

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZYME CHITOSANASE TỪ MẪU ĐẤT Ở PHƯỚC LONG, NHA TRANG

Isolating and Selecting Microorganisms with the Ability to Biosynthetic Chitosanase Enzyme from Phuoclong's (Nha Trang) Soil Sample

Nguyễn Trọng Thăng, Ngô Xuân Mạnh

*Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

Địa chỉ email tác giả liên lạc: *trongthang6886@gmail.com*

Ngày gửi đăng: 20.04.2011; Ngày chấp nhận: 22.06.2011

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm tìm ra các vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitosanase hoạt tính cao từ nguồn nguyên liệu tự nhiên là đất tại nơi có nhiều xác các loài giáp xác phân hủy. Sau khi tiến hành phân lập, tuyển chọn, xác định hoạt tính chitosanase bằng phương pháp DNS đã xác định được một mẫu vi khuẩn (ký hiệu là VK6) và một mẫu xạ khuẩn (ký hiệu là XK14) có khả năng sinh tổng hợp chitosanase hoạt tính cao. Đã nghiên cứu một số đặc tính của chitosanase sản sinh từ mẫu VK6 và XK14. Chitosanase từ mẫu VK6 có  $pH_{opt}$  là 5,5, nhiệt độ phản ứng tối ưu 50°C, thời gian phản ứng tối ưu 30 phút. Chitosanase từ mẫu XK14 có  $pH_{opt}$  là 6,0, nhiệt độ phản ứng tối ưu 55°C, thời gian phản ứng tối ưu 30 phút. Kết quả này mở ra tiềm năng khai thác ứng dụng của enzyme chitosanase từ hai mẫu vi sinh vật trên.

Từ khóa: Chitosanase, phân lập, tuyển chọn, vi khuẩn, xạ khuẩn.

### SUMMARY

The study was conducted to find microorganisms what be able to produce high chitosanase activity enzyme from natural soil. After the isolation, selection, chitosanase activity determined by DNS method that identified a bacteria strain (VK6) and an actinomycete strain (XK14) are capable of biosynthesis high chitosanase activity. The results of this study also showed some characteristics of chitosanase produced from VK6 and XK14. Specifically, the optimum pH for the activity of chitosanase from VK6 was  $pH_{opt}$  5.5, the optimal reaction temperature was 50°C, the optimal reaction time was 30 minutes. And the optimum conditions for activity of chitosanase from XK14 were  $pH_{opt}$  6.0, 55°C, 30 minutes. This result opens up the potential applicability of the enzyme chitosanase from the two microorganisms.

Key words: Actinomycete, bacteria, chitosanase, isolation, selection.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chitin là polymer sinh học có nhiều trong thiên nhiên chỉ đứng sau cellulose, được khai thác từ vỏ các loại sinh vật biển, sinh vật giáp xác như tôm, cua... Chitosan là một dạng chitin đã bị khử gốc acetyl và được xem là polymer tự nhiên quan trọng nhất

nhờ những đặc tính quý báu của nó (tính năng công nghệ, tính năng sinh lý học). Do vậy, chitin/chitosan và các dẫn xuất của chúng ngày càng được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như công nghiệp, nông nghiệp, thực phẩm, mỹ phẩm, công nghệ sinh học, y học và dược phẩm, xử lý nước thải và bảo vệ môi trường...

Ở nước ta, sản lượng phế phụ phẩm từ các nhà máy chế biến thủy hải sản là rất lớn (vỏ tôm, cua...). Đây là nguồn nguyên liệu dồi dào và rẻ tiền để thu nhận chitin, chitosan, nếu tận dụng được sẽ đem lại một nguồn lợi kinh tế to lớn. Tuy nhiên, chitin và chitosan lại có một số nhược điểm như khối lượng phân tử lớn, mạch phân tử dài, không tan trong nước. Điều này làm hạn chế đáng kể tính năng và những ứng dụng của nó, nhất là những ứng dụng trong công nghệ thực phẩm. Để khắc phục được vấn đề này, sản phẩm thủy phân của chitosan đã được tạo ra, đó là chitosan oligosaccharide (COS). Gần đây, COS với những tính năng ưu việt của mình đã ngày càng được sản xuất nhiều hơn và được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực đặc biệt là trong công nghệ thực phẩm với vai trò là oligosaccharide chức năng (Choi và cs., 2004).

COS có thể được thu nhận bằng phương pháp hoá học. Tuy nhiên, phương pháp hiệu quả nhất để sản xuất sản phẩm này là phương pháp sinh học sử dụng enzyme chitosanase. Enzyme chitosanase có thể thu nhận được từ nhiều nguồn khác nhau như vi khuẩn, nấm, virus, một số thực vật... nhưng enzyme chitosanase thu nhận từ vi khuẩn hoặc xạ khuẩn thường có hoạt tính cao hơn (Lee, 2006). Các chủng vi khuẩn hoặc xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp chitosanase lại thường có sẵn trong tự nhiên tại những nơi có xác các loài giáp xác (tôm, cua...) phân huỷ. Do đó, nếu phân lập được nguồn vi sinh vật tự nhiên này thì có thể tạo ra một phương pháp sản xuất COS rất nhanh chóng và rẻ tiền.

Trên thế giới đã có khá nhiều các nghiên cứu về enzyme chitosanase được sinh tổng hợp từ các loài vi sinh vật (Choi và cs., 2004; Lee, 2006). Tuy nhiên, ở Việt Nam cho đến thời điểm này, những nghiên cứu về chitosanase và các loài vi sinh vật sản sinh ra nó còn rất hạn chế.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitosanase hoạt tính cao.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu vi khuẩn và xạ khuẩn được phân lập từ mẫu đất được lấy ở khu vực có rất nhiều xác tôm đã phân huỷ lâu năm tại phường Phước Long – Nha Trang vào tháng 01/2008.

### 2.2. Phân lập, bảo quản và giữ giống

Mẫu đất phơi khô → tán nhỏ → cân 10 g mẫu hoà tan trong 100 ml nước cất → khuấy đều → lọc → thu dịch → pha loãng đến  $10^{-9}$ . Lấy dịch này làm mẫu để phân lập. Sử dụng môi trường Gause để phân lập xạ khuẩn và môi trường MPA để phân lập vi khuẩn. Tiến hành làm thuần, bảo quản giống bằng phương pháp cấy truyền trong môi trường thạch nghiêng. Sau đó cấy chấm điểm trên môi trường thử hoạt tính gồm aga và chitosan để thử hoạt tính sơ bộ (Piza và cs., 1999; Lee, 2006). Xác định đường kính vòng phân giải của enzyme thô của các mẫu sau khi nuôi cấy bằng phương pháp đục lỗ thạch.

### 2.3. Nuôi cấy các mẫu có hoạt tính

Môi trường nuôi cấy bán tổng hợp được phân chia vào các bình tam giác vô trùng định lượng 100 -150 ml. Cấy giống đã hoạt hoá (hoạt hóa 1 vòng que cấy trong ống nghiệm với thể tích môi trường hoạt hoá 5 ml) vào môi trường nuôi cấy ở chế độ vô trùng. Quá trình nuôi cấy được tiến hành trên máy lắc ở chế độ 200 v/ph ở 37°C trong thời gian 2 ngày đối với vi khuẩn và 4 ngày đối với xạ khuẩn. Sau khi dừng nuôi cấy, tiến hành li tâm để loại bỏ kết tủa, thu dịch nuôi cấy. Phân tích hoạt tính enzyme của dịch enzyme thu được để tiếp tục tuyển chọn ra mẫu có khả năng sinh tổng hợp chitosanase hoạt tính cao.

### 2.4. Xác định hoạt tính enzyme Chitosanase

Hoạt tính chitosanase được xác định thông qua lượng đường khử giải phóng, đường khử được xác định bằng phương pháp quang phổ sử dụng acid dinitrosalicylic (DNS) (Wang, 2007; Miller, 1959).

Chuẩn bị 2 ống nghiệm, một ống thí nghiệm, một ống đối chứng. Lấy 2 ml dịch enzyme cho vào mỗi ống, ở ống đối chứng cho thêm 10  $\mu$ l dung dịch NaOH 10N để bất hoạt enzyme. Sau đó, thêm vào mỗi ống 2 ml dung dịch chitosan 0,2%. Đặt 2 ống nghiệm trong bể ổn nhiệt ở nhiệt độ 50°C/30 phút. Sau đó, nhỏ 100  $\mu$ l NaOH 10N vào ống thí nghiệm để dừng phản ứng. Từ mỗi ống này lấy ra 3 ml rồi thêm vào 3 ml DNS, đặt 2 ống nghiệm trong bể ổn nhiệt 90°C/5 - 10 phút. Sau đó, nhỏ vào mỗi ống 1 ml dung dịch potassium sodium tartrate 40%. Để nguội đến nhiệt độ phòng và đo A575. Kết quả hoạt tính enzyme được tính theo đường chuẩn glucose.

### 2.5. Phương pháp xác định hàm lượng protein

Xác định hàm lượng protein trong dung dịch enzyme theo phương pháp Bradford (1976). Lấy 0,1 ml dung dịch protein cần xác định, thêm 5 ml dung dịch thuốc nhuộm protein, trộn đều. Đo A ở bước sóng 595 nm ( $A_{595}$ ) sau 2 phút đến 1h. Mẫu đối chứng được tiến hành song song. Tính hàm lượng protein của mẫu thí nghiệm theo đường chuẩn protein (albumine).

### 2.6. Làm sạch enzyme bằng phương pháp tủa phân đoạn cồn

Tủa cồn tại từng phân đoạn. Làm lạnh cồn tuyệt đối, làm lạnh dung dịch enzyme cần tủa. Lấy 100 ml dung dịch enzyme đã làm lạnh cho vào cốc thủy tinh, cho từ từ 30 ml cồn đã làm lạnh vào dung dịch enzyme này, khuấy đều, lại làm lạnh 15 - 30 phút. Sau đó, ly tâm ở tốc độ 10.000 v/ph trong 15 phút, thu cặn tủa. Đánh dấu phân đoạn tủa 0 - 30%. Cặn thu được hoà tan trong đệm phosphate pH 6,0 ta được dịch enzyme phân đoạn 0 - 30%. Còn dịch trong thu được tiếp tục cho thêm cồn đã làm lạnh để đạt 40% cồn. Tiến hành tương tự như trên cho đến phân đoạn 80 - 90%. Các tiểu phân thu được tiến hành xác định riêng hoạt tính enzyme và hàm lượng protein.

### 2.7. Xác định tính chất của enzyme chitosanase sinh tổng hợp từ các mẫu được tuyển chọn

Để khảo sát ảnh hưởng của pH và xác định pH tối ưu cho hoạt động của enzyme chitosanase, ta cho phản ứng xảy ra tại các giá trị pH khác nhau: 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0 trong môi trường đệm Mc Ilvaine (pH 2,2 - 8,0). Các điều kiện khác (nhiệt độ, thời gian phản ứng...) được giữ cố định. Kết quả về khả năng thủy phân cơ chất tại các giá trị pH khác nhau của enzyme được biểu hiện bằng hoạt tính của chúng. Hoạt tính này được xác định thông qua việc đo độ hấp thụ quang bằng máy quang phổ. Tương tự, nhiệt độ tối ưu và thời gian phản ứng tối ưu của chitosanase cũng được khảo sát theo cách trên, phản ứng của enzyme được thực hiện ở các giá trị nhiệt độ khác nhau: 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 70°C và các thời gian khác nhau: 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 phút.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

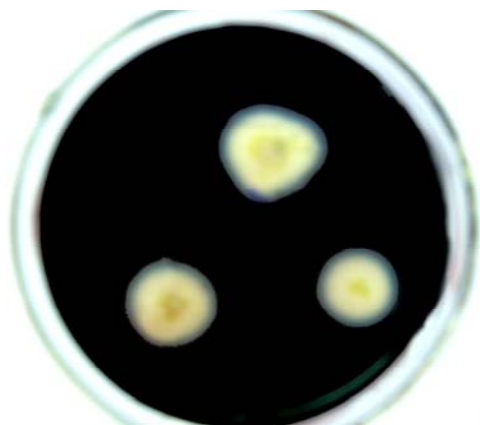
### 3.1. Phân lập và tuyển chọn các mẫu vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitosanase hoạt tính cao

Vì chitosanase là enzyme đặc hiệu đối với cơ chất chitosan nên những vi sinh vật có khả năng sinh chitosanase ngoại bào sẽ tiết enzyme ra ngoài môi trường để phân giải cơ chất chitosan tạo nên vòng phân giải trên môi trường. Từ mẫu đất lấy ở phường Phước Long, thành phố Nha Trang, đã chọn được 4 mẫu vi khuẩn và 5 mẫu xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitosanase. 4 mẫu vi khuẩn được kí hiệu là: VK2, VK6, VK13, VK16 và 5 mẫu xạ khuẩn được kí hiệu là: XK10, XK11, XK13, XK14, XK17. Các mẫu này đều có vòng phân giải cơ chất rộng và sáng nhưng không đều nhau, chúng tỏ hoạt tính chitosanase của chúng là khác nhau.

Kết quả tuyển chọn sơ bộ bằng phương pháp đục lỗ thạch ở bảng 1 và các hình 1, 2 và 3 cho thấy 3 mẫu VK2, XK13, XK17 có hiệu số đường kính vòng phân giải  $\leq 0,5$  cm. Còn 6 mẫu còn lại có hiệu số đường kính vòng phân giải  $\geq 0,7$  cm. Hiệu số đường kính vòng phân giải càng lớn thì enzyme đó càng có khả năng có hoạt tính cao. 6 mẫu VK6, VK13, VK16, XK10, XK11, XK14 tiếp tục được xác định hoạt tính bằng phương pháp acid dinitrosalicylic.

**Bảng 1. Hiệu số đường kính vòng phân giải của enzyme chitosanase từ các mẫu phân lập**

Kí hiệu mẫu	VK2	VK6	VK13	VK16	XK10	XK11	XK13	XK14	XK17
Hiệu số đường kính vòng phân giải của chitosanase (cm)	0,5	1,5	0,8	1,1	1,0	0,7	0,4	1,2	0,4



**Hình 1. Vòng phân giải cơ chất của chitosanase sản sinh từ mẫu VK6**



**Hình 2. Vòng phân giải cơ chất của chitosanase sản sinh từ mẫu XK14**



**Hình 3. Vòng phân giải cơ chất của chitosanase sản sinh từ mẫu VK6 được thử bằng phương pháp đục lỗ thạch**

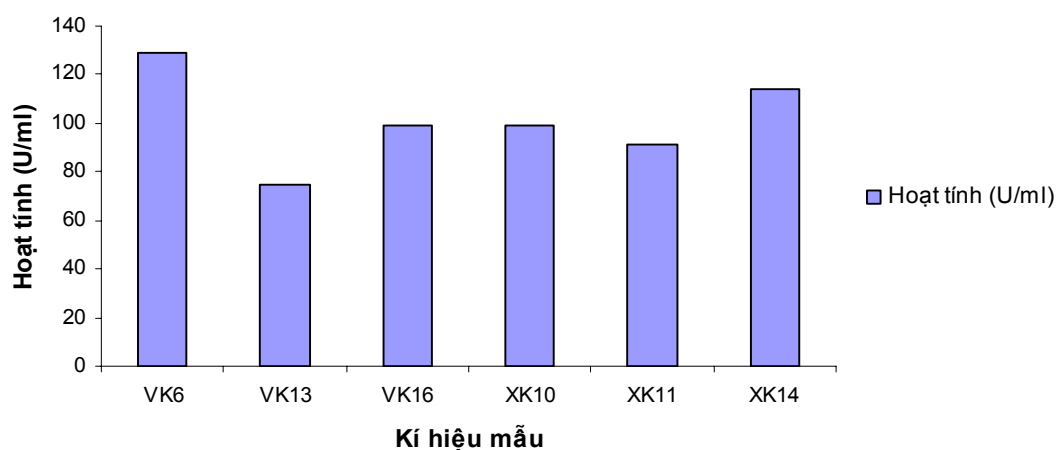
Mẫu vi khuẩn có hoạt tính enzyme chitosanase cao nhất là mẫu VK6 (129,4 U/ml), mẫu xạ khuẩn có hoạt tính cao nhất là XK14 (114,4 U/ml) (Hình 4). Theo Lee (2006), Fukamizo và Brzezinski (1997), với hoạt tính enzyme chitosanase thô của dịch nuôi cấy lớn hơn 100 U/ml là rất khả quan. Vì vậy, 2 mẫu này được sử dụng tiếp cho các nghiên cứu sau.

### 3.2. Làm sạch sơ bộ enzyme chitosanase bằng phương pháp tủa cồn

Enzyme chitosanase của mẫu VK6 tủa tốt trong khoảng 30 - 60% cồn (đạt 71,2% hoạt tính tổng số) và đạt hoạt tính cao nhất (367,7 U/ml, chiếm 28,4% hoạt tính tổng số) ở phân xuất cồn 40 - 50%, hàm lượng protein thu được ở phân xuất này là 60,5 mg/ml thấp hơn so với hàm lượng protein thu được ở phân xuất 30 - 40% (66,6 mg/ml), đồng thời có hoạt độ riêng cao nhất mà dịch enzyme có hoạt tính càng cao và hàm lượng protein càng thấp thì càng sạch (Bảng 2). Vì vậy, phân xuất cồn thích hợp nhất cho việc

kết tủa để thu hồi chitosanase từ mẫu này là 40 - 50%.

Kết quả ở bảng 2 cũng cho thấy, ở các phân xuất cồn dưới 50 - 60% thì hoạt tính chitosanase của mẫu XK14 tăng dần khi tăng nồng độ cồn. Ở phân xuất 50 - 60%, hoạt tính chitosanase tăng 9,3% so với hoạt tính chitosanase ở phân xuất 0 - 30%. Nhưng khi tủa ở nồng độ cồn cao (trên 50 - 60%) thì hoạt tính chitosanase của mẫu này lại giảm xuống khi tăng nồng độ cồn. Chitosanase của mẫu XK14 tủa tốt trong khoảng nồng độ 40 - 70% cồn (đạt 60,7% hoạt tính tổng số) và đạt hoạt tính cao nhất (307,1 U/ml, chiếm 21,5% hoạt tính tổng số) ở phân xuất 50 - 60%, hàm lượng protein thu được ở phân xuất này là 55,8 mg/ml (đạt 22,0% hàm lượng protein tổng). Hơn nữa, hoạt độ riêng ở phân xuất cồn 60 - 70% cũng đạt giá trị cao nhất. Điều đó chứng tỏ phân xuất cồn thích hợp nhất cho việc tủa để thu hồi chitosanase từ mẫu này là 50 - 60%.



Hình 4. Hoạt tính chitosanase của 6 mẫu được chọn

**Bảng 2. Hoạt tính chitosanase và nồng độ protein của các phân xuất tủa bằng cồn (mẫu VK6 và XK14)**

Phân xuất tủa bằng cồn (%)	VK6		XK14	
	Hoạt tính chitosanase (U/ml)	Nồng độ protein (mg/ml)	Hoạt tính chitosanase (U/ml)	Nồng độ protein (mg/ml)
0-30	-	-	174,3	36,0
30-40	262,8	66,6	196,8	41,3
40-50	367,7	60,5	292,8	46,9
50-60	291,4	58,4	307,1	55,8
60-70	217,9	48,3	268,9	52,4
70-80	154,6	36,2	190,6	21,5
80-90	-	-	-	-

### 3.3. Xác định tính chất của enzyme chitosanase từ chủng VK6 và XK14

#### 3.3.1. pH tối ưu của enzyme chitosanase từ 2 mẫu VK6 và XK14

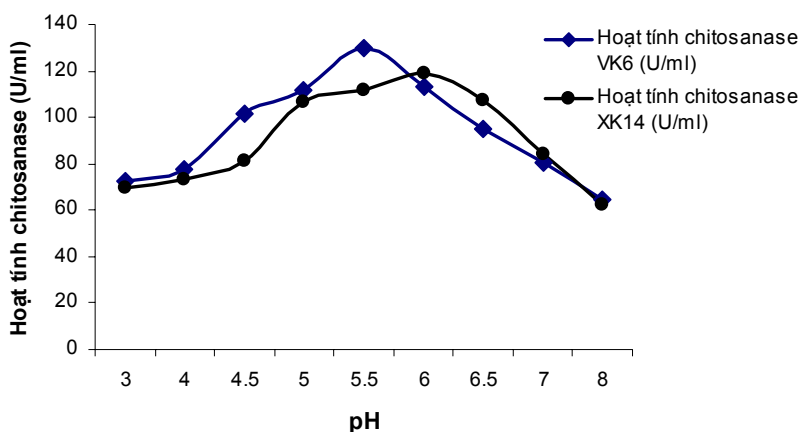
pH tối ưu của enzyme chitosanase từ mẫu VK6 là  $pH_{opt}$  5,5 với hoạt tính cao nhất là 130,0 U/ml. pH tối ưu của enzyme chitosanase từ mẫu XK14 là  $pH_{opt}$  6,0 với hoạt tính cao nhất là 119,1 U/ml (Hình 5).

Đối với enzyme chitosanase từ mẫu VK6: Hoạt động tốt nhất trong khoảng pH 4,5 - 6,5. Hoạt tính enzyme giảm nhanh khi pH < 4,5 hoặc pH > 6,5. Cụ thể là khi pH giảm xuống 4,0 thì hoạt tính enzyme còn 77,6 U/ml, còn khi pH tăng lên 7,0 thì hoạt tính enzyme là 80,3 U/ml. Tuy nhiên, khi pH giảm từ 5,5 xuống 4,5 hoạt tính enzyme chỉ giảm 22%, trong khi pH tăng từ 5,5 lên 6,5 thì hoạt tính giảm mạnh hơn (giảm 27%), (được biểu diễn bằng độ dốc của đường cong trên khoảng pH 5,5-6,5 lớn hơn độ dốc trên khoảng 4,5-5,5). Điều đó chứng tỏ enzyme chitosanase từ mẫu VK6 chịu được môi trường acid tốt hơn môi trường kiềm hay hoạt tính tối ưu của enzyme này là trong môi trường acid yếu. Nhưng khi môi trường phản ứng quá acid hoặc quá kiềm thì hoạt tính enzyme lại giảm mạnh. Chẳng hạn, khi pH 3,0 thì hoạt tính giảm 44%, còn khi pH 8,0 hoạt tính giảm 50%.

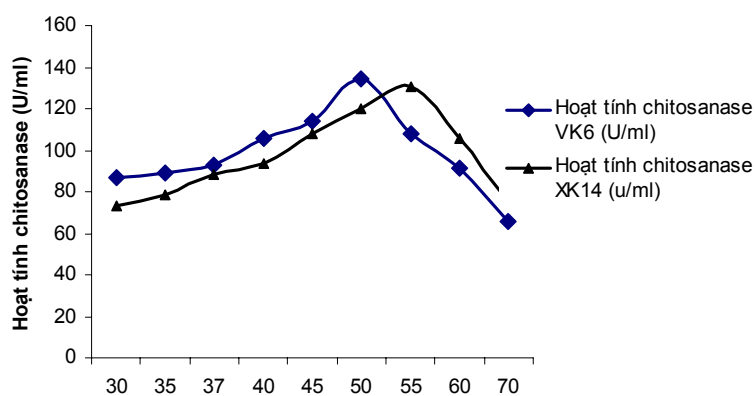
Đối với enzyme chitosanase từ mẫu XK14: Có khoảng pH hoạt động tốt nhất là

5,0-6,5. Như vậy, khoảng pH này hẹp hơn so với chitosanase của VK6. Khi pH < 5,0 hoặc pH > 6,5 thì hoạt tính enzyme cũng giảm nhanh. Chẳng hạn, khi pH giảm xuống 4,5 thì hoạt tính enzyme giảm 32%, còn khi pH tăng lên 8,0 thì hoạt tính enzyme giảm đến 47%. Như vậy, enzyme chitosanase của mẫu XK14 cũng chịu được môi trường acid tốt hơn môi trường kiềm.

Kết quả nghiên cứu trên đây phù hợp với đặc tính của đa số các enzyme chitosanase đã nghiên cứu. Choi và cs. (2004) đã chỉ ra rằng enzyme chitosanase từ *Bacillus* sp. KCTC 0377BP bền ở khoảng pH 4,0 - 8,0. Nó hoàn toàn không hoạt động ở pH 2,0 và hoạt động tốt nhất trong khoảng pH 4,0-6,0,  $pH_{opt}$  là 5,0. Enzyme chitosanase từ *Sphingomonas* sp. CJ-5 (Zhu và cs., 2007) thì chỉ bền ở khoảng pH hẹp từ 5,5 - 7,5. ở pH < 5,0 và pH > 8,0 hoạt tính của enzyme này giảm rất nhanh, pH tối ưu cho sự hoạt động của enzyme này là 6,5. Enzyme chitosanase từ *Bacillus cereus* có  $pH_{opt}$  5,8. Enzyme này bị biến tính ở pH > 7,0. Hoạt tính của nó hầu như bị mất hết khi ủ 10 phút ở pH > 7,0 (Piza và cs., 1999). Enzyme chitosanase từ *Streptomyces griseus* HUT 6037 có  $pH_{opt}$  5,7 (Tanabe và cs., 2002). Enzyme chitosanase từ *Streptomyces* N174 có khoảng pH hoạt động 4,0 - 6,0, tối ưu tại  $pH_{opt}$  5,5 (Fukamizo và Brzezinski, 1997).



Hình 5. Ảnh hưởng của pH phản ứng đến hoạt tính của enzyme chitosanase từ mẫu VK6 và XK14



Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hoạt tính của enzyme chitosanase từ mẫu VK6 và XK14

**3.3.2. Khả năng chịu nhiệt và nhiệt độ tối ưu của enzyme chitosanase từ 2 mẫu VK6 và XK14**

Cùng với ảnh hưởng của pH môi trường phản ứng thì nhiệt độ cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng nhiều nhất đến hoạt tính enzyme. Việc xác định được nhiệt độ tối ưu cho enzyme hoạt động ảnh hưởng rất nhiều đến việc nghiên cứu và sản xuất enzyme sau này. Chính vì vậy, để nghiên cứu sự phụ thuộc của hoạt tính enzyme vào nhiệt độ, nghiên cứu tiến hành khảo sát trong dải nhiệt độ 30-70°C trong môi trường

đệm Mc Ilvaine pH<sub>opt</sub> 5,5 đối với mẫu VK6 và pH<sub>opt</sub> 6,0 đối với mẫu XK14 (Hình 6).

Hoạt tính enzyme chitosanase của mẫu VK6 tăng dần khi nhiệt độ tăng từ 30°C đến 50°C và đạt giá trị lớn nhất tại nhiệt độ 50°C là 134,1U/ml. Trong khoảng nhiệt độ 50-70°C, hoạt tính bắt đầu giảm dần, đặc biệt giảm nhanh khi nhiệt độ lớn hơn 60°C. Chẳng hạn, ở nhiệt độ 70°C, hoạt tính enzyme giảm 51%. Nguyên nhân của sự giảm hoạt tính này được giải thích là do sự biến tính của phân tử protein enzyme khi ở nhiệt độ cao. Như vậy, nhiệt độ tối ưu cho

hoạt động của enzyme chitosanase từ mẫu VK6 là 50°C.

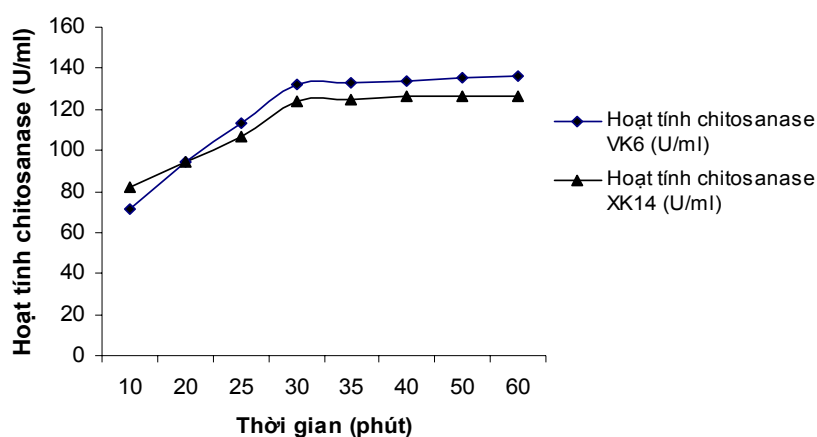
Tương tự như vậy, nhiệt độ tối ưu cho sự hoạt động của chitosanase từ mẫu XK14 là 55°C. Hơn nữa, ở nhiệt độ 70°C, hoạt tính của enzyme này chỉ giảm 42%, giảm ít hơn so với hoạt tính của chitosanase từ mẫu VK6 (ở nhiệt độ 70°C giảm 51%). Như vậy, enzyme chitosanase của mẫu XK14 chịu nhiệt tốt hơn so với chitosanase của mẫu VK6.

### 3.3.3. Thời gian phản ứng tối ưu

Nghiên cứu tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng trong các khoảng thời gian từ 10 phút đến 60 phút, trong điều kiện pH và nhiệt độ tối ưu đã xác định ở trên. Hình 7 cho thấy, 2 loại enzyme chitosanase này đều có chung một dạng đồ thị. Hoạt tính enzyme của cả 2 mẫu đều tăng dần khi tăng thời gian phản ứng từ 10 phút đến 30 phút. Ở thời gian phản ứng 30 phút, hoạt tính enzyme chitosanase của mẫu VK6 đạt 132,0 U/ml, của mẫu XK14 đạt 123,9 U/ml. Khi thời gian phản ứng tăng lên trên

30 phút thì hoạt tính enzyme của cả 2 mẫu đều gần như ổn định, có tăng nhưng tăng không đáng kể. Cụ thể là, đối với mẫu VK6: ở thời gian phản ứng 60 phút, hoạt tính enzyme chỉ tăng thêm 3,1% mà thời gian phản ứng phải cần thêm 30 phút. Đối với chitosanase của mẫu XK14 cũng vậy, hoạt tính enzyme đạt giá trị cao nhất là 126,6 U/ml nhưng phải sau thời gian phản ứng là 50 phút, tức là hoạt tính enzyme chỉ tăng thêm 2,2% mà cần thêm thời gian phản ứng là 20 phút. Theo kết quả phân tích thống kê thì hoạt tính chitosanase của cả 2 mẫu VK6 và XK14 ở các nhiệt độ 30, 35, 40, 50, 60°C cũng khác nhau không có ý nghĩa ( $P > 0,05$ ). Như vậy, thời gian phản ứng tối ưu cho cả 2 loại enzyme chitosanase này là 30 phút.

Nguyên nhân của việc sau thời gian phản ứng 30 phút, hoạt tính chitosanase của cả 2 mẫu enzyme đều hầu như ổn định và không tăng nữa được giải thích chủ yếu là vì thời gian 30 phút là đủ để cho enzyme chitosanase hoạt động thủy phân gần hết cơ chất chitosan.



**Hình 7.** Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến hoạt tính của enzyme chitosanase từ mẫu VK6 và XK14



#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tuyển chọn được 6 mẫu có khả năng sinh tổng hợp chitosanase là VK6, VK13, VK16, XK10, XK11 và XK14. Đồng thời đã lựa chọn được 1 mẫu vi khuẩn (VK6) và 1 mẫu xạ khuẩn (XK14) có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitosanase hoạt tính cao có giá trị tương ứng 129,4 U/ml và 114,4 U/ml.

Nghiên cứu cũng đã xác định được một số điều kiện thích hợp cho sự hoạt động của 2 loại enzyme chitosanase được sinh tổng hợp từ 2 mẫu VK6 và XK14.

Đối với chitosanase từ VK6 có pH tối ưu 5,5; nhiệt độ phản ứng tối ưu là 50°C; thời gian tối ưu là 30 phút. Mẫu XK14, chitosanase có pH tối ưu 6,0; nhiệt độ tối ưu 55°C; thời gian tối ưu là 30 phút.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Choi Y. J., E. J. Kim, Z. Piao (2004). Purification and Characterization of Chitosanase from *Bacillus* sp. Strain KCTC 0377BP and Its Application for the Production of Chitosan Oligosaccharides. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 70, No. 8, Aug., p. 4522–4531.
- Fukamizo T., R. Brzezinski (1997). Chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174: a comparative review of its structure and function. *Biochem. Cell Biol.* 75(6), p. 687–696.
- Lee J. (2006). Isolation, Purification and Characterization of Chitosanase from *Bacillus subtilis* CH1. *J. of Aquaculture*, Vol. 19(1), p. 40-46.
- Miller (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. chem.*, 31, 426.
- Nam Su Wang (2007). Experiment no.4A glucose assay by dinitroalicylic colorimetric method.
- Piza F. A. T., A. P. Siloto, C. V. Carvalho, T.T. Franco (1999). Production, characterization and purification of chitosanase from *Bacillus cereus*. *Braz. J. Chem. Eng.* vol. 16, no. 2.
- Tanabe Toshiaki, Kazuko Morinaga (2003). Novel Chitosanase from *Streptomyces griceus* HUT 6037 with Transglycosylation activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67(2), p. 354 – 364.
- Wang Yan, Peigen Zhou, Jianxing Yu, Xiaorong Pan, Pingping Wang, Weiqing Lan, Shendan Tao (2007). Antimicrobial effect of Chitooligosaccharides produced by Chitosanase from *Pseudomonas* CUY8. *Asia Pac J Clin Nutr*, 16 (Suppl 1), p. 174-177.
- Yabuki M., A. Uchiyama, K. Suzuki (1999). Purification and properties of chitosanase from *Bacillus circulands* MH-K1. *Biosci. Biochem.*, 21, p. 246-248.
- Xu-fen Zhu, Ying Zhou, Jun-li Feng (2007). Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-5. *J. Zhejiang Univ Sci B*. November, 8(11): 831–838.