SÀNG LỌC CHỦNG XẠ KHUẨN SINH TỔNG HỢP CHITINASE TỪ RỪNG NGẬP MẶN TỈNH KHÁNH HÒA VÀ KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐỂ THU NHẬN CHITINASE

SCREENING OF ACTINOBACTERIA STRAINS FOR CHITINASE FROM MANGROVE FORESTS IN KHANH HOA PROVINCE AND INVESTIGATION OF CULTURE CONDITIONS FOR ENZYME PRODUCTION

Nguyễn Thành Nam, Phạm Ngọc Huyền Trân,
Dương Thị Hiền Nhi và Nguyễn Thị Như Thường*

Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Thủy sản và Khoa học sự sống, Trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Như Thường, Email: nhuthuongnt@ntu.edu.vn

Ngày nhận bài: 17/10/2025; Ngày phản biện thông qua: 18/03/2026 ; Ngày duyệt đăng: 25/03/2026

TÓM TẮT

Chitinase, một loại enzyme thủy phân polysaccharide, là công cụ quan trọng trong các nghiên cứu phân tích đặc tính và chức năng sinh học của các dẫn xuất chitin oligosaccharide. Chitinase có nguồn gốc từ xạ khuẩn đang được quan tâm nghiên cứu trong những năm gần đây do hoạt tính mạnh và ổn định. Trong nghiên cứu này, 45 chủng xạ khuẩn đã được phân lập từ rừng ngập mặn tỉnh Khánh Hòa, được sàng lọc khả năng sinh tổng hợp chitinase. Kết quả cho thấy 41 chủng (91,1%) có hoạt tính enzyme, trong đó chủng A41 biểu hiện khả năng phân giải chitin mạnh nhất với đường kính vòng phân giải đạt 21,50 ± 0,55 mm. Phân tích trình tự gen 16S rRNA xác định chủng A41 thuộc loài Streptomyces thermocarboxydus với mức độ tương đồng 99,93% khi so sánh với cơ sở dữ liệu về trình tự gen 16S rRNA của các loài xạ khuẩn trên GenBank. Các thí nghiệm khảo sát điều kiện nuôi cấy cho thấy chủng A41 sinh tổng hợp chitinase cao nhất sau 5 ngày với hoạt độ đạt 3,39 ± 0,01 U/mL, khi được nuôi trong môi trường SCB bổ sung 1% sucrose và 0,5% malt extract. Kết quả nghiên cứu cho thấy Streptomyces thermocarboxydus A41 là chủng xạ khuẩn tiềm năng để sản xuất chitinase hoạt tính tốt, và ứng dụng trong lĩnh vực y dược, nông nghiệp và xử lý môi trường.

Từ khóa: *chitinase enzyme, xạ khuẩn, rừng ngập mặn, điều kiện nuôi cấy.*

ABTRACT

Chitinase, a polysaccharide-hydrolyzing enzyme, serves as a crucial tool for characterizing the properties and biological functions of chitin oligosaccharides. Recently, chitinases derived from actinobacteria have received research interest due to their high activity and stability. In this study, 45 actinobacteria strains isolated from mangrove forests in Khanh Hoa Province, Vietnam, were screened for their ability to produce chitinase. The results showed that 41 strains (91.1%) exhibited enzymatic activity, with strain A41 demonstrating the highest chitin-degrading capacity, forming a hydrolysis zone of 21.50 ± 0.55 mm. Molecular identification based on 16S rRNA gene sequencing confirmed that strain A41 belongs to Streptomyces thermocarboxydus, showing 99.93% sequence similarity compared with the 16S rDNA gene database on GenBank. Optimization of culture conditions revealed that chitinase production by strain A41 reached a maximum activity of 3.39 ± 0.01 U/mL after 5 days of incubation in SCB medium supplemented with 1% sucrose and 0.5% malt extract. These findings highlight Streptomyces thermocarboxydus A41 as a promising actinobacterial strain for chitinase production with potential applications in medicine, agriculture, and environmental biotechnology.

Keywords: *Chitinase enzyme, actinobacteria, mangrove forest, culture conditions.*

I. MỞ ĐẦU

Chitinase là một loại enzyme thuộc nhóm glycosyl hydrolase, với kích thước phân tử dao động từ khoảng 20 kDa đến 90 kDa [8]. Enzyme này được tìm thấy ở nhiều loài sinh vật khác nhau như vi khuẩn, nấm, nấm men, thực vật, xạ khuẩn, động vật chân đốt và cả ở người [9]. Dựa vào cơ chế tác động, chitinase được chia thành hai nhóm chính: endo-chitinase và exo-chitinase. Endo-chitinase cắt các liên kết glycoside bên trong chuỗi polymer chitin để tạo ra các sản phẩm như diacetylchitobiose và N-acetyl-D-glucosamine, trong khi exo-chitinase tiếp tục phân cắt các sản phẩm oligomer do endo-chitinase tạo ra để tạo thànhcác monomer [27].

Chitinase được xem như một chất kiểm soát sinh học. Một số tác nhân gây bệnh, chẳng hạn như *Fusarium* sp., *Botrytis cinerea, Sclerotinia sclerotiorum* và *Rhizoctonia solani*, có chitin là thành phần chính của thành tế bào. Chitinase có thể được sử dụng để chống lại cả nấm gây bệnh thực vật và côn trùng gây hại [19]. Chitin oligosaccharides được tổng hợp thông qua quá trình thủy phân chitin bằng chitinase đã được quan tâm trong những năm gần đây do ứng dụng rộng rãi của chúng trong các ứng dụng y tế, nông nghiệp và công nghiệp, bao gồm hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, giúp hạ cholesterol và hạ huyết áp, và được sử dụng như một chất tăng cường chất lượng thực phẩm [8].

Xạ khuẩn (Actinobacteria) là một ngành lớn thuộc nhóm sinh vật nhân sơ, chúng bao gồm các vi khuẩn gram dương, sống hoại sinh, hầu hết các loài sống ở điều kiện hiếu khí, trong khi một số ít sống trong điều kiện yếm khí hoặc yếu khí tùy ý, với hàm lượng guanosine+cytosine (G+C) cao trong DNA (55%) và là một đơn vị phân loài lớn của vi khuẩn dựa trên các nghiên cứu phân loại 16S rRNA [28]. Trong số các loại xạ khuẩn được tìm thấy trong nhiều môi trường sống khác nhau, xạ khuẩn có nguồn gốc từ biển và các môi trường liên quan đến biển được công nhận rộng rãi về tầm quan trọng của chúng trong nhiều lĩnh vực y tế, nông nghiệp và nhiều ngành công nghiệp khác [14]. Xạ khuẩn là nhóm vi khuẩn hoại sinh có vai trò quan trọng, nổi bật với khả năng sản xuất kháng sinh và chất chuyển hóa thứ cấp, cũng như tổng hợp các enzyme phân giải chitin [7]. Các loài thuộc chi *Streptomyces* là nguồn sinh tổng hợp chitinase phổ biến và tiềm năng nhất. Nhiều nghiên cứu chứng minh chitinase có thể phân hủy mạnh mẽ cơ chất chitin thành các sản phẩm có giá trị sinh học. Nhiều chủng xạ khuẩn đã được ghi nhận có hoạt tính chitinase tốt khi được nuôi cấy trong các điều kiện khác nhau, chẳng hạn như *S. canus* KS10 có pH tối ưu 8 và nhiệt độ tối ưu 50°C [13], *S. pseudogriseolus* BH1 có hoạt tính mạnh ở khoảng pH 4 – 9, nhiệt độ tối ưu 50°C [13], hay *S. mutabilis* IMA8 với khoảng pH hoạt động 4 – 7 và nhiệt độ tối ưu 45°C [21]. Sự đa dạng về khoảng pH và nhiệt độ hoạt động cho thấy enzyme này có khả năng thích ứng tốt với nhiều môi trường khác nhau. Với mục đích tăng hoạt tính của enzyme chitinase, các điều kiện nuôi cấy vi sinh vật, đặc biệt là ảnh hưởng của các thành phần trong môi trường như nguồn carbon, nguồn nitơ và thời gian nuôi cấy cần được xác định để thu enzyme có hoạt tính cao nhất. Hiện nay, chitinase từ xạ khuẩn có tiềm năng ứng dụng cao trong nhiều lĩnh vực như kiểm soát sinh học nấm bệnh, sản xuất chitin oligosaccharides, chế biến phế phụ phẩm thủy sản và xử lý môi trường. Do đó, việc nghiên cứu và khai thác enzyme chitinase từ xạ khuẩn rất có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Bộ sưu tập 45 chủng xạ khuẩn được phân lập từ rừng ngập mặn khu vực tỉnh Khánh Hòa của nhóm nghiên cứu Trường Đại học Nha Trang trong đề tài nghiên cứu khoa học

sinh viên SV2022-13-13, được chuyển giao và bảo quản tại trung tâm thí nghiệm thực hành – Trường Đại học Nha Trang [6].

2. Hoạt hóa chủng

45 chủng xạ khuẩn được hoạt hóa trên môi trường PDB bổ sung 1,5% NaCl và ủ lắc ở nhiệt độ 30°C, 150 vòng/phút trong 3 - 5 ngày. Dịch nuôi cấy sau đó được làm thuần trên môi trường HPDA có bổ sung 1,5% NaCl, ủ ở 30°C trong 5 - 7 ngày. Các khuẩn lạc thuần được đối chiếu với mô tả hình thái trước đó của Trần Tiến Ninh và cộng sự (2023) để xác nhận và chuẩn bị cho thí nghiệm tiếp theo [5].

3. Sàng lọc chủng xạ khuẩn sinh enzyme chitinase

3.1. Sàng lọc sơ cấp

Các chủng xạ khuẩn được khảo sát sơ bộ bằng phương pháp cấy điểm trên môi trường Gause I có chứa 1% chitin. Các đĩa sau đó được ủ ở 30°C trong 7 ngày. Sau thời gian ủ, vòng phân giải thể hiện hoạt tính chitinase được kiểm tra bằng thuốc thử lugol. Dựa trên đường kính vòng thủy phân (D) và đường kính khuẩn lạc (d) hình thành sau thời gian ủ, xác định đường kính vòng phân giải chitin (x) theo công thức: D - d = x (mm) (x > 20 mm (+++); x = 10 – 20 mm (++); x = 1 – 10 mm (+), x < 1 mm (-)) [3]. Dựa vào đường kính vòng phân giải chitin, tiến hành chọn một số chủng xạ khuẩn có vòng phân giải được đánh giá ở mức (+++) để tiến hành thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Sàng lọc thứ cấp

Các chủng xạ khuẩn đã lựa chọn thông qua sàng lọc sơ cấp ban đầu mang kết quả vòng phân giải ở mức mạnh (+++) được tiến hành nuôi lỏng trong bình tam giác chứa 30 mL môi trường Gause I bổ sung 1% chitin keo, ủ lắc ở 150 vòng/phút, 30°C trong 7 ngày để thu nhận dịch enzyme thô. Sau thời gian nuôi cấy, dịch ngoại bào được tách bằng cách ly tâm lạnh 8000 vòng/phút, 15 phút, 4°C, thu phần dịch nổi và loại bỏ sinh khối. Hoạt tính chitinase được sàng lọc thứ cấp bằng phương pháp khuếch tán thạch theo mô tả của Đỗ Quang Trung và cộng sự (2022) [2]. Môi trường thử nghiệm gồm 1% chitin keo và 1,8% agar. Mỗi giếng thạch (đường kính 8 mm) được bổ sung 150 µL dịch chiết enzyme thô, sau đó ủ ở 37°C trong 24 giờ. Vòng phân giải chitin keo được quan sát bằng thuốc thử lugol. Đường kính vòng phân giải chitin (x) được xác định theo công thức: x = D – d (mm), trong đó D là đường kính vòng thủy phân và d là đường kính giếng thạch (8 mm) [3]. Dựa vào đường kính vòng phân giải chitin, lựa chọn chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải chitin lớn nhất để tiếp tục nghiên cứu.

4. Phân loại xạ khuẩn

4.1. Phân loại sơ bộ

Chủng xạ khuẩn tiềm năng được nuôi trên hệ thống môi trường ISP1 đến ISP7. Quan sát các yếu tố như cường độ phát triển, màu sắc khuẩn ty cơ chất (KTCC), khuẩn ty khí sinh (KTKS), khả năng sinh sắc tố tan và sự hình thành sắc tố melanin sau 7, 14 và 21 ngày nuôi cấy với nhiệt độ 30°C theo mô tả của Shirling và Gottlieb (1966) [22]. Màu sắc của KTKS và KTCC của các chủng xạ khuẩn được so với bảng màu RAL. Tiến hành nhuộm Gram và quan sát ở độ phóng đại X1000 lần dưới kính hiển vi quang học để ghi nhận các đặc điểm về, hình thái hệ sợi khuẩn ty và chuỗi bào tử, so sánh với mô tả của Li và cộng sự (2016) [12]. Tất cả các đặc điểm trên được ghi nhận và so sánh với khóa phân loại Bergey's để xác định đến chi của chủng xạ khuẩn tiềm năng [18].

4.2. Định danh bằng sinh học phân tử

DNA chủng xạ khuẩn tiềm năng được tách chiết bằng bộ kit genomic DNA Isolation của hãng GeNet Bio. Các bước tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Genomic DNA Extraction Kit manual 1411(tissue)). Sau đó, khuếch đại đoạn gen 16S rRNA bằng phản ứng PCR, sử dụng cặp mồi 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTAG-3' và 1492R 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3' [11]. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR

Mastercycler – Eppendorf theo chu kỳ 96°C/3 phút, 30 chu kỳ (94°C/1 phút, 40°C/1 phút, 72°C/2 phút), 72°C/10 phút, giữ 4°C. Kiểm tra sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1%. Sản phẩm PCR được gửi đến công ty trách nhiệm hữu hạn (TNHH) dịch vụ và thương mại Nam Khoa để giải trình tự gen. Sau đó, kết quả trình tự gen 16S rRNA được xử lý peak tạp bằng phần mềm Mega 11. Cuối cùng tiến hành so sánh với các trình tự gen có sẵn trên cơ sở dữ liệu của GenBank bằng phần mềm BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

5. Khảo sát điều kiện nuôi cấy chủng xạ khuẩn tiềm năng thu nhận chitinase

5.1. Xác định hoạt độ chitinase

Hoạt độ chitinase được xác định theo phương pháp DNS [20]. Tiến hành cho vào các ống nghiệm hỗn hợp phản ứng gồm: 2 mL dịch enzyme thô + 1 mL chitin keo 1% (các dung dịch đã được làm ấm đến 37°C từ trước đó). Mẫu được ủ ở 37°C trong vòng 2 giờ, ngừng phản ứng bằng cách đun sôi cách thủy trong 15 phút. Tiến hành lọc hỗn hợp dịch phản ứng bằng giấy lọc Whatman 54, thu dịch lọc, cho vào ống nghiệm sạch khác 1mL dịch lọc + 2 mL thuốc thử DNS 1%, lắc đều bằng máy vortex. Sau đó, tiến hành đun sôi cách thủy trong 15 phút, các ống nghiệm được để nguội về nhiệt độ phòng, tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 540 nm. Lượng N-acetyl- β- D-Glucosamine (NAG) được suy ra từ đường chuẩn NAG. Một đơn vị hoạt độ là lượng enzyme cần để giải phóng 1 µM NAG từ phản ứng thủy phân cơ chất chitin trong thời gian 1 phút ở nhiệt độ 37°C.

5.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Chủng xạ khuẩn tiềm năng được khảo sát điều kiện thời gian bằng cách tiếp giống 1% vào bình tam giác có chứa môi trường SCB được điều chỉnh ở pH 7, NaCl 2% với nguồn carbon và nitơ lần lượt là tinh bột và casein. Tiến hành nuôi lỏng trong thời gian 10 ngày ở điều kiện tốc độ lắc 150 vòng/phút, ở 30°C. Thực hiện thu dịch nuôi cấy mỗi ngày bằng phương pháp ly tâm lạnh 8000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Xác định hoạt độ chitinase để đánh giá ảnh hưởng của thời gian đến quá trình sinh tổng hợp chitinase của chủng xạ khuẩn tiềm năng.

5.3. Khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon

Nguồn carbon được sử dụng trong thí nghiệm bao gồm: tinh bột tan, D–glucose, sucrose và glycerol, lần lượt được bổ sung vào môi trường SCB (pH 7, NaCl 2% với 0,5% casein) với nồng độ 1% (w/v) để tiến hành nuôi cấy chủng xạ khuẩn tiềm năng. Các bình tam giác được ủ ở 30°C trên máy lắc 150 vòng/phút trong thời gian thích hợp được chọn ở thí nghiệm 5.2. Sau thời gian nuôi cấy tiến hành thu dịch enzyme thô bằng phương pháp ly tâm 8000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Dịch enzyme thô được kiểm tra hoạt độ chitinase để đánh giá ảnh hưởng của các nguồn carbon khác nhau lên khả năng sinh enzyme của chủng xạ khuẩn tiềm năng.

5.4. Khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ hữu cơ

Các nguồn nitơ hữu cơ được khảo sát gồm có: casein, malt extract, yeast extract và peptone. Chủng xạ khuẩn tiềm năng được nuôi trong môi trường SCB (pH 7, NaCl 2%) có bổ sung lần lượt các nguồn nitơ hữu cơ với nồng độ là 0,5% (w/v). Các bình tam giác được ủ ở 30°C trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong thời gian thích hợp được chọn ở thí nghiệm 5.2. Kết thúc thời gian nuôi cấy, các bình tam giác được tiến hành thu dịch enzyme thô bằng phương pháp ly tâm lạnh ở 4°C với tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 phút. Dịch enzyme thô sau đó được kiểm tra hoạt độ để đánh giá ảnh hưởng của các nguồn nitơ hữu cơ đến khả năng tổng hợp chitinase của chủng xạ khuẩn tiềm năng.

6. Phương pháp xử lý số liệu

Dữ liệu sau khi thu thập sẽ được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019 để tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được phân tích bằng phương pháp ANOVA một yếu tố, kết hợp với phép thử Duncan để so sánh hậu kiểm, sử dụng phần mềm thống kê SPSS phiên bản 22.0. Các phân tích thống kê được thực hiện ở mức ý nghĩa 95% ($p < 0,05$).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả sàng lọc các chủng xạ khuẩn sinh enzyme chitinase ngoại bào

1.1. Kết quả sàng lọc sơ cấp

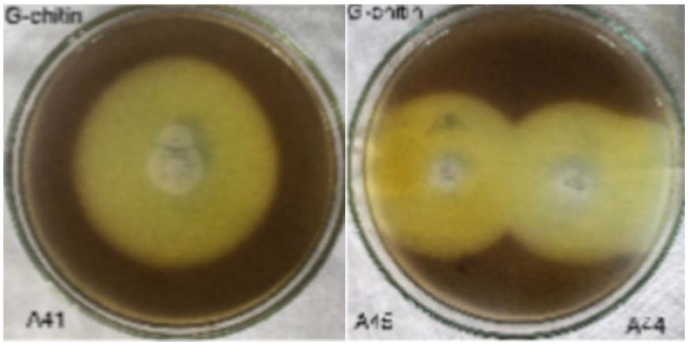
Khả năng sinh tổng hợp chitinase của 45 chủng xạ khuẩn được sàng lọc sơ cấp dựa vào quá trình hình thành vòng phân giải cơ chất trên môi trường Gause I sau 7 ngày. Căn cứ vào đường kính vòng phân giải cơ chất (D) và đường kính khuẩn lạc (d), Kết quả sàng lọc sơ bộ enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn được thể hiện ở hình 1 và bảng 1.

Kết quả cấy điểm trên môi trường thạch Gause I-chitin cho thấy, 41 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp chitinase ngoại bào (chiếm 91,1%) và 4 chủng không có khả năng sinh chitinase ngoại bào (chiếm 8,9%). Dựa vào đường kính vòng phân giải cơ chất ở mức (+++) được thể hiện ở bảng 1, 6 chủng xạ khuẩn được lựa chọn để tiến hành xác định hoạt tính thứ cấp bằng phương pháp khuếch tán thạch bao gồm các chủng A5, A8, A21, A22, A27 và A41.

Bảng 1: Kết quả sàng lọc sơ cấp khả năng sinh chitinase của các chủng xạ khuẩn trên môi trường Gause I-chitin sau 7 ngày nuôi cấy ở 30°C.

Tên mã hóa	x	Tên mã hóa	x	Tên mã hóa	x	Tên mã hóa	x
A1	+	A12	-	A23	-	A34	+
A2	++	A13	++	A24	+	A35	++
A3	++	A14	++	A25	++	A36	++
A4	++	A15	++	A26	++	A37	++
A5	+++	A16	++	A27	+++	A38	++
A6	++	A17	++	A28	++	A39	++
A7	++	A18	++	A29	++	A40	++
A8	+++	A19	++	A30	++	A41	+++
A9	++	A20	-	A31	++	A42	-
A10	++	A21	+++	A32	++	A43	++
A11	++	A22	+++	A33	++	A44 – A45	++

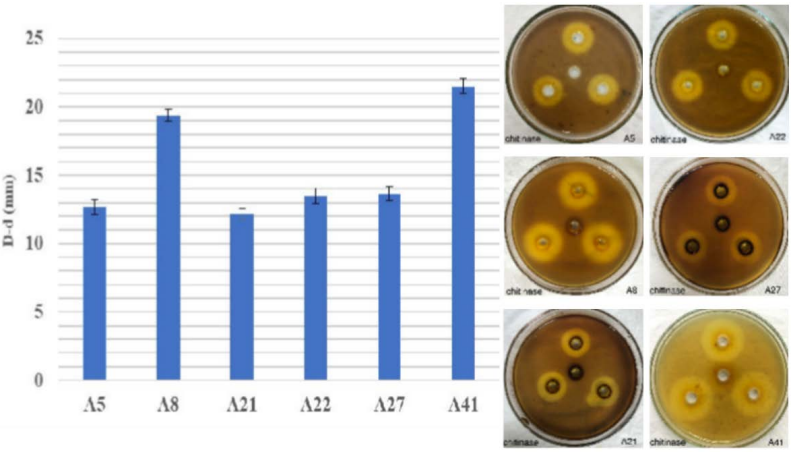
D-d = x; x >20 mm (+++); x = 10-20 mm (++); x = 1,0-10 mm (+); x < 1,0 mm (-)



Hình 1: Kết quả sàng lọc sơ cấp của chủng xạ khuẩn sinh chitinase trên môi trường Gause I–chitin.

1.2. Kết quả sàng lọc thứ cấp

Có 6 chủng xạ khuẩn được lựa chọn từ kết quả sàng lọc sơ bộ khả năng sinh chitinase ngoại bào của 45 chủng xạ khuẩn phân lập từ rừng ngập mặn tỉnh Khánh Hòa. Các chủng này được nuôi cấy trong môi trường Gause bổ sung 1% (w/v) chitin keo làm cơ chất cảm ứng trong thời gian 7 ngày, ở nhiệt độ 30°C trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút. Khả năng sinh chitinase ngoại bào được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán thạch, và kết quả thu được trình bày ở hình 2.



Hình 2: Kết quả sàng lọc thứ cấp hoạt tính chitinase.

Kết quả cho thấy, trong 6 chủng xạ khuẩn được khảo sát thứ cấp, chủng A8 và A41 thể hiện hoạt tính chitinase ngoại bào mạnh (D-d > 20 mm) với đường kính vòng phân giải trung bình lần lượt là 19,83 ± 0,4 mm và 21,50 ± 0,5 mm, trong khi các chủng còn lại có hoạt tính chitinase ngoại bào ở mức độ trung bình (D-d = 10-20 mm), cụ thể: A5 (12,67 ± 0,52 mm), A21 (12,17 ± 0,41 mm), A22 (13,50 ± 0,55 mm) và A27 (13,67

± 0,52 mm).

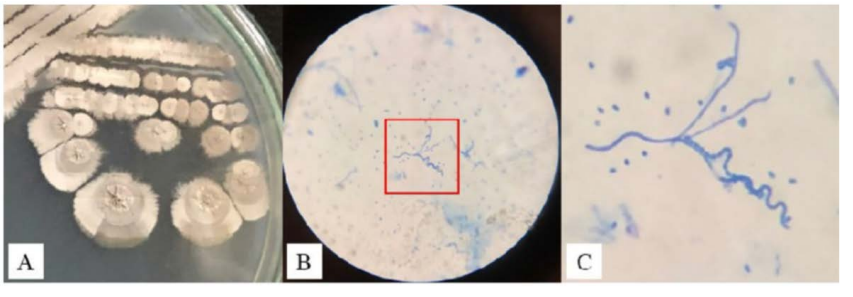
Từ kết quả trên, lựa chọn chủng A41 với kết quả khảo sát hoạt tính enzyme chitinase lớn nhất là 21,5

± 0,55 mm là chủng tiềm năng có thể sử dụng để nghiên cứu điều kiện nuôi cấy thích hợp sinh enzyme chitinase ngoại bào có hoạt tính tốt.

2. Phân loại xạ khuẩn

2.1. Phân loại sơ bộ xạ khuẩn

Kết quả phân tích hình thái cho thấy chủng A41 (hình 3) có khuẩn lạc hình tròn, bề mặt khô, khuẩn lạc màu xám trắng, có tâm nhô cao, xù xì, KTCC màu vàng nhạt, KTKS dạng mạch thẳng, phân nhánh, không phân đốt. Bào tử hình trứng (ovoid), chuỗi bào tử dài, dạng uống cong (flexuous), số lượng bào tử trong một chuỗi lớn hơn 10 trong một chuỗi bào tử hoàn chỉnh.



Hình 3: Một số đặc điểm hình thái của chủng A41. (A) Đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên môi trường ISP4; (B-C) Hình thái sợi KTKS và bào tử của chủng A41 độ phóng đại X1000 (C).

Chủng A41 được nuôi cấy trên 7 loại môi trường ISP (ISP1 đến ISP7) và theo dõi trong thời gian 7, 14 và 21 ngày để đánh giá các tiêu chí về khả năng phát triển, màu sắc KTKS, KTCC, khả năng tạo sắc tố tan và melanin. Kết quả được tổng hợp trong bảng 2.

Sau 7 ngày nuôi cấy, chủng xạ khuẩn A41 phát triển tốt trên các môi trường ISP1, ISP4, ISP5 và ISP6, với KTKS có màu xám trắng và KTCC có màu vàng nhạt. Trên các môi trường ISP2, ISP3 và ISP7, mức độ phát triển chỉ đạt mức độ vừa phải, KTKS chưa hình thành rõ rệt. Đến ngày thứ 14, mức độ phát triển nhìn chung được cải thiện rõ rệt trên tất cả các môi trường. Chủng xạ khuẩn A41 tạo KTKS xám trắng rõ ràng hơn trên ISP2, ISP4, ISP5 và ISP7. Ở môi trường ISP6, KTKS có màu xám và phát triển tốt. Trên ISP3, hình thành KTKS có màu trắng và phát triển vẫn ở mức vừa phải. KTCC vẫn giữ màu vàng nhạt đồng nhất trên tất cả các môi trường. Sau 21 ngày, chủng xạ khuẩn A41 tiếp tục phát triển ổn định trên các môi trường ISP1 đến ISP7, với KTKS màu xám trắng trên các môi trường ISP1, ISP2, ISP4, ISP5 và ISP7. Ở môi trường ISP6, KTKS có màu xám, trong khi trên ISP3, chủng xạ khuẩn A41 vẫn phát triển ở mức vừa phải và hình thành KTKS màu trắng. Đặc điểm chung trên tất cả các môi trường là KTCC đều mang màu vàng nhạt. Không ghi nhận sự xuất hiện của sắc tố tan hay melanin trên bất kỳ môi trường nào trong suốt 21 ngày nuôi cấy.

Với các dữ kiện trên, tiến hành so sánh các đặc điểm về hình thái, màu sắc khuẩn ty ký sinh, khuẩn ty cơ chất, khả năng hình thành sắc tố tan và melanin với khóa phân loại Bergey's [18]. Cho thấy, chủng A41 có nhiều nét tương đồng với chi *Streptomyces*.

Bảng 2: Đặc điểm của A41 khi nuôi trên các môi trường ISP sau 7, 14 và 21 ngày.

Môi trường	Phát triển	KTKS	KTCC	Sắc tố tan	Melanin
		Ngày 7			
ISP1	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP2	Vừa phải	-	Vàng nhạt	-	-
ISP3	Vừa phải	-	Vàng nhạt	-	-
ISP4	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP5	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP6	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP7	Vừa phải	-	Vàng nhạt	-	-
		Ngày 14			
ISP1	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP2	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP3	Vừa phải	Trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP4	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP5	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP6	Tốt	Xám	Vàng nhạt	-	-
ISP7	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
		Ngày 21			
ISP1	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP2	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-

Môi trường	Phát triển	KTKS	KTCC	Sắc tố tan	Melanin
ISP3	Vừa phải	Trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP4	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP5	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-
ISP6	Tốt	Xám	Vàng nhạt	-	-
ISP7	Tốt	Xám trắng	Vàng nhạt	-	-

2.2. Định danh bằng sinh học phân tử

Thông qua sàng lọc thứ cấp khả năng sinh chitinase ngoại bào của các chủng xạ khuẩn, chủng A41 cho thấy hoạt động sinh tổng hợp chitinase ở mức cao với đường kính vòng phân giải đạt 21,5 ± 0,55 mm, được tiến hành định danh đến loài thông qua đoạn gen 16S rRNA.

Kết quả giải trình tự cho thấy đoạn gen 16S rRNA của chủng *Streptomyces* sp. A41 có độ dài 1408 bp. Sau khi so sánh với các kết quả trình tự có sẵn trên NCBI (National Center for Biotechnology Information) bằng phần mềm BLAST cho thấy chủng *Streptomyces* sp. A41 có độ tương đồng 99,93% với chủng *Streptomyces thermocarboxydus* NBRC 16323 (bảng 3). Chủng *Streptomyces thermocarboxydus* NBRC 16323 có độ dài của trình tự 16S rRNA là 1436 bp, nên khi so sánh với trình tự của chủng A41 cho thấy sự tương đồng cao nhất so với các chủng *Streptomyces* khác cũng có độ tương đồng trên 99% ở Bảng 3.

Bảng 3: Mức độ tương đồng trình tự 16S rRNA của chủng *Streptomyces* sp. A41 với các trình tự có sẵn trong dữ liệu của NCBI.

Chủng xạ khuẩn	Xác định loài trên NCBI	Mã số	Độ tương đồng
Streptomyces sp. A41	*Streptomyces thermocarboxydus*	NBRC 16323	99,93%
	Streptomyces thermocarboxydus	AT37	99,86%
	Streptomyces lusitanus	NBRC 13464	99,36%
	Streptomyces coeruleorubidus	NBRC 12844	99,08%
	Streptomyces coerulescens	CSSP046	99,08%

Theo nghiên cứu của Tran và cộng sự (2019) [26], chủng *S. thermocarboxydus* TKU045 được phân lập từ đất tại Đài Loan thể hiện khả năng sinh enzyme chitinase với hoạt độ cao. Khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 1% SPP ở nhiệt độ 45°C trong 3 ngày, chủng này đạt hoạt độ chitinase là 52,985 U/mL. Sản phẩm chitin oligosaccharide thu được từ quá trình thủy phân chitin dạng keo bằng enzyme chitinase TKU045 cho thấy tiềm năng ứng dụng trong y học hoặc dược phẩm chức năng, nhờ chứa các hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa và prebiotic.

Mới đây, chủng *S. thermocarboxydus* MIP-GN36 được phân lập từ đất vùng rễ cây rừng tại huyện Khoái Châu, tỉnh Hưng Yên cho thấy khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase hiệu quả trong môi trường A2 có pH 7, được bổ sung 1,5% (w/v) CMC làm cơ chất cảm ứng. Khi được nuôi cấy ở nhiệt độ 45°C trong 5 ngày, chủng MIP-GN36 đạt hoạt độ cellulase tối đa là 22,5 ± 0,43 U/mL. Kết quả này cho thấy enzyme cellulase thu được có tiềm năng ứng dụng cao trong lĩnh vực xử lý môi trường [1].

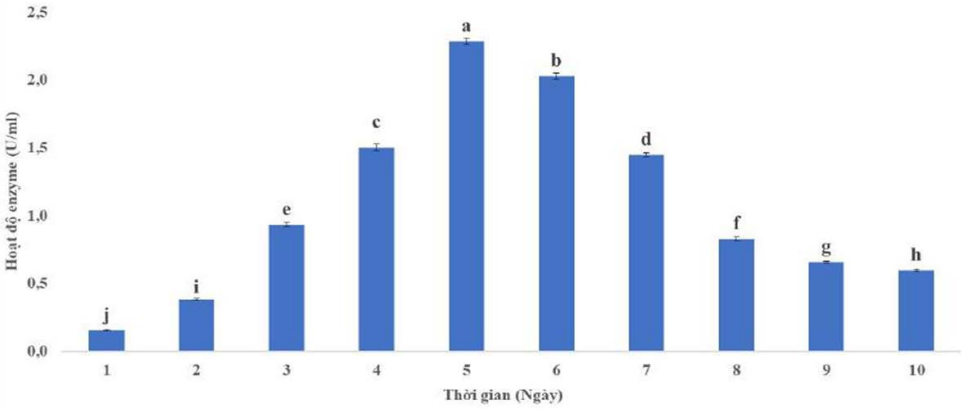
Trong nghiên cứu này, *S. thermocarboxydus*

A41 đã được phân lập từ trầm tích rừng ngập mặn cho thấy khả năng tổng hợp chitinase có hoạt tính tốt, cho thấy tiềm năng ứng dụng tốt trong các lĩnh vực y tế, dược phẩm và nông nghiệp.

3. Khảo sát điều kiện nuôi cấy chủng xạ khuẩn tiềm năng thu nhận chitinase

3.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Hoạt động sản xuất chitinase từ chủng xạ khuẩn A41 (hình 4) được ghi nhận bắt đầu sau ngày 1 và có xu hướng tăng mạnh, đạt mức tối đa ở ngày thứ 5 nuôi cấy (đạt 2,28 ± 0,02 U/mL), sau thời gian này, ghi nhận khả năng sinh chitinase giảm dần từ ngày 6 đến ngày 10.



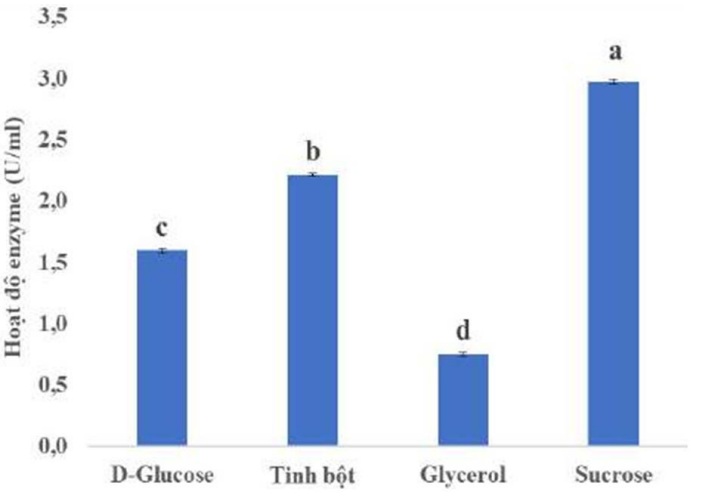
Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các ký tự a, b, c, d, e, f, g, h, i, j trên mỗi cột cho thấy sự khác biệt giữa các mốc thời gian (p<0,05).

Hình 4: Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng xạ khuẩn A41.

Kết quả khảo sát thời gian nuôi cấy phù hợp để thu nhận chitinase từ chủng xạ khuẩn A41 cho thấy sự tương đồng với nghiên cứu của Nawani và Kapadnis (2004) [17] trên chủng *Streptomyces* sp. NK1057, trong đó hoạt động sản xuất chitinase cao nhất cũng được ghi nhận sau 5 ngày nuôi cấy. Trong khi đó, các nghiên cứu khác lại ghi nhận thời điểm tối ưu sớm hơn. Cụ thể, *Streptomyces* sp. ANU 6277 và *S. halstedii* AJ-7 đạt hoạt động chitinase cao nhất sau 2,5 và 3 ngày nuôi cấy, theo các nghiên cứu của Narayana và Vijayalakshmi (2009) [16] và Joo (2005) [10]. Ngoài ra, nghiên cứu của Tran và cộng sự (2019) [26], trên chủng *S. thermocarboxydus* TKU045 cho thấy chitinase đạt hoạt độ 52,985 U/mL chỉ sau 1,5 ngày nuôi cấy. Những khác biệt này cho thấy thời điểm tối ưu để thu nhận chitinase phụ thuộc vào chủng xạ khuẩn cũng như điều kiện nuôi cấy cụ thể. Việc xác định thời gian nuôi cấy phù hợp cho từng chủng là cần thiết nhằm đạt hiệu quả sinh enzyme cao nhất.

3.2. Ảnh hưởng của nguồn carbon

Thí nghiệm được thực hiện trong môi trường SCB với các nguồn carbon khác nhau bao gồm: tinh bột, sucrose, D-glucose và glycerol ở nồng độ 1% (w/v). Các mẫu được ủ trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút, ở nhiệt độ 30°C trong 5 ngày. Kết quả khảo sát các nguồn carbon được trình bày ở hình 5. Ghi nhận hoạt động sản xuất chitinase của chủng xạ khuẩn A41 lần lượt là D-glucose (1,59 ± 0,02 U/mL), tinh bột (2,21 ± 0,01 U/mL), glycerol (0,75 ± 0,02 U/mL) và sucrose (2,97 ± 0,02 U/mL). Kết quả cho thấy hoạt động sản xuất chitinase cao nhất khi sử dụng 1% (w/v) sucrose đạt 2,97 ± 0,02 U/mL, trong khi, 1% (w/v) glycerol lại cho thấy hoạt động sản xuất chitinase là thấp nhất khi hoạt độ enzyme ghi nhận được chỉ đạt 0,75 ± 0,02 U/mL.



Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các ký tự a, b, c, d trên mỗi cột cho thấy sự khác biệt giữa các nguồn carbon được dùng trong thí nghiệm (p<0,05).

Hình 5: Ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng xạ khuẩn A41.

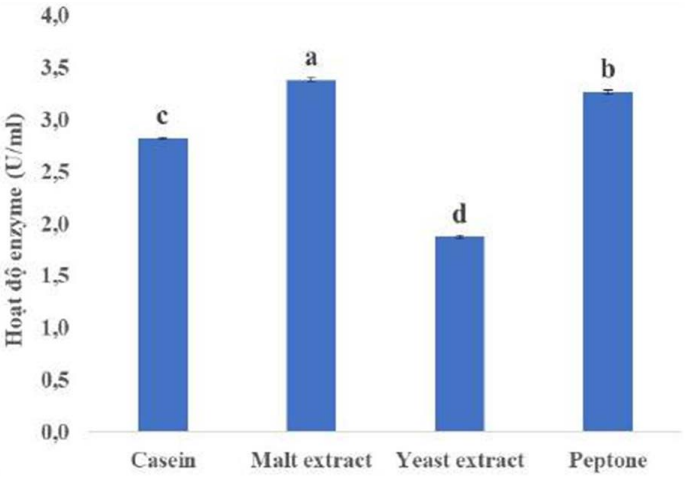
Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng xạ khuẩn có khả năng sử dụng đa dạng các nguồn carbon khác nhau trong quá trình sinh tổng hợp chitinase. Kết quả nghiên cứu hiện tại, phù hợp với nghiên cứu của Thiagarajan và cộng sự (2011) [25] trên chủng *Streptomyces* sp. PTK19, khi cả hai đều ghi nhận hoạt độ chitinase cao nhất khi sử dụng sucrose làm nguồn carbon. Ngoài ra, trong nghiên cứu này, các nguồn carbon khác như dextrose, maltose và galactose cũng được khảo sát, tuy nhiên hoạt độ enzyme thu được ở các nguồn này thấp hơn so với sucrose. Điều này cho thấy sucrose là nguồn carbon phù hợp cho nhiều chủng *Streptomyces* trong việc tăng cường sản xuất chitinase [25].

Ngoài ra, chủng *Streptomyces* sp. ANU 6277 trong nghiên cứu của Narayana và Vijayalakshmi (2009)

[16] đã được khảo sát với nhiều nguồn carbon khác nhau bao gồm tinh bột, glucose, cellulose, maltose và arabinose. Kết quả cho thấy hoạt độ chitinase cao nhất đạt được khi sử dụng 0,2% tinh bột (7,22 ± 0,08 U/mL), trong khi bổ sung 0,4% glucose cho hoạt độ thấp nhất (1,45 ± 0,00 U/mL). Tương tự, nghiên cứu của Shivalee và cộng sự (2018) [23] trên chủng *S. pratensis* KLSL55 phân lập từ đất cũng cho thấy ảnh hưởng rõ rệt của nguồn carbon đến hoạt động sinh enzyme. Trong đó, fructose ở nồng độ 1,25% cho hoạt độ chitinase cao nhất (904 IU), tiếp theo là glucose (768,33 IU), lactose (762 IU) và maltose (690 IU). Đáng chú ý, các nguồn carbon như arabinose, mannitol và sucrose lại có tác động tiêu cực đến khả năng sản xuất chitinase ở mọi nồng độ khảo sát. Kết quả này trái ngược với chủng xạ khuẩn A41 trong nghiên cứu hiện tại, khi hoạt động sản xuất chitinase lại đạt cao nhất trong điều kiện môi trường được bổ sung 1% sucrose, cho thấy sự khác biệt về sinh lý và cơ chế điều hòa enzyme giữa các chủng *Streptomyces* khác nhau.

3.3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ hữu cơ

Tương tự như nguồn carbon, nguồn nitơ hữu cơ cũng là yếu tố dinh dưỡng thiết yếu, ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình sinh trưởng và khả năng tổng hợp enzyme của vi sinh vật. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitơ hữu cơ đến hoạt động sản xuất chitinase của chủng A41 được trình bày tại hình 6.



Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các ký tự a, b, c, d trên mỗi cột cho thấy sự khác biệt giữa các nguồn nitơ hữu cơ được dùng trong thí nghiệm (p<0,05).

Hình 6: Ảnh hưởng của nguồn nitơ hữu cơ đến khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng xạ khuẩn A41.

Hoạt động sản xuất chitinase khi sử dụng các nguồn nitơ hữu cơ khác nhau cho thấy malt extract là nguồn hiệu quả nhất, với hoạt độ enzyme đạt 3,39 ± 0,01 U/mL. Việc sử dụng casein và peptone cũng mang lại hiệu quả tương đối cao, với hoạt độ tương ứng là 2,82 ± 0,01 U/mL và 3,27 ± 0,01 U/mL. Ngược lại, khi sử dụng yeast extract làm nguồn nitơ, khả năng sinh chitinase của chủng xạ khuẩn A41 bị ức chế nhẹ, thể hiện qua hoạt độ chỉ đạt 1,87 ± 0,01 U/mL.

Nghiên cứu từ chủng *S. macrosporeus* M1 phân lập từ biển Arabian - Ấn Độ của Sukalkar và cộng sự (2018) [24], cho thấy sự tương đồng với chủng xạ khuẩn A41, khi chủng *S. macrosporeus* M1 cũng ghi nhận hoạt động sản xuất chitinase tốt trong môi trường chứa các nguồn nitơ như casein, peptone và malt extract trong khi hoạt động thấp nhất ghi nhận khi sử dụng yeast extract làm nguồn nitơ hữu cơ [24]. Trong các nghiên cứu khác về tối ưu hóa hoạt động sản xuất chitinase từ xạ khuẩn cũng ghi nhận khả năng sử dụng nhiều nguồn nitơ hữu cơ khác nhau [15, 16, 25].

IV. KẾT LUẬN

Chủng xạ khuẩn A41 sinh chitinase ngoại bào có hoạt tính mạnh với đường kính vòng phân giải đạt 21,50 ± 0,55 mm, được định danh là chủng *Streptomyces thermocarboxydus* dựa trên phân tích trình tự gen 16S RNA. Điều kiện thích hợp để chủng xạ khuẩn A41 sinh tổng hợp enzyme chitinase cao nhất (3,39 ± 0,01 U/mL) là nuôi cấy trong môi trường SCB với nguồn carbon và nitơ hữu cơ lần lượt là sucrose và malt extract ở 30°C trong 5 ngày với tốc độ lắc là 150 vòng/phút. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng chitinase thu được trong lĩnh vực công nghiệp, nông nghiệp như xử lý phụ phẩm thủy sản, sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ vi khuẩn, nấm gây bệnh và côn trùng gây hại.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi nguồn ngân sách khoa học và công nghệ của Trường Đại học Nha Trang trong đề tài nghiên cứu khoa học sinh viên mã số: SV2023-13-55. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ quý báu đó!

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tham khảo tiếng Việt

1. Chu Thanh Bình (2024), "Nghiên cứu một số điều kiện sinh tổng hợp cellulase ngoại bào từ chủng MIP_GN36 (xạ khuẩn Streptomyces thermocarboxydus) ứng dụng trong xử lí môi trường", *Tạp Chí Y học Quân sự*, (371), tr. 44-47.
2. Đỗ Quang Trung, Vũ Văn Hạnh và Lưu Thế Anh (2022), "Phân lập và xác định đặc tính của vi khuẩn bản địa cho sản xuất chế phẩm sinh học trong nuôi trồng thủy sản ở Bạch Long, tỉnh Nam Định", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, (58), tr. 24-101.
3. Nguyễn Thị Diệu Hạnh, Hứa Trường Chinh, Đặng Bích Ngân, Nguyễn Thị Thanh Thúy, Nguyễn Ngọc Ẩn và Phạm Tấn Việt (2021), "Phân lập và tuyển chọn xạ khuẩn có khả năng sinh các hợp chất có hoạt tính cao", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, (53B), tr. 56-67.
4. Phạm Thị Tuyết Ngân, Vũ Hùng Hải, Huỳnh Trường Giang và Vũ Ngọc Út (2021), "Tối ưu các điều kiện sinh enzyme protease ngoại bào của vi khuẩn Streptomyces DH3.4", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 57(4B), tr. 186-193.
5. Trần Tiến Ninh, Lê Xuân Phong, Phạm Lưu Hoàng Vũ, Văn Hồng Cẩm và Nguyễn Thị Như Thường (2023), *Đánh giá khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của một số chủng xạ khuẩn phân lập từ rừng ngập mặn khu vực tỉnh Khánh Hoà*, Báo cáo tổng kết đề tài nghiên cứu Khoa học sinh viên, Mã số: SV2022-13-13, TP. Nha Trang.
6. Trần Tiến Ninh, Lê Xuân Phong, Phạm Lưu Hoàng Vũ, Văn Hồng Cẩm và Nguyễn Thị Như Thường (2024), "Đánh giá khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của một số chủng xạ khuẩn phân lập từ rừng ngập mặn khu vực tỉnh Khánh Hoà", *Tạp chí Khoa học-Công nghệ Thủy Sản*, (02), tr. 102-114.

Tài liệu tham khảo tiếng Anh

7. Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.P., Clément, C., Ouhdouch, Y., and van Wezel, G.P. (2015), "Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria", *Microbiol Mol Biol Rev*, 80(1), pp. 1-43.
8. Bhattacharya, D., Nagpure, A., and Gupta, R. K. (2007), "Bacterial chitinases: properties and potential", *Critical reviews in biotechnology*, 27(1), pp. 21-28.
9. Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J., and Javed, S. (2013), "Chitinases: An update", *Journal of pharmacy and bioallied sciences*, 5(1), pp. 21–29.
10. Joo, G. J. (2005), "Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent Streptomyces halstedii", *Biotechnology letters*, 27, pp. 1483-1486.
11. Lane D.J. (1991), 16S/23S rRNA Sequencing, In: Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, John Wiley and Sons, New York, pp.115-175.
12. Li, Q., Chen, X., Jiang, Y. and Jiang, C. (2016), Morphological Identification of Actinobacteria, In: Dhanasekaran, D., and Jiang, Y. (Eds), *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*, IntechOpen, pp. 59-86.
13. Mane, U. V., and Deshmukh, A. M. (2009), "Chitin degrading potential of three aquatic actinomycetes and its optimization", *African Journal of Biotechnology*, 8(23), pp. 6617-6620.
14. Manikkam, R., Pati, P., Thangavel, S., Venugopal, G., Joseph, J., Ramasamy, B., and Dastager, S. G. (2019), Distribution and Bioprospecting Potential of Actinobacteria from Indian Mangrove Ecosystems, In: Satyanarayana, T., Johri, B.N., and Das, S.K. (Eds), *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability*

and Biotechnological Applications, Springer Singapore, pp. 319–353.

15. Meriem, G., and Mahmoud, K. (2017), "Optimization of chitinase production by a new Streptomyces griseorubens C9 isolate using response surface methodology", *Annals of Microbiology*, 67, pp. 175- 183.
16. Narayana, K. J., and Vijayalakshmi, M. (2009), "Chitinase production by Streptomyces sp. ANU 6277, *Brazilian Journal of MicrobiologyI,* 40, pp. 725-733.
17. Nawani, N.N., and Kapadnis, B.P. (2004), "Production dynamics and characterization of chitinolytic system of Streptomyces sp. NK 1057, a well equipped chitin degrader", *World J. Microbiol. Biotechnol*, 20, pp. 487-494.
18. Parte, A., Whitman, W. B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Ludwig, W., and Suzuki, K. I. (2012), *Bergey's manual of systematic bacteriology: volume 5: the Actinobacteria*, Springer New York, New York.
19. Patil, N. S., and Jadhav, J. P. (2015), "Significance of Penicillium ochrochloron chitinase as a biocontrol agent against pest Helicoverpa armigera", *Chemosphere*, 128, pp. 231-235.
20. Rahmansyah, M., and Sudiana, I. M. (2003), "Optimasi analisis amilase dan glukanase yang diekstrak dari miselium Pleurotus ostreatus dengan asam 3, 5 dinitrosalisilat", *Berkala Penelitian Hayati*, 9(1), pp. 7-12.
21. Rajendran, K., Krishnamoorthy, M., Karuppiah, K., Ethiraj, K., and Sekar, S. (2024), "Chitinase from Streptomyces mutabilis as an effective eco-friendly biocontrol agent", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 196(1), pp. 18-31.
22. Shirling, E. T., and Gottlieb, D. (1966), **"**Methods for characterization of Streptomyces species 1", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16(3), pp. 313-340.
23. Shivalee, A., Lingappa, K., and 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), pp. 421-426.
24. Sukalkar, S. R., Kadam, T. A., and Bhosale, H. J. (2018), "Optimization of chitinase production from Streptomyces macrosporeus M1", *Res. J. Life Sci. Bioinform. Pharm. Chem. Sci*, 4, pp. 106-114.
25. Thiagarajan, V., Revathi, R., Aparanjini, K., Sivamani, P., Girilal, M., Priya, C. S., and Kalaichelvan, P. T. (2011), "Extra cellular chitinase production by Streptomyces sp. PTK19 in submerged fermentation and its lytic activity on Fusarium oxysporum PTK2 cell wall", *Int J Curr Sci*, 1, pp. 30-44.
26. Tran, T. N., Doan, C. T., Nguyen, V. B., Nguyen, A. D., and Wang, S. L. (2019), "The isolation of chitinase from Streptomyces thermocarboxydus and its application in the preparation of chitin oligomers", *Research on Chemical Intermediates*, 45, pp. 727-742.
27. Udaya, N.A., Jayanthi, M., Sabarinathan, R., Kangueane, P., Mathew, L., and Sekar, K. (2010), "Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases, *J Mol Evol*, 70, pp. 466–478.
28. Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., and van Sinderen, D. (2007), "Genomics of Actinobacteria : Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), pp. 495–548.