

# NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY ĐẾN KHẢ NĂNG SINH ENZYME $\beta$ -1,3-GLUCANASE CỦA CHỦNG *Bacillus siamensis* ML3

Phạm Thị Diễm Thi<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Bích Thảo<sup>2</sup>, Nguyễn Đức Chung<sup>2</sup>,  
Trương Thị Phương Lan<sup>3</sup>, Hoàng Tấn Quảng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

<sup>2</sup>Trường đại học Nông Lâm, Đại học Huế

<sup>3</sup>Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

## TÓM TẮT

Nấm bệnh là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến hư hỏng nông sản trước và sau thu hoạch, làm giảm năng suất và hiệu quả kinh tế. Sử dụng  $\beta$ -1,3-glucanase trong phòng chống nấm bệnh cho rau củ sau thu hoạch là hướng phát triển tiềm năng trong tương lai. Nghiên cứu này tập trung vào việc xác định môi trường và điều kiện nuôi cấy tối ưu để thu được enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase có hoạt độ cao nhất từ chủng *Bacillus siamensis* ML3. Các kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường tốt nhất cho sự tổng hợp enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase từ chủng ML3 là môi trường có chứa 0,65 g/L  $K_2HPO_4$ ; 2,5 g/L  $KH_2PO_4$ ; 0,5 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ ; 2,5 g/L NaCl; 0,12 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 40 g/L rỉ đường; 1,5 g/L bột đậu nành; pH 7,0. Điều kiện nuôi cấy tối ưu là ở 30°C, tốc độ lắc 180 rpm, tỷ lệ tiếp giống là 1,5%. Hoạt độ enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase khi nuôi cấy chủng ML3 trong các điều kiện tối ưu đạt 2,88 U/mL. Dịch enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase thô từ chủng ML3 với hoạt độ 1,44 U/ml có khả năng ức chế nấm *Lasiodiplodia theobromae* KBTD NHA, *Fusarium salawesiensi* HUCL4 và *Collectotrichum endophyticum* HUPV2 với tỷ lệ lần lượt là 40,28%; 15,22% và 28,57%.

**Từ khóa:** *Bacillus siamensis*,  $\beta$ -1,3-glucanase, điều kiện nuôi cấy, hoạt độ enzyme, kháng nấm bệnh.

## MỞ ĐẦU

Nhiễm nấm bệnh là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến hư hỏng rau củ trước và sau thu hoạch, trong quá trình phân phối và bảo quản. Thông thường, các chất diệt nấm hóa học được sử dụng để kiểm soát vấn đề này. Tuy nhiên, nếu dùng nhiều loại thuốc hóa học với liều lượng cao trong thời gian dài sẽ tạo môi trường bất lợi đối với các sinh vật có ích; tạo điều kiện để nấm bệnh, các loài côn trùng có hại kháng thuốc phát triển. Ở một số nước phát triển, thuốc diệt nấm có nguồn gốc hóa học bị hạn chế hoặc cấm sử dụng do dư lượng còn sót lại ngày càng tăng trên nông sản, trong đất gây ô nhiễm môi trường và các vấn đề có liên quan đến sức khỏe con người. Vì vậy, việc hướng tới sử dụng một giải pháp thay thế an toàn hơn để giảm thiểu sự hư hỏng của nông sản sau thu hoạch là cần thiết. Trong đó, biện pháp sử dụng các chế phẩm enzyme được tạo ra từ vi sinh vật đối kháng được xem là hướng đi đầy triển vọng (Jeong *et al.*, 2019; Tram *et al.*, 2023).

Các loại nấm bệnh nói chung thường có thành tế bào được cấu tạo bởi các thành phần là glucan, cellulose, chitin, chitosan, prorein, lipid,... trong đó glucan và chitin là hai thành phần chính (Fesel, Zuccaro, 2016). Để tiêu diệt các loài nấm bệnh, phương pháp sử dụng chế phẩm enzyme để phân hủy glucan và chitin của thành tế bào nấm là phương pháp ưu việt hơn so với việc dùng thuốc hóa học. Sử dụng chế phẩm có nguồn gốc từ vi sinh vật đối kháng mang lại lợi ích lâu dài, giảm chi phí đầu tư, thân thiện với môi trường và an toàn cho sức khỏe. Đồng thời, phương pháp này còn góp phần phát triển nền nông nghiệp hữu cơ bền vững. Nhiều loài *Bacillus* đã được chứng minh là có hiệu quả chống lại nhiều mầm bệnh thực vật. Chúng được báo cáo là chất kích thích tăng trưởng thực vật, được sử dụng để sản xuất nhiều loại hợp chất đối kháng và là đối thủ cạnh tranh về các yếu tố tăng trưởng như không gian và chất dinh dưỡng với các vi sinh vật gây bệnh khác thông qua quá trình xâm chiếm (Jeong *et al.*, 2019; Tram *et al.*, 2023).

Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã phân lập được một số chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase ngoại bào mạnh đồng thời có khả năng kháng lại các loài nấm bệnh thân thư hại ớt, trong đó có chủng *Bacillus siamensis* ML3 (Tram *et al.*, 2023). Nghiên cứu này trình bày ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy lên khả năng sản xuất  $\beta$ -1,3-glucanase từ chủng ML3, một enzyme rất tiềm năng để phát triển chế phẩm phòng trừ nấm bệnh trong tương lai.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng vi sinh vật

Chủng vi khuẩn *Bacillus siamensis* ML3 có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase, các chủng nấm *Fusarium*

*salawesiensi* HUCL4 và *Collectotrichum endophyticum* HUPV2 gây bệnh trên cây ớt, chủng nấm *Lasiodiplodia theobromae* KBTD NHA gây bệnh trên cây sen do Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế cung cấp.

### **Xây dựng đường cong sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme $\beta$ -1,3-glucanase**

Chủng *Bacillus siamensis* ML3 được nuôi theo phương pháp của Dewi *et al.* (2016). Dịch giống mật độ  $0,5 \times 10^8$  CFU/mL (1% v/v) được cấy vào 100 mL môi trường cơ bản có bổ sung 1% laminarin như là chất cảm ứng, nuôi cấy trong tủ lắc. Dịch huyền phù vi khuẩn được thu từ 0-33 giờ nuôi cấy để xác định mật độ tế bào và 12-33 giờ để xác định hoạt độ enzyme.

Mật độ tế bào được xác định thông qua đo mật độ quang (OD) dịch huyền phù trên máy quang phổ (Spectro UV-2650, Labomed, Mỹ) ở bước sóng 600 nm.

Dịch nuôi cấy được thu bằng ly tâm 11.000 vòng/phút trong 7 phút để xác định hoạt độ enzyme. Hoạt độ  $\beta$ -1,3-glucanase được xác định bằng phương pháp so màu (Wu *et al.*, 2018): trộn 500  $\mu$ L dịch enzyme với 500  $\mu$ L đệm 100 mM sodium acetate chứa 0,5% laminarin (pH 7,0), ủ ở 40°C trong 30 phút. Bổ sung 2 mL dung dịch 1% 3,5-dinitro salicylic acid (DNS), đun sôi trong 10 phút để phát triển màu. Mật độ quang được đo ở bước sóng 540 nm. Nồng độ glucose trong dịch phản ứng được xác định dựa trên đường chuẩn glucose. Một đơn vị hoạt độ của  $\beta$ -1,3-glucanase được xác định bằng lượng enzyme cần thiết để tạo ra 1  $\mu$ mol đường khử trong thời gian 1 phút ở điều kiện thí nghiệm (Wu *et al.*, 2018).

### **Ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy đến hoạt độ enzyme $\beta$ -1,3-glucanase**

#### **Ảnh hưởng của nguồn carbon**

Ảnh hưởng của nguồn carbon đến quá trình sinh tổng hợp enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase được đánh giá bằng cách lên men chủng ML3 trong môi trường cơ bản (0,65 g/L  $K_2HPO_4$ ; 2,5 g/L  $KH_2PO_4$ ; 0,5 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ ; 2,5 g/L NaCl, 0,12 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 1,5 g/L dịch chiết nấm men (YE)) (Dewi *et al.* (2016) có bổ sung laminarin, đại mạch, yến mạch, bột mì, rỉ đường hoặc glucose ở nồng độ 1% (w/v). Điều kiện nuôi cấy: tiếp giống 1%, lắc 180 vòng/phút, nhiệt độ phòng, 21 giờ. Nguồn carbon tối ưu (1-5%) tiếp tục được sử dụng để khảo sát nồng độ thích hợp nhất (Phạm Thị Tuyết Ngân *et al.*, 2021).

#### **Ảnh hưởng của nguồn nitrogen**

Ảnh hưởng của nguồn nitrogen được đánh giá bằng cách nuôi cấy chủng ML3 trong môi trường có bổ sung các nguồn nitrogen khác nhau như peptone, bột đậu nành hoặc YE với nồng độ 0,15% (w/v). Nguồn nitrogen tối ưu (0,05-0,5%) được sử dụng để khảo sát nồng độ thích hợp nhất (Phạm Thị Tuyết Ngân *et al.*, 2021).

#### **Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống**

Chủng ML3 được nuôi cấy trên môi trường tối ưu với tỷ lệ tiếp giống từ 1-3% (Phạm Thị Tuyết Ngân *et al.*, 2021).

#### **Ảnh hưởng của pH môi trường**

Chủng ML3 được nuôi cấy trên môi trường tối ưu với pH môi trường nuôi cấy được khảo sát trong khoảng 4,0-8,0 (Nguyễn Thị Lâm Đoàn, 2021).

#### **Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy**

Chủng ML3 được nuôi cấy trên môi trường tối ưu với nhiệt độ nuôi cấy được khảo sát trong khoảng từ 25-45°C (Nguyễn Thị Lâm Đoàn, 2021).

#### **Ảnh hưởng của tốc độ lắc**

Chủng ML3 được nuôi cấy trên môi trường tối ưu với tốc độ lắc được khảo sát trong khoảng 140-200 vòng/phút với các điều kiện tối ưu ở trên.

### **Đánh giá khả năng kháng nấm của chế phẩm $\beta$ -1,3-glucanase từ chủng *Bacillus siamensis* ML3**

Dịch enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase thô từ chủng ML3 được thu bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy ở tốc độ 14.000 rpm trong 15 phút. Để đánh giá khả năng kháng nấm của enzyme, các chủng nấm được nuôi cấy trên môi trường PDA có bổ sung dịch enzyme nồng độ 50%. Khả năng ức chế nấm bệnh của enzyme được đánh giá sau 5 ngày cấy theo công thức:

$$H = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100 (\%)$$

Trong đó:  $R_1$  là đường kính nấm bệnh trên đĩa đối chứng (mm) và  $R_2$  đường kính nấm bệnh trên đĩa thí nghiệm (mm).

#### **Xử lý số liệu**

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Kết quả thí nghiệm được xử lý để thu giá trị trung bình và phân tích Duncan's test bằng phần mềm SPSS 20.0 với mức xác suất có ý nghĩa  $p < 0,05$ , đồ thị được xây dựng dựa trên phần mềm Microsoft Excel.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Đường cong sinh trưởng và khả năng sinh enzyme của vi khuẩn *Bacillus siamensis* ML3

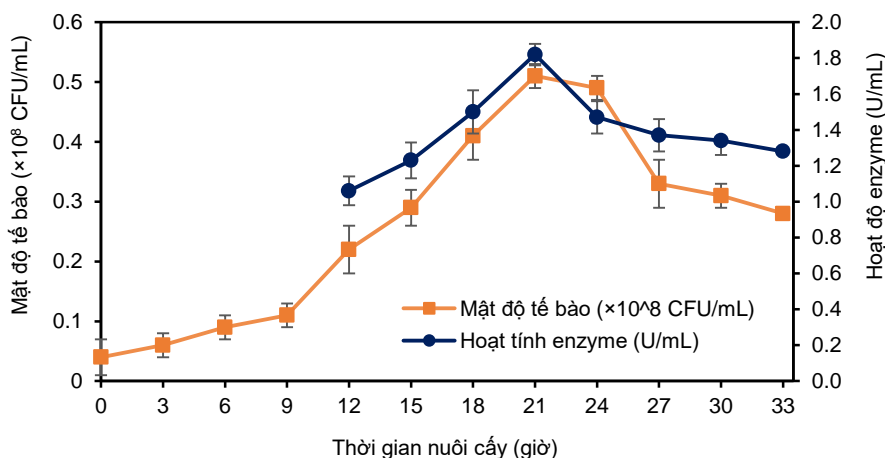
Mỗi chủng vi sinh vật có tốc độ sinh trưởng không giống nhau; tốc độ phân chia tế bào ở mỗi giai đoạn là khác nhau nên việc xây dựng đường cong sinh trưởng và sinh enzyme ngoại bào là cần thiết để xác định được thời điểm thu sinh khối và enzyme tốt nhất. Kết quả xác định mật độ tế bào và hoạt độ  $\beta$ -1,3-glucanase trên môi trường chứa 1% laminarin được thể hiện ở Hình 1.

Trong khoảng thời gian từ 0-9 giờ, vi khuẩn ở pha lag và sinh trưởng chậm. Sau đó, tốc độ sinh trưởng của tế bào tăng nhanh do bước vào pha log. Mật độ tế bào chủng ML3 thu được sau 12 giờ là  $0,22 \times 10^8$  CFU/mL, sau đó tăng dần và đạt giá trị cao nhất là  $0,51 \times 10^8$  CFU/mL sau 21 giờ nuôi cấy. Sau 21 giờ, mật độ tế bào giảm liên quan đến sự suy giảm nguồn dinh dưỡng trong môi trường. Hoạt độ enzyme cũng thay đổi theo xu hướng tương tự với sự phát triển của mật độ tế bào. Hoạt độ enzyme ở thời điểm 12 giờ là 1,06 U/mL, tăng dần và đạt giá trị lớn nhất ở 21 giờ nuôi cấy với 1,82 U/mL; đây là giai đoạn cuối của pha tăng trưởng và bước vào pha tĩnh. Kết quả này tương đồng với một số nghiên cứu đã công bố. Enzyme  $\beta$ -glucanase có nguồn gốc từ chủng *Bacillus subtilis* SAHA 32.6 (Dewi *et al.*, 2016) hay từ chủng *B. subtilis* ZJF - 1A5 (Ting *et al.*, 2004) đều có hoạt độ cao nhất khi vi khuẩn sinh trưởng ở cuối pha log và bước vào giai đoạn ổn định.

### Ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy đến hoạt độ $\beta$ -1,3-glucanase

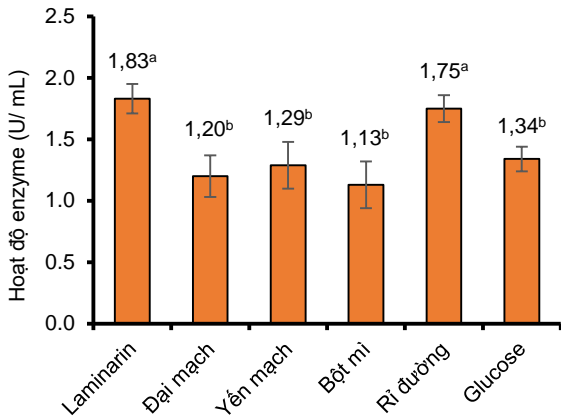
#### Ảnh hưởng của nguồn carbon

Để đánh giá ảnh hưởng của nguồn carbon lên sinh trưởng và sinh enzyme, chủng ML3 được nuôi cấy trong môi trường cơ bản với nguồn carbon là laminarin được thay thế bằng một trong các nguồn đại mạch, yến mạch, bột mì, rỉ đường và glucose. Dịch nuôi cấy được thu sau 21 giờ để xác định hoạt độ enzyme. Kết quả Hình 2 cho thấy, hoạt độ  $\beta$ -1,3-glucanase của chủng ML3 khi nuôi cấy ở các nguồn carbon thay thế thấp hơn so với môi trường chứa laminarin và đạt hiệu quả cao nhất khi sử dụng rỉ đường là nguồn carbon với hoạt độ là 1,75 U/mL (Hình 2). Sử dụng laminarin và rỉ đường làm nguồn carbon cho kết quả không có sự khác biệt thống kê về khả năng sinh enzyme sau 21 giờ nuôi cấy. Tuy nhiên, với nguồn carbon là rỉ đường, sản phẩm phụ của công nghiệp đường mía có giá thành thấp, dễ tìm nên được chọn làm nguồn carbon thay thế cho laminarin trong các nghiên cứu tiếp theo.

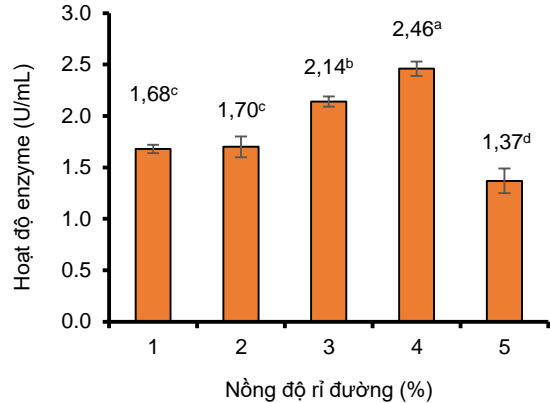


Hình 1. Đường cong sinh trưởng và hoạt độ enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase của chủng *Bacillus siamensis* ML3

Khả năng sinh tổng hợp  $\beta$ -1,3-glucanase của chủng ML3 có sự khác biệt rõ rệt ở các nồng độ rỉ đường khác nhau. Hoạt độ enzyme tăng dần theo nồng độ rỉ đường từ 1-4%, đạt giá trị lần lượt là 1,68 U/mL, 1,7 U/mL, 2,14 U/mL và cao nhất là 2,46 U/mL ở nồng độ 4%. Khi bổ sung nguồn carbon ở nồng độ cao hơn (5%), hoạt độ enzyme thu được giảm chỉ còn 1,37 U/mL (Hình 3). Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Shabeab *et al.* (2010), nhóm tác giả đã cho rằng nồng độ rỉ đường khác nhau từ 2-20% là phù hợp để sản xuất cellulase đối với chủng *B. subtilis* BM1. Rỉ đường (4%) được chọn làm nguồn carbon cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn carbon

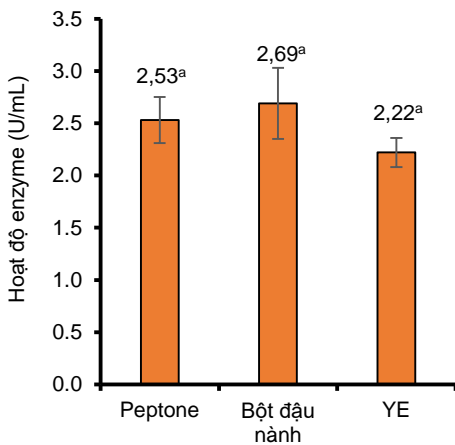


Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ nguồn carbon

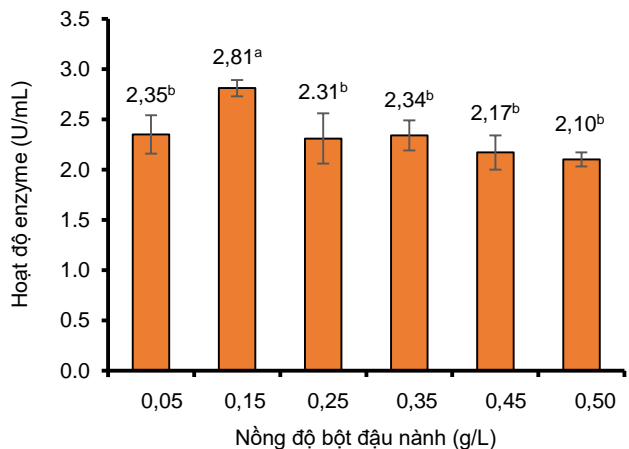
**Ảnh hưởng của nguồn nitrogen**

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến hoạt độ enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase từ Hình 4 cho thấy, hoạt độ enzyme trong môi trường có sử dụng peptone, bột đậu nành, YE đạt từ 2,22-2,69 U/mL và không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa  $p < 0,05$ . Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Ting *et al.* (2004), cả YE và bột đậu nành đều thích hợp làm nguồn nitrogen cho *B. subtilis* ZJF-1A5 sinh trưởng và sinh enzyme  $\beta$ -glucanase. Nizamudeen, Bajaj (2009) cũng đã công bố rằng bột đậu nành là nguồn nitrogen thích hợp kích thích sản xuất endoglucanase từ chủng *Bacillus* sp. NZ. Do bột đậu nành có giá thành rẻ hơn so với các nguồn nitrogen còn lại nên được lựa chọn cho quá trình nghiên cứu và sản xuất enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase từ chủng ML3.

Ảnh hưởng của nồng độ bột đậu nành đến hoạt độ enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase được thể hiện ở Hình 5. Hoạt độ enzyme tăng dần khi bổ sung bột đậu nành nồng độ 0,05 đến 0,15% và đạt giá trị cao nhất là 2,81 U/mL tại nồng độ 0,15%. Hoạt độ giảm dần ở các nồng độ cao hơn (0,25-0,5%), đạt giá trị thấp nhất là 2,1 U/mL tại nồng độ 0,5%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nồng độ bột đậu nành thích hợp cho sản xuất enzyme là 0,15%, thấp hơn nghiên cứu của Nizamudeen, Bajaj (2009) với nồng độ bột đậu nành tối ưu là 0,5% khi sản xuất endoglucanase từ chủng *Bacillus* sp. NZ.



Hình 4. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen



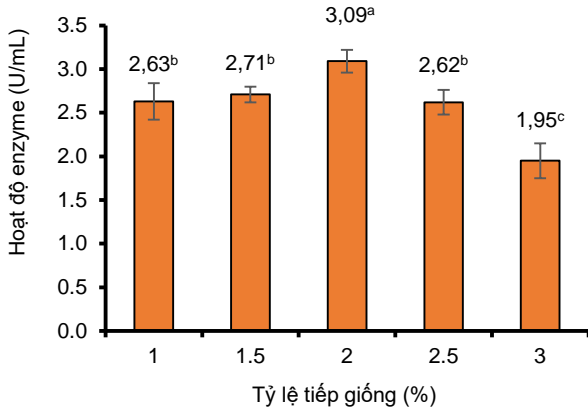
Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ nguồn nitrogen

**Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống**

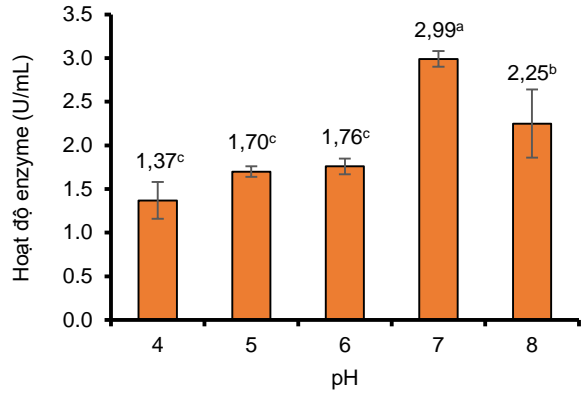
Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống được tiến hành với 5 tỷ lệ khác nhau từ 1-3% (v/v) nhằm tối ưu được lượng giống cần thiết cho quá trình lên men. Kết quả trình bày ở hình 6 cho thấy, hoạt độ enzyme tăng dần theo tỷ lệ tiếp giống từ 1-2% với giá trị lần lượt là 2,63; 2,71 và 3,09 U/mL. Hoạt độ enzyme giảm dần ở các tỷ lệ tiếp giống cao hơn và đạt giá trị thấp nhất là 1,95 U/mL khi tỷ lệ giống bổ sung là 3%. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Shankar, Isaiarasu (2011) khi sản xuất cellulase từ chủng *B. pumilus* EWBCM1 trong các điều kiện môi trường khác nhau. Hoạt độ cellulase tối đa thu được khi nuôi cấy ở 37°C trong 72 giờ với tỷ lệ giống 2%.

**Ảnh hưởng của pH môi trường**

Hoạt động của enzyme phụ thuộc vào quá trình gấp cuộn của protein và nhạy cảm với các yếu tố môi trường như nhiệt độ, pH và nồng độ muối (Moran, 2018). Khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy (4,0-8,0) lên hoạt độ  $\beta$ -1,3-glucanase cho thấy, hoạt độ enzyme tăng dần từ pH acid đến trung tính và giảm xuống khi pH base. *Bacillus siamensis* ML3 sinh trưởng tốt ở môi trường có pH 7,0 với hoạt độ cao nhất đạt 2,99 U/mL (Hình 7). Đa số các công trình nghiên cứu sản xuất  $\beta$ -1,3-glucanase từ chi *Bacillus* đều nhận thấy pH 7,0 là phù hợp cho sản xuất enzyme, chẳng hạn, sản xuất  $\beta$ -1,3-glucanase từ *B. subtilis* J1 (Narasimhan *et al.*, 2013) hay *B. subtilis* AF1 (Manjula, Podile, 2005).



Hình 6. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống



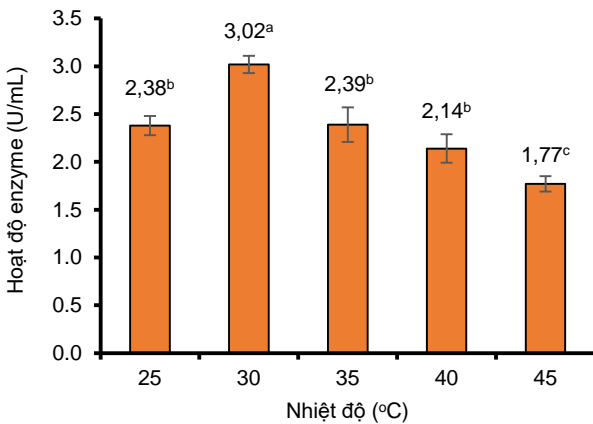
Hình 7. Ảnh hưởng của pH môi trường

**Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy**

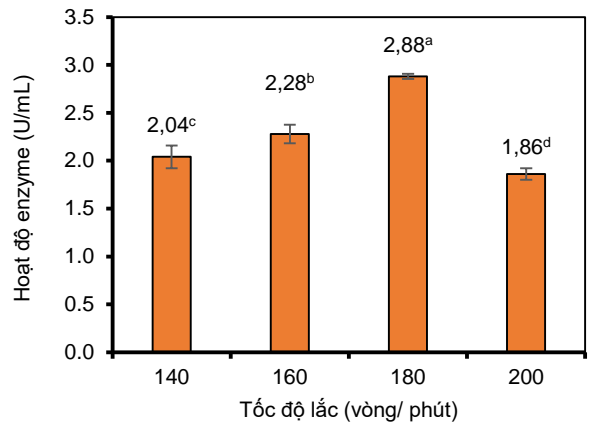
Khả năng tổng hợp enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase của chủng ML3 tăng dần từ nhiệt độ 25-30°C và mạnh nhất khi nhiệt độ nuôi cấy 30°C với giá trị 3,02 U/mL. Hoạt độ  $\beta$ -1,3-glucanase giảm dần khi nhiệt độ nuôi cấy tăng lên 35, 40 và 45°C lần lượt là 2,39; 2,14 và 1,77 U/mL (Hình 8). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Narasimhan *et al.* (2013) khi tối ưu quá trình sản xuất enzyme phân giải nấm (chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase và cellulose) từ *B. subtilis* J1. Hoạt độ tối đa của cả ba enzyme đều đạt được khi nhiệt độ của môi trường ở 30°C. Manjula, Podile (2005) cũng thu được hoạt độ enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase cao nhất khi nuôi cấy chủng *B. subtilis* AF1 ở nhiệt độ 30°C.

**Ảnh hưởng của tốc độ lắc**

Tốc độ lắc trong quá trình nuôi cấy có ảnh hưởng đến khả năng sinh enzyme cũng như hoạt độ của enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase của chủng ML3. Hoạt độ enzyme tăng dần theo tốc độ lắc từ 140-180 vòng/phút với các giá trị lần lượt là 2,04; 2,28; 2,88 U/mL và thấp nhất khi nuôi ở tốc độ 200 vòng/phút (1,86 U/mL). Theo Manjula, Podile (2005), chủng *B. subtilis* AF1 được nuôi trong môi trường có laminarin 1%, YE 0,3%, pH 7, ở 30°C với tốc độ lắc 180 vòng/phút thu được enzyme tối đa sau 3 ngày nuôi cấy, tương tự như tốc độ lắc đối với nuôi cấy chủng ML3.



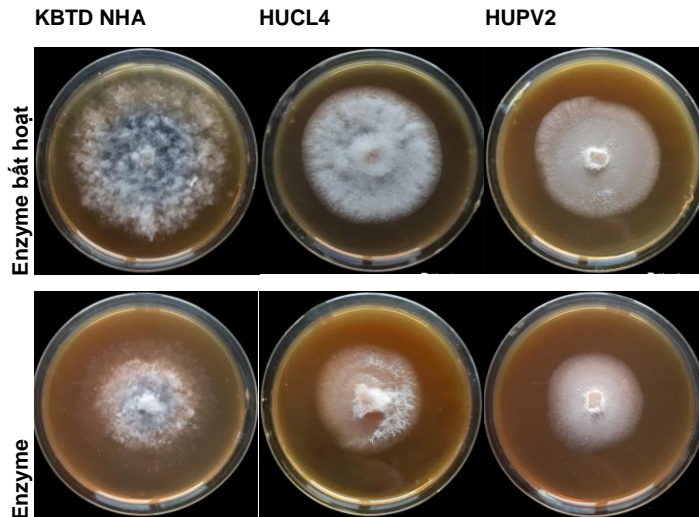
Hình 8. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi



Hình 9. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

**Khả năng kháng một số loài nấm của chế phẩm enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase**

*Bacillus* nói chung và *Bacillus siamensis* ML3 nói riêng được biết đến như một tác nhân phòng trừ sinh học đối với một số loại nấm gây bệnh ở thực vật vì chúng có khả năng sinh ra các enzyme ngoại bào như chitinase,  $\beta$ -glucanase, protease, cellulase,... làm suy giảm thành tế bào, ức chế sự phát triển của nấm bệnh (Tram *et al.*, 2023). Chitin và  $\beta$ -glucan là các polysaccharide chính trong thành tế bào của nấm. Kết quả thử nghiệm khả năng ức chế sinh trưởng của nấm bệnh cho thấy, dịch enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase thô từ chủng ML3 có khả năng ức chế sự phát triển của các chủng nấm được khảo sát. Chủng nấm KBTD NHA, HUCL4 và HUPV2 sinh trưởng trên đĩa đối chứng (bổ sung dịch enzyme đã bị bất hoạt) có đường kính tản nấm lần lượt là 72, 46 và 63 mm. Trong khi đó, các chủng nấm này khi sinh trưởng trên môi trường có enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase đường kính tăng nấm đạt lần lượt là 43, 39 và 45 mm; tương ứng với tỷ lệ ức chế 40,28%, 15,22% và 28,57% (Hình 10).



Hình 10. Khả năng ức chế sự phát triển của một số loài nấm bởi enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase từ chủng ML3

**KẾT LUẬN**

Môi trường tốt nhất cho sự tổng hợp enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase từ chủng ML3 là môi trường có chứa 0,65 g/L  $K_2HPO_4$ ; 2,5 g/L  $KH_2PO_4$ ; 0,5 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ ; 2,5 g/L NaCl, 0,12 g/L  $MgSO_4.7H_2O$ ; 40 g/L rỉ đường; 1,5 g/L bột đậu nành; pH 7. Điều kiện nuôi cấy tối ưu là ở 30°C, tốc độ lắc 180 rpm, tỷ lệ tiếp giống là 1,5%. Hoạt độ enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase khi nuôi cấy chủng ML3 trong các điều kiện tối ưu đạt 2,88 U/mL. Dịch enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase thô từ chủng ML3 với hoạt độ 1,44 U/ml có khả năng ức chế nấm *Lasiodiplodia theobromae* KBTD NHA, *Fusarium salawesiensi* HUCL4 và *Collectotrichum endophyticum* HUPV2 với tỷ lệ lần lượt là 40,28%; 15,22% và 28,57%.

*Lời cảm ơn:* Công trình được thực hiện bằng kinh phí của đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo năm 2022, mã số CT.2022.09.DHH.03.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Dewi RTK, Mubarik NR, Suhartono MT (2016) Medium optimization of beta-glucanase production by *Bacillus subtilis* SAHA 32.6 used as biological control of oil palm pathogen. *Emir J Food Agric* 28: (2).

Fesel PH, Zuccaro A (2016)  $\beta$ -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genet Biol* 90: 53-60.

Jeong H, Choi SK, Ryu CM, Park SH (2019) Chronicle of a soil bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a tiny guardian of plant and human health. *Front Microbiol* 10: 467.

Manjula K, Podile AR (2005) Production of fungal cell wall degrading enzymes by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF 1. *Ind J Exper Biol* 43: (10) 892-896.

Moran S (2018) Chapter 3 - Biology. *An Applied Guide to Water and Effluent Treatment Plant Design*, (Moran S, ed. ^eds.), p. ^pp. 25-37. Butterworth-Heinemann.

Narasimhan A, Bist D, Suresh S, Shivakumar S (2013) Optimization of mycolytic enzymes (chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase and cellulose) production by *Bacillus subtilis*, a potential biocontrol agent using one-factor approach. *J Sci Ind Res* 72: 172-178.

Nguyễn Thị Lâm Đoàn (2021) Xác định điều kiện và môi trường thay thế để nuôi cấy khuẩn *Bacillus* spp. tạo chế phẩm vi khuẩn phục vụ xử lý nước thải. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* 2: (123) 103-110.

Nizamudeen S, Bajaj B (2009) A novel thermo-alkalitolerant endoglucanase production using cost-effective agricultural residues as substrates by a newly isolated *Bacillus* sp. NZ. *Food Technol Biotechnol* 47: 435-440.

- Phạm Thị Tuyết Ngân, Vũ Hùng Hải, Huỳnh Trường Giang, Vũ Ngọc Út (2021) Tối ưu các điều kiện sinh enzyme protease ngoại bào của vi khuẩn *Streptomyces* DH3.4. *Can Tho University Journal of Science* 57: (4) 186-193.
- Shabeb MSA, Younis MAM, Hezayen FF, Nour-Eldein MA (2010) Production of cellulase in low-cost medium by *Bacillus subtilis* KO strain. *World Appl Sci J* 8: 35-42.
- Shankar T, Isaiarasu L (2011) Cellulase production by *Bacillus pumilus* EWBCM1 under varying cultural conditions. *Middle East J Sci Res* 8: (1) 40-45.
- Ting XJ, He GQ, Chen QH, Zhang XY, Ali MA (2004) Medium optimization for the production of thermal stable glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. *J Bioresour Technol* 93: 175-181.
- Tram TTN, Quang HT, Vu NQH, Nguyen PTT, Thi TNM, Phuong TTB, Thi PTD (2023) Isolation of bacteria displaying potent antagonistic activity against fungi causes anthracnose disease in chilli. *Biodiversitas* 24: (9) 4919-4926.
- Wu Q, Dou X, Wang Q, Guan Z, Cai Y, Liao X (2018) Isolation of  $\beta$ -1,3-glucanase-producing microorganisms from *Poria cocos* cultivation soil via molecular biology. *Molecules* 23: (7) 1555.

## EFFECTS OF MEDIUM AND CULTURE CONDITIONS ON $\beta$ -1,3-GLUCANASE PRODUCTION OF *Bacillus siamensis* ML3

Pham Thi Diem Thi<sup>1\*</sup>, Nguyen Thi Bich Thao<sup>2</sup>, Nguyen Duc Chung<sup>2</sup>,  
Truong Thi Phuong Lan<sup>3</sup>, Hoang Tan Quang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Hue University

<sup>2</sup>University of Agriculture and Forestry, Hue University

<sup>3</sup>University of Medicine and Pharmacy, Hue University

### ABSTRACT

Fungal diseases are the leading cause of damage to agricultural products, reducing productivity and economic efficiency. Using  $\beta$ -1,3-glucanase in preventing post-harvest vegetables against fungal diseases in is a potential method in the future. The aims of this study is determining the optimal medium and culture conditions to obtain the highest activity  $\beta$ -1,3-glucanase from *Bacillus siamensis* ML3. The results shown that the suitable culture medium for  $\beta$ -1,3-glucanase production from ML3 strain containing 0.65 g/L  $K_2HPO_4$ ; 2.5 g/L  $KH_2PO_4$ ; 0.5 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ ; 2.5 g/L NaCl; 0.12 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 40 g/L molasses and 1.5 g/L soybean powder (pH 7.0). ML3 strain was culture at 30°C, shaking speed 180 rpm with the inoculum ratio of 1.5% (v/v). The  $\beta$ -1,3-glucanase activity of ML3 strain reached 2.88 U/mL under optimal conditions. Crude  $\beta$ -1,3-glucanase enzyme solution from ML3 strain (1.44 U/mL) has the ability to inhibit the growth ability of *Lasiodiplodia theobromae* MPA NHA, *Fusarium salawesiensi* HUCL4 and *Colletotrichum endophyticum* HUPV2 at a rate of 40.28%, 15.22% and 28.57%, respectively.

**Keywords:** Antifungal, *Bacillus siamensis*,  $\beta$ -1,3-glucanase, culture conditions, enzyme activity.

\* Author for correspondence: Tel: 0983336019. Email: ptdiemthi@hueuni.edu.vn