

## TUYỂN CHỌN VÀ KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY CHỦNG *Streptomyces* CÓ KHẢ NĂNG SINH CHITINASE CAO

Trương Thị Thúy Hằng, Đỗ Hoài Thương, Nguyễn Thị Như Ý, Huỳnh Kim Thuyết,  
Nguyễn Thị Thanh Lan, Nguyễn Thị Thủy Tiên\*

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

\*Tác giả liên hệ: nguyenthithuytien84@huaf.edu.vn

Nhận bài: 17/10/2025 Hoàn thành phản biện: 17/11/2025 Chấp nhận bài: 22/11/2025

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm sàng lọc các chủng *Streptomyces* có khả năng sinh chitinase và xác định các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh enzyme của chúng có tiềm năng cao nhất. 24 chủng *Streptomyces* được đánh giá khả năng sinh chitinase thông qua đường kính vòng phân giải chitin dạng keo (colloidal chitin, CC). Chúng có hoạt tính mạnh nhất được định danh dựa trên trình tự gen 16S rRNA và phân tích cây phát sinh loài. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh chitinase được khảo sát gồm nồng độ CC ban đầu (0–3,5%, bước nhảy 0,5%), pH (4–9), nhiệt độ nuôi cấy (30, 35 và 40°C) và thời gian nuôi cấy (0–144 giờ, cách nhau 12 giờ). Dịch enzyme thô được thu nhận bằng cách ly tâm canh trường (5000 vòng/phút, 4°C trong 10 phút) nhằm loại bỏ tế bào. Hoạt độ chitinase trong dịch nổi được xác định bằng phương pháp so màu sử dụng thuốc thử 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) tại bước sóng 540 nm. Kết quả sàng lọc cho thấy, có 19/24 chủng thể hiện hoạt tính chitinase, trong đó chủng N2R3 có hoạt tính lớn nhất (16,3 mm). Kết quả phân tích trình tự gen xác định chủng này thuộc loài *Streptomyces malaysiense*. Hoạt độ chitinase đạt cực đại 3,33 U/mL tại 3% CC, pH 8, 30°C sau 84 giờ nuôi cấy. *S. malaysiense* N2R3 cho thấy tiềm năng ứng dụng chitinase trong xử lý phế phụ phẩm chứa chitin.

**Từ khóa:** Chitinase, Enzyme thủy phân, *Streptomyces*

## SCREENING AND EVALUATION OF CULTURE CONDITIONS FOR *Streptomyces* STRAINS WITH HIGH CHITINASE PRODUCTION

Truong Thi Thuy Hang, Do Hoai Thuong, Nguyen Thi Nhu Y, Huynh Kim Thuyet,  
Nguyen Thi Thanh Lan, Nguyen Thi Thuy Tien\*

University of Agriculture and Forestry, Hue University

\*Corresponding author: nguyenthithuytien84@huaf.edu.vn

Received: 17/10/2025

Revised: 17/11/2025

Accepted: 22/11/2025

### ABSTRACT

This study aimed to screen *Streptomyces* strains capable of producing chitinase and to determine the culture conditions affecting the enzyme activity of the most promising strain. Twenty-four *Streptomyces* isolates were evaluated for chitinase production based on the diameter of the colloidal chitin (CC) hydrolysis zone. The most active strain was identified by 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis. Factors influencing chitinase production were investigated, including initial CC concentration (0–3.5%, at 0.5% intervals), pH (4–9), incubation temperature (30, 35, and 40°C), and cultivation time (0–144 h, at 12-h intervals). The crude enzyme was obtained by centrifuging the culture broth (5,000 rpm for 10 minutes at 4 °C) to remove the cells. Chitinase activity in the culture supernatant was determined using a colorimetric assay with 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent at 540 nm. The results indicated that 19 of the 24 tested isolates exhibited chitinase activity, with strain N2R3 producing the largest hydrolysis zone (16.3 mm). Sequence analysis identified this strain as *Streptomyces malaysiense*. The maximum chitinase activity (3.33 U/mL) was obtained under conditions of 3% CC, pH 8, 30°C, and 84 h of incubation. *S. malaysiense* N2R3 exhibited strong potential for chitinase applicability in the biotechnological degradation and valorization of chitin-containing by-products.

**Keywords:** Chitinase, Hydrolysis enzyme, *Streptomyces*

## 1. MỞ ĐẦU

Chitinase là enzyme xúc tác thủy phân liên kết  $\beta$ -1,4 giữa các gốc N-acetylglucosamine (GlcNAc) trong chitin, tạo ra các oligomer và monomer có giá trị sinh học cao, đồng thời có tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp, y dược và công nghiệp thực phẩm (Gonfa và cs., 2023). Tùy theo cách cắt mạch chitin, chitinase có thể được phân thành hai loại chính: endochitinase và exochitinase. Endochitinase (EC 3.2.1.14) tạo ra các oligomer hòa tan có khối lượng phân tử thấp bằng cách thủy phân ngẫu nhiên các liên kết  $\beta$ -1,4 tại các vị trí nội mạch trong chitin. Exochitinase gồm chitobiosidase (EC 3.2.1.29), xúc tác giải phóng dần diacetylchitobiose từ đầu không khử của chuỗi chitin và N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase (EC 3.2.1.52), thủy phân chitobiose thành đơn vị monomer GlcNAc. Cả endo- và exochitinase đều cần thiết để phân giải hiệu quả chitin thành monomer GlcNAc có thể chuyển hóa, tạo năng lượng, CO<sub>2</sub> và amoniac cần thiết cho các sinh vật khác (Thakur và cs., 2023). Trong số các vi sinh vật sản xuất chitinase, chi *Streptomyces* nổi bật nhờ hệ enzyme ngoại bào mạnh và bộ gene chitinase đa dạng, mang lại hiệu suất cao và ổn định. Hoạt lực enzyme phụ thuộc đáng kể vào chủng và các điều kiện nuôi cấy như pH, nhiệt độ, nguồn carbon/nitrogen và chất cảm ứng (Saito và cs., 2000). Hiệu quả sản xuất chitinase thường được đánh giá qua vòng phân giải trên môi trường chitin dạng keo (colloidal chitin, CC) kết hợp với định lượng enzyme trong dịch nuôi cấy (Ekundayo và cs., 2022; Saadoun và cs., 2009).

Chitin là polysaccharide amin hóa phổ biến thứ hai trong tự nhiên, hiện diện chủ yếu ở vỏ tôm, cua và các loài giáp xác, đồng thời là cơ chất quan trọng cho hoạt động của chitinase. Quá trình thu nhận

chitin hiện nay chủ yếu được thực hiện qua hai con đường: hóa học và sinh học. Phương pháp hóa học sử dụng acid và kiềm mạnh để khử khoáng, khử protein và khử acetyl nhưng dễ làm biến đổi cấu trúc polymer, tiêu tốn năng lượng và gây ô nhiễm môi trường. Ngược lại, phương pháp sinh học dựa trên enzyme hoặc lên men vi sinh được xem là thân thiện và bền vững hơn nhờ giảm sử dụng hóa chất và hạn chế tác động môi trường (Thakur và cs., 2023). Chitin sau khi được xử lý có thể được phân giải bằng các phương pháp hóa học, vật lý hoặc bằng enzyme. Tuy nhiên, các phương pháp vật lý và hóa học dù đã được công nghiệp hóa vẫn có những hạn chế như hiệu suất thấp, chi phí cao và độ chọn lọc kém. Phân giải chitin bằng enzyme thân thiện môi trường hơn nhưng thường có động học phản ứng chậm. Vì vậy, xu hướng hiện nay tập trung vào việc cải thiện phương pháp enzyme thông qua việc tìm kiếm các chủng vi sinh vật sinh chitinase mạnh và tối ưu hóa điều kiện để tăng cường hoạt tính phân giải chitin của chúng (Meriem và Mahmoud, 2017).

Đã có nhiều nghiên cứu quốc tế tập trung sàng lọc và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy để nâng cao khả năng sinh tổng hợp chitinase từ các loài *Streptomyces* (Ekundayo và cs., 2022; Shivalee và cs., 2018; Jha và cs., 2016; Meriem và Mahmoud, 2017). Những kết quả này chứng minh tiềm năng của *Streptomyces* trong sản xuất chitinase và cung cấp cơ sở phương pháp cho các nghiên cứu tiếp theo. Tuy nhiên, tại Việt Nam, các nghiên cứu về chitinase từ *Streptomyces* vẫn còn hạn chế, chủ yếu tập trung vào ứng dụng trong kiểm soát sinh học (Đỗ Thị Tú Oanh và cs., 2023; Nguyễn Thị Thanh Mai và cs., 2023). Trong bối cảnh nước ta là quốc gia có sản lượng thủy sản lớn, tạo ra khối lượng phế phẩm chứa chitin dồi dào nhưng chưa được khai thác hiệu quả, việc nghiên cứu tuyển chọn

các chủng *Streptomyces* sinh chitinase từ nguồn vi sinh vật bản địa là rất cần thiết.

Do đó, nghiên cứu này tập trung tuyển chọn các chủng *Streptomyces* có khả năng sinh chitinase cao, đồng thời khảo sát các yếu tố nuôi cấy gồm nồng độ chitin dạng keo (CC), pH, nhiệt độ và thời gian, nhằm xác định điều kiện thích hợp cho sản xuất enzyme. Kết quả dự kiến sẽ tạo cơ sở cho các nghiên cứu về chitinase và các phế phụ phẩm có chứa chitin.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các chủng *Streptomyces* được cung cấp từ phòng thí nghiệm vi sinh, Khoa Cơ khí và Công nghệ, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, được bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$  trong glycerol 20%.

### 2.2. Bố trí thí nghiệm

24 chủng *Streptomyces* được sàng lọc trên môi trường có chứa 1% CC (w/v) thông qua việc đo đường kính vòng phân giải. Chủng có hoạt tính chitinase cao nhất được chọn để định danh dựa trên trình tự gen 16S rRNA và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến khả năng sinh chitinase của chủng *Streptomyces* được khảo sát lần lượt theo nồng độ CC, pH, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy. Môi trường cơ bản gồm (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,4;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,6;  $\text{NaCl}$  0,6;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10,0;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001 và  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,0. Các yếu tố khảo sát lần lượt bao gồm: môi trường được bổ sung CC ở các nồng độ 0–3,5% (bước nhảy 0,5%), pH môi trường được điều chỉnh từ 4–9, nhiệt độ nuôi cấy ở 30, 35 và  $40^{\circ}\text{C}$  và thời gian nuôi cấy trong khoảng 12–144 giờ, cách nhau 12 giờ. Tất cả các thí nghiệm được thực hiện trong bình tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường, bổ sung 50  $\mu\text{L}$  huyền phù bào tử

*Streptomyces*, lắc ở 100 vòng/phút và ủ ở nhiệt độ phòng (trừ các thí nghiệm khảo sát nhiệt độ). Sau 5 ngày (hoặc theo mốc thời gian khảo sát), thu dịch nổi để xác định hoạt tính chitinase (Ekundayo và cs., 2022; Kotb và cs. 2023). Hoạt độ chitinase được xác định bằng phương pháp so màu sử dụng thuốc thử 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). Điều kiện nuôi cấy thích hợp được xác định là điều kiện cho hoạt độ chitinase cao nhất.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Chuẩn bị chitin dạng keo

Chitin dạng keo được chuẩn bị từ chitin dạng mảnh (Macklin, Trung Quốc) theo phương pháp của Kotb và cs. (2023). Bổ sung 88 ml HCl đậm đặc vào 5 g chitin dạng mảnh, khuấy đều trong 3 giờ. Thêm chính xác 1000 mL nước cất lạnh và khuấy tiếp trong 3 giờ. Bảo quản huyền phù chitin này ở  $4^{\circ}\text{C}$  trong 24 giờ. Ly tâm tách nước, CC được rửa lại nhiều lần với nước cất để loại bỏ HCl cho đến khi huyền phù thu được có pH đạt 6,7 – 7,0. CC được bảo quản ở  $4^{\circ}\text{C}$  cho các lần sử dụng tiếp theo nhưng không quá 7 ngày.

#### 2.3.2. Sàng lọc chủng *Streptomyces* sinh chitinase cao nhất

Các chủng được làm thuần, chấm điểm trên môi trường có chứa 1% CC. Một lít môi trường có chứa 10 g CC, 0,5 g cao nấm men, 1,0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,36 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  và 15 g agar, pH 7,2. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng, sau 6 ngày đo đường kính vòng phân giải chitin. Kích thước vòng thủy phân (D) được tính theo công thức:  $D = D_1 - D_2$ . Trong đó, D là kích thước vòng thủy phân (mm),  $D_1$  là đường kính bên ngoài vòng thủy phân (mm) và  $D_2$  là đường kính khuẩn lạc *Streptomyces* (mm) (Shivalee và cs., 2016). Chủng có khả năng sinh chitinase cao nhất được chọn để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

### 2.3.3. Định danh chủng *Streptomyces* được chọn

Chủng *Streptomyces* được chọn được giải trình tự dựa trên đoạn gene 16S rRNA bằng máy ABI3130xl 16-capillary (Hãng Applied Biosystems Inc., Mỹ), BigDye Terminator 3.1, thực hiện bởi Công ty TNHH DNA SEQUENCING, Cần Thơ, Việt Nam. Trình tự thu được được so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLASTn

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) và cơ sở dữ liệu EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net/>). Xây dựng cây phát sinh loài dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng được chọn và các chủng gần gũi bằng phần mềm MEGA11 để định danh chủng *Streptomyces* ở mức độ loài.

### 2.3.4. Phương pháp xây dựng đường chuẩn *N-acetyl-D-glucosamine*

Đường chuẩn GlcNAc (97%, Macklin, Trung Quốc) được thiết lập dựa trên phản ứng khử của GlcNAc với thuốc thử 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (Merck, Đức). Dung dịch chuẩn gốc 100  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  được pha từ 22,1 mg GlcNAc trong 100 mL nước cất, sau đó pha loãng thành các nồng độ 0–60  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ . 1,5 mL mẫu ở mỗi nồng độ GlcNAc được phản ứng với 1,5 mL thuốc thử DNS, đun sôi 10 phút, làm nguội và đo độ hấp thụ ở 540 nm. Phương trình hồi quy tuyến tính thu được là  $y = 0,0073x + 0,1554$  ( $R^2 = 0,9917$ ) và được dùng để tính hàm lượng GlcNAc trong các mẫu phân tích (Halim và cs., 2020).

### 2.3.6. Phương pháp thu nhận enzyme thô và xác định hoạt tính chitinase

Canh trường nuôi cấy *Streptomyces* được ly tâm (5.000 vòng/phút, 4°C, 10 phút) bằng máy ly tâm Centurion Scientific K3R (Centurion Scientific Ltd., UK) để thu dịch nổi là enzyme thô. Canh trường không bổ sung *Streptomyces* được sử dụng làm đối chứng. Hoạt tính chitinase được xác định

theo phương pháp DNS, sử dụng CC 0,5% (trong đệm citrat 0,1 M, pH 7,0) làm cơ chất. Hỗn hợp gồm 1,5 mL enzyme và 1,5 mL cơ chất được ủ ở 45°C trong 45 phút, sau đó dùng phản ứng bằng 3 mL thuốc thử DNS, đun sôi 10 phút và đo độ hấp thụ ở 540 nm. Một đơn vị hoạt tính chitinase được định nghĩa là lượng enzyme giải phóng 1  $\mu\text{mol}$  GlcNAc trong mỗi phút trên mỗi mL, xác định dựa trên đường chuẩn GlcNAc (Pramesti và cs., 2020; Kotb và cs., 2023).

### 2.3.7. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại ba lần đối với mỗi thông số khảo sát, phân tích thống kê các kết quả thu được bằng phương pháp phân tích phương sai một yếu tố (One-Way ANOVA) và so sánh sự khác biệt giữa các giá trị trung bình bằng phép thử Duncan (Duncan's multiple range test) ở mức ý nghĩa  $p < 0,05$ , sử dụng phần mềm SPSS Statistics phiên bản 20.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả sàng lọc khả năng sinh chitinase của các chủng *Streptomyces*

Khả năng phân giải chitin của 24 chủng *Streptomyces* được thể hiện trong bảng 1 và Hình 1. Bảng 1 cho thấy các chủng *Streptomyces* có sự khác biệt đáng kể về khả năng phân giải chitin. Trong đó, chủng N2R3 thể hiện hoạt tính mạnh nhất với đường kính vòng phân giải đạt 16,3 mm, vượt trội so với các chủng được khảo sát (Hình 1). Ngược lại, có 5 chủng (NB2.04, NN2.01, NNY08, DS1.24 và DS1.27) không tạo vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc trên môi trường chứa chitin, chúng tỏ không có khả năng sinh chitinase. Các chủng còn lại thể hiện hoạt tính phân giải ở các mức độ khác nhau. Đáng chú ý, các chủng NAVS1.8, GY901, NBY08, NYR4, DMS 40091 và NBA.03 cho thấy khả năng phân giải chitin tương đối cao với đường kính vòng phân giải lớn hơn 11 mm. Trong

khi đó, một số chủng như HC21, ĐNN1.1, THT1.2 và NYĐ01 chỉ tạo vòng thủy phân

nhỏ, lần lượt đạt 4,3; 4,7; 4,7 và 5,7 mm, phản ánh hoạt tính chitinase yếu.

**Bảng 1.** Kích thước vòng phân giải chitin (mm) của các chủng *Streptomyces*

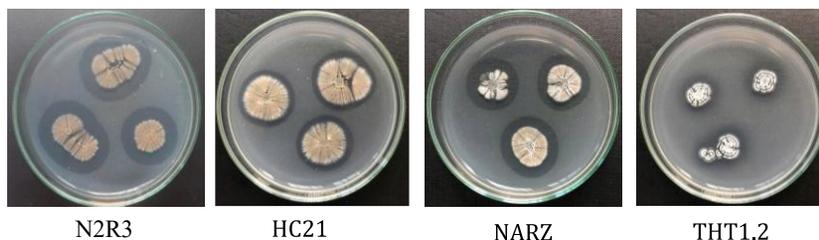
<i>Streptomyces</i> ID	Kích thước (mm)	<i>Streptomyces</i> ID	Kích thước (mm)
NAVS1.8	14,3 ± 1,2 <sup>b</sup>	HC21	4,3 ± 0,5 <sup>f</sup>
NYR4	11,7 ± 1,5 <sup>cd</sup>	ĐNN1.1	4,7 ± 0,6 <sup>f</sup>
DMS 40091	11,7 ± 1,5 <sup>cd</sup>	GY901	12,3 ± 1,5 <sup>c</sup>
NARZ	8,7 ± 0,6 <sup>e</sup>	N2R3	16,3 ± 0,6 <sup>a</sup>
THT1.2	4,7 ± 0,6 <sup>f</sup>	PD1.18	1,7 ± 1,2 <sup>g</sup>
DSM 41432	9,7 ± 1,2 <sup>de</sup>	NBY08	11,3 ± 1,2 <sup>cd</sup>
DS1.15	8,3 ± 0,6 <sup>e</sup>	NYĐ01	5,7 ± 0,6 <sup>f</sup>
NYR5	8,7 ± 1,2 <sup>e</sup>	NB2.04	-
NĐ2.03	7,7 ± 1,2 <sup>e</sup>	NN2.01	-
NBA.02	9,7 ± 1,5 <sup>de</sup>	NNY08	-
NBA.03	11,7 ± 0,6 <sup>cd</sup>	DS1.24	-
NVA.04	9,7 ± 1,5 <sup>de</sup>	DS1.27	-

(-) chủng không có khả năng phân giải chitin. Các chữ cái khác nhau trên cột thể hiện kích thước đường kính vòng thủy phân biểu thị mức sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0,05$ .

Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn ( $n=3$ )

Việc sàng lọc các chủng vi sinh vật có khả năng sinh chitinase cao là bước cần thiết trước khi tiến hành tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy và khảo sát đặc tính enzyme. Trên môi trường có CC làm chất cảm ứng, kết quả sàng lọc cho thấy chủng N2R3 có khả năng sinh chitinase nổi bật với đường kính vòng phân giải đạt 16,3 mm. So sánh với các nghiên cứu trước đây, kết quả này ở mức tương đương hoặc cao hơn một số

cho vòng phân giải lớn nhất chỉ đạt 10 mm trong số 231 chủng được phân lập. Ngược lại, Ekundayo và cs. (2022) cho thấy *S. albus* tạo vòng phân giải 2 mm trên môi trường muối khoáng chitin. Những so sánh này cho thấy khả năng sinh chitinase của các chủng *Streptomyces* là rất đa dạng, phụ thuộc vào đặc điểm di truyền cũng như điều kiện phân lập, nuôi cấy. Do đó, kết quả vòng phân giải 16,3 mm của chủng N2R3 cho



**Hình 1.** Vòng thủy phân chitin của một số chủng *Streptomyces*

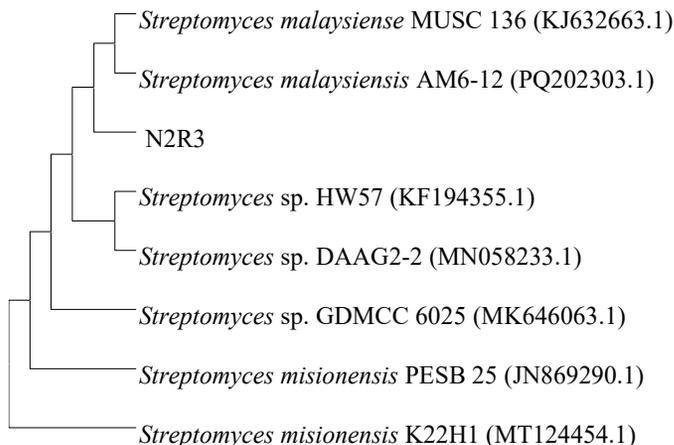
chủng đã được báo cáo. Cụ thể, Jha và cs. (2016) ghi nhận *S. rubiginosus* SP24 có vòng phân giải 17 mm trên môi trường chứa 1% chitin dạng keo, trong khi Saadoun và cs. (2009) báo cáo *Streptomyces* sp. S242

thấy tiềm năng đáng kể, khẳng định giá trị của việc lựa chọn chủng này để tiếp tục định danh và khảo sát các điều kiện nuôi cấy thích hợp nhằm nâng cao khả năng sinh tổng hợp chitinase.

### 3.2. Định danh chủng N2R3

Kết quả phân tích BLASTn khi so sánh trình tự gene 16S rRNA của chủng N2R3 trên GenBank cho thấy chủng N2R3 tương đồng 100% với 4 chủng, gồm *Streptomyces* sp. SCPE, *Streptomyces* sp. H49, *Streptomyces* sp. GDMCC và *S. misionensis* PESB25. Trong khi đó, kết quả

so sánh với cơ sở dữ liệu EzTaxon hiển thị mức độ tương đồng 99,85% với chủng *S. malaysiense* MUSC136. Vì vậy, để định danh ở mức độ loài của chủng N2R3, ngoài kết quả so sánh với các cơ sở dữ liệu, chúng tôi kết hợp xây dựng cây phát sinh loài dựa trên trình tự của nó với các trình tự gene 16S rRNA của các loài gần gũi, kết quả thể hiện ở Hình 2.



**Hình 2.** Cây phát sinh loài xây dựng dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng N2R3 với các chủng có quan hệ gần gũi được tham khảo trên ngân hàng gene. Mã số gene của các chủng được đặt trong dấu ngoặc đơn.

Cây phát sinh loài cho thấy chủng N2R3 có quan hệ gần gũi nhất với các chủng thuộc loài *S. malaysiense*, chứng tỏ có sự tương đồng di truyền cao. Kết quả này phù hợp với kết quả so sánh trên cơ sở dữ liệu EzTaxon, qua đó khẳng định chủng N2R3 thuộc loài *S. malaysiense*, được đặt tên là *S. malaysiense* N2R3.

Một điểm đáng chú ý trong nghiên cứu này là việc phát hiện hoạt tính chitinase mạnh từ chủng *S. malaysiense* N2R3. Trong công bố gốc mô tả loài *S. malaysiense* (chủng chuẩn MUSC 136T), Ser và cs.

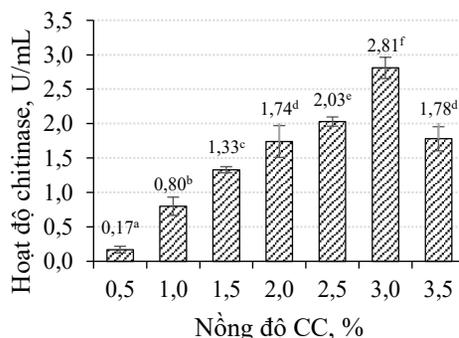
(2016) đã ghi nhận rằng chủng này âm tính với khả năng thủy phân chitin. Sự khác biệt này cho thấy rõ sự đa dạng về đặc tính sinh hóa nội loài (intraspecific biochemical diversity) của *S. malaysiense*. Do đó, theo hiểu biết của chúng tôi, đây là báo cáo đầu tiên ghi nhận khả năng sản sinh chitinase từ loài *S. malaysiense*. Phát hiện này không chỉ bổ sung thêm một đặc tính enzyme quan trọng vào mô tả của loài, mà còn khẳng định chủng N2R3 là một ứng cử viên mới và đầy hứa hẹn cho việc sản xuất chitinase ứng dụng.

### 3.3. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh chitinase của chủng *S. malaysiense* N2R3

#### 3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ colloidal chitin

Nồng độ cơ chất CC trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng *S.*

*malaysiense* N2R3, thể hiện trên hình 5. Hoạt độ chitinase tăng dần từ 0,17 U/mL lên 2,03 U/mL khi nồng độ cơ chất tăng từ 0,5% đến 2,5%, đạt cực đại 2,81 U/mL ở nồng độ CC 3%. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ cơ chất lên 3,5%, hoạt độ chitinase giảm còn 1,78 U/mL.



**Hình 5.** Ảnh hưởng của nồng độ CC đến hoạt độ chitinase sinh tổng hợp bởi *S. malaysiense* N2R3 trong môi trường có pH 7,2, sau 5 ngày nuôi cấy lắc 100 vòng/phút ở nhiệt độ phòng (Các chữ cái khác nhau trên các kết quả biểu thị mức sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0,05$ )

Chitinase là một enzyme cảm ứng, được vi sinh vật tổng hợp khi có mặt chất cảm ứng thích hợp. Chitin đóng vai trò là tín hiệu kích thích, thúc đẩy vi sinh vật tiết chitinase để thủy phân cấu trúc polymer phức tạp của chitin thành các đường đơn, sau đó được tế bào hấp thu và sử dụng như nguồn dinh dưỡng (Meriem và Mahmoud, 2017; Pramesti và Puspita, 2020). Nồng độ CC thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp chitinase phụ thuộc vào nồng độ CC trong môi trường nuôi cấy và chủng *Streptomyces* được sử dụng. Kết quả trong nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu khác cùng lĩnh vực, Shivalee và cs. (2018) cho thấy, việc gia tăng nồng độ CC từ 0,25% đến 1,5% làm tăng đáng kể hoạt tính chitinase của chủng *S. pratensis* KLSL55, đạt giá trị cực đại 157,54 IU ở nồng độ 1,5%. Tuy nhiên, tại các nồng độ cao hơn, đặc biệt ở 2,5%, hoạt tính enzyme suy giảm rõ rệt, chỉ còn 19,29 IU. Việc tối ưu hóa điều kiện nuôi

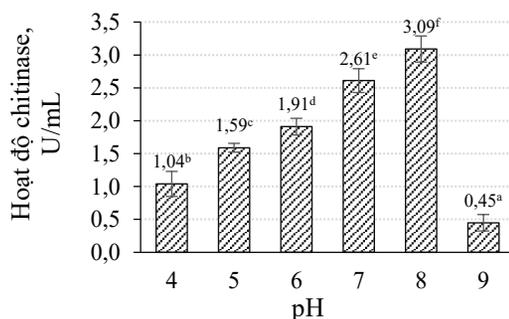
cấy chủng *Streptomyces griseorubens* C9 bằng phương pháp đáp ứng bề mặt cho thấy hoạt độ chitinase cao nhất đạt được khi môi trường có bổ sung CC ở nồng độ 2%, vượt trội so với các nồng độ 1% và 3% (Meriem và Mahmoud, 2017). Trong số 5 nồng độ CC khảo sát, 0,5% - 2,5% (bước nhảy 0,5%), môi trường có chứa 1% CC tạo điều kiện cho chủng *Streptomyces rubiginosus* SP24 có hoạt tính chitinase cao nhất, đạt 2,76 U/ml, nhưng giảm còn 1,65 U/ml khi nồng độ CC tăng lên 1,5% (Jha và cs., 2016). Điều này có thể là do ở nồng độ thấp, CC có thể không cung cấp đủ nguồn carbon và năng lượng cần thiết cho sự phát triển tế bào, dẫn đến sự suy giảm khả năng tổng hợp enzyme chitinase (Pramesti và Puspita, 2020). Ngược lại, khi nồng độ cơ chất quá cao, sự hình thành enzyme cũng bị ức chế. Hiện tượng này được giải thích dựa trên cơ chế “sự ức chế bởi cơ chất” (substrate inhibition) áp dụng cho hệ vi sinh (mô hình

hóa bởi Tan và cs., 1996). Trong nghiên cứu này, nồng độ CC 3% được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo bởi *S. malaysiense* N2R3 sinh tổng hợp chitinase cao nhất.

### 3.3.2. Ảnh hưởng của pH môi trường

pH của môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đáng kể đến quá trình sinh tổng hợp chitinase của chủng *S. malaysiense* N2R3. Trong khoảng pH khảo sát từ 4 đến 9, hoạt

tính chitinase thu được thay đổi rõ rệt theo giá trị pH ban đầu của môi trường (hình 6). Cụ thể, khi pH tăng từ 4 đến 7, hoạt tính chitinase tăng dần từ 1,04 U/mL lên 2,61 U/mL. Giá trị pH tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp enzyme là pH 8, với hoạt tính đạt mức cao nhất 3,09 U/mL. Ngược lại, tại pH 9, hoạt tính chitinase giảm mạnh, chỉ còn 0,45 U/mL.



**Hình 6.** Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến hoạt độ chitinase sinh tổng hợp bởi *S. malaysiense* N2R3 trong môi trường có chứa 3% CC, sau 5 ngày nuôi cấy lắc 100 vòng/phút ở nhiệt độ phòng (Các chữ cái khác nhau trên các kết quả biểu thị mức sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0,05$ )

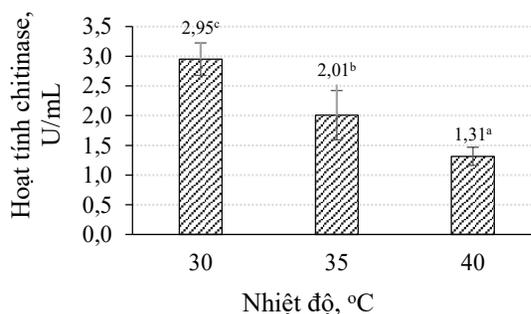
Độ pH của môi trường nuôi cấy đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa quá trình sản xuất enzyme, hoạt động trao đổi chất tổng thể cũng như sự biến đổi hình thái của vi sinh vật (Thakur và cs., 2023). Hầu hết các loài thuộc Actinobacteria phát triển trong đất có pH trung tính, sinh trưởng tối ưu trong khoảng pH 6–9, với tốc độ phát triển cao nhất gần giá trị trung tính (Barka và cs., 2016). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với báo cáo của Shivalee và cs. (2018), theo đó *S. pratensis* KLSL55 đạt khả năng sinh tổng hợp chitinase cao nhất ở pH 8 với hoạt độ 96,79 IU, trong khi ở pH 9, hoạt độ enzyme giảm mạnh còn 13,70 IU. Tương tự, *S. sporovirgulis* cũng đạt hoạt độ chitinase cao nhất ở pH 8,0 (Brzezinska và cs., 2013). Trong khi đó, *S. rubiginosus* (Jha và cs., 2016) và *Streptomyces* sp. S242 (Saadoun và cs., 2009) lại sinh tổng hợp

chitinase cao nhất trong môi trường nuôi cấy có pH ban đầu là 7. Môi trường nuôi cấy có pH 6 lại là pH thích hợp cho *S. albus* (Ekundayo và cs., 2022) và *Streptomyces* sp. ANU 6277 (Narayana và Vijayalakshmi, 2009). Như vậy, giá trị pH thích hợp cho quá trình sản xuất chitinase có sự khác biệt giữa các chủng, phản ánh đặc điểm sinh lý và khả năng thích nghi riêng. Hầu hết các nghiên cứu nêu trên đều chỉ ra rằng pH tối ưu cho sinh tổng hợp chitinase của các *Streptomyces* rơi vào khoảng 6–8, phù hợp với khả năng phát triển của chúng trong điều kiện gần trung tính. Khi pH vượt quá phạm vi này, sự sinh trưởng bị ức chế, dẫn đến giảm khả năng tổng hợp enzyme.

### 3.3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Sự thay đổi nhiệt độ lên men làm thay đổi quá trình sản xuất chitinase của chủng *S. malaysiense* N2R3 (Hình 7). Trong khoảng nhiệt độ khảo sát, 30, 35 và 40°C, nhiệt độ nuôi cấy tăng làm lượng

chitinase được sinh tổng hợp giảm, đạt cao nhất 2,95 U/mL ở 30°C. Sau đó, lượng chitinase giảm dần về 2,01 U/mL và 1,31 U/mL tương ứng với nhiệt độ nuôi cấy 35°C và 40°C.



**Hình 7.** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ chitinase sinh tổng hợp bởi chủng *S. malaysiense* N2R3 sinh tổng hợp trên môi trường có chứa 3% CC, pH 8, sau 5 ngày nuôi cấy lắc 100 vòng/phút. Các chữ cái khác nhau trên các kết quả biểu thị mức sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0,05$

Nhiệt độ là một yếu tố môi trường quan trọng kiểm soát sự phát triển và sản xuất các chất chuyển hóa của vi sinh vật. Nhiệt độ ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của các đại phân tử, và thường thay đổi tùy theo từng sinh vật (Thakur và cs., 2023). Không chỉ trong nghiên cứu của chúng tôi mà nhiệt độ 30°C còn được xem là điều kiện thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp chitinase ở nhiều chủng *Streptomyces* khác đã được ghi nhận, bao gồm *S. albus* (Ekundayo và cs., 2022), *S. rubiginosus* (Jha và cs., 2016). Tuy nhiên, một số chủng *Streptomyces* cho thấy nhiệt độ cao hơn hoặc thấp hơn 30°C là nhiệt độ thích hợp cho khả năng sinh chitinase. Ví dụ, 40°C đối với chủng *S. pratensis* KLSL55 (Shivalee và cs., 2018), 35°C đối với *Streptomyces* sp. ANU 6277 (Narayana và Vijayalakshmi, 2009), 28°C đối với *S. sporovirgulus* (Brzezinska và cs., 2013) và *Streptomyces* sp. S242 (Saadoun và cs., 2009).

### 3.3.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

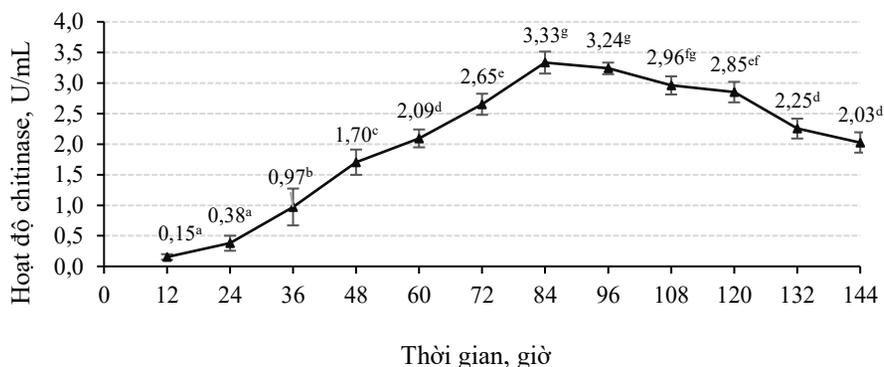
Với môi trường nuôi cấy ban đầu chứa 3% CC và được điều chỉnh ở pH 8,

chủng *S. malaysiense* N2R3 được nuôi ở nhiệt độ 30°C. Quá trình sinh tổng hợp chitinase được theo dõi trong các khoảng thời gian khác nhau, từ 12 đến 144 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy, với mỗi mốc thời gian cách nhau 12 giờ, kết quả thể hiện trên hình 8.

Hoạt độ chitinase sinh tổng hợp bởi chủng *S. malaysiense* N2R3 có xu hướng tăng dần theo thời gian nuôi cấy, đạt giá trị cực đại 3,33 U/mL sau 84 giờ, sau đó giảm dần. Cụ thể, trong giai đoạn từ 12 đến 72 giờ, hoạt độ enzyme tăng mạnh, đạt tương ứng 0,15 U/mL sau 12 giờ và 2,65 U/mL sau 72 giờ, phản ánh quá trình sinh trưởng và chuyển hóa tích cực của vi sinh vật, đồng thời cho thấy sự cảm ứng mạnh mẽ của hệ enzyme chitinase. Mặc dù hoạt độ chitinase tại 96 giờ (3,24 U/mL) không sai khác có ý nghĩa thống kê so với tại 84 giờ (3,33 U/mL) nhưng xét về hiệu quả thời gian, 84 giờ được xem là thời điểm thích hợp nhất để thu enzyme. Sau đó, hoạt độ chitinase giảm dần, chỉ còn 2,03 U/mL sau 144 giờ nuôi cấy. Sự suy giảm hoạt tính enzyme khi kéo dài thời

gian nuôi cấy có thể liên quan đến sự cạn kiệt các chất dinh dưỡng hoặc cơ chất cảm ứng trong môi trường, cũng như sự tích lũy của

enzyme. Thời gian thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp chitinase thường thay đổi tùy thuộc vào đặc điểm sinh trưởng, khả năng



**Hình 8.** Hoạt độ chitinase sinh tổng hợp bởi chủng *S. malaysiense* N2R3 tại các thời điểm nuôi cấy khác nhau trong môi trường có chứa 3% CC, pH 8, nuôi cấy lắc 100 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C

(Các chữ cái khác nhau trên các kết quả biểu thị mức sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0,05$ )

các sản phẩm chuyển hóa hoặc enzyme phân giải nội bào, dẫn đến quá trình thoái hóa

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Kotb và cs. (2023), khi *S. variabilis* Am1 cũng đạt hoạt tính chitinase cao nhất (110,2 U/mL) sau 84 giờ nuôi cấy. Tuy nhiên, thời điểm đạt cực đại về hoạt tính chitinase có thể khác nhau giữa các chủng. Cụ thể, *Streptomyces* sp. ANU 6277 đạt mức enzyme tối đa sau 60 giờ trong điều kiện lên men chìm (Narayana và Vijayalakshmi, 2009), trong khi chủng *Streptomyces* SP24 cho thấy hoạt tính cao nhất đạt sau 72 giờ ở pH 7 và 30°C, xấp xỉ 2,2 U/mL (Jha và cs., 2016). Bên cạnh đó, *S. pratensis* KLSL55 đạt hoạt tính chitinase cao nhất (105,65 IU) chỉ sau 48 giờ nuôi cấy ở pH 8 và 40°C (Shivalee và cs., 2018). Tương tự, hoạt tính chitinase của *S. sporovirgulis* được phát hiện từ ngày nuôi cấy thứ hai, tăng dần và đạt cực đại sau 4 ngày (Brzezinska và cs., 2013).

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã sàng lọc và xác định được chủng *S. malaysiense* N2R3 là tác nhân tiềm năng mới cho khả năng sản sinh chitinase ngoại bào mạnh. Việc khảo sát các

thích ứng và bản chất sinh lý của từng chủng *Streptomyces* (Shivalee và cs., 2018).

điều kiện nuôi cấy như nồng độ cơ chất, pH, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy góp phần xác định các yếu tố thích hợp để nâng cao hiệu quả nuôi cấy nhằm thu nhận chitinase từ chủng này. Các kết quả thu được cung cấp cơ sở ban đầu cho những nghiên cứu tiếp theo hướng đến tinh sạch, mô tả đặc tính chitinase và tối ưu hóa quá trình lên men ở quy mô lớn hơn.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, thuộc Đề tài có mã số DHL-NCKH-SV-04.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

##### 1. Tài liệu tiếng Việt

Nguyễn Thị Thanh Mai, Nguyễn Thị Thu, Trần Văn Tuấn, Phạm Hồng Hiền và Nguyễn Xuân Cảnh. (2023). Khảo sát một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27 sử dụng trong kiểm soát nấm bệnh hại cây chuối. *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 65(5), 59-63.

Đỗ Thị Tú Oanh, Huỳnh Nguyễn Tố Uyên, Nguyễn Thị Huyền và Trần Minh Định. (2023). Sàng lọc và tuyển chọn xạ khuẩn

sinh tổng hợp chitinase được phân lập từ đất ở Vườn Quốc gia Yok Dôn. *Tạp chí Khoa học Tây Nguyên*, 17(59), 91-98.

## 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H., Clément, C., Ouhdouch, Y., & Van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Ekundayo, F. O., Folorunsho, A. E., Ibisani, T. A., & Olabanji, O. B. (2022). Antifungal activity of chitinase produced by *Streptomyces* species isolated from grassland soils in Futa Area, Akure. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00782-4>
- Gonfa, G. T., Negessa, K. A., Bulto, A. O. (2023). Isolation, screening, and identification of chitinase-producing bacterial strains from riverbank soils at Ambo, Western Ethiopia. *Heliyon*, 9(11), e21643. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21643>
- Halim, Y., Fransiska, Hardoko, & Handayani, R. (2020). Production of N-acetylglucosamine from shrimp shells' chitin using intracellular chitinase from *Mucor circinelloides*. *Food Research*, 4(5), 1582-1587. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(5\).135](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(5).135)
- Jha, S., Modi, H. A., & Jha, C. K. (2016). Characterization of extracellular chitinase produced from *Streptomyces rubiginosus* isolated from rhizosphere of *Gossypium* sp. *Cogent Food and Agriculture*, 2(1), 1198225. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1198225>
- Kotb, E., Alabdalall, A. H., Alghamdi, A. I., Ababutain, I. M., Aldakeel, S. A., Al-Zuwaid, S. K., Algarudi, B. M., Algarudi, S. M., Ahmed, A. A., & Albarrag, A. M. (2023). Screening for chitin-degrading bacteria in the environment of Saudi Arabia and characterization of the most potent chitinase from *Streptomyces variabilis* Am1. *Scientific Reports*, 13(1), 11723. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38876-2>
- Lv, J., Lv, X., Ma, M., Oh, D.-H., Jiang, Z., & Fu, X. (2023). Chitin and chitin-based biomaterials: A review of advances in processing and food applications. *Carbohydrate Polymers*, 299, 120142. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120142>
- Meriem, G., & Mahmoud, K. (2017). Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology. *Annals of Microbiology*, 67(2), 175-183. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1249-8>
- Narayana, K. J. P., & Vijayalakshmi, M. (2009). Chitinase production by *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 725-733. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000400002>
- Pramesti, E., & Puspita, I. D. (2020). Optimization of colloidal chitin and inoculum concentration in chitinase production by *Streptomyces* sp. PB2 using response surface methodology. *E3S Web of Conferences*, 147, 03011. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014703011>
- Saadoun, I., Al-Omari, R., Jaradat, Z., & Ababneh, Q. (2009). Influence of culture conditions of *Streptomyces* sp. (strain S242) on chitinase production. *Polish Journal of Microbiology*, 58(4), 339-345.
- Ser, H. L., Palanisamy, U. D., Yin, W. F., Chan, K. G., Goh, B. H., Lee, L. H. (2016). *Streptomyces malaysiense* sp. nov.: A novel Malaysian mangrove soil actinobacterium with antioxidative activity and cytotoxic potential against human cancer cell lines. *Scientific Report*, 13(6), 24247. <https://doi.org/10.1038/srep24247>
- Shivalee, A., Divatar, M., Sandhya, G., Ahmed, S., & Lingappa, K. (2016). Isolation and screening of soil microbes for extracellular chitinase activity. *Journal of Advanced Scientific Research*, 7(2), 10-14.
- Shivalee, A., Lingappa, K., & Mahesh, D. (2018). Influence of bioprocess variables on the production of extracellular chitinase under submerged fermentation by *Streptomyces pratensis* strain KLSL55. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 421-426. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.12.006>

Brzezinska, S.M., Jankiewicz, U., & Lisiecki, K. (2013). Optimization of cultural conditions for the production of antifungal chitinase by *Streptomyces sporovirgulis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(2),154–159.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683813020014>

Thakur, D., Chauhan, A., Jhila, P., Kaushal, R., & Dipta, B. (2023). Microbial chitinases and their relevance in various industries. *Folia Microbiologica*, 68(1), 29–53.  
<https://doi.org/10.1007/s12223-022-00999-w>