Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ
Số chuyên đề: Khoa học tự nhiên Đồng bằng sông Cửu Long
ISSN 1859-2333 | e-ISSN 2815-5599

DOI:10.22144/ctujos.2026.191

CẢI BIẾN DI TRUYỀN *Yarrowia lipolytica* TRONG TĂNG CƯỜNG SẢN XUẤT GAMMA-GLUTAMYL CYSTEINE

Đặng Bảo Ngọc, Lê Thị Bé Ba, Châu Thị Thúy Hằng và Đỗ Thị Hoàng Diễm*
Trường Cao đẳng Y tế Đồng Tháp, Việt Nam
**Tác giả liên hệ (Corresponding author): dthdiem@cdytdt.edu.vn*

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 04/06/2026
Sửa bài (Revised): 17/06/2026
Duyệt đăng (Accepted): 24/08/2026

Title: *Genetic engineering in Yarrowia lipolytica for overproducing gamma-glutamylcysteine*

Author(s): *Dang Bao Ngoc, Le Thi Be Ba, Chau Thi Thuy Hang and Do Thi Hoang Diem**

Affiliation(s): *Dong Thap Medical College, Viet Nam*

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm thiết kế chủng nấm men Yarrowia lipolytica có khả năng tích lũy cao dipeptide gamma-glutamylcysteine (γ-GC). Phương pháp nghiên cứu bao gồm việc xóa bỏ gene ylGSH2 mã hóa enzyme glutathione synthetase để chặn con đường tổng hợp glutathione, kết hợp với việc biểu hiện quá mức gene ylGSH1 (một hoặc hai bản sao) dưới sự kiểm soát của promoter mạnh pTEF. Các phương pháp phân tích hiện đại như NMR và LC-QTOF/MS đã được sử dụng để xác nhận sự hiện diện của γ-GC thay cho glutathione. Kết quả cho thấy các chủng đột biến (RIY455 và RIY445) ghi nhận hàm lượng thiol nội bào khoảng 102 nmol/mg protein; sự hiện diện của γ-GC được xác nhận bằng NMR và LC-QTOF/MS. Việc bổ sung cysteine và glutamate vào môi trường giúp nâng hiệu suất lên tối đa 239,9 nmol/mg protein (tăng 177%). Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu còn cho thấy đối với Y. lipolytica, việc bất hoạt gene ylGSH2 mã hóa enzyme glutathione synthetase và biểu hiện quá mức gene ylGSH1 (một hoặc hai bản sao) làm tăng tích lũy γ-GC nội bào. Ý nghĩa của nghiên cứu giúp mở ra hướng sản xuất γ-GC bằng công nghệ sinh học hiệu quả, phục vụ cho các ứng dụng y dược và thực phẩm chức năng.

Từ khóa: *Gamma-glutamylcysteine, glutathione, kỹ thuật di truyền, nấm men Yarrowia lipolytica*

ABSTRACT

This study aimed to engineer the yeast Yarrowia lipolytica for the enhanced accumulation of the dipeptide γ-glutamylcysteine (γ-GC). The research methodology involved the disruption of the ylGSH2 gene, which encodes glutathione synthetase, to block the second step of the glutathione (GSH) synthesis pathway. Subsequently, the ylGSH1 gene was overexpressed in either single or double copies under the control of the constitutive pTEF promoter. The successful synthesis of γ-GC instead of GSH in the resulting mutant strains (RIY455 & RIY445) was confirmed through advanced analytical techniques, including NMR spectroscopy & LC-QTOF/MS analysis. Results indicated that the engineered strains achieved intracellular thiol content of approximately 102 nmol/mg protein, while the presence of γ-GC was confirmed by NMR and LC-QTOF/MS analyses. Furthermore, supplementation with the precursors cysteine & glutamate significantly improved yields, reaching a maximum of 239.9 nmol/mg protein in strain RIY445, representing a 177% increase. The findings conclude that inactivation of the ylGSH2 gene, which encodes glutathione synthetase, together with overexpression of the ylGSH1 gene (one or two copies), resulted in increased accumulation of intracellular γ-glutamylcysteine (γ-GC). This research provides a promising biotechnological framework for the efficient production of γ-GC, a compound of significant medical & nutritional interest.

Keywords: *Gamma-glutamylcysteine, genetic engineering, glutathione, Yarrowia lipolytica*

1. GIỚI THIỆU

Dipeptide gamma-glutamylcysteine (γ-GC) là tiền chất trực tiếp của glutathione (GSH). γ-GC được xem là một loại thuốc triển vọng trong việc ngăn ngừa và điều trị các rối loạn liên quan đến tuổi tác như Alzheimer và Parkinson (Ferguson & Bridge, 2016; Braidy et al., 2019; Liu et al., 2021).

Việc tổng hợp hóa học γ-GC gặp nhiều thách thức do liên kết γ bất thường giữa cysteine và glutamate, đòi hỏi quy trình phức tạp và sử dụng dung môi độc hại. Các phương pháp enzym học hiện nay lại có chi phí cao và quy trình phức tạp. So với các phương pháp tổng hợp hóa học truyền thống, việc sản xuất γ-GC thông qua kỹ thuật di truyền vi sinh vật đã thể hiện sự tối ưu trên ba phương diện chính về mặt hóa học và công nghệ: Enzyme xúc tác sinh học hình thành chính xác liên kết γ-peptide và duy trì hoàn toàn cấu hình không gian tự nhiên của phân tử, giúp loại bỏ các bước bảo vệ/khử bảo vệ nhóm chức rườm rà trong tổng hợp hóa học. Quá trình sinh tổng hợp diễn ra trong điều kiện ôn hòa (dung môi nước), thay thế hoàn toàn các dung môi hữu cơ độc hại và tác nhân bắt cặp gây ô nhiễm, tuân thủ các nguyên tắc của hóa học xanh, đảm bảo an toàn cho con người và thân thiện với môi trường. Việc tổng hợp hóa học bị giới hạn bởi giá thành đắt đỏ của các tiền chất đã qua tinh chế hóa học (Yang et al., 2019; Ikeda & Fujii, 2023; Do et al., 2024). Nhằm khắc phục được điều này, hệ thống chuyển hóa linh hoạt của *Yarrowia lipolytica* cho phép tận dụng trực tiếp các nguồn cơ chất carbon rẻ tiền có nguồn gốc từ phụ phẩm công nghiệp (như glycerol thô, sinh khối lignocellulose). Điều này không chỉ giảm thiểu tối đa chi phí sản xuất mà còn đóng góp trực tiếp vào mô hình kinh tế tuần hoàn và phát triển bền vững (Koutinas et al., 2014; Do et al., 2019; Theodosiou, 2023). Do đó, việc sản xuất γ-GC thông qua kỹ thuật di truyền vi sinh vật là một hướng đi cần thiết (Thoen & Schloesser, 2014; Wu et al., 2021).

Quá trình cải biến di truyền chủng nấm men *Y. lipolytica* nhằm tăng cường sản xuất gamma-glutamyl cysteine (γ-GC) là một bước tiến quan trọng trong công nghệ sinh học hiện đại, kết hợp giữa khả năng trao đổi chất đặc biệt của vi sinh vật và các công cụ kỹ thuật gene tiên tiến (Nicaud, 2012). Trong số các vật chủ vi sinh vật, *Y. lipolytica* nổi lên như một "nhà máy tế bào" ưu việt nhờ khả năng chịu đựng môi trường khắc nghiệt và hệ thống chuyển hóa linh hoạt, cho phép nó tận dụng hiệu quả các nguồn cơ chất carbon rẻ tiền từ phụ phẩm công nghiệp như glycerol thô, dầu thải hay sinh khối lignocellulose (Chen et al., 1997; Do et al., 2019; Do & Fickers, 2020).

Để tối ưu hóa năng suất γ-GC, việc tái thiết kế con đường chuyển hóa theo hướng tăng nguồn cung glutamate và cysteine cần được thực hiện; đồng thời, việc tăng biểu hiện enzyme γ-glutamylcysteine ligase, enzyme then chốt xúc tác bước tạo γ-GC cũng cần được tiến hành. Bằng cách tích hợp kỹ thuật chuyển hóa chất phụ phẩm với các chiến lược cải biến di truyền sâu rộng, quy trình sản xuất γ-GC dựa trên *Y. lipolytica* không chỉ mang lại hiệu quả kinh tế cao mà còn đóng góp tích cực vào mô hình kinh tế tuần hoàn và phát triển bền vững trong ngành công nghiệp thực phẩm và dược phẩm (Do & Fickers, 2020).

Nghiên cứu này lần đầu tiên báo cáo việc sử dụng nấm men không truyền thống *Yarrowia lipolytica* làm "nhà máy tế bào" để sản xuất γ-GC bằng cách loại bỏ gene *ylGSH2* (mã hóa glutathione synthase) và tối ưu hóa các con đường chuyển hóa axit amin cấu thành.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu và quy trình thực hiện

Nghiên cứu được thực hiện theo hướng thực nghiệm trong phòng thí nghiệm nhằm xây dựng các chủng nấm men *Yarrowia lipolytica* tái tổ hợp có khả năng tăng tích lũy γ-GC. Việc thiết kế nghiên cứu được thực hiện dựa trên hai chiến lược chính: Thứ nhất là việc bất hoạt gene *ylGSH2* và mã hóa enzyme glutathione synthetase nhằm ngăn bước chuyển hóa γ-GC thành glutathione; thứ hai là việc biểu hiện quá mức gene *ylGSH1* và mã hóa enzyme γ-glutamylcysteine ligase nhằm tăng cường bước tổng hợp γ-GC.

Quy trình nghiên cứu gồm các bước: lựa chọn chủng và plasmid; nuôi cấy và chuẩn bị vật liệu di truyền; tạo cassette bất hoạt *ylGSH2* bằng PCR chồng lấn; biến nạp vào Y. lipolytica và sàng lọc thể tái tổ hợp; loại bỏ marker chọn lọc bằng hệ thống Cre-lox; tích hợp cassette biểu hiện ylGSH1 dưới sự kiểm soát của promoter pTEF với một hoặc hai bản sao; xác nhận kiểu gene bằng PCR; đánh giá mức biểu hiện ylGSH1 bằng RT-qPCR; khảo sát sinh trưởng, định lượng thiol/γ-GC nội bào; đánh giá ảnh hưởng của glutamate và/hoặc cysteine; định danh γ-GC bằng NMR và UPLC-QTOF/MS; sau cùng là xử lý và so sánh số liệu giữa các chủng, nghiệm thức.

2.2. Chủng vi sinh vật, plasmid, môi trường và điều kiện nuôi cấy

Các chủng vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu được liệt kê ở Bảng 1.

Escherichia coli được dùng làm vật chủ nhân dòng plasmid, trong khi *Y. lipolytica* được dùng làm vật chủ cải biến di truyền và đánh giá khả năng tích lũy γ-GC.

E. coli được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường Luria–Bertani (LB), có bổ sung ampicillin (100 mg/L) hoặc kanamycin sulfate (50 mg/L) khi cần thiết.

Các chủng nấm men được nuôi cấy ở 28°C trong môi trường YPD gồm 20 g/L Difco bacto peptone, 10 g/L Difco yeast extract và 20 g/L glucose; hoặc trong môi trường YNBD gồm 1,7 g/L Difco yeast nitrogen base không chứa amino acid và amoni sulfat, 20 g/L glucose, 2 g/L Difco casamino acids, 1 g/L NH_4Cl và đệm phosphate 0,05 M (pH 6,8). Đối với các chủng khuyết dưỡng, môi trường được bổ sung leucine (0,2 g/L) hoặc uracil (0,1 g/L). Môi trường YNBDplus được chuẩn bị từ môi trường YNB có bổ sung glutamate (0,1 g/L), cysteine (0,1 g/L) hoặc đồng thời cả hai hợp chất.

Đối với môi trường thạch, agar được bổ sung ở nồng độ 15 g/L. Tất cả các thí nghiệm nuôi cấy trong bình lắc được thực hiện tối thiểu ba lần lặp lại độc lập. Các bình nuôi được cấy với mật độ ban đầu OD_{600} = 0,2 từ nguồn giống đã được nuôi trong môi trường YPD trong 24 giờ và rửa hai lần bằng đệm phosphate 50 mM (pH 6,8) trước khi sử dụng.

Bảng 1. Plasmids và *Y. lipolytica* được sử dụng trong nghiên cứu

Chủng	Kiểu gene/ plasmid	Nguồn
E. coli		
DH5α	Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(rK-mK+) *pho*A *sup*E44 λ– *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 F– φ80lacZΔM15	Promega
RIE210	RIP210, pTEF-*GSH1*, *LEU2*	Do & Fickers (2020)
RIE211	RIP211, pTEF-*GSH1*, *URA3*	Do & Fickers (2020)
RIE295	RIP295, pGEMTeasy-Δ*GSH*2, URA3	Nghiên cứu này
RIE112	RIP112 pUB4-CRE (*Cre, hph*)	Fickers et al. (2003), Cre recombinase
Y. lipolytica		
Po1d	*ura3-303 leu2-270 xpr2-322* MATA	Barth & Gaillardin, (1997)
JMY2900	RIY129, Po1d, *URA*3, *LEU*2	
RIY176	Po1d Δ EYK ura-leu-	Trassaert et al. (2017)
RIY218	RIY176 + pTEF-*GSH1, LEU2ex*	NC này
RIY443	RIY218 + Δ*GSH2*, *HYGex*	NC này
RIY445	RIY443 + pTEF-*GSH1, URA3*ex	NC này
RIY455	RIY443 + *URA3*ex	NC này

2.3. Xây dựng chủng Y. lipolytica tái tổ hợp

Các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn được thực hiện theo phương pháp của Sambrook et al. (1989). Các enzyme cắt giới hạn và enzyme nối T4 DNA ligase được cung cấp bởi New England BioLabs (Mỹ). Phản ứng PCR được thực hiện bằng GoTaq DNA polymerase (Promega, Mỹ) hoặc Q5 High-Fidelity DNA polymerase (New England BioLabs) với các cặp mồi được liệt kê trong Bảng 2.

Các sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit Qiagen Purification Kit (Qiagen, Đức), trong khi các đoạn DNA tách từ gel agarose được thu hồi bằng bộ kit Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England BioLabs, Mỹ). Plasmid được tách chiết và tinh sạch bằng bộ GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific). DNA hệ gen của nấm men được tách chiết và quá trình biến nạp tế bào nấm men được thực hiện theo các phương pháp đã công bố trước đó (Chen et al., 1997). Việc phân tích qPCR được thực hiện theo phương pháp của Do and Fickers (2020) với các cặp mồi trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Primers sử dụng trong nghiên cứu

Tên	Trình tự 5'-3'	Ghi chú
GSH2pro_for	GAATAGCAGCTTTGCAACGCGAAG	
GSH2pro_rev	AGCAGGAGTTATCCGAAGCGATAATGGATTAGATAGATAAGGTGTG GTTCAGTACATACAGTAC	
GSH2ter_for	GTTATCTAGGGATAACAGGGTAATCCGTCATTGGTTGTTTCGGAGAC G	
GSH2ter_rev	GGTCTTCTCATCCTTGGGCTTC	
Auxo_fo	ATTATCGCTTCGGATAACTCCTGCT	
Auxo_rev	GATTACCCTGTTATCCCTAGATAAC	
GSH2_verif	GAGTCTTTGCGCCATCG	
URA-Fo	GGATGTTACCACCACCAAGG	
URA-Rev	GTTCTGGCCGTACAGACCTC	
pTEF-Fo	GGACCCAACCCCGGCG	
GSH1_rev	GCGCCTAGGCTACTCCTTCTCGTACTCAAAACC	
LoxP-Fo	GCATACATTATACGAAGTTATTCTGAATTC	
LoxR-Rev	GGGTAATTATCGCTTCGGATA	
qGsh1_Fo	TGACTTCGACGACATTCTGC	qPCR, GSH1
qGsh1_Rev	CACCCTTGGGCTCGTAATAA	qPCR, GSH1

Để bất hoạt gene *ylGSH2*, đoạn trình tự dài 1 kb nằm phía thượng nguồn codon khởi đầu (*Pro_GSH2*) và đoạn trình tự dài 1,2 kb nằm phía hạ nguồn codon kết thúc (*Ter_GSH2*) của gene *YALI0C17831g* được khuếch đại bằng PCR từ DNA hệ gen của chủng *Y. lipolytica* RIY129, sử dụng lần lượt các cặp mồi GSH2pro_for/GSH2pro_rev và GSH2ter_for/GSH2ter_rev. Marker chọn lọc *URA3* được khuếch đại từ plasmid RIP110 bằng cặp mồi Auxo_fo/Auxo_rev.

Cassette bất hoạt *GSH2* (*Pro_GSH2–URA3–Ter_GSH2*) được tạo bằng kỹ thuật PCR chồng lấn, sử dụng các đoạn *Pro_GSH2*, *URA3* và *Ter_GSH2* làm khuôn, với cặp mồi GSH2pro_for/GSH2ter_rev. Sản phẩm PCR thu được có kích thước khoảng 3,5 kb, được sử dụng để biến nạp vào chủng RIY176 và đồng thời được gắn vào vector pGEM-T Easy để tạo plasmid RIP295 (Bảng 1).

Các dòng biến nạp được tuyển chọn trên môi trường YNBG. Kiểu gen của các chủng tái tổ hợp được xác nhận bằng PCR phân tích với cặp mồi GSH2_verif/Auxo_rev.

2.4. Phân tích phiên mã gene ylGSH1

RNA tổng số được ly trích từ các chủng *Y. lipolytica*; sau đó, việc định lượng và kiểm tra độ tinh sạch được thực hiện bằng máy quang phổ Nanodrop ở bước sóng 260 nm. RNA đạt yêu cầu được sử dụng cho phản ứng phiên mã ngược và định lượng bằng RT-qPCR. Mức độ biểu hiện của *ylGSH1* được chuẩn hóa theo gene actin và so sánh tương đối với chủng đối chứng/hoang dại.

2.5. Đánh giá sinh trưởng, định lượng thiol và ảnh hưởng của tiền chất

Sinh trưởng của các chủng được đánh giá thông qua sinh khối tế bào khô, biểu thị bằng gDCW/L. Tế bào sau nuôi cấy được thu hoạch, rửa sạch và phá vỡ bằng máy lắc hạt thủy tinh FastPrep-24 để thu dịch chiết nội bào (Do & Fickers, 2020). Nồng độ protein tổng số được xác định theo phương pháp Bradford. Hàm lượng thiol nội bào, đại diện chủ yếu cho γ-GC trong các chủng đã bất hoạt *ylGSH2*, được định lượng bằng bộ kit Fluorometric Thiol Quantitation và chuẩn hóa theo protein tổng số, biểu thị bằng nmol/mg protein.

Để đánh giá vai trò của tiền chất axit amin, các chủng tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường YNB không bổ sung hoặc có bổ sung glutamate

và/hoặc cysteine. Chỉ tiêu so sánh là hàm lượng thiol/γ-GC nội bào và mức tăng tích lũy γ-GC so với nghiệm thức không bổ sung.

2.6. Định danh γ-GC bằng NMR và UPLC-QTOF/MS

Để xác nhận hợp chất thiol tích lũy là γ-GC thay vì glutathione, dịch chiết tế bào được phân tích bằng NMR và UPLC-QTOF/MS. Phổ NMR, gồm 1D ^{1}H và 2D HH TOCSY, được dùng để nhận diện các tín hiệu đặc trưng của γ-GC so với mẫu chuẩn. Việc phân tích UPLC-QTOF/MS được thực hiện dựa trên tỷ lệ khối lượng/điện tích (m/z) và thời gian lưu, giúp phân biệt γ-GC với glutathione và các dạng thiol liên quan.

2.7. Xử lý số liệu

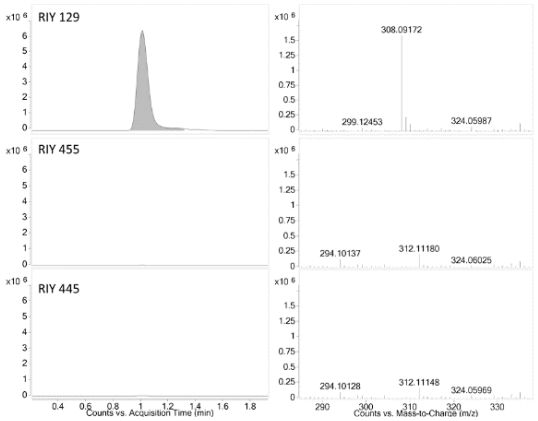
Các thí nghiệm định lượng được thực hiện với ba lần lặp lại độc lập. Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Mức biểu hiện *ylGSH1* được tính tương đối sau khi chuẩn hóa với gene actin, hàm lượng thiol nội bào (γ-GC) được chuẩn hóa theo protein tổng số. Các chỉ tiêu sinh khối, biểu hiện gene và hàm lượng thiol/γ-GC được so sánh giữa các chủng và nghiệm thức để đánh giá hiệu quả của chiến lược cải biến di truyền.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

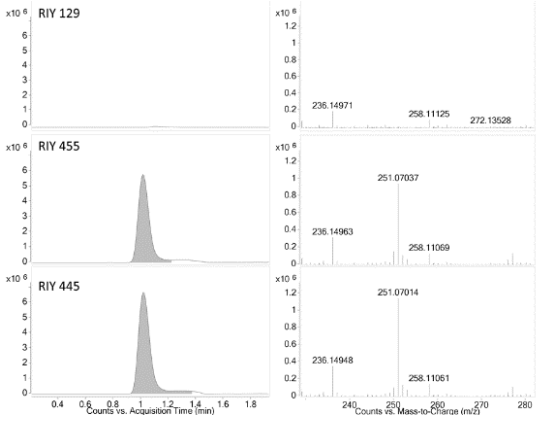
3.1. Bất hoạt gene ylGSH2 và biểu hiện quá mức gene ylGSH1

Quá trình thiết kế chủng nấm men tập trung vào việc tạo ra một chủng có khả năng tổng hợp γ-GC cao bằng cách can thiệp vào con đường sinh tổng hợp glutathione. Để chứng minh sự tổng hợp γ-GC thay thế cho glutathione (GSH) ở các chủng đã được tạo dòng, dịch chiết tế bào tương ứng đã được phân tích bằng khối phổ. Phổ ESI-Q-TOF thu được từ chủng RIY129 cho thấy sự xuất hiện của ion phân tử $[M+H]^+$ tại m/z 308,0917, tương ứng với GSH. Trong khi đó, ion phân tử đặc trưng này không được phát hiện trong dịch chiết tế bào của các chủng bị bất hoạt *ylGSH2* (RIY455 và RIY445) như minh họa ở hình 1, glutathione được rửa giải ở thời gian lưu 1,15 phút.

Ngược lại, các ion phân tử $[M+H]^+$ đặc trưng của γ-glutamylcysteine (γ-GC) được phát hiện trong dịch chiết tế bào của cả hai chủng RIY455 và RIY445, với giá trị m/z lần lượt là 251,07. Điều này cho thấy việc bất hoạt gene *ylGSH2* đã ngăn cản quá trình tổng hợp GSH, đồng thời dẫn đến sự tích lũy γ-GC trong tế bào ở Hình 2. γ-GC được rửa giải ở thời gian lưu 1,05 phút.

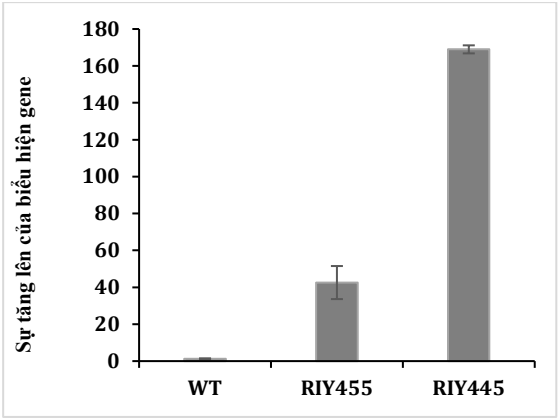


Hình 1. Sắc ký đồ ion chiết xuất (EIC) và phổ khối của glutathione ($[M+H]^+$; m/z 308,092) trong dịch chiết tế bào đã khử protein của các chủng RIY129 (WT), RIY455 và RIY445



Hình 2. Sắc ký đồ ion chiết xuất (EIC) và phổ khối của γ-glutamylcysteine ($[M+H]^+$; m/z 251,070) trong dịch chiết tế bào đã khử protein của các chủng RIY129, RIY455 và RIY445

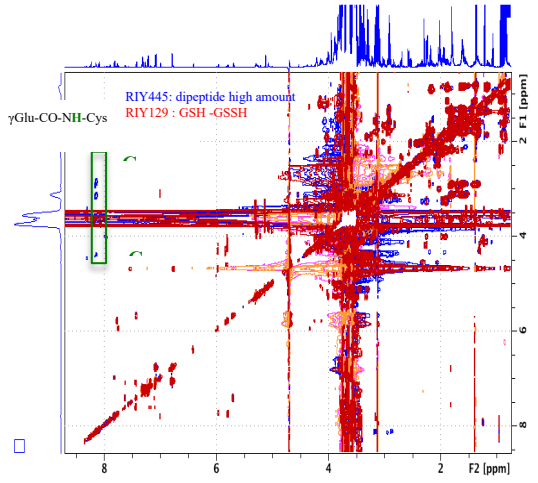
Kết quả trên cho thấy sự biến đổi hồ sơ thiol nội bào, với việc không phát hiện tín hiệu GSH và xuất hiện tín hiệu đặc trưng của γ-GC ở các chủng RIY455 và RIY445. Kết quả này phù hợp với chiến lược bất hoạt ylGSH2 nhằm hạn chế chuyển γ-GC thành GSH. Sau đó, gene *ylGSH1* (mã hóa γ-glutamylcysteine ligase) được đưa vào biểu hiện dưới sự kiểm soát của promoter mạnh pTEF. Kết quả phân tích mức độ phiên mã cho thấy sự gia tăng đáng kể về biểu hiện gene, cụ thể là chủng RIY455 (biểu hiện 1 bản sao) tăng 43 lần và chủng RIY445 (biểu hiện 2 bản sao) tăng tới 169 lần so với chủng hoang dã.



Hình 3. Phân tích phiên mã của gen ylGSH1 ở các chủng WT (đối chứng âm), RIY455 (ΔGSH2-pTEF-ylGSH1) và RIY445 (ΔGSH2-pTEF-ylGSH1-GSH1)

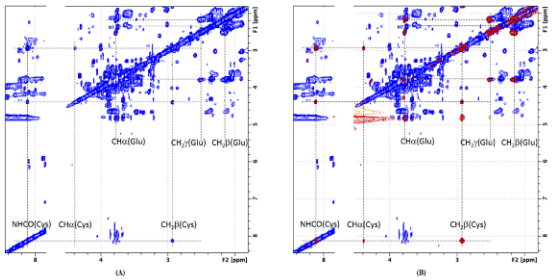
3.2. Bằng chứng về sự tổng hợp γ-GC trong các chủng tái tổ hợp

Phân tích γ-L-glutamyl-L-cysteine (γ-GC) trong dịch chiết tế bào của chủng đột biến RIY445 so với chủng hoang dã (WT-RIY129) bằng NMR cho thấy có sự biến đổi thành phần nội bào rõ rệt giữa chủng đột biến và chủng hoang dã.



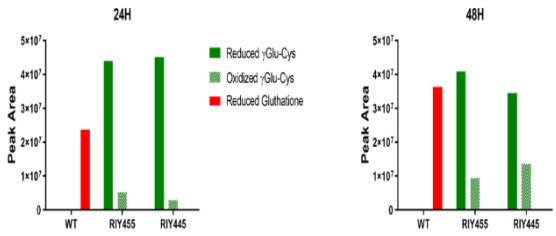
Hình 4. Phân tích γ-L-glutamyl-L-cysteine (γ-GC) trong dịch chiết tế bào của chủng đột biến RIY445 so với chủng hoang dã (WT-RIY129)

Việc xác định sự hiện diện của γ-GC trong các chủng đột biến được thực hiện thông qua nhiều phương pháp phân tích bổ trợ nhau. Bộ kit định lượng thiol huỳnh quang đã được sử dụng, các chủng đột biến cho thấy nồng độ thiol tích lũy khoảng 102 nmol/mg protein. Tuy nhiên, khi sử dụng phương pháp định lượng GSH chuyên biệt (DTNB và GSH reductase), kết quả cho thấy tín hiệu rất yếu hoặc không có, điều này khẳng định rằng hợp chất thiol được đo lường thực tế không phải là GSH mà là γ-GC. Việc phân tích NMR 2D TOCSY trên dịch chiết tế bào chủng RIY445 đã xác nhận giả thuyết này khi các tín hiệu proton hoàn toàn trùng khớp với mẫu γ-GC tinh khiết. Cuối cùng, kết quả LC-QTOF/MS cho thấy trong khi chủng hoang dã chuyển hóa toàn bộ dipeptide trung gian thành GSH, các chủng ΔGSH2 đã loại bỏ hoàn toàn khả năng hình thành GSH và thay thế bằng việc tích lũy γ-GC ở cả dạng khử và dạng oxy hóa (Hình 4, Hình 5 và Hình 6).



Hình 5. Xác định tín hiệu γ-l-glutamyl-l-cysteine (γ-GC) từ dịch chiết tế bào của chủng đột biến RIY445 bằng phương pháp NMR

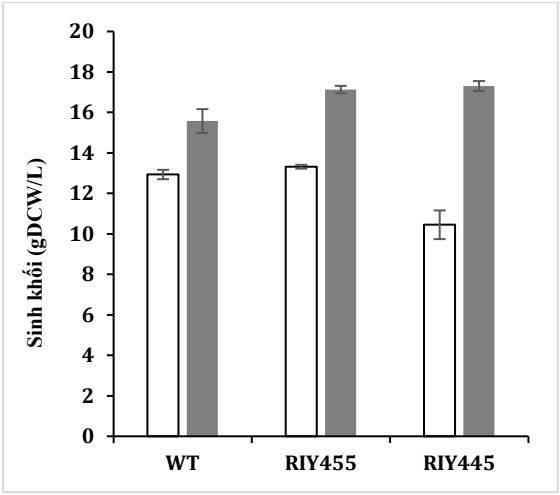
Ghi chú: (A) Phổ TOCSY 2D của dịch chiết tế bào từ chủng RIY445; (B) Phổ chồng lấp TOCSY 2D của dịch chiết tế bào RIY445 (màu xanh) và γ-glucys tinh khiết 50 mM (màu đỏ).



Hình 6. Xác định γ-glucys bằng phương pháp LC-QTOF/MS ở các chủng Y. lipolytica RIY455 (ΔGSH2-pTEF-ylGSH1) và RIY445 (ΔGSH2-pTEF-ylGSH1-ylGSH1)

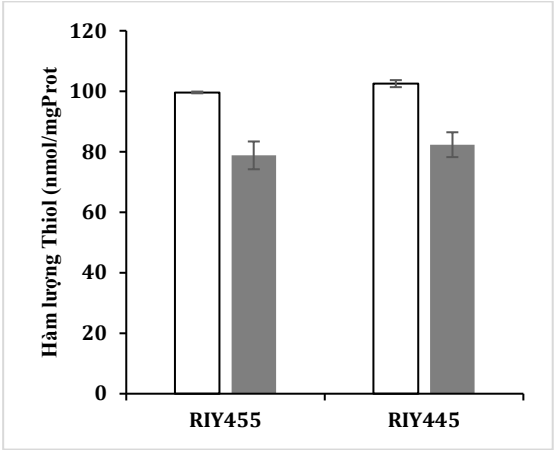
3.3. Đặc điểm sinh trưởng của các chủng đột biến

Trong nghiên cứu này, tác động của việc thiếu hụt GSH đối với khả năng sinh tồn và phát triển của nấm men *Y. Lipolytica* cũng đã được đánh giá. Mặc dù vào thời điểm 24 giờ sau khi cấy, chủng RIY445 (biểu hiện 2 bản sao *GSH1*) có sinh khối thấp hơn so với chủng hoang dã và RIY455, nhưng sau 48 giờ, các chủng đột biến đã phục hồi và đạt được mức sinh khối khoảng 17 gDCW/L, vượt qua mức 15.6 gDCW/L của chủng hoang dã.



Hình 7. Sinh khối (g/L) của các chủng Y. lipolytica WT, RIY455 (ΔGSH2-pTEF-ylGSH1) và RIY445 (ΔGSH2-pTEF-ylGSH1-ylGSH1) ở 24h (trắng) và 48h (xám) nuôi cấy trong môi trường YPD

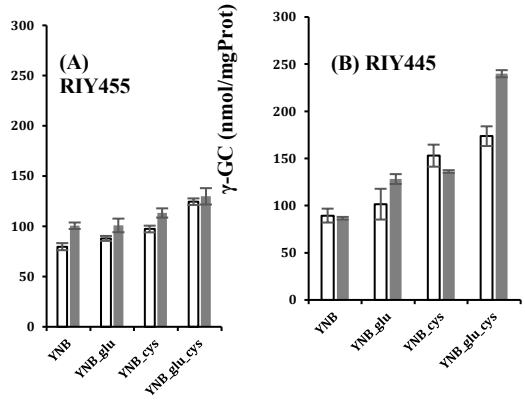
Kết quả này chứng minh rằng enzyme glutathione synthetase không phải là yếu tố thiết yếu tuyệt đối cho sự tăng trưởng của nấm men nếu tế bào tích lũy đủ lượng γ-GC. Sự tích lũy γ-GC có thể góp phần hỗ trợ khả năng sinh trưởng của tế bào trong điều kiện thiếu GSH (Grant et al., 1997; Wheeler et al., 2002).



Hình 8. Hàm lượng thiol được biểu thị bằng nmol trên mg protein (nmol/mgProt) của các chủng *Y. lipolytica* RIY455 và RIY445 ở 24h (trắng) và 48h (xám) nuôi cấy trong môi trường YPD

3.4. Ảnh hưởng của việc bổ sung axit amin đến năng suất γ-GC

Hiệu suất tổng hợp γ-GC được chứng minh là phụ thuộc lớn vào nồng độ các tiền chất axit amin (glutamate và cysteine) trong môi trường nuôi cấy (Kim et al., 2008; Lorenz et al., 2015; Lorenz et al., 2016; Schmacht et al., 2017). Việc biểu hiện quá mức gene *ylGSH1*, gene mã hóa enzyme γ-glutamylcysteine ligase, giúp tăng hoạt tính xúc tác tạo γ-GC và nồng độ thiol nội bào lên mức xấp xỉ 100 nmol/mg protein trong điều kiện tiêu chuẩn. Khi môi trường YNB được bổ sung thêm hai loại axit amin này, nồng độ dipeptide tăng rõ rệt, cho thấy nguồn axit amin tiền chất này là một yếu tố giới hạn quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp γ-GC.



Hình 9. Sự sản xuất thiol của các chủng *Ylipolytica* RIY455 (ΔGSH2-pTEF-ylGSH1) (A) và RIY445 (ΔGSH2-pTEF-ylGSH1-ylGSH1) (B) ở 24h (trắng) và 48h (xám) nuôi cấy trong môi trường YNBplus

Đặc biệt, ở chủng RIY445, việc bổ sung đồng thời glutamate và cysteine giúp nồng độ thiol đạt cực đại là 239,9 nmol/mg protein sau 48 giờ, tăng 177% so với điều kiện không bổ sung. Tuy nhiên, xét về khía cạnh kinh tế, việc bổ sung cysteine trực tiếp vào môi trường nuôi cấy không phải là giải pháp tối ưu cho sản xuất quy mô lớn do cysteine có giá thành cao. Vì vậy, hướng cải tiến hợp lý trong tương lai là việc tăng cường khả năng tự tổng hợp cysteine của tế bào bằng cách tối ưu các con đường đồng hóa của lưu huỳnh nội bào trong *Y. lipolytica*. Cách tiếp cận này có thể giúp giảm chi phí bổ sung tiền chất, đồng thời nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp γ-GC (Hébert et al., 2013; Li et al., 2023; Do et al., 2024).

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu này đã thiết lập một hệ thống sinh học trên nấm men *Y. lipolytica* nhằm tối ưu hóa sự tích lũy dipeptide γ-glutamylcysteine (γ-GC).

Thông qua các kỹ thuật chỉnh sửa di truyền, gene *ylGSH2* và mã hóa enzyme glutathione synthetase đã được loại bỏ nhằm ngăn chặn bước chuyển hóa từ γ-GC thành glutathione. Sự gián đoạn này làm ngưng con đường sinh tổng hợp glutathione, từ đó thúc đẩy sự tích lũy γ-GC nội bào. Đồng thời, gene *ylGSH1* và mã hóa enzyme γ-glutamylcysteine ligase được biểu hiện quá mức dưới sự kiểm soát của promoter mạnh pTEF với một hoặc hai bản sao. Sự kết hợp giữa việc loại bỏ *ylGSH2* và tăng biểu hiện *ylGSH1* đã tạo ra các chủng đột biến có khả năng tích lũy γ-GC cao hơn đáng kể so với chủng hoang dã.

Sự hiện diện của γ-GC như một hợp chất thiol chủ đạo thay thế cho glutathione đã được xác nhận bằng các phương pháp phân tích hóa lý hiện đại, bao gồm phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR và sắc ký lỏng ghép khối phổ độ phân giải cao LC-QTOF/MS. Các phân tích này cho phép phân biệt γ-GC với glutathione dựa trên đặc điểm cấu trúc và khối lượng phân tử. Một phát hiện đáng chú ý khác là các chủng đột biến vẫn duy trì khả năng sinh trưởng ổn định khi nồng độ γ-GC nội bào đạt mức cao. Kết quả này cho thấy khả năng thay thế một phần vai trò sinh học của glutathione bởi γ-GC trong việc sinh trưởng của tế bào.

Kết quả thực nghiệm cho thấy hiệu suất sản xuất γ-GC có thể được cải thiện đáng kể thông qua việc bổ sung các tiền chất axit amin vào môi trường nuôi cấy, đặc biệt là cysteine. Tuy nhiên, xét về tính kinh tế và khả năng mở rộng quy mô, việc bổ sung cysteine trực tiếp không phải là giải pháp tối ưu do chi phí nguyên liệu cao. Vì vậy, hướng cải tiến chủng bằng cách tăng cường con đường đồng hóa lưu huỳnh nội bào đã được đề xuất nhằm nâng cao khả năng tự tổng hợp cysteine của tế bào, từ đó cung cấp nhiều tiền chất hơn cho phản ứng tạo γ-GC, giảm phụ thuộc vào cysteine ngoại sinh và tạo nền tảng thuận lợi hơn cho sản xuất γ-GC quy mô lớn phục vụ các ứng dụng y dược và thực phẩm chức năng.

LỜI CẢM TẠ

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi Trung tâm Giảng dạy và Nghiên cứu TERRA, Đại học Liège; Quỹ học bổng VIED-BGDDT Việt Nam và nhóm tác giả cảm ơn sự hỗ trợ kỹ thuật từ O. Denies, S. Steels, và G. Balleux. Đồng thời, các tác giả xin cảm ơn trường Cao đẳng Y tế Đồng Tháp đã tạo điều kiện thuận lợi cho các thành viên thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Barth, G., Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus Yarrowia lipolytica. *FEMS Microbiol Rev.*, *19*(4),219-37. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00002-8

Braidy, N., Zarka, M., Jugder, B. E., Welch, J., Jayasena, T., Chan, D. K. Y., Sachdev, P., & Bridge, W. (2019). The precursor to glutathione (GSH), gamma-glutamylcysteine (GGC), can ameliorate oxidative damage and neuroinflammation induced by Aβ40 oligomers in human astrocytes. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, Article 177. https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00177

Chen, D., Beckerich, J. M., & Gaillardin, C. (1997). One-step transformation of the dimorphic yeast Yarrowia lipolytica. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *48*(2), 232–235. https://doi.org/10.1007/s002530051043

Do, D. T. H., Theron, C. W., & Fickers, P. (2019). Organic Wastes as Feedstocks for Non-Conventional Yeast-Based Bioprocesses. *Microorganisms*, *7*(8), 229. https://doi.org/10.3390/microorganisms7080229

Do, D. T. H., & Fickers, P. (2020). Engineering Yarrowia lipolytica for the Synthesis of Glutathione from Organic By-Products. *Microorganisms*, *8*(4), 611. https://doi.org/10.3390/microorganisms8040611

Do, D., Guruk, M., Kus-Liśkiewicz, M., Damblon, C., Arguelles-Arias, A., Erten, H., & Fickers, P. (2024). Biosynthesis of the antioxidant γ-glutamyl-cysteine with engineered Yarrowia lipolytica. *Biotechnology Journal*, *19*(2), e2300564. https://doi.org/10.1002/biot.202300564

Ferguson, G., & Bridge, W. (2016). Glutamate cysteine ligase & the age-related decline in cellular glutathione: The therapeutic potential of γ-glutamylcysteine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 593, 12–23. https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.01.017

Fickers, P., Le Dall, M. T., Gaillardin, C., Thonart, P., & Nicaud, J. M. (2003). New disruption cassettes for rapid gene disruption & marker rescue in the yeast Yarrowia lipolytica. *Journal of Microbiological Methods*, *55*(3), 727–737. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.07.003

Grant, C. M., MacIver, F. H., & Dawes, I. W. (1997). Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal & oxidative stress conditions in the yeast Saccharomyces cerevisiae due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Molecular Biology of the Cell*,

8(9), 1699–1707. https://doi.org/10.1091/mbc.8.9.1699

Hébert, A., Forquin-Gomez, M.-P., Roux, A., Aubert, J., Junot, C., Heilier, J.-F., Landaud, S., Bonnarme, P., & Beckerich, J.-M. (2013). New insights into sulfur metabolism in yeasts as revealed by studies of *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(4), 1200–1211. https://doi.org/10.1128/AEM.03259-12

Ikeda, Y., & Fujii, J. (2023). The emerging roles of γ-glutamyl peptides produced by γ-glutamyltransferase and the glutathione synthesis system. *Cells*, *12*(24), Article 2831. https://doi.org/10.3390/cells12242831

Kim, E. K., Cha, C. J., Cho, Y. J., Cho, Y. B., & Roe, J. H. (2008). Synthesis of γ-glutamylcysteine as a major low-molecular-weight thiol in lactic acid bacteria Leuconostoc spp. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *369*(4), 1047–1051. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.139

Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Lopez Garcia, I., Kookos, I. K., Papanikolaou, S., Kwan, T. H., & Lin, C. S. K. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*, *43*(8), 2587–2627. https://doi.org/10.1039/C3CS60293A

Li, W., Zhou, Z., & Wang, D. (2023). Recent advances, challenges, and metabolic engineering strategies in L-cysteine biosynthesis. *Fermentation*, *9*(9), 802. https://doi.org/10.3390/fermentation9090802

Liu, Y., Chen, Z., Li, B., Yao, H., Zarka, M., Welch, J., Sachdev, P., Bridge, W., & Braidy, N. (2021). Supplementation with gamma glutamylcysteine (gamma-GC) lessens oxidative stress, brain inflammation and amyloid pathology and improves spatial memory in a murine model of AD. *Neurochemistry International*, 144, Article 104931. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.104931

Lorenz, E., Schmacht, M., & Senz, M. (2016). Evaluation of cysteine ethyl ester as efficient inducer for glutathione overproduction in Saccharomyces spp. *Enzyme and Microbial Technology*, 93–94, 122–131. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.08.004

Lorenz, E., Schmacht, M., Stahl, U., & Senz, M. (2015). Enhanced incorporation yield of cysteine for glutathione overproduction by fed-batch fermentation of Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biotechnology*, 216, 131–139. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.10.016

Nicaud, J. M. (2012). Yarrowia lipolytica. *Yeast*, *29*(10), 409–418. https://doi.org/10.1002/yea.2921

Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schmacht, M., Lorenz, E., Stahl, U., & Senz, M. (2017). Medium optimization based on yeast's elemental composition for glutathione production in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *123*(5), 555–561. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.12.011

Theodosiou, E. (2023). Engineering strategies for efficient bioconversion of glycerol to value-added products by *Yarrowia lipolytica*. *Catalysts*, *13*(4), 657. https://doi.org/10.3390/catal13040657

Thoen, M., & Schloesser, T. (2014). *Microorganism & method for overproduction of gamma-glutamylcysteine & derivatives of this dipeptide by fermentation* (Patent No. WO2014072483A1). World Intellectual Property Organization.

Trassaert, M., Vandermies, M., Carly, F., Denies, O., Thomas, S., Fickers, P., & Nicaud, J. M. (2017). New inducible promoter for gene expression & synthetic biology in Yarrowia lipolytica. *Microbial Cell Factories*, *16*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/s12934-017-0755-0

Yang, J., Bai, W., Zeng, X., & Cui, C. (2019). Gamma-glutamyl peptides: The food source, enzymatic synthesis, kokumi-active and the potential functional properties—A review. *Trends in Food Science & Technology*, *91*, 339–346. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.022

Wheeler, G. L., Quinn, K. A., Perrone, G., Dawes, I. W., & Grant, C. M. (2002). Glutathione regulates the expression of γ-glutamylcysteine synthetase via the Met4 transcription factor. *Molecular Microbiology*, *46*(2), 545–556. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03174.x

Wu, Z., Li, Y., Zhang, L., Ding, Z., Shi, G. (2021). Microbial production of small peptide: pathway engineering and synthetic biology. *Microb Biotechnol.*, *14*(6), 2257-2278. https://doi: 10.1111/1751-7915.13743