

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN THỦY PHÂN α -CHITIN THÔ SỬ DỤNG CHITINASE TỪ CHỦNG *Vibrio proteolyticus* B02

Vũ Thị Kiều Oanh, Lê Thanh Hà*

Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

TÓM TẮT

Alpha chitin - một dạng chitin tinh thể khó phân giải có nhiều trong phế thải thủy sản như vỏ tôm, cua. Việc chuyển hóa α -chitin về dạng hòa tan như chitooligosaccharide (COS) và N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) bằng phương pháp enzyme là phương pháp thân thiện môi trường vừa giúp giải quyết vấn nạn ô nhiễm môi trường vừa tạo ra nhiều sản phẩm có hoạt tính sinh học ứng dụng trong nhiều lĩnh vực. Trong nghiên cứu này, hệ enzyme chitinase từ vi khuẩn biển *Vibrio proteolyticus* B02 đã được nghiên cứu tối ưu điều kiện thủy phân trực tiếp α -chitin thành GlcNAc và (GlcNAc)₂. Các điều kiện thủy phân được khảo sát bao gồm ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ chitin, nồng độ NaCl và thời gian thủy phân cũng như các phương pháp tiền xử lý chitin. 10 g/L của α -chitin thô chứa 86,6% chitin được chuyển đổi thành 5,47 g/L GlcNAc, đạt hiệu suất thủy phân lên đến 68,69% sau 90 giờ (h) thủy phân ở điều kiện tối ưu.

Từ khóa: α -chitin, chitinase, thủy phân, *Vibrio proteolyticus*, vi khuẩn biển.

MỞ ĐẦU

Chitin là một polysaccharides phổ biến trong tự nhiên với lượng lớn thứ hai sau cellulose và lớn nhất trong môi trường biển. Trong các loài thủy sản đặc biệt là trong vỏ tôm, chitin liên kết chặt chẽ với thành phần khoáng và protein, trong đó hàm lượng chitin chiếm khá cao từ 12-42% trọng lượng khô. Ba dạng chitin tinh thể được tìm thấy trong tự nhiên bao gồm α -chitin, β -chitin và γ -chitin trong đó α -chitin (có nhiều trong vỏ tôm, cua) được phân bố rộng rãi nhất và là dạng kết tinh rắn chắc nhất. Beta-chitin ít phổ biến hơn có chủ yếu trong mai mực với cấu trúc tinh thể lỏng lẻo hơn α -chitin (Cardozo *et al.*, 2019). Do đó, có rất nhiều công bố về việc thủy phân hiệu quả trực tiếp β -chitin (Chen *et al.*, 2010; Kuk *et al.*, 2006). Gamma-chitin được tìm thấy với số lượng ít trong tự nhiên có cấu trúc tinh thể dạng trung gian giữa hai dạng α và β -chitin (Cardozo *et al.*, 2019). Do α -chitin được xem là nguồn cơ chất dồi dào, rẻ tiền nên việc chuyển đổi sinh học α -chitin có thể giải quyết các vấn đề về vấn nạn ô nhiễm môi trường do lượng phế thải không lồ này gây ra.

Chuyển đổi sinh học α -chitin mang nhiều thách thức với các nhà công nghệ sinh học do cấu trúc nén chặt và mức độ kết tinh cao của nó làm hạn chế khả năng tiếp cận của chitinase với các liên kết β -glycoside. Do đó, nhiều công trình nghiên cứu đã sử dụng phương pháp tiền xử lý chitin bằng hóa học (Cardozo *et al.*, 2019), nghiền bi và bằng sóng siêu âm (Guadalupe *et al.*, 2013) kết hợp với thủy phân enzyme để nâng cao hiệu quả thủy phân chitin. Hệ enzyme chitinase bao gồm endochitinase, chitobiosidase và N-acety-hexosaminidase (NAHase) đóng vai trò chính trong việc thủy phân chitin thành đơn phân N-acetyl glucosamine GlcNAc (Cardozo *et al.*, 2019). Trong đó, endochitinase được xem là enzyme quan trọng giúp chuyển hóa chitin tinh thể thành dạng hòa tan.

Hệ enzyme chitinase từ vi khuẩn biển *Vibrio proteolyticus* B02 đã được nhóm công bố trước đó là có khả năng sinh tổng hợp đầy đủ hệ enzyme cần thiết cho việc thủy phân chitin thành GlcNAc. Đồng thời trong nghiên cứu này các điều kiện thủy phân chitin keo cũng đã được khảo sát. Tuy nhiên việc chuyển đổi chitin thô thành chitin keo là không mong muốn do sử dụng nhiều acid có thể gây ô nhiễm môi trường (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023). Bên cạnh đó, loài *Vibrio proteolyticus* đã được chứng minh có khả năng sinh tổng hợp endochitinase thủy phân α -chitin thô, tuy nhiên điều kiện thủy phân α -chitin thô của loài này chưa được đề cập (Itoi *et al.*, 2007). Do đó, nghiên cứu ứng dụng hệ enzyme của loài này thủy phân α -chitin thô là hướng đi tiềm năng.

Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên điều kiện thủy phân α -chitin thô bằng hệ enzyme của chủng B02 được khảo sát. Nghiên cứu này được xem là nghiên cứu tiền đề về khả năng thủy phân α -chitin thô, hướng tới những nghiên cứu sâu hơn về hệ enzyme đặc biệt là endochitinase được sinh tổng hợp từ chủng B02. Đồng thời sản phẩm thủy phân cuối cùng cũng sẽ được kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng TLC để đánh giá tiềm năng ứng dụng của chúng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng giống vi sinh vật

Chủng *Vibrio proteolyticus* B02 (Mã số ON003467 trên ngân hàng gen NCBI) được phân lập từ nước biển Cát Hải, tỉnh Hải Phòng và được lưu giữ tại phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách Khoa Hà Nội.

Nguyên liệu và hóa chất sử dụng

Alpha-chitin thô được thu nhận từ vỏ tôm thẻ chứa 86,6% chitin, 1,24% khoáng, 2,1% protein, độ ẩm 10%; β -chitin được thu nhận từ mai mực chứa 88,37% chitin, 0,07% khoáng, 2,15% protein, 9,4% độ ẩm.

Các hóa chất chính sử dụng trong nghiên cứu bao gồm Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NH_4Cl , NaCl được mua của hãng Samchun (Hàn Quốc); Chiết xuất nấm men, peptone của Angel (Trung Quốc); GlcNAc và $(\text{GlcNAc})_2$ của sigma (Mỹ); n-propanol và NH_3 của Trung Quốc.

Phương pháp thu nhận chitinase

Chủng *V. proteolyticus* B02 được nhân giống trên môi trường LB 2% NaCl trong 18 giờ và cấp giống theo tỷ lệ 1% sang 50 ml môi trường khoáng tối thiểu M9 (Salas-Ovilla *et al.*, 2019) bổ sung 2% (w/v) α -chitin thô và 0,05% chiết xuất nấm men chứa trong bình tam giác 250 ml. Tiến hành nuôi cấy ở 30°C, lắc 150 v/p trong 96 giờ. Dịch enzyme thô được thu bằng cách ly tâm ở 10°C, 6000 rpm trong 30 phút và được dùng để đo hoạt độ enzyme và thủy phân chitin.

Hoạt độ enzyme chitinase, endochitinase, hexosaminidase và chitobiosidase đo được trong nghiên cứu này lần lượt là: $0,088 \pm 0,002$ (U/mL); $0,183 \pm 0,008$ (U/mL); $0,559 \pm 0,067$ (U/mL); $4,973 \pm 0,179$ (U/mL) (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023).

Phương pháp xác định điều kiện thủy phân chitin thô

Khảo sát pH thủy phân trong dải từ 4 đến 8, nhiệt độ thủy phân từ 30°C đến 40°C, nồng độ NaCl thêm vào dịch enzyme từ 1% đến 6% với cơ chất 1% α -chitin thô. Khảo sát nồng độ α -chitin thô trong khoảng từ 1% đến 3%, nhiệt độ 35°C, pH 6.

Các phương pháp tiền xử lý vật lý chitin bao gồm:

Xử lý nhiệt: Chitin được hòa trong đệm phosphate pH 6 và xử lý nhiệt ở 121°C trong 20 phút hoặc 100°C trong 20 phút (Đặng Thị Hương, Lê Thanh Hà, 2019).

Siêu âm gián đoạn 50 Hz ở 40°C 15 phút/lần lặp lại 4 lần: Hòa chitin trong đệm phosphate pH 6 (SA) và hòa trực tiếp chitin trong dịch enzyme (SA+E) (Đặng Thị Hương, Lê Thanh Hà, 2019). Lấy mẫu đo đường khử tạo thành sau 72h.

Công thức tính hiệu suất thủy phân (HSTP): $H = \frac{M_1 \cdot 0,92}{M_2} \cdot 100\%$ (1)

Trong đó: H: hiệu suất thủy phân (%); M_1 : lượng GlcNAc tạo thành trong dịch thủy phân (g/L) được xác định bằng phương pháp DNS (g); M_2 : khối lượng chitin tính theo % chitin trong nguyên liệu (g); 0,92: hệ số chuyển đổi chitin thành GlcNAc theo lý thuyết.

Phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC) xác định phổ sản phẩm thủy phân

Dịch sau thủy phân được chấm trên bản silica gel (Kieselgel 60 F245 Merck), sử dụng n-propanol 99%: amoniac 27% theo tỷ lệ 2:1 (v/v) làm dung môi phân tách. Sản phẩm thủy phân được quan sát trên bản sắc ký sau khi phun bản sắc ký bằng dung dịch 5% H_2SO_4 pha trong EtOH tuyệt đối và sấy ở nhiệt độ 140°C trong 30 phút.

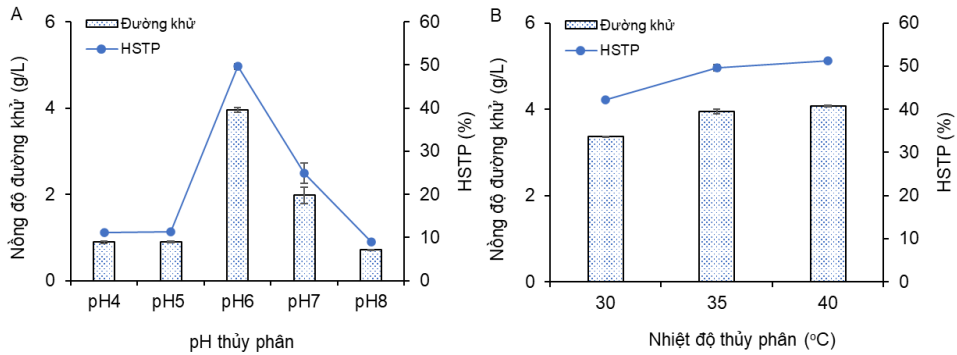
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ đến hiệu suất thủy phân α -chitin thô

Khảo sát ảnh hưởng của pH (4, 5, 6, 7, 8) được thực hiện tại nhiệt độ 35°C, ảnh hưởng của nhiệt độ (30°C, 35°C, 40°C) được thực hiện tại pH 6. Bổ sung 1% α -chitin thô vào dịch enzym và tiến hành thủy phân. Sau 72h dịch thủy phân đem ly tâm loại cặn chitin, thu dịch nổi phía trên và xác định lượng đường khử tạo thành.

Kết quả hình 1A cho thấy, nồng độ đường khử và hiệu suất thủy phân (HSTP) cao nhất đạt được ở pH 6 sau 72h thủy phân tương ứng với 3,96 g/L và 49,65%, cao gấp 3 lần nồng độ đường khử tạo thành ở pH 5 và gấp 1,5 lần ở pH 7. Điều này có thể giải thích do pH 6 là pH tối ưu cho hoạt động của endochitinase sinh tổng hợp bởi chủng B02 và pH từ 5 đến 7 cũng là pH tối ưu cho hoạt độ của các enzyme thành phần khác là chitobiosidase và NAHase (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023). Tại pH 4,5 và pH 8 quá trình thủy phân gần như không diễn ra, trong khi tại pH 7 HSTP bằng ½ so với pH 6 (Hình 1A). Kết quả này khác với thủy phân chitin keo đã công bố trước đây là tại pH 5 và pH 7 hiệu suất thủy phân tương tự với pH 6 (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023). Điều này có thể được giải thích là do sự khác biệt về cấu trúc tinh thể của cơ chất sử dụng. Theo các công bố trước đây, không phải tất cả chitinase sinh tổng hợp bởi vi sinh vật đều có khả năng thủy phân chitin thô. Kết quả này cho thấy endochitinase từ B02 chịu trách nhiệm chính thủy phân chitin tinh thể về dạng hòa tan do endochitinase hoạt động tối ưu tại pH 6 (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023), trong khi hexosaminidase hoạt động tối ưu tại pH 7 còn chitobiosidase tại pH 5. *V. proteolyticus* đã được công bố có khả năng sinh endochitinase thủy phân α -chitin (Itoi *et al.*, 2007). Chitobiosidase và hexosaminidase đều có thể thủy phân chitin keo nên hiệu quả thủy phân có thể tương đương nhau tại pH 5, pH 6 và pH 7.

Sau 72h thủy phân, lượng đường khử tạo thành và HSTP tăng lên khi nhiệt độ thủy phân tăng từ 30°C lên 40°C (Hình 1B), cao nhất ở 40°C đạt 4,08 g/L. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nhiệt độ tối ưu của endochitinase từ chủng B02 đã khảo sát là trong khoảng từ 35°C đến 45°C (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023). Khi kéo dài thủy phân đến 144h, lượng đường khử tạo thành lại cao nhất ở 35°C do tại 30°C và 40°C lượng đường khử tạo thành tăng chậm hơn so với ở 35°C (dữ liệu không hiển thị). Khi kéo dài thời gian thủy phân, hoạt độ của enzyme kém bền ở nhiệt độ cao (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023). Bên cạnh đó sự ức chế ngược có thể xảy ra, trong đó sự tích lũy của sản phẩm tạo thành làm giảm tốc độ thủy phân (Jamialahma *et al.*, 2011). Kết quả này cũng có sự khác biệt với thủy phân chitin keo khi nhiệt độ thủy phân tối ưu là 30°C thể hiện sự khác nhau của từng hoạt độ enzym thành phần trong hệ chitinase với các cơ chất chitin khác nhau (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023). Do đó, 35°C được chọn làm nhiệt độ thủy phân cho quá trình thủy phân α -chitin thô.



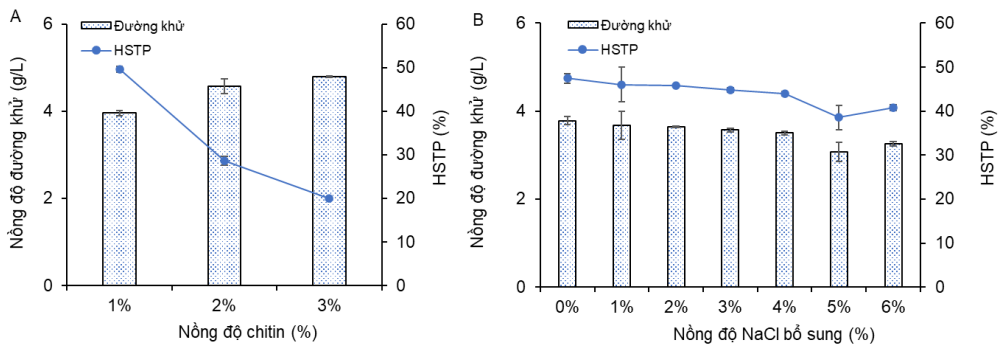
Hình 1. Ảnh hưởng của pH (A) và nhiệt độ (B) đến nồng độ đường khử tạo thành và hiệu suất thủy phân

Kết quả trên phù hợp với các nghiên cứu đã chỉ ra, rằng điều kiện nhiệt độ và pH tối ưu của các chitinase ở các loài vi sinh vật ưa ấm khác nhau thường nằm trong khoảng 35–50°C và pH 5–8 (Cardozo *et al.*, 2019).

Ảnh hưởng của nồng độ chitin đến hiệu suất thủy phân α -chitin thô

Ảnh hưởng của nồng độ chitin thô (1%, 2%, 3%) đến HSTP được thực hiện tại nhiệt độ 35°C, pH 6, sau 72h (Hình 2A).

Khi tăng nồng độ chitin mặc dù lượng đường khử tăng (3,96 g/L ở 1% và 4,8 g/L ở 3%), nhưng HSTP giảm mạnh (Hình 2A). Cụ thể, HSTP đạt được giảm dần lần lượt là 49,65%, 28,67%, 20,06% sau 72h thủy phân tương ứng với 1%, 2% và 3% cơ chất chitin được sử dụng. Sự giảm HSTP xảy ra khi tăng nồng độ cơ chất có thể do sự khuếch tán kém của enzyme vào cơ chất vì nồng độ chitin cao gây ra độ nhớt cao (Jamialahmadi *et al.*, 2011). Do đó, 1% α -chitin thô là nồng độ chitin phù hợp được lựa chọn cho quá trình thủy phân.



Hình 2. Ảnh hưởng nồng độ chitin thô (A) và nồng độ NaCl bổ sung (B) đến nồng độ đường khử tạo thành và hiệu suất thủy phân

Ảnh hưởng của nồng độ muối bổ sung vào dịch enzyme đến hiệu suất thủy phân α -chitin thô

Do *V. proteolyticus* là vi khuẩn biển sống trong điều kiện nồng độ muối từ 3,1-3,8%, NaCl có thể ảnh hưởng đến hoạt tính chitinase. Do vậy NaCl được thêm vào dịch enzyme trong quá trình thủy phân ở các nồng độ khác nhau từ 1% đến 6%. Kết quả mức độ ảnh hưởng của nồng độ muối bổ sung được đánh giá bằng sự thay đổi nồng độ đường khử và hiệu suất thủy phân so với kết quả không bổ sung NaCl thể hiện ở Hình 2B.

Kết quả Hình 2B thể hiện rằng, mặc dù chitinase sinh tổng hợp từ vi khuẩn biển *V. proteolyticus* B02 vẫn hoạt động tốt trong điều kiện có sự hiện diện nồng độ NaCl cao là 6%, tuy nhiên nồng độ đường khử và hiệu suất thủy

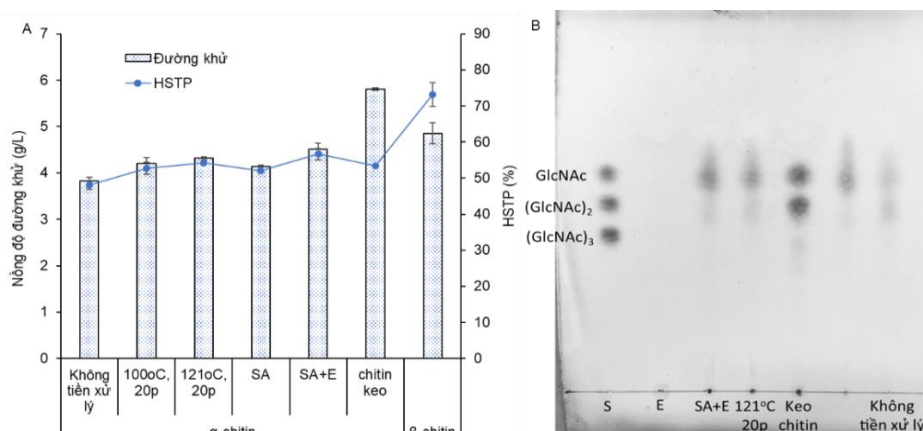
phân vẫn có xu hướng giảm khi nồng độ NaCl tăng (từ 47,45 % ở 0% NaCl giảm xuống còn 38,53% ở 5%). Tại 0% NaCl được bổ sung, chúng tôi quan sát thấy hiện tượng tạp nhiễm làm giảm nồng độ đường khử xảy ra sau 120h thủy phân (dữ liệu không hiển thị) và điều này không được phát hiện ở các mẫu bổ sung 3%, 4%, 5% và 6% NaCl. Việc bổ sung NaCl trong quá trình thủy phân có thể ngăn chặn hoặc kìm hãm sự phát triển của các vi sinh vật, tạo điều kiện vô trùng cho quá trình thủy phân kéo dài (Rivera-Solis *et al.*, 2023). Do đó 3% NaCl được bổ sung vào dịch thủy phân để giảm sự nhiễm tạp xảy ra trong quá trình thủy phân.

Ảnh hưởng của các phương pháp tiền xử lý đến hiệu suất thủy phân

Đặc tính của cơ chất sử dụng trong quá trình thủy phân là yếu tố quan trọng quyết định đến hiệu suất thủy phân cũng như sản phẩm tạo thành. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các loại cơ chất chitin khác nhau đến hiệu quả thủy phân. Kết quả thể hiện ở Hình 3.

Kết quả hình 3 cho thấy mặc dù các điều kiện thủy phân đã được tối ưu cho α -chitin thô, tuy nhiên lượng đường khử thu được trên α -chitin thô vẫn nhỏ hơn trên β -chitin thô và chitin keo cụ thể là 3,8 g/L, 4,8 g/L và 5,8 g/L tương ứng. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với cấu trúc tinh thể rắn chắc hơn của α -chitin so với β -chitin và phù hợp với các kết quả đã công bố (Muzzarelli, 1977). Chitin keo, một dạng tiền xử lý hóa học của α -chitin sử dụng nồng độ acid cao làm giảm số lượng liên kết hydro hoặc tương tác kỵ nước của cấu trúc tinh thể α -chitin, tạo điều kiện thuận lợi cho khả năng tiếp cận của chitinase với các liên kết glycoside (Cardozo *et al.*, 2019). Tuy nhiên quá trình chuyển đổi α -chitin về chitin keo tốn nhiều thời gian, công sức và sử dụng lượng lớn acid HCl nồng độ cao (Salas-Ovilla *et al.*, 2019), điều này có thể ảnh hưởng nghiêm trọng đến môi trường. Do đó các phương pháp tiền xử lý vật lý bằng siêu âm hay nhiệt được ưa thích hơn.

Kết quả thủy phân các loại α -chitin được tiền xử lý vật lý cho thấy chỉ siêu âm chitin hay xử lý nhiệt 100°C trong 20p không cải thiện đáng kể khả năng thủy phân chitin (HSTP tăng tương ứng từ 48% lên 51,98% và 52,68%). Phương pháp xử lý nhiệt ở nhiệt độ cao hơn 121°C trong 20p hay siêu âm cùng enzyme cho HSTP tăng lên rõ rệt hơn (HSTP đạt 54,18% và 56,64% tương ứng). Guadalupe và đồng tác giả (2013) cũng nhận thấy hiệu quả thủy phân cao hơn khi siêu âm chitin trong 20p so với nguyên liệu không được xử lý trước khi thực hiện thủy phân bằng chitinase từ *Lecanicillium lecanii* (Guadalupe *et al.*, 2013).



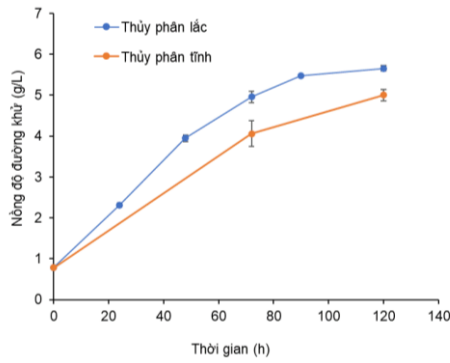
Hình 3. Ảnh hưởng của phương pháp tiền xử lý, loại chitin đến HSTP (A), kết quả xác định phổ sản phẩm thủy phân bằng TLC (B)

SA: cho enzyme vào sau siêu âm mẫu chitin 15 phút x 4 lần; SA + E: cho chitin vào dịch enzyme rồi siêu âm 15 phút x 4 lần

Sóng siêu âm tạo nhiều lỗ hổng, phá vỡ một phần liên kết hydro bên trong nguyên liệu, đồng thời làm chỉ số kết tinh của chitin giảm (Wang *et al.*, 2024). Các lỗ hổng tạo ra sẽ tạo điều kiện cho enzyme dễ xâm nhập sâu để tiếp xúc với cơ chất. Đặc biệt khi siêu âm có mặt cả enzyme, trong điều kiện cường độ thấp và tần số phù hợp, siêu âm tạo ra hiệu ứng tạo lỗ rỗng và dao động cơ học làm thay đổi cấu hình của enzyme để tăng tốc độ tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất. Do đó, hoạt động sinh học của enzyme được thúc đẩy, đẩy quá trình thủy phân nhanh hơn so với phương pháp chỉ siêu âm nguyên liệu mà không có mặt enzyme (Huang *et al.*, 2017). Kết quả này cũng được thể hiện rõ ở kết quả xác định phổ sản phẩm thủy phân hình 3B, khi thủy phân chitin không tiền xử lý tạo ra lượng đường đơn GlcNAc và đường đimer (GlcNAc)₂ là tương đương nhau trong khi chitin được tiền xử lý trước với nhiệt và siêu âm kết hợp enzyme tạo ra được nhiều đường đơn hơn (thể hiện ở vạch đậm hơn). Ảnh hưởng tích cực của siêu âm cùng enzyme đến hiệu quả thủy phân chitin cũng đã được quan sát trong thí nghiệm của Đặng Thị Hường và Lê Thanh Hà (2019).

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian thủy phân và khuấy trộn đến nồng độ đường khử tạo thành

Thực hiện thí nghiệm tại các điều kiện như sau: pH6, nhiệt độ 35°C, 3% NaCl, 1% cơ chất α -chitin. Lượng đường khử tạo thành được xác định sau mỗi 24h.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và việc khuấy trộn đến nồng độ đường khử

Kết quả cho thấy thủy phân kết hợp lắc cho hiệu quả thủy phân tăng nhanh hơn so với thủy phân tĩnh (Hình 4). Cụ thể, sau 72h thủy phân tại điều kiện lắc, nồng độ đường khử tạo thành đạt 4,96 g/L cao hơn ở điều kiện thủy phân tĩnh 1,35 lần. So với nghiên cứu của Rath năm 2002 về enzyme thô từ *Burkholderia cepacia* TU09 và *B. licheniformis* SK-1, HSTP 1% α -chitin thô đạt lần lượt là 54% và 40% sau 72h thì kết quả của chúng tôi là khả quan hơn (đạt 62,27% sau 72h) (Pichyangkura *et al.*, 2002). Tuy nhiên, nồng độ đường khử bắt đầu tăng chậm từ sau 90h thủy phân đạt 5,47 g/L tương ứng với HSTP 68,69%. Sự tăng chậm HSTP và nồng độ đường khử từ 90h đến 120h có thể do sự ức chế ngược của sản phẩm cuối kèm theo sự suy giảm hoạt độ enzyme (Jamialahma *et al.*, 2011). Như vậy sau quá trình tối ưu thủy phân, lượng đường khử thu được đạt 5,47 g/L chỉ thấp hơn không đáng kể so với thủy phân chitin keo 5,8 g/L.

KẾT LUẬN

Enzyme thô được sinh tổng hợp từ chủng *Vibrio proteolyticus* B02 có khả năng thủy phân α -chitin thô với sản phẩm tạo thành chủ yếu là đường đơn N-acetyl-D-glucosamine. Điều kiện thủy phân tối ưu thu được tại pH6, 35°C, 1% cơ chất được trộn cùng với enzyme và thực hiện siêu âm gián đoạn 15 phút 4 lần ở 40°C, 3% NaCl được bổ sung, lắc 150rpm. Hiệu suất thủy phân đạt 68,69% sau 90h, tương ứng với lượng đường khử thu được là 5,47 g/L. Với các kết quả khảo sát thu được, nhận thấy hệ enzyme sinh tổng hợp từ chủng B02 có nhiều tiềm năng ứng dụng trong thủy phân α -chitin thô, tuy nhiên cần được nghiên cứu thêm để có thể xử lý được lượng chitin lớn hơn chuyển hóa thành lượng đường đơn cao hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cardozo FA, Facchinatto WM, Colnago LA, Campana-Filho SP, Pessoa A (2019). Bioproduction of N-acetyl-glucosamine from colloidal α -chitin using an enzyme cocktail produced by *Aeromonas caviae* CHZ306. *World J Microbiol Biotechnol*, 35(8): 114.
- Chen JK, Shen CR, Liu CL (2010). N-Acetylglucosamine: *Production and Applications*. 8(9): 2493-2516.
- Đặng Thị Hương, Lê Thanh Hà (2019). Tiềm xử lý nâng cao khả năng thủy phân chitin bằng chitinase từ *Penicillium oxalicum* 20B. *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*.
- Guadalupe VL, Humberto GM, Gimeno M, Lospez-Luna A, Basrzana E, Shirai K (2013). Ultrasonication and steam-explosion as chitin pretreatments for chitin oligosaccharide production by chitinases of *Lecanicillium lecanii*. *Bioresour Technol*, 146: 794–798.
- Huang G, Chen S, Dai C, Sun L, Sun W, Tang Y, Xiong F, He R, Ma H (2017). Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrason Sonochem*, 37: 144-149.
- Itoi S, Kanomata Y, Koyama Y, Kadokura K, Uchida S, Nishio T, Oku T, Sugita H (2007). Identification of a novel endochitinase from a marine bacterium *Vibrio proteolyticus* strain No. 442. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 1774(9): 1099-1107.
- Jamialahma K, Behravan J, Najafi M, Yazdi M, Shahverdi AR, Faramarzi M (2011). Enzymatic Production of N-Acetyl-D-Glucosamine from Chitin Using Crude Enzyme Preparation of *Aeromonas* sp. PTCC1691. *Biotechnology(Faisalabad)*, 10: 292-297.
- Kuk JH, Jung WJ, Jo GH, Kim KY, Park RD (2006). Production of N,N'-diacetylchitobiose from chitin using temperature-sensitive chitinolytic enzyme preparations of *Aeromonas* sp. GJ-18. *World J Microbiol Biotechnol*, 22(2): 135-139.
- Muzzarelli RAA (1977). Chitin. *Pergamon Press, Oxford, Great Britain*, 1-309.
- Pichyangkura R, Kudan S, Kuttiyawong K, Sukwattanasinitt M, Aiba S (2002). Quantitative production of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose from crystalline chitin by bacterial chitinase. *Carbohydr Res*, 337(6): 557-559.
- Rivera-Solís RA, Granados-Baeza MJ, Solís-Pereira SE, Lizama-Uc G, Magaña-Ortiz D, Sánchez-González MN, Rojas-Herrera RA, Rivera-Muñoz G (2023). Establishment of the colloidal chitin enzymatic hydrolysis conditions to obtain N-acetyl glucosamine. *Front Sustain Food Syst*, 7.
- Salas-Ovilla R, Gálvez-López D, Vázquez-Ovando A, Salvador-Figueroa M, Rosas-Quijano R (2019). Isolation and identification of marine strains of *Stenotrophomonas maltophilia* with high chitinolytic activity. *PeerJ*, 7: e6102.
- Vũ Thị Kiều Oanh, Trần Thị Vân Anh, Phạm Thu Hà, Vy Thị Thanh Hiền, Lê Thanh Hà (2023). Đặc tính chitinaza từ vi khuẩn *Vibrio proteolyticus* B02 và tiềm năng ứng dụng trong thủy phân chitin. *Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, 1: 371-379.
- Wang Y, Feng Y, Wang X, Ji C, Xiao Z, Luo Y (2024). Ultrasonication-based preparation of raw chitin nanofiber and evaluation of its reinforcement effect on chitosan film for functionalization with curcumin. *Food Hydrocoll*, 15: 110193.

INVESTIGATION HYDROLYSIS CONDITIONS FOR CRUDE α -CHITIN USING THE CHITINASE FROM *Vibrio proteolyticus* B02 STRAIN

Vu Thi Kieu Oanh, Le Thanh Ha*

School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology

SUMMARY

Alpha chitin is a hard-to-decompose crystalline form of chitin with high concentrations in shrimp and crab shell wastes. Enzymatic conversion of α -chitin to soluble forms such as chitooligosaccharide (COS) and N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) reduces the environmental pollution problem and produces high bioactive compounds for various applications. In the present study, chitinases delivered from *Vibrio proteolyticus* B02 were optimized for the reaction conditions on α -chitin hydrolysis into GlcNAc and (GlcNAc)₂. The hydrolysis conditions included temperature, pH, chitin concentration, NaCl concentration, hydrolysis time and pre-treatment conditions. 10 g/L of crude α -chitin containing 86.6% chitin was converted into 5.47 g/L GlcNAc and the hydrolysis efficiency reached up to 68.69% after 90 h of hydrolysis under optimal conditions.

Keyword: α -chitin, chitinase, hydrolysis, *Vibrio proteolyticus*, marine bacteria.

* Author for correspondence: Tel: 0904831516; Email: ha.lethanh@hust.edu.vn