

**BỘ CÔNG THƯƠNG  
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM**  
-----

**NHIỆM VỤ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ THƯỜNG XUYÊN**

**KHAI THÁC VÀ PHÁT TRIỂN NGUỒN GEN VI SINH VẬT  
CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM**

Chủ nhiệm: PGS. TS. Vũ Nguyên Thành

**7850**  
07/4/2010

Hà nội, tháng 12 năm 2009

**BỘ CÔNG THƯƠNG  
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM**

-----

**NHIỆM VỤ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ THƯỜNG XUYÊN**

**KHAI THÁC VÀ PHÁT TRIỂN NGUỒN GEN VI SINH VẬT  
CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM**

Thực hiện theo hợp đồng số: 05B.09 QG/HĐ-KHCN ngày 3/03/2009 giữa  
Bộ Công Thương và Viện Công nghiệp Thực phẩm

Chủ nhiệm: PGS. TS. Vũ Nguyên Thành

Các thành viên tham gia:

ThS. Ngô Thanh Xuân (*ĐH Sư phạm HN*)  
ThS. Nguyễn Thanh Thủy (*Viện CNTP*)  
CN. Đào Anh Hải (*Viện CNTP*)  
ThS. Đinh Mỹ Hằng (*Viện CNTP*)  
ThS. Nguyễn Hương Giang (*Viện CNTP*)  
TS. Mai Thị Hằng (*ĐH Sư phạm HN*)

Hà nội, tháng 12 năm 2009

## MỞ ĐẦU

Phytase là enzyme phân giải axit phytic (muối phytate) được phát hiện vào năm 1907 và trở thành sản phẩm thương mại năm 1994. Phytase thủy phân muối phytate, giải phóng phospho vô cơ và các yếu tố liên kết với nó như Ca, các ion Fe, Zn, Mg [Simell và CS, 1989]

Ở các động vật nhai lại, axit phytic được phân giải bởi các phytase do khu hệ vi sinh vật (vi khuẩn, nấm) sống trong dạ cỏ tiết ra. Nhưng ở động vật dạ dày đơn (lợn, gia cầm, cá) không có phytase hoạt động trong bộ máy tiêu hóa nên không thể sử dụng các khoáng chất có trong thức ăn hiệu quả, đặc biệt là nguyên tố phospho. Chính vì vậy phospho vô cơ thường được bổ sung trong thức ăn nhằm đáp ứng nhu cầu phospho cho cơ thể vật nuôi. Việc bổ sung phospho vô cơ vào thức ăn gây ô nhiễm môi trường khu vực chăn nuôi do dư thừa lượng phospho thải ra phân động vật. Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy việc bổ sung phytase vi sinh vật vào thức ăn chăn nuôi lợn và gia cầm làm tăng hiệu quả sử dụng phospho và giảm lượng phospho bài tiết trong phân động vật. Như vậy phytase là enzyme ngoài giúp tăng trọng vật nuôi còn góp phần tăng tính thân thiện với môi trường trong ngành chăn nuôi, do giảm lượng phospho vô cơ thải vào môi trường [Wodzinski và Ullah, 1996].

Xu hướng mới của thị trường cho thấy ngày càng nhiều loại enzym được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Các enzym được sử dụng như protease, xylanlase, phytase, amylase, đều là những sản phẩm dinh dưỡng rất mới trên thị trường thức ăn chăn nuôi, và thị phần này đang phát triển mạnh mẽ. Hiện nay chỉ có một lượng nhỏ phytase công nghiệp được sử dụng trong chăn nuôi vì giá thành cao trong sản xuất. Vấn đề làm thế nào để giảm được giá thành trong sản xuất phytase cũng như các loại enzym khác đang là trọng tâm của nhiều nghiên cứu công nghệ vi sinh hiện nay [Janne Kerovuo, 2000].

Một giải pháp cho vấn đề nâng cao năng suất sản sinh enzym là sử dụng vi sinh vật biến đổi gen. Việc tách dòng, nhân dòng và biểu hiện gen phytase đã được đề cập từ lâu nhưng một dạng phytase tối ưu dùng trong sản xuất công nghiệp đang trong quá trình nghiên cứu. Gen phytase được ứng dụng để sản xuất phytase trong công nghiệp đầu tiên là từ *A. niger*. Hiện nay nhiều gen phytase từ *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Aspergillus niger*, *Emericella nidulans*, *Talaromyces thermophilus*, *Aspergillus terreus*, *Myceliophthora thermophila* đã được tách dòng và biểu hiện.

Nhằm khai thác hiệu quả nguồn gene đa dạng và quý hiếm, có trong bộ sưu tập giống thuộc Bộ môn Vi sinh, Viện Công nghiệp Thực phẩm, hướng tới sản xuất enzyme phytase phục vụ ngành chăn nuôi trong nước. Chúng tôi đã thực hiện hướng nghiên cứu này từ năm 2007 và bước đầu đã đạt được một số kết quả đầy triển vọng.

Phát triển những nghiên cứu đã đạt được trong năm 2008 để tiến đến mục tiêu sản xuất phytase tái tổ hợp. Năm 2009, chúng tôi nghiên cứu phát triển nguồn gene vi sinh vật với những nhiệm vụ như sau:

- Tách dòng và giải trình tự 05 gen mã hóa *phyA* từ *Aspergillus niger*
- Xác định số lượng copy của vector tái tổ hợp ở 03 dòng *Pichia pastoris* có hoạt lực phytase cao được biến nạp trong năm 2008
- Xác định điều kiện lên men sinh phytase tái tổ hợp
- Lên men và thu hồi phytase tái tổ hợp ở quy mô phòng thí nghiệm và xác định hoạt lực

# MỤC LỤC

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| <b>MỞ ĐẦU</b> .....                                     | 1  |
| <b>MỤC LỤC</b> .....                                    | 3  |
| <b>KÝ HIỆU VÀ VIẾT TẮT</b> .....                        | 6  |
| <b>TÓM TẮT NHIỆM VỤ</b> .....                           | 7  |
| <b>Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....               | 8  |
| 1.1. Axit phytic .....                                  | 8  |
| 1.2. Enzyme phân giải phytate (phytase).....            | 9  |
| 1.2.1. Nguồn phytase .....                              | 10 |
| 1.2.2. Đặc điểm phytase.....                            | 11 |
| 1.2.3. Ứng dụng của phytase .....                       | 12 |
| 1.3. Nghiên cứu chuyển gene mã hóa phytase .....        | 15 |
| 1.3.1. Gene mã hoá phytase.....                         | 15 |
| 1.3.2. Một số thành tựu chuyển gene mã hóa phytase..... | 16 |
| 1.4. Hệ biểu hiện.....                                  | 18 |
| 1.4.1. Các hệ biểu hiện phổ biến .....                  | 18 |
| 1.4.2. Đặc điểm của hệ biểu hiện P. pastoris.....       | 19 |
| 1.5. Cấu trúc của vector pTZ57R .....                   | 19 |
| 1.6. Công nghệ sản xuất enzyme tái tổ hợp.....          | 21 |
| 1.6.1. Lên men sinh enzyme .....                        | 22 |
| 1.6.2. Thu hồi enzyme .....                             | 23 |
| 1.6.3. Cô đặc enzyme.....                               | 26 |
| 1.6.4. Tinh chế enzyme.....                             | 28 |
| 1.6.5. Định dạng sản phẩm .....                         | 29 |
| <b>Chương 2. THỰC NGHIỆM</b> .....                      | 30 |
| 2.1. Nguyên liệu.....                                   | 30 |
| 2.1.1. Chuồng vi sinh vật.....                          | 30 |
| 2.1.2. Plasmid .....                                    | 30 |

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.3. Hóa chất.....                                                                           | 30 |
| 2.1.4. Môi trường nuôi cấy và dung dịch đệm .....                                              | 31 |
| 2.1.4.1. Môi trường nuôi cấy .....                                                             | 31 |
| 2.1.4.2. Dung dịch đệm.....                                                                    | 31 |
| 2.1.5. Thiết bị.....                                                                           | 32 |
| 2.2. Phương pháp nghiên cứu .....                                                              | 32 |
| 2.2.1. Tách chiết ADN.....                                                                     | 32 |
| 2.2.1.1. Tách chiết ADN genome của <i>Aspergillus</i> và <i>Pichia</i> .....                   | 32 |
| 2.2.1.2. Tách chiết plasmid.....                                                               | 32 |
| 2.2.2. PCR.....                                                                                | 33 |
| 2.2.3. Xác định trình tự gene .....                                                            | 33 |
| 2.2.4. Ghép nối plasmid.....                                                                   | 34 |
| 2.2.5. Biến nạp ADN vào <i>E. coli</i> bằng sốc nhiệt.....                                     | 34 |
| 2.2.6. Tuyển chọn dòng mang gene biến nạp .....                                                | 35 |
| 2.2.7. Xác định hoạt tính phytase .....                                                        | 35 |
| 2.2.8. Phương pháp xác định protein tổng số (Bradford) .....                                   | 37 |
| <b>Chương 3. KẾT QUẢ VÀ BÌNH LUẬN</b> .....                                                    | 39 |
| 3.1 Tách dòng và giải trình tự gene mã hóa <i>phyA</i> từ <i>Aspergillus niger</i> .....       | 39 |
| 3.1.1. Nhân dòng gene <i>phyA</i> .....                                                        | 39 |
| 3.1.2. Gắn sản phẩm PCR với vector TA .....                                                    | 40 |
| 3.1.3. Kiểm tra sự có mặt <i>phyA</i> trong <i>E. coli</i> bằng PCR colony .....               | 41 |
| 3.1.4. Tách chiết plasmid.....                                                                 | 42 |
| 3.1.5. Kiểm tra sự có mặt <i>phyA</i> trong plasmid tái tổ hợp .....                           | 42 |
| 3.1.6. Giải trình tự các gen <i>phyA</i> từ <i>Aspergillus niger</i> .....                     | 43 |
| 3.2. Xác định số lượng copy của 3 thể biến nạp <i>Pichia pastoris</i> được biến nạp 2008 ..... | 53 |
| 3.2.1. Thiết kế môi cho RT-PCR.....                                                            | 54 |
| 3.2.1.1. Thiết kế môi cho gene chỉ thị .....                                                   | 54 |

|                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.1.2. Thiết kế môi nhân gene đích .....                                                     | 54        |
| 3.2.2. Chuẩn bị nguyên liệu phục vụ định lượng copy.....                                       | 55        |
| 3.2.3. Xác định tính đặc hiệu của cặp mồi thiết kế.....                                        | 56        |
| 3.2.4. Xác định mối tương quan giữa gene chỉ thị và gene đích .....                            | 57        |
| 3.2.4. Kiểm tra xác định số copy ở các chủng.....                                              | 59        |
| 3.3. Xác định điều kiện lên men thu phytase tái tổ hợp .....                                   | 61        |
| 3.3.1. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng của <i>Pichia pastoris</i> .....                        | 61        |
| 3.3.1.1. Khả năng sinh trưởng trên môi trường nhân tạo .....                                   | 61        |
| 3.3.1.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng của <i>Pichia pastoris</i> ...   | 62        |
| 3.3.1.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng sinh trưởng .....                      | 62        |
| 3.3.1.4. Nghiên cứu thay thế môi trường YPD.....                                               | 63        |
| 3.3.2. Nghiên cứu khả năng biểu hiện của <i>Pichia pastoris</i> .....                          | 64        |
| 3.3.2.1. Ảnh hưởng sinh khối từ các môi trường đến khả năng biểu hiện .....                    | 64        |
| 3.3.2.2. Khả năng biểu hiện hoạt tính trực tiếp môi trường YPD .....                           | 65        |
| 3.4. Nghiên cứu qui trình thu hồi phytase ở qui mô phòng thí nghiệm.....                       | 66        |
| 3.4.1. Nghiên cứu qui trình tinh chế phytase từ môi trường nuôi cấy.....                       | 66        |
| 3.4.2. Nghiên cứu qui trình tạo chế phẩm enzyme dạng bột.....                                  | 67        |
| 3.4.3. Nghiên cứu đặc tính của chế phẩm dạng bột.....                                          | 68        |
| 3.5. Nghiên cứu tính miễn cảm với enzyme thủy phân protein trong đường tiêu hóa động vật ..... | 69        |
| 3.6. Nghiên cứu tiêu hóa hai pha trong ống nghiệm ( <i>in vitro</i> ) .....                    | 70        |
| 3.7. Sản xuất thử nghiệm và chuyển giao thử trên động vật .....                                | 72        |
| <b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....</b>                                                              | <b>73</b> |
| <b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>                                                                 | <b>74</b> |
| <b>PHỤ LỤC .....</b>                                                                           | <b>82</b> |

## KÝ HIỆU VÀ VIẾT TẮT

AOX - Alcohol Oxidase

BSA - Bovine Serum Albumin

cDNA – Copy DNA

CNTP – Suu tập giống vi sinh vật Viện Công nghiệp Thực phẩm

CS – Cộng sự

FIRI – Food Industries Research Institute (Viện Công nghiệp Thực phẩm)

ITS – Internal Transcribed Spacer

JCM – Japan Collection of Microorganisms (Bảo tàng giống Vi sinh vật Nhật Bản)

JICA - Japan International Cooperation Agency

kDa – Kilo Dalton

MALDI-TOF – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight (kỹ thuật khối phổ peptid dựa trên sự ion hóa bằng tia laser)

MW – Molecular weight (trọng lượng phân tử)

NMR - Nuclear Magnetic Resonance (cộng hưởng từ hạt nhân)

NRRL - Northern Regional Research Laboratory (hiện là National Center For Agricultural Utilization Research) (Bảo tàng giống Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ)

OD - Optical Density (mật độ quang)

PAGE - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (điện di polyacrylamide)

PCR - Polymerase Chain Reaction (phản ứng trùng hợp chuỗi)

PDA - Potato Dextrose Agar

P<sub>vc</sub> – Phospho vô cơ

RT-PCR - Realtime PCR

SDS- Sodium Dodecyl Sulfate

TCA - Trichloroacetic Acid

U - Unit (đơn vị)

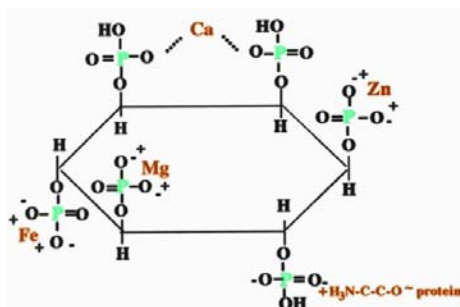
## TÓM TẮT NHIỆM VỤ

| STT | Nội dung công việc                                                                                                                 | Kết quả đạt được                                          |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1.  | Tách dòng và giải trình tự 05 gen mã hóa <i>phyA</i> từ <i>Aspergillus niger</i>                                                   | Có vector mang 05 gen <i>phyA</i> đã giải trình tự        |
| 2.  | Xác định số lượng copy của vector tái tổ hợp ở 03 dòng <i>Pichia pastoris</i> có hoạt lực phytase cao được biến nạp trong năm 2008 | Xây dựng được phương pháp và xác định được số lượng copy  |
| 3.  | Xác định điều kiện lên men sinh phytase tái tổ hợp                                                                                 | Xác định được điều kiện lên men                           |
| 4.  | Lên men và thu hồi phytase tái tổ hợp ở quy mô phòng thí nghiệm và xác định hoạt lực                                               | Có 200 g sản phẩm phytase tái tổ hợp, hoạt lực >2000 IU/g |

# Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

## 1.1. Axit phytic

Axit phytic (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6 - hexakis dihydrogen phosphate; công thức hóa học  $C_6H_{18}O_{24}P_6$ ; phân tử lượng 659,86) là dạng dự trữ photpho chủ yếu ở các cây ngũ cốc, cây họ đậu và các loại hạt chứa dầu. Axit phytic trong thực vật không tồn tại tự do mà thường tạo muối phytate với một số nguyên tố khoáng như Mg, K, Ca, cũng như tham gia liên kết với các protein.



**Hình 1.** Muối phytate và các liên kết với ion kim loại và protein.

Trong hạt cây, axit phytic có thể có những vai trò sinh lý như: (1) Nguồn dự trữ photpho; (2) Nguồn dự trữ năng lượng; (3) Nguồn các ion dương (cation); (4) Nguồn cung cấp *myo*-inositol. Ngoài ra, axit phytic có thể còn có một vài chức năng khác như là chất chống oxy hóa trong giai đoạn nghỉ của hạt [Graf và CS., 1987].

Axit phytic về căn bản tồn tại dưới dạng muối của cation hóa trị một hay cation hóa trị hai (ví dụ như muối K-Mg phytate có trong gạo và muối Ca-K-Mg phytate trong đậu tương). Axit phytic thông thường được tổng hợp trong quá trình chín của hạt và xảy ra đồng thời với sự tổng hợp các hợp chất tích trữ khác như tinh bột và lipid. Trong ngũ cốc và cây họ đậu, axit phytic được tổng hợp trong hạt Aloron (Aleurone) và tinh thể hình cầu [Reddy và CS., 1989]. Phytate hầu như không có mặt trong nội nhũ của lúa mỳ và lúa nước mà tập trung trong mầm và trong lớp vỏ Aloron của tế bào hạt. Ở đậu Hà Lan, 99% phytate của hạt tìm được trong lá mầm và 1% trong phôi mầm. Ngô là loại ngũ cốc có hàm lượng phytate cao nhất (chiếm 0,83 – 2,22% khối lượng hạt). Trong số các cây họ đậu, đậu dolique (dolique beans) có hàm lượng phytate cao nhất (5,92 – 9,15% khối lượng hạt) [Reddy và CS., 1989].

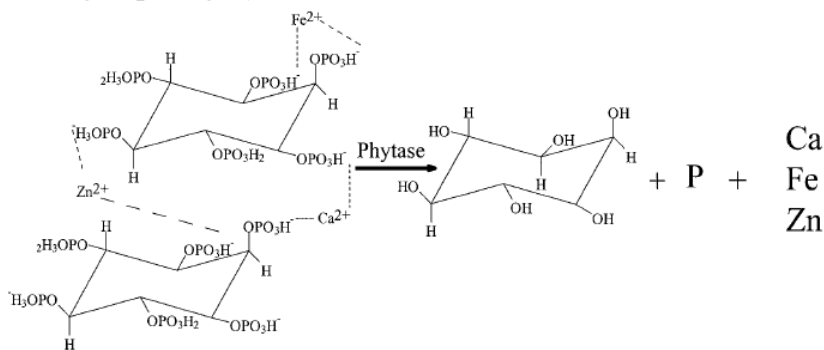
Axit phytic có hiệu ứng kháng dinh dưỡng rất mạnh đối với động vật. Do cấu trúc phân tử đặc biệt (Hình 1), axit phytic có thể liên kết chặt chẽ với protein, các nguyên tố khoáng và tạo thành phức hợp không tan trong đường tiêu hóa. Hiệu ứng này dẫn đến ức chế quá trình tiêu hoá protein và hạn chế khả năng hấp thụ các ion khoáng như Ca, Mg, Zn... [Davies, 1982; Reddy và CS., 1989]. Kẽm là một nguyên

tổ vi lượng mà hoạt tính sinh học của nó bị ảnh hưởng lớn nhất bởi axit phytic. Thử nghiệm trên chuột cho thấy axit phytic bổ sung vào thức ăn làm giảm mạnh khả năng hấp thụ ion  $Zn^{2+}$  và trọng lượng của chuột [Rimbach và Pallauf, 1992].

Axit phytic có thể tương tác với protein trong dải pH rộng để tạo thành phức hợp phytate-protein. Dưới điều kiện pH thấp, axit phytic liên kết chặt chẽ với những protein thực vật khi điểm đẳng điện của những protein này dao động trong khoảng pH 4,0 – 5,0. Trong khoảng pH 6,0 – 8,0, axit phytic và phần lớn protein thực vật tích điện âm. Tuy vậy, trong điều kiện này, sự tạo thành phức hợp giữa axit phytic và protein vẫn khá phổ biến [Cheryan, 1980]. Liên kết giữa protein thực vật với axit phytic làm giảm độ hòa tan, khả năng bị phân cắt của protein và do vậy làm giảm giá trị dinh dưỡng của chúng. Hơn nữa, khi liên kết với muối khoáng, protein, axit phytic vẫn tiếp tục tương tác với các enzyme tiêu hoá như trypsin, pepsin,  $\alpha$ -amylase và  $\beta$ -galactosidase, làm giảm hoạt tính của những enzyme này [Deshp và Cheryan, 1984; Singh và Krikorian, 1982; Inagawa và CS., 1987].

## 1.2. Enzyme phân giải phytate (phytase)

Phytase (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) xúc tác phản ứng thủy phân *myo*-inositol hexakisphosphate (axit phytic) thành những gốc photphat đơn vô cơ và những dẫn xuất đơn giản hơn của *myo*-inositol phosphate. Trong một vài trường hợp phản ứng có thể giải phóng *myo*-inositol tự do (Hình 2).



**Hình 2.** Phản ứng xúc tác của enzyme phytase.

Ủy ban danh pháp enzyme thuộc Hiệp hội Hóa sinh Quốc tế (The Enzyme Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry) phân loại phytase thành hai dạng là:

Dạng 1: kí hiệu (EC 3.1.3.8)

*Tên đề xuất:* 3-phytase

*Tên phân loại:* *myo*-inositol-hexakisphosphate 3 phosphohydrolase

*Tên khác:* phytase; phytate-3-phosphatase

Dạng 2: kí hiệu (EC 3.1.3.26)

*Tên đề xuất:* 6-phytase

*Tên phân loại:* myo-inositol-hexakisphosphate 6 phosphohydrolase

*Tên khác:* phytase; phytate-6-phosphatase

Sự phân loại này dựa trên cơ sở vị trí nhóm photphat đầu tiên bị phytase tấn công. Enzyme 3-phytase (EC 3.1.3.8) tấn công vào nhóm photphat ở vị trí thứ 3; đây là dạng phytase điển hình của vi sinh vật và enzyme 6-phytase (EC 3.1.3.26) tấn công đầu tiên vào nhóm photphat số 6; đây là dạng điển hình cho phytase từ thực vật [Ashima, 2000].

### ***1.2.1. Nguồn phytase***

Phytase rất phổ biến trong tự nhiên, nó đã được tìm thấy từ mô thực vật, động vật và rất nhiều loài vi sinh vật.

#### **Phytase từ vi sinh vật**

Hoạt tính phytase từ vi sinh vật thường thấy nhất ở nấm mốc đặc biệt ở các loài thuộc chi *Aspergillus*. Shieh và Ware (1968) đã phân lập và tuyển chọn từ đất hơn 2000 loài vi sinh vật để sản xuất phytase. Hầu hết các chủng sản sinh phytase nội bào, chỉ có 30 chủng sinh phytase ngoại bào và chúng đều là nấm sợi, trong đó 28 chủng thuộc về chi *Aspergillus*, 1 thuộc về chi *Penicillium* và 1 thuộc về *Mucor*. Trong 28 chủng của chi *Aspergillus* sản sinh phytase, có 21 chủng thuộc về loài *A. niger*. Những nhóm nghiên cứu khác như Howson và Davis (1983), Volfova và CS. (1994) đã khẳng định rằng *A. niger* là loài có khả năng sản sinh phytase ngoại bào tốt nhất.

Phytase cũng đã được tìm thấy trong các nhóm vi khuẩn như: *Aerobacter aerogenes* [Greaves và CS., 1967], *Pseudomonas* sp. [Irving và Cosgrove, 1971], *Bacillus subtilis* [Powar và Jagannathan, 1982], *Klebsiella* sp. [Shah và Parekh, 1990], *B. subtilis* [Shimizu, 1992], *Escherichia coli* [Greiner và CS., 1993], *Enterobacter* sp. [Yoon và CS., 1996] và *B. amyloliquefaciens* [Kim và CS. 1998]. Những vi khuẩn sinh phytase ngoại bào là những chủng thuộc về chi *Bacillus* và *Enterobacter*. Còn phytase từ *E. coli* lại là enzyme nội bào (periplasmic enzyme). Một số nấm men như *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Torulopsis candida*, *Debaryomyces castelii*, *Debaryomyces occidentalis*, *Kluyveromyces fragilis* và *Schwanniomyces castelii*, cũng có khả năng sản sinh phytase [Nayini và Markakis, 1984; Sequeilha CS., 1992; Mochizuki và Takahashi, 1999].

#### **Phytase từ thực vật**

Phytase được tìm thấy rộng rãi trong giới thực vật. Phytase từ một số cây ngũ cốc (lúa mì, ngô, lúa mạch, lúa...), cây họ đậu (cây đậu xanh, đậu lùn, đậu trắng...) đã được tinh sạch và mô tả. Ngoài ra, phytase cũng được tìm thấy trong cây mù tạc trắng, khoai tây, củ cải, rau diếp, rau bina, hạt phấn hoa huệ tây [Dvorakova, 1998].

### Phytase từ động vật

Các nhà khoa học đã chứng minh có sự tồn tại phytase trong cơ thể động vật dạ dày đơn [Bitar và Reinhold, 1972; Copper và Gowing, 1983; Yang và CS., 1991; Chi và CS., 1999]. Tuy nhiên, phytase này trong ruột non động vật dạ dày đơn không có vai trò rõ ràng trong việc phân giải muối phytate từ thức ăn [Williams và Taylor, 1985]. Một enzyme giống như phytase cũng đã được tìm thấy trong động vật nguyên sinh *Paramecium* [Freund và CS., 1992]. Nguồn gốc của một số phytase được thể hiện trong bảng 1.

#### **1.2.2. Đặc điểm phytase**

##### Đặc điểm phân tử

Hầu hết các loại phytase được biết đều là enzyme monome, điển hình như phytase từ nấm [Wyss và CS., 1999; Wodzinski và CS., 1996; Dvorakova và CS., 1997], từ *E. coli* và *K. terrigena* [Greiner và CS., 1993; Greiner và CS., 1997] và từ *B. subtilis* [Shimizu, 1992]. Tuy vậy, một số phytase từ thực vật và động vật được tạo thành từ nhiều tiểu đơn vị. Một loại phytase được tổng hợp ở hạt ngô trong giai đoạn nảy mầm là enzyme dime bao gồm hai tiểu đơn vị kích cỡ 38 kDa [Laboure và CS., 1993]. Trong khi đó, phytase tinh sạch từ ruột non của chuột thể hiện hai băng (band) protein trên SDS-PAGE với trọng lượng phân tử ước tính là 70 và 90 kDa [Yang và CS., 1991]. Tuy vậy, chỉ có tiểu đơn vị 90 kDa có hoạt tính thủy phân axit phytic, có thể hai băng protein là đại diện cho hai enzyme khác nhau (phosphatase kiềm và phytase). Đặc biệt enzyme từ động vật nguyên sinh *Paramecium* có cấu trúc hexame [Freund và CS., 1992].

Phytase vi khuẩn thường nhỏ hơn phytase từ nấm. Kết quả thực nghiệm cho thấy, phytase nấm có khối lượng khoảng 65 và 70 kDa và đã được glycosyl hóa (glycosylation). Phytase từ *A. niger* NRRL 3135 được glycosyl hóa 27%. Nó có đầu N liên kết với chuỗi manose và galactose [Ullah, 1988]. Wyss và CS. (1999) nghiên cứu chỉ ra rằng mức độ glycosyl của phytase tái tổ hợp là không ổn định. Ở *Hansenula polymorpha* và *S. cerevisiae* quá trình glycosyl hóa rất hay thay đổi. Ngược lại, quá trình này của enzyme trong *A. niger* khá ổn định. Điểm đáng chú ý là, sự glycosyl hóa không chỉ khác nhau giữa các loài mà còn khác nhau giữa những lần lên men khác nhau của cùng một chủng.

Nhìn chung, mức độ glycosyl hóa có thể có vài tác động lên đặc tính của enzyme. Đầu tiên, nó có thể ảnh hưởng đến đặc tính xúc tác hoặc tác động đến sự ổn định của enzyme. Thứ hai, nó có thể ảnh hưởng đến điểm đẳng điện của protein (pI). Thứ ba, nó có thể làm giảm mức độ biểu hiện của protein thông qua sự chi phối năng lượng trao đổi [Wyss và CS., 1999].

##### Đặc tính nhiệt độ và pH

Nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của các phytase dao động từ 45 đến 75°C. Wyss và CS. (1998) nghiên cứu sự ổn định nhiệt độ của ba phosphatase có nguồn gốc từ nấm và đã kết luận rằng phytase từ *A. niger* không bền với nhiệt độ hoặc không có khả năng hồi lại hoạt tính sau khi đun nóng gây biến tính. Tại nhiệt độ 50 và 55°C nó mất khoảng 70-80% hoạt tính. Phytase từ *A. fumigatus* cũng không bền với nhiệt độ nhưng có một đặc tính đáng quý là có khả năng hồi lại hoạt tính ban đầu sau 20 phút làm biến tính ở 90°C. So với hai phytase trên thì axit phosphatase từ *A. niger* pH 2,5 có khả năng ổn định với nhiệt độ rất cao; ở nhiệt độ tới 80°C enzyme chưa bị biến tính. Tuy nhiên khi ở 90°C, nó mất hoàn toàn hoạt tính.

Phytase từ chủng *Bacillus* sp. DS11 có nhiệt độ tối ưu ở 70°C, cao hơn nhiệt độ tối ưu của những phytase thông thường. Phytase này cũng rất bền với nhiệt: 100% hoạt tính còn lại sau 10 phút ủ tại 70°C (với sự có mặt của  $\text{CaCl}_2$ ). Khi không có  $\text{CaCl}_2$  khả năng bền với nhiệt của phytase từ *Bacillus* sp. DS11 giảm mạnh, hoạt tính bị mất khi nhiệt độ trên 60°C. Ngược lại khi có mặt của  $\text{CaCl}_2$  nó có thể bền với nhiệt độ lên tới 90°C, sau 10 phút lượng enzyme mất đi khoảng 50% hoạt tính. Nghiên cứu này chỉ ra rằng ion  $\text{Ca}^{2+}$  có khả năng giúp phytase ổn định chống chịu với nhiệt độ cao [Kim và CS., 1998].

pH tối ưu của phytase dao động từ 2,2 đến 8. Hầu hết các phytase từ vi sinh vật, điển hình phytase có nguồn gốc từ nấm có pH tối ưu ở khoảng 4,5 - 5,6. Đặc biệt, khác với hầu hết phytase từ nấm, phytase từ *A. fumigatus* có dải pH tối thích từ 4,0 - 7,3 (còn giữ được ít nhất 80% hoạt tính). Trong khi đó phytase từ *A. niger* NRRL 3135 và từ *Citrobacter freundii* mang đặc điểm khác biệt là có hai giá trị pH tối ưu. Một vài phytase từ vi khuẩn, đặc biệt từ các loài *Bacillus* có pH tối ưu từ 6,5 - 7,5. pH tối thích của enzyme tách ra từ hạt thực vật dao động từ 4,0 - 7, còn hầu hết có pH tối thích ở 4,0 - 5,6. Hai phytase kiềm từ thực vật có pH tối ưu vào khoảng 8,0 đã được nghiên cứu từ hạt ngũ cốc [Scott, 1999] và ở hạt phấn hoa huệ tây [Hara và CS., 1985]

### **1.2.3. Ứng dụng của phytase**

#### **Ứng dụng trong chăn nuôi**

Động vật nhai lại tiêu hóa được muối phytate là nhờ phytase do hệ vi sinh vật sống trong dạ cỏ tiết ra. Phốt phát vô cơ giải phóng trong dạ cỏ sẽ được khu hệ vi sinh vật ở đó và bản thân động vật chủ sử dụng. Tuy nhiên, động vật dạ dày đơn như lợn, gia cầm và cá không có khả năng tiêu hóa axit phytic vì chúng không có hoặc có rất ít phytase trong đường tiêu hóa. Do đó, để đáp ứng nhu cầu phốt pho cho cơ thể vật nuôi, người ta đã bổ sung phốt pho vô cơ vào thức ăn. Điều này sẽ làm tăng chi phí thức ăn và gây ra môi trường bị ô nhiễm phốt phát, đặc biệt đối với ngành nuôi trồng thủy sản. Phốt phát dư thừa trong thức ăn dành cho tôm cá sẽ nhanh chóng hòa tan vào môi trường nước, cộng với muối phytate không được tiêu hoá thải qua phân động vật sẽ bị vi sinh vật sống trong đất phân giải thành phốt phát vô cơ. Đây là điều kiện hết sức thuận lợi cho các loài tảo vì

phốt pho là nhân tố rất phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của sinh vật này. Tảo phát triển quá mức sẽ gây hiện tượng "nước nở hoa", khi đó tảo sử dụng hầu hết oxy hòa tan trong nước khiến các sinh vật thủy sinh (động vật và thực vật) chết hàng loạt [Vũ Duy Giảng, 2004]. Khi bổ sung vào thức ăn chăn nuôi, phytase làm tăng khả năng đồng hóa phốt phát ngay trong chính thành phần của thức ăn, đồng thời làm giảm lượng phốt phát thải qua phân từ đó sẽ có những đóng góp tích cực cho môi trường sinh thái [Đỗ Hữu Phương, 2004]. Đáng chú ý, ở Việt Nam đã bắt đầu có những công trình nghiên cứu ảnh hưởng của phytase đến sinh trưởng của vật nuôi. Trần Quốc Việt và Ninh Thị Len (Viện Chăn nuôi) đã nghiên cứu sử dụng chế phẩm phytase thương mại (Natuphos, BASF) đến năng suất và hiệu quả sử dụng thức ăn của lợn con cai sữa và lợn nuôi thịt. Theo các tác giả, sử dụng phytase giúp lợn tăng trọng 16,4% và giúp giảm chi phí thức ăn được 8% so với lô đối chứng. Tương tự như vậy, năm 2002, Nguyễn Thị Hoài Trâm và CS (Viện Công nghiệp Thực phẩm) đã khảo sát khả năng ứng dụng enzyme phytase thương phẩm trong chăn nuôi gà và cho thấy việc sử dụng phytase làm tăng 2% tỷ lệ đẻ trứng, làm giảm 8,4 - 11,6% chi phí thức ăn cho gà con [Nguyễn Thị Hoài Trâm và CS., 2002].

Người ta dự tính, nếu phytase được sử dụng cho chăn nuôi động vật dạ dày đơn ở Mỹ thì enzyme này sẽ giải phóng lượng phốt phát có trong thức ăn với giá trị tương đương 168 triệu USD và tránh được  $8,23 \times 10^4$  tấn phốt phát dư thừa thải ra môi trường hàng năm. Việc ứng dụng phytase trong chăn nuôi đã được 22 quốc gia thực hiện. Tổ chức FDA (The Food and Drug Administration) đã coi phytase là enzyme an toàn GRAS (Generally Regarded As Safe) [Wodzinski và Ullah, 1996]. Enzyme Finase<sup>®</sup> phytase đã được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi lợn có thành phần là ngô và đậu tương đã giúp cải thiện 1/3 lượng phốt phát khó tiêu trong thức ăn thành lượng phốt phát dễ tiêu [Cromwell và CS., 1995]. Thí nghiệm tương tự với Allzyme Phytase<sup>®</sup> và Natuphos<sup>®</sup> phytase bổ sung vào khẩu phần ăn cho lợn và gà, kết quả thu được cũng chỉ ra rằng phytase cải thiện được giá trị sinh học của muối phytate đối với lợn và gà thịt [Cromwell và CS., 1995; Yi và CS., 1996; O'Quinn và CS., 1997]. Một vài thí nghiệm khác cũng khẳng định rằng có thể thay thế phốt phát vô cơ bằng cách bổ sung phytase từ vi sinh vật vào thành phần của thức ăn cho động vật dạ dày đơn. Ở Hà Lan, phytase từ *A. niger* đã được thử nghiệm thành công vào thức ăn chăn nuôi và làm giảm từ 30 - 40% lượng phốt phát thải qua phân ra môi trường [Jongbloed và CS., 1992].

### Ứng dụng trong công nghệ thực phẩm

Khẩu phần ăn hàng ngày của người chứa nhiều thành phần có nguồn gốc từ các cây ngũ cốc và cây họ đậu. Những người ăn chay thường gặp phải vấn đề mất cân bằng dinh dưỡng do ăn quá nhiều ngũ cốc. Những cư dân ở các quốc gia kém phát triển thường ăn bánh mì chay (loại bánh mì không được bổ sung nấm men) và trẻ em thường hay sử dụng nhiều sản phẩm từ đậu nành. Những thức phẩm này đều có chứa một lượng lớn

muối phytate [Simell và CS., 1989]. Muối phytate không những không thể tiêu hóa được trong đường tiêu hóa của người mà còn gây cản trở sự hấp thụ các nguyên tố khoáng như: kẽm, canxi, magiê và sắt. Nó cũng làm giảm khả năng tiêu hóa protein trong khẩu phần cũng như ức chế các enzyme tiêu hóa khác.

Anno và CS. (1985) đã loại bỏ muối phytate trong sữa đậu nành bằng cách sử dụng phytase từ lúa mì. Bổ sung phytase từ nấm mốc *A. niger* vào bột mì có chứa cám lúa mì đã làm tăng khả năng hấp thụ sắt ở người [Sandberg và CS., 1996]. Như vậy, vai trò quan trọng của phytase với thực phẩm dành cho con người đã khá rõ ràng. Phytase không những làm tăng khả năng tiêu hóa protein mà còn tăng hấp thụ khoáng. Có lẽ trong tương lai không xa enzyme này sẽ được dùng phổ biến như một chất phụ gia cho thực phẩm.

#### Ứng dụng trong tổng hợp các dẫn xuất myo-inositol phosphate

Các dẫn xuất myo-inositol phosphate được ứng dụng rộng rãi trong y học. Inositol phosphate và phospholipid có vai trò nòng cốt trong việc truyền tín hiệu qua màng và duy động nguồn canxi dự trữ trong tế bào [Billington, 1993]. Một số inositol triphosphate được sử dụng để phòng tránh viêm khớp, bệnh hen, hoặc làm thuốc giảm đau [Siren, 1995]. Este của inositol triphosphate được sử dụng làm chất ức chế chống lại sự lây nhiễm các bệnh do nhóm Retrovirus gây ra bao gồm cả HIV [Siren, 1998].

Những ứng dụng dược học của một số myo-inositol phosphate đặc hiệu ngày càng tăng lên. Tuy nhiên, việc tổng hợp bằng con đường hóa học các myo-inositol phosphate này gặp rất nhiều khó khăn, vì qui trình được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ và áp suất rất cao [Billington, 1993]. Từ khi phytase được phát hiện có hoạt tính thủy phân các myo-inositol hexaphosphate thành các dẫn xuất khác nhau thì việc sản xuất myo-inositol tự do từ myo-inositol phosphate được thực hiện bằng con đường sinh học để thay thế phương pháp tổng hợp hóa học. Tổng hợp bằng con đường sinh học mang tính đặc hiệu, cho sản phẩm có độ tinh khiết cao, phản ứng diễn ra trong điều kiện "ôn hòa" hơn. Việc sản xuất D-myoinositol 1,2,6-trisphosphate, D-myoinositol 1,2,5-trisphosphate, L-myoinositol 1,3,4-trisphosphate và myo-inositol 1,2,3-trisphosphate bằng con đường thủy phân axit phytic nhờ phytase từ nấm men *S. cerevisiae* đã được Siren nghiên cứu và thực hiện từ năm 1986. Phytase cố định đã được sử dụng để sản xuất các dẫn xuất myo-inositol phosphate khác nhau [Ullah và CS., 1988; Greiner và CS., 1996].

#### Ứng dụng trong công nghiệp giấy

Việc loại bỏ axit phytic rất quan trọng trong ngành công nghiệp giấy. Cách loại bỏ axit phytic trong thực vật bằng enzyme sẽ không tạo ra những chất có khả năng gây ung thư và những chất thải có độ độc cao, giúp cải thiện môi trường cũng như góp phần vào sự phát triển của công nghệ sạch [Liu và CS., 1998]. Những enzyme bền ở nhiệt độ cao thường được sử dụng để phân giải axit phytic trong quá trình chế biến giấy.

### Ứng dụng trong cải tạo đất

Ở một số vùng, axit phytic và dẫn xuất của nó chiếm tới 50% tổng lượng phốt pho hữu cơ trong đất [Nakamori, 1997]. Nghiên cứu của Findenegg và Nelemans (1993) cho thấy khả năng sinh trưởng của ngô tỷ lệ thuận với mức độ phân giải axit phytic khi bổ sung phytase vào đất trồng. Nghiên cứu này cũng mở ra một hướng trong tương lai có thể chuyển và biểu hiện gene phytase vào rễ cây thực vật nhằm làm tăng giá trị phốt pho dễ tan trong đất.

### **1.3. Nghiên cứu chuyển gene mã hóa phytase**

Trong những năm qua, tiềm năng ứng dụng to lớn của phytase trong nhiều lĩnh vực đã thu hút được sự quan tâm của các công ty công nghệ sinh học và các nhà khoa học. Doanh thu từ phytase năm 2002 đạt 135 triệu USD, con số này đã tăng gấp đôi chỉ trong vòng hai năm. Năm 2006, doanh thu từ phytase đạt 500 triệu USD và ước tính trong mỗi năm tới sẽ tăng thêm 30% [Casey và Walsh, 2004]. Để thu được phytase phù hợp với mục đích ứng dụng, các nghiên cứu một mặt tập trung tuyển chọn nguồn sinh phytase mạnh, tinh sạch và nghiên cứu các đặc tính của phytase; mặt khác ứng dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp để chuyển gene mã hoá phytase vào sinh vật biểu hiện phù hợp.

Nhằm mục đích thu được lượng lớn phytase với hoạt tính cao, đã có rất nhiều nghiên cứu nhân dòng và biểu hiện gene phytase thành công trong các vật chủ biểu hiện khác nhau.

#### **1.3.1. Gene mã hoá phytase**

Trong những năm gần đây, các nhà khoa học đã giải mã trình tự gene phytase của một số chủng nấm. Gene mã hoá phytase từ *A. niger* var. *awamori* có tới hơn 97% tương đồng với phytase gene từ *A. niger* NRRL 3135 (*phyA*). Trình tự *phyA* này có độ tương đồng 65% với phytase gene của *A. fumigatus*, 62% của *A. terreus*, 62% của *E. nidulans*, 61% của *T. thermophilus* và 46% của *M. thermophila*. Gene *phyB* của *A. niger* NRRL 3135 có 99% trình tự tương đồng với gene mã hoá protein tương ứng của *A. niger* var. *awamori*. Điều thú vị là gene mã hoá hai loại phytase của *A. niger* NRRL 3135 (*phyA* và *phyB*) lại chỉ có 25% độ tương đồng [Ashok, 2001]

Gene phytase của *E. coli* và của chuột không có nhiều trình tự tương đồng với gene của *A. niger*. Tuy nhiên, chúng lại có cùng trình tự bảo thủ mã hoá cho trung tâm hoạt động của enzyme [Ullah và CS., 1991]. Thêm vào đó, chúng cùng mã hoá histidine và axit aspartic ở đầu C (C-terminal), những axit amin này tham gia trực tiếp vào phản ứng enzyme. Những phytase này được xếp vào nhóm histidine acid phosphatase.

Hai đoạn gene mã hoá phytase của ngô là *PHYTI* và *PHYTII* có trình tự gần giống nhau nhưng lại rất khác biệt với các gene phytase khác. Tuy nhiên, khi phân tích vùng

gene mã hoá 33 axit amin của *PHYTI* và *PHYTII*, Maugenest và CS. (1997) cũng tìm được sự tương đồng với phytase của *A. niger*. Vùng gene này có lẽ là điểm nhận biết vị trí cắt phốt pho trong axit phytic.

David và CS. (1997) đã phân lập hai đoạn gene mã hoá phytase từ hai loại nấm khác nhau là *A. terreus* và *Myceliophthora thermophila*. So sánh với gene *phyA* của *A. niger*, chúng tương đồng tới 60% với *A. terreus* và 48% với *M. thermophila*. Gene mã hoá phytase của *B. amyloliquefaciens* tương đồng 72% với vùng ORF (mã đọc mở) ở *B. subtilis*. Gene phytase của *Enterobacter* sp. có độ tương đồng 30-38% với *Chryseobacterium meningosepticum* và *Streptococcus equisimilis*, đặc biệt ở vị trí mã hóa lysine và tryptophan [Ashok, 2001].

Phytase từ *B. subtilis* VTT E-68013 (*phyC*) không có điểm tương đồng với các phytase khác, nó cũng không chứa trình tự bảo thủ RHGX<sub>2</sub>XP, mã hoá trung tâm hoạt động của các phytase đã được công bố. Tuy nhiên, enzyme này thể hiện hoạt tính phân cắt liên kết phốt pho trong axit phytic. Có thể đây là một loại enzyme mới [Janne và CS., 1998].

### **1.3.2. Một số thành tựu chuyển gene mã hóa phytase**

Laboure và CS. (1993) đã tinh sạch, mô tả đặc điểm của phytase từ hạt ngô đang nảy mầm và gene mã hóa cũng đã được tách dòng từ cDNA. Nhóm nghiên cứu của Viện Khoa học Nông nghiệp Đan Mạch đã lai tạo thành công lúa mì biến đổi gene với phytase bền nhiệt, bằng cách đưa gene phytase từ *A. fumigatus*. Phytase có lợi cho tiêu hóa do khả năng phân giải Fe-phytate, Zn-phytate, tuy nhiên, phytase của lúa mì bị mất tác dụng khi đun nấu ở nhiệt độ cao. Phytase của chủng lúa mì biến đổi gene bền nhiệt hơn và có hàm lượng tăng gấp 6 lần so với giống chưa biến đổi gene. Một số nghiên cứu tương tự cũng được tiến hành trên lúa với nguồn gene phytase của vi khuẩn [Ashok Pandey, 2001], hoặc trong khoai tây với gene *phyA* từ nấm [Ullah và CS., 2003]. Gene mã hoá phytate từ *B. subtilis* được chuyển vào cây thuốc lá để tăng khả năng sinh trưởng, ra hoa, tăng số lượng quả khi sống trong điều kiện thiếu phốt pho [Wingkin Yip và CS., 2003]. Cũng trong dòng nghiên cứu này gene *phyAI* của *A. ficuum* AS3.324 được chuyển vào tế bào *Nicotiana tabacum*. Lượng phytase tạo ra chiếm tới 17,6% protein tổng số từ lá cây thuốc lá này [Linghua Zhang và CS., 2003].

Craxton và CS. (1997) đã tách dòng và biểu hiện một inositol polyphosphate phosphatase phức tạp từ gan chuột (MIPP) có hoạt tính phytase. mARN của enzyme MIPP này có mặt trong tất cả các mô của chuột, nhưng nó chỉ biểu hiện rõ nhất ở gan và thận. Eric Rodriguez và CS. (1999) đã phân lập gene *appA* mã hoá phytase của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ ruột kết của lợn và biểu hiện trong *P. pastoris*. Tế bào *P. pastoris* tái tổ hợp có khả năng tạo phytase với hoạt tính 130 IU/ml dịch nuôi cấy.

Han và CS. (1999) đã nghiên cứu biểu hiện của gene mã hoá phytase (*phyA*) từ *A. niger* trong *S. cerevisiae*. Ông cho rằng quá trình glycosyl hoá có ảnh hưởng đến hoạt tính cũng như độ bền nhiệt của phytase. Đoạn gene mã hóa phytase có kích thước khoảng 1,4 kb được gắn vào vector pYES2 và biểu hiện trong *S. cerevisiae*. Hoạt tính của phytase tái tổ hợp đạt giá trị tối ưu ở hai điểm pH 2,0 - 2,5 và 5,0 - 5,5; nhiệt độ tối ưu từ 55<sup>0</sup>C - 60<sup>0</sup>C. Khối lượng phân tử của enzyme này khoảng 120 kDa. Việc loại các gốc đường (De-glycosylation) của phytase sẽ làm mất 9% hoạt tính và 40% độ bền nhiệt của enzyme này. Gene *phyA* mã hoá cho phytase của *A. niger* (với hai điểm pH tối ưu là 5,5 và 2,2) cũng đã được biểu hiện trong *E. coli* dưới sự kiểm soát của promoter T7lac [Phillippy và Mullaney, 1997]. Han và Lei (1999) đã nghiên cứu biểu hiện gene *phyA* của *A. niger* trong *P. pastoris*. Đoạn gene với kích thước khoảng 1,4 kb được gắn vào vector biểu hiện pPICZαA với tín hiệu tiết *α-factor* và sự kiểm soát của promoter AOX1. Plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào hai chủng *P. pastoris* X-33 và KM71H. Cả hai chủng này đều sinh một lượng lớn phytase với hoạt tính cao (25-65 IU/ml).

Xiong và CS. (2004) đã chuyển gene có kích thước 1347 bp của *A. niger* SK-57 vào *P. pastoris* và thu được 6,1 g protein tinh khiết, với hoạt tính 865 IU/ml, trên 1 lít môi trường nuôi cấy. Do quá trình glycosyl hoá nên phytase tái tổ hợp thu được có kích thước khác nhau (64, 67, 87, 110 và 120 kDa). Những phân tích hoá sinh cho thấy enzyme này hoạt động tối thích ở pH 2,5 và 5,5; nhiệt độ 60<sup>0</sup>C [Xiong và CS., 2004]. Tương tự như vậy, đoạn gene được ký hiệu là *phyII* phân lập từ chủng *A. niger* 113 có độ tương đồng 90% với *phyA* từ *A. niger* NRRL3135 và 89% với gene *phyA* từ *A. niger* SK-57. Biểu hiện gene *phyII* trong *P. pastoris*, thu được 4,2 g protein tái tổ hợp, hoạt tính 9,5 IU/mg, trên 1 lít môi trường nuôi cấy. Các protein tạo ra cũng có nhiều kích thước khác nhau (120, 95, 85, và 64 kDa), hoạt động tối thích ở pH 2,0 và 5,0; nhiệt độ tối ưu cũng là 60<sup>0</sup>C [Xiong và CS., 2005].

Phytase từ *A. fumigatus* là enzyme chịu được nhiệt độ cao, có tiềm năng ứng dụng lớn. Gene mã hoá enzyme này đã được biểu hiện thành công trong *A. niger*, *Hansenula polymorpha*, *S. cerevisiae* và *P. pastoris* [Eric và CS., 2000]. Trước khi chuyển vào *P. pastoris*, đoạn gene này được gắn vào vector pPICZαA. Rodriguez và CS. (2000) đã thu được 729 mg protein tinh sạch với hoạt tính 43 IU/mg ở pH 5,5 trên 1 lít môi trường nuôi cấy. Với nhiệt độ 90<sup>0</sup>C trong 20 phút, enzyme tái tổ hợp còn giữ được 20-39% hoạt tính. Enzyme này bền với pepsin nhưng lại bị phân huỷ trong điều kiện nồng độ trypsin cao. Phytase thu được từ chủng *A. niger* tái tổ hợp rất bền với nhiệt độ, chỉ mất 10% hoạt tính khi đun ở 100<sup>0</sup>C trong 20 phút. Gene *phyA* từ chủng nấm ưa nhiệt *Thermomyces lanuginosus* cũng đã được tách dòng và biểu hiện trong *Fusarium venenatum*. Phytase tái tổ hợp hoạt động tốt trong khoảng pH rộng từ 3-7,5; duy trì hoạt tính khi nâng nhiệt độ lên tới 75<sup>0</sup>C [Berka, 1998].

Tại Việt Nam trong những năm gần đây cũng đã có một số nghiên cứu tách dòng và tạo phytase tái tổ hợp. Năm 2007 Đỗ Thị Ngọc Huyền đã tách dòng và thể hiện phyC tái tổ hợp từ *Bacillus subtilis* trên *E. coli* và thu được lượng enzyme tái tổ hợp ở nồng độ 288 mg/l, gấp 48 lần phytase từ chủng tự nhiên [Đỗ Thị Ngọc Huyền, 2007]. Năm 2008 Nguyễn Văn Viết thể hiện phyC tái tổ hợp từ *Bacillus subtilis* trên *E. coli* BL21(DE3) đạt tổng năng suất phytase nội bào và ngoại bào là 92 IU/ml.

## **1.4. Hệ biểu hiện**

### **1.4.1. Các hệ biểu hiện phổ biến**

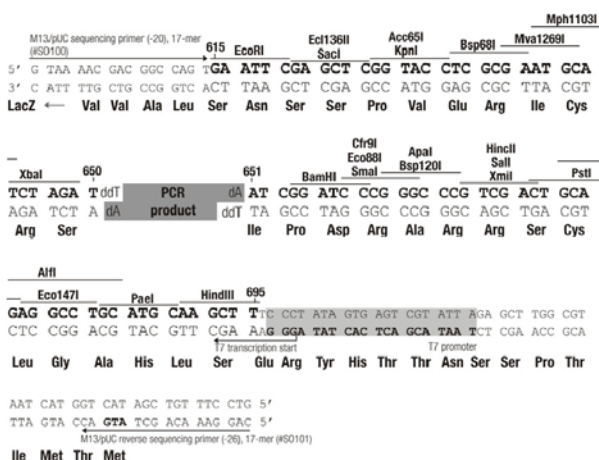
Những hệ biểu hiện phổ biến nhất hiện nay bao gồm *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *A. niger*, và tế bào động vật. Mỗi hệ biểu hiện có những ưu điểm và hạn chế riêng, tùy thuộc sản phẩm protein mà cần lựa chọn hệ biểu hiện phù hợp. *B. subtilis* có khả năng biểu hiện và bài tiết rất tốt protein có nguồn gốc vi khuẩn ra ngoài môi trường nuôi cấy. *E. coli* có thể biểu hiện hầu hết các protein có kích thước vừa phải, không quá kỵ nước hay chứa nhiều gốc cystein. Tuy nhiên, con đường bài tiết protein của *E. coli* có nhiều hạn chế. Hệ biểu hiện *E. coli* và *B. subtilis* đều có chung một nhược điểm là mặc dù có khả năng sản xuất protein của sinh vật nhân chuẩn ở mức độ cao, nhưng những protein này thường không mang hoạt tính hoặc không hòa tan [Joseph Fernandez và CS., 1999]. Hệ biểu hiện trong tế bào động vật có thể biểu hiện các nhóm protein khác nhau và có ý nghĩa đặc biệt trong y dược học, tuy nhiên quá trình chọn lọc, nhân dòng và nuôi cấy tế bào phức tạp hơn nhiều so với các hệ sử dụng vi sinh vật. Hệ biểu hiện trong nấm men là một giải pháp hữu hiệu khắc phục những hạn chế trên.

Nấm men là hệ biểu hiện đang được sử dụng rộng rãi hiện nay bởi nó có rất nhiều ưu điểm. Chúng là sinh vật nhân chuẩn được nghiên cứu rất kỹ về mặt di truyền, có khả năng tích hợp các gene lạ của các sinh vật nhân thực khác vào genome của mình. Ngoài ra, chúng là sinh vật nhân chuẩn duy nhất có khả năng thực hiện được các thao tác kỹ thuật di truyền phân tử dễ dàng như ở *E. coli* và có khả năng phát triển rất mạnh trong môi trường nuôi cấy. Đặc biệt, ở nấm men có quá trình sửa đổi sau dịch mã hoàn thiện để trở thành dạng protein hoạt động và có khả năng tiết protein ra ngoài môi trường hiệu quả [Invitrogen, 2005]. *S. cerevisiae* là chủng nấm men đầu tiên được sử dụng để biểu hiện gene. Tuy vậy, *S. cerevisiae* cũng có một số hạn chế do chưa có hệ vector biểu hiện hữu hiệu, các plasmid dùng để biểu hiện thường là dạng đa phiên bản (multi-copy) nên rất dễ bị đào thải [Joseph Fernandez và CS., 1999]. Từ những hiểu biết kỹ lưỡng về hệ biểu hiện *S. cerevisiae*, hệ biểu hiện *P. pastoris* đã ra đời và khắc phục được những nhược điểm trên.



### Hình 3. Cấu trúc của vector pTZ57R.

Trình tự các nucleotit trong vùng hỗ trợ tách dòng (Multiple Cloning Site)



### >Vector pTZ57R

GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGC  
 CCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATC  
 GGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCA  
 CGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTT  
 GTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCT  
 ATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAAATTAACGCTTACAATTTCCATT  
 CGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGG  
 GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGA  
 ATTCGAGCTCGGTACCTCGCAATGCATCTAGATATCGGATCCCGGGCCGTCGACTCGAGAGGCCGTCATGCAAG  
 CTTTCCCTATAGTACGTTAGAGCTTGGCGTAATCATGTCATAGCTAGCTGTTTCTCTGTGAAATTTGTTATCCGC  
 TCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGTGAGCTAACTCACA  
 TTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACG  
 CGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGC  
 TGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAAC  
 ATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTTCATAGGCTCCGCCC  
 CCTTGACGAGCATCAGAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGT  
 TTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCT  
 TCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCTCATAGCTCAGCGTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTGAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGG  
 CTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACATCGTCTTGTAGTCCAACCCGGTAA  
 GACACGACTTATCGCCACTGCGCAGCAGCACTGGTAACAGGATATGACAGAGCGAGGTATGAGGCGGTGCTACAGAG  
 TTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTAC  
 CTTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGC  
 AGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAAC  
 GAAAACTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATG  
 AAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTA  
 TCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGC  
 TTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCTCACCAGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCA  
 GCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGCTATTAATTTGTTGCGGGG  
 AAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCCAAGCTTGTGTCATTGCTACAGGATCGTGGTGTACGC  
 TCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAA  
 AAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGG  
 CAGCACTGCATAATTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCA  
 TTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAG  
 AACTTTAAAAGTGCTCATATTGGAACCGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCA  
 GTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAA  
 ACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCA  
 ATATTATGGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGACGGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAA  
 TAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAAGTGCCACCT

Ghi chú

**GTAAACGACGGCCAGT** – Vị trí bám mồi M13 forward

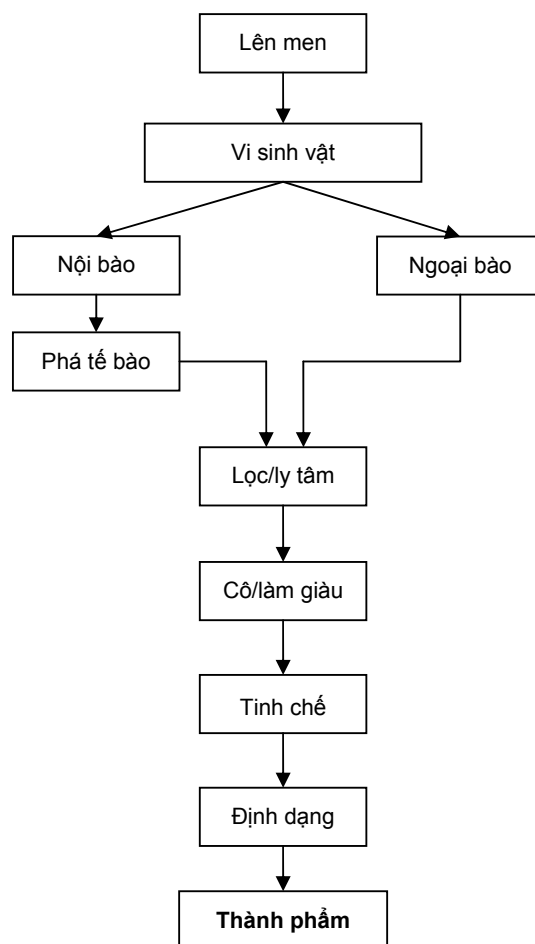
**GTCATAGCTGTTTCCTG** – Vị trí bám mồi M13 reverse

↓ – Vị trí chèn của sản phẩm PCR

Dựa trên sơ đồ về cấu trúc của vector pTZ57R, cặp mồi M13 forward và M13 reverse được dùng để giải trình tự của đoạn gene đích được chèn vào vector.

### 1.6. Công nghệ sản xuất enzyme tái tổ hợp

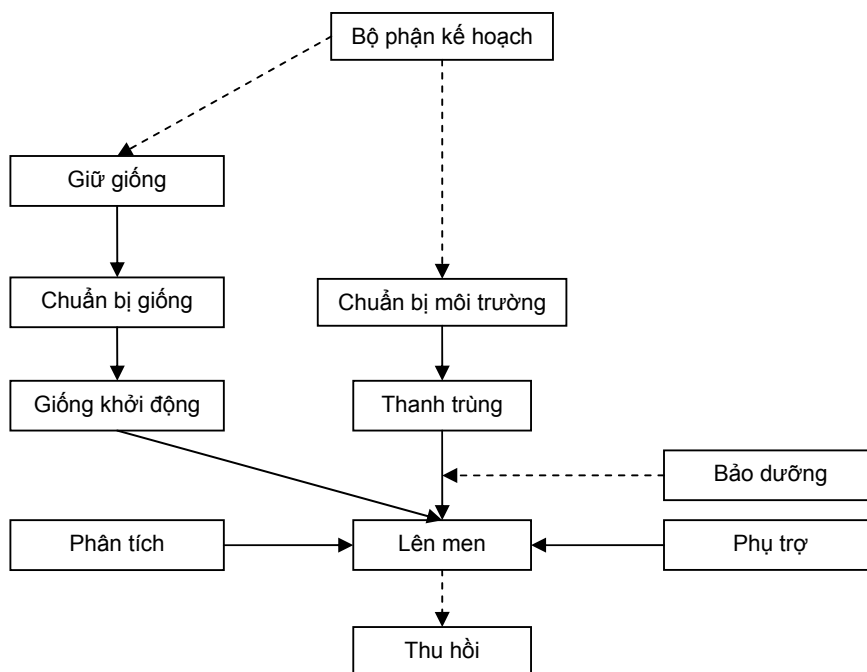
Sản xuất enzyme công nghiệp hiện nay phần lớn dựa trên các chủng tái tổ hợp. Tùy theo từng trường hợp cụ thể, enzyme có thể là nội bào hoặc ngoại bào. Tuy nhiên, công nghệ được lựa chọn chủ yếu vẫn là enzyme ngoại bào do giá thành tinh chế thấp. Các giai đoạn chính trong sản xuất enzyme tái tổ hợp được trình bày trong hình dưới.



**Hình 4.** Các công đoạn chính trong sản xuất enzyme tái tổ hợp từ vi sinh vật.

### 1.6.1. Lên men sinh enzyme

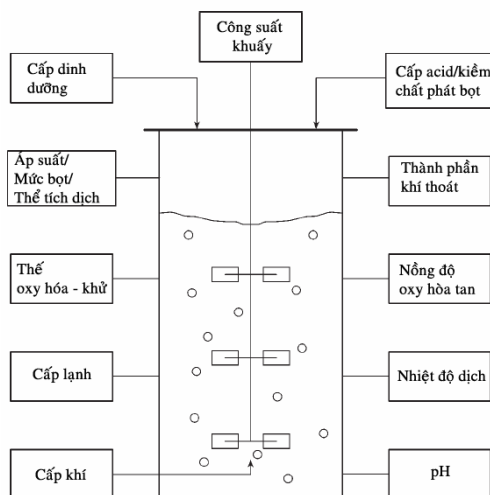
Trong sản xuất enzyme công nghiệp từ vi sinh vật, công nghệ chủ đạo hiện nay là sử dụng chủng sinh enzyme ngoại bào, sử dụng thiết bị lên men chìm, hiếu khí và có cánh khuấy. Chủng giống sinh enzyme nội bào ít khi được sử dụng vì giá thành tinh chế cao. Với nấm mốc, đôi khi công nghệ lên men bề mặt cũng được sử dụng, tuy nhiên công nghệ này cũng gặp nhiều hạn chế do những khó khăn trong tự động hóa và kiểm soát quá trình. Những công đoạn chủ yếu trong lên men được trình bày trong hình 5.



**Hình 5.** Các công đoạn trong lên men sinh enzyme tái tổ hợp.

Thiết kế quá trình lên men là sự kết hợp của nhiều ngành khoa học trong đó có hóa công và sinh lý vi sinh vật. Để đưa sản xuất enzyme từ quy mô phòng thí nghiệm lên quy mô công nghiệp, các thông số cần được điều chỉnh và tính toán. Mặc dù các thông số thích hợp của sản xuất công nghiệp có thể được tính toán dựa trên thông số phòng thí nghiệm, thông thường quá trình vẫn được kiểm nghiệm ở quy mô pilot. Quá trình chuyển chất và truyền nhiệt phụ thuộc rất lớn vào quy mô của nồi lên men và do vậy cần được tính toán và thiết kế phù hợp ở mỗi quy mô. Sản xuất enzyme công nghiệp thường được thực hiện ở quy mô 20-200 m<sup>3</sup>. Trong quá trình lên men, các thông số chủ chốt cần được kiểm soát bao gồm: áp suất, nhiệt độ, pH, nồng độ oxy hòa tan, thế oxy hóa khử, lượng bọt, tốc độ truyền nhiệt, tốc độ hô hấp (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>), hệ số truyền khối và truyền nhiệt (hình 6). Thiết bị lên men có thể được gắn kết với thiết bị khối phổ để xác định thành phần khí thoát để từ đó tính toán tốc độ sử dụng oxy, đào thải CO<sub>2</sub> và cân bằng nguồn carbon.

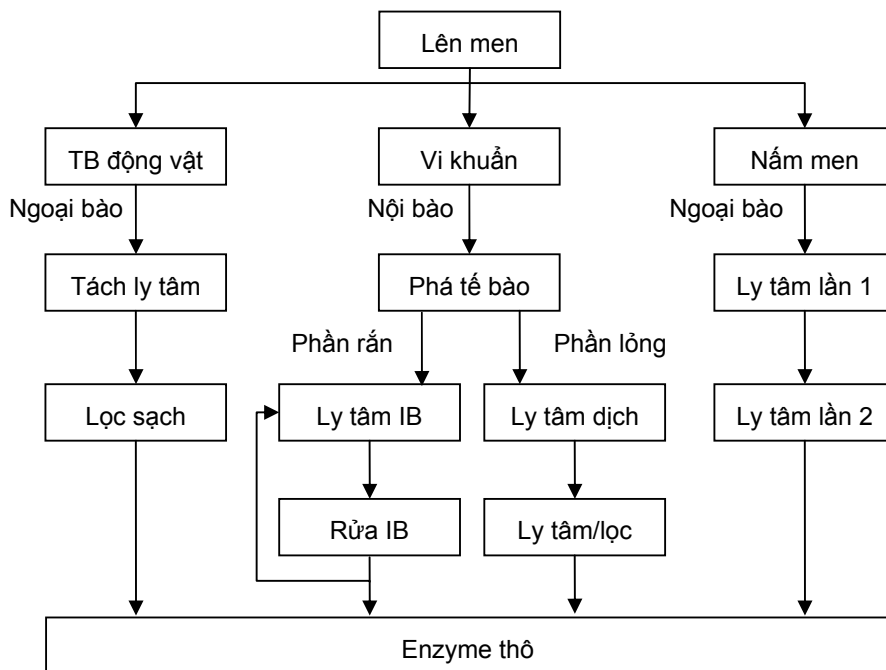
Thiết bị lên men ở các thể tích khác nhau và mức độ tự động hóa khác nhau hiện nay được cung cấp rộng rãi trên thị trường. Trong số đó phải kể tới các nhà sản xuất như Hitachi (Nhật), Marubishi (Nhật), B-Braun (Satorius) (Đức), New Brunswick (Mỹ)...Ngoài ra một số hệ thống lên men tự động khác có chi phí thấp hơn của Bio Top (Đài Loan), Hanson Biotech (Hàn Quốc).



**Hình 6.** Các thông số cần kiểm soát trong thiết bị lên men.

### 1.6.2. Thu hồi enzyme

Sau khi lên men, enzyme tái tổ hợp cần được thu hồi. Sơ đồ thu hồi chung được trình bày trong hình dưới.



**Hình 7.** Các công đoạn thu hồi enzyme tái tổ hợp dạng thô.

### Phá tế bào (với enzyme nội bào)

Sau khi lên men, công đoạn tiếp theo trong sản xuất enzyme là thu hồi enzyme. Trong trường hợp enzyme là nội bào, để thu hồi enzyme tế bào vi sinh vật phải được phá vỡ. Có nhiều phương pháp phá vỡ tế bào hiện được áp dụng ở quy mô công nghiệp. Đồng hóa áp suất cao là công nghệ phổ biến nhất để phá vỡ tế bào vi sinh vật. Sinh khối nén ở áp suất cao được thoát ra và đập vào khuôn va chạm (ví dụ máy đồng hóa Manton-Gaulin). Tế bào vi sinh vật bị phá vỡ bởi lực xé và sự thay đổi áp suất đột ngột. Công suất của hệ thống có thể đạt từ 50-5000 lít/giờ. Áp suất cần thiết để phá vỡ tế bào vi khuẩn vào khoảng 55 MPa. Áp suất cao hơn có thể dẫn tới sự gia nhiệt ( $2.2^{\circ}\text{C}$  với mỗi 10 MPa) và bất hoạt enzyme. Trong trường hợp như vậy việc bố trí hệ thống làm lạnh là cần thiết. Nghiền bi cũng là một công nghệ khá hiệu quả để phá vỡ tế bào vi sinh vật. Trong trường hợp này các viên bi thủy tinh kích thước 0.2 đến 1 mm được sử dụng. Hiệu quả của phương pháp phụ thuộc nhiều vào cấu trúc của hệ thống khuấy. Thông thường hệ thống với các đĩa tròn bố trí đối xứng đem lại hiệu quả tốt hơn so với hệ thống bất đối xứng. Khi các thông số như kích thước bi, tốc độ dòng, và mật độ tế bào được tối ưu hóa, hiệu suất phá tế bào có thể đạt 90% cho một mẻ phá. Ngoài phương pháp cơ học, một số tác nhân khác cũng được sử dụng ví dụ như sử dụng siêu âm, enzyme, chất hoạt động bề mặt...tuy nhiên những tác nhân này chỉ có thể áp dụng cho những trường hợp cụ thể.

### Tách pha rắn

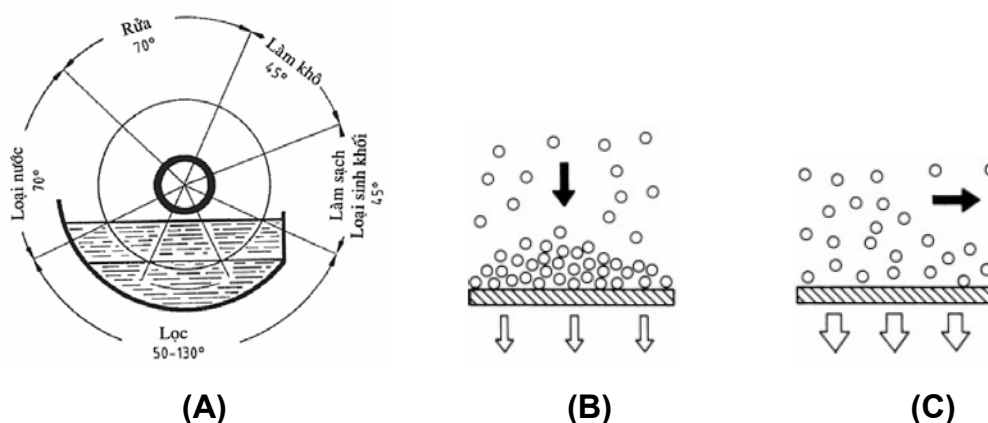
Công đoạn tiếp theo sau khi có enzyme trong dịch huyền phù là tách dung dịch enzyme khỏi pha rắn. Đây là một công đoạn không đơn giản do kích thước rất nhỏ của tế bào vi sinh vật và tỷ trọng của tế bào và dịch lên men không có khác biệt lớn. Các công nghệ tách sinh khối vi sinh vật hiện đang ứng dụng trong công nghiệp bao gồm lọc liên tục, gạn chắt (với tế bào lớn, có khả năng kết dính và kết lắng), và ly tâm.

### Phương pháp lọc

Có 3 kỹ thuật lọc là lọc áp suất, lọc chân không và lọc dòng chảy chéo (cross-flow).

(a) Lọc áp suất: Thường được dùng để lọc dung tích dịch nhỏ hoặc để loại bỏ kết tủa trong quá trình tinh chế. Nhược điểm của phương pháp là không thể sử dụng đối với dung dịch có lượng chất rắn lớn, tuy nhiên lọc áp suất lại rất phù hợp để dung dịch enzyme ở những khâu cuối quá trình tinh chế.

(b) Lọc chân không: Phương pháp lọc chân không được sử dụng tương đối phổ biến. Lọc chân không theo phương pháp lọc lồng quay có thể được áp dụng để lọc liên tục một thể tích dịch lớn. Thông thường dịch trước khi lọc được trộn với bột trợ lọc và bản thân trống lọc cũng được phủ một lớp mỏng bột trợ lọc. Trống được chia thành các phần riêng rẽ phục vụ các mục đích rửa, làm khô sinh khối trên bề mặt. Sinh khối dạng bánh cuối cùng được tách khỏi màng trống bởi một dao gạt.



**Hình 8.** Nguyên lý của một số công nghệ lọc cơ bản. (A) - Lọc trống; (B) – Lọc thông thường (dead end); (C) – Lọc dòng chảy chéo (cross-flow).

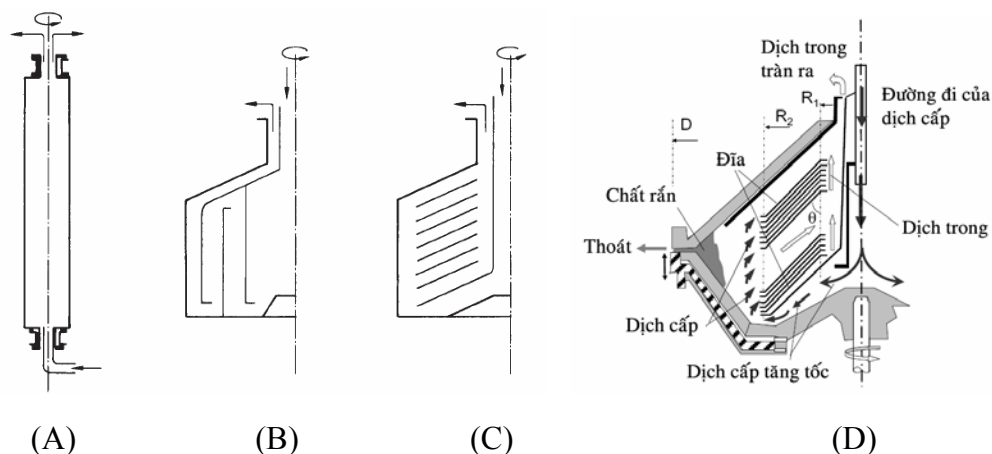
(c) Lọc dòng chảy chéo (cross-flow): Trong công nghệ lọc truyền thống dịch lọc đi vuông góc với bề mặt lọc (hình 8 b), ngược lại, trong phương pháp lọc dòng chảy chéo dịch lọc chuyển động song song với bề mặt lọc và do vậy có thể loại được hiện tượng tích tụ sinh khối và vật chất không tan trên bề mặt và tránh được hiện tượng bít tắc. Tùy theo kích thước màng lọc mà người ta có thể ứng dụng công nghệ lọc trong việc tách sinh khối, cô đặc enzyme... Công nghệ lọc dòng chảy chéo hiện đã được áp dụng ở quy mô công nghiệp, một trong những ví dụ điển hình là công nghệ lọc bia của Alfa Laval.

#### *Phương pháp ly tâm*

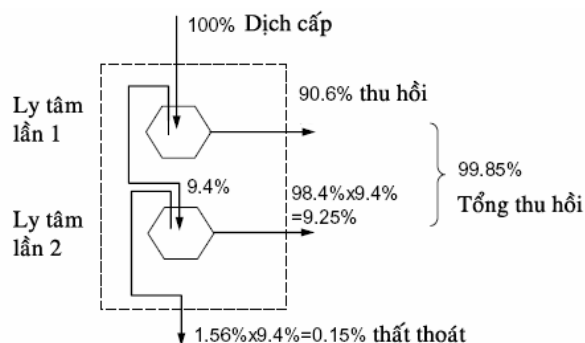
Ly tâm là một phương pháp kinh điển và khá hiệu quả về mặt kinh tế. Trong số những dạng ly tâm phổ biến có dạng sử dụng thành đặc để lưu giữ sản phẩm và thành rạng rây (lưới) cho phép dung dịch lọc qua. Các thiết kế ly tâm rất phong phú nhằm đảm bảo nhu cầu khác nhau của công nghệ. Dạng ly tâm ứng dụng phụ thuộc vào kích thước hạt và hàm lượng chất rắn (bảng 1, hình 9).

**Bảng 1.** Ứng dụng của một số dạng thiết bị ly tâm.

| Loại thiết bị ly tâm                     | Hàm lượng chất rắn | Kích thước hạt, $\mu\text{m}$ |
|------------------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| Ly tâm đa buồng (multichamber separator) | 0–5                | 0.5–500                       |
| Ly tâm vòi (nozzle separator)            | 5–25               | 0.5–500                       |
| Ly tâm rây (sieve centrifuge)            | 5–60               | 5–10 000                      |
| Ly tâm đẩy (pusher centrifuge)           | 20–75              | 100–50 000                    |



**Hình 9.** Một số dạng ly tâm thành đặc phổ biến. (A) – Ly tâm ống; (B) – Ly tâm đa buồng; (C) – Ly tâm đĩa; (D) – Nguyên lý hoạt động của ly tâm đĩa.



**Hình 10.** Các công đoạn và hiệu suất thu hồi enzyme tái tổ hợp dạng thô từ nấm men.

Đối với enzyme tái tổ hợp mà vật chủ là nấm men, bước đầu tiên của quá trình thu hồi là tách dung dịch protein tái tổ hợp khỏi tế bào nấm men sử dụng phương pháp ly tâm. Bước ly tâm tiếp theo nhằm đảm bảo độ trong cần thiết của dung dịch protein. Tế bào nấm men có kích thước trung bình khoảng 4-10  $\mu\text{m}$ . Cả hai loại ly tâm đĩa chồng (disk stack) và ly tâm ống (tubular) đều có thể sử dụng. Hình 10 là một ví dụ về các bước ly tâm và hiệu suất thu hồi dịch enzyme trong sản xuất enzyme tái tổ hợp từ nấm men ở quy mô công nghiệp.

### 1.6.3. Cô đặc enzyme

Nồng độ enzyme trong canh trường sau khi loại bỏ tế bào thường không cao. Dung tích dung dịch cần xử lý là khá lớn và thêm vào đó là những tạp chất cần loại bỏ. Như vậy, để quá trình tinh chế được hiệu quả về mặt kinh tế, dung dịch enzyme cần được cô đặc. Chỉ những biện pháp ôn hòa không làm bất hoạt protein mới được sử dụng. Những

biện pháp này bao gồm xử lý nhiệt (bay hơi), kết tủa, và biện pháp gần đây ngày càng phổ biến hơn là lọc màng.

#### Xử lý nhiệt (bay hơi)

Phương pháp xử lý nhiệt làm bay hơi dung dịch chỉ áp dụng ở nhiệt độ thấp do nguy cơ biến tính enzyme. Các thiết bị cô quay chân không có thể được sử dụng. Tuy nhiên đây không phải là kỹ thuật thực sự phổ biến trong sản xuất enzyme ở quy mô công nghiệp.

#### Kết tủa

Phương pháp kết tủa là một phương pháp tương đối đơn giản để cô đặc enzyme. Các tác nhân kết tủa có thể là muối, phổ biến nhất là  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Enzyme có thể được phân tách tùy theo từng nồng độ muối bổ sung. Nhược điểm của  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  là gây hạn rỉ thiết bị và phức tạp trong xử lý chất thải. Muối  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  cũng có thể được sử dụng tuy nhiên tính tan của muối này không cao và nhiệt độ kết tủa thường phải duy trì ở 35-40°C. Ngoài ra, dung môi hữu cơ như ethanol hoặc acetone cũng thường được sử dụng. Trong trường hợp này các yếu tố như nhiệt độ và nồng độ dung môi cần được kiểm soát chặt chẽ nhằm tránh bất hoạt enzyme. Polyethylen glycols hoặc polyethylenimine là hai polimer phổ biến được sử dụng trong kết tủa protein và enzyme. Nồng độ sử dụng thường trong khoảng 15-20%. Một phương pháp kết tủa enzyme khá hiệu quả về mặt kinh tế là đưa pH dung dịch về điểm đẳng điện của enzyme. Quá trình kết tủa thường được thực hiện ở quy mô nhỏ. Việc mở rộng quy mô có thể gặp một số trở ngại liên quan tới thời gian khuấy và tốc độ khuấy. Hai yếu tố này kết hợp tương đối khó khăn ở quy mô lớn và đều có thể ảnh hưởng tới sự hình thành kết tủa cũng như hoạt độ của enzyme.

#### Lọc màng

Việc sử dụng màng lọc với các kích cỡ lỗ khác nhau trong việc cô đặc enzyme ngày càng phổ biến trong công nghiệp. Tùy theo các kích cỡ hạt mà màng cho phép đi qua có thể chia làm các nhóm như vi lọc (microfiltration) (đối với hạt >1000 Kda hoặc mảnh tế bào), siêu lọc (ultrafiltration) (>10 Kda, cao phân tử) và thẩm thấu ngược (reverse osmosis) (>200 Da). Các kỹ thuật mới như lọc dòng chảy chéo (cross-flow filtration) phát triển gần đây đã hạn chế được những nhược điểm của phương pháp lọc màng như hiện tượng tạo gel trên bề mặt, hiện tượng bám tắc và bít lỗ. Các yếu tố trong quá trình lên men như việc sử dụng chất phá bọt cần được quan tâm vì chúng có thể tương tác và gây cản trở quá trình thẩm thấu qua màng. Kết cấu của màng lọc hiện nay rất đa dạng nhằm đáp ứng quy mô cũng như yêu cầu cụ thể của công nghệ.

#### ***1.6.4. Tinh chế enzyme***

Trong nhiều ứng dụng công nghiệp enzyme thô có thể được trực tiếp sử dụng. Tuy nhiên enzyme phục vụ các mục đích y học, phân tích hoặc trong các phản ứng tổng hợp cao cấp cần được tinh chế. Tinh chế enzyme là công đoạn khá phức tạp và tốn kém trong sản xuất enzyme. Các công nghệ tinh chế hiện hành bao gồm kết tinh, điện di và sắc ký.

##### ***Kết tinh***

Kết tinh là một trong những biện pháp truyền thống và rẻ nhất để tinh chế enzyme. Để enzyme kết tinh cần tạo thúc đẩy tương tác protein-protein bằng cách tạo điều kiện dung môi ở trạng thái quá bão hòa enzyme. Các tác nhân ảnh hưởng tới quá trình kết tinh bao gồm nồng độ và loại muối, pH, nhiệt độ, nồng độ và dạng tạp chất. Khuấy trộn và việc đưa vào các tinh thể mầm cũng tác động mạnh tới quá trình tạo tinh thể.

##### ***Điện di***

Điện di là công nghệ phổ biến để tinh chế protein ở quy mô phòng thí nghiệm. Sự gia nhiệt trong quá trình điện di gây ảnh hưởng tới khả năng phân giải là một trong những trở ngại khi nâng quy mô của công nghệ. Điện di ở quy mô công nghiệp được thực hiện bằng quá trình liên tục và điện trường được duy trì ổn định bằng phương pháp quay.

##### ***Sắc ký***

Kỹ thuật sắc ký được sử dụng ở quy mô công nghiệp trong tinh chế enzyme từ những năm 1960. Những loại gel sắc ký đầu tiên được sử dụng là Sephadex G-25 và DEAE Sephadex A-50. Những thông số quan trọng trong sắc ký công nghiệp là chiều cao của cột, sự tuyến tính của dòng chảy và tỉ lệ giữa dung tích mẫu và dung tích gel. Sự cân đối giữa nhu cầu tăng công suất, tốc độ dòng chảy và độ phân giải cũng cần tìm được công thức thỏa hiệp. Nhằm tránh hiện tượng giảm áp trong cột, hiện nay trong sản xuất công nghiệp các loại cột gián đoạn được sử dụng. Các loại vật liệu như thủy tinh, nhựa, hoặc inox đều được ứng dụng trong sắc ký công nghiệp. Các loại cột có thể được kết gán bằng Viton hoặc Polytetrafluoroethylene (PTFE). Các ống nối có kích thước lớn hơn 4 mm cần được làm bằng thép không gỉ và không có các đầu chết nhằm chịu áp và chống nhiễm khuẩn.

Các dạng sắc ký hiện hành bao gồm sắc ký hấp phụ (adsorption), phân phối (distribution), trao đổi ion (ion exchange), lọc gel (gel filtration), ái lực (affinity), tương tác kỵ nước (hydrophobic), đồng hóa trị (covalent), phức kim loại (metal chelate). Ngoài những dạng sắc ký dựa trên bản chất của enzyme nguyên gốc, bằng việc tạo ra các enzyme tái tổ hợp người ta có thể đưa thêm các đoạn protein hoặc peptid ngoại lai để hỗ trợ tinh chế. Những hệ thống enzyme ngoại lai hỗ trợ tinh chế phổ biến nhất bao gồm glutathione-S-transferase (GST), protein A (SPA), maltose binding protein (MBP), và thioredoxin (TR). Một số đoạn peptide ngắn thường được đưa vào phục vụ tinh chế chọn

lọc bao gồm poly-histidine, poly-arginine và tryptophan. Xu thế hiện nay là đưa vào những protein, peptide có kích thước nhỏ hơn để tăng tỷ lệ protein đích với protein hỗ trợ. Chế độ rửa giải cho protein cũng là một vấn đề đang được cải tiến nhằm lựa chọn những tác nhân ít độc hại và nồng độ thấp. Ngoài ra, trong nhiều trường hợp việc loại bỏ các protein/peptide hỗ trợ cũng cần thiết và phương pháp loại bỏ chúng bằng hóa học hoặc phản ứng enzyme cũng là vấn đề được quan tâm.

#### ***1.6.5. Định dạng sản phẩm***

Enzyme thương phẩm trên thị trường được bán dưới dạng dung dịch ổn định hoặc dạng hạt. Việc định dạng sản phẩm nhằm giảm thiểu thất thoát về hoạt tính của enzyme trong quá trình vận chuyển, tàng trữ và sử dụng. Các tác nhân ảnh hưởng bao gồm độ ẩm, nhiệt, chất oxy hóa. Phần lớn công việc cải thiện độ bền cần được thực hiện từ khâu sàng lọc tuyển chọn enzyme có cấu trúc bền vững, chịu nhiệt. Các hóa chất ổn định enzyme trong quá trình định dạng chỉ mang tính chất hỗ trợ. Chất ổn định có thể đóng vai trò giảm thiểu các tác nhân biến tính, bất hoạt tâm hoạt động, và phân hủy. Quá trình biến tính enzyme diễn ra khi cấu trúc bậc ba mất đi do tác dụng của các tác nhân vật lý hoặc hóa học. Khi phân tử enzyme bắt đầu đứt ra nó trở nên rất mẫn cảm với các tác nhân bất hoạt và thủy phân. Để đảm bảo giảm thiểu điều này tác nhân ổn định cần tạo ra môi trường hỗ trợ cấu trúc nhỏ gọn của protein. Điều này có thể được thực hiện một cách hiệu quả thông qua việc loại bỏ chọn lọc các phân tử nước khỏi bề mặt phân tử protein bằng cách đưa vào các chất liên kết nước như đường, rượu bậc cao, các muối hình thành tinh thể lỏng (lyotropic salts). Cách tốt nhất để giảm thiểu sự bất hoạt tâm hoạt động là đảm bảo đủ nồng độ cofactor cần thiết, đưa vào chất ức chế thuận nghịch và loại bỏ các tác nhân oxy hóa khỏi sản phẩm.

Ngoài việc đảm bảo ổn định hoạt tính enzyme, công thức định dạng cần đáp ứng một số yêu cầu phụ như chống nhiễm khuẩn, chống kết tủa, chống đục, đảm bảo màu sắc, mùi vị cần thiết. Một số đặc tính như màu sắc mùi vị có thể phải được xác định từ khâu chọn nguyên liệu lên men và kỹ thuật lọc. Để đảm bảo tránh kết tủa có thể định dạng sản phẩm ở gần điểm đẳng điện của enzyme trong dung môi ưa nước như glycerol, propylene glycol. Một số loại muối có độ solvate cao có thể được sử dụng ở

## Chương 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Nguyên liệu

#### 2.1.1. *Chủng vi sinh vật*

Chủng nấm mốc phục vụ nghiên cứu tách dòng được tiếp nhận từ Suu tập giống Vi sinh vật Công nghiệp Thực phẩm, Viện Công nghiệp Thực phẩm (CNTP). Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  nhận được từ Suu tập giống Viện CNTP sử dụng trong công đoạn nhân dòng gene. Thể biến nạp nấm men *P. pastoris* X-33 có khả năng sinh phytase ngoại bào cao được tuyển chọn từ năm 2008 thuộc bộ sưu tập giống Viện CNTP, sử dụng nghiên cứu lên men và xác định số copy.

#### 2.1.2. *Plasmid*

Vector pTZ57R/T (Fermentas) được sử dụng cho tách dòng gene phytase.

#### 2.1.3. *Hóa chất*

Các hóa chất dùng trong nghiên cứu đều thuộc loại tinh khiết ở mức độ phân tích. Phần lớn chúng có nguồn gốc từ các hãng như Sigma (Mỹ), Merck (Đức), Difco (Mỹ), Invitrogen (Mỹ), Fermentas (Đức), Roth (Đức). Nguồn gốc của một số hóa chất quan trọng có thể ảnh hưởng tới kết quả thí nghiệm được liệt kê cùng kết quả thí nghiệm. Trong nghiên cứu cũng sử dụng một số loại kit chuyên dụng như: Kit tinh sạch ADN (QIAEX II Gel Extraction Kit - Đức), kit tách chiết plasmid (NucleoSpin Plasmid extraction kit - Macherey-Nagel, Đức), kit tách chiết sản phẩm PCR (Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System – Promega, màng siêu lọc Amicon ultrafiltration Unit (Millipore, Mỹ). Các cặp mồi sử dụng cho PCR được trình bày qua bảng 2

**Bảng 2.** Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu.

| Mồi           | Trình tự 5'-3'                                                     |
|---------------|--------------------------------------------------------------------|
| PhyA-primer F | <u>gaggaatt</u> <u>AA</u> <u>GTCCCCGCCTCGAGAT</u> <u>TCAATCCAG</u> |
| PhyA-primer R | <u>aggtagaa</u> <u>AAGCAAAACACTCCGCCCAATC</u>                      |
| PhyB-primer F | <u>gaggaat</u> <u>TTTCTCCTACGGCGCTGCCATTCTCAG</u>                  |
| PhyB-Primer R | <u>ggtagaa</u> <u>AGTCCATAGCATCACCTCTGGCA</u>                      |
| MET2-F        | GGCGAAACTTTGCACAATGTTC                                             |
| MET2-R        | AACCCGTTAAAGCATGGCAGAT                                             |
| Ble-F         | CGTGACCCTGTTTCATCAGC                                               |
| Ble-R         | CACTCGGCGTACAGCTCGT                                                |

#### **2.1.4. Môi trường nuôi cấy và dung dịch đệm**

##### **2.1.4.1. Môi trường nuôi cấy**

*YM*: 0,3% malt extract; 0,3% yeast extract; 0,5% peptone; 1% glucose

*LB*: 0,5% yeast extract; 1% tryptone; 1% NaCl, pH 7

*LB-Ampicillin*: LB có bổ sung 100 mg/l ampicillin

*LB low salt*: 0,5% yeast extract; 1% tryptone; 0,5% NaCl, pH 7

*LB-Zeocin*: LB low salt bổ sung 25 - 100 mg/l zeocin

*YPD*: 1% yeast extract, 2% Bacto pepton, 2% glucose

*YPDS*: 1% yeast extract, 2% Bacto pepton, 2% Glucoza, 1M Sorbitol

*YPDS-Zeocin*: YPDS có bổ sung 100 mg/l zeocin

*BMM*: Đệm K - P 100 mM, pH 6; 1,34% YNB; 0,5% methanol

*BMMY*: 1% Methanol, 1% cao nấm men, 2% peptone, 0,34% YNB, 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (w/v) và 4 x 10<sup>-5</sup>% biotin, pha trong đệm photophat 0,1M, pH 6,0.

*mBMMHY*: 1% methanol, 0,1% cao nấm men, 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (w/v) và 4 x 10<sup>-5</sup>% biotin, 0,004% histidine, pha trong đệm photophat 0,1M, pH 6,0.

*FBSH*: 1% Glycerol; 26,7 ml/l H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85% stock), 0,93 g/l CaSO<sub>4</sub>, 18,2 g/l K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14,9 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 4,13 g/l KOH, chỉnh về pH 5,0 bằng NH<sub>4</sub>OH. Thêm 0,004% histidine và 0,435 ml PTM1 dung dịch vi chất (6 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,08 g/l KI, 3 g/l MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,2 g/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0,02 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,5 g/l CoCl<sub>2</sub>, 20 g/l ZnCl<sub>2</sub>, 65 g/l FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,2 g/l biotin và 5ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

##### **2.1.4.2. Dung dịch đệm**

2×SSC: 0,3 M NaCl; 0,03 M CH<sub>3</sub>COONa; pH 7

*Sol I*: Tris-HCl 25 mM, pH 8; EDTA 10 mM, pH 8; glucose 50 mM

*Sol II*: NaOH 0,2M; SDS 1%

*Sol III*: CH<sub>3</sub>COOK 3M; axit axetic 11,5%; CH<sub>3</sub>COONa 3 M

*Phenol/chloroform*: 50 ml phenol, 49 ml chloroform, 1 ml isoamylalcohol, 0,1 g hydroxyquinonline, bão hoà trong 100 ml TE

*TE*: Tris-HCl 1M, pH 8; EDTA 0,5 M, pH 8

×50 TAE: 24,2 g Tris-bazơ; 5,71 ml axit axetic; 10 ml EDTA 0,5 M, pH 8; dẫn nước cất đến 100 ml

*Loading dye*: 0,25% bromophenol blue; 0,25% xylen cyanol FF; 30% glycerol

### 2.1.5. Thiết bị

Các thiết bị, máy móc dùng trong nghiên cứu thuộc Bộ môn Vi sinh, Viện Công nghiệp thực phẩm, bao gồm: Máy lắc ổn nhiệt OSI (Pháp), máy lắc ổn nhiệt Thermocomfort (Đức), tủ ẩm, tủ sấy (Anh), máy đo pH MP200R (Thụy Sĩ), cân điện Shimadzu (Nhật Bản), cân phân tích Precisa XT 320M (Thụy Sĩ), nồi khử trùng ướ Tommy (Nhật), nồi khử trùng khô (Anh), box cấy (Pháp), máy làm đá Brema (Italia), máy vortex (Đức), máy PCR 9700 Applied biosystems (Mỹ), bộ điện di Bio Rad (Mỹ), máy soi ADN (Mỹ), máy ảnh số Olympus 4000Z (Nhật), máy li tâm lạnh cao tốc Sorwall (Mỹ), máy phá tế bào Biospec (Mỹ).

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Tách chiết ADN

#### 2.2.1.1. Tách chiết ADN genome của *Aspergillus* và *Pichia*

Nấm mốc được nuôi cấy trên Malt agar 2% trong 3-5 ngày ở 30°C. Bào tử được thu bằng 2 ml Tween 80 0,1%. Sau đó, 0,5 ml dịch bào tử được chuyển vào bình tam giác chứa 10 ml YM và nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong khoảng 8-16 giờ (đảm bảo bào tử mới chỉ nhú mầm, chưa mọc dài thành sợi và kết vào nhau). Sau đó chuyển 1 ml mầm bào tử vào ống Eppendorf 1,5 ml và ly tâm ở 12000 vòng/phút trong 1 phút. Sinh khối được rửa bằng nước cất thanh trùng và bổ sung 0,75 ml  $\times 2$  SSC, vortex rồi ủ ở 99°C trong 20 phút. Chuyển toàn bộ dịch và tế bào sang ống Eppendorf mới và ly tâm ở 12000 vòng/phút trong 1 phút, loại bỏ dịch phía trên. Sinh khối được rửa bằng nước cất, sau đó bổ sung 100  $\mu$ l phenol/chloroform, 100  $\mu$ l hạt thủy tinh và 100  $\mu$ l nước. Sinh khối được đồng hóa trên máy phá tế bào Biospec ở chế độ tối đa trong 2 phút. Hỗn hợp được ly tâm ở 12000 vòng/phút trong 10 phút. Dịch nổi phía trên được dùng trực tiếp làm khuôn cho PCR. Trong trường hợp nấm men, việc tách chiết ADN được thực hiện tương tự như trên nhưng bỏ qua qua giai đoạn kích hoạt nảy mầm bào tử.

#### 2.2.1.2. Tách chiết plasmid

Việc tách chiết plasmid từ *E. coli* được thực hiện theo Sambrook (2001):

- Cấy chuyển một khuẩn lạc *E. coli* vào ống nghiệm chứa 2 ml LB-Ampicillin (hoặc LB-Zeocin), nuôi lắc qua đêm ở 37°C, 200 vòng/phút
- Chuyển 1 ml dịch nuôi cấy vào ống Eppendorf, ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút
- Hòa tủa tế bào vào 100  $\mu$ l Sol I bằng máy vortex, để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút
- Bổ sung 200  $\mu$ l Sol II, đảo đều ống Eppendorf nhanh nhưng nhẹ nhàng để tránh đứt gãy ADN. Hỗn hợp sẽ trở nên trong suốt và quánh. Để yên trong đá 7 phút
- Bổ sung tiếp 150  $\mu$ l Sol III, đảo nhanh rồi ủ trong đá 5 phút, hỗn dịch sẽ kết tủa trắng

- Ly tâm với tốc độ 13000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C
- Thu dịch nổi và chuyển sang ống Eppendorf 1,5 ml mới. Sau đó bổ sung 600 µl dung dịch phenol/chloroform, trộn đều và ly tâm ở tốc độ 13000 vòng/phút trong 10 phút để loại protein và ADN nhiễm sắc thể
- Hút pha dịch lỏng ở bên trên chuyển sang ống eppendorf 1,5 ml mới và lặp lại bước trên với 450 µl hỗn hợp chloroform/isoamylalcohol (24:1).
- Tủa dịch thu được với 2 lần thể tích cồn lạnh 99,5%, để dung dịch kết tủa trong khoảng 20 phút
- Thu tủa ADN bằng cách ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút
- Phần kết tủa được rửa lại bằng cồn lạnh 70% và thu lại bằng cách ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút
- Sau đó làm khô tủa cồn bằng máy Speed Vac
- Hòa tan ADN plasmid vào 30 - 40 µl dung dịch TE
- ARN lẫn trong sản phẩm tách chiết ADN được loại bỏ bằng cách bổ sung RNase (100 µg/ml), ủ hỗn hợp trong 30 phút ở 37°C
- ADN plasmid đã tách chiết được kiểm tra bằng cách chạy điện di trên gel agarose 0,8%

### 2.2.2. PCR

Trong nghiên cứu này, tùy thuộc vào thí nghiệm, thành phần phản ứng PCR có thể thay đổi từ điều kiện gốc như sau:

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| x10 Buffer KCl (Fermentas)            | 5 µl    |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Fermentas) | 5 µl    |
| Môi xuôi 10 mM                        | 1 µl    |
| Môi ngược 10 mM                       | 1 µl    |
| dNTP 20 mM                            | 1 µl    |
| <i>Taq polymerase</i> (5 unit/µl)     | 0,25 µl |
| ADN khuôn                             | 1 µl    |
| H <sub>2</sub> O                      | 36 µl   |
| Tổng thể tích                         | 50 µl   |

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5 %, nhuộm bản gel với ethidium bromit và quan sát bằng đèn cực tím.

### 2.2.3. Xác định trình tự gene

Trình tự ADN được đọc bằng phương pháp “dideoxy chain termination” với việc sử dụng kit AmpliTaq (Amersham) theo hướng dẫn của hãng với các môi tương ứng. Máy đọc trình tự, model 377 của hãng Applied Biosystem được sử dụng. Các chuỗi ADN được so sánh với GeneBank thông qua giao diện tìm kiếm BLAST nucleotide-nucleotide

đặt tại trung tâm tin sinh học quốc gia (National Center for Biotechnology Information), Bethesda, Mỹ. Các chuỗi liên quan được chuyển tải về sau đó xử lý bằng phần mềm BioEdit [Hall, 1999] và so sánh bằng ClustalX [Thompson và CS., 1997]. Cây tiến hóa được hiển thị bằng phần mềm TreeExplorer.

#### **2.2.4. Ghép nối plasmid**

Ghép nối: Đoạn ADN sau khi cắt bằng enzyme hạn chế được nối vào vector cũng đã được xử lý cùng một enzyme tương ứng theo tỷ lệ nồng độ 3:1. Thành phần của phản ứng trong tổng thể tích 10 ml như sau:

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Đệm 10x của T4 ADN ligase | : 1 µl |
| T4 ADN ligase 400 U/ml    | : 1 µl |
| Vector                    | : 4 µl |
| ADN                       | : 4 µl |

Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 22°C trong 16 giờ.

#### **2.2.5. Biến nạp ADN vào *E. coli* bằng sốc nhiệt**

Tạo tế bào *E. coli* DH5α khả biến [Sambrook, 2001]

- Cấy chuyển một khuẩn lạc *E. coli* DH5α vào 5 ml môi trường LB, lắc 200 vòng/phút ở 37°C qua đêm
- Chuyển 0,5 ml dịch tế bào sang 50 ml môi trường LB, tiếp tục cấy lắc ở 200 vòng/phút ở 37°C cho tới khi đạt OD<sub>600</sub> từ 0,4 - 0,6. Sau đó lấy mẫu ra và đặt lên đá khoảng 1 giờ. Từ bước này tất cả các thao tác đều phải tiến hành ở 4°C
- Ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút. Hoà tế bào thu được trong 50 ml CaCl<sub>2</sub> 100 mM (vô trùng). Ủ mẫu 15 phút và ly tâm thu tế bào ở 3500 vòng/phút trong 10 phút
- Hoà tủa trong 25 ml CaCl<sub>2</sub> 100 mM, ủ mẫu trong 60 phút trên đá
- Ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C
- Hoà tế bào trong 0,5 ml CaCl<sub>2</sub> 100 mM, bổ sung 15% glycerol
- Hút 0,1 ml dịch tế bào trên vào mỗi ống Eppendorf và bảo quản ở - 75°C hoặc sử dụng trực tiếp

Biến nạp bằng sốc nhiệt [Sambrook, 2001]

- Tế bào khả biến được lấy ra từ tủ - 75°C, làm tan trên đá trong khoảng 15 phút. Sau đó bổ sung vào mỗi ống tế bào khả biến 10-100 ng ADN, đảo nhẹ nhàng để ADN phân bố đều trong dịch tế bào khả biến. Sau đó để mẫu trên đá trong thời gian 30 phút
- Mẫu được chuyển sang bể ổn nhiệt có nhiệt độ 42°C và ủ trong 90 giây Sau đó mẫu được lấy ra và đặt trên đá trong 2 phút
- Bổ sung 1 ml LB, lắc hỗn hợp tế bào ở 37°C trong 60 phút
- Hút 100ml dịch tế bào cấy trải trên đĩa môi trường LB-Ampicillin hoặc LB-Zeocin, ủ đĩa ở 37°C qua đêm

### ***2.2.6. Tuyển chọn dòng mang gene biến nạp***

Đối với thể biến nạp là *E. coli DH5α*

Thực hiện PCR trực tiếp không thông qua tách chiết ADN (colony PCR). Dùng đầu tip chấm khuẩn lạc, chuyển vào ống PCR (15 µl/phản ứng). Chương trình chạy như chương trình nhân gene *phyA* nhưng bổ sung thêm giai đoạn đun 95°C trong 10 phút trước phản ứng.

### ***2.2.7. Xác định hoạt tính phytase***

Hoạt tính phytase được xác định theo phương pháp của Shimizu và cộng sự đề xuất năm 1992. Lượng  $P_{vc}$  giải phóng dưới tác động của phytase được xác định bằng dung dịch thử màu.

Dung dịch thử màu

Là dung dịch có chứa 4 lần thể tích dung dịch A (1,5% amoniummolybdate -  $((NH_4)_6Mo_7O_{24})_4 + 5,5\% H_2SO_4$ ) và 1 lần thể tích dung dịch B (2,7%  $FeSO_4.7H_2O$ ). Dung dịch thử màu được pha và sử dụng trong ngày.

Cách pha dung dịch thuốc thử

- *Pha dung dịch A:* Đổ pha 240 ml dung dịch A cần 14 ml dung dịch  $H_2SO_4$  95% và 226 ml nước cất. Đổ từ từ  $H_2SO_4$  vào nước cất, sau đó để nguội ta thu được dung dịch  $H_2SO_4$  5,5%. Bổ sung vào 240 ml dung dịch axit trên 3,823 g muối amonium molybdate, hoà tan hoàn toàn sẽ được dung dịch A.
- *Pha dung dịch B:* Cân chính xác 0,494 g  $FeSO_4.7H_2O$  hoà tan vào 10 ml nước sẽ thu được dung dịch B có chứa  $FeSO_4.7H_2O$  2,7%. (Lưu ý: dung dịch B chỉ được pha trước khi sử dụng vì để lâu  $Fe^{2+}$  sẽ bị oxy hoá thành  $Fe^{3+}$ ).
- Sau khi có dung dịch A và dung dịch B, trộn đều 4 lần thể tích A + 1 lần thể tích B. Sau đó để hỗn hợp ổn định sau khoảng 1 giờ khi dung dịch trong suốt không màu thì sử dụng được.

Dung dịch cơ chất

Là dung dịch có chứa 3 mM phytate-Na trong đệm axetate-Na 0,1M pH 5,5.

Cách pha dung dịch cơ chất

- Cân 0,277 g muối phytate-Na pha trong 10 ml nước cất ta thu được dung dịch gốc phytate-Na có nồng độ 30 mM. Từ dung dịch này pha loãng 10 lần với dung dịch đệm axetate-Na 0.1M (pH 5,5) để thu được dung dịch cơ chất mong muốn.

Cách tiến hành phản ứng enzyme thực hiện như sau

- *Mẫu thí nghiệm:* 0,2 ml dịch enzyme + 0,2 ml dịch cơ chất (3 mM phytate-Na trong đệm Na-axetate 0,1M pH 5,5) ủ 50°C trong 20 phút, sau đó bổ sung 0,4 ml TCA

(trichloroacetic acid) 15% để dừng phản ứng, tiếp theo bổ sung 0,8 ml thuốc thử, để phản ứng màu bền sau 5 phút rồi xác định OD ở bước sóng 700 nm.

- *Mẫu đối chứng*: 0,2 ml dịch enzyme + 0,4 ml TCA 15% nhằm bất hoạt enzyme, sau đó + 0,2 ml dịch cơ chất (3 mM phytate-Na trong đệm acetate-Na 0,1M pH 5,5) ủ ở 50°C trong 20 phút, tiếp theo bổ sung 0,8 ml thuốc thử phản ứng màu bền sau 5 phút rồi xác định OD ở bước sóng 700 nm.

#### Xác định đồ thị chuẩn photpho

Dung dịch  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  được sử dụng làm chuẩn photpho. Cân chính xác 1,36 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  hoà tan vào 100 ml nước cất thu được dung dịch  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1M (tương đương 0,1 M  $\text{P}_{\text{vc}}$  = 100 mM) từ dung dịch gốc này ta pha loãng thành các nồng độ như sau: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2 mM. Từ mỗi độ pha loãng này lấy ra 0,4 ml để thử phản ứng màu bằng cách bổ sung thêm 0,4 ml TCA, ủ 20 phút tại 50°C rồi bổ sung thêm 0,8 ml thuốc thử màu và xác định màu tại OD 700 nm kết quả mô tả qua bảng 3.

**Bảng 3.** Tương quan giữa hàm lượng photpho vô cơ và OD 700 nm.

| STT | Nồng độ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (mM) | Thể tích mẫu lấy đi thử | Lượng Pvc có trong mẫu thử ( $\mu\text{mol}$ ) | OD 700 nm |
|-----|---------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------------|-----------|
| 1   | 0,0                                   | 0,4ml                   | 0,0                                            | 0,000     |
| 2   | 0,5                                   | 0,4ml                   | 0,2                                            | 0,352     |
| 3   | 1,0                                   | 0,4ml                   | 0,4                                            | 0,680     |
| 4   | 1,5                                   | 0,4ml                   | 0,6                                            | 0,894     |
| 5   | 2,0                                   | 0,4ml                   | 0,8                                            | 1,157     |

Từ kết quả OD và hàm lượng photpho có trong dung dịch chúng tôi lập phương trình hồi qui tuyến tính (hàm tương quan). Xác định các hệ số của phương trình hồi qui và hệ số tương quan như sau:

$$y = ax + b$$

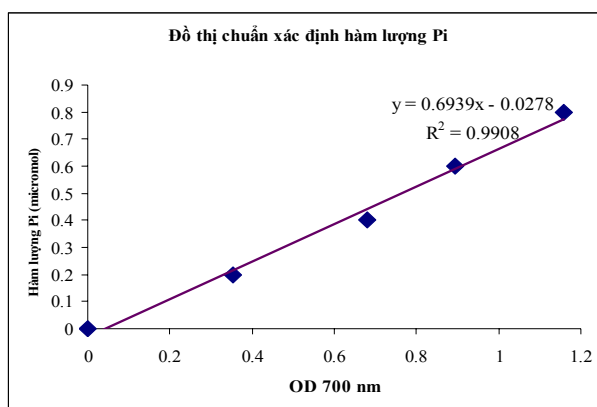
Trong đó: y : Hàm lượng photpho ( $\mu\text{mol}$ )

x : Độ hấp phụ của mẫu

n : Hệ số tỉ lệ thuận của y và x

b : Hệ số góc của đường thẳng  $y = ax + b$

Dựa trên phương pháp toán học này chúng tôi đã xử lý kết quả bằng phần mềm Excel và đã thu được đồ thị chuẩn và hàm hồi qui như sau:



**Hình 11.** Đồ thị chuẩn xác định hàm lượng  $P_{vc}$

Đồ thị đường chuẩn có dạng  $y = 0,6939x - 0,0278$  với độ chính xác  $R > 99\%$ . Như vậy mức độ liên hệ giữa  $x$  và  $y$  là rất chặt chẽ, kết quả đo được là đáng tin cậy. Một đơn vị hoạt tính (IU) được tính là lượng  $P_{vc}$  ( $\mu\text{mol}$ ) giải phóng trong 1 phút bởi 1 ml enzyme ở điều kiện thử.

#### 2.2.8. Phương pháp xác định protein tổng số (Bradford)

*Thuốc thử Bradford:*

Pha 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 trong 50 ml 95% ethanol, bổ sung 100 ml 85% (w/v) phosphoric acid. Thêm nước cất để được 1 lít hòa tan hoàn toàn các thành phần. Dung dịch thuốc thử được lọc qua giấy lọc Whatman #1 trước khi sử dụng.

*Chuẩn bị đồ thị chuẩn*

Dung dịch BSA có nồng độ 10 mg/ml, từ dung dịch mẹ này sẽ pha loãng ra các nồng độ chuẩn BSA khác nhau từ 0-500  $\mu\text{g/ml}$  (bảng 4 )

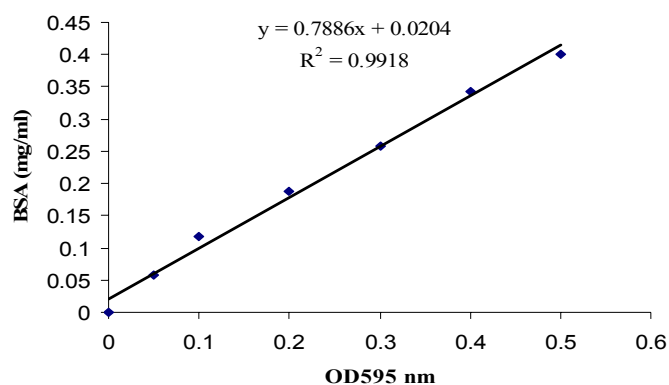
*Cách tiến hành thí nghiệm*

- Lấy 100  $\mu\text{l}$  mẫu cần xác định hàm lượng protein
- Bổ sung 5000  $\mu\text{l}$  thuốc thử Bradford trộn đều và để bền màu sau 5 phút
- Tiến hành đo OD ở bước sóng 595 nm

Kết quả OD với các nồng độ BSA khác nhau được trình bày qua bảng 4

**Bảng 4.** Giá trị OD với các nồng độ chuẩn BSA khác nhau.

| Dung dịch BSA | µg BSA/ml | Dung dịch mẹ BSA (µl) | µl H <sub>2</sub> O cất | Thể tích cuối cùng (µl) | OD <sub>595</sub> |
|---------------|-----------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| 0             | 0         | 0                     | 1000                    | 1000                    | 0                 |
| 1             | 50        | 5                     | 995                     | 1000                    | 0.058             |
| 2             | 100       | 10                    | 990                     | 1000                    | 0.117             |
| 3             | 200       | 20                    | 980                     | 1000                    | 0.188             |
| 4             | 300       | 30                    | 970                     | 1000                    | 0.258             |
| 5             | 400       | 40                    | 960                     | 1000                    | 0.343             |
| 6             | 500       | 50                    | 950                     | 1000                    | 0.401             |



**Hình 12.** Đồ thị chuẩn xác định hàm lượng protein

Dựa vào phương trình đồ thị chuẩn, từ giá trị OD595 đo được chúng ta có thể định lượng được hàm lượng protein có trong mẫu thử.

## Chương 3. KẾT QUẢ VÀ BÌNH LUẬN

### 3.1 Tách dòng và giải trình tự gene mã hóa *phyA* từ *Aspergillus niger*

#### 3.1.1. Nhân dòng gene *phyA*

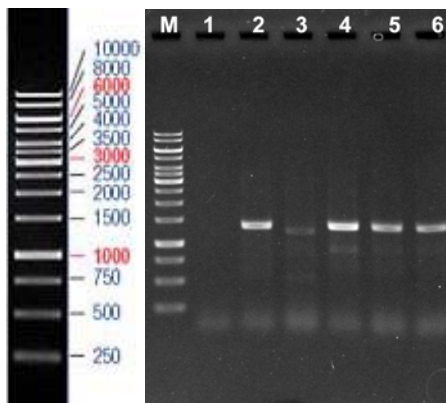
Từ bộ sưu tập giống của Bộ môn Vi sinh - Viện Công nghiệp thực phẩm chúng tôi lựa chọn 6 chủng *A. niger*. Đây là đối tượng thường được dùng để tách nguồn gene mã hóa phytase và phytase từ loài sinh vật này thường có đặc tính là hoạt động tốt ở pH thấp. Danh sách các chủng được tách dòng phytase được mô tả ở bảng 5.

**Bảng 5.** Danh sách các chủng tách dòng gene *phyA*

| Stt | Chủng | Ký hiệu | Phân loại sơ bộ | Nguồn gốc |
|-----|-------|---------|-----------------|-----------|
| 1   | C5P   | P2      | <i>A. niger</i> | Viện CNTP |
| 2   | V80   | P3      | <i>A. niger</i> | Viện CNTP |
| 3   | 559   | P4      | <i>A. niger</i> | Viện CNTP |
| 4   | 770   | P5      | <i>A. niger</i> | Viện CNTP |
| 5   | 1922  | P7      | <i>A. niger</i> | Viện CNTP |
| 6   | 1925  | P9      | <i>A. niger</i> | Viện CNTP |

Các chủng được tách chiết ADN tổng số, sau đó tiến hành tinh sạch ADN tổng số nhằm thu lại lượng ADN tinh sạch không chứa tạp chất và chất ức chế, đảm bảo cho phản ứng PCR nhân dòng gene *phyA* được thành công.

Chúng tôi tiến hành phản ứng PCR với các cặp mồi sẵn có của phòng thí nghiệm: *PhyA*-primer F và *PhyA*-Primer R với chương trình chạy như sau : Phản ứng được thực hiện với các chương trình nhiệt bao gồm bước biến tính ở độ 94°C trong 3 phút, kế tiếp là 30 chu kỳ nhiệt (94°C trong 40 giây, 52°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút) và kết thúc là pha hoàn tất ở 72°C trong 7 phút. Để kiểm tra kết quả PCR, sản phẩm được điện di trên gel agarose 0,8%. Theo tính toán lí thuyết, đoạn *phyA* sau khi được tổng hợp bằng kĩ thuật PCR với cặp mồi thiết kế như trên sẽ có chiều dài 1344 bp.



**Hình 13.** Sản phẩm PCR gen *phyA* từ các chủng. M: Marker; 1 - P5; 2 - P2; 3 - P3; 4 - P4; 5 - P7; 6 - P9.

Kết quả cho thấy đã xuất hiện band của gene *phyA* có kích thước 1,4 kb ở các mẫu, chỉ có mẫu số 1 thuộc về chủng P5 là không có sản phẩm. Chứng tỏ phản ứng PCR là phù hợp và phương pháp tách chiết là tinh sạch là hiệu quả. Từ kết quả PCR này chúng tôi lựa chọn 5 chủng tương ứng với mẫu chạy số 2 đến số để phục vụ công tác tách dòng.

### 3.1.2. Gắn sản phẩm PCR với vector TA

Theo khuyến cáo của Kit về TA vector các gene có kích thước nhỏ hơn 1kb không cần thiết phải qua tinh sạch và có thể sử dụng trực tiếp sản phẩm PCR vào việc gắn với vector tách dòng TA. Tuy nhiên, sản phẩm *phyA* có kích thước là 1,4 kb nên việc tinh sạch sản phẩm PCR là cần thiết đảm bảo hiệu suất của phản ứng nối (ligation) giữa gene đích và vector là cao nhất.

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được sử dụng trực tiếp vào phản ứng nối với TA vector. Thành phần phản ứng như sau:

| Thành phần                   | Thể tích (μl) |
|------------------------------|---------------|
| Vector pTZ57R/T, (0.18 pmol) | 1             |
| 5X ligation buffer           | 3             |
| Sản phẩm PCR                 | 1             |
| T4 ligase                    | 1             |
| H <sub>2</sub> O             | 4             |

Trộn đều hỗn hợp và ủ ở nhiệt độ 4 °C qua đêm. Sau đó 5 μl hỗn hợp plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào 200 μl tế bào khả biến *E.coli* DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt và nuôi cấy trên môi trường đĩa thạch LB – ampicillin X-Gal/IPTG chứa 100 mg/l ampicillin ở 37°C qua đêm. Theo lý thuyết khi biến nạp thành công thì *E. coli* có khả năng sinh trưởng trên môi trường có chứa kháng sinh ampicillin. Sẽ xuất hiện 2 loại

khuẩn lạc có khả năng kháng ampicillin; Khuẩn lạc màu trắng là những *E. coli* có đoạn gene gắn thành công vào plasmid; Khuẩn lạc màu xanh là plasmid tự đóng vòng hoặc gắn đoạn xen là bội số của 3. Kết quả sau biến nạp được mô tả qua hình 14. Kết quả cho thấy đã xuất hiện các khuẩn lạc màu xanh và màu trắng, chứng tỏ phản ứng gắn kết gene đích (*phyA*) vào vector tách dòng TA đã thành công.



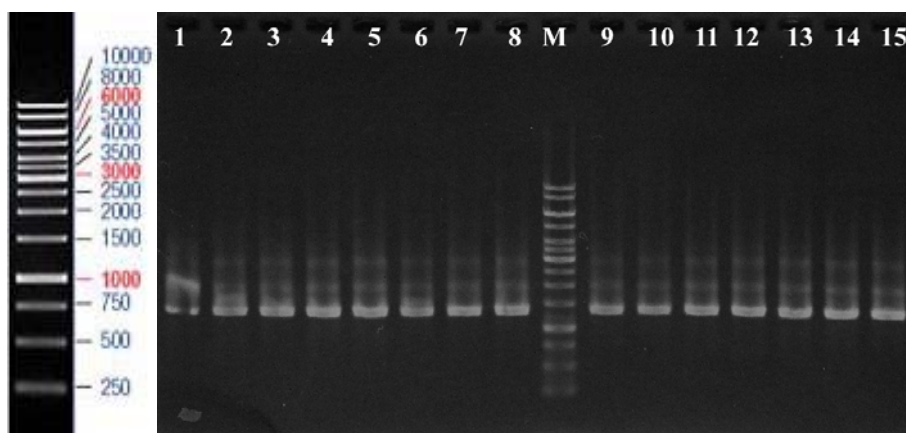
a. Thí nghiệm

b. Đối chứng

**Hình 14.** Kết quả sau khi biến nạp vào TA vector.

### 3.1.3. Kiểm tra sự có mặt *phyA* trong *E. coli* bằng PCR colony

Từ mỗi gene *phyA* được tách dòng chúng tôi chọn ra 3 thể biến nạp là những tế bào *E. coli* màu trắng kháng ampicillin để kiểm tra sự có mặt của gene *phyA*. Phương pháp kiểm tra bằng kỹ thuật colony PCR sử dụng cặp mồi Phy-A-primer F và Phy-A-Primer R. Chương trình chạy được thực hiện như chương trình nhân gene, sau đó sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

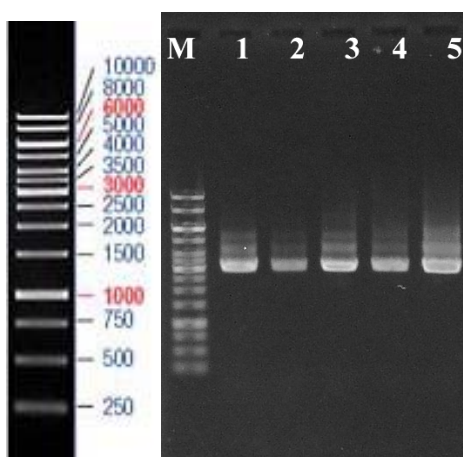


**Hình 15.** Kiểm tra sự có mặt của *phyA* trong *E. coli* bằng PCR colony. Thứ tự mẫu chạy: 1-3: P2; 4-6: P3; 7-9: P4; 10-12: P7; 13-15: P9; M: marker

Kết quả điện di qua hình 15 cho thấy tất cả các thể biến nạp chứa plasmid tái tổ hợp đều thấy xuất hiện band sản phẩm có kích thước 1,4 kb. Như vậy gene *phyA* đã được gắn thành công vào vector TA và quá trình biến nạp là hiệu quả.

#### 3.1.4. Tách chiết plasmid

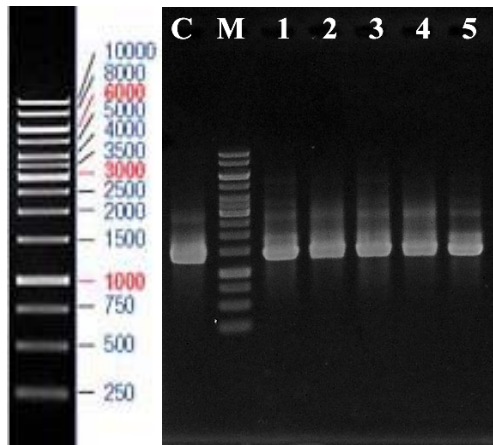
Sau khi đã chọn lọc được các thể biến nạp có mang plasmid tái tổ hợp TA/ *phyA*, chúng tôi tiến hành nuôi cấy *E. coli* tái tổ hợp và tách chiết plasmid theo phương pháp Sambrook (2001). ADN plasmid đã tách chiết được kiểm tra bằng cách chạy điện di trên gel agarose 0,6%. Kết quả tách chiết cho thấy plasmid của cả 5 chủng đã được tách chiết và tinh sạch thành công.



**Hình 16.** Kết quả tách chiết plasmid tái tổ hợp. M: Marker, Thứ tự plasmid các chủng: 1 - P2; 2 - P3; 3 - P4; 4 - P7; 5 - P9.

#### 3.1.5. Kiểm tra sự có mặt *phyA* trong plasmid tái tổ hợp

Nhằm khẳng định plasmid sau khi tách chiết là plasmid tái tổ hợp TA/*phyA* chúng tôi tiến hành kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi Phy-A-primer F và Phy-A-Primer R sử dụng trực tiếp plasmid sau khi tách chiết làm khuôn. Chương trình chạy như chương trình nhân gene. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm sau PCR trên gel agarose 0.8% được mô tả qua hình 17.

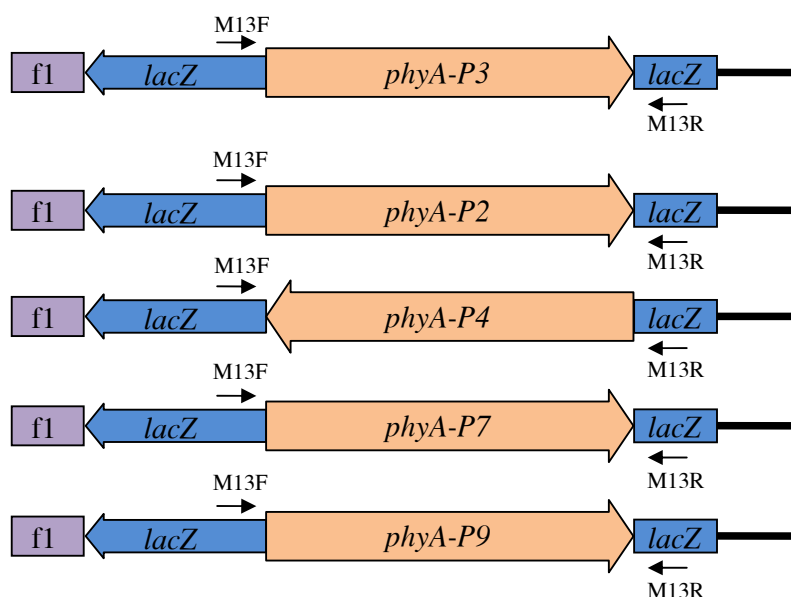


**Hình 17.** Kiểm tra sự có mặt *phyA* trong plasmid. M: Marker, Thứ tự plasmid các chủng: 1 - P2; 2 - P3; 3 - P4; 4 - P7; 5 - P9.

Kết quả cho thấy khi dùng plasmid sau khi tách chiết làm khuôn cho phản ứng PCR ở tất cả các mẫu đều xuất hiện band AND phù hợp với kích thước 1,4 kb của *phyA*. Kết quả này minh chứng plasmid tái tổ hợp đã mang gene *phyA* và đây là điều kiện cần thiết dùng plasmid tái tổ hợp để giải trình tự.

### 3.1.6. Giải trình tự các gen *phyA* từ *Aspergillus niger*

Với mục đích nghiên cứu sự đa dạng của trình tự gene mã hóa *phyA* chúng tôi tiến hành giải trình tự của của gene này trong vector tái tổ hợp. Phân đoạn mã hóa mature protein (thành phần mang hoạt tính ngoại bào) từ các chủng *Aspergillus* được tách dòng bằng PCR sử dụng cặp mồi T-*PhyA*-EcoRI-F (5'-gctgaattcCTGGCAGTCC CCGCCTCGAGA-3') và T-*PhyA*-XbaI-R (5'- tgttctagaGCAAAACACTCCGCC CAATCACC-3'). Sản phẩm PCR được gắn vào vector pTZ57R/T (Fermentas) theo hướng dẫn của hãng và biến nạp vào tế bào DH5 $\alpha$ . Plasmid từ các chủng dương tính được tách chiết và giải trình tự sử dụng cặp mồi M13F và M13R. Các trình tự được phân tích sử dụng phần mềm Contig Express của Invitrogene. Trình tự axit amin được tính toán sử dụng bảng mã cho *Aspergillus niger*.



**Hình 18.** Vị trí và hướng của *phyA* từ các chủng *A. niger* trên vector pTZ57R sau biến nạp.

Phân tích trình tự tại các vùng gộp nối cho thấy *phyA* được tích hợp vào pTZ57R/T theo các hướng khác nhau (hình 11). Trong khi *phyA-P4* được tích hợp cùng chiều với *lacZ* cả 4 gen *phyA-P2*, *phyA-P3*, *phyA-P7*, *phyA-P9* có hướng ngược lại so với *lacZ*. Sử dụng cặp mồi M13F và M13R chúng tôi đọc toàn bộ *phyA* và các vùng ghép nối đối với 4 chủng P2, P3, P4, P9. Riêng với chủng P7, trình tự 276 nucleotid đầu có chứa nhiều lỗi đọc và không được phân tích. Kết quả phân tích 1068 nucleotid còn lại cho thấy *phyA-P7* tương đồng 99.5% với *phyA-P3* về trình tự ADN và 99.4% về trình tự axit amin. Trình tự nucleotid, amino acid cũng như sự khác biệt ở các gen tách dòng được liệt kê dưới đây. Mức độ tương đồng và số lượng khác biệt được tính toán và thể hiện trong các bảng 6, 7, 8, và 9.

*Trình tự và sự khác biệt giữa các gen tách dòng:*

|                | 10                                                            | 20 | 30 | 40  | 50  | 60  |
|----------------|---------------------------------------------------------------|----|----|-----|-----|-----|
| <i>phyA-P2</i> | CTGGCAGTCCCCGCCTCGAGAAATCAATCCACTTGCGATACGGTCGATCAGGGGTATCAA  |    |    |     |     |     |
| <i>phyA-P3</i> | .....                                                         |    |    |     |     |     |
| <i>phyA-P4</i> | .....                                                         |    |    |     |     |     |
| <i>phyA-P9</i> | .....                                                         |    |    |     |     |     |
| <i>phyA-P7</i> | .....                                                         |    |    |     |     |     |
|                | 70                                                            | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| <i>phyA-P2</i> | TGCTTCTCGGAGACTTCGCATCTTTGGGGCCAAATACGCGCCGTTCTTTTCTCTGGCAAAC |    |    |     |     |     |
| <i>phyA-P3</i> | .....C.....T.....                                             |    |    |     |     |     |
| <i>phyA-P4</i> | .....C.....                                                   |    |    |     |     |     |
| <i>phyA-P9</i> | .....                                                         |    |    |     |     |     |
| <i>phyA-P7</i> | .....                                                         |    |    |     |     |     |

|                 |                                                            |     |     |     |     |     |
|-----------------|------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 130                                                        | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| <i>phyA</i> -P2 | AAATCGGCCATCTCCCTGATGTCCTGCCGGATGCCATGTCACTTTCGCCCAGGTTCTC |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P3 | G.....T.....C.....GA.....T.....C...                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P4 | .....T.....                                                |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P9 | .....T.....                                                |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P7 | -----                                                      |     |     |     |     |     |

|                 |                                                              |     |     |     |     |     |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 190                                                          | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| <i>phyA</i> -P2 | TCCCGCCATGGAGCACGGTATCCGACCGACTCCAAGGGCAAGAAATACTCCGCTCTCATC |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P3 | .....T.....A.....                                            |     |     |     |     | T   |
| <i>phyA</i> -P4 | .....                                                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P9 | .....                                                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P7 | -----                                                        |     |     |     |     |     |

|                 |                                                             |     |     |     |     |     |
|-----------------|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 250                                                         | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| <i>phyA</i> -P2 | GAGGAGATCCAGCAGAACCGACAACCTTCGAGGGGAAATATGCCTTCCTGAAGACATAC |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P3 | .....T.....C.....T.....T.....                               |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P4 | .....                                                       |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P9 | .....                                                       |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P7 | -----                                                       |     |     |     |     |     |

|                 |                                                              |     |     |     |     |     |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 310                                                          | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| <i>phyA</i> -P2 | AACTACAGCCTGGGCGCGGATGACCTGACTCCCTTCGGAGAGCAGGAGCTGGTCAACTCC |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P3 | .....T.....A.....T.....A.....A.....                          |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P4 | .....T.....                                                  |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P9 | .....                                                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P7 | .....A.....A.....T.....A.....                                |     |     |     |     |     |

|                 |                                                               |     |     |     |     |     |
|-----------------|---------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 370                                                           | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| <i>phyA</i> -P2 | GGCGTCAAGTTCTACCAGCGATACAAATCGCTCACAAGAAACATTGTCCCGTTTCATCCGA |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P3 | ..A.....T.....G.....CA.T..A.....                              |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P4 | .....G.....                                                   |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P9 | .....G.....                                                   |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P7 | ..A.....T.....G.....CA.....A.....                             |     |     |     |     |     |

|                 |                                                              |     |     |     |     |     |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 430                                                          | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| <i>phyA</i> -P2 | TCCTCAGGCTCCAGCCGCTGATTGCCTCTGGCAATAAATTTCATCGAGGGCTTCCAGAGC |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P3 | .....T.....C.....C.....G.....                                |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P4 | .....                                                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P9 | .....                                                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P7 | .....T.....C.....C.....G.....                                |     |     |     |     |     |

|                 |                                                            |     |     |     |     |     |
|-----------------|------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 490                                                        | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
| <i>phyA</i> -P2 | ACTAAGCTGAAGGATCCTCGTGCCAGCCCGACCAATCGTCGCCAAGATCGACGTGGTC |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P3 | .C.....G.....                                              |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P4 | .....G.....                                                |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P9 | .....                                                      |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P7 | .C.....                                                    |     |     |     |     |     |

|                 |                                                             |     |     |     |     |     |
|-----------------|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 550                                                         | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| <i>phyA</i> -P2 | ATTTCAAGGCCAGCACATCCAACAACACTCTCGATCCGGGCACCTGCACCGTTTTCGAA |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P3 | .....C.....T.....C..A.....T..C.....                         |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P4 | .....                                                       |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P9 | .....                                                       |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P7 | .....C.....T.....C..A.....T..C.....                         |     |     |     |     |     |

|                 |                                                            |     |     |     |     |     |
|-----------------|------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 610                                                        | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 |
| <i>phyA</i> -P2 | GATAGCGAATTGGCCGATGACATCGAAGCCAATTTACCGCCACGTTCGTCCCTCCATT |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P3 | .....C..G.....A.....                                       |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P4 | .....                                                      |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P9 | .....                                                      |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P7 | .....C..G.....A.....                                       |     |     |     |     |     |

|                 |                                                              |     |     |     |     |     |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 670                                                          | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 |
| <i>phyA</i> -P2 | CGTCAACGTCTGGAGAACGACTTGTCTGGCGTGTCTCTCACGGACACAGAAGTGACCTAC |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P3 | .....C.....A.....G.....                                      |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P4 | .....                                                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P9 | .....                                                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P7 | .....C.....A.....G.....                                      |     |     |     |     |     |

|                 |                                                              |     |     |     |     |     |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 730                                                          | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 |
| <i>phyA</i> -P2 | CTCATGGACATGTGCTCCTTCGACACCATCTCCACCAGCACCGTCGACACCAAGCTGTCC |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P3 | .....                                                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P4 | .....                                                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P9 | .....                                                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P7 | .....                                                        |     |     |     |     |     |

|                 |                                                              |     |     |     |     |     |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 790                                                          | 800 | 810 | 820 | 830 | 840 |
| <i>phyA</i> -P2 | CCCTTCTGTGACCTGTTCACCCATGAAGAATGGATCAACTACGACTACCTCCAGTCCCTG |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P3 | .....T.....C.....                                            |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P4 | .....                                                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P9 | .....                                                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P7 | .....T.....C.....                                            |     |     |     |     |     |

|                 |                                                              |     |     |     |     |     |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 | 850                                                          | 860 | 870 | 880 | 890 | 900 |
| <i>phyA</i> -P2 | AACAAATACTACGGCCATGGCGCAGGTAACCCGCTCGGCCCGACCCAGGGCGTCGGCTAC |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P3 | ..A..G.....G.....                                            |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P4 | .....                                                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P9 | .....                                                        |     |     |     |     |     |
| <i>phyA</i> -P7 | ..A..G.....G.....                                            |     |     |     |     |     |

|                 |                                           |                                                               |      |      |      |      |
|-----------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
|                 | 910                                       | 920                                                           | 930  | 940  | 950  | 960  |
| <i>phyA</i> -P2 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | GCTAACGAGCTCATCGCCCGTCTCACCCACTCGCCTGTCCACGATGACACCCAGCTCCAAC |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P3 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P4 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P9 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P7 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
|                 | 970                                       | 980                                                           | 990  | 1000 | 1010 | 1020 |
| <i>phyA</i> -P2 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | CACACATTGGACTCCAACCCGGCTACTTTCCCGCTCAACTCCACTCTCTATGCGGACTTT  |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P3 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | .....T.....T.....C.....T.....T.....C.....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P4 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P9 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P7 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | .....T.....T.....C.....T.....T.....T.....C.....               |      |      |      |      |
|                 | 1030                                      | 1040                                                          | 1050 | 1060 | 1070 | 1080 |
| <i>phyA</i> -P2 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | TCGCATGATAACGGCATCATCTCTATCCTCTTTGCTTTGGGTCTGTACAACGGCACCAAG  |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P3 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..C..C.....T.....T.....T.....                                 |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P4 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P9 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P7 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..C..C.....T.....T.....T.....                                 |      |      |      |      |
|                 | 1090                                      | 1100                                                          | 1110 | 1120 | 1130 | 1140 |
| <i>phyA</i> -P2 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | CCGCTGTCTTCCACGACCGCGGAGAATATCACCCAGACCGATGGGTCTCATCTGCCTGG   |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P3 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | .....A.....T.C.....A.....A.....G.....AT...                    |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P4 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P9 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P7 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | .....A.....T.C.....A.....A.....G.....T...                     |      |      |      |      |
|                 | 1150                                      | 1160                                                          | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| <i>phyA</i> -P2 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ACGGTTCCTTTTCGCTCGCGCATGTACGTCGAGATGATGCAATGCCAGTCCGAGCAGGAG  |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P3 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | .....G..T..T.....TC.....T.....G..G.....                       |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P4 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P9 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P7 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | .....G..T..T.....TC.....T.....G..G.....                       |      |      |      |      |
|                 | 1210                                      | 1220                                                          | 1230 | 1240 | 1250 | 1260 |
| <i>phyA</i> -P2 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | CCTTTGGTCCGTGTCTTGGTTAATGATCGTGTGTTCCGCTGCATGGCTGTCCGGTTGAT   |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P3 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..GC.....C.....C.....G.....                                   |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P4 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P9 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P7 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..GC.....C.....C.....G.....                                   |      |      |      |      |
|                 | 1270                                      | 1280                                                          | 1290 | 1300 | 1310 | 1320 |
| <i>phyA</i> -P2 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | GCTTTGGGAAGATGTACGCGGGATAGCTTCGTGAAGGGGTTGAGCTTTGCCAGATCTGGG  |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P3 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | .....A..G.....C.....T.....T.....                              |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P4 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P9 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                     |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P7 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | .....A..G.....C.....T.....T.....                              |      |      |      |      |
|                 | 1330                                      | 1340                                                          |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P2 | ..... ..... ..... ..... .....             | GGTGATTGGGCGGAGTGTTTGT                                        |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P3 | ..... ..... ..... ..... .....             | ..... ..... ..... ..... .....                                 |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P4 | ..... ..... ..... ..... .....             | ..... ..... ..... ..... .....                                 |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P9 | ..... ..... ..... ..... .....             | ..... ..... ..... ..... .....                                 |      |      |      |      |
| <i>phyA</i> -P7 | ..... ..... ..... ..... .....             | ..... ..... ..... ..... .....                                 |      |      |      |      |

*Trình tự axit amin và sự khác biệt giữa các gen tách dòng:*

|         |                                                              |                |                     |              |     |     |
|---------|--------------------------------------------------------------|----------------|---------------------|--------------|-----|-----|
|         | 10                                                           | 20             | 30                  | 40           | 50  | 60  |
| phyA-P2 | LAVPASRNQSTCDTV                                              | DQGYQCFSETSHLW | GQYAPFFSLANKSAISPDV | PAGCHVTFAQVL |     |     |
| phyA-P3 |                                                              |                |                     | E            |     | R   |
| phyA-P4 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P9 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P7 |                                                              |                |                     |              |     |     |
|         | 70                                                           | 80             | 90                  | 100          | 110 | 120 |
| phyA-P2 | SRHGARYPTDSKGKKYSALIEEIQQNATTFEGKYAFLKTYNYSLGADDLTPFGEQELVNS |                |                     |              |     |     |
| phyA-P3 |                                                              |                | D                   |              |     |     |
| phyA-P4 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P9 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P7 |                                                              |                |                     |              |     |     |
|         | 130                                                          | 140            | 150                 | 160          | 170 | 180 |
| phyA-P2 | GVKFYQRYKSLTRNIVPFISSGSSRVIASGNKFIEGFQSTKLKDPRAQPDQSSPKIDVV  |                |                     |              |     |     |
| phyA-P3 | I                                                            | E              | I                   | K            |     | G   |
| phyA-P4 | E                                                            |                |                     |              |     | G   |
| phyA-P9 | E                                                            |                |                     |              |     |     |
| phyA-P7 | I                                                            | E              | I                   | K            |     |     |
|         | 190                                                          | 200            | 210                 | 220          | 230 | 240 |
| phyA-P2 | ISEASTSNNTLDPGTCTVFEDSELADDIEANFTATFVPSIRQRLNDLSGVSLTDEVTY   |                |                     |              |     |     |
| phyA-P3 | S                                                            |                | AV                  |              | T   |     |
| phyA-P4 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P9 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P7 | S                                                            |                | AV                  |              | T   |     |
|         | 250                                                          | 260            | 270                 | 280          | 290 | 300 |
| phyA-P2 | LMDMCSFDITSTSTVDTKLSPFCDLFTHEEWINYDYLQSLNKYYGHGAGNPLGPTQGVGY |                |                     |              |     |     |
| phyA-P3 |                                                              |                | D                   |              | K   |     |
| phyA-P4 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P9 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P7 |                                                              |                | D                   |              | K   |     |
|         | 310                                                          | 320            | 330                 | 340          | 350 | 360 |
| phyA-P2 | ANELIARLTHSPVHDDTSSNHTLDSNPATFPLNSTLYADFSHDNGIISILFALGLYNGTK |                |                     |              |     |     |
| phyA-P3 |                                                              |                | S                   |              |     |     |
| phyA-P4 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P9 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P7 |                                                              |                | S                   |              |     |     |
|         | 370                                                          | 380            | 390                 | 400          | 410 | 420 |
| phyA-P2 | PLSSTTAENITQTDGFSSAWTVPFASRMYVEMMQCQSEQLVVRVLVNDRVVPLHGCPVD  |                |                     |              |     |     |
| phyA-P3 | T                                                            | VQ             |                     | D            |     | L   |
| phyA-P4 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P9 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P7 | T                                                            | VQ             |                     |              |     | L   |
|         | 430                                                          | 440            |                     |              |     |     |
| phyA-P2 | ALGRCTRDSFVKGLSFARSGGDWAECFA                                 |                |                     |              |     |     |
| phyA-P3 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P4 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P9 |                                                              |                |                     |              |     |     |
| phyA-P7 |                                                              |                |                     |              |     |     |

**Bảng 6.** Độ tương đồng trình tự ADN của các gen *phyA* mới tách dòng và các gen đã tách dòng trước đây tại Viện Công nghiệp Thực phẩm.

| <i>Gen</i>      | <i>phyA_P1</i> | <i>phyA_P2</i> | <i>phyA_P3</i> | <i>phyA_P4</i> | <i>phyA_P6</i> | <i>phyA_P8</i> | <i>phyA_P9</i> | <i>phyA_P10</i> |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| <i>phyA_P1</i>  | <b>ID</b>      | 93.4           | 96.7           | 93.3           | 95.8           | 95.9           | 93.3           | 96.7            |
| <i>phyA_P2</i>  | 93.4           | <b>ID</b>      | 93.4           | 99.5           | 92.1           | 92.3           | 99.7           | 93.2            |
| <i>phyA_P3</i>  | 96.7           | 93.4           | <b>ID</b>      | 93.4           | 96.1           | 96.2           | 93.3           | 96.4            |
| <i>phyA_P4</i>  | 93.3           | 99.5           | 93.4           | <b>ID</b>      | 92.1           | 92.3           | 99.7           | 93.2            |
| <i>phyA_P6</i>  | 95.8           | 92.1           | 96.1           | 92.1           | <b>ID</b>      | 99.1           | 92.1           | 96.2            |
| <i>phyA_P8</i>  | 95.9           | 92.3           | 96.2           | 92.3           | 99.1           | <b>ID</b>      | 92.2           | 96.3            |
| <i>phyA_P9</i>  | 93.3           | 99.7           | 93.3           | 99.7           | 92.1           | 92.2           | <b>ID</b>      | 93.1            |
| <i>phyA_P10</i> | 96.7           | 93.2           | 96.4           | 93.2           | 96.2           | 96.3           | 93.1           | <b>ID</b>       |

**Bảng 7.** Số lượng nucleotid khác biệt giữa các gen *phyA* mới tách dòng và các gen đã tách dòng trước đây tại Viện Công nghiệp Thực phẩm.

| <i>Gen</i>      | <i>phyA_P1</i> | <i>phyA_P2</i> | <i>phyA_P3</i> | <i>phyA_P4</i> | <i>phyA_P6</i> | <i>phyA_P8</i> | <i>phyA_P9</i> | <i>phyA_P10</i> |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| <i>phyA_P1</i>  | <b>ID</b>      | 88             | 44             | 90             | 56             | 54             | 89             | 44              |
| <i>phyA_P2</i>  | 88             | <b>ID</b>      | 88             | 6              | 105            | 103            | 3              | 91              |
| <i>phyA_P3</i>  | 44             | 88             | <b>ID</b>      | 88             | 52             | 50             | 89             | 48              |
| <i>phyA_P4</i>  | 90             | 6              | 88             | <b>ID</b>      | 105            | 103            | 3              | 91              |
| <i>phyA_P6</i>  | 56             | 105            | 52             | 105            | <b>ID</b>      | 12             | 106            | 51              |
| <i>phyA_P8</i>  | 54             | 103            | 50             | 103            | 12             | <b>ID</b>      | 104            | 49              |
| <i>phyA_P9</i>  | 89             | 3              | 89             | 3              | 106            | 104            | <b>ID</b>      | 92              |
| <i>phyA_P10</i> | 44             | 91             | 48             | 91             | 51             | 49             | 92             | <b>ID</b>       |

**Bảng 8.** Độ tương đồng trình tự protein của các gen *phyA* mới tách dòng và các gen đã tách dòng trước đây tại Viện Công nghiệp Thực phẩm.

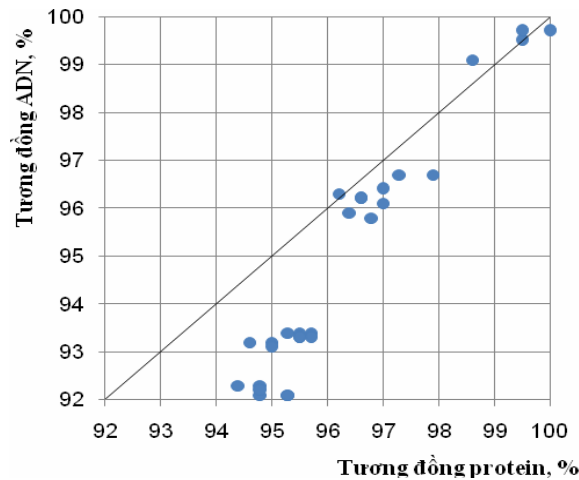
| <i>Protein</i> | <i>phyA_P1</i> | <i>phyA_P2</i> | <i>phyA_P3</i> | <i>phyA_P4</i> | <i>phyA_P6</i> | <i>phyA_P8</i> | <i>phyA_P9</i> | <i>phyA_P10</i> |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| <i>phyA_P1</i> | <b>ID</b>      | 95.5           | 97.9           | 95.5           | 96.8           | 96.4           | 95.5           | 97.3            |
| <i>phyA_P2</i> | 95.5           | <b>ID</b>      | 95.3           | 99.5           | 94.8           | 94.4           | 99.5           | 94.6            |
| <i>phyA_P3</i> | 97.9           | 95.3           | <b>ID</b>      | 95.7           | 97             | 96.6           | 95.7           | 97              |
| <i>phyA_P4</i> | 95.5           | 99.5           | 95.7           | <b>ID</b>      | 95.3           | 94.8           | 100            | 95              |

| Protein         | <i>phyA_P1</i> | <i>phyA_P2</i> | <i>phyA_P3</i> | <i>phyA_P4</i> | <i>phyA_P6</i> | <i>phyA_P8</i> | <i>phyA_P9</i> | <i>phyA_P10</i> |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| <i>phyA_P6</i>  | 96.8           | 94.8           | 97             | 95.3           | <b>ID</b>      | 98.6           | 95.3           | 96.6            |
| <i>phyA_P8</i>  | 96.4           | 94.4           | 96.6           | 94.8           | 98.6           | <b>ID</b>      | 94.8           | 96.2            |
| <i>phyA_P9</i>  | 95.5           | 99.5           | 95.7           | 100            | 95.3           | 94.8           | <b>ID</b>      | 95              |
| <i>phyA_P10</i> | 97.3           | 94.6           | 97             | 95             | 96.6           | 96.2           | 95             | <b>ID</b>       |

**Bảng 9.** Số lượng axit amin khác biệt giữa các gen *phyA* mới tách dòng và các gen đã tách dòng trước đây tại Viện Công nghiệp Thực phẩm.

| Protein         | <i>phyA_P1</i> | <i>phyA_P2</i> | <i>phyA_P3</i> | <i>phyA_P4</i> | <i>phyA_P6</i> | <i>phyA_P8</i> | <i>phyA_P9</i> | <i>phyA_P10</i> |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| <i>phyA_P1</i>  | <b>ID</b>      | 20             | 9              | 20             | 14             | 16             | 20             | 12              |
| <i>phyA_P2</i>  | 20             | <b>ID</b>      | 21             | 2              | 23             | 25             | 2              | 24              |
| <i>phyA_P3</i>  | 9              | 21             | <b>ID</b>      | 19             | 13             | 15             | 19             | 13              |
| <i>phyA_P4</i>  | 20             | 2              | 19             | <b>ID</b>      | 21             | 23             | 0              | 22              |
| <i>phyA_P6</i>  | 14             | 23             | 13             | 21             | <b>ID</b>      | 6              | 21             | 15              |
| <i>phyA_P8</i>  | 16             | 25             | 15             | 23             | 6              | <b>ID</b>      | 23             | 17              |
| <i>phyA_P9</i>  | 20             | 2              | 19             | 0              | 21             | 23             | <b>ID</b>      | 22              |
| <i>phyA_P10</i> | 12             | 24             | 13             | 22             | 15             | 17             | 22             | <b>ID</b>       |

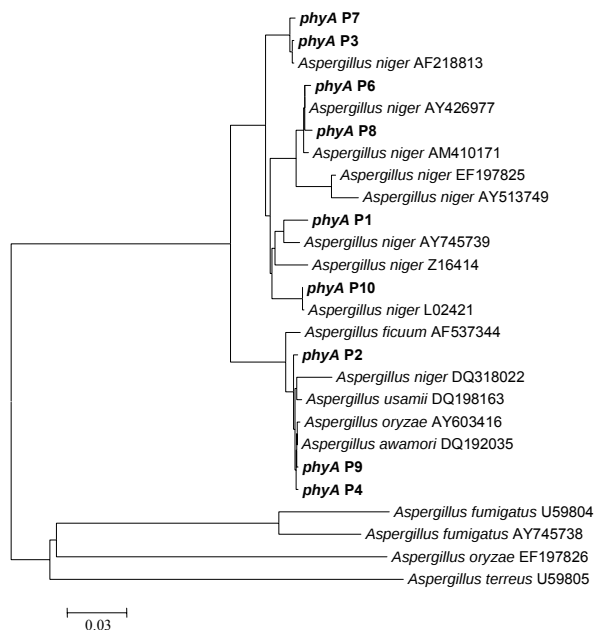
Trình tự *phyA* xác định trong năm 2009 được so sánh với các trình tự thu nhận trước đó của nhóm đề tài. Các trình tự có độ tương đồng thấp nhất là *phyA-P6* và *phyA-P9* (với 92.1%). Hai trình tự này có 106 nucleotid khác biệt và thể hiện bằng 21 thay đổi trong trình tự axit amin. Khác biệt về trình tự ADN không nhất thiết dẫn tới khác biệt về trình tự acid amin. Ví dụ, *phyA-P4* và *phyA-P9* có 3 nucleotid khác biệt nhưng trình tự axit amin không có khác biệt nào. Nhìn chung, trình tự axit amin bảo thủ hơn so với trình tự nucleotid (xem hình 19).



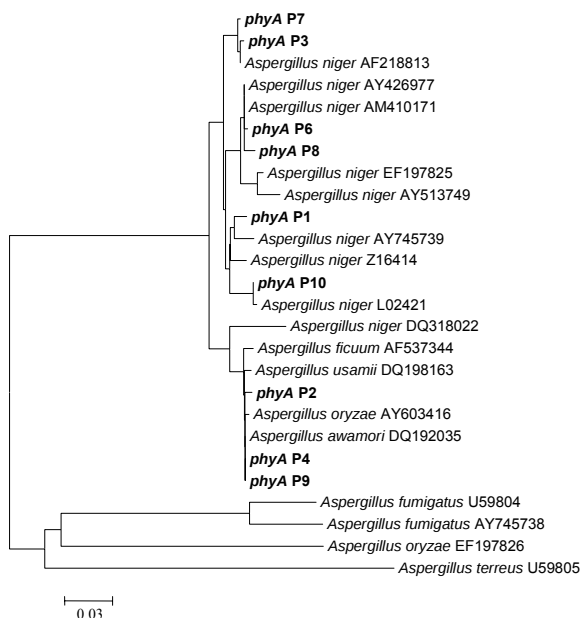
**Hình 19.** Phân tích tương quan giữa độ tương đồng về trình tự nucleotid và trình tự axit amin của *phyA* từ các chủng *A. niger* khảo sát (P1, P2, P3, P4, P6, P8, P9, P10).

Trình tự *phyA* của chúng tôi được sử dụng để so sánh với các trình tự đã công bố trên Genbank. Kết quả phân tích độ tương đồng trong trình tự ADN và protein cho thấy gen *phyA* đã công bố đối với nấm mốc *Aspergillus niger* có thể chia làm 4 nhóm chính và nguồn gen đã tách dòng và hiện đang lưu giữ tại Viện Công nghiệp thực phẩm có đại diện ở cả 4 nhóm này. Những nhóm chính được liệt kê bao gồm: (nhóm 1) - P3, P7; (nhóm 2) – P6, P8; (nhóm 3) – P1, P10; (nhóm 4) – P2, P4, P9. Kết quả phân nhóm dựa trên cả trình tự nucleotid và trình tự amino acid đều đưa ra cùng kết quả khá nhất quán.

Sự có mặt của hầu hết các nhóm cơ bản sẽ giúp ích trong việc tìm những gen thích hợp phục vụ cải thiện đặc tính chủng tái tổ hợp. Các gen tách dòng hiện đang được lưu giữ trong dạng kết gán với vector pTZ57R/T.



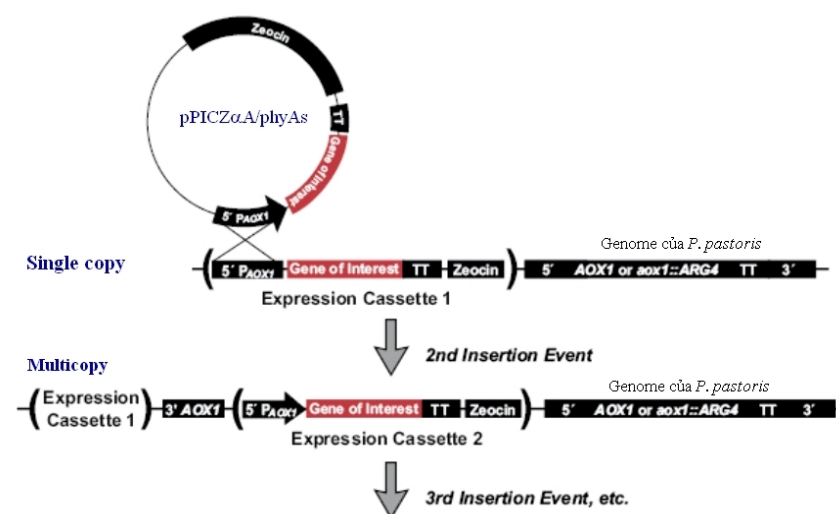
**Hình 20** . Đồ thị độ tương đồng trình tự gen mã hóa enzyme phytase của các chủng nghiên cứu và những chủng đã công bố. Mã số GenBank của các trình tự được đưa kèm sau tên loài.



**Hình 21**. Đồ thị độ tương đồng trình tự acid amin enzyme phytase của các chủng nghiên cứu và những chủng đã công bố. Mã số GenBank của các trình tự được đưa kèm sau tên loài.

### 3.2. Xác định số lượng copy của 3 thể biến nạp *Pichia pastoris* được biến nạp 2008

Giống như *Saccharomyces cerevisiae*, ADN mạch thẳng được chuyển vào trong tế bào *P. pastoris* khi gặp vùng tương đồng với genome sẽ xảy quá trình trao đổi chéo (Cregg et al., 1985; Cregg et al., 1989). Quá trình trao đổi chéo có thể xảy ra một lần tạo ra chủng biến nạp đơn bản (single copy) hoặc được thực hiện nhiều lần tạo ra chủng biến nạp đa bản (multicopy). Sự trao đổi chéo nhiều lần tạo đa bản xảy ra ngẫu nhiên và có tần suất từ 1-10% so với tổng số tế bào có trao đổi chéo đơn bản (Invitrogene). Đối với *P. pastoris* khi được biến nạp bằng vector tái tổ hợp pPICZαA/*phyAs* quá trình trao đổi chéo sẽ xảy ra tại locus AOX1 hoặc tại locus *aox1::ARG4* (hình 22). Đối với những chủng biến nạp đa bản sẽ chứa nhiều khung biểu hiện (Expression cassette) trong genome.



**Hình 22.** Mô hình biến nạp đa bản

Từ những kết quả nghiên cứu năm 2008 về tách dòng và biểu hiện *phyA* cho thấy: các thể biến nạp chống chịu với nồng độ kháng sinh zeocin cao có khả năng sản xuất nhiều phytase ngoại bào hơn. Cơ sở khoa học của vấn đề này là do thể biến nạp chứa nhiều khung biểu hiện nên chứa nhiều gene kháng zeocin đồng thời chứa nhiều gene *phyA*. Đây chính là những thể biến nạp mang đa gene đích (multicopy). Việc nghiên cứu xác định số lượng gene (copy number) được biến nạp vào tế bào nấm men là hết sức quan trọng, đây là cơ sở để xác định, lựa chọn những chủng hoạt tính cao.

Nguyên lý thiết kế thí nghiệm để xác định số lượng copy như sau:

Chúng tôi sử dụng 2 gene, một gene chỉ thị nằm trên genome của nấm men, gene này có số lượng copy đã biết và không có trình tự trùng với plasmid ngoại lai cũng như gene đích. Gene thứ hai dùng để xác định số lượng copy là gene có liên quan mật thiết đến gene đích (nằm trong khung biểu hiện) gene này có yêu cầu là không có trình tự trùng lặp với bất kì trình tự nào của genome *Pichia pastoris*. Genome của các thể biến nạp được

định lượng sử dụng Realtime PCR (RT-PCR). Nếu sản phẩm của gene chỉ thị bằng nhau mà sản phẩm của gene đích khác nhau thì các thể biến nạp đó có sự khác nhau về số lượng copy. Đây chính là cơ sở so sánh để xác định số lượng copy giữa các thể biến nạp. Dựa trên nguyên lý đó chúng tôi tiến hành thiết kế mồi cho phản ứng RT-PCR như sau:

### 3.2.1. Thiết kế mồi cho RT-PCR

#### 3.2.1.1. Thiết kế mồi cho gene chỉ thị

Trên genome của nấm men chúng tôi lựa chọn gene *MET2* làm gene chỉ thị (Lin-Cereghino. J.và CS, 2008). Trình tự của gene *MET2* như sau:

#### >AY876284 *Pichia pastoris* homoserine-O-transacetylase (*MET2*) gene, toàn bộ CDS

AGGAAGTCAAATGCGAACTGATTATTAGAGATTTCAATAATAACATAAAGCAGCTACCCCTACCACAGAAATAGGTGACTTGTGAG  
TCGGTTCTGACTATGGTACTATTTAGTCTAAAATATTCCAATTCAGCTCCTAATGGCATTCTGTAGATCGAGCTCAATTAACCCCTT  
AACATGTATTATCTCAAGCATTAGTTGTGTGATACTCTAGGCAATTGACTACTGGGCTACCTACATGCCATGAAAAAGCAACAAG  
AAAATCCCCGGTAATCTTGTAAATGAGTTCCAGGTCAGTGAAATCAGGCAAGAGCTTAAGTTAAGTTACCTTTGAACAGGCCTCAGT  
TTATTAACCTTGTCTCCACACCGCGACATTGCAGTGATCTAATCTACTCTCCTTCTATAATCAGTCTCAAGTTCGCCCTTTTT  
CGCCTCAACATATTGAATTAAGAGATACCAGGAGGTTTCATGAGCCCGAAAACCCATTCTCACTTCTAGTAAAAGGTCAGACAATAG  
TGGAATACCTCAAGTGCAGTTGGAAGC**GCGGAACTTTGCACAATGTTCCGGTAGCTTTCAAACCTGGGGGAAGCTTAACAAA**  
**GAAGGCACCAATTGCATGGTGATCTGCCATGCTTTAACGGGTT**CCAGTGATGTAGTTGATTGGTGGGGACCTTTGTTAGGTAAGGG  
CAAGGCATTTGATCCCGCAAGTTTTTATTGTGTGCTTGAATCTTTAGGAAGTCCTTATGGGTCTGTTCTCCAGTAAGTAGAG  
ATCCGGCAGTTAATGAAGTATATGGTCCAGAATCCCCCTGTATCAGTCAGAGATGATGTGAATATACATAGACTGATTCTAAAT  
GATCTTGGTGTCAAGCAGGTCGCAATAGTAATAGGAGGATCTATGGGTGGAATGCTTGCTTTAGAATGGTGCTTTTTTGGTCTATC  
GTATGCTCTCAACTGCGTCGTTTTGGCCACCAGTGCTAAGCATAGTGCATGGTGTATATCTTGGGGAGAAGCCCAAAGACAAAGTA  
TATACAGTGATCCCAAATATGATGACGGTTATTACCCACTGGAAGATCCACCTATTCAAGGATTGGGAGCTGCTAGAATGAGCGCT  
TTGTTGACTTATCGTTCTCGCAACTCTTTGGAAGAAGCTTTGGACGAGGAGCCCCAACGCCACAAATGAGAGAAAAGTCTCTTCG  
AACTTCGGTCATAACTGATGCCATTGAAGCACCTGCTGTTAGCGAAGATAACTGCGCTGTACATAACGATGGACATTATTCATACT  
CTTCATCCACCAAAGTTAGATCAAGATCTCTGTCTTCGAACAATTTAGTCTTTAGATGTGAAAGAGGACACAAGTAGTATTGTC  
AACCAACATGGCGTTGGTCAACGTACCCGCCGTCGTCACAGCATTATTTTTCTGCTCAAAGTTACTTAAGGTACCAGGCAGCCAA  
GTTTCAGTCAAAGATTTGATGCTAATTGTTATATATCCATTACAAGGAAATGGACACACATGACGTGGGAAGGAACAGACCTGAAT  
TTCATAACTCCACAATAGAGGCTCTCCAATCGTTAGAACAGAATTTCTTGTAGTAGGCATACAATCTGATGCCCTGTTTACATAC  
TCAGAACAGGTTTTTCATAGCAAAACAGGTTAAGAATTCGAAGTTATGCAAAATTGACTCTCCAGAGGGCCATGATCGTTTTTATT  
AGAGTTCGAAGCAATTAACAAGCTGATTCTAGAATTTGAAATCGAACACGTTCTGAACTTCTAATGCAAACTCCGACGATTCTT  
GGTCGGATTCTGAAGTAAAGCACTAAGGAGAGCATATTCGGTGAAGTTGAGGATCCGACGTCGTTGGT**TAAG**CTACAAAGTAAAAA  
TTTGCCTCAGCTATTTGCTCTGGCTGAAATAATAATGACCGTTTATAGAAAATTAATAATGGTAAAGTTTTTATCATTCTTTAAC  
GAGCCTCAATCTGTCTAAAACCTTCTGACGGACTTCGATTATATCCGTCGCTCGGAAGGTAAAAAAGTGCAACGATGAAAAAGT  
TGGTAACCGCAAGCACAGTTATTAATGTTGACGTGAAAAGAAAAAGAACACTAGACCATGGGGCTATGAAAGAGACTAATGTTACG  
GAAACATGCAATCCAATAATGACTAAAATTGAAACAAAGACGTGAAAAGATCTCCATTTACCTGACGTCT

Dựa trên trình tự trên chúng tôi thiết kế mồi *MET2* nhằm nhân trình tự của gen *MET2*. Tuy nhiên yêu cầu sản phẩm của RT-PCR có kích thước nhỏ (dưới 150 bp), nên chúng tôi thiết kế mồi nhân đoạn trình tự thuộc gene *MET2* có chiều dài 100 bp (trình tự gạch chân).

#### 3.2.1.2. Thiết kế mồi nhân gene đích

Gene xác định số lượng multicopy là gene phải nằm trên plasmid ngoại lai và nằm trong khung biểu hiện (expression catsette), đồng thời gene này phải đảm bảo có số lượng phụ thuộc vào gene *phyA*. Chúng tôi lựa chọn gene *Ble* là gene kháng zeocin. Trình tự của *Ble* được trình bày dưới đây:

### >Sh *Ble* ORF 2163-2537 (xác định tính kháng Zeocin)

ATGGCCAAGTTGACCAAGTGCCGTTCCGGTGCTACCGCGCGGACGTCGCCGGAGCGGTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGAGCGTGACCCCTGTTTCATCAGCGCGGTCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACACCTGGCTGGGTGGGTGGCGCGGCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTCGTGTCCACGAACTTCGGGACGCCTCCGGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGA

Nguyên tắc thiết kế mồi cho gene *Ble* cũng giống như cho gene *MET2*. Đặc điểm của 2 cặp mồi cho gene *MET2* và gene *Ble* được trình bày qua bảng 10.

**Bảng 10.** Đặc điểm của mồi cho gene *MET2* và *Ble*.

| Tên mồi | Trình tự                     | Độ dài mồi (nu) | Nhiệt độ biến tính (°C) | Nhiệt độ bám mồi tối ưu (°C) | Chiều dài sản phẩm PCR |
|---------|------------------------------|-----------------|-------------------------|------------------------------|------------------------|
| MET2-F  | 5'-GGCGAAACTTTGCACAATGTTC-3' | 22              | 62.3                    | 52.0                         | 100 bp                 |
| MET2-R  | 5'-AACCCGTTAAAGCATGGCAGAT-3' | 22              | 62.8                    |                              |                        |
| Ble-F   | 5'-CGTGACCCCTGTTTCATCAGC-3'  | 19              | 56.4                    | 56.5                         | 99 bp                  |
| Ble-R   | 5'-CACTCGGCGTACAGCTCGT-3'    | 19              | 59.4                    |                              |                        |

### 3.2.2. Chuẩn bị nguyên liệu phục vụ định lượng copy

Nuôi cấy các chủng tái tổ hợp *Pichia pastoris* trên môi trường YPD sau đó tiến hành tách chiết ADN tổng số, tinh sạch ADN và dùng làm khuôn cho phản ứng PCR. Các chủng tham gia xác định số copy được mô tả qua bảng 11.

**Bảng 11.** Các chủng xác định số lượng copy.

| Stt | Tên chủng                 | Khả năng mọc trên zeocin (mg/l) | Hoạt tính (IU/ml) | Số copy |
|-----|---------------------------|---------------------------------|-------------------|---------|
| 1   | <i>Pichia pastoris</i> B  | <1000                           | 149               | Đơn bản |
| 2   | <i>Pichia pastoris</i> A3 | 2000                            | 373               | Đa bản  |
| 3   | <i>Pichia pastoris</i> A6 | 2000                            | 394               | Đa bản  |
| 4   | <i>Pichia pastoris</i> A7 | 2000                            | 449               | Đa bản  |

Điểm khác biệt của phản ứng RT-PCR so với PCR thông thường chính là chất bắt màu huỳnh quang có trong thành phần phản ứng. Chất bắt màu huỳnh quang đảm bảo độ nhạy và độ đặc hiệu với từng thiết bị của máy RT-PCR. Nồng độ chất bắt màu huỳnh quang nếu thấp quá sẽ khiến quá trình bắt màu định lượng ADN thiếu chính xác, ngược lại nồng độ cao hoàn toàn gây ức chế phản ứng PCR. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng SYBR-Green là chất bắt màu huỳnh quang, nồng độ phù hợp cho phản ứng RT-PCR đã được chúng tôi nghiên cứu và tối ưu. Thành phần cho phản ứng RT-PCR được trình bày qua bảng 12.

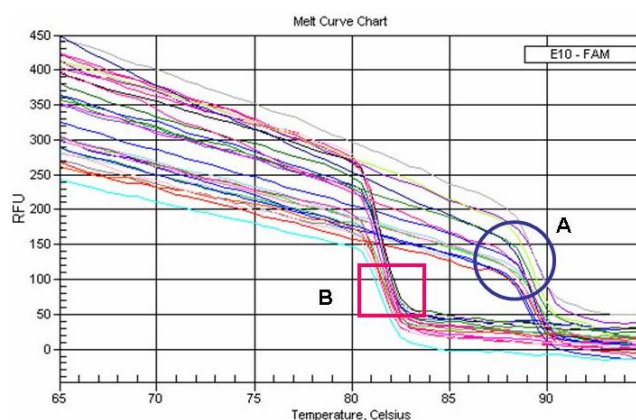
**Bảng 12.** Thành phần cho phản ứng RT-PCR.

| Stt         | Thành phần       | Thể tích (μl) |
|-------------|------------------|---------------|
| 1           | 10x buffer       | 5             |
| 2           | dNTP             | 1             |
| 3           | Primer F         | 1             |
| 4           | Primer R         | 1             |
| 5           | Taq polymerase   | 0.5           |
| 6           | ADN khuôn        | 1             |
| 7           | SYBR-Green *     | 6             |
| 8           | H <sub>2</sub> O | 34.5          |
| <b>Tổng</b> |                  | <b>50</b>     |

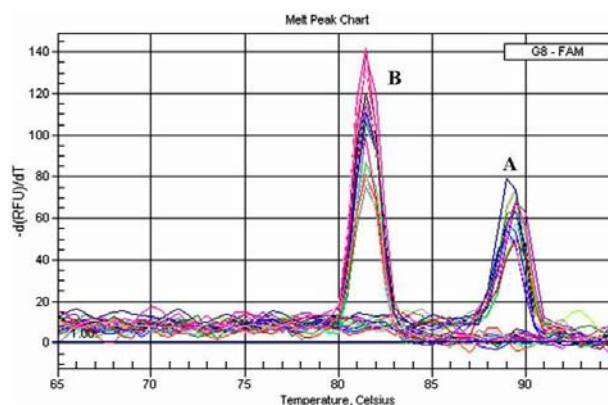
(\*) - Dung dịch SYBR-Green được chuẩn bị dung dịch gốc với tỷ lệ 1:3000, bảo quản tránh ánh sáng trực tiếp.

### 3.2.3. Xác định tính đặc hiệu của cặp mồi thiết kế

Một trong những yêu cầu của phản ứng Realtime-PCR là cặp mồi phải đặc hiệu và sản phẩm PCR phải tương ứng với thiết kế dự đoán ban đầu. Đảm bảo được điều kiện này thì cách tính số copy mới chính xác. Nhằm xác định tính đặc hiệu của hai cặp mồi MET2 và *Ble* cho sản phẩm PCR. Chúng tôi tiến hành lấy 12 sản phẩm PCR từ mỗi cặp mồi trên và kiểm tra bằng phương pháp Melting Curve (biểu đồ biến tính). Kết quả được minh họa qua các hình 23, 24..



**Hình 23.** Biểu đồ chạy Melting curve của sản phẩm PCR. A: sản phẩm PCR của cặp mồi *Ble*; B: sản phẩm PCR của cặp mồi MET2.

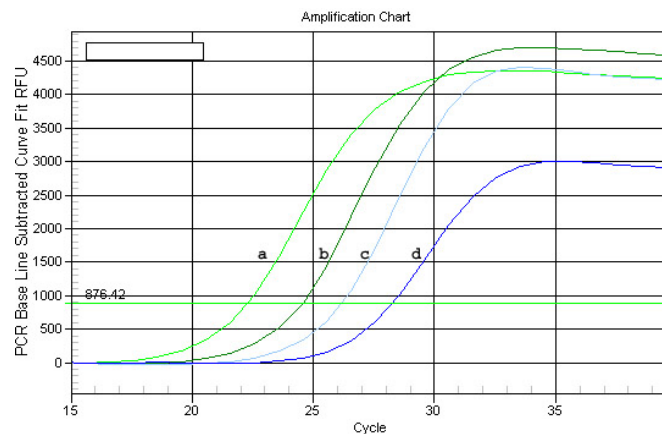


**Hình 24.** Biểu đồ điểm biến tính ( $T_m$ ) của sản phẩm PCR. A: sản phẩm PCR của cặp mồi *Ble*; B: sản phẩm PCR của cặp mồi *MET2*.

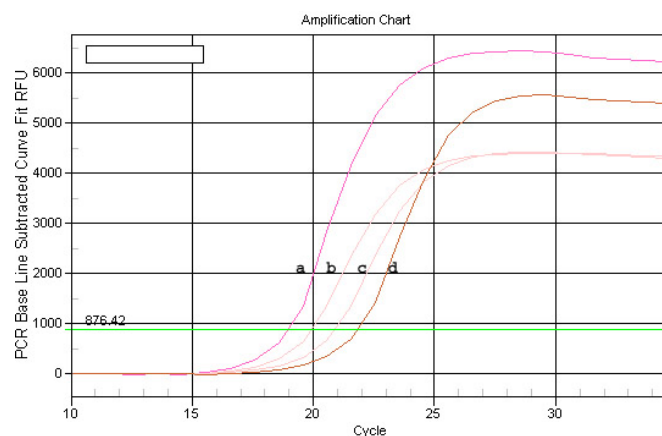
Theo lý thuyết sản phẩm PCR của cặp mồi *Ble* có tỷ lệ GC = 69%, đối với cặp mồi *MET2* là 47%. Chính sự khác biệt của tỷ lệ GC này sẽ dẫn tới sự khác biệt về  $T_m$  (nhiệt độ biến tính). Kết quả phân tích cho thấy các mẫu chạy phân biệt rõ về 2 nhóm nhóm A và nhóm B, tương ứng với sản phẩm của hai cặp mồi (hình 23). Khi phân tích  $T_m$  của các sản phẩm PCR chúng tôi nhận thấy cũng có sự phân ra 2 nhóm rõ rệt (hình 24), nhóm A tương ứng với sản phẩm của cặp mồi *Ble* cho kết quả  $T_m = 89^\circ\text{C}$ , trong khi đó nhóm B tương ứng với  $82^\circ\text{C}$ . Kết quả này hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết theo trình tự của 2 sản phẩm PCR trên. Việc không xuất hiện bất kỳ một peak bất thường nào chứng tỏ rằng cặp mồi chúng tôi thiết kế là đặc hiệu cho RT-PCR.

### 3.2.4. Xác định mối tương quan giữa gene chỉ thị và gene đích

Đối với RT-PCR chỉ tiêu quan trọng nhất chính là chu kì ngưỡng - Ct (threshold cycle) đó là điểm mà tín hiệu huỳnh quang tăng lên mạnh mẽ và đột ngột so với đường cơ sở, ở các mẫu tùy thuộc vào lượng ADN khuôn khác nhau mà có giá trị Ct khác nhau. Khi lượng ADN khuôn càng nhiều thì giá trị Ct càng thấp và ngược lại. Nhằm xác định mối tương quan giữa gene chỉ thị và gene đích, đồng thời xây dựng đồ thị chuẩn để xác định số copy. Chúng tôi lựa chọn ADN của chủng *Pichia pastoris* A6 làm khuôn. ADN làm khuôn chuẩn được pha loãng với các nồng độ như sau: 0; 2; 4; 8 (lần). Tương ứng với số lượng copy được giảm đi 2, 4, 8 lần, sau đó khuôn ở các nồng độ pha loãng này được bổ sung với hai cặp mồi khác nhau là *MET2* và *Ble* đồng thời tiến hành chạy RT-PCR song song. Chương trình chạy được thực hiện bước biến tính ở  $95^\circ\text{C}$  trong 3 phút, tiếp đó là 45 chu kỳ ( $94^\circ\text{C}$  trong 30 giây;  $52^\circ\text{C}$  trong 1 phút;  $72^\circ\text{C}$  trong 1 phút). RT-PCR được tiến hành chạy trên máy Bio-Rad iQ5. Dữ liệu được xử lý bằng thống kê toán học và phần mềm chuyên dụng cho máy iQ5. Kết quả chạy RT-PCR với mẫu chuẩn được mô tả qua hình 25, 26 và bảng 13.



**Hình 25.** RT-PCR mẫu chuẩn với cặp môi Ble với *P. pastoris* A6. Chú thích các đường chạy: a – không pha loãng; b – pha loãng 2 lần; c: pha loãng 4 lần; d: pha loãng 8 lần.



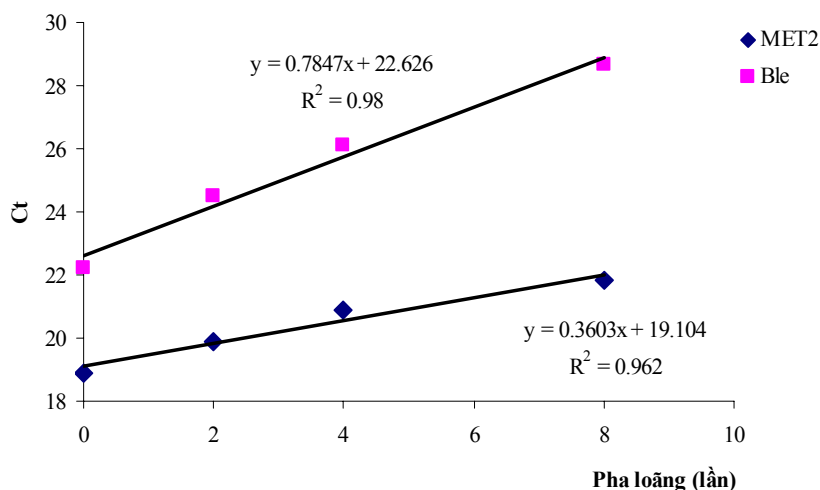
**Hình 26.** RT-PCR mẫu chuẩn với cặp môi MET2 với *P. pastoris* A6. a – Mẫu không pha loãng; b – pha loãng 2 lần; c: pha loãng 4 lần; d: pha loãng 8 lần.

**Bảng 13.** Tổng hợp kết quả Ct (threshold cycle) với mẫu chuẩn *P. pastoris* A6.

| Stt | Độ pha loãng mẫu chuẩn | Giá trị Ct   |             |
|-----|------------------------|--------------|-------------|
|     |                        | Cặp môi MET2 | Cặp môi Ble |
| 1   | × 0                    | 18.90        | 22.22       |
| 2   | × 2                    | 19.88        | 24.50       |
| 3   | × 4                    | 20.87        | 26.12       |
| 4   | × 8                    | 21.81        | 28.65       |

Kết quả qua hình 18, 19 cho thấy phản ứng PCR đã diễn ra và cặp môi thiết kế là phù hợp cho quá trình nhân gene. Ở các độ pha loãng khác nhau giá trị Ct là khác nhau, ở độ pha loãng cao tức là lượng ADN khuôn càng ít thì giá trị Ct cũng tăng theo, điều này

hoàn toàn phù hợp với nguyên lý của Realtime-PCR. Hơn nữa giá trị Ct ở 2 cặp mồi là không giống nhau: Đối với cặp mồi MET2 nồng độ ADN khuôn giảm đi 2 lần thì Ct tăng thêm 1 chu kỳ, trong khi đó đối với cặp mồi *Ble* là 2 chu kỳ. Điều này có thể giải thích là do số copy của ADN khuôn khác nhau hoặc do tính chất đặc điểm của trình tự gene cần khuếch đại khác nhau dẫn tới tốc độ sinh tổng hợp là khác nhau. Dựa trên những kết quả ở bảng 13, chúng tôi thiết lập mối tương quan giữa độ pha loãng (số copy) với Ct cho từng cặp mồi (hình 27).

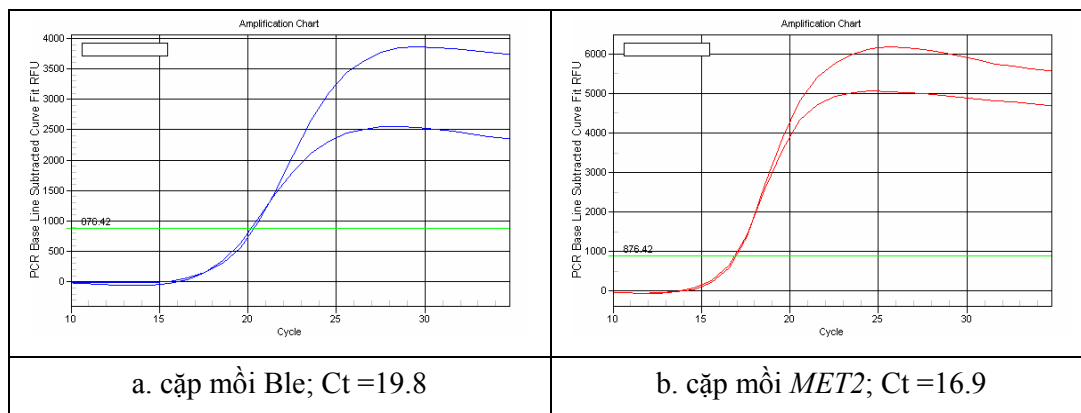


**Hình 27.** Đồ thị tuyến tính giữa độ pha loãng mẫu chuẩn với Ct của các cặp mồi MET2 và *Ble* với *P. pastoris* A6.

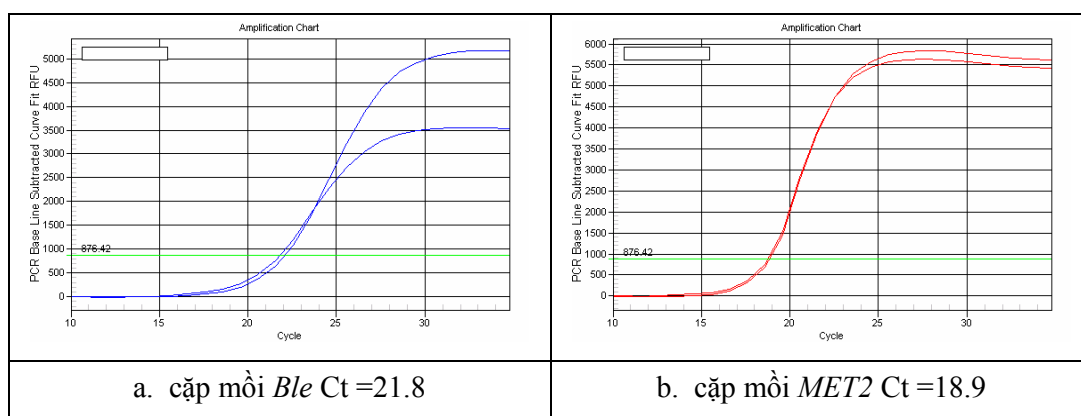
Kết quả trên cho thấy với cặp mồi *Ble*, mối quan hệ về Ct với độ pha loãng được biểu diễn bởi hàm số:  $y = 0,7847x + 22,626$  (công thức 1), với cặp mồi MET2 là:  $y = 0,3603x + 19,104$  (công thức 2). (trong đó y là giá trị Ct; x là độ pha loãng, điều kiện  $x \neq \pm 1$ ). Như vậy, với kết quả đạt được chúng tôi đã nhận được 2 công thức với  $R^2 \geq 0.95$  thể hiện mối tương quan giữa x và y trong các công thức là chặt chẽ và kết quả có độ tin cậy cao.

### 3.2.4. Kiểm tra xác định số copy ở các chủng

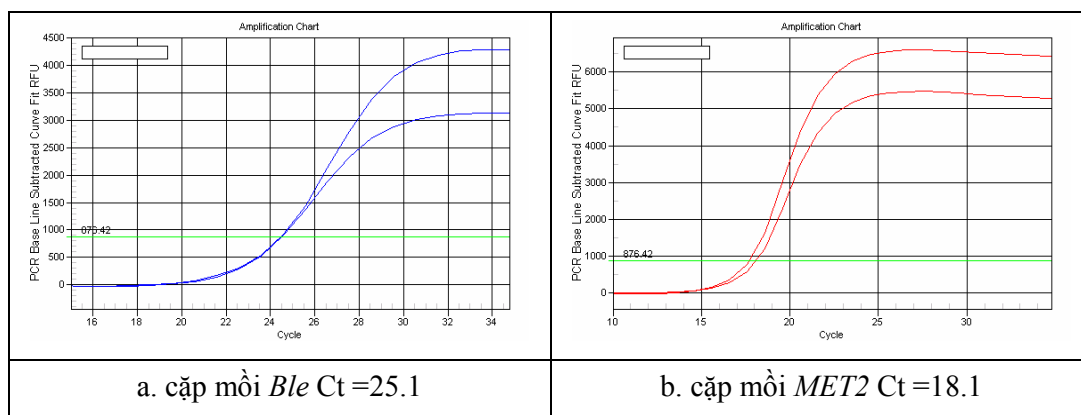
Trong tất cả các thể biến nạp được kiểm tra, theo lý thuyết chỉ có thể khác nhau về số copy của gene *Ble*, còn đối với gene MET2 thì tất cả các chủng đều có số copy như nhau vì đây là gene chỉ thị giống nhau ở tất cả các tế bào *Pichia pastoris*. Dựa trên lý thuyết đó, khi so sánh các chủng với nhau và so sánh với chủng đơn bản (*Pichia pastoris* B), chúng tôi sẽ đưa các chủng cần kiểm tra về cùng giá trị Ct của cặp mồi MET2. Trên cơ sở chênh lệch về Ct của cặp mồi *Ble* dựa vào đồ thị chuẩn (theo công thức 1, 2) có thể tính số copy cho từng thể biến nạp. Chúng tôi tiến hành chạy RT-PCR cho các thể biến nạp cần kiểm tra với 2 cặp mồi MET2 và *Ble*. Mỗi phản ứng PCR được lặp lại 2 lần. Kết quả chạy chi tiết cho từng chủng được mô tả qua hình 29, 30, 31.



**Hình 29.** Biểu đồ RT-PCR của *Pichia pastoris* A3.



**Hình 30.** Biểu đồ RT-PCR của *Pichia pastoris* A7.



**Hình 31.** Biểu đồ RT-PCR của *Pichia pastoris* B.

Kết quả RT-PCR trên các mẫu cho thấy ở mỗi mẫu chạy đã có sự khác biệt về Ct giữa các cặp mồi. Dựa trên những kết quả Ct về PCR, chúng tôi tính ra giá trị Ct của cặp mồi *Ble* theo đường chuẩn. So sánh giá trị Ct cặp mồi *Ble* của các thể biến nạp A3, A6, A7 với thể biến nạp đơn bản B. Trên cơ sở chênh lệch về giá trị Ct dựa theo đồ thị chuẩn

chúng tôi tính được số lượng copy cho từng thể biến nạp. Kết quả được trình bày qua bảng 14.

**Bảng 14.** Xác định số copy cho từng thể biến nạp

| Thể biến nạp              | Ct thực tế |      | Ct tính theo đường chuẩn |     | $\Delta Ct$ cặp môi <i>Ble</i> – với thể đơn bản | Số copy |
|---------------------------|------------|------|--------------------------|-----|--------------------------------------------------|---------|
|                           | Met2       | Ble  | Met2                     | Ble |                                                  |         |
| <i>Pichia pastoris</i> B  | 18.1       | 25.1 | 18                       | 25  | 0                                                | 1       |
| <i>Pichia pastoris</i> A3 | 16.9       | 19.8 | 18                       | 22  | 3                                                | 3       |
| <i>Pichia pastoris</i> A6 | 18.9       | 22.2 | 18                       | 20  | 5                                                | 5       |
| <i>Pichia pastoris</i> A7 | 18.8       | 21.8 | 18                       | 20  | 5                                                | 5       |

Kết quả trên cho thấy thể biến nạp A6, A7 cho số copy cao nhất 5 copy, trong khi đó A3 chỉ cho 3 copy. Kết quả này phù hợp với khả năng chống chịu zeocin khi cả 3 thể biến nạp này sinh trưởng ở nồng độ zeocin cao 2000 mg/l.

### 3.3. Xác định điều kiện lên men thu phytase tái tổ hợp

#### 3.3.1. Nghiên cứu khả năng sinh trưởng của *Pichia pastoris*

##### 3.3.1.1. Khả năng sinh trưởng trên môi trường nhân tạo

Mật độ tế bào có ảnh hưởng quyết định đến năng suất protein ngoại bào. Để khảo sát khả năng sinh trưởng của chủng *Pichia pastoris* chúng tôi tiến hành thí nghiệm như sau. Bổ sung 5% giống ban đầu vào các môi trường nuôi cấy nuôi cấy thu sinh khối, mật độ tế bào ban đầu trong các môi trường khi mới bắt đầu bổ sung giống đo ở bước sóng 600 nm là 0,3. Sau 2 ngày nuôi cấy ở 30 °C, tốc độ lắc 200 rpm tiến hành kiểm tra khả năng sinh trưởng bằng cách li tâm, rửa tế bào với nước cất và đo mật độ tế bào ở bước sóng 600 nm. Kết quả được trình bày qua bảng sau :

**Bảng 15.** Kết quả đo mật độ tế bào tại bước sóng 600 nm.

| Stt | Môi trường | OD 600 nm |      |      |
|-----|------------|-----------|------|------|
|     |            | 0h        | 24h  | 48h  |
| 1   | YPD        | 0.3       | 15.6 | 28.2 |
| 2   | BMGY       | 0.3       | 10.2 | 18.1 |
| 3   | mBMGHY     | 0.3       | 8.7  | 15.4 |
| 4   | BMG        | 0.3       | 6.8  | 12.3 |
| 5   | FBSH       | 0.3       | 4.7  | 7.9  |

Kết quả trên cho thấy môi trường YPD với thành phần glucose, cao men, peptone cho kết quả cao nhất. Sau 48 h giá trị OD đạt 28,2 trong khi đó môi trường FBSH cho kết quả

thấp nhất giá trị OD = 7,8. Môi trường BMG là môi trường được khuyến cáo sử dụng cho nuôi cấy biểu hiện với nguồn cacbon là glycerol cho kết quả là 12,3. So với môi trường YPD là môi trường giàu dinh dưỡng và rất phù hợp cho sinh trưởng của nấm men *Pichia pastoris*. Các môi trường còn lại sử dụng nguồn cacbon là glycerol đều cho kết quả thấp hơn nhiều so với YPD. Như vậy sử dụng môi trường YPD với các thành phần thông dụng đồng thời năng suất thu sinh khối cao sẽ là lợi thế khi nuôi cấy ở qui mô lớn.

### 3.3.1.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng của *Pichia pastoris*

pH không chỉ là yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng của nấm men mà pH còn ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt tính và năng suất của enzyme. Với mong muốn tìm giá trị pH thích hợp nhất cho sinh trưởng của nấm men chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của yếu tố này sinh trưởng của nấm men.

Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường YPD với các pH khác nhau của đệm photphat 0,1 M. Tiến hành nuôi cấy ở 30 °C tốc độ lắc 200 rpm, kiểm tra OD 600 nm sau 24 và 48 h. Kết quả được trình bày qua bảng 16.

**Bảng 16.** Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng

| STT | pH  | OD 600 nm |      |      |
|-----|-----|-----------|------|------|
|     |     | 0h        | 24h  | 48h  |
| 1   | 4.5 | 0.23      | 12.6 | 25.7 |
| 2   | 5.0 | 0.23      | 13.5 | 26.8 |
| 3   | 5.5 | 0.23      | 14.6 | 27.2 |
| 4   | 6.0 | 0.23      | 14.7 | 27.5 |
| 5   | 6.5 | 0.23      | 15.0 | 28.1 |
| 6   | 7.0 | 0.23      | 16.2 | 28.9 |
| 7   | 8.0 | 0.23      | 16.0 | 28.3 |

Kết quả cho thấy nấm men *Pichia pastoris* phát triển tốt trong dải pH từ 4,5 – 8,0 trong đó pH 6-8 là thuận lợi nhất cho sinh trưởng của nấm men. Khả năng sinh trưởng với dải pH rộng sẽ giúp cho việc chuẩn bị môi trường và công tác nuôi cấy sẽ dễ dàng hơn do không phải kiểm soát chặt chẽ yếu tố này.

### 3.3.1.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng sinh trưởng

Nhằm nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng sinh trưởng của *Pichia pastoris* chúng tôi tiến hành nuôi cấy trên môi trường YPD ở pH 6.0 tốc độ lắc 200 rpm ở các giá trị nhiệt độ khác nhau như trong bảng dưới. Kết quả kiểm tra mật độ tế bào sau 48 h nuôi cấy được mô tả qua bảng 17.

**Bảng 17.** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của *Pichia pastoris*.

| Stt | Nhiệt độ | OD 600 nm |      |      |
|-----|----------|-----------|------|------|
|     |          | 0h        | 24h  | 48h  |
| 1   | 25       | 0.28      | 11.2 | 21.6 |
| 2   | 28       | 0.28      | 14.8 | 25.8 |
| 3   | 30       | 0.28      | 16.8 | 29.4 |
| 4   | 32       | 0.28      | 19.2 | 31.8 |

Kết quả từ bảng 20 cho thấy *Pichia pastoris* phát triển mạnh nhất ở 32°C sau 48 h nuôi cấy giá trị OD 600 nm đạt 31,8 trong khi đó ở 30°C đạt 29,8. Tuy nhiên, do nhiệt độ 32°C nằm ở cuối vùng khảo sát, việc mở rộng dải nhiệt độ trong đánh giá sinh trưởng là cần thiết trong thời gian tới.

#### 3.3.1.4. Nghiên cứu thay thế môi trường YPD

Môi trường nuôi cấy YPD phù hợp với sinh trưởng của nấm men. Tuy nhiên với thành phần Bacto Peptone và Cao nấm men là hai thành phần hữu cơ giàu dinh dưỡng và có giá thành cao. Những yếu tố này sẽ làm tăng giá thành sản nếu thực hiện lên men trên qui mô công nghiệp. Nhằm định hướng giảm giá thành cho qui trình lên men chúng tôi tiến hành nghiên cứu nuôi cấy nấm men trên môi trường nuôi cấy thông dụng là Malt. Thí nghiệm được tiến hành bằng cách chuẩn bị môi trường với 2% là glucose sau đó bổ sung dịch chiết Malt với cách nồng độ từ 1 Bx đến 6 Bx như bảng 21. Sau đó bổ sung giống và tiến hành nuôi cấy ở 30 °C, tốc độ lắc 200 rpm, kiểm tra giá trị OD sau 24 và 48h. Kết quả được trình bày qua bảng 18.

**Bảng 18.** Ảnh hưởng của nồng độ Malt đến sinh trưởng của nấm men.

| Stt | Môi trường | OD 600 nm |      |      |
|-----|------------|-----------|------|------|
|     |            | 0h        | 24h  | 48h  |
| 1   | 1Bx        | 0.32      | 3.0  | 5.6  |
| 2   | 2Bx        | 0.32      | 5.6  | 10.7 |
| 3   | 3Bx        | 0.32      | 9.8  | 17.1 |
| 4   | 4Bx        | 0.32      | 10.4 | 22.4 |
| 5   | 5Bx        | 0.32      | 11.9 | 28.9 |
| 6   | 6Bx        | 0.32      | 12.2 | 30.2 |
| 7   | YPD        | 0.32      | 13.8 | 27.1 |

Kết quả cho thấy mật độ tế bào nấm men sau 48h nuôi cấy tăng dần từ nồng độ 1Bx đến 6 Bx. Nguyên nhân chính của sự sinh trưởng tốt như trên theo chúng tôi đó là hàm

lượng đường và vi chất (vitamin, khoáng chất...) tăng khi bổ sung thêm dịch Malt. Tuy nhiên giữa nồng độ 5 Bx và 6 Bx sự khác biệt về mật độ tế bào là không đáng kể nên hoàn toàn có thể chọn nồng độ 5 Bx cho việc lên men thu sinh khối. Khi so sánh với môi trường YPD kết quả cho thấy khi nồng độ Malt lớn hơn 5 Bx thì khả năng sinh trưởng của nấm men tốt hơn.

### 3.3.2. Nghiên cứu khả năng biểu hiện của *Pichia pastoris*

#### 3.3.2.1. Ảnh hưởng sinh khối từ các môi trường đến khả năng biểu hiện

Theo khuyến cáo của Invitrogen (hãng cung cấp chủng chủ *Pichia pastoris*), việc nuôi cấy thu sinh khối nấm men chỉ được thực hiện trên môi trường có nguồn cacbon là glycerol. Tuy nhiên theo những nghiên cứu trên chúng tôi nhận thấy khả năng nấm men sinh trưởng trên môi trường có glycerol thấp hơn rất nhiều so với môi trường có glucose. Chính vì vậy việc kiểm tra khả năng biểu hiện của sinh khối từ các môi trường khác nhau có ý nghĩa đến việc chọn lựa môi trường lên men tối ưu.

Thí nghiệm được tiến hành khi nuôi cấy sinh khối trên các môi trường như trong bảng 22. Sau 48h, sinh khối được thu và rửa bằng nước cất, sinh khối được hòa tan trở lại môi trường BMM với OD 600 nm = 20; bổ sung 1% methanol, biểu hiện sau 4 ngày ở 28°C và kiểm tra hoạt tính, kết quả được trình bày qua bảng sau:

**Bảng 19.** Ảnh hưởng sinh khối từ các môi trường đến khả năng biểu hiện.

| STT | Sinh khối từ môi trường | Hàm lượng Glucose sau 48 h nuôi cấy | Hoạt tính IU/ml |
|-----|-------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| 1   | YPD                     | 0%                                  | 759             |
| 2   | BMGY                    | 0%                                  | 768             |
| 3   | mBMGHY                  | 0%                                  | 746             |
| 4   | BMG                     | 0%                                  | 725             |
| 5   | FBSH                    | 0%                                  | 739             |
| 6   | Malt 5 Bx + 2% glucose  | 3%                                  | 246             |

Kết quả trên cho thấy ở các môi trường nuôi sinh khối có nguồn cacbon là glycerol cho kết quả từ 725 IU/ml đến 768 IU/ml. Đối với môi trường YPD có nguồn cacbon glucose sau giai đoạn nuôi sinh khối, tế bào biểu hiện cho kết quả tương đồng với tế bào từ các môi trường có nguồn cacbon là glycerol. Tuy nhiên riêng môi trường Malt 5 Bx + 2% glucose cho kết quả rất thấp chỉ đạt 246 IU/ml. Điều này có thể do hàm lượng glucose tích tụ trong tế bào cao (có thể ở dạng glycogen dự trữ) nên khi chuyển sang môi trường biểu hiện glucose sẽ ức chế hoạt động của promoter AOX1. Từ kết quả trên chúng

tôi lựa chọn môi trường YPD cho nuôi cấy thu sinh khối phục vụ cho quá trình biểu hiện thu phytase.

### 3.3.2.2. Khả năng biểu hiện hoạt tính trực tiếp môi trường YPD

Đặc điểm của *Pichia pastoris* là sử dụng promoter AOX1 để điều khiển sự biểu hiện gen ngoại lai là nếu trong môi trường có glucose, acetate... sẽ ức chế hoạt động của promoter dẫn tới gen ngoại lai không được biểu hiện. Đó chính là lý do mà khi nuôi cấy biểu hiện *Pichia pastoris* người ta thường sử dụng môi trường nuôi cấy thu sinh khối, sau đó li tâm loại lấy sinh khối rồi bổ sung vào môi trường biểu hiện mới có nguồn cacbon là methanol để kích hoạt sự biểu hiện protein. Cách làm như trên sẽ đảm bảo loại bỏ các chất ức chế, tuy nhiên sẽ gây phức tạp qui trình và tốn kém nguyên liệu nếu thực hiện ở qui mô lớn.

Từ những kết quả nghiên cứu trên cho thấy môi trường YPD rất phù hợp cho nuôi cấy thu sinh khối. Trong nghiên cứu này lần đầu tiên chúng tôi tiến hành thử nghiệm biểu hiện trên môi trường YPD không đổi mới. Do môi trường YPD có chứa glucose nên trước khi biểu hiện một yêu cầu cần thiết là hàm lượng glucose rất thấp hoặc không có trong môi trường nuôi cấy.

Thí nghiệm được tiến hành như sau: bổ sung 5% giống vào trong bình tam giác 1000ml chứa 250ml môi trường YPD, tiến hành nuôi sinh khối ở 30°C. Sau mỗi 48, 72, 96, 120h thì rút ra 20ml dịch nuôi cấy chuyển vào bình tam giác 250ml, bổ sung 1% methanol (v/v), rồi biểu hiện hoạt tính. Cứ sau 24h biểu hiện lấy 200µl dịch nuôi cấy để thử hoạt tính. Bổ sung methanol hằng ngày để đảm bảo nồng độ methanol là 1%.

Để tiện theo dõi chúng tôi qui ước kí hiệu các mẫu được biểu hiện vào các thời điểm kế tiếp nhau như sau:

Mẫu được biểu hiện vào thời điểm sau khi nuôi lấy sinh khối được 48h : **mẫu A**

Mẫu được biểu hiện vào thời điểm sau khi nuôi lấy sinh khối được 72h : **mẫu B**

Mẫu được biểu hiện vào thời điểm sau khi nuôi lấy sinh khối được 96h: **mẫu C**

Mẫu được biểu hiện vào thời điểm sau khi nuôi lấy sinh khối được 120h: **mẫu D**

Mẫu đối chứng là sinh khối được biểu hiện trên môi trường YPD mới đã loại bỏ glucose (1% YE, 2% Bacto pepton). Trong thí nghiệm này mật độ tế bào lúc biểu hiện với giá trị OD 600nm là 23.04. Kết quả thu được trình bày qua bảng dưới đây:

**Bảng 20.** Khả năng biểu hiện hoạt tính của các mẫu.

| Stt | Tên mẫu   | Hoạt tính theo thời gian (IU/ml) |      |       |       |       |
|-----|-----------|----------------------------------|------|-------|-------|-------|
|     |           | 24h                              | 48h  | 72h   | 96h   | 120h  |
| 1   | Đối chứng | 33,0                             | 70,9 | 104,1 | 183,4 | 167,5 |

|   |              |      |      |       |       |       |
|---|--------------|------|------|-------|-------|-------|
| 2 | <b>Mẫu A</b> | 26,1 | 54,6 | 96,1  | 136,7 | 139,2 |
| 3 | <b>Mẫu B</b> | 33,8 | 61,1 | 100,3 | 168,0 | 153,4 |
| 4 | <b>Mẫu C</b> | 43,6 | 73,4 | 128,7 | 172,6 | 159,2 |
| 5 | <b>Mẫu D</b> | 54,5 | 84,9 | 102,9 | 164,5 | 131,8 |

Kết quả trên cho thấy *Pichia pastoris* có khả năng biểu hiện khá tốt trên môi trường YPD không đổi mới, hoạt tính thu được ở các mẫu A,B,C,D khá đồng đều nhau và dao động từ 131,8-159,2 IU/ml sau 4 ngày biểu hiện. Khả năng sinh enzyme mạnh nhất sau 4 ngày biểu hiện đến ngày thứ năm thì hầu như hoạt tính đều giảm. Riêng mẫu A thì mức độ biểu hiện hoạt tính vào ngày thứ tư và thứ năm tương đương nhau.

Theo kết quả trên thì mẫu C (sau 96h nuôi sinh khối) cho hoạt tính cao nhất, sau đó đến mẫu B (sau 72h nuôi sinh khối), mẫu D (sau 120h nuôi sinh khối), Mẫu A (sau 48h nuôi sinh khối). Điều này có thể giải thích là đến ngày thứ hai khi nuôi lấy sinh khối lượng glucose trong môi trường còn tồn tại, nên khả năng ức chế promotor AOX1. Thời gian nuôi cấy thu sinh khối càng kéo dài, lượng glucose càng giảm thì khả năng ức chế promotor AOX1 càng yếu, kết quả là lượng enzyme sinh ra tăng lên. Nếu nuôi lấy sinh khối đến ngày thứ 5 mới bổ sung methanol (mẫu sau 120h) thì mức độ biểu hiện hoạt tính cũng không cao hơn so với các mẫu B, C đó là bởi vì thời gian nuôi cấy quá lâu, tế bào quá già, trong môi trường nuôi cấy có nhiều chất thải độc hại cho nên khả năng sinh enzym cũng giảm.

Đối với mẫu đối chứng hoạt tính sau 24h biểu hiện không cao hơn so với mẫu A cùng thời điểm. Như vậy suy ra rằng vào ngày thứ hai lượng glucose trong môi trường gần như đã bị tiêu thụ hết. Tuy nhiên mức độ biểu hiện hoạt tính trên mẫu đối chứng cao hơn các mẫu khác 183,4 IU/ml điều này có thể giải thích mẫu đối chứng là môi trường mới giàu dinh dưỡng hơn và không tồn tại nhiều chất chất độc hại ức chế tế bào.

Kết quả trên cho thấy so với những môi trường biểu hiện chuyên dụng mà chúng tôi nghiên cứu năm 2008 năng suất enzyme là thấp hơn. Tuy nhiên đây là nghiên cứu mà lần đầu tiên môi trường nuôi cấy cũng là môi trường biểu hiện, đặc biệt glucose được sử dụng là nguồn cung cấp cacbon. Với những kết quả đạt được đã cho thấy glucose không quá nhạy cảm để ức chế hoàn toàn promotor AOX1. Chính điều này là tiền đề để có thể sử dụng các môi trường rẻ tiền thông dụng để có thể nuôi cấy và biểu hiện *Pichia pastoris* trên qui mô công nghiệp, hướng tới giảm giá thành cho protein tái tổ hợp.

### 3.4. Nghiên cứu qui trình thu hồi phytase ở qui mô phòng thí nghiệm

#### 3.4.1. Nghiên cứu qui trình tinh chế phytase từ môi trường nuôi cấy

Sau quá trình nuôi cấy biểu hiện phytase tái tổ hợp thu được về cơ bản là rất sạch về mặt protein. Tuy nhiên trong canh trường nuôi cấy còn chứa rất nhiều các khoáng chất và đặc biệt còn có thể tồn dư methanol. Methanol là một chất gây độc đối với có thể động

vật nếu chế phẩm được ứng dụng trực tiếp cho chăn nuôi. Chính vì thế việc loại bỏ methanol và các khoáng chất dư thừa là rất cần thiết nhằm đảm bảo cho chế phẩm enzyme an toàn và ổn định trong quá trình bảo quản.

Các phương pháp tinh sạch hiện nay rất đa dạng, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành lựa chọn phương pháp lọc luân hồi. Nguyên lý của phương pháp này là cho dịch cần tinh sạch chạy qua màng lọc protein với kích thước xác định, những phân tử hữu cơ nhỏ và vô cơ sẽ đi qua lỗ màng. Protein đích có kích thước to hơn kích lỗ màng sẽ được giữ lại. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng kích thước màng là 10 kDa để tiến hành tinh sạch protein.

Dịch enzyme thô thu được khi biểu hiện trên môi trường lỏng YPD, ly tâm loại bỏ sinh khối, chúng tôi tiến hành lọc 2 lít dịch enzyme thô sau khi lọc được hết enzyme thô chúng tôi bổ sung 500 ml nước cất lọc rửa bổ sung. Kết quả được trình bày qua bảng dưới đây.

**Bảng 21.** Tinh sạch phytase tái tổ hợp bằng phương pháp lọc luân hồi

| Các bước tinh chế     | Thể tích (ml) | Hoạt tính (IU/ml) | Hiệu suất thu hồi phytase (%) | Hàm lượng Pvc ( $\mu$ M/ml) | Hàm lượng protein (mg/ml) | Hiệu suất thu hồi protein (%) | Hoạt tính đặc hiệu (IU/mg) |
|-----------------------|---------------|-------------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Dịch gốc (enzyme thô) | 2000          | 185               | 100                           | 92,6                        | 0.13                      | 100                           | 1423                       |
| Dịch lọc              | 310           | 1180              | 99                            | 0                           | 0.55                      | 66                            | 0                          |
| Dịch thải             | 2190          | 0                 | 0                             | 84,6                        | 0.04                      | 34                            | 2145                       |

Kết quả trên cho thấy sau quá trình tinh sạch lượng enzyme thu hồi đạt rất cao đến 99% hoạt tính, còn về mặt protein lượng protein thu hồi đạt 66% và lượng protein bị loại thải là 34%. Các muối khoáng vô cơ như photpho đã được loại bỏ hoàn toàn sau quá trình lọc. Như vậy quá trình tinh sạch bằng màng lọc 10k Da là rất hiệu quả để tinh chế phytase ngoại bào từ *Pichia pastoris*. Với ưu điểm nhanh, qui mô dễ mở rộng, hiệu suất thu hồi enzyme cao, loại bỏ được methanol và các muối khoáng có thể coi đây là một giải pháp tối ưu khi thực hiện sản xuất chế phẩm enzyme. Phần methanol sót sẽ bay hơi trong các bước làm khô tiếp theo.

### 3.4.2. Nghiên cứu qui trình tạo chế phẩm enzyme dạng bột

Sử dụng 200 ml dung dịch enzyme trộn với 400 g cơ chất mang, sau đó cho hỗn hợp vào sấy đông khô ở nhiệt độ  $-40^{\circ}\text{C}$ . Sau 12 giờ chúng tôi thu được chế phẩm dạng bột khô, kiểm tra hoạt tính chế phẩm được trình bày qua bảng sau đây:

**Bảng 22.** Hiệu suất thu làm khô chế phẩm bằng đông khô

| <b>Trước khi sấy</b>                  |                            | <b>Sau khi sấy</b>               |                            |
|---------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| <i>Nguyên liệu</i>                    | <i>Tổng hoạt tính (IU)</i> | <i>Sản phẩm</i>                  | <i>Tổng hoạt tính (IU)</i> |
| Dịch enzyme: 200 ml hoạt tính 1180/ml | 263000                     | 400g chế phẩm hoạt tính 578 IU/g | 228000                     |
| Cơ chất mang: 400 g                   |                            |                                  |                            |

Như vậy sau khi sấy đông khô, tỷ lệ bảo toàn enzyme đạt 97%.

### 3.4.3. Nghiên cứu đặc tính của chế phẩm dạng bột

Trong sản xuất enzyme ứng dụng cho thức ăn chăn nuôi hiện nay có 2 phương thức: một là chế phẩm enzyme được sản xuất riêng và người chăn nuôi bổ sung vào thức ăn khi sử dụng. Chế phẩm này đảm bảo qui trình bảo quản enzyme tối ưu tuy nhiên sẽ rất khó khăn khi thực hiện ứng dụng enzyme cho thức ăn qui mô công nghiệp. Chế phẩm enzyme thứ hai là được nhà sản xuất thức ăn chăn nuôi bổ sung trực tiếp vào thức ăn, chế phẩm này sẽ giúp đơn giản qui trình chăn nuôi tuy nhiên đòi hỏi enzyme phải chịu được nhiệt khi trải qua giai đoạn ép viên (75 - 80 °C trong 10 - 1 phút). Nhằm nghiên cứu khả năng bền nhiệt của chế phẩm để làm cơ sở cho định hình quá trình sản xuất enzyme. Chế phẩm enzyme được xử lý nhiệt ở các nhiệt độ khác nhau trong thời gian 30 phút. Sau xử lý nhiệt chế phẩm được ổn định trong điều kiện 4°C trong 30 phút và được kiểm tra hoạt tính, kết quả được trình bày qua bảng 23.

**Bảng 23.** Khả năng bền nhiệt của chế phẩm phytase.

| <b>Stt</b> | <b>Nhiệt độ (°C)</b> | <b>OD 700 nm</b> |           | <b>Pha loãng</b> | <b>IU/g</b> |
|------------|----------------------|------------------|-----------|------------------|-------------|
|            |                      | <b>TN</b>        | <b>ĐC</b> |                  |             |
| 1          | 4                    | 0.584            | 0.132     | 7000             | 549         |
| 2          | 50                   | 0.582            | 0.132     | 7000             | 546         |
| 3          | 60                   | 0.583            | 0.132     | 7000             | 548         |
| 4          | 70                   | 0.580            | 0.132     | 7000             | 544         |
| 5          | 80                   | 0.582            | 0.132     | 7000             | 546         |
| 6          | 90                   | 0.584            | 0.132     | 7000             | 549         |
| 7          | 100                  | 0.578            | 0.132     | 7000             | 542         |

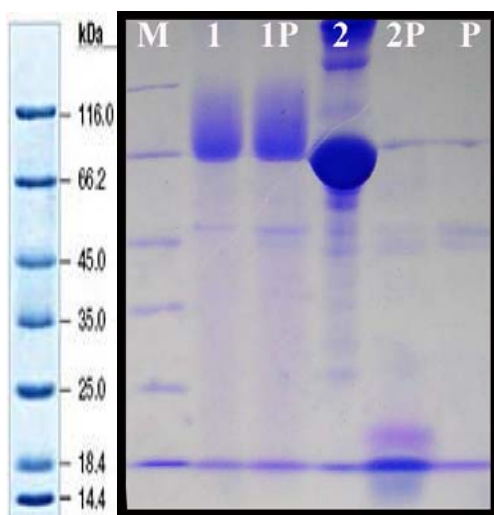
Kết quả cho thấy chế phẩm rất bền với nhiệt, chế phẩm hầu như vẫn đảm bảo hoạt tính ở ngay điều kiện 100°C. Điều này hoàn toàn khác hẳn với sản phẩm enzyme dạng lỏng giảm hoạt tính rất nhanh ở nhiệt độ 70°C. Theo chúng tôi cơ chất mang có vai trò quan trọng đến việc bảo quản và giữ vững cấu trúc không gian của phytase. Chính những liên kết chặt chẽ giữa cơ chất và protein đã giúp enzyme không bị biến tính ở nhiệt độ cao. Trong khi đó khi ở dạng lỏng mỗi liên kết giữa protein với nước và các ion dung dịch đệm là kém bền, khi nhiệt độ cao khiến cho cấu trúc không gian phytase bị phá vỡ.

Hoạt tính phytase từ đó giảm mạnh. Mặc dù sản phẩm phytase khá bền nhiệt ở dạng khô, trong thời gian tới chúng tôi cần thử nghiệm độ bền của sản phẩm ở điều kiện gần nhất với quá trình nén viên trong sản xuất thức ăn gia súc để có câu trả lời xác đáng hơn.

### 3.5. Nghiên cứu tính miễn cảm với enzyme thủy phân protein trong đường tiêu hóa động vật

Một trong những yêu cầu cần thiết đối với enzyme ứng dụng trong chăn nuôi là phải có khả năng chống chịu được hệ enzyme thủy phân trong đường tiêu hoá của động vật. Chỉ khi có được khả năng này enzyme mới có thể thực hiện chức năng xúc tác sinh học trong đường tiêu hoá. Chính vì vậy việc nghiên cứu khả năng miễn cảm với enzyme pepsin, một trong những enzyme thủy phân chủ yếu trong dạ dày của động vật có ý nghĩa quyết định đến ứng dụng của enzyme.

Các mẫu phytase tái tổ hợp, 0,2% BSA (*bovine serum albumin*) được xử lý dung dịch HCl 0.1N (pH = 2.0) có chứa 2000 IU/ml enzyme pepsin với tỷ lệ 1:1. Sau đó hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 45 phút. Mẫu sau khi xử lý được kiểm tra mức độ phân hủy protein bằng phương pháp điện di protein SDS-PAGE. Kết quả chạy điện di được mô tả qua hình dưới đây:



**Hình 32.** Tác động của enzyme pepsin. M: Protein marker; 1: phytase; 1P: phytase xử lý với pepsin; 2: BSA; 2P: BSA xử lý với pepsin; P: enzyme pepsin.

Kết quả cho thấy đối với phytase tái tổ hợp trước và sau xử lý (mẫu 1 và 1P) không bị ảnh hưởng bởi pepsin, trên bản điện di mức độ đậm của hai mẫu là như nhau. Trong khi đó với BSA mặc dù lượng protein ban đầu là khá lớn (giếng 2) nhưng sau khi xử lý với pepsin thì protein BSA bị thủy phân hoàn toàn (giếng 2P), trên bản điện di chỉ còn vạch

protein của enzyme pepsin. Kết quả này cũng cho thấy hoạt động thủy phân enzyme pepsin trong điều kiện dung dịch HCl 0.1N (pH = 2.0) là rất mạnh mẽ.

Nghiên cứu này cho thấy phytase tái tổ hợp không mất cảm với pepsin, một enzyme chủ chốt trong đường tiêu hóa của động vật. Đây là một trong những đặc tính nổi trội để có thể ứng dụng enzyme này cho thức ăn chăn nuôi mà không cần sự can thiệp của các chất bảo quản chống lại sự thủy phân. Điều này giúp đơn giản hoá qui trình sản xuất và góp phần làm giảm giá thành sản phẩm khi thực hiện sản xuất ứng dụng phytase tái tổ hợp cho thức ăn chăn nuôi.

### **3.6. Nghiên cứu tiêu hóa hai pha trong ống nghiệm (*in vitro*)**

Nghiên cứu ở trên cho thấy phytase tái tổ hợp không mất cảm với pepsin trong dạ dày của động vật. Tuy nhiên, trước khi thử nghiệm phytase trên động vật, việc kiểm tra sự tồn tại cũng như khả năng thể hiện hoạt tính của enzym phytase tái tổ hợp trong đường tiêu hóa của động vật là rất cần thiết. Việc hoạt tính còn hay mất, sẽ là cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo khi thử nghiệm trên động vật nuôi. Chính vì vậy chúng tôi chúng tôi tiến hành nghiên cứu này theo phương pháp của Bedford, M. R., and H. L. Classen. 1993.

Mẫu thức ăn đem thử bao gồm: Bột đậu tương, Bột ngô, Bột cám gạo và muối Na-phytate 0.3 mM. Các loại bột trên đều được sấy trong 90°C trong 2 giờ, nhằm đảm bảo độ khô đồng đều cho mẫu, đồng thời làm bất hoạt enzyme phytase thực vật.

- **Giai đoạn tiêu hoá trong dạ dày:**

Cơ chất dùng để thử là 0.1g mỗi mẫu thức ăn trên, riêng muối Na-phytate (nồng độ 0.3 mM) thì dùng 0.3 ml, các mẫu cơ chất này được cho vào từng ống nghiệm riêng biệt. Sau đó bổ sung thêm 3ml dung dịch HCl 0.1N (pH = 2.0) có chứa 2000 IU/ml enzyme pepsin. Tiếp theo thêm vào mỗi mẫu cơ chất trên 0.3 ml enzyme phytase (0.5 IU/ml). Ủ trong 45 phút ở 37°C đồng thời lắc đều nhằm tạo điều kiện giống như nhu động của dạ dày.

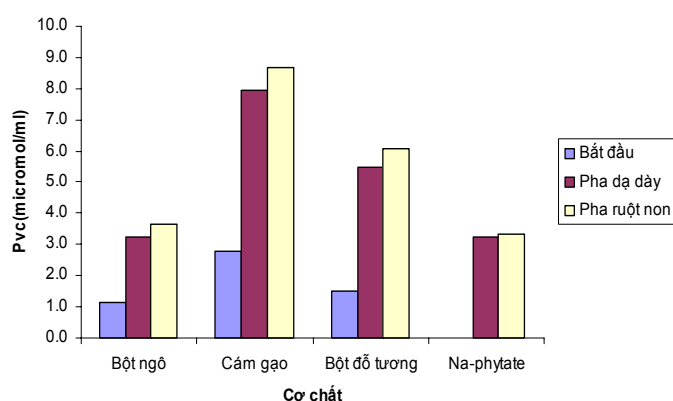
- **Giai đoạn tiêu hoá ruột non.**

Sau pha dạ dày (sau 45 phút) mỗi mẫu trên được bổ sung thêm 1 ml NaHCO<sub>3</sub> 1M (pH = 9.6) có chứa 2 mg pancreatin/ml, tiếp tục ủ và lắc đều ở 37 °C trong 2 giờ. Nhằm tạo điều kiện giống như pha ruột non của động vật.

Mẫu được lấy ra ở từng giai đoạn: Giai đoạn ban đầu (0 phút), sau pha dạ dày (45 phút), sau pha ruột non (165 phút) và được ly tâm 10000 vòng/5 phút, dịch nổi được đem xác định hàm lượng photpho vô cơ. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 24.

**Bảng 24.** Kết quả nghiên cứu tiêu hóa hai pha trong ống nghiệm

| Loại cơ chất        | Lượng Pi ( $\mu\text{mol/ml}$ ) |                |                  | Độ lệch giữa các pha |     |
|---------------------|---------------------------------|----------------|------------------|----------------------|-----|
|                     | Bắt đầu (a)                     | Pha dạ dày (b) | Pha ruột non (c) | b-a                  | c-b |
| <b>Bột cám gạo</b>  | 1,1                             | 3,3            | 3,6              | 2,1                  | 0,4 |
| <b>Bột đỗ tương</b> | 2,8                             | 7,9            | 8,7              | 5,2                  | 0,7 |
| <b>Bột ngô</b>      | 1,5                             | 5,5            | 6,1              | 4,0                  | 0,6 |
| <b>Na-phytate</b>   | 0,0                             | 3,2            | 3,3              | 3,2                  | 0,1 |



**Hình 26.** Hai pha tiêu hóa trong ống nghiệm.

Theo kết quả cho thấy phytase hoạt động ở cả pha dạ dày và pha ruột non. Sau pha dạ dày lượng phospho ở tất cả các mẫu đều tăng lên nhất là cám gạo thêm  $5.2 \mu\text{mol}$ , sau đó là bột đỗ tương ( $4.0 \mu\text{mol}$ ), Na-phytate ( $3.2 \mu\text{mol}$ ) rồi đến bột ngô ( $2.1 \mu\text{mol}$ ). Điều này có thể do lượng cơ chất (axit phytic) và lượng phosphate của cám gạo cao hơn các loại bột khác. Sau pha ruột non lượng Pvc có tăng lên nhưng không đáng kể so với pha dạ dày. Ở bột cám tăng lên  $0.7 \mu\text{mol}$ , bột đỗ tương ( $0.6 \mu\text{mol}$ ), bột ngô ( $0.4 \mu\text{mol}$ ), Na-phytate ( $0.1 \mu\text{mol}$ ). Kết quả này được giải thích là pH kiềm ở ruột non đã làm yếu hoạt động của phytase tái tổ hợp.

Như vậy khả năng miễn cảm hoàn toàn với pepsin, khả năng phân cắt tốt cơ chất trong nguyên liệu làm thức ăn chăn nuôi ngay ở điều kiện axit (pH thấp) là những điều kiện tiên quyết cho việc ứng dụng phytase tái tổ hợp. Mô hình tiêu hóa của chúng tôi tuy nhiên còn một số khiếm khuyết về phổ enzyme protease khảo sát. Việc bổ sung enzyme đặc trưng cho dạ dày hoặc sử dụng trực tiếp dịch dạ dày động vật là điều cần thiết trong những nghiên cứu sau này.

### **3.7. Sản xuất thử nghiệm và chuyển giao thử trên động vật**

Theo công thức lên men và tạo chế phẩm đạt được, chúng tôi lặp lại thí nghiệm lên men, tạo chế phẩm ở quy mô 4L trên môi trường YPD. Dịch lọc và cô qua màng 10 KDa có hoạt tính 2520 IU/ml được bổ sung với 200 g chất mang được đông khô. Sản phẩm cuối cùng dạng khô có hoạt tính 2100 IU/g được chuyển cho nhóm nghiên cứu tại ĐH Sư phạm Hà Nội thử nghiệm thăm dò trên lợn. Kết quả thăm dò ban đầu được đánh giá khả quan (thông báo chưa công bố của Dự án SIDA/SAREC - ĐHSP HN).

# KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

## KẾT LUẬN

Từ những kết quả đạt được, chúng tôi rút ra các kết luận sau:

- Đã tách dòng 05 gene mã hóa *phyA* từ 5 chủng *Aspergillus niger* và giải trình tự 5 gene trên.
- Đã xây dựng được phương pháp xác định số lượng copy của thể biến nạp *Pichia pastoris* bằng RT-PCR và xác định được số copy của 03 chủng có hoạt tính cao như sau: *P. pastoris* A3 có 3 copy; *P. pastoris* A6 và *P. pastoris* A7 có 5 copy.
- Đã xác định điều kiện lên men sinh phytase tái tổ hợp. Môi trường nuôi cấy phù hợp là YPD; pH nuôi cấy từ 6,0 - 8,0; nhiệt độ 30 – 32°C. Hoạt tính đạt được là 172 IU/ml.
- Đã lên men, thu hồi phytase tái tổ hợp ở quy mô phòng thí nghiệm và tạo được 200 g chế phẩm dạng khô với hoạt tính 2100 IU/g sử dụng cho thử nghiệm thăm dò.
- Phytase tái tổ hợp không mất cảm với pepsin trong điều kiện HCl 0,1 N (pH=2,0) và thủy phân tốt các cơ chất làm thức ăn trong pha dạ dày và pha ruột non.

## KIẾN NGHỊ

Nhằm nâng cao công tác phát triển và khai thác hiệu quả nguồn gen vi sinh vật, bảo tồn gen viện Công nghiệp thực phẩm cần được đầu tư chiều sâu về trang thiết bị phục vụ công tác Di truyền – Sinh học phân tử.

# TÀI LIỆU THAM KHẢO

## TIẾNG VIỆT

1. **Vũ Duy Giảng** (2004) Enzyme thức ăn. *Đặc san khoa học kỹ thuật thức ăn chăn nuôi*. **3**, 11-13.
2. **Đỗ Thị Ngọc Huyền** (2007) Nghiên cứu tính chất phytase tự nhiên và tái tổ hợp của vi khuẩn *Bacillus subtilis*. *Tóm tắt luận án Tiến sĩ Sinh học*. Hà Nội.
3. **Đỗ Hữu Phương** (2004) Vai trò của enzyme trong chăn nuôi. *Đặc san khoa học kỹ thuật thức ăn chăn nuôi*. **1**, 25-26.
4. **Nguyễn Thị Hoài Trâm** (2002) Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm enzyme trong sản xuất thức ăn chăn nuôi. Báo cáo tổng kết đề tài R-D. Bộ Công nghiệp, Viện Công nghiệp Thực phẩm, 2002.
5. **Ngô Thanh Xuân** (2006) Tuyển chọn và nghiên cứu sản xuất phytase vi sinh vật trên bã sắn phế thải để dùng cho chăn nuôi. Luận văn thạc sỹ khoa học sinh học. *Trường đại học Sư phạm Hà nội*, 37-38.
6. **Nguyễn Văn Viết** (2008) Nghiên cứu biểu hiện gene phyC có nguồn gốc từ *Bacillus subtilis* trên *E. coli* BL21 (DE3) và bước đầu ứng dụng enzyme tái tổ hợp cho chăn nuôi. Luận văn thạc sỹ khoa học sinh học. *Trường đại học Sư phạm Hà nội*, 37-38.

## TIẾNG ANH

7. A manual of methods for expression of recombinant proteins in *P. pastoris*. *Pichia* Expression Kit (2005) *Catalog N<sup>o</sup> K1740-01*, 1-56.
8. **Al Asheh S. and Duvnjak Z.** (1994) Characteristics of phytase produced by *Aspergillus carbonarius* NRC 401121 in canola meal. *Acta Biotechnol.* **14**, 223-233.
9. **Amano Pharmaceuticals.** (1995) Novel Phytase. *Japan Pat.* **706**, 8-26.
10. **Anno T., Nakanishi K., Matsuno R., Kamikubo T.** (1985) Enzymatic elimination of phytate in soybean milk. *J. Japan Soc. Food Sci. Technol.* **32**, 174-180.
11. **Berka R .M., Rey M. W., Brown K. M., Byun T., Klotz A. V.** (1998) Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Appl Environ Microbiol. American Society for Microbiology.* **64(11)**, 4423–4427.
12. **Billington D. C.** (1993) The Inositol Phosphates. Chemical Synthesis and Biological Significance. *Verlag Chemie, Weinheim.* **26**, 38-42.

13. **Bitar K. and Reinhold J. G.** (1972) Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosa of rat, chicken, calf, and man. *Biochim. Biophys. Acta* **268**, 442-452.
14. **Casey A., Walsh G.** (2004) Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *J Biotechnol.* **110**(3), 313-22.
15. **Cheryan M.** (1980). Phytic acid interactions in food systems. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **13**, 297-335.
16. **Chi H., Tiller G. E., Dasouki M. J. Romano P. R., Wang J., O'keefe R. J., Puzas J. E., Rosier R. N., Reynolds P. R.** (1999) Multiple inositol polyphosphate phosphatase: evolution as a distinct group within the histidine phosphatase family and chromosomal localization of the human and mouse genes to chromosomes 10q23 and 19. *Genomics* **56**, 324-336.
17. **Copper J. R. and Gowing H. S.** (1983) Mammalian small intestine phytase. *Br. J. Nutr.* **50**, 673-678.
18. **Craxton A., Caffrey J. J., Burkhart W., Safrany S. T. and Shears S. B.** (1997) Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase. *Biochem. J.* **328**, 75-81.
19. **Cromwell G. L., Coffey R. D., Monegue H. J. and Randolph J. H.** (1995) Efficacy of low-activity, microbial phytase in improving the bioavailability of phosphorus in cornsoybean meal diets for pigs. *J. Animal Sci.* **73**, 449-456.
20. **Cromwell G. L., Stahly T. S., Coffey R. D., Monegue H. J. and Randolph J. H.** (1993) Efficacy of phytase in improving the bioavailability of phosphorus in soybean meal and corn-soybean meal diets for pigs. *J. Animal Sci.* **71**, 1831-1840.
21. **Delucca A. J., Dischinger C. and Ullah A. H. J.** (1992) Identification of a phytase from *Citrobacter freundii*. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.* **92**, 385.
22. **Deshpande S. S. and Cheryan M.** (1984) Effect of phytic acid, divalent cations, and their interactions on alpha-amylase activity. *J. Food Sci.* **49**, 516-524.
23. **Dvorakova J.** (1998) Phytase: Sources, Preparation and Exploitation. *Folia Microbiol.* **43**, 323-338.
24. **Fernandez J. M., Hoeffler J.P.** (1999) Gen expression System. *Acedamic press*, 158-191.
25. **Findenegg G. R., Nelemans J. A.** (1993) The effect of phytase on the vailability of P from myo-inositol hexaphosphate (phytate) for maize roots. *Plant Soil.* **154**, 189-196.
26. **Freund W. D., Mayr G. W., Tietz C. and Schultz J. E.** (1992) Metabolism of inositol phosphates in the protozoan *Paramecium*. *Eur. J. Biochem.* **207**, 359-367.
27. **Ghareib M.** (1990) Biosynthesis, purification, and some properties of extracellular phytase from *Aspergillus carneus*. *Acta Microbiol. Hung.* **37**, 412-418.

28. **Ghosh S.** (1997). Phytase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. *M. sc dissertation, Department of Microbiology, Unirversity of Delhi, Delhi*, 442-453.
29. **Gibson D. M. and Ullah A. H. J.** (1988) Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* **260**, 503-513.
30. **Graf E., Empson K. and Eaton J. W.** (1987) Phytic acid. A natural antioxidant. *J. Biol. Chem.* **262**, 11647-11651.
31. **Greaves M. P., Anderson G. and Webley D. M.** (1967) The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim. Biophys. Acta* **132**, 412-418.
32. **Greiner R., Haller E., Konietzny U. and Jany K. D.** (1997) Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Arch. Biochem. Biophys.* **341**, 201-206.
33. **Greiner R., Konietzny U. and Jany K. D.** (1993) Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 107-113.
34. **Haefner S., Knietzsch A., Scholten E., Braun J., Lohscheidt M., Zelder O.** (2005) Biotechnological production and applications of phytases. *Appl Microbiol Biotechnol.* **68**, 588-597.
35. **Hall T.A.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp.* **41**, 95-98.
36. **Han Y. M., Wilson D. B., Lei X. G.** (1999) Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (*phyA*) in *Sacharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(4)**, 1915-1918.
37. **Han Y. M., Lei X. G.** (1999) Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Pichia pastoris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **364 (1)**, 83-90.
38. **Han Y. W and Gallagher D.J.** (1987) Phytase production by *Apergilus ficuum* on semi-solid substrate. *J. Ind. Microbiol.* **2**, 195-200.
39. **Han Y. W.** (1988). Removal of phytic axit from soybean and cotton seed meals by *A. ficuum* phytase. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 1181 - 1183.
40. **Hara A., Ebina S., Kondo A. and Funaguma T.** (1985) A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 3539-3544.
41. **Howson S. J. and Davis R. J.** (1983) Production of phytate-hydrolysing enzyme by fungi. *Enzyme Microbiol. Technol.* **5**, 377-382.
42. **Inagawa J., Kiyosawa I. and Nagasawa T.** (1987) Effect of phytic acid on the hydrolysis of lactose with beta-galactosidase. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 3027-3032.
43. **Irving G. C. J. and Cosgrove D. J.** (1971) Inositol phosphate phosphatase of microbial origin. Observations on the nature of the active center of a bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *Austral. J. Biol. Sci.* **24**, 1559-1564.

44. **IUPAC-IUB** (Commission on Biochemical Nomenclature). (1977) Nomenclature of phosphorus containing compounds of biochemical importance. *Eur. J. Biochem.* **79**, 1-9.
45. **Jareonkitmongol S., Ohya M., Watanabe R., Takagi H. and Nakamori S.** (1997) Partial purification of phytase from a soil isolate bacterium, *Klebsiella oxytoca* MO-3. *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 393-394.
46. **Jongbloed A. W., Mroz Z. and Kemme P. A.** (1992) The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorus, and phytic acid in different sections of the alimentary tract. *J. Animal Sci.* **70**, 1159-1168.
47. **Kerovuo J.** (2000) A Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization and Production of the Enzyme. Thesis. *Faculty of Science of the University of Helsinki*, 2-18.
48. **Kim D. H, Oh B. C., Choi W. C., Lee J. K and Oh T. K.** (1999) Enzymatic evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* phytase as a feed additive. *Biotech. Lett.* **21**, 925-927.
49. **Kim Y. O., Lee J. K., Kim H. K., Yu J. H. and Oh T. K.** (1998) Cloning of the thermostable phytase gene (*phy*) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**, 185-191.
50. **Kim Y. O., Lee J. K., Oh B. C. and Oh T. K.** (1999) High-level expression of a recombinant thermostable phytase in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 2205-2207.
51. **Kornegay Yi Z., Ravindran E. T., Denbow D. M.** (1996) Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation of phosphorus equivalency values for phytase. *Poultry Sci.* **75**, 240-249.
52. **Laboure A. M., Gagnon J. and Lescure A. M.** (1993) Purification and characterization of a phytase (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *Biochem. J.* **295**, 413-419.
53. **Lambrechts C., Boze H., Moulin G., Galzy, P.** (1992) Utilization of phytate by some yeast. *Biotechnol. Lett.* **14**, 61-66.
54. **Lin-Cereghino. J., Hashimoto M.D., Moy A., Castelo J., Orazem C. C., Kuo P., Xiong S., Gandhi V., Hatae C. T., Chan A., Lin-Cereghino G.P.** (2008) Direct selection of *Pichia pastoris* expression strains using new G418 resistance vectors. *Yeast.* **25**:293-299.
55. **Liu B. L., Rafiq A., Tzeng Y. M. and Rob A.** (1998) The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme Microbiol. Technol.* **22**, 415-424.
56. **Liu W. and Hulett M.** (1998) Comparison of PhoP binding to the *tuaA* promoter with PhoP binding to other Pho-regulon promoters establishes a *Bacillus subtilis* Pho core binding site. *Microbiology* **144**, 1443-1450.

57. **Maugenest S., Martinez, I. and Lescure A. M.** (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding maize seedling phytase. *Biochem. J.* **322**, 511-517.
58. **Maugenest S., Martinez I., Godin B., Perez P. and Lescure A. M.** (1999) Structure of two maize phytase genes and their spatio-temporal expression during seedling development. *Plant Mol. Biol.* **39**, 503-514.
59. **Mochizuki D. and Takahashi H.** (1999) Method for producing phytase. *Patent application EP 0931837-A*, 327 – 331.
60. **Nakamura Y., Fukuhara H., and Sano K.** (2000) Secreted phytase activities of yeasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64** (4), 841-844.
61. **Nayini N. R. and Markakis P.** (1984) The phytase of yeast. *Food Sci. Technol.* **17**, 126-132.
62. **O'Quinn P. R., Knabe D. A. and Gregg E. J.** (1997) Efficacy of Natuphos in sorghumbased diets of finishing swine. *J. Animal Sci.* **75**, 1299-1307.
63. **Pallauf J. and Rimbach G.** (1996) Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Arch. Anim. Nutr.* **50**, 301-319.
64. **Pandey A., Szakacs G., Soccol C. R., Rodriguez-Leon J. A., Soccol V.T.** (2001) Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology.* **77**, 203-214.
65. **Pasamontes L., Haiker, M., Henriquez-Huecas M., Mitchell D. B. and van Loon A. P. G. M.** (1997) Cloning of the phytases from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1353**, 217-223.
66. **Phillippy B.Q., Mullaney E.J.** (1997) Expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** (8), 3337-3342.
67. **Powar V. K. and Jagannathan V.** (1982) Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **151**, 1102-1108.
68. **Reddy N. R., Pierson M. D., Sathe S. K. and Salunkhe D. K.** (1989) Phytates in cereals and legumes. *CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla*, 218-227.
69. **Rimbach G. and Pallauf J.** (1992) The effect of a supplement of microbial phytase on zinc availability. *Z. Ernährungswiss.* **31**, 269-277.
70. **Rodriguez E., Han Y., Lei X.G.** (1999) Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene (*appA2*) isolated from pig colon. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **257**, 117–123.
71. **Sambrook J., Russell D. W.** (2001) Molecular cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York.* **1**, 31-32.

72. **Sambrook J., Russell D. W.** (2001) Molecular cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York.* **2**, 112-122.
73. **Sandberg A. S., Hulthen L. R. and Turk M.** (1996) Dietary *Aspergillus niger* phytase increases iron absorption in humans. *J. Nutr.* **126**, 476-480.
74. **Sano K., Fukuhara H., and Nakamura. Y.** (1999) Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*, *Biotechnol.* **21**, 33-38.
75. **Scott J. J.** (1991). Alkaline phytase activity in nonionic detergent extracts of legume seeds. *Plant Physiol.* **95**, 1298-1301.
76. **Sequeilha L., Lambrechts C., Boze H., Moulin G. and Galzy P.** (1992) Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castelii*. *J. Ferment. Bioeng.* **74**, 7-11.
77. **Shah V. and Parekh L. J.** (1990) Phytase from *Klebsiella* sp. No. PG-2: Purification and properties. *Indian J. Biochem. Biophys.* **27**, 98-102.
78. **Shieh T. R. and Ware J. H.** (1968) Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.* **16**, 1348-1351.
79. **Shieh T. R., Wodzinski R. J. and Ware J. H.** (1969) Regulation of the formation of acid phosphatase by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. *J. Bacteriol.* **100**, 1161-1165.
80. **Shimizu M.** (1992) Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1266-1269.
81. **Shimizu M.** (1993) Purification and characterization of phytase and acid phosphatase by *Aspergillus oryzae* K1. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1364-1365.
82. **Simell M., Turunen M., Piironen J. and Vaara T.** (1989) Feed and food applications of phytase. Lecture at 3rd Meet. *Industrial Applications of Enzymes, Barcelona, Spain*, 33-38.
83. **Singh M. and Krikorian A. D.** (1982) Inhibition of trypsin activity *in vivo* by phytate. *J. Agric. Food Chem.* **30**, 799-805.
84. **Siren M.** (1995). Method of treating pain using inositol triphosphate. *U.S. Patent 5407924*, 23-28.
85. **Siren M.** (1998) Use of an ester of inositoltriphosphate for the preparing of medicaments. *U.S. Patent 5846957*, 21-28.
86. **Siren M., Lofkvist, B. and Edvinsson, L.** (1992) Method of treating cardiovascular diseases using inositoltrisphosphate. *U.S. Patent 5128332*, 34-37.
87. **Sutardi M. and Buckle K. A.** (1988) Characterization of extra - and intracellular phytase from *Rhizopus oligosporus* used in tempeh production. *Int. J. Food Microbiol.* **6**, 67-69.

88. **Tambe S. M., Kaklij G. S., Kelkar S. M. and Parekh L. J.** (1994) Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: evidence for unusually small active enzyme peptide. *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 23-27.
89. **Ullah A. H. J.** (1988) *Aspergillus ficuum* phytase: partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic characterization. *Prep. Biochem.* **18**, 459-471.
90. **Van Loon A. P. G. M.** (1997) The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology.* **143**, 245-252.
91. **Vohra A., Satyanarayana V.** (2003) Phytase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology.* **23** (1), 9-60.
92. **Volfova O., Dvorakova J., Hanzlikova A. and Jandera A.** (1994) Phytase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.* **39**, 481-484.
93. **Williams, P. J. and Taylor, T. G.** (1985). A comparative study of phytate hydrolysis in the gastrointestinal track of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and the laboratory rat. *Br. J. Nutr.* **54**, 429-435.
94. **Wodzinski, R. J. and Ullah, A. H. J.** (1996) Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* **42**, 263-302.
95. **Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., Rémy R., Fimbel R., Oesterheld G., Lehmann M., Van Loon A. P.G.M.** (1999) Biochemical characterization of fungal phytase (myo-Inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties. *Applied and Environmental Microbiology.* **65**(2) 367 - 373.
96. **Wyss M., Pasamontes L., Friedlein A., Remy R., Tessier M., Kronenberger A., Middendorf A., Lehmann M., Schnoebelen L., Röthlisberger U., Kusznir E., Wahl G., Muller F., Lahm H. W., Vogel K., and van Loon, A. P. G. M.** (1999) Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 359-366
97. **Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H., Han P.L., Cheng Z.M., Li Y.** (2005) High level expression of a recombinant acid phytase gene in *Pichia pastoris*. *J. Appl. Microbiol.* **98** (2), 418-428.
98. **Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H., Han P.L., Li X., Fan H.Q., Guo M.J., Zhang S.L.** (2004) Isolation, Characterization, and molecular cloning of the cDNA encoding a novel phytase from *Aspergillus niger* 113 and high expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* **37**(3), 282-291.
99. **Yamada, K., Minoda, Y. and Yamamoto, Y.** (1968) Phytase from *Aspergillus terreus*. Production, purification and some general properties of the enzyme. *Agric. Biol. Chem.* **32**, 1275-1282.

100. **Yang, W. J., Matsuda, Y. Inomata, M. and Nakagawa** (1991) Developmental and dietary induction of 90 kDa subunit of rat intestinal phytase. *Biochim. Biophys. Acta* **1075**, 83-87.
101. **Yanke, L. J., Selinger, L. B., and Cheng, K. J.** (1999) Phytase activity of *Selenomonas ruminantium*: a preliminary characterization. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**, 20 - 25.
102. **Yip W. K., Wang L. J., Cheng C. W., Wu W. L., Lung S. C., Lim B. L.** (2003) The introduction of a phytase gene from *Bacillus subtilis* improved the growth performance of transgenic tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 1148–1154.
103. **Yoon, S. J., Choi, Y. J., Min, H. K., Cho, K. K., Kim, J. W., Lee, S. C. and Jung, Y. H.** (1996) Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microbiol. Technol.* **18**, 449-454.
104. **Zhang L.H., Ana L. J., Gaoa X. R., Wang Y. J.** (2005) Properties of *A. ficuum* AS3.324 phytase expressed in tobacco. *Process Biochemistry.* **40**, 213–216.

## PHỤ LỤC

### **Phụ lục 1.** Phân tích mẫu trên máy RT-PCR Bio-Rad iQ5



### **Phụ lục 2.** Trình tự nucleotit của *phyA* được tách dòng

#### **>phyA-P2 (toàn bộ phần mã hóa mature protein)**

CTGGCAGTCCCCGCCTCGAGAAATCAATCCACTTGCATACGGTCGATCAGGGGTATCAATGCTTCTCGGAGACTTC  
GCATCTTTGGGGCCAATACGCGCCGTTCTTTTCTCTGGCAAACAAATCGGCCATCTCCCCTGATGTGCCTGCCGGAT  
GCCATGTCACTTTGCGCCAGGTTCTCTCCCGCCATGGAGCACGGTATCCGACCGACTCCAAGGGCAAGAAATACTCC  
GCTCTCATCGAGGAGATCCAGCAGAACGCGACAACCTTCGAGGGGAAATATGCCTTCTGAAGACATACAACTACAG  
CCTGGGCGCGGATGACCTGACTCCCTTCGGAGAGCAGGAGCTGGTCAACTCCGGCGTCAAGTTCTACCAGCGATACA  
AATCGCTCACAAGAAACATTGTCCCGTTTCATCCGATCCTCAGGCTCCAGCCGCGTGATTGCCTCTGGCAATAAATTC  
ATCGAGGGCTTCCAGAGCACTAAGCTGAAGGATCCTCGTGGCCAGCCCGACCAATCGTCGCCAAGATCGACGTGGT  
CATTTTCAGAGGCCAGCACATCCAACAACACTCTCGATCCGGGCACCTGCACCGTTTTTCGAAGATAGCGAATTGGCCG  
ATGACATCGAAGCCAATTTACCGCCACGTTTCGTCCTCCATTTCGTCAACGTCTGGAGAACGACTTGTCTGGCGTG  
TCTCTCACGGACACAGAAGTGACCTACCTCATGGACATGTGCTCCTTCGACACCATCTCCACCAGCACCCTCGACAC  
CAAGCTGTCCCCCTTCTGTGACCTGTTTCAACCATGAAGAATGGATCAACTACGACTACCTCCAGTCCCTGAACAAAT  
ACTACGGCCATGGCGCAGGTAACCCGCTCGGCCGACCCAGGGCGTCGGCTACGCTAACGAGCTCATCGCCCGTCTC  
ACCCACTCGCCTGTCCACGATGACACCAGCTCCAACCACACATTGGACTCCAACCCGGCTACTTTCCCGCTCAACTC  
CACTCTCTATGCGGACTTTTCGATGATAACGGCATCATCTCTATCCTCTTTGCTTTGGGTCTGTACAACGGCACCA  
AGCCGCTGTCTTCCAGACCGCGGAGAATATACCCAGACCGATGGGTTCTCATCTGCCTGGACGGTTCCCTTCGCG  
TCGCGCATGTACGTGAGATGATGCAATGCCAGTCCGAGCAGGAGCCTTTGGTCCGTGTCTTGTTAATGATCGTGT  
TGTTCCGCTGCATGGCTGTCCGGTTGATGCTTTGGGAAGATGTACGCGGGATAGCTTCGTGAAGGGGTTGAGCTTTG  
CCAGATCTGGGGGTGATTGGGCGGAGTGTCTTGTCT

#### **>phyA-P3 (toàn bộ phần mã hóa mature protein)**

CTGGCAGTCCCCGCCTCGAGAAATCAATCCACTTGCATACGGTCGATCAGGGGTATCAATGCTTCTCCGAGACTTC  
GCATCTTTGGGGTCAATACGCGCCGTTCTTTTCTCTGGCAAACGAATCGGCCATCTCTCCTGATGTGCCCGCCGGAT  
GCCGAGTCACTTTGCTCAGGTCCTCTCCGTCATGGAGCACGGTATCCGACCGACTCCAAGGGCAAGAAATACTCC  
GCTCTCATTGAGGAGATCCAGCAGAATGCGACCACCTTTGATGGGAAATATGCCTTCTGAAGACATACAACTACAG  
CCTGGGTGCAGATGACCTGACTCCTTTTCGGAGAACAGGAGCTAGTCAACTCCGGCATCAAGTTCTATCAGCGATACG  
AATCGCTCACAAGAAACATCATTCCATTTCATCCGATCCTCTGGCTCCAGCCGCGTGATCGCTCCGGCAAGAAATTC  
ATCGAGGGCTTCCAGAGACCAAGCTGAAGGATCCTCGTGGCCAGCCCGGCAATCGTCGCCAAGATCGACGTGGT  
CATTTCCGAGGGCCAGCTCATCCAACAACACTCTGACCCAGGCACCTGCACTGTCTTGAAGACAGCGAATTGGCCG  
ATGCCGTGGAAGCCAATTTACCGCCACGTTTCGTCCTCCACCATTCGTCAACGTCTGGAGAACGACCTGTCTGGCGTG  
TCTCTCACAGACACAGAGGTGACCTACCTCATGGACATGTGCTCCTTCGACACCATCTCCACCAGCACCCTCGACAC  
CAAGCTGTCCCCCTTCTGTGACCTGTTTCACTCATGACGAATGGATCAACTACGACTACCTCCAGTCCCTGAAAAAGT  
ACTACGGCCATGGCGCGGGTAACCCGCTCGGCCGACCCAGGGCGTCGGCTACGCTAACGAGCTCATCGCCCGTCTC

ACCCACTCGCCTGTCCACGATGACACCAGCTCCAACCACACATTGGACTCTAACTCGGCTACCTTTCCGCTCAACTC  
TACTCTCTACGCGGACTTTTCCACGATAACGGCATCATCTCTATTCTCTTTGCTTTGGGTCTGTATAACGGCACCA  
AGCCGCTGTCTACCACGACCGTGCAGAATATACCCAGACAGATGGATTCTCGTCTGATTGGACGGTTCGGTTTGCT  
TCGCGTCTGTACGTCGAGATGATGCAATGTCAGGCGGAGCAGGAGCCGCTGGTCCGTGTCTTGGTTAATGATCGCGT  
TGTCGCTGTCATGGGTGTCCGTTGATGCTTTAGGGAGATGTACCCGGGATAGCTTTGTGAAGGGGTTGAGCTTTG  
CTAGATCTGGGGGTGATTGGGCGGAGTGTtttgc

**>phyA-P4 (toàn bộ phần mã hóa mature protein)**

CTGGCAGTCCCCGCTCGAGAAATCAATCCACTTGCATACGGTCGATCAGGGGTATCAATGCTTCTCCGAGACTTC  
GCATCTTTGGGGCCAATACGCGCGTTCTTTTCTCTGGCAAACAAATCGGCCATCTCCCTGATGTTCTCGCGGAT  
GCCATGTCACTTTGCGCCAGGTTCTCTCCCGCCATGGAGCACGGTATCCGACCGACTCCAAGGGCAAGAAATACTCC  
GCTCTCATCGAGGAGATCCAGCAGAACGCGACAACCTTCGAGGGGAAATATGCCTTCTGAAGACATACAATACTACAG  
CCTGGGCGCGGATGATCTGACTCCCTTCGGAGAGCAGGAGCTGGTCAACTCCGGCGTCAAGTTCTACCAGCGATACG  
AATCGCTCACAAGAAACATTGTCCCGTTTCATCCGATCCTCAGGCTCCAGCCGCGTGATTGCCTCTGGCAATAAATTC  
ATCGAGGGCTTCAGAGCACTAAGCTGAAGGATCCTCGTGGCCAGCCCGGCCAATCGTCGCCAAGATCGACGTGGT  
CATTTTCAGAGGCCAGCACATCCAACAACACTCTCGATCCGGGCACCTGCACCGTTTTGAAGATAGCGAATTGGCCG  
ATGACATCGAAGCCAATTTACCGCCACGTTTCCTCCCTCCATTCTGTCACGCTCGGAGAACGACTTGTCTGGCGTG  
TCTCTACGGACACAGAAGTGACCTACCTCATGGACATGTGCTCCTTCGACACCATCTCCACCAGCACCGTCGACAC  
CAAGCTGTCCCCCTTCTGTGACCTGTTTACCCATGAAGAATGGATCAACTACGACTACCTCCAGTCCCTGAACAAAT  
ACTACGGCCATGGCGCAGGTAACCCGCTCGGCCGACCCAGGGCGTGGCTACGCTAACGAGCTCATCGCCCGTCTC  
ACCCACTCGCCTGTCCACGATGACACCAGCTCCAACCACACATTGGACTCCAACCCGGCTACTTTCCGCTCAACTC  
CACTCTCTATGCGGACTTTTCGATGATAACGGCATCATCTCTATCTCTTTGCTTTGGGTCTGTACAACGGCACCA  
AGCCGCTGTCTTCCACGACCGCGGAGAATATACCCAGACCGATGGGTTCTCATCTGCCTGGACGGTTCCTTTCCG  
TCGCGCATGTACGTCGAGATGATGCAATGCCAGTCCGAGCAGGAGCCTTTGGTCCGTGTCTTGGTTAATGATCGTGT  
TGTTCCGCTGTCATGGCTGTCCGTTGATGCTTTGGGAAGATGTACGCGGGATAGCTTCGTGAAGGGGTTGAGCTTTG  
CCAGATCTGGCGGTGATTGGGCGGAGTGTtttgc

**>phyA-P7 (phần mã hóa mature protein, phân đoạn 1068 bp của đầu 3')**

AAATATGCCTTCTGAAGACATACAATACTACGCTGGGAGCAGATGACCTGACTCCTTTCCGAGAGCAGGAGCTAGT  
CAACTCCGGCATCAAGTTCTATCAGCGATACGAATCGCTCACAAGAAACATCATCCATTTCATCCGATCCTCTGGCT  
CCAGCCGCGTGATCGCTCCGGCAAGAAATTCATCGAGGGCTTCAGAGCACCAAGCTGAAGGATCCTCGTCCCCAG  
CCCGACCAATCGTCGCCCAAGATCGACGTGGTCATTTCCGAGGGCCAGCTCATCCAACAACACTCTCGACCCAGGCAC  
CTGCACTGTCTTGAAGACAGCGAATTGGCCGATGCCGTGGAAGCCAATTTACCGCCACGTTTCGTCCCCACCATTC  
GTCAACGTCTGGAGAACGACCTGTCTGGCGTGTCTCTACAGACACAGAGGTGACCTACCTCATGGACATGTGCTCC  
TTGACACCATCTCCACGACCGTCGACACCAAGCTGTCCCCCTTCTGTGACCTGTTCACTCATGACGAATTGGAT  
CAACTACGACTACCTCCAGTCCCTGAAAAAGTACTACGGCCATGGCGGGGTAAACCCGCTCGGCCCGACCCAGGGCG  
TCGGCTACGCTAACGAGCTCATCGCCCGTCTACCCACTCGCTGTCCACGATGACACCAGCTCCAACCACACATTG  
GACTCTAACTCGGCTACCTTTCCGCTCAACTCTACTCTCTACGCGGACTTTTCCACGATAACGGCATCATCTCTAT  
TCTCTTTGCTTTGGGTCTGTATAACGGCACCAAGCCGCTGTCTACCACGACCGTGCAGAATATACCCAGACAGATG  
GATTCTCGTCTGCTTGGACGGTTCGTTTGCTTCGCGTCTGTACGTCGAGATGATGCAATGTCAGGCGGAGCAGGAG  
CCGCTGGTCCGTGTCTTGGTTAATGATCGCGTTGTCCCGCTGTCATGGGTGTCCGTTGATGCTTTAGGGAGATGTAC  
CCGGGATAGCTTTGTGAAGGGGTTGAGCTTTGCTAGATCTGGGGGTGATTGGGCGGAGTGTtttgc

**>phyA-P9 (toàn bộ phần mã hóa mature protein)**

CTGGCAGTCCCCGCTCGAGAAATCAATCCACTTGCATACGGTCGATCAGGGGTATCAATGCTTCTCCGAGACTTC  
GCATCTTTGGGGCCAATACGCGCGTTCTTTTCTCTGGCAAACAAATCGGCCATCTCCCTGATGTTCTCGCGGAT  
GCCATGTCACTTTGCGCCAGGTTCTCTCCCGCCATGGAGCACGGTATCCGACCGACTCCAAGGGCAAGAAATACTCC  
GCTCTCATCGAGGAGATCCAGCAGAACGCGACAACCTTCGAGGGGAAATATGCCTTCTGAAGACATACAATACTACAG  
CCTGGGCGCGGATGACCTGACTCCCTTCGGAGAGCAGGAGCTGGTCAACTCCGGCGTCAAGTTCTACCAGCGATACG  
AATCGCTCACAAGAAACATTGTCCCGTTTCATCCGATCCTCAGGCTCCAGCCGCGTGATTGCCTCTGGCAATAAATTC  
ATCGAGGGCTTCAGAGCACTAAGCTGAAGGATCCTCGTGGCCAGCCGACCAATCGTCGCCCAAGATCGACGTGGT  
CATTTTCAGAGGCCAGCACATCCAACAACACTCTCGATCGGGGACCTGCACCGTTTTTGAAGATAGCGAATTGGCCG  
ATGACATCGAAGCCAATTTACCGCCACGTTTCGTCCCTCCATTCTGTCACGCTCGGAGAACGACTTGTCTGGCGTG  
TCTCTACGGACACAGAAGTGACCTACCTCATGGACATGTGCTCCTTCGACACCATCTCCACCAGCACCGTCGACAC  
CAAGCTGTCCCCCTTCTGTGACCTGTTTACCCATGAAGAATGGATCAACTACGACTACCTCCAGTCCCTGAACAAAT  
ACTACGGCCATGGCGCAGGTAACCCGCTCGGCCGACCCAGGGCGTGGCTACGCTAACGAGCTCATCGCCCGTCTC  
ACCCACTCGCCTGTCCACGATGACACCAGCTCCAACCACACATTGGACTCCAACCCGGCTACTTTCCGCTCAACTC  
CACTCTCTATGCGGACTTTTCGATGATAACGGCATCATCTCTATCTCTTTGCTTTGGGTCTGTACAACGGCACCA  
AGCCGCTGTCTTCCACGACCGCGGAGAATATACCCAGACCGATGGGTTCTCATCTGCCTGGACGGTTCCTTTCCG  
TCGCGCATGTACGTCGAGATGATGCAATGCCAGTCCGAGCAGGAGCCTTTGGTCCGTGTCTTGGTTAATGATCGTGT  
TGTTCCGCTGTCATGGCTGTCCGTTGATGCTTTGGGAAGATGTACGCGGGATAGCTTCGTGAAGGGGTTGAGCTTTG  
CCAGATCTGGCGGTGATTGGGCGGAGTGTtttgc

### **Phụ lục 3.** Trình tự protein mã hóa bởi các gen *phyA*

#### **>phyA-P2**

lavpasrnqstcdtvdqgyqcfsetshlwgyapffslanksaispdvpagchvtfaqlsrhgaryptdskgkksaliecei  
qqnattfegkyafklynyslgaddltpfgeqelvnsqvkfyqryksltnivpfirssgssrviasgnkfiegfqstklkdpraq  
pdqsspkidvvisseastsntldpgtctvfedseladdieanftatfvpsirqlendlsgvsltdtevtlylmdmcsfdtiststv  
tklspfcldftheewinydylqslnkyyghgagnplgptqgvgyaneliarlthspvhddtssnhtldsnpatfplnstlyadf  
shdngiisilfalglyngtkplsstaenitqtdgfssawtvpfasrmyvemmqcseqeplvrvlvndrvvplhgcpvdal  
grctrdsfvkglsfarsggdwaecfa

#### **>phyA-P3**

lavpasrnqstcdtvdqgyqcfsetshlwgyapffslanesaispdvpagcrvtfaqlsrhgaryptdskgkksaliecei  
qqnattfdgkyafklynyslgaddltpfgeqelvnsqvkfyqryesltniipfirssgssrviasgkknkfiegfqstklkdpraq  
pgqsspkidvvisseastsntldpgtctvfedseladaveanftatfvptirqlendlsgvsltdtevtlylmdmcsfdtiststv  
dtklspfcldfthdewinydylqslnkyyghgagnplgptqgvgyaneliarlthspvhddtssnhtldsnpatfplnstlyad  
fshdngiisilfalglyngtkplstttvqnitqtdgfssdwtpfasrlyvemmqcqaeeplvrvlvndrvvplhgcpvdal  
grctrdsfvkglsfarsggdwaecfa

#### **>phyA-P4**

Lavpasrnqstcdtvdqgyqcfsetshlwgyapffslanksaispdvpagchvtfaqlsrhgaryptdskgkksaliecei  
iqnattfegkyafklynyslgaddltpfgeqelvnsqvkfyqryesltniipfirssgssrviasgkknkfiegfqstklkdpra  
qpgqsspkidvvisseastsntldpgtctvfedseladaveanftatfvpsirqlendlsgvsltdtevtlylmdmcsfdtiststv  
dtklspfcldftheewinydylqslnkyyghgagnplgptqgvgyaneliarlthspvhddtssnhtldsnpatfplnstlyad  
fshdngiisilfalglyngtkplsstaenitqtdgfssawtvpfasrmyvemmqcseqeplvrvlvndrvvplhgcpvdal  
grctrdsfvkglsfarsggdwaecfa

#### **>phyA-P7**

Kyafklynyslgaddltpfgeqelvnsqvkfyqryesltniipfirssgssrviasgkknkfiegfqstklkdpraqpdqsspkid  
vvisseastsntldpgtctvfedseladaveanftatfvptirqlendlsgvsltdtevtlylmdmcsfdtiststvdklspfcldf  
thdewinydylqslnkyyghgagnplgptqgvgyaneliarlthspvhddtssnhtldsnpatfplnstlyadfshdngiisil  
falglyngtkplstttvqnitqtdgfssawtvpfasrlyvemmqcqaeeplvrvlvndrvvplhgcpvdalgrctrdsfvkg  
lsfarsggdwaecfa

#### **>phyA-P9**

lavpasrnqstcdtvdqgyqcfsetshlwgyapffslanksaispdvpagchvtfaqlsrhgaryptdskgkksaliecei  
qqnattfegkyafklynyslgaddltpfgeqelvnsqvkfyqryesltnivpfirssgssrviasgnkfiegfqstklkdpraq  
pdqsspkidvvisseastsntldpgtctvfedseladdieanftatfvpsirqlendlsgvsltdtevtlylmdmcsfdtiststv  
tklspfcldftheewinydylqslnkyyghgagnplgptqgvgyaneliarlthspvhddtssnhtldsnpatfplnstlyadf  
shdngiisilfalglyngtkplsstaenitqtdgfssawtvpfasrmyvemmqcseqeplvrvlvndrvvplhgcpvdal  
grctrdsfvkglsfarsggdwaecfa

#### Phụ lục 4. Sắc kí đồ giải trình tự của *phyA* – P9

File: VCNTP\_P9\_M13F.ab1



Sample Name: ADT09-2502

Signal Strengths: A = 141, C = 133, G = 141, T = 123

Mobility: KB\_3100\_POP4\_BDTv3.mob

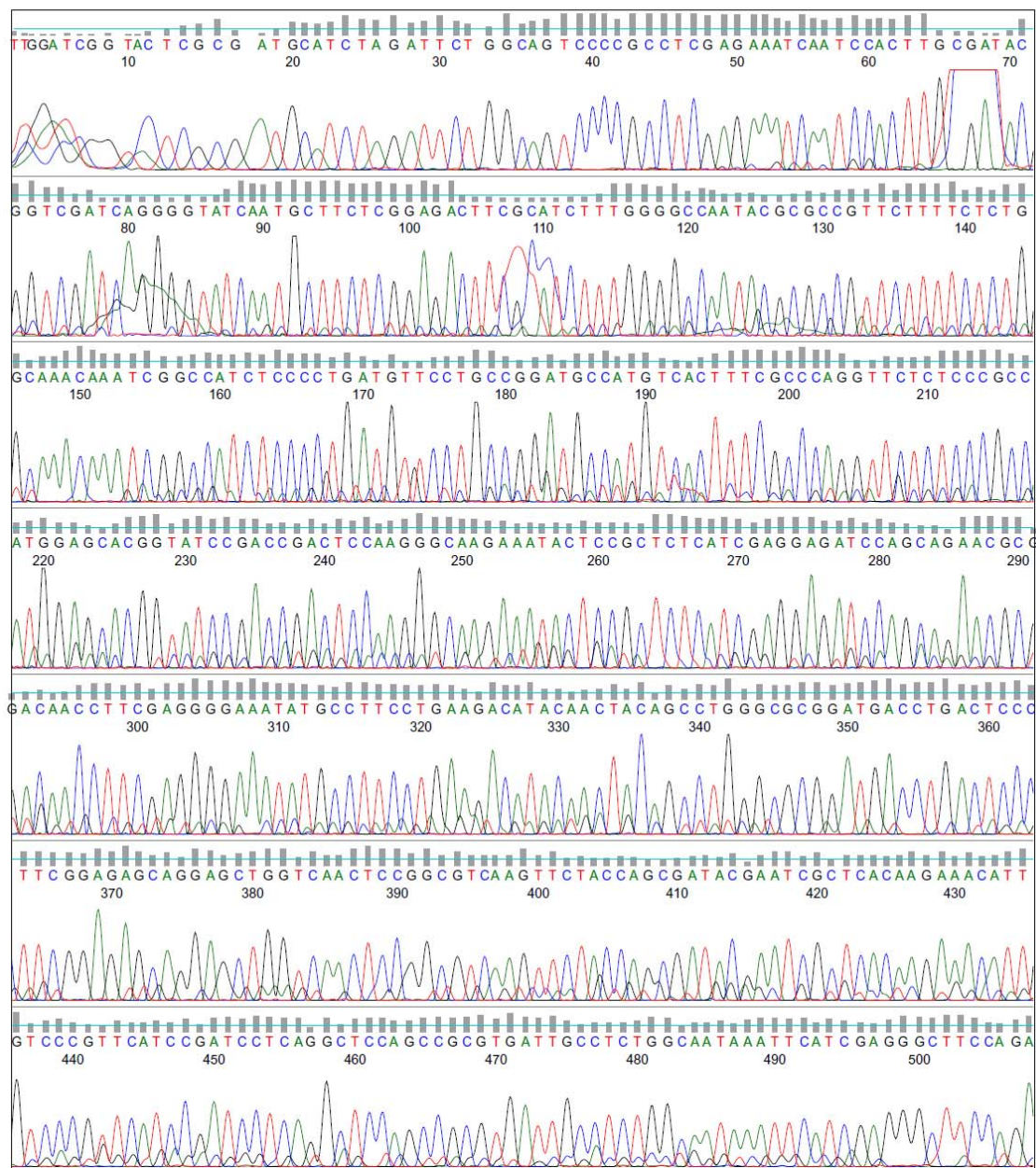
Lane/Cap#: 9

Spacing: 16.9535

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



File: VCNT\_P9\_M13F.ab1

Sample Name: ADT09-2502

Signal Strengths: A = 141, C = 133, G = 141, T = 123

Mobility: KB\_3100\_POP4\_BDTv3.mob

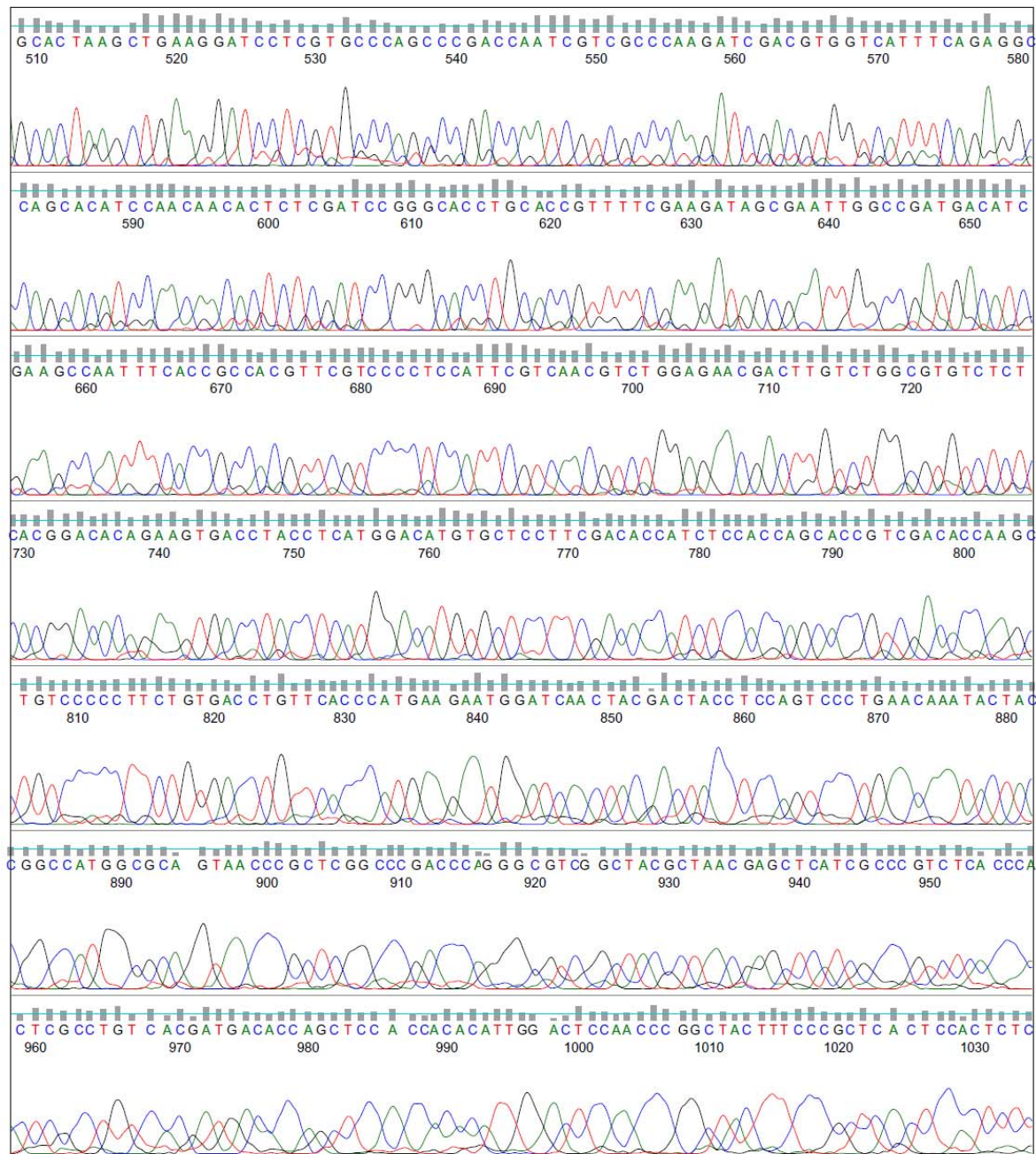
Lane/Cap#: 9

Spacing: 16.9535

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



File: VCNT\_P9\_M13R.ab1

Sample Name: ADT09-2516

Signal Strengths: A = 110, C = 95, G = 111, T = 100

Mobility: KB\_3100\_POP4\_BDTv3.mob

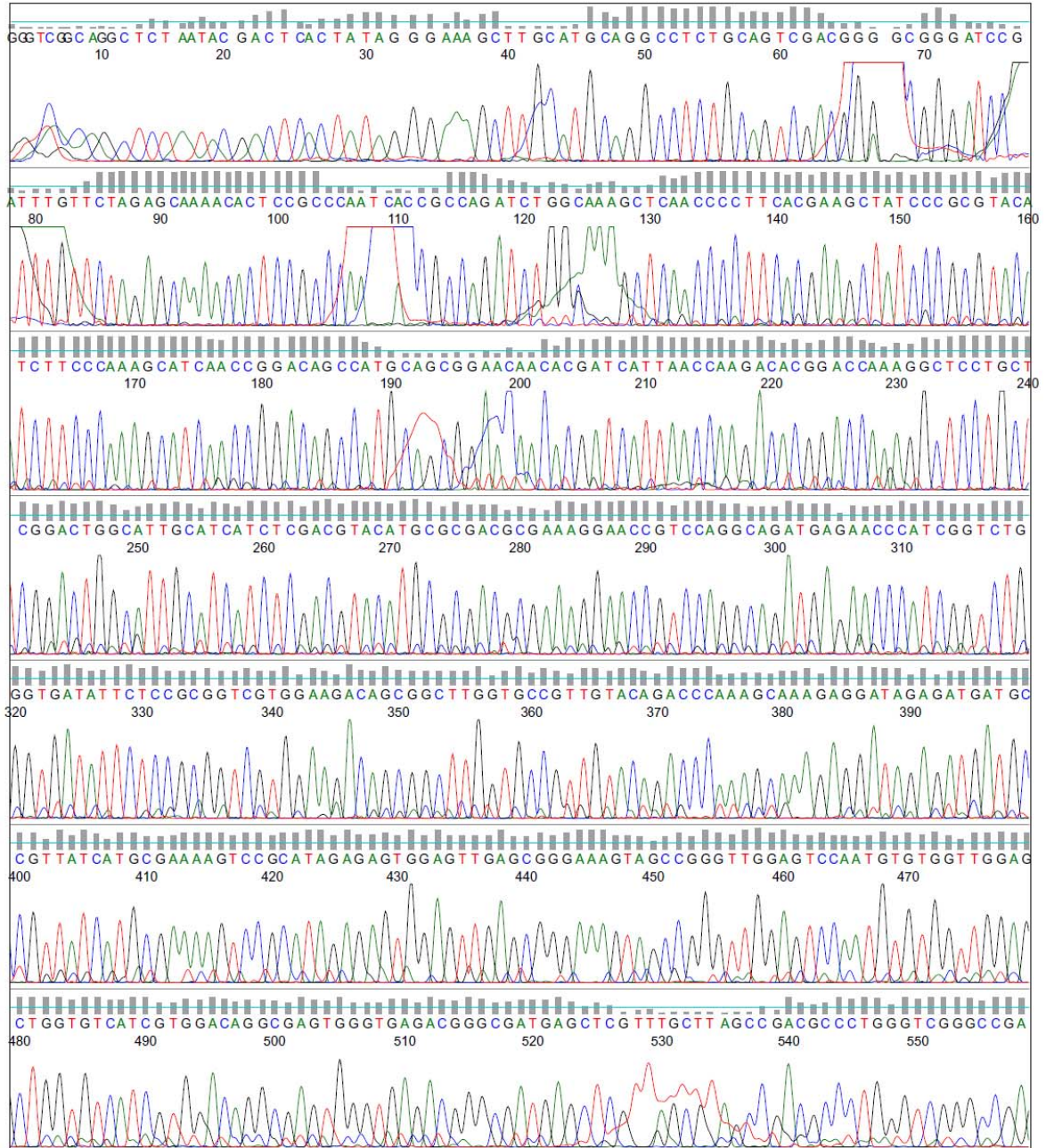
Lane/Cap#: 5

Spacing: 16.4326

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



File: VCNT\_P9\_M13R.ab1

Sample Name: ADT09-2516

Signal Strengths: A = 110, C = 95, G = 111, T = 100

Mobility: KB\_3100\_POP4\_BDTv3.mob

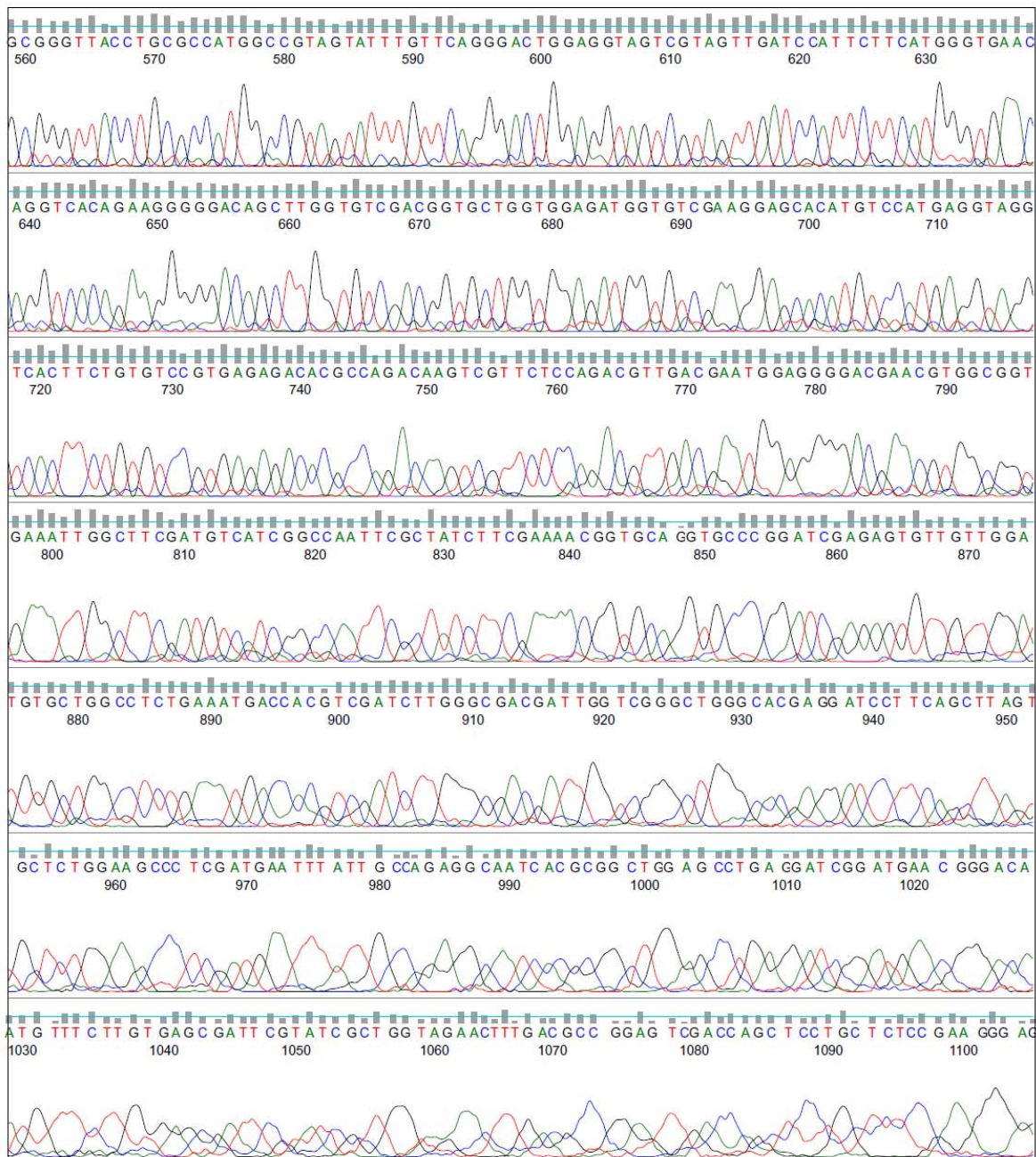
Lane/Cap#: 5

Spacing: 16.4326

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



## **Phụ lục 5. Hợp đồng khoa học**

**BỘ CÔNG THƯƠNG**

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM**

**Độc lập - Tự do - Hạnh phúc**

Số: /HĐ-KHCN

Hà Nội, ngày 3 tháng 3 năm 2009

05B.09 QG/HĐ-KHCN

### **HỢP ĐỒNG**

### **NGHIÊN CỨU KHOA HỌC VÀ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ**

Căn cứ Nghị định số 189/2007/NĐ-CP ngày 27 tháng 12 năm 2007 của Chính phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Bộ Công Thương;

Căn cứ Quyết định số 419/TTg ngày 21 tháng 7 năm 1995 của Thủ tướng Chính phủ về cơ chế quản lý các hoạt động nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ;

Căn cứ Nghị định số 81/2002/NĐ-CP ngày 17 tháng 10 năm 2002 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành một số điều của Luật Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Quyết định số 1035/QĐ-BCT ngày 27/02/2009 của Bộ trưởng Bộ Công Thương về việc giao kế hoạch KHCN năm 2009,

Chúng tôi gồm:

#### **1. Bên giao (Bên A) là: Bộ Công Thương**

Địa chỉ : 54, Hai Bà Trưng, Hà Nội.

Điện thoại: 04-2202310

Đại diện là ông: Nguyễn Phú Cường

Chức vụ : Phó Vụ trưởng Vụ Khoa học và Công nghệ

#### **2. Bên nhận (Bên B) là: Viện Công nghiệp thực phẩm**

Địa chỉ : 301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

Điện thoại: 04-38584481

Tài khoản: 301.01.004.02.16 Kho bạc Nhà nước Thanh Xuân - Hà Nội

Đại diện là ông: Lê Đức Mạnh

Chức vụ : Viện trưởng

Hai bên thoả thuận ký Hợp đồng thực hiện nhiệm vụ Quý gen năm 2009 như sau:

#### **Điều 1. Trách nhiệm bên B:**

1. Bên B cam kết thực hiện nhiệm vụ “**Khai thác và phát triển nguồn gen vi sinh vật công nghiệp Thực phẩm**”.

Nội dung, tiến độ và dự toán thực hiện nhiệm vụ được nêu trong Phụ lục 1 và 2 của Hợp đồng này.

2. Trong vòng 15 ngày kể từ ngày kết thúc hợp đồng. Bên B phải nộp cho Bên A báo cáo khoa học và quyết toán Hợp đồng này.

**Điều 2. Kinh phí thực hiện hợp đồng:**

- Kinh phí cấp từ ngân sách Nhà nước để thực hiện Hợp đồng là: **160 triệu** đồng (bằng chữ: **một trăm sáu mươi triệu** đồng chẵn).

**Điều 3. Thời hạn thực hiện hợp đồng**

- Thời gian thực hiện hợp đồng là: từ tháng 1/2009 đến hết tháng 12 năm 2009.

**Điều 4. Trách nhiệm Bên A**

- Bên A cam kết chuyển cho bên B số kinh phí thực hiện Hợp đồng nêu tại điều 2 theo quy định hiện hành về cấp phát kinh phí từ ngân sách Nhà nước.
- Trong thời gian 30 ngày kể từ ngày kết thúc hợp đồng. Bên A sẽ tổ chức đánh giá, nghiệm thu và thanh lý hợp đồng.

**Điều 5. Điều khoản thi hành**

- Hai bên cam kết thực hiện đầy đủ các điều khoản đã ghi trong hợp đồng. Nếu có yêu cầu cần thay đổi, hai bên sẽ thỏa thuận để giải quyết.
- Hợp đồng này có hiệu lực kể từ ngày ký và được lập thành 6 bản. Bên B giữ 3 bản./.

**Đại diện Bên A**

**TL. BỘ TRƯỞNG BỘ CÔNG THƯƠNG  
KT. VỤ TRƯỞNG VỤ KHCN  
PHÓ VỤ TRƯỞNG**



**Nguyễn Phú Cường**

**Đại diện Bên B**

**VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM  
VIỆN TRƯỞNG**



**Lê Đức Mạnh**

**Phụ lục 1**

**NỘI DUNG, TIẾN ĐỘ VÀ KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI**  
(Kèm theo hợp đồng số: /HĐ-KHCN, ngày tháng năm 2009)

| TT | Nội dung                                                                                                                           | Thời gian thực hiện |           | Kết quả cụ thể (Số lượng, các chỉ tiêu cơ bản)            | Ghi chú |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------|-----------------------------------------------------------|---------|
|    |                                                                                                                                    | Từ tháng            | Đến tháng |                                                           |         |
| 1  | Xây dựng đề cương nghiên cứu                                                                                                       | 1/2009              | 1/2009    | Thông qua đề cương và ký hợp đồng                         | .       |
| 2  | Tách dòng và giải trình tự 05 gen mã hóa phyA từ <i>Aspergillus niger</i>                                                          | 2/2009              | 9/2009    | Có vector mang 05 gen <i>phyA</i> đã giải trình tự        |         |
| 3  | Xác định số lượng copy của vector tái tổ hợp ở 03 dòng <i>Pichia pastoris</i> có hoạt lực phytase cao được biến nạp trong năm 2008 | 5/2009              | 9/2009    | Xây dựng được phương pháp và xác định được số lượng copy  |         |
| 4  | Xác định điều kiện lên men sinh phytase tái tổ hợp                                                                                 | 6/2009              | 11/2009   | Xác định được điều kiện lên men                           |         |
| 5  | Lên men và thu hồi phytase tái tổ hợp ở quy mô phòng thí nghiệm và xác định hoạt lực                                               | 6/2009              | 11/2009   | Có 200 g sản phẩm phytase tái tổ hợp, hoạt lực >2000 IU/g |         |
| 6  | Tổng kết và nghiệm thu nhiệm vụ                                                                                                    | 12/2009             | 12/2009   | Nhiệm vụ được nghiệm thu                                  |         |

**Phụ lục 2**

**DỰ TOÁN KINH PHÍ**

(Kèm theo hợp đồng số: /HD-KHCN, ngày tháng năm 2009)

| Mục lục NS                               | Nội dung                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Kinh phí<br>(triệu đồng) |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| <b>Nhóm 1 (Thanh toán cá nhân)</b>       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>12,0</b>              |
| 6000 (102)                               | Phụ cấp chủ nhiệm đề tài                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 12,0                     |
| <b>Nhóm 2 (Chi nghiệp vụ chuyên môn)</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>138,0</b>             |
| 6500 (109)                               | Thanh toán tiền điện                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 6,0                      |
| 6550 (110)                               | Vật tư văn phòng                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1,0                      |
| 6600 (111)                               | Thanh toán điện thoại, internet                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1,0                      |
| 6650 (112)                               | Hội nghị nghiệm thu                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 3,0                      |
| 6750 (114)                               | Chi phí thuê mướn<br>Tách dòng và giải trình tự 05 gen mã hóa phyA từ <i>Aspergillus niger</i><br>Xác định số lượng copy của vector tái tổ hợp ở 03 dòng <i>Pichia pastoris</i> có hoạt lực phytase cao được biến nạp trong năm 2008<br>Xác định điều kiện lên men sinh phytase tái tổ hợp<br>Lên men và thu hồi phytase tái tổ hợp ở quy mô phòng thí nghiệm và xác định hoạt lực | 20<br>15<br>20<br>15     |
| 7000 (119)                               | Chi phí nguyên vật liệu, hóa chất<br>Môi trường nuôi cấy vi sinh (agar, peptone, khoáng chất...)<br>Hóa chất sinh học phân tử (kit PCR, Kit tách ADN, kit biểu hiện, Taq...)<br>Hóa chất phân tích (dung môi, hóa chất phân tích enzyme...)                                                                                                                                        | 12,0<br>30,0<br>15,0     |
| <b>Nhóm 3 (Mua sắm, sửa chữa)</b>        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>0,0</b>               |
| 9050 (145)                               | Mua sắm TSCĐ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0,0                      |
| <b>Nhóm 4 (Các khoản chi khác)</b>       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>10,0</b>              |
| 7750 (134)                               | Chi khác: quản lý phí cho cơ quan chủ quản                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 10,0                     |
| <b>Tổng</b>                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>160,0</b>             |

**BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG K.H.C.N CẤP CƠ SỞ**  
**GIÁM ĐỊNH, NGHIỆM THU NHIỆM VỤ**

Tên nhiệm vụ:

***Khai thác và phát triển nguồn gen vi sinh vật công nghiệp thực phẩm***

Chủ nhiệm nhiệm vụ: PGS. TS. Vũ Nguyên Thành  
Các cộng tác viên: ThS. Nguyễn Thanh Thủy  
CN. Đào Anh Hải  
ThS. Đinh Thị Mỹ Hằng  
ThS. Nguyễn Thị Hương Giang

**Các cán bộ, cơ quan phối hợp:** Đại học Sư phạm I Hà Nội  
ThS. Ngô Thanh Xuân  
PGS. TS. Mai Thị Hằng

**Thành phần tham dự:**

Hội đồng K.H.C.N cấp cơ sở giám định nhiệm vụ trên được thành lập theo Quyết định của Viện Công nghiệp thực phẩm số 182/HĐKH-VTP ngày 11/12/2009.

*\*Các thành viên Hội đồng:*

| <b>TT</b> | <b>Họ và tên</b>             | <b>Chức danh</b>  |
|-----------|------------------------------|-------------------|
| 1.        | TS. Lê Đức Mạnh              | Chủ tịch Hội đồng |
| 2.        | PGS.TS. Nguyễn Thị Hoài Trâm | Ủy viên Phản biện |
| 3.        | TS. Nguyễn La Anh            | Ủy viên Hội đồng  |
| 4.        | PGS.TS. Nguyễn Thị Minh Hạnh | Ủy viên Hội đồng  |

|     |                         |                  |
|-----|-------------------------|------------------|
| 5.  | ThS. Nguyễn Thúy Hương  | Ủy viên Hội đồng |
| 6.  | TS. Phạm Văn Thành      | Ủy viên Hội đồng |
| 7.  | TS. Bùi Quang Thuật     | Ủy viên Hội đồng |
| 8.  | TS. Nguyễn Thị Việt Anh | Ủy viên Hội đồng |
| 9.  | TS. Trịnh Thị Kim Vân   | Ủy viên Hội đồng |
| 10. | ThS. Đàm Lam Thanh      | Ủy viên Thư ký   |

*\*Các đại biểu khác:*

1. Các cán bộ tham gia thực hiện đề tài.

### **Nội dung:**

Chủ tịch Hội đồng điều khiển Hội nghị.

- Hội đồng đã nghe chủ nhiệm đề tài - PGS. TS. Vũ Nguyên Thành trình bày nội dung và kết quả nghiên cứu; các cộng tác viên bổ sung, làm rõ các vấn đề chủ nhiệm chưa trình bày.
- Hội đồng đã nghe ủy viên phản biện - PGS. TS. Nguyễn Thị Hoài Trâm đọc bản nhận xét kết quả.

### **Các thành viên Hội đồng nhận xét và đóng góp ý kiến:**

*1/ Những nội dung, nhiệm vụ khoa học chủ yếu đã hoàn thành được theo Hợp đồng:*

- Đã tách dòng 5 gene mã hóa phyA từ 5 chủng *Aspergillus niger* vào vector TA và giải trình tự 5 gene đã tách dòng trên
- Đã xây dựng được phương pháp xác định số lượng copy của thể biến nạp *Pichia pastoris* bằng Realtime PCR. Từ 3 thể biến nạp cho hoạt tính cao, đã xác định được số copy như sau: chủng *Pichia pastoris* A3 có 3 copy, chủng *Pichia pastoris* A6 và A7 có 5 copy
- Đã xác định được điều kiện lên men thu hồi sinh khối phù hợp cho nấm men
- Đã xác định được điều kiện tinh sạch thu hồi phytase từ môi trường nuôi cấy bằng phương pháp lọc luân hồi. Hiệu suất thu hồi enzyme là 99%
- Đã lên men và thu hồi được 400g sản phẩm phytase tái tổ hợp có hoạt lực 578IU/g ở quy mô phòng thí nghiệm

*2/ Hiệu quả thực tế và khả năng áp dụng kết quả của nhiệm vụ:*

- Đã xác định được sản phẩm của nhiệm vụ là enzym phytase tái tổ hợp không mất cảm với pepsin trong điều kiện HCl 0,1N (pH = 2,0)
- Sản phẩm có khả năng ứng dụng để sản xuất phytase ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp

*3/ Những tồn tại cần khắc phục và hoàn thiện:*

- Tổng quan, phương pháp nghiên cứu: phải bổ sung những phần liên quan đến nhiệm vụ năm nay: lên men, thu nhận, ứng dụng phytase
- Cần phải đưa kết quả đạt được trong các năm vừa qua vào. Chủng P1 có trùng phần đã làm hay không? Những gen mới biểu hiện có tốt hơn kết quả cũ không
- Chính sửa lại những biện luận không có so sánh với các kết quả trước
- Viết lại kết luận theo đúng hợp đồng
- Nên có so sánh với các chế phẩm thương mại: nếu không đạt kết quả bằng sao đã ứng dụng?
- Nên tính sơ bộ giá thành. Khi sử dụng các phương pháp lọc luân hồi, sấy khô, giá thành sẽ cao, nếu ứng dụng trong sản xuất thức ăn gia súc: có khả thi không?
- Viết kỹ phần phương pháp: thử enzym trong môi trường sẽ hoạt động.
- Nghiên cứu sinh tổng hợp enzym còn sơ sài.
- Xác định ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng từ 4,5 – 8, kết quả 6,5 - 8 khoảng quá rộng, nên xác định chính xác hơn.
- Không ai nuôi nấm men trong môi trường có Bx = 1. Nên nuôi từ Bx = 4 trở lên
- Hoạt tính ở 100°C giữ được không giảm. Nên xem xét lại số liệu bảng 26 – Khả năng bền nhiệt của chế phẩm.
- Tại sao tác giả chuyển gen phytase từ nấm mốc sang nấm men trong khi gen này có rất nhiều trong các vi sinh vật khác? Việc này khó hơn, gen TTH không bền và không ổn định.
- Hoạt tính của enzym không bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ, sao lại tạo chế phẩm trong điều kiện đông khô (–40°C) – Không khả thi khi đưa ra sản xuất.

4/ *Đánh giá tổng quát của chủ tịch Hội đồng:*

- Đề tài đã hoàn thành các nội dung đã đăng ký với Vụ Khoa học và Công nghệ - Bộ Công Thương
- Báo cáo đầy đủ, trình bày logic, ít lỗi.

**Kiến nghị của Hội đồng:**

- Chính sửa theo ý kiến Hội đồng và đề nghị nghiệm thu cấp Bộ

**Kết quả bỏ phiếu đánh giá của Hội đồng:**

*Tổng số phiếu bầu:* 10

Xuất sắc: 10

Khá:

Đạt:

Không đạt:

**Kết luận:**

Nhiệm vụ đạt loại: Xuất sắc (94,0/100)

*Hà Nội, ngày 17 tháng 12 năm 2009*

**THƯ KÝ HỘI ĐỒNG**

**CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG**



**ThS. Đàm Lam Thanh**



**PGS. TS. Lê Đức Mạnh**

## BẢN NHẬN XÉT BÁO CÁO TỔNG KẾT

NHIỆM VỤ KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ THƯỜNG XUYÊN NĂM 2009

### KHAI THÁC VÀ PHÁT TRIỂN NGUỒN GEN VI SINH VẬT CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM

Chủ nhiệm nhiệm vụ: **PGS. TS. Vũ Nguyên Thành**

Cơ quan chủ trì thực hiện nhiệm vụ: Viện Công nghiệp thực phẩm

#### *Nhận xét:*

Nhiệm vụ Khai thác và phát triển nguồn gen vi sinh vật công nghiệp thực phẩm được Bộ Công thương giao cho Viện CNTP theo Quyết định số 05B.09 QG/HĐ-KHCN ký ngày 3 tháng 3 năm 2009 đã được nhóm đề tài thực hiện với mục tiêu “Lên men và thu hồi được enzyme phytaza tái tổ hợp ở quy mô phòng thí nghiệm” từ chủng nấm men tái tổ hợp *Pichia pastoris* mang gen *phyA* mã hoá tổng hợp enzym phytaza từ nấm mốc *Aspergillus niger* đã thu được từ kết quả nhiệm vụ đã được thực hiện năm 2007 và 2008.

Trong Phần Tổng quan, các tác giả đã cung cấp khá đầy đủ và chi tiết các thông tin về axit phytic, enzym phytaza. Các nghiên cứu trên thế giới về chuyển gen mã hoá phytaza, công cụ biểu hiện gen hiện đang được sử dụng rộng rãi và có hiệu quả nói chung với các enzym tái tổ hợp và nói riêng với enzym phytaza đã được mô tả chi tiết với các trích dẫn tài liệu cập nhật và trung thực.

Các phương pháp nghiên cứu và phân tích sử dụng để thực hiện các nội dung của nhiệm vụ là thông dụng và hiện đại, hoá chất, thiết bị, các vật liệu di truyền đều của các nước thuộc nhóm G7 nên số liệu thu được và chính xác và đáng tin cậy.

Năm 2007 và 2008 khi thực hiện nhiệm vụ Khai thác và phát triển nguồn gen vi sinh vật công nghiệp thực phẩm, các tác giả nhóm đề tài đã đạt được một số các kết quả như sau:

- Đã tách dòng thành công gen *phyA* mã hoá tổng hợp enzym phytaza từ 4 chủng *A. niger* P1, P6, P8 và P10 bằng kỹ thuật PCR và đánh giá đặc tính của chúng;
- Đã thiết kế được vector biểu hiện gen ngoại lai (pPICZαA/*phyA* P1, P6, P8, P10) và chuyển được hai thiết kế (P1, P8) vào nấm men *P. pastoris* X-33 và KM71H.
- Đã thành công trong việc thiết kế môi, thiết kế vector thể hiện *phyA* không chứa đuôi His-tag và c-myc-epitope, giải trình tự của thiết kế mới tại các vị trí liên kết;

- Đã biến nạp được vector biểu hiện gen ngoại lai (pPICZαA/phyA s) vào nấm men *P. pastoris* X-33 và KM71H

- Đã biểu hiện thành công gen *phyA* của *A.niger* trên cả 2 chủng *P. pastoris*.X-33 và KM71H.

- Đã biến nạp và tuyển chọn được 9 chủng biến nạp *P. pastoris*.X-33 mang biến nạp đa bản (multicopy) có khả năng sinh trưởng trên nồng độ zeocin cao (2000 mg/) và khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp cao;

- Đã nghiên cứu được một số điều kiện lên men thu nhận phytaza tái tổ hợp quy mô phòng thí nghiệm: Trên môi trường biểu hiện có chứa metanol (là chất kích thích quá trình biểu hiện của gen và là nguồn cacbon duy nhất cho quá trình sinh trưởng và phát triển của *P. pastoris* tái tổ hợp) với nồng độ 1%, sau 4 ngày biểu hiện năng suất phytaza ngoại bào đạt 1329 IU/ml, hàm lượng protein đạt 1,71 g/l. Tăng 22 lần so với kết quả nghiên cứu năm 2007 và 1000 lần so với chủng gốc.

- Đã nghiên cứu đặc tính phytaza tái tổ hợp, enzym này hoạt động tối ưu ở pH 2,5 và 5,0, nhiệt độ 60°C. Phytaza bền khi nhiệt độ bảo quản nhỏ hơn 55°C, trong điều kiện pH=2,0-8,0.

**Năm 2009:** Nhóm đề tài đã tiếp tục nghiên cứu và đạt được một số kết quả như sau:

- Đã tách dòng 5 gen mã hóa *phyA* từ 5 chủng *Aspergillus niger* vào vector TA và giải trình tự 5 gen đã tách dòng trên;

- Đã xây dựng được phương pháp và xác định được số lượng copy của 3 thể biến nạp *Pichia pastoris*.

- Đã nghiên cứu và lựa chọn điều kiện lên men, thu sinh khối phù hợp cho chủng nấm men tái tổ hợp: Môi trường nuôi cấy YPD thông dụng (chứa glucose, cao nấm men, Bacto pepton) ; pH nuôi cấy: 6,0-8,0; nhiệt độ nuôi cấy: 30-32°C;. Enzim phytaza tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trên môi trường YPD có nguồn cacbon là glucose, hoạt tính đạt được 171 IU/ml.

- Đã nghiên cứu lựa chọn được phương pháp làm sạch, thu hồi, tạo chế phẩm enzyme phytaza tái tổ hợp dạng bột đông khô có hoạt lực 578 IU/gam

- Enzim phytaza tái tổ hợp dạng bột đông khô thể hiện khả năng bền với nhiệt độ cao, không mất cảm với pepsin trong điều kiện pH=2,0 và hoạt động thủy phân tốt các cơ chất làm thức ăn khi nghiên cứu tiêu hóa hai pha (pha dạ dày và pha ruột non) trong ống nghiệm (*in vitro*) .

- Đã thực hiện lên men, thu hồi, tạo sản phẩm quy mô phòng thí nghiệm và thu được 200 gam enzym phytaza tái tổ hợp có hoạt tính 2100 IU/gam.

Như vậy, chủ nhiệm và các cán bộ thực hiện nhiệm vụ đã hoàn thành tốt nội dung, công việc được giao năm 2009, tuy nhiên, để hoàn thiện báo cáo tổng kết, đề nghị nhóm đề tài bổ sung, chỉnh sửa, làm rõ một số điểm như sau:

- Trong chương 1 - Tổng quan tài liệu: Bổ sung thêm tổng quan tài liệu về công nghệ lên men, thu hồi enzym tái tổ hợp

- Trong chương 2 – Thực nghiệm: Bổ sung thêm phương pháp lên men, thu hồi, làm sạch, đông khô enzym; phương pháp xác định tính bền nhiệt, ảnh hưởng của enzym tiêu hóa pepsin và phương pháp nghiên cứu tiêu hóa 2 pha trong ống nghiệm.
- Trong chương 3 - Kết quả và bình luận: Trước khi thông báo những kết quả nghiên cứu của năm 2009, đề nghị tóm tắt lại các kết quả tương ứng năm 2007 và 2008, như vậy, sự biện luận, so sánh kết quả sẽ thuyết phục hơn.

Báo cáo còn khá nhiều lỗi chính tả, chế bản, đặc biệt, nhiều giải thích, biện luận kết quả còn dài dòng, chưa ngắn gọn và thoát ý.

Kết luận chung:

Với các kết quả đạt được của nhiệm vụ thể hiện trong báo cáo tôi đánh giá chủ nhiệm nhiệm vụ và các cộng sự đã có rất nhiều cố gắng, làm việc nghiêm túc, có nhiều kinh nghiệm và kỹ năng trong lĩnh vực công nghệ gen. Nhiệm vụ đã hoàn thành tốt mục tiêu và nội dung, tôi đánh giá nhiệm vụ đạt Xuất sắc và đề nghị Bộ Công Thương cho phép được nghiệm thu cấp Bộ sau khi Báo cáo tổng kết đã được bổ sung, chỉnh sửa.

*Hà Nội, ngày 16 tháng 12 năm 2009*

Người viết nhận xét



**PGS. TS. Nguyễn Thị Hoài Trâm**