

Tối ưu hóa quy trình biểu hiện và tinh sạch MHETase-PETase trên hệ thống *Escherichia coli*

Võ Thị Tú Bình*, Trần Hồng Diễm, Trần Thị Hậu, Phùng Thị Thu Hường

¹Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Thành phố Hồ Chí Minh

²Trung tâm Phát triển Công nghệ cao Đại học Nguyễn Tất Thành, Khu Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh

*vttbinh@ntt.edu.vn

Tóm tắt

PET (polyethylene terephthalate) là nhựa tổng hợp phổ biến nhưng khó phân hủy sinh học, gây ô nhiễm môi trường. Việc phát hiện hai enzyme PETase và MHETase từ vi khuẩn *Ideonella sakaiensis* đã mở ra hướng xử lý PET bằng công nghệ sinh học. Tuy nhiên, công nghệ biểu hiện và tinh sạch enzyme ghép MHETase-PETase trên *Escherichia coli* vẫn chưa tối ưu, đòi hỏi nhiều bước phức tạp. Nghiên cứu này tập trung tối ưu hóa điều kiện biểu hiện và đơn giản hóa quy trình tinh sạch enzyme ghép MHETase-PETase nhằm nâng cao hiệu suất và khả năng ứng dụng quy mô lớn. Kết quả cho thấy chủng *E. coli* BL21(DE3) đạt hiệu quả biểu hiện tốt nhất với điều kiện tối ưu là cảm ứng bằng 0,1 mM IPTG ở 30 °C trong 6 giờ. Quá trình tinh sạch chỉ cần một bước sắc ký ái lực Ni-NTA, thu được enzyme với hàm lượng 7,33 mg/mL. Khi khảo sát hoạt tính phân hủy PET, enzyme ghép MHETase-PETase bắt đầu phân hủy PET sau 7 ngày ở nồng độ 0,4 mg/mL, với mức độ phân hủy tăng đáng kể sau 28 ngày. Enzyme ghép thể hiện hoạt tính vượt trội so với PETase đơn lẻ, có thể phân hủy PET chỉ sau 48 giờ. Nghiên cứu này mở ra hướng ứng dụng enzyme trong công nghệ xử lý PET và tái chế nhựa bền vững.

Nhận 16/03/2025

Được duyệt 10/06/2025

Công bố 28/06/2025

Từ khóa

PET,
MHETase-PETase,
tối ưu biểu hiện,
tinh sạch

© 2025 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Sản lượng nhựa trên toàn cầu đạt 413,8 triệu tấn (2023) và đến năm 2050, sản lượng chất thải nhựa tích lũy được dự đoán đạt trên 25 tỷ tấn, gấp 3 lần mức hiện tại [1,2]. Khả năng trở về mặt hóa học của nhựa dẫn đến sự mất kiểm soát tích tụ chất thải trong tất cả hệ sinh thái trên trái đất. Theo thống kê từ Bộ Tài nguyên và Môi trường, Việt Nam có khoảng 1,8 triệu tấn rác thải nhựa ra môi trường, trong đó (0,28-0,73) triệu tấn bị thải ra biển. Tuy nhiên, chỉ 27 % trong tổng số rác thải nhựa là được tái chế, tận dụng bởi các cơ sở, và doanh nghiệp. Trong số đó, 90 % rác thải được xử lý theo cách

chôn, lấp, đốt và chỉ 10 % còn lại được tái [3]. Hiện nay, việc tái chế nhựa dựa trên hai phương pháp chính là hóa học và sinh học. Tái chế nhựa theo hướng hóa học đòi hỏi xúc tác hóa chất, đi kèm các điều kiện nhiệt độ, áp suất cao và tiêu thụ một lượng lớn năng lượng [2]. Ngoài ra, phương pháp này tiêu tốn nhiều chi phí và tạo ra lượng lớn các chất độc hại thứ cấp gây nguy cơ ô nhiễm môi trường [4]. Ngược lại, xử lý nhựa bằng phương pháp sinh học tiết kiệm chi phí, hiệu suất cao hơn và không tạo ra các chất ô nhiễm do không phụ thuộc vào các chất xúc tác, điều kiện phản ứng. Sản phẩm cuối cùng của quá trình phân hủy sinh học có thể

được thu hồi và mang lại lợi ích kinh tế như ethanol dùng trong nhiên liệu sinh học [5].

Phân hủy PET bằng phương pháp sinh học chủ yếu dựa vào enzyme có nguồn gốc từ vi sinh vật như nấm và vi khuẩn để xúc tác quá trình thủy phân PET ở nhiệt độ cao [6]. Trong đó, hai enzyme PETase và MHETase được phát hiện từ vi khuẩn *Ideonella sakaiensis* 201-F6, đã tạo nền tảng cho nhiều nghiên cứu xử lý rác thải PET bằng enzyme [7]. PETase xúc tác quá trình phân cắt PET thành mono(2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET), sau đó MHETase tiếp tục chuyển hóa MHET thành acid terephthalic (TPA) và ethylene glycol (EG) [8]. Tuy nhiên, sự tích tụ MHET có thể bám vào vùng không hoạt động của PETase dẫn đến giảm hiệu suất phân giải PET. Để khắc phục vấn đề này, các nghiên cứu gần đây đã tiến hành ghép PETase và MHETase thành enzyme hợp nhất để tăng cường hiệu quả phân hủy PET bằng cách giảm sự bám dính cơ chất trung gian (MHET) và tạo điều kiện cho phản ứng xúc tác liên tiếp [9, 10]. Kết quả từ các nghiên cứu này cho thấy enzyme ghép có thể cải thiện đáng kể hiệu suất phân hủy PET so với enzyme đơn lẻ.

Dù các nghiên cứu trước đây đã thành công trong việc tinh sạch enzyme ghép MHETase – PETase bằng các phương pháp sắc ký nhiều bước, một số hạn chế vẫn tồn tại. Cụ thể, quy trình tinh sạch protein trong hai nghiên cứu trước khá phức tạp, đòi hỏi nhiều bước như sắc ký ái lực Ni-NTA, sắc ký lọc gel và siêu lọc để loại muối [9, 10]. Quy trình này làm tăng thời gian và chi phí và còn có thể gây thất thoát protein, ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi. Việc lựa chọn chủng vi khuẩn biểu hiện thích hợp cũng đóng vai trò quan trọng trong việc tối ưu hóa năng suất và chất lượng protein tái tổ hợp. Sự lựa chọn này ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng và quyết định mức độ biểu hiện và trạng thái hòa tan của protein [11]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào tập trung vào việc lựa chọn chủng biểu hiện tối ưu và đơn giản hóa quy trình tinh sạch enzyme ghép này. Đây là những yếu tố quan trọng giúp thu nhận enzyme với hiệu suất cao và phù hợp cho các ứng dụng quy mô công nghiệp sau này. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu tối ưu hóa chủng và điều kiện biểu hiện trên hệ thống *E. coli*, đồng thời đơn giản hóa quy trình

tinh sạch enzyme ghép MHETase-PETase, tạo tiền đề cho quá trình tinh sạch hiệu quả hơn mà không yêu cầu quá nhiều thời gian và chi phí. Việc tối ưu biểu hiện giúp nâng cao mức độ tổng hợp protein, hạn chế hình thành thể vùi, đảm bảo enzyme có cấu trúc đúng và từ đó tăng cường hoạt tính xúc tác. Đồng thời, thay vì sử dụng nhiều bước sắc ký như các nghiên cứu trước, quy trình tinh sạch được đơn giản hóa chỉ còn sắc ký ái lực Ni-NTA, giúp thu nhận enzyme với hiệu suất tốt hơn, giảm chi phí sản xuất và tạo điều kiện thuận lợi để ứng dụng enzyme vào quy mô công nghiệp.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu và thiết bị nghiên cứu

Plasmid pCJ190 (Addgene) được thiết kế từ pET-21b(+), mang gen mã hóa tổ hợp MHETase-ETase từ *I. sakaiensis*, liên kết qua đoạn Gly/Ser và tối ưu hóa codon cho *E. coli*, có đuôi His-tag ở đầu C [10]. Các chủng *E. coli* BL21(DE3), C41(DE3) và MG1655(DE3) được bảo quản tại Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT và nuôi cấy trong môi trường LB (Difco, USA). Kháng thể kháng His-tag gắn HRP được cung cấp bởi Proteintech (Singapore) phát hiện protein mang His-tag sau một lần ủ. Thiết bị thí nghiệm gồm: máy PCR (Eppendorf, Germany), buồng điện di (Bio-Rad, Singapore), thiết bị western blot bán khô (Thermo Fisher, USA) và hệ thống chụp ảnh gel G:BOX Chemi XRQ (Syngene, England).

2.2 Phương pháp

2.2.1 Biến nạp vector tái tổ hợp pCJ190 vào *E. coli*

Vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3), C41 (DE3) và MG1655 (DE3) được nuôi cấy ở 37 °C với tốc độ lắc 150 rpm trong 10 mL môi trường Luria-Bertani (LB) lỏng qua đêm. Sau đó, 1 mL dịch nuôi được chuyển vào 30 mL LB và tiếp tục nuôi đến khi OD600 đạt 0,4-0,5. Tế bào được ủ đá 10 phút, ly tâm 6 000 rpm, 4 °C trong 8 phút, rửa với CaCl₂ 0,1 M lạnh, rồi tiếp tục ly tâm và bổ sung CaCl₂ 0,1 M trong glycerol 15 %. Plasmid tái tổ hợp (1 µL, 5 ng/µL) được chuyển vào 50 µL tế bào khả nạp, ủ đá 30 phút, sốc nhiệt 42 °C trong 1 phút, ủ lạnh 5 phút. Thêm 950 µL LB, ủ 37 °C trong 60 phút, lắc 150 rpm, ly tâm và cấy lên đĩa LB có ampicillin 100 µg/mL.

Khuẩn lạc sau ủ đêm được kiểm tra gen mục tiêu bằng PCR khuẩn lạc với môi T7.

2.2.2 PCR khuẩn lạc kiểm tra sau khi biến nạp

Lấy 1/2 khóm khuẩn lạc đơn trên đĩa LB hòa tan với 30 μ L nước miliQ đã hấp vô trùng và ủ hỗn hợp ở 95 °C trong 5 phút. Sau đó, phản ứng PCR khuẩn lạc được thực hiện với cặp môi T7 terminator: GCTAGTTATTGCTCAGCGG và T7 promoter: TAATACGACTCACTATAGGG để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen mục tiêu trong tế bào *E. coli* sau khi biến nạp. Chu trình chạy được thực hiện theo hướng dẫn của Taq 2X MasterMix (NEB, Anh). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 1 %.

2.2.3 So sánh biểu hiện protein MHETase-PETase giữa các chủng *E. coli* (DE3)

Khuẩn lạc đơn của *E. coli* BL21(DE3), C41(DE3) và MG1655(DE3) mang vector pCJ190 được nuôi qua đêm trong 10 mL LB + ampicillin 1X ở 37 °C, lắc 150 rpm. Tiếp theo, 1 mL dịch nuôi được chuyển vào 50 mL LB + ampicillin 1X và nuôi đến khi OD600 đạt 0,6-0,8. IPTG 1 mM được thêm vào và cảm ứng ở 20 °C trong (18-24) giờ. Tế bào được thu bằng ly tâm 10 000 rpm trong 10 phút, hòa vào buffer NPI-10 (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole) theo tỷ lệ 1 g:10 mL. Sau đó, tế bào được phá vỡ bằng siêu âm (20 Hz, 20 % biên độ, chu kỳ 10 giây, đầu tip 6 mm) trong 5 phút. Hiệu suất biểu hiện protein MHETase-PETase được đánh giá qua SDS-PAGE và Western blot dựa trên độ đậm/nhạt của các băng protein ở các pha tổng, tựa và tan. Phương pháp điện di SDS-PAGE và lai miễn dịch Western blot sử dụng kháng thể kháng 6X His được thực hiện [13]. Độ đậm nhạt của băng protein trong thí nghiệm Western blot được phân tích và so sánh bằng phần mềm ImageJ.

2.2.4 Khảo sát điều kiện biểu hiện tối ưu protein MHETase-PETase

Khuẩn lạc đơn của chủng *E. coli* BL21(DE3) mang vector pCJ190 được nuôi tăng sinh trong ống nghiệm chứa 10 mL LB có bổ sung ampicillin 1X và lắc ở tốc độ 150 rpm ở 37 °C qua đêm. Sau đó, 1 mL dung dịch tăng sinh được chuyển vào các ống nghiệm chứa 50 mL LB + ampicillin 1X và tiếp tục nuôi lắc cho đến khi

OD600 đạt giá trị từ 0,6 đến 0,8. Chất cảm ứng IPTG được thêm vào với các nồng độ cuối khác nhau: (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 và 1,5) mM và quá trình cảm ứng được thực hiện tại 4 mức nhiệt độ khác nhau: (16, 20, 25 và 30) °C. Đồng thời, thời gian cảm ứng cũng được điều chỉnh phù hợp với từng mức nhiệt độ [10, 14, 15]. Các bước tiếp theo, hiệu suất biểu hiện protein MHETase-PETase được thực hiện và đánh giá tương tự mô tả thí nghiệm ở trên.

2.2.5 Biểu hiện và tinh sạch protein MHETase-PETase
Tế bào *E. coli* BL21(DE3) mang gen mã hóa protein MHETase-PETase được nuôi trong 1 L môi trường LB + ampicillin 1X và cảm ứng bằng IPTG trong điều kiện tối ưu. Tế bào được thu bằng ly tâm 10 000 rpm trong 15 phút, sau đó hòa với buffer NPI-10 theo tỷ lệ 1 g tế bào:10 mL NPI-10 và bổ sung protease inhibitor cocktail (Sigma, USA) theo tỷ lệ 1 g tế bào:250 μ L cocktail. Tế bào được phá bằng sóng siêu âm (20 Hz, 20% biên độ, chu kỳ bật/tắt 10 giây, đầu tip 6 mm) trong 20–30 phút tùy thể tích mẫu. Hỗn hợp sau siêu âm được ly tâm 12.000 rpm trong 30 phút, thu dịch nổi (lysate) và tinh sạch protein bằng cột Ni-NTA agarose (Qiagen, Germany, (4-6) mL). Cột được cân bằng bằng NPI-10, dịch lysate cho chảy qua với tốc độ (4-5) giây/giọt. Dịch không gắn được thu lại; cột rửa bằng NPI-10 (gấp 2,5 lần thể tích cột) để loại protein không đặc hiệu. Protein đích có đuôi 6X His được rửa giải bằng NPI-90 (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 90 mM). Các phân đoạn rửa giải được thu vào eppendorf 1,5 mL (1 mL/phân đoạn). Cuối cùng, cột được làm sạch bằng NPI-500 (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 500 mM), rửa và bảo quản trong cồn 20 %.

2.2.6 Đánh giá sơ bộ hoạt tính phân hủy PET của enzyme MHETase-PETase sau tinh sạch

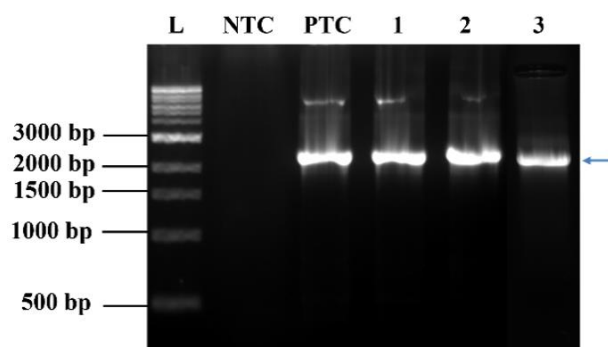
Định lượng MHETase-PETase tinh sạch được thực hiện bằng Pierce™ Bradford Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Các miếng nhựa PET có đường kính 5 mm được cắt từ chai nước giải khát thương mại (PepsiCo, Việt Nam). Những miếng nhựa này được ủ với enzyme ghép (0,4 mg/mL) hoặc enzyme đơn PETase (0,4 mg/mL) trong dung dịch đệm gồm NaCl 90 mM, Na_3PO_4 45 mM (pH = 7,5) và DMSO 10

% (v/v), ở nhiệt độ 30 °C [10]. Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm một thể tích methanol 100 % tương đương với thể tích dung dịch phản ứng. Sau đó, các miếng nhựa được rửa sạch lần lượt bằng SDS 1 %, DMSO 100 %, nước siêu sạch và ethanol 95 %. Cuối cùng, các mẫu nhựa được sấy khô ở 60 °C trước khi quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 10X tại các mốc thời gian cố định. Dung dịch đệm có thể được thay thế sau mỗi lần quan sát để đảm bảo điều kiện phản ứng ổn định.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Tạo chủng *E. coli* chứa plasmid pCJ190

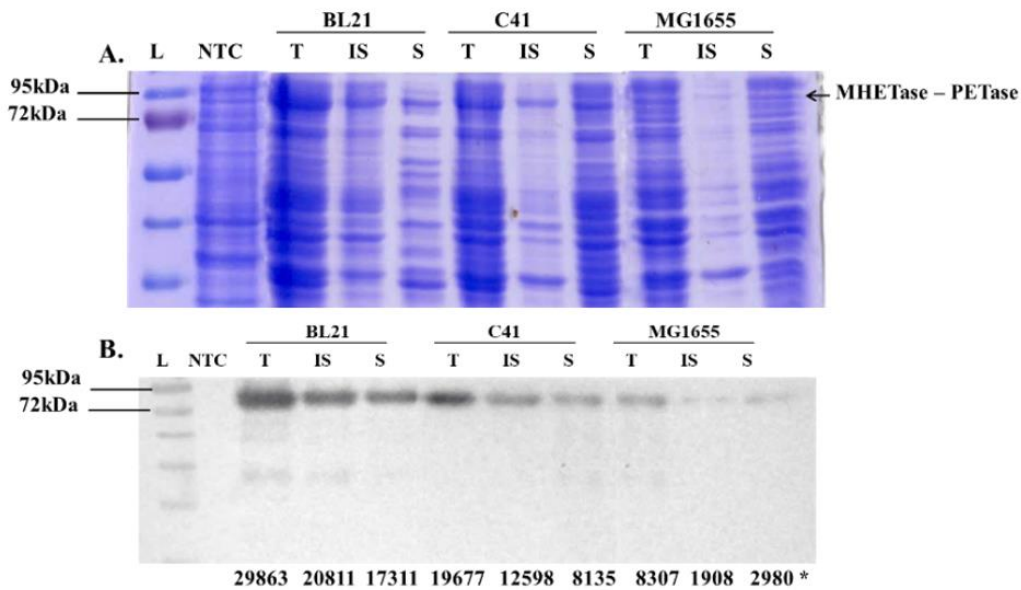
Các chủng vi khuẩn *E. coli* DE3 mang gen T7 RNA polymerase dưới sự kiểm soát của promoter lacUV5 có thể cảm ứng bằng IPTG. Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 1) cho thấy tất cả các chủng *E. coli* BL21 (DE3), C41 (DE3) và MG1655 (DE3) sau biến nạp đều xuất hiện băng DNA có kích thước 2 661 bp, tương ứng với đoạn gen mã hóa enzyme ghép MHETase-PETase. Kháng định plasmid pCJ190 đã được biến nạp thành công vào cả ba chủng vi khuẩn. Do đó, các bước tiếp theo sẽ tập trung vào việc đánh giá biểu hiện và tối ưu điều kiện cảm ứng biểu hiện enzyme ghép MHETase-PETase, nhằm đánh giá sự phù hợp của từng chủng vi khuẩn trong việc sản xuất enzyme với hiệu suất tốt nhất.



Hình 1 Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc sau biến nạp với cặp mồi T7. L: thang DNA 1kb; NTC: chủng *E. coli* BL21(DE3) không biến nạp plasmid; PTC: plasmid pCJ190; (1) chủng *E. coli* BL21 sau biến nạp (2) chủng *E. coli* C41 sau biến nạp (3) chủng *E. coli* MG1655 sau biến nạp.

3.2 Khảo sát chủng *E. coli* biểu hiện protein MHETase-PETase tối ưu

Ba chủng vi khuẩn *E. coli* BL21, C41 và MG1655 đã được khảo sát về khả năng biểu hiện protein MHETase-PETase. Kết quả SDS-PAGE cho thấy BL21 có mức độ biểu hiện protein cao nhất với băng protein mục tiêu rõ ràng trong cả pha tổng (T) và pha tan (S), cho thấy khả năng biểu hiện protein ở pha tan tốt. Chủng C41 biểu hiện thấp hơn và lượng protein hòa tan ít hơn, riêng MG1655 có mức biểu hiện kém nhất. Dựa vào Western blot, chủng BL21 có kết quả tương tự và tốt hơn hai chủng còn lại (Hình 2). Vì vậy, *E. coli* BL21 (DE3) được xác định là chủng tối ưu cho việc sản xuất MHETase-PETase.



Hình 2 Khảo sát chủng vi khuẩn *E.coli* biểu hiện tối ưu MHETase-PETase

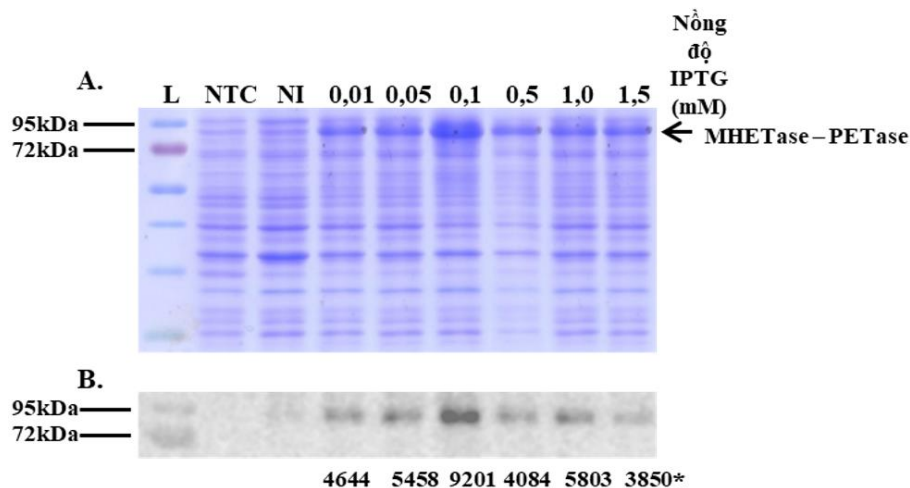
Trong Hình 2, điện di SDS-PAGE (A) và lai Western blot với kháng thể kháng 6X His tag (B). L: thang color prestained protein standard broad range; NTC: chủng *E. coli* BL21(DE3) không biến nạp plasmid. T (Total): pha tổng, IS (Insoluble): pha tủa, S (Soluble): pha tan. Protein được cảm ứng biểu hiện với 1 mM IPTG ở 20 °C trong (18-24) giờ với các chủng khảo sát BL21, C41 và MG1655. *Cường độ đậm (%), dữ liệu được phân tích bằng phần mềm ImageJ.

3.3 Xác định điều kiện biểu hiện tối ưu protein MHETase-PETase ở *E. coli* BL21(DE3)

Nồng độ IPTG, nhiệt độ và thời gian cảm ứng là những thông số then chốt ảnh hưởng đến hiệu quả biểu hiện protein tái tổ hợp trong hệ thống *E. coli* BL21 (DE3). Nồng độ IPTG quyết định mức độ hoạt động promoter T7, nồng độ quá cao (≥ 1 mM) có thể gây ức chế sinh trưởng tế bào và hình thành thể vùi. Trong khi nồng độ IPTG thấp hơn (0,05-0,5) mM cho hiệu quả biểu hiện ổn định hơn và tăng khả năng hòa tan của protein [11]. Nhiệt độ thấp (20-30) °C giúp giảm tốc độ tổng hợp

protein, qua đó cải thiện khả năng gấp cuộn đúng cấu trúc và hạn chế tạo thể vùi. Thời gian cảm ứng quyết định tổng lượng protein thu được trước khi tế bào bước vào pha suy thoái. Thời gian quá ngắn có thể không đủ tích lũy protein, trong khi cảm ứng quá dài dễ làm giảm hiệu suất do stress tế bào [16].

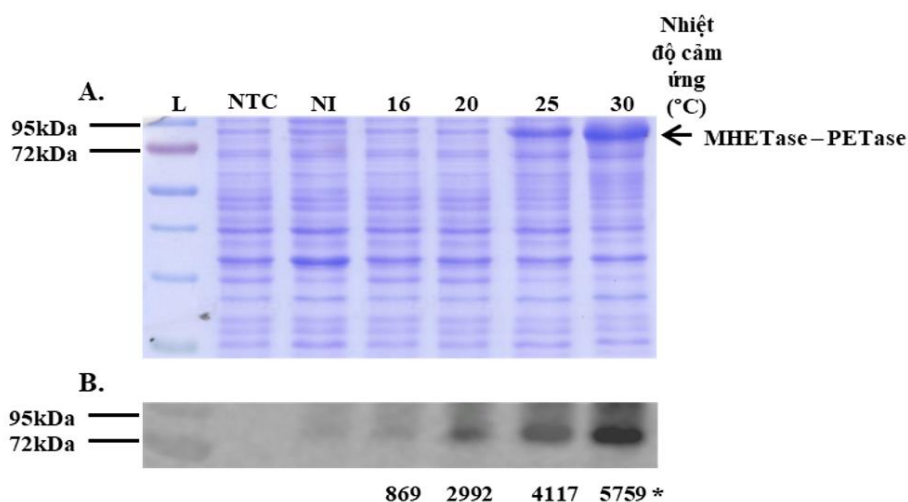
Đầu tiên, nồng độ IPTG được xác định nhằm tối ưu biểu hiện MHETase-PETase ở *E. coli* BL21(DE3). Kết quả SDS và Western blot cho thấy vạch tín hiệu của protein MHTase-PETase xuất hiện ở tất cả các nồng độ IPTG được khảo sát (0,01-1,5) mM (Hình 3). Tuy nhiên, ở nồng độ 0,1 mM, vạch tín hiệu rõ nhất, cho thấy mức độ biểu hiện protein tối ưu so với các nồng độ còn lại. Ở các nồng độ thấp hơn (0,01 và 0,05) mM, vạch protein mờ hơn, chứng tỏ mức độ biểu hiện ít hơn. Ngược lại, khi tăng nồng độ IPTG lên (0,5-1,5) mM, lượng protein không tăng mà còn có dấu hiệu giảm. Vì vậy, 0,1 mM IPTG được lựa chọn làm nồng độ cảm ứng để biểu hiện MHETase-PETase ở *E. coli* BL21 cho các thí nghiệm sau.



Hình 3 Khảo sát nồng độ cảm ứng IPTG biểu hiện tối ưu MHETase-PETase trên chủng *E.coli* BL21

Trong Hình 3, điện di SDS-PAGE (A) và lai Western blot với kháng thể kháng 6X His tag (B). L: thang color prestained protein standard broad range; NTC: chủng *E. coli* BL21(DE3) không biến nạp plasmid; NI: chủng *E. coli* BL21(DE3) trước khi cảm ứng IPTG. Protein được cảm ứng biểu hiện ở 25 °C trong 8 giờ với các khoảng IPTG khảo sát (0,01-1,5) mM. * Cường độ đậm (%), dữ liệu được phân tích bằng phần mềm ImageJ. Nhiệt độ cảm ứng là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tốc độ phiên mã và dịch mã của protein tái tổ hợp.

Thí nghiệm này khảo sát sự biểu hiện protein thay đổi theo nhiệt độ cảm ứng từ 16 °C đến 30 °C. Tại nghiệm thức 16 °C trong 24 giờ, vạch tín hiệu protein nhạt nhất, cho thấy quá trình biểu hiện diễn ra chậm hoặc không hiệu quả. Vạch tín hiệu protein rõ dần từ nghiệm thức 20 đến 30 và đạt tối ưu tại nghiệm thức 30 tương ứng với giá trị cảm ứng ở 30 °C trong 6 giờ (Hình 4). Từ đó, 30 °C được chọn là nhiệt độ biểu hiện MHETase-PETase ở *E. coli* BL21(DE3) cho các thí nghiệm sau.



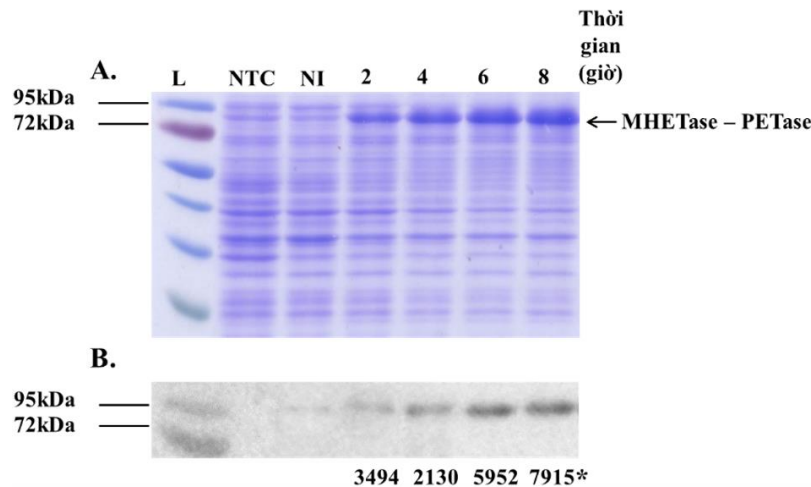
Hình 4 Khảo sát nhiệt độ cảm ứng IPTG biểu hiện tối ưu MHETase-PETase trên chủng *E.coli* BL21

Trong Hình 4, điện di SDS-PAGE (A) và lai Western blot với kháng thể kháng 6X His tag (B). L: thang color prestained protein standard broad range; NTC: chủng *E. coli* BL21(DE3) không biến nạp plasmid; NI: chủng *E. coli* BL21(DE3) trước khi cảm ứng IPTG. Protein

được cảm ứng biểu hiện với 0,1 mM IPTG trong khoảng khảo sát ở các mốc nhiệt độ 16 (24 giờ), 20 (16 giờ), 25 (8 giờ) và 30 (6 giờ). *Cường độ đậm (%), dữ liệu được phân tích bằng phần mềm ImageJ.

Thí nghiệm khảo sát thời gian cảm ứng cho thấy sự khác biệt rõ rệt về mức độ biểu hiện protein ở các mốc thời gian (2, 4, 6 và 8) giờ. Tại thời điểm 2 giờ sau khi cảm ứng với IPTG, protein mục tiêu bắt đầu xuất hiện và tăng dần theo thời gian. Đặc biệt, tại mốc 6 giờ và 8 giờ, mức độ biểu hiện đạt giá trị cao nhất, với tín hiệu protein rõ ràng và đậm nhất (Hình 5). Không có sự khác biệt đáng kể giữa 6 giờ và 8 giờ, cho thấy mức độ biểu hiện protein đã đạt ngưỡng tối ưu vào thời điểm 6 giờ.

Do đó, thời điểm 6 giờ sau khi cảm ứng được lựa chọn là tối ưu để cân bằng giữa hiệu suất và thời gian nuôi cấy. Từ các kết quả thu được, điều kiện tối ưu cho biểu hiện protein MHETase-PETase trong chủng *E. coli* BL21 (DE3) được xác định là sử dụng IPTG ở nồng độ 0,1 mM, cảm ứng ở 30 °C trong 6 giờ. Các điều kiện này đóng vai trò nền tảng cho các bước tiếp theo như tinh sạch và đánh giá hoạt tính enzyme.

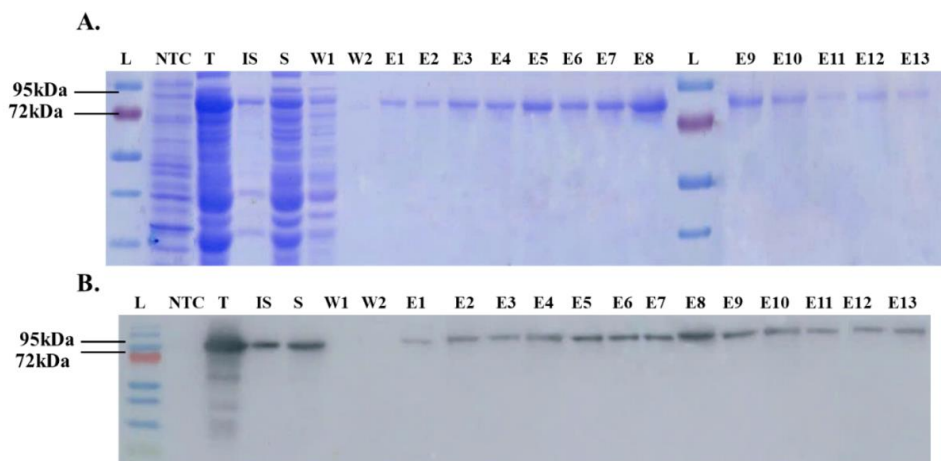


Hình 5 Khảo sát thời gian cảm ứng IPTG biểu hiện tối ưu MHETase-PETase trên chủng *E. coli* BL21

Trong Hình 5, điện di SDS-PAGE (A) và lai Western blot với kháng thể kháng 6X His tag (B). L: thang color prestained protein standard broad range; NTC: chủng *E. coli* BL21(DE3) không biến nạp plasmid; NI: chủng *E. coli* BL21(DE3) trước khi cảm ứng IPTG. Protein được cảm ứng biểu hiện với 0,1 mM IPTG ở 30 °C tại các mốc thời gian (2, 4, 6 và 8) giờ. *Cường độ đậm (%), dữ liệu được phân tích bằng phần mềm ImageJ. Điều kiện cảm ứng khi sử dụng IPTG 0,1 mM tại 30 °C bằng chủng *E. coli* BL21 (DE3) cho thấy lượng protein MHETase-PETase biểu hiện đạt mức tối ưu sau 6 giờ cảm ứng. So với nghiên cứu [18], mặc dù cùng sử dụng nồng độ IPTG và nhiệt độ tương tự để biểu hiện MHETase nhưng thời gian cảm ứng trong nghiên cứu này dài hơn (6 giờ so với 5 giờ) Trong khi đó, chủng *E. coli* C41 để biểu hiện enzyme ghép MHETase-PETase trong điều kiện IPTG 1 mM ở 20 °C từ (18-24) giờ [10]. So sánh với nghiên cứu trên, điều kiện biểu hiện của nghiên cứu hiện tại không chỉ giúp rút ngắn thời gian cảm ứng mà còn giảm đáng kể lượng IPTG sử dụng, đồng thời cho hiệu

quả biểu hiện cao hơn khi dùng chủng BL21. Những kết quả này khẳng định tính hiệu quả và khả thi của điều kiện biểu hiện được thiết lập trong nghiên cứu này, đồng thời phù hợp với xu hướng tối ưu hóa chi phí và thời gian trong sản xuất enzyme tái tổ hợp.

3.4 Biểu hiện và tinh sạch protein MHETase – PETase
Protein được tinh sạch bằng sắc ký ái lực Ni-NTA, được phân tích bằng SDS-PAGE và xác nhận qua Western blot, Hình 6. Kết quả SDS-PAGE cho thấy protein mục tiêu (92 kDa) xuất hiện ở các phân đoạn rửa giải (E1-E13). Các protein tập trung chủ yếu ở các phân đoạn E5–E9, trong đó E8 là phân đoạn đỉnh có lượng protein mục tiêu nhiều nhất. Phân tích Western blot khẳng định sự có mặt của protein mục tiêu trong các phân đoạn rửa giải, trong khi mẫu đối chứng âm (NTC) không xuất hiện vạch tín hiệu, xác nhận rằng MHETase-PETase chỉ được biểu hiện khi có plasmid mang gen tương ứng. Kết quả cho thấy protein ghép MHETase-PETase đã được tinh sạch thành công thông qua sắc ký ái lực Ni-NTA.

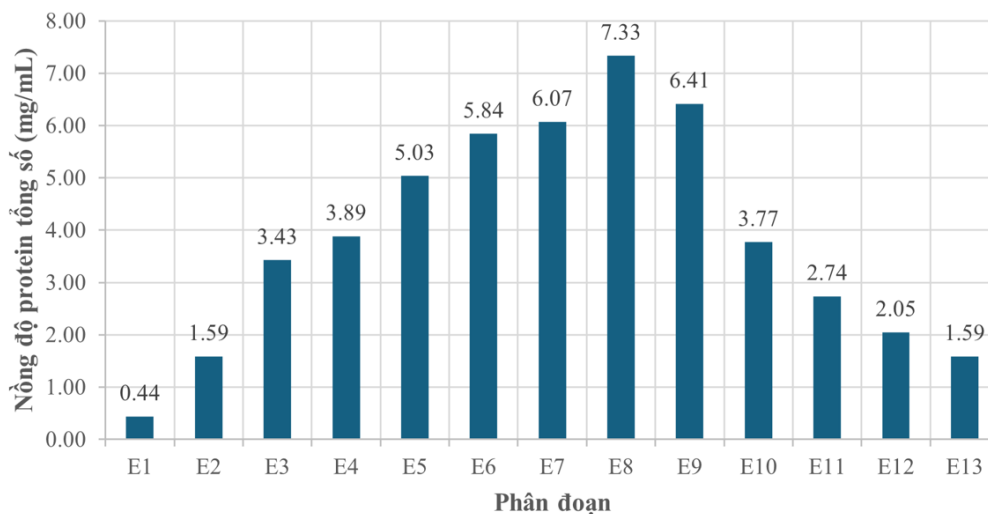


Hình 6 Kết quả SDS-PAGE các phân đoạn tinh sạch MHETase-PETase bằng sắc ký ái lực Ni-NTA có bổ sung PI.

Trong Hình 6, điện di SDS-PAGE (A) và lai Western blot với kháng thể kháng 6X His tag (B). T (total): phần tổng, IS (Insoluble): phần không tan, S (Soluble): dịch nổi sau ly tâm, L: thang color prestained protein standard broad range, W1-2: phân đoạn rửa cột (W1: NPI-10, W2: NPI-20); E1-10: phân đoạn rửa giải với NPI-90 (mỗi phân đoạn chỉ thu 1mL); NTC: chủng E. coli BL21(DE3) không biến nạp plasmid.

Để đảm bảo protein sau tinh sạch có nồng độ phù hợp cho thí nghiệm đánh giá hoạt tính, các phân đoạn rửa

giải được định lượng protein tổng số bằng phương pháp Bradford (Hình 7). Ở giai đoạn đầu (E1-E2), nồng độ protein còn thấp (0,44-1,59) mg/mL, cho thấy lượng protein thu nhận ban đầu chưa đáng kể. Từ phân đoạn E3 trở đi, nồng độ protein tăng dần, đạt cực đại tại E8 với giá trị 7,33 mg/mL. Đây là phân đoạn chứa lượng enzyme đích cao nhất. Sau E8, nồng độ protein giảm dần qua các phân đoạn E10–E13, cho thấy sự suy giảm của protein mục tiêu, có thể do lượng protein đã được rửa giải gần hết.



Hình 7 Kết quả định lượng protein tổng số trong mỗi phân đoạn sau tinh sạch bằng phương pháp Bradford

Ni-NTA là phương pháp tinh sạch protein tái tổ hợp được sử dụng phổ biến hơn so với các kỹ thuật như trao đổi ion hay sắc ký lọc gel nhờ vào cơ chế ái lực đặc hiệu giữa His tag và ion Ni^{2+} . Cụ thể, Ni-NTA cho phép

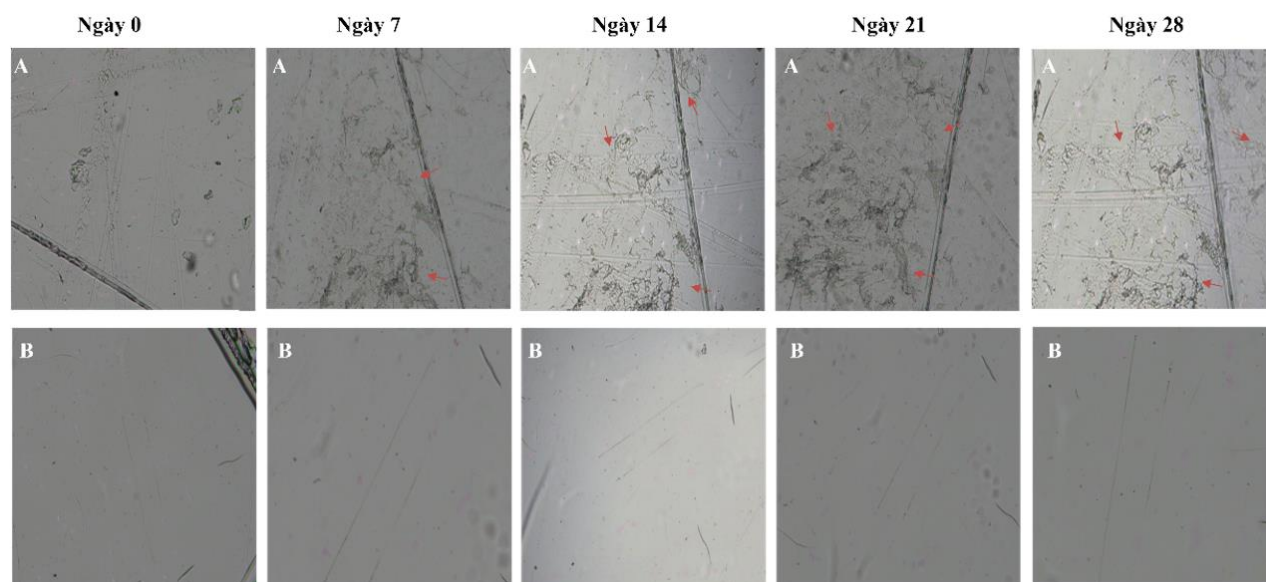
liên kết chọn lọc với chuỗi histidine được gắn vào protein mục tiêu, giúp loại bỏ hiệu quả các tạp chất chỉ sau một bước sắc ký. Trong khi đó, các phương pháp truyền thống như trao đổi ion yêu cầu tối ưu hóa nhiều

điều kiện như pH và lực ion, và thường cần nhiều bước để đạt được độ tinh khiết tương đương. Ngoài ra, quy trình tinh sạch bằng Ni-NTA diễn ra trong điều kiện ít bị ảnh hưởng bởi hóa chất, giúp duy trì hoạt tính sinh học của protein [18]. Protein ghép MHETase-PETase được tinh sạch bằng sắc ký ái lực Ni-NTA đã đơn giản hóa so với các nghiên cứu trước đây.

3.5 Đánh giá sơ bộ hoạt tính phân hủy PET của protein MHETase-PETase

Sau 28 ngày ủ với enzyme MHETase-PETase tinh sạch ở nồng độ 0,4 mg/mL, phân tích dưới kính hiển vi cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa mẫu thử nghiệm (A) và mẫu đối chứng (B) (Hình 8). Ở mẫu A, các vết xước

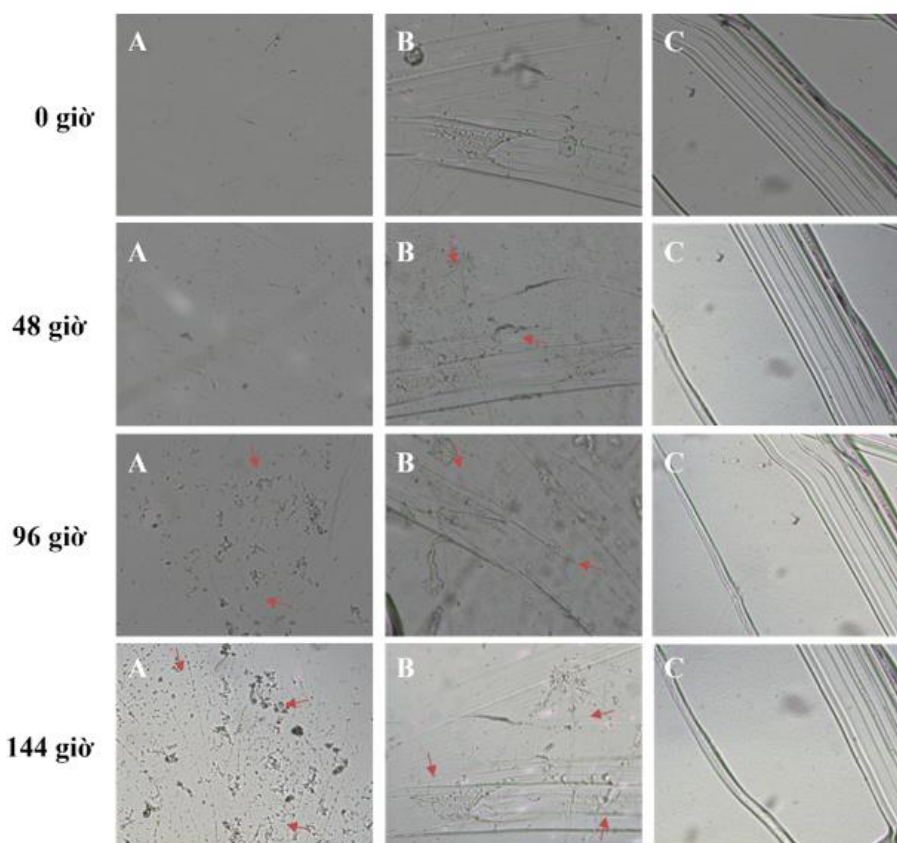
trên bề mặt PET bắt đầu xuất hiện từ ngày thứ 7 và trở nên rõ rệt hơn theo thời gian. Đến ngày 28, sự lan rộng của các vết xước phản ánh mức độ phân hủy đáng kể trên bề mặt miếng nhựa, cho thấy enzyme ghép đã tác động trực tiếp lên PET, góp phần phá hủy cấu trúc polyme. Ngược lại, bề mặt PET ở mẫu B (mẫu không bổ sung enzyme MHETase-PETase) không có sự thay đổi đáng kể, vẫn giữ nguyên trạng thái ban đầu và không xuất hiện dấu hiệu phân hủy rõ rệt. Kết quả này khẳng định rằng sự biến đổi quan sát được ở mẫu A là do hoạt động của enzyme MHETase-PETase, thay vì ảnh hưởng từ các yếu tố trong dung dịch đệm trong quá trình ủ.



Hình 8 Kết quả theo dõi hoạt tính MHETase - PETase tinh sạch nồng độ 0,4 mg/mL trong 28 ngày (độ phóng đại 10X). (A) Mẫu ủ trong hỗn hợp MHETase-PETase 0,4 mg/mL và dung dịch NaCl 90 mM, Na_3PO_4 45 mM (pH = 7,5) và (v/v) DMSO 10 % ở 30 °C. (B) Mẫu ủ trong dung dịch đệm dung dịch đệm NaCl 90 mM, Na_3PO_4 45 mM (pH = 7,5) và (v/v) DMSO 10 % ở 30 °C

Khi so sánh sơ bộ hoạt tính giữa enzyme ghép MHETase-PETase (A) và enzyme đơn PETase (B), các miếng nhựa đều xuất hiện dấu vết phân hủy sau 144 giờ (Hình 9). Ở mốc 0 giờ, bề mặt nhựa ở cả ba mẫu A, B và C chưa có sự thay đổi. Sau 48 giờ, enzyme ghép bắt

đầu tạo ra các vết cắt nhẹ, trong khi enzyme đơn có ít tác động hơn. Sự khác biệt trở nên rõ nét hơn ở các mốc thời gian 96 giờ và 144 giờ. Kết quả trên cho thấy hoạt tính của enzyme MHETase-PETase sau tinh sạch có hoạt tính mạnh hơn so với enzyme PETase.



Hình 9 Kết quả so sánh hoạt tính của MHETase-PETase và PETase trong 144 giờ (độ phóng đại 10X). (A) Mẫu ủ trong hỗn hợp PETase 0,4 mg/mL và dung dịch đệm NaCl 90 mM, Na_3PO_4 45 mM (pH = 7,5) và (v/v) DMSO 10 % ở 30 °C. (B) Mẫu ủ trong hỗn hợp MHETase-PETase 0,4 mg/mL và dung dịch đệm NaCl 90 mM, Na_3PO_4 45 mM (pH = 7,5) và (v/v) DMSO 10 % ở 30 °C. (C) Mẫu ủ trong dung dịch đệm dung dịch đệm NaCl 90 mM, Na_3PO_4 45 mM (pH = 7,5) và (v/v) DMSO 10 % ở 30 °C.

4 Kết luận

Nghiên cứu này đã tối ưu hóa được điều kiện biểu hiện và quy trình tinh sạch protein ghép MHETase-PETase, nhằm nâng cao hiệu suất sản xuất và tiềm năng ứng dụng enzyme trong phân hủy nhựa PET. Kết quả thu được xác định chủng *E. coli* BL21 (DE3) là chủng biểu hiện hiệu quả nhất với điều kiện cảm ứng tối ưu là 0,1 mM IPTG ở 30 °C, trong 6 giờ. Quá trình tinh sạch sử dụng sắc ký ái lực Ni-NTA đã thu nhận được protein có khối lượng 92 kDa, tập trung chủ yếu ở các phân đoạn rửa giải E5-E9, trong đó E8 là phân đoạn có độ tinh khiết cao nhất (7,33 mg/mL). Đặc biệt, enzyme MHETase-PETase tinh sạch thể hiện hoạt tính phân hủy PET rõ rệt với sự thay đổi bề mặt PET quan sát được từ ngày thứ 7 và trở nên rõ ràng hơn sau 28 ngày

ủ ở 30 °C với nồng độ enzyme 0,4 mg/mL. So với enzyme PETase, enzyme ghép cho thấy hoạt tính vượt trội, có thể phân hủy nhựa PET chỉ sau 48 giờ trong cùng điều kiện phản ứng.

Những kết quả này không chỉ khẳng định tính khả thi của việc sử dụng *E. coli* BL21 (DE3) để biểu hiện MHETase-PETase, mà còn giải quyết được hạn chế trong việc tối ưu hóa biểu hiện và tinh sạch enzyme ghép – một yếu tố quan trọng để hướng tới ứng dụng công nghiệp. Việc tối ưu biểu hiện giúp cải thiện mức độ tổng hợp protein, hạn chế hiện tượng tủa, từ đó đảm bảo enzyme có cấu trúc đúng và tăng hoạt tính xúc tác. Đồng thời, đơn giản hóa quy trình tinh sạch không chỉ giúp thu được enzyme có hoạt tính mà còn giảm chi phí sản xuất, mở ra hướng nghiên cứu mới trong phát triển các giải pháp enzyme sinh học bền vững nhằm xử lý

nhựa PET trên quy mô công nghiệp. Mặc dù nghiên cứu đã tối ưu hiệu quả điều kiện biểu hiện và đơn giản hóa quy trình tinh sạch enzyme MHETase-PETase nhưng vẫn tồn tại một số hạn chế. Cụ thể, hiệu suất tinh sạch protein chưa được đánh giá một cách toàn diện và hoạt tính enzyme mang tính định tính thông qua quan sát hiển vi. Những kết quả bước đầu này là cơ sở quan

trọng, định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm hoàn thiện quy trình và tiến hành phân tích chuyên sâu hơn về hiệu quả enzyme.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Thành Phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số 2024.01.24/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Brahney, J., Hallerud, M., Heim, E., Hahnenberger, M., & Sukumaran, S. (2020). Plastic rain in protected areas of the United States. *Science* 368, 1257. <https://doi.org/10.1126/science.aaz5819>
2. Geyer B., Lorenz G., & Kandelbauer A. (2016). Recycling of poly(ethylene terephthalate)—a review focusing on chemical method. *Express Polymer Letters* 10, 559. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2016.53>
3. Mạnh Hùng. (2022). *Rác thải nhựa ở Việt Nam: Thực trạng và giải pháp*. Truy cập ngày 16/02/2025 tại: <https://tapchicongsan.org.vn/bao-ve-moi-truong/-/2018/826009/rac-thai-nhua-o-viet-nam--thuc-trang-va-giai-phap.aspx>.
4. Al-Sabagh A. M., Yehia F. Z., Eshaq G., Rabie A. M., & ElMetwally A. E. (2016). Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate. *Egyptian Journal Petroleum* 25, 53. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.001>
5. Webb H., Arnott J., Crawford R., & Ivanova E. (2013). Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate). *Polymers* 5, 1. <https://doi.org/10.3390/polym5010001>
6. Wei R., & Zimmermann W. (2017). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we. *Microbial Biotechnology* 10, 1308. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12710>
7. Yoshida S., Hiraga K., Takehana T., Taniguchi I., Yamaji H., Maeda Y.,...Oda K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* 351, 1196. <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>
8. Maity, W., Maity, S., Bera, S., & Roy, A. (2021). Emerging Roles of PETase and MHETase in the Biodegradation of Plastic Wastes. *Applied Biochemistry Biotechnology* 193, 2699. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03562-4>
9. Zhang, J., Wang, H., Luo, Z., Yang, Z., Zhang, Z., Wang, P.,...Zhu, Y. (2023). Computational design of highly efficient thermostable MHET hydrolases and dual enzyme system for PET recycling. *Communications Biology* 6, 1135. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05523-5>
10. Knott, B. C., Erickson, E., Allen, M. D., Gado, J. E., Graham, R., Kearns, F. L.,...McGeehan, J. E. (2020). Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, 25476. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006753117>
11. Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
12. Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2015). *Western Blotting: An Introduction*. In: Kurien, B., Scofield, R. (eds) *Western Blotting. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, p. 17-30. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_5.



13. Heyde, S. A. H., & Nørholm, M. H. H. (2021). Tailoring the evolution of BL21(DE3) uncovers a key role for RNA stability in gene expression toxicity. *Communications Biology* 4, 963. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02493-4>
14. Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* 72, 211-222. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8>
15. Akiba, H., & Tsumoto, K. (2016). Expression in bacteria and refolding. In T. Senda & K. Maenaka (Eds.), *Advanced Methods in Structural Biology* (pp. 3–23). Tokyo: Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-56030-2_1
16. Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology* 10, 411-421. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(99)00003-8)
17. Hoa, Đ. T., Cường, P. K., & Anh, T. L. (2024). Nghiên cứu thiết kế và biểu hiện gene mã hóa enzyme MHETase trong *E. coli*. *Journal of Military Science and Technology*, (FEE), 280-285.
18. Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology* 326, 245–254. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8)

Optimization of expression and purification of MHETase-PETase in *Escherichia coli*

Binh Thi Tu Vo^{1,2,*}, Diem Hong Tran^{1,2}, Hau Thi Tran^{1,2}, Huong Thi Thu Phung^{1,2}

¹Center for Hi-Tech Development, Nguyen Tat Thanh University, Saigon Hi-Tech Park, Ho Chi Minh City, Vietnam

²NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh City, Vietnam

*vttbinh@ntt.edu.vn

Abstract Polyethylene terephthalate (PET) is a widely used synthetic polymer with low biodegradability, causing tremendous environmental pollution. The discovery of PET-degrading enzymes PETase and MHETase from *Ideonella sakaiensis* 201-F6 has accelerated the development of biological approaches for PET waste treatment. However, expression and purification of the fusion protein MHETase–PETase in *Escherichia coli* remain suboptimal, requiring multiple complex steps. In this study, we optimized the expression conditions and streamlined the purification process of the MHETase–PETase enzyme to enhance production efficiency and scalability. Results indicated that *E. coli* BL21(DE3) was the most effective host, with optimal induction achieved by adding 0.1 mM IPTG at 30 °C for 6 hours. Using a single Ni–NTA affinity chromatography step, the purified enzyme reached 7.33 mg/mL in the elution peak. At 0.4 mg/mL of enzyme concentration, PET film degradation was observed after 7 days of incubation at 30 °C, and significantly increased by day 28. Notably, the fusion protein MHETase–PETase displayed superior activity to PETase alone, with PET degradation observed as early as 48 hours under the same conditions. These findings highlight the potential of combining an optimized host strain, tailored culture conditions, and a simplified purification protocol to improve production yield while reducing costs. This study paves the way for the application of enzyme-based biotechnology in PET processing, contributing to the development of sustainable plastic recycling solutions.

Keywords PET, MHETase-PETase, expression optimization, recombinant protein purification

