

TUYỂN CHỌN NẤM MỐC SINH ENZYME CHITOSANASE PHÂN LẬP TỪ ĐẤT MỘT SỐ VÙNG THUỘC NAM BỘ

Đào Thị Mỹ Linh*, Nguyễn Thị Quỳnh Mai,
Phạm Thị Phương Thùy, Hồ Thị Mai, Phạm Thị Kim Ngân
Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: linhdtm@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 28/6/2019; Ngày chấp nhận đăng: 05/9/2019

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm thu nhận và tuyển chọn các chủng nấm mốc có khả năng sinh enzyme chitosanase cao. Kết quả phân lập đã thu được 18 chủng nấm mốc từ các nguồn mẫu ban đầu khác nhau. Ở bước sàng lọc sơ cấp xác định được 6 chủng có vòng thủy phân chitosan tốt nhất với đường kính 7,67-20 mm. Sau khi thực hiện sàng lọc thứ cấp đã chọn ra được 4 chủng nấm có hoạt tính chitosanase cao nhất đạt 0,08-1,17 UI/mL. Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gen vùng ITS cho thấy 4 chủng thuộc các loài *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus toxicarius*. Các loài này sẽ tiếp tục được khảo sát trong môi trường nuôi cấy phù hợp và tối ưu điều kiện nuôi cấy thu nhận enzyme chitosanase.

Từ khóa: Nấm mốc, chitosanase, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus toxicarius*.

1. MỞ ĐẦU

Chitosanases (EC 3.2.1.132) là nhóm các glycosyl hydrolase xúc tác quá trình thủy phân β -1,4-glycosidic có trong liên kết của chitosan, acetyl hóa một phần để giải phóng oligosaccharide chitosan (COS) có ứng dụng trong y học và thực phẩm [1]. Vì COS không chỉ hòa tan trong nước, không độc hại, tương thích với các vật liệu sinh học, mà chúng còn có nhiều tính chất sinh học như kháng khuẩn, kháng nấm, chống ung thư, cũng như các hiệu ứng tăng cường miễn dịch trên động vật [2]. COS có thể tạo ra bằng phương pháp hóa học nhưng nhiều vấn đề tồn tại trong sản xuất như sản lượng thấp, chi phí trích ly cao và ô nhiễm môi trường [3].

Chitosanase được sản xuất bởi nhiều nhóm sinh vật như xạ khuẩn, nấm, thực vật và vi khuẩn. Các nghiên cứu đã tìm thấy trong bộ phận sinh dưỡng và hạt của một số cây hai lá mầm như hạt lúa mì (*Triticum aestivum*) và lúa mạch (*Hordeum vulgare*), hạt đậu (*Pisum sativum*) và trái dưa chuột (*Cucumis sativus*) có nguồn chitosanase tốt nhất. Ở thực vật, các chitosanase đã được coi là protein, tham gia vào các cơ chế bảo vệ chống lại các loại nấm gây bệnh [4]. Chitosanase vi khuẩn được đặc biệt chú ý bởi có hoạt tính cao, rất quan trọng đối với việc duy trì cân bằng sinh thái, đã được sử dụng để nghiên cứu xác định cơ chế thủy phân chitosan ở cấp độ sinh hóa và phân tử, được dùng phân giải chitosan thành glucosamine oligomers một cách hiệu quả và có ưu thế trong sản xuất công nghiệp. Tuy nhiên, nấm và xạ khuẩn cũng là nguồn thu nhận chitosanase để sản xuất chitosan oligomers từ chitosan [4, 5].

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về chitosanase đã được nhiều nhà khoa học tìm hiểu như khảo sát điều kiện thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp enzyme chitosanase từ *Penicillium oxalicum*

BKH2 [6], nghiên cứu cố định chitosanase thu từ *Penicillium* sp. ZDZ1 bằng phản ứng liên kết chéo [7], tinh sạch và xác định đặc tính của chitosanase và exo- β -D-glucosaminidase từ nấm mốc *Aspergillus oryzae* IAM2660 [8]. Kết quả của các nghiên cứu là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm thu nhận nguồn enzyme chitosanase có hoạt tính tốt và giảm giá thành, ứng dụng thủy phân thu nhận COS từ nguồn chitin có trong vỏ tôm, một nguồn phụ phẩm của công nghiệp chế biến thủy sản dồi dào trong nước.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Cám, trấu mua ở Tây Ninh, được sấy tới độ ẩm không đổi 5%, bảo quản trong điều kiện thường và được sử dụng làm môi trường bán rắn nuôi cấy nấm mốc.

Chitosan tan trong nước được mua từ công ty TNHH MTV chitosan VN (Số 23/6 Ngô Thời Nhiệm, Tp. Rạch Giá, Kiên Giang, Việt Nam) có DE > 80%.

MT1: Môi trường cấy truyền potato dextrose/gluucose agar (PDA/PGA) (Himedia-Ấn Độ).

MT2: Czapek-Dox (g/L) K_2HPO_4 1, KCl 0,5, $NaNO_3$ 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02, agar 15, pH 5,5 và bổ sung chitosan 0,3% [9].

MT3: Môi trường sàng lọc cấp 2 được chuẩn bị môi trường có tỷ lệ cám:trấu = 7:3, bổ sung 12 mL dung dịch muối khoáng có chứa chitosan 0,3% để được độ ẩm 60%.

Cách pha dung dịch muối bổ sung môi trường bán rắn tạo độ ẩm cần thiết để nuôi cấy nấm mốc gồm: 1 g $NaNO_3$, 1 g K_2HPO_4 , 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g NaCl và 3 g chitosan; tất cả được cho vào cốc 1000 mL, hòa tan bằng nước cất và định mức tới 1000 mL.

Các thiết bị được sử dụng gồm: lò vi sóng Electrolux EMM2021GW, máy đo pH InoLab pH 7110, máy ly tâm Hermle Z216M và máy đo quang phổ Optima SP3000 Nano.

Chủng MD2 (*Aspergillus niger*) được phân lập trên môi trường dứa mốc kế thừa từ nghiên cứu trước [10].

Chuẩn bị giống bào tử: hút 10 mL dung dịch tween 80 (0,1% v/v) đã khử trùng, cho vào ống giống thạch nghiêng có môi trường PDA nuôi ủ trong 7 ngày ở nhiệt độ 27-30 °C chứa rất nhiều bào tử, lắc đều, tách lớp bào tử trên mặt thạch và chuyển dung dịch bào tử sang ống nghiệm vô trùng.

Mật độ bào tử được xác định bằng phương pháp buồng đếm hồng cầu và được đo mật độ quang tại bước sóng 610 nm tương ứng ở các nồng độ pha loãng. Dụng đường chuẩn tương quan giữa giá trị OD và mật độ bào tử. Giá trị OD từ 1,5-1,6 mật độ đạt $\geq 10^7$ bào tử/mL. Bảo quản dịch bào tử ở 4 °C cho đến khi sử dụng [11].

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp phân lập

Mẫu phân lập là đất được lấy tại khuôn viên khu vực nuôi tôm của đại lý nuôi tôm Thuận Phát, xã Bình Khánh, huyện Cần Giờ. Đất vườn nuôi bò sữa huyện Hóc Môn. Đất các vùng trồng rau ở Bình Thuận (Huyện Đức Linh và Hàm Tân) và đất cát biển ở Vũng Tàu. Cách lấy mẫu đất: chọn 5 điểm (4 góc và giữa vườn) để lấy mẫu đất bằng cách cào nhẹ lớp đất mặt, dùng dao xắn nhẹ đồng đều từ trên xuống (độ sâu từ 0-30 cm), mỗi điểm lấy khoảng 50 gam, trộn đều thành mẫu 250 gam bỏ vào túi nilon. Ghi rõ tên người lấy, địa chỉ nơi lấy, ngày lấy mẫu.

Cách tiến hành: Cân 1 g mẫu đất hòa loãng trong 99 mL nước cất khử trùng, lắc vortex để đồng nhất mẫu. Dung dịch này có nồng độ pha loãng là 10^{-2} . Từ ống nghiệm 10^{-2} hút tiếp 1 mL và cho vào ống nghiệm chứa 9 mL dung dịch pha loãng (nước cất khử trùng) sẽ được một dung dịch mới có độ pha loãng 10^{-3} , tiếp tục lặp lại thao tác này sẽ thu được các dung dịch có các độ pha loãng 10^{-4} , 10^{-5} ... Hút 0,1 mL dịch pha loãng ở các nồng độ trên nhỏ lên đĩa petri chứa môi trường PDA, dùng que gạt thủy tinh trải đều lên bề mặt thạch, ủ các đĩa ở điều kiện nhiệt độ phòng, sau 3 ngày lấy ra quan sát. Chọn các khuẩn lạc nấm mốc và tiếp tục kỹ thuật cấy chấm điểm trên đĩa petri mới chứa môi trường PDA đã chuẩn bị sẵn để được các khuẩn lạc đơn, thuần khiết [12, 13].

2.2.2. Xác định chủng nấm mốc có khả năng sinh chitosanase

Sàng lọc sơ cấp được thực hiện qua 2 bước.

Bước 1: Nuôi nấm mốc trên môi trường Czapek-Dox có bổ sung chitosan 0,3% [3], hấp khử trùng ở 121°C trong vòng 15 phút và phân phối vào các đĩa petri đã hấp khử trùng. Dùng que cấy lấy sinh khối của chủng nấm mốc đã phân lập chấm vào giữa đĩa thạch. Sau 72 giờ, nhỏ thuốc thử lugol lên đĩa petri ủ tiếp 20 phút, quan sát và đo đường kính vòng thủy phân [13].

Bước 2: Sàng lọc bằng phương pháp đục lỗ thạch, nấm mốc được nuôi trên 10 g môi trường bán rắn (cám, trấu) có bổ sung chitosan 5%, độ ẩm 60% trong bình tam giác 250 mL. Cấy 1 mL giống có mật độ $\geq 10^7$ bào tử/mL vào môi trường, trộn đều và ủ 96 giờ ở điều kiện nhiệt độ phòng ($25-30^{\circ}\text{C}$). Sau thời gian nuôi cấy, enzyme được trích ly từ giá thể đã lên men bằng cách bổ sung 45 mL dung dịch đệm acetate 0,2 M, pH 5,5 lắc trên máy lắc với tốc độ là 150 vòng/phút trong 20 phút. Lọc dịch qua giấy lọc để thu enzyme thô [2].

Môi trường agar có bổ sung 0,3% chitosan được hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút được phân phối vào các đĩa petri đã hấp khử trùng. Dùng dụng cụ đục lỗ thạch có đường kính ($d = 8\text{ mm}$) tiến hành đục 1 lỗ trên đĩa petri, nhỏ 0,1 mL dịch enzyme vào lỗ thạch và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày. Hoạt tính enzyme chitosanase được xác định dựa trên đường kính vòng phân giải sau khi nhuộm bằng thuốc thử lugol. Chủng nấm mốc có hoạt tính chitosanase mạnh, trung bình hoặc yếu có đường kính vòng thủy phân D-d tương ứng 10-20 và nhỏ hơn 10 mm [14].

2.2.3. Xác định hoạt tính chitosanase

Hoạt tính chitosanase được xác định theo phương pháp Silva *et al.* (2012) [15]. Tất cả các chủng đã chọn qua sàng lọc sơ cấp được nuôi cấy trong môi trường bán rắn như đã mô tả ở phần trên. Dịch enzyme từ sinh khối lên men được trích ly bằng cách thêm 45 mL dung dịch đệm acetate 0,2M pH 5,5, lắc đều trộn để đồng nhất, đưa lên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong 20 phút ở 37°C . Sau đó lọc qua giấy lọc, dịch thu được sử dụng để xác định hoạt tính enzyme.

Một đơn vị hoạt độ (UI) chitosanase được coi là lượng enzyme cần thiết để xúc tác thủy phân chitosan, giải phóng được 1 μmol đường khử sau mỗi phút tại điều kiện nhiệt độ và pH 5,5 phản ứng quy định [15].

$$HT = \frac{x \cdot F \cdot V}{v \cdot t} \times 5 \text{ (UI/mL)}$$

Trong đó: HT: Hoạt tính enzyme chitosanase (UI/mL); x: Lượng đường khử sinh ra ($\mu\text{mol/mL}$); F: Hệ số pha loãng; V: Tổng thể tích dung dịch phản ứng (mL); v: Thể tích enzyme đem vào phản ứng (mL); t: Thời gian phản ứng (phút); 5: Hệ số quy đổi về 1 mL dịch enzyme.

Cách tiến hành xác định hoạt tính chitosanase: Hỗn hợp phản ứng gồm: 0,2 mL enzyme chitosanase, 0,8 mL dung dịch chitosan 0,3% trong đệm acetate 0,2M pH 5,5. Ủ phản ứng 60 phút ở 37 °C. Sau đó, thêm 3 mL DNS 1%, đun sôi trong 5 phút và sau đó làm lạnh nhanh. Ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút. Thu dịch trong và đo độ hấp thụ quang OD trên máy quang phổ ở bước sóng 540 nm. Mẫu đối chứng được tiến hành tương tự nhưng sau khi cho enzyme và DNS dung dịch phản ứng được đun sôi 5 phút để bất hoạt enzyme. Dựa vào đường chuẩn glucosamine HCL để xác định lượng đường khử sinh ra.

2.2.4. Định danh

Sử dụng khóa phân loại của Bùi Xuân Đồng và cộng sự (2000), nấm được phân loại bằng quan sát hình thái khuẩn lạc và cuống sinh bào tử kết hợp với xác định trình tự gen vùng ITS theo quy trình của công ty Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam) [16]. DNA nấm được tách tiến hành theo phương pháp tách chiết nhanh như sau: lấy khoảng 0,01 g sợi nấm cho vào tube eppendorf 1,5 mL, thêm 100 µL dung dịch đệm TE 1X có thành phần 50 mM Tris base và 100 mM EDTA trong 100 mL pH 8) trộn đều bằng pipet tip. Đun nóng ở nhiệt độ 95 °C trong 5 phút rồi ly tâm 13000 vòng/phút. Dịch trong phía trên được chuyển qua tube mới để sử dụng cho phản ứng PCR (Polymerase chain reaction). Khuếch đại trình tự ITS1-5,8-ITS2 của các chủng nấm bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi được sử dụng là ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' và ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. Sản phẩm PCR được tiếp tục tinh sạch và giải trình tự tự động trên thiết bị ABI3500 (Applied Biosystems, Mỹ). Trình tự sau đó được xử lý bằng phần mềm Bioedit và so sánh với các trình tự tương ứng trên NCBI GenBank bằng công cụ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm Mega 6.06 theo phương pháp thống kê Construct/Test UPBMA Tree, dựa trên thuật toán gamma với giá trị Bootstrap bằng 500 lần lặp và chỉ những giá trị bootstrap cao hơn mới được hiển thị trên cây [17].

2.2.5. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, các số liệu được ghi nhận và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010, đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu thí nghiệm được thực hiện bằng phương pháp thống kê Anova và kiểm định LSD với độ tin cậy 95% bằng Statgraphic XVI, cây phát sinh loài được vẽ bằng phần mềm Mega 6.06, đồ thị được vẽ bằng phần mềm Origin 8.5.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các chủng nấm mốc

Từ mẫu đất được lấy tại các địa điểm khác nhau ở vùng Nam Bộ, như huyện Cần Giò, Hóc Môn thành phố Hồ Chí Minh, Bình Thuận, Vũng Tàu trong thời gian nghiên cứu từ tháng 9 đến tháng 12 năm 2018. Tiến hành phân lập vi sinh vật trên môi trường PGA, kết quả cho thấy ở nồng độ pha loãng 10^{-4} khuẩn lạc mọc rời rạc dễ quan sát, các nồng độ còn lại khuẩn lạc mọc dày (Hình 1). Làm thuần các khuẩn lạc trên đĩa petri có môi trường PGA và cấy truyền giữ giống liên tục trên thạch nghiêng sau 5-7 ngày ở nhiệt độ thường để thực hiện tiếp các khảo sát sàng lọc. Ngoài ra, các chủng giống phân lập được giữ dưới dạng bào tử trong eppendorf 2,5 mL bằng phương pháp lạnh sâu trong môi trường có bổ sung glycerol 10% ở nhiệt độ -80 °C và cấy truyền sau mỗi 6 tháng [18].

Kết quả có 17 chủng phân lập được từ mẫu đất Cần Giò gồm 2 chủng CO2, CO5; Hóc Môn có 4 chủng PM1, PM4, SM1, SM2; huyện Đức Linh (Bình Thuận) có 4 chủng gồm

DL2, DL3, DL6, DL7; huyện Hàm Tân (Bình Thuận) có 3 chủng gồm BT1, BT3, BT7 và Vũng Tàu có 4 chủng BL1, BD3, DP2, MC2.

Bộ sưu tập 18 chủng nấm mốc gồm 17 chủng được phân lập mới và 1 chủng MD2 là *Aspergillus niger* (kế thừa từ nghiên cứu trước [10]) được sử dụng cho sàng lọc khả năng sinh tổng hợp enzyme chitosanase trong các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Mẫu phân lập ở các nồng độ pha loãng

3.2. Tuyển chọn cấp một các chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp chitosanase

Các chủng nấm mốc sinh enzyme chitosanase có khả năng tạo vòng thủy phân vì trong môi trường có cơ chất cảm ứng là chitosan, nấm mốc sẽ sinh tổng hợp chitosanase để phân giải chitosan thành các đoạn nhỏ (chito-oligosaccharide), N-acetyl glucosamine và D-glucosamine để chúng sử dụng, các chất này không bắt màu với thuốc thử lugol. Khi tác dụng với thuốc thử lugol, độ lớn của phần môi trường trong suốt (vòng phân giải) phản ánh hoạt tính chitosanase [19].

Các chủng nấm mốc được kiểm tra khả năng sinh tổng hợp enzyme chitosanase bằng cách tiến hành thử định tính khả năng sinh chitosanase trên môi trường có bổ sung cơ chất là chitosan bằng phương pháp cấy chấm điểm sau 72 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 27-30 °C. Trong môi trường có chitosan với vai trò cung cấp nguồn cacbon và chất cảm ứng thì vi sinh vật nào có khả năng tổng hợp chitosanase sẽ sinh trưởng và phát triển, còn vi sinh vật không có khả năng tổng hợp chitosanase sẽ không sinh trưởng và phát triển được. Kết quả xác định đường kính vòng thủy phân của 18 chủng nấm mốc được trình bày ở Bảng 1.

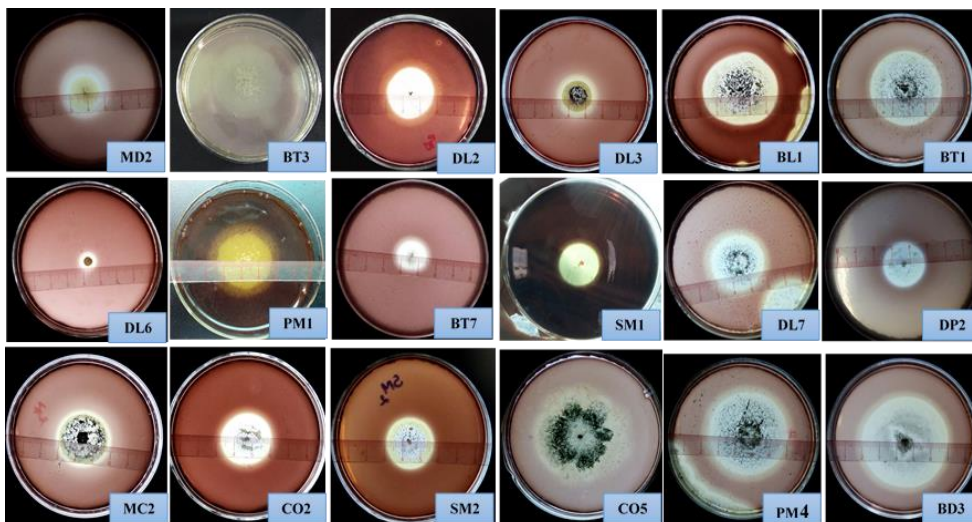
Bảng 1. Đường kính vòng thủy phân của các chủng nấm mốc trong môi trường MT2

STT	Ký hiệu giống	D - d (mm)	STT	Ký hiệu giống	D - d (mm)
1	CO2	8,67 ^{ef} ± 0,58	10	BL1	11,00 ^{cde} ± 2,65
2	CO5	8,00 ^{ef} ± 1,00	11	BD3	7,00 ^f ± 1,00
3	BT1	7,33 ^f ± 1,53	12	DP2	7,33 ^f ± 0,58
4	BT3	12,33 ^{cd} ± 3,06	13	MC2	8,67 ^{ef} ± 0,58
5	BT7	9,33 ^{def} ± 2,08	14	SM1	8,67 ^{ef} ± 2,08
6	DL2	17,33 ^a ± 3,06	15	SM2	8,00 ^{ef} ± 1,00
7	DL3	13,67 ^{bc} ± 1,15	16	PM1	9,67 ^{def} ± 1,15
8	DL6	11,00 ^{cde} ± 2,65	17	PM4	7,67 ^f ± 1,15
9	DL7	8,67 ^{ef} ± 2,52	18	MD2	16,33 ^{ab} ± 1,15

^{abcd}ef là giá trị trung bình cột sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai khác về mặt thống kê (p<0,05)

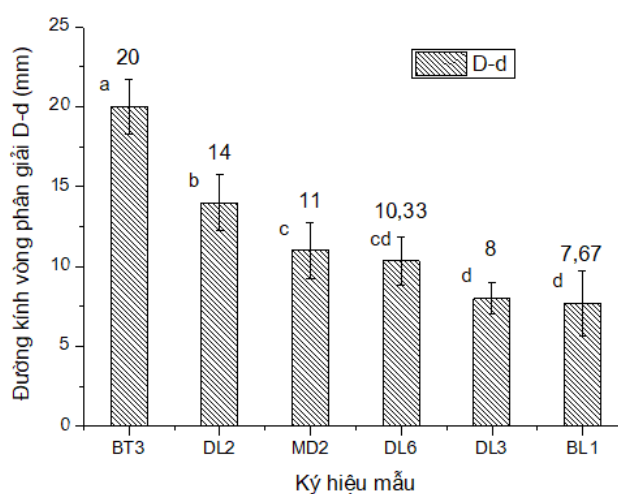
Kết quả trong Bảng 1 cho thấy các chủng có đường kính vòng thủy phân dao động 7,00-17,33 mm. Trong đó, chủng DL2 có khả năng tạo vòng thủy phân tốt nhất so với các chủng khác. Vòng thủy phân của chủng này sau 72 giờ nuôi cấy là 17,33 mm, cho thấy tiềm năng tốt cho việc sản xuất enzyme chitosanase. Sau đó là chủng MD2 có đường kính vòng thủy phân 16,33 mm và chủng BD3 có đường kính vòng thủy phân thấp nhất là 7,00 mm. 6

chủng nấm mốc có đường kính D-d (mm) thể hiện hoạt tính chitosanase mạnh, trung bình sẽ được tiến hành sàng lọc bước 2 dựa vào đường kính phân giải chitosan của enzyme chitosanase thô.



Hình 2. Các chủng nấm mốc có vòng thủy phân trong môi trường có bổ sung chitosan 0,3%

Qua số liệu ở Hình 3 cho thấy các chủng có đường kính vòng thủy phân dao động 7,67-20 mm. Trong đó, chủng BT3 có khả năng tạo vòng thủy phân tốt nhất so với các chủng khác. Vòng thủy phân của chủng này sau 96 giờ nuôi cấy là 20 mm, cho thấy tiềm năng để thu nhận enzyme chitosanase. Sau đó là chủng DL2 có đường kính vòng thủy phân 14 mm và chủng MD2, DL6 có đường kính vòng phân giải lần lượt là 11 và 10,33 mm.



Hình 3. Đường kính vòng phân giải của các chủng nấm mốc có hoạt tính chitosanase cao trong MT3 (abcdef là giá trị trung bình cột sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai khác về mặt thống kê ($p < 0,05$))


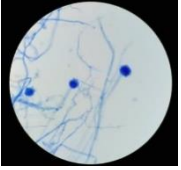
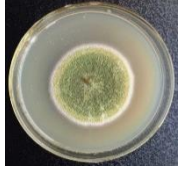

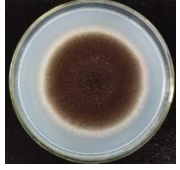




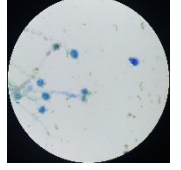


Nghiên cứu của Ngô Xuân Mạnh và cs (2009) thu được kết quả vòng phân giải của 4 chủng xạ khuẩn có ký hiệu NN3, HS1, NN1 và NN2 lần lượt là 18, 23, 33, 36 mm trên môi trường có cơ chất phân giải của enzyme chitosanase [19]. Trong nghiên cứu này, 6 chủng nấm mốc tiếp tục được sàng lọc cấp 2.

3.3. Nhận diện các chủng nấm mốc đã tuyển chọn

Để định danh sơ bộ các chủng có khả năng sinh enzyme chitosanase, tiến hành quan sát đại thể và vi thể trước khi tuyển chọn cấp hai.

Kết quả quan sát đại thể các khuẩn lạc được cấy chấm điểm trên đĩa thạch PGA, ủ ở nhiệt độ phòng trong 96 giờ. Các khuẩn lạc được quan sát cho thấy khuẩn ty có màu trắng và bào tử có màu xanh, đen, cam nâu.

Bảng 2. Kết quả quan sát hình thái khuẩn lạc và vi thể của một số nấm mốc

Ký hiệu giống	Đặc điểm khuẩn lạc	Hình ảnh đại thể sau 96 giờ nuôi cấy trên môi trường PGA	Hình ảnh vi thể quan sát phóng đại 400 lần
BL1	Mốc xanh; sợi bào tử trắng; viền ngoài trắng; dạng mặt mịn, len xốp, lồi		
DL2	Mốc xanh; bào tử xanh; sợi bào tử trắng; viền ngoài trắng; dạng mặt có khía, mịn, len xốp		
DL3	Mốc đen; sợi bào tử trắng; vòng ngoài trắng, bào tử đen		
DL6	Mốc cam nâu; sợi bào tử trắng; vòng ngoài trắng; dạng mặt mịn, len xốp, có khía; có sắc tố hòa tan		
BT3	Mốc lục vàng; dạng mặt len; màu mặt sau không màu; không có giọt tiết; không có sắc tố hòa tan		
MD2	Mốc đen; sợi bào tử trắng; vòng ngoài trắng; không có sắc tố hòa tan		

Quan sát vi thể dưới kính hiển vi ở vật kính X40 có độ phóng đại 400 lần bằng phương pháp phòng ẩm cho thấy các chủng nấm đều có đặc điểm là khuẩn ty có vách ngăn, giá bào tử trần phát triển từ tế bào chân, như là một nhánh của khuẩn ty, gần thẳng góc với trục của tế bào chân. Giá bào tử trần không có nhánh, có phần đỉnh to ra thành bọng hình chùy, hình elip, hình nửa cầu hoặc hình cầu. Bọng này gọi là bọng đỉnh giá mang các thể bình. Các thể bình này hoặc song song và hợp thành cụm ở phần đỉnh bọng, hoặc xếp thành tia sát nhau

trên bề mặt bông. Thễ bình hoặc chỉ có một tầng hoặc là có hai tầng. Các bào tử trần được tạo thành nối tiếp nhau trong miệng thễ bình, thành chuỗi hướng góc, (bào tử ở ngay miệng thễ bình là non nhất, càng xa miệng thễ bình thì càng già) không phân nhánh. Khối bào tử trần đính bông có các hình dạng hình cầu, hình tia tỏa tròn [20]. Kết quả theo dõi hình thái khuẩn lạc nấm mốc và quan sát vi thể các chủng sàng lọc được, bước đầu đã xác định được các chủng BL1, BT3, DL2, DL3, DL6 và MD2 đều thuộc chi *Aspergillus* sp.

Phương pháp kiểm tra hoạt tính enzyme chitosanase nhờ vào vòng thủy phân là một phương pháp đơn giản và phổ biến dùng để đánh giá sơ bộ hoạt tính chitosanase của nấm mốc trong bước đầu phân lập. Để có được kết quả chính xác và chọn được chủng nấm sinh tổng hợp chitosanase cao thì 6 chủng nấm mốc sẽ được nuôi cấy trên môi trường bán rắn và thu dịch enzyme thô để xác định hoạt tính.

3.3.1. Kết quả sàng lọc cấp hai các chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitosanase cao

Sau khi tiến hành nuôi cấy 6 chủng nấm mốc trên môi trường MT3 có bổ sung chitosan 0,5 (v/w), có độ ẩm 60%. Sau 96 giờ tiếp tục thu dịch enzyme thô và xác định hoạt tính enzyme bằng phương pháp DNS. Kết quả được trình bày ở Bảng 3 cho thấy, các chủng có hoạt tính chitosanase dao động 0,08-1,17 UI/mL. Trong đó, chủng BT3 có khả năng sinh tổng hợp chitosanase tốt nhất so với các chủng khác. Hoạt tính của chủng này sau 96 giờ nuôi cấy là 1,17 UI/mL, cho thấy tiềm năng tốt cho việc sản xuất enzyme chitosanase. Sau đó là chủng DL2 có hoạt tính 0,32 UI/mL và chủng BL1 có hoạt tính thấp nhất là 0,08 UI/mL.

Nghiên cứu của Nguyen *et al.* (2014) đã phân lập được 34 chủng nấm từ đất ở tỉnh Đắk Lắk vùng Tây Nguyên của Việt Nam, sàng lọc được 5 chủng sinh enzyme chitosanase có hoạt tính cao. Chủng D4 mạnh nhất đã được chọn để tối ưu hóa các quá trình và thông số môi trường. Dựa trên hình thái học, chủng D4 đã được xác định sơ bộ thuộc loài *Penicillium*. Bằng giải trình tự gen rRNA 18S xác định D4 là *Penicillium janthinellum*, D4 được nuôi cấy trên môi trường bán rắn thu nhận được enzyme chitosanase có hoạt tính 2,2 mUI/g [21]. Tác giả Ngô Xuân Mạnh và cs (2009) đã lựa chọn được 4 chủng xạ khuẩn (*Streptomyces griceus*) có khả năng sinh tổng hợp chitosanase, chủng NN2 có khả năng sinh tổng hợp chitosanase cao nhất đã được lựa chọn nuôi cấy trên môi trường M0, thu được enzyme chitosanase có hoạt tính là 0,371 UI/mL [19]. Tác giả Silva và cs (2012) đã tiến hành tối ưu môi trường bán rắn nuôi cấy chủng *Trichoderma koningii* sp. có khả năng sinh chitosanase hoạt tính là 4,84 UI/g tương ứng 1,08 UI/mL [15]. Theo nghiên cứu của Zhang *et al.* (2000) đã thu nhận và tinh sạch chitosanase từ *Aspergillus oryzae* IAM 2660 cho thấy hoạt tính dung dịch enzyme thô thu được là 0,05 UI/mL [8]. Do đó các chủng nấm mốc mà nghiên cứu đã phân lập được cho thấy có tiềm năng ứng dụng để nuôi cấy thu nhận enzyme chitosanase.

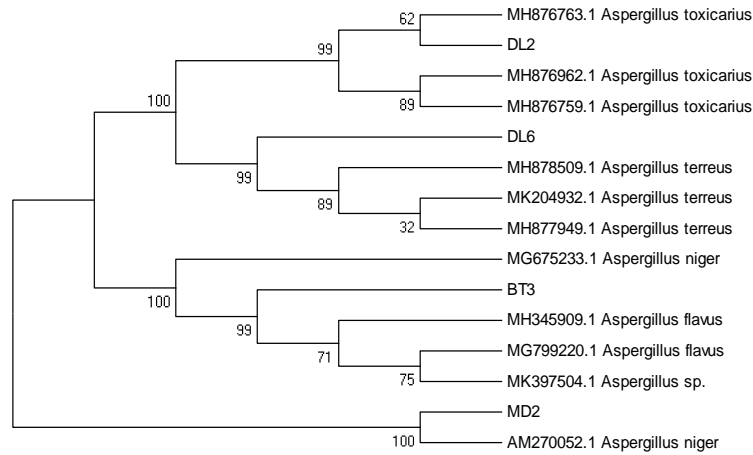
Bảng 3. Hoạt tính chitosanase của các chủng nấm mốc trong môi trường MT3

STT	Ký hiệu giống	Hoạt tính chitosane (UI/mL)
1	BL1	0,08 ^e ± 0,01
2	BT3	1,17 ^a ± 0,02
3	DL2	0,32 ^b ± 0,02
4	DL3	0,15 ^d ± 0,01
5	DL6	0,24 ^c ± 0,02
6	MD2	0,25 ^c ± 0,01

(^{abcde}) là giá trị trung bình cột sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai khác về mặt thống kê (p<0,05))

3.3.2. Kết quả định danh chủng nấm mốc

Từ kết quả sàng lọc sơ cấp và tuyển chọn cho thấy 4 chủng BT3, DL2, DL6, MD2 có hoạt tính tốt hơn so với các chủng còn lại. 4 chủng nấm được chọn gửi đi định danh bằng phương pháp xác định trình tự gen vùng ITS tại công ty Phù Sa. Trình tự một phần đoạn ITS1-5 và 8S-ITS2 của 4 chủng nấm có kích thước từ 555 bp tới 578 bp tương đồng từ 99,65-100% so với trình tự tham chiếu trên ngân hàng GenBank (National Center for Biotechnology Information).



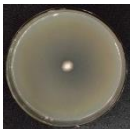





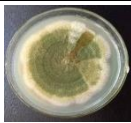
Hình 4. Cây phả hệ biểu diễn mối liên hệ giữa 4 chủng chọn lọc và các loài dựa vào trình tự ITS (Trình tự tham chiếu thu nhận trên cơ sở dữ liệu của GenBank)

Cụ thể, chủng BT3 tương đồng 100% với *Aspergillus flavus* ID MG799220.1; chủng DL2 có sự tương đồng 100% so với *Aspergillus toxicarius* ID MH876763.1; DL6 có sự tương đồng 99,65% với *Aspergillus terreus* ID MK204932.1; MD2 tương đồng 99,89% với *Aspergillus niger* ID MG675233.1. Kết hợp với các quan sát về hình thái và phân tích trình tự gen ITS, 4 chủng nấm đã được định danh BT3, DL2, DL6, MD2 tương ứng là *Aspergillus flavus*, *Aspergillus toxicarius*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* thuộc cùng chi *Aspergillus*. Mối quan hệ phát sinh chủng loại của 4 chủng nấm nghiên cứu với một số đại diện được trình bày ở Hình 4. Cây phát sinh chủng loại của 4 loại nấm cho thấy cùng ngành nấm túi (Ascomycotina)

Trong 4 chủng được định danh có chủng DL2 là *Aspergillus toxicarius* được tìm hiểu thấy có ít nhất các nghiên cứu liên quan được công bố. *Aspergillus toxicarius* lần đầu tiên được phát hiện vào năm 1966 thuộc nhóm có khả năng sinh độc tố aflatoxins cao [22]. Để có định hướng mới cho các nghiên cứu tiếp theo, *Aspergillus toxicarius* được nghiên cứu kỹ hơn và được mô tả hình thái khuẩn lạc trong 7 ngày nuôi cấy. Kết quả quan sát được thể hiện trong Bảng 4.

Chủng nấm mốc *Aspergillus toxicarius* được nuôi cấy trên đĩa petri có môi trường PGA, hình thái khuẩn lạc có viền trắng, bề mặt nhẵn, hệ sợi nấm dày bông lên, trên bề mặt không có giọt tiết và không tiết sắc tố ra môi trường, màu sắc và đường kính khuẩn lạc thay đổi trong quá trình sinh trưởng và phát triển, từ xanh nhạt tới xanh đậm với một vài vùng đốm nâu, đường kính 1,0-7,5 cm trong thời gian ủ từ 1-7 ngày.

Bảng 4. Hình thái khuẩn lạc DL2 quan sát trong 7 ngày nuôi cấy

Ngày	1	2	3	4
Hình thái				
Đường kính (cm)	1,0	2,5	3,6	4,6
Mô tả đặc điểm	Hệ sợi trắng, vành ngoài trắng, trên bề mặt không có giọt tiết và không tiết sắc tố ra môi trường	Hệ sợi trắng, xuất hiện bào tử xanh nhạt, viền ngoài trắng, có khía, trên bề mặt không có giọt tiết và không tiết sắc tố ra môi trường	Hệ sợi trắng, bào tử xanh đậm, viền ngoài trắng, có khía, trên bề mặt không có giọt tiết và không tiết sắc tố ra môi trường, đường kính khuẩn lạc	
Ngày	5	6	7	
Hình thái				
Đường kính (cm)	5,4	6,8	7,5	
Mô tả đặc điểm	Hệ sợi trắng, trên bề mặt không có giọt tiết và không tiết sắc tố ra môi trường, từ tâm ra ngoài bào tử xanh đậm chuyển sang xanh nhạt, viền ngoài trắng	Hệ sợi trắng mọc dày bông lên, trên bề mặt không có giọt tiết và không tiết sắc tố ra môi trường. Khuẩn lạc nhẵn, có màu xanh nhạt trên bề mặt đĩa petri và xanh đậm ở mặt sau. Bào tử ban đầu màu xanh sau chuyển sang màu nâu. Đường kính khuẩn lạc từ 6-7 cm, cao nhất là 8 cm trong thời gian ủ khoảng 1 tuần ở 30 °C [22].		

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã lấy 5 mẫu đất ở các điểm khác nhau ở vùng Nam Bộ phân lập được 18 chủng nấm mốc. Từ những cá thể phân lập đã chọn được các chủng có triển vọng ở bước 1 và bước 2 lần lượt là 6 và 4 chủng thuộc loài *Aspergillus* có hoạt tính chitosanase trong môi trường bán rắn có bổ sung chitosan. Hoạt tính cao nhất của chủng có triển vọng là 1,17 UI/mL. Các điều kiện nuôi cấy nấm mốc sẽ được tiến hành tối ưu ở những nghiên cứu tiếp theo nhằm thu nhận được enzyme chitosanase ứng dụng thủy phân thu nhận glucosamin có hoạt tính sinh học.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này do Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 56/HĐ-DCT. Trân trọng cảm ơn Khoa Công nghệ Sinh học đã tạo điều kiện và các bạn sinh viên làm đồ án chuyên ngành CNSH 06DHSB đã giúp đỡ nhóm tác giả hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Thadathil N., Velappan S.P. - Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: a review, *Food Chemistry* **150** (2014) 392-399.
2. Nidheesh T., Pal G.K., Suresh P.V. - Chitooligomers preparation by chitosanase produced under solid state fermentation using shrimp by-products as substrate, *Carbohydrate Polymers* **121** (2015) 1-9.

3. Yan Wang, Peigen Zhou, Jianxing Yu, Xiaorong Pan, Pingping Wang, Weiqing Lan, Tao S. - Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by chitosanase from *Pseudomonas* CUY8, Original Article **16** (1) (2007) 174-177.
4. Sing P.S., Vidyasagar G.M. - Isolation, purification and optimization of chitosanase production from a common mahabubnagar agricultural field fungi *Aspergillus fumigatus* of telangana state, World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences **6** (9) (2017) 886-898.
5. Zhou W., Yuan H., Wang J., Yao J. - Production, purification and characterization of chitosanase produced by *Gongronella* sp. JG, Original Article **46** (2007) 49-54.
6. Lê Thanh Hà, Nguyễn Thị Tuyết Mai, Lê Quân Hà - Xác định điều kiện thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp enzym chitosanaza từ *Penicillium oxalicum* BKH2, Tạp chí khoa học và công nghệ các trường đại học kỹ thuật **71** (2009) 74-77.
7. Jia Zeng, Zheng L.-Y. - Studies on *Penicillium* sp. ZDZ1 chitosanase immobilized on chitin by cross-linking reaction, Process Biochemistry **38** (2002) 531-535.
8. Zhang X.-Y., Dai A.-L., Zhang X.-K. Kuroiwa K., Kodaira R., Shimosaka M., Okazaki M. - Purification and characterization of chitosanase and exo- β -D-glucosaminidase from a Koji mold, *Aspergillus oryzae* IAM2660, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **64** (9) (2000) 1896-1902.
9. Shimosaka M., Nogawa M., Ohno Y., Okazaki M. - Chitosanase from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli - purification and some properties, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry **57** (2) (1993) 231-235.
10. Đào Thị Mỹ Linh, Trần Thị Mỹ Thảo, Lý Thị Diễm Trang, Lê Thị Mỹ Trinh - Khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme lipase từ các chủng nấm mốc phân lập trong môi trường giàu lipid, Tạp chí khoa học và công nghệ Thực phẩm **16** (1) (2018) 67-78.
11. Niyonaima N.F., More S.S. - Screening and optimization of cultural parameters for an alkaline protease production by *Aspergillus terreus* Gr. under submerged fermentation, International Journal of Pharma and Bio Sciences (2013) 1016-1028.
12. Mai Thị Hằng, Đinh Thị Kim Nhung, Vương Trọng Hào - Thực hành vi sinh vật học, Nhà xuất bản Đại học Sư phạm (2011) 26-56.
13. Nguyễn Thị Minh Hằng, Nguyễn Minh Thư - Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh tổng hợp amylase và bacteriocin, Tạp chí Khoa học Công nghệ lâm nghiệp **3** (2013) 3-10.
14. Nguyễn Thị Hà - Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chủng *Penicillium citrinum* sinh tổng hợp enzyme chitinase được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ, Tạp chí Khoa Học trường Đại Học Cần Thơ **30** (2013) 32-39.
15. da Silva L.C.A., Honorato T.L., Franco T.T., Rodrigues S. - Optimization of chitosanase production by *Trichoderma koningii* sp. under solid-state fermentation, Food and Bioprocess Technology **5** (5) (2012) 1564-1572.
16. Bùi Xuân Đồng và Nguyễn Văn Huy - Vi nấm dùng trong Công nghệ Sinh học, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật (2000) 11-40.
17. Felsenstein Job. - Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, Evolution **39** (1985) 783-791.
18. Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết, Lê Thị Thủy Tiên, Tạ Thu Hằng, Huỳnh Ngọc Oanh, Nguyễn Thúy Hương, Phan Thanh Huyền - Công nghệ enzyme, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh (2010) 301-303.

19. Ngô Xuân Mạnh, Nguyễn Thị Phương Nhung - Lựa chọn điều kiện tối ưu để sản xuất chitosanase từ *Streptomyces griceus* (chủng NN2), Tạp chí Khoa học và phát triển **7** (6) (2009) 780-787.
20. Nguyễn Văn Thành - Giáo trình môn nấm học, Viện Công nghệ sinh học - Đại học Cần Thơ (2009) 11-12.
21. Nguyen A.D., Liang W.T., Huang C.C., Nguyen V.B., Pan P.S., Wang S.L. - Production and purification of a fungal chitosanase and chitooligomers from *Penicillium janthinellum* D4 and discovery of the enzyme activators, Carbohydrate Polymers (2014) 331-337.
22. Murakami H. - Classification of the koji mold, The Journal of General and Applied Microbiology **17** (4) (1971) 281-309.

ABSTRACT

SCREENING CHITOSANASE-PRODUCING FUNGI FROM SOIL SAMPLES IN SOUTHERN VIETNAM

Dao Thi My Linh*, Nguyen Thi Quynh Mai,
Pham Thi Phuong Thuy, Ho Thi Mai, Pham Thị Kim Ngân
Ho Chi Minh City University of Food Industry
*Email: linhdtm@hufi.edu.vn

This study aimed to isolate fungal strains capable of producing chitosanase with high activity. From 18 isolates obtained from different sources, only 6 isolates were selected based on the size of the chitosan hydrolysis zone (7,67-20 mm). Among these, 4 strains with highest chitosanase activity (0,08-1,17 UI/mL) were analyzed by the ITS sequence. The identified strains were confirmed to be *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Aspergillus toxicarius*. Those are considered potential producers of chitosanase and would be subjected to further investigation of optimum culture conditions for maximal chitosanase activity production.

Keywords: Fungal strains, chitosanase, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus toxicarius*.