

TINH SẠCH VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG THỦY PHÂN ARABINOXYLAN CỦA XYLANASE TỰ NHIÊN VÀ TÁI TỔ HỢP

Đỗ Thị Tuyên^{1,2,✉}, Nguyễn Thu Ngân³, Đào Thị Mai Anh³, Nguyễn Thị Hồng Nhung¹

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

³Trường Đại học Dược Hà Nội

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

Ngày nhận bài: 06.7.2020

Ngày nhận đăng: 23.9.2020

TÓM TẮT

Hệ enzyme thủy phân arabinoxylan rất phong phú và đa dạng, trong đó là endo-1,4- β -xylanase là nhóm enzyme quan trọng nhất, tác động ngẫu nhiên vào mạch chính của khung xylan và giải phóng ra các arabinoxylan oligosacaride như các loại đường D-xylose, xylobiose, L-arabinose, xylotetraose, xylopentose. Nhóm enzyme này dễ dàng được sản xuất từ các chủng vi sinh vật tự nhiên như vi khuẩn, nấm men, nấm sợi và cũng được nghiên cứu sử dụng công nghệ tái tổ hợp để chuyển gene vào các vật chủ thích hợp nhằm chủ động về chủng giống. Trong bài báo này, chúng tôi tiến hành tinh sạch xylanase tự nhiên và tái tổ hợp để so sánh sự khác nhau về sản phẩm thủy phân giữa enzyme tự nhiên và tái tổ hợp. Qua hai bước tinh sạch bằng cột sắc ký lọc gel sephadex G-100 và cột sắc ký trao đổi ion DEAE-sephadex, chúng tôi đã đã tinh sạch được xylanase tự nhiên từ chủng *Aspergillus niger* DSM1957 có khối lượng phân tử khoảng 25 kDa, hoạt tính riêng đạt 3240 IU/mg, độ sạch tăng so với enzyme thô ban đầu là 1,68 lần, với hiệu suất thu hồi 36%. Xylanase tái tổ hợp từ chủng *Pichia pastoris* GS115/pPXlnA được tinh sạch qua cột sắc ký ái lực ProbondTM có khối lượng phân tử khoảng 36 kDa, hoạt tính riêng đạt 423,11 IU/mg protein, độ sạch tăng so với enzyme thô ban đầu là 3,2 lần, với hiệu suất thu hồi 21,1%. Xylanase tự nhiên thương mại có khả năng thủy phân ra đường L- arabinose tốt hơn enzyme tự nhiên và tái tổ hợp. Xylanase tự nhiên thủy phân arabinoxylan hãng Megazyme ra đường L- arabinose trong đệm sodium acetate 50 mM, pH 5,0. Từ các số liệu thu được cho thấy, xylanase tinh sạch từ các nguồn khác nhau rất ổn định, có tính đặc hiệu cao với cơ chất xylan. Xylanase có tiềm năng ứng dụng tạo các sản phẩm công nghệ sinh học chất lượng cao.

Từ khóa: *Aspergillus niger* DSM1957, DEAE-sephadex, *Pichia pastoris* GS115/pPXlnA, sephadex G-100, xylanase

MỞ ĐẦU

Arabinoxylan (AX) là một nhóm hemicellulose được tìm thấy nhiều trong thành tế bào và nội nhũ của hạt ngũ cốc. Chúng là các polysaccharide không tinh bột, có đặc tính nhớt, giữ nước và được coi là một loại chất xơ giá trị dinh dưỡng cao (Correia *et al.* 2011). Không chỉ vậy, AX cũng có nhiều tác dụng sinh học quan trọng như kích thích hệ miễn dịch, loại bỏ các gốc tự do hay làm giảm nồng độ glucose máu (Kellow and Walker 2018; Mendis and Simsek 2014), khiến cho nhóm polysaccharide này trở thành một nguồn nguyên liệu tiềm năng trong lĩnh vực y dược. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng các AX có khối lượng phân tử nhỏ có hoạt tính sinh học và tiềm năng ứng dụng cao hơn nhiều so với các AX có khối lượng phân tử lớn (Méndez-Encinas *et al.* 2018; Mendis and Simsek

2014). Do đó người ta tìm cách thủy phân AX để tạo các sản phẩm có giá trị kinh tế và giá trị sử dụng cao hơn so với polysaccharide thô. Có nhiều phương pháp khác nhau được sử dụng để thủy phân hoàn toàn xylan. Trong đó, sử dụng kiềm mạnh hoặc acid mạnh là những biện pháp phổ biến bởi hiệu quả thủy phân cao và giá thành rẻ. Tuy nhiên việc sử dụng hóa chất trong công nghiệp đang ngày càng làm cho vấn đề ô nhiễm môi trường gia tăng, đòi hỏi các nhà khoa học phải tìm tòi, nghiên cứu ra phương pháp thủy phân polysaccharide nói chung và arabinoxylan nói riêng bằng enzyme sinh học.

Hệ enzyme thủy phân AX rất phong phú và đa dạng, trong đó là endo-1,4- β -xylanase (EC 3.2.1.8) là nhóm enzyme quan trọng nhất, tác động ngẫu nhiên vào mạch chính của khung xylan và giải phóng

ra các arabinoxylan oligosacaride như các loại đường xylose, xylobiose, arabinose (Basit *et al.* 2018; Kellow and Walker 2018). Nhóm enzyme này dễ dàng được sản xuất từ các chủng vi sinh vật tự nhiên như vi khuẩn, nấm men, nấm sợi và cũng được nghiên cứu sử dụng công nghệ tái tổ hợp để chuyển gen vào các vật chủ thích hợp nhằm tăng hiệu quả và chủ động trong sản xuất (Bhardwaj *et al.* 2019; Guo *et al.* 2009 ; Nguyễn Thị Thương Thương 2010).

Năm 2014, để tinh sạch xylanase từ chủng *Bacillus pumilus*, Kapilan và cs đã sử dụng phương pháp tủa muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kết hợp với sắc kí trao đổi ion DEAE-Sepharose. Xylanase từ *Aspergillus niger* DFR-5 được tinh sạch bằng tủa muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30-65%), cột sắc kí sephadex G-100 và cột sắc kí trao đổi ion (DEAE-cellulose). Enzyme tinh sạch có khối lượng phân tử 32 kDa, hoạt tính riêng đạt 1399,14 IU/mg với hiệu suất thu hồi 38,9% và độ tinh sạch gấp đến 36,97 lần so với dịch enzyme thô (Pal and Khanum 2011). Năm 2014, khi tinh sạch XylA từ *Aspergillus oryzae* biểu hiện trên *Pichia pastoris*, Kirikyali và cs đã sử dụng phương pháp ly tâm, lấy phần dịch nổi và tủa bằng Sartorius Sartocoon Slide, sau đó qua màng lọc với 10x đệm Tris (10 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,5). Phần tủa thu được được ổn định trong sucrose 30%, bảo quản dài hạn ở -20°C và phải được loại sucrose trước khi tiến hành các phản ứng enzyme. Trong khi đó, XylA từ *Bacillus licheniformis* 9945A được tinh sạch bằng phương pháp tủa muối amonium sulfat ở các nồng độ khác nhau, hòa tan tủa trong đệm citrat phosphat, thẩm tích và tinh sạch bằng cột sắc kí Protino® Ni-TED (Zafar *et al.* 2015). β -xylanase tái tổ hợp từ chủng *Thermotoga naphthophila* cũng được tinh sạch bằng phương pháp tương tự sau khi đã được xử lý nhiệt trong các khoảng thời gian khác nhau (30 phút, 60 phút, 90 phút và 120 phút) (Hamid and Aftab 2019). Trong bài báo này, chúng tôi đã thành công trong việc nghiên cứu tinh sạch hai loại xylanase, đồng thời đánh giá khả năng thủy phân cơ chất arabinoxylan thành những sản phẩm đường đơn như D- xylose.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng giống

Chủng nấm *A. niger* DSM1957 sinh tổng hợp xylanase được cung cấp từ Trung tâm Bảo tàng Chủng chuẩn DSMZ (Đức). Sinh tổng hợp enzyme xylanase của chủng nấm này tốt nhất sau 72 giờ nuôi cấy. Nhiệt độ và pH môi trường là 30°C , pH 7,0.

Chủng *P. pastoris* GS115/pPXlnA tái tổ hợp được cung cấp bởi Phòng Công nghệ sinh học Enzyme, Viện Công nghệ sinh học. Chủng được tạo ra bằng cách sử dụng đoạn gen mã hóa sinh tổng hợp endo-1,4-beta-xylanase A (xlnA) thuộc họ GH 10 từ *A. niger* DMS1957 có kích thước 978 bp mã hóa cho 326 acid amin. Sản phẩm sau khi khuếch đại PCR được đưa vào vector pJET1.2/blunt, sau đó sử dụng enzyme cắt giới hạn *EcoRI* và *XbaI* và cấp môi đặc hiệu để đưa gen vào vector pPICZaA tạo ra plasmid tái tổ hợp pPXlnA. Plasmid sau đó được biến nạp vào *P. pastoris* GS115 tạo chủng tái tổ hợp *P. pastoris* GS115/pPXlnA.

Nuôi cấy vi sinh vật sinh tổng hợp enzyme xylanase

Chủng nấm *A. niger* DSM1957 sinh tổng hợp xylanase được hoạt hóa, nhân giống trong môi trường Czapek nhiệt độ 30°C , lắc 200 vòng/phút sau 72 giờ. Sau đó được nuôi trong môi trường tối ưu: 2% bột đậu tương, 5% lõi ngô ở 30°C , lắc 200 vòng/phút, 72 giờ.

Chủng tái tổ hợp *P. pastoris* GS115/pPXlnA sinh tổng hợp xylanase được hoạt hóa, nhân giống trong môi trường YP thêm 1% glycerol ở nhiệt độ 30°C , lắc 180 vòng/phút sau 16 giờ. Sau đó được nuôi trong môi trường YP cảm ứng methanol 0,5% mỗi 24 giờ, lắc 180 vòng/phút.

Định lượng xylanase

Hoạt tính xylanase được định lượng theo phương pháp quang phổ theo Miller (1959). Dịch enzyme phản ứng với cơ chất xylan trong đệm potassium phosphat 20 mM, ở trong điều kiện pH, nhiệt độ thích hợp và khoảng thời gian phản ứng là 5 phút. Hàm lượng đường khử giải phóng ra được định lượng bằng phản ứng với DNS và đo quang phổ bước sóng 540 nm. Một đơn vị hoạt độ xylanase là lượng enzyme phân giải cơ chất xylan thành đường khử tương đương 1 μmol xylose trong một phút ở điều kiện nhất định.

Tinh sạch xylanase tự nhiên

Dịch enzyme thô (dịch lên men) sau khi được ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch nổi và đưa dịch nổi lên cột sắc kí lọc gel (Duong-Ly and Gabelli 2014). Kích thước cột là 0,6 x 26 cm, được cân bằng với đệm potassium phosphate 50 mM, pH 7,5. Tốc độ dòng chảy khoảng 24 mL/h. Thu thể tích mỗi phân đoạn 1,5 mL. Các phân đoạn thu được sau khi qua cột sephadex G-100, được tiến hành kiểm tra hoạt độ enzyme xylanase. Các phân đoạn có hoạt

tính cao được gom lại và đưa lên cột sắc kí trao đổi ion DEAE-sephadex (Cummins *et al.* 2017). Cột có kích thước 0,6 x 26 cm được cân bằng với đệm 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 chứa 50 mM NaCl. Tốc độ dòng chảy khoảng 24 mL/h. Các phân đoạn chứa protein không gắn cột được đẩy bằng đệm 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 chứa NaCl nồng độ 50 mM. Sau đó các phân đoạn chứa protein gắn cột được đẩy bằng đệm 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 chứa NaCl nồng độ 1 M. Thu thể tích mỗi phân đoạn 1,5 mL. Hàm lượng protein và hoạt tính enzyme được xác định trong mỗi phân đoạn.

Tinh sạch xylanase tái tổ hợp

Dịch nuôi cấy sau khi được ly tâm lạnh trong 10000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ cặn tế bào sẽ được đi qua cột Probond™ (Invitrogen). Cột tinh sạch có thể tích 10 mL được cho 2 mL hạt resin vào, resin lắng xuống nhờ trọng lực và hút nhẹ dịch nổi ra. Cột Ni²⁺ được rửa 2 lần với nước khử ion và đệm gắn cột (NBB) pH 8,0. Sau đó hút 8 mL dịch nổi lên cột, đặt lên máy lắc rung nhẹ để các hạt resin luôn giữ ở trạng thái lơ lửng trong dịch protein 60-90 phút để xylanase gắn vào hạt resin. Tiếp theo, các hạt resin được để lắng và loại bỏ dịch trong cột. Cột được rửa 4 lần với đệm rửa (NWB) pH 8,0. Protein gắn cột được đẩy ra bằng dung dịch đẩy (NEB) pH 8,0 với 5 phân đoạn, mỗi phân đoạn 1,5 mL. Hàm lượng protein và số đơn vị hoạt tính enzyme được xác định trong mỗi phân đoạn.

Xác định hàm lượng protein và điện di SDS-PAGE

Gel polyacrylamid được sử dụng để điện di protein với nồng độ 12,5% theo phương pháp điện di biến tính của Laemmli (1970). Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp Bradford (1976).

Thủy phân arabinoxylan bằng xylanase

Sử dụng cùng số đơn vị hoạt độ (khoảng 1 U cho 1 mg mẫu arabinoxylan) của mỗi loại xylanase để thủy phân. Thủy phân arabinoxylan trong 24 giờ ở 55°C, trong đệm CH₃COONa 50 mM, pH 5,0. Dịch mẫu sau khi thủy phân được bất hoạt enzyme ở 100°C trong 10 phút. Đánh giá khả năng thủy phân 3 mẫu enzyme: xylanase tự nhiên tinh sạch, xylanase tái tổ hợp tinh sạch, xylanase tự nhiên thương mại (Novozyme). Sử dụng phương pháp sắc kí lớp mỏng để phân tách các mẫu sau thủy phân với hệ dung môi pha động n-butanol : acid acetic : H₂O = 3 : 1 : 1 (Rose and Inglett 2011).

Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Sắc ký bản mỏng (TLC) là một kỹ thuật phân tách rắn-lỏng. Bản mỏng là pha cố định, gồm một lớp gel mỏng (thường là silicagel) dày khoảng 0,1-0,2 mm tráng trên bề mặt kính hoặc nhôm và hệ dung môi là pha động được lựa chọn để phân tách các chất chấm trên bản gel (Santiago and Strobel 2013). Các vết phân tách các chất trên bản sắc ký được hiển thị bằng dung dịch H₂SO₄ 20%, sau đó sấy bản mỏng ở 100°C cho đến khi hiện vết hoàn toàn. Mẫu được chạy sắc kí song song với chất chuẩn là D-xylose và L-arabinose được mua từ hãng Megazyme.

Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm MS Excel 2016. Các giá trị được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$ (\bar{X} là giá trị trung bình, SD là độ lệch chuẩn).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

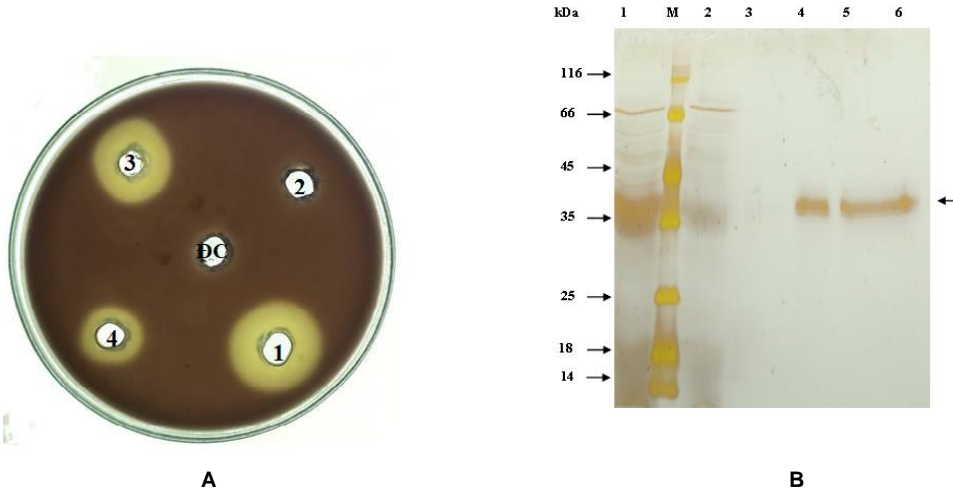
Tinh sạch xylanase tái tổ hợp

Chủng *P. pastoris* GS115/pPXlnA được nuôi với lượng 25 mL trong bình nón 100 mL, thu hoạch sau 120 giờ cảm ứng bằng 0,5% methanol mỗi 24 giờ. Dịch nuôi được ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ tế bào để thu dịch enzyme thô. Dịch nổi sau khi ly tâm được đưa lên cột sắc kí ái lực Probond™. Do plasmid tái tổ hợp pPXlnA đã được gắn thêm 6 amino acid histidine nên protein tạo ra sẽ được tích hợp với một trình tự gồm 6 His-tag. Trình tự His-tag này sẽ giúp protein tái tổ hợp kết bám đặc hiệu vào Nikel gắn trên hạt resin trong cột sắc kí. Kết quả là protein tái tổ hợp được giữ lại trong khi các protein khác sẽ bị loại bỏ khỏi cột bởi dịch rửa (NWB) chứa imidazol 20 mM. Sau khi đã rửa sạch các protein liên kết không đặc hiệu với cột, xylanase tái tổ hợp được đẩy ra bằng dung dịch đệm rửa chứa imidazol 250 mM. Sau tinh sạch thu được 5 phân đoạn, mỗi phân đoạn 1,5 mL. Các phân đoạn sau tinh sạch được thử hoạt tính trên đĩa thạch xylan 0,5% (Hình 1A).

Các phân đoạn sau tinh sạch có hoạt tính cao nhất (phân đoạn 1-3) được kiểm tra trên bản điện di SDS-PAGE. Các phân đoạn tinh sạch chỉ có một băng protein đồng nhất trên điện di đồ (Hình 1B) và có kích thước khoảng 36 kDa. Độ sạch của các băng khi kiểm tra bằng phần mềm Dolphin 1D đều đạt trên 99% (không dẫn hình). Dịch nổi *P. pastoris* GS115/pPXlnA (giống 1) cũng có băng protein với

kích thước 36 kDa và nhiều băng protein khác nữa của tế bào *P. pastoris* GS115. Dịch qua rửa cột lần 4 (giếng 3) không còn xuất hiện băng protein nào chứng tỏ các protein không đặc hiệu đã bị rửa hết ra khỏi cột, đồng thời không có protein tái tổ hợp cần

tinh sạch bị rửa khỏi cột bởi dịch rửa nồng độ imidazole thấp. Như vậy, sau khi đưa dịch nổi lên cột sắc kí ái lực ProBond™, chúng tôi đã tinh sạch được một protein duy nhất có hoạt tính xylanase với kích thước khoảng 36 kDa.



Hình 1. Định tính xylanase tái tổ hợp trên đĩa thạch xylan (A); ĐC: đối chứng; 1: Dịch nổi (R-r: 16 mm); 2: Dịch rửa lần 4 (R-r: 0 mm); 3: Phân đoạn 1 (R-r: 12 mm); 4: Phân đoạn 2 (R-r: 6 mm). Điện di đồ SDS-PAGE xylanase tái tổ hợp qua cột ProBond™ (B) (1: Dịch nổi; M: Marker; 2: Dịch qua cột; 3: Dịch rửa lần 4; giếng 4, 5, 6: Dịch tinh sạch phân đoạn 1, 2, 3).

Bảng 1. Bảng tóm tắt kết quả tinh sạch của xylanase tái tổ hợp.

Mẫu	Hoạt tính tổng (IU)	Protein tổng (mg)	Hoạt tính riêng (IU/mg)	Độ sạch (lần)	Hiệu suất thu hồi (%)
Dịch nổi	114,25 ± 2,04	0,86 ± 0,03	132,39 ± 2,36	1,0	100,0
Dịch tinh sạch	24,12 ± 1,22	0,06 ± 0,00	423,11 ± 10,72	3,2	21,1

Tóm tắt kết quả tinh sạch xylanase tái tổ hợp (Bảng 1) cho thấy hoạt tính riêng của dịch tinh sạch ở mức trung bình, đạt 423,1 IU/mg protein với hiệu suất thu hồi đạt 21,1% và độ sạch là 3,2 lần so với dịch nổi. Zafar và cs (2015) tinh sạch XylA từ *B. licheniformis* 9945A biểu hiện trong *E. coli* với độ sạch lên đến 57,58 lần, hiệu suất thu hồi đạt 70,08%. Hamid và Aftab (2019) tinh sạch β-xylanase Tnap_0700 tái tổ hợp từ *Thermotoga naphthophila* với độ sạch đạt 57,91 lần, hiệu suất 65,98%. Tại Việt Nam, Nguyễn Thị Kim Thu (2020) tinh sạch *A. niger* VTCC017/pANXlnG2 chỉ đạt độ sạch 2,2 lần nhưng hiệu suất thu hồi lên tới 52,6%. Có thể thấy, so với kết quả tinh sạch xylanase tái tổ hợp của các tác giả khác thì độ tinh sạch và hiệu suất thu hồi của chúng tôi khá thấp. Về khối lượng phân tử của enzyme, đoạn gen được sử dụng để nhân dòng được lấy từ *A. niger* DSM 1957 sẽ mã hóa cho endo-1,4-β-xylanase có 327 amino acid với khối lượng phân tử dự đoán

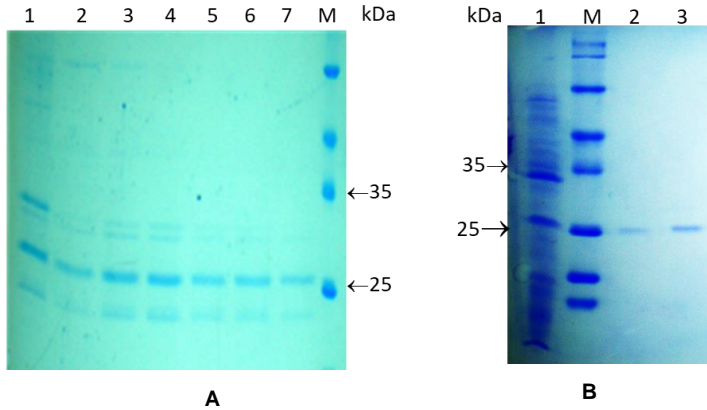
khoảng 35,5 kDa. Do đó protein tái tổ hợp được tạo ra cũng có kích thước khoảng 35,5 kDa. Kết quả của chúng tôi sau khi tinh sạch thu được một băng protein có khối lượng phân tử khoảng 36 kDa trên điện di đồ, hoàn toàn phù hợp với khối lượng phân tử tính toán theo lý thuyết

Tinh sạch enzyme tự nhiên

Với mục đích so sánh khả năng thủy phân arabinoxylan của enzyme tự nhiên và tái tổ hợp với các chất chuẩn là D- xylose và L- arabinose, chúng tôi tiến hành tinh sạch xylanase tự nhiên từ chủng *A. niger* DSM1957 là chủng gốc tự nhiên dùng để nhân dòng gene mã hóa enzyme xylanase A và biểu hiện trong *P. pastoris* GS115. Bằng phương pháp sắc ký lọc gel kết hợp với sắc ký trao đổi ion. Những phân đoạn qua cột sephadex G100 có hoạt tính cao được đưa lên cột sắc kí trao đổi ion DEAE-sephadex.

Protein được phân tách thành 1 đỉnh rõ rệt trên sắc ký đồ sephadex G100 (không dẫn hình). Hoạt tính xylanase đặc hiệu của phân đoạn đạt 2237 IU/mg protein. Protein thu được trên điện di SDS-PAGE có 2 băng đậm ở ~25 kDa và <25 kDa (Hình 2A). Các phân đoạn trên cột sephadex G100 có hoạt tính cao đưa lên cột sắc ký trao đổi ion DEAE. Sản phẩm trên

điện di đồ SDS-PAGE cho thấy, xylanase tinh sạch có khối lượng ~25 kDa (Hình 2B). Từ những số liệu thu được cho thấy sau hai lần tinh sạch qua cột sắc ký lọc gel và sắc ký trao đổi ion, enzyme xylanase thu được có hoạt tính đặc hiệu đạt 3240 IU/mg protein với độ sạch 1,68 lần so với dịch enzyme thô ban đầu, hiệu suất thu hồi 36 % (Bảng 2).



Hình 2. (A) Điện di đồ SDS-PAGE của *A. niger DSM1957* sau khi qua cột sephadex G100 (giếng 1: dịch nổi; giếng 2-7: các phân đoạn 2,3,4,5,6,7 qua cột G100; M: Marker); (B) Mẫu enzyme sạch sau khi qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE-sephadex (giếng 1: dịch nổi; giếng 2-3: các phân đoạn sau khi qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE-sephadex; M: Marker)

Bảng 2. Tóm tắt kết quả tinh sạch xylanase từ *A. niger DSM1957*.

Các bước tinh sạch	Protein tổng số (mg/ml)	Hoạt tính xylanase (IU/ml)	Hoạt tính xylanase (IU/mg)	Hiệu suất thu hồi (%)	Độ tinh sạch (lần)
Dịch nổi	0,07	134,9	1927,1		
Sắc ký qua cột sephadex G100	0,045	100,7	2237,7	74	1,16
Sắc ký trao đổi ion DEAE-sephadex	0,015	48,6	3240	36	1,68

So với các nghiên cứu khác, đây là một kết quả rất khả quan. Kapilan (2014) tinh sạch xylanase từ *B. pumilus* chỉ thu được dịch có hoạt tính riêng là 223,7 IU/mg protein (Kapilan 2014); Hoàng Thu Huyền và đồng tác giả (2019) thu được dịch tinh sạch từ chủng *A. oryzae* có hoạt tính cao (128,6 IU/mL) nhưng hoạt tính riêng chỉ đạt 1286 IU/mg protein; xylanase từ *A. niger DFR-5* được tinh sạch bởi Pal và cs (2011) thu được hoạt tính riêng 1399,14 IU/mg protein. Một điểm đáng chú ý là tất cả các nghiên cứu này đều có độ sạch cao hơn nhiều so với kết quả của chúng tôi, độ sạch từ 3,91-36,97 lần trong khi độ sạch của chúng tôi chỉ đạt 1,68 lần. Mặc dù vậy, hiệu suất thu hồi enzyme của chúng tôi tương đối cao so với các nghiên cứu khác đạt 36%. Kết quả điện di đồ cho thấy xylanase sau khi tinh sạch được có khối lượng phân tử khoảng 25 kDa, phù hợp với khối lượng phân tử của các xylanase từ chủng *Aspergillus* được nghiên cứu trước đây (21-39 kDa) (Hoàng Thu

Huyền *et al.*, 2019; Nguyễn Thị Kim Thu, 2020; Subramanian and Prema 2002).

Đánh giá khả năng thủy phân arabinoxylan

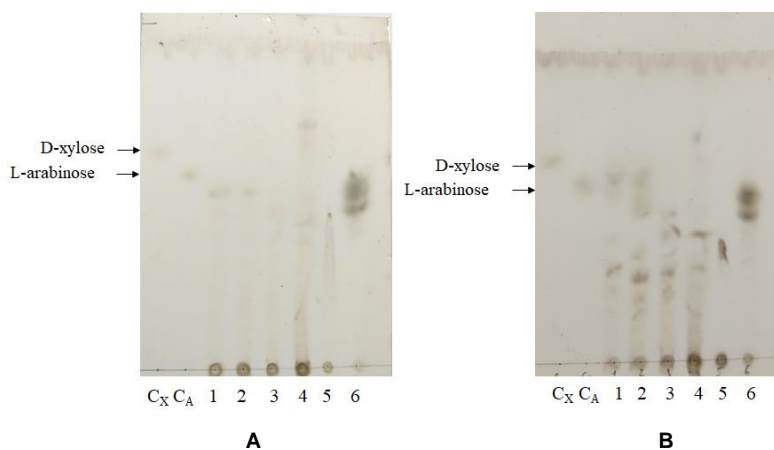
Sau khi tinh sạch xylanase tự nhiên và tái tổ hợp có cùng khối lượng phân tử khoảng tương ứng là 25 kDa và 36 kDa, chúng tôi bước đầu đánh giá khả năng thủy phân cơ chất arabinoxylan của các mẫu enzyme này. Thí nghiệm sử dụng hai loại arabinoxylan: AX thương mại (Immunobran) được cung cấp từ Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội và AX chuẩn từ hãng Megazyme.

Đối với thủy phân AX thương mại trong đệm natri acetat 50 mM, pH 5, các dịch enzyme tự nhiên (1-3) không có khả năng thủy phân ra các đường đơn D-xylose và L-arabinose. Dịch enzyme tái tổ hợp (4-5) cũng không có khả năng này, trong khi dịch

enzyme tự nhiên thương mại (6) lại có thể thủy phân AX thương mại ra L-arabinose ($R_{fA} = 0,54$; $R_{f6} = 0,52$). Đối với AX hãng (Megazyme) trong đệm natri acetat 50 mM, pH 5, các đường chạy sắc kí rõ nét hơn. Các dịch enzyme tự nhiên (1-2) cũng không thể thủy phân ra D-xylose nhưng lại có thể cắt nhánh để tạo L-arabinose ($R_{fA} = R_{f1,2} = 0,61$) trong khi các dịch enzyme tái tổ hợp (4-5) không thể thủy phân cơ chất hãng ra loại đường đơn nào. Cuối cùng enzyme tự nhiên thương mại (6) có thể thủy phân ra một vết gần tương đương với L-arabinose ($R_{f6} = 0,55$). Có thể nhận thấy rõ ràng trên sắc kí đồ vẫn hiện các vết tách biệt, chứng tỏ các enzyme này vẫn có khả năng thủy phân thành các sản phẩm khác, tuy nhiên chưa có chất chuẩn để đối chiếu.

AX và các sản phẩm thủy phân của nó có nhiều tác dụng sinh học quan trọng và có thể trở thành

nguồn nguyên liệu tiềm năng trong lĩnh vực chăm sóc sức khỏe. Chính vì vậy, nghiên cứu khả năng thủy phân cơ chất này bằng enzyme sinh học là vô cùng cần thiết. Tuy nhiên với mỗi mẫu chất khác nhau, cần phải tối ưu hệ dung môi để khả năng phân tách các chất là tốt nhất. Ngoài ra, để đánh giá khả năng thủy phân arabinoxylan từ cám gạo, Ngô Thị Huyền Trang (2012) còn sử dụng xylose-kit và arabinan-kit của Megazyme để định lượng lượng các đường trong dịch sau thủy, từ đó xác định chính xác hơn các sản phẩm được tạo thành. Một số nghiên cứu khác thì sử dụng sắc kí hiệu năng cao HPLC để phân tích tất cả các thành phần của dịch sau khi thủy phân (Sørensen *et al.* 2007). Các phương pháp này tuy hiện đại hơn và có độ chính xác cao hơn nhưng giá thành không rẻ và không sẵn có trong tất cả các phòng nghiên cứu.



Hình 3. Sắc ký bản mỏng thủy phân arabinoxylan thương mại (A) và arabinoxylan hãng Megazyme (B) trong đệm CH_3COONa 50 mM, pH 5,0 của xylanase tự nhiên và enzyme tái tổ hợp (Cx: D-xylose chuẩn; Ca: L-arabinose chuẩn; 1-3: Dịch xylanase tự nhiên thô (1), tinh sạch qua cột Sephadex (2), tinh sạch qua cột DEAE (3); 4-5: Dịch xylanase tái tổ hợp thô (4), tinh sạch qua cột Probond™ (5); 6: Xylanase tự nhiên thương mại)

KẾT LUẬN

Qua hai bước tinh sạch bằng cột sắc ký lọc gel sephadex G-100 và cột sắc ký trao đổi ion DEAE-sephadex, chúng tôi đã tinh sạch được xylanase tự nhiên từ chủng *A. niger* DSM1957 có khối lượng phân tử khoảng 25 kDa, hoạt tính riêng là 3240 IU/mL, độ sạch tăng so với enzyme thô ban đầu là 1,68 lần, với hiệu suất thu hồi 36%. Xylanase tái tổ hợp từ chủng *P. pastoris* GS115/pPXlnA được tinh sạch qua cột sắc ký ái lực Probond™. Kết quả thu được enzyme có khối lượng phân tử khoảng 36 kDa, hoạt tính riêng là 423,11 IU/mg protein, độ sạch tăng so với enzyme thô ban đầu là 3,2 lần, với hiệu suất thu hồi 21,1%. Xylanase tự nhiên thương mại có khả năng thủy phân ra đường arabinose tốt hơn enzyme tự nhiên và tái tổ hợp ở mọi điều kiện thủy phân. Xylanase tự nhiên thủy phân arabinoxylan hãng Megazyme ra đường L- arabinose trong môi trường

natri acetat pH 5,0 và xylanase tái tổ hợp thủy phân cả hai loại arabinoxylan ra đường D-xylose.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ kinh phí của Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (Nafosted): “Tạo chủng *Aspergillus niger* tái tổ hợp sinh tổng hợp enzyme xylanase hoạt tính cao định hướng ứng dụng làm thực phẩm chức năng”, mã số 106.02-2018.347.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Basit A, Liu J, Rahim K, Jiang W, Lou H (2018) Thermophilic xylanases: from bench to bottle. *Crit Rev Biotechnol* 38(7):989-1002
- Bhardwaj N, Kumar B, Verma P (2019) A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing* 6(1):40

- Correia MAS, Mazumder K, Brás JLA, Firbank SJ, Zhu Y, Lewis RJ, York WS, Fontes CMGA, Gilbert HJ (2011) Structure and function of an arabinoxylan-specific xylanase. *J Biol Chem* 286(25):22510-22520
- Cummins PM, Rochfort KD, O'Connor BF (2017) Ion-exchange chromatography: basic principles and application. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 1485:209-223
- Duong-Ly KC, Gabelli SB (2014) Gel filtration chromatography (size exclusion chromatography) of proteins. *Methods in enzymology* 541:105-14
- Guo B, Chen XL, Caiyun S, Cheng Z, Zhang YZ (2009) Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo-1,4-xylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:1107-15
- Hamid A, Aftab MN (2019) Cloning, Purification, and characterization of recombinant thermostable β -xylanase tnap_0700 from *Thermotoga naphthophila*. *Appl Biochem Biotechnol* 189(4):1274-1290
- Hoàng Thu Huyền, Nguyễn Thị Kim Thu, Lê Thanh Hoàng, Đào Thị Mai Anh, Đỗ Thị Tuyên (2019) Nghiên cứu tinh sạch xylanase tự nhiên từ chủng *Aspergillus oryzae* VTCC-F187. *Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc*:50-54
- Kapilan R (2014) Purification of xylanase produced by *Bacillus pumilus*. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 42:365-368
- Kellow NJ, Walker KZ (2018) Authorised EU health claim for arabinoxylan. In: *Sadler MJ (ed) Foods, Nutrients and Food Ingredients with Authorised EU Health Claims. Woodhead Publishing, 201-218*
- Méndez-Encinas M, Carvajal-Millan E, Rascon A, García H, Valencia D (2018) Ferulated arabinoxylans and their gels: functional properties and potential application as antioxidant and anticancer agent. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*:1-22
- Mendis M, Simsek S (2014) Arabinoxylans and human health. *Food Hydrocolloids* 42:239-243
- Nguyễn Thị Kim Thu (2020) Nghiên cứu tinh sạch và đánh giá tính chất của xylanase từ chủng *Aspergillus niger* tái tổ hợp. *Luận văn Thạc sỹ, Đại học Khoa học Tự nhiên-Đại học Quốc gia Hà Nội*
- Nguyễn Thị Thương Thương (2010) Nghiên cứu đặc tính enzyme xylanase của nấm mốc *Aspergillus niger*, tách dòng và biểu hiện gene mã hóa xylanase trên *Escherichia coli* BL21. *Luận văn Thạc sỹ Đại học Bách Khoa Hà Nội*
- Pal A, Khanum F (2011) Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. *Process Biochemistry - process biochem* 46:879-887
- Rose D, Inglett G (2011) A method for the determination of soluble arabinoxylan released from insoluble substrates by xylanases. *Food Analytical Methods* 4:66-72
- Santiago M, Strobel S (2013) Thin layer chromatography. *Methods in enzymology* 533:303-24
- Sørensen HR, Pedersen S, Jørgensen CT, Meyer ABS (2007) Enzymatic hydrolysis of wheat arabinoxylan by a recombinant "minimal" enzyme cocktail containing beta-xylosidase and novel endo-1,4-beta-xylanase and alpha-L-arabinofuranosidase activities. *Biotechnology Progress* 23(1):100-107
- Subramaniam S, Prema P (2002) Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit Rev Biotechnol* 22(1):33-64
- Zafar A, Aftab MN, Din ZU, Aftab S, Iqbal I, Shahid A, Tahir A, Haq IU (2015) Cloning, expression, and purification of xylanase Gene from *Bacillus licheniformis* for use in saccharification of plant biomass. *Appl Biochem Biotechnol* 178(2):294-311

PURIFICATION OF WILD TYPE AND RECOMBINANT XYLANASES AND EVALUATION OF THEIR ARABINOXYLAN HYDROLYSIS ABILITY

Do Thi Tuyen^{1,2}, Nguyen Thu Ngan³, Dao Thi Mai Anh³, Nguyen Thi Hong Nhung¹

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

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

³Hanoi University of Pharmacy

SUMMARY

Arabinoxylan hydrolyzing enzymes are very rich and diversified groups, among these, endo-1,4- β -xylanase is the most important group which catalyzes the cleavage of xylan main skeleton to release arabinoxylan oligosaccharides such as D-xylose, xylobiose, L-arabinose, xylotetraose, xylopentose. This group of enzyme was efficiently produced from natural microorganism including bacteria, yeast and fungi and

recombinant strains. In this study, we have purified wild-type and recombinant xylanase to compare the difference in hydrolysis products of these two enzymes. Using sephadex G-100 and DEAE-sephadex column chromatography, we have purified xylanase from wild-type *Aspergillus niger* DSM1957 with molecular weight of 25 kDa, specific activity of 3240 IU/mL, the purity increases 1.68 folds compare to crude extract, and a recovery rate of 36%. The recombinant enzyme from *Pichia pastoris* GS115/pPXlnA was purified by Probond™ affinity chromatography column, with a molecular weight of 36 kDa; the purity increased 3.2 folds than the crude extract, and with the recovery efficiency of 21.1%. The activity of commercial wild-type xylanase was better than that of our recombinant and wild-type enzymes. Our wild-type xylanase could hydrolyze arabinoxylan into L-arabinose in 50 mM CH₃COONa pH 5.0. Our results showed that xylanases purified from different sources were stable and highly specific to xylan. Xylanase has potential application in the production of high quality biotechnological products.

Keywords: *Aspergillus niger* DSM1957, DEAE-sephadex, *Pichia pastoris* GS115/pPXlnA Sephadex G-100, xylanase