

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY CHỦNG *PENICILLIUM CITRINUM* SINH TỔNG HỢP ENZYME CHITINASE ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ

Nguyễn Thị Hà¹

¹ Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 07/03/2013

Ngày chấp nhận: 20/08/2013

Title:

Optimisation of culture conditions for chitinase production by *penicillium citrinum* isolated from can gio mangrove forest

Từ khóa:

Rừng ngập mặn Cần Gio, enzyme chitinase, *Penicillium citrinum*, lên men bán rắn

Keywords:

Can Gio mangrove forest, Chitinase, *Penicillium citrinum*, solid substrate conditions

ABSTRACT

Penicillium citrinum exposing chitinolytic activity was isolated from Can Gio mangrove forest. Conditions affecting the production of chitinases by *Penicillium citrinum* were optimised under solid substrate fermentation (SSF). The most suitable conditions for chitinase production by *P. citrinum* were 10^6 spore/g culture medium containing 10% chitin, 2% NaCl with pH 4.5 and moisture of 60-80%; the incubation time was 36 hours at 40°C. *Penicillium citrinum* yielded maximum chitinase 0.144 U/ml. Chitinase was partially purified with $(NH_4)_2SO_4$ showed optimum activity at temperature 60°C and pH 6.0.

TÓM TẮT

Chúng *Penicillium citrinum* có hoạt tính chitinase được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ. Các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự sinh tổng hợp enzyme chitinase đã được tối ưu trong môi trường lên men bán rắn. Mật độ bào tử 10^6 bào tử/g môi trường nuôi cấy có chứa 10% chitin, 2% NaCl, với pH 4,5 và ẩm độ ban đầu 60-80%, thời gian nuôi cấy 36 giờ ở nhiệt độ 40°C, là thích hợp nhất cho sự sinh tổng hợp chitinase của chủng nấm này. Hoạt tính chitinase cao nhất của chủng này là 0,144 U/ml. Dịch enzyme được tinh sạch sơ bộ bằng $(NH_4)_2SO_4$ có hoạt tính chitinase cao nhất ở nhiệt độ 60°C và pH 6,0.

1 GIỚI THIỆU

Rừng ngập mặn Cần Giờ có hệ sinh thái đa dạng phong phú, điều kiện khí hậu khắc nghiệt ở đây đã làm cho sinh vật cũng như nấm sợi có tính thích nghi cao và tạo ra sản phẩm trao đổi chất đặc biệt hơn so với điều kiện khác. Một trong những nguồn rác thải dồi dào ở rừng ngập mặn đó là các loại vỏ của động vật chân khớp ở biển như: tôm, cua, ghẹ... có thành phần chủ yếu là chitin. Chitin là chất khó phân hủy, có thể sử dụng nhiều biện pháp hóa lý khác nhau để phân hủy chitin nhưng chi phí rất cao. Hiện nay, người ta đã nghiên cứu chiết tách enzyme chitinase phân giải chitin từ các nguồn khác nhau: động vật, thực vật, vi khuẩn, nấm... nhưng chỉ có enzyme chitinase do vi sinh vật

tổng hợp đặc biệt là do nấm sợi tổng hợp mới có hoạt tính cao, ổn định với nhiệt độ và pH. Ngoài ra, enzyme chitinase còn có rất nhiều ứng dụng trong nông nghiệp, công nghiệp và y học. Khả năng khử chitin làm cho chitinase có giá trị trong phòng trừ dịch bệnh, giảm ô nhiễm môi trường. Chitinase được khai thác sử dụng như là tác nhân phòng trừ sinh học. Chúng cũng có vai trò quan trọng trong sự hình thành thể nguyên sinh nấm, phòng trừ muỗi, sản xuất các chitoooligosaccharide hoạt hóa. Những thí nghiệm thử hoạt tính kháng nấm bằng cách sử dụng *Trichoderma harzianum* phân hủy thành tế bào của nấm gây bệnh *Colletotrichum gloeosporioides* đã được áp dụng trên thực nghiệm.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên vật liệu

2.1.1 Bột chitin và chitin huyền phù

Bột chitin: Vô tằm rửa sạch, sấy khô. Sau đó xử lý tách protein bằng dung dịch NaOH 4% ở 70-75°C trong 4 giờ, rửa sạch bằng nước cất. Tiếp tục tách khoáng bằng dung dịch HCl 8% ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ, rửa sạch bằng nước cất. Sấy khô, xay nhuyễn thành dạng bột.

Chitin huyền phù: Theo phương pháp của Dai *et al.* (2011) dung dịch chitin huyền phù 1% được chuẩn bị như sau: 1g bột chitin được cho dần vào 20 ml HCl đậm đặc, để ở 4°C và khuấy đều qua đêm. Thêm vào hỗn hợp 200 ml ethanol lạnh (-20°C) khuấy đều thật nhanh và ủ qua đêm. Ly tâm hỗn hợp ở 5000 vòng/phút, trong 20 phút, thu lấy kết tủa và rửa bằng nước cất cho đến khi pH trung tính. Thêm vào tủa nước cất cho đến thể tích 100 ml.

2.1.2 Chủng nấm *Penicillium*

Nấm *Penicillium citrinum* được phân lập từ Rừng ngập mặn (RNM) Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh. Nấm được nuôi trên môi trường thạch nghiêng MEA (Malt Extract Agar) ở nhiệt độ phòng trong 5-7 ngày. Bào tử được thu nhận với dung dịch 0,05% tween 80, đã được khử trùng và được sử dụng để cấy sau khi điều chỉnh đến mật độ mong muốn.

2.1.3 Môi trường nuôi cấy bán rắn

Môi trường bán rắn: Trấu 50 g, cám 40 g, cao nấm men 1g, (NH₄)₂SO₄ 0,1 g, CaCl₂ 0,1 g, KCl 0,05 g, MgSO₄.H₂O 0,05 g, bột chitin 10 g, muối 2%, độ ẩm 60%.

Sau khi hấp khử trùng, môi trường được chủng vào 1 ml dịch huyền phù bào tử, điều chỉnh sao cho mật độ 10⁶ bào tử/g môi trường và nuôi cấy ở nhiệt độ phòng trong 4 ngày. Độ ẩm môi trường nuôi cấy ban đầu được điều chỉnh bằng cách thay đổi thể tích nước cho vào.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Chọn lọc chủng nấm sợi (NS) có hoạt tính chitinase cao

Nguyên tắc: Khi chitinase có mặt trong môi trường chứa chitin nó sẽ phân giải chitin thành N-acetyl glucosamine và các cấu trúc mạch ngắn hơn 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 chitinase của chủng NS. Đo đường kính vòng phân giải để xác định hoạt tính chitinase.

Cách tiến hành: Dùng khoan nút chai (d= 0,9 cm) vô trùng, khoan các lỗ thạch trên MT nuôi cấy NS ở các đĩa petri. Dùng pipet vô trùng nhỏ 100 µl dịch enzyme thô (chưa tinh sạch) vào các lỗ khoan.

Giữ các hộp petri ở nhiệt độ phòng trong 1 đến 2 ngày, cho thuốc thử lugol vào. Xác định hoạt tính chitinase bằng thuốc thử lugol rồi đo kích thước vòng phân giải (D - d, cm), với D là đường kính vòng phân giải.

D-d ≥ 2,5cm: chủng NS có hoạt tính chitinase mạnh

D-d ≥ 2,0cm: chủng NS có hoạt tính chitinase khá mạnh

D-d ≥ 1,5cm: chủng NS có hoạt tính chitinase trung bình

D-d < 1,5cm: chủng NS có hoạt tính chitinase yếu

2.2.2 Xác định hoạt tính (HT) enzyme chitinase

Nguyên tắc: hoạt tính chitinase được xác định dựa vào lượng đường khử N-acetyl-β-D-Glucosamine sinh ra trong phản ứng thủy phân. Khi cho chitinase tác dụng với cơ chất là chitin huyền phù, N-acetyl-β-D-Glucosamine sinh ra trong phản ứng được định lượng qua phản ứng với thuốc thử DNS (3,5-dinitrosalicylic acid), cho sản phẩm 3-amino-5 nitrosalicylic acid hấp thụ ánh sáng khả kiến ở bước sóng 535 nm.

Tiến hành: Dịch enzyme được chiết tách bằng nước cất (100 ml) trên máy lắc trong 30 phút (200 vòng/phút), thu dịch lọc, ly tâm dịch lọc với tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch nổi là dịch enzyme thô. Cho vào các eppendorf hỗn hợp phản ứng gồm: 0,5 ml dịch enzyme thô + 0,5 ml chitin huyền phù 1%. Ủ lắc ở 40°C trong vòng 60 phút. Ngừng phản ứng bằng 0,5 ml NaOH 1N và đun sôi cách thủy trong 5 phút. Ly tâm 4000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch thủy phân enzyme, bỏ cặn. Cho vào eppendoff 0,2 ml dung dịch thủy phân enzyme + 0,2 ml DNS 1%, lắc đều, đun sôi cách thủy trong 5 phút, làm lạnh nhanh trong bồn làm lạnh. Thêm 1 ml nước cất, lắc đều và đo OD ở bước sóng 535 nm. Lượng glucosamine sinh ra

được xác định dựa theo đường chuẩn N-acetyl-β-D-Glucosamine. Một đơn vị hoạt tính chitinase (đvht) là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μmol N-acetyl-β-D-Glucosamine (NAG) từ phản ứng thủy phân cơ chất chitin trong thời gian 1 phút ở nhiệt độ 40°C (Dai *et al.*, 2011).

2.2.3 Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy

Xác định mật độ bào tử, độ ẩm môi trường bán rắn, thời gian nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy, hàm lượng chitin, hàm lượng muối NaCl thích hợp cho sự tăng trưởng và sinh tổng hợp enzyme tối ưu của nấm *Penicillium citrinum*

2.2.4 Xác định pH và nhiệt độ tối ưu của chitinase từ *Penicillium citrinum*

Nhiệt độ tối ưu được xác định bằng cách xác định hoạt tính enzyme chitinase tại các nhiệt độ khác nhau. Dịch enzyme được tinh sạch sơ bộ bằng (NH₄)₂SO₄ sau đó lấy 0,02g chế phẩm enzyme hòa tan trong 1 ml dung dịch đệm. Lấy 0,5 ml dịch enzyme ủ với 0,5 ml 1% chitin huyền phù trong 30 phút ở các nhiệt độ khác nhau: 35, 40, 45, 50, 55, 60°C. Xác định hoạt tính chitinase và tìm ra được nhiệt độ tối ưu cho phản ứng enzyme

pH tối ưu được xác định bằng cách thực hiện phản ứng tại nhiệt độ tối ưu và các pH khác nhau sử dụng hệ đệm phù hợp như: (i) 0,05M Sodium citrate pH 3,5; 4; 4,5; 5,0; 5,5; (ii) 0,05M Sodium phosphate pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; (iii) 0,05M Glycine - NaOH pH 8,0, 8,5; 9,0.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Chọn lọc chủng nấm sợi có hoạt tính chitinase cao

Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme chitinase của 60 chủng NS phân lập từ RNM Cần Giờ được trình bày trong Bảng 2. Các chủng có đường kính cao nhất được chọn để phân tích thống kê (Bảng 1).

Theo kết quả thống kê chủng nấm số 10, 15 và 16 có đường kính vòng phân giải lớn nhất, lớn hơn 2,5 cm và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các chủng còn lại ở độ tin cậy 95% (Duncan, *p*<0,05) (Hình 1). Hai chủng 10 và 16 đã được khảo sát về mặt hình thái đồng thời gửi đến

công ty Nam Khoa để giải trình tự bằng kỹ thuật PCR, kết quả cho thấy đó là chủng *Penicillium citrinum* và *Aspergillus protuberus*. Ở đây chủng nấm *Penicillium citrinum* được chọn để tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy.

Bảng 1: Kết quả đường kính vòng phân giải trung bình của các chủng nấm sợi

Chủng nấm	Đường kính trung bình (cm)
4	2.34±0.02bc
5	2.30±0.10bc
8	2.23±0.15c
10	2.65±0.18a
15	2.40±0.10abc
16	2.55±0.05ab
31	2.30±0.20c
40	2.20±0.16c
44	1.90±0.16d
55	2.25±0.05bc
57	1.40±0.00d

Giá trị: Trung bình ± Độ lệch chuẩn.

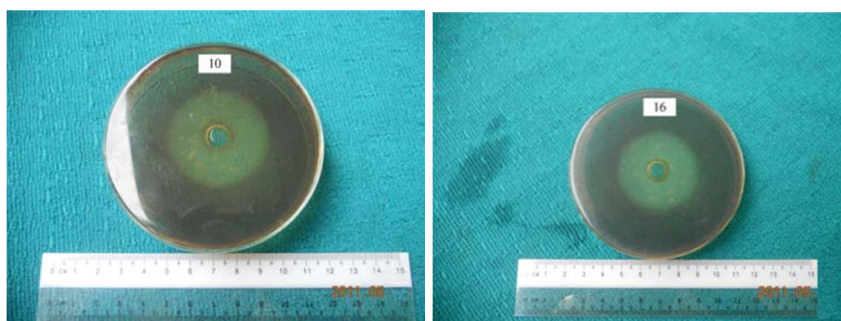
Trị trung bình có các mẫu tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (Duncan, P0.05)

Bảng 2: Đường kính vòng phân giải của 60 chủng nấm sợi phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ

STT	HT chitinase		HT chitinase		HT chitinase	
	(D-d, cm)	STT	(D-d, cm)	STT	(D-d, cm)	STT
1	0,50	21	0,60	41	0,75	0,75
2	0,55	22	0,22	42	0,75	0,75
3	0,65	23	0,50	43	0,60	0,60
4	2,34	24	0,70	44	1,90	1,90
5	2,30	25	0,60	45	0,60	0,60
6	0,60	26	0,65	46	0,60	0,60
7	0,90	27	0,80	47	0,22	0,22
8	2,20	28	1,20	48	0,50	0,50
9	0,32	29	0,90	49	0,80	0,80
10	2,65	30	0,95	50	0,70	0,70
11	1,10	31	2,30	41	0,65	0,65
12	1,65	32	1,20	52	1,20	1,20
13	0,60	33	1,00	53	0,90	0,90
14	0,40	34	0,30	54	0,95	0,95
15	2,40	35	0,50	55	2,25	2,25
16	2,55	36	0,55	56	0,75	0,75
17	0,80	37	0,20	57	1,40	1,40
18	1,00	38	0,70	58	1,10	1,10
19	1,20	39	0,50	59	0,80	0,80
20	0,50	40	2,20	60	1,20	1,20

D: đường kính vòng phân giải, d: đường kính nút khoan

Hình 1: Đường kính vòng phân giải của một số chủng nấm sợi

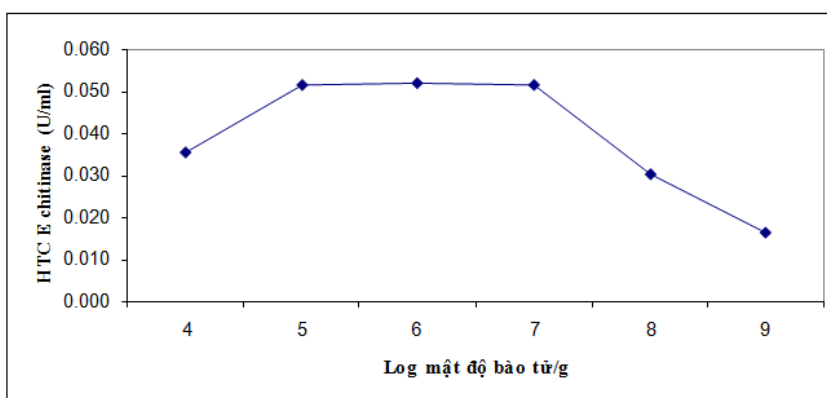


3.2 Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy

3.2.1 Mật độ bào tử

Dịch huyền phù bào tử được điều chỉnh ở các

mật độ khác nhau sao cho mật độ bào tử đạt các mức độ 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^8 bào tử/g môi trường.



Hình 2: Ảnh hưởng của mật độ bào tử lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *P. Citrinum*

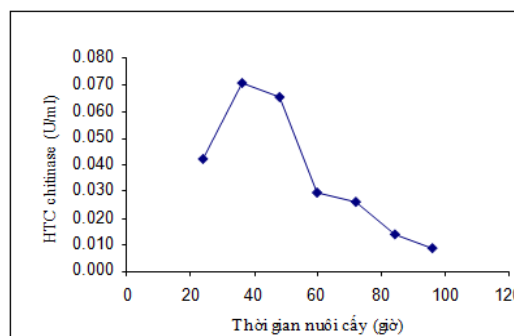
Ở mật độ bào tử 10^5 - 10^7 enzyme chitinase có hoạt tính chung (HTC) cao nhất (Hình 4). Mật độ bào tử càng tăng hoạt tính enzyme thể hiện càng giảm. Theo Suresh kích thích khuẩn lạc có ảnh hưởng quan trọng đến sản lượng enzyme chitinase của nấm *Beauveria bassiana* (Suresh et al., 1999).

3.2.2 Thời gian nuôi cấy

Nấm *P. citrinum* sinh enzyme chitinase có hoạt tính cao 0,071U/ml khi nuôi trong khoảng thời gian 36 giờ. Điều này tương đồng với nghiên cứu của Lê Thị Huệ (2010) về chitinase của chủng *Aspergillus awamori* có hoạt độ cao nhất khi nuôi cấy 36 giờ. Nhưng lại khác với nấm *Aspergillus terreus* có HT chitinase cao khi nuôi trong thời gian lâu hơn là 96 giờ (Ghanem et al., 2010)

Mỗi một loài có một thời gian tăng trưởng tối ưu khác nhau, thường thì HT enzyme mạnh nhất ở thời điểm bào tử mới bắt đầu hình thành (Nguyễn Đức Lượng và ctv., 2006). Số liệu trên

cho thấy thời gian nuôi cấy càng lâu HT enzyme càng giảm. Chủng *P. citrinum* có thời gian nuôi cấy tương đối ngắn, đây là điểm cần chú ý vì sẽ nâng cao hiệu suất thu nhận enzyme.



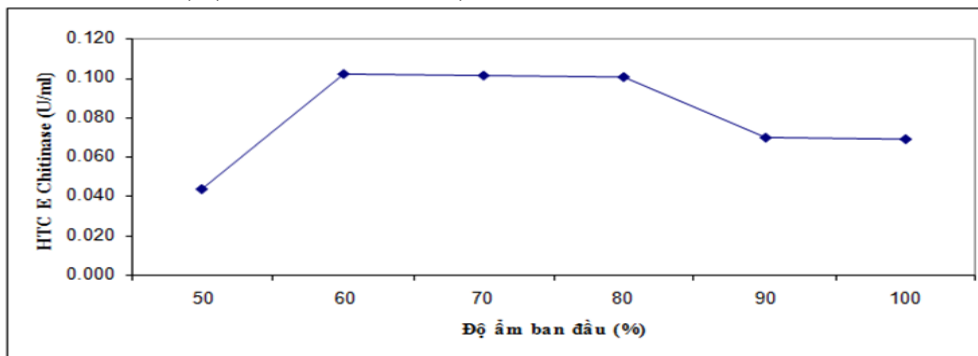
Hình 3: Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *P. citrinum*

3.2.3 Ẩm độ môi trường nuôi cấy

Độ ẩm ban đầu 60-80% thích hợp cho chủng *Penicillium citrinum* sinh tổng hợp enzyme chitinase (Hình 4). Độ ẩm ban đầu ảnh

hưởng đến sự sản sinh các loại enzyme thủy phân khi nuôi ở môi trường bán rắn vì nó ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của cơ thể sinh vật (Nishio *et al.*, 1979) (Ramesh *et al.*, 1990).

Chủng *P. Chrysogenum* PPCS1 và PPCS 2 đạt hoạt tính chitinase cao nhất khi nuôi ở độ ẩm ban đầu là 80% và 120% tương ứng (Patidar *et al.*, 2005).



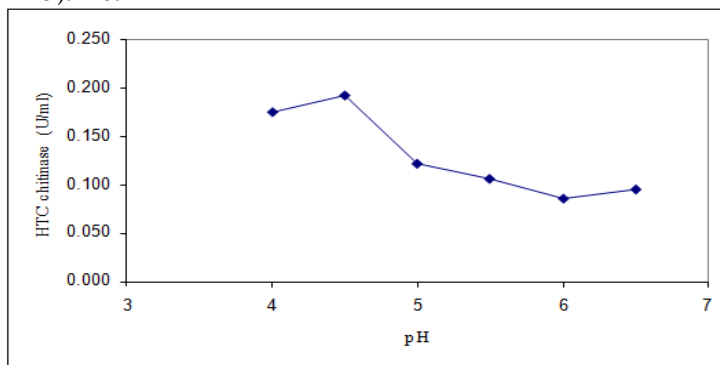
Hình 4: Ảnh hưởng của độ ẩm lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *P. citrinum*

3.2.4 pH môi trường nuôi cấy

Chủng *P. citrinum* sinh enzyme chitinase có HT tổng cao 0,193U/ml tại pH 4.5 (Hình 5). Kết

quả trên phù hợp với những quan điểm của Ingold (1967), cho rằng pH thích hợp cho NS sinh enzyme tối ưu là từ 4-6.

Hình 5: Ảnh hưởng của pH môi trường lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *P. citrinum*

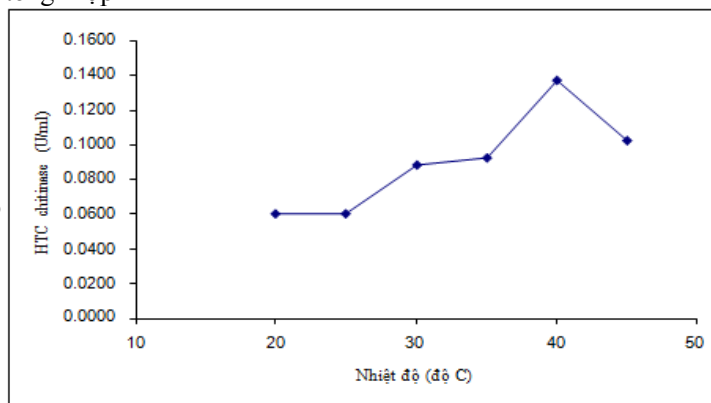


3.2.5 Nhiệt độ nuôi cấy

Nhiệt độ nuôi cấy là một đặc trưng của cơ thể sinh vật và có ảnh hưởng sâu sắc đến sản lượng và thời gian của pha tổng hợp enzyme (Ramesh và Lonsane, 1987). Nhiệt độ 40°C rất thích hợp cho *P. citrinum* sinh tổng hợp

enzyme chitinase (HTC 0,137U/ml). Kết quả trên phù hợp với nghiên cứu của Patidar (2005) về chủng nấm sợi sinh chitinase *P. chrysogenum* có nhiệt độ sinh tổng hợp enzyme chitinase tối ưu là 40°C. Các nghiên cứu về NS cho biết NS thuộc nhóm vi sinh vật ưa ấm.

Hình 6: Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *P. citrinum*

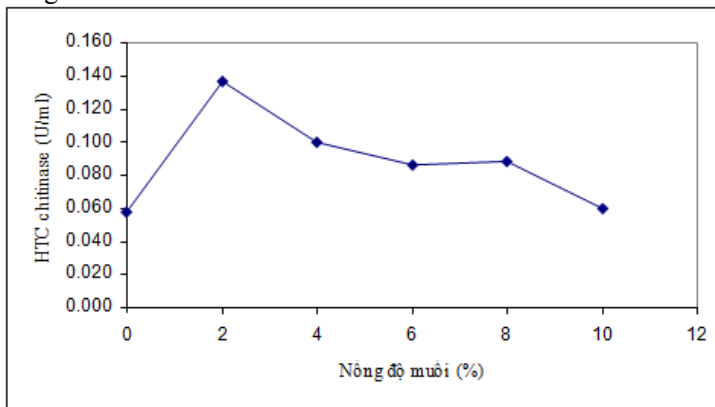


3.2.6 Hàm lượng muối NaCl

Nồng độ muối cao không ảnh hưởng nhiều đến khả năng sinh trưởng của chủng nấm *P. citrinum*, chủng *P. citrinum* có khả năng sinh

enzyme chitinase cao nhất (0,137U/ml) ở nồng độ muối NaCl 2% (Hình 7), chứng tỏ chủng này là chủng chịu mặn và đây là chủng nấm du nhập từ đất liền vào rừng ngập mặn.

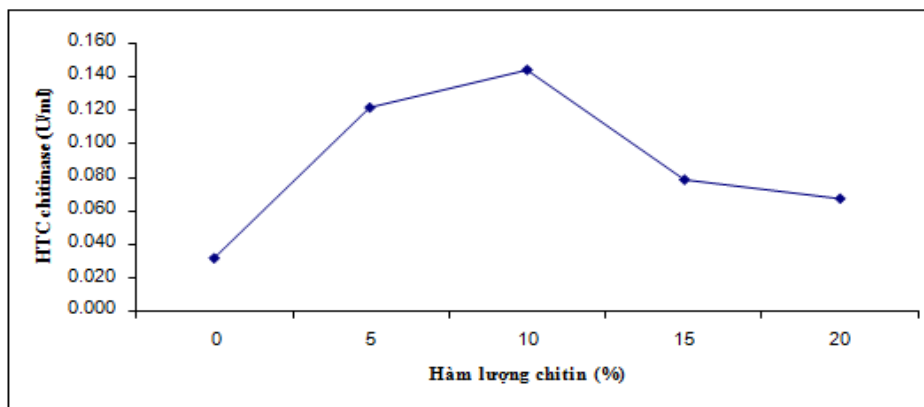
Hình 7: Ảnh hưởng của hàm lượng muối NaCl lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *P. citrinum*



3.2.7 Hàm lượng chitin

Chủng *P. citrinum* thể hiện nhu cầu chitin

không cao, HT enzyme mạnh với hàm lượng chitin 10%. HT enzyme chitinase có xu hướng giảm khi HL chitin vượt qua mức 10%.



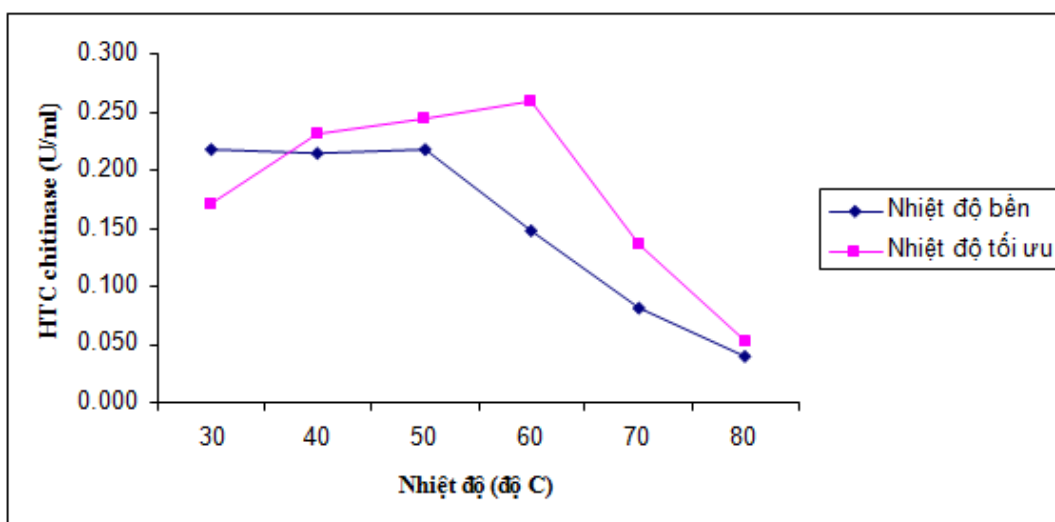
Hình 8: Ảnh hưởng của hàm lượng chitin lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *P. citrinum*

3.3 pH và nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của chitinase

3.3.1 Nhiệt độ

Kết quả trên Hình 9 cho thấy enzyme chitinase hoạt động mạnh ở trong khoảng nhiệt độ khá cao ở 60°C với hoạt tính là 0.218U/ml, nhiệt độ bên dưới 50°C. Hoạt tính của enzyme bắt đầu giảm khi nhiệt độ cao hơn 60°C. So sánh với một số enzyme chitinase từ các chủng nấm sợi khác như *Penicillium sp. LYG 0704* (Lee *et al.*, 2009), và *Penicillium aculeatum* ở 50°C (Parameswaran Binod *et al.*, 2005). Nhiệt độ tối ưu của enzyme chitinase từ chủng nấm *Penicillium citrinum* khá cao. Hầu hết các enzyme sẽ bị giảm hoặc mất hoạt tính khi nhiệt

độ phản ứng cao trừ các enzyme chịu nhiệt từ các vi sinh vật ở các điều kiện khắc nghiệt như suối nước nóng, các vùng nóng ẩm (Purwani *et al.*, 2004). Do đó, các nhà nghiên cứu đặc biệt quan tâm đến các loại enzyme có khả năng chịu nhiệt cao vì các enzyme này thường có tốc độ phản ứng nhanh nhưng khả năng bị biến tính thấp ở nhiệt độ cao. Như vậy, với khả năng hoạt động ở nhiệt độ cao, enzyme thích hợp để thủy phân các sản phẩm chitin trong điều kiện cần gia nhiệt với tốc độ phản ứng nhanh, đặc biệt dùng phân hủy các chất thải trong lĩnh vực chế biến thủy sản cũng như ứng dụng trong ngăn cản sự xâm nhập gây bệnh của nhóm vi sinh vật chịu nhiệt.

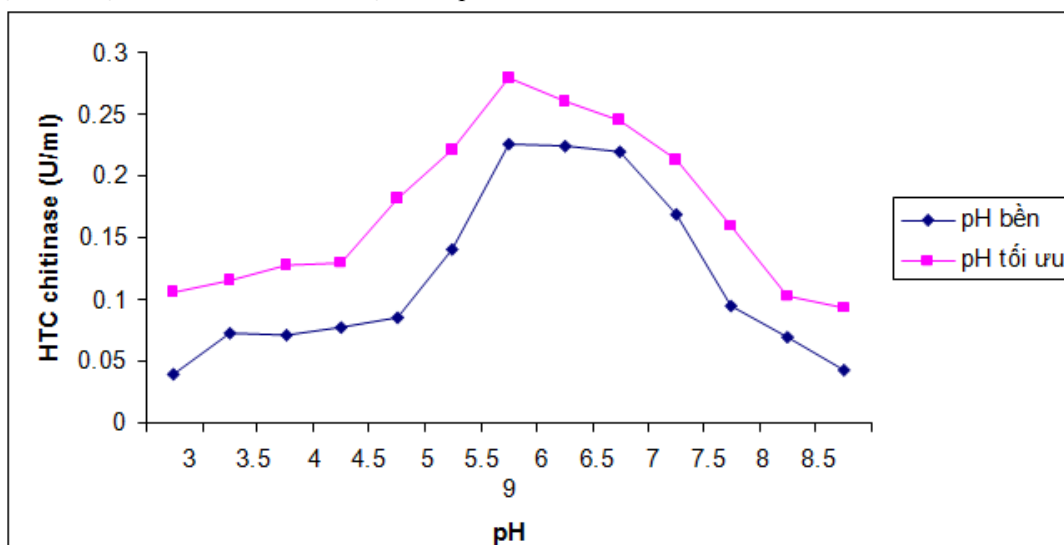


Hình 9: Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *P. citrinum*

3.3.2 pH

Dùng hệ đệm phù hợp để điều chỉnh pH trong khoảng từ 3-9. Cân 0,02 g chế phẩm

enzyme hòa tan trong 1 ml dung dịch đệm. Cho 0,5 ml dịch enzyme ủ với 0,5 ml 1% chitin huyền phù trong 30 phút ở nhiệt độ tối ưu (55°C).



Hình 10: Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính enzyme chitinase thô của chủng *Penicillium citrinum*

Enzyme chitinase do chủng *P. citrinum* sinh ra có HT mạnh nhất tại pH 6 (HTC 0,279U/ml) (Hình 10), enzyme này bền ở khoảng pH từ 6-7. Kết quả trên có sự tương đồng so với các nghiên cứu đã công bố. Theo Y. G. Lee *et al* năm 2009 nghiên cứu, chitinase của nấm hoạt động tốt trong khoảng pH từ 4-7. So sánh với một số enzyme chitinase từ các chủng *Penicillium sp.* khác như *Penicillium chrysogenum* (Pankaj *et al.*, 2005), *Penicillium sp. LYG 0704* (Yoon *et*

al., 2009) pH tối ưu ở 5.0 và *Penicillium aculeatum* ở pH 5.5 (Parameswaran Binod *et al.*, 2004), pH tối ưu của enzyme chitinase từ chủng nấm *Penicillium citrinum* thích hợp để thủy phân trong điều kiện axit. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu lại khác với một số báo cáo trước đây về một số chitinase ưa kiềm từ chủng *Bacillus circulans* No.4.1 lại hoạt động tốt pH 8.0 và *Beauveria bassianse* ở pH 9.2 (Suresh và Chandransekaran, 1999).

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng nấm *P. citrinum* được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ có khả năng sinh tổng hợp chitinase cao trên môi trường nuôi cấy bán rắn với hàm lượng chitin 10%, NaCl 2%, mật độ bào tử chủng vào môi trường 10^6 bào tử/g môi trường, độ ẩm ban đầu 60 - 80%, pH 4,5, nhiệt độ 40°C trong thời gian nuôi cấy 36 giờ. Hoạt tính enzyme chitinase sau khi khảo sát các điều kiện nuôi cấy là 0,144 U/ml cao gấp 2,7 lần so với ban đầu (0,052 U/ml). Chế phẩm enzyme chitinase thô của nấm *P. citrinum* hoạt động mạnh ở nhiệt độ 60°C, pH 6,0, bền ở nhiệt độ dưới 50, pH 6 - 7. Chủng nấm này cần được nghiên cứu tiếp tục để sản xuất chitinase trong phạm vi phòng thí nghiệm nhằm có thể đưa vào ứng dụng trong thực tiễn đời sống.

LỜI CẢM ƠN

Cám ơn Viện Công nghệ Sinh học Trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện vật chất cho thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lê Thị Huệ. 2010. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase của một số chủng NS thuộc giống *Aspergillus*, *Trichoderma* và ứng dụng. Luận văn Thạc sĩ. Trường ĐHSP Tp. HCM.
- Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết. 2006. Thí nghiệm công nghệ sinh học tập 2. NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.
- De-hui Dai, Wei-lian Hu, Guang-rong Huang and Wei Li, 2011. Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1. *African Journal of Biotechnology* Vol.10(13), 2476 - 2485.
- Ghanem, K. M., Al-Garni, S. M., & Al-Makishah, N. H, 2010. Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Biotechnology*, 9(32), 5135-5146.
- Lee, YG, Ki Chul Chung, KC, Wi, SG, Lee, JC, Bae, HJ, 2009. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. *Protein Expression and Purification* 65, 244 - 250.
- Pankaj Patidar, Deepti Agrawal, Tushar Banerjee, Shridhar Patil, 2005. Optimisation of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, 40, 2962 - 2967.
- Nishio N, Tai K, Nagai S, 1979. Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 8, 263 - 270
- Parameswaran Binod, Tunde Pusztahelyi, Viviana Nagy, Chandran Sandhya, George Szakacs, Istvan Pocs, Ashok Pandey, 2005. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 21 under solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 880 - 887.
- Purwani EY, Maggy TS, Yaya R, Jae KH, Yu RP, 2004. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the indonesian *Bacillus* sp.13.26. *Enzyme Microbial. Technol*, 35, 147 - 153.
- Ramesh MV, Lonsane BK, 1990. Critical importance of moisture content of the medium in alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* M 27 in a solid state fermentation system. *Appl Microbiol Biotechnol*, 33, 501 - 505.
- Ramesh MV, Lonsane BK, 1987. Solid State fermentation for production of alpha amylase by *Bacillus megaterium* 16 M. *Biotechnol Lett*, 9, 323 - 328.
- Sherief AA, El-Sawah MMA, Abd El-Naby MA, 1991. Some properties of chitinase produced by a potent *Aspergillus carneus* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 35, 228 - 230.
- Suresh PV, Chandrasekaran M, 1999. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. *Process Biochem*, 34, 257 - 267.
- Yoon Gyo Lee, Ki-Chul Chung, Seung Gon Wic, Jae Chang Lee, Hyeun-Jong Bae, 2009. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. *Protein Expression and Purification*, 65, 244 - 250.