

NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN ENDO-GLUCANASE TÁI TỔ HỢP NGUỒN GỐC TỪ DNA METAGENOM VI KHUẨN ĐẠ CỎ ĐỀ Ở QUY MÔ BÌNH LÊN MEN 5 LÍT

ĐÀO TRỌNG KHOA⁽¹⁾, ĐỖ THỊ HUYỀN⁽¹⁾, TRƯƠNG NAM HẢI⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cellulose là vật liệu có cấu trúc đa phân nguồn gốc thực vật, là thành phần polysaccharide phong phú nhất trên Trái đất. Cellulose có công thức cấu tạo là $(C_6H_{10}O_5)_n$. Khối lượng phân tử của cellulose rất lớn (khoảng 1 000 000-2 400 000 đvC), tùy thuộc vào giá trị n. Giá trị n thể hiện số lượng các đơn phân và phụ thuộc vào loại nguyên liệu cellulose. Thông thường, mỗi chuỗi cellulose ở thành tế bào thực vật nói chung có khoảng 5000-7000 đơn phân. Các đơn phân β -D-glucose liên kết với nhau bằng liên kết β -1,4-glucoside tạo thành một chuỗi thẳng. Nhóm hydroxyl của chuỗi này tạo liên kết hydro với phân tử oxy của chuỗi bên cạnh (liên kết hydro liên phân tử) hoặc trên cùng chuỗi (liên kết hydro nội phân tử) hình thành cấu trúc vi sợi. Cellulose ở dạng tinh thể được tạo thành nhờ các liên kết β -1,4-glycoside ở mạch polysaccharide, các liên kết hydro và lực Van der Waal giữa các mạch polysaccharide cũng như giữa các vi sợi ở gần nhau. Cấu trúc cellulose tinh thể không cho phép các enzym hay chất hóa học tiếp cận với liên kết nội phân tử, bảo đảm tính bền của tinh thể cellulose nói chung [2].

Để chuyển hóa cellulose thành đường đơn glucose cần có sự phối hợp của nhiều loại enzym được gọi chung là cellulase, trong đó bao gồm ba loại chính là endo-glucanase (endo-1,4- β -glucanase, EC 3.2.1.4), exo-glucanase (exo-1,4- β -glucanase, EC 3.2.1.91) và β -glucosidase (cellobiase, EC 3.2.1.21). Trong ba loại trên, endo-glucanase được coi là enzym quan trọng nhất vì enzym này xúc tác phản ứng phân cắt ngẫu nhiên mạch dài cellulose tạo ra các oligo-saccharide với các đầu không khử mới, là tiền đề cho enzym exo-glucanase và β -glucosidase hoạt động [1].

Trong một khu hệ sinh thái thủy phân cellulose nói riêng và lignocellulose nói chung, rất nhiều loài vi khuẩn và nấm có khả năng thủy phân lignocellulose hoạt động tương hỗ lẫn nhau để chuyển hóa những phân tử cấu trúc bậc cao dạng tinh thể không tan thành những phân tử đơn giản hòa tan, cụ thể là cellobiose, glucose và các đường đơn khác, có thể được sử dụng làm nguyên liệu của tế bào. Hầu hết các vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose là vi khuẩn và nấm, mặc dù có một số nghiên cứu phát hiện một số loài động vật nguyên sinh yếm khí và nấm nhầy cũng có khả năng phân hủy cellulose [14]. Vi sinh vật phân hủy cellulose có thể thiết lập mối quan hệ hữu cơ với những loài không có khả năng phân hủy cellulose khu trú trong môi trường. Mối tương tác lẫn nhau trong quần xã sinh vật là cơ sở để quần xã có thể phân giải hoàn toàn cellulose, giải phóng carbon dioxide và nước trong điều kiện hiếu khí, hoặc carbon dioxide, methan và nước trong điều kiện yếm khí [5].

Ở Việt Nam, endo-glucanase đã được nghiên cứu và tách dòng hầu hết từ nguồn gốc nấm như từ *Trichoderma asperellum* [13], *Aspergillus niger* [10], *Aspergillus awamori* [8], bên cạnh một số nghiên cứu biểu hiện endo-glucanase có nguồn gốc vi khuẩn như *Clostridium thermocellum* [9], hay từ DNA metagenom hệ

vi khuẩn ruột môi [7]. Trong khuôn khổ đề tài Nghị định thư Việt Nam - CHLB Đức “Nghiên cứu sản xuất một số enzyme phân hủy lignocellulose trên cơ sở khai thác dữ liệu metagenom”, mã số: NĐT.50.GER/18, chúng tôi đã tách dòng gen endo-glucanase khai thác từ dữ liệu DNA metagenom hệ vi khuẩn dạ cỏ dê Việt Nam và biểu hiện thành công ở dạng tái tổ hợp trong vi khuẩn *E. coli* ở điều kiện bình tam giác. Để nâng cao hiệu quả sản xuất và làm tiền đề cho sản xuất ở quy mô lớn, chúng tôi tiến hành nghiên cứu biểu hiện endo-glucanase trong hệ thống lên men 5 lít. Nghiên cứu này mở đường cho việc mở rộng quy mô sản xuất endo-glucanase tái tổ hợp ở quy mô công nghiệp, góp phần chuyển giao sản phẩm từ nghiên cứu đến sản xuất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

2.1.1. Vector và chủng vi sinh vật

Vector pET22b(+) biểu hiện protein tái tổ hợp endo-glucanase được tổng hợp nhân tạo bởi hãng Genscript (Hoa Kỳ) ký hiệu pET22_EG5. Chủng *E. coli* Rosetta1 (DE3) (Merck, Đức) mang vector pET22_EG5 được tạo bởi phòng Kỹ thuật di truyền, viện Công nghệ Sinh học.

2.1.2. Môi trường biểu hiện

Chủng vi khuẩn mang gen tái tổ hợp được biểu hiện trong môi trường LB (cao nấm men (0,5%), bacto tryton (1%), NaCl (1%), bổ sung kháng sinh ampicilline đến nồng độ 100 µg/ml).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Biểu hiện chủng *E. coli* mang pET22b(+)_EG5 ở hệ thống lên men 5 lít

Chuẩn bị 2 lít môi trường LB trong hệ thống lên men 5 lít. Khử trùng toàn bộ hệ thống và môi trường trong điều kiện thích hợp để chuẩn bị lên men. Cây chủng giống gốc *E. coli* mang pET22b(+)_EG5 trong bình tam giác 500 ml chứa 50 ml môi trường LB bổ sung ampicilline đến 100 µg/ml, nuôi lắc qua đêm ở nhiệt độ 37°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút. Sục khí với lượng 1 lít khí/lít môi trường/phút (vvm) và khuấy với tốc độ 180 vòng/phút trong 5 phút để bão hòa nguồn oxy trong môi trường trước khi lên men. Đo OD₆₀₀ của dịch nuôi cấy chủng qua đêm, từ đó bổ sung chủng vào hệ thống lên men sao cho OD₆₀₀ ban đầu bằng khoảng 0,05. Điều kiện lên men ban đầu là nhiệt độ 37°C, pH môi trường khoảng 6,0-7,0, độ sục khí là 1 vvm và tốc độ khuấy là 180 vòng/phút.

Lấy mẫu đo và kiểm tra mật độ tế bào của dịch nuôi cấy sau mỗi 30 phút. Sau khoảng 1 giờ 30 phút, khi OD₆₀₀ đạt khoảng 0,4÷0,5 thì bắt đầu hạ nhiệt độ nuôi cấy xuống 25°C. Bổ sung chất cảm ứng IPTG đến nồng độ cuối cùng là 0,05 mM để cảm ứng quá trình sinh tổng hợp endo-glucanase. Tiếp tục kiểm tra mật độ tế bào theo thời gian sau khi cảm ứng. Mẫu được lấy mỗi giờ và quá trình lên men được dừng lại ở thời điểm 7 giờ sau cảm ứng. Sinh khối tế bào sau quá trình lên men được đo OD₆₀₀ để xác định mật độ tế bào và ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ môi trường trước khi được bảo quản ở -20°C.

2.2.2. Kiểm tra protein tái tổ hợp trên SDS-PAGE

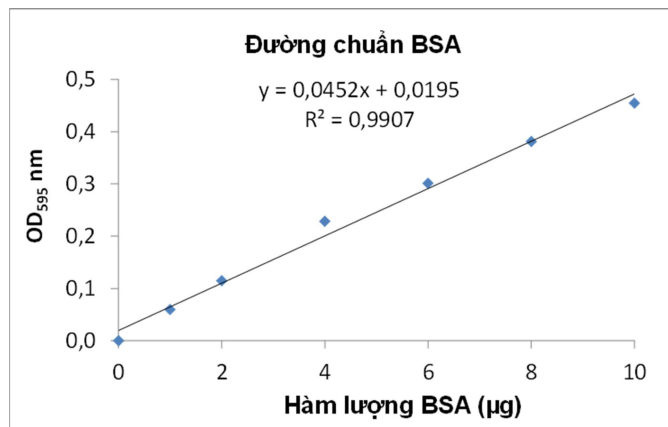
Sinh khối tế bào được hòa bằng nước deion vô trùng sao cho OD₆₀₀ bằng 10. 500 µl dịch tế bào được xử lý bằng sóng siêu âm cường độ cao trong khoảng 100-200 lần, mỗi lần phóng sóng siêu âm trong khoảng 0,5 giây, thời gian nghỉ giữa các lần phóng sóng siêu âm khoảng 0,5 giây. Dịch tế bào sau siêu âm được coi là mẫu protein tổng số, đồng thời dịch này được ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để tách riêng hai pha tan và không tan. Mẫu được biến tính ở 100°C trong 10 phút và điện di trên gel polyacrylamid 12,6%.

2.2.3. Tinh chế enzym endo-glucanase bằng sắc ký ái lực His-tag

10 ml dịch tế bào OD₆₀₀ ~20 được phá tế bào bằng sóng siêu âm ở điều kiện lạnh (4°C) trong 5 phút với quy trình 3 giây phóng sóng siêu âm, 3 giây nghỉ. Sau đó, dịch được ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút, thu pha tan. Một lần thể tích đệm PBS 2X pH 7 chứa imidazol 40 mM được bổ sung vào dịch tế bào. Dịch tan được lọc qua màng 0,45 µm. Dịch lọc được đưa lên cột sắc ký ái lực Hi-trap 5 ml đã được cân bằng với 25 ml đệm bám cột (PBS 1x pH 7, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol) với tốc độ dòng 1 ml/phút, thu dịch chảy ra từ cột để kiểm tra mức độ bám của enzym (F). Rửa cột bằng 25 ml đệm rửa 1 (PBS 1x pH 7, 500 mM NaCl, 75 mM imidazol), thu dịch. Đẩy enzym EG5 ra khỏi cột bằng 25 ml đệm thu mẫu (PBS 1x pH 7, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol), thu enzym theo phân đoạn 1 ml. Rửa sạch protein còn sót lại trên cột bằng 15 ml đệm rửa 2 (PBS 1x pH 7, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol), thu dịch. Cân bằng cột bằng đệm bám cột trước khi lặp lại các lần tinh chế tiếp theo. Điện di protein kiểm tra các phân đoạn tinh chế trên gel SDS-PAGE 12,6%. Các phân đoạn chứa EG5 đậm được gộp lại và chuyển vào túi thẩm tích có kích thước lỗ màng cut-off là 10 kDa. Mẫu được thẩm tích trong đệm PBS 1x pH 7, trong quá trình thẩm tích, đệm thẩm tích được duy trì ở điều kiện lạnh (4°C) có khuấy từ nhẹ. Dịch sau thẩm tích được bổ sung glycerol khử trùng đến nồng độ cuối cùng 10% để bảo quản.

2.2.4. Định lượng protein bằng phương pháp Bradford

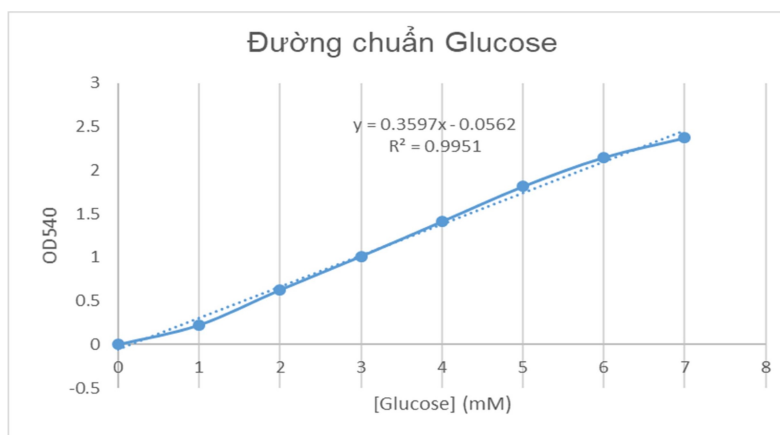
Lượng protein trong các mẫu nghiên cứu được định bằng phương pháp Bradford và theo hướng dẫn của nhà cung cấp dung dịch Bradford (5000006, Biorad). Hút 800 µl mẫu cần xác định nồng độ vào ống Eppendorf (chú ý: mẫu protein được pha loãng sao cho sau khi ủ phản ứng, cường độ màu đo được nằm trong dải của đường chuẩn). Sau đó bổ sung thêm 200 µl dung dịch Bradford reagent 5X vào mỗi ống. Trộn đều và ủ phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Đo cường độ màu phản ứng ở bước sóng 595 nm. Nồng độ protein trong mẫu được tính toán dựa vào phương trình của đường chuẩn được thiết lập giữa nồng độ BSA (0 - 10 µg/ml) với bước sóng đo được ở 595 nm. Chú ý, mỗi mẫu được lặp lại 3 lần. Blank là mẫu sử dụng dH₂O thay thế cho dịch protein.



Hình 1. Đường chuẩn biểu thị sự phụ thuộc giữa nồng độ BSA và cường độ màu đo được ở bước sóng 595 nm

2.2.5. Xác định hoạt tính của enzym *endo-glucanase*

Phản ứng được thực hiện dựa trên phương pháp đo độ hấp thụ màu của dung dịch DNS (DNSA 1%, NaOH 0,25 M, NaHSO₃ 0,05%, sodium-potassium tartrat 0,645 M) [6]. Mỗi mẫu phản ứng gồm 50 µl PBS 10X pH 4, 125 µl CMC 2%, 1 µl MnCl₂ 500 mM, 274 µl dH₂O và 50 µl enzym EG5 (2 µg/ml). Phản ứng giữa enzym và cơ chất được diễn ra trong 30 phút ở 50°C. Sau 30 phút ủ, bổ sung 500 µl DNSA vào mỗi ống. Mẫu đối chứng có thành phần tương tự như mẫu đo hoạt tính chỉ khác là 50 µl mẫu chứa enzym được cho vào sau khi bổ sung DNSA. Ủ hỗn hợp ở 100°C trong 15 phút và đo OD₅₄₀. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm, mỗi mẫu lặp lại 3 lần. Độ hấp thụ được so sánh với đường chuẩn glucose để xác định hàm lượng glucose trong mỗi ống phản ứng.



Hình 2. Đường chuẩn biểu thị sự phụ thuộc giữa nồng độ glucose và cường độ màu đo được ở bước sóng 540 nm

Một đơn vị hoạt tính (IU) enzym là lượng *endo-glucanase* cần thiết để giải phóng ra 1 µmol glucose trong 1 phút ở điều kiện đo.

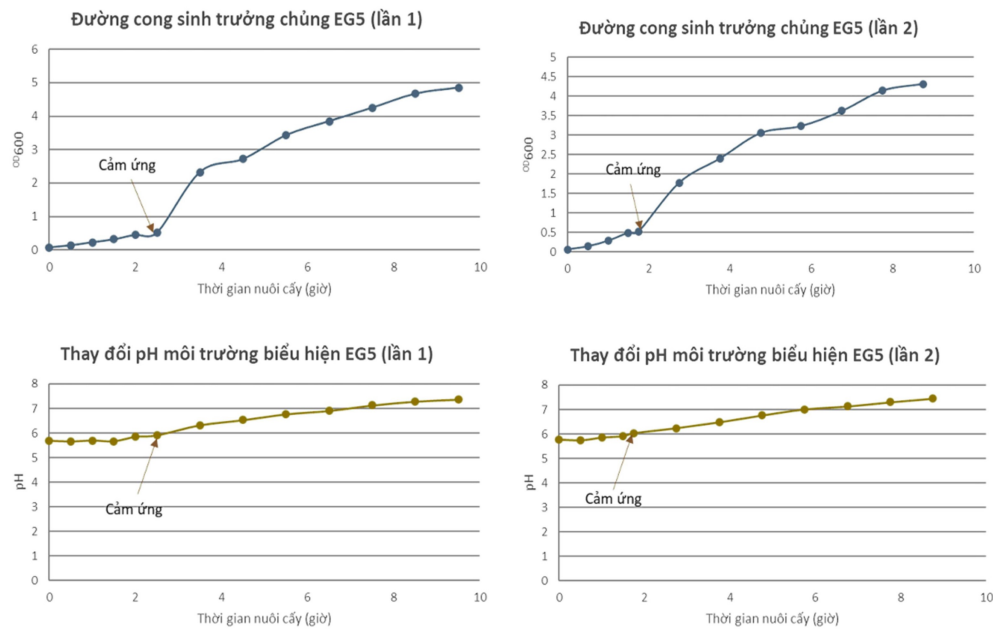
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Lên men chủng *E. coli* mang pET22(b)_EG5 trong hệ thống lên men 5 lít

Trước khi nghiên cứu biểu hiện EG5 trong quy mô bình lên men, chủng *E. coli* biểu hiện EG5 tái tổ hợp đã được nghiên cứu xây dựng quy trình biểu hiện và tinh sạch protein ở quy mô bình tam giác. Cụ thể, EG5 đã được biểu hiện trong chủng *E. coli* mang vector pET22b(+)_EG5 trong môi trường LB bổ sung ampicilline đến nồng độ cuối cùng là 100 µg/ml, nuôi lắc ở nhiệt độ 37°C với tốc độ lắc là 180 vòng/phút. Protein EG5 được cảm ứng biểu hiện ở thời điểm mật độ tế bào dịch nuôi cấy đạt OD₆₀₀ là khoảng 0,5-0,6 với nồng độ chất cảm ứng là 0,05 mM IPTG. Sau khi cảm ứng, chủng biểu hiện được tiếp tục nuôi lắc ở nhiệt độ 25°C, tốc độ lắc không đổi trong vòng 7 giờ. Dựa trên quy trình biểu hiện protein EG5 tái tổ hợp đã được thiết lập ở quy mô bình tam giác, chủng biểu hiện được lên men trong hệ thống lên men 5 lít.

Ở hai lần lên men trong hệ thống lên men 5 lít, với môi trường LB, pH môi trường ban đầu lần lượt là 6,79 và 6,75. Các thông số về tốc độ khuấy 180 vòng/phút, tốc độ sục khí 1 lít khí/lít môi trường/phút, nhiệt độ biểu hiện 37°C được duy trì tự động bằng hệ thống điều khiển. Đây là các điều kiện tiêu chuẩn để nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu trước đây. Kết quả xây dựng đường cong sinh trưởng và theo dõi pH môi trường nuôi cấy của chủng biểu hiện EG5 tái tổ hợp trong hệ thống lên men được thể hiện ở hình 3.

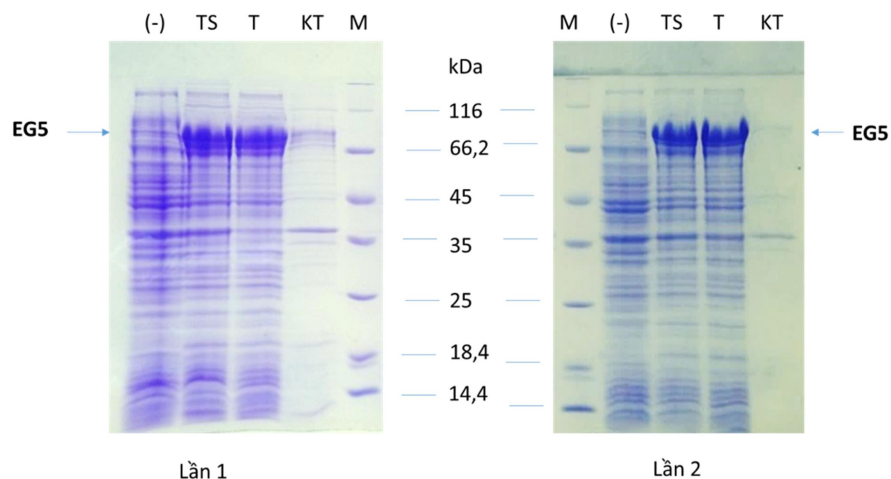
Kết quả đo OD₆₀₀ mật độ tế bào để xây dựng đường cong sinh trưởng cho thấy, chủng biểu hiện EG5 tái tổ hợp sinh trưởng tương đối chậm trong khoảng thời gian đầu, khi giá trị OD₆₀₀ nằm trong khoảng 0÷0,6, trong thời gian này, pH môi trường nuôi cấy cũng gần như được duy trì tương đối ở khoảng pH acid 5,7÷5,9. Sau khoảng 2 giờ nuôi cấy, khi OD₆₀₀ của dịch nuôi cấy tế bào đạt đến ngưỡng giá trị cảm ứng (0,5÷0,6), chất cảm ứng IPTG được bổ sung vào môi trường nuôi cấy đồng thời nhiệt độ nuôi cấy được giảm xuống còn 25°C. Trong vòng 3 giờ đầu tiên sau khi cảm ứng, chủng biểu hiện sinh trưởng rất nhanh, thể hiện ở độ dốc lớn trong biểu đồ đường cong sinh trưởng. Chủng biểu hiện tiếp tục sinh trưởng với tốc độ chậm hơn, thể hiện ở thông số giá trị OD₆₀₀ vẫn tiếp tục tăng đến tận thời điểm thu mẫu (7 giờ sau khi cảm ứng), điều này có thể do chất dinh dưỡng trong môi trường vẫn còn chưa được sử dụng hết. OD₆₀₀ ở thời điểm thu mẫu là khoảng 4,5, cao hơn khoảng 25-30% so với OD₆₀₀ của mẫu biểu hiện trong điều kiện bình tam giác. pH của môi trường sau cảm ứng có xu hướng tăng dần, chứng tỏ quá trình sinh tổng hợp EG5 làm tăng lượng các chất có tính kiềm tiết ra ngoài môi trường.



Hình 3. Đường cong sinh trưởng của chủng tái tổ hợp EG5 và sự thay đổi pH môi trường biểu hiện ở 2 lần lên men

3.2. Kết quả kiểm tra khả năng biểu hiện của protein tái tổ hợp EG5 ở hai lần lên men

Tế bào chủng biểu hiện sau khi kết thúc quá trình lên men được thu hồi bằng phương pháp ly tâm. Tất cả dịch tế bào được ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 10 phút để thu sinh khối tế bào, một phần nhỏ sẽ được điện di trên gel SDS-PAGE để kiểm tra khả năng biểu hiện của protein EG5.



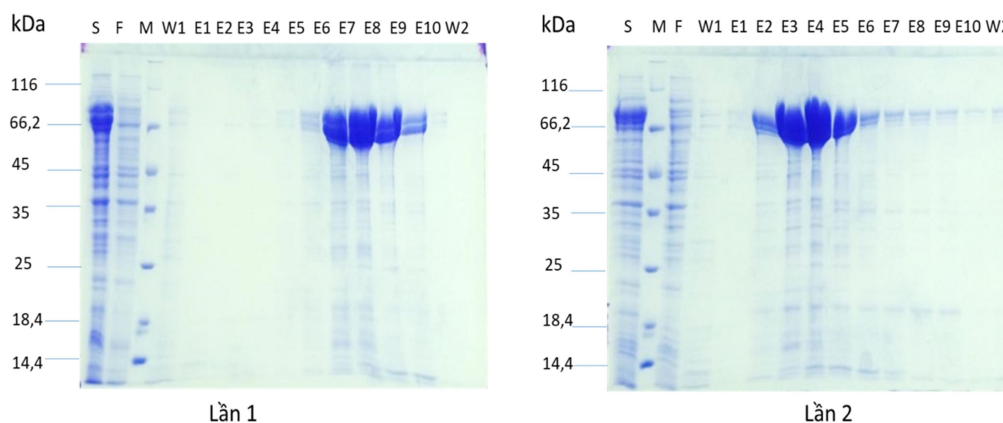
Hình 4. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của EG5 trên gel SDS-PAGE 12,6%

Ghi chú: Đường chạy (-): chủng *E. coli* Rosetta 1 mang vector pET22b(+) không mang gen *eg5*; M: thang protein chuẩn (#SM0431, Fermentas); TS, T và KT: lần lượt là protein ở các pha tổng số, pha tan, pha không tan của chủng tái tổ hợp mang vector pET22_EG5.

Protein tái tổ hợp biểu hiện ở chủng chủ cần được kiểm tra xem chúng tồn tại ở dạng tan hay dạng không tan. Sau khi màng tế bào biểu hiện được phá vỡ bằng sóng siêu âm, toàn bộ protein nội bào sẽ được giải phóng, phần protein tan và không tan sẽ được phân thành hai pha dưới tác dụng của lực ly tâm. Pha tan và pha không tan sẽ được điện di biến tính trên gel SDS-PAGE. Kết quả điện di protein trên hình 4 đã chỉ ra rằng băng protein EG5 có kích thước khoảng 78 kDa được biểu hiện gần như hoàn toàn ở pha tan mà không xuất hiện ở pha không tan. Băng enzym ở pha tan và pha tổng số đậm tương đương nhau (mẫu TS và T). Trong khi đó, ở pha không tan hầu như không có băng enzym này (mẫu KT). Điều đó chứng tỏ rằng các điều kiện lên men đã được kiểm soát rất tốt, các thông số lên men đã thiết lập từ quy trình lên men quy mô lượng nhỏ được áp dụng cho bình lên men quy mô 5 lít là phù hợp. Nghiên cứu này là nghiên cứu bước đầu để có thể ứng dụng đưa việc biểu hiện endo-glucanase tái tổ hợp từ quy mô phòng thí nghiệm vào điều kiện sản xuất quy mô lớn.

3.3. Tinh chế protein EG5 bằng cột sắc ký ái lực His-tag

Như đã trình bày ở phần quy trình, enzym tái tổ hợp EG5 biểu hiện từ chủng chủ được tinh sạch bằng sắc ký ái lực his-tag sử dụng đệm PBS 1x, pH 7 chứa nồng độ imidazol cao 200 mM. Kết quả tinh chế của hai lần đều được điện di kiểm tra trên gel SDS-PAGE 12,6%.



Hình 5. Ảnh minh họa enzyme EG5 được tinh chế từ dịch tổng số pha tan của 2 lần tinh chế khác nhau trên cột sắc ký ái lực his-tag

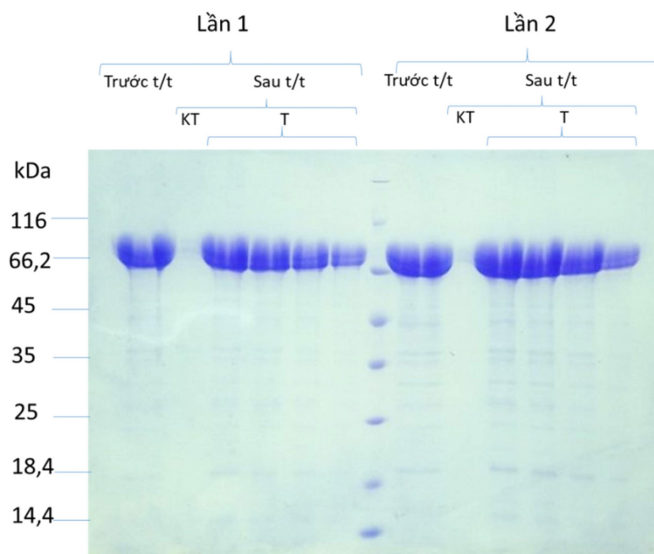
Ghi chú: M: thang protein chuẩn (#SM0431, Fermentas); S: protein tổng số pha tan; F: dịch thu trong khi đưa mẫu lên cột sắc ký; W1 và W2: dịch rửa cột được thu từ đệm PBS 1x (pH 7) chứa imidazol lần lượt có nồng độ 75 và 500 mM; E1-E10: các phân đoạn thu enzym bằng đệm PBS 1x (pH 7) chứa imidazol ở nồng độ 200 mM

Kết quả điện di protein trên hình 5 cho thấy phần lớn protein tạp đã được loại bỏ trong lúc đưa mẫu lên bám cột do không có khả năng bám ái lực lên chất giá (mẫu F). Nhiều protein tạp khác bám không đặc hiệu tiếp tục được loại bỏ bởi các đệm rửa có nồng độ imidazol 75 mM (mẫu W1). Kết quả điện di protein trên hình 5 cũng chỉ ra rằng enzym EG5 đều được giải phóng ra khỏi cột một cách ổn định từ 3-4 phân đoạn thu mẫu bởi đệm rửa mẫu chứa imidazol ở nồng độ cao 200 mM (Elution buffer). Các phân đoạn thu mẫu này đều chứa bằng protein đậm chứng tỏ chúng được giải phóng ra một cách tập trung (khoảng 2-3 phân đoạn). Như vậy, các mẻ tinh chế được lặp lại một cách ổn định.

Do các mẫu enzym EG5 đều chứa nồng độ muối imidazol cao (200 mM), có khả năng ức chế hoạt tính enzym nên chúng được gộp lại sau mỗi mẻ tinh chế để loại muối ở bước tiếp theo. Để loại muối ra khỏi mẫu protein, có nhiều cách làm khác nhau như sử dụng cột loại muối có sẵn trên thị trường, loại muối bằng phương pháp sắc ký lọc gel, loại muối bằng thẩm tích. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp loại muối bằng thẩm tích. Đây là phương pháp loại muối hiệu quả, đơn giản và có thể áp dụng cho lượng mẫu lớn. Màng thẩm tích có cut off 10 kDa cho phép các phân tử chất tan có kích thước nhỏ như đường, muối... dễ dàng đi qua lỗ màng trong khi các phân tử chất tan có kích thước lớn >10 kDa sẽ được giữ lại. Theo nguyên lý khuếch tán, các chất tan sẽ di chuyển từ nơi có nồng độ cao tới nơi có nồng độ thấp hơn, cụ thể trong trường hợp này là imidazol, trong khi các phân tử enzym có kích thước lớn hơn lỗ màng sẽ được giữ lại ở trong màng. Quá trình khuếch tán diễn ra liên tục cho tới khi nồng độ muối bên trong và bên ngoài màng đạt trạng thái cân bằng. Khi đó, nồng độ imidazol trong mẫu enzym đã giảm xuống đáng kể. Quá trình thẩm tích cho enzym EG5 được thực hiện trong điều kiện lạnh có khuấy từ nhẹ để thúc đẩy quá trình khuếch tán diễn ra thuận lợi hơn. Điều kiện lạnh được duy trì liên tục giúp hạn chế sự suy giảm hoạt tính của enzym EG5.

Sau thời gian thẩm tích, mẫu enzym được lấy ra quan sát sơ bộ bằng mắt thường. Kết quả cho thấy dịch enzym trong, ít tủa. Mẫu được ly tâm tách riêng pha tan và pha không tan. Mẫu protein trước thẩm tích và pha tan cũng như pha không tan của mẫu protein sau khi thẩm tích được điện di biến tính trên gel SDS-PAGE 12,6% (hình 6). Sau khi thẩm tích, mẫu protein tinh sạch ở dạng tan được bổ sung glycerol khử trùng đến nồng độ cuối cùng là 10%. Trên thực tế, glycerol thường được các nhà sản xuất bổ sung vào các mẫu protein, enzym... nhằm bảo quản mẫu và duy trì hoạt tính lâu hơn. Kết quả nghiên cứu thực nghiệm cho thấy nồng độ glycerol 10% là nồng độ thích hợp để duy trì tính bền và hoạt tính của enzym trong thời gian dài, so với các nồng độ glycerol khác (kết quả không báo cáo).

Kết quả điện di kiểm tra protein trên hình 6 chỉ ra rằng sau khi thẩm tích loại muối, enzym EG5 đều ở pha tan, bằng protein đậm và rõ nét tương đương bằng protein này trước khi thẩm tích (mẫu tan). Trong khi đó ở pha tủa gần như không xuất hiện băng protein. Điều này chứng tỏ rằng kết quả thẩm tích loại muối được lặp lại với độ ổn định cao. Enzym thu được đều ở pha tan, có khả năng đảm bảo hoạt tính sinh học. Kết quả điện di SDS-PAGE đã được kiểm tra độ sạch bằng phần mềm ImageLab (Bio-rad), tất cả các mẫu sau khi tinh sạch và thẩm tích đều có độ sạch hơn 95%.



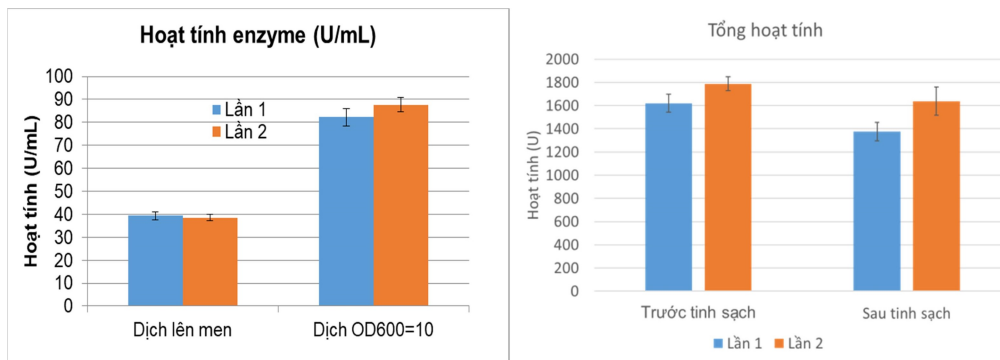
Hình 6. Ảnh minh họa enzym EG5 được loại muối bằng thẩm tích

Ghi chú: M: thang protein chuẩn (Fermentas, #SM0431); T và KT: pha protein tan và không tan của mẫu EG5 sau khi thẩm tích

3.4. Xác định hoạt tính enzym EG5 trước và sau khi tinh sạch

Enzym EG5 tái tổ hợp sau khi được biểu hiện trong tế bào *E. coli* ở hai lần lên men lượng lớn được đo nồng độ protein bằng phương pháp Bradford. Dịch tế bào thô trước khi tinh sạch có hàm lượng là $1585,55 \pm 67,59$ $\mu\text{g/ml}$ đối với lần lên men thứ nhất, và có hàm lượng $1727,14 \pm 82,23$ $\mu\text{g/ml}$ đối với lần lên men thứ hai. Hàm lượng protein của mẫu biểu hiện khá đồng đều và cao hơn khoảng 10% so với mẫu biểu hiện trong bình tam giác. Dịch protein tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực và thẩm tích loại muối bằng màng thẩm tích cũng được kiểm tra bằng Bradford. Kết quả thu được cho thấy dịch protein sau khi tinh sạch với mẫu lên men lần 1 là $1040,56 \pm 14,22$ $\mu\text{g/ml}$, với mẫu lên men lần 2 là $1450,59 \pm 70,84$ $\mu\text{g/ml}$.

Dịch protein EG5 biểu hiện ở hai lần lên men có hoạt tính khá ổn định, với lần 1 đạt $39,29 \pm 1,86$ U/ml, lần 2 đạt $38,52 \pm 1,29$ U/ml dịch nuôi cấy, tương ứng với $82,33 \pm 3,83$ U/ml của lần lên men thứ nhất và $87,7 \pm 2,98$ U/ml của lần lên men thứ 2 khi đưa cô đặc tế bào về dịch nuôi có giá trị OD_{600} bằng 10 (hình 7). Sau khi tinh sạch và thẩm tích, protein EG5 tái tổ hợp biểu hiện lần 1 có hoạt tính thu được là $458,75 \pm 26,69$ U/ml, trong khi mẫu biểu hiện lần 2 có hoạt tính cao hơn, đạt được $545,69 \pm 40,69$ U/ml. Tính theo tổng hoạt tính của mẫu endo-glucanase trước khi tinh sạch và sau khi tinh sạch, hiệu suất thu hồi của quá trình tinh sạch đạt được là tương đối cao, lần lượt là 85% và 92% với hai lần lên men lượng lớn, điều này đảm bảo tính hiệu quả của quá trình tinh sạch. Hoạt tính riêng của mẫu tinh sạch đạt được là 440,4 U/mg đối với mẫu lên men đợt 1 và 376,3 U/mg đối với mẫu tinh sạch đợt 2.



Hình 7. Kết quả đo hoạt tính endo-glucanase của hai lần lên men lượng lớn

Hoạt tính endo-glucanase thu được sau khi tinh sạch là khá cao so với nhiều công bố trước đây của các nhóm nghiên cứu trong và ngoài nước. Cụ thể, Kyong-Cheol và các cộng sự (2011) đã biểu hiện một gen cellulase có nguồn gốc từ vi khuẩn kỵ khí thuộc họ Clostridiaceae trong dạ cỏ bò, enzyme có hoạt tính endo-cellulase và exo-cellulase lần lượt là 15,9 và 0,036 U/mg [3]. Trong một nghiên cứu khác, Kurokawa và cộng sự đã phân lập một gen cellulase từ chủng *Clostridium thermocellum* F1 và biểu hiện tái tổ hợp trong *E. coli*, protein tái tổ hợp thể hiện hoạt tính cao nhất với CMC là 137 U/mg [4]. Yang và các đồng tác giả đã nhân dòng và biểu hiện tái tổ hợp gen cellulase nguồn gốc từ *Bacillus subtilis* trong *E. coli*, enzyme tái tổ hợp thu được có hoạt tính là 6,78 U/ml, cao hơn so với chủng tự nhiên là 2,82 U/ml [15].

So với các nghiên cứu trong nước, endo-glucanase EG5 cũng có hoạt tính tương đối cao. Những cellulase bền nhiệt nguồn gốc từ các chủng *Geobacillus* phân lập từ Tuyên Quang bởi Trần Đình Mẫn và các cộng sự có hoạt tính đạt từ 84-105 U/ml [12]. Hoạt tính của enzyme cellulase từ chủng *Bacillus* sp. VLSH08 trong nghiên cứu của Phan Thị Tuyết Minh và đồng tác giả đạt mức 14 U/ml [11].

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã biểu hiện thành công endo-glucanase tái tổ hợp có nguồn gốc từ vi khuẩn trong dạ cỏ dê trong tế bào *Escherichia coli* Rosetta1 ở điều kiện quy mô bình lên men 5 lít. Enzyme tái tổ hợp được tinh sạch và thu hồi có độ tinh sạch cao và có hoạt tính đến khoảng 400 U/mg khi thử hoạt tính với cơ chất CMC bằng phương pháp DNS. Kết quả trên là cơ sở để định hướng ứng dụng của enzyme tái tổ hợp trong thực tiễn.

Lời cảm ơn: Bài báo được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài Nghị định thư Việt Nam - CHLB Đức “Nghiên cứu sản xuất một số enzyme phân hủy lignocellulose trên cơ sở khai thác dữ liệu metagenom”, mã số: NĐT.50.GER/18, do GS.TS. Trương Nam Hải, Viện Công nghệ sinh học chủ nhiệm. Công trình có sử dụng trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bredon Marius, Jessica Dittmer, Cyril Noël, Bouziane Moumen, Didier Bouchon, *Lignocellulose degradation at the holobiont level: teamwork in a keystone soil invertebrate*, Microbiome, 2018, **6**(1):162.
2. Ghaemi Ferial, Luqman Chuah Abdullah, Hidayah Ariffin, *Chapter 2 - Lignocellulose structure and the effect on nanocellulose production*, in Lignocellulose for Future Bioeconomy, H. Ariffin, S.M. Sapuan and M.A. Hassan, Editors. Elsevier, 2019, p. 17-30.
3. Ko K. C., Y. Han, J. H. Choi, G. J. Kim, S. G. Lee, J. J. Song, *A novel bifunctional endo-/exo-type cellulase from an anaerobic ruminal bacterium*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011, **89**(5):1453-62.
4. Kurokawa J., E. Hemjinda, T. Arai, T. Kimura, K. Sakka, K. Ohmiya, *Clostridium thermocellum cellulase CelT, a family 9 endoglucanase without an Ig-like domain or family 3c carbohydrate-binding module*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, **59**(4-5):455-61.
5. Matthews C., F. Crispie, E. Lewis, *The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency*, Gut Microbes, 2019, **10**(2):115-132.
6. Miller G. L., *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*, Analytical Chemistry, 1959, **31**(3):426-428.
7. Nguyễn Thị Thảo, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải, *Đánh giá đa dạng vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose và hemicellulose trong ruột mối Coptotermes gestroi cư trú tại miền bắc Việt Nam*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2019, **17**(3):537-544.
8. Nguyen Van Tuan, Quyen Dinh Thi, *Purification and properties of a novel thermoactive endoglucanase from Aspergillus awamori VTCC-F099*, Aust. J. Basic. Appl. Sci., 2010, **4**:6211-6216.
9. Phạm Lương Thắng, Phan Thị Phương Trang, Trần Linh Thuộc, Nguyễn Đức Hoàng, *Biểu hiện endoglucanase A của Clostridium thermocellum trong vi khuẩn Bacillus subtilis*, Science & Technology Development, 2014, **17**(4): 74.
10. Phạm Thị Hòa, *Phân lập biểu hiện gen mã hoá endo- β -1,4-glucanase từ Aspergillus niger và nghiên cứu tính chất của enzyme tái tổ hợp*, Luận án tiến sĩ, Hà Nội, Việt Nam, 2012.
11. Phan Thị Tuyết Minh, Nguyễn Ngọc An, Nguyễn Quốc Việt, Trần Đình Mẫn, *Xác định các tính chất của carboxymethyl cellulase (CMCase) được tạo ra từ chủng Bacillus sp. VLSH08*, Tạp chí Công nghệ sinh học, 2010, **8**:865-870.
12. Tran D. M., Nguyen Q. V., Nguyen T. T., Phan T. M., Bui T. T., Doan T. H., *Screening bacterial strains producing thermostable cellulase from hot springs for biomass hydrolysis*, Bioethanol: Status and Future, 2009, p. 19-20.

13. Trần Lê Minh Đức, Nguyễn Hoàng Lộc, Nguyễn Phúc Như Hà, Bùi Thị Bích Thoa Châu Hồ Tịnh Tâm, Vũ Tuấn Anh, *Biểu hiện endo-beta-1,4-glucanases từ Trichoderma asperellum PQ34 trong hệ thống pPICZA A - Pichia pastoris GS115*, Tạp chí y học dự phòng, 2019, **29**(6):53.
14. Wang Guan, Yu Duan, *Studies on lignocellulose degradation by rumen microorganism*, Advanced Materials Research, 2013, **853**:253-259.
15. Yang D., H. Weng, M. Wang, W. Xu, Y. Li, H. Yang, *Cloning and expression of a novel thermostable cellulase from newly isolated Bacillus subtilis strain 115*, Mol. Biol. Rep., 2010, **37**(4):1923-9.

SUMMARY

EXPRESSION OF RECOMBINANT ENDO-GLUCANASE DERIVED FROM BACTERIA INSIDE VIETNAM GOAT RUMEN IN 5-LITER BIO-REACTOR

Cellulose is one of the three main components of lignocellulose and one of the world's largest reserves of biomass. Endo-glucanase is one of the three crucial enzymes in the hydrolysis process of cellulose into glucoses. The endo-glucanase gene has been mined by bioinformatics tools in next-generation sequencing data of metagenom DNA from bacteria residing in goat rumen. In previous study, the endo-glucanase gene was successfully recombinantly expressed in the *E. coli* Rosetta1 strain in flask, the expressed protein existed in the soluble form with good activity. In order to apply in bigger scale, endo-glucanase was investigated for expression in a 5-liter bio-reactor. The research results showed that the expressed protein reached about 1.5-1.7 mg/ml with crude activity of about 37-38 U/ml of fermentation solution. The endo-glucanase protein, after being purified by His-tag affinity chromatography column and salt-removed by membrane dialysis, has a fairly high activity of about 400 U/mg. This result showed potential for the application of endo-glucanase production on an industrial scale.

Keywords: Metagenomics, endo-glucanase, *E. coli* Rosetta1, bio-reactor.

Nhận bài ngày 28 tháng 7 năm 2022

Phản biện xong ngày 12 tháng 10 năm 2022

Hoàn thiện ngày 18 tháng 11 năm 2022

⁽¹⁾ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Liên hệ: **ThS. Đào Trọng Khoa**

Phòng Kỹ thuật Di truyền, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Số 18 Hoàng Quốc Việt - Cầu Giấy - Hà Nội.

Điện thoại: 0943418493; Email: khoadt2103@gmail.com