

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN HOẠT TÍNH ENZYM CHITINASE CỦA CHỦNG NẤM SỢI BX1.1 VÀ BX1.4 PHÂN LẬP TỪ BỘ XÍT BỊ BỆNH

Nguyễn Xuân Cảnh¹, Lê Thị Đường¹, Phạm Hồng Hiến², Trịnh Thị Vân²

TÓM TẮT

Nấm sợi đã được nghiên cứu, ứng dụng để sản xuất nhiều loại enzym khác nhau trong đó có chitinase. Nghiên cứu này tập trung vào đánh giá các điều kiện ảnh hưởng đến hoạt tính enzym chitinase của hai chủng nấm sợi phân lập từ các mẫu bộ xít bị nhiễm bệnh. Từ 14 chủng nấm phân lập được đã xác định được 04 chủng có khả năng sinh chitinase, hai chủng có hoạt tính mạnh nhất là BX1.1 và BX1.4 được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả đánh giá hình thái cho thấy hai chủng BX1.1 và BX1.4 mang nhiều đặc điểm giống với nấm thuộc chi *Aspergillus*. Thời gian nuôi cấy để hai chủng này cho hoạt tính mạnh nhất được xác định là hai ngày. Nồng độ cơ chất chitin bổ sung vào môi trường nuôi cấy để cảm ứng sinh enzym phù hợp nhất là 0,5% cho chủng BX1.4 và 1% cho chủng BX1.1. Khảo sát các điều kiện pH và nhiệt độ cho thấy cả hai chủng đều sinh hoạt tính mạnh nhất khi pH ban đầu là 7 và nhiệt độ nuôi cấy là 30°C.

Từ khóa: *Aspergillus* sp., chitinase, *Tessaratomya papillosa*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chitin là một polymer sinh học có công thức hóa học $(C_8H_{13}O_5N)_n$, phân bố rất rộng rãi và được tìm thấy ở nhiều đối tượng trong tự nhiên giống như cellulose. Chitin là thành phần cấu tạo chính của thành tế bào nấm cũng như một số tảo Chlorophyceae. Đây cũng là một thành phần cấu trúc quan trọng trong lớp vỏ của một số động vật không xương sống như côn trùng, nhuyễn thể, giáp xác và giun tròn... Ở động vật thủy sinh đặc biệt là trong vỏ tôm, cua ghe, mai mực, hàm lượng chitin có thể lên tới 14 - 35% trọng lượng khô. Chitin có ba dạng cấu trúc gồm α , β và γ . Chuỗi α -chitin xếp xuôi, ngược xen kẽ nhau nhưng có một cặp xếp cùng chiều. Ở chuỗi β -chitin các chuỗi sắp xếp theo một chiều nhất định, chuỗi γ -chitin có các cặp chuỗi xếp cùng chiều so le với một chuỗi ngược chiều trong cấu trúc (Li, 2006). Chitin không tan trong các dung môi như nước, dung dịch axit và kiềm loãng, cồn và các dung môi thông thường nhưng lại tan được trong một số axit vô cơ đặc (HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4 ,...) (Omumasaba *et al.*, 2001). Trong tự nhiên chitin được phân hủy bởi hệ enzym chitinase. Đây là một loại enzym thủy phân (hydrolase), có khả năng thủy phân chitin thành chitobiose hay chitotriose qua việc xúc tác phân giải liên kết 1,4-glucoside giữa C1 và C4 của hai phân tử N-acetyl glucosamine liên tiếp nhau trong chitin (Jolles and Muzzaralli, 1999). Chitinase được sử dụng trong rất nhiều các ứng dụng khác nhau như kiểm soát nấm gây bệnh cây trồng, xử lý chất thải, sản xuất một số các hợp chất có hoạt tính sinh học. Xạ khuẩn là đối tượng đầu tiên được nghiên

cứ để thu nhận chitinase ứng dụng trong việc phá vỡ vách tế bào nấm. Trong những năm gần đây việc sản xuất và thu nhận chitinase được tập trung nhiều trên các loài nấm sợi khác nhau như *Aspergillus* sp. và *Trichoderma* sp. (Harman, 2006; Sherief *et al.*, 1992; Shubakow and Kucheryavykh, 2004; Ulhoa and Peberdy, 1991).

Bộ xít hại nhân vải (*Tessaratomya papillosa*), là loài côn trùng có lớp vỏ ngoài với thành phần cấu tạo chính là chitin vững chắc. Tuy nhiên, rất nhiều trong số chúng có khả năng nhiễm bệnh do nấm sợi, sợi nấm sẽ phá hủy lớp chitin và ăn sâu vào trong cơ thể bộ xít. Để thực hiện điều này khả năng cao là nấm sợi sẽ sinh ra enzym chitinase có hoạt tính cao. Chính vì vậy nghiên cứu này đặt ra nhằm tìm kiếm được các chủng nấm sợi có khả năng sinh enzym chitinase từ nguồn mẫu là bộ xít bị nhiễm nấm, đồng thời xác định các điều kiện tối ưu để các chủng này hoạt động hiệu quả.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng các chủng nấm sợi có khả năng sinh enzym chitinase được phân lập từ bộ xít bị nhiễm bệnh do nấm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập nấm sợi

Lấy 10 g mẫu bộ xít nghiền nát cho vào bình chứa 90 ml nước cất vô trùng, lắc 5 phút với tốc độ 200 vòng/phút. Sau đó lấy 1 ml dịch huyền phù trộn đều với 9 ml nước cất vô trùng, thu được dung dịch có nồng độ pha loãng là 10^{-1} , tiếp tục pha loãng với các

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Ban Khoa học và Hợp tác Quốc tế, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

nồng độ khác nhau. Mẫu phân lập được nuôi cấy trên môi trường PGA (Dịch chiết từ 200 g khoai tây; Glucose 20 g/l; Agar 20 g/l; pH 5,6 - 5,8) ở điều kiện 30°C, trong 3 ngày, thu thập và làm thuần các khuẩn lạc đặc trưng cho nấm sợi (Nguyễn Xuân Cảnh và *ctv.*, 2017).

2.2.2. Phương pháp kiểm tra khả năng sinh enzym chitinase ngoại bào của nấm sợi

Khả năng sinh enzym chitinase ngoại bào của các chủng nấm sợi phân lập được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch có chứa cơ chất là chitin theo như mô tả trong nghiên cứu trước đây (Nguyễn Xuân Cảnh và *ctv.*, 2017). Xác định hoạt tính enzym nhờ đo vòng phân giải cơ chất quanh giếng thạch.

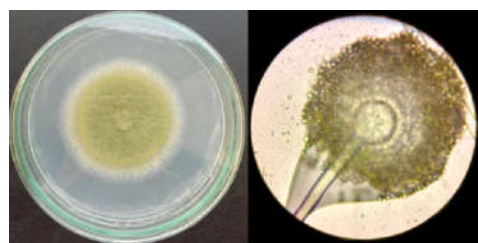
2.2.3. Phương pháp xác định hoạt độ enzym chitinase

Hoạt độ enzym chitinase được xác định dựa trên phương pháp định lượng glucosamine trong quá trình phân giải chitin. Lượng glucosamine tạo ra được hiện màu với thuốc thử DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) và đo mật độ quang ở bước sóng 535 nm.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến hoạt tính chitinase của chủng nấm sợi được tuyển chọn

Chủng nấm sợi được nuôi lỏng lắc trong ống nghiệm chứa môi trường PGB (lỏng) ở điều kiện 30°C, 180 vòng/phút với các khoảng thời gian: 1, 2, 3, 4, 5 ngày. Dịch nuôi cấy được thu nhận, xử lý và xác định hoạt tính enzym chitinase. Sau khi xác định được thời gian nuôi cấy thích hợp, các chủng này tiếp tục được khảo sát điều kiện nuôi cấy khác bao gồm pH môi trường ban đầu (giá trị pH khảo sát 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) và nhiệt độ nuôi cấy (20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C), ở mỗi giá trị khảo sát xác định hoạt tính enzym chitinase.

Cuối cùng, nấm sợi được nuôi ở các điều kiện nhiệt độ, pH thích hợp đã xác định và bổ sung nồng độ chitin huyền phù với các nồng độ khác nhau 0%; 0,5%; 1,0%; 1,5% và 2,0%. Sau 02 ngày nuôi cấy, thu dịch và xác định hoạt tính enzym.



BX1.1

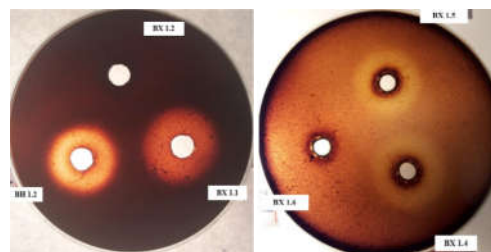
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam từ tháng 5/2017 đến tháng 5/2018.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn chủng nấm sợi có khả năng sinh enzym chitinase

Từ các mẫu bọ xít bị nhiễm bệnh do nấm thu thập được, tiến hành phân lập nấm sợi trên môi trường PGA, kết quả thu được 14 chủng nấm sợi khác nhau. Các chủng nấm này được sử dụng để kiểm tra khả năng sinh enzym chitinase. Khảo sát được thực hiện trên môi trường có chứa 1% chitinase, sau đó xác định đường kính vòng phân giải (Hình 1). Kết quả cho thấy trong số 14 chủng phân lập được chỉ có 04 chủng có khả năng sinh ra enzym chitinase ngoại bào bao gồm chủng BH1.2, BX1.1, BX1.4 và BX1.5. Trong số các chủng có hoạt tính thì chủng BX1.1 và BX1.4 có hoạt tính mạnh nhất với đường kính vòng phân giải đạt gần 22 mm, hai chủng này được lựa chọn để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Hoạt tính phân giải chitin của một số chủng nấm sợi phân lập

Hai chủng nấm sợi này được sơ bộ đánh giá các đặc điểm hình thái và một số đặc điểm sinh hóa cơ bản. Căn cứ vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc, cường sinh bào tử, bào tử cũng như sợi nấm, nhận thấy hai chủng BX1.1 và BX1.4 có đặc điểm tương đồng với các loài trong chi *Aspergillus* (Hình 2). Điều này cũng tương đồng với kết quả trước đây đã xác định các loài trong chi *Aspergillus* có khả năng sinh chitinase cao (Sherief *et al.*, 1992).



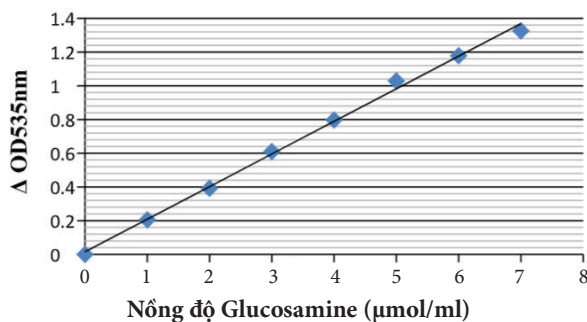
BX1.4

Hình 2. Hình thái khuẩn lạc trên môi trường PGA sau 06 ngày nuôi cấy và hình thái cuống bào tử của hai chủng nấm sợi BX1.1 và BX1.4

3.2. Xác định hoạt độ enzym chitinase sinh ra bởi hai chủng BX1.1 và BX1.4

Trước khi xác định hoạt tính enzym chitinase sinh ra bởi hai chủng nấm mốc thì đường chuẩn Glucosamine thể hiện mối tương quan giữa chỉ số mật độ quang OD_{535nm} và nồng độ Glucosamine (μmol/ml) được thiết lập (Hình 3). Căn cứ vào số liệu dựng đường chuẩn, hoạt độ enzym chitinase trên mẫu thực được xác định. Khi enzyme chitinase tác dụng với cơ chất là chitin huyền phù, sản phẩm tạo thành là N-acetyl-β-D-Glucosamine phản ứng màu với thuốc thử DNS. Phản ứng màu giữa glucosamine với thuốc thử càng đậm thì lượng glucosamine sinh

ra càng nhiều hay enzym chitinase phân hủy càng mạnh. Kết quả xác định được thể hiện trên bảng 1.



Hình 3. Đồ thị đường chuẩn Glucosamine

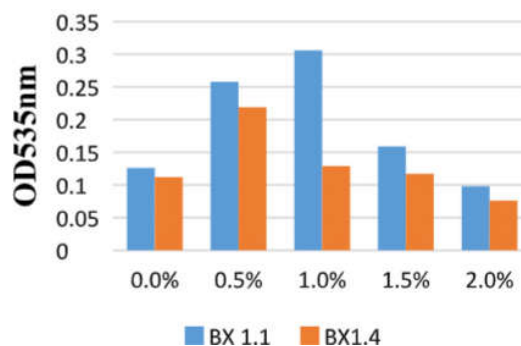
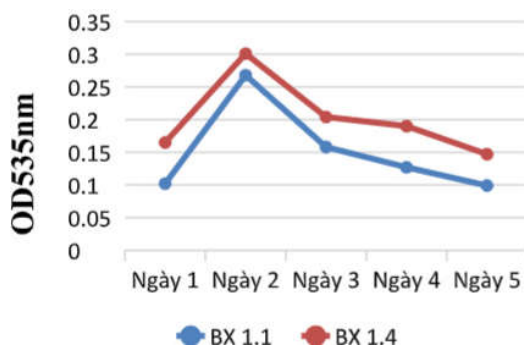
Bảng 1. Kết quả đo hoạt độ enzym chitinase

Chủng nấm	Δ OD _{535nm}	Hàm lượng Glucosamine (μg/ml)	Hoạt độ chitinase (U/ml)
BX 1.1	0,086 ± 0,0015	81,377 ± 1,7505	1,356 ± 0,0290
BX 1.4	0,099 ± 0,0036	96,277 ± 4,1329	1,604 ± 0,0691

3.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy và nồng độ chất cảm ứng đến hoạt tính chitinase của hai chủng BX1.1 và BX1.4

Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích xác định thời gian nuôi cấy thích hợp để thu enzym

chitinase có hoạt độ cao nhất. Nuôi cấy các chủng trong điều kiện nuôi cấy lỏng lắc ở nhiệt độ phòng, thu mẫu và xác định hoạt độ enzym chitinase tại các thời điểm nuôi cấy sau 1, 2, 3, 4, 5. Kết quả được thể hiện trên hình 4.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy và nồng độ chất cảm ứng đến hoạt tính enzym chitinase của hai chủng BX1.1 và BX4.1

Từ kết quả hình 4 cho thấy, khi tăng thời gian nuôi cấy thì khả năng phân giải chitin của hai chủng nấm mốc đều tăng sau đó giảm dần. Đối với cả 2 chủng BX 1.1 và BX 1.4 hoạt tính phân giải chitin mạnh nhất sau 2 ngày nuôi cấy. Điều này tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Thị Hà (2012) về chủng nấm *Aspergillus protuberus* sinh enzym chitinase có hoạt độ cao nhất khi nuôi trong khoảng thời gian 48 giờ. Do vậy, thời điểm 2 ngày nuôi cấy được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

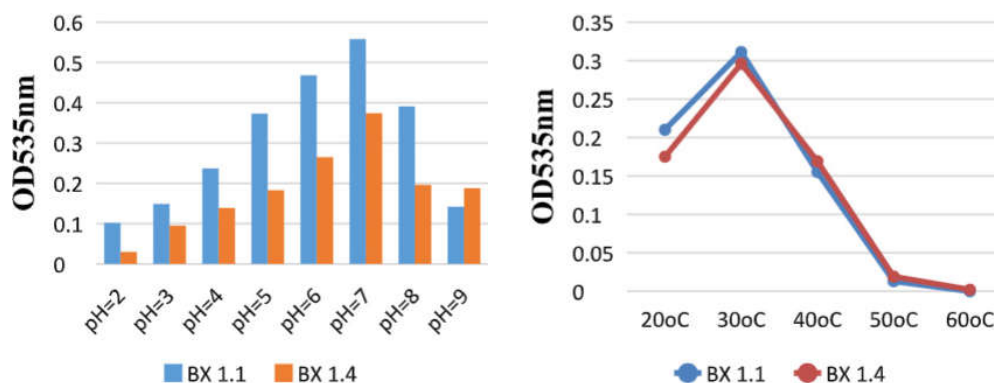
Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất cảm ứng trong

môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh enzym chitinase của nấm mốc được khảo sát với các nồng độ chitin là 0%, 0,5%, 1,0%, 1,5% và 2,0%. Sau 2 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ phòng, tiến hành thu dịch enzym để xác định hoạt tính chitinase. Kết quả trên cho thấy, năng suất tổng hợp chitinase là cao nhất khi được cảm ứng chitin ở nồng độ 0,5% đối với chủng BX 1.4 và 1% đối với chủng BX 1.1 (hình 4). Do đó nồng độ chitin cảm ứng cho chủng BX 1.1 là 1,0% và BX 1.4 là 0,5% được sử dụng cho các nghiên cứu khảo sát khác.

3.4. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ môi trường đến khả năng sinh chitinase của hai chủng BX1.1 và BX1.4

Giá trị pH môi trường ban đầu có ảnh hưởng quan trọng đến sinh trưởng và phát triển của nấm mốc. Đặc biệt, pH còn ảnh hưởng đến sự tạo thành các sản phẩm trung gian, sự phân li, sự hòa tan các chất trong môi trường... từ đó ảnh hưởng quan trọng đến hoạt tính enzym. Việc khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh enzym chitinase của hai chủng nấm đã được tuyển chọn được thực hiện với các giá trị pH là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9. Kết quả thể hiện ở hình 5 cho thấy enzym chitinase do 2 chủng BX 1.1 và BX 1.4 sinh ra đều có hoạt tính cao nhất ở pH = 7.

Nhiệt độ nuôi cấy có ảnh hưởng sâu sắc đến sản lượng và thời gian của pha tổng hợp enzym. Nhiệt độ quá cao hoặc quá thấp có thể kìm hãm sự sinh



Hình 5. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ nuôi cấy đến hoạt tính enzym chitinase của hai chủng BX1.1 và BX4.1

IV. KẾT LUẬN

Đã phân lập được 14 chủng nấm sợi từ các mẫu bọ xít bị nhiễm bệnh do nấm, trong số này có 04 chủng có khả năng sinh enzym chitinase. Hai chủng có hoạt tính mạnh nhất là BX1.1 và BX1.4 mang nhiều đặc điểm tương đồng với nấm thuộc chi *Aspergillus*. Khảo sát hoạt tính enzym chitinase sinh ra từ hai chủng này cho thấy, hoạt tính cao nhất khi nuôi cấy sau 02 ngày ở nhiệt độ 30°C, pH 7 với 0,5% cơ chất cảm ứng là chitin cho chủng BX1.4 và 1% cho chủng BX1.1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Xuân Cảnh, Nguyễn Thị Diệu Hương, Trần Đông Anh, 2017. Phân lập, xác định và nghiên cứu đặc điểm của vi khuẩn gây bệnh trên nấm Linh chi. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 11: 86-91.

trường, thậm chí có thể giết chết sợi nấm, quá trình tổng hợp enzym sẽ bị ức chế. Do đó, tiến hành thí nghiệm xác định nhiệt độ phù hợp nhất để hai chủng nấm tổng hợp chitinase có hoạt tính cao nhất. Môi trường nuôi cấy với nồng cơ chất cảm ứng và giá trị pH được chuẩn bị với các giá trị tối ưu đã khảo sát ở trên. Sau đó, chủng nấm được nuôi cấy trong các nhiệt độ khảo sát là 20°C, 30°C, 40°C, 50°C và 60°C. Sau 2 ngày tiến hành thu dịch enzym để xác định hoạt tính chitinase.

Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt tính chitinase của hai chủng BX 1.1 và BX 1.4 tăng dần khi nhiệt độ tăng từ 20°C đến 30°C, hoạt tính đạt cực đại khi nhiệt độ nuôi cấy là 30°C. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu khi khảo sát nhiệt độ môi trường nuôi cấy tổng hợp chitinase ở chủng *Aspergillus carneus* thích hợp nhất ở 30°C (Sherief *et al.*, 1992).

Nguyễn Thị Hà, 2012. 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*, số 22b: 26-35.

Harman G.E., 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp.. *Journal of Phytopathology*, 96(2): 190-194.

Jolles P. and Muzzaralli A.R., 1999. *Chitin and chitinase*. Birkhauser verlag, Basel, Switzerland, 125-133.

Li D-C., 2006. Review of fungal chitinases. *Journal of Mycopathologia*, 161: 345-360.

Omumasaba C. A., Yoshida N. and Ogawa K., 2001. Purification and characterization of a chitinase from *Trichoderma viride*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 47(2): 53-61.

Sherief A.A., Abdel-Naby M.A., and El-Shayeb N.M.A., 1992. Purification and some properties

of chitinase from *Aspergillus carneus*. *Applied Biochemistry and biotechnology*, 37: 141-154.
Shubakov A.A. and Kucheryavykh P.S., 2004. Chitinolytic Activity of Filamentous Fungi. *Applied*

Biochemistry and Microbiology, 40: 445-447.
Ulhoa C.J. and Peberdy J.F., 1991. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology*, 137: 2163-2169.

Effect of culture conditions on chitinase activity induced by BX1.1 and BX1.4 strains isolated from fungal infected *Tessarotoma papillosa*

Nguyen Xuan Canh, Le Thi Duong, Pham Hong Hien, Trinh Thi Van

Abstract

Filamentous fungi have been studied, applied to produce a variety of enzymes including chitinase. This research focused on the identification of culture conditions for two fungal strains inducing active chitinase. Fourteen strains were isolated from fungal infected bugs (*Tessarotoma papillosa*). Among them four chitinase inducing strains were identified. Strains BX1.1 and BX1.4 with the morphological characteristics similarity to *Aspergillus* were selected for further studies. The chitinase activity from these strains was influenced by culture conditions including time, temperature, pH and concentration of the substrates. Both strains induced the high chitinase activity after two days of culture. Concentrations of added chitin to the culture medium for optimum induction were 0.5% for BX1.4 and 1% for BX1.1 strain, respectively. The investigation of pH and temperature conditions showed that both strains had the strongest activity at initial pH of 7 and culture temperature of 30°C.

Keywords: *Aspergillus* sp., chitinase, *Tessarotoma papillosa*

Ngày nhận bài: 10/7/2018

Ngày phản biện: 19/7/2018

Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Hoàng Anh

Ngày duyệt đăng: 15/10/2018

ĐÁNH GIÁ SỰ BẠC MÀU ĐẤT VƯỜN TRỒNG CAM SÀNH DỰA TRÊN HÌNH THÁI, ĐẶC TÍNH LÝ, HÓA ĐẤT TẠI HUYỆN TAM BÌNH, TỈNH VINH LONG

Bùi Triệu Thương¹, Tất Anh Thu¹, Nguyễn Ngọc Thanh², Nguyễn Minh Phương¹, Trần Bá Linh¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá sự bạc màu đất liếp chuyên canh cây cam sành qua nhiều năm canh tác tại xã Tường Lộc, huyện Tam Bình, tỉnh Vĩnh Long. Qua việc mô tả hình thái phẫu diện của vùng đất đai diện kết hợp với phân tích các chỉ tiêu vật lý, hóa học đất ở các tầng phát sinh của hai phẫu diện đất TB-VL1 (đất liếp vườn canh tác cam sành 40 năm) và TB-VL2 (đất liếp vườn canh tác cam sành 22 năm) đã đánh giá các yếu tố trở ngại về đất ở các độ sâu khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy, đất ở phẫu diện TB-VL1 có sa cấu thuộc nhóm đất sét pha thịt đến thịt trung bình, bị nén dễ ở tầng canh tác, độ xốp của đất thấp (24,0% - 37,8%). Độ phì hóa học giảm thể hiện ở khả năng trao đổi cation thấp (11,8 - 12,5 meq/100 g đất), thành phần Ca²⁺ và Mg²⁺ trao đổi trong đất rất thấp (< 2,0 meq/100 g đất). Bên cạnh đó hàm lượng chất hữu cơ trong đất thấp (2,09 - 3,86% OM), hàm lượng P dễ tiêu trong đất ở mức trung bình (9,8 - 16,5 mg P₂O₅/kg đất). Đối với đất liếp vườn ở phẫu diện TB-VL2 có sa cấu thuộc nhóm đất sét pha thịt đến sét nặng và gặp các trở ngại về nén dễ đất ở tầng tích lũy (dung trọng 1,46 g/cm³), chỉ số độ bền của đất ở tầng đất mặt thấp (0,66). Khả năng trao đổi cation (CEC), thành phần Ca²⁺ và Mg²⁺ trao đổi trong đất ở mức thấp. Hàm lượng chất hữu cơ trong đất ở mức trung bình đến thấp (2,32 - 5,33% OM), pH ở tầng đất mặt thấp (pH = 4,36) chưa phù hợp cho sự phát triển của cây cam sành. Hàm lượng nước hữu dụng ở tầng tích lũy (50 - 70 cm) của hai phẫu diện thấp so với điều kiện thủy dung ngoài đồng.

Từ khóa: Độ phì, cam sành, phẫu diện đất, bạc màu đất, Tam Bình

¹ Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

² Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tỉnh Vĩnh Long