

LỰA CHỌN ĐIỀU KIỆN TỐI ƯU ĐỂ SẢN XUẤT CHITOSANASE TỪ *STREPTOMYCES GRICEUS* (CHŨNG NN2)

Selection of Optimal Conditions to Produce Chitosanase from *Streptomyces griceus* (strain NN2)

Ngô Xuân Mạnh, Nguyễn Thị Phương Nhung

Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội
Địa chỉ email tác giả liên lạc : nxmanh@hua.edu.vn

TÓM TẮT

Chitosanase thủy phân chitosan thành chitosan oligosaccharide (COS) có ứng dụng rất lớn trong sản xuất. Mục tiêu của đề tài là lựa chọn được chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp chitosanase cao, từ đó chọn lựa điều kiện tốt nhất để sản xuất chitosanase. Trong 4 chủng xạ khuẩn (*Streptomyces griceus*) có khả năng sinh tổng hợp chitosanase, chủng NN2 có khả năng sinh tổng hợp chitosanase cao nhất đã được tuyển chọn. Từ đường cong sinh trưởng của chủng NN2 đã chọn thời điểm tiếp giống thích hợp là khoảng 36 h sau khi nuôi ở môi trường hoạt hóa. Môi trường nuôi cấy thích hợp để sinh tổng hợp chitosanase của chủng NN2 đã được chọn lựa, là môi trường thay thế MT3 (có thành phần rỉ đường là 3%), pH = 6,0, thời gian nuôi cấy là 3 ngày. So sánh hai phương pháp làm sạch bước đầu enzyme là tủa muối amoni sunfate và tủa ethanol cho thấy phương pháp tủa muối amoni sunfate tốt hơn và phân xuất 50 - 70% cho hiệu quả làm sạch cao nhất, mức độ làm sạch là 1.8 lần, hoạt tính riêng của enzyme là 201,9 U/ml.

Từ khoá: Chitosan, chitosan oligosaccharide, Chitosanase, *Streptomyces griceus*.

SUMMARY

Chitosanase hydrolyzes chitosan to produce chitosan oligosaccharide (COS) which is applied widely in industry. To select the best strain of microorganisms and optimal conditions to produce chitosanase was the purpose of the present study. Strain NN2 of *Streptomyces griceus* was found the best to produce chitosanase among the strains isolated. Based on the cell growth curve, the time to reculture the strain should be after about 36 hours in activated culture. The best culture medium composition for the highest level of chitosanase was obtained with 0.3% molasses at a pH of 6.0, 37°C and 3 days of fermentation. Comparing two methods to partly purify chitosanase, viz. precipitating with ethanol and with ammonium sulfate showed that ammonium sulfate precipitation was better and the optimal concentration of ammonium sulfate was 50 - 70%, which resulted in 1.8 fold purification and a chitosanase specific activity of 201.9 U/mg.

Key words: Chitosanase, Chitosan, culture medium, purification, *Streptomyces griceus*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chitosan là một polysaccharide cao phân tử, mạch thẳng, cấu tạo từ các mắt xích D-glucosamine liên kết với nhau bởi các liên kết D-1-4-glycoside. Trong tự nhiên, chitosan được tìm thấy trong thành tế bào

của nấm thuộc lớp *Zygomycetes*, trong chất Chlorophycean của tảo *Chlorella* sp. và trong lớp biểu bì các loài côn trùng (Nogawa và cs. (1998), Shimosaka và cs. (1995), Zhou và cs. (2008)). Ngoài ra, chitosan cũng được tạo ra từ quá trình deacetyl hóa chitin. Chitosan

ứng dụng vô cùng rộng rãi trong công nghiệp, thực phẩm, môi trường, công nghệ sinh học, mỹ phẩm, y học và dược phẩm... (Cao Minh Hậu, 2006; Choi và cs., 2004). Trong những năm gần đây, chitosan oligosaccharide (COS) rất được quan tâm do có nhiều các tính năng công nghệ và tính năng sinh học như khả năng kháng vi sinh vật, giảm cholesterol, miễn dịch và kháng ung thư (Wang và cs., 2007). Sử dụng phương pháp enzyme để sản xuất COS đã khắc phục các nhược điểm của phương pháp hóa học như phải sử dụng lượng acid lớn, sản lượng thấp và chất lượng của COS không cao. Enzyme chitosanase thủy phân liên kết β -(1-4)-glycoside của chitosan thành COS, nó được tìm thấy từ: vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm, virus, sâu bọ, côn trùng và một số loài thực vật, hiện nay nguồn cung cấp chủ yếu là vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm.

Sự sinh tổng hợp chitosanase phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: nguồn C, N, chitosan, pH, nhiệt độ, thời gian nuôi cấy... (Phạm Thị Trân Châu và Phan Tuấn Nghĩa, 2007; Yoon và cs., 2001; Zhou và cs., 2008). Nghiên cứu này đã lựa chọn được chủng xạ khuẩn NN2 có khả năng sinh tổng hợp cao chitosanase, bước đầu nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy trong đó sử dụng rỉ đường 3% làm nguồn cơ chất thay thế, thực hiện làm sạch bước đầu enzyme bằng amoni sunfate phân xuất 50 - 70%.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Chitosan (96% acetyl hóa), agar, peptone, cao thịt, các hóa chất NaCl, NaOH, HCl, Na_2SO_3 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , dinitrosalicylic acid, acetic acid, phenol, potassium sodium tartrate, cồn (Trung Quốc) là hoá chất có độ sạch PA.

2.2. Các chủng xạ khuẩn

Ba chủng xạ khuẩn *Streptomyces griceus*, kí hiệu NN1, NN2, NN3 và HS1 được phân lập và tuyển chọn do Bộ môn Hoá sinh -

CNSH Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội trên môi trường thử hoạt tính (agar 2%, chitosan 0,2 %).

2.3. Bảo quản và giữ giống

Các chủng xạ khuẩn được cấy truyền vào môi trường thạch nghiêng và nuôi cấy ở tủ ấm 37°C, bảo quản ở 3 - 4°C, sau 2 - 3 tuần cấy truyền lại một lần. Môi trường cấy truyền gồm: Manitol 1%, peptone 0,2%, cao thịt 0,1%, cao men 0,1%, K_2HPO_4 0,15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, KNO_3 0,05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001%, KCl 0,05%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,05%, tinh bột tan 2%, agar 2%, nước cất.

2.4. Nuôi cấy

Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong các bình tam giác 250 ml. Cấy mẫu giống đã hoạt hoá (hoạt hóa 1 vòng que cấy trong 5ml môi trường hoạt hoá) vào môi trường nuôi cấy (Manitol 1%, peptone 0,2%, cao thịt 0,1%, cao men 0,1%, K_2HPO_4 0,15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, KNO_3 0,05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001%, KCl 0,05%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,05%, tinh bột tan 2%, chitosan 2%, nước cất), chế độ lắc 200 rpm, 37 °C trong 2 ngày.

2.5. Xác định đường cong sinh trưởng của chủng xạ khuẩn

Tiến hành nuôi chủng xạ khuẩn trong môi trường lỏng (môi trường nuôi cấy). Cứ sau 6 h lại lấy dịch nuôi cấy đem đo độ hấp thụ quang học (Absorbance) ở bước sóng 620 nm (A_{620}). Đường cong sinh trưởng được xác định chính là sự thay đổi của độ hấp thụ quang học trong quá trình nuôi cấy.

2.6. Xác định các điều kiện tối ưu cho sự sinh tổng hợp chitosanase

Chủng xạ khuẩn được lựa chọn sẽ nuôi cấy trong các bình tam giác chứa 100ml môi trường ở các môi trường MT0, MT1, MT2, MT3, MT4 và MT5, là môi với nồng độ rỉ đường tương ứng từ 0%, 1%, ..., 5%, pH từ 5-7, thời gian 1-4 ngày. Sau khi chọn được điều kiện tốt nhất, thực hiện nuôi cấy với thể tích 300 ml.

2.7. Xác định đường kính vòng phân giải của enzyme (phương pháp đục lỗ thạch)

Sau khi dừng nuôi cấy, ly tâm, lấy 50 l dịch thu được nhỏ vào các lỗ thạch trên đĩa petri có môi trường agar-chitosan, để tủ lạnh trong 2 h, ủ tủ ấm 37°C. Sau 24 h, đổ lugol và quan sát vòng phân giải.

2.8. Thu nhận và làm sạch enzyme

Ly tâm dịch nuôi cấy với tốc độ 6000 rpm ở 4°C, thu lại phần dịch trong - dịch enzyme thô. Cô đặc dung dịch enzyme thô bằng phương pháp sấy đông khô, sau đó thực hiện tách enzyme bằng phương pháp tủa phân đoạn protein bằng ethanol và muối amoni sunfate. Các phân đoạn thu được tiến hành xác định hoạt tính enzyme và hàm lượng protein, từ đó lựa chọn phương pháp có hiệu quả cao hơn.

2.9. Xác định hoạt tính enzyme Chitosanase (phương pháp DNS)

Hoạt tính chitosanase được xác định thông qua lượng đường khử tạo ra khi chitosanase thủy phân chitosan giải phóng ra. Lấy 1 ml dịch enzyme cho vào 2 ống, ở ống đối chứng thêm 100 l dung dịch NaOH 10N để bất hoạt enzyme. Sau đó, thêm vào mỗi ống 2 ml dung dịch chitosan 0,2%. Đặt 2 ống ở 50°C trong 30 phút. Sau đó, nhỏ 100 l NaOH 10N vào ống thí nghiệm để dừng phản ứng. Thêm vào mỗi ống này 3 ml DNS, rồi đặt vào bể ổn nhiệt 90°C trong 5 - 10 phút, nhỏ vào mỗi ống 1 ml dung dịch Kali natri tartrate 40%, để nguội đến nhiệt độ phòng và đo A_{575} . Hoạt tính enzyme được tính theo đường chuẩn D-glucosamin. Một đơn vị hoạt tính enzyme chitosanase là lượng enzyme cần thiết xúc tác phản ứng thủy phân Chitosan để giải phóng ra 1 mol đường khử trong thời gian 1 phút ở các điều kiện tiêu chuẩn của phương pháp phân tích.

2.10. Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Bradford

Lấy 0,1 ml dung dịch protein cần xác định, thêm 5 ml dung dịch thuốc nhuộm Coomassie Blue G250, trộn đều, so màu trên máy quang phổ ở bước sóng 595 nm. Mỗi mẫu được làm lặp lại 3 lần. Tính hàm lượng protein của mẫu theo đường chuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hoạt tính của chitosanase từ các chủng xạ khuẩn

Nuôi cấy cả 4 chủng trên môi trường MT0. Thu dịch thô enzyme rồi thử hoạt tính bằng phương pháp đục lỗ thạch và xác định hoạt tính bằng phương pháp DNS. Kết quả trình bày ở bảng 1 và hình 1. Kết quả cho thấy 4 chủng xạ khuẩn đều có khả năng sinh chitosanase, nhưng khác nhau về hoạt tính. Trong số 4 chủng nghiên cứu chủng NN2 có khả năng sinh tổng hợp cao chitosanase và khác nhau có ý nghĩa với các chủng còn lại.

3.2. Xác định đường cong sinh trưởng của chủng xạ khuẩn SG2

Từ hình 2 cho thấy, từ 0 - 18 h đầu nuôi cấy trên cả hai môi trường số lượng tế bào NN2 tăng lên rất chậm, đây là thời gian tương ứng với pha lag trong chu kỳ sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Từ 18 - 30 h, chủng NN2 sinh trưởng và phát triển nhanh chóng tương ứng với pha log, đến cuối pha này ở MT0 sau 30 h thì độ hấp thụ quang đạt cực đại là 1,57 nhưng MT2 thì số lượng tế bào tiếp tục tăng sau 6 h nữa tức là sau 36 h với độ hấp thụ quang cực đại là 2,071. Sau đó số lượng tế bào tương đối ổn định đến 42 h và khoảng thời gian từ 36 - 42 h được coi là tương ứng với pha ổn định. Từ 42 h trở đi thì độ hấp thụ quang có xu hướng giảm dần, sự sinh trưởng và phát triển của SG2 tiến vào pha tử vong.

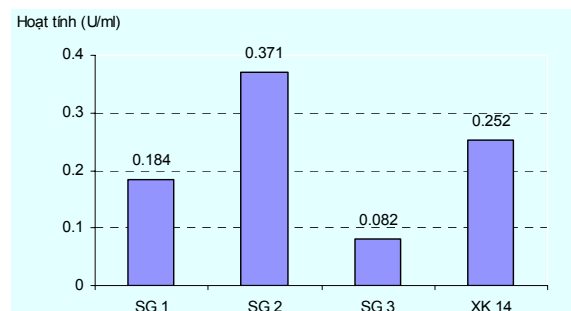
Như vậy, dựa trên đường cong sinh trưởng, ta xác định được thời điểm tiếp giống tốt nhất là khoảng 36 h của môi trường hoạt hóa hoặc nhân giống.

Bảng 1 Đặc điểm vòng phân giải cơ chất của chitosanase từ 4 chủng xạ khuẩn

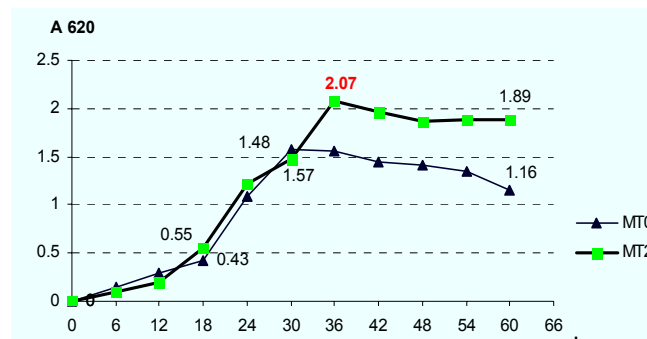
Tên chủng	Đường kính (mm)	Đặc điểm
NN1	33	Rất mờ
NN1	36	Sáng, rõ ràng
NN3	18	Tương đối sáng
HS1	23	Mờ



Vòng phân giải cơ chất của chitosanase từ chủng NN2



Hình 1. Khả năng sinh chitosanase từ 4 chủng xạ khuẩn



Hình 2. Đường cong động học của chủng NN2 trên môi trường MTO và MT2

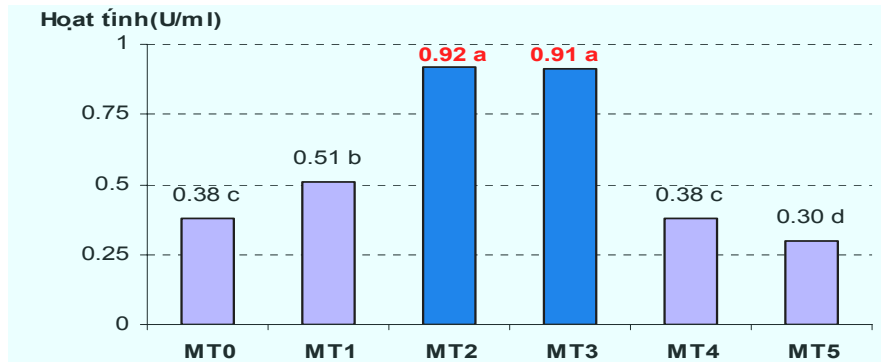
3.3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Khi sử dụng môi trường MT1, MT2, MT3 hoạt tính chitosanase tăng, đặc biệt là MT2 và MT3, điều này chứng tỏ môi trường rỉ đường rất thích hợp với sự sinh trưởng và phát triển của SG2. Khi so sánh giữa MT2 và MT3 thì sự sai khác về hoạt tính của chitosanase là không có nghĩa, do vậy chúng tôi quyết định sử dụng cả 2 môi trường này để khảo sát các điều kiện

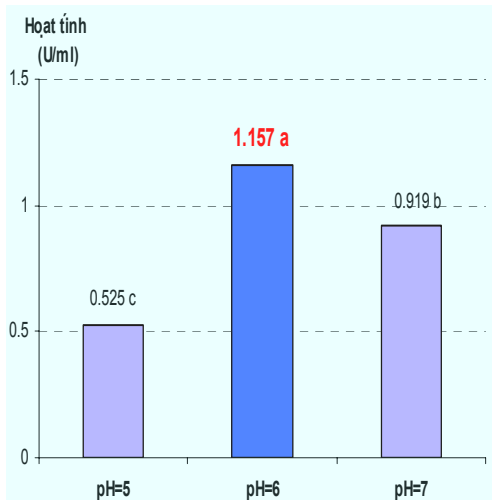
nuôi cấy tiếp theo (Hình 3).

3.4. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy

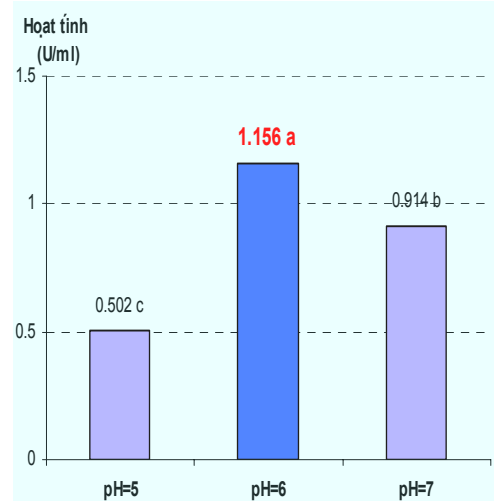
Trên cả hai môi trường thì ảnh hưởng của pH rất rõ rệt tới khả năng sinh tổng hợp chitosanase và khi pH môi trường bằng 6 thì cho hoạt tính chitosanase là cao nhất, với MT2 hoạt tính là 1,57 U/ml và MT3 là 1,56 U/ml, như vậy pH = 6 là pH tối ưu cho việc sinh tổng hợp chitosanase (Hình 4 và 5).



Hình 3. Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng sinh chitosanase của SG2



Hình 4. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy trên MT2 đến hoạt tính chitosanase



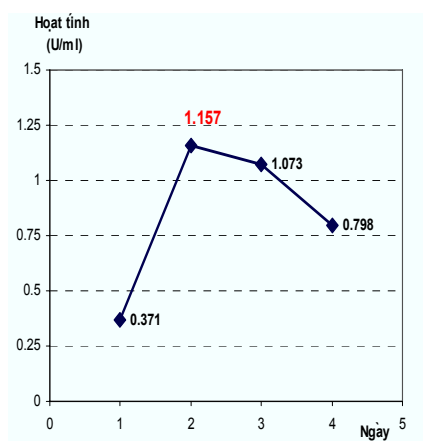
Hình 5. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy trên MT3 đến hoạt tính chitosanase

3.5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

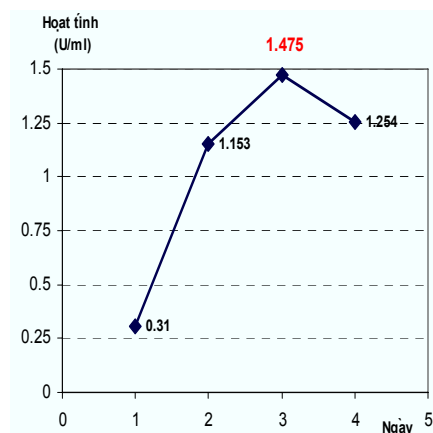
Khi nuôi NN2 trên MT2 thì đến ngày nuôi cấy thứ hai chitosanase có hoạt tính cao nhất còn đối với môi trường MT3 là sang ngày thứ ba. Tuy nhiên hai giá trị cực đại này là khác nhau, trên MT2 là 1.157 U/ml còn MT3 là 1.475 U/ml (Hình 6 và 7). Như vậy việc sử dụng môi trường MT3 với 3 ngày

nuôi cấy cho khả năng chitosanase cao hơn. Từ những kết quả đã đạt được, điều kiện nuôi cấy được chọn lựa như sau:

- Môi trường nuôi cấy: MT3
- pH môi trường nuôi cấy: 6
- Thời gian nuôi cấy: 3 ngày
- Nhiệt độ nuôi cấy: 37°C
- Chế độ lắc: 200 rpm



Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy trên MT2 đến hoạt tính chitosanase



Hình 7. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy trên MT3 đến hoạt tính chitosanase

3.6. Nuôi cấy và thu nhận enzyme

Thực hiện nuôi cấy NN2 với các điều kiện nuôi cấy như trên, sau thời gian nuôi cấy, ly tâm, thu dịch enzyme thô và cô đặc bằng sấy đông khô đến khi thể tích của dịch enzyme thô còn 1/4, hoạt tính và nồng độ

protein thay đổi (Bảng 2).

Kết quả bảng 2 cho thấy nồng độ protein và hoạt tính của chitosanase rất phù hợp với hệ số cô đặc. Tuy nhiên, hoạt tính riêng của enzyme cũng bị giảm khoảng 15 % so với dịch enzyme trước khi cô đặc.

Bảng 2. Kết quả của quá trình cô đặc bằng phương pháp sấy đông khô

Dịch enzyme	Hoạt tính (U/ml)	Nồng độ protein (mg/ml)	Hoạt tính riêng (U/mg)
Trước cô đặc	1,335	0,0102	130,9
Cô đặc	4,408	0,0396	111,3

3.7. Tủa phân đoạn enzyme bằng amoni sulfate và cồn ethylic

Đối với phương pháp tủa cồn ethylic phân đoạn enzyme thu được có hoạt tính riêng cao nhất là phân đoạn 40 - 50% và 50 - 60% cồn, tuy nhiên khi so sánh hiệu quả phân tách giữa các phân đoạn là không cao, điều này cho thấy khả năng làm sạch cho chitosanase bằng việc tủa cồn là không hiệu quả.

Đối với phương pháp tủa phân đoạn bằng muối amoni sunphate cho thấy hiệu quả phân đoạn enzyme cao hơn, hoạt tính riêng giữa các phân đoạn khác nhau rất rõ

ràng. Trong các phân đoạn thì phân đoạn có nồng độ muối 50 - 60% và 60 - 70% cho hoạt tính riêng của chitosanase là cao nhất, 186 và 177,6 U/mg (Bảng 3 và 4).

Dựa trên những kết quả trên, phương pháp tủa muối amoni sunphate đã được lựa chọn để tách enzyme chitosanase trong dịch enzyme thô, phân đoạn được lựa chọn là 50 - 70% muối (Bảng 5). Như vậy, enzyme thu được trong phân đoạn 50 - 70% muối amon sulfate cho hoạt tính riêng cao hơn rất nhiều so với hoạt tính riêng của enzyme trong dịch thô ban đầu. Mức độ làm sạch là 1,8 lần.

Bảng 3. Hoạt tính Chitosanase ở các phân xuất tủa bằng cồn ethylic

Phân đoạn	Hoạt tính tổng (U)	Protein tổng (mg)	Hoạt tính riêng (U/mg)
0 - 30	4,430	0,072	61,2
30 - 40	2,328	0,023	101,0
40 - 50	1,938	0,015	129,2
50 - 60	1,852	0,015	123,5
60 - 70	1,951	0,017	114,8
70 - 80	1,696	0,028	60,6

Bảng 4. Hoạt tính chitosanase ở các phân xuất tủa bằng (NH₄)₂SO₄

Phân đoạn	Hoạt tính tổng (U)	Protein tổng (mg)	Hoạt tính riêng (U/mg)
0 - 30	1,730	0,087	19,9
30 - 40	1,639	0,032	51,2
40 - 50	1,710	0,025	68,4
50 - 60	3,534	0,019	186,0
60 - 70	2,664	0,015	177,6
70 - 80	1,776	0,033	53,8

Bảng 5. Hoạt tính chitosanase tủa bằng muối amoni sunphate ở phân đoạn 50 - 70%

Phân đoạn	Thể tích (ml)	Hoạt tính tổng (U)	Protein tổng (mg)	Hoạt tính riêng (U/mg)
0 - 50	10	1,878	0,129	14,6
50 - 70	10	5,048	0,025	201,9
70 - 80	10	1,778	0,034	52,3
Ban đầu	40 ^a	44,068	0,396	111,3

(a : tính theo dịch thô ban đầu)

4. KẾT LUẬN

Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi đi đến những kết luận:

- Trong 4 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp chitosanase đã khảo sát là NN1, NN2, NN3 và HS14 thì chủng NN 2 có khả năng sinh tổng hợp chitosanase có hoạt tính cao nhất.

- Thời điểm tiếp giống thích hợp cho NN2 trong quá trình nuôi cấy là khoảng 36 h sau khi nuôi ở môi trường hoạt hóa. Các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho NN2 sinh tổng hợp cao chitosanase là: môi trường MT3 (có thành phần rỉ đường là 3%), pH = 6,0, thời gian nuôi cấy là 3 ngày.

- Trong quá trình thu nhận và làm sạch enzyme thì phương pháp rửa muối amoni sunphate cho hiệu quả cao hơn so với phương pháp rửa bằng cồn ethylic, nồng độ muối amoni sunphate thích hợp cho rửa phân đoạn thu hồi chitosanase là 50 - 70%, mức độ làm sạch là 1.8 lần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Phạm Thị Trân Châu và Phan Tuấn Nghĩa (2007). Công nghệ sinh học. NXB. Giáo dục.
Choi Y. J. et al. (2004). Purification and Characterization of Chitosanase from

Bacillus sp. Strain KCTC 0377BP and Its Application for the Production of Chitosan Oligosaccharides. *Applied and environmental microbiology*, 70 (8), 4522–4531.

Jung H.S. et al. (1999). Effective production of chitosanase and chitinase by *Streptomyces griseus* HUT 6037 using colloidal chitin and various degrees of deacetylation of chitosan. *Biotechnol. Bioprocess Eng*, 4, 26-31.

Nogawa M. et al. (1998). Purification and Characterization of Exo-β-D-Glucosaminidase from a Cellulolytic Fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Applied and environmental microbiology*, 64 (3), 890-895.

Shimosaka M. et al. (1995). Production of Two Chitosanases from a Chitosan-Assimilating Bacterium, *Acinetobacter* sp. Strain CHB101. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (2), 438 -442.

Zhou W. et al. (2008). Production, purification and characterization of chitosanase produced by *Gongronella* sp. JG. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 49-54.

Wang Y. et al. (2007). Antimicrobial effect of Chitooligosaccharides Produced by Chitosanase from *Pseudomonas* CUY8. *Asia Pac J Clin Nutr*, 16 (Suppl 1), 174-177.

