

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC



NGUYỄN TRẦN MINH ANH

**TẶNG BIỂU HIỆN GENE *ALKB1*, *ALKB2* MÃ HÓA
ENZYME *N-ALKANE MONOOXYGENASE* Ở
Rhodococcus opacus B4**

**LUẬN VĂN KỸ SƯ
CHUYÊN NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

**TĂNG BIỂU HIỆN GENE *ALKB1*, *ALKB2* MÃ HÓA
ENZYME *N-ALKANE MONOOXYGENASE* Ở
Rhodococcus opacus B4**

**LUẬN VĂN KỸ SƯ
CHUYÊN NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**Giáo viên hướng dẫn:
GS. TS. HISAO OHTAKE
TS. LÊ ĐÌNH ĐÔN**

**Sinh viên thực hiện:
NGUYỄN TRẦN MINH ANH**

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2006

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY, HCMC
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY**

★★★★★★★★

**OVEREXPRESS GENE ALKB1/B2 ENCODING
FOR *N-ALKANE MONOOXYGENASE* IN
*Rhodococcus opacus B4***

**GRADUATION THESIS
MAJOR: BIOTECHNOLOGY**

Professor

Pro.Dr. HISAO OHTAKE

Dr. LE DINH DON

Student

NGUYEN TRAN MINH ANH

TERM: 2002 - 2006

HCMC, 09/2006

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn:

- Ban Giám Hiệu trường Đại Học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh đã tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt thời gian học tập tại trường.
- Các Thầy Cô trong Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học cùng các thầy cô khác trong trường đã luôn tận tình hướng dẫn, giảng dạy và giúp đỡ tôi.
- TS. Lê Đình Đôn và GS. TS. Hisao Ohtake, TS. Honda, TS. Sameshima, TS. Yamashita đã trực tiếp hướng dẫn và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài tốt nghiệp.
- Tập thể phòng thí nghiệm sinh hóa, khoa công nghệ sinh học, đại học Osaka đã tạo mọi điều kiện giúp em hoàn thành đề tài.
- Trường Đại Học Osaka, Nhật Bản đã giúp đỡ tôi trong thời gian vừa qua.
- Tập thể các bạn sinh viên trong lớp CNSH 28 đã hỗ trợ, giúp đỡ và đồng viên tôi trong suốt thời gian làm đề tài.

Con thành kính ghi ơn cha mẹ và tất cả những người thân trong gia đình luôn là nguồn động viên và khích lệ to lớn cho con trong suốt thời gian học tập tại trường.

Tháng 06 năm 2006

Nguyễn Trần Minh Anh

TÓM TẮT KHÓA LUẬN

NGUYỄN TRẦN MINH ANH, Đại học Nông Lâm TP.HCM. Tháng 9/2006.
“CHUYỂN PLASMID CHỨA GENE *ALKB1*, *ALKB2* VÀO *Rhodococcus opacus* B4
ĐỂ TĂNG NĂNG SUẤT TẠO ENZYME *N-ALKANE MONOOXYGENASE*
PHÂN GIẢI *N-ALKANE* TẠO *N-ALCOHOL*”.

Giáo viên hướng dẫn:

GS. TS. HISAO OHTAKE

TS. LÊ ĐÌNH ĐÔN

Khóa luận nhằm tạo chủng *Rhodococcus opacus* B4 có biểu hiện của enzyme *n-alkane monooxygenase* tăng so với dòng chưa biến nạp, bằng cách tạo plasmid chứa gene *alkB1/alkB2* rồi chuyển plasmid đó vào *R. opacus* B4.

Một số kết quả đạt được:

- Tạo được plasmid mới có promoter mạnh và có chứa gene *alkB1/alkB2*.
- Tạo được dòng *R. opacus* B4 mới có biểu hiện gene *alkB1/alkB2* tăng so với dòng tự nhiên.
- Đề xuất: kiểu bể phản ứng dành cho *R. opacus*.

MỤC LỤC

	TRANG
Trang tựa	
Lời cảm ơn.....	iii
Tóm tắt khóa luận.....	iv
Mục lục.....	v
Danh sách các hình.....	vii
Danh sách sơ đồ và bảng.....	viii
1. MỞ ĐẦU.....	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục đích và yêu cầu.....	1
1.2.1. Mục đích.....	1
1.2.2. Yêu cầu.....	1
2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	2
2.1. Tầm quan trọng của sản xuất hóa chất bằng sinh vật.....	2
2.2. Giới thiệu chung về loài vi khuẩn <i>Rhodococcus</i>	3
2.3. Giới thiệu về <i>Rhodococcus opacus</i> B4.....	5
2.4. N- alkane monooxygenase.....	8
3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	11
3.1. Thời gian và địa điểm.....	11
3.2. Vật liệu.....	11
3.2.1. Chủng vi khuẩn và phương pháp nuôi cấy.....	11
3.2.2. Plasmid.....	11
3.2.3. PCR primers.....	11
3.2.4. Môi trường.....	12
3.3. Chiến lược thí nghiệm tổng quát.....	14
3.4. Phương pháp.....	15
3.4.1. Kỹ thuật.....	15
3.4.1.1. PCR.....	15
3.4.1.2. Thiết kế môi.....	15

3.4.1.3. Sắc ký khí	16
3.4.2. Phương pháp	18
3.4.2.1. Phân lập <i>Rhodococcus opacus</i> B4	18
3.4.2.2. Phương pháp khuếch đại đoạn gene bằng PCR.....	18
3.4.2.3. Phương pháp tách plasmid từ vi khuẩn	18
3.4.2.4. Ligation vào T- vector	19
3.4.2.5. Kỹ thuật blunt-end	19
3.4.2.6. Chuyển nạp bằng phương pháp shock nhiệt.....	19
3.4.2.7. Điện chuyển.....	20
3.4.2.8. Xác định hoạt tính enzyme	20
4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	22
4.1. Kết quả.....	22
4.2. Thảo luận	24
5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	27
5.1. Kết luận.....	27
5.2. Đề nghị	27
6. TÀI LIỆU THAM KHẢO	28

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình 2.1: Công nghiệp sản xuất hóa chất.....	2
Hình 2.2: Vi khuẩn <i>Rhodococcus opacus</i> B4.....	6
Hình 2.3: Mô hình AlkB – <i>alkane hydroxylase</i>	8
Hình 4.1: Kết quả điện di sau khi xử lý enzyme cắt.....	22
Hình 4.2: Kết quả điện di sau khi xử lý bằng enzyme giới hạn EcoRI	22
Hình 4.3: Nồng độ các mảnh DNA sau khi tách từ gel band	23
Hình 4.4: Điện di kết quả PCR khuẩn lạc	23
Hình 4.5: Kết quả điện di khẳng định plasmid mới tạo.....	24

DANH SÁCH SƠ ĐỒ VÀ BẢNG

Sơ đồ 2.1: Quy trình sản xuất phenol từ benzen	3
Sơ đồ 2.2: Con đường chuyển hóa của n-octane	9
Sơ đồ 2.3: Cơ chế oxy hóa nhóm methyl cuối của n- alkane	10
Sơ đồ 3.1: Quy trình thí nghiệm tổng quát	14
Bảng 2.1: Đặc tính sinh lý sinh hóa của <i>Rhodococcus</i>	6

1.1. Đặt vấn đề

Ngày nay, các công nghệ sản xuất các hóa chất có giá trị thương mại từ các chất không tan trong nước như các hydrocarbon từ nguồn dầu mỏ bằng xúc tác sinh học đang rất được quan tâm. Các tế bào thường được sử dụng làm xúc tác sinh học vì có sẵn các cofactor (NADH,...) và có khả năng tái tạo các cofactor này. Khả năng tái tạo các cofactor của tế bào rất cần thiết cho các phản ứng oxy hóa và khử. Trong ngành công nghệ hóa chất, nguyên liệu để tổng hợp hóa chất thường không phân cực như các hydrocarbon trong dầu mỏ và các dẫn xuất của chúng. Các nguyên liệu này và các sản phẩm tạo thành có độ tính cao đối với các xúc tác sinh học và làm giới hạn việc ứng dụng xúc tác sinh học trong ngành công nghiệp hóa chất. Giải pháp cho vấn đề này là phải sử dụng các vi sinh vật chủ (host strain) có khả năng chịu được các dung môi hữu cơ làm xúc tác sinh học.

Rhodococcus opacus B4 thậm chí có thể sống, sinh trưởng tốt và có thể xúc tác nhiều phản ứng sinh tổng hợp trong môi trường thậm chí chỉ có dung môi hữu cơ nên là đối tượng đang rất được quan tâm. Và trong các phản ứng mà nó xúc tác, phản ứng chuyển đổi n-alkane đóng một phần quan trọng.

1.2. Mục đích và yêu cầu

1.2.1. Mục đích

Tạo chủng *R. opacus* có biểu hiện gene alkB cao hơn chủng bình thường, nhằm phục vụ cho sản xuất hóa chất bằng xúc tác sinh học sau này.

1.2.2. Yêu cầu

Tạo chủng *R. opacus* có năng suất chuyển hóa n-alkane cao hơn chủng bình thường.

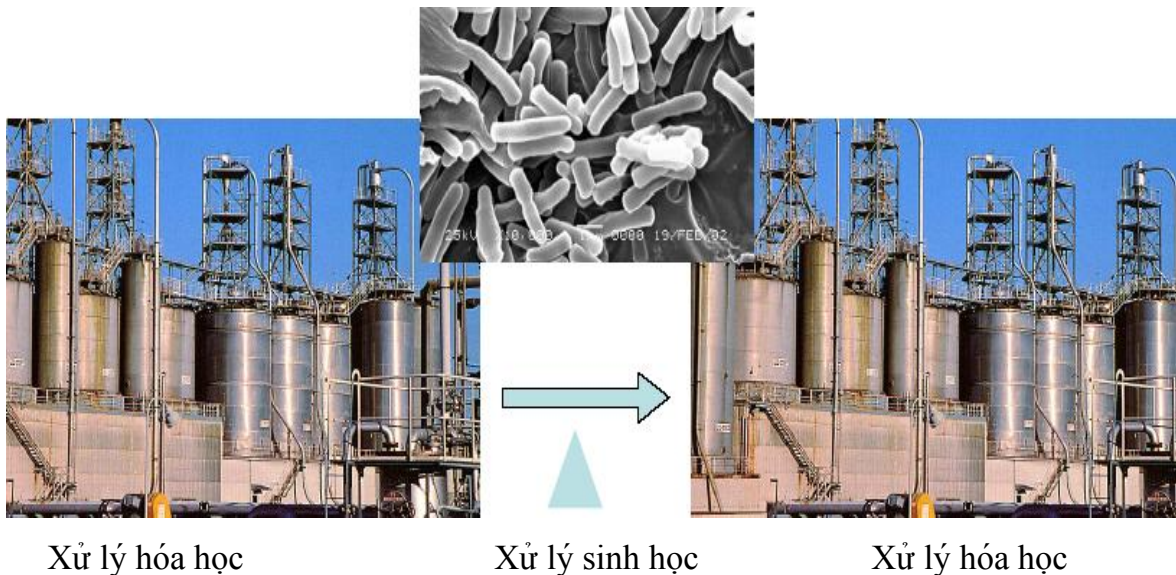
PHẦN 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2

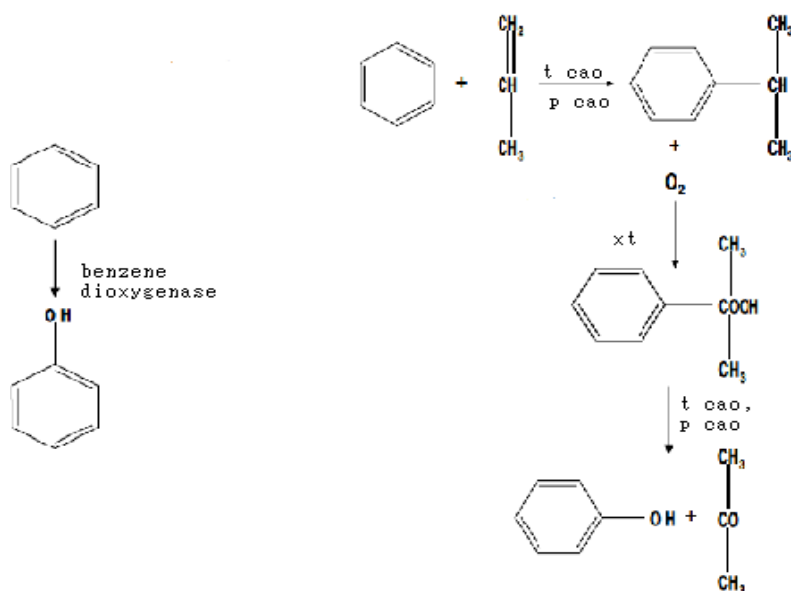
2.1. Tầm quan trọng của sản xuất hóa chất bằng sinh vật

Quá trình xử lý sinh học được áp dụng khi cần thiết để giảm chi phí và năng lượng cho toàn bộ quá trình sản xuất.

Sản xuất bằng xúc tác sinh học đơn giản, ít tốn hóa chất và năng lượng hơn sử dụng xúc tác hóa học. Bên cạnh đó còn có thể tạo các sản phẩm đặc hiệu về cấu trúc không gian (stereo-), điều khiển được nơi phản ứng xảy ra trên cơ chất (regio-) và tránh được sản phẩm phụ không mong muốn. Cả tế bào vi sinh vật là xúc tác sinh học lý tưởng vì có khả năng tái tạo các co factor (như NAD(P)H ...), rất cần thiết cho phản ứng sinh tổng hợp. Cho đến nay, xúc tác sinh học được ứng dụng trong ngành công nghiệp hóa chất để sản xuất các hóa chất đặc biệt, polymer và một số các hóa chất quan trọng khác.



Hình 2.1: Công nghiệp sản xuất hóa chất



Sơ đồ 2.1: Quy trình sản xuất phenol từ benzene

Tính khả thi về mặt kinh tế của việc sử dụng xúc tác sinh học phụ thuộc nhiều yếu tố như loại xúc tác sinh học, loại bề phản ứng, cấu hình máy móc... Phần lớn các phản ứng chuyển hóa đang được quan tâm là phản ứng chuyển hóa các chất không phân cực. Các hợp chất phân cực không tan trong nước và rất độc đối với các tế bào. Mặt khác, enzyme ổn định hơn trong dung môi hữu cơ (11). Vì vậy, bề phản ứng hai pha lỏng gồm có pha nước và pha dung môi hữu cơ thường được sử dụng.

2.2. Giới thiệu chung

Loài vi khuẩn *Rhodococcus. spp* được Zopf đề cập lần đầu tiên vào năm 1891, là loài vi khuẩn mang sắc tố đỏ, quan trọng về mặt thú y, bệnh lý, công nghiệp. Hầu hết họ rhodococci (ngoại trừ *R. equi* là nguồn gây bệnh trên thú và người) có tiềm năng thương mại cao do có khả năng tạo nhiều chất hoạt tính bề mặt – acid mycolic – và có hệ thống enzyme có tác dụng chuyển hóa và phân hủy sinh học. *Rhodococcus opacus* B4, được phân lập từ vùng đất nhiễm dầu, là đối tượng lý tưởng dùng trong phân hủy sinh học các loại hydrocarbon vì nó có thể phân hủy nhiều loại hợp chất hữu cơ phổ biến trong môi trường, bề mặt vi khuẩn có tính kỵ nước và hấp thụ nguồn hydrocarbon bằng cách tạo các chất hoạt hóa bề mặt nên chịu được nhiều loại dung môi hữu cơ khác nhau.

Hiện nay, việc sử dụng hệ thống oxy hóa alkane của vi khuẩn làm xúc tác sinh học trong sản xuất hóa chất và dược phẩm rất được quan tâm. Các phản ứng sinh học

này thu hút nhiều sự quan tâm vì việc đưa nguyên tử [O] vào các hóa chất bất hoạt⁴ như alkane bằng con đường hóa học cổ điển có nhiều khó khăn. Một phần vì các chất oxy hóa mạnh cần để kích hoạt nguyên tử C thường không tương thích với cơ chất. Phần khác vì thường tạo ra các sản phẩm oxy hóa phụ khác thông qua các phản ứng phụ.

Tính kỵ nước của vi khuẩn giúp bảo vệ vi khuẩn khỏi độc tính của các hợp chất tan trong nước. Chỉ có *Rhodococcus* có thể chịu được nồng độ cao chất hữu cơ tan. Hơn nữa, lipid hoạt hóa bề mặt rhodococci góp phần tạo khả năng trao đổi alkane.

Sự trao đổi alkane được mã hóa chủ yếu bởi gene *alkane hydroxylase* (alk) được bảo tồn trong nhiều loài vi khuẩn. AlkB có tính bảo tồn cao và có nhiều phiên bản nên biểu hiện của mỗi loại alkB được điều khiển bởi mỗi loại nhân tố phiên mã khác nhau. Cho đến nay, người ta đã biết đến 60 dạng alkB có trình tự rất đa dạng.

Alkane chiếm từ 20 – 50% trong thành phần dầu thô, phụ thuộc vào nguồn dầu. Tuy nhiên, nhiều loại sinh vật như vi khuẩn, cây cối và một số loài động vật cũng sản sinh ra alkane. Alkane trở về mặt hóa học và phải được hoạt hóa trước khi chuyển hóa. Khi có mặt oxygen, phản ứng oxy hóa thường bắt đầu từ oxy hóa nhóm methyl cuối cùng tạo n- alcohol và sau đó quá trình oxy hóa tiếp tục bởi enzyme *dehydrogenase* để tạo acid béo tương ứng.

Một vài loài vi khuẩn chỉ có một loại *alkane hydroxylase*, trong khi một số loài khác có nhiều dạng *alkane hydroxylase* hơn. Các loại *alkane hydroxylase* này thường có dạng cơ chất tương tự nhau, chỉ khác nhau là chúng được tạo ra ở phase ổn định ban đầu hay phase tăng trưởng trong giai đoạn sinh trưởng của vi khuẩn (17).

Hầu hết các loài vi khuẩn có khả năng chuyển hóa chuỗi alkane dài hơn 10 nguyên tử C (C_{12} tới C_{20} hay thậm chí C_{30}). Trong khi rất nhiều loài vi sinh vật có khả năng sử dụng alkane có chuỗi C dài, dạng thể lỏng thì một số loài vi khuẩn Gram (+) như *Corynebacterium* – *Nocardia* – *Mycobacterium* – *Rhodococcus* chỉ có thể chuyển hóa các alkane chuỗi ngắn, dạng thể khí.

AlkB1, alkB2 là các gene có sẵn trong genome của *R. opacus* B4, mã hóa cho enzyme *n-alkane monooxygenases* (2 enzyme liên kết với màng tế bào), có tác dụng xúc tác quá trình oxy hóa nhóm methyl cuối cùng trong mạch carbon của n- alkane để tạo alcohol, aldehyde và acid béo (các hợp chất hữu cơ quan trọng trong ngành công

nghiệp hóa chất). Alcohol, aldehyde và acid béo là các loại hóa chất rất quan trọng⁵ trong các quá trình sản xuất và trong đời sống hằng ngày. Nhưng để sản xuất các chất này bằng con đường hóa học phải cần qui trình sản xuất ở nhiệt độ và áp suất cao.

Nhân tố chính và quan trọng nhất để có thể giảm chi phí của toàn bộ qui trình sản xuất là chi phí xúc tác sinh học, quyết định bởi giá cả của môi trường và nguồn C dùng cho tế bào, hoạt tính và tính ổn định của xúc tác sinh học trong điều kiện sản xuất. Nếu hoạt tính xúc tác sinh học gấp đôi và ổn định sẽ giảm toàn bộ chi phí của quá trình đến 5,7 USD/kg (đối với fed – batch) và 5,9 USD/kg (đối với qui trình sản xuất liên tục). Vì vậy việc tăng hoạt tính của enzyme đóng vai trò rất quan trọng.

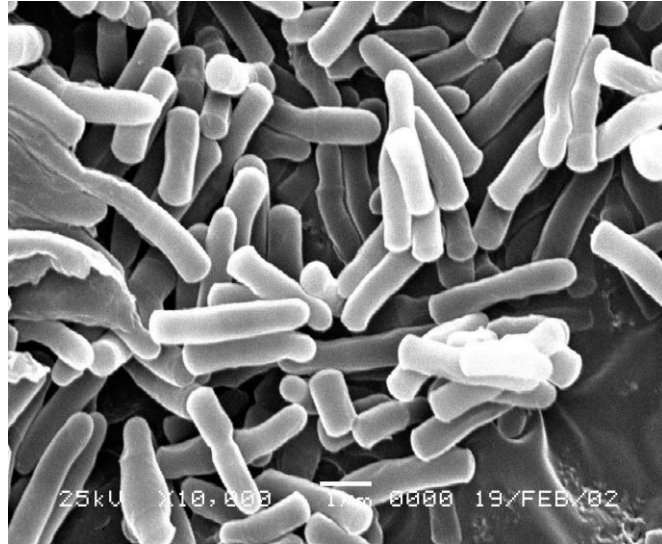
2.3. Giới thiệu về *Rhodococcus opacus* B4

Từ trước đến nay, họ rhodococci rất ít được quan tâm vì nhiều lý do. Một trong những lý do đó là họ vi khuẩn này sinh trưởng chậm, khó phân lập và thiếu dấu hiệu để nhận biết có phải là nguồn gây bệnh hay không. Gần đây, họ vi khuẩn này đang là đối tượng nghiên cứu trên nhiều quốc gia. Một trong những nghiên cứu là ứng dụng chúng vào biến đổi hóa học và sinh tổng hợp các hợp chất hữu cơ.

R. opacus chiếm phần lớn trong quần thể vi sinh vật sống trong đất. *R. opacus* có thể sống ở 33°C, nhưng không thể sống ở 42°C, có thể sống ở nhiệt độ thấp (4 – 10°C) và trong khoảng pH rộng (5 – 9). *Rhodococcus opacus* có nhiễm sắc thể dạng thẳng và các plasmid dạng thẳng, có kích thước rất lớn, có thể sử dụng nhiều loại chất hữu cơ làm nguồn hydrocarbon như benzene, toluene, naphthalene, n-alkane...

Khi có mặt n-alkane, rhodococci tạo ra 1 loại saccharide ngoại bào gọi là EPS (extra cellular polysaccharides), phát triển cấu trúc màng nội bào, cũng như tăng cường phát triển vách tế bào (Ivshina và ctv, 1982; Glazacheva và ctv, 1990). Khi tăng trưởng trên n-alkane lỏng, rhodococci có khả năng tổng hợp các chất hoạt tính bề mặt giúp giảm độ căng bề mặt của nước, tạo thể sữa và có nhiều ưu điểm trong việc tổng hợp các chất tẩy rửa. Các chất hoạt tính bề mặt từ rhodococci ít độc hại hơn 100 lần so với các chất tẩy rửa tổng hợp khác.

Rhodococci rất được quan tâm về mặt sinh thái và cả về mặt công nghiệp vì chúng có khả năng tổng hợp các acid ngoại bào, bao gồm các acid amine thiết yếu khi phát triển trên n-alkane.



Hình 2.2: Vi khuẩn *Rhodococcus opacus* B4

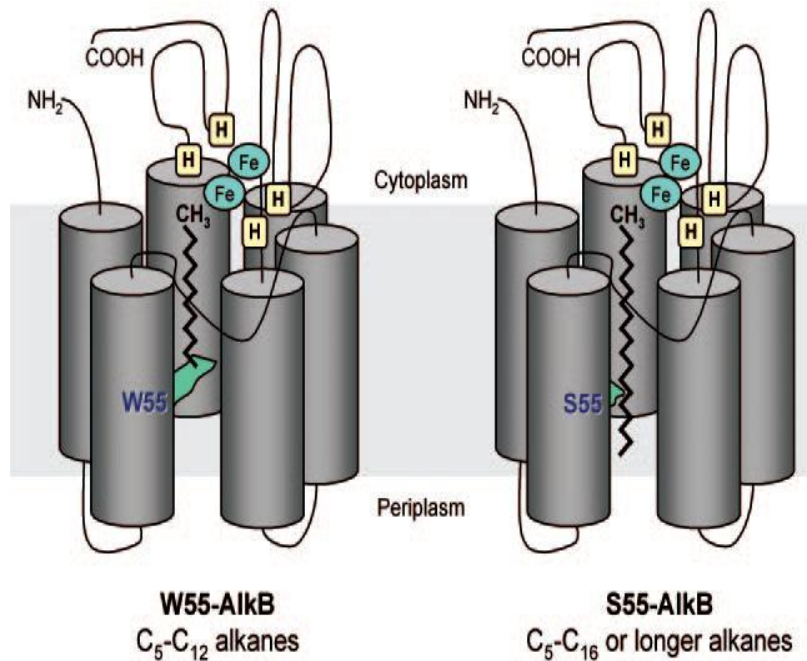
Bảng 2.1: Đặc tính sinh lý sinh hóa của *Rhodococcus*

<u>Nguồn tạo acid :</u>		<u>Nhạy cảm với :</u>	
Glucose	-	Penicillin G	-
Mannitol	O	Polymicine B	-
Inositol	O	O/129	-
Sorbitol	O	Nalidixic acid	-
Rhamnose	-	Tobramicine	-
Sucrose	-	Chloramphenicol	+
Melibiose	-	<u>Thủy phân :</u>	
Amigdalín	-	Aesculin	-
Arabinose	-	Gelatin	-
Glycerol	O	Agar	-
Maltose	-	Starch	-
Galactose	-	Tween 40	+
Mannose	-	Tween 80	+
Starch	-		
Fructose	O		

<u>Phản ứng Gram</u>	+	<u>Thử nghiệm sinh hóa</u>	
<u>Tạo bào tử</u>	-	Urease	+
<u>Khoảng pH tăng trưởng</u>	5 -> 9	Lysine decarboxylase	-
<u>Nồng độ NaCl tăng trưởng (%)</u>		Ornithine decarboxylase	-
tối thiểu	0	β -galactosidase	+
tối đa	9	Arginine dihydrolase	-
<u>Nguồn carbon sử dụng</u>		Tryptophane deaminase	-
Glucose	-	Tạo Indole	-
Arabinose	-	Voges-Proskauer	+
Mannose	-	Khử Nitrate thành Nitrogen	-
Mannitol	+	Hình thành H ₂ S	-
N-acetyl-glucosamine	+	Alkaline phosphatase	+
Maltose	-	Esterase	+
Gluconate	+	Esterase lipase	+
Caprate	-	Lipase	+
Adipate	+	Leucine arylamidase	+
Malate	+	Valine arylamidase	+
Citrate	-	Acid phosphatase	+
Phenyl-acetate	+	α -glucosidase	+
Acetic acid	-	β -glucosidase	+
Citric acid	nd	Tăng trưởng trên nhiều môi trường rắn	+
D-Alanine	-	TSA	+
L-Alanine	-	TSA + 3%NaCl	+
L-Alaninamide	-	NA	+
L-Serine	-	NA + 3%NaCl	+
L-Leucine	nd	TSB	+

2.4. *N*-alkane monooxygenase (hydroxylase)

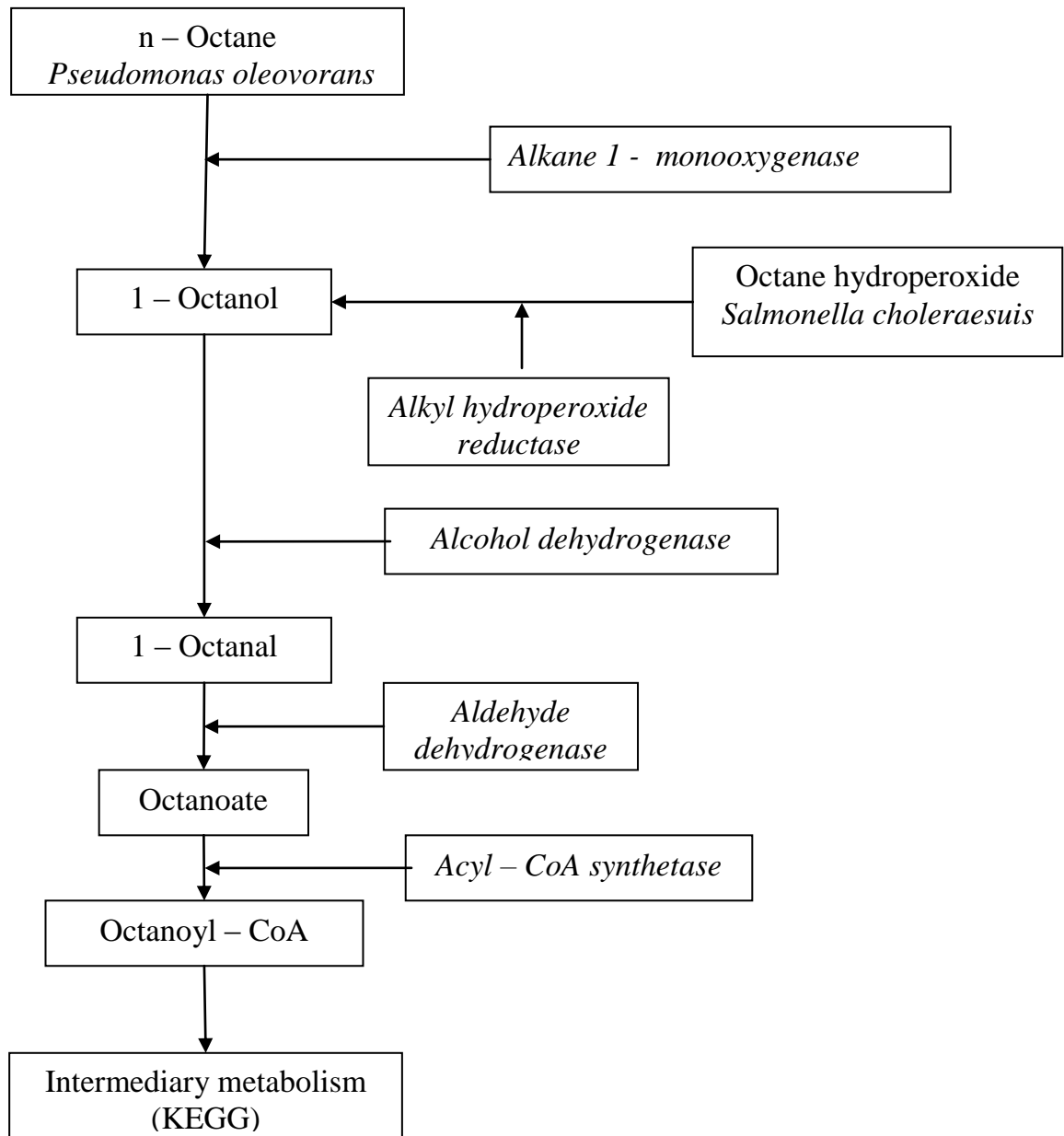
Tên chính thức của loại enzyme này là *n*-alkane monooxygenase, ngoài ra còn có nhiều tên gọi khác như *alkane 1-hydroxylase*, *fatty acid ω -hydroxylase*, *lauric acid ω -hydroxylase*, *ω -hydroxylase*.



Hình 2.3: Mô hình AlkB – *alkane hydroxylase* (17)

Enzyme *alkB* được giả thiết là có 6 trục xoắn, được sắp xếp theo hình lục giác, tạo ra một túi dài kỳ nước cho alkane mạch thẳng có thể che n vào. Các phân tử histidine có tính bảo tồn cao gắn với nhân Fe.

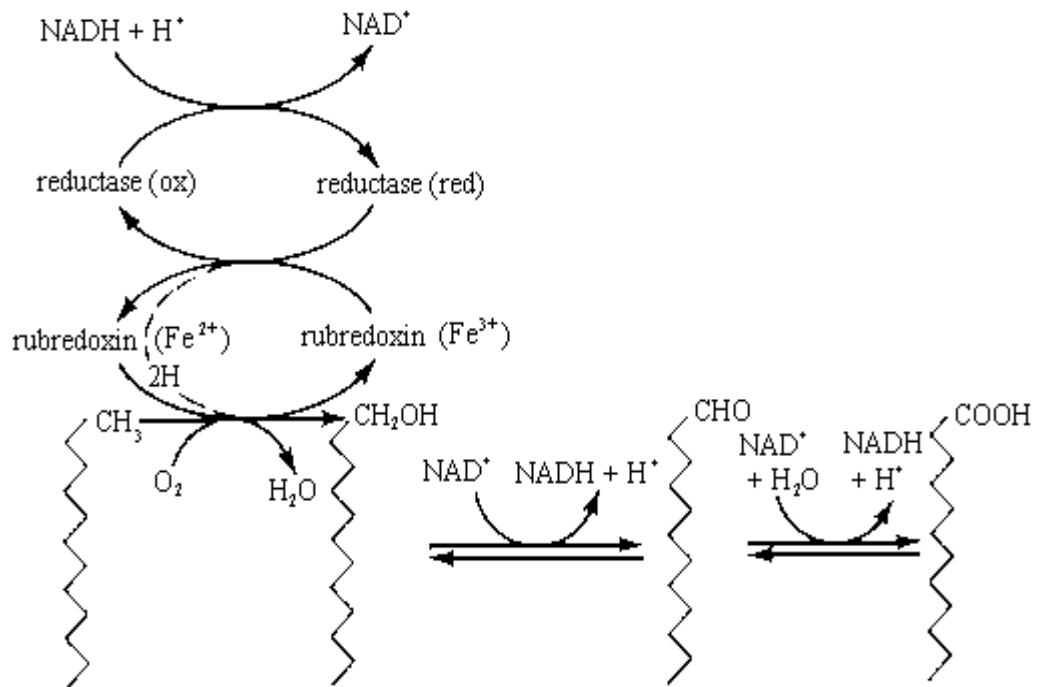
Tính chất: không bền, trọng lượng phân tử lớn, tương đối không tan, khó tinh chế, là protein liên kết màng có mang 2 nguyên tử Fe nhưng không mang nhân heme (chỉ có 1 lượng nhỏ heme và flavin).



Sơ đồ 2.2: Con đường chuyển hóa của n-octane

❖ Cơ chế hoạt động:

AlkB chuyển 1 nguyên tử oxygen từ phân tử O_2 đến nhóm methyl cuối cùng¹⁰ của phân tử alkane để tạo alcohol, còn electron từ rubredoxin khử nguyên tử O còn lại thành H_2O .



Sơ đồ 2.3: Cơ chế oxy hóa nhóm methyl cuối của n- alkane(18)

Rubredoxin là 1 loại protein có khối lượng phân tử thấp , có chứa nhân Fe , có vai trò quan trọng trong việc vận chuyển điện tử trong tế bào .

PHẦN 3: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Thời gian và địa điểm

- Thời gian thực hiện đề tài: từ tháng 2/2006 đến tháng 6/2006.
- Địa điểm: Phòng thí nghiệm sinh hóa của khoa CNSH, trường Đại học Osaka, Japan.

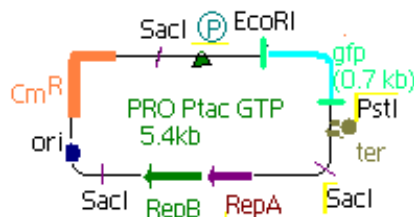
3.2. Vật liệu

3.2.1. Chủng vi khuẩn và phương pháp nuôi cấy

- *Rhodococcus opacus* B4 (được cung cấp bởi đại học Hiroshima), được nuôi cấy trên môi trường TSB, cùng với nguồn C, lắc đều ở 30°C.
- *E. coli* JM109 (Takara, Japan), nuôi cấy trên môi trường LB có ampicillin (5 mg/ml) khi cần thiết. Chọn lọc bằng kháng sinh và khả năng phân giải X – gal.

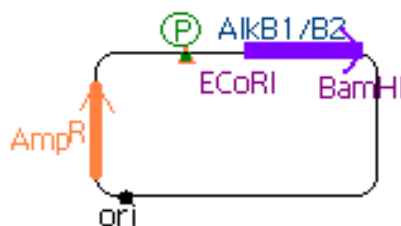
3.2.2. Plasmid

- pRO : vector plasmid



Plasmid pRO có mang gene mã hóa RepA, RepB nên có thể nhân bản trong *E. coli* JM109 và *Rhodococcus opacus* B4. Promoter tac là promoter mạnh, tăng khả năng biểu hiện của gene.

- T – B1/B2: (~ 4,2 kb) 3 kb + 1,2 kb



3.2.3. PCR primers

- B1_F :

ROalkB1EcoF ($T_m^{\circ}\text{C} = 62,9$; ABS = 0,251; TE = 457,4 μl ; 355,7 μg ;¹³
45,7 nmol)

GAG GTT GAA TTC GTG ACG ACG TCG G

- **B1_R :**

ROalkB1BamR ($T_m^{\circ}\text{C} = 66,1$; ABS = 0,245; TE = 468,3 μl ; 359,1 μg ;
46,8 nmol)

GGT AGG GGA TCC TCA CCG AAC TCC G

- **B2_F :**

ROalkB2EcoF ($T_m^{\circ}\text{C} = 61,2$; ABS = 0,293; TE = 503,1 μl ; 391,4 μg ;
50,3 nmol)

TGA GGA GAA TTC GTG ACG ACG AAC G

- **B2_R :**

ROalkB2BamR ($T_m^{\circ}\text{C} = 61,2$; ABS = 0,323; TE = 643,9 μl ; 488,9 μg ;
64,4 nmol)

GAT AAC GGA TCC TTA CTT CGC TCC G

3.2.4. Môi trường

- ❖ **LB, TSB (20 g/l)**

- ❖ **SOB**

- Bacto Trypton (Difco) 20 g/l
- Yeast extract (Difco) 5 g/l
- NaCl 0,5 g/l
- 1M KCl 2,5 ml/l

- ❖ **SOC**

- SOB 5 ml
- 2M MgCl_2 25 μl
- 1M MgSO_4 100 μl
- 1M glucose 100 μl

- ❖ **TB buffer**

- PIPES 1.5 g (thường ở dạng rắn và không tan ở pH thấp, nên phải đưa pH lên 6.7 bằng cách thêm KOH để làm tan).

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.1 g
- KCl 9.3 g
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.45 g

→ thêm miliQ cho đủ 500 ml → lọc → trữ ở 4°C.

❖ **HS buffer**

- pH 7.0
- Sucrose 8.63%
- HEPES 0.17%

→ Trữ ở 4°C

❖ **Thành phần hỗn hợp PCR khuẩn lạc**

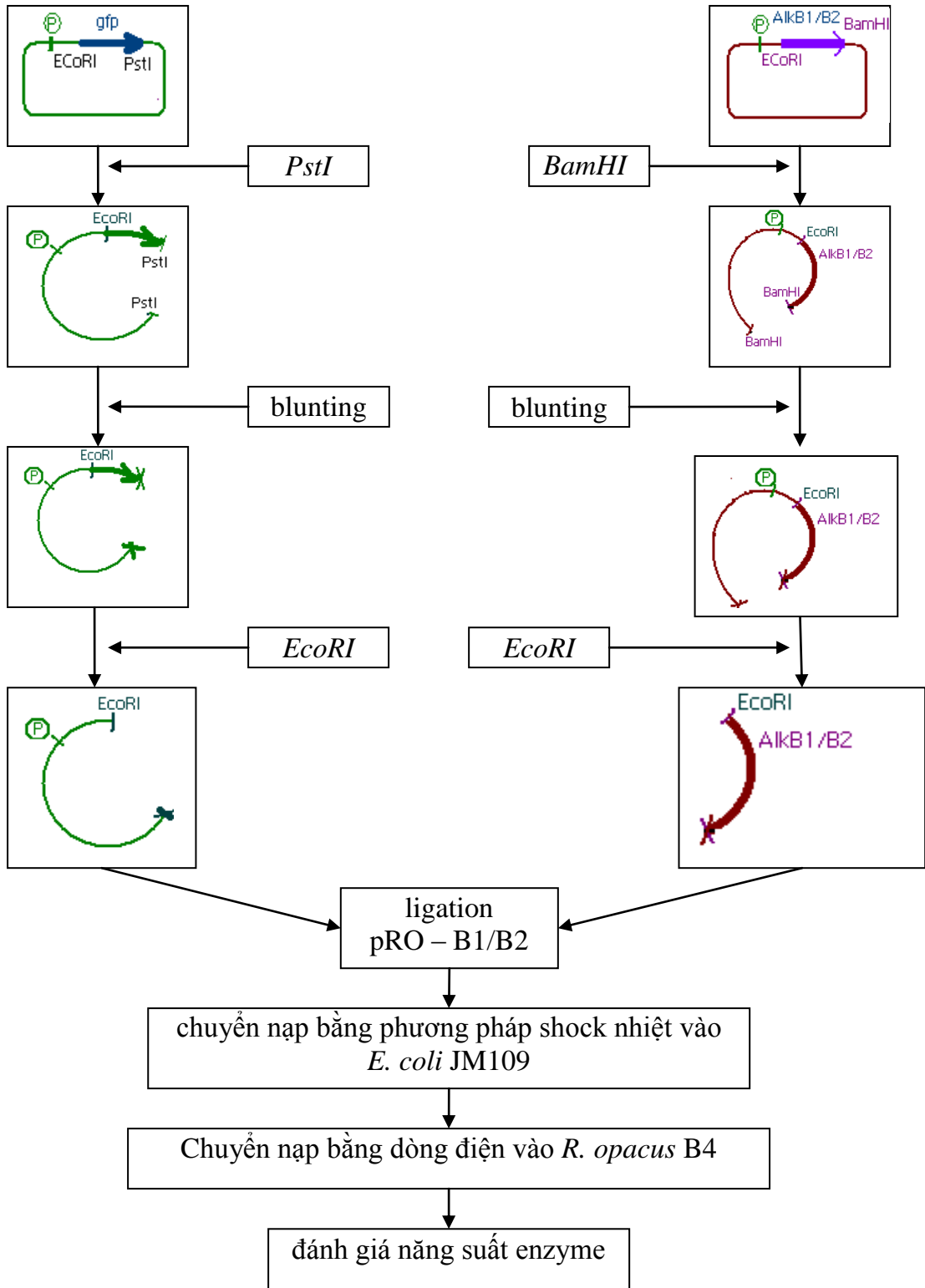
Phân phối 20µl dịch PCR / 1 mẫu

Thành phần có trong 50µl dịch PCR :

MgCl_2	4 µl (4°C)
Mg free buffer	5µl (4°C)
2mM dNTPs	5µl (-4°C)
Primer F	2µl
Primer R	2µl
Taq polymerase	0.2µl (on ice)

Thêm nước khử ion vào cho đủ 50 µl

3.3. Chiến lược thí nghiệm tổng quát



Sơ đồ 3.1: Quy trình thí nghiệm tổng quát

3.4. Phương pháp

3.4.1. Kỹ thuật

3.4.1.1. PCR

PCR là phương pháp để khuếch đại 1 đoạn gene. Từ đó, ta có thể ứng dụng để thu 1 đoạn gene mong muốn hay kiểm tra xem vi khuẩn có mang đoạn gene đó hay không. Một chu kỳ PCR có 3 bước cơ bản: biến tính, bắt mồi, kéo dài.

❖ Bước biến tính mở đầu: việc biến tính hoàn toàn DNA khi bắt đầu phản ứng PCR rất quan trọng. Biến tính không hoàn toàn DNA sẽ dẫn đến việc không sử dụng hiệu quả khuôn DNA, dẫn đến lượng sản phẩm PCR giảm. Thường được thực hiện ở 94°C.

❖ Biến tính: Chỉ cần khoảng 30 giây đến 2 phút ở 94 – 95°C, vì sản phẩm PCR tổng hợp từ chu kỳ đầu ngắn hơn hẳn so với khuôn DNA ban đầu.

❖ Bắt mồi: thường thấp hơn 5°C so với nhiệt độ tan của phức hợp DNA khuôn và mồi ($T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$).

❖ Kéo dài: thường thực hiện ở 70 – 75°C, nhiệt độ thích hợp nhất để DNA taq polymerase tổng hợp DNA.

❖ Bước kết thúc: sau chu kỳ tổng hợp cuối cùng, ủ ở 72°C từ 5 – 15°C. Bước này có chức năng hoàn tất sản phẩm PCR mới tổng hợp. Và cũng trong bước này, Taq DNA Polymerase thêm a. nucleotides vào đầu 3' của sản phẩm PCR (dùng để ligate với pGEM – Teasy).

❖ Chu kỳ nhiệt độ cho *n-alkane monooxygenase*

AlkB1: 94°C (5 phút) → 94°C (1 phút) → 56°C (1 phút) → 72°C (1 phút) → 72°C (10 phút): 30 chu kỳ.

AlkB2: 94°C (5 phút) → 94°C (1 phút) → 52°C (1 phút) → 72°C (1 phút) → 72°C (10 phút): 30 chu kỳ.

3.4.1.2. Thiết kế mồi: (Innis and Gelfand, 1991)

❖ Nguyên tắc:

- Chiều dài mồi từ 17 – 28 base
- Thành phần mồi nên từ 50 – 60% GC
- Mồi nên kết thúc bằng G hay C hay GC hay CG để ngăn hiện tượng

“breathing” ở đầu 3’ và tăng hiệu suất khi bắt mồi

- Nhiệt độ tan từ 55 – 80°C
- Nên tránh chuỗi từ 3 G hay 3 C trở lên vì dễ gây bắt cặp nhầm với trình tự giàu GC bởi tính ổn định của quá trình bắt mối
- Tránh trình tự tạo dimer hay cấu trúc kẹp tóc

3.4.1.3. Sắc ký khí

Sắc ký khí là phương pháp phân tích một hỗn hợp khí. Pha chuyển động là khí trơ hay một chất bay hơi và pha ổn định là một chất lỏng hay một chất rắn. Cấu trúc của máy sắc ký khí gồm 5 phần:

❖ Pha chuyển động: có chức năng mang mẫu đi qua pha ổn định trong cột phân tách. Để thực hiện chức năng này, người ta thường sử dụng các khí trơ như nitrogen, helium, argon, ... Pha chuyển động đi qua cột nhanh hơn mẫu phân tích.

❖ Cổng lấy mẫu: là nơi tiêm mẫu khí phân tích. Cổng lấy mẫu phải có vách ngăn bằng cao su để ngăn rò rỉ khí và để tiêm mẫu vào. Phần này của máy có nhiệt độ cao hơn nhiệt độ sôi của các hợp chất khí trong mẫu khí phân tích.

❖ Cột phân tách: được đặt trong lò ổn nhiệt. Cột chứa pha ổn định. Pha ổn định ở đây có thể là chất rắn hay là chất lỏng không bay hơi như hydrocarbon phủ trên nền rắn. Dạng thứ hai này được dùng để phân tách các chất khí có khối lượng phân tử thấp. Có 2 loại cột:

- Cột nén: gồm có lõi thủy tinh hay lõi sắt không rỉ, được nhồi pha cố định. Chiều dài và đường kính cột ảnh hưởng thời gian lưu. Thông thường, chiều dài của cột từ 0,9 m đến 1,8 m, đường kính trong từ 2 – 4 mm.

- Cột mao dẫn: là một ống mao dẫn mỏng làm từ thạch anh nóng chảy, có pha ổn định phủ trên bề mặt phía trong ống. Đường kính cột thường là 0,25 mm và 0,32 mm. Loại ống phổ biến nhất có chiều dài 30 m.

❖ Detector: Các thành phần của hỗn hợp mẫu đi qua cột với vận tốc khác nhau và được phát hiện bởi detector khi chúng ra khỏi cột. Có nhiều loại detector, thông dụng nhất là flame ionization detector (FID) gồm ngọn lửa màu đỏ tạo bởi khí H₂, không khí và một đĩa thu. Sau khi mẫu khí qua cột sắc ký, nó đi qua ngọn lửa và giải phóng các ion. Các ion này phát ra lượng tín hiệu điện bằng với lượng hợp chất có trong mẫu.

Tính dẫn điện của khí tương ứng với nồng độ các hạt mang điện tích trong khí.

Quá trình ion hóa ngắn hay dài là tùy thuộc bản chất của hợp chất (cấu trúc phân tử)¹⁸ và nhiệt độ ngọn lửa (phụ thuộc tỉ lệ H₂/ không khí / khí mang).

FID có thể phát hiện cho tới 5 – 10% thành phần có trong 1 µl mẫu vận tốc khí lưu thông thường. Ở nồng độ cao hơn, ngọn lửa bị quá tải, kết quả sẽ không chính xác.

❖ Tổng hợp: là chương trình máy tính, xử lý dữ liệu sau mỗi phép đo đạc, có chức năng:

- Phân biệt các peak và đường bị nhiễu
- Xác định điểm đầu và điểm cuối của các peak
- Đo diện tích các peak
- Đo thời gian lưu các peak
- Điều chỉnh lại độ lệch đường nền
- Điều chỉnh lại để được các peak đối xứng

Thiết bị sắc ký khí được dùng ở đây có pha chuyển động là khí N₂, cột mao dẫn (0,25 mm x 30 m), FID.

✓ **GC (Shimadzu GC-14B)**

Mẫu

- 1 C₆ (999µl hexane + 1µl hexanol)
- 2 C₆1 (Alk B1)
- 3 C₆2 (Alk B2)
- 4 C₆ control (wild type)
- 5 C₇
- 6 C₇1
- 7 C₇2
- 8 C₇ control
- 9 C₈
- 10 C₈1
- 11 C₈2
- 12 C₈ control

Khí mang: N₂

Thể tích mẫu: 1 µl

Nhiệt độ lò: 80°C/ 7 phút, sau đó tăng nhiệt độ lên đến 250°C với vận tốc gia nhiệt: 5°C/ phút

Nhiệt độ ở cổng lấy mẫu: 210°C

Nhiệt độ cột: 90°C

Nhiệt độ phát hiện: 250°C

3.4.2. Phương pháp

3.4.2.1. Phân lập *Rhodococcus opacus* B4 (5)

Mẫu đất được lấy từ các nhà máy hóa chất và ở ven đường ở Hiroshima, Japan. Ủ 5 g đất với 1 ống nghiệm nhỏ chứa benzene trong 1 bình 50 ml có nắp đậy trong vòng 1 tuần ở 28°C. Sau đó, hòa tan 1 g đất đó với 4 ml nước vô trùng và để yên trong 30 phút. Cho 1 ml dịch đất này vào 9 ml môi trường MSB, thêm 0,5 ml benzene trong 1 bình có nắp đậy có 1 ống nghiệm nhỏ chứa 0,5 ml benzene. Ủ, lắc (120 rpm) bình này trong 5 ngày ở 28°C. Tiếp đó, 1 ml dịch cấy này được ủ tiếp với 9 ml môi trường MSB mới trong 2 ngày. Cứ pha loãng như vậy rồi cấy trên môi trường thạch MSB rồi ủ trong tủ làm khô với 1 cốc becher chứa benzene lỏng. Dem các khuẩn lạc thu được cấy trở lại vào môi trường lỏng để khẳng định khả năng chuyển hóa benzene. Giữ chủng vi khuẩn thu được trên đĩa thạch TSB.

Chủng B4 được quan tâm nhiều vì có tốc độ sinh trưởng nhanh nhất so với các chủng *R. opacus* khác.

3.4.2.2. Phương pháp khuếch đại đoạn gene bằng PCR

Khuếch đại đoạn DNA mang cụm gene mã hóa cho n-alkane monooxygenase alkB1, alkB2 từ DNA nhiễm sắc thể của 1 oài *R. opacus* B4 bằng PCR với cặp primer đặc hiệu lần lượt mang site cắt EcoRI và BamHI. Sau đó các đoạn khuếch đại với kích thước khoảng 1,2 kb sẽ được lọc từ gel sau khi điện di và ligate vào pGEM – Teasy để tăng hiệu suất khi xử lý với enzyme giới hạn (EcoRI và BamHI).

3.4.2.3. Phương pháp tách plasmid từ vi khuẩn (theo protocol của Miniprep)

Nuôi cấy vi khuẩn trong 3 ml môi trường LB, cùng với 3 µl kháng sinh thích hợp (Ampicillin hay Chloramphenicol) qua đêm.

Ly tâm dịch nuôi cấy vi khuẩn 8000 rpm/1 phút/ 4°C. Hòa tan hoàn toàn tủa tế bào trong 250 µl cell resuspension solution. Thêm vào 250 µl cell lysis solution, đảo 4 lần để trộn đều, thêm vào 10 µl alkaline protease solution, đảo 4 lần để trộn đều, ủ ở

nhệt độ phòng trong 5 phút. Thêm vào 350 μ l dung dịch trung hòa (Neutralization²⁰ solution), đảo 4 lần để trộn đều. Ly tâm với tốc độ cực đại trong 10 phút.

Chuyển dịch t rong vào column , đặt trong collection tube, ly tâm trong 1 phút. Bỏ dịch thu được. Thêm vào 750 μ l dung dịch rửa cột (đã hòa EtOH như hướng dẫn). Ly tâm với tốc độ cực đại trong 1 phút. Lặp lại bước rửa plasmid với 250 μ l dung dịch rửa cột. Ly tâm với tốc độ cực đại trong 2 phút. Chuyển column vào eppendorf 1,5 ml. Thêm vào column 100 μ l Nuclease free water, ly tâm trong 1 phút.

3.4.2.4. Ligation vào T- vector

DNA	1 μ l
T – easy vector	0,5 μ l
T4 DNA ligase	1 μ l
2X ligation buffer	2,5 μ l

→ ủ ở 16°C từ 30 phút cho đến khi bắt đầu bước chuyển nạp.

3.4.2.5. Kỹ thuật blunt-end

DNA 8 μ l

Buffer 1 μ l

9 μ l → ủ 70°C trong 5 phút → thêm vào 1 μ l T4 DNA polymerase → ủ ở 37°C trong 5 phút.

→ thêm nước khử ion vào cho đủ 400 μ l

↓ ← 40 μ l sodium acetate

Phenol chloroform → tua ethanol

3.4.2.6. Chuyển nạp bằng phương pháp shock nhiệt

- Chuẩn bị *E. coli* JM109 (competent cell)

Cấy chủng JM109 trong môi trường LB (1 đĩa và 1 ống nghiệm), ủ qua đêm ở 37°C. Lấy 50 μ l dịch nuôi cấy đó chuyển vào môi trường SOC lỏng. Ủ khoảng 2 – 3 giờ ở 37°C cho đến khi đạt độ OD ở bước sóng 660 nm khoảng 0,4 – 0,6. Giữ dịch nuôi cấy trên đá lạnh khoảng 10 phút. Ly tâm với vận tốc 3000 vòng ở 4°C trong 15 phút, sau đó hòa tua tế bào thu được trong 3,4 ml TB buffer. Để trên đá lạnh 10 phút rồi đem ly tâm với vận tốc 3000 vòng ở 4 °C trong 10 phút. Hòa tua tế bào thu được

với 800 µl TB buffer và 7% (tương đương khoảng 56 µl) dung dịch DMSO. Để trên đá lạnh 10 phút, phân phối 200 µl hay 400 µl vào mỗi eppendorf. Đem trữ lạnh ở -80 °C cho đến khi dùng.

- **Ligation and chuyển nạp bằng phương pháp shock nhiệt**

4µl insert DNA

1µl vector DNA —————> ủ ở 16°C trong 1 giờ

5µl 2X ligation mixture

Competent cell JM 109 để tan từ từ trên đá trong 10 phút. Thêm vào plasmid, hòa đều, để trên đá trong 30 phút, ủ ở 42°C trong vòng 30 giây. Để trên đá trong 2 phút. Sau đó thêm môi trường LB vào sao cho tổng thể tích là 1 ml. Đem ủ ở 37°C trong 30 phút. Ly tâm 5000 rpm /4°C/1 phút, bỏ đi 900 µl dịch nổi. Nuôi cấy 100 µl dịch tế bào còn lại trên môi trường LB thạch với 20 µl Chloramphenicol. Ủ qua đêm ở 37°C. Chuyển các khuẩn lạc thu được qua đĩa thạch LB mới có chứa Chloramphenicol, ủ qua đêm rồi đem PCR từng khuẩn lạc đó để xác định khuẩn lạc nào có pRO B1/B2.

3.4.2.7. Điện chuyển (Electroporation)

Nuôi cấy chủng B4 trong ống môi trường TSB trong 24 giờ. Lấy 1 ml dịch nuôi cấy này cho vào bình tam giác thể tích 100 ml có chứa 9 ml TSB (0.5% (w/v) glycine). Lắc, ủ ở 28°C trong 24 giờ.

Ly tâm với vận tốc 8000 g trong 5 phút ở 4°C và rửa tủa tế bào 2 lần bằng buffer HS đã để lạnh. Hòa tủa tế bào trong 1ml HS buffer (1/10 V). Lấy 400 µl dịch này trộn với 1 µl DNA (để nồng độ cuối cùng khoảng 0,1 – 1 µg/ml). Ủ ở 40°C trong 10 phút, chuyển tất cả vào 2 mm gap cuvette, đem áp dụng dòng điện với điều kiện 6,5 kV/cm, 725 Ω, 50 µF. Ngay sau đó chuyển vào 4 ml môi trường TSB trong ống nghiệm, đem ủ ở 28°C trong 24 giờ. Sau đó đem nuôi cấy trên môi trường thạch TSB cùng với 20 µl Chloramphenicol.

3.4.2.8. Xác định hoạt tính enzyme

Nuôi cấy từng loại vi khuẩn riêng biệt (*R. opacus* B4 bình thường, *R. opacus* B4 đã chuyển nạp AlkB1, *R. opacus* đã chuyển nạp AlkB2) trong môi trường TSB lỏng

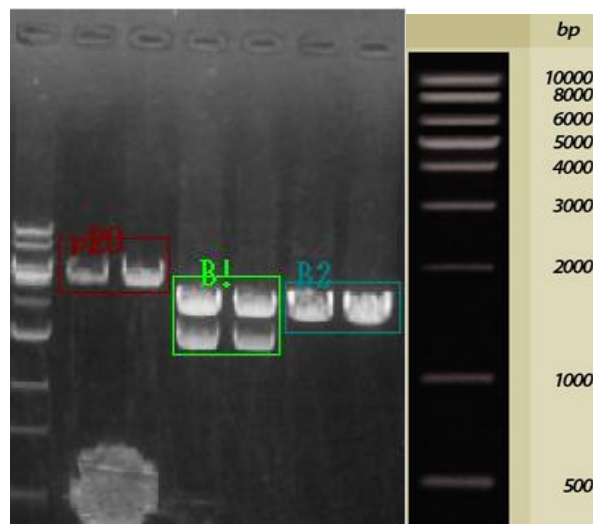
qua đêm. Lấy 100 μ l vi khuẩn, ủ chung với 900 μ l từng loại n- alkane (1- hexane, 1-²² heptane, 1- octane) riêng biệt . Sau 48 giờ, trải ra đĩa TSB có Chloramphenicol , ủ qua đêm ở 28°C, sau đó đếm số khuẩn lạc và so sánh.

PHẦN 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Kết quả

Thu vector plasmid pRO từ *Ecoli* JM109, thu insert plasmid T-AlkB1/ AlkB2 từ *Ecoli* JM109.

Cắt pRO bằng enzyme cắt PstI. Cắt T-AlkB1/B2 bằng enzyme cắt BamHI.

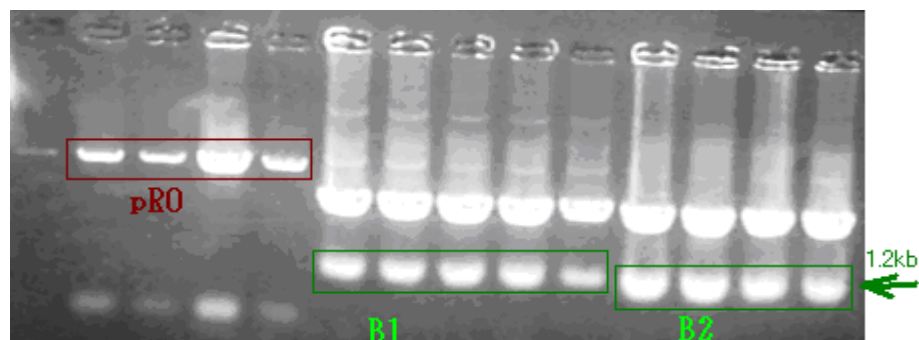


Hình 4.1: Kết quả điện di sau khi xử lý enzyme cắt PstI đối với pRO, BamHI đối với T-AlkB1/AlkB2

Lane 1: thang chuẩn 1kb

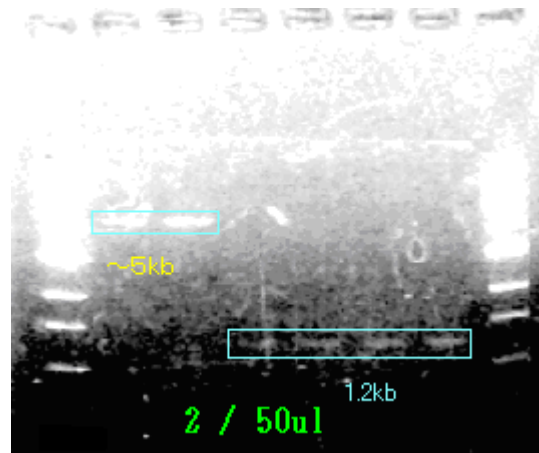
Ở kết quả điện di Hình 4.1, sau khi cắt plasmid chứa gene mã hóa cho alkB 1 bằng BamHI, thu được 2 mảnh DNA riêng biệt. Điều này có thể là do tạp nhiễm một đoạn DNA có kích thước khoảng 3 kb.

Sau xử lý blunt-end các đoạn DNA trên, cắt chúng bằng enzyme giới hạn EcoRI.



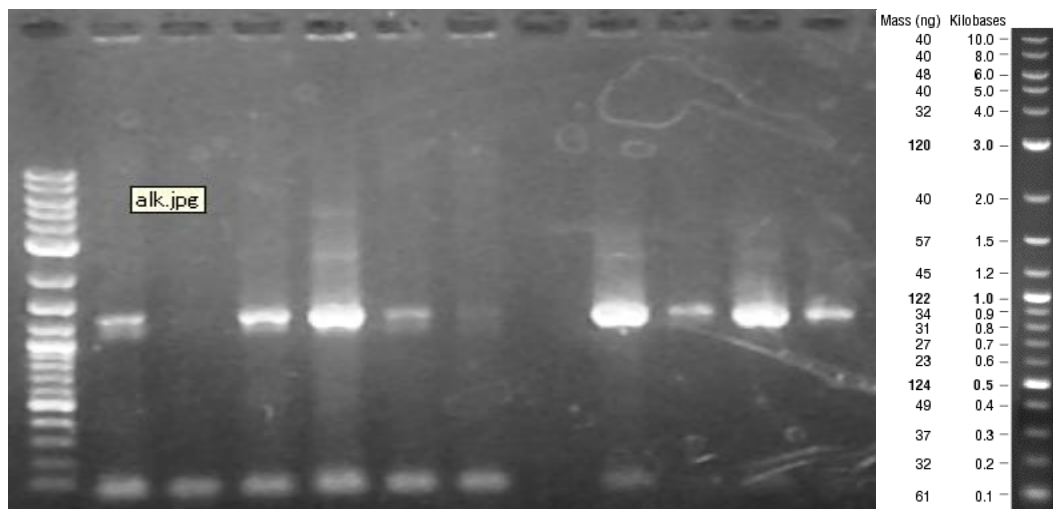
Hình 4.2: Kết quả điện di sau khi xử lý bằng enzyme giới hạn EcoRI 24

Tách mảnh DNA tương ứng 1,2 kb đối với alkB1 /alkB2 và mảnh DNA tương ứng khoảng 5 kb đối với pRO từ gel band, kiểm tra lại nồng độ DNA.



Hình 4.3: Nồng độ các mảnh DNA sau khi tách từ gel band

Tiến hành ligate để tạo pRO -B1 và pRO-B2, sau đó chuyển plasmid mới tổng hợp vào JM109, ủ qua đêm ở 37°C. Chỉ chọn những khuẩn lạc sống sót khi nuôi cấy với Chloramphenicol và có màu trắng. Tiến hành PCR các khuẩn lạc đã chọn để xác định khuẩn lạc nào có chứa plasmid mới tổng hợp (pRO-B1/B2).



Hình 4.4: Điện di kết quả PCR khuẩn lạc

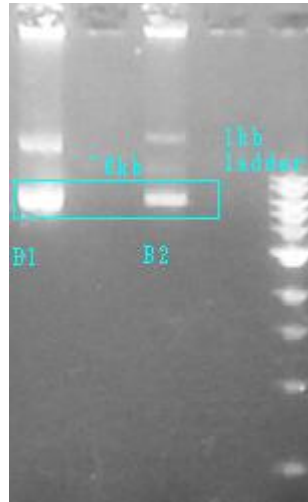
Lane 1: thang chuẩn 2- log

Lane 2: đối chứng dương

Lane 3-7: các khuẩn lạc nghi ngờ có chứa AlkB1

Lane 9-12: các khuẩn lạc nghi ngờ có chứa AlkB2

Tách plasmid pRO-B1/B2 từ khuẩn lạc *E.coli* JM109 cho kết quả giống đối chứng dương và chuyển vào *R.opacus* B4 bằng phương pháp điện chuyển (electroporation)



Hình 4.5: Kết quả điện di khẳng định plasmid mới tạo

Lane 1: pRO- B1

Lane 2: pRO- B2

Lane 3: thang chuẩn 1 kb

Kết quả xác định hoạt tính enzyme:

Sau 24 giờ, đem cấy ra đĩa và ủ qua đêm, đối với n- hexane, quan sát thấy mật độ số khuẩn lạc mang plasmid chứa gene mã hóa alkB 1 trên nhiều hơn hẳn số khuẩn lạc alkB 2 và wild-type. Điều này chứng tỏ chủng overexpress AlkB 1 tăng khả năng chuyển hóa n- hexane và AlkB2 không ảnh hưởng đến quá trình chuyển hóa n - hexane. Đối với n- heptane và n - octane, chủng đột biến làm tăng khả năng chuyển hóa hai loại alkane này so với chủng wild-type.

Sau 48 giờ, đem cấy ra đĩa và ủ qua đêm, quan sát thấy chỉ còn lại rất ít khuẩn lạc loài wild-type. Số lượng khuẩn lạc của chủng đột biến trên n - octane nhiều hơn trên n- heptane và nhiều hơn trên n- hexane.

4.2. Thảo luận

Kỹ thuật blunt-end được áp dụng vì khoảng cách từ tac promoter đến codon đầu tiên của gene cloned rất quan trọng đối với biểu hiện của gene.

Tạo thành công *R. opacus* có năng suất enzyme n - alkane monooxygenase AlkB1, AlkB2 tăng. Nhưng qua kiểm tra khả năng tạo n - alcohol từ n - alkane (n- hexane, n- heptane, n- octane) bằng sắc ký khí thì thấy lượng alcohol phát hiện

được không nhiều hơn đáng kể so với chủng tự nhiên. Một trong những lý do là enzyme đó oxy hóa tiếp alcohol tạo thành aldehyde và acid béo và cuối cùng là CO_2 . Muốn dừng quá trình oxy hóa ở n - alcohol trong sản xuất, phải tạo giống vi khuẩn đã loại bỏ gene mã hóa cho *alkanol dehydrogenase*.

Khi tiếp xúc với n - alkane, rhodococci tạo ra các phân tử hoạt tính bề mặt, chủ yếu là glycolipid làm tăng khả năng sử dụng n - alkane cũng như các hợp chất không tan khác để tăng trưởng. Rhodococci hầu như bám chặt lấy alkane và cần có 1 ít môi trường nước để tăng trưởng và chuyển hóa. Họ vi khuẩn này chỉ có thể tăng trưởng ở phần tiếp xúc giữa môi trường nước và phần hydrocarbon vì hydrocarbon oxygenase không tách khỏi tế bào mà luôn bám lấy màng tế bào. *Rhodococcus opacus* có khuynh hướng kết dính với nhau ở bề mặt tiếp giáp giữa dầu và nước.

Do tính chất có thể tạo chất hoạt tính bề mặt, họ rhodococci đã được đem ứng dụng trong ngành công nghiệp dầu, chủ yếu trong lĩnh vực tăng cường khai thác dầu và làm sạch dầu, ứng dụng trong y khoa và mỹ phẩm. Hơn nữa, alkB còn được đem ứng dụng để làm sạch môi trường, sản xuất hóa chất hay trong y khoa dùng để khử methyl hóa DNA.

Chiều dài chuỗi C của n - alkane càng thấp thì độc tính với tế bào càng tăng. Thường thì n- alkane từ C_{10} đến C_{18} dễ chuyển hóa nhất, trong khi các alkane có chuỗi C càng dài hơn thì càng ít tan hơn, làm giảm tốc độ oxy hóa.

Giá trị của n - alkanol vẫn chưa được xác định rõ. Nhưng cho đến giờ, n- octanol, tiêu biểu cho n - alkanol được sử dụng một phần nào đó để sản xuất chất tẩy rửa, nước hoa, thuốc diệt côn trùng, cũng như các loại ester... Giá cả sản phẩm thay đổi từ 4,5 USD.kg⁻¹ (98% nguyên chất) nếu sản xuất với số lượng lớn, đến 23 USD.Kg⁻¹ đối với 99,5% nguyên chất 1- octanol, trong khi giá cả nguyên liệu thay đổi từ 0,45 USD.kg⁻¹ (94% nguyên chất) đến 50,4 USD.kg⁻¹ (99% nguyên chất) n- octane.

Hiệu quả kinh tế được quyết định bởi hiệu quả của enzyme hay quá trình tinh chế sản phẩm từ bề lên men. Vì vậy, muốn đưa vào sản xuất, ta phải tìm điều kiện nuôi cấy, chuyển hóa cho thích hợp nhất. Ví dụ như bề phản ứng có cánh khuấy để giảm kích thước các hạt thể sữa, làm tăng diện tích tiếp xúc và trao đổi giữa tế bào và cơ chất. Các yếu tố khác cũng không kém phần quan trọng. N- alkane có mạch C dài thường không tan nên rất khó để vi khuẩn chuyển hóa. Trong trường hợp này, ta có thể

sử dụng oleyl alcohol làm dung môi hữu cơ để hòa tan các n - alkane dạng rắn. Oleyl alcohol được chọn sử dụng vì có bản chất trơ, không độc đối với các tế bào, ít bay hơi hơn cơ chất và sản phẩm nên tạo thuận lợi trong quá trình tinh chế sản phẩm sau này.

Tính đặc hiệu cơ chất của AlkB rất đa dạng, có thể oxy hóa nhiều phân tử khác ngoài n- alkane. Ngoài chức năng hydroxy hóa nhóm methyl cuối cùng trong phân tử alkane, AlkB còn có thể phóng thích epoxide từ alkene và các hóa chất khác có nối đôi ở cuối phân tử, oxy hóa alcohol thành aldehyde và xúc tác các phản ứng khử methyl hay sulfoxide hóa (19,20). Các epoxide có tính chất quang học nên có thể sử dụng để sản xuất các hóa chất hữu dụng để từ đó điều chế nhiều sản phẩm có giá trị hơn (17).

PHẦN 5: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

Có thể thực hiện phản ứng chuyển hóa n - alkane ở *Rhodococcus opacus* trong môi trường hầu như chỉ có dung môi hữu cơ.

Chủng B4 mới tạo, với hiệu suất tạo enzyme AlkB 1/ AlkB2 tăng, tăng khả năng chuyển hóa n- alkane.

5.2. Đề nghị

Tuy nhiên, lượng n- alkanol tương ứng tạo thành không tăng. Để ức chế chuyển hóa tiếp sản phẩm tạo ra , ta có thể tạo chủng đột biến đã loại bỏ gene mã hóa cho alkanol dehydrogenase.

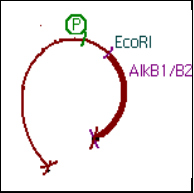
Để ứng dụng trong sản xuất công nghiệp ở quy mô lớn, cần phải nghiên cứu về điều kiện sản xuất cho thích hợp để enzyme đạt tính ổn định và có hiệu quả cao, quy trình tinh chế từ bề lên men sao cho đạt hiệu quả kinh tế cao nhất như bề phản ứng có cánh khuấy, dùng oleyl alcohol để hòa tan các n- alkane có mạch C dài.

PHẦN 6: TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1) Differential expression of the components of the 2 alkane hydroxylases from *Pseudomonas aeruginosa*.
- 2) Characterization of 2 alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis*.
- 3) Isolation and phenotypic and molecular characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Terra Nova Bay (Antarctica). Dep. of Animal Biology and Genetics, Univ. of Florence. Dep. of Animal Biology and Marine Ecology, Univ. of Messina, Italy.
- 4) Recent Advances in Petroleum Microbiology. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, Dec. 2003, p. 503–549 092-2172/03/\$08.000 DOI: 10.1128/MMBR.67.4.503–549.2003.
- 5) **Na, K.S., Nagayasu, K., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ikeda, T., Ohtake, H., and Kato, J** : Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains. J. Biosci. Bioeng., 99, 378-382 (2005).
- 6) **Na, K.S., Nagayasu, K., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ikeda, T., Ohtake, H., and Kato, J** : Development of a genetic transformation system for benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains. J. Biosci. Bioeng., 99, 408-414 (2005).
- 7) Functional analysis of alkane hydroxylases from Gram-negative and Gram-positive bacteria. J. Bacteriology., v184, No6.
- 8) **Schmid, J.S., Dordick, B., Hauer, A., Kiener, M., Wubbolts, B., Witholt.** Industrial biocatalysis today and tomorrow. Nature. V409.11/Jan/2001.
- 9) **Eva J. McKenna, Minor J. Coon.** Enzymatic ω -oxidation. IV. Purification and properties of the ω -hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. J. Biological Chemistry, v245., No15, 3882-3889, 1970.
- 10) **Renata G. Mathys, Oemer M. Kut, Bernard Witholt** . Alkanol removal from the apolar phase of a two-liquid phase bioconversion system. Part I : comparison of a less volatile and a more volatile in-situ extraction solvent for the separation of 1-octanol by distillation. J. chem. Technol. Biotechnol. 1998, 71, 315-325.
- 11) **Renata G. Mathys, Oemer M. Kut, Bernard Witholt.** Integrated two-liquid phase

bioconversion and product-recovery processes for the oxidation of alkanes : process design and economic evaluation.

- 12) **T.Kotani, T.yamamoto, H.Yurimoto, Y. Sakai, N.Kato.** Propane monooxygenase and NAD⁺- dependent secondary alcohol dehydrogenase in propane metabolism by *Gordonia* sp. Strain TY-5. J.Bacteriology, Dec.2003, 7120-7128.
- 13) **Sakai, Y., J.H. Maeng, S.Kubota, A. Tani, Y.Tani, N.Kato.** 1996. A non-conventional dissimilation pathway for long chain n- alkanes inn *Acinetobacter* sp. M-1 that start with a dioxygenase reaction. J.Ferment. Bioeng.81:286-291.
- 14) **Whyte, L.G.,T.H. Smits, D.Labbe, B.Witholt, C.W.Greer, J.B.vanBeilen,** 2002, Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strain Q15 and NRRLB-16531. Appl. Environ. Microbiol. 68:5933-5942.
- 15) **M.Nieboer, A. Vis, B.Witholt.** 1996. Overproduction of a foreign membrane protein in *Escherichia coli* stimulates and depends on phospholipids synthesis. J.Biochem. 241, 691-696.
- 16) *Mycobacterium* sp., *Rhodococcus erythropolis*, and *Pseudomonas putida* behavior in the presence of organic solvents. 2004. Microscopic research and technique.
- 17) Specificity at the end of the tunnel : Understanding substrate length discrimination by the alkB Alkane Hydroxylase.
- 18) Determination of the presence of the catabolic alkane monooxygenase gene from soil microorganisms isolated from coastal sand dunes. 2000.
- 19) **van Beilen,J.B., M. Wubbolts, Q. chen, M.Nieboer, and B.Witholt,** 1996. Effects of two-liquid-phase systems and expression of alk genes on the physiology of alkane-oxidizing strains, p. 35-47. In T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas, and S. Silver (ed.), Molecular biology of Pseudomonas , ASM Press, Washington, D.C.
- 20) **Witholt, B., M.J. de Smet, J.B. Kingma, J.B. van Beilen, M. Kok, R.G.Lageveen, and G.Eggpink.** 1990. Bioconversions of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* inn multiphase bioreactors: background and economic potential. Trends Biotechnol. 8:46-52.
- 21) Biotransformation of D-limonene to (+)trans-carveol by toluene –grown *R.opacus*



PWD4 cells.

- 22) **Daniel J.Arp.** Butane metabolism by butane-grown '*Pseudomonas butanovora*' .
Microbio (1999), 145, 1173-1180.
- 23) **Hara, S.Baik, K. Syutsubo, N.Misawa, H. M. Smits, Jan B. van Beilen, S.Harayama.** Env.Microbio. (2004)6(3), 191–197. Cloning and functional analysis of alkB genes in *Alcanivorax borkumensis* SK2.
- 24) Surface-active lipids in rhodococci. Antonie van Leeuwenhoek 74: 59-70, 1998.
- 25) Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature .V.409.11Jan, 2001.