

TẠO DÒNG GEN MÃ HÓA CHITINASE 42 kDa CỦA *TRICHODERMA ASPERELLUM* VÀ DỰ ĐOÁN ĐẶC TÍNH CỦA ENZYME

Phùng Thị Bích Hòa¹, Mai Thị Thu Hiền², Nguyễn Hoàng Tuệ³, Nguyễn Tý¹, Nguyễn Thị Kim Co¹,
Nguyễn Xuân Huy^{1,4*}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế, 34 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

²Trường THCS Lê Lợi, Ngũ Hành Sơn, Đà Nẵng, Việt Nam

³Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

⁴Đại học Huế, 03 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Nguyễn Xuân Huy <nguyensexuanhuy@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 04-04-2021; Ngày chấp nhận đăng: 24-06-2021)

Tóm tắt. Chitinase là enzyme xúc tác thủy phân chitin bằng cách phân cắt liên kết 1,4-N-acetyl- β -glucosaminide. Chitinase được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau, đặc biệt trong kiểm soát dịch bệnh, giảm thiểu ô nhiễm, nghiên cứu sinh học cơ bản và ứng dụng. Nguồn thu nhận chitinase chủ yếu là từ vi sinh vật, điển hình từ các chủng nấm *Trichoderma*. Gen mã hóa chitinase 42 kDa (*chi42*) của *Trichoderma asperellum* SH16 sau khi tạo dòng vào vector pUC19 được ghép nối thành công vào vector pQE30 để biểu hiện ở *E. coli* M15. Chitinase là enzyme ngoại bào. Cấu trúc bậc 2 của chitinase bao gồm 15 chuỗi xoắn α và 13 phiến β với cấu trúc không gian tương đồng cao với enzyme thủy phân chitin ở *T. harzianum*. Chitinase có khả năng chịu nhiệt độ cao hơn 65 °C và hoạt tính xúc tác mang tính acid. Kết quả nghiên cứu là cơ sở cho các nghiên cứu biểu hiện và sản xuất enzyme tái tổ hợp.

Từ khóa: Chitinase 42 kDa, đặc tính, tạo dòng, *Trichoderma asperellum*

Cloning and characteristic prediction of 42 kDa chitinase from *trichoderma asperellum*

Phung Thi Bích Hoa¹, Mai Thi Thu Hien², Nguyen Hoang Tue³, Nguyen Ty¹, Nguyen Thi Kim Co¹,
Nguyen Xuan Huy^{1,4*}

¹ Faculty of Biology, University of Education, Hue University, 34 Le Loi St., Hue, Viet Nam,

² Le Loi Secondary School, Ngu Hanh Son, Da Nang, Vietnam

³ Faculty of Biology, University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue St., Hue, Vietnam

⁴ Hue University, 03 Le Loi St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Xuan Huy <nguyensexuanhuy@hueuni.edu.vn>

(Received: 04 April 2021; Accepted: 24 June 2021)

Abstract. Chitinase is an enzyme that catalyzes the hydrolytic reaction of chitin by cleaving 1,4-N-acetyl- β -glucosaminide linkages. Chitinase has been widely used in various fields, especially pest control, pollution reduction, and basic and applied biology. Chitinase from microorganisms is an essential source, typically from *Trichoderma*. After removing intron sequences, the gene encoding chitinase 42 kDa (*chi42*) from *Trichoderma asperellum* SH16 was synthesized and cloned into the pUC19 vector. The gene

chi42 digested by *Bam*HI and *Sac*I was successfully cloned into the pQE30 vector, which was expressed in *E. coli*. The primary *in silico* analysis of the protein structure shows that chitinase is an extracellular protein. The secondary structure analysis reveals that chitinase has 15 α helices and 13 β sheets, while the dimension structure of chitinase is highly homological with the chitin hydrolytic enzyme from *T. harzianum*. The chitinase from *T. asperellum* is resistant to temperatures higher than 65 °C and exhibits acidic catalysis activity. Our results would provide basic information for heterologous expression and scale-up production of chitinase 42 kDa.

Keywords: Chitinase 42 kDa, cloning, characteristic, *Trichoderma asperellum*

1 Đặt vấn đề

Chitinase hay còn gọi là poly *beta*-1,4-poly-*N*-acetyl glucosamidinase (EC 3.2.1.14) là enzyme thuộc nhóm thủy phân (hydrolase), xúc tác thủy phân chitin thành các đơn phân *N*-acetyl glucosamine, chitobiose hay chitotriose bằng cách phân cắt liên kết 1,4-*N*-acetyl- β -glucosaminide của chitin [1]. Chitin là một trong những polysaccharide phổ biến trong tự nhiên [2] và là polysaccharide được tạo thành nhờ liên kết β -1,4 của các đơn phân *N*-acetylglucosamine(2-acetamido-2-deoxy-D-glucose) [3].

Chitinase được tổng hợp từ rất nhiều nguồn sinh vật khác nhau trong tự nhiên. Trong đó, vi sinh vật là nguồn cung cấp chitinase nhiều hơn so với động vật và thực vật [4]. Chitinase được chia thành hai họ: chitinase 18 và chitinase 19 dựa trên sự tương đồng về trình tự amino acid. Họ chitinase 18 cắt liên kết β -1,4-glycoside của không chỉ GlcNAc-GlcNAc mà còn GlcNAc-GlcN, còn họ chitinase 19 phân cắt liên kết GlcNAc-GlcNAc và GlcNAc-GlcN [5, 6].

Nấm *Trichoderma* là tác nhân kiểm soát sinh học hiệu quả nhờ khả năng kháng lại các loài vi nấm gây hại cây trồng bằng nhiều cơ chế khác nhau. Cơ chế tiết enzyme ngoại bào của *Trichoderma*, đặc biệt là chitinase, đóng vai trò quan trọng trong việc làm tan vách tế bào của các loài nấm khác [7]. Trong số các gen mã hóa chitinase của nấm *Trichoderma*, gen *chi42* mã hóa chitinase 42 kDa của *Trichoderma asperellum* thuộc nhóm endochitinase, là nhóm enzyme được quan tâm và nghiên cứu chi tiết hơn cả vì tính đa dạng, sự xuất

hiện thường xuyên khi nuôi cảm ứng với cơ chất chứa chitin và khả năng ứng dụng trong kiểm soát sinh học trong hệ enzyme thủy phân chitin [8-10].

Trong nghiên cứu này, gen *chi42* từ chủng nấm *T. asperellum* SH16 được tổng hợp và tạo dòng vào vector pQE30 để biểu hiện ở *E. coli*. Đặc tính chitinase được dự đoán bằng cách sử dụng công cụ tin sinh. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở quan trọng cho các nghiên cứu sâu hơn về biểu hiện tái tổ hợp dị chủng và nghiên cứu các đặc tính của enzyme tinh chế cho các ứng dụng khác nhau.

2 Đối tượng và phương pháp

2.1 Đối tượng

Gen *chi42* mã hóa chitinase từ nấm *T. asperellum* SH16 (GenBank: HM191683.1) sau khi loại bỏ các đoạn intron được tổng hợp ở công ty TNHH MTV Hóa Sinh Phù Sa, Việt Nam (PHUSA Biochem, Việt Nam); sau đó được gắn vào vector tạo dòng pUC19 (Takara Bio Inc.) và biến nạp vào tế bào *E. coli* Top10.

Vector biểu hiện pQE30 (Qiagen, Đức) [11] và chủng vi khuẩn *E. coli* M15 do phòng thí nghiệm Viện Nghiên cứu hoạt chất Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế cung cấp.

2.2 Phương pháp

Ghép nối gen *chi42* vào vector biểu hiện

Gen *chi42* của *T. asperellum* SH16 sau khi tổng hợp được ghép nối vào vector pUC19. Tế bào *E. coli* TOP10 khả biến được sản xuất theo phương

pháp sử dụng CaCl_2 [12]. Vector pUC19 mang gen *chi42* (pUC/*chi42*) được biến nạp vào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt [13]. Tế bào *E. coli* TOP10 mang vector pUC/*chi42* sau khi biến nạp được chọn lọc trên môi trường Luria-Bertani (LB) rắn có bổ sung 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin (Amp) trong 16 giờ ở 37 °C. Plasmid tái tổ hợp được tách chiết và kiểm tra bằng phương pháp ly giải kiềm [14] hoặc bằng GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Trình tự DNA chính xác của gen *chi42* được xác nhận bằng phương pháp giải trình tự cải tiến BigDye® Terminator v.3.1 của công ty First BASE, Malaysia, với hai mồi M13-F: 5'-TGTAACGACGGCCAGT- 3' và M13-R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'. Trình tự DNA được phân tích bằng phần mềm CLC sequence 8 (<https://clc-sequence-viewer.software.informer.com/8.0/>). Gen *chi42* và vector pQE30 lần lượt được cắt bằng enzyme hạn chế *Bam*HI và *Sac*I (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Tinh chế sản phẩm DNA bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Gen *chi42* được gắn vào vector pQE30 bằng T4 Ligase (Promega, Mỹ) và hỗn hợp được trộn đều và ủ ở 16 °C qua đêm. Dung dịch phản ứng gắn pQE30/*chi42* được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 khả biến. Thể biến nạp được chọn lọc trên môi trường LB rắn có bổ sung 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp trong 16 giờ ở 37 °C. Sau đó, kiểm tra sự có mặt của đoạn chèn trong vector tái tổ hợp pQE30/*chi42* bằng phản ứng cắt với cặp enzyme *Bam*HI và *Sac*I. Gen mã hóa chitinase sau khi tạo dòng thành công được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* M15 để biểu hiện protein tái tổ hợp. Thể biến nạp được chọn lọc trên môi trường LB rắn có bổ sung 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin (Km) và 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp. Khuẩn lạc *E. coli* M15 mang plasmid pQE30/*chi42* trên đĩa nuôi cấy được kiểm tra bằng phương pháp ly giải kiềm [13]. Plasmid pQE30/*chi42* được cắt kiểm tra bằng hai enzyme *Bam*HI và *Sac*I.

Phân tích khả năng glycosyl hóa kiểu N của chitinase

Các vị trí amino acid tham gia quá trình glycosyl hóa ở giai đoạn hoàn thiện sau dịch mã được xác định theo như mô tả của Gavel và cs. [14]. Phân tích khả năng glycosyl hóa kiểu N(N-glycosylation) của chitinase bằng phần mềm NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Dự đoán cấu trúc không gian và vị trí gắn cơ chất của chitinase

Cấu trúc không gian và vị trí gắn cơ chất của chitinase 42 kDa được dự đoán bằng phần mềm Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) [15]. Kết quả dự đoán về hình ảnh, các liên kết và cấu trúc không gian ba chiều được mô phỏng theo cơ sở dữ liệu Protein (Scop) hoặc Ngân hàng dữ liệu Protein (PDB).

Dự đoán khả năng chịu nhiệt của chitinase

Khả năng chịu nhiệt của chitinase 42 kDa được dự đoán bằng phần mềm Tm Predictor của Taiwan Bioinformatics Institute - TBI (<http://140.114.98.13/tm/>). Khả năng chịu nhiệt của enzyme được dự đoán dựa trên nguyên tắc tương đồng với các số liệu của 150.000 protein chịu nhiệt khác nhau trong ngân hàng NCBI ở ba mức: trên 65 °C, 55–65 °C và dưới 55 °C [16].

Dự đoán môi trường hoạt động xúc tác của chitinase

Khả năng xúc tác kiềm/acid của chitinase được dự đoán bằng phần mềm AcalPred (<http://lin.uestc.edu.cn/server/AcalPred>). Phần mềm này dựa trên các thông tin theo thứ tự tổ hợp nhiều chỉ số khác nhau của các protein đã nghiên cứu thực nghiệm bao gồm: thành phần các amino acid, chỉ số GO (Gene ontology), nhóm các amino acid được bảo tồn, giá trị của điện tích... Các chỉ số này sẽ là cơ sở để thiết kế vector SVM (Support Vector Machine) làm chỉ số tham chiếu với mẫu phân tích [17, 18].

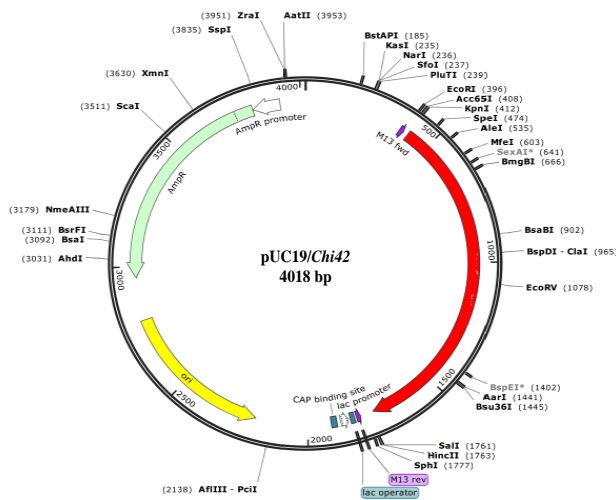
3 Kết quả và thảo luận

3.1 Tổng hợp và tạo dòng gen *chi42* vào vector biểu hiện trong *E. coli*

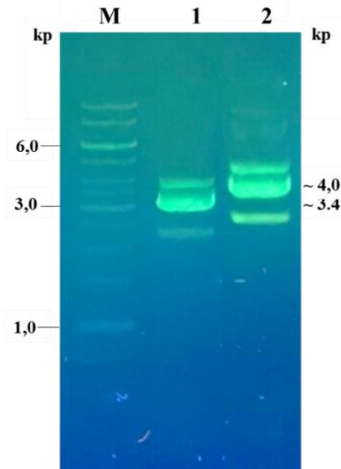
Gen *chi42* mã hóa chitinase từ nấm *T. asperellum* SH16 được tổng hợp sau khi loại bỏ các đoạn intron, ghép nối vào vector tạo dòng pUC19 (Hình 1) và biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10.

Thể biến nạp *E. coli* mang vector pUC19/*chi42* và vector pQE30 lần lượt được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường LB lỏng có bổ sung 50 µg/mL Amp để tách chiết plasmid. Kết quả giải trình tự gen *chi42* cho thấy sự tương đồng 100% so với trình tự nucleotide mã số HM191683.1 trên GenBank.

Plasmid pUC19/*chi42* và pQE30 được tách chiết và điện di trên gel agarose 0,8%. Plasmid pUC19/*chi42* và pQE30 thu được lần lượt có chiều dài 4018 bp và 3461 bp (Hình 2).

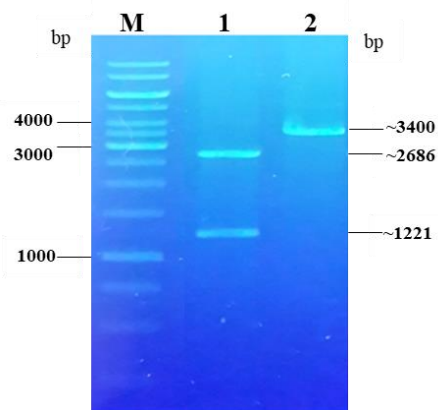


Hình 1. Vector pUC19 mang gen *chi42* (màu đỏ); *AmpR*: gen kháng ampicillin (màu xanh lục); *ori*: vùng khởi đầu sao chép (màu vàng); *lacZ*: gen mã hóa β -galactosidase; các vị trí nhận diện enzyme cắt hạn chế



Hình 2. Hình ảnh điện di plasmid pUC19/*chi42* và pQE30; M: kích thước thang DNA 1 kb chuẩn (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); 1: plasmid pQE30; 2: plasmid pUC19/*chi42*

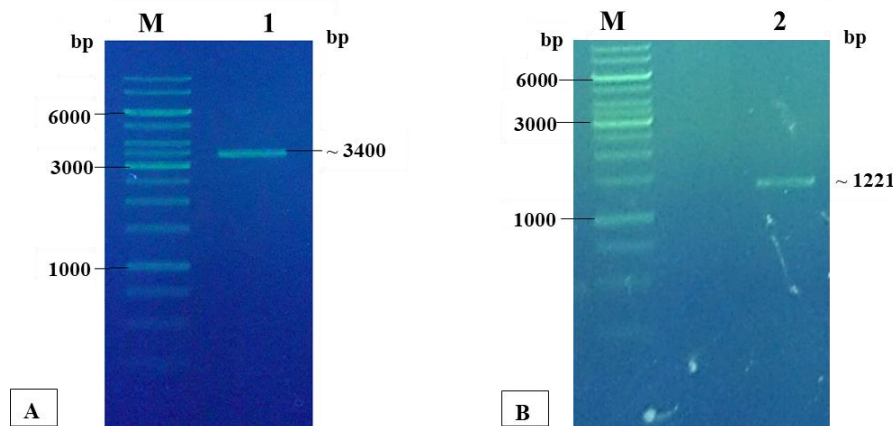
Plasmid pUC19/*chi42* và pQE30 lần lượt được cắt mở vòng đồng thời bằng hai enzyme hạn chế *Bam*HI và *Sac*I. Sản phẩm cắt sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% (Hình 3). Kết quả cho thấy phản ứng cắt mở vòng xảy ra, xuất hiện 2 băng DNA, trong đó băng trên ở vị trí khoảng 2686 bp phù hợp với kích thước của vector pUC19, băng dưới có kích thước khoảng 1221 bp tương đương với kích thước gen *chi42*. Phản ứng cắt vector pQE30 cho kết quả băng ở vị trí khoảng 3400 bp phù hợp với kích thước của vector pQE30.



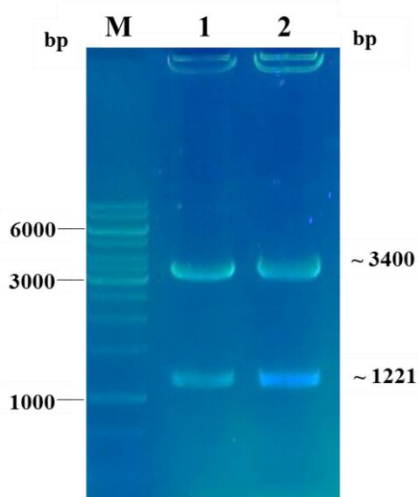
Hình 3. Hình ảnh điện di gel agarose 1% sản phẩm cắt các plasmid pUC19/*chi42* và pQE30 bằng *Bam*HI và *Sac*I M: kích thước thang DNA 1 kb chuẩn (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); 1: gen *chi42* + vector pUC19; 2: vector pQE30

Độ tinh khiết của đoạn gen *chi42* và vector pQE30 được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% (Hình 4). Gen *chi42* và vector pQE30 sau khi tinh sạch được nối bằng enzyme T4 ligase (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) tạo thành vector tái tổ hợp pQE30/*chi42* và biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10. Kết quả kiểm tra cho thấy có sự xuất hiện các băng

có kích thước phù hợp với vector pQE30 (3400 bp) và gen *chi42* (1221 bp) (Hình 5). Kết quả này cho thấy đoạn gen *chi42* đã được tạo dòng thành công vào vector pQE30 trong *E. coli* TOP10. Plasmid pQE30/*chi42* sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* M15 để biểu hiện protein tái tổ hợp (Hình ảnh không trình bày).



Hình 4. Hình ảnh điện di vector pQE30 (A) và đoạn gen *chi42* (B) thu hồi từ gel tinh sạch sản phẩm cắt hạn chế bằng *Bam*HI và *Sac*I; M: kích thước thang phân tử 1 kb chuẩn (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); 1: Vector pQE30, 2: đoạn gen *chi42*.



Hình 5. Hình ảnh điện di sản phẩm của phản ứng cắt hạn chế pQE30/*chi42* từ các thể biến nạp bằng *Bam*HI và *Sac*I; M: kích thước thang DNA 1 kb chuẩn (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); 1 - 2: plasmid tách từ các thể biến nạp pQE30/*chi42*

3.2 Khả năng glycosyl hóa kiểu N

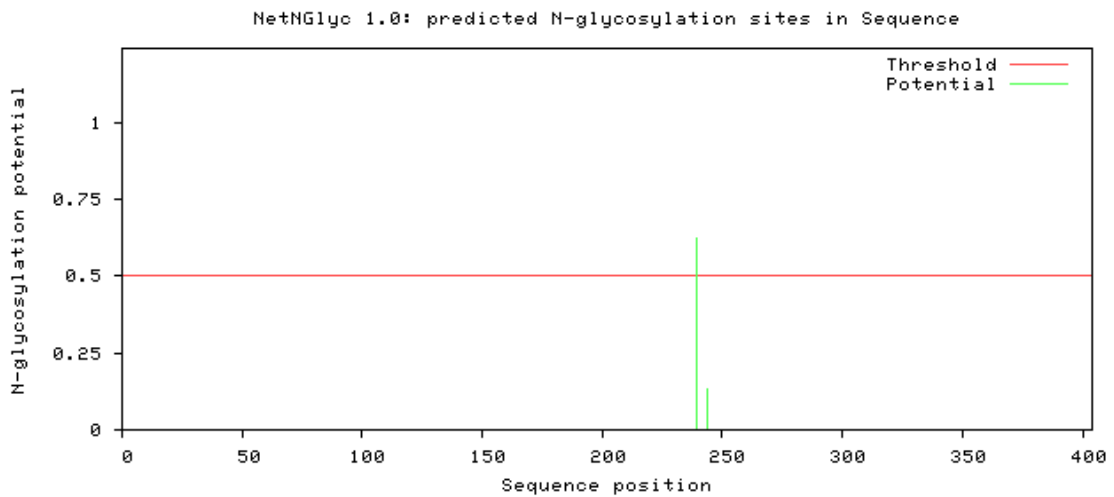
Quá trình glycosyl hóa (glycosylation) là quá trình gắn các carbohydrate vào protein có thể cùng lúc với quá trình dịch mã hoặc sau dịch mã. Các protein tiết ra ngoại bào thường được glycosyl hóa. Mối tương quan giữa đặc điểm chức năng và cấu trúc của protein có vai trò rất quan trọng; do đó, việc xác định cấu trúc glycan và vị trí glycosyl hóa trong phân tử protein là rất cần thiết đối với các nhà nghiên cứu và các nhà dược học nhằm chứng minh sản phẩm biểu hiện có trải qua các cải biến này hay không. Trong đó, khả năng glycosyl hóa kiểu N là phổ biến nhất và xảy ra khi các oligosaccharide liên kết với nitơ của nhóm amide trong Asn-X-Ser/Thr, trong đó X là bất kỳ amino acid (aa) nào trừ proline [14]. Gen *chi42* mã hóa enzyme có chiều dài 405 aa. Phân tích trình tự chitinase 42 kDa dự đoán có 2 vị trí aa có khả năng xảy ra N-glycosylation là vị trí 239 và 244 (Hình 6). Chitinase có khả năng được glycosyl hóa kiểu N

trước khi gấp hoàn toàn và tiết ra môi trường. Để đảm bảo cấu trúc và hoạt động của chitinase tái tổ hợp, tế bào vật chủ *E. coli* cần được thiết kế quá trình glycosyl hóa kiểu N để sản xuất các trimannosyl chitobiose glycans sinh vật nhân chuẩn và chuyển các phân tử glycans này đến các gốc asparagine đặc biệt ở protein đích [19].

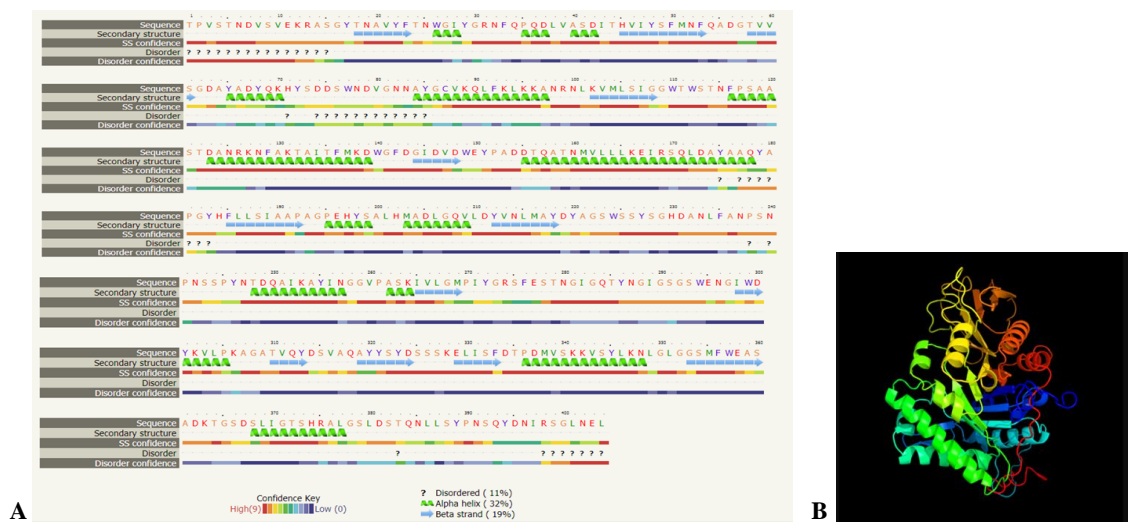
3.3 Dự đoán cấu trúc không gian và vị trí gắn cơ chất

Kết quả sử dụng phần mềm phân tích cấu

trúc protein tương đồng và nhận diện các vùng chức năng cho thấy chitinase 42 kDa có cấu trúc tương tự với chitinase ở *T. harzianum* với độ tin cậy 100%. Dựa trên cấu trúc không gian của chitinase của *T. harzianum* (mã số PDB: c6epbA), cấu trúc bậc hai và mô hình cấu trúc không gian của chitinase 42 kDa đã được dự đoán và trình bày ở Hình 7. Cấu trúc bậc hai của chitinase 42 kDa có 15 vị trí gấp cuộn xoắn α và 13 vị trí gấp cuộn phiến β (Hình 7A). Cấu trúc phiến β được trình bày bằng hình mũi tên dạng lát mỏng; cấu trúc cuộn xoắn α được trình bày bằng hình lát mỏng dạng cuộn (Hình 7B).



Hình 6. Dự đoán hai vị trí aa 239 và 244 có khả năng xây ra N-glycosylation



Hình 7. Cấu trúc bậc 2 (A) và mô hình cấu trúc không gian 3 chiều (B) của chitinase 42 kDa từ *T. asperillum*

3.4 Dự đoán khả năng chịu nhiệt

Kết quả dự đoán khả năng chịu nhiệt của chitinase 42 kDa bằng phần mềm Tm Predictor cho thấy chitinase có khả năng chịu nhiệt độ cao hơn 65 °C. So sánh với một số chitinase từ các chủng nấm sợi khác như *Penicillium* sp. LYG 0704 [21], *Aspergillus carneus* hoạt động tối ưu ở 40 °C [21] và *Penicillium aculeatum* ở 50 °C [22]. Hầu hết các enzyme sẽ bị giảm hoặc mất hoạt tính khi nhiệt độ phản ứng tăng cao trừ các enzyme chịu nhiệt. Do đó, các nhà nghiên cứu đặc biệt quan tâm đến các loại enzyme có khả năng chịu nhiệt cao vì các enzyme này thường có tốc độ phản ứng nhanh và khả năng bị biến tính thấp ở nhiệt độ cao. Như vậy, với khả năng hoạt động ở nhiệt độ cao, chitinase 42 kDa thích hợp để thủy phân các sản phẩm chitin trong điều kiện cần gia nhiệt với tốc độ phản ứng lớn, đặc biệt dùng phân hủy các chất thải trong lĩnh vực chế biến thủy sản cũng như ứng dụng trong ngăn cản sự xâm nhập gây bệnh của nhóm vi sinh vật chịu nhiệt. Đồng thời, kết quả này là cơ sở để lựa chọn mức nhiệt độ thích hợp nhằm kiểm tra hoạt tính enzyme.

3.5 Dự đoán môi trường xúc tác

Dựa vào phần mềm dự đoán khả năng chịu được môi trường xúc tác kiềm/acid của AcalPred, chúng tôi nhận thấy chitinase có khả năng chịu acid. Chỉ số xúc tác mang tính acid lên đến 0,9977; trong khi đó, chỉ số kiềm chỉ là 0,0023. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Thị Hà khi tác giả nhận thấy hoạt tính của chitinase được phân lập từ chủng *Aspergillus protuberus* giảm mạnh khi môi trường phản ứng mang tính kiềm [22]. Tương tự với nghiên cứu của Sherief và cs., chitinase của nấm hoạt động tối ưu trong môi trường acid [23].

4 Kết luận

Chúng tôi đã tạo dòng thành công gen *chi42* mã hóa chitinase vào vector biểu hiện pQE30 ở *E. coli*. Kết quả phân tích đặc tính protein *in silico* cho

thấy chitinase 42 kDa của *T. asperellum* SH16 được dự đoán có khả năng xảy ra N-glycosyl hóa tại vị trí aa 239 và aa 244; cấu trúc và chức năng của enzyme tương tự với chitinase của *T. harzianum*. Enzyme của *T. asperellum* có khả năng hoạt động tốt ở môi trường acid và chịu nhiệt độ cao hơn 65 °C.

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này được Đại học Huế tài trợ qua đề tài khoa học và công nghệ mã số DHH2019-03-119; NCS. Phùng Thị Bích Hòa được tài trợ bởi Tập đoàn Vingroup – Công ty CP và hỗ trợ bởi chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VinBigdata), mã số VINIF.2020.TS.111.

Tài liệu tham khảo

1. Jollès P, Muzzarelli RA. *Chitin and Chitinases*. Basel: Birkhäuser; 1999.
2. Castro SPM, Paulín EGL. The Complex World of Polysaccharides [internet]. Rijeka: InTech; 2012. Chapter 1, Is Chitosan a New Panacea? Areas of Application. p. 1-46.
3. Catalli A, Kulka M. Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery. 2010;4(3):175-189.
4. Hiệp ĐM, Hồng PTA, Thắng NT, Suong NK. Báo cáo Hội nghị khoa học Các biện pháp phòng trừ sâu bệnh không gây ô nhiễm môi sinh, Hồ Chí Minh: Nxb Nông nghiệp; 2007. Khảo sát khả năng đối kháng *in vitro* của các chủng nấm *Trichoderma* đối với 3 loại nấm gây bệnh cây trồng (*Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora palmivora*). p. 84-90.
5. Mitsutomi M, Ohtakara A, Fukamizo T, Goto S. Action pattern of *Aeromonas hydrophila* chitinase on partially N-acetylated chitosan. Agricultural and Biological Chemistry. 1990;54(4):871-877.
6. Ohtakara A, Matsunaga H, Mitsutomi M. Action pattern of *Streptomyces griseus* chitinase on partially N-acetylated chitosan. Agricultural and Biological Chemistry. 1990; 54(12):3191-3199.

7. Huy ND, Nguyên PQ, Hồng NTT, Giang H, Viên NV, Cảnh NT. Phân lập và đánh giá khả năng đối kháng của *Trichoderma asperellum* đối với tác nhân gây bệnh có nguồn gốc trong đất. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 2017;15(12):1593-1604.
8. Carsolio C, Benhamou N, Haran S, Cortés C, Gutiérrez A, Chet I, et al. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene *ech42* in mycoparasitism. Applied and Environmental Microbiology. 1999; 65(3): 929-935.
9. Harjono, Widyastuti SM. Antifungal activity of purified endochitinase produced by biocontrol agent *Trichoderma reesei* against *Ganoderma philippii*. Pakistan Journal Biology Sciences. 2001;4(10):1232-1234.
10. Harman GE, Kubicek CP. *Trichoderma* And *Gliocladium*, Volume 2. 1st edition. London: CRC Press; 1998. Chapter 4, Chitinolytic enzymes and their genes; p. 73-92.
11. Qiagen. pQE-30 (map) [Data file]. 2020. [cited 5 March 2021]. Available from: http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pQE_vectors/pQE-30_map.pdf
12. Moon SY. Protocol for lab of plant molecular biotechnology. Chungbuk: Chonbuk National University; 2003.
13. Sambrook S, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor; 2003.
14. Gavel Y, Heijne GV. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. Protein Engineering. 1990;3(5):433-442.
15. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nature Protocols. 2015;10(6):845-858.
16. Giang NM, Huyền ĐT, Hải TN. Sử dụng một số công cụ tin sinh khai thác gen mã hóa enzyme phân hủy Lignocellulose từ dữ liệu Metagenome của vi sinh vật trong ruột mối *Coptotermes gestroi*. Tạp chí Công nghệ Sinh học. 2016;14(1):39-47.
17. Fan GL, Li QZ, Zuo YC. Predicting acidic and alkaline enzymes by incorporating the average chemical shift and gene ontology informations into the general form of Chou's PseAAC. Process Biochemistry. 2013;48:1048-1053.
18. Lin H, Chen W, Ding H. AcalPred: A sequence-based tool for discriminating between acidic and alkaline enzymes. PLoS ONE. 2013;8(10):e75726.
19. Valderrama-Rincon JD, Fisher AC, Merritt JH, Fan Y, Reading CA, Chhiba K, et al. An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*. Nature Chemical Biology. 2012;8(5):434-436.
20. Lee, YG, Ki Chul Chung, KC, Wi, SG, Lee, JC, Bae, HJ. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. Protein Expression and Purification. 2009;65(2):244-250.
21. Sherief A, El-Sawah M, Abd El-Naby M. Some properties of chitinase produced by a potent *Aspergillus carneus* strain. Applied Microbiology and Biotechnology. 1991;35(2).
22. Binod P, Pusztahelyi T, Nagy V, Sandhya C, Szakács G, Pócsi I, et al. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 21 under solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology. 2005;36(7):880-887.
23. Hà NT. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chủng *Aspergillus protuberus* sinh tổng hợp enzyme chitinase được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ. 2012;22b:26-35.