

**TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY
CHŨNG NẤM SỢI *Penicilium oxalicum*
SINH TỔNG HỢP ENZYME CHITINASE ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ ĐẤT**

NGUYỄN THỊ HÀ
Trường Đại học Cần Thơ

Nhiều enzyme quan trọng được khai thác từ vi sinh vật và được ứng dụng rộng rãi trong đời sống sản xuất, do vi sinh vật chiếm khối lượng lớn và có khả năng chuyển hóa vật chất trong tự nhiên rất hữu hiệu. Khi so sánh với các nguồn enzyme khác có nguồn gốc từ động vật và thực vật, enzyme có nguồn gốc vi sinh có nhiều ưu điểm như hoạt tính cao, thời gian sinh tổng hợp ngắn, nguyên liệu sản xuất rẻ tiền, có thể sản xuất theo quy mô công nghiệp. Nhiều enzyme khai thác từ vi sinh vật được tập trung nghiên cứu ứng dụng trong thời gian qua như protease, amylase, cellulase, pectinase... Bên cạnh đó còn có nhóm enzyme chitinase có khả năng thủy phân lớp vỏ chitin của loài giáp xác cũng được đặc biệt quan tâm. Bài báo này trình bày một số kết quả về tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy các chủng Nấm sợi được phân lập từ đất ở thành phố Cần Thơ nhằm tạo nguồn chitinase với hoạt tính cao.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Các chủng Nấm sợi được phân lập từ đất ở thành phố Cần Thơ.

2. Phương pháp

Kiểm tra hoạt tính chitinase của các chủng Nấm sợi phân lập được bằng phương pháp đo đường kính vòng vô khuẩn. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố như thời gian nuôi cấy, nhiệt độ, ẩm độ, hàm lượng muối, độ pH, cơ chất đến khả năng sinh tổng hợp chitinase của nấm sợi. Chọn 3 yếu tố có ảnh hưởng đáng kể lên khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng Nấm sợi nghiên cứu để tối ưu hóa theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm.

II. KẾT QUẢ

1. Phân lập một số chủng Nấm sợi có khả năng sinh tổng hợp chitinase

Đã phân lập được 70 chủng Nấm sợi và tiến hành nuôi cấy các chủng này trên môi trường nuôi cấy nấm sợi trong 4 ngày. Tiến hành khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase bằng phương pháp đo đường kính vòng phân giải. Kết quả nghiên cứu cho thấy có 10 chủng Nấm sợi thể hiện hoạt tính chitinase được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

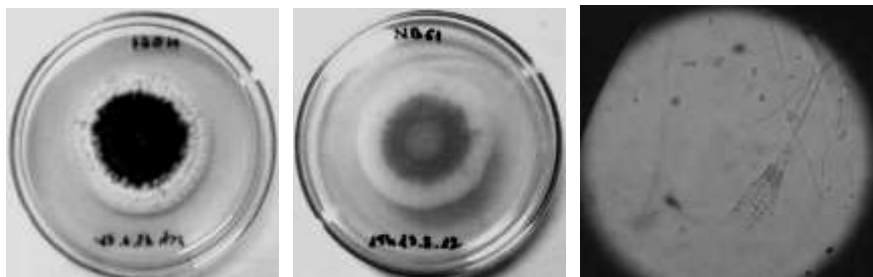
Đường kính vòng phân giải chitin của 10 chủng Nấm sợi nghiên cứu

TT	Tên	Đường kính vòng phân giải (cm)	TT	Tên	Đường kính vòng phân giải (cm)
1	4	4,0	6	NB62	2,5
2	4m	2,7	7	NB63	5,5
3	BM11	2,0	8	NB64	2,2
4	LX31	1,5	9	OM11	3,5
5	NB61	6,5	10	TN11	1,7

Chủng NB61 có đường kính vòng phân giải cao nhất (6,5cm) được chọn để nghiên cứu tiếp.

2. Khảo sát đặc điểm hình thái và định danh chủng NB61

* Đặc điểm về hình thái của chủng nấm NB61:



Hình 1. Hình thái đại thể và vi thể của chủng nấm NB61

* Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử:

Chủng nấm sợi NB61 nghiên cứu được định danh đến loài theo phương pháp sinh học phân tử. Trình tự gene nhận được dưới đây được phân tích so sánh với các gen đã biết trong cơ sở dữ liệu trên trang web NCBI sử dụng chương trình BLAST.

```

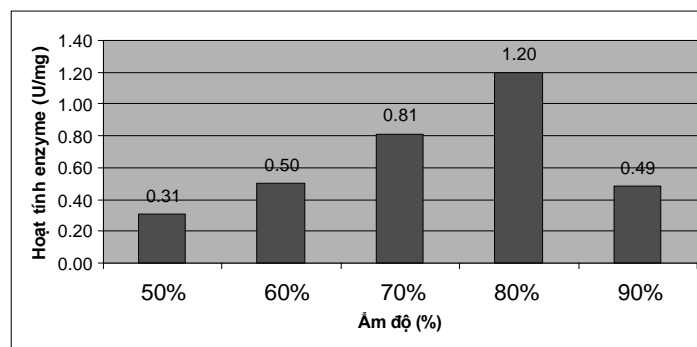
CCCACCCGTGTTTATCGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCAGGCCGCCGGGGGGC
ATCCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGGAAGACACAAAAACGAACCTTGTCTGAAGATTGCA
GTCTGAGTACTTGACTAAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
GAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC
ATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTCTCGCCCCCGCTTCCGGGGGGCGG
GCCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCTCCGGCTCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCG
CTCTGTAGGCCCGGCCGCGCCCGGCGAACACCATCAATCTTAACCAGGTTGACCTC
GGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA.
    
```

Đối chiếu trình tự DNA với trình tự DNA của các chủng NS từ ngân hàng gen NCBI cho thấy tỷ lệ tương đồng với loài *Penicillium oxalicum* là cao nhất (90%)

Kết hợp giữa kết quả phân tích hình thái và sinh học phân tử, chủng Nấm sợi NB61 có thể thuộc loài *Penicillium oxalicum*.

3. Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến quá trình sinh tổng hợp chitinase của *Penicillium oxalicum*

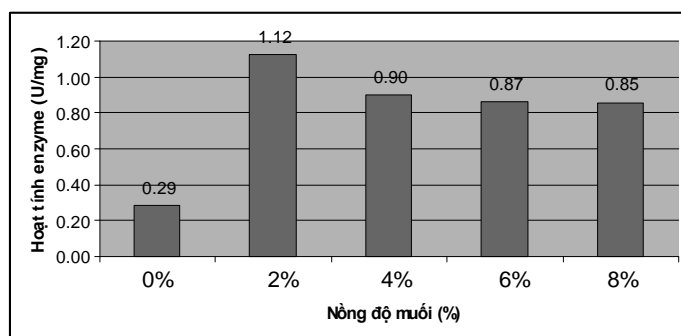
- Ẩm độ môi trường nuôi cấy:



Hình 2. Biểu đồ biểu thị ảnh hưởng của ẩm độ lên khả năng sinh chitinase của *P. oxalicum*

Biểu đồ ở hình 2 cho thấy, nấm *P. oxalicum* phát triển tốt trên môi trường có ẩm độ 80%, hoạt tính enzyme chitinase đạt cao nhất (1,20U/mg protein), khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức khác, ở ẩm độ thấp (50-70%) nấm mốc không phát triển tốt, hoạt tính enzyme thấp. Ở ẩm độ cao (> 80%), lượng nước dư trong môi trường nuôi cấy sẽ làm hồ hoá với cơ chất và kết chặt môi trường lại làm mất độ xốp, thoáng khí của môi trường đồng thời cũng gây khó khăn cho khuẩn ty phát triển. Điều này cho thấy độ ẩm ảnh hưởng khá lớn đến quá trình phát triển và sinh tổng hợp enzyme chitinase của nấm *P. oxalicum*

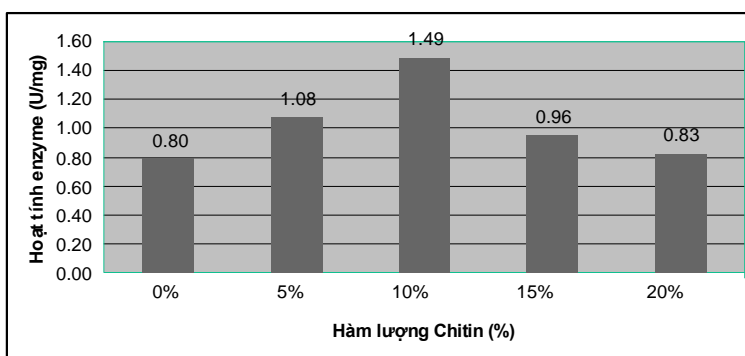
- Ảnh hưởng của nồng độ NaCl



Hình 3. Biểu đồ biểu thị ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến khả năng sinh chitinase của *P. oxalicum*

Kết quả thí nghiệm ở hình 3 cho thấy, chủng Nấm sợi *P. oxalicum* sinh tổng hợp chitinase tốt nhất ở nồng độ NaCl trong môi trường nuôi cấy là 2%, hoạt tính enzyme thu nhận được là 1.12 U/mg protein, tăng gấp khoảng 4 lần so với đối chứng không bổ sung NaCl. Tuy nhiên khi nồng độ muối tăng hơn 2% khả năng sinh tổng hợp enzyme của *P. oxalicum* lại giảm xuống. Điều này cho thấy khoáng Na⁺ cần thiết cho sự phát triển của *P. oxalicum* sinh tổng hợp enzyme chitinase.

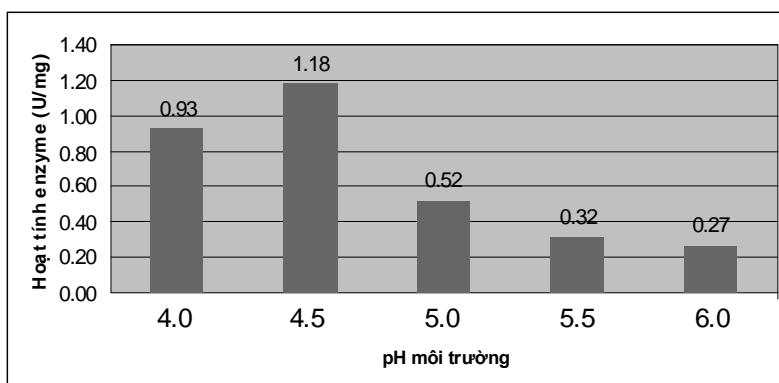
- Ảnh hưởng của hàm lượng chitin:



Hình 4. Biểu đồ biểu thị ảnh hưởng của hàm lượng chitin đến khả năng sinh chitinase của *P. oxalicum*

Hoạt tính chitinase của *P. oxalicum* tăng dần khi hàm lượng chitin tăng và đạt cực đại 1,49 U/mg ở hàm lượng chitin bổ sung là 10%, tuy nhiên hàm lượng chitin cao hơn lại ức chế khả năng sinh enzyme của nấm.

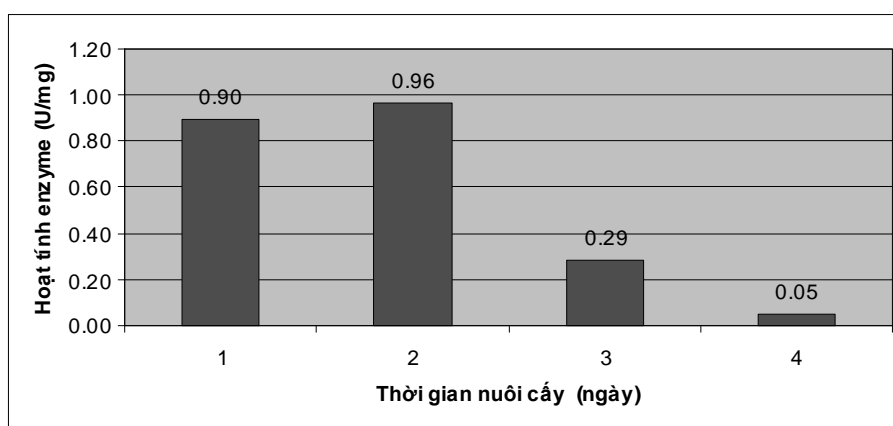
- Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy:



Hình 5. Biểu đồ biểu thị ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh chitinase của *P. oxalicum*

Về ảnh hưởng của pH, qua biểu đồ ở hình 5 cho thấy, quá trình sinh tổng hợp enzymes không đạt hiệu quả cao khi tăng độ pH môi trường nuôi cấy. Ở các giá trị pH lớn như 5,5 và 6,0 hoạt tính (U/mg protein) của enzyme do nấm sợi sinh tổng hợp không cao. Tuy nhiên quá trình sinh tổng hợp diễn ra mạnh ở pH 4,0 và đạt cao nhất ở pH 4,5 với hoạt tính riêng enzyme ghi nhận đạt được cao nhất là 1.18 U/mg. Ở giá trị pH từ 5-6, hoạt tính enzyme giảm mạnh, điều này chứng tỏ yếu tố pH môi trường có ảnh hưởng vô cùng quan trọng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme của nấm sợi *P. oxalicum*.

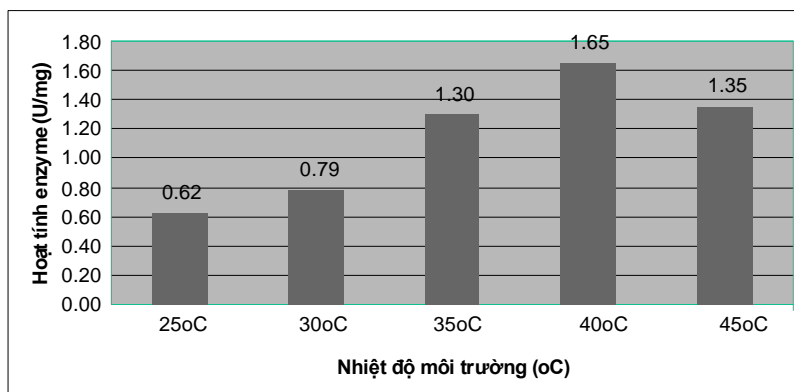
- Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy:



Hình 6. Biểu đồ biểu thị ảnh hưởng của yếu tố thời gian nuôi cấy đến hoạt tính enzyme chitinase của nấm sợi *P. oxalicum*

Biểu đồ xác định hoạt tính riêng enzyme thu nhận được theo thời gian (hình 6) cho thấy *P. oxalicum* có khả năng sinh tổng hợp chitinase rất mạnh ngay từ lúc bắt đầu nuôi cấy và hoạt tính riêng enzyme thu được đạt cao nhất 0.96 U/mg vào ngày thứ 2 chứng tỏ nấm mốc rất dễ thích nghi với môi trường và bắt đầu diễn ra các phản ứng sinh hoá sử dụng chất dinh dưỡng của môi trường để sinh trưởng và phát triển. Sang ngày thứ 3 hoạt tính riêng enzyme bắt đầu giảm mạnh do quá trình sinh tổng hợp enzyme sắp kết thúc và nguồn dinh dưỡng từ môi trường cũng cạn.

- Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nuôi cấy:



Hình 7. Biểu đồ biểu thị ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh chitinase của *P. oxalicum*

Biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase của chủng Nấm sợi *P. oxalicum* (hình 7) cho thấy sinh tổng hợp enzyme đạt hiệu quả cao nhất (hoạt tính riêng enzyme cao nhất 1,65 U/mg) khi nuôi cấy ở 40°C.

3. Quy hoạch thực nghiệm tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chủng Nấm sợi *P. oxalicum* sinh tổng hợp chitinase cao

Từ kết quả trên cho thấy 3 yếu tố ẩm độ, pH và nhiệt độ có ảnh hưởng mạnh đến khả năng sinh tổng hợp enzyme của nấm sợi. Do đó, ba yếu tố môi trường là: Ẩm độ, nhiệt độ và pH được chọn để tiếp tục nghiên cứu trong thí nghiệm khảo sát tối ưu.

Bảng 2

Sơ đồ và kết quả bố trí thí nghiệm thực nghiệm

TN	Các yếu tố theo tỷ lệ thực			Các yếu tố theo tỷ lệ mã hóa				HTR enzyme
	Z ₁	Z ₂	Z ₃	X ₀	X ₁	X ₂	X ₃	Y
1	45	85	5	1	1	1	1	1.568
2	35	75	5	1	-1	-1	1	1.484
3	45	75	5	1	1	-1	1	1.373
4	35	85	5	1	-1	1	1	1.705
5	45	85	4	1	1	1	-1	1.589
6	35	75	4	1	-1	-1	-1	1.624
7	45	75	4	1	1	-1	-1	1.776
8	35	85	4	1	-1	1	-1	1.654
9	40	80	4.5					1.092
10	40	80	4.5					1.108
11	40	80	4.5					1.138

Từ số liệu thí nghiệm, ta xác định được các hệ số hồi quy. Sau khi loại bỏ các hệ số không có ý nghĩa thì phương trình hồi quy có dạng: $Y = 1.597 - 0.064X_3 - 0.042X_1X_3 + 0.071X_2X_3$. Từ phương trình hồi quy nhận thấy muốn tăng giá trị của hoạt tính enzyme chitinase của nấm sợi *P. oxalicum* cần phải tăng giá trị ẩm độ, giảm nhiệt độ và pH của môi trường nuôi cấy. Do đó, tiếp tục nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy môi trường bằng phương pháp đường dốc nhất bắt đầu từ mức cơ sở là 0. Chọn bước nhảy là 2 đối với ẩm độ, 2 đối với nhiệt độ và 0.2 đối với pH môi trường. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3

Kết quả nuôi cấy *P. oxalicum* theo phương pháp leo dốc

TT	Nhiệt độ	Ẩm độ	pH môi trường	HTR enzyme chitinase
1	40	80	4.5	1.520
2	38	82	4.3	1.603
3	36	84	4.1	1.824
4	34	86	3.9	1.548
5	32	88	3.7	1.515

Số liệu ở bảng 3 cho thấy, điều kiện nuôi cấy trên môi trường bán rắn tối ưu cho nấm sợi *P. oxalicum* sinh tổng hợp enzyme phân giải cơ chất chitin là: Môi trường có ẩm độ 84%, độ pH môi trường 4.1, cơ chất cảm ứng chitin 10%, nhiệt độ môi trường 36°C, hàm lượng muối 2%, thời gian nuôi cấy 48h.

III. KẾT LUẬN

Trong 70 chủng Nấm sợi phân lập từ đất ở thành phố Cần Thơ có 10 chủng thể hiện hoạt tính chitinase, trong đó *Penicillium oxalicum* có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase cao nhất. Các yếu tố môi trường như: Ẩm độ, độ muối, nhiệt độ, hàm lượng cơ chất cảm ứng chitin, thời gian nuôi cấy, pH môi trường đều có ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase của nấm sợi *P. oxalicum*, trong đó ba nhân tố là ẩm độ, pH và nhiệt độ có ảnh hưởng nhiều nhất. Môi trường bán rắn tối ưu cho nấm sợi *P. oxalicum* sinh tổng hợp enzyme phân giải cơ chất chitin là môi trường có ẩm độ 84%, độ pH 4.1, cơ chất cảm ứng chitin 10%, nhiệt độ 36°C, hàm lượng muối 2%, thời gian nuôi cấy 48h.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Võ Bích Giang**, 2005. Thực tập enzyme học, Trường Đại học Sư phạm Tp. Hồ Chí Minh.
2. **Nguyễn Đức Lượng**, 2004. Công nghệ enzyme, NXB. Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, tr.27-108.
3. **Nguyễn Đức Lượng**, 2003. Thí nghiệm công nghệ sinh học tập 1, NXB. Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, tr. 200-250.
4. **Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết**, 2006. Thí nghiệm công nghệ sinh học tập 2, NXB. Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
5. **Nguyễn Minh Tuấn**, 2004. Quy hoạch thực nghiệm, NXB. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, tr.84-100.
6. **Pankaj Patidar, Deepti Agrawal, Tushar Banerjee, Shridhar Patil**, 2005. Optimisation of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, 40, 2962-2967.
7. **Yoon Gyo Lee, Ki-Chul Chung, Seung Gon Wic, Jae Chang Lee, Hyeun-Jong Bae**, 2009. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. *Protein Expression and Purification*, 65, 244-250.

**OPTIMISATION OF CULTURE CONDITIONS FOR CHITINASE PRODUCTION
BY *Penicillium oxalicum* ISOLATED FROM SOIL**

NGUYEN THI HA

SUMMARY

This paper present results of the research aimed at isolating fungi strains which exposed high chitinase activity and at studying the medium conditions affecting chitinase production of a chosen fungi strain. By determination of the halo's diameters of colonies on culture medium with chitin as a specific substrate, ten fungi strains with high chitinase activity were isolated. Among isolated, one strain with highest chitinase production was selected. This strain was morphologically and biomolecularly determined as *Penicillium oxalicum*. The suitable conditions for high chitinase production of *Penicillium oxalicum* were as follows: Humidity of 80%, chitin of 10%, sodium chloride of 2%, 48 h incubation, pH of 4,5 and temperature of 40°C. Also, the interaction of three factors such as pH, temperature, and incubation time were studied. The optimum conditions were defined as follows: Humidity of 84%, pH of 4,1 and temperature of 36°C.