

TẠO DÒNG, BIỂU HIỆN VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH ENZYME CỦA EUGENOL OXIDASE (EUGO) TRONG *ESCHERICHIA COLI*

Phạm Thị Mỹ Bình, Lê Hải Yến, Trần Quốc Tuấn, Nguyễn Thị Hồng Thương✉

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nththuong@hcmus.edu.vn

Ngày nhận bài: 31.10.2018
Ngày nhận đăng: 20.02.2019

TÓM TẮT

Eugenol oxidase (EUGO) là enzyme thuộc họ enzyme vanillyl alcohol oxidase, có khả năng xúc tác phản ứng oxy hóa vanillyl alcohol thành vanillin – hương liệu tạo mùi vani được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm. EUGO đã được tạo dòng, biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* TOP10 và được tinh sạch bằng kỹ thuật sắc ký trao đổi anion Q-Sepharose nhưng độ tinh sạch thấp. Nhằm cải thiện hiệu suất quá trình tinh sạch EUGO, trong nghiên cứu này, chúng tôi tạo dòng và biểu hiện EUGO trong vi khuẩn *E. coli* Tunetta thông qua vector pET-28a. Kết quả phân tích sự biểu hiện protein trong tế bào *E. coli* mang gen EUGO ở một số điều kiện cảm ứng biểu hiện khác nhau cho thấy EUGO biểu hiện tốt ở pha tan khi được cảm ứng ở nhiệt độ 25°C với nồng độ IPTG 0,1 mM trong thời gian 6 giờ. Protein EUGO được tinh sạch bằng kỹ thuật sắc ký ái lực cố định ion Ni²⁺-NTA agarose và được khảo sát hoạt tính enzyme *in vitro*. Enzyme EUGO sau khi được tinh sạch có hoạt tính riêng cao hơn chế phẩm enzyme trước tinh sạch gần 4 lần. Đặc biệt là phương pháp tinh sạch dựa trên His-tag cho EUGO có độ tinh sạch cao hơn gấp 2,5 lần so với phương pháp tinh sạch Q-sepharose của nhóm nghiên cứu trước đây. Kết quả này cho thấy quá trình tinh sạch enzyme EUGO đã được cải thiện đáng kể.

Từ khóa: Eugenol oxidase, *E. coli*, pET-28a-EUGO, vanillin, sắc ký ái lực cố định ion

MỞ ĐẦU

Vanillin là một loại hương liệu có mùi vani được sử dụng trong các lĩnh vực khác nhau như thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm (Peretti *et al.*, 2017; Shyamala *et al.*, 2007). Vanillin có thể được chiết xuất từ hạt của cây hoa lan *Vani planifolia* hoặc được sản xuất bằng tổng hợp hóa học từ những nguyên liệu như lignin, eugenol... Tuy nhiên, nguồn cung cấp vanillin tự nhiên thì có giới hạn trong khi nguồn cung cấp thông qua tổng hợp hóa học lại có những nhược điểm như sử dụng nhiều hóa chất và dung môi độc hại trong quá trình tổng hợp đồng thời sản phẩm vanillin sinh ra có thể lẫn nhiều sản phẩm phụ không mong muốn dẫn đến chi phí tinh sạch cao (Walton *et al.*, 2000). Do đó, việc tổng hợp vanillin bằng phương pháp sinh học, chẳng hạn như sử dụng enzyme tái tổ hợp, có thể được xem là một giải pháp bổ sung hoặc thay thế để sản xuất vanillin đạt chất lượng, dễ thực hiện, ít chi phí và thân thiện với môi trường (Winter *et al.*, 2012).

Eugenol oxidase (EUGO) - enzyme được mã hóa bởi gene *eugo* có nguồn gốc từ chủng vi khuẩn *Rhodococcus Jostii* RHA1 (Nguyen *et al.*, 2016) thuộc họ vanillyl alcohol oxidase, có khả năng xúc tác phản ứng oxy hóa vanillyl alcohol thành vanillin (Fraaije *et al.*, 1998; Leferink *et al.*, 2008). Gene *eugo* đã được chèn vào vector pBAD/myc-HisA tạo ra plasmid pEUGOA. Enzyme EUGO đã được biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* TOP10 và được tinh sạch bằng kỹ thuật sắc ký trao đổi anion Q-Sepharose nhưng độ tinh sạch (thể hiện qua sự thay đổi hoạt tính riêng) của enzyme EUGO chỉ tăng 1,6 lần (Jin *et al.*, 2007; Winter *et al.*, 2012). Nhằm cải thiện hiệu suất quá trình thu hồi và độ tinh sạch của EUGO hướng đến sử dụng enzyme này trong tổng hợp vanillin, trong nghiên cứu này, chúng tôi tạo dòng trình tự mã hóa protein EUGO vào vector pET-28a và kiểm tra sự biểu hiện của EUGO trong chủng *E. coli* Tunetta (Taylor, 2012). Protein EUGO được tổng hợp ở dạng dung hợp với polyhistine (His)₆ được tinh sạch bằng kỹ thuật sắc ký ái lực cố định ion kim loại với cột Ni²⁺-NTA agarose và được khảo

sát hoạt tính enzyme *in vitro*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Plasmid pEUGOA mang trình tự *eugo* (1581 bp) mã hóa cho protein EUGO có nguồn gốc từ *Rhodococcus jostii* RHA1, hai đầu trình tự gene *eugo* có vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn *Hind*III và *Nde*I (Jin *et al.*, 2007). Vector pET-28a (Novagen) mang gene kháng kanamycin và trình tự gene mã hóa cho chuỗi oligopeptide gồm 6 histidine (6×His) hỗ trợ sự nhận biết và tinh sạch protein tái tổ hợp. Hai chủng vi khuẩn *E. coli* bao gồm *E. coli* TOP10 (Invitrogen) được sử dụng để nhân bản plasmid và *E. coli* Tunetta được dùng để biểu hiện protein mục tiêu (Taylor, 2012). Vanillin và vanillyl alcohol (Sigma) được sử dụng để xác định hoạt tính eugenol oxidase.

Phương pháp

Tạo dòng trình tự mã hóa eugenol oxidase (EUGO) vào vector pET28a

Plasmid pEUGOA được cắt với *Hind*III và *Nde*I và sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 1%. Phân đoạn *eugo* được cắt từ gel, tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) và chèn vào vector pET-28a đã được cắt mở vòng ở vị trí *Hind*III và *Nde*I để tạo thành plasmid pET-28a-EUGO. Hỗn hợp phản ứng nối được biến nạp vào tế bào khả nạp *E. coli* TOP10 và được trải trên đĩa LB có bổ sung kanamycin (50 µg/mL). Các thể biến nạp *E. coli* TOP10/pET-28a-EUGO được sàng lọc bằng phản ứng PCR khuôn lạc với môi RheUGO-F (bắt cặp đặc hiệu với trình tự gene mục tiêu) và môi T7 terminator (bắt cặp đặc hiệu với trình tự vector pET-28a). Khuẩn lạc cho kết quả PCR dương tính được lựa chọn để tách plasmid bằng GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific). Plasmid pET-28a-EUGO được kiểm tra kích thước bằng phản ứng cắt với enzyme cắt giới hạn *Hind*III và *Nde*I.

Kiểm tra sự biểu hiện của protein EUGO trong tế bào vi khuẩn *E. coli* Tunetta

Một khuẩn lạc đơn của chủng *E. coli* Tunetta mang plasmid pET-28a-EUGO được nuôi qua đêm ở 37°C trong 1 mL môi trường LB có bổ sung kanamycin (50 µg/mL) và chloramphenicol (34 µg/mL). Chuyển 0,1 mL dịch nuôi cấy trên vào 30 mL môi trường LB có chứa kanamycin và chloramphenicol, nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở 37°C cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6 – 0,8 thì bắt đầu cảm ứng

biểu hiện protein EUGO bằng IPTG với nồng độ cuối lần lượt là 0,25 mM và 0,1 mM ở 25°C trong 6 giờ và 16 giờ. Sau đó, phần sinh khối tế bào được thu nhận bằng cách ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút và được huyền phù lại trong đệm ly giải (Tris-Cl 50 mM, imidazole 10 mM, NaCl 300 mM, DTT 5 mM, glycerol 5%, pH 7,5). Tế bào được phá vỡ bằng sóng siêu âm trong điều kiện lạnh. Dịch tế bào ly giải chứa protein tổng số được ly tâm và phần dịch chứa protein tan được thu nhận. Dung dịch chứa protein tan được chia làm 2 phần: phần thứ nhất được sử dụng để kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp trong tế bào vi khuẩn *E. coli* Tunetta bằng điện di SDS-PAGE, phần thứ hai được sử dụng để tinh sạch protein tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực cố định ion và xác định hoạt tính enzyme *in vitro* của EUGO.

Tinh sạch protein EUGO tái tổ hợp có gắn đuôi His-tag bằng sắc ký ái lực cố định ion

100 µL dịch Ni²⁺-NTA agarose (Thermo Scientific) được ly tâm 13000 vòng/phút trong 2 phút ở 4°C. Phần resin lắng bên dưới được thu nhận và tái huyền phù trong 1 mL đệm ly giải (Lysis Buffer), hỗn hợp tạo thành được ly tâm 13000 vòng/phút trong 2 phút ở 4°C và phần dịch nổi được loại bỏ. Dịch protein tan được ủ với Ni²⁺-NTA agarose đã chuẩn bị ở bước trên trong 1 giờ ở 4°C. Hỗn hợp này được cho vào cột. Protein gắn với Ni²⁺-NTA agarose lưu lại trên cột được rửa với đệm rửa (Tris-Cl 50 mM, imidazole 20 mM, NaCl 300 mM, DTT 5 mM, glycerol 5%, pH 7,5). Dịch rửa giải được thu nhận để điện di kiểm tra có sự thất thoát protein mục tiêu trong quá trình rửa giải hay không. Sau đó, thôi giải protein mục tiêu với đệm thôi giải (Elution Buffer) (Tris-Cl 50 mM, imidazole 300 mM, NaCl 300 mM, DTT 5 mM, glycerol 5%, pH 7,5). Các phân đoạn protein thôi giải được trữ ở -20°C và được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE. Phân đoạn thôi giải có chứa protein mục tiêu được sử dụng để xác định hoạt tính enzyme *in vitro* của EUGO.

Xác định hoạt tính *in vitro* của EUGO

Hoạt tính của eugenol oxidase được xác định dựa trên sự oxy hóa cơ chất vanillyl alcohol thành sản phẩm là vanillin (Jin *et al.*, 2007). Thực hiện phản ứng như sau trong điều kiện tối: cho 3,56 mL vanillyl alcohol 0,5 mM (được pha trong đệm Tris-Cl 50 mM, pH 7,5) vào ống nghiệm và ủ ở 35°C trong 5 phút, sau đó bổ sung dịch enzyme (10 µL dịch enzyme thô hoặc 40 µL dịch enzyme tinh sạch), cuối cùng thêm dung dịch đệm Tris-Cl 50 mM (pH

7,5) cho đủ thể tích 3,6 mL và ủ hỗn hợp phản ứng ở 35°C trong 15 phút. Bổ sung 400 μ L NaOH 1 N, lắc đều và đo mật độ quang ở bước sóng 340 nm. Thực hiện đồng thời mẫu đối chứng với enzyme bất hoạt. Mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần. Hoạt độ eugenol oxidase (UI) được định nghĩa là số microgram (μ g) vanillin sinh ra do sự oxy hóa vanillyl alcohol bởi 1 mL dung dịch hay 1 mg hỗn hợp chứa eugenol oxidase trong 1 phút ở nhiệt độ 35°C, pH 7,5. Hàm lượng protein (μ g/mL) trong các mẫu enzyme thô và enzyme tinh sạch được xác định bằng phương pháp Bradford (Bradford, 1976).

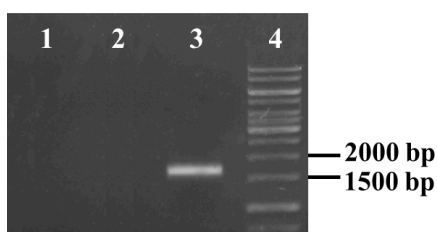
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo dòng trình tự mã hóa eugenol oxidase (EUGO) vào vector pET28a

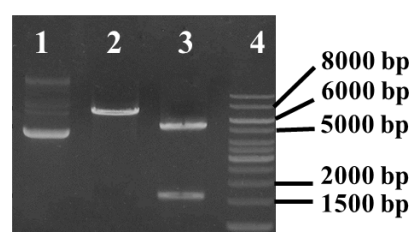
Đoạn trình tự *eugo* được thu nhận từ plasmid pEUGOA thông qua phản ứng cắt với *Hind*III và *Nde*I và được nối vào vector pET-28a đã cắt mở vòng với hai enzyme trên. Hỗn hợp phản ứng nối được biến nạp vào tế bào khả nạp *E. coli* TOP10. Kết quả sàng lọc dòng tế bào *E. coli* TOP10 mang plasmid pET-28a-EUGO bằng phản ứng PCR khuẩn lạc với môi trường RhEUGO-F và T7 terminator (Hình 1) cho thấy sản phẩm nhân bản ở phản ứng sử dụng

DNA khuẩn lạc làm khuôn cho ra một vạch băng có kích thước lớn hơn 1500 bp và nhỏ hơn 2000 bp khi so sánh với thang DNA chuẩn (Hình 1, giếng 4), tương ứng với kích thước dự đoán của sản phẩm nhân bản là 1685 bp (Hình 1, giếng 3). Trong khi đó không có sự xuất hiện của vạch sản phẩm ở vị trí này ở hai giếng đối chứng âm sử dụng nước cất hoặc plasmid pET28a thay cho DNA khuẩn lạc (Hình 1, giếng 1 và giếng 2).

Khuẩn lạc cho kết quả PCR dương tính được lựa chọn để tách plasmid pET-28a-EUGO. Kết quả kiểm tra kích thước của plasmid pET28a-EUGO bằng phản ứng cắt với *Hind*III hoặc với *Hind*III và *Nde*I (Hình 2) cho thấy sản phẩm cắt với *Hind*III cho một vạch nằm trong khoảng giữa hai vạch 6000 bp và 8000 bp khi so sánh với thang DNA chuẩn (Hình 2, giếng 4), tương ứng với kích thước dự đoán của plasmid pET-28a-EUGO là 6885 bp (Hình 2, giếng 2). Bên cạnh đó, sản phẩm cắt với *Hind*III và *Nde*I cho hai vạch: một vạch tương ứng với kích thước của đoạn trình tự *eugo* (1581 bp), vạch còn lại tương ứng với kích thước của vector pET-28a sau khi cắt (5304 bp) (Hình 2, giếng 3). Kết quả này cho thấy rằng đoạn trình tự *eugo* đã được tạo dòng thành công vào vector pET-28a tạo thành plasmid tái tổ hợp pET-28a-EUGO.



Hình 1. Phân tích sản phẩm PCR nhân bản gen EUGO trực tiếp từ khuẩn lạc *E. coli* TOP10 đã được biến nạp với sản phẩm nối tạo plasmid pET-28a-EUGO. 1 và 2. Đối chứng âm, 3. Sản phẩm PCR khuẩn lạc, 4. Thang DNA chuẩn 1kb.



Hình 2. Phân tích sản phẩm của phản ứng cắt plasmid pET-28a-EUGO bằng enzyme cắt giới hạn. 1. Plasmid pET-28a-EUGO, 2. Sản phẩm phản ứng cắt plasmid pET-28a-EUGO với *Hind*III, 3. Sản phẩm phản ứng cắt plasmid pET-28a-EUGO với *Hind*III và *Nde*I, 4. Thang DNA chuẩn 1kb

Sự biểu hiện của protein EUGO trong *E. coli* Tunetta

Để kiểm tra sự biểu hiện của protein EUGO trong *E. coli* Tunetta, tế bào *E. coli* Tunetta/pET-28a-EUGO được nuôi cấy ở 25°C và cảm ứng với IPTG 0,25 mM trong 6 giờ và 16 giờ. Protein tổng số và protein tan được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE. Kết quả mô tả ở Hình 3 cho thấy các mẫu protein tổng số (Hình 3, giếng 3 và giếng 6 tính từ trái qua) và protein tan (Hình 3, giếng 4 và giếng 7

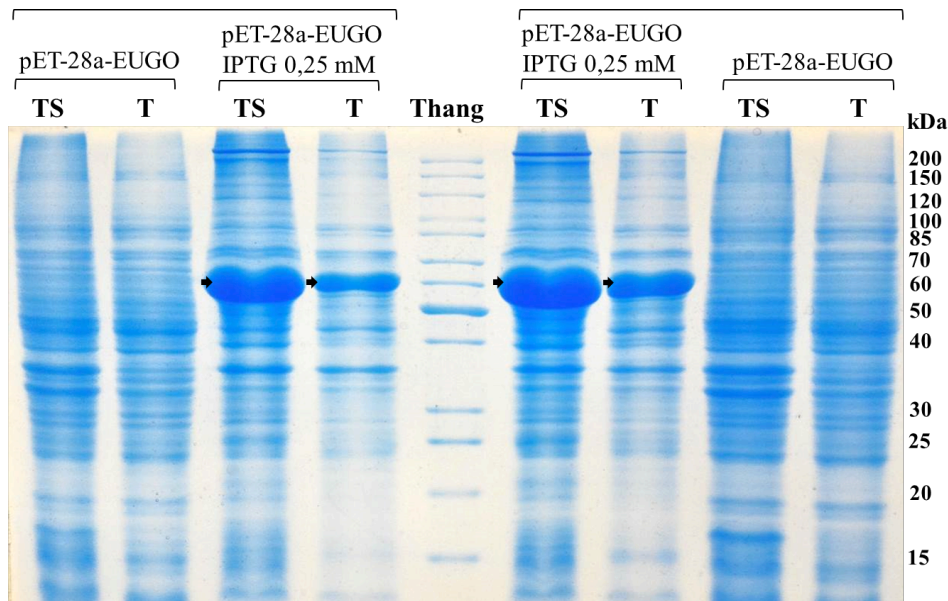
tính từ trái qua) từ chủng *E. coli* Tunetta/pET-28a-EUGO được cảm ứng IPTG đều có xuất hiện một vạch tương ứng kích thước dự đoán của protein EUGO là 61,4 kDa khi được so sánh với thang protein chuẩn (Hình 3, giếng 5 tính từ trái qua). Trong khi đó, các mẫu protein tổng số (Hình 3, giếng 1 và giếng 8) và protein tan (Hình 3, giếng 2 và giếng 9 tính từ trái qua) được thu nhận từ chủng *E. coli* Tunetta mang vector pET-28a-EUGO không cảm ứng IPTG không cho vạch có kích thước tương tự. Khi tăng thời gian cảm ứng từ 6 giờ lên 16 giờ,

mức độ biểu hiện của protein EUGO chỉ tăng khoảng 1,2 lần, trong đó protein EUGO ở dạng tan vẫn chiếm một tỷ lệ tương tự (khoảng 25% protein tổng số) như khi được biểu hiện cảm ứng trong 6 giờ. Do vậy, chúng tôi chọn thời gian nuôi cấy cảm ứng trong 6 giờ ở nhiệt độ 25°C để tiến hành các khảo sát tiếp theo nhằm cải thiện hiệu suất thu nhận protein EUGO ở dạng tan.

Sự biểu hiện của protein EUGO được mô tả ở Hình 3 cho thấy mặc dù lượng mẫu được dùng để điện di là nhiều gấp đôi nhưng cường độ sáng của vạch protein EUGO ở các mẫu protein hòa tan (Hình 3, giếng 4 và giếng 7 tính từ trái qua) vẫn thấp hơn nhiều so với của vạch protein tương ứng ở mẫu protein tổng số (Hình 3, giếng 3 và giếng 6 tính từ trái qua), hay nói cách khác là vẫn còn một lượng lớn protein EUGO được biểu hiện ở dạng không tan (chiếm khoảng 75% EUGO trong mẫu protein tổng số), mà khả năng là do protein EUGO đã được biểu hiện quá mức, làm xuất hiện tương tác kỵ nước giữa các phân tử chưa kịp gấp nếp dẫn đến làm sai lệch quá trình hình thành cấu trúc không gian tự nhiên của protein EUGO và làm các protein dính vào nhau

tạo protein thể vùi. Do đó, chúng tôi tiếp tục khảo sát sự biểu hiện protein EUGO ở nồng độ chất cảm ứng IPTG thấp hơn (0,1 mM) để đánh giá liệu sự thay đổi này có giúp cải thiện khả năng tan của protein EUGO được biểu hiện trong chủng vi khuẩn *E. coli* Tunnetta/pET28a-EUGO ở điều kiện nhiệt độ và thời gian cảm ứng trên.

Kết quả điện di SDS-PAGE được mô tả ở Hình 4 cho thấy cường độ sáng của vạch protein EUGO có trong 8 µL mẫu protein hòa tan (Hình 4, giếng 1 tính từ trái qua) tương đương với của vạch protein mục tiêu có trong 4 µL mẫu protein tổng số (Hình 4, giếng 2 tính từ trái qua), chứng tỏ khi giảm nồng độ chất cảm ứng IPTG từ 0,25 mM xuống 0,1 mM tỷ lệ protein EUGO biểu hiện ở dạng hòa tan đã tăng lên (từ 25% lên 50% lượng EUGO trong mẫu protein tổng số). Như vậy, việc giảm nồng độ của chất cảm ứng IPTG đã góp phần cải thiện tính tan của protein EUGO. Do đó, điều kiện nuôi cấy cảm ứng ở 25°C trong 6 giờ với IPTG 0,1 mM được lựa chọn để nuôi cấy biểu hiện protein EUGO cho thí nghiệm tinh sạch protein EUGO tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực cố định ion kim loại.



Hình 3. Kiểm tra sự biểu hiện của protein EUGO trong *E. coli* Tunnetta/pET-28a-EUGO khi được cảm ứng với IPTG 0,25 mM ở 25°C trong 6 giờ và 16 giờ (TS: 4 µL dịch protein tổng số; T: 8 µL dịch protein tan). Mũi tên chỉ protein EUGO.

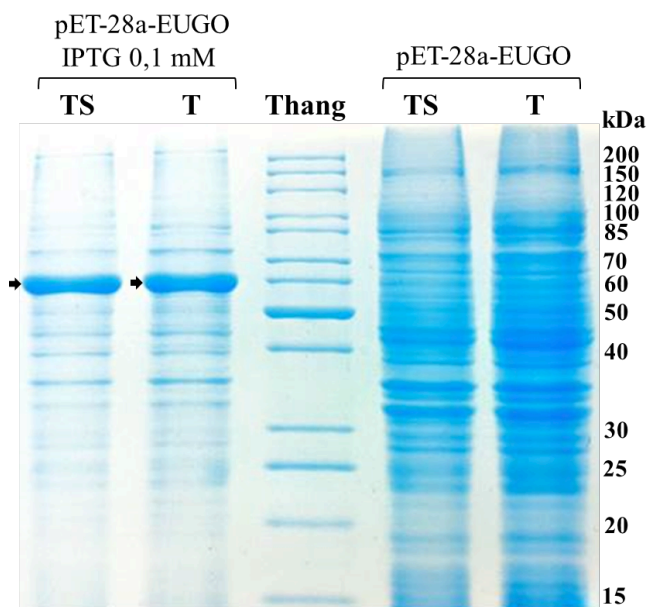
Tinh sạch và khảo sát hoạt tính xúc tác *in vitro* của enzyme EUGO

Protein hòa tan được thu nhận từ dịch nuôi cấy tế bào vi khuẩn *E. coli* Tunnetta/pET-28a-EUGO

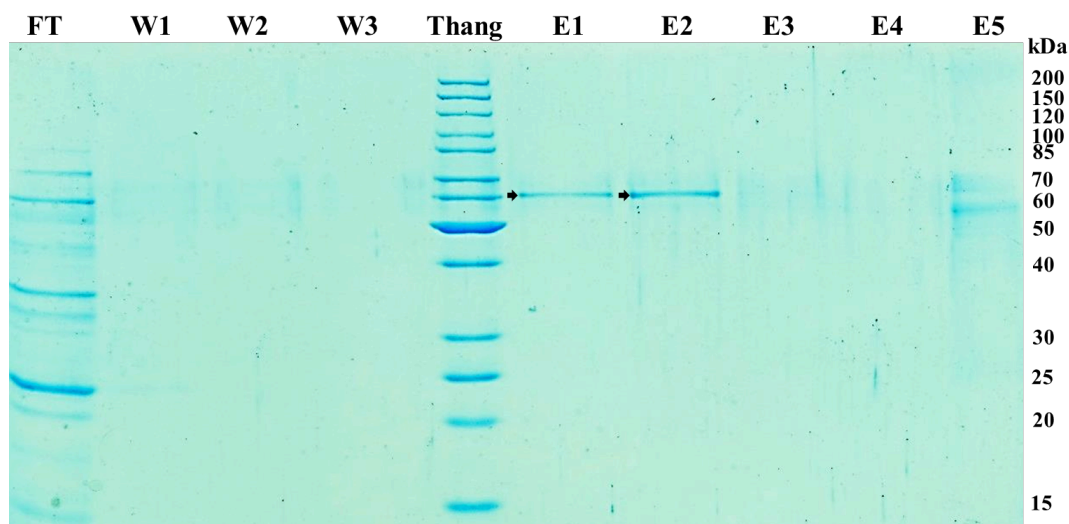
sau 6 giờ cảm ứng với IPTG 0,1 mM ở 25°C được tinh sạch như mô tả trong phần Vật liệu và Phương pháp. Dịch qua cột, các phân đoạn rửa giải và các phân đoạn thổi giải trong quá trình tinh sạch được điện di SDS-PAGE. Kết quả ở Hình 5 cho thấy ở

phân đoạn thôi giải E1 và E2 (Hình 5, giếng 6 và giếng 7 tính từ trái qua) có sự hiện diện của vạch protein nằm trên vạch 60 kDa khi so sánh với thang protein chuẩn và tương ứng với khối lượng phân tử dự đoán của protein tái tổ hợp EUGO là 61,4 kDa. Ở các giếng tương ứng với phân đoạn thôi giải tiếp theo bao gồm E3, E4 và E5 (Hình 5, giếng 8, giếng

9 và giếng 10 tính từ trái qua) không thấy xuất hiện vạch có kích thước được dự đoán tương ứng với protein mục tiêu. Điều này chứng tỏ protein EUGO đã được thôi giải ra khỏi cột hoàn toàn. Phân đoạn E1 và E2 được gộp lại thành một dung dịch protein tinh sạch duy nhất sử dụng để xác định hoạt tính enzyme *in vitro*.



Hình 4. Kiểm tra sự biểu hiện của protein EUGO trong *E. coli* Tunetta/pET-28a-EUGO khi được cảm ứng với IPTG 0,1 mM ở 25°C trong 6 giờ (TS: 4 μ L dịch protein tổng số; T: 8 μ L dịch protein tan). Mũi tên chỉ protein EUGO.



Hình 5. Điện di SDS-PAGE các phân đoạn tinh sạch protein enzyme EUGO bằng sắc ký ái lực Ni^{2+} -NTA agarose. FT: dịch của cột; W1-3: phân đoạn rửa 1-3; E1-5: phân đoạn thôi giải 1-5. Mũi tên chỉ protein EUGO.

Kết quả xác định hoạt tính enzyme *in vitro* của dịch protein tinh sạch (enzyme tinh sạch) và

của dịch enzyme thô (dịch protein ở pha tan) được mô tả ở bảng 1 cho thấy hiệu suất thu hồi

hàm lượng protein là 13,6%, hiệu suất thu hồi hoạt tính enzyme khoảng 53,7% và độ tinh sạch của enzyme tăng gấp 3,96 lần. Điều này cho thấy quá trình tinh sạch protein EUGO đã loại được nhiều protein tạp.

Như vậy, độ tinh sạch (purification fold) của enzyme EUGO đạt được thông qua quy trình tinh sạch

dựa trên His-tag trong nghiên cứu này cao gấp 2,5 lần (= 3,96/1,6) so với quy trình tinh sạch bằng sắc kí trao đổi ion Q-Sepharose được thực hiện bởi Winter và cộng sự (2012). Điều đó cho thấy chúng tôi đã bước đầu thành công trong việc cải thiện quá trình tinh sạch enzyme EUGO thông qua việc sử dụng kĩ thuật sắc kí ái lực cố định ion Ni²⁺-NTA agarose.

Bảng 1. Hàm lượng, hoạt tính và độ tinh sạch của enzyme EUGO.

Thành phần	Tổng hàm lượng (mg)	Tổng hoạt tính (UI)	Hoạt tính riêng (UI/mg)	Độ tinh sạch
Enzyme thô	0,106	27,55	259,06	1
Enzyme tinh sạch	0,014	14,78	1026,67	3,96

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện vượt mức protein EUGO trong *E. coli* Tunetta ở một số điều kiện cảm ứng khác nhau về thời gian và nồng độ chất cảm ứng. Kết quả khảo sát cho thấy rằng protein EUGO biểu hiện hầu hết ở pha tan và có hoạt tính khi được cảm ứng bởi IPTG 0,1 mM ở 25°C trong 6 giờ. Enzyme EUGO được tinh sạch bằng kỹ thuật sắc kí ái lực cố định ion Ni²⁺-NTA agarose có độ tinh sạch gần 4 lần. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở để chúng tôi có thể tiến hành những nghiên cứu tiếp theo với mong muốn tối ưu hóa quá trình tinh sạch enzyme EUGO và ứng dụng enzyme này trong sản xuất vanillin.

Lời cảm ơn: Cảm ơn giáo sư Marco W. Fraaije, Đại học Groningen, Hà Lan đã gửi tặng plasmid *pEUGOA* được sử dụng trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Fraaije MW, van Berkel WJ, Benen JAE, Visser J, Mattevi A (1998) A novel oxidoreductase family sharing a conserved FAD-binding domain. *Trends Biochem Sci* 23(6): 206-207. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01210-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01210-9)

Jin J, Mazon H, Van Den Heuvel RHH, Janssen DB, Fraaije MW (2007) Discovery of a eugenol oxidase from *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *FEBS J.*

<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05767.x>

Leferink NGH, Heuts DPHM, Fraaije MW, van Berkel WJH (2008) The growing VAO flavoprotein family. In *Arch Biochem Biophys.* <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.027>

Nguyen QT, de Gonzalo G, Binda C, Rioz-Martínez A, Mattevi A, Fraaije MW (2016) Biocatalytic Properties and Structural Analysis of Eugenol Oxidase from *Rhodococcus jostii* RHA1: A Versatile Oxidative Biocatalyst. *ChemBioChem* 17(14): 1359-1366. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600148>

Peretti AL, Antunes JS, Lovison K, Kunz, RI, Castor LRG, Brancalhão RMC, Bertolini GRF, Ribeiro L de FC (2017) Action of vanillin (*Vanilla planifolia*) on the morphology of tibialis anterior and soleus muscles after nerve injury. *Einstein (São Paulo)*, 15(2): 186-191. <https://doi.org/10.1590/s1679-45082017ao3967>

Shyamala BN, Madhava Naidu M, Sulochanamma G, Srinivas P (2007) Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through in vitro models. *J Agricult Food Chem* 55(19), 7738-7743. <https://doi.org/10.1021/jf071349+>

Taylor VL (2012) *The activities of herbicide safeners in wheat (Triticum aestivum L)* [Durham University, England]. <http://etheses.dur.ac.uk/3926/>

Walton NJ, Narbad A, Faulds CB, Williamson G (2000) Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. In *Curr Opin Biotechnol.* [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00125-7](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00125-7)

Winter RT, van Beek HL, Fraaije MW (2012) The Nose Knows: Biotechnological Production of Vanillin. *J Chem Education* 89(2): 258-261. <https://doi.org/10.1021/ed200271u>

CLONING, EXPRESSION AND ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT EUGENOL OXIDASE (EUGO) IN *ESCHERICHIA COLI*

Pham Thi My Binh, Le Hai Yen, Tran Quoc Tuan, Nguyen Thi Hong Thuong

University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh City

SUMMARY

Eugenol oxidase (EUGO), a member of the vanillyl alcohol oxidase family, catalyzes the oxidative reaction of vanillyl alcohol to vanillin. This compound is responsible for the vanilla aroma and is widely used as a flavoring agent in food, cosmetics, and pharmaceuticals. Previously, EUGO was cloned and expressed in *E. coli* TOP10, and purified by anion-exchange chromatography with Q-Sepharose resin but the purification factor was low. To improve the efficiency of the EUGO purification, in this study, we cloned *eugo* gene into pET-28a vector and expressed it in *E. coli* Tunetta. The SDS-PAGE analysis of protein extracts obtained from *E. coli* expressing EUGO under different induction conditions showed that EUGO was expressed mostly in the soluble fraction at 6 hours after induction with 0.1 mM IPTG at 25°C. EUGO was purified by immobilized-metal affinity chromatography with Ni²⁺-NTA agarose and the *in vitro* enzymatic activity was characterized. The specific activity of purified EUGO was nearly 4-fold higher than that of the crude enzyme sample. In particular, the enzyme preparation produced by the purification method based on Ni-NTA affinity in this study was 2,5-fold more pure than that produced by Q-sepharose purification method described previously.

Keywords: Eugenol oxidase, *E. coli*, pET-28a-EUGO, vanillin, immobilized-metal affinity chromatography