

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

ĐẠI HỌC KHOA HỌC

Nguyễn Ngọc Mai

*“Nghiên cứu phát triển chủng, tối ưu môi trường lên men xộp sản xuất cao sản chitinase từ chủng nấm kí sinh côn trùng *Lecanicillium lecanii* và đánh giá tính chất của enzyme này”.*

MỞ ĐẦU

Chitin phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên, là polysaccharide phổ biến thứ hai sau cellulose. Nó là một chuỗi polymer chứa các đơn phân là *N*-acetylglucosamine được liên kết bởi liên kết β -1,4-glucoside, có trọng lượng phân tử cao, không hòa tan trong nước và các dung môi hữu cơ khác. Chitin là thành phần cấu trúc chính trong vỏ và lớp biểu bì của động vật chân đốt, giáp xác, các loài côn trùng và trong thành tế bào của nấm.

Chitinase thuộc nhóm enzyme thủy phân, phân cắt chitin thành các sản phẩm khác nhau như *N*-acetylglucosamine, chitobiose hay chitotriose. Chitinase có trong nhiều loại cơ thể sống khác nhau bao gồm vi khuẩn, nấm, động vật không xương sống, thực vật và động vật có xương sống. Chitinase được ứng dụng nhiều trong các ngành nông nghiệp như là một tác nhân nhằm kiểm soát nấm gây bệnh thực vật, kiểm soát côn trùng. Trong y dược, chitinase có giá trị trong phòng trừ dịch bệnh, tổng hợp chitooligosaccharide hoạt hóa... Hiện nay, người ta đã nghiên cứu tách chiết chitinase phân giải chitin từ các nguồn khác nhau như vi khuẩn, nấm, động vật, thực vật... nhưng chỉ có chitinase do vi sinh vật tổng hợp, đặc biệt là từ nấm sợi mới có hoạt tính cao, ổn định với nhiệt độ và pH.

Hiện nay, đối với việc phòng ngừa côn trùng có hại cho cây trồng thì biện pháp biến nhất vẫn là sử dụng thuốc trừ sâu hóa học. Việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học với liều lượng ngày càng cao, tần suất nhiều đang ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người và môi trường sinh thái. Với ưu điểm vượt trội về sự thân thiện với con người và môi trường thì thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc sinh học đang là sự lựa chọn có tiềm năng lớn trong xu hướng phát triển nền nông nghiệp bền vững. *Lecanicillium lecanii* là một trong số những chủng nấm entomopathogenic, mà trước đó đã được biết đến rộng rãi như *Verticillium lecanii*, nhưng hiện nay được hiểu là một dạng anamorphic trong nhóm Trùng thảo. Hầu

hết, entomopathogens đều kí sinh trên cơ thể côn trùng. Tuy nhiên, một số entomopathogens có thể tồn tại trên cây trồng. Vì vậy, *L. lecanii* spp. có thể có hai vật chủ là côn trùng và thực vật. Trong tự nhiên, nấm *Lecanicillium* spp. kí sinh và gây bệnh đối với côn trùng phá hoại cây, đặc biệt là rệp. *Lecanicillium* có độc lực rất mạnh đối với một số loài rệp như: rệp đào (*Myzus persicae*) và rệp bông (*Aphis gossypii*). Do vậy, bào tử nấm *Lecanicillium* spp. rất được quan tâm trong vấn đề kiểm soát côn trùng và sâu hại cây.

Từ những vấn đề thực tiễn đã nêu ở trên, chúng tôi tiến hành đề tài: ***“Nghiên cứu phát triển chủng, tối ưu môi trường lên men xộp sản xuất cao sản chitinase từ chủng nấm kí sinh côn trùng *Lecanicillium lecanii* và đánh giá tính chất của enzyme này”***.

Mục tiêu đề tài: Sử dụng biện pháp đột biến để cải biến chủng, tăng hoạt tính chitinase. Đồng thời, tối ưu môi trường lên men xộp sản xuất cao sản chitinase.

Nội dung đề tài:

- Gây đột biến chủng nấm *lecanicillium lecanii* bằng cách sử dụng hóa chất gây đột biến NTG (*N*-methyl-*N'*-nitron-nitrosoguanidine) và tia UV (tia cực tím).
- Sàng lọc các chủng nấm kí sinh côn trùng có hoạt tính chitinase cao nhất.
- Tối ưu môi trường lên men xộp sản xuất cao sản chitinase từ chủng nấm kí sinh côn trùng đột biến sàng lọc.
- Xác định tính chất chitinase.

Chương I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TỔNG QUAN VỀ CHITINASE

1.1.1. Giới thiệu về chitinase

Chitinase [poly- β -1,4-(2-acetalmido-2-deoxy)-D-glucoside glucanohydrolase] thuộc nhóm glycosyl hydrolase, là enzyme thủy phân chitin thành các đơn phân là chitobiose hay chitotriose qua việc xúc tác sự thủy giải liên kết β -1,4-glucoside giữa C1 và C4 của hai phân tử *N*-acetyl Glucosamine liên tiếp nhau trong chitin.

Kí hiệu của chitinase là EC3.2.1.14

Trong đó: 3 → Hydrolase

2 → Glycosylase

1 → Glycosidase

14 → Chitinase

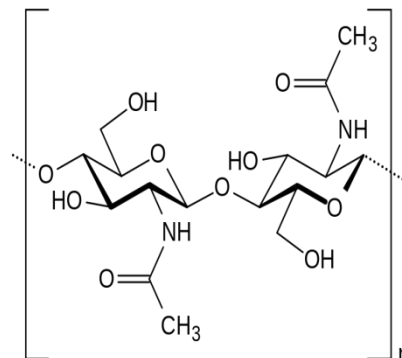
Chitinase còn có các tên gọi khác tùy theo xuất xứ của enzyme là chitodextrinase, β -poly-*N*-acetylglucosamine, ChiA1 (*Bacillus circulans*), Chitotriosidase (*Homo sapiens*), ChiC (*Streptomyces griceus*)...[98].

Chitinase có thể được tìm thấy ở những loài có thành phần cấu trúc chứa chitin như nấm, côn trùng, giáp xác, đến những loài không có chitin như vi khuẩn, thực vật [59]. Ở những sinh vật chứa chitin, chitinase đóng vai trò chính trong quá trình phát sinh hình thái và phân chia tế bào. Tùy thuộc vào các loài sinh vật khác nhau mà tổng hợp chitinase với mục đích khác nhau. Vi khuẩn tổng hợp chitinase để phân hủy chitin tạo ra nguồn carbon. Ở thực vật và động vật, chitinase nằm trong hệ thống chống lại các tác nhân gây bệnh như nấm bằng cách phá vỡ thành tế bào chứa chitin của nấm [91].

Cơ chất của chitinase là chitin và một số dẫn xuất của nó.

- *Chitin [111]*

Chitin $[(C_8H_{13}O_5N)_n]$ là một trong những dạng polysaccharide phổ biến trong tự nhiên, được tạo thành bởi các đơn phân là *N*-acetylglucosamine liên kết với nhau bằng liên kết β -1,4-glucoside. Về mặt cấu trúc, chitin có cấu trúc tương tự như cellulose, điểm khác biệt duy nhất là nhóm acetamido ở vị trí số 2 trên khung carbon của chitin được thay bằng nhóm hydroxyl (-OH) ở cellulose [71].



Hình 1.1: Cấu trúc hóa học của chitinase

Chitin có hoạt tính hóa học thấp, màu trắng, cứng và có chứa nitrogen. Nó không hòa tan trong nước, kiềm loãng hay đặc, rượu và hầu hết các dung môi hữu cơ thông thường. Nó tan axit vô cơ đặc (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄...) và một số dung môi khác (hexafluro isopropanol, hexafluro acetone...) [69], [94].

Một số động vật không xương sống như côn trùng, huyễn thể, giáp xác và giun tròn, chitin là một thành phần cấu trúc quan trọng của lớp vỏ. Ở động vật thủy sản, đặc biệt là trong vỏ tôm, cua, ghẹ, mai mực, hàm lượng chitin chiếm khá cao từ 14 – 35% so với trọng lượng khô [10]. Trong giới thực vật, chitin có ở thành tế bào của nấm và một số tảo *Chlorophyceae* [85].

- *Các dẫn xuất của chitinase*

Chitinase có thể thủy phân một số dẫn xuất của chitin như glycol-chitin, carboxymethylchitin, chitosan, chitinsulfat, 4-methylumbelliferyl-tri *N*-acetylchititriose (MUC – phát huỳnh quang) [33], [60] và không thủy phân một số cơ chất: chitin nitrat, cellulose, hyaluronic acid, alginic acid hoặc mucin.

1.1.2. Phân loại chitinase

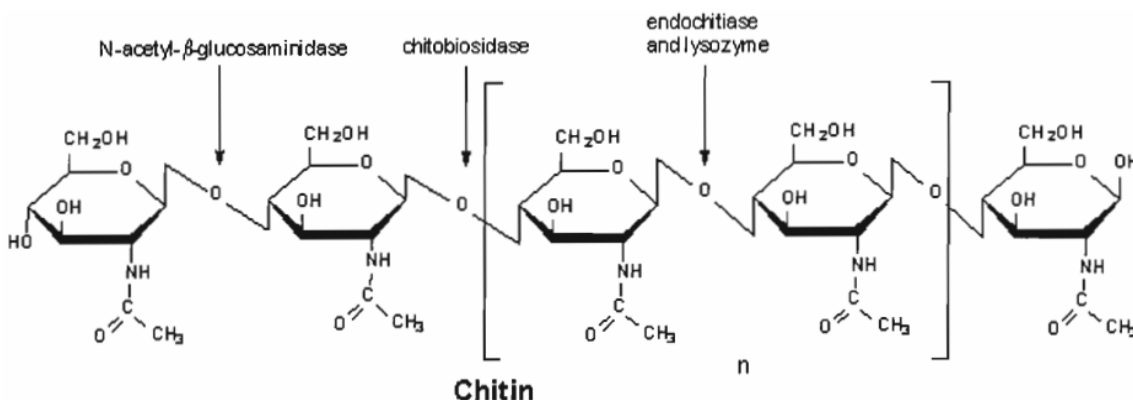
❖ Dựa vào phản ứng phân cắt

Enzyme phân giải chitin bao gồm: endochitinase, chitin-1,4- β -chitobiosidase, *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (exochitinase) [60].

Endochitinase (EC 3.2.1.14): là nhóm enzyme phân cắt nội mạch chitin một cách ngẫu nhiên tạo các đoạn oligosaccharide. Các enzyme này đã được nghiên cứu từ dịch chiết môi trường nuôi cấy nấm mốc *Trichoderma harzianum* (2 loại endochitinase: $M_1 = 36\text{kDa}$, $pI_1 = 5,3 \pm 0,2$ và $M_2 = 40\text{kDa}$, $pI_2 = 3,9$), *Gliocladium virens* ($M = 41\text{kDa}$, $pI = 78$).

Chitin-1,4- β -chitobiosidase: enzyme phân cắt chitin tạo thành các sản phẩm chính là các dimer chitobiose.

N-acetyl- β -D-glucosaminidase (exochitinase): enzyme tiếp tục phân cắt chitin từ một đầu cho sản phẩm chính là các nhóm monomer *N*-acetyl-D-glucosamin.



Hình 1.2: Sơ đồ phân cắt chitinase bởi các enzyme thuộc nhóm chitinase [117]

❖ Dựa vào cấu trúc phân tử

Chitinase thuộc ba họ Glycohydrolase 18, Glycohydrolase 19 và Glycohydrolase 20 [60].

- *Họ Glycohydrolase 18:*

Là họ lớn nhất với khoảng 180 chi, được tìm thấy ở hầu hết các loài thuộc Eukaryote, Prokaryote và virus. Họ này bao gồm chủ yếu là chitinase, ngoài ra còn có chitodextrinase, chitobiase và *N*-acetyl glucosaminidase.

Các enzyme chitinase thuộc họ Glycohydrolase 18 có cấu trúc xác định gồm 8 xoắn α/β cuộn tròn, hoạt động thông qua một cơ chế kiểm soát mà trong đó các đoạn β -polymer bị phân cắt tạo ra sản phẩm là β -anomer [43]. Chúng thủy phân các liên kết GlcNAc – GlcNAc, GlcNAc – GlcN bằng cơ chế giữ nguyên cấu hình anomeric. Hoạt tính của các chitinase thuộc họ 18 bị ức chế bởi allosamidin [53].

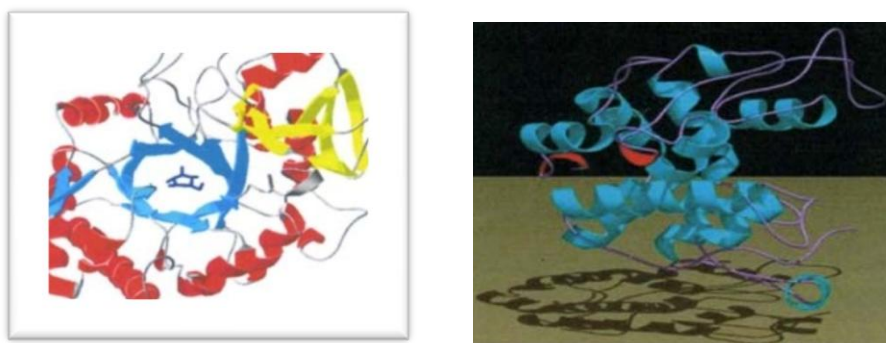
Các chitinase thuộc họ Glycohydrolase 18 bao gồm những chitinase từ thực vật (*Arabidopsis*, dưa leo, cây họ đậu, thuốc lá...), nấm (*Aphanocladium*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*...), vi khuẩn (*Alteromonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Streptomyces*...), virus và động vật [53].

- *Họ Glycohydrolase 19:*

Họ này gồm hơn 130 chi, thường thấy chủ yếu ở thực vật như cà chua (*Solanum tuberosum*), cải (*Arabidopsis thaliana*), đậu Hà Lan (*Pisum sativum*)... ngoài ra còn có ở xạ khuẩn *Streptomyces griceus*, vi khuẩn *Haemophilus influenzae*... Chúng có cấu trúc hình cầu với một vòng xoắn và hoạt động thông qua cơ chế nghịch chuyển.

- *Họ Glycohydrolase 20*

Họ Glycohydrolase 20 bao gồm β -*N*-acetyl-D-Glucosamine acetylhexosaminidase từ vi khuẩn, *Streptomyces* và người.



Hình 1.3: Cấu trúc không gian của họ Glycohydrolase 18 (A) và họ Glycohydrolase 19 (B) [118]

❖ *Dựa vào trình tự amino acid*

Ngoài ra, dựa vào trình tự đầu amin (N), sự định vị của enzyme, điểm đẳng điện, peptide nhận biết và vùng cảm ứng, người ta phân loại enzyme chitinase thành 5 nhóm [88]:

Nhóm I: là những đồng phân enzyme trong phân tử có đầu N giàu cystein nối với tâm xúc tác thông qua một đoạn giàu glycin hoặc prolin ở đầu carboxyl (C) (peptide nhận biết). Vùng giàu cystein có vai trò quan trọng đối với sự gắn kết enzyme và cơ chất chitin nhưng không cần cho hoạt động xúc tác.

Nhóm II: là những đồng phân enzyme trong phân tử chỉ có tâm xúc tác, thiếu đoạn giàu cystein ở đầu N và peptid nhận biết ở đầu C, có trình tự amino acid tương tự chitinase ở nhóm I. Chitinase nhóm II có ở thực vật, nấm, và vi khuẩn. Chúng được cảm ứng bởi các tác nhân bên ngoài.

Nhóm III: trình tự amino acid hoàn toàn khác với chitinase nhóm I và II

Nhóm IV: là những đồng phân enzyme chủ yếu có ở lá cây hai lá mầm, 41 – 47% trình tự amino acid ở tâm xúc tác của chúng tương tự như chitinase nhóm I, phân tử cũng có đoạn giàu cystein nhưng kích thước phân tử nhỏ hơn đáng kể so với chitinase nhóm I.

Nhóm V: dựa trên những dữ liệu về trình tự, người ta nhận thấy vùng gắn chitin (vùng giàu cystein) có thể đã giảm đi nhiều lần trong quá trình tiến hóa ở thực vật bậc cao.

1.1.3. Nguồn thu nhận chitinase

Chitinase hiện diện ở hầu hết các giới sinh vật bao gồm vi sinh vật, thực vật và động vật [37], [60], [94].

❖ Chitinase vi khuẩn

Chitinase được tìm thấy ở *Chromobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Bacillus* và đặc biệt ở nhóm *Streptomyces*. Vi khuẩn tổng hợp chitinase để phân giải chitin trong môi trường nhằm sử dụng nguồn cacbon cho sự sinh trưởng và phát triển.

Chitinase ở vi khuẩn có thể là enzyme cấu trúc hoặc enzyme cảm ứng. Tuy nhiên trong các môi trường nuôi cấy vi sinh vật, người ta đều cho thêm chitin như nguồn cơ chất kích thích làm tăng khả năng tổng hợp chitinase, đồng thời ổn định hoạt tính chitinase sau quá trình tách chiết.

❖ Chitinase nấm

Các loài nấm sợi cũng có khả năng tạo ra chitinase. Các chủng nấm mốc cho chitinase cao như *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Calvatia* ... và đặc biệt ở các nấm lớn như *Lycoperdon*, *Coprinus* ...

Tương tự như ở vi khuẩn, chitinase của nấm cũng đóng vai trò quan trọng về mặt dinh dưỡng, nhưng khác là hoạt động của chúng rất linh hoạt trong quá trình phát triển và trong sự phát sinh hình thái của nấm bởi vì chitin là thành phần chính của vách tế bào nấm. Chitinase còn giữ vai trò trong hoạt động kí sinh nấm nhằm đối kháng lại các loài nấm gây bệnh ở thực vật

❖ *Chitinase thực vật*

Những thực vật bậc cao có khả năng sinh chitinase như thuốc lá, cao su, lúa mạch, cà rốt, đậu nành (hạt), khoai lang (lá) ... Ngoài ra, một số loài tảo biển cũng là nguồn cung cấp chitinase [41].

Chitinase do thực vật tổng hợp nhằm mục đích chống lại các loại côn trùng và nấm kí sinh gây bệnh cho cây trồng [44]. Người ta đã quan sát thấy chitinase được tách chiết từ cây cần tây có khả năng ức chế sợi nấm phát triển. Tuy nhiên cũng có tác giả cho rằng chitinase còn có vai trò khác như tham gia vào quá trình hình thành phôi [35].

❖ *Chitinase động vật*

Ở một số động vật nguyên sinh, từ các mô và tuyến khác nhau trong hệ tiêu hóa của nhiều loài động vật không xương như ruột khoang, giun tròn, thân mềm, chân đốt ... có thể thu nhận được chitinase (ví dụ trong dịch ruột của ốc sên *Helix aspersa*). Đối với động vật có xương sống, chitinase được tiết ra từ tuyến tụy và dịch dạ dày của các loài cá, lưỡng cư, bò sát ăn sâu bọ, trong dịch dạ dày của những loài chim, thú ăn sâu bọ.

Ngoài ra, chitinase còn được thu nhận từ dịch biểu bì của giun tròn trong suốt quá trình phát triển và dịch tiết biểu bì của các loài chân đốt vào thời điểm thay vỏ, lột da. Chitinase giúp côn trùng tiêu hóa màng ngoài (cuticun) của chúng trong quá trình biến thái hay lột xác [33].

1.2. NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG CỦA CHITINASE

1.2.1. Sơ lược nghiên cứu về chitinase

❖ *Nghiên cứu trên thế giới*

So với các enzyme như protease, amylase... thì chitinase được nghiên cứu chậm hơn. Chitinase lần đầu tiên được mô tả bởi Bernad (1911) về ảnh hưởng