

BIỂU HIỆN GEN VÀ THU NHẬN ENZYME MALTOGENIC AMYLASE TÁI TỔ HỢP TỪ *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3) CHO ỨNG DỤNG TRONG CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM

*Nguyễn Thị Phương Thảo¹, Nguyễn Thị Thu Hiền¹, Vũ Kim Thoa¹,
Nguyễn Thị Ngọc Anh¹, Nguyễn Thành Chung¹
Email: phuongthaocnsh@hou.edu.vn*

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 02/04/2025

Ngày phản biện đánh giá: 03/10/2025

Ngày bài báo được duyệt đăng: 20/10/2025

DOI: 10.59266/houjs.2025.851

Tóm tắt: Công nghệ DNA tái tổ hợp có nhiều ứng dụng quan trọng trong ngành công nghiệp thực phẩm, đặc biệt là trong sản xuất enzyme. Enzyme maltogenic amylase ứng dụng trong sản xuất maltose, cải thiện chất lượng bánh mì và xử lý tinh bột. Gen MT được xác định trình tự từ GenBank, mã hóa cho enzyme maltogenic amylase. Tách dòng gen MT từ chủng vi khuẩn probiotic *Bacillus subtilis* MHN21, chèn vào vector biểu hiện và biểu hiện trên chủng vi khuẩn *Escherichia coli* BL21 (DE3). Kết quả khảo sát các thông số trong quá trình biểu hiện gen cho thấy ở nhiệt độ 37°C, nồng độ chất cảm ứng IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) 1,5 mM, thời gian biểu hiện 4 giờ là điều kiện tối ưu cho sự biểu hiện enzyme. Đánh giá hoạt tính enzyme thô cho thấy enzyme thu được có hoạt độ 103,25 U/mg ở 55°C, pH=7. Quy trình biểu hiện gen và thu nhận enzyme maltogenic amylase tái tổ hợp có tính khả thi và mở ra tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm.

Từ khóa: biểu hiện gen, maltogenic amylase, enzyme tái tổ hợp

I. Đặt vấn đề

Các vi sinh vật như vi khuẩn, nấm men và nấm cùng với enzyme của chúng được sử dụng rộng rãi trong một số chế phẩm thực phẩm để cải thiện hương vị và kết cấu, đồng thời mang lại lợi ích kinh tế to lớn cho các ngành công nghiệp. Enzyme vi sinh vật là nguồn được ưa chuộng hơn so với enzyme thực vật hoặc động vật do

một số ưu điểm như lên men sản xuất dễ dàng, tiết kiệm chi phí, có tính nhất quán cao nên việc sửa đổi và tối ưu hóa quy trình có thể được thực hiện rất dễ dàng (Raveendran & cộng sự, 2018).

Maltogenic amylase là một phân lớp của hydrolase cyclodextrin thuộc họ glycosidehydrolase 13. Các nguồn cung cấp enzyme hiện tại là từ *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Actinomyces*, *Aspergillus*,

¹ Trường Đại học Mở Hà Nội

Byssoschlamys và *Penicillium* (Goesaert & cộng sự, 2009). Maltogenic amylase là một enzyme thủy phân tinh bột thành maltose (một loại đường được tạo thành từ hai phân tử glucose), do đó có tên gọi maltogenic. Trong công nghiệp, maltogenic amylase không chỉ được sử dụng để tổng hợp các hợp chất thông qua phản ứng chuyển hóa glycosyl hóa, thủy phân tinh bột và các sản phẩm từ tinh bột (Baek & cộng sự, 2003), mà còn giúp cải thiện vấn đề về ngoại hình bên ngoài của bánh, mùi vị thơm hơn, mềm hơn và thời hạn sử dụng lâu hơn (Amigo & cộng sự, 2021; Liu & cộng sự, 2023; Zhai & cộng sự, 2022). Do đó, nó có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm. Tuy nhiên, maltogenic amylase thường được sản xuất với năng suất thấp và độ ổn định nhiệt kém. Công nghệ gene giúp tạo ra enzyme tái tổ hợp mang lại lợi ích về môi trường và chất lượng sản phẩm. Do vậy, nghiên cứu này thực hiện nhằm tách chiết thu nhận enzyme maltogenic amylase tái tổ hợp từ chủng *Escherichia coli* BL21 ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm.

II. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Các chủng vi khuẩn

- *Bacillus subtilis* MHN21: chủng probiotic được nghiên cứu từ đề tài cấp Trường, mã số MHN2022-02.05, chủng cung cấp gen MT mã hóa cho enzyme maltogenic amylase (Nguyễn & cộng sự, 2024).

- *E. coli* XL1 Blue: chủng chuyển gen

- *E. coli* BL21 (DE3): chủng biểu hiện gen

Các chủng vi khuẩn sinh trưởng phát triển trên môi trường Luria-Bertani (LB; 0,5% cao nấm men, 1% Tryptone, 1% NaCl) ở 37°C.

2.1.2. Gen MT

Gen MT được xác định từ ngân hàng Genbank với mã số NP_391342.1, có độ dài 1764bp, gồm 589 amino acids mã hóa sinh tổng hợp enzyme maltogenic alpha amylase với kích thước khoảng 68.7 kDa.

Gen MT được tách dòng gen từ chủng *Bacillus subtilis* MHN21

2.1.3. Vector và plasmid

- pGEM-T Easy vector (Promega): Vector nhân dòng sản phẩm PCR

- pET-32a (+) (Promega): Vector biểu hiện

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết DNA genome từ vi khuẩn

Chủng vi khuẩn probiotic *Bacillus subtilis* MHN21 được nuôi cấy trong môi trường LB, sau 18h tiến hành ly tâm 5000 vòng/phút, 10 phút, 4°C để thu tế bào. Tách chiết DNA genome của chủng theo phương pháp Phenol/Chloroform (Wright & cộng sự, 2017).

2.2.2. Phương pháp khuếch đại gen PCR

Phản ứng nhân gen MT bằng cặp mồi MT-F (5'-CGGAATTCatggaatgcgcgattca-3'), MT-R (5'-CCCTCGAGtacagggcgccgacactca-3') với chu trình nhiệt là 95°C - 5 phút, 25 chu kỳ (95°C - 30s, 52°C - 30s, 72°C - 1 phút 50s), 72°C - 8 phút. Sản phẩm điện di kiểm tra trên gel agarose 1% (Harley & Prescott, 2002).

2.2.3. Phương pháp cắt, nối DNA

Sử dụng enzyme giới hạn *XhoI* và *EcoRI* để cắt đoạn chứa gen MT, phản ứng ở 37°C trong 1 giờ. Sản phẩm điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

Sử dụng enzyme T4 DNA ligase để nối đoạn gen MT với vector, phản ứng ở 16°C qua đêm, sản phẩm được chuyển gen vào tế bào khả biến tạo vector tái tổ hợp (Harley & Prescott, 2002).

2.2.4. Phương pháp chuyển gen vào tế bào vi khuẩn

Dung dịch CaCl₂ 0,1M làm cho màng tế bào *E. coli* trở nên khả nạp, DNA xâm nhập dễ dàng xâm nhập hơn. Hỗn hợp DNA plasmid và tế bào khả biến *E. coli* được giữ trong nước đá 30 phút, shock nhiệt 42°C trong 60 giây. Sau đó chuyển dịch tế bào vào nước đá để 1 - 2 phút. Bổ sung 500μl LB lỏng. Nuôi lắc ở 37°C, 150rpm trong 1 giờ. Lấy dịch cấy trang trên môi trường LB chứa X-gal, IPTG và kháng sinh thích hợp, để ở 37°C qua đêm (Harley & Prescott, 2002).

2.2.5. Phương pháp biểu hiện gen

Vector tái tổ hợp được chuyển gen vào *Escherichia coli* BL21 (DE3). Chủng sau sàng lọc mang gen biểu hiện tăng sinh trong 3ml môi trường LB-ampicillin (100μg/ml), nuôi lắc qua đêm 16-18h ở 37°C. Sau đó, chuyển 2% dịch nuôi tế bào tăng sinh bậc 1 sang bình tam giác chứa 100ml môi trường LB-ampicillin 100μg/ml. Nuôi lắc 150rpm ở 37°C đến khi OD 600nm đạt 0,5-0,6. Bổ sung IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) với nồng độ 0,5-2,0 mM/ml, lắc 150rpm 37°C để biểu hiện protein tái tổ hợp. (Lin & cộng sự, 2024)

Thu mẫu sau các thời gian nuôi lắc 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h. Ly tâm thu sinh khối tế bào. Rửa và phá vỡ tế bào, thu protein thô, sản phẩm chạy điện di protein SDS-PAGE và đánh giá hoạt tính enzyme thô.

2.2.6. Phương pháp phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm

Dịch nuôi tế bào *E. coli* BL21 sau khi biểu hiện gen MT ly tâm 6000rpm, 4°C trong 15 phút. Loại bỏ dịch và thu tế bào. Rửa tế bào 2 lần bằng nước cất, ly tâm 6000rpm, 4°C trong 15 phút. Thu tế bào, bổ sung đệm phosphat pH 7.0 và phenylmethylsulfonyl fluoride để ức chế protease. Sử dụng thiết bị công phá mẫu Qsonica Q700 Mỹ, thời gian xử lý mẫu trong 10 phút, với chu kỳ ngắn phá mẫu 5 giây và nghỉ 10 giây. Trong quá trình thực hiện, phải đảm bảo mẫu luôn được làm lạnh trong nước đá. Sau đó ly tâm 10.000rpm, 4°C trong 15 phút thu dịch protein enzyme thô, chạy điện di SDS-PAGE kiểm tra (Ferdous & cộng sự, 2021).

2.2.7. Phương pháp xác định hoạt tính enzyme

Hoạt tính của enzyme maltogenic amylase được xác định bằng phương pháp DNS. Thêm 0,1ml enzyme vào 1,9ml cơ chất α-cyclodextrin hòa tan trong đệm phosphat pH 7.0. Hỗn hợp được để ở 55°C trong 30 phút. Sau đó thêm DNS, đun sôi 10 phút. Để nguội nhiệt độ phòng và đo độ hấp thụ ở bước sóng 540nm (Sulong & cộng sự, 2017).

Một đơn vị hoạt độ enzyme là lượng enzyme cần thiết để chuyển hóa α-cyclodextrin tạo thành 1 mg maltose trong thời gian 1 phút ở 55°C.

Phương trình tính toán hoạt độ enzyme dựa trên phương trình của đồ thị đường chuẩn DNS theo maltose:

$$H_d = (X/T) * D/V_e$$

Trong đó:

X: Hàm lượng đường khử maltose có trong mẫu phản ứng

T: thời gian phản ứng

D: Hệ số pha loãng của enzyme

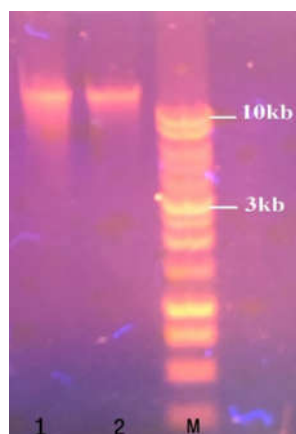
V_e: thể tích enzyme tham gia phản ứng

III. Kết quả và thảo luận

3.1. Tách dòng gen MT từ *Bacillus subtilis* MHN21

3.1.1. Tách DNA tổng số

Chủng *Bacillus subtilis* MHN21 được nuôi cấy trong môi trường LB, 37°C, lắc 150rpm qua đêm 16-18h. Dịch nuôi ly tâm 5000rpm trong 15 phút 4°C, thu tế bào. Tách DNA genome của chủng bằng phương pháp Phenol/Chloroform, theo Wright và cộng sự (2017). Hòa tan DNA tổng số trong đệm TE và điện di kiểm tra trên gel agarose 1% (hình 1). Kết quả cả 2 mẫu tách chiết đều xuất hiện 1 băng vạch DNA đậm có kích thước trên 10kb, đã tách thành công DNA tổng số của chủng *Bacillus subtilis* MHN21.

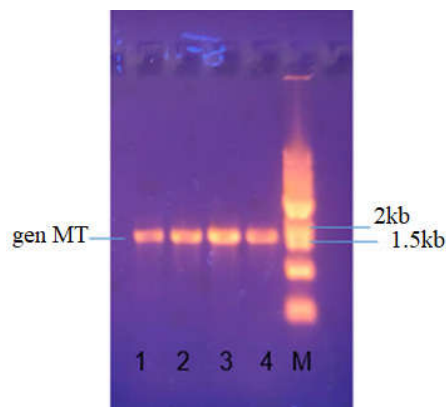


Hình 1. Điện di DNA tổng số chủng *B. subtilis* MHN21

M: 1 kb DNA Ladder; 1, 2 mẫu tách DNA tổng số

3.1.2. Tách dòng gen MT bằng vector pGEM-T

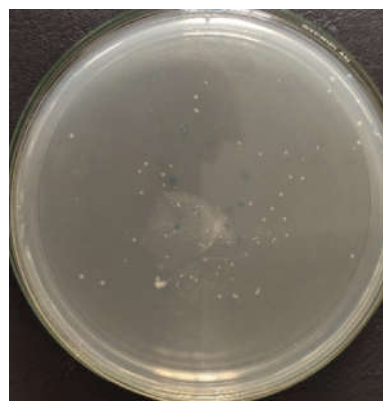
Khuếch đại đoạn gen MT từ DNA tổng số của chủng *B. subtilis* MHN21 với cặp mồi đặc hiệu MT-F/MT-R. Sản phẩm PCR gen MT được điện di kiểm tra (Hình 2). Kết quả thu được một băng vạch duy nhất và tương ứng với vị trí trên vạch 1,5 kb của DNA marker, vị trí này tương ứng với kích thước của đoạn gen MT là 1764 bp.



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR gen MT

M: 1 kb DNA Ladder; Mẫu 1, 2, 3, 4: Sản phẩm PCR gen MT

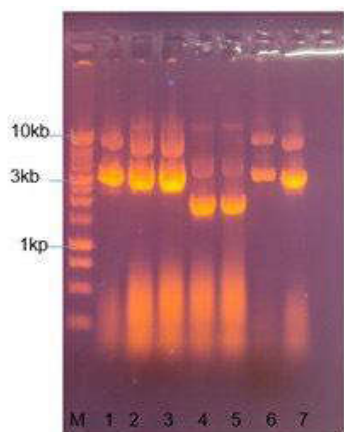
Sản phẩm PCR gen MT sau tinh sạch được nối với vector pGEM-T Easy. Sản phẩm ligase chuyển gen vào vi khuẩn *Escherichia coli* XL1 Blue, nuôi cấy trong LB-Ampicillin (Amp) (100µg/ml), X-gal và IPTG ở 37°C để chọn lọc. Những khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp được chuyển gen thành công sẽ có màu trắng, ngược lại khuẩn lạc màu xanh mang plasmid chưa được ligase thành công (Hình 3).



Hình 3. Chuyển gen pGEM-T-MT vào *E. coli* XL1 Blue

Chọn 5 khuẩn lạc trắng, 2 khuẩn lạc xanh nuôi cấy và tách plasmid điện di kiểm tra (Hình 4). Vector pGEM-T Easy 3015bp, đoạn gen MT có kích thước 1764bp. Vector pGEM-T ligase với gen MT sẽ tạo plasmid tái tổ hợp pGEM-T-MT có kích thước khoảng 4,8kb. Kết quả 5 khuẩn lạc trắng có

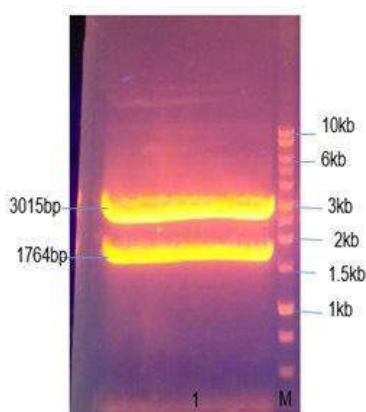
kích thước băng vạch DNA cao hơn băng vạch DNA của 2 khuẩn lạc xanh.



Hình 4. Điện di kiểm tra plasmid pGEM-T-MT sau chuyển gen

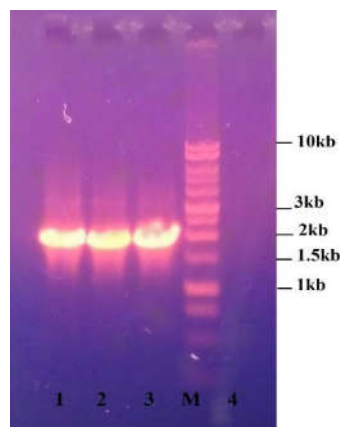
M: 1 kb DNA Ladder; Mẫu 1, 2, 3, 6, 7: Khuẩn lạc trắng; Mẫu 4, 5: Khuẩn lạc xanh

PCR gen MT kiểm tra với 3 mẫu plasmid tái tổ hợp pGEM-T-MT và 1 mẫu đối chứng âm (plasmid của khuẩn lạc xanh) (Hình 5). Với 3 dòng khuẩn lạc lựa chọn cho kết quả dương tính với một băng vạch DNA duy nhất có kích thước trên 1,5kb phù hợp với kích thước gen MT 1764bp, đã tạo được plasmid tái tổ hợp pGEM-T-MT.



Hình 6. pGEM-T-MT cắt bằng XhoI/EcoRI

Lựa chọn 5 khuẩn lạc nuôi trên môi trường LB-Amp, lắc 150 vòng/phút qua đêm 16-18h ở 37°C. Tách DNA plasmid và điện di kiểm tra với mẫu

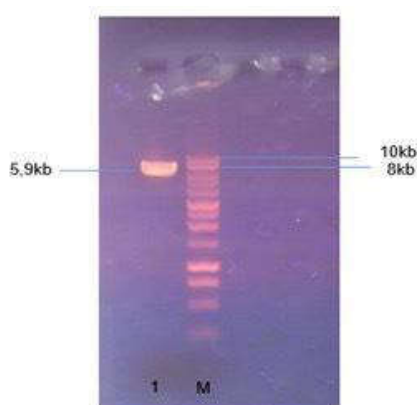


Hình 5. PCR kiểm tra biến nạp pGEM-T-MT vào *E. coli* XL1 Blue

M: 1 kb DNA Ladder; Mẫu 1,2,3: plasmid khuẩn lạc trắng; Mẫu 4: plasmid khuẩn lạc xanh

3.2. Tạo vector tái tổ hợp pET32-MT

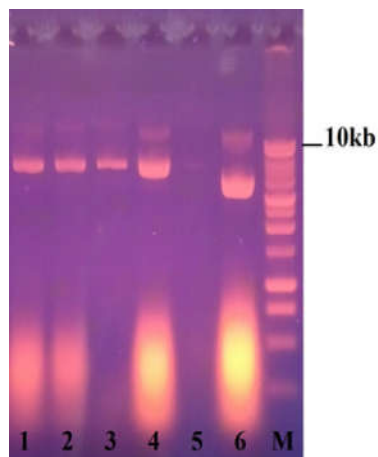
Cắt vector pET32a(+) và pGEM-T-MT cùng bằng 2 enzyme giới hạn là XhoI và EcoRI (Hình 6, 7). Sản phẩm được tinh sạch, nối đoạn gen MT vào vector pET32a(+), tạo vector pET32-MT, biến nạp vào *E. coli* XL1 Blue, nuôi cấy trên LB-Amp (100μg/ml) ở 37°C.



Hình 7. pET32a(+) cắt bằng XhoI/EcoRI

vector pET32 (Hình 8). Kết quả cho thấy 4/5 mẫu tách cho băng vạch DNA rõ nét có kích thước lớn hơn băng vạch DNA của pET32.

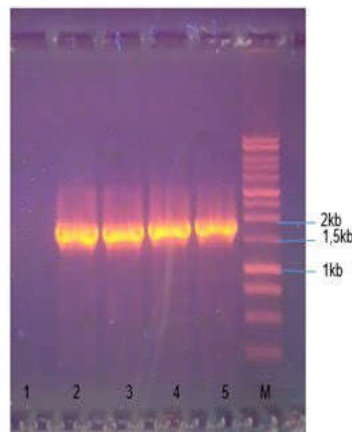
PCR kiểm tra 4 mẫu plasmid tái tổ hợp pET32-MT và mẫu đối chứng âm (pET32) với cặp mồi MT-F/MT-R. Từ hình 9 cho thấy cả 4 mẫu đều xuất



Hình 8. Kiểm tra biến nạp pET32-MT vào *E. coli* XL1 Blue

1-5: khuẩn lạc chuyển gen pET32-MT vào *E. coli* XL1 Blue
6: mẫu plasmid pET32
M: 1kb DNA ladder

hiện 1 băng vạch DNA duy nhất có kích thước trên 1.5kb tương ứng với gen MT (1764bp). Vector pET32-MT biến nạp thành công vào *E. coli* XL1 Blue.

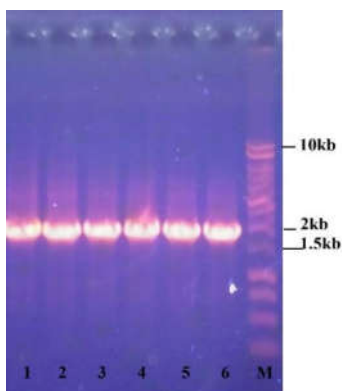


Hình 9. PCR kiểm tra biến nạp vector pET32-MT vào *E. coli* XL1 Blue

1: sản phẩm PCR mẫu pET32 (đối chứng âm)
2-5: sản phẩm PCR mẫu vector pET32-MT
M: 1kb DNA ladder

3.3. Biểu hiện gen MT trên *Escherichia coli* BL21

Vector tái tổ hợp pET32-MT biến nạp vào chủng *Escherichia coli* BL21 (DE3), nuôi cấy trên môi trường LB có amp (100µg/ml) ở 37°C. Sau 20h nuôi cấy chọn 6 dòng khuẩn lạc, tách chiết DNA plasmid, PCR với cặp mồi MT-F/MT-R, điện di kiểm tra (hình 10).



Hình 10. PCR kiểm tra pET32-MT chuyển gen vào *E. coli* BL21

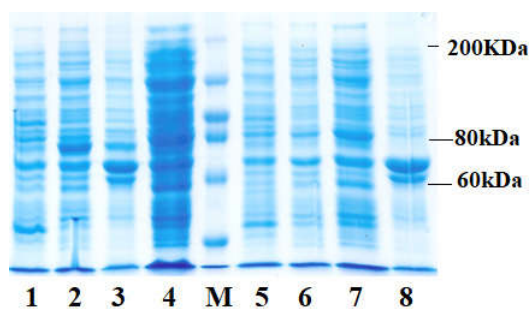
1-6: PCR kiểm tra pET32-MT với cặp mồi MT-F/MT-R
M: 1kb DNA ladder

Kết quả cả 6 mẫu đều xuất hiện 1 băng vạch DNA có kích thước trên 1.5kb tương ứng với kích thước gen MT. Tạo dòng thành công chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET32-MT

Khảo sát các điều kiện biểu hiện gen để biểu hiện gen MT trên chủng *E. coli* BL21: nhiệt độ, nồng độ chất cảm ứng IPTG, thời gian biểu hiện

3.3.1. Lựa chọn nhiệt độ và nồng độ IPTG biểu hiện gen

Chủng *E. coli* BL21 mang vector tái tổ hợp pET32-MT được biểu hiện với nồng độ IPTG 1mM, lắc 150rpm ở các nhiệt độ khảo sát 28, 31, 34, 37°C. Lấy mẫu sau 2h biểu hiện, ly tâm thu tế bào, phá vỡ tế bào bằng phương pháp sonication, điện di trên gel polyacrylamide (Hình 11).



Hình 11. Điện di protein tổng số chủng tái tổ hợp

1-4: mẫu protein tổng số chủng tái tổ hợp biểu hiện tại các nồng độ IPTG 0,5; 1; 1,5; 2mM
5-8: mẫu protein tổng số chủng tái tổ hợp biểu hiện tại nhiệt độ 28, 31, 34, 37°C
M: marker ProteinRuler

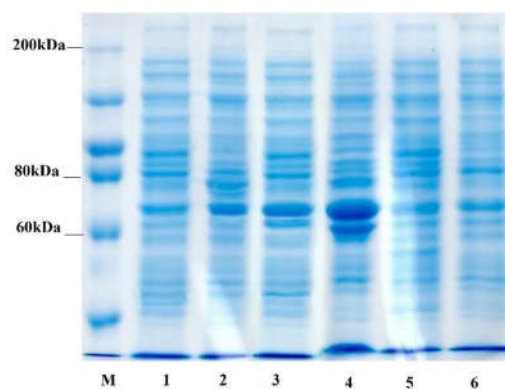
Kết quả tại nhiệt độ 37°C có băng vạch protein được biểu hiện rõ nét có kích thước trên 60kDa, tương ứng với gen MT mã hóa enzyme maltogenic amylase có kích thước 68.7kDa. Như vậy, ở 37°C gen MT được biểu hiện tối ưu phù hợp với các kết quả nghiên cứu biểu hiện gen trên thế giới, lựa chọn 37°C làm nhiệt độ thích hợp để biểu hiện.

Biểu hiện gen MT trên chủng *E. coli* BL21 với nồng độ IPTG khảo sát 0,5; 1; 1,5; 2mM nuôi lắc 150 vòng/phút ở 37°C. Sau 2h biểu hiện thu mẫu, ly tâm thu tế bào, tách chiết thu protein thô, điện di SDS-PAGE kiểm tra (hình 11). Tại nồng độ IPTG 1,5mM cho sự biểu hiện maltogenic amylase là tối ưu. Khi tăng hàm lượng IPTG lên 2mM thì hầu như các protein khác cũng được biểu hiện với hàm lượng cao hơn, vì vậy sẽ khó khi tinh sạch protein mục tiêu. Vì vậy lựa chọn nồng độ IPTG 1,5mM thích hợp để biểu hiện gen.

3.3.2. Lựa chọn thời gian biểu hiện

Khảo sát thời gian biểu hiện gen MT, sau 1, 2, 3, 4, 5, 6 giờ biểu hiện với nồng độ IPTG 1,5mM, 37°C, lắc 150rpm.

Các mẫu khảo sát được ly tâm thu tế bào, phá vỡ tế bào thu nhận protein thô, điện di trên bản gel polyacrylamide (Hình 12). Sau 1-4 giờ biểu hiện protein maltogenic amylase được biểu hiện với hàm lượng tăng dần, tại 4 giờ cho hàm lượng cao nhất với băng vạch protein đậm rõ nét nhất, khi tăng từ 5-6 giờ biểu hiện thì gen MT không biểu hiện protein với hàm lượng nhiều. Như vậy lựa chọn thời gian biểu hiện 4 giờ cho kết quả biểu hiện là tối ưu.

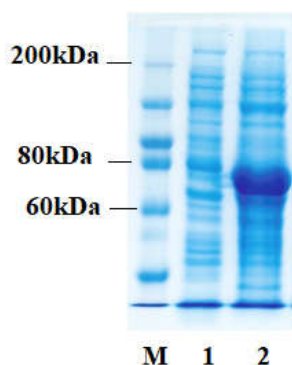


Hình 12. Điện di protein tổng số của chủng tái tổ hợp sau 1-6 giờ biểu hiện

1-6: mẫu protein tổng số của chủng tái tổ hợp sau 1, 2, 3, 4, 5, 6 giờ biểu hiện
M: marker ProteinRuler

3.4. Tách chiết, thu nhận enzyme maltogenic amylase từ chủng biểu hiện

Chủng *E. coli* BL21 mang vector tái tổ hợp pET32-MT biểu hiện gen MT với các thông số được lựa chọn: nồng độ IPTG 1,5mM, 37°C, lắc 150rpm trong 4 giờ. Thu mẫu, phá vỡ tế bào bằng phương pháp sóng siêu âm, ly tâm 10.000rpm trong 15 phút ở 4°C thu dịch, điện di protein kiểm tra với protein tách chiết từ chủng đối chứng *E. coli* BL21 (DE3) không được chuyển gen có chất cảm ứng IPTG (hình 13).



Hình 13. Điện di enzyme maltogenic amylase tái tổ hợp từ chủng biểu hiện

1: mẫu protein thô từ chủng *E. coli* BL21 không được chuyển gen có IPTG
2: mẫu protein thô từ chủng *E. coli* BL21 mang vector pET32-MT
M: marker ProteinRuler

Bảng 1. Hàm lượng và hoạt độ enzyme thô

Mẫu	Thể tích (ml)	Hoạt độ tổng (U)	Protein tổng (mg)	Hoạt độ riêng (U/mg)
Maltogenic amylase thô	4,5	985	9,54	103,25

Enzyme maltogenic amylase tái tổ hợp thu được cho hoạt tính enzyme là 103,25 U/mg tại 55°C, pH 7 tương đối gần với các nghiên cứu trước đây. Nghiên cứu của Sulong và cộng sự (2017) xác định enzyme maltogenic amylase tái tổ hợp từ chủng *Geobacillus* sp. GK70 có hoạt tính 107,23 U/mg. Điều này cho thấy kỹ thuật biểu hiện và chiết xuất enzyme trong nghiên cứu của chúng tôi là đáng tin cậy và phù hợp với các phương pháp phổ biến (Sulong & cộng sự, 2017).

IV. Kết luận và kiến nghị

Gen MT mã hóa cho enzyme maltogenic amylase đã được biểu hiện gen thành công trên chủng *E. coli* BL21 (DE3) với vector pET-32a (+). Lựa chọn được các điều kiện biểu hiện tối ưu như nhiệt độ 37°C, nồng độ IPTG 1,5 mM, thời gian sau 4 giờ biểu hiện cho lượng enzyme thô nhiều nhất. Tách chiết thu nhận được maltogenic amylase tái tổ hợp dạng thô từ

Mẫu protein tách chiết từ chủng *E. coli* BL21 mang vector tái tổ hợp cho bằng vạch protein đậm có kích thước trên 60kDa tương ứng với trọng lượng phân tử của enzyme maltogenic amylase, enzyme được biểu hiện tối ưu hơn so với chủng đối chứng (*E. coli* BL21 không mang vector tái tổ hợp). Kết quả biểu hiện gen MT thành công trên chủng *E. coli* BL21 (DE3).

Dịch enzyme thô thu được sau khi ly tâm, xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford và xác định hoạt tính enzyme maltogenic amylase bằng phương pháp DNS, kết quả thể hiện trên bảng 1.

chủng biểu hiện. Mặc dù hoạt tính enzyme chưa được cải thiện đáng kể, quy trình biểu hiện sử dụng gen từ chủng *Bacillus subtilis* MHN21 cho thấy tính ổn định và khả năng tái tạo, tạo cơ sở để tối ưu hóa ở các nghiên cứu tiếp theo. Nghiên cứu mở ra khả năng phát triển thêm các kỹ thuật tối ưu hóa biểu hiện, lựa chọn điều kiện phản ứng, quá trình tinh sạch nhằm nâng cao hoạt tính enzyme trong công nghệ sản xuất enzyme tái tổ hợp, ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Amigo, J. M., Olmo, A. D., Engelsens, M. M., Lundkvist, H., & Engelsens, S. B. (2021). Staling of white wheat bread crumb and effect of maltogenic α -amylases. Part 3: Spatial evolution of bread staling with time by near infrared hyperspectral imaging. *Food Chem*, 353, 129478. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129478>.

- [2]. Baek, J.-S., Kim, Y.-W., Cha, H.-J., Kim, Y. R., Moon, T. W., Park, K. H., Kim, T. J., Kim, J. W., & Lee, S. J. (2003). Role of dipeptide at extra sugar-binding space of *Thermus maltogenic* amylase in transglycosylation activity. *Journal of microbiology and biotechnology*, 13(6), 969-975.
- [3]. Ferdous, S., Dopp, J. L., & Reuel, N. F. (2021). Optimization of *E. Coli* Tip-Sonication for High-Yield Cell-Free Extract using Finite Element Modeling. *AIChE J*, 67(10).<http://doi.org/10.1002/aic.17389>.
- [4]. Goesaert, H., Slade, L., Levine, H., & Delcour, J. A. (2009). Amylases and bread firming - an integrated view. *Journal of Cereal Science*, 50(3), 345-352.<http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.04.010>.
- [5]. Harley, J. P., & Prescott, L. M. (2002). *Laboratory Exercises in Microbiology*. 5th Edition, The McGraw-Hill Companies.
- [6]. Lin, W., Zhang, D., Huang, J., Lei, Y., Su, X., Huang, W., & Wu, M. (2024). Expression and characterization of a maltogenic amylase from *Lactobacillus plantarum* in *Escherichia coli* and its application in extending bread shelf life. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 4(1), 318-327. <http://doi.org/10.1007/s43393-022-00155-y>.
- [7]. Liu, P., Ma, L., Duan, W., Gao, W., Fang, Y., Guo, L., Yuan, C., Wu, Z., & Cui, B. (2023). Maltogenic amylase: Its structure, molecular modification, and effects on starch and starch-based products. *Carbohydr Polym*, 319, 121183.<http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121183>.
- [8]. Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S., & Pandey, A. (2018). Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Technol Biotechnol*, 56(1), 16-30.<http://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>.
- [9]. Sulong, M. R., Leow, T. C., Abd Rahman, R. N. Z. R., Basri, M., & Salleh, A. B. (2017). Characteristics of recombinant maltogenic amylase from *Geobacillus* sp. SK70. *Indian Journal of Biotechnology*, 16, 91-99.
- [10]. Nguyễn, T. P. T., Nguyễn, T. N. A., Vũ, K. T., & Tạ, T. T. T. (2024). Đánh giá tiềm năng sản xuất chế phẩm probiotic của chủng *Bacillus subtilis* MHN21 trong chăn nuôi gà. *TNU Journal of Science and Technology*, 229(01), 376-383.
- [11]. Wright, M. H., Adelskov, J., & Greene, A. C. (2017). Bacterial DNA Extraction Using Individual Enzymes and Phenol/Chloroform Separation. *J Microbiol Biol Educ*, 18(2).<http://doi.org/10.1128/jmbe.v18i2.1348>.
- [12]. Zhai, Y., Li, X., Bai, Y., Jin, Z., & Svensson, B. (2022). Maltogenic α -amylase hydrolysis of wheat starch granules: Mechanism and relation to starch retrogradation. *Food Hydrocolloids*, 124, 107256.<http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107256>.

GENE EXPRESSION AND RECOVERY OF RECOMBINANT MALTOGENIC AMYLASE FROM *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3) FOR FOOD APPLICATIONS

*Nguyen Thi Phuong Thao², Nguyen Thi Thu Hien², Vu Kim Thoa²,
Nguyen Thi Ngoc Anh², Nguyen Thanh Chung²*

Abstract: Recombinant DNA technology has many vital applications in the food industry, especially in enzyme production. Maltogenic amylase is used in maltose production, improving bread quality, and starch processing. The MT gene, encoding maltogenic amylase, was identified and sequenced from GenBank. The MT gene was isolated from the probiotic bacterial strain *Bacillus subtilis* MHN21, inserted into an expression vector, and expressed in the *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain. The investigation of expression parameters showed that the optimal conditions for enzyme expression were 37°C, a 1.5 mM IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) induction concentration, and a 4-hour expression period. The evaluation of crude enzyme extract activity showed that the obtained enzyme had an activity of 103.25 U/mg at 55°C and pH=7. The gene expression and recombinant maltogenic amylase production process is feasible and shows potential for applications in the food industry.

Keywords: gene expression, maltogenic amylase, recombinant enzyme

² Hanoi Open University