

# NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TỔNG HỢP VÀ TÁCH CHIẾT CÁC HỢP CHẤT CHITIN TỪ SINH KHỐI NẤM SỢI

HOÀNG ĐÌNH HOÀ, ĐINH SỸ MINH LĂNG, ĐỖ THỊ THỦY LÊ, NGUYỄN THỊ HOÀI TRÂM

## I. MỞ ĐẦU

Chitin (poly-N-acetylglucosamine) là một polymer sinh học có nhiều trong cấu trúc khớp, sụn của các động vật bậc thấp, trong thành phần tế bào một số vi sinh vật như nấm mốc, nấm men, vi khuẩn,... và trong lớp vỏ của các loài giáp xác như tôm, cua, ốc, hến,... [3, 5]. Quá trình thu nhận, tách chiết chitin, chitosan (poly-glucosamine) và glucosamin tạo ra các sản phẩm có ích được ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp, tiêu dùng – thực phẩm, nông nghiệp, y - dược và bảo vệ môi trường như các chất đông tụ, điều chỉnh và kiểm soát pH, chất làm dai giấy viết, thuốc chữa xương khớp, da nhân tạo,...[2, 7]. Ở Việt Nam, chitin và chitosan đã được nghiên cứu và sản xuất quy mô pilot từ phế phụ liệu của ngành chế biến thủy hải sản và được ứng dụng làm chất kháng khuẩn trong nông nghiệp, làm thuốc chữa bỏng và chất làm dai trong sản xuất giò chả thay thế hàn the độc hại [5]. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày những kết quả ban đầu trong việc khảo sát, lựa chọn chủng giống, điều kiện nuôi cấy và tách chiết các hợp chất chitin từ sinh khối một số chủng nấm sợi.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vi sinh vật và phương pháp nuôi cấy

Chủng nấm sợi *Aspergillus oryzae* Jo trong sưu tập giống vi sinh vật Viện Công nghiệp thực phẩm, chủng *Blakeslea trispora* WH<sub>2</sub> do Sưu tập giống Viện Vi rút học Vũ Hán, Trung Quốc tặng Viện CNTP để sử dụng trong đề tài khoa học cấp Nhà nước KC.04.27 (2004 - 2005), chủng *Asp. niger* Ex 2006-1 được trao đổi trong đề tài Nghị định thư Việt Nam – Trung Quốc 5-309J (2005 - 2006) và chủng *Rhizopus* sp. BG được phân lập từ bánh men rượu Bắc Giang năm 2006 được dùng trong nghiên cứu. Bào tử của các chủng nấm sợi bảo quản trong cát sạch vô trùng ở 4°C được rắc trên mặt thạch PDA (2,5% thạch, 2% glucoza và nước chiết khoai tây - 20% khoai tây gọt vỏ, thái nhỏ đun sôi 20 phút và lọc lấy nước trong) trong các bình tam giác 500 ml, nuôi ở 28°C từ 72 - 120 giờ. Nhân giống vào 100 ml môi trường lên men trong bình tam giác dung tích 500 ml bằng bảo tử và lên men trên máy lắc tròn ở 28°C, 200 vòng/phút trong 48-120 giờ (1). Môi trường lên men chuẩn số 1 (0,3% cao nấm men, 1% pepton, 2% glucoza, pH 4,5) và các môi trường số 2 (pepton 1%, đường kính 2%, pH 5,7), số 3 (glucoza 4%, asparagin 0,2%, vitamin B1 0,005%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05%, MgSO<sub>4</sub> 0,025%, pH 5,1) và số 4 (cao nấm men 1,7%, glucoza 2%, pH 6,0) được sử dụng trong nghiên cứu [1, 3, 4].

### 2. Thu nhận sinh khối nấm sợi và tách chiết chitin, chitosan

Sinh khối nấm sợi sau lên men được thu nhận bằng li tâm hoặc lọc, sau đó được rửa, làm khô và giữ ở nhiệt độ 4°C đến khi sử dụng. Thành tế bào hệ sợi được phá vỡ bằng dung dịch kiềm loãng để loại protein, lipid và các polisaccarit tan trong kiềm chứa các hợp chất chitin (bao gồm chitosan và phức hợp chitin – glucan). Chitosan được tách chiết khỏi các hợp chất chitin nhờ phản ứng với dung dịch axit loãng (3, 4, 6).

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

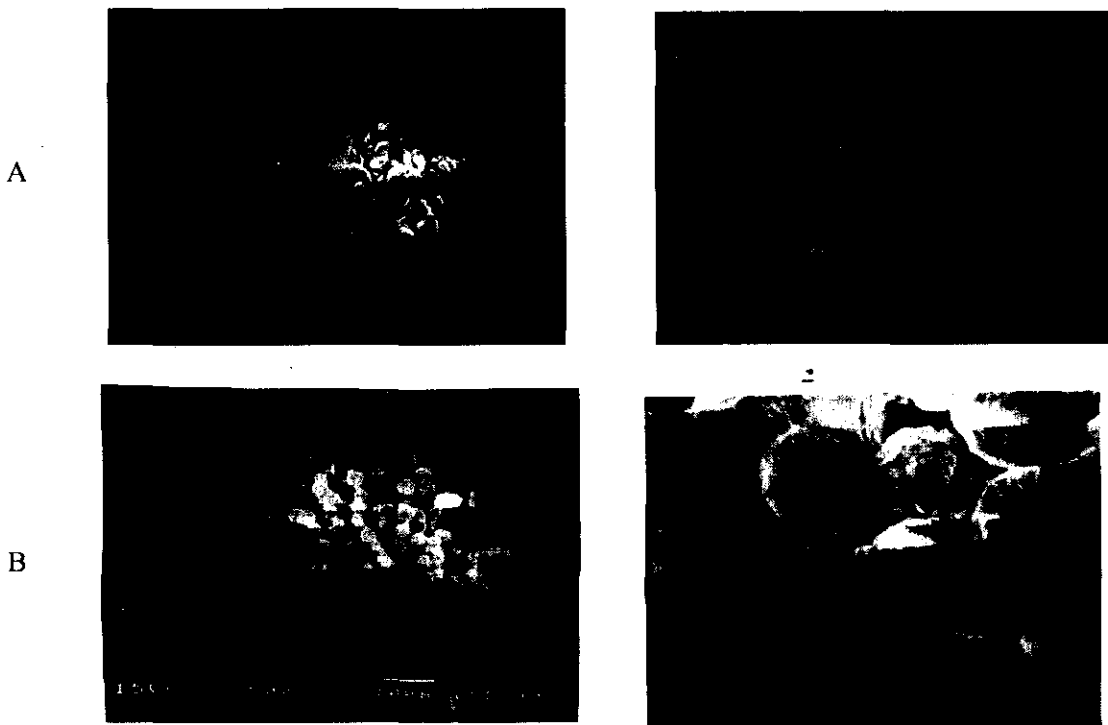
#### 1. Nghiên cứu khảo sát và lựa chọn các chủng nấm sợi có khả năng tổng hợp sinh khối hệ sợi và các hợp chất chitin cao

Bốn chủng nấm sợi *Aspergillus niger* Ex 2006-1, *A. oryzae* Jo, *Blakeslea trispora* WH<sub>2</sub> và *Rhizopus* sp. BG đã được sử dụng trong việc khảo sát và lựa chọn khả năng tạo sinh khối hệ sợi và các hợp chất chitin trên môi trường lên men chuẩn. Các chủng này thuộc ngành phụ Nấm túi - Ascomycota (*A. niger*, *A. oryzae*) và Nấm tiếp hợp - Zygomycotina (*B. trispora* và *Rhizopus* sp.). Trên môi trường thạch PDA, các chủng *Aspergillus* và *Rhizopus* phát triển nhanh hơn, tạo bào tử sau 48 giờ nuôi cấy, trong khi *B. trispora* phát triển chậm hơn, tạo bào tử sau 72 giờ nuôi cấy (bảng 1, hình 1)

Bảng 1. Sự phát triển hệ sợi và bào tử các chủng nấm sợi trên môi trường thạch PDA

Chủng giống	Thời gian nuôi cấy			
	24 giờ	48 giờ	72 - 96 giờ	96 - 120 giờ
<i>A. niger</i> Ex 2006-1	Hệ sợi trắng ngà, ngắn.	Bào tử màu nâu đen, phủ đầy mặt thạch. Bào tử hình cầu, bề mặt ráp.	-	-
<i>A. oryzae</i> Jo	Hệ sợi trắng, dài.	Bào tử màu vàng xanh, phủ đầy mặt thạch.	-	-
<i>B. trispora</i> WH <sub>2</sub>	Chưa phát triển	Hệ sợi dạng tơ trắng ngà, ngắn, thưa.	Lác đác xuất hiện bào tử màu nâu đen.	Bào tử màu nâu đen, phủ đầy mặt thạch. Bào tử hình bầu dục dính thành chùm 3.
<i>Rhizopus</i> sp. BG	Hệ sợi dài, màu trắng xám, lác đác xuất hiện bào tử màu nâu đen.	Hệ sợi dài, màu trắng xám, bào tử nâu đen phủ đầy mặt thạch.	-	-

Sau 96 giờ nuôi cấy trên môi trường lên men chứa cao nấm men, pepton và glucoza - YPD, sinh khối khô hệ sợi đạt 4,5 – 8,3 gam lít, cao nhất là *A. oryzae* Jo và thấp nhất là *Rhizopus* sp. BG (bảng 2). Kết quả này phù hợp với một số công bố của các tác giả trên thế giới, sinh khối sợi nấm thu được trong phòng thí nghiệm trên quy mô máy lắc đạt từ 4,0-10,0 gam/ lít với các chủng *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii* và *Rhizopus oryzae* [2, 3, 6]. Các hợp chất chitin (thành tế bào) thu được sau khi xử lý với dung dịch kiềm đạt 140 - 263 mg/g, chiếm tỉ lệ 14 - 26,3% so với tổng sinh khối khô hệ sợi.



Hình 1. Túi bào tử và chùm 3 bào tử chủng *B. trispora* WH<sub>2</sub> (A); Đỉnh cuống bào tử và bào tử chủng *Asp. niger* Ex 2006-1 (B) (ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử x 7500)

Bảng 2. Hiệu suất tổng hợp sinh khối hệ sợi của các chủng nấm sợi trên môi trường lên men chuẩn

Chủng giống	Sinh khối khô (g/l)	Các hợp chất chitin (mg/g)	Tỉ lệ các hợp chất chitin/sinh khối khô hệ sợi (%)
<i>A. niger</i> Ex 2006-1	7,1	152	15,2
<i>A. oryzae</i> Jo	8,3	140	14,0
<i>B. trispora</i> WH <sub>2</sub>	5,7	238	23,8
<i>Rhizopus</i> sp. BG	4,5	263	26,3

## 2. Nghiên cứu lựa chọn môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp để tổng hợp các hợp chất chitin, chitosan.

Ba môi trường lên men 2, 3 và 4 đã được sử dụng để nuôi cấy 4 chủng nấm sợi. Sau 96 giờ nuôi cấy, kết quả trình bày ở bảng 3 cho thấy môi trường số 2 phù hợp với 2 chủng *Aspergillus*, môi trường số 4 lại tốt hơn cho hai chủng *B. trispora* WH<sub>2</sub> và *Rhizopus* sp. BG tổng hợp sinh khối hệ sợi.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tổng hợp sinh khối hệ sợi của các chủng nấm sợi

Chủng giống	Hàm lượng sinh khối khô (g/l)			
	MT 2	MT 3	MT 4	MT chuẩn
<i>A. niger</i> Ex 2006-1	8,10	4,71	8,05	7,1
<i>A. oryzae</i> Jo	10,82	3,57	8,46	8,3
<i>B. trispora</i> WH <sub>2</sub>	5,36	5,34	6,53	5,7
<i>Rhizopus</i> sp. BG	5,32	2,88	7,09	4,5

Sinh khối hệ sợi của các chủng *A. niger* Ex 2006-1 và *A. oryzae* Jo trên môi trường số 2 và 2 chủng *B. trispora* WH<sub>2</sub>, *Rhizopus* sp. BG trên môi trường số 4 được xử lí với dung dịch kiềm và sau đó với axit để thu các hợp chất chitin và chitosan. Kết quả trình bày ở bảng 4 cho thấy *A. niger* Ex 2006-1 và *A. oryzae* Jo chứa hàm lượng chitosan thấp, đạt tương ứng là 0,4 và 1,7% so với sinh khối khô hệ sợi. *Blakeslea trispora* WH<sub>2</sub>, *Rhizopus* sp. BG chứa hàm lượng chitosan cao hơn, tương ứng là 5,8 và 8,6% so với sinh khối khô hệ sợi.

**Bảng 4.** Khả năng tổng hợp các hợp chất chitin, chitosan của các chủng nấm sợi

Chủng giống	Sinh khối khô (g/l)	Các hợp chất chitin		Hàm lượng chitosan	
		(mg/g)	% so với skk	(mg/l)	% so với skk
<i>A. niger</i> Ex 2006-1	8,10	165	16,5	23,1	0,4
<i>A. oryzae</i> Jo	10,82	171	17,1	183,9	1,7
<i>B. trispora</i> WH <sub>2</sub>	6,53	240	24,0	378,7	5,8
<i>Rhizopus</i> sp. BG	7,09	286	28,6	609,7	8,6

Hai chủng *A. oryzae* Jo và *Rhizopus* sp. BG đại diện của 2 chi thuộc hai ngành phụ Nấm túi và Nấm tiếp hợp được tiếp tục nghiên cứu để lựa chọn các điều kiện nuôi cấy thích hợp nhằm nâng cao hiệu suất tổng hợp sinh khối hệ sợi, hàm lượng chitin, chitosan. Thời gian nuôi cấy và pH môi trường ban đầu là những yếu tố được khảo sát, kết quả ở bảng 5 và 6 cho thấy hiệu suất tổng hợp sinh khối và chitosan đạt kết quả cao với chủng *A. oryzae* Jo là 48 giờ và pH = 6,5 - 7,0 và với chủng *Rhizopus* sp. BG là 64 giờ và pH = 6,5 - 7,0.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hiệu suất tổng hợp sinh khối và chitosan của các chủng nấm sợi *A. oryzae* Jo và *Rhizopus* sp. BG

Chủng giống	Chỉ số lên men	Thời gian nuôi cấy (giờ)				
		48	64	72	96	120
<i>A. oryzae</i> Jo	Sinh khối khô (g/l)	8,0	8,5	8,0	7,1	7,1
	Chitosan (mg/l)	160,0	144,5	104,0	106,5	92,3
	% chitosan so với SKK	2,0	1,7	1,5	1,5	1,3
<i>Rhizopus</i> sp. BG	Sinh khối khô (g/l)	6,3	7,5	7,4	7,0	7,0
	Chitosan (mg/l)	497,7	817,5	821,4	777,0	714,0
	% chitosan so với SKK	7,9	10,9	11,1	11,1	10,2

Bảng 5. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến hiệu suất tổng hợp sinh khối và chitosan của các chủng nấm sợi *A. oryzae* Jo và *Rhizopus* sp. BG

Chủng giống	Chỉ số lên men	pH nuôi cấy						
		5,0	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
<i>A. oryzae</i> Jo	Sinh khối khô (g/l)	6,6	9,2	10,8	9,4	9,2	9,1	9,0
	Chitosan (mg/l)	120,6	198,0	247,5	200,0	161,5	81,3	63,3
	(Thời gian lên men 48 giờ) % chitosan so với SKK	1,8	2,2	2,3	2,1	1,8	0,9	0,7
<i>Rhizopus</i> sp. BG	Sinh khối khô (g/l)	7,5	7,6	8,3	8,1	7,9	6,9	6,9
	Chitosan (mg/l)	735,0	813,2	971,1	923,4	900,6	759,0	745,2
	(Thời gian lên men 64 giờ) % chitosan so với SKK	9,8	10,7	11,7	11,4	11,4	11,0	10,8

### 3. Nghiên cứu lựa chọn các điều kiện tách chiết chitosan từ sinh khối nấm sợi

Sinh khối hệ sợi nấm được xử lý với dung dịch kiềm để loại bỏ protein, lipid và các polysaccharit tan trong kiềm. Các hợp chất chitosan, chitin-glucan sau thu được sau đó được xử lý với dung dịch axit và chitosan được thu nhận sau khi kết tủa trong dung dịch kiềm. Ba phương pháp tách chiết chitosan sử dụng axit axetic và clohydric đã được khảo sát. Sử dụng 5 gam sinh khối khô hệ sợi *Rhizopus* sp. BG cho thí nghiệm. Kết quả trình bày ở bảng 6 cho thấy sử dụng dung dịch axit axetic 2% là phương pháp được chúng tôi lựa chọn để tiếp tục các nghiên cứu sau này.

Bảng 6. Ảnh hưởng của phương pháp tách chiết đến hiệu suất thu hồi chitosan từ sinh khối nấm sợi

Phương pháp tách chiết	Hàm lượng chitosan (mg/g SSK)	Hiệu suất thu hồi chitosan (%)
Xử lý kiềm: NaOH 2% (1 : 30), 90°C, 2 giờ. Xử lý axit: axit axetic 10% (1 : 40), 60°C, 6 giờ; chỉnh dung dịch axit đến pH 9 bằng NaOH 4 M, li tâm thu kết tủa chitosan, rửa và sấy ở 20°C.	95	88,5
Xử lý kiềm: NaOH 1 M (1 : 30), hấp 121°C/15 phút. Xử lý axit: axit axetic 2% (1 : 40), 95°C, 8 giờ; chỉnh dung dịch axit đến pH 10 bằng NaOH 2 M, li tâm thu kết tủa chitosan, rửa, sấy ở 60°C/5 phút.	118	100
Xử lý kiềm: NaOH 1 M (1 : 30), 100°C, 1,5 giờ. Xử lý axit: axit HCl 1 M (1 : 40), 95°C, 5 giờ; chỉnh dung dịch axit đến pH 8,5 bằng NaOH 1 M, li tâm thu kết tủa chitosan, rửa, sấy ở 20°C.	110	93,2

#### IV. KẾT LUẬN

Đã khảo sát 4 chủng nấm sợi *Aspergillus niger* Ex 2006-1, *A. oryzae* Jo, *Blakeslea trispora* WH<sub>2</sub> và *Rhizopus* sp. BG để thu nhận sinh khối hệ sợi, các hợp chất chitin, chitosan trong điều kiện lên men chìm. Trong cùng môi trường và điều kiện nuôi cấy, sinh khối khô hệ sợi đạt cao nhất là *A. oryzae* Jo (8,3 g/l) và thấp nhất là *Rhizopus* sp. BG (4,5 g/l). Các hợp chất chitin (thành tế bào) của 4 chủng nấm sợi thu được sau khi xử lý với dung dịch kiềm đạt 14 - 26,3% so với khối lượng khô hệ sợi.

Hàm lượng chitosan trong thành tế bào hệ sợi *Aspergillus niger* Ex 2006-1 và *A. oryzae* Jo rất thấp, đạt tương ứng là 0,4 và 1,7%, còn *Rhizopus* sp. BG và *Blakeslea trispora* WH<sub>2</sub> là 8,6% và 5,8%.

Thời gian nuôi cấy, pH môi trường thích hợp cho chủng *Rhizopus* sp. BG tổng hợp đạt hiệu suất cao cả về sinh khối khô hệ sợi (7,5 - 8,3 g/l) và chitosan (11,1 - 11,7%) là 64 giờ và 6,5 - 7,0.

Đã lựa chọn phương pháp sử dụng dung dịch axit axetic 2% để tách chiết chitosan từ sinh khối sợi nấm *Rhizopus* sp. BG.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Hoài Trâm, Phạm Thị Thu, Đỗ Thị Thủy Lê - Nghiên cứu khả năng tổng hợp  $\beta$ -carotene của 2 chủng nấm sợi *Blakeslea trispora* WH<sub>1</sub> và WH<sub>2</sub>, Tạp chí Công nghệ sinh học 2 (2) (2004) 193-204.
2. P. Pochanavanich and W. Suntornsuk - Fungal chitosan production and its characterization, Letters in Applied Microbiology 35 (2002) 17-21.
3. T. C. M. Stamford, T. L. M. Stamford, N. P. Stamford, B. B. Neto, G. M. C. Takaki - Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium, Microbial Biotechnology 10 (1) (2007) 1-8.
4. J. Synowiecki, N.A.A.Q. Al-Kateeb - Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan, Food Chemistry 60 (1997) 605-610.
5. Trang Si Trung - Chitin - chitosan production, regeneration and characterization from shrimp waste in Vietnam. Oral presentation of 9<sup>th</sup> Asean Food Conference, 8-10 August, 2005. Jakarta, Indonesia, 2005.
6. S. A. White, P. R. Farina, and I. Fulton - Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. Applied and Environmental Microbiology 38 (2) (1979) 323-328.
7. T. Wu, S. Zivanovic, F. A. Draughon, W. S. Conwway, C. E. Sams - Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan, Agric Food Chem 53 (10) (2005) 3888-3894.

#### SUMMARY

##### STUDY ON BIOSYNTHESIS AND ISOLATION OF CHITINOUS MATERIALS FROM FILAMENTOUS FUNGAL BIOMASS

Chitin, chitosan and D-glucosamine with their versatile biological and physico - chemical properties are used in many industrial, pharmaceutical and medical applications. Four species of filamentous fungi *Aspergillus niger* Ex 2006-1, *Asp. oryzae* Jo, *Blakeslea trispora* WH<sub>2</sub> and *Rhizopus* sp. BG were investigated for the preparation of microbial chitin and chitosan. The