

Thu nhận hiệu quả beta-mannanase dung hợp với móc neo LysM3014 trong *Escherichia coli* bằng phương pháp phá vỡ tế bào với hạt thủy tinh

Nguyễn Hoàng Minh*, Phan Thị Thúy Hằng, Nguyễn Thị Ý Như, Lê Chánh Chí Tài, Nguyễn Ngọc Trâm

Khoa Hóa, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng, 54 Nguyễn Lương Bằng, phường Hòa Khánh Bắc, quận Liên Chiểu, TP Đà Nẵng, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/9/2023; ngày chuyển phân biện 25/9/2023; ngày nhận phân biện 4/1/2024; ngày chấp nhận đăng 21/3/2024

Tóm tắt:

Hướng đến sự phát triển hệ thống xúc tác toàn tế bào theo phương thức không biến đổi gen, trong nghiên cứu này, ba phương pháp phá vỡ tế bào *E. coli* gồm: siêu âm, kết đông - rã đông và lắc với hạt thủy tinh được thực hiện để thu nhận hiệu quả enzyme lai LysM3014-ManB chứa beta-mannanase (ManB) từ *Bacillus licheniformis* dung hợp với một vùng LysM từ transglycosylase ngoại bào giả định Lp_3014 của *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Kết quả cho thấy, hoạt tính xúc tác của beta-mannanase cao nhất (~46.651 U/l dịch lên men) đạt được khi tế bào được phá vỡ bởi hạt thủy tinh. Ngoài ra, hoạt tính xúc tác của đoạn enzyme lai đã tăng lên 1,4 lần (~66.000 U/l dịch lên men) trong điều kiện phá vỡ tế bào bằng hạt thủy tinh sử dụng ống falcon có thể tích 50 ml với tỷ lệ hạt thủy tinh 1,0 g/ml và thời gian phá vỡ là 8 phút. Nghiên cứu này cho thấy, phá vỡ tế bào bằng hạt thủy tinh là phương pháp đơn giản và hiệu quả nhất so với các phương pháp còn lại. Enzyme lai có thể được sử dụng để tiếp tục nghiên cứu quá trình cố định ManB trên bề mặt tế bào *L. plantarum* thông qua móc neo chứa một vùng LysM.

Từ khóa: *Escherichia coli*, hạt thủy tinh, LysM3014, mannanase, phá vỡ tế bào.

Chỉ số phân loại: 1.4, 2.4

Efficient recovery of beta-mannanase fused with LysM3014 domain in *Escherichia coli* by glass bead based-cell disruption method

Hoang Minh Nguyen*, Thi Thuy Hang Phan, Thi Y Nhu Nguyen, Chanh Chi Tai Le, Ngoc Tram Nguyen

Faculty of Chemical Engineering, University of Science and Technology, The University of Danang,
54 Nguyen Luong Bang Street, Hoa Khanh Bac Ward, Lien Chieu District, Da Nang City, Vietnam

Received 22 September 2023; revised 4 January 2024; accepted 21 March 2024

Abstract:

Toward the development of whole cell biocatalysts via non-GMO strategy, in this study, three *E. coli* cell disruptions, including sonication, freezing - thawing, and bead-shaking have been evaluated to recover efficiently fusion protein LysM3014-ManB containing a beta-mannanase (ManB) from *Bacillus licheniformis* fused with a single LysM3014 domain derived from a putative extracellular transglycosylase Lp_3014 of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. The results showed that the highest volumetric activity of beta-mannanase (~46,651 U/l fermentation) was obtained when shaking the cells with glass beads. Moreover, the hybrid enzymatic activity of LysM3014-ManB increased approximately 1.4 folds (~66,000 U/l fermentation) under the optimum conditions of glass bead-based cell disruption with falcon 50 ml, glass bead ratio of 1.0 g/ml and disruption time of 8 min. The study indicates that shaking the cells with glass beads is likely to be the simplest and the most efficient cell disruption method in comparison with other disruption methods. Hybrid enzymes can be used to further study the immobilisation of ManB on the surface of *L. plantarum* through an anchor containing a LysM domain.

Keywords: cell disruption, *Escherichia coli*, glass bead, LysM3014, mannanase.

Classification numbers: 1.4, 2.4

*Tác giả liên hệ: Email: nhminh@dut.udn.vn

1. Đặt vấn đề

Escherichia coli là vi khuẩn gram âm được nghiên cứu rộng rãi như là một vật chủ để sản xuất các loại enzyme tái tổ hợp có nhiều ứng dụng khác nhau, chẳng hạn như beta-mannanase, một enzyme có khả năng chuyển đổi bã com dừa thành các prebiotic tiềm năng [1]. Để có thể thu nhận lượng lớn các enzyme với hoạt tính xúc tác cao, giai đoạn ly giải tế bào *E. coli* đóng vai trò đặc biệt quan trọng [2]. Nếu quá trình phá vỡ không tốt, lượng enzyme giải phóng sẽ rất thấp, đồng thời cấu trúc trung tâm hoạt động của enzyme sẽ bị biến đổi. Vì vậy, việc lựa chọn phương pháp phá vỡ quyết định độ phức tạp của công nghệ thu hồi sản phẩm và tính kinh tế của quá trình sản xuất [3].

Về cơ bản, tế bào có thể được phá vỡ dựa trên các phương pháp khác nhau và việc lựa chọn phương pháp phá vỡ phụ thuộc vào cơ chế phá vỡ cũng như cách thức thực hiện phương pháp [4]. Ở quy mô phòng thí nghiệm, phương pháp siêu âm dựa trên quá trình chuyển đổi năng lượng của âm thanh (20 kHz) thành các dao động cơ học là phương pháp được sử dụng nhiều nhất [4]. Các dao động này được truyền vào chất lỏng và tạo thành hiện tượng bong bóng có kích thước vi mô, khi các vi bóng vỡ ra, tạo thành sóng có năng lượng lớn lan tỏa khắp chất lỏng và gây phá vỡ tế bào. Nhìn chung, phương pháp siêu âm tương đối đơn giản, dễ thực hiện, hiệu quả phá vỡ cao; tuy nhiên, phương pháp này cần đầu tư về mặt thiết bị, có thể sinh nhiệt và tạo các gốc tự do, làm tổn thương đến phân tử mục tiêu [5]. Do đó, việc luôn luôn đặt mẫu trong điều kiện lạnh và thực hiện chế độ phá gián đoạn luôn được đề xuất trong nhiều quy trình nghiên cứu. Ngoài phương pháp siêu âm, phương pháp kết đông - rã đông dựa trên sự hình thành và sự tan chảy các tinh thể đá cũng được sử dụng, để phá vỡ tế bào vì sự đơn giản, dễ thực hiện và thường được sử dụng kết hợp với các phương pháp khác để nâng cao hiệu quả phá vỡ [6]. Chính các tinh thể nước đá được tạo ra trong quá trình cấp đông có vai trò phá vỡ tế bào. Phương pháp này phụ thuộc vào nồng độ tế bào trong mẫu, số vòng kết đông - rã đông và nhiệt độ làm đông [7]. Phương pháp phá vỡ tế bào bằng hạt thủy tinh là phương pháp thường được sử dụng và có thể được thực hiện chủ động bằng nhiều cách khác nhau (như khuấy với que khuấy từ, vortex với máy trộn tốc độ cao...) [5]. Quá trình phá vỡ tế bào bằng hạt thủy tinh chủ yếu dựa trên lực tạo ra khi hạt thủy tinh va chạm với tế bào, còn gọi là lực mài mòn hay lực nghiền [4]. Hiệu quả phá vỡ phụ thuộc vào nồng độ tế bào, kích thước của hạt thủy tinh, tỷ lệ hạt thủy tinh so với thể tích canh trường và lực tác động [8].

Có thể thấy rằng, có nhiều phương pháp phá vỡ tế bào, mỗi phương pháp đều có ưu và nhược điểm. Phương pháp phá vỡ tốt nhất là phương pháp có quy trình đơn giản, thuận tiện trong thao tác, không cần thiết bị đắt tiền và quan trọng hơn cả là có thể giải phóng lượng lớn hợp chất đích có hoạt tính sinh học cao nhất [7]. Với mục tiêu lựa chọn phương

pháp phá vỡ tế bào phù hợp, trong nghiên cứu này, các phương pháp như: siêu âm, kết đông - rã đông và lắc với hạt thủy tinh được sử dụng để phá vỡ tế bào *E. coli* BL21 tái tổ hợp nhằm thu nhận đoạn protein lai LysM3014-ManB chứa beta-mannanase (ManB) từ *Bacillus licheniformis* DSM13 dung hợp với một vùng LysM từ transglycosylase ngoại bào giả định Lp_3014 của *L. plantarum* WCFS1. Phương pháp tốt nhất trong ba phương pháp sẽ được lựa chọn để khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phá vỡ tế bào.

Đây là nghiên cứu mới trình bày quá trình thu nhận protein lai LysM3014-ManB trong *E. coli* bằng các phương pháp phá vỡ khác nhau. Kết quả của nghiên cứu sẽ là bước khởi đầu quan trọng để cố định ManB trên bề mặt tế bào *L. plantarum* sử dụng móc neo LysM, hướng đến sự phát triển hệ thống xúc tác toàn tế bào theo phương thức không biến đổi gen.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chủng vi sinh vật và môi trường nuôi cấy

Escherichia coli BL21 mang pBAD3014_ManB được nuôi cấy trong môi trường Luria-Bertani (LB) bổ sung 100 µg/ml ampicillin ở 37°C (LBA), trong điều kiện lắc [9].

2.2. Hóa chất và plasmid

Các hóa chất như cơ chất Locust bean gum (LBG), L-arabinose, ampicillin, NaCl, KCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 và hạt thủy tinh 0,5 mm (Z250465-1PAK) đạt độ tinh khiết cao và được mua từ Công ty Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Vector pBAD3014_ManB là vector có nguồn gốc từ vector thương mại pBAD, có chứa trình tự móc neo LysM từ Lp_3014 lai với gen *manB* từ *B. licheniformis* DSM13 (ATCC 14580).

2.3. Biểu hiện gen mã hóa protein lai LysM3014-ManB trong tế bào *E. coli* BL21

Quá trình biểu hiện gen mã hóa LysM3014-ManB trong tế bào *E. coli* BL21 được thực hiện theo quy trình được mô tả trước đây với một điều chỉnh nhỏ về nồng độ cảm ứng [9]. Về cơ bản, *E. coli* tái tổ hợp được nuôi cấy lắc qua đêm ở 37°C trong môi trường LBA. Sau đó, dịch tế bào qua đêm được chuyển sang 50 ml môi trường LBA mới sao cho $\text{OD}_{600} \sim 0,1$, và tiếp tục được nuôi lắc ở 37°C. Quá trình biểu hiện gen được cảm ứng tại $\text{OD}_{600} \sim 0,6$ bằng L-arabinose đến nồng độ cuối là 0,9 mg/ml, tế bào được thu nhận sau 24 giờ cảm ứng bằng ly tâm (4000×g, 10 phút, 4°C) trước khi được rửa 2 lần với đệm PBS chứa 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , và 10 mM Na_2HPO_4 (pH 7,4). Để đảm bảo một lượng tế bào được thu nhận trong mỗi thí nghiệm là như nhau, thể tích của canh trường tế bào ($V_{\text{canh trường}}$) được tính toán dựa trên công thức: $V_{\text{canh trường}} \times \text{OD}_{600} = 20$. Sinh khối tế bào được tái huyền phù trong 1 ml dung dịch đệm PBS lạnh trước khi được phá vỡ bằng các phương pháp khác nhau.

2.4. Các phương pháp phá vỡ tế bào *E. coli* tái tổ hợp

Siêu âm: Quá trình phá vỡ tế bào bằng phương pháp siêu âm được thực hiện như phương pháp trước đây và có một vài điều chỉnh [7]. Tế bào được phá vỡ trong điều kiện ướp lạnh trong khoảng 15 giây bằng máy siêu âm (Bandelin Sonopuls HD60, Đức, công suất 80%, tần số 20 kHz), sau đó đặt trong điều kiện ướp lạnh nghỉ trong 45 giây. Tổng thời gian phá tế bào bằng siêu âm là 4 phút.

Kết đông - rã đông: Quá trình phá vỡ tế bào bằng phương pháp kết đông - rã đông được thực hiện như phương pháp trước đây và có một vài điều chỉnh [6]. Một cách ngắn gọn, ống đựng sinh khối tế bào được ướp lạnh trong 10 phút, sau đó ống này được ủ trong ống đựng ethanol lạnh (98%) ở -80°C trong vòng 15 phút. Hai bước này được lặp lại khoảng 15 lần, sau đó tái huyền phù tế bào trong 0,1 ml đệm PBS. Dịch nổi chứa enzyme được thu nhận bằng ly tâm (10.000×g, 4°C, 10 phút).

Phá vỡ tế bào với hạt thủy tinh: Tế bào được phá vỡ bằng cách trượt ống eppendorf (thể tích 1,5 ml) chứa 1 ml dịch tế bào và 0,5 g hạt thủy tinh 0,5 mm trên giá đựng ống nghiệm trong 60 giây, sau đó ủ trong điều kiện ướp lạnh 15 giây. Tổng thời gian phá vỡ tế bào bằng phương pháp này là 4 phút. Dịch chiết enzyme thô được thu nhận nhờ ly tâm ở 10000×g, 4°C, 1 phút và dùng để xác định hoạt tính enzyme.

2.5. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả phá vỡ tế bào bằng hạt thủy tinh

Thời gian phá vỡ tế bào: 1 ml dịch tế bào huyền phù được hòa trộn với 0,5 g hạt thủy tinh. Sau đó, tế bào được phá trong các khoảng thời gian khác nhau (4, 6, 8 và 10 phút).

Tỷ lệ hạt thủy tinh: 1 ml dịch tế bào huyền phù được hòa trộn với hạt thủy tinh với tỷ lệ khác nhau (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 g/ml). Tế bào được phá trong tổng thời gian được khảo sát ở trên.

Hình dạng ống đựng tế bào: Ống đựng có hình dạng khác nhau (eppendorf 1,5 ml, falcon 15 ml và falcon 50 ml) được sử dụng để chứa một ml dịch tế bào huyền phù và hạt thủy tinh. Quy trình phá vỡ tế bào được thực hiện với các thông số thời gian phá và tỷ lệ hạt thủy tinh được xác định ở nghiên cứu trước.

Hiệu quả phá vỡ tế bào được xác định dựa vào hoạt tính thể tích của mannanase tái tổ hợp.

2.6. Xác định hoạt tính xúc tác của mannanase

Hoạt tính mannanase được xác định theo quy trình được mô tả trước đây [1]. Một cách ngắn gọn, hỗn hợp phản ứng gồm 100 µl dịch enzyme với 900 µl của 0,5% (w/v) dung dịch cơ chất locust bean gum chứa thành phần galactomannan. Dung dịch cơ chất được chuẩn bị bằng cách pha loãng locust bean gum trong 50 mM đệm sodium citrate (pH 6,0)

tại 80°C trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được ủ tại 37°C, 600 vòng/phút trong 5 phút. Lượng đường tạo ra sau phản ứng được xác định bằng phương pháp dinitrosalicylic acid (phương pháp DNS). Trong phương pháp này, 100 µl dịch sau phản ứng được trộn với 100 µl dung dịch DNS, tiếp đó ủ ở 99°C trong 10 phút, làm lạnh trên đá trong 5 phút, pha loãng với 800 µl nước chung cất hai lần trước khi đo độ hấp thụ tại bước sóng 540 nm, sử dụng 1-5 µmol/ml chất chuẩn D-mannose. Một đơn vị hoạt tính của mannanase được xác định là lượng enzyme giải phóng 1 µmol mannose tương đương trong một phút dưới điều kiện phản ứng. Phản ứng được lặp lại 3 lần với tỷ lệ sai số nhỏ hơn 5%.

2.7. Xác định nồng độ protein

Nồng độ protein được xác định bằng phương pháp Bradford sử dụng albumin huyết thanh bò làm chất chuẩn [10].

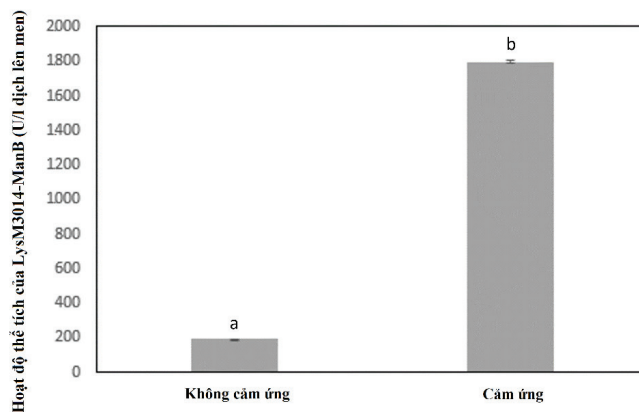
2.8. Phương pháp thống kê

Tất cả các thí nghiệm được thực hiện ít nhất 3 lần, tất cả dữ liệu được trình bày trong bảng và đồ thị là giá trị trung bình với độ lệch chuẩn. Phép kiểm định Fisher's LSD được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giá trị trung bình giữa các nhóm nếu kiểm định ANOVA cho ý nghĩa khác biệt.

3. Kết quả

3.1. Hoạt tính xúc tác của beta-mannanase dung hợp với móc neo LysM3014

Quá trình biểu hiện protein lai LysM3014-ManB trong tế bào *E. coli* tái tổ hợp được cảm ứng bởi L-arabinose. Sau 24 giờ cảm ứng, tế bào *E. coli* mang plasmid pBAD3014_ManB đã được phá vỡ bằng phương pháp siêu âm. Hoạt tính mannanase của LysM3014-ManB được phân tích dựa vào phương pháp DNS.



Hình 1. Hoạt tính mannanase của dịch chiết thô chứa protein lai LysM3014-ManB thu nhận trong điều kiện nuôi cấy không cảm ứng và cảm ứng sau 24 giờ. Các chữ cái a, b thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng Fisher's LSD của hoạt độ thể tích mannanase với $p < 0,05$.

Kết quả hình 1 cho thấy, hoạt tính xúc tác của LysM3014-ManB trong điều kiện cảm ứng là ~1.800 U/l dịch lên men, cao hơn 9 lần so với trường hợp biểu hiện gen không cảm ứng, tuy nhiên thấp hơn 27 lần so với hoạt tính của ManB tự do thu nhận từ nghiên cứu trước đây (50.000 U/l dịch lên men) [1]. Điều này cho thấy rằng, phương pháp phá vỡ tế bào bằng siêu âm đã sinh nhiệt, từ đó làm tổn thương đến cấu trúc trung tâm hoạt động của ManB. Do vậy, việc khảo sát các phương pháp phá vỡ tế bào khác nhau là vô cùng cần thiết, góp phần thu nhận lượng lớn tổ hợp enzyme lai có hoạt tính xúc tác.

3.2. Hiệu quả của các phương pháp phá vỡ tế bào *E. coli* BL21 tái tổ hợp

Kết quả bảng 1 cho thấy, phương pháp siêu âm giải phóng protein với nồng độ cao nhất (khoảng 9,7 mg/ml), cao hơn khoảng 3 lần so với hai phương pháp còn lại. Tuy nhiên, khi so sánh giá trị hoạt độ thể tích của mannanase trong 1 l dung dịch lên men thì thấy rằng, phương pháp phá vỡ với hạt thủy tinh giải phóng lượng enzyme có hoạt tính cao nhất (~46.651 U/l), gấp 26 lần so với trường hợp siêu âm và gấp khoảng gần 4 lần so với trường hợp phá vỡ bằng kết đông - rã đông. Giá trị hoạt độ riêng của mannanase trong phương pháp phá vỡ bằng hạt thủy tinh (~82 U/mg) cũng đạt giá trị cao nhất, gấp khoảng 27 lần so với phương pháp kết đông - rã đông và siêu âm (~3 U/mg). Điều này cho thấy, phương pháp phá vỡ tế bào bằng cách trượt ống chứa tế bào và hạt thủy tinh trên giá đỡ là phương pháp đơn giản nhất và tạo ra dịch chiết tách có hoạt độ enzyme cao nhất. Do vậy, phương pháp phá vỡ bằng hạt thủy tinh được lựa chọn cho các thí nghiệm sau.

Bảng 1. Hoạt độ của LysM3014-ManB thu được từ các ly giải tế bào *E. coli* tái tổ hợp sử dụng các phương pháp khác nhau.

Hoạt tính của LysM3014-ManB	Siêu âm	Kết đông - rã đông	Hạt thủy tinh
Hoạt độ thể tích (U/l dịch lên men)	1788±7,93 ^a	12017±526 ^b	46651±3,94 ^c
Protein tổng (mg/ml)	9,76±0,35 ^a	3,10±0,07 ^b	2,85±0,22 ^b
Hoạt độ riêng (U/mg protein)	2,90±0,41 ^a	3,06±0,16 ^a	82,98 ±0,95 ^b

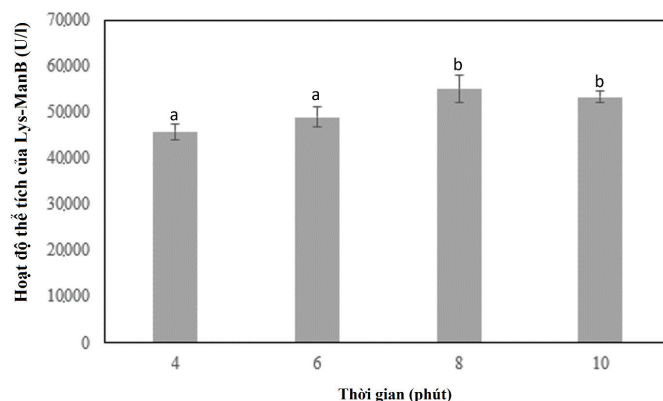
Ghi chú: Các chữ cái a, b, c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng Fisher's LSD của các thông số khác nhau ở các phương pháp phá vỡ tế bào với p<0,05.

3.3. Ảnh hưởng của các yếu tố liên quan đến quá trình phá vỡ tế bào bằng hạt thủy tinh

3.3.1. Thời gian

Kết quả hình 2 cho thấy, khi phá vỡ tế bào *E. coli* mang plasmid pBAD3014_ManB trong thời gian 8 phút, hoạt tính xúc tác của LysM3014-ManB được xác định là cao nhất (~55.000 U/l dịch lên men), cao hơn so với trường hợp sử dụng thời gian phá mẫu là 4 phút (~46.000 U/l dịch lên men) và 6 phút (~49.000 U/l dịch lên men). Tuy nhiên, khi tăng

thời gian phá mẫu bằng hạt thủy tinh lên 10 phút (~53.310 U/l dịch lên men), hoạt độ thể tích của LysM3014-ManB không có sự khác biệt đáng kể so với trường hợp sử dụng thời gian 8 phút. Điều này có thể cho thấy, khi phá vỡ tế bào trong khoảng thời gian 8 phút, một lượng đáng kể enzyme lai LysM3014-ManB đã được giải phóng ra. Nếu tiếp tục tiến hành phá vỡ, lượng enzyme này sẽ trực tiếp va chạm với các hạt thủy tinh, làm cho cấu trúc trung tâm hoạt động của enzyme bị biến đổi. Do đó, trong nghiên cứu này, tổng thời gian 8 phút là phù hợp để phá vỡ tế bào bằng hạt thủy tinh.

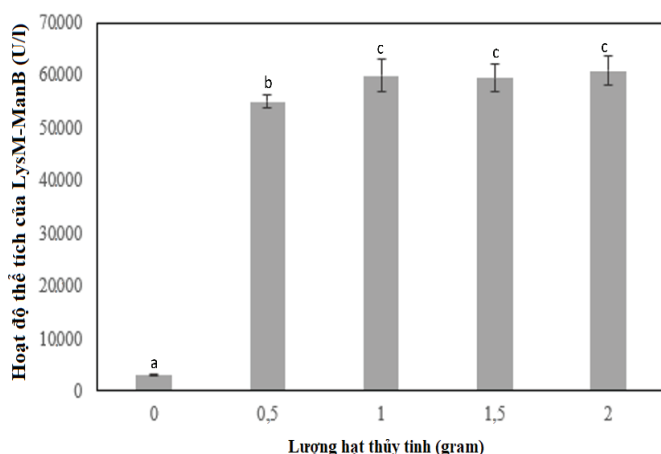


Hình 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên hoạt độ của LysM-ManB thu được từ phương pháp phá vỡ tế bào *E. coli* tái tổ hợp sử dụng hạt thủy tinh. Các chữ cái a, b thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng Fisher's LSD với p<0,05.

3.3.2. Tỷ lệ hạt thủy tinh

Khi phá vỡ tế bào trong điều kiện không dùng hạt thủy tinh, hoạt tính xúc tác của LysM3014-ManB vẫn được xác định (~3.000 U/l dịch lên men). Điều này cho thấy, khi trượt ống eppendorf chứa tế bào trên giá đỡ ống nghiệm, các tế bào *E. coli* đã va chạm vào nhau, gây nên sự vỡ của tế bào và giải phóng enzyme lai. Tuy nhiên, lực va chạm giữa các tế bào chưa đủ mạnh nên chỉ một lượng nhỏ tế bào bị phá vỡ. Điều này cho thấy, rất cần thiết phải sử dụng hạt thủy tinh để hỗ trợ cho quá trình phá vỡ tế bào.

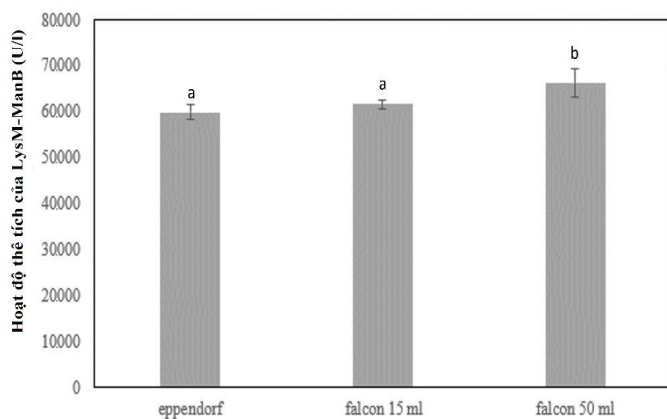
Trong trường hợp phá vỡ tế bào với tỷ lệ hạt thủy tinh là 0,5 g/ml, hoạt tính của LysM3014-ManB (~55.000 U/l dịch lên men) đã tăng khoảng 18 lần so với trường hợp không sử dụng hạt thủy tinh (hình 3). Khi tăng tỷ lệ hạt thủy tinh lên 1,0 g/ml, hoạt tính xúc tác của enzyme đạt khoảng ~60.000 U/l dịch lên men. Tuy nhiên, hoạt tính enzyme đã tăng lên không đáng kể (~61.000 U/l dịch lên men) khi sử dụng tỷ lệ hạt thủy tinh cao hơn (1,5 và 2,0 g/ml). Kết quả này cho thấy rằng, tỷ lệ hạt thủy tinh (1,0 g/ml) là vừa đủ để phá vỡ tế bào trong 1 ml dịch huyền phù. Nếu dùng tỷ lệ hạt thủy tinh lớn hơn 1,0 g/ml, không gian của ống đựng đã giới hạn sự va chạm hiệu quả của hạt thủy tinh với tế bào, vì vậy hoạt tính xúc tác của enzyme không tăng nữa. Do đó, trong nghiên cứu này, tỷ lệ hạt thủy tinh 1,0 g/ml được lựa chọn để phá vỡ tế bào.



Hình 3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ hạt thủy tinh lên hoạt độ của LysM-ManB thu được từ phương pháp phá vỡ tế bào *E. coli* tái tổ hợp sử dụng hạt thủy tinh. Các chữ cái a, b, c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng Fisher's LSD với $p < 0,05$.

3.4. Hình dạng của ống đựng

Để khảo sát ảnh hưởng của các loại ống đựng lên quá trình phá vỡ tế bào, hỗn hợp gồm dịch tế bào huyền phù và hạt thủy tinh (tỷ lệ hạt thủy tinh là 1,0 g/ml) đã được đựng trong các loại vật chứa khác nhau (ống eppendorf thể tích 1,5 ml; ống falcon thể tích 15 ml và ống falcon thể tích 50 ml). Quá trình phá vỡ tế bào được thực hiện bằng cách trượt ống đựng trên giá đỡ ống nghiệm trong tổng thời gian 8 phút. Kết quả ở hình 4 cho thấy, hoạt tính xúc tác của LysM3014-ManB tăng dần khi tăng thể tích của ống đựng, và đạt cao nhất (~66.000 U/l dịch lên men) trong trường hợp sử dụng ống falcon 50 ml, cao hơn khoảng 1,5 lần so với hoạt tính của ManB tự do ở nghiên cứu trước (~50.000 U/l dịch lên men). Điều này cho thấy, thể tích ống đựng lớn sẽ tăng không gian để hạt thủy tinh di chuyển và va đập vào tế bào hiệu quả hơn.



Hình 4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hình dạng ống đựng lên hoạt độ của LysM-ManB thu được từ phương pháp phá vỡ tế bào *E. coli* tái tổ hợp sử dụng hạt thủy tinh. Các chữ cái a, b thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng Fisher's LSD với $p < 0,05$.

4. Bàn luận

LysM (Lysin Motif) là các đoạn lặp lại có chiều dài thay đổi từ 40 đến 65 amino acid, có thể gắn vào peptidoglycan và chitin theo phương thức không cộng hóa trị [11]. Đặc điểm gắn này đã được ứng dụng để xây dựng hệ thống cố định protein trên bề mặt tế bào theo phương thức không biến đổi gen, trong đó các đoạn lai có chứa đoạn LysM được tổng hợp trong một tế bào vật chủ (ví dụ *E. coli* hay *L. lactis*), sau đó sự cố định các đoạn lai này được thực hiện trên một chủng tự nhiên khác như là *Lactobacillus*. Với mục tiêu phát triển hệ thống xúc tác toàn tế bào không biến đổi gen, trong nghiên cứu này, ManB lai với móc neo LysM3014 tạo thành đoạn protein lai LysM3014-ManB đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* và được thu nhận bằng các phương pháp phá vỡ tế bào khác nhau.

Trong nghiên cứu này, ba phương pháp phá vỡ tế bào (siêu âm, kết đông - rã đông và lắc với hạt thủy tinh) đã được sử dụng và so sánh. Về cơ bản, cả ba phương pháp đều đơn giản, dễ thực hiện, tuy nhiên, phương pháp siêu âm và kết đông - rã đông cần có thiết bị đắt tiền (như thiết bị siêu âm, thiết bị lạnh sâu), trong khi đó phương pháp phá vỡ tế bào bằng hạt thủy tinh trong nghiên cứu này không cần sử dụng máy phá tế bào Mini-Beadbeater [2] hay máy trộn [7] như các nghiên cứu trước, mà chỉ cần trượt ống chứa tế bào với hạt thủy tinh trên giá đỡ ống nghiệm. Do đó, xét về mặt kinh tế, phương pháp phá vỡ bằng hạt thủy tinh trong nghiên cứu này đơn giản, ít tốn kém nhất và có thể sử dụng thuận tiện trong mọi điều kiện nghiên cứu ở quy mô phòng thí nghiệm.

Khi xét về hiệu quả giải phóng protein, phương pháp phá vỡ tế bào *E. coli* với hạt thủy tinh giải phóng lượng protein tổng tương đương với phương pháp kết đông - rã đông, và thấp hơn 3 lần so với phương pháp siêu âm (9,7 mg/ml). Tuy nhiên, khi so sánh với nghiên cứu khác sử dụng siêu âm để phá vỡ tế bào *E. coli* thì nồng độ protein tạo ra bằng phương pháp phá vỡ với hạt thủy tinh trong nghiên cứu này cao hơn khoảng 1,5-2 lần [5]. Một nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng, phương pháp phá vỡ tế bào *E. coli* bằng hạt thủy tinh trong điều kiện tối ưu có thể giải phóng lượng protein (12 mg/ml) cao hơn trường hợp sử dụng phương pháp siêu âm (10 mg/ml) [8]. Điều này chỉ ra rằng, phương pháp phá vỡ tế bào bằng hạt thủy tinh có thể giải phóng lượng protein tương đối cao. Đặc biệt hơn nữa, hoạt độ thể tích và hoạt độ riêng của LysM3014-ManB trong dịch chiết thô thu nhận từ phương pháp phá vỡ bằng hạt thủy tinh đều đạt giá trị cao nhất (~66.000 U/l dịch lên men) và cao hơn 1,4 lần so với hoạt tính xúc tác của ManB tự do ở nghiên cứu trước [1]. Hoạt tính của LysM3014-ManB có thể còn tăng cao hơn nữa nếu quá trình phá vỡ bằng hạt thủy tinh được khảo sát

trong điều kiện tối ưu hóa. Điều này cho thấy, lực tạo ra do quá trình trượt ống đựng chứa hạt thủy tinh và tế bào trên giá đỡ đủ lớn để phá vỡ tế bào và đủ nhỏ để không làm ảnh hưởng đến trung tâm hoạt động của enzyme. Kết quả của nghiên cứu này cũng tương đồng với nghiên cứu của L. Benov và cs (2002) [7] khi chỉ ra rằng, phương pháp phá vỡ bằng hạt thủy tinh đưa ra lượng enzyme fumarase và aconitase có hoạt tính cao nhất so với phương pháp siêu âm và kết đông - rã đông. Chính vì những lý do trên, phương pháp phá vỡ tế bào *E. coli* bằng hạt thủy tinh được đánh giá là phương pháp hiệu quả nhất trong ba phương pháp.

5. Kết luận

Nghiên cứu đã mô tả quá trình thu nhận protein lai LysM3014-ManB từ tế bào *E. coli* một cách đơn giản, thuận tiện và hiệu quả bằng phương pháp phá vỡ tế bào với hạt thủy tinh. Enzyme lai có thể được sử dụng để tiếp tục nghiên cứu quá trình cố định ManB trên bề mặt tế bào *L. plantarum* thông qua móc neo chứa một vùng LysM.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.02-2019.339. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] C. Songsiririthigul, B. Buranabanyat, D. Haltrich, et al. (2010), "Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan licheniformis in *Escherichia coli*", *Microbial Cell Factories*, **9(20)**, DOI: 10.1186/1475-2859-9-20.

[2] O.M.D. Bruin, H.C. Birnboim (2016), "A method for assessing efficiency of bacterial cell disruption and DNA release", *BMC Microbiology*, **16(197)**, DOI: 10.1186/s12866-016-0815-3.

[3] T.A. Gomes, C.M. Zanette, M.R. Spier (2020), "An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery", *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **50(7)**, pp.635-654, DOI: 10.1080/10826068.2020.1728696.

[4] S.T.L. Harrison (1991), "Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products", *Biotechnology Advances*, **9(2)**, pp.217-240, DOI: 10.1016/0734-9750(91)90005-G.

[5] R.N. Ramanan, T.C. Ling, A.B. Ariff (2008), "The performance of a glass bead shaking technique for the disruption of *Escherichia coli* cells", *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **13**, pp.613-623, DOI: 10.1007/s12257-008-0047-y.

[6] B.H. Johnson, M.H. Hecht (1994), "Recombinant protein can be isolated by freeze and thaw cycle", *Nat. Biotechnol.*, **12(13)**, pp.1357-1360, DOI: 10.1038/nbt1294-1357.

[7] L. Benov, J.A. Ibraheem (2002), "Disrupting *Escherichia coli*: A comparison of methods", *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **35(4)**, pp.428-431, DOI: 10.5483/bmbrep.2002.35.4.428.

[8] R.S. Singh (2013), "A comparative study on cell disruption methods for release of aspartase from *Escherichia coli* K-12", *Indian Journal of Experimental Biology*, **51(11)**, pp.997-1003.

[9] M.L. Pham, A.M. Tran, S. Kittibunchakul, et al. (2019), "Immobilization of β -galactosidases on the lactobacillus cell surface using the peptidoglycan-binding motif LysM", *Catalysts*, **9(5)**, DOI: 10.3390/catal9050443.

[10] M.M. Bradford (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, **72**, pp.248-254, DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

[11] G. Buist, A. Steen, J. Kok, et al. (2008), "LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans", *Molecular Microbiology*, **68(4)**, pp.838-847, DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06211.x.