

TÌM HIỂU HOẠT TÍNH CHITINASE CỦA CHŨNG XẠ KHUẨN PHÂN LẬP TỪ ĐẤT

NGUYỄN NGỌC TÂM HUYÊN

Trường Đại học Nông lâm Tp. Hồ Chí Minh

PHẠM THỊ NGỌC LAN

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Chitin là polymer thiên nhiên có trữ lượng đứng thứ hai chỉ sau cellulose. Đây là hợp chất hữu cơ khá bền vững nhưng cũng được nhiều sinh vật phân giải đặc biệt là vi sinh vật. Các nhóm vi sinh vật thể hiện hoạt lực phân giải chitin chủ yếu là vi khuẩn, nấm mốc và xạ khuẩn được phân bố nhiều trong đất, nước. Việc nghiên cứu vi sinh vật phân giải chitin có ý nghĩa quan trọng, làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng sản xuất các chế phẩm diệt côn trùng, phục vụ cho nông nghiệp, sản xuất enzyme chitinase, chitosanase cho Y học [1], [3], [7]... Đặt vấn đề phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có hoạt lực phân giải chitin mạnh từ môi trường đất, nước là cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng.

I. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu: Các chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải chitin mạnh được phân lập từ một số mẫu đất trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên-Huế.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định hoạt tính enzyme bằng phương pháp khuếch tán trên thạch: Nuôi cấy xạ khuẩn trong môi trường dịch thể Gause I để thu dịch enzyme. Chuẩn bị môi trường thạch-chitin để tạo giếng rồi đưa vào một lượng dịch enzyme nhất định. Đĩa thạch được ủ ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 24 - 48 giờ, sau đó nhuộm màu bằng thuốc thử Lugol để xác định kích thước vòng phân giải chitin [4].

Xác định sinh khối xạ khuẩn: Phần sinh khối tách ra từ dịch nuôi cấy được sấy khô tuyệt đối để xác định trọng lượng bằng phương pháp cân [4].

Thăm dò ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến hoạt tính chitinase: Nuôi cấy các chủng xạ khuẩn đã được tuyển chọn trong môi trường Gause I dịch thể với thời gian, pH môi trường, nguồn carbon, nguồn nitrogen khác nhau. Sau khi nuôi cấy, thu sinh khối và dịch lọc để xác định hoạt tính chitinase.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Tuyển chọn chủng xạ khuẩn

Bảng 1

Hoạt tính chitinase của các chủng xạ khuẩn

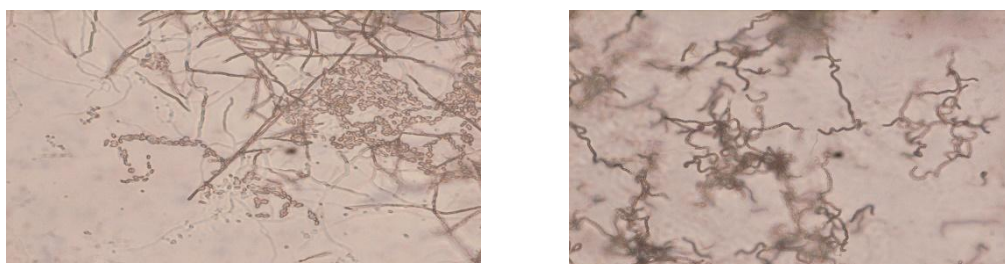
STT	Chủng xạ khuẩn	Đường kính vòng phân giải (mm)
1	X32	18,5 ± 0,5
2	X65	19,5 ± 0,3
3	X66	21,0 ± 0,0
4	X75	29,0 ± 0,5
5	X83	32,0 ± 0,0

Tuyển chọn 5 chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải chitin phân lập từ đất được nuôi cấy trong môi trường Gause I dịch thể để xác định hoạt tính chitinase. Kết quả thí nghiệm (bảng 1)

cho thấy, sau 48 giờ nuôi cấy 2 chủng X75 và X83 thể hiện khả năng phân giải chitin khá lớn, kích thước vòng phân giải đạt 29 mm và 32 mm. Kết quả này phù hợp với kết quả cấy vạch trên môi trường thạch đĩa, do đó 2 chủng X75 và X83 được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1: Vạch phân giải chitin của các chủng xạ khuẩn
(ảnh: Nguyễn Ngọc Tâm Huyền và Phạm Thị Ngọc Lan, 2015)



Hình 2: Ảnh hiển vi của 2 chủng xạ khuẩn X75 và X83 (x40)
(ảnh: Nguyễn Ngọc Tâm Huyền và Phạm Thị Ngọc Lan, 2015)

2. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến hoạt tính chitinase của xạ khuẩn

Ảnh hưởng của pH môi trường: Xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Gause I dịch thể với các mức pH khác nhau (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0) để thu sinh khối và dịch chiết enzyme. Kết quả được trình bày ở bảng 2. Kết quả thí nghiệm cho thấy, chủng X75 có pH môi trường thích hợp tương đối rộng, khoảng 6,0 đến 7,5 và pH tối ưu là 7,0 (sinh khối khô đạt 32,3 mg/ml, đường kính vòng phân giải đạt 31,0 mm). Chủng X83 có pH môi trường thích hợp từ 5,5 đến 7,0 và pH tối ưu là 6,5 (sinh khối khô đạt 31,5 mg/ml, đường kính vòng phân giải đạt 32,0 mm). Theo kết quả của Phạm Thị Ngọc Lan và cs (2010) cho thấy, pH môi trường 7,5 là thích hợp cho hai chủng vi khuẩn sản sinh chitinase có hoạt tính cực đại. Kích thước vòng phân giải chitin đạt 22,0-22,5 mm [5]. Theo nghiên cứu của Nguyễn Phương Huệ và cs (2010), pH môi trường thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp chitinase của chủng HT11 là 8,0 [6].

Bảng 2

Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng, phát triển và khả năng phân giải chitin của xạ khuẩn

pH	Đường kính vòng phân giải (mm)		Sinh khối khô (mg/ml)	
	X75	X83	X75	X83
5,0	17,5 ± 0,0	22,0 ± 0,3	16,8 ± 0,7	18,0 ± 1,5
5,5	19,0 ± 0,3	25,5 ± 0,0	20,1 ± 0,9	21,5 ± 2,4
6,0	24,0 ± 0,5	30,5 ± 0,5	25,5 ± 1,2	26,8 ± 1,2
6,5	30,0 ± 0,3	32,0 ± 0,3	29,6 ± 0,6	31,5 ± 0,5
7,0	31,0 ± 0,0	19,5 ± 0,5	32,3 ± 2,5	24,7 ± 0,7
7,5	25,0 ± 0,3	18,0 ± 0,3	27,6 ± 2,1	20,3 ± 1,5
8,0	22,5 ± 0,5	16,5 ± 0,0	23,7 ± 1,3	13,2 ± 0,9

Ảnh hưởng của thời gian: Nuôi cấy xạ khuẩn trong môi trường Gause I dịch thể, sau các khoảng thời gian 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 và 96 giờ. Số liệu từ bảng 3 cho thấy, khi tăng thời gian nuôi cấy thì sự sinh trưởng phát triển và khả năng phân giải chitin của các chủng xạ khuẩn đều tăng nhưng khi vượt qua thời gian nuôi cấy thích hợp thì lại giảm mạnh. Đối với chủng X75 trong khoảng từ 12 giờ đến 48 giờ nuôi cấy, sinh trưởng phát triển và khả năng phân giải chitin đều tăng nhanh và đạt cực đại ở 60 giờ nuôi; sinh khối khô là 31,5 mg/ml và kích thước vòng phân giải là 32,5 mm. Chủng X83, sinh trưởng phát triển và phân giải chitin mạnh nhất ở 72 giờ nuôi cấy với sinh khối đạt 30,5 mg/ml và đường kính vòng phân giải đạt 32 mm.

Kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan và cs (2010) cho thấy, thời gian nuôi cấy tối ưu cho sinh tổng hợp chitinase của hai chủng vi khuẩn phân lập từ đất là 36 và 48 giờ, kích thước vòng phân giải chitin đạt 25,5-26,5 mm [5].

Ảnh hưởng của nguồn carbon: Sử dụng các nguồn carbon khác nhau để nuôi cấy các chủng xạ khuẩn. Kết quả cho thấy, các nguồn carbon có ảnh hưởng rất lớn và rất khác nhau đến sự sinh trưởng phát triển cũng như hoạt tính chitinase của 2 chủng xạ khuẩn. Chủng X75 sinh trưởng và phát triển mạnh nhất trong môi trường có nguồn carbon là glucose với sinh khối đạt 32,5 mg/ml, nhưng thể hiện hoạt tính chitinase mạnh nhất trong môi trường có saccharose với vòng phân giải chitin đạt 33,5 mm. Chủng X83 sinh trưởng mạnh nhất trong môi trường có nguồn carbon là CMC (CarboxyMethyl Celulose) với sinh khối đạt 35,0 mg/ml nhưng thể hiện hoạt tính chitinase mạnh nhất trong môi trường có tinh bột với đường kính vòng phân giải đạt 32,0 mm.

Bảng 3

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng, phát triển và hoạt tính chitinase của xạ khuẩn

Thời gian (giờ)	Đường kính vòng phân giải (mm)		Sinh khối khô (mg/ml)	
	X75	X83	X75	X83
12	20,0 ± 0,3	17,0 ± 0,5	17,0 ± 0,5	16,7 ± 0,5
24	24,5 ± 0,5	23,0 ± 0,0	23,0 ± 0,0	18,5 ± 0,7
36	26,0 ± 0,5	25,5 ± 0,3	25,5 ± 0,3	21,1 ± 1,2
48	28,5 ± 0,5	29,0 ± 0,3	29,0 ± 0,3	26,8 ± 1,9
60	32,5 ± 0,3	30,5 ± 0,5	30,5 ± 0,5	28,5 ± 1,5
72	29,0 ± 0,0	32,0 ± 0,5	32,0 ± 0,5	30,5 ± 0,3
84	24,5 ± 0,5	28,5 ± 0,3	28,5 ± 0,3	27,1 ± 1,6
96	21,0 ± 0,3	26,0 ± 0,5	26,0 ± 0,5	24,3 ± 0,8

Theo một số nghiên cứu cho thấy, các chủng vi sinh vật phân giải chitin thích nghi với nhiều nguồn carbon khác nhau như rỉ đường, lactose... Theo nghiên cứu của Nguyễn Phương Huệ và cs (2010), nguồn carbon thích hợp cho sinh tổng hợp chitinase tái tổ hợp của chủng vi khuẩn HT11 là lactose, hoạt độ chitinase đạt 3151,14 U/ml [6]. Theo nghiên cứu của Phạm Hồng Ngọc Thùy (2008), nguồn carbon thích hợp cho sự tích lũy chitinase của chủng VTCC-A-1126 là mannitol, tuy nhiên chủng này cũng có khả năng sử dụng tinh bột khá tốt cho sinh trưởng, phát triển và tích lũy chitinase [7].

Ảnh hưởng của nguồn nitrogen: Sử dụng các nguồn NaNO₃, NH₄Cl, KNO₃, peptone, casein, gelatine, urea để thăm dò khả năng sinh trưởng phát triển và hoạt tính chitinase của các chủng xạ khuẩn. Kết quả cho thấy, hai chủng xạ khuẩn đều có khả năng sử dụng nguồn nitrogen dưới dạng hữu cơ và vô cơ nhưng với mức độ khác nhau. Chủng X75 sinh trưởng, phát triển tốt và thể hiện hoạt tính chitinase mạnh nhất trong môi trường có nguồn nitrogen là gelatine, chủng X83 là urea.

Bảng 4

Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sinh trưởng phát triển và khả năng phân giải chitin của xạ khuẩn

Nguồn carbon	Đường kính vòng phân giải (mm)		Sinh khối khô (mg/ml)	
	X75	X83	X75	X83
Glucose	24,0 ± 0,0	22,5 ± 0,5	32,5 ± 1,6	25,2 ± 2,0
Saccharose	33,5 ± 0,5	27,0 ± 0,3	27,0 ± 1,6	29,5 ± 1,0
Rỉ đường	21,0 ± 0,5	29,0 ± 0,0	19,0 ± 2,4	22,0 ± 2,0
Tinh bột	28,0 ± 0,5	32,0 ± 0,0	22,5 ± 3,2	27,5 ± 2,1
Chitin	29,5 ± 0,0	30,0 ± 0,5	24,0 ± 1,5	27,0 ± 0,7
CMC	29,0 ± 0,3	25,0 ± 0,0	25,0 ± 0,7	35,0 ± 0,9

Bảng 5

Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến sự sinh trưởng, phát triển và khả năng phân giải chitin của xạ khuẩn

Nguồn nitrogen	Đường kính vòng phân giải (mm)		Sinh khối khô (mg/ml)	
	X75	X83	X75	X83
NaNO ₃	29,0 ± 0,5	29,0 ± 0,0	23,0 ± 1,3	24,0 ± 2,7
NH ₄ Cl	20,0 ± 0,0	18,0 ± 0,5	18,5 ± 0,7	20,5 ± 1,0
KNO ₃	30,5 ± 0,5	27,0 ± 0,5	30,5 ± 1,5	31,0 ± 1,2
Peptone	23,0 ± 0,3	25,5 ± 0,0	24,5 ± 1,5	22,5 ± 0,6
Casein	25,5 ± 0,5	28,0 ± 0,3	28,0 ± 2,4	26,5 ± 2,5
Gelatine	41,5 ± 0,5	33,0 ± 0,5	35,0 ± 1,0	26,0 ± 1,6
Urea	27,0 ± 0,5	42,0 ± 0,5	31,0 ± 1,5	35,0 ± 0,7

Theo nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan và cs (2010), nguồn nitrogen thích hợp cho quá trình tổng hợp chitinase của hai chủng vi khuẩn C25 và C41 là urea. Tuy nhiên hai chủng này thể hiện hoạt lực enzyme thấp hơn nhiều so với hai chủng mà tôi đã tuyển chọn, kích thước vòng phân giải chỉ đạt 26,5-29,5 mm [5]. Theo nghiên cứu của Nguyễn Phương Huệ và cs (2010), nguồn nitrogen thích hợp cho sinh tổng hợp chitinase tái tổ hợp của chủng HT11 là peptone [6].

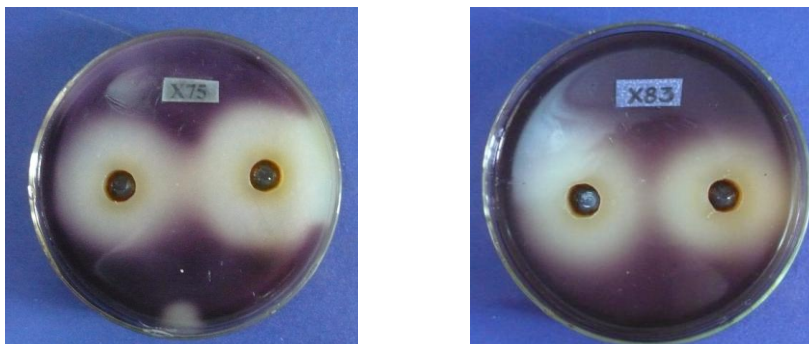
Ảnh hưởng của nhiệt độ: Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy tĩnh trong môi trường Gause I dịch thể ở các mức nhiệt độ: 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C trong điều kiện thời gian, pH môi trường, nguồn carbon, nguồn nitrogen tối ưu.

Bảng 6

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng, phát triển và khả năng phân giải chitin của xạ khuẩn

Nhiệt độ (°C)	Đường kính vòng phân giải (mm)		Sinh khối khô (mg/ml)	
	X75	X83	X75	X83
20	23,0 ± 0,0	24,5 ± 0,5	19,0 ± 2,8	21,0 ± 1,0
25	29,0 ± 0,5	29,5 ± 0,0	30,5 ± 2,0	30,0 ± 3,1
30	26,0 ± 0,5	25,0 ± 0,3	22,5 ± 1,7	27,0 ± 2,4
35	24,0 ± 0,0	20,0 ± 0,5	27,0 ± 0,8	24,5 ± 0,8
40	20,5 ± 0,3	17,0 ± 0,5	23,0 ± 0,6	22,5 ± 1,9

Kết quả cho thấy, khi tăng nhiệt độ nuôi cấy từ 20°C đến 35°C thì sinh trưởng, phát triển cũng như hoạt tính chitinase của xạ khuẩn tăng nhưng khi đạt mức nhiệt độ 40°C thì hoạt tính enzyme và sinh khối đều giảm mạnh. Cả hai chủng xạ khuẩn đều thích nghi ở nhiệt độ nuôi cấy là 25°C. Do điều kiện nuôi cấy tĩnh nên sinh khối thu được trong khoảng 30-30,5 mg/ml và kích thước vòng phân giải chỉ đạt 29-29,5 mm.



Hình 3: Vòng phân giải chitin của enzyme tách từ hai chủng xạ khuẩn X75 và X83 nuôi trong môi trường tối ưu

(ảnh: Nguyễn Ngọc Tâm Huyền và Phạm Thị Ngọc Lan, 2015)

Theo nghiên cứu của Lê Thị Thanh Hà và cs. (2007), nhiệt độ tối ưu cho sự tích lũy sinh khối và hoạt tính chitinase của các chủng vi khuẩn T11.9.1, V11.3, V13.1 và K1.3 là 30-40°C [2].

III. KẾT LUẬN

Phân lập và tuyển chọn từ đất hai chủng xạ khuẩn X75 và X83 có khả năng phân giải chitin mạnh nhất với đường kính vòng phân giải đạt 29-32 mm.

Nuôi cấy xạ khuẩn trên môi trường Gause I dịch thể, ở nhiệt độ 25°C, chủng X75 sinh trưởng, phát triển và thể hiện hoạt tính chitinase cao nhất trong môi trường có nguồn carbon là saccharose, nguồn nitrogen là gelatine, pH môi trường 7, nuôi cấy sau 60 giờ. Trong khi chủng X83 sinh trưởng phát triển và thể hiện hoạt tính chitinase cao nhất trong môi trường có nguồn carbon là tinh bột, nguồn nitrogen là urea, pH môi trường 6,5, nuôi cấy sau 72 giờ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alias, N., N. M. Mahadi, A. M. A. Murad, F. D. A. Bakar, N. A. N. Mahmood, R. M. Illias, 2009. World Journal of Microbiology Biotechnology, 25: 561-572.
2. Lê Thị Thanh Hà, Phạm Đức Ngọc, Phạm Văn Ty, 2007. Nghiên cứu vi khuẩn phân giải chitin phân lập từ Vườn Quốc gia Tam Đảo”, Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng, 2: 523-529.
3. Hung, N. B., H. T. Quang, T. T. T. Ha, T. N. Thao, T. T. D. Chau, N. H. Loc, 2010. Tạp chí Công nghệ sinh học, 8 (3B): 1651-1657.
4. Phạm Thị Ngọc Lan, Hoàng Quốc Anh, 2010. Tạp chí Công nghệ sinh học, 8 (3B): 1639-1643.
5. Nguyễn Phương Huệ, Nguyễn Văn Hiếu, Phí Quyết Tiến, 2010. Tạp chí Công nghệ sinh học, 8 (3B): 1625-1632.
6. Phạm Hồng Ngọc Thùy, 2008. Bước đầu nghiên cứu thu nhận enzyme chitosanase kỹ thuật từ Streptomyces griseus. Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản, 03 (2008): 45-53.

STUDY ON CHITINASE ACTIVITY OF STREPTOMYCETES ISOLATED FROM SOIL

NGUYEN NGOC TAM HUYEN, PHAM THI NGOC LAN

SUMMARY

Chitin is a natural polymer with reserves second only after cellulose. This is organic compounds are quite stable, but many species can degrading especially microorganisms. The groups of microorganisms have the activity chitin-degrading mainly Bacteria, Fungi and Streptomyces, is distributed in the soil and water. Isolation and selection of strong chitin-degrading microorganisms from water and soil is the basis for research and application. Among 102 Streptomyces strains with chitinase activity isolated from samples of soil, two strains X75 and X83 with high chitinase activity (29.0- 32.0 mm diameters) were screened. The effect of culture conditions on their chitinase activity was investigated. The results shows that in Gause I's liquid medium with the temperature 25°C, X75 strain grows stronglies and has highest chitinase activity with the culture conditions adding saccharose, gelatine at pH 7 after 60 hours culturing times. X83 strain grows strongliest and has highest chitinase activity with culture conditions adding starch, urea at pH 6.5 after 72 hours culturing times.