# KHẢO SÁT KHẢ NĂNG THỦY PHÂN CHITIN BẰNG ENZYM THU NHẬN TỪ *TRICHODERMA HARZIANUM* ĐỂ TẠO N-ACETYL-D-GLUCOSAMIN

**Đào Thị Thanh Xuân, Trần Phương Chi**

*Khoa Hóa, Trường Đại học Vinh*

## 1. MỞ ĐẦU

Chitin là polymer mạch thẳng của liên kết β-1,4 acetyl-glucosamine, là polymer sinh học quan trọng thứ hai sau Cellulose. Chitin là thành phần chính cấu tạo nên lớp vỏ ngoài của côn trùng, các động vật giáp xác và thành tế bào nấm. Chitin bị thủy phân bởi các enzym endo, exo chitinase và β-N acetylhexosaminidase để tạo ra các sản phẩm thủy phân khác nhau. Trong tự nhiên các enzym này được thu nhận từ vi khuẩn, nấm mốc, xạ khuẩn và một số nguồn khác.[3][7]

Chitinase là nhóm enzym thủy phân phức tạp, chúng xúc tác phân cắt các chuỗi polymer của chitin. Chitin được thủy phân bằng endochitinase giải phóng các oligomer của N-acetyl-D-glucosamine. Các oligomer lần lượt được phân giải bởi enzym β - N acetylhexosaminidase để tạo các monomer N-acetyl -D-glucosamine [7].

Quá trình thủy phân chitin sử dụng axit tạo sản phẩm muối hydrochlorid (GlcNHCl) là một trong những thực phẩm chức năng quan trong và là thuốc sử dụng bắt buộc đối với các bệnh nhân viêm khớp. Để tránh các ảnh hưởng không tốt như vị đắng và vị mặn của muối vô cơ, thì dạng GlcNAc có vị ngọt được đề xuất sử dụng để thay thế với tác dụng tương tự. [6] [7]

Các báo cáo điều chế N-acetyl glucosamine bằng phương pháp sử dụng enzym đã được công bố trong những năm gần đây [3][6][7]. Nghiên cứu này thực hiện điều chế N-acetyl-D-glucosamin sử dụng chitinase thu nhận từ *Trichoderma* spp.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Chủng *Trichoderma harzianum* 095TH được phân lập và tuyển chọn tại phòng thí nghiệm hóa thực phẩm Trường Đại học Vinh. Bảo quản trên môi trường PDA ở 4$^o$C.

*Trichoderma harzianum* 095TH nuôi cấy trên môi trường PDA trong 3 ngày ở 30$^o$C. Thu nhận hệ sợi cấy chuyền lên lỏng cho quá trình sinh tổng hợp enzym chitinase

Môi trường sinh tổng hợp enzym

$(NH_4)_2SO_4$ 0,7 g, $FeSO_4.7H_2O$ 0,0025g, $KH_2PO_4$ 1g, $MnSO_4$ 0,0008g , Urea 0,015g, $MgSO_4$ 0,15g, $ZnSO_4.7H_2O$ 0.0007g, $CaCl_2$ 0,15g, $CoCl_2$ 0,001g. Bổ sung Chitin huyền phù 1% , pH = 3,5 - 5, nhiệt độ 20 - 60$^o$C. [1][2]

Chitin được điều chế từ vỏ tôm theo quy trình

Vỏ tôm Ngâm trong HCl Đun với NaOH 3% Tẩy màu bằng $KMnO_4$ Rửa sạch Sấy khô Chitin

## 2.2 Phương pháp

*2.2.1 Xác định hoạt tính enzyme chitinase*

Hoạt tính của enzyme chitinase được xác định dựa trên cơ sở định lượng sản phẩm N – acetyl D – Glucosamin tạo thành khi thủy phân chitin bằng enzym thô bằng phương pháp Elson - Morgan

Xây dựng đường chuẩn với chất chuẩn N-acetyl D- glucosamine ở các nồng độ khác nhau. Cường độ màu của phản ứng tương ứng với một hàm lượng nhất định.

Một đơn vị hoạt tính của enzyme chitinase tương ứng với 1 µmol N-acetyl-D-glucosamin tạo thành trong thời gian thủy phân là một phút ở nhiệt độ phản ứng.

*2.2.2. Nghiên cứu một số đặc tính chitinase từ Trichoderma 095TH*

pH và nhiệt độ tối ưu của enzym được xác định bởi phản ứng enzym ở pH từ 3,5 - 5,5 và nhiệt độ từ 20 - 60$^{o}$C [4][5].

*2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ E/S đến phản ứng thủy phân chitin*

- Chitin được huyền phù làm cơ chất
- Thực hiện phản ứng ở các tỉ lệ E/S = 10 U/g – 30U/g
- Môi trường đệm acetat pH = 4,5
- Nhiệt độ thủy phân t = 45$^{0}$C
- Thời gian thủy phân là 30 phút

Xác định hàm lượng N-acetyl-D-glucosamin tạo thành bằng phương pháp Elson – Morgan .

*2.2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng thời gian thủy phân đến phản ứng thủy phân chitin*

- Chitin huyền phù 1%
- Phản ứng trong môi trường đệm pH = 4,5
- Nhiệt độ phản ứng t = 45$^{0}$C
- Đo hàm lượng N-acetyl-D-glucosamin sau mỗi ngày thủy phân

*2.2.5. Hiệu suất thủy phân điều chế GlcNAc*

$$H = \frac{m_2}{m_1} \times 100$$

Trong đó:

$m_1$: là lượng chitin đưa vào tham gia phản ứng

$m_2$: là hàm lượng glucosamin thu được sau phản ứng thủy phân

*2.2.6. Kiểm tra sản phẩm N-acetyl D-glucosamin bằng sắc ký hiệu năng cao HPLC*

Kiểm tra sản phẩm bằng sắc ký hiệu năng cao HPLC ở các điều kiện

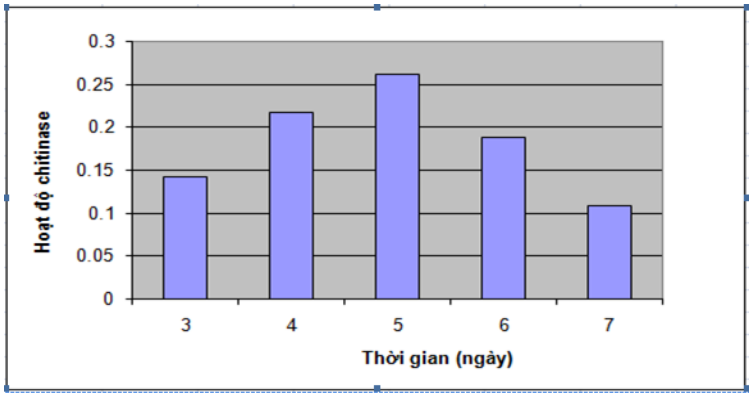
- Cột chạy sắc kí: Hydrat Cacbon
- Thể tích mẫu: 20µl
- Tốc độ dòng: 1ml/phút

UV = 205

## 3. KẾT QỦA VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Thu nhận chế phẩm enzyme chitinase từ *Trichoderma harzianum* 095TH

*Trichoderma* 095TH được nuôi lắc tốc độ 180 vòng/phút, trong môi trường sinh tổng hợp enzym với cơ chất là chitin huyền phù 1%, pH 5 và nhiệt độ 30$^{o}$C. Lấy mẫu sau 3, 4, 5, 6 và 7 ngày để xác định hoạt độ chitinase . Kết quả xác định hoạt tính chitinase theo thời gian cho thấy hoạt tính enzym cao nhất sau 5 ngày nuôi cấy đạt 0,261 U/ml.

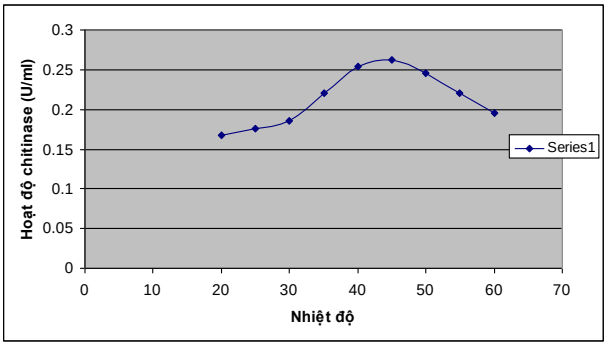



*Hình 1*: Hoạt độ enzym thu được từ *Trichoderma* 095TH theo thời gian

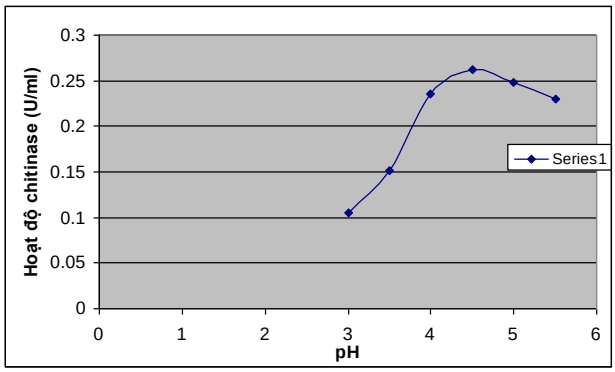
Thu nhận enzym tại thời điểm lớn nhất bằng cách lọc loại bỏ sinh khối thu enzym thô. Mỗi enzyme có khoảng nhiệt độ và pH hoạt động nhất định, ngoài khoảng hoạt động enzyme bị bất hoạt làm giảm hoạt tính xúc tác. Hoạt độ xúc tác của enzym mạnh nhất tại nhiệt độ và pH tối ưu.

Để xác định nhiệt độ và pH tối ưu của chitnase từ *Trichoderma* 095 TH sử dụng enzym được kết tủa bằng $(NH)_2SO_4$ bão hòa ở tỷ lệ Vez/Vdm = 1:3.

Kết quả thể hiện ở các hình 2 và hình 3




*Hình 2*: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính chitinase của enzym từ *Trichoderma* 095TH




*Hình 3*: Ảnh hưởng của pH tới hoạt tính chitinase của enzym từ *Trichoderma* 095TH

Kết quả thể hiện ở hình 2 và 3cho thấy chitinase thu nhận từ *Trichoderma* 095TH hoạt động mạnh khoảng nhiệt độ từ 40$^o$C - 50$^o$C, nhiệt độ tối ưu 45$^o$C. pH hoạt động mạnh từ pH 4 đến pH 5, pH tối ưu là 4,5

### 3.2. Thủy phân chitin thu nhận N-acetyl-D-glucosamin bởi chế phẩm enzym chitinase

Phản ứng điều chế N-acetyl-D-glucosamin được thực hiện với cơ chất là chitin huyền phù điều chế từ vỏ tôm tại pH tối ưu và nhiệt độ tối ưu của chitinase từ *Trichoderma* 095TH.

Hiệu suất thủy phân chitin bởi enzym không những phụ thuộc nhiệt độ, pH của phản ứng mà còn chịu ảnh hưởng bởi tỷ lệ enzym: cơ chất và thời gian phản ứng

#### *3.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ enzym/ cơ chất (E/S)*

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ enzym/ cơ chất được tiến hành tại pH và nhiệt độ tối ưu của enzym. Thay đổi tỷ lệ E/S từ 10, 15, 20, 25 và 30 U/g với thời gian thủy phân 30 phút. Đo hàm lượng sản phẩm tạo thành thu được kết quả như sau**.**

*Bảng 1*: Ảnh hưởng của tỷ lệ enzym/cơ chất đến hàm lượng N acetyl D glucosamin trong dịch thủy phân

| Tỉ lệ E/S (U/g) | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
|---|---|---|---|---|---|
| Mật độ quang | 0.932 | **1.028** | 0.867 | 0.794 | 0.795 |
| Hàm lượng N- acetyl D- glucosamin(µg/ml) | 736.4 | **823.6** | 677.3 | 610.9 | 610,9 |

Kết quả bảng 1 cho thấy tỷ lệ E/S thích hợp nhất cho phản ứng thủy phân điều chế N-acetyl-D-glucosamine là 15U/g.

*3.2.2. Quá trình thủy phân chitin bởi enzym theo thời gian*

Nghiên cứu thời gian thủy phân của phản ứng được tiến hành tại pH và nhiệt độ tối ưu của enzym, tỷ lệ enzym/ cơ chất (E/S) là 15U/g. Đo hàm lượng sản phẩm tạo thành sau các thời gian phản ứng khác nhau từ ngày thứ nhất đến thời điểm kết thúc phản ứng.

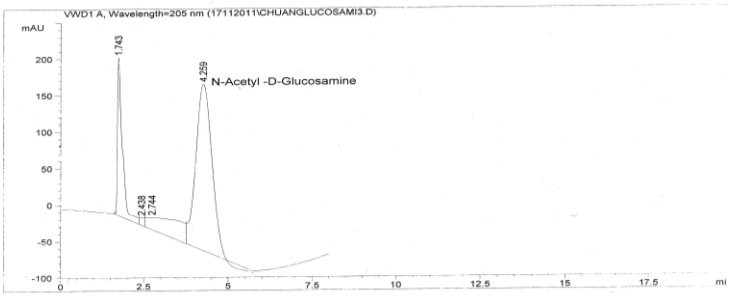
*Bảng 2*: Ảnh hưởng của thời gian phản ứng tới lượng N acetyl D glucosamin tạo thành trong dịch thủy phân

| **Thời gian (ngày)** | **ΔOD** | **Hàm lượng N -acetyl D-Glucosamin (µg/ml)** |
|---|---|---|
| 1 | 2.123 | 1819.1 |
| 2 | 2.507 | 2168.2 |
| 3 | 2.792 | 2427.3 |
| 4 | 3.059 | 2670 |
| 5 | 3.477 | 3050.1 |
| 6 | 3.937 | 3468.5 |
| **7** | **4.348** | **3842** |
| 8 | 4.348 | 3842 |
| 9 | 4.348 | 3842 |

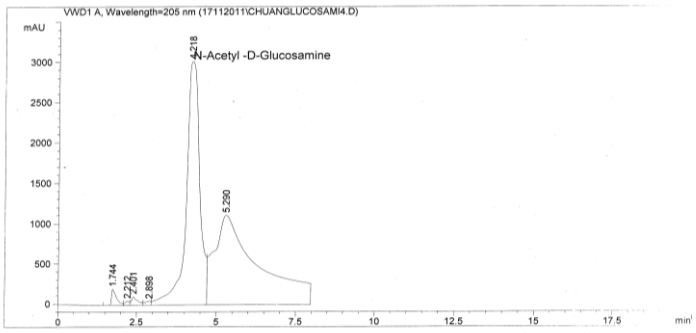
Qua bảng kết quả ta thấy rằng hàm lượng sản phẩm cao nhất thu được sau 7 ngày thủy phân. Sau 7 ngày thủy phân hiệu suất đạt 76,8%

*3.3. Xác định N-acetyl-D-glucosamin trong dịch thủy phân bằng HPLC*

Kiểm tra sản phẩm tạo thành chúng tôi sử dụng sắc ký hiệu năng cao HPLC.




*Hình 4*: Sắc kí HPLC của N acetyl D Glucosamin chuẩn




*Hình 5:* Sắc kí HPLC sản phẩm thủy phân chitin bằng chtinase thu nhận từ Trichoderma 095TH

Kết quả kiểm tra bằng HPLC cho thấy thời gian lưu mẫu thủy phân và mẫu chuẩn trùng nhau, do đó có thể kết luận sản phẩm chủ yếu khi thủy phân chitin bằng chitinase thu nhận từ *Trichoderma* 095TH là N-acetyl -D-Glucosamin

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A.K Singh, G.Mehta and S.H. Chahatpar-Optimization of medium constituents for improved chitinase production by Paenibacillus sp.D1 using statistical approach, The Sociaety for Applied Micrbiology , Letter in Applied Microbiology 49 (2009) 704 – 714.
2. Cirano J. Ulhoa and John F.-Regulation of chitinase synthesis in Trichoderma harzianum, Jounal of General Microbiology ,137(1991) 2163 -2169.
3. Masahiro MATSUMIYA-Enzymatic production of N-acetyl D-glucosamine using crude ezyme from the liver of Squids, Food Sci. Technol. Res 10 (3) (2004) 296 -299

4. Neetu Dahiya Department of Biotechnology Panjab University-Chitinase from *Enterobacter sp*. NRG4: Its purification, characterization and reaction pattern, Electronic Journal of Biotechology 8(2) (2005) 134-135.
5. Kyoung - Ja Kim, Yong - Joon Yang and Jong - Gi Kim-Purification and Characterrization of Chitinase from *Streptomyces*, Journal of Biochemistry and Molecular Biology 36(2) (2003) 185 -189.
6. Seiichi AIBA-Production of N-acetyl -D-glucosamine from chitin using crude enzyme preparation in Large Scale. Journal of Metal, Material and Mineral 15(1) 2005 23 – 25.
7. Phakapob SETTHAKASET, Rath PICHYANGKURA, anawat AJAVAKOM and Mongkol SUKWATTANASINITT-Preparation of N-acetyl D-glucosamine using enzym from *Aspergillus* sp, Jounal of Metals, Materials and Mineral 18(2) (2008) 53-57.

## ABSTRACT

## PREPARATION OF N-ACETYL-D-GLUOCOSAMINE USING ENZYM FROM TRICHODERMA HARZIANUM SPP

The preparation of GlcNAc using chitinase of *Trichoderma* spp is used in studied. The cultivation *Trichoderma* 095TH in colloidal chitin media at pH 5 and temperature 30$^{o}$C. After 5 days gives the hightest chitinolytic activity of 0,261 U/ml. The crude enzym obtained from the cultivation is used in the hydrolysic of chitin at optimal conditions of chitinase are pH 4.5 and temprature 45$^{o}$C, using 15 U/ml of enzym per gram of chitin. After 7 day of hydrolysis, NlcNAc is isolated in 76,8 % yield. The main product analyzed by HPLC, was GlcNAc

*Keywoords: Glucosamin, N-Acetyl D-glucosamin, chitinase, chitin*