NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN ENTEROCIN E-760 TÁI TỔ HỢP TRONG *Escherichia coli* Rosetta 2

Tô Lan Anh[1], Lương Kim Phượng[1], Nguyễn Văn Hoàng[1],
Đặng Thị Thu Hằng[2], Vũ Thị Thương[2], Nguyễn Khánh Hoàng Việt[1*]

Tóm tắt: *Enterocin E-760 là một trong số ít các peptide kháng khuẩn thuộc nhóm bacteriocin lớp II có hoạt tính kháng khuẩn đối với một số vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm như Listeria monocytogenes, Salmonella, Staphylococcus aureus,... thuộc cả nhóm gram dương và gram âm. Mục đích của nghiên cứu này là tạo dòng và biểu hiện enterocin E-760 trong Escherichia coli với hiệu quả kháng khuẩn tốt. Chủng E. coli Rosetta 2 mang plasmid pET22b(+)-SUMOE được nuôi cấy biểu hiện trong môi trường LBA, protein nội bào được thu nhận sau 5 giờ cảm ứng bởi IPTG 0,1 mM trong điều kiện nuôi lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 37ºC. Kết quả kiểm tra trên bản điện di SDS-PAGE 12,6% cho thấy enterocin E-760 dung hợp SUMO được biểu hiện ở dạng tan có kích thước 25 kDa. Enterocin tái tổ hợp thể hiện hoạt tính kháng khuẩn 106 AU/mL đối với chủng chỉ thị L. monocytogenes ATCC® 35152™ nồng độ 10^5 CFU/mL. Kết quả trên là cơ sở để tối ưu quy trình lên men tạo enterocin E-760 nhằm ứng dụng trong bảo quản thực phẩm.*

Từ khóa: Bacteriocin; Enterocin E-760; Enterococcus sp; pET22b(+); E. coli Rosetta 2.

1. MỞ ĐẦU

Trên thế giới đã có một số nghiên cứu tổng hợp enterocin theo con đường tái tổ hợp bằng cách sử dụng các hệ biểu hiện như *P. pastoris* X33, *E. coli* [1, 3]. Masias cùng cộng sự đã tổng hợp enterocin CRL35 tái tổ hợp sử dụng hệ biểu hiện *E. coli* với 5 chủng *E. coli* khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy enterocin CRL35 biểu hiện tốt nhất trong chủng *E. coli* Rosetta-gami 2 [4]. Ngoài ra, nhóm tác giả Tây Ban Nha đã tổng hợp được enterocin P có nguồn gốc từ chủng *E. faecium* P13 sử dụng hệ biểu hiện *E. coli*, có hoạt tính kháng khuẩn đối với hai chủng gram dương là *E. faecium* T136 và *Lactobacillus sakei* NCFB2714 [5]. Ở Việt Nam, Đỗ Thị Huyền và cộng sự cũng đã tạo được enterocin P tái tổ hợp có khả năng kháng được vi khuẩn gram dương *L. monocytogens*, sử dụng cả hệ biểu hiện *P. pastoris* X33 và *E. coli* [6]. Không giống như hầu hết các bacteriocin, enterocin E-760 mang hoạt tính ức chế sự phát triển của vi khuẩn thuộc cả nhóm gram âm và gram dương, đặc biệt là các chủng vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm.

Enterocin E-760 thuộc nhóm bacteriocin lớp II có chiều dài 62 amino acid với khối lượng phân tử 5,362 kDa [1]. Nghiên cứu của J. Line và cộng sự đã chỉ ra rằng enterocin E-760 trong môi trường invitro có hoạt tính ức chế được 20 chủng vi khuẩn *Campylobacter* được phân lập từ gà [2]. Nhìn chung, hàm lượng enterocin E-760 được tiết ra từ các chủng vi khuẩn trong tự nhiên thấp. Do đó, hướng nghiên cứu sản xuất enterocin theo con đường tái tổ hợp nhằm nâng cao hiệu suất tổng hợp enterocin mang hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với cả chủng vi khuẩn gram dương và gram âm là một hướng nghiên cứu tiềm năng. Enterocin tái tổ hợp có thể được sử dụng như một nguồn nguyên liệu để sản xuất các chế phẩm bảo quản thực phẩm an toàn, kháng đặc hiệu với một số chủng thường gây ngộ độc thực phẩm. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ trình bày kết quả biểu hiện enterocin E-760 dung hợp protein SUMO trong chủng *E. coli* Rosetta 2 và đánh giá khả năng kháng khuẩn đối với chủng *L. monocytogenes* ATCC® 35152™ của protein thu được. Kết quả biểu hiện và hoạt tính kháng khuẩn của enterocin E-760 được xác định để làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo.

2. NGUYÊN LIỆU, HÓA CHẤT VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu, hóa chất và môi trường

Nguyên liệu: Chủng vi khuẩn *E. coli* Rosetta 2, *E. coli* DH5α, chủng vi khuẩn chỉ thị *L.*

monocytogene ATCC® 35152™, plasmid pET22b(+) mang gen mã hóa enterocin E-760 dung hợp protein SUMO được tổng hợp nhân tạo bởi hãng Genscript.

Hóa chất: NaCl, NaH_2PO_4, KH_2PO_4 (Sigma, Mỹ); NH_4Cl, Glycerol (Merck, Đức),…

Môi trường nuôi vi sinh vật: MT1 (LB): 0,5% cao nấm men, 1% peptone, 1% NaCl; MT2 (TB): 1,2% peptone, 2,4% cao nấm men, 72 mM K_2HPO_4, 17 mM KH_2PO_4, 0,4% glycerol; MT3 (SB): 3,2% peptone, 2% cao nấm men, 0,5% NaCl; MT4 (M_9): 0,6% NaH_2PO_4; 0,3% KH_2PO_4; 0,05% NaCl; 0,1% NH_4Cl và các yếu tố vi lượng Trace element 1X; MT5: M_9 bổ sung 1% glycerol; MT6: M_9 bổ sung 1% glucose; MT7: M_9 + 0,5% cao nấm men; MT8: M_9 bổ sung 1% glycerol, 0,5% cao nấm men; MT9: M_9 bổ sung thêm 1% glucose, 0,5% cao nấm men; Brain Heart Infusion borth (BHI); LBA: môi trường LB bổ sung kháng sinh Ampicillin 100 µg/ml.

2.2. Thiết bị, dụng cụ

Một số thiết bị chính như máy lắc ổn nhiệt (Multitron, Đức); máy điện di protein (Biorad, Mỹ), máy điện di DNA (Cleaver, Anh), cân phân tích (Presica, Thụy Sĩ), máy siêu âm (Sorvall Biofuge Fresco), tủ an toàn sinh học cấp II (Esco, Singapore).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thiết kế vector pET22b(+) mang gen mã hóa enterocin E-760 dung hợp SUMO, nhân dòng và kiểm tra sự có mặt của gen enterocin E-760 trong plasmid

Gen mã hóa enterocin E-760 được thiết kế dung hợp protein SUMO và bổ sung vào đầu 5’ và 3’ trình tự nhận biết của cặp enzyme cắt giới hạn *Nde* I, *Xho* I. Cấu trúc gen mã hóa enterocin E-760 sau thiết kế được chuyển vào vector pET22b (+) tạo vector biểu hiện pET22b(+)-SUMOE và tổng hợp nhân tạo (Hãng Genscript, Mỹ). Tế bào *E. coli* DH5α được sử dụng để nhân dòng và tạo lượng lớn vector biểu hiện. Plasmid sau khi tách chiết được cắt bởi hai enzyme giới hạn *Nde* I và *Xho* I và điện di trên gel agarose 0,8 % để kiểm tra sự có mặt của gen enterocin E-760.

2.3.2. Biểu hiện gen mã hóa enterocin E-760 dung hợp SUMO trong E. coli Rosetta 2

Phương pháp biểu hiện gen mã hóa enterocin E-760 trong hệ biểu hiện *E. coli* Rosetta 2 được tham khảo từ công trình nghiên cứu trước với một số điều kiện được thay đổi [7]. Plasmid pET22b(+)-SUMOE được biến nạp vào tế bào *E. coli* Rosetta 2 bằng phương pháp sốc nhiệt và được sàng lọc trên môi trường chứa Ampicillin. Sau đó, các dòng tế bào chọn lọc được nuôi lắc 200 vòng/phút trong 2 ml môi trường LBA, nhiệt độ 37 ºC. Dịch nuôi sau từ 16 đến 18 giờ được chuyển sang môi trường mới sao cho giá trị OD_{600} ban đầu đạt 0,1. Tiếp tục nuôi lắc ở điều kiện trên đến khi OD_{600} khoảng 0,6 đến 0,8 thì cảm ứng bằng 0,1 mM IPTG. Sau 5 giờ cảm ứng biểu hiện, sinh khối tế bào được thu lại bằng cách ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. Sinh khối tế bào được hòa tan trong nước đến OD_{600} =10, sử dụng 20 µl dịch tế bào xử lý và điện di trên gel SDS-PAGE 12,6% [8] để kiểm tra khả năng biểu hiện enterocin E-760 tái tổ hợp.

2.3.3. Khảo sát môi trường biểu hiện enterocin E-760 trong E. coli Rosetta 2

Khuẩn lạc của chủng *E. coli* Rosetta 2 tái tổ hợp được nuôi cấy biểu hiện trong các môi trường khác nhau MT1, MT2, MT3, MT4, MT5, MT6, MT7, MT8, MT9 [7]. Protein của chủng sau khi biểu hiện được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE 12,6% để chọn được môi trường thích hợp nhất.

2.3.4. Xác định trạng thái của protein tái tổ hợp được biểu hiện

Tế bào thu được sau lên men được hòa lại trong đệm và phá vỡ bằng sóng siêu âm trong 10 phút với tần số 20 kHz, 10 giây/xung, nghỉ 20 giây giữa các xung ở điều kiện 4 ºC. Mẫu sau siêu âm được tách pha tan, pha tủa bằng cách ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút. Các mẫu được xử lý biến tính và điện di SDS-PAGE 12,6% để đánh giá mức độ biểu hiện protein ở dạng tan, tủa.

2.3.5. Xác định hoạt tính kháng khuẩn

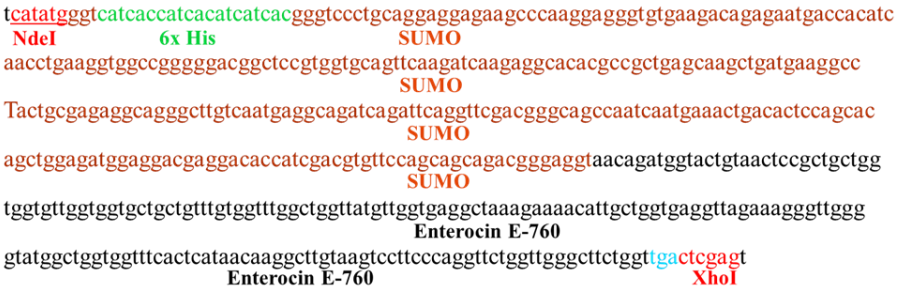
Hoạt tính kháng khuẩn của enterocin E-760 trong dịch thu được từ chủng *E. coli* Rosetta 2

được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch sử dụng chủng chị thị *L. monocytogenes* ở nồng độ 10^5 CFU/mL nuôi cấy trong môi trường BHI. Hoạt tính kháng khuẩn được tính theo công thức AU/mL = $\frac{2^n}{V}$. Trong đó, V là số mL mẫu được sử dụng; n là số lần pha loãng mà tại đó mẫu vẫn còn hoạt tính kháng khuẩn với kích thước vòng kháng khuẩn đạt ít nhất 2 mm [9].

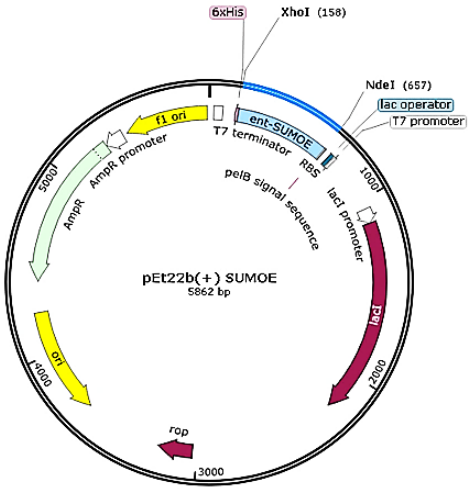
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thiết kế cấu trúc gen mã hóa enterocin E-760 dung hợp protein SUMO và nhân dòng gen trong *E. coli* DH5α

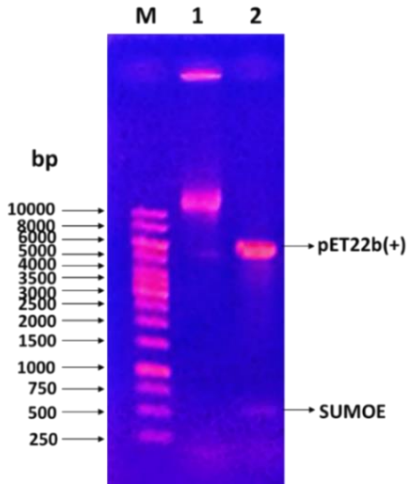
Do kích thước của các enterocin nhỏ, dễ bị phân cắt bởi các protease của vật chủ, do đó, sản lượng protein đích được tổng hợp thường bị giảm đáng kể. Một giải pháp được đưa ra là biểu hiện những peptide ngắn ở dạng dung hợp với một protein khác. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa enterocin E-760 được thiết kế dung hợp gen mã hóa protein SUMO với hai vị trí nhận biết enzyme cắt giới hạn *Nde* I và *Xho* I. SUMO là một loại protein dung hợp được dùng nhiều trong sinh học phân tử để biểu hiện những protein khó biểu hiện, giúp tăng cường mức độ biểu hiện, protein cuộn xoắn chính xác, tăng tính tan từ đó làm tăng hoạt tính sinh học của protein [10, 11]. Cấu trúc gen enterocin E-760 thiết kế cho biểu hiện được thể hiện ở hình 1. Vector pET22b(+) được lựa chọn là vector biểu hiện với gen chọn lọc kháng kháng sinh Ampicillin và promoter T7 để chèn đoạn gen mã hóa enterocin E-760 có trình tự dung hợp protein SUMO (hình 2).



Hình 1. *Cấu trúc gen mã hóa enterocin E-760 thiết kế biểu hiện trong E. coli (507 bp).*



Hình 2. *Vector pET22b(+)-SUMOE chứa gen SUMOE (màu xanh dương) được nhận biết bởi enzyme giới hạn Nde I và Xho I.*

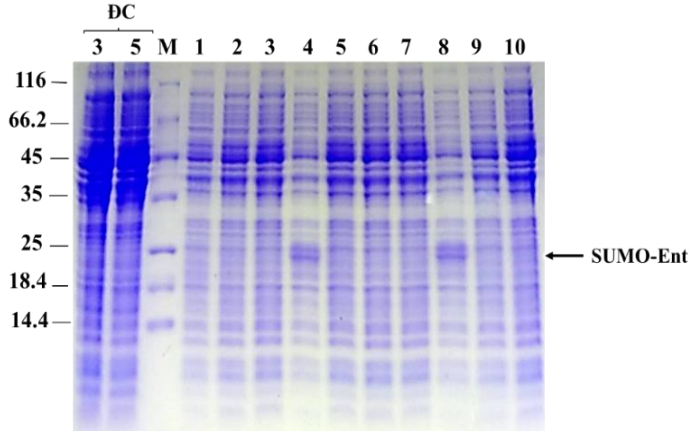


Hình 3. *pET22b(+)-SUMOE được cắt bằng hai enzyme Nde I, Xho I: (1): vector pET22b(+)-SUMOE; (2): pET22b(+)-SUMOE sau cắt.*

Sau khi plasmid pET22b(+)-SUMOE được tổng hợp nhân tạo (Genscript, Mỹ) và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α, chúng tôi tiến hành tách DNA plasmid lượng lớn của chủng biến nạp và cắt bằng hai enzyme giới hạn *Nde* I, *Xho* I. Kết quả điện di trên gel Agarose 0,8% cho thấy (hình 3), ở đường chạy mẫu (2) là plasmid sau khi cắt bởi hai enzyme giới hạn xuất hiện một băng có kích thước khoảng 5500 bp tương đương với kích thước ban đầu của vector pET22b(+), một băng có kích thước tương đương 500 bp phù hợp với kích thước của gen enterocin E-760 dung hợp SUMO. Như vậy, có thể khẳng định trong vector tổng hợp có chứa gen mã hóa enterocin E-760 theo thiết kế và đã nhân dòng thành công tạo lượng lớn plasmid cho quá trình biểu hiện.

3.2. Biểu hiện đánh giá khả năng sinh tổng hợp enterocin E-760 dung hợp SUMO tái tổ hợp từ *E. coli* Rosetta 2

Gen mã hóa enterocin E-760 trong plasmid pET22b(+)-SUMOE hoạt động dưới sự điều khiển của promoter T7 và được kiểm soát bởi chất cảm ứng IPTG. Kết quả đo mật độ tế bào của các chủng biến nạp được lựa chọn biểu hiện sau 5 giờ được cảm ứng bằng IPTG 0,1 mM cho thấy, dòng tế bào 4 và 8 có giá trị OD_{600} lần lượt là 1,435 và 1,285 thấp hơn khi so sánh với các dòng tế bào còn lại và mẫu đối chứng (bảng 1). Đồng thời, kết quả kiểm tra trên gel SDS-PAGE 12,6% chỉ xuất hiện một băng kích thước 25 kDa (theo kích thước enterocin E-760 lý thuyết) ở hai đường chạy mẫu protein của dòng tế bào 4 và 8 (hình 4). Điều này có thể là do quá trình sinh tổng hợp enterocin E-760 ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng của chủng *E. coli* Rosetta 2 tái tổ hợp. Do đó, điều kiện dinh dưỡng của môi trường cần được khảo sát để phù hợp cho sự phát triển của chủng tái tổ hợp cũng như tăng khả năng sinh tổng hợp enterocin E-760 mang hoạt tính kháng khuẩn.



Hình 4. *Mẫu protein tổng số của chủng E. coli Rosetta 2 mang plasmid pET22b(+)-SUMOE: ĐC3 và ĐC5 lần lượt là các chủng 3 và 5 không cảm ứng bằng IPTG; 1-10 tương ứng là protein các chủng biểu hiện E. coli Rosetta 2; M là thang chuẩn marker.*

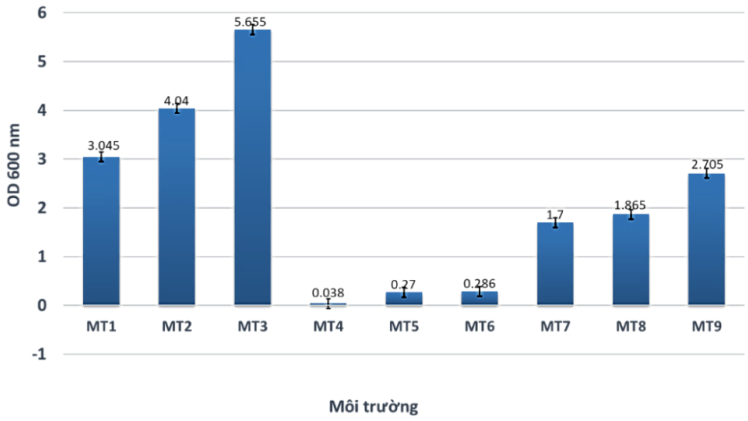
Bảng 1. *Mật độ tế bào của chủng biểu hiện sau 5 giờ cảm ứng bằng IPTG.*

Dòng tế bào	1	2	3	**4**	5	6	7	**8**	9	10	ĐC3	ĐC5
OD_{600nm}	2,185	2,415	2,67	**1,435**	2,04	1,94	2,21	**1,285**	1,915	2,44	3,74	3,77

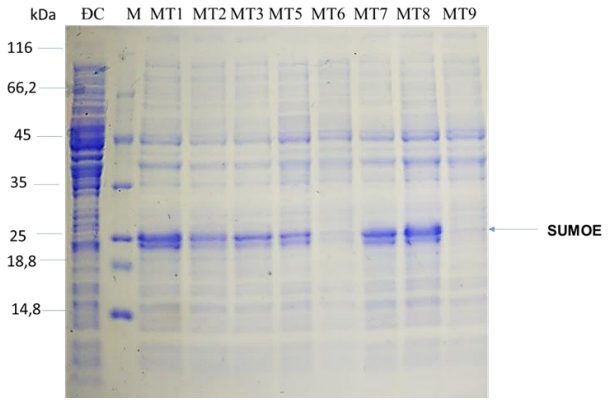
3.3. Khảo sát sự sinh tổng hợp enterocin E-760 trong các môi trường khác nhau

Trong 9 môi trường với thành phần dinh dưỡng khác nhau, môi trường MT1, MT2 và MT3 có đầy đủ nguồn dinh dưỡng, chủng *E. coli* tái tổ hợp phát triển mạnh, mật độ OD_{600} đạt cao nhất bằng 5,655 (MT3). Trong khi đó, chủng phát triển khá yếu trong môi trường chỉ có chứa một số muối khoáng cần thiết hoặc chỉ cung cấp carbon từ glucose và glycerol (MT5, MT6) và gần như không phát triển trong môi trường MT4 (OD_{600} = 0,038). Ở các môi trường còn lại (MT7, MT8, MT9), chủng phát triển tương đối tốt (hình 5). Như vậy, các thành phần muối hay nguồn nitơ và

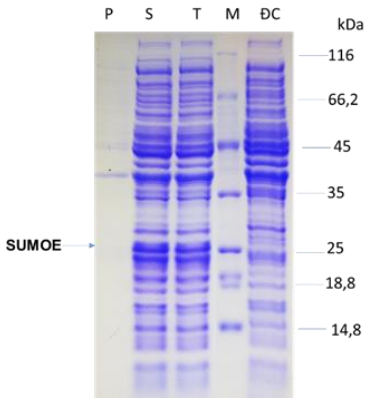
cacbon trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng rất nhiều đến khả năng phát triển của tế bào. Bên cạnh đó, kết quả điện di trên gel SDS-PAGE 12,6% của mẫu protein tổng số từ những chủng được nuôi lắc trong các môi trường trên cho thấy enterocin E-760 dung hợp SUMO được sinh tổng hợp ở chủ yếu ở môi trường MT1 và MT8, thể hiện qua một băng protein đậm, kích thước tương đương 25 kDa. Ở hai môi trường MT6 và MT9, không thấy xuất hiện băng protein có kích thước 25 kDa (hình 6). Từ các kết quả trên, chúng tôi lựa chọn môi trường LB là môi trường phát triển chủng *E. coli* Rosetta 2 tái tổ hợp cho sự tổng hợp enterocin E-760. Đồng thời, kết quả điện di mẫu siêu âm phá tế bào và tách pha cho thấy protein tái tổ hợp hoàn toàn biểu hiện ở pha tan, thể hiện qua một băng kích thước tương đương 25 kDa trên đường chạy mẫu protein pha tan (S) khi so sánh với đường chạy của mẫu đối chứng và mẫu tổng số của chủng *E. coli* tái tổ hợp (hình 7).



Hình 5. *Mật độ tế bảo của chủng tế bào E. coli Rosetta 2 mang plasmid pET22b(+)-SUMOE trong các môi trường khác nhau (MT1-MT9).*



Hình 6. *Mẫu protein tổng số của chủng biểu hiện E. coli Rosetta nuôi cấy trong các môi trường có thành phần dinh dưỡng khác nhau. ĐC: Chủng tế bào E. coli Rosetta 2 mang vector pET22b(+); M: Thang chuẩn marker; MT1-MT9: Chủng biểu hiện trong môi trường cảm ứng tương ứng MT1-MT9.*



Hình 7. *Protein tổng số từ chủng E. coli Rosetta tái tổ hợp. ĐC: Chủng tế bào mang vector pET22b; M: Thang chuẩn marker; T, S, P: Mẫu protein pha tổng số, pha tan, pha tủa.*

3.4. Xác định khả năng kháng khuẩn của enterocin E-760 tái tổ hợp

Enterocin E-760 tái tổ hợp có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *L. monocytogenes* ATCC® 35152™ thể hiện qua vòng kháng khuẩn của mẫu protein trong dịch tổng số (1) và mẫu protein được biểu hiện ở pha tan (2). Ngoài ra, hoạt độ của enterocin E-760 tái tổ hợp thu được ước tính khoảng 106 AU/mL tại độ pha loãng 1: 16 (hình 8). Hoạt tính kháng khuẩn của

enterocin E-760 tái tổ hợp giảm dần theo độ pha loãng và ở độ pha loãng 1:32 thì enterocin E-760 không còn khả năng ức chế sự phát triển của chủng vi khuẩn chỉ thị. Như vậy, bước đầu có thể khẳng định, enterocin E-760 được nghiên cứu biểu hiện thành công trong *E. coli* Rosetta 2 ở dạng tan và thể hiện hoạt tính ức chế sự phát triển của chủng vi khuẩn *L. monocytogenes* ATCC® 35152™.



Hình 8. *Kết quả đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của enterocin E-760 dung hợp SUMO từ chủng E. coli Rosetta 2 tái tổ hợp. (+): Kháng sinh Ampicillin 1 µg/mL; (-): Protein từ chủng tế bào E. coli mang vector pET22b(+); 1, 2 lần lượt là protein tổng số, pha tan của chủng E. coli Rosetta tái tổ hợp; 3-8: Dịch pha loãng 2, 4, 8, 16, 32, 64 của protein enterocin E-760 ở pha tan.*

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn *E. coli* Rosetta 2 mang plasmid pET22b(+)-SUMOE đã sinh tổng hợp được enterocin E-760 dung hợp SUMO ở dạng tan khi được nuôi cấy biểu hiện trong môi trường LBA. Enterocin E-760 được xác định trên bản điện di SDS-PAGE gel 12,6% có kích thước khoảng 25 kDa. Hoạt tính kháng vi khuẩn gram dương đối với chủng vi khuẩn chỉ thị *L. monocytogenes* ATCC® 35152™ của enterocin E-760 tái tổ hợp đạt 106 AU/mL khi sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Từ những kết quả nghiên cứu trên, quá trình biểu hiện enterocin E-760 tái tổ hợp từ chủng biểu hiện *E. coli* Rosetta 2 tiếp tục được thực hiện nhằm tối ưu các điều kiện giúp tăng khả năng sinh tổng hợp enterocin E-760, cũng như nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng khuẩn đối với một số loại vi khuẩn gram dương khác và một số gram âm điển hình thường gây ngộ độc thực phẩm. Đây là cơ sở để tạo chất bảo quản sinh học có phổ kháng khuẩn cao ứng dụng trong bảo quản thực phẩm tươi sống.

Lời cảm ơn: *Nhóm tác giả cảm ơn sự tài trợ kinh phí của Đề tài cấp Viện KHCNQS năm 2019: "Nghiên cứu sản xuất enterocin tái tổ hợp để bảo quản thực phẩm tươi sống cho bộ đội".*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. S. Arbulu *et al.*, "*Cloning and expression of synthetic genes encoding the broad antimicrobial spectrum bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077, by recombinant Pichia pastoris,*" BioMed research international, (2015).

[2]. J. Line *et al.*, "*Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria,*" Antimicrobial agents and chemotherapy, **Vol. 52**, No. 3 (2008), pp. 1094-1100.

[3]. J. Jasniewski *et al.*, "*Optimization of the production and purification processes of carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from Carnobacterium maltaromaticum CP5 by heterologous expression in Escherichia coli,*" Journal of microbiological methods, **Vol. 73**, No. 1 (2008), pp. 41-48.

[4]. B. Mesa-Pereira *et al.*, "*Heterologous expression of biopreservative bacteriocins with a view to low cost production,*" Frontiers in microbiology, **Vol. 9**, (2018), pp. 1654.

[5]. J. Gutiérrez *et al.*, "*Cloning, production and functional expression of enterocin P, a sec-dependent bacteriocin produced by Enterococcus faecium P13, in Escherichia coli,*" International journal of food microbiology, **Vol. 103**, No. 3 (2005), pp. 239-250.

[6]. P. T. Linh và cộng sự, "*Ghép nối và biểu hiện gen mã hóa Enterocin P của vi khuẩn Enterococcus Faecium trong nấm men Pichia pastoris X33*," *Tạp chí Công nghệ sinh học,* **số 2**, (2010), pp. 221-226.
[7]. D. T. Hương và cộng sự, "*Nghiên cứu tối ưu điều kiện biểu hiện Interleukin-3 người dung hợp với PelB trong E. coli*," Tạp chí Sinh học, **số 38**, (2014), pp. 250-356.
[8]. U. K. Laemmli, "*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*," Nature, **Vol. 227**, No. 5259 (1970), pp. 680-685.
[9]. M. Balouiri *et al.*, "*Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*," Journal of pharmaceutical analysis, **Vol. 6**, No. 2 (2016), pp. 71-79.
[10]. M. P. Malakhov, et al, "S*UMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins*," Journal of Structural and Functional Genomics, **Vol. 5**, No. 1–2 (2004).
[11]. T. R. Butt, et al, "*SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins*," Protein Expression and Purification, **Vol. 43**, No. 1 (2005), pp. 1-9.

ABSTRACT

CLONING AND EXPRESSION OF GENE ENCODING ENTEROCIN E-760 IN *Escherichia coli* Rosetta 2

Enterocin E-760 is an antimicrobial peptide belonging to bacteriocins class II which shows a broad spectrum against both gram-negative and gram-positive especially food pathogens such as Listeria monocytogenes, Salmonella, Staphylococcus aureus, etc. This article illustrated the expression of the recombinant enterocin E-760 in E. coli Rosetta 2 with high antibacterial activity. The recombinant strain was induced in LB medium shaking at 200 rpm/min and 37 ºC and using 0.1 mM IPTG as inducer for 5 hours. The molecular weight of enterocin E-760 conjugated protein SUMO was 25 kDa by using SDS-PAGE electrophoresis of gel 12,6%; the antimicrobial activity against L. monocytogenes ATCC® 35152™ at the concentration of 10^5 CFU/mL reached 106 AU/mL by analyzing on agar diffusion. These results are the first step to optimize the expression process to produce a large amount of enterocin E-760 from E. coli with the purpose of applying in food preservation.

Keywords: Bacteriocin; Enterocin E-760; *Enterococcus* sp.; pET22b(+); *E. coli* Rosetta 2.

Nhận bài ngày 19 tháng 4 năm 2021
Hoàn thiện ngày 20 tháng 8 năm 2021
Chấp nhận đăng ngày 05 tháng 9 năm 2021

Địa chỉ: [1]Viện Công nghệ mới/Viện Khoa học và Công nghệ quân sự;
[2]Khoa Sinh học, Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.
*Email: hoangviet1015@gmail.com.