

NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ CHITO-OLIGOSACCHARIDE KHÁNG *Fusarium oxysporum* BẰNG ENZYME THỦY PHÂN CHITIN/CHITOSAN TỪ XẠ KHUẨN

Trịnh Thị Vân Anh, Nguyễn Quỳnh Uyên, Nguyễn Ngọc Hồng, Đinh Thị Lâm, Hoàng Văn Vinh✉

Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: vinhhv@vnu.edu.vn

Ngày nhận bài: 29.10.2020

Ngày nhận đăng: 05.5.2021

TÓM TẮT

Chito-oligosaccharide (COS), một trong những dẫn xuất đáng chú ý của chitosan, không những có được hầu hết những hoạt tính sinh học của chitosan mà còn vượt trội ở một số đặc tính như hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn, kích kháng thực vật... Phương pháp điều chế COS theo con đường sinh học bằng cách sử dụng enzyme đã cho thấy nhiều lợi thế so với các phương pháp hóa học và vật lý. Trong nghiên cứu này, COS đã bước đầu được nghiên cứu điều chế từ nguyên liệu chitosan bằng cách sử dụng enzyme có hoạt tính thủy phân chitin/chitosan từ chủng xạ khuẩn VTCC 940003. Chủng xạ khuẩn sử dụng được định danh dựa trên trình tự 16S rDNA. Khả năng sinh tổng hợp enzyme của chủng này được định tính bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, sau đó được định lượng dựa trên lượng đường khử bằng cách sử dụng thuốc thử dinitrosalicylic acid (DNS). Kết quả cho thấy chủng xạ khuẩn được định danh là *Streptomyces macrosporeus* và hoạt độ tương đương chitinase của chủng này là $24 \pm 0,05$ U/ml. Sản phẩm COS được tạo ra bằng cách sử dụng enzyme từ chủng VTCC 940003 để thủy phân chitosan. Sản phẩm COS thu được chủ yếu có mức độ polyme (degree of polymerization, DP) nằm trong khoảng DP3-DP5 dựa trên kết quả sắc ký bản mỏng. Ở nồng độ 0,3% sản phẩm này có tác dụng ức chế 98% sự nảy mầm của bào tử nấm *Fusarium oxysporum* tại 24 giờ và hoạt tính này tiếp tục được duy trì tại 48 giờ.

Từ khóa: chitinase, chito-oligosaccharide, mức độ polyme, sắc ký bản mỏng, xạ khuẩn

ĐẶT VẤN ĐỀ

Các biện pháp sinh học sử dụng các sinh vật đối kháng, kháng sinh tự nhiên, chế phẩm sinh học... để tiêu diệt, hạn chế vi sinh vật gây bệnh nhưng không gây độc cho cây trồng, vật nuôi và không gây ô nhiễm môi trường đang ngày càng được phát triển. Chito-oligosaccharide (COS) là một dạng oligome, được tạo ra từ quá trình thủy phân chitosan và được ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp với vai trò thuốc bảo vệ thực vật sinh học chống các tác nhân gây bệnh bao gồm cả nấm (Dahiya *et al.*, 2006; Kawase *et al.*, 2006). *Fusarium oxysporum* là một trong những loài nấm bệnh gây thiệt hại lớn đối với nhiều loại cây trồng có giá trị kinh tế như tiêu, cà phê, cà chua, khoai tây... (Kawase *et al.*, 2006).

Điều chế COS từ chitosan bằng phương pháp hóa học hay vật lý có thể gây ra ô nhiễm môi trường hay các phản ứng phụ. Ngoài ra, hoạt tính của COS phụ thuộc rất nhiều vào các đặc tính như mức độ polymer hóa (degree of polymerization, DP), độ deacetyl hóa,

sự phân bố điện tích và bản chất biến đổi hóa học trên phân tử COS. Trong khi đó, thủy phân chitosan bằng phương pháp sinh học sử dụng enzyme có nhiều lợi thế so với các phương pháp trên về khả năng dự đoán và khả năng kiểm soát (Rinaudo, 2006). Trong số các loài thuộc chi *Streptomyces*, *Bacillus* và *Pseudomonas*, enzyme có hoạt tính phân giải chitin/chitosan từ *Streptomyces* được nghiên cứu nhiều nhất. Tuy nhiên, enzyme có hoạt tính thủy phân chitin/chitosan từ các chi vi sinh vật trên cũng như từ *Streptomyces* nói riêng thường có hoạt độ yếu (Tsujibo *et al.*, 2003; Veliz *et al.*, 2017; Kawase *et al.*, 2006). Trong nghiên cứu này, COS đã bước đầu được nghiên cứu điều chế bằng enzyme có hoạt tính thủy phân chitin/chitosan từ xạ khuẩn. Chủng xạ khuẩn VTCC 940003 (được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử là *Streptomyces macrosporeus*) có khả năng sinh tổng hợp enzyme có hoạt tính thủy phân chitin/chitosan với hoạt độ tương đương với hoạt tính chitinase cao ($24 \pm 0,05$ U/ml). Dựa trên phương pháp sắc ký bản mỏng sản phẩm COS thu được có mức độ

polyme hóa chủ yếu nằm trong khoảng DP3-DP5. Sản phẩm COS ở nồng độ 0,3‰ có tác dụng ức chế 98% sự nảy mầm của bào tử nấm *Fusarium oxysporum* tại 24 giờ và hoạt tính này tiếp tục được duy trì tại 48 giờ.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Các chủng vi sinh vật được lưu giữ tại Trung tâm Nguồn gen Vi sinh vật Quốc gia (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Cụ thể là: chủng xạ khuẩn sinh enzyme có hoạt tính phân giải chitin/chitosan VTCC 940003 và các chủng đối chứng thuộc chi *Streptomyces* có mã số lần lượt là VTCC 1156, VTCC 1163, VTCC 1176 và VTCC 1251. Chitosan (được mua từ hãng Marinard Biotech, Canada) với các đặc tính như: trọng lượng phân tử trung bình khoảng 85 ± 5 kDa, mức độ deacetyl khoảng 90% và mức độ polyme khoảng 207. Mẫu chuẩn chito-oligosaccharide (chứa các oligome có mức độ polyme từ DP1 đến DP5) được mua từ hãng Seikagaku Biobusiness Corporation, Nhật Bản.

Các hóa chất đạt tiêu chuẩn cần thiết cho các nghiên cứu trong sinh học phân tử và phân tích hóa sinh.

Nuôi cấy và định danh xạ khuẩn

Dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn sau 4 ngày ở nhiệt độ 25°C trong môi trường YS (10 g tinh bột tan, 1 g K_2HPO_4 , 1 g $MgSO_4$, 1 g NaCl, 2 g $(NH_4)_2SO_4$, 2 g chitin; thể tích 1 lit) được ly tâm với tốc độ 10000 vòng/phút trong 20 phút thu dịch trong (để xác định hoạt tính và hoạt độ enzyme) và cặn tế bào (để tách hệ gen theo Sambrook và đồng tác giả (2001)). Gen 16S rDNA của chủng vi khuẩn được khuếch đại với cặp mồi 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG và 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT. Hỗn hợp phản ứng (50 μ l) gồm 25 μ l master mix, 10 pmol mỗi mồi, 1 μ l DNA khuôn và nước được bổ sung cho đủ thể tích 50 μ l. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR: 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ (95°C: 30s; 55°C: 30s; 72°C: 1 phút 30s) và 72°C: 10 phút. Đối chứng âm (-) có thành phần như trên, nhưng DNA khuôn được thay bằng nước. Sản phẩm PCR sau đó được phân tích bằng điện di trên gel agarose và gửi đến hãng 1st Base (Singapore) để xác định trình tự. Sau đó các trình tự này được xử lý và phân tích bằng các phần mềm tin sinh như: Bioedit, MegaX, ClustalX. Cây phân loại được tạo nên bằng phương pháp neighbor-joining (Saitou, Nei, 1987). Mô hình cây phân loại đã được đánh giá bằng phân tích bootstrap với 1000 lần lặp lại (Felsen, 1985).

Xác định hoạt tính và hoạt độ chitinase (Lee *et al.*, 2009)

Dịch nuôi cấy xạ khuẩn sau ly tâm được nhỏ vào các giếng thạch trên môi trường có chứa 0,1% chitin. Đĩa thạch được đặt ở 4°C trong vòng 15 phút rồi ủ ở nhiệt độ 37°C và sau 24 giờ được nhuộm bằng Lugol (1 g I_2 và 2 g KI hòa tan trong 100 ml nước). Hoạt tính enzyme được xác định bằng đường kính vòng phân giải cơ chất. Đối chứng âm là môi trường nuôi cấy không có vi sinh vật. Hoạt độ enzyme là hoạt độ tương đương chitinase và được xác định bằng phương pháp sử dụng thuốc thử dinitrosalylic acid (DNS) với chất chuẩn là N-acetyl glucosamine. Phương trình đường chuẩn có dạng: $Y = 0,0005x + 0,328$; $R^2 = 0,9999$; trong đó: x: Hàm lượng đường N-acetyl glucosamin có trong dung dịch (μ g/ml); Y: Độ hấp phụ quang học tại bước sóng 500 nm. Một đơn vị hoạt độ chitinase được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng lượng đường khử tương đương 100 μ M N-acetyl glucosamin trong 60 phút ở điều kiện phản ứng.

Điều chế COS bằng chitinase từ chủng VTCC 940003

Cơ chất chitosan (nồng độ nằm trong khoảng 0,01 đến 0,02 g/ml) được chuẩn bị bằng cách hòa tan chitosan trong dung dịch acetic acid 1% rồi bổ sung nước cất và dung dịch đệm Tris-base 0,5M pH 8. Dung dịch chitinase với hoạt độ $24 \pm 0,05$ U/ml thu từ chủng VTCC 940003 được ủ với cơ chất chitosan theo thể tích (1:9) và khuấy đều ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Sau đó hỗn hợp được đun sôi ở 100°C trong 10 phút, ly tâm, thu dịch trong để kiểm tra chất lượng sản phẩm COS thu được.

Phương pháp sắc ký bản mỏng TLC

Phương pháp sắc ký bản mỏng (Thin Layer Chromatography, TLC) được thực hiện trên bản silicagel (Merck 60. GF-254) bằng cách sử dụng n-propanol: H₂O: amoniac khan theo tỷ lệ 7:2:1 (v:v:v). Kết quả được thể hiện sau khi phun dung dịch H₂SO₄ 10% trong cồn. Đối chứng dương là mẫu chuẩn chứa các oligome có mức độ polyme từ DP1 đến DP5.

Phương pháp xác định khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm (Koo *et al.*, 1998)

Hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum* của COS được đánh giá qua khả năng ức chế nảy mầm của bào tử nấm dựa trên việc đo mật độ quang học (OD) của bào tử nấm ở bước sóng 540 nm. Chitosan hoặc chế phẩm COS ở các nồng độ 0,03‰, 0,06‰, 0,1‰, 0,15‰ và 0,3‰ được bổ sung vào các mẫu có chứa bào tử nấm (10^6 bào tử/ml) rồi ủ ở 30°C trong 24 và

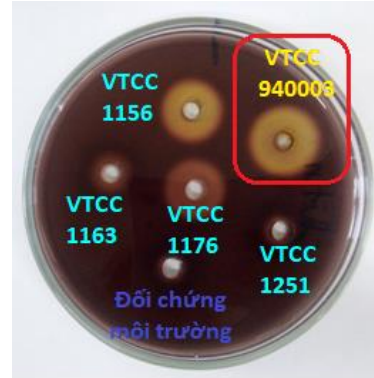
48 giờ. Mức độ ức chế của chitosan hoặc chế phẩm COS đối với sự nảy mầm bào tử nấm được tính theo phần trăm khi so sánh với đối chứng dương là mẫu bào tử hoàn toàn không được xử lý với COS hay chitosan. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và Student T-test được sử dụng để đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với trị số $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

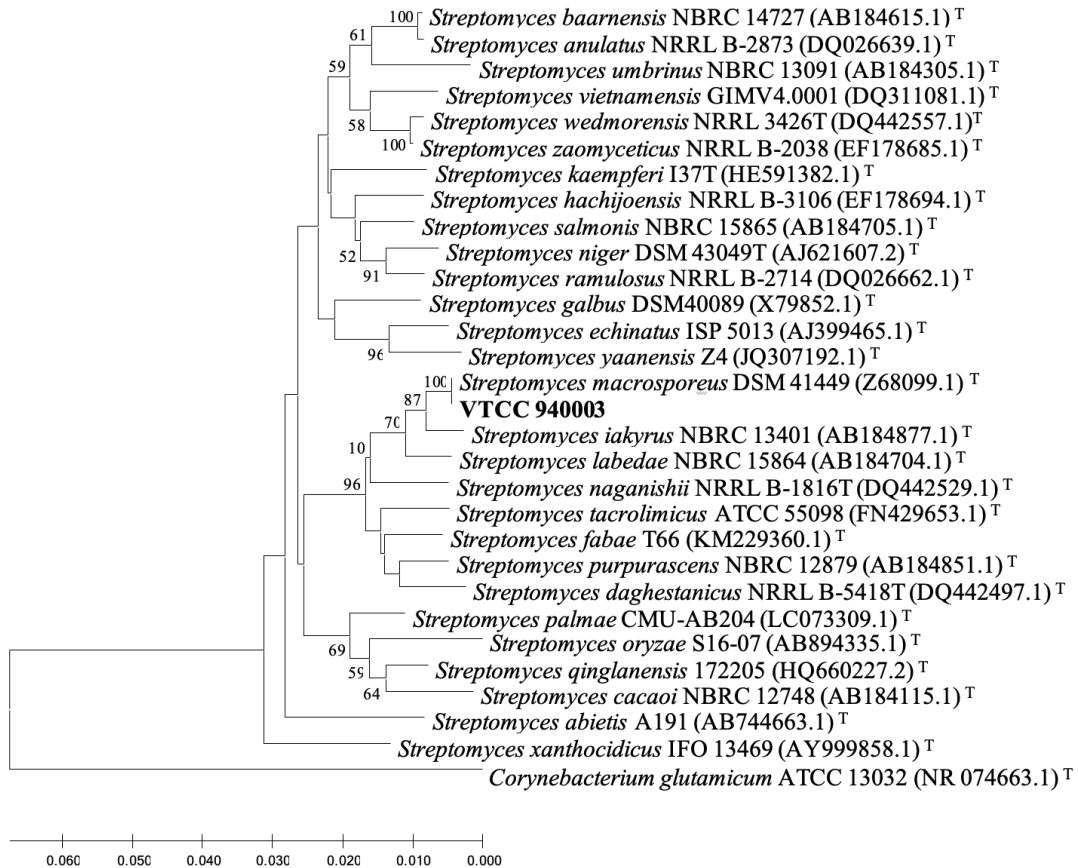
Chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp chitinase

Kết quả kiểm tra hoạt tính (Hình 1) cho thấy chủng xạ khuẩn VTCC 940003 có hoạt tính thủy phân chitin/chitosan cao hơn so với các chủng đối chứng (VTCC 1156, VTCC 1163, VTCC 1176, VTCC1251) và hoạt độ enzyme tương đương chitinase của chủng này đạt $24 \pm 0,05$ U/ml (trong khi hoạt độ enzyme của các chủng đối chứng khác chỉ đạt lần lượt là $12,1 \pm 0,08$; $8,7 \pm 0,03$; $4 \pm 0,1$; $1,04 \pm 0,02$ U/ml) dựa trên

phương pháp sử dụng DNS. Enzyme được sinh tổng hợp bởi chủng *Serratia marcescens* PRNK-1 có hoạt độ cao nhất là 32,8 U/ml tại nhiệt độ tối ưu (Moon *et al.*, 2017). Như vậy enzyme có khả năng thủy phân chitin/chitosan trong nghiên cứu của chúng tôi có hoạt độ khá cao.



Hình 1. Hoạt tính chitinase của chủng xạ khuẩn VTCC 940003 và các chủng đối chứng.

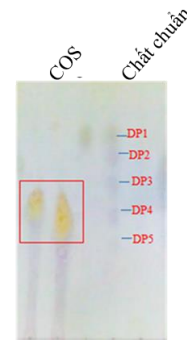


Hình 2. Cây phân loại dựa trên trình tự nucleotide 16S rDNA của chủng VTCC 940003 và các loài có quan hệ gần gũi, sử dụng phần mềm MEGA X với phương pháp phân tích Neighbor joining. Giá trị bootstrap (%) dựa trên 1000 lần lặp lại.

Chủng VTCC 940003 tiếp tục được nghiên cứu định danh bằng phương pháp hình thái và sinh học phân tử. Chủng này được sơ bộ xác định thuộc chi *Streptomyces* dựa vào đặc điểm hình thái (kết quả không trình bày ở đây). Để định danh chính xác hơn, thí nghiệm phân tích trình tự 16S rDNA của chủng VTCC 940003 được chúng tôi thực hiện. Kết quả cây phân loại chủng VTCC 940003 được trình bày ở Hình 2. Kết quả so sánh trình tự gen 16S rDNA cho thấy trình tự gen 16S rDNA của chủng VTCC 940003 tương đồng đến 99,9% (1400/1401 bp) với gen này của chủng *Streptomyces macrosporeus* Z68099.1^T.

Điều chế COS bằng enzyme từ chủng VTCC 940003

COS có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các enzyme đặc hiệu như chitinase hay chitosanase (Olicón-Hernández *et al.*, 2016; Mallakuntla *et al.*, 2017) cũng như các enzyme không đặc hiệu như carbohydrase và protease (Kim, Je, 2010; Xie *et al.*, 2011, Hoài *et al.*, 2017). Trong nghiên cứu của chúng tôi, COS được điều chế bằng cách sử dụng enzyme có hoạt tính thủy phân chitin/chitosan từ chủng *S. macrosporeus* VTCC 940003 để thủy phân chitosan và sản phẩm COS tạo ra được kiểm tra mức độ polyme bằng phương pháp sắc ký bản mỏng. Kết quả cho thấy enzyme của chủng *S. macrosporeus* VTCC 940003 có khả năng thủy phân chitosan tạo thành các oligo và sản phẩm COS thu được là hỗn hợp các oligosaccharide có kích thước khác nhau với DP chủ yếu nằm trong khoảng từ DP3 đến DP5 (Hình 3). Trong nghiên cứu của Kumar *et al.*, 2018, chitinase của *Humicola grisea* đã thể hiện hoạt tính thủy phân rõ rệt đối với colloidal chitin khi tạo ra COS có DP2 và DP3. Như vậy, kết quả xác định DP của COS được điều chế trong nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả này.

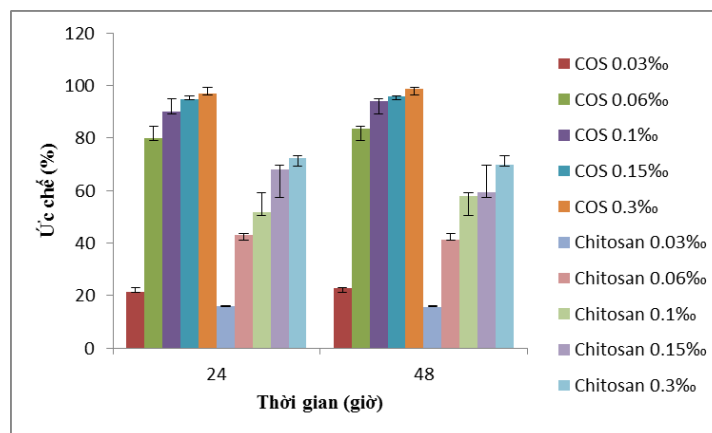


Hình 3. Phân tích sản phẩm thủy phân chitosan bởi enzyme của chủng *S. macrosporeus* VTCC 940003 bằng sắc ký bản mỏng.

Tác dụng ức chế của COS đối với sự nảy mầm của bào tử *Fusarium oxysporum*

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng hoạt tính sinh học của COS phụ thuộc rất lớn vào mức độ polyme và mức độ acetyl nên sản phẩm COS điều chế trong nghiên cứu này sẽ được chúng tôi đánh giá sơ bộ hoạt tính kháng sự nảy mầm của bào tử nấm *Fusarium oxysporum* (Kumar *et al.*, 2020). Hoạt tính kháng sự nảy mầm của bào tử nấm *F. oxysporum* sẽ được thực hiện với dải nồng độ của COS và chitosan từ 0,03% đến 0,3% (Hình 4).

Kết quả cho thấy COS ở nồng độ 0,03% ức chế yếu sự nảy mầm bào tử nhưng ở nồng độ 0,3% phần trăm ức chế đạt đến 98% tại 24 giờ và hoạt tính này tiếp tục duy trì tại 48 giờ. Cũng ở nồng độ 0,3%, hoạt tính của chitosan ức chế sự nảy mầm bào tử nấm tại các thời điểm 24 và 48 giờ chỉ đạt khoảng 70%. Tuy nhiên, tác dụng ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm (thể hiện bằng giá trị %) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa COS và chitosan ($p > 0,05$) sử dụng trong thí nghiệm này.



Hình 4. Tác dụng ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm *F. oxysporum*.

KẾT LUẬN

Chủng xạ khuẩn VTCC 940003 có khả năng sinh tổng hợp enzyme thủy phân chitin/chitosan với hoạt độ tương đương chitinase cao ($24 \text{ U/ml} \pm 0,05$) và được định danh là *Streptomyces macrosporeus* bằng phương pháp sinh học phân tử dựa trên trình tự 16S rDNA. Dựa trên phương pháp sắc ký bản mỏng sản phẩm COS chủ yếu thu được có mức độ polyme nằm trong khoảng DP3-DP5. Sản phẩm này ở nồng độ 0,3% có tác dụng ức chế 98% sự nảy mầm của bào tử nấm *F. oxysporum* tại 24 giờ và hoạt tính này tiếp tục được duy trì tại 48 giờ.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài KH&CN cấp ĐHQGHN, mã số QG.16.87: “Nâng cấp quy mô sản xuất chế phẩm chitosan oligomer từ nguồn phế liệu vỏ tôm ứng dụng cho bảo vệ thực vật” do TS. Hoàng Văn Vinh chủ trì.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bùi Văn Hoài, Đào An Quang, Nguyễn Thị Nam Phương, Vó Đình Nguyên, Trần Thị Kim Quyên, Ngô Đại Nghiệp (2017) Khảo sát quá trình thủy phân chitosan bằng cellulose tạo chitooligosaccharide. Tạp chí Khoa học công nghệ và Thực phẩm 12(1): 11-18

Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 773- 782.

Felsen JS (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783- 791.

Kawase T, Yokokawa S, Saito A, Fujii T, Nikaidou N, Miyashita K, Watanabe T (2006) Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinase from *S. coelicolor* A3(2). *BioSci Biotechnol Biochem* 70: 988-998.

Kim SK, Je JY (2010) Continuous production of Chitooligosaccharides by enzymatic hydrolysis. In Kim KS, ed. Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications. Boca Raton FL CRC Press: 185-195.

Koo CJ, Lee YS, Chun JH, Cheong HY, Choi SJ, Kawabata S, Miyagi M, Tsunasawa S, Ha SK, Bae WD, Han C, Lee LB, Cho JM (1998) Two hevain homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochim Biophys Acta* 1382: 80-90

Kumar M, Brar A, Vivekanand V and Pareek N (2018) Process optimization, purification and characterization of a novel acidic, thermostable chitinase from *Humicola grisea*. *Int J of Biol Macromol* 116: 931-938. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.125

Kumar M, Rajput M, Soni T, Vivekanand V and Pareek N (2020) Chemoenzymatic production and engineering of chitooligosaccharides and N-acetyl glucosamine for refining biological activities. *Front Chem*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00469>.

Lee YG, Chung KC, Wi SG, Lee JC & Bae HJ (2009) Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. *Protein Expr Purif* 65: 244-250.

Mallakuntla MK, Vaikuntapu PR, Bhuvanachandra BDasSN, and Podile AR (2017) Transglycosylation by a chitinase from *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* generates longer chitin oligosaccharides. *Sci Rep* 7: 5113. doi: 10.1038/s41598-017-05140-3.

Moon C, Seo DJ, Song YS, Hong SH, Choi SH, Jung WJ (2017) Antifungal activity and patterns of N-acetylchitooligosaccharide degradation via chitinase produced from. *Microb Pathog* 113: 218-224.

Olicón-Hernández DR, Vázquez-Landaverde PA, Cruz-Camarillo R, Rojas-Avelizapa LI, Tomas S, Hidalgo DM (2016) Comparison of chitooligosaccharide production from three different colloidal chitosans using the endochitonsanalytic system of *Bacillus thuringiensis*. *Prep Biochem Biotechnol* 47: 116-122. doi: 10.1080/10826068.2016.1181086

Rinaudo M (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 31: 603-632.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406- 425.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Tsujibo H, Kubota T, Yamamoto M, Miyamoto K, Inamori Y (2003) Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete, *Nocardioopsis prasina* OPC-131. *Appl Environ Microbiol* 69: 894-900.

Veliz E, Martínez-Hidalgo P and Hirsch MA (2017) Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiol* 3(3): 689-705.

Xie H, Jia Z, Huang J, Zhang C (2011) Preparation of low molecular weight chitosan by complex enzymes hydrolysis. *Int J Chem* 3: 47-5. doi: 10.5539/ijc.v3n2p180

PREPARATION OF *Fusarium oxysporum*-INHIBITING CHITO-OLIGOSACCHARIDE BY CHITIN/CHITOSAN-HYDROLYZING ENZYME FROM ACTINOMYCETES

Trinh Thi Van Anh, Nguyen Quynh Uyen, Nguyen Ngoc Hong, Dinh Thi Lam, Hoang Van Vinh

Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University Hanoi

SUMMARY

Chito-oligosaccharide (COS), one of remarkable derivatives of chitosan, has almost chitosan's biological function but better activities in antibacteria, antifungi and plant elicitor... Producing COS by biological enzymes shows many advantages in comparison with physical and chemical methods. In our study, COS was prepared using chitin/chitosan-hydrolyzing enzyme from actinomycetes. By analysis of 16S rDNA sequence, the enzyme producer VTCC 940003 belonged to *Streptomyces macrosporeus*. The strain's ability to synthesize the enzyme having chitin/chitosan-hydrolyzing activity was first detected by agar plate method and then its activity equivalent to chitinase activity was determined using dinitrosalicylic acid (DNS). The enzyme activity in the strain culture was 24 ± 0.05 U/ml. The COS was prepared by using the enzyme from *S. macrosporeus* VTCC 940003 to hydrolyze chitosan. The degree of polymerization (DP) of the obtained COS was mainly DP3-DP5. At the concentration of 0,3‰ the COS inhibited 98% of spore germination of *Fusarium oxysporum* after 24 hours and this activity remained after 48 hours.

Keywords: chitinase, chito-oligosaccharide, degree of polymerization, thin layer chromatography, actinomycetes