

THU HỒI VÀ TINH SẠCH PHYTASE TÁI TỔ HỢP CÓ NGUỒN GỐC TỪ *Bacillus subtilis* TRONG DỊCH LÊN MEN *Escherichia coli* THEO MỀ

Trần Thị Thúy và Mai Thị Ngọc

Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Tóm tắt. Phytase là enzyme có ứng dụng quan trọng trong công nghiệp chế biến thức ăn chăn nuôi và chế biến thực phẩm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã cải tiến môi trường lên men LB và thu hồi được enzyme phytase BacP tái tổ hợp bằng phương pháp lên men theo mẻ chủng *E. coli* BL21(DE3) mang gen *phyC* tái tổ hợp. Enzyme BacP tái tổ hợp với hoạt độ 18,49 IU/mL thu được sau 18 giờ kích hoạt bằng lactose, cao hơn so với việc sử dụng chất kích hoạt biểu hiện isopropyl β -D-1-thio-galactopyranoside (IPTG). Bằng phương pháp sắc ký ái lực kết hợp với cột đặc dịch lên men qua màng có kích thước lỗ 5 KDa, enzyme BacP đã được tinh sạch 4,5 lần, đạt hoạt độ riêng 24,48 IU/mg protein. Nghiên cứu này là tiền đề cho việc đánh giá khả năng sử dụng BacP, loại phytase kiềm có khả năng thủy phân phytate thành các dẫn xuất inositol phosphate bậc thấp (IP₂, IP₃) có giá trị dược học, trong chế biến thực phẩm.

Từ khóa: Phytase, enzyme tái tổ hợp, lên men mẻ, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.

1. Mở đầu

Phytase là enzyme xúc tác cho phản ứng thủy phân axit phytic thành myo-inositol phosphate và các gốc phosphate vô cơ tự do. Dạng muối của axit phytic (các phytate) là dạng dự trữ phosphate chính yếu trong các hạt ngũ cốc (chiếm 1-3% hàm lượng chất khô của hạt) [1]. Đây chính là nguyên nhân gây ức chế quá trình tiêu hóa, làm giảm khả năng hấp thụ các chất khoáng và protein ở cơ thể người và động vật [2, 3]. Chính vì vậy, enzyme phytase đã được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi như một enzyme bổ sung vào thức ăn chăn nuôi nhằm tăng hiệu quả kinh tế, giảm ô nhiễm phosphate trong môi trường đất và nước cho các trang trại chăn nuôi quy mô công nghiệp, bán công nghiệp [4].

Căn cứ vào vị trí nhóm phosphate đầu tiên bị phytase tác động, Ủy ban danh pháp enzyme thuộc Hiệp hội Hóa sinh Quốc tế đã chia phytase thành hai nhóm: 3-phytase và 6-phytase [5]. Tuy nhiên, trong thực tế ứng dụng, các đặc tính hóa lý, hóa sinh của enzyme lại được quan tâm nhiều hơn; do vậy, người ta thường phân chia phytase thành phytase axit (Histidine Acid Phosphatase, HAP phytase) và phytase kiềm (Beta Propeller Phytase, BPP phytase) [6]. Các HAP phytase (phytase từ *E. coli* và nấm mốc *Aspergillus* sp.) được nghiên cứu khá nhiều và được ứng dụng rộng rãi trong chăn nuôi; tuy nhiên, các nghiên cứu về BPP phytase (phytase kiềm từ *Bacillus* sp. và từ phần một số loài hoa huệ tây) còn khá hạn chế [7, 8, 9], mặc dù loại phytase này được cho là thủy phân phytate không hoàn toàn, tạo ra nhiều inositol phosphate bậc thấp (IP₂, IP₃) có lợi cho sức khỏe [10].

Ngày nhận bài: 12/3/2019. Ngày sửa bài: 20/3/2019. Ngày nhận đăng: 27/3/2019.

Tác giả liên hệ: Trần Thị Thúy. Địa chỉ e-mail: thuy_tt@hnue.edu.vn

Phytase kiềm của cây hoa huệ tây (*Lilium longiflorum*) đã được tinh sạch bởi Garchow và cs, 2006 [11]. Đầu tiên, dịch enzyme này được kết tủa bằng dung dịch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ với nồng độ bão hòa 25 - 60% thu được enzyme với hoạt tính còn lại là 41,1 - 56,5%. Dịch thu được tiếp tục được tinh sạch theo phương pháp sắc ký trao đổi ion bằng cột HiTrap Q-FF hoặc HiPrep (Amersham Biosciences) và cuối cùng được tinh sạch đến đồng nhất bằng sắc ký lọc gel. Powar và Jagannathan, năm 1982, đã tinh sạch phytase từ dịch nuôi cấy *Bacillus subtilis* [12]. Dịch lọc lần lượt được kết tủa bằng cồn ethanol và acetone, sau đó tiến hành sắc ký lọc gel bằng cột lọc Amberlite IRP-64 và tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion DEAE-cellulose. Năm 1998, hai nhóm nghiên cứu độc lập của Kerovuo J và Kim YO đã chuyển và biểu hiện thành công gen mã hóa phytase kiềm trong *Bacillus subtilis* và tinh sạch được phytase kiềm tái tổ hợp (PhyC và TS-phy) từ dịch lên men bằng sắc ký ái lực [7, 8].

Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện trên phytase kiềm có nguồn gốc từ *Bacillus subtilis* được biểu hiện trong *E. coli* BL21 (DE3), vật chủ được dùng phổ biến và có hiệu suất sinh tổng hợp protein tái tổ hợp cao [13]. Phytase này mặc dù đã được Đỗ Thị Ngọc Huyền và cs (2007) nghiên cứu tinh sạch một phần và xác định đặc tính nhưng chưa đánh giá được vai trò của các chất kích hoạt trong toàn bộ quá trình lên men và thu hồi enzyme tái tổ hợp [14].

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Nguyên vật liệu

Chủng *E. coli* NB tái tổ hợp mang plasmid tái tổ hợp *pE10C2* chứa gen *phyC* mã hóa phytase từ *Bacillus subtilis* được tạo và lưu giữ tại bộ môn Công nghệ Sinh học - Vi sinh, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội (Tran, 2010). Chủng *E. coli* BL21(DE3), dòng thường ký hiệu là BL (Novagen, Mỹ) và dòng biến nạp nhanh (One-shot) ký hiệu là OS (Invitrogen, Mỹ) được dùng để biểu hiện nguồn gen mã hóa phytase từ *Bacillus subtilis*; các dòng này được dùng để lên men, sinh tổng hợp phytase tái tổ hợp (BacP).

Môi trường Luria Betani - LB (Difco), môi trường LBA (môi trường LB có bổ sung ampicillin 100 mg/l). Các hóa chất: Tris-base (Sigma); axit axêtic, axit clohidric, natri hidroxít, ethanol, iso-propanol, glyxerol, canxi clorua, natri clorua, EDTA, IPTG, lactose, glucose, ammonium molybdate trichloroaxetic axit (Merck); natri-phytate (Sigma, P3168) đều tinh sạch ở mức phân tích.

2.1.2. Phương pháp nghiên cứu

* **Xác định hoạt tính enzyme phytase BacP**

Hoạt tính enzyme phytase được xác định theo phương pháp của Shimizu, năm 1992 [15]. Lượng phosphate vô cơ (P_{vc}) giải phóng dưới tác dụng của phytase được xác định bằng dung dịch thử màu, dung dịch có chứa 4 lần thể tích dung dịch A (1,5% ammoniummolybdate $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ pha trong dung dịch 5,5% H_2SO_4) và 1 lần thể tích dung dịch B (2,7% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). So màu trên máy quang phổ tử ngoại khả kiến ở bước sóng 700 nm và định lượng P_{vc} trong dịch enzyme dựa vào đồ thị chuẩn P_{vc} với hàm lượng NaH_2PO_4 từ 0,05 đến 1 mM. Một đơn vị hoạt tính phytase (IU) được quy định là lượng enzyme để giải phóng 1 μmol P_{vc} trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm.

* **Biểu hiện enzyme BacP trong dịch nuôi cấy chủng *E. coli* BL21(DE3) tái tổ hợp**

Chủng *E. coli* BL21(DE3) tái tổ hợp mang gen *phyC* được hoạt hóa bằng cách cấy 1 khuẩn lạc từ đĩa thạch giữ giống ở 4-10°C vào đĩa thạch chứa môi trường LBA và nuôi trong tủ 37°C. Từ một khuẩn lạc trên đĩa môi trường thạch hoạt hóa cấy vào 25ml LBA trong bình nón, thể tích 100ml, nuôi lắc ở 37°C và 200 vòng/phút. Giống vi khuẩn đã hoạt hóa được bổ sung vào 200ml

môi trường LBA lỏng trong bình tam giác 1000 ml sao cho OD₆₂₀ ban đầu đạt 0,1; nuôi lắc ở 37°C và 200 vòng/phút cho đến khi OD₆₂₀ đạt giá trị 1,0 -100 (Giai đoạn tăng sinh khối). Gen mã hóa phytase được kích hoạt biểu hiện bằng cách bổ sung chất cảm ứng - IPTG 1mM hoặc lactose (1-12,5 mM) và CaCl₂ 10mM khi OD₆₂₀ đạt giá trị 1,0 – 100 (tùy thuộc vào chiến lược lên men) và nồng độ P_{vc} < 1mM. Lấy mẫu (3 mL) định kỳ 1 giờ/lần để kiểm tra khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp phytase.

*** Thu hồi enzyme BacP từ dịch nuôi cấy và tế bào**

Dịch nuôi cấy *E. coli* BL21(DE3) tái tổ hợp mang gen *phyC* được ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch nổi (dịch enzyme trong dịch nuôi) và cặn tế bào. Cặn tế bào được hòa trong dung dịch đệm 100mM Tris – HCl pH = 7, 5mM CaCl₂ với thể tích bằng 1/10 thể tích ban đầu, đặt trong nước đá (0°C) và đem phá tế bào bằng sóng siêu âm với âm tần 20kHz, lặp lại 4 vòng (mỗi vòng gồm 1 phút siêu âm từ mức 10 đến 50% công suất và 1 phút nghỉ). Dịch phá tế bào được ly tâm thu dịch nổi (dịch enzyme trong tế bào) và loại bỏ cặn là các mảnh vỡ tế bào.

*** Tinh sạch enzyme BacP**

Enzyme BacP được tinh sạch bằng sắc ký ái lực IMAC (Immobilized metal affinity chromatography). Cột sắc ký ái lực chứa hạt gel mang nhóm chức NTA (nitrilotriacetic acid) gắn với Ni²⁺, protein tái tổ hợp chứa đuôi 6-His tag (đuôi 6 histidine) có khả năng tạo liên kết tĩnh điện với ion kim loại Ni²⁺, giúp protein này được giữ lại trên hạt gel và được chiết rút bằng lực ion khi môi trường có chất cạnh tranh (imidazole) với đuôi 6-His tag ở nồng độ cao.

Quy trình tinh sạch gồm 05 bước: (1) Cân bằng cột bằng dung dịch đệm cân bằng cột (100mM Tris – HCl pH = 7, 300 mM NaCl, 5mM CaCl₂, 1% Glycerol); (2) Gắn protein đích: Mẫu protein enzyme (trong dung dịch 100mM Tris – HCl pH = 7, 5 mM CaCl₂ và dung dịch đệm cân bằng cột được trộn theo tỉ lệ thể tích 1 mẫu protein: 1 dung dịch đệm) được bổ sung vào cột; (3) Rửa cột bằng dung dịch đệm cân bằng cột; (4) Chiết enzyme khỏi cột bằng dung dịch đệm chiết enzyme (100mM Tris – HCl pH = 7, 300 mM NaCl, 5mM CaCl₂, 1% Glycerol, 250mM imidazol); (5) Cân bằng lại cột bằng dung dịch đệm cân bằng cột. Vận tốc dòng chảy trong suốt quá trình tinh sạch là 1 mL/phút.

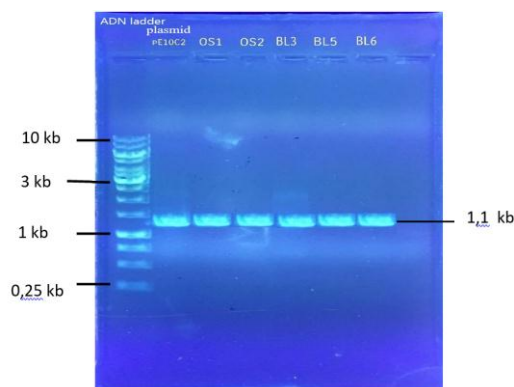
Protein tổng số trong dung dịch được xác định bằng phản ứng màu với coomassie brilliant blue [16]. Kích thước phytase BacP được xác định bằng điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 12,5% (w/v) và vị trí của các băng vạch protein sẽ được hiển thị bằng cách nhuộm bản gel trong dung dịch coomassie brilliant blue [17]. Trọng lượng phân tử protein được xác định bằng protein chuẩn của hãng Lonza.

2.2. Kết quả và thảo luận

2.2.1. Hoạt hóa, đánh giá và lựa chọn chủng *E. coli* BL21(DE3) tái tổ hợp mang gen mã hóa phytase từ *Bacillus subtilis*

Plasmid tái tổ hợp *pE10C2* mang đoạn ADN ngoại lai (*phyC*) mã hóa phytase tiềm (BacP) của *Bacillus subtilis* được bảo quản trong tế bào chủ tách dòng *E. coli* NB của hãng Novagen. Để phục vụ mục đích lên men, biểu hiện gen trong *E. coli*, chúng tôi đã tách chiết, tinh sạch plasmid này từ dịch nuôi cấy *E. coli* NB tái tổ hợp và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21(DE3). Kết quả biến nạp vào hai dòng tế bào chủ *E. coli* BL21(DE3) khả biến BL và OS thu được một số khuẩn lạc to và tách biệt trên môi trường thạch LB có chứa kháng sinh ampicilin 100 µg/mL như một yếu tố chọn lọc. Các khuẩn lạc mọc trên môi trường này đều là các khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp *pE10C2*, tuy nhiên, chúng tôi vẫn thực hiện việc kiểm tra lại sự có mặt của gen *phyC* trong một số dòng tế bào được lựa chọn ngẫu nhiên từ các khuẩn lạc mọc tách biệt trên đĩa thạch môi trường LB có chứa kháng sinh ampicilin 100 µg/mL bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen *phyC*. Kết quả điện di để kiểm tra sự nhân lên của gen *phyC* trong phản

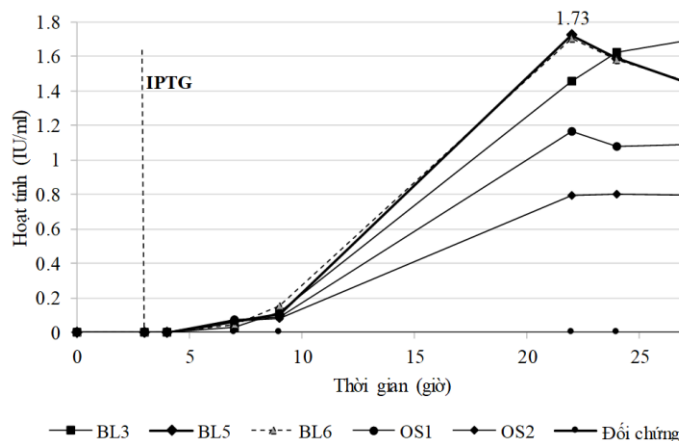
ứng PCR trực tiếp từ dịch phá vỡ tế bào của các dòng *E. coli* kiểm tra đều dương tính (Hình 1). Như vậy, các dòng tế bào này đều mang đoạn ADN đích (gen *phyC*), đoạn ADN có kích thước khoảng 1,1 kb (đúng với kích thước của gen *phyC*).



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR nhân gen *phyC* trực tiếp từ khuẩn lạc

Chú thích: ADN ladder: Thang chuẩn ADN; plasmid pE10C2: đối chứng dương (phản ứng PCR có ADN khuôn là plasmid pE10C2 tách chiết từ *E. coli* NB); BL3, 5 và 6: dòng tế bào biến nạp *E. coli* BL21 (DE3), OS1 và 2: dòng tế bào biến nạp nhanh *E. coli* One shotBL21 (DE3)

Kết quả đánh giá khả năng biểu hiện của các dòng *E. coli* mang gen mã hóa phytase kiểm, *phyC*, được trình bày trong Hình 2. Trên môi trường LBA, sử dụng 1 mM IPTG cùng với 10 mM CaCl_2 làm chất kích hoạt biểu hiện khi OD_{620} đạt giá trị 1, cả 5 dòng *E. coli* kiểm tra đều biểu hiện protein tái tổ hợp có hoạt tính phytase từ 0,03 IU/mL đến 1,73 IU/mL trong dịch nuôi cấy (Hình 2). Mẫu đối chứng được kích hoạt bằng nước và 10mM CaCl_2 không thể hiện hoạt tính. Tuy nhiên, protein tái tổ hợp từ các dòng được biểu hiện sau 6 giờ kích hoạt và đạt cực đại sau 20 giờ kích hoạt; chậm hơn so với nghiên cứu của Tran và cs (2010) là 3 và 10 giờ [13]. Khác biệt này có thể do tốc độ sinh trưởng tại thời điểm kích hoạt của các dòng *E. coli* tái tổ hợp trong nghiên cứu này ($\text{OD}_{620} \approx 1,0$ sau 3 giờ nuôi cấy) thấp hơn rất nhiều so với tốc độ sinh trưởng của quần thể vi sinh vật tại thời điểm kích hoạt nghiên cứu của Tran và cs ($\text{OD}_{620} = 10,8$).



Hình 2. Đánh giá khả năng biểu hiện gen *phyC* của 5 dòng *E. coli* tái tổ hợp

Sau 22 giờ nuôi cấy, dòng BL5 và BL6 cho khả năng tổng hợp phytase cao hơn so với 3 chủng còn lại ($\approx 1,7$ IU/ml), tuy nhiên dòng BL5 sinh trưởng tốt hơn trên môi trường LBA (OD_{620} đạt 4,7) so với dòng BL6 (OD_{620} đạt 4,2). Do đó, chúng tôi lựa chọn dòng BL5 cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Lên men và thu hồi phytase BacP tái tổ hợp

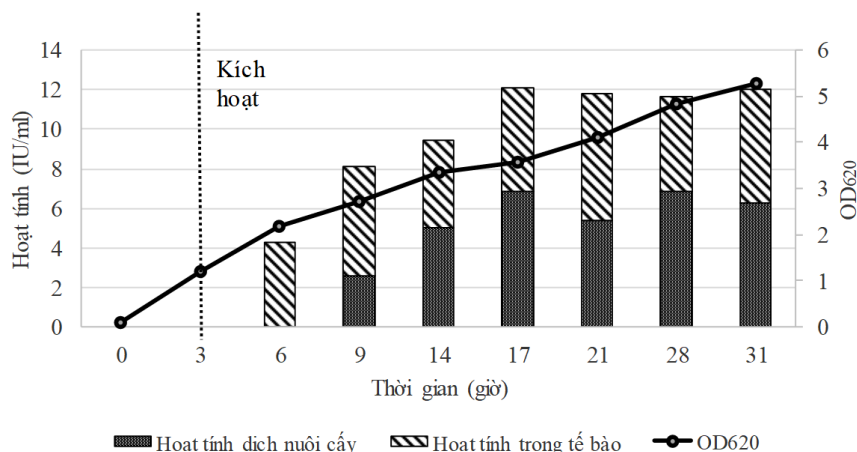
Từ kết quả đánh giá biểu hiện của các dòng biến nạp, chúng tôi nhận thấy chủng sản xuất sinh trưởng tốt trên môi trường LBA. Tuy nhiên, do giá thành của tryptone – thành phần quan trọng trong môi trường LBA tương đối cao nên chúng tôi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo trên môi trường LBA cải tiến sử dụng peptone làm nguồn cung cấp carbon và nitơ.

Chất kích hoạt biểu hiện có vai trò rất quan trọng quyết định đến quá trình sinh tổng hợp phytase, do đó để lựa chọn được chất kích hoạt phù hợp với nồng độ thích hợp là rất cần thiết. Dựa vào kết quả nghiên cứu của Tran (2010), sử dụng IPTG và lactose làm chất kích hoạt đạt kết quả tương đối cao với tổng hoạt tính thu được khi kích hoạt sử dụng IPTG là 10 U/mL và đạt 71 U/mL khi sử dụng lactose, chúng tôi tiến hành lên men tổng hợp phytase trên chủng sản xuất với cả hai chất kích hoạt là IPTG và lactose. Các chất kích hoạt được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ lần lượt: 1mM IPTG và 12,5 mM lactose cùng với 10 mM $CaCl_2$, khi tế bào *E. coli* đang ở trong pha sinh trưởng cấp số.

* Kết quả kích hoạt biểu hiện gen *phyC* bằng IPTG

IPTG là một trong các chất kích hoạt biểu hiện gen rất phổ biến trong các nghiên cứu tổng hợp enzyme tái tổ hợp. IPTG liên kết với lacI và bất hoạt chúng nhưng nó không phải là cơ chất của β -galactosidase nên không bị chuyển hóa thành sản phẩm khác, đồng thời nồng độ của chúng cũng không đổi do không bị chuyển hóa bởi *E. coli* [18].

Sau khi kích hoạt bằng IPTG, chúng tôi thu mẫu tế bào và dịch nuôi cấy để tiến hành xác định hoạt tính phytase tổng số. Dòng *E. coli* BL5 bắt đầu tổng hợp phytase sau 6 giờ nuôi cấy. Hoạt tính phytase tăng dần từ 4,25 IU/mL và đạt cao nhất sau 14 giờ kích hoạt biểu hiện (đạt 12 IU/mL) tại thời điểm OD_{620} đạt 3,36. Sau đó, quá trình tổng hợp phytase tái tổ hợp rơi vào pha cân bằng; sau 21 giờ nuôi cấy, mặc dù OD_{620} vẫn tăng nhẹ đến 28 giờ sau kích hoạt nhưng protein tái tổ hợp không được sinh tổng hợp thêm nữa (Hình 3).



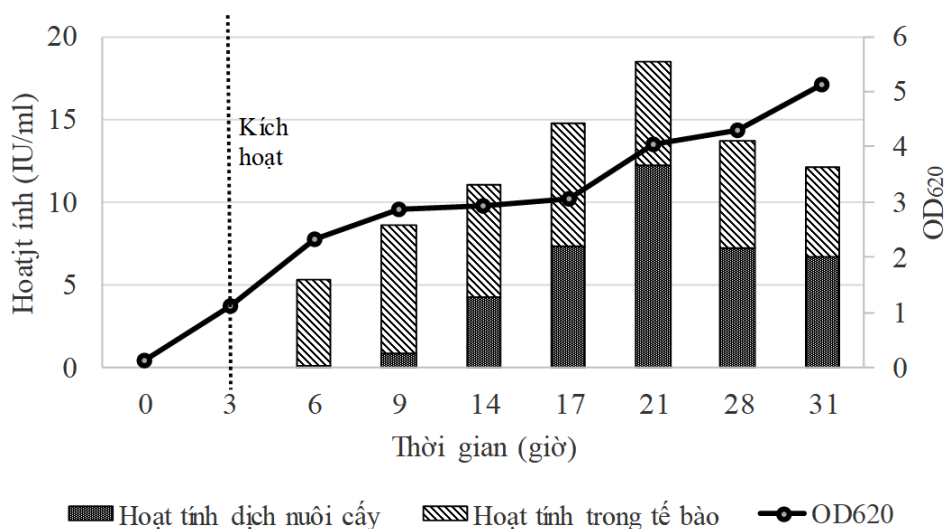
Hình 3. Kết quả kích hoạt biểu hiện gen *phyC* bằng IPTG

Trong 3 giờ đầu sau khi kích hoạt biểu hiện gen, enzyme phytase tái tổ hợp được biểu hiện chủ yếu trong tế bào khoảng 4,25 IU/mL (không đo được hoạt tính phytase bên ngoài dịch nuôi cấy). Sau 6 giờ kích hoạt biểu hiện gen, một lượng phytase tái tổ hợp (20 - 30% tổng hoạt tính phytase

biểu hiện) đã xuất hiện trong dịch nuôi tế bào. Hoạt tính phytase thoát ra bên ngoài tế bào, trong dịch nuôi tăng dần đạt mức 50-60% tổng hoạt độ phytase tái tổ hợp đo được. Việc enzyme tái tổ hợp được biểu hiện trong xoang chu chất của tế bào *E. coli* thoát ra ngoài môi trường nuôi cấy khi có CaCl_2 trong môi trường nuôi cấy đã được báo cáo bởi nhiều tác giả Choi và Lee năm 2004 [19], Pugsley năm 1993 [20]; và được giải thích là do lượng protein tái tổ hợp biểu hiện quá nhiều trong xoang chu chất, quá mức chứa của xoang nên đã thoát ra bên ngoài tế bào khi có tác động của ion Ca^{2+} .

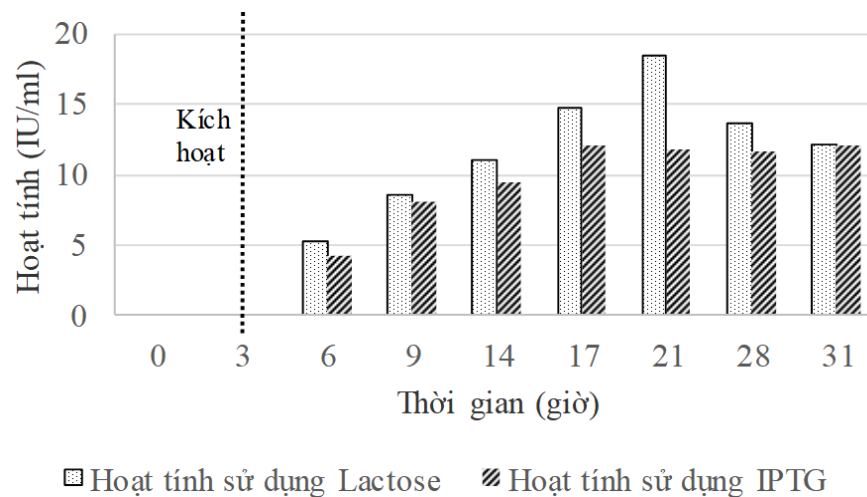
* Kết quả kích hoạt biểu hiện gen *phyC* bằng lactose

Lactose là chất kích hoạt biểu hiện tự nhiên của hệ thống operon *lac*. Do có giá thành rẻ hơn chất kích hoạt tổng hợp hóa học IPTG, lactose được dùng nhiều trong kích hoạt biểu hiện gen tái tổ hợp dưới sự điều khiển của *lac* operator ở quy mô công nghiệp. Tuy nhiên, vấn đề của chất kích hoạt này là tế bào chủ *E. coli* luôn có hệ thống enzyme β – galactosidase thủy phân cơ chất này thành đường glucose và lactose phục vụ cho hoạt động sống của *E. coli*; do vậy, lactose sẽ bị tế bào chủ phân hủy một phần hoặc toàn bộ trong môi trường. Để ngăn ngừa hiện tượng này xảy ra, người ta thường bổ sung lactose với hàm lượng lớn hơn IPTG rất nhiều khi dùng lactose để kích hoạt biểu hiện gen; ngoài ra, người ta cũng sử dụng chiến lược bổ sung thêm lactose trong suốt quá trình kích hoạt biểu hiện gen. Kết quả thu được khi kích hoạt bằng lactose tương tự với quá trình lên men kích hoạt bằng IPTG, hoạt tính phytase tổng số tăng dần từ 3 giờ sau khi kích hoạt, tăng từ 5,32 IU/mL đến 18,49 IU/mL sau 18 giờ kích hoạt (Hình 4) nhưng sau đó lại giảm. Hoạt tính phytase tái tổ hợp trong xoang tế bào cũng bắt đầu thoát ra bên ngoài tế bào, trong dịch nuôi cấy sau 6 giờ kích hoạt biểu hiện và tăng dần đến mức chiếm 70% tổng hoạt tính phytase sau 18 giờ kích hoạt biểu hiện gen. Theo báo cáo của Tran và cs (2010), hoạt tính phytase tái tổ hợp thoát ra bên ngoài tế bào chủ khi kích hoạt bằng lactose có thể lên đến hơn 90% trong môi trường khoáng cơ sở [13].



Hình 4. Kết quả kích hoạt biểu hiện gen *phyC* bằng lactose

So sánh quá trình sinh tổng hợp phytase khi sử dụng hai chất kích hoạt IPTG và lactose, chúng tôi nhận thấy rằng dòng *E. coli* tái tổ hợp BL5 có khả năng sinh tổng hợp phytase cao với cả hai chất kích hoạt biểu hiện IPTG và lactose. Tuy nhiên khi sử dụng lactose làm chất kích hoạt chúng có hoạt tính cao gấp 1,53 lần so với sử dụng IPTG (Hình 5); chất kích hoạt này cũng rẻ tiền và dễ kiểm hơn; do đó, chúng tôi lựa chọn lactose làm chất kích hoạt biểu hiện để thu enzyme với lượng lớn để phục vụ cho quá trình tinh sạch phytase.



Hình 5. So sánh hoạt độ phytase BacP tái tổ hợp khi sử dụng chất kích hoạt biểu hiện IPTG và lactose

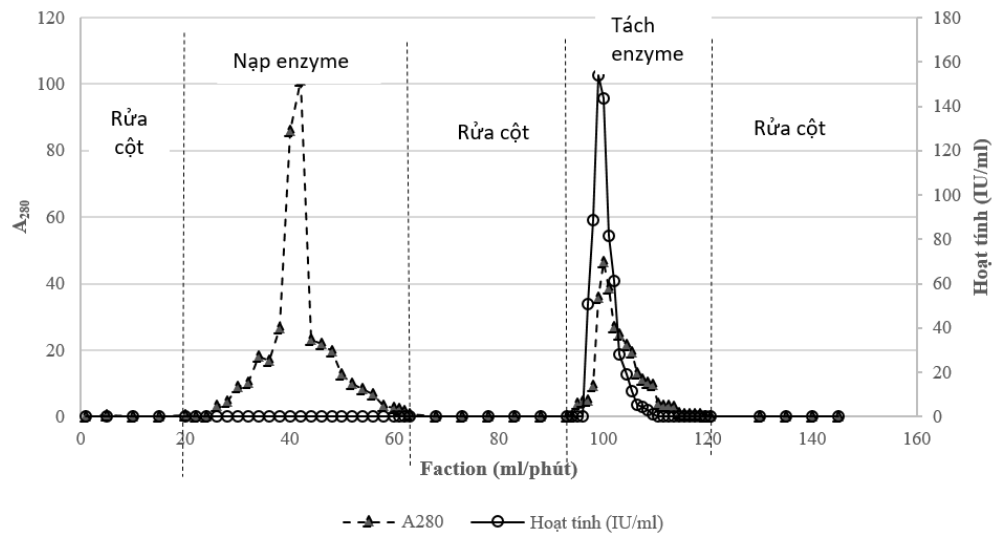
2.2.3. Tinh sạch phytase BacP tái tổ hợp

Sau khi lên men sản xuất phytase BacP tái tổ hợp trên môi trường LBA cải tiến sử dụng chất kích hoạt biểu hiện lactose, chúng tôi tiến hành phá tế bào và tinh sạch phytase theo quy trình đã trình bày ở trên.

Theo các báo cáo của các tác giả khác thì kích thước phân tử của BacP là từ 35-50 kDa [13]. Do vậy, chúng tôi tiến hành li tâm dịch phá tế bào qua cột có màng lọc 5 kilodalton, kết quả từ 300 mL dịch enzyme thô chúng tôi thu được 112 mL dịch li tâm chứa phytase BacP với hoạt độ riêng tăng gấp 1,9 lần và hiệu suất thu hồi đạt 74,12 % (Bảng 1). Phytase BacP tái tổ hợp được tinh sạch từ 112 mL dịch li tâm cô đặc bằng cột sắc kí ái lực cột Ni-NTA 5 mL. Các phân đoạn được thu với thể tích 1 mL/phân đoạn (giai đoạn rửa giải) và 2 mL/phân đoạn (giai đoạn gắn protein), được xác định protein tổng số bằng quang phổ UV với bước sóng 280 nm. Kết quả tinh sạch phytase BacP bằng sắc kí ái lực được trình bày trong Hình 6.

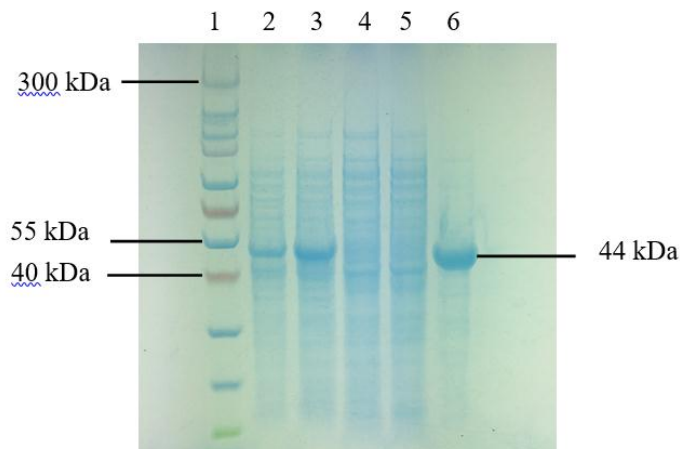
Bảng 1. Kết quả tinh sạch phytase BacP tái tổ hợp

Các bước tinh sạch	Thể tích tổng số (ml)	Hoạt tính (IU/ml)	Hoạt tính tổng số (IU)	Protein tổng số (mg)	Hoạt độ riêng (IU/mg)	Hiệu suất thu hồi (%)	Độ tinh sạch (lần)
Dịch phá tế bào	300	19,24	5772	3,52	5,46	100	1
Dịch lọc qua màng lọc 5 KDa	112	38,20	4278,4	3,69	10,35	74,12	1,9
Dịch chiết qua cột sắc kí ái lực	15	148,87	2233,05	6,08	24,48	38,69	4,5



Hình 6. Sắc kí đồ tinh sạch phytase BacP tái tổ hợp bằng sắc kí ái lực trong cột Ni-NTA

Hoạt tính enzyme phytase của các phân đoạn số 20-60; 61-93; 94-115 và 116-145 được kiểm tra đồng thời. Các phân đoạn 20-60; 61-93 và 116-145 đều không có hoạt tính hoặc có hoạt tính rất thấp. Hoạt tính enzyme phytase tái tổ hợp thu được chủ yếu ở phân đoạn 94-115; đỉnh hoạt tính trùng với đỉnh của protein được rửa giải khỏi cột (Hình 6) trong đó hoạt tính trung bình của enzyme thu được ở phân đoạn 99 - 100 cao nhất đạt 148,87 IU/mL. Đây là các phân đoạn mà imidazole bổ sung vào dung dịch đệm đã thay thế hoàn toàn và đẩy được phytase tái tổ hợp ra khỏi cột. Các phân đoạn tinh sạch bằng sắc kí ái lực được kiểm tra độ tinh sạch trên bản điện di SDS - PAGE (Hình 7).



Hình 7. Kết quả chạy điện di SDS – PAGE

Chú thích: (1) Thang protein chuẩn của Lonza (4,5-300 kDa); (2) Dịch enzyme thô; (3) Dịch enzyme li tâm qua cột 5 kDa; (4) phân đoạn 40; (5) phân đoạn 50; (6) phân đoạn 99 – Enzyme tinh sạch đã được pha loãng 10 lần bằng dung dịch đệm.

Kết quả chạy điện di SDS-PAGE tại vị trí đỉnh protein khi rửa giải enzyme (phân đoạn 99) cho thấy có 1 băng vạch xuất hiện đậm nét nằm giữa vạch 40 và 55 KDa của thang protein chuẩn; các vạch phụ khác có hàm lượng protein rất thấp (không rõ nét). Kết quả này tương ứng với kết quả kiểm tra hoạt tính, chứng tỏ enzyme đã được tinh sạch tốt bằng sắc kí ái lực trong cột Ni-NTA.

Phytase kiềm BacP tái tổ hợp có khối lượng khoảng 44 kDa, phù hợp với các nghiên cứu trước đây về phytase kiềm của [21].

3. Kết luận

Bằng phương pháp lên men chủng *E. coli* BL21(DE3) (mang gen *phyC* tái tổ hợp) theo mẻ trên môi trường LB cải tiến, chúng tôi đã thu hồi được enzyme BacP tái tổ hợp với hoạt độ 18,49 IU/ml sau 18 giờ kích hoạt bằng lactose hoặc 12 IU/ml sau 14 giờ kích hoạt biểu hiện bằng IPTG. Kết quả tinh sạch bằng sắc ký ái lực thu được enzyme BacP được tinh sạch 4,5 lần, enzyme tinh sạch có hoạt độ riêng đạt 24,48 IU/mg protein. Phytase BacP tinh sạch này sẽ tiếp tục được đánh giá về tính an toàn để có thể ứng dụng trong chế biến thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Cheryan M, 1980. *Phytic acid interactions in food systems*. CRC Crit Rev Food Sci Nutr, 13, pp. 297-335.
- [2] Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK, 1989. *Interactions of phytate with proteins and minerals*, In: Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK, editors. Phytate in legumes and cereal, CRC Press, pp. 57-70.
- [3] Harland BF, Morris ERM, 1995. *Phytate: A good or a bad food component?* Nutrition Research, 15(5), pp. 733-754.
- [4] Tran Thi Thuy and Dao Thi Nu, 2017. *Synergic effect of different phytase preparations in feed*. HNUe Journal of Science, Chemical and Biological Sciences, Vol. 62. Iss.10, pp. 143-152.
- [5] Greiner R, Konietzny U, Jany KD, 1993. *Purification and characterization of two phytases from Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys 303, pp. 107-113.
- [6] Oh BC, Chang BS, Park KH, Ha NC, Kim HK, 2001. *Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from Bacillus amyloliquefaciens DS11*. Biochem (40), pp. 9669-9676.
- [7] Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J, 1998. *Isolation, characterization, molecular gene cloning of a novel phytase from Bacillus subtilis*. Appl. Environ Microbiol 64(6), pp. 2079-2085.
- [8] Kim YO, Kim HK, Bae KS, Yu JH, Oh TK, 1998. *Purification and properties of a thermostable phytase from Bacillus sp. DS 11*, Enzyme Microbiol Technol 22, pp. 2-7.
- [9] Tye AJ, Siu F, Leung T, Lim B, 2001. *Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from B. subtilis 168 and B. Licheniformis*. Appl. Microbiol Biotechnol 59, pp. 190-197.
- [10] Oh BC, Choi WC, Park S, Kim YO, Oh TK, 2004. *Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytase*. Appl. Micro Biotech 63, pp. 362- 372.
- [11] Garchow BG, Jog SP, Mehta BD, Monosso JM, Murthy PP, 2006. *Alkaline phytase from Lilium longiflorum: purification and structural characterization*. Protein Expression and Purification, 46(2), pp. 221-232.
- [12] Powar VK and Jagannathan V, 1982. *Purification and properties of phytate-specific phosphatase from bacillus subtilis*. J. Bacteriol, 151(3), pp. 1102-1108.
- [13] Tran TT, Mamo G, Mattiasson B, Hatti-Kaul R, 2010. *A thermostable phytase from Bacillus sp. MD2: cloning, expression and high-level production in Escherichia coli*. J. Industrial Microbiol Biotechnol, 37(3), pp. 279-287.

- [14] Đỗ Thị Ngọc Huyền và cs, 2007. *Tinh sạch và xác định tính chất của phytase tái tổ hợp*. Tạp chí Công nghệ Sinh học, 5(3), tr. 331-336.
- [15] Shimizu M, 1992. *Purification and characterization of phytase from Bacillus subtilis (natto) N-77*. Biosci Biotechnol Biochem, 56(8), pp. 1266-1269.
- [16] Bradford M, 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding*. Anal Biochem, 72, pp. 248-254.
- [17] Laemmli UK, 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature 227(5259), pp. 680-685.
- [18] https://www.biologicscorp.com/blog/iptg-induction-protein-expression/#.W_HMsegzbIU (16/2/2018).
- [19] Choi JH, Lee SY, 2004. *Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol 64, pp. 625-635.
- [20] Pugsley AP, 1993. *The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria*. Microbiol Rev 57, pp. 50-108.
- [21] Lehmann M, Kostrewa D, Wyss M, Brugger R, D'Arcy A, Pasamontes L., 2000. *From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase*. Protein Eng, 13, pp. 49-57.

ABSTRACT

EXPRESSION AND PURIFICATION OF A RECOMBINANT PHYTASE ORIGINATED FROM *Bacillus subtilis* IN BATCH CULTIVATION OF *Escherichia coli*

Tran Thi Thuy and Mai Thi Ngoc

Faculty of Biology, Hanoi National University of Education

Phytase is an important enzyme in feed and food processing. In this study, common medium (LB broth) have been modified for batch cultivation of *E. coli* BL21(DE3) to express *phyC* gene coding for a recombinant phytase (BacP) originated from *Bacillus subtilis*. Recombinant BacP enzyme was recovered at 18.49 IU/ml after 18 hours of induction by lactose, which was higher than that of induction by isopropyl β -D-1-thio-galactopyranoside (IPTG). Cultivation both was concentrated by filtration through a 5 KDa cutoff membrane and BacP enzyme was purified 4.5 times by affinity chromatography through Ni-NTA column to reach a specific activity of 24,48 IU/mg protein. These shall be a preliminary results for further study on application of phytase enzyme BacP which can catalyse the hydrolysis of phytate to lower *myo*-inositol phosphate (IP₂ and IP₃) having potential health benefit in food.

Keywords: Phytase, recombinant enzyme, batch cultivation, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.