

TẠO DÒNG NẤM MEN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* TÁI TỔ HỢP BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA GLUCOAMYLASE

Đặng Thị Phương Thảo, Trần Linh Thuộc

Khoa Sinh học Trường ĐH Khoa học tự nhiên - ĐH Quốc Gia TP.HCM

(Bài nhận ngày 27 tháng 3 năm 2002, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 22 tháng 4 năm 2002)

TÓM TẮT: Plasmid pGA11 biểu hiện gen mã hóa glucoamylase chứa phức hợp gồm gen mã hóa glucoamylase từ nấm mốc *Rhizopus oryzae* được liên kết ở đầu 5' với trình tự tiết sss và ở đầu 3' với trình tự đầu C của gen mã hóa α -agglutinin của nấm men được đặt dưới sự kiểm soát của promoter cảm ứng GAPDH. Việc biến nạp plasmid này vào trong tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1 đã tạo được dòng tái tổ hợp MT-PGA có hoạt tính thủy phân tinh bột tạo vòng phân giải trong suốt quanh khuẩn lạc và có khả năng lên men rượu trực tiếp từ tinh bột. Khả năng ứng dụng thực tiễn của dòng nấm men này trong chế biến tinh bột được đề cập.

MỞ ĐẦU

Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* thường được sử dụng trong công nghiệp làm bia rượu, trong lên men ethanol dùng làm dung môi, nhiên liệu. *S. cerevisiae* không có khả năng thủy phân các đường cao phân tử như tinh bột và cellulose [1] nên không thể được sử dụng để lên men rượu trực tiếp từ các nguồn nguyên liệu phong phú và rẻ tiền này. Để lên men rượu, trước tiên cơ chất đường cao phân tử như tinh bột cần được thủy phân để giải phóng đường khử nhờ nấm mốc hoặc enzyme thủy phân từ nấm mốc, vi khuẩn... Trước đây, trong lên men rượu truyền thống ở qui mô nhỏ, bước đường hóa này của tinh bột được thực hiện chủ yếu nhờ vào enzyme tiết ra từ nấm mốc hiện diện trong bánh men rượu. Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, các chế phẩm enzyme khác nhau từ vi khuẩn, nấm mốc, thực vật... đã được sử dụng để đường hóa tinh bột, giúp kiểm soát tốt hơn bước thủy phân này và nâng cao hiệu suất chung của quá trình lên men [2, 3]. Do vậy, nếu tạo được một chủng nấm men mới có khả năng thủy phân tinh bột thì chủng này có thể thực hiện cả bước đường hóa cũng như bước lên men và có thể lên men rượu trực tiếp từ tinh bột. Chủng nấm men như thế có ý nghĩa lớn trong thực tiễn, giúp thay đổi công nghệ lên men rượu từ tinh bột, đơn giản hóa qui trình, hứa hẹn mang lại nhiều lợi ích kinh tế.

Về nguyên tắc, có thể dễ dàng tạo ra chủng nấm men đột biến biểu hiện gen mã hóa enzyme thủy phân tinh bột thành đường khử bằng cách dòng hóa gen này vào một vector biểu hiện ở nấm men. Tuy nhiên, enzyme này có thể nằm lại bên trong tế bào không tiếp xúc được cơ chất để xúc tác phản ứng thủy phân. Một kỹ thuật cho phép biểu hiện gen ngoại lai ra bên ngoài tế bào để thể hiện chức năng là Công nghệ Bề mặt Tế bào (Cell Surface Engineering). Đây là một công nghệ khá mới trên thế giới dựa trên kỹ thuật gen, chủ động làm thay đổi thành phần bề mặt tế bào (thêm protein nhằm tăng cường thêm chức năng mới cho tế bào, thay receptor bình thường bằng một receptor đột biến không tương tác được với ligand tương ứng...), tạo ra một tế bào mới có chức năng ưu việt theo một hướng ứng dụng

nhất định. Công nghệ này mở ra nhiều triển vọng khai thác, ứng dụng các gen đã được dòng hóa vào nhiều lĩnh vực khác nhau như liên kết giữa các tế bào, nhận diện phân tử, sản xuất vắc xin, thay đổi chức năng tế bào, tạo biosensor, trong xử lý môi trường [4].

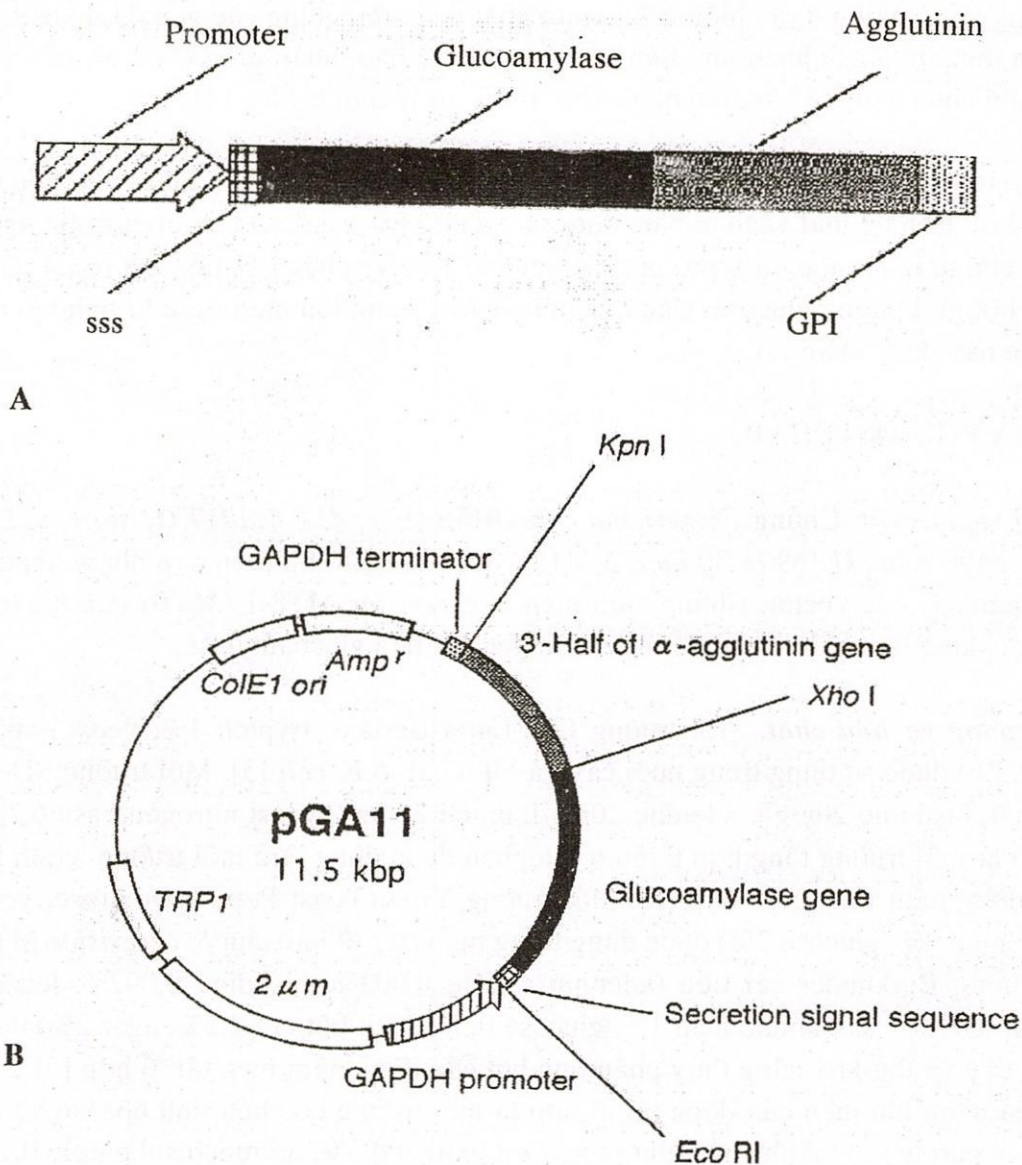
Trong báo cáo này, chúng tôi trình bày kết quả tạo dòng nấm men biểu hiện gen mã hóa glucoamylase trên bề mặt vách tế bào. Glucoamylase (EC 3.2.1.3.) là một enzyme ngoại bào được tinh chế từ nấm mốc *Rhizopus oryzae*, xúc tác sự thủy phân các liên kết α -1,4 và α -1,6 trong tinh bột giải phóng glucose. Các đặc tính và khả năng lên men rượu từ tinh bột của dòng nấm men này được khảo sát.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật. Chủng *Escherichia coli* DH5 α [*F' endA1 hsdR17 (r_k/m_k) supE44 thi λ recA1 gyrA96 Δ lac U 169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15)] được dùng trong biến nạp nhằm khuếch đại số lượng bản sao các vector. Chủng nấm men *S. cerevisiae* MT8-1 (*MAT α ade his leu2 trp1 ura3*) được dùng làm tế bào chủ để biểu hiện gen mã hóa glucoamylase.

Môi trường và hóa chất. Môi trường LB (Luria-Bertani, trypton 1%, yeast extract 0,5%, NaCl 0,5%) được sử dụng trong nuôi cấy và biến nạp ở *E. coli* [5]. Môi trường SD-trp (leucine 30mg/l, histidine 20mg/l, adenine 20mg/l, uracil 20mg/l, yeast nitrogen base 6,7g/l, glucose 20g/l) là môi trường tổng hợp thiếu tryptophan được dùng làm môi trường chọn lọc và nuôi cấy dòng nấm men biến nạp [5]. Môi trường YPD (Yeast Pepton Dextrose, yeast extract 1%, pepton 2%, glucose 2%) được dùng trong nuôi cấy tế bào chủ *S. cerevisiae* MT8-1 [5]. Môi trường Burkholder cải tiến (adenine sulfate 0,002%, histidine 0,002%, leucine 0,003%, uracil 0,002%, cassamino acid 1%, glucose 0,5%, tinh bột tan 2,5%, agar 2%) được dùng để nuôi cấy và thử khả năng thủy phân tinh bột của dòng nấm men tái tổ hợp [5]. Môi trường thử khả năng lên men của dòng tái tổ hợp là môi trường có chứa tinh bột tan và chỉ thị bromocresol purple với thành phần như sau: yeast extract 0,5%, bromocresol purple 0,1%, tinh bột tan 2,5%, glucose 0,5% [4]. Các hóa chất sử dụng cho kỹ thuật tái tổ hợp gen, dùng để biến nạp nấm men do Amersham Pharmacia Biotech cung cấp.

Vector pGA11 dùng để biến nạp và biểu hiện gen mã hóa glucoamylase trên bề mặt tế bào nấm men có ở Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học phân tử, Trường ĐH Khoa học tự nhiên, ĐH Quốc gia Tp. HCM (Hình 1). Đoạn gen biểu hiện glucoamylase trên bề mặt vách tế bào: gen mã hóa cho glucoamylase được kết nối ở đầu 5' với trình tự sss (secretion signal sequence) cần cho sự tiết sản phẩm của gen ra khỏi tế bào. Ở đầu 3' gen mã hóa glucoamylase được kết nối đồng khung với trình tự gen mã hóa cho đầu C của α -agglutinin là một thành phần bề mặt vách tế bào nấm men. Phức hợp gen kết nối này được đặt dưới sự kiểm soát của GAPDH (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) promoter ở đầu 5' và GAPDH terminator ở đầu 3'. Phần còn lại của vector chứa trình tự khởi đầu sao chép trong *E. coli* là *ColE1* và gen kháng Amp dùng cho mục đích tuyển chọn các dòng *E. coli* biến nạp. Vector này còn chứa đoạn 2 μ m DNA của nấm men giúp sự sao chép của vector thành nhiều bản sao trong tế bào nấm men và gen *TRP1* liên quan đến sinh tổng hợp tryptophan dùng làm chỉ thị để tuyển chọn thể nấm men biến nạp.



Hình 1. Sơ đồ plasmid pGA11 biểu hiện gen mã hóa glucoamylase. A, Thành phần của phức hợp chứa gen mã hóa glucoamylase, B, Sơ đồ plasmid pGA11.

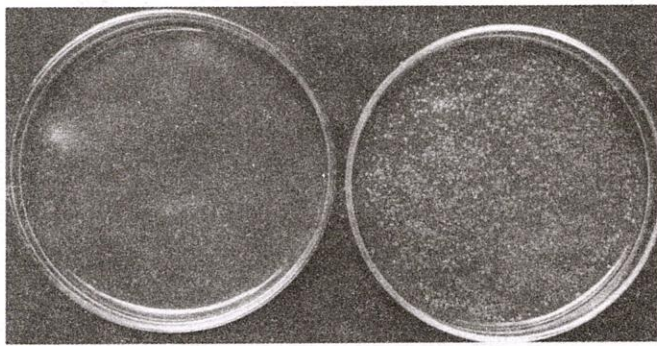
Phương pháp. Vector pGA11 biểu hiện glucoamylase trên bề mặt tế bào nấm men được biến nạp vào tế bào *E. coli* bằng phương pháp biến nạp bằng Calcium – lạnh [5,6]. Plasmid này được tách chiết và tinh sạch bằng phương pháp SDS-kiềm để thu nhận plasmid DNA dùng cho sự biến nạp nấm men bằng phương pháp Lithium – acetate cải tiến [6]. Các thể nấm men biến nạp được nuôi cấy trên môi trường Burkholder cải tiến chứa tinh bột tan và một hàm lượng thấp glucose để cảm ứng hoạt tính của promoter GAPDH. Hoạt tính của glucoamylase của dòng tái tổ hợp MT-PGA được xác định bằng cách nuôi cấy dòng này trên môi trường thạch Burkholder chứa 2,5% tinh bột tan ở 30°C trong 3 - 4 ngày và nhuộm đĩa thạch nuôi cấy bằng dung dịch Lugol để tìm vòng thủy phân tinh bột quanh khuẩn lạc. Khả năng lên men rượu trực tiếp từ tinh bột của dòng nấm men tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp lên men trong ống nghiệm chứa môi trường có nguồn cơ chất là tinh bột với sự

hiện diện của chất chỉ thị bromocresol purple để theo dõi sự giảm pH do ethanol và ống Durham để bẫy bọt khí CO₂ được tạo ra từ quá trình lên men [7].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tách chiết và tinh sạch plasmid pGA11 biểu hiện gen mã hóa cho glucoamylase.

Plasmid pGA11 biểu hiện gen mã hóa cho glucoamylase được biến nạp vào *E. coli* DH5 α và thể biến nạp được tuyển chọn nhờ tính kháng Ampicillin (Amp). Thể biến nạp mang gen kháng kháng sinh có khả năng sinh trưởng trên môi trường LB bổ sung 50 μ g/ml Amp. Ngược lại, tế bào chủ *E. coli* DH5 α không có khả năng kháng Amp nên không mọc được trên môi trường có Amp (Hình 2).



A

B

Hình 2. Kết quả biến nạp pGA11 vào tế bào *E. coli*. A, *E. coli* DH5 α ; B, *E. coli* DH5 α được biến nạp bằng pGA11.

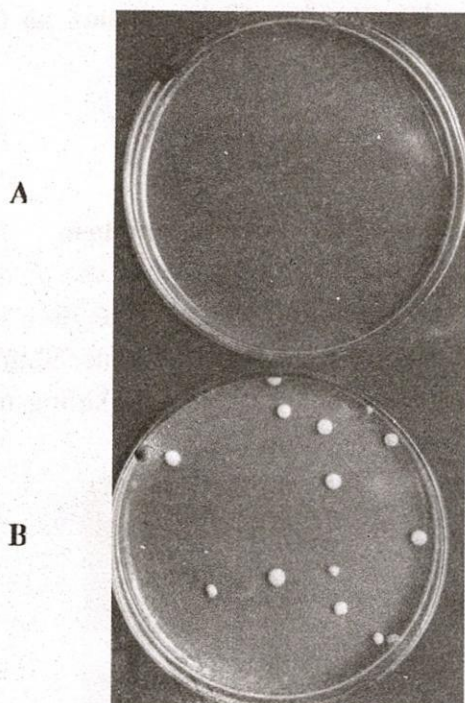


Hình 3. Kiểm tra plasmid pGA11 bằng *EcoRI*. 1, pGA11; 2, pGA11-*EcoRI*; 3, λ -HindIII.

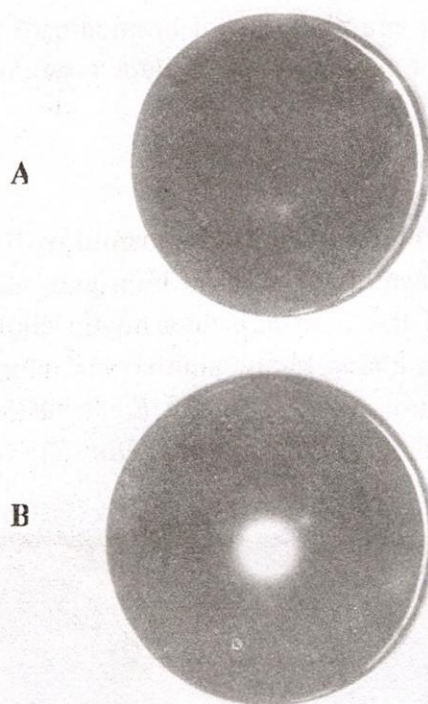
Từ các thể biến nạp thu được, plasmid pGA11 được tách chiết và kiểm tra bằng phản ứng cắt với *EcoRI* (Hình 3). Plasmid được tách chiết từ thể biến nạp *E. coli* DH5 α cho 4 vạch trên bản điện di agarose (giống 1). Việc cắt bằng *EcoRI* cho thấy plasmid thu được chỉ bị cắt ở một vị trí và có độ dài khoảng 11,5kb tương ứng với pGA11.

2. Tạo dòng nấm men *S. cerevisiae* MT-PGA tái tổ hợp biểu hiện gen mã hóa cho glucoamylase

Plasmid pGA11 được biến nạp vào dòng nấm men *S. cerevisiae* MT8-1 và thể biến nạp được tuyển chọn bằng cách trải huyền phù sau biến nạp lên môi trường chọn lọc SD-trp. MT8-1 là chủng đột biến khuyết dưỡng tryptophan nên chủng này sẽ không mọc được trên môi trường SD-trp. Ngược lại, các thể biến nạp mang vector tái tổ hợp lại có khả năng sinh trưởng trong môi trường SD-trp (Hình 4). Dòng biến nạp mọc được trên môi trường SDtrp được đặt tên là MT-PGA.



Hình 4. Kết quả biến nạp pGA11 vào nấm men MT8-1. A, S. cerevisiae MT8-1; B, MT8-1/pGA11 (MT-PGA)



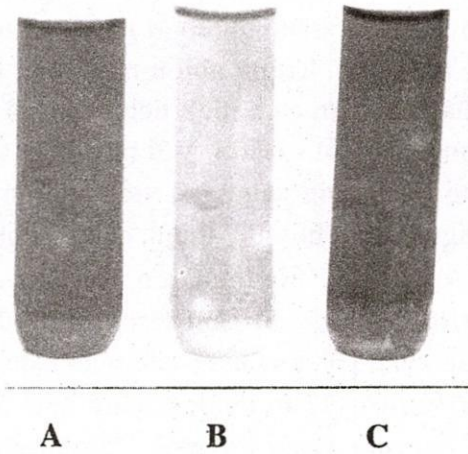
Hình 5. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của gen mã hóa glucoamylase của chủng tái tổ hợp MT-PGA. A, MT8-1; B, MT8-1/pGA11 (MT-PGA)

3. Kiểm tra sự biểu hiện của gen mã hóa cho glucoamylase

Hoạt tính thủy phân tinh bột thành glucose của glucoamylase được sử dụng để kiểm tra sự biểu hiện của gen trong dòng nấm men tái tổ hợp MT-PGA (Hình 5). Chủng MT-PGA tạo vòng thủy phân rất rõ xung quanh khuẩn lạc, trong khi đó, chủng đối chứng MT8-1 tăng trưởng rất yếu trên môi trường và không tạo được vòng thủy phân tinh bột này. Như vậy, chủng nấm men tái tổ hợp MT-PGA có khả năng sản xuất glucoamylase hay nói cách khác gen mã hóa glucoamylase đã được biểu hiện trong chủng nấm men này.

4. Kiểm tra khả năng lên men trực tiếp từ tinh bột của dòng nấm men tái tổ hợp MT-PGA

Khả năng lên men trực tiếp từ tinh bột của MT-PGA được kiểm chứng bằng cách lên men trong ống nghiệm môi trường lỏng chứa nguồn carbon là tinh bột tan với sự hiện diện của chỉ thị bromocresol purple. Kết quả kiểm chứng cho thấy chủng nấm men MT-PGA có khả năng lên men ethanol làm chuyển màu chỉ thị từ nâu đỏ sang vàng và có bọt khí trong ống Durham (Hình 6). Tuy nhiên, bọt khí ở đây nhỏ, chứng tỏ có lên men ethanol nhưng không mạnh. Ngược lại ở ống đối chứng MT8-1 cũng như ống môi trường không được cấy giống, màu môi trường không thay đổi và không có bọt khí trong ống Durham.



Hình 6. Kết quả thử khả năng lên men rượu từ tinh bột của chủng nấm men tái tổ hợp MT-PGA. A, MT8-1 (màu đỏ); B, MT-PGA (màu vàng); C, không cấy giống (màu đỏ).

KẾT LUẬN

Dùng kỹ thuật tái tổ hợp gen chúng tôi đã thành công trong việc tạo dòng tế bào nấm men *S. cerevisiae* MT-PGA biểu hiện glucoamylase. Sự hiện diện của enzyme này được kiểm chứng dựa trên hoạt tính thủy phân tinh bột tạo vòng thủy phân trong suốt xung quanh khuẩn lạc trên môi trường chứa tinh bột và bằng khả năng lên men rượu trong môi trường chứa tinh bột làm nguồn carbon duy nhất. Mặc dù chưa chứng minh được một cách trực tiếp bằng thực nghiệm sự hiện diện của enzyme này trên bề mặt tế bào của chủng nấm men MT-PGA tái tổ hợp, tuy nhiên, các kết quả thực nghiệm nêu trên cũng gián tiếp chứng minh sự hiện diện của glucoamylase trên bề mặt tế bào nhờ vậy enzyme này có thể tiếp xúc được với cơ chất tinh bột vốn không thể đi qua vách tế bào nấm men. Hiện nay chúng tôi đang triển khai kiểm tra hiệu suất lên men rượu trực tiếp từ tinh bột của dòng nấm men tái tổ hợp MT-PGA ở qui mô phòng thí nghiệm trên một số nguồn nguyên liệu khác nhau như bắp, khoai, gạo...

Bằng cách gắn glucoamylase lên bề mặt vách tế bào bằng kỹ thuật gen, chúng tôi đã tạo được một chủng nấm men có khả năng sử dụng trực tiếp tinh bột để lên men rượu. Tuy nhiên, khả năng này của chủng chưa mạnh. Điều này có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau: promoter hoạt động chưa hiệu quả, quá trình gắn glucoamylase trên bề mặt chưa hiệu quả, số phân tử glucoamylase trên một đơn vị diện tích bề mặt còn thấp, hoặc cũng do bản thân hoạt tính thủy phân tinh bột thành glucose của glucoamylase không cao. Các nguyên nhân này sẽ được xem xét để tìm giải pháp nâng cao hiệu suất lên men của chủng trong thời gian tới. Hiện nay chúng tôi đang tiến hành tạo dòng nấm men tái tổ hợp thể hiện đồng thời gen mã hóa α -amylase và glucoamylase nhằm cải thiện hiệu quả thủy phân tinh bột và nâng cao hiệu suất lên men rượu nói chung của các dòng nấm men tái tổ hợp bằng công nghệ bề mặt tế bào này.

Vị trí địa lý và khí hậu nhiệt đới là lợi thế tự nhiên về nguồn bức xạ mặt trời và nguồn nước cho phép nước ta sản xuất nhiều loại cây trồng giàu tinh bột với năng suất sản lượng cao. Các cây trồng này một mặt là nguồn lương thực, là nguồn nguyên liệu dồi dào để chế biến thực phẩm, mặt khác có thể trở thành nguồn tài nguyên nhiên liệu tái sinh rất quan trọng có vai trò chiến lược trong tương lai. Trong nhiều năm qua, nhằm khai thác các diện tích đất nông nghiệp có độ phì thấp, độ hạn cao, diện tích trồng cây sắn (khoai mì) đã tăng lên rất nhanh tạo ra tổng sản lượng tinh bột rất lớn. Với năng lực sản xuất như hiện nay và tiềm lực phát triển diện tích, năng suất trong tương lai, việc nghiên cứu, phát triển các công nghệ khác nhau nhằm chế biến nguồn tinh bột này thành các sản phẩm có giá trị kinh tế, có tính cạnh tranh cao là một yêu cầu bức xúc của thực tiễn. Các dòng nấm men được gắn các enzyme thủy phân tinh bột như α -amylase, glucoamylase có thể được ứng dụng làm nguồn enzyme tái tổ hợp để chế biến nguồn tinh bột này thành các sản phẩm có giá trị kinh tế cao hơn. Ưu điểm của nguồn enzyme loại này là: (1) an toàn, vì nấm men *S. cerevisiae* vốn đã được dùng trong sản xuất bia, rượu và các sản phẩm lên men khác từ lâu đời; (2) giá thành thấp, vì có thể nhân sinh khối các dòng nấm men này trong điều kiện hiếu khí không cần vô trùng (như sản xuất men bánh mì) với hiệu suất cao.

Các kết quả nghiên cứu này được thực hiện bằng kinh phí từ đề tài MS642801 thuộc Hội đồng Khoa học tự nhiên, Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường.

ESTABLISHMENT OF A RECOMBINANT YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EXPRESSING GLUCOAMYLASE-CODING GENE

Dang Thi Phuong Thao, Tran Linh Thuoc

Faculty of Biology - University of Natural Sciences - VNU-HCM

ABSTRACT: The glucoamylase gene-expressing plasmid pGA11 contains a fused DNA of glucoamylase coding gene from the mold *Rhizopus oryzae* linked at the 5' end with the yeast secreting signal sequence sss and at the 3' end with the coding sequence of the C-terminal domain of α -agglutinin under the control of the inducible GAPDH promoter. The transformation of pGA11 into the yeast *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1 resulted in the recombinant clone MT-PGA which possesses the hydrolyzing activity of starch to form a clear halo circle surrounding the yeast colony and the ability to directly ferment starch into alcohol. Practical application of the yeast recombinant clone in starch transformation was discussed.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. N.V. Uyển, N.T. Thắng, *Những kiến thức cơ bản về công nghệ sinh học*, NXB Giáo dục Tp. HCM, tr. 130, 1999.
2. L.Đ. Phẩm, *Công nghệ vi sinh vật*, NXB Nông nghiệp Hà Nội, tr. 186, 1998.
3. L.T.N. Tú, L.V. Chử, P.T. Châu, N.L. Dũng, *Enzym vi sinh vật*, NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, tr. 29 - 31 (tập 1), 192 - 220 (tập 2), 1982.
4. T. Murai, M. Ueda, A. Tanaka, Practical Application of Microbial Cell Surface Engineering: Review, *Recent Res. Devel. Microbiology*, 3, 7 - 22 1999.
5. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p 1.25 -1.44, 1989.
6. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., p 13.7.1, 1994.
7. T.R. Johnson, C.L. Case, *Laboratory Experiments in Microbiology*, The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc, p. 101 - 103, 1995.