



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.043

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC YẾU TỐ MÔI TRƯỜNG LÊN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CHẤT ỨC CHẾ α -AMYLASE VÀ α -GLUCOSIDASE CỦA DÒNG *Streptomyces* SP. TVS1

Nguyễn Ngọc Trai, Nguyễn Cao Thùy Giang, Lương Ánh Huệ và Nguyễn Minh Chon*

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Minh Chon (email: nmchon@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 26/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Studying on appropriate conditions for the production of α -amylase and α -glucosidase inhibitors from *Streptomyces* sp. TVS1

Từ khóa:

α -amylase, đất nhiễm mặn, α -glucosidase, IC_{50} , *Streptomyces* sp.

Keywords:

α -amylase, α -glucosidase, IC_{50} , saline soil, *Streptomyces* sp.

ABSTRACT

Streptomyces from the saline soil can produce many biologically active substances. In this study, *Streptomyces* sp. TVS1 from the saline soil of Tra Vinh province was cultured to determine the suitable conditions to produce α -amylase and α -glucosidase inhibitors. The culturing conditions were performed with different media (SCB, R, X and G), pH, and culturing periods. Determination of IC_{50} values showed that the G medium, which contained oatmeal as the rich nutrient source, had the best inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase about 2.67 and 0.062 mg/mL, respectively. The 5 days of culturing in the G-medium also gave the best IC_{50} values of about 2.64 and 0.073 mg/mL on α -amylase and α -glucosidase, respectively. G medium also showed that pH 8.0 was the most appropriate for the production of α -amylase and α -glucosidase inhibitors with the IC_{50} values of 2.66 mg/mL on α -amylase and 0.062 mg/mL on α -glucosidase. These results suggested that the *Streptomyces* sp. TVS1 was able to secrete the α -amylase and α -glucosidase inhibitors. For further investigation, particular enzyme inhibitors in the culture solution of this *Streptomyces* species should be identified, and their potential application in diabetes prevention should be explored.

TÓM TẮT

Vi khuẩn sợi *Streptomyces* từ vùng đất nhiễm mặn có thể sinh tổng hợp chất có hoạt tính sinh học. Trong nghiên cứu này, *Streptomyces* sp. TVS1 từ đất nhiễm mặn của tỉnh Trà Vinh đã được nuôi cấy để xác định điều kiện thích hợp cho việc tổng hợp chất ức chế α -amylase và α -glucosidase. Các môi trường khác nhau như SCB, R, X và G cùng với sự thay đổi pH và thời gian nuôi cấy *Streptomyces* sp. TVS1 đã được thực hiện. Kết quả cho thấy, môi trường G với nguồn dinh dưỡng là bột yến mạch thích hợp cho vi khuẩn *Streptomyces* sp. phát triển. Cao chiết từ dịch nuôi cấy môi trường này có khả năng ức chế tốt nhất với giá trị IC_{50} tương ứng là 2,67 mg/mL đối với α -amylase và 0,062 mg/mL đối với α -glucosidase. Sau 5 ngày nuôi cấy trong môi trường G, giá trị IC_{50} của cao chiết ức chế α -amylase và α -glucosidase lần lượt là 2,64 mg/mL và 0,073 mg/mL. Cũng trên môi trường G, pH 8,0 là pH thích hợp nhất cho vi khuẩn sản sinh chất ức chế các enzyme này với giá trị IC_{50} đối với α -amylase là 2,66 mg/mL và α -glucosidase là 0,062 mg/mL. Kết quả này cho thấy *Streptomyces* sp. TVS1 có khả năng sinh tổng hợp chất ức chế α -amylase và α -glucosidase. Cần xác định các chất đặc biệt trong dung dịch nuôi cấy *Streptomyces* và ứng dụng chúng trong phòng ngừa bệnh tiểu đường cho tương lai.

Trích dẫn: Nguyễn Ngọc Trai, Nguyễn Cao Thùy Giang, Lương Ánh Huệ và Nguyễn Minh Chon, 2019. Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên khả năng sinh tổng hợp chất ức chế α -amylase và α -glucosidase của dòng *Streptomyces* sp. TVS1. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 49-56.

1 GIỚI THIỆU

Vi khuẩn sợi (Actinobacteria) là một ngành thuộc nhóm vi khuẩn thật (Eubacteria), có khả năng sinh tổng hợp nhiều hợp chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học có giá trị thương mại cao như kháng sinh, kháng khối u, kháng khuẩn, kháng nấm (Reddy *et al.*, 2011). Trong đó, chi *Streptomyces* đóng vai trò quan trọng trong sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học với khoảng 80% trong tổng các chất kháng sinh được sản xuất bởi vi khuẩn sợi đã được công bố (Alan and James, 2007). *Streptomyces* cũng là chi lớn nhất trong ngành Actinobacteria với hơn 500 loài đã được phát hiện và mô tả bởi Euzéby năm 2008. Bên cạnh đó, vi khuẩn sợi còn được sử dụng làm nguồn sản xuất các chất có khả năng ức chế α -amylase và α -glucosidase ứng dụng trong điều trị bệnh đái tháo đường. Các nghiên cứu gần đây về *Streptomyces* được phân lập từ trầm tích biển, rừng ngập mặn ở Ấn Độ đã cho thấy khả năng sinh chất ức chế α -amylase và α -glucosidase cao hơn so với các hợp chất đã được nghiên cứu trước đây (Revathy *et al.*, 2013). Các yếu tố của môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến sự sinh tổng hợp các chất ức chế α -amylase và α -glucosidase, đặc biệt là acarbose của các dòng *Streptomyces* sp. được phân lập từ đất vùng biển và vùng nhiễm mặn (Geng *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2017). Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích xác định ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy và một số điều kiện nuôi cấy, lên sự sản sinh các hợp chất kể trên của dòng vi khuẩn sợi *Streptomyces* sp. TVS1, được phân lập từ đất ngập mặn của huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Chủng vi khuẩn sợi *Streptomyces* sp. TVS1 được phân lập từ mẫu đất vùng ngập mặn của xã Trường Long Hoà, huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh. Mẫu được trữ tại phòng thí nghiệm Sinh hóa, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ và được hoạt hóa trên môi trường starch casein agar (SCA) để dùng cho nghiên cứu này.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Môi trường nuôi cấy

Bốn môi trường nuôi cấy chủng *Streptomyces* sp. TVS1 khác nhau trong nghiên cứu gồm: (1) Môi trường starch casein broth (SCB): tinh bột hoà tan 10 g/L; casein 0,3 g/L; K_2HPO_4 2 g/L; KNO_3 2 g/L; $MgSO_4.7H_2O$ 0,05 g/L; $FeSO_4.7H_2O$ 0,01 g/L; $CaCO_3$ 0,02 g/L; NaCl 1 g/L; pH 7,2; (2) Môi trường R theo Ren *et al.* (2017): sucrose 40 g/L; glucose 15 g/L; maltose 10 g/L; NH_4Cl 6 g/L; peptone 2 g/L;

yeast extract 1 g/L; $K_2HPO_4.3H_2O$ 1,5 g/L; $FeSO_4.7H_2O$ 0,02 g/L; $MgSO_4$ 1 g/L; $CaCO_3$ 3 g/L; pH 7,2; (3) môi trường X theo Xue *et al.* (2013): maltose syrup (11 g/L glucose và 160 g/L maltose) 270 mL/L; glucose 40 g/L; bột đậu nành 17 g/L; sodium glutamate 5 g/L; $CaCO_3$ 2,5 g/L; NH_4NO_3 2 g/L; $CaCl_2$ 2,5 g/L; $FeCl_3$ 0,5 g/L; K_2HPO_4 1,0 g/L; glycerol 5,0 mL; pH 7,2 và (4) môi trường G theo Geng *et al.* (2008): bột yến mạch 20 g/L; KNO_3 1 g/L; NaCl 0,5 g/L; $K_2HPO_4.12H_2O$ 0,5 g/L; $MgSO_4.7H_2O$ 0,5 g/L; $FeSO_4.7H_2O$ 0,01 g/L; pH 7,2. Đây là các môi trường với thành phần và hàm lượng carbon, nitơ khác nhau đã được các tác giả nghiên cứu lên khả năng sản sinh chất ức chế α -amylase và α -glucosidase của các chủng vi khuẩn sợi.

Môi trường nuôi cấy cho hoạt tính ức chế α -amylase và α -glucosidase cao nhất sẽ được chọn để khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy (từ 3 đến 9 ngày) và pH (trong khoảng từ 6,0 - 9,0).

2.2.2 Khảo sát khả năng ức chế của dịch nuôi cấy chủng *Streptomyces* sp. TVS1 trên các môi trường nuôi cấy khác nhau

- *Nuôi cấy vi khuẩn*: Chủng vi khuẩn sợi *Streptomyces* sp. TVS1 sau khi hoạt hóa trên môi trường SCA (Starch Casein Agar) được nuôi tăng sinh trong môi trường SCB (Starch Casein Broth). Sau đó, 100 mL sinh khối được chủng vào 900 mL môi trường (bốn môi trường thí nghiệm) trong bình tam giác 2,0 L, có pH môi trường là 7,2 và thời gian nuôi 7 ngày.

- *Thu nhận chất ức chế α -amylase và α -glucosidase từ dịch nuôi cấy bằng dung môi ethyl acetate* (Revathy *et al.*, 2013): Dịch nuôi cấy *Streptomyces* sp. TVS1 được lọc qua giấy lọc, sử dụng dung môi ethyl acetate để tách các hoạt chất ức chế (lặp lại hai lần) với tỷ lệ 1:1. Sau đó loại ethyl acetate bằng máy cô quay chân không. Cao chiết sau cô quay được trữ lạnh ở 4°C và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

- *Xác định khả năng ức chế α -amylase và α -glucosidase trong cao chiết ethyl acetate từ dịch nuôi cấy *Streptomyces* sp. TVS1.*

+ *Khả năng ức chế α -amylase được đánh giá* theo Revathy *et al.* (2013) và Cheng *et al.* (2015), được điều chỉnh như sau: Enzyme α -amylase được hoà tan trong dung dịch đệm phosphate 0,02 M (pH 7) với nồng độ 2 U/mL. Cao chiết được pha thành các nồng độ từ 0,5 đến 6 mg/mL, cho vào 100 μ L cao chiết ethyl acetate 50 μ L dung dịch enzyme và ủ trong 10 phút ở 37°C. Sau đó, 250 μ L tinh bột (1 mg/mL) được thêm vào pha trong dung dịch đệm phosphate 0,02 M, ủ tiếp tục ở 37°C trong 10 phút.

Phản ứng bị ức chế bằng 200 μL HCl 1N. Cuối cùng, hỗn hợp phản ứng được thêm vào 300 μL thuốc thử iodine 0,025 mM, xác định độ hấp thụ của dung dịch phản ứng ở bước sóng 660 nm. Khả năng ức chế α -amylase (% ức chế) được tính dựa vào hàm lượng tinh bột còn thừa sau khi đã ngừng phản ứng thủy phân.

Chỉ tiêu đánh giá:

– Tỷ lệ enzyme bị ức chế, được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế} = 100 - \frac{(A_{660 \text{ đối chứng}} - A_{660 \text{ cao ethyl acetate}}) \times 100}{A_{660 \text{ đối chứng}}}$$

Trong đó: A_{660} đối chứng: giá trị độ hấp thụ của dung dịch phản ứng đối chứng (không có cao chiết ethyl acetate) ở bước sóng 660 nm;

A_{660} cao chiết ethyl acetate: giá trị độ hấp thụ của dung dịch phản ứng ức chế (có sự hiện diện của cao chiết ethyl acetate) ở bước sóng 660 nm.

– Giá trị IC_{50} (Inhibition concentration 50%): IC_{50} là giá trị nồng độ mà tại đó cao chiết ethyl acetate có khả năng ức chế 50% hoạt động α -amylase và được xác định dựa trên biểu đồ tỷ lệ % ức chế của cao chiết ethyl acetate ở các nồng độ khác nhau.

+ Khả năng ức chế α -glucosidase được đánh giá theo Revathy *et al.* (2013) và được điều chỉnh như sau: 50 μL cao chiết ethyl acetate ở các nồng độ từ 0,01 đến 0,012 mg/mL cho vào 100 μL α -glucosidase 0,2 U/mL đã chuẩn bị với dung dịch đệm phosphate 0,1 M (pH 6,9), ủ 10 phút ở 37°C. Tiếp theo, 50 μL cơ chất para-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG) 4 mM vào hỗn hợp phản ứng, ủ tiếp 20 phút ở 37°C, dùng phản ứng bằng 1 mL Na_2CO_3 0,2 M. Khả năng ức chế α -glucosidase (%) được xác định thông qua độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 405 nm của lượng para-nitrophenol tạo thành trong phản ứng.

Chỉ tiêu đánh giá:

– Tỷ lệ (%) enzyme bị ức chế được tính theo công thức:

$$\% \text{ Ức chế} = \frac{(A_{405 \text{ đối chứng}} - A_{405 \text{ cao ethyl acetate}}) \times 100}{A_{405 \text{ đối chứng}}}$$

Trong đó: A_{405} đối chứng: giá trị độ hấp thụ của dung dịch phản ứng đối chứng (không có cao chiết ethyl acetate) ở bước sóng 405 nm;

A_{405} cao chiết ethyl acetate: giá trị độ hấp thụ của dung dịch phản ứng (có cao chiết ethyl acetate) sau khi ngừng phản ứng ở bước sóng 405 nm.

– Giá trị IC_{50} (Inhibition concentration 50%): IC_{50} là giá trị nồng độ mà tại đó cao chiết ethyl acetate có khả năng ức chế 50% hoạt động α -glucosidase và được xác định dựa trên biểu đồ % ức chế của cao chiết ethyl acetate ở các nồng độ khác nhau.

2.2.3 Xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và tính toán bằng phần mềm Excel; xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS version 20. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm SE (sai số chuẩn).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp chất ức chế α -amylase và α -glucosidase của *Streptomyces sp.* TVS1

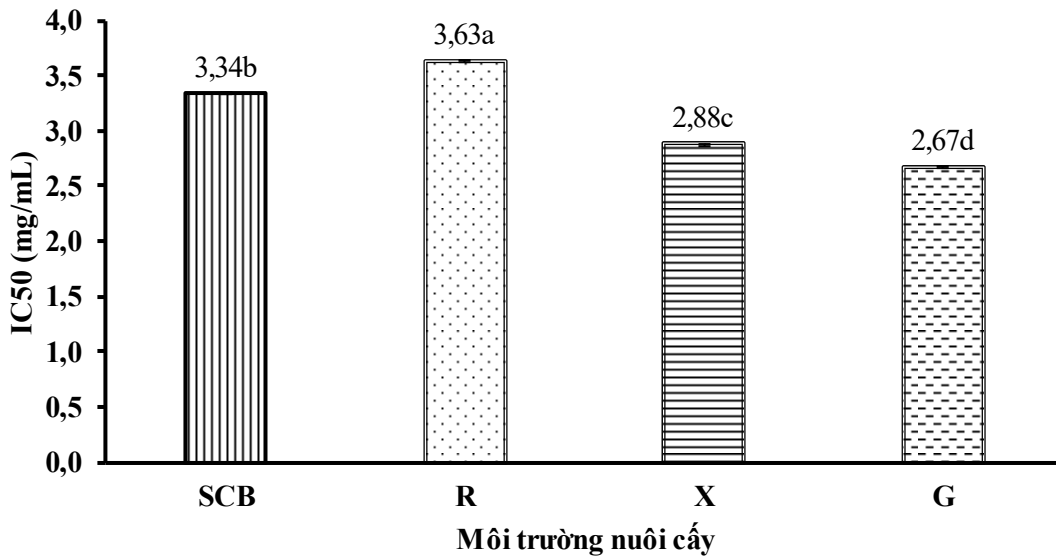
Bảng 1 cho thấy, ở 4 môi trường nuôi cấy khác nhau thì chủng vi khuẩn sợi *Streptomyces sp.* TVS1 đều sinh chất ức chế α -amylase. Tuy nhiên, cùng một nồng độ cao chiết, khả năng ức chế α -amylase của dịch trích thu được từ các môi trường nuôi cấy khác nhau cũng khác nhau. Nồng độ cao chiết 0,5 mg/mL, tỷ lệ α -amylase bị ức chế của dịch trích từ môi trường R là thấp nhất, môi trường X là cao nhất. Khi tăng nồng độ cao chiết, ở các môi trường khác nhau, tỷ lệ α -amylase bị ức chế cũng tăng theo. Ở nồng độ cao chiết 6,0 mg/mL, khả năng ức chế α -amylase của cao chiết thu từ môi trường R vẫn thấp nhất (84,14 \pm 0,1%) và môi trường G là cao nhất (99,14 \pm 0,2%). Tuy nhiên, để biết khả năng ức chế mạnh hay yếu của một chất, giá trị IC_{50} là thông số cụ thể cần xác định.

Trong 4 môi trường nuôi cấy, giá trị IC_{50} ức chế α -amylase thu được từ môi trường R là cao nhất đạt 3,63 mg/mL và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các nghiệm thức nuôi ở 3 môi trường còn lại. Kế đến là môi trường SCB và môi trường X với giá trị IC_{50} lần lượt là 3,34 mg/mL và 2,88 mg/mL. Thấp nhất là môi trường G với IC_{50} đạt 2,67 mg/mL. Kết quả thí nghiệm có thể kết luận cao chiết ethyl acetate từ dịch trích chủng *Streptomyces sp.* TVS1 ở môi trường G là tốt nhất vì hoạt tính chất ức chế α -amylase cao hơn so với các môi trường còn lại. Môi trường R có giá trị IC_{50} cao nhất (3,63 mg/mL) chứng tỏ môi trường R cho hiệu quả không cao để nuôi chủng *Streptomyces sp.* TVS1 nhằm sản xuất đề thu nhận chất ức chế α -amylase.

Bảng 1: Tỷ lệ α -amylase bị ức chế bởi cao chiết chủng *Streptomyces* sp. TVS1 nuôi cấy trong 4 loại môi trường

Nồng độ cao chiết (mg/mL)	Tỷ lệ enzyme bị ức chế (%)			
	SCB	R	X	G
0,0	0 ^m	0 ^m	0 ^m	0 ^m
0,5	12,30 ^l ±0,05	8,91 ^l ±0,09	19,39 ^l ±4,10	17,48 ^l ±0,08
1,0	18,81 ^k ±0,04	11,93 ^k ±0,06	31,01 ^k ±0,07	29,26 ^k ±0,08
1,5	26,28 ^j ±0,01	22,50 ^j ±0,12	37,68 ^j ±0,03	35,60 ^j ±0,12
2,0	32,41 ⁱ ±0,03	28,84 ⁱ ±0,01	44,90 ⁱ ±0,02	47,78 ⁱ ±0,12
2,5	39,06 ^h ±0,04	34,38 ^h ±0,11	50,98 ^h ±0,02	51,78 ^h ±0,10
3,0	42,74 ^g ±0,02	37,19 ^g ±0,04	56,03 ^g ±0,01	60,26 ^g ±0,17
3,5	51,60 ^f ±0,04	45,59 ^f ±0,07	61,44 ^f ±0,07	68,22 ^f ±0,18
4,0	62,20 ^e ±0,03	55,12 ^e ±0,05	68,09 ^e ±0,02	81,02 ^e ±0,16
4,5	64,91 ^d ±0,04	62,15 ^d ±0,04	76,04 ^d ±0,03	84,42 ^d ±0,21
5,0	77,09 ^c ±0,03	67,86 ^c ±0,02	83,71 ^c ±0,03	95,72 ^c ±0,28
5,5	81,79 ^b ±0,04	77,89 ^b ±0,02	92,59 ^b ±0,06	96,74 ^b ±0,18
6,0	86,43 ^a ±0,05	84,14 ^a ±0,10	96,13 ^a ±0,07	99,14 ^a ±0,20

* Các giá trị trong cùng cột, nếu có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% qua phép thử Duncan. ± sai số chuẩn.



Hình 1: Biểu đồ biểu diễn giá trị IC₅₀ ức chế α -amylase của cao chiết chủng *Streptomyces* sp. TVS1 nuôi ở 4 môi trường

Ngoài các hoạt chất có khả năng ức chế α -amylase, các hợp chất có khả năng ức chế α -glucosidase cũng được nghiên cứu. Hoạt động chính của α -glucosidase trong cơ thể người là thủy phân các đường đôi thành đường đơn glucose. Vì vậy,

chất ức chế α -glucosidase đã được sử dụng trong điều trị bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì thông qua việc làm giảm lượng glucose được tạo ra, từ đó giúp hạ đường huyết (Toeller, 1994; Kotowaroo et al., 2006).

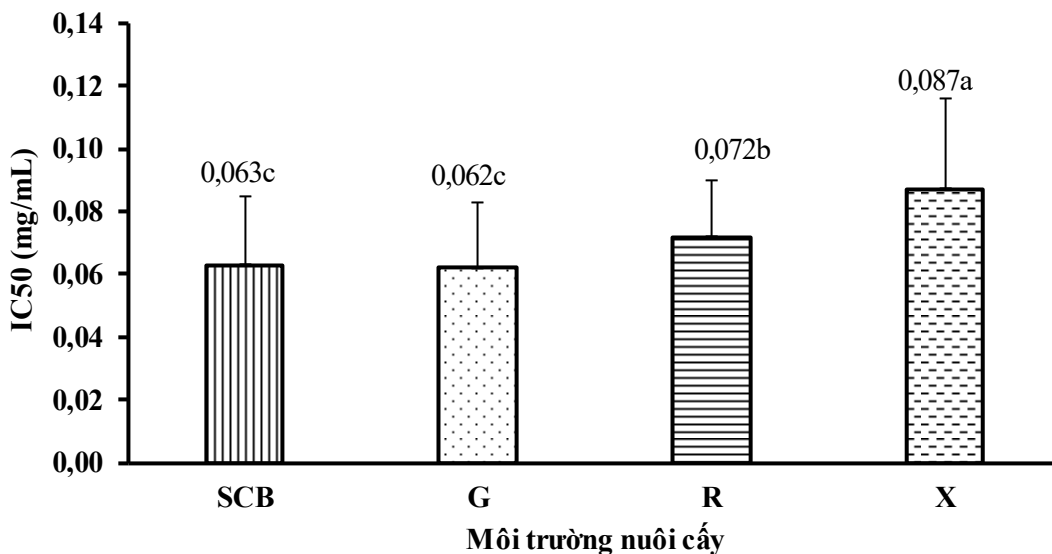
Bảng 2: Tỷ lệ α -glucosidase bị ức chế của cao chiết từ nuôi cấy ở 4 loại môi trường

Nồng độ cao chiết (mg/mL)	Tỷ lệ enzyme bị ức chế (%)			
	SCB	R	X	G
0	0 ^k	0 ⁱ	0 ⁱ	0 ^h
0,01	7,28 ^j ±3,16	6,82 ^h ±3,13	5,97 ^h ±2,96	7,60 ^g ±2,83
0,02	19,00 ⁱ ±2,73	16,97 ^g ±2,78	10,17 ^h ±2,83	11,44 ^f ±2,74
0,03	30,00 ^h ±2,35	23,92 ^f ±2,53	17,56 ^g ±2,62	15,71 ^f ±2,60
0,04	39,14 ^g ±2,10	26,91 ^f ±2,47	25,45 ^f ±2,36	30,13 ^e ±2,11
0,05	44,66 ^f ±1,90	37,06 ^e ±2,12	33,13 ^d ±2,12	41,89 ^e ±1,80
0,06	49,00 ^f ±1,76	50,58 ^d ±1,66	37,18 ^d ±1,99	43,84 ^e ±1,80
0,07	55,47 ^e ±1,54	52,49 ^d ±1,59	42,12 ^d ±1,82	59,10 ^d ±1,27
0,08	65,49 ^d ±1,18	55,23 ^d ±1,52	42,55 ^d ±1,82	66,42 ^e ±1,06
0,09	72,48 ^c ±0,97	61,53 ^c ±1,30	50,62 ^c ±1,57	67,81 ^e ±1,01
0,10	76,73 ^c ±0,82	62,24 ^c ±1,29	55,44 ^c ±1,42	80,49 ^b ±0,61
0,11	83,56 ^b ±0,57	75,07 ^b ±0,80	62,26 ^b ±1,20	93,68 ^a ±0,18
0,12	90,97 ^a ±0,29	84,13 ^a ±0,56	68,64 ^a ±0,99	96,81 ^a ±0,08

* Các giá trị trong cùng cột, nếu có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% qua phép thử Duncan. ± sai số chuẩn.

Khả năng ức chế α -glucosidase của cao chiết ethyl acetate từ dung dịch nuôi cấy chủng *Streptomyces* sp. TVS1 trong bốn môi trường SCB, X, R, G được trình bày ở Bảng 2. Ở nồng độ thấp 0,01 mg/mL, tỷ lệ α -glucosidase bị ức chế bởi cao chiết từ môi trường X là thấp nhất (5,97±2,96 mg/mL) kế đến là môi trường R (6,82±3,13 mg/mL) và môi trường SCB (7,28±3,16 mg/mL). Giá trị này đạt được ở môi trường G là cao nhất (7,60±2,83

mg/mL). Tỷ lệ α -glucosidase bị ức chế tăng tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết. Nồng độ cao chiết là 0,12 mg/mL thì hoạt tính ức chế của cao chiết từ môi trường G đối với α -glucosidase là mạnh nhất, hiệu quả ức chế lên đến 96,81±0,08%. Trong khi đó, sự ức chế hoạt động của α -glucosidase được ghi nhận là thấp nhất đối với cao chiết từ môi trường X, hiệu quả ức chế đạt 68,64±0,99% với nồng độ cao chiết là 0,12 mg/mL.



Hình 2. Biểu đồ biểu diễn giá trị IC₅₀ ức chế α -glucosidase của cao chiết ethyl acetate từ dịch nuôi cấy chủng *Streptomyces* sp. TVS1 ở 4 môi trường SCB, G, R, X.

Hình 2 biểu diễn giá trị IC₅₀ ức chế trên α -glucosidase của cao chiết ethyl acetate từ dịch nuôi cấy chủng *Streptomyces* sp. TVS1 được nuôi ở 4 môi trường khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Môi trường X có giá trị IC₅₀ cao nhất (0,087

mg/mL), kế đến là môi trường R đạt 0,072 mg/mL. Giữa môi trường SCB và môi trường G, giá trị này khác biệt không có ý nghĩa thống kê đạt lần lượt là 0,063 mg/mL và 0,062 mg/mL. Kết quả thí nghiệm có thể thấy môi trường G thích hợp hơn cả cho việc

nuôi cấy chủng *Streptomyces* sp. TVS1 thu nhận dịch nuôi cấy với hoạt động ức chế α -amylase và α -glucosidase cao.

Về thành phần môi trường nuôi cấy thì cả 4 loại môi trường SCB, G, R, X đều chứa các yếu tố cần thiết để vi khuẩn sợi phát triển gồm nguồn carbon (Sucrose, glucose, maltose...), nitơ (đạm hữu cơ: casein, peptone, yeast extract... hoặc vô cơ: KNO_3) và muối khoáng. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu cho thấy rằng môi trường được nghiên cứu bởi Geng *et al.* (2008) được xem là môi trường nuôi cấy tốt nhất trong bốn loại môi trường khảo sát, thích hợp cho *Streptomyces* sp. TVS1 sinh tổng hợp chất ức chế α -amylase và α -glucosidase. Thành phần môi trường này ngoài các nguyên tố khoáng, đạm vô cơ còn có sự hiện diện của bột yến mạch. Ngoài việc cung cấp carbohydrate cho vi khuẩn sợi, trong bột yến mạch còn chứa protein, các nguyên tố khoáng và vitamin, có thể đây là các yếu tố góp phần làm tăng khả năng tạo chất ức chế α -amylase và α -glucosidase từ chủng *Streptomyces* sp. TVS1.

3.2 Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự sản sinh hợp chất ức chế α -amylase và α -glucosidase từ chủng *Streptomyces* sp. TVS1

Trong nuôi cấy vi sinh vật, thời điểm tạm dừng việc nuôi cấy để thu hợp chất biến dưỡng mong muốn là yếu tố cực kỳ quan trọng. Nếu thu hoạch sớm thì lượng hoạt chất cần thiết không nhiều, thu trễ dẫn đến hàm lượng hoạt chất cần thiết thấp do bị biến đổi thành các chất khác. Thu hoạch đúng thời điểm cho hàm lượng hoạt chất thu được cao nhất và mang lại hiệu quả kinh tế cao trong nghiên cứu do tiết kiệm được thời gian và chi phí nuôi. Vì vậy, khảo sát thời gian nuôi cấy thích hợp chủng *Streptomyces* sp. TVS1 để thu nhận hợp chất ức chế α -amylase và α -glucosidase cao rất quan trọng.

Kết quả Bảng 3 trình bày khả năng ức chế α -amylase của cao chiết ethyl acetate từ dịch nuôi cấy *Streptomyces* sp. TVS1 dựa trên chỉ số IC_{50} có sự khác biệt rõ rệt theo thời gian. Cao chiết sau 3 ngày nuôi có giá trị IC_{50} rất cao, lên đến $4,02 \pm 0,01$ mg/mL và có khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại, trừ nghiệm thức 4 ngày nuôi cấy. Kết quả chứng tỏ, chất ức chế α -amylase của cao chiết vi khuẩn sợi trong những ngày đầu này chưa được tạo ra nhiều. Sau đó, từ ngày thứ 5 đến thứ 9, giá trị IC_{50} giảm dần ($2,64$ - $2,67$ mg/mL), khác biệt không có ý nghĩa thống kê trong số 5 nghiệm thức này ở mức ý nghĩa 5%. Từ đây, có thể suy ra khoảng thời gian tốt để có thể thu dịch nuôi và sản xuất cao chiết là từ 5 - 9 ngày. Tuy nhiên, để tiết kiệm thời gian và hiệu quả kinh tế, dịch nuôi được thu sau 5 ngày nuôi là phù hợp nhất vì khả năng ức chế enzyme từ sau 5 ngày nuôi trở đi không còn tăng

lên nữa và cũng không có khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê.

Bảng 3: Giá trị IC_{50} ức chế α -amylase và α -glucosidase của cao chiết *Streptomyces* sp. TVS1 sau từng thời gian nuôi khác nhau

Ngày nuôi	Giá trị IC_{50} (mg/mL)	
	α -amylase	α -glucosidase
3	$4,02^{a \pm 0,01}$	$0,084^a \pm 0,001$
4	$4,01^{a \pm 0,04}$	$0,081^{ab \pm 0,001}$
5	$2,64^{b \pm 0,00}$	$0,073^{dc \pm 0,001}$
6	$2,64^{b \pm 0,00}$	$0,071^c \pm 0,003$
7	$2,66^{b \pm 0,00}$	$0,074^{dc \pm 0,001}$
8	$2,67^{b \pm 0,01}$	$0,076^{cd \pm 0,000}$
9	$2,67^{b \pm 0,01}$	$0,080^{bc \pm 0,000}$

* Các giá trị trong cùng cột, nếu có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% qua phép thử Duncan. \pm sai số chuẩn.

Về khả năng ức chế α -glucosidase, cao chiết chủng *Streptomyces* sp. TVS1 trong khoảng sau 3 ngày nuôi đã có khả năng ức chế enzyme này, giá trị IC_{50} đạt được là $0,084 \pm 0,001$ mg/mL. Giá trị IC_{50} giảm khi thời gian nuôi tăng lên và đạt thấp nhất ($0,071 \pm 0,003$ mg/mL) sau 6 ngày nuôi. Khi thời gian nuôi lâu hơn 6 ngày, giá trị IC_{50} lại tăng lên. Kết quả cho thấy dòng *Streptomyces* sp. TVS1 tổng hợp chất ức chế tăng và số lượng chất ức chế được tạo ra nhiều hơn sau 6 ngày nuôi, khi thời gian tăng lên có thể hoạt chất ức chế bị mất đi do có thể đã biến đổi thành hoạt chất khác trong quá trình chuyển hoá chất.

Thời gian 5 ngày nuôi cấy là thích hợp nhất cho vi khuẩn sản sinh chất ức chế hoạt tính của hai enzyme nói trên, với giá trị IC_{50} trên α -amylase là $2,64$ mg/mL và trên α -glucosidase là $0,073$ mg/mL.

Theo Xue *et al.* (2012) thì kết quả nghiên cứu chủng *Actinoplanes utahensis* ZJB-08196 cho thấy thời gian nuôi tạo acarbose cao nhất ở thời điểm 7 ngày nuôi cấy dài hơn so với *Streptomyces* sp. TVS1 (5 ngày) trong nghiên cứu này. Kết quả này có thể giải thích là tùy vào điều kiện sinh thái ở từng vùng mà vi khuẩn sợi sẽ mang những đặc tính khác nhau, khả năng hình thành các chất biến dưỡng thứ cấp khác nhau cả về số lượng cũng như về chất lượng.

3.3 Ảnh hưởng của pH môi trường lên khả năng tạo chất ức chế α -amylase và α -glucosidase từ chủng *Streptomyces* sp. TVS1

Trong khoảng pH khảo sát từ 6,0 đến 9,0 thì kết quả ở môi trường có pH 6,0 và 6,5, cao chiết có khả năng ức chế α -amylase thấp nhất với IC_{50} lần lượt là 3,37 và 3,51 mg/mL. Ở pH 7,0; 7,5; 8,5 và 9,0 hiệu quả ức chế enzyme cao hơn tương ứng 2,84; 2,74;

2,87; 2,91 mg/mL. Riêng ở pH 8,0 khả năng ức chế enzyme α -amylase cao nhất với IC₅₀ là thấp nhất (2,66 mg/mL). Kết quả này đồng nghĩa với việc lượng chất ức chế được sinh ra nhiều nhất khi chủng *Streptomyces* sp. TVS1 được nuôi trong môi trường G với có pH trong khoảng pH là 7,0-8,0.

Bảng 4: Giá trị IC₅₀ trên α -amylase và α -glucosidase của cao chiết acethyl acetate từ dịch nuôi cấy *Streptomyces* sp. TVS1 trong môi trường G với các pH khác nhau

pH	Giá trị IC ₅₀ (mg/mL)	
	α -amylase	α -glucosidase
6,0	3,51 ^a ±0,20	0,069 ^a ±0,000
6,5	3,37 ^b ±0,01	0,067 ^b ±0,000
7,0	2,84 ^d ±0,00	0,066 ^b ±0,001
7,5	2,74 ^c ±0,02	0,064 ^c ±0,001
8,0	2,66 ^f ±0,12	0,062 ^d ±0,000
8,5	2,87 ^{cd} ±0,01	0,063 ^c ±0,000
9,0	2,91 ^e ±0,02	0,067 ^b ±0,000

* Các giá trị trong cùng cột, nếu có ít nhất một chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% qua phép thử Duncan. ± sai số chuẩn.

Đối với α -glucosidase, ở môi trường có pH 8, giá trị IC₅₀ thấp nhất (0,062 mg/mL), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% với giá trị IC₅₀ ở các giá trị pH còn lại. Như vậy, môi trường G, pH 8,0 là điều kiện thích hợp cho chủng TVS1 sản sinh chất ức chế α -amylase và α -glucosidase. Tương tự, kết quả nghiên cứu của Ren *et al.* (2017) cũng cho thấy đối với chủng *Streptomyces* M37, pH của môi trường nuôi cấy ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh trưởng và sự tạo thành acarbose. Khi tăng pH môi trường hàm lượng acarbose cũng tăng theo và đạt cao nhất (3,345 mg/L) ở pH 8. Ở pH lớn hơn 8,0 lượng acarbose thu được thấp hơn.

Kết quả của nghiên cứu cho thấy chủng *Streptomyces* sp. TVS1 với điều kiện nuôi cấy phù hợp rất khả quan so với một số nghiên cứu trên thế giới. Chủng vi khuẩn sợi *Micromonospora* sp. được phân lập từ trầm tích biển Marakkanam (Ấn Độ) có khả năng ức chế 74,32% α -amylase tại nồng độ 100 mg/mL và ức chế 74,43% α -glucosidase ở nồng độ 0,1 mg/mL (Suthindhiran *et al.*, 2009). Kết quả nghiên cứu của Kang *et al.* (2013) đối với cao chiết dòng *Aspergillus oryzae* N159-1 lên α -glucosidase với giá trị IC₅₀ = 3,1 mg/mL. Cao chiết dòng *Streptomyces* sp. VITMSS05 được phân lập từ vùng biển ở Ấn Độ có khả năng ức chế 61,1% α -amylase và 91,5% α -glucosidase ở nồng độ 0,5 mg/mL (Revathy *et al.*, 2013). Một nghiên cứu khác cũng tại Ấn Độ đã công bố dòng *Streptomyces variabilis* PO-178 có ức chế α -amylase (Prashith and

Onkarappa, 2014). Tùy vào điều kiện sinh thái ở từng vùng mà vi khuẩn sợi sẽ mang những đặc tính khác nhau, khả năng hình thành các chất biến dưỡng thứ cấp khác nhau cả về số lượng cũng như về chất lượng (Waskman, 1961).

Ở Việt Nam, nghiên cứu về vi khuẩn sợi có khả năng ức chế α -amylase và α -glucosidase chưa tìm thấy. Vì vậy, nghiên cứu này cho thấy vùng sinh thái ngập mặn ở Việt Nam có nhiều chủng vi khuẩn sợi sinh các hợp chất có hoạt tính sinh học cao. Cần có những nghiên cứu tiếp theo có thể ứng dụng những dòng vi khuẩn tiềm năng này.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Điều kiện thích hợp để chủng vi khuẩn sợi *Streptomyces* sp. TVS1 phát triển và sản sinh chất ức chế α -amylase và α -glucosidase cao là thời gian nuôi 5 ngày ở pH 8,0 trong môi trường G có bổ sung bột yến mạch là nguồn bổ sung dinh dưỡng thích hợp cho vi khuẩn.

4.2 Đề xuất

Tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố như: NaCl, muối amonium, điều chỉnh pH trong thời gian nuôi... đến khả năng hình thành chất ức chế α -amylase và α -glucosidase chủng *Streptomyces* sp. TVS1 và xác định công thức phân tử chất ức chế.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn các thành viên của Phòng thí nghiệm Sinh hoá, Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học của Trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện và hỗ trợ để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alan, T.B and James, E.M.S., 2007. Marine Actinobacteria: New opportunities for natural product search and discovery. Trends in Microbiology. 15: 491-499.
- Cheng, Q., Cai, N. S. B. D. J., Wang, R. J., Zhou, F., Ji, B. P. and Chen, Y. Q., 2015. In vitro antioxidant and pancreatic α -amylase inhibitory activity of isolated fractions from water extract of Qingzhuan tea. Journal of food science and technology. 52 (2): 928-935.
- Euzéby, J. P., 2008. Genus *Streptomyces* – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Everest Journal of Applied Microbiology. 20: 45-54.
- Geng, P., Bai, G., Shi, Q., Zhang, L., Gao, Z. and Zhang, Q., 2008. Taxonomy of the *Streptomyces* strain ZG0656 that produces acarviosatin α -amylase inhibitors and analysis of their effects

- on blood glucose levels in mammalian systems. *Journal of Applied Microbiology*. 106 (2009): 525-533.
- Kang, M. G., Yi, S. H. and Lee, J. S., 2013. Production and Characterization of a New α -Glucosidase Inhibitory Peptide from *Aspergillus oryzae* N159-1. *Mycobiology*. 41 (3): 149-154.
- Kotowaroo, M. I., Mahomoodally M. F., Gurib-Fakim, A. and Subratty A. H., 2006. Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of Mauritius for possible alpha-amylase inhibitory effects in vitro. *Phytotherapy Research*, 20: 228-231.
- Reddy, N. G., Ramakrishna, D. P. N. and Raja, G. S. V., 2011. A Morphological, Physiological and Biochemical Studies of Marine *Streptomyces rochei* (MTCC 10109) Showing Antagonistic Activity Against Selective Human Pathogenic Microorganisms. *Asian Journal of Biological Sciences*. 1-14. ISSN: 1996-3351.
- Ren, F., Chen, L., Xiong, S. and Tong, Q., 2017. Enhanced acarbose production by *Streptomyces* M37 using a two-stage fermentation strategy. *PLoS One*. 12(2): 1-11.
- Revathy, T., Jayasri M.A. and Suthindhiran K., 2013. Anti-oxidant and enzyme-inhibitory potential of marine *Streptomyces*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 9 (3): 282-290.
- Suthindhiran, K. R., Jayasri, M. A. and Kannabiran, K., 2009. α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities of *Micromonospora* sp. VITSDK3 (EU551238). *International Journal of Intergrative Biology*. 6 (3): 115-120. ISSN: 0973-8363.
- Toeller, M., 1994. Alpha-Glucosidase inhibitors in diabetes: Efficacy in NIDDM subjects. *European Journal of Clinical Investigation*. 24: 31-35.
- Waskman, S. A., 1961. The Actinomycetes: classification, identification and descriptions of genera and species. The Williams & Wilkins company, Baltimore. In the United States of America. 384 pp.
- Xue, Y. P., Qin, J. W., Wang, Y. J., Wang, Y. S. and Zheng, Y. G. 2013. Enhanced production of acarbose and concurrently reduced formation of impurity by addition of validamine in fermentation of *Actinoplanes utahensis* ZJB-08196. *BioMed research international*. 2013(3): 1-9.