

Biểu hiện, tinh sạch và đánh giá sơ bộ hoạt tính phân hủy nhựa PET của enzyme PETase tái tổ hợp

Phạm Nguyễn Minh Trang, Trần Hồng Diễm, Trần Thị Hậu, Phùng Thị Thu Hương

Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành
pnmtrang@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Nhu cầu xử lý rác thải nhựa polyethylene terephthalate (PET) đang ngày càng trở nên cấp thiết và quan trọng trong xã hội hiện đại. Hiện nay, việc xử lý rác thải PET dựa trên phương pháp phân hủy sinh học được xem là giải pháp bền vững để xử lý rác thải nhựa PET bằng cách sử dụng enzyme nguồn gốc từ vi sinh vật để xúc tác quá trình thủy phân PET. Nghiên cứu đã biểu hiện và tinh sạch thành công enzyme PETase thông qua kỹ thuật protein tái tổ hợp. Điều kiện tối ưu để biểu hiện PETase được xác định là cảm ứng 4 giờ 30 phút ở 30 °C với nồng độ IPTG là 0,01 mM. PETase sau tinh sạch thể hiện khả năng phân hủy nhựa PET hiệu quả với hoạt tính được tối ưu hóa khi bổ sung đồng thời glycerol 10 % và DTT 1 mM. Kết quả của nghiên cứu tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo liên quan đến sản xuất enzyme phân hủy PET và các nghiên cứu liên quan đến protein tái tổ hợp để tái chế rác thải nhựa tại Việt Nam.

Nhận 10/05/2023
Được duyệt 21/06/2023
Công bố 12/09/2023

Từ khóa
PETase,
protein tái tổ hợp, PET,
biểu hiện, tinh sạch.

© 2023 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Được phát triển bởi DuPont vào giữa những năm 1940, Polyethylene terephthalate (PET) là loại nhựa nhiệt dẻo được sản xuất và sử dụng rộng rãi nhờ các đặc tính của nhựa. PET thu được từ quá trình trùng hợp axit terephthalic (TPA) và ethylene glycol (EG) hoặc thu được từ quá trình chuyển hóa este của dimethylterephthalate (DMT) và EG. Thế giới đã sản xuất 367 triệu tấn PET vào năm 2020 [1,2]. Tuy nhiên, mức độ tái chế của nhựa PET rất thấp. Dữ liệu từ Hội đồng Hóa học Hoa Kỳ (American Chemistry Council) và Hiệp hội Quốc gia về Tài nguyên Vật liệu PET (National Association for PET Container Resources) năm 2018 cho thấy, chỉ có 29,1 % chai và lọ PET được tái chế, 16,3 % lượng PET sản xuất được thu hồi năng lượng nhờ quá trình đốt, còn lại 27 triệu tấn nhựa phải xử lý bằng cách chôn lấp hoặc trôi dạt ra môi trường nước [3,4]. Do tính trơ về mặt hóa học, chất thải PET gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng, mất khoảng

(400-1.000) năm để PET phân hủy trong môi trường tự nhiên. Mặt khác, chất thải PET tích tụ trong đại dương với tốc độ song song với tốc độ sản xuất, tạo thành mối đe dọa khủng khiếp đến môi trường và các sinh vật biển. Việc tích lũy nhựa liên tục làm dấy lên mối lo ngại đáng kể về tác động của nhựa đối với sức khỏe con người và động vật hoang dã [5-8].

Tái chế nhựa dựa trên 3 phương pháp chính là: nhiệt phân, hóa học và sinh học. Trong đó, phương pháp phân hủy sinh học được xem là giải pháp bền vững để xử lý rác thải nhựa từ PET bằng cách sử dụng enzyme nguồn gốc từ vi sinh vật để xúc tác quá trình thủy phân PET ở nhiệt độ cao [9]. Trên thế giới có rất nhiều nghiên cứu về việc tái chế PET sử dụng phương pháp sinh học đã và đang được chú ý. Năm 2005, cutinase từ *Fusarium solani pisi* đã được sử dụng để li giải các bề mặt sợi tổng hợp như polyester, polyamide và acrylics [10]. Xạ khuẩn *Thermobifida fusca* được phân lập và dùng enzyme hydrolase chiết từ xạ khuẩn này để phân hủy mạch polymer trong PET [11]. Kỹ thuật chuyển gen mã hóa



cutinase từ *Thermobifida cellulosilytica* và *T. fusca* vào chủng *Escherichia coli* BL21-Gold đã được thực hiện thành công [12]. Đáng chú ý, là việc phân lập thành công vi khuẩn *Ideonella sakaiensis* 201-F6 có khả năng tiết PETase để phân hủy PET thành terephthalate (TPA) và ethylene glycol (EG) ở nhiệt độ từ (20-40) °C. So với các enzyme phân giải nhựa trước đây, PETase có độ đặc hiệu và hiệu quả cao khi phân hủy màng PET mà không yêu cầu điều kiện nhiệt độ khắc khe như các loại enzyme khác. Sẽ mất hàng trăm năm để PET thoái hóa tự nhiên, nhưng PETase có khả năng làm thoái hóa PET chỉ trong vài ngày. PETase phân hủy PET thành bis(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET), mono(2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET) và TPA. Trong điều kiện 30 °C với pH = 7,0; enzyme hiệu quả hơn (5,5-120) lần so với các chất tương đồng phân hủy PET [13]. Quá trình thủy phân PET sử dụng protein tái tổ hợp PETase được kì vọng sẽ cung cấp một giải pháp bền vững và hiệu quả cho vấn đề xử lí ô nhiễm rác thải nhựa. Tuy nhiên, hiện nay, tại Việt Nam vẫn chưa có dữ liệu về các nghiên cứu tái chế PET dựa trên lĩnh vực sinh học phân tử. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm biểu hiện và tinh sạch enzyme PETase thông qua kĩ thuật protein tái tổ hợp. Kết quả nghiên cứu sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu sau liên quan đến sản xuất enzyme phân hủy PET và các hướng nghiên cứu liên quan đến protein tái tổ hợp ứng dụng tái chế rác thải nhựa.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

Chủng vi khuẩn, môi trường

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) được lưu trữ tại phòng thí nghiệm Sinh học phân tử tại Viện Kỹ thuật Công nghệ cao Nguyễn Tất Thành (NTT). Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Luria-Bertani (LB) (Peptone: 10 g/L, NaCl: 5 g/L, cao chiết nấm men: 5 g/L).

Plasmid mang gen mã hóa PETase

Vector tái tổ hợp pET21b(+)-Is-PETase-W159H-S238F chứa trình tự mã hóa cho PETase của *I. sakaiensis* 201-F6 (Genbank GAP38373.1) với đột biến W159H và S238F, tối ưu hóa codon biểu hiện ở *E. coli* K12 được cung cấp bởi một kho lưu trữ plasmid phi lợi nhuận Addgene.

*Kháng thể kháng 6*His*

Kháng thể đơn dòng được cung cấp từ Công ty công nghệ sinh học Proteintech, Singapore. Đây là kháng thể nhận diện đặc hiệu đuôi polyhistidine (6*His) nhờ khả

năng gắn trực tiếp với enzyme horseradish peroxidase để phát quang. Vì thế, kháng thể có thể phát hiện vị trí protein mục tiêu trên màng lai ngay sau một lần ủ kháng thể mà không cần đến bước ủ kháng thể thứ cấp.

Thiết bị và dụng cụ

Thiết bị Western Blot - Novex™ Semi-Dry Blotter được cung cấp bởi Công ty Thermo Fisher Scientific, Mỹ. Hệ thống chụp ảnh gel và hoá phát quang - G:BOX Chemi XRQ được cung cấp bởi Công ty Syngene, Anh. Cột sắc kí tinh sạch PETase có thành phần là Ni-NTA Agarose được cung cấp bởi Công ty Qiagen, Đức.

2.2 Phương pháp

Biến nạp vector tái tổ hợp (pET21b(+)-Is-PETase-W159H-S238F) vào E. coli BL21 (DE3)

Tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) sẽ được hoạt hóa ở 37 °C với tốc độ lắc 150 vòng/phút, nuôi cấy qua đêm trong 10 mL LB lỏng. Tiếp theo, 1 mL dịch nuôi cấy qua đêm được chuyển vào bình tam giác chứa 30 mL LB đã được tiệt trùng và làm ấm đến 37 °C trước đó. Dịch vi khuẩn tiếp tục được nuôi lắc ở 37 °C đến khi giá trị OD₆₀₀ đạt 0.4-0.5. Sau đó chia dịch khuẩn vào các Eppendorf (1 mL dịch khuẩn/Eppendorf) và giữ lạnh trong đá trong 10 phút. Thu tế bào vi khuẩn bằng cách li tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 8 phút ở 4 °C. Phần dịch nổi phía trên được loại bỏ, thêm 400 µL CaCl₂ 0,1 M ủ lạnh vào từng Eppendorf. Ủ tế bào trên đá trong 20 phút và tiếp tục li tâm với điều kiện như trên để thu tế bào. Bổ sung 200 µL CaCl₂ 0,1 M trong 15 % Glycerol.

Tiếp theo, 2 µL plasmid tái tổ hợp nồng độ 5 ng/µL sẽ được chuyển vào tube chứa 100 µL tế bào khả nạp *E. coli* BL21 (DE3). Sau đó hỗn hợp được trộn đều nhẹ nhàng không vortex và để yên trên đá trong 30 phút. Hỗn hợp tế bào được đem đi sốc nhiệt ở 42 °C trong 1 phút, sau đó chuyển vào đá lạnh trong 5 phút. Thêm 950 µL LB ở nhiệt độ phòng vào hỗn hợp, ống được đem đi ủ tại 37 °C trong 60 phút với tốc độ lắc 250 vòng/phút, li tâm 6000 vòng/phút thu tế bào. Các tế bào bị sốc nhiệt sẽ được trải trên đĩa thạch LB chứa ampicillin 1X. Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) sử dụng hệ thống biểu hiện T7 RNA polymerase/T7 promoter để phiên mã gen mục tiêu nằm sau vùng T7 promoter trên vector chuyển gen pET [14]. Do đó, khóm khuẩn lạc bất kỳ mọc sau khi ủ qua đêm ở 37 °C được xác minh biến nạp plasmid thành công bằng phương pháp PCR với cặp mồi T7 được thiết kế đặc hiệu cho plasmid. Thông tin về cặp mồi T7 được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1 Trình tự cặp mồi T7

Tên	Đoạn gen mục tiêu	Trình tự mồi (5'-3')	Chiều dài sản phẩm dự kiến
Mồi xuôi	T7 terminator –	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	1053 bp
Mồi ngược	T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	

PCR khuôn lạc kiểm tra sau khi biến nạp

Sử dụng que cấy vô trùng lấy $1/5$ khóm khuẩn lạc đơn từ đĩa LB đã chuẩn bị và thực hiện phản ứng PCR khuôn lạc với cặp mồi đặc hiệu để kiểm tra sự có mặt của plasmid pET21b(+)-Is-PETase-W159H-S238F trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) sau khi biến nạp. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt được trình bày trong Bảng 2. Kiểm tra sản phẩm PCR bằng kỹ thuật điện di trên gel Agarose.

Bảng 2 Thành phần và chu trình nhiệt PCR khuôn lạc

Thành phần	Thể tích (μL)	Chu trình nhiệt PCR colony			
		Các bước thực hiện	Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	Thời gian (giây)	Số chu trình
Dung dịch đệm 5X MyTaq Reaction	10	Biến tính ban đầu	95	30	1
Khuẩn lạc	$1/5$ khóm khuẩn lạc	Biến tính DNA	95	45	35
Mồi (20 μM)	1	Gắn mồi	53	20	
MyTaq HS DNA Polymerase	1	Kéo dài	72	60	
Nước (ddH ₂ O)	vừa đủ 50				

Khảo sát điều kiện biểu hiện PETase

Khóm khuẩn lạc được xác định mang vector pET21b(+)-Is-PETase-W159H-S238F được chuyển vào ống nghiệm chứa 10 mL LB bổ sung ampicillin 1X và nuôi lắc 150 vòng/phút ở 37 $^{\circ}\text{C}$ qua đêm. Tiếp tục chuyển 1 mL dịch nuôi cấy vào các ống nghiệm chứa 10 mL LB + ampicillin 1X và nuôi lắc đến khi OD₆₀₀ = 0,5. Tiến hành bổ sung chất cảm ứng isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) với các giá trị nồng độ cuối khác nhau: (0,01; 0,05; 0,1 và 0,2) mM; cảm ứng ở 2 mốc điều kiện nhiệt độ lần lượt là (25 và 30) $^{\circ}\text{C}$; đồng thời thay đổi các mốc thời gia cảm ứng lần lượt là 1; 2; 3; 4; 4,30 và 5 giờ. Kết quả tối ưu biểu hiện PETase được đánh giá dựa vào độ đậm nhạt của các band protein thu được sau khi lai hóa Western Blot. Độ đậm nhạt của băng protein ở các thí nghiệm lai hóa Western Blot được so sánh bằng phần mềm Image J. Tiếp theo, hỗn hợp dung dịch được đem li tâm 6000 vòng/phút trong 30 phút ở 4 $^{\circ}\text{C}$ để thu tế bào. Các tế bào sẽ được đem trữ đông tại -80 $^{\circ}\text{C}$ trong dung dịch NPI-10 (NPI-10 gồm 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl và 10 mM Imidazole; tỉ lệ tế bào/NPI: 1 g/10 mL).

Nuôi tăng sinh tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang vector pET21b(+)-Is-PETase-W159H-S238F trong bình tam

giác chứa 1 L LB với quy trình tương tự, bổ sung chất cảm ứng IPTG với kết quả nhiệt độ, nồng độ và thời gian tối ưu đã khảo sát.

Tinh sạch PETase

Tế bào *E. coli* được phá vỡ bằng sóng siêu âm với tần số 20 Hz (thiết lập mặc định) và biên độ 20 %, bật 10 giây rồi tắt 10 giây, kích thước đầu tip là 6 mm, trong tổng thời gian (bật) từ (20-30) phút tùy thể tích dung dịch. Hỗn hợp dung dịch sau đó được chuyển sang ống Eppendorf 2 mL và li tâm 17.000 vòng trong 15-30 phút. Loại bỏ phần cặn, dịch nổi sẽ được cho qua cột sắc kí chứa 2 mL Ni-NTA Agarose (Qiagen, Germany) để tinh sạch protein giải phóng từ tế bào. Cân bằng cột sắc kí với dung dịch đệm NPI-10. Tiếp tục bổ sung dịch lysate (dung dịch chứa protein giải phóng từ tế bào), cho dịch chảy qua cột từ từ, thời gian chảy chậm sẽ quyết định tỉ lệ protein bám lại cột (điều chỉnh tốc độ chảy của cột bằng cách gắn đầu kim tiêm vào phần đuôi cột và điều chỉnh sao cho tốc độ dòng chảy là 4-5 giây/giọt). Dịch ra khỏi cột được thu vào ống li tâm nhựa và đánh dấu là phần dịch không bám cột. Rửa cột với 2,5 lần thể tích cột bằng dung dịch đệm NPI-10 để loại bỏ các thành phần không bám dính được trên cột (kí hiệu là W). Ở giai đoạn này, chỉ còn lại protein mục

tiêu gắn đuôi 6* His bám dính lên cột. Thu protein đích bằng 5 lần thể tích cột với dung dịch NPI-250 (dung dịch ra khỏi cột được chứa bằng eppendorf 1,5 mL, mỗi eppendorf chỉ thu 500 µL dung dịch và được đánh dấu lần lượt là E1, E2,... cho đến hết). Cuối cùng, cột được làm sạch bằng 10 lần thể tích cột với dung dịch NPI-500, làm sạch lần nữa với cồn 20% và bảo quản trong cồn 20%.

Kiểm tra protein tinh sạch

Định lượng PETase tinh sạch được thực hiện bằng phương pháp Bradford, kết quả được trình bày là trung bình cộng của ba lần lặp lại và độ lệch chuẩn, phân tích thống kê bằng kiểm định One-way ANOVA (kiểm định được xem là có ý nghĩa thống kê khi P<0.05). Định tính PETase tinh sạch được kiểm tra bằng phương pháp điện di Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel Electrophoresis (SDS-PAGE) và phương pháp lai miễn dịch Western Blot với kháng thể kháng 6*His (Proteintech, Singapore) [15-17].

Ứng với mỗi phân đoạn, việc xác định nồng độ protein bằng 1 phương pháp nào đó (chẳng hạn Bradford) luôn cần lặp lại ít nhất 3 lần trên mỗi phân đoạn đó, như vậy kết quả nồng độ protein của phân đoạn đó có tính lặp lại thì giá trị cung cấp sau cùng là giá trị trung bình của các lần lặp lại đó, từ đó suy ra độ lệch chuẩn.

Đánh giá sơ bộ hoạt tính phân hủy PET của PETase sau tinh sạch

PETase phân hủy PET thành TPA và EG ở nhiệt độ từ (20-40) °C. Các nghiên cứu trước đây cho thấy PETase vẫn hoạt động tốt ở nhiệt độ phòng [9, 13]. Do đó, nhóm nghiên cứu sử dụng nhiệt độ phòng trong toàn bộ thí nghiệm khảo sát hoạt tính PETase để tối giản máy móc sử dụng đồng thời chứng minh tính khả thi khi sử dụng PETase phân hủy PET trong thực tế.

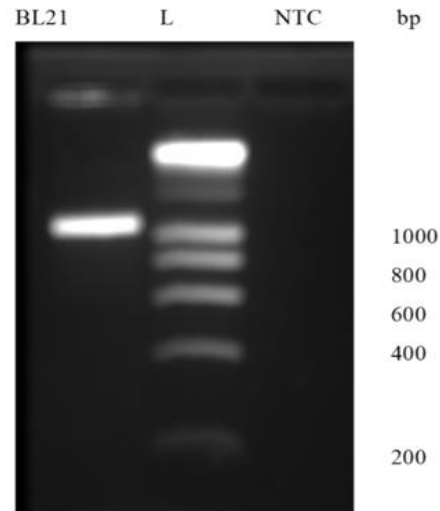
Chuẩn bị các miếng nhựa đường kính 5 mm từ chai nước giải khát PET thương mại (PepsiCo., Việt Nam). Sau đó, ủ các miếng nhựa này lần lượt vào hỗn hợp enzyme và dung dịch đệm khác nhau (DTT, glycerol 10% , hỗn hợp DTT và glycerol 10%) với dãy tăng dần các nồng độ PETase sau tinh sạch ở từng mốc thời gian khác nhau. Hỗn hợp được ủ tại nhiệt độ phòng, và kết quả phân hủy trên bề mặt các miếng nhựa được quan sát dưới kính hiển vi (độ phóng đại 10X) sau các mốc thời gian lần lượt là (24, 48, 72 và 96) giờ; 1 tuần và 1 tháng. Dung dịch đệm có thể được thay sau mỗi lần quan sát miếng nhựa dưới kính hiển vi hoặc sau 7 ngày sử dụng tùy vào mục đích thí nghiệm. Hoạt tính phân

hủy PET của PETase được đánh giá dựa trên mật độ các vết nứt xuất hiện theo thời gian.

3 Kết quả và thảo luận

Biến nạp vector tái tổ hợp

Chủng vi khuẩn *E. Coli* BL21 (DE3) là chủng được sử dụng nhiều nhất để biểu hiện protein nhờ vào khả năng phát triển nhanh trong môi trường nuôi cấy đơn giản, rẻ tiền. Trong BL21 (DE3), sự biểu hiện của gen mã hóa protein đích nằm trên plasmid pET được điều khiển bởi T7 RNA polymerase [18]. Do đó, sau khi biến nạp plasmid pET21b(+)-Is-PETase-W159H-S238F vào tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3), sự hiện diện của plasmid được kiểm tra bằng phương pháp PCR colony với cặp mồi T7. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy sự hiện diện của đoạn trình tự mục tiêu chứa gene PETase với kích thước mong muốn (1053 bp) trong tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) sau biến nạp (Hình 1).



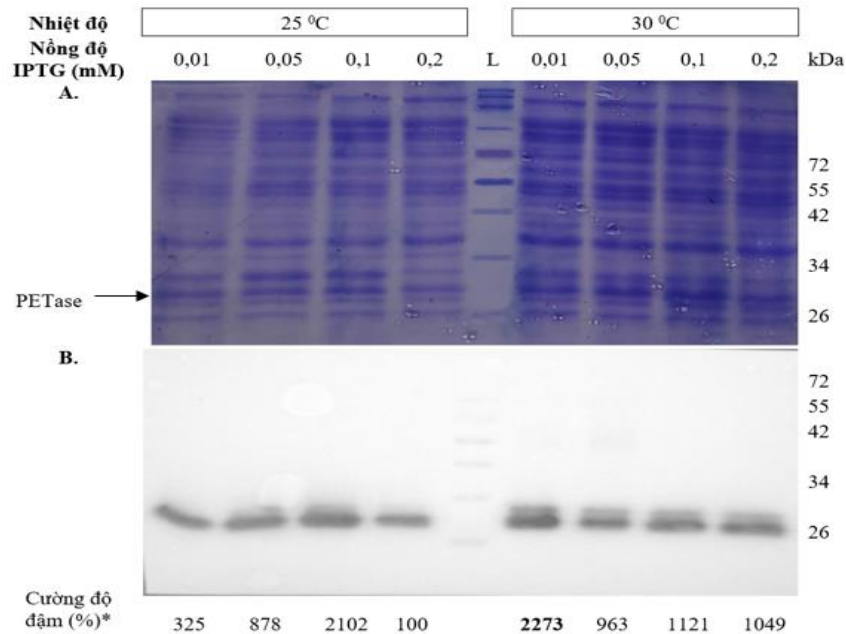
Hình 1 Kết quả điện di sản phẩm PCR colony sau biến nạp với cặp mồi T7. BL21: chủng *E. coli* BL21(DE3) sau biến nạp, L: thang DNA chuẩn 100 bp, NTC: chủng *E. coli* BL21(DE3) không biến nạp plasmid

Điều kiện tối ưu biểu hiện PETase

Mức độ biểu hiện của PETase tại các giá trị nồng độ IPTG và nhiệt độ được đánh giá bằng phương pháp Western Blot. Kết quả Western Blot cho thấy xuất hiện vạch tín hiệu tương ứng với kích thước của protein PETase trên lí thuyết (29 kDa). Xét về điều kiện tối ưu, protein PETase biểu hiện ở 30 °C với nồng độ cảm ứng IPTG tương ứng là 0,01 mM cho vạch đậm nhất, theo sau là vạch protein biểu hiện ở 25 °C với nồng độ IPTG 0,1 mM. Ở các nồng độ và nhiệt độ còn lại, lượng protein PETase tạo ra thấp thể hiện thông qua các vạch

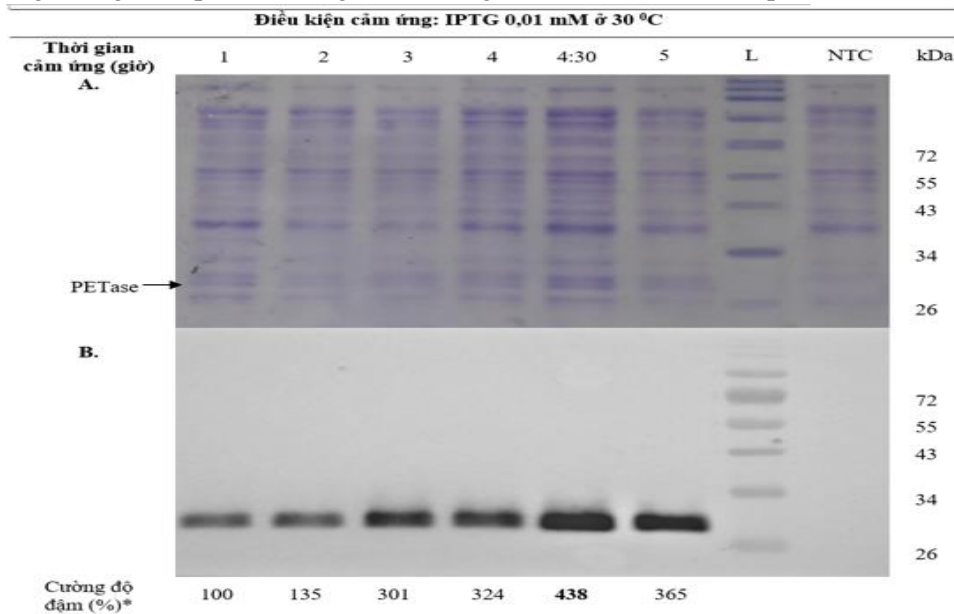
protein mờ hơn trên màng lai (dữ liệu phân tích bằng phần mềm ImageJ). Do đó, nhiệt độ 30 °C và nồng độ

IPTG 0,01 mM là điều kiện tối ưu để biểu hiện PETase (Hình 2).



Hình 2 Khảo sát nhiệt độ và nồng độ cảm ứng IPTG tối ưu biểu hiện PETase của chủng *E. coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp điện di SDS-PAGE (A) và phương pháp lai Western Blot (B). L: thang color prestained protein standard broad range. *Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm ImageJ

Thời gian cảm ứng IPTG tối ưu biểu hiện PETase cũng được đánh giá bằng phương pháp Western Blot. Kết quả Western Blot cho thấy thời gian cảm ứng càng tăng thì lượng protein PETase thu được càng nhiều, tuy nhiên sau mốc 4 giờ 30 phút cảm ứng thì lượng protein PETase thu được giảm xuống. Kết quả phân tích từ phần mềm ImageJ cho thấy, protein PETase được cảm ứng IPTG trong 4 giờ 30 phút cho vạch đậm nhất, theo sau là mốc 5 giờ cảm ứng. Tại các mốc thời gian từ (1-4) giờ cảm ứng IPTG, lượng PETase tạo ra thấp hơn (Hình 3). Như vậy, chúng tôi chọn mốc thời gian 4 giờ 30 phút là thời gian cảm ứng IPTG tối ưu biểu hiện protein PETase.

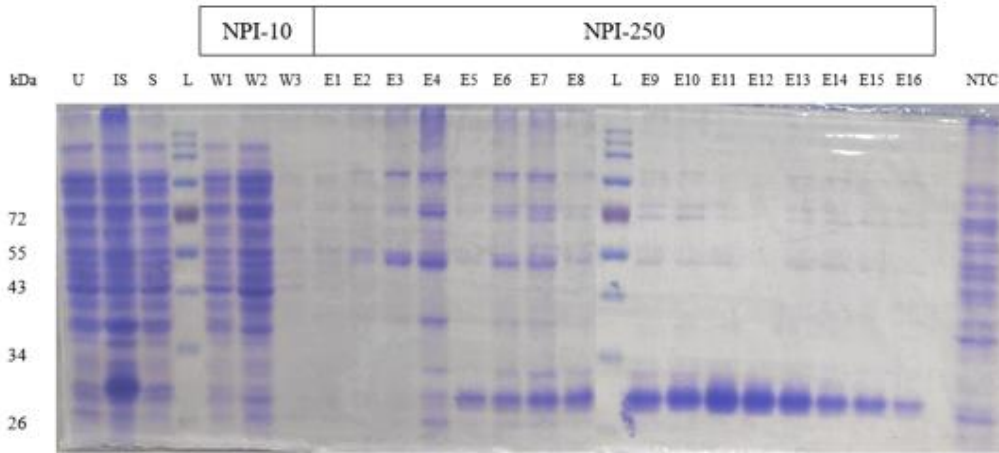


Hình 3 Khảo sát thời gian cảm ứng IPTG tối ưu biểu hiện PETase của chủng *E. coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp điện di SDS-PAGE (A) và phương pháp lai Western blot (B). L: thang color prestained protein standard broad range, NTC: chủng *E. coli* BL21(DE3) không biến nạp plasmid. *Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm ImageJ

Biểu hiện và tinh sạch PETase

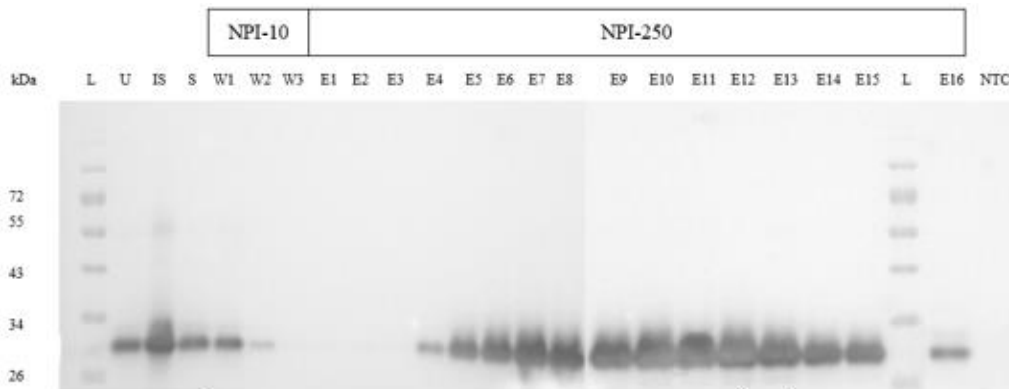
Kết quả điện di SDS-PAGE sau khi tinh sạch PETase sử dụng cột Ni-NTA cho thấy vạch sản phẩm protein tinh sạch (phân đoạn E4-E15) thu được ở điều kiện biểu hiện tối ưu có kích thước là 29 kDa, tương ứng với kích thước trên lý thuyết. Đồng thời, protein tái tổ hợp PETase cũng có trong phần dịch không bám cột, phần không tan và phần dịch nổi sau li tâm của dịch phá tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Ngược lại, vạch sản phẩm này dường như không xuất hiện trong E1, E2, E3 và mẫu

đối chứng âm là chủng *E. coli* BL21 (DE3) không biến nạp plasmid mục tiêu. PETase tinh sạch xuất hiện chủ yếu từ phân đoạn E5-E16, các phân đoạn E1-E8 còn chứa nhiều protein khác, từ phân đoạn E10-E15 protein PETase thu được với nồng độ cao và sạch hơn. Trong tất cả các phân đoạn, nồng độ PETase tinh sạch cao nhất ở phân đoạn E11 và thấp nhất ở phân đoạn E4. Điều này chứng minh protein tái tổ hợp PETase đã được tinh sạch (Hình 4).



Hình 4. Kết quả SDS-PAGE các phân đoạn tinh sạch PETase bằng sắc ký ái lực Ni-NTA. U (Unbound): phần dịch không bám cột, IS (Insoluble): phần không tan, S (Soluble): dịch nổi sau li tâm, L: thang color prestained protein standard broad range, W1-3: phân đoạn rửa cột với NPI-10 (W1: 1 mL dịch đầu, W2: 1 mL dịch tiếp theo, W3: 1 mL dịch cuối cùng); E1-16: phân đoạn rửa giải với NPI-250 (mỗi phân đoạn chỉ thu 500 µL); NTC: chủng *E. coli* BL21(DE3) không biến nạp plasmid.

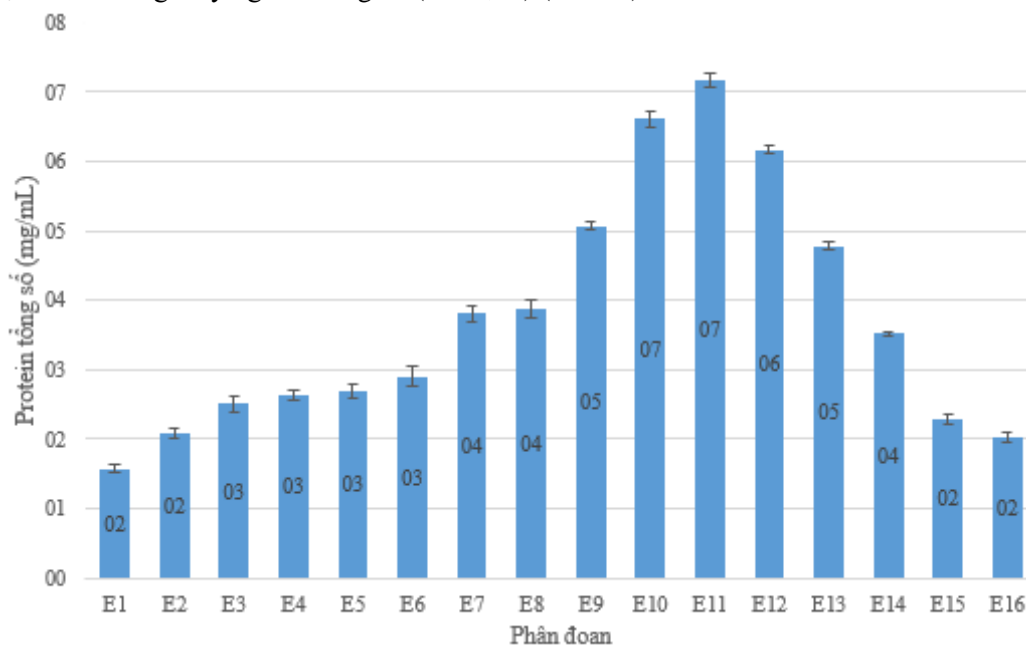
Kết quả Western Blot cho thấy các băng protein kích thước 29 kDa xuất hiện trong phần dịch không bám cột, phần không tan, dịch nổi sau li tâm, W1-2 và E4-E16. Trong các phân đoạn thu protein bằng NPI-250, phân đoạn từ E4-E16 lần lượt hiển thị sự có mặt của protein PETase với E4 là phân đoạn chứa ít nhất và E11 là phân đoạn chứa nhiều nhất PETase mục tiêu. Như vậy, chúng tôi đã tinh sạch thành công protein tái tổ hợp PETase (Hình 5).



Hình 5 Kết quả Western Blot các phân đoạn tinh sạch PETase bằng sắc ký ái lực Ni-NTA

L: thang color prestained protein standard broad range, U (Unbound): phần dịch không bám cột, Is (Insoluble): phần không tan, S (Soluble): dịch nổi sau li tâm, W1-3: phân đoạn rửa cột với NPI-10 (W1: 1 mL dịch đầu, W2: 1 mL dịch tiếp theo, W3: 1 mL dịch cuối cùng); E1-16: phân đoạn thời giải với NPI-250 (mỗi phân đoạn chỉ thu 500 µL), NTC: Chủng *E. coli* BL21(DE3) không biến nạp plasmid.

Protein tổng số trong các phân đoạn tinh sạch được định lượng bằng phương pháp Bradford. Kết quả được trình bày là trung bình cộng của ba lần lặp lại và độ lệch chuẩn. Phân đoạn từ E9 đến E13 thu được dãy nồng độ protein cao (4,8-7,2) mg/mL). Trong tất cả các phân đoạn sau tinh sạch, phân đoạn E11 có nồng độ protein tổng cao nhất (7,2 mg/mL), theo sau là phân đoạn E10 (6,6 mg/mL) và phân đoạn E12 (6,2 mg/mL), phân đoạn có nồng độ protein thấp nhất là phân đoạn E1 (1,6 mg/mL). Tuy nhiên, nồng độ protein tổng số trong mỗi phân đoạn sau tinh sạch khác biệt nhau không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) (Hình 6).



Hình 6 Kết quả định lượng protein tổng số trong mỗi phân đoạn sau tinh sạch bằng phương pháp Bradford. Nồng độ protein tổng số được trình bày trung bình cộng của ba lần đo lặp lại và độ lệch chuẩn.

Đánh giá sơ bộ hoạt tính phân hủy PET của PETase sau tinh sạch

Các nghiên cứu gần đây sử dụng kính hiển vi điện tử để quan sát sự thay đổi của bề mặt miếng nhựa (cắt từ chai nước khoáng thương mại) sau khi được ủ với enzyme PETase ghi nhận sự xuất hiện của các lỗ hổng và vết nứt trên bề mặt miếng nhựa trong khoảng thời gian từ 72 giờ đến 5 tuần theo dõi [19-21]. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu chính nhằm đánh giá sơ bộ hoạt tính phân hủy nhựa PET của enzyme PETase tái tổ hợp, do đó chúng tôi lựa chọn phương pháp quan sát miếng nhựa dưới kính hiển vi sau các mốc thời gian theo dõi nhằm tiết kiệm chi phí nghiên cứu.

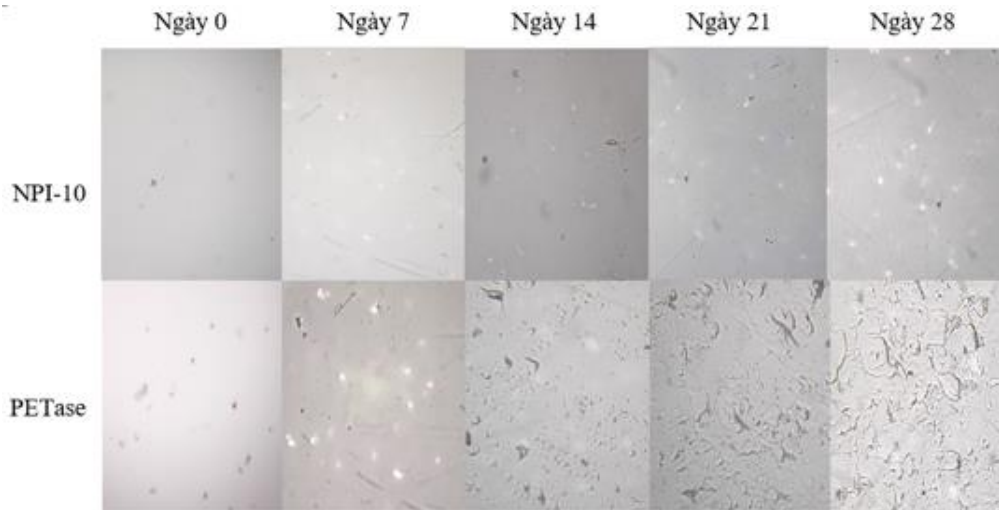
Thông thường, việc biểu hiện ở mức độ cao của nhiều protein tái tổ hợp trong chủng *E. coli* tạo ra các protein thể vùi và năng suất tái tổ hợp tương đối thấp. Thể vùi được hình thành khi có sự mất cân bằng giữa quá trình tổng hợp và hòa tan protein, chúng là dạng protein bị kết cụm lại do các liên kết liên phân tử (chủ yếu là liên kết disulfide và các bề mặt kỵ nước trong chuỗi

polypeptide của phân tử protein). Do bị biến đổi về mặt cấu trúc, thể vùi thường chứa các protein không có hoạt tính sinh học. Để khắc phục điều này, protein bị biến đổi cấu trúc trong thể vùi cần được tái gấp cuộn thông qua việc tái tạo cầu nối disulfide tại các vị trí cần thiết trong phân tử protein [22, 23]. Hiện nay, DTT (Dithiothreitol) được sử dụng rộng rãi để ngăn chặn sự hình thành liên kết disulfide trong protein chứa cysteine. Nhờ vậy, DTT giúp giữ protein chứa cysteine ở trạng thái hoạt động. Mặt khác, nhiều nghiên cứu trước đây đã chứng minh glycerol và các đồng dung môi đa chức khác thay đổi tính chất động học và nhiệt động lực học của protein. Cấu trúc phân tử glycerol gồm 3 gốc -OH và liên kết hydro giữa các phân tử này tạo nên tính nhớt đặc trưng của glycerol. Bổ sung glycerol làm tăng độ nhớt của dung dịch, làm giảm chuyển động giữa các phân tử từ đó tăng cường sự ổn định của protein. Glycerol cũng là chất hoạt động bề mặt giúp tăng tính chất ưa nước của PETase và tăng khả năng tiếp xúc của protein với màng PET [24-27].

Với mong muốn tối ưu hóa hiệu quả của protein tái tổ hợp PETase, dịch PETase sau tinh sạch (nồng độ 4,5 mg/mL) được bổ sung lần lượt glycerol 10 %, DTT 1 mM và hỗn hợp 2 chất này để tiếp tục đánh giá hoạt tính phân hủy PET trong 96 giờ quan sát.

Kết quả khảo sát hoạt tính phân hủy PET của PETase sau 28 ngày ủ miếng nhựa đường kính 5 mm tại nhiệt độ phòng với enzyme PETase đã tinh sạch với nồng độ 4,5 mg/mL (thay enzyme sau mỗi 7 ngày) không ghi

nhận sự thay đổi rõ rệt trên bề mặt miếng nhựa khi quan sát bằng mắt thường. Tuy nhiên, khi quan sát dưới kính hiển vi, sự phân hủy sinh học của PETase trên bề mặt miếng nhựa được thể hiện bằng các vết nứt lớn dần theo thời gian, trái ngược với miếng nhựa được ngâm trong NPI-10 thì không xuất hiện các vết nứt trong cả 28 ngày quan sát. Kết quả này cũng cho thấy PETase nồng độ 4,5 mg/mL đã thể hiện được hoạt tính phân hủy nhựa (Hình 7).

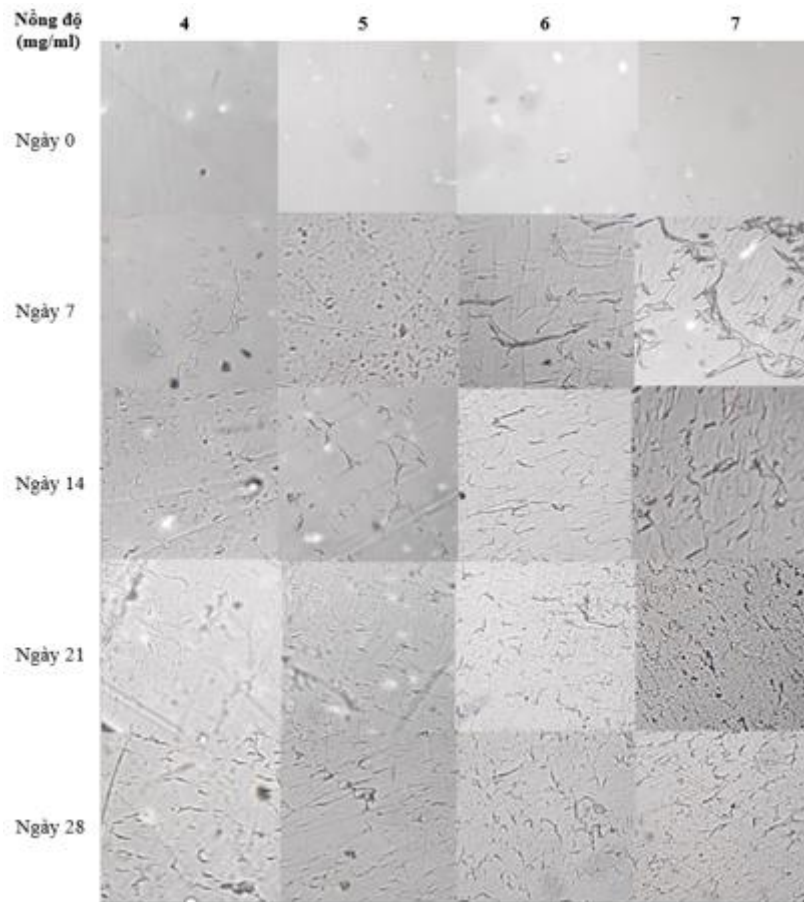


Hình 7 Kết quả theo dõi hoạt tính PETase tinh sạch nồng độ 4,5 mg/mL trong 28 ngày (độ phóng đại 10X)

Kết quả đánh giá sơ bộ hoạt tính phân hủy PET với nồng độ tăng dần PETase trong 28 ngày cho thấy các vết nứt to, rõ và xuất hiện tăng dần tỉ lệ thuận với nồng độ PETase và thời gian tiếp xúc enzyme. Ở tuần đầu tiên (ngày 7), PETase nồng độ 4 mg/mL gây vài vết nứt nhỏ nhưng PETase nồng độ 7 mg/mL tạo ra những vết nứt to và rõ trên bề mặt miếng nhựa khi quan sát dưới kính hiển vi. Ở tuần thứ hai (ngày 14), PETase nồng độ 4 mg/mL tạo ra các vết nứt nhỏ, đồng đều; PETase nồng độ 5-7 mg/mL tạo các vết nứt dài và rõ ràng hơn trên khắp bề mặt miếng nhựa. So với kết quả tuần thứ 3 (ngày 21), các vết nứt tiếp tục to dần và xuất hiện dày đặc hơn trên bề mặt các miếng nhựa được ủ với PETase nồng độ 4-5 mg/mL tại tuần theo dõi thứ 4 (ngày 28). Tuy nhiên, chúng tôi không nhận thấy sự thay đổi rõ rệt trên bề mặt miếng nhựa được ủ với PETase nồng độ (6-

7) mg/mL khi so sánh giữa tuần thứ 3 (ngày 21) và tuần thứ 4 (ngày 28) (Hình 8).

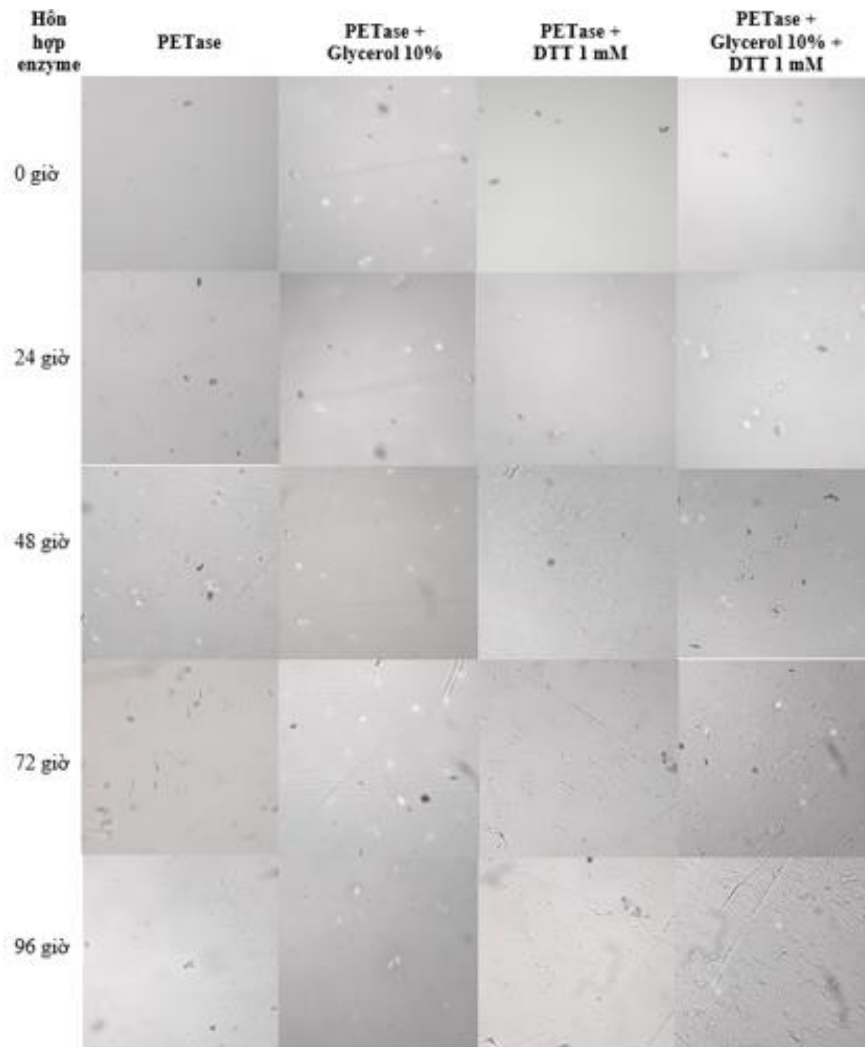
Khi đánh giá hoạt tính phân hủy PET của PETase trong 96 giờ, miếng nhựa được ủ trong PETase đơn thuần bắt đầu xuất hiện các vết nứt li ti trên bề mặt sau 96 giờ quan sát. Miếng nhựa ủ trong hỗn hợp PETase và glycerol 10% lại không xuất hiện các vết nứt khi so sánh với miếng nhựa được ủ trong PETase. Ngược lại, miếng nhựa được ủ với hỗn hợp PETase và DTT 1 mM bắt đầu xuất hiện các vết nứt nhỏ trên bề mặt chỉ sau 72 giờ và các vết nứt này to và nhiều dần lên khi ủ đến mốc thời gian 96 giờ. Miếng nhựa ủ trong hỗn hợp PETase, glycerol 10 % và DTT 1 mM xuất hiện nhiều vết nứt trên bề mặt nhất, các vết nứt nhỏ bắt đầu xuất hiện chỉ sau 48 giờ theo dõi và đến 96 h ủ thì các vết nứt trở nên to và dày đặc trên bề mặt miếng nhựa (Hình 8).



Hình 8 Kết quả theo dõi hoạt tính PETase tinh sạch với nồng độ tăng dần trong 28 ngày (độ phóng đại 10X)

Theo thuyết Kramers, khi tăng độ nhớt dung dịch, lực ma sát của protein giảm; điều này sẽ dẫn đến giảm chuyển động và ức chế xúc tác của các enzyme vận động trong dung dịch. Tính chất nhớt của glycerol giúp tăng cường sự ổn định của protein nhưng cũng vô hình chung làm bất hoạt hoạt động của protein. Do đó, miếng nhựa ủ trong PETase và glycerol 10 % đã không xuất hiện các vết nứt ăn mòn nhựa theo thời gian. Mặt khác, cấu trúc protein tái tổ hợp PETase gồm 2 cầu nối disulfide hình thành từ 4 phân tử cysteine (C176-C212, C242-C262). Việc bổ sung DTT 1 mM vào PETase

giúp ngăn chặn sự tạo thành các liên kết disulfide nội phân tử và các liên phân tử hình thành giữa các gốc cysteine của protein [28]. Nói cách khác, DTT 1 mM giúp tăng cường hoạt động của PETase. Điều này được chứng minh qua hình ảnh các vết nứt hiện diện sau 72 giờ ủ với hỗn hợp DTT 1 mM và PETase. Mức độ tối ưu hóa hoạt động của PETase được thể hiện rõ nhất khi bổ sung đồng thời glycerol 10 % và DTT 1 mM với các vết nứt nhỏ bắt đầu hình thành sau 48 giờ ủ, nhanh hơn rõ rệt khi so sánh với mốc 72 giờ xuất hiện vết nứt của hỗn hợp PETase và DTT 1 mM (Hình 9).



Hình 9 Kết quả theo dõi hoạt tính hỗn hợp enzyme PETase trong 96 giờ (độ phóng đại 10X)

4 Kết luận

Trong nghiên cứu này, enzyme PETase tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trong *E. Coli* thông qua vector tái tổ hợp pET21b(+)-Is-PETase-W159H-S238F. Khảo sát sơ bộ ban đầu đã cho thấy được khả năng phân hủy nhựa PET của enzyme sau khi được tinh sạch. Kết quả cung cấp cơ sở tiền đề cho các nghiên

cứu chuyên sâu tiếp theo để xác định điều kiện phân hủy nhựa PET tối ưu, từ đó hướng đến các nghiên cứu có tính ứng dụng trong việc hỗ trợ xử lý rác thải nhựa.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, mã số đề tài: 2022.01.125/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Crawford, C. B., & Quinn, B. (2016). *Microplastic Pollutants*: Elsevier Limited.
2. Benyathiar, P., Kumar, P., Carpenter, G., Brace, J., & Mishra, D. K. (2022). Polyethylene Terephthalate (PET) Bottle-to-Bottle Recycling for the Beverage Industry: A Review. *Polymers* (Basel), 14(12).
3. Plastics Europe (n.d.). The Facts 2021: An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data. [Plasticseurope.org](https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/). Retrieved April 25, 2023, from <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/>
4. United States Environmental Protection Agency (2023, April 21). Plastics: Material-Specific Data. *EPA*. Retrieved June 1, 2023, from <https://www.epa.gov/facts-and-figures-about-materials-waste-and-recycling/plastics-material-specific-data>
5. Bornscheuer, U. T. (2016). Feeding on plastic. *Science*, 351(6278), pp. 1154-1155.
6. Neufeld, L., Stassen, F., Sheppard, R., & Gilman, T. (2016). The new plastics economy: rethinking the future of plastics. *Paper presented at the World Economic Forum*.
7. Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), pp. 768-771.
8. Thiele, C. J., Hudson, M. D., Russell, A. E., Saluveer, M., & Sidaoui-Haddad, G. (2021). Microplastics in fish and fishmeal: an emerging environmental challenge? *Scientific Reports*, 11(1), pp. 2045. -8
9. Wei, R., & Zimmermann, W. (2017). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? *Microbial Biotechnology*, 10(6), pp. 1308-1322. DOI:10.1111/1751-7915.12710
10. Silva, C. M., Carneiro, F., O'Neill, A., Fonseca, L. P., Cabral, J. S., Guebitz, G., & Cavaco-Paulo, A. (2005). Cutinase-a new tool for biomodification of synthetic fibers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 43(11), pp. 2448-2450.
11. Müller, R. J., Schrader, H., Profe, J., Dresler, K., & Deckwer, W. D. (2005). Enzymatic degradation of poly (ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*. *Macromolecular rapid communications*, 26(17), pp. 1400-1405.
12. Herrero Acero, E., Ribitsch, D., Steinkellner, G., Gruber, K., Greimel, K., Eiteljoerg, I., . . . Zinn, M. (2011). Enzymatic surface hydrolysis of PET: effect of structural diversity on kinetic properties of cutinases from *Thermobifida*. *Macromolecules*, 44(12), pp. 4632-4640.
13. Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., . . . Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196-1199.
14. PET System Manual. No. 11th Edition
15. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold spring harbor laboratory press.
16. Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. *The Protein Protocols Handbook*, 17-24.
17. Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medicine and Science*, 4(9), pp. 429-434.
18. Du, F., Liu, Y.-Q., Xu, Y.-S., Li, Z.-J., Wang, Y.-Z., Zhang, Z.-X., & Sun, X.-M. (2021). Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*, 20(1), pp. 1-10.
19. Moog, D., Schmitt, J., Senger, J., Zarzycki, J., Rexer, K. H., Linne, U., . . . Maier, U. G. (2019). Using a marine microalga as a chassis for polyethylene terephthalate (PET) degradation. *Microbial Cell Factories*, 18(1), pp. 171.
20. Sevilla, M. E., Garcia, M. D., Perez-Castillo, Y., Armijos-Jaramillo, V., Casado, S., Vizuete, K., . . . Cerda-Mejía, L. (2023). Degradation of PET Bottles by an Engineered *Ideonella sakaiensis* PETase. *Polymers* (Basel), 15(7).
21. Kim, J. W., Park, S. B., Tran, Q. G., Cho, D. H., Choi, D. Y., Lee, Y. J., & Kim, H. S. (2020). Functional expression of polyethylene terephthalate-degrading enzyme (PETase) in green microalgae. *Microbial Cell Factories*, 19(1), pp. 97.



22. Palmer, I., & Wingfield, P. T. (2012). Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science*, 70(1), pp. 6.3. 1-6.3. 20.
23. Pérez-Boada, M., Doyle, W., Ruiz-Dueñas, F., Martínez, M., Martínez, A., & Smith, A. (2002). Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli* and optimisation of *in vitro* folding. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), pp. 518-524.
24. Prieve, A., Almagor, A., Yedgar, S., & Gavish, B. (1996). Glycerol decreases the volume and compressibility of protein interior. *Biochemistry*, 35(7), pp. 2061-2066.
25. Gavish, B., & Yedgar, S. (1995). Solvent viscosity effect on protein dynamics: updating the concepts. *Protein-Solvent Interactions*, pp. 343-373.
26. Gavish, B., & Werber, M. (1979). Viscosity-dependent structural fluctuations in enzyme catalysis. *Biochemistry*, 18(7), pp. 1269-1275.
27. Bone, S., & Pethig, R. (1985). Dielectric studies of protein hydration and hydration-induced flexibility. *Journal of Molecular Biology*, 181(2), pp. 323-326.
28. O'Neil, M., Smith, A., Heckelman, P., & Budavari, S. (2001). *éditeurs. Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, & Biologicals*, 13 ième éd. Whitehouse Station (NJ): Merck & Co. In: Inc.

Expression, purification and preliminary evaluation of PET degradation activity of PETase

Trang Minh Pham Nguyen, Diem Hong Tran, Hau Thi Tran, Huong Thi Thu Phung
NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University
pnmtrang@ntt.edu.vn

Abstract The urgent and growing importance of recycling polyethylene terephthalate (PET) plastic waste in modern society cannot be overstated. To address this issue sustainably, biodegradable methods for PET plastic recycling have gained considerable attention. These methods involve utilizing enzymes derived from microorganisms to catalyze PET hydrolysis. In this study, we successfully employed recombinant protein techniques to express and purify PETase enzyme. The optimal conditions for PETase expression were determined to be a 4-hour and 30-minute induction at 30 °C using IPTG concentration of 0.01 mM. Upon purification, the PETase enzyme exhibited efficient degradation of PET film, displaying optimized activity when supplemented with 10 % glycerol and 1 mM DTT. These findings lay the groundwork for future research endeavors pertaining to the production of PET cleavage enzymes and the exploration of recombinant proteins for plastic waste recycling in Vietnam.

Keywords: PETase, recombinant protein, PET, expression, purification.