



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002701

(51)⁷ **C12N 15/00; C12N 15/09; C12N 15/63;
C12N 15/03**

(13) **Y**

(21) 2-2017-00312

(22) 11/10/2017

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/04/2019 373A

(73) Viện Công nghệ sinh học-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu
Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Trương Nam Hải (VN); Đỗ Thị Huyền (VN); Đào Trọng Khoa (VN).

(54) **TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA EXPANSIN CÓ NGUỒN GỐC TỪ VI KHUẨN TRONG DẠ
CỎ DÊ VÀ EXPANSIN TÁI TỔ HỢP CÓ KHẢ NĂNG LÀM TĂNG CHUYỂN HÓA
XENLULOZA TINH THỂ CỦA XENLULAZA**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến trình tự gen mã hóa expansin và expansin tái tổ hợp có khả năng làm tăng chuyển hóa xelluloza tinh thể của xellullaza. Bằng kỹ thuật metagenomic, gen *exp* mới, mã hoá expansin được khai thác từ dữ liệu giải trình tự DNA metagenome vi khuẩn trong dạ cỏ dê. Kết hợp với công nghệ DNA tái tổ hợp, gen *exp* được biểu hiện mạnh trong tế bào biểu hiện *E. coli* Rosseta 1. Sản phẩm expansin tái tổ hợp sau tinh sạch có khả năng làm tăng chuyển hóa xelluloza tinh thể từ giấy lọc lên 44%.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến trình tự gen mã hóa expansin có nguồn gốc từ vi khuẩn trong dạ cỏ dê và expansin tái tổ hợp được tạo ra bằng công nghệ ADN tái tổ hợp từ nguồn gen này. Protein này có độ tinh sạch cao và có khả năng làm tăng chuyển hóa xenluloza tinh thể của xenulaza.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Việt Nam là nước nông nghiệp với các sản phẩm đa dạng gồm lúa và các cây hoa màu. Trên thế giới, Việt Nam được xếp đứng thứ hai về sản xuất gạo. Do đó, lượng phế phụ phẩm từ nông nghiệp đặc biệt là rơm rạ là rất lớn. Theo báo cáo thống kê về nông nghiệp cho thấy sản lượng lúa cả năm 2015 đạt 45,2 triệu tấn, tăng 240,9 nghìn tấn so với năm 2014 (theo gso.gov.vn). Ước tính hàng năm có khoảng 30 đến 40 triệu tấn rơm rạ không sử dụng gây lãng phí nghiêm trọng. Bên cạnh đó, nhiều địa phương đã dùng biện pháp đốt rơm rạ gây ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe con người và đến cảnh quan thiên nhiên.

Hiện nay có rất nhiều ứng dụng thực tiễn từ rơm rạ như dùng rơm rạ đã qua xử lý để làm cơ chất cho nuôi trồng nấm hay chuyển hóa chúng thành nguồn đường cho lên men sản xuất nhiều sản phẩm có giá trị kinh tế cao như cồn sinh học, dầu sinh học nhằm góp phần tăng hiệu suất kinh tế đồng thời bảo vệ môi trường (Howard, Abotsi, Jansen, & Howard, 2003). Đứng trước thực trạng ngày càng cạn kiệt dần về tài nguyên khoáng sản, nhiên liệu hóa thạch và yêu cầu bảo vệ môi trường để phát triển bền vững, việc tận dụng sinh khối thực vật đang được đề cao hơn bao giờ hết, đặc biệt ở các nước nông nghiệp như Việt Nam.

Phế phụ phẩm nông nghiệp có thành phần chính là lignoxenluloza.

Lignoxenluloza có cấu trúc vững chắc, được tạo thành từ xenluloza, hemixenluloza, lignin và các chất khoáng. Xenluloza, hemixenluloza có những vùng cấu trúc tinh thể rắn chắc (vùng định hình) và vùng vô định hình và bao quanh bởi chất keo lignin làm cho lignoxenluloza rất khó được chuyển hóa. Lignin là chất dễ bị tan ra ở nhiệt độ cao để bộc lộ xenluloza, hemixenluloza. Tuy nhiên, do cấu trúc tinh thể phức tạp của xenluloza và hemixenluloza nên việc chuyển hóa nguồn sinh khối này phải cần tới nhiều loại enzym thủy phân. Các enzym này thuộc hai nhóm lớn là xenlulaza và hemixenlulaza. Ngoài hai nhóm enzym trên, việc thủy phân lignoxenluloza còn cần sự phối hợp nhiều loại protein không có chức năng xúc tác nhưng có tác dụng nới lỏng cấu trúc vùng tinh thể xenluloza hoặc giúp enzym bám chắc lên cơ chất. Các loại protein tham gia thúc đẩy hoạt tính xenlulaza, hemixenlulaza được khám phá một cách tình cờ, không có quy luật và do đó cho đến nay nhóm protein này vẫn còn chứa nhiều bí mật hấp dẫn các nhà nghiên cứu liên tục tìm kiếm.

Năm 2003, Foreman và cộng sự đã phát hiện hai protein CIP1, CIP2 có trình tự tương đồng với lyaza (Jacobson *et al.*, 2013) và glucuronoyl esteraza CE15 (Pokkuluri *et al.*, 2011) nhưng lại có hoạt tính chuyển hóa xenluloza như xenlulaza (Foreman *et al.*, 2003). Hai protein này có khả năng làm tăng chuyển hóa đáng kể lignoxenluloza (Banerjee *et al.*, 2010). Tiếp theo đó, hàng loạt các nghiên cứu khác cũng phát hiện ra các protein như swollenin, expansin thường có ở thành tế bào thực vật cũng làm tăng tốc độ thủy phân của các enzym chuyển hóa lignoxenluloza (Gourlay *et al.*, 2013). Trong những năm gần đây một phát hiện được cho là cuộc cách mạng lớn nhất trong việc tìm kiếm phức hợp thủy phân lignoxenluloza là việc phát hiện ra enzym lytic polysaccharit monooxygenaza (LPMO). Qua nghiên cứu, các nhà khoa học đã chứng minh được LPMO hoạt động trên bề mặt sợi xenluloza tinh thể, oxy hóa xenluloza vùng tinh thể để làm bung cấu trúc, tạo điều kiện cho xenlulaza tiếp cận thủy phân xenluloza (Harris *et al.*, 2010; Levasseur *et al.*, 2013; Eibinger *et al.*, 2014).

Expansin là một họ protein thực vật lớn gồm 4 họ nhỏ là alpha-expansin, beta-expansin, protein A giống expansin (expansin-like A) và protein B giống expansin (expansin-like B). Expansin có hoạt tính phá hủy cấu trúc thành tế bào thực vật và các polysaccarit như xenluloza, hemixenluloza, có mặt ở tất cả các loài thực vật và một số vi sinh vật như vi khuẩn và nấm, giun tròn (McQueen-Mason & Cosgrove, 1994; Cosgrove, 2000; Qin *et al.*, 2004; Sampedro & Cosgrove, 2005). Các kết quả nghiên cứu cho thấy expansin có chức năng làm tăng chuyển hóa xenluloza của enzym xenlulaza từ 20% lên tới 100% (Georgelis, Nikolaidis, & Cosgrove, 2015). Hoạt tính này được đánh giá trên một số dạng cơ chất như làm yếu cấu trúc giấy lọc (McQueen-Mason & Cosgrove, 1994; Saloheimo *et al.*, 2002), giúp xenlulaza tiếp cận xenluloza và chuyển hóa chúng (Cosgrove, 2001). Expansin có nguồn gốc từ thực vật và nấm rất khó được sản xuất dưới dạng protein tái tổ hợp (Kim *et al.*, 2010). Trình tự GR2 mã hóa cho protein ở phần hoa cỏ có cấu trúc tương đồng 25-40% với expansin đã được nghiên cứu có khả năng biểu hiện tốt ở *E. coli*, có chức năng làm tăng chuyển hóa xenluloza của endoglucanaza từ *Trichoderma* (Cosgrove & Takeda, 2007). Hiện nay expansin có nguồn gốc từ vi khuẩn bao gồm *Bacillus subtilis*, *Hahella chejuensis* 23 (KCTC 96), *Dictyostelium discoideum*, *Neosartorya fischeri*, *Aspergillus fumigatus*, *A. clavatus*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *Penicillium chrysogenum*, *A. niger*, *Emericella nidulans*, *Magnaporthe grisea*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Frankia* sp., *Streptomyces svaceus*, *Sorangium cellulosum*, *Stigmatella aurantiaca*, *Plesiocystis pacifica*, *Myxococcus xanthus*, *Leptothrix cholodnii*, *Roseiflexus* sp., *Roseiflexus castenholzii*, *Chloroflexus aurantiacus*, *Herpetosiphon aurantiacus*, *Acidovorax avenae* subsp., *Pectobacterium atrosepticum*, *B. licheniformis*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *B. pumilus*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*, *Xylella fastidiosa*, *Nakamurella multipartite*, *Micromonospora* sp., *Catenulispora acidiphila* và *Dickeya zeae* cũng được nghiên cứu có hoạt tính tương tự như expansin từ thực vật (Kim *et al.*, 2010). Vì vậy, nguồn

expansin từ vi khuẩn được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu tạo protein tái tổ hợp cho ứng dụng vào thực tiễn.

Cấu trúc phân tử của expansin gồm hai vùng D1 và D2 liên kết với nhau bởi 4 axit amin. Kết quả so sánh vùng bảo thủ cho thấy, D1 thường tương đồng với đầu N của xenlulaza, D2 tương đồng với protein thuộc họ protein liên kết hydrat cacbon 63 (carbohydrate binding module 63 - CBM63). Vùng D2 có vai trò quan trọng trong việc giúp expansin bám vào thành tế bào, sợi xenluloza và sợi polysaccarit (Georgelis *et al.*, 2015). Chức năng sinh học khác của vùng D1 hay của toàn bộ phân tử expansin hiện chưa được làm sáng tỏ (Georgelis *et al.*, 2015).

Trong những năm gần đây, ứng dụng kỹ thuật metagenomics cho phép các nhà khoa học sàng lọc và tìm kiếm được những gen chức năng mới từ hệ vi sinh vật mà không có khả năng nuôi cấy bằng phương pháp truyền thống. Nguồn gen từ vi sinh vật không nuôi cấy được (chiếm 99% trong mỗi hệ sinh thái) là nguồn gen quý và chưa được khai thác. Kỹ thuật metagenomics dựa trên giải trình tự toàn bộ ADN đa hệ gen của quần xã vi khuẩn từ một số hệ sinh thái điển hình, có khả năng chuyển hóa nhanh lignoxenluloza như vi khuẩn trong ruột mối (Do *et al.*, 2014), vi khuẩn từ phân trâu, bò, dạ cỏ trâu, bò, ngựa... đã cho phép khai thác được một số lượng gen mới mã hóa enzym/protein phân cắt lignoxenluloza vô cùng lớn và hết sức phong phú. Dạ cỏ dê cũng như dạ cỏ của nhiều động vật nhai lại khác là môi trường chứa nhiều vi khuẩn có khả năng hỗ trợ chuyển hóa nhanh nguồn thức ăn lignoxenluloza (Lim *et al.*, 2013). Vì vậy đây là nguồn gen phong phú cho khai thác expansin từ vi khuẩn có trong dạ cỏ dê.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất trình tự gen mã hóa expansin có khả năng làm tăng chuyển hóa xenluloza tinh thể của xenlulaza như được thể hiện trong SEQ ID NO:1 (còn gọi là gen *exp*). Trình tự gen này có nguồn gốc từ vi khuẩn trong dạ cỏ dê.

Theo mục đích khác, giải pháp hữu ích đề xuất expansin tái tổ hợp có khả năng làm tăng chuyển hóa xenluloza tinh thể của xenlulaza, có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO:2, được mã hóa từ trình tự gen *exp* nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện điện di đồ expansin được biểu hiện trong chủng *E. coli* Rosetta (A) và expansin tái tổ hợp được tinh chế (B) trên gel polyacrylamit 12,6%, trong đó các chữ viết tắt được thể hiện trên hình vẽ là EXP: expansin; TS: protein tổng số; Tan: protein pha tan; KTan: protein pha không tan; M: protein chuẩn (Fermentas).

Hình 2 thể hiện khả năng của expansin tái tổ hợp trong việc chuyển hóa xenluloza tan và xenluloza tinh thể của xenlulaza thương mại.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Theo một phương án, giải pháp hữu ích đề cập đến trình tự gen mã hóa expansin có khả năng làm tăng chuyển hóa xenluloza tinh thể của xenlulaza, có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:1 (còn gọi là gen *exp*).

Trình tự gen mã hóa expansin nêu trên được khai thác từ dữ liệu giải trình tự ADN đa hệ gen của các vi khuẩn trong dạ cỏ dê. Dê được sử dụng trong giải pháp hữu ích là 10 con dê gồm 5 dê Cỏ, 5 dê Bách Thảo sống chăn thả tại các vùng núi cao ở Ninh Bình, Quảng Ninh. Mẫu dạ cỏ của 10 con dê sau khi thu thập được bảo quản lạnh và đưa về phòng thí nghiệm. Mẫu được lọc nhiều lần bằng vải xô để loại bỏ thức ăn và các mảnh thức ăn, sau đó được ly tâm phân đoạn để loại bỏ các sinh vật đơn bào, nấm và thu vi khuẩn. Vi khuẩn này là vi khuẩn tổng số từ mẫu dạ cỏ. Sau đó ADN của các vi khuẩn được tách chiết, giải trình tự trên hệ thống giải trình tự thế hệ mới Illumina 2500 (BGI, Hồng Kông). Tổng số kích thước đa hệ gen giải được là 9 Gb được lắp ghép bằng công cụ tin sinh học thành các đoạn trình tự dài (contig). Dựa trên các contig, 164644 khung đọc mở (open reading frame - ORF) đã được phát hiện. Chức năng của các protein mã hóa từ các khung đọc mở đã được chú giải dựa trên cơ sở dữ liệu CAZy (Cantarel *et al.*, 2009), KEGG (Kanehisa *et al.*, 2008). Bên cạnh đó,

nguồn gốc của các ORF cũng được ước đoán dựa vào việc so sánh với cơ sở dữ liệu NR (non-redundant) của NCBI kết hợp với phần mềm MEGAN 4.6 (Huson *et al.*, 2007).

Dựa trên việc chú giải chức năng của ORF, từ 164644 ORF, các tác giả giải pháp hữu ích đã tìm kiếm được một trình tự có mang vùng mã hóa CBM63 có 858 nucleotit như đã nêu trong SEQ ID NO:1. Phân tích chi tiết khung đọc mở cho thấy 78 nucleotit đầu 5' mã hóa cho trình tự peptit tín hiệu có vai trò trong việc tiết enzym ra ngoài môi trường và 777 nucleotit mã hóa cho protein. Trình tự nucleotit của gen không tương đồng với bất cứ trình tự gen nào trên NCBI. Trình tự axit amin suy diễn từ gen tương đồng cao nhất là 81% với protein giả định, tương đồng 72% với expansin (SFW30713.1) có nguồn gốc từ *R. flavefaciens* với độ bao phủ 99%.

Theo một phương án khác, giải pháp hữu ích đề cập đến expansin tái tổ hợp có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2, có khả năng làm tăng chuyển hóa xenluloza tinh thể của xenlulaza, được mã hóa từ trình tự gen *exp* nêu trên.

Phương pháp sinh tổng hợp expansin tái tổ hợp theo giải pháp hữu ích được thực hiện trong tế bào *E. coli*. Tiến hành chuyển gen có kích thước 777 nucleotit (không chứa trình tự mã hóa cho peptit tín hiệu) mã hóa expansin vào vector biểu hiện tại vị trí của enzym giới hạn *NcoI* và *XhoI*. Vector dùng để mang gen và chuyển gen *exp* vào *E. coli* là pET22b(+) (Novagen) để tạo plasmit biểu hiện pET22-*exp*.

Plasmit tái tổ hợp pET22-*exp* được đưa vào tế bào chất của chủng biểu hiện *E. coli* Rosetta 1 bằng phương pháp sốc nhiệt. Quá trình biểu hiện gen *exp* được thực hiện như sau: chủng vi khuẩn *E. coli* Rosetta 1 mang gen *exp* được nuôi cấy trong môi trường LB có ampicilin (LBA) ở 37°C qua đêm. Sau đó dịch nuôi cấy qua đêm được chuyển sang môi trường TBcb có bổ sung ampicilin mới và tiếp tục nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở 37°C cho đến khi đạt giá trị OD₆₀₀ khoảng 0,6 - 0,8 thì tiến hành cảm ứng với nồng độ IPTG cuối cùng là 0,1 mM. IPTG có mặt trong môi trường sẽ đi vào trong tế bào chất và cảm ứng vùng khởi

động T7lac để khởi động quá trình phiên mã sinh tổng hợp expansin. Tế bào được nuôi cấy trong môi trường cảm ứng trên ở 20°C trong 18 giờ thì được thu lại bằng phương pháp ly tâm. Cặn tế bào được hòa lại bằng dung môi Tris-HCl 20 mM để đạt giá trị OD₆₀₀ cuối cùng là 10. Dung dịch tế bào chứa protein biểu hiện expansin được tiến hành siêu âm để thu protein pha tan và pha không tan. Protein tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit 12,6% (Laemmli, 1970). Trên điện di đồ, expansin được biểu hiện với kích thước khoảng 35 kDa và tồn tại chủ yếu trong pha tan.

Dung dịch protein ở pha tan được bổ sung NaCl đến nồng độ cuối cùng là 500 mM và imidazol đến nồng độ cuối cùng là 50 mM. Dung dịch protein này sau đó được đưa vào cột HiTrap đã được gắn Ni²⁺. Do expansin được gắn 6 axit amin histidin nên liên kết chặt với Ni²⁺ được giữ lại trên cột còn các protein khác không có hoặc có ái lực yếu với Ni²⁺ sẽ bị rửa trôi. Protein tái tổ hợp sau đó được tách ra khỏi cột nhờ đệm có nồng độ imidazol cao 500 mM, expansin có độ tinh sạch đạt >98% (như được đánh giá bằng QuantityOne).

Sản phẩm protein sau khi tinh sạch được loại muối bằng cột loại muối PD10, có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:2. Expansin tái tổ hợp thu được được bảo quản trong dung dịch glyxerol 20% ở 20-80°C tại Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Biểu hiện gen exp trong tế bào E. coli Rosetta 1

Nuôi cấy một khuẩn lạc *E. coli* Rosetta 1 mang plasmit pET22-*exp* trong 2 ml môi trường LB (0,5% cao nấm men, 1% trypton, 0,5% NaCl) có bổ sung 100 µg/ml ampicilin (LBA) lắc 200 vòng/phút ở 37°C qua đêm. Chuyển 20 µl dịch nuôi cấy qua đêm sang 5 ml môi trường TBcb (2,4% cao nấm men, 1,2% pepton, 0,24% D-glucoza, 17 mM KH₂PO₄, 72 mM K₂HPO₄) có bổ sung 100 µg/ml ampicilin (gọi chung là môi trường TBcb-Amp), lắc tiếp trong 2 giờ ở 37°C cho đến khi OD₆₀₀ đạt khoảng 0,6 – 0,8 thì tiến hành cảm ứng với 0,1 mM IPTG, tế bào chuyển sang nuôi cấy ở nhiệt độ cảm ứng 20°C, lắc 200 vòng/phút

trong 18 giờ. Tế bào sau nuôi cấy được thu lại bằng cách ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 5 phút. Cặn tế bào được hòa lại bằng dung môi Tris-HCl 20 mM để đạt OD₆₀₀ cuối cùng bằng 10. Dung dịch tế bào được tiến hành siêu âm lặp lại 100-200 lần, mỗi lần phóng sóng siêu âm trong khoảng 0,5 giây, cách nhau khoảng 0,5 giây, trong điều kiện nhiệt độ 4°C. Dịch tế bào sau siêu âm được coi là mẫu protein tổng số. Dịch này được ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 10 phút để tách riêng hai pha protein tan và không tan. Mẫu protein tổng số, protein tan đều được bổ sung dung dịch đệm mẫu 6X (tris 0,375 M, pH8, glyxerol 60%, SDS 12%, bromophenol blue 0,06%, 2-mecaptoethanol 10%) theo tỷ lệ thể tích 5 mẫu:1 đệm, trộn đều, biến tính ở 100°C trong 5 phút. Mẫu protein được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamit 12,6% (Hình 1A). Expansin tái tổ hợp có kích thước khoảng 35 kDa đã được biểu hiện ở pha protein tan.

Ví dụ 2: Tinh chế expansin tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực

Dịch protein tan được bổ sung NaCl đến nồng độ cuối cùng là 500 mM và imidazol đến nồng độ cuối cùng là 50 mM, sau đó đưa lên cột sắc ký ái lực HisTrap 5 ml đã được gắn Ni²⁺. Dung dịch expansin được biểu hiện có chứa hexahistidin ở tận cùng đầu C có ái lực cao với niken trên cột và được giữ lại trên cột. Các protein tạp không có hoặc có ái lực yếu với niken sẽ bị đẩy ra khỏi cột bằng đệm rửa chứa natri photphat 20 mM, NaCl 500 mM và imidazol 100 mM. Protein sau đó được thu lại ở dung dịch đệm chứa nồng độ imidazol 500 mM. Protein sau khi thu được từ các phân đoạn được định lượng bằng nano-drop (Implen 2000C) và kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamit 12,6% (Hình 1B). Gel điện di sau khi rửa sạch được scan bằng máy scanner và đưa vào phần mềm QuantityOne để phân tích độ sạch, cho thấy có độ sạch đạt trên 98%.

Ví dụ 3: Đánh giá khả năng của expansin tái tổ hợp thu được trong việc làm tăng chuyển hóa xenluloza tinh thể của xenlulaza

Thử nghiệm đánh giá khả năng làm tăng chuyển hóa xenluloza của xenlulaza được tiến hành dựa trên nguyên liệu là cacboxymetyl xenluloza (viết

tất là CMC) làm nguồn cơ chất xenluloza tan, và giấy lọc làm nguồn cơ chất xenluloza tinh thể. Các thử nghiệm bao gồm: (1) chỉ có expansin; (2) chỉ có xenlulaza; (3) có xenlulaza và có expansin. Theo nguyên lý chung, bất kỳ enzym hay protein nào phân cắt, chuyển hóa được xenluloza đều tạo gốc đường khử. Hàm lượng đường khử giải phóng ra từ xenluloza được định lượng bằng axit 3,5-dinitrosalixylic (DNS) và được tính tương đương với chất chuẩn là glucoza (Gusakov, Kondratyeva, & Sinitsyn, 2011). Khả năng chuyển hóa xenluloza của xenlulaza được tính theo đơn vị hoạt tính. Một đơn vị hoạt tính của xenlulaza là lượng enzym cần thiết để chuyển hóa xenluloza thành gốc đường khử tương đương với 1 μmol glucoza.

Thử nghiệm 1 (0,5 ml) gồm hai ống nghiệm: ống 1 gồm 10 mg giấy lọc, 0,05 ml đệm natri xitrat 50 mM, pH 6, 0,3 mg expansin tinh sạch và nước khử ion vô trùng; ống 2 gồm 0,1 mg CMC, 0,05 ml đệm natri xitrat 50 mM, pH 6, 0,3 mg expansin tinh sạch và nước khử ion vô trùng. Thử nghiệm 2 (0,5 ml) gồm 2 ống nghiệm: ống 1 gồm 10 mg giấy lọc, 0,05 ml đệm natri xitrat 50 mM, pH 6, 0,025 U xenlulaza thương mại (Sigma) và nước khử ion vô trùng; ống 2 gồm 0,1 mg CMC, 0,05 ml đệm natri xitrat 50 mM, pH 6, 0,025 U xenlulaza thương mại (Sigma) và nước khử ion vô trùng. Thử nghiệm 3 gồm 2 ống nghiệm: ống 1 gồm 10 mg giấy lọc, 0,05 ml đệm natri xitrat 50 mM, pH 6, 0,3 mg expansin tinh sạch, 0,025 U xenlulaza thương mại (Sigma) và nước khử ion vô trùng; ống 2 gồm 0,1 mg CMC, 0,05 ml đệm natri xitrat 50 mM, pH 6, 0,3 mg expansin tinh sạch, 0,025 U xenlulaza thương mại (Sigma) và nước khử ion vô trùng. Cả ba thử nghiệm đều được ủ ở 50°C trong 90 phút để thực hiện phản ứng. Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 0,5 ml dung dịch DNS và nhúng toàn bộ các ống nghiệm vào nước đang sôi và tiếp tục đun sôi trong 5 phút. Mẫu sau phản ứng được đo ở bước sóng 540 nm. Mỗi thử nghiệm được làm lặp lại 3 lần. Khả năng chuyển hóa xenluloza của các thử nghiệm được tính bằng lượng glucoza được tạo thành và được thể hiện trên Hình 2. Trong thử nghiệm 1, khi không có xenlulaza, expansin hầu như không có khả năng chuyển hóa xenluloza, thể hiện là lượng đường khử được tạo ra rất thấp (dưới 0,03 U/ml) và sai số cao.

Trong thử nghiệm 2, khi có xenlulaza nhưng không có expansin, trên cơ chất tan CMC, hoạt tính xenlulaza đạt 0,5 U/ml và, trên cơ chất giấy lọc, hoạt tính xenlulaza đạt 0,2 U/ml. Trong thử nghiệm 3, khi bổ sung thêm expansin vào cùng xenlulaza, trong dung dịch có CMC, hoạt tính xenlulaza không tăng, giữ nguyên như không có expansin (0,5 U/ml). Cũng trong thử nghiệm này, trong dung dịch có cơ chất xenluloza tinh thể (cụ thể là giấy lọc), hoạt tính xenlulaza đạt 0,48 U/ml. Như vậy, khả năng chuyển hóa xenluloza tinh thể của xenlulaza đã tăng lên hơn 2 lần. Điều đó chứng tỏ với cơ chất tan, xenlulaza có thể tiếp cận và thủy phân tối đa cơ chất để tạo gốc đường khử nhưng với cơ chất giấy lọc, cấu trúc xenluloza có phần xenluloza tinh thể đã ngăn cản xenlulaza tiếp cận để chuyển hóa. Expansin đã làm nới lỏng cấu trúc xenluloza tinh thể, giúp enzym xenlulaza tiếp cận chuyển hóa tốt hơn, do đó làm tăng quá trình chuyển hóa giấy lọc của xenlulaza.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm thu được trình tự gen mã hóa expansin từ các vi khuẩn trong dạ cỏ dê và để tạo ra expansin tái tổ hợp từ gen này. Expansin tái tổ hợp thu được có khả năng làm tăng chuyển hóa xenluloza tinh thể của xenlulaza.

Các tài liệu tham khảo

- BANERJEE, G., CAR, S., SCOTT-CRAIG, J.S., BORRUSCH, M.S., ASLAM, N. & WALTON, J.D. (2010) Synthetic enzyme mixtures for biomass deconstruction: Production and optimization of a core set. *Biotechnology and Bioengineering* **106**, 707–720.
- CANTAREL, B.L., COUTINHO, P.M., RANCUREL, C., BERNARD, T., LOMBARD, V. & HENRISSAT, B. (2009) The Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* **37**, D233–D238.
- COSGROVE, D. (2001) Enhancement of accessibility of cellulose by expansins. [Http://www.google.com/patents/US6326470](http://www.google.com/patents/US6326470).
- COSGROVE, D.J. (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**, 321–326.
- COSGROVE, D.J. & TAKEDA, T. (2007) Use of Gr2 proteins to modify cellulosic materials and to enhance enzymatic and chemical modification of cellulose. [Https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2007084711](https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2007084711) [accessed 6 October 2017].
- DO, T.H., NGUYEN, T.T., NGUYEN, T.N., LE, Q.G., NGUYEN, C., KIMURA, K. & TRUONG, N.H. (2014) Mining biomass-degrading genes through Illumina-based de novo sequencing and metagenomic analysis of free-living bacteria in the gut of the lower termite *Coptotermes gestroi* harvested in Vietnam. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **118**, 665–671.
- DOI, R.H. & KOSUGI, A. (2004) Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nature Reviews. Microbiology* **2**, 541–551.
- EIBINGER, M., GANNER, T., BUBNER, P., ROŠKER, S., KRACHER, D., HALTRICH, D., LUDWIG, R., PLANK, H. & NIDETZKY, B. (2014) Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharit monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. *The Journal of Biological Chemistry* **289**, 35929–35938.

FOREMAN, P.K., BROWN, D., DANKMEYER, L., DEAN, R., DIENER, S., DUNN-COLEMAN, N.S., GOEDEGEBUUR, F., HOUFEK, T.D., ENGLAND, G.J., KELLEY, A.S., MEERMAN, H.J., MITCHELL, T., MITCHINSON, C., OLIVARES, H.A., TEUNISSEN, P.J.M., ET AL. (2003) Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 31988–31997.

GEORGELIS, N., NIKOLAIDIS, N. & COSGROVE, D.J. (2015) Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. .

GOURLAY, K., HU, J., ARANTES, V., ANDBERG, M., SALOHEIMO, M., PENTTILÄ, M. & SADDLER, J. (2013) Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. *Bioresource Technology* **142**, 498–503.

GUSAKOV, A. V., KONDRATYEVA, E.G. & SINITSYN, A.P. (2011) Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. *International Journal of Analytical Chemistry* **2011**, 1–4.

HARRIS, P.V., WELNER, D., MCFARLAND, K.C., RE, E., NAVARRO POULSEN, J.-C., BROWN, K., SALBO, R., DING, H., VLASENKO, E., MERINO, S., XU, F., CHERRY, J., LARSEN, S. & LO LEGGIO, L. (2010) Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry* **49**, 3305–3316.

HOWARD, R.L., ABOTSI, E., JANSEN, VAN R.E.L. & HOWARD, S. (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* **2**, 602–619.

HUSON, D.H., AUCH, A.F., QI, J. & SCHUSTER, S.C. (2007) MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Research* **17**, 377–386.

- JACOBSON, F., KARKEHABADI, S., HANSSON, H., GOEDEGEBUUR, F., WALLACE, L., MITCHINSON, C., PIENS, K., STALS, I. & SANDGREN, M. (2013) The crystal structure of the core domain of a cellulose induced protein (Cip1) from *Hypocrea jecorina*, at 1.5 Å resolution. *PloS One* **8**, e70562.
- KANEHISA, M., ARAKI, M., GOTO, S., HATTORI, M., HIRAKAWA, M., ITOH, M., KATAYAMA, T., KAWASHIMA, S., OKUDA, S., TOKIMATSU, T. & YAMANISHI, Y. (2008) KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic acids research* **36**, D480-484.
- KIM, E.S., LEE, H.J., BANG, W., CHOI, I. & KIM, K.H. (2009) Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and bioengineering* **102**, 1342–1353.
- KIM, K.H., CHOI, I.-G., LEE, H.J. & KIM, E.S. (2010) Prokaryotic expansin protein activating cellulose expansion and cellulose - degrading composition comprising the same. [Http://www.google.sr/patents/US20100173386](http://www.google.sr/patents/US20100173386).
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- LEVASSEUR, A., DRULA, E., LOMBARD, V., COUTINHO, P.M. & HENRISSAT, B. (2013) Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels* **6**, 41.
- LIM, S., SEO, J., CHOI, H., YOON, D., NAM, J., KIM, H., CHO, S. & CHANG, J. (2013) Metagenome analysis of protein domain collocation within cellulase genes of goat rumen microbes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **26**, 1144–1151.
- MCQUEEN-MASON, S. & COSGROVE, D.J. (1994) Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 6574–6578.

- POKKULURI, P.R., DUKE, N.E.C., WOOD, S.J., COTTA, M.A., LI, X.-L., BIELY, P. & SCHIFFER, M. (2011) Structure of the catalytic domain of glucuronoyl esterase Cip2 from *Hypocrea jecorina*. *Proteins* **79**, 2588–2592.
- QIN, L., KUDLA, U., ROZE, E.H.A., GOVERSE, A., POPEIJUS, H., NIEUWLAND, J., OVERMARS, H., JONES, J.T., SCHOTS, A., SMANT, G., BAKKER, J. & HELDER, J. (2004) Plant degradation: a nematode expansin acting on plants. *Nature* **427**, 30.
- SALOHEIMO, M., PALOHEIMO, M., HAKOLA, S., PERE, J., SWANSON, B., NYSSÖNEN, E., BHATIA, A., WARD, M. & PENTTILÄ, M. (2002) Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry* **269**, 4202–4211.
- SAMPEDRO, J. & COSGROVE, D.J. (2005) The expansin superfamily. *Genome Biology* **6**, 242.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Trình tự gen mã hóa expansin có khả năng làm tăng chuyển hóa xenluloza tinh thể của xenlulaza, trong đó trình tự gen này có nguồn gốc từ vi khuẩn trong dạ cỏ dê, có trình tự nêu trong SEQ ID NO:1.
2. Expansin tái tổ hợp có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2, trong đó protein này được mã hóa bởi trình tự gen nêu trong điểm 1 có khả năng làm tăng chuyển hóa xenluloza tinh thể của xenlulaza.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<120> Trình tự gen mã hóa expansin có nguồn gốc từ vi khuẩn trong dạ cỏ dê và expansin tái tổ hợp có khả năng làm tăng chuyển hóa xenluloza tinh thể của xenlulaza

<160> 2

<210> 1

<211> 858

<212> ADN

<213> Vi khuẩn trong dạ cỏ dê

<400> 1

```

1      ATGATACGCAGGATTTTACTGCAATGACTGCCTGTGCAGCTGCGATGACAATACTGCTT      60
61     ATGCCGTCCGCGAACGCTGCCGATCCTATGGACTATGTCCCGGACGGCAGGATAAACTGC      120
121    TTGACGTTATAGCAGCCCGCAGGAAGGGCGTTCCGGCAGAGGAGCTGAAAGCCCTCACG      180
181    GACCATATCCTCGGCAGGGGAAAGTACGACGGCGATTACACCGTTGATGAGGAGCTTATC      240
241    CTCGAACCCAAGGGCACTGTCCACACCGGCGAGGGAACGTTCTACGGCGGAGGCTATGTC      300
301    GGAGGCTGTGCGATGCTCGATCCGGTACCTATGAATTACTGGATAGTTGCGATGAACCTC      360
361    GCTGACTATAACGAGGGACAGCTCGCAGGAGCCTACATAGAAGTCACAGGCGAGCTCGGC      420
421    ACTATTAATATGTACGTTACGGACCTTCTGCCGGAGGGCAAGAAGGGTGACCTCGATCTC      480
481    TTCACTGACGCTTTTCCGCTGATAGCTCCCGTTGAAAAGGGCAGAGTTCCGGTGAGCTGG      540
541    AGGATAATCCCGATGGATACCGCAGACCACCTGCCCGTGACTACAAGTACAAGGAGGGA      600
601    ACGTCCGACTTCTGGATGGGAGTTCAGGTGCGCAACCACCGCTATCCTATAACCAAGCTC      660
661    GAATACCTCAACGAGGACGGCGGCTGGACCGAGATAAAGCGCCGCAGATAACAATATTTT      720
721    GAGGCGTCGGCTATGGGACCGGGACCGTTTACCTCCGCATCACGGACATCTACGGTCAG      780
781    CAGATAATCGACAGGGATATCCCCCTGTCTATGACGACACTGAGATAATCAGAGGCAAT      840
841    GTACAGTTTCCGGAGTAA      858

```

<210> 2

<211> 259

<212> axit amin

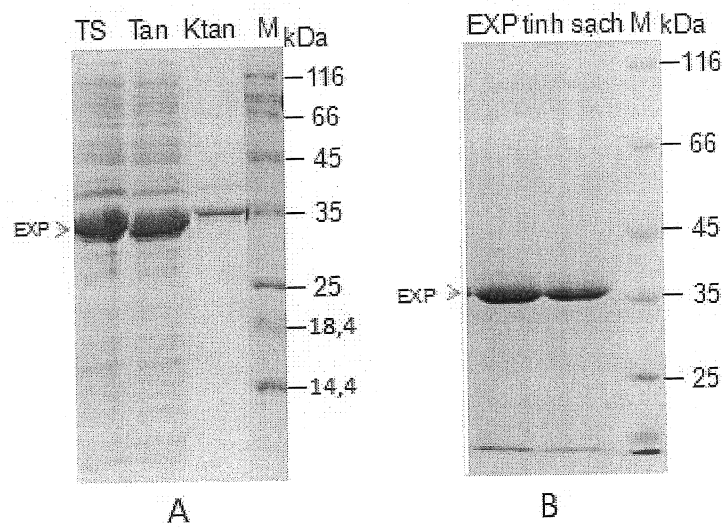
<213> Trình tự suy diễn từ gen

<400> 1

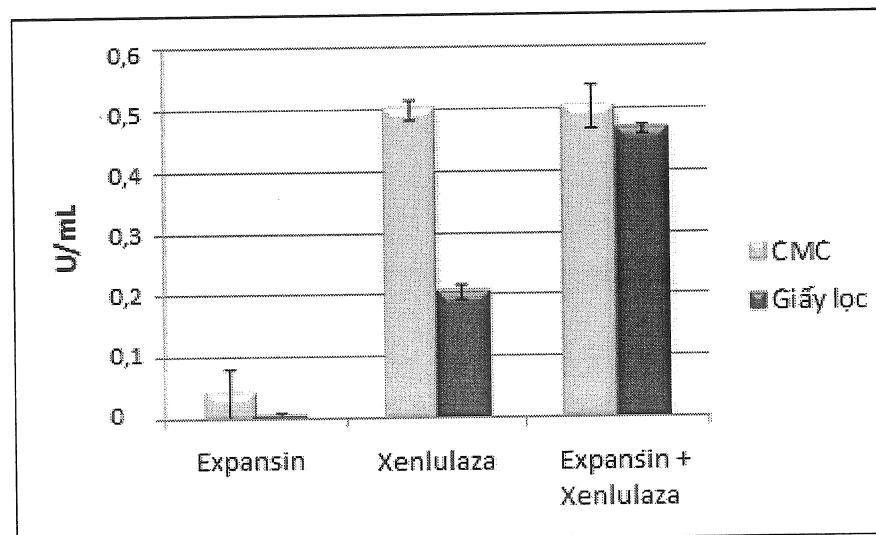
```

1      AlaAspProMetAspTyrValProAspGlyArgIleAsnCysPheAspValIleAlaAla      20
21     ArgArgLysGlyValProAlaGluGluLeuLysAlaLeuThrAspHisIleLeuGlyArg      40
41     GlyLysTyrAspGlyAspTyrThrValAspGluGluLeuIleLeuGluProLysGlyThr      60
61     ValHisThrGlyGluGlyThrPheTyrGlyGlyGlyTyrValGlyGlyCysAlaMetLeu      80
81     AspProValProMetAsnTyrTrpIleValAlaMetAsnLeuAlaAspTyrAsnGluGly      100
101    GlnLeuAlaGlyAlaTyrIleGluValThrGlyGluLeuGlyThrIleAsnMetTyrVal      120
121    ThrAspLeuLeuProGluGlyLysLysGlyAspLeuAspLeuPheThrAspAlaPhePro      140
141    LeuIleAlaProValGluLysGlyArgValProValSerTrpArgIleIleProMetAsp      160
161    ThrAlaAspHisLeuProValTyrTyrLysTyrLysGluGlyThrSerAspPheTrpMet      180
181    GlyValGlnValArgAsnHisArgTyrProIleThrLysLeuGluTyrLeuAsnGluAsp      200
201    GlyGlyTrpThrGluIleLysArgArgArgTyrAsnTyrPheGluAlaSerAlaMetGly      220
221    ProGlyProPheThrPheArgIleThrAspIleTyrGlyGlnGlnIleIleAspArgAsp      240
241    IleProLeuSerTyrAspAspThrGluIleIleArgGlyAsnValGlnPheProGlu      259

```



Hình 1



Hình 2