

Bước đầu phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cổ ưa mặn tiềm năng sinh cellulase, chitinase, xylanase và hyaluronidase

Cao Thị Thúy Hằng^{1,2}, Nguyễn Thị Thuận¹, Võ Thị Diệu Trang¹, Phan Thị Thuỳ Trang², Đinh Thành Trung¹, Trần Nguyễn Hà Vy¹, Hoàng Hồng Hạnh¹, Phạm Đức Thịnh^{1,2}, Huỳnh Hoàng Như Khánh^{1,2*}

¹Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 1 Cầu Đá, phường Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 4/11/2024; ngày chuyển phản biện 6/11/2024; ngày nhận phản biện 22/11/2024; ngày chấp nhận đăng 27/11/2024

Tóm tắt:

Haloarchaea là vi khuẩn cổ ưa mặn, có khả năng sản sinh enzyme hoạt động hiệu quả trong môi trường siêu mặn. Nghiên cứu này đã phân lập 27 chủng vi sinh vật từ cánh đồng muối Hòn Khoai, Khánh Hòa (trước sáp nhập) và sàng lọc năm chủng tiềm năng thuộc nhóm Haloarchaea qua thử nghiệm độ nhạy anisomycin. Các chủng này được sàng lọc khả năng sinh enzyme phân giải polysaccharide như cellulase/xylanase, chitinase và hyaluronidase bằng phương pháp đĩa thạch sử dụng cơ chất CMC (carboxymethyl cellulose), chitin và acid hyaluronic. Kết quả cho thấy, chủng VS7M5.3 có hoạt tính mạnh trên cả ba cơ chất, đặc biệt với CMC và acid hyaluronic. Hai chủng VS7M5.1 và VS7M5.7 cũng có hoạt tính enzyme đáng chú ý. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam tập trung vào vi khuẩn cổ nuôi cấy được, phân lập từ môi trường siêu mặn tại đồng muối Hòn Khoai và sàng lọc thành công các chủng tiềm năng sinh enzyme phân giải polysaccharide. Nghiên cứu đã bước đầu xác định các chủng có hoạt tính enzyme mạnh, đặc biệt là VS7M5.3, mở ra tiềm năng khai thác nguồn vi sinh vật bản địa cho các ứng dụng công nghệ sinh học.

Từ khóa: cellulase, chitinase, Haloarchaea, hyaluronidase, xylanase.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.6

Preliminary isolation and screening of halophilic archaea with potential to produce cellulase, chitinase, xylanase, and hyaluronidase enzymes

Thi Thuý Hang Cao^{1,2}, Thi Thuan Nguyen¹, Thi Dieu Trang Vo¹, Thi Thuý Trang Phan², Thanh Trung Dinh¹, Nguyen Ha Vy Tran¹, Hong Hanh Hoang¹, Duc Thinh Pham^{1,2}, Hoang Nhu Khanh Huynh^{1,2*}

¹Institute of Oceanography, Vietnam Academy of Science and Technology, 1 Cau Da Street, Nha Trang Ward, Khanh Hoa Province, Vietnam

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Hanoi, Vietnam

Received 4 November 2024; revised 22 November 2024; accepted 27 November 2024

Abstract:

Haloarchaea are halophilic archaea capable of producing enzymes that function effectively in hypersaline environments. This study isolated 27 microbial strains from the salt fields of Hon Khoi, Khanh Hoa (before the administrative merger), and screened five potential haloarchaea strains using anisomycin sensitivity tests. These strains were assessed for their ability to produce polysaccharide-degrading enzymes, including cellulase or xylanase, chitinase, and hyaluronidase, using agar plate assays with carboxymethyl cellulose (CMC), chitin, and hyaluronic acid as substrates. The results showed that strain VS7M5.3 exhibited strong activity on all three substrates, particularly carboxymethyl cellulose and hyaluronic acid. Two other strains, VS7M5.1 and VS7M5.7, also demonstrated noteworthy enzyme activities. This is the first study in Vietnam to focus on culturable halophilic archaea isolated from hypersaline environments in the salt fields of Hon Khoi, successfully screening potential strains for polysaccharide - degrading enzyme production. The study has preliminarily identified strains with strong enzymatic activity, especially VS7M5.3, highlighting the potential of exploiting local microbial resources for biotechnological applications.

Keywords: cellulase, chitinase, Haloarchaea, hyaluronidase, xylanase.

Classification numbers: 1.6, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: khanhhuynh@nitra.vast.vn

1. Đặt vấn đề

Haloarchaea, hay vi khuẩn cổ ưa mặn, là nhóm vi sinh vật phát triển mạnh trong các môi trường siêu mặn như hồ muối, biển Chết và các đồng muối nhân tạo [1, 2]. Các vi sinh vật này có khả năng chịu nồng độ muối cao nhờ cơ chế thích nghi đặc biệt, đồng thời sản sinh các enzyme có hoạt tính vượt trội trong điều kiện khắc nghiệt. Trong môi trường siêu mặn, nguồn carbon chủ yếu bao gồm cellulose, xylan, chitin và hemicellulose - những polysaccharide đóng vai trò quan trọng trong chu trình carbon trên Trái Đất [3, 4].

Cellulose, xylan và chitin là các polysaccharide chính, cấu thành thành tế bào thực vật và vỏ chitin của động vật, đại diện cho nguồn carbon hữu cơ lớn nhất trong hệ sinh thái trên cạn và đại dương [5]. Để sử dụng những nguồn carbon này, các vi sinh vật siêu mặn, bao gồm Haloarchaea, sản sinh các enzyme chuyên biệt như cellulase, xylanase và chitinase. Các enzyme này không chỉ phân giải polysaccharide thành năng lượng mà còn có những đặc tính đặc biệt như chịu mặn, bền nhiệt và ổn định ở pH thấp, làm cho Haloarchaea trở thành đối tượng tiềm năng trong các ứng dụng công nghiệp, xử lý môi trường, nông nghiệp và thủy sản [3].

Đặc biệt, enzyme hyaluronidase - thủy phân acid hyaluronic (HA), một polysaccharide quan trọng trong cơ thể người và động vật - đang nhận được nhiều sự chú ý. HA đóng vai trò quan trọng trong các quá trình sinh học như di chuyển tế bào, biệt hóa, sửa chữa tổn thương và điều trị ung thư. Tuy nhiên, trọng lượng phân tử cao của HA làm giảm khả năng hấp thụ và hiệu quả điều trị, đòi hỏi sự phát triển các enzyme sinh học an toàn để cắt mạch HA, tạo ra các sản phẩm có khối lượng phân tử thấp với ứng dụng tiềm năng trong y-dược phẩm [6]. Các nghiên cứu phân tích hệ gen gần đây đã phát hiện nhiều enzyme thuộc nhóm CAZyme (Carbohydrate - Active enzymes) từ Haloarchaea, trong đó có hyaluronidase, nhấn mạnh tiềm năng lớn của nhóm vi sinh vật này trong công nghệ sinh học.

Tại Việt Nam, mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về cellulase, xylanase và chitinase từ vi khuẩn hiếu khí, vi nấm hoặc vi sinh vật chịu mặn thông thường [7-9], các nghiên cứu về enzyme từ Haloarchaea vẫn còn rất hạn chế. Việc nghiên cứu nhóm vi khuẩn cổ này gặp nhiều thách thức vì chúng khó phân lập và nuôi cấy trong điều kiện phòng thí nghiệm [10]. Hầu hết các phân tích vi sinh vật biển hiện nay tập trung vào đa dạng hệ gen (metagenomics), thay vì các nghiên cứu thực nghiệm về khả năng sản sinh enzyme [11, 12].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập và tuyển chọn các chủng Haloarchaea từ đồng muối Hòn Khói, tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam (trước sáp nhập). Mục tiêu chính là xác định các chủng có khả năng sản xuất enzyme thủy phân polysaccharide (cellulase, xylanase, chitinase và hyaluronidase), từ đó tìm kiếm nguồn enzyme đặc biệt phục vụ các ứng dụng công nghệ sinh học hiện đại. Đây là bước đầu tiên để khai thác tiềm năng từ nguồn tài nguyên vi sinh vật bản địa, đồng thời cung cấp dữ liệu thực nghiệm góp phần phát triển lĩnh vực công nghệ sinh học.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu được thu thập tại cánh đồng muối Hòn Khói, xã Ninh Diêm, huyện Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa, một trong những khu vực sản xuất muối lớn nhất miền Trung Việt Nam vào tháng 6/2023. Mẫu được thu thập từ các vị trí được chọn tại ruộng muối, chứa trong chai nhựa vô trùng, bảo quản ở 4°C và chuyển về phòng thí nghiệm (hình 1).

Ký hiệu mẫu	Mẫu	Vị trí thu mẫu	Độ mặn của mẫu (g/Lit)	Nhiệt độ tại thời điểm thu mẫu (°C)	pH mẫu
VS1	Nước muối và trầm tích	12°32'7.732" N	375	40,8	7,07
VS7	Nước muối	12°32'16.735" N	165	36,5	7,60
VS8	Nước muối	12°32'20.868" N	320	42,8	6,80
VS9	Nước muối và trầm tích	12°32'23.496" N	340	60,2	6,90



Hình 1. Địa điểm thu mẫu ở các ruộng muối Hòn Khói, xã Ninh Diêm, huyện Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa vào tháng 6/2023.

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu: xylan (Megazyme, Ireland), cellulose (Sigma, Đức), chitin (Sigma, Đức), cao chiết nấm men (YE) (Merck, Đức), peptone (Sigma, Đức), kháng sinh anisomycin (Santa Cruz, Mỹ), hyaluronic acid chiết xuất từ dây rốn người (HA) (Sigma, Đức) và các hóa chất khác đều có nguồn gốc từ hãng Sigma, Đức.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân lập cổ khuẩn Haloarchaea: Một lượng 100 µl từ mỗi mẫu được cấy vào môi trường tăng trưởng (MGM) với nồng độ muối 23% (w/v). Môi trường MGM bao gồm: 1% (w/v) chiết xuất đậu tương, 0,5% chiết xuất nấm men, 1,5% agar và các loại muối: 3,1 M NaCl, 0,1 M MgCl₂.6H₂O, 0,1 M MgSO₄.7H₂O, 0,07 M KCl và 5×10⁻³ M CaCl₂.2H₂O (dung dịch CaCl₂ được tiệt trùng riêng trước khi bổ sung vào môi trường). Độ pH của môi trường được điều chỉnh trong khoảng 7,2-7,4. Các mẫu đã cấy được ủ ở 40°C trong thời gian tối đa một tháng. Các khuẩn lạc sẽ mọc trên màng lọc và tiếp tục được chuyển sang môi trường MGM nhiều lần để được đồng thuần. Các chủng này được lưu trữ ngắn hạn trong tủ lạnh và sử dụng nitơ lỏng để bảo quản lâu dài ở -80°C [13].

Thử nghiệm độ nhạy của vi sinh vật đối với kháng sinh: Để xác định các chủng Haloarchaea trong số các chủng vi sinh vật đã phân lập, thử nghiệm độ nhạy kháng sinh anisomycin được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Mỗi đĩa thạch được sử dụng chứa 30 µg kháng sinh anisomycin [3, 13]. Các chủng vi sinh vật nhạy cảm với anisomycin được lựa chọn để tiếp tục sàng lọc khả năng sinh enzyme thủy phân polysaccharide, bao gồm chitinase, cellulase, xylanase và hyaluronidase.

Sàng lọc Haloarchaea theo định hướng sinh enzyme thủy phân chitin: Để sàng lọc định tính khả năng sinh chitinase, các chủng cổ khuẩn thuần được cấy trên môi trường thạch MGM không chứa peptone, bổ sung 23% (w/v) muối và 1% (w/v)

chitin nguồn carbon duy nhất, ủ ở 40°C trong 15-30 ngày. Vùng trong suốt xung quanh các vùng sinh khối vi sinh vật chỉ thị sự sinh chitinase [13].

Sàng lọc *Haloarchaea* theo định hướng sinh enzyme thủy phân cellulase/xylanase: Để sàng lọc định tính khả năng sinh cellulase/xylanase, các chủng cổ khuẩn thuần được cấy trên môi trường thạch MGM không chứa peptone, bổ sung 23% (w/v) muối và 1% (w/v) CMC nguồn carbon duy nhất, ủ ở 40°C trong 15-30 ngày. Sau đó, đĩa môi trường được nhuộm với dung dịch thuốc nhuộm iodine trong 15 phút, cuối cùng đĩa thạch được rửa lại với nước nhiều lần để nhìn thấy vòng phân giải rõ ràng, chủng vi sinh thủy phân CMC sẽ tạo vùng không màu xung quanh điểm sinh khối vi sinh vật phát triển.

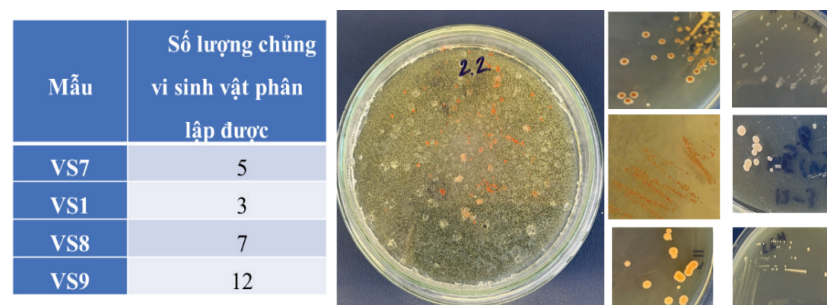
Phương pháp sàng lọc *Haloarchaea* sinh hyaluronidase: Hoạt tính hyaluronidase được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Môi trường thạch được chuẩn bị với các thành phần: 1% thạch Noble, 0,4 mg/ml hyaluronic acid, 1% muối NaCl, albumin huyết thanh bò (BSA) và 0,1% sodium azide, tạo ra các giếng đường kính 6 mm trên đĩa thạch. Để kiểm tra hoạt tính enzyme, 0,1 ml dung dịch nuôi cấy vi sinh trong môi trường MGM được thêm vào từng giếng. Sau đó, các đĩa được ủ ở 37°C trong 3-5 ngày, tiếp theo nhuộm đĩa thạch với dung dịch acid acetic 2N trong 30 phút. Trong môi trường này, hyaluronic acid không bị phân hủy sẽ tạo thành kết tủa, làm vùng thạch xung quanh giếng trở nên mờ đục. Các vùng trong suốt xuất hiện quanh giếng là dấu hiệu của hoạt tính enzyme hyaluronidase, cho thấy sự phân hủy hyaluronic acid bởi enzyme do vi sinh vật tiết ra.

Phương pháp xử lý số liệu: Các thử nghiệm đánh giá hoạt tính enzyme được thực hiện ít nhất ba lần lặp lại độc lập.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả phân lập cổ khuẩn từ các mẫu thu ở đồng muối Hòn Khói

Khu vực Hòn Khói, tỉnh Khánh Hòa, nổi tiếng với các cánh đồng muối tự nhiên, tạo nên môi trường siêu mặn đặc trưng và lý tưởng cho sự phát triển của các vi sinh vật ưa mặn, đặc biệt là vi khuẩn cổ. Các hệ sinh thái siêu mặn này đóng vai trò như một nguồn tài nguyên quý giá để nghiên cứu các vi sinh vật ưa cực, vốn có khả năng sinh tồn và hoạt động hiệu quả trong điều kiện khắc nghiệt.



Hình 2. Các chủng vi sinh vật trên môi trường phân lập sau 3 tuần nuôi cấy và một số khuẩn lạc đã được làm thuần.

Từ 4 mẫu thu nhận tại ruộng muối Hòn Khói, tỉnh Khánh Hòa, đã phân lập được 27 chủng vi sinh vật, một số đặc điểm của vi sinh vật phân lập được thể hiện ở hình 2. Trong tổng số 27 chủng vi sinh vật đã được phân lập, mẫu VS9 có số lượng vi sinh vật được phân lập nhiều nhất (12 chủng), tiếp theo là mẫu VS8 (7 chủng), VS7 (5 chủng), thấp nhất là VS1 (3 chủng). So với nghiên cứu của M.Y. Bafghi và cs (2019) [13] (phân lập được 500 chủng từ 3 mẫu), số lượng chủng phân lập trong nghiên cứu này thấp hơn. Sự khác biệt có thể bắt nguồn từ điều kiện môi trường, như nồng độ muối, hàm lượng chất hữu cơ hoặc phương pháp phân lập. Cụ thể, hàm lượng muối trong các mẫu của nghiên cứu này dao động từ 165-375 g/l, cao hơn rất nhiều so với mức 2,3-2,8 g/l trong các mẫu của M.Y. Bafghi và cs (2019) [13]. Điều này cho thấy, các chủng vi sinh vật được phân lập trong nghiên cứu này là những chủng có khả năng thích nghi và tồn tại ở điều kiện siêu mặn, đặc trưng của môi trường đồng muối. Ngoài ra, nhiệt độ tại thời điểm thu mẫu dao động từ 36,5 đến 60,2°C và môi trường nuôi cấy được duy trì ở 40°C trong 4 tuần nuôi cấy, cho thấy các chủng vi sinh vật này cũng có khả năng chịu nhiệt cao, phù hợp với các điều kiện khắc nghiệt của môi trường siêu mặn.

Hình ảnh các đĩa phân lập cho thấy các chủng vi sinh vật có sự khác biệt rõ rệt về hình thái khuẩn lạc, bao gồm kích thước, màu sắc và bề mặt khuẩn lạc. Đặc biệt là các khuẩn lạc có màu đỏ hoặc hồng và kết hợp với các thông tin từ các nghiên cứu trước đây, có thể dự đoán rằng đây là các chủng cổ khuẩn có khả năng thuộc các họ *Haloarculaceae*, *Halobacteriaceae* và *Haloferacaceae*. Các họ này bao gồm các chi như *Halorubrum*, *Haloferax* và *Haloarcula*, vốn phổ biến trong môi trường siêu mặn và thường thể hiện màu sắc khuẩn lạc đặc trưng do sự hiện diện của sắc tố carotenoid như bacterioruberin [14].

Với điều kiện độ mặn cao (165-375 g/l) tại đồng muối Hòn Khói, các chủng phân lập được nhiều khả năng là các loài ưa mặn cực đoan (extreme halophiles), phù hợp với các loài cổ khuẩn đã được nghiên cứu [15]. Hơn nữa, kết quả phân tích metagenomics trong một công bố liên quan của chúng tôi đã xác định rằng, các nhóm cổ khuẩn chính trong mẫu nghiên cứu bao gồm *Halorubrum*, *Halobacterium* và *Haloarcula* từ các họ *Halobacteriaceae*, *Haloferacaceae* và *Haloarculaceae*. Đặc biệt, mẫu VS7 có sự hiện diện cao của nhóm *Nanohaloarchaeota* (78,5%), cho thấy tính đặc thù về điều kiện môi trường siêu mặn tại khu vực đồng muối này [16].

Trong số 27 chủng vi sinh vật được phân lập, để bước đầu xác định chúng thuộc nhóm cổ khuẩn hay vi khuẩn chịu mặn, chúng tôi tiến hành thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh anisomycin [13]. Anisomycin là một kháng sinh được biết đến với khả năng ức chế tổng hợp protein ở sinh vật nhân thực và cổ khuẩn bằng cách gắn vào vị trí trung tâm peptidyl transferase trên ribosome, ngăn chặn sự hình thành liên kết peptide trong quá trình dịch mã. Tuy nhiên, ribosome của vi khuẩn nhân sơ,

bao gồm cả vi khuẩn chịu mặn, có cấu trúc khác biệt tại vị trí này, khiến anisomycin không thể gắn kết hiệu quả, dẫn đến sự kháng thuốc tự nhiên ở các vi khuẩn này [17]. Kết quả cho thấy, có 5 chủng vi sinh vật nhạy cảm với anisomycin, bao gồm VS1M2.1.4, VS7M5.1, VS7M5.3, VS7M5.7 và VS7M5.11. Các chủng vi sinh vật này được sử dụng để sàng lọc khả năng sinh enzyme phân cắt chitin, cellulose/xylanase và HA.

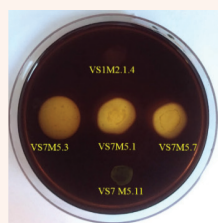
3.2. Kết quả sàng lọc *Haloarchaea* có khả năng sinh enzyme phân cắt chitin, cellulose/xylanase và acid hyaluronic

Haloarchaea là nhóm vi sinh vật cực đoan, có khả năng thích nghi và phát triển trong môi trường có nồng độ muối cao, đồng thời có tiềm năng ứng dụng lớn trong các quy trình công nghệ sinh học hiện đại, nhờ khả năng tổng hợp các enzyme hoạt động hiệu quả ở điều kiện khắc nghiệt. Trong nghiên cứu này, 5 chủng vi sinh vật, bao gồm VS1M2.1.4, VS7M5.1, VS7M5.3, VS7M5.7 và VS7M5.11, đã được sàng lọc khả năng phân giải polysaccharide, cụ thể với các cơ chất sử dụng là chitin, CMC và acid HA. Kết quả thử nghiệm được trình bày chi tiết ở bảng 1 cho thấy, các chủng này có tiềm năng sản sinh enzyme với hoạt tính phân giải rõ rệt trên các cơ chất polysaccharide thử nghiệm.

Bảng 1. Hoạt tính trên các cơ chất chitin, carboxymethyl cellulose và acid hyaluronic của *Haloarchaea*.

Ký hiệu chủng cổ khuẩn	Hoạt tính enzyme trên các cơ chất		
	Chitin	Carboxymethyl cellulose	Acid hyaluronic
VS1M2.1.4	+/-	-	+/-
VS7M5.1	+/-	+++	+
VS7M5.3	++	+++	+++
VS7M5.7	++	++	+/-
VS7M5.11	+/-	-	++

+/-: Hoạt tính rất yếu hoặc không rõ ràng; +: Hoạt tính yếu; ++: Hoạt tính trung bình; +++: Hoạt tính mạnh.



Đĩa thạch carboxymethyl cellulose

Kết quả bảng 1 cho thấy sự khác biệt đáng kể về hoạt tính enzyme giữa các chủng cổ khuẩn phân lập. Trong đó, chủng VS7M5.3 và VS7M5.1 nổi bật với hoạt tính cao trên CMC, cho thấy khả năng sản sinh enzyme cellulase và xylanase. Đây là các enzyme quan trọng trong công nghiệp năng lượng sinh học, đặc biệt trong việc chuyển hóa lignocellulose thành nhiên liệu sinh học như bioethanol [18]. Ngoài ra, trong lĩnh vực xử lý sinh học, enzyme cellulase và xylanase từ các chủng này có thể được ứng dụng để phân hủy chất thải nông nghiệp giàu lignocellulose trong môi trường mặn, giúp giảm thiểu ô nhiễm và tạo ra các sản phẩm có giá trị.

Hoạt tính chitinase được ghi nhận ở mức trung bình đối với VS7M5.3 và VS7M5.7, trong khi các chủng khác có hoạt tính yếu hoặc không rõ ràng. Các enzyme chitinase không chỉ hỗ trợ xử lý sinh học chất thải như vỏ tôm, cua mà còn tạo

ra các sản phẩm giá trị gia tăng như N-acetylglucosamine, một hợp chất quan trọng trong y học và công nghiệp thực phẩm. Tại Việt Nam, mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về vi sinh vật sinh chitinase như *Aspergillus* spp. [9], *Bacillus* spp. [19], các nghiên cứu về chitinase từ cổ khuẩn vẫn còn hạn chế. Do đó, kết quả này cung cấp thông tin mới, góp phần mở rộng phạm vi nghiên cứu vi sinh vật sinh enzyme tại các khu vực siêu mặn trong nước.

Về khả năng sinh hyaluronidase, chủng VS7M5.3 thể hiện hoạt tính cao nhất, trong khi VS7M5.11 đạt mức trung bình và các chủng khác có hoạt tính thấp hơn. Hyaluronidase là enzyme thủy phân HA, một polysaccharide quan trọng tham gia vào các quá trình sinh lý và bệnh lý như di chuyển tế bào, sửa chữa tổn thương và hỗ trợ điều trị ung thư [6]. Sự ổn định của enzyme này trong môi trường mặn cao từ các chủng cổ khuẩn có thể mở ra tiềm năng ứng dụng trong y học, đặc biệt là sản xuất các chế phẩm HA có trọng lượng phân tử thấp.

Nhìn chung, chủng VS7M5.3 nổi bật với hoạt tính enzyme cao trên cả ba cơ chất, cho thấy tiềm năng ứng dụng đa dạng trong các ngành công nghiệp liên quan đến năng lượng sinh học, xử lý chất thải và y sinh học. Các phát hiện này không chỉ làm phong phú thêm dữ liệu về vi sinh vật tại Việt Nam, mà còn mở ra hướng khai thác các enzyme từ cổ khuẩn trong môi trường khắc nghiệt, góp phần vào phát triển công nghệ sinh học bền vững.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và sàng lọc thành công 27 chủng vi sinh vật từ môi trường siêu mặn tại ruộng muối Hòn Khói, tỉnh Khánh Hòa, trong đó có 5 chủng được xác định thuộc nhóm *Haloarchaea* nhờ khả năng nhạy cảm với anisomycin. Đây là các chủng cổ khuẩn nuôi cấy được trong điều kiện phòng thí nghiệm, một bước quan trọng trong việc nghiên cứu và khai thác tiềm năng của nhóm vi sinh vật này. Kết quả sàng lọc cho thấy, hai chủng có hoạt tính phân giải mạnh với CMC, một chủng có hoạt tính cao với hyaluronan và hai chủng khác thể hiện hoạt tính trung bình trên cơ chất chitin, chứng tỏ khả năng sinh enzyme cellulase, xylanase, chitinase và hyaluronidase. Những phát hiện này không chỉ khẳng định khả năng sinh enzyme phân giải polysaccharide của các chủng cổ khuẩn, mà còn mở ra hướng nghiên cứu sâu hơn để thu nhận enzyme và phát triển các ứng dụng trong công nghệ sinh học.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ Nhiệm vụ hợp tác quốc tế mã số QTIT01.01/23-24. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ quý báu từ những người nông dân và chủ nhân của cánh đồng muối Hòn Khói, xã Ninh Diêm, huyện Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa trong quá trình thu thập mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Tschitschko, T.J. Williams, M.A. Allen, et al. (2016), “Ecophysiological distinctions of Haloarchaea from a Hypersaline Antarctic Lake as determined by metaproteomics”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, pp.3165-3173, DOI: 10.1128/AEM.00473-16.
- [2] J. Li, Y. Gao, H. Dong, et al. (2022), “Haloarchaea, excellent candidates for removing pollutants from hypersaline wastewater”, *Trends Biotechnol.*, **40**, pp.226-239, DOI: 10.1016/j.tibtech.2021.06.006.
- [3] A.M. Kakhki, M.A. Amoozegar, E.M. Khaledi (2011), “Diversity of hydrolytic enzymes in Haloarchaeal strains isolated from salt lake”, *International Journal of Environmental Science & Technology*, **8(4)**, pp.705-714, DOI: 10.1007/BF03326255.
- [4] R.M. Espinosa, M.G. Alonso, L.S. Cabrera, et al. (2022), “Industrial applications of enzymes from Haloarchaea”, *Extremozymes and Their Industrial Applications*, pp.289-320, DOI: 10.1016/B978-0-323-90274-8.00014-9.
- [5] J. Verbančič, J.E. Lunn, M. Stitt, et al. (2018), “Carbon supply and the regulation of cell wall synthesis”, *Mol. Plant*, **11(1)**, pp.75-94, DOI: 10.1016/j.molp.2017.10.004.
- [6] B.A. Buhren, H. Schrumpf, N.P. Hoff, et al. (2016), “Hyaluronidase: From clinical applications to molecular and cellular mechanisms”, *Eur. J. Med. Res.*, **21**, DOI: 10.1186/S40001-016-0201-5.
- [7] N.N. An, N.M. Tan, N.T.T. Hien, et al. (2019), “Isolation, selection and enhanced cellulase production of TH-VK22 and TH-VK24 bacterial strains”, *Journal of Science and Technology*, **39B**, pp.248-259, DOI: 10.46242/jst-juh.v39i03.481.
- [8] C.T. Giang, L.H.T. Vo, T.K. Le (2024), “Isolation and selection of salt tolerant bacteria in Can Gio district, Ho Chi Minh city with fixed nitrogen and phosphate solubilising activity”, *CTU Journal of Science*, **60**, pp.438-447, DOI: 10.22144/ctujos.2024.365 (in Vietnamese).
- [9] N.T. Ha (2012), “Optimisation of the culture conditions for chitinase production by *Aspergillus protuberans* isolated from Can Gio mangrove forest”, *CTU Journal of Science*, **22B**, pp.26-35 (in Vietnamese).
- [10] M. Rafiq, N. Hassan, M. Rehman, et al. (2023), “Challenges and approaches of culturing the unculturable archaea”, *Biology (Basel)*, **12(12)**, DOI: 10.3390/biology12121499.
- [11] L.M. Cycil, S. Dassarma, W. Pecher, et al. (2020), “Metagenomic insights into the diversity of halophilic microorganisms indigenous to the Karak salt mine”, *Pakistan*, **11**, pp.1-14, DOI: 10.3389/fmicb.2020.01567.
- [12] S. Nag, P. DasSarma, D.J. Crowley, et al. (2023), “Genomic analysis of Haloarchaea from diverse environments, including permian halite, reveals diversity of ultraviolet radiation survival and DNA photolyase gene variants”, *Microorganisms*, **11**, DOI: 10.3390/microorganisms11030607.
- [13] M.Y. Bafghi, H. Babavalian, M.A. Amoozegar (2019), “Isolation, screening and identification of Haloarchaea with chitinolytic activity from hypersaline lakes of Iran”, *Arch. Biol. Sci.*, **71**, pp.71-81, DOI: 10.2298/ABS180525049Y.
- [14] E.S. Cho, I.T. Cha, S.W. Roh, et al. (2021), “*Haloferax litoreum* Sp. Nov., *Haloferax marinesediminis* Sp. Nov., and *Haloferax marinum* Sp. Nov., low salt-tolerant Haloarchaea isolated from seawater and sediment”, *Antonie van Leeuwenhoek*, **114**, pp.2065-2082, DOI: 10.1007/S10482-021-01661-0/metrics.
- [15] E.O. Casamayor, R. Massana, S. Benlloch, et al. (2002), “Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern”, *Environ. Microbiol.*, **4**, pp.338-348, DOI: 10.1046/J.1462-2920.2002.00297.X.
- [16] V.L. Cono, G.L. Spada, F. Smedile, et al. (2024), “Unique features of extremely halophilic microbiota inhabiting solar saltworks fields of Vietnam”, *Microorganisms*, **12**, DOI: 10.3390/Microorganisms12101975/S1.
- [17] R.E. Bardavid, A. Oren (2008), “Sensitivity of haloquadratum and salinibacter to antibiotics and other inhibitors: Implications for the assessment of the contribution of archaea and bacteria to heterotrophic activities in hypersaline environments”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **63**, pp.309-315, DOI: 10.1111/J.1574-6941.2007.00433.X.
- [18] P. Bajaj, R. Mahajan (2019), “Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **103**, pp.8711-8724, DOI: 10.1007/S00253-019-10146-0/METRICS.
- [19] L.T. Mai, L.V.K. Trang, C.K. Cuong, et al. (2020), “Study on selection of chitinase - producing *Bacillus thuringiensis* and survey their chitinase biosynthesis affecting factors”, *Journal of Science and Technology, University of Danang*, **18**, pp.56-61 (in Vietnamese).