

## NGHIÊN CỨU CÁC ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐỂ THU NHẬN CHẾ PHẨM ENZYME CHITINASE THÔ TỪ CHỦNG *TRICHODERMA* SP.

PHẠM THỊ LỊCH\*, TRẦN THANH THỦY\*\*

### TÓM TẮT

Vi nấm *Trichoderma* là một tác nhân kiểm soát sinh học có hiệu quả nhờ khả năng đối kháng với các vi nấm gây hại cây trồng bằng nhiều cơ chế. Trong đó, cơ chế tiết các enzyme ngoại bào của chúng có vai trò rất quan trọng, đặc biệt là hệ enzyme chitinase. Đây là hệ enzyme thủy phân có khả năng phân hủy chitin – thành phần cấu tạo của vách tế bào các loài vi nấm gây hại cây trồng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy để thu nhận chitinase có hoạt tính cao từ chủng *Trichoderma* sp., làm cơ sở cho việc tạo chế phẩm chitinase ứng dụng trong phòng trừ bệnh hại cây trồng.

**Từ khóa:** *Trichoderma*, chitinase, chitin, điều kiện nuôi cấy.

### ABSTRACT

**A research on the transplanting conditions for the production of antifungalchitinase enzyme from *Trichoderma* sp.**

*Trichoderma* species are efficient bio-control factors due to their resistance to pathogenic fungi on plants in various mechanisms. One of these is the production of a large variety of cell-wall degrading enzymes, especially chitinase enzymes. This kind of enzyme has a highly chitinolytic ability of breaking down the chitin that is responsible for rigidity on cell wall of several plant pathogens. In this study, we maximized the transplanting conditions for highly active chitinase from *Trichoderma* sp., which serves as a base for creating chitinase productions applied in protecting plants from diseases .

**Keywords:** *Trichoderma*, chitinase, chitin, culture conditions.

### 1. Mở đầu

Chitinase là enzyme phân hủy chitin, vốn là một thành phần trong vách tế bào nấm. Trong tự nhiên, có nhiều loài vi khuẩn, nấm có khả năng tiết chitinase, trong đó đáng chú ý có *Trichoderma*, là loài nấm đối kháng hiện đang được quan tâm trong lĩnh vực sản xuất nông nghiệp [6]. Do *Trichoderma* có khả năng tiêu diệt vi nấm gây hại cây trồng bằng nhiều cơ chế như kí sinh, sinh kháng sinh, tiết các enzyme ngoại bào,... Hệ enzyme ngoại bào của *Trichoderma* đóng vai trò rất quan trọng trong đấu tranh sinh học, đặc biệt là enzyme chitinase. [9]

\* HVCH, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

\*\* TS, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

Chitinase của *Trichoderma* sẽ phân hủy vách tế bào chủ của các loài nấm gây hại, vì chitin cũng là một trong những thành phần cấu tạo chính của vách tế bào vi nấm gây bệnh trên cây trồng [9]. Vì vậy, mà những năm gần đây đã có nhiều công trình nghiên cứu chiết tách enzyme chitinase từ các chủng *Trichoderma*.

Năm 2003, các tác giả Nguyễn Thị Hồng Thương, Đinh Minh Hiệp, Đồng Thị Thanh Thu [4] có công trình nghiên cứu khảo sát một số yếu tố tác động lên quá trình sinh tổng hợp hệ enzyme chitinase của các chủng nấm mốc *Trichoderma*.

Năm 2010, tác giả Lê Thị Huệ đã khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase của một số chủng nấm sợi thuộc giống *Aspergillus*, *Trichoderma*. Và bước đầu thu chế phẩm enzyme chitinase thô từ *Aspergillus* để phòng trừ sâu tơ và sản xuất glucosamine. [4]

Năm 2012, tác giả Đinh Minh Hiệp đã nghiên cứu chitinase và  $\beta$ -glucanase từ *Trichoderma* spp. và khả năng kiểm soát sinh học đối với một số nấm gây bệnh. [3]

Việc nghiên cứu để tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy nhằm thu nhận chế phẩm chitinase từ các chủng *Trichoderma* ứng dụng trong phòng trừ bệnh hại cây trồng là một việc làm rất cần thiết vì lợi ích của sức khỏe con người cũng như môi trường. Đây cũng chính là nội dung được chúng tôi giới thiệu trong công trình nghiên cứu này.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu: 10/12/2012 – 05/4/2013.

Địa điểm: Phòng Vi sinh – Sinh hóa, Trường Đại học Sư phạm TPHCM.

### 2.1. Vật liệu

#### Các giống vi sinh vật (VSV) đã sử dụng

Chủng *Trichoderma* spp. nhận từ Viện Sinh học Nhiệt đới và Phòng Thí nghiệm Vi sinh – Sinh hóa, Trường Đại học Sư phạm TPHCM.

#### Các môi trường (MT) nghiên cứu đã sử dụng

**MT1 (YEA):** Cao nấm men 4g; glucose 20g; agar 20g; nước cất 1000ml. [1]

**MT2:** NaNO<sub>3</sub> 3,5g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5g; KCl 0,5g; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,01g (vết); chitin 10g; agar 20g; nước cất 1000ml. [1]

**MT3:** Trấu 50g; cám 40g; MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,2g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g; KCl 0,2g; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1,0g; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,002g; MnSO<sub>4</sub> 0,002g; bột chitin 10g; pH = 5 – 6, nước cất 50 - 60%. [7]

**MT4:** Trấu 50g; cám 40g; pepton 1g; urea 0,3g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2g; CaCl<sub>2</sub> 0,3g; Tween 80 1,2g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4g; MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,3g; bột chitin 10g; pH = 5 – 6; nước cất 50 - 60%. [10]

**MT5:** Trấu 50g; cám 40g; pepton 0,5g, cao nấm men 0,5g; glucose 1,0g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,7g; MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,5g; FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,5g; ZnSO<sub>4</sub> 0,001g; bột chitin 10g; pH = 5 – 6; nước cất 50 - 60%. [8]

**2.2. Các phương pháp nghiên cứu đã sử dụng**

Sau khi tuyển chọn chủng *Trichoderma* sp. có khả năng tổng hợp enzyme chitinase hoạt độ cao; chúng tôi tiến hành khảo sát các điều kiện nuôi cấy và bước đầu tạo chế phẩm enzyme chitinase thô theo các phương pháp như sau:

- Xác định hoạt tính enzyme ngoại bào của nấm sợi (NS) bằng phương pháp khuếch tán trên MT thạch. [1]
- Nuôi cấy NS thu nhận chitinase trên MT bán rắn. [5]
- Tách chiết và thu nhận CPE chitinase thô từ MT nuôi cấy NS. [5]
- Khảo sát ảnh hưởng của tác nhân tủa đến hoạt độ chitinase của CPE. [5]
- Thẩm tích CPE qua màng cellophane. [5]
- Xác định hàm lượng glucosamine bằng phương pháp so màu với thuốc thử DNS (3,5-dinitrobenzoic acid). [11]
- Xác định hoạt độ enzyme chitinase theo phương pháp Elson- Morgan. [11]

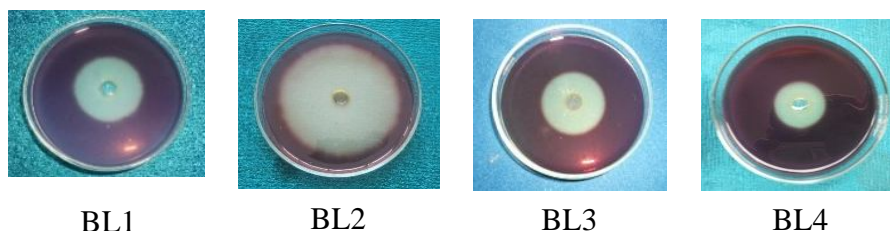
**3. Kết quả và biện luận**

**3.1. Kết quả tuyển chọn chủng *Trichoderma* có hoạt độ chitinase cao**

Chúng tôi tiến hành khảo sát sơ bộ khả năng tổng hợp enzyme chitinase của 4 chủng *Trichoderma* spp. bằng cách xác định đường kính vòng phân giải. Kết quả trình bày trong Bảng 1 và minh họa ở Hình 1.

*Bảng 1. Đường kính vòng phân giải chitin của 4 chủng *Trichoderma**

Kí hiệu các chủng <i>Trichoderma</i>	BL1	BL2	BL3	BL4
Đường kính vòng phân giải chitin, D-d (cm)	4,9±0,24	<b>6,1±0,31</b>	3,4±0,20	2,5±0,17



**Hình 1. Khả năng phân giải chitin của 4 chủng *Trichoderma***

Kết quả trên cho thấy, tất các chủng *Trichoderma* đều có khả năng tổng hợp enzyme chitinase phân giải chitin. Trong đó, enzyme chitinase của chủng BL4 có khả năng phân giải chitin yếu nhất; enzyme chitinase của 3 chủng BL1, BL2, BL3 có khả năng phân giải chitin rất mạnh; mạnh nhất là chủng BL2. Vì vậy, chúng tôi quyết định chọn chủng *Trichoderma* BL2 để tiếp tục nghiên cứu.



Hình 2. Hình thái đại thể chủng BL2



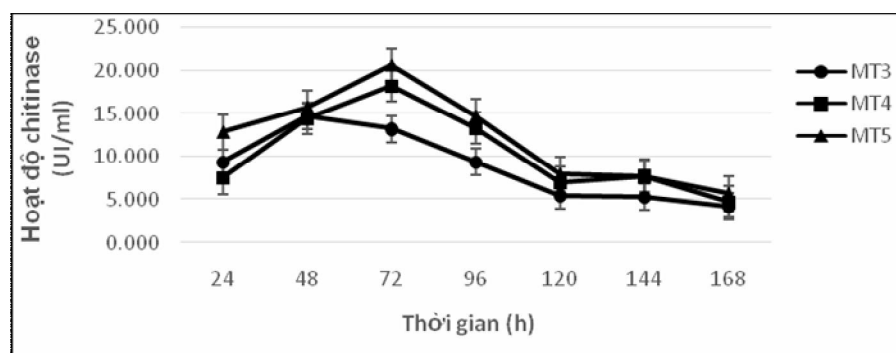
Hình 3. Hình thái vi thể chủng BL2

### 3.2. Ảnh hưởng của MT và các điều kiện nuôi cấy đến hoạt độ chitinase của chủng *Trichoderma* BL2

Các điều kiện nuôi cấy như thành phần MT, nhiệt độ, pH, độ ẩm,... có ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng, tạo bào tử cũng như khả năng tạo enzyme của NS. Do đó, việc nghiên cứu tìm ra điều kiện nuôi cấy thích hợp thu chitinase là điều cần thiết.

#### 3.2.1. Ảnh hưởng của MT lên men bán rắn

Để chọn MT thích hợp cho chủng *Trichoderma* BL2 sinh tổng hợp chitinase, chúng tôi tiến hành xác định hoạt độ chitinase của chủng NS nghiên cứu trên MT3, MT4 và MT5 trong 168h. Sau 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168h nuôi cấy tiến hành xác định hoạt độ chitinase. Kết quả được trình bày trong Hình 4.



Hình 4. Đồ thị ảnh hưởng của thành phần MT bán rắn đến hoạt độ chitinase chủng *Trichoderma* BL2 theo thời gian

Kết quả trên cho thấy:

Ở MT3, hoạt tính chitinase tăng nhanh ở giai đoạn đầu nuôi cấy, và đạt cao nhất ở 48h nuôi cấy; sau đó hoạt tính chitinase đã bắt đầu giảm dần đến 168h sau đó. Sự gia tăng hoạt tính chitinase ở giai đoạn đầu nuôi cấy chứng tỏ ở giai đoạn này tế bào vi nấm *Trichoderma* đã tổng hợp chitinase để phân giải chitin, nguồn carbon duy nhất trong MT nuôi cấy, tạo ra các sản phẩm trao đổi phục vụ cho quá trình đồng hóa nhờ đó tăng cường khả năng trao đổi chất giữa tế bào và MT. Sau 48h, lượng sinh khối *Trichoderma* trong MT đã tăng cao thúc đẩy mạnh quá trình tổng hợp chitinase để phân giải nguồn chitin trong MT. Sau khi hệ enzyme chitinase hoạt động ở mức cao sẽ có xu

hướng giảm do MT không còn chitin, tế bào NS lúc này đã chuyển sang pha sinh trưởng chậm dần.

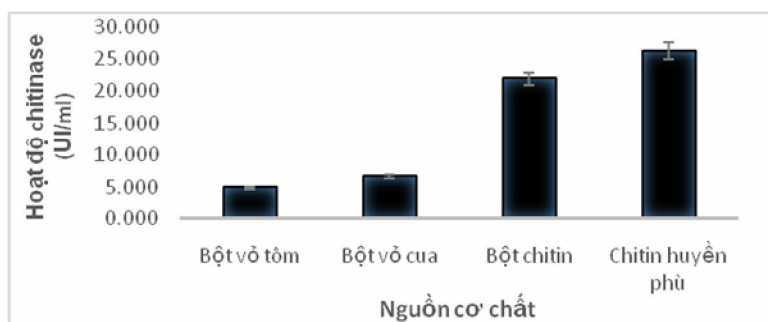
Ở MT4, hoạt tính chitinase cũng có sự thay đổi rõ rệt theo thời gian nuôi cấy. Sau 48h nuôi cấy, hoạt tính chitinase đã tăng mạnh. Điều này chứng tỏ pepton có trong MT là nguồn dinh dưỡng dễ hấp thu, vì thế mà chủng *Trichoderma* BL2 đã sử dụng pepton để gia tăng sinh khối trong thời gian ngắn. Khi lượng sinh khối tăng cao, đồng thời với sự cạn kiệt pepton trong MT đã đẩy nhanh sự tổng hợp enzyme chitinase để phân giải chitin thành các sản phẩm đơn giản phục vụ cho sự tăng trưởng. Vì vậy, mà ở thời điểm 72h nuôi cấy, hoạt tính chitinase đạt cao nhất, và sau đó đã giảm dần khi nguồn chitin trong MT bắt đầu giảm.

Ở MT5, hoạt tính chitinase cũng thay đổi rõ rệt theo thời gian nuôi cấy. Tăng mạnh chỉ sau 24h nuôi cấy và đạt cực đại ở 72h, đến 96h hoạt tính giảm dần. Điều này chứng tỏ, trong thời gian đầu chủng NS nghiên cứu đã đồng hóa mạnh các nguồn cacbon và nitơ dễ hấp thu để gia tăng sinh khối. Sau 48h lượng sinh khối trong MT đã tăng rất nhiều, mà nguồn dinh dưỡng dễ hấp thu đã cạn kiệt, vì vậy thúc đẩy chủng *Trichoderma* BL2 tiếp tục tổng hợp chitinase để phân giải nguồn chitin có trong MT và sau 72h nuôi cấy hoạt độ chitinase được ghi nhận là cao nhất. Sau đó, khi nguồn chitin trong MT đã bị phân cắt hết đồng thời khi các sản phẩm cuối như N-acetyl-D glucosamine có nhiều trong MT đã gây ức chế ngược lại quá trình sinh tổng hợp chitinase nên hoạt tính chitinase có xu hướng giảm.

So sánh hiệu quả tổng hợp và hoạt độ chitinase của chủng *Trichoderma* BL2 trên cả 3 MT chúng tôi nhận thấy MT nuôi cấy đã ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt độ chitinase. Mặc dù, thời gian để chủng NS nghiên cứu tổng hợp chitinase nhiều và hoạt độ cao ở MT3 là nhanh nhất, nhưng hoạt độ lại không cao, nên chúng tôi không chọn MT3 làm MT nuôi cấy tiếp theo. MT4 và 5 đều là những MT giàu dinh dưỡng, không chỉ thuận lợi cho sự tăng trưởng sinh khối của *Trichoderma* mà còn tạo điều kiện cho chủng này sinh tổng hợp các loại enzyme thủy phân để sử dụng nguồn dinh dưỡng MT, trong đó có chitinase. So sánh sự biến thiên hoạt độ chitinase ở MT4 và 5, chúng tôi nhận thấy tốc độ và thời gian gia tăng hoạt tính chitinase ở 2 MT tương đối giống nhau; nhưng ở MT5 giá trị hoạt độ chitinase đạt cao hơn. Vì thế, chúng tôi quyết định chọn MT5 và thời gian ban đầu để thu nhận enzyme chitinase là 72h cho các thí nghiệm (TN) sau.

### 3.2.2. Ảnh hưởng của cơ chất cảm ứng

Nuôi chủng *Trichoderma* BL2 trên MT5, trong đó sử dụng cơ chất cảm ứng lần lượt thay đổi là bột vỏ tôm, bột vỏ cua, bột chitin, chitin huyền phù 1%. Sau 3 ngày thu dịch enzyme thô, tiến hành xác định hoạt độ enzyme chitinase, kết quả được thể hiện ở Hình 5.



**Hình 5.** Biểu đồ ảnh hưởng của nguồn cơ chất cảm ứng đến hoạt độ chitinase của chủng *NS* nghiên cứu

Kết quả biểu đồ cho thấy:

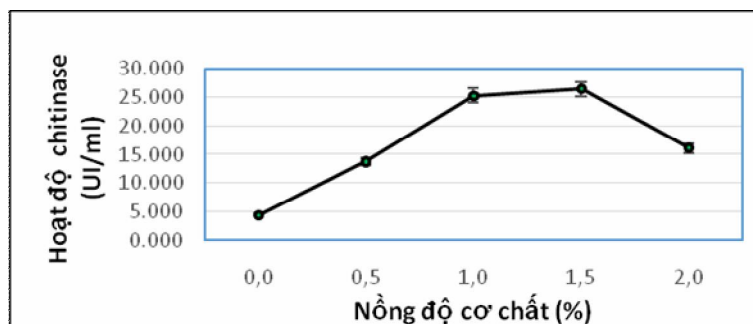
Đối với cơ chất cảm ứng là bột vỏ tôm, bột vỏ cua thì hoạt độ chitinase của chủng nghiên cứu rất thấp. Nguyên nhân là do bột vỏ tôm, bột vỏ cua là nguồn cơ chất rất khó phân giải, bởi thành phần cấu tạo của chúng ngoài chitin, còn có rất nhiều tạp chất và khoáng chất khác như  $\text{CaCO}_3$ , protein, lipid, chất hữu cơ... nên enzyme chitinase do *Trichoderma* BL2 tổng hợp trong MT không thể phân giải hoàn toàn để tạo sản phẩm cuối cùng là N-acetyl-D glucosamine được.

Đối với cơ chất cảm ứng là bột chitin, hoặc chitin huyền phù thì hoạt độ enzyme chitinase cao hơn đáng kể. Bởi trong thành phần chitin đã được loại bỏ các tạp chất khó thủy phân, trong cấu trúc chitin chủ yếu chỉ còn các liên kết hydro, không còn ở dạng phức hợp liên kết với các chất khác như ở bột vỏ tôm, cua thô nữa. Tuy nhiên, khi sử dụng cơ chất chitin ở dạng huyền phù thì hoạt độ chitinase đạt giá trị cực đại. Điều này chứng tỏ chitin là một cấu trúc khá bền vững, rất khó tan trong nước, trong dung dịch acid hay kiềm loãng. Do đó, khi tạo dạng chitin huyền phù bằng acid HCl đậm đặc đã phá vỡ một phần các liên kết trong mạch chitin. Nhờ đó mà enzyme chitinase dễ dàng thực hiện các phản ứng phân cắt.

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Ulhoa C. J (1991) [12] khi xác định chitin huyền phù là nguồn cơ chất thích hợp để *Trichoderma* sinh tổng hợp chitinase có hoạt độ cao và cũng thống nhất với kết luận của El-Katatny et al. (2001) khi chọn chitin huyền phù làm cơ chất để thu chitinase từ chủng *T. harzianum*. Do đó, chúng tôi chọn chitin huyền phù làm nguồn cơ chất cảm ứng cho các TN tiếp theo.

### 3.2.3. Khảo sát ảnh hưởng nồng độ chất cảm ứng

Tiến hành nuôi chủng *Tri.* BL2 trên MT5 thay đổi nồng độ chitin huyền phù từ 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0%. Sau 3 ngày nuôi cấy, tiến hành xác định hoạt độ chitinase. Kết quả được minh họa ở Hình 6.



**Hình 6.** Đồ thị ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến hoạt độ chitinase *Trichoderma BL2*

Kết quả cho thấy, khi không có hoặc bổ sung 0,5% chitin huyền phù vào MT thì hoạt độ chitinase rất thấp. Điều này chứng tỏ, khi không có hoặc nồng độ quá thấp thì lượng cơ chất này không đủ để *Trichoderma BL2* vừa tăng sinh khối vừa tổng hợp enzyme. Khi tăng nồng độ cơ chất vào MT thì hoạt tính chitinase đã tăng lên rõ rệt. Tuy nhiên, ở nồng độ 2%, hoạt độ chitinase đã giảm mạnh, điều này cho thấy nếu tăng lượng cơ chất vào MT quá cao, thì pha tăng trưởng của NS sẽ có thể kéo dài hơn, sản phẩm cuối và thứ cấp sẽ tích tụ nhiều hơn gây ức chế sự tổng hợp chitinase. Trong khi đó, nồng độ chitin huyền phù từ 1,0% đến 1,5% là khoảng thích hợp cho enzyme chitinase với hoạt độ cao.

Tác giả Lê Thị Huệ (2010) [4], khi nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp chitinase của *Aspergillus* và *Trichoderma* đã kết luận ở nồng độ chitin trong khoảng 1,0 – 1,5% hoạt độ chitinase đạt mức cao, và thích hợp nhất là ở nồng độ 1,0%. Tác giả Đinh Minh Hiệp (2013) [3] khi nghiên cứu nồng độ cơ chất cảm ứng bổ sung vào MT nuôi cấy *Trichoderma* để thu chitinase đã kết luận nồng độ chitin huyền phù 1,0% là thích hợp nhất cho quá trình tăng trưởng và sinh tổng hợp enzyme ở *Trichoderma*.

Xem xét những nghiên cứu của các tác giả, và so sánh về giá trị hoạt độ chitinase đạt được ở 2 nồng độ trong TN trên, đồng thời nhằm tiết kiệm nguyên liệu chúng tôi quyết định chọn nồng độ chitin huyền phù 1,0% để tiến hành các TN sau.

#### 3.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

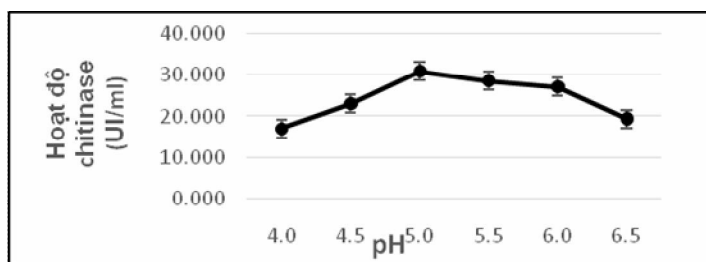
**Bảng 2.** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ chitinase *Trichoderma BL2*

Nhiệt độ (°C)	20	25	30	35	40
<b>Hoạt độ chitinase (UI/ml)</b>	15,841 ± 0,059	25,236 ± 0,076	<b>31,836 ± 0,214</b>	26,054 ± 0,37	14,273 ± 0,284

Kết quả cho thấy chủng *Tri.* BL2 có thể sinh tổng hợp enzyme chitinase hoạt độ khá cao ở tất cả các điều kiện nhiệt độ khảo sát. Trong đó, chủng này sinh enzyme chitinase hoạt độ cao trong khoảng nhiệt độ từ 25 – 35°C, cao nhất ở 30°C. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Lê Thị Huệ [4] về khoảng nhiệt độ tối ưu cho *Trichoderma* tổng hợp chitinase.

3.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường ban đầu:

Kết quả được minh họa ở Hình 7



**Hình 7.** Đồ thị ảnh hưởng pH ban đầu của MT ban đầu đến hoạt độ chitinase

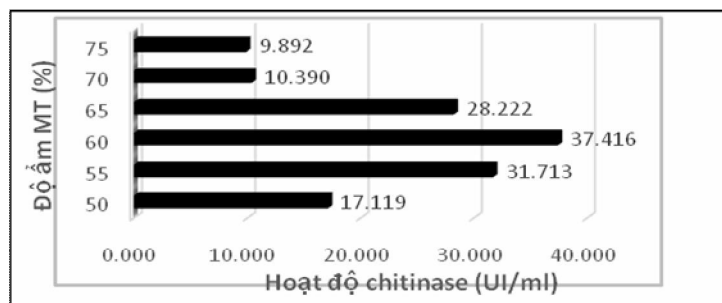
Kết quả cho thấy chủng *Trichoderma* BL2 có khả năng sinh enzyme chitinase rất mạnh ở hầu hết các điều kiện pH khảo sát. Trong đó, chủng này sinh enzyme chitinase hoạt độ cao nhất ở pH 5.

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của các tác giả Tô Duy Khương (2007) [4], Lê Thị Huệ (2010) [4] khi xác định pH của MT ban đầu thích hợp cho *Trichoderma* spp. sinh tổng hợp chitinase hoạt độ cao trong khoảng pH 5 – 6. Kết quả này cũng thống nhất với tác giả Đinh Minh Hiệp (2012) [3] khi nghiên cứu chitinase và  $\beta$ -glucanase từ *Trichoderma* spp. và khả năng kiểm soát sinh học đối với một số nấm gây bệnh, đã xác định pH ban đầu của MT thích hợp cho hoạt độ chitinase cao là 5.0.

3.2.6. Khảo sát ảnh hưởng của độ ẩm

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của độ ẩm MT lên hoạt độ chitinase của chủng *Trichoderma* BL2. Nuôi chủng này trên MT5, cơ chất cảm ứng là chitin huyền phù 1,0% ở nhiệt độ 30°C, pH 5, với độ ẩm MT được thay đổi là 50, 55, 60, 65, 70, 75%. Sau 3 ngày nuôi cấy, tiến hành xác định hoạt độ chitinase. Kết quả được thể hiện trong Hình 8.



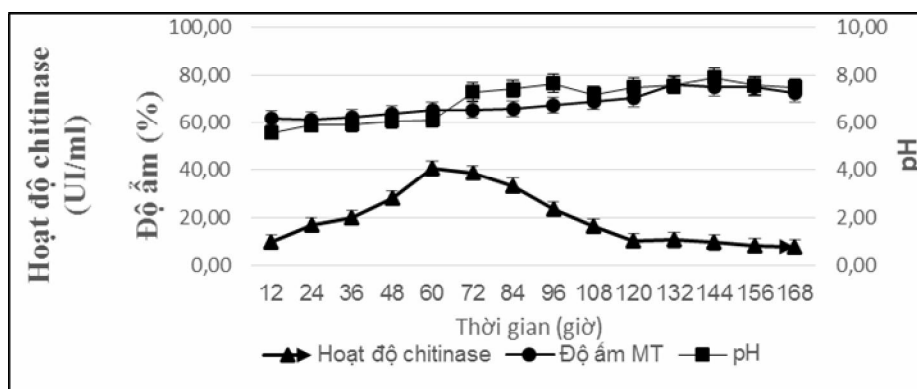


**Hình 8.** Biểu đồ ảnh hưởng của độ ẩm MT ban đầu đến hoạt độ chitinase

Kết quả cho thấy khoảng độ ẩm MT ban đầu thích hợp cho chủng *Tri. BL2* tổng hợp enzyme chitinase hoạt độ cao là 55 – 65%, đạt cao nhất là ở mức 60%. Độ ẩm MT trên 70% thì hoạt độ chitinase giảm mạnh đáng kể. Qua kết quả trên chúng tôi chọn độ ẩm MT nuôi cấy ban đầu là 60% cho các TN sau.

**3.2.7. Động thái quá trình sinh tổng hợp chitinase của *Trichoderma BL2***

Nuôi chủng *Trichoderma BL2* trên MT5, cơ chất cảm ứng là chitin huyền phù 1,0% ở nhiệt độ 30°C, pH 5, độ ẩm MT 60%. Sau 12 giờ thu mẫu 1 lần, để tiến hành xác định độ ẩm MT và pH dịch lên men, sau đó xác định hoạt độ chitinase của chủng này, kết quả được minh họa ở Hình 9.



**Hình 9.** Đồ thị động thái quá trình sinh tổng hợp chitinase của *Trichoderma BL2*

Từ kết quả trên chúng tôi nhận thấy, trong khoảng thời gian đầu, pH môi trường nuôi cấy tăng chậm. Điều này có thể giải thích là do trong thời gian đầu chủng *Trichoderma BL2* bắt đầu sinh trưởng đã tạo ra các sản phẩm trao đổi chất trung gian là acid hữu cơ, nhưng đồng thời cũng bắt đầu sinh tổng hợp các loại enzyme để phân giải nguồn cơ chất là glucose, pepton, cao nấm men để sinh trưởng. Chính sự có mặt của các sản phẩm trao đổi chất này của quá trình phân giải đã làm pH môi trường có xu hướng tăng dần. pH môi trường bắt đầu tăng nhanh từ 6,10 đến 7,29 sau 60h nuôi cấy; sau đó pH môi trường tiếp tục tăng và khá ổn định. Đồng thời, trong suốt quá trình lên men chủng

*Trichoderma* BL2 đã thực hiện các quá trình oxi hóa phân giải cơ chất tạo sản phẩm, và tổng hợp enzyme làm độ ẩm MT ngày càng tăng.

Qua đó, ta có thể thấy pH và độ ẩm của MT nuôi cấy tăng tỉ lệ thuận với sự biến thiên hoạt độ của chitinase. Hoạt độ chitinase của chủng bắt đầu tăng dần từ thời điểm 12h, đến thời điểm 48h nuôi cấy sinh khối NS nghiên cứu đã tăng rất cao, và nguồn dinh dưỡng dễ hấp thu như glucose, pepton... dần cạn kiệt, thúc đẩy sự tổng hợp enzyme chitinase của chủng *Trichoderma* BL2. Khi chitinase được tổng hợp nhiều và tăng cường hoạt động phân cắt chitin, song song đó hoạt độ chitinase đạt giá trị cực đại. Như vậy, sau 60h hoạt độ chitinase đã đạt giá trị cao nhất. Sau 72h hoạt độ enzyme bắt đầu giảm. Kết quả thời gian này thay đổi so với kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến hoạt độ chitinase ban đầu. Nguyên nhân là khi tập trung các điều kiện tối ưu lại thì các yếu tố MT sẽ tác động đồng thời lên chủng *Trichoderma* BL2 làm thời gian thu được chitinase có hoạt độ cao được rút ngắn. Như vậy, để thu nhận chitinase thô từ chủng *Trichoderma* BL2 có thể tiến hành nuôi cấy đến thời điểm 48h – 72h, tốt nhất là 60h trong MT 9 có pH môi trường ban đầu là 5,0 độ ẩm MT ban đầu là 60%.

### 3.3. Chiết tách enzyme và tạo chế phẩm enzyme (CPE) chitinase thô từ chủng *Trichoderma* BL2

#### 3.3.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các tác nhân tủa đến hoạt tính của CPE chitinase

Sau khi nuôi chủng *Trichoderma* BL2 trên MT5 với các điều kiện thích hợp để sinh chitinase cao nhất, tiến hành tủa enzyme với các tác nhân tủa tương ứng. Sử dụng CPE thu được sau khi tủa để xác định hoạt độ chitinase. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của tác nhân tủa lên hoạt tính của CPE chitinase

Tác nhân tủa	Tỉ lệ (TL) enzyme/ tác nhân tủa	Hoạt độ chitinase (UI/gCPE)
<i>Acetone</i>	<b>TL1- 1:2</b>	<b>33,401 ± 0,116</b>
	TL2 - 1:3	27,065 ± 0,146
	TL3 - 1:4	26,964 ± 0,143
<i>Ethanol 96<sup>0</sup></i>	TL1 - 1:2	28,392 ± 0,186
	<b>TL2 - 1:3</b>	<b>60,409 ± 0,186</b>
	TL3 - 1:4	36,905 ± 0,140
<i>Muối (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	TL1 - 60%	36,367 ± 0,227
	<b>TL2 - 70%</b>	<b>66,964 ± 0,124</b>
	TL3 - 80%	48,149 ± 0,140

Kết quả trên cho thấy:

Đối với tác nhân rửa là acetone, hoạt độ chitinase cao nhất khi tỉ lệ giữa dịch chiết enzyme và dung môi là 1:2.

Đối với tác nhân rửa là ethanol, hoạt độ chitinase cao nhất khi tỉ lệ giữa dịch chiết enzyme và dung môi là 1:3.

So sánh giữa 2 tác nhân rửa là dung môi thì hoạt độ chitinase của CPE rửa bằng ethanol 96<sup>o</sup> cao hơn so với tác nhân acetone.

CPE khi rửa bằng muối (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> có hoạt độ khá cao ở hầu hết các tỉ lệ % độ bão hòa. Hoạt độ chitinase của CPE cao nhất (66,964 UI/gCPE) ở tỉ lệ độ bão hòa là 70%.

So sánh 3 tác nhân rửa, thì CPE thu được khi rửa bằng muối (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> có hoạt độ cao hơn. Tuy nhiên, trước khi chọn tác nhân rửa chính chúng tôi đã tiến hành khảo sát hiệu suất thu hồi CPE bằng phương pháp thẩm tích enzyme qua màng cellophane. Cho dung dịch enzyme vào cellophane, sau đó đặt cả túi vào nước cất hoặc dung dịch đệm pha loãng. Màng cellophane là màng bán thấm, có kích thước lỗ cho các chất có phân tử nhỏ xuyên và đi qua vào các dung dịch đệm loãng theo định luật khuếch tán. Còn lại trong màng là enzyme – protein có phân tử lớn. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

**Bảng 4. Hiệu suất thu nhận CPE tương ứng các tác nhân rửa**

Tác nhân rửa	Khối lượng CPE trung bình thu được sau khi rửa (g)	
Aceton	0,24 g/100ml	
Ethanol 96 <sup>o</sup>	<b>0,59 g/100ml</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Trước thẩm tích	Sau thẩm tích
	5,54 g/100ml	<b>0,35 g/100ml</b>

Từ kết quả Bảng 4, chúng tôi quyết định chọn tác nhân rửa để thu hồi CPE là dung môi ethanol, dù hoạt độ CPE rửa bằng ethanol không cao bằng muối nhưng khối lượng CPE thu bằng ethanol cao hơn rất nhiều so với muối. Điều này đáp ứng nhu cầu của đề tài là tạo CPE trong phòng thí nghiệm.

### 3.3.2. Thu nhận CPE chitinase thô từ chủng *Trichoderma BL2*

\* Nuôi *Trichoderma BL2* trên MT bán rắn

Tiến hành nuôi *Trichoderma BL2* trên MT5 với những điều kiện tối ưu đã xác định, sau 60h thu dịch enzyme thô. Chúng tôi nhận thấy, sau 36h nuôi cấy bào tử màu xanh của chủng nghiên cứu bắt đầu hình thành và bao phủ bề mặt cơ chất MT. Kết quả được minh họa ở Hình 10.



(a) Sau 12h nuôi cấy

(b) Sau 36h nuôi cấy

**Hình 10.** Nuôi *Trichoderma* BL2 trên MT bán rắn

*\* Thu nhận chế phẩm enzyme*

Sau 60h nuôi cấy, chúng tôi tiến hành chiết dịch enzyme bằng nước cất vô trùng. Dịch chiết enzyme sẽ được lọc, li tâm lạnh để loại bỏ bào tử và tơ nấm, ta sẽ thu được dịch enzyme thô màu vàng trong chứa chitinase, nước và các chất hòa tan khác. Sau đó, sử dụng ethanol làm tác nhân tủa, ủ lạnh trong khoảng 12h, li tâm để thu tủa, sấy ở nhiệt độ 35 – 40°C cho đến khô, xay mịn ta được CPE chitinase thô dạng bột. Kết quả được minh họa ở Hình 11 và 12.



**Hình 11.** Tủa enzyme chitinase sau khi li tâm



**Hình 12.** CPE enzyme chitinase thô

Sau đó, tiến hành kiểm tra lại hoạt độ chitinase của CPE (60,418 UI/gCPE) và bảo quản CPE trong điều kiện nhiệt độ lạnh từ 4 – 8°C.

**4. Kết luận**

Sau quá trình nghiên cứu, chúng tôi có thể đưa ra một số kết luận sau:

- Tuyển chọn được chủng *Trichoderma* BL2 có khả năng tổng hợp enzyme chitinase hoạt độ cao nhất trong 4 chủng khảo sát.
- Đã xác định được các điều kiện nuôi cấy thích hợp thu enzyme chitinase hoạt độ cao từ chủng *Trichoderma* BL2 là: Trấu 50g; cám 40g; pepton 0,5g, cao nấm men 0,5g; glucose 1g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,7g; MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,5g; FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,5g; ZnSO<sub>4</sub> 0,001g; chitin huyền phù 1,0%; pH 5; độ ẩm 60%, thời gian nuôi cấy 60h.
- Đã xác định tác nhân tủa để thu CPE chitinase là ethanol 96°.
- Hoạt độ chitinase của CPE sau khi tủa bằng ethanol 96° xác định được là 60,418(UI/gCPE).

**Kiến nghị:** Tiếp tục khảo sát các đặc tính lí hóa của CPE chitinase từ chủng *Trichoderma* BL2 và thử nghiệm CPE này trong việc phòng trừ vi nấm gây bệnh trên cây trồng.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượu, Phạm Văn Ty (1978), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, (3), Nxb Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, tr.115-140.
2. Phạm Thị Ánh Hồng (2003), *Kỹ thuật sinh hóa*, Tủ sách trường Đại học Khoa học Tự nhiên, tr.98-115.
3. Đinh Minh Hiệp (2012), *Nghiên cứu chitinase và  $\beta$ -glucanase từ *Trichoderma* spp. và khả năng kiểm soát sinh học đối với một số nấm bệnh gây hại*, Luận án Tiến sĩ, Viện Sinh học Nhiệt đới.
4. Lê Thị Huệ (2010), *Khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase của một số chủng nấm sợi thuộc giống *Aspergillus*, *Trichoderma* và ứng dụng*, Luận văn Thạc sĩ sinh học, Trường Đại học Sư phạm TPHCM
5. Lương Đức Phẩm (2011), *Sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học trong nông nghiệp*, Nxb Giáo dục Việt Nam, tr.209-215.
6. Brameld A. Ken, William D. Shrader, Imperiali Barbara and Goddard III A. (1998), "Substrate assistance in the Mechanism of family 18 chitinase: Theoretical studies of potential intermediates and inhibitors", *J. Mol. Biol*, Vol. 280, pp.923-933.
7. El-Katatny et al (2000), "Production of Chitinase and -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*", *Food technol. Biotechnol*, 38(3), pp.173-180.
8. Guoqing et al. (2001), "A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407", *Eur. J. Biochem*, 268, pp.4079-4085.
9. Harmen G E, Howell C R, Viterbo A, Chet I and Lorito M (2004), "*Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts", *Nature Reviews Microbiology*, 2, pp.43-56.
10. Hirohi Ihui, Hirano S., Kosaki H., Uno Y., Toda T. (1994), "Biotechnology and bioactive polymers", *International Journal of Science*, 2, pp.34-35.
11. Matroudi et al. (2009), "Antagonistic effects of three species of *Trichoderma* sp. on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot", *Egyptian Journal of Biology*, 11, pp.37-44.
12. Ulhoa C. J., Peberdy J. F. (1991), "Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*", *Journal of General Microbiology*, 137, pp.2163-2169.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 26-8-2013; ngày phản biện đánh giá: 23-9-2013;  
ngày chấp nhận đăng: 14-10-2013)