

# PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA ENZYME XYLANASE TỪ LÚA MÌ NẤY MẦM

Nguyễn Nhật Minh Phương<sup>1</sup>, Evelien De Baker<sup>2</sup>,  
Gebruers K.<sup>2</sup>, Jan A. Delcour<sup>2</sup>

## ABSTRACT

*Endo-(1→4)-β-D-xylanases (EC 3.2.1.8), shortly called xylanases, are the most important enzymes involved in the hydrolysis of arabinoxylan. To obtain more insight into the properties of the xylanases, the xylanases were isolated from germinated wheat kernels. Different wheat xylanase isoforms were purified in one pool from a crude extract of wheat germinated for 24 days. Soluble wheat proteins were fractionated by ammonium sulfate precipitation and anion exchange chromatography. Then the wheat xylanases were selectively isolated by affinity chromatography with anti-barley xylanase antibodies. The N-terminal sequences of the different isoforms of wheat xylanases were determined by Edman degradation. Based on the alignment of the N-termini with the amino acid sequence of wheat xylanase, theoretical molecular masses ranging from approximately 60 kDa to 20 kDa and theoretical pI values ranging from 4,69 to 5,75 were calculated for the different xylanase isoforms.*

**Keywords:** Xylanase, arabinoxylan, wheat, Anion exchange chromatography, Affinity chromatography, SDS-PAGE

**Title:** Isolation and characterization of endogenous wheat xylanases from germinated wheat

## TÓM TẮT

*Enzyme nội sinh 1→4-β-D-xylanase, gọi tắt là xylanase, là enzyme đóng vai trò quan trọng nhất trong quá trình thủy phân arabinoxylan. Để hiểu sâu hơn về tính chất của xylanase, xylanase được phân lập và xác định một số đặc điểm sinh học từ hạt lúa mì nảy mầm 24 ngày. Các dạng đồng đẳng xylanase khác nhau được tinh chế từ dịch chiết. Protein hòa tan được tủa phân đoạn với ammonium sulfate và sắc ký trao đổi ion. Sau đó xylanase được phân lập có lựa chọn bởi sắc ký ái lực với kháng thể của xylanase từ lúa mạch. Trình tự sắp xếp của các acid amin trong chuỗi polypeptide ở đầu N tận cùng của các dạng đồng đẳng xylanase được quyết định bởi phương pháp Edman. Dựa vào trình tự sắp xếp acid amin ở đầu N của xylanase, trọng lượng phân tử lý thuyết nằm trong khoảng 60 kDa đến 20 kDa và điểm đẳng điện pI từ 5,75 đến 4,69 được xác định cho các dạng đồng đẳng xylanase từ lúa mì.*

**Từ khóa:** Xylanase, lúa mạch, lúa mì, sắc ký trao đổi ion, sắc ký ái lực, SDS-PAGE

## 1 GIỚI THIỆU

Arabinoxylan thuộc polysaccharide không tiêu hóa nằm ở thành tế bào của các loại ngũ cốc như lúa mì, lúa mạch, yến mạch, lúa mạch đen, bắp, lúa gạo v.v...(Fincher

<sup>1</sup> Khoa Nông nghiệp & Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Phòng thí nghiệm Hoá học và Sinh hóa thực phẩm, Bộ môn Hệ thống phân tử và vi sinh, Khoa Kỹ thuật sinh học, Đại học Leuven, Vương Quốc Bỉ.

và Stone, 1986; Andersson và Åman, 2001). Mặc dù arabinoxylan chiếm một phần rất nhỏ trong hạt ngũ cốc nhưng arabinoxylan có ảnh hưởng đáng kể đến chức năng của lúa mì trong các quá trình kỹ thuật sinh học được biết như quá trình làm bánh mì, phân tách gluten - tinh bột, quá trình làm bia và trong công nghệ chế biến thức ăn gia súc.

Thủy phân hoàn toàn arabinoxylan yêu cầu nhiều loại enzyme nội sinh và ngoại sinh làm việc một cách hiệp lực với nhau (Biely, 1985; Poutanen và cộng sự, 1991; Biely và cộng sự, 1992). Theo quan điểm về kỹ thuật sinh học, enzyme nội sinh 1→4-β-D-xylanase (gọi tắt là xylanase) là enzyme thủy phân arabinoxylan quan trọng nhất. Xylanase thủy phân liên kết β-1,4 của mạch xylose để tạo ra oligosaccharide, xylobiose và xylose (Dekker và Richards, 1976) và có khả năng làm thay đổi tính chất lý hóa của arabinoxylan (Biely và cộng sự, 1992).

Xylanase được biết nhiều nhất đến ngày nay có nguồn gốc từ vi sinh vật. Vi sinh vật sử dụng enzyme này để thủy phân thành tế bào thực vật và phóng thích các loại carbohydrate chuyên hóa như nguồn năng lượng cho chúng (Simpson và cộng sự, 2003). Hầu hết xylanase có nguồn gốc từ vi sinh có thể được tìm thấy trong gia đình enzyme thủy phân glycoside 10, 11 và chúng được ứng dụng trong các quá trình kỹ thuật sinh học khác nhau. Trong đó một số được sử dụng trong chế biến ngũ cốc để cải thiện chất lượng của các sản phẩm từ ngũ cốc. Ngược lại xylanase có nguồn gốc từ thực vật ít được nghiên cứu. Một số đã được tinh chế từ bột lúa mì, lúa mạch nảy mầm, bắp, đu đủ và cây keo. Xylanase từ lúa mạch đã có nhiều nghiên cứu bởi vì sự ảnh hưởng của chúng trong công nghệ chế biến bia, từ đó những tính chất sinh hóa, lý hoá và các chức năng đã được hiểu rõ. Ngược lại với xylanase có nguồn gốc từ lúa mạch, kiến thức về xylanase từ lúa mì có nhiều giới hạn, vì thế những tính chất, chức năng của chúng ít được hiểu biết nhiều.

Trong hạt lúa mì, hoạt độ của xylanase rất thấp. Trong quá khứ, Corder và Henry (1989) đã chứng minh hoạt độ của xylanase gia tăng trong suốt quá trình nảy mầm của hạt lúa mì. Vì thế trong nghiên cứu này, các dạng đồng đẳng khác nhau của xylanase từ lúa mì sẽ được phân lập từ hạt lúa mì nảy mầm. Việc phân lập này có tính chất cần thiết để hiểu sâu hơn về tính chất, chức năng của xylanase và đáp ứng cho các nghiên cứu sau này.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

### 2.1 Phương tiện

Lúa mì được thu hoạch từ Clovis Matton (Avelgem, Bỉ) vào năm 2005. Viên Azurine cross-linked wheat Xylazyme-arabinoxylan từ Megazyme (Bray, Ái Nhĩ Lan). Tất cả môi trường điện di được cung cấp từ Bio-Rad (Nazareth, Bỉ). Băng protein chuẩn có trọng lượng phân tử thấp (GE Healthcare, Uppsala, Thụy Điển) bao gồm phosphorylase b (94,0 kDa), bovine serum albumin (67,0 kDa), ovalbumin (43,0 kDa), carbonic anhydrase (30,0 kDa), soybean trypsin inhibitor (20,1 kDa), và α-lactalbumin (14,4 kDa). Tất cả các hóa chất khác được cung cấp từ Sigma-Aldrich (Bornem, Bỉ).

## 2.2 Phương pháp

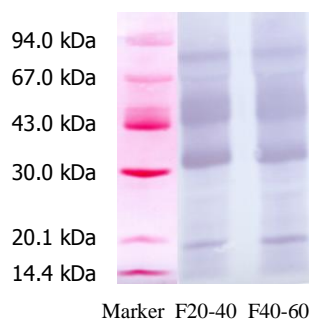
Xác định hoạt độ xylanase bằng phương pháp so màu quang phổ Xylazyme-arabinoxylan (Megazyme, Bray, Ái Nhĩ Lan) ở bước sóng 590 nm. Hàm lượng protein được quyết định bởi phương pháp Bradford (1976), sử dụng bovine serum albumin (BSA) làm đường chuẩn và đo ở bước sóng 595 nm (Ultraspec III UV/visible spectrophotometer -GE Healthcare, Uppsala, Thụy Điển).

Lúa mì nảy mầm 24 ngày được sấy thăng hoa và nghiền thành bột. Protein được trích ly trong dung dịch 50 mM sodium phosphate pH 7,0, 6 °C và chất ức chế enzyme protease được bổ sung vào dịch chiết. Theo sau, protein được tủa phân đoạn ở 6 °C với ammonium sulfate với các mức độ bão hòa khác nhau 0-20 % (F0-20), 20-40 % (F20-40), 40-60 % (F40-60), 60-80 % (F60-80) và trên 80 % (F>80). Hỗn hợp được ly tâm, phần lắng được thẩm tách, sấy thăng hoa và chuẩn bị cho các bước tinh chế tiếp theo. Dịch chiết enzyme xylanase thô được tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion âm trên cột Q-sepharose (Anion exchange chromatography) và sắc ký ái lực với kháng thể (Affinity chromatography). Kiểm tra độ tinh khiết của protein và nhận diện enzyme xylanase bằng sự điện di trên gel SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) và kiểm tra với kháng thể anti-barley xylanase. Xác định trình tự acid amin ở đầu N tận cùng bằng phương pháp Edman.

## 3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

### 3.1 Kết tủa với ammonium sulfate

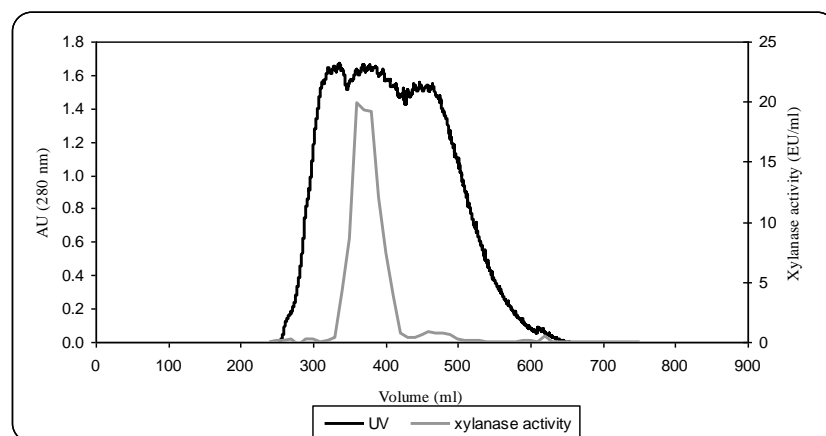
Hầu hết protein kết tủa tập trung ở mẫu được tủa phân đoạn với ammonium sulfate có mức độ bão hòa là 20-40 % và 40-60 %. Protein kết tủa phục hồi 23 % trong tổng số protein từ dịch chiết thô. Protein bị mất do bị biến tính trở nên không hoà tan và bị tổn thất trong quá trình tủa phân đoạn. Hoạt độ đặc trưng xylanase, được diễn tả như là hoạt độ xylanase (mEU) trên hàm lượng protein (mg), cao nhất ở mẫu 20-40 % khoảng 2364,2 mEU/mg (bảng 1). Kiểm tra độ tinh khiết của enzyme xylanase trong mẫu 20-40 % trên gel SDS-PAGE với kháng thể anti-barley xylanase cho thấy xylanase có trọng lượng phân tử khoảng 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa và 60 kDa. Mẫu 20-40 % được chọn cho các bước phân lập enzyme xylanase tiếp theo.



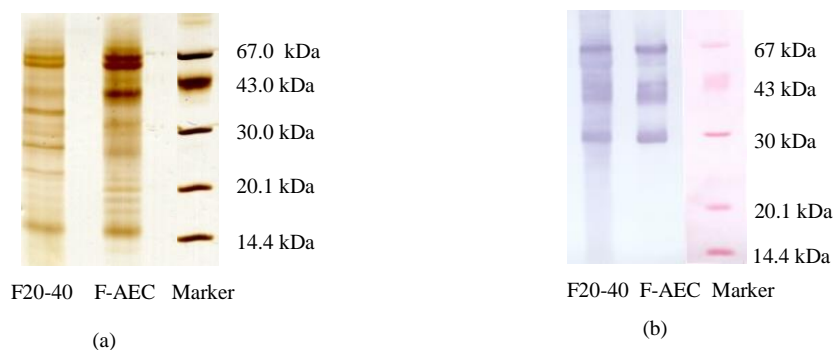
**Hình 1: Nhận diện enzyme xylanase với kháng thể anti-barley xylanase trên gel SDS-PAGE trong mẫu 20-40 % và 40-60 %**

### 3.2 Sắc ký trao đổi ion âm

Sắc ký trao đổi ion là kỹ thuật rất phù hợp dựa trên sự khác nhau trong tính tích điện của protein để phân tách protein trong một hỗn hợp protein. Phương pháp này thường được sử dụng như là bước đầu tiên trong quá trình tinh chế enzyme. Hỗn hợp protein trong mẫu 20- 40% thông qua sắc ký trao đổi ion trong cột Q-Sepharose. Sắc ký đồ được thu hồi và hoạt độ xylanase thể hiện ở hình 2. Các phân đoạn thu hồi có hoạt độ xylanase cao được gom chung với nhau (F-AEC) và được kiểm tra độ tinh khiết bằng cách nhuộm với bạc và nhận diện enzyme với kháng thể trên gel SDS-PAGE (hình 3). Hoạt độ đặc trưng xylanase gia tăng gần 6 lần sau khi phân tách bằng sắc ký trao đổi ion so với mẫu sau khi kết tủa với ammonium sulfate ở mức độ bão hòa 20- 40% và gần 60 lần so với dịch chiết thô (bảng 1). Từ hai gel SDS-PAGE (hình 3), rõ ràng vẫn còn nhiều protein bị nhiễm trong mẫu sau sắc ký trao đổi ion. Tuy nhiên, băng protein thể hiện rõ hơn so với mẫu sau khi tủa phân đoạn với ammonium sulfate ở mức độ bão hòa 20- 40%. Tất cả các dạng đồng đẳng xylanase hiện diện trong mẫu F20-40 thì đều hiện diện trong mẫu F-AEC.



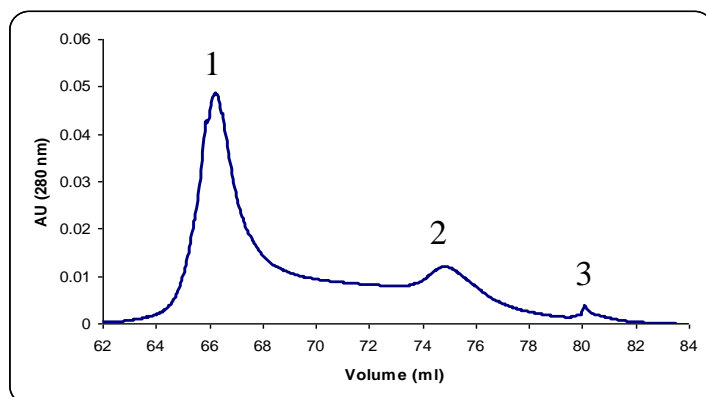
**Hình 2:** Sắc ký đồ của mẫu F20-40 trong phương pháp sắc ký trao đổi ion và đồ thị biểu diễn hoạt độ xylanase



**Hình 3:** (a) Gel SDS-PAGE được nhuộm với bạc và (b) nhận diện enzyme với kháng thể anti-barley xylanase của mẫu F20-40 và F-AEC

### 3.3 Sắc ký ái lực với kháng thể anti-barley xylanase

Để tinh chế enzyme xylanase một cách có lựa chọn từ dịch chiết xylanase đã được tinh chế một phần, cột ái lực bao gồm kháng thể anti-barley xylanase liên kết cộng hóa trị với protein A được sử dụng. Kháng thể được biết phản ứng rất đặc biệt với protein mà có trình tự acid amin giống nhau. Kháng thể anti-barley xylanase trong cột ái lực phản ứng với enzyme xylanase trong lúa mì. Điều này không có gì ngạc nhiên bởi vì trình tự acid amin của xylanase ở lúa mạch và ở lúa mì rất giống nhau (Simpson và cộng sự, 2003). Hỗn hợp protein sau khi phân tách bằng kỹ thuật sắc ký trao đổi ion (F-AEC) được tiếp tục tinh sạch trong cột ái lực. Nhờ vào tính đặc biệt trong phản ứng của kháng thể với enzyme xylanase, chỉ có những protein này được giữ lại trong cột và tất cả protein khác chảy thông qua cột ái lực. Sắc ký đồ bao gồm 3 đỉnh thể hiện ở hình 4. Tất cả protein được phân đoạn, thu hồi và chỉ có protein ở đỉnh 1 được gom chung với nhau (F-AB) và xác định hoạt độ xylanase. Hàm lượng protein trong F-AB giảm đáng kể so với F-AEC. Tuy nhiên, hoạt độ đặc trưng xylanase trong F-AB gia tăng so với F-AEC là 37 lần (bảng 1). Nhận diện enzyme xylanase với kháng thể anti-barley xylanase cho thấy 5 băng protein. Băng trên đỉnh của gel chứa kháng thể bị rò rỉ từ cột ái lực. Các băng còn lại có trọng lượng phân tử xấp xỉ 60 kDa, 40 kDa và 30 kDa. Cụ thể có 2 băng khoảng 40 kDa, một băng thấp hơn 30 kDa và một băng khoảng 20 kDa (hình 5).

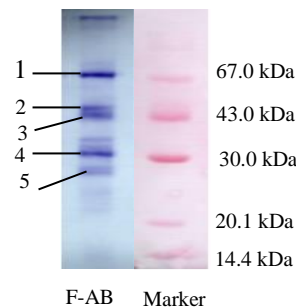


Hình 4: Sắc ký đồ của mẫu F-AEC trong phương pháp sắc ký ái lực với kháng thể anti-barley xylanase

Bảng 1: Tinh chế enzyme xylanase bởi tủa phân đoạn với ammonium sulfate, sắc ký trao đổi ion âm và sắc ký ái lực với kháng thể anti-barley xylanase

	Hàm lượng protein	Hoạt độ xylanase	Hoạt độ đặc trưng xylanase	Hệ số tinh sạch <sup>a</sup>	Phục hồi
	(mg)	(EU)	(mEU/mg)	(lần)	(%)
Dịch chiết	8625,0	1886,3	218,7	1	100
F20-40	545,7	1290,2	2364,2	11	68,4
F-AEC	88,8	1166,4	13135,1	60	61,8
F-AB	0,7	318,8	486190,0	2223	0,17

<sup>a</sup> Hoạt độ đặc trưng của từng phân đoạn chia cho hoạt độ đặc trưng của dịch chiết



**Hình 5: Nhận diện enzyme xylanase sau sắc ký ái lực với kháng thể. Sự khác nhau của những băng protein được đánh số từ 1-5 trong phản ứng Edman**

### 3.4 Trình tự acid amin ở đầu N trong chuỗi polypeptide

Hỗn hợp xylanase sau khi phân tách bằng sắc ký ái lực với kháng thể được thực hiện phản ứng phân giải Edman để xác định trình tự acid amin ở đầu N tận cùng và để xác định có phải protein đã được tinh sạch là enzyme xylanase. Mẫu F-AB được cô đặc nhiều lần với Microcon. Các dạng đồng đẳng xylanase khác nhau được phân đoạn bằng điện di trên gel SDS-PAGE và cố định trên màng polyvinylidene fluoride (PVDF) cho việc giải trình tự acid amin. Sự khác nhau của các băng protein được đánh số như hình 5. Trình tự acid amin ở đầu N chỉ ra ở bảng 2. Những trình tự này được so sánh với trình tự acid amin được miêu tả trong tài liệu của Simpson và các cộng sự (2003).

Trình tự acid amin thứ 1 là DVSM DGS LVDYAPFGSSTT với trọng lượng phân tử khoảng 60259,9 và pI là 5,47. Trọng lượng phân tử này khớp với trọng lượng phân tử 60 kDa trên hình 5.

Hai trình tự acid amin thứ 2 và thứ 3 là DHKARFRQLKDKTKDKAR và DKTDKARKRDLVILKLGAGAAASV. Trọng lượng phân tử lần lượt là 43816,4 và 42535,9 với điểm đẳng điện là 5,75 và 5,37 được cho ở bảng 2. Kết quả này cũng trùng khớp với trọng lượng phân tử trên hình 5.

Băng protein thứ 4 bao gồm 19 acid amin LDNAFPFGTCINTSVIQKP có trọng lượng phân tử là 39687,6 và pI là 5,05. Trong khi đó trên hình 5 xylanase này khoảng 30 kDa. Lý do cho sự không trùng khớp này có thể được giải thích do một phần acid amin ở đầu C bị loại bỏ trong suốt quá trình nảy mầm mà điều này không được xác định trong phản ứng Edman. Caspers và các cộng sự (2001) cũng đã miêu tả hiện tượng này của xylanase trong lúa mạch trong suốt quá trình nảy mầm.

Đối với băng protein thứ 5, trình tự acid amin là PEPALFVNDYNVERAN có trọng lượng phân tử là 22221,0 và pI là 4,69. Trọng lượng phân tử này không trùng với trọng lượng trên hình 5 là khoảng 28 kDa. Lý do cho sự khác biệt này chưa rõ và cũng chưa có tài liệu nào miêu tả hiện tượng này.

**Bảng 2: Trình tự acid amin của 5 băng protein trong mẫu F-AB được quyết định bởi phản ứng Edman. Trọng lượng phân tử và điện đẳng điện pI**

	Trình tự acid amin	Trọng lượng phân tử	pI
Băng 1	DVSMDGSLVDYAPFGSSTT	60259,9	5,47
Băng 2	DHKARFRQLKDKTDKAR	43816,4	5,75
Băng 3	DKTDKARKRDVILKLGAGAAASV	42535,9	5,37
Băng 4	LDNAFPFGTCINTSVIQKP	39687,6	5,05
Băng 5	PEPALFVNDYNVERAN	22221,0	4,69

#### 4 KẾT LUẬN

Dựa vào phương pháp tủa phân đoạn với amonium sulfate, kỹ thuật sắc ký trao đổi ion và sắc ký ái lực với kháng thể, enzyme xylanase là enzyme đóng vai trò quan trọng nhất trong quá trình thủy phân đường arabinoxylan đã được phân lập và tinh sạch. Có 4 dạng đồng đẳng enzyme xylanase với trọng lượng phân tử khoảng 60, 40, 30 và 20 kDa và điểm đẳng điện pI từ 5,47 đến 4,69. Đây là bước khởi đầu quan trọng trong việc hiểu được một phần đặc điểm của enzyme xylanase, là tiền đề cho các bước nghiên cứu tiếp theo để hoàn thiện các tính chất lí, sinh hoá của enzyme cũng như việc áp dụng chúng trong các quá trình kỹ thuật sinh học.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Andersson R. và Åman, P.**, 2001. Cereal arabinoxylan: occurrence, structure and properties. In: *Advanced dietary fibre technology*. Ed. McCleary, B.V. and Prosky, L. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. 301-314.
- Biely P.**, 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnology*, 3: 286-290.
- Biely P., Vrsanska` M. và Kuca`r S.**, 1992. Identification and mode of action of endo-(1→4)-β-xylanases. In 'Xylans and xylanases' (J. Visser et al., eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. 81–95.
- Caspers M.P.M, Lok F., Sinjorgo K.M.C, van Zeijl M.J., Nielsen K.A. và Cameron-Mills V.**, 2001. Synthesis, processing and export of cytoplasmic endo-b-(1,4)-xylanase from barley aleurone during germination. *Plant Journal*, 26: 191-204.
- Corder A.M. và Henry R.J.**, 1989. Carbohydrate-degrading enzymes in germinating wheat. *Cereal chemistry*, 66: 435-439.
- Dekker R.F.H. và Richards G.N.**, 1976. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 32: 277-352.
- Fincher G.B. và Stone B.A.**, 1986. Cell walls and their components in cereal grain technology. In: *Advances in cereal sciences and technology*, vol. VIII. Ed. Pomeranz, Y. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, MN, USA. 207-295.
- Poutanen K., Tenkanen M., Korte H. và Puls J.**, 1991. Accessory enzymes involved in the hydrolysis of xylans. In 'Enzymes in biomass conversion', American Chemical Society, Washington DC, U.S.A. 426–436.
- Simpson D.J., Fincher G.B., Huang A.H.C. và Verena Cameron-Mills**, 2003. Structure and function of cereal and related higher plant (1→4)-β-xylan endohydrolases. *Journal of cereal science*, 37: 111-127