

XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN THÍCH HỢP CHO QUÁ TRÌNH SINH TỔNG HỢP ENZYM CHITOSANAZA TỪ *Penicillium oxalicum* BKH2

STUDY ON APPROPRIATE CONDITIONS FOR CHITOSANASE BIOSYNTHESIS
BY *Penicillium oxalicum* BKH2

Lê Thanh Hà, Nguyễn Thị Tuyết Mai, Quấn Lê Hà

Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

TÓM TẮT

Các ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng C, N và điều kiện nuôi cấy như nhiệt độ và pH ban đầu đến khả năng sinh tổng hợp chitosanaza của chủng *Penicillium oxalicum* BKH2 đã được nghiên cứu. Nguồn C chitosan làm tăng hoạt độ chitosanaza lên đến 2 lần so với nguồn tinh bột. Nguồn nitơ pepton làm tăng hoạt độ chitosanaza lên gần 2 lần so với NaNO_3 . Nhiệt độ nuôi cấy 30°C tăng hoạt độ chitosanaza thu được lên 5,7 lần so với 40°C . Giá trị pH ban đầu 7 làm tăng hoạt độ chitosanaza lên 2,6 lần so với pH 7,5. Điều kiện thích hợp cho quá trình tổng hợp enzym chitosanaza: nguồn C chitosan với tỉ lệ 0,3%, nguồn nitơ pepton với tỉ lệ 0,5%, nhiệt độ nuôi cấy 30°C , pH ban đầu 7,0 và thời gian nuôi cấy 84 h. Với điều kiện này, hoạt độ chitosanaza đạt được 1,08 U/ml.

ABSTRACT

The effect of C, N sources and cultivation conditions such as temperature, initial cultivation pH on the chitosanase activity obtained from *Penicillium oxalicum* BKH2 was investigated. The chitosanase activity can be increased up to 2 fold if the chitosan was chosen instead of starch and peptones was chosen instead of NaNO_3 . Furthermore, the chitosanase activity can be increased up to 5.7 fold if cultivation temperature of 30°C was chosen instead of 40°C and to 2.6 fold if the initial pH of 7.0 was chosen instead of 7.5. The right conditions shown in this study are: chitosan as C source at concentration of 0.3% (w/v), peptone as N source at concentration of 0.5% (w/v), cultivation temperature of 30°C , initial cultivation pH of 7.0 and cultivation time of 84 h. The chitosanase activity has reached 1.08 U/ml.

I. MỞ ĐẦU

Chitosan được thu nhận từ quá trình deacetyl hóa chitin, được chiết xuất chủ yếu từ vỏ động vật giáp xác như tôm, cua, nguồn phế liệu dồi dào của ngành thủy sản [8]. Tuy rất sẵn có trong tự nhiên, ứng dụng thương mại của chitin và chitosan không được phát triển trong một thời gian dài do chúng hòa tan kém trong nước và trong dung môi. Chitin không tan trong nước, trong môi trường kiềm, acid loãng và các chất dung môi hữu cơ như ether, rượu... mà chỉ hòa tan trong dung dịch đặc nóng của muối thioxianat Liti (LiSCN) và thioxianat canxi $\text{Ca}(\text{SCN})_2$ tạo thành dung dịch keo. Chitosan tuy cũng không tan trong nước nhưng có thể tan trong dung dịch axit loãng. Trong khoảng 20 năm trở lại đây, chitosan được ứng dụng trong rất nhiều ngành công nghiệp như thực phẩm, dệt, mỹ phẩm và nhiều ngành công nghiệp khác cũng như trong xử lý nước thải [10]. Gần đây, các nhà khoa học quan tâm nhiều đến sản phẩm thủy phân của chitin và chitosan là

chitoooligosaccharit (COS) do chúng có thể tan tốt trong nước và có hoạt tính sinh học cao như kháng khuẩn và kháng nấm [2], chống ung thư [4, 6], chống oxy hóa [9], tăng cường miễn dịch [11], kích thích protein kháng bệnh trong thực vật [12] và có khả năng hấp thụ chất béo [3] nên được dùng như thức ăn chống béo.

Việc thu nhận COS có thể được thực hiện bằng phương pháp hóa học hoặc phương pháp sinh học (dùng enzym thủy phân). So với phương pháp hóa học, phương pháp sinh học có ưu điểm là biết được sản phẩm thủy phân và đặc biệt là thân thiện với môi trường. Enzym chitosanaza (EC 3.2.1.132) là enzym thủy phân liên kết trong nội phân tử chitosan và được ứng dụng chủ yếu để tạo ra các loại phân tử chitosan phân tử lượng thấp COS. Chitosanaza được sinh tổng hợp bởi nhiều loại vi sinh vật khác nhau bao gồm vi khuẩn [7] và nấm [1, 5].

Nghiên cứu thu nhận enzym chitosanaza mới có hoạt tính cao là hướng đi quan trọng

nhằm phục vụ cho việc ứng dụng vào sản xuất thu nhận chitooligosaccharit. Bài báo này đề cập đến nghiên cứu tìm điều kiện thích hợp cho việc sinh tổng hợp chitosanaza từ chủng *Penicillium oxalicum* BKH2 đã được lựa chọn trong nghiên cứu trước.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi sinh vật. Chủng *Penicillium oxalicum* BKH2 được phân lập tại bộ môn công nghệ sinh học trường Đại học Bách khoa Hà nội.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy. Chủng nghiên cứu được đem nhân giống ở môi trường Czapeck ở 30°C trong 24 h và cấy chuyển vào môi trường MS-chitosan có chứa 0.3% chitosan dạng huyền phù và môi trường MS (mineral salt-muối tối thiểu) bao gồm 0.5% cao nấm men, 0.2% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.07% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% NaCl, 0.05% KCl, 0.01% $CaCl_2$, pH 6.8 theo tỉ lệ cấy giống 3% (thể tích/thể tích) rồi nuôi cấy trên máy lắc với tốc độ 180 vòng/phút. Cứ sau khoảng thời gian nhất định, canh trường được lấy ra và đem li tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong khoảng thời gian 10 phút. Dịch nổi sau li tâm được đem xác định hoạt tính chitosanaza.

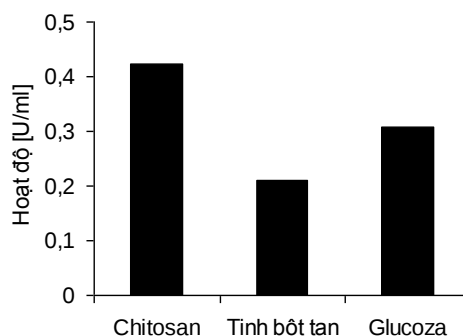
Cách xác định hoạt độ chitosanaza. Cơ chất chitosan có độ deacetyl hóa (degree of deacetylation) DDA 85% của Sigma được pha trong đệm axetat natri 0.2 M pH=5 theo tỉ lệ 1% và được sử dụng làm cơ chất cho thí nghiệm xác định hoạt độ của chitosanaza. Enzym được pha loãng bằng đệm axetat natri 0.2 M pH=5 và đem trộn với dung dịch cơ chất chitosan 1% theo tỉ lệ 1:1 rồi cho phản ứng ở 50°C trong thời gian 30 phút. Lượng đường khử tạo thành được xác định theo phương pháp dinitrosalicylic acid DNS với glucosamin-HCl làm chất chuẩn. Một đơn vị hoạt độ chitosanaza được định nghĩa là lượng enzym xúc tác thủy phân cơ chất giải phóng ra 1 μ mol D-glucosamin trong 1 phút ở điều kiện nêu trên.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng C

Môi trường sinh tổng hợp chitosanaza được sử dụng ở đây là môi trường MS với các thành phần 0.5% cao nấm men, 0.2% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.07% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05%

NaCl, 0.05% KCl, 0.01% $CaCl_2$. Các nguồn cacbon được sử dụng lần lượt là chitosan, tinh bột tan, glucoza với tỉ lệ 0,3% (khối lượng/thể tích) và môi trường được kí hiệu lần lượt là MS-chitosan, MS-tinh bột và MS-glucoza. Nhiệt độ nuôi cấy là 37°C. Sau khoảng 72 giờ nuôi cấy, lấy mẫu và đem đi xác định hoạt độ chitosanaza. Kết quả thu được thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến khả năng sinh tổng hợp chitosanaza. Chủng *Penicillium oxalicum* BKH2 được đem nuôi cấy trên môi trường MS-chitosan, MS-tinh bột và MS-glucose tại 37°C, pH=6.8. Các nguồn cacbon được bổ sung theo tỉ lệ 0.3% (khối lượng/thể tích).

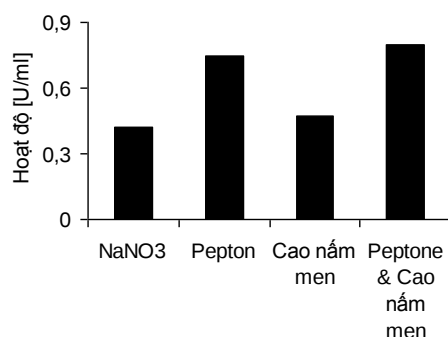
Nhìn vào kết quả thu được ta thấy khi sử dụng chitosan làm nguồn C, hoạt độ enzym chitosanaza đạt giá trị cao nhất 0.4 U/ml, gấp đôi so với hoạt độ thu được khi sử dụng nguồn C là tinh bột 0.2 U/ml và gấp 1.3 lần so với nguồn C glucoza 0.3 U/ml, mặc dù glucoza là nguồn C dễ sử dụng nhất bởi vi sinh vật. Điều này chứng tỏ chitosanaza là enzym cảm ứng. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu đã công bố trước đây [13]. Như vậy chitosan là nguồn C thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp chitosanaza.

3.2 Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng N

Chủng *Penicillium oxalicum* BKH2 được nuôi cấy trên môi trường MS- chitosan với các nguồn nitơ khác nhau, nguồn cacbon cố định là chitosan 0.3%, tỷ lệ cấy giống là 3%, pH ban đầu là 6.8 và nhiệt độ nuôi cấy là 30°C. Các nguồn nitơ vô cơ và hữu cơ được sử dụng trong nghiên cứu là $NaNO_3$, cao nấm men, peptone, hỗn hợp cao nấm men và peptone theo tỉ lệ 1:1 với khối lượng là 0.5% so với thể tích. Mẫu

được lấy sau 72h nuôi cấy và đem xác định hoạt tính chitosanaza. Kết quả được thể hiện trên hình 2.

Kết quả hình 2 cho thấy peptone có ảnh hưởng tốt đến khả năng sinh tổng hợp chitosanaza của chủng *Penicillium oxalicum* BKH2. Hoạt độ chitosanaza đạt 0.75 U/ml cao gấp 1,6 lần so với khi sử dụng nguồn N là cao nấm men (đạt 0.47 U/ml). Còn khi sử dụng nguồn N là NaNO_3 , hoạt độ chitosanaza bị giảm nhẹ (đạt 0.42 U/ml). Trong khi đó nếu sử dụng hỗn hợp cao nấm men và peptone theo tỉ lệ 1:1 có làm tăng hoạt độ chitosanaza lên nhưng không đáng kể (0.8 U/ml so với 0.75 U/ml). Do cao nấm men đắt hơn peptone nên sử dụng 100% peptone có giá trị kinh tế hơn.

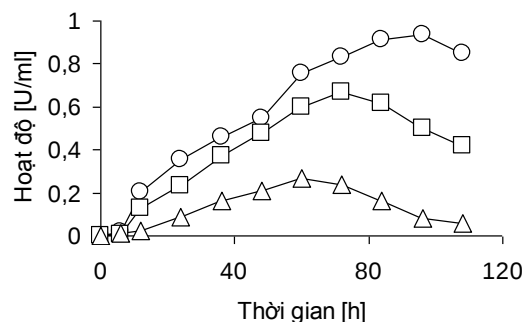


Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh tổng hợp chitosanaza. Chủng *Penicillium oxalicum* BKH2 được đem nuôi cấy trên môi trường MS-chitosan, tại 30°C , pH=6.8. Các nguồn N được bổ sung như trên hình vẽ theo tỉ lệ 0.5% (trọng lượng/thể tích). Mẫu được lấy sau 72h nuôi cấy và đem xác định hoạt độ chitosanaza.

3.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ

Để xác định ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh tổng hợp chitosanaza, tiến hành nuôi cấy chủng nấm mốc *Penicillium oxalicum* BKH2 trên môi trường MS – chitosan có thành phần 0.3% chitosan, 0.5% pepton, 0.2% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.07% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% NaCl, 0.05% KCl, 0.01% CaCl_2 với pH ban đầu là 6.8 ở các nhiệt độ 30°C , 37°C và 40°C . Tỷ lệ giống là 3% và nuôi cấy trên máy lắc với tốc độ 180 vòng/phút. Hoạt độ chitosanaza được đem phân tích sau các khoảng thời gian là 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 84h, 96h, 108h. Kết quả được thể hiện ở hình 3.

Kết quả nghiên cứu cho thấy nhiệt độ nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh tổng hợp chitosanaza của chủng nghiên cứu. Hoạt độ enzyme tại các nhiệt độ khác nhau có xu hướng giống nhau là tăng dần lên đạt giá trị cực đại sau đó lại giảm dần. Do vậy chọn thời gian thích hợp để thu nhận enzyme là cần thiết. Giá trị hoạt độ cực đại giảm nếu nhiệt độ nuôi cấy tăng và thời gian đạt giá trị cực đại cũng có xu hướng giảm dần; ứng với tại 30°C hoạt độ enzyme đạt giá trị cao nhất 0.93 U/ml và ổn định trong một thời gian khá dài từ 84h đến 96h. Nếu tăng nhiệt độ lên 37°C , hoạt độ enzyme đạt cao nhất là 0.67 U/ml tại 72h. Tại nhiệt độ 40°C hoạt độ enzyme cao nhất chỉ đạt 0.27 U/ml sau 60h nuôi cấy. Như vậy nhiệt độ thích hợp để sinh tổng hợp chitosanaza là 30°C và khoảng thời gian thích hợp để thu nhận enzyme từ chủng *Penicillium oxalicum* BKH2 là từ 84 h đến 96h nuôi cấy.



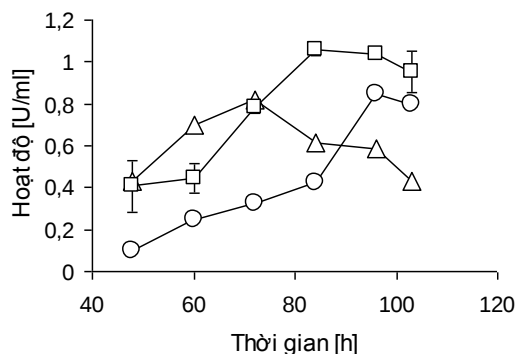
Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng sinh tổng hợp chitosanaza. Chủng *Penicillium oxalicum* BKH2 được nuôi cấy trên môi trường MS-chitosan, pH ban đầu 6.8 tại các nhiệt độ 30°C (○), 37°C (□) và 40°C (△). Mẫu được lấy tại các thời điểm nhất định và đem xác định hoạt độ chitosanaza.

3.4 Ảnh hưởng của pH ban đầu

Trong các thí nghiệm tiếp theo, chúng tôi đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh tổng hợp chitosanaza của chủng *Penicillium oxalicum* BKH2.

Môi trường MS-chitosan có thành phần 0.3% chitosan, 0.5% pepton, 0.2% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.07% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% NaCl, 0.05% KCl, 0.01% CaCl_2 được điều chỉnh đến các giá trị pH ban đầu là 6.0, 7.0 và 7.5. Cấy giống theo tỉ lệ 3% và nuôi cấy tại nhiệt độ 30°C . Mẫu được lấy sau mỗi 12h từ

khoảng 48h đến 103h sau nuôi cấy và đem đi xác định hoạt độ chitosanaza bằng phương pháp DNS. Kết quả được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng sinh tổng hợp chitosanaza. Chủng *Penicillium oxalicum* BKH2 được nuôi cấy tại 30°C trên môi trường MS-chitosan được điều chỉnh pH ban đầu đến giá trị 6 (O), 7(□) và 7.5 (△). Mẫu được lấy tại các thời điểm nhất định và đem xác định hoạt độ chitosanaza.

Kết quả thu được cho thấy pH ban đầu có ảnh hưởng lớn đến hoạt độ chitosanaza thu được. Giá trị cao nhất của hoạt độ chitosanaza đạt được sớm hơn tại giá trị pH thấp hơn (96h tại pH=7.5; 84h tại pH=7 và 72h tại pH=6.0). Tuy nhiên giá trị hoạt độ chitosanaza cực đại cũng thay đổi. Khi tăng pH ban đầu từ 6.0 lên 7.0, hoạt độ chitosanaza cực đại tăng từ 0.84 U/ml lên đến 1.08U/ml. Hơn nữa giá trị hoạt độ enzym tại pH=7 bền trong khoảng thời gian từ 84h đến 96h, phù hợp với kết quả ở hình 3. Khi tăng tiếp pH lên 7.5 thì giá trị cao nhất của hoạt độ enzym chitosanaza đạt được tuy không giảm đi nhiều so với pH=6.0 (0.81U/ml so với 0.84U/ml) nhưng hoạt độ enzym giảm rất nhanh

nếu kéo dài thời gian nuôi cấy. Như vậy pH ban đầu thích hợp cho sinh tổng hợp chitosanaza của chủng *Penicillium oxalicum* BKH2 là pH =7.0.

IV. KẾT LUẬN

Ảnh hưởng của các yếu tố nghiên cứu bao gồm nguồn C và N cũng như nhiệt độ nuôi cấy và pH ban đầu đến quá trình sinh tổng hợp chitosanaza của chủng *Penicillium oxalicum* BKH2 là đáng kể. Khi sử dụng nguồn C thích hợp là chitosan, hoạt độ chitosanaza có thể tăng lên đến 2 lần (so với nguồn cacbon là tinh bột) (Hình 1). Tiếp đó khi sử dụng nguồn nitơ thích hợp là pepton, hoạt độ chitosanaza cũng tăng lên gần 2 lần (so với nguồn nitơ là NaNO₃) (Hình 2). Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp làm tăng hoạt độ chitosanaza thu được lên 5.7 lần (Hình 3- giá trị so sánh giữa hoạt độ tại 30°C và 40°C sau 84 h nuôi cấy). Cuối cùng giá trị pH ban đầu thích hợp làm tăng hoạt độ chitosanaza lên 2.6 lần (Hình 4 - giá trị so sánh giữa hoạt độ tại pH=7 và pH=6 sau 84 h nuôi cấy).

Các điều kiện thích hợp cho sinh tổng hợp chitosanaza của chủng *Penicillium oxalicum* BKH2 từ kết quả nghiên cứu bao gồm: nguồn cacbon là chitosan với tỉ lệ 0.3%, nguồn nitơ là pepton với tỉ lệ 0.5%, nhiệt độ nuôi cấy là 30°C và pH ban đầu là 7.0, thời gian thu enzym là 84 h. Tại điều kiện như vậy, hoạt độ chitosanaza đạt được là 1.08 U/ml. Trong các nghiên cứu tiếp theo chúng tôi muốn nghiên cứu tiếp ảnh hưởng của một số các yếu tố như tốc độ khuấy cũng như ảnh hưởng của nồng độ các nguồn dinh dưỡng và sử dụng phương pháp tối ưu bề mặt để tối ưu hóa khả năng sinh tổng hợp chitosanaza của chủng *Penicillium oxalicum* BKH2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alfonso C., Martinez M. J. & Reyes F.; Purification and properties of two endochitosanases from *Mucor rouxii* implicated in its cell wall degradation; FEMS Microbiol. Lett. 95, 187–194, (1992)
2. Gerasimenko D. V., Avdienko I. D., Bannikova G. E., Zueva O. Y. & Varlamov V. P.; Antibacterial effects of water-soluble low molecular- weight chitosans on different microorganisms; Applied Biochemistry and Microbiology, 40, 253–257, 2004
3. Ikeda I., Sugano M., Yoshida K., Sasaki E., Iwamoto Y. & Hatano K.; Effects of chitosan hydrolysates on lipid absorption and on serum and liver lipid concentration in rats; Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41, 431–435, 1993

4. Jeon Y. J. & Kim S. K.; Antitumor activity of chisan oligosaccharides produced in an ultra filtration membrane reactor system; Journal of Microbiology and Biotechnology, 12, 503–507, 2002
5. Kim S. Y., Shon D. H. & Lee K. H.; Purification and characteristics of two types of chitosanases from *Aspergillus fumigatus*; Journal of Microbiology and Biotechnology, 8, 568–574, 1998
6. Kobayashi M., Watanabe T., Suzuki S. & Suzuki M.; Effect of N-acetylchitohexaose against *Candida albicans* infection of tumor-bearing mice; Microbiol. Immunol. 34, 413–426, 1990
7. Lee H. W., Choi J. W., Han D. P., Park M. J., Lee N. W. & Yi D. H.; Purification and characteristics of chitosanase from *Bacillus* sp. HW-002; Journal of Microbiology and Biotechnology, 6, 19–25, 1996
8. No H.K. & Lee M.Y.; Isolation of Chitin from Crab Shell Waste; Journal Korean Soc. Food Nutrition. , 24, 105-113, 1995
9. Ngo D.N., Kim M.M & Kim S.K.; Chitin oligosaccharides inhibit oxidative stress in live cells; Carbohydrate Polymers, 74, 228-234, 2008
10. Peniche-covas C., Alvarez L. W. & Arguelles-Monal W.; The adsorption of mercuric ions by chitosan; Journal of Applied Polymer Science, 46, 1147–1150, 1987
11. Suzuki S., Watanabe T., Mikami T., Matsumo T. & Suzuki M.; Immuno-enhancing effects of N-acetyl chitohexaose; In C. J. Brine, P.A. Sandford & J. P. Zikakis, Advanced chitin and chitosan (pp. 96–105). Amsterdam: Elsevier, 1992
12. Takeshi Y., Yuki I. & Naoto S.; Oligosaccharide Elicitors and Their Receptors for Plant Defense Responses; Trends in Glycoscience and Glycotechnology. 12, 113–120, 2000
13. Yuying S., Baoqin H., Wanshun L., Jiquan Z. & Xingshuang G.; Substrate induction and statistical optimization for the production of chitosanase from *Microbacterium* sp. OU01; Bioresouce Technology. 98, 1548-1553, 2007

Địa chỉ liên hệ: Lê Thanh Hà - Tel: 0904. 831.516, Email: halt-ibft@mail.hut.edu.vn
 Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm
 Trường Đại học Bách khoa Hà Nội