Online First
https://doi.org/10.58334/vrtc.tckhcnnd.924

Nghiên cứu tạo chủng *Escherichia coli* tái tổ hợp mang cụm gen *glpFKD* từ *Bacillus subtilis* có khả năng tăng cường hấp thụ glycerol

Ngô Thuỳ Dương[(1)], Chử Lương Luân[(1)]✉

[(1)] Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

✉ **Corresponding author**

Email: luancl@vnu.edu.vn

ORCID: 0000-0001-9223-6798

How to cite this article

Ngô, T. D., Chử, L. L. (2026). Nghiên cứu tạo chủng *Escherichia coli* tái tổ hợp mang cụm gen *glpFKD* từ *Bacillus subtilis* có khả năng tăng cường hấp thụ glycerol. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nhiệt đới.*

https://doi.org/10.58334/vrtc.tckhcnnd.924

Abstract

Glycerol là phụ phẩm lớn trong công nghiệp sản xuất biodiesel. Sự tăng trưởng mạnh mẽ của ngành đã tạo ra lượng glycerol dư thừa, giá rẻ. Từ đó, đặt ra bài toán kinh tế lớn khi xử lý, tinh chế chúng bằng phương pháp hóa học truyền thống. Việc phát triển các quy trình chuyển hóa glycerol thô thành các sản phẩm có giá trị cao đang trở thành xu hướng thiết yếu. Sự phát triển của công nghệ DNA tái tổ hợp đã tạo nền tảng cho các nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật cải biến di truyền, như các hệ thống chuyển hóa sinh học an toàn, hiệu quả. Nghiên cứu này nhằm tạo chủng *Escherichia coli* tái tổ hợp mang các gen *glpF, glpK* và *glpD* từ *Bacillus subtilis* ST123 nhằm tăng khả năng hấp thụ glycerol. Các gen đích được nhân dòng, đưa vào vector pETDuet-1, xác nhận bằng giải trình tự Sanger và biến nạp vào *E. coli* bằng sốc nhiệt. Khả năng sử dụng glycerol được đánh giá trong môi trường M9, trong đó glycerol là nguồn carbon duy nhất. Kết quả cho thấy các gen được chèn chính xác 100% và chủng tái tổ hợp hấp thụ glycerol cao hơn đối chứng 2,4 lần sau 48 giờ. Lượng glycerol sử dụng đạt 6,7 g/L, tương ứng với khoảng 70% trong môi trường bổ sung 0,75% glycerol. Kết quả khẳng định tiềm năng ứng dụng của chủng tái tổ hợp trong chuyển hóa glycerol, tiến tới xử lý glycerol thô và ứng dụng trong sinh tổng hợp các chất có giá trị cao.

Keywords

biodiesel;Escherichia coli; glycerol facilitator (GlpF); glycerol kinase (GlpK); glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GlpD); hấp thụ glycerol.

ONLINE FIRST

Đặt vấn đề

Glycerol là một nguồn carbon giá rẻ, dồi dào, được tạo ra như một sản phẩm phụ trong quá trình sản xuất xăng sinh học (Chiang và cộng sự, 2024). Trong quy trình sản xuất biodiesel, phản ứng chuyển đổi este (transesterification) tạo ra phụ phẩm glycerol thô với tỉ lệ khối lượng khoảng 10%; cụ thể, cứ mỗi 100 kg xăng sinh học được sản xuất lại thải 10 kg glycerol thô ra môi trường (Pirzadi & Meshkani, 2022; Attarbachi và cộng sự, 2023). Sự tăng trưởng mạnh mẽ của ngành công nghiệp biodiesel đã tạo ra lượng glycerol dư thừa, dẫn đến giá glycerol thô giảm mạnh, xuống còn 1/10 so với mức ban đầu trong hơn hai thập kỷ qua (Chiang và cộng sự, 2024; Harussani và cộng sự, 2023). Từ đó tạo ra một bài toán kinh tế lớn đối với ngành công nghiệp sản xuất và tinh chế glycerol thô, đồng thời tiềm năng kinh tế của ngành công nghiệp sản xuất xăng sinh học cũng bị ảnh hưởng vô cùng nghiêm trọng; cụ thể, quá trình tinh chế 1 kg glycerol thô bằng phương pháp hóa học tiêu tốn từ 50 đến 80 USD, tương ứng từ 1,5 đến 2 triệu VND (Attarbachi và cộng sự, 2023; Bansod và cộng sự, 2025). Do đó, việc phát triển các quy trình chuyển hóa glycerol thô thành các sản phẩm có giá trị cao đã và đang trở thành một nhu cầu thiết yếu đối với nền kinh tế nói chung và ngành công nghiệp sản xuất biodiesel nói riêng. Việc sử dụng glycerol làm nguồn carbon giá rẻ cho quá trình sinh tổng hợp các hợp chất có giá trị ở vi sinh vật được cải biến di truyền đang trở thành một xu thế phổ biến hiện nay.

Đặc biệt, vi sinh vật phổ biến trong công nghiệp sản xuất hiện nay như *E. coli* sở hữu những ưu điểm gồm tốc độ sinh trưởng nhanh, khả năng thích nghi tốt, an toàn cho sản xuất và hệ thống di truyền đã được nghiên cứu chi tiết (Ruiz & Silhavy, 2022). Qua chiến lược cải biến di truyền hiện đại, các chủng *E. coli* có thể được tái cấu trúc mạng lưới trao đổi chất để tối ưu hóa việc sử dụng glycerol như một nguồn carbon khác, bên cạnh glucose, nguồn carbon ưu tiên của hầu hết vi sinh vật nhờ cơ chế ức chế dị hóa carbon (Chiang và cộng sự, 2020). Tăng cường biểu hiện các

protein chính trong hệ thống chuyển hóa glycerol, gồm protein xuyên màng vận chuyển glycerol (được mã hóa bởi gen *glpF*), enzyme glycerol kinase xúc tác cho quá trình phosphoryl hóa glycerol (được mã hóa bởi gen *glpK*) và glycerol-3-phosphate dehydrogenase xúc tác cho quá trình oxy hóa sản phẩm, đưa tới những con đường chuyển hóa tiếp theo (được mã hóa bởi gen *glpD*) giúp tế bào vượt qua rào cản trong hấp thụ glycerol của vi khuẩn *E. coli* (Chiang và cộng sự, 2020). Theo nghiên cứu của Chiang và cộng sự (2024), việc tái cấu trúc hệ thống chuyển hóa glycerol kết hợp với điều chỉnh các con đường liên quan đến phosphoryl hóa và oxy hóa sản phẩm đã giúp cải thiện trạng thái sinh lý của tế bào *E. coli*, từ đó nâng cao hiệu suất biểu hiện protein endoglucanase tái tổ hợp khi sử dụng glycerol thô làm nguồn carbon (Chiang và cộng sự, 2024). Tuy nhiên, biểu hiện của các gen tái tổ hợp thường đi kèm với những thách thức lớn về gánh nặng chuyển hóa và mất cân bằng biểu hiện giữa các gen; những yếu tố này có thể làm suy giảm hiệu quả sinh trưởng cũng như khả năng chuyển hóa glycerol của *E. coli* (Liu và cộng sự, 2026). Trong bối cảnh đó, hệ vector biểu hiện pETDuet-1 tạo nền tảng thuận lợi cho đồng biểu hiện đa gen nhờ khả năng mang nhiều cassette biểu hiện độc lập (Merck Millipore, 2010). Kết hợp hệ thống điều hòa biểu hiện phù hợp, tạo chủng *E. coli* tái tổ hợp có khả năng tăng cường chuyển hóa thông qua đồng biểu hiện các protein tham gia vào con đường đó (Liu và cộng sự, 2026).

Xuất phát từ những cơ sở trên, nghiên cứu này nhằm thiết kế hệ thống biểu hiện đa gen *glpF, glpK, glpD* trên vector pETDuet-1 ở *E. coli*, hướng tới đánh giá sự sinh trưởng và khả năng hấp thụ glycerol của *E. coli* tái tổ hợp. Đồng thời, cung cấp cơ sở cho việc phát triển chủng *E. coli* tái tổ hợp có khả năng sử dụng glycerol thô làm nguồn carbon thay thế trong các quá trình sinh tổng hợp các hợp chất có giá trị cao.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Môi trường Luria-Bertani (LB, Bio Basic, Canada) chứa 10 g/L tryptone, 5 g/L cao nấm men và 5 g/L NaCl được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn. Môi trường tối thiểu M9 gồm các thành phần: 1 g/L NH_4Cl, 6 g/L Na_2HPO_4, 3 g/L KH_2PO_4 và 0,5 g/L NaCl được nhóm nghiên cứu chuẩn bị và sử dụng để đánh giá sự sinh trưởng và khả năng hấp thụ glycerol. Kháng sinh ampicillin (100 µg/mL) và kanamycin (50 µg/mL) (Bio Basic, Canada) được bổ sung vào môi trường để sàng lọc. Các chủng nhân dòng và biểu hiện, vector và plasmid sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê trong Bảng 1.

Phương pháp nghiên cứu

Nhân dòng 3 gen glpF, glpK, glpD và giải trình tự

Các gen *glpF, glpK, glpD* có nguồn gốc từ DNA tổng số của vi khuẩn *B. subtilis* ST123 với kích thước lần lượt là 825 bp, 1491 bp, 1668 bp, được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu của gen. Cụ thể, gen *glpF* khuếch đại bằng mồi xuôi-glpF: 5’-AGTCAGGATCCGATGACAGCATTTTGGGG-3’ và mồi ngược-glpF: 5’-GCTGAATTCTTAAATATATTTAGAATTTGATAATG-3’; gen *glpK* qua cặp mồi xuôi-glpK: 5’-GTCAGTCGACAAGGAGGCACACATGGAAACGTACATTTTA-3’ và mồi ngược-glpK: 5’- GACTGCGGCCGCTTATTTAAAAGCC-3’; *glpD* mồi xuôi-glpD: 5’-GGCGAGATCTATGAATCATCAATT-3’ và mồi ngược-glpD: 5’-CTCGAGTTATTGCTCAAGCGGTACG-3’. DNA tổng số của vi khuẩn *B. subtilis* ST123 được tách chiết bằng bộ Genomic DNA Kit (BioFACT, Hàn Quốc).

Phản ứng PCR khuếch đại gen mục tiêu được thực hiện với chu trình: 95 °C - 5 phút; 30 chu kỳ gồm 95 °C - 30 giây, 58 °C - 30 giây, 72 °C - 1 phút; kết thúc 72 °C - 5 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ Gel & PCR Purification System (BioFACT, Hàn Quốc). Gen *glpF, glpK, glpD* sau khi tinh sạch được nhân dòng theo hướng dẫn của bộ All in One™ PCR Cloning Kit (BioFACT, Hàn Quốc). Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* DH5α và sàng lọc trên đĩa thạch LB bổ sung 50 µg/mL kanamycin và 100 µg/mL ampicillin. Các gen mục tiêu được xác nhận bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi M13 của

ONLINE FIRST

vector (mồi xuôi M13: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' và mồi ngược M13: 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'). DNA plasmid sau khi được tách chiết và kiểm tra bằng phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn được sử dụng để giải trình tự các gen (CTY TNHH DNA Sequencing, Việt Nam). Sản phẩm được kiểm tra bằng điện di gel agarose 1%.

Bảng 1. Chủng vi sinh vật và vector đã được sử dụng trong nghiên cứu

Nguyên liệu	Vai trò	Nguồn gốc
Chủng vi sinh vật		
***B. subtilis* ST123**	Tách bộ DNA tổng số	(Nguyen & Chu, 2025)
***E. coli* DH5α**	Chủng nhân dòng	Invitrogen, Hoa Kỳ
***E. coli* BL21(DE3)**	Chủng biểu hiện	Invitrogen, Hoa Kỳ
E. coli FKD	*E. coli* BL21(DE3) mang pETDuet-glpF-glpK-glpD	
Các vector được sử dụng		
All in One™	Vector nhân dòng	BIOFACT, Hàn Quốc
pETDuet-1	Vector biểu hiện	Novagen, Đức
pETDuet-glpF	pETDuet-1 mang gen *glpF* từ *B. subtilis* ST123	Nghiên cứu
pETDuet-glpF-glpK	pETDuet-1 mang gen *glpF, glpK* từ *B. subtilis* ST123	Nghiên cứu
pETDuet-glpF-glpK-glpD	pETDuet-1 mang gen *glpF, glpK, glpD* từ *B. subtilis* ST123	Nghiên cứu

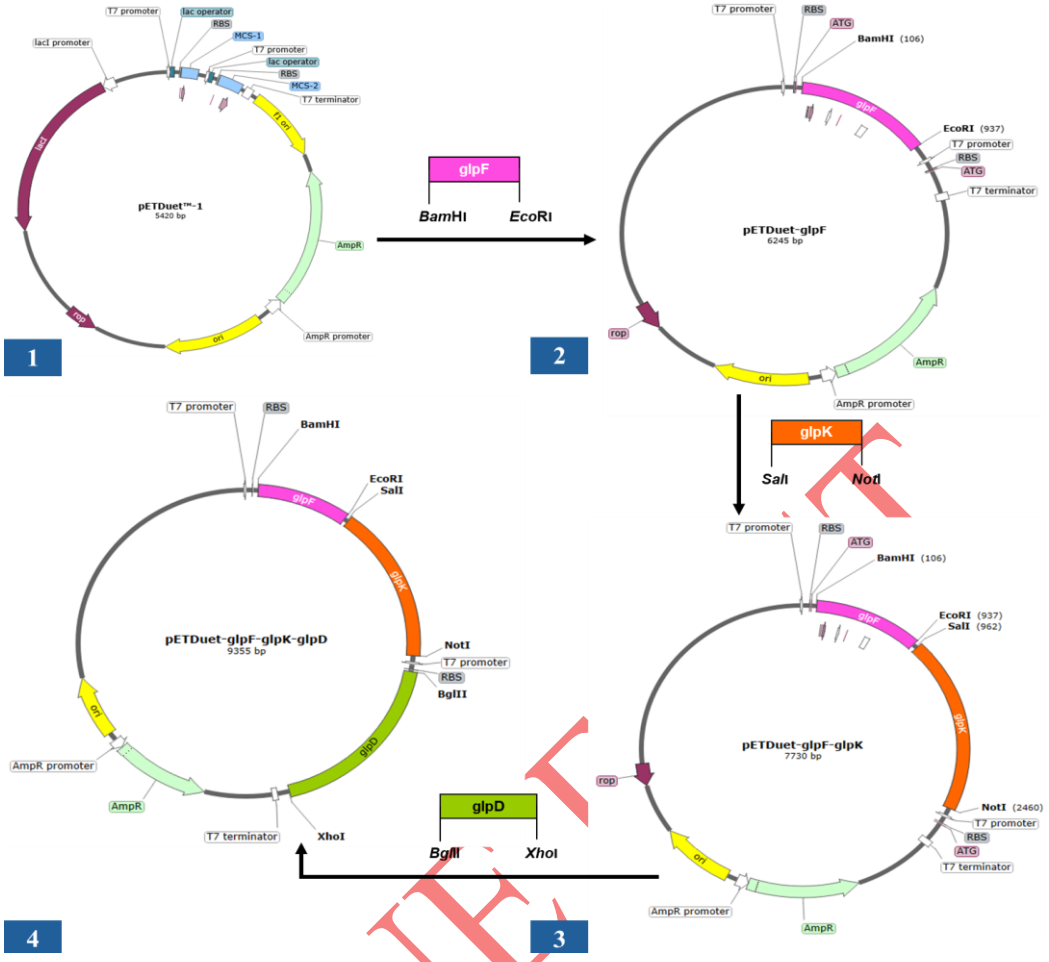
Tạo vector tái tổ hợp pETDuet-glpF-glpK-glpD và chủng E. coli tái tổ hợp FKD

Vector pETDuet-1 được sử dụng cho hệ thống đồng biểu hiện 3 gen *glpF, glpK, glpD* với 2 trình tự T7 promoter, *lac* operator và gen kháng kháng sinh ampicillin. Ba gen *glpF, glpK, glpD* trên vector nhân dòng được cắt bằng cặp enzyme giới hạn với trình tự nhận biết đã được thiết kế trên cặp mồi đặc hiệu của chúng. Quy trình tạo vector tái tổ hợp pETDuet-glpF-glpK-glpD gồm: (1) Tạo pETDuet-glpF qua cắt pETDuet-1, *glpF* bởi cặp *Bam*HI/*Eco*RI và nối bằng T4 DNA ligase; (2) Tạo pETDuet-glpF-glpK qua cắt pETDuet-glpF, *glpK* bởi cặp *Sal*I/*Not*I và nối tương tự; (3) Cắt pETDuet-glpF-glpK, *glpD* bởi cặp *Bgl*I/*Xho*I và nối để tạo vector tái tổ hợp pETDuet-glpF-glpK-glpD (Hình 1).

Vector pETDuet-1 (mang hai promoter T7 độc lập, *lac* operator và gen kháng ampicillin) được sử dụng làm khung cho hệ thống đồng biểu hiện ba gen *glpF*, *glpK* và *glpD*. Ba gen *glpF, glpK, glpD* trên vector nhân dòng được cắt với cặp enzyme giới hạn với trình tự nhận biết đã được thiết kế trên cặp mồi đặc hiệu của chúng. Quy trình tạo vector tái tổ hợp pETDuet-glpF-glpK-glpD được mô tả tại Hình 1 gồm các bước cụ thể như sau: (1) Tạo vector pETDuet-glpF bằng cách cắt đồng thời tạo đầu dính gen *glpF* và mở vòng tại vị trí nhận biết của cặp enzyme giới hạn *Bam*HI/*Eco*RI thuộc vùng MCS1 của vector pETDuet-1. Sau đó, nối gen vào vector bằng T4 DNA ligase. Ở cấu trúc này, gen *glpF* nằm cố định tại MCS1 dưới sự điều khiển trực tiếp của promoter T7 thứ nhất và vị trí gắn ribosome (RBS) của vector. (2) Tạo vector pETDuet-glpF-glpK bằng cách cắt mở vòng plasmid pETDuet-glpF và đoạn gen *glpK* bởi cặp enzyme giới hạn *Sal*I/*Not*I, tiếp tục nối bằng T4 DNA ligase để đặt gen *glpK* dưới sự điều khiển của promoter T7 thứ nhất và trình tự RBS được nhóm nghiên cứu bổ sung. (3) Cuối cùng, vector pETDuet-glpF-glpK và đoạn gen *glpD* được cắt bằng cặp enzyme giới hạn *Bgl*II/*Xho*I (thuộc MCS2 của vector), sau đó nối lại để thu được vector tái tổ hợp pETDuet-glpF-glpK-glpD.

ONLINE FIRST

Online First
https://doi.org/10.58334/vrtc.tckhcnnd.924



Hình 1. Quy trình tạo vector tái tổ hợp pETDuet-glpF-glpK-glpD

1: pETDuet^{TM}-1; 2: pETDuet-glpF; 3: pETDuet-glpF-glpK; 4: pET-glpF-glpK-glpD

Sau mỗi bước nối, sản phẩm được biến nạp vào *E. coli* DH5α để lưu dòng và sàng lọc bước đầu trên đĩa thạch LB bổ sung 100 µg/mL ampicillin. Phương pháp PCR khuẩn lạc với sự kết hợp của mồi đặc hiệu của gen và vector (*glpF* xác nhận bằng mồi xuôi-T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' và mồi ngược-glpF; *glpK* sàng lọc với mồi xuôi-glpK và mồi ngược-T7: 5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'; còn *glpD* là mồi xuôi-glpD và mồi ngược-T7) giúp xác định các khuẩn lạc có khả năng dương tính cao. DNA plasmid từ các khuẩn lạc dương tính được cắt và kiểm tra bằng enzyme giới hạn; kết quả được thể hiện qua điện di trên gel agarose 1%. Sau khi thiết kế thành công, pETDuet-glpF-glpK-glpD được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt để tạo chủng *E. coli* FKD. Khuẩn lạc được sàng lọc trên môi trường thạch LB bổ sung 100 µg/mL ampicillin.

Đánh giá sự sinh trưởng và khả năng hấp thụ glycerol của chủng E. coli tái tổ hợp FKD

Chủng *E. coli* tái tổ hợp FKD và đối chứng *E. coli* BL21(DE3) được nuôi khởi động qua đêm trong môi trường LB ở 37 °C và cấy chuyển vào môi trường tối thiểu M9 bổ sung 0.75% glycerol. Các chủng được cảm ứng với 0,5 mM IPTG và nuôi lắc ở 30 °C với tốc độ 160 vòng/phút trong 48 giờ. Dung dịch nuôi cấy được thu sau mỗi 12 giờ để theo dõi sự sinh trưởng, ly tâm và lọc qua đầu lọc 0,22 µm để loại bỏ cặn vi khuẩn. Sau đó, các mẫu dịch nổi này được xử lý theo hướng dẫn của bộ Glycerol Assay Kit (Megazyme Ltd., Neogen, USA) để đánh giá khả năng hấp thụ glycerol của các chủng thông qua hiệu số hấp phụ của NADH giảm giữa trước và sau khi phản ứng với glycerol kinase (GK) của mẫu ở bước sóng 340 nm. Số liệu sau đó được xử lý bằng đường chuẩn glycerol với 4 nồng độ từ 0,01 đến 0,2 g/L và có dạng:

$$y = ax + b \quad (1)$$

ONLINE FIRST

Với y là độ hấp phụ, x là nồng độ glycerol có mặt trong phản ứng [g/L] và $R^2 \geq 0,9$.

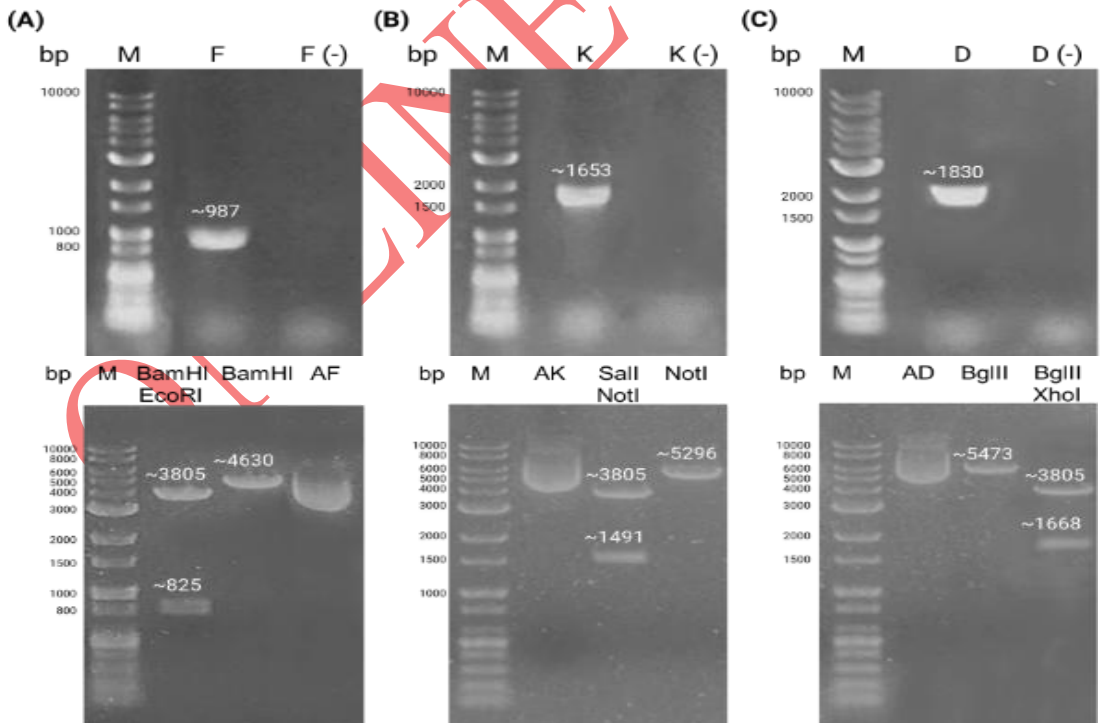
Kết quả

Tạo dòng 3 gen glpF, glpK, glpD trên vector nhân dòng All in One và giải trình tự

Các gen *glpF, glpK, glpD* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu của chúng cho kết quả điện di gel agarose 1% với kích thước đúng lý thuyết là khoảng 825 bp (gen *glpF*), 1491 bp (gen *glpK*), 1668 bp (gen *glpD*) và được tạo dòng thành công trong vi khuẩn *E. coli* DH5α. Các vector nhân dòng All in One trung gian mang các gen *glpF, glpK, glpD* thu được nhờ tách DNA plasmid từ khuẩn lạc dương tính được sàng lọc trên đĩa thạch LB bổ sung kháng sinh ampicillin. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc với cặp mồi M13 của vector xác nhận sự có mặt của các gen *glpF* tương ứng với khoảng 987 bp (Hình 2A), *glpK* tương ứng với khoảng 1653 bp (Hình 2B) và *glpD* tương ứng với 1830 bp (Hình 2C) trên vector All in One là đúng với lý thuyết (tổng kích thước mỗi gen và khoảng 162 bp của vector).

Kết quả điện di sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn các plasmid trung gian, cụ thể, All-in-One-glpF cắt bởi *BamH*I cho kích thước khoảng 4630 bp và cắt bằng cặp *BamH*I/*EcoR*I cho 2 băng ở vị trí khoảng 825 bp (tương ứng với băng gen) cùng 3805 bp (tương ứng với băng vector) (Hình 2A). Tương tự, All-in-One-glpK cắt bởi *Not*I cho kích thước khoảng 5296 bp và cắt bằng cặp *Sal*I/*Not*I cho 2 băng khoảng 1491 bp và 3805 bp (Hình 2B); đồng thời All-in-One-glpD cắt bởi *Bgl*II cho kích thước khoảng 5473 bp và cắt bằng cặp *Bgl*II/*Xho*I cho 2 băng khoảng 1668 bp và 3805 bp (Hình 2C). Khẳng định các gen *glpF, glpK, glpD* được tạo dòng đúng kích thước lý thuyết trên vector nhân dòng All in One.

Kết quả phân tích trình tự các gen *glpF, glpK, glpD* cho kết quả tương đồng 100% với trình tự gốc (Hình 3). Chứng minh các gen *glpF, glpK, glpD* được tạo dòng thành công với trình tự tương đồng với trình tự gốc.



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc, cắt enzyme giới hạn xác nhận *glpF* (A), *glpK* (B), *glpD* (C) trên vector All in One. *M: BioFact™ 1Kb Plus DNA Ladder; F, K, D và F(-), K(-), D(-): sản phẩm PCR khuẩn lạc các gen glpF, glpK, glpD bằng cặp mồi M13 và đối chứng âm; AF, AK, AD: All-in-One-glpF, All-in-One-glpK, All-in-One-glpD; BamHI, NotI, BglII và BamHI/EcoRI, SalI/NotI, BglII/XhoI: AF, AK, AD cắt bằng 1 và đa enzyme giới hạn*

ONLINE FIRST

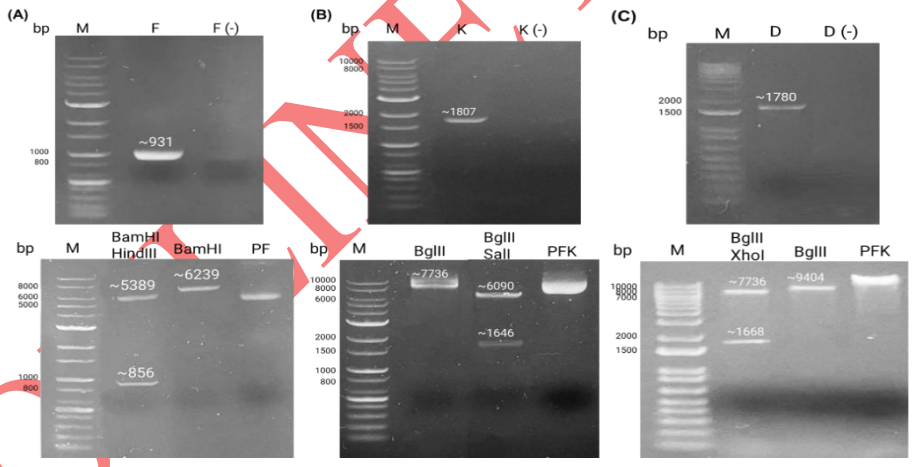
Online First
https://doi.org/10.58334/vrtc.tckhcnnd.924



Hình 3. Kết quả dóng hàng trình tự các gen *glpF* (A), *glpK* (B), *glpD* (C) với trình tự gốc trên ngân hàng gen

Tạo vector tái tổ hợp pETDuet-glpF-glpK-glpD và tạo chủng E. coli FKD

Các gen *glpF, glpK, glpD* tạo dòng thành công và được xác nhận qua giải trình tự đã được cắt và nối lần lượt vào vector pETDuetTM-1, tạo thành vector tái tổ hợp pETDuet-glpF-glpK-glpD (Hình 1). Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc khẳng định sự hiện diện của các gen mục tiêu trong pETDuet™-1. Cụ thể, xuất hiện băng ở vị trí khoảng 931 bp đối với gen *glpF* (Hình 4A), 1807 bp đối với gen *glpK* (Hình 4B) và 1780 bp đối với gen *glpD* (Hình 4C) (tương ứng tổng kích thước mỗi gen và khoảng 100-200 bp của vector). Qua đó, chứng minh các gen glpF, glpK, glpD có khả năng cao được nối vào vector pETDuet™-1 đúng chiều và kích thước lý thuyết.



Hình 4. Điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc và cắt enzyme giới hạn xác nhận gen *glpF* trong pETDuet-glpF (A), *glpK* trong pETDuet-glpF-glpK (B), *glpD* trong pETDuet-glpF-glpK-glpD (C). *M: BioFact™ (A, B), Invitrogen™ (C) 1Kb Plus DNA Ladder; F, K, D và F(-), K(-), D(-): sản phẩm PCR khuẩn lạc glpF, glpK, glpD bằng cặp mồi gen-vector và đối chứng âm; PF, PFK, PFKD: pETDuet-glpF, pETDuet-glpF-glpK, pETDuet-glpF-glpK-glpD; BamHI, BglII và BamHI/HindIII, BglII/SalI, BglII/XhoI: PF, PFK, PFKD cắt bằng 1 và đa enzyme giới hạn*

Kết quả điện di sản phẩm cắt kiểm tra bằng 1 và đa enzyme giới hạn plasmid pETDuet-glpF, pETDuet-glpF-glpK, pETDuet-glpF-glpK-glpD khẳng định các gen mục tiêu được chèn vào pETDuet™-1 đúng chiều và theo lý thuyết. Cụ thể, pETDuet-glpF cắt bằng *Bam*HI cho băng tổng kích thước của *glpF và* pETDuet-1 là khoảng 6239 bp, cắt bằng cặp *Bam*HI/*Hin*dIII cho 2 băng lần lượt khoảng 856 bp và 5389 bp (Hình 4A). Tương tự, pETDuet-glpF-glpK cắt bằng *Bgl*II cho băng khoảng 7736 bp, cắt bằng cặp *Bgl*II/*Sal*I cho 2 băng khoảng 1646 bp và 6090 bp (Hình 4B); pETDuet-glpF-glpK-glpD cắt bằng *Bgl*II cho băng khoảng 9404 bp; cắt bằng cặp *Bgl*II/*Xho*I cho 2 băng khoảng 1668 bp và 7736 bp (Hình 4C). Khẳng định rằng nghiên

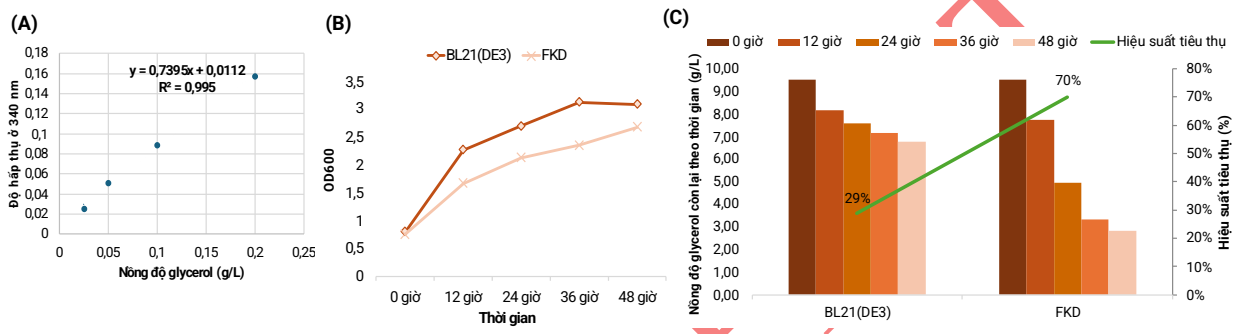
ONLINE FIRST

cứu đã thiết kế thành công vector tái tổ hợp pETDuet-glpF-glpK-glpD.

Vector tái tổ hợp pETDuet-glpF-glpK-glpD sau khi được xác nhận thông qua các phương pháp sàng lọc đã được biến nạp thành công vào *E. coli* BL21(DE3), tạo thành chủng tái tổ hợp *E. coli* FKD.

Đánh giá sự sinh trưởng và khả năng hấp thụ glycerol của chủng E. coli FKD so với đối chứng

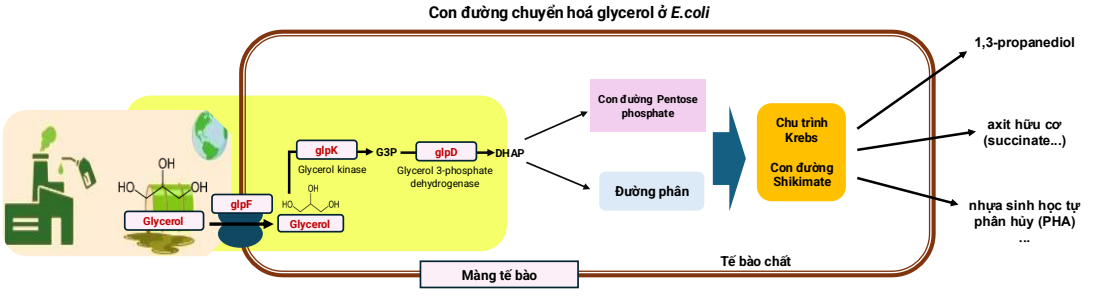
So sánh sự sinh trưởng của chủng *E. coli* FKD và chủng đối chứng ở Hình 5B, thấy được giới hạn sinh khối thể hiện qua giá trị OD_{600} trên đường cong sinh trưởng, cho thấy sự thấp hơn ở chủng FKD (khoảng 2,5 so với 3 sau 48 giờ). Từ đó cho thấy giới hạn sinh khối của chủng tái tổ hợp chủ yếu do gánh nặng chuyển hóa. Dù gánh nặng chuyển hóa từ quá trình đồng biểu hiện 3 gen *glpF, glpK, glpD* làm giảm sinh khối tối đa so với đối chứng, chủng tái tổ hợp vẫn thể hiện khả năng hấp thụ glycerol vượt trội, cao gấp 2,4 lần so với đối chứng, tương ứng với khoảng 6,7 g/L glycerol được hấp thụ sau 48 h nuôi cấy (Hình 5C). Qua đó, khẳng định nghiên cứu đã tối ưu hóa thành công dòng trao đổi chất, giúp *E. coli* tăng cường khả năng hấp thụ glycerol.



Hình 5. Đường chuẩn định lượng glycerol (A); sự sinh trưởng (B) và khả năng hấp thụ glycerol (C) của *E. coli* FKD so với đối chứng trong môi trường tối thiểu M9 bổ sung 0,75% glycerol *(mốc 0 giờ nồng độ glycerol có mặt trong môi trường là nồng độ trung bình tính toán được tại đó, 9,5 g/L tương ứng 0,75% glycerol với khối lượng riêng của glycerol là 1,26 g/cm³)*

Thảo luận

Ba gen *glpF, glpK* và *glpD* (kích thước lần lượt là 825 bp, 1491 bp và 1668 bp) được nhân dòng từ DNA tổng số của vi khuẩn *B. subtilis* ST123 có trình tự tương đồng 100% với trình tự gốc của chúng. Việc lắp ráp chính xác 3 gen này vào vector biểu hiện pETDuet theo đúng chiều và kích thước thiết kế đã giúp thiết lập một con đường tăng cường chuyển hóa glycerol hoàn chỉnh bên trong vi khuẩn *E. coli*. Khác với những phương pháp tiếp cận trước đây, các nghiên cứu mới nhất hiện nay chỉ ra rằng việc cải biến toàn bộ hệ thống chuyển hóa glycerol là yếu tố thiết yếu để tối ưu dòng chuyển hóa carbon (Chiang và cộng sự, 2020, 2024) . Chiến lược nghiên cứu này đảm bảo sự ổn định của dòng carbon với GlpF, giúp vận chuyển glycerol qua màng tế bào vi khuẩn; GlpK xúc tác quá trình phosphoryl hóa glycerol; và GlpD xúc tác quá trình oxy hóa, đưa sản phẩm tới các con đường chuyển hóa trung tâm (Hình 6). Thiết kế mô-đun chuyển hóa này không chỉ duy trì dòng carbon liên tục mà còn tránh gây ngộ độc tế bào do ứ đọng các chất trung gian hoặc các sản phẩm dư thừa gây độc tế bào như acetate (Ojima và cộng sự, 2025).



Hình 6. Sơ đồ chuyển hóa glycerol ở *E. coli* (Chiang và cộng sự, 2020)

Online First
https://doi.org/10.58334/vrtc.tckhcnnd.924

Hiệu quả hoạt động của mô-đun chuyển hóa này đã được chứng minh rõ nhất qua sự vượt trội trong kết quả đánh giá khả năng hấp thụ glycerol của chủng tái tổ hợp *E. coli* FKD với hiệu suất hấp thụ glycerol cao gấp 2,4 lần so với chủng đối chứng (6,7 g/L glycerol được sử dụng) (Hình 5). Mặc dù việc sử dụng môi trường tối thiểu bổ sung glycerol là nguồn carbon duy nhất chưa đem lại sự gia tăng sinh khối như kỳ vọng khi so sánh với chủng đối chứng, nguyên nhân chủ yếu là do hiện tượng gánh nặng chuyển hóa. Ở đây, tế bào buộc phải phân phối năng lượng và các tiền chất nội bào để phục vụ cho các quá trình duy trì plasmid, phiên mã, dịch mã và biểu hiện các protein ngoại lai, dẫn đến sự giới hạn nguồn lực dành cho chu kỳ phân chia tế bào. Tuy nhiên, sự giảm sinh khối so với chủng đối chứng này không ảnh hưởng đến mục tiêu của nghiên cứu. Việc duy trì tốc độ hấp thụ glycerol nhanh và nhiều hơn của chủng tái *E. coli* tổ hợp FKD so với chủng đối chứng *E. coli* BL21(DE3) trong điều kiện mật độ tế bào thấp đã cho thấy hiệu quả hoạt động của mô-đun chuyển hóa glycerol của nghiên cứu. So sánh với các hệ thống *E. coli* tái tổ hợp mang gánh nặng biểu hiện khác, như chủng sản xuất proinsulin thường giới hạn khả năng hấp thụ khoảng 2 g/L glycerol sau 24 giờ nuôi cấy, thấp hơn khoảng 2,3 lần so với chủng *E. coli* FKD của nghiên cứu, với khoảng 4,6 g/L glycerol được hấp thụ (Ojima và cộng sự, 2025). Sự vượt trội này là do hệ thống GlpF-GlpK-GlpD được biểu hiện mạnh, giúp vi khuẩn vượt qua cơ chế ức chế dị hóa carbon tự nhiên. Thay vì hấp thụ nguồn carbon chậm, chủng tái tổ hợp có khả năng sử dụng nguồn cơ chất này ngay cả khi nồng độ glycerol trong môi trường rất thấp (Chiang và cộng sự, 2020). Từ đó, khẳng định phương pháp đồng biểu hiện mạnh mẽ các protein trong mô-đun vận chuyển - phosphoryl hóa - oxy hóa glycerol là điều kiện tiên quyết để tối ưu hóa dòng chuyển hóa nguồn carbon thay thế là glycerol.

Tóm lại, việc tạo ra chủng *E. coli* tái tổ hợp FKD mang vector biểu hiện đa gen *glpF, glpK, glpD* đã tái xác nhận chức năng sinh học và sự phối hợp của cụm protein này trong con đường chuyển hóa glycerol nội bào ở vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp. Việc sử dụng môi trường tối thiểu M9 bổ sung glycerol là nguồn carbon duy nhất tạo ra một hệ thống biểu hiện có thành phần xác định, giúp định tuyến dòng carbon một cách có kiểm soát mà không bị nhiễu bởi các nguồn carbon hữu cơ khác. Chủng FKD với năng lực hấp thu glycerol vượt trội mở ra triển vọng trong việc ứng dụng làm chủng nền để chuyển hóa nguồn phụ phẩm này thành các hợp chất giá trị cao như 1,3-propanediol, axit hữu cơ hoặc nhựa sinh học tự phân hủy (PHA). Đây là tiền đề để giải quyết bài toán môi trường của ngành sản xuất xăng sinh học, đồng thời tối ưu hóa chi phí khi phải xử lý phụ phẩm này ở quy mô công nghiệp trước khi được tái sử dụng.

Kết luận

Nghiên cứu đã nhân dòng thành công 3 gen *glpF, glpK, glpD* từ *B. subtilis* ST123 mã hóa cho 3 protein chính tham gia vào con đường hấp thụ glycerol là GlpF, GlpK, GlpD ở *E. coli* với độ tương đồng lên tới 100% khi dóng hàng kết quả giải trình tự của chúng với trình tự gốc. Các kết quả sàng lọc bằng kháng sinh, PCR và cắt enzyme giới hạn sau đó cho thấy 3 gen *glpF, glpK, glpD* đã được đưa lần lượt thành công lên vector biểu hiện pETDuet-1 với đúng kích thước và chiều thiết kế của nghiên cứu. Từ đó tạo ra vector tái tổ hợp pETDuet-glpF-glpK-glpD và chủng *E. coli* FKD tái tổ hợp có khả năng hấp thụ glycerol cao gấp 2,4 lần so với đối chứng, tương ứng với 6,7 g/L glycerol sau 48 giờ nuôi cấy ở điều kiện cảm ứng với 0,5 mM IPTG, 30 °C trong môi trường tối thiểu bổ sung 0,75% glycerol. Đây là những kết quả bước đầu trong nghiên cứu tạo chủng *E. coli* tái tổ hợp có khả năng tăng cường hấp thụ glycerol hướng tới xử lý glycerol thô trong chất thải của công nghiệp xăng sinh học.

Thông tin tài trợ: *Nghiên cứu này được tài trợ bởi nhiệm vụ khoa học QG.25.104 của Đại học Quốc gia Hà Nội.*

Tuyên bố về khả năng truy cập dữ liệu: *Dữ liệu hỗ trợ cho các kết quả của nghiên cứu này có thể được cung cấp bởi tác giả liên hệ theo yêu cầu hợp lý.*

Khai báo về việc sử dụng Generative AI (GenAI): *Các công cụ AI tạo sinh không được sử dụng để tạo ra hoặc chỉnh sửa nội dung khoa học của bản thảo này. Trong phần có sử dụng công cụ AI (chỉ hỗ trợ kiểm tra ngữ pháp/định dạng), các tác giả đã kiểm tra toàn bộ nội dung và hoàn toàn chịu trách nhiệm đối với nội dung cuối cùng.*

ONLINE FIRST

Tuyên bố về đóng góp của tác giả: *Ngô Thùy Dương: Thực hiện phương pháp, phân tích dữ liệu, tổng quan và viết bản thảo; Chử Lương Luân: Xây dựng ý tưởng nghiên cứu, xây dựng phương pháp, phân tích kết quả, rà soát và chỉnh sửa bản thảo.*

Tuyên bố về xung đột lợi ích: *Các tác giả tuyên bố không có xung đột lợi ích.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Attarbachi, T., Kingsley, M. D., & Spallina, V. (2023). New trends on crude glycerol purification: A review. *Fuel, 340*, 127485. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.127485

Bansod, Y., Ghasemzadeh, K., & D'Agostino, C. (2025). Techno-economic assessment of biodiesel-derived crude glycerol purification processes. *RSC Sustainability, 3*(6), 2605–2618. https://doi.org/10.1039/D4SU00599F

Chiang, C.-J., Chao, C.-H., Hu, M.-C., & Chao, Y.-P. (2024). Pathway engineering of *Escherichia coli* for the glycerol-based production of recombinant endoglucanase. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 155*, 105276. https://doi.org/10.1016/j.jtice.2023.105276

Chiang, C.-J., Ho, Y.-J., Hu, M.-C., & Chao, Y.-P. (2020). Rewiring of glycerol metabolism in *Escherichia coli* for effective production of recombinant proteins. *Biotechnology for Biofuels, 13*(1), 205. https://doi.org/10.1186/s13068-020-01848-z

Harussani, M. M., Cheng, S., & Cross, J. (2023). Current and future trends for crude glycerol upgrading to high value-added products. *Sustainability, 15*, 2979. https://doi.org/10.3390/su15042979

Liu, R., Wang, L.-W., Gao, Z.-H., Sun, X.-T., Lv, S.-R., Liu, H., Kang, S., & Sun, B. (2026). Multi-gene co-expression systems in *E. coli*: From single-vector designs to programmable expression platforms. *Synthetic and Systems Biotechnology, 12*, 330–341. https://doi.org/10.1016/j.synbio.2025.12.008

Merck Millipore. (2010). *pETDuet™-1 vector: Instruction manual*. Novagen. https://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf

Nguyen, T. M., & Chu, L. L. (2025). Coumarin derivatives as fibronectin-binding protein A inhibitors against bone and joint infections by *Staphylococcus aureus*: Molecular docking and pharmacological profiling. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*. https://doi.org/10.31276/VJSTE.2025.0065

Ojima, Y., Saito, H., Miyuki, S., Fukunaga, K., Tsuboi, T., & Azuma, M. (2025). Induction conditions that promote the effect of glycerol on recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnology Reports, 46*, e00898. https://doi.org/10.1016/j.btre.2025.e00898

Pirzadi, Z., & Meshkani, F. (2022). From glycerol production to its value-added uses: A critical review. *Fuel, 329*, 125044. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125044

Ruiz, N., & Silhavy, T. J. (2022). How *Escherichia coli* became the flagship bacterium of molecular biology. *Journal of Bacteriology, 204*(9), e00230-22. https://doi.org/10.1128/jb.00230-22

ONLINE FIRST

Abstract

Construction of a Recombinant *Escherichia coli* Strain Carrying the *glpFKD* gene Cluster from *Bacillus subtilis* for Enhanced Glycerol Utilization

Glycerol is a major byproduct of the biodiesel industry, and the rapid expansion of this sector has led to an oversupply of low-cost crude glycerol. This poses a significant economic challenge for the treatment and purification of the material using traditional chemical methods. The development of processes to convert crude glycerol into high-value products has become a key area of research. Advances in recombinant DNA technology have laid the foundation for the use of engineered microorganisms as safe and efficient biotransformation systems. In this study, a recombinant *Escherichia coli* strain carrying the *glpF*, *glpK*, and *glpD* genes from *Bacillus subtilis* ST123 was constructed to enhance glycerol utilization. The target genes were cloned, ligated into the pETDuet-1 vector, and verified by Sanger sequencing. The recombinant vector was transformed into *E. coli via* the heat shock method. Glycerol utilization capacity was evaluated in M9 medium with glycerol as the sole carbon source. The results showed that the inserted genes were 100% correct compared to the target sequences. The recombinant strain exhibited a 2.4-fold increase in glycerol consumption compared to the control after 48 hours. The amount of glycerol utilized reached 6.7 g/L, corresponding to approximately 70% consumption in medium supplemented with 0.75% glycerol. These findings highlight the potential application of the recombinant strain for glycerol utilization, with the aim of crude glycerol consumption and the biosynthesis of high-value compounds.

Keywords: *biodiesel; engineered Escherichia coli; glycerol facilitator (GlpF); glycerol kinase (GlpK); glycerol utilization; glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GlpD).*

Online First
https://doi.org/10.58334/vrtc.tckhcnnd.924

ONLINE FIRST

Ngày nhận bài: 11/5/2026 | Phản biện xong: 21/6/2026 | Chấp nhận đăng: 24/7/2026