

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH THU NHẬN VÀ BÁN TINH SẠCH CHITOSANASE TỪ NẤM MỐC *Aspergillus toxicarius*

Đào Thị Mỹ Linh*, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Nguyễn Thị Thùy Trang

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: linhdtm@cntp.edu.vn

Ngày nhận bài: 03/7/2019; Ngày chấp nhận đăng: 06/9/2019

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm thu nhận và bán tinh sạch chitosanase từ chủng nấm mốc *Aspergillus toxicarius*. Enzyme được khảo sát pH trích ly để thu nhận bằng đệm acetate pH 4; 4,5; 5; 5,5 và đệm phosphate pH 6; 6,5; 7; 7,5. Enzyme chitosanase được bán tinh sạch bằng phương pháp kết tủa, sử dụng 2 dung môi là acetone, ethanol theo tỷ lệ 1:2; 1:3; 1:4 (v/v) và muối ammonium sulfate có nồng độ 30-80% (w/v). Thời gian bảo quản các loại dịch enzyme (thô, bán tinh sạch và enzyme cô đặc) được theo dõi trong 10 ngày ở nhiệt độ từ 2-4 °C. Quá trình sấy phun được khảo sát với nồng độ maltodextrin bổ sung 15; 20; 25% (w/v). Kết quả cho thấy, hoạt tính enzyme cao nhất khi tách chiết bằng đệm acetate pH 5,5; bán tinh sạch hiệu quả nhất với tỷ lệ enzyme:acetone 1:3 (v/v). Hoạt tính enzyme chitosanase ổn định trong khoảng thời gian 10 ngày bảo quản và khi bổ sung maltodextrin ở nồng độ 25% (w/v) sau sấy hoạt tính chitosanase cao nhất là 88,012 (UI/g).

Từ khóa: *Aspergillus toxicarius*, acetone, bán tinh sạch, chitosanase, ethanol.

1. MỞ ĐẦU

Chitosanase là nhóm các enzym đặc biệt thủy phân chitosan để tạo ra các chitoooligomer và monomer là glucosamine và N-acetyl-d-glucosamine. Dựa trên phương thức hoạt động có hai loại enzyme chitosanase đã được tìm hiểu gồm exo (EC 3.2.1.165) và endochitosanase (EC 3.2.1.132). Endochitosanase thủy phân β -1,4 liên kết giữa đuôi Gln (glucosamine) trong chitosan bị acetyl hóa một phần và được sử dụng để sản xuất chitoooligosaccharides (COS) bằng cách khử đuôi chitosan. Trong khi đó, exochitinase tấn công chitosan từ đầu không khử COS hoặc chitosan để tạo ra Gln (glucosamine) hoặc N-acetyl-d-glucosamine (NAG) [1].

Chitosanase thường được cho là có vai trò quan trọng trong phòng bệnh chống lại mầm bệnh xâm nhập vì có khả năng thủy phân polysaccharides vách tế bào nấm bệnh. Ngoài ra, chitosanase được sử dụng thủy phân cơ chất là chitosan và chitin để tạo ra các chitosan oligomer kích thước đặc trưng phù hợp với yêu cầu trong các ngành công nghiệp dược phẩm, y sinh, nông nghiệp, công nghệ sinh học và trong ngành công nghiệp thực phẩm [2]. Chitosanase vi khuẩn đã được nghiên cứu rộng rãi, đặc biệt là từ *Bacillus* spp. và *Streptomyces* spp. về các tính năng xúc tác, cơ chế enzyme và protein cấu trúc. Tuy nhiên, so với chitosanase từ vi khuẩn, thì chitosanases xạ khuẩn, nấm ít được nghiên cứu [3].

Các enzyme có thể được thu nhận ở các dạng sản phẩm khác nhau như chế phẩm thô (trích ly từ môi trường lên men), chế phẩm kỹ thuật hay bán tinh sạch (đã được tinh chế sơ bộ) và tinh khiết (đã loại hoàn toàn các protein và enzyme tạp) để phục vụ nhu cầu đa dạng hiện nay trên thị trường [4]. Enzyme bán tinh sạch thường được thu nhận từ môi trường nuôi cấy theo quy trình như sau: trích ly enzyme thô, sau đó thực hiện kết tủa sử dụng tác nhân như dung môi hữu cơ (ethanol, acetone), kết tủa điểm đẳng điện hoặc dùng muối ammonium

sulfate, tiếp tục cô đặc enzyme bằng màng lọc tiếp tuyến [2]. Hiện nay, các nghiên cứu về *Aspergillus toxicarius* chưa có nhiều công bố. Do vậy nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá khả năng thu nhận enzyme chitosanase từ chủng nấm mốc này.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Chủng *Aspergillus toxicarius* có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitosanase được phân lập và sàng lọc được cung cấp từ ngân hàng giống của Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp. Hồ Chí Minh.

Cám gạo và trấu được thu mua tại Tây Ninh.

Chitosan được mua từ Công ty TNHH MTV chitosan VN Số 23/6 Ngô Thời Nhiệm, Tp. Rạch Giá, Kiên Giang, Việt Nam.

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 từ 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 nhiệt độ 4 °C cho đến khi sử dụng.

Chuẩn bị môi trường bán rắn nuôi cấy *Aspergillus toxicarius* thu nhận chitosanase thô gồm 10 g cơ chất cám gạo và trấu theo tỷ lệ tương ứng 7:3. Bổ sung 8 mL dung dịch muối khoáng (có thành phần gồm (g/L): NaNO_3 1, K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, NaCl 1 và chitosan 3) để ẩm độ môi trường là 50%, sau đó môi trường được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Để nguội môi trường và cấy dịch giống 1% (v/w), nuôi ở nhiệt độ phòng trong 72 giờ [5].

Trích ly enzyme thô: nấm mốc 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, ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút thu được dung dịch enzyme thô [5].

Hóa chất được dùng trong nghiên cứu gồm: Ethanol 96°, Glucosamin-HCl 96% (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương); NaOH, NaNO_3 , KCl, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NaCl, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , tween 80, CH_3COOH , $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, muối seignette ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), DNS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, acetone, H_3PO_4 (Trung Quốc); Coomassive Brilliant Blue (Đức), maltodextrin (Himedia).

Các thiết bị được sử dụng gồm: Nồi hấp tiệt trùng ALP, tủ cấy mốc, máy lắc LM-420D, máy đo pH Lab 845, cân điện tử 4 số, máy đo quang phổ SP-300 Spectrophotometer, máy ly tâm Hermle Z206A, máy khuấy từ IKA C-MAG HS10, máy sấy phun LabPlant SD-06AG, thiết bị lọc tiếp tuyến (QuixStand System) và cột lọc hollow fiber cartridge kích thước 3 kDa.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của pH dịch trích ly đến hoạt tính enzyme chitosanase

Bổ sung vào môi trường sau lên men 45 mL dung dịch trích ly có pH được khảo sát là 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 (đệm acetate); 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 (đệm phosphate), lắc đều trên máy lắc với

tốc độ 150 vòng/20 phút ở nhiệt độ phòng. Lọc dịch qua bông thấm nước và giấy lọc, thu dịch có chứa chitosanase thô cần xác định hoạt tính enzyme.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của tác nhân tủa trong quá trình tinh sạch enzyme

Thêm vào 20 mL dịch enzyme thô các tác nhân tủa: acetone và ethanol tỷ lệ 1:2; 1:3; 1:4 (v/v); muối ammonium sulfate bổ sung theo các phân đoạn 30-80%. Ủ lạnh 1 giờ ở 2-4°C. Ly tâm 4.000 vòng/15 phút. Kết tủa thu được, hoàn nguyên với đệm acetate pH 5,5 về thể tích ban đầu 20 mL. Đối với mẫu kết tủa muối ammonium sulfate tiến hành thẩm tích bằng màng cellophane (màng bán thấm) qua đêm (24 giờ ở 10 °C) nhằm loại bỏ hết muối. Đánh giá hoạt tính enzyme và hàm lượng protein.

2.2.3. Khảo sát quá trình cô đặc enzyme chitosanase bằng phương pháp lọc tiếp tuyến

Enzyme cô đặc: dịch enzyme thô được cô đặc bằng thiết bị lọc tiếp tuyến QuixStand System, sử dụng cột lọc cut-off 3 kDa, với tốc độ bơm nhập liệu 85 vòng/phút và điều chỉnh sao cho áp suất trên bề mặt màng không quá 15 psi. Dịch lọc trên màng (dòng retentate) được sử dụng cho phần sấy phun tạo chế phẩm chitosanase dạng bột [6].

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian bảo quản dịch enzyme chitosanase

Dịch enzyme thô, dịch enzyme bán tinh sạch được lựa chọn ở thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng tác nhân tủa và dịch enzyme cô đặc sau lọc tiếp tuyến được giữ lạnh ở nhiệt độ 2-4 °C trong vòng 10 ngày, hoạt tính enzyme chitosanase được xác định trong thời gian bảo quản.

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất trợ sấy đến hoạt tính enzyme chitosanase

Tiến hành sấy phun dung dịch enzyme chitosanase cô đặc với các thông số cố định: nhiệt độ vào 150 °C và nhiệt độ ra 58 °C, tốc độ bơm nhập liệu là 300mL/giờ, chất trợ sấy là maltodextrin, nồng độ chất trợ sấy lần lượt là 15; 20 và 25%. Đánh giá hoạt tính enzyme theo các nghiệm thức khảo sát.

2.2.6. Phương pháp phân tích

Xác định hoạt tính enzyme chitosanase

Một đơn vị hoạt độ (UI) chitosanase được định nghĩa là lượng enzyme xúc tác thủy phân chitosan, giải phóng 1 μmol đường khử mỗi phút tại điều kiện phản ứng và pH 5,5 [7]

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

Trong đó: HT: Hoạt tính enzyme chitosanase (UI/mL), x: Lượng đường khử sinh ra (μmol/mL), F: Hệ số pha loãng, V: Tổng thể tích dung dịch phản ứng (mL), v: Thể tích enzyme đem đi phản ứng (mL), t: Thời gian phản ứng (phút), 5: Hệ số quy đổi về 1 mL dịch enzyme.

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

Xác định hàm lượng protein

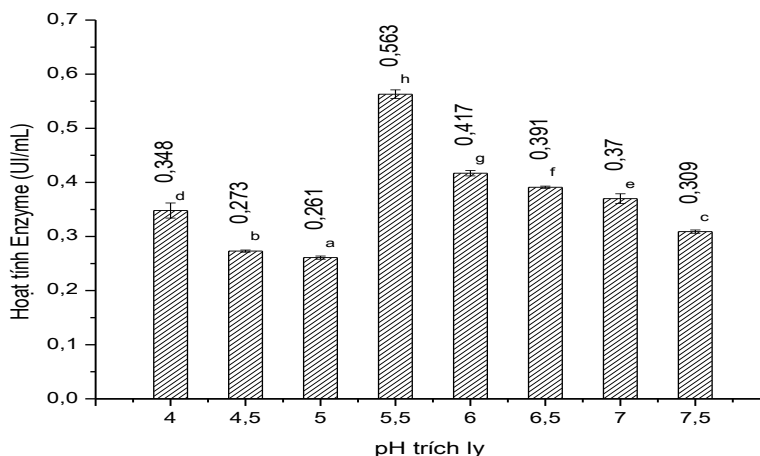
Hàm lượng protein trong enzyme được xác định bằng phương pháp Bradford. Các protein khi phản ứng với thuốc thử Bradford sẽ hình thành hợp chất màu có khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 595 nm. Cường độ màu tỷ lệ với nồng độ protein trong dung dịch. Bovine serum albumin (BSA) được sử dụng xây dựng đường chuẩn có hàm lượng protein từ 10-50 mg/mL, dựa vào đường chuẩn protein suy ra hàm lượng protein trong dung dịch mẫu phân tích [8].

Xử lý số liệu: Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần, số liệu thu nhận được xử lý bằng phần mềm Microsoft excel 2010, Statgraphics centurion XVI và OriginPro 8.5.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của pH dịch trích ly đến hoạt tính enzyme chitosanase

Môi trường sau nuôi cấy được trích ly thu enzyme với các loại đệm pH khác nhau. Kết quả ghi nhận được ở Hình 1 cho thấy, khi trích ly bằng đệm acetate pH 4,0; 4,5; 5,0 và đệm phosphate pH 7,5 thì hoạt tính enzyme thu được thấp, lần lượt là 0,348; 0,273; 0,261 và 0,309 UI/mL, trong đó hoạt tính thấp nhất khi trích ly bằng đệm acetate pH 5,0. Hoạt tính enzyme đạt cao nhất khi trích ly bằng đệm acetate pH 5,5 với hoạt tính 0,563 UI/mL (cao gấp 2,1 lần so với đệm acetate pH 5,0), tương đối cao khi trích ly bằng đệm phosphate pH 6,0 với hoạt tính thu được là 0,417 UI/mL. Khi trích ly bằng đệm phosphate pH 6,5 và 7,0 thì hoạt tính enzyme thu được lần lượt là 0,391 và 0,37 UI/mL.



Hình 1. Ảnh hưởng của pH dịch trích ly đến hoạt tính enzyme chitosanase

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

Khi pH thay đổi, hoạt tính enzyme thay đổi có thể là do các liên kết trong trung tâm hoạt động có dạng các ion tích điện, một số giá trị pH sẽ tái kết hợp các ion này thành nhóm không tích điện, dẫn đến enzyme ko tương tác được với cơ chất. Nguyên nhân cũng có thể là do pH làm enzyme bị biến tính khi pH làm yếu hay đứt các liên kết giữa các bộ phận của enzyme, tạo ra một số liên kết khác mà trước đây không có trong phân tử [9].

Dịch trích ly có pH 5,5 cho hoạt tính enzyme cao nhất. Kết quả này giống với nghiên cứu của Silva *et al.* (2010) khi thực hiện trích ly chitosanase từ chủng *Trichoderma koningii* sp. trên môi trường bán rắn ở điều kiện pH 5,5; enzyme có hoạt tính 4,84 IU/g tương ứng với 1,08 U/mL. Nghiên cứu của Silava cũng đưa ra so sánh với một số nghiên cứu khác như khi nuôi cấy *Trichoderma reesei*, *Gongronella* sp. *Trichoderma harzanium* với chitosan làm chất cảm

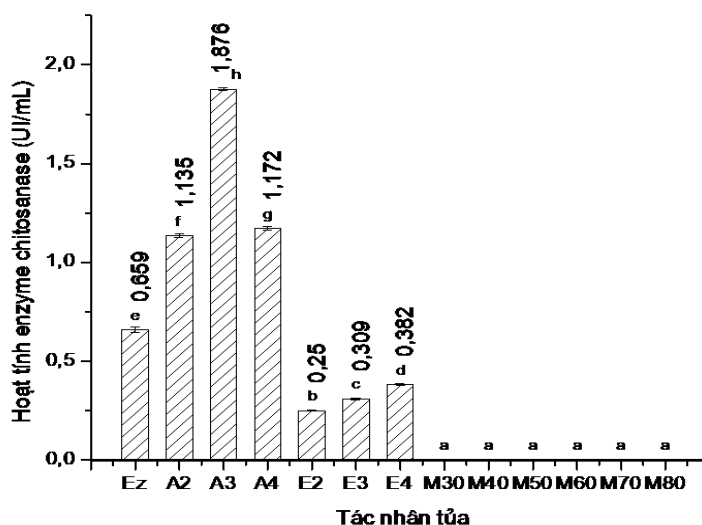
ứng thu nhận chitosanase có hoạt tính tương ứng là 0,23 mg/mL, 0,8 IU/mL và 3,18 IU/gds ở pH 5,0 [7]. Ở một nghiên cứu khác, Choi *et al.* (2004) nuôi cấy chủng *Bacillus* sp. KCTC 0377BP trong môi trường MS-chitosan (0,5% chitosan) với các điều kiện nhiệt độ và pH khác nhau, cho hoạt tính chitosanase tối đa 1,2 U/mL ở nhiệt độ 30 °C và pH 6,8 [10]. Theo nghiên cứu của Jun và cs (2008), chủng *Gongronella* JG có khả năng sinh endo-chitosanase hoạt động pH thích hợp là 5,6 [11]. Nghiên cứu của Zhou *et al.* (2008) về ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của enzyme chitosanase-csn1 bằng đệm natri acetate có giá trị pH dao động 4,2-5,8, kết quả cho hoạt tính cao nhất trong khoảng pH 4,6-4,8 [12]. Như vậy, chitosanase từ các loại vi sinh vật sẽ khác nhau về đặc tính của enzyme.

3.2. Ảnh hưởng của tác nhân kết tủa trong quá trình bán tinh sạch enzyme

Tinh sạch enzyme là một quá trình gồm nhiều công đoạn với nhiều phương pháp khác nhau. Độ tinh sạch của enzyme được đánh giá dựa trên hoạt tính riêng qua các bước quá trình tinh sạch [4]. Kết quả sau khi tiến hành khảo sát hoạt tính enzyme trước và sau khi tủa với các tác nhân khác nhau được thể hiện Hình 2.

Với phương pháp kết tủa bằng muối ammonium sulfate, ở nồng độ 30% không xuất hiện tủa, đối với các nồng độ khác, không có hoạt tính enzyme, điều này có thể là do hoạt tính enzyme ở các nghiệm thức này rất thấp, khi hoàn nguyên lại bằng với thể tích dịch enzyme ban đầu đem đi tủa (20 mL) thì không xác định được hoạt tính. Ngoài ra, ở các nghiên cứu khác rất ít dùng phương pháp thẩm tích để loại muối, có thể do thời gian thẩm tích lâu (24 giờ) ở điều kiện 10 °C có thể làm mất hoạt tính enzyme.

Kết tủa bằng ethanol 96° làm giảm hoạt tính của enzyme, từ 0,659 UI/mL xuống lần lượt là 0,250; 0,309; 0,382 UI/mL, có thể là vì trong quá trình ly tâm không được thực hiện ở điều kiện lạnh mà chỉ ly tâm ở nhiệt độ thường làm ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme.



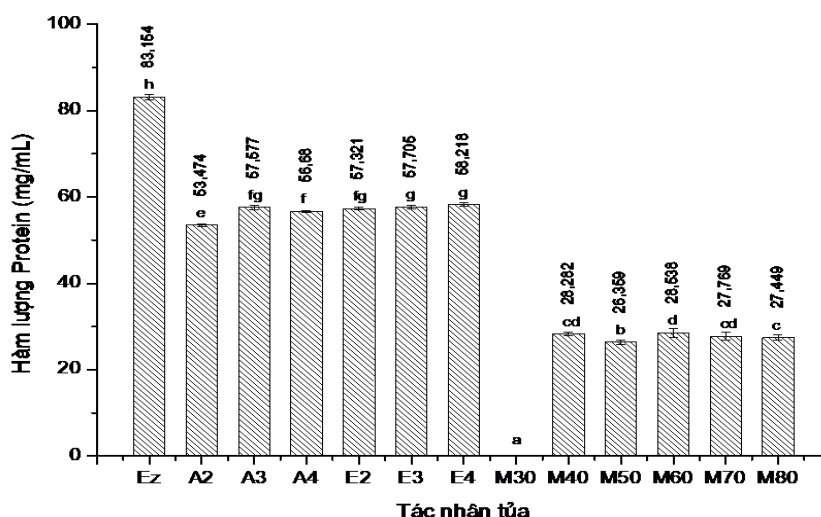
Hình 2. Ảnh hưởng của tác nhân tủa đến hoạt tính enzyme chitosanase

Ez: Hoạt tính enzyme thô; A2, A3, A4 là tỷ lệ tủa enzyme với acetone tương ứng 1:2; 1:3; 1:4 E2, E3, E4 là tỷ lệ tủa enzyme với ethanol tương ứng 1:2; 1:3; 1:4; M30, M40, M50, M60, M70 tỷ lệ muối bổ sung từ 30-80%
 Các ký tự ^{bcdefhc} là giá trị trung bình cột, sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$)

Với phương pháp kết tủa bằng acetone giúp tăng hoạt tính enzyme, hoạt tính cao nhất khi kết tủa với tỷ lệ enzyme:acetone (1:3) là 1,876 UI/mL, gấp 2,8 lần so với hoạt tính enzyme ban đầu. Đối với tỷ lệ enzyme:acetone là 1:2 và 1:4 thì hoạt tính cũng tăng lên so với hoạt tính ban đầu tương ứng là 1,135 và 1,172 (gấp 1,7 và 1,5), tuy nhiên thấp hơn tỷ lệ enzyme:acetone

1:3 (v/v). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Zitouni (2013), bán tinh sạch enzyme bằng acetone cho hoạt tính cao nhất, tuy nhiên tỷ lệ enzyme:acetone là 1:2 (v/v) [13].

Sau quá trình kết tủa, hàm lượng protein giảm đáng kể, nhất là kết tủa muối ammonium sulfate với 50% bão hòa (giảm 3,2 lần so với enzyme thô), các nghiệm thức kết tủa muối khác cũng có hàm lượng protein thấp hơn hẳn so với nghiệm thức tủa cồn và acetone. Tuy nhiên, do không có hoạt tính, nên quá trình tinh sạch này không hiệu quả. Đối với các mẫu kết tủa acetone, hoạt tính cao hơn, hàm lượng protein giảm so với mẫu enzyme thô ban đầu vì trong quá trình bán tinh sạch đã loại bỏ được một số các protein tạp. Hoạt tính riêng của enzyme thô ban đầu là $7,9 \times 10^{-3}$ UI/mg, sau khi kết tủa bằng acetone ở tỷ lệ 1:3 cho hoạt tính riêng chitosanase cao nhất là 32×10^{-3} UI/mg, độ tinh sạch tăng lên 4 lần so với enzyme thô. Với tác nhân tủa là ethanol tỷ lệ 1:4 cho hoạt tính riêng $6,6 \times 10^{-3}$ UI/mg, giảm so với enzyme thô ban đầu. Trong nghiên cứu của Wang *et al.* (2008), quá trình tinh sạch chitosanase từ chủng *Serratia marcescens* TKU011 bằng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cho tổng hoạt tính enzyme là 27 UI, hoạt tính riêng là 0,014 UI/mg độ tinh sạch là 7 lần so với ban đầu [14]. Nghiên cứu của Zhou *et al.* (2008) từ *Gongronella* JG thu được 2 loại chitosanase là csn1 và csn2, tinh sạch csn1 bằng phương pháp sắc ký qua 3 bước CM (carboxymethyl)-sepharose fast flow (FF), Sephacryl S200, SP (sulfopropyl)-sepharose FF có độ tinh sạch hơn tương ứng so với dịch chiết thô ban đầu là 7, 40 và 46 lần. Trọng lượng phân tử của csn1 là khoảng 90 000 Da được xác định bởi SDS-PAGE [12].



Hình 3. Ảnh hưởng của tác nhân tủa đến hàm lượng protein

Ez: Hoạt tính enzyme thô; A2, A3, A4 là tỷ lệ tủa enzyme với acetone tương ứng 1:2; 1:3; 1:4 E2, E3, E4 là tỷ lệ tủa enzyme với ethanol tương ứng 1:2; 1:3; 1:4; M30, M40, M50, M60, M70 tỷ lệ muối bổ sung từ 30-70% Các ký tự ^{abdefg} là giá trị trung bình cột, sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$)

3.3. Thu nhận enzyme chitosanase cô đặc bằng phương pháp lọc tiếp tuyến

Lọc tiếp tuyến là một phương pháp nhanh chóng và hiệu quả cho cô đặc hoặc lọc rửa các phân tử sinh học. Các ứng dụng có thể được áp dụng như cô đặc enzyme giúp giảm thể tích làm việc cho khâu sấy phun, tăng thời gian bảo quản. Vì khối lượng phân tử của chitosanase trong khoảng 24-100 kDa [15], do vậy loại màng được sử dụng có kích thước cut off 3kDa sẽ loại bỏ nước ở phần dòng permeate (dưới màng) và thu nhận enzyme ở dòng retentate (trên màng). Tiến hành nuôi cấy mốc trong 25 bình tam giác 250, sau thời gian 72 giờ tiến hành trích ly enzyme trong đệm pH 5,5 thu nhận được 1000 mL dịch enzyme thô, được đem đi cô đặc. Hoạt tính enzyme trước và sau khi lọc màng được thể hiện qua Bảng 1.

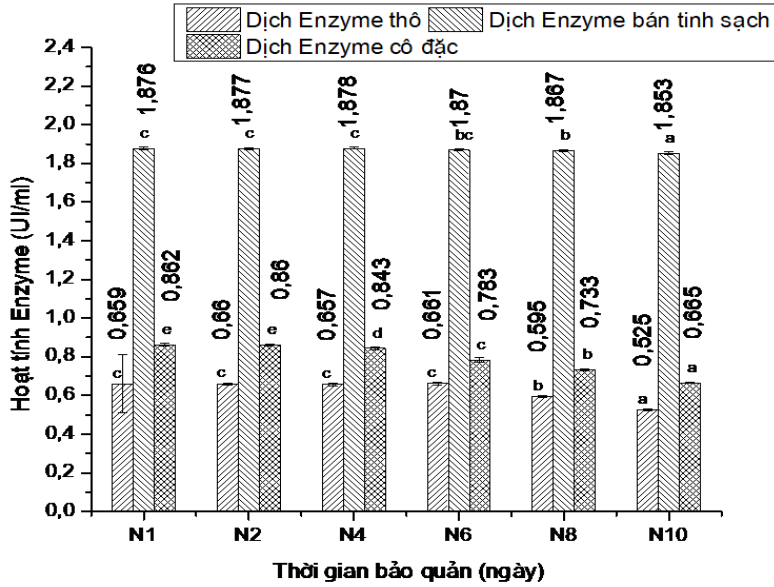
Bảng 1. Hiệu quả của quá trình cô đặc enzyme chitosanase

Dịch enzyme	Thể tích (mL)	Hoạt tính enzyme (UI/mL)	Tổng hoạt tính (UI)	Hiệu suất thu hồi hoạt tính (%)
Dịch chiết thô	1100	0,659	724,9	100
Dịch trên màng (Retentate) 3 kDa	485	0,862	418,07	57,67%
Dịch dưới màng (Permeate) 3 kDa	510	0,087	44,37	6,12%

Bảng 1 cho thấy, sau khi lọc màng thể tích enzyme đã giảm hơn ½ so với trước khi lọc màng, hoạt tính enzyme trên màng lọc là 0,862 UI/mL và cao hơn rất nhiều lần so với hoạt tính enzyme dưới màng. Do kích thước của chitosanase lớn hơn lỗ màng 3 kDa nên enzyme được giữ lại phía trên màng, chính vì thế hoạt tính enzyme dưới màng rất thấp (0,087 UI/mL). Điều này chứng tỏ, chủ yếu nước và các phân tử protein có kích thước bé hơn 3 kDa được loại bỏ. Tuy nhiên, hoạt tính thu hồi enzyme thấp, khoảng 57,67%. Nguyên nhân của hiện tượng này có thể được giải thích là do hoạt tính enzyme giảm trong thời gian lọc màng cũng như hao hụt về thể tích còn lại trong hệ thống màng lọc và một phần nhỏ có ở dòng dưới màng.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian bảo quản dịch enzyme đến hoạt tính enzyme

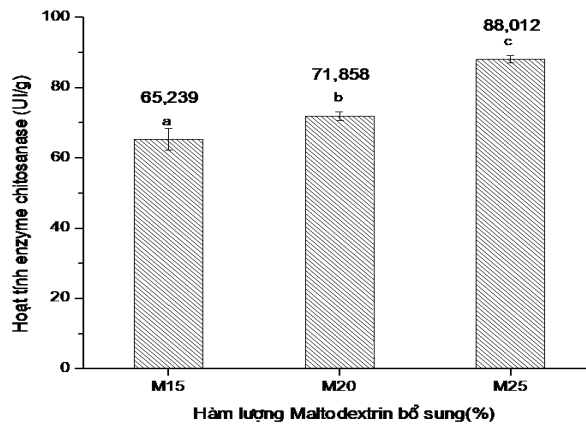
Quá trình tinh sạch enzyme gồm nhiều bước và thường phải mất thời gian hơn 48 giờ. Vì vậy, hoạt tính enzyme cần phải ổn định tốt trong thời gian khảo sát. Do đó, tiến hành khảo sát hoạt tính enzyme trước và sau 10 ngày bảo quản ở nhiệt độ 2-4 °C với các loại dịch enzyme khác nhau. Theo kết quả ở Hình 4, mẫu dịch enzyme thô và bán tinh sạch đều bắt đầu mất hoạt tính sau ngày thứ 6, mẫu enzyme cô đặc mất hoạt tính sau ngày thứ 4, tuy nhiên với mỗi loại dịch khác nhau thì khả năng mất hoạt tính cũng khác nhau. Mẫu enzyme cô đặc mất hoạt tính nhanh nhất, sau 10 ngày đã giảm từ 0,862 xuống 0,665 UI/mL (khoảng 22,8% hoạt tính), mẫu enzyme thô giảm hoạt tính từ 0,659 xuống 0,525 UI/mL (khoảng 20,3% hoạt tính). Mẫu enzyme bán tinh sạch rửa acetone sau 10 ngày giảm từ 1,876 xuống 1,853 ± 0,006 UI/mL (khoảng 1,2% hoạt tính). Enzyme cô đặc mất hoạt tính nhanh, chỉ có thể sử dụng trong vòng 2 ngày; tuy nhiên, mục đích của việc cô đặc là loại nước cho quá trình sấy phun nên điều này không quá ảnh hưởng đến ứng dụng của enzyme cô đặc. Enzyme rửa bằng acetone sau 10 ngày hoạt tính giảm không đáng kể do trong quá trình bán tinh sạch, dịch enzyme đã được loại bỏ các tạp chất ảnh hưởng đến hoạt tính, hoạt tính enzyme cũng cao hơn hẳn so với dịch enzyme thô và dịch enzyme cô đặc. Enzyme dạng thô và bán tinh sạch khá ổn định hoạt tính trong vòng 6 ngày, thời gian này có thể đủ để thực hiện các công đoạn trong quy trình tinh sạch enzyme tiếp theo như sắc ký, điện di, cũng như khảo sát các tính chất khác của enzyme. Enzyme cô đặc mất hoạt tính nhanh hơn, có thể vì trong quá trình loại nước tuy hoạt tính enzyme tăng nhưng không loại bỏ protein tạp. Ngoài ra, quá trình này cũng loại bỏ khoáng – chất làm ổn định pH môi trường, làm cho pH thay đổi dẫn tới hoạt tính của enzyme có thể giảm nhanh trong thời gian bảo quản.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến hoạt tính enzyme
 Các ký tự ^{abcde} là giá trị trung bình cột, sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$)

3.5. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất trợ sấy đến hoạt tính enzyme chitosanase

Để bảo quản enzyme với thời gian lâu hơn, cũng như dễ vận chuyển, việc sấy phun enzyme là cần thiết. Tiến hành sấy phun 100 mL dung dịch enzyme chitosanase đã qua lọc cô đặc với kích thước lỗ màng là 3 kDa nhằm loại bỏ nước với các thông số cố định: nhiệt độ đầu vào 150 °C, nhiệt độ đầu ra 58 °C, tốc độ bơm nhập liệu là 300 mL/giờ, với chất trợ sấy là maltodextrin, với nồng độ chất trợ sấy là 15, 20 và 25%. Kết thúc quá trình sấy, enzyme được khảo sát ngay hoạt tính trong 24 giờ bảo quản lạnh ở 4 °C.



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ chất trợ sấy đến hoạt tính enzyme chitosanase
 Các ký tự ^{abc} là giá trị trung bình cột, sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$)

Khi bổ sung maltodextrin ở nồng độ 15% thì hoạt tính enzyme đạt $65,239 \pm 3,040$ UI/g; ở nồng độ 20%, hoạt tính tăng lên $71,858 \pm 1,190$ UI/g. Đối với nồng độ maltodextrin 25% thì hoạt tính enzyme thu được là cao nhất với hoạt tính $88,012 \pm 1,066$ UI/g.

Cả 3 mẫu đều có màu trắng, hạt mịn sau quá trình sấy, ở nồng độ 15% và 20% lượng maltodextrin bổ sung hoạt tính enzyme tương ứng là 65,239 và 71,858 UI/g với độ ẩm lần

lượt 5,71 và 5,01%, nhưng khả năng hút ẩm nhanh đóng cục sau 15 ngày bảo quản ở nhiệt độ 2-4 °C, khó tách hạt. Nồng độ 25% cho độ ẩm là 3,51% thấp hơn hẳn, khả năng hút ẩm cũng chậm hơn so với hai mẫu 15% và 20%. Độ ẩm càng thấp thì tính ổn định của sản phẩm càng cao, mẫu 25% ổn định nhất nhờ có độ ẩm thấp nhất.

Theo nghiên cứu của Alloue *et al.* (2007), phương pháp sấy phun đạt hiệu quả cao khi kết hợp với các chất trợ sấy như maltodextrin nhờ chất trợ sấy giúp hoạt tính enzyme ổn định, hạn chế sản phẩm bị hút ẩm. Maltodextrin tạo một lớp phủ bên ngoài bảo vệ bề mặt của sản phẩm giúp cho enzyme không bị oxy hóa trong khi sấy, sau khi sấy sản phẩm được bảo quản trong túi nhôm và hút chân không [16]. Hàm lượng maltodextrin bổ sung cao hơn so với nghiên cứu của Alloue, điều này có thể là do hàm lượng chất khô của thí nghiệm thấp (Brix=3), cần tăng hàm lượng maltodextrin phù hợp với quá trình sấy phun.

4. KẾT LUẬN

Sau quá trình thu nhận enzyme chitosanase từ chủng nấm mốc *Aspergillus toxicarius* nhận thấy, enzyme có hoạt tính cao khi trích ly bằng đệm acetate pH 5,5 và kết tủa enzyme bằng acetone với tỷ lệ 1:3 (v/v). Thời gian bảo quản của dịch enzyme thô và dịch enzyme bán tinh sạch bằng acetone còn ngắn. Vì vậy, cần có nghiên cứu tiếp theo để tạo nguồn chitosanase ổn định và có hiệu quả kinh tế.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này do Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 56/HĐ-DCT.

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. Shivakumar S.P, 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.
3. Merve S., Hayrunnisa N., Neslihan D., Recep K. - Purification of chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **13** (35) (2004) 1-7.
4. Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Xuân Sâm - Công nghệ enzyme, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội (2012) 30-32.
5. Nidheesh T., Pal G.K., Suresh P.V. - Chitooligomers preparation by chitosanase produced under solid state fermentation using shrimp by-products as substrate, *Academy of Scientific and Innovative Research* **121** (2015) 1-9.
6. Đào Thị Mỹ Linh, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Đỗ Thị Hoàng Tuyền, Nguyễn Thị Như Phương - Khảo sát quá trình tạo chế phẩm bromelain dạng bột từ phụ phẩm dứa, *Tạp chí Khoa học công nghệ và Thực phẩm* **12** (2017) 21-35.
7. 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) (2010) 1564-1572.

8. Bradford M.M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* **72** (1-2) (1976) 248-254.
9. Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết, Lê Thị Thùy Tiên, Tạ Thu Hằng, Huỳnh Ngọc Oanh, Nguyễn Thúy Hương, Phan Thị Huyền - Công nghệ enzyme, Nhà xuất bản ĐH Quốc gia TP. Hồ Chí Minh (2010) 301-303.
10. Choi Y.J., Kim E.J., Piao Z., Yun Y.C., Shin Y.C. - Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides, *Applied and Environmental Microbiology* **70** (8) (2004) 4522-4531.
11. Jun W., Wei Z., Hang Y., Yujuan W. - Characterization of a novel fungal chitosanase Csn2 from *Gongronella* sp. JG, *Carbohydrate Research* **343** (15) (2008) 2583-2588.
12. 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.
13. Zitouni M., Fortin M., Scheerle R.K., Letzel T., Matteau D., Rodrigue S., Brzezinski R. Biochemical and molecular characterization of a thermostable chitosanase produced by the strain *Paenibacillus* sp. 1794 newly isolated from compost, *Applied Microbiology and Biotechnology* **97** (13) (2013) 5801-5813.
14. Wang S.L., Peng J.H., Liang T.W., Liu K.C. - Purification and characterization of a chitosanase from *Serratia marcescens* TKU011, *Carbohydrate Research* **343** (8) (2008) 1316-1323.
15. Somashekar D., Joseph R. - Chitosanases - properties and applications: A review, *Bioresource Technology* **55** (1) (1996) 35-45.
16. Alloue W.A.M., Destain J., Amighi K., Thonart P. - Storage of *Yarrowia lipolytica* lipase after spray-drying in the presence of additives, *Process Biochemistry* **42** (9) (2007) 1357-1361.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CHITOSANASE COLLECTION AND SEMI-PURIFICATION PROCESS FROM *Aspergillus toxicarius*

Dao Thi My Linh*, Nguyen Thi Quynh Mai, Nguyen Thi Thuy Trang

Ho Chi Minh City University of Food Industry

*Email: linhdtm@cntp.edu.vn

The study aimed to obtain and semi-purify chitosanase from *Aspergillus toxicarius*. Chitosanase was extracted by acetate buffer with pH 4.5; 5.0; 5.5 and phosphate buffer with pH 6.5; 7.0; 7.5. The crude enzyme solution was precipitated with acetone and ethanol at ratio of 1:2; 1:3; 1:4 (v/v), respectively and ammonium sulfate (30-80%). The activity of crude and concentrated enzymes were investigated during storage time of 6-10 days at 2-4° C. The spray drying process was studied with maltodextrin concentration of 15%; 20%; 25% (w/v). The results showed that enzymatic activity was highest in extraction with acetate buffer pH 5.5. The most effective semi-purification condition was enzyme:acetone ratio of 1:3 (v/v). The enzymatic activity was stable during storage time of 10 days. Enzyme powder got maximum activity when maltodextrin was added at a concentration of 25% (w/v).

Keywords: *Aspergillus toxicarius*, acetone, chitosanase, ethanol, semi-purification.