



Nghiên cứu biểu hiện và tinh chế α -glucuronidase có nguồn gốc vi khuẩn dạ cỏ dê trong tế bào *Escherichia coli*

Lê Ngọc Giang¹, Lê Tùng Lâm¹, Trần Thị Loan^{1,2},
Đỗ Thị Huyền¹, Trương Nam Hải^{1,*}

¹*Viện Công nghệ sinh học, Viện HLKHCN Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam*

²*Bộ môn Vi sinh vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 13 tháng 6 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 16 tháng 4 năm 2018; Chấp nhận đăng ngày 16 tháng 4 năm 2018

Tóm tắt: α -1,2-Glucuronidase GH67 là enzyme có khả năng phân cắt chuỗi bên 4-O-methylglucuronic acid ((Me)GlcA) trong glucuronoarabinoxylan để làm tăng chuyển hóa lignocellulose thành đường đơn cho lên men sản xuất cồn và các chất có giá trị từ sinh khối thực vật. Trong nghiên cứu này, gen *Gglc1* dài 1908 nucleotide mã hóa cho enzyme α -1,2-glucuronidase GH67 trưởng thành có nguồn gốc từ vi khuẩn trong dạ cỏ dê đã được biểu hiện thành công trong chủng *E. coli* Roseta. Hầu hết enzyme được biểu hiện dưới dạng tan khi chủng tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường TB, PE có 0,05 mM IPTG ở 25°C, 30°C. Enzym được tinh chế thành công bằng sắc ký ái lực với độ tinh sạch 90%. Hoạt tính của enzyme đã được đánh giá sơ bộ dựa trên sự chuyển hóa (Me)GlcA trong birchwood xylan thành 4-O-methyl-D-glucuronic acid và D-glucuronic acid làm thay đổi pH dung dịch và được phát hiện bằng bromothymol blue. Enzyme sẽ được tiếp tục đánh giá tính chất để xem xét khả năng bổ sung vào hỗn hợp enzyme cho chuyển hóa hiệu quả sinh khối thực vật thành đường.

Từ khóa: α -glucuronidase, biểu hiện gen, *Escherichia coli*, DNA metagenome, *Gglc1*.

1. Mở đầu

Gỗ mềm và sinh khối lignocellulose từ phế phụ phẩm nông nghiệp là nguồn sinh khối tái tạo có giá trị cho sản xuất năng lượng sinh học, giấy và các sản phẩm có giá trị trong công

nghiệp, y dược [1]. Sinh khối lignocellulose bao gồm ba thành phần chính là cellulose, hemicellulose và lignin được liên kết với nhau thành khối rắn chắc. Việc phân hủy lignocellulose cần đến sự tham gia của nhiều loại enzyme trong đó có nhóm enzyme cellulase thủy phân cellulose thành đường glucose, nhóm hemicellulase thủy phân hemicellulose thành nhiều loại đường 5C, 6C. Các đường đơn này sẽ được sử dụng cho lên men sản xuất các sản

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-24-37917980.

Email: tnhai@ibt.ac.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4491>

phẩm đích như côn sinh học hay các hóa chất, enzyme.

Trong cấu trúc của hemicellulose của gỗ mềm, glucuronoarabinoxylan (GAX) chiếm 8-15% tổng trọng lượng carbohydrate khô phụ thuộc vào loài thực vật [2]. Tuy nhiên, GAX và xylan nói chung có thể hấp thụ và bám chặt vào các sợi cellulose vi thể, đồng thời liên kết cộng hóa trị với lignin, làm cản trở cellulase tiếp cận với cellulose trong quá trình chuyển hóa [3-5]. GAX có cấu trúc phức tạp bao gồm khung xylan được hình thành từ các tiểu đơn vị xylopyranosyl liên kết β -1,4 (Xylp) và các chuỗi bên arabinofuranosyl theo liên kết α -1,3 (Araf), hoặc 4-O-methylglucuronic acid (MeGlcA) qua mỗi liên kết α -1,2. Trung bình, MeGlcA chiếm khoảng 14% trong phân tử xylan [6]. Việc loại bỏ các gốc glucuronic acid trong cấu trúc xylan là một trở ngại lớn cho việc chuyển hóa nguồn sinh khối này [7]. Vì vậy, việc tìm kiếm các enzyme thủy phân gốc glucuronic acid để hỗ trợ chuyển hóa sinh khối là cần thiết.

α -Glucuronidase là enzyme thuộc họ glycoside hydrolases (EC 3.2.1.-) bao gồm GH4, GH67 và GH115. Cho đến nay, các nhà khoa học đã chứng minh α -1,2-glucuronidase GH67 hoạt động trên các chuỗi xylan ngắn chứa (Me)GlcA và cắt từ đầu không khử [8, 9]. α -Glucuronidase thuộc GH115 có thể hoạt động trên mạch polymer của xylan kích thước lớn và cả trên các chuỗi oligosaccharide ngắn [10, 11]. Từ nguồn dữ liệu DNA metagenome của vi sinh vật trong dạ cỏ dê, một khung đọc mở (ORF) đầy đủ dài 1977 nucleotide đã được khai thác. ORF này không tương đồng với gen nào trên ngân hàng gen NCBI, mã hóa cho enzyme gồm 658 aa có độ tương đồng cao nhất 64% so với enzyme alpha-glucuronidase của *Bacteroides vulgatus*. Khung đọc mở có 69 nucleotide phía đầu 5' mã hóa cho tín hiệu tiết. Phần gen alpha-glucuronidase (*Gglc1*) mã hóa cho protein trưởng thành có chức năng sinh học bao gồm 1908 amino acid đã được tối ưu mã cho biểu hiện tốt ở *E. coli*, sau đó được tổng hợp nhân tạo và đưa vào vector biểu hiện pET-22b(+) tại điểm cắt của enzyme hạn chế *NcoI* và *XhoI* để

tạo thành vector pET22-Gglc1. Trong bài báo này, gen *Gglc1* được nghiên cứu biểu hiện trong *E. coli* và tiến hành tinh chế làm nguyên liệu cho đánh giá đặc điểm sinh học của enzyme.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 Rosetta (DE3) được sử dụng trong thí nghiệm biểu hiện gen; vector pET22b(+) mang gen *Gglc1* dùng làm vector biểu hiện.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Biểu hiện gen *Gglc1*

Vector pET22-Gglc1 được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 Rosetta (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt [12]. Khuẩn lạc *E. coli* mang vector pET22-Gglc1 được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có bổ sung ampicillin đến nồng độ cuối cùng là 100 μ g/ml (môi trường LBA), lắc 200 vòng/phút ở 37°C qua đêm. Sau đó, dịch nuôi cấy được chuyển sang môi trường mới (môi trường được khảo sát là môi trường LBA, PEA, TBA, TBcbA) để đạt OD₆₀₀ ban đầu là 0,1 và nuôi tiếp trong khoảng 2 giờ ở 37°C cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,4 – 0,6 thì tiến hành bổ sung thêm IPTG để cảm ứng sinh tổng hợp enzyme tái tổ hợp. Thành phần môi trường như sau: LB gồm 0,5% cao nấm men, 1% bacto tryptone, 1% NaCl; TB gồm 2,4% cao nấm men, 1,2% peptone, 0,4% glycerol, 0,17 M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄; TBcb gồm 2,4% cao nấm men, 1,2% peptone, 0,24% D-glucose, 0,17 M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄; PE gồm 2% peptone, 1% cao nấm men. Nồng độ IPTG được khảo sát trong khoảng từ 0 đến 1 mM. Mẫu được nuôi cấy tiếp trong điều kiện lắc 200 vòng/phút ở các nhiệt độ khác nhau để lựa chọn ra nhiệt độ thích hợp. Dịch tế bào được ly tâm 5000 vòng/phút, trong 10 phút để loại bỏ dịch nổi. Tủa tế bào được hòa lại trong đệm PBS (8 g NaCl; 2 g KCl; 0,24 g KH₂PO₄; 1,42 g Na₂HPO₄ bổ sung nước cho đến 1 lít)

sao cho $OD_{600}=10$ để tiện so sánh. Tế bào được giữ ở -80°C đến khi phân tích. Protein trong tế bào được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide 12,6%.

Phân tách protein pha tan và pha không tan

Để đánh giá protein tái tổ hợp được biểu hiện ở pha tan hay không tan, tế bào từ -80°C được làm tan nhanh trong nước ấm ($40-50^{\circ}\text{C}$) sau đó được phá vỡ bằng siêu âm với chu kỳ 3 giây siêu âm và 3 giây nghỉ trong tổng thời gian 10 phút. Dịch siêu âm được ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút để tách protein pha tan và pha không tan. Pha tan là phần dịch nổi được thu lại, còn phần cặn là pha không tan được hòa trở lại trong PBS với thể tích bằng thể tích phần dịch vừa hút ra. Mẫu được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE [13].

Tinh chế enzyme α -glucuronidase tái tổ hợp

Enzyme tái tổ hợp được đưa vào pET22b(+) dưới dạng dung hợp với hexahistidine có sẵn trên vector, vì vậy enzyme đã được tinh chế bằng sắc ký ái lực với cột HiChap Chelating HP 5 ml. Cột tinh sạch có chứa hạt gel đã gắn sẵn với Ni^{2+} bảo quản trong lạnh trong cồn 20% được lấy ra và rửa bằng nước deion với thể tích bằng 10 lần thể tích cột. Sau đó gel trong cột được cân bằng với đệm gắn cột (imidazole 20 mM, NaCl 500 mM, PBS 5X) với thể tích bằng 5 lần thể tích cột. Dịch nổi sau khi phá tế bào (45 ml) được bổ sung thêm muối NaCl, imidazol và đệm PBS sao cho nồng độ cuối cùng tương đương với đệm gắn cột sau đó được đưa vào cột. Dịch qua cột được thu lại để phân tích. Mẫu protein trong cột được rửa với đệm rửa (thể tích bằng 5 lần thể tích cột) có thành phần tương tự đệm gắn cột nhưng thay đổi nồng độ imidazol 50 mM và 100 mM. Sau đó, protein tái tổ hợp được đẩy ra khỏi cột bằng đệm thu mẫu có thành phần tương tự đệm gắn cột nhưng có nồng độ imidazol cao 300, 500 mM. Mẫu được thu trong các phân đoạn, mỗi phân đoạn 1 ml. Protein trong các phân đoạn được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE. Độ

sạch của enzyme sau tinh chế được đánh giá bằng phần mềm Quantity One 7.1.

Phương pháp đánh giá định tính hoạt tính enzyme

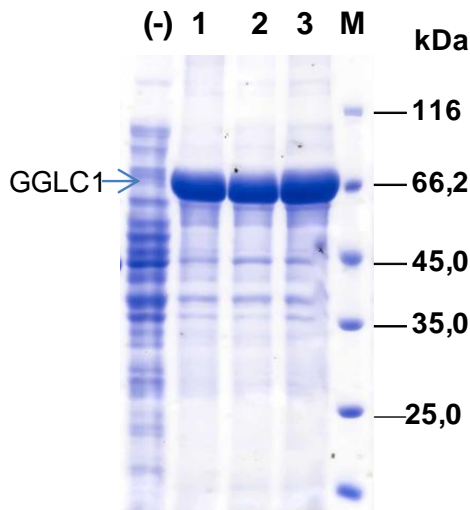
Bromothymol blue là một chất chỉ thị pH, được sử dụng phổ biến để đánh giá sự thay đổi pH với độ nhạy cao. Khi bổ sung bromothymol blue vào dung dịch, dung dịch sẽ chuyển từ màu xanh thẫm đến màu vàng đậm khi pH chuyển từ cao xuống thấp. Theo nguyên lý, trong nước dưới sự có mặt của α -glucuronidase, (Me)GlcA trong birchwood xylan sẽ bị chuyển thành 4-O-methyl-D-glucuronic acid + D-glucuronic acid [14]. Các acid sẽ làm chuyển màu bromothymol blue nên dễ dàng quan sát được để đánh giá sơ bộ hoạt tính enzyme. Xylan (Sigma) 1% được chuẩn bị trong nước de ion đun sôi để phá vỡ cấu trúc của bó sợi xylan. Phản ứng giữa enzyme và cơ chất được tiến hành trong 1000 μl bao gồm 200 μl xylan, 100 μl xylanase (Sigma, 5 μg), 500 μl dịch protein pha tan có chứa enzyme α -glucuronidase. Mẫu đối chứng 1 có thành phần tương tự nhưng dịch enzyme α -glucuronidase được thay bằng protein pha tan của chúng đối chứng. Mẫu đối chứng 2 có thành phần tương tự nhưng dịch enzyme α -glucuronidase và cơ chất được ủ riêng rẽ và chỉ được trộn trước khi bổ sung bromothymol blue. Phản ứng enzyme cơ chất diễn ra ở 40°C qua đêm. Sau đó, mẫu được bổ sung với 200 μl bromothymol blue. Quan sát sự đổi màu của dung dịch trong các mẫu.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Biểu hiện gen Gglc1 trong chủng E. coli Rosetta

Gen *Gglc1* trong vector pET22b(+) nhận được từ hãng Genscript đã được giải trình tự để kiểm tra. Kết quả, trình tự gen đúng 100% so với trình tự đặt tổng hợp. Plasmid đã được biến nạp vào *E. coli* Rosetta và tiến hành biểu hiện ở 30°C với 0,05 mM IPTG trong 5 giờ. Theo tính toán lý thuyết, GGLC1 có kích thước

khoảng 74 kDa. Kết quả, enzyme α -glucuronidase có kích thước cao hơn protein chuẩn (bảng kích thước 66,2 kDa) được biểu hiện trong cả 3 dòng *E. coli* Rosetta được cảm ứng với IPTG trong khi đó dòng đối chứng không cảm ứng với IPTG không có protein này (Hình 1).

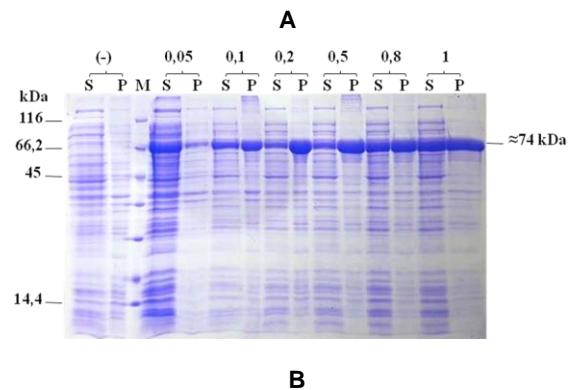
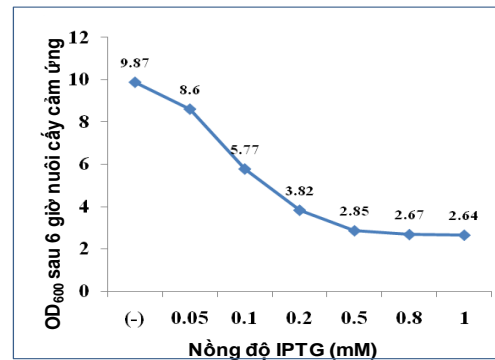


Hình 1. Phân tích sản phẩm biểu hiện của gen *Gglc1* trong trên gel polyacrylamide 12,6%.

M: Protein chuẩn (Fermentas); (-): Dòng không cảm ứng IPTG (đối chứng); 1, 2, 3: Các dòng được nuôi cấy cảm ứng với IPTG.

Ảnh hưởng của nồng độ IPTG lên khả năng biểu hiện gen *Gglc1*

Để nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng IPTG lên khả năng tổng hợp của α -glucuronidase, chủng tái tổ hợp được nuôi trong 200 ml môi trường TBA lỏng ở 37°C trong 1,5 giờ để đạt đến OD₆₀₀ từ 0,4-0,6. Dịch tế bào được chia vào 7 bình, mỗi bình 20 ml trong đó có một bình không được cảm ứng bằng IPTG dùng làm đối chứng. Sáu bình còn lại được bổ sung lượng IPTG thích hợp sao cho nồng độ IPTG cuối cùng trong mỗi bình là 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 0,8 mM và 1 mM. Tất cả các bình sau đó được nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút, biểu hiện ở 20°C và thu mẫu sau 6 giờ.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ IPTG lên khả năng sinh trưởng (A) và tổng hợp α -glucuronidase (B) của chủng *E. coli* tái tổ hợp.

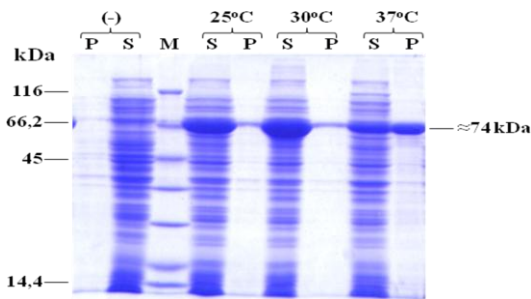
M: Protein chuẩn (Fermentas); (-) : Dòng không cảm ứng IPTG (đối chứng); S: Protein pha tan; P: Protein pha không tan

Kết quả (Hình 2A) cho thấy, sinh khối tế bào thu được sau 6 giờ cảm ứng giảm mạnh khi nồng độ IPTG tăng dần. Diễn hình sinh khối tế bào giảm tới 3 lần khi tế bào được cảm ứng với nồng độ IPTG từ 0,5 đến 1. Trong khi đó, kết quả điện di sản phẩm protein ở pha tan và pha không tan trong tế bào *E. coli* ở các nồng độ chất cảm ứng IPTG khác nhau (Hình 2B) cho thấy nồng độ chất cảm ứng IPTG càng tăng thì protein ngoại lai được tổng hợp càng nhiều. Mặt khác, kết quả trên Hình 2A và 2B cũng cho thấy mức độ tổng hợp enzyme cao đã ảnh hưởng tới quá trình trao đổi chất của tế bào chủ làm cho chúng phát triển kém.

Enzyme được biểu hiện ở pha tan thường sẽ có cấu trúc đúng và có hoạt tính sinh học. So

sánh α -glucuronidase pha tan được biểu hiện ở các nồng độ IPTG khác nhau, chúng tôi nhận thấy ở nồng độ 0,05 mM, protein tan khá nhiều, gần tương đương với lượng enzyme tan khi được cảm ứng ở 0,8 và 1 mM IPTG. Trong khi đó, sinh khối tế bào thu được sau 5 giờ cảm ứng với 0,05 mM IPTG cao gần 4 lần so với sinh khối tế bào được cảm ứng ở 0,8 và 1 mM IPTG. Vì vậy, nồng độ IPTG 0,05 mM đã được lựa chọn cho nghiên cứu biểu hiện gen ở các thí nghiệm tiếp theo.

Khảo sát nhiệt độ biểu hiện

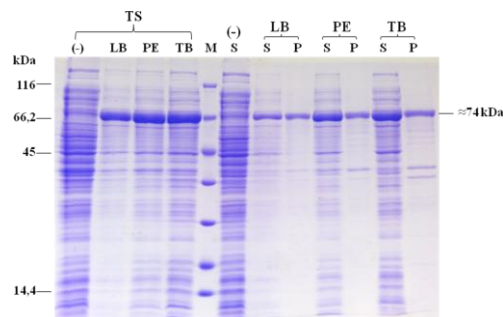
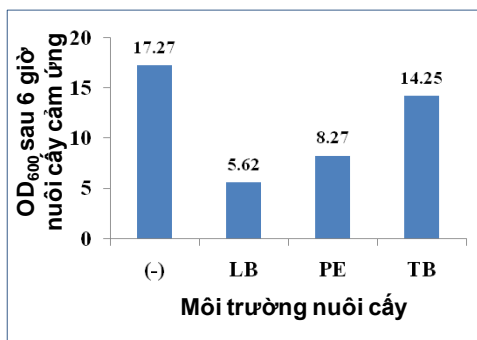


Hình 3. Điện di đồ kiểm tra sự biểu hiện của enzym α -glucuronidase trong tế bào biểu hiện *E. coli* Rosetta ở các nhiệt độ khác nhau trên gel polyacrylamide 12,6%.

(-): Dòng tế bào biểu hiện không được cảm ứng bằng IPTG; M: Protein chuẩn (Fermentas); S: Protein pha tan; P: Protein pha tủa.

Nhiệt độ là một yếu tố vô cùng quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của chủng biểu hiện và khả năng tan của protein. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát biểu hiện ở 3 nhiệt độ khác nhau là 25°C, 30°C và 37°C. Kết quả cho thấy, sau 6 giờ nuôi cấy trong môi trường TBA cảm ứng, OD₆₀₀ của mẫu không cảm ứng đạt 13,49, trong khi đó OD₆₀₀ của mẫu cảm ứng nuôi cấy ở 25°C, 30°C và 37°C thấp hơn, đạt tương ứng là 9,3; 7,4 và 6,4. Bình thường *E. coli* sinh trưởng tốt ở 37°C nên sinh khối thường đạt cao nhất ở nhiệt độ này. Tuy nhiên, trong nghiên cứu, sinh khối đạt cao nhất sau 6 giờ nuôi là ở 25°C. Chúng tôi ở thời điểm sau 6 giờ nuôi cấy, chủng nuôi ở các nhiệt độ 30, 37°C rất có thể đã ở giai đoạn thoái hóa, đi vào pha chết. Kết quả phân tích protein biểu hiện ở các nhiệt độ khác nhau cho thấy enzyme α -glucuronidase được biểu hiện chủ yếu ở pha tan khi nuôi cấy cảm ứng chủng ở nhiệt độ 25°C, 30°C trong khi đó bằng mắt thường có thể thấy một nửa enzyme có kích thước 74 kDa biểu hiện ở pha không tan khi nuôi cấy chủng ở 37°C (Hình 3).

Khảo sát môi trường biểu hiện



Hình 4. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng (A) và tổng hợp GGCL1 (B) của chủng *E. coli* tái tổ hợp.

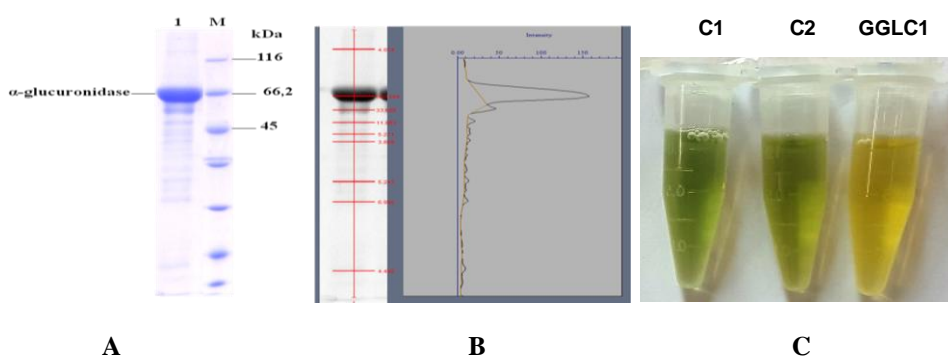
M: Protein chuẩn (Fermentas); (-) : Dòng không cảm ứng IPTG (đối chứng); TS: Protein tổng số từ cùng thể tích môi trường; S: Protein pha tan từ cùng thể tích môi trường; P: Protein pha không tan từ cùng thể tích môi trường.

Môi trường biểu hiện là nơi cung cấp dinh dưỡng cho sự tăng sinh và biểu hiện protein của tế bào chủ. Một môi trường biểu hiện phù hợp sẽ giúp cho tế bào chủ sinh trưởng một cách tốt nhất đồng thời hỗ trợ tối ưu cho việc biểu hiện protein ngoại lai của tế bào. Vì vậy sau khi đã chọn được nhiệt độ và nồng độ chất cảm ứng IPTG phù hợp, chúng tôi tiếp tục khảo sát sự biểu hiện của *E. coli* Rosetta mang vector pET-22b(+) chứa gen mã hóa α -glucuronidase trong 3 môi trường khác nhau là LB, PE và TB.

Nhìn vào giá trị đo OD₆₀₀ sau khi thu mẫu có thể thấy *E. coli* Rosetta mang gen mã hóa α -glucuronidase sinh trưởng tốt nhất trong môi trường TB, với giá trị OD₆₀₀ vượt trội hơn hẳn so với hai môi trường còn lại. Tuy nhiên, trong cùng một thể tích môi trường thì trong môi trường PE và TB chủng tái tổ hợp đều tổng hợp tốt enzyme α -glucuronidase tương đương nhau và lượng enzyme được biểu hiện ở pha tan cũng tương đương nhau (Hình 4). Trong môi trường LB, α -glucuronidase được biểu hiện hơi thấp hơn. Nếu tính về kinh tế thì môi trường PE là môi trường đơn giản, dễ chuẩn bị và thành phần đơn giản hơn môi trường TB do đó có thể sử dụng môi trường PE cho biểu hiện enzyme cho thí nghiệm tinh chế.

Nghiên cứu tinh chế α -glucuronidase

Enzyme α -glucuronidase được nghiên cứu biểu hiện với lượng lớn và được tinh chế với các điều kiện khác nhau như thay đổi nồng độ imidazol trong đệm lên cột (20 mM, 50 mM, 70 mM), trong đệm rửa (50 mM, 100 mM, 150 mM). Kết quả cho thấy quy trình tinh chế sử dụng đệm lên cột có nồng độ imidazole 70 mM, đệm rửa có nồng độ imidazole 100 mM và đệm rửa giải chứa 300 mM imidazole cho kết quả tinh chế tốt nhất khi lượng protein tái tổ hợp thu được lẫn ít protein tạp chất hơn (Hình 5A). Sản phẩm α -glucuronidase sau đó được tua lại trong dung dịch (NH₄)SO₄ 80% bão hòa và được loại muối thông qua cột sắc ký lọc gel và được kiểm tra độ sạch bằng phần mềm QuantityOne (Bio-rad). Kết quả cho thấy tổng hàm lượng protein trên đường chạy là 7,56 μ g trong đó GGLC1 có hàm lượng là 6,8 μ g. Vì vậy độ sạch của enzyme sau tinh chế là 90% (Hình 5B). α -Glucuronidase đã thể hiện được hoạt tính phân cắt chuỗi bên (Me)GlcA trong birchwood xylan thành 4-O-methyl-D-glucuronic acid + D-glucuronic acid làm chuyển màu bromothymol blue sang màu vàng nên dễ dàng quan sát được để đánh giá sơ bộ hoạt tính enzyme. Ống đối chứng (-) C1 không có enzyme và ống đối chứng âm C2 được bổ sung enzyme nhưng enzyme ngay lập tức bị bất hoạt nên không thể hiện được hoạt tính dẫn đến dung dịch có màu xanh lá cây.



Hình 5. Đánh giá độ tinh sạch của α -glucuronidase (GGLC1) bằng SDS-PAGE (A) phần mềm QuantityOne (B) và kiểm tra hoạt tính enzyme trên cơ chất xylan (C).

M: Protein chuẩn (Fermentas); 1: Mẫu α -glucuronidase đã tinh chế; C1: mẫu chứng 1 không chứa enzyme; C2: Mẫu chứng 2 enzyme được bổ sung trước khi bổ sung chỉ thị màu.

4. Kết luận

Gen *Gglc1* mã hóa α -glucuronidase có nguồn gốc từ vi khuẩn trong dạ cỏ dê đã được biểu hiện thành công trong *E. coli* ở pha tan trong môi trường TB, PE có 0,05 mM IPTG ở 25, 30°C. Enzym được tinh chế thành công bằng sắc ký ái lực với độ tinh sạch 90% và có hoạt tính chuyển hóa mạch bên xylan.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện bằng nguồn kinh phí của Đề tài độc lập “Nghiên cứu metagenome của một số hệ sinh thái mini tiềm năng nhằm khai thác các gen mới mã hóa hệ enzyme chuyển hóa hiệu quả lignocelluloses“, mã số ĐTDLCN.15/14 và trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen.

Tài liệu tham khảo

- [1] Z. Anwar, M. Gulfraz, M. Irshad, Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7 (2014) 163.
- [2] S. Willför, A. Sundberg, J. Hemming, B. Holmbom, Polysaccharides in some industrially important softwood species, *Wood Science and Technology* 39 (2005) 245.
- [3] T.J. Bosmans, A.M. Stépán, G. Toriz, S. Renneckar, E. Karabulut, L. Wågberg, P. Gatenholm, Assembly of debranched xylan from solution and on nanocellulosic surfaces, *Biomacromolecules* 15 (2014) 924.
- [4] M.A. Kabel, H. van den Borne, J.P. Vincken, A.G.J. Voragen, H.A. Schols, Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose, *Carbohydrate Polymers* 69 (2007) 94.
- [5] Å. Linder, R. Bergman, A. Bodin, P. Gatenholm, Mechanism of assembly of xylan onto cellulose surfaces, *Langmuir* 19 (2003) 5072.
- [6] A. Escalante, A. Gonçalves, A. Bodin, A. Stepan, C. Sandström, G. Toriz, P. Gatenholm, Flexible oxygen barrier films from spruce xylan, *Carbohydrate Polymers* 87 (2012) 2381.
- [7] L.S. McKee, H. Sunner, G.E. Anasontzis, G. Toriz, P. Gatenholm, V. Bulone, F. Vilaplana, L. Olsson, A GH115 α -glucuronidase from *Schizophyllum commune* contributes to the synergistic enzymatic deconstruction of softwood glucuronoarabinoxylan, *Biotechnology for Biofuels* 9 (2016) 2.
- [8] G. Golan, D. Shallom, A. Teplitsky, G. Zaide, S. Shulami, T. Baasov, V. Stojanoff, A. Thompson, Y. Shoham, G. Shoham, Crystal structures of *Geobacillus stearothermophilus* α -glucuronidase complexed with its substrate and products MECHANISTIC IMPLICATIONS, *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 3014.
- [9] D. Nurizzo, T. Nagy, H.J. Gilbert, G.J. Davies, The structural basis for catalysis and specificity of the *Pseudomonas cellulosa* α -glucuronidase, GlcA67A, *Structure* 10 (2002) 547.
- [10] P.M. Martínez, M.M. Appeldoorn, H. Gruppen, M.A. Kabel, The two *Rasamsonia emersonii* α -glucuronidases, ReGH67 and ReGH115, show a different mode-of-action towards glucuronoxylan and glucuronoxyloligosaccharides, *Biotechnology for Biofuels* 9 (2016).
- [11] B. Cobucci-Ponzano, A. Strazzulli, R. Iacono, G. Masturzo, R. Giglio, M. Rossi, M. Moracci, Novel thermophilic hemicellulases for the conversion of lignocellulose for second generation biorefineries, *Elsevier* 78 (2015) 63.
- [12] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL Press, 2001.
- [13] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680.
- [14] A. Rogowski, A. Baslé, C.S. Farinas, A. Solovyova, J.C. Mortimer, P. Dupree, H.J. Gilbert, D.N. Bolam, Evidence that GH115 α -glucuronidase activity, which is required to degrade plant biomass, is dependent on conformational flexibility, *The Journal of Biological Chemistry* 289 (2014) 53.

Expression and Purification of α -glucuronidase Derived from Bacteria in Goats Rumen from Recombinant *Escherichia coli* Rosetta (DE3)

Le Ngoc Giang¹, Le Tung Lam¹, Tran Thi Loan^{1,2},
Do Thi Huyen¹, Truong Nam Hai¹

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

²*Biology Faculty, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam*

Abstract: α -1,2-Glucuronidase GH67 plays an important role in the degradation of 4-O-methylglucuronic acid ((Me)GlcA) side chain in glucuronoarabinoxylan to enhance lignocellulose conversion into fermentable sugars for production of bioethanol and value-added products from plant biomass. In this study, a gene *Gglc1* of 1908 nucleotides coding for mature α -1,2-glucuronidase GH67 derived from bacteria in goats rumen was successfully expressed in *E. coli* Rosetta. Most of recombinant enzyme was soluble fraction when the host cultured in TBA, PEA media containing 0.05 mM IPTG at 25°C or 30°C. The recombinant enzyme was purified by His-tag affinity chromatography with purity of 90%. Preliminarily, the enzyme exhibited activity to convert (Me)GlcA present in birchwood xylan into 4-O-methyl-D-glucuronic acid and D-glucuronic acid to reduce pH which was detected by pH indicator bromothymol blue. In future, the recombinant enzyme will be characterized for supplementation into enzyme cocktail for effective lignocellulose conversion into sugar.

Keywords: α -glucuronidase, expression, *Escherichia coli*, DNA metagenome, *Gglc1*.