

TẠO CHỦNG *E. COLI* CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT LYCOPENE

Nguyễn Thị Hương¹, Nguyễn Xuân Vũ
Ngô Xuân Bình¹, Dương Văn Cường

TÓM TẮT

Lycopene là sắc tố màu đỏ có trong các loại quả như gấc, cà chua, bưởi đỏ.... Sắc tố này là chất chống oxy hóa hiệu quả và đã được chứng minh là có khả năng chống lại một số bệnh ung thư nhất định, như ung thư tuyến tiền liệt. Với tiềm năng thương mại của lycopene đã có nhiều nghiên cứu sản xuất lycopene bằng các phương pháp khác nhau, trong đó phương pháp điều hướng trao đổi chất đang được quan tâm nghiên cứu. Con đường sinh tổng hợp lycopene từ tiền chất isopentenyl diphosphat (IPP) được xúc tác bởi các enzym isopentenyl diphosphat isomeraza, geranylgeranyl pyrophosphat synthetaza, phytoene synthaza, phytoene dehydrogenaza mã hóa bởi các gen tương ứng là *idi*, *crtE*, *crtB*, *crtI*. Trong nghiên cứu này đã thiết kế một cấu trúc policistron chứa các gen *idi*, *crtE*, *crtI*, *crtB* dựa trên nền tảng vector pRSET-A nhằm biểu hiện các enzym chuyển hóa các bước xúc tác từ ipp đến lycopene trong chủng *E. coli* BL21 (DE3). Đã thiết kế thành công vector pR-iEIB mang 4 gen *idi*, *crtE*, *crtI*, *crtB*. Cảm ứng biểu hiện tổ hợp gen trong *E. coli* BL21(DE3) với IPTG thu được cặn khuẩn màu hồng. Phân tích dịch cảm ứng sau 24h bằng HPLC thu được hàm lượng lycopene là 1,15 mg/l.

Từ khóa: *Idi*, *crtE*, *crtI*, *crtB*, lycopene, carotenoid.

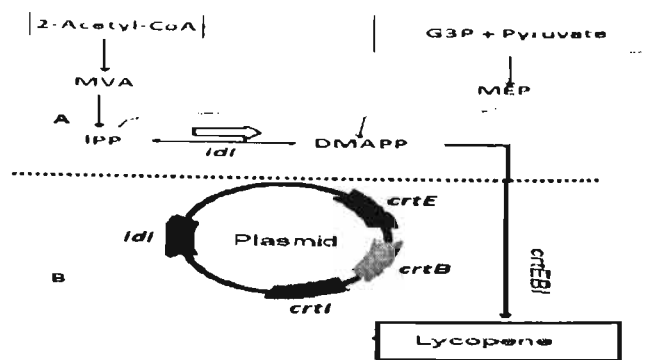
1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Carotenoid là nhóm sắc tố tự nhiên được tổng hợp trong nhiều loài thực vật, tảo nấm và vi khuẩn; nhóm chất này đang được quan tâm nghiên cứu vì tiềm năng của chúng với đời sống và sức khỏe con người (Sandmann and Gerhard, 2001). Lycopene thuộc nhóm carotenoid, được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm. Sắc tố này có khả năng bảo vệ tế bào khỏi sự oxy hóa, làm chậm quá trình phát triển của một số bệnh ung thư tiền liệt tuyến, ruột kết, thực quản và ngăn ngừa bệnh tim mạch (Giovannucci, 1999). Sử dụng khẩu phần ăn nhiều cà chua, trong đó có chứa lycopene, làm giảm tỷ lệ mắc ung thư (Sies and Stahl, 1998). Với tác dụng hữu ích của carotenoid, nhu cầu của các hợp chất này trên thị trường ngày càng tăng. Theo báo cáo của tổ chức BCC Research, thị trường carotenoid toàn cầu năm 2007 vào khoảng 766 triệu USD và dự đoán tăng lên 919 triệu USD vào năm 2015 (BBC, 2008).

Lycopene đã được sản xuất bằng tổng hợp hóa học, lên men hoặc tách từ nguồn tự nhiên (Johnson and Schroeder, 1996). Tuy nhiên những phương pháp này có nhược điểm nhất định như tạo nhiều chất thải ô nhiễm, phụ thuộc thời vụ, hiệu quả kinh tế thấp. Vì vậy sử dụng vi sinh vật để tổng hợp

lycopene đang được quan tâm nghiên cứu (Lee and Schmidt-Dannert, 2002).

Mục tiêu của nghiên cứu này là sử dụng kỹ thuật di truyền để tạo ra chủng *Escherichia coli* có khả năng sản xuất lycopene. *E. coli* tự nhiên có thể cung cấp isopentenyl diphosphat, đơn vị cấu thành của tất cả các carotenoid, thông qua con đường non-mevalonate (hình 1A). Để có thể tạo ra lycopene, *E. coli* cần được bổ sung 03 gen ngoại lai từ *Pantoea ananatis* bao gồm geranylgeranyl pyrophosphat synthaza (*crtE*), phytoene synthaza (*crtB*) và phytoene desaturaza (*crtI*). Trong thiết kế của nghiên cứu này các gen nói trên được đặt dưới sự điều khiển của promoter T7 trong vector biểu hiện pRSET-A (Hình 1B). Với mục tiêu giữ cân bằng IPP cho vật chủ, gen mã hóa enzym isopentenyl diphosphat isomeraza (*idi*) đồng thời được đưa vào thiết kế (Hình 1B).



Hình 1. Con đường trao đổi chất tự nhiên trong *E. coli* (A) và bổ sung gen ngoại lai (B) (Yoon et al., 2006)

¹Khoa Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường ĐH Nông Lâm Thái Nguyên

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Các gen carotenoid *crtE*, *crtI*, *crtB* đã được tách dòng từ vi khuẩn *Pantoea ananatis* và gen *idi* từ vi khuẩn *E. coli* DH5α trong vector pLUG. Các vị trí enzym giới hạn ở 2 đầu các gen được bảo toàn (Nguyễn Thị Hương *et al.*, 2011; Trần Thị Hương *et al.*, 2010).

Vi khuẩn *E. coli* DH5α và *E. coli* BL21(DE3) được cung cấp từ Viện Công nghệ Sinh học. Các bộ KIT ADN- spin™ Plasmid ADN Purification và MEGA-spin™ Agarose Gel Extraction của Hãng INTRON Biotechnology™. Vector biểu hiện pRSET-A của Hãng Invitrogen™ Các hoá chất thí nghiệm của các Hãng Merk, Sigma và Invitrogen.

2. Phương pháp nghiên cứu

** Thiết kế vector pR-iEIB*

Các cặp mỗi nhân gen được thiết kế dựa trên trình tự bộ gen *P. ananatis* trên ngân hàng dữ liệu NCBI (Bảng 1). Đã lựa chọn các vị trí cắt enzym giới hạn duy nhất trên pRSET-A để tạo các đầu treo trên mỗi. Để đảm bảo hoạt động của policistron, mỗi cặp mỗi đều được bố trí vị trí bám của ribosom, bộ ba mở đầu và bộ ba kết thúc riêng biệt. Thứ tự các gen trong policistron lần lượt là *idi* → *crtE* → *crtI* → *crtB* tương ứng với thứ tự của các vị trí giới hạn duy nhất trên pRSET-A lần lượt là *NdeI* → *BamHI* → *XhoI* → *KpnI* → *EcoRI* (Hình 3).

Bảng 1. Trình tự các cặp mỗi sử dụng trong nghiên cứu

Tên	Trình tự
idiF	ATACATATGATGCAAACGGAACACGTCAT
idiR	AATGGATCCTTAITTTAAGCTGGGTAAATGCAG
crtEF	TAAGGATCCAGGAGGTAATAAATATGTATCCGTTTATAAGGACAGC
crtER	CCTCTCGAGTTAACTGACGGCAGCGAG
crtIF	TAACTCGAGAGGAGGTAATAAATATGAAACCAACTACGGTAATTG
crtIR	CCTGGTACCTCAAATCAGATCCTCCAGCA
crtBF	TGAGGTACCAGGAGGTAATAAATATGAATAATCCGTCGTTACTCAATCA
crtBR	AATGAATTCCTAGAGCGGGCGCTGCCA
crtYF	TAGGAATTCAGGAGGTAATAAATATGGGAGCGGCTATGCAA
crtYR	CGCAAGCTITTAACGATGAGTCGTCATAATGG

Quá trình ghép nối gen *idi* vào vị trí *NdeI* và *BamHI* trên pRSET-A được thực hiện như sau: Gen *idi* được tách khỏi vector pLUG bằng cách xử lý với enzym *NdeI* và *BamHI*, đồng thời cắt mở vòng vector pRSET-A bằng hai enzym tương ứng với thành phần phản ứng như sau: 3 μl dung dịch đệm, 20 μl ADN plasmid, 2 μl enzym và 5 μl nước cất. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C, trong 2 giờ. Sau đó điện di sản phẩm phản ứng cắt trên gel agarose 1% và thời gel thu nhận lại gen *idi* và vector pRSET-A bằng Kit MEGA- spin™ Agarose Gel Extraction.

Gen *idi* được ghép nối vào cấu trúc pRSET-A (Mở vòng) nhờ enzym T4 ligaza, thành phần phản ứng gắn nối như sau: 2 μl đệm 5X, 4 μl vector, 12 μl ADN và 1 μl enzym nối T4 ligaza, ủ hỗn hợp phản ứng ở 16°C trong 5 giờ. Sản phẩm phản ứng gắn nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α bằng

phương pháp sốc nhiệt 42°C trong 90 giây. Sản phẩm biến nạp được cấy trải trên môi trường LB đặc có bổ sung ampicilin (0,5 μg/ml). Các dòng khuẩn lạc trắng được nhặt nuôi tăng sinh riêng rẽ trong 7 ml LB lỏng có bổ sung ampicilin ở điều kiện lắc 37°C qua đêm. Tách plasmid các dòng khuẩn lạc thu được bằng Kit “DNA-spin™” của Hãng Intron Biotechnology. Chọn lọc khuẩn lạc, kiểm tra sự có mặt của gen *idi* trong vector biểu hiện với các phản ứng cắt bằng enzym giới hạn tương ứng (*NdeI*, *BamHI*).

Thực hiện tương tự như trên tiến hành ghép nối gen *crtE* vào vị trí *BamHI* và *XhoI* của vector pR-i, gen *crtI* vào vị trí *XhoI* và *KpnI* của vector pR-iE, cuối cùng là ghép nối gen *crtB* vào vị trí *KpnI* và *EcoRI* của pR-iE1 tạo vector pR-iEIB.

** Biểu hiện pR-iEIB trong E. coli BL21 (DE3)*

Biến nạp vector pR-iEIB vào tế bào khả biến *E. coli* BL21(DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt, môi trường cấy trải là LB đặc bổ sung ampicilin (0,5 µg/ml) và IPTG. Khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch được nhặt nuôi riêng rẽ trong 7 ml LB lỏng có bổ sung amp. Lấy 100 µl mỗi dòng khuẩn nuôi trong 5 ml LB lỏng có amp, nuôi lắc 37°C trong 2 giờ rồi đo OD₆₀₀ nm. Đến khi OD đạt 0,3 đến 0,5 bổ sung IPTG đến nồng độ cuối là 0,5mM, nuôi lắc ở 37°C trong 12 giờ, 24 giờ.

** Phân tích lycopene bằng HPLC*

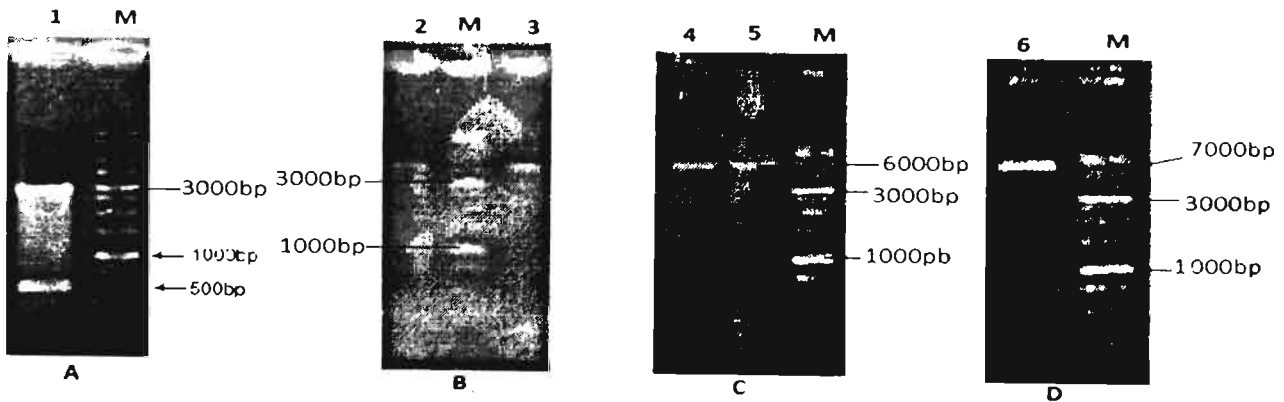
Lycopene tạo thành trong dịch nuôi được phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo quy trình của Yoon S. (Johnson and Schroeder). Mẫu dịch nuôi cảm ứng được ly tâm thu cặn tế bào ở 14000 vòng trong 40 giây, rửa cặn với nước một lần. Bổ sung 1 ml axeton vào ống cặn tế bào và ủ ở 55°C, 15 phút ở trong tối. Sau đó ly tâm ở 14000 v/p trong 10 phút và thu dịch nổi chứa

lycopene sang một ống mới. Lycopene chiết xuất tế bào được định tính, định lượng trên máy (LC - 20A Shimadzu, Japan) với điều kiện sắc ký là: Detecto UV-VIS là 454 và 475 nm, cột Symmetry C18 (250x mm; 5 µm); pha động metanola: axetonitrin (70:30) tốc độ dòng 1,5 ml/phút.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả thiết kế vector pR-iEIB

Để kiểm tra sự có mặt của gen *idi*, *crtE*, *crtI*, *crtB* trong các plasmid (pR-i, pR-iE, pR-iEI, pR-iEIB) đã tiến hành cắt với enzym tương ứng; kết quả thể hiện trên hình 2. Theo lý thuyết khi cắt vector pR-i đồng thời với *NdeI* + *BamHI* sẽ tạo 2 băng: 1 băng khoảng 3 kb của vector pRSET-A và 1 băng khoảng 500 bp của gen *idi* (549 bp). Khi cắt mở vòng pR-iE với *BamHI*, *XhoI*; pR-iEI với *XhoI*, *KpnI* và pR-iEIB với *EcoRI* sẽ tạo băng kích thước tương ứng khoảng 4,3 kb; 6 kb và 7 kb.

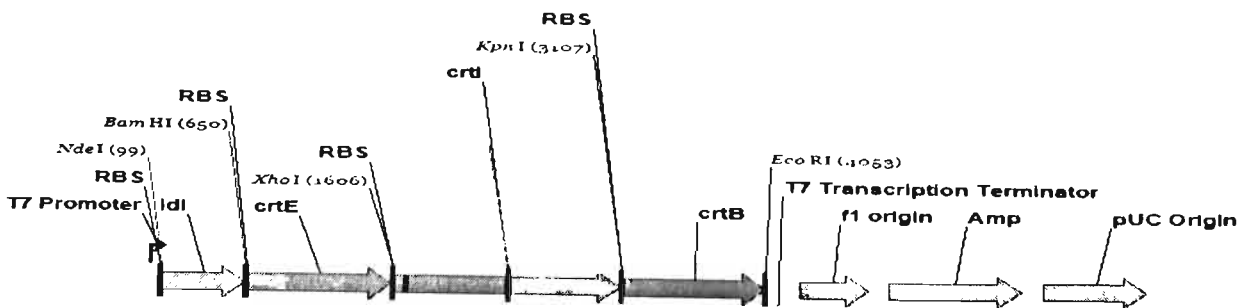


Hình 2. Kết quả cắt pR-i (A), pR-iE (B), pR-iEI (C), pR-iEIB (D)

M: Thang ADN chuẩn 1 kb; đường chạy 1: pR-i cắt với *NdeI*+*BamHI*; đường chạy 2, 3 pR-iE cắt với lần lượt với *BamHI*, *XhoI*; đường chạy 4, 5 pR-iEI cắt lần lượt với *XhoI*, *KpnI*; đường chạy 6: pR-iEIB cắt với *EcoRI*

Hình 2A cho thấy, đường chạy 1 xuất hiện 2 băng có kích thước lần lượt 3 kb và 500 bp tương ứng vector pRSET-A và gen *idi* (549 bp). Đường chạy 2, 3 xuất hiện băng khoảng 4,3 kb, đường chạy 4, 5 xuất hiện băng khoảng 6 kb, đường chạy 6 xuất hiện băng

khoảng 7 kb. Như vậy có thể kết luận đã gắn thành công gen *idi*, *crtE*, *crtI*, *crtB* tạo vector tương ứng pR-i, pR-iE, pR-iEI, pR-iEIB và các gen gắn xuôi chiều trên vector. Sơ đồ vector pR-iEIB được thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Sơ đồ vector pR-iEIB

Các gen *idi*, *crtE*, *crtI*, *crtB* đều có chứa vị trí bám của ribosom, bộ ba mở đầu và bộ ba kết thúc, vì vậy trên vector pR-iEIB các gen hoạt động theo nguyên lý polycistron dưới sự điều khiển của promoter T7.

Trong nghiên cứu này, gen *crtB* của *P. ananatis* được sử dụng có trình tự mã bộ ba mở đầu TTG đã thay đổi thành bộ ba ATG. Theo nghiên cứu của Schneider năm 1986, *E. coli* thường sử dụng ATG làm mã bộ ba mở đầu cho quá trình dịch mã, *E. coli* cũng có thể sử dụng các mã bộ ba khác như GTG và TTG để làm mã mở đầu. Tuy nhiên, chúng ưu tiên sử dụng ATG với tần số 90%, lớn hơn rất nhiều so với GTG (8%) và TTG (1%) (O'Donnell and Janssen, 2001; Schneider *et al.*, 1986). Do vậy, trình tự mã bộ ba mở đầu TTG thay đổi thành ATG làm tăng mức độ biểu hiện của gen này trong *E. coli*.

2. Kết quả biểu hiện pR-iEIB trong *E. coli* BL21 (DE3)

Sau khi biến nạp vector pR-iEIB vào chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) và cảm ứng bằng IPTG đã thu được các dòng khuẩn lạc màu hồng (Hình 4).



Hình 4. Biểu hiện lycopene trong *E. coli* BL21 (DE3)

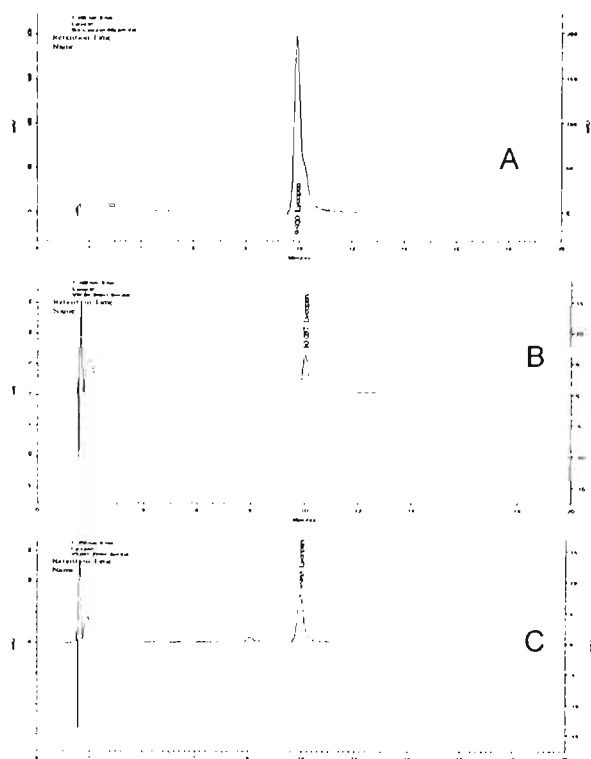
Ống 1: cấy khuẩn dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang pR-iEIB; ống 2: đối chứng (cấy tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang pR-iE1)

Như vậy dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang pR-iEIB biểu hiện màu hồng chính là màu của sắc tố lycopene. Để khẳng định cấy khuẩn màu hồng là lycopene tiến hành phân tích dịch khuẩn cảm ứng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

3. Kết quả phân tích lycopene bằng phương pháp HPLC

Sắc ký đồ của mẫu chuẩn, mẫu cảm ứng 12 giờ và 24 giờ được thể hiện ở hình 5.

Từ hình 5A, 5B, 5C cho thấy thời gian lưu ở các sắc ký đồ tương đối ổn định, tương ứng là 9,930 phút, 10,037 phút, 9,963 phút. Vậy có thể khẳng định dịch cảm ứng có chứa lycopene.



Hình 5. Sắc ký đồ (A) mẫu chuẩn, (B) mẫu 12h, (C) mẫu 24h

Kết quả biểu hiện tổ hợp gen pR-iEIB với sự điều khiển của promoter T7 thu được hàm lượng lycopene trong mẫu cảm ứng 12h là 0,868 mg/l, mẫu 24h tăng 25% so với mẫu 12h (1,15 mg/l). Đã có nhiều nghiên cứu khác nhau về quá trình điều hướng trao đổi chất nhằm tăng cường tổng hợp lycopene trong *E. coli*. Theo Sang-Hee Lee để tăng cường biểu hiện lycopene, các gen *crtE*, *crtI*, *crtB* và *ipiHP1* được đưa vào vector pTr99A với promoter mạnh *trc* thu được hàm lượng lycopene là 17 mg/l (Yoon *et al.*, 2006). *E. coli* có chứa các gen crt của *P. agglomerans* sản xuất được 27 mg/l lycopene khi nuôi trong môi trường không chứa chất cảm ứng IPTG cao gấp 2 lần so với sản xuất bằng *E. coli* chứa gen crt của *P. ananatis* (12 mg/l) khi môi trường nuôi cấy có bổ sung 0,1 mM IPTG (Yoon *et al.*, 2007). Wang và cộng sự đã đạt được kết quả tăng vọt khi tiến hành đưa gen *dxs* và *gps* cùng các gen crt vào chủng vi khuẩn *E. coli*, làm hiệu quả tổng hợp lycopene tăng lên 45 mg/l (Wang *et al.*, 2000). So sánh với các kết quả trên, nhằm tăng hàm lượng lycopene trong các nghiên cứu sau, dự định một số hướng, bao gồm: Sử dụng các vector biểu hiện với promoter khác với nồng độ chất cảm ứng và thời gian cảm ứng khác nhau; sử dụng gen crt của *P. Agglomerans*; đưa các gen của con đường mevalonate (*mvaK1*, *mvaK2*, *mvaD*); *dxs*, *dxr*, *gps*,... vào *E. coli* để tăng cường tổng hợp các tiền chất của IPP.

IV. KẾT LUẬN

Đã thiết kế thành công vector pR-iEIB mang policistron gồm 4 gen *idi*, *crtE*, *crtI*, *crtB*. Cảm ứng biểu hiện tổ hợp gen trong *E. coli* BL21(DE3) dưới sự điều khiển của promoter T7 thu được hàm lượng lycopene là 1,15 mg/l. Kết quả này là tiền đề cho các bước nghiên cứu tiếp theo nhằm tăng hàm lượng lycopene sản phẩm và tạo một số chủng *E. coli* có khả năng sản xuất các carotenoid có giá trị khác.

Lời cảm ơn: Công trình được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Giovannucci, E., 1999. *Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature*. J. Natl. Cancer Inst. 91 (4): 317-331.
2. Johnson, E. A. & Schroeder, W. A., 1996. *Microbial carotenoids*. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 53: 119-178.
3. Lee, P. C. & Schmidt-Dannert, C., 2002. *Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 (1-2): 1-11.
4. Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Xuân Vũ & Dương Văn Cường, 2011. *Tách dòng gen crtI mã hóa cho Phytoene dehydrogenaza từ Pantoea ananatis*. Tạp chí Y học Việt Nam 384 (2): 180-184.
5. O'Donnell, S. M. & Janssen, G. R., 2001. *The initiation codon affects ribosome binding and translational efficiency in Escherichia coli of cI mRNA with or without the 5' untranslated leader*. J. Bacteriol. 183(4): 1277-1283.
6. Sandmann & Gerhard, 2001. *Carotenoid Biosynthesis and Biotechnological Application*.

Archives of Biochemistry and Biophysics 385(1): 4-12.

7. Schneider, T. D., Stormo, G. D., Gold, L. & Ehrenfeucht, A., 1986. *Information content of binding sites on nucleotide sequences*. J. Mol. Biol. 188(3): 415-431.

8. Sies, H. & Stahl, W., 1998. *Lycopene: antioxidant and biological effects and its bioavailability in the human*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 218(2): 121-124.

9. Trần Thị Hương, Nguyễn Thị Hòa & Dương Văn Cường, 2010. *Tách dòng và xác định trình tự gen idi mã hóa cho isopentenyl diphosphat isomeraza từ E. coli DH5α*. Hội nghị khoa học và công nghệ khối nông lâm ngư thủy toàn quốc lần thứ 5 (2): 827-832.

10. Wang, C., Oh, M. K. & Liao, J. C., 2000. *Directed evolution of metabolically engineered Escherichia coli for carotenoid production*. Biotechnol. Prog. 16(6): 922-926.

11. Yoon, S.-H., Lee, Y.-M., Kim, J.-E., Lee, S.-H., Lee, J.-H., Kim, J.-Y., Jung, K.-H., Shin, Y.-C., Keasling, J. D. & Kim, S.-W., 2006. *Enhanced lycopene production in Escherichia coli engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate*. Biotechnology and Bioengineering 94(6): 1025-1032.

12. Yoon, S. H., Kim, J. E., Lee, S. H., Park, H. M., Choi, M. S., Kim, J. Y., Shin, Y. C., Keasling, J. D. & Kim, S. W., 2007. *Engineering the lycopene synthetic pathway in E. coli by comparison of the carotenoid genes of Pantoea agglomerans and Pantoea ananatis*. Appl. Microbiol Biotechnol. 74(1): 131-139.

PRODUCTION OF LYCOPENE BY METABOLICALLY ENGINEERED E. COLI STRAIN

Nguyen Thi Huong, Nguyen Xuan Vu, Ngo Xuan Binh, Duong Van Cuong

Summary

Lycopene is the red pigment dominantly available in cochinchingourd, tomato, red grapefruit, etc. Because of its strong antioxidant property, lycopene has been considered as an anticancer compound in some specific cases, such as prostate cancer. The commercial value of lycopene enhanced studies to find alternative methods of production. Metabolic engineering of the well understood non-carotenogenic bacteria *E. coli* is one of the main approach. The biosynthesis pathway of lycopene derived from the building block isopentenyl diphosphate (IPP) catalyzed by the enzymes *isopentenyl diphosphate isomerase*, *geranylgeranyl pyrophosphate synthetase*, *phytoene synthase*, and *phytoene dehydrogenase* encoded by *idi*, *crtE*, *crtB*, *crtI*, respectively. In this study a policistron of *idi*, *crtE*, *crtI*, and *crtB* based on pRSET-A vector has been designed to express the required enzymes in *E. coli* BL21(DE3). The pR-iEIB vector were successfully constructed to harbour *idi*, *crtE*, *crtI*, and *crtB*. Overexpression of the policistron under the control of T7 promoter generated red cell pellet. HPLC analysis of the 24h culture confirmed the availability of lycopene at 1.15 mg/l.

Keywords: *Idi*, *crtE*, *crtI*, *crtB*, *lycopene*, *carotenoid*.

Người phản biện: TS. Nguyễn Văn Đồng