NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN VÀ KHẢO SÁT CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG TỚI KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CHITINASE CỦA VI KHUẨN *Bacillus thuringiensis*

STUDY ON SELECTION OF CHITINASE – PRODUCING *Bacillus thuringiensis* AND SURVEY THEIR CHITINASE BIOSYNTHESIS AFFECTING FACTORS

Lê Thị Mai[1], Lê Vũ Khánh Trang[1], Cáp Kim Cương[2], Lê Quang Trường[1], Nguyễn Thị Huyền Trang[1]

[1]Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng;
ltmai_smt@ued.udn.vn, lvkhanhtrang @ued.udn.vn, letruongqb198@gmail.com, huyentrang16cnsh@gmail.com
[2]Trường Đại học Quốc gia Kangwon, Hàn Quốc; kimcuong.cap@gmail.com

Tóm tắt - Nghiên cứu được tiến hành với mục đích tìm ra chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có hoạt tính chitinase mạnh làm cơ sở khoa học cho việc sản xuất chế phẩm chitinase ứng dụng trong phòng trừ bệnh hại cây trồng. Từ 25 mẫu đất của hợp tác xã Túy Loan, huyện Hòa Vang, Tp. Đà Nẵng, chúng tôi đã phân lập được 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. có hoạt tính sinh tổng hợp chitinase (T1, T2 và T3). Trong đó, chủng T3 có khả năng sinh tổng hợp chitinase mạnh nhất. Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA cho thấy, chủng T3 có độ tương đồng 99,86% với loài *Bacillus thuringiensis* SRG2 . Hoạt tính chitinase cao nhất của chủng T3 được tìm thấy trong môi trường nuôi cấy sau 48h với nguồn nitơ là pepton, cacbon là lactose, pH = 7. Các dạng chitin (chitosan, gel chitin, vỏ tôm) bổ sung vào môi trường nuôi cấy ảnh hưởng không đáng kể đến khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng T3.

Từ khóa - *Bacillus thuringiensis*; chitinase; tinh thể độc; enzyme; bào tử.

Abstract - The study is conducted with the aim of finding *Bacillus thuringiensis* with the highest chitinase activity and optimal conditions for chitinase biosynthesis for the chitinase production in application for plant diseases control. From 25 soil samples collected from Tuy Loan, Hoa Vang district, Da Nang city, we have isolated 3 strains of *Bacillus thuringiensis* with chitinase activity (T1, T2 and T3). Among them, T3 strain has the highest chitinase activity. The result of identification by sequencing 16S rRNA shows that, the T3 strain has 99.86% similarity to *Bacillus thuringiensis* SRG2. The highest chitinase activity of T3 strain is obtained after 48h culture in medium containing peptone and lactose as nitrogen and carbon source respectively, pH = 7, The different forms of chitin (chitosan, colloidal chitin, shrimp shells) supplemented to the culture medium do not significantly affect the ability of chitinase activity of T3 strain.

Key words - *Bacillus thuringiensis*; chitinase; toxic crystal; enzyme; spore.

1. Đặt vấn đề

Phân giải chitin bằng phương pháp sinh học, sử dụng enzyme chitinase đã và đang được quan tâm rộng rãi hiện nay bởi sự an toàn, ít sản phẩm phụ so với phương pháp hóa học. Những sản phẩm phân giải từ chitin có tiềm năng rất lớn trong y học, là nguyên liệu điều chế một số dược phẩm quý chữa trị các bệnh: Viêm khớp, viêm phổi, viêm sưng dạ dày, chống nhiễm trùng…, như Oligo N-acetyl-Dglucosamine – sản phẩm được tạo ra từ chitin còn có khả năng chống khối u, kháng nấm và kháng vi khuẩn [1]. Bên cạnh đó, có rất nhiều ứng dụng to lớn của enzyme này trong nhiều lĩnh vực khác nhau như thu nhận tế bào trần, sản xuất chitooligosaccharides, glucosamine, sản xuất thuốc trừ sâu sinh học và kiểm soát nấm kí sinh trên cây trồng [2].

Chitinase có thể được tách chiết từ nhiều nguồn khác nhau như động vật, thực vật và vi sinh vật. Quy trình thu nhận chitinase từ động vật, thực vật khá phức tạp, giá thành cao và cũng không thể đáp ứng nhu cầu thực tế. Trong khi đó, vi sinh vật là nguồn quý giá và vô tận để thu nhận chitinase. Trong tự nhiên, có nhiều loài vi khuẩn có khả năng sinh chitinase, trong đó phải kể đến *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), tác nhân kiểm soát sinh học rất được quan tâm nghiên cứu.

Bt là một loài vi khuẩn gram dương có khả năng sản xuất protein diệt côn trùng được gọi là protein tinh thể (Cry). Tinh thể Cry là độc tố có thể hình thành lỗ và gây chết tế bào bằng cơ chế khác nhau [3]. Nhiều nghiên cứu đã báo cáo rằng chitinase được phát hiện trong các chủng *Bt* [4], [5]. Trong quá trình diệt côn trùng, chitinase do *Bt* sinh tổng hợp đã góp phần đục thủng hàng rào màng peritrophic, để tạo điều kiện cho sự xâm nhập của protein Cry vào màng biểu mô và gây chết tế bào côn trùng [3].

Tại Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu về các chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp chitinase, tuy nhiên nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp chitinase từ vi khuẩn *Bt* còn hạn chế. Vì vậy, việc tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bt* có hoạt tính chitinase và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp chitinase của chúng là rất cần thiết.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp lấy mẫu

Thu 25 mẫu đất từ hợp tác xã Túy Loan, huyện Hòa Vang, Tp. Đà Nẵng. Mỗi mẫu được thu bằng cách gạt bỏ lớp đất mặt khoảng 2–3 cm, lấy lớp đất phía dưới tùy loại cây trồng canh tác mà độ sâu lấy mẫu khác nhau từ 5–20 cm. Sau đó, các mẫu được lưu trữ trong lọ vô trùng kín ở 4°C cho đến khi phân tích.

2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn

Tiến hành pha loãng mẫu đất bằng nước muối sinh lý NaCl 0,9% đến 10^{-10}. Loại bỏ tế bào sinh dưỡng và các vi sinh vật khác bằng cách tiến hành gia nhiệt trong bể ổn nhiệt ở 80°C trong 10 phút. Hút 100µl dịch pha loãng cấy trải trên môi trường Luria Bertani (LB): Cao nấm men 5g/l; Tryptone 10g/l; NaCl 5g/l; pH 7 - 7,2. Sau đó, chuyển đĩa vào ủ ở 37°C trong 24 giờ. Chọn khuẩn lạc đặc trưng cho *Bacillus thuringiensis*, tiến hành nhuộm Gram, nhuộm Coomassie brilliant blue trong 3 phút để quan sát hình dạng tế bào, tinh thể và bào tử [6].

2.3. Phương pháp tuyển chọn chủng vi khuẩn Bacillus thuringiensis có hoạt tính chitinase cao

Tiến hành xác định hoạt tính chitinase bằng phương pháp cấy chấm điểm [7] thực hiện trên môi trường LB bổ sung 0,5% dịch huyền phù chitin. Sau 3 ngày nuôi cấy xác định khả năng phân giải chitin được bằng cách nhuộm với dung dịch Lugol 1%.

2.4. Phương pháp xác định vi khuẩn được tuyển chọn

Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* giả định có hoạt tính chitinase mạnh nhất được định danh sơ bộ bằng đặc điểm sinh lý, sinh hóa. Nghiên cứu đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng vi khuẩn tuyển chọn được tiến hành theo phương pháp của theo Claus và Berkeley [8] với các phép thử sinh hóa như Oxidase, Catalase, Voges Proskauer (VP), khả năng sử dụng Citrate, khả năng phân giải Gelatin, khả năng sử dụng các loại đường glucose, sucrose, đặc điểm sinh trưởng ở 5°C, 42°C và nồng độ 10% NaCl.

Sau đó, tiến hành định danh bằng phương pháp giải trình tự vùng gen 16S rRNA [9]. Nuôi cấy thu sinh khối vi khuẩn trong môi trường LB ở máy lắc 180 vòng/phút trong 16 giờ. Tách chiết DNA tổng số, khuếch đại vùng gen 16S rRNA bằng phản ứng PCR, sản phẩm PCR được tinh chế và gửi giải trình tự tại Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ). Sử dụng công cụ BLAST trên website NCBI để tìm kiếm trình tự tương đồng cho kết quả.

2.5. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến hoạt tính chitinase của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Tiến hành nuôi cấy vi khuẩn tuyển chọn trong môi trường (LB) với tỷ lệ tiếp giống là 7%, pH = 7, nhiệt độ 37°C, tốc độ lắc là 200rpm. Tiến hành khảo sát các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến hoạt tính chitinase bao gồm:

Thời gian nuôi cấy: Thu dịch enzyme thô tại sau 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 60 giờ và 72 giờ.

Nguồn nitơ: Các nguồn nitơ bao gồm pepton, Ure, $NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$ ở nồng độ 0,5% (w/v) được sử dụng thay thế cho Tryptone trong môi trường LB.

Nguồn carbon: Các nguồn carbon: glucose, lactose, saccharose, mantose ở nồng độ 0,5% (w/v) được bổ sung cho nguồn carbon trong môi trường LB.

pH: Khảo sát pH lần lượt là: 6, 7, 8, 9.

Cơ chất chitin: Khảo sát các dạng chitin bao gồm chitosan, bột vỏ cua, gel chitin với nồng độ bổ sung là 5g/lit.

Hoạt tính chitinase được định tính theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Tiến hành ly tâm dịch nuôi cấy ở 6.000 vòng/phút trong 15 phút để thu phần dịch trong (enzyme thô). Đĩa thạch chứa cơ chất chitin huyền phù 0,5% được đục lỗ đường kính 0,8 cm. Mỗi giếng nhỏ 100 µl dịch enzym thô rồi để 2 - 3 tiếng ở 4ºC để enzym khuếch tán vào thạch. Sau đó chuyển đĩa vào ủ 37ºC, trong 14 – 16 giờ rồi lấy ra nhuộm dung dịch Lugol 1% [5], [10].

2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại ba lần và lấy giá trị trung bình. Số liệu thực nghiệm được xử lý thống kê sử dụng phần mềm Microsoft excel.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn Bacillus thuringiensis

Sau khi thu 25 mẫu đất của hợp tác xã Túy Loan, huyện Hòa Vang, Tp. Đà Nẵng, nhóm tác giả tiến hành tuyển chọn các chủng *Bacillus thuringiensis* theo phương pháp của Traves [6]. Dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc nuôi ở 37°C trên môi trường LB 48 giờ và quan sát hình dạng tế bào, tinh thể và bào tử khi nhuộm với Coomassie brilliant blue theo phương pháp của Fadel [11], thu được 3 chủng vi khuẩn được kí hiệu từ T1 đến T4, trong đó có 03 chủng khả năng là *Bacillus thuringiensis* (T1, T2 và T3) (Bảng 1).

Bảng 1. *Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và một số đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn phân lập được ở 37ºC*

Kí hiệu chủng	Hình thái khuẩn lạc (KL)	Hình thái tế bào	Bào tử	Tinh thể
T1	KL màu trắng sữa, có núm ở giữa, viền lan rộng, nhìn nghiêng bề mặt sần sùi	Hình que, xếp thành chuỗi, bào tử chính tâm, tinh thể hình cầu	+	+
T2	KL có màu trắng sữa, lõm ở giữa lớn, viền lan rộng tròn nhăn	Hình que, xếp riêng lẻ, bào tử chính tâm tinh thể hình cầu	+	+
T3	KL màu trắng đục, tròn đều, có ria nhỏ tỏa đều, hơi nhầy	Hình que, xếp riêng lẻ, bào tử chính tâm tinh thể hình cầu và hình quả trám	+	+
T4	KL màu vàng nhạt, tròn đều, có nhầy	Hình que, không sinh bào tử	-	-

Ghi chú: (+) kết quả dương tính; (-) kết quả âm tính

Kết quả thể hiện ở Bảng 1 nhận thấy, 3 chủng thuộc chi *Bacillus* và có sự hiện diện của tinh thể độc. Những chủng vi khuẩn này có đặc điểm giống với các vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* đã được công bố, đó là: Khuẩn lạc màu trắng, bề mặt nhăn hoặc không, có viền lan rộng; Tế bào có dạng hình que, đầu hơi tù, bào tử hình trứng chính tâm; Tinh thể có hình lưỡng tháp, hình lập phương và hình cầu [9].

3.2. Kết quả tuyển chọn các chủng vi khuẩn Bacillus thuringiensis có khả năng sinh enzyme chitinase

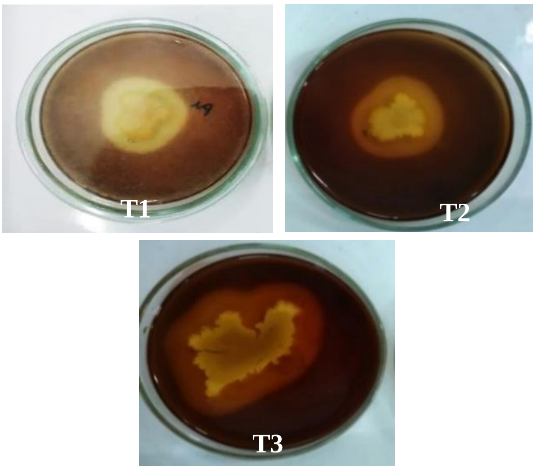
Từ 3 chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* giả định đã phân lập, tiến hành thu dịch enzyme vi khuẩn và xác định hoạt tính phân giải chitin theo phương pháp cấy chấm điểm. Kết quả được trình bày ở Bảng 2 và Hình 1.

Bảng 2. *Kết quả thử hoạt tính của các chủng vi khuẩn Bacillus thuringiensis giả định*

Kí hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải (D - d) mm	Mức độ hoạt tính
T1	11,0 ± 1,08	Trung bình
T2	15,5 ± 1,75	Trung bình
T3	20,0 ± 1,01	Mạnh

Kết quả của Bảng 2 và Hình 1 cho thấy, cả 3 chủng *Bacillus thuringiensis* giả định đều có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase. Tuy nhiên, chủng T3 có khả năng phân giải chitin mạnh nhất, đường kính vòng phân giải là 20 ± 1,01mm. Dựa vào kết quả sàng lọc trên, nhóm tác giả chọn chủng vi khuẩn T3 có hoạt tính chitinase cao để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Nếu so sánh với kết quả của Trịnh Thị Thu Hà, thì hoạt tính của chủng T3 thấp hơn, chủng Bt MSS1.1 có hoạt tính chitinase đạt 29mm [12].



Hình 1. *Vòng phân giải chitin của enzyme chitinase đối với 3 chủng T1,T2, T3*

3.3. Kết quả định danh chủng T3

Các chủng *Bacillus thuringiensis* được đặc trưng bởi sự hiện diện của protein tinh thể. Tuy nhiên, để phân biệt *Bacillus thuringiensis và Bacillus cereus* nhóm tác giả tiến hành khảo sát các đặc tính sinh lý và sinh hóa của chủng T3. Đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn tuyển chọn được tiến hành theo phương pháp theo Claus và Berkeley [8].

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, T3 có các phản ứng dương tính liên quan đến xét nghiệm catalase, phản ứng VP, và có khả năng di động, khả năng phân giải gelatin, có khả năng sử dụng citrate và các loại đường glucose, sucrose, lactose làm nguồn cacbon. Vi khuẩn T3 tăng trưởng ở 42°C nhưng không sinh trưởng ở 5°C và cũng không thể phát triển trong môi trường có chứa NaCl 10%, đây là một những đặc điểm để phân biệt giữa loài *B. thuringiensis* với loài *B. cereus*. Như vậy, với những đặc điểm sinh hóa của chủng T3, dựa vào khóa phân loại của Claus và Berkeley [8], có thể khẳng định sơ bộ được T3 là *Bacillus thuringiensis*.

Để định danh chính xác chủng T3, nhóm tác giả gửi sản phẩm khuếch đại đọc trình tự tại Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ) thu được kết quả như sau: Trình tự tương đồng 99,86% với loài *Bacillus thuringiensis* SRG 2, cho phép kết luận chủng T3 là loài *Bacillus thuringiensis* (Phụ lục 1).

Bảng 3. *Kết quả thử nghiệm sinh hóa của chủng T3*

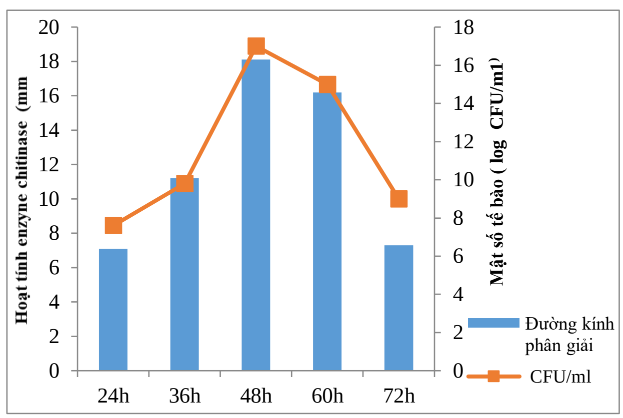
Oxidase	Catalase	Khả năng sử dụng				Điều kiện sinh trưởng			Phân giải gelatin	VP	Di động
		Glucose	Sucrose	Lactose	Citrate	5°C	42°C	NaCl 10%			
+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+

Ghi chú: (+) kết quả dương tính; (-) kết quả âm tính

3.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt tính chitinase của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Để xác định thời gian thích hợp thu nhận chitinase cần phải tiến hành khảo sát thời gian nuôi cấy. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt tính chitinase của chủng vi khuẩn T3 được thể hiện ở Hình 2. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong điều kiện nuôi cấy tĩnh, vi khuẩn T3 sinh trưởng, phát triển mạnh trong 48h nuôi cấy, tế bào đi vào pha cân bằng sau 48h, mật độ tế bào đạt $1{,}7.10^9 \pm 0{,}05$ CFU/ml. Đây cũng là thời điểm ghi nhận hoạt tính chitinase của chủng T3 mạnh nhất với đường kính vòng phân giải đạt $18{,}1 \pm 1{,}01$mm. Sau 60h nuôi cấy, mật độ tế bào giảm và sau 72h, mật độ tế bào chỉ đạt $9.10^8 \pm 0{,}03$ CFU/ml, đồng thời hoạt tính enzyme cũng giảm mạnh, đường kính vòng phân giải chỉ thu được $7{,}3 \pm 0{,}4$ mm. Kết quả của nghiên cứu tương đồng với nghiên cứu của Chanpen Wiwat khi khảo sát sự tăng trưởng và sản xuất chitinase của *B. thuringiensis* ssp. kurstaki HD-1 (G) thấy rằng, hoạt tính chitinase cao nhất sau 2 ngày nuôi cấy (19,3 mU / ml) và giảm sau khi nuôi cấy thêm [13]. Điều này có thể được giải thích, khi vào pha suy vong do thiếu chất dinh dưỡng, do các chất độc hại được tạo ra làm bất hoạt enzyme hoặc do lysosome của tế bào giải phóng các enzyme phân giải bào quan và cả tế bào dẫn tới giảm năng suất enzyme [14].

Nghiên cứu của M. Liu và cs [4] có sự khác biệt, chủng *Bacillus thuringiensis* T13003 và T04A001 có hoạt động chitinase xuất hiện vào lúc 6 đến 10 giờ, lúc bắt đầu sinh bào tử và tăng dần trong toàn bộ giai đoạn bào tử. Các hoạt động chitinase tối đa được phát hiện sau 72 giờ nuôi cấy, tương ứng với giai đoạn giải phóng bào tử, với hoạt tính chitinase cao nhất là 314 U/ ml và 355 U/ml. Sự khác biệt này có thể được giải thích là do chủng T3 có thời gian sinh trưởng ngắn hơn so với các chủng vi sinh vật khác.



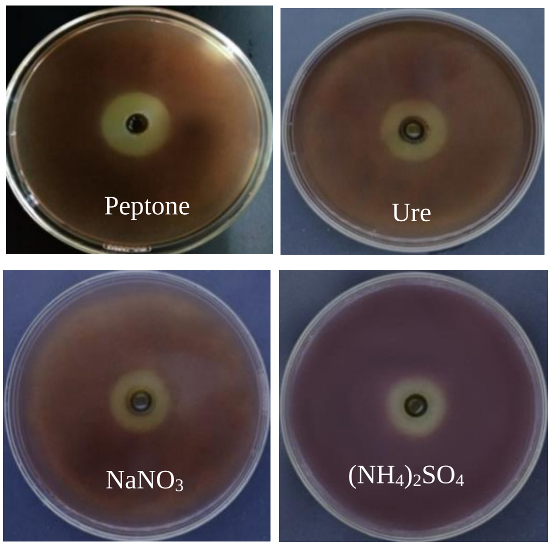
Hình 2. *Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt tính chitinase của các chủng vi khuẩn T3*

3.5. Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung trong môi trường nuôi cấy đến hoạt tính chitinase của chủng vi khuẩn T3

Bản chất của enzyme là protein. Vì vậy nguồn nitơ có ảnh hưởng sâu sắc đến quá trình sinh tổng hợp enzyme do nó là tiền chất cuối cùng của sinh tổng hợp protein. Nguồn nitơ cũng có thể ảnh hưởng đến độ pH của môi trường nuôi cấy, ảnh hưởng đến hoạt động và tính ổn định của enzyme [15]. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung trong môi trường nuôi cấy đến hoạt tính chitinase của chủng vi khuẩn T3 được ghi nhận ở Bảng 5 và Hình 3.

Bảng 5. *Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase của chủng T3*

Nguồn nitơ	Đường kính phân giải (mm)	Mức độ hoạt tính
Peptone	20,3 ± 2,3	Mạnh
Ure	15,5 ± 1,75	Trung bình
$NaNO_3$	11,2 ± 1,58	Trung bình
$(NH_4)_2SO_4$	9,2± 0,58	Yếu



Hình 3. *Đường kính vòng phân giải chitin của chủng T3 ở các nguồn nitơ*

Kết quả Bảng 5 và Hình 3 cho thấy, môi trường có các nguồn nitơ khác nhau thì đường kính vòng phân giải chitin của chủng T3 khác nhau. Nếu sử dụng $(NH_4)_2SO_4$ thì đường kính vòng phân giải nhỏ nhất (9,2 ± 0,58 mm) do lượng enzyme sinh ra không nhiều, khả năng phân giải chitin không cao. Kết quả này trùng hợp với nghiên cứu của Abdel- Abdel-Mawgoud AM và cs [16] và Makkar RS [17]. Trong các nghiên cứu của hai tác giả trên thấy rằng. một số chủng *Bacillus* spp. không thể sử dụng $(NH_4)_2SO_4$ để sinh trưởng phát triển hoặc sản xuất chất hoạt động bề mặt; Tuy nhiên, các chủng này vẫn có thể sử dụng $NaNO_3$, NH_4NO_3 hoặc KNO_3. Một nghiên cứu khác của Trịnh Thị Thu Hà cũng cho thấy khi sử dụng urê làm nguồn nitơ thì hoạt tính chitinase thu được rất thấp (đạt 0,47 U/ml) [12].

Khi nguồn nitơ là hữu cơ thì vòng phân giải chitin của chủng T3 tăng lên. Đạt giá trị cao nhất khi sử dụng 5g peptone, đường kính 20,3 ± 2,3 mm. Việc thay thế peptone cho tryptone giúp giảm chi phí sản xuất do giá thành của tryptone cao hơn so với peptone.

Kết quả trên cũng hoàn toàn phù hợp với đặc điểm sinh trưởng của *Bacillus thurgiensis* trong các nghiên cứu tương tự. Theo Eman Zakaria Gomaa [5], nguồn nitơ hữu cơ rất giàu axit amin và peptide ngắn hỗ trợ sản xuất enzyme. Trong nghiên cứu của tác giả thì casein mang lại kết quả cao nhất sản xuất chitinase của *B. thuringiensis* đạt 19,21 U/ml. Còn trong nghiên cứu của Trịnh Thị Thu Hà khi khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ của chủng *Bt* MSS1.1 cho thấy, sử dụng bột đậu tương làm nguồn nitơ thì hoạt tính chitinase thu được cao nhất (đạt 0,87 U/ml), tiếp đến là cao nấm men, peptone và cao thịt hoạt tính lần lượt là 0,78; 0,74 và 0,69 U/ml [12].

3.6. Ảnh hưởng của nguồn carbon bổ sung trong môi trường nuôi cấy đến hoạt tính chitinase của chủng vi khuẩn T3

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase của chủng T3 được ghi nhận ở Bảng 6.

Qua kết quả Bảng 6 cho thấy, Lactose và Mantose làm tăng hoạt tính phân giải chitin của chủng T3, đường kính vòng phân giải chitin lần lượt là 19mm ± 0.58 và 16mm ± 0,41. Kết quả này trùng hợp với nghiên cứu của Eman Zakaria Gomaa [5] khi sử dụng đường Lactose và Mantose cho sản xuất chitinase bởi *B. thuringiensis,* hoạt tính chitinase tương ứng 10 U/ml và 9 U/ml. Tuy nhiên, theo tác giả khả năng sinh enzyme của *Bacillus thurgiensis* được tìm thấy trong môi trường gel chitin sửa đổi với galactose là cao nhất (16,02 U/ml).

Bảng 6. *Ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng T3*

Nguồn Carbon	Đường kính phân giải (mm)	Mức độ hoạt tính
Lactose	19,5 ± 0,58	Mạnh
Mantose	16,3 ± 0,41	Trung bình
Saccharose	11,3 ± 0,41	Trung bình
Glucose	11,2 ± 1,86	Trung bình

Theo Trịnh Thị Thu Hà [12], chủng *Bt* MSS1.1 trong môi trường sử dụng bột ngô làm nguồn carbon chính, hoạt tính chitinase đạt cao nhất (0,79 U/ml), cao hơn so với môi trường cơ sở ban đầu sử dụng glucose làm nguồn carbon (hoạt tính đạt 0,71 U/ml). Hoạt tính chitinase sinh ra thấp nhất (0,56 U/ml) trong môi trường có nguồn carbon là lactose.

3.7. Nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến hoạt tính chitinase của chủng T3

pH của môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến một số ion chuyển hóa như H^+ và OH^- và tính thấm của màng tế bào vi khuẩn, từ đó hỗ trợ sự phát triển của tế bào và khả năng sản xuất enzyme. Phần lớn vi khuẩn sản xuất chitinase đạt hiệu quả tối đa khi được nuôi cấy trong môi trường trung tính hoặc axit yếu [18]. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến hoạt tính chitinase của các chủng vi khuẩn T3 được ghi nhận ở Bảng 7.

Bảng 7. *Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến hoạt tính chitinase của chủng vi khuẩn T3*

Nồng độ pH	Đường kính phân giải (mm)	Mức độ hoạt tính
pH6	11 ± 0.67	Trung bình
pH7	21,1 ± 0,72	Mạnh
pH8	20 ± 0,38	Mạnh
pH9	10,4 ± 1,22	Trung bình

Dựa vào Bảng 7 nhận thấy, chủng T3 sinh tổng hợp chitinase thích hợp ở pH = 7.0 và 8.0, đường kính vòng phân giải chitin từ 20 ± 0,38 mm đến 21,1 ± 0,72mm. Ở pH = 6 và pH = 9, hoạt tính enzyme mức trung bình, vòng phân giải từ 10,4 ± 1,22 mm đến 11 ± 0,67mm. Kết quả này trùng hợp với nghiên cứu của Eman Zakaria Gomaa [5] *B. thuringiensis* và *B. licheniformis* sinh chitinase tối ưu pH 7.0 và 8.0 với hàm lượng lần lượt là 1,28 và 1,20 U/ml. Tương tự, Nawani và cộng sự [19] báo cáo rằng pH tối ưu cho sản xuất chitinase bởi *Microbispora* sp. V2 là pH 7. Shanmugaiah V và cs [20] cho rằng, độ pH tối ưu tương tự là 8,0 đối với sản xuất chitinase của *B. pabuli* K1 và *B. laterosporus* ML2270. Nghiên cứu của Trịnh Thị Thu Hà cũng cho kết quả tương đồng, hoạt tính chitinase của chủng *Bt* MSS1.1 cao nhất được thu nhận tại pH=7 [12].

3.8. Ảnh hưởng của dạng cơ chất chitin đến hoạt tính chitinase của chủng T3

Ảnh hưởng của các dạng cơ chất bao gồm chitin thô, gel chitin và chitosan tới khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng T3 được thể hiện ở Bảng 8.

Bảng 8. *Ảnh hưởng của các dạng cơ chất chitin bổ sung vào môi trường nuôi cấy đến hoạt tính chitinase của chủng vi khuẩn T3*

Các dạng chitin	Đường kính phân giải (mm)	Mức độ hoạt tính
Chitosan	11 ± 0,05	Trung bình
Gel chitin	10,2 ± 0,01	Trung bình
Bột vỏ cua	9,1 ± 0,08	Yếu

Kết quả Bảng 8 cho thấy dạng cơ chất chitin ảnh hưởng không đáng kể đến khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng T3. Hoạt tính chitinase của chủng T3 dao động trong khoảng 8,5 ± 0,08 mm đến 11 ± 0,01 mm ở các dạng chitin khác nhau. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Đặng Thị Hường [21], theo tác giả dạng chitin ảnh hưởng không nhiều đến khả năng sinh tổng hợp chitinase của *P. oxalicum* 20B. Hoạt tính chitinase nhận được tương đương nhau dao động trong khoảng 0,062 U/ml đến 0,065 U/ml trong quá trình lên men và đạt cao nhất ở thời điểm 120 h.

Theo Trịnh Thị Thu Hà [12] khi sử dụng bột chitin làm cơ chất cảm ứng, hoạt độ chitinase do chủng *Bt* MSS1.1 sinh ra cao nhất đạt 0,67 (U/ml) so với nguồn chitin là vỏ tôm (0,43 U/ml), vỏ cua (5,2 U/ml).

Trong nghiên cứu của Saima và cs [22] đã công bố, trong số các dạng chitin như chitin dạng thô, dạng bột và dạng gel, chitin dạng gel là chất cảm ứng tốt nhất cho sinh tổng hợp chitinase từ *Aeromonas hydrophila* HS4 cũng như từ *A.punctata* HS6. Theo Kim và cs [23] công bố gel chitin và chitin dạng bột (kích thước nhỏ hơn 250 µm) cho hoạt tính chitinase cao nhất trong 7 ngày lên men từ *Serratia marcescens* QM B1466. Chen và cs [24] nghiên cứu sinh tổng hợp chitinnase từ chủng *Aeromonas schubertii* cho thấy kích thước bột chitin trong khoảng 30 - 35 µm cho hoạt tính chitinase tương tự nhau, nhưng kích thước nhỏ 12µm thì hoạt tính chitinase nhận được lại giảm nhiều.

4. Kết luận

Từ 25 mẫu đất của hợp tác xã Túy Loan, huyện Hòa Vang, Tp. Đà Nẵng đã phân lập được 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. có sự hiện diện của tinh thể độc và có khả năng sinh tổng hợp chitinase (T1, T2 và T3). Trong đó, chủng T3 có khả năng sinh tổng hợp chitinase mạnh nhất. Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng T3 có độ tương đồng 99,86% với loài *Bacillus thuringiensis* SRG2. Hoạt tính chitinase cao nhất của chủng T3 được tìm thấy trong môi trường nuôi cấy sau 48h với nguồn nitơ là pepton, carbon là lactose, pH = 7. Các dạng chitin (chitosan, gel chitin, vỏ tôm) bổ sung vào môi trường nuôi cấy ảnh hưởng không đáng kể đến khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng T3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Kirkham, S.G. and R.K. Sammarasinghe, "Review article: glucosamine" *Orthop Surg (Hong Kong)*, 2009,17: pp. 72-76

[2] Nguyễn Thị Hà, "Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chủng nấm *Aspergillus protuberus* sinh tổng hợp enzyme chitinase được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ", *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ* , 2012, 22b, tr.26-35.

[3] Shotaro Honda, Toshiyuki Kunii, Kenta Nohara, Satoshi Wakita, Yasusato Sugahara, Masao Kawakita, Fumitaka Oyama, and Masayoshi Sakaguchi,"Characterization of a *Bacillus thuringiensis* chitinase that binds to cellulose and chitin", *AMB Express*, 2017, 7 (51).

[4] M. Liu, Q.X. Cai, H.Z. Liu, B.H. Zhang, J.P. Yan, Z.M. Yuan "Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity", *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93, 374–379.

[5] Eman Zakaria Gomaa, "Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol", *The Journal of Microbiology*, 2012, 50, 103–111.

[6] Traves R.S., Martin, P. A. W., Reichelderfer, C. F., "Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* sp." *Applied Environmental Microbiology,* 1987, 53: 1263–1266.

[7] Lê Ngọc Tú và cộng sự, *Enzyme vi sinh vật* (*tập 1, tập 2*), Nhà xuất bản. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 1982

[8] Claus, D. and Berkeley, R.C.W. *Genus Bacillus Cohn, 1872*. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt. J.G., Eds., *Bergey's Manual of Systematic Bac-teriology,* The Williams & Wilkins Co., Baltimore 2, 1105-1139, 1986

[9] Nguyễn Thiên Phú, Trần Thanh Thủy, "Phân lập và tuyển chọn *Bacillus thuringiesis* từ rừng ngập mặn Cần Giờ có hoạt tính diệt sâu (Plutella xylos)". *Tạp chí Khoa học Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh*, 2013, 51, 49 – 58

[10] Trịnh Thị Hồng, "Nghiên cứu ảnh hưởng một số yếu tố đến quá trình sinh tổng hợp chitinase của chủng nấm metarhizium sp. được phân lập từ xác côn trùng tại Thanh hóa", *Tạp chí khoa học trường đại học Hồng Đức*, 2017, số 35.70- 75

[11] Fadel A. Sharif and N. Gfirdal Alaeddinoglu, "A rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*", *Journal of Industrial Microbiology*, 1988, 227 – 229.

[12] Trịnh Thị Thu Hà, "*Tách dòng, biểu hiện và nghiên cứu tính chất của Endochitinase từ Bacillus thuringiensis phân lập ở Việt Nam*", Luận án Tiến sĩ, Viện Công nghệ sinh học, Viện hành lâm khoa học và công nghệ Việt Nam, 2018.

[13] Chanpen Wiwat, Saranya Thaithanun, Somsak Pantuwatana, and Amaret Bhumiratana, "Toxicity of Chitinase-Producing Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki HD-1 (G) toward *Plutella xylostella*", *Journal of Invertebrate Pathology*, 2000, 76, 270–277.

[14] P.M. Kao, P.J. Tsai, Y.C. Liu, Y.C. Chang, Optimization of cultivation conditions for the production of chitinase from *Paenibacillus* sp. *CHE-N1, J. Chin. Inst. Chem. Eng*. 37 (2006) 263–355

[15] S. Nizamudeen and B.K. Bajaj, "Thermo-Alkalitolerant Endoglucanase from *Bacillus*, Food Technol", *Biotechnol*, 2009, 47 (4), 435–440.

[16] Abdel-Mawgoud AM, Aboulwafa MM, Hassouna NAH, "Optimized production of Surfactin by *Bacillus subtilis* isolated BS5", *Biotechnology*, 2008, 150 (3). 305-325

[17] Makkar RS, Cameotra SS, "Produces surfactants with a thermophilic *Bacillus subtilis* strain", *Biotechnology J Ind Microbiol*, 1997, 18. 37-42

[18] Sharaf EF, "A potent chitinolytic activity of Alternaria alternata isolated from Egyptian lack Sand", *Polish journal of Microbiology*, 2005, vol 54, No2, 145 -151

[19] Nawani NN, Kapadnis BP, "Chitin degrading potential of bacteria from extreme and moderate environment", *Indian J Exp Biol*, 2003, 41, 248–254

[20] Shanmugaiah V, Mathivanan N, Balasubramanian N, Manoharan PT, "Optimization of culture conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil", *Afr J Biotechnol*, 2008, 7, 2562–2568.

[21] Đặng Thị Hường "*Nghiên cứu thu nhận N-acetylglucosamine (NAG) bằng chitinase từ Penicillium oxalicum 20B định hướng ứng dụng trong sản xuất thực phẩm chức năng*", Luận án tiến sỹ, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, 2017.

[22] Saima, M.K., Rooh, I.Z. Ahmad, "Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase". *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2013 11:pp, 39-46.

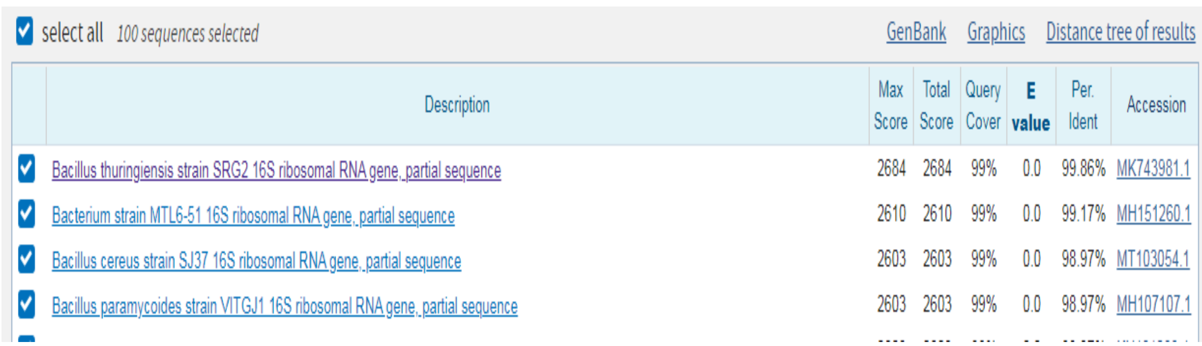
[23] Kim, K., A.L. Creagh, and C.A. Haynes Effective Production of N-Acetyl-ß-Dglucosamine By Serratia mareescens Using Chitinaeeous Waste. *Biotechnol.Bioprocess Eng*. 1998, 3: pp. 71-77.

[24] Chen, J.K., C.R. Sheng, and C.L. Liu, "The Characteristics of Chitinase Expression in Aeromonas schubertii*", Appl Biochem Biotechnol*, 2014 172: pp, 3827-3834.

Phục lục 1

CAGCTTGGGG GGCGTGCTAT ACATGCAAGT CGAGCGAATG GATTAAGAGC TTGCTCTTATGAAGTTAGCG GCGGACGGGT GAGTAACACG TGGGTAACCT GCCCATAAGA CTGGGATAACTCCGGGAAAC CGGGGCTAAT ACCGGATAAC ATTTTGAACC GCATGGTTCG AAATTGAAAGGCGGCTTCGG CTGTCACTTA TGGATGGACC CGCGTCGCAT TAGCTAGTTG GTGAGGTAACGGCTCACCAA GGCAACGATG CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGACGAAAGTCTGACGGAG CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGCTTTCGG GTCGTAAAAC TCTGTTGTTAGGGAAGAACA AGTGCTAGTT GAATAAGCTG GCACCTTGAC GGTACCTAAC CAGAAAGCCACGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGTAGGTG GCAAGCGTTA TCCGGAATTATTGGGCGTAA AGCGCGCGCA GGTGGTTTCT TAAGTCTGAT GTGAAAGCCC ACGGCTCAACCGTGGAGGGT CATTGGAAAC TGGGAGACTT GAGTGCAGAA GAGGAAAGTG GAATTCCATGTGTAGCGGTG AAATGCGTAG AGATATGGAG GAACACCAGT GGCGAAGGCG ACTTTCTGGTCTGTAACTGA CACTGAGGCG CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGAG TGCTAAGTGT TAGAGGGTTT CCGCCCTTTA GTGCTGAAGTTAACGCATTA AGCACTCCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG GCTGAAACTC AAAGGAATTGACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTT GAAGCAACGC GAAGAACCTTACCAGGTCTT GACATCCTTT GACAACCCTA GAGATAGGGC TTCTCCTTCG GGAGCAGAGTGACAGGTGGT GCATGGTTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAACGAGCGCAAC CCTTGATTTTAGTTGCCATC ATTTAGTTGG GCACTCTAAG GTGACTGCCGGTGACAAACC GGAGGAAGGT GGGGATGACG TCAAATCATC ATGCCCCTTA TGACCTGGGCTACACACGTG CTACAATGGA CGGTACAAAG AGCTGCAAGA CCGCGAGGTG GAGCTAATCT CATAAAACCGTTCTCAGTTC GGATTGTAGG CTGCAACTCG CCTACATGAA GCTGGAATCGCTAGTAATCG CGGATCAGCA TGCCGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACCCCGCCCGTCCCCCCC CGAGAGTTTG TAACCCCCGA AGTCGGTGG GTAACCTTTT TGAGCCAGCCGCCTAAAGG GGGAACAGA ATA

Hình 1. *Trình tự gen 16S rRNA của chủng T3*


select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☑	Bacillus thuringiensis strain SRG2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2684	2684	99%	0.0	99.86%	MK743981.1
☑	Bacterium strain MTL6-51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2610	2610	99%	0.0	99.17%	MH151260.1
☑	Bacillus cereus strain SJ37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2603	2603	99%	0.0	98.97%	MT103054.1
☑	Bacillus paramycoides strain VITGJ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2603	2603	99%	0.0	98.97%	MH107107.1

Hình 2. *Kết quả tìm kiếm trình tự tương đồng chủng vi khuẩn T3*

(BBT nhận bài: 17/4/2020, hoàn tất thủ tục phản biện: 26/11/2020)