

INVESTIGATING CONDITION OF EXPRESSION CONDITIONS FOR RECOMBINANT HUMAN MONOAMINE OXIDASE B IN *PICHIA PASTORIS*

Diem Thu Pham^{1*}, Bich Loan Phung¹, Minh Hieu Bui¹, Thanh Thao Vu¹, Quoc Thai Nguyen¹,
Khac Minh Thai^{2,3*}

¹School of Pharmacy, Ho Chi Minh City University of Medicine and Pharmacy - YA1 Administrative Building, Hai Thuong Lan Ong Street, Ho Chi Minh City National University Urban Area, Dong Hoa Ward, Di An City, Binh Duong

²University of Health Sciences - Ho Chi Minh City National University - 41 Dinh Tien Hoang Street, Saigon Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Ho Chi Minh City National University Health Care Product Research and Development Center - Ho Chi Minh City National University - YA1 Administrative Building, Ho Chi Minh City National University Urban Area, Hai Thuong Lan Ong Street, Dong Hoa Ward, Di An City, Binh Duong, Vietnam

Received: 10/06/2025

Revised: 03/07/2025; Accepted: 07/09/2025

ABSTRACT

Objectives: To investigate and determine the optimal conditions for the expression of active recombinant human monoamine oxidase B (MAO-B) in *Pichia pastoris* KM71.

Methods: The *P. pastoris* KM71 strain carrying the gene encoding human MAO-B was used. Cultivation and induction conditions were investigated, including biomass-generating media (BMG, BMGY), induction media (BMM, BMMY), methanol concentrations (0.25%, 0.5%, 1%), and induction times (24 - 144 hours). Cell disruption conditions by mechanical bead beating were also optimized. MAO-B was purified by ion-exchange chromatography (HiTrap Q FF), and its activity was determined spectrophotometrically using benzylamine as a substrate.

Results: The minimal medium BMG - BMM yielded higher enzyme activity than the complex medium BMGY - BMMY. A methanol concentration of 0.5% and an induction time of 24 hours resulted in the highest MAO-B activity. The optimal cell disruption condition was 6 cycles of 6-minute beating and 10-minute incubation in ice bath. MAO-B was successfully purified, eluting mainly at 30% and 40% HIGH-QB concentrations, and the purified enzyme exhibited an activity of approximately 2977 U/L.

Conclusion: The study successfully expressed active recombinant human MAO-B in *P. pastoris* KM71 and identified optimal conditions for the expression, cell disruption, and initial purification processes, providing a foundation for further applications.

Keywords: Human monoamine oxidase B, *Pichia pastoris*, recombinant.

*Corresponding author

Email: pdthu@ump.edu.vn Phone: (+84) 938061110 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD14.3150>

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN BIỂU HIỆN MONOAMIN OXIDASE B NGƯỜI TRÊN *PICHIA PASTORIS*

Phạm Diễm Thu^{1*}, Phùng Thị Bích Loan¹, Bùi Minh Hiếu¹, Vũ Thanh Thảo¹, Nguyễn Quốc Thái¹,
Thái Khắc Minh^{2,3*}

¹Trường Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh - Tòa nhà hành chính YA1, Đường Hải Thượng Lãn Ông, Khu Đô thị ĐHQG-HCM, P. Đông Hòa, TP. Dĩ An, Bình Dương

²Trường Đại học Khoa học Sức khỏe - Đại học Quốc Gia TP Hồ Chí Minh - 41 Đinh Tiên Hoàng, phường Sài Gòn, thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Trung tâm nghiên cứu và phát triển sản phẩm chăm sóc sức khỏe ĐHQG-HCM - Đại học Quốc Gia TP Hồ Chí Minh - Tòa nhà hành chính YA1, Khu đô thị Đại học Quốc gia Hồ Chí Minh, Đường Hải Thượng Lãn Ông, Đông Hòa, Dĩ An, Bình Dương, Việt Nam

Ngày nhận bài: 10/06/2025

Ngày chỉnh sửa: 03/07/2025; Ngày duyệt đăng: 07/09/2025

TÓM TẮT

Mục tiêu: Khảo sát và xác định các điều kiện tối ưu cho việc biểu hiện enzyme monoamine oxidase B (MAO-B) người tái tổ hợp trên *Pichia pastoris* KM71.

Phương pháp nghiên cứu: Chủng *P. pastoris* KM71 mang gen mã hóa MAO-B người được sử dụng. Các điều kiện nuôi cấy và cảm ứng được khảo sát bao gồm các loại môi trường tăng sinh khối (BMG, BMGY), môi trường cảm ứng (BMM, BMMY), nồng độ methanol (0,25%, 0,5%, 1%) và thời gian cảm ứng (24 - 144 giờ). Điều kiện phá tế bào bằng phương pháp cơ học với hạt thủy tinh cũng được tối ưu hóa. MAO-B được tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion (HiTrap Q FF) và hoạt tính được xác định bằng phương pháp đo quang với cơ chất benzylamin.

Kết quả: Môi trường tối thiểu BMG - BMM cho hoạt tính enzyme cao hơn môi trường phức hợp BMGY - BMMY. Nồng độ methanol 0,5% và thời gian cảm ứng 24 giờ cho hoạt tính MAO-B cao nhất. Điều kiện phá tế bào tối ưu là 6 phút phá, 10 phút nghỉ, trong 6 chu kỳ. MAO-B được tinh chế thành công, rửa giải chủ yếu ở nồng độ 30% và 40% HIGH-QB và enzyme tinh chế có hoạt tính khoảng 2977 U/L.

Kết luận: Nghiên cứu đã biểu hiện thành công enzyme MAO-B người tái tổ hợp có hoạt tính trên chủng *P. pastoris* KM71 và xác định được các điều kiện tối ưu cho quá trình biểu hiện, phá tế bào và tinh chế bước đầu, tạo tiền đề cho các ứng dụng tiếp theo.

Từ khóa: Monoamin oxidase B người, *Pichia pastoris*, tái tổ hợp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Monoamine oxidase B (MAO-B) là một enzyme then chốt trong chuyển hóa các chất dẫn truyền thần kinh như dopamine, serotonin và norepinephrine, qua đó có ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt động của hệ thần kinh trung ương. Sự rối loạn trong hoạt động của MAO-B có liên quan mật thiết đến nhiều bệnh thoái hóa thần kinh như Parkinson, Alzheimer và một số bệnh khác [1]. Do đó, MAO-B là mục tiêu quan trọng để phát triển các thuốc điều trị các bệnh thoái hóa thần kinh này. Tuy nhiên, việc sản xuất MAO-B với số lượng lớn và hoạt tính cao vẫn là một thách thức. Nấm men *Pichia pastoris* nổi lên như một hệ thống ưu việt nhờ khả năng thực hiện các biến đổi hậu dịch mã phức tạp, tốc độ tăng trưởng nhanh và dễ dàng

mở rộng quy mô [2]. Dù vậy, việc tối ưu hóa điều kiện để biểu hiện MAO-B người tái tổ hợp trên *Pichia pastoris* vẫn còn nhiều vấn đề như thành phần môi trường nuôi cấy, nồng độ và thời gian cảm ứng, có thể ảnh hưởng lớn đến hiệu suất và hoạt tính của enzyme. Vì vậy, khảo sát và tối ưu hóa các điều kiện này là cần thiết để thu được lượng MAO-B lớn, ổn định và có hoạt tính sinh học tốt.

Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn và tiềm năng ứng dụng của MAO-B, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu xác định các điều kiện tối ưu cho quy trình biểu hiện enzyme này.

*Tác giả liên hệ

Email: pdthu@ump.edu.vn Điện thoại: (+84) 938061110 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD14.3150>

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71 mang vector biểu hiện pPIC3.5K mang gen mã hóa enzyme MAO-B người. Môi trường cảm ứng biểu hiện nấm men *P. pastoris* được khảo sát bao gồm BMMY (buffered methanol-complex medium); BMM (buffered minimal methanol). Các môi trường nuôi cấy ban đầu cho nấm men để tăng sinh khối là BMGY (buffered glycerol-complex medium); BMG (buffered Minimal Glycerol) có thành phần dinh dưỡng tương tự môi trường cảm ứng, ngoại trừ methanol được thay thế bằng glycerol 10%. Các môi trường nuôi khởi động là MD (Minimal Dextrose), YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) [3].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xây dựng đường cong sinh trưởng

Chủng gốc *P. pastoris* được cấy trên môi trường thạch MD và ủ ở nhiệt độ 30°C trong vòng 48 giờ. Sau đó, khuẩn lạc được chuyển vào môi trường lỏng YPD, nuôi lắc ở tốc độ 250 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C. Theo dõi OD₆₀₀ theo thời gian.

2.2.2. Khảo sát một số điều kiện nuôi cấy, cảm ứng và nồng độ methanol

Chủng gốc từ môi trường YPD được chuyển vào bình lắc có vách chứa môi trường tăng sinh khối (BMG hoặc BMGY), lắc 250 vòng/phút ở 30 °C trong 60 giờ. Sinh khối được ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút và chuyển vào bình lắc có vách chứa các môi trường cảm ứng (BMM hoặc BMMY), nuôi ở điều kiện tương tự. Mỗi môi trường được cảm ứng bằng methanol đến nồng độ 0,25%, 0,5% và 1% mỗi 12 giờ, trong 72 giờ. Ở mỗi điều kiện khảo sát, tiến hành đo các thông số sau: sinh khối (phương pháp cân), nồng độ protein (phương pháp Bradford), hoạt tính MAO-B (phương pháp sử dụng cơ chất benzylamin).

2.2.3. Đo hoạt tính enzyme MAO-B bằng phương pháp đo quang phổ với cơ chất benzylamin

Hoạt tính enzyme được xác định bằng phương pháp đo quang và theo dõi tốc độ tạo thành benzaldehyd ở bước sóng 250 nm ($\epsilon = 12800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Đơn vị hoạt tính enzyme được quy ước là 1 U = số μmol sản phẩm tạo thành mỗi phút.

2.2.4. Khảo sát thời gian cảm ứng

Các khoảng thời gian cảm ứng được khảo sát bao gồm: 24 giờ (1 ngày), 48 giờ (2 ngày), 72 giờ (3 ngày), 96 giờ (4 ngày), 120 giờ (5 ngày) và 144 giờ (6 ngày). Ở mỗi điều kiện khảo sát, tiến hành đo các thông số sinh khối tế bào, nồng độ protein, hoạt tính MAO-B.

2.2.5. Khảo sát điều kiện phá tế bào

Sinh khối tế bào được trộn với đệm phá tế bào (50 mM NaPi pH 7,4, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 1 mM PMSF, 30 μM DTT) và được phá bằng phương pháp

nghiền bi ở tốc độ 2500 vòng/phút. Các điều kiện phá tế bào được khảo sát bao gồm: thời gian phá lần lượt 4, 6, 8 phút – thời gian nghỉ trong đá lần lượt 8, 10 phút – số chu kỳ lần lượt 4, 6, 8 chu kỳ.

Dịch nội bào thu được ở mỗi điều kiện khảo sát được ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ 5°C, đo nồng độ protein trong phần dịch nổi.

2.3. Tái tổ hợp MAO-B người trên *Pichia pastoris*

2.3.1. Phương pháp điện di SDS-PAGE

Các mẫu protein được tiến hành điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 12% theo phương pháp Laemmli.

2.3.2. Biểu hiện và tinh chế MAO-B

Tế bào thu được từ quá trình nuôi cấy được phá vỡ theo điều kiện tốt nhất đã khảo sát. Hỗn hợp được lọc qua màng lọc 25 μm để loại bỏ hạt thủy tinh. Dịch lọc được ly tâm ở 4000 vòng/phút để loại bỏ các mảnh vỡ lớn, thu dịch nổi và tiếp tục ly tâm với lực 70000g trong 45 phút ở 5°C để thu được cặn màng tế bào. Cặn màng tế bào phân tán trong đệm HIGH-QA, thêm triton X-100 đến nồng độ cuối cùng là 0,5%, khuấy ở 4 °C trong bóng tối trong 30 phút. Dịch triton được ly tâm với lực 70000 g trong 30 phút, thu phần dịch nổi và nạp vào cột HiTrap Q FF. Rửa cột với đệm HIGH-QA (25 mM KPi pH 7,0, 20% glycerol (+0,8% OG)) sau đó rửa với đệm rửa giải có nồng độ HIGH-QB (250 mM KPi pH 7,0, 20% glycerol (+0,8% OG)) tăng dần từ 0% đến 100%.

Các phân đoạn protein sau chạy cột được tiến hành điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 12% theo phương pháp Laemmli để xác định phân đoạn tập trung MAO-B nhiều nhất.

3. KẾT QUẢ

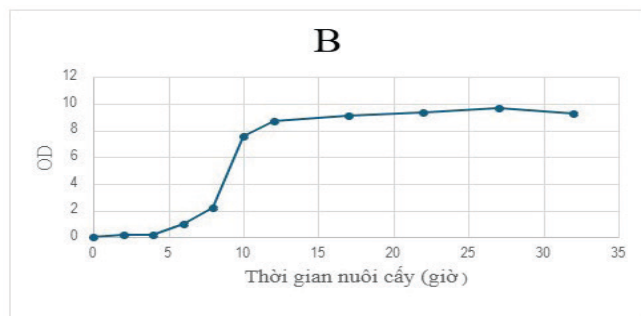
3.1. Xây dựng đường cong sinh trưởng

Chủng gốc *P. pastoris* mọc tốt trên thạch MD ở nhiệt độ 30 °C trong 48 giờ như Hình 1.



Hình 1. Chủng gốc *P. pastoris* được cấy trên thạch MD ủ ở nhiệt độ 30 °C trong 48 giờ

Nuôi *P. pastoris* biểu hiện MAO-B trong môi trường YPD, 30 °C, theo dõi OD₆₀₀ mỗi 2 giờ trong 12 giờ đầu và mỗi 5 giờ trong khoảng thời gian tiếp theo ta thu được đường cong sinh trưởng như Hình 2.



Hình 2. Đường cong sinh trưởng vi khuẩn *P. pastoris* tính theo OD

Nấm men *P. pastoris* được nuôi ở nhiệt độ 30 °C trong môi trường YPD có pha tiềm ẩn trong 4 giờ đầu và pha tăng trưởng trong vòng 8 giờ tiếp theo. Pha cân bằng kéo dài trong khoảng 12-27 giờ và bước vào pha chết từ khoảng 32 giờ. OD₆₀₀ cao nhất trong suốt quá trình nuôi cấy ghi nhận được là 9,63 sau 27 giờ nuôi cấy.

Khảo sát môi trường tăng sinh khối, môi trường cảm ứng và nồng độ methanol cảm ứng

Sinh khối tế bào và nồng độ protein ở môi trường BMGY - BMMY lớn hơn so với môi trường BMG - BMM nhưng hoạt tính enzyme ở môi trường BMG - BMM cao hơn và cao nhất ở nồng độ methanol cảm ứng 0,5% (Bảng 1).

Bảng 1. Sinh khối, nồng độ protein và hoạt tính enzyme MAO-B tái tổ hợp trong các môi trường và nồng độ chất methanol khảo sát

Môi trường	BMG-BMM				BMGY-BMMY		
Nồng độ metanol		0,25%	0,5%	1%	0,25%	0,5%	1%
Sinh khối (g)	Lần 1	1,15	1,44	1,42	6,44	6,79	6,25
	Lần 2	1,12	1,60	1,52	6,28	6,63	6,32
	Lần 3	1,19	1,35	1,45	6,20	6,77	0,39
Nồng độ protein (mg/mL)	Lần 1	0,50	2,26	0,18	4,05	6,27	3,42
	Lần 2	0,47	2,31	0,21	3,76	6,46	3,98
	Lần 3	0,54	2,51	0,23	3,73	6,33	4,21
Hoạt tính MAO-B (U/L)	Lần 1	30,24	572,81	258,81	56,51	113,81	53,14
	Lần 2	29,01	524,71	269,85	57,34	110,35	51,60
	Lần 3	31,48	512,53	269,41	56,79	106,71	50,37

* Khảo sát thời gian cảm ứng

Sinh khối giữa các thời điểm cảm ứng khác nhau không có sự khác biệt đáng kể. Thời điểm cảm ứng 24 giờ được chọn vì tỷ lệ hoạt tính enzyme MAO-B so với nồng độ protein đạt cao nhất (Bảng 2).

Bảng 2. Sinh khối, nồng độ protein và hoạt tính MAO-B người tái tổ hợp trong các thời gian cảm ứng khảo sát

Thời gian cảm ứng		24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ	120 giờ	144 giờ
Sinh khối (g)	Lần 1	1,75	1,69	1,53	1,67	1,75	1,58
	Lần 2	1,40	1,78	1,66	1,51	1,63	1,76
	Lần 3	1,63	1,65	1,71	1,53	1,58	1,65
Nồng độ protein (mg/mL)	Lần 1	1,13	2,69	2,20	2,32	3,36	2,37
	Lần 2	1,09	2,51	2,32	2,45	3,35	2,46
	Lần 3	0,84	2,63	2,58	1,93	3,53	2,66
Hoạt tính MAO-B (U/L)	Lần 1	762,89	604,10	533,79	552,54	622,85	450,59
	Lần 2	743,55	600,59	499,80	573,05	614,06	462,30
	Lần 3	759,96	590,04	503,32	590,63	642,77	528,52

* Khảo sát thời gian phá tế bào

Kết quả nồng độ protein đo bằng phương pháp Bradford thu được sau khi khảo sát các điều kiện phá tế bào được thể hiện ở Bảng 3. Điều kiện phá tế bào trong 6 phút, nghỉ 10 phút trong vòng 6 chu kỳ được chọn để biểu hiện vì nồng độ protein trong dịch phá tế bào là cao nhất.

Bảng 3. Nồng độ protein ở các điều kiện được khảo sát

Điều kiện khảo sát		Nồng độ protein (mg/mL)		
		Lần 1	Lần 2	Lần 3
Phá 4 phút, nghỉ trong 8 phút	4 chu kỳ	0,11	0,13	0,15
	6 chu kỳ	0,29	0,26	0,26
	8 chu kỳ	2,52	2,17	2,06
Phá 6 phút, nghỉ trong 10 phút	4 chu kỳ	0,36	0,38	0,38
	6 chu kỳ	3,41	3,98	4,76
	8 chu kỳ	3,46	3,42	4,50
Phá 8 phút, nghỉ trong 10 phút	4 chu kỳ	1,26	1,51	1,26
	6 chu kỳ	1,96	2,14	1,80
	8 chu kỳ	2,26	2,08	1,80

3.2. Biểu hiện và tinh chế MAO-B bằng quy trình với các điều kiện khảo sát tối ưu

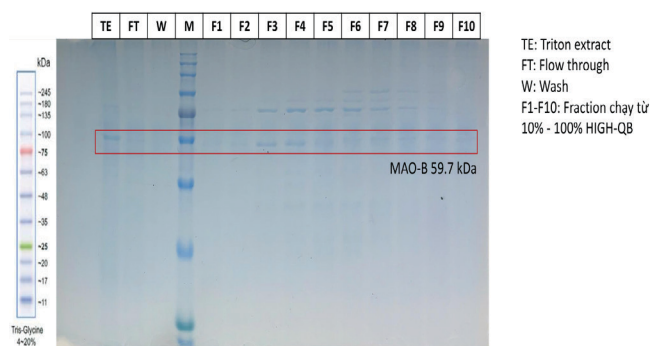
3.2.1. Biểu hiện

Chủng gốc được nuôi trên môi trường thạch MD ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ. Khuẩn lạc được chuyển vào môi trường YDP, lắc 250 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong vòng 8 giờ. Cấy chuyển từ môi trường YPD vào bình lắc có vách 2 L chứa 330 mL môi trường BMG, lắc 250 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong vòng 60 giờ. Sinh khối được li tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút và chuyển vào bình lắc có vách 2 L chứa

165 mL các môi trường cảm ứng BMM, được cảm ứng bằng metanol đến nồng độ 0,5% trong vòng 24 giờ.

3.2.2. Tinh chế

Cần màng tế bào được xử lý với Triton X-100. Sau khi tinh chế MAO-B với cột HiTrap Q FF, các mẫu dịch chạy cột được tiến hành điện di SDS – PAGE (Hình 3).



Hình 3. Kết quả điện di SDS – PAGE các mẫu chạy cột trong quá trình tinh chế MAO-B tái tổ hợp bằng cột HiTrap Q FF

M: Thang chuẩn protein; TE: dịch triton trước khi qua cột; FT: Dịch triton sau khi chạy qua cột; W: đệm HIGH-QA rửa cột sau khi chạy dịch Triton; F1-10: đệm chạy với tỷ lệ HIGH-QB từ 10-100% (F1: 10%; F2: 20%, F3: 30%; F4: 40%; F5: 50%; F6: 60%; F7: 70%; F8: 80%; F9: 90%; F10: 10%).

MAO xuất hiện ở phân đoạn TE và gần như không xuất hiện ở phân đoạn FT và W. Khi rửa giải với nồng độ HIGH-QB tăng dần, MAO-B bắt đầu xuất hiện ở phân đoạn HIGH-QB 30%. Phân đoạn chứa HIGH-QB 30% và 40% rửa giải được phần lớn lượng MAO-B có trong cột. MAO-B ở phân đoạn F3, F4 được cô đặc thu được 500 μ L và có hoạt tính khoảng 9983 U/L. Toàn bộ quá trình tinh chế enzym MAO-B tái tổ hợp từ dịch phá tế bào đến sản phẩm cuối cùng đã được theo dõi và đánh giá hiệu suất qua từng giai đoạn (Bảng 4).

Bảng 4. Bảng tổng hợp hiệu suất tinh chế MAO-B qua các giai đoạn

	Thể tích (mL)	Nồng độ protein (mg/mL)	Tổng protein (mg)	Hoạt tính (U/L)	Tổng hoạt tính (U)	Hoạt độ riêng (U/mg)	Hiệu suất (%)
Dịch phá tế bào	40	3,11	124,4	770	30,8	0,25	100
Dịch Triton	6	8,33	49,98	4367	26,2	0,52	85,06
Dịch chảy qua cột	6	4,83	28,98	218	1,308	0,037	4,2
F3 và F4 sau khi cô đặc	0,5	5,86	2,93	9983	4,99	1,7	16,21

Bước tinh chế sơ bộ bằng Triton X-100 đã bảo toàn được 85% hoạt tính trong khi loại bỏ hơn một nửa

lượng protein tạp. Tiếp theo, bước sắc ký trao đổi ion đã phân tách hiệu quả MAO-B, với phần lớn protein tạp còn lại được tìm thấy trong dịch chảy qua cột. Quy trình đạt được độ tinh sạch cuối cùng là 6,8 lần, với hoạt độ riêng của MAO-B sau cô đặc đạt 1,7 U/mg. Hiệu suất thu hồi tổng thể của toàn bộ quy trình là 16,21%.

4. BÀN LUẬN

Môi trường phức hợp BMGY-BMMY giúp *P. pastoris* tăng sinh khối và protein tổng cao hơn môi trường tối thiểu BMG-BMM do nguồn dinh dưỡng dồi dào. Tuy nhiên, hoạt tính enzyme MAO-B lại cao hơn ở môi trường tối thiểu. Điều này có thể do môi trường phức hợp ưu tiên tăng trưởng tế bào, trong khi môi trường tối thiểu tạo “stress” nhẹ, kích thích tế bào tập trung sản xuất protein tái tổ hợp hiệu quả hơn [4].

Nồng độ methanol rất quan trọng trong quá trình cảm ứng biểu hiện protein tái tổ hợp. Nếu nồng độ methanol quá thấp có thể dẫn đến sự suy thoái của protein tái tổ hợp hoặc cảm ứng yếu, nếu nồng độ methanol quá cao có thể dẫn đến việc tích lũy các sản phẩm độc hại HCHO và H_2O_2 trong quá trình chuyển hóa methanol, gây ức chế sự phát triển của tế bào nếu vượt quá ngưỡng 3,65 g/L [5]. Trong nghiên cứu này, nồng độ methanol 0,5% được xác định là tối ưu cho việc cảm ứng biểu hiện MAO-B.

Thời gian cảm ứng 24 giờ cho hoạt tính enzyme MAO-B cao nhất, dù tổng lượng protein thấp hơn khi cảm ứng kéo dài. Điều này cho thấy kéo dài thời gian cảm ứng tuy làm tăng protein tổng nhưng không đồng nghĩa với tăng hoạt tính MAO-B. Nguyên nhân có thể do enzyme giảm hoạt tính theo thời gian vì protease nội bào, oxy hóa hoặc gấp cuộn sai trong quá trình nuôi cấy kéo dài [6]. Việc đạt được hoạt tính enzyme cao nhất ở thời gian cảm ứng tương đối ngắn (24 giờ) là một ưu điểm, giúp tiết kiệm thời gian, chi phí sản xuất và có thể thu được enzyme với hoạt tính tốt.

Vì MAO-B là enzyme liên kết màng ty thể nên việc phá vỡ tế bào hiệu quả để giải phóng protein rất quan trọng. Nghiên cứu đã khảo sát các chu kỳ phá, thời gian phá và thời gian nghỉ khác nhau bằng phương pháp nghiền bi. Kết quả cho thấy tăng từ 4 lên 6 chu kỳ (phá 6 phút, nghỉ 10 phút) làm tăng đáng kể protein thu được, nhưng 8 chu kỳ lại làm giảm nhẹ. Do đó, 6 chu kỳ là điểm cân bằng giữa hiệu quả phá vỡ và bảo toàn protein.

Quá trình biểu hiện MAO-B người tái tổ hợp quy mô lớn đã thành công với dịch nội bào sau phá tế bào đạt nồng độ protein 3,11 mg/mL. Do MAO-B liên kết màng ty thể, Triton X-100 0,5% được dùng để hòa tan enzyme từ cần màng, thu được dịch Triton màu vàng sáng, có thể do sự hiện diện của co-factor FAD của MAO-B [7]. Dịch triton chứa MAO-B sau đó được tinh chế bằng sắc ký trao đổi anion sử dụng cột HiTrap Q FF. Đây là cột chứa nhựa Q Sepharose Fast Flow, là một chất trao đổi anion mạnh. Việc MAO-B liên kết tốt với cột ở pH 7.0 (pH của đệm HIGH-QA) và được

rửa giải bằng gradient nồng độ muối tăng dần cho thấy tại pH này, MAO-B mang điện tích âm đủ lớn để tương tác tĩnh điện với các nhóm amine bậc bốn trên bề mặt nhựa. Sự rửa giải của MAO-B ở khoảng 30 - 40% HIGH-QB (tương ứng khoảng 75-100 mM KPi) là điển hình cho các protein có mức độ tích điện trung bình trên cột trao đổi anion mạnh. Hình ảnh điện di SDS-PAGE cho thấy sự làm giàu của một băng protein có kích thước phù hợp với MAO-B ở các phân đoạn F3 và F4, chứng tỏ quy trình tinh chế bước đầu đã thành công trong việc loại bỏ một phần các protein tạp. MAO-B ở phân đoạn F3, F4 được cô đặc thu được 500 μ L và có hoạt tính khoảng 9983 U/L.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã khảo sát và xác định thành công các điều kiện tối ưu để biểu hiện enzyme MAO-B người tái tổ hợp trên nấm men *Pichia pastoris* KM71. Các yếu tố quan trọng như môi trường nuôi cấy, nồng độ methanol, thời gian cảm ứng và quy trình phá tế bào cơ học, đã được khảo sát để đạt hoạt tính enzyme cao nhất. Quy trình tinh chế MAO-B đã được thực hiện thành công, làm tăng độ tinh sạch của MAO-B lên 6,8 lần và đạt hiệu suất thu hồi cuối cùng là 16,2%. Bước hòa tan màng bằng Triton X-100 đóng vai trò là bước tinh chế sơ bộ hiệu quả, giúp tăng gấp đôi độ tinh sạch ban đầu trong khi bảo toàn 85% hoạt tính. Tiếp đó, bước sắc ký trao đổi ion đã phân tách hiệu quả MAO-B khỏi các protein tạp còn lại, mang lại chế phẩm cuối có hoạt độ riêng cao đạt 1,7 U/mg.

Nghiên cứu này thực hiện với sự tài trợ của Đại học Quốc Gia TP HCM mã số 36-2024-44-01.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Duncan J, Johnson S, Ou X-M. Monoamine oxidases in major depressive disorder and alcoholism. *Drug discoveries & therapeutics*. 2012;6(3):112-22.
- [2] Bill RM. Playing catch-up with *Escherichia coli*: using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:85.
- [3] Invitrogen L. User manual-EasySelect TM *Pichia* Expression Kit. Cat; 2010.
- [4] Matthews CB, Kuo A, Love KR, Love JC. Development of a general defined medium for *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2018;115(1):103-13.
- [5] Hu R, Lan D, Cui R, Hong H, Niu Y, Wang Y. Controlling methanol feeding for recombinant protein production by *Pichia pastoris* under oxidation stress in fed-batch fermentation. 2020.
- [6] Karbalaee M, Rezaee SA, Farsiani H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of cellular physiology*. 2020;235(9):5867-81.
- [7] Massey V. The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochemical Society Transactions*. 2000;28(4):283-96.