

## NÂNG CAO HIỆU QUẢ BIỂU HIỆN $\beta$ -GLUCOSIDASE TÁI TỔ HỢP TỪ TRÌNH TỰ GEN TRONG CƠ SỞ DỮ LIỆU METAGENOMIC SUỐI NƯỚC NÓNG BÌNH CHÂU

Trần Thanh Thủy, Lại Thị Hồng Nhung, Lê Thị Thanh Xuân, Nguyễn Kim Thoa<sup>✉</sup>

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>✉</sup> Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nkthoa@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 12.02.2019

Ngày nhận đăng: 17.9.2019

### TÓM TẮT

Sản phẩm trao đổi chất của các vi sinh vật trong các hệ sinh thái địa nhiệt thường có tính chất đặc biệt, giúp cho vi sinh vật có thể tồn tại, sinh trưởng và phát triển trong môi trường cực trị. Để khai thác nguồn gen vi sinh vật từ các hệ sinh thái đặc biệt này, cần phải có cách tiếp cận mới mà không thông qua nuôi cấy. Cùng với sự phát triển của kỹ thuật metagenomic theo hướng giải trình tự gen thế hệ mới và các phần mềm tin sinh học, các nhà nghiên cứu đã dần dần tiếp cận được với các gen mới của vi sinh vật trực tiếp từ hệ gen môi trường. Trong nghiên cứu này, trình tự ORF mã số [denovogenes] 32768 mã hóa cho  $\beta$ -glucosidase được khai thác từ dữ liệu DNA metagenome suối nước nóng Bình Châu được lựa chọn để biểu hiện trong vector pET17b do có độ tương đồng amino acid thấp với các enzyme trong GenBank, có chỉ số kiểm tính và Tm cao. Nhằm nâng cao hiệu quả biểu hiện, một số điều kiện (chủng chủ, môi trường, nồng độ IPTG, độ thông khí...) cũng đã được khảo sát. Kết quả cho thấy chủng *E. coli* C43(DE3) tái tổ hợp đạt lượng sinh khối khô cực đại 8,26 g/L, biểu hiện hoạt tính  $\beta$ -glucosidase tốt nhất 0,34 U/mL sau 42-48 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, trên môi trường TB trong điều kiện lắc với thể tích dịch nuôi cấy chiếm 20% thể tích bình nuôi, nồng độ IPTG cảm ứng là 0,25mM. Kết quả nghiên cứu này không chỉ góp phần khẳng định hiệu quả của việc khai thác trực tiếp gen mới mã hóa cho các enzyme từ DNA metagenome vi sinh vật suối nước nóng Việt Nam mà còn là cơ sở để nghiên cứu và sản xuất các enzyme tái tổ hợp đáp ứng nhu cầu chuyên hóa sinh khối.

**Từ khóa:** Biểu hiện gen, DNA metagenome, *E. coli* C43(DE3),  $\beta$ -glucosidase, enzyme tái tổ hợp, suối nước nóng Bình Châu.

### MỞ ĐẦU

Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21) là nhóm enzyme thủy phân mối liên kết glycoside trong phân tử carbohydrate để giải phóng các gốc glycosyl không khử, glycoside và oligosaccharide. Nhóm enzyme này có mặt trong hầu hết các cơ thể sống bao gồm vi khuẩn, cổ khuẩn, eukaryote, đóng nhiều vai trò quan trọng trong các quá trình trao đổi chất, ví dụ như chuyển hóa sinh khối ở vi sinh vật, phân giải glycolipid, quá trình hóa gỗ ở thực vật, hoạt hóa phytohormone, kiểm soát sinh học kháng các loài gây hại ... (Singh *et al.*, 2016). Beta-glucosidase cũng đóng vai trò quan trọng trong điều trị bệnh Gaucher (Butters, 2007). Trong đó,  $\beta$ -glucosidase vẫn được sử dụng nhiều nhất trong phức hệ cellulase, là enzyme xúc tác bước cuối cùng trong quá trình thủy phân cellulose.

Để thu nhận và nâng cao hoạt tính enzyme, một số phương pháp như biểu hiện các gen mã hóa  $\beta$ -glucosidase từ các nguồn khác nhau đã được công bố (Byeon *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2014). Việc tìm kiếm chủng chủ phù hợp để sản xuất lượng lớn enzyme là một trong những mối quan tâm hàng đầu. Các chủng chủ từ nấm men *Pichia pastoris*, *Trichoderma reesei* đến các chủng *E. coli* đều được sử dụng cho mục đích này (Harhangi *et al.*, 2002; Murray *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2014). Trong đó, các chủng chủ *E. coli* vẫn giữ được ưu thế do tốc độ sinh trưởng nhanh, mật độ tế bào lớn, điều kiện nuôi cấy đơn giản, rẻ tiền và quá trình biến nạp DNA ngoại lai vào tế bào chủ nhanh và hiệu quả (Rosano, Ceccarelli, 2014). Các kỹ thuật và phương pháp nhằm nâng cao hiệu quả biểu hiện protein tái tổ hợp ở tế bào *E. coli* ngày càng được cải tiến. Các điều kiện nuôi cấy như thành phần môi trường, nhiệt độ biểu hiện, độ thông khí, nồng độ chất cảm ứng... cũng

là những yếu tố góp phần làm tăng hoạt tính của enzyme tái tổ hợp.

Việc sử dụng thành công các chủng *E. coli* trong tách dòng và biểu hiện các gen của vi sinh vật không thông qua nuôi cấy càng làm tăng ưu thế của hệ thống này. Theo ước tính, khoảng 18% các gen mã hóa cellulase ưa nhiệt được phát hiện và thu nhận thông qua kỹ thuật metagenomic (Escuder-Rodríguez *et al.*, 2018). Nhiều  $\beta$ -glucosidase đã được sàng lọc, xác định trình tự, tách dòng và biểu hiện thành công trong *E. coli* (Kim *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; Schröder *et al.*, 2014; Ramirez-Escudero *et al.*, 2016). Tuy nhiên các nghiên cứu tương tự để tìm kiếm  $\beta$ -glucosidase bền nhiệt mới từ DNA metagenome suối nước nóng còn ít được công bố ngoại trừ nghiên cứu của Schröder *et al.*, (2014). Trong nghiên cứu này, trình tự khung đọc mã hóa cho  $\beta$ -glucosidase (mã số [denovogenes]\_32768) đã được lựa chọn từ cơ sở dữ liệu DNA metagenome suối nước nóng Bình Châu để biểu hiện trong *E. coli* bằng hệ vector pET17b (Novagen). Nhằm nâng cao hiệu suất biểu hiện enzyme tái tổ hợp, các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện gen [denovogenes]\_32768 đã được khảo sát. Kết quả thu được là một minh chứng cho tiềm năng thu nhận enzyme tái tổ hợp trực tiếp không thông qua nuôi cấy.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu

Các chủng *E. coli* tái tổ hợp mang vector pET17b có gắn đoạn ORF của trình tự gen [denovogenes]\_32768 được dùng để nghiên cứu biểu hiện  $\beta$ -glucosidase; p-nitrophenol và p-nitrophenyl- $\beta$ -glucopyranoside (pNPG) (Sigma Aldrich) được sử dụng làm chất chuẩn và cơ chất cho thử hoạt tính của  $\beta$ -glucosidase. Các hoá chất khác được sử dụng: cao nấm men, bacto tryptone, glycerol, IPTG (Merck), ... đều có độ tinh khiết, đảm bảo cho quá trình thực nghiệm.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Dự đoán tính chất enzyme

Sử dụng phần mềm Tm Index ở địa chỉ <http://tm.life.nthu.edu.tw/> (Ku *et al.*, 2009) để dự đoán tính chịu nhiệt và phần mềm Acalpred (<http://lin.uestc.edu.cn/server/AcalPred>) để dự đoán tính chịu kiềm, acid của protein.

#### Biểu hiện gen [denovogenes]\_32768

Các chủng *E. coli* có mang plasmid pET17b\_32768 được nhân giống trong môi trường

LB lỏng + ampicillin (100  $\mu$ g/ml) ở 37°C, 200 rpm từ 16-18 giờ. Giống được chuyển sang bình tam giác 500 ml có chứa 100 ml môi trường biểu hiện + ampicillin (100  $\mu$ g/ml) với tỷ lệ 1% (v/v). Lắc bình ở điều kiện 200 rpm, 37°C cho đến khi OD<sub>600</sub> của dịch nuôi cấy đạt 0,6-0,8, bổ sung 1 mM IPTG và tiếp tục nuôi lắc 200 rpm trong 48 giờ ở 30°C. Dịch nuôi cấy được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút để loại dịch nổi, thu tế bào. Bảo quản tế bào ở -20°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

+ Xác định trọng lượng sinh khối khô: Sấy sinh khối tươi ở 105°C đến trọng lượng không đổi để xác định trọng lượng sinh khối khô.

+ Thu nhận enzyme thô: Sinh khối tươi được rửa và hòa lại vào trong dung dịch đệm phá tế bào (Tris/HCl 50 mM, pH 8,5; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM; DTE 0,1 mM và PMSF 1 mM) trước khi phá vỡ bằng siêu âm để thu dịch enzyme thô.

+ Xác định hoạt độ  $\beta$ -glucosidase: Hoạt độ  $\beta$ -glucosidase được xác định theo phương pháp của Lu *et al.*, (2013) cải tiến sử dụng p-NPG là cơ chất. Cụ thể: 0,5 mL enzyme được thêm vào 1 mL dung dịch đệm Tris/Cl 50 mM, pH 8,5. Bổ sung 0,5 ml dung dịch p-NPG 20 mM. Phản ứng được thực hiện ở 55°C trong 15 phút trước khi bổ sung 2 ml dung dịch Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 mM để dừng phản ứng. Lượng p-NP giải phóng ra được xác định bằng mức độ hấp thụ ở bước sóng 400 nm. Một đơn vị hoạt tính enzyme được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết xúc tác phản ứng để giải phóng ra 1  $\mu$ mol p-NP từ p-NPG trong thời gian một phút ở điều kiện phản ứng.

+ Ảnh hưởng của các yếu tố đến hiệu suất biểu hiện  $\beta$ -glucosidase

Lựa chọn chủng chủ biểu hiện: Hai dòng tế bào *E. coli* C43(DE3) (Lucigen) và *E. coli* JM109 (DE3) (Promega) được sử dụng làm chủng chủ để biểu hiện  $\beta$ -glucosidase tái tổ hợp. Plasmid pET17b\_32768 được biến nạp vào 2 dòng tế bào khả biến bằng phương pháp xung điện. Các tế bào *E. coli* tái tổ hợp được nuôi cấy và xác định trọng lượng sinh khối cũng như hoạt tính của enzyme dung hợp.

Lựa chọn môi trường biểu hiện: Chủng *E. coli* C43(DE3) tái tổ hợp mang vector pET17b\_32768 được nhân giống trên môi trường LB trước khi chuyển sang biểu hiện trên 3 loại môi trường NB, LB và TB. Hiệu suất biểu hiện được đánh giá thông qua trọng lượng sinh khối và hoạt tính của enzyme dung hợp.

Độ thoáng khí: Giống khởi động của chủng tái tổ

hợp *E. coli* C43(DE3) được chuyển vào các bình tam giác (thể tích 500 mL) chứa môi trường TB với các thể tích khác nhau 50-300 mL (tương ứng 10-60% thể tích bình). Quá trình biểu hiện được thực hiện ở 30°C, 200 rpm trong 48 giờ. Hiệu suất biểu hiện được đánh giá thông qua trọng lượng sinh khối và hoạt tính của enzyme dung hợp.

**Nồng độ IPTG:** Nuôi cấy chủng tái tổ hợp *E. coli* C43(DE3) trên môi trường TB cho đến khi OD<sub>600</sub> đạt 0,6-0,8, bổ sung IPTG với các nồng độ 0,25-1,5 mM. Hiệu suất biểu hiện được đánh giá thông qua trọng lượng sinh khối và hoạt tính của enzyme dung hợp.

**Động thái sinh trưởng và biểu hiện  $\beta$ -glucosidase:** Chủng *E. coli* C43(DE3) tái tổ hợp được nuôi trong bình tam giác (500 ml) có chứa 100 ml môi trường TB. Quá trình biểu hiện được thực hiện sau khi cảm ứng 0,25 mM IPTG, 30°C, 200 rpm. Trọng lượng sinh khối khô và hoạt tính của enzyme dung hợp của các mẫu được xác định cách nhau 6 tiếng trong 48 giờ. Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần để tính giá trị sai số chuẩn.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Dự đoán tính chất enzyme

Trong số các ORF mã hóa cho  $\beta$ -glucosidase, ORF [denovogenes]\_32768 đã được lựa chọn do có trình tự amino acid tương đồng 76,11% với  $\beta$ -glucosidase có mã số A2392\_03130 từ vi khuẩn *Candidatus kaiserbacteria* RIFOXYB1\_FULL\_46\_14 và 53,94% với  $\beta$ -glucosidase A của vi khuẩn *Parcubacteria* sp GW2011\_GWF2\_44\_8. Hơn nữa, ORF này có chỉ số kiểm đạt 0,83 và Tm 0,92. Do đó, protein được dự đoán có tính chất kiềm và có nhiệt độ hoạt động tối ưu trong khoảng 55°C - 65°C. Trình tự ORF [denovogenes]\_32768 đã được đăng ký trên GenBank với mã số QAU55422, có chiều dài 1224 nucleotide, mã hóa cho 407 amino acid. Trình tự nucleotide này đã được tổng hợp nhân tạo và gắn vào hệ vector pET17b (Novagen) để nghiên cứu biểu hiện protein tái tổ hợp.

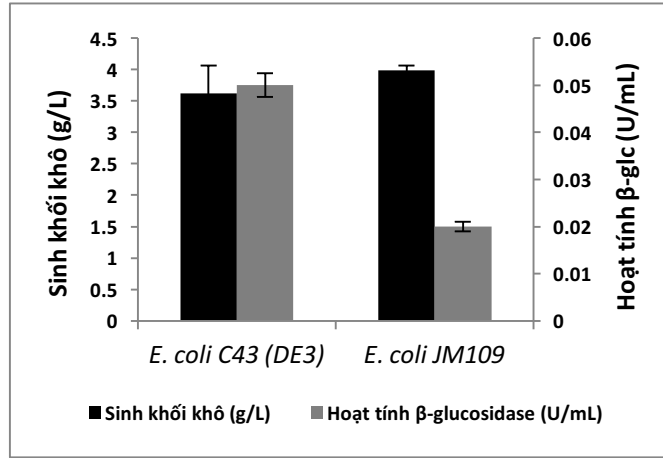
### Lựa chọn chủng chủ biểu hiện $\beta$ -glucosidase tái tổ hợp

Để sản xuất  $\beta$ -glucosidase tái tổ hợp, một trong những mối quan tâm đầu tiên phải kể đến đó là lựa chọn được chủng chủ phù hợp. Plasmid pET17b\_32768 được biến nạp vào hai dòng tế bào *E. coli* C43(DE3) và *E. coli* JM109(DE3). Sau 48 giờ

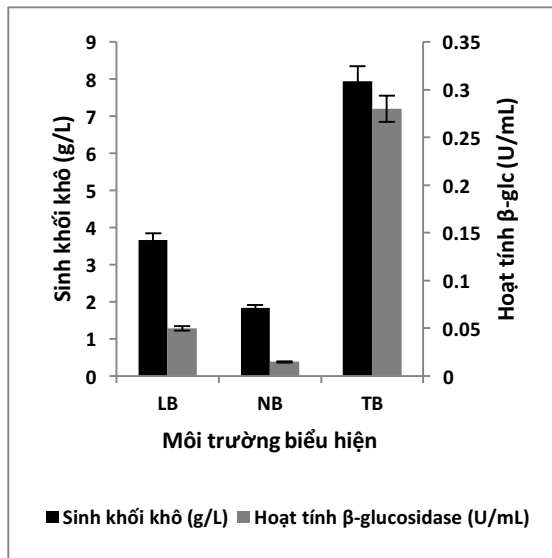
cảm ứng khả năng sinh trưởng của hai chủng tái tổ hợp tương đương nhau, tuy nhiên hoạt tính  $\beta$ -glucosidase của chủng *E. coli* C43(DE3) (0,05 U/mL) cao hơn 2,5 lần so với enzyme của chủng *E. coli* JM109(DE3) (0,02 U/mL) (Hình 1). Như vậy có thể thấy enzyme tái tổ hợp đã được biểu hiện ở dạng tan. Chủng *E. coli* C43(DE3) được Miroux và Walker (1996) phát triển từ quá trình sàng lọc các biến chủng của dòng *E. coli* BL21(DE3) để biểu hiện vượt ngưỡng các protein màng. Ưu điểm của dòng *E. coli* C43(DE3) so với dòng gốc *E. coli* BL21(DE3) ở chỗ hạn chế tỷ lệ chết của tế bào khi biểu hiện quá mức protein dung hợp do đã được đột biến tại hai điểm trên vùng -10 của promoter *lacUV5*. Trong khi đó, dòng tế bào *E. coli* JM109(DE3) là chủng được dùng chủ yếu trong các chiến lược tách dòng gen. Từ kết quả nghiên cứu trên, chủng tái tổ hợp *E. coli* C43(DE3) mang pET17b\_32768 được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

### Lựa chọn môi trường biểu hiện $\beta$ -glucosidase tái tổ hợp

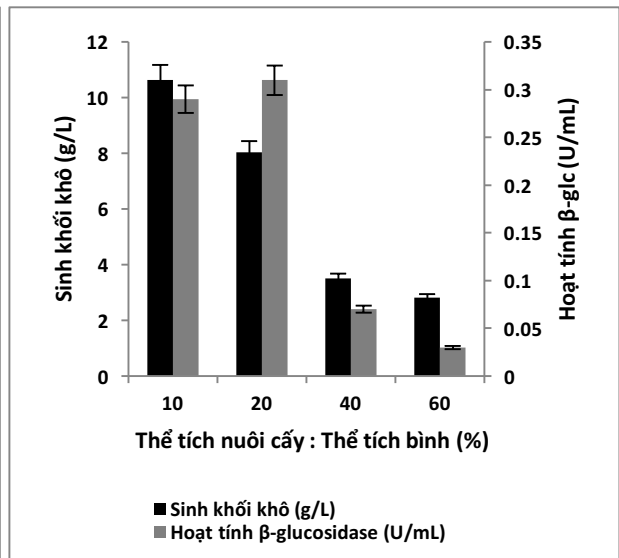
Để biểu hiện  $\beta$ -glucosidase, chủng tái tổ hợp *E. coli* C43(DE3) mang vector pET17b\_32768 được nuôi trên các môi trường NB, LB và TB. Sau 48 giờ biểu hiện ở 30°C, môi trường TB là môi trường cho sinh trưởng và biểu hiện hoạt tính enzyme tốt nhất (7,95 g/L và 0,28 U/mL), kế sau là môi trường LB và cuối cùng là môi trường NB (Hình 2). Kết quả này cũng tương tự như các công bố quốc tế khi nghiên cứu quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp protein tái tổ hợp bằng hệ thống *E. coli* (Sezonov *et al.*, 2007; Studier, 2005; 2014). Môi trường NB và LB được sử dụng phổ biến nhất để nuôi cấy *E. coli* do chứa các thành phần dinh dưỡng dễ hấp thụ ở giai đoạn tăng sinh sớm. Tuy nhiên, các môi trường này không phải là lựa chọn tốt nhất để biểu hiện các protein dung hợp vì chứa rất ít carbohydrate và các ion kim loại hóa trị II (Sezonov *et al.*, 2007). Trong khi đó, thành phần môi trường TB có hàm lượng cao nấm men gấp đôi so với thành phần môi trường LB và NB, vì vậy khi nuôi cấy *E. coli* trong môi trường TB sẽ cho mật độ tế bào cao hơn (Studier, 2005). Mặt khác, các chủng *E. coli* tái tổ hợp khi biểu hiện protein dung hợp cần một lượng phosphate rất lớn, điều này chỉ có môi trường TB đáp ứng được. Hơn nữa, môi trường TB có chứa glycerol cũng đóng vai trò cảm ứng biểu hiện protein được điều khiển bởi *lac* promoter (Studier, 2014). Nhờ đó, hiệu suất biểu hiện protein dung hợp tăng lên đáng kể.



**Hình 1.** Ảnh hưởng của chủng chủ lên quá trình sinh trưởng và biểu hiện  $\beta$ -glucosidase tái tổ hợp. Sinh khối khô được biểu hiện trên cột màu đen, hoạt tính enzyme được biểu hiện trên cột màu ghi.



**Hình 2.** Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên sinh trưởng và sinh hoạt tính  $\beta$ -glucosidase của chủng *E. coli* C43(DE3) tái tổ hợp. Sinh khối khô được biểu hiện trên cột màu đen, hoạt tính enzyme được biểu hiện trên cột màu ghi.



**Hình 3.** Ảnh hưởng của độ thoáng khí lên sinh trưởng và sinh hoạt tính  $\beta$ -glucosidase của chủng *E. coli* C43(DE3) tái tổ hợp. Sinh khối khô được biểu hiện trên cột màu đen, hoạt tính enzyme được biểu hiện trên cột màu ghi.

### Ảnh hưởng của độ thoáng khí đến biểu hiện $\beta$ -glucosidase tái tổ hợp

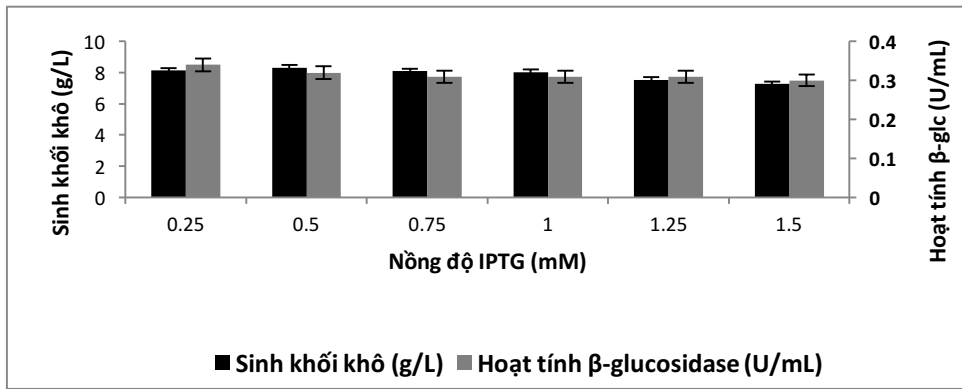
*E. coli* là vi khuẩn hiếu khí, do vậy, lượng oxy hoà tan trong môi trường nuôi cấy là một yếu tố quan trọng, có ảnh hưởng rõ rệt đến sự sinh trưởng (O'Beirne, Hamer, 2000; Losen *et al.*, 2004). Để nâng cao hàm lượng sinh khối tế bào cũng như hoạt tính

enzyme dung hợp, người ta có thể điều chỉnh chỉ số oxy hoà tan bằng cách tăng tốc độ lắc hoặc giảm thể tích dịch nuôi trong bình. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát ảnh hưởng của 4 thể tích dịch nuôi trên cùng một loại bình tam giác (500 mL). Kết quả nghiên cứu trong hình 3 cho thấy thể tích dịch nuôi cấy có ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và biểu hiện enzyme dung hợp. Mật độ tế bào của chủng

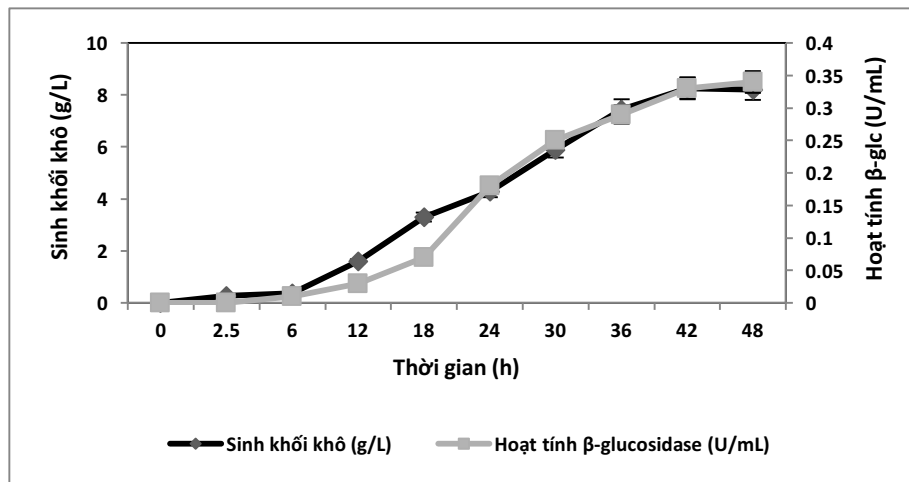
tái tổ hợp tỉ lệ nghịch với thể tích nuôi cấy. Trong 4 điều kiện khảo sát, mật độ tế bào đạt cao nhất (10,64 g/L) khi thể tích nuôi cấy chiếm 10% thể tích bình và giảm dần khi tăng thể tích dịch nuôi cấy. Trong khi đó, hoạt tính  $\beta$ -glucosidase tái tổ hợp cao nhất ở bình chứa thể tích dịch nuôi cấy chiếm 20% (hoạt tính đạt 0,31 U/mL) (Hình 3). Do đó, xét về hiệu quả biểu hiện enzyme dung hợp và hiệu quả kinh tế, tỷ lệ 20% được lựa chọn là tỷ lệ thông khí thích hợp cho biểu hiện enzyme dung hợp. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với công bố của Rosano và Ceccarelli (2014) khi nghiên cứu biểu hiện protein tái tổ hợp trong chủng chủ *E. coli*.

**Ảnh hưởng của nồng độ IPTG đến biểu hiện  $\beta$ -glucosidase tái tổ hợp**

IPTG là chất cảm ứng cho T7-promoter của hầu hết các vector biểu hiện thuộc hệ thống pET. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của nồng độ IPTG từ 0,25 - 1,5 mM lên quá trình sinh trưởng và biểu hiện  $\beta$ -glucosidase của chủng *E. coli* C43(DE3) tái tổ hợp. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ IPTG có ảnh hưởng không nhiều đến khả năng sinh trưởng và biểu hiện  $\beta$ -glucosidase của chủng tái tổ hợp. Trong khoảng nồng độ IPTG cảm ứng từ 0,25 - 1,5 mM, sinh khối khô của chủng tái tổ hợp dao động từ 7,28 - 8,13 g/L, enzyme tái tổ hợp được biểu hiện ở tất cả các nồng độ IPTG cảm ứng và hoạt tính dao động từ 0,3 - 0,34 U/mL (Hình 4). Do đó, nồng độ IPTG 0,25 mM được chọn để cảm ứng biểu hiện enzyme dung hợp.



**Hình 4.** Ảnh hưởng nồng độ IPTG cảm ứng lên sinh trưởng và biểu hiện  $\beta$ -glucosidase của chủng *E. coli* C43(DE3) tái tổ hợp. Sinh khối khô được biểu hiện trên cột màu đen, hoạt tính enzyme được biểu hiện trên cột màu ghi.



**Hình 5.** Động thái sinh trưởng và sinh  $\beta$ -glucosidase của chủng *E. coli* C43(DE3) tái tổ hợp. Sinh khối khô được biểu hiện trên đường màu đen, hoạt tính enzyme được biểu hiện trên đường màu ghi.

### Động thái sinh trưởng và biểu hiện $\beta$ -glucosidase dung hợp của chủng *E. coli* C43(DE3) tái tổ hợp

Dưới các điều kiện nuôi cấy được lựa chọn ở trên, quá trình sinh trưởng và biểu hiện  $\beta$ -glucosidase tái tổ hợp của chủng *E. coli* C43(DE3) mang plasmid pET17b\_32768 vào pha cân bằng sau 42-48 giờ nuôi cấy. Trong khoảng thời gian này, sinh khối khô đạt giá trị dao động trong khoảng 8,21-8,26 g/L; sinh tổng hợp  $\beta$ -glucosidase đạt 0,33-0,34 U/mL (Hình 5).

### KẾT LUẬN

Gen [denovogenes]\_32768 mã hóa cho  $\beta$ -glucosidase là một gen mới lần đầu tiên được phát hiện từ DNA metagenome suối nước nóng Bình Châu. Gen này đã được biểu hiện thành công trong dòng *E. coli* C43(DE3). Đã xác định được một số điều kiện tối ưu cho sinh tổng hợp  $\beta$ -glucosidase của chủng *E. coli* C43(DE3) tái tổ hợp. Enzyme dung hợp được biểu hiện tốt nhất trong môi trường TB với thể tích dịch nuôi cấy chiếm 20% so với thể tích bình, nồng độ IPTG cảm ứng 0,25 mM. Sau 42 - 48 giờ nuôi cấy, sinh khối khô đạt 8,21 - 8,26 g/L, hoạt tính  $\beta$ -glucosidase đạt 0,33 - 0,34 U/mL.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu metagenome của một số hệ sinh thái mini tiềm năng nhằm khai thác các gen mới mã hóa hệ enzyme chuyển hóa hiệu quả lignocellulose”, mã số ĐTĐLCN.15/14.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Butters TD (2007) Gaucher disease. *Curr Opin Chem Biol* 11(4): 412-418.

Byeon GM, Lee KS, Gui ZZ, Kim I, Kang PD, Lee SM, Sohn HD, Jin BR (2005) A digestive  $\beta$ -glucosidase from the silkworm, *Bombyx mori*: cDNA cloning, expression and enzymatic characterization. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 141(4): 418-427.

Chan AKN, Wang YY, Ng KL, Fu Z, Wong WKR (2012) Cloning and characterization of a novel cellobiase gene, *cba3*, encoding the first known  $\beta$ -glucosidase of glycoside hydrolase family 1 of *Cellulomonas biazotea*. *Gene* 493(1): 52-61.

Chang J, Park I-H, Lee Y-S, Ahn S-C, Zhou Y, Choi Y-L (2011) Cloning, expression, and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Exiguobacterium* sp. DAU5 and transglycosylation activity. *Biotechnol Bioprocess Eng* 16(1): 97-106.

Escuder-Rodríguez J-J, DeCastro M-E, Cerdán M-E, Rodríguez-Belmonte E, Becerra M, González-Siso M-I

(2018) Cellulases from Thermophiles Found by Metagenomics. *Microorganisms* 6(3): 66.

Guo H, Feng Y, Mo X, Duan C, Tang J, Feng J (2008) Cloning and Expression of a  $\beta$ -glucosidase Gene *umcel3G* from Metagenome of Buffalo Rumen and Characterization of the Translated Product. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 24(2): 232-238.

Harhangi HR, Steenbakkers PJM, Akhmanova A, Jetten MSM, van der Drift C, Op den Camp HJM (2002) A highly expressed family 1  $\beta$ -glucosidase with transglycosylation capacity from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. E2. *Biochim Biophys Acta - Gene Structure and Expression* 1574(3): 293-303.

<http://lin.uestc.edu.cn/server/AcalPred>

<http://tm.life.nthu.edu.tw/>

Kim SJ, Lee CM, Kim MY, Yeo YS, Yoon SH, Kang HC, Koo BS (2007) Screening and characterization of an enzyme with  $\beta$ -glucosidase activity from environmental DNA. *J Microbiol Biotechnol* 17(6): 905-912.

Ku T, Lu P, Chan C, Wang T, Lai S, Lyu P, Hsiao N (2009) Predicting melting temperature directly from protein sequences. *Comput Biol Chem* 33(6): 445-450.

Li Y, Liu N, Yang H, Zhao F, Yu Y, Tian Y, Lu X (2014) Cloning and characterization of a new  $\beta$ -glucosidase from a metagenomic library of rumen of cattle feeding with *Miscanthus sinensis*. *BMC Biotechnol* 14: 85-85.

Losen M, Frölich B, Pohl M, Büchs J (2004) Effect of Oxygen Limitation and Medium Composition on *Escherichia coli* Fermentation in Shake-Flask Cultures. *Biotechnology progress* 20: 1062-1068.

Lu J, Du L, Wei Y, Hu Y, Huang R (2013) Expression and characterization of a novel highly glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from a soil metagenome. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 45(8): 664-673.

Miroux B, Walker JE (1996) Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. *Journal of Molecular Biology* 260(3): 289-298.

Murray P, Aro N, Collins C, Grassick A, Penttilä M, Saloheimo M, Tuohy M (2004) Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3  $\beta$ -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Protein Expr Purif* 38(2): 248-257.

O'Beirne D, Hamer G (2000) Oxygen availability and the growth of *Escherichia coli* W3110: A problem exacerbated by scale-up. *Bioprocess Engineering* 23(5): 487-494.

Ramirez-Escudero M, Del Pozo MV, Marin-Navarro J, Gonzalez B, Golyshin PN, Polaina J, Ferrer M, Sanz-Aparicio J (2016) Structural and Functional Characterization of a Ruminant  $\beta$ -Glycosidase Defines a Novel Subfamily of Glycoside Hydrolase Family 3 with

- Permuted Domain Topology. *J Biol Chem* 291(46): 24200-24214.
- Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology* 5: 172-172.
- Schröder C, Elleuche S, Blank S, Antranikian G (2014) Characterization of a heat-active archaeal  $\beta$ -glucosidase from a hydrothermal spring metagenome. *Enzyme and Microbial Technology* 57: 48-54.
- Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R (2007) *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *J Bacteriol* 189(23): 8746-8749.
- Singh G, Verma AK, Kumar V (2016) Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of  $\beta$ -glucosidases. *3 Biotech* 6(1): 3.
- Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41(1): 207-234.
- Studier FW (2014) Stable Expression Clones and Auto-Induction for Protein Production in *E. coli*. *Structural Genomics: General Applications*. Y. W. Chen. Totowa, NJ, Humana Press: 17-32.
- Tang Z, Liu S, Jing H, Sun R, Liu M, Chen H, Wu Q, Han X (2014) Cloning and expression of *A. oryzae*  $\beta$ -glucosidase in *Pichia pastoris*. *Molecular Biology Reports* 41(11): 7567-7573.
- Wang Q, Qian C, Zhang XZ, Liu N, Yan X, Zhou Z (2012) Characterization of a novel thermostable beta-glucosidase from a metagenomic library of termite gut. *Enzyme Microb Technol* 51(6-7): 319-324.

## IMPROVEMENT OF A RECOMBINANT $\beta$ -GLUCOSIDASE ACTIVITY OF A SEQUENCE DERIVED FROM METAGENOME DATABASE OF BINH CHAU HOTSPRING

Tran Thanh Thuy, Lai Thi Hong Nhung, Le Thi Thanh Xuan, Nguyen Kim Thoa

*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### SUMMARY

Metabolic products obtaining from microorganisms of geothermal ecologies often show special characteristics which help their cells to survive, grow and develop under extreme conditions. Exploiting the microbial gene resource of those environments demands a new approach via uncultured methods. Thanks to the development of metagenomics and bioinformatic softwares, we can exploit novel genes from environment directly. Based on Binh Chau hot spring's DNA metagenome sequencing, ORF [denovogenes]\_32768 encoding for  $\beta$ -glucosidase is selected for expression into pET17b vector because it shown a low similarity of amino acid sequence as compared to others in Genbank, a high alkali and  $T_m$  predicted values. To improve the expression efficiency of  $\beta$ -glucosidase, some factors (host strains, medium culture, IPTG concentration, aeration...) are investigated. The results showed that the recombinant *E. coli* C43(DE3) reached the highest dried biomass at 8.26 g/L and the maximum enzymatic activity at 0.34 U/mL in shaking condition (TB medium plus 0.25 mM IPTG with the ratio of cultured /flask volume is 20%, 42-48 hours, 30°C). This study demonstrates the capacity of mining a novel gene encoded for enzyme from DNA metagenome of Vietnam hot spring as well as produces recombinant enzyme for biomass conversion.

**Keywords:** Gene expression, DNA metagenome, *E. coli* C43(DE3),  $\beta$ -glucosidase, recombinant enzyme, Binh Chau hot spring.