

PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH CHỦNG NẤM MỐC CÓ HOẠT TÍNH CHITINASE CAO

Ngô Ngọc Lan Anh, Nguyễn Thị Thùy Linh, Hồ Đăng Quốc Huy, Nguyễn Minh Trí*

Trường Đại học Khoa học - Đại học Huế

TÓM TẮT

Nấm mốc đã được nghiên cứu và ứng dụng để sản xuất nhiều loại enzym khác nhau, trong đó có chitinase. Nghiên cứu này tập trung vào quá trình tuyển chọn, định danh chủng nấm mốc có hoạt tính chitinase cao được phân lập từ đất vườn, trầm tích rừng ngập mặn, ao nuôi tôm... và đánh giá các điều kiện ảnh hưởng đến hoạt tính chitinase của chủng nấm mốc được tuyển chọn. Từ 9 mẫu đất vườn, trầm tích rừng ngập mặn, ao nuôi tôm... ở thành phố Huế, đã phân lập được 36 chủng nấm mốc, kết quả sơ tuyển chọn được chủng M11 phân lập từ trầm tích ao nuôi tôm có khả năng phân giải chitin với kích thước vòng phân giải lớn nhất ($36,2 \pm 0,31$ mm). Kết quả định danh bằng phân tích trình tự ITS và so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI, chủng M11 được xác định là loài *Aspergillus oryzae*. Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sinh trưởng và tổng hợp chitinase của *A. oryzae* M11 là: thời gian nuôi cấy 72 giờ, pH = 5.5, chất cảm ứng là bột chitin với nồng độ 1% là thích hợp nhất và cho hoạt độ chitinase cao nhất. Kết quả điện di SDS-PAGE của chế phẩm chitinase được kết tủa bằng ethanol từ dịch chiết enzyme của chủng *A. oryzae* M11 có sự hiện diện của chitinase với trọng lượng phân tử khoảng 26 ~ 35 kDa. Nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng của chủng nấm mốc *A. oryzae* M11 có hoạt tính chitinase cao trong việc sản xuất các chế phẩm từ vỏ tôm là nguồn phế phụ phẩm của ngành chế biến thủy sản, góp phần bảo vệ môi trường.

Từ khóa: Nấm mốc, chitinase, *Aspergillus oryzae*.

MỞ ĐẦU

Chitin là một polymer sinh học có trữ lượng đứng thứ 2 trong tự nhiên chỉ sau cellulose (Dutta P.K. *et al.*, 2004). Chitin phân bố rất rộng rãi ở dạng cấu trúc cơ bản trong thành tế bào của nấm và là cấu tạo phần vỏ ngoài của tôm, cua và côn trùng... Đây là một polymer có trọng lượng phân tử cao, không tan trong nước, chứa các đơn phân là N-acetyl-glucosamine liên kết bởi liên kết 1,4- β -glucoside (Trang Sĩ Trung và đồng tác giả, 2010). Chitin không có khả năng hòa tan trong nước nên việc sử dụng chúng rất hạn chế. Vì thế để nâng cao giá trị sử dụng của chitin, người ta nghiên cứu theo hướng sản xuất các chế phẩm từ chitin như: oligochitin, glucosamine, chitosan... có thể hòa tan để mở rộng phạm vi ứng dụng và giải quyết các nguồn phế phẩm từ ngành chế biến thủy sản của nước ta, nhằm giảm tác hại gây ô nhiễm môi trường. Những năm gần đây có nhiều công trình nghiên cứu tập trung vào chitinase do tiềm năng ứng dụng to lớn của enzyme này trong nhiều lĩnh vực khác nhau như trong thu nhận tế bào trần (thể nguyên sinh), sản xuất chitin oligosaccharide, glucosamine và N-acetyl glucosamine, sản xuất thuốc trừ sâu sinh học, trong việc kiểm soát nấm ký sinh trên cây trồng, ứng dụng trong y học... (Trần Thị Luyết và đồng tác giả, 2006). Những nguồn để thu nhận chitinase đáng kể là các chủng vi khuẩn thuộc các chi *Enterobacter* và *Streptomyces*, các chủng nấm sợi thuộc các chi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* và một số động vật nguyên sinh.

Do đó, việc phân lập và chọn lọc các chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp chitinase mạnh cũng như tối ưu hóa các điều kiện thu nhận chitinase từ các chủng này được quan tâm nghiên cứu trong những năm gần đây. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập, tuyển chọn và định danh chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp chitinase ngoại bào có hoạt tính cao và xác định các điều kiện thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp chitinase của chủng được tuyển chọn. Nghiên cứu này tạo cơ sở cho việc thu nhận chitinase ngoại bào cũng như ứng dụng trong việc tạo chế phẩm sinh học để ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng nấm mốc có hoạt độ chitinase cao được phân lập từ các nguồn khác nhau tại thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế: đất vườn, trầm tích rừng ngập mặn, ao nuôi tôm... Mẫu đất sau khi thu về được hong khô trong không khí ở nhiệt độ phòng, sau đó nghiền nhỏ và lọc qua rây để loại bỏ rác, cho vào túi nilon để bảo quản chuẩn bị cho phân lập.

Vỏ tôm thẻ chân trắng được thu nhận tại nhà máy chế biến thủy sản Phú Song Hoàng, thành phố Huế.

Hóa chất: 3,5-acid dinitrosalicylic (DNS) của hãng Sigma Aldrich, agar (Thái Lan), các hóa chất thông thường (Trung Quốc).

Phương pháp

Bột chitin và chitin huyền phù

Bột chitin: Vỏ tôm thẻ chân trắng được rửa sạch, sấy khô. Sau đó xử lý tách protein bằng dung dịch NaOH 5% ở 70-75°C trong 4 giờ, rửa sạch bằng nước cất. Tiếp tục tách khoáng bằng dung dịch HCl 10% ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ, rửa sạch bằng nước cất. Sấy khô, nghiền nhỏ thành dạng bột.

Chitin huyền phù 1%: Dung dịch chitin huyền phù 1% được chuẩn bị như sau: 1g bột chitin được cho từ từ vào 20ml HCl đậm đặc, khuấy đều và để qua đêm ở 4°C. Thêm vào hỗn hợp 200ml ethanol lạnh, khuấy đều và ủ qua đêm. Ly tâm hỗn hợp ở 5000 vòng/phút trong 20 phút, thu lấy kết tủa và rửa bằng nước cất cho đến khi pH trung tính. Thêm nước cất vào tủa cho đủ thể tích 100ml (Nguyễn Thị Hà, 2012).

Phân lập các chủng nấm mốc

Sử dụng phương pháp Koch để phân lập nấm mốc trên môi trường Czapeck có thành phần như sau: 20 g saccharose, 1g KH₂PO₄, 0,01 g FeSO₄, 0,5 g MnSO₄, 3g NaNO₃, 20 g agar, nước cất vừa đủ 1000 ml (Nguyễn Lâm Dũng và đồng tác giả, 2003).

Cân 1g mẫu, hòa tan vào 9ml nước cất vô trùng, khuấy đều, ta thu được dung dịch có độ pha loãng là 10⁻¹. Từ dung dịch trên tiến hành pha loãng mẫu ở các độ pha loãng tiếp theo 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵. Lấy dịch pha loãng ở các độ pha loãng ở trên nhỏ lên đĩa Petri chứa môi trường Czapeck, mỗi đĩa 1 giọt. Dùng que gạt được khử trùng trên ngọn lửa đèn cồn và làm nguội, trải đều giọt dịch khắp môi trường nuôi cấy cho đến khi khô. Đậy nắp đĩa, ghi chú các thông tin như: ngày cấy, thông tin mẫu, độ pha loãng. Gói các đĩa petri bằng giấy báo và nuôi trong tủ ấm 30°C, trong 3 ngày, sau đó thu được khuẩn lạc riêng rẽ trên đĩa thạch, từ các khuẩn lạc đơn đó cấy truyền qua ống thạch nghiêng để giữ giống.

Xác định khả năng phân giải chitin của nấm mốc

Trên môi trường thạch có chứa chitin, nấm mốc sẽ tiết ra chitinase ngoại bào phân hủy cơ chất để sinh trưởng và làm cho môi trường trong hơn khi nhuộm màu bằng thuốc thử Lugol. Độ lớn của khuẩn lạc và khoảng môi trường trong suốt phản ánh khả năng phân giải chitin của nấm mốc (Phạm Thị Ngọc Lan, 2012).

Phương pháp phân loại chủng nấm mốc

Quan sát hình thái: Quan sát đại thể trên môi trường thạch đĩa. Sử dụng phương pháp nuôi cấy nấm mốc trên phiến kính để quan sát cơ quan sinh sản (Nguyễn Lâm Dũng và đồng tác giả, 2003).

Phương pháp định danh: Chủng nấm mốc có hoạt tính chitinase mạnh được giải trình tự tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa (Thành phố Hồ Chí Minh). Phương pháp này được tiến hành như sau: Hệ sợi nấm được sử dụng cho tách chiết DNA theo phương pháp của Gardes và Bruns (1993): 50mg sợi nấm được nghiền trong 5 phút, thêm 500µl dung dịch trích ly, vortex và để ở nhiệt độ phòng 10 phút, sau đó ly tâm rồi thu lấy dung dịch phía trên. DNA được tủa bằng cồn 96^o và rửa 2 lần bằng cồn 70^o. DNA sau đó được sấy chân không 10 phút ở 45°C rồi hòa tan trong 100µl TE 0.1X. Cuối cùng DNA được kiểm tra chất lượng thông qua quá trình đo quang phổ và điện di trên gel agarose 0,8%. Những sản phẩm đạt yêu cầu được bảo quản ở -20°C cho những bước tiếp theo.

Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi ITS1 và ITS4 (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTA TTG ATATGC-3') theo phương pháp của White *et al*, (1990). Sản phẩm PCR sẽ được phân tích trên gel agarose và sau đó giải trình tự theo nguyên lý của phương pháp Sanger cải tiến, sử dụng máy đọc trình tự tự động ABI 3130XL. Phân tích kết quả bằng phần mềm Sequencing Analysis 5.3 và cuối cùng trình tự này được so sánh với các trình tự ITS trên ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST để phân loại chủng nấm mốc (Sambrook and Russell, 2001).

Các trình tự được sắp giống bằng phần mềm ClustalW. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền giữa mẫu nghiên cứu và các loài thuộc chi *Aspergillus* hiện có trên dữ liệu GenBank được xây dựng bằng phần mềm MEGA 11 theo phương pháp Maximum Parsimony với hệ số tin tưởng (bootstrap) 100%.

Xác định hoạt độ chitinase bằng phương pháp Bernfeld

Hoạt độ chitinase của enzyme ngoại bào từ nấm mốc được xác định thông qua lượng đường khử tạo thành sau phản ứng giữa dịch enzyme thô và chitin huyền phù 1%. Phương pháp này dựa trên cơ sở sử dụng thuốc thử 3,5-acid dinitrosalicylic (DNS) có màu vàng sau khi cho phản ứng với đường khử (sản phẩm thủy phân của chitin) sẽ tạo thành 3-amino,5-nitro salicylic acid màu đỏ cam có khả năng hấp thụ cực đại bước sóng 540nm (Bernfeld P. 1955).

Nuôi chủng nấm mốc trong điều kiện bán rắn để thu nhận dịch thô chitinase ngoại bào. Dịch enzyme cho phản ứng với dung dịch huyền phù chitin 1% trong 10 phút và thuốc thử DNS được thêm vào để xác định lượng đường khử giải phóng sau phản ứng. Đơn vị hoạt tính (UI) của chitinase được xác định bằng lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 micromole đường khử ở 37°C trong 3 phút (Da Silva et al, 2012).

Xác định ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến hoạt tính của chitinase

Tiến hành nuôi cấy nấm mốc trong môi trường cám gạo có bổ sung chitin trong các khoảng thời gian nuôi cấy khác nhau (24, 48, 72, 96, 120, 144 và 168 giờ). Xác định hoạt độ chitinase và tìm ra được thời gian tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp chitinase của nấm mốc.

pH tối ưu được xác định bằng cách thực hiện nuôi cấy nấm mốc tại thời gian tối ưu và các pH khác nhau, sử dụng hệ đệm phù hợp như: sodium citrate có pH 4; 5,0 và sodium phosphate có pH 6,0; 7,0 (Nguyễn Thị Hà, 2012).

Xác định thành phần protein enzyme

Sử dụng phương pháp điện di SDS-PAGE theo Andrew. Phân tích kết quả điện di để xác định trọng lượng phân tử của protein enzyme dựa trên thang chuẩn protein Prestained Protein Ladder, 10 - 180 kDa của hãng Thermo Scientific (B.N. Andrew, 2014).

Các phân tích được thực hiện trong ba lần lặp lại, kết quả là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Tất cả các số liệu được xử lý bằng chương trình MS. Excel 2016 (Đặng Văn Giáp, 2000)

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Từ 9 mẫu đất thu thập ở các địa điểm khác nhau trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế, bằng phương pháp phân lập trên môi trường Czapek, đã phân lập được 36 chủng nấm mốc. Tiến hành cấy các chủng nấm mốc đã phân lập trên môi trường Czapek thạch đĩa có bổ sung cơ chất chitin. Xác định khả năng phân giải chitin của nấm mốc bằng cách đo đường kính vòng phân giải cơ chất, dựa trên khả năng sinh trưởng mạnh trong môi trường và tiết enzyme để phân giải cơ chất. Vòng phân giải được phát hiện bằng thuốc nhuộm lugol và hoạt tính được xác định bằng hiệu số vòng phân giải.

Trong 36 chủng đã phân lập được thì chỉ có 1 chủng có khả năng phân giải chitin rất mạnh chiếm 2.78% số chủng, 19.44% chủng có khả năng phân giải mạnh, 27.77% chủng có khả năng phân giải chitin trung bình và 50.00% chủng còn lại phân giải chitin ở mức yếu (Bảng 1).

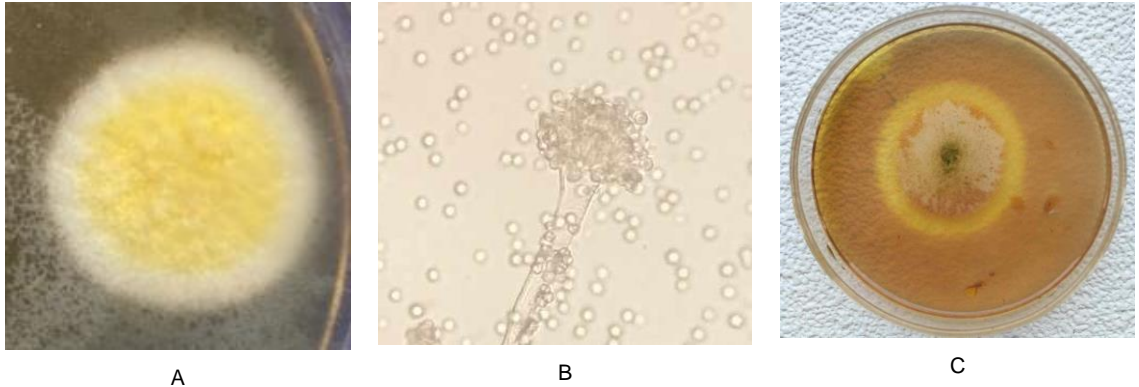
Bảng 1. Khả năng phân giải chitin của các chủng nấm mốc trên môi trường Czapek – chitin

| Mức độ phân giải | Đường kính vòng phân giải D – d (mm) | Số chủng | Tỷ lệ % |
|------------------|--------------------------------------|----------|---------|
| Yếu | < 10 | 18 | 50.00 |
| Trung bình | 10 - 15 | 10 | 27.77 |
| Mạnh | > 15 - 20 | 7 | 19.44 |
| Rất mạnh | > 20 | 1 | 2.78 |

Đặc điểm hình thái và phân loại của chủng nấm mốc

Qua kết quả sơ tuyển, chúng tôi lựa chọn được chủng M11 được phân lập từ trầm tích ao nuôi tôm có đường kính vòng phân giải chitin lớn nhất (36,2 ± 0,31 mm) và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các chủng còn lại với độ tin cậy 95% để khảo sát về mặt hình thái, đồng thời giải trình tự gen bằng phương pháp PCR để định danh khoa học.

Đặc điểm hình thái: Khuẩn lạc tròn, mặt phải lúc đầu màu trắng có sợi mịn như nhung, về sau chuyển dần sang màu vàng hoa cau, không tiết sắc tố, mép khuẩn lạc xẻ rãnh nhỏ, sợi nấm mọc tỏa tròn. Sợi nấm màu xanh lục có vách ngăn, phân nhánh. Cuống sinh bào tử không phân nhánh. Thể bình một tầng hoặc hai tầng. Bào tử trần hình cầu không có vách ngăn (hình 1). Kết quả giải trình tự gen 28S rRNA được thể hiện ở Hình 1.



Hình 1. Đặc điểm hình thái của chủng nấm mốc M11 được tuyển chọn (Ảnh: Tác giả)
 A: Hình thái khuẩn lạc; B: Bào tử (10x10); C: Vòng phân giải chitin của khuẩn lạc.

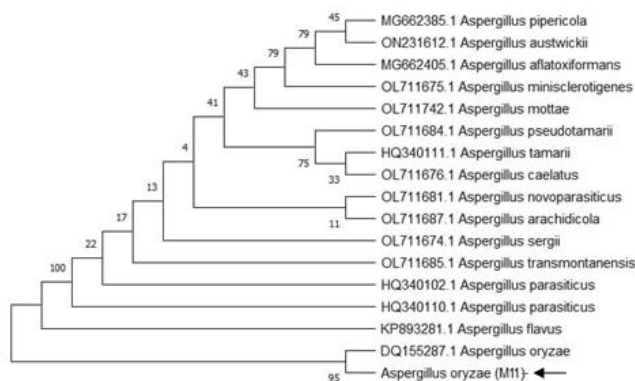
Sử dụng công cụ Blast Search để tra cứu và so sánh, đối chiếu trình tự này trên Ngân hàng gene. Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen 28S rRNA của chủng nấm mốc M11 được tuyển chọn có độ tương đồng 100% với trình tự đoạn gen 28S rRNA của chủng *Aspergillus oryzae* RIB40 DNA, SC206 (Bảng 1 và Hình 2). Như vậy, chủng nấm mốc được xác định là thuộc loài *Aspergillus oryzae* M11.

Bảng 2. Đánh giá mức độ tương đồng trình tự đoạn gen 28S RNA

| Tên loài | Tên chủng | Mã số truy cập | Độ tương đồng (%) |
|---------------------------|--|----------------|-------------------|
| <i>Aspergillus oryzae</i> | RIB40 DNA, SC206 | DQ155287.1 | 100 |
| Query 1 | CACGGGCGGGACACCCCATCCCAGACGGGATTCTCACCTCTCTGACGGCCCGTTCCAG | 60 | |
| Sbjct 3119 | CACGGGCGGGACACCCCATCCCAGACGGGATTCTCACCTCTCTGACGGCCCGTTCCAG | 3080 | |
| Query 61 | GGCACTTAGACAGGGGCGCACCCGAGCATCCTCTGCAAATTACAATGGGACCCCGAA | 120 | |
| Sbjct 3059 | GGCACTTAGACAGGGGCGCACCCGAGCATCCTCTGCAAATTACAATGGGACCCCGAA | 3000 | |
| Query 121 | GGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCG | 180 | |
| Sbjct 2999 | GGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCG | 2940 | |
| Query 181 | GTTGGTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGAT | 240 | |
| Sbjct 2939 | GTTGGTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGAT | 2880 | |
| Query 241 | CCGAGTCAACCTGGAAAAAGATTGATTTGCGTTGCGCAAGCGCCGGCCGGGCTACAGA | 300 | |
| Sbjct 2879 | CCGAGTCAACCTGGAAAAAGATTGATTTGCGTTGCGCAAGCGCCGGCCGGGCTACAGA | 2820 | |
| Query 301 | GCGGTTGACAAAGCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCGCTGCCCTTGGGG | 360 | |
| Sbjct 2819 | GCGGTTGACAAAGCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCGCTGCCCTTGGGG | 2760 | |
| Query 361 | CCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGCCAACACACAAAGCCGTGCTTGATGGGACGCA | 420 | |
| Sbjct 2759 | CCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGCCAACACACAAAGCCGTGCTTGATGGGACGCA | 2700 | |
| Query 421 | ATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGAC | 480 | |
| Sbjct 2899 | ATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGAC | 2840 | |
| Query 481 | TCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCAT | 540 | |
| Sbjct 2639 | TCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCAT | 2580 | |
| Query 541 | CGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAATCAACT | 600 | |
| Sbjct 2579 | CGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAATCAACT | 2520 | |
| Query 601 | CAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGCGGGCGCGGGCCGGGGCTG | 660 | |
| Sbjct 2519 | CAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGCGGGCGCGGGCCGGGGCTG | 2460 | |
| Query 661 | AGAGCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAAGTAAACAG | 720 | |

Hình 2. Kết quả giải trình tự gen 28S rRNA của chủng M11

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự 28S rRNA của chủng nghiên cứu và các chủng có quan hệ họ hàng gần thuộc chi *Aspergillus* được thể hiện qua Hình 3.



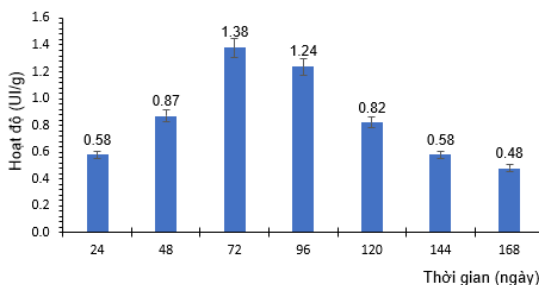
Hình 3. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền của chủng *Aspergillus oryzae* M11

(Ghi chú: Chủng nghiên cứu được đánh dấu bằng mũi tên)

Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến hoạt độ chitinase của *A. oryzae* M11

Ảnh hưởng của thời gian

Tiến hành nuôi cấy chủng *A. oryzae* M11 trong môi trường cám gạo có bổ sung chitin sau các khoảng thời gian 24, 48, 72, 96, 120, 144 và 168 giờ, thu dịch enzyme và xác định hoạt độ chitinase, kết quả được thể hiện ở Hình 4.



Hình 4. Biến thiên hoạt độ chitinase của chủng *A. oryzae* M11 theo thời gian nuôi cấy

Kết quả nghiên cứu cho thấy: khi tăng thời gian nuôi cấy thì sự sinh trưởng và khả năng phân giải chitin của chủng nấm mốc đều tăng nhưng khi vượt quá thời gian nuôi tối ưu thì hoạt độ chitinase giảm mạnh. Thời gian nuôi cấy tối ưu cho sinh tổng hợp chitinase của nấm mốc *A. oryzae* M11 là 72 giờ với hoạt độ enzyme là 1,38 IU/g, sau đó hoạt độ giảm dần theo thời gian. Kết quả này cho thấy với mỗi loại VSV có giới hạn thời gian thích hợp để sinh enzyme.

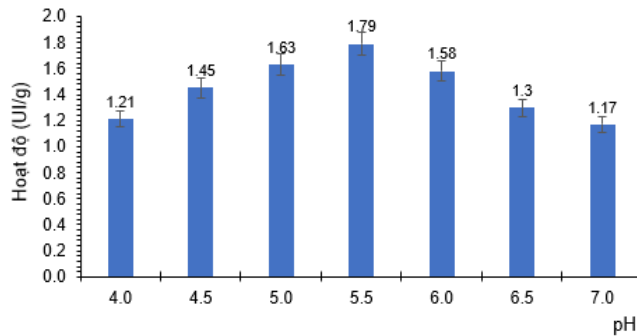
Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Lê Thị Huệ (2010) khi nghiên cứu về chủng *Aspergillus* sp. sinh chitinase có hoạt độ cao nhất khi nuôi cấy ở 72 giờ. Tuy nhiên khác với kết quả của Brazeinska M.S. (2012) khi nghiên cứu về chủng *A. niger* tổng hợp chitinase đạt hoạt độ cao nhất khi nuôi ở 144 giờ. Qua kết quả từ Hình 4, chúng tôi chọn thời gian nuôi cấy là 72 giờ cho các thí nghiệm tiếp theo của chủng *A. oryzae* M11.

Ảnh hưởng của pH

Sau khi khảo sát thời gian nuôi cấy thích hợp, tiến hành khảo pH môi trường để biết được sự ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh tổng hợp chitinase. Chủng nấm mốc *A. oryzae* M11 được nuôi trong môi trường cám gạo có nguồn chitin trong thời gian tối ưu với các giá trị pH khác nhau (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 và 7,0); sau 72 giờ tiến hành thu dịch chiết enzyme và xác định hoạt độ chitinase. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hoạt độ enzyme cao nhất là 1,79 IU/g ở pH=5,5 (Hình 5).

Kết quả cho thấy chủng *A. oryzae* M11 sinh tổng hợp chitinase ở một khoảng pH rộng từ 4,5 - 6,5 và sinh tổng hợp chitinase mạnh nhất ở khoảng pH từ 5,5 - 6,0 với hoạt độ chitinase cao nhất ở pH 5,5 (1,79 IU/g). Khi tăng pH môi trường thì sự tổng hợp chitinase để phân giải chitin trong môi trường của chủng nấm mốc cũng tăng nhưng khi vượt qua pH môi trường nuôi cấy tối ưu thì hoạt độ chitinase giảm mạnh.

Kết quả của chúng tôi là phù hợp với của Lê Thị Huệ (2010) khi xác định pH ban đầu của môi trường nuôi cấy thích hợp cho *Aspergillus* sp. sinh tổng hợp chitinase hoạt độ cao trong khoảng pH 5 – 6. Theo nghiên cứu của Gunalan *et al.*, (2012) khi sản xuất và tối ưu hóa chitinase từ *A. flavus* C₁₀M₃ đã xác định pH của môi trường nuôi cấy thích hợp để *A. flavus* C₁₀M₃ sinh tổng hợp chitinase là 6.5. Như vậy tùy từng chủng nấm sợi khác nhau mà sẽ có giá trị pH thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của từng loài.

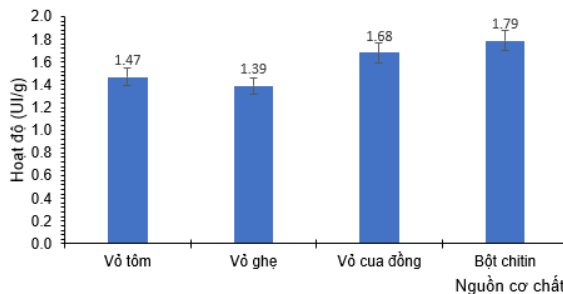


Hình 5. Biến thiên hoạt độ chitinase của chủng *A. oryzae* M11 theo pH

Ảnh hưởng của cơ chất

Qua khảo sát thời gian và pH tối ưu, chúng tôi chọn được thời gian nuôi cấy là 72 giờ với pH = 5.5 để tiếp tục khảo sát các loại cơ chất ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng *A. oryzae* M11.

Dùng môi trường cám gạo và lần lượt các loại cơ chất khác nhau: bột vỏ gẹ, bột vỏ cua đồng, bột vỏ tôm và bột chitin với tỉ lệ 1%. Tiến hành nuôi ở điều kiện 30°C và pH = 5.5 trong 72 giờ. Thu dịch enzyme và tiến hành xác định hoạt độ chitinase, kết quả ghi nhận được ở hình 6.



Hình 6. Biến thiên hoạt độ chitinase của chủng *A. oryzae* M11 theo loại cơ chất

Kết quả cho thấy: cơ chất có ảnh hưởng lớn và khác nhau đến sự sinh trưởng cũng như hoạt độ chitinase của *A. oryzae* M11. Đối với cơ chất là bột vỏ tôm, vỏ cua đồng và vỏ gẹ thì hoạt độ chitinase của *A. oryzae* M11 thấp hơn so với bột chitin.

Nguyên nhân là do bột vỏ tôm, vỏ gẹ, vỏ cua đồng là nguồn cơ chất khó phân giải, do thành phần cấu tạo của chúng ngoài chitin, còn có rất nhiều tạp chất và khoáng chất khác nên chitinase tổng hợp trong môi trường không thể phân giải hoàn toàn để tạo sản phẩm cuối cùng là N-acetyl-D-glucosamine. Với cơ chất cảm ứng là bột chitin thì hoạt độ chitinase cao hơn đáng kể, vì chitin đã trải qua bước loại bỏ protein, loại bỏ các muối calcium carbonate, phosphate calcium và các sắc tố. Cấu trúc chitin bây giờ không còn ở dạng phức hợp liên kết với các chất khác như ở bột vỏ tôm, cua, gẹ thô (Nguyễn Thu Hiền, 2012). Theo Đinh Minh Hiệp (2007) khi nghiên cứu nồng độ cơ chất bổ sung vào môi trường nuôi cấy *Trichoderma atroviride* để thu chitinase đã kết luận nồng độ chitin thô 10% là thích hợp nhất cho quá trình tăng trưởng và sinh tổng hợp chitinase.

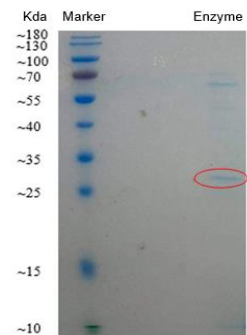
Đánh giá thành phần protein enzyme bằng điện di SDS-PAGE

Để xác định chính xác thành phần chitinase trong hỗn hợp dịch enzyme thu được, chúng tôi tiến hành phân tích điện di SDS-PAGE, kết quả được thể hiện ở Hình 7.

Kết quả điện di SDS-PAGE của chế phẩm chitinase được kết tủa bằng ethanol 96⁰ cho thấy có hiện sự diện rõ nét của band là có trọng lượng phân tử khoảng 26 ~ 35 kDa (Hình 7).

Theo nghiên cứu của Beltagy khi điện di SDS-PAGE chitinase tinh khiết thì cho trọng lượng phân tử ước tính khoảng 30 kDa (Beltagy *et al*, 2018).

Theo Moore, trọng lượng phân tử thu được khi điện di SDS-PAGE của chitinase thu được từ *A. flavus* là 29 kDa (Moore *et al.*, 2003)



Hình 7. Kết quả điện di SDS

KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất vườn, trầm tích rừng ngập mặn, ao nuôi tôm... ở thành phố Huế, đã phân lập được 36 chủng nấm mốc, kết quả sơ tuyển chọn được chủng M11 phân lập từ trầm tích ao nuôi tôm có khả năng phân giải chitin với kích thước vòng phân giải lớn nhất ($36,2 \pm 0,31$ mm). Phân tích trình tự ITS và so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI, chủng M11 được xác định là loài *Aspergillus oryzae*. Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sự sinh trưởng và tổng hợp chitinase của *A. oryzae* M11 là: thời gian nuôi cấy 72 giờ, pH = 5.5, chất cảm ứng là bột chitin với nồng độ 1% là thích hợp nhất và cho hoạt độ chitinase cao nhất. Kết quả điện di SDS-PAGE của chế phẩm chitinase được kết tủa bằng ethanol từ dịch chiết enzyme của chủng *A. oryzae* M11 có sự hiện diện của chitinase với trọng lượng phân tử khoảng 26 ~ 35 kDa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dutta PK., Dutta J, and Tripathi VS (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, pp. 20–31.
- Trang Sĩ Trung, Trần Thị Luyến, Nguyễn Anh Tuấn, Nguyễn Thị Hoàng Phượng (2010). *Chitin-Chitosan từ phế liệu thủy sản và ứng dụng*. NXB Nông nghiệp.
- Trần Thị Luyến, Đỗ Minh Phụng, Nguyễn Anh Tuấn (2006), *Sản xuất các chế phẩm kỹ thuật và y dược từ phế liệu thủy sản*. NXB Nông nghiệp.
- Nguyễn Thị Hà (2012). 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*, 22b: 26-35.
- Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyền, Phạm Văn Ty (2003). *Vì sinh vật học*. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
- Phạm Thị Ngọc Lan (2012). *Thực tập vi sinh vật học*. Nxb Đại học Huế.
- Gardes M, Bruns TD (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, and Taylor JW (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics*. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. US. 482pp.
- Sambrook J, and Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Bernfeld P (1955). *Amylase, α and β* . *Methods in Enzymology*. 1: 149-158.
- Da Silva LCA, Honorato TL, Franco TT, Rodrigues S (2012). Optimization of chitosanase production by *Trichoderma koningii* sp. under solid-state fermentation. *Food and Bioprocess Technology* 5 (5), 1564-1572.
- Andrew BN, Wobig WJ, and Petering DH (2014). Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics*, vol 6, no. 5, pp: 1068-1078.
- Đặng Văn Giáp (2000). *Phân tích dữ liệu khoa học bằng Microsoft Excel*. NXB Giáo dục, Hà Nội.
- Lê Thị Huệ (2010). *Khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase của một số chủng nấm sợi thuộc giống Aspergillus, Trichoderma và ứng dụng*. Luận văn Thạc sĩ. Trường ĐHSP TP. Hồ Chí Minh.
- Brzazinska MS, Jankiewicz U (2012). Production of Antifungal Chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and Its Potential Role in the Biological Control. *Curr Microbiol*. pp. 271-285.
- Gunalan G, Sadhana D, and Ramya PR (2012). Production, Optimization of Chitinase Using *Aspergillus flavus* and its Biocontrol of *Phytopathogenic* Fungi. *Journal of Pharmacy Research*, 5(6), 3151-3154.
- Nguyễn Thu Hiền (2012). *Nghiên cứu sử dụng vi sinh vật tạo nguyên liệu thực phẩm giàu glucosamine và protein từ cua đồng*. Luận văn Thạc sĩ. Trường ĐHSP TP. Hồ Chí Minh.
- Đình Minh Hiệp, Lê Đình Đôn, Nguyễn Tiến Thắng và Ngô Kế Sương (2007). Khảo sát hoạt tính các enzyme chitinase, β -glucanase, cellulase, pectinase, amylase, protease của các chủng *Trichoderma* phân lập tại Việt Nam. Tuyển tập Báo cáo Hội nghị khoa học toàn quốc Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr.708-710
- Beltagy EA, Rawway M, Abdul-Raouf UM, Elshenawy MA, Kelany MS (2018). Purification and characterization of thermohalophilic chitinase producing by halophilic *Aspergillus flavus* isolated from Suez Gulf. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. DOI: 10.1016/j.ejar.2018.08.002
- Moore KG, Price MS, Boston RS, Weissinger AK, Payne GA (2003). A Chitinase from Tex6 Maize Kernels Inhibits Growth of *Aspergillus flavus*. *The American Phytopathological Society*, Vol. 94, No. 1.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MOLD STRAINS WITH HIGH CHITINASE ACTIVITY

Ngo Ngoc Lan Anh, Nguyen Thi Thuy Linh, Ho Dang Quoc Huy, Nguyen Minh Tri*

Hue University of Science, Hue University

SUMMARY

Molds have been studied and applied to produce many different types of enzymes, including chitinases. This study focuses on the selection and identification of mold strains with high chitinase activity isolated from garden soil, mangrove sediments, shrimp ponds, etc., and evaluates the conditions affecting the chitinase activity of the selected mold strains.

From 9 samples of garden soil, mangrove sediments, shrimp ponds... in Hue city, 36 mold strains were isolated. The preliminary selection results showed that strain M11 isolated from shrimp pond sediments had the ability to decompose chitin with the largest resolution ring size (36.2 ± 0.31 mm). The identification results were obtained by ITS sequence analysis and comparison with the NCBI database, strain M11 was identified as *Aspergillus oryzae*. The optimal culture conditions for growth and chitinase synthesis of *A. oryzae* M11 were: culture time of 72 hours, pH = 5.5, the inducer was chitin powder with a concentration of 1% which was the most suitable and gave the highest chitinase activity. The SDS-PAGE electrophoresis results of the chitinase preparation precipitated with ethanol from the enzyme extract of *A. oryzae* M11 strain showed the presence of chitinase with a molecular weight of about 26 ~ 35 kDa. This study shows the potential application of the mold strain *A. oryzae* M11 with high chitinase activity in the production of products from shrimp shells, a by-product of the seafood processing industry, contributing to environmental protection.

Keywords: Mold strains, chitinase, *Aspergillus oryzae*.

* Author for correspondence: 0914031085; Email: nguyenminhtri@husc.edu.vn