

KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY ĐẾN BIỂU HIỆN CHITINASE TÁI TỔ HỢP TRONG TẾ BÀO *ESCHERICHIA COLI*

Huỳnh Nguyễn Tố Uyên¹, Đỗ Thị Tú Oanh¹, Nguyễn Thị Huyền¹, Trần Minh Định¹

Ngày nhận bài: 09/11/2022; Ngày phản biện thông qua: 09/12/2022; Ngày duyệt đăng: 31/03/2023

TÓM TẮT

Enzyme chitinase 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. Nghiên cứu này nhằm mục đích lựa chọn được điều kiện nuôi cấy thích hợp để cải thiện mức độ biểu hiện chitinase tái tổ hợp trong tế bào chủ *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL. Nghiên cứu này sử dụng phương pháp nuôi cấy và tách chiết thu nhận chitinase tái tổ hợp, xác định hoạt tính chitinase và điện di SDS-Page kiểm tra khả năng biểu hiện gen mã hóa cho enzyme chitinase. Các điều kiện về loại môi trường, pH, nhiệt độ, tốc độ lắc, nồng độ chất cảm ứng và thời gian cảm ứng đã được khảo sát. Kết quả cho thấy, môi trường nuôi cấy thích hợp là môi trường LB cải tiến (bổ sung 1,5 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $MgSO_4$) với hoạt tính chitinase đạt 0,086 U/mL, pH từ 6 - 7 cho khả năng biểu hiện gen tốt nhất, tốc độ lắc 150 vòng/phút. Nồng độ chất cảm ứng Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) thích hợp là 0,1 mM tại 15°C, thời gian cảm ứng thích hợp từ 16 - 24 giờ.

Từ khóa: điều kiện nuôi cấy, chitinase tái tổ hợp, *Escherichia coli*.

1. MỞ ĐẦU

Enzyme chitinase (EC 3.2.1.14) phân hủy chitin bằng việc thủy phân liên kết β -1,4 giữa các N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), được tìm thấy ở rất nhiều tổ chức sống như vi khuẩn, nấm, côn trùng... 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 (Han et al., 2009). Để phát triển tác nhân sinh học mới thay thế thuốc hóa học trong kiểm soát nấm bệnh hại cây trồng, chúng tôi tập trung nghiên cứu vi khuẩn sinh chitinase. Một trong số đó, chủng *Bacillus velezensis* RB.IBE29 trước đây là *Bacillus velezensis* DS29 được báo cáo là một tác nhân kiểm soát sinh học mạnh với hoạt tính chitinase cao được phân lập từ thân rễ của hạt tiêu đen trồng ở Tây Nguyên, Việt Nam (Trinh et al., 2019). *B. velezensis* RB.IBE29 sở hữu 2 chitinase thuộc họ 18 và một protein có hoạt tính phụ trợ họ AA10, trong đó, chitinase A đã được tạo dòng và biểu hiện thành công trong tế bào *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL bằng cách sử dụng vectơ biểu hiện pCold II. Enzyme chitinase A tái tổ hợp tinh sạch có hoạt tính ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm *Fusarium falciforme* và sự nở trứng của tuyến trùng đốt rễ (*Meloidogyne* spp.), đây là các tác nhân chính gây bệnh trên cây hồ tiêu ở Tây Nguyên (Tran et al., 2022). Đối với gen mã hóa cho chitinase B ở *B. velezensis* RB.IBE29 đã được nhận diện, tạo dòng và phân tích. ORF (open reading frame) của *chiB* gồm 1.263 bp, mã hóa protein (BvChiB) dài 420

aa với khối lượng 47,59 kDa (Vu et al., 2021). Gen chitinase B cũng được tạo dòng trong tế bào *E. coli* (DH5 α) và biểu hiện trong tế bào *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIPL nhờ vector pCold II. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, các gen tái tổ hợp không biểu hiện được trong tế bào nhận, hoạt tính của enzyme tái tổ hợp chưa được khảo sát. Một số thành phần muối khoáng như $MgSO_4$ và KH_2PO_4 ảnh hưởng tới khả năng sinh tổng hợp chitinase của vi sinh vật (Khan et al., 2010). Các thành phần môi trường cho các nguồn nitơ và carbon ảnh hưởng đến sản xuất chitinase ngoại bào, sản xuất chitinase cũng bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố vật lý như pH, độ thoáng khí và nhiệt độ (Bhushan, 1998). Tuy nhiên các công bố về ảnh hưởng của thành phần môi trường và các điều kiện nuôi cấy chitinase tái tổ hợp trong tế bào *E. coli* vẫn còn hạn chế.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự biểu hiện gen mã hóa cho enzyme chitinase tái tổ hợp trong tế bào *E. coli*.

- Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) đến việc tăng cường sinh tổng hợp chitinase tái tổ hợp trong tế bào *E. coli*.

- Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến sự biểu hiện gen mã hóa cho enzyme chitinase tái tổ hợp trong tế bào *E. coli* (pH, tốc độ lắc, thời gian

¹Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên;

Tác giả liên hệ: Huỳnh Nguyễn Tố Uyên; Tel: 0377478679; Email: hntuyen@ttn.edu.vn.