

TUYỂN CHỌN VÀ XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY THÍCH HỢP CHO SINH TỔNG HỢP AMYLASE CỦA CÁC CHỦNG VI NẤM BIỂN PHÂN LẬP TỪ VỊNH NHA TRANG VÀ VỊNH VÂN PHONG, TỈNH KHÁNH HÒA

Phạm Thu Thủy, Đinh Thị Sở, Nguyễn Văn Duy*

Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang, 2 Nguyễn Đình Chiểu, Nha Trang, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Nguyễn Văn Duy <duynv@ntu.edu.vn>
(Ngày nhận bài: 16-12-2019; Ngày chấp nhận đăng: 14-04-2020)

Tóm tắt. Vi nấm biển đóng vai trò quan trọng trong các hệ sinh thái biển và cung cấp nhiều sản phẩm có giá trị trong công nghiệp. Nghiên cứu này tuyển chọn chủng vi nấm biển sinh amylase và xác định các điều kiện nuôi cấy thích hợp để thu nhận enzyme từ các chủng này. Trong tổng số 160 chủng vi nấm biển thu thập được, tất cả các chủng nấm men không thể hiện hoạt tính amylase (0/112 chủng); trong khi đó, các chủng nấm mốc có hoạt tính amylase cao với tỷ lệ 70,8% (34/48 chủng). Trong số này, chủng DM12M có hoạt độ amylase cao nhất (13,0 U/mL). Môi trường nuôi cấy thích hợp cho sinh tổng hợp amylase của chủng này là Czapek–Dox cải tiến, bổ sung 1% tinh bột tan, 0,3% NaNO₃, 0,5% NaCl, pH 6,0 với thời gian nuôi cấy 5 ngày ở 30 °C. Ở điều kiện này, hoạt độ amylase của chủng DM12M đạt 58,4 U/mL, cao hơn khoảng 4,5 lần so với trước khi tối ưu hóa. Chủng DM12M có trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 tương đồng 99,8–100% với các chủng của loài *Aspergillus aculeatus* nên có thể thuộc về loài này. Nghiên cứu cung cấp thông tin khoa học về các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sản xuất amylase ngoại bào của vi nấm biển và mở ra tiềm năng ứng dụng của chúng trong công nghiệp.

Từ khóa: amylase, vi nấm biển, *Aspergillus aculeatus*, vịnh Nha Trang, vịnh Vân Phong

Selection and culture condition optimisation for amylase biosynthesis of marine fungal strains isolated from Nha Trang Bay and Van Phong Bay, Khanh Hoa province

Pham Thu Thuy, Dinh Thi So, Nguyen Van Duy*

Institute of Biotechnology and Environment, Nha Trang University, 2 Nguyen Dinh Chieu St., Nha Trang, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Van Duy <duynv@ntu.edu.vn>
(Received: 16 December 2019; Accepted: 14 April 2020)

Abstract. Marine fungi play an important role in marine ecosystems and provide numerous valuable industrial products. This study screens for amylase-producing marine fungi strains and studies the appropriate culture conditions to obtain enzymes. From 160 isolated strains, all the yeast strains do not have amylase activity (0/112 strains), while the molds have amylase activity with a high rate at 70.8% (34/48 strains). Among these molds, the DM12M strain has the highest amylase activity (13.0 U/mL).

Suitable culture conditions for amylase production of this strain are the modified Czapek–Dox medium supplemented with 1% soluble starch, 0.3% NaNO₃, 0.5% NaCl, and 5 days incubation at pH 6.0 and 30 °C. Under these conditions, the amylase activity of the DM12M strain reaches 59.0 U/mL, approximately 4.5 times higher than that under pre-optimal conditions. The DM12M strain has the ITS1-5.8S-ITS2 nucleotide sequence of 99.8–100% similarity to the strain of *Aspergillus aculeatus*, revealing that it may belong to this species. The research provides scientific data on the factors affecting the ability of the marine fungi to produce extracellular amylase and opens up their potential for industrial applications.

Keywords: amylase, *Aspergillus aculeatus*, marine fungi, Nha Trang Bay, Van Phong Bay

1 Mở đầu

Trong thị trường công nghiệp enzyme, amylase là enzyme quan trọng và chiếm thị phần lớn nhất với 30% tổng thị phần enzyme trên thế giới [1]. Amylase được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, sản xuất thức ăn gia súc, chất tẩy rửa, xử lý môi trường... Để ứng dụng trong công nghiệp, các enzyme nói chung và amylase nói riêng cần có hoạt tính cao và ổn định cũng như thích ứng với một số điều kiện sản xuất như chịu được nhiệt và pH.

Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu về amylase từ vi nấm biển. Điển hình có Mohapatra và cs. đã sàng lọc được chủng *Mucor* sp. sinh amylase từ bọt biển *Spirastrella* sp. sử dụng môi trường muối tối thiểu chứa 1% tinh bột tan [2]. Li và cs. đã sàng lọc được chủng nấm men biển *Aureobasidium pullulans* N13d sinh amylase ngoại bào từ các trầm tích biển sâu ở Thái Bình Dương sử dụng môi trường chứa 1% tinh bột tan pha trong nước biển, pH 4,0 [3]. Sahoo và cs. đã sàng lọc hoạt tính amylase của nấm mốc phân lập từ các mẫu trầm tích rừng ngập mặn ở Ấn Độ. Nghiên cứu này đã phân lập được 40 chủng nấm mốc, trong đó 1/2 số chủng có hoạt tính amylase ngoại bào. Trong số này chủng *Penicillium citrinum* MSF-9 sản sinh amylase mạnh nhất trong điều kiện môi trường nuôi cấy chứa 1% tinh bột tan, 1% NaCl, pH 5 [4]. Gần đây, Lanka và cs. đã phân lập các mẫu nước ven biển Machilipatnam ở Ấn Độ và sàng lọc được 3 chủng *Fusarium* sp. ưa muối có tiềm năng sản xuất các enzyme ngoại bào mạnh trong đó có

amylase [5]. Wang và cs. đã sàng lọc khả năng sinh các enzyme ngoại bào và nguồn cacbon thích hợp cho sinh trưởng của sáu chủng vi nấm biển đại diện thuộc bộ sưu tập vi nấm biển thuộc Trung tâm nghiên cứu biển GEOMAR, Kiel, Cộng hòa liên bang Đức. Kết quả cho thấy trong số 19 nguồn cacbon khác nhau, nguồn cacbon phù hợp nhất cho sinh trưởng của cả sáu chủng này là tinh bột, laminarin và xylan [6].

Tại Việt Nam, nhiều nghiên cứu nhằm khai thác tiềm năng của vi sinh vật biển đã được thực hiện, nhưng các công bố về amylase từ vi nấm biển còn rất hạn chế. Phần lớn các nghiên cứu về amylase từ vi nấm tập trung vào các chủng nấm có nguồn gốc trên cạn. Chỉ có một số nghiên cứu về amylase từ vi nấm nước lợ đã được thực hiện. Điển hình, Nguyễn Thị Thanh Bình đã phân lập được 409 chủng nấm mốc từ rừng ngập mặn Cần Giờ, trong đó 261 chủng có khả năng sinh amylase (63,81%) [7]. Phạm Thị Ngọc Lan và Huỳnh Ngọc Thành đã tuyển chọn được 53 chủng nấm mốc từ ao nuôi tôm ở Thừa Thiên Huế. Chi 3/53 chủng này có khả năng sinh amylase với hoạt tính ở mức trung bình [8].

Điều này cho thấy amylase từ vi nấm biển có tiềm năng ứng dụng lớn, nhưng hiện nay những nghiên cứu theo hướng này ở Việt Nam vẫn còn rất hạn chế. Mục tiêu của nghiên cứu này là tuyển chọn chủng vi nấm biển có khả năng sinh amylase từ nước biển ven bờ ở vịnh Nha Trang và vịnh Vân Phong, và nghiên cứu các điều kiện và môi trường nuôi cấy thích hợp để thu nhận amylase từ các chủng này.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Chúng vi nấm biển

Tổng số 160 chủng vi nấm biển được phân lập từ nước biển ven bờ tại 11 vị trí thuộc vịnh Vân Phong và vịnh Nha Trang trong khoảng thời gian từ tháng 5 đến tháng 8/2018. Các chủng này được lưu giữ trong glycerol 20% ở $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ và trên thạch nghiêng ở $4\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ tại Phòng thí nghiệm Vi sinh, Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang.

2.2 Nuôi cấy vi nấm

Các chủng vi nấm được hoạt hóa trên môi trường thạch PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) (MT1) đối với nấm mốc và môi trường thạch YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose, Difco) (MT2) đối với nấm men ở $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 1–3 ngày đối với nấm men và 1–10 ngày tùy vào thời gian sinh trưởng của mỗi chủng vi nấm mốc cho tới khi kích thước khuẩn lạc đạt 2,5–3,0 cm, sau đó sử dụng cho các mục đích tiếp theo.

Nhằm cảm ứng khả năng sinh tổng hợp amylase, các chủng vi nấm được nuôi cấy trên môi trường Czapek–Dox cải tiến có bổ sung tinh bột tan làm cơ chất cảm ứng (MT3). Thành phần môi trường bao gồm NaNO_3 3,0 g/L, K_2HPO_4 1,0 g/L, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, KCl 0,5 g/L, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L, tinh bột tan 10 g/L, pH $6,5 \pm 0,2$, pha trong 50% nước biển. Môi trường thạch được bổ sung thêm 1,5% agar. Các môi trường được hấp khử trùng ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút, sau đó bổ sung kháng sinh ampicillin 0,05% và streptomycin sulfate 0,075%. Các chủng nấm mốc được cấy chấm điểm (một điểm) và các chủng nấm men được cấy vạch (ba vạch) lên các đĩa thạch, sau đó ủ ở $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong năm ngày.

Đối với môi trường lỏng, trước tiên các chủng nấm mốc được hoạt hóa trên môi trường MT1 cho tới khi đường kính khuẩn lạc đạt 2,5–3,0 cm; sau đó dùng dao vô trùng cắt một miếng khuẩn lạc, kích thước bằng 1/10 khuẩn lạc, bổ sung

vào môi trường MT3, nuôi lắc 120 vòng/ phút ở $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong vòng năm ngày, nhằm cảm ứng khả năng sinh amylase.

2.3 Xác định hoạt tính amylase bằng phương pháp đo đường kính vòng phân giải

Các chủng vi nấm được nuôi cấy trên môi trường thạch MT3 ở $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sau 5 ngày nuôi cấy, các đĩa thạch được lấy ra và bổ sung 10 mL thuốc thử Lugol, để 5 phút rồi đo đường kính vòng phân giải cơ chất bằng thước đo xăng ti mét. Hoạt tính enzyme được xác định dựa vào hiệu số $D - d$, trong đó D là đường kính vòng phân giải (mm), và d là đường kính khuẩn lạc (mm).

2.4 Xác định hoạt độ amylase bằng phương pháp DNS

Hoạt độ amylase của các chủng nấm mốc được xác định theo phương pháp DNS [9]. Một đơn vị hoạt độ enzyme (U/mL) được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết giải phóng 1 mg maltose từ tinh bột tan trong ba phút ở pH 6,9 và $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hoạt độ enzyme được tính theo công thức sau:

$$\text{Hoạt độ enzyme (U/mL)} = (\text{hàm lượng maltose giải phóng} \times df) / V$$

trong đó df là độ pha loãng dịch enzyme thô, V là thể tích dịch enzyme thô sử dụng (mL) và lượng maltose giải phóng (mg) được xác định dựa vào đường chuẩn maltose.

2.5 Khảo sát các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh tổng hợp amylase

Các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh tổng hợp amylase của các chủng vi nấm nghiên cứu được khảo sát theo các bước tuần tự gồm thời gian nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy, pH môi trường, nguồn carbon, nguồn nitơ, và độ mặn, trong đó kết quả về các thông số tối ưu từ bước trước sẽ được áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.6 Định danh chủng vi nấm bằng giải trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2

DNA tổng số của vi nấm được tách chiết bằng bộ kit EZ-10 spin column plant genomic DNA miniprep kit (BioBasic, Canada) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được bảo quản ở -20°C .

Các mồi được sử dụng cho phản ứng PCR là ITS1F_KYO2 (5'-TAG AGG AAG TAA AAG TCG TAA-3') [10] và ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') [10]. Hỗn hợp phản ứng PCR bao gồm 9,5 μL nước, 1 μL mỗi mồi (10 mM), 1 μL DNA (2–20 ng), và 12,5 μL MyTaq Mix 2X (Bioline, Mỹ). Chu trình nhiệt được thực hiện như sau: 93°C trong 5 phút, 35 chu kỳ của 93°C trong 30 giây, $56\text{--}58^{\circ}\text{C}$ trong 30 giây, 72°C trong 30 giây và kết thúc ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,2%.

Sản phẩm PCR được gửi đi giải trình tự tại công ty Macrogen (Hàn Quốc). Trình tự DNA được xử lý bằng phần mềm MEGA 6 [11], Geneious 10.2.2 (Biomatters, New Zealand) và công cụ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2.7 Xử lý số liệu

Các số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS 16 (SPSS Inc., Chicago, Mỹ), trong đó sự khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Sàng lọc hoạt tính amylase ngoại bào của các chủng vi nấm biển

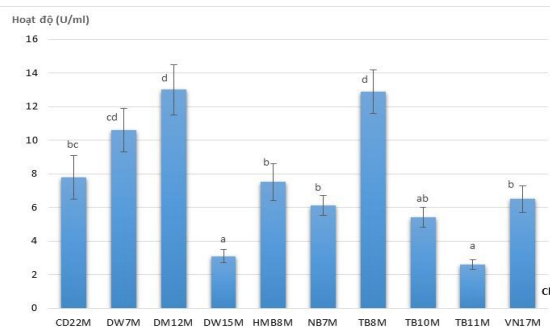
Trong số 160 chủng vi nấm biển (112 chủng nấm men và 48 chủng nấm mốc) đã phân lập, tất cả chủng nấm men không thể hiện hoạt tính amylase, trong khi đó có 34/48 (70,8%) chủng nấm mốc có hoạt tính amylase. Nấm mốc được biết đến là nguồn sản xuất enzyme ngoại bào mạnh. Vì vậy, nhiều nghiên cứu nhằm sàng lọc hoạt tính amylase ngoại bào từ vi nấm biển đã được thực hiện [2, 4,

5]. Từ kết quả trên, 10 chủng nấm mốc có đường kính vòng phân giải tinh bột lớn nhất sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2 Hoạt độ amylase của các chủng vi nấm biển nghiên cứu

Để đánh giá chính xác khả năng sinh amylase của 10 chủng nấm mốc làm cơ sở cho quá trình tuyển chọn tiếp theo, chúng tôi tiến hành nuôi cấy các chủng này trên môi trường lỏng MT3 ở 28°C . Sau 5 ngày nuôi cấy, dịch enzyme thô được thu nhận để xác định hoạt độ enzyme theo phương pháp DNS.

Trong số 10 chủng nấm mốc tuyển chọn, 3 chủng DM12M, TB8M và DW7M có khả năng phân giải tinh bột mạnh nhất với hoạt độ enzyme tương ứng đạt 13,0; 12,9 và 10,6 U/mL (Hình 1). Mohapatra và cs. đã sàng lọc được chủng *Mucor* sp. sinh amylase từ bọt biển *Spirastrella* sp. sử dụng môi trường muối tối thiểu chứa 1% tinh bột tan. Chủng này sinh enzyme mạnh nhất ở môi trường pH 5,0 với hoạt độ đạt được là 41,84 U/mL [2]. Li và cs. đã sàng lọc được chủng nấm men biển *Aureobasidium pullulans* N13d sinh amylase ngoại bào mạnh từ các mẫu trầm tích biển sâu ở Thái Bình Dương sử dụng môi trường chứa 1% tinh bột tan pha trong nước biển, pH 4,0. Amylase thu được từ chủng này có hoạt tính cao nhất (10 U/mL) khi nuôi cấy ở 28°C trong 56 giờ [3]. Điều này cho thấy hoạt tính enzyme thu được của các chủng nấm rất khác nhau, tùy thuộc vào nguồn gốc phân lập và



Hình 1. Hoạt độ amylase trung bình của 10 chủng nấm mốc tuyển chọn (Các chữ cái a–d cho biết sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$)

các điều kiện nuôi cấy. Từ kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi chọn 3 chủng DM12M, DW7M và TB8M cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3 Thời gian nuôi cấy thích hợp cho sinh tổng hợp amylase của 3 chủng DM12M, DW7M và TB8M

Khi nuôi cấy ở 28 °C, cả 3 chủng nấm mốc nghiên cứu đều có hoạt độ amylase cao nhất sau 5 ngày nuôi cấy, trong đó chủng DM12M có khả năng sinh enzyme mạnh nhất, đạt 13,7 U/mL (Hình 2). Từ ngày thứ 6 trở đi hoạt độ enzyme giảm dần, có thể do môi trường đã tạo ra các sản phẩm thứ cấp ức chế sự sinh trưởng hoặc do cạn kiệt chất dinh dưỡng. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Ominyi về khả năng sinh amylase của các chủng nấm mốc *Aspergillus*, *Mucor* và *Rhizopus*, với khả năng sản sinh amylase đạt hoạt độ cao nhất sau 5 ngày [12]. Vì vậy, thời gian nuôi cấy 5 ngày sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

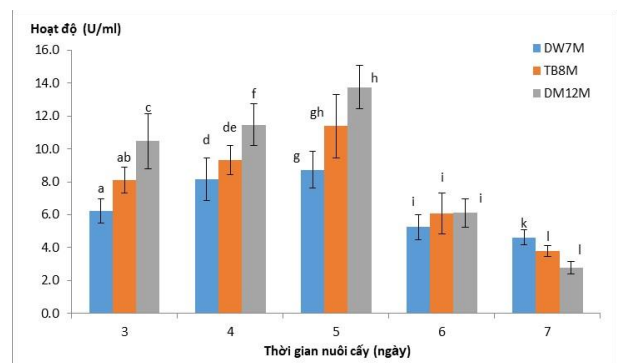
3.4 Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp amylase của 3 chủng DM12M, DW7M và TB8M

Nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh amylase ngoại bào của các chủng nấm. Cụ thể, 3 chủng DM12M, DW7M và TB8M sinh amylase mạnh nhất ở 30, 37 và 28 °C, nhưng xét về tổng thể, khả năng sinh amylase của chủng DM12M là mạnh nhất so với 2 chủng còn lại (Hình 3). Vì vậy, chủng DM12M cùng với nhiệt độ nuôi cấy 30 °C được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy khác nhằm thu nhận enzyme. Mahapatra và Banerjee, trong quá trình tối ưu hoá các điều kiện nuôi cấy nhằm thu nhận amylase từ chủng *Aspergillus aculeatus* DBF9, cũng sử dụng môi trường Czapek–Dox lỏng, bổ sung 1% tinh bột tan và nhận thấy chủng này sinh enzyme tối ưu ở 30 °C [13]. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi khi chủng DM12M được định danh là *Aspergillus aculeatus* (kết quả được trình bày ở các mục tiếp theo).

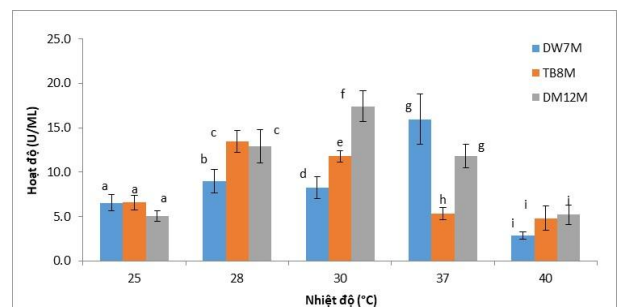
3.5 pH môi trường nuôi thích hợp cho sinh tổng hợp amylase của chủng DM12M

Khi thay đổi pH của môi trường từ 4 đến 8, khả năng sinh amylase của chủng DM12M tăng

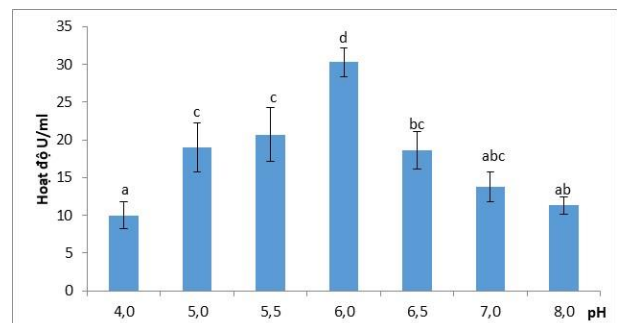
đần và đạt tối ưu ở giá trị pH 6,0 với hoạt độ đạt 30 U/mL sau đó giảm dần ở các giá trị pH cao hơn (Hình 4). Mahapatra và Banerjee cũng đưa ra kết luận tương tự đối với chủng *Aspergillus aculeatus* DBF9 [13].



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh amylase của 3 chủng nấm mốc DM12M, DW7M và TB8M (Các chữ cái a–d cho biết sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$)



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh amylase của 3 chủng DM12M, DW7M và TB8M (Các chữ cái a–i cho biết sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$)



Hình 4. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến hoạt độ amylase của chủng DM12M (Các chữ cái a–c cho biết sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$)

3.6 Nguồn cacbon thích hợp cho sinh tổng hợp amylase của chủng DM12M

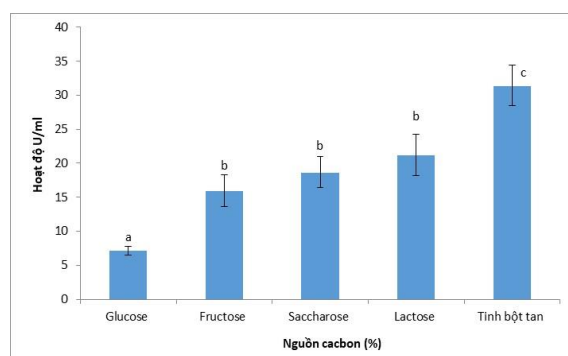
Hình 5 cho thấy hoạt độ amylase của chủng DM12M đạt cao nhất (30 U/mL) khi sử dụng nguồn cacbon là tinh bột tan 1%. Điều này chứng tỏ tinh bột tan là nguồn cacbon phù hợp và là nguồn cơ chất cảm ứng tốt nhất để kích thích sản sinh amylase của chủng này. Kết quả này cũng tương đồng với một số nghiên cứu trước đây khi tinh bột tan là nguồn cacbon thích hợp cho quá trình sinh amylase của nhiều chủng nấm mốc biển [6].

3.7 Nguồn nitơ thích hợp cho sinh tổng hợp amylase của chủng DM12M

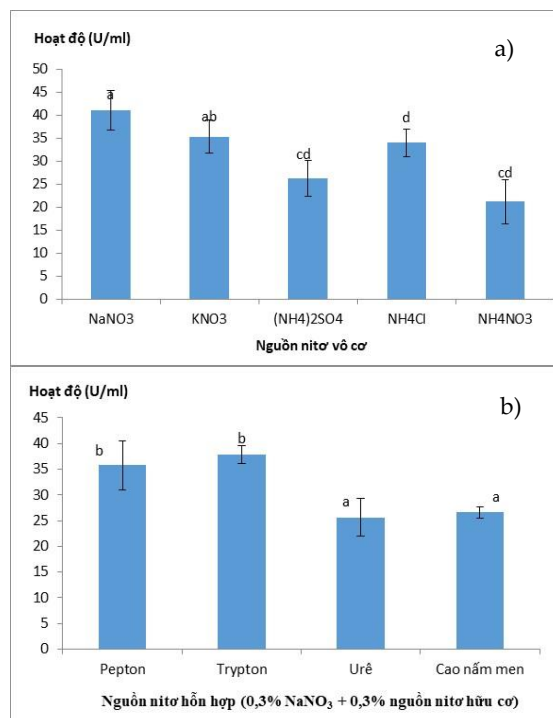
Đối với 0,3% các nguồn nitơ vô cơ khác nhau bổ sung vào môi trường nuôi cấy thì NaNO_3 là thích hợp cho quá trình sản xuất amylase ngoại bào của chủng DM12M với hoạt độ đạt được là 40,0 U/mL (Hình 6a). Chúng tôi tiếp tục tối ưu nguồn nitơ hỗn hợp bằng cách bổ sung thêm vào môi trường nuôi cấy 0,3% các nguồn nitơ hữu cơ khác nhau gồm pepton, trypton, urê và cao nấm men. Hoạt độ amylase của chủng DM12M đạt 30–40 U/mL, tức là không có sự thay đổi đáng kể so với môi trường ban đầu chỉ bổ sung nguồn nitơ vô cơ (Hình 6b). Vì vậy, NaNO_3 được chọn là nguồn nitơ trong môi trường nuôi cấy cho các thí nghiệm tiếp theo của chủng DM12M.

3.8 Nồng độ NaCl và NaNO_3 thích hợp cho sinh tổng hợp amylase của chủng DM12M

Độ mặn là yếu tố quan trọng có ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của vi nấm biển. Trong các thí nghiệm ở trên, các chủng nấm được nuôi cấy trong môi trường chứa 50% nước biển (độ mặn 2–3,6%), hay môi trường nuôi cấy chứa 1–1,8% NaCl. Để xác định chính xác độ mặn thích hợp cho sinh tổng hợp amylase của chủng DM12M, chúng tôi tiến hành nuôi cấy chủng này trong môi trường không bổ sung nước biển và có bổ sung NaCl ở các nồng độ khác nhau. Khi bổ sung thêm 0,5% NaCl vào môi trường nuôi cấy, hoạt độ amylase của chủng DM12M đạt cao nhất

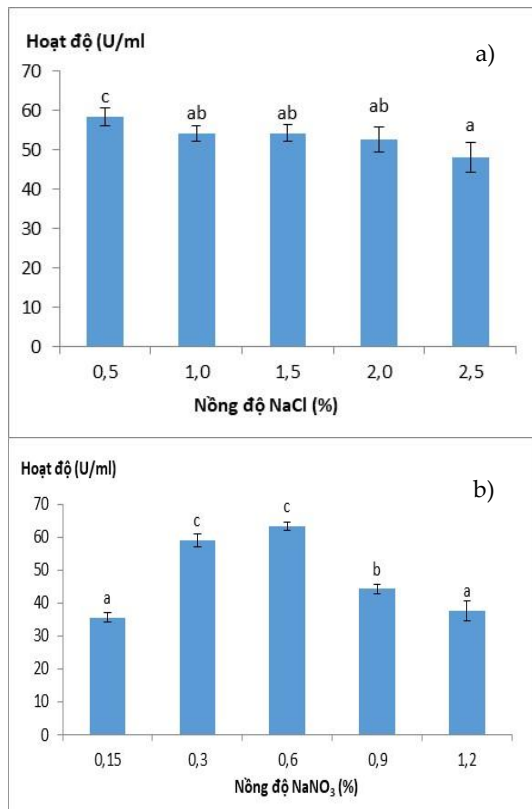


Hình 5. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến hoạt độ amylase của chủng DM12M (Các chữ cái a–c cho biết sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$)



Hình 6. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến hoạt độ amylase của chủng DM12M: (a) nitơ vô cơ; (b) nitơ hữu cơ (Các chữ cái a–d cho biết sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$)

(58,4 U/mL) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các điều kiện nồng độ NaCl cao hơn (Hình 7a). Kết quả này khác với nghiên cứu của Sahoo và cs. về khả năng sinh amylase của vi nấm ở rừng ngập mặn, trong đó nồng độ NaCl thích hợp là 1% [4].



Hình 7. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl (a) và NaNO₃ (b) đến hoạt độ amylase của chủng DM12M (Các chữ cái a-c cho biết sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$)

Các kết quả thu được ở trên được ứng dụng để tiếp tục xác định nồng độ NaNO₃ thích hợp cho sinh tổng hợp amylase của chủng nghiên cứu. Khi bổ sung 0,6% NaNO₃ vào môi trường nuôi cấy thì hoạt độ amylase của chủng DM12M đạt cao nhất (63,2 U/mL) (Hình 7b). Hoạt độ enzyme thu được là cao hơn so với điều kiện môi trường chứa 0,3% NaNO₃ (59,0 U/mL), nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Do vậy, xét về mặt kinh tế, nồng độ NaNO₃ 0,3% được lựa chọn.

3.9 Định danh chủng nấm mốc DM12M

Sản phẩm PCR đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng DM12M thu nhận được có kích thước khoảng 580 bp. Kết quả giải và phân tích trình tự gen cho thấy trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng DM12M có độ tương đồng cao nhất đạt từ 99,8% đến 100% so với 4 chủng thuộc loài *Aspergillus aculeatus* (mã số GenBank tương ứng KY320594, EU833205, EU326206 và AJ279995), và có độ tương đồng thấp hơn (99,7%) với các chủng của các loài *A. violaceofuscus* (MG682503) và *A. japonicus* (KC128815) (Bảng 1). Như vậy, chủng DM12M có thể thuộc về loài *Aspergillus aculeatus*. Kết quả này cũng tương đồng với các đặc điểm hình thái của chủng được chúng tôi mô tả và từ những nghiên cứu trước đây.

Bảng 1. So sánh trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng DM12M với các trình tự tương đồng cao nhất trên Genbank

Điểm xếp hạng	Mã số Genbank	Tên loài	Tỷ lệ tương đồng (%)	Tỷ lệ che phủ (%)
1064.79	KY320594	<i>Aspergillus aculeatus</i>	100	100
1064.79	EU833205	<i>Aspergillus aculeatus</i>	100	100
1064.79	EU326206	<i>Aspergillus aculeatus</i>	100	100
1057.4	AJ279995	<i>Aspergillus aculeatus</i>	99,8	100
1053.71	MG682503	<i>Aspergillus violaceofuscus</i>	99,7	100
1053.71	KC128815	<i>Aspergillus japonicus</i>	99,7	100

Hiện nay, trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về khả năng sinh amylase của chi *Aspergillus*, nhưng công bố về amylase từ *A. aculeatus* còn hạn chế. Khokhar và cs. đã so sánh khả năng sinh amylase và cellulase của các chủng nấm mốc thuộc chi *Aspergillus* và *Penicillium* từ các nguồn khác nhau và cho thấy *A. aculeatus* có khả năng sinh amylase [14]. Mahapatra và cs. đã thu nhận, tinh chế và xác định các đặc tính hoá sinh của amylase thu nhận từ chủng *A. aculeatus* DBF9 phân lập từ đất rừng [13]. Một nghiên cứu ứng dụng khác cho thấy rằng chủng *A. aculeatus* BCC17849 có khả năng sản sinh amylase phân giải tinh bột đa thành phần [15]. Điều thú vị là sử dụng dịch chiết các enzyme ngoại bào từ chủng này (trong đó có amylase) trong quá trình đường hoá tinh bột sắn và lên men thu nhận etanol đã làm tăng hiệu suất của quá trình lên tới 96,7% [15]. Các nghiên cứu trên cho thấy tiềm năng ứng dụng của chủng *A. aculeatus* DM12M sinh amylase trong quá trình thủy phân tinh bột và các lĩnh vực công nghiệp khác nhau

4 Kết luận

Nghiên cứu đã sàng lọc hoạt tính amylase ngoại bào của 160 chủng vi nấm biển có nguồn gốc từ vịnh Nha Trang và vịnh Vân Phong và tuyển chọn được chủng nấm mốc DM12M có khả năng sinh amylase mạnh nhất. Môi trường nuôi cấy thích hợp để thu nhận amylase từ chủng này là Czapek–Dox cải tiến bổ sung 1% tinh bột tan, 0,3% NaNO₃ và 0,5% NaCl, với thời gian nuôi trong 5 ngày ở pH 6,0 và 30 °C. Trong điều kiện này, hoạt độ amylase đạt 58,4 U/mL, cao gấp 4 lần so với khi chưa tối ưu. Chủng DM12M có trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 tương đồng 99,8–100% với các chủng của loài *Aspergillus aculeatus* nên có thể thuộc về loài này. Các kết quả này cho thấy chủng DM12M và amylase từ chủng này có thể có tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp.

Thông tin tài trợ

Công trình này được thực hiện dưới sự tài trợ của Quỹ NAFOSTED (Đề tài mã số 106-NN.02-2016.70).

Tài liệu tham khảo

1. Vaidya S, Srivastava PK, Rathore P, Pragya R, Pandey AK. Amylases: a prospective enzyme in the field of biotechnology. *The Journal of Applied Biosciences*. 2015; 41: 1-18.
2. Mohapatra B, Banerjee U, Bapuji M. Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. *Journal of Biotechnology*. 1998;60:113–117.
3. Li HF, Chi ZM, Wang XH, Duan XH, Ma LY, Gao LM. Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40:1006-1012.
4. Sahoo K, Dhal N, Das R. Production of amylase enzyme from mangrove fungal isolates. *African Journal of Biotechnology*. 2014;13(46):4338-4346.
5. Lanka S, Pydipally M, Latha JNL. Extraction and activity studies of industrially important enzymes from marine fusarium species isolated from Machilipatnam sea water, (a.p), India. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 2016;3(12): 254-258.
6. Wang Y, Barth D, Tamminen A, Wiebe MG. Growth of marine fungi on polymeric substrates. *BMC Biotechnology*. 2016;16(3). doi: 10.1186/s12896-016-0233-5.
7. Bình NTT. Nghiên cứu thu nhận enzym amylase của một số chủng nấm sợi phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ [Luận văn]. Hồ Chí Minh: Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh; 2010.
8. Lan PTN, Thành HN. Nghiên cứu nấm mốc có khả năng phân giải tinh bột phân lập từ ao nuôi tôm ở Đầm Sam – Chuồn, Thừa Thiên Huế Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. *Tạp chí khoa học Đại học Huế*. 2012;73(4):147-156.
9. Bernfeld P. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*. 1955;1:149-58.

10. Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S, Sato H. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. PLoS ONE. 2012;7(7): e40863.
11. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 2013;30:2725-2729.
12. Ominyi MC. Optimization of α -amylase and glucoamylase production from three fungal strains isolated from Abakaliki, Ebonyi State. European Journal of Experimental Biology. 2013;3(4):26-34.
13. Mahapatra S, Banerjee D. Production and characterization of thermal acid amylase from *A. aculeatus* DBF9. Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology. 2012;6(1): 109-112.
14. Khokhar I, Mukhtar I, Mushtaq S. Comparative studies on the amylase and cellulase production of *Aspergillus* and *Penicillium*. Journal of Applied Sciences and Environmental Management. 2011;15(4):657-661.
15. Poonsrisawat A, Paemanee A, Wanlapatit S, Piyachomkwan K, Eurwilaichitr L, Champreda V. Simultaneous saccharification and viscosity reduction of cassava pulp using a multi-component starch- and cell-wall degrading enzyme for bioethanol production. 3 Biotech. 2017;7(5):290.