

BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA ENDO-1,4- β -XYLANASE CHỊU NHIỆT, HOẠT ĐỘNG TRONG MÔI TRƯỜNG AXIT NHẪM ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT THỨC ĂN CHĂN NUÔI

Đặng Thị Kim Anh¹, Thân Thị Hương¹, Nguyễn Thanh Thủy¹, Đặng Tất Thành¹,
Vũ Nguyên Thành^{1*}, Lisbeth Cecilia Olsson²

¹Trung tâm Vi sinh vật Công nghiệp, Viện Công nghiệp Thực Phẩm, ²Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology, Gothenburg, Sweden

Email*: thanh@firi.ac.vn

Ngày gửi bài: 09.10.2015

Ngày chấp nhận: 17.03.2016

TÓM TẮT

Xylanase là chất phụ gia thức ăn chăn nuôi được sử dụng rộng rãi nhằm giảm độ nhớt, cải thiện khả năng tiêu hóa của vật nuôi. Tính bền nhiệt và khả năng hoạt động ở pH thấp là những yếu tố quan trọng quyết định chất lượng của xylanase ứng dụng trong chăn nuôi. Những đặc tính này giúp xylanase chịu được quá trình ép viên ở nhiệt độ cao và hoạt động tốt trong dịch dạ dày động vật. Trong nghiên cứu này, để tạo xylanase tái tổ hợp, đoạn gen có độ dài 636 nucleotide mã hóa endo-1,4- β -xylanase dựa trên trình tự FJ212324 (Xyl11B) của *Bispora* sp. MEY-1 được tối ưu hóa codon và tổng hợp hóa học. Gen tổng hợp sau đó được chuyển vào genome của *Pichia pastoris* X33 và biểu hiện ngoại bào sử dụng vector pPICZ α A. Hoạt lực xylanase của chủng tái tổ hợp sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường khoáng với methanol là nguồn carbon duy nhất đạt 96 IU.ml⁻¹. Endo-1,4- β -xylanase sau tinh sạch có kích thước 30 kDa, hoạt động ở pH thấp và tối ưu ở 65°C, pH 3,0. Enzyme tái tổ hợp khá bền nhiệt và duy trì 90% hoạt tính sau khi xử lý ở 70°C trong 20 phút. Enzyme bền với pepsin, một protease chính trong dịch tiêu hóa của dạ dày. Xylanase tái tổ hợp bị ức chế bởi sự có mặt của SDS, ion Mn²⁺ và Cu²⁺. Với mức độ biểu hiện xylanase ngoại bào cao, đáp ứng các tiêu chí của enzyme chăn nuôi, chủng *P. pastoris* X33 tái tổ hợp được đánh giá có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất.

Từ khóa: Bền nhiệt, chăn nuôi, chịu axit, enzyme, *Pichia pastoris*, tái tổ hợp, xylanase.

Expression of Synthetic Gene Encoding Acidic, Thermostable Endo-1,4- β -Xylanase for Application in Feed Industry

ABSTRACT

Xylanase is widely used as feed additive to reduce viscosity and to improve digestibility. Thermostability and activity at low pH of feed grade xylanase are important characteristics that allow it to withstand pelleting process at high temperature and to remain active in acidic environment of animal stomach. This study was aimed at producing recombinant xylanase for application in feed industry. The GenBank sequence FJ212324 of 636 nucleotides encoding endo-1,4- β -xylanase Xyl11B from *Bispora* sp. MEY-1 was optimized for codon usage in *Pichia pastoris* and synthesized by GenScript. The synthetic sequence was inserted to pPICZ α A and transformed into *P. pastoris* X33 for heterologous extracellular enzyme production. Recombinant *P. pastoris* X33 strain showed xylanase activity of 96 IU.ml⁻¹ after 10 days of cultivation using flask culture in mineral medium with methanol as sole carbon source. The purified enzyme had a molecular weight of 30 kDa. Endo-1,4- β -xylanase was most active at 65°C and pH 3.0. It was thermostable and retained 90% of activity after 20 min of incubation at 70°C. Recombinant enzyme retained more than 90% activity at a wide range of pH from 1 to 8.5. The enzyme was resistant to the proteolytic activity of pepsin. The enzyme activity was inhibited by the presence of SDS. Metal ions, such as Mn²⁺, Cu²⁺ negatively affected the enzyme activity. Endo-1,4- β -xylanase obtained met the important requirements for feed grade enzyme. With high level of extracellular enzyme production. The recombinant *P. pastoris* strain could be a potential candidate for industrial application.

Keywords: Acidic, enzyme, feed, xylanase, *Pichia pastoris*, recombinant, thermostable.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Endo-1,4- β -xylanase (EC 3.2.1.8) là enzyme thuộc họ glycoside hydrolase 11, phân cắt các liên kết glycosidic bên trong mạch chính của phức hợp xylan, thành phần quan trọng của hemicellulose có nhiều trong thức ăn của vật nuôi (Octavio and Francisco, 2006; Quyền Đình Thi và Đỗ Thị Tuyên, 2015). Xylanase thường được bổ sung vào thức ăn làm giảm độ nhớt, giúp cho vật nuôi tiêu hóa và hấp thụ chất dinh dưỡng tốt hơn, cải thiện hệ vi sinh vật đường ruột theo hướng có lợi, đồng thời làm giảm lượng phân thải ra gây ô nhiễm môi trường (Roberfroid, 1997; Vázquez *et al.*, 2000).

Enzyme ứng dụng trong thức ăn chăn nuôi đòi hỏi phải có những đặc tính phù hợp với điều kiện sản xuất như có hoạt tính cao, chịu nhiệt độ cao của quá trình ép viên, hoạt động tốt trong môi trường axit của dịch dạ dày. Nhiều enzyme từ nấm mốc được coi là có tiềm năng ứng dụng trong chăn nuôi. Tuy nhiên, việc sử dụng các chủng tự nhiên trong sản xuất enzyme gặp một số khó khăn như lượng enzyme tạo ra thấp và có thể chứa các thành phần không mong muốn, tế bào nấm sợi dễ bị đứt gãy khi khuấy đảo, sinh khối có thể gây tắc đường ống... (Kanwar and Sunita, 2012). Sản xuất enzyme tái tổ hợp sử dụng hệ biểu hiện *Pichia pastoris* được coi là lựa chọn thích hợp do mức độ biểu hiện cao, chủng tái tổ hợp ổn định về di truyền mà không cần duy trì bằng kháng sinh, thành phần môi trường nuôi cấy rẻ tiền, sinh sản dạng đơn bào và phù hợp với lên men công nghiệp (Sue *et al.*, 2005; Krainer *et al.*, 2012).

Nấm mốc ưa axit *Bispora* sp. MEY-1, được phân lập từ nguồn nước thải chứa axit của mỏ quặng uranium, có khả năng sinh tổng hợp các enzyme thủy phân lignocellulose hoạt động ở pH thấp như: mannanase (Luo *et al.*, 2009c), xylanase (Luo *et al.*, 2009a, b, c; Luo *et al.*, 2010a), galactosidase (Wang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010), glucanase (Luo *et al.*, 2010b), glucoamylase (Hua *et al.*, 2014)... Xylanase từ *Bispora* sp. MEY-1 được quan tâm đặc biệt do tính bền nhiệt cao cũng như khả năng hoạt động trong môi trường axit (Luo *et al.*, 2009a,

b). Trong đó, hai gen *Xyl10C*, *Xyl11B* (mã số GenBank tương ứng là FJ492963 và FJ212324) mã hóa endo-1,4- β -xylanase đã được Luo và CS nghiên cứu tách dòng và biểu hiện trên *P. pastoris* GS115. Với mục đích tạo chủng tái tổ hợp sinh xylanase đáp ứng được đầy đủ các yêu cầu trong sản xuất thức ăn chăn nuôi, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tổng hợp gen *Xyl11B* dựa trên trình tự FJ212324, biểu hiện trên *P. pastoris* X33 và xác định đặc tính enzyme tái tổ hợp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Tạo chủng tái tổ hợp

Đoạn gen có độ dài 636 nucleotide mã hóa endo-1,4- β -xylanase dựa trên trình tự FJ212324 được tối ưu hóa codon, tổng hợp hóa học và đưa vào plamid pUC79 sử dụng dịch vụ tổng hợp ADN của GenScript (Mỹ). Đoạn mã hóa enzyme thành thực của *Xyl11B* được khuếch đại từ pUC79/*Xyl11B* bằng PCR sử dụng cặp mồi X11B-Mature-F (5'-GAAGCTGAATTCGCCCTACATCAGTTC-3') và X11B-R (5'-TTTGTCTCTAGATTAATTAGA-3') đã được bổ sung các trình tự nhận biết của enzyme giới hạn *EcoRI* và *XbaI* (phân gach chân). Để đảm bảo giảm thiểu các lỗi có thể gặp trong PCR, enzyme PhusionHigh-Fidelity DNA polymerase (Thermo, Mỹ) được sử dụng. Phản ứng PCR được thực hiện bao gồm các thành phần: 5 ng ADN khuôn là vector pUC79/*Xyl11B*, 10 pmol mồi X11B-Mature-F và X11B-R, 200 μ M dNTPs, 1 IU enzyme trong đệm Phusion High-Fidelity DNA polymerase với chế độ nhiệt: 98°C trong 30 giây; 25 chu kỳ phản ứng (98°C: 10 giây; 52°C: 10 giây; 72°C: 30 giây); 72°C trong 10 phút trên thiết bị C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Mỹ). Sản phẩm PCR được xử lý bằng enzyme giới hạn *EcoRI*, *XbaI* (Thermo, Mỹ) và tinh chế bằng Kit GeneJET Gel extraction (Thermo, Mỹ) và gắn vào vector pPICZaA (Invitrogen, Mỹ) đã được mở vòng bằng các enzyme tương ứng. Hỗn hợp phản ứng ghép nối sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5a (Invitrogen, Mỹ) bằng phương pháp sốc nhiệt (Sambrook *et al.*, 1989).

Tế bào *E. coli* DH5 α mang vector pPICZ α A/Xyl11B được nuôi cấy lắc trong 10 ml LB low salt-zeocin (0,5% yeast extract, 0,5% NaCl, 1% tryptone, 250 μ g zeocin) trên ống Falcon 50 ml ở 37°C. Sau 16 giờ, tế bào được thu nhận và tách chiết plasmid bằng kit GeneGET Plasmid Miniprep (Thermo, Mỹ). Vector pPICZ α A/Xyl11B sau đó được mở vòng bằng enzyme giới hạn *MssI* (Thermo, Mỹ), tinh chế và chuyển vào hệ gen của nấm men *P. pastoris* X33 (Invitrogen, Mỹ) bằng biến nạp xung điện (Cregg, 2007). Các thể biến nạp được tinh sạch trên đĩa YPDS-zeocin (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 2% agar, 100 μ g.ml⁻¹ zeocin) và sàng lọc trên vi đĩa 24 giếng với môi trường BMMY (1% yeast extract, 2% peptone, 1,34% Yeast Nitrogen Base (HiMedia, Ấn Độ), 40 ppm Biotin, 100 mM K-phosphate pH 6,0, 1% methanol). Sau 96 giờ biểu hiện, dịch enzyme được thu hồi và xác định hoạt tính xylanase.

2.2. Lên men, thu hồi và tinh sạch endo-1,4- β -xylanase tái tổ hợp

Dòng *P. pastoris* X33 tái tổ hợp sinh xylanase cao nhất được nuôi cấy tăng sinh trong 200ml môi trường khoáng 2MM (1% glycerol, 1,7% KH₂PO₄, 0,2% MgSO₄.7H₂O, 1,5% (NH₄)₂SO₄, 100 mM K-phosphate pH 6,0, 0,2% PTM4 (0,2% CuSO₄.5H₂O, 0,008% NaI, 0,3% MnSO₄.H₂O, 0,0148% (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 0,002% H₃BO₃, 0,05% CoCl₂, 0,7% ZnCl₂, 2,2% FeSO₄.H₂O, 0,02% Biotin, 0,1% H₂SO₄)) trong bình tam giác 1 lít ở 28°C với tốc độ lắc 150 vòng phút⁻¹. Cứ sau 24 giờ, 4 ml môi trường tiếp dưỡng (2 ml methanol 50% và 0,6% PTM4, 2 ml đệm 1,75 M K-phosphate pH 6,0) được bổ sung vào môi trường lên men. Sau 10 ngày biểu hiện, dịch enzyme thô được thu nhận bằng cách ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng phút⁻¹ trong 10 phút để loại bỏ sinh khối nấm men.

Dịch enzyme thô được cô lại bằng phương pháp lọc tiếp tuyến VivaFlow 200 (Sartorius, Đức) với màng lọc 5 kDa NMWCO ở 4°C với tốc độ lọc khoảng 100 ml giờ⁻¹. Nhằm loại muối và các thành phần có phân tử lượng nhỏ từ môi trường nuôi cấy, dịch sau khi cô tới 10⁻¹ thể tích

được bổ sung đệm 20 mM Na-Acetate pH 5,0 và tiếp tục lọc cho tới khi nồng độ muối gốc theo tính toán giảm được 100 lần.

Enzyme sau khi lọc tiếp tuyến được bổ sung (NH₄)₂SO₄ tới nồng độ 1,25 M sau đó tinh sạch bằng sắc ký tương tác kỵ nước trên hệ thống sắc ký AKTA Purifier (GE, Thụy Điển). Dịch enzyme thô được đưa vào cột đường kính 1 cm chứa 10 ml Butyl Sepharose HP (GE, Thụy Điển) và rửa dải bằng gradient (NH₄)₂SO₄ với nồng độ giảm từ 1,25 M tới 0 M. Quá trình rửa dải được theo dõi bằng các thông số: độ protein (OD_{280nm}), độ dẫn điện (mS cm⁻¹), hoạt tính xylanase (IU ml⁻¹). Các phân đoạn chứa hoạt tính xylanase cao nhất được dồn lại để nghiên cứu xác định đặc tính enzyme.

2.3. Xác định đặc tính của xylanase tái tổ hợp

2.3.1. Hoạt tính enzyme

Hoạt tính xylanase được xác định theo phương pháp của Miller (1959). Phản ứng thủy phân được thực hiện ở 65°C trong 10 phút sử dụng cơ chất xylan (X0627-Sigma) trong đệm 50 mM Na-citrate-phosphate pH 2,6. Lượng đường khử giải phóng được xác định bằng thuốc thử axit 3,5-dinitrosalicylic (Merck, Đức) và đo ở bước sóng 540 nm. Một đơn vị hoạt tính xylanase (IU) được tính bằng lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μ mol đường khử tương đương của xylose trong 1 phút ở điều kiện thử.

2.3.2. Phân tích zymogram

Phân tích zymogram được thực hiện tương tự như 12% SDS-PAGE (Laemmli, 1970), với thành phần gel chứa 2% xylan và mẫu không xử lý nhiệt trước khi nạp. Sau khi điện di, gel được ngâm trong 100 ml 2% Triton X-100 trong 30 phút có lắc và lặp lại 2 lần. Sau đó, gel được ngâm trong 100 ml đệm 100 mM citrate-phosphate pH 2,6 trong 15 phút, có lắc và lặp lại 2 lần. Để thực hiện phản ứng, gel được ngâm trong 100 ml đệm 100 mM citrate-phosphate pH 2,6 và ủ ở 50°C trong 30 phút. Để hiển thị, gel được nhuộm trong 100 ml dung dịch Congo red 0,1% ở 50°C trong 1 giờ sau đó rửa 2 lần bằng 200 ml NaCl 1M, mỗi lần 15 phút.

2.3.3. Nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt

Để xác định nhiệt độ tối ưu của enzyme, phản ứng với cơ chất được thực hiện ở pH 2,6 trong thời gian 10 phút với các nhiệt độ khác nhau sử dụng thiết bị nhiệt Thermomixer Comfort (Eppendorf, Đức). Hoạt tính tương đối của enzyme ở các nhiệt độ khác được tính theo hoạt tính ở nhiệt độ tối ưu. Để kiểm tra độ bền nhiệt, enzyme được pha loãng về nồng độ xấp xỉ $1,5 \text{ IU ml}^{-1}$ sau đó ủ ở các nhiệt độ khác nhau trong 20 phút và hồi tính ở 4°C trong 24 giờ. Hoạt tính còn lại của enzyme được xác định ở 65°C , pH 2,6. Độ bền nhiệt của enzyme được thể hiện qua hoạt tính tương đối so với hoạt tính của mẫu đối chứng không qua xử lý nhiệt (ủ ở 4°C).

2.3.4. pH tối ưu và độ bền ở các pH khác nhau

Để xác định pH tối ưu, enzyme và cơ chất xylan 1% được đưa về các pH khác nhau sử dụng hệ đệm tương ứng (pH 1,0-2,0, đệm 0,1 M KCl-HCl; pH 2,6-8,0 đệm 0,1 M citrate-phosphate; pH 8,5-10,0, đệm 0,1 M Glycine-NaOH) và xác định hoạt tính ở 65°C trong thời gian 10 phút. Hoạt tính tương đối của enzyme ở các pH khác nhau được tính theo hoạt tính ở pH tối ưu. Để xác định ảnh hưởng của pH đến độ bền, enzyme nồng độ cao (80 IU ml^{-1}) được pha vào các đệm với các pH khác nhau như đã nêu

trên sau đó ủ ở 4°C trong 60 phút. Enzyme sau đó được chỉnh về pH tối ưu bằng cách pha loãng bằng đệm tương ứng và chuẩn độ pH. Hoạt tính còn lại được xác định ở 65°C trong 10 phút. Đối chứng là mẫu enzyme được ủ tại pH tối ưu. Hoạt tính tương đối của enzyme được tính dựa theo hoạt tính còn lại của mẫu đối chứng.

2.3.5. Ảnh hưởng của ion kim loại, SDS, EDTA và β -mercaptoethanol

Ảnh hưởng của ion kim loại, SDS, EDTA và β -mercaptoethanol được xác định bằng việc bổ sung các thành phần trên vào dung dịch phản ứng và kiểm tra hoạt tính enzyme ở 65°C , pH 2,6 trong 10 phút. Ion kim loại từ các loại muối sau được sử dụng: Cu^{2+} (CuSO_4); Ni^{2+} (NiCl_2); Ca^{2+} (CaCl_2); K^+ (KCl); Mn^{2+} (MnCl_2); Mg^{2+} (MgSO_4). Hoạt tính tương đối của enzyme được tính theo hoạt tính của mẫu đối chứng không bổ sung các yếu tố khảo sát.

2.3.6. Tác động của pepsin

Enzyme tái tổ hợp được xử lý bằng 10 IU ml^{-1} pepsin (#P7125, Sigma, Mỹ) trong dung dịch 0,1 N HCl ở 37°C trong 30 phút. Mức độ phân hủy của enzyme được xác định bằng SDS-PAGE. Để phục vụ đối chứng, BSA (Bovine Serum Albumin, Merck) cũng được xử lý bằng pepsin trong cùng điều kiện.

Bảng 1. Ảnh hưởng của ion kim loại, SDS, EDTA và β -mercaptoethanol tới hoạt tính của enzyme endo-1,4- β -xylanase Xyl11B tái tổ hợp

Chất hóa học	Hoạt tính tương đối (%)		
	2 mM	5 mM	10 mM
Cu^{2+}	111	95	62
Ni^{2+}	100	102	100
Ca^{2+}	81	94	96
K^+	98	113	111
Mn^{2+}	46	42	38
Mg^{2+}	92	97	99
SDS	9	7	8
EDTA	82	82	88
β -mercaptoethanol	99	101	98

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu hóa codon gen mã hóa endo-1,4- β -xylanase

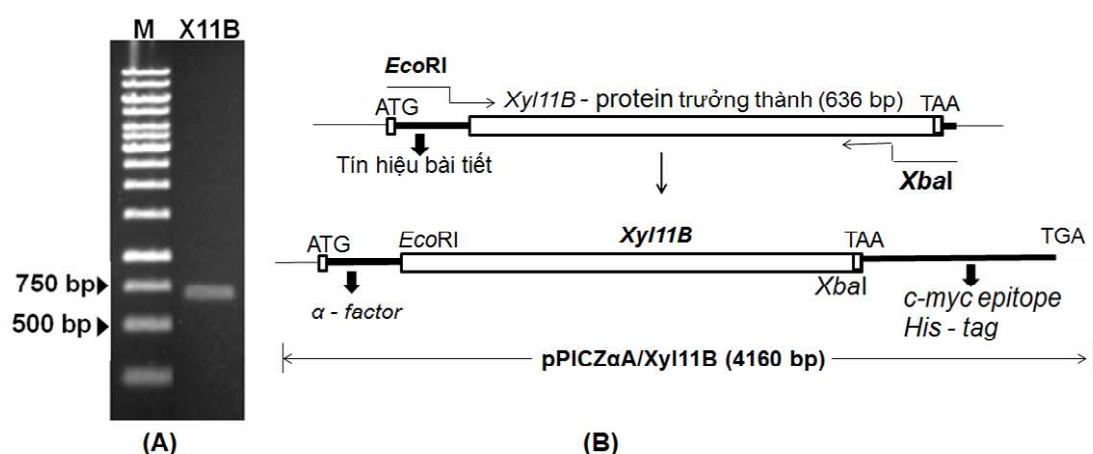
Pichia pastoris là hệ thống biểu hiện được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu và sản xuất enzyme tái tổ hợp. Mức độ biểu hiện của gen ngoại lai phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó có hàm lượng G + C trong gen, tần suất sử dụng của codon và đặc biệt là sự có mặt của các codon hiếm có thể dẫn đến lỗi dịch mã ở *P. pastoris* (Sinclair and Choy, 2002). Khác với phương thức tách dòng bằng PCR, việc tổng hợp gen cho phép tối ưu hóa trình tự cho phù hợp nhất với vật chủ dự kiến trước khi tổng hợp và chuyển vào vật chủ mới.

Dựa trên trình tự gen FJ212324 mã hóa endo-1,4- β -xylanase từ nấm mốc *Bispora* sp. MEY-1, gen *Xyl11B* được tối ưu hóa codon bằng các thuật toán của GenScript. Trình tự gen sau khi tối ưu có 30,5% thay đổi so với gen gốc chứa 693 nucleotide. Sự thay đổi khá lớn này, tuy nhiên không dẫn tới thay đổi trong trình tự axit amin. Hệ số CAI (Codon Adaptation Index) tăng từ 0,64 thành 0,83 (dự kiến CAI từ 0,8 đến 1,0 cho mức biểu hiện tốt). Hàm lượng G + C giảm xuống còn 44,7% thấp hơn 6,8% so với trình tự gốc. Gen *Xyl11B* cải biến được tổng hợp và đưa vào pUC79 sử dụng dịch vụ của GenScript.

3.2. Chuyển gen mã hóa endo-1,4- β -xylanase *Xyl11B* vào *P. pastoris*

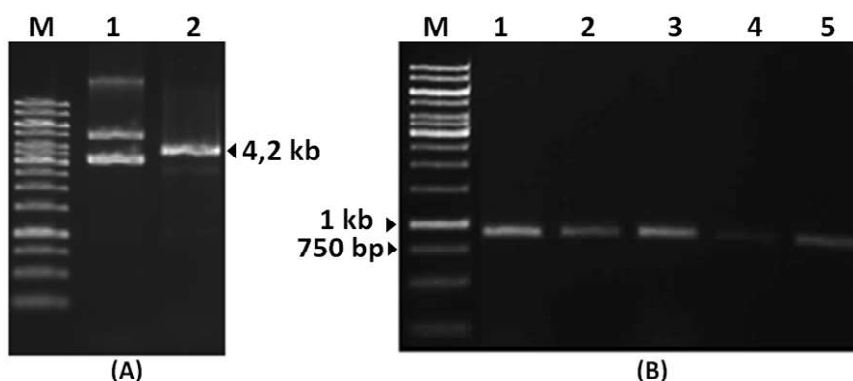
Xyl11B mã hóa 211 axit amin (aa) của enzyme trưởng thành và 19 aa của peptide tín hiệu bài tiết. Do tín hiệu bài tiết gốc (từ *Bispora* sp. MEY-1) có thể không hoạt động tốt trên *P. pastoris*, đoạn tín hiệu này được loại bỏ và peptide tín hiệu α -factor của pPICZ α A được sử dụng. Cặp mồi X11B-Mature-F, X11B-R được thiết kế để khuếch đại đoạn gen mã hóa enzyme *Xyl11B* trưởng thành. Mã kết thúc TAA được đưa vào *Xyl11B*, do vậy sản phẩm biểu hiện sẽ không chứa phần c-myc và His-tag từ pPICZ α A và giảm thiểu được yếu tố ngoại lai của enzyme tái tổ hợp (Hình 1-B).

Sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi X11B-Mature-F, X11B-R cho một băng ADN duy nhất (Hình 1-A, giếng M11B) có kích thước khớp với tính toán (636 bp). Sản phẩm PCR được gắn vào vector biểu hiện pPICZ α A thông qua hai vị trí cắt giới hạn *Eco*RI, *Xba*I và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Vector pPICZ α A mang gen sàng lọc kháng zeocin nên sản phẩm biến nạp có thể phát triển trên môi trường LB zeocin. Khuẩn lạc dương tính pPICZ α A/M11B được nuôi cấy, tách chiết plasmid làm vật liệu chuyển gen vào *P. pastoris* X33. Vector biểu hiện pPICZ α A/M11B được mở vòng bởi enzyme giới hạn *Mss*I và biến nạp vào *P. pastoris* X33 bằng xung điện (Hình



Hình 1. Chèn gen *Xyl11B* vào vector biểu hiện pPICZ α A

Ghi chú: (A) X11B-Sản phẩm PCR với mồi X11B-Mature-F, X11B-R và ADN khuôn là pUC79/Xyl11B; M: Thang ADN 1 kb (Thermo). (B) Sơ đồ tách dòng gen *Xyl11B*.



Hình 2. Biến nạp pPICZαA/M11B vào *P. pastoris* X33

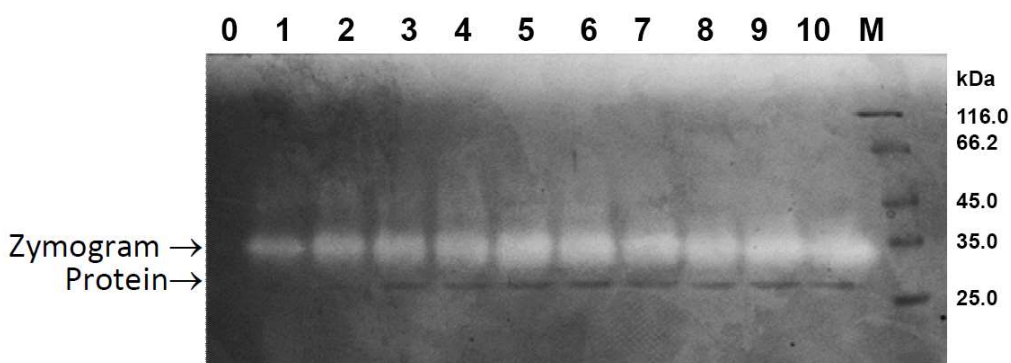
Ghi chú: (A) 1-pPICZαA/M11B; 2-pPICZαA/M11B mở vòng bằng MssI. (B) 1 đến 5-sản phẩm kiểm tra các thể biến nạp *P. pastoris* X33 bằng PCR sử dụng cặp mồi α-factor, 3'-AOX (Invitrogen); M:Thang ADN 1 kb.

2-A, giếng 2). Sau 3 ngày nuôi cấy ở 28°C, nhiều khuẩn lạc màu trắng sữa xuất hiện trên đĩa thạch YPDSzeocin. Các khuẩn lạc được lựa chọn ngẫu nhiên và kiểm tra sự có mặt của gen đưa vào bằng PCR. Kết quả cho thấy, các thể biến nạp X33.M11B.1, 2, 3, 4, 5 đều xuất hiện băng ADN có tương ứng với kích thước tính toán (876 bp, bao gồm 636 bp của gen *Xyl11B* và 240 bp vùng bám môi trên vector pPICZαA) (Hình 2-B, giếng 1-5). Như vậy, gen *Xyl11B* đã được cài vào genome của *P. pastoris* X33.

3.3. Biểu hiện và tinh sạch endo-1,4-β-xylanase *Xyl11B* tái tổ hợp

Các thể biến nạp khác nhau được sàng lọc trên vi đĩa 24 giếng với môi trường biểu hiện

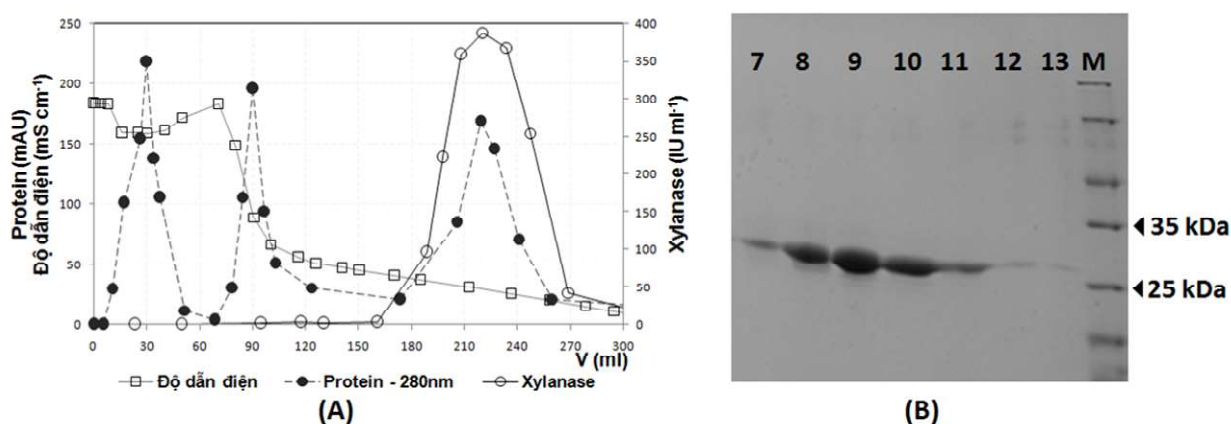
BMMY. Kết quả phân tích hoạt tính xylanase cho thấy, hầu hết các dòng tái tổ hợp đều sinh xylanase trong đó có 10 dòng có hoạt tính trên 35 IU ml⁻¹. Dòng X33.M11B.21 được lựa chọn để nghiên cứu khả năng biểu hiện và đặc tính enzyme. Sau 10 ngày nuôi biểu hiện trên môi trường khoáng với methanol 1%, hoạt tính xylanase của canh trường đạt 58 IU mg⁻¹. Các mẫu canh trường từ thời điểm ban đầu tới sau 10 ngày lên men được điện di để kiểm tra thành phần protein, kích thước phân tử cũng như hoạt tính xylanase. Kết quả điện cho thấy, băng protein có kích thước 30 kDa, ở vị trí thấp hơn so với băng hoạt tính zymogram (Hình 3). Một khả năng đặt ra là khi tiến hành phân tích Zymogram hàm lượng SDS sử dụng cần thấp



Hình 3. Điện di zymogram dịch canh trường chủng *P. pastoris* X33 tái tổ hợp

Ghi chú: Ảnh hiển thị là kết quả chồng ảnh gel sau nhuộm bằng Congo Red và bằng Comassie Brilliant Blue. Giếng 0-10: dịch canh trường ban đầu và sau 1-10 ngày nuôi cấy. M-Thang protein chuẩn.

Biểu hiện gen mã hóa Endo-1,4- β -xylanase chịu nhiệt, hoạt động trong môi trường axit nhằm ứng dụng trong sản xuất thức ăn chăn nuôi



Hình 4. Sản phẩm tinh chế xylanase tái tổ hợp sử dụng sắc ký tương tác ái lực

Ghi chú: (A) Sắc ký đồ tinh chế xylanase bằng cột Butyl Sephrose HP; (B) 7-13: SDS-PAGE với gel polyacrylamide 12% của các phân đoạn mang hoạt tính từ F7 tới F13. M: protein thang chuẩn (#26610 Thermo Scientific).

hơn khi phân tích SDS-PAGE (trong gel polyacrylamide là 0,1% SDS, đệm mẫu 1× là 1% SDS), tuy nhiên thành phần SDS đã không được thay đổi dẫn đến gây biến tính phần lớn protein và những phân tử chưa biến tính sẽ chuyển động chậm hơn do tương tác với cơ chất xylan trong gel nên thể hiện bằng hoạt tính ở phía trên. Lượng phân tử này có thể rất nhỏ nên không xuất hiện bằng khi nhuộm Coomassie Brilliant Blue. Sau khi loại bỏ các thành phần không mong muốn trong canh trường bằng phương pháp lọc tiếp tuyến, xylanase tái tổ hợp được tinh sạch bằng sắc ký tương tác kỵ nước. Kết quả trên sắc ký đồ cho thấy, hoạt tính xylanase chỉ thể hiện tại peak protein tương ứng với các phân đoạn F7-11 có protein kích thước 30 kDa (Hình 4). Như vậy, giả thuyết chúng tôi đặt ra là hợp lý.

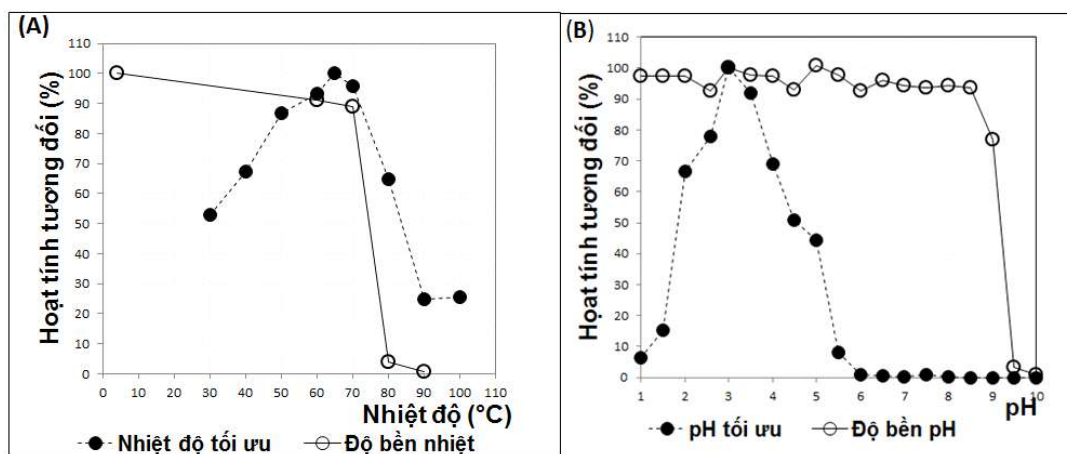
3.4. Đặc tính của endo-1,4- β -xylanase Xyl11B tái tổ hợp

Phân đoạn F9 chứa hàm lượng enzyme cao nhất (542 IU mg⁻¹) và đạt độ tinh sạch được lựa chọn để nghiên cứu các đặc tính của xylanase tái tổ hợp. Phân tích hoạt tính enzyme ở các nhiệt độ khác nhau cho thấy Xyl11B hoạt động tối ưu ở 65°C và duy trì hoạt tính khá cao trong dải nhiệt từ 30°C tới 80°C, tương tự như kết quả phân tích enzyme gốc của Luo *et al.* (2009a). Xylanase tái tổ hợp khá bền nhiệt và giữ được

90% hoạt tính sau khi xử lý ở 70°C trong 20 phút (Hình 5-A). Đây là một trong những đặc tính tốt đảm bảo cho enzyme chống chịu nhiệt độ cao của quá trình ép viên trong chế biến thức ăn chăn nuôi. Kết quả này khá tương đồng với enzyme Xyl11B gốc, nhiệt.

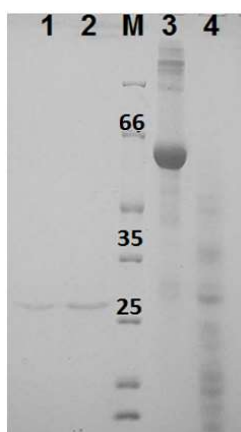
Bên cạnh việc duy trì hoạt tính trong quá trình chế biến thức ăn, enzyme tái tổ hợp cần phải hoạt động tốt trong đường tiêu hóa của động vật, đặc biệt trong điều kiện pH thấp của dịch dạ dày. Phân tích hoạt tính xylanase trong dải từ pH 1,0 tới 10,0 cho thấy Xyl11B hoạt động tối ưu ở pH 3,0. Phổ hoạt động của Xyl11B tương đối hẹp và trong vùng axit (từ pH 2,0 tới 5,0). Xyl11B hầu như không thể hiện hoạt tính trong môi trường trung tính hoặc kiềm (Hình 5-B). Xyl11B khá bền khi xử lý ở các điều kiện pH từ 1,0 tới 8,5. Đối với gen *Xyl11B* chưa tối ưu codon, enzyme tái tổ hợp có hoạt lực cao nhất ở pH 2,6 và duy trì được khoảng 60% hoạt tính ở dải pH 2,0-4,0 (Luo *et al.*, 2009a).

Xylanase tái tổ hợp bị ức chế rất mạnh bởi SDS. Ở nồng độ thấp nhất trong khảo sát là 2 mM hoạt tính của enzyme còn lại chỉ 9%. Điều này khá phù hợp với kết quả phân tích zymogram mà chúng tôi nhận định ở phần trên. Ion Mn²⁺ cũng có tác động khá mạnh lên hoạt tính enzyme. Ở nồng độ thấp nhất (2 mM) cũng có tới trên 50% hoạt tính enzyme bị mất đi. Cu²⁺ cũng làm giảm hoạt lực enzyme tuy ở mức độ



Hình 5. Ảnh hưởng nhiệt độ, pH đối với endo-1,4-β-xylanase Xyl11B tái tổ hợp

Ghi chú: (A) Nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt của Xyl11B; (B) pH tối ưu và độ bền của Xyl11B ở các pH khác nhau



Hình 6. Ảnh hưởng pepsin đối với endo-1,4-β-xylanase Xyl11B tái tổ hợp

Ghi chú: M: protein thang chuẩn. 1-Xylanase đã xử lý pepsin; 2-Xylanase không xử lý pepsin; 3-BSA không xử lý pepsin; 4-BSA đã xử lý pepsin.

thấp hơn. Các ion Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} và các tác nhân như EDTA, β-mercaptoethanol không thể hiện ảnh hưởng rõ rệt lên hoạt tính của xylanase tái tổ hợp. Ion K^{+} làm tăng nhẹ hoạt tính enzyme. Ảnh hưởng của các tác nhân khảo sát sẽ góp phần cung cấp thông tin cho việc xác định điều kiện phản ứng và cũng hữu ích khi xây dựng công thức bảo quản enzyme.

Một trong những yêu cầu cần thiết đối với enzyme ứng dụng trong chăn nuôi là phải có khả năng chống chịu được pepsin, protease chính trong dịch dạ dày động vật. Đặc tính này giúp enzyme thực hiện chức năng xúc tác sinh học trong quá trình tiêu hoá. Kết quả khảo sát sự

toàn vẹn của xylanase tái tổ hợp khi xử lý bằng pepsin cho thấy enzyme hầu như không bị ảnh hưởng dưới tác động của pepsin (Hình 6, băng 1, 2). Trong khi đó, với lượng BSA ban đầu khá lớn (giếng 3) nhưng sau khi xử lý với pepsin, BSA bị thuỷ phân hầu như hoàn toàn (giếng 4).

Các kết quả nghiên cứu đặc tính cho thấy, xylanase Xyl11B tái tổ hợp từ gen FJ212324 đã được tối ưu hóa codon vẫn duy trì tốt các đặc tính đáng quý như gen gốc mà Luo *et al.* đã công bố. Từ kết quả khảo sát này nhóm nghiên cứu sẽ tiếp tục tiến hành nghiên cứu quy trình sản xuất xylanase tái tổ hợp trên quy mô pilot và các điều kiện bảo quản enzyme.

4. KẾT LUẬN

Gen mã hóa endo-1,4- β -xylanase từ nấm mốc *Bispora* sp. MEY-1 đã được cải biến và biểu hiện trên nấm men *P. pastoris* X33. Mức độ biểu hiện ngoại bào của enzyme tái tổ hợp khá cao, với hoạt tính xylanase trên môi trường khoáng đạt 96 IU ml⁻¹. Xylanase tái tổ hợp hoạt động tối ưu ở 65°C, pH 3,0. Enzyme tái tổ hợp bền nhiệt, hoạt động trong dải pH axit và có khả năng chịu pepsin. Enzyme bị ức chế bởi các tác nhân như SDS, ion Mn²⁺, Cu²⁺. Với những đặc tính kể trên, xylanase tái tổ hợp có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất thức ăn chăn nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Quyền Đình Thi, Đỗ Thị Tuyên (2015). Enzyme bổ sung vào thức ăn chăn nuôi: Tự nhiên và tái tổ hợp. Nhà xuất bản Khoa học và Công nghệ, tr. 69-80.
- Cregg J.M. (2007) Methods in molecular biology, vol. 389: *Pichia* protocols. Second Edition. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Hua H., Luo H., Bai Y., Wang K., Niu C., Huang H., Shi P., Wang C., Yang P., Yao B. (2014). A thermostable Glucoamylase from *Bispora* sp. MEY-1 with stability over a broad pH range and significant starch hydrolysis capacity. Plos one, 9(11): e113581.
- Kanwar S.S., Sunita D. (2012). Thermostable xylanases of microbial origin: Insights and biotechnological potential. The International Journal of Biotechnology, 1: 1-20
- Krainer F.W., Dietzsch C., Hajek T., Herwig C., Spadiut O., Glieder A. (2012). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. Microbial Cell Factories, 11: 22.
- Luo H., Wang Y., Li J., Wang H., Yang J., Yang Y., Huang H., Fan Y., Yao B. (2009a). Cloning, expression and characterization of a novel acidic xylanase, XYL11B, from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. Enzyme and Microbial Technology, 45: 126-133.
- Luo H., Wang Y., Li J., Wang H., Yang Y., Huang H., Shi P., Yuan T., Fan Y., Yao B. (2009b). A thermophilic and acid stable family-10 xylanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. Extremophiles, 13: 849-857.
- Luo H., Wang Y., Wang H., Yang J., Yang Y., Huang H. (2009c). A novel highly acidic β -mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. Applied Microbiology and Biotechnology, 82: 453-461.
- Luo H., Yang J., Li J., Shi P., Huang H., Bai Y. (2010a). Molecular cloning and characterization of novel acidic xylanase XYLD from *Bispora* sp. MEY-1 that is homologous to family 30 glycosyl hydrolase. Applied Microbiology and Biotechnology, 86: 1829-1839.
- Luo H., Yang J., Yang P., Li J., Huang H., Shi P. (2010b). Gene cloning and expression of a new acidic family 7 endo- β -1,3-1,4- glucanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. Applied Microbiology and Biotechnology, 85: 1015-1023.
- Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31: 426-428.
- Octavio L.C., Francisco V.O. (2006). Enzyme biotechnology: Xylanases. Advances in Agricultural and Food Biotechnology, pp. 305-322.
- Roberfroid M.B. (1997). Health benefits of non-digestible oligosaccharides. Advances in Experimental Medicine and Biology, 427: 211-219.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- Sinclair G., Choy F.Y. (2002). Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, 26: 96-105.
- Sue M.P., Mariana L.F., Brian M., Linda M.H. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast, 22: 249-270.
- Vázquez M., Alonso J., Domínguez H., Parajó J. (2000). Xylooligosaccharides: Manufacture and applications. Trends in Food Science & Technology, 11: 387-393.
- Wang H., Li J., Bai Y., Huang H., Shi P. (2010). An α -galactosidase from an acidophilic *Bispora* sp. MEY-1 strain acts synergistically with β -mannanase. Bioresource Technology, 101: 8376-8382.
- Wang H., Luo H., Bai Y., Wang Y., Yang P., Shi P. (2009). An acidophilic β -galactosidase from *Bispora* sp. MEY-1 with high lactose hydrolytic activity under simulated gastric conditions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 5535-5541.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259): 680-685.