

Tối ưu điều kiện biểu hiện enzyme PMO trong bioreactor

Optimization of PMO enzyme expression in bioreactor

Lê Quỳnh Loan^{a,b,c}, Nguyễn Minh Hùng^d, Vũ Văn Vân^{c*}
Le Quynh Loan^{a,b,c}, Nguyen Minh Hung^d, Vu Van Van^{c*}

^aViện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

^aInstitute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

^bTrường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

^bUniversity of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

^cViện Kỹ thuật Công nghệ Cao Nguyễn Tất Thành, Đại học Nguyễn Tất Thành

^cNTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

^dTrung tâm Sinh học phân tử, Trường Y Dược - Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

^dCenter for Molecular Biology, College of Medicine and Pharmacy - Duy Tan University, Da Nang, 550000, Vietnam

(Ngày nhận bài: 20/5/2022, ngày phản biện xong: 20/6/2022, ngày chấp nhận đăng: 15/7/2022)

Tóm tắt

Polysaccharide monoxygenase (PMO) là nhóm enzyme mới được phát hiện gần đây có nhiều ứng dụng trong công nghiệp. Chúng có đặc điểm có khả năng xúc tác phân giải polysaccharide bằng cơ chế oxy hóa khử thay vì thủy phân như các họ enzyme khác. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng hệ thống lên men có dung tích 05L để tối ưu biểu hiện thu sinh khối và tách chiết protein tái tổ hợp MGG_00245. Kết quả, sau 144 giờ lên men đã thu nhận được lượng sinh khối khoảng 95g/L. Sử dụng đồng thời 02 cơ chất cảm ứng là methanol và glycerol (thay vì methanol như thông thường), chúng tôi thu được hiệu suất lên men khoảng 66,76mg/L protein tái tổ hợp MGG_00245 được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực Ni.

Từ khóa: Polysaccharide monoxygenase; PMO; *Pichia pastoris*; biểu hiện protein.

Abstract

Polysaccharide monoxygenase (PMO) is a recently discovered enzyme family with many industrial applications. They catalyze the oxidative cleavage of glycosidic bonds in recalcitrant polysaccharides instead of hydrolysis. In this study, we used a 05L bioreactor to obtain biomass involving the production of the recombinant protein MGG_00245. Results showed that a biomass of about 95g/L was obtained after 144 hours of fermentation. By using two inducers methanol and glycerol (instead of methanol as usual), we obtained a fermentation yield of about 66.76mg/L recombinant protein MGG_00245.

Keywords: Polysaccharide monoxygenase; PMO; *Pichia pastoris*; protein expression.

1. Mở đầu

Polysaccharide monoxygenase (PMO) là nhóm enzyme mới được phát hiện gần đây có tiềm năng ứng dụng cao trong công nghiệp. Cơ chế xúc tác phân giải polysaccharide bằng phản

ứng oxy hóa khử thay vì phản ứng thủy phân. Các kiến thức về cơ chế xúc tác, động lực học phản ứng cũng như việc phân loại các PMO này vẫn còn chưa được hoàn thiện. Hiện nay, lĩnh vực nghiên cứu liên quan đến PMO đang

*Corresponding author: Vu Van Van, NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh city, Vietnam
Email: vanvu@ntt.edu.vn

rất được quan tâm trên thế giới, ngày càng có nhiều công bố về các PMO mới, cơ chế hoạt động và tiềm năng ứng dụng của PMO được xuất bản. Việc sản xuất và biểu hiện PMO bằng các hệ thống tái tổ hợp là một công cụ hữu hiệu và cần thiết cho phép thu nhận lượng lớn protein mục tiêu, phục vụ cho việc nghiên cứu và ứng dụng loại enzyme tiềm năng này.

Nấm men *Pichia pastoris* là hệ thống biểu hiện được sử dụng phổ biến để sản xuất các loại protein tái tổ hợp với nhiều ưu điểm như (i) dễ thao tác các kỹ thuật di truyền; (ii) protein tái tổ hợp được biểu hiện ở mức cao nhờ promoter AOX1 cảm ứng methanol, một chất cảm ứng giá rẻ và dễ tìm; (iii) khả năng sinh trưởng nhanh để đạt được mật độ tế bào cao và môi trường nuôi cấy không yêu cầu phải chứa protein; (iv) loại trừ các ảnh hưởng tiêu cực của các loại endotoxin và bacteriophage; (v) có thể thực hiện nhiều bước sửa đổi sau dịch mã như gấp cuộn chuỗi polypeptide, glycosyl hóa, methyl hóa, acyle hóa, điều chỉnh proteolytic,... Do đó, các hệ thống biểu hiện *P. pastoris* đang được sử dụng nhiều nhất để biểu hiện PMO nguồn gốc eukaryote trong các nghiên cứu được công bố gần đây (khoảng 45% PMO từ eukaryote được sản xuất bằng *P. pastoris*). Hiện nay, có nhiều chủng *P. pastoris* thương mại được sử dụng để sản xuất PMO như *P. pastoris* X-33 (wild-type), KM71H (*arg4, aox1::ARG4*), SMD1168H (*pep4*) và SuperMan₅ (HIS⁺) cùng với các vector pPICZαA hoặc pGAPZα.

Sử dụng hệ thống biểu hiện *P. pastoris* X33 và vector pPICZαA, Couturier và cộng sự (2018) đã biểu hiện thành công hai loại PMO PcAA14 (#KY769369 và #KY769370) có nguồn gốc từ nấm thối trắng *Pycnoporus coccineus* và sử dụng trong nghiên cứu hoạt tính PMO và công bố họ AA14 mới. Sản lượng protein thu được sau mẻ lên men trong bioreactor 1,3L là 1g/L [1]. Tác giả Kittl

và cộng sự (2012) cũng đã biểu hiện một số loại PMO có nguồn gốc từ vi nấm *Neurospora crassa* bằng hệ thống *P. pastoris* với hiệu suất khá cao (từ 45mg/L đến trên 300mg/L, tùy từng loại PMO) [2].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tối ưu biểu hiện một loại enzyme PMO (MGG_00245) được phân lập từ nấm đạo ôn *Magnaporthe oryzae* gây hại trên cây lúa sử dụng bioreactor dung tích 05L.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Quy trình lên men

Hệ thống lên men Bioreactor BioFlo 120 được sử dụng để nuôi cấy chủng *P. pastoris* X33 mang vector pPICZαA_00245 biểu hiện cho enzyme PMO. Quy trình lên men được thực hiện như sau: chủng *P. pastoris* X33/pPICZαA_00245 được nuôi cấy trên đĩa thạch YPD có bổ sung 25μg/mL zeocin và ủ ở 30°C trong 48 giờ. Dịch tế bào sơ cấp được chuẩn bị bằng cách cấy một khuẩn lạc đơn vào 25mL môi trường YPD bổ sung 25μg/mL zeocin và ủ trong tủ âm lạnh ở 30°C, 150 vòng/phút. Dịch tế bào thứ cấp được thu nhận bằng cách cấy dịch sơ cấp vào 400mL môi trường BMGY và ủ ở 30°C, 150 vòng/phút, cho đến khi đạt giá trị OD₆₀₀ = 1 – 2.

Quá trình lên men được bắt đầu bằng cách cấy 400mL dịch tế bào thứ cấp vào 5L môi trường BMGY trong bình lên men BioFlo 120. Điều kiện nuôi cấy được cài đặt ổn định ở 30°C; pH 6,0; tốc độ khuấy 250 vòng/phút; sục không khí ở tốc độ 10L/phút; lượng oxy hòa tan (DO) được ghi nhận liên tục để theo dõi sự phát triển của tế bào. Giai đoạn đầu là lên men theo mẻ với glycerol là nguồn C chính (Glycerol batch phase) được kéo dài đến khi giá trị DO giảm mạnh xuống gần bằng 0 (cho thấy glycerol đã được tiêu thụ hoàn toàn). Mẻ lên men bước vào giai đoạn lên men liên tục bổ sung glycerol (Glycerol fed-batch phase) để

tăng mật độ tế bào. 50% glycerol được bổ sung vào môi trường nuôi cấy thông qua bơm với tốc độ 3,65mL/h/L. Giai đoạn cảm ứng methanol/sorbitol fed-batch phase được thực hiện bằng cách bơm liên tục với bơm 1 bổ sung 100% methanol bổ sung 12mL/L dung dịch muối khoáng PTM1 và bơm 2 bổ sung 50g/L sorbitol. Tốc độ mỗi bơm là 3,65mL/h/L môi trường được kéo dài trong 6 giờ để tế bào làm quen với nguồn C mới (giá trị DO tăng lên). Sau đó, tốc độ bơm được điều chỉnh tăng gấp đôi lên 7,3mL/h/L môi trường. Sau 6 giờ tiếp theo, tốc độ bơm được tăng đến 10,9mL/h/L môi trường và duy trì tốc độ này đến hết quá trình cảm ứng (~48 giờ). Mẫu được thu thập thường xuyên để theo dõi và ghi nhận trọng lượng sinh khối (WCW – wet cell weight (g/L)) và nồng độ protein tổng số.

2.2. Thu nhận protein nội bào và ngoại bào

Protein mục tiêu được thu nhận từ dịch lên men (ngoại bào) và trong tế bào nấm men (nội bào). Dịch lên men được thu thập và ly tâm 4000 vòng/phút trong 15 phút để tách riêng phần dịch môi trường và tế bào.

Dịch lên men được lọc và cô đặc bằng hệ thống lọc tiếp tuyến Pellicon 2 cassette màng lọc 10 kDa. Phần dịch chứa protein >10 kDa được bảo quản ở 4°C để tinh chế protein ngoại bào.

Tế bào nấm men được hòa vào dung dịch phá tế bào NPI-10 và bổ sung 1X dung dịch ức chế proteinase. Tế bào được phá bằng sóng siêu âm với xung được cài đặt ở 400W, 60 chu kỳ 5 giây phá – 10 giây nghỉ. Ly tâm 4000 vòng/phút trong 15 phút để thu phần dịch tế bào chứa protein nội bào.

2.3. Tinh chế protein

Protein ở hai pha nội bào và ngoại bào được tinh chế bằng sắc ký ái lực dựa trên lực liên kết của 6-Hix tag và hạt gel Ni-NTA. Cột Ni-NTA được cân bằng với buffer NPI-10. Các dung dịch protein được cho chạy qua cột bằng bơm

với tốc độ dòng 1mL/phút. Cột được rửa bằng NPI-20 để rửa các thành phần không bám lên cột. Protein mục tiêu được rửa giải (hòa tan) bằng cách bơm dung dịch NPI với nồng độ imidazole tăng dần từ 30 đến 250mM. Các phân đoạn rửa giải được thu nhận và điện di trên gel SDS-PAGE để phát hiện protein mục tiêu.

Các phân đoạn protein được gom lại, sử dụng cột PD MiniTrap™ G-25 để loại muối trong dung dịch protein và trao đổi sang dung dịch đệm 50mM Tris-HCl pH 8,0. Protein mục tiêu sau khi tinh sạch được phát hiện bằng điện di trên gel SDS-PAGE.

2.4. Điện di SDS-PAGE

Chuẩn bị gel polyacrylamide: lắp khung đổ gel, đổ gel 2 lớp theo thứ tự gel phân tách chứa 12% acrylamide và gel gom chứa 4% acrylamide. Lắp lược vào phần gel gom và đợi gel đông lại. Lắp khung gel vào bồn điện di, thêm dung dịch chạy điện di Tris-Glycine SDS running buffer vào bồn. Biến tính các mẫu protein bằng cách thêm 1X SDS sample buffer vào mẫu và xử lý biến tính ở 100°C, 20 phút, sau đó ủ đá 10 phút. Nạp các mẫu vào giếng điện di với thể tích 10 µL mẫu/giếng. Tiến hành chạy điện di với cường độ dòng điện 15mA trong 45 phút để các mẫu gom về cùng một vị trí xuất phát trong giếng. Sau đó tăng hiệu điện thế lên 100V và chạy trong khoảng 90 phút. Gel được nhuộm bằng dung dịch coomassive blue sau 30 phút và giải nhuộm. Bản gel được chụp ảnh bằng máy đọc gel Blook Led. Sử dụng phần mềm ImageJ để ước tính độ tinh sạch của protein mục tiêu.

2.5. Xác định nồng độ protein

Nồng độ protein có thể được xác định nhanh bằng máy đo quang phổ UV-Vis nanodrop và phương pháp Bradford's. Phương pháp Bradford's được sử dụng với Bradford Protein Assay Kit (Bio Basic). Phản ứng được thực hiện bằng cách hòa 100µL dung dịch protein

vào 1mL thuốc thử Bradford. Trộn đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Mẫu được đo quang phổ ở bước sóng 595nm. Mẫu thử không sử dụng dung dịch đệm 50mM Tris-HCl pH 8,0. Đường chuẩn được xây dựng với chất chuẩn là BSA theo dãy nồng độ từ 0 – 125 μ g/mL. Sử dụng giá trị đo quang phổ OD₅₉₅ và phương trình đường chuẩn để tính nồng độ protein trong mẫu.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

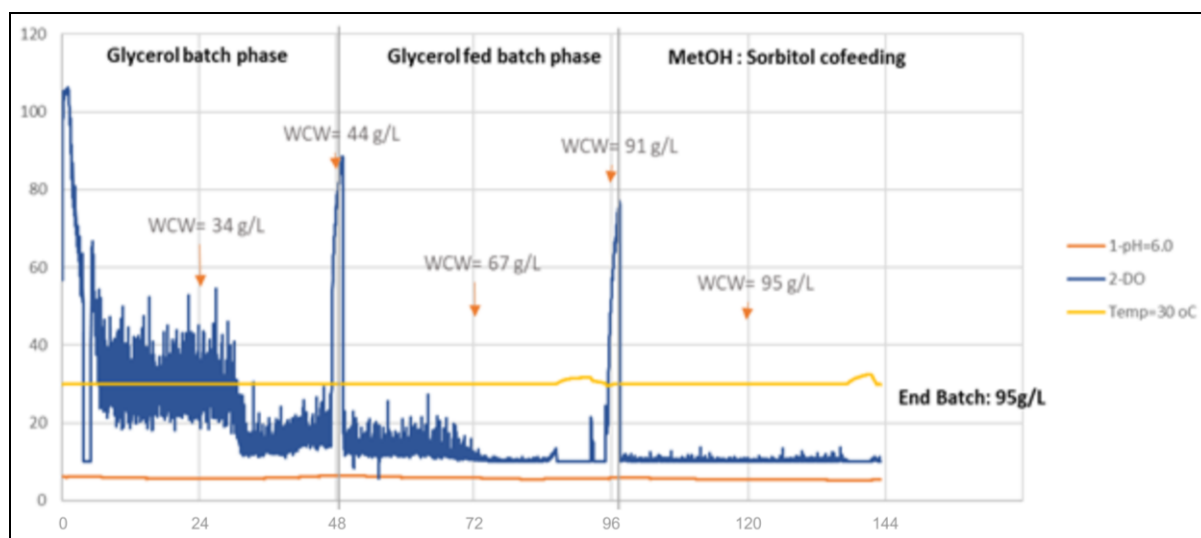
3.1. Tối ưu điều kiện biểu hiện lên men và thu sinh khối

Đối với hệ thống biểu hiện *P. pastoris*/pPICZaA sử dụng promoter AOX1 cảm ứng bằng methanol, thì việc sử dụng 100% methanol có thể gây ức chế sự phát triển của tế bào nấm men do tích tụ methanol gây độc cho tế bào và dễ gây cháy nổ trong điều kiện lên men nhiều ngày liên tục. Do đó, chúng tôi sử dụng phương pháp nuôi cấy *P. pastoris* và đồng cảm ứng methanol/sorbitol. Sorbitol được biết đến là nguồn cacbon cho *P. pastoris* và không gây ức chế promoter AOX1. Việc sử dụng thêm một nguồn carbon bổ sung như sorbitol đã được báo cáo có tác dụng kiểm soát các mức cơ chất còn lại trong môi trường, giảm mức độ gây độc

tế bào và do đó tăng năng suất biểu hiện protein mục tiêu (3).

Chủng nấm men *P. pastoris* X33/pPICZaA-00245 được nuôi cấy trên môi trường agar YPD/zeocin và được sử dụng để lên men biểu hiện và thu nhận protein MGG_00245. Một khuẩn lạc đơn từ đĩa môi trường YPD/zeocin được cấy nhân giống cấp 1 và cấp 2 lần lượt vào bình tam giác chứa 25mL môi trường YPD/Zeocine và 400mL môi trường BMGY. Giống nấm men cấp 2 được nuôi ở điều kiện 30°C, lắc 150 vòng/phút đến khi mật độ OD₆₀₀ đo được đạt giá trị trong khoảng 1 – 2 thì đạt yêu cầu để cấy vào bình lên men.

Hệ thống BioFlo120 dung tích 5L được sử dụng để lên men biểu hiện và thu nhận protein mục tiêu. Quy trình lên men 3 giai đoạn, gồm có: 1) nuôi cấy mẹ với nguồn C duy nhất là glycerol (Glycerol batch phase); 2) nuôi cấy bổ sung với glycerol (Glycerol fed batch phase); và 3) pha cảm ứng methanol:sorbitol (methanol:sorbitol co-feeding). Các thông số lên men được ghi nhận và thể hiện ở Hình 1. Nhiệt độ và pH của quá trình được kiểm soát ổn định liên tục ở 30°C và pH 6.0. Oxy được cung cấp bằng bơm sục không khí nén, tốc độ sục khí là 10 L/phút và quạt khuấy với tốc độ 250 vòng/phút.

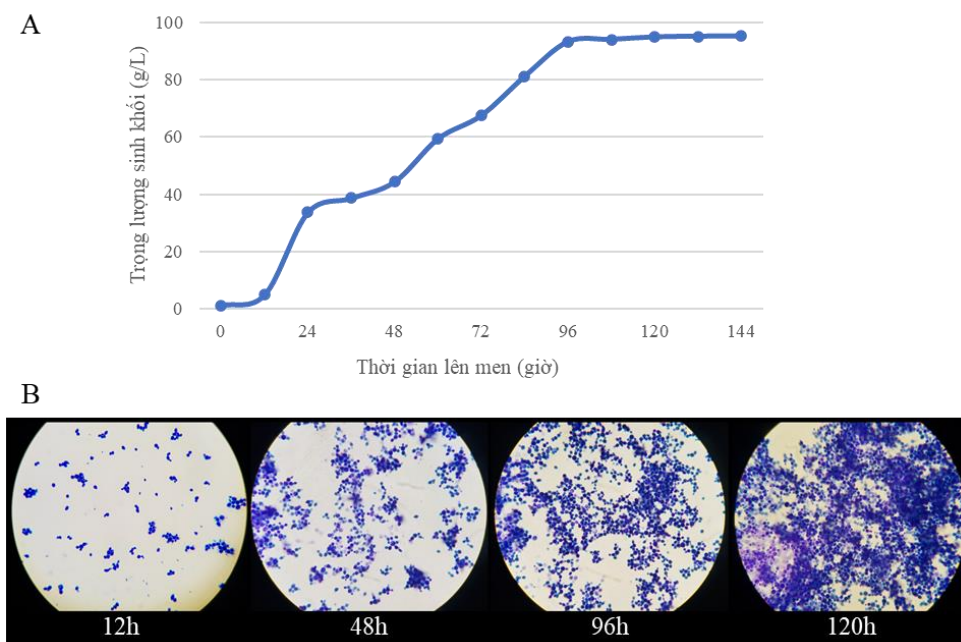


Hình 1. Dữ liệu lên men bằng hệ thống BioFlo 120

Giá trị DO (nồng độ oxy hòa tan) được ghi nhận trong suốt quá trình lên men phản ánh mức độ hô hấp tế bào, từ đó cho phép dự đoán và đánh giá mức độ phát triển của nấm men trong hệ thống lên men. Nồng độ oxy hòa tan càng thấp cho thấy tế bào thực hiện hô hấp và biến dưỡng càng mạnh, khi nồng độ oxy tăng đột ngột ở thời điểm 48 và 96 giờ, chứng tỏ tại thời điểm này nguồn carbon (ở đây là glycerol) trong môi trường đã được tiêu thụ hoàn toàn, nấm men tạm ngừng sử dụng oxy để chuyển hóa C thành năng lượng. Sau khi bổ sung nguồn C mới, giá trị DO lại giảm xuống chứng tỏ nấm men đã thích ứng và sử dụng nguồn C mới để biến dưỡng.

Sự phát triển tế bào còn được đánh giá dựa vào trọng lượng sinh khối thu được. Kết quả ở Hình 2 cho thấy trong 12 giờ đầu nấm men chưa phát triển mạnh, pha tăng trưởng bắt đầu từ 12 đến 48 giờ (thời điểm glycerol được tiêu

thụ hoàn toàn, DO tăng mạnh, trọng lượng sinh khối (wet cell weight = wcw) đạt 44g/L), sau đó tiếp tục bổ sung liên tục glycerol để kéo dài pha tăng đến khi trọng lượng sinh khối ướt đạt > 90g/L thì ngừng bổ sung glycerol (tốc độ 3,65mL/h/L). Khoảng 12 giờ sau thì ngừng bơm glycerol vì DO vẫn thấp và dao động không tăng. Đến khoảng 96 giờ khi DO tăng lên thì chuyển sang pha cảm ứng. Tại thời điểm 96 giờ, glycerol một lần nữa được tiêu thụ hoàn toàn trong bình lên men thì bắt đầu cảm ứng để biểu hiện protein bằng cách bổ sung liên tục methanol để hoạt hóa promoter AOX1, đồng thời sorbitol cũng được sử dụng làm nguồn C thứ cấp nhằm giảm khả năng gây độc tế bào do tích tụ methanol, đảm bảo nấm men vẫn tiếp tục phát triển trong suốt pha cảm ứng. Trong suốt pha cảm ứng tế bào nấm men tăng trưởng chậm lại, tuy nhiên vẫn có tế bào mới liên tục được tạo thành (từ 93 lên đến 95g/L).



Hình 2. Tốc độ phát triển của nấm men trong hệ thống lên men. A) trọng lượng sinh khối (g/L) theo thời gian; B) soi dịch nuôi cấy nấm men dưới kính hiển vi, vật kính x100.

Sau 144 giờ nuôi cấy gồm có 96 giờ nuôi tăng sinh và 48 giờ cảm ứng biểu hiện protein, mẻ nuôi cấy kết thúc, dịch nuôi cấy được ly tâm để tách riêng phần môi trường và phần sinh

khối tế bào. Cả hai phần này được lưu trữ và sử dụng để tinh chế protein mục tiêu (ngoại bào và nội bào).

3.2. Tinh chế protein tái tổ hợp

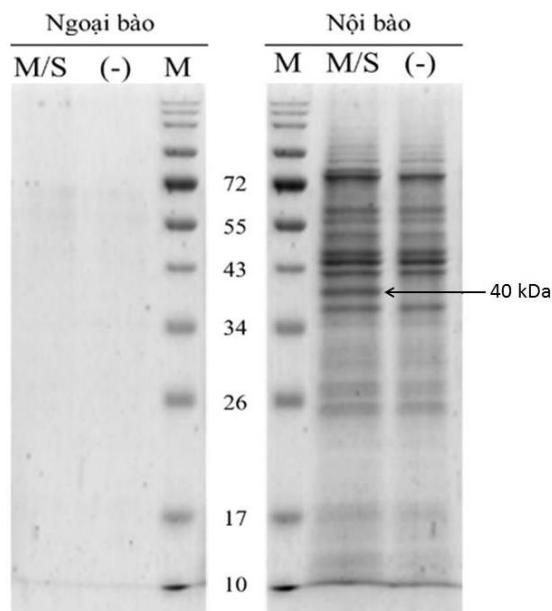
3.2.1. Xác nhận sự hiện diện của protein MGG_00245

Sau khi kết thúc mẻ lên men, dịch lên men được thu nhận và ly tâm để tách riêng phần môi trường chứa protein tiết (ngoại bào) và phần sinh khối chứa protein nội bào.

Phần protein ngoại bào (dịch môi trường) được cô lại bằng phương pháp lọc tiếp tuyến. Phần sinh khối nấm men được xử lý phá màng tế bào bằng phương pháp siêu âm và thu nhận dịch protein nội bào. Mẫu lên men cảm ứng bằng methanol/sorbitol được so sánh với các mẫu nấm men nuôi cấy không cảm ứng (đối chứng âm).

Kết quả thể hiện ở Hình 3 cho thấy dịch ngoại bào ở cả mẫu cảm ứng và mẫu đối chứng đều không có sự hiện diện của protein. Trong khi trong dung dịch protein nội bào cho thấy ở mẫu có cảm ứng methanol/sorbitol thì xuất hiện 1 băng protein ở kích thước 40 kDa, băng này không xuất hiện trong dịch nội bào không cảm ứng. Như vậy, protein MGG_00245 đã được biểu hiện với kích thước 40 kDa và chỉ tồn tại trong tế bào nấm men mà không thấy tồn tại trong dịch tiết, có thể protein được tiết ra dịch ngoại bào một lượng nhỏ và khả năng đã bị phân giải sau 144 giờ nuôi cấy.

Kích thước protein thu nhận từ *P. pastoris* lớn hơn so với kích thước dự đoán dựa vào trình tự amino axit của MGG_00245, điều này có thể giải thích do protein sau khi dịch mã được thực hiện glycosil hóa gắn thêm nhiều gốc đường (cả N-linked và O-linked glycosylation). Kết quả tương tự cũng được ghi nhận ở các loại PMO khác khi sử dụng hệ thống biểu hiện nấm men hoặc nấm sợi [4].

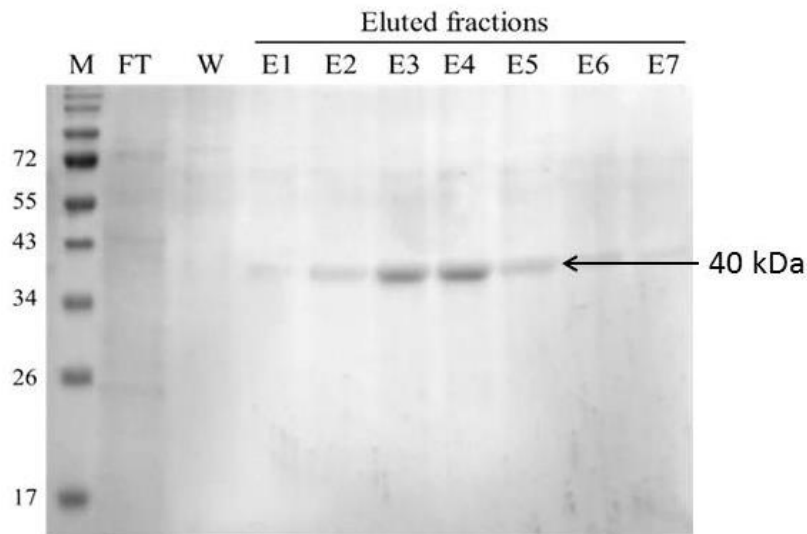


Hình 3. Protein tổng số trong phần ngoại bào và nội bào của nấm men *P. pastoris*. M/S: mẫu thu nhận từ mẻ lên men có cảm ứng methanol/sorbitol; (-), mẫu thu nhận từ mẻ không cảm ứng; M: thang chuẩn protein.

Như vậy, MGG_00245 chỉ hiện diện trong phần nội bào của nấm men *P. pastoris* với kích thước 40 kDa. Phần dịch nội bào của nấm men tiếp tục được sử dụng để tinh chế lượng lớn protein mục tiêu bằng cột Ni-NTA.

3.2.2. Tinh chế protein bằng sắc ký ái lực với cột Ni-NTA

Cột nhồi Ni-NTA kích thước 20x100mm được sử dụng để tinh chế toàn bộ dịch protein nội bào dựa trên nguyên tắc liên kết ái lực giữa đuôi 6His với hạt resin Ni-NTA. Protein mục tiêu sau khi liên kết với cột được rửa giải bằng dung dịch đệm phosphate với nồng độ imidazole tăng dần (từ 30 tới 250mM). Kết quả thể hiện ở Hình 4 cho thấy đã tinh chế thành công protein MGG_00245 với kích thước 40 kDa. Các phân đoạn rửa giải từ E2 đến E5 được gom lại và tiến hành các bước tinh sạch tiếp theo.



Hình 4. Gel SDS-PAGE các phân đoạn thu được trong quá trình tinh chế MGG_00245 bằng cột Ni-NTA. M: thang chuẩn protein; FT: dung dịch qua cột; W: phân đoạn rửa cột; E1-E7: các phân đoạn rửa giải protein mục tiêu.

Công cụ ImageJ được sử dụng để đánh giá độ tinh sạch của protein trên bản gel. Kết quả cho thấy đã biểu hiện và thu nhận được protein MGG_00245 với độ tinh sạch đạt khoảng 94%. Hiệu suất của quá trình lên men biểu hiện MGG_00245 cũng được tính dựa vào lượng protein tinh khiết thu được trên thể tích bình lên men, kết quả cho thấy hiệu suất biểu hiện protein đạt 66,76mg/L môi trường. Một số công bố về biểu hiện trên *P. pastoris* cho hiệu suất khá biến thiên, Kittl và cộng sự (2012) biểu hiện một số loại PMO có nguồn gốc từ vi nấm *N. crassa* với hiệu suất dao động từ 45mg/L đến trên 300mg/L, tùy từng loại PMO [2]. Couturier và cộng sự (2018) đã biểu hiện thành công hai loại PMO *PcAA14* với hiệu suất khá cao 1g/L [1]. Như vậy, hiệu suất biểu hiện của chúng tôi ghi nhận vẫn còn thấp so với các công bố trên thế giới.

4. Kết luận

Sử dụng hệ thống lên men BioFlo 120 đã lên men thành công dòng tế bào *P. pastoris* X33/pPICZαA-00245 đạt sinh khối 95g/L môi trường sau 144 giờ lên men. Cảm ứng biểu hiện và tinh chế thành công protein tái tổ hợp

MGG_00245 từ nội bào. Hiệu suất biểu hiện được ghi nhận đạt 66,76mg/L môi trường và độ tinh sạch đạt 94%.

Lời cảm ơn: Công trình khoa học này là một phần kết quả của Chương trình Hợp tác Khoa học và Công nghệ Nghị định thư giữa Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Bộ Ngoại giao và Hợp tác quốc tế Italia (Mã số NĐT.36.ITA/18).

Tài liệu tham khảo

- [1] Couturier M, Ladevèze S, *et al.* (2018), Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation. *Nature Chemical Biology*. 4(3):306-10.
- [2] Kittl R, Kracher D, *et al.* (2012), Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. *Biotechnology for Biofuels*. 5(1):79.
- [3] Azadi S, Mahboubi A, *et al.* (2017) Evaluation of Sorbitol-Methanol Co-Feeding Strategy on Production of Recombinant Human Growth Hormone in *Pichia Pastoris*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 16(4):1555-64.
- [4] Filiatrault-Chastel C, Navarro D, *et al.* (2019) AA16, a new lytic polysaccharide monooxygenase family identified in fungal secretomes. *Biotechnology for Biofuels*. 12(1):55.