

TẠO CHỦNG *ESCHERICHIA COLI* TÁI TỔ HỢP CÓ KHẢ NĂNG LÊN MEN CỒN TỪ ĐƯỜNG C5 VÀ C6

Trương Quốc Phong, Nguyễn Lan Hương, Tô Kim Anh, Vũ Thị Thu Hà

Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội

TÓM TẮT

Việc sản xuất cồn nhiên liệu đi từ lignocellulose (phế phụ phẩm nông nghiệp) hy vọng sẽ làm hạ giá thành sản phẩm và không ảnh hưởng đến an ninh lương thực. Tuy nhiên, trong tự nhiên không có chủng vi sinh vật nào có khả năng lên men cồn hiệu quả từ hỗn hợp các loại đường được tạo ra do thủy phân lignocellulose. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành tách dòng và giải trình tự hai gen mã hóa hai enzyme quan trọng của con đường lên men ethanol là pyruvate decarboxylase (PDC) và alcohol dehydrogenase (ADH) từ *Zymomonas mobilis*. Hai gen *pdh* và *adhB* có kích thước tương ứng là 1,7 và 1,15 kb. Hai gen *pdh* và *adhB* được tách dòng đã được gắn vào vector biểu hiện pTAC-MAT và đưa vào chủng chủ *Escherichia coli* ATCC 11303 để tạo ra chủng vi khuẩn tái tổ hợp có khả năng sử dụng được các loại đường C5 và C6 cho lên men ethanol. Khả năng lên men ethanol của chủng *E. coli* C13 tái tổ hợp đã được đánh giá sơ bộ trên môi trường lên men có bổ sung 12% glucose và ethanol sinh ra đã được xác định bằng phương pháp sắc ký khí và phương pháp đo phản ứng màu. Lượng ethanol sinh ra tăng mạnh nhất ở thời điểm từ 24 đến 48 h và mức độ tăng giảm đi sau 48 và 72 h lên men. Các kết quả thu được cho thấy chủng *E. coli* đã được cải biến di truyền bằng việc đưa vào hai gen *pdh* và *adhB* nguồn gốc *Z. mobilis* để tạo ra chủng tái tổ hợp có khả năng lên men ethanol.

Từ khóa: alcohol dehydrogenase II (ADH), đường C5 và C6, pyruvate decarboxylase (PDC), *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*

GIỚI THIỆU

Hầu hết cồn nhiên liệu hiện nay được sản xuất từ nguồn đường hexose (đường C6) có nguồn gốc từ tinh bột ngũ cốc hoặc rỉ đường mía sử dụng chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* hoặc vi khuẩn *Zymomonas mobilis* (Sanchez *et al.*, 2010). Tuy nhiên, đây là nguồn nguyên liệu tương đối đắt nên việc sử dụng nguồn nguyên liệu này sẽ làm tăng giá thành sản phẩm, hơn nữa có khả năng ảnh hưởng đến an ninh lương thực (Dien *et al.*, 2003). Tinh bột và đường chỉ chiếm một tỷ lệ nhỏ trong tổng số carbohydrate của thực vật, trong khi đó phần lớn sinh khối thực vật là cellulose và hemicellulose. Thủy phân các polymer này sẽ tạo ra một hỗn hợp các đường bao gồm glucose, xylose, mannose, galactose và arabinose (Zaldivar *et al.*, 2001). Dù đi từ nguồn nguyên liệu ban đầu nào, thì vi sinh vật vẫn đóng vai trò chủ chốt trong quá trình lên men sản xuất ethanol. Tuy nhiên, cho đến nay chưa tìm được bất cứ chủng vi sinh vật nào trong tự nhiên có khả năng lên men nhanh và hiệu quả hỗn hợp đường này thành ethanol hoặc các sản phẩm khác có giá trị (Lau *et al.*, 2010). Do đó, việc tạo ra chủng vi sinh vật bằng công nghệ tái tổ hợp có khả năng sử dụng được

hỗn hợp các loại đường để lên men cồn là một hướng đi rất có ý nghĩa và thực tiễn. Như chúng ta đã biết, *Escherichia coli* là chủng vi sinh vật có khả năng sử dụng được hầu như tất cả các loại đường là thành phần chính của sinh khối thực vật, tuy nhiên chủng lại không chuyển hóa được thành ethanol do thiếu hụt hai enzyme quan trọng đó là pyruvate decarboxylase (PDC) và alcohol dehydrogenase (ADH) (Zhang *et al.*, 2007). Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành đưa hai gen *pdh* và *adh* nguồn gốc *Z. mobilis* vào chủng *E. coli* nhằm tạo ra chủng tái tổ hợp có khả năng lên men ethanol từ đường C5 và C6.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Các chủng *E. coli* ATCC 11303 and *Zymomonas mobilis* ATCC 31821 nhận được từ ngân hàng chủng giống của Mỹ. Các chủng nghiên cứu được nuôi cấy trên môi trường Luria Bertani broth (LB) lỏng hoặc trên đĩa Petri thạch chứa 1% tryptone, 0,5% cao nấm men, 1% NaCl.

Hai cặp mồi đặc hiệu gen mã hóa enzyme PDC và

ADH II với trình tự các cặp môi tương ứng như sau:

Cặp môi PDC gồm môi xuôi (PDCf) 5'-ATAGAATTCATGAGTTATACTGTCGG -3'; môi ngược (PDCr) 5'-TTTAGATCTCTAGAGGAGCTTGTTAA C -3';

Cặp môi ADH gồm môi xuôi (ADHf) 5'-ATAGAATTCATGGCTTCTTCAACTT -3', môi ngược (ADHr) 5'-TTTAGATCTTTAGAAAGCGCTCAG -3'.

Vector biểu hiện pTAC-MAT của Sigma-Aldrich (Mỹ). Các enzyme giới hạn được cung cấp bởi hãng New England Biolabs. Các hóa chất khác dùng cho nghiên cứu này được cung cấp bởi các hãng như Sigma-Aldrich, Merck, Invitrogen, Fermentas.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết DNA, phương pháp PCR, phương pháp cắt DNA bằng enzyme giới hạn, phương pháp lai ghép gen, phương pháp tinh sạch DNA, phương pháp biến nạp bằng sốc nhiệt, phương pháp tách chiết plasmid được mô tả bởi Sambrook và Russell (2001).

Phương pháp cắt DNA bằng enzyme giới hạn: Sản phẩm PCR và vector được cắt bằng enzyme giới hạn *EcoRI* và *BglII* ở 37°C qua đêm sau đó tinh sạch bằng kit của Invitrogen.

Phương pháp nối ghép gen: Sản phẩm PCR và vector sau khi được xử lý bằng enzyme giới hạn được nối ghép với nhau nhờ sự xúc tác của T4 DNA ligase (Fermentas) ở 22°C qua đêm.

Phương pháp biến nạp: Sản phẩm nối ghép được sử dụng để biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* DH10b khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 2 phút. Tế bào vi khuẩn sau khi biến nạp được cấy trải trên môi trường LB chọn lọc chứa ampicillin (100 µg/ml).

Phương pháp lên men: Sử dụng môi trường lên men LB được bổ sung đệm kali phosphate pH 7,0 nồng độ 0,2 M; kháng sinh ampicillin 100 µg/ml; đường glucose 12%. Quá trình lên men được tiến hành như sau: cấy khuẩn lạc vào môi trường LB và nuôi lắc qua đêm; sử dụng môi trường lên men để đưa mật độ dịch nuôi về OD₅₅₀ = 1,0 và bắt đầu quá trình lên men ở 30°C trên máy lắc tốc độ 200 vòng/phút. Tiến hành thu dịch nuôi sau mỗi 24 h để xác định hàm lượng ethanol được tạo ra trong quá trình lên men.

Phương pháp xác định nồng độ ethanol: Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp phản

ứng màu giữa dicromate và ethanol để xác định nồng độ ethanol trong dịch lên men (Seo *et al.*, 2009). Phương pháp có thể tóm tắt như sau: dịch lên men được đảo trộn với dung dịch di-*n*-butyl phthalate (DBP) theo tỷ lệ 1:1 trong 1 h, để yên cho đến khi tách pha hoàn toàn, hút pha dưới sang ống mới và bổ sung một thể tích tương đương thuốc thử dichromate. Sau khi đảo trộn 30 phút, hỗn hợp được để yên cho đến khi tách pha hoàn toàn, hút pha dưới và xác định mật độ quang ở bước sóng 595 nm.

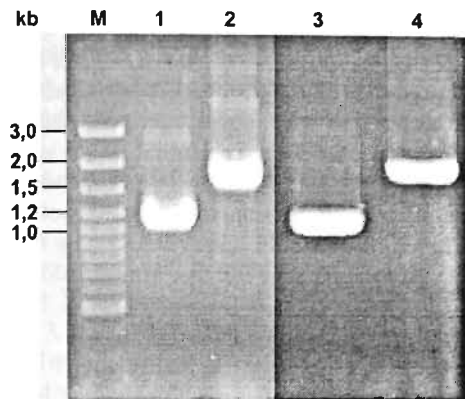
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách dòng gen mã hóa pyruvate decarboxylase (PDC) và alcohol dehydrogenase II (ADH II)

Gen *pdv* và *adhB* mã hóa cho enzyme PDC và ADHII tương ứng được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp môi PDC và ADH tương ứng. Kết quả của phản ứng PCR được thể hiện trên hình 1. Kết quả trên hình 1 cho thấy trên mỗi đường chạy xuất hiện một băng DNA rất đậm với kích thước tương ứng là khoảng 1,15 kb và 1,7 kb (đường chạy số 1 và 2). Kích thước này hoàn toàn phù hợp với kích thước của đoạn gen mã hóa enzyme ADH và PDC tương ứng theo như thiết kế. Kết quả này chỉ ra rằng hai đoạn gen mã hóa cho enzyme pyruvate decarboxylase và alcohol dehydrogenase II đã được khuếch đại thành công bằng kỹ thuật PCR. Để có thể sử dụng sản phẩm PCR cho phản ứng lai ghép vào vector, chúng tôi đã tiến hành xử lý sản phẩm PCR bằng enzyme giới hạn là *EcoRI* và *BglII* (NEB) và tinh sạch sản phẩm bằng bộ kit tinh sạch của Invitrogen. Hình ảnh điện di thu được cho thấy băng DNA quan tâm rất đậm chứng tỏ rằng sản phẩm thu được sau tinh sạch có hàm lượng rất cao và đảm bảo chất lượng cho phản ứng lai ghép gen.

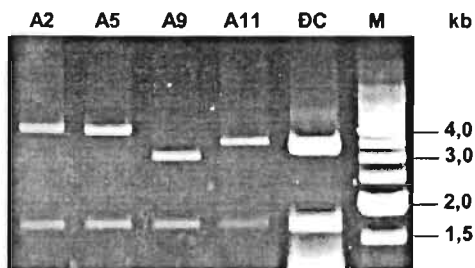
Sản phẩm PCR và vector sau khi được chuẩn bị (được mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu) đã được nối ghép với nhau nhờ sự xúc tác của T4 DNA ligase. Sản phẩm nối ghép được sử dụng để biến nạp vào tế bào *E. coli* DH10 khả biến. Tổng số 19 khuẩn lạc đối với gen *adhB* và 10 khuẩn lạc đối với gen *pdv* được thu nhận. Các khuẩn lạc mọc được trên môi trường có chứa kháng sinh điều đó chứng tỏ rằng các vi khuẩn đã mang plasmid. Tuy nhiên để xác định khuẩn lạc nào có chứa plasmid tái tổ hợp mang gen quan tâm chúng tôi đã tiến hành tách chiết DNA plasmid của tất cả các dòng thu được. Theo lý thuyết thì những DNA plasmid nào chứa gen ngoại lai thì băng DNA chạy chậm hơn so với băng DNA đối chứng (DNA plasmid không mang gen). Kết quả cho thấy các dòng số 2, 5, 9 và 11 (ký

hiệu là A2, A5, A9 và A11) các băng DNA plasmid chạy chậm hơn so với đối chứng nên có thể đã mang thêm một đoạn DNA.



Hình 1. Sản phẩm PCR của gen *adh* và *pdc*. M: thang DNA chuẩn 100 bp (Fermentas); 1, 3: sản phẩm PCR của gen *adh* trước và sau khi tinh sạch; 2, 4: sản phẩm PCR của gen *pdc* trước và sau khi tinh sạch.

Để khẳng định các đoạn DNA chèn vào là các gen quan tâm, DNA plasmid từ các dòng 2, 5, 9 và 11 được cắt bằng enzyme giới hạn *Pst*I. Theo tính toán nếu là dòng tái tổ hợp sẽ tạo thành hai băng DNA có kích thước 1,7 kb và 4,6 kb.

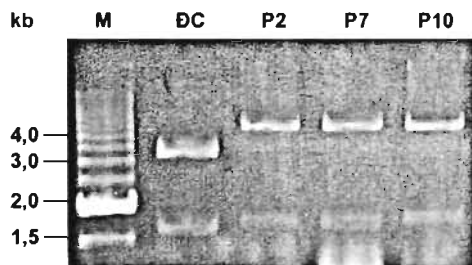


Hình 2. Sản phẩm cắt kiểm tra DNA plasmid mang đoạn gen mã hóa bằng enzyme giới hạn *Pst*I. A2, A5, A9, A11: DNA plasmid từ các dòng A2, A5, A9; DC: đối chứng (pTAC-MAT/*Pst*I); M: thang DNA chuẩn 500 bp (Invitrogen).

Từ kết quả hình 2 cho thấy hai dòng A2 và A5 có các băng DNA với kích thước như dự đoán. Do vậy, các dòng A2 và A5 là các dòng tái tổ hợp mang gen mã hóa alcohol dehydrogenase II. Để khẳng định chắc chắn hơn nữa chúng tôi đã tiến hành giải trình tự đoạn gen quan tâm từ dòng tái tổ hợp. Sau khi blast trình tự thu được lên ngân hàng gen (NCBI) kết quả cho thấy đoạn gen thu được có độ tương đồng là

100% so với gen *adhB* của chủng *Z. mobilis* (mã số: AB359062.1).

Tương tự, các dòng tái tổ hợp đối với gen pyruvate decarboxylase cũng đã được tiến hành sàng lọc. Kết quả điện di plasmid của 10 dòng khác nhau đối với gen *pdc* cho thấy các dòng số 2, 7, 10 được ký hiệu là P2, P7, P10 có băng DNA chạy chậm hơn so với đối chứng (pTAC-MAT), do đó có thể các dòng này đã mang gen *pdc*. Các dòng khả nghi sau đó đã được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *Pst*I. Theo lý thuyết nếu là dòng tái tổ hợp thì sẽ thu được hai băng DNA với kích thước 1,7 kb và 5,1 kb.



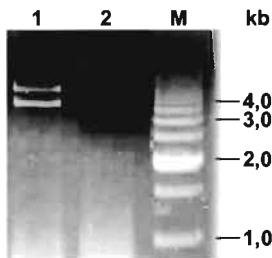
Hình 3. Điện di sản phẩm cắt kiểm tra DNA plasmid mang đoạn gen bằng enzyme giới hạn *Pst*I. P2, P7, P10 là plasmid từ các dòng P2, P7, P10; DC: đối chứng (pTAC-MAT/*Pst*I); M: thang DNA chuẩn 500 bp (Invitrogen).

Kết quả điện di trên hình 3 cho thấy cả 3 dòng P2, P7 và P10 đều có các băng DNA với kích thước như dự kiến. Kết quả này chỉ ra rằng các dòng P2, P7 và P10 này là các dòng tái tổ hợp mang gen mã hóa pyruvate decarboxylase. Để khẳng định chắc chắn hơn nữa chúng tôi đã tiến hành giải trình tự đoạn gen quan tâm từ dòng tái tổ hợp. Sau khi blast trình tự thu được lên ngân hàng gen (NCBI) kết quả cho thấy đoạn gen thu được có độ tương đồng là 100% so với gen *pdc* của chủng *Z. mobilis* (mã số: M15393.2).

Tạo vector biểu hiện mang gen mã hóa pyruvate decarboxylase và alcohol dehydrogenase II

Để có thể biểu hiện được đồng thời hai gen *pdc* và *adh* trong tế bào chủ *E. coli*, hệ vector biểu hiện mang đồng thời hai gen quan tâm đã được thiết kế. Quá trình tạo vector biểu hiện mang hai gen *pdc* và *adh* như sau: hệ vector biểu hiện được sử dụng là pTAC-MAT, với promoter là *tac*. Mảnh DNA chứa gen mã hóa cho enzyme alcohol dehydrogenase II thu được từ vector tái tổ hợp sau khi xử lý bằng enzyme *Bam*HI và *Bgl*II sẽ được nối ghép vào vector tái tổ hợp chứa gen *pdc* đã được mở vòng với sự xúc tác của enzyme T4 DNA ligase. Sản phẩm nối ghép

được biến nạp vào *E. coli* Dh10b và kết quả nhận được là 13 khuẩn lạc khác nhau. Kết quả điện di DNA plasmid tách từ các dòng thu được cho thấy rằng tất cả DNA plasmid đều chạy chậm hơn so với DNA plasmid đối chứng (pTAC-MAT). Tuy nhiên, hai dòng số 11 và 13 có kích thước lớn hơn các dòng còn lại. Điều đó chứng tỏ có thể hai dòng này đã mang hai gen *pdh* và *adh*. Dòng 13 đã được lựa chọn để cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *NcoI* và *BglII*, theo lý thuyết nếu là dòng tái tổ hợp mong muốn sẽ xuất hiện hai băng với kích thước khoảng 3,4 kb và 4,7 kb. Kết quả hình 4 cho thấy các băng tạo ra khi cắt đơn lẻ bằng enzyme *BglII* hoặc phối hợp hai enzyme *NcoI* và *BglII* đều có kích thước như mong đợi. Từ kết quả này chúng tôi có thể khẳng định rằng đã tạo dòng được hai gen *pdh* và *adh* trong vector biểu hiện pTAC-MAT và được ký hiệu là pHBB1807.



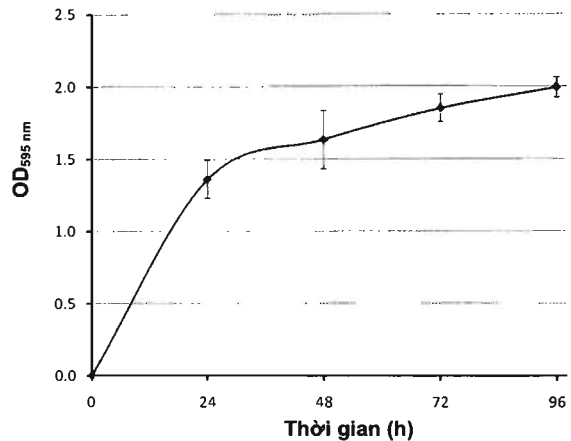
Hình 4. Điện di sản phẩm cắt kiểm tra dòng 13 (C13) bằng enzyme giới hạn. đường chạy 1-C13/*NcoI*+*BglII*, 2-C13/*BglII*, M. thang DNA chuẩn 500 bp (Invitrogen).

Đánh giá khả năng sinh ethanol của chủng *E. coli* tái tổ hợp mang vector pHBB1807

Vector tái tổ hợp pHBB1807 thu được đã được sử dụng để biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* ATCC 11303 và kiểm tra khả năng lên men ethanol của chủng tái tổ hợp thu được. Chủng *E. coli* tái tổ hợp được ký hiệu là *E. coli* C13. Quá trình lên men ethanol của chủng *E. coli* C13 được thực hiện như mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu. Dịch lên men sau đó được thu nhận và xác định ethanol theo cả hai phương pháp sắc ký khí và phản ứng màu. Kết quả sắc ký khí cho thấy chúng tôi đã thu được một đỉnh (peak) từ dịch lên men của chủng *E. coli* C13 với thời gian trễ là 3,678 phút. Khi so sánh với đỉnh thu được từ kết quả sắc ký ethanol chuẩn có thời gian trễ là 3,670 phút, kết quả này chỉ ra rằng trong dịch lên men có xuất hiện ethanol. Theo như công bố trước đây thì chủng *E. coli* 11303 hoàn toàn không có khả năng sinh ethanol do khuyết thiếu pyruvate

decarboxylase và alcohol dehydrogenase (Alterthum, Ingram, 1989). Kết quả này cho thấy hai gen *pdh* và *adhB* đã được đưa thành công vào chủng *E. coli* ATCC 11303 để tạo ra chủng tái tổ hợp có khả năng sinh ethanol.

Sự sinh tổng hợp ethanol theo thời gian trong quá trình lên men cũng đã được khảo sát và kết quả được thể hiện trên hình 5. Trong quá trình lên men mẫu được lấy sau mỗi 24 h (24, 48, 72, 96 h) và xác định hàm lượng ethanol thông qua phản ứng màu với thuốc thử dichromate. Kết quả cho thấy ethanol sinh ra đã được xác định sau 24 h lên men và tăng mạnh nhất ở thời điểm từ 24 đến 48 h (0,274). Mức độ tăng giảm đi sau 48 và 72 h lên men (0,216 và 0,143 tương ứng). Đối với mẫu đối chứng là chủng *E. coli* ATCC 11303 và chủng này mang plasmid pTAC-MAT đều không thấy xuất hiện ethanol. Đây là kết quả đánh giá sơ bộ khả năng lên men ethanol của chủng *E. coli* C13 tái tổ hợp.



Hình 5. Khả năng sinh ethanol của chủng *E. coli* C13 tái tổ hợp.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được của nghiên cứu này chúng tôi đưa ra một số kết luận như sau:

Hai gen mã hóa alcohol dehydrogenase II (*adh*) và pyruvate decarboxylase (*pdh*) từ *Zymomonas mobilis* đã được tách dòng thành công trong vector pTAC-MAT.

Đã tạo được vector biểu hiện tái tổ hợp mang hai gen *adh* và *pdh*, ký hiệu pHBB1807.

Tạo được chủng *E. coli* C13 tái tổ hợp mang hai gen mã hóa alcohol dehydrogenase II và pyruvate

decarboxylase.

Đánh giá được sơ bộ khả năng lên men ethanol của chủng *E. coli* C13 tái tổ hợp trên môi trường lên men có bổ sung 12% glucose.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí của Đề tài ĐT.05.09/NLSH của Bộ Công thương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alterthum F, Ingram LO (1989) Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 55: 1943-1948.

Dien BS, Cotta MA, Jeffries TW (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 258-266.

Ingram LO, Conway T, Clark DP, Sewell GW, Preston JF (1987) Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 53: 2420-2425.

Lau MW, Gunawan C, Balan V, Dale BE (2010) Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) and

Zymomonas mobilis AX101 for cellulosic ethanol production. *Biotechnol Biofuels* 2010: 3-11.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sanchez RG, Karhumaa K, Fonseca C, Nogués VS, Almeida JRM, Larsson CU, Bengtsson O, Bettiga M, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF (2010) Improved xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering. *Biotechnol Biofuels* 2010: 3-13.

Seo HB, Kim HJ, Lee OK, Ha JH, Lee HY, Jung KH (2009) Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36: 285-292.

Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 17-34.

Zhang B, Yang Q, Zhang X, Song J (2007) Mechanism and research progress of ethanol fermentation related genes *pdh* and *adhII* involved in fuel ethanol production. *KMITL Sci Tech J* 7: 171-178.

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI* STRAIN FOR ETHANOL FERMENTATION FROM C5 AND C6 SUGARS

Truong Quoc Phong*, Nguyen Lan Huong, To Kim Anh, Vu Thi Thu Ha

School of Biotechnology and Food Technology, Hanoi University of Science and Technology

SUMMARY

Efficient utilization of lignocellulosic feedstocks (agricultural wastes) offers an opportunity to reduce the cost of producing fuel ethanol and does not affect food security. However, no organism has been found in nature which can rapidly and efficiently metabolize different sugars from hydrolyzed lignocellulose into ethanol. Here we reported that two pivotal genes of ethanol producing pathway from *Zymomonas mobilis* including pyruvate decarboxylase (1.7 kb) and alcohol dehydrogenase II (1.15 kb) were cloned and sequenced. Cloned genes were inserted into expression vector pTAC-MAT and transformed into the host *E. coli* ATCC11303. A recombinant strain was tested for ethanol production on the fermentation medium containing 12% glucose by using gas chromatography and colorimetric measurement. Ethanol production was strongly increased from 24 - 72 h. These results indicate that it is possible to change the genetics of *E. coli* strain by the addition of genes encoding pivotal enzymes of ethanol producing pathway from *Z. mobilis* to generate recombinant strain for ethanol fermentation from C5 and C6 sugars.

Keywords: alcohol dehydrogenase II (ADH), C5 and C6 sugars, pyruvate decarboxylase (PDC), *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-38682594; E-mail: tqphong@mail.hut.edu.vn