

TUYỂN CHỌN VÀ KHẢO SÁT MÔI TRƯỜNG ẢNH HƯỞNG ĐẾN HOẠT TÍNH CHITINASE THU NHẬN TỪ NẤM MỐC

Đào Thị Mỹ Linh*, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Bùi Thiên Kim Thu,
Nguyễn Đình Triều Vũ, Nguyễn Đăng Khoa, Sơn Thiên Nga,
Kiều Yến Vy, Trần Quỳnh Hoa

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: linhdtm@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 10/8/2019; Ngày chấp nhận đăng: 27/11/2019

TÓM TẮT

Chitinase thuộc nhóm enzyme lớn thứ hai trên thế giới sau cellulase, có nhiều ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực nông nghiệp, công nghiệp và y dược. Đặc biệt dẫn xuất COS - sản phẩm thủy phân chitin bởi chitinase có nhiều đặc tính y học như hoạt tính kháng khuẩn, tác dụng chống ung thư, chống oxy hóa và hoạt động kích thích miễn dịch. Nghiên cứu được thực hiện với mục đích tuyển chọn chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp chitinase cao nhất và khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính chitinase. Quá trình tuyển chọn được tiến hành trên môi trường M0, sau 14 ngày nuôi cấy thu dịch enzyme thô, chủng nấm mốc có hoạt tính chitinase cao nhất được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 28S rRNA. Các yếu tố ảnh hưởng của môi trường tới hoạt tính chitinase được khảo sát bao gồm các loại môi trường nuôi cấy (MT1, MT2, MT3, MT4, MT5), tỷ lệ chitin 0-20% (w/w), tỷ lệ giống 1-3% (v/w), nguồn cacbon (glucose, tinh bột, đường vàng) tỷ lệ tương ứng 0,2; 0,4; 0,6 g (w/w), thời gian nuôi cấy (24-96 giờ). Kết quả cho thấy môi trường MT4 với tỷ lệ giống cấy 1 mL, tỷ lệ cơ chất chitin 15%, thời gian nuôi cấy 48 giờ và đường vàng bổ sung với hàm lượng 0,6 g (w/w) là tốt nhất cho sinh tổng hợp enzyme chitinase từ *Aspergillus sydowii* có hoạt tính đạt 1,667 UI/mL.

Từ khóa: *Aspergillus sydowii*, chitinase, chitin, nguồn cacbon.

1. MỞ ĐẦU

Chitinase (EC 3.2.2.14) là enzyme thuộc nhóm hydrolase glycosyl với kích thước từ 20 kDa đến khoảng 90 kDa. Chúng có vai trò thiết yếu trong hệ thống phòng thủ thực vật thông qua cơ chế phân giải lớp chitin ở tế bào nấm bệnh, được coi là gen mục tiêu quan trọng để cải thiện cây trồng [1]. Ngoài ra, chitinase có nhiều chức năng như làm suy giảm thành tế bào, hạn chế bào tử nảy mầm, biệt hóa tế bào. Bên cạnh đó, chitinase có các ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực y học, kỹ thuật chế biến sinh hóa, sản xuất thuốc trừ sâu, trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và là enzyme phân hủy thành tế bào [2]. Việc sử dụng enzyme chitinase để thủy phân chitin tạo ra một số dẫn xuất như chitooligosaccharides, glucosamine và N-acetyl glucosamine, mang lại tiềm năng lớn trong y dược như thuốc chống hen suyễn, thuốc kháng khuẩn và chống ung thư, vật liệu băng vết thương, tăng sự dẻo dai của xương, chống sốt rét; và là một vector trong liệu pháp gen và bệnh nhân tiểu đường [3]. Đặc biệt xu hướng sử dụng các protein đơn bào thay thế thực phẩm truyền thống đang nhận được sự quan tâm hàng đầu và chitinase là một enzyme tiềm năng cho việc phân giải chitin thành các protein đơn bào [4].

Chitinase có mặt trong hầu hết các sinh vật như vi khuẩn, nấm mốc, nấm men, thực vật, xạ khuẩn, động vật chân khớp và con người [5]. Chúng chủ yếu được tổng hợp trong quá trình phát triển của nấm mốc. Chitinase đã được nghiên cứu thu nhận và tinh chế từ nhiều loại vi

nấm *Trichoderma harzianum*, *Scopularisopsis brevicaulus*, *Pennicillium aculeatum*, nấm ký sinh *Isaria japonica*, *Streptomyces cyaneus* [6], *Aspergillus*, *Mucor*, *Mortierella* và các vi khuẩn đất như *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Cytophaga*, *Pseudomonas* [7]. Với nhiều lợi ích mang lại cho con người nên chitinase ngày càng được quan tâm và nghiên cứu từ nguồn vi sinh vật, khả năng tổng hợp để thu nhận, tinh sạch cũng như những ứng dụng enzyme này vào một số lĩnh vực nông nghiệp, công nghiệp và y học.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Chitin được cung cấp bởi Công ty TNHH MTV Chitosan có DE > 80%.

Trấu, cám đã được cung cấp từ huyện Di Linh, tỉnh Lâm Đồng. Môi trường cơ bản có thành phần trấu, cám với tỷ lệ 5:4 và độ ẩm ban đầu được xác định là 5,58% theo phương pháp TCVN 1867:2010 [8].

Ngân hàng 6 chủng nấm mốc ký hiệu thứ tự là DT1, MD2, KB6, DT9, BD1, KB3 được phân lập từ đất của một số vùng ở Nam Bộ và giữ giống trên môi trường PDA (Potato dextrose agar) do Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh cung cấp.

Các hóa chất chính được sử dụng trong nghiên cứu gồm có peptone (Án Độ), đường vàng (Việt Nam), tween 80, DNS (Trung Quốc).

Môi trường PDA đông khô của Himedia (Án Độ) có thành phần: 39 g/L, pH $5,6 \pm 0,2$.

Môi trường M0 (Czapek - chitin) có thành phần gồm: NaNO_3 3,5 g, K_2HPO_4 1,5 g, MgSO_4 0,5 g, KCl 0,5 g, FeSO_4 0,1 g, bổ sung chitin huyền phù chitin 1% 50 mL, bổ sung nước cất 1000 mL.

Môi trường MT1 có thành phần và hàm lượng các chất trong 100 g môi trường gồm: trấu 50 g, cám 40 g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, K_2HPO_4 0,1 g, KCl 0,2 g, NH_4NO_3 1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002 g, MnSO_4 0,002 g, bột chitin 10 g, pH 5-6, độ ẩm 60%.

Môi trường MT2 có thành phần và hàm lượng các chất trong 100 g môi trường gồm: trấu 50 g, cám 40 g, pepton 1 g, urea 0,3 g, KH_2PO_4 0,2 g, CaCl_2 0,3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,3 g, tween 80 1,2 g, bột chitin 10 g, độ ẩm 60%, pH 5-6.

Môi trường MT3 có thành phần và hàm lượng các chất trong 100 g môi trường gồm: trấu 50 g, cám 40 g, pepton 0,5 g, cao nấm men 0,5 g, glucose 10 g, KH_2PO_4 0,3 g, K_2HPO_4 0,7 g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, ZnSO_4 0,001 g, bột chitin 10 g, độ ẩm 60%, pH 5-6.

Môi trường MT4 có thành phần và hàm lượng các chất trong 100 g môi trường gồm: trấu 50 g, cám 40 g, đường vàng 4 g, urea 2,2 g, KH_2PO_4 0,1 g, CaCl_2 0,1 g, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, KCl 0,05 g, HCl 0,05 g, bột chitin 10 g, độ ẩm 60%, pH 5-6.

Môi trường MT5 có thành phần và hàm lượng các chất trong 100 g môi trường gồm: trấu 50 g, cám 40 g, cao nấm men 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g, CaCl_2 0,1 g, KCl 0,05 g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, bột chitin 10 g, độ ẩm 60%, pH 5-6.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tuyển chọn và định danh chủng nấm mốc có khả năng sinh chitinase cao

Tuyển chọn các chủng nấm mốc có khả năng sinh chitinase:

Chuẩn bị các bình tam giác 100 mL có chứa 50 mL môi trường M0 được hấp khử trùng ở 121 °C trong 15 phút. Cây 1 mL dịch giống có mật độ 10^7 bào tử/mL. Các chủng nấm mốc

được nuôi cấy với tốc độ lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ 30 °C trong 14 ngày. Canh trường sau nuôi cấy được ly tâm để loại bỏ sinh khối nấm mốc và bào tử, thu nhận dịch có chứa chitinase ngoại bào. Xác định hoạt tính chitinase, tìm chủng nấm mốc có hoạt tính cao nhất.

Định danh chủng nấm mốc có khả năng sinh chitinase có hoạt tính cao nhất sau quá trình tuyển chọn được thực hiện bằng phương pháp tách chiết nhanh tại phòng thí nghiệm của Công ty TNHH MTV Sinh Hóa Phù Sa.

Phân loại nấm dựa trên phân tích trình tự gen ITS1–5,8–ITS2: nấm được phân loại bằng cách quan sát hình thái khuẩn lạc và cuống sinh bào tử kết hợp với xác định trình tự vùng ITS. DNA tổng số của nấm được tách chiết bằng kit Fungi/Yeast DNA Extraction (Norgen, Canada). Trình tự ITS1–5,8–ITS2 được nhân lên từ DNA tổng số với cặp mồi ITS1(5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3'); ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3'). Sản phẩm PCR được tinh sạch, giải trình tự trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM®3100-Avant genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tại Công ty TNHH MTV Sinh Hóa Phù Sa. Các trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit (ver. 6.0.7, Mỹ) và so sánh với các trình tự tương ứng của các chủng đã được đăng ký trên genBank bằng công cụ BLAST trên NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm Mega (ver.6).

2.2.2. *Khảo sát ảnh hưởng điều kiện môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp chitinase có hoạt tính cao nhất*

Chủng nấm mốc có hoạt tính chitinase cao nhất được định danh, sau đó tiến hành khảo sát ảnh hưởng của điều kiện môi trường khả năng sinh chitinase. Nuôi cấy chủng nấm mốc *Aspergillus sydowii* trong 5 môi trường gồm: MT1, MT2, MT3, MT4, MT5. Trên môi trường đã lựa chọn, khảo sát cơ chất cảm ứng chitin với tỷ lệ từ 0-20% (w/w). Ảnh hưởng của tỷ lệ giống cấy từ 1-3 mL (v/w) với mật độ giống $\geq 10^7$ bào tử/mL. Khảo sát thời gian nuôi cấy được từ 24-96 giờ và nhiệt độ từ 30-50 °C. Khảo sát ảnh hưởng nguồn cacbon gồm glucose, đường vàng, tinh bột với hàm lượng 0,2-0,6 g (w/w). Hoạt tính enzyme là chỉ tiêu được dùng đánh giá trong các khảo sát.

2.3. Phương pháp phân tích

Xác định hoạt tính chitinase theo Farag và cộng sự (2014), có sửa đổi:

Hỗn hợp phản ứng gồm có 0,5 mL dịch trích enzyme với 1 mL chitin huyền phù 1% và ủ trong thời gian 30 phút, ở 40 °C. Sau đó, thêm 0,5 mL NaOH 1N [9] kết hợp đun ở 100 °C trong 3 phút để dừng phản ứng. Tiếp tục, đem dịch phản ứng ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút, hút 0,5 mL dịch nổi vào ống nghiệm mới rồi bổ sung 1,5 mL DNS, đun ở 100 °C trong 5 phút và làm lạnh nhanh. Đo độ hấp phụ quang ở bước sóng 540 nm. Một đơn vị enzyme được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết xúc tác sự hình thành 1 μ mol glucosamine trong một phút ở thí nghiệm điều kiện chuẩn.

Bào tử giống nấm mốc có mật độ $\geq 10^7$ (bào tử/mL): Chủng nấm mốc được cấy chuyển và giữ giống trên môi trường PDA. Sau khoảng 7 ngày cấy, tiến hành cho 10 mL dung dịch chứa 0,1% Tween 80 vào ống giống, sử dụng que cấy vòng thu bào tử và chuyển dung dịch bào tử sang ống nghiệm vô trùng. Mật độ bào tử được xác định bằng phương pháp buồng đếm hồng cầu và được đo mật độ quang tại bước sóng 540 nm tương ứng ở các nồng độ pha loãng. Dụng đường chuẩn tương quan giữa các giá trị OD và mật độ bào tử. Giá trị OD từ 1,5-1,6 mật độ đạt $\geq 10^7$ bào tử/mL.

Phân tích và xử lý số liệu: Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, các số liệu được ghi nhận và xử lý bằng Microsoft Excel 2010, Statgraphic XVI và Origin 8.5.

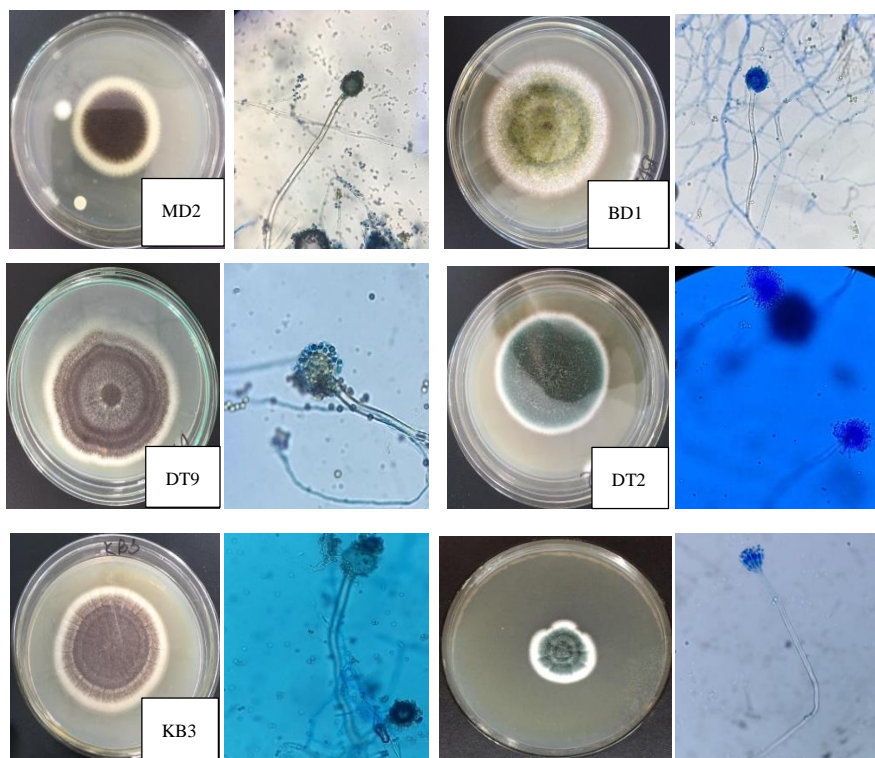
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn chủng nấm mốc có hoạt tính chitinase cao nhất

Từ ngân hàng giống nấm mốc được cung cấp, các chủng nấm mốc được cấy chấm điểm và lưu giữ giống trên môi trường PDA để thực hiện nghiên cứu. Đặc điểm hình thái vi thể, đại thể và đường kính của các chủng nấm mốc được quan sát và mô tả trong Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Một số đặc điểm của các chủng nấm mốc

STT	Ký hiệu	Đặc điểm của chủng nấm mốc		
		Màu khuẩn lạc	Thời gian xuất hiện bào tử (ngày)	Đường kính nấm sau 4 ngày (mm)
1	DT2	Xanh lục đậm	2	50
2	MD2	Đen	2	39
3	KB6	Xanh lục đậm	2	30
4	DT9	Xám nâu	2	57
5	BD1	Xanh rêu	2	52
6	KB3	Xám trắng	2	54

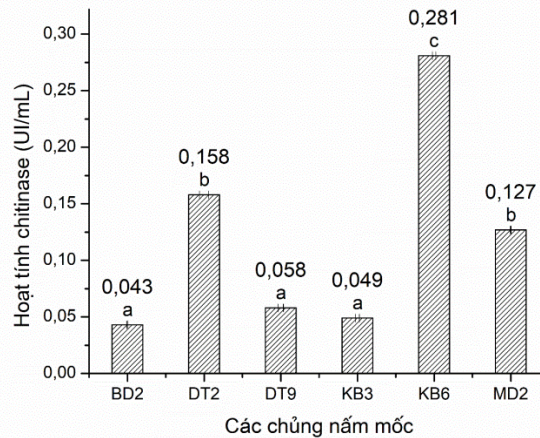


Hình 1. Hình thái đại thể và vi thể của các chủng nấm mốc

Qua quan sát hình thái khuẩn lạc trên đĩa thạch cho thấy các chủng tuyển chọn đều có khuẩn lạc tròn, mép ngoài khuẩn lạc có viền sợi nấm trắng, mịn trừ chủng KB6 bề mặt khuẩn lạc không có sợi nấm, hơi gồ ghề, mép không đều. Quan sát vi thể dưới kính hiển vi ở vật kính X40 bằng phương pháp phòng ẩm nhận thấy, các sợi nấm không màu, có vách ngăn. Giá bào

tử trần không có nhánh, có phần đỉnh to ra thành bọng hình chùy, hình elip hoặc hình cầu. Bọng này gọi là bọng đỉnh giá mang các thể bình. Các thể bình mọc thành cụm ở đầu đỉnh (KB3) hay phân bố đều trên bề mặt bọng (DT9, MD2). Một số bào tử đính vào bọng dạng hình tia tỏa tròn như cánh hoa (BD1, DT2) hay dạng bông lúa (KB6). Kết quả theo dõi khuẩn lạc và quan sát vi thể các chủng phân lập được có thể xác định các chủng DT1, MD2, KB6, DT9, BD1, KB3 đều thuộc chi *Aspergillus* [10].

Từ 6 chủng nấm mốc được nuôi cấy trên môi trường M0 để tuyển chọn chủng có hoạt tính chitinase cao nhất. Sau 14 ngày nuôi cấy, dịch enzyme thô được thu nhận và xác định hoạt tính. Kết quả được trình bày ở Hình 2.



Hình 2. Hoạt tính chitinase của các chủng nấm mốc trong môi trường M0
(abc: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

Hoạt tính chitinase của các chủng nấm mốc dao động trong khoảng 0,043-0,281 UI/mL. Trong đó, chủng BD2 có hoạt tính thấp nhất (0,043 UI/mL), chủng DT2 có hoạt tính khá cao (0,158 UI/mL) và chủng có hoạt tính cao nhất là KB6 (0,281 UI/mL). Trong nghiên cứu của Nguyễn Văn Bồn và cộng sự (2011) đã phân lập và tuyển chọn được từ đất vùng Tây Nguyên một số chủng nấm mốc có hoạt tính chitinase cao như *Trichoderma*, *Penicillium*, *Paecilomyces* với hoạt tính hơn 2 UI/mL [11]. Theo Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2014) đã tuyển chọn một số chủng nấm mốc sinh tổng hợp chitinase được phân lập từ đất xác định hoạt tính theo đường kính vòng phân giải kết quả cho thấy 2 chủng nấm mốc có hoạt tính chitinase cao nhất lần lượt là *Aspergillus oryzae* và *Aspergillus fumigatus* với 37,7 mm và 38 mm [12].

3.2. Định danh chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp chitinase

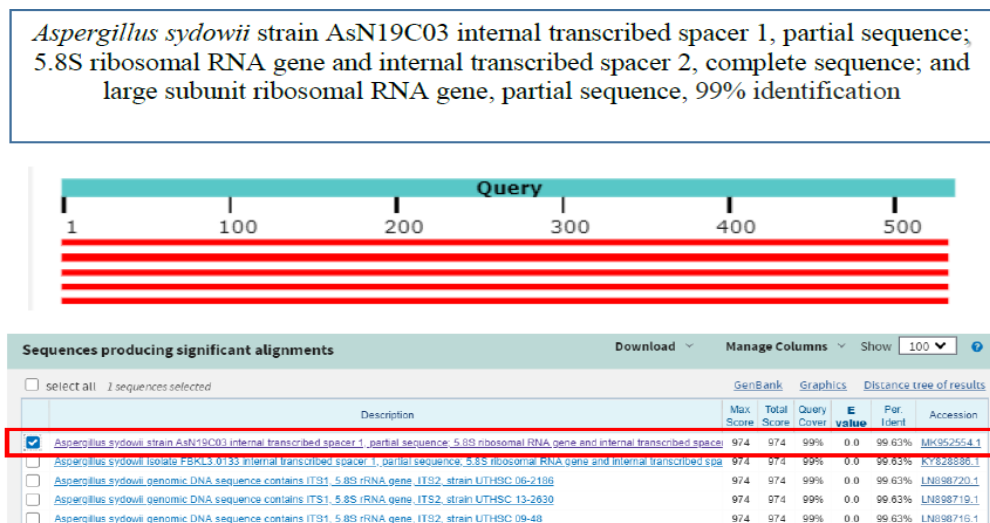
Nấm được phân loại nhờ hình thái khuẩn lạc và cường độ sinh bào tử kết hợp với xác định trình tự gen vùng ITS. Chủng KB6 có hoạt tính cao trong bước tuyển chọn được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 28s tại công ty TNHH Sinh Hóa Phù Sa. Với các bước thực hiện tách chiết DNA tổng số của nấm bằng kit Fungi/Yeast DNA Extraction, PCR với mỗi đặc hiệu vùng 28s dựa trên phân tích trình tự gen ITS-5,8-ITS2. Sau đó giải trình tự trực tiếp rồi so sánh trình tự với ngân hàng dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information), từ đó xác định mẫu nấm thuộc loài nào. Kết quả giải trình tự gen thu được ở Hình 3.

Tuyển chọn và khảo sát môi trường ảnh hưởng đến hoạt tính chitinase thu nhận từ nấm mốc

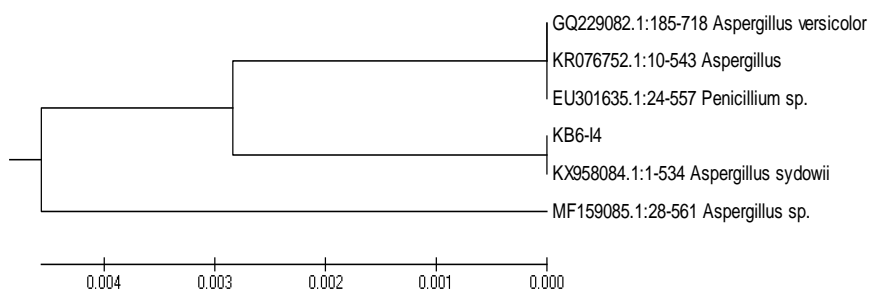
TTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCACCTGAAGAAAA
 ATGGTTGGAGACGCTCGGCTGGCGCCC GGCCGCGCCTAGTCGAGCGGGTGATAAAGCCCCATACGCTCGA
 GGACCGGACACGGTCCGCGCTGCCTTTCGGGCCCCGTCCTCCCGGGGGGGACGACGCCAACACACAA
 GCCGGCTTTGATGGGCAACAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGTG
 CGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAGTTCGCTGCGTTCAT
 CGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAAGTTTTGACTGATTTATATTCAGACTCAGACTGCATCA
 CTCTCAGGCATGAAGTTCAGTAGTCCCGGCGGCTCGCCCCGAGGGAGCTCCCGCCGAAGCAACAGT
 GTTAGTATTACGGGTGGGAGGTTGGCGCCGGAGGCAGCCGATCTT

Hình 3. Kết quả giải trình tự chi tiết mẫu KB6

Kết quả trình tự gen trên định danh từ mẫu phân lập KB6 được tra cứu trên BLAST search (NCBI) có độ tương đồng là 99%, nguồn gốc phát sinh gần với loài *Aspergillus sydowii* có ID MK952554.1 (Hình 4). Cây phát sinh loài (Hình 5) xây dựng bằng Clustal Omega với Bootstrap (giá trị lặp lại 500 lần).



Hình 4. Kết quả BLAST của DNA chủng KB6

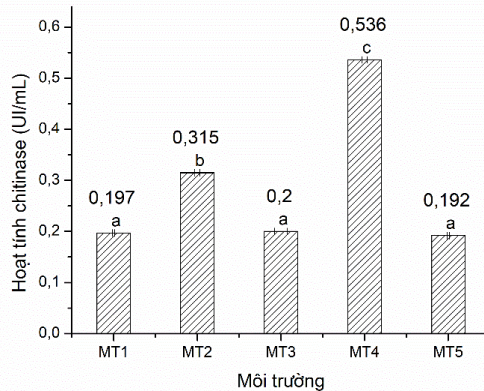


Hình 5. Cây phát sinh loài của KB6 *Aspergillus sydowii*

3.3. Ảnh hưởng các môi trường đến khả năng sinh enzyme chitinase

Nuôi cấy chủng *Aspergillus sydowii* trên 5 môi trường được khảo sát. Các điều kiện nuôi cấy bao gồm tỷ lệ giống cấy 1% (v/w), độ ẩm môi trường 60%, thời gian nuôi cấy 96 giờ [9] và đem ủ ở nhiệt độ phòng. Kết quả thể hiện trên Hình 6. Sau 96 giờ nuôi cấy, 5 môi trường nuôi cấy *A. sydowii* đều phát triển và sinh enzyme chitinase từ 0,192-0,536 UI/mL. Trong đó môi trường 4 cho thấy hoạt tính chitinase cao nhất đạt 0,536 UI/mL, gấp khoảng 3 lần các môi trường 1, 3 và 5. Vì trong môi trường 4, nguồn cacbon từ đường vàng (saccharose) và nguồn

nitơ được cung cấp từ ure, so với môi trường 3 thì hàm lượng cacbon và nitơ gấp 2- 4 lần. Trong số các nguồn cacbon và nitơ được sử dụng, đường saccharose và nitrate, ammonium cũng như asparagine hỗ trợ tốt nhất cho sự sinh trưởng và sinh bào tử [13]. MT4 là môi trường cung cấp đầy đủ nhất nguồn và hàm lượng khoáng cần thiết cho việc sinh enzyme chitinase đáp ứng nhu cầu tăng trưởng và khả năng sinh enzyme của *A. sydowii*.



Hình 6. Ảnh hưởng các loại môi trường nuôi cấy nấm mốc thu nhận chitinase

(^{abc}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

Môi trường 3 chứa đủ nguồn cung cấp nitơ và cacbon, tuy nhiên hoạt lực enzyme không cao là do trong thời gian đầu nấm mốc đã đồng hóa mạnh các nguồn cacbon và nitơ để hấp thu để gia tăng sinh khối. Các nguồn dinh dưỡng dễ hấp thu đã cạn kiệt, sẽ thúc đẩy chúng phân giải chitin để tạo chitinase và khi nguồn chitin trong môi trường đã bị phân cắt hết đồng thời các sản phẩm cuối như N-acetyl-D glucosamine có nhiều trong môi trường đã gây ức chế ngược lại quá trình sinh tổng hợp chitinase nên hoạt tính chitinase có xu hướng giảm [14].

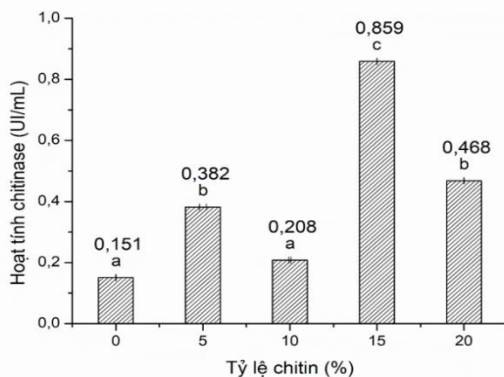
Môi trường 1, hoạt lực enzyme thấp đạt 0,197 UI/mL có thể do thiếu các thành phần chính cung cấp nguồn cacbon và nitơ, nên sau 96 giờ nuôi thì chủng *A. sydowii* đã sử dụng hết các nguồn cacbon cung cấp từ trấu, cám và chitin, bước vào giai đoạn thoái hóa. Do đó, hoạt lực enzyme giảm xuống thấp.

Môi trường 2 và 5 cung cấp đầy đủ nguồn nitơ từ peptone, ure, cao nấm men và nguồn cacbon trong môi trường nuôi cấy là chitin, cám. Giai đoạn đầu nấm mốc bắt đầu phân giải nguồn nitơ và cacbon tạo ra các sản phẩm trao đổi phục vụ cho quá trình đồng hóa nhờ đó tăng cường khả năng trao đổi chất giữa tế bào và môi trường. Sau đó, lượng sinh khối trong môi trường đã tăng cao thúc đẩy mạnh quá trình tổng hợp chitinase để phân giải nguồn chitin trong môi trường. Sau khi hệ enzyme chitinase hoạt động ở mức cao sẽ có xu hướng giảm do môi trường không còn chitin, tế bào nguyên sinh lúc này đã chuyển sang pha sinh trưởng chậm dần [14].

3.4. Ảnh hưởng tỷ lệ chitin tới quá trình thu nhận enzyme chitinase

Các điều kiện nuôi cấy bao gồm tỷ lệ giống cấy 1% (v/w), độ ẩm môi trường 60%, thời gian nuôi cấy 96 giờ và đem ủ ở nhiệt độ phòng. Kết quả được thể hiện và Hình 7.

Từ Hình 7 cho thấy tỷ lệ chitin có ảnh hưởng đến hoạt tính chitinase sinh ra của *Asperillus sydowii*. Ở tỷ lệ chitin 15% enzyme chitinase có hoạt tính cao nhất là 0,859 UI/mL. Khi tăng hàm lượng chitin lên 20% thì hoạt tính enzyme lại có xu hướng giảm. Điều này có thể khẳng định rằng, khi hàm lượng chitin cao sẽ ức chế sự phát triển của *Aspegrillus sydowii* làm giảm hoạt lực enzyme.

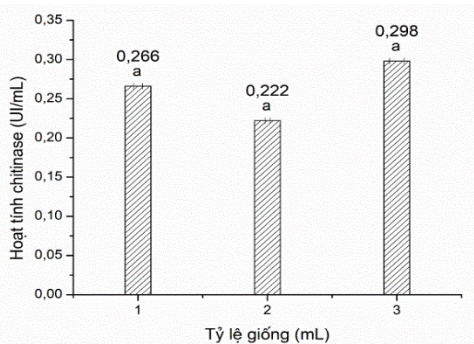


Hình 7. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ cơ chất tới khả năng sinh enzyme chitinase (abc thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

Theo nghiên cứu của Lê Thị Huệ và cộng sự (2010) về *Aspergillus awamori* ở nồng độ chitin trên môi trường bán rắn là 10-15% hoạt độ chitinase đạt giá trị cao nhất, vượt qua nồng độ chitin 15%, hoạt độ enzyme chitinase có xu hướng giảm [4]. Ngoài ra, trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Hà (2012) về chủng *A. protuberus* thể hiện nhu cầu chitin cao, hoạt tính enzyme mạnh 1,252 U/g với hàm lượng chitin 10-15%. Hoạt tính enzyme chitinase có xu hướng giảm khi hàm lượng chitin vượt qua mức 15% [9]. Điều này hoàn toàn tương đồng với kết quả nghiên cứu về chủng *Aspergillus sydowii*.

3.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến khả năng sinh enzyme chitinase

Nuôi cấy chủng *Aspergillus sydowii* trên môi trường MT5 và tỷ lệ giống được khảo sát tại các tỷ lệ khác nhau. Các điều kiện nuôi cấy là độ ẩm môi trường 60%, thời gian nuôi cấy 96 giờ và ủ ở nhiệt độ phòng. Kết quả được trình bày trong Hình 8.



Hình 8. Hoạt tính chitinase của các chủng nấm mốc trong môi trường M0 (a: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

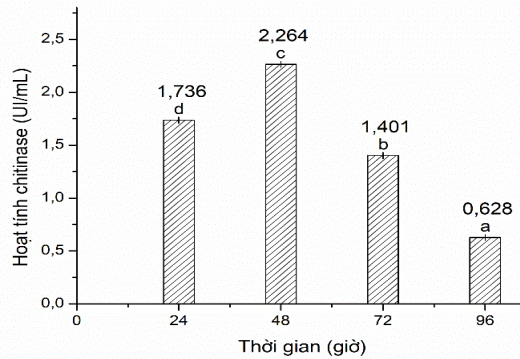
Kết quả Hình 8 cho thấy hoạt tính enzyme chitinase thu được với tỷ lệ giống cấy khác nhau không có sự khác biệt đáng kể, hoạt tính dao động trong khoảng 0,222-0,298 UI/mL. Kết quả này cho phép ta kết luận rằng cùng một mật độ giống 10^7 bào tử/mL, dù thể tích giống cấy tăng 2-3 lần thì vẫn chưa đủ lớn để tạo nên sự khác biệt về hoạt tính enzyme chitinase. Với những thể tích giống khác nhau chỉ phần nào ảnh hưởng đến độ ẩm môi trường nuôi cấy, nên để đảm bảo duy trì độ ẩm ban đầu 60% và không gây lãng phí giống, tỷ lệ giống được chọn là 1 mL/10 g môi trường để làm cho các khảo sát tiếp theo.

Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Hà (2012) về *Aspergillus protuberus*, tỷ lệ giống cấy 10^6 bào tử/mL là thích hợp nhất [9]. Theo nghiên cứu của Nguyễn Văn Tính và cộng sự (2015) về chủng *Aspergillus fumigatus* ET3 mật số 10^8 bào tử/mL là phù hợp để chủng sinh nhiều hoạt tính nhất. Kết quả còn cho thấy rằng ở mật số 10^6 bào tử/mL, lượng bào tử quá thấp nên

làm giảm hiệu suất sinh tổng hợp enzyme [15]. Đối với chủng *Aspergillus niger* LOCK 62 thì mật độ 10^7 bào tử/mL là tốt nhất cho phát triển và sinh enzyme chitinase [16].

3.6. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh enzyme chitinase

Nuôi cấy chủng *Aspergillus sydowii* trên môi trường MT4 với hàm lượng chitin 1,5 g (w/w) và tỷ lệ giống cấy 1 mL (v/w) với mật độ $>10^7$ bào tử/mL theo kết quả nghiên cứu ở các thí nghiệm trên. Các điều kiện nuôi cấy là độ ẩm môi trường 60% và ủ ở nhiệt độ phòng. Tiến hành khảo sát thời gian nuôi cấy ở các mốc thời gian khảo sát 24, 48, 72 và 96 giờ. Thu nhận enzyme tại từng mốc thời gian và xác định hoạt tính enzyme để chọn ra thời điểm thu nhận enzyme phù hợp nhất mang lại hoạt tính cao. Kết quả được thể hiện trong Hình 9.



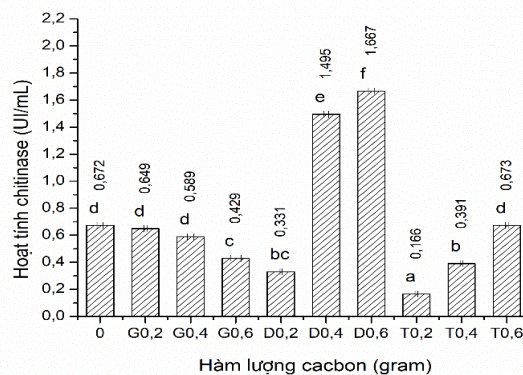
Hình 9. Ảnh hưởng của thời gian tới khả năng sinh enzyme chitinase (abcd: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

Từ kết quả Hình 9 cho thấy, ở các mốc thời gian nuôi cấy khác nhau, hoạt tính enzyme chitinase thu được đều có sự khác biệt. Mỗi loài có thời gian tăng trưởng tối ưu khác nhau, thường thì hoạt tính enzyme mạnh nhất ở thời điểm bào tử mới bắt đầu hình thành [9].

Đối với chủng *A. sydowii*, hoạt tính enzyme thu được cao nhất ở 48 giờ đạt 2,264 UI/mL. Khi vượt quá 48 giờ nuôi cấy thì hoạt tính enzyme giảm dần. Kết quả nghiên cứu có sự khác biệt khá lớn về chủng *Aspergillus niger* LOCK 62 thời gian thu được enzyme có hoạt tính cao nhất đối với chủng này là 6 ngày [16] và nó cũng được kết luận đối với enzyme chitinase từ chủng *Metarhizium* sp [17]. Điều này cho thấy, khi nuôi cấy chủng *A. sydowii* nhằm thu enzyme chitinase thì có lợi về mặt thời gian hơn hẳn một số loài nấm mốc khác.

3.7. Ảnh hưởng của nguồn và hàm lượng carbon đến hoạt tính chitinase

Nuôi cấy chủng *Aspergillus sydowii* trên môi trường MT4 với hàm lượng và nguồn carbon được khảo sát tại các tỷ lệ khác nhau. Các điều kiện nuôi cấy là độ ẩm môi trường 60%, thời gian nuôi cấy 48 giờ và ủ ở nhiệt độ phòng. Kết quả được trình bày trong Hình 10.



Hình 10. Ảnh hưởng của nguồn và hàm lượng carbon tới khả năng sinh enzyme chitinase (abcdef: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

Kết quả ở Hình 10 cho thấy, hoạt tính enzyme khi bổ sung các nguồn cacbon khác nhau với tỷ lệ khảo sát khác nhau thì có sự khác biệt khá lớn. Đối với mỗi chủng và điều kiện nuôi cấy khác nhau thì sẽ cần nguồn cacbon khác nhau để thu enzyme có hoạt tính tốt nhất [18].

Do chitinase vừa là enzyme cấu trúc, vừa là enzyme cảm ứng nên trong môi trường nuôi cấy nấm sợi sinh chitinase, cần có nguồn chitin là chất cảm ứng và là nguồn cacbon nhằm tăng khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase [4].

Trong nghiên cứu *Aspergillus niger* về khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme glucose oxidase cho thấy nguồn cacbon từ glucose cho hoạt tính enzyme cao hơn từ saccharose. Kết quả này được dùng làm tham khảo để thực hiện khảo sát nguồn cacbon đối với khả năng sinh enzyme chitinase của chủng *Aspergillus sydowii*. Kết quả khảo sát cho thấy có sự khác biệt lớn giữa 2 chủng này [19].

Nguồn cacbon từ đường vàng, hoạt tính enzyme sinh ra của *A. sydowii* là cao nhất đạt 1,667 UI/mL. Hoạt tính chitinase tăng dần theo hàm lượng khảo sát 0,2 g, 0,4 g và 0,6 g lần lượt là 0,331 UI/mL, 0,648 UI/mL, 1,667 UI/mL. Kết quả này hoàn toàn tương đồng với bài nghiên cứu của Olutiola [13] về chủng *Aspergillus sydowii*, trong số các nguồn cacbon được sử dụng, đường saccarose hỗ trợ tốt nhất cho sự sinh trưởng và sinh bào tử. Đường vàng hay saccarose là một dạng đường đôi, mặc dù trong giai đoạn đầu sinh khối nấm không cao do đây là nguồn cacbon khó tiêu hóa, chúng sẽ sử dụng nguồn cacbon từ chitin để thay thế. Tuy nhiên đến giai đoạn sau đường vàng lại là nguồn cung cấp cacbon tốt cho sự tổng hợp enzyme. Điều này được khẳng định tại thời điểm thu enzyme hoạt tính chitinase thu được là cao nhất. Sự tăng mạnh hoạt độ enzyme trong giai đoạn này có thể được giải thích là do vi sinh vật đã thích ứng với môi trường dinh dưỡng, đặc biệt là sự có mặt đầy đủ các chất cần thiết cho quá trình phát triển của vi sinh vật như cacbon, nitơ, chất khoáng, chất kích thích nên làm cho chúng phát triển mạnh và sinh enzyme có hoạt độ cao.

Nguồn cacbon từ glucose dễ sử dụng do đó trong giai đoạn đầu nấm mốc phát triển khá tốt nhưng sau 96 giờ nuôi cấy nấm mốc bước vào giai đoạn sinh enzyme thì nguồn cacbon lúc này đang trở nên cạn kiệt, hoạt tính enzyme tại thời điểm khảo sát không cao. Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Hồng Lĩnh (2011) về khả năng sinh enzyme GOD của *Aspergillus niger*, việc giảm hoạt độ enzyme có thể do trong môi trường nguồn dinh dưỡng đã bị cạn kiệt làm giảm hoạt tính trao đổi chất, phân hủy dần dần các chất dự trữ và cuối cùng dẫn đến sự chết hàng loạt của tế bào, thêm vào đó là sự tích lũy các sản phẩm trao đổi chất.

Theo nghiên cứu của Farag và cộng sự (2014) về chủng *Aspergillus terreus* sử dụng nguồn cơ chất là tinh bột thì hoàn toàn không sinh enzyme chitinase [2]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, vẫn thu được enzyme chitinase nhưng hoạt tính thấp do trong môi trường có nguồn cơ chất cảm ứng từ chitin, do đó việc thu được enzyme với hoạt tính không cao cũng là điều dễ hiểu. Tinh bột là một polysaccharide, rất khó tiêu hóa nên việc thủy phân tinh bột để sinh trưởng ở nấm rất hạn chế, cần phải có thời gian phân giải lâu hơn.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tuyển chọn và định danh được chủng *Aspergillus sydowii* có khả năng sinh enzyme chitinase có hoạt tính cao nhất từ 6 chủng nấm mốc trong tự nhiên. Quá trình nuôi cấy *A. sydowii* có nguồn cơ chất là phụ phẩm rẻ tiền, sử dụng phương pháp nuôi cấy và tách chiết thông dụng, kết quả đã xác định được điều kiện nuôi cấy thích hợp thu enzyme hoạt tính cao từ *A. sydowii* là MT4 khi bổ sung tỷ lệ chitin là 15%, tỷ lệ giống cấy 1mL và sử dụng nguồn cacbon là đường vàng với hàm lượng 0,6 g, thời gian nuôi cấy 48 giờ.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu do Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo hợp đồng số 114/HĐ-DCT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao S., Wang Y., Li Z., Shi W., Gao F., Zhou Y., Zhang G., Feng J. - Genome-wide identification and expression analyses of the chitinases under cold and osmotic stress in *Ammopiptanthus nanus*, *Genes* (Basel) **10** (6) (2019).
2. Aida F.M., Al-Nusarie S., Taghreed S. - Production, optimization, characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terreus*, *African Journal of Biotechnology* **13** (14) (2014) 1567-1578.
3. Kumar M., Brar A., Vivekanand V., Pareek N. - Bioconversion of Chitin to bioactive chitoooligosaccharides: amelioration and coastal pollution reduction by microbial resources, *Mar Biotechnol* (NY) **20** (3) (2018) 269-281.
4. Lê Thị Huệ - Khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase của một số chủng nấm sợi thuộc giống *Aspergillus*, *Trichoderma* và ứng dụng, Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh (2010).
5. Hamid R., Khan M.A., Ahmad M., Ahmad M.M., Abdin M.Z., Musarrat J., Javed S. - Chitinases: An update, *Journal Pharm Bioallied Sciences* **5** (1) (2013) 21-9.
6. Tasharofi N., Adrangie S., Fazelia M., Rastegarc H., Khoshayandd M.R., Faramarzia M.A. - Optimization of chitinase production by *Bacillus pumilus* using Plackett-Burman design and response surface methodology, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **10** (4) (2011) 759-768.
7. Kim T.I., Lim D.H., Baek K.S., Jang S.S., Park B.Y., Mayakrishnan V. - Production of chitinase from *Escherichia fergusonii*, chitosanase from *Chryseobacterium indologenes*, *Comamonas koreensis* and its application in N-acetylglucosamine production, *International Journal Biological Macromolecules* **112** (2018) 1115-1121.
8. TCVN 1867:2001., Giấy và các tông - xác định độ ẩm – phương pháp sấy khô. 2001.
9. Nguyễn Thị Hà - 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* **22 b** (2012) 26-35.
10. Bùi Xuân Đồng và Nguyễn Văn Huy - Vi nấm dùng trong Công nghệ Sinh học, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ Thuật (2000) 11-40.
11. Nguyen Van Bon, Tran Minh Dinh, Nguyen Anh Dzung. - Study on isolation and selection of some fungal strains with high chitinase activity in central highland, *Viet Nam Faculty of Natural Science and Technology, Tay Nguyen University* **P-02** (2011) 184-193.
12. Phạm Thị Ngọc Lan, Võ Thị Thanh Nhân - Tuyển chọn một số chủng nấm mốc sinh tổng hợp chitinase phân lập từ đất, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Khoa học Huế* **1** (1) (2014) 40-47.
13. Olutiola P.O., Cole O.O. - Some environmental and nutritional factors affecting growth and sporulation of *Aspergillus sydowi*, *Physiology Plant* **39** (1977) 239-242.
14. Phạm Thị Lịch, Trần Thanh Thủy - Nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy để thu nhận chế phẩm enzyme chitinase thô từ chủng *Trichoderma* sp, *Tạp chí Khoa học Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh* (2013) 117-129.
15. Nguyễn Văn Tính, Nguyễn Thị Hà - Khảo sát môi trường nuôi cấy nấm *Aspergillus fumigatus* ET3 để tăng hiệu suất sản sinh phytase, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ sinh học* **37** (1) (2015) 49-56.

16. Brzezinska M.S., Jankiewicz U. - Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control, *Current Microbiology* **65** (6) (2012) 666-72.
17. Trịnh Thị Hồng - Nghiên cứu ảnh hưởng một số yếu tố đến quá trình sinh tổng hợp chitinase của chủng nấm *Metarhizium* sp được phân lập từ xác côn trùng tại Thanh Hóa, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Hồng Đức* (35) (2017) 73-79.
18. Choi Y.J., Kim E.J., Piao Z., Yun Y.C., Shin Y.C. - Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides, *Applied Environmental Microbiology* **70** (8) (2004) 4522-31.
19. Nguyễn Thị Hồng Lĩnh - Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp enzym glucose oxydase từ chủng nấm mốc *Aspergillus niger*, Đại học Đà Nẵng (2011).

ABSTRACT

SELECTING AND INVESTIGATING THE EFFECTS OF ENVIRONMENT ON CHARACTERISTICS OF CHITINASE FROM SOIL FUNGI

Dao Thi My Linh*, Nguyen Thi Quỳnh Mai, Bui Thien Kim Thu,
Nguyen Dinh Trieu Vu, Nguyen Dang Khoa, Son Thien Nga,
Kieu Yen Vy, Tran Quynh Hoa

Ho Chi Minh City University of Food Industry

*Email: linhdtm@hufi.edu.vn

Chitinase is the second-largest enzyme group in the world after cellulase, it has wide applications in many fields of agriculture, industry, and medicine. Chitooligosaccharides, the chitin hydrolyzed products by chitinase, have many medical properties such as antibacterial activity, anti-cancer, antioxidant and immunostimulating. This study was conducted with the aim of selecting a fungus strain with the highest chitinase biosynthesis ability from the soil and investigating some factors affecting chitinase activity. The selection process was conducted by culturing the fungi on M0 medium for 14 days. We found a fungus strain with the best chitinase biosynthesis based on raw chitinase activity. This fungus strain was identified via the 28S rRNA gene sequencing as *Aspergillus sydowii*. The factors affecting the culture medium on chitinase activity were investigated including types of culture medium (MT1, MT2, MT3, MT4, MT5), chitin content (0-20%), seed rate of 1-3% (v/w), carbon source (glucose, starch, yellow sugar is 0.2, 0.4, 0.6 g/10.5g medium, respectively), culture time (24-96 hours). The results showed that the good conditions for biosynthesis of chitinase from *Aspergillus sydowii* were determined: MT4 medium with 1 mL seedling rate, percentage of chitin is 15%, culture time was 48 hours and carbon source was brown sugar with 0.6 g (w/w). Activity of obtained chitinase was 1,667 UI/mL.

Keywords: *Aspergillus sydowii*, chitinase, chitin, carbon source.