Xanthomonas campestris* (Leza *et al.*, 1996) để tổng hợp và tiết lipase ngoại bào. Bằng cách tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy, dẫn đến lipase ngoại bào tăng gấp 12 lần so với nuôi cấy ban đầu trong bình lắc.

Sinh tổng hợp *Pseudomonas* lipase đòi hỏi hoạt hóa và tiết qua màng. Một biểu hiện có điều khiển của gene *lipH*, mã hóa foldase chuyên dụng cho lipase, rất quan trọng để biểu hiện mức độ cao trong tế bào dị chủ *E. coli* (Reetz, Jaeger, 1998). Việc thiết kế các protein dung hợp đuôi his thích hợp cho phép biểu hiện mức độ cao, tiết ra môi trường, và tinh sạch một bước lipase từ dịch nuôi cấy nổi của tế bào dị chủ *P. aeruginosa*.

Lipase của chủng *B. cepacia* và chaperone của nó lần đầu tiên được Quyen biểu hiện vào năm 1998 (Quyen, 1998; Quyen *et al.*, 1999; Quyền Đình Thi *et al.*, 2001a; Quyền Đình Thi *et al.*, 2001b) mức độ sinh tổng hợp lần lượt đạt 40% và 60% tổng số. Lipase được hoạt hóa hoàn toàn trong ống nghiệm với chaperone theo tỉ lệ tối ưu 1:1, hoạt tính lipase đạt 100% hoạt tính lipase tự nhiên tách chiết từ chủng *B. cepacia*.

A. oryzae sinh tổng hợp ít nhất 3 loại enzyme lipolytic ngoại bào L1, L2, L3, trong đó gene lipase L3 (được gọi là *tgla*) đã được Toida *et al.* nhân dòng vào năm 2000 (Toida *et al.*, 2000). Trình tự nucleotide của genomic DNA và cDNA cho thấy gene L3 có một khung đọc mở 954 nucleotide, bao gồm 3 intron 47, 83, và 62 bp. Trình tự amino acid suy diễn của gene *tgla* có 254 amino acid, gồm một trình tự đơn của 30 amino acid tương đồng với trình tự của cutinase nấm. Các gốc này lập ra bộ tam xúc tác bảo thủ Ser, Asp, và His. cDNA của gene *tgla* được biểu hiện trong *E. coli* để tổng hợp triacylglycerol chức năng.

Nấm lưỡng hình *C. rugosa* có bộ ba tam mã hóa khác thường gây cản trở biểu hiện đúng chức năng của gene xuất thân từ nấm này trong tế bào chủ thông thường khác. CRL tồn tại ở một vài dạng isoform khác nhau do họ gene *lip* mã hóa và được Brocca *et al.* tổng hợp vào năm 1998 (Brocca *et al.*, 1998). Trong những lipase này, isoform được mã hóa bởi gene *lip1* là dạng dư thừa nhất. Gene *lip1* có kích thước 1647 bp được tổng hợp hoàn toàn với trình tự nucleotide tối ưu để đơn giản hóa thao tác di truyền và cho phép biểu hiện dị chủ trong nấm men. Gene tổng hợp được biểu hiện đủ chức năng trong *Pi. pastoris*, cho phép sản xuất lipase tái tổ hợp isoform đặc biệt này với mức 150 U/ml trong môi trường nuôi cấy. Các tính chất xúc tác và hóa lý của lipase tái tổ hợp được so sánh với những dịch CRL không tái tổ hợp, thương mại chứa các isoform khác nhau.

Theo Mileto *et al.* (1998), lipase isoenzymes (CRLs) của nấm *C. rugosa* chia sẻ khoảng 40% và 30% tương đồng trình tự lần lượt với các lipase với *G. candidum* và *Yarrowia lipolytica*. Vùng trình tự bảo thủ tồn tại ở đầu N của protein (Mileto *et al.*, 1998). Để tách các isoform qua biểu hiện dị chủ, gene *lip1*, mã hóa dạng chính CRL, được biểu hiện trong *C. maltosa* - một nấm men gần với bộ tam mã hóa như *C. rugosa*. Lipase tái tổ hợp được tổng hợp và tiết ra môi trường nuôi cấy dưới dạng hoạt động.

Rhizop. niveus lipase có cấu trúc duy nhất gồm hai polypeptide liên kết không hóa trị với nhau (chuỗi A và chuỗi B). Để cải thiện enzyme này bằng công nghệ protein, năm 1999 Kohno *et al.* đã phát triển một hệ thống biểu hiện mới để sinh tổng hợp lipase trong nấm men *S. cerevisiae*. Hệ thống biểu hiện hiệu quả sử dụng chủng ND-12B và plasmid pJDB 219 đa bản sao (Kohno *et al.*, 1999).

Gene lipase chủng *Rhizop. oryae* DSM 853 cũng được Beer *et al.* nhân dòng vào năm 1998. Rõ ràng, lipase khác từ *Rhizopus* sp. được mô tả trong tài liệu cho kết quả thủy phân proteolytic khác và xuất xứ từ cùng một nguồn gene (Beer *et al.*, 1998).

Gene *lip2* của nấm men lipolytic *Y. lipolytica* được Pignede *et al.* nhân dòng vào năm 2000. Bằng cách sử dụng các chủng biểu hiện cao, lipase sinh ra có hoạt tính cao hơn 100 lần so với chủng hoang dại (Pignede *et al.*, 2000).

1.4.2 Lipase và chaperone của *Ralstonia* sp. M1

Năm 2004, Quyen *et al.* đã nhân dòng và đọc trình tự gene lipase *lipA* và gene chaperone *lipB* (Quyen *et al.*, 2004c) của chủng *Ralstonia* sp. M1 phân lập ở Việt Nam (Quyền Đình Thi *et al.*, 2003a; Quyền Đình Thi *et al.*, 2003b). Đây là một kết quả nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về nhân dòng và đọc trình tự gene lipase của các chủng vi sinh vật phân lập được ở Việt Nam. So sánh trình tự gene *lipA*, gene *lipB* và các trình tự protein tương ứng cho thấy lipase từ chủng *Ralstonia* sp. M1 thuộc họ phụ I.2 *Burkholderia* lipase/chaperone. Trình tự amino acid của lipase LipA (328 aa) và chaperone LipB (352 aa) của *Ralstonia* sp. M1 có mức độ tương đồng lần lượt là 49,3-60,3% và 23,7-32,7% với lipase và chaperone của họ phụ I.2 *Burkholderia* lipase/chaperone (Quyen *et al.*, 2004c). Gene *lipA* và *lipB3* (cắt đi 56 aa) được biểu hiện trong hệ thống vector *E. coli* BL21/pET22b(+) với mức độ biểu hiện lần lượt là 70 và 12 mg/g tế bào tươi. Lipase được hoạt hóa với chaperone LipB3 trong ống nghiệm với tỷ lệ tối ưu 1:10 và đạt hoạt tính 650 U/mg protein. Lipase được xác định tính chất cho thấy đây là một enzyme chịu nhiệt (50-55°C), kiềm (pH 10,75), chịu dung môi và được kích thích bởi các chất tẩy rửa (hoạt tính tăng gấp 3 lần) (Quyen *et al.*, 2003a; Quyen *et al.*, 2005b).

Lipase vi khuẩn họ I đã được chia làm 7 họ nhỏ hơn dựa vào sự tương đồng của trình tự amino acid, và lipase của *Ralstonia* sp. M1 mới phát hiện thuộc về họ I.2. Đặc điểm chung của các vi sinh vật có lipase thuộc họ I.1 và I.2 là sự xuất hiện của gene thứ hai, thường nằm ngay sau gene mã hóa lipase, có trường hợp nằm trước (Kok *et al.*, 1995). Gene này mã hóa một protein có tên gọi là chaperone, chaperone cần thiết cho quá trình hoạt hóa lipase và tiết lipase ngoại bào. Những lipase loại này, trong quá trình được tiết ra gian bào và ngoại bào có sự tham gia trực tiếp của chaperone để tạo

cấu trúc đúng. Những lipase có cấu trúc sai sẽ bị protease trong gian bào phân hủy hoặc tích tụ lại ở dạng thể vùi. Việc sử dụng chaperone đã được thương mại hóa trong những năm gần đây khi một số viện nghiên cứu không bán vector biểu hiện protein thay vào đó là một hệ vector biểu hiện chaperone khác nhau cho các đối tượng. Chaperone đang là đối tượng nghiên cứu mới vì vai trò của nó trong các tương tác protein.

Trong một nghiên cứu trước (Quyen *et al.*, 2005b) lipase và chaperone chủng *Ralstonia* sp. M1 đã được biểu hiện cao trong *E. coli* và hoạt hóa *in vitro*, tuy nhiên, do lipase nguyên thủy chủng *Ralstonia* sp. M1 chưa được tinh sạch nên hiệu quả hoạt hóa chưa được đánh giá.

Để biểu hiện đồng thời hai protein lipase và chaperone với mức độ cao trong tế bào *E. coli* nhằm mục đích tổng hợp lipase tái tổ hợp hoạt hóa ngay trong tế bào *E. coli*, hai cassette promoter-gene-terminator được biến nạp đồng thời vào tế bào *E. coli*. Có ba cách tạo ra *E. coli* tái tổ hợp biểu hiện đồng thời hai gene *lipA* và *lipB*. Cách thứ nhất là thiết kế một plasmid biểu hiện mang cassette promoter-lipA-lipB-terminator chứa một bộ promoter/terminator và cụm gene *lipA-lipB*, có stop codon nằm giữa *lipA* và *lipB*. Cách thứ hai là thiết kế hai plasmid biểu hiện, mỗi plasmid mang một cassette promoter-gene-terminator và biến nạp đồng thời vào tế bào *E. coli*. Cách này đòi hỏi mỗi plasmid phải mang một gene kháng lại kháng sinh khác nhau thì mới chọn lọc được các thể biến nạp mang đồng thời hai plasmid. Cách thứ ba là thiết kế một plasmid biểu hiện mang đồng thời hai cassette promoter-*lipA*-terminator và promoter-*lipB*-terminator.

Quyen *et al.* (2005) đã thiết kế hệ thống biểu hiện BL21/pELipAB^{amp} mang một cassette promoter-terminator chứa cụm gene *lipA-lipB* và biểu hiện với hoạt tính lipase *in vivo* rất thấp. Trong nghiên cứu này, các hệ thống biểu hiện mang hai plasmid và một plasmid/hai cassette được thiết kế nhằm mục đích biểu hiện cao lipase hoạt hóa *in vivo*.

1.5 Lý do hợp tác

Lipase (triacylglycerol hydrolase, EC 3.1.1.3) là các enzyme thủy phân mối liên kết ester trong các tri-, di- và monoacylglycerol tạo ra các acid béo tự do, glycerol, di-

và monoacylglycerol. Một số lipase còn phân hủy nhiều hợp chất khác có liên kết ester. Phản ứng này thuận nghịch, lipase cũng có thể xúc tác tổng hợp các acylglycerol từ acid béo và glycerol.

Tính chất đặc trưng của lipase là hoạt động ở bề mặt phân pha giữa nước và dầu (Martinelle *et al.*, 1995). Bám vào giao diện, enzyme thể hiện hoạt tính cao hơn nhiều trong môi trường có nước. Lipase có khả năng hoạt động trong dung môi hữu cơ thiếu các phân tử nước, xúc tác nhiều phản ứng có ứng dụng cao như chuyển ester, gắn nhóm acyl đặc trưng vào glycerol và menthol, tổng hợp peptide.

Thị trường lipase trên thế giới năm 1994 đạt 70 triệu US\$ (Sheldon, 1996) và ngày nay có thể đạt hàng trăm triệu US\$. Người ta sử dụng lipase chủ yếu vào sản xuất bột giặt, chế biến sữa, fromage, dầu thực vật, thuốc da, công nghiệp dược phẩm, thuốc trừ sâu trừ cỏ, mỹ phẩm (Sharma *et al.*, 2001). ước tính hàng ngàn tấn lipase được bổ sung vào khoảng 130 triệu tấn bột giặt sản xuất mỗi năm (Jaeger, Reetz, 1998).

Các chủng nấm *Fusarium* và *Mycosphaerella* gây ra những bệnh cây trồng bao gồm: thối đọt, bạc lá, héo lá và gây thiệt hại hàng tỷ US dollar. Nấm có thể sử dụng những enzyme bao gồm các protease và lipase để thủy phân lipid và protein, phân hủy thành tế bào và tấn công cây trồng và hạt ngũ cốc.

Lipase (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) xúc tác thủy phân triglyceride tại giao diện của cơ chất hòa tan và nước. Chính vì vậy, vai trò của lipase là một yếu tố cực kỳ có hại trong việc phát sinh bệnh hại cây trồng được nghiên cứu rất sâu và kỹ.

Mặt khác, nhờ có tính đặc hiệu cơ chất, đặc hiệu vùng, đặc hiệu chiral, tính bền nhiệt, và bền kiềm, mà lipase được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực công nghiệp bao gồm bột giặt, sữa, chuẩn đoán, chế biến dầu, chuyển hóa hóa chất, và hóa chất đồng phân.

Hầu hết lipase được sử dụng trong công nghiệp có nguồn gốc vi sinh vật. Số lượng lipase vi sinh vật mới mà được nhân dòng, xác định tính chất hóa lý ngày càng tăng. Để khai thác các công cụ mới cho công nghệ sinh học, các lipase mới từ những chủng vi sinh vật phân lập ở Việt nam sẽ được xác định tính chất và nhân dòng.

Sau khi nghiên cứu cơ bản những lipase nấm hại cây trồng, mối liên quan giữa biểu hiện lipase và việc xâm hại sẽ được tìm ra, và khả năng tìm ra một số thuốc

chống nấm hại cây trồng sẽ được phát triển dựa theo những hiểu biết về lipase mới này.

Lipase vi khuẩn được sử dụng rộng rãi trong các ứng dụng công nghiệp và công nghệ sinh học. Những enzyme này có khả năng xúc tác thủy phân lẫn tổng hợp các mối liên kết ester của triglycerol. Nhờ các tính chất của chúng, như bền trong dung môi hữu cơ, không cần các yếu tố cofactor và có tính đặc hiệu phân cực cao, nên chúng có giá trị cao trong lĩnh vực sản xuất các hợp chất phân cực hoạt hóa, các ester, và lactone. Hơn nữa, chúng có thể được bổ sung vào bột giặt và sử dụng trong chế biến thức ăn.

Việc khám phá ra các lipase mới là những yếu tố độc hại vi sinh vật rất quan trọng. Các bệnh *Fusarium* và nấm đen Black Sigatoka Disease trên cây chuối, làm tăng giá thành khi trồng chuối lên tới 30% để sản xuất thuốc diệt nấm. Việc xác định và khám phá ra lipase mới là mục đích tìm ra thuốc diệt nấm sẽ cho phép chúng ta phát triển những loại thuốc diệt nấm mới có hiệu quả hơn và rẻ hơn.

GS Schaefer đã tiến hành nhiều đề tài nghiên cứu về lipase nấm hại cây trồng như *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Pyrenophora teres* và cơ chế xâm nhiễm của các loại nấm bệnh nhờ enzyme lipase nhiều năm nay. GS Schaefer đã chứng minh được cơ chế xâm nhiễm của nấm bệnh cây là nhờ có enzyme lipase.

Ở Việt Nam nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã đi đầu trong nghiên cứu về enzyme lipase tách chiết từ vi sinh vật và đã đạt được một số kết quả khoa học nhất định.

TS. Quyền Đình Thi đã thực hiện đề tài nghiên cứu “Lipase tái tổ hợp từ *Pseudomonas cepacia*: biểu hiện mức độ cao ở *Escherichia coli* và cải biến protein” trong thời gian 1994-1998 trong khuôn khổ của một luận văn tiến sỹ. Lần đầu tiên tác giả đã biểu hiện chaperone chủng *Pseudomonas cepacia* với năng suất cao ở *E. coli* và hoạt hóa lipase thành công ở ống nghiệm với hoạt tính đạt 100% so với lipase hoang dại. Những biến thể lipase cải biến cũng đã thể hiện hoạt tính đặc hiệu thủy phân amide tăng nhiều lần.

Năm 1998-1999, và 2001-2003 nhóm nghiên cứu đã tham gia một nhánh đề tài cấp Viện KHCN và cấp KC-04 về biểu hiện và đánh giá tính chất của lipase chủng *Bacillus thermocatenuatus* ở tế bào nấm *Pichia pastoris*. Lipase chủng *B.*

thermocatenulatus được biểu hiện với năng suất cao ở nấm *P. pastoris* và thể hiện là một lipase kiềm chịu nhiệt có ứng dụng cao trong chế biến thực phẩm (Quyền Đình Thi *et al.*, 2002; Quyen *et al.*, 2003c).

Năm 2001-2003, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã thực hiện đề tài nghiên cứu cơ bản “*Tạo chủng vi sinh biểu hiện lipase cao bằng phương pháp sàng lọc từ môi trường và biến đổi gene*”. Mục tiêu của đề tài là phân lập các chủng vi sinh vật phát triển trong môi trường đất, lòng (nước) ở Việt Nam có khả năng tổng hợp lipase, sàng lọc một số vi khuẩn có hoạt tính thủy phân mỡ và chất béo cao, tách gene mã hóa lipase và biểu hiện tái tổ hợp ở *E. coli*, nghiên cứu ứng dụng (Quyền Đình Thi *et al.*, 2003a).

Kết quả là chúng tôi đã phân lập được 150 chủng vi sinh vật sinh tổng hợp lipase. Trong số đó tác giả đã phân tích trình tự 16S rDNA để xác định tên 41 chủng có hoạt tính lipase cao, thuộc 7 nhóm: *Acinetobacter* sp. (4), *Ralstonia* sp. (2), *Staphylococcus* sp. (1), *Stenotrophomonas* sp. (6), *Pseudomonas* sp. (23), *Bacillus* sp. (3), *Serratia* sp. (2). Hai nhóm chủng *Ralstonia* và *Stenotrophomonas* là những chủng mới trên thế giới được biết là có khả năng sinh tổng hợp lipase. Nhóm nghiên cứu đã nuôi cấy, lên men, tách thô enzyme chủng *Ralstonia* M1 (GenBank AY293807) và xác định một số tính chất hóa lý. Đây là một enzyme chịu nhiệt ưa kiềm, là những tính chất quý để sản xuất bột giặt. Nhóm nghiên cứu đã nhân dòng thành công gene lipase của chủng *Ralstonia* (Quyen *et al.*, 2004a; Quyen *et al.*, 2004c; Quyen *et al.*, 2005b).

Đây là một gene mới, mã hóa lipase có mức tương đồng so với các lipase đã biết là 56%. Lần đầu tiên một enzyme lipase ở Việt nam được nhân dòng và đăng ký trình tự gene GenBank AY364601.

Để tiếp tục nghiên cứu biểu hiện năng suất cao và ứng dụng lipase mới này chúng tôi đã tiến hành đề tài nghiên cứu cơ bản giai đoạn 2004-2005: “*Xây dựng plasmid biểu hiện, sản xuất lipase tái tổ hợp mới từ chủng vi khuẩn Ralstonia M1 phân lập ở Việt nam, và nghiên cứu ứng dụng (mã số trong ngân hàng GenBank: GenBank accession AY364601)*”. Xây dựng một plasmid biểu hiện năng suất cao và biểu hiện trong tế bào *E. coli* BL21, sau đó tinh sạch đánh giá hoạt tính và các tính chất của

enzyme tái tổ hợp, và nghiên cứu các ứng dụng của enzyme tái tổ hợp (Lê Thị Thu Giang *et al.*, 2005; Quyền Đình Thi *et al.*, 2005).

Kết quả là lipase và chaperone được biểu hiện cao ở tế bào *E. coli* với năng suất 70 và 12 mg protein/g tế bào tươi. Lipase được hoạt hóa trong ống nghiệm, được đánh giá các tính chất hóa lý. Sau đó lipase và chaperone được biểu hiện đồng thời ở tế bào *E. coli*, hoạt tính lipase hoạt hóa trong tế bào đã tăng lên 4-9 lần và lipase hoạt hóa được tiết ra môi trường tăng 29-51 lần so với biểu hiện một cụm gene.

Có rất nhiều gene lipase của các chủng vi sinh vật khác nhau đã được công bố trên thế giới nhưng gene lipase *lipA* chủng *Ralstonia* phân lập ở Việt nam là một gene được công bố đầu tiên trên thế giới. Việc nghiên cứu và hoàn thiện gene này là có giá trị về mặt khoa học cũng như khả năng ứng dụng của nó.

Trong quá trình nghiên cứu chúng tôi đã tách dòng và phân tích gene mã hóa lipase chủng *Ralstonia* sp. M1. Đây là một gene thuộc chủng vi khuẩn mới *Ralstonia*, lần đầu tiên ở Việt Nam và trên thế giới. Chúng tôi đã đóng góp thêm một trình tự gene mã hóa lipase cho GenBank. Lipase này đã được biểu hiện ở tế bào *E. coli* với năng suất cao, đáp ứng được nhu cầu sản xuất lipase tái tổ hợp. Tuy nhiên khó khăn và chúng tôi gặp phải trong việc ứng dụng lipase tái tổ hợp này là việc sinh tổng hợp lipase tái tổ hợp hoạt hóa, nghĩa là lipase được sinh tổng hợp với năng suất cao nhưng phải có hoạt tính thì mới có giá trị ứng dụng trong thực tiễn sản xuất bột giặt hay chế biến thức ăn gia súc. Hiện tại chúng tôi phải sinh tổng hợp đồng thời cả lipase và chaperone ở *E. coli*, sau đó tinh sạch riêng rẽ và hoạt hóa lipase trong ống nghiệm.

Chúng tôi đã cải thiện hệ thống biểu hiện lipase chủng *Ralstonia* nhằm mục đích tạo ra lipase hoạt hóa vivo cao. Lipase đã được cải thiện rõ rệt, hoạt tính lipase vivo đã tăng lên 4-9 lần và hàm lượng lipase được tiết ra môi trường tăng 29-51 lần so với biểu hiện một cụm gene lipase-chaperone. Tuy đã được cải thiện nhưng vẫn chưa đáp ứng được yêu cầu cần thiết để có lipase tái tổ hợp với năng suất biểu hiện cao và có hoạt tính ngay sau khi biểu hiện.

Do gặp phải vấn đề như trên chúng tôi đã nghĩ cách phải tìm các chủng vi sinh vật khác phát triển ở các điều kiện Việt Nam, sinh tổng hợp lipase cao. Những chủng vi sinh vật sinh tổng hợp lipase có nhiều ứng dụng trong thực tế là các chủng

Pseudomonas, *Bacillus* và nấm. Kết hợp với Phòng Di truyền và Bệnh lý học Phân tử, Viện Thực vật Đại cương, Trường ĐHTH Hamburg, chuyên nghiên cứu về lipase nấm hại cây trồng, một tác nhân tham gia tích cực vào quá trình xâm nhiễm thực vật để thực hiện ý tưởng tìm kiếm các lipase vi sinh vật mới ứng dụng làm phụ gia bột giặt hoặc chế biến thức ăn gia súc.

Một mặt chúng tôi gửi nghiên cứu sinh sang Phòng Di truyền và Bệnh lý học Phân tử thực hiện nghiên cứu về vai trò phân tử của lipase nấm hại cây trồng trong quá trình xâm nhiễm thực vật nhằm sáng tỏ cơ chế phân tử của lipase đóng góp vào các nghiên cứu cơ bản, đồng thời trong quá trình nghiên cứu đó có thể tìm ra các chất có tác dụng kìm hãm hoạt tính lipase nấm hại cây trồng trong quá trình xâm nhiễm nhằm phát triển các thuốc diệt nấm hại cây trồng sau này.

Qua việc nghiên cứu cơ chế cơ bản của lipase trong việc xâm nhiễm thực vật, nghiên cứu sinh của chúng tôi sẽ nắm bắt được các kỹ thuật cơ bản, các chiến lược nghiên cứu về lipase như tạo ra các thể lipase đột biến có hoạt tính đặc hiệu cao hơn lipase nguyên thủy nhiều lần để ứng dụng vào nghiên cứu cải biến các lipase mà chúng tôi đã có trong tay ở Việt Nam.

Song song với công việc thực hiện ở Viện Thực vật Đại cương (TVĐC), chúng tôi sẽ tiến hành phân lập các chủng vi sinh vật mới có khả năng sinh tổng hợp lipase với năng suất cao, hoạt tính thủy phân mỡ cao. Với sự trợ giúp của Viện Thực vật Đại cương, (theo kế hoạch làm việc này, chúng tôi sẽ thực hiện một số thí nghiệm tách dòng lipase bằng phương pháp PCR suy biến ở Phòng thí nghiệm đó 2x 3 tháng), chúng tôi sẽ hoàn thành việc phân lập và phân tích gene lipase mới từ các chủng vi sinh vật phân lập được ở Việt Nam. Sau đó chúng tôi sẽ biểu hiện lipase mới ở *E. coli* hoặc nấm men, đánh giá các tính chất lý hóa và nghiên cứu ứng dụng vào thực tiễn ở Việt Nam.

Đề tài hợp tác ở phía Đức đã được tài trợ kinh phí từ Bộ Đào tạo và Nghiên cứu Liên bang (BMBF) Đức với tổng số tiền khoảng 100000 US\$, chủ yếu tài trợ học bổng toàn phần cho một nghiên cứu sinh Việt Nam trong 36 tháng (~1896 US\$/tháng gồm cả tiền bảo hiểm, đi lại, trợ cấp gia đình đoàn tụ) và khoản tiền hóa chất (24000 US\$) và hướng dẫn nghiên cứu (2376 US\$) cho Phòng Di truyền và Bệnh lý học Phân

tử. Sự hợp tác này là một thuận lợi để chúng tôi đào tạo được cán bộ nghiên cứu trẻ kế cận và gửi cán bộ sang tiếp cận các kỹ thuật hiện đại để nhân dòng và cơ bản các enzyme quan trọng phục vụ cho nhu cầu thực tiễn ở Việt Nam. Trong nội dung hợp tác của dự án với Đức có phần công việc cần thực hiện ở Việt Nam trong 36 tháng. Để thực hiện tốt các nội dung này chúng tôi cần kinh phí hỗ trợ của Bộ Khoa học và Công nghệ dành cho việc tiếp đón chuyên gia bạn sang làm việc, thực hiện các nghiên cứu ở Việt Nam và gửi cán bộ sang Đức làm việc.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Phân lập các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp lipase

Các chủng vi sinh vật được phân lập theo mô tả trước đây (Quyền Đình Thi *et al.*, 2003a).

Bảng 2.1. Nguồn gốc phân lập mẫu.

TT	Ngày lấy mẫu	Nơi lấy mẫu	Kí hiệu mẫu	TT	Ngày lấy mẫu	Nơi lấy mẫu	Kí hiệu mẫu
1	14/7/05	Nước thải cửa hàng hải sản, Cửa Lò	CL	34	16/2/06	Bùn cống, 63 Đội Cấn, Hà nội	LP09
2	9/8/05	Nước thải cửa hàng hải sản, Trà Cổ	TC	35	16/2/06	Bùn cống ở CH phố 50 Đội Cấn-Hà nội	LP10
3	10/8/05	Phà bãi Cháy	HL1	36	16/2/06	Bùn cống CH ăn uống 34 HQ việt-Hà nội	LP11
4	10/8/05	Bến cá Hạ long	HL2	37	16/2/06	Bùn chợ cá Nghĩa Tân-Hà nội	LP12
5	10/8/05	Bến tàu Hạ Long	HL3	38	16/2/06	Nước thải chợ thịt lợn Nghĩa Tân-Hà nội	LP13
6	10/9/05	Bùn chợ cá ,QNinh	QN1	39	2/3/06	Nước bùn sông Tô lịch Khương đình-Hà nội	LP14
7	10/9/05	Nước thải CH chế biến chả mực, Quảng Ninh	QN2	40	3/3/06	Lò mổ Phùng Khoang-Hà nội	LP15
8	10/9/05	Cơ sở giết mổ lợn, Quảng Ninh	QN3	41	7/3/06	Bùn suối nước nóng Tuyên quang	LP16-
9	10/9/05	Bùn cống CH ăn uống ,Quảng Ninh	QN4	42	10/3/06	Bùn suối nước nóng Kim Bôi-Hòa Bình	LP17
10	1/10/05	Bến tàu Cửa Ông	QN5	43	15/3/06	Bùn bãi sau -Vũng tàu	LP18
11	1/10/05	Bến tàu than, Quảng Ninh	QN6	44	15/3/06	Bùn bãi dàu-Vũng tàu	LP19
12	1/10/05	Bùn thải nhà máy đồ hộp, Quảng Ninh	QN7	45	16/3/06	Bùn nhà s/x đậu phụ xóm 1b, Cổ Nhuế-Hà nội	LP20
13	6/11/05	Bùn thải chợ ,Quảng Ninh	QN8	46	20/3/06	Bãi ốc, bãi cá Hồ tây-Hà nội	LP21
14	6/11/05	Bùn thải Khách sạn,Quảng Ninh	QN9	47	20/3/06	Nước thải sông Tô Lịch-Hà nội	LP22
15	6/11/05	Bùn thải khu vực bán gà vịt Ưông bí,Quảng Ninh	QN10	48	20/3/06	Nước thải hồ Trúc bạch-Hà nội	LP23
16	6/11/05	Cống thải khu vực bán thịt chợ Ưông bí, Quảng Ninh	QN11	49	20/3/06	Nước thải hồ Hoàn kiếm-Hà nội	LP24
17	6/11/05	Cống thải CH ăn uống, Ưông bí Quảng Ninh	QN12	50	20/3/06	Nước thải hồ Thuyền quang-Hà nội	LP25
18	6/11/05	Lò mổ thịt lợn tại Ưông	QN13	51	20/3/06	Bùn thải có nhiều cá chết hồ	LP26

		bí, Quảng Ninh				Bảy mẫu-Hà nội	
19	6/11/05	Cống thải khu vực bệnh viện VN-thụy điển, Quảng Ninh	QN14	52	20/3/06	Nước thải hồ Ba Mẫu, Hà nội	LP27
20	6/11/05	Cống thải CH chế biến gà vịt, Uông bí, Quảng Ninh	QN15	53	20/3/06	Nước thải hồ Đắc di, Hà nội	LP28
21	6/11/05	Bùn chợ cá Hà Lâm, Quảng Ninh	QN16	54	20/3/06	Lò mổ phổ Bùi Xương Trạch-Hà nội	LP29
22	6/11/05	Cống thải khu vực bán thịt chợ Hà Lâm, Quảng Ninh	QN17	55	20/3/06	Rác thải bãi rác Sóc sơn-Hà nội	LP30
23	6/11/05	Cống thải khu vực bán gà, vịt Hà LâmQuảng Ninh	QN18	56	20/3/06	Nước đọng bản bên Đục suối Yên, chùa Hương	LP31
24	4/12/05	Nước biển Cầu cảng,Hải Phòng	HP1	57	19/4/06	Nước đọng bản bên lên đông Hương tích suối Yên, chùa Hương	LP32
25	4/12/05	Bùn nơi có nhiều rác cầu cảng HP	HP2	58	19/4/06	Bùn thải có nhiều cá chết hồ Nghĩa đô-Hà nội	LP33
26	9/1/06	Cơ sở s/x giò chả Linh Hương 39 Ngô thi Nhậm, HN	LP1	59	19/4/06	Bùn thải có nhiều cá chết hồ Mễ trì-Hà nội	LP34
27	11/1/06	Cơ sở giết mổ lợn, bò Mê linh, Vĩnh Phú	LP2	60	19/4/06	Bùn thải có nhiều rác hồ Giảng võ-Hà nội	LP35
28	11/1/06	Cơ sở giết mổ lợn, bò Sóc sơn, Hà Nội	LP3	61	19/4/06	- Bùn thải có nhiều rác hồ Ngọc Khánh ,Hà nội	LP36
29	12/1/06	Cửa hàng thịt chó Vân đình	LP4	62	19/4/06	- Bùn thải có nhiều rác hồ Thủ lệ, Hà n ội	LP37
30	14/1/06	Nhà máy thịt đông lạnh - Nam định	LP5	63	26/4/06	Váng tương ủ từ đậu tương-Hà nội	LP38
31	14/1/06	Nhà máy thực phẩm, Nam định	LP6	64	26/4/06	Bùn thải có nhiều rác cầu Thanh Nhân-Hà nội	LP39
32	14/1/06	Lò mổ lợn-Nam định	LP7	65	26/4/06	Bùn thải có nhiều rác ở sông Kim Ngưu-Hà nội	LP40
33	26/1/06	Cửa hàng lòng lợn tiết canh, Vân đình	LP8				

Các mẫu nước biển lấy từ các địa danh như Bãi Cháy, Hạ Long, Trà Cổ, Phà Bãi Cá, Bến cá Hạ Long (Quảng Ninh); Đồ Sơn (Hải Phòng); Cửa Lò (Nghệ An); Thạch Hải (Hà Tĩnh) và các nguồn thu lấy mẫu khác như các ao hồ ở Hà Nội, lò mổ được nuôi cấy trên môi trường làm giàu trong 24 giờ ở nhiệt độ 30°C. Sau đó nuôi cấy trên các môi trường khác nhau, các chủng vi sinh vật khác nhau được phân lập với chú trọng khả năng sinh tổng hợp lipase. Khả năng sinh tổng hợp lipase của các chủng vi sinh vật được định tính trên đĩa thạch chứa 0,2% trybutyrin. Nếu chủng nào sinh tổng hợp lipase thì xuất hiện vòng sáng xung quanh.

2.2 Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và xác định tính chất hóa lý của lipase tự nhiên

2.2.1 Lipase tự nhiên chủng *Geotrichum sp.* DTQ-26.3

2.2.1.1 Nguyên liệu

Các mẫu nước biển lấy từ Bãi Cháy, Hạ Long, Trà Cổ, Phà Bãi Cáy, Bến cá Hạ Long (Quảng Ninh); Đồ Sơn (Hải Phòng); Cửa Lò (Nghệ An); Thạch Hải (Hà Tĩnh) và các mẫu nước khác như từ các ao hồ ở Hà Nội được sử dụng để phân lập vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp lipase.

2.2.1.2 Tế bào và môi trường nuôi cấy

Tế bào *E. coli* DH5 α (Invitrogen), vector pTZ57R/T (Fermentas) được sử dụng để nhân dòng. Môi trường LB: 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) cao nấm men; 1% (w/v) peptone, pH 7,0, khử trùng. Môi trường thạch được bổ sung 2% (w/v) agar.

2.2.1.3 Hóa chất

Các hóa chất dùng trong thí nghiệm được cung cấp từ các hãng hóa chất khác nhau: tryptone (Ân Độ); cao nấm men (Biorad, Mỹ); tributyrin (Sigma, Mỹ), proteinase K, EDTA, sodium dodecylsulfate, chloroform:isoamyl alcohol (24:1) (Merck, Đức), Tris-base (Promega), PCR master mix, *Eco*RI, *Hind*III (Fermentas, Litva); T4-ligase (Biolabs, Mỹ); agarose (Q-biogene). Cặp mồi NL1: 5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3' và NL4: 5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3' được sử dụng để thu nhận phân đoạn D1/D2 thuộc vùng 26S rRNA.

2.2.1.4 Nhân dòng phân đoạn 26S rRNA

Để khuếch đại phân đoạn 26S rRNA, 10 μ l hỗn hợp phản ứng PCR được pha chế bao gồm 5 μ l PCR master mix; 0,5 μ l DNA khuôn; 0,5 μ l mồi xuôi NL1; 0,5 μ l mồi ngược NL4; 3,5 μ l H₂O vô trùng. Phản ứng được thực hiện theo chu trình: 95°C/4'; 35 chu kỳ: (95°C/1', 50°C/1', 72°C/1'); 72°C/10'; 4°C/ ∞ .

DNA tổng số từ chủng nấm sợi DTQ-26.3 và plasmid từ vi khuẩn *E. coli* DH5 α được tách chiết và tinh sạch theo các phương pháp cải biến (Quyền Đình Thi *et al.*, 2005). Plasmid DNA được gắn dính và cắt hạn chế theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Dung dịch gắn dính được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α theo phương pháp biến nạp shock nhiệt CaCl₂ đã mô tả trước đây (Quyền Đình Thi *et al.*, 2005).

2.2.1.5 Phân tích phân đoạn 26S rRNA

Trình tự phân đoạn chèn 26S rRNA trong plasmid tái tổ hợp được xác định theo phương pháp Sanger sử dụng máy đọc trình tự ABI Prism 3100 Avant (Mỹ). Sau đó trình tự nucleotide 26S rRNA được so sánh với các trình tự tương đồng trong GenBank sử dụng phần mềm DNASTar để xác định tên chủng DTQ-26.3.

2.2.1.6 Định tính lipase

Các mẫu phân lập được nuôi cấy trong môi trường làm giàu trong 24 giờ ở 30°C. Sau khi nuôi cấy trong các môi trường khác nhau, các chủng vi sinh vật khác nhau được phân lập. Khả năng sinh tổng hợp lipase của các chủng vi sinh vật được định tính trên đĩa thạch chứa 0,2% trybutyrin. Chủng nào sinh tổng hợp lipase có vòng sáng xung quanh khuẩn lạc.

2.2.1.7 Xác định hoạt tính

Hoạt tính lipase được xác định bằng phương pháp chuẩn độ pH tự động (Quyên *et al.*, 2005a) với cơ chất 5% dầu olive và 1% gum arabic, 40°C, pH 8,0. Một đơn vị hoạt tính lipase là lượng enzyme để giải phóng 1 μ mol acid béo trong một phút ở điều kiện nhất định.

2.2.1.8 Động thái sinh trưởng

Chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở 30°C. Cứ sau 24 giờ nuôi cấy, 1 ml dịch nuôi cấy được thu để xác định hoạt tính và trọng lượng tế bào khô. Tủa tế bào được sấy khô đến trọng lượng không đổi để xác định tốc độ sinh trưởng.

2.2.1.9 Cơ chất cảm ứng và nồng độ cơ chất cảm ứng

Để xác định khả năng cảm ứng của các loại cơ chất khác nhau, chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 được nuôi cấy trong môi trường LB với 0,5% dầu (đậu nành, thực vật, Neptune, mè, olive) và LB với 0,5% dầu và 0,5% gum Arabic. Dịch nổi được thu hoạch sau 48 giờ nuôi cấy. Sau khi xác định cơ chất cảm ứng thích hợp nhất, để tối ưu

nồng độ, chủng DTQ-26.3 được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có bổ sung dầu olive với các nồng độ 0,1-4%.

2.2.1.10 Nhiệt độ và pH môi trường nuôi cấy

Để xác định nhiệt độ nuôi cấy tối ưu, chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 được nuôi lắc 48 giờ với 200 vòng/phút trong môi trường LB có bổ sung 0,5% dầu olive ở các nhiệt độ khác nhau 28°C, 30°C, 37°C và 45°C. Chủng DTQ-26.3 được nuôi cấy 48 giờ trong môi trường LB với pH môi trường nuôi cấy 4-9, ở 30°C, lắc 200 vòng/phút để xác định pH môi trường tối ưu.

2.2.1.11 Nguồn nitơ

Để nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh tổng hợp lipase, chủng DTQ 26.3 được nuôi cấy trong môi trường chứa 0,5% (w/v) cao nấm men, 1% (w/v) NaCl và 0,5% (w/v) nguồn nitơ khác nhau (peptone, cao thịt bò, cao thịt, urea, ammonium sulfate, ammonium nitrate, và tryptone) với pH 5 ở 30°C, lắc 200 vòng/phút. Sau 48 giờ nuôi cấy, hoạt tính lipase ở dịch nổi được xác định.

2.2.2 Lipase tự nhiên chủng *Ralstonia* sp. M1

2.2.2.1 Hóa chất

Triglycerides (C4-C18), triolein, các ester p-nitrophenyl (C2, C3, C6, C8, C14 và C16), dầu olive, gum arabic và dầu tự nhiên (dầu dừa, dầu hạt bông, dầu ngô cốc, dầu lạc, dầu đậu nành, dầu lúa mạch, dầu mầm lúa mì) được cung cấp bởi Sigma (USA). Dầu hạt lanh từ công ty Yakuri Pure Chemical (Osaka, Japan), mỡ bò và dầu cọ từ công ty Nongshim (Soul, Korea). Triton X-100 và Triton X-45 được cung cấp lần lượt bởi Biorad Laboratories (CA, USA) và Fluka Chemie (AG Buchs, Swiss). Tween 80, 60 và 40 từ công ty hóa chất tinh sạch Shinyo (Osaka, Japan). Bacto-tryptone và yeast extract của Difco (USA). Tất cả những hóa chất khác đều ở mức tinh khiết.

2.2.2.2 Chủng vi khuẩn, các điều kiện nuôi cấy

Chủng vi sinh vật M1 được phân lập từ mẫu đất ở Việt Nam, chủng có hoạt tính lipase trên đĩa môi trường LB (Luria-Bertani) chứa 1% of tributyrin và tricaprilyn và đã được xác định là chủng *Ralstonia* sp. theo trình tự của đoạn 16S rRNA (Quyen *et al.*, 2004b) được sử dụng để sinh tổng hợp lipas ngoại bào.

Để sinh tổng hợp lipase với năng suất cao, *Ralstonia* M1 được nuôi trong 50 ml môi trường gồm 0,5% (w/v) peptone, 0,25% (w/v) yeast extract, 0,1% (w/v) K_2HPO_4 , 0,02% (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, với 0,5% (w/v) các nguồn carbon khác nhau (gồm mỡ bò, dầu dừa, dầu hạt bông, dầu ngũ cốc, dầu hạt lanh, dầu oliu, dầu cọ, dầu lạc, dầu đậu nành và dầu mầm lúa mì) ở 30°C, lắc 170 vòng/phút theo Kulkarni *et al.* (Kulkarni, Gadre, 2002). Sau khi tối ưu nguồn carbon để *Ralstonia* sp. M1 sinh tổng hợp lipase cao nhất, chủng được nuôi trong 50 ml gồm 0,5% (w/v) mỡ bò, 0,25% (w/v) yeast extract, 0,1% (w/v) K_2HPO_4 , 0,02% (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, với 0,5% (w/v) các nguồn nitrogen khác nhau (gồm ammonium sulfate, bactopectone, bactotryptone, beef extract, casein hydrolysate, casein peptone, diammonium phosphate, sodium nitrate, urea và yeast extract), lắc 170 vòng/phút ở 30°C.

Sau khi tối ưu nguồn carbon và nitrogen, *Ralstonia* sp. M1 được lên men trong thiết bị lên men có dung tích 5-lít (Infors, Switzerland) với 3 lít môi trường gồm 0,5% (w/v) mỡ bò, 0,5% (w/v) diammonium phosphate, 0,25% (w/v) yeast extract, 0,1% (w/v) K_2HPO_4 , và 0,02% (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Các điều kiện lên men là 30°C, 300±150 vòng/phút, oxy hòa tan $DO > 2,0$, pH 7,0-8,0, và lượng oxy 0,1%.

Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp Bradford với kit phân tích của Bio-Rad.

2.2.2.3 Điện di SDS-PAGE

Điện di gel polyacrylamide SDS (SDS-PAGE) được thực hiện theo mô tả của Laemmli (Laemmli, 1970) với các thiết bị của Bio-Rad. SDS-PAGE được thực hiện với gel gồm 12,5% (w/v) acrylamide theo hướng dẫn của hãng. Để nhuộm hoạt đặc hiệu hoạt tính lipase (Quyen *et al.*, 2003b), gel được ủ trong 50 ml đệm 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 chứa 0,5% (w/v) Triton X-100 trong 30 phút để hồi tính lipase. Sau đó gel được nhuộm 30 phút trong hỗn hợp 50 ml đệm 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 có chứa 20 mg 1-naphthyl acetate (Fluka) (trước đó đã được hòa tan trong 5 ml acetone) và 50 ml đệm 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 chứa 50 mg Fast Red TR (Serva).

2.2.2.4 Định lượng hoạt tính lipase

Hoạt tính lipase được xác định với cơ chất dầu olive và đo trên máy pH-stat 718 tự động của (Metrohm, Swiss) giống như mô tả trước đây (Quyen *et al.*, 2005a). Một

đơn vị lipase được định nghĩa là lượng enzym để giải phóng 1 μmol acid béo trong 1 phút.

2.2.2.5 Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, dung môi hữu cơ, chất tẩy rửa và ion kim loại lên hoạt tính lipase và độ bền

Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, các dung môi hữu cơ, chất tẩy rửa và ion kim loại lên hoạt tính lipase và độ bền được thực hiện theo miêu tả trước đây (Quyen *et al.*, 2005a).

2.2.2.6 Xác định đặc hiệu cơ chất

Cơ chất đặc hiệu được xác định bằng cách sử dụng một số các triglycerid và các ester p-nitrophenyl khác nhau theo miêu tả trước đây (Quyen *et al.*, 2005a).

Tất cả các thí nghiệm đều được thực hiện ba lần và kết quả được lấy với giá trị trung bình của ba lần thí nghiệm.

2.3 Nhân dòng và biểu hiện các gene mã hóa lipase

2.3.1 Nhân dòng gene mã hóa Gcl

2.3.1.1 Chọn vi sinh vật

Các chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 được phân lập và định tên trong các nghiên cứu trước đây. Chủng vi khuẩn *Escherichia coli* DH5 α được dùng để nhân dòng, *Pichia pastoris* GS115 dùng để biểu hiện. Chủng *E.coli* được nuôi trong môi trường LB, chủng *pichia pastoris* được nuôi trong môi trường YPG (cao nấm men 1%, pepton 2%, glucose 2%); BMGY (cao nấm men 1%, peptone 2% 100mM đệm phosphat pH 6.0, 1,34% YBN, 4×10^{-5} biotin, glycerol 1%); BMMY (100mM đệm phosphat pH 6.0, 1,34% YBN, 4×10^{-5} biotin, methanol 1%).

2.3.1.2 Môi và vector nhân dòng

Cặp mồi GclF: 5'-GC GTC GAC CAG GCC CCC ACG GCC GT-3' và GclR: 5'-GCCTC GAG ACC GAA GAG AGT AAC GTC AG -3' được sử dụng để nhân dòng gene mã hóa lipase. Vector nhân dòng T/A pTZ57R/T được mua từ Fermentas. Cặp mồi: GclF1 5'-GC GAA TTC CAG GCC CCC ACG GCC G-3' và GclR1: 5'-GC TCT AGA GCA CCG AAG AGA GTA ACG TC-3' được dùng để biểu hiện. Vector được dùng để biểu hiện trong nấm men là pPICZ α A.

2.3.1.3 Hóa chất

EcoRI và *XbaI* từ fermentas (Mỹ); peptone và cao nấm men từ Difco (Mỹ); agar, InsT/Aclone™ PCR product cloning kit, DNA extraction kit từ Fermentas (Lithia). Các hóa chất khác được sử dụng trong nghiên cứu này đều có độ tinh khiết cao.

2.3.1.4 Các phương pháp nhân dòng

Các phương pháp nhân dòng (tách chiết RNA tổng số, DNA plasmid, gắn dính, cắt enzyme hạn chế, chạy điện di agarose, biến nạp, chọn dòng) đã được mô tả ở công trình trước đây (Quyền Đình Thi, 2004a).

Khuếch đại gene lipase được thực hiện với khuôn cDNA và cặp mồi đặc hiệu GclF và GclR với chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: 94°C/3'; 35x (94°C/1', 62°C/1', 72°C/1'); 72°C/10'; 4°C/∞. Phản ứng PCR để gắn đoạn gene vào vector biểu hiện với cặp mồi GclF1 và GclR1 94°C/3'; 35x (94°C/1', 57°C/1', 72°C/1'); 72°C/10'; 4°C/∞.

2.3.1.5 Xác định và phân tích trình tự nucleotide

Trình tự nucleotide được xác định theo phương pháp Sanger, trên máy ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Phân tích trình tự nucleotide được thực hiện bằng phần mềm DNASTAR.

2.3.1.6 Phương pháp biểu hiện

Plasmid pPGcl sau khi cắt bằng enzyme giới hạn *MssI* được biến nạp bằng xung điện vào tế bào nấm men, sau khi ủ 30°C ở 30°C trong 1 giờ dịch được trải trên môi trường YPGS có chứa 100 µg/ml zeocin. Các khuẩn lạc mọc lên được nuôi cấy trên môi trường YPG và được tách chiết DNA, kiểm tra sự có mặt của đoạn gene bằng phản ứng PCR. Những khuẩn lạc sau khi tách chiết DNA khuếch đại bằng PCR có sản phẩm được nuôi trong môi trường BMGY ở 30°C lắc 250 vòng/phút trong 16 giờ. Lấy tất cả canh trường li tâm ở 2000 G/phút loại bỏ dịch nổi bổ sung tế bào vào 30ml môi trường BMMY sao cho OD đạt 1-1,2, nuôi ở 30°C lắc 250 vòng/phút. Sau 24, 48, 72, 96, 120, 144 giờ, bổ sung 0,5% (v/v) methanol, lấy mẫu thử hoạt tính.

Các phương pháp điện di PAGE và phương pháp SDS-PAGE đã được trình bày trong các nghiên cứu trước đây (Quyen *et al.*, 2005c).

2.3.2 Nhân dòng gene mã hóa *estR*

2.3.2.1 Hóa chất

Các ester p-Nitrophenyl được mua từ Sigma, Bacto-tryptone và yeast extract từ Difco. Các enzyme hạn chế, calf intestinal alkaline phosphatase và T4 ligase được cung cấp bởi Roche. The DNA Gel-Extraction Kit và Ni-NTA-matrix của Qiagen. PCR mix và các dung dịch tinh sạch được mua từ Bioneer. Các hóa chất khác đều ở dạng tinh khiết.

2.3.2.2 Các plasmid, chủng vi khuẩn và điều kiện nuôi cấy

Dòng M1-81 từ thư viện genome DNA xây dựng từ chủng *Ralstonia* sp. M1 (Quyen *et al.*, 2004b) được sử dụng cho việc xác định trình tự và cấu gene esterase *estR*. *Escherichia coli* XL1 xanh chứa pUC19- bắt nguồn từ plasmid pUM1-81 được nuôi trong môi trường LB medium với ampicillin (100 µg/ml) ở 37°C. Vector pET22b+ (Invitrogen) và tế bào *E. coli* BL21 được sử dụng để biểu hiện vượt mức gene esterase *estR* dưới sự điều khiển của promoter T7 được cảm ứng bằng IPTG.

2.3.2.3 Các thao tác DNA

Tinh sạch plasmid DNA được thực hiện theo hướng dẫn của Bioneer. Các đoạn DNA và các sản phẩm PCR được cắt từ gel 0,8% agarose và được tinh sạch theo miêu tả của Qiagen. Trình tự DNA đọc bởi Genotech. *E. coli* BL21 được biến nạp bằng xung điện theo mô tả trước đây (Quyen *et al.*, 2004b).

2.3.2.4 Xây dựng plasmid và nhân dòng phụ

Vector pET22b+ được sử dụng để biểu hiện vượt mức esterase trong *E. coli*. Khung đọc mở gồm 963-bp mã hóa cho esterase từ *Ralstonia* sp. M1 được khuếch đại từ plasmid pUM1-81 bằng PCR với môi xuôi EstRF 5'-GGCCATGGTCCAGACCGTCCTGAT-3', với điểm cắt enzyme *NcoI* có chứa bộ ba mở đầu (ATG thay vì GTG), và môi ngược EstRR 5'-GGAAGCTTGGCTGACGCGGCGGCTTC-3', với vị trí *HindIII* ngay trước bộ ba kết thúc (TAG). Sản phẩm PCR sau đó được cắt với *NcoI* + *HindIII* và chèn vào pET22b+ cũng được mở vòng bằng hai enzyme tương tự để tạo nên vector tái tổ hợp pEstR, trong đó gene *estR* được điều khiển bởi promoter T7 và có thể cảm ứng bằng IPTG.

Plasmid cũng mang gene kháng kháng sinh ampicillin, một đoạn peptide tín hiệu ở đầu 5' và một đuôi 6xHis ở đầu 3' của khung đọc mở. Esterase EstRhis được mã hóa bởi plasmid pEstR có chứa yếu tố dẫn pelB, khung đọc mở ORF cho esterase và một trình tự mã hóa cho đuôi 6xHis. Các kỹ thuật DNA tái tổ hợp chuẩn khác được thực hiện theo Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989).

2.3.2.5 *Biểu hiện gene*

Esterase EstR tái tổ hợp được biểu hiện trong các thể biến nạp *E. coli* BL21 có chứa pEstR theo mô tả trước đây (Quyen *et al.*, 2004b).

2.3.2.6 *Tinh sạch enzyme và xác định hàm lượng protein*

Dạng protein lai EstRhis mang đuôi 6xHis tag ở đầu C được biểu hiện trong *E. coli*. Để tinh sạch esterase EstR, cặn tế bào (~200 mg trọng lượng tươi) từ 50 ml dịch nuôi trong môi trường LB được thu bằng cách ly tâm và sau đó hòa lại trong 1 ml đệm 5 mM imidazole (pH 8.0). Sau khi phá siêu âm tế bào (phá ba lần, mỗi lần 1 phút và giữa mỗi lần phá nghỉ 1 phút), dịch phá tế bào sau đó được ly tâm ở điều kiện 10.000xg, 4°C trong 15 phút. Dịch nổi sau ly tâm được đưa lên cột Ni-NTA (Qiagen) theo hướng dẫn của hãng. Dung dịch esterase EstR tinh sạch được dùng để nghiên cứu tính chất. Nồng độ protein được xác định theo phương pháp Bradford với kit phân tích protein của Bio-Rad.

2.3.2.7 *Đánh giá hoạt tính esterase*

Hoạt tính esterase với cơ chất là các ester p-NP (acetate, propionate, caproate, caprylate, myristate và palmitate) được thực hiện theo mô tả trước đây (Quyen *et al.*, 2005a).

Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, dung môi hữu cơ, các chất tẩy rửa và các ion kim loại đến hoạt tính esterase.

Để xác định ảnh hưởng của một số yếu tố đến hoạt tính esterase, 10 mM p-NP caproate được sử dụng làm cơ chất.

Nhiệt độ tối ưu cho hoạt tính enzyme được xác định ở pH 8,0 với dải nhiệt độ từ 25°C đến 90°C. pH tối ưu cho hoạt tính enzyme được xác định ở 55°C và trong các đệm 0,1 M (acetate, phosphate hoặc Tris-HCl) với các giá trị pH 4,0-11,0.

Ảnh hưởng của các chất tẩy rửa, dung môi hữu cơ và ion kim loại hoặc các chất ức chế lên hoạt tính esterase được xác định bằng cách ủ enzyme trong 30 phút ở 30°C trong đệm 0,1 M Tris-HCl (pH 8.0) có chứa 0,2, 1 và 5% (w/v) chất tẩy rửa; 10% và 30% (v/v) dung môi hữu cơ; 0,1, 1 và 10 mM ion kim loại hoặc chất ức chế. Sau khi thí nghiệm, hoạt tính của hỗn hợp esterase được xác định ở pH 8,0 và 55°C với cơ chất là p-NP caproate.

Tất cả các thí nghiệm đều được thực hiện ba lần và kết quả được lấy là giá trị trung bình của ba lần thí nghiệm.

2.3.2.8 Điện di gel

Điện di gel polyacrylamide SDS (SDS-PAGE) được thực hiện theo miêu tả của Laemmli 1970 với thiết bị của Bio-Rad. SDS-PAGE thường sử dụng gel 12,5% (w/v) acrylamide theo hướng dẫn của hãng.

2.3.2.9 Các kết nối trình tự DNA và amino acid

Các kết nối trình tự được xây dựng và phân tích nhờ chương trình Megalign DNASTar.

2.3.3 Nhân dòng gene mã hóa lóp *Fgl4* và *Fgl5*

2.3.3.1 Nuôi cấy *E. coli*

Tế bào *E. coli* TOF 10F bảo quản ở -80°C được cấy băng lên đĩa thạch để hoạt hóa hoặc dịch tế bào pha loãng với nồng độ thích hợp được trải lên đĩa sau đó ủ qua đêm ở 37°C.

Để nuôi cấy *E. coli* trong môi trường LB lỏng, một khuẩn lạc riêng rẽ trên đĩa thạch được chủng vào 2 ml LB lỏng bổ sung ampicillin (nồng độ cuối cùng 100 µg/ml), lắc 200 vòng/phút ở 37°C qua đêm.

Tế bào nấm *Pichia pastoris* bảo quản ở -80°C được cấy băng lên đĩa thạch để hoạt hóa hoặc dịch tế bào pha loãng với nồng độ thích hợp được trải lên đĩa sau đó ủ qua đêm ở 30°C.

Để nuôi cấy nấm *P. pastoris* trong môi trường YPG lỏng, một khuẩn lạc riêng rẽ trên đĩa thạch được nuôi vào 5 ml YPG lỏng lắc 200 vòng/phút ở 30°C qua đêm.

Để biểu hiện gene, dịch nuôi cấy hoạt hóa qua đêm được tiếp giống vào môi trường YPG theo tỷ lệ 1:100. Sau các mốc thời gian nhất định, 1 ml mẫu được lấy ra, ly tâm 6.000 vòng/phút ở 4°C thu tế bào và dịch nổi để xác định hoạt tính lipase và mức độ biểu hiện.

2.3.3.2 *Xác định hoạt tính lipase*

Định tính lipase: Tế bào của các chủng tái tổ hợp được nuôi lắc trong môi trường YPG trong 24 h ở 30°C, sau đó được nuôi cấy trên đĩa thạch YPG bổ sung 0,2% trybutyrin. Khả năng sinh tổng hợp lipase của các chủng tái tổ hợp được phát hiện khi vòng sáng xung quanh xuất hiện.

Định lượng lipase: Đệm 50 mM Bis-Tris propane chứa 0,1 % Triton X-100; 0,1 % gum Arabic và 50 mM cơ chất p-nitrophenyl palmitate (pNPP, pha trong isopropanol pH 8,0). Hỗn hợp 100 µl dịch enzyme và 900 µl đệm chứa cơ chất được lắc đều và ủ 1 giờ ở 37°C, sau đó so màu ở bước sóng 410 nm. Đơn vị hoạt tính của lipase (U/ml) được định nghĩa là lượng enzyme để giải phóng 1 µmol pNPP trong một phút ở điều kiện thí nghiệm.

2.3.3.3 *Tách chiết plasmid*

Một khuẩn lạc biến nạp phát triển trên đĩa thạch bổ sung ampicillin được cấy vào một ống nghiệm 3 ml môi trường LB chứa ampicillin, nuôi lắc qua đêm ở 37°C, 200 vòng/phút. Tủa tế bào từ 1,5 ml dịch nuôi cấy (ly tâm 5 phút với 6.000 vòng/phút) được vortex khoảng 30 giây trong 150 µl Sol I thành dịch đồng nhất. Sau đó, 150 µl Sol II được bổ sung, lắc nhiều lần, rồi ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng. Thêm 150 µl Sol III, tiếp tục lắc mạnh nhiều lần, rồi ủ 15 phút ở 4°C. Hỗn hợp được bổ sung 450 µl dung dịch chloroform/isoamyl alcohol 24:1, lắc rung và ly tâm 10 phút với 13.000 vòng/phút. 450 µl pha trên được hút sang một ống mới, bổ sung 1000 µl isopropanol và lắc để tủa plasmid. Tủa plasmid (ly tâm 20 phút với 13.000 vòng/phút) được rửa với 500 µl 70% ethanol ở 4°C để loại muối và isopropanol và làm khô trong tủ 37°C (20 phút). Cuối cùng, tủa plasmid được hòa trong đệm TE pH 8,0 hoặc nước khử ion vô trùng, phân tích điện di, cắt kiểm tra bằng enzyme hạn chế hoặc bảo quản ở -20°C để dùng lâu dài.

Lượng plasmid lớn cũng được tách chiết theo qui trình này với các tỷ lệ Sol I, II, và III tương quan thuận với thể tích dịch tế bào. Trong một số trường hợp, plasmid được tinh sạch theo QIAprep Spin Miniprep Kit.

2.3.3.4 Điện di gel agarose

0,8 g agarose được hòa vào 100 ml đệm 1x TBE trong lọ Pyrex 250 ml có đáy nắp lỏng tay, đun nóng chảy trong lò vi sóng, nhắc ra lắc mạnh cho hòa đều. Sau khi nhiệt độ hạ xuống 50°C, gel được đổ vào khuôn điện di đã cài lược sẵn và để yên 30 phút cho đến khi gel đông. Gel đông được đặt vào bồn điện di, vừa đủ ngập trong đệm chạy 1x TBE, nhắc lược ra. Mẫu DNA được trộn với đệm nạp và nạp vào giếng. Sau 45 phút chạy với hiệu điện thế 150 V, gel được nhuộm trong dung dịch EtBr, soi tia tử ngoại bước sóng 300 nm và chụp ảnh làm tài liệu.

2.3.3.5 Cắt DNA bằng enzyme giới hạn

DNA tổng số hoặc plasmid được cắt với các enzyme hạn chế *EcoRI*, *XbaI*, *KpnI*, trong 2-3 giờ hoặc qua đêm ở 37°C với tỷ lệ sử dụng theo hướng dẫn của hãng sản xuất. Sau khi cắt hoàn toàn, sản phẩm cắt được kiểm tra trên gel điện di agarose.

2.3.3.6 Tách phân đoạn DNA từ agarose

Phân đoạn DNA trên gel agarose được tách chiết theo QIAquick Gel Extraction Kit và kiểm tra lại kết quả trên gel điện di agarose.

2.3.3.7 Gắn dính DNA

Phản ứng gắn dính với thể tích 15 µl bao gồm 1,5 µl đệm gắn dính 10x; 4 µl DNA plasmid; 3 µl phân đoạn chèn DNA; 1,5 µl nước cất vô trùng; 5 µl T4-DNA ligase được thực hiện qua đêm ở 22°C.

2.3.3.8 Biến nạp plasmid

Plasmid được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* theo phương pháp sốc nhiệt và hóa học hoặc plasimid được biến nạp vào tế bào khả biến nấm *Pichia* bằng xung điện.

1 µl dung dịch plasmid hoặc hỗn hợp phản ứng nối được trộn với 40 µl dịch tế bào khả biến vừa chuẩn bị xong (hoặc tế bào khả biến ở -80°C được giải đông), ủ 20-30 phút ở 4°C. Hỗn hợp được gây sốc nhiệt 45 giây ở 42°C. Sau đó được đặt ngay vào đá

lạnh khoảng 2 phút rồi bổ sung 750 µl môi trường LB đã khử trùng. Sau khi ủ lắc hỗn hợp khoảng 60 phút ở 37°C với 200 vòng/phút, 50-200 µl dịch tế bào đã biến nạp plasmid được cấy trải trên đĩa thạch có chứa chất chỉ thị (theo hệ thống chọn lọc xanh/trắng) hoặc cơ chất và kháng sinh thích hợp, ủ qua đêm ở 37°C để sàng lọc tiếp.

Cho 10 µl DNA plasmid vào 80 µl tế bào khả biến ủ đá 5 phút, hỗn hợp được xung điện 5 s/mẫu rồi bổ sung 1 ml dung dịch 1 M sorbitol (đã để lạnh) vào ống mẫu dùng pipet sục đều, ủ ở 30°C trong 2 giờ, trải 300 µl hỗn dịch đã biến nạp trên đĩa môi trường YPGS có bổ sung 100 µg zeocin/ml. Ủ ở 30°C từ 2-3 ngày đến lúc xuất hiện khuẩn lạc. Xung điện: Hiệu điện thế: 1500 v; Cường độ dòng điện: 25 mA; Công suất: 25 w; Chế độ: Capacitance: 50 µF; Điện trở: 100 ω; Thời gian: 4 -5 giây/mẫu.

2.3.3.9 Khuếch đại PCR

Các phân đoạn DNA được khuếch đại bằng phương pháp PCR nhờ vào khả năng tổng hợp chuỗi DNA của enzyme xúc tác chịu nhiệt *Taq* polymerase dưới điều kiện chu kỳ nhiệt phù hợp, các hóa chất thích hợp và các môi đặc hiệu đã được thiết kế. a) Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR. b) Khảo sát và chọn chu kỳ nhiệt phù hợp để tiến hành phản ứng. c) Kiểm tra kết quả bằng điện di trên gel agarose.

Phản ứng PCR được tiến hành để nhân đoạn gene từ plasmid với cặp môi đặc hiệu như sau: 1 µl khuôn DNA; 1 µl mỗi 10 pM Fgl4F; 1,0 µl mỗi 10 pM Fgl4R; 14,25 µl nước; 2,5 µl đệm buffer (10x), 2,5 µl MgCl (25 mM), 0,25 µl *Taq* polymerase, 2,0 µl dNTP (10 mM) tổng thể tích 25 µl. Thực hiện phản ứng PCR: biến tính khởi động 94°C/3'; 35 chu kỳ (94°C/30", 55°C/45", 72°C/30"); tổng hợp kết thúc 72°C/10', 4°C/∞.

Môi xuôi Fgl5F: 5'-GAA TTC AGC CCA ACA ATC AAG GGC-3'. Môi ngược Fgl5R: 5'-GGT ACC ACA GCA AAT CCA TTC TGA ACA C-3'.

Sản phẩm PCR sẽ được tinh sạch bằng kit của Qiagen (QIAquick PCR Purification Kit) nếu dùng cho mục đích ghép nối DNA.

2.3.3.10 Điện di polyacrylamide

Điện di protein được thực hiện trên gel polyacrylamide 12,5% theo Laemmli (1972) Sự phân tách các protein bằng điện di gel polyacrylamide SDS (SDS-PAGE)

không phải dựa vào sự tích điện bên trong của các polypeptide mà dựa vào khối lượng phân tử. Sodium dodecylsulfate (SDS) là một chất hoạt tính bề mặt có điện tích âm (anion), làm biến tính protein bằng cách bao phủ xung quanh polypeptide chính của phân tử protein. Trong điện di protein, SDS sẽ cung cấp một mạng lưới điện tích âm dọc suốt theo chiều dài polypeptide. Như vậy với sự có mặt của SDS và một yếu tố khử, các polypeptide trở nên duỗi thẳng và tích điện âm. Khi điện di, dưới tác dụng của dòng điện một chiều các phân tử protein tích điện âm sẽ di chuyển đến cực dương và được phân tách thành các băng khác nhau theo khối lượng của mỗi phân tử.

Các băng protein được xác định bằng nhuộm Coomassie. Nhuộm Coomassie: Gel sau khi điện di được nhuộm với dung dịch nhuộm Coomassie Brilliant Blue trong 1 giờ. Sau đó gel được tẩy màu bằng dung dịch tẩy cho đến khi nền gel trở nên trong còn các băng protein xuất hiện màu xanh.

Sản phẩm cắt được tinh sạch bằng isopropanol lạnh và 70% ethanol: cho 700 μ l isopropanol lạnh vào ống mẫu đã cắt lắc đều để tủ -20°C trong 30 phút, ly tâm 13000 rpm thu rửa, thêm 500 μ l 70% EtOH lạnh ly tâm thu rửa, ủ 30 phút ở 37°C cho khô rồi hòa lại với 15 μ l nước cất tinh khiết).

2.3.3.11 Định lượng protein tổng số

Protein tổng số được xác định theo phương pháp Bradford với Bio-Rad protein assay kit.

2.3.4 Phá bỏ gene mã hóa lipase

2.3.4.1 Nguyên liệu

Ba tổ hợp cassette **promoter** *fgl* **hygromycin terminator** *fgl* (PHygT) là P12-Hyg-T12, P13-Hyg-T13, P14-Hyg-T14 (Phụ lục) được sử dụng để phá hủy gene mã hóa lipase Lip12, Lip13 và Lip14 ở chủng nấm *Fusarium graminearum*.

2.3.4.2 Hóa chất và môi trường biến nạp

Bảng 2.1. Môi trường và đệm dùng cho quá trình biến nạp và tách DNA nấm.

TT	Tên môi trường	Thành phần
1	Hỗn hợp enzyme	5% driselase; 3,5% glucanase; 20 ml 700 mM NaCl; pH5,6
2	Môi trường phục hồi M_{REG} (Regeneration medium)	2 g hỗn hợp yeast-casein (1 g yeast extract; 1 g casein đã thủy phân); 342 g sucrose; 16 g agar; 1 lit H ₂ O khử ion
3	Môi trường phủ agar (Overlay-agar)	1,2% agar trong 1 lit H ₂ O khử ion; 200 µg hygromycin
4	Môi trường CM (Complete medium)	10 ml solution A (10% Ca(NO ₃) ₂); 10 ml Solution B (2% KH ₂ PO ₄ ; 2,5% MgSO ₄ ; 15% NaCl, pH 5,3); 0,2% hỗn hợp yeast-casein; 1% glucose; 1 ml MNS; 900 ml H ₂ O
5	Môi trường chọn lọc (Selection-agar)	1,6% agar trong môi trường CM; 100 µg hygromycin
6	Môi trường SNA	1 g KH ₂ PO ₄ + 1 g KNO ₃ + 0,5 g MgSO ₄ + 0,5 g KCl + 0,2 g glucose + 0,2 g sucrose; 16-22 g agar trong 1 lit H ₂ O
7	Môi trường YPG	1% yeast extract + 2% peptone + 2% glucose
8	STC	1,2 M sorbitol; 10 mM Tris HCl pH7,0; 50 mM CaCl ₂
9	PTC	60% polyethylenglycol (PEG); 10 mM Tris HCl pH 7,0; 50 mM CaCl ₂
10	700 mM NaCl pH5,6	40,9 g NaCl; 8,6 ml NaH ₂ PO ₄ (500mM); 1,4 ml Na ₂ HPO ₄ (500 mM); 1 lit H ₂ O
11	Đệm ly giải	2% CTAB + 1 M Tris HCl + 5 M NaCl + 0,5 M EDTA

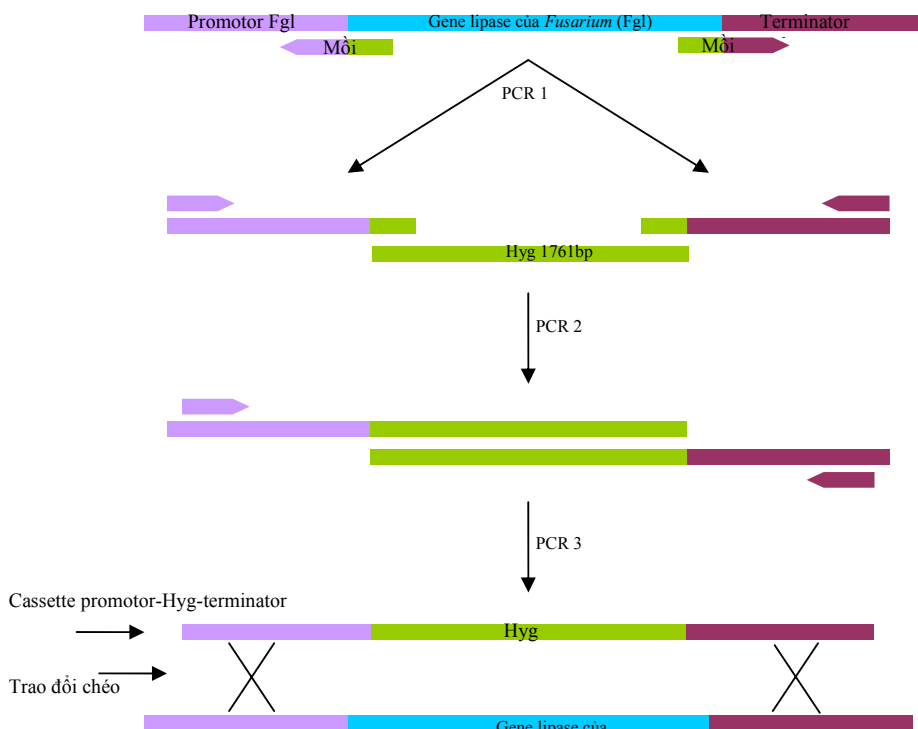
Bảng 2.2. Hóa chất dùng trong lai Southern.

TT	Tên dung dịch	Thành phần
1	Đệm dịch gầy	0,25 N HCl (pha bằng nước đã khử trùng)
2	Đệm biến tính	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
3	Đệm trung hòa	0,5 M Tris-HCl pH7,5; 1,5 M NaCl
4	20 ×SSC (khử trùng)	175,2 g NaCl; 88,2 g Na-citrat
5	5 B1 (khử trùng)	58,05g maleic acid; 43,83 g NaCl; Chính pH 7,5 bằng NaOH
6	Đệm tiền lai	5 SSC; 0,1% N-lauryl-sarkosine; 0,02% SDS; 2% blocking reagent
7	W1	2 SSC; 0,1% SDS
8	W2	0,2 SSC; 0,1% SDS
9	B2	1 B1; 1% blocking reagent
10	AK	B2; kháng thể
11	WP	1 B; 0,3% Tween 20
12	B3	100 mM Tris HCl pH 9,5; 100 mM NaCl

2.3.4.3 Thiết kế cassette promotorFgl-Hyg-terminatorFgl

Nguyên lý để phá bỏ hoàn toàn một gene nào đó trong nấm sợi (sinh vật nhân chuẩn) là dựa vào việc trao đổi chéo giữa các đoạn DNA tương đồng trong quá trình sinh trưởng của sinh vật. Dựa vào đó ta có thể đưa một gene khác để thay thế một gene nào đó của nấm (thường là gene kháng sinh để làm dấu hiệu nhận biết). Các

cassette promoter Fgl – Hygromycin – terminator Fgl (*PHygT*) (Hình 2.1) được sử dụng để thay thế và phá bỏ 3 gene mã hóa lipase Fgl12, Fgl13, Fgl14.



Hình 2.1. Quá trình thiết kế cassette *PHygT*.

2.3.4.4 Biến nạp vào nấm sợi *F. graminearum*

Chuẩn bị giống cấp 1: Khoảng 30000 bào tử được nuôi trong 50 ml môi trường CM, lắc 28°C, 150 vòng/phút qua đêm. Toàn bộ dịch nuôi cấy trên được xay cùng với 150 ml môi trường CM (3 lần, mỗi lần 10 giây). Sau khi xay, 50 ml hỗn hợp trên được cho vào 150 ml môi trường CM và lắc qua đêm ở 28°C, 150 vòng/phút trong bình 500 ml tạo ra giống cấp 1.

Tạo tế bào trần: Toàn bộ dịch giống cấp 1 được lọc bằng phễu lọc Wilson-sieve (100 µm) và rửa 2 lần bằng nước khử ion khử trùng. Trọng lượng của hỗn hợp sợi nấm sau khi làm khô bằng giấy thấm đã khử trùng được xác định. Dung dịch enzyme được trộn với hỗn hợp sợi nấm trên (20 ml dịch enzyme với 1-1,5 g sợi nấm), trong bình 100 ml ở 28°C, 75 vòng/phút. Sau 2 giờ, việc tạo tế bào trần được kiểm tra dưới kính hiển vi. Việc tạo tế bào trần tốt nhất nếu hầu hết các hệ sợi được enzyme phân cắt. Tiếp theo tế bào trần được lọc lần lượt qua phễu lọc Wilson-sieve 100 µm và 40 µm

để loại hoàn toàn các hệ sợi chưa bị phân cắt. Mỗi lần lọc đều được rửa lại với 10 ml NaCl. Dịch tế bào trần được ly tâm trong ống ly tâm 12 ml, 2000 vòng/phút, trong 10 phút ở 2°C. Cặn tế bào trần được hòa lại rất cẩn thận trong 12 ml NaCl. Sau đó lại được ly tâm và hòa lại cặn tế bào trần như trên. Một ít dịch sau khi hòa cặn tế bào trần được đếm số lượng tế bào trần bằng kính hiển vi. Mỗi lần biến nạp cần tối thiểu 1×10^7 tế bào trần. Dịch tế bào trần được ly tâm thêm 10 phút, 2000 vòng/phút ở 2°C và hòa lại cặn tế bào trong 1 ml STC. Các tế bào trần này có thể được giữ ở 4°C qua đêm hoặc để ở trong đá 1 giờ sau đó dùng để biến nạp ngay.

Biến nạp: 25 µg DNA plasmid được bổ sung, trộn đều thật cẩn thận và ủ trong đá 10 phút và cứ sau 2 phút lại lắc đều. Một ml PTC đã để lạnh trước được bổ sung và trộn đều cẩn thận, giữ trong đá 15 phút và cứ 2 phút lại lắc đều. Hỗn hợp được bổ sung từ từ 8 ml STC và trộn đều. Tất cả hỗn hợp trên được trải nhẹ nhàng lên đĩa môi trường M_{REG} , mỗi đĩa 750 µl, ủ qua đêm ở 28°C. Sau khi ủ qua đêm, đĩa thạch được phủ 10 ml môi trường agar bổ sung kháng sinh chọn lọc hygromycin với nồng độ 200 µg/ml lên mỗi đĩa. Tiếp tục ủ đĩa ở 28°C. Kiểm tra đĩa mỗi ngày và khi có khuẩn lạc mọc thì nhặt và chuyển sang đĩa môi trường chọn lọc mới.

2.3.4.5 Tách DNA từ nấm sợi

Khoảng 1 cm² đĩa thạch nuôi cấy nấm được cắt và nuôi trong 50 ml môi trường lỏng YPG, lắc 200 vòng/phút ở 28°C trong 3-4 ngày. Sợi nấm được lọc hút chân không qua phễu lọc, nghiền nhỏ trong cối chày sứ bằng nitrogen lỏng, sau đó chuyển vào ống eppendorf 2 ml. Tế bào nghiền được bổ sung 600 µl đệm ly giải vào mỗi ống và ủ lắc ở 65°C từ 40 phút đến 1 giờ. Hỗn hợp tế bào được ly tâm 10 phút với 13000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng hoặc 4°C. Pha trên được hút sang ống eppendorf 1,5 mới, bổ sung 1 V chloroform và lắc đều, ly tâm 15 phút với 13000 vòng/phút ở 4°C. Pha trên được hút sang ống 1,5 mới và rửa DNA bằng cách bổ sung 750 µl isopropanol, lắc đều và để vào tủ lạnh 30 phút (có thể để qua đêm). Rửa DNA được ly tâm 20 phút với 13000 vòng/phút ở 4°C. Rửa DNA được rửa bằng 500 µl cồn 70% lạnh, làm khô và hòa lại trong TE.

2.3.4.6 *Lai Southern*

Chuẩn bị DNA để chuyển lên màng nylon: Mẫu DNA tổng số sau khi xử lý bằng enzyme hạn chế được chạy điện di trên gel agarose, nhuộm ethidium bromide và kiểm tra sự phân tách của mẫu. Gel được cho vào hộp nhựa và rửa qua bằng nước cất 2 lần đã khử trùng. Mẫu được cố định bằng cách ngâm gel trong đệm gầy, lắc nhẹ ở nhiệt độ phòng khoảng 10-20 phút hoặc cho đến khi màu của bromophenol blue chuyển từ xanh sang vàng. Sau đó rửa qua với nước cất 2 lần đã khử trùng. DNA trong gel được biến tính trong dung dịch biến tính, lắc 30 phút ở nhiệt độ phòng. Gel được rửa bằng nước cất 2 lần đã khử trùng. Tiếp theo, gel được ngâm vào đệm trung hòa, lắc 30 phút ở nhiệt độ phòng. Gel được cân bằng trong 20x SSC ít nhất 10 phút.

Chuyển DNA lên màng nylon: Một tấm giấy thấm Whatman 3MM được làm cầu dẫn dung dịch 20x SSC và đặt bản gel lên trên, tránh bọt khí tạo thành giữa hai lớp. Màng nylon được đặt lên trên mặt gel, cũng tránh bọt khí giữa hai lớp. Khoảng 4-5 tấm giấy thấm Whatman 3MM được đặt thêm lên trên màng nylon. Chồng giấy thấm dày khoảng 10 cm được đặt lên trên và một vật nặng có trọng lượng khoảng 200-500 g được đặt lên trên cùng, để qua đêm cho DNA chuyển lên màng nylon.

Cố định DNA trên màng bằng UV: Trước khi cố định, màng được rửa qua đệm 2x SSC. Màng được đặt lên tấm Whatman 3MM (mặt chứa DNA lên phía trên), cố định dưới tia UV 1-3 phút. Màng được rửa lại với 2x SSC, đặt trở lại trên tấm Whatman 3MM và để khô.

Gắn mẫu dò: Màng được cuộn cho vào ống tròn, mặt chứa DNA cho vào phía trong để tiếp xúc được với đệm. Màng được phủ bằng 20 ml đệm tiền lai, lắc xoay vòng ở 68°C, qua đêm. Đệm tiền lai được loại bỏ, và đồ hỗn hợp mẫu dò vào và ủ tiếp qua đêm ở 68°C.

Gắn kháng thể và đọc kết quả: Hỗn hợp mẫu dò được loại ra và màng được rửa lại 2 lần, mỗi lần 5 phút ở nhiệt độ phòng với 20 ml dung dịch W1, rửa 2 lần, mỗi lần 15 phút ở 68°C với 20 ml dung dịch W2. Sau đó màng được rửa qua với dung dịch WP và rửa 30 phút trong dung dịch B2 ở nhiệt độ phòng. Kháng thể được gắn trong 30 phút (5 µl kháng thể được pha trong 50 ml dung dịch B2). Màng được rửa 3 lần, mỗi lần 20 phút với dung dịch WP ở nhiệt độ phòng, rửa 5 phút trong dung dịch B3 để

cân bằng lại pH thích hợp cho enzyme hoạt động để phân giải cơ chất. 500 μ l cơ chất được trải đều lên tấm nhựa nylon, sau đó úp mặt màng chứa DNA lên trên cơ chất, để 5 phút ở nhiệt độ phòng. Đọc kết quả dưới tia huỳnh quang hóa học.

2.3.5 Tạo chế phẩm lipase

2.3.5.1 Lên men lipase

Chủng lên men là chủng nấm men tự nhiên màu trắng *Geotrichum candidum*. Môi trường hoạt hóa là môi trường LB. Môi trường nhân giống cấp I và lên men là môi trường LB low salt có bổ sung 0,5% dầu Olive

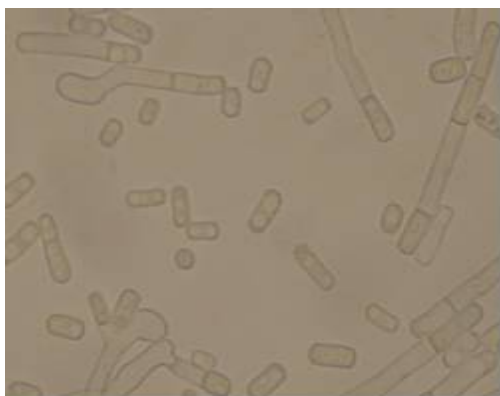
Thông số lên men ban đầu là: nhiệt độ 30°C, pH= 6, tốc độ khuấy ban đầu 400 rpm và sục khí 0,7 vvm. Trong quá trình lên men, tiến hành lấy mẫu định kỳ 6 giờ một lần để theo dõi sự phát triển và đo hoạt tính enzyme. Đồng thời các mẫu cũng được tiến hành chạy điện di và đo hàm lượng protein tổng số để kiểm tra. Thu mẫu lên men tại thời điểm 30h đo hoạt tính thu được là 43 U/ml.



Hình thái khuẩn lạc *Geotrichum candidum* trên môi trường LB+0,5 Oliu



Lên men *Geotrichum candidum*



Hình thái tế bào *Geotrichum candidum* trên kính hiển vi (mẫu kiểm tra lên men)

2.3.5.2 Tạo chế phẩm thô

Sau khi kiểm tra theo dõi và thu hồi dịch lên men ở thời điểm tối ưu, dịch thu hồi đem ly tâm để loại bỏ cặn và xác tế bào, sau đó dịch tiếp tục được xử lý qua máy lọc luân hồi Masterflex (Nhật) với màng lọc có kích thước thích hợp để loại nước, muối khoáng và một số protein có kích thước nhỏ hơn enzyme nghiên cứu. Dịch cô đặc cuối cùng sẽ được đông khô trộn bột tạo ra chế phẩm enzyme dạng bột. Các chế phẩm này sẽ được đo kiểm tra hoạt tính và xác định độ bền ở hai điều kiện bảo quản là nhiệt độ thường và trong tủ lạnh 4°C.



Máy lọc tuần hoàn Masterflex (Nhật).



Máy đông khô IK118 (Đài Loan).

Tiến hành ly tâm cô đặc và đông khô thu được 52g bột chế phẩm enzyme lipase với hoạt tính đo được là 1635 U/g bột lipase với độ bền khảo sát trong 6 tháng như sau:

Điều kiện bảo quản	% hoạt tính lipase còn lại sau:					
	1 tháng	2 tháng	3 tháng	4 tháng	5 tháng	6 tháng
Tủ lạnh 4°C	95	95	78,4	68	70	70
Nhiệt độ thường	93	93	77,3	65	66	67

2.3.5.3 Tạo chế phẩm tinh sạch

Lipase biểu hiện ở *P. pastoris* dưới dạng có đuôi 6xhistidine được tinh sạch qua cột nickel. Sau đó lipase được rửa với dung môi thích hợp là 80% acetone, 80% ethanol, và 80% methanol (hòa 1 thể tích enzyme 5% với 4 thể tích dung môi), để ở 4°C, ly tâm thu rửa và hòa lại vào 20 µl nước cất, sau đó đông khô.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp lipase (Nội dung 1-2)

Bảng 3.1A. Các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp lipase.

TT	Tên mẫu	Hoạt tính				Nơi lấy mẫu	TT	Tên mẫu	Hoạt tính				Nơi lấy mẫu
		LB + 1% DĐN	Tauson + 1% DĐN	MT5 + 1% D8NĐ	LB + 0,2 Tri				LB + 1% DĐN	Tauson + 1% DĐN	MT5 + 1% D8NĐ	LB + 0,2 Tri	
1	LP1.1			+	+		80	LP12.8					
2	LP1.2				+		81	LP13.1					
3	LP1.3				+		82	LP13.2					
4	LP1.4				+		83	LP13.3					
5	LP1.5				+		84	LP14.1					
6	LP1.6				+		85	LP15.1		+			
7	LP1.7	+		+	+		86	LP15.2		+			
8	LP2.1				+		87	LP15.3					
9	LP2.2				+		88	LP15.4			+		
10	LP2.3				+		89	LP15.5			+		
11	LP2.4				+		90	LP15.6					
12	LP2.5				+		91	LP15.7	+				
13	LP2.6				+		92	LP15.8					
14	LP2.7		+		+		93	LP16.1		+			
15	LP3.1	+		+	+		94	LP16.2		+			
16	LP3.2	+			+		95	LP16.3		+			
17	LP3.3				+		96	LP16.4					
18	LP3.4				+		97	LP16.5					
19	LP3.5				+		98	LP16.6		+			
20	LP3.6	+		+	+		99	LP16.7		+			
21	LP3.7		+		+		100	LP16.8			+		
22	LP3.8		+		+		101	LP17.1		+			
23	LP3.9		+		+		102	LP17.2		+			
24	LP4.1				+		103	LP17.3		+			
25	LP4.2	+			+		104	LP17.4					
26	LP4.3	+			+		105	LP17.5					
27	LP4.4				+		106	LP17.6		+			
28	LP4.5	+		+	+		107	LP17.7			+		
29	LP4.6				+		108	LP17.8			+		
30	LP4.7		+		+		109	LP18.1		+			
31	LP4.8		+		+		110	LP18.2					
32	LP5.1				+		111	LP18.3					
33	LP5.2				+		112	LP18.4		+			
34	LP5.3				+		113	LP18.5			+		
35	LP5.4				+		114	LP19.1		+			
36	LP5.5				+		115	LP19.2		+			

37	LP5.6				+		116	LP19.3		+			
38	LP6.1	+			+		117	LP19.4		+			
39	LP6.2				+		118	LP19.5			+		
40	LP6.3				+		119	LP20.1			+		
41	LP6.4				+		120	LP20.2			+		
42	LP6.5				+		121	LP20.3			+		
43	LP6.6	+			+		122	LP20.4					
44	LP6.7		+		+		123	LP20.5					
45	LP6.8		+		+		124	LP20.6					
46	LP6.9		+		+		125	LP20.7					
47	LP7.1				+		126	LP20.8		+			
48	LP7.2				+		127	LP20.9					
49	LP7.3				+		128	LP20.10			+		
50	LP7.4				+		129	LP20.11			+		
51	LP7.5	+			+		130	LP21.1			+		
52	LP7.6				+		131	LP22.1			+		
53	LP7.7		+		+		132	LP22.2			+		
54	LP8.1						133	LP22.3			+		
55	LP8.2	+					134	LP22.4			+		
56	LP8.3						135	LP22.5			+		
57	LP8.4						136	LP23.1			+		
58	LP8.5						137	LP23.2			+		
59	LP8.6			+			138	LP23.3			+		
60	LP8.7						139	LP24.1			+		
61	LP8.8		+				140	LP24.2			+		
62	LP8.9		+				141	LP24.3			+		
63	LP8.10		+				142	LP25.1			+		
64	LP9.1						143	LP26.1			+		
65	LP9.2						144	LP26.2			+		
66	LP9.3			+			145	LP26.3			+		
67	LP10.1						146	LP27.1			+		
68	LP10.2						147	LP27.2			+		
69	LP10.3						148	LP28.1			+		
70	LP11.1						149	LP28.2			+		
71	LP11.2			+			150	LP29.1			+		
72	LP11.3						151	LP29.1			+		
73	LP12.1	+					152	LP29.2			+		
74	LP12.2						153	LP31.1			+		
75	LP12.3						154	LP31.2			+		
76	LP12.4	+					155	LP20.11			+		
77	LP12.5	+					156	LP27.2			+		
78	LP12.6						157	LP21.1			+		
79	LP12.7												

Bảng 3.1B Các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp lipase được phân lập từ nước thải. Nơi lấy mẫu: B: bờ; CR công rãnh, LM: lò mổ; MD: Mai động; M: mỡ; HK: Hoàn kiếm. ^{a)} Vòng sáng thủy phân dầu Marvella.

T	Ký hiệu	Màu sắc	HT ^{a)}	T	Ký hiệu	Màu sắc	HT ^{a)}	T	Ký hiệu	Màu sắc	HT ^{a)}
T	chủng			T	chủng			T	chủng		

1	B1	Vàng N	+++	15	LM22	Vàng	+++	29	MD16	Vàng	++
2	B2	Vàng C	++	16	LM23	Vàng	+++	30	MD17	Vàng	++
3	CR1	Vàng	+	17	LM24	Vàng	++	31	MD18	Vàng	++
4	LM111	Vàng N	+	18	LM25	Vàng	+++	32	TL1	Vàng	++
5	LM112A	Vàng N	+	19	LM27	Vàng	+++	33	TL31	Vàng	++
6	LM112B	Vàng N	+	20	M1	Vàng N	+++	34	CRS1	Vàng	++
7	LM113	Vàng N	+	21	M2	Vàng C	++	35	CRS2	Vàng	++
8	LM114	Vàng N	+	22	M3	Vàng N	+++	36	CRS3	Vàng	++
9	LM116	Vàng N	+	23	M42	Vàng N	+++	37	CRS4	Vàng	++
10	LM12	Vàng	+	24	M5	Vàng N	+++	38	HKS1	Vàng	++
11	LM13	Vàng	+	25	M8	Vàng	++	39	HKS2	Vàng	++
12	LM14	Vàng	+	26	MD13	Vàng	++	40	MDS1	Vàng	++
13	LM15	Vàng	+++	27	MD14	Vàng	++	41	TSS1	Vàng	++
14	LM21	Vàng	++	28	MD15	Vàng	++				

Bảng 3.1C. Danh sách các chủng *Pseudomonas* đã được khảo sát hoạt tính lipase. - Không có hoạt tính lipase.
+ có hoạt tính lipase thấp. ++ có hoạt tính lipase trung bình. +++ có hoạt tính lipase cao.

TT	Chủng	HT	TT	Chủng	HT	TT	Chủng	HT	TT	Chủng	HT
1	9 ₁	+	26	5 ₄	++	51	7 ₂	+	77	ĐN ₃	+
2	9 ₂	+	27	3 ₂	++	52	7 ₃	+++	78	ĐN ₆	+
3	9 ₃	+	28	TBXL ₅	+	53	2 ₁ CT	+	79	KT ₁	+
4	9 ₄	+	29	TBXL ₄	-	54	2 ₂ CT	-	80	G ₃	+++
5	8 ₁	+	30	5 ₄ CT	-	55	2 ₃ CT	+++	81	3 ₁ CT	+
6	8 ₂	+	31	5 ₆ CT	+++	56	O ₁	+	82	QT2 ₃	+
7	ĐT ₂	+	32	4 ₁	+	57	O ₂	+	83	CC ₂	+++
8	7 ₁	+	33	4 ₃	+	58	O ₃	+	84	CC ₃	-
9	1 ₁	++	34	4 ₄	+	59	8 ₄	+	85	CC ₄	+
10	5 ₃	++	35	TBXL ₇	-	60	ĐDH ₁	+	86	F ₃ O ₂	-
11	T ₃ O ₁	++	36	TBXL ₈	+	61	ĐDH ₂	+	87	Tb2 ₃	+
12	F ₃ O ₄	+	37	ĐT ₁	++	62	ĐDH ₃	++	88	G ₂	+
13	M ₃	+++	38	ĐT ₃	+++	63	ĐDH ₄	+++	89	ĐV ₁	++
14	M ₄	+	39	ĐN ₅	++	64	ĐDH ₅	+	90	ĐV ₂	-
15	HK ₁	+	40	HK ₂	+	65	8 ₅	+	91	ĐDH11	-
16	1 ₃	+	41	HA ₁	+	66	M ₁	++	92	4 ₃ CT	+
17	F ₁ O ₄ T	+	42	HA ₂	+	67	M2	-	93	1 ₃ CT	+
18	ĐN ₁	+	43	QT2 ₃₀ ³	+++	68	M5	-	94	HC ₂	+
19	ĐN ₄	+	44	QT2 ₃₀ ⁵	++	69	M6T	-	95	F ₁ O ₂	+++
20	ĐD ₁	+	45	TBCXL ₁	+++	70	2 ₂	+	96	HK ₁	+++
21	2 ₁	+	46	TBCXL ₂	-	71	2 ₃	+	97	RDH ₁	++
22	TBXL ₁	+	47	TBCXL ₃	+	72	2 ₄	-	98	RDH ₂	+
23	TBXL ₂	-	48	TBCXL ₄	+	73	2 ₄ CT	+	99	RDH ₃	++
24	TBXL ₃	+++	49	5 ₁ CT	+	74	4 ₂	+	100	RDH ₄	+++
25	5 ₂	++	50	5 ₂ CT	++	75	M ₆ đỏ	+	101	RDH ₆	+
						76	ĐN ₂	+	102	RDH ₇	+++

Kết quả đã phân lập được 300 (157+41+102) chủng vi sinh vật trên các môi trường phân lập khác nhau có bổ sung cơ chất là dầu 1%. Các khuẩn lạc thuần khiết, riêng rẽ được thử trên các môi trường chứa cơ chất là dầu hay tributyrin (Hình 3.1). Kết quả về hoạt tính lipase được thống kê trong bảng 3.1.

Như vậy đã phân lập được 10 chủng vi sinh vật biển và 95 vi sinh vật đất có hoạt tính lipase. Từ các chủng vi sinh vật kể trên chúng tôi đã chọn ra một chủng có hoạt tính cao nhất ký hiệu 26.3 để thực hiện các nghiên cứu về hình thái, tính chất lý hóa.

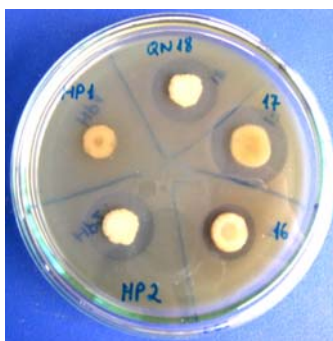
Theo phân loại sơ bộ của Viện 69 chủng 26.3 thuộc loài *Geotrichum candidum*. Khuẩn lạc phát triển mạnh $d = 5-6$ cm trong 5 ngày ở 25°C , màu trắng, dạng màng, đầu sợi nấm phân nhánh lưỡng phân $d = 7-11\ \mu\text{m}$. Bào tử trần hình trụ tròn đầu, tạo thành chuỗi thẳng hoặc ngang, kích thước $6-20 \times 3-9\ \mu\text{m}$ (Hình 3.2). Bào tử trần thuộc dạng bào tử đính khớp (arthoconidial), được tạo thành bằng sự phân đoạn các sợi nấm dinh dưỡng hoặc các nhánh của cuống sinh bào tử trần không phân sinh.

3.2 Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và xác định tính chất hóa lý của lipase tự nhiên (Nội dung 3-4)

3.2.1 Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và xác định tính chất hóa lý của lipase

Geotrichum sp. DTQ-26.3

Từ các mẫu nước biển, nước ao hồ và nước thải, 300 chủng vi sinh vật khác nhau được phân lập trong các môi trường phân lập khác nhau có bổ sung 1% (w/v) cơ chất dầu. Các khuẩn lạc thuần khiết, riêng rẽ được thử trên các môi trường chứa cơ chất dầu hay tributyrin (Hình 3.1). Kết quả phân lập được 10 chủng vi sinh vật biển và 95 vi sinh vật đất có hoạt tính lipase. Từ các chủng vi sinh vật này chủng nấm DTQ-26.3 có hoạt tính lipase cao nhất được chọn để sinh tổng hợp lipase và thực hiện các nghiên cứu về hình thái, tính chất lý hóa.



Hình 3.1. Hoạt tính thủy phân tributyrin của một số chủng vi sinh vật phân lập được trên đĩa thạch chứa tributyrin, chủng QN18, 17, 16, HP2, HP1.



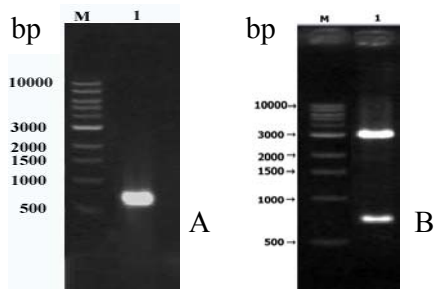
Hình 3.2. Hình thái chủng DTQ-26.3 dưới kính hiển vi phóng đại 4000 lần.

3.2.1.1 Hình thái khuẩn lạc

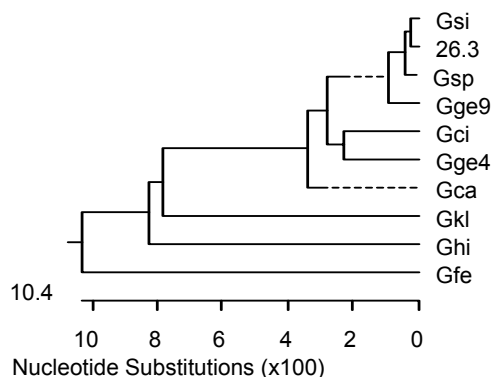
Phân loại sơ bộ bằng kính hiển vi điện tử cho thấy chủng DTQ-26.3 thuộc loài *Geotrichum candidum*. Khuẩn lạc phát triển mạnh $d = 5-6$ cm trong 5 ngày ở 25°C , màu trắng, dạng màng, đầu sợi nấm phân nhánh lưỡng phân $d = 7-11$ μm (Hình 3.2). Bào tử trần hình trụ tròn đầu, tạo thành chuỗi thẳng hoặc ngang, kích thước $6-30 \times 3,9$ μm thuộc dạng đỉnh khớp Arthroconidi, được tạo thành bằng sự phân đoạn các sợi nấm dinh dưỡng hoặc các nhánh của cuống sinh bào tử trần không phân sinh.

3.2.1.2 Phân tích trình tự 26S rRNA

Theo nhận định hình thái ban đầu chủng DTQ-26.3 là chủng nấm mốc. Để củng cố nhận định này, trình tự vùng 26S rRNA với chiều dài ~600 bp được phân tích. DNA tinh sạch được dùng làm khuôn để nhân đoạn 26S rRNA với cặp mồi đặc hiệu NL1 và NL4 (Hình 3.3A).



Hình 3.3. Điện di đồ sản phẩm PCR của phân đoạn 26S rRNA (A) và sản phẩm cắt plasmid (B), M: DNA Marker 1 kb.



Hình 3.4. Mối quan hệ di truyền giữa chủng DTQ-26.3 và các chủng *Geotrichum* khác trên GenBank. Gsi: *Geotrichum silvicola* (DQ377646); 26.3: DTQ-26.3; Gsp: *Geotrichum* sp. MTCC 3974 (AY225313); Gge9: *Galactomyces geotrichum* (DQ907938); Gci: *Geotrichum citri-auranti* (U94918, U84233); Gge4: *Galactomyces geotrichum* (U40118); Gca: *Geotrichum candidum* (AJ507661); Gkl: *Geotrichum klebahnii* (U40114); Ghi: *Geotrichum histeridarum* (DQ002499); Gfe: *Geotrichum fermentans* (U40117).

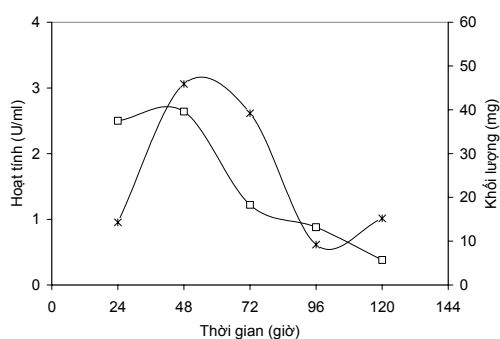
Phân đoạn 26S rRNA (Hình 3.3A) được gắn dính vào vector pTZ57R/T và được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α . Plasmid tinh sạch được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *Eco*RI và *Hind*III, theo tính toán lý thuyết sẽ cho 2 băng tương ứng với một đoạn của vector pTZ57R/T và phân đoạn chèn (Hình 3.3B).

Trình tự gene 26S rRNA của chủng DTQ-26.3 được so sánh với trình tự 26S rRNA của một số chủng *Geotrichum* trên GenBank bằng DNASTAR (Hình 3.4).

Chủng DTQ-26.3 có độ tương đồng cao nhất (99,7-99,3%) so với các chủng *Geotrichum candidum* (AJ507661), *Geotrichum silvicola* (DQ377646) và *Geotrichum* sp. MTCC 3974; 97,1-95,8% so với các chủng *Galactomyces geotrichum* (DQ907938); *Galactomyces geotrichum* (U40118), *Geotrichum citri-auranti* (U94918, U84233); 89,0-83,3% so với các chủng *Geotrichum klebahnii* (U40114), *Geotrichum*

histeridarum (DQ002499), *Geotrichum fermentans* (U40117). Như vậy có thể kết luận rằng chủng DTQ-26.3 thuộc chi *Geotrichum*. Trình tự 26S rRNA của chủng DTQ-26.3 được đăng ký trong GenBank với mã số DQ640273 và được đặt tên là *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.

3.2.1.3 Động học sinh trưởng và sinh tổng hợp lipase



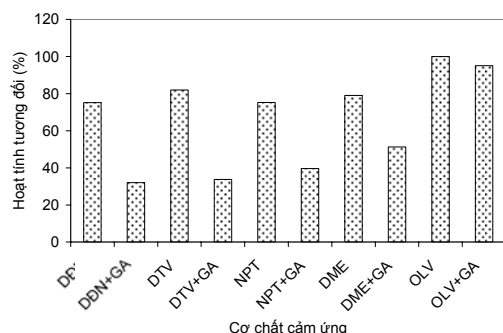
Hình 3.5. Động học sinh trưởng (*) và sinh tổng hợp lipase (□) của chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.

Khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp lipase của chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 tăng theo pha logarith đến 48 giờ (Hình 3.5). Đây là pha sinh trưởng, tốc độ sinh trưởng tăng tuyến tính với sinh tổng hợp lipase. Tại thời điểm 48 giờ, sinh tổng hợp enzyme đạt cao nhất 2,64 U/ml, tương ứng với trọng lượng 45,9 mg/50 ml. Sinh tổng hợp enzyme

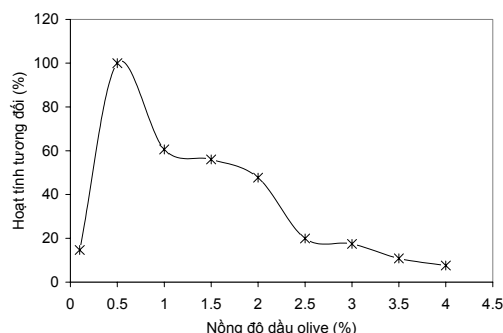
giảm từ từ trong khoảng thời gian 48-72 giờ, sau đó giảm mạnh xuống 0,38 U/ml sau 120 giờ nuôi cấy.

3.2.1.4 Cơ chất cảm ứng và nhiệt độ cơ chất cảm ứng

Trong môi trường LB chứa 0,5% (v/v) dầu đậu nành, chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 sinh tổng hợp lipase cao gấp 9 lần (25,9 U/ml) so với môi trường LB. Các loại dầu đậu nành (25,9 U/ml), dầu mè (27,2 U/ml), dầu Neptune (26 U/ml) và dầu thực vật (28,3 U/ml) cảm ứng sinh tổng hợp lipase gần như nhau và đạt 75-82% so với cảm ứng dầu olive (Hình 3.6). Trong khi đó bổ sung 0,5% dầu olive vào môi trường nuôi cấy, sinh tổng hợp lipase đạt cực đại và tăng 13 lần so với giá trị cực đại khi nuôi cấy không bổ sung dầu. Như vậy cơ chất cảm ứng tốt nhất cho sinh tổng hợp lipase là dầu olive. Khi bổ sung hỗn hợp gum arabic và dầu (0,5% mỗi loại) vào môi trường nuôi cấy, hoạt tính giảm rõ rệt (Hình 3.6). Hỗn hợp gum arabic và dầu (đậu nành, thực vật, Neptune, mè) làm giảm sinh tổng hợp lipase xuống còn khoảng một nửa so với môi trường LB chỉ bổ sung dầu. Hỗn hợp gum arabic và dầu olive làm giảm sinh tổng hợp lipase không đáng kể (5%).



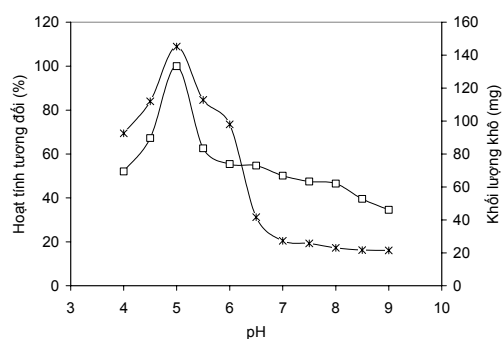
Hình 3.6. Khả năng cảm ứng của các loại cơ chất (dầu) và gum Arabic đối với chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 trong môi trường LB có bổ sung dầu đậu nành (DĐN); dầu thực vật (DTV); dầu Neptune (NPT); dầu mè (DME); dầu olive (OLV); GA: gum arabic.



Hình 3.7. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến khả năng sinh tổng hợp lipase.

Với nồng độ 0,1% (v/v) olive, hoạt tính chỉ đạt 15% (5,56 U/ml), tăng 20% so với môi trường không bổ sung dầu. Hoạt tính tăng đột ngột và đạt ngay cực đại ở nồng độ 0,5% (34,48 U/ml) tăng 85% so với nồng độ 0,1% (Hình 3.7). Bắt đầu từ nồng độ 0,5%, hoạt tính enzyme giảm dần xuống và đến nồng độ dầu olive 4%, hoạt độ chỉ còn 8% so với mức cực đại. Như vậy chứng tỏ, với nồng độ 0,5% dầu olive, lượng lipase được cảm ứng sinh ra đủ để phân hủy nguồn carbon dinh dưỡng cho sự sinh trưởng của tế bào, vì vậy cho dù tăng nồng độ cơ chất thì lượng lipase cũng không tăng thêm.

3.2.1.5 Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến sinh tổng hợp lipase

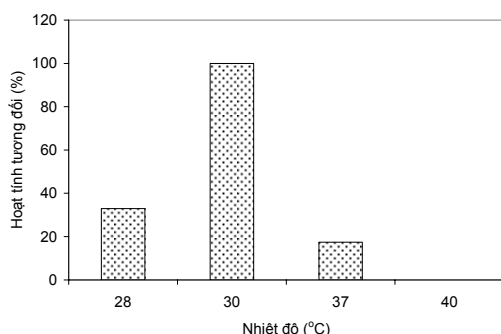


Hình 3.8. Ảnh hưởng của pH dịch nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp lipase (□) và sinh trưởng của chủng (*).

Hoạt tính tăng dần theo pH môi trường, từ 52% ở pH 4,0 (19,7 U/ml) đến cực đại 100% (37,9 U/ml) ở pH 5,0. Sinh trưởng của tế bào tăng theo giá trị pH, tại pH 5,0 khối lượng tế bào đạt cực đại 145,2 mg (Hình 3.8). Hoạt tính enzyme giảm nhanh xuống còn 63% ở pH 5,5, sau đó giảm dần xuống 35% ở pH 9,0. Sinh trưởng của tế bào cũng giảm cùng với độ tăng pH, có thể do chủng

Geotrichum sp. DTQ-26.3 là nấm mốc nên thường thích hợp với môi trường acid hơn.

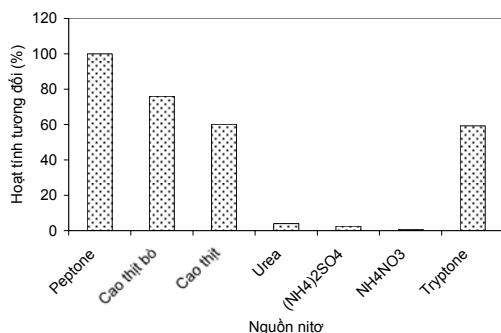
3.2.1.6 Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sinh tổng hợp lipase



Hình 3.9. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sinh tổng hợp lipase.

hơn một chút 28°C, hoạt tính chỉ đạt 33% (11,36 U/ml) so với hoạt tính cực đại.

3.2.1.7 Nguồn nitrogen



Hình 3.10. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh tổng hợp lipase.

tính đạt 60-100% (22,5-37,9 U/ml). Peptone là nguồn nitơ thích hợp nhất cho chủng nấm DTQ-26.3 sinh tổng hợp lipase (37,9 U/ml) (Hình 3.10) trong số các nguồn nitơ được khảo sát.

3.2.1.8 Thảo luận

Ginalska et al. (2004) đã nghiên cứu sinh trưởng và sinh tổng hợp lipase từ một chủng R59 giống như chủng *Geotrichum*. Sinh trưởng lipase ngoại bào được tăng lên đáng kể khi tối ưu pH ban đầu của môi trường nuôi cấy, nguồn carbon và nitrogen, các chất cảm ứng sinh trưởng lipase, nhiệt độ và thời gian. Sucrose và triolein là

Ở nhiệt độ 37°C, nấm phát triển mạnh nhưng hoạt tính lipase không cao có thể do enzyme không bền ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 48 giờ. Do đó ở nhiệt độ nuôi cấy cao hơn 40°C, không thấy hoạt tính lipase (Hình 3.9). Chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 sinh tổng hợp lipase cao nhất ở 30°C đạt 100% (34,48 U/ml). Ngay ở nhiệt độ nuôi cấy thấp

Chủng nấm DTQ-26.3 sinh tổng hợp lipase rất thấp ở trong các môi trường có nguồn nitơ là các muối vô cơ (urea, ammonium sulfate, ammonium nitrate). Hoạt tính lipase không quá 4% (1,5 U/ml) (Hình 3.10). Nhưng các nguồn nitơ hữu cơ (peptone, cao thịt bò, cao thịt, và tryptone) rất thích hợp cho chủng nấm DTQ-26.3 sinh tổng hợp lipase. Hoạt

những nguồn carbon hiệu quả nhất cho sinh tổng hợp lipase (Ginalska *et al.*, 2004). Hoạt tính lipase tối thích (146 U/ml) thu được với urea là nguồn nitơ. Sinh trưởng ở 30°C, pH ban đầu 6,0 và thời gian nuôi cấy 48 giờ được tìm thấy là các điều kiện tối ưu cho sinh trưởng tế bào và sinh tổng hợp lipase của chủng R59 giống như *Geotrichum*. Như vậy hầu hết các điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sinh trưởng lipase của chủng R59 rất tương tự như chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 như nhiệt độ (30°C), pH (6,0 và 5,0), thời gian nuôi cấy (48 giờ), nguồn carbon hiệu quả (triolein, olive, dầu olive chứa chủ yếu triolein). Riêng nguồn nitơ là khác nhau. Chủng DTQ-26.33 cần nitơ hữu cơ tốt nhất cho sinh tổng hợp lipase trong khi đó chủng R59 cần nitơ vô cơ urea.

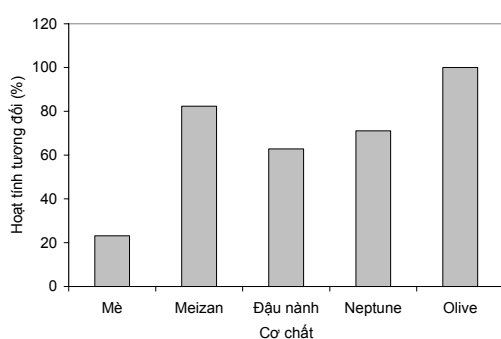
Burkert *et al.* (2004) đã sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng để nghiên cứu các ảnh hưởng của nồng độ nguồn carbon (dầu đậu nành, dầu olive và glucose) và nguồn nitrogen (dịch rượu ngô ngâm và NH_4NO_3) lên sinh tổng hợp lipase của chủng *Geotrichum* sp. Theo các đáp ứng từ các thiết kế thí nghiệm, các ảnh hưởng của mỗi ẩn số được tính toán và sự tác động qua lại giữa chúng được xây dựng. Phương pháp bề mặt đáp ứng được áp dụng để tối ưu nồng độ các chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy cho sinh tổng hợp enzyme, ở 30°C. Thành phần môi trường tối ưu cho sinh tổng hợp lipase bởi chủng *Geotrichum* sp. là ammonium nitrate 2,1-2,5%, dịch ngô ngâm 13-15% và dầu đậu nành 0,6% làm nguồn carbon, chúng dẫn tới hoạt tính lipase vào khoảng 20 U/ml (Burkert *et al.*, 2004). Sử dụng dầu olive làm nguồn carbon, thành phần tối ưu là ammonium nitrate 0,8-1%, dịch rượu ngô ngâm 13-15% và dầu olive 0,6%, dẫn tới hoạt tính của 17 U/ml.

3.2.1.9 Kết luận

- Từ các mẫu nước biển, nước ao hồ, nước thải, 193 chủng vi sinh vật được phân lập, trong đó 10 chủng vi sinh vật biển và 95 chủng vi sinh vật đất có hoạt tính lipase.
- Chủng nấm DTQ-26.3 có vòng thủy phân dầu lớn nhất được nghiên cứu hình thái, phân tích 26S rRNA và xác định một số điều kiện nuôi cấy tối ưu.

- Hình thái và mức độ tương đồng trình tự 26S rRNA cho thấy chủng DTQ-26.3 thuộc chi *Geotrichum* (99,7%). Trình tự phân đoạn 26S rRNA được đăng ký trong GenBank với mã số DQ640273.
- Nhiệt độ và pH môi trường và thời gian tối ưu cho sinh tổng hợp lipase lần lượt là 30°C, pH 5 và 48 giờ.
- Peptone là trong số nguồn nitơ tốt nhất và 0,5% dầu olive là cơ chất cảm ứng tốt nhất cho sinh tổng hợp lipase.

3.2.1.10 Cơ chất đặc hiệu

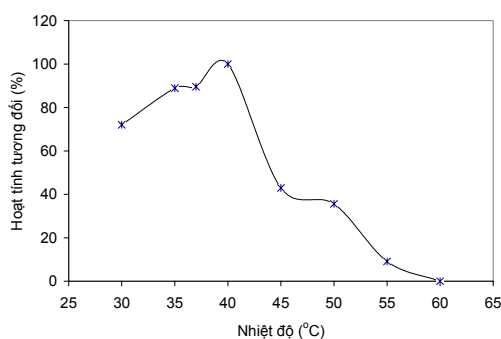


Hình 3.11. Hoạt tính đặc hiệu cơ chất của lipase chủng *Geotrichum sp. DTQ-26.3*.

Lipase là enzyme có tính đặc hiệu nhóm tương đối. Do các loại dầu khác nhau về thành phần và hàm lượng acid béo, số liên kết no và không no cho nên đối với mỗi loại dầu khác nhau thì khả năng phân giải của cùng một lipase cũng khác nhau.

Lipase chủng *Geotrichum sp. DTQ-26.3* có hoạt tính đặc hiệu cao nhất đối với dầu olive (37,9 U/ml), sau đó đến dầu Meizan (31,2 U/ml), dầu Neptune (26,9 U/ml), dầu đậu nành (23,8 U/ml), và cuối cùng là dầu mè (8,8 U/ml) (Hình 3.11).

3.2.1.11 Nhiệt độ tối ưu

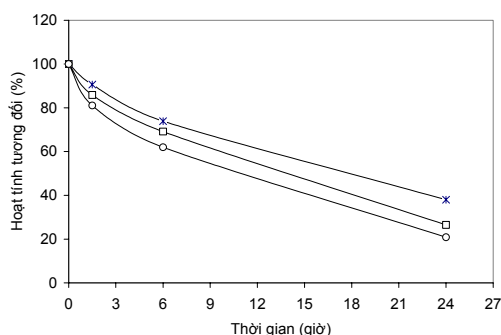


Hình 3.12. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng lên hoạt tính lipase chủng *Geotrichum sp. DTQ-26.3*.

Ở nhiệt độ 30°C, hoạt tính lipase chủng *Geotrichum sp. DTQ-26.3* đạt 27,3 U/ml (72%). Hoạt tính tăng dần lên và đạt tối đa ở nhiệt độ 40°C (37,9 U/ml) (Hình 3.12). Khi nhiệt độ phản ứng tiếp tục tăng lên 45°C, hoạt tính đột ngột giảm xuống còn 43% và ổn định tới 50°C (36%) và giảm mạnh xuống 9% ở 55°C. Hoạt tính tối thích của lipase

chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 là 40°C.

3.2.1.12 Độ bền nhiệt

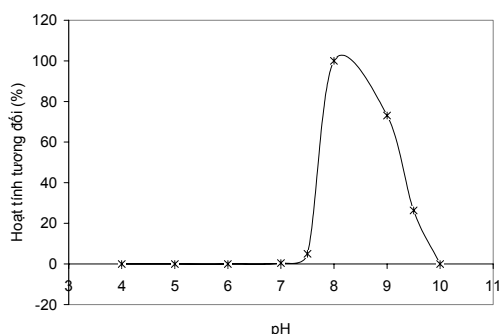


Hình 3.13. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên độ bền của lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3. *: 30°C; □: 40°C; O: 50°C.

40°C và 50°C (Hình 3.13).

Đồ thị hoạt tính của enzyme ủ ở các nhiệt độ 30, 40 và 50°C theo thời gian rất tương tự nhau (Hình 3.13), đều giảm tuyến tính theo thời gian, nhưng nhiệt độ ủ càng cao, hoạt tính càng giảm càng nhiều. Sau 1,5 giờ ủ ở 30-50°C, hoạt tính enzyme giảm nhẹ 9-19%, sau 6 giờ ủ, hoạt tính giảm 26-38% và sau 24 giờ ủ, hoạt tính còn lại chỉ bằng 20-38% so với hoạt tính ban đầu (Hình 3.13). Đây là một enzyme kém bền nhiệt, không thể bảo quản bình thường ở nhiệt độ phòng.

3.2.1.13 pH tối ưu



Hình 3.14. Ảnh hưởng của pH phản ứng lên hoạt tính lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.

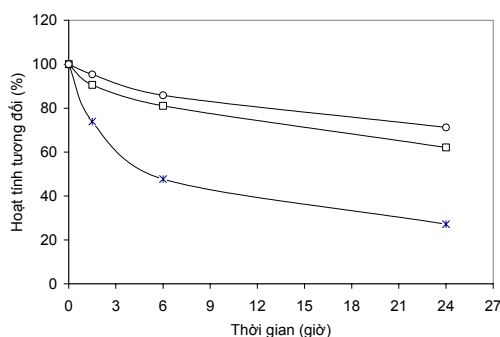
Dưới tác động của nhiệt độ, enzyme đều bị biến tính ít nhiều và ảnh hưởng tới hoạt tính. Nhiệt độ có thể làm cho một số liên kết hydro trong mạng lưới liên kết hydro tham gia vào việc giữ vững cấu trúc của enzyme bị đứt gãy. Mức độ ảnh hưởng tùy thuộc vào nhiệt độ và thời gian ủ enzyme. Lipase chủng *Geotrichum* DTQ-26.3 được ủ trong đệm pH 8,0 ở các nhiệt độ khác nhau 30°C,

pH môi trường phản ứng ảnh hưởng rất lớn đến hoạt tính enzyme vì nó ảnh hưởng đến mức độ ion hóa cơ chất, enzyme và ảnh hưởng đến độ bền của cấu trúc protein. Để xác định pH phản ứng tối ưu, thực hiện phản ứng enzyme với các pH khác nhau từ pH 4,0 đến 10,0.

Ở độ pH acid (4,0-6,5) enzyme bị biến tính hoàn toàn bởi pH acid, hầu như

không còn hoạt tính (Hình 3.14). Hoạt tính lipase tăng đột ngột sau pH 7,5 và đạt tối ưu ngay ở pH 8,0 (37,9 U/ml). Sau đó hoạt tính lipase giảm mạnh xuống còn một phần tư ở pH 9,5 và mất hết hoạt tính ở pH 10,0. Như vậy pH tối ưu cho lipase là pH 8,0-8,5. Đây là loại lipase ưa kiềm nhẹ (Hình 3.14).

3.2.1.14 Độ bền pH



Hình 3.15. Ảnh hưởng của pH lên độ bền của lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3. *: pH 4,0; □: pH 7,0; ○: pH 8,0.

Do pH môi trường ảnh hưởng đến độ bền của enzyme nên việc lựa chọn môi trường đệm pH thích hợp để bảo quản enzyme là rất quan trọng. Có những loại lipase bền trong môi trường acid (2,0-6,0); có loại bền trong môi trường trung tính và có loại lại bền trong môi trường kiềm. Ở đây chúng tôi khảo sát độ bền hoạt tính của lipase trong các đệm khác nhau với pH 4,0; 7,0 và 8,0. Sau một thời

gian nhất định ủ cùng với đệm ở 40°C, hoạt tính còn lại của dịch enzyme được xác định (Hình 3.15).

Đồ thị hoạt tính lipase còn lại theo thời gian ở hai độ pH 7,0 và 8,0 nói chung rất giống nhau (Hình 3.15). Ở pH 8,0 lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 tương đối bền, sau 24 giờ ủ hoạt tính còn lại là 71% trong khi ở pH 4 hoạt tính lipase còn 27% sau 1,5 giờ ủ và giảm mạnh còn 27% sau 24 giờ ủ (Hình 3.15). Như vậy lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 bền ở pH hơi kiềm 8,0.

3.2.1.15 Ảnh hưởng của ion kim loại

Ion kim loại thường ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme. Đối với lipase thì ion kim loại không tham gia hình thành cấu trúc, nó tác dụng chủ yếu giữ vững cấu hình không gian, tăng tốc độ phản ứng thông qua tạo phức với cơ chất hoặc tham gia cầu nối kết hợp cơ chất với enzyme. Để nghiên cứu ảnh hưởng của ion kim loại tới hoạt tính lipase, dịch enzyme được bổ sung 1 mM và 10 mM ion kim loại. Sau 1,5 giờ ủ ở nhiệt độ 30°C, hoạt tính còn lại được xác định và kết quả được trình bày trên bảng 3.2.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của ion kim loại lên hoạt tính của lipase.

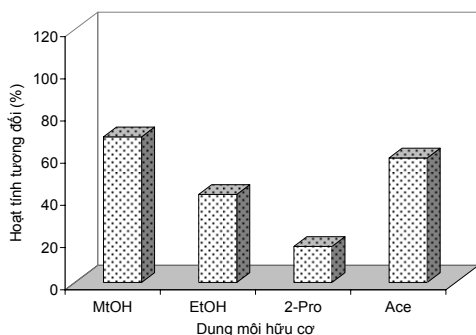
Ion kim loại	Hoạt tính lipase còn lại (%) ở nồng độ ion kim loại	
	1 mM	10 mM
Ca ²⁺	106	77
Pb ²⁺	89	3
Mg ²⁺	89	60
Na ⁺	78	60
Zn ²⁺	69	53
Cu ²⁺	49	48
EDTA	106	124

gian của enzyme hay ngăn chặn tiếp xúc giữa cơ chất với enzyme.

Các ion Mg²⁺, Na⁺, Zn²⁺ hay Cu²⁺ đều có tác dụng ức chế lipase, nồng độ càng cao hoạt tính enzyme càng giảm. Hoạt tính enzyme giảm mất một phần tư đến một nửa (Bảng 3.2).

Chất tạo gong kim EDTA có tác dụng hoạt hóa enzyme, làm tăng hoạt tính của enzyme lên 6-24% tương ứng với nồng độ 1 mM và 10 mM. Điều này cho thấy lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 không cần các ion kim loại kép trong phản ứng xúc tác của nó.

3.2.1.16 Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ



Hình 3.16. Ảnh hưởng của các dung môi hữu cơ methanol (MeOH), ethanol (EtOH), 2-propanol (2-Pro) và acetone (Ace) lên hoạt tính lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.

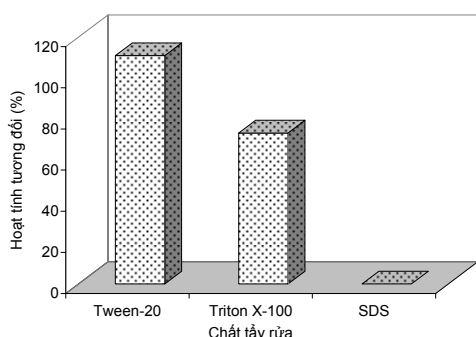
hoạt tính mất đi khoảng một phần ba (Hình 3.16), còn đối với ethanol, hoạt tính mất đi khoảng hai phần ba. Riêng bổ sung 30% (v/v) isopropanol, hoạt tính chỉ còn 17%.

Ion Ca²⁺ với nồng độ 1 mM làm tăng hoạt tính enzyme lên 6%, nhưng với nồng độ 10 mM làm giảm hoạt tính xuống còn 77%. Ion Pb²⁺ với nồng độ thấp 1 mM làm giảm 11% hoạt tính enzyme và với nồng độ 10 mM thì hầu như mất hết hoạt tính, có thể tại nồng độ quá cao làm thay đổi cấu hình không

Các dung môi hữu cơ khác nhau tác dụng một phần làm giảm hoạt tính enzyme. Để đánh giá ảnh hưởng của dung môi hữu cơ lên hoạt tính lipase, dịch enzyme được bổ sung 30% (v/v) dung môi hữu cơ. Sau 3 giờ ủ ở nhiệt độ 30°C, hoạt tính còn lại được xác định (Hình 3.16).

Bổ sung 30% (v/v) methanol hoặc acetone vào dịch enzyme (Hình 3.16),

3.2.1.17 Ảnh hưởng của chất tẩy rửa



Hình 3.17. Ảnh hưởng của chất tẩy rửa lên hoạt tính lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.

Để đánh giá ảnh hưởng của chất tẩy rửa tới hoạt tính lipase, dịch enzyme được ủ với chất tẩy rửa (SDS, Triton X-100, Tween 20). Sau 1,5 giờ ủ ở 30°C, hoạt tính còn lại được xác định (Hình 3.17).

Bổ sung 1% (w/v) SDS làm mất hoàn toàn hoạt tính enzyme (Hình 3.17). Bổ sung 1% (w/v) Triton X-100 ảnh hưởng

đáng kể đến hoạt tính lipase, làm giảm 27% còn Tween 20 lại làm tăng hoạt tính lipase lên 11% (Hình 3.17).

3.2.1.18 Thảo luận

Lipase chủng *G. marinum* có tính đặc hiệu cơ chất đối với các triglyceride chứa mỗi liên kết đôi cis trong mạch bên của acid béo, và tốc độ phản ứng tăng lên với số liên kết đôi tăng lên trong mạch bên (Huang *et al.*, 2004). Lipase ưa các liên kết ester ở các vị trí sn-1 và sn-3 hơn là liên kết ester ở vị trí sn-2. Lipase chủng *Geotrichum candidum* NRRL Y-553 có tính đặc hiệu thủy phân 4-methylumbelliferyl esters của oleic acid hơn là palmitic acid theo tỷ lệ 20:1 (Baillargeon, McCarthy, 1991). Trong nghiên cứu của chúng tôi, lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 cũng có tính đặc hiệu cao nhất đối với dầu olive hơn các loại dầu còn lại. Lipase ngoại bào A và C được sinh tổng hợp từ chủng *Geotrichum* sp. FO401B lần lượt có vị trí đặc hiệu ở sn-1,3 và sn-2 của triglyceride (Ota *et al.*, 2000). Lipase C thủy phân mỡ tự nhiên từ dầu cá sardine ở vị trí sn-2, nhưng cũng có một ít hoạt tính đồng phân lập thể đối với triolein.

Các enzyme lipase chủng *Geotrichum* nói chung có nhiệt độ phản ứng tối ưu tương đối thấp, chỉ trong khoảng trên dưới 40°C (Huang *et al.*, 2004). (Gopinath *et al.*, 2003) thông báo lipase chủng *G. candidum* có nhiệt độ tối ưu ở 40°C. Trong khi đó lipase B tái tổ hợp từ chủng *G. candidum* biểu hiện trong *P. pastoris* có nhiệt độ tối ưu vào khoảng 43°C (Catoni *et al.*, 1997). Enzyme này có độ bền nhiệt ở dải nhiệt độ thấp

hơn 35°C. Ngược lại, lipase từ chủng *Geotrichum* R59 rất bền nhiệt và cho thấy hoạt tính rất cao sau một giờ ủ ở 60°C (Ginalska *et al.*, 2004). Lipase từ *G. asteroides* cũng khá bền, nó không mất hoạt tính ở 4°C sau một năm bảo quản. Nhiệt độ tối thích của chế phẩm enzyme là 37°C (Ksandopulo, Ruban, 1979). Lipase chủng DTQ-26.3 có nhiệt độ tối thích là 40°C, nhưng kém bền nhiệt, chỉ bền ở nhiệt độ không quá 30°C.

pH tối thích của các phản ứng xúc tác bởi các dạng lipase từ các chủng *Geotrichum* khác nhau được tìm thấy trong dãy pH 6,0-7,0 và giữa 8,0 và 8,5, một ví dụ là chủng ATCC 34614 (Sugihara *et al.*, 1990). (Veeraragavan *et al.*, 1990) đã tinh sạch được hai lipase từ chủng *Geotrichum candidum* Lipase I và II có các giá trị pH tối ưu lần lượt là 6,0 và 6,8 thuộc dải trung tính - acid nhẹ. Các dạng lipase chủng *G. candidum* có độ bền pH trong dãy 6,0 và 8,0 (Veeraragavan *et al.*, 1990). Ở dải pH acidic (pH < 5,0) và kiềm (pH > 9,0), các dạng lipase bị biến tính hoàn toàn. (Hedrich *et al.*, 1991) đã sinh tổng hợp một lượng lớn lipase chủng *G. candidum*, xác định tính chất và tinh thể hóa. Lipase này có giá trị pH tối thích là 8,0 và 8,5 đối với enzyme đã khử gốc glycosyl. (Gopinath *et al.*, 2003) cũng tinh sạch được lipase chủng *G. candidum* và xác định được pH tối thích 7,0 và bền ở dãy pH 6,5-8,5 ở 30°C trong 24 giờ. Lipase B tái tổ hợp chủng *G. candidum* trong *P. pastoris* có pH tối thích 8,5-9,0 và độ bền pH ở dải pH 7,5-8,5 (Catoni *et al.*, 1997). Lipase từ *G. asteroides* hoạt động tối thích ở pH 8,0; nó giữ nguyên hoạt tính khi bảo quản 3 giờ ở trong một môi trường phản ứng với pH từ 3 đến 10 (Ksandopulo, Ruban, 1979). Lipase chủng DTQ26.3 cũng có pH tối ưu (pH 8,0) tương tự như lipase từ các chủng *G. candidum* khác và cũng có độ bền pH thuộc dải 7,0-8,0.

Các ion đơn trị có ảnh hưởng thấp đến hoạt tính của các lipase từ chủng *G. candidum* (Veeraragavan *et al.*, 1990), trong khi đó EDTA chỉ với nồng độ trên 10 mM đã ức chế đáng kể cả hai dạng enzyme. Mặt khác, các ion lưỡng trị ở nồng độ trên 50 mM mới thể hiện khả năng ức chế hoạt tính lipase. Sodium dodecyl sulfate ở nồng độ thấp hơn 10 mM ức chế hoàn toàn hoạt tính lipase (Veeraragavan *et al.*, 1990).

Các cation Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , và Mg^{2+} ở 6 mM kích thích hoạt tính lipase, nhưng Na^+ , K^+ ở 500 mM và Fe^{2+} , Mn^{2+} ở 6 mM lại làm giảm hoạt tính lipase từ chủng *G. marinum* (Huang *et al.*, 2004). Chất hoạt động bề mặt anionic, taurocholic acid, và

chất hoạt động bề mặt zwitterionic, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, làm tăng hoạt tính với 0,1 mM. Các chất hoạt động bề mặt anionic khác như SDS, sodium dioctyl sulfosuccinate, các chất hoạt động bề mặt cationic methylbenzethonium bromide, cetyltriethylammonium bromide, và chất hoạt động bề mặt nonionic Tween-20, Triton X-100 ức chế hoạt tính lipase ở các mức độ khác nhau (Huang *et al.*, 2004). (Gopinath *et al.*, 2003) thấy rằng hoạt tính enzyme từ chủng *G. candidum* bị ức chế mạnh bởi AgNO₃, NiCl₂, HgCl₂, và EDTA. Tuy nhiên, sự có mặt của các ion Ca²⁺ và Ba²⁺ lại làm tăng hoạt tính enzyme.

3.2.1.19 Kết luận

- Lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 với cơ chất là dầu olive hoạt động tốt ở nhiệt độ 40°C và pH 8, bền ở 30°C và pH 7-8.
- Các dung môi hữu cơ khảo sát đều làm giảm hoạt tính lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.
- Các ion kim loại nói chung đều làm giảm hoạt tính lipase, trừ Ca²⁺.
- Bổ sung 1 mM và 10 mM chất tạo gong kìm EDTA lần lượt làm tăng hoạt tính của enzyme lên 6 và 24%.
- SDS làm mất hoàn toàn hoạt tính enzyme, Tween 20 lại làm tăng hoạt tính lipase.

3.2.2 Tối ưu các điều kiện nuôi cấy và xác định tính chất hóa lý của lipase *Ralstonia* sp. M1

3.2.2.1 Ảnh hưởng của nguồn carbon lên sinh tổng hợp lipase

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nguồn carbon lên sinh tổng hợp lipase.

Oil	24h		48h	
	OD _{600nm}	Hoạt tính (U/ml)	OD _{600nm}	Hoạt tính (U/ml)
Mỡ bò	6,48	0,67	5,18	1,62
Dầu dừa	5,86	0,11	5,50	0,37
Dầu hạt bông	5,93	0,64	6,44	0,60
Dầu ngô	7,26	0,48	6,65	0,46
Linseed oil	11,88	0,15	6,40	0,49
Dầu olive	7,52	0,58	7,14	0,31
Dầu cọ	6,30	0,78	5,09	0,52
Dầu lạc	5,87	0,38	6,95	0,48
Dầu đậu nành	7,24	0,81	7,21	0,63
Dầu lúa mạch	8,64	0,34	7,35	0,07

Để tối ưu nguồn carbon, chủng *Ralstonia* M1 được nuôi trong 50 ml môi trường với các nguồn carbon khác nhau (Bảng 3.3). Sinh trưởng và sinh tổng hợp lipase ngoại bào được đánh giá sau 24 và 48 giờ nuôi cấy. Sau 24 giờ nuôi cấy, *Ralstonia* sp. M1 sinh trưởng rất tốt với các

nguồn carbon khảo sát (OD_{600 nm}: 5,86-8,64), đặc biệt với nguồn carbon là dầu hạt lanh (OD_{600 nm}: 11,9). Trong khi đó M1 sinh tổng hợp lipase ngoại bào tốt nhất trong môi trường có nguồn carbon là 0,5% (w/v) dầu đậu nành (0,81 U/ml) và dầu cọ (0,78 U/ml) (Bảng 3.3). Tại thời điểm 48 giờ nuôi cấy, M1 phát triển tốt nhất trong các môi trường có nguồn carbon là 0,5% (w/v) dầu mầm lúa mì, dầu đậu nành và dầu olive với OD_{600 nm} 7,1-7,4. Nhưng lipase lại được tổng hợp nhiều nhất trong môi trường có nguồn carbon là mỡ bò (1,6 U/ml). Với các nguồn carbon khác, lipase được tổng hợp ngoại bào đều thấp hơn 0,65 U/ml.

Giống với *Ralstonia* sp. M1, *Bacillus stearothermophilus* L1 cũng sinh tổng hợp lipase tối ưu trong môi trường có nguồn carbon là mỡ bò và dầu cọ (Kim *et al.*, 1998). Một số chủng vi sinh vật khác cũng sinh tổng hợp tối ưu trong môi trường có nguồn carbon là dầu như dầu olive đối với chủng *Bacillus* A30-1 (Wang *et al.*, 1995), *B. thermoleovorans* ID-1 (Lee *et al.*, 1999), và *P. pseudoalcaligenes* F-111 (Lin *et al.*, 1996); tripalmitin đối với *Bacillus* sp. Wai 28A 45 lipase (Janssen *et al.*, 1994); citric acid và dầu đậu nành đối với *P. alcaligenes* M-1 lipase (Gerritse *et al.*, 1998), dầu dừa đối với *P. fluorescens* NS2W (Kulkarni, Gadre, 2002), dầu thầu dầu đối với *P. aeruginosa* KKA-5 lipase (Sharon *et al.*, 1998).

3.2.2.2 Ảnh hưởng của nguồn nitơ lên sinh tổng hợp lipase

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen lên sinh tổng hợp lipase.

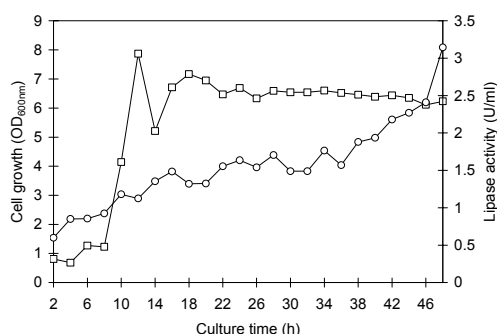
Nitrogen source	24 h		48 h		Sau khi tối ưu nguồn carbon tốt nhất cho việc sinh tổng hợp lipase của chủng <i>Ralstonia</i> sp. M1, chúng được nuôi trong 50 ml môi trường với các nguồn nitơ khác nhau (Bảng 3.4). Sau 24 giờ nuôi cấy, chủng M1 đều sinh trưởng
	OD ₆₀₀	Hoạt tính (U/ml)	OD ₆₀₀	Hoạt tính (U/ml)	
Ammonium sulfate	8,65	1,76	7,72	1,45	
Bactopeptone	6,40	0,53	5,76	0,91	
Bactotryptone	8,00	1,52	7,04	0,65	
Cao thịt bò	7,06	0,46	6,40	1,14	
Casein hydrolysate	9,93	0,26	7,68	0,70	
Casein peptone	8,64	0,42	5,76	1,17	
Diammonium phosphate	7,33	2,30	6,46	2,35	
Sodium nitrate	7,74	0,44	6,78	0,25	
Urea	6,07	0,19	8,62	0,42	
Cao nấm men	6,32	0,41	6,45	0,61	

tốt trong tất cả các môi trường nuôi cấy với OD_{600 nm} đạt 6,07-9,93. Nguồn nitơ thích hợp nhất cho việc sinh tổng hợp lipase là 0,5% (w/v) diammonium phosphate (2,3 U/ml) và ammonium sulfate (1,76 U/ml). Sau 48 giờ nuôi cấy, mật độ tế bào đạt 5,76-8,62 và lipase vẫn được tổng hợp tốt nhất trong hai nguồn nitơ là ammonium sulfate (2,35 U/ml) và ammonium sulfate (1,45 U/ml).

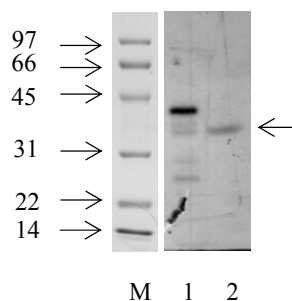
Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy nguồn nitơ đơn thuần chỉ là các muối ammonium hoặc kết hợp cùng với các nguồn nitơ hữu cơ là rất thích hợp cho việc sinh tổng hợp lipase như *P. fluorescens* NS2W (Kulkarni, Gadre, 2002), *P. fluorescens* 2D (Makhzoum *et al.*, 1995), *A. calcoaceticus* (Cordenons *et al.*, 1996), và *Bacillus* sp. A 30-1 (Wang *et al.*, 1995). Nhìn chung, các vi sinh vật sinh tổng hợp lipase cao trong môi trường có nguồn nitơ hữu cơ là peptone, đậu tương, dịch chiết ngũ cốc như *Pseudomonas* sp. KW1-56 (Iizumi *et al.*, 1990), *P. alcaligenes* F-111 (Lin *et al.*, 1996), *P. aeruginosa* KKA-5 (Sharon *et al.*, 1998)).

3.2.2.3 Lên men lượng lớn *Ralstonia* sp. M1

Sau khi tối ưu nguồn nitơ và nguồn carbon, *Ralstonia* sp. M1 được lên men 3 lít trong một bình lên men 5 lít. Sau 12 giờ lên men, tốc độ sinh trưởng của tế bào đạt tối ưu với OD_{600 nm} = 7,9 và sau đó giảm nhẹ về 5,2-6,2 sau 48 giờ lên men (Hình 3.18). Lipase được tổng hợp tăng dần từ 0,6 U/ml (sau 2 giờ lên men) đến 1,6 U/ml sau 36 giờ. Từ 36 đến 48 giờ, lipase được tổng hợp rất mạnh từ 1,6 U/ml đến 3,2 U/ml (Hình 3.18).



Hình 3.18. Mật độ tế bào (□) và hoạt tính lipase (○) của chủng M1.

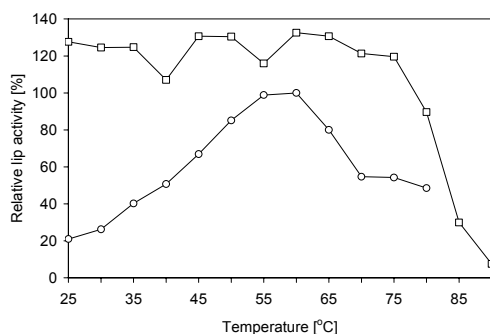


Hình 3.19. Điện di đồ SDS-PAGE của dịch phá tế bào và dịch nổi của chủng M1. Protein được nhuộm theo phương pháp nhuộm hoạt tính lipase/esterase (lane 1, 2). Làn M, thang protein chuẩn kDa; làn 1, dịch phá tế bào *Ralstonia sp.* M1; làn 2, dịch nổi *Ralstonia sp.* M1.

Dịch phá tế bào và dịch nổi được điện di SDS-PAGE và nhuộm hoạt tính esterase/lipase. Sau khi nhuộm hoạt tính, trên bản gel cho thấy dịch phá tế bào có 5 băng protein khác nhau (Hình 3.19, làn 1), trong khi dịch nổi chỉ có một băng protein duy nhất với kích thước khoảng 32 kDa (Hình 3.19, làn 2). Kết quả này cho thấy chủng *Ralstonia sp.* M1 có thể sinh tổng hợp 5 loại lipase/esterase và trong số đó có một lipase ngoại bào vì nó có khả năng thủy phân tricaprilin.

3.2.2.4 Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính lipase và độ bền

Enzyme lipase có hoạt tính và độ bền ở nhiệt độ cao là một đặc tính quý để có thể đưa enzyme ứng dụng vào sản xuất bột giặt và chuyển hóa sinh học. Khi phản ứng thực hiện ở nhiệt độ thấp, hoạt tính lipase chỉ đạt 21% so với hoạt tính tối ưu 100% ở 60°C (Hình 3.20). Sau đó hoạt tính tăng dần tỷ lệ thuận với sự tăng nhiệt độ phản ứng từ 21% ở 25°C đến 99% ở 55°C. Hoạt tính duy trì không đổi ở nhiệt độ 55-60°C rồi giảm xuống còn 55% ở 70°C. Ở 70-80°C, hoạt tính giảm nhẹ còn 50% so với ở nhiệt độ tối ưu 60°C. Như vậy, lipase của chủng M1 là một lipase ưa nhiệt, hoạt động tốt nhất ở 55-60°C.



Hình 3.20. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính lipase (O) và độ bền (□). Để tối ưu nhiệt độ phản ứng, hoạt tính của 5 μ l dịch lipase tinh sạch được đo ở các nhiệt độ khác nhau (25-90 °C) bằng phương pháp đo pH-stat với cơ chất là 1% dầu olive và ở pH 8,0. Để khảo sát độ bền nhiệt độ, 5 μ l của dịch lipase tinh sạch được ủ 30 phút ở các nhiệt độ khác nhau 25-90 °C trong đệm 0.1 M Tris-HCl, pH 8,0, và hoạt tính còn lại được xác định bằng phương pháp pH-stat với 1% cơ chất dầu olive ở pH 9,0 và 55 °C.

khuẩn cũng đã được tinh sạch như lipase của các chủng *Pseudomonas* (Kojima *et al.*, 1994; Sharon *et al.*, 1998), các chủng *Bacillus* (Wang *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998; Quyen *et al.*, 2003b) và *Acinetobacter* (Snellman *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2003).

Lipase từ *P. fluorescens* NS2W hoạt động tối ưu ở 55°C và bền tới nhiệt độ 60°C với hơn 70% hoạt tính còn giữ lại được sau ít nhất 2 giờ ủ ở 60°C (Kulkarni, Gadre, 2002). Enzyme bền nhiệt từ chủng *Bacillus* (Wang *et al.*, 1995) cũng hoạt động tối ưu ở 60°C và hoạt tính vẫn giữ được 100% khi nhiệt độ duy trì ở 75°C trong 30 phút. Thời gian bán sống của enzyme này là 8 giờ ở 75°C. Enzyme này giữ được ít nhất là 90% hoạt tính sau khi ủ ở 60°C trong 15 giờ (Wang *et al.*, 1995). Lipase từ *P. aeruginosa* KKA-5 bền tới 45°C (Sharon *et al.*, 1998). Lipase từ *P. pseudoalcaligenes* F-111 có nhiệt độ hoạt động tối ưu ở 40°C (Lin *et al.*, 1996).

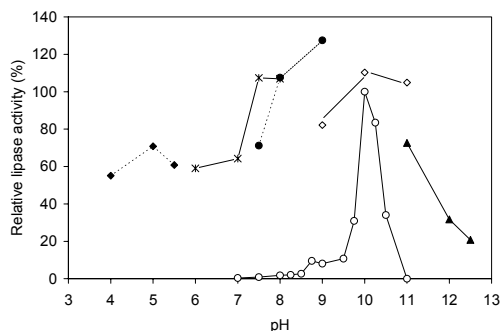
3.2.2.5 Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính lipase và độ bền

Ở vùng pH từ 7,0-8,5, hoạt tính lipase rất thấp, nhỏ hơn 3% so với hoạt tính tối ưu 100% ở pH 10. pH từ 8,75-9,5 hoạt tính tăng đến 11% (Hình 3.21). Khi tăng tiếp pH phản ứng lên 9,75 thì hoạt tính tăng mạnh tới 31%. Hoạt tính tăng mạnh trong vùng pH từ 9,5-10 và tối ưu ở pH 10 (100%). Sau đó hoạt tính lại giảm rất nhanh xuống còn

Hoạt tính lipase của dịch nổi bảo quản ở 4°C được dùng làm mẫu chuẩn và hoạt tính là 100%. Hoạt tính lipase tăng khi ủ ở nhiệt độ từ 25°C đến 75°C (7-33%), tăng tối đa lên tới 1/3. Sau đó hoạt tính lipase giảm còn 90% khi xử lý ở 80°C. Từ 80-90°C, hoạt tính lipase giảm mạnh, từ 90% ở 80°C còn 8% ở 90°C (Hình 3.20).

Giống với lipase của chủng tự nhiên, lipase LipA tái tổ hợp từ *Ralstonia* sp. M1 cũng hoạt động tối ưu ở 50-55°C và chỉ bền với nhiệt độ $\leq 45^\circ\text{C}$ (Quyen *et al.*, 2005a). Một số lipase bền nhiệt từ vi

34% ở pH 10,5 và enzyme hoàn toàn không hoạt động ở pH 11. Hoạt động tối ưu ở pH 10, lipase từ *Ralstonia* sp. M1 là một enzyme kiềm.



Hình 3.21. Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính lipase (○) và độ bền (◆: acetate, *: phosphate, ●: Tris-HCl, ◇: glycine/HCl, ▲: phosphate/KOH). Để xác định pH tối ưu, hoạt tính của 5 μ l dịch lipase tinh sạch được đo bằng phương pháp đo pH-stat với cơ chất là 1% dầu olive ở 55°C và dải pH từ 7,0-11,0. Để khảo sát độ bền pH, 5 μ l của dịch lipase tinh sạch được ủ 30 phút ở 30°C trong các đệm 0,1M với pH khác nhau (4,0-12,5), và hoạt tính còn lại được xác định bằng phương pháp pH-stat với 1% cơ chất dầu olive ở pH 9,0 và 55°C.

Hoạt tính lipase của dịch nổi được dùng làm mẫu chuẩn với hoạt tính là 100%. Ở vùng pH 4,0-7,0, hoạt tính lipase duy trì ở mức 55-71%. pH 7,5-11, hoạt tính còn lại bằng 104-110% ngoại trừ ở pH 7,5 trong đệm Tris-HCl hoạt tính chỉ còn 71% và ở pH 11,0 của đệm phosphate-KOH hoạt tính cũng còn 73% (Hình 3.21). Với pH cao hơn (12 và 12,5), hoạt tính còn lại chỉ là 32 và 21%. Kết quả này cho thấy lipase bền ở pH kiềm từ 7,5 đến 11.

Tương tự với lipase từ chủng tự nhiên, pH tối ưu của lipase tái tổ hợp LipA là 10,75 và bền ở vùng pH kiềm từ

8,0 đến 10,5 (Quyen *et al.*, 2005a). pH hoạt động tối ưu và độ bền pH của lipase này cũng tương tự với những lipase kiềm khác từ các chủng *Acinetobacter* (Snellman *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2003). Lipase từ *Acinetobacter* sp. RAG-1 bền ở pH 5,8-9,0 và hoạt động tốt nhất ở pH 9,0 (Snellman *et al.*, 2002). Lipase của *Actinotobacter* sp. SY-01 có pH tối ưu là 10 và bền với pH từ 9,0-11,0 (Han *et al.*, 2003). Lipase từ *Pseudomonas fluorescens* NS2W có pH tối ưu là 9,0 và bền trong một dải pH rộng từ 3-11 với hơn 70% hoạt tính còn được duy trì (Kulkarni, Gadre, 2002). Lipase tinh sạch một phần từ *Bacillus* A 30-1 có pH tối ưu là 9,5 (Wang *et al.*, 1995). Lipase từ *P. aeruginosa* KKA-5 bền trong các pH từ 7-10 và pH tối ưu ở 8.5 (Sharon *et al.*, 1998). Lipase kiềm của *P. pseudoalcaligenes* thích hợp với vùng pH 6-10 và cũng bền trong vùng pH này (Lin *et al.*, 1996).

3.2.2.6 Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ lên hoạt tính lipase

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ lên hoạt tính lipase.

Dung môi	Hoạt tính còn lại (%) ở nồng độ (%)	
	10	30
Methanol	88	102
Ethanol	104	112
Isopropanol	116	121
1-Butanol	100	118
tert-Butanol	122	110
Dichloromethane	83	76
Ethyl acetate	121	130
Acetonitrile	97	105
Acetone	109	98
Amino ethanol	202	270
Hexane	63	54
DMSO	77	83
DMFA	125	103

Một đặc điểm quan trọng khác của các chất xúc tác có bản chất protein để sử dụng trong các phản ứng tổng hợp chất hữu cơ là phải có đặc tính bền và hoạt động tốt trong dung môi hữu cơ. Hexane, dichloromethane, và DMSO là những chất ức chế đối với lipase của chủng M1. Với nồng độ 10 và 30% (v/v), những dung môi hữu cơ này làm giảm hoạt tính lipase còn 54-83%. Amino ethanol kích thích mạnh hoạt tính lipase. Bổ sung 10 và 30% (v/v) amino ethanol

làm tăng hoạt tính từ 102-170% (Bảng 3.5). Nếu bổ sung 10 và 30% (v/v) các dung môi hữu cơ khác như ethanol, isopropanol, 1-butanol, tert-butanol, ethyl acetate và DMFA, hoạt tính lipase tăng 3-30% (Bảng 3.5). Methanol, acetonitrile và acetone ảnh hưởng không đáng kể lên hoạt tính lipase, chúng chỉ làm tăng hoạt tính thêm 9% hoặc giảm bớt 12%.

Nhìn chung, hầu hết các dung môi hữu cơ đều kích thích hoạt tính enzyme từ chủng tự nhiên cũng như lipase tái tổ hợp LipA từ *Ralstonia* sp. M1 (Quyen *et al.*, 2005a), trong khi đó chúng lại là chất ức chế mạnh với lipase từ *Acinetobacter* sp. SY-01 (Han *et al.*, 2003) nhưng lại không ảnh hưởng đáng kể đến lipase từ *Acinetobacter* sp. RAG-1 (Snellman *et al.*, 2002). Hoạt tính còn lại của lipase tự nhiên và lipase tái tổ hợp LipA tăng lên 2,7 lần và 3,3 lần với sự có mặt của 10-30% (v/v) nhiều dung môi hữu cơ, tương ứng. Trái ngược với lipase tự nhiên và lipase tái tổ hợp LipA từ *Ralstonia* sp. M1, lipase từ *Acinetobacter* SY-01 chỉ còn lại trong khoảng 9-58% khi xử lý với các dung môi hữu cơ (trừ methanol hoạt tính còn giữ được 100%) và lipase từ *Acinetobacter* RAG-1 hoạt tính cũng chỉ ở giữ lại trong khoảng 72-100%, trừ pyridine hoạt tính còn lại là 0-25%. Lipase từ chủng tự nhiên từ *Ralstonia* sp. M1 có hoạt tính cao và bền trong môi trường có dung môi hữu cơ nên có khả năng ứng dụng lipase này vào các phản ứng tổng hợp hữu cơ. Lipase từ *P. aeruginosa* KKA-5 bền

trong các dung dịch có dung môi như methanol and ethanol, nhưng không bền với sự có mặt của acetone (Sharon *et al.*, 1998).

3.2.2.7 Ảnh hưởng của các ion và chất ức chế lên hoạt tính lipase

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của các ion kim loại và chất ức chế lên hoạt tính lipase.

Ion kim loại	Hoạt tính còn lại (%) ở nồng độ (mM)		
	0, 1	1	10
CaCl ₂	76	44	19
CuCl ₂	92	86	62
FeCl ₃	63	16	21
MgCl ₂	88	71	51
MnCl ₂	74	44	26
SnCl ₂	81	106	84
ZnCl ₂	73	37	26
DEPC	81	97	131
EDTA	90	89	116
PMSF	84	118	94
2-Mercapto ethanol	98	111	112

Trong nghiên cứu này, tất cả các ion kim loại nặng đều làm ức chế hoạt tính lipase và ở nồng độ càng cao thì ức chế càng mạnh. Nhóm các ion kim loại Cu²⁺, Mg²⁺, và Sn²⁺ ức chế không đáng kể đến hoạt tính lipase. Khi bổ sung 0,1-1 mM những ion kim loại này làm giảm nhẹ hoạt tính lipase 8-29%, ngoại trừ ở nồng độ 1 mM Sn²⁺ làm tăng hoạt tính thêm 6% (Bảng 3.6). Với nồng độ bổ sung là 10 mM, hoạt tính còn lại là 51-84% so

với mẫu đối chứng không ủ với ion kim loại. Nhóm ion thứ hai gồm các ion Ca²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, và Zn²⁺ ảnh hưởng mạnh đến hoạt tính lipase. Việc bổ sung 0,1 và 1 mM những ion này làm giảm hoạt tính lipase tương ứng là 24-37% và 56-84% (Bảng 3.6). Hoạt tính chỉ còn giữ lại 19-26% so với mẫu đối chứng khi lipase được ủ với các ion này ở nồng độ 10 mM.

Trái ngược với lipase tự nhiên, các ion kim loại trên có những ảnh hưởng khác nhau đến hoạt tính lipase tái tổ hợp LipA. Một số ion kim loại làm tăng nhẹ hoạt tính lên 19%. Một số ion khác làm giảm hoạt tính 17%, trừ Zn²⁺ hoạt tính giảm ≤70%. Nhìn chung, các ion kim loại làm giảm hoạt tính lipase từ chủng tự nhiên so với lipase tái tổ hợp LipA. Khác với lipase từ *Ralstonia* sp. M1, lipase từ *Acinetobacter* RAG-1 tăng hoạt tính 10% và 27-33% tương ứng khi ủ với 1 mM Zn²⁺ và 1-10 mM Fe³⁺, nhưng giảm hoạt tính 63% và 84% khi ủ với 1 mM và 10 mM of Cu²⁺ (Snellman *et al.*, 2002).

Lipase của *P. pseudoalcaligenes* F-111 chỉ giữ được 60% hoạt tính khi ủ với Fe³⁺ nhưng không bị ảnh hưởng với Ca²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Co²⁺, Cd²⁺ và Pb²⁺ (Lin *et al.*, 1996). Lipase từ *P. aeruginosa* KKA-5 vẫn duy trì được hoạt tính trong sự

có mặt của Ca^{2+} và Mg^{2+} nhưng bị ức chế nhẹ với Mn^{2+} , Cd^{2+} và Cu^{2+} . Các muối của kim loại nặng như Fe^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , hoạt tính lipase bị ức chế mạnh, có thể những ion này làm ảnh hưởng đến cấu trúc enzyme (Sharon *et al.*, 1998). Lipase *P. aeruginosa* KKA-5 tương đối bền với Ca^{2+} và bị bất hoạt với sự có mặt của EDTA. Sự bất hoạt này có thể khắc phục bằng cách bổ sung CaCl_2 , điều này gợi mở sự có mặt của vị trí liên kết Ca^{2+} trong lipase của *P. aeruginosa*. Một lipase ngoại bào khác của *P. aeruginosa* MB5001 bị ức chế mạnh bởi Zn^{2+} ở nồng độ 1 mM (ức chế 94%) nhưng lại được kích thích bằng cách bổ sung 10 mM Ca^{2+} (hoạt tính tăng 1,24 lần) và 200 mM acid taurocholic (kích thích 1,6 lần) (Chartrain *et al.*, 1993).

Các chất ức chế gồm DEPC và EDTA ức chế nhẹ lên hoạt tính lipase khi ở nồng độ thấp 0,1-1 mM với lipase trong 30 phút trong đệm 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, hoạt tính giữ lại được 81-97% so với mẫu đối chứng. Nhưng ở nồng độ 10 mM, DEPC và EDTA lại làm tăng hoạt tính lipase lên tương ứng là 16 và 31%. Với 0,1 mM 2-mercaptoethanol, hoạt tính lipase tăng thêm 2% và với nồng độ 1 và 10 mM hoạt tính tăng tới 11 và 12%. PMSF ở nồng độ 0,1 và 10 mM làm ức chế hoạt tính lipase, hoạt tính còn giữ lại 84 và 94%, nhưng riêng ở nồng độ 1 mM lại làm tăng hoạt tính lên 18% (Bảng 3.6).

Trái ngược với lipase tự nhiên, các chất ức chế ở hầu hết các nồng độ đều ức chế lipase tái tổ hợp LipA từ *Ralstonia* sp. M1 (Quyen *et al.*, 2005a), hơn nữa chúng ức chế mạnh hoạt tính enzyme từ *Acinetobacter* RAG-1 với 90% hoạt tính bị mất đi (Snellman *et al.*, 2002). 2-mercaptoethanol ảnh hưởng tương tự (giảm nhẹ) lên cả lipases từ *Ralstonia* sp. M1 và *Acinetobacter* RAG-1, nhưng làm tăng hoạt tính của lipase tự nhiên từ *Ralstonia* sp. M1 lên 12%. DEPC ở nồng độ thấp (0,1 mM) làm tăng nhẹ hoạt tính của enzyme tái tổ hợp (tăng 5%), nhưng làm giảm nhẹ hoạt tính của enzyme tự nhiên (giảm 19%). Ở nồng độ cao hơn (10 mM), DEPC lại cho thấy sự ảnh hưởng ngược lại, làm giảm hoạt tính của lipase tái tổ hợp (giảm 15%) và tăng hoạt tính của enzyme tự nhiên (tăng 31%). Các muối kim loại (EDTA, o-phenanthrolin) không ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính lipase *P. pseudoalcaligenes* F-111 (Lin *et al.*, 1996).

3.2.2.8 Ảnh hưởng của các chất tẩy rửa lên độ bền lipase

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của chất tẩy rửa lên hoạt tính lipase.

Chất tẩy rửa	Hoạt tính còn lại (%) ở nồng độ (%)		
	0,2	1	5
Tween 80	159	170	169
Tween 60	108	133	157
Tween 40	93	106	106
Triton X-100	67	115	56
Triton X-45	77	56	73
SDS	76	41	7

Các chất tẩy như Tween 80, Tween 60 và Tween 40 ở nồng độ từ 0,2 đến 5% (w/v) đều ảnh hưởng tích cực lên hoạt tính của lipase tự nhiên và lipase tái tổ hợp từ *Ralstonia* sp. M1 (Quyen *et al.*, 2005a). Khi bổ sung 0,2-5 mM Tween 80 và Tween 60 đã kích thích hoạt tính lipase. Hoạt tính lipase tăng 8% đến 70%

(Bảng 3.7). Tween40 ảnh hưởng không đáng kể đến hoạt tính lipase. Nếu cộng thêm 0,2% Tween40, hoạt tính lipase giảm 7% trong khi nếu bổ sung ở nồng độ 1-5% thì hoạt tính lại tăng thêm 6%. Với Triton X-100, khi bổ sung ở nồng độ 1% thì hoạt tính tăng 15% nhưng khi ở nồng độ 0,2% và 5% cũng như Triton X-45 ở nồng độ 0,2% đến 5% hoạt tính lipase lại giảm 23-44%. SDS làm ức chế mạnh hoạt tính của lipase. Khi tăng nồng độ SDS từ 0,2% đến 1%, hoạt tính lipase giảm từ 24% đến 59%. Còn khi tăng nồng độ SDS lên 5% thì hoạt tính lipase giảm rất nhanh, hoạt tính chỉ còn lại 7%. Đối với lipase tái tổ hợp LipA, việc cộng thêm Triton X-100, Triton X-45 và SDS ở nồng độ thấp (0,2-1%) (w/v) cũng làm tăng hoạt tính lipase lên 50% (Quyen *et al.*, 2005a). Nhưng ở khi ở nồng độ cao (5%, w/v) các chất tẩy rửa này lại ức chế mạnh hoạt tính lipase, hoạt tính còn lại chỉ trong khoảng 10-70%.

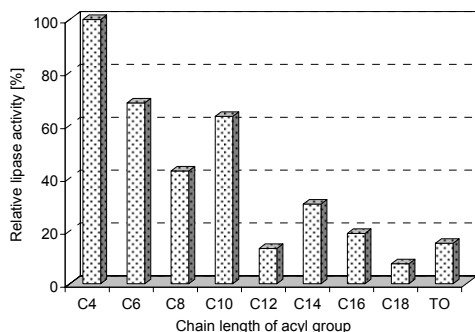
Lipase từ *P. aeruginosa* KKA-5 bị ức chế bởi SDS, một anion có hoạt tính bề mặt, còn các cation có hoạt tính bề mặt như Triton X-100 và Tween 80 làm tăng đáng kể hoạt tính của enzyme (Sharon *et al.*, 1998). Lipase được sinh tổng hợp từ *P. alcaligenes* F-111 không bị tác động nhiều của một số chất tẩy rửa (Lin *et al.*, 1996). Các cation hoạt động bề mặt như SDS, natri tripolyphosphate, natri dodecyl benzene sulfonate và natri alkyl benzene sulfonate không ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme, và đây được coi là một enzyme rất tốt để ứng dụng vào công nghiệp chất tẩy rửa.

3.2.2.9 Đặc hiệu cơ chất

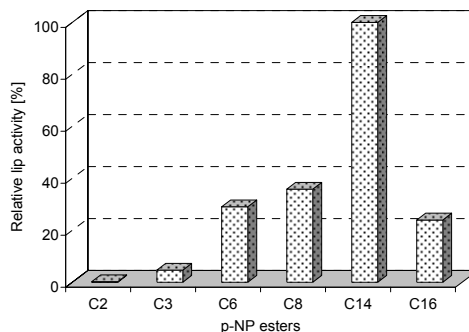
Trong số các ester acid béo của glycerol, lipase có hoạt tính cao nhất (100%) với tributyrin (nhóm acyl ở C4) ở pH 9.0 và 55°C. Hình 3.22A cho thấy hoạt tính thủy

phân các triglyceride có chiều dài chuỗi carbon khác nhau. Giống như lipase tái tổ hợp LipA (Quyen *et al.*, 2005a), hoạt tính lipase từ chủng tự nhiên giảm khi chiều dài chuỗi carbon tăng lên, ngoại trừ hai cơ chất là tricaprylin và trilaurin (Hình 3.22A). Hoạt tính với tricaproin (nhóm acyl ở C6) và tricaprin (nhóm acyl ở C10) tương ứng bằng 68% và 63% so với tributyrin. Hoạt tính thủy phân với tricaprylin (nhóm acyl ở C8) và trimyristin (nhóm acyl ở C14) bằng khoảng 43% và 30% so với tributyrin. Với trilaurin (nhóm acyl ở C12), tripalmitin (nhóm acyl ở C16) và triolein (18:1), hoạt tính bằng khoảng 13-19% so với tributyrin. Lipase này thủy phân tristearin (nhóm acyl ở C18) thấp nhất, hoạt tính chỉ bằng 8% so với tributyrin.

Lipase chủng tự nhiên M1 cũng cho thấy sự khác biệt về đặc hiệu cơ chất với các p-nitrophenyl ester có các chuỗi carbon có chiều dài khác nhau. Hoạt tính được xác định bằng phương pháp đo quang phổ với bước sóng 405 nm đối với C2-C8 và 420 nm đối với C14-C16, ở pH 8,0 và 55°C. Các p-nitrophenyl ester đã cho thấy sự khác biệt về đặc hiệu cơ chất so với các triglyceride. Trong các p-nitrophenyl ester, lipase có hoạt tính cao nhất (100%) với p-nitrophenyl myristate (nhóm acyl ở C14). Phổ đặc trưng của hoạt tính đặc hiệu của lipase đối với các p-nitrophenyl ester được trình bày trong hình 22B. Hoạt tính lipase tốt nhất với các cơ chất p-NP caprylate (nhóm acyl ở C8), caproate (nhóm acyl ở C6), và palmitate (nhóm acyl ở C16), tương ứng là 36%, 29% và 24% so với p-NP myristate. p-NP acetate (nhóm acyl ở C2) và propionate (nhóm acyl ở C3) là hai cơ chất bị thủy phân ít nhất (tương ứng <1% và 5%) so với p-NP caprylate. Lipase tái tổ hợp từ *Ralstonia* sp. M1 thủy phân tốt nhất với cơ chất caprylate (nhóm acyl ở C8) (Quyen *et al.*, 2005a). Lipase của *Acinetobacter* sp. RAG-1 cũng thích hợp với các ester acid béo của p-nitrophenyl. Hơn nữa, lipase từ *Acinetobacter* SY-01 cũng giống lipase from *Acinetobacter* sp. RAG-1, có hoạt tính tốt nhất với p-nitrophenyl acetate và hoạt tính giảm dần với chiều dài chuỗi tăng dần (Han *et al.*, 2003). Lipase kiềm từ *P. pseudoalcaligenes* F-111 cũng cho thấy sự thích hợp với các cơ chất là các ester p-nitrophenyl có nhóm acyl ở C12 và C14 (Lin *et al.*, 1996).



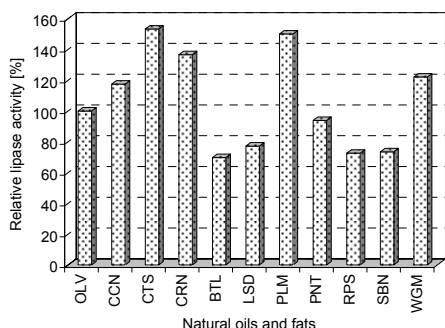
Hình 3.22A. Đặc hiệu cơ chất của lipase từ chủng tự nhiên. Đặc hiệu chiều dài chuỗi acyl của lipase được xác định bằng cách đo hoạt tính của nó với các cơ chất là các triglyceride (C4-C18). Hoạt tính lipase được xác định bằng phương pháp pH-stat với các triacylglycerol khác nhau (C4-C18) ở pH 9,0 và 55°C. Hoạt tính % cao nhất với C4.



Hình 3.22B. Cơ chất đặc hiệu của lipase từ chủng tự nhiên. Đặc hiệu chiều dài chuỗi acyl của lipase được xác định bằng cách đo hoạt tính của nó với các cơ chất là các p-nitrophenyl (C2-C16). Hoạt tính lipase được xác định bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng 405nm (C2-C8) và 420 nm (C14-C16): 0.1 mM ester pNP, pH 8,0, 55°C, 3 phút. Hoạt tính % cao nhất với C14.

3.2.2.10 Đặc hiệu các cơ chất tự nhiên

Trong số các dầu và chất béo tự nhiên, hoạt tính với cơ chất dầu oliu ở pH 9,0 và 55°C được coi là 100%. Hình 3.23 đã cho thấy tính đặc hiệu của lipase đối với các loại dầu và chất béo tự nhiên. Hoạt tính với dầu hạt bông (CTO), dầu cọ (PLM), dầu hạt ngũ cốc (CRN), dầu mầm lúa mì (WGM), và dầu dừa (CCN) cao hơn so với dầu oliu (Hình 3.23). Trong đó hoạt tính lipase với dầu hạt bông và dầu cọ là cao nhất với hoạt tính tăng tương ứng là 153% và 150%. Còn lại hoạt tính với dầu hạt ngũ cốc, mầm lúa mì và dừa tăng tương ứng là 137%, 122% và 118% so với dầu oliu.



Hình 3.23. Hoạt tính thủy phân dầu và chất béo tự nhiên của lipase từ chủng tự nhiên. Hoạt tính được xác định bằng phương pháp đo pH-stat với 1% dầu hoặc chất béo tự nhiên ở pH 9.0 và 55°C. % hoạt tính được so với hoạt tính tốt nhất đối với cơ chất là dầu oliu. OLV: Olive oil (dầu oliu), CCN: Coconut oil (dầu dừa), CTS: Cottonseed oil (dầu hạt bông), CRN: Corn oil (dầu hạt ngũ cốc), BTL: Beef tallow (mỡ bò), LSD: Linseed oil (dầu hạt lanh), PLM: Palm oil (dầu cọ), PNT: Peanut oil (dầu lạc), RPS: Rapeseed oil (dầu hạt cải), SBN: Soybean oil (dầu đậu nành), WGM: Wheatgerm oil (dầu mầm lúa mì).

Hoạt tính thủy phân với dầu lạc gần ngang bằng so với dầu oliu (94%), còn với mỡ bò, dầu hạt lanh, hạt cải chỉ bằng 3/4 so với dầu oliu (70-77%). Trong số các cơ chất dầu và chất béo tự nhiên đã thử, lipase của cả chủng tự nhiên và tái tổ hợp LipA (Quyen *et al.*, 2005a) đều thích hợp với dầu hạt bông, dầu hạt ngũ cốc, dầu cọ và mầm lúa mì và chúng đều có khuynh hướng về tính đặc hiệu cơ chất với các chất béo và dầu tự nhiên.

3.2.2.11 Kết luận

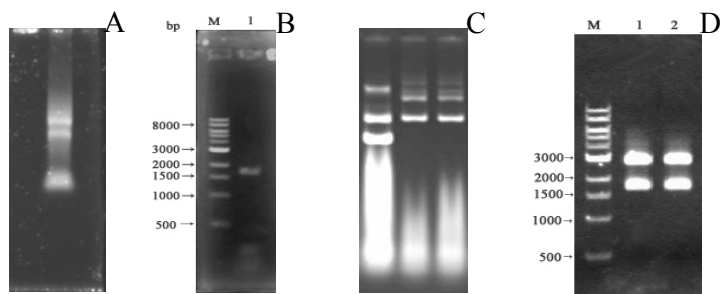
Lipase tái tổ hợp LipA từ *Ralstonia* sp. M1 và lipase từ chủng tự nhiên tương tự nhau về pH, nhiệt độ hoạt động. Các dung môi hữu cơ, các ion kim loại nặng và các chất ức chế cũng tác động tương tự đến hoạt tính và độ bền của hai enzyme này. Ngoài ra, hai enzyme này cũng có tính đặc hiệu cơ chất tương tự. Lipase ngoại bào từ *Ralstonia* sp. M1 là một lipase kiềm, bền nhiệt, không chịu tác động của dung môi hữu cơ và chất tẩy rửa. Các tính chất lý hóa của lipase từ *Ralstonia* sp. M1 cũng giống với lipase từ các chủng *Acinetobacter*, *Pseudomonas* và *Bacillus*, có thể ứng dụng trong công nghiệp chất tẩy rửa và tổng hợp hữu cơ.

3.3 Nhân dòng và biểu hiện các gene mã hóa lipase (Nội dung 5)

3.3.1 Nhân dòng gene mã hóa Gcl

3.3.1.1 Nhân dòng gene lipase

RNA tổng số chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 tinh sạch (Hình 3.24A) được sử dụng làm khuôn để tổng hợp cDNA. Gene mã hóa lipase có kích thước 1632 bp theo lý thuyết được khuếch đại từ cDNA với cặp mồi đặc hiệu với cặp mồi GclF và GclR. Sản phẩm PCR chính của chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 (Hình 3.24B) được khuếch đại bằng *Taq* polymerase có đầu 3'-dA và được chèn vào vector T/A mở vòng có đầu 3'-dT (pTZ57R/T) nhờ T4-ligase. Hỗn hợp gắn dính được biến nạp shock nhiệt vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α . Sau 1 giờ nuôi phục hồi, trang lên đĩa thạch chọn lọc, ủ qua đêm, nhiều khuẩn lạc xanh/trắng xuất hiện. Plasmid tái tổ hợp được tách, tinh sạch từ các khuẩn lạc trắng được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng bổ sung ampicillin và kiểm tra trên gel agarose. Theo lý thuyết, plasmid tái tổ hợp có kích thước lớn hơn vector không có phân đoạn chèn trên cùng gel agarose (Hình 3.24C). Plasmid tái tổ hợp từ khuẩn lạc trắng được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *Eco*RI và *Hind*III, theo lý thuyết sẽ cho băng DNA có kích thước khoảng 1632 bp tương ứng với phân đoạn chèn và băng có kích thước khoảng 2800 bp tương ứng với vector pTZ57R/T (Hình 3.24D).



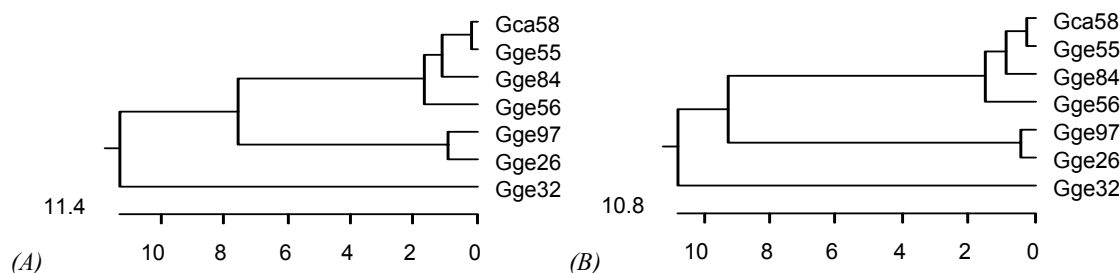
Hình 3.24. Điện di đồ RNA tổng số (A); Sản phẩm PCR (B); Plasmid tách chiết từ các khuẩn lạc trắng (C3) và xanh (C4, C5); Plasmid tái tổ hợp cắt kiểm tra với *Eco*RI và *Hind*III (D).

3.3.1.2 Phân tích trình tự gene lipase

Sau khi xác định trình tự nucleotide, trình tự gene *lipase* và trình tự amino acid suy diễn được so sánh với một số trình tự trong GeneBank bằng phần mềm DNASTar. Trình tự gene *lipase* chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 có độ tương đồng cao so với

các trình tự gene mã hóa lipase của các chủng *Geotrichum* trong GenBank từ 82,2% đến 99,8%: Gge 55 (99,8%), Gge 56 (99,5%), Gge84 (97,6%), Gge97 (86,5%), Gge26 (86,1%) và Gge32 (82,2%) (Hình 3.25A).

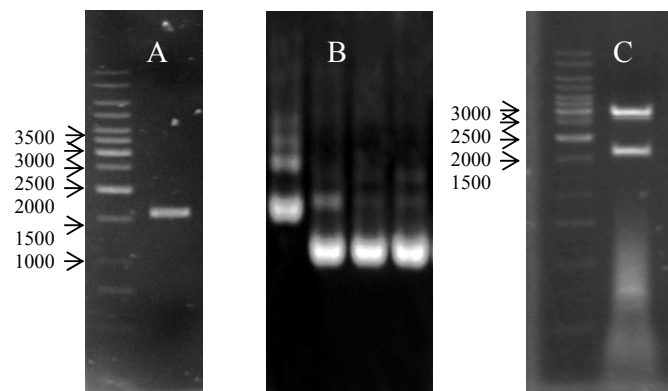
Trình tự aa suy diễn lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 có mức độ tương đồng cao từ 83,8 đến 99,6% so với các trình tự aa suy diễn từ các trình tự nucleotide trong GenBank: Gge55 (99,6%), Gge56 (96,9%), Gge84 (97,9%), Gge97 (83,9%), Gge26(83,9%) và Gge32 (83,8%) (Hình 25B). Cây di truyền giữa nucleotide và aa cũng không chênh lệch nhau nhiều, sự chênh lệch này xảy ra là do có nhiều codon cùng mã hóa cho một aa. Trình tự nucleotide gene *lipase* của chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 đã được đăng ký trên GenBank với mã số EF061458.



Hình 3.25. Cây di truyền của gene (A) và protein (B) lipase. Gge58: *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 EF061458; Gge84: *Galactomyces geotrichum* DQ414684; Gge32 *G. geotrichum* X78032; Gge 26: *G. geotrichum* GCU026; Gge 56: *G. geotrichum* X81656; Gge 55: *G. geotrichum* A74255; Gge 97: *G. geotrichum* D00697.

Trình tự lipase đã đăng ký trong GenBank. Gene mã hóa lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 được nhân dòng thành công bằng PCR với cặp mồi thiết kế đặc hiệu.

3.3.1.3 Xây dựng hệ thống biểu hiện

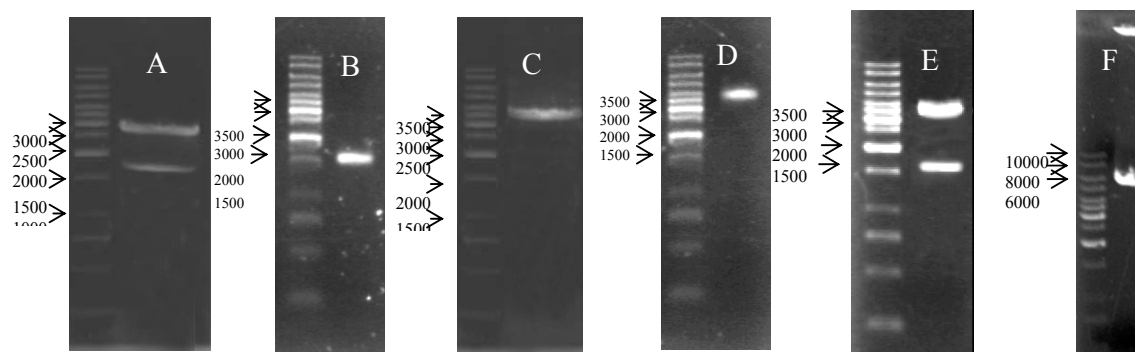


Hình 3.26. Sản phẩm PCR (A), plasmid tách từ khuẩn lạc (B), Plasmid tái tổ hợp pJGcl được cắt bằng *EcoRI* và *XbaI*(C).

Gene mã hóa lipase được khuếch đại với cặp mồi GclF1 và GclR1 với khuôn là plasmid pTGcl (Hình 3.26A). Ligate sản phẩm PCR vào vector nhân dòng pJET1, chọn dòng (Hình 3.26B) và cắt kiểm tra bằng enzyme hạn chế *EcoRI* và *XbaI* (Hình 3.26C).

3.3.1.4 Thiết kế plasmid biểu hiện

Để thiết kế plasmid biểu hiện gene lipase vector pPICZ α A được sử dụng có promotor *AOXI* và có trình tự 6 gốc histidine (6xHis). Plasmid pJGcl có mang đoạn gene *gcl* được cắt bằng hai enzyme hạn chế là *EcoRI* và *XbaI* (Hình 3.27A). Tiến hành tách tinh sạch đoạn gene có kích thước 1632 bp tương ứng với đoạn gene *gcl* theo kit Qiagen (Hình 3.27B). Tương tự vector pPICZ α A cũng được xử lý bằng hai enzyme hạn chế là *EcoRI* và *XbaI* (Hình 3.27C), tinh sạch bằng kit Qiagen và tiến hành điện di kiểm tra sản phẩm trên gel agarose 0.8% (Hình 3.27D). Vector được xử lý cho gắn vào đoạn gene *gcl* tách được ở trên bằng T4 DNA ligate. Sản phẩm gắn dính được biến nạp vào tế bào *E.coli* chủng DH5 α và chọn lọc khuẩn lạc trên môi trường có chứa zeocine 25 μ g/ml. Một số các khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên để tách DNA plasmid và kiểm tra sự có mặt của gene *gcl* (Hình 3.27E). Việc kiểm tra được thực hiện bằng cách cho cắt plasmid bằng hai enzyme hạn chế *EcoRI* và *XbaI* (Hình 3.27F).

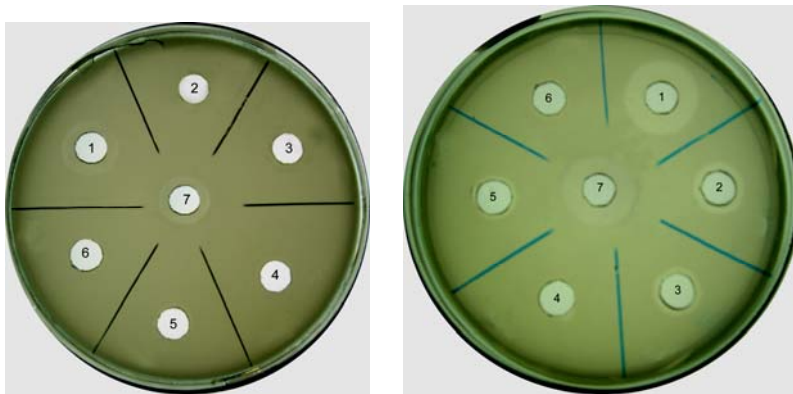


Hình 3.27. plasmid pTGcl được cắt bằng *EcoRI* và *XbaI* (A), Đoạn gene *gcl* sau khi tinh sạch (B), Vector pPICZ α A được cắt bằng *EcoRI* và *XbaI* (C), pPICZ α A đã được xử lý (D), Plasmid tái tổ hợp pPGcl được cắt bằng *EcoRI* và *XbaI* (E), Plasmid tái tổ hợp pPGcl được cắt bằng *MssI* (F).

3.3.1.5 Biểu hiện lipase ở *P. pastoris*

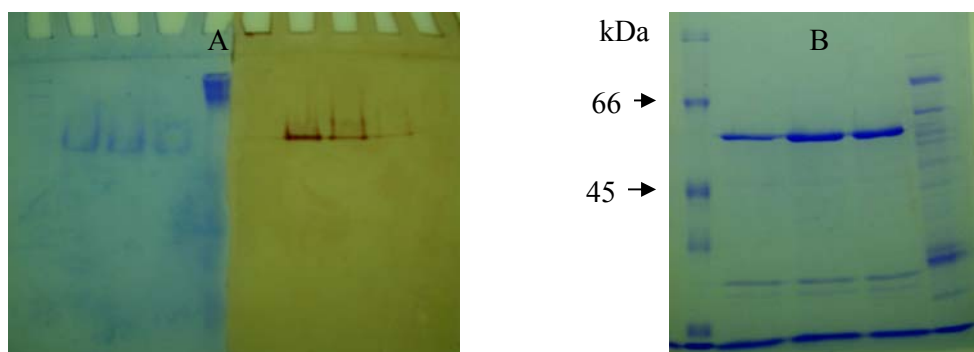
Để biểu hiện gene mã hóa lipase, plasmid tái tổ hợp pPGcl được cắt bằng enzyme hạn chế *MssI* và biến nạp vào chủng *Pichia pastoris* GS115 tạo ra hệ thống biểu hiện *Pichia pastoris* GS115/pPGcl bằng phương pháp xung điện. Sau khi phục hồi, dịch tế

bào được trang lên đĩa thạch có chứa 100 µg/ml zeocine, nuôi ủ ở 30°C. Khuẩn lạc xuất hiện được nuôi cấy để tách chiết để tách DNA và kiểm tra sự có mặt của gene bằng phương pháp PCR. Hệ thống *Pichia pastoris* GS115/pPGcl mang có mang gene mong muốn được nuôi cấy hoạt hóa qua đêm trong 10 ml môi trường BMGY ở bình tam giác 100 ml. Li tâm loại môi trường và tiếp giống vào bình tam giác thể tích 250 ml có chứa 25 ml môi trường BMMY sao cho OD khoảng 1, nuôi lắc ở 250 vòng/phút nhiệt độ 30°C. Cứ sau 24h thì bổ sung 1% methanol và mẫu được lấy 1ml sau 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h để thử hoạt tính lipase trên đĩa thạch 2% agar; 0,5% dầu olive hoặc 0,5% tributyrin; đệm 0,1 M KP pH 7 (Hình 3.28).



Hình 3.28. Hoạt tính thủy phân dầu olive (A); hoạt tính thủy phân dầu tributyrin (B); 1: LP4.28; 2: LP1.8; 3: LP4.10; 4: LP3.6; LP1.10; 6: *pPICZαA*/GS115; 7: *Geotrichum sp. DTQ-26.3*.

Sau khi thử hoạt tính của 40 chủng pPGcl tái tổ hợp chúng tôi chọn chủng LP4.28 là chủng tái tổ hợp sinh tổng hợp lipase có vòng sáng to nhất tương ứng với hoạt tính tốt nhất trên đĩa thạch có chứa dầu olive.



Hình 3.29. Điện di đồ PAGE nhuộm đặc hiệu lipase (A): 1, 10: *P. pastoris*/pPICZαA; 2, 7: LP4.28 (96 giờ); 3, 8: LP4.28 (72 giờ); 4, 9: LP4.28 (48 giờ); 6: *Geotrichum sp. DTQ-26.3*, SDS-PAGE (B): 1: Maker; 2: LP4.28 48 (48 giờ); 3: LP4.28 48 (72 giờ); 4: LP4.28 48 (96 giờ); 5: *P. pastoris*/pPICZαA.

3.3.1.6 Điện di PAGE và SDS-PAGE

Dịch nổi nuôi cấy biểu hiện lipase của các chủng đã thử hoạt tính được chạy điện di trên đồ PAGE (hình 3.29A) và điện di đồ SDS-PAGE. Tiến hành chạy điện di với dịch nổi nuôi cấy biểu hiện chủng LP 4.28. Mẫu được lấy ra ở các giờ nuôi cấy khác nhau, 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ. Chủng tái tổ hợp LP4.28 có hoạt tính dầu và hoạt tính tributiryl có băng protein bắt màu đặc hiệu với thuốc nhuộm. Băng protein xuất hiện trên điện di đồ SDS-PAGE có kích thước khoảng 60 kDa.

3.3.1.7 Thảo luận

Năm 1993 Nagao và đồng tác giả sử dụng các cDNA mã cho lipase I và II đã được tách trước đó như mẫu dò, đã tách 2 gene lipase nhiễm sắc thể 1 và 2 mã cho Lip I và II. Cả 2 gene có chứa đầu 3', 5' được cuộn xoắn cộng với vùng mã hoá. Cả 2 vùng mã hóa không chứa intron và trình tự nucleotide tương đồng đến 86% (Nagao *et al.*, 1993).

Vernet và đồng tác giả đã nghiên cứu tách dòng và biểu hiện Lipase II từ chủng *G. candidum* ATCC34614 trong nấm men *Saccharomyces cerevisiae* BJ3501. Gene lipase ít intron được biểu hiện và được tiết ra trong nấm men với 5 mg/l môi trường. Gel tái tổ hợp được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực miễn dịch và được xác định tính chất. Chủng tái tổ hợp sau khi tinh sạch có khối lượng phân tử khoảng 60 kDa hoạt tính đạt 1017 IU/mg trong khi chủng tự nhiên có hoạt tính thủy phân dầu là 491 IU/mg (Vernet *et al.*, 1993).

Lipase tái tổ hợp từ *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 khi chạy điện di SDS-PAGE có kích thước khoảng 60kDa. Nhuộm đặc hiệu trên bản điện di PAGE có xuất hiện vạch đặc hiệu tương đối rõ nét.

Gene lipase trong bốn chủng *G. candidum* (ATCC 34614, NRCC 205002, NRRLY-552 and NRRLY -553) được tách dòng phân tử nhờ kỹ thuật PCR. Mỗi chủng chứa 2 gen mã cho lipase, trong đó có quan hệ gần gũi với Lipase I và Lipase II của *G. candidum* ATCC 34614. Mỗi họ gen mã cho lipase cho thấy trình tự đa hình, được xác định bằng phương pháp lai Southern. Chỉ có 2 gen được tìm thấy trong mỗi chủng được chứng minh và các nghiên cứu hoá sinh cũng chỉ ra sự tồn tại của lipase với ít nhất đặc hiệu 2 cơ chất khác nhau. Hầu hết sự thay thế amino acid được nằm

trên bề mặt protein, một số có mặt trong phần cấu trúc một cách hợp lý có liên quan đến xác định tính đặc hiệu cơ chất (Bertolini *et al.*, 1994; Bertolini *et al.*, 1995).

Fernández và đồng tác giả đã nghiên cứu biểu hiện Lipase I từ *G. candidum* (BT107) trong nấm men *Pichia pastoris* với vector biểu hiện là pPICZ α A. Lipase I có độ thủy phân dầu olive cao nhất so với tripalmitin và tributirin. Hoạt tính của lipase tái tổ hợp sau khi tinh sạch đạt 99,7 (U/mg) (Fernández *et al.*, 2006).

3.3.1.8 Kết luận

- Nhân dòng thành công gene mã hóa lipase từ chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.
- Trình tự nucleotide mã hóa lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 có mức độ tương đồng 82,2% đến 99,8% so với các trình tự nucleotide mã hóa lipase trong GenBank. Trình tự aa suy diễn lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 có mức độ tương đồng cao từ 83,8 đến 99,6% so với các trình tự aa suy diễn từ các trình tự nucleotide trong GenBank.
- Trình tự gene mã hóa lipase từ chủng được đăng kí trên GenBank với mã số EF061458.
- Thiết kế thành công vector biểu hiện pPGcl mang phân đoạn gene mã hóa lipase từ chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.
- Biểu hiện có hoạt tính thủy phân dầu của phân đoạn gene Gcl mã hóa lipase từ chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 trong *Pichia pastoris*.

3.3.2 Nhân dòng gene mã hóa estR

3.3.2.1 Phân tích gene mã hóa esterase estR từ *Ralstonia* sp. M1

Khuẩn lạc M1-81 có vòng sáng thủy phân tributyrin trên đĩa thạch có bổ sung 1% tributyrin được nhận ra là chủng *Ralstonia* sp khi đối chiếu với thư viện DNA (Quyên *et al.*, 2004b) và thêm vào đó chúng được phân tích trên đĩa agar chứa 1% tricaprylin để phân biệt hoạt tính esterase với lipase. Khuẩn lạc M1-81 không có hoạt tính trên đĩa thạch có 1% tricaprylin sau 2 ngày ủ ở 37°C. Đoạn M1-81 được chèn vào vector pUC19 (plasmid pUM1-81) và đọc trình tự (Hình 3.30). Phân tích đoạn chèn dài 1,6 kb cho thấy có khung đọc mở gồm 963 bp (từ vị trí 587-1549) (Hình 3.30). Dựa vào mức độ tương đồng của các trình tự amino acid suy diễn, khung đọc mở này mã hóa cho một esterase gồm 320 acid amin với trọng lượng phân tử dự đoán là 34 kDa và bộ ba mở đầu là GTG. G+C của *estR* chiếm 67,6%. Theo chiều ngược với *estR*, một vùng -10 CTTAAC (từ vị trí 565-570) và một vùng -35 CTGACA (từ vị trí 510-515) được coi là điểm khởi đầu sao chép.

```
GATCCGCGCCGCGCAAGGCGTCGATCGCCACCGATGAAATCGCCCGCTTCACTCCGCGCGCTGCAAGCTCAAGAGCGGCGAGCATCTCGATGCAGAGCTGGTCTCACGGCCACGGGGCT 120
CAAGCTGAAGGTGCTGGGTGGGGCGTCCATCAGCGTCGACGGACGTGCGGTGAACCTGGCTGACACCGTGTCTTACAAGGGCATGATGTACAGCGGCGTCCGGAACCTGGCGTCTGCTTT 240
CGGCTACACCAACGCGTCTGGACGCTCAAGGCCGAGCTGATCGCGCAGTACGTGTGCCGCGTCTGTAACACATGCGCTCGGGCGGCTTCGACACCTGCATGCCGCGTCTGGACGATGA 360
GGCCATGGGCGCGAGCCGCGTCTGATCTGACGTCGGGCTATATCCAGCGTCTGCCAGCATCTGCCAAAGCAGGGCAGAGCAGCCGTGGAAGTCTGATCAGAATTACGCGCGTGA 480
                                                                                               Primer Rme81F
CTGATGATGCTGAAGTTCGGCTCGCTGGCTGACAGCGCCATGCAAGTTCGAGCGCGCGCGCAACCGATGGGCGCGGCAAGCGCTTAACGTCACGGGGGATCGTGATCCAGACCGT 600
                                                                                               -35                               -10                               V I Q T V
                                                                                               -----Rme----->
CCTGATTGCCGTCGCGCTCGTGATCGCAGCGCGGTGGCGTTCACCTTTGTCTGATCGCAGCGCGCTAACCAAGGCGTTTCCGCCCGCAAGGCAAGTTCATCGATATCGGGGCGGACCGCGT 720
I A V A L V I A A P V A F T F V I A R R V T K A F P P E G K F I D I G A D R V 45
ACACTACACCGACCGCGGCGAGGGTCTGTCATGCTGTCGTCATGGCTATGCGGGAACCTGCGCAACTTCGCTACCTCGATCTGGAGCGGCTGGCGCAATCGACCGCGTGATCGT 840
H Y T D R G Q G P A I V F V (H 6) L C G N L R N F A Y L D L E R L A Q S H R V I V 85
GATCAGCGCGCGGCTCCGACGCTCGCTGCGCGGGGCGGCTCGACGGCGAACATATACGCGCAGGCACGACATGCGCCAGTGCATCCAAAACTGGGCGTCGACCAACCGGTGCT 960
I D R P G S G R S L R G A A S T A N I Y A Q A R T V A A Q C I Q K L G L D Q P V L 125
GGTCGGGCACTGCTGGGCGGTGcGATCGcGCTGGcGGTGGGCTGAATcATCCGAGTGGTTCGTCGGCTTCGCTCGTTCGCGCGCTCACGCGACAGCAGCGCGCCGCCGCTGC 1080
V G H (S) L G G A I A L A V L N H P (D) R I L N V K R Q S V R R L A L V A P L T H N E H A P P G A 165
GTTCAAGGGCTTGGCGTTGACGTCGCGCTGGCGCGCAGGCTGGTGTGCTGGAGCTGGCGGTTCCGCTGTCGATCCTCAACTCGCGCAAGGCGATTGCAGCCGTGTTTGGCGCCGAGGC 1200
F K G L A L T S P L A R R L V S W T L A V P L S I L N S R K A I A A V F A P E A 205
CATGCGGAGGATTTCCGTTCAAGGGCGCGGCTGCTGGGCTGCGTCCGACGCTGTTCTATGCGGATCGTGGATCTGCTGGCGCGCGGGAAGACCTGCCGACATGGAACGCCG 1320
M P E D F P F K G G G L L G L R P H V F Y A A S S D L V A A P E D L P D M E R R 245
CTATGCTCGATGACGGTGCCGCTGACGTGCTGTACGGCGGGGCGACCGCATCTGAACGTCAAGCGCCAGGGCGAAGCGCTCAAGCAGAAGCTCGAGCGCGTGAACCTGCGGGTGGT 1440
Y A S M T V P V D V L Y G R G (D) R I L N V K R Q G E A L K Q K L E R V N L R V V 285
                                                                                               Primer Rme81R
TGACGGCGGGCAGATGCTGCCGCTGACGACGCCGCGCTGACGACGACTGGATACTCGGTGTGGCGCGCGGTCGCCATACAAGCCGAAGCCCGCGCTCAGCGCTAGCCGCGCGCAC 1560
D G G (H) M L P V T Q P A L T T D W I L G V A A A V P I Q A E A A A S A * 320
```

Ccagatc 1567

Hình 3.30. Trình tự nucleotide của đoạn M1-81 và trình tự amino acid suy diễn của *EstR* từ *Ralstonia* sp. M1.

Các amino acid được xếp thẳng hàng với nucleotide đầu tiên của mỗi codon. Các vùng có khả năng là promoter (-10, -35) được đánh dấu và gạch chân. Trình tự đuôi signal của *EstR* được gạch chân dưới trình tự amino acid. Các acid amin bảo thủ Ser, His và Asp được đóng khung. Phần còn lại được coi là oxyanion được vẽ hình thoi. Các codon giữ vai trò làm dừng quá trình phiên mã được đánh dấu hoa thị. Trình tự được đăng ký trên GenBank (Mã số. [AY320282](#)).

3.3.2.2 Phân tích trình tự EstR

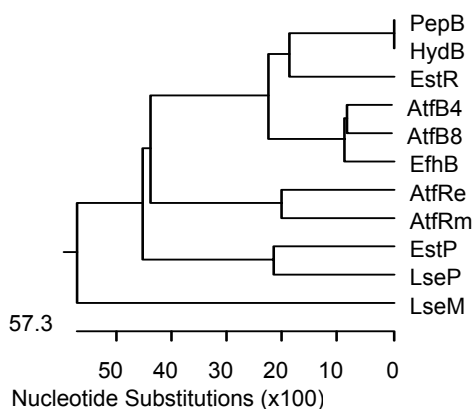
Trình tự amino acid suy diễn của EstR (34,1 kD) được trình bày ở Hình 3.30. Sự có mặt của chuỗi pentapeptide, Gly-His-Ser-Leu-Gly (vị trí từ 103-107) ở đầu N của phân tử protein cho thấy EstR tương đồng với các thành viên esterase và lipase khác. Trên cơ sở so sánh trình tự với protein của esterase đặc hiệu lactone từ *P. fluorescens*, có thể kết luận rằng Ser¹⁰⁵, His²⁶⁵, và Asp²³⁷ là bộ ba xúc tác. His³⁶Gly³⁷ hình thành một chỗ trống có thể oxy hóa anion (Hình 3.30).

3.3.2.3 So sánh trình tự của EstR với các esterase khác

Khi so sánh trình tự của EstR với các trình tự esterase tương ứng từ các chủng vi khuẩn khác (bằng chương trình DNASTar), một cây di truyền đã được xây dựng ở hình 3.31. Kết quả cho thấy EstR từ *Ralstonia M1* có độ tương đồng cao nhất (64-70%) với các esterase của các chủng *Burkholderia* (Bảng 3.8), tương đồng 38-44% với các esterase đặc hiệu lactone từ *P. fluorescens* và *Mesorhizobium loti*, và có mức tương đồng 45-48% so với các esterase của các chủng *Ralstonia*. Vị trí hoạt động của chuỗi pentapeptide GHSLG được bảo tồn hoàn toàn ở các esterase này.

Bảng 3.8. So sánh trình tự của esterase EstR M1 với các trình tự tương tự từ GenBank.

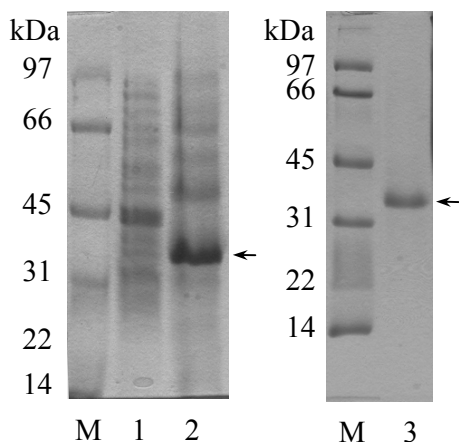
Chủng sinh tổng hợp esterase	Protein	%	Mã số đăng ký
<i>B. pseudomallei</i> K96243	Pepidase	69.6	YP_111976
<i>B. mallei</i> ATCC 23344	Hydrolase	69.6	YP_104940
<i>B. cepacia</i> R18194	Hydrolase/acyltransferase	66.2	ZP_00217547
<i>B. cepacia</i> R1808	Hydrolase/acyltransferase	65.5	ZP_00222665
<i>B. cepacia</i>	Ethyl ferulate-hydrolase	63.9	AAV97951
<i>P. fluorescens</i>	Lactone-specific esterase	44.3	AAC36352
<i>P. fluorescens</i>	Putative esterase	41.6	CAC34851
<i>R. metallidurans</i> CH34	Hydrolase/acyltransferase	44.6	ZP_00023622
<i>Ralstonia sp. M1</i>	Esterase	-	AY320282
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	Hydrolase/acyltransferase	48.1	ZP_00202627
<i>Mesorhizobium loti</i>	Lactone-specific esterase	37.8	NP_102005



Hình 3.31. Phân tích tính di truyền của các esterase dựa vào sự so sánh các trình tự amino acid suy diễn của các protein trưởng thành. Cây di truyền được xây dựng bằng chương trình DNA-Star. Các trình tự được lấy trên GenBank: PepB (peptidase từ *Burkholderia pseudomallei* K96243), Mã số đăng ký: YP_111976); HydB (hydrolase từ *B. mallei* ATCC 23344), YP_104940; AtfB4 (hydrolase/acyltransferase từ *B. cepacia* R18194), ZP_00217547; AtfB8 (hydrolase/acyltransferase từ *B. cepacia* R1808), ZP_00222665; EfhB (ethyl ferulate hydrolase từ *B. cepacia*), [AAV97951](#); LseP (esterase đặc hiệu latone từ *P. fluorescens*), [AAC36352](#); EstP (esterase từ *P. fluorescens*), [CAC34851](#); AtfRm (hydrolase/acyltransferase từ *Ralstonia metallidurans* CH34), [ZP_00023622](#); EstR (esterase từ *Ralstonia* sp. M1, trong nghiên cứu này), [AY320282](#); LseM (lactone-specific esterase từ *Mesorhizobium loti*), [NP_102005](#); AtfRe (hydrolase/acyltransferase từ *Ralstonia eutropha* JMP134) [ZP_00202627](#).

3.3.2.4 Biểu hiện và tinh sạch esterase

Để biểu hiện vượt mức esterase trong *E. coli*, chúng tôi đã thiết kế một cấu trúc plasmid biểu hiện pEstR, trong đó đoạn gene esterase được đặt dưới sự điều khiển của promoter T7 (Hình 3.32). Esterase EstR được biểu hiện với plasmid này trong *E. coli* BL21 ở mức 41 mg protein trên một gram tế bào (trọng lượng tươi) (Hình 3.32, làn 2). EstR sau đó được tinh sạch bằng sắc ký ái lực Ni-NTA. Điện di SDS-PAGE cho thấy dịch protein tinh sạch chỉ có một băng duy nhất (Hình 3.32, làn 3). Khối lượng phân tử được xác định bằng S-PAGE (Hình 3.32, làn 2 và 3) trùng với các tính toán lý thuyết (34,1 kDa).



Hình 3.32. SDS-PAGE của *EstR* biểu hiện vượt mức trong *E. coli* BL21 và tinh sạch bằng Ni-NTA. Protein được nhuộm với Coomassie Brilliant Blue. Làn M, thang protein có kích thước chuẩn, kDa; làn 1, dịch phá tế bào *E. coli* pEstR trước khi cảm ứng IPTG; làn 2, dịch phá tế bào của *E. coli* pEstR sau khi IPTG; làn 3, esterase *EstR* có đuôi His được tinh sạch bằng Ni-NTA.

3.3.2.5 Đặc hiệu cơ chất

Để xác định tính đặc hiệu cơ chất, hoạt tính esterase *EstR* được đo với các ester p-NP có chiều dài chuỗi carbon khác nhau bằng cách đo quang phổ ở bước sóng 405 nm (với các p-NP có nhóm acyl ở C2 đến C8) và ở bước sóng 420 nm (với các p-NP có nhóm acyl ở C14-C16), ở pH 8,0 và 55°C. Trong số các ester p-NP, esterase *EstR* có hoạt tính cao nhất với p-NP caproate (nhóm acyl C6) và được coi là 100%. Hoạt tính đặc hiệu với chiều dài chuỗi carbon của esterase này với các cơ chất p-NP ester được thể hiện ở bảng 3.9. Hoạt tính với p-NP myristate (nhóm acyl C14) và palmitate (nhóm acyl C16) không được phát hiện dưới các điều kiện đặc biệt. Hoạt tính của esterase *EstR* với p-NP acetate (nhóm acyl C2), propionate (nhóm acyl C3), và caprylate (nhóm acyl C8) tương ứng là 18%, 51%, và 65% so với p-NP caproate.

Bảng 3.9 Hoạt tính^a và đặc hiệu cơ chất của esterase từ *Ralstonia* sp. M1.

Cơ chất	Hoạt tính đặc hiệu (U/mg protein)	Hoạt tính tương đối (%)
p-Nitrophenyl acetate	18,3	18
p-Nitrophenyl propionate	53,1	51
p-Nitrophenyl caproate	104,5	100
p-Nitrophenyl caprylate	67,5	65
p-Nitrophenyl myristate	N.D. ^b	-
p-Nitrophenyl palmitate	N.D. ^b	-

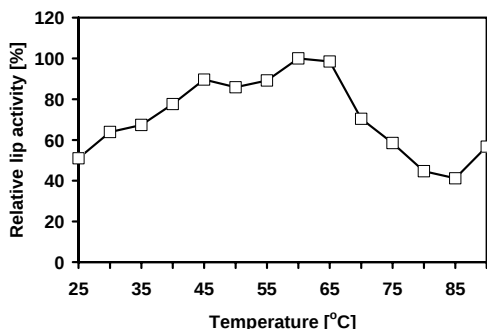
^aHoạt tính esterase được xác định bằng phương pháp đo quang phổ với 10 mM cơ chất là các ester p-nitrophenyl và 20 µg esterase *EstR* ở pH 8.0 và 55°C.

^bN.D.: không phát hiện ra dưới các điều kiện đặc biệt.

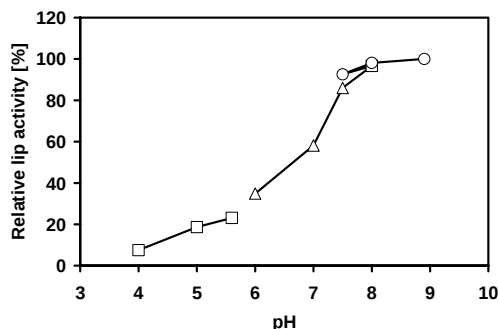
3.3.2.6 Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính esterase

Nhiệt độ phản ứng tối ưu của esterase *EstR* được xác định với cơ chất p-nitrophenyl caproate (nhóm acyl C6) ở pH 9,0. Nhiệt độ tối ưu là 60°C với p-

nitrophenyl caproate (Hình 3.33). Hoạt tính tăng dần từ 51% ở 25°C đến tối đa 100% ở 60°C và sau đó giảm dần tới 41% ở 85°C. Esterase hoạt động tốt trong khoảng nhiệt độ 45°C đến 65°C (86-100%). Esterase này thuộc vào loại enzyme bền nhiệt.



Hình 3.33. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính esterase. Hoạt tính của 20 μ g esterase EstR tinh sạch được xác định bằng quang phổ với 10 mM cơ chất p-nitrophenyl caproate ở pH 8,0 và ở các nhiệt độ khác nhau 25-90°C.



Hình 3.34. Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính của esterase. Hoạt tính của 20 μ g esterase EstR tinh sạch được xác định bằng quang phổ với 10 mM cơ chất p-nitrophenyl caproate ở 55°C và các pH khác nhau 4,0-1,0.

3.3.2.7 Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính esterase

Hoạt tính tối ưu của esterase EstR được xác định ở 55°C với cơ chất p-nitrophenyl caproate trong vùng pH từ 4,0 đến 11,0 (Hình 3.34). Esterase có hoạt tính tốt nhất ở pH 9,0. Hoạt tính còn lại tăng rất đều từ 8% ở pH 4,0 đến 58% ở pH 7,0 sau đó duy trì ở mức 86-100% ở vùng pH từ 7,5 đến 9,0. Khi pH vượt qua 9,0, sự tự thủy phân của cơ chất lớn hơn các giá trị đo ở pH 9,0 và các giá trị này của các mẫu được tính cộng vào với hoạt tính của enzyme, nhưng hoạt tính còn lại cũng không thể xác định được.

3.3.2.8 Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ lên hoạt tính esterase

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ lên hoạt tính^a.

Dung môi	Hoạt tính còn lại (%) ở các nồng độ (%) của	
	10	30
Methanol	98	110
Ethanol	100	104
Isopropanol	90	90
1-Butanol	19	14
tert-Butanol	86	22
Dichloromethane	116	78
Ethyl acetate	86	69
Acetonitrile	90	99
Acetone	88	68
Ethanolamine	569	1482
Hexane	99	88
DMSO	87	96
DMFA	96	97

^a20 µg esterase EstR tinh sạch được ủ trong đệm 0,1 M Tris, pH 8,0 ở 30°C trong 30 min với 10% hoặc 30% (v/v) của các dung môi. Hoạt tính esterase được xác định bằng phương pháp đo quang phổ với 10 mM cơ chất p-nitrophenyl caproate ở pH 8.0 và 55°C.

hoạt tính tương ứng từ 6 đến 15 lần. Trái với các dung môi hữu cơ khác, việc bổ sung 10 và 30% của 1-butanol và 30% tert butanol làm ức chế mạnh hoạt tính esterase.

Hoạt tính còn lại được duy trì ở khoảng 20% so với mẫu đối chứng.

Ảnh hưởng của 10 và 30% (v/v) của các dung môi hữu cơ (Bảng 3.10) lên hoạt tính esterase được kiểm tra bằng cách ủ esterase EstR trong 30 phút ở 30°C trong đệm 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0). Nhìn chung, esterase EstR từ *Ralstonia* sp. M1 không bị ảnh hưởng bởi các dung môi hữu cơ thử nghiệm ngoại trừ 1- và tert-butanol. Không có sự ảnh hưởng đáng kể nào lên esterase EstR khi ủ với 10 và 30% các dung môi hữu cơ trong 30 phút, hoạt tính esterase giảm 32% hoặc tăng 16% so với mẫu đối chứng không ủ với dung môi. Ethanolamine kích thích mạnh hoạt tính esterase EstR. Việc bổ sung 10% và 30% ethanolamine làm tăng

3.3.2.9 Ảnh hưởng của các ion và các chất ức chế lên hoạt tính esterase

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của ion và chất ức chế lên hoạt tính esterase.

Ion kim loại	Hoạt tính còn lại (%) ở nồng độ (mM) của		
	0, 1	1	10
CaCl ₂	88	87	96
CuCl ₂	91	93	85
FeCl ₃	88	73	83
MgCl ₂	101	87	90
MnCl ₂	94	95	92
SnCl ₂	92	100	110
ZnCl ₂	85	87	80
DEPC	96	88	90
EDTA	105	101	85
PMSF	77	80	17

^a20 µg esterase EstR tinh sạch được ủ trong đệm 0,1 M Tris, pH 8,0 ở 30°C trong 30 phút với 0,1, 1 hoặc 10 mM của các ion hoặc các chất ức chế. Hoạt tính esterase được xác định bằng phương pháp đo quang phổ với 10 mM cơ chất p-nitrophenyl ở pH 8,0 và 55°C.

Ảnh hưởng của 0,1, 1, và 10 mM của các ion được xác định bằng cách ủ esterase EstR trong 30 phút với đệm 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0. Nhìn chung, tất cả các ion kim loại thử nghiệm không ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính esterase EstR (Bảng 3.11). Việc bổ sung 0,1, 1 và 10 mM các ion kim loại tăng và giảm nhẹ hoạt tính tương ứng 27% và 10%. Không có ảnh hưởng đáng kể của các dạng chất ức chế lipase/esterase lên hoạt tính esterase EstR ngoại trừ 10 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) làm tăng hoạt tính lên 83%.

3.3.2.10 Ảnh hưởng của các chất tẩy rửa lên hoạt tính esterase

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của các chất tẩy rửa lên hoạt tính.

Chất tẩy rửa	Hoạt tính còn lại (%) ở nồng độ (%)		
	0, 2	1	5
Tween 80	107	94	55
Tween 60	110	87	75
Tween 40	101	90	52
Triton X-100	97	71	42
Triton X-45	260	396	
SDS	0	0	0

^a20 µg esterase EstR tinh sạch được ủ trong đệm 0,1 M Tris buffer, pH 8,0 ở 30°C trong 30 phút với 0,2, 1 hoặc 5% (w/v) các chất tẩy rửa. Hoạt tính esterase được xác định bằng phương pháp quang phổ với cơ chất 10 mM p-nitrophenyl caproate ở pH 8,0 và 55°C.

tăng những chất này lên 5% hoạt tính lại giảm tới 48%. Triton X-100 cho thấy là một chất ức chế hoạt tính esterase. Hoạt tính giảm từ 3% đến 58% khi ủ với 0,2-5% Triton X-100. Nhưng Triton X-45 lại kích thích mạnh hoạt tính esterase. Hoạt tính tăng từ

Ảnh hưởng của 0,2, 1 và 5% (w/v) của các chất tẩy rửa gồm Tween 80, Tween 60, Tween 40, Triton X-100, Triton X-45 và SDS được xác định bằng cách ủ esterase EstR trong 30 phút 30°C trong đệm 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0. Việc bổ sung 0,2% (w/v) Tween 80, Tween 60 và Tween 40 làm tăng nhẹ hoạt tính esterase từ 1-10% (Bảng 3.12). Nhưng khi bổ sung 1% các chất tẩy rửa này làm giảm hoạt tính lên 13%. Hơn nữa khi

2,6 đến 4 lần so với mẫu đối chứng. Trái ngược với những chất tẩy rửa trên, SDS cho thấy là một chất ức chế hoàn toàn hoạt tính esterase.

3.3.2.11 Thảo luận

Trước đây, chúng tôi thông báo đã phân lập được cặp gene lipase và chaperone của nó từ *Ralstonia* sp. M1, trình tự, phân tích trình tự, biểu hiện trong *E. coli*, tạo cấu trúc gấp nếp invitro và xác định các tính chất lý hóa (Quyen *et al.*, 2004b; Quyen *et al.*, 2005a). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm thêm một enzyme thủy phân lipid khác cũng từ *Ralstonia* sp. M1: nhân dòng gene, phân tích trình tự, biểu hiện trong *E. coli* và xác định tính chất lý hóa.

Trình tự đoạn dài 1,6 kb được nhân dòng từ khuẩn lạc M1-81 có một khung đọc mở (ORF) đơn và dự đoán là mã hóa cho enzyme EstR thủy phân lipid. Trình tự amino acid suy diễn (320 aa) cho thấy một mức độ tương đồng đáng kể với những trình tự của các esterase trong cùng một họ từ các nguồn khác, tương đồng chủ yếu với esterase từ *Burkholderia* (tương đồng 64-70%), *Pseudomonas* (tương đồng 42-45%) và *Ralstonia* (tương đồng 48%). Cũng tương tự với các thông báo khác về các gene mã hóa cho các esterase khác, ORF của *Ralstonia* sp. M1 dùng mã mở đầu là GTG hơn là ATG (Kim *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2003). Trong ORF tìm thấy một sự tương phản cao về hàm lượng G+C (67%), một đặc điểm đặc trưng của nhiễm sắc thể của *Pseudomonas* và *Burkholderia* (Stover *et al.*, 2000).

Tiền protein (preprotein) của EstR được dự đoán chứa một đoạn peptide 24 aa định hướng và nó sẽ bị cắt bỏ khỏi phân tử protein trưởng thành (296 aa) ở pI 9,86 (Nielsen *et al.*, 1997).

ORF của esterase từ *Ralstonia* sp. M1 có một motif liên ứng V-I-V-V-G-H-S-L-G-G. Theo dữ liệu của ProSite (Hofman *et al.*, 1999), họ lipase cũng bao gồm cả các esterase acetylcholine có motif liên ứng [LIV]-x-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-x-G-[GSTAC] (S là vị trí hoạt động còn lại) (Chapus *et al.*, 1988). Trong khi motif của vị trí hoạt động là F-[GR]-G-x(4)-[LIVM]-x-[LIV]-x-G-x-S-[STAG]-G (S là vị trí hoạt động còn lại) (Cygler *et al.*, 1993). So sánh các motif này cho thấy motif của esterase EstR là motif của lipase, không phải là esterase motif. Điều này khẳng định motif cho lipase cũng có mặt ở motif esterase và ngược lại (Fojan *et al.*, 2000).

Cả hai enzyme thủy phân lipid esterase và lipase đều có hoạt tính với các ester p-nitrophenyl, nhưng khác nhau về đặc hiệu. Lipase LipA từ *Ralstonia* sp. M1 có hoạt tính cao nhất với p-NP caprylate (nhóm acyl C8), và cũng có hoạt tính tốt với p-NP myristate (nhóm acyl C14) và palmitate (nhóm acyl C16) (Quyen *et al.*, 2005a). Mặc dù vậy, esterase EstR cũng từ chủng này lại cho hoạt tính cao nhất với p-NP caproate (nhóm acyl C6), nhưng không có hoạt tính với các ester p-NP nhóm acyl C14 hoặc C16. Hơn nữa, esterase EstR không có hoạt tính với các triglyceride (tài liệu không chỉ ra). Các esterase từ *Pseudomonas* sp. KCTC 10122BP, *Acinetobacter* sp. chủng số 6, có hoạt tính cao nhất với p-NP acetate trong số các p-NP ester thử nghiệm (Suzuki *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003). Esterase từ *Aeropyrum pernix* K1 cũng có hoạt tính với các p-NP ester nhóm acyl C12, C16 và C18 và cao nhất với p-NP caprylate (Gao *et al.*, 2003).

Một đặc điểm quan trọng cần thiết cho các ứng dụng trong chế biến chất tẩy rửa và các chuyển hóa sinh học là enzyme phải hoạt động ở nhiệt độ cao và trong vùng pH kiềm. Esterase EstR từ *Ralstonia* sp. M1 có nhiệt độ tối ưu từ 60-65°C và pH 7,5 đến 9,0. Hoạt tính còn lại không thể xác định được ở pH từ 10,0 đến 11,0 vì độ tự thủy phân ở vùng pH này lớn hơn ở pH 9,0 khi có sự bổ sung của cả EstR. Lipase LipA cũng từ *Ralstonia* sp. M1 chỉ ra hoạt tính lớn nhất cũng ở vùng nhiệt độ cao 55-60°C và pH kiềm 10,75 (Quyen *et al.*, 2005a). Nhiệt độ phản ứng tối ưu được thông báo ở đây thấp hơn so với các esterase từ *A. pernix* K1 (90°C) (Gao *et al.*, 2003) và từ *Archaeoglobus fulgidus* (80°C) (Manco *et al.*, 2000), nhưng cao hơn các esterase từ *Aspergillus ficuum* (40-45°C) (Chung *et al.*, 2002) và từ *Fusarium oxysporum* (45°C) (Topakas *et al.*, 2003). Hơn nữa esterase EstR của *Ralstonias* sp. M1 có pH tối ưu cao hơn các esterase từ *A. pernix* K1 (pH 8,0) (Gao *et al.*, 2003) và từ *F. oxysporum* (pH 7,0) (Topakas *et al.*, 2003).

Tương tự với lipase LipA từ chủng *Ralstonia* sp. M1 (Quyen *et al.*, 2005a), EstR có tính kháng rất cao đối với các dung môi hữu cơ. Nhìn chung, phần lớn các dung môi hữu cơ kích thích hoạt tính của LipA cũng như enzyme dạng tự nhiên từ *Ralstonia* sp. M1 và không ảnh hưởng đến EstR. Ethanolamine làm tăng mạnh hoạt tính của cả lipase và esterase lên tương ứng 3 lần và 6-15 lần. 1-butanol ảnh hưởng rõ ràng lên

hoạt tính esterase và lipase LipA, hoạt tính còn lại giảm một nửa và 1/5 so với mẫu đối chứng.

Các ion dùng trong thí nghiệm cũng cho thấy sự ảnh hưởng tương tự nhau lên hoạt tính của lipase và esterase, hoạt tính đều tăng nhẹ hoặc giảm nhẹ. Việc bổ sung EDTA làm giảm hoạt tính lipase, điều này đưa đến nhận định có thể EDTA đi vào vị trí liên kết với Ca^{2+} và loại bỏ ion này (Quyen *et al.*, 2005a), trong khi muối này lại không ảnh hưởng đến hoạt tính esterase. DEPC làm ức chế nhẹ hoạt tính của lipase và esterase. DEPC làm ức chế hoạt tính bằng cách biến đổi đuôi histidine làm cho nó bị mắc trong quá trình xúc tác. PMSF cũng cho thấy là một chất ức chế ảnh hưởng đến cả hoạt tính của cả lipase LipA (Quyen *et al.*, 2005a) và esterase EstR, và chúng ức chế bằng cách ngăn cản serine trong bộ ba xúc tác.

Các chất tẩy rửa ảnh hưởng tích cực đến hoạt tính lipase, chúng làm tăng hoạt tính lên đến 3 lần. Trong khi đó Triton X-45 làm tăng hoạt tính còn lại của esterase lên tới 4 lần và các chất tẩy rửa khác cũng làm tăng nhẹ hoặc làm ức chế không đáng kể. 1% (w/v) SDS làm tăng mạnh hoạt tính lipase LipA thêm 0,5 lần (Quyen *et al.*, 2005a), trong khi esterase EstR bị ức chế hoàn toàn.

EstR tái tổ hợp từ *Ralstonia* sp. M1 là một esterase kiềm, ưa nhiệt, kháng dung môi hữu cơ cao và chất tẩy rửa. Những điểm đặc trưng nổi bật này làm cho esterase tái tổ hợp EstR rất hấp dẫn với các ứng dụng trong công nghệ sinh học.

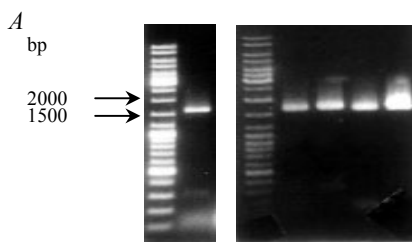
3.3.3 Nhân dòng gene mã hóa lipase *Fgl4* và *Fgl5*

3.3.3.1 Thiết kế plasmid chọn dòng trung gian

Sản phẩm PCR của các gene *fgl4* và *fgl5*

Để thiết kế các plasmid tái tổ hợp biểu hiện pGAF4 và pGAF5 (từ vector biểu hiện pGAP), trước tiên các plasmid trung gian pGEF4 và pGEF5 được thiết kế từ vector pGEM chứa các gene *fgl4* và *fgl5*.

Các bộ môi dùng để khuếch đại gene *fgl4* và *fgl5* được thiết kế lần lượt chứa các điểm cắt *SacII*+*XbaI* và *EcoRI*+*KpnI*. Sau khi khảo sát chu trình nhiệt với cặp môi *Fgl4* và *Fgl5* và khuôn cDNA (do Markus cung cấp), các sản phẩm PCR của gene *fgl4* và *fgl5* từ chủng *Furasium* được khuếch đại có kích thước khoảng 1600 bp (Hình 3.35). Sản phẩm PCR là đặc hiệu, cho một băng duy nhất, không nhòe, phù hợp với tính toán lý thuyết.



Hình 3.35. Điện di đồ sản phẩm PCR của các gene *fgl4* (A) và *fgl5* (B).



Hình 3.36. Điện di đồ sản phẩm PCR của các khuẩn lạc mọc trên đĩa biến nạp hỗn hợp gắn dính pGEF4 và pGEF5.

Các plasmid chọn dòng trung gian pGEF4 và pGEF5

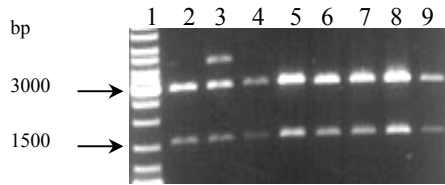
Bước đầu tiên, các sản phẩm PCR của *fgl4* và *fgl5* được chèn vào vector nhân dòng pGEM-T và cho các plasmid tái tổ hợp pGEF4 và pGEF5 tương ứng. Các khuẩn lạc mang plasmid pGEF4 và pGEF5 được kiểm tra bằng PCR để xem các plasmid có mang phân đoạn chèn *fgl4* và *fgl5* tương ứng. Kết quả cho thấy một số khuẩn lạc có mang plasmid tái tổ hợp pGEF4 và pGEF5 (Hình 3.36).

3.3.3.2 Xây dựng các plasmid biểu hiện pGAF4 và pGAF5

Các phân đoạn cắt enzyme hạn chế *fgl4*[*SX*] và *fgl5*[*EK*]

Các plasmid pGEF4 và pGEF5 nhân dòng trung gian được cắt kiểm tra lần lượt với cặp enzyme *SacII* + *XbaI* và *EcoRI* + *KpnI* cho các băng tương ứng đúng với tính

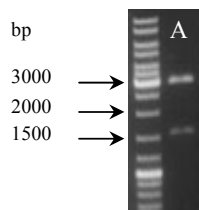
toán lý thuyết (Hình 3.37). Vector pGEM khoảng 3.000 bp còn *fgl4*[SX] và *fgl5*[EK] khoảng 1600 bp, các băng trên điện di đồ (Hình 3.37) nét và đủ chất lượng cho các thí nghiệm tiếp theo.



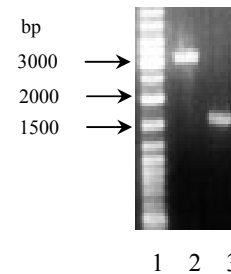
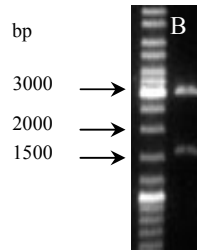
Hình 3.37. Điện di đồ sản phẩm cắt các plasmid *pGEF4* (2; 4-5) và *pGEF5* (6-9).

tinh sạch bằng kit Qiagen (Hình 3.39).

Các sản phẩm cắt *fgl4*[SX] và *fgl5*[EK] tinh sạch bằng kit Qiagen được kiểm tra cùng vector pGAPZαA mở vòng trên gel agarose (Hình 3.39).



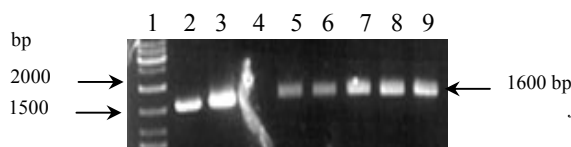
Hình 3.38. Điện di đồ sản phẩm cắt plasmid *pGEF4*[SX] (A) và *pGEF5*[EK] (B).



Hình 3.39. Điện di đồ sản phẩm *pGAPZαA* mở vòng (2) và *fgl5*[EK] (3).

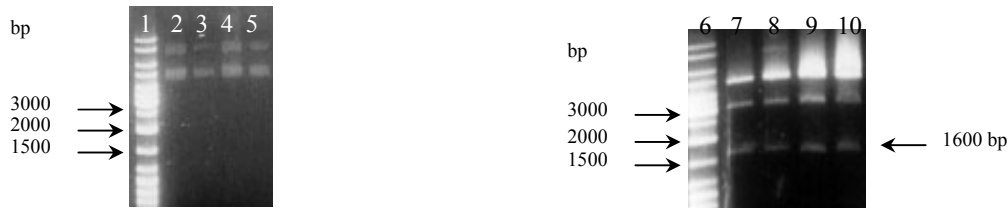
Các plasmid biểu hiện *pGAF4* và *pGAF5*

Các sản phẩm cắt hạn chế *fgl4*[SX] và *fgl5*[EK] đã tinh sạch được chèn vào vector pGAP nhờ T4-DNA ligase tạo ra các plasmid mới *pGAF4* và *pGAF5*. Dịch gấn dính được biến nạp vào *E. coli* TOF 10F bằng phương pháp sốc nhiệt và trải trên đĩa môi trường Lowsal LB với dấu hiệu chọn lọc là kháng zeocin. Tôi chọn một số khuẩn lạc mọc trên đĩa biến nạp để chạy PCR kiểm tra sự có mặt của các đoạn gene *fgl4* và *fgl5* với các cặp mồi đã thiết kế ở trên (Hình 3.40).



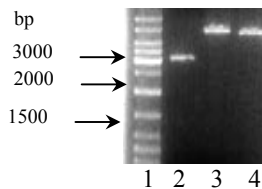
Hình 3.40. Điện di đồ sản phẩm PCR của các khuẩn lạc đã được biến nạp hỗn hợp gấn dính pGAP với *fgl4*[SX] và *fgl5*[EK] trên đĩa môi trường Lowsal LB.

Các dòng có sản phẩm PCR tương ứng với băng khoảng 1600 bp được chọn ra để tinh sạch plasmid tái tổ hợp và để kiểm tra phân đoạn chèn.



Hình 3.41. Điện di đồ các plasmid tái tổ hợp pGAF4 (2-3) và pGAF5 (4-5), sản phẩm cắt pGAF4 với *SacII* + *XbaI* (kênh 7-8) và pGAF5 với *EcoRI* + *KpnI* (kênh 9-10).

Sau khi chọn ngẫu nhiên các thể biến nạp, các dòng mang đúng plasmid tái tổ hợp pGAF4 và pGAF5 (Hình 3.41A) được chọn ra và cắt kiểm tra với cặp enzyme tương ứng *SacII*+*XbaI* và *EcoRI*+*KpnI*. Điện di đồ (Hình 3.41B) có thể khẳng định rằng các plasmid tái tổ hợp pGAF4 và pGAF5 đã được xây dựng.

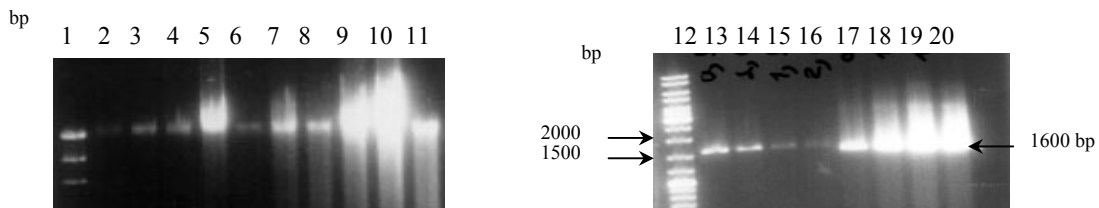


Hình 3.42. Điện di đồ sản phẩm pGAPZαA mở vòng (2), pGAF4 (3) và pGAF5 (4) bằng *PagI*.

Sau đó, các plasmid tái tổ hợp pGAPZαA, pGAF4 và pGAF5 được cắt mở vòng lượng lớn bằng *PagI*. Điện di đồ (Hình 3.42) cho thấy sản phẩm cắt mở vòng pGAPZαA, pGAF4 và pGAF5

bằng enzyme *PagI* cho một băng mảnh không nhòe, đúng với kích thước dự đoán.

Sản phẩm cắt mở vòng pGAPZαA[P], pGAF4[P] và pGAF5[P] bởi *PagI* được biến nạp vào nấm *Pichia pastoris* bằng xung điện, 300 μl hỗn dịch được trải trên đĩa môi trường YPG bổ sung 100 μg zeocin/ml. Sau 2 ngày, một số khuẩn lạc trắng mọc trên đĩa biến nạp, được chọn ngẫu nhiên để tách DNA của nấm và kiểm tra sự có mặt của các đoạn gene *fgl4* và *fgl5* bằng PCR.

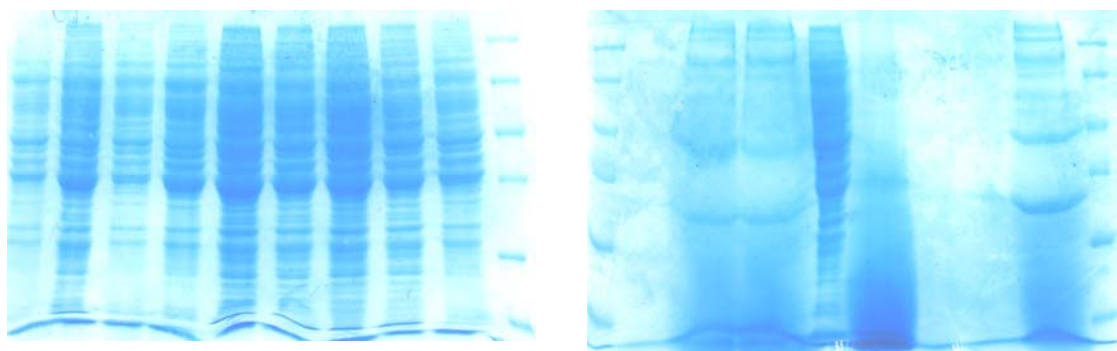


Hình 3.43. Điện di đồ DNA tổng số của các khuẩn lạc nấm *Pichia pastoris* sau khi biến nạp (2-11) và sản phẩm PCR của các khuẩn lạc pGAF4 (13-16) và pGAF5 (17-20).

Điện di đồ ở hình 3.43 cho thấy sản phẩm PCR của các khuẩn lạc pGAF4 (các giếng 13-16) và sản phẩm PCR của các khuẩn lạc pGAF5 (các giếng 17-20) có kích thước tương ứng với kích thước của các đoạn gene *fgl4* và *fgl5*. Điều đó chứng tỏ sự có mặt của các đoạn gene nói trên trong tế bào nấm *Pichia* được biến nạp. Như vậy hệ thống biểu hiện nấm *Pichia pastoris* (GS 115) pGAF4 và pGAF5 đã được xây dựng.

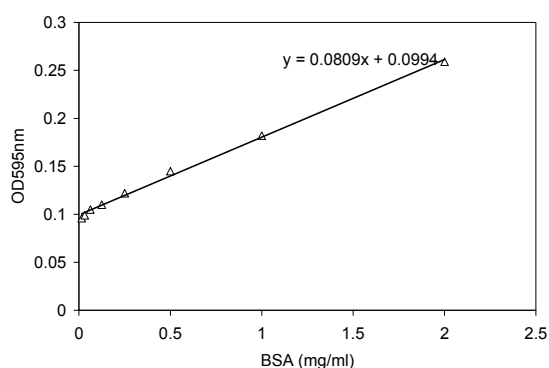
3.3.3.3 Biểu hiện lipase *Fgl4* và *Fgl5* tái tổ hợp

Tế bào tái tổ hợp thu được từ 100 μ l dịch nuôi cấy sau các thời gian 0; 24; 48; 72; 96; 144 và 168 giờ được biến tính và điện di trên gel 12,5% polyacrylamide để đánh giá năng suất biểu hiện lipase. Kết quả điện di protein tổng số được thể hiện trên điện di đồ hình 3.44.



Hình 3.44. Điện di đồ protein tổng số của dịch phá tế bào nấm *Pichia pastoris* (A) và của dịch nổi (B). Điện di protein tổng số của dịch biểu hiện *Fgl4* (2; 3; 4) và *Fgl5* (8; 9).

Dựa theo đường chuẩn Bradford thì hàm lượng protein tổng số của *Fgl4* là 0,848 mg/ml dịch biểu hiện tươi và của *Fgl5* là 1,206 mg/ml.



Hình 3.45. Đường chuẩn BSA.

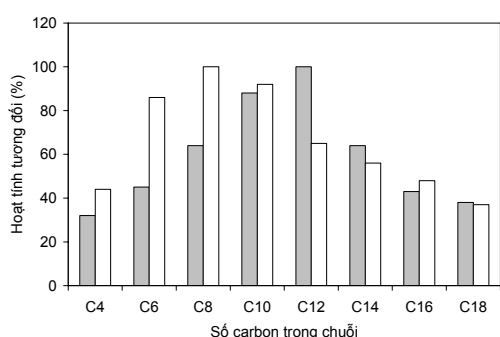
y =	Mẫu	OD ₅₉₅	mg/ml
0,0809x	Fgl4.1	0,168	0,848
+ 0,0994	Fgl5.17	0,197	1,206

3.3.3.4 Một số tính chất của hai lipase tái tổ hợp Fgl4 và Fgl5

Dịch nuôi cấy sau 168 giờ của các chủng tái tổ hợp *Pichia pastoris*/pGAF4.1 và *Pichia pastoris*/pGAF15.17 có hoạt tính lipase được ly tâm 10 phút với 10.000 rpm. Dịch nổi được sử dụng để xác định một số tính chất của các lipase tái tổ hợp Fgl4 và Fgl5.

Cơ chất đặc hiệu

Để xác định cơ chất đặc hiệu cho từng lipase, hỗn hợp phản ứng được thực hiện 1 giờ ở 37°C, pH 8,0 với các cơ chất tổng hợp khác nhau từ C4 đến C18. Đối với Fgl4 thì hoạt tính tương đối của enzyme tăng dần từ 32% đối với C4 và đạt cao nhất đối với C12 (100%) nhưng đến C18 thì hoạt tính tương đối của nó cũng chỉ còn là 37% (Hình 3.46). Cơ chất đặc hiệu đối với Fgl4 là C12 và rất cao đối với C10 (88%).

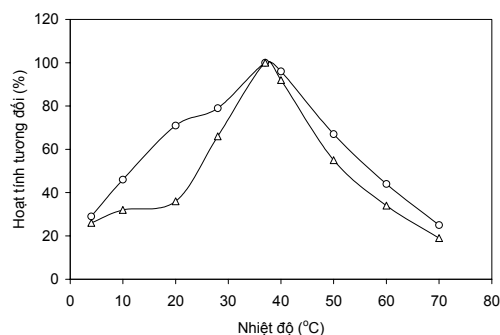


Hình 3.46. Hoạt tính đặc hiệu của Fgl4 (■) và Fgl5 (□) đối với một số cơ chất có số carbon từ 4 đến 18.

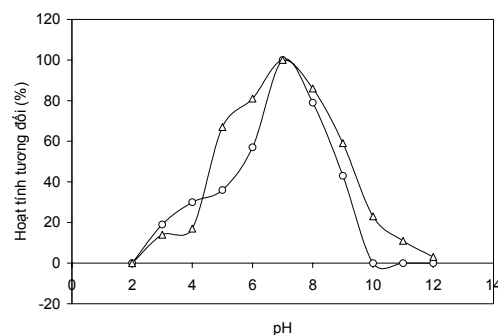
Nhiệt độ tối thích

Để xác định ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng lên hoạt tính của lipase tái tổ hợp Fgl4 và Fgl5, nhiệt độ phản ứng được thay đổi từ 4°C đến 70°C còn các điều kiện khác của phản ứng được giữ nguyên. Đồ thị hoạt tính tương đối của cả hai enzyme đối với nhiệt độ thay đổi rất giống nhau, đều có nhiệt độ tối thích là 37°C. Ở các nhiệt độ quá cao (70°C) hoặc quá thấp (4°C) thì hoạt tính giảm chỉ còn dưới 30%, điều này cũng phù hợp vì ở nhiệt độ quá cao hoặc quá thấp thì cấu trúc của protein thay đổi kéo theo sự thay đổi của trung tâm hoạt động và cấu hình không gian của phân tử protein nên làm giảm hoạt tính enzyme.

Đối với Fgl5 thì cơ chất đặc hiệu lại là C8 và hoạt tính đối với C6 (86%) và C12 (92%) cũng rất cao so với C8. Để xác định các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính của các enzyme tái tổ hợp biểu hiện Fgl4 và Fgl5 thì cơ chất được sử dụng tương ứng là C12 và C8.



Hình 3.47. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng tới hoạt tính lipase tái tổ hợp Fgl4 (○) và Fgl5 (△).



Hình 3.48. Ảnh hưởng của pH phản ứng tới hoạt tính lipase tái tổ hợp Fgl4 (○) và Fgl5 (△).

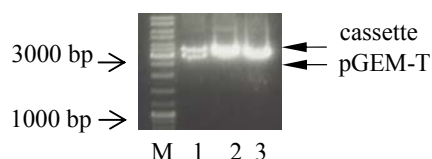
pH tối thích

Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của các lipase tái tổ hợp Fgl4 và Fgl5 được thực hiện ở 37°C trong dải pH từ 2 đến 13, đối với các cơ chất C12 và C8, tương ứng (Hình 3.48). Giống như yếu tố nhiệt độ, đồ thị biểu thị mối tương quan giữa pH phản ứng và hoạt tính tương đối của cả hai lipase tái tổ hợp Fgl4 và Fgl5 rất tương tự nhau (Hình 3.48).

Cả hai lipase tái tổ hợp Fgl4 và Fgl5 đều có pH tối ưu ở 7. Ở pH 2 cả hai enzyme này đều không hoạt động và hoạt tính tương đối tăng dần từ pH 3 đến pH 7. Đối với Fgl4 ở pH 9, hoạt tính giảm hẳn một nửa so với ở pH 7 và đến pH 10 thì enzyme này không còn hoạt động nữa. Nhưng đối với Fgl5, hoạt tính tương đối giảm dần đến pH 12 vẫn còn 4%. Đây là hai enzyme hoạt động ở vùng pH trung tính.

3.3.4 Phá bỏ gene mã hóa lipase

3.3.4.1 Nhân cassette PHygT



Hình 3.49. Plasmid pGEM-T và cassette sau khi cắt bằng *NotI* và *PaeI*.

Ba cassette PHygT12 (của gene lipase số 12), PHygT13 (gene lipase số 13) và PHygT14 (gene lipase số 14) được đưa vào vector nhân dòng pGEM-T có kích thước 3100 bp và sau đó được chuyển vào *E. coli* DH5 α , nuôi cấy, tách chiết và tinh sạch lượng lớn plasmid.

Plasmid sau tinh sạch được cắt bằng *NotI* và *PaeI* (hai enzyme trong vector nhân dòng pGEM-T) để thu lượng lớn cassette PHygT dùng cho biến nạp (Hình 3.49). Để có hiệu quả cao cho quá trình trao đổi chéo và phá bỏ gene lipase trong *F.graminearum*, cassette PHygT phải được cắt hoàn toàn ra khỏi vector pGEM-T.

3.3.4.2 Biến nạp vào *F. graminearum* và chọn lọc các thể biến nạp

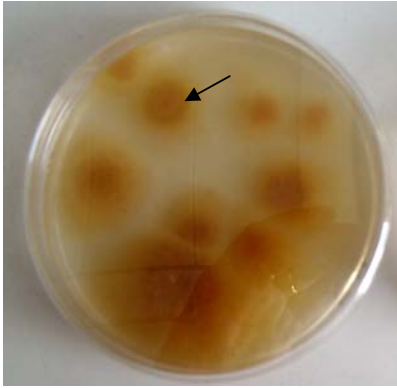
Khoảng 25 μ g DNA cassette được dùng để biến nạp. Các đĩa biến nạp được ủ ở 28°C khoảng 3-4 ngày cho đến khi các thể biến nạp mọc (Hình 3.50).

Các thể biến nạp mọc ngai hấn lên lớp agar phủ có chứa hyg sẽ được cấy chuyển sang đĩa môi trường CM có bổ sung hygromycin với nồng độ 100 μ g/ml, ủ ở 28°C để kiểm tra xem thể biến nạp có kháng được hygromycin thực sự không. Nếu thực sự kháng được thì sau 3-4 ngày thể biến nạp sẽ mọc kín đĩa (Hình 3.51). Và tổng số các thể biến nạp thu được được thống kê trong bảng 3.13.

Bảng 3.13. Kết quả biến nạp.

Mẫu	Tổng số các thể biến nạp thu được
Fgl12	11
Fgl13	30
Fgl14	40

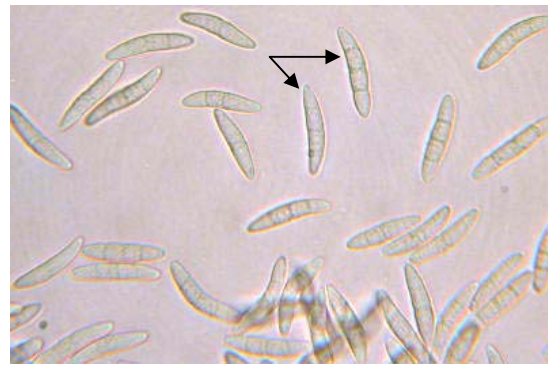
Tiếp theo các thể biến nạp sau khi mọc kín trên đĩa CM+Hyg sẽ được chọn dòng lại bằng cách chuyển sang môi trường SNA để tạo bào tử, sau đó sẽ nhặt từng bào tử riêng rẽ. Thể bào tử sẽ được hình thành trên môi trường tối thiểu SNA sau khoảng 3-4 ngày ở điều kiện nhiệt độ 24°C (Hình 3.52).



Hình 3.50. Các thể biến nạp mọc trên lớp agar phủ có chứa Hyg sau 6 ngày.



Hình 3.51. Các thể biến nạp sau 4 ngày cấy chuyển lên đĩa môi trường CM+Hyg.



Hình 3.52. Sự hình thành bào tử của *F.graminearum* trên môi trường SNA.



A



B

Hình 3.53. Hình dạng của nấm *F.graminearum* đại và thể biến nạp

(Hình 53B). Sự thay đổi màu sắc này là do sự có mặt của gene mã hóa Hyg.

Các bào tử sau đó được cấy trở lại môi trường CM+Hyg, ủ 28°C và trong khoảng 3-5 ngày là mọc kín đĩa (Hình 53). Chủng *F.graminearum* đại mọc đối xứng tỏa tròn và có màu trắng (Hình 53A), còn thể biến nạp cũng có kiểu mọc đối xứng tỏa tròn nhưng có màu đỏ hồng

3.3.4.3 Phân tích thể biến nạp bằng PCR

Các thể biến nạp sau khi được chọn dòng lại từ các bào tử và phát triển tốt trên môi trường CM+Hyg được dùng để nuôi, thu sinh khối, tách DNA, và kiểm tra việc phá bỏ

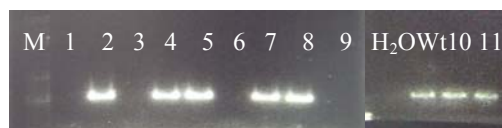
gene lipase bằng cách chạy PCR với cặp mồi được thiết kế để cắt một đoạn bên trong gene lipase có kích thước khoảng 500 bp, và cặp mồi này cũng được sử dụng để làm mẫu dò cho việc kiểm tra việc phá bỏ gene lipase bằng lai Southern.

3.3.4.4 Các thể biến nạp của *Fgl12*

11 thể biến nạp của *Fgl12* được tách DNA (Hình 3.54) và chạy PCR kiểm tra. Kết quả ở hình 55 cho thấy có 4 thể biến nạp bị phá bỏ gene lipase là thể biến nạp số 1, 3, 6, 9.



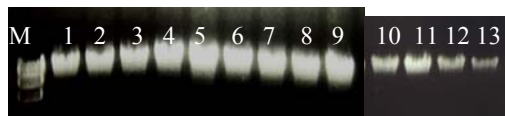
Hình 3.54. Điện di đồ DNA. M (marker λ), 1-10. DNA các thể biến nạp của *Fgl12*, 11. DNA của chủng *F. graminearum* tự nhiên.



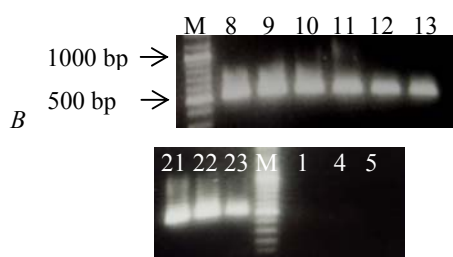
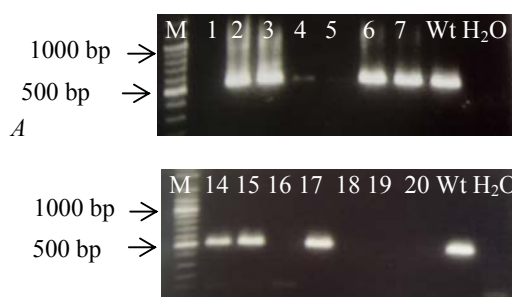
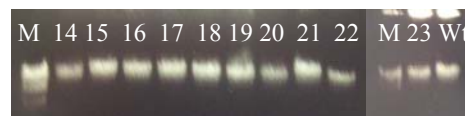
Hình 3.55. Điện di đồ sản phẩm PCR kiểm tra các thể biến nạp của *Fgl12* WT. DNA chủng tự nhiên *F. graminearum*.

3.3.4.5 Các thể biến nạp của *Fgl13*

Chọn 23 thể biến nạp mọc tốt nhất trên môi trường CM+Hyg trong tổng số 30 thể biến nạp để tách DNA (Hình 3.56) và kiểm tra việc phá bỏ gene lipase số 13.



Hình 3.56. Điện di đồ DNA. M (marker λ), 1-23. DNA các thể biến nạp của *Fgl13* WT. DNA chủng đại *F. graminearum*.



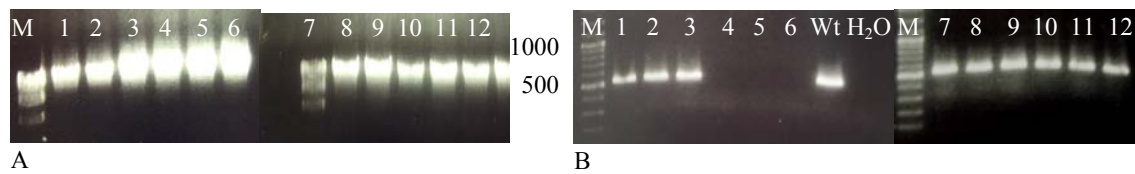
Hình 3.57. Điện di đồ sản phẩm PCR kiểm tra các thể biến nạp của *Fgl13*

Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 3.57) cho thấy các thể biến nạp số 1, 16, 18, 19, 20 đã bị phá bỏ gene lipase. Riêng thể biến nạp số 4 và 5 sản phẩm PCR khá mờ (Hình 3.57A), trong khi lượng khuôn đưa vào để chạy PCR giữa các mẫu là tương

đương. Hiện tượng này có thể là trong quá trình nghiền mẫu tách DNA đã bị lẫn bột nghiền qua găng tay. Để chắc chắn, tôi đã tách lại DNA và chạy kiểm tra PCR lại, kết quả sản phẩm PCR âm tính (Hình 3.57D, làn 1, 4, 5). Như vậy sơ bộ Fgl13 đã chọn được tổng số là 7 thể đột biến.

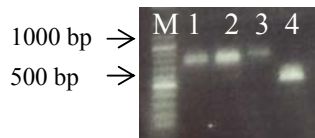
3.3.4.6 Các thể biến nạp của *Fgl14*

Mười hai thể biến nạp tốt nhất trong số 40 thể biến nạp được nuôi cấy và tách DNA (Hình 3.58A) và thể biến nạp số 4, 5, 6 đã bị phá bỏ gene lipase số *fgl14* (Hình 3.58B).



Hình 3.58. Điện di đồ DNA (A) và sản phẩm PCR (B) của các thể biến nạp *Fgl14*, M: marker λ .

3.3.4.7 Kiểm tra các thể đột biến bằng Southern blot



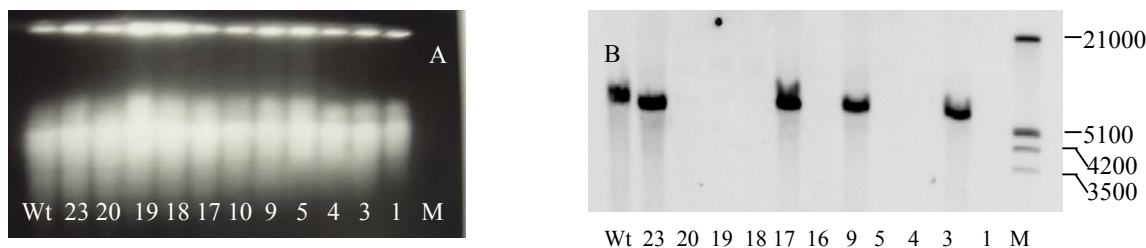
Hình 3.59. Điện di đồ sản phẩm tạo mẫu dò 1, 2, 3. Sản phẩm PCR được gắn thêm Digoxigenin-11-dUTP; 4. Đối chứng.

Để chắc chắn, những thể đột biến này được kiểm tra lại bằng phương pháp Southern blot. Trước tiên, mẫu dò cho 3 loại gene lipase số 12, 13, 14 được tạo ra bằng cách nhân một đoạn khoảng 500 bp trong từng gene lipase từ chủng gốc

F. garaminearum và trong hỗn hợp nhân PCR có bổ sung Digoxigenin-11-dUTP (đã được gắn enzyme) để làm dấu hiệu nhận biết. Hình 3.59 cho thấy kích thước của các đoạn DNA trong phản ứng có bổ sung Digoxigenin-11-dUTP lớn hơn so với trong phản ứng không được bổ sung Digoxigenin-11-dUTP. Điều đó chứng tỏ Digoxigenin-11-dUTP đã gắn được vào đoạn DNA.

Tất cả các thể biến nạp có khả năng đã bị phá bỏ gene lipase sau khi kiểm tra bằng PCR và một số thể biến nạp khác có sản phẩm PCR dương tính được kiểm tra lại bằng Southern blot. Khoảng 20 µg DNA tổng số được cắt bằng enzyme hạn chế, chạy điện di trên gel 0,8% agarose để phân tách thành các băng khác nhau. Sau đó chúng được chuyển lên màng nylon và lai với mẫu dò đặc hiệu đã được gắn Digoxigenin-11-dUTP.

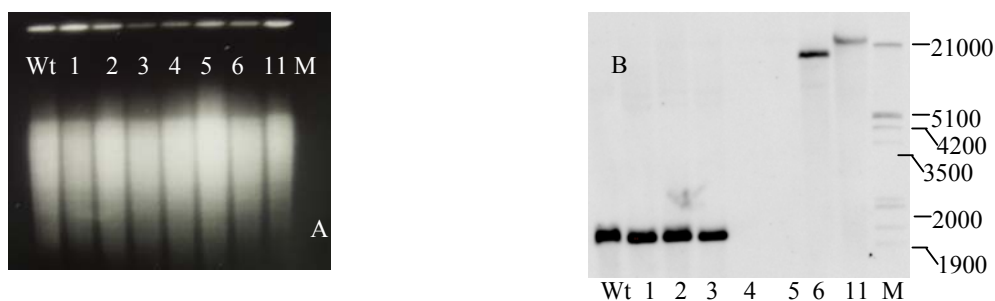
DNA tổng số của *fgl13* được xử lý với *XbaI* (Hình 3.60A). Theo tính toán khi xử lý với *XbaI*, gene lipase *fgl13* của *F. graminearum* nằm trong đoạn DNA có kích thước khoảng 5200 bp. Hình 3.60B cho thấy rằng các thể biến nạp số 1, 4, 5, 16, 18, 19, 20 của Fgl13 có khả năng bị phá bỏ gene lipase sau khi kiểm tra bằng PCR thì đều âm tính. Điều đó có thể khẳng định một lần nữa các thể biến nạp số 1, 4, 5, 16, 18, 20 đã bị phá bỏ gene lipase số 13. Còn các thể biến nạp khác vẫn còn tồn tại gene lipase và chưa bị thay thế bởi cassette PHygT nhưng vẫn mọc được trên môi trường có Hyg, chứng tỏ là cassette PHygT đã đi vào đâu đó trong hệ gene của *F. graminearum*.



Hình 3.60. Kết quả lai Southern với các thể biến nạp của *Fgl13*, (A). Điện di đồ DNA một số thể biến nạp của *Fgl13* sau khi cắt bằng *XbaI* (B). Kết quả lai southern blot

Tương tự đối với Fgl14, DNA tổng số của ba thể biến nạp có khả năng bị phá bỏ gene lipase *fgl14* là 4, 5, 6 và một số thể biến nạp khác có kết quả PCR dương tính được cắt với *XhoI* (Hình 3.61A). Theo tính toán thì gene *fgl14* của *F. graminearum* nằm trong đoạn DNA có kích thước khoảng 6200 bp. Và hình 3.61B cho thấy chỉ có thể biến nạp số 4 và 5 âm tính. Tuy nhiên các thể biến nạp khác lại có kích thước khoảng 1600 bp trong khi theo tính toán đoạn DNA phải có kích thước khoảng 6200 bp. Giả thuyết đưa ra là có thể hỗn hợp *XhoI* đã bị nhiễm một loại enzyme khác trong quá trình làm thí nghiệm hoặc trong quá trình nhân lên trong *E.coli*, cassette bị đột biến điểm và xuất hiện thêm điểm cắt enzyme.

Như vậy Fgl14 đã tạo được 2 thể đột biến khuyết gene lipase số 14.



Hình 3.61. Kết quả lai southern blot với các thể biến nạp của *Fgl14*

3.3.4.8 Kiến nghị

- Lai Southern mẫu *Fgl12*, *Fgl14*
- Làm southern blot cả ba mẫu *Fgl12*, *Fgl13* và *Fgl14* với môi dò của đoạn hygromycin để xem gene *Hyg* đã chèn vào đúng vị trí đích.
- Đánh giá các thể đột biến khuyết gene lipase trên cây trồng trong điều kiện nhà kính.

4 Kết luận và kiến nghị

Kết luận phần khoa học do phía Việt Nam thực hiện. Các kết luận khác về đào tạo, hợp tác ở báo cáo tóm tắt.

1. Từ trên ba trăm chủng vi sinh vật được phân lập từ các mẫu nước thải, nước lò mổ, nước thải ra biển, chúng tôi đã phân lập được hai chủng vi khuẩn *Ralstonia* sp. M1 và chủng nấm *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 có hoạt tính lipase cao nhất trong số các chủng thu được.
2. Tối ưu nuôi cấy và sinh tổng hợp lipase từ hai chủng *Ralstonia* sp. M1 và *Geotrichum* sp. DTQ-26.3. Tinh sạch và đánh giá các tính chất lý hóa của hai lipase tự nhiên từ hai chủng này.
3. Nhân dòng gene mã hóa Gcl từ *Geotrichum* sp. DTQ-26.3, biểu hiện cao ở *P. pastoris*, tinh sạch và đánh giá các tính chất của lipase Gcl tái tổ hợp.
4. Nhân dòng gene mã hóa EstR từ *Ralstonia* sp. M1, biểu hiện ở *E. coli*, tinh sạch và đánh giá các tính chất của EstR tái tổ hợp.
5. Nhân dòng gene mã hóa Fgl4 và Fgl5 từ *Fusarium graminearum*, biểu hiện ở *P. pastoris*, tinh sạch và đánh giá các tính chất của Fgl4 và Fgl5 tái tổ hợp.

6. Phá bỏ gene mã hóa Fgl12, Fgl13 và Fgl14 thành công ở *Fusarium graminearum* tạo ra các chủng *F. graminearum* hỏng gene để nghiên cứu chức năng của các lipase này trong quá trình xâm nhiễm thực vật.
7. Tạo được 52 g chế phẩm lipase thô với hoạt tính 1635 U/g bột.

Định hướng tiếp theo

1. Lên men sản xuất lipase từ chủng tái tổ hợp *P. pastoris* và ứng dụng vào thuộc da cũng như bổ sung vào bột giặt.
2. Tiếp tục nghiên cứu những lipase mới khác.

5 Tài liệu tham khảo

- Baillargeon MW, McCarthy SG (1991) *Geotrichum candidum* NRRL Y-553 lipase: purification, characterization and fatty acid specificity. *Lipids* 26: 831-836.
- Balashev K, Jensen TR, Kjaer K, Bjornholm T (2001) Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces: Part I. Atomic force microscopy. *Biochimie* 83: 387-397.
- Balcao VM, Paiva AL, Malcata FX (1996) Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme Microb Technol* 18: 392-416.
- Beer HD, McCarthy JE, Bornscheuer UT, Schmid RD (1998) Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1399: 173-180.
- Berglund P, Hutt K (2000) *Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases*. In: Patel RN (ed) *Stereoselective biocatalysis*. Marcel Dekker, New York
- Bertolini MC, Laramée L, Thomas DY, Cygler M, Schrag JD, Vernet T (1994) Polymorphism in the lipase genes of *Geotrichum candidum* strains. *Eur J Biochem* 219: 119-125.
- Bertolini MC, Schrag JD, Cygler M, Ziomek E, Thomas DY, Vernet T (1995) Expression and characterization of *Geotrichum candidum* lipase I gene. Comparison of specificity profile with lipase II. *Eur J Biochem* 228: 863-869.
- Brocca S, Schmidt-Dannert C, Lotti M, Alberghina L, Schmid RD (1998) Design, total synthesis and functional over expression of the *Candida rugosa* lip 1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Sci.* 7: 1415-1422.
- Burkert JF, Maugeri F, Rodrigues MI (2004) Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresour Technol* 91: 77-84.
- Catoni E, Schmidt-Dannert C, Brocca S, Schmid RD (1997) Overexpression of lipase A and B of *Geotrichum candidum* in *Pichia pastoris*: High-level production and some properties of functional expressed lipase B. *Biotechnol Tech* 11: 689-695.
- Chapus C, Rovey M, Sarda L, Verger R (1988) Minireview on pancreatic lipase and colipase. *Biochimie* 70: 1223-1234.
- Chartrain M, Katz L, Marcin C, Thien M, Smith S, Fisher F, Goklen K, Salmon P, Brix T, Price K, Greasham R (1993) Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 575-580.
- Cho AR, Yoo SK, Kim EJ (2000) Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol Lett* 186: 235-238.
- Chung HJ, Park SM, Kim HR, Yang MS, Kim DH (2002) Cloning the gene encoding acetyl xylan esterase from *Aspergillus ficuum* and its expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* 31: 384-391.
- Cordenons A, Gonzalez R, Kok R, Hellingwerf KJ, Nudel C (1996) Effect of nitrogen sources on the regulation of extracellular lipase production in *Acinetobacter calcoaceticus* strains. *Biotechnol. Lett.* 18: 633-638.
- Cygler M, Schrag JD, Sussman JL, Harel M, Silman I, Gentry MK, Doctor BP (1993) Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci* 2: 366-382.

- Dartois V, Coppee JY, Colson C, Baulard A (1994) Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 60: 1670-1673.
- Fernández L, Victoria IP, Benítez PL, Morales JC, Velasco J, Adrio JL (2006) High-level expression and characterization of *Galactomyces geotrichum* (BT107) lipase I in *Pichia pastoris* *Prot Exp. Purif* 49: 256-264.
- Fojan P, Jonson PH, Peterson MTN, Peterson SB (2000) What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochemie* 82: 1033-1041.
- Gao R, Feng Y, Ishikawa K, Ishida H, Ando S, Kosugi Y, Cao S (2003) Cloning, purification and properties of a hyperthermophilic esterase from archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *J Mol Catal B: Enzym* 24-25: 1-8.
- Gerritse G, Hommes RW, Quax WJ (1998) Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain. *J Appl Environ Microbiol* 64: 2644-2651.
- Ginalska G, Bancarz R, Kornilowicz-Kowalska T (2004) A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum*-like strain, R59. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31: 177-182.
- Gopinath SCB, Hilda A, Lakshmi priya T, Annadurai G, Anbu P (2003) Purification of lipase from *Geotrichum candidum*: conditions optimized for enzyme production using Box-Behnken design. *World J Microbiol Biotechnol* 19: 681-689.
- Grochulski P, Li Y, Schrag JD, Bouthillier F, Smith P, Harrison D, Rubin B, Cygler M (1993) Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J Biol Chem* 268: 12843-12847.
- Han SJ, Back JH, Yoon MY, Shin PK, Cheong CS, Sung MH, Hong SP, Chung IY, Han YS (2003) Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* species SY-01. *Biochimie* 85: 501-510.
- Hedrich HC, Spener F, Menge U, Hecht H-J, Schmid RD (1991) Large-scale purification, enzymic characterization, and crystallization of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Enzyme Microb Technol* 13: 840-847.
- Hofman K, Bucher P, Falquet L, Bairoch A (1999) The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res* 27: 215-219.
- Horwich AL, Weber-Ban EU, Finley D (1999) Chaperone rings in protein folding and degradation. *Natl. Acad. Sci. Colloq.* 96: 11033-11040.
- Huang Y, Locy R, Weete JD (2004) Purification and characterization of an extracellular lipase from *Geotrichum marinum*. *Lipids* 39: 251-257.
- Iizumi T, Nakamura K, Fukase T (1990) Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric. Biol. Chem.* 54: 1253-1258.
- Jaeger KE, Reetz TM (1998) Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 16: 396-403.
- Janssen PH, Monk CR, Morgan HW (1994) A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its p-nitrophenyl- palmitate esterase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 120: 195-200.
- Kim GJ, Lee EG, Gokul B, Hahm MS, Prerna D, Choi GS, Ryu YW, Ro H-S, Chung BH (2003) Identification, molecular cloning and expression of a new esterase from *Pseudomonas* sp. KCTC 10122BP with enantioselectivity towards racemic ketoprofen ethyl ester. *J Mol Catal B: Enzym* 22: 29-35.

- Kim HK, Park SY, Lee JK, Oh TK (1998) Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 66-71.
- Kim KK, Song HK, Shin DH, Hwang KY, Suh SW (1997) The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* 5: 173-185.
- Kim YS, Lee HB, Choi KD, Park S, Yoo OJ (1994) Cloning of *Pseudomonas fluorescens* carboxylesterase gene and characterization of its product expressed in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 111-116.
- Kohno M, Enatsu M, Yoshiizumi M, Kugimiya W (1999) High-level expression of *Rhizopus niveus* lipase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and structural properties of the expressed enzyme. *Protein Expr Purif* 15: 327-335.
- Kojima Y, Yokoe M, Mase T (1994) Purification and characterization of alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 1564-1568.
- Kok RG, van Thor JJ, Nugteren-Roodzant IM, Brouwer MB, Egmond MR, Nudel CB, Vosman B, Hellingwerf KJ (1995) Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Mol Microbiol* 15: 803-818.
- Ksandopulo GB, Ruban EL (1979) Some properties of lipase from *Geotrichum asteroides*. *Biol Bull Acad Sci USSR* 6: 261-264.
- Kulkarni N, Gadre RV (2002) Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 28: 344-348.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lawson DM, Brzozowski AM, Dodson GG, Hubbard RE (1994) *Threedimensional structures of two lipase from filamentous fungi*. In: *Lipases, their structure, biochemistry and application*. Cambridge University Press, Cambridge
- Lê Thị Thu Giang, Quyền Đình Thi, Vũ Hải Chi (2005) *Biểu hiện cao lipase hoạt hóa chủng Ralstonia sp. M1 trong E. coli BL21 sử dụng hệ thống hai plasmid*. In: Báo cáo KH, Hội nghị KH Toàn quốc 2005. Những Vấn đề NCCB trong KHSS. Nxb KHKT, Hà Nội, pp 209-212.
- Lee D, Kok Y, Kim KJ, Kim B, Choi H, Kim D, Suhartono MT, Pyun Y (1999) Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 179: 393-400.
- Leza A, Palmeros B, Garcia JO, Galindo E, Chavez GS (1996) *Xanthomonas campestris* as a host for the production of recombinant *Pseudomonas aeruginosa* lipase. *J. Ind. Microbiol.* 16: 22-28.
- Lin SF, Chiou CM, Yeh C, Tsai YC (1996) Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1093-1095.
- Makhzoum A, Knapp JS, Owusu RK (1995) Factors affecting growth and extracellular lipase production by *Pseudomonas fluorescens* 2D. *Food Microbiol.* 12: 277-290.
- Manco G, Giosue E, D'Auria S, Herman P, Carrea G, Rossi M (2000) Cloning, overexpression, and properties of a new thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Arch Biochem Biophys* 373: 182-192.

- Martinelle M, Holmquist M, Hult K (1995) On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochim Biophys Acta* 1258: 272-276.
- Martinelle M, Hult K (1994) *Kinetics of triglyceride lipases*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Martinez C, Gues PD, Lauwereys M, Matthyssens G, Cambillau C (1992) *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature* 356: 615-618.
- Mileto D, Brocca S, Lotti M, Takagi M, Alquati C, Alberghina L (1998) Characterization of the *Candida rugosa* lipase system and overexpression of the lip 1 isoenzyme in a non-conventional yeast. *Chem Phys Lipids* 93: 47-55.
- Misset O, Gerritse G, Jaeger KE, Winkler U, Colson C, Schanck K, Lesuisse E, Dartois V, Blaauw M, Ransac S, et al. (1994) The structure-function relationship of the lipases from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *Protein Eng* 7: 523-529.
- Nagao T, Shimada Y, Sugihara A, Tominaga Y (1993) Cloning and sequencing of two chromosomal lipase genes from *Geotrichum candidum*. *J Biochem (Tokyo)* 113: 776-780.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, vonHeijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10: 1-6.
- Noble MEM, Cleasby A, Johndon LN, Egmond MR, Frenken LGJ (1993) The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett* 331: 123-128.
- Ota Y, Sawamoto T, Hasuo M (2000) Tributyrin specifically induces a lipase with a preference for the sn-2 position of triglyceride in *Geotrichum* sp. FO401B. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 2497-2249.
- Pignede G, Wang H, Fudalej F, Gaillardin C, Seman M, Nicaud JM (2000) Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 182: 2802-2810.
- Quyền Đình Thi (2004a) Những kỹ thuật cơ bản trong phân tích DNA. Tập 1:
- Quyền Đình Thi (2004b) *Những ứng dụng của lipase vi sinh vật*. In: Báo cáo KH, Hội nghị KH, Hóa sinh Y Dược năm 2004, Hà Nội 8/2004, pp 123-136.
- Quyền Đình Thi, Lê Thị Thu Giang, Vũ Hải Chi (2005) *Biểu hiện cao lipase hoạt hóa chủng Ralstonia sp. M1 trong E. coli*. In: Báo cáo KH, Hội nghị KH Toàn quốc 2005. Những Vấn đề NCCB trong KHSS. Nxb KHKT, Hà Nội, pp 1393-1396.
- Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Bảy, Mai Thị Thanh, Nguyễn Thị Thảo, Lê Thị Thu Giang, Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Ngọc Dũng (2003a) *Phân lập chủng vi khuẩn sinh tổng hợp lipase từ nước thải và khảo sát hoạt tính lipase của 102 chủng Pseudomonas*. *Di truyền học và ứng dụng* 4/2003: 37-41.
- Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Thảo, Đặng Thị Thu (2002) *Sinh tổng hợp và xác định một số tính chất của lipase Bacillus*. *Tạp chí Di truyền và Ứng dụng* 4/2002: 37-42.
- Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Thảo, Lê Thị Thu Giang, Đào Thị Tuyết, Oh Tae Kuang (2003b) *Sinh tổng hợp, xác định tính chất hóa lý và nhân dòng lipase chủng Ralstonia mannitolilytica M1*. In: Tuyển tập Báo cáo KH. Hội nghị Toàn quốc lần thứ hai: Những Vấn đề NCCB trong KHSS, Huế 25-26/7/2003, pp 1020-1025.

- Quyền Đình Thi, Schmidt-Dannert C, Schmid RD (2001a) Biểu hiện vượt mức và tinh sạch các biến thể chaperone *P. cepacia* ATCC21808 ở *E. coli*. *Kỷ yếu Viện CNSH 2000-2001*: 385-396.
- Quyền Đình Thi, Schmidt-Dannet C, Schmid RD (2001b) Biểu hiện cao và tinh chế các biến thể *Pseudomonas cepacia* chaperone tái tổ hợp mang đuôi C-hexahistidine ở *E. coli*. *Tạp chí KH và CN* 39: 20-29.
- Quyên DT (1998) *Recombinant lipase from Burkholderia cepacia: High-level expression in Escherichia coli and protein engineering*. In: Institute of Technical Biochemistry, Faculty of Biology. University of Stuttgart, Stuttgart, Germany, p 147.
- Quyên DT, Lê TTG, Nguyễn TT, Lee JK, Oh T-K (2004a) *Overexpression of a alkaline and thermophilic lipase from Ralstonia sp. M1 in E. coli*. In, Hanoi, Vietnam
- Quyên DT, Lê TTG, Nguyễn TT, Oh TK, Lee JK (2005a) High-level heterologous expression and properties of a novel lipase from *Ralstonia* sp. M1. *Prot Exp Purif* 39: 97-106.
- Quyên DT, Lê TTG, Nguyễn TT, Oh TK, Lee JK (2005b) High-level heterologous expression and properties of a novel lipase from *Ralstonia* sp. M1. *Prot Expr Purif* 39: 97-106.
- Quyên DT, Nguyễn TT, Lê TTG, Đào TT, Oh T-K (2003a) *Production, Characterization of physicochemical properties of a lipase from Ralstonia mannitolilytica M1 and cloning of its gene*. In: The 2nd National Conference in Life Sciences: Problems in Basic Research in Life Sciences. Science and Technology Publishing House, Hue, Vietnam, pp 1020-1025.
- Quyên DT, Nguyễn TT, Lê TTG, Kim HK, Oh TK, Lee JK (2004b) A novel lipase/chaperone pair from *Ralstonia* sp. M1: analysis of the folding interaction and evidence for gene loss in *R. solanacearum*. *Mol Gen Genomics* 272: 538-549.
- Quyên DT, Nguyễn TT, Lê TTG, Kim HK, Oh TK, Lee JK (2004c) A novel lipase/chaperone pair from *Ralstonia* sp. M1: Analysis of the folding interaction and evidence for gene loss in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Gen Genomics* 272: 538-554.
- Quyên DT, Oh T-k, Lee J-K (2005c) Production and characterization of an extracellular thermophilic, alkaline, highly organic-solvent-resistant and detergent-inducible lipase from *Ralstonia* sp. M1. *Submission to Enzyme Microb. Technol.*:
- Quyên DT, Schmidt-Dannert C, Schmid RD (1999) High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid in vitro refolding. *Appl Environ Microbiol* 65: 787-794.
- Quyên DT, Schmidt-Dannert C, Schmid RD (2003b) High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. *Protein Expr Purif* 28: 102-110.
- Quyên DT, Schmidt C, Schmid RD (2003c) High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. *Prot. Expr. Purif.* 28: 102-110.
- Reetz MT, Jaeger KE (1998) Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. *Chem Phys Lipids* 93: 3-14.
- Rua ML, Schmidt-Dannert C, Wahl S, Sprauer A, Schmid RD (1997) Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus* large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *J Biotechnol* 56: 89-102.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schrag JD, Li Y, Cygler M, Lang D, Hecht HJG, Schmid R, Schomburg D, Rydel TJ, Oliver JD, Strickland LC, Dunaway CM, Larson SB, Day J, McPherson A (1997) The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* 5: 187-202.
- Schrag JD, Li YG, Wu S, Cygler M (1991) Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* 351: 761-764.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotech Advances* 19: 627-662.
- Sharon C, Furugoh S, Yamakido T, Ogawa H, Kato Y (1998) Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 304-307.
- Snellman EA, Sullivan ER, Colwell RR (2002) Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Eur. J. Biochem.* 269: 5771-5779.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.
- Sugihara A, Shimada Y, Tominaga Y (1990) Separation and characterization of two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase. *J Biochem (Tokyo)* 107: 426-430.
- Suzuki T, Nakayama T, Kurihara T, Nishino T, Esaki N (2002) A cold-active esterase with a substrate preference for vinyl esters from a psychrotroph, *Acinetobacter* sp. strain no. 6: gene cloning, purification, and characterization. *J Mol Catal B: Enzym* 16 255-263.
- Sztajer H, Maliszewska I, Wieczorek J (1988) Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme Microb Technol* 10: 492-497.
- Toida J, Fukuzawa M, Kobayashi G, Ito K, Sekiguchi J (2000) Cloning and sequencing of the triacylglycerol lipase gene of *Aspergillus oryzae* and its expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 189: 159-164.
- Topakas E, Stamatis H, Biely P, Kekos D, Macris BJ, Christakopoulos P (2003) Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures. *J Biotechnol* 102: 33-44.
- Turner C, Persson M, Mathiasson L, Adlercreutz P, King JW (2001) Lipase-catalyzed reactions in organic and supercritical solvents: application to fat-soluble vitamin determination in milk powder and infant formula. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 111-121.
- Veeraragavan K, Colpitts T, Gibbs BF (1990) Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochim Biophys Acta* 1044: 26-33.
- Vernet T, Ziomek E, Recktenwald A, Schrag JD, de Montigny C, Tessier DC, Thomas DY, Cygler M (1993) Cloning and expression of *Geotrichum candidum* lipase II gene in yeast. Probing of the enzyme active site by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 268: 26212-26219.
- Vulfson EN (1994) *Industrial applications of lipases*. In: Woolley P, Peterson SB (eds) *Lipases: their structure, biochemistry and applications*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp 271-288.

- Wang Y, Srivastava KC, Shen GJ, Wang HY (1995) Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841). *J Ferment Bioeng* 79: 433-438.
- Woolley P, Peterson SB (1994) *Lipases: their structure, biochemistry and applications*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

PHU LUC

Trình tự P12-Hyg-T12

ATTAATGATGTCGTA CTGCGGATCATTGCCGCATGGATAATTCCAGTCAGACGAGGAGATGT
CTTCTCGCTTGCA GTCTTG CATCCGTTTACAGGGGTTGGTTTTGTGTCCTTGGCGAATACGA
GGGAGGATTCCCTTGATCCCTGTATCGAGATGCCCCGAGGAAGAAGCACATTGATTGGTGAGCA
AAGGCCAACGTCACTGCCAACATTGTCTGTATGAGGGTTTTATCTACATGCAGGTTGACCCT
GTGGGCCGTCAAATCCGATGCCGAAATATTTAAGTGTCAACCAACTATAATTATAAGAGACC
AAGATGTGTTGGGTAAAGGAATAGCCTTGGAATCAAATCAACTGCATGGCTTTATGTCCTGA
TAATTTCTGTTCAAGTCTTCATGATTCTCACAGCAAAACACAATGCTCAGACTTGTCTGAAC
CCAAGTGTAAATCCCATGTGCTTAAACTGTGCAGGGTAAGATAACTTCCCAAAGTTGTTTA
CTCGCTTACACATGTTCAACATTGTTCAACATACCTACTGCAAACAGGCCTACGTCATGCCT
TGTTATCACCACTCACACTTGACTATGAATGTCATGGTTGGGAGATCTGGTAGGGTTTCTAT
TCCTATGAGAGGAGTAACTTGTCTAGTCCAGTCATGCTATCCATTAAGTCACTTTGTGCGCA
CTAAGTAGCATAGACCAAACAGATAGTAGCCAATCCTTTTCCAATCAAGCCTAAGCAATAAA
CCACCTTCCAGATAAAGTGCCAAAAGCGAGAAGTGTGAGTGCCAAGTGATAAGCTTACTTTG
ACTGCCACTATCTAACCCTGCTAGgggggacagctcttgttcggtcggcatctactctatt
cctttgccctcggacgagtgctggggcgctcgggttccactatcggcgagttctacacag
ccatcgggtccagacggccgcgcttctgcgggagatttggtacgcccagagtcgggctcc
ggatcggacgattgcgtcgcacgacctgcgccaagctgcatcatcgaaattgccgtcaa
ccaagctctgatagagttggtcaagaccaatgcggagcatatacgcccggagccgcgcgat
cctgcaagctccggatgcctccgctcgaagtagcgctctgctgctccatacaagccaacca
cggcctccagaagaagatggtggcgacctcgtattgggaatccccgaacatcgctcgtcc
agtcaatgaccgctgttatgcggccattgtccgtcaggacattgttgagccgaaatccgcg
tgcacgaggtgccggacttcggggcagtcctcggcccaaagcatcagctcatcgagagcctg
cgcgacggacgcactgacggtgtcgtccatcacagtttgccagtgatacacatggggatcag
caatcgcgcatatgaaatcacgccatgtagtgtattgaccgattccttgcggtccgaatggg
ccgaaccgctcgtctggctaagatcggccgcagctatcgcatccatggcctccgcgaccgg
ctgcagaacagcgggcagttcgggttccaggcaggtcttgcaacgtgacacctgtgcacggc
gggagatgcaataggtcaggctctcgtcgaattccccaatgtcaagcacttccggaatcggg
agcgcgccgcatgcaaagtgccgataaacataacgatctttgtagaaccatcggcgagct
atttacccgcaggacatatccacgccctcctacatcgaagctgaaagcacgagattcttcgc
cctccgagagctgcatcaggctcggagacgctgtcgaacttttcgatcagaaacttctcgaca
gacgtcgcgggtgagttcagggtggatcaaagggcaggctgctgccctctttcttgcggagga
ctcgtcaaagtaggctccttgcccagaggtggacgcgggggtgacgggtacgttggtga
tgtcgggatggagtgcagggtgagagctttcttggaagcgattgaaggtcgctcgggcttg
ccgtctgtggtatctgtaggggcgctcatggcgattgtaggctgagcacctgttgactata
tcaaagggttagatatcgagcttggatccccactgagagtgatgctttgagagagttaatag
acttgaattgaggaatggaaatcgggctgagctcactgctttatatgtgagaaaaggtgatg
agcaggtggtaagaggcagatttttgtggtcgggtgctgtgtttttgttggtttgagctagg
ccggtgagggaggggcaagctaaatagctaccagccctgaggacgtcacagagttttagtag
ttctttttctgccatcggacatgcagctcacgcctagaccaattacacctttgcgccctc
ccacacatccggccggttgatcattgtcagatacggcagagaaatcgcaacctcggccaag
ggtagccacgattcgaagccgcggagagcaccggaggcggtgaaggtcagcctgggtacctt
ttggtcaagtgggtacactagtcaatgctacatcacccacctcgctccccTGAAGTGAAGC
TATTATGTGCTTTTGA CTGATTA ACTGTGTCTCAGAAACAGGGGAATTTCTCCATTGCGAG
CGACTCGGTGATTAGATTATTACCAAGTCATTAATAATACTTGCAAGCCGATAATAATGACC
TGTATTTTTTAAACTTCTATAGGCTTTATTACCAAGTCCAGCAACTTTACCCCTTCCCACC
CGGCGCCGCCCGTGCTAACCTATTTCTCGGAATTCTGAAAATAGGATATTCCATACCCGCT
TGCACAGGAATAATATTGAACTTGACATAACTGTCAATATTCTCAGGCTCAAGTGCAATAAA
CGCCAAAGCCGCGTTCTGCTGCTTGGTGCTAACATAGAAGCTTCCCACGGGCAGAACACCT

CTCTTATTGTTGTGTTGGTAGTGACAGTGTTCAAGTAGGTACCCTCATACAACTTGGGCTCA
ACGACCGAGGACTCGATAACAAGTGTTCAGAGTTTGGCGGAACTCGTAGTCAAGCTTCTC
AACCTTGAGACCGAGGATCTCTAGTCTCTCAGCAACATCGATCCACGTTCTTGGGATGATGT
AAGCCTCGGGTCTCGCCCGGGTAAGGTTTGCAACAGAAGGGGTGGTTCTCTTGAAGTCGATG
GGAAC TTGTACAACACTACCATTTGCTGATCAATCATTGTGAAAGTCCTGTTTTCGGGGAC
ATAAGAGTCGGTGATAACAATGTCTTTATCGCTGTTGATGAAGTCCTCGCGAGCATTTTCAA
CAATGGACTTGACCTTGTCAGCGTTGTCTCTCGCAAGCTCAAGGATAGTTTGGATCTTGATG
AGAGCGGTAGCGACTCGACGCTGGAAATGTTGGTTGGCGATACGAATGCCACGCATCTCAAG
CAGGAAGGAGATGGTCTG

Trình tự P13-Hyg-T13

ACGAATTCATACCAGAGGAGGATGAACATTTAATTTCTTTTCAAAGTGTTATATTGGAACGT
TTGGGGGTTAATGTGAGAGAAGTATTCTGTTGGAGGTCTCGGTCACAATGGTTTGGTGTGTG
ATTAATGGTGTGTGGAATAGCCACCTGCTGCAGGCAGATTAGGTAGTAATCAGAAACACATT
GTTGTCAAATACTTCTTTCTCTAAGTTTCATCCGTCTTCAAGTACAACCTAGTGAATAAGACT
AGAGTTAGACCAGTATAAATTATAAATGTGTGAGAATCCAAATTGTCTGGTTAATGTCCTGG
TGTTAGCTACCTCAGCATGACCGCCTCTTAGGCTTTGGATGTTGGACAATGTGATGTTACAA
AGTGGAACACACTTACCCTCAGTATGACTTGATAGTATGCCAGGGTTTAACAGGGTGTATGT
CTTTAAGTTGCACCGTCGGCGAACATTAATTAGGACCACCGAACCGAAGCCGAGGCACCAGG
GACAAACGATGCGGGGAACCAAGGCATACTCTTTTCGTCTAGGGACGACTATAATAAACAAA
TATCGTGGATAAACGTTTCATGACGTACCATCGAAGCCCACTTGGACTACGCCAACGATGCC
GTGAAGCCGCGTAGATCTGGACCCCGCGTCATGTTTCCCCAGGTTTCTCCACGTATTACTGG
CTTAGCTCCACTACCCAGATCGAAATTGATAAATATTTACCCAGGCAATGGAAAATGTGGT
CCGTCTTCGGCAGCTCTTGTTATATCGCGACTATATAATGATACTCTCAAGGTAACCAATAG
CCAGAACTGATAGTCTTGGCATTCTGTGgggggacagctcttgttcggtcggcatctactcta
ttcctttgcccctcggacgagtgctggggcgctcgggtttccactatcggcgagctacttctacac
agccatcgggtccagacggccgcgcttctgcgggagatttgtgtacgcccagacagtcgccggt
ccggatcggacgattgcgtcgcacgcacctgcgcccagctgcatcatcgaaattgccgct
aaccaagctctgatagagttggtcaagaccaatgcggagcatatacgcccggagccgcggcg
atcctgcaagctccggatgcctccgctcgaagtagcgcgctctgctgctccatacaagccaac
cacggcctccagaagaagatggtggcgacctcgtattgggaatccccgaacatcgccctcgct
ccagtcacatgaccgctgttatgcggccattgtccgctcaggacattgttgagagccgaatccg
cgtgcacgaggtgccggacttcggggcagtcctcggcccaaagcatcagctcatcgagagcc
tgcgcgacggacgcactgacggtgtcgtccatcacagtttgccagtgatacacatggggatc
agcaatcgcgcatatgaaatcacgccatgtagtgtattgaccgattccttgcggtcgcaatg
ggccgaaccgcgtcgtctggctaagatcgccgcagctatcgcatccatggcctccgcgacc
ggctgcagaacagcgggaggttcgggtttcaggcaggtcttgcaacgtgacacctgtgcacg
gcgggagatgcaataggtcaggctctcgtgaattccccaatgtcaagcacttcgggaatcg
ggagcgcgccgatgcaaagtgccgataaacataacgatctttgtagaaaccatcggcgag
ctattttaccgcgagacatatccacgccctcctacatcgaagctgaaagcacgagattcttc
gccctccgagagctgcatcaggtcggagacgctgtcgaacttttcgatcagaaacttctcga
cagacgtcgcggtgagttcaggtggatcaaagggcaggctgctgccctctttcttgcggag
gactcgtcaaagtaggcccgtcttgcccagaggtggacgcgggggtgacgggtacgttgg
gatgtcgggatggagtgacgggtgagagcttcttgggaagcgattgaaggtcgtcgggct
tgccgtctgtggtatctgtaggggcgtcatggcgattgtaggctgagcacctgttgacta
tatcaaagggttagatatcgagcttggatccccactgagagtgatgctttgagagagttaat
agacttgaattgaggaatggaaatcgggctgagctcactgctttatatgtgagaaaagggtga
tgagcaggtggtaagaggcagatttttgtggtcgggtgctgtgttttgttgggtttgagctag
gtccggtgagggaggggcaagctaaatagctaccagccctgaggacgtcacagagttttagt
agttctttttctgccatcggacatgcagctcacgcctagaccaattacaccctttgcgccc
tcccacacatccggccggttggtatcattgtcagatacggcagagaaatcgcaacctcggcc
agggtagccacgattcgaagccgcggagagcaccggaggcggtgaaggtcagcctgggtacc
ttttggtcaagtggtagactagtcaatgtacatcacccacctcgctccccGAGAAATATT
AAGGCCATCAGGTCTAAACCTCTAAAATCAAACCTTGTACAATGATGGATCCTGAAGCG
ATCGGCCTCATGTTGCTCGTCACCACTTCGGGACGGGTGAGAGGATACAGTGGATGGAACGT
TTTATACTTCAAATCGCTCAGTCGGAAACGGCTCAGTATTACTTAATTTCAACTTCCAGGTT
CTAGTACAACATTACCAGATGCTCTTCTCGATCGGCATCATATTGCTTTTGTAGCGAATCG
GTTATATGAGGTCACCAACTTGTATGTTAGGCGAACAAAGAAGTTCGGCGGAAACTCCAA
CCTACCGAAGCACCTCATAAGCTTTACGACTATGCCCGTAAAGGCTACATTGAATAACGATC
GCCTAATGATGTAGGGTAATATGCAGCTGTTATGGCGTATCGCCGATGAAATTAGACGAGTA

TCTTGCATGGATGGCATCGATCTACCGTAGATTGCACGCACGAGCTTAAATTAGTTGACACA
CTTAGATACACTTGTTGTGAAACGAGAAATCCATGCTTATACTATTGCAAACATAACTTGGT
TTTCAACGTATAAGAATGAGCCTTTTTTTTGGCTTTTACCAGTGCACTATCGGAGGTTAG
TCGGACAGCTGCCTGAAAGTTTCGGGTCCCGTTTTCTGGATCTCATCTTCCGATCCGAGAG
CGAAGCGGTCTGTTCAATGTGCAAGTGCAGGGGTTCTTTGCCATGAGAATTAAGTTCTTGC
TGAGCTCAATGACGGATAAAACGGAAAGAGT

Trình tự P14-Hyg-T14

TGTGACCTTTGACGAGTTGGTTTGTTCGGTTGTCCAGGGTAGCCAAAGTTCAACAGTGCT
GGATAGCGGTTTCTTGCCACGCCTGAGCGTCATCACTATGGACTGACTCCAAGCCACAATAA
GCGAGATATTATTAACAAGACATGATGCAAATGTCTTGCTAGTCATCCATCAAGACACCTC
GGCTTTGACTTACCTAGTGGGTAGCAGAAAAGTTGGCCTCCTAAGTCTTAGGGTATAAAAAAT
AAGTATTCTAAGAAGCTTAGTCTAAGAGCCATAAGATGTCCTAATAATTTTGTCTCTTATGC
TCCTGGCGATCAATTTTTCTAATAACCCTGAGGCTTACACGTCCGGATATGCAAATGCCCATA
TTACAAGTCAAAGCTGAGGCTCTGGCCTAACTACTTTAAGCTTCATGTTGCGCTACCCTTG
TATCGTCAGTGCCAGGATATTTAACTCAACCAATAAGCAGAGTCGAAAATGTAACCCGAT
GGAGTAAGGTCAATATCGCCTCGACGGCTTGCCAGACCTCACGATGACTCTGGTTTGTAT
TGGCTACTTAATGATCTTTGAAGATCGCTGTTCTGTATGTCAAGCTCAACGACACAGCCTTG
CTCCTCCGCTAAAGATGCCAAGCCAAGGTATGATGCTGGCTTATACCCACTGCGGAATGAGT
GTAAGGTAAGCTGTCAGGCTGTTGACGATGTGGTCGAGGCTTGGGATATTCTATATAACGAG
CCTCATGTCTGTCTTCCATTgggggacagctcttggtcggtcggcatctactctatttcctt
tgccctcggacgagtgtggtggcgctcgggttccactatcggcgagtacttctacacagccat
cgggtccagacggccgcgttctgcgggcgatttgtgtacgcccagacgtcccggctccggat
cggacgattgcgtcgcacgcaccctgcgcccagctgcatcatcgaaattgcccgtcaaccaa
gctctgatagagttggtcaagaccaatgcggagcatatacgcccggagccgcggcgatcctg
caagctccggatgcctccgctcgaagtagcggtctgctgctccatacaagccaaccacggc
ctccagaagaagatgttggcgacctcgtattgggaatccccgaacatcgctcgtccagtc
aatgaccgctgttatgcggccattgtccgtcaggacattgttggagccgaaatccgcgtgca
cgaggtgccggacttcggggcagtcctcggcccaaagcatcagctcatcgagagcctgcgcg
acggacgcactgacgggtgtcgtccatcacagtttgccagtgatacacatggggatcagcaat
cgcgcatatgaaatcacgccatgtagtgtattgaccgattccttgcggtccgaatgggcccga
acccgctcgtctggctaagatcggccgcagctatcgcatccatggcctccgcgaccggctgc
agaacacggggcagttcgggttccaggcaggtcttgcaacgtgacaccctgtgcacggcgga
gatgcaataggtcaggctctcgctgaattccccaatgtcaagcacttccggaatcgggagcg
cggccgatgcaaagtgccgataaacataacgatctttagtagaaaccatcggcgagctat
acccgcaggacatatccacgccctcctacatcgaagctgaaagcacgagattcttcgccctc
cgagagctgcatcaggtcggagacgctgtcgaacttttcgatcagaaacttctcgacagacg
tcgcggtgagttcaggtggatcaaagggcaggtgctgcccctcttcttctgctcggaggactcg
tcaaagtaggccgtcttgcccagaggtggacgccgggggtgacgggtacgttgggtgatgtc
gggatggagtgcaggggtgagagcttcttggaagcgattgaaggtcgctcgggcttgccgt
ctgtggtatctgtagggcgctcatggcgattgtaggctgagcacctgttgactatatcaa
agggtagatatcgagcttggatccccactgagagtgatgctttagagagagttaatagactt
gaattgaggaatggaaatcgggctgagctcactgctttatatgtgagaaaaggtgatgagca
ggtggtaagaggcagatttttgtggtcgggtgctgtgttttgttgggtttgagctaggtccgg
tgagggaggggcaagctaaatagctaccagccctgaggacgtcacagagtttttagtagttct
tttctgccatcggacatgcagctcacgcctagaccaattacacccttgcgccctccac
acatccggccggttggatcattgtcagatacggcagagaaatcgcaacctcggccaagggtga
gccacgattcgaagccgcggagagcaccggaggcggtgaaggtcagcctgggtaccttttg
tcaagtggtagactagtcaatgctacatcacccacctcgctccccGCCCTTCCATAGACAT
ACCTCTAATAAAATATAATTACACTAATACTCTTCATAAAGGTAGATTTGTGACAATGAGCC
TCTACCTTGCCGCTTCTCATACATCATTGCTGAGCCAATCAGTCTCGTCGTACACAGCTGA
GGGGAGCACTTGGGTTTTAAGGTTATAAAATTTCTTCATCAAGAGATTAGTAACTGGAAATA
GAAGAAAAGACAGTCTCGTGATGCACGAGAGGTGCTCCTTGTGTACTAGTCCAGGATCCAA
GCTTTGGTCAAGAACTTGCCGACACAAGTTTGTCCACGTCCGCATCCGGAATCCGAGCTCA
CCACGACACCAAGTGCGACGTTTGCCATGCTTCATCTGGCGAAGGATAGGCGAACAGACTAG
ACTTACTTTGTGTTTCTCAGCGACCAGAGTCTCGGCAGTACATGCCGCGGAAGGGTGTGA
GTTTGTAAATATAAGAAGCGACGGCCGATTCCATTAAACGAAGTTTGTCTAGCAGGATTGT

TGGTACATTTGCATTACCATATTGCCATCATCAATCAACGAATGCCGTCAAGTGAATTGAC
GCAACGTATCTTTCTACCATTGTCTAAGACACCCACCATCGCAACCGAAAACGGAACACGAT
GCTATTCACAACAACCCTTATCAGCATTGCATCTCTCTGCCTCGCAAAAGAAGTCACTAAAA
ACCGCAATACCGAACCAGACGCCATCATAGACCA

☐ 1: [EF025925](#). [Reports](#) Geotrichum sp. DTQ-LP20.11 [gi:116563959] [Links](#)

[Features](#)
[Sequence](#)

LOCUS EF025925 588 bp DNA linear PLN 29-OCT-2006
DEFINITION Geotrichum sp. DTQ-LP20.11 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EF025925
VERSION EF025925.1 GI:116563959
KEYWORDS .
SOURCE Geotrichum sp. DTQ-LP20.11
ORGANISM [Geotrichum sp. DTQ-LP20.11](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Dipodascaceae; mitosporic Dipodascaceae; Geotrichum.
REFERENCE 1 (bases 1 to 588)
AUTHORS Quyen,D.T., Nguyen,T.T. and Dao,T.T.
TITLE Screening microbials degrading fats and oils
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 588)
AUTHORS Quyen,D.T., Nguyen,T.T. and Dao,T.T.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-SEP-2006) Enzymology, Institute of Biotechnology, Vietnamese Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet
Road, Distr. Cau Giay, Hanoi 10600, Vietnam
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..588
/organism="Geotrichum sp. DTQ-LP20.11"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="DTQ-LP20.11"
/db_xref="taxon:[408247](#)"
[rRNA](#) <1..>588
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gcatatcaat aagcggagga aaagaaacca acagggattg ccttagtaac ggcgagtgaa
61 gcggcaaaag ctcaaatttg aaatcggcca ccaggctcgag ttgtaatttg tagattgtat
121 cttgagagcg gattaaagtc tgttggaaca cagcgcctta gaggggtgaca gccccgtaaa
181 atctattctc attgtaagat actttcgaag agtcgagttg tttgggaatg cagctctaag
241 tgggaggtaa attccttcta aagctaaata ttgacgagag accgatagcg aacaagtact
301 gtgaaggaaa gatgaaaagc actttgaaaa gagagtgaaa aagtacgtga aattgttaaa
361 aggggaaggt attgaatcag acttggtgct gttgttcaac tgtgtttcgg cacagtgtac
421 tcagcagtac taggccaagg tggggtgttt gggagtgaaa aagaagttgg aacgtaactc
481 ttcggagtgt tatagcctac ttcatagct cctcaggcgc ctcaggactg cgcttcggca
541 aggaccttgg cataatgatt ctataccgcc cgtcttgaaa cacggacc
//

1: [EF061458](#). [Reports](#) [Geotrichum sp. DTQ-26.3](#) [gi:116563957]

[Links](#)

[Features](#)

[Sequence](#)

LOCUS EF061458 1632 bp mRNA linear PLN 29-OCT-2006

DEFINITION *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 lipase mRNA, partial cds.

ACCESSION EF061458

VERSION EF061458.1 GI:116563957

KEYWORDS .

SOURCE *Geotrichum* sp. DTQ-26.3

ORGANISM [Geotrichum sp. DTQ-26.3](#)

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Dipodascaceae; mitosporic Dipodascaceae; *Geotrichum*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1632)

AUTHORS Quyen,D.T., Nguyen,S.L.T. and Dao,T.T.

TITLE Gene cloning, sequencing, expression and characterization of a lipase gene from *Geotrichum* sp. DTQ-26.3

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1632)

AUTHORS Quyen,D.T., Nguyen,S.L.T. and Dao,T.T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (13-OCT-2006) Enzymology, Institute of Biotechnology, Vietnamese Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc

Viet

Road, Distr. Cau Giay, Hanoi 10600, Vietnam

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..1632

/organism="*Geotrichum* sp. DTQ-26.3"

/mol_type="mRNA"

/strain="DTQ-26.3"

/db_xref="taxon:[389671](#)"

[CDS](#)

<1..>1632

/codon_start=1

/product="lipase"

/protein_id="[ABJ99978.1](#)"

/db_xref="GI:116563958"

/translation="QAPTAVLNGNEVISGVLEGKVDTFKGIPFADPPVGDRLRFKHPQP
FTGSYQGLKANDFSSACMLDPGNAFSLLDKVVGLGKILPDNLRGPLYDMAQGSVSMN
EDCLYLNVFRPAGTKPDAKLPMVWIIYGGAFVFGSSASYPGNGYVKESVEMGQPVVVFV
SINYRTGPYGFLGGDAITAEGSTNAGLHDQRKGLEWVSDNIANFGGDPDKVMIFGESA
GAMSVAHQLVAYGGDNTYNGKQLFHSAILQSGGPLPYFDSTSVGPESAYSRFQYAGC
DTSASDNDTLACLRKSSDVLHSAQNSYDLKDLFGLLPQFLGFGPRPDGNIIPDAAYE
LYRSGRYAKVPYITGNQEDEGTILAPVAINATTTPHVKKWLKYICSQASDASLDRVLS
LYPGSWSEGSPFRTGILNALTPQFKRIAAIFTDLLFQSPRRVMLNATKDVNRWYLAT
QLHNLVPFLGTFFHGSDDLQFYVVDLGPSAYRRYFISFANHDPNVGTNLQQRDMYTD
AGKEMLQIHMIGNSMRTDDFRIEGISNFESDVTLFG"

ORIGIN

```

1  caggccccca  cggccggttct  taatggcaac  gaggtcatct  ctggtgtcct  tgagggcaag
61  gttgatacct  tcaagggaaat  cccatttgct  gaccctcctg  ttggtgactt  gcggttcaag
121 cacccccagc  ctttcaactgg  atcctaccag  ggtcttaagg  ccaacgactt  cagctctgct
181 tgtatgcagc  ttgatcctgg  caatgccttt  tctttgcttg  acaaagtagt  gggcttggga
241 aagattcttc  ctgataacct  tagaggccct  ctttatgaca  tggcccaggg  tagtgtctcc
301 atgaatgagg  actgtctcta  ccttaacggt  ttccgccccg  ctggcaccaa  gcctgatgct
361 aagctccccg  tcatggtttg  gatttacggg  ggtgcctttg  tgtttggttc  ttctgcttct
421 taccctggta  acggctacgt  caaggagagt  gtggaaatgg  gccagcctgt  tgtgtttggt
481 tccatcaact  accgtaccgg  cccctatgga  ttcttgggtg  gtgatgccat  caccgtgaa
541 ggcagcacca  acgctggtct  gcacgaccag  cgcaagggtc  tcgagtgggt  tagcgacaac
601 attgccaact  ttggtggtga  tcccgacaag  gtcatagattt  tcggtgagtc  cgctggtgcc
661 atgagtgttg  ctcaccagct  tgttgccctac  ggaggtgaca  acacctacaa  cggaaagcag
721 cttttccact  ctgccattct  tcagtctggc  ggtcctcttc  cttactttga  ctctacttct
781 gttggtcccg  agagtgccta  cagcagattt  gctcagtatg  ccggtatgtga  caccagtgcc
841 agtgataatg  aactctggc  ttgtctccgc  agcaagtcca  gcgatgtctt  gcacagtgcg
901 cagaactcgt  atgatcttaa  ggacctgttt  ggtctgctcc  ctcaattcct  tggatttggt
961 cccagaccgg  acggcaacat  tattcccgat  gccgcttatg  agctctaccg  cagcggtaga
1021 tacgccaagg  ttccctacat  tactggcaac  caggaggatg  aggggtactat  tcttgcccc
1081 gttgctatta  atgctaccac  tactcccat  gttagaagt  ggttgaagta  cattttagc
1141 caggcttctg  acgcttcgct  tgatcgtgtt  ttgtcgctct  accccggctc  ttggtcggag
1201 ggttcaccat  tccgcaactg  tattcttaat  gctcttacc  ctcagttcaa  gcgcattgct
1261 gccattttca  ctgatttgct  gttccagtct  cctcgtcgtg  ttatgcttaa  cgctaccaag
1321 gacgtcaacc  gctggactta  ccttgccacc  cagctccata  acctcgttcc  atttttgggt
1381 actttccatg  gcagtgatct  tctttttcaa  tactacgtgg  accttggtcc  atcttctgct
1441 taccgccgct  actttatctc  gtttgccaac  caccacgacc  ccaacgttgg  taccaacctc
1501 caacagcggg  atatgtacac  tgatgcaggc  aaggagatgc  ttcagattca  tatgattggg
1561 aactctatga  gaactgacga  ctttagaatc  gagggaatct  cgaactttga  gtctgacgtt
1621 actctcttcg  gt

```

//

1: [DQ640273](#). [Reports](#) Geotrichum sp. DT...[gi:108863311]

[Links](#)

[Features](#)

[Sequence](#)

LOCUS DQ640273 588 bp DNA linear PLN 19-JUN-2006

DEFINITION Geotrichum sp. DTQ-26.3 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION DQ640273

VERSION DQ640273.1 GI:108863311

KEYWORDS .

SOURCE Geotrichum sp. DTQ-26.3

ORGANISM [Geotrichum sp. DTQ-26.3](#)

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Dipodascaceae; mitosporic Dipodascaceae; Geotrichum.

REFERENCE 1 (bases 1 to 588)

AUTHORS Quyen,D.T., Dao,T.T., Nguyen,S.L.T. and Truong,T.B.H.

TITLE Cloning, expression and characterization of a lipase from Geotrichum sp. 26.3

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 588)

AUTHORS Quyen,D.T., Dao,T.T., Nguyen,S.L.T. and Truong,T.B.H.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (15-MAY-2006) Enzymology, Institute of Biotechnology, Vietnamese Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc

Viet,

Distr. Cau Giay, Hanoi 10600, Vietnam

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..588

/organism="Geotrichum sp. DTQ-26.3"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="26.3"

/db_xref="taxon:[389671](#)"

[rRNA](#)

<1..>588

/product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gcatatcaat aagcggagga aaagaaacca acagggattg ccttagtaac ggcgagtga
61 gcggcaaaag ctcaaatttg aaatcggcca ccaggtcgag ttgtaatttg tagattgtat
121 cttgagagcg gattaaagtc tggttgaaca cagcgcctta gagggtgaca gccccgtaa
181 atctattctc attgtaagat actttcgaag agtcgagttg tttgggaatg cagctctaag
241 tgggaggtaa attccttcta aagctaaata ttgacgagag accgatagcg aacaagtact
301 gtgaaggaaa gatgaaaagc actttgaaaa gagagtgaag aagtacgtga aattgttaaa
361 aggggaagggt attgaatcag acttggtgct gttgttcaac tgtgttttgg cacagtgtac
421 tcagcagtag taggccaagg tggggtgttt gggagtgaag aagaagttgg aacgtaactc
481 ttcggagtgt tatagcctac ttcatagct cctcaggcgc ctcaggactg cgcttcggca
541 aggaccttgg cataatgatt ctataccgcc cgtcttgaaa cacggacc
```

//

1: [AY320282](#). [Reports](#) Ralstonia mannito...[gi:37136567]

[Links](#)

[Features](#)

[Sequence](#)

LOCUS AY320282 1567 bp DNA linear BCT 21-DEC-2006

DEFINITION Ralstonia mannitolilytica strain M1 esterase gene, complete cds.

ACCESSION AY320282

VERSION AY320282.1 GI:37136567

KEYWORDS .

SOURCE Ralstonia mannitolilytica

ORGANISM [Ralstonia mannitolilytica](#)

Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Ralstonia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1567)

AUTHORS Quyen,D.T., Dao,T.T. and Thanh Nguyen,S.L.

TITLE A novel esterase from Ralstonia sp. M1: Gene cloning, sequencing,

high-level expression and characterization

JOURNAL Protein Expr. Purif. 51 (2), 133-140 (2007)

PUBMED [16893659](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1567)

AUTHORS Quyen,T.D., Tuyet,T.T., Kim,K.H., Oh,K.T. and Lee,K.J.

TITLE Gene cloning, expression and characterization of a novel esterase

from Ralstonia sp. M1

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 3 (bases 1 to 1567)

AUTHORS Quyen,T.D., Tuyet,T.T., Kim,K.H., Oh,K.T. and Lee,K.J.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (10-JUN-2003) Institute of Biotechnology, 18 Hoang Quoc

Viet Road, Cau Giay, Hanoi 10600, Vietnam

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..1567

/organism="Ralstonia mannitolilytica"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="M1"

/db_xref="taxon:[105219](#)"

[CDS](#)

587..1549

/codon_start=1

/transl_table=[11](#)

/product="esterase"

/protein_id="[AAQ83881.1](#)"

/db_xref="GI:34979720"

/translation="MIQTVLIAVALVIAAPVAFTFVIARRVTKAFPPEGKFIDIGADR
VHYTDRGQGPAIVFVHGLCGNLRNFAYLDLERLAQSHRVIVIDRPGSGRSLRGAASTA
NIYQAQARTVAQCIQKLGLDQPVLVGHSLGGAIALAVGLNHPQSVRRALVAPLTHNEH
APPGAFKGLALTSPLARRLVSWTLAVPLSILNSRKAIAAVFAPEAMPEDFPFKGGGLL
GLRPHVFYAASSDLVAAPEDLPDMERRYASMTVPVDVLYGRGDRIINVKRQGEALKQK
LERVNLRVVDGGHMLPVTQPALTTDWILGVAAAVPIQAEAAASA"

ORIGIN

```

1 gatccgcgcc ggcaaggcgt cgatcgccac cgatgaaatc gcccgcgttca ctcccgccgg
61 cctgcagctc aagagcggcg agcatctcga tgcagacgtg gtcgtcacgg ccacgggggt
121 caagctgaag gtgctgggtg gggcgtccat cagcgtcgac ggacgtgcgg tgaacctggc
181 tgacaccgtg tcctacaagg gcatgatgta cagcggcgtg ccgaacctgg cgtcgtcgtt
241 cggctacacc aacgcgtcgt ggacgctcaa ggccgagctg atcgcgcagt acgtgtgccg
301 gctgctgaac cacatgcgct cgggcggcgt cgacacctgc atgccgcgtc tggacgatga
361 ggccatgggc cgcgagccgg ccgtcgatct gacgtcgggc tatatccagc gtgtgccag
421 catcctgcc aagcagggca cgaagcagcc gtggaagtcg tatcagaatt acgcgcgtga
481 cctgatgatg ctgaagtctg gctcgtcggc tgacagcgcc atgcagtctg agcgcgcgc
541 gcaaccgatg ggcgcggcac aagccgctta acgtcacggg ggcatcgtga tccagaccgt
601 cctgattgcc gtcgcgctcg tgatcgacgc gccggtggcg ttcacctttg tcatcgcacg
661 gcgcgtaacc aaggcggttc cggccgaagg caagtctatc gatatcgggg ccgaccgcgt
721 aactacacc gaccgcggcc agggctcctg catcgtgttc gtgcatggcc tatgcggaaa
781 cctgcgcaac ttgcctacc tcgatctgga gcggctggcg caatcgacc gcgtgatcgt
841 gatcgaccgg cccggctccg gacgctcgct gcgcggggcg gcctcgacgg cgaacatata
901 cgcgcaggca cgcacagtcg ccagtgcat ccaaaaactg ggctcgacc aaccggtgct
961 ggtcgggcac tcgctgggcg gtgcgatcgc gctggcgggt gggctgaatc atccgcagtc
1021 ggttcgctcg cttgcgctcg ttgcgccgt cacgcacaac gagcacgcgc cggccggtgc
1081 gttcaagggc ttggcgttga cgtcgccgt ggcgcgcagg ctggtgtcgt ggacgtggc
1141 cgttccgctg tcgatcctca actcgcgcaa ggcgattgca gccgtgtttg cggccgaggc
1201 catgccggag gatttccgt tcaagggcgg cggcctgctg gggctgcgtc cgcacgtgtt
1261 ctatgcggca tcgtcggatc tcgtggccgc gccggaagac ctgcccgaca tggaaacccg
1321 ctatgcctcg atgacggtgc ccgtcgacgt gctgtacggc cggggcgacc gcacctgaa
1381 cgtcaagcgc cagggcgaag cgctcaagca gaagctcgag cgcgtgaacc tgcgggtggg
1441 tgacggcggg cacatgctgc ccgtgacgca gccgcgcgtg acgacggact ggatactcgg
1501 tgtggccgcc gcggtgcccc tacaagccga agccgccgcg tcagcctagc cgcgccgcac
1561 ccagatc

```

//