

TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN BIỂU HIỆN NHẪM NÂNG CAO KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CHITINASE CỦA CHỦNG VI KHUẨN TÁI TỔ HỢP BẰNG PHƯƠNG PHÁP BỀ MẶT ĐÁP ỨNG

Trịnh Thị Thu Hà^{1,2}, Đồng Văn Quyền^{1,2}, Ngô Đình Bình^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

TÓM TẮT: Chitinase (EC 3.2.1.14) thuộc nhóm enzyme thủy phân (hydrolase), là enzyme thủy phân chitin thành chitobiose hay chitotriose qua việc xúc tác sự phân giải liên kết 1,4 glucoside giữa C1 và C4 của hai phân tử N-acetyl glucosamine liên tiếp nhau trong chitin. Enzyme này đang được ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp nhằm kiểm soát một số tác nhân gây bệnh ở cây trồng, đặc biệt trong kiểm soát nấm gây bệnh thực vật và tăng hoạt tính diệt côn trùng của *Bacillus thuringiensis*. Trong nghiên cứu này, gen *chi A* mã hóa protein chitinase đã được biểu hiện trong *E. coli*, tối ưu hóa điều kiện lên men chủng tái tổ hợp nhằm tăng cường khả năng sinh tổng hợp chitinase bằng phương pháp bề mặt đáp ứng dựa trên phần mềm thống kê Design-Expert 10.1 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Hoa Kỳ). Các điều kiện lên men như: nồng độ chất cảm ứng, thời gian cảm ứng và mật độ tế bào tại thời điểm cảm ứng và ảnh hưởng của các yếu tố này đến quá trình sinh tổng hợp chitinase của chủng tái tổ hợp đã được khảo sát. Chúng tôi đã xác định được điều kiện tối ưu cho lên men sản xuất chitinase tái tổ hợp bao gồm: nồng độ lactose 6,15 mM; thời gian cảm ứng 8,12 giờ và mật độ tế bào tại thời điểm cảm ứng là $OD_{600nm}=0,87$ với giá trị chitinase đạt 7,49 U/ml. Tiến hành lên men chủng tái tổ hợp theo điều kiện tối ưu, hoạt tính chitinase theo thực tế đạt 7,54 U/ml, cao gấp 1,32 lần so với trước tối ưu (hoạt tính đạt 5,71 U/ml). Ngoài ra, sử dụng chất cảm ứng lactose thay thế IPTG còn giúp giảm giá thành sản phẩm chitinase tái tổ hợp.

Từ khóa: *E. coli*, phương pháp bề mặt đáp ứng, sản xuất chitinase, tối ưu điều kiện biểu hiện.

MỞ ĐẦU

Chitinase (EC 3.2.1.14) là enzyme xúc tác quá trình phân hủy cơ chất chitin không hòa tan trong nước thành các sản phẩm chitooligosaccharide hòa tan trong nước thông qua quá trình thủy phân liên kết glucosyl. Chitinase có tiềm năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như: nông nghiệp, công nghiệp, y dược và công nghệ sinh học nhờ khả năng kháng nấm gây bệnh thực vật (Han et al., 2009), kháng côn trùng (Halder et al., 2012), kháng khuẩn, tăng cường miễn dịch (Songsiriritthigul et al., 2010) và sản xuất protein đơn bào. Chitinase được sản sinh bởi vi nấm, nấm men, vi khuẩn, thực vật và nhiều loại côn trùng (Huang et al., 2005). Tuy nhiên, chitinase tự nhiên thường có hàm lượng rất thấp. Vì vậy, chitinase tái tổ hợp được tạo ra bằng kỹ thuật DNA nhằm sản xuất lượng lớn enzyme này đã được quan tâm nghiên cứu. Các vật chủ thường được các nhà nghiên cứu chọn để biểu hiện gen chitinase là các vi sinh vật có

khả năng sinh trưởng và phát triển nhanh như *E. coli* (Lobo et al., 2013; Mehtap et al., 2015). Quá trình lên men chủng tái tổ hợp chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau như: nồng độ chất cảm ứng, thời gian cảm ứng, mật độ tế bào tại thời điểm cảm ứng, nhiệt độ cảm ứng. Tối ưu điều kiện lên men là kỹ thuật rất quan trọng không những nhằm thu sản lượng cao nhất mà còn chi phí ở mức thấp nhất. Tối ưu điều kiện lên men chủng tái tổ hợp bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) có thể giải quyết một phương trình đa biến nhằm tiết kiệm thời gian và chi phí. Phương pháp RSM là một phương pháp sử dụng toán học và thống kê được áp dụng rộng rãi để xác định ảnh hưởng của các yếu tố và để tối ưu hóa quá trình lên men sinh học (Dagbagli, Goksungur, 2008; Castillo, 2007). RSM đã được áp dụng rộng rãi để tối ưu thông số quá trình nuôi cấy để sản xuất lipase (He & Tan, 2006), tannase (Battestin & Macedo, 2007), α -amylase (Uma Maheswar Rao & Satyanarayana, 2007), β -cyclodextrin glucanotransferase (Ibrahim et al., 2005),

lactase (Dagbagli, Goksungur, 2008; Ana Paula Manera et al., 2008). Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra tiện ích của phương pháp RSM cho phân tích các loại cơ chất để tối ưu hóa sự sản xuất chitinase từ *Bacillus cereus* (Wang et al., 2009). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tối ưu hóa nồng độ chất cảm ứng, thời gian cảm ứng, mật độ tế bào tại thời điểm cảm ứng bằng phương pháp RSM nhằm thu lượng chitinase cao nhất từ chủng *E. coli* tái tổ hợp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng giống vi sinh vật và môi trường nuôi cấy

Chủng *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang vector biểu hiện pET28b(+) chứa gen *chiA* mã hóa protein chitinase đã được mô tả từ nghiên cứu trước đây (Trinh Thị Thu Hà và nnk., 2014).

Môi trường LB (g/l): Tryptone: 10, cao thịt: 5, NaCl: 5, bổ sung kanamycin nồng độ 50 µg/ml dùng để nuôi cấy chủng *E. coli* tái tổ hợp.

Xác định hoạt tính chitinase

Hoạt tính chitinase được xác định theo phương pháp Miller dựa trên nguyên tắc bắt màu của N-acetyl D-glucosamine giải phóng ra khi thủy phân cơ chất colloidal chitin với thuốc thử DNS (3,5-dinitrosalicylic) ở bước sóng 540 nm (Miller, 1959). Phản ứng gồm 0,5 ml dung dịch chitinase và 0,5 ml colloidal chitin 1%, ủ ở 55°C trong 60 phút. Dừng phản ứng bằng cách đun cách thủy hỗn hợp trong 5 phút. Sau đó, ly tâm tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch. Một đơn vị hoạt độ chitinase được xác

định là lượng enzyme cần thiết để giải phóng ra 1 µmol N-acetyl D-glucosamine trong thời gian 1 phút ở 40°C, pH 7.

Xác định ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng, thời gian cảm ứng và mật độ tế bào tại thời điểm cảm ứng đến hoạt tính của chitinase tái tổ hợp

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian cảm ứng đến sự tổng hợp *rchiA* của chủng *E. coli* tái tổ hợp như sau: chủng tái tổ hợp được nuôi lắc 200 vòng/phút trong môi trường LB, cảm ứng bằng ITPG nồng độ 0,05 mM; nhiệt độ cảm ứng 30°C; thời gian cảm ứng 12 giờ, mẫu được thu sau các khoảng thời gian 3, 6, 9 và 12 giờ để xác định hoạt tính chitinase.

Để xác định ảnh hưởng của mật độ tế bào đến khả năng sinh tổng hợp protein ChiA tái tổ hợp (*rchiA*), chủng tái tổ hợp *E. coli* BL21 được nuôi lắc 200 vòng/phút trên môi trường LB, cảm ứng bằng ITPG nồng độ 0,05 mM tại các thời điểm mật độ tế bào (OD_{600nm}) đạt 0,2; 0,4; 0,6; 0,7; 0,8; 1 và 1,2; nhiệt độ sau cảm ứng là 30°C, sau cảm ứng 9 giờ thu protein tái tổ hợp để xác định hoạt tính enzyme.

Nồng độ chất cảm ứng được xác định bằng cách nuôi lắc chủng tái tổ hợp 200 vòng/phút trong môi trường LB, cảm ứng bằng ITPG nồng độ 0,05 mM và cảm ứng bằng lactose ở các nồng độ 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10 mM khi $OD_{600nm} = 0,7$; sau cảm ứng 9 giờ thu protein tái tổ hợp để xác định hoạt tính enzyme.

Tối ưu khả năng sinh tổng hợp chitinase theo phương pháp bề mặt đáp ứng

Bảng 1. Giá trị mã hóa các yếu tố thực nghiệm

Biến số	Ký hiệu	Đơn vị	-1	0	+1
Lactose	A	mM/l	5	6	7
Thời gian	B	Giờ	6	9	12
OD_{600nm}	C	Đơn vị	0,6	0,8	1

Xác định tác động đồng thời của các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng sinh tổng hợp chitinase bằng cách sử dụng quy hoạch trực giao đối xứng cho 3 biến: Nồng độ chất cảm ứng lactose (A) 5-7 mM; Thời gian cảm ứng (B) 6-12 giờ và mật độ tế bào (C) (OD_{600nm}) 0,6-1,0 tiến hành

tại các mức (-1, 0, +1) như bảng 1. Theo thiết kế, tổng số phương án xử lý là 20 thí nghiệm với 1 hàm mục tiêu: hoạt độ chitinase. Xử lý số liệu thực nghiệm bằng phần mềm thống kê Design-Expert 10.1 để phân tích các hệ số hồi quy, bề mặt đáp ứng và tối ưu hóa với thuật

toán hàm mong đợi.

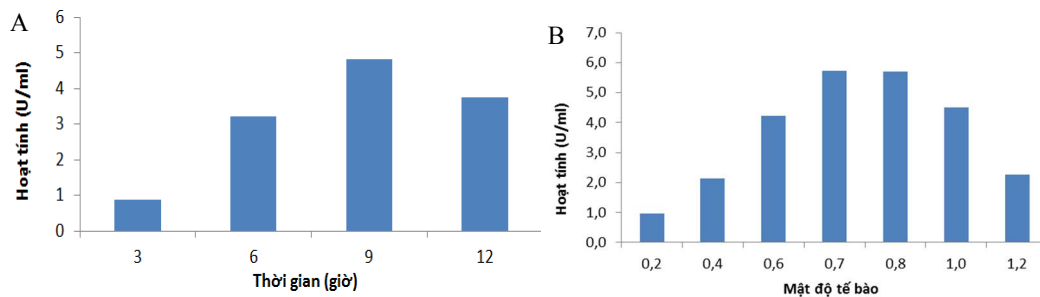
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của thời gian cảm ứng đến khả năng sinh tổng hợp chitinase

Thời gian lên men là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến năng suất biểu hiện protein tái tổ hợp ChiA, vì lượng protein được tổng hợp ở các thời điểm là rất khác nhau. Nếu thu sớm thì protein chưa được tổng hợp tối đa, nếu thu muộn sẽ sinh ra các chất ức chế và phân hủy protein mới được tạo thành. Vì khi môi trường thiếu dinh dưỡng, tế bào sẽ tiết ra protease để thủy phân,

chuyển hóa tế bào chết và các sản phẩm phụ thành nguồn dinh dưỡng cho tế bào, do đó, các sản phẩm protein ngoại lai thường bị thủy phân bởi protease (Shojaosadati et al., 2008).

Kết quả ở hình 1A cho thấy, sau khi cảm ứng 3 giờ hoạt tính enzyme của ChiA tái tổ hợp bắt đầu tăng, đến 9 giờ sau cảm ứng thì đạt cực đại (4,83 U/ml), kéo dài thời gian sau cảm ứng đến 12 giờ thì hoạt tính bắt đầu giảm (chỉ còn 3,74 U/ml). Kết quả này cho thấy, khoảng thời gian thích hợp cho quá trình thu hồi protein ChiA tái tổ hợp là từ 6-12 giờ sau khi cảm ứng, tối ưu là sau 9 giờ cảm ứng.



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian cảm ứng (A) và mật độ tế bào (B) đến khả năng sinh tổng hợp chitinase. ChiA được tổng hợp tối đa sau 9 giờ cảm ứng; Hoạt tính enzyme đạt cao nhất (5,73 U/ml) khi mật độ tế bào $OD_{600nm}=0,7$

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

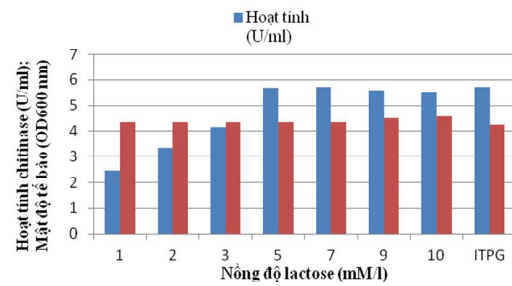
Mật độ tế bào trong môi trường lên men ảnh hưởng lớn đến quá trình sinh tổng hợp protein của chủng tái tổ hợp. Kết quả nghiên cứu (hình 1B) cho thấy, mật độ tế bào quá thấp ($OD_{600nm} = 0,2$) hoặc quá cao ($OD_{600nm} = 1,2$) cũng đều ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp protein tái tổ hợp. Điều này có thể do khi mật độ tế bào thấp, quá trình sinh tổng hợp chitinase được thực hiện liên tục, cơ chế trao đổi chất không đáp ứng đủ cho quá trình tổng hợp chitinase, do đó lượng protein chitinase sinh ra thấp. Hoạt tính enzyme đạt cao nhất (5,73 U/ml) khi mật độ tế bào $OD_{600nm}=0,7$. Kết quả khảo sát chỉ ra rằng, mật độ tế bào tại thời điểm cảm ứng thích hợp nhất cho tổng hợp protein rchiA của chủng tái tổ hợp là OD_{600nm} đạt từ 0,6-1,0 đơn vị, tối ưu ở mật độ 0,7.

Ảnh hưởng của chất cảm ứng lactose

Trong biểu hiện protein chitinase, có thể sử dụng lactose làm chất cảm ứng thay cho IPTG. Do khi có mặt lactose trong môi trường, *E. coli* sẽ sinh tổng hợp β -galactosidase chuyển hóa lactose thành glucose và galactose. Đồng thời β -galactosidase xúc tác chuyển hóa một phần đường lactose thành dạng allolactose. Allolactose là một đồng phân của lactose và có cấu trúc không gian tương tự như IPTG, có thể liên kết chất kim hãm operon, để operon thực hiện quá trình phiên mã (Gerd, 2005). Bên cạnh đó, IPTG được biết đến như chất gây ra gánh nặng trao đổi chất cho tế bào dẫn đến sự hình thành protein mục tiêu dạng kết cụm không hoạt động, gọi là thể vùi. Ngoài ra, lactose còn làm tăng mật độ tế bào, giảm sự hình thành thể vùi và tăng sự hình thành sản phẩm tái tổ hợp dạng tan (Bashir et al., 2015; Fruchtl et al., 2015). Mặt khác, lactose có giá thành thấp và *E. coli* có thể sử dụng làm nguồn các bon cho sinh trưởng nên có thể giảm chi phí sản xuất. Như vậy,

lactose được nghiên cứu như chất cảm ứng thay thế ITPG. Kết quả thể hiện trên hình 2 cho thấy, ở nồng độ lactose 7 mM mật độ tế bào đạt 4,34 đơn vị và hoạt tính chitinase đạt cao nhất là 5,71 U/ml, hoạt tính này thấp hơn không đáng kể so với khi cảm ứng bằng ITPG nồng độ 0,05 mM (hoạt tính 5,73 U/ml). Khi tăng nồng độ lactose lên 9 và 10 mM thì hoạt tính chitinase giảm nhẹ (5,6 và 5,5 U/ml), trong khi mật độ tế bào tăng nhẹ ($OD_{600nm} = 4,49$). Điều này có thể do β -galactosidase đã chuyển hóa một phần lactose thành glucose và galactose và *E. coli* đã sử dụng 2 loại đường này làm nguồn các bon cho sinh trưởng. Như vậy, có thể sử dụng lactose làm chất cảm ứng thay thế ITPG trong lên men sản

xuất chitinase tái tổ hợp và nồng độ lactose thích hợp trong khoảng 5-7 mM.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ lactose đến hoạt tính chitinase và sinh trưởng của chủng *E. coli* tái tổ hợp. Hoạt tính ChiA tái tổ hợp đạt cực đại ở 7 mM nồng độ chất cảm ứng lactose

Bảng 2. Kết quả của 20 thí nghiệm cho 3 yếu tố ảnh hưởng

STT	Lactose (mM)	Thời gian cảm ứng (giờ)	Mật độ tế bào (OD_{600nm})	Hoạt độ (U/ml)
1	7	6	0,6	4,66
2	6	14,04	0,8	5,15
3	5	6	1	3,4
4	5	12	0,6	2,41
5	4,31	9	0,8	1,71
6	6	9	0,8	7,3
7	6	9	0,46	4,43
8	6	9	0,8	7,55
9	6	9	0,8	7,4
10	7	6	1	5,56
11	6	9	0,8	7,5
12	7	12	0,6	5,68
13	5	6	0,6	1,76
14	6	9	0,8	7,31
15	7	12	1	5,7
16	6	9	0,8	7,15
17	6	9	1,13	4,2
18	7,68	9	0,8	6,8
19	5	12	1	3,32
20	6	3,95	0,8	4,85

Tối ưu khả năng sinh tổng hợp chitinase theo phương pháp bề mặt đáp ứng

Các kết quả trên cho thấy, thời gian cảm ứng, mật độ tế bào tại thời điểm cảm ứng và nồng độ chất cảm ứng lactose có ảnh hưởng lớn đến quá trình sinh tổng hợp protein ChiA tái tổ hợp. Tuy nhiên, những kết quả trên mới chỉ đánh giá được tác động độc lập của từng yếu tố

mà chưa đánh giá được tác động cộng hưởng, tương tác giữa các yếu tố với nhau. Với mục tiêu thu được protein ChiA có hoạt tính cao nhất, chúng tôi tìm sự tương tác đồng thời của các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sinh tổng hợp rchiA như đã trình bày trong phần phương pháp. Như vậy, ba yếu tố với tổng số 20 thí nghiệm được tiến hành. Mỗi thí nghiệm được

lặp lại 3 lần, kết quả thể hiện ở bảng 2.

Kết quả kiểm tra sự có ý nghĩa của các hệ số và sự thích ứng của mô hình bằng phân tích hồi quy trình bày ở bảng 3 cho thấy, giá trị p của mô hình <0,0001. Kết quả phân tích cho thấy, mô hình hoàn toàn có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 99,99%. Sự có ý nghĩa của các hệ số hồi quy được kiểm định bởi chuẩn F, các giá trị P

lớn hơn F ít hơn 0,05 cho biết mô hình có nghĩa. Trong trường hợp này các yếu tố A, B, C đều có $p < 0,05$ nên cả ba yếu tố này đều thể hiện là các yếu tố có tác động đến hoạt tính chitinase. Bảng 3 cũng cho thấy, sự kết hợp AB, BC không thể hiện rõ sự tác động, biểu hiện ở giá trị $P > 0,05$ tuy nhiên các yếu tố này vẫn được giữ trong mô hình để tiến hành tối ưu hóa.

Bảng 3. Kết quả phân tích hồi quy hoạt độ chitinase

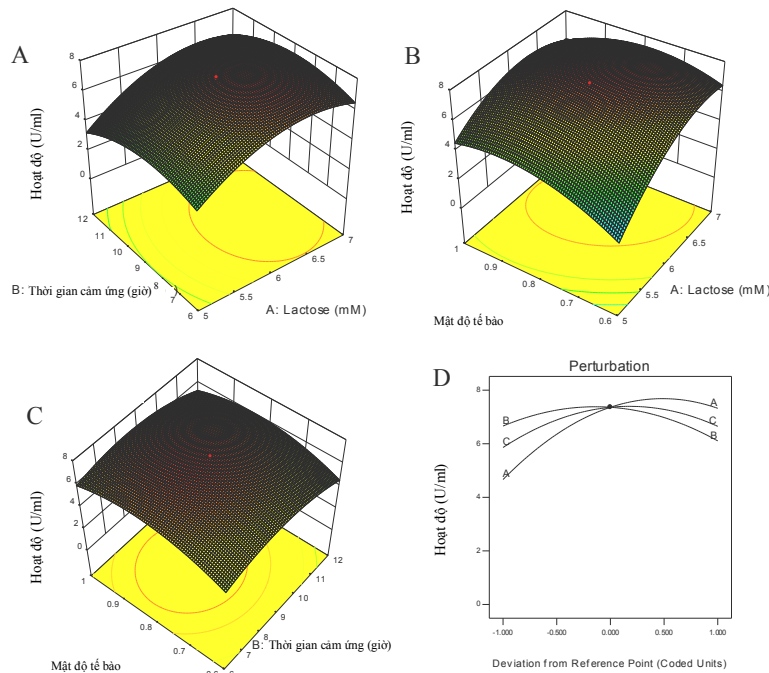
Thông số (Source)	Tổng phương sai (Sum of squares)	Bậc tự do (df)	Trung bình phương sai khác (Mean of square)	Chuẩn Fisher (F Value)	Giá trị P (Prob>F)
Mô hình	80,22	9	8,91	136,95	< 0,0001
A-Lactose	2,16	1	24,16	371,27	< 0,0001
B-Thời gian cảm ứng	1,05	1	1,05	16,12	0,0025
C-Mật độ tế bào	2,11	1	2,11	32,46	0,0002
AB	0,18	1	0,18	2,72	0,1301
AC	3,11	1	3,11	47,83	< 0,0001
BC	1,250E-005	1	1,250E-005	1,921E-004	0,9892
A ²	27,15	1	27,15	417,13	< 0,0001
B ²	13,79	1	13,79	211,87	< 0,0001
C ²	17,44	1	17,44	268,02	< 0,0001
Độ lệch thực nghiệm và mô hình	0,65	10	0,065		
Sự không tương thích mô hình	0,54	5	0,11	5,01	0,0508
Sai số	0,11	5	0,022		
Phương sai tổng	80,87	19			

Chuẩn F cho sự không tương thích của mô hình là 5,01 chứng tỏ sự không tương thích của mô hình là không có ý nghĩa, chỉ có 5,08 % (P = 0,0508) cơ hội xuất hiện lỗi do độ nhiễu gây nên. Sự không có ý nghĩa của giá trị không tương thích của mô hình cho thấy, mô hình hoàn toàn tương thích với thực nghiệm (Li et al., 2007). Như vậy, hoạt tính chitinase được biểu diễn bằng phương trình bậc 2 như sau:

$$\text{Hoạt độ chitinase} = - 89,43213 + 19,79515*A + 1,56811*B + 64,98013*C +$$

$$0,049583*AB - 3,11875*AC - 2,08333E-003*BC - 1,36811*A^2 - 0,10869*B^2 - 27,67398*C^2.$$

Nghiên cứu ảnh hưởng của từng yếu tố (khi các yếu tố khác giữ ở mức trung tâm) đến sinh tổng hợp chitinase (hình 3D) cho thấy, cả ba yếu tố này đều ảnh hưởng mạnh đến hoạt tính chitinase. Trong đó, mạnh nhất là nồng độ lactose, sau đó đến mật độ tế bào và cuối cùng là thời gian cảm ứng. Sự tương tác giữa nồng độ lactose và mật độ tế bào có ảnh hưởng nhiều nhất tới hoạt độ chitinase.



Hình 3. Bề mặt đáp ứng của từng cặp các yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp chitinase của chủng *E. coli* tái tổ hợp

A. Nồng độ lactose và thời gian cảm ứng thay đổi, mật độ tế bào cố định; B. Nồng độ lactose và mật độ tế bào thay đổi, thời gian cảm ứng cố định; C. Thời gian cảm ứng và mật độ tế bào thay đổi, nồng độ lactose cố định; D. Sự tác động đồng thời của cả 3 yếu tố.

Giải bài toán tối ưu bằng cách chấp mục tiêu theo thuật toán “hàm mong đợi” dùng phần mềm Design-Expert 10.1 với 100 phương án tối ưu được đưa ra. Phương án tối ưu nhất cho sinh tổng hợp chitinase của chủng *E. coli* tái tổ hợp là: nồng độ lactose 6,15 mM; thời gian cảm ứng 8,12 giờ và mật độ tế bào tại thời điểm cảm ứng là $OD_{600nm} = 0,87$ với giá trị chitinase theo tính toán đạt 7,49 U/ml. Để kiểm tra sự chính xác của mô hình, thí nghiệm xác nhận được tiến hành 3 lần. Kết quả cho thấy, hoạt độ chitinase theo thực nghiệm (7,54 U/ml) và mô hình (7,49 U/ml) không có sự chênh lệch lớn, như vậy, mô hình này phù hợp với thực nghiệm.

Kết quả trên cho thấy, nghiên cứu đánh giá sự tác động đồng thời của các yếu tố đến khả năng sản sinh chitinase của vi sinh vật nhằm tìm ra phương án tối ưu nhất là rất quan trọng. Nghiên cứu của tác giả Nawani & Kapadnis (2005) cho thấy, phương pháp bề mặt đáp ứng đã giúp làm tăng sự sản sinh chitinase của xạ khuẩn *Streptomyces* NK1057 lên 29%, cũng nhờ phương pháp bề mặt đáp ứng mà sự sản sinh chitinase của chủng *Lysinibacillus fusiformis* B-CM18 tăng 56,1 lần (Rajesh et al., 2012).

KẾT LUẬN

Công cụ thiết kế thí nghiệm tối ưu đa yếu tố theo phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) là công cụ mạnh trong việc tối ưu hóa giá trị các yếu tố làm cho hàm đáp ứng cực đại. Việc sử dụng các công cụ này cùng với phần mềm chuyên dụng Design expert giảm được thời gian tiêu tốn, giảm các thí nghiệm đồng thời có thể lựa chọn một trong những giải pháp tối ưu do phần mềm đề nghị.

Như vậy, sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng đã tìm được điều kiện lên men tối ưu để nâng cao khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng *E. coli* tái tổ hợp, bao gồm: nồng độ chất cảm ứng lactose 6,15 mM; thời gian cảm ứng 8,12 giờ và mật độ tế bào tại thời điểm cảm ứng là $OD_{600nm} = 0,87$ với giá trị chitinase theo tính toán đạt 7,49 U/ml. Khi lên men trong điều kiện tối ưu hoạt tính thực nghiệm đạt được 7,54 U/ml, tăng 1,32 lần so với trước tối ưu. Mặt khác sử dụng chất cảm ứng lactose thay thế cho ITPG vừa nâng cao được hiệu quả sản xuất enzyme của chủng tái tổ hợp, vừa hạ giá thành sản phẩm.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ về kinh phí của Nhiệm vụ Quỹ gen của Bộ Khoa học và Công nghệ: “Khai thác và phát triển nguồn gen diệt côn trùng của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phục vụ cho sản xuất chế phẩm sinh học”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bashir H., Ahmed N., Khan M. A., Zafar A. U., Tahir S., Khan M. I., Khan F., Husnain T., 2015. Simple procedure applying lactose induction and one-step purification for high-yield production of rhCIFN. *Biotechnol Appl Biochem.* doi:10.1002/bab.1426.
- Battestin V., Macedo G. A., 2007. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresour. Technol.*, 98(9): 1832-1837.
- Castillo E. D., 2007. Process Optimization A Statistical Approach. Springer Science. New York, USA: 118-122.
- Dagbagli S., Goksungur Y., 2008. Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. *Electron. J. Biotechnol.*, 11(4): 1-12.
- Gerd G., 2005. Production of recombinant proteins. Novel Microbial and Eucaryotic expression systems. Wiley-VCH, Weinheim, Germany
- Halder S. K., Maity C., Jana A., Pati B. R., Keshab C. M., 2012. Chitinolytic enzymes from the newly isolated *Aeromonas hydrophila* SBK1: Study of the mosquitocidal activity. *Biocontrol*, 57(3): 441-449.
- Trịnh Thị Thu Hà, Đồng Văn Quyên, Đặng Văn Tiến, Ngô Đình Bính, 2014. Phân lập gen mã hóa endochitinase từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* tại Hà Nội. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 12(4): 757-763.
- Han Y., Yang B., Zhang F., Miao X., Li Z., 2009. Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with south China sea sponge *Craniella Australiensis*. *Mar. Biotechnol.*, 11(1): 132-140.
- He Y. Q., Tan T. W., 2006. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. *J. Mol. Catal.*, 43(1-4): 9-14.
- Huang C. J., Wang T. K., Chung S. C., Chen C. Y., 2005. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Biochem. Mol. Biol.*, 38(1): 82-88.
- Ibrahim H. M., Yusoff W. M. W., Hamid A. A., Illias R. M., Hassan O., Omar O., 2005. Optimization of medium for the production of β -cyclodextrin glucanotransferase using central composite design (CCD). *Process. Biochem.*, 40(2): 753-758.
- Li Y., Liu Z., Zhao H., Xu Y. and Cui F., 2007. Statistical optimization of xylanase production from new isolated *Penicillium oxalicum* ZH-30 in submerged fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 34(1): 82-86.
- Lobo M. D., Silva F. D., Landim P. G., da Cruz P. R., de Brito T. L., de Medeiros S. C., Oliveira J. T., Vasconcelos I. M., Pereira H. D., Grangeiro T. B., 2013. Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.*, 13:46. doi: 10.1186/1472-6750-13-46.
- Manera A. P., Ores J. C., Ribeiro V. A., Burkert C. A. V., Kalil S. J., 2008. Optimization of the Culture Medium for the Production of β -Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. *Food Technol. Biotechnol.*, 46(1): 66-72.
- Mehtap D., İsmail D., Kazım S., Hacer M., Remziye N., 2015. Cloning and expression of chitinase A, B, and C (*chiA*, *chiB*, *chiC*) genes from *Serratia marcescens* originating from *Helicoverpa armigera* and determining their activities. *Turk. J. Biol.*, 39: 78-87. doi: 10.3906/biy-1404-31.
- Nawani N. N., Kapadnis B. P., 2005. Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs. *Process. Biochem.*, 40(2): 651-660.
- Rajesh K. S., Kumar D. P., Solanki M. K., Singh P., Srivastva A. K., Kumar S.,

- Kashyap P. L., Saxena A. K., Singhal P. K., Arora D. K., 2013. Optimization of media components for chitinase production by chickpea rhizosphere associated *Lysinibacillus fusiformis* B-CM18. J. Basic Microb., 53(5): 451-460. doi: 10.1002/jobm.201100590.
- Shojaosadati S. A., Kolaei S. M. V., Babaeipour V., Farnoud A. M., 2008. Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. Iranian J. Biotechnol., 6(2): 63-77.
- Songsiriritthigul C., Lapboonrueng S., Pechsrichuang P., Pesatcha P., Yamabhai M., 2010. Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste. Bioresour. Technol., 101: 4096-4103. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.036
- Uma Maheswar Rao J. L., Satyanarayana T., 2007. Improving production of hyperthermostable and high maltose-forming α -amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology and its applications. Bioresource Technol., 98(2): 345-352.
- Wang S. L., Chao C. H., Liang T. W., Che C. C., 2009. Purification and characterization of protease and chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and conversion of marine wastes by these enzymes. Mar. Biotechnol., 11(3): 334-344.

OPTIMIZATION AND IMPROVEMENT OF RECOMBINANT CHITINASE BIOSYNTHESIS IN *E. coli* USING RESPONSE SURFACE METHOD

Trinh Thi Thu Ha^{1,2}, Dong Van Quyen^{1,2}, Ngo Dinh Binh^{1*}

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Graduate University of Science and Technology, VAST

SUMMARY

Chitinases (EC 3.2.1.14) are enzymes that degrade chitin. These enzymes are gaining importance for their wide-ranging applications including the preparation of pharmaceutically important chitooligosaccharides and N-acetyl D glucosamine, preparation of single-cell protein, isolation of protoplasts from fungi and yeast, control of pathogenic fungi, treatment of chitinous waste, mosquito control and morphogenesis and especially in agriculture fields to control pathogens. Previously, we have cloned *chiA* gene encoding chitinase for overexpression in *E. coli*. Herein, we optimized the expression conditions for improvement of chitinase biosynthesis in recombinant *E. coli* strain using response surface method (RSM) based on Design-Expert 10.1 software (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA). Fermentation conditions such as inducer concentrate, induction time and cell density at the time of induction and their effects on the chitinase biosynthesis were investigated. The RMS analysis suggested that the optimal conditions for production of recombinant ChiA are at lactose concentration of 6.15 mM, 8.12 hours after induction and cell density $OD_{600nm} = 0.87$ with predicted enzyme activity of 7.49 U/ml. The model obtained was used for fermentation of recombinant strain and the real chitinase activity achieved 7.54 U/ml which is 1.32 times higher compared to that of the pre-optimization (5.71 U/ml). The RSM was found to be useful in optimizing and determining the interactions among process variables in ChiA enzyme production. Our data also indicated that using lactose as the inducer instead of IPTG for ChiA expression can also reduce product costs.

Keywords: *E. coli*, chitinase production, recombinant, expression condition optimization, response surface method.

Citation: Trinh Thi Thu Ha, Dong Van Quyen, Ngo Dinh Binh, 2018. Optimization and improvement of recombinant chitinase biosynthesis in *E. coli* using response surface method. Tạp chí Sinh học, 40(1): 115-123. DOI: 10.15625/0866-7160/v40n1.10495.

**Corresponding author:* binh.gen@gmail.com

Received 5 July 2017, accepted 20 November 2017