

## NGHIÊN CỨU SỰ CẢM ỨNG ISOZYME ENDOCHITINASE Ở *TRICHODERMA LONGIBRACHIATUM* TĐ16

Thạch Thành Trung<sup>(1)</sup>, Hồ Thị Thu Linh<sup>(1)</sup>, Đinh Minh Hiệp<sup>(2)</sup>

(1) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(2) Sở Khoa học và Công nghệ Tp.HCM

**TÓM TẮT:** *Trichoderma* là một tác nhân kiểm soát sinh học tiềm năng bởi khả năng kháng nấm gây bệnh thực vật với nhiều cơ chế khác nhau (kí sinh nấm, tiết kháng sinh, cạnh tranh dinh dưỡng,...). Một trong những cơ chế quan trọng nhất là khả năng tiết ra môi trường các hệ enzyme ngoại bào phân giải vách tế bào nấm ký sinh thực vật (chitinase,  $\beta$ -glucanase, protease). Trong đó, nhóm endochitinase đóng vai trò quan trọng trong cơ chế enzyme này vì sự cảm ứng đa dạng, thường xuyên hơn những nhóm còn lại trong toàn hệ chitinase. Chúng *Trichoderma longibrachiatum* TĐ16 được nuôi cấy trên môi trường TSM với nhiều cơ chất cảm ứng khác nhau. Chúng tôi nhận thấy cơ chất chitin huyền phù 1,0% (g/l) và vách tế bào nấm *Sclerotium rolfsii* 0,5% (g/l) cảm ứng sinh tổng hợp chitinase và endochitinase có hoạt tính cao hơn vách tế bào nấm *Phytophthora capsici* vào ngày nuôi cấy thứ 5. Khi sinh trưởng trên hai cơ chất trên, chủng *Trichoderma longibrachiatum* TĐ16 cảm ứng và biểu hiện các dạng isozyme endochitinase khác nhau. Đối với cơ chất chitin huyền phù 1,0%, hai isozyme endochitinase 52 và 42 kDa được biểu hiện; trong khi cơ chất vách tế bào nấm *S. rolfsii* 0,5% chủng *T. longibrachiatum* TĐ16 biểu hiện hai isozyme endochitinase 42 và 36 kDa sau 5 ngày nuôi cấy. Như vậy, endochitinase 42 kDa được biểu hiện đồng thời ở cả hai cơ chất.

**Từ khóa:** *Trichoderma longibrachiatum*, isozyme, chitinase, endochitinase

### 1. MỞ ĐẦU

Hệ enzyme thủy phân chitin (chitinase) thuộc nhóm enzyme thủy phân (Hydrolase), có khả năng thủy giải liên kết  $\beta$ -1,4 glycoside giữa C<sub>1</sub> và C<sub>4</sub> của hai monomer N-acetyl-D-glucosamine trong mạch chitin. Hệ enzyme này hiện diện ở tất cả các giới sinh vật: Vi khuẩn, Nguyên sinh động vật, Nấm, Thực vật và Động vật [8].

Dựa vào khả năng phân cắt, chitinase được chia thành 4 loại: endochitinase (mã số EC 3.2.1.14), exochitinase (EC 3.2.1.30), chitobiosidase, và chitobiase [11,13]. Ở vi nấm *Trichoderma*, endochitinase là nhóm enzyme được quan tâm và nghiên cứu chi tiết hơn cả vì tính đa dạng, sự hiện diện thường xuyên khi nuôi cảm ứng với cơ chất chứa chitin và khả năng ứng dụng trong kiểm soát sinh học của nó hơn hẳn các nhóm còn lại trong hệ enzyme thủy phân chitin [2,7,11].

Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm xác định sự hiện diện của endochitinase ngoại bào khi nuôi cấy cảm ứng *Trichoderma*

*longibrachiatum* trên cơ chất chitin huyền phù và vách tế bào nấm gây bệnh thực vật bằng phương pháp Native-PAGE, đồng thời sử dụng phương pháp SDS-PAGE xác định trọng lượng phân tử các isozyme endochitinase đó.

### 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### 2.1. Vật liệu

Chúng *Trichoderma longibrachiatum* TĐ16 trong bộ giống *Trichoderma* được lưu giữ tại bộ môn Sinh hóa, khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM và 2 chủng vi nấm gây bệnh thực vật *Phytophthora capsici*, *Sclerotium rolfsii* do bộ môn Bảo vệ Thực vật, khoa Nông học, trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh cung cấp.

Các môi trường dùng trong thực nghiệm: môi trường giữ giống PGA (Potato Glucose Agar); môi trường cảm ứng TSM (*Trichoderma* selective medium) chứa 0,5-2% cơ chất vách tế bào nấm *P. capsici*, *S. rolfsii* và chitin huyền phù [6].

#### 2.2. Phương pháp

- Phương pháp điều chế carboxymethylchitin (CM-chitin) theo Shigehiro Hirano [9]

- Phương pháp thu nhận vách tế bào sợi nấm theo Perez-Leblic [1]

- Phương pháp nuôi cấy cảm ứng chitinase [10]: bổ sung  $3 \times 10^6$  bào tử/ml *Trichoderma* vào môi trường TSM chứa cơ chất cảm ứng, nuôi cấy lắc ở nhiệt độ phòng (28-30°C), lọc thu dịch chiết môi trường.

- Phương pháp xác định hoạt tính chung (HTC) chitinase dựa vào việc định lượng sản phẩm cuối N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine theo Elson-Morgan [5].

- Phương pháp xác định HTC endochitinase dựa vào sự giảm độ đục của hỗn hợp chitin huyền phù sau phản ứng thủy phân [8].

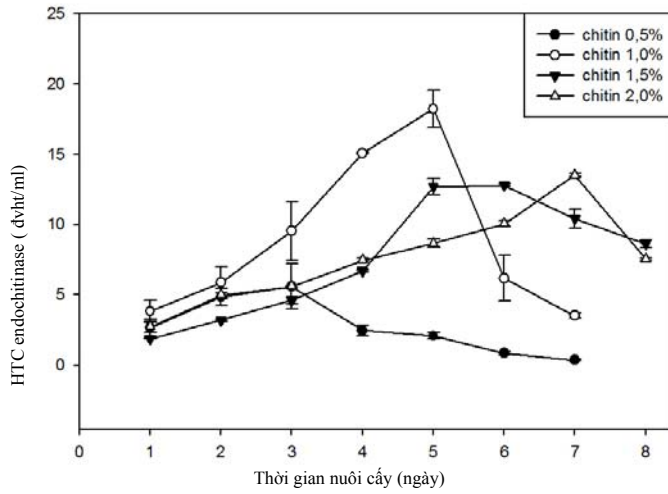
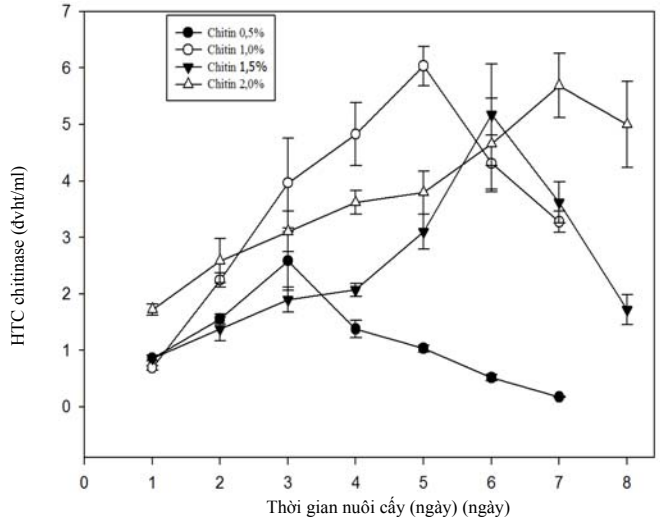
- Phương pháp thu nhận chế phẩm enzyme thô: tiến hành tủa phân đoạn  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  75% độ bão hòa, ly tâm lạnh thu tủa, thẩm tách loại muối và bảo quản mẫu ở -20°C.

- Phương pháp điện di Native-PAGE [4,12,14]: chuẩn bị gel phân tách 15%, gel gom 5%, mẫu được nạp với dung dịch nạp mẫu với tỉ lệ 1:1, chạy ở điều kiện 4°C. Sau khi điện di Native-PAGE, chuyển thẩm gel polyacrylamide lên gel agarose 0,5% chứa 0,5% CM-chitin, ủ ở nhiệt độ phòng (28-30°C) trong 90 phút, nhuộm gel agarose với dung dịch fluorescent brightener 0,01% trong đệm tris HCl 0,5M, pH 8,9. Sau 5 phút, quan sát band hoạt tính dưới ánh sáng UV.

### 3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

#### 3.1. Khảo sát động học sinh tổng hợp chitinase và endochitinase theo thời gian nuôi cấy của chủng *Trichoderma longibrachiatum* TĐ16 với các nồng độ cơ chất cảm ứng khác nhau

Cơ chất chitin huyền phù



**Đồ thị 1.** Biến thiên HTC chitinase và endochitinase theo thời gian nuôi cấy trong môi trường TSM bổ sung các nồng độ (g/l) chitin huyền phù khác nhau

Kết quả trên đồ thị 1 cho thấy chủng *T. longibrachiatum* TĐ16 cảm ứng sinh tổng hợp

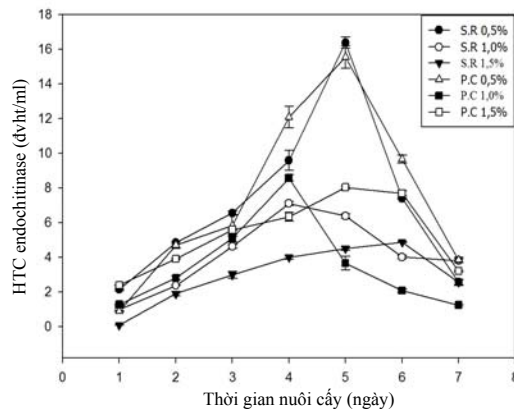
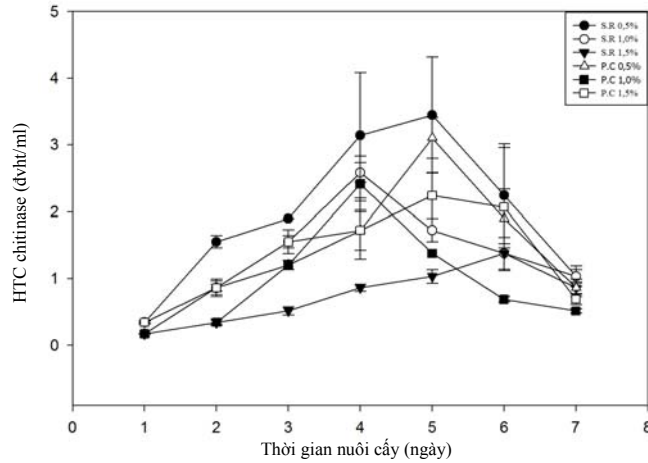
chitinase có hoạt tính cao nhất đối với nồng độ cơ chất 1% chitin huyền phù (HTC chitinase  $6,035 \pm 0,348$  đvht/ml và HTC endochitinase

18,23 ± 1,31 đvht/ml) tương ứng thời gian nuôi cấy là 5 ngày. Sau đó, HTC enzyme giảm dần bởi môi trường cạn kiệt nguồn cơ chất và dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng, phát triển và cảm ứng sinh tổng hợp enzyme của chủng *Trichoderma*.

Động học sinh tổng hợp endochitinase biến thiên tương tự như chitinase, thể hiện vai trò

quan trọng của sự cảm ứng endochitinase trong toàn hệ enzyme thủy giải chitin suốt quá trình cảm ứng của *Trichoderma*. HTC chitinase cao, tương ứng với HTC endochitinase cao và ngược lại [3,6].

Cơ chất vách tế bào nấm *Sclerotium rolfisii* (S.R) và *Phytophthora capsici* (P.C)



**Đồ thị 2.** Biến thiên HTC chitinase và endochitinase theo thời gian nuôi cấy trong môi trường TSM bổ sung các nồng độ (g/l) vách tế bào nấm *S. rolfisii* và *P. capsici* khác nhau

Tương tự như cơ chất chitin huyền phù, từ kết quả của đồ thị 2 cho thấy: đối với cơ chất vách tế bào nấm *S. rolfisii* và *P. capsici*, nồng độ

thích hợp để thu nhận chitinase, endochitinase là 0,5% sau 5 ngày nuôi cấy. HTC chitinase 3,448 ± 0,868 đvht/ml, HTC endochitinase 16,38 ±

0,32 đvht/ml khi cơ chất cảm ứng là 0,5% (g/l) S.R (vách tế bào nấm *S. rolfssii*) và HTC chitinase  $3,103 \pm 0,310$  đvht/ml, HTC endochitinase  $15,54 \pm 0,64$  đvht/ml khi cơ chất cảm ứng là 0,5% (g/l) P.C (vách tế bào nấm *P. capsici*).

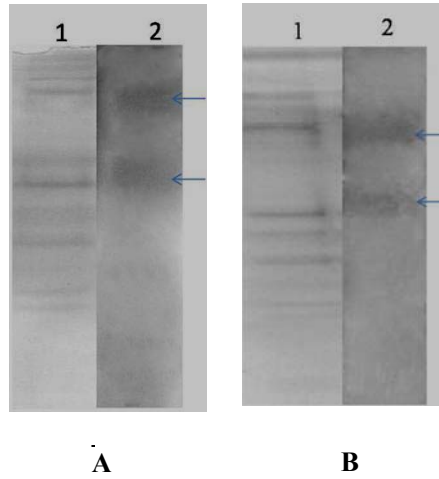
Bên cạnh đó, khi nuôi cấy cảm ứng *T. longibrachiatum* TĐ16 trong môi trường TSM với vách tế bào nấm, HTC chitinase chỉ bằng khoảng 50% khi cảm ứng bởi chitin huyền phù, trong khi đó HTC endochitinase đạt từ 85-90%. Điều này chứng tỏ cơ chất vách tế bào nấm cảm ứng một lượng lớn endochitinase trong toàn hệ enzyme thủy giải chitin ở *T. longibrachiatum* TĐ16, cao hơn đôi với cơ chất chitin huyền phù. Có thể do trong thành phần vách tế bào nấm, chitin ở trạng thái liên kết với nhiều thành phần khác như  $\beta$ -glucan, protein,... tạo thành một cấu trúc phức tạp. Cấu trúc này có khả năng gây cảm ứng mạnh hơn đối với sự sinh tổng hợp endochitinase [6,8].

**3.2. Khảo sát sự cảm ứng biểu hiện endochitinase**

Để khảo sát sự biểu hiện endochitinase của *T. longibrachiatum* TĐ16 cảm ứng bởi vách tế bào nấm, chúng tôi chọn vách tế bào nấm *S. rolfssii* cho kết quả cảm ứng sinh tổng hợp endochitinase có hoạt tính cao hơn vách tế bào nấm *P. capsici* sau 5 ngày nuôi cấy. Kết quả quan sát từ hình 1 thể hiện rõ hai band hoạt tính endochitinase khi nuôi cấy chủng *T. longibrachiatum* TĐ16 trong môi trường TSM chứa 0,5% (g/l) S.R như là nguồn carbon duy nhất (hình 1B, lane 2); tương tự đối với cơ chất chitin huyền phù 1,0%, chủng *Trichoderma* này cũng cảm ứng biểu hiện hai band hoạt tính endochitinase sau 5 ngày nuôi cấy (hình 1A, lane 2).

Sự biểu hiện của các band protein khi nuôi cấy chủng *T. longibrachiatum* TĐ16 trên hai cơ chất khác nhau cũng khác nhau (hình 1, lane 1). Điều này có thể lý giải vì ngoài chitin, vách tế bào nấm được cấu tạo từ nhiều thành phần khác nhau như  $\beta$ -glucan, lipoprotein,... nên có khả năng cảm ứng sinh tổng hợp các hệ enzyme thủy phân khác. Bên cạnh đó, không phải tất cả các band protein được quan sát trên gel polyacrylamide đều mang hoạt tính

endochitinase. Tương ứng với những band protein đó, chỉ có hai band là isozyme endochitinase được biểu hiện bởi chủng *T. longibrachiatum* TĐ16 khi nuôi cấy lần lượt trên cơ chất chitin huyền phù 1,0% (g/l) và vách tế bào nấm *S. rolfssii* 0,5% (g/l).



**Hình 1.** Các band protein trên gel polyacrylamide sau khi chạy Native-PAGE nhuộm comassive brilliant blue (lane 1) và nhuộm cơ chất đặc hiệu endochitinase trên gel agarose (lane 2) tương ứng hình A cơ chất cảm ứng là chitin huyền phù, hình B cơ chất cảm ứng là vách tế bào nấm *S. rolfssii*

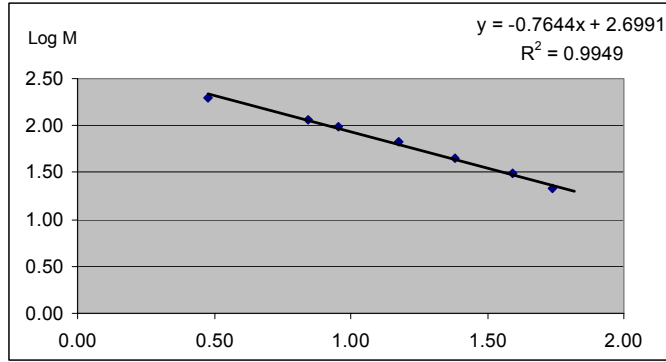
**3.3. Xác định trọng lượng phân tử các isozyme endochitinase**

**Bảng 1.** Đường chuẩn thang protein (cat# 161-0317)

S (mm)	Log X	MARKERS (kDa)	Log M
3	0.477121	200	2.30103
7	0.845098	116.25	2.065393
9	0.954243	97.4	1.988559
15	1.176091	66.2	1.820858
24	1.380211	45	1.653213
39	1.591065	31	1.491362
55	1.740363	21.5	1.332438

M: Trọng lượng phân tử protein.

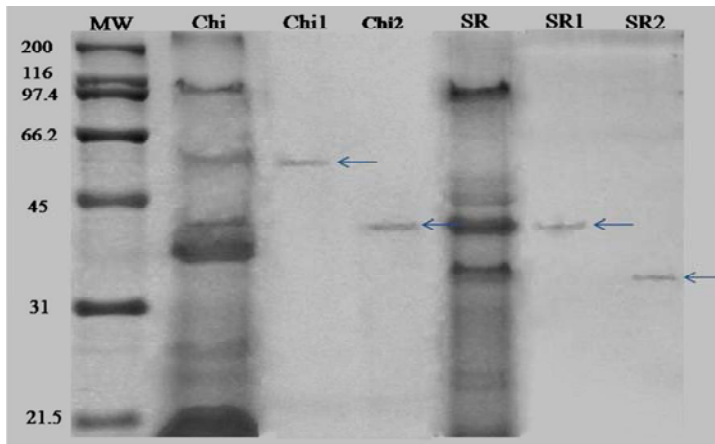
S: Khoảng cách dịch chuyển trên gel tương ứng với từng band trọng lượng phân tử protein.



Đồ thị 3. Đường chuẩn thang protein

Từ các phân đoạn có hoạt tính endochitinase được xác định ở mục 3.2, chúng tôi tiến hành rửa giải, thu nhận protein từ gel polyacrylamide

sau điện di Native-PAGE và xác định trọng lượng phân tử các isozyme đó bằng phương pháp SDS-PAGE. Kết quả thể hiện ở hình 2



Hình 2. Kết quả SDS-PAGE hai isozyme endochitinase. Cơ chất cảm ứng là chitin huyền phù 1% (Chi1 và Chi2) và vách tế bào nấm *S. rolfssii* 0,5% (SR1 và SR2) cùng với mẫu thô tương ứng (Chi và SR)

Đối chiếu kết quả với đường chuẩn thang protein ở đồ thị 3 cho thấy hai phân đoạn isozyme endochitinase khi cơ chất cảm ứng là chitin huyền phù 1,0% có trọng lượng phân tử lần lượt là 52 kDa (Chi1) và 42 kDa (Chi2) và cơ chất cảm ứng là vách tế bào nấm *S. rolfssii* 0,5% là 42 kDa (SR1), 36 kDa (SR2).

#### 4. KẾT LUẬN

*Trichoderma longibrachiatum* TĐ16 cảm ứng sinh tổng hợp chitinase và endochitinase có hoạt tính cao nhất vào ngày nuôi cấy thứ 5 đối với cơ chất chitin huyền phù 1,0% (HTC

chitinase  $6,035 \pm 0,348$  đvht/ml, HTC endochitinase  $18,23 \pm 1,31$  đvht/ml) và vách tế bào nấm *Sclerotium rolfisii* 0,5% (HTC chitinase  $3,448 \pm 0,868$  đvht/ml, HTC endochitinase  $16,38 \pm 0,32$  đvht/ml) trong môi trường TSM lớn hơn cơ chất vách tế bào nấm *P. capsici* ở nồng độ tương ứng. Đồng thời chủng này cũng cảm ứng biểu hiện hai isozyme endochitinase có

trọng lượng phân tử 52 và 42 kDa đối với cơ chất chitin huyền phù 1,0% sau 5 ngày nuôi cấy. Trong khi đó, chủng *T. longibrachiatum* TĐ16 cảm ứng biểu hiện hai isozyme endochitinase có trọng lượng phân tử 42 và 36 kDa sau 5 ngày nuôi cấy với cơ chất vách tế bào nấm *S. rolfisii* 0,5%. Như vậy, isozyme endochitinase 42 kDa được cảm ứng biểu hiện ở cả hai cơ chất.

## STUDY ON INDUCTION OF *TRICHODERMA LONGIBRACHIATUM* ENDOCHITINASE ISOZYMES

Thanh-Trung Thach<sup>(1)</sup>, Thu-Linh Ho Thi<sup>(1)</sup>, Minh-Hiep Dinh<sup>(2)</sup>

(1) University of Sciences, VNU-HCM

(2) Department of Science and Technology HCMC

**ABSTRACT:** *Trichoderma* species are known as potential biocontrol agents against the plant pathogenic fungi with various mechanisms (parasitism, antibiosis, substrate competition...). One of the most important mechanisms is the secretion of cell wall degrading enzymes. Chitinolytic enzymes; especially, endochitinase plays an important role in the enzymatic mechanism by the abundant and frequent induction more than other groups in whole of chitinolytic system. *Trichoderma longibrachiatum* TĐ16 was grown in the TSM medium containing various substrates. We recognized that 1.0% (w/v) colloidal chitin and 0.5% (w/v) *S. rolfisii* cell wall induced to biosynthesize chitinase and endochitinase with higher activity than *P. capsici* cell wall at the fifth day. This strain induced and expressed various endochitinase isozymes when growing on the substrates above, respectively. Two endochitinase isozymes (52 and 42 kDa) on colloidal chitin and (42 and 36 kDa) on *S. rolfisii* cell wall were induced. The 42 kDa endochitinase is induced and expressed on both two substrates.

**Keywords:** *Trichoderma longibrachiatum*, isozyme, chitinase, endochitinase

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bruce A., Srinivasan U., Staines H.J. và Highley T.L., Chitinase and laminarinase production in liquid cultural by *Trichoderma* spp. and their role in biocontrol of wood decay fungal, *Inter. Biodeter. Biodegr.* 35(4): 337-353 (1995).
- [2]. Carsolio C., Benhamou N., Haran S., Cortés C., Gutiérrez A., Chet I. và Herrera-Estrella A., Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene *ech42* in mycoparasitism, *Appl. Environ. Microbiol.* 65(3): 929-935 (1998).
- [3]. El-Katatny M.H., Gudelj M., Robra K.H., Elnaghy M.A., Gübitz G.M., Characterization of a chitinase and an endo  $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfisii*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56(1-2): 137-143 (2001).
- [4]. Gohel V., Vyas P., Chhatpar H.S., Activity staining method of chitinase on chitin agar plate through polyacrylamide gel electrophoresis. *African Journal of Biotechnology* 4(1): 87-90 (2005).

- [5]. Good T.A. và Beesman S.P., Determination of glucosamine and galactosamine using borate buffers for modification of the Elson-Morgan and Morgan-Elson reactions, *Anal. Biochem.* 9: 253-262 (1964).
- [6]. Haran S., Schickler H., Oppenheim A. và Chet I., Expression of *Trichoderma harzianum* chitinase during mycoparasitism. *Phytopathology* 86(9): 980-985 (1996).
- [7]. Harjono, Widyastuti S.M., Antifungal activity of purified endochitinase produced by biocontrol agent *Trichoderma reesei* against *Ganoderma philippii*, *Pakistan Journal Biology Sciences* 4: 1232-1234 (2001).
- [8]. Harman G. E., Purified chitinase and use thereof, *US. Patent* 5.173.419 (1992).
- [9]. Hirano S., Water soluble glycol chitin and carboxymethylchitin, *Methods in Enzymology* 161: 408-410 (1988).
- [10]. Lima L.H.C., de Marco J.L., Ulhoa C.J., Felix C.R., Synthesis of a *Trichoderma* chitinase which affects the *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls, *Folia Microbiol.* 44: 45-49 (1999).
- [11]. Lorito M., Chitinolytic enzymes and their genes. In: Harman G.E. and Kubicek C.P. *Trichoderma and Gliocladium*. Vol.2. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor and Francis Ltd. London, p.73-92 (1998).
- [12]. Trudel J. và Asselin A., Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis, *Biochemistry* 178: 362-368 (1988).
- [13]. Ulhoa C. J., John F. P., Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*, *Journal of General Microbiology* 137: 2163-2169 (1991).
- [14]. Zaldivar M., Velquez J.C., Contreras I., Pérez L.M., *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol, *Electronic Journal of Biotechnology* 4(3): 160-168 (2001).