

# Khảo sát hoạt tính $\beta$ -glucosidase từ cổ khuẩn siêu chịu nhiệt *Pyrococcus furiosus* để ứng dụng trong sản xuất isoflavone từ đậu nành

Đinh Nguyễn Tấn Hòa<sup>1</sup>, Hoàng Trọng Minh Quân<sup>1</sup>, Phan Hoàng Mỹ Linh<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Bạch Huệ<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Trung tâm Nghiên cứu hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 20/12/2018; ngày gửi phản biện 31/12/2018; ngày nhận phản biện 29/3/2019; ngày chấp nhận đăng 19/4/2019

## Tóm tắt:

Isoflavone là một nhóm hợp chất polyphenol được tìm thấy với nồng độ cao trong đậu nành và các sản phẩm từ đậu nành. Tuy nhiên, hầu hết trong số chúng được hấp thụ thấp trong dạ dày vì ở dạng glycosyl hóa, một hoặc nhiều phân tử đường gắn với vòng thơm hoặc nhóm hydroxyl của isoflavone. Việc giải phóng các phân tử đường này từ dạng glycoside sang dạng aglycone sẽ giúp isoflavone được hấp thụ tốt và tăng các hoạt tính sinh học tiềm năng như: khả năng chống oxy hóa, giảm cholesterol và hoạt tính tương tự như hormone estrogen. Quá trình này cần sự xúc tác của enzyme  $\beta$ -glucosidase. Trong bài viết này, các tác giả khảo sát hoạt tính và khả năng chịu nhiệt của enzyme  $\beta$ -glucosidase từ cổ khuẩn *Pyrococcus furiosus*. Gen *celB* mã hóa  $\beta$ -glucosidase được biểu hiện dưới dạng hòa tan trong tế bào chủ *E. coli* nhờ dung hợp với đuôi Glutathione-S-transferase (GST), chiếm 17,05% tổng protein tan nội bào trước tinh chế và đạt 57,5% sau tinh chế. Hoạt tính của enzyme đối với cơ chất 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NPG) được tối ưu ở 100°C, pH 5,0; hoạt tính riêng 164,44 U.mg<sup>-1</sup>; giá trị  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_{cat}$  lần lượt ghi nhận là 0,088 mM, 332,27 U.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> và 446,9 s<sup>-1</sup>. Việc dung hợp GST không ảnh hưởng đến khả năng chịu nhiệt. Khảo sát thành công hoạt tính enzyme đối với các hợp chất glycoside từ đậu nành, hầu hết genistin và daidzin chuyển đổi thành các dạng aglycone tương ứng là genistein và daidzein.

**Từ khóa:** chịu nhiệt, đậu nành, *Pyrococcus furiosus*, thủy phân isoflavone,  $\beta$ -glucosidase.

**Chỉ số phân loại:** 2.10

## Đặt vấn đề

Isoflavone là một polyphenol dị vòng có cấu trúc tương đồng với hợp chất 17  $\beta$ -estrogen ở người, có nhiều trong các cây họ đậu, đặc biệt là đậu nành [1]. Các nghiên cứu cho thấy, nhóm hợp chất này có tác dụng trong quá trình chống oxy hóa, bổ sung nội tiết tố, đặc biệt là ngăn chặn quá trình lão hóa da; giúp phòng ngừa và điều trị nhiều loại bệnh như tim mạch, loãng xương, ung thư, tiểu đường... [1, 2]. Isoflavone dạng glycoside chiếm hàm lượng cao trong đậu nành, tuy nhiên, hoạt tính sinh học thấp và khó được hấp thụ vào cơ thể. Trong khi đó, isoflavone dạng aglycone có hoạt tính sinh học cao, dễ hấp thụ nhưng chỉ chiếm hàm lượng thấp trong đậu nành [3].

Isoflavone aglycone được thu nhận từ dạng isoflavone glycoside tương ứng thông qua việc loại bỏ gốc đường nhờ hoạt tính xúc tác của enzyme  $\beta$ -glucosidase [EC 3.2.1.21]. Đây là enzyme xúc tác phản ứng thủy phân liên kết glycosidic để giải phóng một phân tử  $\beta$ -D-glucose từ đầu không khử của hợp chất glycoside hoặc oligosaccharide [4].  $\beta$ -glucosidase hiện nay được thu nhận từ một số loài vi sinh vật thông thường bằng phương

pháp lên men [5-7]. Tuy nhiên, phương pháp này gặp nhiều khó khăn, chủ yếu do hoạt tính enzyme trong vi sinh thu nhận còn thấp nên thời gian thủy phân lâu, dễ tạp nhiễm [3]; dễ bị ức chế bởi độ nhớt, nồng độ glucose cao [8]. Cách đơn giản nhất để giải quyết các vấn đề trên là tăng nhiệt độ, vừa tiêu diệt được vi khuẩn, làm giảm độ nhớt của dung dịch, vừa làm tăng tốc độ phản ứng. Vì vậy, nghiên cứu này hướng tới việc thu nhận enzyme  $\beta$ -glucosidase từ cổ khuẩn *Pyrococcus furiosus*. Đây là cổ khuẩn siêu chịu nhiệt, có nhiệt độ tối thích lên tới 100°C cùng với hệ enzyme và protein có khả năng kháng nhiệt và bức xạ [9]. Các nghiên cứu cho thấy, *P. furiosus*  $\beta$ -glucosidase (BGLPf) có nhiệt độ tối ưu 102-105°C; không bị ức chế bởi HgCl<sub>2</sub> (1 mM), N-ethylmaleimide (5 mM), iodoacetamide (2 mM); là một trong những enzyme có tính bền nhiệt cao nhất với thời gian bán rã là 85 giờ ở 100°C và 13 giờ ở 110°C [10].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát điều kiện tối ưu và các thông số động học cho hoạt tính của enzyme BGLPf trên cơ chất nhân tạo *p*NPG và bước đầu thử nghiệm hoạt tính trên hợp chất isoflavone glycoside đậu nành.

\*Tác giả liên hệ: Email: ntbhue@hcmus.edu.vn

# Study on $\beta$ -glucosidase activity from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* for application in the hydrolysis of soy isoflavone glycosides

Nguyen Tan Hoa Dinh<sup>1</sup>, Trong Minh Quan Hoang<sup>1</sup>,  
Hoang My Linh Phan<sup>2</sup>, Thi Bach Hue Nguyen<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Lab of Molecular and Environmental Biotechnology, University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh city

<sup>2</sup>Research Center for Bioactive Natural Products, University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh city

Received 20 December 2018; accepted 19 April 2019

## Abstract:

Isoflavones are a class of polyphenolic compounds found with the high concentration in soybeans and soy products. However, most of them are low absorbed in the human stomach as glycosylated forms, one or more sugar molecule(s) conjugated to the aromatic ring or a hydroxyl group. The release of the sugar molecule(s) from the isoflavone glycoside results in an isoflavone aglycone, one of the best-absorbed polyphenols with the high potential of estrogenic, cholesterol-lowering and antioxidation improvement. To convert these glycosides into the corresponding aglycone forms, the  $\beta$ -glucosidase enzyme is required. In this article, the authors investigate the thermophilic ability and catalytic activity of  $\beta$ -glucosidase enzyme from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. The *celB* gene encoding the  $\beta$ -glucosidase is expressed as the soluble form in *E. coli* host cells by binding to the Glutathione-S-transferase (GST) tag with 17.05% and 57.5% yields of total intracellular soluble before and after purification, respectively. Enzymatic activity using 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NPG) as a substrate has been optimised at 100°C, pH 5.0; specific activity is 164.44 U.mg<sup>-1</sup>; the values of  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $K_{cat}$  are respectively 0.088 mM, 332.27 U.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> and 446.9 s<sup>-1</sup>. The enzyme shows the catalytic activity on soybean glycoside compounds, most genistin and daidzin are converted into the corresponding aglycone forms, genistein and daidzein, respectively.

**Keywords:** isoflavone hydrolysis, *Pyrococcus furiosus*, soybean, thermophilic,  $\beta$ -glucosidase.

**Classification number:** 2.10

## Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### Chủng, môi trường

Tế bào chủ biểu hiện *E. coli* BL21/pGEX-2TK-*celB* được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh. Môi trường LB (g.l<sup>-1</sup>): trypton 10 g, cao nấm men 5 g, NaCl 5 g, agar 20 g và môi trường LB ampicilin 100 g.ml<sup>-1</sup>; tất cả môi trường được hấp vô trùng ở 121°C, 20 phút, làm nguội rồi bổ sung ampicilin (nếu có) trước khi thao tác.

### Cảm ứng và thu nhận $\beta$ -glucosidase

Hoạt hóa qua đêm (14-16 giờ) một khuẩn lạc *E. coli*/BL21-pGEX-2TK-*celB* trong ống nghiệm 5 ml LB ampicillin ở 37°C, 250 vòng/phút. Cấy truyền tỷ lệ 1:20 sang ống nghiệm 5 ml LB ampicillin và nuôi lắc ở 37°C, 250 vòng/phút đến khi OD đạt 0,8-1,0. Bổ sung 0,1 mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Bio-basic) nồng độ cuối vào dịch nuôi, tiếp tục nuôi lắc 37°C, 250 vòng/phút trong 4 giờ [11].

Thu nhận 1,5 ml dịch nuôi cấy, ly tâm 5.000 vòng/phút trong 5 phút loại dịch, hòa sinh khối lại trong 400  $\mu$ l nước cất vô trùng. Phá tế bào bằng sóng siêu âm ở 50 Hz, 5 chu kỳ, mỗi chu kỳ 15-20 giây; hút 50  $\mu$ l làm pha tổng. Phần còn lại ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C, thu 50  $\mu$ l dịch nổi làm pha tan. Hòa tủa trong 350  $\mu$ l nước cất vô trùng, hút 50  $\mu$ l làm pha tủa. Bổ sung mỗi pha tổng, tan, tủa 10  $\mu$ l Sample 6X, đun 100°C trong 15 phút, làm lạnh nhanh. Tiến hành điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 15%; nhuộm gel, giải nhuộm và xác định độ tinh sạch bằng phần mềm ImageJ.

Tiến hành định lượng protein bằng phương pháp đo Bradford với tỷ lệ V mẫu:V thuốc thử Bradford = 1:4.

### Tinh sạch $\beta$ -glucosidase và xác định nồng độ sau tinh chế

Phần tan được lọc qua bộ lọc có kích thước lỗ lọc 0,2  $\mu$ M, chuyển vào cột GraviTrap chứa sẵn 2 ml Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare). Cột được rửa lại hai lần với 5V PBS, pH 7,3 để loại bỏ protein không liên kết. Protein được ly giải nhờ 15 mM Glutathione khử (Merck-Millipore) trong 50 mM dung dịch Tris-HCl, pH 8,0.

Xác định kích thước và độ tinh sạch protein nhờ điện di SDS-PAGE và phần mềm ImageJ.

### Khảo sát điều kiện tối ưu của BGL trên cơ chất *p*NPG

Nhiệt độ được khảo sát từ 60-100°C và pH từ 4,0-6,0.

Phản ứng được thực hiện trong 500  $\mu$ l, bao gồm: 6,45  $\mu$ g BGLPf, 1 mM *p*NPG (Sigma), 50 mM đệm citrate phosphate ở pH khảo sát. Tiến hành phản ứng trong 5 phút ở nhiệt độ khảo sát. Bổ sung 500  $\mu$ l dung dịch 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dừng phản ứng. Đo OD ở bước sóng 405 nm [3].

### Xác định hoạt tính và hoạt tính riêng của enzyme đối với cơ chất *p*NPG

Đường chuẩn *p*-nitrophenol (*p*NP) (Sigma) được thực hiện trong dãy nồng độ từ 0-200  $\mu$ M trong đệm citrate phosphate, pH tối ưu. Kết quả ghi nhận ở OD 405 nm.

Phản ứng được thực hiện trong 500 µl, bao gồm: 6,45 µg BGLPf, 1 mM pNPG, 50 mM đệm citrate phosphate ở pH tối ưu. Tiến hành phản ứng trong 5 phút ở nhiệt độ tối ưu. Bổ sung 500 µl dung dịch 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dừng phản ứng. Đo OD ở bước sóng 405 nm.

Dựa vào đường pNP, xác định lượng cơ chất bị phân cắt. Từ đó, tính toán được hoạt tính và hoạt tính riêng của enzyme với định nghĩa: một đơn vị hoạt tính (1 unit) là lượng enzyme cần để phân cắt hoàn toàn 1 µM cơ chất trong 1 phút ở điều kiện tối ưu [12]; hoạt tính riêng (U.mg<sup>-1</sup>) là số đơn vị hoạt tính trên 1 mg protein mẫu. Hoạt tính riêng xác định độ tinh sạch của enzyme mục tiêu trong mẫu.

$$\text{Hoạt tính (U)} = \frac{m_{\text{BGLPf}}}{n_{\text{pNPG}}}, \text{ Hoạt tính riêng} = \frac{1000}{U}$$

trong đó: m<sub>BGLPf</sub>: lượng enzyme BGLPf trong phản ứng; n<sub>pNPG</sub>: số mol cơ chất pNPG bị phân cắt.

**Động học enzyme BGLPf nhờ phương pháp Lineweaver-Burk**

Nồng độ pNPG được khảo sát từ 0-2000 µM.

Phản ứng được thực hiện trong 500 µl, bao gồm: 6,45 µg BGLPf, pNPG ở các nồng độ khảo sát, 50 mM đệm citrate phosphate ở pH tối ưu. Tiến hành phản ứng trong 5 phút ở nhiệt độ tối ưu. Bổ sung 500 µl dung dịch 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dừng phản ứng. Đo OD ở bước sóng 405 nm. Dựa vào đường chuẩn pNP, xác định lượng cơ chất bị phân cắt. Vẽ đồ thị Lineweaver-Burk, tính toán các giá trị K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub> và K<sub>cat</sub>.

**Thử nghiệm hoạt tính enzyme trên hợp chất isoflavone từ đậu nành bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao**

Hòa tan 20 g bột đậu nành đã nghiền mịn vào 100 ml ether dầu hỏa. Phá tế bào bằng Ultra turax trong 3 phút; khuấy đều dịch bằng máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút; ly tâm 10.000 vòng/phút, 15 phút, thu tủa. Lặp lại các bước trên hai lần. Bột sau khi đã ủ khô tự nhiên được hòa lại trong 100 ml methanol 80% (v/v); phá tế bào bằng Ultra turax trong 3 phút; khuấy đều dịch bằng máy khuấy từ ở 80°C trong 2 giờ; ly tâm 10.000 vòng/phút, 15 phút, thu dịch; cô quay thu nhận cao tổng [13].

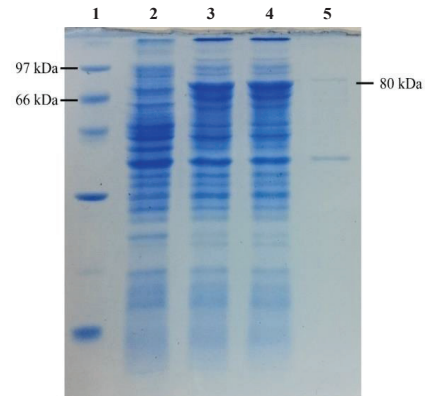
Tiến hành thủy phân 0,15g cao tổng ở nhiệt độ tối ưu trong 1 ml dung dịch đệm citrate phosphate ở pH tối ưu, 21,5 µg BGLPf, bổ sung nước cất đủ 2 ml; tiến hành ly tâm thu dịch, cô quay thu cao, cân khối lượng. Hòa tan cao thu nhận trong dung môi MeOH:DMSO = 4:1 về nồng độ 10.000 ppm; tiến hành chạy HPLC pha đảo, sử dụng cột Macherey Nagel, CC Kromasil, 125x4 mm, 5 µm 100A, C18 với quy trình: 0-100% AcN, 0,5 ml/phút trong 15 phút; 100-100% AcN, 0,5 ml/phút trong 4 phút; 100-0% AcN, 0,5 ml/phút trong 1 phút; 0-0% AcN, 0,5 ml/phút trong 5 phút; thời gian lưu: 25 phút. Đối chiếu kết quả thu nhận được với profile chất chuẩn thương mại: daidzein, genistein (Sigma).

**Kết quả và bàn luận**

**Cảm ứng và thu nhận β-glucosidase**

Kết quả ở hình 1 cho thấy, xuất hiện vạch mục tiêu khoảng 80 kDa ở mẫu có cảm ứng (giếng 3) so với mẫu không cảm ứng

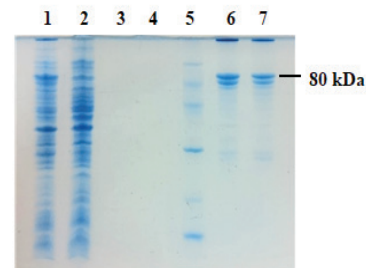
(giếng 2) đúng như giả thiết. Bên cạnh đó, protein này nằm hoàn toàn trong pha tan và chiếm 17,04% tổng protein tan trong E. coli.



**Hình 1. Kết quả điện di kiểm tra khả năng biểu hiện BGLPf.**  
Giếng 1: thang protein LMW; giếng 2: E. coli BL21 trong môi trường có 0,1 mM IPTG; giếng 3-5: pha tổng, tan và tủa tương ứng của E. coli BL21/pGEX-2TK-celB trong môi trường có 0,1 mM IPTG.

**Tinh sạch β-glucosidase và xác định nồng độ sau tinh chế**

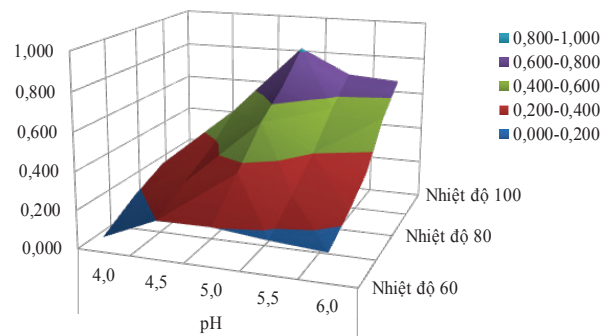
Kết quả hình 2 cho thấy, phần lớn protein tạp đều được rửa ra khỏi cột chỉ sau lần rửa thứ nhất, trong khi hầu hết BGLPf được giữ lại (vạch 80 kDa) chiếm 57,5%.



**Hình 2. Kết quả tinh chế BGLPf.**  
Giếng 1: protein tổng; giếng 2: dịch qua cột; giếng 3, 4: dịch sau rửa cột lần 1 và 2; giếng 5: thang protein LMW; giếng 6, 7: dịch dung ly lần 1 và 2.

**Khảo sát điều kiện tối ưu của BGL trên cơ chất pNPG**

Kết quả khảo sát cho thấy enzyme hoạt động tối ưu ở điều kiện nhiệt độ 100°C, pH 5,0 (hình 3).



**Hình 3. Kết quả khảo sát điều kiện tối ưu cho hoạt tính của BGLPf.**



Nhiệt độ tối ưu cho hoạt tính của tính enzyme BGLPf ở 100°C, cao hơn hẳn ở nhiều loài vi khuẩn, nấm men, nấm mốc khác [14]. Một số kết quả khảo sát nhiệt độ tối ưu trong khoảng 90-110°C cũng được ghi nhận ở một số enzyme khác trên *Pyrococcus furiosus* [15-17] hay một số enzyme thuộc nhóm hydrolase ở những loài chịu nhiệt khác [18]. Ngoài ra, việc dung hợp đuôi GST không làm ảnh hưởng tới hoạt tính chịu nhiệt của enzyme.

Đối với thông số pH, kết quả thu nhận phù hợp với một số nghiên cứu khác trên cả chủng tái tổ hợp lẫn chủng tự nhiên [10, 19, 20]. Các nghiên cứu khác trên một số enzyme thủy phân của *P. furiosus* như  $\beta$ -mannosidase,  $\beta$ -galactosidase trên các cơ chất khác nhau [15-17] và ở những loài có enzyme thuộc nhóm glycosyl hydrolase [14, 18] cũng có khoảng pH tối ưu từ 5,0-7,5. Khoảng pH này phù hợp với các loại carbohydrate trong tự nhiên, nhờ đó có tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong sản xuất công nghiệp thực phẩm.

**Xác định hoạt tính và hoạt tính riêng của enzyme đối với cơ chất pNPG**

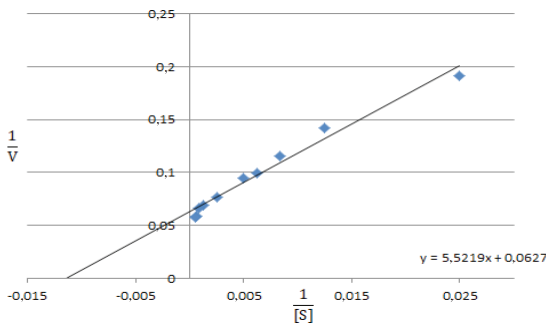
Đơn vị hoạt tính và hoạt tính riêng của enzyme BGLPf lần lượt là 6,018  $\mu\text{g}$  và 164,44  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , tương đương so với nghiên cứu của Voorhorst và cs [21] và cao hơn nhiều so với nhiều loài nấm mốc (bảng 1).

**Bảng 1. Hoạt tính riêng của enzyme đối với cơ chất pNPG.**

Nguồn thu nhận	Hoạt tính riêng ( $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	Tài liệu tham khảo
<i>Pyrococcus furiosus</i>	200	[21]
<i>Penicillium pinophilum</i>	83	[8]
<i>Penicillium citrinum</i>	0,159	
<i>Fomitopsis</i>	53	[22]
<i>Aspergillus niger</i>	1,9 124	
<i>Humicola grisea</i>	26,1	[23]
<i>Trichoderma reesei</i>	23,9	

**Động học enzyme BGLPf nhờ phương pháp Lineweaver-Burk (hình 4)**

Kết quả ghi nhận các giá trị động học tính toán được lần lượt là  $K_m = 0,088 \text{ mM}$ ,  $V_{max} = 332,27 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  và  $K_{cat} = 446,9 \text{ s}^{-1}$ .

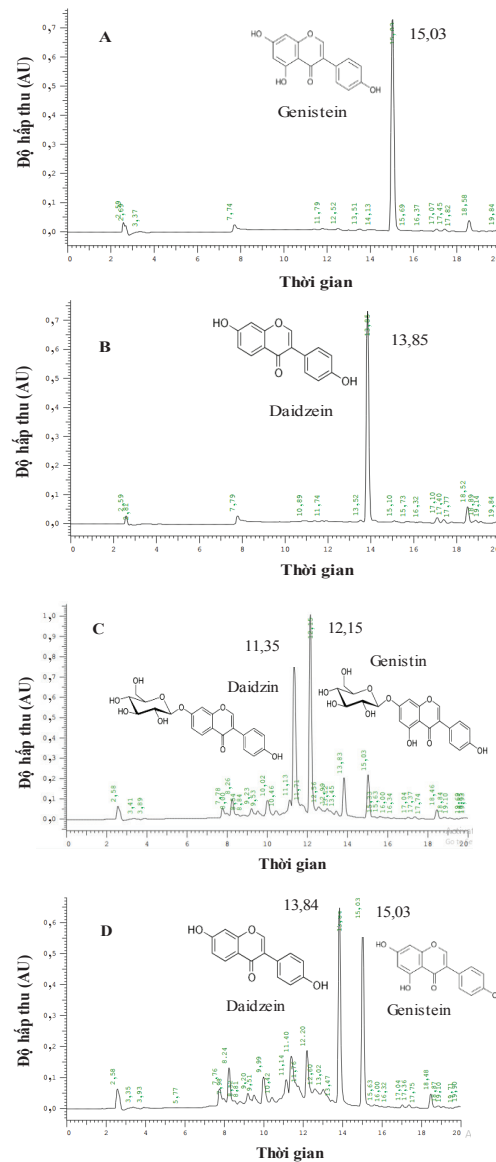


**Hình 4. Đồ thị Lineweaver-Burk đối với enzyme BGLPf.**

So với một số nghiên cứu khác về BGL từ cổ khuẩn *P. furiosus* thì giá trị  $K_m$  và  $V_{max}$  thấp hơn một nửa, cụ thể giá trị ghi nhận được lần lượt là  $K_m = 0,15 \text{ mM}$  và  $V_{max} = 700 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  [10, 15, 20, 21]. Dự đoán, enzyme của đề tài có khả năng bị ức chế bởi nồng độ glucose cao. Lập luận này dựa trên cơ sở khi hàm lượng glucose, tức sản phẩm của quá trình thủy phân, có nồng độ cao sẽ gây ức chế ngược lại hoạt động enzyme  $\beta$ -glucosidase [8, 24].

**Thử nghiệm hoạt tính enzyme trên hợp chất glycoside từ đậu nành bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao**

Dựa vào profile chất chuẩn, hai hợp chất có thời gian lưu 13,85 phút và 15,03 phút lần lượt là daidzein và genistein. Ở mẫu chưa xử lý enzyme, hai peak có thời gian lưu ngắn hơn là daidzin ở 11,25 phút và genistin ở 12,15 phút (hình 5).



**Hình 5. Profile kết quả HPLC.**

A. Chất chuẩn Genistein; B. Chất chuẩn Daidzein; C. Mẫu cao không xử lý enzyme; D. Mẫu cao có xử lý enzyme.

Khi so sánh giữa hai kết quả có xử lý và không xử lý enzyme, có sự tăng cường hai peak daidzein và genistein từ mẫu không xử lý enzyme sang mẫu có xử lý. Cùng với đó, có sự chuyển đổi đáng kể của hai peak có thời gian lưu ngắn (11,35 phút và 12,15 phút) sang peak có thời gian lưu dài (13,85 phút và 15,03 phút) phù hợp với việc các hợp chất glycoside có tính phân cực cao hơn đã bị chuyển đổi thành các dạng aglycone có tính phân cực thấp hơn nên thời gian lưu lâu hơn. Như vậy, enzyme BGLPf từ đề tài thu nhận cho hoạt tính chuyển đổi cao đối với các hợp chất isoflavone glycoside trên cơ chất đậu nành.

## KẾT LUẬN

Enzyme  $\beta$ -glucosidase siêu chịu nhiệt từ cổ khuẩn *Pyrococcus furiosus* có hoạt tính tối ưu ở 100°C, pH tối ưu 5,0, hoạt tính enzyme 164,44 U.mg<sup>-1</sup> cao hơn nhiều so với các loài nấm mốc khác. Với điều kiện tối ưu này, BGLPf là một ứng viên triển vọng trong ứng dụng chuyển đổi isoflavone nói riêng và các hợp chất glycoside nói chung. Bước đầu thử nghiệm hoạt tính đạt hiệu quả chuyển đổi cao trên cơ chất isoflavone đậu nành.

## LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn GS Michael Thomm (Đại học Regensburg - CHLB Đức) đã tặng genome cổ khuẩn *Pyrococcus furiosus* và Chương trình “Vườn ươm sáng tạo khoa học công nghệ trẻ” được quản lý bởi Trung tâm Phát triển khoa học công nghệ trẻ, Thành đoàn TP Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện đề tài.

Toàn bộ quá trình nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học và Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A. Vincent and L.A. Fitzpatrick (2000), “Soy isoflavones: are they useful in menopause?”, *Mayo Clinic Proceedings*, **75**(11), pp.1174-1184.

[2] Q. Wang, X. Ge, X. Tian, et al. (2013), “Soy isoflavone: the multipurpose phytochemical”, *Biomedical Reports*, **1**(5), pp.697-701.

[3] S.J. Yeom, B.N. Kim, Y.S. Kim, et al. (2012), “Hydrolysis of isoflavone glycosides by a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**(6), pp.1535-1541.

[4] G. Singh, A. Verma, and V. Kumar (2016), “Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of  $\beta$ -glucosidases”, *3 Biotech*, **6**(1), p.3.

[5] O.N. Donkor and N.P. Shah (2008), “Production of  $\beta$ -Glucosidase and Hydrolysis of Isoflavone Phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in Soymilk”, *Journal of Food Science*, **73**(1), pp.M15-M20.

[6] L.C. Kuo, W.Y. Cheng, R.Y. Wu, et al. (2006), “Hydrolysis of black soybean isoflavone glycosides by *Bacillus subtilis natto*”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **73**(2), pp.314-320.

[7] Y.H. Pyo, T.C. Lee, and Y.C. Lee (2005), “Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with  $\beta$ -glucosidase-producing lactic acid bacteria”, *Food Research International*, **38**(5), pp.551-559.

[8] R.R. Singhania, A.K. Patel, R.K. Sukumaran, et al. (2013), “Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production”, *Bioresource Technology*, **127**, pp.500-507.

[9] E. Williams, T.M. Lowe, J. Savas, et al. (2007), “Microarray analysis of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* exposed to gamma irradiation”, *Extremophiles*, **11**(1), pp.19-29.

[10] S.W. Kengen, E.J. Luesink, A.J. Stams, et al. (1993), “Purification and characterization of an extremely thermostable  $\beta$ -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*”, *European Journal of Biochemistry*, **213**(1), pp.305-312.

[11] H.T.M. Quan, L.V. Ngo, and N.T.B. Hue (2016), “Cloning and expression of recombinant hyperthermophilic  $\beta$ -glucosidase fused with GST, and initial testing for hydrolytic activity as applied to biofuel processing”, *Asia-Pacific Journal of Food Safety and Security*, **2**(4), pp.10-19.

[12] J. Labuda, R.P. Bowater, M. Fojta, et al. (2018), “Terminology of bioanalytical methods (IUPAC Recommendations 2018)”, *Pure and Applied Chemistry*, **90**(7), pp.1121-1198.

[13] Y. Xue, J. Yu, and X. Song (2009), “Hydrolysis of soy isoflavone glycosides by recombinant  $\beta$ -glucosidase from hyperthermophile *Thermotoga maritima*”, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **36**(11), pp.1401.

[14] Y. Bhatia, S. Mishra, and V. Bisaria (2002), “Microbial  $\beta$ -glucosidases: cloning, properties, and applications”, *Critical Reviews in Biotechnology*, **22**(4), pp.375-407.

[15] M.W. Bauer, E.J. Bylina, R.V. Swanson, et al. (1996), “Comparison of a  $\beta$ -Glucosidase and a  $\beta$ -Mannosidase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* purification, characterization, gene cloning, and sequence analysis”, *Journal of Biological Chemistry*, **271**(39), pp.23749-23755.

[16] Q. Dong, X. Yan, M. Zheng, et al. (2014), “Characterization of an extremely thermostable but cold-adaptive  $\beta$ -galactosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* for use as a recombinant aggregation for batch lactose degradation at high temperature”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **117**(6), pp.706-710.

[17] B. Li, Z. Wang, S. Li, et al. (2013), “Preparation of lactose-free pasteurized milk with a recombinant thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*”, *BMC Biotechnology*, **13**(1), pp.73.

[18] A. Sunna, M. Moracci, M. Rossi, et al. (1997), “Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles”, *Extremophiles*, **1**(1), pp.2-13.

[19] T. Kaper, J.H. Lebbink, J. Pouwels, et al. (2000), “Comparative structural analysis and substrate specificity engineering of the hyperthermostable  $\beta$ -glucosidase CelB from *Pyrococcus furiosus*”, *Biochemistry*, **39**(17), pp.4963-4970.

[20] S.W. Kengen and A.J. Stams (1994), “An extremely thermostable  $\beta$ -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*; a comparison with other glucosidases”, *Biocatalysis*, **11**(2), pp.79-88.

[21] W. Voorhorst, R. Eggen, E.J. Luesink, et al. (1995), “Characterization of the celB gene coding for beta-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and its expression and site-directed mutation in *Escherichia coli*”, *Journal of Bacteriology*, **177**(24), pp.7105-7111.

[22] S. Dan, I. Marton, M. Dekel, et al. (2000), “Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger*- $\beta$ -glucosidase”, *Journal of Biological Chemistry*, **275**(7), pp.4973-4980.

[23] S. Takashima, A. Nakamura, M. Hidaka, et al. (1999), “Molecular cloning and expression of the novel fungal  $\beta$ -glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*”, *The Journal of Biochemistry*, **125**(4), pp.728-736.

[24] Z. Xiao, X. Zhang, D.J. Gregg, et al. (2004), “Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates”, *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Breckenridge, CO, pp.1115-1126.