

Biểu hiện endoglucanase A của *Clostridium thermocellum* trong vi khuẩn *Bacillus subtilis*

- Phạm Lương Thắng
- Phan Thị Phượng Trang
- Trần Linh Thuớc
- Nguyễn Đức Hoàng

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 24 tháng 09 năm 2014, nhận đăng ngày 26 tháng 01 năm 2015)

TÓM TẮT

Endoglucanase A (CelA) là thành phần quan trọng trong phức hệ enzyme cellulase chịu nhiệt (cellulosome) từ chủng vi sinh vật kỵ khí *Clostridium thermocellum*. Trong phức hệ này, CelA cho khả năng phân cắt cao nhất các liên kết β -1,4 glucoside từ bên trong các phân tử cellulose và một số loại polysaccharide tạo thành các oligosaccharide. *Bacillus subtilis* là vi khuẩn Gram dương, hiếu khí, phát triển nhanh, thường dùng trong sản xuất enzyme công nghiệp. Đây là chủng vi khuẩn có thể được dùng để thay thế cho chủng vi khuẩn kỵ khí, phát triển chậm, *C. thermocellum* để biểu hiện CelA. Để tạo chủng *B. subtilis* có khả năng tiết CelA tái tổ hợp, gen *celA* từ *C. thermocellum* được thu nhận bằng phản ứng

PCR và chèn vào plasmid pHT43, ngay sau trình tự tín hiệu tiết *amyQ*. Plasmid pHT43-*celA* tạo thành sẽ được biến nạp vào chủng biểu hiện *B. subtilis* 1012, có biểu hiện protease ngoại bào và *B. subtilis* WB800N, đã gây đột biến trên 8 protease ngoại bào. CelA từ các chủng *B. subtilis* được cảm ứng biểu hiện bằng IPTG ở các nồng độ khác nhau. Tiến hành thu mẫu dịch tiết protein ngoại bào trong môi trường nuôi cấy từ 2 đến 24 giờ sau cảm ứng. Khả năng biểu hiện của chủng được đánh giá bằng SDS-PAGE và hoạt tính Endo- β -1,4-glucanase. Nghiên cứu này chứng tỏ có thể biểu hiện CelA trong *B. subtilis* và tiềm năng phát triển chủng có khả năng biểu hiện CelA cho các ứng dụng thủy phân cellulose sau này.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, Plasmid pHT43, Pgrac, CelA, IPTG, Endo- β -1,4-glucanase.

MỞ ĐẦU

C. thermocellum là vi khuẩn Gram dương, kỵ khí tuyệt đối được biết đến với hệ cellulase cho khả năng phân giải cellulose hiệu quả nhất. Chủng vi sinh vật này có khả năng tạo phức hệ enzyme chịu nhiệt và được gọi là cellulosome ngoại bào. Phức hệ này bao gồm: endoglucanase, có khả năng phân cắt liên kết β -1,4-glycosidic trong phân tử cellulose; exoglucanase hay còn gọi là cellobiohydrolases, có vai trò phân cắt

cellulose mạch dài, tạo sản phẩm cellobiose đơn giản hơn và protein lõi, vừa có vai trò kết dính các enzyme cellulase với nhau vừa tăng cường khả năng gắn của enzyme lên cơ chất, thông qua các domain ái lực cao với cellulose trên bề mặt. Qua đó, tăng cường hoạt tính của enzyme cellulase lên nhiều lần [14]. Trong phức hệ cellulosome, endoglucanase A (CelA) là enzyme đầu tiên được thu nhận và tinh chế [8]. Cấu tạo

CelA rất đơn giản, chỉ bao gồm 1 domain Dockerin 1 (domain gắn vào protein lõi của cellulosome) liên kết với lõi enzyme thuộc nhóm GH8 (Glycosyl hydrolase 8) [1]. Ngoài ra, các nghiên cứu về phức hệ cellulosome cho thấy rằng CelA là đại diện duy nhất của nhóm GH8 trên *C. thermocellum* [3] và được biểu hiện cao ở cả 2 cấp độ phiên mã [10] và dịch mã [13].

Bacillus là nhóm vi sinh vật giữ vai trò chủ đạo trong nền công nghiệp sản xuất enzyme với hơn 60 % enzyme công nghiệp được sản xuất từ nhóm vi sinh vật này [12]. Trong đó, *B. subtilis* đã được ứng dụng trong công nghiệp từ rất lâu tại Nhật Bản trong sản xuất chế phẩm từ đậu nành-Natto [6]. Do đó, việc sử dụng *B. subtilis* để biểu hiện, sản xuất hệ enzyme cellulase của *C. thermocellum* sẽ có được những ưu điểm so với các chủng biểu hiện truyền thống khác như *Escherichia coli* hay *Saccharomyces cerevisiae*: (i) Tương đồng về mặt cấu trúc tế bào vì cả hai cùng là vi khuẩn Gram dương; (ii) Hệ thống plasmid tồn tại độc lập pHT43 (MoBiTec), cho phép biểu hiện protein tái tổ hợp dạng tiết ra môi trường; (iii) Điều kiện nuôi cấy đơn giản, chi phí thấp nhưng hiệu quả tạo sản phẩm, tạo sinh khối cao gấp nhiều lần *C. thermocellum*; (iv) Là chủng an toàn theo chuẩn GRAS (General Regarded As Safe) được công nhận bởi cơ quan Quản lý Thuốc và Thực phẩm Hoa Kỳ (FDA-Foods and Drugs Administration, Mỹ). Ngoài ra, sinh khối *B. subtilis* còn có thể ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản, phân bón sinh học, cho phép tận dụng hết tối đa sản phẩm của quy trình sản xuất enzyme.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi sinh vật kỵ khí *C. thermocellum* DSM 1313 từ ngân hàng chủng DSMZ, CHLB Đức. Plasmid biểu hiện tiết pHT43 và các chủng biểu hiện *B. subtilis* 1012, *B. subtilis* WB800N

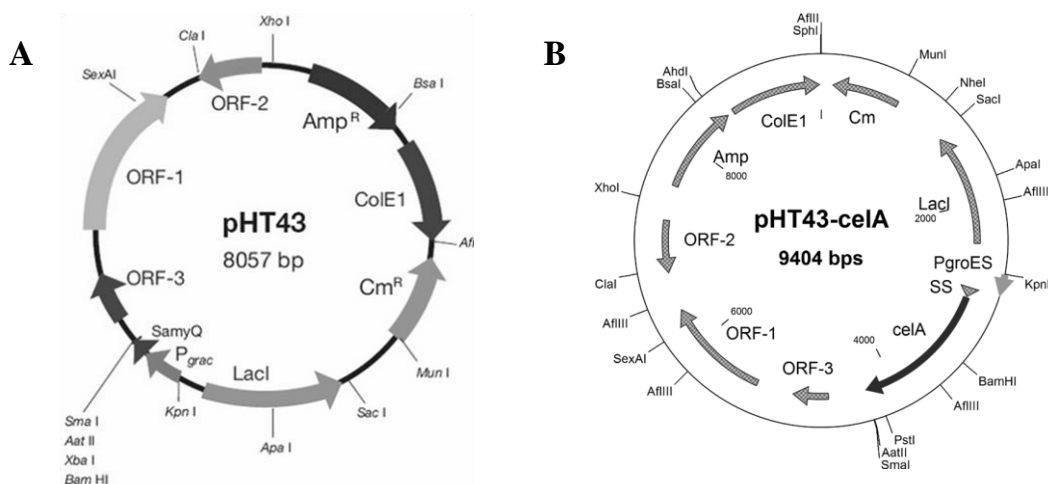
được cung cấp bởi công ty MoBiTec (đại diện là Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học,

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM). Các enzyme, hóa chất cần thiết cho dòng hóa, biểu hiện protein và đo hoạt tính enzyme tái tổ hợp.

Nuôi cấy, thu nhận DNA bộ gen của *C. thermocellum* và tạo plasmid tái tổ hợp pHT43-celA

C. thermocellum DSM 1313 được nuôi cấy trong bình nuôi kỵ khí bằng môi trường 122, theo hướng dẫn của ngân hàng chủng DSMZ, ở 60 °C trong 4 ngày. Thu sinh khối và tách chiết DNA bộ gen theo quy trình phenol/chloroform [5], đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch bằng máy NanoDrop 1000.

Plasmid pHT43 (Hình 1A) là một plasmid con thoi, có khả năng tồn tại và sao chép độc lập trên cả 2 chủng chủ *E. coli* và *B. subtilis*. Plasmid này chịu sự kiểm soát bởi promoter Pgrac, bao gồm promoter *groES* kết hợp với *lacO* operator và trình tự Shine-Dangarno của *gsiB* [7]. Bên cạnh đó, trình tự tín hiệu tiết *SamyQ* được gắn ngay sau Pgrac promoter, cho phép tiết protein tái tổ hợp ra ngoài môi trường nuôi cấy. Gen mã hóa endoglucanase A (CelA) được khuếch đại từ DNA bộ gen của *C. thermocellum* bằng cặp mồi CelA_F, 5'-GGCCATAGATCTGCAAACACTGTGTCAGCGGCA-3' và CelA_R, 5'-GGCCATGACGTCTTAATAAGGTAGGTGGG GTATGCTC-3'. Sản phẩm PCR cùng với plasmid pHT43 được xử lý bằng *BglIII* và *AatII* sẽ là nguyên liệu cho phản ứng nối tạo plasmid tái tổ hợp pHT43-celA. Tiếp theo, plasmid pHT43-celA (Hình 1B) được biến nạp vào chủng *E. coli* OmniMAX. Tiến hành PCR khuẩn lạc để sàng lọc khuẩn lạc tái tổ hợp, tách plasmid bằng QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN) và kiểm tra kết quả tạo dòng bằng phương pháp giải trình tự.



Hình 1. Bản đồ gen của plasmid thương mại pHT43 và plasmid pHT43-*celA*. (A) pHT43 (MoBiTec) với trình tự kháng **ampicillin** cho *E. coli* và trình tự kháng chloramphenicol cho *B. subtilis*. (B) pHT43-*celA* chứa promoter *Pgrac* và gen *celA* sau trình tự tín hiệu tiết *SamyQ*.

Tạo chủng *B. subtilis* tái tổ hợp và sàng lọc các dòng tái tổ hợp biểu hiện CelA dạng tiết

Plasmid sau khi giải trình tự được biến nạp vào *B. subtilis* theo quy trình hướng dẫn của MoBiTec. Khuẩn lạc *B. subtilis* mọc được sau khi biến nạp sẽ được kiểm tra sự hiện diện của plasmid pHT43-*celA*. Tiến hành PCR khuần lạc các chủng tái tổ hợp *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N bằng cặp mồi *CelA_F* và *ON632* (TAGGCGGGCTGCCCGGGGACG). Sản phẩm PCR có kích thước dự đoán là 1392 bp. Sử dụng gel agarose 1% để phân tích kết quả. Từ các khuẩn lạc cho phản ứng PCR dương tính, khảo sát khả năng biểu hiện *CelA* trên đĩa thạch LB-Cm 10 (Luria Bertani-Chloramphenicol 10 µg/ml) có chứa 0,5 % carboxymethylcellulose (CMC) và nồng độ chất cảm ứng IPTG khác nhau từ 0,01 mM, 0,1 mM, 0,5 mM đến 1 mM. Sau 24 giờ nuôi cấy, khả năng biểu hiện của chủng sẽ được đánh giá thông qua bán kính vòng phân giải CMC.

Đánh giá khả năng biểu hiện tiết *CelA* của *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N

Chúng tôi tiến hành biểu hiện trong môi trường lỏng 100 mL LB-Cm 10 µg/mL cũng ở các nồng độ IPTG tương tự như khi khảo sát trên

đĩa. Ở mỗi thời điểm khảo sát, thu nhận 2 mL dịch nuôi cấy đã loại tế bào bằng ly tâm ở 10.000 vòng trong 5 phút. Để chuẩn bị mẫu cho phân tích SDS-PAGE, 1 ml dịch enzyme được tủa với TCA (trichloroacetic acid) ở nồng độ cuối là 10 %. Song song đó, chúng tôi xác định hoạt tính CMCase của enzyme *CelA* theo quy trình sau: 250 µL dịch enzyme ủ với 250 µL **natri**acetat buffer, pH 5,5 có chứa 1 % CMC, ủ 50 °C trong 30 phút. Sau đó, định lượng đường khử tạo thành bằng thuốc thử DNS [4]. Với 1 IU hoạt tính enzyme cần thiết để tạo ra lượng đường khử tương đương với 1 µmol glucose (0,18 mg glucose) trong 1 phút.

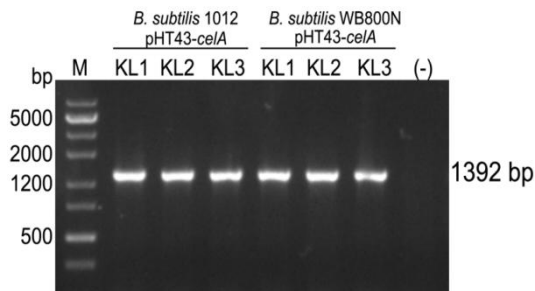
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu nhận gen tạo plasmid tái tổ hợp pHT43-*celA*

Kết quả đo NanoDrop DNA bộ gen của *C. thermocellum* cho thấy nồng độ DNA nằm trong khoảng 391 ng/µL, với độ tinh sạch thể hiện qua tỉ lệ OD260/OD280 là 1,92. Tiến hành tạo plasmid tái tổ hợp pHT43-*celA* như trong phần vật liệu và phương pháp nghiên cứu. Kết quả giải trình tự cho thấy sự tương đồng của trình tự mục tiêu so với thiết kế là 100 % và kết quả BLAST trên ngân hàng gen NCBI cũng là 100 % khi so

sánh với trình tự gen *celA* trên chủng *C. thermocellum* tự nhiên.

Tạo chủng *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N mang plasmid tái tổ hợp



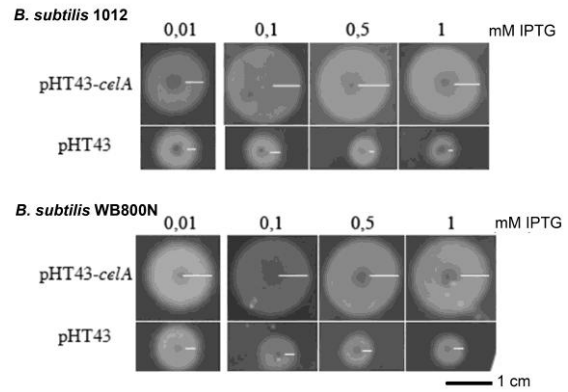
Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra sự hiện diện của tái tổ hợp pHT43-*celA* ở các chủng *B. subtilis* tái tổ hợp. Đối chứng âm là sản phẩm PCR chủng *B. subtilis* 1012 mang plasmid pHT43. Kết quả điện di được phân tích trên gel agarose 1 %.

Kết quả PCR khuẩn lạc để kiểm chứng plasmid tái tổ hợp pHT43-*celA* ở các chủng *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N (Hình 2) cho thấy các dòng vi khuẩn *B. subtilis* tái tổ hợp đều cho vạch sản phẩm PCR khuẩn lạc có kích thước lý thuyết 1392 bp nằm giữa vị trí 1200 bp và 2000 bp của thang chuẩn DNA. Trong khi đó, ở khuẩn lạc đối chứng, không xuất hiện vạch sáng nào trên bản gel agarose 1 %. Điều này cho thấy chúng tôi đã tạo thành công các chủng tái tổ hợp *B. subtilis* 1012/pHT43-*celA* và *B. subtilis* WB800N/pHT43-*celA*.

Khảo sát khả năng biểu hiện *CelA* trên môi trường rắn

Việc đánh giá khả năng biểu hiện *CelA* dạng tiết của chủng bằng đĩa thạch LB-Cm 10 chứa 0,5 % CMC dễ dàng cho kết quả chỉ sau 24 giờ nuôi cấy ở 37 °C, và 15 phút nhuộm bằng Congo Red 1 % [2]. Kết quả thu nhận được trong Hình 3 cho thấy vòng phân giải từ các chủng *B. subtilis* mang plasmid pHT43-*celA* lớn hơn rất nhiều so với các mẫu chứng âm mang plasmid pHT43 ở cả 4 nồng độ IPTG 0,01 mM, 0,1 mM, 0,5 mM và 1 mM. Kết quả phân tích bán kính vòng phân giải còn cho thấy sự ảnh hưởng của IPTG không nhiều ở các nồng độ được khảo sát 0,1 mM, 0,5

mM và 1 mM. Chỉ có sự khác biệt rõ rệt về khả năng phân giải CMC ở nồng độ 0,01 mM so với 3 nồng độ IPTG còn lại. Như vậy, các chủng *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N mang plasmid tái tổ hợp pHT43-*celA* tạo thành có khả năng tiết *CelA* có hoạt tính cao trên môi trường chứa cơ chất CMC.



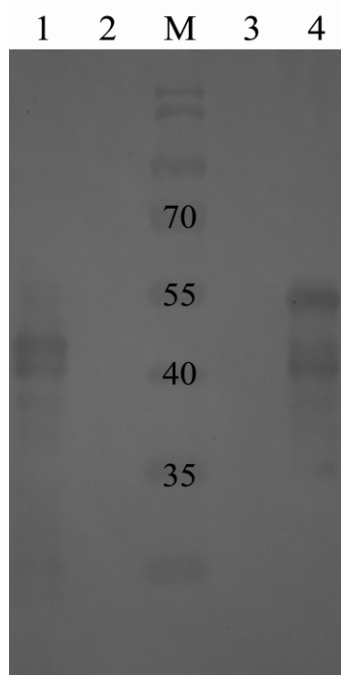
Hình 3. Khả năng phân giải CMC của chủng biểu hiện *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N mang plasmid tái tổ hợp pHT43-*celA* ở các nồng độ IPTG là 0,01 mM, 0,1 mM, 0,5 mM và 1 mM. Đối chứng âm là chủng *B. subtilis* mang plasmid pHT43. Thanh màu trắng thể hiện bán kính vòng phân giải cơ chất CMC. Thanh màu đen thể hiện thước đo có kích thước là 1 cm.

Khảo sát khả năng biểu hiện *CelA* trên môi trường lỏng

Quá trình khảo sát nuôi cấy lắc ở 24 giờ sau cảm ứng cho phép đánh giá chính xác hơn các yếu tố ảnh hưởng đến sự biểu hiện *CelA* có hoạt tính như nồng độ chất cảm ứng IPTG, thời gian nuôi cấy, qua đó, có thể xây dựng tiền đề cho việc tối ưu hóa quy trình và áp dụng trên quy mô lớn hơn (1 L hoặc 5 L). Ở đây, chúng tôi sử dụng 2 phương pháp để đánh giá khả năng biểu hiện là SDS-PAGE và đo hoạt tính dịch nuôi cấy.

Xác nhận sự biểu hiện *CelA* tiết từ *B. subtilis* 1012 và WB800N

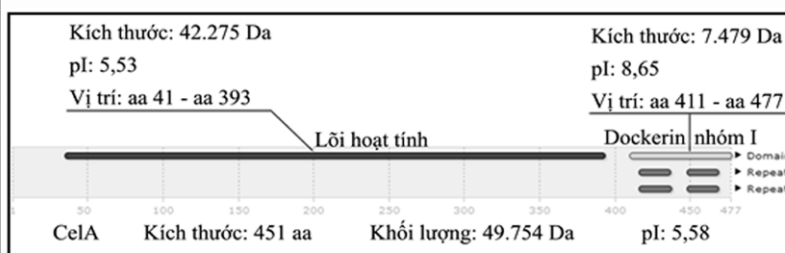
Trước khi tiến hành khảo sát khả năng biểu hiện, chúng tôi tiến hành lai Western Blot để xác nhận chính xác sự biểu hiện *CelA* trong dịch nuôi cấy *B. subtilis* tại thời điểm 8 giờ sau khi cảm ứng bằng 0,1 mM IPTG.



Hình 4. Kết quả xác định sự biểu hiện CelA ở *B. subtilis*.

(A) Kết quả lai Western Blot dịch tiết *B. subtilis* với kháng thể thô đa dòng kháng CelA; Giếng 1: dịch tiết *B. subtilis* 1012 mang plasmid pHT43-celA; Giếng 2: dịch tiết *B. subtilis* 1012 mang plasmid pHT43 (đối chứng âm); M: thang chuẩn protein; Giếng 3: dịch tiết *B. subtilis* WB800 mang plasmid pHT43 (đối chứng âm); Giếng 4: dịch tiết *B. subtilis* WB800 mang plasmid pHT43-celA.

(B) Cấu trúc protein CelA tái tổ hợp theo ngân hàng dữ liệu Uniprot. CelA gồm 2 domain chính là lõi hoạt tính (kích thước khoảng 43 kDa) và Dockerin nhóm I (kích thước khoảng 7 kDa).



(A)

(B)

Kết quả lai trong Hình 4A cho thấy CelA tạo thành ở *B. subtilis* 1012 có kích thước khoảng 43 kDa trong khi ở dịch tiết *B. subtilis* WB800N, CelA vẫn giữ được 2 vạch kích thước là 50 kDa và 43 kDa. Ngoài ra, ở mẫu đối chứng là dịch tiết *B. subtilis* mang plasmid pHT43, không có vạch lai nào được phát hiện. Điều này cho thấy kết quả lai tốt, kháng thể CelA là đặc hiệu và không tạo sản phẩm không đặc hiệu nào với protein ngoại bào của *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N. Enzyme CelA có kích thước 49754 Da (Hình 4B). Cấu trúc CelA bao gồm domain Dockerin loại I (kích thước khoảng 7 kDa) liên kết với lõi hoạt tính enzyme (43 kDa). Tuy nhiên, 2 thành phần này lại gấp cuộn riêng rẽ và độc lập với nhau [1]. Do đó, protease ngoại bào sẽ cắt phần Dockerin loại I trước, trong khi lõi enzyme với cấu trúc phức tạp và chắc chắn hơn sẽ ít bị ảnh hưởng bởi hoạt tính của protease. Kết quả này tương tự một nghiên cứu khác về biểu hiện CelA cũng cho kết quả lai Western-Blot ở kích thước tương ứng khoảng 43 kDa [9]. *B. subtilis* 1012 là

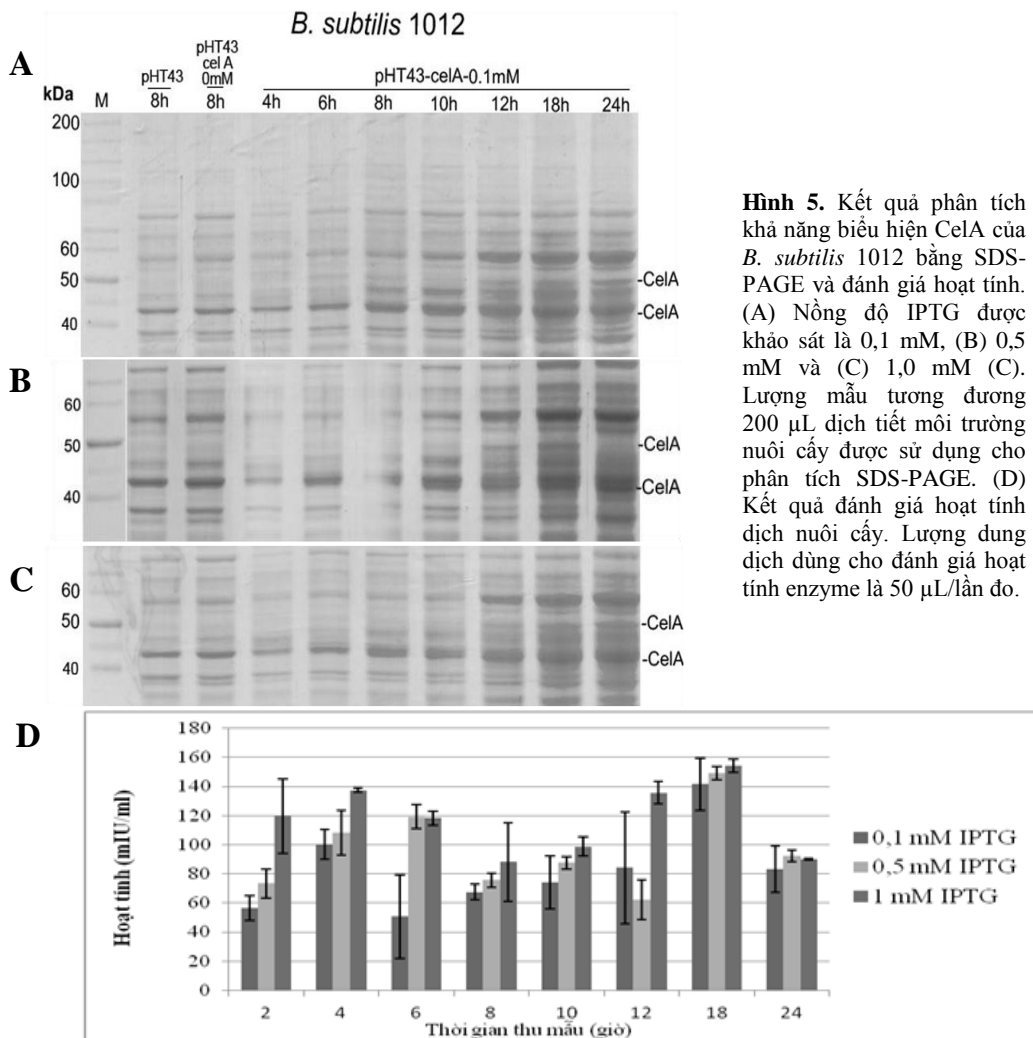
chúng được nghiên cứu từ lâu [11]. Tuy nhiên, *B. subtilis* 1012 có nhược điểm là biểu hiện nhiều loại protease ngoại bào, do đó, sản phẩm lai dịch tiết CelA chỉ cho 1 vạch ở kích thước 43 kDa tương ứng với lõi hoạt tính. Nhằm khắc phục vấn đề này, chúng tôi sử dụng chủng *B. subtilis* WB800N để biểu hiện CelA. *B. subtilis* WB800N là chủng biểu hiện đã bị đột biến mất 8 protease ngoại bào [9], chính vì vậy, cấu trúc hoàn chỉnh của CelA, bao gồm cả Dockerin loại I và lõi hoạt tính sẽ không bị phân cắt nhiều bởi protease, cho phép giữ nguyên được kích thước đầy đủ của enzyme CelA (49,754 kDa). Điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả lai với 2 vạch protein là 50 kDa và 43 kDa tương ứng với kích thước đầy đủ và lõi hoạt tính của CelA đã bị phân cắt Dockerin loại I.

Khả năng biểu hiện CelA ở chủng B. subtilis 1012

Các kết quả SDS-PAGE (Hình 5A, 5B, 5C) cho thấy xuất hiện 2 vạch nhỏ có kích thước khoảng 50 kDa và 43 kDa ở các chủng *B. subtilis*

1012 mang plasmid pHT43-*celA*, trong khi, ở chủng đối chứng *B. subtilis* 1012/pHT43 thì không xuất hiện. Như vậy, chúng tôi có thể kết luận rằng CelA được biểu hiện thành công trên chủng *B. subtilis* 1012. Mặc dù sản phẩm tiết bị protease phân cắt một phần ở các thời điểm 4, 6, 8 và 10 giờ sau cảm ứng, tuy nhiên, ở các thời điểm 12, 18 và 24 giờ, vẫn có một lượng CelA mới tạo thành và chưa bị phân cắt bởi protease của *B. subtilis* 1012. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả lai Western Blot trước đó – Hình 4. Đồng thời, khi đối chiếu kết quả đo hoạt tính

dịch nuôi cấy (Hình 5D) cho thấy enzyme vẫn có hoạt tính cao, nằm trong khoảng 120 đến 140 mU/ml dịch nuôi cấy. Điều này cho thấy rằng lỗi hoạt tính enzyme vẫn còn khả năng phân giải cơ chất CMC mặc dù đã bị loại bỏ domain Dockerin loại I bởi protease ngoại bào của *B. subtilis* 1012. Bên cạnh đó, kết quả đo hoạt tính ở thời điểm cảm ứng IPTG (0 giờ) cho thấy lượng đường khử tạo thành rất thấp, dưới 0,1 mg/mL nằm ngoài giá trị đường chuẩn glucose có thể phát hiện được bằng phương pháp định lượng với thuốc thử DNS là 0,1 mg/mL – 3,2 mg/mL.

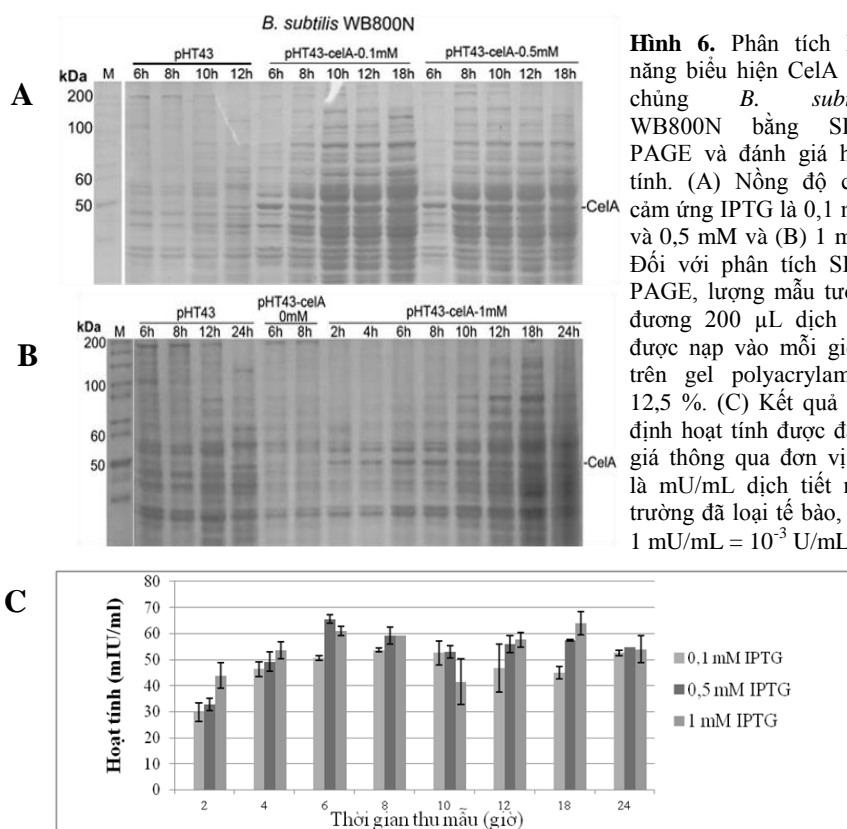


Hình 5. Kết quả phân tích khả năng biểu hiện CelA của *B. subtilis* 1012 bằng SDS-PAGE và đánh giá hoạt tính. (A) Nồng độ IPTG được khảo sát là 0,1 mM, (B) 0,5 mM và (C) 1,0 mM (C). Lượng mẫu tương đương 200 μ L dịch tiết môi trường nuôi cấy được sử dụng cho phân tích SDS-PAGE. (D) Kết quả đánh giá hoạt tính dịch nuôi cấy. Lượng dung dịch dùng cho đánh giá hoạt tính enzyme là 50 μ L/lần đo.

Khả năng biểu hiện CelA ở chủng *B. subtilis* WB800N

Như đã trình bày, CelA biểu hiện ở *B. subtilis* WB800N bao gồm protein hoàn chỉnh và lõi hoạt tính đã loại bỏ domain Dockerin loại I. Trong đó, chủ yếu là protein hoàn chỉnh CelA tạo thành ở kích thước là 50 kDa. Kích thước này tương ứng với vạch xuất hiện ở các giếng 6, 8, 10, 12 và 18 giờ sau cảm ứng ở các nồng độ 0,1 mM và 0,5 mM IPTG (Hình 6A) và các giếng từ 2 đến 24 giờ sau cảm ứng ở nồng độ IPTG 1 mM (Hình 6B). Trong khi đó, ở các mẫu chứng âm (chủng mang plasmid pHT43 và chủng mang plasmid pHT43-celA không được cảm ứng (0 mM – Hình 6B) thì vạch này không xuất hiện. Như vậy, chúng tôi kết luận đây là vạch protein tái tổ hợp CelA biểu hiện vượt mức do có sự cảm ứng bởi IPTG. Lượng CelA tạo thành tăng dần qua các giờ nuôi cấy và đạt tối đa trong khoảng 10 đến 18 giờ sau cảm ứng.

Bên cạnh đó, kết quả đánh giá hoạt tính (Hình 6C) cũng phản ánh đúng kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 6A và 6B). Trong đó, lượng CelA tạo thành đạt ngưỡng tối đa tại thời điểm 8 giờ sau cảm ứng. Như vậy, chúng tôi có thể kết luận rằng khoảng thời gian tốt nhất dùng nuôi cấy và thu nhận enzyme CelA là 10 đến 12 giờ sau cảm ứng. Nồng độ IPTG cảm ứng là 0,1 mM, 0,5 mM và 1 mM, lượng CelA tạo thành là tương đương nhau trong khoảng thời gian từ 8 đến 24 giờ sau cảm ứng IPTG (Hình 4), với hoạt tính enzyme tái tổ hợp thu được khoảng 70 mU/mL dịch nuôi cấy. Cũng tương tự như chủng *B. subtilis* 1012, mẫu thu dịch tiết *B. subtilis* WB800N tại thời điểm 0 giờ cho kết quả tạo đường khử là rất thấp, không thể phát hiện được khi định lượng khử bằng thuốc thử DNS. Như vậy, có thể thấy rằng hoạt tính phân giải CMC của dịch tiết *B. subtilis* là do sự biểu hiện của vector tái tổ hợp pHT43-celA.



Hình 6. Phân tích khả năng biểu hiện CelA của chủng *B. subtilis* WB800N bằng SDS-PAGE và đánh giá hoạt tính. (A) Nồng độ chất cảm ứng IPTG là 0,1 mM và 0,5 mM và (B) 1 mM. Đối với phân tích SDS-PAGE, lượng mẫu tương đương 200 μ L dịch tiết được nạp vào mỗi giếng trên gel polyacrylamide 12,5 %. (C) Kết quả xác định hoạt tính được đánh giá thông qua đơn vị đo là mU/mL dịch tiết môi trường đã loại tế bào, với 1 mU/mL = 10^{-3} U/mL.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tạo thành công chủng *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N mang plasmid pHT43-*celA* và biểu hiện thành công enzyme tái tổ hợp CelA từ *C. thermocellum* có hoạt tính cao trên cơ chất CMC. Kết quả ban đầu cho thấy tiềm năng ứng dụng lớn của *B. subtilis* trong việc biểu hiện enzyme cellulase tái tổ hợp, phục vụ cho

việc thủy phân nguồn cơ chất như rơm rạ ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN: Đề tài được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh, năm 2012-2013. Mã số 178/2013/HĐ-SKH&CN.

Production of endoglucanase A of *Clostridium thermocellum* in *Bacillus subtilis*

- Pham Luong Thang
 - Phan Thi Phuong Trang
 - Tran Linh Thuoc
 - Nguyen Duc Hoang
- University of Science, VNU-HCM.

SUMMARY

Endoglucanase A (CelA) is a component of thermostable complex - cellulosome which is produced by anaerobic bacterium Clostridium thermocellum. In this complex, CelA has the highest catalytic activity and it can cleave randomly β -1,4 glucosidic linkage of cellulose to smaller oligosaccharides. Bacillus subtilis a Gram positive and aerobic fast growth bacterium, is commonly used to produce industrial enzymes. This bacterium can be used to replace the anaerobic slow growth bacterium, C. thermocellum, to produce CelA. To create B. subtilis strains which can secrete recombinant CelA enzyme, celA gene was amplified using C. thermocellum DNA genome by PCR and

inserted in the C-terminus of signal peptide of amyQ (samyQ) in plasmid pHT43. The plasmid pHT43-celA was then transformed into B. subtilis 1012 and WB800N, an extracellular protease deficiency strain. Next, CelA production was induced by IPTG at different concentrations. Cultural supernatant was collected from 2 to 24 hours after addition of IPTG. The expression levels were evaluated by SDS-PAGE and endo- β -1,4-glucanase activity. This report demonstrates that CelA can be expressed in B. subtilis and its potentials for development of bacterial strains which can produce CelA to hydrolyze cellulose in the future.

Keywords: *Bacillus subtilis, Plasmid pHT43, Pgrac, CelA, IPTG, Endo- β -1,4-glucanase.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. P.M. Alzari, H. Souchon, R. Dominguez, The crystal structure of endoglucanase CelA, a family 8 glycosyl hydrolase from *Clostridium thermocellum*, *Structure*, 4, 265–275 (1993).
- [2]. P. Cornet, J. Millet, P. Béguin, J.P. Aubert, Characterization of two cel (Cellulose degradation) genes of *Clostridium thermocellum* coding for endoglucanases, *Nature Biotechnology*, 1, 589–594 (1983).
- [3]. A.L. Demain, M. Newcomb, J.H.D. Wu, Cellulase, *Clostridia*, and ethanol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 124–154 (2005).
- [4]. D.E. Eveleigh, M. Mandels, R. Andreotti, C. Roche, Measurement of saccharifying cellulase, *Biotechnology for Biofuels*, 2, 21 (2009).
- [5]. M.R. Green, J. Sambrook, Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. (3th, 2012)
- [6]. T. Hara, A. Aumayr, Y. Fujio, S. Ueda, Elimination of plasmid-linked polyglutamate production by *Bacillus subtilis* (natto) with acridine orange, *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 1456–1458 (1982).
- [7]. H.D. Nguyen, T.T.P. Phan, W. Schumann, Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*, *Current Microbiology*, 55, 89–93 (2007).
- [8]. J. Petre, R. Longin, J. Millet, Purification and properties of an endo-beta-1,4-glucanase from *Clostridium thermocellum*. *Biochimie*, 63, 629–639 (1981).
- [9]. T.T.P. Phan, H.D. Nguyen, W. Schumann, Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*, *Protein Expression and Purification*, 46, 189–195 (2006).
- [10]. A. Riederer, T.E. Takasuka, S. Makino, D.M. Stevenson, Y.V. Bukhman, N.L. Elsen, B.G. Fox, Global gene expression patterns in *Clostridium thermocellum* as determined by microarray analysis of chemostat cultures on cellulose or cellobiose, *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1243–1253 (2011).
- [11]. H. Saito, T. Shibata, T. Ando, Mapping of genes determining nonpermissiveness and host-specific restriction to bacteriophages in *Bacillus subtilis* Marburg, *Molecular & General Genetics MGG*, 170, 117–122 (1979).
- [12]. W. Schumann, Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*, *Advances in Applied Microbiology*, 62, 137–189 (2007).
- [13]. A.C. Tolonen, W. Haas, A.C. Chilaka, J. Aach, S.P. Gygi, G.M. Church, Proteome-wide systems analysis of a cellulosic biofuel-producing microbe, *Molecular Systems Biology*, 7, 461 (2011).
- [14]. P.B.V. García-Campayo, Synergism between the cellosome-integrating protein CipA and endoglucanase CelD of *Clostridium thermocellum*, *Journal of Biotechnology*, 57, 39–47 (1997).