

NGHIÊN CỨU LÊN MEN LƯỢNG LỚN CHỦNG *ESCHERICHIA COLI* BL21 TÁI TỔ HỢP MANG GEN MÃ HÓA LIPASE CỦA *BACILLUS SUBTILIS* FS2

PHÙNG THU NGUYỆT, NGUYỄN HỒNG THANH,
JAN-CHRISTER JANSON, TRƯƠNG NAM HẢI

1. MỞ ĐẦU

Lipase (hay còn gọi là triacylglycerol acylhydrolase, EC. 3.1.13) là một enzym có khả năng xúc tác quá trình thủy phân các triacylglycerol thành glycerol và axit béo tự do. Các lipase có ở động vật, thực vật, nấm và các vi sinh vật. Tuy nhiên chỉ có lipase của vi sinh vật mới có giá trị thương mại và hiện đang được ứng dụng nhiều trong các quá trình sản xuất công nghiệp như công nghiệp giấy, công nghiệp sản xuất bột giặt, công nghiệp chế biến thực phẩm, công nghiệp hóa tổng hợp và đặc biệt trong lĩnh vực y dược. Lipase có khả năng tham gia vào quá trình ester hóa các axit béo để làm tăng mùi vị của các sản phẩm bơ sữa, thúc đẩy quá trình chín của phô mát và tăng độ thơm cho sản phẩm đồ uống. Ngoài ra lipase còn có khả năng tham gia vào chuyển hóa sự tạo thành các dạng đồng phân R và S của các axit phenoxypionic, tiền chất của thuốc chống viêm không chứa steroid như naproxen, ibuprofen và các loại thuốc chữa AIDS... Khả năng ứng dụng của lipase trong quá trình sản xuất công nghiệp chủ yếu dựa vào đặc tính enzym và sự đa dạng về tính đặc hiệu cơ chất của nó.

Gen mã hóa lipase đã được phân lập từ chủng *B. subtilis* FS2 và biểu hiện trong tế bào *E. coli* [7]. Đây là một enzym ngoại bào bao gồm 181 axit amin với trình tự bảo thủ ở tâm hoạt tính là các gốc Ala-Xaa-Ser-Xaa-Gly giống như lipase A của chủng *B. subtilis* 168 [1, 2]. Qua nghiên cứu chúng tôi nhận thấy lipase từ chủng *B. subtilis* FS2 có một số tính chất khá lý thú về tính đặc hiệu cơ chất và có tiềm năng ứng dụng trong một số ngành công nghiệp. Vì vậy, chúng tôi đã nghiên cứu quá trình lên men chủng *E. coli* BL21 tái tổ hợp mang gen *lip* và khả năng tinh sạch của enzym tái tổ hợp này sau lên men. Trong báo cáo này chúng tôi trình bày kết quả lên men chủng *E. coli* BL21-Lip trong các hệ thống lên men 1 lít, 10 lít, 200 lít bằng phương pháp nuôi cấy tế bào mật độ cao.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.2. Chủng vi sinh vật

Chủng *E. coli* BL21 tái tổ hợp mang gen *lip* của *B. subtilis* FS2 (kí hiệu: *E. coli* BL21-Lip).

2.2. Môi trường và hóa chất

- Môi trường LB: Yeast extract (YE): 5 g/l, NaCl: 10 g/l; Tryptone: 10 g/l, glucose 3 g/l.

- Môi trường giàu: YE: 5 g/l, NH_4SO_3 : 2,5 g/l; K_2HPO_4 : 2 g/l; KH_2PO_4 : 3 g/l; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.5 g/l, CaCl_2 : 0,0139 g/l, và thành phần vi khoáng ($\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.0084 g/l;

CoCl₂.2H₂O: 0,0072 g/l; CuSO₄.5H₂O: 0,0072 g/l; MnSO₄.H₂O: 0,0216 g/l; CaCl₂.H₂O: 0,108 g/l; FeCl₃: 0,03 g/l, glucose 3 g/l; vitamin 0,66 mM, Thiamin 3%).

- Môi trường affibody: thành phần môi trường giống môi trường giàu nhưng không có YE.

- Môi trường GE: KH₂PO₄: 0,528 g/l; NH₄SO₄: 4 g/l, NaCl 0,06 g/l và thành phần vi khoáng (giống môi trường giàu), glucose 3 g/l.

- Các hóa chất khác Ampicilin nồng độ 100 mg/ml, IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactosidase) nồng độ 1 M.

3.3. Thiết bị lên men

Hệ thống lên men 1 lít (SARA fermenter), hệ thống lên men 10 lít (Kent fermenter), hệ thống lên men 200 lít (Gustav pilot fermenter) do hãng Belach Bioteknik AB, Thụy Điển sản xuất. Các hệ thống này được điều khiển bằng chương trình phần mềm Biophantom® do hãng Belach Bioteknik cung cấp cho phép kiểm soát chế độ lên men và thu thập các thông số kỹ thuật.

2.4. Lên men bổ sung cơ chất (fed-batch) trong các bình lên men 1 lít, 10 lít và 200 lít

Chuẩn bị môi trường lên men: Trước khi cấy giống, bổ sung Amp vô trùng tới nồng độ cuối cùng là 100 µg/ml và chỉnh pH 7,0 (bằng 14% NH₄OH và 3 M H₃PO₄), bổ sung chất phá bọt PPG (polypropylene glycol) vào bình lên men tỉ lệ 1/10000.

Chuẩn bị giống cho lên men: Nhân giống *E. coli* BL21-Lip trong bình tam giác chứa 50 ml môi trường LBA, lắc 200 vòng/phút, nhiệt độ 37°C qua đêm.

Điều kiện lên men: Thiết lập chế độ lên men trong bình như sau: pH 7,0; nhiệt độ 37°C; sục khí 1 lít/phút; tốc độ khuấy 200 vòng/phút. Cây huyền dịch tế bào đã chuẩn bị qua đêm vào các bình lên men theo tỉ lệ 1/1000. Các thông số chủ yếu của quá trình lên men như nhiệt độ, pH, tốc độ khuấy, nồng độ oxy hòa tan dO₂ được điều khiển tự động bởi chương trình phần mềm Biophantom®. Điều chỉnh tốc độ khuấy khoảng 200 vòng/phút và sục khí 1 lít/phút để duy trì dO₂ ≥ 30%.

Cảm ứng sinh tổng hợp protein tái tổ hợp: Mật độ tế bào trong bình lên men được theo dõi liên tục cho tới khi OD₆₀₀ đạt 0,4 trong bình lên men 1 lít và OD₆₀₀ đạt 4 trong bình lên men 10 lít và 200 lít, cảm ứng sinh tổng hợp protein bằng bổ sung IPTG nồng độ cuối cùng là 0,5 mM và hạ nhiệt độ lên men xuống tới 30°C.

Điện di trên gel polyacrylamide: Hút 1 ml dịch nuôi cấy, li tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút thu cặn tế bào. Tế bào được phá vỡ bằng đệm phá và siêu âm trong 5 phút. Li tâm 15000 vòng/phút và thu dịch nổi. Hòa 20 µl dịch nổi thu được và 5 µl đệm xử lí mẫu. Điện di kiểm tra protein trên gel polyacrylamide với gradient nồng độ 8 - 25% trên máy Phastgel (Pharmacia, Thụy Điển).

2.5. Phương pháp nuôi cấy tế bào mật độ cao (HCDC-High Cell Density Culture) [4]

Phương pháp này tiến hành theo các bước được mô tả trong thông báo của Lee (1996).

2.6. Tinh sạch lipase tái tổ hợp

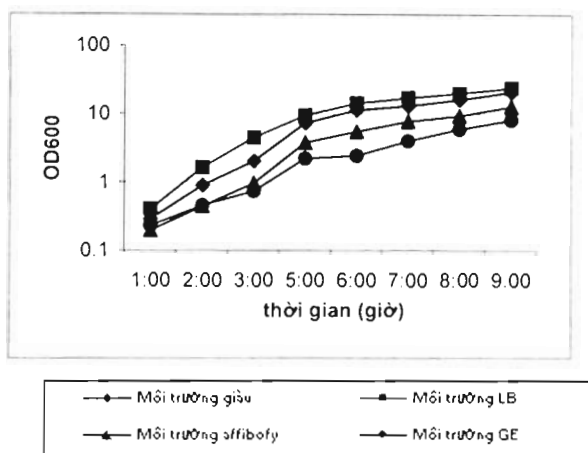
Lipase tái tổ hợp được tinh sạch bằng cột sắc kí ái lực His-Trap 5 ml trên hệ thống sắc kí AKTA (Amersham Bioscience, Mỹ) với phần mềm UNICORN 4.0. Cân bằng cột với 15 ml

đệm gắn (50 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, pH 4). Đưa 30 ml mẫu lên cột tốc độ 1 ml/phút. Rửa cột với 30 ml đệm gắn và đẩy protein ra khỏi cột với 40 ml đệm thô có chứa 600 mM imidazole, tốc độ 1 ml/phút. Kiểm tra phân đoạn protein đã thu bằng điện di trên gel polyacrylamide với gradient nồng độ 8 - 25%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu hóa quá trình lên men chủng *E. coli* BL21-Lip với các môi trường khác nhau

Môi trường nuôi cấy là một trong những nhân tố quan trọng nhất cho quá trình phát triển của vi sinh vật. Các thành phần trong môi trường nuôi cấy bao gồm nguồn carbon, nguồn nitơ và các thành phần muối khoáng được cân bằng ở tỉ lệ nhất định để thích hợp cho sự phát triển của từng nhóm vi sinh vật khác nhau. Tuy nhiên trong quá trình lên men, sự phát triển của vi sinh vật có thể bị ức chế bởi nguồn carbon, nitrogen hoặc glucose khi các thành phần này ở nồng độ cao và hạn chế sự sinh trưởng của vi sinh vật. Do vậy, để tối ưu hóa quá trình phát triển của chủng *E. coli* tái tổ hợp, chúng tôi đã tiến hành lên men chủng *E. coli* BL21-Lip trong các môi trường nuôi cấy khác nhau trước khi lên men lượng lớn bao gồm 4 loại môi trường là môi trường giàu, môi trường affibody, môi trường LB và môi trường GE (hình 1).



Hình 1. Quá trình phát triển của chủng tái tổ hợp *E. coli* BL21-Lip trên các môi trường khác nhau

Kết quả lên men chủng *E. coli* BL21-Lip trên hình 1 cho thấy có sự khác biệt về quá trình sinh trưởng của vi sinh vật trong mỗi bình lên men khác nhau. Tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật hoàn toàn phụ thuộc vào thành phần dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy. Môi trường LB bao gồm các thành phần như cao nấm men, peptone là các thành phần giàu chất dinh dưỡng và thích hợp nhất cho sự phát triển của chủng tái tổ hợp *E. coli* BL21-Lip so với các môi trường khác và OD₆₀₀ tối đa đạt được khoảng 20. Trong khi đó các môi trường GE và môi trường affibody là các môi trường nghèo gồm chủ yếu là các khoáng chất và đường glucose, do vậy vi sinh vật sinh trưởng trong các môi trường này cũng bị hạn chế về mặt dinh dưỡng với OD₆₀₀ tối đa chỉ đạt khoảng 13 và 11. Ngoài ra, môi trường giàu gồm đầy đủ các thành phần dinh dưỡng và thành phần vi khoáng giúp cho tế bào phát triển, do vậy sinh khối thu được cũng tương đương với sinh khối tế bào khi lên men trong môi trường LB với OD₆₀₀ tối đa đạt khoảng 19. Tuy nhiên thành

phần của môi trường này khá phức tạp do phải bổ sung thêm một số các chất khoáng. Trên thực tế trong quá trình sản xuất công nghiệp thì môi trường lên men cho các chủng vi sinh vật cần phải được đơn giản hóa để giảm chi phí sản xuất mà vẫn đạt được hiệu suất cao. Do vậy môi trường LB là môi trường thích hợp nhất cho quá trình lên men lượng lớn chủng *E. coli* tái tổ hợp mang gen mã hóa lipase.

3.2 Tối ưu hóa quá trình lên men chủng *E. coli* BL21-Lip đạt sinh khối cao

Đa số các protein tái tổ hợp được tổng hợp trong tế bào *E. coli* BL21 đều được tích lũy ở dạng nội bào, do vậy hiệu suất tổng hợp protein tỉ lệ với sinh khối tế bào sau khi lên men và hiệu suất tổng hợp protein (lượng protein được tạo thành trên một đơn vị sinh khối tế bào trong một thời gian nhất định). Do vậy phương pháp nuôi cấy tế bào tạo sinh khối cao với chủng *E. coli* tái tổ hợp mang gen *lip* đã được ứng dụng để tăng hiệu suất quá trình tạo thành sản phẩm, làm giảm thể tích lên men và giảm giá thành sản phẩm. Phương pháp HCDC này chủ yếu được sử dụng thông qua việc điều khiển tốc độ bổ sung nguồn cơ chất cho phép tế bào luôn sinh trưởng ở tốc độ tối ưu. Phương pháp này thường được tiến hành trong quá trình lên men mẻ có bổ sung cơ chất để nguồn dinh dưỡng cho vi sinh vật phát triển luôn được ổn định. Glucose là các nguồn cacbon trong môi trường nuôi cấy được vi sinh vật sử dụng hiệu quả nhất để cung cấp nguồn năng lượng cho tế bào sinh trưởng và phát triển, vì vậy nguồn cơ chất là glucose cũng phải được bổ sung liên tục trong quá trình lên men để làm tăng sinh khối tế bào và tăng sự tổng hợp protein tái tổ hợp trong các tế bào *E. coli*.

Công thức xác định tốc độ bổ sung glucose tăng theo lũy thừa đạt sinh khối cao như sau [4]:

$$Ms(t) = \frac{\mu}{Y_{x/s}} X_{(t_0)} V_{(t_0)} \exp[\mu(t - t_0)].$$

trong đó:

$Ms(t)$	Tốc độ bổ sung glucose theo thời gian	(gam/giờ)
μ	Hằng số tốc độ phát triển đặc hiệu	$\mu = 0,2$ (của <i>E. coli</i>)
$Y(x/s)$	Hiệu suất tạo sinh khối khi bổ sung glucose	0,5
X	Sinh khối tế bào tạo thành khi bổ sung glucose	(gam)
S	Nồng độ glucose bổ sung	(g/l)
$X_{(t_0)}$	Sinh khối tế bào ở thời điểm bắt đầu bổ sung glucose	3 (g/l)
$V_{(t_0)}$	Thể tích nuôi cấy ở thời điểm bắt đầu bổ sung glucose	0,8 (lít)
t	Thời gian nuôi cấy	(giờ)
t_0	Thời điểm bắt đầu bổ sung glucose	$t_0 = 3$ (giờ)

Tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật được xác định bằng việc tăng sinh khối tế bào theo thời gian và nó được xác định ở pha sinh trưởng. Tuy nhiên, khi vi sinh vật đạt được đến tốc độ sinh trưởng tối đa thì chỉ sau một thời gian tốc độ sinh trưởng này sẽ bị giảm dần do nguồn dinh dưỡng bị hạn chế và các sản phẩm độc đối tế bào được tích lũy. Do vậy, để sinh khối tế bào được tăng cao và sinh trưởng ở tốc độ tối đa thì nguồn cơ chất luôn luôn phải được bổ sung để

đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng của các tế bào được tạo thành. Dựa vào công thức xác định tốc độ bổ sung glucose vào hệ thống lên men mà sinh khối tế bào luôn được tăng theo thời gian và tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật luôn đạt ở pha lũy thừa.

Bảng 1. Tốc độ bổ sung glucose vào bình lên men và OD thu được với chủng *E. coli* BL21-Lip

Thời gian t (giờ)	Ms (t) (g/h)	OD600
3	0,96	2,28
4	1,17	7,32
5	1,43	8,96
6	1,75	11,39
7	2,14	11,59
8	2,61	13,19
9	3,19	16,14
10	3,89	20,98
11	4,75	40,78
12	5,81	48,02
13	7,09	61,89
14	8,66	71,73
15	10,58	87,80
16	12,93	114,26
17	15,79	124,24
18	19,28	143,14

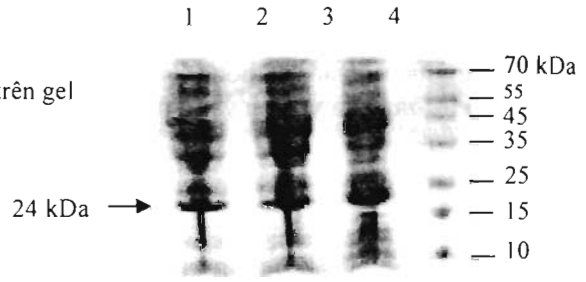
Kết quả trên bảng 1 cho thấy quá trình lên men chủng tái tổ hợp *E. coli* BL21-Lip đã được tối ưu hóa và giá trị OD₆₀₀ đo mật độ tế bào có thể lên tới 143 trên môi trường LB sau 18 giờ nuôi cấy. Cơ chất glucose đã được bổ sung liên tục vào hệ thống lên men để đạt sinh khối cao trong khi nếu lên men không có bổ sung glucose liên tục thì OD₆₀₀ tối đa chỉ đạt được khoảng 20 (kết quả phần 3.1). Lượng sinh khối tế bào thu được khi sử dụng phương pháp HCDC đạt khoảng 160 g/l. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu của Lee (1996) khi lên men chủng *E. coli* tái tổ hợp bằng phương pháp HCDC thì sinh khối tế bào thu được khoảng từ 140 cho đến 200 g/l. Từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy chủng *E. coli* BL21-Lip thích hợp cho việc sử dụng trong các ngành công nghiệp bởi khả năng tạo sinh khối cao và hiệu suất tổng hợp enzym lipase tái tổ hợp có thể được tăng lên bằng phương pháp HCDC.

3.3. Lên men lượng lớn lipase tái tổ hợp

Để khảo sát khả năng tạo sinh khối của chủng *E. coli* BL21-Lip tái tổ hợp khi lên men lượng lớn, chúng tôi đã tiến hành lên men chủng vi sinh vật này trong các bình lên men với thể tích khác nhau như 1 lít, 10 lít và 200 lít. Kết quả điện di trên gel SDS-PAGE lipase tái tổ hợp sau quá trình lên men trong các hệ thống lên men 1 lít, 10 lít, 200 lít được thể hiện trên hình 2.

Hình 2. Điện di protein tái tổ hợp sau khi lên men trên gel polyacrylamide với gradient nồng độ 8 - 25%

- Giếng 1: Lên men trong bình 1 lít
- Giếng 2: Lên men trong bình 10 lít
- Giếng 3: Lên men trong bình 200 lít
- Giếng 4: Thang protein chuẩn



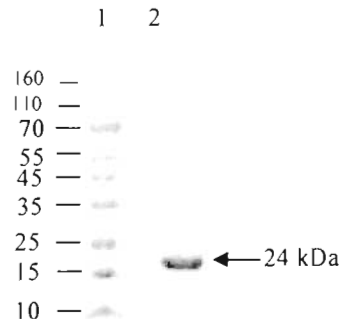
Quá trình lên men lượng lớn các protein tái tổ hợp trong các bình lên men thường phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nồng độ oxy hoà tan, nồng độ chất dinh dưỡng được bổ sung, nhiệt độ và pH tối ưu. Các hệ thống bình lên men thường được điều khiển bằng hệ thống tự động để giúp cho các thông số lên men được cân bằng như việc cung cấp oxy hoà tan, điều khiển sự thay đổi pH bằng axit hoặc kiềm, duy trì nhiệt độ sinh trường và nhiệt độ cảm ứng, điều khiển tốc độ khuấy trong bình lên men và cung cấp chất dinh dưỡng để tránh tạo ra các sản phẩm trao đổi gây độc cho tế bào. Để tối ưu quá trình lên men sinh tổng hợp lipase tái tổ hợp trong các bình 1 lít, 10 lít và 200 lít, các thông số cho quá trình lên men đã được nghiên cứu và khảo sát với kết quả đạt được như nồng độ oxy hoà tan 30%, nồng độ glucose được bổ sung là 3 g/l, pH 7,0, tốc độ khuấy 200 - 250 vòng/phút và nhiệt độ sinh trường cho chủng *E. coli* tái tổ hợp là 37°C. Quá trình sinh tổng hợp lipase tái tổ hợp đã được cảm ứng ở nhiệt độ 37°C sau 4 giờ nuôi cấy với nồng độ IPTG cuối cùng được bổ sung vào các hệ thống lên men là 0,5 mM. Sau khi lên men, tổng số sinh khối thu được trong bình lên men 200 lít là 2,5 kg/160 lít (tương đương với khoảng 16 g/l), lượng sinh khối được tạo thành trong các bình lên men 1 lít và 10 lít (khoảng 20 g/l). Như vậy theo tính toán và kết quả lên men lượng lớn chủng *E. coli* BL21-Lip trên hình 2 cho thấy lượng sinh khối được tổng hợp trong các bình lên men đạt được gần tương đương nhau khoảng từ 16-20 g/l. Khi so sánh với kết quả nghiên cứu của Gosset (1993) cho thấy lượng sinh khối tối đa tạo thành trong các bình 14 lít và 300 lít đạt khoảng 20 g/l. Như vậy, kết quả của chúng tôi cũng tương đương với kết quả của Gosset khi lên men *E. coli* chủng tái tổ hợp trong các bình lên men 10 lít và 200 lít. Kết quả này mở ra triển vọng để có thể tổng hợp lượng lớn lipase tái tổ hợp và ứng dụng vào một số ngành sản xuất công nghiệp.

3.4. Tinh sạch lipase tái tổ hợp

Các lipase tái tổ hợp sau khi tổng hợp trong bình lên men 1 lít, 10 lít và 200 lít được tiến hành tinh sạch qua cột sắc kí ái lực chứa ion Ni^{2+} có khả năng liên kết với các nhóm Histidine. Imidazole trong đệm chạy sẽ cạnh tranh vị trí liên kết với ion Ni^{2+} và protein tái tổ hợp bắt đầu được đẩy ra khỏi cột ở nồng độ imidazole cao. Kết quả tinh sạch protein tái tổ hợp điện di trên hình 3.

Hình 3. Điện di protein tái tổ hợp tinh sạch trên gel polyacrylamide với gradient nồng độ 8 - 25%

- Giếng 1: Thang protein chuẩn
- Giếng 2: Protein tinh sạch



Lipase tái tổ hợp có chứa trình tự của 6 gốc His được thiết kế nằm ở phía đầu N để thuận lợi cho quá trình tinh sạch. Do ái lực liên kết giữa các gốc His và ion Ni^{2+} nên tất cả các protein không chứa đuôi His-tag được đẩy ra khỏi cột His-trap affinity column ở nồng độ imidazole thấp và các protein tái tổ hợp có chứa các gốc His sẽ được đẩy ra khỏi cột ở nồng độ imidazole cao khoảng 300 mM. Kết quả điện di trên gel polyacrylamide với gradient nồng độ 8 - 25% ở hình 3 cho thấy trên đường chạy 2 xuất hiện một băng protein duy nhất có kích thước khoảng 24 kDa, kích thước này đúng với kích thước của lipase tái tổ hợp được tính toán theo lý thuyết, như vậy chúng tôi đã tinh sạch thành công lipasetái tổ hợp qua cột sắc kí ái lực. Lượng lipase tái tổ hợp được tinh sạch đạt khoảng 0,4 g lipase/lít nuôi cấy.

Lời cảm ơn. Công trình trên được tài trợ bởi kinh phí của dự án hợp tác nghiên cứu Việt Nam - Thụy Điển SIDA-SAREC với đề tài: "Production of recombinant protein for agricultural and medical use", mã số VS/BT-03.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dartois V., Coppee J. Y., Colson C., and Baulard A. - Genetic Analysis and overexpression of Lipolytic Activity in *Bacillus subtilis*, Appl. Environ. Micro. **60** (5) (1994) 1670-1673.
2. Lesuisse E., Schanck K., Colson C. - Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH tolerant enzyme - Eur. J. Biochem. **216** (1994) 155-160.
3. Elibol M., Ozer D. - Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*, Process Biochem. **36** (2001) 325-329.
4. Sang Yup Lee - High cell density culture of *Escherichia coli*, TIBTech. **14** (1996) 98-105.
5. D. J. Korz, U. Rinas, K. Hellmuth, E. A. Sander, W. D. Deckwer - Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology **39** (1995) 59-65.
6. G. Gosset, R. de Anda, N. Cruz, A. Martínez, R. Quintero, F. Bolivar - Recombinant protein production in cultures of an *Escherichia coli* trp- strain. Appl Microbiol Biotechnol. **39** (4-5) (1993) 541-546.
7. Nguyễn Hồng Thanh, Phùng Thu Nguyệt, Trương Nam Hải - Biểu hiện gen mã hoá lipase (LipA) từ chủng *Bacillus subtilis* FS2, Tạp chí Công nghệ Sinh học **5** (1) (2007) 1-6.

SUMMARY

STUDY ON THE LARGE-SCALE FERMENTATION OF THE RECOMBINANT STRAIN *ESCHERICHIA COLI* BL21 HARBORING GENE ENCODING LIPASE OF *BACILLUS SUBTILIS* FS2

The lipase of *Bacillus subtilis* FS2 is an extracellular enzyme which consists of 181 amino acids and enable to hydrolysis ester bonds of long-chain acyl glyceride ($C > 10$). The gene encoding lipase was cloned and overexpressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The fermentation processs of recombinant strain *E. coli* BL21 harboring gene *lip* was studied with different culturing media. It was shown that the LB medium was the best for growing of *E. coli* strain compare to the others. The biomass obtained from fermentation batchs of the recombinant

strain *E. coli* BL21-Lip was 21 g/l in 1 liter fermenter, 20 g/l in 10 liter fermenter and 16 g/l in 200 liter fermenter under optimal conditions at 30°C after 4 hours with 0.5 mM Isopropyl β -D-thiogalactosidase as an inducer. Maximum value of OD₆₀₀ for the fermentation process of the recombinant strain *E. coli* BL21-Lip on LB medium reached 143 using the high cell density culture method under continuously feeding glucose. The recombinant lipase of 24 kDa was purified by His-trap affinity chromatography column at 300 mM imidazole concentration and purified protein achieved about 0.4 g lipase per 1 liter growth culture.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 12 tháng 4 năm 2008

Phùng Thu Nguyệt, Nguyễn Hồng Thanh, Trương Nam Hải,
Viện Công nghệ sinh học, Viện KH&CN Việt Nam.

Jan-Christer Janson,

Trường Đại học Uppsala, Uppsala, Thụy Điển.