

Biểu hiện và tinh sạch enzyme PMO quy mô pilot

Expression and purification of PMO enzyme in pilot scale

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

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

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

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

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

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

^cNTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

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

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

(Ngày nhận bài: 14/02/2023, ngày phản biện xong: 23/3/2023, ngày chấp nhận đăng: 17/5/2023)

Tóm tắt

Họ enzyme polysaccharide monoxygenase (PMO) mới được phát hiện gần đây có nhiều ứng dụng trong công nghiệp. Chúng có đặc điểm có khả năng xúc tác phân giải polysaccharide bằng cơ chế oxy hóa khử thay vì thủy phân như các họ enzyme khác. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng hệ thống lên men có dung tích 100L để biểu hiện protein tái tổ hợp MGG_00245. Kết quả, sau 48 giờ lên men và 48 giờ cảm ứng đã thu nhận được lượng sinh khối khoảng 62,64 g/L. Sử dụng đồng thời 02 cơ chất cảm ứng là methanol và glycerol, chúng tôi thu được hiệu suất lên men khoảng 23,06 mg/L protein tái tổ hợp MGG_00245 được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực Ni với hoạt độ đạt 40,93 U/g.

Từ khóa: Polysaccharide monoxygenase; PMO; Pichia pastoris; biểu hiện protein; quy mô pilot.

Abstract

In recent years, the discovery of the polysaccharide monoxygenase (PMO) enzyme family has garnered significant attention due to its various industrial applications. Unlike traditional hydrolysis methods, PMOs catalyze the oxidative cleavage of glycosidic bonds in challenging polysaccharides. In a recent study, we aimed to evaluate the production of the recombinant protein MGG_00245 using a 100-liter bioreactor. The results showed that after 96 hours of fermentation, a biomass of approximately 62.64 g/L was obtained. The use of two inducers, methanol, and glycerol, resulted in a fermentation yield of 23.06 mg/L of the recombinant protein, with an oxidative activity of 40.93 U/g.

Keywords: Polysaccharide monoxygenase; PMO; Pichia pastoris; protein expression; pilot scale.

1. Mở đầu

Polysaccharide monoxygenase (PMO) là những enzyme có khả năng phân hủy

polysaccharide bền thông qua phản ứng oxy hóa khử xảy ra tại liên kết glycoside nhờ trung tâm hoạt động đơn nhân đồng (monocopper

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Minh Hùng; Trung tâm Công nghệ Sinh học Dược, Trường Y Dược - Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

Email: hungmolbio@gmail.com

active site). Trước đây, quá trình phân hủy polysaccharide chỉ được biết đến thông qua hoạt tính thủy phân của các enzyme họ glycoside hydrolase (GH). Từ năm 2010, lần đầu tiên PMO đã được chứng minh có khả năng phân hủy polysaccharide theo một cơ chế hoàn toàn mới đó là phản ứng oxy hóa khử. Dựa vào sự trợ giúp của phản ứng này, hoạt tính phân hủy polysaccharide của các enzyme GH đã tăng lên đáng kể [1].

Quá trình phát hiện ra cơ chế hoạt động của các PMO bắt đầu từ một giả thuyết của Erikson và cộng sự (1974), khi họ phát hiện rằng quá trình phân cắt cellulose bằng enzyme hiện diện trong dung dịch nuôi cấy các loại nấm phân hủy cellulose cho thấy hiệu quả cao hơn nếu phản ứng được thực hiện trong điều kiện hiếu khí. Điều này dẫn đến một giả thuyết rằng phản ứng oxy hóa có thể có liên quan đến việc phân cắt cellulose [2]. Năm 2005, Vaaje-Kolstad và cộng sự phát hiện ra một số protein vốn được biết đến với tên gọi là “protein liên kết chitin” hay họ CBM33 (family 33 carbohydrate-binding modules) có tác dụng tăng cường hiệu quả của các chitinase, enzyme thủy phân chính trong quá trình phân hủy chitin [3]. Sau đó, vào năm 2010, Vaaje-Kolstad đã chỉ ra rằng các loại protein liên kết chitin này là các enzyme sử dụng lực khử và O_2 để oxy hóa và bẻ gãy liên kết glycoside trong chitin [1]. Cùng lúc đó, có một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng những protein trước đây được phân loại vào các họ enzyme glycoside hydrolase 61 (GH61) có cấu trúc tương tự với CBM33 và có khả năng tăng cường hoạt tính của cellulase [4, 5]. Cuối cùng, vào năm 2010, hoạt tính phân cắt cellulose bằng phản ứng oxy hóa khử của CBM33 [6] và GH61 [6-8] đã được ghi nhận.

PMO có nhiều loại cơ chất đặc hiệu khác nhau và cũng có sự khác biệt về tính điều hòa phản ứng oxy hóa. Nhìn chung, các PMO sử dụng phản ứng oxy hóa khử để hydroxyl hóa bẻ gãy cầu nối C-H của liên kết glycoside, tạo

thành cấu trúc trung gian bất ổn định và sau đó liên kết bị phân cắt một cách tự nhiên. Các PMO có thể oxy hóa ở vị trí C1 hoặc C4 của liên kết glycoside, trong khi một số PMO khác thì thực hiện phản ứng ở cả C1 và C4. Sự đa dạng này cũng tìm thấy ở những PMO đặc hiệu cơ chất cellulose và xyloglucan, trong khi nhiều loại PMO đặc hiệu chitine đã được mô tả chỉ tìm thấy sản phẩm của phản ứng oxy hóa tại vị trí C1. Những dữ liệu hiện có chỉ ra rằng việc liên kết với cơ chất phụ thuộc vào nhiều yếu tố tương tác, chủ yếu liên quan đến tương tác giữa bề mặt liên kết cơ chất của PMO và các chuỗi polysaccharide trong cơ chất [9-11].

Điều kiện để phản ứng oxy hóa khử dưới sự xúc tác của enzyme PMO xảy ra cần có sự hiện diện của chất cho điện tử bên ngoài cùng với sự tồn tại của oxy hoặc hydro peroxide và cơ chất [9, 11]. Những phát hiện mới này cho thấy hoạt tính xúc tác oxy hóa khử của PMO có thể được tăng cường đáng kể khi sử dụng H_2O_2 , điều này rất có ý nghĩa trong công nghiệp sản xuất nhiên liệu sinh học (NLSH) có sử dụng PMO. Tác dụng tăng cường hoạt tính của hỗn hợp enzyme thủy phân của PMO như mô tả ở trên phù hợp với các nghiên cứu được thực hiện trước khi bản chất xúc tác oxy hóa khử của PMO được khám phá, cho thấy những enzyme GH61 (sau này là PMO AA10) có khả năng tăng cường quá trình phân cắt cellulose. Giá thành của hỗn hợp cocktail enzyme thủy phân cellulose đã giảm mạnh trong hai thập kỷ gần đây, nhưng cấu trúc tinh thể của lignocellulose vẫn còn là một trong những nút thắt cản trở khả năng phổ biến và thương mại hóa các sản phẩm nhiên liệu và hóa chất từ sinh khối thực vật. Trong 15 năm trở lại đây, những nhà sản xuất enzyme lớn trên thế giới đã xem xét các tiềm năng của PMO và vai trò của nó trong quá trình phân hủy sinh khối bằng enzyme. Một loạt các nghiên cứu về ảnh hưởng của PMO trong các hỗn hợp cocktail enzyme thương mại được tiến hành. Trong một nghiên cứu ban đầu, Cannella và

cộng sự (2012) đã so sánh hiệu suất đường phân của hỗn hợp Celluclast (một loại cocktail cellulase nghèo PMO), Novozym 188 (β -glucosidase) với hiệu suất đường phân của Cellic CTec2, trong quá trình phân giải rơm rạ đã tiền xử lý bằng thủy nhiệt [12]. Nhóm tác giả đã quan sát thấy sự gia tăng hiệu suất xử lý cellulose khi sử dụng CTec2 và phát hiện thấy có sản phẩm glucose và cellobiose dạng bị oxy hóa trong hỗn hợp phản ứng. Hu và cộng sự (2014) đã báo cáo rằng việc tăng cường hỗn hợp Celluclast (nghèo PMO) bằng *TaAA9A* cho hiệu quả tăng từ 18-63 % khi chuyển hóa cellulose từ các loại cơ chất râu ngô, cây dương và thông xanh, phụ thuộc vào cơ chất và cách tiền xử lý [13]. Nghiên cứu của Muller và cộng sự (2015) đã phân tích hiệu quả của *TaAA9A* trong quá trình hoạt động của hỗn hợp Celluclast/Novozym 188, trong khi đánh giá đồng thời tác động của chất khử và oxy, và định lượng hoạt tính PMO thông qua việc xác định các sản phẩm oxy hóa. Các kết quả nghiên cứu cho thấy tác động tích cực của PMO thể hiện rõ ràng mối tương quan giữa hiệu suất chung của cả hỗn hợp cocktail và tỷ lệ các loại đường bị oxy hóa. Nhìn chung, trước áp lực ngày càng gia tăng vì giá nhiên liệu có nguồn gốc từ hóa thạch và nguồn cung đang ngày càng cạn kiệt, thì việc nghiên cứu ra các loại nhiên liệu thân thiện với môi trường để dần dần tăng tỷ lệ sử dụng so với nhiên liệu hóa thạch là một trong những hướng đi cấp bách và cần thiết.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tối ưu biểu hiện một loại enzyme PMO (MGG_00245) được phân lập từ nấm đạo ôn *Magnaporthe oryzae* gây hại trên cây lúa sử dụng bioreactor dung tích 100 L. Kết quả lên men và tinh chế protein tái tổ hợp PMO MGG_00245 là tiền đề cho các nghiên cứu

phân giải các cơ chất cellulose phục vụ cho các nghiên cứu và ứng dụng tiếp theo trong công nghiệp.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Chuẩn bị giống

Khuẩn lạc nấm men chủng *P. pastoris* X33 mang vector pPICZ α A_00245 biểu hiện cho enzyme PMO từ đĩa môi trường YPD/Zeocin được cấy nhân giống cấp 1 vào 2 bình tam giác chứa 500mL môi trường YPD. Nấm men được nuôi ở điều kiện 30°C, lắc 150 vòng/phút đến giá trị OD₆₀₀ khoảng 1 - 2 thì đạt yêu cầu để cấy vào bình lên men cấp 2. Giống cấp 2 được chuẩn bị bằng cách lên men theo mẻ trong hệ thống Bioreactor BioFlo 120 với thể tích 10L/bình. Giống nấm men cấp 1 (1000mL) được cấy vào bình lên men chứa 10L môi trường BMGY. Hệ thống được nuôi ở điều kiện 30°C, tốc độ khuấy 150 vòng/phút, pH = 6,0 trong 48 giờ, giá trị OD₆₀₀ > 1,5. Giống được kiểm tra độ thuần chủng dưới kính hiển vi quang học.

Để nuôi cấy nấm men ở quy mô pilot, hệ thống lên men quy mô lớn Model VA-FCP 300 (Vĩnh An Co., Việt Nam) được sử dụng với tổng thể tích của mẻ lên men là 100 L (Hình 1). Các thành phần của môi trường BMGY (trừ YNB và biotin) và antifoam (2 mL/L) được chuẩn bị trong bồn lên men, toàn bộ hệ thống và đường ống được tiệt trùng bằng hơi nước ở 120°C, 0,05 - 0,1 MPa, 45 phút. Tiếp theo hệ thống được làm nguội và bổ sung thêm 10X YNB và biotin qua màng lọc vô trùng. Sau đó, 10L giống nấm men cấp 2 được cấy vào bồn lên men. Hệ thống được duy trì ở điều kiện 30°C, pH = 6,0 \pm 1,0, sục không khí liên tục để cung cấp oxy với tốc độ bơm khí là 50L/phút.



Hình 1. Hệ thống lên men VA-FCP 300

Cảm ứng biểu hiện protein bằng cách bổ sung đồng thời methanol và sorbitol. Bắt đầu cảm ứng với tỷ lệ 0,5% methanol: 0,5% sorbitol để tế bào làm quen với nguồn carbon mới (500 mL metOH: 500mL Sor/mẻ 100L), sau đó methanol và sorbitol được bổ sung với nồng độ tăng dần. Sau 6 giờ, bổ sung thêm 1% methanol: 1% sorbitol. Sau 6 giờ tiếp theo, bổ sung thêm 2% methanol: 2% sorbitol. Sau 24 giờ từ lúc bắt đầu cảm ứng, bổ sung thêm 5% methanol: 5% sorbitol. Kết thúc mẻ lên men sau 48 giờ cảm ứng protein.

2.2. Kiểm tra tế bào nấm men

Mẻ nấm men được theo dõi liên tục, tốc độ phát triển của tế bào được kiểm tra bằng cách hút 50mL mẫu ở các thời điểm lên men để đo mật độ quang học OD_{600} và cân trọng lượng sinh khối ướt.

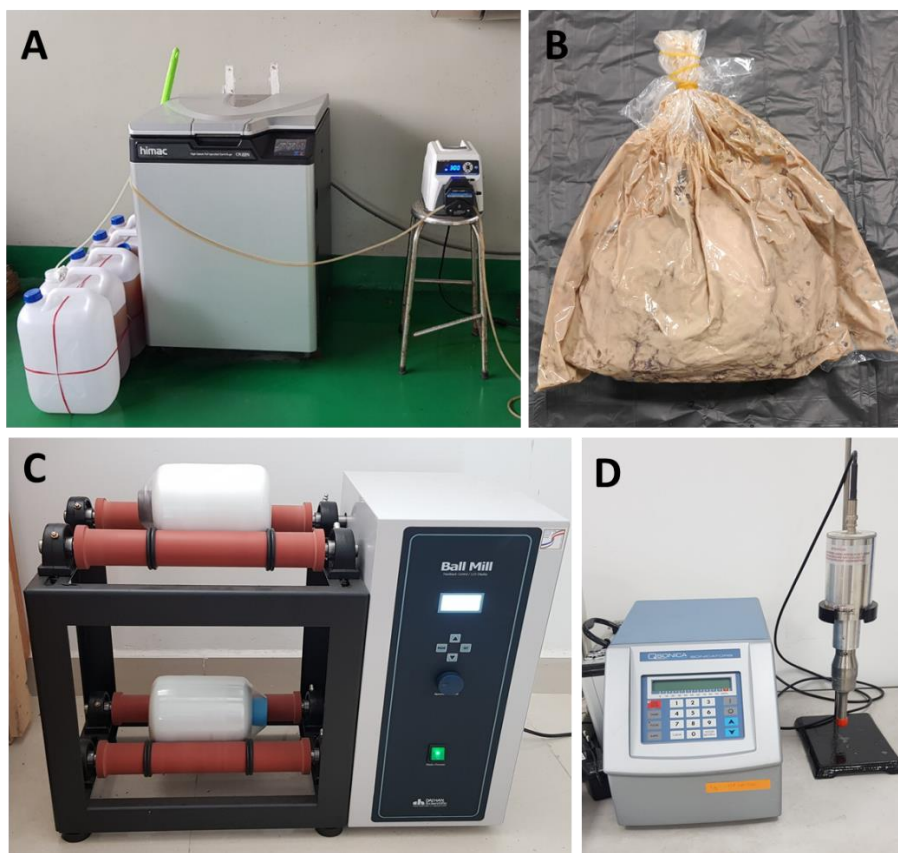
Ngoài ra, sự phát triển của nấm men cũng được theo dõi bằng cách xác định tỷ lệ tế bào sống bằng phương pháp nhuộm Trypan Blue: 1mL dung dịch nấm men được ly tâm ở tốc độ 100g trong 5 phút để thu nhận tế bào. Tế bào sau đó được rửa lại 2 lần với dung dịch đệm

PBS (Phosphate buffer saline). Hòa sinh khối trong 100 μ L dung dịch đệm PBS và bổ sung 100 μ L dung dịch thuốc nhuộm Trypan blue 0,4%. Hòa đều dung dịch và nhỏ 1 giọt lên buồng đếm hồng cầu. Kiểm tra tế bào dưới kính hiển vi quang học. Tế bào sống sẽ không bắt màu thuốc nhuộm và trong suốt, tế bào chết có màu xanh. Tỷ lệ tế bào sống được xác định. Mẻ lên men phát triển tốt ở pha tăng trưởng nếu tỷ lệ tế bào sống đạt > 90%.

2.3. Thu nhận protein

Protein mục tiêu hiện diện ở phần nội bào. Do đó, sau khi kết thúc mẻ lên men, dịch nuôi cấy được bơm vào máy ly tâm liên tục HIMAC CR22N (Eppendorf, USA), ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút. Tế bào sau đó được thu nhận.

Hòa tế bào vào dung dịch đệm NPI-10 pH 7.5, bổ sung thêm 1X protease inhibitor cocktail và phá vỡ màng tế bào bằng máy nghiền bi Ball mill BML (Daihan, Hàn Quốc) với các hạt bi thủy tinh với kích thước 1.0 mm. Sau đó, tế bào được phá màng tiếp tục bằng sóng siêu âm với máy Q-500 Sonicator (Qsonica, USA) (Hình 2).



Hình 2. Thiết bị sử dụng: (A), máy ly tâm liên tục; (B) sinh khối nấm men thu được; (C), máy nghiền tế bào; (D), máy phá tế bào bằng sóng siêu âm.

Dung dịch protein nội bào sau đó được sử dụng để thu nhận protein mục tiêu bằng phương pháp sắc ký ái lực với cột Ni-NTA với các dung dịch rửa giải chứa Imidazole. Kiểm tra sự hiện diện của protein bằng phương pháp SDS-PAGE. Sau đó dung dịch protein được loại muối.

Nồng độ protein thu nhận được xác định bằng phương pháp Bradford và tính hiệu suất lên men của mẻ.

2.4. Xác định hoạt độ enzyme PMO

Protein mục tiêu sau khi thu nhận được tiến hành xác định hoạt độ enzyme bằng phương pháp đo quang phổ. LPMO là enzyme xúc tác cho phản ứng oxy hóa khử, do đó hoạt tính oxy hóa của chúng có thể được xác định thông qua phản ứng màu với thuốc thử 2,6-DMP (2,6-Dimethoxyphenol). Khi có sự hiện diện của

H₂O₂, LPMO sẽ thực hiện phản ứng oxy hóa 2,6-DMP và chuyển hóa thành coeruleone (màu nâu vàng). Phản ứng PMO được thực hiện trong ống nghiệm chứa 100 mM sodium succinate/phosphate buffer, 10 mM 2,6-DMP, 1mM H₂O₂ và 20 μL LPMO (đã xử lý kex2 protease và hoàn nguyên với Cu²⁺). Phản ứng được ủ ở 30°C và đo sự tăng độ hấp thụ quang học ở bước sóng 469 nm trong 300 giây bằng máy đo quang phổ UV-Vis V730 (Jasco, Nhật Bản). Hoạt độ enzyme được xác định bằng công thức:

$$\text{Activity (Ug}^{-1}\text{)} = \text{rate (min}^{-1}\text{)} \times \text{EF}$$

Rate: Tỷ lệ tăng OD₄₆₉ trong thời gian phản ứng.

EF: Enzyme factor được xác định bằng công thức sau, với $\epsilon_{469} = 53,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

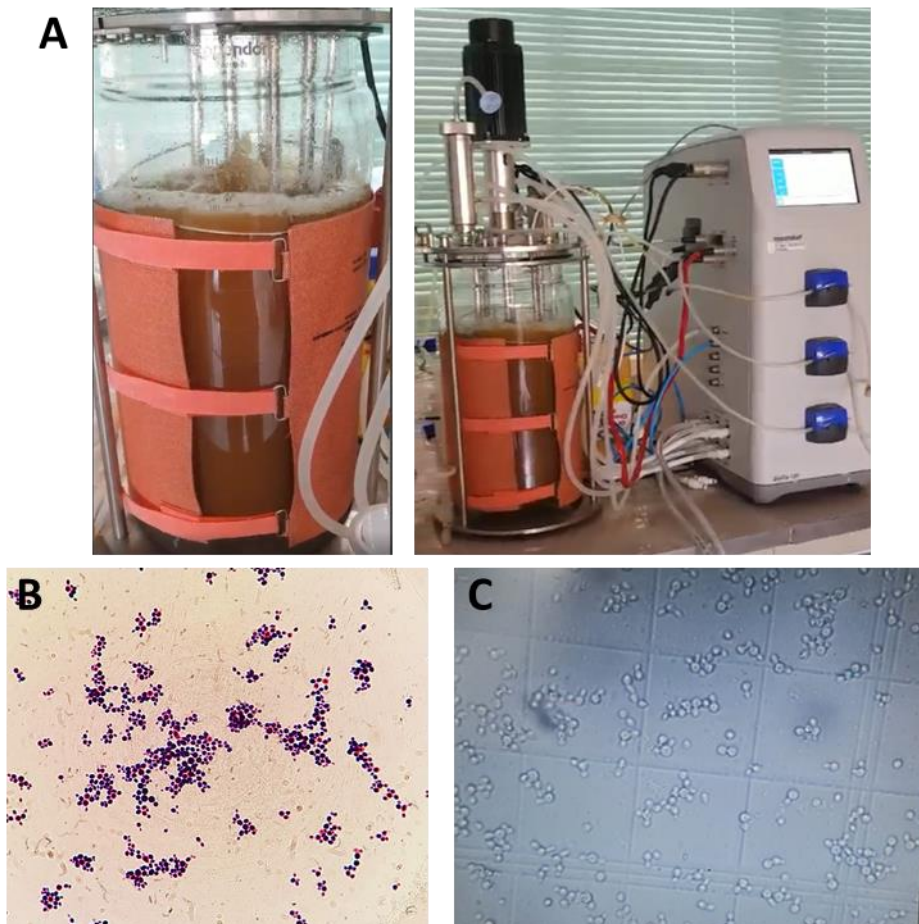
$$EF = \frac{\text{Tổng thể tích (mL)} \times \text{Độ pha loãng}}{\text{Thể tích mẫu (mL)} \times \text{Kích thước cuvette (cm)} \times \epsilon_{469} (\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1})}$$

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Kết quả chuẩn bị giống

Giống nấm men được chuẩn bị lần lượt trong các bình tam giác 500mL và sau đó là bình lên men 10L. Giá trị OD₆₀₀ được ghi nhận

là 1,68, tế bào được nhuộm và soi dưới kính hiển vi quang học cho thấy nấm men phát triển tốt, không nhiễm vi sinh vật khác. Tỷ lệ tế bào sống cao - đủ tiêu chuẩn để cấy vào hệ thống lên men thể tích lớn (Hình 3).

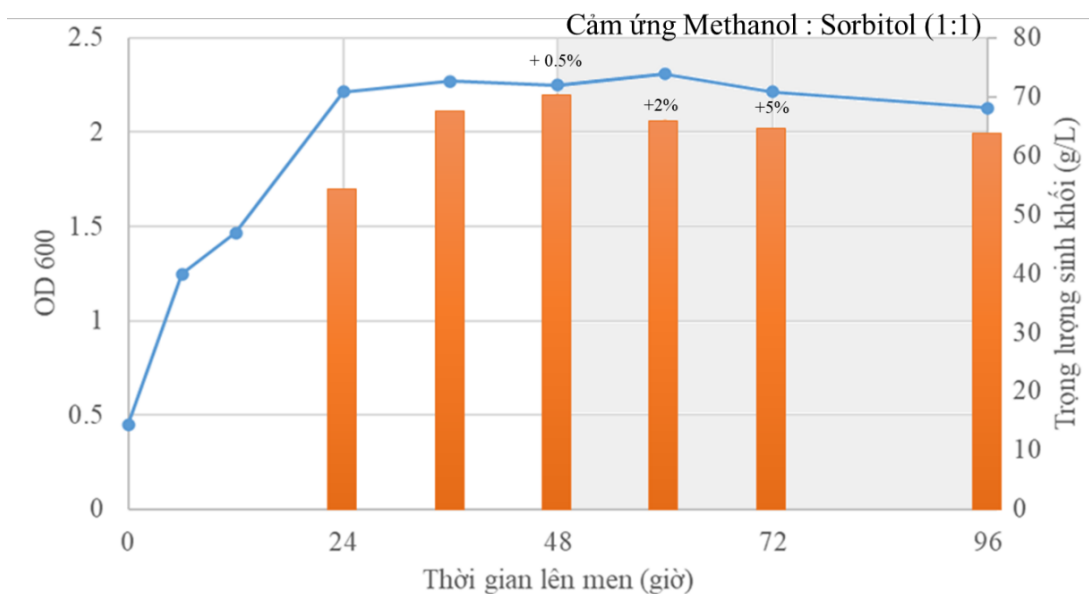


Hình 3. Lên men giống cấp 2: (A), Bình lên men 10 L trong BioFlo 120; (B), dung dịch tăng sinh được nhuộm crystal violet và soi dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x40, tế bào phát triển tốt và không bị nhiễm vi sinh vật ngoại lai; (C), Nhuộm tế bào bằng Trypan blue 0,4 %, tỷ lệ tế bào sống cao > 98 % (tế bào trong suốt, không bắt màu xanh).

3.2. Lên men ở quy mô pilot

Giống cấp 2 được cấy vào bồn lên men với tổng thể tích là 100L. Tế bào nấm men phát triển đạt đến pha tăng trưởng sau 24 giờ nuôi cấy với giá trị OD₆₀₀ đạt 2,22 và trọng lượng sinh khối ướt (WCW) đạt 53,11g/L. Đến 48 giờ nuôi cấy, tế bào tiếp tục tích lũy sinh khối, giá trị WCW = 69,32g/L. Tại thời điểm này, cả giá

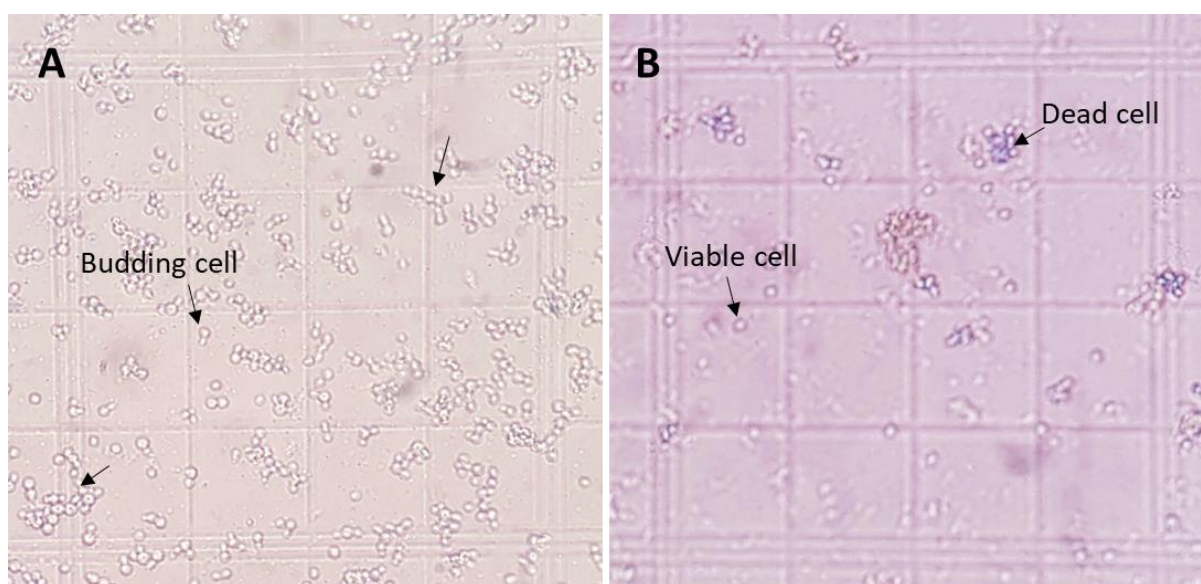
trị OD₆₀₀ và trọng lượng sinh khối tế bào đều đạt vào pha cân bằng, methanol và sorbitol được bổ sung để cảm ứng protein. Lượng methanol và sorbitol bổ sung tăng dần theo thời gian. Trong quá trình cảm ứng protein, nấm men đạt trạng thái cân bằng, ngừng tăng trưởng sinh khối (Hình 4).



Hình 4. Theo dõi sự phát triển của tế bào *P. pastoris* trong quá trình lên men.

Theo dõi tỷ lệ tế bào sống cho thấy, tại thời điểm 48 giờ, tỷ lệ tế bào sống đạt > 98% (Không quan sát thấy tế bào chết trên buồng đếm hồng cầu). Ngoài ra, quan sát trên kính hiển vi còn cho thấy tế bào đang ở giai đoạn phát triển và nhân đôi, đa số tế bào đang mọc chồi và hình thành các cụm tế bào (Hình 5A). Như vậy, bắt đầu từ thời điểm này methanol và sorbitol được bổ sung vào để cảm ứng sinh tổng hợp protein.

Tại thời điểm 96 giờ, tỷ lệ tế bào sống đạt chỉ 70%. Hình 5 cho thấy nấm men bắt đầu vào giai đoạn suy thoái, tế bào sống tồn tại dưới dạng đơn bào, có quan sát được một số tế bào đã chết (màu xanh) và bắt đầu bị ly giải. Do đó, kết thúc mẻ nấm men sau 96 giờ nuôi cấy (tức là sau 48 giờ cảm ứng), trọng lượng sinh khối tươi thu được lúc này là 62,64g/L.

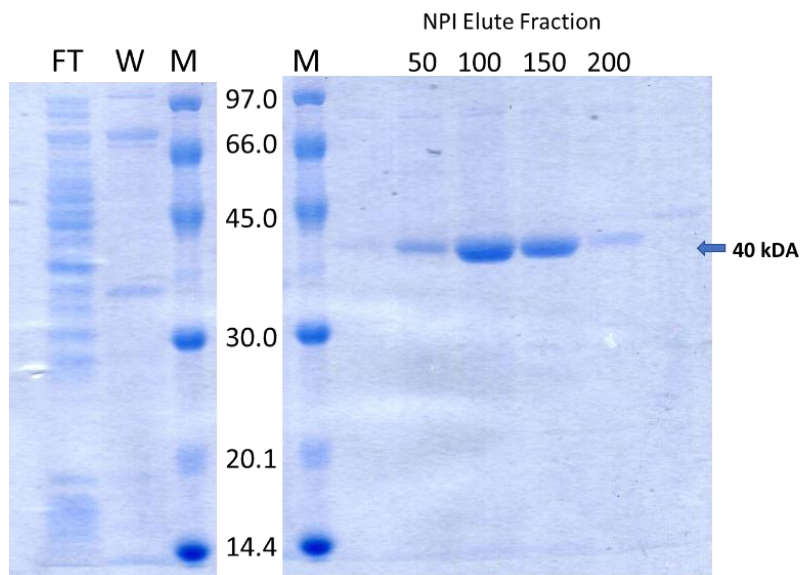


Hình 5. Kết quả nhuộm Trypan blue: (A), thời điểm bắt đầu cảm ứng (48 giờ); (B), thời điểm kết thúc mẻ (96 giờ).

3.3. Thu nhận protein mục tiêu

Nấm men được ly tâm liên tục và thu nhận sinh khối, tế bào sau đó được phá màng bằng

máy nghiền và máy siêu âm. Dung dịch protein nội bào sau đó được tinh chế qua cột Ni-NTA để thu nhận protein mục tiêu (Hình 6).



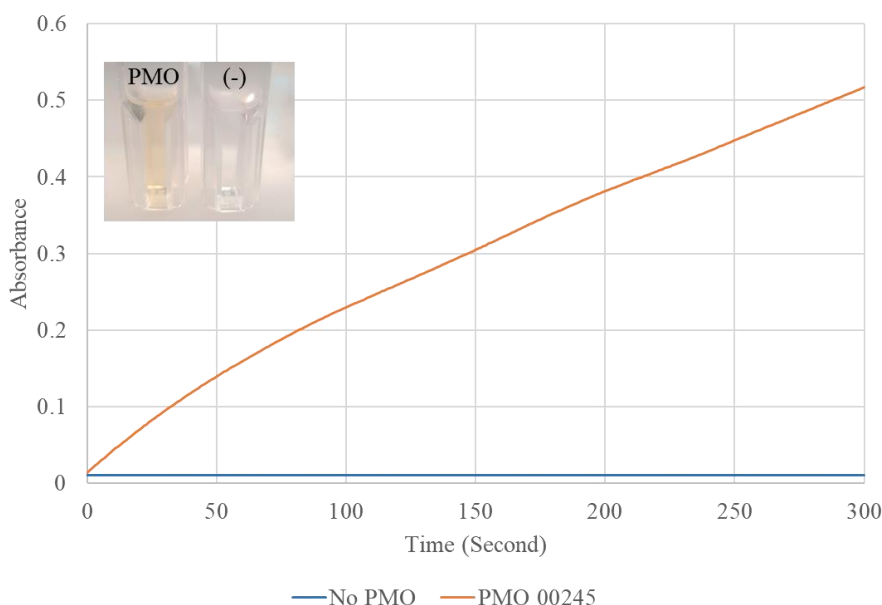
Hình 6. Tinh chế protein mục tiêu bằng cột Ni-NTA

Hiệu suất thu nhận protein của mẻ lên men pilot thu được đạt 23,06mg/L môi trường. Hiệu suất này không cao bằng mẻ lên men ở quy mô 10L (đạt 66,76mg/L). Có nhiều nguyên nhân có thể giải thích điều này, thứ nhất là do lượng sinh khối (WCW) thu được chưa cao, chỉ đạt 62g/L, có thể giải thích do quy mô lên men lớn nên các yếu tố nhiệt độ, pH không được kiểm soát chặt chẽ bằng, độ chênh lệch nhiệt độ trong quá trình lên men là $30 \pm 4^{\circ}\text{C}$ và độ chênh lệch pH là $6,0 \pm 1$. Ngoài ra, khi thực hiện với hệ thống lên men ở quy mô pilot không thể theo dõi được lượng oxy hòa tan trong bình lên men (DO), mà oxy có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển tế bào và cảm ứng protein. Không theo dõi được DO dẫn đến việc khó xác định thời điểm thích hợp để cảm ứng protein, có khả năng ở thời điểm bắt đầu cảm ứng, glycerol vẫn còn chưa được sử dụng hết và gây ức chế ngược đến promoter AXO1 dẫn đến việc giảm hiệu quả biểu hiện protein.

Tuy hiệu suất tính theo mẻ lên men không cao bằng ở quy mô phòng thí nghiệm, nhưng khi lên men ở quy mô pilot với thể tích 100 L/mẻ, chúng tôi ghi nhận thấy tế bào nấm men phát triển nhanh hơn, nấm men tăng trưởng trong vòng 24 giờ đầu nuôi cấy và đi vào pha cân bằng. Ở mẻ lên men này, chúng tôi bắt đầu cảm ứng ở thời điểm 48 giờ và kết thúc mẻ ở thời điểm 96 giờ. Trong khi quá trình lên men ở quy mô phòng thí nghiệm (với thể tích 10L/mẻ) kéo dài đến 144 giờ. Việc tăng thể tích và rút ngắn thời gian nuôi cấy này có thể giúp tiết kiệm kinh phí và nhân lực nếu thực hiện các mẻ lên men liên tục.

3.4. Hoạt tính oxy hóa của PMO mục tiêu

Hoạt độ enzyme PMO được xác định dựa trên khả năng oxy hóa 2,6-DMP và được đo bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 469 nm. Kết quả cho thấy ở phản ứng có sự hiện diện của protein mục tiêu MGG_00245 thì phản ứng màu đã xảy ra. 2,6-DMO bị oxy hóa thành coerulignone (Hình 7).



Hình 7. Phản ứng oxy hóa của enzyme PMO với thuốc thử 2,6-DMP.

Hoạt độ enzyme PMO của protein thu nhận được xác định đạt giá trị 40,93 U/g. So sánh với một số nghiên cứu đã xác định hoạt tính PMO dựa trên phương pháp quang phổ này đã ghi nhận thì NcPMO9 từ *Neurospora crassa* có hoạt độ 32,3U/g [14]. Trong một nghiên cứu khác của Breslmayer (2019) thì hoạt tính khi xác định bằng phương pháp 2,6-DMP của 3 loại Nc PMO9 (từ *N.crassa*) đạt từ 13-31 U/g, và 3 loại MtPMO (từ *Myriococcum thermophilum*) đạt 16-38 U/g. Nghiên cứu của Telistin và cộng sự (2020) đã xác định hoạt độ enzyme PMO trong các hỗn hợp thu nhận khi biểu hiện tái tổ hợp bằng nấm sợi *Penicillium veruculosum* nằm trong khoảng từ 6 - 64U/g [15].

4. Kết luận

Sử dụng hệ thống lên men VA-FCP 300 đã lên men thành công dòng tế bào *P. pastoris* X33/pPICZαA-00245 đạt sinh khối 62,64 g/L môi trường sau 96 giờ lên men. Cảm ứng biểu hiện và tinh chế thành công protein tái tổ hợp MGG_00245 từ nội bào. Hiệu suất biểu hiện được ghi nhận đạt 23,06 mg/L môi trường và hoạt độ đạt 40,93 U/g.

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

Tài liệu tham khảo

- [1] Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu Z, Zhai H, Sørli M, Eijsink VGH. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science*, 330, 219-222. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1192231>
- [2] Eriksson KE, Pettersson B, Westermark U. (1974). Oxidation: An important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose. *FEBS Letters*, 49, 282-285. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80531-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80531-4)
- [3] Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, van Aalten DM, Synstad B, Eijsink VG. (2005). The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J Biol Chem*, 280, 28492-28497. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M504468200>
- [4] Harris PV, Welner D, McFarland KC, Re E, Navarro Poulsen JC, Brown K, Salbo R, Ding H, Vlasenko E, Merino S, Xu F, Cherry J, Larsen S, Lo Leggio L. (2010). Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: Structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry*, 49, 3305-3316. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi100009p>

- [5] Karkehabadi S, Hansson H, Kim S, Piens K, Mitchinson C, Sandgren M. (2008). The First Structure of a Glycoside Hydrolase Family 61 Member, Cel61B from *Hypocrea jecorina*, at 1.6 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 383, 144-154. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.016>
- [6] Forsberg Z, Vaaje-kolstad G, Westereng B, Bunsæ AC, Stenstrøm Y, Mackenzie A, Sørli M, Horn SJ, Eijsink VGH. (2011). Cleavage of cellulose by a cbm33 protein. *Protein Science*, 20, 1479-1483. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.689>
- [7] Phillips CM, Beeson WT, Cate JH, Marletta MA (2011). Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa* *ACS Chemical Biology*, 6, 1399-1406. DOI: <https://doi.org/10.1021/cb200351y>
- [8] Quinlan RJ, Sweeney MD, Lo Leggio L, Otten H, Poulsen J-CN, Johansen KS, Krogh KBRM, Jørgensen CI, Tovborg M, Anthonsen A, Tryfona T, Walter CP, Dupree P, Xu F, Davies GJ, Walton PH. (2011). Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 15079. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1105776108>
- [9] Bissaro B, Isaksen I, Vaaje-Kolstad G, Eijsink VGH, Røhr ÅK. (2018). How a Lytic Polysaccharide Monooxygenase Binds Crystalline Chitin. *Biochemistry*, 57, 1893-1906. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00138>
- [10] Jensen MS, Klinkenberg G, Bissaro B, Chylenski P, Vaaje-Kolstad G, Kvitvang HF, Nærdal GK, Sletta H, Forsberg Z, Eijsink VGH. (2019). Engineering chitinolytic activity into a cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenase provides insights into substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 294, 19349-19364. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010056>
- [11] Vu VV, Marletta MA. (2016). Starch-degrading polysaccharide monooxygenases. *Cell Mol Life Sci*; 73, 2809-2819. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2251-9>
- [12] Cannella D, Hsieh C-wC, Felby C, Jørgensen H. (2012). Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. *Biotechnology for Biofuels*, 5, 26. DOI: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-26>
- [13] Li RY, Wu XM, Yin XH, Liang JN, Li M. (2014). The natural product citral can cause significant damage to the hyphal cell walls of *magnaporthe grisea*. *Molecules*, 19, 10279-10290. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules190710279>
- [14] Breslmayr E, Hanžek M, Hanrahan A, Leitner C, Kittl R, Šantek B, Oostenbrink C, Ludwig R. (2018). A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase. *Biotechnology for Biofuels*, 11, 79. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1063-6>
- [15] Telitsin VD, Semenova MV, Osipov DO, Gusakov AV, Sinitsyn AP. (2020). 2,6-Dimethoxyphenol-Based Assay for Quantitation of Polysaccharide Monooxygenase in Multienzyme Cocktails. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 75, 96-100. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0027131420020157>