

# NGHIÊN CỨU THU NHẬN LACTOFERRIN TÁI TỔ HỢP TỪ *Escherichia coli* VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA LACTOFERRIN DẠNG THỦY PHÂN

Trương Quốc Phong<sup>1,2\*</sup>, Lê Minh Khôi<sup>2</sup>, Ngô Thu Hường<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Viện Khoa học và Công nghệ Sức khỏe, Đại học Bách khoa Hà Nội

<sup>2</sup>Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

<sup>3</sup>Trung tâm Nghiên cứu sản xuất vắc xin và sinh phẩm y tế

## TÓM TẮT

Lactoferrin (Lf) là một loại glycoprotein cation đa chức năng gắn sắt thuộc họ transferrin (TF) đã được chứng minh là có liên quan đến nhiều tác dụng sinh lý và bảo vệ bao gồm hoạt động kháng khuẩn, kháng vi-rút, tăng sinh và biệt hóa tế bào, điều hòa cytokine, phản ứng viêm và hoạt động điều hòa miễn dịch. Các báo cáo cho rằng các peptide có nguồn gốc từ lactoferrin cho tác dụng kháng khuẩn vượt trội so với lactoferrin dạng nguyên. Trong nghiên cứu này, chúng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp mang cấu trúc pET28b::bLf đã được sử dụng để tổng hợp protein lactoferrin. Quá trình sinh tổng hợp protein lactoferrin của chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET28b::bLf sử dụng chất cảm ứng IPTG được tối ưu hóa gồm: nồng độ IPTG 0,01 mM, thời gian cảm ứng 4 giờ, nhiệt độ 37°C, lượng cấp giống theo OD600nm đạt 0,25. Protein Lf dạng thể vùi được tinh sạch theo quy trình gồm 2 bước rửa bằng các đệm 1X PBS chứa 1% Triton X100 và 1X PBS chứa 3 M urea. Dịch thủy phân protein Lf thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tăng lên 30% so với protein nguyên vẹn. Điều kiện thủy phân protein Lf dạng thể vùi tối ưu là: tỷ lệ pepsin/protein Lf (0,0005 U/mg), thời gian thủy phân 60 phút.

**Từ khóa:** Dịch thủy phân, *Escherichia coli* (*E. coli*), kháng khuẩn, lactoferrin, tái tổ hợp.

## MỞ ĐẦU

Lactoferrin là một loại glycoprotein cation đa chức năng gắn sắt thuộc họ transferrin (TF) (Elzoghby *et al.*, 2020). Lactoferrin có ái lực cao với các ion sắt, khoảng 250–300, cao gấp nhiều lần so với TF. Hoạt động như một chất điều hòa cân bằng nội môi oxi hóa khử sắt (Fe-R-H), Lf, chelat sắt và trung hòa các gốc tự do qua trung gian sắt, làm giảm stress oxy hóa và cải thiện khả năng phòng vệ của vật chủ bằng cách tối ưu hóa quá trình chuyển hóa sắt (Naidu *et al.*, 2023).

Ở người và động vật, Lf chủ yếu được tìm thấy trong các sản phẩm của tuyến ngoại tiết nằm ở cửa ngõ của hệ thống tiêu hóa, hô hấp và sinh sản (Dierick *et al.*, 2020). Điều này cho thấy Lf đóng vai trò phòng vệ không đặc hiệu chống lại các mầm bệnh xâm nhập và là tuyến phòng thủ đầu tiên chống lại nhiễm trùng do vi khuẩn và virus (Albar *et al.*, 2014). Năm 1972, Bullen và đồng tác giả (1972) lần đầu tiên cho rằng Lf có tác dụng kháng khuẩn phụ thuộc vào nồng độ sắt (Bullen *et al.*, 1972). Sử dụng phương pháp miễn dịch huỳnh quang, Arnold và đồng tác giả (1981) phát hiện ra rằng apo-Lf có thể liên kết với bề mặt của vi khuẩn và ngăn các chất dinh dưỡng đi vào tế bào vi khuẩn, khiến vi khuẩn bị chết (Arnold *et al.*, 1981).

Lactoferricin lần đầu tiên được thu nhận từ lactoferrin bò bởi Tomita và đồng tác giả (1991) (Tomita *et al.*, 1991). Sau quá trình thủy phân lactoferrin bởi pepsin, dịch thủy phân thu được đã ức chế sự phát triển của nhiều vi khuẩn gram dương và gram âm, bao gồm một số vi khuẩn kháng lactoferrin. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng hoạt tính kháng khuẩn của lactoferricin của bò lớn hơn so với các loài khác và vi khuẩn Gram dương thường nhạy cảm hơn với lactoferricin của bò so với vi khuẩn Gram âm.

Khi mô tả đặc điểm của các peptide khác nhau được tạo ra bởi quá trình thủy phân Lf, người ta nhận thấy rằng những biến đổi tối thiểu trong trình tự axit amin làm thay đổi hoạt tính kháng khuẩn của peptide. Ví dụ, LFampin 268–284 và LFampin 265–284, các đoạn được tổng hợp hóa học từ trình tự đầu N của bLF, chỉ khác nhau ở ba axit amin (265Asp-Leu-267Ile) nhưng thể hiện cường độ khác nhau của hoạt tính kháng khuẩn (Van Der Kraan *et al.*, 2006). Khi được thu nhận từ phân tử tự nhiên, đầu N và C thể hiện hoạt động sinh lý thông qua các cơ chế độc lập với cơ chế cô lập sắt. Lactoferricin là lõi kháng khuẩn của lactoferrin, có thể được tạo ra thông qua sự phân cắt được xúc tác bởi pepsin. Thủy N bao gồm các miền hoạt động để thực hiện chức năng diệt khuẩn và liên kết heparin, trong khi thủy C bao gồm một miền để thực hiện các chức năng liên kết và nội hóa tế bào gan (Jin *et al.*, 2019).

Protein Lf tái tổ hợp đã được nghiên cứu tổng hợp trong các vật chủ khác nhau như *Escherichia coli*, nấm men *Pichia pastoris*. Protein lactoferrin và N-lobe lactoferrin tổng hợp từ *E. coli* đều tồn tại ở dạng thể vùi (Wang *et al.*, 2010).

Trong nghiên cứu này, protein Lf được tổng hợp trong *E. coli* BL21(DE3) cũng được thu nhận ở dạng thể vùi. Hoạt tính kháng khuẩn của protein Lf dạng thể vùi và dịch thủy phân đã được khảo sát.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, USA) được lựa chọn làm đối tượng để biểu hiện; plasmid pET28b::bLf mang gen tối ưu mã hóa Lactoferrin (khoảng 80 kDa) được cung cấp bởi phòng nhóm nghiên cứu của chúng tôi tại Đại học Bách khoa Hà Nội. Môi trường LB (Luria Bertani) sử dụng để hoạt hóa và biểu hiện: 1% peptone; 0,5% yeast extract; 1% NaCl; bổ sung 2% agar đối với môi trường đặc. Môi trường PYG sử dụng trong khảo sát hoạt tính kháng khuẩn dạng thủy phân Lf: 1% peptone; 0,05% yeast extract; 1% glucose, pH 7 ± 0,2. Pepsin (SERVA, Đức) sử dụng để thủy phân protein Lf thể vùi. Một đơn vị hoạt độ pepsin giải phóng 0,001 đơn vị A280 mỗi phút ở pH 2,0 nhiệt độ 37°C dưới dạng sản phẩm thủy phân hòa tan trong axit tricloacetic (TCA) với cơ chất sử dụng là Hemoglobin. Các hóa chất dùng cho điện di SDS-PAGE, đệm 1X PBS, Urea, Triton X100 được mua của hãng Sigma (Mỹ), Merck (Đức). Protein marker (PageRuler plus prestain protein ladder, 10-250 kDa) được mua của hãng Thermo Scientific (Mỹ).

### Phương pháp nghiên cứu

#### Phương pháp lên men sinh tổng hợp lactoferrin

Chủng vi khuẩn tái tổ hợp *E.coli* BL21(DE3)/pET28b::bLf được hoạt hóa trong môi trường LB có bổ sung kanamycin nồng độ cuối 100 µg/mL, nuôi ở 37°C với tốc độ lắc 120 vòng/phút, từ 16-18 tiếng. Canh trường sau hoạt hóa được cấy chuyển sang môi trường LB có kháng sinh kanamycin để biểu hiện protein Lf với mật độ ban đầu OD600 là 0,25. Sau 2 giờ, bổ sung chất cảm ứng IPTG 0,01 mM, nuôi ở 37°C với tốc độ lắc 120 vòng/phút, trong 4 giờ. Thu sinh khối bằng cách ly tâm 6000 vòng/phút, trong 5 phút.

#### Phương pháp tối ưu hóa biểu hiện protein tái tổ hợp

Các thí nghiệm biểu hiện protein Lf tái tổ hợp được thực hiện ở các điều kiện khác nhau. Sau khi nuôi cấy trong hai giờ ở 37°C, protein tái tổ hợp được biểu hiện ở các nồng độ IPTG khác nhau trong dải 0 – 1 mM. Biểu hiện được thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau 10°C, 25°C và 37°C và ở các thời điểm cảm ứng khác nhau là 4, 8, 20, 24 và 28 giờ.

#### Phương pháp tách chiết protein tái tổ hợp

Sinh khối tế bào được thu nhận bằng cách ly tâm, sau đó hòa tan lại bằng đệm 1X PBS chứa 1% Triton X100. Tế bào được phá bằng siêu âm trong 3 phút, 5 giây hoạt động, 5 giây nghỉ, mức năng lượng 27%. Sau đó, mẫu được tiến hành ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 20 phút. Phần cặn tiếp tục được rửa 5 lần bằng đệm 1X PBS chứa 1% Triton X100 để thu thể vùi. Sau đó, thể vùi được hòa tan trong đệm 1X PBS chứa 3M Urea và siêu âm trong 3 phút, 5 giây hoạt động, 5 giây nghỉ, mức năng lượng 27%; ly tâm 3000 vòng/phút, 4°C trong 2 phút, thu dịch nổi. Dịch nổi được ly tâm 8000 vòng/phút, 4°C trong 20 phút, thu thể vùi protein Lf.

#### Phương pháp điện di SDS-PAGE

Các mẫu protein được tiến hành điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 12% theo phương pháp Laemmli (1970).

#### Phương pháp thủy phân protein bằng pepsin

Protein LF thể vùi thu được hòa trong đệm 1X PBS, chỉnh pH 2 bằng HCl, sau đó được ủ với pepsin ở 37°C với các tỷ lệ pepsin : cơ chất khác nhau: 0,0005 – 0,01 U/mg và ở các giá trị thời gian khác nhau là 10 phút, 30 phút, 1 giờ và 2 giờ.

#### Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của lactoferrin dạng thủy phân

Trong khuôn khổ nghiên cứu này, chủng *E.coli* BL21(DE3) sẵn có được sử dụng làm chủng kiểm định; sau khi được hoạt hóa 16 – 18 tiếng được đo soi kiểm tra tỷ lệ sống chết, độ thuần khiết. Sau đó, vi sinh vật được cấy giống vào môi trường PYG có và không có chứa dịch thủy phân Lf với nồng độ giống ban đầu đạt 10<sup>5</sup> cfu/ml. Canh trường được ủ ở 37°C trong 6 tiếng, tốc độ lắc 120 vòng/phút. Độ sinh trưởng được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 600nm tại thời điểm 6 tiếng sau khi cấy giống. Khả năng ức chế của dịch thủy phân Lf đến chủng vi sinh vật được đánh giá theo tỷ lệ phần trăm OD của chúng ở mẫu có xử lý với dịch thủy phân Lf trên OD của mẫu kiểm chứng trong cùng điều kiện thí nghiệm.

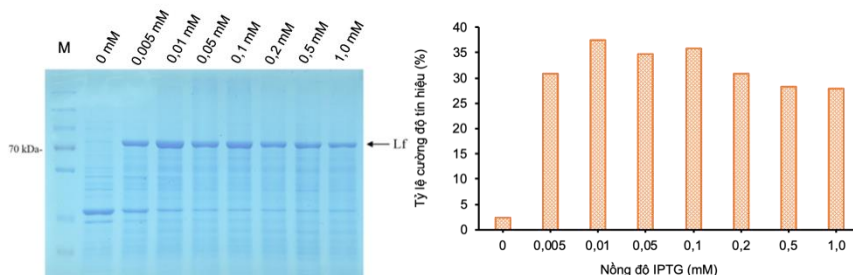
Phương pháp phân tích hình ảnh gel điện di: Cường độ băng trên hình ảnh gel điện di được phân tích bằng phần mềm ImageQuant TL verion 10.2. Tỷ lệ cường độ tín hiệu của băng Lf = Cường độ tín hiệu băng Lf/Tổng cường độ tín hiệu các băng trong đường chạy điện di \* 100.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa protein lactoferrin trong *E. coli*

#### Ảnh hưởng của nồng độ IPTG đến biểu hiện protein lactoferrin

Trong cấu trúc vector biểu hiện tái tổ hợp pET28b::*bLf* thì gen đích mã hóa protein lactoferrin (Lf) được điều khiển phiên mã bởi T7 promotor và chất cảm ứng IPTG. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy, nồng độ chất cảm ứng IPTG ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của protein đích (Ashayeri-Panah *et al.*, 2017).

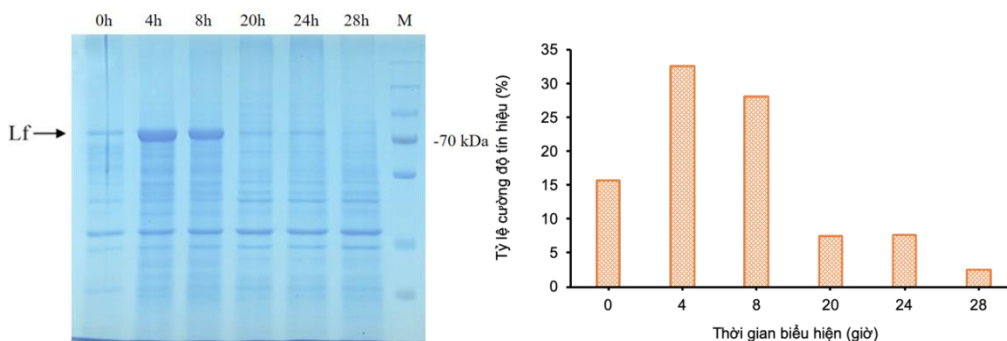


Hình 1. Ảnh hưởng của các nồng độ IPTG khác nhau đến sự biểu hiện protein Lf thể vùi

Do đó, trong nghiên cứu này một dải nồng độ IPTG 0 – 1 mM đã được khảo sát. Kết quả cho thấy nồng độ IPTG ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của protein Lactoferrin tái tổ hợp trong *E. coli*. Ở nồng độ 0mM không có sự xuất hiện của protein lactoferrin trên phổ điện di. Mức độ biểu hiện protein tăng lên khi nồng độ IPTG tăng lên đến 0,01 mM và giữ mức thay đổi không nhiều đến nồng độ 0,1 mM, sau đó giảm dần khi tiếp tục tăng nồng độ IPTG (Hình 1). Điều này có thể giải thích rằng ở nồng độ IPTG cao có thể gây độc cho sự sinh trưởng của tế bào (Malakar, Venkatesh, 2012) hoặc do xuất hiện sự cạnh tranh vị trí bám trên protein Lac I dẫn đến giảm mức độ phiên mã và tổng hợp protein đích. Dựa vào kết quả thu được, nồng độ IPTG 0,01 mM được chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

#### Ảnh hưởng của thời gian cảm ứng đến mức độ biểu hiện protein lactoferrin

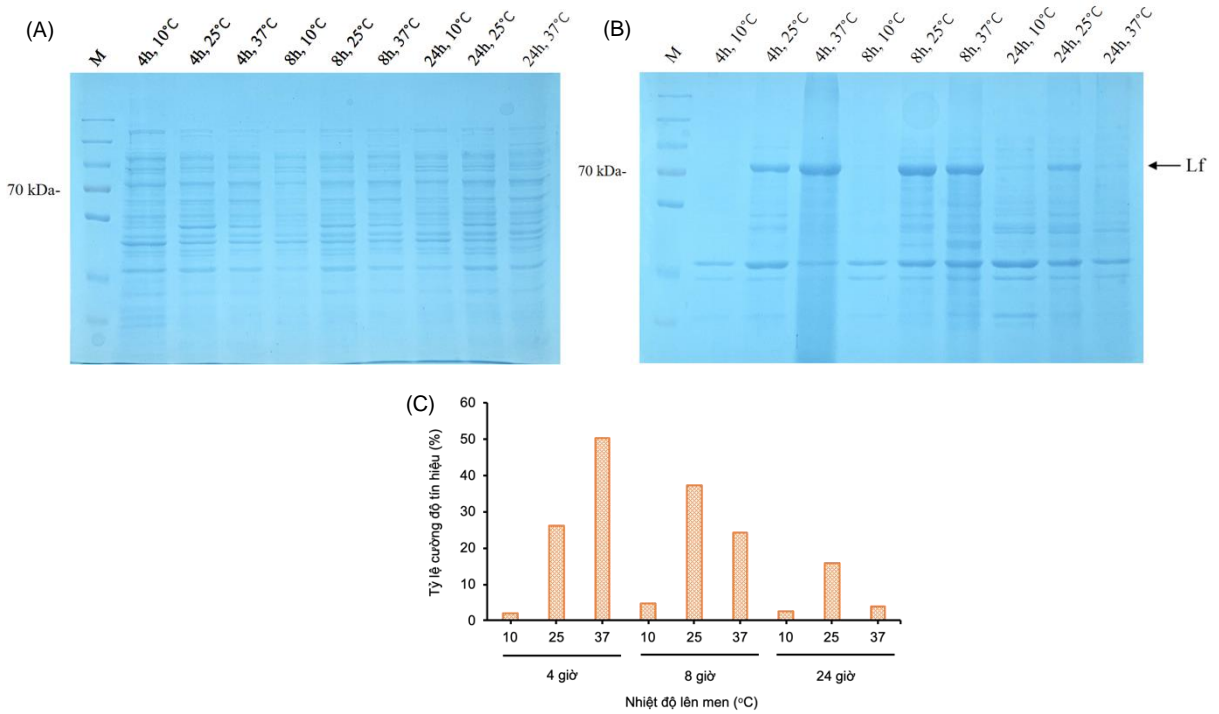
Để lựa chọn thời gian cảm ứng thích hợp, mức độ biểu hiện protein Lf của chủng *E. coli* BL21(DE3) mang pET28b::*bLf* được đánh giá ở các mốc thời gian khác nhau 0, 4, 8, 20, 24 và 28 giờ. Kết quả cho thấy lượng protein Lf thu được sẽ khác nhau ở các thời điểm cảm ứng khác nhau. Mức độ biểu hiện protein Lf là cao nhất sau 4 giờ cảm ứng và giảm dần khi tăng thời gian cảm ứng lên đến 28 giờ (Hình 2). Hiện tượng giảm này có thể do sự phân hủy Lf bởi protease tạo ra bởi tế bào *E. coli* nhằm phân hủy protein không bình thường được biểu hiện quá mức gây độc cho tế bào. Thời gian cảm ứng 4 giờ được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian đến biểu hiện protein Lf thể vùi

#### Ảnh hưởng của nhiệt độ đến biểu hiện protein lactoferrin

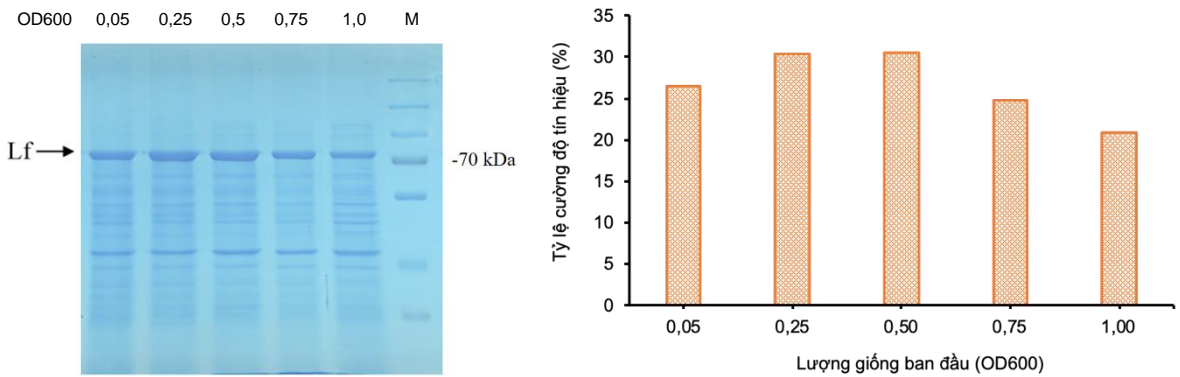
Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng nhiệt độ có ảnh hưởng đến tốc độ sinh tổng hợp protein cũng như khả năng cuộn gấp của protein. Khi ở nhiệt độ thấp, tốc độ trao đổi chất ở tế bào chậm dẫn đến quá trình sinh tổng hợp protein kéo dài hơn khiến tỉ lệ protein trong tế bào có nhiều thời gian để cuộn gấp đúng cấu trúc sẽ tăng lên, khiến cho protein có khả năng tan cao hơn giúp ngăn ngừa việc tích lũy protein dưới dạng thể vùi khi cảm ứng với IPTG. Trong nghiên cứu này, sự biểu hiện protein Lf trong *E. coli* BL21(DE3) mang pET28b::*bLf* được thực hiện ở 10°C, 25°C và 37°C. Kết quả cho thấy protein Lf được biểu hiện chủ yếu ở thể vùi (protein không tan) và biểu hiện mạnh nhất ở 37°C (Hình 3).



Hình 3. Phổ điện di ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến biểu hiện protein Lf thể tan (A) và thể vùi (B). Tỷ lệ cường độ tín hiệu bằng protein Lf thể vùi theo thời gian và nhiệt độ biểu hiện

**Ảnh hưởng của lượng cấp giống đến biểu hiện protein lactoferrin**

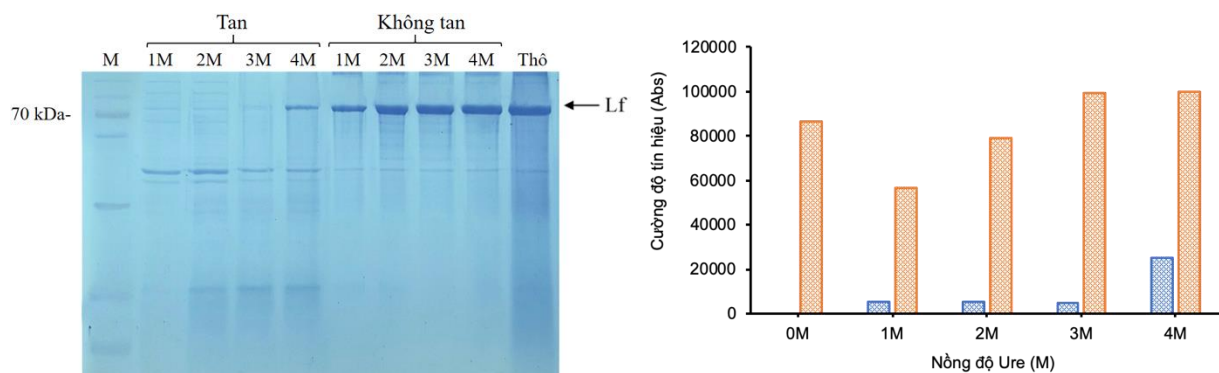
Kết quả điện di cho thấy tín hiệu protein Lf đạt tối đa ở mẫu có lượng cấp giống OD600 đạt 0,25 – 0,5 (Hình 4). Lượng cấp giống OD600 đạt 0,25 được chọn là điều kiện phù hợp cho biểu hiện protein Lf sử dụng chất cảm ứng IPTG.



Hình 4. Ảnh hưởng của lượng cấp giống đến biểu hiện protein Lf

**Khảo sát điều kiện thu nhận lactoferrin dạng thể vùi**

Như kết quả thu được ở trên cho thấy protein Lf được biểu hiện ở dạng thể vùi, do đó việc tinh sạch protein Lf có thể thực hiện thông qua việc tinh sạch thể vùi. Hướng tiếp cận này đã được thực hiện bởi nhiều nghiên cứu trước đây (Singh et al., 2015), tuy nhiên điều kiện tối ưu để thu nhận được tối đa thể vùi dạng tinh sạch sẽ cần được nghiên cứu cho từng loại protein khác nhau. Trong nghiên cứu này, thể vùi được rửa 5 lần với đệm PBS chứa 1% TritonX100 để loại bỏ các protein tan và sau đó hòa tan bằng đệm 1X PBS chứa urea ở nồng độ khác nhau. Các nồng độ urea được khảo sát là 1M, 2M, 3M, 4M với mục tiêu hòa tan các phức protein có trọng lượng tương hoặc lớn hơn thể vùi nhưng không làm tan thể vùi. Kết quả điện di cho thấy ở nồng độ urea 3M, protein tủa trong thể vùi được hòa tan tốt nhất đồng thời chỉ hòa tan lượng nhỏ protein Lf (Hình 5). Do đó, quy trình tinh sạch thể vùi gồm 02 bước rửa: (1) năm lần với đệm PBS chứa 1% Triton X100, (2) một lần với đệm PBS chứa 3 M urea.

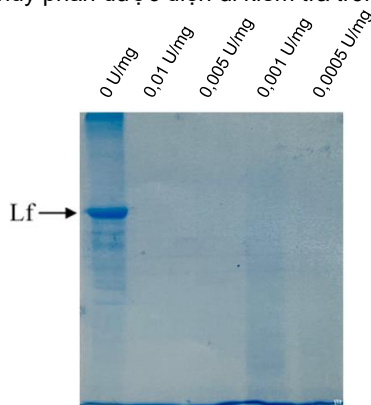


Hình 5. Khảo sát nồng độ Urea sử dụng trong quá trình rửa thể vùi Lf

### Khảo sát các điều kiện thủy phân tạo peptide có hoạt tính kháng khuẩn từ Lf tái tổ hợp

#### Kiểm tra hiệu suất thủy phân thể vùi Lf bằng pepsin

Các nghiên cứu chỉ ra rằng protein Lf thủy phân bởi pepsin giải phóng ra các đoạn peptide thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh mẽ hơn so với protein Lf ban đầu (Ripolles *et al.*, 2015). Để kiểm tra hiệu suất thủy phân của pepsin, protein Lf dạng thể vùi được thủy phân với tỷ lệ hoạt độ pepsin/protein là 0,0005 U/mg, 0,001 U/mg, 0,005 U/mg, 0,01 U/mg. Sản phẩm thủy phân được điện di kiểm tra trên gel SDS-PAGE.

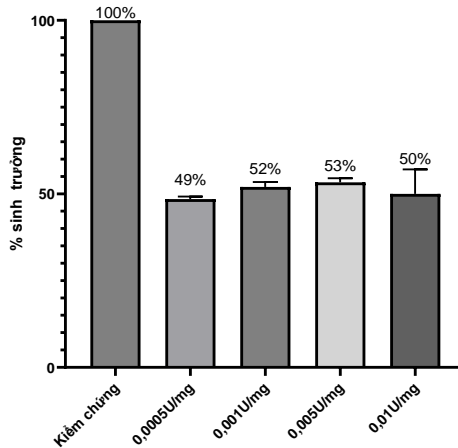


Hình 6. Kết quả điện di thể vùi Lf sau thủy phân với các tỷ lệ hoạt độ pepsin/protein Lf khác nhau

Kết quả điện di cho thấy tại các tỷ lệ phản ứng từ 0,0005U/mg đến 0,01U/mg, protein Lf được thủy phân hoàn toàn thành các đoạn peptide ngắn, không thể xác định trên gel 12% (Hình 6). Các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng hoạt động kháng khuẩn mạnh mẽ sẽ bộc lộ ở các peptide có kích thước < 5 kDa (Dini *et al.*, 2022). Hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân thu được được đánh giá trên chủng *E.coli* BL21(DE3).

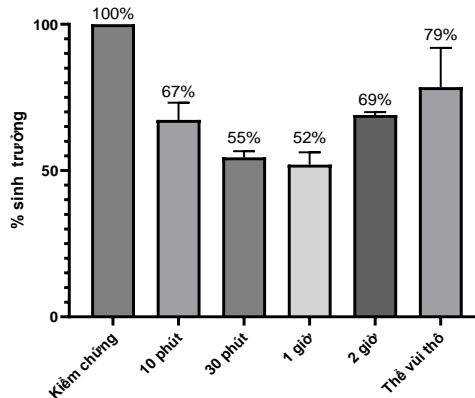
#### Kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân lactoferrin

Các đoạn peptide có hoạt tính kháng khuẩn được tạo ra nhờ quá trình thủy phân sẽ ức chế sự sinh trưởng của chủng kiểm định khiến cho OD600 của canh trường có chứa dịch thủy phân lactoferrin có xu hướng thấp hơn so với OD600 của canh trường không bổ sung dịch thủy phân lactoferrin. Các peptide có kích thước khác nhau sẽ có hoạt tính kháng khuẩn khác nhau (Huan *et al.*, 2020), theo nghiên cứu trước đây peptide có hoạt tính kháng khuẩn thường có kích thước 10-25 amino acids, do đó trong nghiên cứu này hoạt tính kháng khuẩn của hỗn hợp peptide sinh ra sau thủy phân Lf trong các điều kiện khác nhau về nồng độ pepsin đã được khảo sát. Kết quả cho thấy dịch thủy có khả năng ức chế khoảng 50% sự sinh trưởng của vi khuẩn *E. coli* và không có sự khác nhau nhiều giữa các nồng độ enzyme được sử dụng (Hình 7).



Hình 7. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân Lf với các nồng độ pepsin khác nhau (0,0005; 0,001; 0,005; 0,01 U/mg)

Thời gian thủy phân khác nhau cũng sẽ tạo ra hỗn hợp peptide với kích thước khác nhau và có thể bộc lộ hoạt tính kháng khuẩn khác nhau. Do đó, protein Lf đã được thủy phân ở các khoảng thời gian khác nhau: 10, 30, 60, 120 phút. Dịch sau thủy phân được kiểm tra khả năng kháng khuẩn và được thể hiện trên Hình 8. Kết quả cho thấy hoạt tính kháng khuẩn tăng dần khi thời gian thủy phân tăng từ 10 phút đến 60 phút, sau đó hoạt tính kháng khuẩn giảm khi tiếp tục tăng thời gian thủy phân lên 120 phút (Hình 8). Kết quả thu được có thể được giải thích như sau: Khi tăng thời gian thủy phân từ 10 đến 60 phút sẽ tạo ra nhiều peptide có kích thước ngắn hơn và các peptide này bộc lộ hoạt tính kháng khuẩn; tuy nhiên khi tăng thời gian thủy phân lên 120 phút có thể các peptide đã bị cắt nhỏ hơn và không còn khả năng kháng khuẩn. Kết quả trong nghiên cứu này cũng cho thấy protein Lf nguyên vẹn chỉ thể hiện hoạt tính ức chế vi khuẩn *E. coli* là 20%, khi được thủy phân thành các peptide ngắn thì hoạt tính kháng khuẩn đã tăng lên đến 50% (Hình 8).



Hình 8. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân Lf theo thời gian khác nhau

## KẾT LUẬN

Điều kiện tối ưu cho sự sinh tổng hợp protein lactoferrin của chủng *E.coli* BL21(DE3)/pET28b::*bLf* sử dụng chất cảm ứng IPTG gồm: nồng độ IPTG 0,01mM, thời gian cảm ứng 4 giờ, nhiệt độ 37°C, lượng cấp giống theo OD600nm đạt 0,25. Protein Lf dạng thể vùi được tinh sạch theo quy trình gồm 2 bước rửa bằng các đệm 1X PBS chứa 1% Triton X100 và 1X PBS chứa 3 M urea. Dịch thủy phân protein Lf thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tăng lên 30% so với protein nguyên vẹn. Điều kiện thủy phân protein Lf dạng thể vùi tối ưu là: tỷ lệ pepsin/protein Lf (0,0005 U/mg), thời gian thủy phân 60 phút.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Albar AH, Almehdar HA, Uversky VN, Redwan EM (2014). Structural Heterogeneity and Multifunctionality of Lactoferrin. *Curr Protein & Peptide Sci*, 15(8): 778–797.
- Arnold RR, Russell JE, Champion WJ, Gauthier JJ (1981). Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism. *Infect Immun*, 32(2): 655–660.
- Ashayeri-Panah M, Eftekhari F, Kazemi B, Joseph J (2017). Cloning, optimization of induction conditions and purification of Mycobacterium tuberculosis Rv1733c protein expressed in *Escherichia coli*. *Iran J Microbiol*, 9(2): 64.

- Bullen JJ, Rogers HJ, Leigh L (1972). Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *Br Med J*, 1(5792): 69–75.
- Dierick M, Vanrompay D, Devriendt B, Cox E (2020). Lactoferrin, a versatile natural antimicrobial glycoprotein that modulates the host's innate immunity. *Biochem Cell Biol*, 99(1): 61–65.
- Dini I, De Biasi MG, Mancusi A (2022). An Overview of the Potentialities of Antimicrobial Peptides Derived from Natural Sources. *Antibiotics*, 11(11): 1–22.
- Elzoghby AO, Abdelmoneem MA, Hassanin IA, Abd Elwakil MM, Elnaggar MA, Mokhtar S, Fang JY, Elkhodairy KA (2020). Lactoferrin, a multi-functional glycoprotein: Active therapeutic, drug nanocarrier & targeting ligand. *Biomaterials*, 263: 120355.
- Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol*, 11: 582779.
- Jin L, Li L, Zhou L, Zhang R, Xu Y, Li J (2019). Improving Expression of Bovine Lactoferrin N-Lobe by Promoter Optimization and Codon Engineering in *Bacillus subtilis* and Its Antibacterial Activity. *J Agric and Food Chem*, 67(35): 9749–9756.
- Malakar P, Venkatesh KV (2012). Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins. *Appl Microbiol Biot*, 93(6): 2543–2549.
- Naidu SAG, Clemens RA, Naidu AS (2023). SARS-CoV-2 Infection Dysregulates Host Iron (Fe)-Redox Homeostasis (Fe-R-H): Role of Fe-Redox Regulators, Ferroptosis Inhibitors, Anticoagulants, and Iron-Chelators in COVID-19 Control. *J Diet Suppl*, 20(2): 312–371.
- Ripolles D, Harouna S, Parrón JA, Calvo M, Pérez MD, Carramiñana JJ, Sánchez L (2015). Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin and its hydrolysates prepared with pepsin, chymosin and microbial rennet against foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Int Dairy J*, 45: 15–22.
- Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact*, 14(1): 1–10.
- Tomita M, Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K (1991). Potent Antibacterial Peptides Generated by Pepsin Digestion of Bovine Lactoferrin. *J Dairy Sci*, 74(12): 4137–4142.
- Van Der Kraan MIA, Nazmi K, Van't Hof W, Nieuw Amerongen AV, Veerman ECI, Bolscher JGM (2006). Distinct bactericidal activities of bovine lactoferrin peptides LFampin 268-284 and LFampin 265-284: Asp-Leu-Ile makes a difference. *Biochem Cell Biol*, 84(3): 358–362.
- Wang J, Tian Z, Teng D, Yang Y, Hu J, Wang J (2010). Cloning, expression and characterization of Kunming mice lactoferrin and its N-lobe. *Biometals*, 23(3): 523–530.

## STUDY ON THE PRODUCTION OF RECOMBINANT LACTOFERRIN FROM *Escherichia coli* AND THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ITS HYDROLYSATE

Truong Quoc Phong<sup>1,2\*</sup>, Le Minh Khoi<sup>2</sup>, Ngo Thu Huong<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Health Science and Technology, Hanoi University of Science and Technology*

<sup>2</sup>*School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology*

<sup>3</sup>*Center for Research and Production of Vaccines and Biologicals*

### SUMMARY

Lactoferrin (Lf) is a multifunctional iron-binding cationic glycoprotein of the transferrin (TF) family that has been shown to be involved in many physiological and protective effects, including antibacterial, antiviral, and cell proliferation and differentiation, cytokine regulation, inflammatory response, and immunomodulatory activity. Reports suggest that lactoferrin-derived peptides have superior antibacterial effects compared to intact lactoferrin. In this study, the recombinant *E. coli* strain carrying the pET28b::bLf structure was used to synthesize lactoferrin protein. Optimal conditions for the production of recombinant lactoferrin by *E. coli* L21(DE3)/pET28b::bLf strain was investigated, including IPTG concentration of 0.01 mM, induction time of 4 hours, temperature of 37 °C, and seeding amount according to OD<sub>600nm</sub> reaching 0.25. The inclusion body of Lf protein was purified following a two-step washing procedure with 1X PBS buffers containing 1% Triton X100 and 1X PBS containing 3M urea. Lf protein hydrolyzate exhibited 30% increased antibacterial activity compared to intact protein. Optimal conditions for hydrolysis of inclusion-type Lf protein are: pepsin/Lf protein ratio (0.0005 U/mg), hydrolysis time of 60 minutes.

**Keywords:** Antibacteria, *Escherichia coli* (*E. coli*), hydrolysate, lactoferrin, recombinant.

\* Author for correspondence: Tel: 0988793468; Email: phong.truongquoc@hust.edu.vn