

## NGHIÊN CỨU CẢI THIỆN MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN CHITINASE 42 kDa CỦA *TRICHODERMA ASPERELLUM* SH16 Ở *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Hoàng Tấn Quảng<sup>2</sup>, Lê Mỹ Tiểu Ngọc<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Quý Hòa<sup>2</sup>, Nguyễn Hoàng Lộc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

Ngày nhận bài: 07.8.2014

Ngày nhận đăng: 03.10.2014

### TÓM TẮT

Chitinase là một enzyme thuộc nhóm glycosyl hydrolase xúc tác thủy phân chitin, có trong nhiều cơ thể sống khác nhau bao gồm vi khuẩn, nấm, động vật không xương sống, thực vật và động vật có xương sống. Chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công gen mã hóa chitinase 42 kDa (*chi42*-SH16) của chủng *Trichoderma asperellum* SH16 trong nấm men *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1. Bài báo này trình bày kết quả khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp để cải thiện mức độ biểu hiện của enzyme. Kết quả cho thấy chitinase 42 kDa có hoạt độ cao nhất khi mật độ tế bào của nấm men đạt  $OD_{600} = 12$ , được cảm ứng bằng galactose 4% và duy trì tại nhiệt độ 30°C trong 12 giờ nuôi cấy. Ở dịch chiết nội bào, hoạt độ chung của enzyme đạt giá trị cao nhất là 44,78 u/mL trong môi trường YPD (yeast extract, peptone và dextrose) (hoạt độ riêng là 85,92 u/mg protein). Ở môi trường ngoại bào, hoạt độ chung cao nhất của enzyme thu được trong môi trường YPL (yeast extract, peptone và lactose) là 21,05 u/mL (hoạt độ riêng là 41,12 u/mg protein). Điện di dịch enzyme ngoại bào từ các môi trường nuôi cấy khác nhau cho thấy băng chitinase có khối lượng phân tử phù hợp với tính toán vào khoảng 50 kDa (42 kDa của enzyme + 4 kDa của đoạn peptide tín hiệu + 3,4 kDa của đuôi dung hợp của vector pYES2/NT-C). Độ đậm nhạt của băng chitinase ở các môi trường khác nhau cũng phù hợp với kết quả phân tích hoạt độ enzyme.

**Từ khóa:** Biểu hiện gen, *chi42*, chitinase 42 kDa, *Trichoderma asperellum* SH16

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Chitinase là một enzyme thuộc nhóm glycosyl hydrolase xúc tác thủy phân chitin, có trong nhiều cơ thể sống khác nhau như vi khuẩn, nấm, động vật không xương sống, thực vật và động vật có xương sống. Chitinase thực vật là các enzyme thủy phân chitin của thành tế bào nấm bệnh. Tuy nhiên, không phải cây trồng nào cũng có khả năng sản xuất chitinase, hoặc hoạt tính chitinase của chúng đủ mạnh để kháng lại tác nhân gây bệnh. Vì vậy, việc tạo ra một chủng vi sinh vật có khả năng sản xuất hàm lượng enzyme này cao và hoạt tính mạnh là rất cần thiết (Li, 2006).

Đến nay, nhiều công trình nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện gen chitinase trong nấm men *Saccharomyces cerevisiae* đã được công bố. Chẳng hạn, nghiên cứu biểu hiện gen chitinase *ech42* của *T. aureoviride* trong chủng *S. cerevisiae* H158 của Song *et al.* (2005), nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện gen endoglyucanase của các loài *Trichoderma* trong *S. cerevisiae* INVSc1 của Ganiger *et al.* (2008)...

Chúng tôi cũng đã tạo dòng và biểu hiện thành công gen mã hóa chitinase 42 kDa của chủng nấm sợi *T. asperellum* SH16 trong nấm men *S. cerevisiae* INVSc1 (Loc *et al.*, 2013). Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu tiếp theo đó là khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp cho nấm men để tăng mức độ biểu hiện của chitinase 42 kDa tái tổ hợp.

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Đối tượng nghiên cứu

Chủng nấm men *S. cerevisiae* INVSc1 có chứa vector pYES2/NT-C mang gen *chi42*-SH16 mã hóa chitinase 42 kDa của chủng nấm sợi *T. asperellum* SH16 (Loc *et al.*, 2013).

#### Phương pháp nghiên cứu

##### Nuôi cấy nấm men

Tế bào nấm men *S. cerevisiae* INVSc1 mang gen *chi42*-SH16 được nuôi trong bình tam giác 250

mL chứa 50 mL môi trường SC-U (synthetic complete minimal media lacking uracil) có bổ sung 50  $\mu\text{g/mL}$  ampicillin. Nuôi cấy được thực hiện qua đêm ở 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút, cỡ mẫu là 1% (v/v).

### Ảnh hưởng của một số yếu tố lên sinh tổng hợp chitinase 42 kDa

Khi mật độ tế bào đạt  $\text{OD}_{600} = 1$ , galactose được bổ sung vào môi trường ở các nồng độ khác nhau (1-5%) để cảm ứng sinh tổng hợp chitinase 42 kDa, enzyme được thu sau 12 giờ cảm ứng. Sau khi chọn được nồng độ galactose thích hợp, tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của mật độ tế bào tại thời điểm cảm ứng ( $\text{OD}_{600} = 0,4-16$ ), nhiệt độ cảm ứng (15-30°C) lên sự biểu hiện của enzyme. Cuối cùng, thăm dò môi trường thích hợp cho sinh tổng hợp enzyme: SC-U, YPD (yeast extract 1%, peptone 2% và dextrose 2%) (Cahong *et al.*, 2007), SOC (super optimal broth with catabolite repression: tryptone 2%, yeast extract 0,5%, NaCl 10 mM và KCl 2,5 mM; bổ sung thêm  $\text{MgCl}_2$  20 mM và glucose 20 mM) (Loc *et al.*, 2011a), SSL (semi-synthetic lactose: yeast extract 0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,04% và lactose 2%) (Domingues *et al.*, 2004), và YPL (yeast extract 1%, peptone 2% và lactose 2%) (Rech & Ayub, 2006).

### Xác định hoạt độ chitinase

Hoạt độ chitinase được xác định theo phương pháp của Tsujibo & Hatano (1998) bằng cách dùng para-nitrophenyl- $\beta$ -N-acetylglucosaminide (pNp-GlcNAc) làm cơ chất. Cho 70  $\mu\text{L}$  dịch enzyme thô vào 140  $\mu\text{L}$  dung dịch pNp-GlcNAc 2,5 mM trong đệm acetate 50 mM (pH 5), phản ứng được thực hiện ở 50°C trong 10 phút. Ngừng phản ứng bằng 1,4 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M. Đo độ hấp thụ quang của sản phẩm tạo thành ở bước sóng 420 nm. Hoạt độ chitinase được định nghĩa là lượng enzyme có khả năng xúc tác chuyển hóa 1 nmol cơ chất pNp-GlcNAc thành p-nitrophenol trong thời gian 1 phút ở điều kiện thí nghiệm. Hàm lượng p-nitrophenol được tính theo đường chuẩn  $y = 0,673x$  ( $R^2 = 0,988$ ), với  $y$  là nồng độ p-nitrophenol và  $x$  là  $\text{OD}_{420}$ .

Hàm lượng protein hòa tan tổng số được xác định theo phương pháp Bradford (1976) ở bước sóng 595 nm bằng đường chuẩn albumin huyết thanh bò

(BSA):  $y = 0,72x$  ( $R^2 = 0,975$ ). Trong đó,  $y$  là nồng độ BSA,  $x$  là  $\text{OD}_{595}$ . Hoạt độ riêng của chitinase được tính bằng cách chia hoạt độ chung (unit/mL) cho hàm lượng protein hòa tan tổng số (mg/mL).

### Xử lý thống kê

Số liệu thí nghiệm là trung bình cộng của ít nhất 3 lần lặp lại. Kết quả nghiên cứu được phân tích ANOVA (Duncan's test) với  $p < 0,05$  bằng chương trình SAS.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

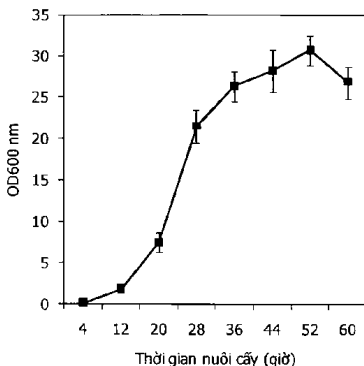
### Khảo sát đường cong sinh trưởng của nấm men tái tổ hợp

Đường cong sinh trưởng của tế bào nấm men được trình bày ở hình 1 với pha lag kéo dài khoảng 4 giờ, pha sinh trưởng bắt đầu từ giờ thứ 4 tới giờ thứ 52, pha cân bằng xuất hiện không rõ, và cuối cùng là pha chết. Mật độ tế bào tăng liên tục từ 4-52 giờ và đạt giá trị  $\text{OD}_{600}$  cao nhất là 30,81. Các thí nghiệm đánh giá sự biểu hiện của chitinase được thiết kế dựa trên đường cong sinh trưởng này.

### Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng

Nồng độ chất cảm ứng thường được khảo sát để tăng mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng galactose từ 1-5% bổ sung vào môi trường SC-U với thời gian cảm ứng là 12 giờ. Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy, nồng độ galactose 4% là thích hợp nhất cho sinh tổng hợp chitinase 42 kDa với hoạt độ chung là 24,27 u/mL và hoạt độ riêng là 51,59 u/mg protein.

Nghiên cứu của Laar *et al.*, (2006) cho thấy nồng độ galactose thích hợp để cảm ứng đoạn kháng thể lạc đà (camelid antibody fragment) ở *S. cerevisiae* là 0,3%. Trong khi đó, để cảm ứng các enzyme như phytase (Han *et al.*, 1999), enterokinase (Kim *et al.*, 2005), chitinase (Song *et al.*, 2005), và dimethylallyltryptophan synthase (Unsold & Li, 2005) ở *S. cerevisiae* nồng độ galactose thích hợp là 2%. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nồng độ galactose cho kết quả tốt là 4%, cao hơn ở các nghiên cứu trên và tương đương với nghiên cứu biểu hiện glutathione-S-transferase của Blanquet *et al.* (2004).



Hình 1. Đường cong sinh trưởng của nấm men *S. cerevisiae* INVSc1 mang gen *chi42*-SH16 của chủng *Trichoderma asperellum* SH16.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ galactose lên biểu hiện của chitinase 42 kDa.

Nồng độ galactose (%)	Hoạt độ chung (u/mL)	Hoạt độ riêng (u/mg protein)
1	4,62 <sup>a</sup>	9,82 <sup>a</sup>
2	9,73 <sup>ab</sup>	20,88 <sup>b</sup>
3	15,11 <sup>ab</sup>	32,12 <sup>ab</sup>
4	24,27 <sup>a</sup>	51,59 <sup>a</sup>
5	18,33 <sup>ab</sup>	38,97 <sup>ab</sup>

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test ( $p < 0,05$ ). Chú thích này đúng chung cho tất cả các bảng.

#### Ảnh hưởng của mật độ tế bào tại thời điểm cảm ứng

Nhiều công trình đã chứng minh giai đoạn sinh trưởng của tế bào mà tại đó protein được cảm ứng biểu hiện có ảnh hưởng lớn đến sự tổng hợp và khả năng hoạt động của protein, vì vậy cần tối ưu mật độ tế bào trước khi bổ sung chất cảm ứng (Byun *et al.*, 2007; Gupta, Rao, 2003). Chúng tôi đã khảo sát ảnh hưởng của mật độ tế bào lên quá trình sản xuất chitinase 42 kDa với OD<sub>600</sub> từ 0,4 đến 16. Kết quả trình bày ở bảng 2 cho thấy hoạt độ chung của enzyme đạt giá trị cao nhất khi

OD<sub>600</sub> = 12 được cảm ứng bằng galactose 4% là 28,26 u/mL và hoạt độ riêng cao nhất là 71,36 u/mg protein.

Hau *et al.*, (1999) đã cảm ứng biểu hiện phytase ở *S. cerevisiae* INVSc1 bằng galactose 2% khi OD<sub>600</sub> = 2. Nghiên cứu của Li *et al.*, (1996) cho thấy hoạt độ xylanase (của *Aureobasidium pullulans*) ngoại bào đạt giá trị cao nhất là 35 u/mL sau 25 giờ cảm ứng bằng galactose 2% khi OD<sub>600</sub> của *S. cerevisiae* bằng 2. Theo Blanquet *et al.*, (2004), thời điểm thích hợp để cảm ứng biểu hiện glutathione-S-transferase

ở *S. cerevisiae* bằng galactose 4% là khi  $OD_{600} = 4$ . Caihong *et al.*, (2007) nghiên cứu biểu hiện của gen mã hóa endochitinase *cht37* của *T. harzianum* trong

*S. cerevisiae* H158 cho thấy, hoạt độ enzyme đạt giá trị cao nhất (750 u/mL) sau 96 giờ cảm ứng bằng galactose 2% khi  $OD_{600} = 1$ .

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của mật độ tế bào lên biểu hiện của chitinase 42 kDa.

Mật độ tế bào ( $OD_{600\text{ nm}}$ )	Hoạt độ chung (u/mL)	Hoạt độ riêng (u/mg protein)
0,4	5,78 <sup>a</sup>	14,59 <sup>a</sup>
1	6,04 <sup>a</sup>	15,48 <sup>a</sup>
2	6,59 <sup>a</sup>	16,63 <sup>a</sup>
4	7,69 <sup>a</sup>	19,41 <sup>c</sup>
8	24,65 <sup>b</sup>	58,68 <sup>b</sup>
12	28,26 <sup>a</sup>	71,36 <sup>a</sup>
16	3,71 <sup>f</sup>	9,38 <sup>f</sup>

### Ảnh hưởng của nhiệt độ cảm ứng

Nhiệt độ nuôi cấy là yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến sinh trưởng và sản xuất protein của vi sinh vật. Nhưng nhiệt độ nuôi cấy sinh khối vi sinh vật chưa hẳn là nhiệt độ thích hợp cho sinh tổng hợp enzyme. Hầu hết các công trình nghiên cứu đều thừa nhận nhiệt độ tốt nhất cho sinh trưởng của *S. cerevisiae* là 30°C (Domingues *et al.*, 2004, Nam *et al.*, 1993; Rech, Ayub, 2006). Trong nghiên cứu của chúng tôi, nhiệt độ cảm ứng cũng tương đương với nhiệt độ sinh trưởng của nấm men là 30°C, hạ thấp nhiệt độ cảm ứng đã ảnh hưởng đáng kể đến hoạt độ của chitinase 42 kDa (Bảng 3).

Nhiều công bố trước đây cho thấy 30°C là nhiệt độ thích hợp để cảm ứng sinh protein tái tổ hợp từ nấm men *S. cerevisiae*. Nam *et al.*, (1993) đã cảm ứng biểu hiện invertase và inulinase ở 2 chủng *S. cerevisiae* HN18 và MCY528 tái tổ hợp ở 30°C.

Domingues *et al.*, (2004) nghiên cứu sản xuất  $\beta$ -galactosidase từ chủng *S. cerevisiae* NCYC869-A3/pVK1 tái tổ hợp đã sử dụng môi trường SSL và nhiệt độ cảm ứng 30°C. Rech & Ayub (2006) đã nuôi *S. cerevisiae* W303 tái tổ hợp trên hệ lên men 3 L chứa 1,5 L môi trường YPL ở 30°C để sản xuất  $\beta$ -galactosidase. Năm 2010, Rojas và đồng tác giả khi nghiên cứu sản xuất polygalacturonase I của *Aspergillus kawachii* trong *S. cerevisiae* INVSel ở bình tam giác và hệ lên men 1,5 L đều sử dụng nhiệt độ cảm ứng là 30°C.

Bên cạnh đó, mức nhiệt độ cảm ứng cao hơn cũng đã được sử dụng. Blanquet *et al.*, (2004) khi nghiên cứu các điều kiện để 2 chủng *S. cerevisiae* tái tổ hợp WppV5H6 và WppGSTV5H6 tiết peptide-V<sub>3</sub>H<sub>6</sub> hoặc glutathione-S-transferase-V<sub>3</sub>H<sub>6</sub> đã sử dụng nhiệt độ cảm ứng 37°C với nồng độ galactose 4%.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của nhiệt độ cảm ứng lên biểu hiện của chitinase 42 kDa.

Nhiệt độ (°C)	Dịch chiết nội bào		Dịch ngoại bào	
	HĐC (u/mL)	HĐR (u/mg protein)	HĐC (u/mL)	HĐR (u/mg protein)
15	0,77 <sup>b</sup>	1,59 <sup>b</sup>	0,19 <sup>b</sup>	0,39 <sup>b</sup>
20	2,86 <sup>b</sup>	5,87 <sup>b</sup>	0,40 <sup>b</sup>	0,82 <sup>b</sup>
25	4,57 <sup>b</sup>	9,95 <sup>b</sup>	1,46 <sup>a</sup>	3,18 <sup>a</sup>
30	28,26 <sup>a</sup>	71,36 <sup>a</sup>		

Chú thích: HDC: hoạt độ chung, HDR: hoạt độ riêng. Chú thích này đúng chung cho bảng 4

### Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Nhiều nghiên cứu cho thấy môi trường thích hợp cho sinh trưởng thường không thích hợp cho sinh tổng hợp enzyme (Loc *et al.*, 2011b). Vì thế, chúng tôi đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của một số môi trường lên hoạt độ enzyme và kết quả được trình bày trong bảng 4. Trong các môi trường nghiên cứu, môi trường YPD cho biểu hiện của chitinase 42 kDa cao nhất với HĐC và HDR của dịch chiết nội bào lần lượt là 44,78 u/mL và 85,92 u/mg protein. Môi trường YPL và SOC cho hoạt độ enzyme rất thấp. Tuy nhiên, ở môi trường YPL lượng enzyme ngoại bào lại nhiều hơn với HĐC và HDR lần lượt là 21,05 u/mL và 41,12 u/mg protein.

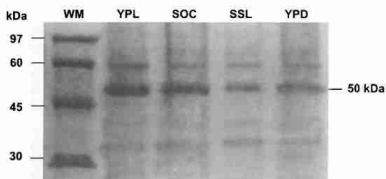
Môi trường YPD được nhiều tác giả sử dụng

trong nuôi cấy sinh khối hoặc để sản xuất các protein tái tổ hợp, chẳng hạn sản xuất  $\beta$ -galactosidase (Hardjito *et al.*, 1993), enterokinase (Kim *et al.*, 2005) hay chitinase (Caihong *et al.*, 2007)... Môi trường YPL cũng đã được (Rech & Ayub., 2006) sử dụng để sản xuất  $\beta$ -galactosidase trong *S. cerevisiae* W303 tái tổ hợp.

Kết quả điện di dịch enzyme ngoại bào từ các môi trường nuôi cấy khác nhau cho thấy băng chitinase có khối lượng phân tử phù hợp với tính toán vào khoảng 50 kDa (42 kDa của enzyme + 4 kDa của đoạn peptide tín hiệu + 3,4 kDa của đuôi dung hợp của vector pYES2/NT-C) (Hình 2). Độ đậm nhạt của băng chitinase 42 kDa ở các môi trường khác nhau cũng phù hợp với kết quả phân tích hoạt độ enzyme trình bày ở bảng 4

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên biểu hiện của chitinase 42 kDa.

Môi trường	Dịch chiết nội bào		Dịch ngoại bào	
	HĐC (u/mL)	HDR (u/mg protein)	HĐC (u/mL)	HDR (u/mg protein)
YPL	1,96 <sup>d</sup>	3,76 <sup>d</sup>	21,05 <sup>a</sup>	41,12 <sup>a</sup>
YPD	44,78 <sup>a</sup>	85,92 <sup>a</sup>	11,18 <sup>b</sup>	21,83 <sup>b</sup>
SOC	3,68 <sup>d</sup>	7,06 <sup>d</sup>	12,37 <sup>b</sup>	24,15 <sup>b</sup>
SSL	38,20 <sup>b</sup>	73,28 <sup>b</sup>	5,52 <sup>c</sup>	10,78 <sup>c</sup>
SC-U	28,26 <sup>c</sup>	54,21 <sup>c</sup>		



**Hình 2.** Điện di trên gel polyacrylamide 12% cho chitinase 42 kDa ngoại bào được tổng hợp từ các môi trường nuôi cấy khác nhau. WM. protein chuẩn (97-14,4 kDa)

### KẾT LUẬN

Chitinase 42 kDa có hoạt độ cao nhất khi nuôi tế bào nấm men tái tổ hợp đạt đến mật độ có OD<sub>600</sub> = 12 được cảm ứng bằng galactose 4% với nhiệt độ

cảm ứng 30°C. Trường hợp dịch chiết nội bào, lượng enzyme thu được cao nhất ở môi trường YPD với HĐC và HDR lần lượt là 44,78 u/mL và 85,92 u/mg protein. Trường hợp dịch ngoại bào, lượng enzyme thu được cao nhất ở môi trường YPL với HĐC và

HĐR lần lượt là 21,05 u/mL và 41,12 u/mg protein.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện nhờ sự tài trợ kinh phí của đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo "Nghiên cứu sản xuất enzyme chitinase tái tổ hợp ở quy mô pilot" (2012-2014).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Blanquet S, Antonelli R, Laforet L (2004) Living recombinant *Saccharomyces cerevisiae* secreting proteins or peptides as a new drug delivery system in the gut. *J Biotechnol* 110(1): 37-49.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Byun SG, Kim MD, Lee WH, Lee KJ, Han NS, Seo JH (2007) Production of GDP-L-fucose, L-fucose donor for fucosyloligosaccharide synthesis, in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 768-775

Caihong H, Qian Y, Jinzhu S, Yingqi S (2007) Expression of a novel chitinase gene from *Trichoderma harzianum* in *Saccharomyces cerevisiae*. *The 12th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (ICBBE)*, Wuhan 283-285.

Domínguez L, Oliveira C, Castro L, Lima N, Teixeira J (2004) Production of  $\beta$ -galactosidase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* grown on lactose. *J Chem Tech Biotechnol* 79(8): 809-815.

Ganiger MC, Bhat S, Chettri P, Kuruvimbetti MS (2008) Cloning and expression of endoglucanase genes from *Trichoderma* species in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Sci Res* 4(11) 1546-1556.

Gupta A, Rao G (2003) Astudy of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor. *Biotechnol Bioeng* 84(3): 351-358.

Han Y, Wilson DB, Lei XG (1999) Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (*phyA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 65: 1915-1918.

Hardjito L, Greenfield PF, Lee PL (1993) Recombinant protein production via fed-batch culture of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 15: 120-126.

Kim HJ, Kim YH, Roh YH, Seong BL, Shin CS (2005) Optimization of enterokinase fermentation using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem* 40: 717-722.

Laar TVD, Visser C, Holster M (2007) Increased heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae* growing on ethanol as sole carbon source. *Biotechnol Lett* 96(3): 483-494.

Li D (2006) Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161: 345-360.

Li XL, Ljungdahl LG (1996) Expression of *Aureobasidium pullulans* xynA and secretion of the xylanase from *S. cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 62(1): 209-213.

Loc NH, Giap DV, Quang HT (2011a) Production of NPRC10 protease by recombinant *Escherichia coli* through submerged culture in 40-L fermenter. *Ann Biol Res* 2(6): 62-68.

Loc NH, Quang HT, Lam BTH, Trang DTT (2011b) The effects of culture conditions on neutral protease (NPRC10) in a recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Ann Biol Res* 2(3): 474-485.

Loc NH, Hoa NTQ, Cuc PTK, Quang HT (2013) Expression of chitinase (*chi42*) gene from *Trichoderma asperellum* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Biol Res* 4(9): 15-19.

Nam SW, Yoda K, Yamasaki M (1993) Secretion and localization of invertase and inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 15(10): 1049-1054.

Rech R, Ayub MAZ (2006) Fed-batch bioreactor process with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* growing on cheese whey. *Braz J Chem Eng* 23(04): 435-442.

Rojas NL, Ortiz GE, Baraque DJ, Cavalitto SF, Ghirngbelli PD (2010) Production of heterologous polygalacturonase I from *Aspergillus kawachii* in *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38(9): 1437-1447.

Song JZ, Yang Q, Liu BD, Chen DF (2005) Expression of the chitinase gene from *Trichoderma aureoviride* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 39-43.

Tsujiho H, Hatano N, Mikami T, Hirasawa A, Miyamoto K, Inamori Y (1998) A novel  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520: gene cloning, expression, and assignment to family 3 of the glycosyl hydrolases. *Appl Environ Microbiol* 64(8): 2920-2924

Unsold IA, Li SM (2005) Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol* 151: 1499-1505.

## ENHANCING THE EXPRESSION OF 42 kDa CHITINASE FROM *TRICHODERMA ASPERELLUM* SH16 IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Hoang Tan Quang<sup>2</sup>, Le My Tieu Ngoc<sup>1</sup>, Nguyen Thi Quy Hoa<sup>2</sup>, Nguyen Hoang Loc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Sciences, Hue University

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, Hue University

### SUMMARY

Chitinases, a group of enzymes capable of degrading chitin directly to lower molecular weight products, have been shown to be produced by bacteria, fungi, insects, plants, invertebrates and vertebrates. In previous report, we successfully cloned and expressed the *chi42*-SH16 gene encoding 42 kDa chitinase from *Trichoderma asperellum* SH16 in *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1. In this study, we investigated culture conditions for enhancing enzyme expression. The results showed that the highest expression level of 42 kDa chitinase was determined after induction by 4% galactose for 12 h of culture at 30°C when cell density (OD<sub>600</sub>) reached a value of 12. For intracellular chitinase extract, the highest activity was found in YPD (yeast extract, peptone and dextrose) medium with total and specific activities were 44.78 u/mL and 85.92 u/mg protein, respectively. For extracellular chitinase excretion, the highest activity was found in YPL (yeast extract, peptone and lactose) medium with total and specific activities were 21.05 u/mL and 41.12 u/mg protein, respectively. Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE) of extracellular enzyme from different culture media showed a type of chitinase band with a molecular weight of about 50 kDa (42 kDa of enzyme + 4 kDa of signal peptide + 3.4 kDa of fusion tail of pYES2/NT-C vector). Besides, the intensity of chitinase bands on the gel from different culture media are also consistent with the analysis of enzyme activity.

**Keywords:** *chi42*, chitinase 42 kDa, expression, *Trichoderma asperellum* SH16