

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC YẾU TỐ MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY TỚI QUÁ TRÌNH SINH CHITINASE TỪ NẤM MỐC (*Aspergillus sydowii*)

Đào Thị Mỹ Linh*, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Bùi Thiên Kim Thu
Nguyễn Đình Triều Vũ, Nguyễn Đăng Khoa, Sơn Thiên Nga
Kiều Yên Vy, Trần Quỳnh Hoa

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: linhdtm@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 14/02/2022; Ngày chấp nhận đăng: 27/4/2022

TÓM TẮT

Các enzyme thuộc nhóm chitinase nhận được sự chú ý ngày càng tăng do có nhiều ứng dụng, một số đã được sản xuất công nghiệp có nguồn gốc từ vi sinh vật như *Aspergillus*, *Bacillus*, *Trichoderma*. Nghiên cứu nhằm mục đích khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng và khả năng tận dụng vỏ tôm làm cơ chất cảm ứng thay cho chitin công nghiệp trong quá trình sinh enzyme có hoạt tính chitinase từ *Aspergillus sydowii*. Các yếu tố ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy tới hoạt tính của chitinase được khảo sát bao gồm nguồn nitơ từ urea, peptone, độ ẩm (40 - 70%), các loại khoáng (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+}), dung dịch trích ly là đệm photphate có pH 6,0 đến 7,5, ảnh hưởng của bột vỏ tôm so với chitin công nghiệp. Kết quả nghiên cứu cho thấy nguồn nitơ là urê với hàm lượng 0,33 g (w/w), độ ẩm 50%, dung dịch trích ly có pH 7,0 là tốt nhất cho sự phát triển và sinh tổng hợp enzyme chitinase. Ngược lại, các ion khoáng Cu^{2+} , Fe^{2+} và Pb^{2+} đều là tác nhân gây ức chế sự phát triển và sinh enzyme có hoạt tính chitinase của *Aspergillus sydowii*. Việc tận dụng nguồn vỏ tôm để làm cơ chất cảm ứng giúp tăng thêm giá trị ứng dụng từ nguồn nguyên liệu này.

Từ khóa: *Aspergillus sydowii*, chitinase, chitin, vỏ tôm.

1. MỞ ĐẦU

Chitinase là một enzyme thủy phân thành phần chitin có trong lớp vỏ của động vật giáp xác (tôm, cua, v.v.) tạo thành các dẫn xuất N – glucosamine, chitooligosaccharide, chitosan được ứng dụng trong sản xuất màng bảo quản thực phẩm, trong y học dẫn truyền thuốc, chống hình thành khối u [1-3]. Hiện nay, tôm xuất khẩu được chế biến dưới dạng bóc vỏ, bỏ đầu (chiếm 10 - 15% trọng lượng của tôm nguyên liệu) [4]. Do vậy, đây là nguồn phụ phẩm dồi dào cho việc thu nhận chitin để ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau. Trong đó, hướng sử dụng chitin làm cơ chất cảm ứng cho việc sản xuất enzyme chitinase nhận được nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học. Nguồn chitin thương mại thường được lựa chọn sử dụng cho các nghiên cứu này [5, 6]. Bên cạnh đó, trong nghiên cứu của các tác giả Brzezinske *et al* (2012) và Farag *et al* (2014), việc sử dụng trực tiếp bột vỏ tôm có tiềm năng thay thế chitin công nghiệp trong vai trò cơ chất cảm ứng sinh enzyme có hoạt tính chitinase [7, 8].

Giống vi sinh vật được lựa chọn cho các nghiên cứu sinh tổng hợp chitinase chủ yếu là nấm mốc. Năm 2002, Rattanakit *et al* đã nghiên cứu 220 chủng nấm, chủng S1-13 được lựa chọn định danh, kết quả cho thấy chi *Aspergillus* cho hoạt tính chitinase cao nhất [9]. Tác giả Lê Thị Huệ (2010) cũng đã tiến hành khảo sát sơ bộ khả năng sinh tổng hợp chitinase của một

số chủng nấm sợi qua việc xác định đường kính vòng phân giải, kết quả thu được chủng *Aspergillus awamori* cho kết quả phân giải cao nhất [5]. Cùng mục đích nghiên cứu chọn ra chủng nấm sợi có hoạt tính chitinase phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ, tác giả Nguyễn Thị Hà (2012) chọn ra được 2 chủng nấm có đường kính vòng phân giải lớn nhất và giải trình tự bằng phương pháp PCR, kết quả thu được là chủng *Penicillium citrinum* và *Aspergillus protuberus* [10]. Đặc biệt, những năm cuối thế kỷ 20, đầu thế kỷ 21 một số các nghiên cứu của các tác giả như Ulhoa *et al* (1991), Felse *et al* (1999) đều nghiên cứu tối ưu hóa quá trình tổng hợp chitinase từ chủng *Trichoderma harzianum* [11, 12]. Các nghiên cứu tập trung khảo sát các môi trường nuôi cấy và các điều kiện nhiệt độ, độ ẩm của quá trình nuôi cấy cũng như nguồn và hàm lượng cơ chất cho quá trình sinh tổng hợp enzyme [5]. Ngoài ra, còn nhiều nghiên cứu chuyên sâu hơn trong việc tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy tổng hợp [6, 10, 13, 14]. Trong nghiên cứu này, các ảnh hưởng của yếu tố dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy đến sự sinh tổng hợp enzyme chitinase của chủng nấm mốc *Aspergillus sydowii* được theo dõi trên môi trường bán rắn. Đồng thời, nghiên cứu cũng thực hiện đánh giá tác động của bột vỏ tôm và chitin công nghiệp trong sự hình thành enzyme có hoạt tính chitinase nhằm hướng đến khả năng tận dụng trực tiếp phụ phẩm vỏ tôm thay cho chitin công nghiệp ở vai trò là cơ chất cảm ứng enzyme chitinase.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Vỏ trấu, cám gạo được cung cấp từ huyện Di Linh, tỉnh Lâm Đồng và sấy khô ở nhiệt độ 60 °C đến khối lượng không đổi 5 - 10%.

Chitin được cung cấp bởi công ty TNHH MTV chitosan có DE > 80%.

Vỏ, đầu tôm đã qua chế biến (luộc chín) được thu nhận tại cơ sở dịch vụ tiệc cưới Bầy Hùng tại Ấp Đông, huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang. Sau đó, các nguyên liệu này được sấy khô đến khối lượng không đổi, tiếp tục được xay mịn và rây qua rây có kích thước lỗ 0,5 mm. Bột vỏ tôm thu được bảo quản trong túi nhôm để phục vụ các thí nghiệm.

Chủng nấm mốc *Aspergillus sydowii* được phân lập và tuyển chọn tại Phòng Thí nghiệm, khoa Công nghệ Sinh học, trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM và định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 28s tại Công ty TNHH MTV Sinh Hóa Phù Sa.

Các hóa chất chính được sử dụng trong nghiên cứu gồm có peptone (Án Độ), đường mía vàng thiên nhiên (Nhà máy đường Biên Hòa, Việt Nam), tween 80, DNS (Trung Quốc).

Môi trường MT4 có thành phần và hàm lượng các chất trong 100 g môi trường gồm: trấu 50 g; cám 40 g; đường vàng 4 g; urea 2,2 g; KH₂PO₄ 0,1 g; CaCl₂ 0,1 g; NH₄H₂PO₄ 0,1 g; MgSO₄.H₂O 0,05 g; KCl 0,05 g; HCl 0,05 g; bột chitin 15 g; độ ẩm 60%; pH 5 - 6.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Aspergillus sydowii được nuôi cấy trong môi trường MT4 với hàm lượng chitin 15%, tỷ lệ giống cấy 1 mL (v/w), thời gian nuôi cấy 24 giờ. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh chitinase được khảo sát bao gồm nguồn nitơ (peptone, urê) với tỷ lệ 3% môi trường; nhiệt độ nuôi cấy từ 30 - 50 °C [15-18]; độ ẩm môi trường nuôi cấy 40 - 70% [19]; các muối khoáng gồm CuSO₄, FeSO₄, Pb(NO₃)₂ với tỷ lệ 0,01%. Sau quá trình nuôi cấy, enzyme được trích ly bằng dung dịch đệm phosphat ở khoảng pH 6,0 - 7,5. Hoạt tính enzyme chitinase là chỉ tiêu được dùng đánh giá trong các khảo sát.

2.3. Phương pháp phân tích

Xác định hoạt tính chitinase theo phương pháp của Farag *et al* (2014) và có sửa đổi cho phù hợp [8]:

Hỗn hợp phản ứng gồm có 0,5 mL dịch trích enzyme với 1 mL chitin huyền phù 1% và ủ trong thời gian 30 phút, ở 40 °C. Sau đó, thêm 0,5 mL NaOH 1N kết hợp đun ở 100 °C trong 3 phút để dừng phản ứng. Dịch phản ứng được ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút, hút 0,5 mL dịch nổi vào ống nghiệm mới rồi bổ sung 1,5 mL DNS, đun ở 100 °C trong 5 phút và làm lạnh nhanh. Đo độ hấp phụ quang ở bước sóng 540 nm. Dựa vào đường chuẩn glucosamine - HCl có nồng độ từ 0-10 $\mu\text{mol/mL}$ bắt màu với thuốc thử DNS 1% tương ứng với giá trị OD ở bước sóng 540 nm dựng phương trình $y = 0,141x + 0,0175$ từ đó tính lượng glucosamine trong mẫu. Một đơn vị enzyme được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết xúc tác sự hình thành 1 μmol glucosamine trong một phút ở pH 7 và nhiệt độ 40 °C.

Chuẩn bị dịch bào tử giống nấm mốc có mật độ $\geq 10^7$ (bào tử/mL): Chủng *Aspergillus sydowii* được cấy chuyển và giữ giống trên môi trường PDA. Sau khoảng 7 ngày cấy, ở 37 °C tiến hành cho 10 mL dung dịch chứa 0,1% Tween 80 vào ống giống, dùng que cấy cạo bào tử và chuyển dung dịch bào tử sang ống nghiệm vô trùng. Mật độ bào tử được xác định bằng phương pháp buồng đếm hồng cầu và được đo mật độ quang tại bước sóng 540 nm tương ứng ở các nồng độ pha loãng. Dựng đường chuẩn tương quan giữa giá trị OD và mật độ bào tử. Giá trị OD từ 1,5 - 1,6 được ghi nhận tương ứng với mật độ của dịch bào tử $\geq 10^7$ bào tử/mL.

Phương pháp xác định độ ẩm môi trường bán rắn: Thành phần môi trường MT4 được cân theo tỷ lệ, sau đó trộn đều môi trường và bổ sung thêm nước theo tỷ lệ 12 ml/10 gam môi trường, xác định độ ẩm bằng cân sấy ẩm Precisa

Chitin huyền phù 1% được chuẩn bị như sau: 1g bột chitin được cho từ từ vào 20 mL HCl đậm đặc, khuấy đều và để qua đêm ở 4 °C. Thêm vào hỗn hợp 200 mL ethanol lạnh (-20 °C) khuấy đều thật nhanh 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 vào tủa nước cất cho đến thể tích 100 mL.

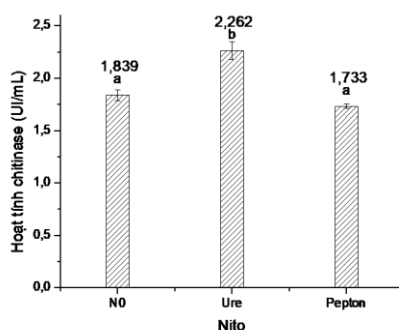
Phân tích và xử lý số liệu: Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, các số liệu được ghi nhận và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010, phần mềm thống kê Statgraphic XVI và vẽ đồ thị bằng phần mềm Origin 8.5.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến hoạt tính chitinase

Nuôi cấy chủng *Aspergillus sydowii* trên môi trường MT4 với hàm lượng chitin 15%, tỷ lệ giống cấy 1 mL (v/w). Các điều kiện nuôi cấy là độ ẩm môi trường 60%, thời gian nuôi cấy 48 giờ và ủ ở nhiệt độ phòng.

Hình 1 cho thấy việc cung cấp nguồn nitơ từ urea 3% cho thấy enzyme thu được có hoạt tính cao nhất là 2,262 UI/mL. Khi chủng nấm sợi muốn sử dụng nguồn nitơ hữu cơ phải phân giải thành các axit amin và chuyển hóa thành NH_3 nhờ enzyme dezaminase được tổng hợp trong quá trình sinh trưởng và phát triển. Vì pepton là hỗn hợp các đoạn peptit chưa được phân giải hoàn toàn, còn urea là hợp chất của nitơ có công thức đơn giản nên hiệu suất để chuyển hóa thành NH_3 của urea sẽ cao hơn pepton. Do đó đến thời điểm 48 giờ thu nhận chitinase thì lúc này nguồn urea đã được sử dụng để sinh chitinase còn pepton khó phân giải hơn vì vậy tại thời điểm xác định hoạt tính, khi sử dụng urea bổ sung 3% cho thấy hoạt tính chitinase được trích ly cao hơn. Ngoài ra ure là nguồn nitơ rẻ tiền sẽ giảm chi phí cho quá trình lên men.

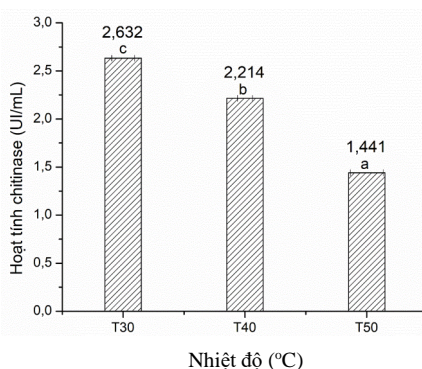


Hình 1. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến hoạt tính chitinase (ab: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%, N0 môi trường đối chứng không bổ sung nguồn Ure, Pepton)

Đối với chủng *Bacillus* sp. R2 nguồn nitơ tốt nhất để tổng hợp chitinase là từ cao nấm men, tiếp đó là từ urea [20]. Trong nghiên cứu thu nhận chitinase từ chủng *Aeromonas* sp. của Ahmadi *et al* (2008) cho thấy nguồn nitơ vô cơ từ amonium sunfat 0,1 % lại phù hợp nhất cho sự sinh và tổng hợp enzyme chitinase [21]. Farag *et al* (2014) đã sử dụng nhiều nguồn nitơ từ các muối vô cơ khác nhau như urea, amonisufat, kali nitrat để thu chitinase từ *Aspergillus niger* cho thấy hoạt tính chitinase cao nhất là 6,28 UI/mg protein với nguồn nitơ từ amonisufat [8]. Sử dụng nguồn nitơ vô cơ từ amonium sunfat cũng được ghi nhận đối với chủng *Aspergillus niger* LOCK 62 trong sinh tổng hợp chitinase [7]. Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy đối với một số chủng như *Trichoderma*, *Penicillium*, *Paecilomyces* cho thấy nguồn peptone 1% cho là tốt nhất sự phát triển và sinh chitinase có hoạt tính cao [22].

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính chitinase

Nuôi cấy chủng *Aspergillus sydowii* ở các điều kiện như khảo sát ảnh hưởng của nitơ. Urea được sử dụng làm nguồn nitơ với hàm lượng 0,33 g (w/w). Nhiệt độ nuôi cấy được khảo sát ở các mốc 30 °C, 40 °C, 50 °C.



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính chitinase (abc thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

Hình 2 cho thấy nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính enzyme chitinase thu được từ chủng *Aspergillus sydowii*. Hoạt tính enzyme cao nhất được ghi nhận ở nhiệt độ 30 °C là 2,632 UI/mL. Hoạt tính chitinase giảm dần theo khi nhiệt độ nuôi cấy được khảo sát ở các mốc 40 °C và 50 °C lần lượt là 2,214 UI/mL và 1,441 UI/mL.

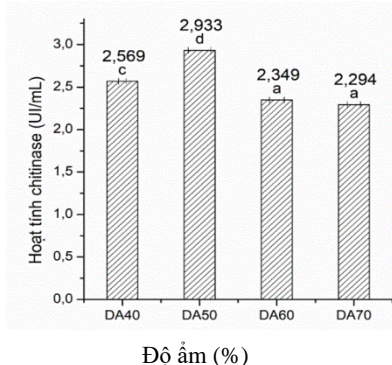
Kết quả này hoàn toàn phù hợp với những nghiên cứu về chủng *A. sydowii*. Chủng này phát triển và sinh bào tử trong một phạm vi nhiệt độ rộng. Phát triển tốt nhất ở 35 °C và ít nhất

là 20 °C. Không có sự tăng trưởng hoặc sinh bào tử xảy ra ở 4 °C và 10 °C. Nghiên cứu của Olutiola *et al* (1977) cũng cho thấy bào tử của *Aspergillus sydowii* phát triển tốt nhất ở 30 °C [23]. Nghiên cứu của Farag *et al* (2014) về khả năng sinh enzyme chitinase từ chủng *Aspergillus terreus* cũng cho kết quả nhiệt độ tương tự là 30 °C [8], trong khi *Aspergillus flavus* là 35 °C [24]. Trong nghiên cứu của Ahmadi *et al*, (2008) nhiệt độ tối ưu cho sự sinh tổng hợp enzyme chitinase chủng *A. sydowii* và *Aeromomas sp.* cũng được ghi nhận là 30 °C [21].

3.3. Ảnh hưởng của độ ẩm đến hoạt tính chitinase

Nuôi cấy chủng *Aspergillus sydowii* trên môi trường MT4 với hàm lượng chitin 15%, tỷ lệ giống cấy 1 mL (v/w), nguồn cacbon sử dụng là đường vàng với hàm lượng 0,6g (w/w), nguồn nitơ là urea hàm lượng 0,33 g (w/w), thời gian nuôi cấy 48 giờ, nhiệt độ nuôi cấy 30 °C. Độ ẩm môi trường nuôi cấy được tiến hành khảo sát ở 40%, 50%, 60%, 70%.

Hoạt tính chitinase cao nhất ở 50% đạt 2,933 UI/mL. Các giá trị độ ẩm thấp hơn (40%) hay cao hơn (60%, 70%) đều làm giảm hoạt tính enzyme. Điều này cho thấy *A. sydowii* là một vi sinh vật cần độ ẩm tương đối để sinh trưởng và phát triển. Độ ẩm là một yếu tố tương đối quan trọng, có ảnh hưởng đến khả năng sinh enzyme trong quá trình nuôi cấy. Khi bổ sung dung dịch muối vào môi trường, dung dịch sẽ tập trung chủ yếu trên bề mặt hạt cơ chất, tạo điều kiện cho bào tử có thể phát triển tạo thành hệ sợi trên bề mặt canh trường. Mặt khác, lượng ẩm còn có khả năng khuếch tán vào trong hạt cơ chất, làm giảm lượng nhiệt do quá trình trao đổi chất sinh ra. Đối với các môi trường có độ ẩm cao (60%, 70%) làm kết dính các hạt cơ chất trong canh trường, làm giảm sự khuếch tán không khí trong canh trường, dẫn đến lượng oxy không được cung cấp đầy đủ, tốc độ sinh trưởng giảm làm cho hoạt tính của enzyme giảm. Đối với môi trường có độ ẩm thấp (40%) các hạt cơ chất rời rạc, môi trường nuôi cấy sẽ nhanh khô, dẫn đến việc sinh bào tử yếu hoặc các bào tử không thể phát triển và làm giảm hoạt tính enzyme tạo thành.



Hình 3. Ảnh hưởng của độ ẩm tới hoạt tính chitinase
(abc: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.
DA40, DA50, DA60, DA70 là nghiệm thức khảo sát độ ẩm ở 40, 50, 60, 70%)

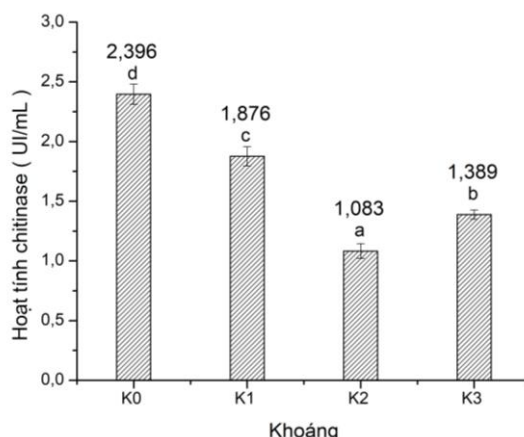
Trong nghiên cứu này, *A. sydowii* cho hoạt tính chitinase tốt nhất ở độ ẩm 50%. Đây cũng là độ ẩm nằm trong khoảng được ghi nhận ở các loài *Aspergillus* khác khi nuôi cấy bằng phương pháp bề mặt. Rattanakit *et al* (2002) đã sử dụng vỏ tôm trong nuôi cấy bề mặt *Aspergillus sp.* S1-13 cho thấy trong khoảng khảo sát độ ẩm môi trường từ 45-80% thì hoạt tính chitinase thể hiện tốt nhất trong khoảng 55-65% và đạt cao nhất ở 58% [9].

3.4. Ảnh hưởng của một số loại khoáng đến hoạt tính chitinase

Nuôi cấy chủng *Aspergillus sydowii* trên môi trường MT4 với hàm lượng chitin 15%, tỷ lệ giống cấy 1mL (v/w), nguồn cacbon sử dụng là đường vàng với hàm lượng 0,6g (w/w),

nguồn nitơ từ urea hàm lượng 0,33g (w/w). Các điều kiện nuôi cấy là độ ẩm môi trường 50%, thời gian nuôi cấy 48 giờ và ủ ở nhiệt độ 30 °C. Một số loại khoáng như Cu^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} được sử dụng khảo sát sự ảnh hưởng tới hoạt tính enzyme chitinase.

Kết quả Hình 4 cho thấy môi trường chứa các loại muối khoáng khác nhau sẽ có ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme thu được. Mẫu đối chứng nuôi cấy với thành phần muối khoáng không đổi theo MT4 cho hoạt tính enzyme chitinase 2,396 UI/mL. Trong đó hai khoáng $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và KH_2PO_4 có tác động tích cực đến sản xuất chitinase [25]. Với các nguồn khoáng được khảo sát hoạt tính enzyme thu được đều thấp hơn mẫu đối chứng. Điều này cho thấy các ion khoáng Cu^{2+} , Fe^{2+} và Pb^{2+} đều là tác nhân gây ức chế sự phát triển và sinh enzyme chitinase của *A. sydowii*. Trong thử nghiệm hoạt tính enzyme chitinase tinh khiết sản xuất bởi chủng *Aspergillus fumigatus* YJ-407 với một số ion khoáng cho thấy hoạt tính enzyme bị ức chế mạnh bởi các ion Fe^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} và Mn^{2+} [26]. Điều này tương đồng với kết quả của nghiên cứu cho thấy sự ức chế của cation Fe^{2+} , Pb^{2+} đối với hoạt tính chitinase từ chủng *A. sydowii*.



Hình 4. Ảnh hưởng của một số loại muối khoáng đến hoạt tính chitinase

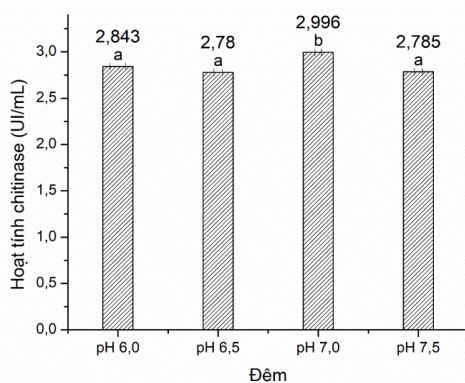
(abc: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%,

K0: không bổ sung khoáng, K1 CuSO_4 0,01%; K2 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0,01%; K3 FeSO_4 0,01%)

3.5. Ảnh hưởng của pH dịch trích ly đến hoạt tính chitinase

Giá trị pH tối thích (pH_{opt}) từ 4-9 đối với các enzyme chitinase ở thực vật bậc cao và tảo; hệ enzyme chitinase ở động vật là 4,8-7,5 và ở vi sinh vật là 3,5-8,0. Theo các nhà khoa học, pH_{opt} của enzyme chitinase có thể có sự phụ thuộc vào cơ chất được sử dụng. Đa số các enzyme chitinase đã được nghiên cứu có pH_{opt} khoảng 5,0 khi cơ chất là glucol chitin nằm trong khoảng pH kiềm yếu.

Chủng *Aspergillus sydowii* được nuôi cấy với các điều kiện tốt nhất đã khảo sát ở trên. Sau khi kết thúc thời gian nuôi cấy, 50 ml dung dịch đệm phosphate ở các pH khảo sát được bổ sung và lắc ở 120 vòng/phút ở 20 °C trong 20 phút. Dịch được lọc qua vải màn, sau đó đem ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 10 phút dịch thu được là chitinase thô. Kết quả cho thấy, pH dung dịch đệm dùng để trích ly enzyme sau nuôi cấy cũng có ảnh hưởng đến hoạt tính chitinase. Đệm phosphate pH 7,0 cho hoạt tính enzyme thu được 2,996 UI/mL và cao hơn hoạt tính chitinase được trích ly ở các pH khác được khảo sát.

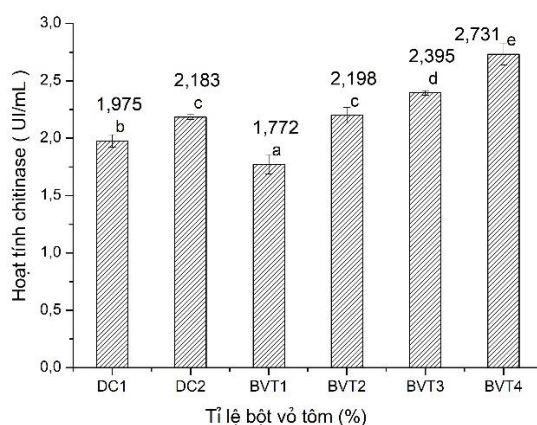


Hình 5. Ảnh hưởng của đệm trích ly đến hoạt tính chitinase (ab: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%).

Theo nghiên cứu của Krishnaveni *et al* (1999) đệm photphate pH 7,0 thường được sử dụng để thu nhận enzyme chitinase [27]. Farag *et al* (2014) trích ly chitinase từ *A. terreus* đạt hiệu quả cao nhất ở đệm photphate pH 5,2 cho hoạt tính 15 U/mg protein [8].

3.6. Ảnh hưởng của bột vỏ tôm so với chitin công nghiệp đến hoạt tính chitinase

Chủng *Aspergillus sydowii* được nuôi cấy trên môi trường MT4 với tỷ lệ giống cấy 1mL (v/w), nguồn cacbon sử dụng là đường vàng với hàm lượng 0,6 g (w/w), nguồn nitơ từ urea hàm lượng 0,33 g (w/w). Các điều kiện nuôi cấy là độ ẩm môi trường 50%, thời gian nuôi cấy 48 giờ và ủ ở nhiệt độ 30 °C. Chitinase được trích ly trong đệm phosphat pH 7. Nguồn bột vỏ tôm được khảo sát ở các tỷ lệ 0, 5, 10, 15 và 20% so với mẫu đối chứng chitin 15%.



Hình 6. Ảnh hưởng của bột vỏ tôm so với chitin công nghiệp đến hoạt tính chitinase (abc: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%)

Trong đó: DC1, DC2 là hoạt tính chitinase thu được trong môi trường tương ứng không bổ sung chitin và bổ sung chitin công nghiệp 15%. BVT1, BVT2, BVT3, BVT4 là hoạt tính chitinase thu nhận được khi nuôi *A. sydowii* trên môi trường có bổ sung bột vỏ tôm tương ứng 5%, 10%, 15%, 20%.

Hoạt tính chitinase đối với nguồn cơ chất là chitin đạt cao nhất 2,731 UL/mL với tỷ lệ 20%, và cao hơn hẳn so với sử dụng nguồn cơ chất chitin 15% với hoạt tính 2,183 UI/mL (Hình 6). Nghiên cứu của Phạm Thị Đan Phượng và cs (2012) về thu nhận chitin từ vỏ tôm thể chân trắng cho thấy thành phần vỏ tôm ngoài chitin (29,4% tính theo khối lượng khô tuyệt đối) còn chứa một lượng lớn protein (24,3%), khoáng (26,5%) và lipit (2,2%). Chính sự liên kết chặt chẽ giữa protein, khoáng và chitin trong vỏ tôm dẫn đến khó khăn trong việc phân

giải và sử dụng chitin có trong hỗn hợp [28]. Farag *et al* (2014) đã sử dụng nguồn cơ chất từ bột vỏ tôm để bổ sung vào môi trường nuôi cấy *Aspergillus terreus* với hàm lượng 20% (w/v) cho việc tăng trưởng và sinh tổng hợp enzyme [8]. Brzezinske *et al* (2012) có thử nghiệm nuôi cấy *Aspergillus niger* LOCK 62 với các nguồn cơ chất từ chitin huyền phù, bột vỏ tôm và bột vỏ cua cho thấy kết quả tương đồng với khảo sát này khi hoạt tính chitinase đạt được cực đại với nguồn cơ chất từ chitin huyền phù và từ bột vỏ tôm cho hoạt tính không cao bằng [7]. Tuy nhiên, nguyên liệu sử dụng trong nghiên cứu đã qua chế biến có thể làm lỏng các liên kết giữa các hợp chất trong vỏ tôm, protein bị biến tính. Vì vậy nấm mốc có thể sử dụng được nguồn protein, khoáng thêm trong quá trình tăng trưởng, làm tăng hoạt tính chitinase.

So sánh về mặt giá thành bột vỏ tôm lại rẻ hơn chitin công nghiệp khoảng 10 lần. Trong sản xuất công nghiệp, thường xét nhiều về khía cạnh kinh tế, với việc tận dụng nguồn phụ phẩm bột vỏ tôm giúp giảm chi phí nguyên liệu đầu vào đáng kể mà vẫn đảm bảo hoạt tính enzyme ở mức có thể chấp nhận được thì hoàn toàn khả thi. Giảm chi phí sẽ hạ giá thành sản phẩm, tăng khả năng cạnh tranh.

Theo Tổng cục Thủy sản, mỗi năm Việt Nam nuôi và khai thác hơn 6 triệu tấn thủy hải sản, trong đó tôm chiếm một số lượng lớn. Tuy nhiên, do công nghệ xử lý thủy hải sản còn hạn chế nên lượng phụ phẩm thải ra trong quá trình sản xuất còn khá cao với tỷ lệ khoảng 35% - 60%, tương đương hơn 2 triệu tấn phụ phẩm thủy hải sản mỗi năm, trong đó có khoảng 250 tấn phụ phẩm tôm, phần lớn bị thải loại trực tiếp vào môi trường, chỉ khoảng 33% được sử dụng để sản xuất các sản phẩm có giá trị gia tăng thấp như phân bón, thức ăn chăn nuôi và khoảng 7% được tận thu để phát triển các dòng có giá trị gia tăng cao như thực phẩm, dược phẩm. Nếu các dưỡng chất được chiết xuất tối ưu và bảo toàn hoạt tính, thành phẩm cuối cùng sẽ có giá trị cao và ứng dụng trong nhiều ngành khác nhau [29]. Do đó việc sản xuất chitinase từ nấm mốc sử dụng môi trường có bổ sung vỏ tôm như nguồn cơ chất sẽ là một hướng đi thiết thực trong định hướng sản xuất các dòng sản phẩm giá trị cao, theo hướng thay thế dần các sản phẩm hóa học bằng các sản phẩm mang tính sinh học như enzyme.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được một số yếu tố ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến hoạt tính chitinase từ *Aspergillus sydowii*. Kết quả thu được điều kiện nuôi cấy thích hợp trên môi trường MT4 là khi sử dụng nguồn nitơ từ urê bổ sung 3%, nhiệt độ 30 °C, độ ẩm môi trường nuôi cấy 50%, dung dịch đệm trích ly phosphat pH 7,0 cho thấy hiệu suất thu hồi chitinase là cao nhất. Ngoài ra, việc tận dụng nguồn phụ phẩm rẻ tiền từ vỏ tôm để làm cơ chất cảm ứng thay thế hoàn toàn chitin công nghiệp cũng cho thấy được những lợi ích về mặt kinh tế. Các ion kim loại như Cu^{2+} , Fe^{2+} và Pb^{2+} cho thấy sự kìm hoạt tính chitinase từ *A. sydowii*. Kết quả này sẽ được kế thừa cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tối ưu quá trình thu nhận chitinase mở ra các hướng ứng dụng enzyme trong công nghiệp.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu do Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo hợp đồng số 114/HĐ-DCT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nathália Kelly de Araújo, Cristiane Fernandes de Assis, Everaldo Silvino Dos Santos, Gorete Ribeiro de Macedo, Louise Fonseca de Farias, Humberto Arimatéia Jr, Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa, Maria Giovana Binder Pagnoncelli - Production of enzymes by *Paenibacillus chitinolyticus* and *Paenibacillus ehimensis* to obtain chitoooligosaccharides, Applied Biochem Biotechnol **170** (2) (2013) 292-300.

2. Bùi Văn Hoài, Đào An Quang, Ngô Đại Nghiệp - Tối ưu hóa quá trình thủy phân chitosan bằng enzyme cellulase để tạo chitoooligosaccharide, Science and Technology Development Journal **20** (K3) (2017) 74-82.
3. Berit B Aam, Ellinor B Heggset, Anne Line Norberg, Morten Sørli, Kjell M Vårum, Vincent G H Eijssink - Production of chitoooligosaccharides and their potential applications in medicine, Mar Drugs **8** (5) (2010) 1482-517.
4. Bộ Công thương Việt Nam - Tận dụng phụ phẩm ngành tôm Việt Nam thu được trăm tỷ mỗi năm, Cổng thông tin điện tử Bộ Công Thương (MOIT) (2019).
5. Lê Thị Huệ - Khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase của một số chủng nấm sợi thuộc giống *Aspergillus*, *Trichoderma* và ứng dụng, Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh (2010).
6. Nguyễn Thị Hà - Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chủng nấm sợi *Penicillium oxalicum* sinh tổng hợp enzyme chitinase được phân lập từ đất, Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 5 (2013) 1001-1007.
7. Brzezinska M. S., and Urszula J. - Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control, Curr Microbiol **65** (6) (2012) 666-672.
8. Farag A.M., Al-Nusarie, and Taghreed S. - Production, optimization, characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terreus*, African Journal of Biotechnology **13** (14) (2014) 1567-1578.
9. Nopakarn Rattanakit, Plikomol A., Yano S., Wakayama M., Tachiki T. - Utilization of shrimp shellfish waste as a substrate for solid-state cultivation of *Aspergillus sp.* S 1 - 13: Evaluation of a culture based on chitinase formation which is necessary for chitin-assimilation, Journal of bioscience and bioengineering **93** (6) (2002) 550-556.
10. Nguyễn Thị Hà - 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** (2012) 26-35.
11. Cirano J. Ulhoa and Peberd J.F. - Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*, Journal of General Microbiology **137** (1991) 2163-2169.
12. Arthur F.P., and Panda T. - Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode, Process Biochemistry **34** (1999) 563-566.
13. Ghanem K.M, Al-Garni S.M, and Al-Makishah N.H. - Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus*, African Journal of Biotechnology **9** (32) (2010) 5135-5146.
14. Warda E.A., Abd El Aty Abeer R., Hamed Eman A., Swelim Mahmoud I., El-Diwany Ahmed - Applications of Plackett–Burman and Central Composite Design for the Optimization of Novel *Brevundimonas diminuta* KT277492 Chitinase Production, Investigation of its Antifungal Activity, Brazilian Archives of Biology and Technology **59** (2016) 1-14.
15. Chanpen Wiwat, Patcharaporn Siwayaprahm, and Amarat Bhumiratana - Purification and Characterization of Chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1, Current microbiology **39** (1999) 134-140.
16. Huang J. H., Chen C. J., and Su Y. C. - Production of chitinolytic enzymes from a novel species of *Aeromonas*, Journal of Industrial Microbiology **17** (1996) 89-95.

17. Frandberg E., and Schnurer J. - Chitinolytic properties of *Bacillus pabuli* K1, Journal of Applied Bacteriology **76** (1994) 361-367.
18. Anne Bendt, Heike Hüller, Ulrike Kammel, Elisabeth Helmke, Thomas Schweder - Cloning, expression, and characterization of a chitinase gene from the Antarctic psychrotolerant bacterium *Vibrio sp.* strain Fi:7, Extremophiles **5** (2) (2001) 119-126.
19. Nguyễn Hoàng Lộc - Nhập môn công nghệ sinh học, Nhà xuất bản Đại học Huế (2007) 76-78.
20. Ben Amar Cheba, Taha Ibrahim Zaghoul, Ahmad Rafik El-Mahdy, Mohamad Hisham El-Massry - Effect of nitrogen sources and fermentation conditions on *Bacillus sp.* R2 chitinase production, ScienceDirect **22** (2018) 280-287.
21. Jami Al Ahmadi K., Yazdi M.T., Fathi Najafi M., Shahverdi A.R, Faramarzi M.A., Zarrini G., Behravan J. - Optimization of Medium and Cultivation Condition for Chitinase Production by the Newly Isolated: *Aeromonas sp.*, Biotechnology **7** (2) (2008) 266-272.
22. Nguyen Van Bon, Tran Minh Dinh, and Nguyen Anh Dzung - Study on isolation and selection of some fungal strains with high chitinase activity in central highland, Viet Nam Faculty of Natural Science and Technology, Tay Nguyen University **P-02** (2011) 184-193.
23. Olutiola P.O., and Cole O.O. - Some Environmental and Nutritional Factors Affecting Growth and Sporulation of *Aspergillus sydowi*, Physiology Plant **39** (1977) 239-242.
24. Gunalan G. - Production, optimization of chitinase using *Aspergillus flavus* and its biocontrol of phytopathogenic fungi, Journal of Pharmacy Research **5** (6) (2012) 3151-3154.
25. Rifat Hamid, Minhaj A. Khan, Mahboob Ahmad, Malik Mobeen Ahmad, Malik Zainul Abdin, Javed Musarrat, Saleem Javed - Chitinases: An update, Journal Pharmacy Bioallied Science **5**(1) (2013) 21-29.
26. Guoqing Xia, Jin C., Zhou J., Yang S., Zhang S., Jin C. - A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407, Europe Journal Biochemical **268** (2001) 4079-4085.
27. Krishnaveni S., Liang G.H., Muthukrishnan S., Manickam A. - Purification and partial characterization of chitinases from sorghum seeds, Plant Science **144** (1999) 1-7.
28. Phạm Thị Đan Phượng and Trang Sĩ Trung - Tính chất của chitin và chitosan từ vỏ tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) khử protein bằng phương pháp hóa học và sinh học, Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản **3** (2012) 48-52.
29. Quỳnh Chi - Làm chủ quy trình xử lý phụ phẩm tôm không chất thải quy mô 100 tấn/ngày, Truyền thông Khoa học và Công nghệ (2020).

ABSTRACT

RESEARCH THE IMPACTION OF FACTORS TO THE PROCESS OF OBTAINING CHITINASE BY *Aspergillus sydowii*

Dao Thi My Linh*, Nguyen Thi Quynh Mai, Bui Thien Kim Thu
Nguyen Dinh Trieu Vu, Nguyen Dang Khoa, Son Thien Nga
Kieu Yen Vy, Tran Quynh Hoa
Ho Chi Minh City University of Food Industry
*Email: linhdtm@hufi.edu.vn

These enzymes have a wealth of applications, some of which have already been realized by industry. Most of the chitinases are original from microorganisms such as *Aspergillus*, *Bacillus*, *Trichoderma*. The bioactivity of chitinase is affected by nutritional and enviromental conditions. This study emphasizes on the impact of critical process variables on the activity of chitinase from *Aspergillus sydowii*. The utilization of shrimp waste as a substrate for solid-state cultivation of the *A. sydowii* was investigated. The shrimp waste induces chitinase biosynthesis and it can be used to replace chitin in cultivation of *A. sydowii* for producing chitinase. Other factors influencing chitinase activity have been studied include source and content of nitrogen (urea, peptone respectively 0.33 g/10.5 g medium), moisture (40-70%), minerals (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+}), pH extract (phosphate buffer pH 6.0-7.5). The results showed that MT4 media containing 0.33 g (w/w) urea, 50% moisture, extraction phosphate buffer pH 7.0, are suitable for chitinase bioactivity. However, the mineral ions such as Cu^{2+} , Fe^{2+} and Pb^{2+} inhibit chitinase bioactivity of *A. sydowii*. Research shows that using cheap sources of by-products from shrimp shells as substrate to replace chitin also shows commercial benefits.

Keywords: *Aspergillus sydowii*, chitinase, chitin, shrimp shell waste.