

ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ KIM LOẠI VÀ HÓA CHẤT ĐẾN HOẠT TÍNH CỦA ENDOGLUCANASE GH5 ĐƯỢC KHAI THÁC TỪ DỮ LIỆU DNA METAGENOME VI KHUẨN DẠ CỎ ĐÊ

Nguyễn Khánh Hoàng Việt^{1,2}, Hà Thị Thúy Hoa¹, Trương Nam Hải^{1,2}, Đỗ Thị Huyền^{1,2,✉}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: dohuyen@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 12.5.2020

Ngày nhận đăng: 19.6.2020

TÓM TẮT

Gen mã hóa cho endoglucanase GH5 được khai thác từ dữ liệu DNA metagenome vi khuẩn dạ cỏ dê Việt Nam có cấu trúc module, gồm vùng xúc tác cellulase, module Fn3 và module X. Enzyme tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trong *E. coli* và đã được tinh chế. Để nghiên cứu ảnh hưởng của một số ion kim loại và hóa chất đến hoạt tính của enzyme, kết quả dựa trên dự đoán nhanh cấu trúc phân tử của trình tự endoglucanase GH5 bằng Swiss-Prot, ProFunc và COFACTOR cho thấy enzyme có hai gốc amino acid bảo thủ (Asp-190 và Asp-192) liên kết với Mn^{2+} trong khoảng bán kính 3,5 Å từ tâm của ion Mn^{2+} và có chứa một cầu disulphide trong phân tử. Kết quả nghiên cứu thực nghiệm ảnh hưởng của một số ion kim loại (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , K^+ , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}) ở nồng độ cuối cùng là 10 mM và sáu loại hóa chất thường sử dụng là SDS (1%), urea (1 μ M), 2-mercaptoethanol (1 μ M), EDTA (1 μ M), tween 80 (1mM), triton X-100 (1 μ M) lên hoạt tính endoglucanase GH5 cho thấy hoạt tính của enzyme được xác định tăng nhẹ khi sử dụng 10 mM Mn^{2+} và tăng lên 2 lần khi sử dụng 40 mM Mn^{2+} nhưng đều bị giảm khi bổ sung các ion kim loại và hóa chất khác. Mn^{2+} được xác định có thể liên kết đặc thù, làm tăng tính ổn định và hoạt tính của endoglucanase GH5.

Từ khóa: endoglucanase, hóa chất, ion kim loại, ProFunc, Swiss-Prot

MỞ ĐẦU

Hệ sinh thái mini trong dạ cỏ của động vật được xác định là lò phản ứng sinh học tự nhiên có hiệu quả thủy phân cấu trúc carbohydrate rất cao (Codron, Clauss 2010). Từ dữ liệu giải trình tự DNA metagenome vi sinh vật dạ cỏ dê Việt Nam, trình tự mã hóa cho endoglucanase GH5 chứa module Fn3 là cấu trúc mới và duy nhất được lựa chọn để nghiên cứu. Trình tự này có chiều dài 1623 nucleotide, gồm 75 nucleotide đầu 5' mã hóa vùng tín hiệu tiết và 1545 nucleotide (gen *xfn3egc*) mã hóa cho enzyme trưởng thành (Nguyen *et al.*, 2019). Kết quả so sánh độ tương đồng bằng BLASTN và phân loại

bằng phần mềm MEGAN cho thấy trình tự có nguồn gốc từ *Ruminococcus bicirculans*. Khi so sánh trình tự amino acid của enzyme bằng BLASTP trên các trình tự trên ngân hàng NCBI, trình tự này có chứa module Fn3 và vùng hoạt tính cellulase GH5 rõ ràng với độ bao phủ tốt (100%), độ tương đồng cao (60%) so với endoglucanase mã CDC67342.1 của loài vi khuẩn khá phổ biến trong dạ cỏ dê là *Ruminococcus* sp. CAG:57. Sau khi được tối ưu các mã bộ ba để biểu hiện tốt nhất trong *E. coli*, gen được tổng hợp nhân tạo và đưa vào vector pETSUMO bằng enzyme giới hạn (*NcoI* và *XhoI*). Gen được biểu hiện trong chủng *E. coli* BL21 (DE3) trong môi trường LB có bổ sung

Amp, nhiệt độ biểu hiện 25°C, nồng độ chất cảm ứng 0,5 mM IPTG. Protein biểu hiện tốt ở pha tan và thể hiện hoạt tính endoglucanase rõ ràng trên cả cơ chất tan là CMC và cơ chất không tan là giấy lọc (Nguyen *et al.*, 2019). Protein tái tổ hợp được tinh chế thành công (Nguyễn Thị Quý *et al.*, 2020) có độ sạch trên 99% được dùng để nghiên cứu, đánh giá một số ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, các kim loại và hóa chất đến hoạt tính của enzyme.

Hoạt tính của enzyme thường dễ bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường bao gồm các ion kim loại và các chất hóa học. Các ion kim loại có thể kích hoạt hoặc ức chế hoạt động của enzyme bằng cách tương tác với nhóm amin hoặc cacboxyl của các amino acid. Ngân hàng dữ liệu protein (PDB) cho thấy có một phần tư số lượng protein có liên kết với ion kim loại (Lu *et al.*, 2012). Các ion kim loại thường phát hiện liên kết phổ biến với protein như các ion natri, kali, canxi, magiê, sắt, mangan, đồng và kẽm. Một số nghiên cứu cho thấy ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt động của cellulase có nguồn gốc khác nhau thường khác nhau. Một số enzyme họ GH10 thường phải liên kết với các ion kim loại để ổn định cấu trúc và hoạt tính của enzyme. Trong khi, một số enzyme họ GH43 có cấu trúc tinh thể luôn liên kết chặt chẽ với Ca²⁺ (Jordan *et al.*, 2013). Một số ion kim loại còn có vai trò tăng cường sự hoạt động và bảo vệ vùng trung tâm hoạt động của enzyme (Zhang *et al.*, 2015). Bên cạnh đó, một số hóa chất như 2-mercaptoethanol và DTT có khả năng khử liên kết disulfide nên chúng thường ức chế sự hoạt động của các enzyme (Maalej *et al.*, 2009). Các tác nhân chelating như EDTA hoặc DPPE (1,2-bis diphenylphosphino-ethylene) còn có thể kích hoạt một số hoạt động của enzyme, đặc biệt là cellulase, bằng cách ức chế cô lập các ion kim loại từ môi trường phản ứng (Miyano *et al.*, 1985). Khi tác nhân chelating liên kết với kim loại trong môi trường phản ứng, vị trí xúc tác của enzyme sẽ sẵn sàng để phản ứng với cơ chất làm tăng hoạt tính của enzyme. Một số hóa chất khác, như SDS lại can thiệp vào các vùng kỵ nước của enzyme, nó làm thay đổi cấu trúc ba chiều hoặc có thể làm biến tính enzyme. Như

vậy, một số ion kim loại và hóa chất có thể có tác dụng làm tăng hoặc kìm hãm hoạt tính của các enzyme. Trong nghiên cứu này để xác định khả năng liên kết và ảnh hưởng bởi các ion kim loại và hóa chất, chúng tôi dựa trên cấu trúc bậc ba có độ tương đồng cao nhất được ước đoán bằng các chương trình có sẵn và dữ liệu ngân hàng protein (PDB). Bên cạnh đó, nghiên cứu thực nghiệm đánh giá ảnh hưởng của một số kim loại và hóa chất thường dùng đến hoạt tính của endoglucanase GH5 được thực hiện để kiểm chứng. Đánh giá ảnh hưởng của kim loại và hóa chất đến hoạt tính của enzyme có ý nghĩa thực tiễn để nâng cao hiệu quả thủy phân cơ chất hoặc loại bỏ các yếu tố làm giảm hoạt tính của enzyme trong quá trình ứng dụng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Endoglucanase GH5 được biểu hiện từ chủng *E. coli* BL21 mang vector pETSUMO-*xfn3egc* (Nguyen *et al.*, 2019). Enzyme được tinh chế bằng cột sắc ký ái lực HisTrap 5 mL và loại muối bằng cột PD-10 (Amersham Bioscience, Anh) có độ tinh sạch trên 99% được dùng để thử nghiệm đánh giá ảnh hưởng của một số kim loại và hóa chất (Nguyễn Thị Quý *et al.*, 2020). Cơ chất CMC (C9481, Sigma) được dùng cho thí nghiệm xác định hoạt tính endoglucanase. Các hóa chất khác dùng trong thí nghiệm được mua của Merk (Đức) và Thermo Scientific (Hoa Kỳ).

Dự đoán khả năng liên kết với kim loại và hóa chất thông qua khảo sát cấu trúc không gian

Cấu trúc bậc ba của endoglucanase GH5 được ước đoán bằng Swiss-Prot trên web theo đường dẫn <https://swissmodel.expasy.org/interactive>. Các trình tự amino acid của protein truy vấn sẽ được xử lý bằng cách quét đối với CSDL của các trình tự protein và tìm sự tương đồng trong các vùng cấu trúc, từ đó xuất ra kết quả bao gồm ước đoán mức độ tin cậy, hình ảnh và các liên kết đến các mô hình ba chiều dự báo và thông

tin thu được từ một trong hai cấu trúc theo cơ sở dữ liệu protein (Scop) hoặc ngân hàng dữ liệu protein (PDB) tùy thuộc vào nguồn gốc của các mẫu phát hiện. Dựa trên cấu trúc không gian có độ tương đồng cao nhất với endoglucanase GH5, vị trí liên kết của các ion kim loại với enzyme có thể được dự đoán bằng cách lựa chọn mục ligands vào phần tương tác với chuỗi protein (interaction with chain). Các phối tử và ion kim loại liên kết với vị trí nhất định là các amino acid trên cấu trúc của enzyme sẽ được xác định.

Bên cạnh đó, chúng tôi dựa vào chương trình ProFunc được xây dựng sẵn theo đường dẫn <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/ProFunc/> để dự đoán chức năng sinh hóa của endoglucanase GH5 dựa trên các trình amino acid của enzyme được đưa vào (Nguyen *et al.*, 2019). Chương trình này cho phép xác định chức năng sinh hóa của protein thông qua một loạt các phương pháp như so sánh các nếp gấp, vùng bảo tồn, phân tích các khe hở bề mặt của cấu trúc không gian để xác định vị trí hoạt động và khả năng tương đồng với các cấu trúc ngân hàng dữ liệu protein (PDB). Chương trình cho phép dự đoán một cách tương đối một số đặc tính sinh hóa của mô hình cấu trúc protein đưa vào thông qua số lượng và loại các nếp gấp beta, gamma, cấu trúc kẹp tóc, các liên kết disulphide... Đối với enzyme có nhiều liên kết disulphide thường bị ảnh hưởng bởi các hóa chất thuộc nhóm các chất tẩy rửa như SDS, 2-mecaptoethanol...

Cấu trúc 3D của phân tử endoglucanase GH5 được xây dựng bằng công cụ Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015). Phyre2 sử dụng trình tự amino acid của protein để xây dựng mô hình cấu trúc không gian của protein dựa trên bốn giai đoạn phân tích bằng các thuật toán. Trình tự dạng FASTA của enzyme được gửi lên qua server <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>. Công cụ đưa ra dự đoán mô hình cấu trúc bậc 2 và bậc 3 của phân tử, các vùng domain, và chất lượng mô hình.

Cấu trúc không gian của phân tử endoglucanase GH5 thu được từ Phyre2 được

gửi lên server của công cụ COFACTOR để tìm ra chức năng sinh học của phân tử. COFACTOR dựa vào dữ liệu protein trước đó tìm ra vị trí trung tâm hoạt động và các phân tử tương đồng. Các tính chất của enzyme như Gene Ontology, Enzyme Commission và vị trí bám với cơ chất được chỉ ra cùng với các cấu trúc sử dụng làm khuôn.

Xác định ảnh hưởng của ion kim loại và hóa chất

Phản ứng được chuẩn bị gồm có 45 μL endoglucanase trong 5 μL đệm PBS 10x, pH 6,8 và 25 μL CMC 1% pha trong đệm PBS 1x. Mỗi phản ứng bổ sung một trong số các ion loại cần kiểm tra với nồng độ 10 mM (Mn^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , K^{+} , Co^{2+}) hoặc một loại hóa chất là urea (1 μM), EDTA (1 μM), 2-mercaptoethanol (1 μM), triton X-100 (1 μM), SDS (1%) và tween 80 (1 mM). Hỗn hợp sau đó được ủ ở 40°C trong 60 phút. Sau thời gian ủ, hỗn hợp được bổ sung 75 μL chất phản ứng DNS và đun sôi trong 15 phút. Sau đó, bổ sung tiếp 25 μL K-Na-tartrate 40%. Mẫu được đo OD ở bước sóng 540 nm. Lượng đường khử tạo ra được tính dựa vào đường chuẩn về mối quan hệ giữa OD₅₄₀ và nồng độ glucose đã được thiết lập. Mỗi phép thử được lặp lại 3 lần. Hoạt tính endoglucanase (tính theo đơn vị U) là số μmol glucose được giải phóng ra trong mỗi phút ở điều kiện đo như nhiệt độ và pH (Dashtban *et al.*, 2010). Một phản ứng được thực hiện tương tự nhưng không bổ sung thêm ion kim loại hoặc hóa chất vào để so sánh, đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố này đến hoạt tính của enzyme. Đối chứng âm là phản ứng được thực hiện trong cùng điều kiện nhưng có enzyme và cơ chất được ủ riêng rẽ, sau đó được trộn trước khi bổ sung DNS.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

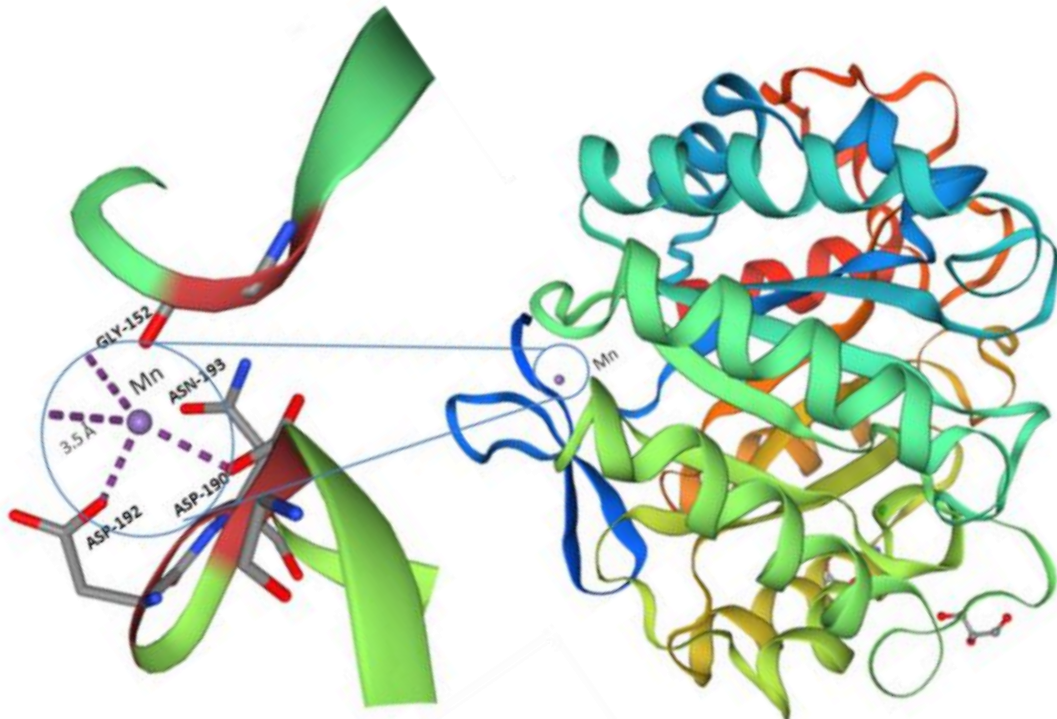
Dự đoán khả năng liên kết với các ion kim loại và hóa chất

Nghiên cứu về cấu trúc không gian bằng Swiss-Port dựa trên trình tự amino acid cho thấy endoglucanase GH5 có cấu trúc tương đồng cao

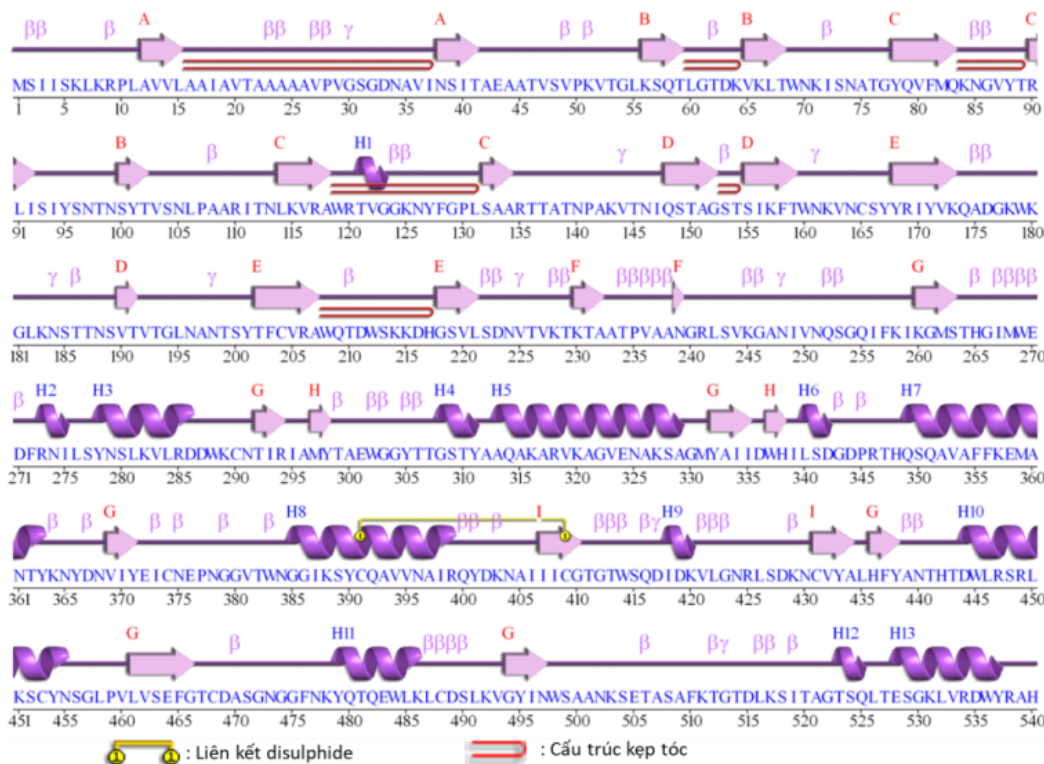
nhất với trình tự endoglucanase (khuôn 3pzt.1.A, độ bao phủ 0,45) có vị trí liên kết của Mn^{2+} trên cấu trúc không gian của endoglucanase GH5. Để xác định vị trí và sự liên kết của ion Mn^{2+} trên phân tử enzyme, nghiên cứu trong mục ligands thể hiện ion này liên kết với enzyme tại vị trí của 2 gốc Asp-190 và Asp-192 trong khoảng bán kính 3,5 Å từ tâm của ion Mn^{2+} (Hình 1). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu về khả năng liên kết của 20 amino acid trong số 1109 chuỗi protein liên kết với ion kim loại cho thấy, một số ion kim loại thường liên kết đặc trưng với các amino acid nhất định trong bán kính 3.5 Å từ tâm của ion kim loại. Trong đó, ion Mn^{2+} được xác định thường chỉ liên kết với Asp, His và Glu (Lu *et al.*, 2012). Do đó, phân tích này thêm khẳng định khả năng liên kết của ion Mn^{2+} với amino acid Asp trên cấu trúc của endoglucanase GH5. Việc liên kết của một ion kim loại trên cấu trúc của enzyme đã được chứng minh có khả năng làm tăng hoạt

tính của enzyme (Jordan *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2015). Bằng phần mềm Phyre2, phân tử endoglucanase GH5 được ước đoán có cấu trúc không gian đặc thù với các xoắn alpha bên ngoài và cấu trúc lõi beta-sheet bên trong tương tự như ước đoán trên Swiss-Prot (Hình 1). Cấu trúc gấp nếp trong lõi của phân tử được dự đoán là vùng trung tâm hoạt động dựa theo các cấu trúc tinh thể của các endoglucanase đã biết trước đó (Fort *et al.*, 2001).

Dựa vào công cụ COFACTOR, các enzyme có độ tương đồng cao với XFN3EGC đã được tìm thấy, trong đó cấu trúc của endo-1,4-beta-glucanase từ *B. subtilis* 168 có tỉ lệ phần trăm tương đồng cao nhất, đặc biệt ở vùng xúc tác. Vùng trung tâm hoạt động có các gốc bảo thủ Glu229 và Glu169 đã được tìm thấy trong cấu trúc XFN3EGC. Trong đó, ion Mn^{2+} cũng được ước đoán liên kết với 2 phân tử H_2O và gốc carboxyl của Asp195 và Asp197 tương tự như ước đoán dựa trên công cụ ProFunc.



Hình 1. Khảo sát vùng bảo thủ trên trình tự endoglucanase GH5 bằng SwissProt và xác định vị trí liên kết với ion kim loại trên cấu trúc bậc ba của enzyme tham chiếu. Mn: Măng gan.



Hình 2. Khảo sát cấu trúc phân tử của endoglucanase GH5 dựa trên các trình tự amino acid bằng ProFunc

	↓	
XFN3EGC	AKSAGMYAIIDWHILSDGDPRTHQSQAVAFFKEMANTYKINYDNVIYEICNEPNGGVTWNG	360
EGC của BS	AKELGIYVIIDWHILNDGNPNQNKKEKAEFFKEMSSLYGNTPNVIYEIANEPNGDVNWKR	178
	* *	
	↓ ↓	
XFN3EGC	GIKSYQAVVNAIRQYDKNAIICGTGTWSQDIDKVLGNRLSDKNCVYALHFYANTHTDW	420
EGC của BS	DIKPYAEVVISVIRKNDPNIIVGTGTWSQDVNDAADDQLKDANVMYALHFYAGTHGQF	238
	* *	
	↓	
XFN3EGC	LRSRLKSCYNSGLPVLVSEFGTCDASGNGGFNKYQTQEWLKLCDLKVGYINWSAANKSE	480
EGC của BS	LRDKANYALSKGAPIFVTEWGTSDASGNGGVFLDQSRWLVKYLDSKTIWVNWNLSDKQE	298
	* *	

Hình 3. Sắp xếp thẳng hàng trình tự XFN3EGC với endoglucanase GH5 từ *Bacillus subtilis* 168. Ba gốc amino acid trên EGC của *B. subtilis* gồm Asp195, Asp197, Asn 198 (vị trí mũi tên liền nhau) là những vị trí có chứa điện tích âm liên kết với ion Mn²⁺. Hai mũi tên còn lại chỉ hai gốc amino acid Glu19 và Glu 257 là trung tâm hoạt động của endoglucanase GH5 ở *B. subtilis*.

Ảnh hưởng của một số ion kim loại đến hoạt tính của endoglucanase GH5

Các ion kim loại, hóa chất có thể ảnh hưởng theo hướng làm tăng cường hoặc kìm hãm hoạt tính của enzyme. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của một số ion kim loại đến hoạt tính của endoglucanase GH5 cho thấy hầu hết các kim

loại đều ảnh hưởng theo hướng kìm hãm hoạt tính của enzyme (Hình 3). Trong đó, ion kim loại Cu²⁺ và Zn²⁺ có ảnh hưởng nhiều nhất đến hoạt tính của enzyme khi hoạt tính chỉ đạt tương ứng là 23,9 và 33,7% so với hoạt tính của enzyme không bổ sung 2 ion kim loại này. Cu²⁺ và Zn²⁺ cũng được đánh giá là những ion kim

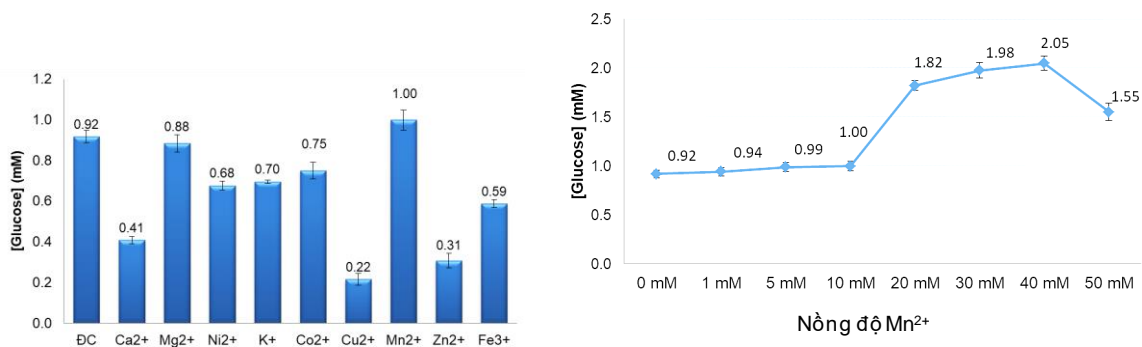
loại thường ức chế hoạt động của các cellulase (Romaniec *et al.*, 1992). Nhiều nghiên cứu cho thấy Co^{2+} có thể làm tăng hoạt tính của endoglucanase lên tới 140% (Pang *et al.*, 2009), 137% (Feng *et al.*, 2007) hoặc 160% (Wang *et al.*, 2012)...Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, Co^{2+} lại làm giảm hoạt tính của endoglucanase GH5 chỉ còn khoảng 80% so với đối chứng là enzyme không bổ sung Co^{2+} .

Các ion kim loại khác như Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} ở nồng độ 10 mM cũng đều làm giảm hoạt tính của enzyme. Kết quả này cũng tương đồng với công trình nghiên cứu về ảnh hưởng của một số ion kim loại đối với endoglucanase của *Li* và cộng sự (Li *et al.*, 2012). Các kim loại K^+ , Cu^{2+} cũng đã được chứng minh làm giảm hoạt tính của endoglucanase khi bổ sung với nồng độ 10 mM (Pol *et al.*, 2012).

Trong nghiên cứu này chỉ có Mn^{2+} làm tăng hoạt tính của enzyme nhưng không đáng kể (108%) ở nồng độ 10 mM. Tuy nhiên khi tăng nồng độ Mn^{2+} lên 20 mM, 30 mM, 40 mM thì hoạt tính tương đối của enzyme cao hơn so với đối chứng tương ứng là 202, 215, 222% (Hình 4). Hoạt tính của enzyme bắt đầu giảm khi bổ sung Mn^{2+} ở nồng độ 50 mM. Do vậy, để tăng hoạt tính của enzyme lên mức cao hơn, phản ứng cần bổ sung thêm từ 20 đến 40 mM Mn^{2+} . Nghiên cứu tương tự đối với endoglucanase GH5 của *Thermobifida halotolerans* YIM 90462 cũng cho thấy việc bổ

sung thêm 5 mM các ion Mn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} làm tăng hoạt tính của enzyme lên từ 27 – 38% (Zhang *et al.*, 2015). Tương tự, nghiên cứu của tác giả Azzeddine và cộng sự cho thấy chỉ sử dụng Mn^{2+} ở nồng độ 5 mM là có hiệu quả làm tăng hoạt tính endoglucanase cao nhất (306,25%) khi thử nghiệm đánh giá ảnh hưởng của một loạt các ion kim loại khác nhau (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , K^+ , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Na^+ , Sr^{2+} , Hg^{2+} , NH_4^+) đến hoạt tính của endoglucanase được sản xuất bởi *Streptomyces* sp. B-PNG23.

Để giải thích nguyên nhân ion Mn^{2+} làm tăng hoạt tính của enzyme, tác giả cho rằng ion này đã phản ứng với vùng amino acid nhất định trong các vị trí hoạt động của protein, gây ra sự thay đổi có lợi về hình dạng làm thúc đẩy hoạt động của enzyme (Bettache *et al.*, 2013). Tác giả khác thì cho rằng sự tác động của ion kim loại có thể làm cầu nối giữa enzyme và cơ chất, làm thay đổi thể oxy hóa - khử, làm bền phân tử. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu về cấu trúc không gian bằng Swiss-Port khi endoglucanase GH5 có cấu trúc tương đồng cao nhất với trình tự endoglucanase (khuôn 3pzt.1.A) có vị trí liên kết của ion Mn^{2+} đặc thù với Asp190 và Asp192 trên cấu trúc không gian. Do đó, enzyme này có thể có vị trí gắn ion Mn^{2+} nên sự có mặt của ion Mn^{2+} trong dung dịch phản ứng đã làm hoạt tính của endoglucanase GH5 trên cơ chất CMC tăng lên rõ rệt.

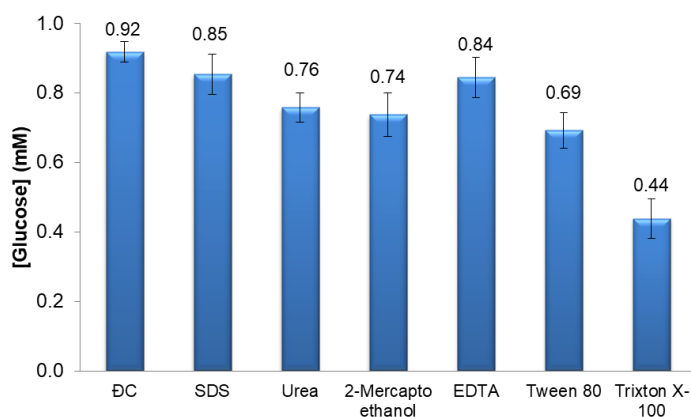


Hình 4. Ảnh hưởng của một số ion kim loại lên hoạt tính của endoglucanase GH5 trên cơ chất CMC.

Ảnh hưởng của một số hóa chất đến hoạt tính của endoglucanase

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của một số hóa chất (urea, 2-mercaptoethanol, EDTA, triton X-100, SDS, tween 80) lên hoạt tính của enzyme cho thấy chúng đều ảnh hưởng theo hướng giảm, làm giảm hoạt tính của endoglucanase GH5 trên cơ chất CMC. Các chất này chủ yếu có bản chất là các chất tẩy rửa nên đã làm thay đổi sức căng bề mặt của dung dịch, có thể dẫn tới ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme. Các dung môi hữu cơ và chất tẩy rửa cũng thường được sử dụng để biến tính protein và hòa tan các cơ chất kị nước trong phản ứng của enzyme. Một số nghiên cứu trước đây đã chỉ ra EDTA và SDS có sự ảnh hưởng ức chế làm giảm hoạt tính của endoglucanase (Feng *et al.*, 2007, Pang *et al.*, 2009). Chất EDTA được cho là chất ức chế đặc trưng của enzyme kim loại, thường được dùng để phân biệt enzyme kim loại và các nhóm enzyme khác. Bên cạnh đó, 2-mercaptoethanol là hợp chất thường được dùng để khử liên kết disulfide mạnh hơn SDS và có thể phản ứng như là một chất chống oxy hóa bằng cách cắt các gốc hydroxyl của các chất khác. Chất này

có thể làm biến tính protein bằng khả năng phân cắt liên kết disulfide. Ở nghiên cứu này, EDTA và SDS đều có ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme nhưng không nhiều khi hoạt tính của enzyme vẫn đạt khoảng 90% so với đối chứng. Trong khi, ure, 2-mercaptoethanol và tween 80 đều làm giảm hoạt tính của enzyme, hoạt tính chỉ đạt lần lượt là 82, 80 và 75% so với đối chứng. Triton X-100 cũng là chất tẩy rửa có bản chất như tween 80 (chất hoạt động bề mặt non-ionic) khác với SDS (chất hoạt động bề mặt anion) lại được xác định có ảnh hưởng nhiều nhất đến hoạt tính của enzyme, sự có mặt của hóa chất này làm cho hoạt tính của enzyme chỉ đạt khoảng 47% so với đối chứng (Hình 5). Kết quả này cũng tương đồng với dự đoán chức năng sinh hóa của enzyme dựa trên chương trình ProFunc khi xác định cấu trúc của enzyme có chứa liên kết disulphide. Các liên kết này thường bị ảnh hưởng mạnh bởi các hóa chất như các chất tẩy rửa (triton X-100, tween 80, SDS) và chất khử liên kết disulfide thường được sử dụng để biến tính protein, điển hình là 2-mercaptoethanol được thử nghiệm trong nghiên cứu này.



Hình 5. Ảnh hưởng của một số hóa chất thường sử dụng lên hoạt tính của endoglucanase trên cơ chất CMC.

KẾT LUẬN

Dựa trên dự đoán nhanh bằng Swiss-Prot và ProFunc cho thấy endoglucanase GH5 được khai thác từ dữ liệu DNA metagenome vi khuẩn dạ cỏ dê được dự đoán có vị trí liên kết với Mn^{2+} tại gốc Asp bảo thủ và có chứa liên kết

disulphide trong phân tử. Kết quả thực nghiệm cho thấy hoạt tính của endoglucanase GH5 chỉ tăng khi bổ sung Mn^{2+} và tăng lên 2 lần khi sử dụng Mn^{2+} ở nồng độ 40 mM.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài thuộc hướng KH&CN ưu

tiên cấp Viện Hàn lâm KH-CNVN (Mã số: VAST02.05/18-19) do PGS. TS. Đỗ Thị Huyền làm chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bettache A, Messis A, Copinet E, Kecha M, Boucherba N, Belhamiche N, Duchiron F, Benallaoua S (2013) Optimization and partial characterization of endoglucanase produced by *Streptomyces* sp. B-PNG23. *Text Directory of Open Access Journals*.
- Codron D, Clauss M (2010) Rumen physiology constrains diet niche: linking digestive physiology and food selection across wild ruminant species. *Can J Zool* 88: 1129–1138.
- Dashtban M, Maki M, Leung KT, Mao C, Qin W (2010) Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Crit Rev Biotechnol* 30: 302–309.
- Feng Y, Duan CJ, Pang H, *et al.*, (2007) Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 319–328.
- Fort S, Varrot A, Schüleim M, Cottaz S, Driguez H, Davies GJ (2001) Mixed-linkage cellooligosaccharides: a new class of glycoside hydrolase inhibitors. *Chembiochem Eur J Chem Biol* 2: 319–325.
- Jordan DB, Lee CC, Wagschal K, Braker JD (2013) Activation of a GH43 β -xylosidase by divalent metal cations: slow binding of divalent metal and high substrate specificity. *Arch Biochem Biophys* 533: 79–87.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*.
- Li CH, Wang HR, Yan TR (2012) Cloning, purification, and characterization of a heat- and alkaline-stable endoglucanase B from *Aspergillus niger* BCRC31494. *Mol Basel Switz* 17: 9774–9789.
- Lu CH, Lin YF, Lin JJ, Yu CS (2012) Prediction of metal ion-binding sites in proteins using the fragment transformation method. *PLoS One* 7: e39252.
- Maalej I, Belhaj I, Masmoudi NF, Belghith H (2009) Highly thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and characterization. *Appl Biochem Biotechnol* 158: 200–212.
- Miyano H, Toyo'oka T, Imai K, Nakajima T (1985) Influences of metal ions on the reaction of amino and imino acids with fluorogenic reagents. *Anal Biochem* 150: 125–130.
- Nguyen K, Nguyen T, Truong N, Do T (2019) Application of bioinformatic tools for prediction of active pH and temperature stability of endoglucanases based on coding sequences from metagenomic DNA data. *Biol Forum - Int J* 11: 14–20.
- Nguyễn Thị Quý, Nguyễn Hồng Dương, Đào Trọng Khoa, Nguyễn Khánh Hoàng Việt, Nguyễn Khánh Hải, Trương Nam Hải, Đỗ Thị Huyền (2020) Lựa chọn điều kiện tinh chế endoglucanase tái tổ hợp có nguồn gốc từ vi khuẩn dạ cỏ dê ở tế bào *Escherichia coli*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 42(1): 73–81.
- Pang H, Zhang P, Duan CJ, Mo XC, Tang JL, Feng JX (2009) Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase. *Curr Microbiol* 58: 404–408.
- Pol D, Laxman RS, Rao M (2012) Purification and biochemical characterization of endoglucanase from *Penicillium pinophilum* MS 20. *Indian J Biochem Biophys* 49: 189–194.
- Romaniec MP, Fauth U, Kobayashi T, Huskisson NS, Barker PJ, Demain AL (1992) Purification and characterization of a new endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. *Biochem J* 283: 69–73.
- Wang G, Zhang X, Wang L, Wang K, Peng F, Wang L (2012) The activity and kinetic properties of cellulases in substrates containing metal ions and acid radicals. *Adv Biol Chem* 2: 390–395.
- Zhang F, Zhang XM, Yin YR, Li WJ (2015) Cloning, expression and characterization of a novel GH5 exo/endoglucanase of *Thermobifida halotolerans* YIM 90462(T) by genome mining. *J Biosci Bioeng* 120: 644–649.

EFFECT OF METAL IONS AND CHEMICAL AGENTS ON THE ACTIVITY OF ENDOGLUCANASE GH5 EXPLOITED FROM GOATS-RUMEN BACTERIAL METAGENOMIC DNA DATA

Nguyen Khanh Hoang Viet^{1,2}, Ha Thi Thuy Hoa¹, Truong Nam Hai^{1,2}, Do Thi Huyen^{1,2}

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

A gene coding for GH5 endoglucanase exploited from metagenomic DNA data of bacteria in Vietnamese goats' rumen was modularly structure including a catalytic module, a fibronectin-3 like module and an X module. The recombinant enzyme was successfully expressed in *E. coli* and purified. To study the effect of some metal ions and chemicals on enzyme activity, in this study, we used some tools including Swiss-Prot, ProFunc, COFACTOR for prediction of enzyme structure and ligands interaction. The obtained results indicated that the most similar structure with enzyme had two conserved residues (Asp-190 và Asp-192) linked with Mn^{2+} within a radius of $\sim 3.5 \text{ \AA}$ from the center of ion Mn^{2+} and enzyme molecule contained a disulphide bond. Experimental results for assessment of the effect of some metal ions (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , K^+ , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}) at the final concentration of 10 mM and of six common chemicals including SDS (1%), urea (1 μ M), 2-mercaptoethanol (1 μ M), EDTA (1 μ M), tween 80 (1mM), triton X-100 (1 μ M) showed that only Mn^{2+} increased enzyme activity slightly at concentration of 10 mM and two times at the concentration of 40 mM Mn^{2+} . The Mn^{2+} has been identified as a specific binding agent may increase the stability and activity of endoglucanase GH5.

Keywords: *endoglucanase, chemicals, metal ions, ProFunc, Swiss-Prot*