

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZYM AXETYL (XYLAN) ESTERAZA CỦA NẤM *Aureobasidium pullulans* var *melanigenum* SH1 TRÊN CƠ CHẤT LÀ CÁC PHỤ PHẨM CÔNG - NÔNG NGHIỆP GIÀU Licnoxenuloza

Đỗ Hữu Nghị¹, Vũ Đình Giáp¹, Đỗ Hữu Cảnh,
Lê Hữu Cường¹, Lê Mai Hương¹

312717

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chủng nấm túi *Aureobasidium pullulans* var *melanigenum* SH1 (*A. pullulans* SH1) có khả năng thủy phân cơ chất *p*-nitrophenyl axetat khi phát triển trên môi trường bổ sung nguồn các bon, nitơ khác nhau như: cà chua, đậu tương, khoai tây và các cơ chất giàu licnoxenuloza từ các phụ phẩm công-nông nghiệp như mùn gỗ, bã ngô (thân cây) và rơm lúa. Kết quả cho thấy chủng *A. pullulans* SH1 sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza mạnh trên môi trường bổ sung các cơ chất như mùn gỗ, khoai tây, đậu tương và rơm với hoạt tính enzym trong thời gian nuôi cấy 24 ngày là từ 346,9 UL⁻¹ (trên môi trường cơ chất là bã ngô) đến 1025,4 UL⁻¹ (trên môi trường cơ chất rơm). Hoạt tính enzym cao nhất với nguồn nitơ từ pepton đạt 1097,3 UL⁻¹. Do vậy, rơm và pepton được sử dụng làm cơ chất và nguồn nitơ cho quá trình lên men sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza của chủng *A. pullulans* SH1 với điều kiện thích hợp được xác định là ở nhiệt độ 25°C, pH 7. Protein enzym được chiết tách bằng phương pháp siêu lọc 10 kDa "cut-off" và bước đầu tinh sạch qua cột sắc ký trao đổi amino DEAE-Sepharose thu được 2 phân đoạn protein biểu hiện hoạt tính axetyl (xylan) esteraza lần lượt là 21,4 U/ml¹ và 3,2 U/ml¹.

Từ khóa: Chủng nấm *Aureobasidium pullulans* SH1, enzym axetyl (xylan) esteraza, cơ chất licnoxenuloza.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Licnoxenuloza từ sinh khối thực vật là các polyme sinh học có ở tất cả các hệ sinh thái trên đất liền và đây là nguồn hợp chất hữu cơ tái tạo lớn nhất trong sinh quyển (Peters, 2007). Xét về nguồn gốc, thành phần và mức độ polyme hóa, có thể phân biệt các loại licnoxenuloza như: từ cây gỗ cứng và gỗ mềm cũng như các vật liệu từ cây trồng (đặc biệt là cây ngũ cốc, các loại cỏ) và cây thảo. Các loại nấm được biết là có hệ enzym xúc tác hiệu quả giúp chúng phân hủy tốt sinh khối licnoxenuloza. Thật vậy, nấm bao gồm hai hệ enzym ngoại bào + hệ enzym thủy phân có vai trò trong phân thủy polysacarit, hệ enzym oxy hóa và enzym phân giải linh tinh ngoại bào để phân hủy linh tinh và xúc tác phản ứng mở vòng phenyl. Ngoài các enzym oxy hóa đã được mô tả khá kỹ (Hatakka, 2001; Hofrichter, 2002; Martínez *et al.*, 2009), quá trình chuyển hóa

licnoxenuloza còn cần các enzym thủy phân bao gồm các xenulaza, xylanaza, hydrat carbon esteraza... có thể hoạt động phối hợp với các enzym tấn công cấu trúc polyme (Van Dyk & Pletschke, 2012).

Axetyl esteraza hay axetyl (xylan) esteraza (EC 3.1.1.72) là các enzym thủy phân liên kết este giữa axetyl và gốc xyloza của cấu trúc xylan, pectin trong cấu trúc polysacarit sinh khối thực vật (Biely, 2012). Quá trình de-axetyl này làm cho các đơn vị xylopyranosyl của mạch chính xylan dễ bị phân hủy hơn bởi endo-β-1,4-xylanaza (EC 3.2.1.8). Các nhóm axetyl liên kết nhánh có thể làm ảnh hưởng sự tiếp cận của các enzym phân cắt mạch chính về không gian, do vậy xúc tác loại bỏ các nhóm O-axetyl ở các vị trí 2/3 trên β-D xylopyranosyl của axetyl xylan bởi axetyl (xylan) esteraza giúp các enzym phân cắt mạch chính được dễ dàng hơn (Javier *et al.*, 2007). Enzym hydrat carbon esteraza này từ một số nấm túi đã được miêu tả, bao gồm *Trichoderma reesei* (Sundberg & Poutanen, 1991), *Aspergillus awamori* (Sundberg *et al.*, 1990), *A. niger* (Linden *et al.*, 1994), *Penicillium purpurogenum* (Gordillo *et al.*, 2006);

¹ Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam

² Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam

Fusarium oxysporum (Christakopoulos, 1999) và *Chrysosporium lucknowense* (Pouvreau et al., 2011).

Tuy nhiên, hiện nay ở Việt Nam có rất ít các công bố liên quan đến việc sử dụng enzym axetyl (xylan) esteraza từ một số loài nấm trong quá trình phân hủy lignoxenuloza từ phụ phẩm công-nông nghiệp.

Aureobasidium pullulans SH1 thuộc ngành nấm túi (Ascomycota; họ Dothioraceae), hình thái giống với nấm men và có thể thấy loài này trong các môi trường khác nhau như đất, nước, không khí và đá vôi. Chúng thường được thấy ở các vùng ôn đới chủ yếu ở Anh, Mỹ nhưng cũng được thấy nhiều ở Canada, Alaska, Antarctica, Nga và châu Âu. Trong tự nhiên, chúng được biết là những loài nội ký sinh của nhiều cây thực vật (như táo, nho, dưa chuột, đậu đỗ, bắp cải) mà không gây ra bất kỳ triệu chứng nào của bệnh. *A. pullulans* SH1 là loài nấm có tầm quan trọng trong công nghệ sinh học cho sinh tổng hợp enzym, siderophore (đại thực bào chứa sắt) (chất mang Fe^{3+}) và pullulan - một biopolyme có giá trị thương mại cao (Singh et al., 2008). Ngoài ra, *A. pullulans* SH1 cũng được quan tâm nghiên cứu cho mục đích sản xuất nhiên liệu sinh học (Wang et al., 2014) và sinh tổng hợp các enzym liên quan quá trình chuyển hóa lignoxenuloza (xylanaza, lacaza...) (Rich et al., 2013; Ohta et al., 2001). Trong công bố này chúng tôi trình bày một số kết quả nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp axetyl (xylan) esteraza cao bởi chủng *A. pullulans* SH1 khi phát triển trên các nguồn các bon khác nhau bao gồm một số cơ chất giàu lignoxenuloza từ phụ phẩm nông nghiệp.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chủng giống

Chủng nấm *Aureobasidium pullulans* var *melanigenum* SH1 là chủng nấm được phân lập và lưu giữ tại Phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên.

Nấm được phát triển trên môi trường thạch mạch nha (20 gL^{-1}) ở nhiệt độ 23°C và lưu giữ ở 4°C sau khi khuẩn ty phát triển đầy bề mặt thạch. Để nhân giống cho quá trình sinh tổng hợp enzym tiếp theo, khuẩn ty nấm từ môi trường thạch được cấy chuyển sang các đĩa môi trường thạch mạch nha mới, nuôi cấy ở 23°C khoảng 3 tuần để nấm phát triển phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2. Xác định nguồn nitơ và cơ chất lignoxenuloza thích hợp

Môi trường lên men lỏng (môi trường cơ bản) bao gồm MgSO_4 $0,5 \text{ gL}^{-1}$; KH_2PO_4 $1,5 \text{ gL}^{-1}$; cao nấm men $3,0 \text{ gL}^{-1}$, dịch vi lượng $0,01 \text{ L}$, pH 6,0. Môi trường vôi thành phần như trên được bổ sung 2% (v/v) lần lượt các cơ chất cảm ứng (nguồn các bon) sinh tổng hợp enzym từ các nguồn giàu lignoxenuloza như bã ngô (BN), rơm rạ (RR) và mùn gỗ (MG). Ngoài ra, nấm cũng được nuôi cấy trên các môi trường với nguồn cơ chất khác như cà chua (CC), khoai tây (KT) và đậu tương (DT). Các cơ chất lignoxenuloza trên được rửa sạch, cắt nghiền nhỏ (3-5 cm), sấy khô, trước khi bổ sung vào bình lên men chứa môi trường cơ bản và khử trùng (121°C trong 30 min).

Môi trường vôi thành phần trên được thay cao nấm men bằng các nguồn nitơ khác nhau: KNO_3 $3,0 \text{ gL}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $3,0 \text{ gL}^{-1}$, pepton $3,0 \text{ gL}^{-1}$, NaNO_3 $3,0 \text{ gL}^{-1}$ để xác định khả năng đồng hóa các nguồn nitơ khác nhau.

Nấm được nuôi cấy ở điều kiện thích hợp trong các bình Erlenmeyer 1000 mL hoặc trên thiết bị lên men 2,5 L (AmAr, Mumbai, Ấn Độ) trong điều kiện có sự khuấy và lắc liên tục (200 v/ph).

Trong quá trình nuôi cấy đến 24 ngày, mẫu (1 ml) được lấy sau mỗi 3 ngày để xác định hoạt tính enzym và sự thay đổi pH môi trường. Thử nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần, kết quả thể hiện là giá trị trung bình của các lần thực nghiệm lặp lại.

2.3. Xác định nhiệt độ, pH tối ưu

Chủng nấm được nuôi cấy nấm trên môi trường lên men lỏng (pH 6,0) bổ sung cơ chất rơm (2%) dưới điều kiện nhiệt độ khác nhau: 23°C , 25°C , 28°C , 30°C và 37°C trong khoảng thời gian tối ưu để sự sinh tổng hợp enzym đạt cao nhất. Tiến hành thu sinh khối, thử hoạt tính enzym, so sánh và tìm ra nhiệt độ thích hợp nhất cho sự phát triển của hệ sợi nấm và hoạt tính enzym. Tương tự, nấm được phát triển trên môi trường lỏng ở nhiệt độ 25°C và các điều kiện môi trường pH khác nhau (pH 5-8) để xác định được pH thích hợp cho sự phát triển và sinh tổng hợp enzym bởi *A. pullulans* SH1.

2.4. Nuôi cấy nấm sinh tổng hợp enzym trên môi trường rắn

Sau khi xác định rơm lúa là cơ chất lignoxenuloza phù hợp cho sinh tổng hợp enzym bởi nấm *A. pullulans* SH1, 2 kg rơm khô được ngâm nước qua đêm sau đó cho vào các túi plastic chịu nhiệt và khử trùng ở 121°C trong 30 phút. Sử dụng 2 hộp

peptri môi trường thạch-mạch nha (dịch chiết mạch nha 20 gL⁻¹, aga-aga 18 gL⁻¹, H₂O 1L) có khuẩn ty nấm *A.pullulans* SH1 nghiền đồng thể trong 160 ml nước cất có 0,9% NaCl. Tiếp theo, cấy chuyển toàn bộ dịch khuẩn ty vào túi plastic với cơ chất rom hoặc mùn gỗ, toàn bộ quá trình nuôi cấy được thực hiện ở điều kiện vô trùng. Sau 2-3 tuần nuôi cấy ở 23 - 25°C, các túi nấm được thu và chiết với nước cất dưới điều kiện lắc qua đêm để thu dịch enzym thô cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.5. Phương pháp đánh giá hoạt độ enzym axetyl (xylan) esteraza

Hoạt tính axetyl (xylan) esteraza ngoại bào được đánh giá qua khả năng thủy phân p-nitrophenyl axetat thành p-nitrophenol xác định bằng phương pháp đo quang ở λ=405 nm. Nồng độ cuối của cơ chất là 1 mM trong đệm phot phat (100 mM). Phản ứng diễn ra ở 37°C trên phiến vi lượng 96 giếng trong 10 phút (Lierset *et al.*, 2006; Purdy & Kolattukudy, 1973).

2.6. Phương pháp xác định protein

Nồng độ protein tổng trong dịch chiết và các phân đoạn tinh sạch được xác định bằng phương pháp so màu theo quy trình của Bradford (1976) sử dụng Roti® - Nanoquant Kit và protein chuẩn BSA (bovine serum albumin). Mẫu được nhỏ lên phiến 96 giếng, lặp lại 3 lần và đo ở λ=590/450 nm với thiết bị đo phiến vi lượng NanoQuant (Tecan, Australia Pty Ltd).

2.7. Chiết tách và bước đầu tinh sạch enzym

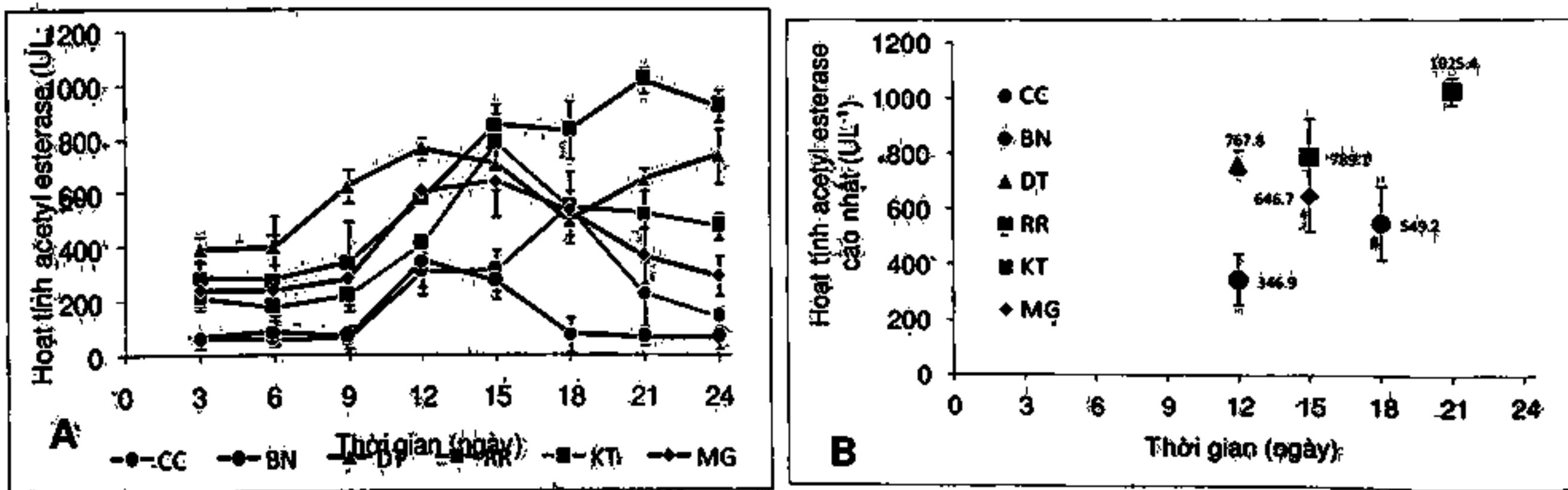
Dịch lên men từ môi trường nuôi cấy *A.pullulans* SH1 được lọc sơ bộ, ly tâm loại cặn lắng 6.000-10.000 v/ph trong 5-10 phút. Sau khi ly tâm, dịch enzym được tủa bằng dung môi hữu cơ (axeton, ethanol) và

muối sulfat amon (nồng độ 40-70%) hoặc lọc bằng hệ thống siêu lọc 10 kDa cut-off (Stirred Ultrafiltration Cell, Millipore, Bedford, USA). Dịch enzym thô được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký trao đổi anion sử dụng sắc ký trao đổi anion DEAE Sepharose.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cơ chất thích hợp sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza

Chủng nấm *A.pullulans* SH1 được nuôi cấy dưới điều kiện lắc 200 v/ph trong 24 ngày ở 23-25°C trên môi trường lên men dịch thể bổ sung các cơ chất khác nhau. Sau mỗi 3 ngày, dịch enzym được thu để xác định hoạt tính enzym axetyl (xylan) esteraza qua khả năng thủy phân p-nitrophenyl axetat. Kết quả được trình bày ở hình 1 cho thấy chủng *A.pullulans* SH1 sinh tổng hợp axetyl (xylan) esteraza mạnh trên môi trường bổ sung các cơ chất như rom, khoai tây, đậu tương và mùn gỗ với hoạt tính enzym cao nhất trong thời gian nuôi cấy là từ 349,7 U.L⁻¹ (trên môi trường cơ chất bã ngô) đến 1025,4 U.L⁻¹ (trên môi trường cơ chất rom). Ở tất cả các môi trường này sự sinh tổng hợp enzym của nấm bắt đầu ngay sau 3 ngày nuôi cấy và sinh tổng hợp axetyl (xylan) esteraza mạnh từ ngày thứ 12 (Hình 1-A). Tuy nhiên hoạt tính cao nhất ở môi trường là khác nhau, theo đó hoạt tính enzym cao nhất thu được sau ngày nuôi cấy thứ 12 đối với cơ chất bã ngô và đậu tương, trong khi ở môi trường có cơ chất cà chua, khoai tây và mùn gỗ ở ngày 15-18 và rom ở ngày 21 (Hình 1-B). Rom là nguồn giàu licoxenuloza, dễ kiếm và rẻ tiền, là cơ chất môi trường thích hợp nhất để nuôi cấy nấm *A.pullulans* SH1 và sinh tổng hợp axetyl (xylan) esteraza (hoạt tính cao nhất đạt 1025,4 U.L⁻¹ sau 21 ngày lên men dịch thể).



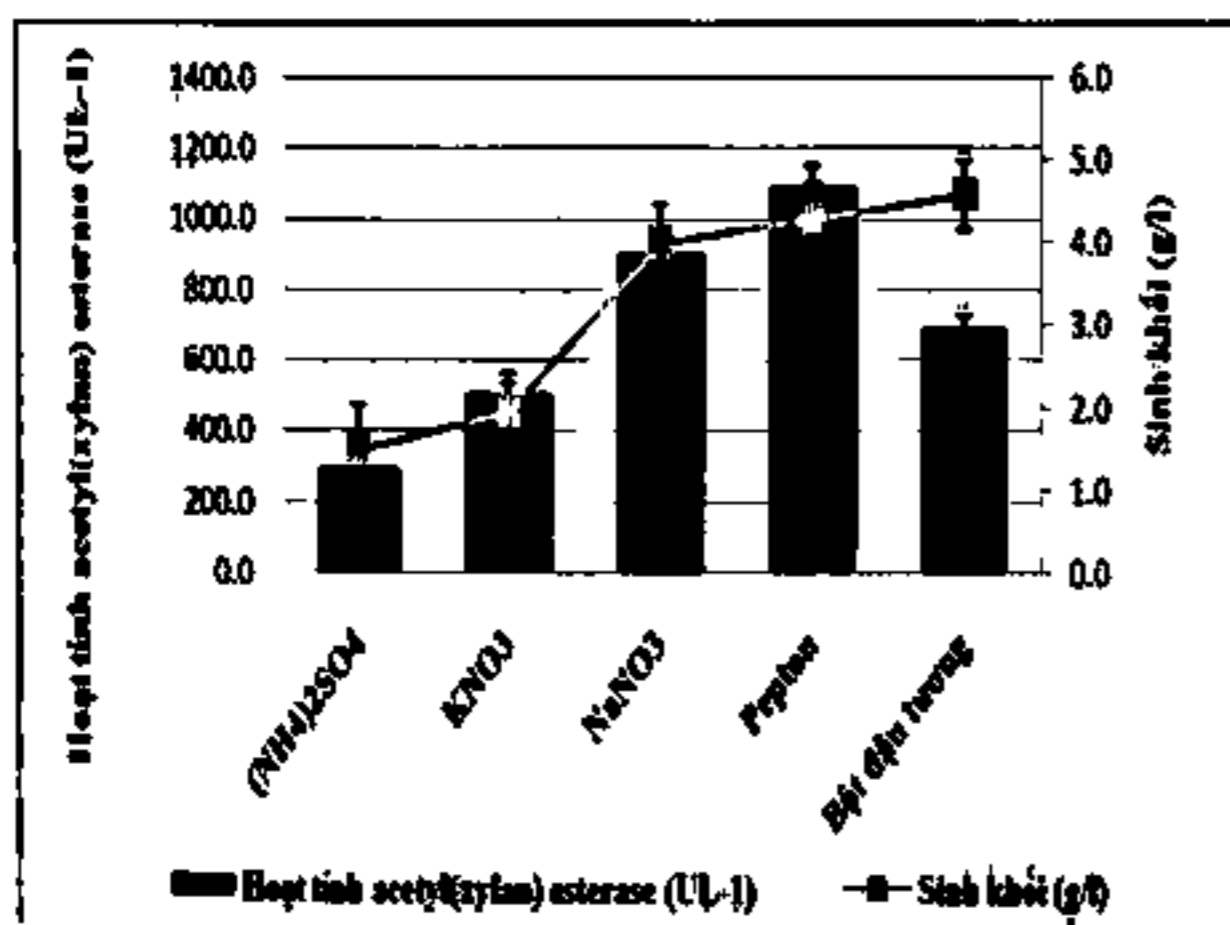
Hình 1. Động học sinh tổng hợp axetyl (xylan) esteraza (A) và hoạt tính enzym cao nhất (B) trong 24 ngày nuôi cấy chủng nấm *Aureobasidium pullulans* SH1 trên các môi trường có bổ sung cơ chất cà chua (CC), bã ngô (BN), đậu tương (DT), rom (RR), khoai tây (KT) và mùn gỗ (MG)

Axetyl (xylan) esteraza là enzym thủy phân xúc tác giải phóng nhóm axetyl từ các polysacarit axetyl hóa như pectin hay xylan. Hoạt tính enzym axetyl (xylan) esteraza bởi chủng nấm trong nghiên cứu này (*A. pullulans* SH1) cao hơn rất nhiều so với chủng *Xylaria polymorpha* mà nhóm chúng tôi mới nghiên cứu gần đây (Vd. 1025,4 UL⁻¹ đối với chủng *A. pullulans* SH1 so với 93,5 UL⁻¹ chủng *X. polymorpha* ở cùng điều kiện lên men dịch thể (Nghị *et al.*, 2015). Ngoài ra, enzym này từ một số loài nấm đảm (Basidiomycetes) cũng đã được nghiên cứu. Tsujiyama & Nakano (1996) công bố khả năng sinh axetyl (xylan) esteraza từ nấm mục gỗ *Coriolus versicolor* trên môi trường có cơ chất mùn gỗ. Thời gian lên men để sinh tổng hợp axetyl (xylan) esteraza của chủng này lâu hơn nhiều so với chủng *A. pullulans* SH1 (sinh enzym mạnh sau 15 ngày nuôi cấy so với 6 tuần ở chủng *C. versicolor*).

Như vậy, kết quả nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza bởi nấm *A. pullulans* SH1 chỉ rõ đây là chủng rất tiềm năng với hoạt tính enzym cao và thời gian lên men sinh tổng hợp ngắn và rơm được lựa chọn là cơ chất đồng thời cũng là nguồn cung cấp các bon thích hợp cho sự phát triển và sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza.

3.2. Khả năng đồng hóa các nguồn nitơ sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza

Để đánh giá được khả năng đồng hóa các nguồn nitơ khác nhau: KNO₃, (NH₄)₂SO₄, NaNO₃, pepton, nấm được nuôi cấy ở các điều kiện thích hợp sử dụng cơ chất là rơm (nguồn các bon) sau 21 ngày nuôi cấy kết quả được thể hiện trên hình 2.



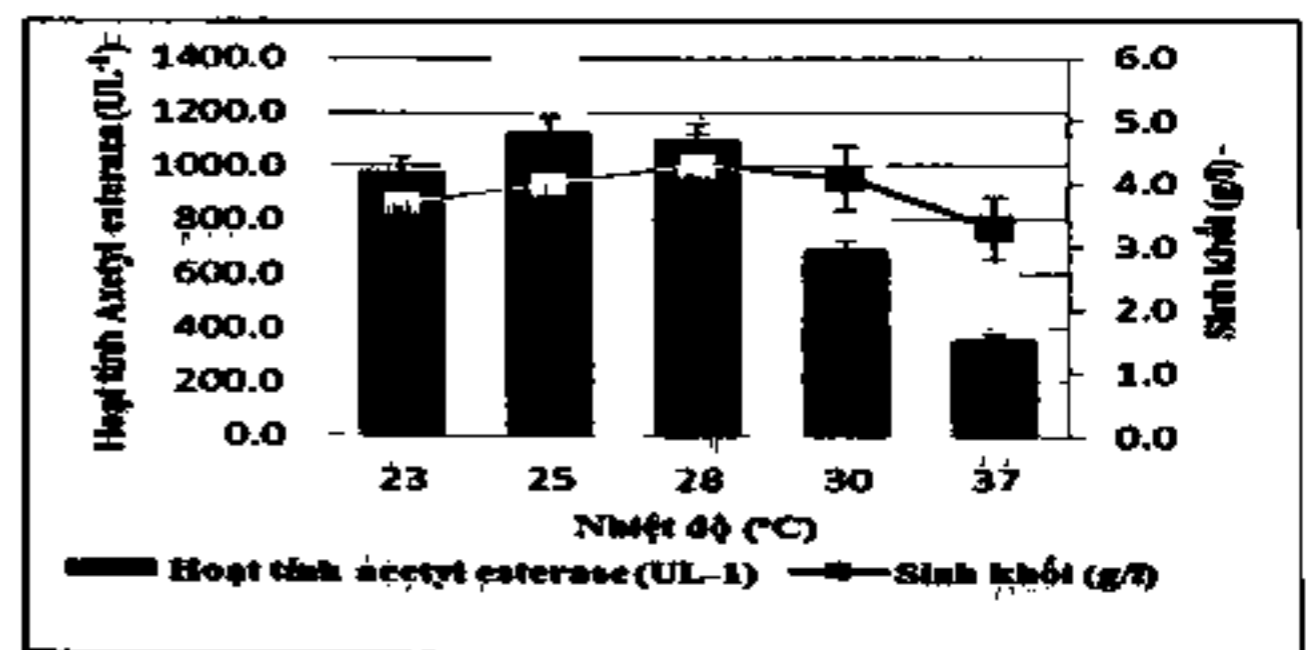
Hình 2. Khả năng đồng hóa các nguồn nitơ khác nhau của chủng nấm *Aureobasidium pullulans* SH1

Kết quả từ hình 2 cho thấy rằng chủng nấm *A. pullulans* SH1 đều có khả năng đồng hóa 5 nguồn nitơ khác nhau. Tuy nhiên với mỗi nguồn nitơ thì khả năng đồng hóa là khác nhau. Nguồn nitơ từ (NH₄)₂SO₄ hoạt tính axetyl (xylan) esteraza thu được là thấp nhất 302,2 UL⁻¹. Hoạt tính enzym cao nhất với nguồn nitơ từ pepton 1097,3 UL⁻¹. Tuy nhiên, nguồn nitơ từ bột đậu tương thu được sinh khối 4,6 gL⁻¹ cao hơn so với sinh khối thu được từ nguồn pepton 4,4 gL⁻¹. Như vậy pepton sẽ được chọn là nguồn cung cấp nitơ thích hợp cho sự phát triển và sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza.

3.3. Nhiệt độ tối ưu sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza

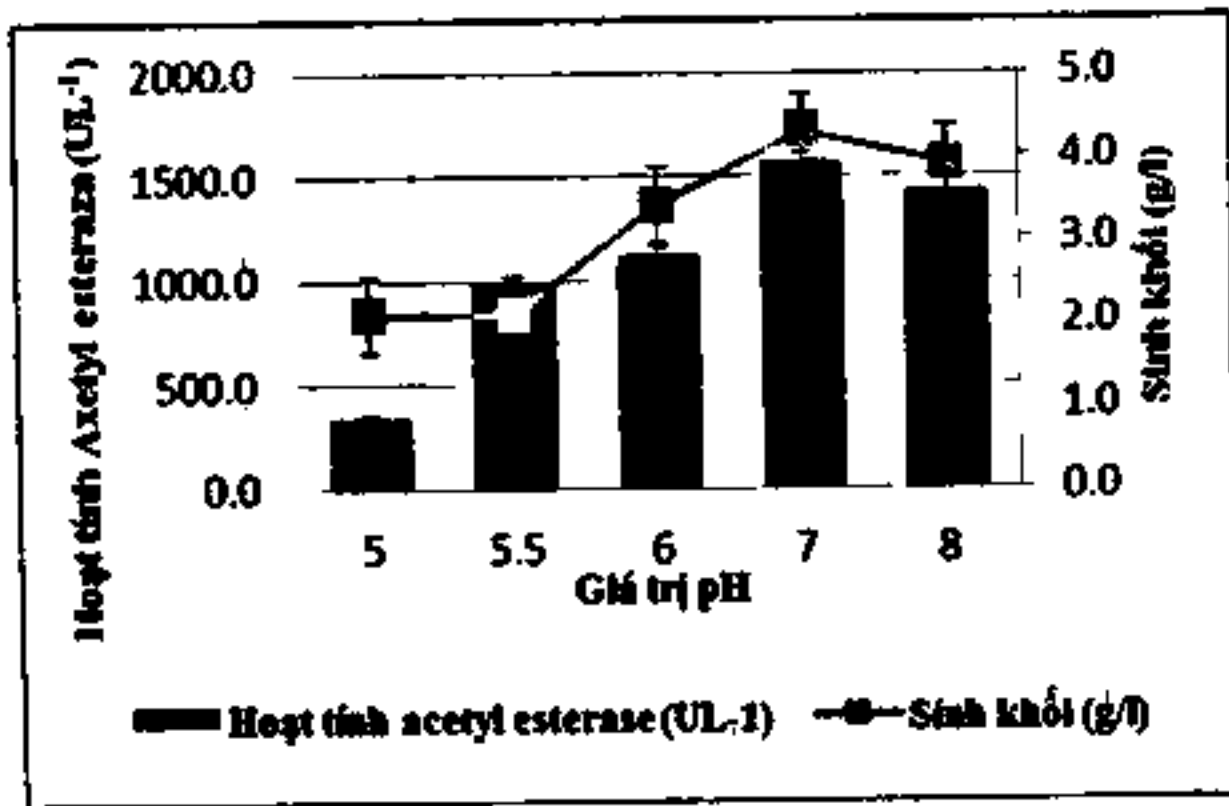
Ngoài thời gian lên men, nhiệt độ lên men là một trong những yếu tố quan trọng, quyết định lên sự sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza cũng như hiệu suất của quá trình lên men. Để xác định nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển sinh khối và sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza bởi chủng nấm *A. pullulans* SH1. Thành phần môi trường nuôi cấy trên được bổ sung nguồn cơ chất rơm nghiên nhỏ, pH 7, cao nấm men được thay bằng pepton để cung cấp nguồn nitơ thích hợp cho nấm phát triển. Nấm được nuôi cấy dưới điều kiện lắc 200 v/ph trong dài nhiệt độ khác nhau: 23°C, 25°C, 28°C, 30°C và 37°C.

Kết quả hoạt độ enzym axetyl (xylan) esteraza và sinh khối thu được sau 21 ngày nuôi cấy được thể hiện trong hình 3. Theo đó, nhiệt độ 23-28°C không ảnh hưởng đáng kể lên sự phát triển và sinh tổng hợp enzym bởi chủng *A. pullulans* SH1 trong khi hoạt tính enzym giảm đáng kể ở nhiệt độ trên 30°C. Theo đó, sự phát triển tốt nhất đồng thời tối ưu nhất cho sinh tổng hợp enzym là ở nhiệt độ 25-28°C với sinh khối đạt từ 3,9 gL⁻¹ đến 4,1 gL⁻¹ và hoạt tính 1100-1123 UL⁻¹.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza trên môi trường nuôi cấy lỏng bởi chủng nấm *Aureobasidium pullulans* SH1

3.4. pH tối ưu sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza



Hình 4. Ảnh hưởng của pH lên sự sinh tổng enzym axetyl (xylan) esteraza của chủng nấm *Aureobasidium pullulans* SH1

Kết quả được thể hiện trên hình 4 cho thấy pH môi trường ảnh hưởng rất rõ rệt tới khả năng phát triển và sinh tổng hợp axetyl (xylan) esteraza bởi chủng *A. pullulans* SH1. Điều kiện môi trường thích hợp nhất là pH trung tính với sinh khối và hoạt độ đạt được tại pH này lần lượt là 4,4 gL⁻¹ và 1568 UL⁻¹. Ở môi trường kiềm (pH 8) nấm vẫn phát triển tốt và hiệu quả sinh enzym (1412 UL⁻¹) cao hơn nhiều so với môi trường axit. Đặc biệt, hoạt độ enzym từ môi trường nuôi cấy giảm mạnh ở pH dưới pH 6 và chỉ còn 25% hoạt tính ở pH 5 so với ở pH trung tính.

3.5. Tách chiết, tinh sạch protein enzym axetyl (xylan) esteraza

3.5.1. Tinh sạch sơ bộ bằng tủa protein và siêu lọc

Để thu được lượng dịch lên men đủ lớn cho các nghiên cứu tiếp theo khi enzym được sinh tổng hợp ở lượng tối đa, động học quá trình lên men sinh tổng hợp axetyl (xylan) esteraza bởi nấm *A. pullulans* SH1

được nghiên cứu trong quá trình nuôi cấy nấm trên môi trường rắn với cơ chất licnoxenluloza (rơm), pH 7, quỹ mô 2 kg/m² ở 25°C trong 21 ngày.

Dịch môi trường nuôi cấy nấm *A. pullulans* SH1 được ly tâm 6 000 v/ph trong 10 phút loại khuẩn ty nấm và cơ chất. Phần dịch được tủa với dung môi phân cực là axeton, ethanol và muối vô cơ sulfat amon ở các nồng độ cuối khác nhau (40, 50, 55, 60, 65 và 70%; v/v). Quá trình tủa protein xảy ra ở 4°C trong 12 giờ, sau đó ly tâm thu cặn protein. Các phân đoạn thu được sau ly tâm và bay hơi dung môi được hòa lại với đệm photphat 10 mM (pH 6,0) để xác định hàm lượng protein và hoạt lực enzym.

Nhìn chung, kết quả thu được cho thấy nồng độ protein tổng và hoạt tính axetyl (xylan) esteraza ở các phân đoạn tủa bằng muối sulfat-amon đều thấp, đối với các phân đoạn tủa bằng axeton thì nồng độ protein cao hơn nhưng hoạt tính enzym không cao. Nồng độ protein cũng như hoạt lực axetyl (xylan) esteraza cao nhất được xác định ở phân đoạn tủa bằng ethanol với nồng độ dung môi 60% (v/v) và hoạt lực enzym 132,2 U mg⁻¹ (Bảng 1).

Bên cạnh đó, phương pháp lọc 10 kDa cut-off ở 11°C cũng được nghiên cứu so sánh. Ở phương pháp này cho thấy lượng protein thu được tương đối thấp (do các protein có trọng lượng phân tử <10 kDa đã được loại bỏ và số liệu không thể hiện ở đây) nhưng hoạt tính enzym còn lại cao hơn nhiều so với các phương pháp tủa ở trên. Theo đó nồng độ protein thu được là 0,7 mg ml⁻¹ và hoạt tính riêng là 184,2 U mg⁻¹. Đây là phương pháp cho hiệu quả thu hồi enzym cao do ít ảnh hưởng đến hoạt tính enzym so với dung môi hữu cơ hay muối sulfat-amon.

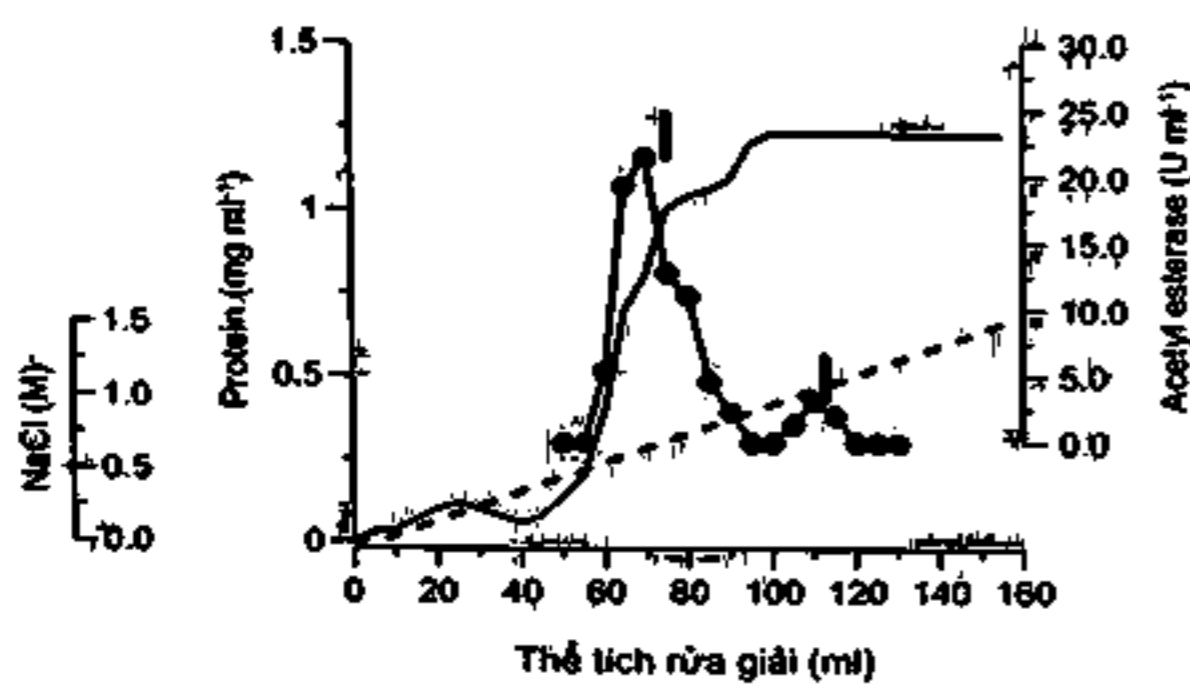
Bảng 1. Kết quả cô, chiết tách protein enzym từ dịch nuôi cấy nấm

Phương pháp	Nồng độ (%; v/v)						Hoạt tính riêng (U mg ⁻¹ protein)
	40	50	55	60	65	70	
Tủa axeton	44,3	95,9	87,9	50,8	39,4	35,9	184,2 U mg ⁻¹
Tủa ethanol	67,3	136,7	124,0	132,2	102,1	85,4	
Tủa sulfat-amon	63,2	81,6	84,2	98,4	58,2	36,3	
Siêu lọc 10 kDa cut-off	184,2 U mg ⁻¹						

3.5.2. Bước đầu tinh sạch axetyl (xylan) esteraza bằng sắc ký trao đổi ion

Dịch chiết enzym thô từ môi trường nuôi cấy nấm sau 3 tuần được cô đặc bằng siêu lọc (màng lọc 10 kDa cut-off). Sau đó protein có hoạt tính enzym trên cơ chất phản ứng p-nitrophenyl axetat [axetyl

(xylan) esteraza] được tinh sạch trên cột sắc ký lỏng. Bước đầu, quá trình rửa giải protein được thực hiện qua sắc ký trao đổi anion DEAE Sepharose và kết quả đã thu được 2 phân đoạn hoạt tính axetyl (xylan) esteraza (ký hiệu phân đoạn I và II; hình 5).



Hình 5. Bước đầu tinh sạch enzym axetyl (xylan) esteraza từ dịch nuôi cấy chủng *Aureobasidium pullulans* SH1 bằng sắc ký trao đổi anion DEAE Sepharose (-) protein (mg ml⁻¹) và (●) hoạt tính enzym trên cơ chất p-nitrophenyl axetat.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza của chủng nấm *Aureobasidium pullulans* SH1 trên một số cơ chất giàu lignoxenuloza như sau:

- Chủng nấm *Aureobasidium pullulans* SH1 sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza trên môi trường bổ sung các nguồn cơ chất đồng thời cũng là nguồn các bon như: cà chua (CC), bã ngô (BN), đậu tương (DT), rơm rạ (RR), khoai tây (KT) và mùn gỗ (MG) với hoạt tính enzym trong thời gian nuôi cấy 24 ngày là từ 347 U L⁻¹ (trên môi trường cơ chất là bã ngô) đến 1025 U L⁻¹ (trên môi trường cơ chất rơm).

- Nguồn nitơ từ pepton thu được hoạt tính enzym axetyl (xylan) esteraza cao nhất đạt 1097,3 U L⁻¹ được xác định là nguồn cung cấp nitơ thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chủng nấm *Aureobasidium pullulans* SH1.

- Điều kiện thích hợp được xác định cho sự phát triển sinh tổng hợp enzym axetyl (xylan) esteraza là ở nhiệt độ 25°C và pH 7. Trong điều kiện như trên, hoạt tính enzym cao nhất đạt 1568 U L⁻¹.

- Môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chủng nấm *Aureobasidium pullulans* SH1 có thành phần như sau: MgSO₄ 0,5 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1,5 g L⁻¹, pepton 3,0 g L⁻¹, dịch vi lượng 0,01 L, pH 7,0, bổ sung 2% (v/v) nguồn cơ chất (nguồn các bon) là rơm nghiền nhỏ và được nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C sau 21 ngày.

- Protein enzym được chiết tách bằng phương pháp siêu lọc 10 kDa "cut-off" và bước đầu tinh sạch qua cột sắc ký trao đổi anion DEAE-Sepharose thu

được 2 phân đoạn protein biểu hiện hoạt tính axetyl (xylan) esteraza lần lượt là 21,4 U ml⁻¹ và 3,2 U ml⁻¹.

Lời cảm ơn

Đề tài được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ quốc gia (NAFOSTED; 106-NN.02-2013.44), đề tài độc lập cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST.ĐLT.01/14-15).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Biely P. (2012). Microbial carbohydrate esterase de acetylate plant polysaccharits. *Biotechnol. Adv.* 30(6): 1575 – 1588.
2. Christakopoulos P., Mamma D., Kekos D., and Macris B. J. (1999). Enhanced Acetyl esterase production by *Fusarium oxysporum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 443-456.
3. Gordillo F., Caputo V., Peirano A., Chavez R., Van Beeumen J., Vandenberghe I., Claeysens M., Bull P., Ravanal M. C., Eyzaguirre J. (2006). *Penicillium purpurogenum* produces a family 1 Acetyl esterase containing a carbohydrate - binding module: characterization of the protein and its gene. *Mycol. Res.* 110:1129-1139.
4. Hofrichter M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzym Microb. Technol.* 30:454-466.
5. Hatakka A., Hofrichter M., Steinbüchel A. (2001). Biopolymers: Lignin, humic substances and coal. *Biodegradation of lignin* (1): 129-180.
6. Javier G., Martiez M., Pablo J. D., Rovira M., Duro L. (2007). Arsenic sorption onto natural hematite, magnetite, and goethite. *J. Hazard Mater* 141: 575 – 580.
7. Linden J., Samara M., Decker S. (1994). Purification and characterization of an Acetyl esterase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 45:383-393.
8. Liers C., Ullrich R., Steffen K. T., Hatakka A. and Hofrichter M. (2006). Mineralization of 14C-labelled synthetic lignin and extracellular enzym activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 573-579.
9. Martínez A., Ruiz Dueñas F., Martínez M., C. del Río J., Gutiérrez A. (2009). Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20:348-357.

10. Nghi D. H., Ullrich R., Moritz F., Huong L. M., Giap V. D., Chi D. H., Hofrichter M., Liers L. (2015). The Ascomycete *Xylaria polymorpha* Produces an Acetyl Esterase That Solubilises Beech Wood Material to Release Water-soluble Lignin Fragments. *J. Korean Soci. Appl. Biol. Chem.* 58:415-421.
11. Ohta K., Moriyama S., Tanaka H., Shige T., Akimoto H. (2001). Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* and sequence analysis of the encoding gene. *J. Biosci. Bioengin.* 92: 262-270.
12. Purdy R., Kolattukudy P. E. (1973). Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. *Pisi*: Isolation and some properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 61 - 69.
13. Poutanen K. and Sundberg M. (1991). An Acetyl esterase of *Trichoderma reesei* and its role in the hydrolysis of Acetyl xylans. *Appl. Microb. Biotechnol.* 28: 419-24.
14. Peters D. (2007). Raw materials. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 105:1-30.
15. Pouvreaux L., Jonathan M. C., Kabel M. A., Hinz S. W. A., Gruppen H., Schols H. A. (2011). Characterization and mode of action of two Acetyl xylan esterase from *Chrysosporium lucknowense* active towards Acetylated xylans. *Enzym Microb. Technol.* 49:312-320.
16. Rich J. O., Leathers T. D., Anderson A. M., Bischoff K. M., Manitchotpisit P. (2013). Laccases from *Aureobasidium pullulans*. *Enzym. Microb. Technol.* 53: 33-37.
17. Singh R. S., Saini G. K., Kennedy J. F. (2006). Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate. Polyme.* 73: 515-531.
18. Sundberg M., Poutanen K., Markkanen P., Linko M. (1990). An extracellular esterase of *Aspergillus awamori*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12:670-680.
19. Tsujiyama S. and Nakano N. (1996). Distribution of Acetyl esterase in wood-rotting fungi. *Mycosci.* 37: 289-94.
20. Van Dyk J. S., Pletschke B. I. (2012). Lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 30:1458-1480.
21. Wang C-L., Li L., Xin F. H., Liu Y. -Y., Chi Z. M. (2014). Evaluation of single cell oil from *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* P10 isolated from mangrove ecosystems for biodiesel production. *Proc. Biochem.* 49: 725-731.

PRODUCTION OF ACETYL (xylan) ESTERASE BY *Aureobasidium pullulans* var *melanigenum* SH1 GROWN ON LIGNOCELLULOSIC AGRO-INDUSTRIAL BY-PRODUCTS

Do Huu Nghi¹, Vu Dinh Giap¹, Do Huu Chi², Le Huu Cuong¹, and Le Mai Huong¹

¹Institution of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

Summary

In this study, the ascomycetous strain *Aureobasidium pullulans* var *melanigenum* SH1 (*A. pullulans* SH1) showed its capacity to hydrolyze *p*-nitrophenyl acetate when grown on culture media supplemented with different sources of nitrogen, carbon such as tomato, soybean, and potato as well as lignocellulose-rich substrates including sawdust, corn-stalk and rice straw. The results showed that during 24 day growth, *A. pullulans* SH1 produced high enzymatic activities on media containing strawdust, potato, soybean and rice straw with specific activity in the range from 346.9 U/L^h (on corn stalk) to 1025.4 U/L^h (on rice straw). Highest enzymatic activity of 1097.3 U/mL was obtained using pepton as nitrogen source. Thus, rice straw and pepton was used as substrate and nitrogen source respectively for production of acetyl (xylan) esterase by *A. pullulans* SH1 under a suitable and defined condition of 25°C, pH 7.0. Enzyme was partially purified using 10 kDa cut-off membran (millipore), followed by DEAE-sepharose chromatography. Two enzymatic fractions were observed with acetyl (xylan) esterase activities of 21.4 and 3.2 U/mL^h, respectively.

Keywords: *Aureobasidium pullulans* SH1, acetyl (xylan) esterase, lignocellulose.

Người phản biện: PGS.TS. Phạm Văn Toàn

Ngày nhận bài: 28/9/2015

Ngày thông qua phản biện: 28/10/2015

Ngày duyệt đăng: 4/11/2015