

SỰ PHỐI HỢP CỦA ENDOGLUCANASE A VÀ EXOGLUCANASE S TÁI TỔ HỢP TIẾT BỎI TẾ BÀO CHỦ *BACILLUS SUBTILIS* WB800N

Nguyễn Hoàng Ngọc Phương^{1,2}, Võ Minh Toàn¹, Lê Dương Vương¹, Phan Thị Phượng Trang^{1,2, ✉}, Trần Linh Thuốc², Nguyễn Đức Hoàng^{1,2}

¹Trung tâm Khoa học và Công nghệ sinh học, Đại học Khoa học tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh

²Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: ptptrang@hcmus.edu.vn

Ngày nhận bài: 05.4.2016

Ngày nhận đăng: 30.11.2017

TÓM TẮT

Việc xây dựng cách tiếp cận để khảo sát hoạt động phối hợp giữa các tiểu đơn vị enzyme là một nhu cầu cần thiết trong định hướng tạo dòng và biểu hiện ngoại bào các thành phần của cellulosome. Endoglucanase A (CelA) và exoglucanase S (CelS) là hai cellulase biểu hiện mạnh trong phức hệ cellulosome của vi khuẩn kỵ khí, ưa nhiệt *Clostridium thermocellum*. Trong khi endoglucanase thể hiện hoạt tính rõ rệt với cơ chất cellulose tan carboxymethyl cellulose (CMC) thì exoglucanase vẫn chưa có cơ chất dạng tan chuyên biệt. Trong nghiên cứu này, hai enzyme CelA và CelS được tạo dòng và biểu hiện ngoại bào trong chủng chủ *Bacillus subtilis* WB800N. Kết quả phân tích dịch ngoại bào của các chủng tái tổ hợp bằng Tandem Mass spectrometry cho thấy protein tái tổ hợp đã được tiết thành công. Nhằm đánh giá hiệu quả phối hợp hoạt tính của CelA và CelS, dịch ngoại bào của từng chủng chủ được thu nhận và trộn theo các tỉ lệ khác nhau. Hoạt tính CMCase từng enzyme và hỗn hợp hai enzyme được đo bằng quy trình định lượng đường khử dinitrosalicylic acid trên đĩa 96 giếng. Phần lớn giá trị hoạt tính CMCase ở các tỉ lệ trộn đều cao hơn tổng giá trị hoạt tính của từng enzyme. Điều này cho thấy có sự cộng hưởng hoạt tính giữa 2 enzyme này trong quá trình thủy phân CMC. Dịch ngoại bào chứa CelA và CelS ở tỉ lệ trộn 3:5 theo thể tích có hoạt tính CMCase cao hơn 35,5% tổng hoạt tính của từng dịch ngoại bào chứa riêng CelA và CelS. Nghiên cứu này cung cấp cách tiếp cận để khảo sát hoạt động phối hợp của các tiểu đơn vị enzyme trong quá trình thiết kế mini-cellulosome trong chủng chủ *B. subtilis* WB800N.

Từ khóa: *Bacillus subtilis* WB800N, *Clostridium thermocellum*, Endoglucanase A, CelA, Exoglucanase S, CelS

MỞ ĐẦU

Phức hệ cellulosome của vi khuẩn ưa nhiệt, kỵ khí *C. thermocellum* có hiệu quả thủy phân cellulose cao hơn 50 lần so với *Trichoderma* (Demain *et al.*, 2005). Hướng đến mục tiêu thủy phân rơm rạ tạo ra các phân tử đường đơn dùng làm cơ chất lên men sản xuất bioethanol, các nhà nghiên cứu đã tạo dòng và biểu hiện các gen thuộc phức hệ cellulosome trong các chủng vi sinh hiếu khí, ôn hòa (Kumar *et al.*, 2008; Dixon, 2013). Các phân tích proteomics cho thấy CelS và CelA là 2 exo và endoglucanase chiếm phần lớn trong hoạt động của cellulosome và được biểu hiện liên tục trong suốt quá trình sống của *C. thermocellum* (Gold & Martin, 2007). Hoạt động phối hợp của các enzyme có thể được mô tả như sau: endoglucanase cắt giữa mạch cellulose tạo ra các đầu

sợi là điểm bám hoạt động của các exoglucanase. Hoạt tính của CelA chủ yếu trên CMC, với avicel và xylan rất thấp, hầu như không có (Beguin *et al.*, 1985). Vai trò quan trọng của CelS trong hoạt động của cellulosome đã được chứng minh khi chủng *C. thermocellum* đột biến mất CelS có tốc độ thủy phân cellulose thấp hơn và chỉ đạt 60% so với chủng tự nhiên (Olson *et al.*, 2010).

Hướng đến ứng dụng trong sản xuất, protein tái tổ hợp nên được biểu hiện trong chủng chủ an toàn và ở dạng tiết. *B. subtilis* là một trong các chủng chủ tiềm năng vì có các ưu điểm như: (i) chủng an toàn (ii) có khả năng lên men mật độ cao, (iii) khả năng tiết protein ngoại bào hiệu quả. Anderson và cộng sự (2011, 2013) đã tạo được chủng *B. subtilis* tái tổ hợp tiết mini-cellulosome và có khả năng sống sót trong môi trường tối thiểu chỉ chứa cơ chất rơm rạ đã qua

tiền xử lý (Anderson *et al.*, 2011; Anderson *et al.*, 2013). Tuy nhiên, việc duy trì sự ổn định hệ protein ngoại bào khỏi sự phân cắt của các protease ngoại bào là một vấn đề cần quan tâm. Một trong những biện pháp có thể làm giảm nguy cơ phân cắt protein ngoại bào là việc sử dụng chủng đột biến *B. subtilis* WB800N [*nprE aprE epr bpr mpr :: ble nprB :: bsr Δvpr wprA :: hyg cm :: neo*; Neo^R (WB800 pB-*cat5-neo-cat3*)] đã bị đột biến loại bỏ tám protease ngoại bào (Wu *et al.*, 2002). Cho đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào được thực hiện nhằm xây dựng vector biểu hiện phù hợp cũng như đánh giá mức độ hiệu quả của việc phối hợp hoạt tính hai enzyme CelA và CelS được biểu hiện trong chủng *B. subtilis* WB800N.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tạo dòng hai vector biểu hiện tiết CelA và CelS trong chủng *B. subtilis* WB800N sau đó phối trộn dịch ngoại bào của hai enzyme này để đánh giá hiệu quả phối hợp hoạt tính thủy phân với cơ chất CMC. Các kết quả này sẽ làm cơ sở tiền đề cho nghiên cứu tạo mini-cellulosome hiệu quả hơn từ chủng *B. subtilis* WB800N.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi sinh vật, plasmid, môi PCR và môi trường nuôi cấy

Hệ thống vector con thoi pHT được sử dụng để tạo dòng trong *E. coli* OmniMAX (Invitrogen) và biểu hiện protein ngoại lai trong *B. subtilis* WB800N. Plasmid pHT43 không mang gen dùng làm chứng âm (MoBiTec, Germany). Plasmid pHT43-*celA* là pHT43 mang gen mã hóa CelA (Phạm Lương Thắng *et al.*, 2014).

Quá trình dòng hóa plasmid pHT1717 mang gen *celS* được thực hiện như sau: Gen *celS* được thu nhận bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi ON1107/ON1108 trên khuôn DNA bộ gen *C. thermocellum*. Sau đó *celS* được chèn vào plasmid pHT1219 đã được cắt mở vòng bằng *Bam*HI và *Aat*II bằng phản ứng In-fusion (In-Fusion HD Cloning Kit, Clontech). Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* và sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi ON314/ON1347, trong đó mồi ON314 có trình tự bắt cặp trên plasmid và ON1347 có trình tự bắt cặp trên gen mục tiêu *celS*. Khuẩn lạc có kết quả PCR dương tính sẽ được nuôi cấy, tách chiết plasmid và giải trình tự với 3 mồi ON707, ON1101 và ON314. Các trình tự mồi được thể hiện trong bảng 1.

Môi trường Luria Broth (LB) được sử dụng để nuôi cấy các chủng *E. coli* với Ampicilline (Amp) nồng độ cuối 100 µg/ml và *B. subtilis* với Chloramphenicol (Cm) nồng độ cuối 10 µg/ml.

Bảng 1. Trình tự mồi cho phản ứng PCR.

Mục đích	Tên mồi	Khuôn	Trình tự nucleic acid (5'- 3')
Thu nhận gen <i>celS</i>	ON1108	DNA bộ gen <i>C. thermocellum</i>	TGCGGATGGCTCCAGGCACAAGCCGTCCTTTCAAATC
	ON1107		GCATCAGCAGGATCCGGTCTACAAAGGCACCTAC
PCR khuẩn lạc	ON1347	pHT1717	ACCGCTTCTGGCATGAAGTTG
	ON314		TGTTTCAACCATTTGTTCCAGGT
	ON707		AAAGGAGGAAGGATCAATGAGAGGAAGCA
Giải trình tự	ON1101	pHT1717	GCAGAAGGCCGTGCTATACAG
	ON314		TGTTTCAACCATTTGTTCCAGGT

Kiểm tra sự hiện diện của protein tái tổ hợp trong dịch ngoại bào bằng LC – MS/MS

Mẫu dùng để chạy LC – MS/MS được chuẩn bị theo quy trình cải tiến từ quy trình của Lai và Witzmann (2011). Nuôi cấy các chủng *B. subtilis* WB800N mang các plasmid tái tổ hợp ở 30°C, cảm ứng isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 0.5 mM. Sau 8 giờ, 2 ml dịch nuôi cấy được thu và ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 10 phút để loại sinh khối. Dịch ngoại bào được tủa protein bằng 10% trichloroacetic acid (TCA), ủ trong đá 30 phút, ly tâm 13000

vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Tủa được rửa hai lần bằng acetone lạnh và để khô ở nhiệt độ phòng. Tủa sau đó được xử lý với 1 µg trypsin/P (Pierce Trypsin Protease, Thermo Fisher Scientific) trong 100 µl NaHCO₃ 200 mM, pH 8 và tiến hành kiểm tra protein được biểu hiện tiết thông qua hệ thống Q-Exactive Mass Spectrometer kết hợp với Easy-nLC 1000 LC (Thermo Fisher Scientific). Kết quả xác định protein được phân tích bằng phần mềm Thermo Proteome Discoverer 1.2 kết nối với dữ liệu phân tích từ Mascot (MatrixScience).

Khảo sát thời gian thu nhận protein tái tổ hợp

Các chủng *B. subtilis* WB800N mang plasmid tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường LB với kháng sinh Cm ở 30°C và tốc độ lắc 250 vòng/phút. Cảm ứng IPTG nồng độ 0.5 mM khi OD₆₀₀ đạt 0,8. Dịch nuôi cấy được thu tại các thời điểm 0 giờ, 4 giờ và 8 giờ sau cảm ứng. Thực hiện tương tự với chủng âm là *B. subtilis* WB800N chứa plasmid pHT43. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trên 3 khuẩn lạc khác nhau.

Hoạt tính endoglucanase được đo theo quy trình định lượng đường khử dinitrosalicylic acid (DNS) (Ghose, 1987). 250 µl dịch ngoại bào được trộn với 250 µl CMC 0.5% pha trong đệm phosphate và ủ hỗn hợp phản ứng ở 55°C trong 1 giờ. Sau đó, 500 µl DNS 1% được thêm vào hỗn hợp phản ứng, tiếp tục ủ hỗn hợp này ở 95°C trong 5 phút và đo giá trị OD hấp thụ ở bước sóng 540 nm. Mẫu blank được chuẩn bị tương tự như mẫu chứa enzyme nhưng bỏ qua bước ủ ở 55°C trong 1 giờ và xử lý ngay với DNS để biết được lượng đường ban đầu không có sự hoạt động của enzyme mục tiêu với cơ chất.

Đơn vị hoạt tính enzyme (IU/ml) được tính là lượng enzyme cần thiết để tạo ra 0,18 mg (ứng với 1 µmol) đường khử glucose tương đương trong 1 phút. Thời gian ủ phản ứng giữa enzyme và CMC là 60 phút, nên 1 mg đường khử tạo thành tương đương 0,0925 IU. Đường chuẩn được xây dựng dựa vào khả

năng hấp thụ ở bước sóng 540 nm của glucose phản ứng với DNS sau khi được thực hiện các bước tương tự như quy trình khảo sát hoạt tính endoglucanase, trong đó lượng enzyme phản ứng được thay thế bằng glucose ở các nồng độ khác nhau. Các kết quả được xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 16.

Khảo sát hoạt tính phối hợp CelA-CelS

Dựa vào kết quả khảo sát ảnh hưởng thời gian thu mẫu lên hoạt tính của từng enzyme đối với cơ chất CMC, dịch nuôi cấy hai chủng *B. subtilis* WB800N mang plasmid tái tổ hợp pHT43-*celA* và pHT1717 trong cùng điều kiện nuôi sẽ được thu nhận và đo hoạt tính phối hợp với quy trình như thí nghiệm khảo sát hoạt tính riêng lẻ của hai enzyme CelA và CelS. Dịch nuôi cấy của hai chủng được phối trộn theo tỉ lệ về thể tích nhằm đánh giá khả năng phối hợp hoạt tính của 2 enzyme trong dịch ngoại bào. Tỉ lệ phối trộn 2 dịch ngoại bào enzyme được thể hiện trong bảng 2.

Hiệu quả phối hợp trong sự phân cắt cơ chất CMC được đánh giá thông qua tỉ lệ H giữa giá trị hoạt tính đo được của mẫu phối trộn với tổng giá trị hoạt tính của từng thành phần dùng để phối trộn với lượng thể tích tương ứng. Nếu tỉ lệ này lớn hơn 1 thì có sự phối hợp hoạt tính giữa 2 enzyme, ngược lại, nếu nhỏ hơn 1 thì không có sự phối hợp để phân cắt cơ chất (Murashima *et al.*, 2003).

Bảng 2. Tỉ lệ phối trộn thể tích của 2 enzyme CelA và CelS.

CelA (µl)	CelS (µl)				
	125	100	75	50	25
125	5:5	5:4	5:3	5:2	5:1
100	4:5	4:4	4:3	4:2	4:1
75	3:5	3:4	3:3	3:2	3:1
50	2:5	2:4	2:3	2:2	2:1
25	1:5	1:4	1:3	1:2	1:1

KẾT QUẢ

Thiết kế plasmid pHT1717 mang gen *celS*

Gen *celS* sau khi được thu nhận từ DNA bộ gen của *C. thermocellum* bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu ON1107/ON1108 và tiến hành chèn vào plasmid pHT1219 bằng phản ứng in-fusion tạo thành plasmid pHT1717. Plasmid tái tổ hợp được sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi ON1347/ON314. Tách chiết plasmid và giải trình tự vùng gen *celS* cho thấy sự tương đồng 100% so với trình tự lý thuyết (kết quả không được trình bày).

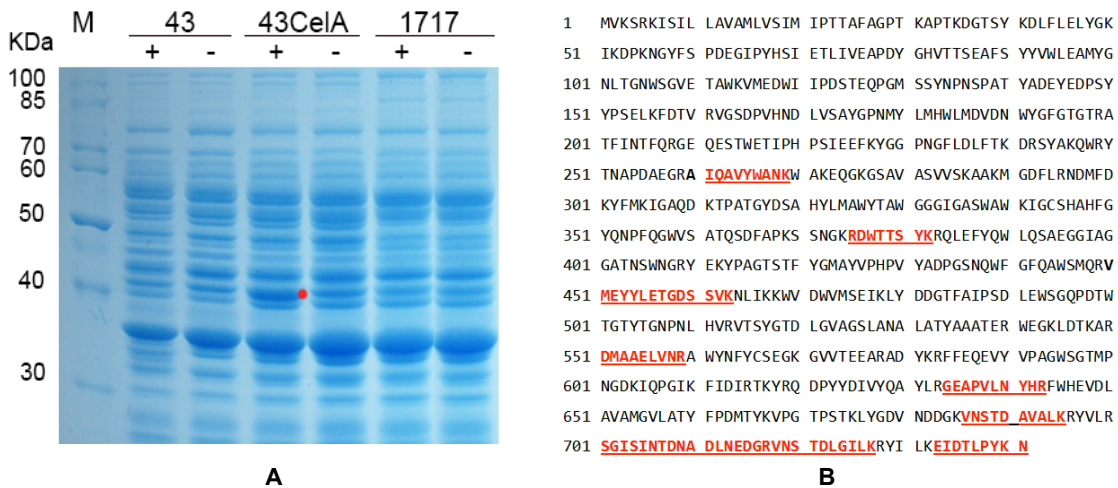
Như vậy, plasmid pHT1717 mã hóa CelS đã được tạo dòng thành công. Các plasmid pHT43-*celA* và pHT1717 lần lượt mã hóa CelA và CelS được biến nạp vào chủng *B. subtilis* WB800N để khảo sát hiệu quả phối hợp hoạt tính của 2 enzyme.

Kiểm tra sự hiện diện của protein tái tổ hợp trong dịch ngoại bào bằng LC - MS/MS

Kết quả SDS-PAGE phát hiện vạch đậm xấp xỉ 40 kDa gần với kích thước lý thuyết của CelA/pHT43-*celA* trong khi không thấy vạch đậm

khác biệt giữa mẫu có và không cảm ứng với IPTG trong dịch ngoại bào của chủng âm pHT43 và CelS/pHT1717 (~80 kDa) trên hình 1A. Có thể lượng CelS tiết ra quá thấp trong dịch ngoại bào nên không thấy rõ vạch biểu hiện. Do đó, chúng tôi sử dụng LC-MS/MS để phân tích các mẫu dịch ngoại bào này. Protein ngoại bào trong dịch nuôi cấy các chủng *B. subtilis* WB800N mang plasmid mục tiêu được thủy phân bằng enzyme trypsin/P để tạo các

đoạn peptide, sau đó được nạp vào hệ thống phân tích LC-MS/MS. Kết quả khối phổ xử lý bằng phần mềm Thermo Proteome Discoverer 1.2 kết nối Mascot để so sánh giữa khối phổ lý thuyết và khối phổ quan sát của các protein có trong dịch ngoại bào. Khối phổ lý thuyết dựa vào cơ sở dữ liệu protein Uniprot của *B. subtilis* 168 (chủng gốc của *B. subtilis* WB800N) kết hợp với trình tự protein từ các plasmid.



Hình 1. Kết quả phân tích SDS-PAGE (A) và trình tự aa của protein CelS/pHT1717 (B). (+)/(-) có/không cảm ứng với IPTG 1 mM. Trình tự in đậm và gạch dưới là các peptide được phát hiện bởi LC-MS/MS.

Bảng 3. Các peptide phát hiện thuộc protein CelS/pHT1717.

Trình tự peptide	IonScore	Exp Value	Điện tích	MH ⁺ [Da]	ΔM [ppm]	m/z [Da]	Thời gian lưu [min]
VNSTDAVALK	75	4.8E-008	2	1017.56072	3.11	509.28400	13.67
DMAAELVNR	59	7.5E-007	2	1018.49767	-0.99	509.75247	18.40
LYGDVNDDGK	58	7.4E-007	2	1095.48979	-5.06	548.24854	13.18
AIQAVYWANK	56	3.4E-006	2	1163.62029	-0.45	582.31378	18.54
VNSTDLGILK	49	1.9E-005	2	1059.60344	-1.00	530.30536	18.88
EIDTLPYK	40	6.6E-005	2	978.51396	-0.31	489.76062	17.37
GEAPVLNYHR	38	1.8E-004	3	1155.58930	-1.10	385.86795	13.79
VmEYYLETGDSSVK	33	2.1E-004	2	1636.73857	-1.57	818.87292	18.08
DWTTSYK	32	2.2E-004	1	900.40344	-7.05	900.40344	17.12
DmAAELVNR	31	6.0E-004	2	1034.49333	-0.24	517.75031	14.64
EIDTLPYKN	28	3.3E-003	2	1092.55754	0.31	546.78241	17.05

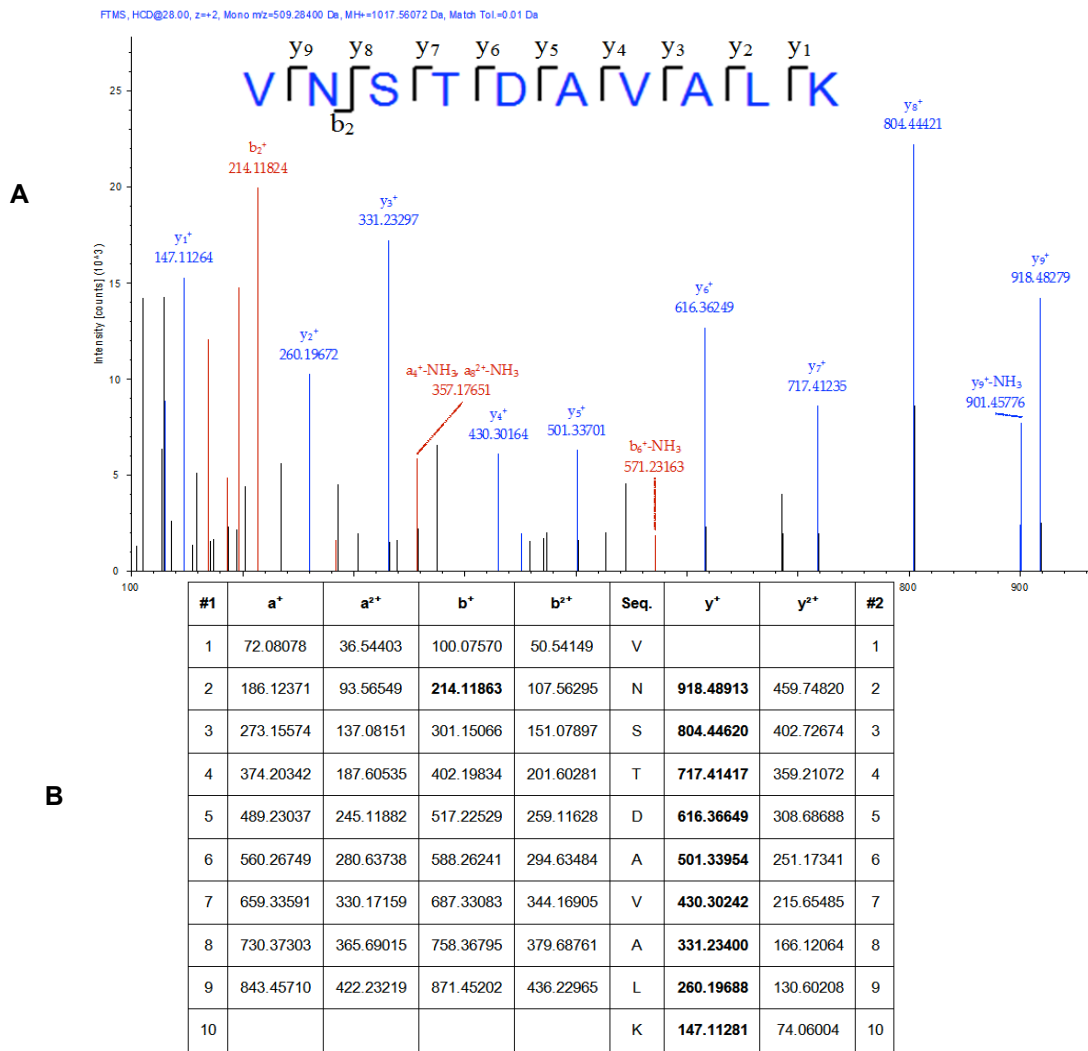
Ghi chú: m: Gốc methionine bị oxy hóa.

Quá trình phân tích kết quả LC-MS/MS của mẫu protein ngoại bào của chủng tiết CelS/pHT1717 sẽ được phân tích cụ thể như sau. Ban đầu, tổ hợp peptide của CelS (hình 1B) được

phân cắt bằng trypsin/P và chạy MS¹, thu được các “mũi mẹ” (mảnh ion có cường độ mạnh) như bảng 3. Kết quả MS² với peptide điển hình như mảnh peptide VNSTDAVALK có đỉnh m/z = 509.28400

thu được như hình 2A. Các giá trị khối phổ quan sát của các mảnh ion này phù hợp với một số phân mảnh ion trên lý thuyết của “mũi mẹ” có trình tự VNSTDAVALK (hình 2A). Tương tự, nhiều peptide khác của protein cũng được giải trình tự đến từng trình tự amino acid, cho thấy protein CelS/pHT1717 đã được tiết thành công vào dịch ngoại bào.

Phân tích LC-MS/MS dịch ngoại bào của pHT43-celA phát hiện thấy CelA trong khi chứng âm pHT43 không phát hiện peptide nào thuộc CelA hay CelS của *C. thermocellum* như bảng 5. Các protein CelA/pHT43-celA và CelS/pHT1717 đều có điểm Mascot từng peptide trên 30 và đều được giải tới từng trình tự amino acid, cho thấy kết quả nhận diện protein có độ tin cậy cao.



Hình 2. Phổ MS² của peptide VNSTDAVALK thuộc CelS/pHT1717 (A) và **Bảng 4.** Ma trận MS² lý thuyết của peptide VNSTDAVALK thuộc CelS/pHT1717 (B). *In đậm: giá trị phổ lý thuyết sát với phổ quan sát.*

Bảng 5. Tổng hợp kết quả phân tích LC-MS/MS protein mục tiêu trong dịch nuôi cấy của các chủng.

Plasmid	peptide CelA	peptide CelS	Chiều dài (aa)	Độ phủ (%)	Unique peptide	Tổng số peptide	Score
pHT43	(-)	(-)					
CelA/pHT43celA	(+)	(-)	477	25	12	21	556
CelS/pHT1717	(-)	(+)	741	13	11	12	363

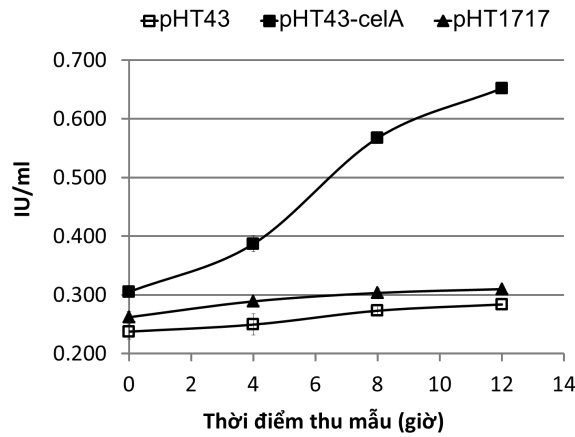
Ghi chú: Độ phủ = % aa phát hiện trên tổng số aa. Unique peptides = số Peptide không trùng lặp. Score= tổng điểm của các peptide. Thông thường, các peptide có độ tin cậy cao thường có Score >25. Protein CelS/pHT1717 có tổng score 363, tức trung bình mỗi peptide >30.

Khảo sát thời gian phù hợp thu mẫu dịch ngoại bào

Một trở ngại lớn khi đánh giá hoạt tính exoglucanase CelS là không có cơ chất phát hiện đặc hiệu, nghĩa là lượng sản phẩm đo đạc trước và sau khi cho CelS phân cắt cơ chất không đủ rõ để thấy khác biệt. Nguyên nhân do exoglucanase CelS cắt mạch cellulose từ đầu khử trong khi đó các cơ chất cellulose phổ thông như CMC, Avicel, RAC quá ít điểm bám để exoglucanase CelS phát huy hiệu quả nếu chỉ hoạt động độc lập (Zhang *et al.*, 2009). Để đánh giá hoạt động thủy phân cellulose của CelS, một trong những giải pháp là bổ sung thêm endoglucanase CelA giúp CelS có nhiều điểm bám hơn. Vì vậy chúng tôi tiến hành khảo sát thời điểm

thu dịch ngoại bào phù hợp để thấy được hoạt tính riêng của từng cellulase lên cơ chất CMC.

Dịch nuôi cấy của 2 chủng *B. subtilis* WB800N mang plasmid pHT43-celA (CelA) và pHT1717 (CelS) sau khi cảm ứng với IPTG tại các thời điểm khác nhau được ly tâm thu dịch nổi và định lượng đường khử DNS. Kết quả cho thấy hoạt tính CMCase của CelA tăng dần và có sự khác biệt rõ rệt so với CelS và chứng âm theo thời gian (hình 3). CelS hầu như không thể hiện hoạt tính CMCase rõ rệt. Tại thời điểm 8 giờ sau cảm ứng với IPTG, hoạt tính CMCase của CelA tăng gấp gần 3,5 lần so với CelS. Thời điểm 8 giờ được chọn để thu mẫu và khảo sát hoạt động phối hợp giữa CelA và CelS trong dịch ngoại bào.



Hình 3. Đồ thị khảo sát hoạt tính glucanase theo thời gian.

Khảo sát hoạt tính phối hợp CelA và CelS

Kiểm chứng vòng phân giải trên đĩa CMC nhuộm với Congo Red cho thấy chủng chủ *B. subtilis* WB800N không có hoạt tính CMCase. Phân tích proteomics (LC-MS/MS) các thành phần dịch ngoại bào không cho thấy có cellulase dạng tiết từ chủng chủ *B. subtilis* WB800N. Phân tích genomics

B. subtilis 168 cho thấy chủng chủ có mang gen mã hoá cellulase nhưng có thể do môi trường LB đã đầy đủ dinh dưỡng nên các gen này bị ức chế. Các dữ liệu này (không trình bày) cho thấy dịch ngoại bào của các chủng tái tổ hợp hoàn toàn chỉ chứa CelA hoặc CelS và sự phối hợp hoạt động thủy phân CMC chỉ do hai enzyme này chịu trách nhiệm.

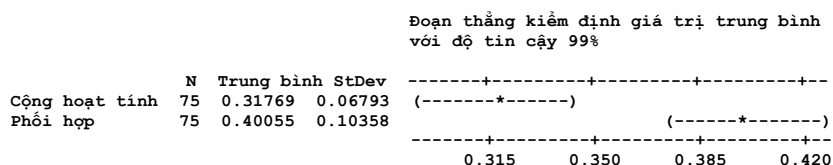
Hoạt tính phân cắt cơ chất CMC được đo trực tiếp bằng dịch môi trường nuôi cấy nhằm đánh giá hiệu quả phối hợp của 2 enzyme trong điều kiện dịch ngoại bào. Trong quá trình thủy phân cơ chất CMC, CelA (endoglucanase) sẽ phân cắt giữa mạch polysaccharide tạo ra các đoạn ngắn oligosaccharide có đầu khử và không khử. Exoglucanase CelS sẽ bám vào các đầu khử để tiếp tục cắt ngắn mạch đường tạo ra các cellobiose. Phân tích Anova một chiều giữa hai cách đo Hoạt tính tổng của hai enzyme như hình 4 cho thấy khác biệt rất có ý nghĩa thống kê giữa hai cách tính: (i) dựa vào hoạt tính thu được khi phối trộn và (ii) dựa vào tổng hoạt tính riêng từng thành phần. Tỷ lệ H giữa (i) hoạt tính của mẫu phối trộn hai enzyme CelA và CelS (bảng 6A) và (ii) tổng hoạt tính riêng của từng loại enzyme (bảng 6B) đại diện cho hiệu quả hoạt động phối hợp của hai enzyme CelA và CelS. Một ví dụ với tỷ lệ phối trộn 125:125, hoạt tính riêng lẻ của CelA và CelS lần lượt là 0,295 và

0,169, trong khi đó, hoạt tính phối trộn 2 enzyme là 0,566, suy ra tỷ lệ $H = (0,295 + 0,169) / 0,566 \approx 1,22$. Như vậy, ở tỷ lệ phối trộn 125:125, tỷ lệ H lớn hơn 1 nên có thể kết luận có sự phối hợp hoạt tính dương với giá trị 1,22 (tăng 22% hoạt tính). Ngược lại, tỷ lệ H nhỏ hơn 1 chứng tỏ có sự phối hợp hoạt tính âm (ức chế hoạt tính lẫn nhau của 2 enzyme) và với tỷ lệ H bằng 1 thì không có sự phối hợp hoạt tính.

Hầu hết các tỷ lệ H thu được từ các tỷ lệ phối trộn khác nhau (hình 5A) đều lớn hơn 1 cho thấy có sự cộng hưởng hoạt tính giữa 2 enzyme này trong quá trình thủy phân CMC. Sự phối hợp hoạt tính hiệu quả hơn khi dùng nhiều CelS và ít CelA. Vùng có tỷ lệ H cao nhất phân bố chủ yếu quanh tỷ lệ 3 CelA : 5 CelS (trương đương thể tích 75 µl CelA : 125 µl CelS) (hình 5B). Với tỷ lệ 75 µl CelA : 125 µl CelS thì sự phối hợp hoạt tính của 2 enzyme này là cao nhất, tỷ lệ H lên đến 1,355 (tăng 35,5% hoạt tính).

Nguồn	Bậc tự do	SS	MS	Giá trị F	P
Hoạt tính tổng	1	0.25748	0.25748	33.56	0.000
Sai số	148	1.13547	0.00767		
Tổng	149	1.39295			

S = 0.08759 R-Sq = 18.48% R-Sq(adj) = 17.93%

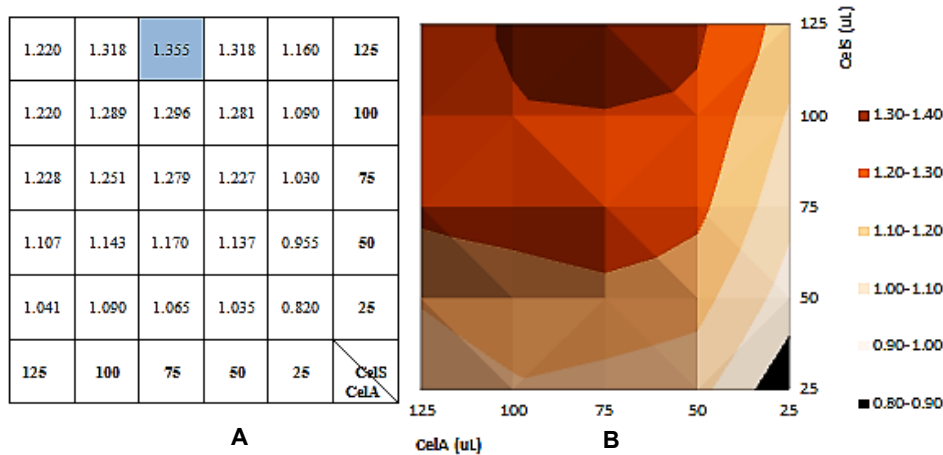


Độ lệch chuẩn = 0.08759

Hình 4. Kết quả phân tích Anova giữa hai cách đo hoạt tính tổng của hai enzyme CelA và CelS.

Bảng 6. Hoạt tính (IU/mL) phối trộn giữa CelA và CelS theo thể tích dịch ngoại bào (µL).

A. Hoạt tính (IU/mL) phối trộn giữa CelA và CelS theo thể tích (µL)						B. Hoạt tính riêng từng enzyme CelA và CelS (IU/mL)		
CelA \ CelS	125 µl	100 µl	75 µl	50 µl	25 µl	Dịch ngoại bào	CelA	CelS
125 µl	0,566 ± 0,0203	0,549 ± 0,0216	0,527 ± 0,015	0,466 ± 0,0167	0,433 ± 0,0137	125 µl	0,295 ± 0,0015	0,169 ± 0,0007
100 µl	0,542 ± 0,0218	0,512 ± 0,0107	0,471 ± 0,0204	0,421 ± 0,0095	0,398 ± 0,0129	100 µl	0,242 ± 0,0072	0,155 ± 0,0028
75 µl	0,491 ± 0,0124	0,452 ± 0,0182	0,419 ± 0,023	0,374 ± 0,0129	0,335 ± 0,0091	75 µl	0,193 ± 0,0037	0,134 ± 0,0017
50 µl	0,421 ± 0,0114	0,392 ± 0,0152	0,349 ± 0,0084	0,314 ± 0,0072	0,281 ± 0,0254	50 µl	0,15 ± 0,0034	0,126 ± 0,003
25 µl	0,328 ± 0,0355	0,294 ± 0,0102	0,256 ± 0,014	0,229 ± 0,025	0,193 ± 0,0153	25 µl	0,114 ± 0,0005	0,122 ± 0,0032



Hình 5. Khảo sát hoạt tính phối hợp CelA và CelS. **(A)** Bảng tỉ lệ phối trộn H giữa 2 enzyme CelA và CelS trong cùng thể tích tổng bổ sung đệm vừa đủ 250 μ l. **(B)** Phân bố tỉ lệ H đại diện cho sự phối hợp hoạt tính được biểu diễn độc lập bằng 2 chủng *B. subtilis* WB800N lần lượt mang plasmid pHT43-*celA* và pHT1717.

THẢO LUẬN

Mini-cellulosome hiện đang được nghiên cứu xây dựng nhằm ứng dụng trong việc phân hủy lượng phế phẩm rom ra dồi dào. Hầu hết các enzyme cellulase thành phần trong hệ cellulosome đều được chủng vi sinh biểu hiện tiết ra ngoài môi trường, quá trình này gặp trở ngại khi protein mục tiêu bị phân cắt bởi các protease ngoại bào. Chủng *B. subtilis* WB800N giảm nguy cơ protein ngoại lai bị phân hủy, mang lại tiềm năng ứng dụng trong biểu hiện cellulase ngoại bào.

Từ các kết quả trên, các enzyme cellulase tái tổ hợp trong chủng *B. subtilis* WB800N đã được biểu hiện ngoại bào thành công. Bản thân CelS không thể hiện hoạt tính rõ rệt với cơ chất CMC, tuy nhiên khi trộn CelS và CelA, hoạt tính thủy phân CMC của hỗn hợp có thể tăng đến 35.5% (75 μ l CelA : 125 μ l CelS) so với tổng hoạt tính riêng của mỗi enzyme. Các tỉ lệ H lớn hơn 1 chứng tỏ trong điều kiện dịch ngoại bào, 2 enzyme mục tiêu có sự phối hợp hoạt động để phân cắt cơ chất. Khi cố định lượng CelA và thay đổi lượng CelS, tỉ lệ H tăng mạnh hơn (so với khi cố định lượng CelS và thay đổi lượng CelA) cho thấy vai trò quan trọng của CelS trong việc gia tăng tốc độ thủy phân CMC.

Nghiên cứu này cung cấp cách tiếp cận và là nền tảng cho các khảo sát sâu rộng khác cho việc đồng biểu hiện tiết các cellulase. Để có thể khai thác *B. subtilis* WB800N trong việc biểu hiện mini-cellulosome tái tổ hợp, cần có những khảo sát thêm về

khả năng duy trì hoạt tính cũng như hiệu quả phối hợp tính phân cắt cơ chất theo thời gian của các cellulase tiêu đơn vị.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tạo thành công các chủng *B. subtilis* WB800N biểu hiện lần lượt 2 enzyme CelA và CelS. Kết quả này cung cấp nguyên liệu và cơ sở khoa học cho chúng tôi tiếp tục nghiên cứu nhằm sử dụng chủng *B. subtilis* WB800N để tạo mini-cellulosome.

CelS được biểu hiện nhưng không thể hiện được hoạt tính phân cắt CMC rõ rệt. Tuy nhiên, khi phối hợp với tỉ lệ 75 μ l CelA : 125 μ l CelS cho hiệu quả phối hợp hoạt tính tốt với CelA.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong Đề tài mã số 106-NN-02.2015.20. Cảm ơn GS. Joseph A. Loo, Rachel Loo và Hong Hanh Nguyen (University of California, Los Angeles, USA) đã hỗ trợ chuyên môn trong phân tích khối phổ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anderson TD, JI Miller, HP Fierobe, & RT Clubb (2013) Recombinant *Bacillus subtilis* that grows on untreated plant biomass. *Appl Environ Microbiol* 79(3): 867-876.
- Anderson TD, SA Robson, XW Jiang, GR Malmirchegini,

- HP Fierobe, BA Lazazzera, RT Clubb (2011) Assembly of mini-cellulosomes on the surface of *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 77(14): 4849-4858.
- Beguín P, P Cornet, JP Aubert (1985) Sequence of a cellulase gene of the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum*. *J Bacteriol* 162(1): 102-105.
- Demain AL, M Newcomb, JHD Wu (2005) Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microb Mol Biol Rev* 69(1): 124-154.
- Dixon RA (2013) Microbiology: Break down the walls. *Nature* 493(7430): 36-37.
- Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* 59(2): 12.
- Gold ND, VJ Martin (2007) Global view of the *Clostridium thermocellum* cellulosome revealed by quantitative proteomic analysis. *J Bacteriol* 189(19): 6787-6795.
- Kumar R, S Singh, OV Singh (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35(5): 377-391.
- Murashima K, Kosugi A, Doi RH (2003) Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. *J Bacteriol* 185(5): 1518-1524.
- Lai X, Witzmann F (2011) Gel-based and gel-free sample preparation for LC-MS/MS analysis. In A. R. Ivanov & A. V. Lazarev, Eds. *Sample Preparation in Biological Mass Spectrometry*: Springer Netherlands: 3-17.
- Olson DG, SA Tripathi, RJ Giannone, J Lo, NC Caiazza, DA Hogsett, . . . LR Lynd (2010) Deletion of the Cel48S cellulase from *Clostridium thermocellum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(41): 17727-17732.
- Pham TL, TTP Phan, LT Tran, DH Nguyen (2014) Biểu hiện endoglucanase A của *Clostridium thermocellum* trong vi khuẩn *Bacillus subtilis*. *Tạp chí Phát triển KH&CN* 17(4).
- Wu SC, JC Yeung, Y Duan, R Ye, SJ Szarka, HR Habibi, SL Wong (2002) Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: Effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Appl Environ Microbiol* 68(7): 3261-3269.
- Zhang YH, J Hong, X Ye (2009) Cellulase assays. In J. R. Mielenz, Ed *Biofuels: methods and protocols, Methods in molecular biology*: Humana Press USA 581: 213-231.

SYNERGY BETWEEN RECOMBINANT ENDOGLUCANASE A AND EXOGLUCANASE S SECRETED BY *BACILLUS SUBTILIS* WB800N

Nguyen Hoang Ngoc Phuong^{1,2}, Vo Minh Toan¹, Le Duong Vuong¹, Phan Thi Phuong Trang^{1,2}, Tran Linh Thuoc², Nguyen Duc Hoang^{1,2}

¹Center for Bioscience and Biotechnology

²University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh City

SUMMARY

An approach for determining the synergistic activity of cellulosomal catalytic units in culture media is among essential steps in the research of artificial cellulosomes. Endoglucanase A (CelA) and exoglucanase S (CelS) are two abundant cellulosomal cellulases secreted by anaerobic thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum* and mostly responsible for the cellulolytic activities. They are the well-known candidates of catalytic units for artificial mini-cellulosome. Their synergistic activities play important roles in cellulolytic degradation. CelA cleaves inside the cellulose chains and produces more chain ends for the next step controlling by CelS. While endoglucanase demonstrates distinct activity on carboxymethyl cellulose, it still lacks the specific substrate for quantifying exoglucanase activity. In this research, we introduced an approach for measuring the synergistic activity for these endo and exoglucanase. We designed two recombinant proteins CelA and CelS secreted by the host-cell *Bacillus subtilis* WB800N in order to investigate their synergistic activity in culture media. The secretory expression was confirmed by tandem mass spectrometry. A modified dinitrosalicylic acid assay was performed on 96 well-plate for quantifying cellulolytic activities of the secreted cellulases in culture media. When adding CelA into CelS, CMCase activities were enhanced and higher than the total of their individual CMCase activities at some cases. When mixing 3 of CelA with 5 of CelS, the CMCase activity was enhanced about 35.5% of the total activities from individual ones. This indicated the synergistic activity of the endo and exoglucanase could degrade cellulose more efficiently than their individual activities. The research also provides the essential materials and methods for further research on designing mini-cellulosome secreted by *B. subtilis*.

Keywords: *Bacillus subtilis* WB800N, *Clostridium thermocellum*, Endoglucanase A, CelA, Exoglucanase S, CelS