

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



HỒ LÝ PHƯƠNG

HỒ LÝ PHƯƠNG

SINH HỌC

**ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CHỐNG BÉO PHÌ VÀ KHÁNG VIÊM
CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT PHÂN LẬP TỪ THỰC
VẬT**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

2022

HÀ NỘI - 2022

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Hồ Lý Phương

**ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CHỐNG BÉO PHÌ VÀ KHÁNG VIÊM CỦA MỘT
SỐ CHỦNG VI SINH VẬT PHÂN LẬP TỪ THỰC VẬT**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
TS. Trần Thị Như Hằng

Hà Nội - 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Hà Nội, ngày 27 tháng 09 năm 2022

Tác giả luận văn

Hồ Lý Phương

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin bày tỏ sự biết ơn sâu sắc đến TS. Trần Thị Như Hằng – người đã tận tình hỗ trợ, hướng dẫn và định hướng nghiên cứu cho tôi trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thành luận văn.

Và tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành đến các anh, chị phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học Hợp chất thiên nhiên đã luôn hỗ trợ và tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành tốt phần thực nghiệm và thực hiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, Phòng Đào tạo, Khoa Công nghệ sinh học và Quý Thầy Cô giáo đã giảng dạy và tạo điều kiện thuận lợi giúp tôi thực hiện luận văn cũng như hoàn thành các thủ tục cần thiết.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ sự biết ơn sâu sắc đến gia đình và bạn bè đã luôn đồng hành, chia sẻ, động viên và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	i
DANH MỤC CÁC BẢNG	ii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ.....	ii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1 Thực trạng bệnh béo phì và các rối loạn chuyển hóa	3
1.2 Nguồn hợp chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật cộng sinh thực vật	4
<i>1.2.1 Chất trao đổi thứ cấp từ vi sinh vật.....</i>	<i>4</i>
<i>1.2.2 Nguồn hoạt chất từ vi sinh vật cộng sinh thực vật</i>	<i>5</i>
1.3 Hợp chất tự nhiên chống béo phì và kháng viêm	9
<i>1.3.1 Hợp chất có hoạt tính chống béo phì từ vi sinh vật.....</i>	<i>9</i>
<i>1.3.2 Hợp chất có hoạt tính kháng viêm từ vi sinh vật</i>	<i>12</i>
Chương 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu	16
2.2 Nguyên vật liệu	16
<i>2.2.1 Vật liệu thí nghiệm</i>	<i>16</i>
<i>2.2.2 Dụng cụ, thiết bị thí nghiệm.....</i>	<i>16</i>
<i>2.2.3 Hóa chất.....</i>	<i>17</i>
2.3 Phương pháp nghiên cứu	18
<i>2.3.1 Phân lập vi sinh vật</i>	<i>19</i>
<i>2.3.2 Lên men và thu dịch chiết</i>	<i>20</i>
<i>2.3.3 Xác định hoạt tính chống oxi hóa</i>	<i>20</i>
<i>2.3.4 Xác định hoạt tính kháng viêm</i>	<i>21</i>
<i>2.3.5 Xác định hoạt tính ức chế lipase.....</i>	<i>22</i>
2.4. Định danh chủng vi sinh vật	23
<i>2.4.1 Định danh theo hình thái</i>	<i>23</i>
<i>2.4.2 Định danh theo phương pháp phân tử.....</i>	<i>23</i>

2.5. Kiểm tra độ an toàn của chủng vi sinh vật trong mô hình <i>in vivo</i> .	25
2.6. Xử lý số liệu	25
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	26
3.1 Kết quả phân lập các vi sinh vật cộng sinh thực vật	26
3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxi hóa	28
3.3. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng viêm.....	32
3.3.1 Khả năng gây độc tế bào	32
3.3.2 Khả năng hạn chế sự tổng hợp NO.....	32
3.4 Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế lipase.....	34
3.5 Kết quả định danh các chủng vi sinh vật.....	39
3.5.1 Kết quả định danh chủng C1 và C8.....	39
3.5.2 Kết quả định danh chủng C13	42
3.5.3 Kết quả định danh chủng C20	44
3.6 Kết quả xác định độ an toàn trên động vật thử nghiệm	49
Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	51
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	53
TÀI LIỆU THAM KHẢO	54

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tên tiếng anh	Tên tiếng việt
BHI	Brain heart infusion	Dịch tim não
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	Một nửa nồng độ ức chế tối đa
IL	Interleukin	Interleukin
IM	Intravenous injection	Tiêm vào tĩnh mạch
IP	Intraperitoneal injection	Tiêm vào xoang bụng
ITS	Internal transcribed spacer	Vùng đệm vùng cách
LPS	Liposaccharide	Liposaccharide
MIC	Minimum inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	
NAFLD	Non alcoholic fatty liver disease	Bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu bia
NO	Nitrite oxide	Nitrite oxide
RAW264.7	Leukemia cell line	Tế bào ung thư bạch cầu
ROS	Reactive oxygen species	Gốc oxi hóa tự do
SC%	Scavenging capacity	Khả năng loại bỏ gốc oxi hóa tự do
SC ₅₀	Half maximal scavenging concentration	Nồng độ loại bỏ tối đa một nửa
TG	Triglyceride	Triglyceride
TNF	Tumor necrosis factor	Yếu tố hoại tử khối u
VSV		Vi sinh vật

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Danh sách các chủng vi sinh vật cộng sinh thực vật phân lập được.	26
Bảng 3.2: Hình thái các chủng vi sinh vật đã phân lập trên đĩa thạch.....	27
Bảng 3.3. Khả năng loại bỏ gốc DPPH của các cặn chiết vi sinh vật.....	29
Bảng 3.4. Hoạt tính ức chế enzyme lipase của các dịch chiết thử nghiệm.....	35
Bảng 3.5. Đặc điểm sinh hóa của chủng C1 và C8.....	42
Bảng 3.6. Đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn C20.	45
Bảng 3.7. Kết quả độ an toàn của nấm trên chuột BALB/c.....	49

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát	19
Hình 3.2. Hoạt tính ức chế tổng hợp NO của 19 cặn chiết ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ trên tế bào RAW 264.7.....	32
Hình 3.3. Mối quan hệ giữa độ ức chế enzyme và nồng độ cặn chiết C2	37
Hình 3.4. Cây phả hệ của chủng C1 và C8 dựa trên trình tự ITS, sử dụng phần mềm MEGA7 theo phương pháp Neighbor joining với giá trị bootstrap 1000	39
Hình 3.5. Đặc điểm hình thái của <i>Eurotium cristatum</i> C1:	40
Hình 3.6. Đặc điểm hình thái của <i>Eurotium cristatum</i> C8:	41
Hình 3.7 Cây phả hệ của chủng C13 dựa trên trình tự 16S rARN, sử dụng phần mềm MEGA7 theo phương pháp Neighbor joining với giá trị bootstrap 1000	42
Hình 3.8. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc C13 trên môi trường ISP4.....	43
Hình 3.9: Kết quả đồng hòa nguồn carbon của chủng C13	43
Hình 3.10 Cây phả hệ của chủng C20 dựa trên trình tự 16S rARN, sử dụng phần mềm MEGA7 theo phương pháp Neighbor joining với giá trị bootstrap 1000	44
Hình 3.11. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc vi khuẩn C20 trên đĩa thạch LB...	45

MỞ ĐẦU

Sự phát triển của kinh tế đã giúp nâng cao điều kiện vật chất của con người nhưng đồng thời cũng kéo theo các hệ lụy. Một trong số đó là sự phổ biến một số loại bệnh như béo phì hay các bệnh liên quan đến viêm nhiễm như gut, khớp, dạ dày,.. Sự gia tăng mạnh mẽ về tỷ lệ mắc bệnh béo phì ở cả các nước phát triển và đang phát triển cũng như sự nghiêm trọng của các hệ quả đã khiến cho bệnh béo phì trở thành mối nguy hiểm đối với sức khỏe của cộng đồng. Hiện nay, với sự phát triển của nền y học, các liệu pháp hiện đại như phẫu thuật, thuốc cùng với các liệu pháp truyền thống như thay đổi chế độ ăn và luyện tập thể chất đã được sử dụng để điều trị béo phì. Tuy nhiên, các biện pháp này hầu như vẫn tồn tại các hạn chế nhất định cũng như các phản ứng phụ hay biến chứng gây nguy hiểm cho sức khỏe bệnh nhân. Do đó, các nhà khoa học vẫn đang tiếp tục nghiên cứu về các phương thức chữa trị hoàn thiện và an toàn hơn.

Vi sinh vật với sự đa dạng về loài cũng như các hoạt động chuyển hóa đang là những đối tượng tiềm năng cho các nghiên cứu về hoạt tính sinh học cũng như tiềm năng ứng dụng vào chế tạo thuốc điều trị các loại bệnh. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy một số vi sinh vật có hoạt tính sinh học và dược học cao, đáng chú ý là khả năng giảm mỡ máu cũng như kháng viêm. Trên cơ sở là sự tích tụ mỡ và các phản ứng viêm quá mức đóng vai trò quan trọng trong sự hình thành bệnh lý cũng như tổn thương do béo phì, việc xác định được các vi sinh vật có hoạt tính kháng viêm và hạn chế sự tích tụ mỡ đóng vai trò then chốt trong việc nghiên cứu và sàng lọc những hợp chất có tiềm năng cải thiện những tổn thương gây ra do béo phì. Tuy nhiên, tới thời điểm hiện tại, cơ sở khoa học liên quan tới các hoạt tính này của vi sinh vật vẫn còn tương đối hạn chế.

Do vậy, đề tài « Đánh giá hoạt tính chống béo phì và kháng viêm của một số chủng vi sinh vật phân lập từ thực vật » được thực hiện nhằm xác định các chủng vi sinh vật phân lập từ thực vật có hoạt tính giảm mỡ máu và kháng viêm.

Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

- Đối tượng : Một số chủng vi sinh vật cộng sinh thực vật

- Phạm vi nghiên cứu : Hoạt tính chống béo phì và kháng viêm của các chủng vi sinh vật trong mô hình *in vitro*

Nội dung nghiên cứu

- Phân lập vi sinh vật từ một số loại thực vật
- Lên men, chiết tách và đánh giá hoạt tính chống béo phì và kháng viêm *in vitro* của các chủng vi sinh vật phân lập được
- Phân loại một số chủng vi sinh vật có hoạt tính chống béo phì và kháng viêm tốt.

Cơ sở khoa học và thực tiễn của đề tài:

- Sàng lọc các chủng vi sinh vật có hoạt tính chống béo phì và kháng viêm sẽ là cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn về các chất thứ cấp có hoạt tính cao cũng như cơ chế phân tử của các hoạt tính.
- Tiềm năng ứng dụng vào việc điều trị bệnh lý béo phì cũng như khắc phục các tổn thương liên quan.

Tính đóng góp của luận văn:

- Cung cấp dữ liệu về hoạt tính sinh học cơ bản của một số chủng vi sinh vật phân lập từ thực vật tại Việt Nam.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Thực trạng bệnh béo phì và các rối loạn chuyển hóa

Quá trình phát triển của xã hội hiện đại chứng kiến sự phát triển mạnh mẽ về kinh tế và công nghệ, tuy nhiên kéo theo mặt trái là vấn đề suy giảm chất lượng sống cộng đồng, đặc biệt là lối sống thụ động cùng với chế độ ăn uống kém lành mạnh. Điều này dẫn đến nhiều hệ lụy nghiêm trọng, đặc biệt là sự gia tăng các vấn đề sức khỏe như một số bệnh lý liên quan đến tim mạch, suy giảm miễn dịch và ung thư. Béo phì được định nghĩa như một loại rối loạn về chức năng sinh lý của cơ thể con người do các nguyên nhân môi trường, di truyền và nội tiết. Béo phì được coi là một phản ứng đối với các kích thích của môi trường, những khuynh hướng và bất thường về di truyền, hoặc đối với sự kết hợp của các yếu tố căn nguyên này. Bệnh béo phì liên quan đến hàng loạt triệu chứng đặc trưng và các rối loạn chuyển hóa khác [1].

Chỉ đến cuối những năm 1970, các ca bệnh béo phì mới trở nên phổ biến hơn. Tuy nhiên bắt đầu từ 1980, tỷ lệ mắc bệnh béo phì đã tăng gấp đôi ở hơn 70 quốc gia và liên tục tăng ở hầu hết các quốc gia khác. Cho đến năm 2015, số lượng người bị béo phì đã lên đến hơn 700 triệu người, trong đó 107,7 triệu (98,7-118,4) trẻ em và 603,7 triệu (588,2- 619,8) người trưởng thành trên toàn thế giới [2]. Béo phì đã trở thành một mối nguy hại đến sức khỏe của cộng đồng. Thống kê ghi nhận rằng béo phì chiếm khoảng 324 nghìn ca tử vong mỗi năm ở Mỹ và tiêu tốn khoảng 7% ngân sách chăm sóc sức khỏe, gây thiệt hại hơn 100 tỷ đô la hàng năm. Đặc biệt, béo phì được xếp thứ hai trong thống kê về nguyên nhân tử vong có thể ngăn chặn được ở Mỹ, chỉ sau hút thuốc lá [3, 4].

Sự gia tăng nhanh chóng của các ca mắc béo phì trong ba thập kỷ qua đã góp phần làm gia tăng tỷ lệ mắc các bệnh lý, bao gồm bệnh đái tháo đường típ 2, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD), hen suyễn, các loại ung thư khác nhau, bệnh tim mạch và thoái hóa thần kinh, và những bệnh khác. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra sự tích tụ của mỡ và tình trạng viêm cấp tính là một trong những tác nhân chính góp phần vào sự phát triển của những bệnh lý này [5]. Điều này được đặc trưng bởi sự gia tăng hàm lượng axit béo tự do trong máu, các yếu tố gây viêm hòa tan (interleukin IL1 β , IL-6, TNF α) cùng với sự kích hoạt và xâm nhập của các tế bào miễn dịch vào các vị trí viêm [6]. Béo phì cũng

thường bao gồm một tình trạng rối loạn lipid máu (rối loạn lipid máu do xơ vữa) đặc trưng bởi sự gia tăng của lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL), sự giảm hàm lượng các hạt lipoprotein tỷ trọng cao (HDL) và tăng triglyceride [7]

1.2 Nguồn hợp chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật cộng sinh thực vật

Để ứng phó với thực trạng gia tăng của béo phì và các rối loạn chuyển hóa, nhiều nghiên cứu đã được triển khai với mục đích tìm kiếm phương thức điều trị thích hợp và hiệu quả. Một trong những hướng nghiên cứu chính là tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học.

Từ thời cổ đại, con người đã biết sử dụng các bộ phận của nhiều loại thực vật trong các bài thuốc dân gian và ngay cả vào thời điểm hiện tại thực vật vẫn đang được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Vi sinh vật là một nhóm đối tượng nghiên cứu mới lạ và còn tương đối bí ẩn, cho đến hiện tại ước lượng ít hơn 1% vi khuẩn và ít hơn 5% các chủng nấm được xác định, hứa hẹn sự khám phá của hàng triệu loại vi sinh vật mới [8]. Những năm gần đây, sự phát triển của khoa học kỹ thuật đã giúp con người có thêm nhiều hiểu biết về phân loại, thành phần và hoạt tính của các loại vi sinh vật. Rất nhiều loại vi sinh vật, bao gồm vi khuẩn, nấm là những nguồn hợp chất hữu cơ có hoạt tính sinh học, do đó chúng đã và đang được khai thác nhằm mục đích phục vụ tổng hợp các sản phẩm dược học, các quá trình lên men trong công nghiệp. Trong đó, các hợp chất thứ cấp của vi sinh vật và thực vật đang là một trong những trọng tâm nghiên cứu và tìm hiểu. Sự đa dạng của hệ vi sinh vật hứa hẹn sự phát hiện của nhiều hợp chất mới. Bên cạnh đó, tốc độ phát triển và sinh sản nhanh chóng của vi sinh vật cũng là một ưu thế so với thực vật trong ứng dụng sản xuất các sản phẩm thứ cấp ở mô hình công nghiệp trong tương lai.

1.2.1 Chất trao đổi thứ cấp từ vi sinh vật

Trong những năm vừa qua, chúng ta đã chứng kiến những bước tiến đáng kể trong công cuộc tìm hiểu về sự tổng hợp các chất trao đổi thứ cấp từ vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn và nấm [9]. Khác với hợp chất sơ cấp là những phân tử cần thiết cho các quá trình phát triển của tế bào và có mặt ở hầu hết các loài sinh vật, hợp chất thứ cấp là những phân tử được tạo ra nhằm thực hiện các chức năng khác ngoài các cơ chế chuyển hóa cơ bản. Các hợp chất trao đổi thứ cấp được vi sinh vật tổng hợp để phục vụ các mục đích sinh tồn, trong các chức

năng sinh lý và dinh dưỡng, có tính đặc trưng cho từng loại sinh vật và liên quan mật thiết đến môi trường sống [10].

Các hợp chất trao đổi thứ cấp của vi sinh vật được cấu thành từ các chất sơ cấp và thường được phân loại dựa trên thành phần và cấu trúc hóa học của nó, bao gồm các peptide, polyketide, carbohydrate, lipid, terpenoid, steroid và alkaloid [11].

Thực tiễn và các nghiên cứu đã chứng minh các hợp chất từ vi sinh vật không chỉ có hoạt tính sinh học đa dạng mà còn có cấu trúc hóa học khá phức tạp và đa dạng. Do đó, nguồn hợp chất thứ cấp trên đã thu hút được sự quan tâm to lớn của các nhà hóa học cũng như sinh vật học, đặc biệt trong mục tiêu tìm kiếm và khám phá các loại thuốc mới. Mặt khác, thách thức đáng kể trong việc tinh chế, xác định đặc điểm cấu trúc hóa học và xác định hoạt tính sinh học đã thúc đẩy sự phát triển của các kỹ năng phòng thí nghiệm độc đáo và một nhánh hóa học dành riêng cho nghiên cứu và phát triển sản phẩm tự nhiên. Trong thực tế, lĩnh vực dược phẩm phụ thuộc vào các phân tử này để sàng lọc các nguồn cung cấp thuốc và phát triển các loại thuốc mới với hoạt lực tốt hơn cho tương lai. Do đó, trọng tâm của nghiên cứu sản phẩm tự nhiên chủ yếu tập trung vào việc xác định các phân tử mới và phương thức khai thác chúng như là liệu pháp điều trị bệnh cho con người hơn là xác định chức năng thực sự của chúng trong các sinh vật sản xuất.

1.2.2 Nguồn hoạt chất từ vi sinh vật cộng sinh thực vật

Vi sinh vật cộng sinh thực vật là định nghĩa dùng để chỉ các loại nấm hoặc vi khuẩn sống trong thực vật quyển (phytosphere) nhưng không gây tổn hại cho vật chủ. Mối quan hệ cộng sinh này thể hiện qua thực vật cung cấp không gian sống cũng như chất dinh dưỡng cho vi sinh vật và đổi lại vi sinh vật tổng hợp các hợp chất kích thích sự sinh trưởng cũng như tham gia vào các cơ chế bảo vệ thực vật khỏi các động vật và các loại tác nhân gây bệnh [12]. Do đó, những vi sinh vật này có ảnh hưởng to lớn đến quần thể thực vật và thậm chí là sự đa dạng của những sinh vật liên quan như vi khuẩn, côn trùng hay giun đất [13].

Thực vật có mối liên hệ chặt chẽ với nhiều loại VSV ở cả dưới và trên mặt đất vì lợi ích chung của chúng. Hệ VSV này đặc trưng trên từng phần bộ phận của thực vật chủ và có thể được phân loại theo chiều dọc thành hai nhóm

lớn là các vùng cơ thể thực vật phía trên mặt đất (phyllosphere) và các phần phía dưới mặt đất hay vùng rễ (rhizosphere). Ngoài ra còn có cách phân biệt theo chiều ngang, nghĩa là phân loại theo môi trường nội mô và trên bề mặt cơ thể thực vật, được gọi lần lượt là endosphere và ectosphere. Có thể nói, thực vật quyền phytosphere là nơi sống của các VSV đa dạng, bao gồm các khoảng không gian bên trong và bên ngoài bề mặt của chúng, được gọi tương ứng là endosphere và ectosphere [14].

Tại vùng thực vật dưới mặt đất, hay rhizosphere, một số VSV có thể xâm nhập vào mô bên trong rễ tạo thành VSV nội sinh rễ. Đối với trên 90% số loài thực vật, endosphere của rễ là nơi cư trú của nấm rễ nội sinh, vi khuẩn nội sinh và đôi khi là archaea nội sinh rễ [15]. Không giống như những VSV tại ectosphere, các VSV tại endosphere tương tác chặt chẽ hơn với cây chủ và có tính đặc trưng cao hơn.

Tại phyllosphere – vùng thực vật trên mặt đất, các mô bên trong lá tạo thành một môi trường hấp dẫn cho nhiều loại vi khuẩn và nấm. Bên cạnh đó, cấu trúc và thành phần các VSV nội sinh trong nội mô lá có tính đa dạng rất cao [15]. Theo Vorholt (2012), số lượng các VSV tại ectosphere của lá có thể lên đến 10^{26} tế bào, do tổng diện tích bề mặt của lá luôn ở mức rất lớn so với các bộ phận khác của thực vật [16]. Dựa trên sự so sánh các khu hệ VSV cộng sinh trong endosphere và ectosphere của các vùng thực vật trên và dưới mặt đất, một số nhà khoa học đã đưa ra giả thuyết, rằng rất có thể các VSV trong endosphere của lá có nguồn gốc từ môi trường bên ngoài, với điểm cư trú đầu tiên là trên bề mặt lá [17]. So với điều kiện môi trường tại ectosphere của rễ, bề mặt lá được đặc trưng bởi các điều kiện khắc nghiệt hơn nhiều như tiếp xúc với bức xạ tia cực tím và các stress nhiệt độ hay độ ẩm. Vì vậy các VSV tại ectosphere đã tiến hóa các cách khác nhau để thích nghi với những điều kiện khắc nghiệt này. Một trong những chiến lược đó là quang dưỡng, nhờ các protein rhodopsin của VSV tại ectosphere [18]. Các protein này có thể hoạt động như những bơm proton sản sinh năng lượng, giúp bổ sung năng lượng cho các VSV trong thực vật quyền. Điều thú vị là những protein này có thể hấp thụ ánh sáng xanh, do đó tránh được sự chòng chẹo với các sắc tố của thực vật [16].

Từ các nội dung đã trình bày trên đây có thể thấy hệ VSV cộng sinh thực vật rất đa dạng và bao gồm các nhóm phân loại có nguồn gốc và xu hướng tiến

hóa khác nhau. Các quần xã này thay đổi theo thời gian tùy thuộc vào các điều kiện môi trường sống của chúng tại các vùng thực vật.

Kể từ lần đầu được phát hiện vào năm 1904, cho đến nay hơn 1000 loài vi sinh vật cộng sinh thực vật đã được nuôi cấy trong phòng thí nghiệm và nghiên cứu về tính chất hóa học cũng như sinh học của các hợp chất thứ cấp [19]. Nhiều nghiên cứu đã xác định được cấu trúc đa dạng và hoạt tính sinh học đáng kể của các hợp chất này. Sau đây là một số hoạt tính sinh học tiêu biểu (gây độc côn trùng, kháng khuẩn, kháng nấm, kích thích sinh trưởng của cây, kháng ung thư, kháng virus và chống oxy hóa) của các vi sinh vật cộng sinh thực vật đã được khẳng định bởi các kết quả nghiên cứu trên thế giới.

Kháng khuẩn và kháng nấm

Một số chất thứ cấp từ vi sinh vật cộng sinh với thực vật đã được xác định có thể ức chế hoặc tiêu diệt nhiều loại tác nhân có hại cho thực vật, con người và động vật bao gồm các vi khuẩn, nấm, vi rút và động vật nguyên sinh. Sau đây là một số hợp chất tiêu biểu.

Phomopsichalasin, một loại cytochalsan được phân lập từ nấm *Phomopsis* sp. – cộng sinh với cây *Salix gracilostyla* var. *melanostachys*. Hợp chất này biểu hiện khả năng ức chế sinh trưởng của các vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella gallinarum*, và nấm mốc *Candida albicans* [20].

Chất thứ cấp cryptocin được phân lập từ *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* – một loại nấm cộng sinh sống trong vỏ thân cây *Tripterygium wilfordii* cho thấy khả năng chống nấm đáng kể đối với *Pyricularia oryzae* (MIC= 0,39 µg/ml) và các loại nấm gây bệnh cho thực vật khác [21].

Một chất thứ cấp lipopeptide khác- cryptocandin- cũng được tổng hợp từ nấm cộng sinh *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. Cryptocandin có hoạt tính chống lại một số loại nấm gây bệnh cho cây trồng, bao gồm cả *Sclerotinia sclerotiorum* (MIC=0,78 µg/ml) và *Botrytis cinerea* (MIC=6,2 µg/ml.). Bên cạnh các nấm gây bệnh cho thực vật, hợp chất cũng kiềm hãm sự sinh trưởng của một số có hại cho người *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* và *Trichophyton rubrum*, với MIC từ khoảng 0,03 đến 0,07 µg/ml [22].

Hợp chất 6-isoprenylindole-3-carboxylic acid là một dẫn xuất indole được phát hiện trong nấm cộng sinh *Colletotrichum* sp.. Hợp chất này có hoạt

tính kháng khuẩn tương đối với một số chủng vi khuẩn Gram dương *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* và một số chủng Gram âm *Pseudomonas* sp., với giá trị MIC từ 25 $\mu\text{g/mL}$ đến 75 $\mu\text{g/mL}$. Ngoài ra, hợp chất này cũng có tác dụng kiềm chế sự sinh trưởng của một số loại nấm gây bệnh trên cây như *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia cerealis* và *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* [23].

Hợp chất peptide colletotric acid được phân lập từ nấm *Colletotrichum gloeosporioides* sống trong thân cây *Artemisia mongolica*. Hoạt tính kháng vi sinh vật của chất thứ cấp được thể hiện thông qua việc kìm hãm sự sinh trưởng của một số vi khuẩn như *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* với giá trị MIC = 25, 50, 50 $\mu\text{g/mL}$, và nấm gây bệnh trên thực vật như *Helmintho sporium sativum* với MIC là 50 $\mu\text{g/mL}$. [24].

Kháng sinh munumbicin được tổng hợp bởi chủng *Streptomyces* sp. NRRL 30562, sống nội sinh trong cây thuốc *Kennedia nigricans*. Munumbicin cho thấy khả năng làm giảm sức sống của các vi khuẩn gram dương như *Bacillus anthracis* và *Mycobacterium tuberculosis* kháng thuốc (IC_{50} =10 $\mu\text{g/mL}$) cũng như một số vi khuẩn kháng thuốc khác như *Staphylococcus aureus* (MIC=2,5 $\mu\text{g/mL}$). Tuy nhiên, hoạt tính sinh học ấn tượng nhất là khả năng chống lại ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* của munumbicin D, trong đó nồng độ ức chế 50% là $4,5 \pm 0,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$ [25] .

Ngoài ra, hợp chất thứ cấp ester (2-methyloctanoic acid 6-oxo-2-propenyl-3,6-dihydro-2H-pyran-3-yl ester) phân lập từ một chủng nấm nội sinh sống trên cây thông rụng lá (*Larix laricina* (Du Roi) K. Koch) được xác định có hoạt tính kháng khuẩn đối với *Vibrio salmonicida*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus aureus* [26].

Chống oxi hóa

Hai hợp chất thứ cấp pestacin và isopestacin được phân lập từ dịch nuôi cấy của *Pestalotiopsi microspora*, một loại nấm sống cộng sinh trong *Terminalia morobensis*. Isopestacin có cấu trúc phân tử tương tự flavonoid và được xác định là có khả năng loại bỏ superoxide và các gốc tự do hydroxyl. Pectasin có hoạt tính chống oxi hóa trên các gốc oxi tự do gấp 11 lần so với Trolox – chất dẫn xuất của vitamin E. Cơ chế loại bỏ gốc tự do là thông qua sự phân cắt của liên kết C-H và ở một số trường hợp là liên kết O-H [27, 28].

Flavonoid là những sắc tố được tổng hợp chủ yếu trong thực vật, có cấu trúc gồm một vòng C và 2 vòng benzene. Chúng được phân loại thành 6 nhóm chính căn cứ vào carbon gắn với vòng benzene và mức độ bão hòa và oxi hóa của vòng C bao gồm anthocyanin, chalcone, flavanone, flavone, flavonol và isoflavonoid [29]. Một trong những hoạt tính nổi bật nhất của flavonoid là khả năng chống oxi hóa thông qua việc phân cắt ion kim loại để ngăn cản sự tạo thành gốc oxi hóa tự do. Nhóm catechol ở vòng benzene, liên kết đôi 2.3 của nhóm carbonyl và nhóm hydroxyl ở vị trí 3 và 5 ở vòng carbon đóng vai trò chính cho các hoạt tính của chúng [30]. Một số flavonoid đã được phân lập thành công từ các vi sinh vật sống cộng sinh với thực vật như quercetin phân lập từ *Aspergillus nidulans* và *Aspergillus oryzae* sống trên cây bạch quả *Ginkgo biloba*, curcumin phân lập từ *Chaetomium globosum* sống trên *Curcuma wenyujin*, rutin phân lập từ *Chaetomium* sp. sống trên *Nerium oleander* [31-33].

1.3 Hợp chất tự nhiên chống béo phì và kháng viêm

1.3.1 Hợp chất có hoạt tính chống béo phì từ vi sinh vật

Cho đến hiện tại, có một số loại thuốc có nguồn gốc từ vi sinh vật đã và đang được ứng dụng vào phác đồ chữa trị cho bệnh nhân béo phì.

Compactin (mevastatin) là một chất ức chế cạnh tranh 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl (HMG)-CoA reductase- enzyme điều hòa cho quá trình sinh tổng hợp cholesterol. Điều này dẫn đến kìm hãm sự chuyển hóa từ HMG sang mevalonic acid, tiền chất để tổng hợp nhiều phân tử lipid khác nhau. Hợp chất được phát hiện lần đầu bởi nhóm nghiên cứu của Brown trong dịch nuôi cấy của *Penicillium brevicompactum* [34]. Kể từ đó, nhiều vi sinh vật như *Trichoderma viridae*, *Gliocladium* sp., *Penicillium citrinum* đã được sàng lọc để tổng hợp được đồng phân có hoạt tính và hàm lượng compactin nhiều nhất [35, 36]. Dựa trên tiền đề là compactin, nhóm nghiên cứu của Endo và Albert đã thành công phân lập lovastatin (monacolin K; mevinolin) từ dịch nuôi cấy của nấm *Monascus ruber* và *Aspergillus terreus* [37, 38]. Ngoài ra, một dẫn xuất phổ biến khác đã được đưa vào ứng dụng trong điều trị của compactin là pravastatin- được tổng hợp bằng quá trình hydroxyl hóa compactin trong

Streptomyces carbophilus xúc tác bởi hệ thống cytochrome P-450sca monooxygenase [39].

Đáng chú ý, orsilat là loại thuốc duy nhất được cho phép sử dụng điều trị dài hạn cho bệnh nhân béo phì. Đây là dẫn xuất bão hòa của lipostatin- một hợp chất ức chế enzyme lipase tuyến tụy tự nhiên được tổng hợp bởi xạ khuẩn *Streptomyces toxytricini*. Cơ chế bất hoạt enzyme lipase của hợp chất là thông qua việc gắn vào vùng serine bằng liên kết hóa trị để ngăn cản sự hydrat hóa của triglyceride và sự hấp thu chất béo ở thành ruột [40, 41].

Bên cạnh các thuốc điều trị, nhiều hợp chất phát hiện trong các vi sinh vật cũng được xác định có hoạt tính chống béo phì theo các cơ chế tương đối đa dạng, điển hình như acarbose và kojic acid.

Acarbose là một tetrasaccharide thu được từ quá trình lên men của vi khuẩn *Actinoplanes utahensis*. Đây là một trong những loại thuốc phổ biến được sử dụng để điều trị bệnh nhân tiểu đường. Acarbose ức chế cạnh tranh các enzyme glucosidase có mặt tại thành ruột, qua đó ngăn cản quá trình phân giải oligosaccharide và polysaccharide thành các phân tử đường đơn có thể hấp thu được [42]. Do các cơ chế chuyển hóa đường cũng tác động nhất định đến sự tích tụ chất béo trong cơ thể nên nhiều nghiên cứu đã tập trung vào hoạt tính của acarbose đối với bệnh béo phì. Nghiên cứu của Maury (1993) đã đánh giá tác dụng của acarbose trên chuột và cho thấy cùng với sự sụt giảm của hàm lượng glucose trong máu và insulin ở plasma, các mẫu có bổ sung cũng ghi nhận các tế bào mỡ có kích thước nhỏ hơn cũng như khối lượng mô mỡ giảm. Sự bổ sung acarbose cũng khiến giảm biểu hiện của các enzyme quan trọng chuyển hóa lipid như fatty acid synthase và acetyl-CoA carboxylase [43].

Kojic acid (5-hydroxy-2-hydroxymethylgamma-pyrone) là một trong những chất thứ cấp chính được tổng hợp các chủng *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tamarii*, và *Penicillium* sp. Nghiên cứu của El-Korany đã xác định hoạt tính chống béo phì của kojic acid phân lập từ *Aspergillus oryzae* trong mô hình *in vivo*. Bổ sung hợp chất ghi nhận thấy việc hạn chế tăng cân nặng cũng như sự thèm ăn và sự giảm hàm lượng triglyceride và tổng cholesterol trong máu của chuột có chế độ ăn giàu chất béo. Cơ chế chống béo phì của kojic acid là thông qua việc ức chế enzyme lipase tuyến tụy, với khả năng bất hoạt lên đến $61.4 \pm 1.8\%$ [44].

Một chất ức chế enzyme lipase tuyến tụy khác là vibrallactone – phân lập từ dịch nuôi cấy của nấm đảm *Boreostereum Vibrans*. Hợp chất vibrallactone là một β -lactone với vòng cyclopentene. Khi sử dụng 4-methylumbelliferyl oleate (4-MU oleate), khả năng bất hoạt enzyme lipase tuyến tụy của vibrallactone được ghi nhận là 0.4 $\mu\text{g/ml}$ [45].

Nghiên cứu của Kim (2015) xác định khả năng chống béo phì của β -glucan phân lập từ *Aureobasidium* sp. trong mô hình *in vitro* và phát hiện β -glucan ở nồng độ 50 và 100 $\mu\text{g/ml}$ có thể hạn chế sự biệt hóa tế bào mỡ ở 3T3-L1 lên đến 32,8 và 39,7% so với đối chứng. Cơ chế hạn chế sự tích tụ chất béo ở mức độ tế bào của β -glucan được thực hiện dựa trên việc điều hòa quá trình phiên mã và dịch mã của $\text{PAR}\gamma$, ACC và aP2- tham gia truyền tín hiệu trong quá trình tổng hợp lipid [46].

3 α -hydroxy-pregn-7-ene-6,20-dione là một phân tử pregnane steroid được phân lập từ chủng *Cladosporium sphaerospermum* SW67 sống cộng sinh trên *Hydractinia echinata*. Hoạt tính của chất được đánh giá trên mô hình tế bào 3T3-L1 và cho thấy hợp chất có thể ngăn cản sự tích tụ của các giọt mỡ và giảm biểu hiện của Adipsin- gene marker của tế bào mỡ đã biệt hóa và FASN and SREBP1- tham gia vào quá trình phân giải lipid. Ngoài ra, sự biểu hiện của ATGL cũng được gia tăng khi bổ sung với 5 μM và 10 μM chất thử. Nghiên cứu kết luận hợp chất steroid này hạn chế sự tích tụ của lipid trong tế bào thông qua việc ngăn cản quá trình biệt hóa của tế bào mỡ đồng thời điều hòa biểu hiện của các gene liên quan đến chu trình chuyển hóa lipid [47].

1,5-Anhydro-D-fructose (1,5-AF) là một monosaccharide được phát hiện trong nấm, tảo hay *Escherichia coli*. Phân tử có cấu trúc tương tự glucose và là sản phẩm của quá trình phân giải từ tinh bột và glycogen thông qua sự xúc tác của enzyme α -1,4-glucan lyase. Nghiên cứu của Kojima-Yuasa đã xác định được hoạt tính chống béo phì của chất trong mô hình *in vitro* và cơ chế của hoạt tính. 1,5-AF có thể ngăn cản sự tích tụ của triglyceride và hạn chế hoạt động của GPDH – một enzyme quan trọng trong quá trình tổng hợp triglyceride ở tế bào 3T3-L1 chưa biệt hóa và đã biệt hóa mà không ảnh hưởng đến sức sống của tế bào. Ở mức độ phân tử, bổ sung 1,5-AF cũng làm giảm sự biểu hiện của một số nhân tố phiên mã như $\text{PPAR}\gamma$ và $\text{C/EBP}\alpha$ và kích thích quá trình phospho hóa của AMPK- phân tử truyền tín hiệu quan trọng [48].

Isofraxidin là một hợp chất coumarin được tổng hợp trong sâm Siberia (*Acanthopanax senticosus* và *Eleutherococcus senticosus*) và chủng nấm *Annulohyphoxylon bovei* var. *microspore* sống cộng sinh trên *Cinnamomum* sp. Nghiên cứu của Jian Li (2017) đã xác định được hoạt tính chống béo phì của isofraxidin thể hiện qua các mẫu chuột có chế độ ăn nhiều chất béo có bổ sung isofraxidin ghi nhận sự giảm trong cân nặng, khối lượng gan và các chỉ số liên quan đến lipid như TG, TC, HDL- cũng như các tổn thương ở gan. Hợp chất điều hòa quá trình chuyển hóa lipid và làm giảm các sự tổn thương gây ra bởi sự rối loạn chuyển hóa thông qua hạn chế sự tích tụ triglyceride, tổng hợp TNF- α và giảm hàm lượng ROS, tăng cường quá trình phosphoryl hóa AMPK α và acetyl coenzyme A carboxylase (ACC). Isofraxidin cũng hạn chế sự biểu hiện của các protein FAS và 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (HMGCS2), qua đó kiểm soát quá trình sinh tổng hợp lipid [49, 50].

1.3.2 Hợp chất có hoạt tính kháng viêm từ vi sinh vật

Phản ứng viêm là một cơ chế bảo vệ cơ thể diễn ra để chống lại các tổn thương mô và sự xâm nhập của các tác nhân ngoại lai như vi khuẩn hay virus [51]. Khi mô chịu sự kích thích của LPS, NO và những cytokine như interleukin (IL-6 và IL-1 β) cũng những tác nhân hoại tử khối u (TNF) sẽ được tổng hợp và tiết ra. Tuy nhiên, sự tổng hợp cytokine mất kiểm soát cũng dẫn đến vấn đề sức khỏe nghiêm trọng, do đó hàm lượng NO và IL thường được coi như những chỉ số đánh giá quan trọng trong việc sàng lọc thuốc cho các bệnh liên quan đến phản ứng viêm [52, 53].

Một số hợp chất được tổng hợp bởi vi sinh vật đã được ứng dụng vào để điều chế các loại thuốc có tác dụng hạn chế các phản ứng viêm và các hoạt động miễn dịch. Một trong những loại thuốc phổ biến được sử dụng trong các ca phẫu thuật và cấy ghép nội tạng là cyclosporins. Cyclosporins là những peptide dạng vòng, ưa lipid bao gồm nhiều amino acid đặc thù, được tổng hợp quá trình lên men hiếu khí của nấm mốc *Tolypocladium nivenum*. Cơ chế hoạt động của chất thông qua việc gắn vào các protein cyclophilin của các tế bào bạch cầu, đặc biệt là bạch cầu T. Phức hợp cyclosporin và cyclophilin sẽ ngăn không cho calcineurin kích hoạt quá trình phiên mã interleukin-2 (IL-2). Ngoài ra, nó cũng ngăn cản các quá trình tổng hợp và tiết lymphokine hay interleukin, do đó hạn chế hoạt động của các tế bào T [54]. Một số những loại thuốc khác

như sirolimus (rapamycin) và FK-506 (tacrolimus) được tổng hợp từ xạ khuẩn cũng hoạt động dựa trên việc tương tác với các immunophilin và ngăn cản con đường truyền tín hiệu để kích hoạt tế bào T [55].

Surfactin, một chuỗi polypeptide thường được phát hiện trong các chủng vi khuẩn *Bacillus* đã được xác nhận bởi nhiều nghiên cứu có thể hạn chế các phản ứng viêm gây ra bởi liposaccharide (LPS) thông qua sự tương tác với đại thực bào. Một cơ chế được đề xuất là thông qua ức chế cạnh tranh với phospholipase A2 trong tế bào chất, từ đó ức chế sự truyền tín hiệu [56]. Surfactin cũng có thể cản trở con đường tín hiệu tế bào nuclear factor- κ B (NF- κ B) bằng hạn chế sự tổng hợp các cytokine IFN- γ , IL-6, iNOS và NO; đồng thời giảm sự biểu hiện của TLR4 protein trong đại thực bào [57]. Ngoài ra, nghiên cứu cũng phát hiện surfactin có thể cản trở sự trình diện kháng nguyên bằng cách kiềm hãm sự biểu hiện của các thụ thể trên bề mặt đại thực bào như CD40, CD54, CD80 và MHC-II. Đồng thời, chất cũng hạn chế sự kích hoạt của tế bào T CD4+ cũng như phân giải phân tử tín hiệu κ B- α và bất hoạt IKK, Akt, JNK, p38 kinase [58]. Một cơ chế khác là surfactin điều hòa tăng sự biểu hiện của hemeoxygenase-1 (HO-1) và Nrf-2 để kích thích quá trình phosphoryl hóa STAT-3, qua đó kiềm hãm sự sản sinh NO và ROS [59].

Nghiên cứu của Xiudong Yang (2017) đã đánh giá hoạt tính chống viêm của *Eurotium amstelodami* trong mô hình *in vitro* và phân lập thành công 3 hợp chất asperflavin, neoehinulin A và preechinulin. Kết quả thí nghiệm đã cho thấy asperflavin kiềm hãm sự tiết của các cytokines như TNF- α , IL-1 β , IL-6; và sự sản xuất của iNOS trong đại thực bào RAW 264.7 chịu kích thích của liposaccharide. Đồng thời cũng ghi nhận là asperflavin không ảnh hưởng đến sự sống chết của tế bào, qua đó thể hiện tiềm năng ứng dụng như một tác nhân chống viêm trong tương lai [60]. Trước đó vào năm 2014, Xiudong và các cộng sự đã thành công phân lập hợp chất questinol cũng từ *Eurotium amstelodami* và có hoạt tính chống viêm tương tự [61]

Ngoài ra, trong một nghiên cứu khác, cristaldehydes A, cristaquinone A và tetrahydroauroglaucin, flavogalaucin, sodihydroauroglaucin, benzaldehyde và varicolorquinone B tách chiết từ *Eurotium cristatum* EN-220 có tác dụng giảm các phản ứng viêm thể hiện qua thông việc kiềm chế sự sản sinh NO được kích hoạt bởi LPS trong tế bào RAW264.7 [62].

Depsipeptides USF-19A, somalimycin và urauchimycin D tổng hợp bởi chủng *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66 đột biến có thể kiềm hãm sự tổng hợp IL-5 trong tế bào lách của chuột chịu sự kích thích của ovalbumin. Kết quả cho thấy depsipeptides USF-19A có khả năng hạn chế quá trình tổng hợp tương đối mạnh ở nồng độ 57 μM , còn somalimycin và urauchimycin D có hoạt tính yếu hơn ($>10 \mu\text{M}$). Bên cạnh đó, cả ba chất depsipeptide đều ít gây độc đối với tế bào nội mô cuống rốn người với giá trị LD50 ghi nhận được là 62,6, 34,6 và 192,9 μM [63].

Violaceomide A – một peptide dạng vòng được tổng hợp từ *Aspergillus violaceofuscus* sống trên bọt biển thể hiện hoạt tính kháng viêm qua việc hạn chế sự biểu hiện mRNA của IL-10 trong tế bào THP-1 (tế bào bệnh bạch cầu cấp tính dòng tủy) với tỉ lệ ức chế lên đến 84,3% ở nồng độ 10 μM [64].

Streptoglycerides E-H được phân lập từ xạ khuẩn *Streptomyces specialis* có cấu trúc phức hợp vòng 6/5/5. Các hợp chất này được xác định kiềm hãm sự sản sinh NO của đại thực bào RAW 264.7 dưới kích thích bởi LPS với IC₅₀ dao động từ 3,5 đến 10,9 μM . Kết quả cho thấy Streptoglycerides F hạn chế quá trình phiên mã tạo thành mRNA của iNOS và IL-6 [65].

Somalimycin một depepsitide và hai đồng phân USF-19A và urauchimycin D được phân lập từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66. Nghiên cứu của Huayue Li đã xác định hoạt tính kháng viêm của các depepsitide trên cũng như khả năng gây độc tế bào trong mô hình *in vitro*. USF-19A ức chế quá trình tổng hợp IL-5 với IC₅₀ = 0,57 μM , còn somalimycin và urauchimycin D có hoạt tính yếu hơn với IC₅₀ $> 10 \mu\text{M}$. Bên cạnh đó, các hợp chất trên cũng không có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của dòng tế bào nội mô tĩnh mạch cuống rốn của người [63].

Bên cạnh hoạt tính chống béo phì, chất thứ cấp isofraxidin cũng biểu hiện khả năng kháng viêm, thể hiện qua làm giảm số lượng tế bào miễn dịch như tế bào F4/80+ Kupffer và đại thực bào CD68 cũng như làm giảm hàm lượng hàm lượng cytokines (TNF- α , IL-6) trong tế bào gan. Cơ chế kháng viêm của isofraxidin được thực hiện dựa trên việc hạn chế sự biểu hiện của thụ thể TLR4 và NF- κB [50].

Sanguinarine là một alkaloid đặc trưng trong rễ của cây *Sanguinaria canadensis* và trong hạt của cây *Argemone mexicana* L., đã được phân lập thành

công từ nấm *Fusarium proliferatum* cộng sinh trên lá cây *Macleaya cordata* [66]. Hợp chất sanguinarine biểu hiện hoạt tính kháng viêm đáng kể trong cả mô hình thử nghiệm tế bào và chuột. Trong điều kiện *in vitro*, hợp chất alkaloid này biểu hiện tác dụng làm tăng tỉ lệ tế bào sống và hạn chế sự tổng hợp NO cũng như TNF-a ở đại thực bào khi bị kích thích bởi LPS. Đồng thời, trên chuột thí nghiệm, sanguinarine cũng cải thiện hiện tượng sưng viêm ở tai cũng như bàn chân chuột. Hoạt tính chống viêm của sanguinarine được xác định là có cơ chế từ khả năng hạn chế sự hoạt hóa của MAPK để ngăn cản sự truyền tín hiệu trong tế bào [67].

Chương 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian thực nghiệm: từ tháng 10/2021 đến tháng 9/2022.

Địa điểm nghiên cứu: Viện Hóa học Các hợp chất Thiên nhiên – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2 Nguyên vật liệu

2.2.1 Vật liệu thí nghiệm

Nguồn vi sinh vật

Các chủng vi sinh vật được kế thừa từ các chủng lưu giữ tại Phòng sinh học thực nghiệm của Viện Hóa học Các hợp chất thiên nhiên và được phân lập từ lá của cây chè (*Camellia sinensis*), chè hoa vàng (*Camellia chrysantha*) và rễ bần (*Sonneratia caseolaris*, *Sonneratia apetala*).

Dòng tế bào

Tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 (ATCC TIB 71) được lưu giữ và duy trì tại Phòng sinh học thực nghiệm - Viện Hóa học Các hợp chất thiên nhiên.

2.2.2 Dụng cụ, thiết bị thí nghiệm

Một số dụng cụ cơ bản sử dụng trong nghiên cứu gồm có:

- Dụng cụ trong các thí nghiệm vi sinh vật: Đĩa petri, que cấy, ống Cryotube để giữ giống, các loại ống đong 100 – 500 – 1000 mL, bình tam giác 500 – 1000 mL, v.v.;

- Một số dụng cụ trong thử nghiệm hoạt tính sinh học: Bình nuôi cấy tế bào (Corning flasks from sizes T25 - T300), phiến 24 giếng, phiến 96 giếng (Corning), micropipet, pipet pasteur, v.v.

Các thiết bị chính sử dụng trong nghiên cứu bao gồm:

- Thiết bị sử dụng trong các thí nghiệm vi sinh vật: Tủ cấy vô trùng (Sanyo, Nhật), máy nuôi lắc (IKA, Đức), máy hút cô quay (Eyela, Nhật), v.v.;
- Một số thiết bị sử dụng trong thử nghiệm hoạt tính sinh học: Máy đọc đĩa F150 (Tecan, Thụy Sĩ), máy ly tâm (Hettich, Đức), máy PCR (MasterCycler EP Gradient S cyclers, Đức), v.v..

2.2.3 Hóa chất

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật: Nghiên cứu sử dụng một số môi trường nuôi cấy vi sinh vật cơ bản đặc trưng cho các nhóm nấm (môi trường PDA), vi khuẩn (môi trường LB), xạ khuẩn (môi trường ISP1, ISP3, ISP4). Thành phần của các môi trường cơ bản này như sau:

Tên môi trường	Thành phần (g/L)	Ghi chú
PDA	<ul style="list-style-type: none"> ○ Khoai tây 200 ○ Glucose 20 ○ Agar 15 	pH=7,0
LB	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tryptone 10 ○ Cao nấm men 5 ○ NaCl 10 ○ Agar 15 	pH=7,0
ISP1	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tryptone 5 ○ Cao nấm men 3 	pH=7,0
ISP3	<ul style="list-style-type: none"> ○ White oat 20 	<p>pH=7,0</p> <p>Bổ sung 1 mL Dung dịch vết gồm có (0.1 g FeSO₄ x 7H₂O. 0.1 g MnCl₂ x 4H₂O. 0.1 g ZnSO₄ x 7H₂O. 100 mL dH₂O)</p>
ISP4	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tinh bột tan 10 ○ MgSO₄ x 7H₂O 5 ○ NaCl 1 ○ (NH₄)₂SO₄ 2 ○ CaCO₃ 2 ○ Agar 15 	<p>pH=7,0</p> <p>Bổ sung 1 mL Dung dịch vết gồm có (0.1 g FeSO₄ x 7H₂O. 0.1 g MnCl₂ x 4H₂O. 0.1 g ZnSO₄ x 7H₂O. 100 mL dH₂O)</p>

Môi trường nuôi cấy tế bào:

- Môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) có bổ sung L-glutamine, sodium piruvat, NaHCO₃, PSF (penicillin - streptomycin sulfate - fungizone); NAA (non-essential amino acids); 10% FBS, bổ sung kháng sinh (100 đơn vị/mL penicillin; 100 mg/mL streptomycin).

Thuốc thử, oligonucleotides:

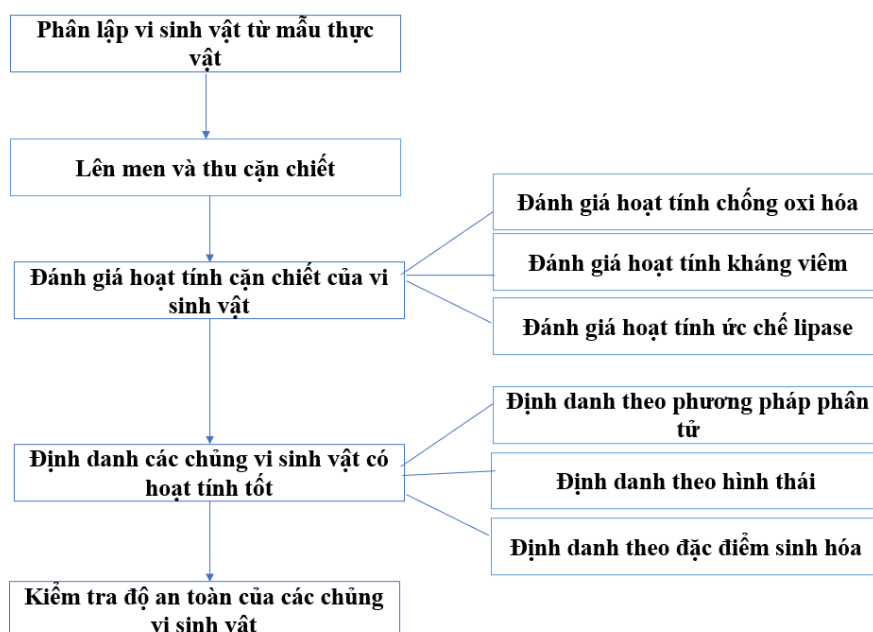
- Kit nhuộm Gram (HiMedia, Ấn Độ);
- Kit định danh API 20E (Biomérieux, Pháp);
- Thuốc nhuộm MTT (Sigma-Aldrich, Đức)
- DPPH (Sigma-Aldrich, Đức);
- Cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')
- Cặp mồi 533F (5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3') và 1496R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

Một số hóa chất khác

- Trypsin-EDTA 0,05%; DMSO (dimethyl sulfoxide); TCA (trichloro acetic acid); Tris Base; PBS (phosphate buffered saline); SRB (sulfo rhodamine B); acetic acid.
- Griess reagent system (Promega, USA), LPS (lipopolysaccharide) (Thermo Fisher Scientific, USA);
- Chất chuẩn: ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Đức), orlistat (Merck, Đức), dexamethasone (Merck, Đức)
- Agarose (Promega, USA).

2.3 Phương pháp nghiên cứu

Đề tài đã được thực hiện theo sơ đồ tổng quát Hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát

2.3.1 Phân lập vi sinh vật

- Để phân lập VSV từ vùng rễ cây bản, tiến hành rũ đất cơ học, chỉ giữ lại vùng đất bám trên rễ. Cắt các đoạn rễ chứa đất bám, hòa vào dung dịch đệm peptone và lắc đều trong 10 phút, rồi thu dịch, pha loãng liên tục và thực hiện cấy trải trên đĩa thạch chứa các môi trường khác nhau (môi trường PDA bổ sung hỗn hợp kháng sinh, môi trường ISP, LB).
- Phân lập các VSV nội sinh từ lá chè theo phương pháp khử trùng bề mặt mô tả bởi Strobel & Daisy [68]. Cụ thể, các mẫu thực vật được rửa 3 lần với nước vô trùng, sau đó được khử trùng bề mặt mẫu lần lượt với ethanol 10%, sodium hypochlorite, ethanol 10%, và rửa lại với nước muối sinh lý vô trùng. Cắt mẫu thành từng đoạn nhỏ, đặt trên đĩa thạch chứa các môi trường khác nhau (môi trường PDA bổ sung hỗn hợp chất kháng sinh, môi trường ISP, LB).
- Ủ đĩa tại 25°C trong 24h đến 7 ngày (đối với vi khuẩn), 5-14 ngày (đối với nấm/xạ khuẩn) cho tới khi khuẩn lạc xuất hiện. Mỗi nồng độ pha loãng được lặp lại 3 lần. Các khuẩn lạc được chọn, dựa vào kích thước, màu sắc, hình dáng và đặc điểm hình thái khác. VSV được lưu giữ tại 4°C, 1 tháng cấy chuyển sang môi trường mới 1 lần.
- Lựa chọn và phân loại sơ bộ các chủng vi sinh vật:

- + Phân loại sơ bộ các chủng nấm và xạ khuẩn theo phương pháp hình thái bằng cách quan sát hệ sợi nấm và các cơ quan sinh sản của nấm và so sánh với khóa phân loại vi nấm.
- + Phân loại sơ bộ các chủng vi khuẩn theo phương pháp nhuộm Gram và thực hiện một số phản ứng hóa sinh và so sánh với khóa phân loại vi khuẩn.
- Các chủng vi sinh vật thuần khiết được lưu trữ trong dung dịch glycerol 20% tại -80°C .

2.3.2 Lên men và thu dịch chiết

Các chủng nấm được nuôi cấy ở 25°C trong 14 ngày trong 150 ml dịch khoai tây dextrose (PDB) trong máy nuôi lắc (200 rpm). Tương tự, các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn được nuôi cấy ở 25°C trong 14-28 ngày trong 150 ml môi trường dịch thể (LB, ISP4). Dịch lên men bao gồm sinh khối (nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn) tách chiết sử dụng ethyl acetate (EtOAc, China) (với tỉ lệ thể tích 1:1) [69] Dịch chiết thô thu được sau khi sử dụng máy hút cô quay (EYELA, Japan) để loại bỏ dung môi. Sau đó, hòa tan dịch chiết thô với dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma Aldrich, Đức) để xác định hoạt tính.

2.3.3 Xác định hoạt tính chống oxi hóa

Hoạt tính chống oxi hóa của mẫu được xác định theo phương pháp đánh giá bằng DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) [70]. Khi bổ sung các chất thử nghiệm vào hỗn hợp DPPH, các chất thử trung hòa các gốc tự do sẽ khiến tín hiệu cường độ hấp thụ ánh sáng của các gốc tự do giảm đi.

Hỗn hợp phản ứng bao gồm 10 μL dịch chiết ở các dải nồng độ khác nhau và 190 μL dung dịch DPPH được ủ ở 37°C trong 30 phút với điều kiện tránh ánh sáng. Độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 515 nm với đối chứng âm được chuẩn bị tương tự sử dụng 1 % DMSO thay vì dịch chiết và đối chứng dương Ascorbic acid. Kết quả tính bằng trung bình của ít nhất 3 lần lặp lại $\pm \sigma$ ($p \leq 0,05$).

Khả năng trung hòa các gốc tự do (Scavenging capacity, SC%):

Giá trị trung bình SC (%) ở các nồng độ mẫu thử được tính toán trong phần mềm Excel dựa theo công thức:

$$SC (\%) = \left(\frac{OD \text{ thí nghiệm} - OD \text{ mẫu trắng}}{OD \text{ chứng âm tính}} \times 100 \right) \pm \sigma$$

Độ lệch tiêu chuẩn σ xác định dựa trên công thức Ducan:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Giá trị SC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$): Giá trị SC₅₀ là nồng độ của chất thử có thể trung hòa 50% các gốc tự do, tính trên phần mềm *TableCurve AISN Software* (Jandel Scientific) bằng dãy nồng độ chất thử và giá trị SC% tương ứng.

2.3.4 Xác định hoạt tính kháng viêm

Thử nghiệm hoạt tính kháng viêm được thực hiện dựa vào phương pháp của Chen & cs. (2008) và Tsikas (2007) dựa trên khả năng ức chế sản sinh nitric oxide (NO) trên tế bào đại thực bào chuột [71, 72]. Khi được kích thích bằng lipopolysaccharide (LPS), đại thực bào đáp ứng bằng các điều hoà nội bào và tiết ra các phân tử NO kém bền và chuyển hóa trong môi trường thành nitrite. Hợp chất có hoạt tính kháng viêm đối với dòng tế bào này được xác định dựa vào khả năng giảm lượng NO tiết ra trong tế bào. Nồng độ nitrite trong môi trường được xác định bằng phản ứng tạo phức màu với thuốc thử Griess (Sulfanilamide và *n*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride).

Nuôi cấy tế bào

Tế bào RAW 264.7 được nuôi ở 37°C trong điều kiện 5% CO₂ sử dụng DMEM có bổ sung 10% FBS, 100 đơn vị/ml penicillin và 100 mg/ml streptomycin.

Phương pháp thử khả năng gây độc tế bào

Tỉ lệ sống chết của đại thực bào RAW 264.7 có bổ sung cặn chiết của nấm được đánh giá bằng phương pháp (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) [73]. Các tế bào (5×10^4 tế bào/1 giếng) tại pha tăng trưởng được bổ sung các nồng độ dịch chiết (200-100-50 $\mu\text{g/mL}$) và 1 $\mu\text{g/mL}$ lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich, Đức). Sau 36 giờ, bổ sung thuốc nhuộm MTT (Sigma-Aldrich, Đức) (0,5 mg/ml) vào các giếng và ủ (4h,

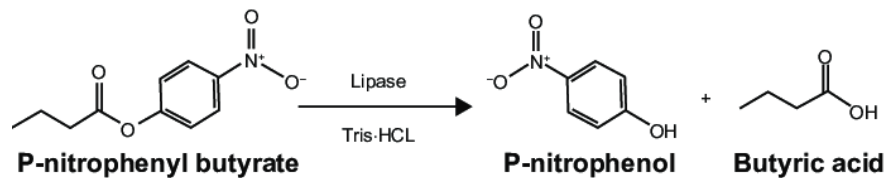
37°C, 5% CO₂). Các tinh thể formazan màu xanh được hòa tan trong DMSO và xác định tại bước sóng 570 nm.

Thử hoạt tính kháng viêm

Tế bào RAW 264.7 được cấy vào phiên 96 giếng ở mật độ 1×10^5 tế bào/1 giếng. Sau khi ủ tế bào trong môi trường 1% FBS trong 6 giờ, một số mẫu được bổ sung thêm cặn chiết nấm (37°C, 5% CO₂, 24 h) và kích thích bằng 1 µg/LPS trong 24h. Kết tủa được dùng để xác định hàm lượng nitric oxide (NO) được tổng hợp bằng phản ứng thuốc thử Griess (1% sulfanilamide và 0,1% N-1-naphtylethylenediamine dihydrochloride trong 2,5% H₃PO₄) (Sigma-Aldrich, Đức) (30°C, 20 phút) và đo độ hấp thụ tại bước sóng 550 nm.

2.3.5 Xác định hoạt tính ức chế lipase

Phương pháp thử nghiệm khả năng ức chế enzyme lipase được thực hiện theo tài liệu của tác giả Lewis (2012) [74]. Nguyên tắc của phương pháp dựa trên phản ứng xúc tác bởi enzyme lipase, thủy phân cơ chất *p*-nitrophenyl butyrate thành *p*-nitrophenol có màu vàng, hấp thụ tối đa ánh sáng ở bước sóng 405 nm. Phản ứng được xúc tác bởi lipase diễn ra như sau:



Chuẩn bị enzyme

Enzyme PPL được hòa trong dung dịch đệm phosphate 50 mM (pH=7) với nồng độ 1 mg/ml, sau đó ly tâm tại 12000 x g (5 min) để thu dịch enzyme hòa tan. Nồng độ stock của dung dịch enzyme là 0,1 mg/mL, tương ứng với 1 mg PPL thô hòa trong 1 mL dung dịch đệm.

Chuẩn bị cơ chất, chất thử

Mẫu thử và chất đối chứng dương orlistat được hòa tan trong dung môi dimethylsulfoxide (DMSO) 100% trước khi tiến hành phản ứng thử nghiệm. Cơ chất *p*NPB được hòa tan trong dung môi DMSO nồng độ 1%, sau đó tiếp tục pha loãng trong dung dịch đệm để đạt đến nồng độ thích hợp cho phản ứng.

Phản ứng enzyme

Xác định hoạt tính ức chế enzyme PPL dựa trên xác định sự thủy phân cơ chất pNPB thành p-nitrophenol trên phiên 96 giếng, đo tại bước sóng 405 nm bằng máy đọc TECAN. Hỗn hợp phản ứng gồm chất thử nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$, PPL và pNPB nồng độ 25 mM/mL trong dung dịch đệm (50mM potassium phosphate buffer, pH 7,2, 0,5% Triton X-100). Hỗn hợp được ủ tại 37°C trong 20 phút.

Tính kết quả

Độ ức chế enzyme lipase được tính toán dựa trên tỉ lệ phần trăm hoạt độ giảm tại điều kiện chuẩn (37°C) khi ủ với PPL có bổ sung chất ức chế.

$$\% \text{ Ức chế} = 100 * (\Delta \text{Đối chứng} - \Delta \text{Mẫu}) / \Delta \text{Đối chứng}$$

Trong đó: $\Delta_{\text{đối chứng}} = Abs_{\text{đối chứng}} - Abs_{\text{blank}}$; $\Delta_{\text{mẫu}} = Abs_{\text{mẫu}} - Abs_{\text{blank}}$

Đối chứng dương: Orlistat; Đối chứng âm: DMSO. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, giá trị Abs của mẫu được tính dựa trên trung bình cộng của độ hấp thụ đo được tại bước sóng 405 nm.

2.4. Định danh chủng vi sinh vật

2.4.1 Định danh theo hình thái

Chủng vi sinh vật tinh sạch được phân loại dựa trên một số đặc điểm hình thái như hình dạng và màu sắc khuẩn lạc, tốc độ sinh trưởng trong môi trường PDA, ISP4, LB và hình dạng của các cấu trúc sinh sản cũng như cấu trúc sợi (đối với nấm).

2.4.2 Định danh theo phương pháp phân tử

Phương pháp tách DNA của mẫu nấm được thực hiện theo phương pháp của Mishira [75]. Sợi nấm được cho vào dung môi tách (0.1M Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 2,5M NaCl, 3,5% CTAB, 150 μL 20mg/mL protease K) trong ống 1,5 mL có hạt thủy tinh (0,5-1mm). Sau khi ly tâm 10000 rpm trong 10 phút, thu kết tủa và bổ sung một lượng tương đương hỗn hợp phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) trước khi cho vào dung môi chloroform. Hỗn hợp được bổ sung isopropanol để kết tủa DNA. Sau khi ly tâm và rửa bằng

ethanol 70% và TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), thu được tổng lượng DNA của chủng nấm.

Phương pháp tách DNA của vi khuẩn bao gồm các bước: Vi khuẩn được nhân sinh khối trong 5mL môi trường LB tại 150 rpm, 28-30°C trong 16 giờ. Chuyển dịch nuôi cấy vào ống eppendorf 1.4 mL và ly tâm lạnh ở 5000 rpm trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi. Cặn tế bào thu được hòa trong 567 μ L dung dịch đệm TE, 5 μ L dung dịch lysosome, ủ 37°C trong 20 phút. Bổ sung 3 μ L dung dịch protease K, 30 μ L SDS 10%, ủ 37°C trong 30 phút. Tiếp theo, bổ sung 100 μ L dung dịch NaCl 5M, mix đều, bổ sung tiếp 80 μ L dung dịch CTAB/NaCl (10% cetyltrimethylammonium bromide, 0.7M NaCl) trộn đều, ủ 65°C trong 10 phút. Hỗn hợp được bổ sung hỗn hợp chloroform: isoamyl (24: 1), ly tâm 12000 rpm, 20 phút, thu kết tủa DNA. Sau khi ly tâm và rửa bằng ethanol 70% và TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), thu được tổng lượng DNA của chủng vi sinh.

Độ tinh sạch của lượng DNA được xác định bằng phương pháp điện di DNA trên 0.8% agarose gel. Sau đó, DNA của các chủng nấm được sử dụng làm khuôn cho quá trình nhân lên của các đoạn ITS của nấm sử dụng primer ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [76]. Quá trình PCR khởi đầu với giai đoạn biến tính ở 95°C trong 3 phút, sau đó là 30 chu trình biến tính ở 94°C trong 30 giây, ủ ở 50°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 30s, giai đoạn kéo dài lần cuối mất 10 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được đánh giá thông qua điện di trên 0.8% agarose gel. Sau đó, trình tự ITS được so sánh với các trình tự trong GenBank sử dụng công cụ tìm kiếm BLASTn. Phần mềm MEGA 7 được sử dụng để phân tích chuỗi trình tự và xây dựng cây phả hệ của chủng nấm. Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được lựa chọn để định danh dựa trên sự sánh trình tự 16S rRNA. Sử dụng cặp mồi 533F (5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3') và 1496R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') để khuếch đại đoạn 16S rRNA của vi khuẩn phân lập được.

2.4.3 Định danh theo đặc điểm sinh hóa

Một số đặc điểm sinh hóa của các chủng vi sinh vật cũng được xác định thông qua các thí nghiệm. Hoạt tính enzyme của các chủng nấm được xác định bằng việc quan sát sự thay đổi của quần thể trên đĩa agar có chứa các hợp chất

theo như phương pháp của Bravo [77]. Khả năng đồng hóa nguồn carbon của các chủng xạ khuẩn được xác định thông qua việc bổ sung môi trường ISP4 với một số nguồn carbon khác nhau, gồm maltose, sucrose, glucose, inositol và CMC.

Các đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn được xác định bằng kit định danh API 20E (Biomerieux, Pháp).

2.5. Kiểm tra độ an toàn của chủng vi sinh vật trong mô hình *in vivo*

Kiểm tra độ an toàn của chủng nấm trên chuột BALB/c được thực hiện theo phương pháp của Carter [78]. Chuột nhắt trắng BALB/c (6 tuần tuổi, 18–20 g, n=10) tiêm 0,5 mL môi trường brain heart infusion (BHI) (Merck, Germany) có chứa bào tử nấm theo vào khoang bụng (IP) hoặc 0,2 mL thông qua đường tĩnh mạch (IM). Tình trạng sức khỏe của các mẫu chuột được kiểm tra định kỳ trong 10 ngày kể từ lúc tiêm.

2.6. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và dữ liệu được biểu thị bằng trung bình \pm độ lệch chuẩn được tính toán qua phần mềm Microsoft Excel 2010.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập các vi sinh vật cộng sinh thực vật

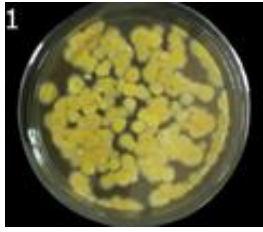
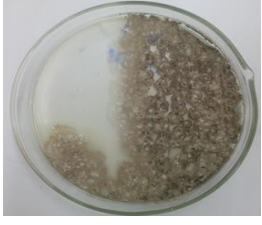
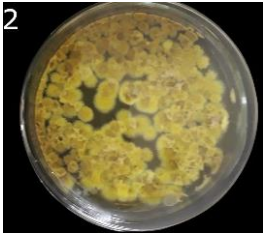
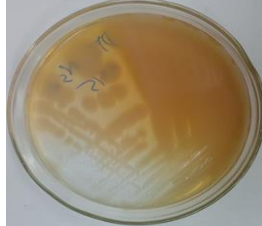
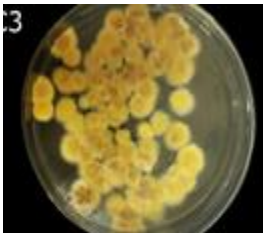

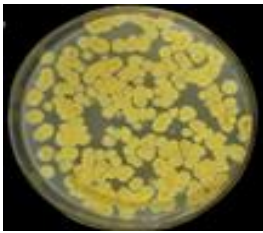




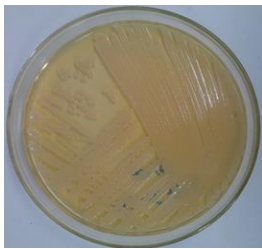
Nhóm nghiên cứu đã tiến hành phân lập và tinh sạch từ các mẫu thực vật cũng như hoạt hóa 19 chủng vi sinh vật thuộc các nhóm nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn. Bảng 3.1 mô tả kí hiệu chủng vi sinh vật và nguồn thực vật sử dụng.


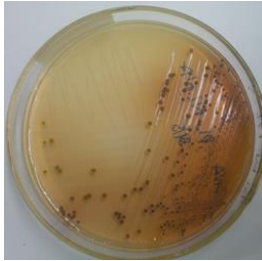
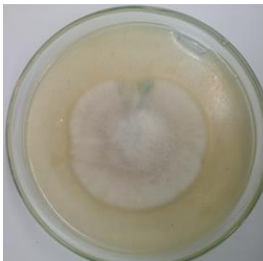
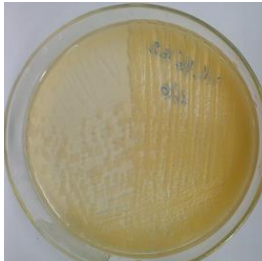

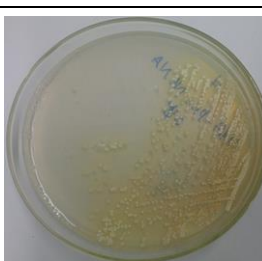
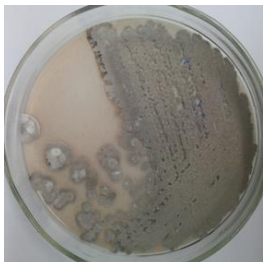
Bảng 3.1. Danh sách các chủng vi sinh vật cộng sinh thực vật phân lập được.

TT	Ký hiệu chủng	Nguồn thực vật phân lập	Phân loại
1	C1	<i>Halophila ovalis</i>	Nấm
2	C2	<i>Halodule pinifolia</i>	Nấm
3	C3	<i>Camellia sinensis</i>	Nấm
4	C6	<i>Camellia chrysantha</i>	Nấm
5	C7	<i>Camellia chrysantha</i>	Nấm
6	C8	<i>Camellia chrysantha</i>	Nấm
7	C10	<i>Sonneratia caseolaris</i>	Nấm
8	C11	<i>Sonneratia caseolaris</i>	Nấm
9	C13	<i>Sargassum crassifolium</i>	Xạ khuẩn
10	C14	<i>Sonneratia caseolaris</i>	Xạ khuẩn
11	C17	<i>Sonneratia apetala</i>	Xạ khuẩn
12	C18	<i>Halophila ovalis</i>	Vi khuẩn
13	C19	<i>Camellia sinensis</i>	Vi khuẩn
14	C20	<i>Camellia sinensis</i>	Vi khuẩn
15	C21	<i>Camellia sinensis</i>	Vi khuẩn
16	C23	<i>Camellia chrysantha</i>	Vi khuẩn
17	C24	<i>Camellia chrysantha</i>	Vi khuẩn
18	C25	<i>Sonneratia caseolaris</i>	Vi khuẩn
19	C26	<i>Sonneratia caseolaris</i>	Vi khuẩn

Sau khi được phân lập, các chủng vi sinh vật được quan sát hình thái (bảng 3.2), sau đó nuôi trên môi trường dịch thể để thu nhận sinh khối cũng như dịch nuôi, chiết 3 lần với dung môi etylaxetat (EtOAc).

Bảng 3.2: Hình thái các chủng vi sinh vật đã phân lập trên đĩa thạch.

T T	Ký hiệu chủng	Hình thái trên đĩa thạch	Môi trường	TT	Ký hiệu chủng	Hình thái trên đĩa thạch	Môi trường
1	C1		PDA	11	C17		ISP4
2	C2		PDA	12	C18		LB
3	C3		PDA	13	C19		LB
4	C6		PDA	14	C20		LB
5	C7		PDA	15	C21		LB
6	C8		PDA	16	C23		LB

7	C10		PDA	17	C24		LB
8	C11		PDA	18	C25		LB
9	C13		ISP3	19	C26		LB
10	C14		ISP4				

Cặn chiết EtOAc thu được sau khi loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm sẽ được sử dụng để xác định hoạt tính sinh học. Các kết quả thử nghiệm của 19 cặn chiết được trình bày lần lượt từ mục 3.2 đến 3.4 sau đây.

3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết các mẫu vi sinh vật đối với DPPH được thể hiện qua các giá trị SC% và SC₅₀. DPPH là một gốc tự do có nguyên tử N với electron tự do có thể bắt cặp với gốc hydro từ chất có hoạt tính chống oxy hóa trong dung môi EtOH bão hòa. Sự bắt cặp này làm mất màu tím đặc trưng của dung dịch DPPH do đó khả năng bắt hoạt và loại bỏ các gốc oxy hóa tự do của mẫu thể hiện qua độ mất màu của DPPH [79]. Giá trị SC% của các cặn chiết vi sinh vật ở nồng độ 200 µg/mL được ghi nhận qua bảng 3.3.

Bảng 3.3. Khả năng loại bỏ gốc DPPH của các căn chiết vi sinh vật

TT	Mẫu	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	SC%	SC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	Đối chứng dương (ascorbic acid)	50	87,48 \pm 0,38	9,75
	Đối chứng âm (DMSO+DPPH)	-	0,0 \pm 0,0	-
1	C1	200	85,36 \pm 0,03	96,07
2	C2	200	58,62 \pm 0,03	167,11
3	C3	200	39,38 \pm 0,07	>200
4	C6	200	35,34 \pm 0,07	>200
5	C7	200	18,13 \pm 0,01	>200
6	C8	200	80,54 \pm 0,08	121,12
7	C10	200	29,23 \pm 0,12	>200
8	C11	200	26,44 \pm 0,09	>200
9	C13	200	70,19 \pm 0,23	108,74
10	C14	200	35,06 \pm 0,05	>200
11	C17	200	17,20 \pm 0,21	>200
12	C18	200	41,35 \pm 0,12	>200
13	C19	200	30,05 \pm 0,08	>200
14	C20	200	77,18 \pm 0,16	115,71
15	C21	200	16,67 \pm 0,12	>200
16	C23	200	21,93 \pm 0,18	>200
17	C24	200	28,47 \pm 0,08	>200
18	C25	200	11,28 \pm 0,02	>200
19	C26	200	27,07 \pm 0,20	>200

Theo như kết quả thí nghiệm, 5 trong 19 mẫu có giá trị $SC > 50\%$ ở nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$. Dịch chiết thô của mẫu C2 cho thấy hoạt tính chống oxi tương đối, với tỉ lệ loại bỏ gốc oxi hóa tự do 58,62% và giá trị SC_{50} là 167,11 $\mu\text{g/mL}$. Mẫu C1 và C8 có khả năng loại bỏ gốc oxi hóa tự do tốt hơn, với $SC\%$ lên đến 80-85% và giá trị SC_{50} tương ứng là 96,07 $\mu\text{g/mL}$ và 121,12 $\mu\text{g/mL}$. Khả năng loại bỏ gốc oxi hóa DPPH của dịch chiết C13 và C20 cũng tương đối đáng kể, với tỉ lệ lên đến $70,19 \pm 0,23\%$ và $77,18 \pm 0,16\%$.

Kết quả này tương đồng với kết quả một số nghiên cứu trước đây. Nhóm nghiên cứu của Miyake (2009) đã xác định hoạt tính của chủng *Eurotium herbariorum* NE-1 và NE-4. Dịch chiết của cả hai chủng đều cho thấy khả năng loại bỏ gốc oxi hóa tự do đáng kể trên DPPH, với $SC\%$ là $82,3 \pm 4,7\%$ đối với *E. herbariorum* NE-1 và $85,8 \pm 3,5\%$ đối *E. herbariorum* NE-4 [80]. Một nghiên cứu khác của Miyake (2014) tiếp tục xác định khả năng loại bỏ gốc oxi hóa tự do DPPH các chủng nấm thuộc chi *Eurotium* phân lập từ karebushi. Giá trị $SC\%$ của *E. herbariorum* NU-2 và *E. repens* KBN2062 được ghi nhận là 60,3% và 63,5% [81].

Nghiên cứu của Radiastuti (2021) xác định hoạt tính chống oxi hóa của 34 chủng nấm cộng sinh với cây rau má *Centella asiatica*. Trong số đó, dịch chiết của các chủng nấm *Perenniporia tephropora* MB5 (52,70 ppm) và *Fusarium falciforme* 2 MB8 (79,81 ppm) cho thấy hoạt tính chống oxi hóa tương đối mạnh [82].

Nghiên cứu của Choi (2020) xác định hoạt tính chống oxi hóa của một số chủng xạ khuẩn phát hiện trong chất lắng ở đáy biển. Trong số 7 chủng vi sinh vật, cặn chiết của *Streptomyces* sp. SCS525 và *Planomicrobium* sp. SCS1153 có hoạt tính chống oxi hóa đáng kể hơn, với giá trị IC_{50} là $0,516 \pm 0,002$ và $0,526 \pm 0,004$ đối với DPPH [83].

Trong nghiên cứu của Kemung (2020), chiết xuất của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. MUSC 14 phân lập từ đất trong rừng ngập mặn đã được phát hiện có hoạt tính chống oxi hóa đối với ABTS, với tỉ lệ trung hòa $62,71 \pm 3,30\%$ ở nồng độ 4 mg/mL . Ngoài ra, khả năng trung hòa gốc oxi hóa tự do DPPH của chiết xuất MUSC 14 được ghi nhận là $24,71 \pm 2,22\%$ ở nồng độ 4 mg/mL [84].

Nghiên cứu của Pieniz (2015) đã phát hiện hoạt tính chống oxi hóa tương đối của một số chủng vi khuẩn *Enterococcus*. Hoạt tính đáng chú ý nhất được

ghi nhận ở chủng *E. faecium* 3, với khả năng trung hòa 92,5% đối với ABTS và $EC_{50} = 7,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ đối với DPPH [85].

Stress oxy hóa (Oxidative stress) được sử dụng để chỉ sự mất cân bằng giữa hàm lượng gốc oxy hóa tự do (ROS) được tổng hợp trong môi trường nội mô và các cơ chế chống oxy hóa để loại bỏ chúng [86]. Do sự giàu năng lượng của các gốc oxy hóa tự do, stress oxy hóa có thể làm thay đổi cấu trúc và chức năng của nhiều các phân tử quan trọng như lipid, protein hay DNA, do đó ảnh hưởng đến sự ổn định của các bào quan cũng như tế bào. Các tế bào hoại tử và mạng lưới nội chất bị tổn thương sẽ giải phóng các phân tử nội bào và ngoại bào, hoạt động như các alarmins kích hoạt các phản ứng miễn dịch nhận diện bởi thụ thể PRRs. Bên cạnh đó, các phân tử lipid và protein bị oxy hóa cũng có thể tạo ra các epitopes, kích hoạt các phản ứng miễn dịch thông qua việc gắn với các thụ thể PRRs [87]. Một ví dụ về các phân tử lipid bị oxy hóa đó là 1-palmytoyl-2-arachidonyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine có thể kích hoạt các phản ứng miễn dịch [88]. Các gốc oxy hóa cũng có thể tái lập trình các tế bào miễn dịch trên cơ sở điều hòa các tín hiệu phụ thuộc vào TLR. Cơ chế này phụ thuộc chính vào kích thích quá trình xuất bào của thụ thể TLR4 từ các khoang trong tế bào chất [89].

Tình trạng stress oxy hóa cũng tương đối phổ biến trong các ca bệnh béo phì do nhiều tác nhân như hàm lượng lipid trong mô tăng, sự thiếu hụt khoáng chất và vitamin, hàm lượng đường trong máu cao, các hoạt động của cơ cần tăng tương ứng với cân nặng, sự rối loạn chức năng ti thể và chế độ ăn [90-93]. Hàm lượng gốc oxy hóa tự do tăng cao góp phần vào sự hình thành của một loạt các bệnh lý liên quan đến béo phì như kháng insulin và tiểu đường, bệnh lý liên quan đến tim mạch, hen suyễn, sự hình thành các khối u, các vấn đề về khớp và suy thận [94, 95]. Một số nghiên cứu đã chỉ ra ROS là một trong những tác nhân chính tăng nguy cơ mắc bệnh tiểu đường tuýp 2 ở người béo phì thông qua hai cơ chế chính: rối loạn chức năng tế bào β và kháng insulin. Sự tổng hợp ROS có khả năng hoạt hóa các phân tử tín hiệu nhạy cảm với stress như *c-jun*-N-terminal kinase (JNK), threonine kinase, qua đó dẫn đến sự phosphoryl hóa các thụ thể insulin và ngăn cản các con đường dẫn truyền tín hiệu của insulin [96]. ROS làm giảm sự biểu hiện của gene và qua đó hạn chế sự tổng hợp insulin thông qua cơ chế điều hòa sau dịch mã hai nhân tố phiên mã, musculoaponeurotic fibrosarcoma protein A (MafA) và pancreatic duodenal

homeobox-1 (PDX-1), gắn vào vùng promoter gene của insulin để bắt đầu quá trình phiên mã [97, 98].

Do đó, việc trung hòa các gốc oxi hóa tự do cũng góp phần thiết yếu trong việc hạn chế phản ứng viêm cũng như cải thiện các tổn thương gây ra do béo phì.

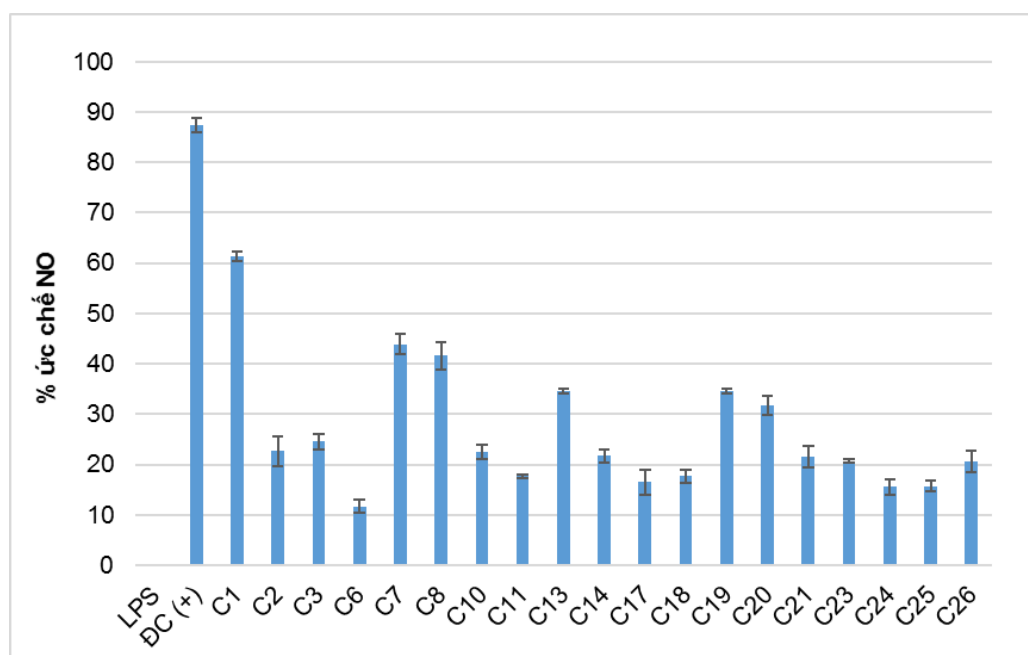
3.3. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng viêm

3.3.1 Khả năng gây độc tế bào

Khả năng gây độc của các cặn chiết vi sinh vật ở nồng độ từ 25 đến 100 $\mu\text{g/mL}$ đối với sự sinh trưởng của các đại thực bào RAW 264.7 được đánh giá dựa trên tỉ lệ tế bào sống sót. Tỉ lệ này dao động từ $89,35 \pm 2,24$ đến $98,92 \pm 1,03\%$, cho thấy tại nồng độ khảo sát thì các mẫu cặn chiết không biểu hiện tác động gây độc nghiêm trọng đối với đại thực bào chuột. Do đó, nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ được sử dụng cho thí nghiệm xác định hoạt tính kháng viêm của các cặn chiết vi sinh vật.

3.3.2 Khả năng hạn chế sự tổng hợp NO

Hoạt tính kháng viêm của 19 mẫu cặn chiết vi sinh vật được đánh giá thông qua khả năng ức chế sự sản sinh NO trong tế bào RAW 264.7 trong hình 3.2.



Hình 3.2. Hoạt tính ức chế tổng hợp NO của 19 cặn chiết ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ trên tế bào RAW 264.7. Kết quả thể hiện bằng giá trị trung bình \pm độ chênh lệch

Kết quả cho thấy phần lớn mẫu cấy chiết không biểu hiện hoạt tính, riêng tại các giếng có bổ sung 100 $\mu\text{g/ml}$ cấy nấm C1 ghi nhận khả năng ức chế sản sinh NO với $61,34 \pm 1,03\%$. Kết quả cụ thể về khả năng ức chế sản sinh NO trong các giếng thử nghiệm được minh họa trong Hình 3.2. Trong đó, khả năng ức chế trong dịch nuôi tế bào có bổ sung LPS được xác định là 0%, và các giếng thử nghiệm có bổ sung chất đối chứng dương (cardamonin 3,0 μM) ghi nhận được ở mức $87,42 \pm 1,33\%$.

Một số nghiên cứu khác trước đây đã xác định được hoạt tính kháng viêm của các cấy chiết từ vi sinh vật khác. Nghiên cứu của Nihad (2013) đã đánh giá hoạt tính của 4 chủng nấm phân lập từ bọt biển, hải tiêu và rong biển. Cấy chiết của các mẫu nấm này cho thấy khả năng kiềm hãm sự tổng hợp NO khá hạn chế, với 2 chủng có hoạt tính mạnh nhất là *Engyodontium album* (49,31%) và *C. globosum* (46.4%) ở nồng độ 6 mg/mL [99].

Trong một nghiên cứu khác của Shin (2021), chiết xuất *Phellinus linteus* làm giảm hàm lượng NO tổng hợp đáng kể ở các nồng độ 100 (19,3%), 200 (36,5%), and 500 (47,9%) $\mu\text{g/mL}$ [100].

Nghiên cứu của Xiudong Yang (2017) đã xác định hoạt tính chống viêm của *Eurotium amstelodami* trong mô hình *in vitro* và phân lập thành công 3 hợp chất asperflavin, neoechinulin A và preechinulin. Kết quả thể hiện khả năng ức chế sản sinh NO của chiết xuất *Eurotium amstelodami* (60,4%) trong tế bào RAW 24.7 chịu kích thích của LPS. Bên cạnh đó, asperflavin kìm hãm sự tiết của các cytokines như TNF- α , IL-1 β , IL-6; và sự sản xuất của iNOS, đồng thời không gây độc tế bào, qua đó thể có thể ứng dụng như một tác nhân chống viêm trong tương lai [61].

Khi đối chiếu với các kết quả đã có, ta có thể nhận định chiết xuất chủng nấm C1 có khả năng hạn chế sự tổng hợp NO tương đối và thể hiện tiềm năng cho những nghiên cứu sâu hơn.

Quá trình viêm cấp tính là một trong những tác nhân quan trọng trong sự hình thành các tổn thương gây ra do béo phì. Điều này được đặc trưng bởi sự gia tăng hàm lượng axit béo tự do trong máu, các yếu tố gây viêm hòa tan IL-1 β , IL-6, hay TNF α , chemokine cũng như sự xuất hiện tế bào miễn dịch đã hoạt hóa tại các vị trí viêm nhiễm [6].

Ở bệnh nhân béo phì, các mô mỡ có xu hướng biểu hiện quá mức cytokine TNF, một chất đáp ứng đối với nhiễm trùng, kích thích viêm và

apoptosis, quan trọng trong phản ứng miễn dịch đối với bệnh ung thư [101]. Nghiên cứu của Jagers và cộng sự (2009) đã chỉ ra sự tích tụ mỡ ở vùng bụng làm tăng nguy cơ tử vong do ung thư lên đến 24% [102]. Bên cạnh đó, TNF- α cũng được cho là nguyên nhân gây ra tình trạng kháng insulin bằng cách ngăn cản sự dẫn truyền tín hiệu của insulin thông qua phosphoryl hóa các cấu trúc thụ thể insulin (IRS) [103]. Một cytokine khác IL-6 kiềm hãm các hoạt động chuyển hóa của insulin dựa trên sự điều hòa biểu hiện của phân tử kiềm hãm tín hiệu cytokine (SOCS-3) [104]. Bên cạnh đó, IL-6 cũng hạn chế các tác dụng của insulin trong việc kiềm hãm sự tổng hợp glucose trong tế bào gan và vận chuyển glucose trong cơ xương thông qua hạn chế hoạt động của enzyme phosphatidylinositol 3-kinase [105]. Ngoài tăng nguy cơ tiểu đường, IL-6 cũng kích thích sự tổng hợp C-reactive protein – một tác nhân nguy hiểm đối với các bệnh tim mạch và được cho là mối tương quan với tình trạng máu nhiễm mỡ ở người bệnh béo phì thông qua việc điều hòa tổng hợp các lipoprotein có mật độ rất thấp (VLDL) [106].

Các cytokine là một trong những nhân tố quan trọng thúc đẩy sự hình thành bệnh lý của gan nhiễm mỡ. Sự tổng hợp bất thường cytokine và chemokine, biểu hiện của các thụ thể kháng viêm và kích hoạt các con đường dẫn truyền tín hiệu viêm dẫn đến quá trình viêm ở tế bào mỡ. Các phản ứng viêm nói trên dẫn đến sự mất cân bằng nội mô về lipid và glucose, từ đó dẫn đến sự phát triển của NAFLD [107]. Do đó, thông qua kiềm hãm các phản ứng viêm, một số chất kháng viêm có thể hạn chế các tổn thương gây ra cho béo phì cũng như sự phát triển của bệnh lý.

3.4 Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế lipase

Khả năng ức chế enzyme lipase có thể được kiểm tra dựa trên một số phương pháp khác nhau, thực hiện trên một số cơ chất như chất béo trung tính tự nhiên hoặc nhân tạo. Nhìn chung, hoạt tính của lipase thường được thử nghiệm trên các cơ chất triacylglycerol bao gồm các axit béo chuỗi dài như triolein, dầu ô liu (nồng độ axit oleic >70%) [108]. Các kỹ thuật này bao gồm đo quang phổ, đo độ đục, đo chuẩn độ, tạo màu và phát hiện hóa miễn dịch [109]. Trong nghiên cứu này, thử nghiệm ức chế lipase tuyến tụy của một số cận chiết vi sinh vật được tiến hành bằng phương pháp quang phổ với *p*NPB làm cơ chất. Cách thực hiện này được áp dụng để tạo điều kiện thuận lợi cho

bước sàng lọc, tăng độ lặp và duy trì khả năng tái lập của xét nghiệm. Với thí nghiệm này, PPL được sử dụng như một enzyme mô hình do các đặc tính của nó, phần lớn tương đương với lipase tuyến tụy của con người với động học và hoạt tính enzyme tương tự [108].

Bảng 3.4. Hoạt tính ức chế enzyme lipase của các dịch chiết thử nghiệm

STT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ (ug/mL)	Độ ức chế (%)
	Orlistat	100	90,29±1,63
1	C1	500	49,32±1,45
2	C2	500	28,65±0,95
3	C3	500	13,14±0,88
4	C6	500	20,27±1,74
5	C7	500	11,02±0,98
6	C8	500	35,27±0,70
7	C10	500	18,52±1,29
8	C11	500	29,97±0,44
9	C13	500	40,90±1,24
10	C14	500	19,68±0,37
11	C17	500	8,53±0,22
12	C18	500	17,33±0,13
13	C19	500	23,36±0,82
14	C20	500	38,53±0,75
15	C21	500	27,81±0,69
16	C23	500	22,42±0,91
17	C24	500	14,48±1,27
18	C25	500	21,10±0,09
19	C26	500	5,96±1,02

Kết quả tại Bảng 3.4 cho thấy, thử nghiệm hoạt tính ức chế PPL sơ bộ đã giúp phát hiện ra 1 cận chiết (C1) có mức độ ức chế ở mức trung bình (~50%) trong khi 3 dịch chiết (C8, C13, C20) có mức ức chế yếu (>35%) và các dịch chiết còn lại biểu hiện mức độ ức chế thấp (<25%) khi ủ với PPL ở nồng độ 500 µg/ml trong 20 phút ở 37 °C. Nồng độ thử nghiệm các cận chiết tại 500 µg/ml cho kết quả phù hợp với độ lệch chuẩn thấp trong thử nghiệm. Trong tổng số 19 mẫu phân lập được, mẫu chiết thô có khả năng ức chế cao đối với lipase tuyến tụy là cận chiết EtOAc của chủng nấm C1.

Một số nghiên cứu trên thế giới đã đề cập đến thành phần hợp chất saringosterol từ rong *Sargassum* sp., không chỉ có khả năng ức chế enzyme PPL, mà còn làm giảm cholesterol và ức chế tế bào nguyên bào mỡ [110]. Ngoài ra, caulerpenyne là hợp chất tách từ dịch chiết EtOAc của *Caulerpa taxifolia* không chỉ ức chế enzyme lipase trong thử nghiệm in vitro, mà còn có tác dụng làm giảm nồng độ triacylglycerol trong huyết tương chuột thí nghiệm [111].

Trong nghiên cứu của Gulyamova (2022), hoạt tính của 15 chủng nấm cộng sinh với 6 cây thuốc ở Uzbekistan đã được đánh giá. Trong số 15 mẫu, 5 mẫu có khả năng ức chế hoạt tính của enzyme lipase tuyến tụy trên 50%. Khả năng ức chế cao nhất được ghi nhận ở cận chiết của 2 chủng nấm *Fusarium sp.* - AL142R (73.7%) và *F.sambucinum* - AL135L (65.2%) phân lập từ cây *Allium longicuspis*. Giá trị ức chế IC₅₀ của cận chiết 2 mẫu lần lượt là 20.7 and 8.01 µg/ml [112].

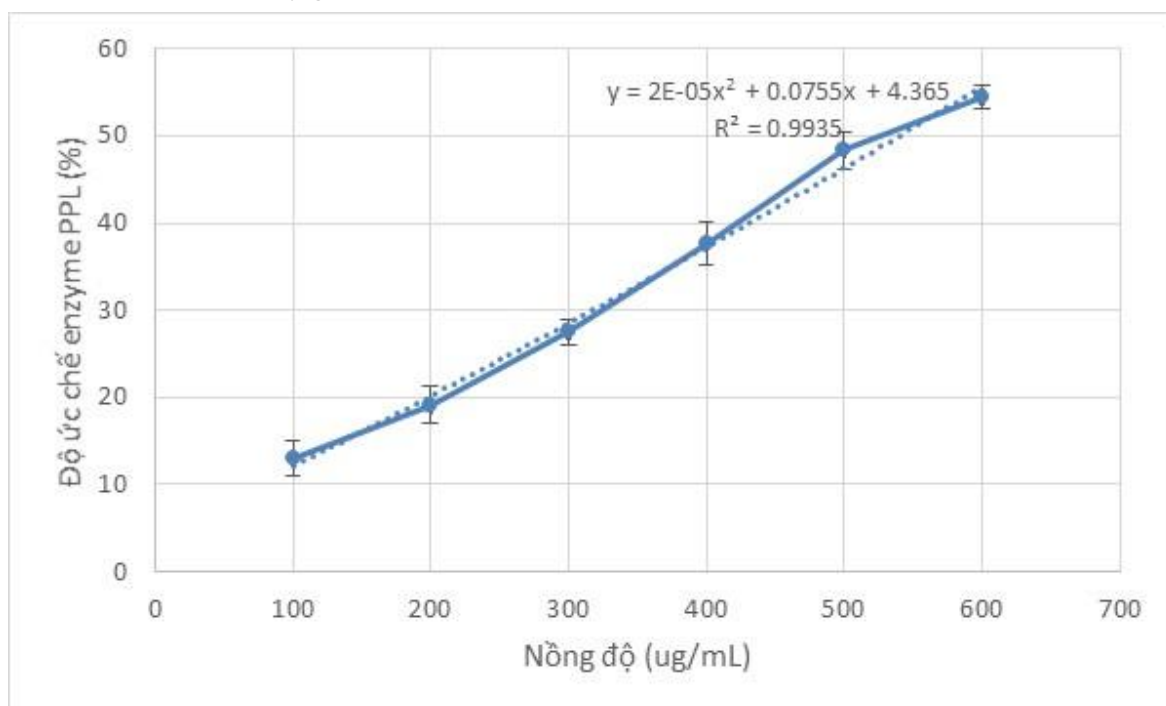
Nghiên cứu của Gupta (2015) đã sàng lọc hoạt tính ức chế enzyme lipase tuyến tụy trên dịch chiết của 70 mẫu nấm cộng sinh trên cây thuốc. Kết quả thử nghiệm trong mô hình in vitro cho thấy dịch chiết của *Penicillium* sp. phân lập từ vỏ cây *Taxus baccata* có khả năng ức chế hoạt tính của lipase tuyến tụy ở mức tương đối (46.1 ± 5.5%) với giá trị IC₅₀ là 3.69 µg/ml [113].

Nghiên cứu của Fadillah (2021) đã đánh giá chiết xuất bằng ethyl acetate của *Purpureocillium lilacinum* IPBCC.19.1498 phân lập từ bọt biển *Stylissa* sp in vitro. Dịch chiết của *Purpureocillium lilacinum* có hiệu quả ức chế hoạt tính của enzyme tuyến tụy, 61,75% ở nồng độ 500 µg.ml⁻¹ và giá trị IC₅₀ 220,60 µg.mL⁻¹, trong đó, đối chứng dương orlistat có giá trị IC₅₀ là 30.57 µg.mL⁻¹ [114]. Kết quả thử nghiệm phần nào cho thấy tiềm năng nghiên cứu và ứng

dụng các vi sinh vật trong điều trị các bệnh liên quan đến chuyển hóa lipid nói chung.

Giá trị IC₅₀

Do C1 là mẫu cặn chiết biểu hiện khả năng ức chế enzyme PPL cao nhất trong số 19 cặn chiết vi sinh vật thử nghiệm, nhóm nghiên cứu đã tiến hành xác định giá trị IC₅₀ của mẫu dịch chiết này, độ ức chế enzyme ở dải 6 nồng độ từ 0,1 đến 0,6 mg/mL đã được xác định. Hình 3.3 biểu diễn mối quan hệ giữa độ ức chế enzyme và nồng độ cặn chiết C1, qua đó đã xác định được biểu thức tuyến tính có dạng $y = 2E-05x^2 + 0.0755x + 4.365$ ($R^2 = 0.9935$). Trong đó y là độ ức chế enzyme (%); x là nồng độ mẫu dịch chiết ($\mu\text{g/mL}$). Từ biểu thức trên, đã xác định được giá trị nồng độ ức chế 50% hoạt độ enzyme PPL của mẫu C1 là $IC_{50} = 518,46 \mu\text{g/mL}$.



Hình 3.3. Mối quan hệ giữa độ ức chế enzyme và nồng độ cặn chiết C2

Trong những năm gần đây, các hợp chất thứ cấp có nguồn gốc từ vi sinh vật đã được chứng minh về hiệu quả chống béo phì, vì vậy một số đã được ứng dụng làm chất bổ sung hoặc thực phẩm chức năng. Tuy nhiên, để đánh giá hiệu quả của các hợp chất này như chất chống béo phì, cần tiến hành thêm các thử nghiệm trên động vật và người với thời gian dài hơn. Bên cạnh đó, để phát triển các loại thuốc chống béo phì mới, đặc biệt là các chất ức chế lipase tuyến tụy, cần có các nghiên cứu sâu hơn về mối quan hệ giữa cấu trúc và hoạt tính sinh

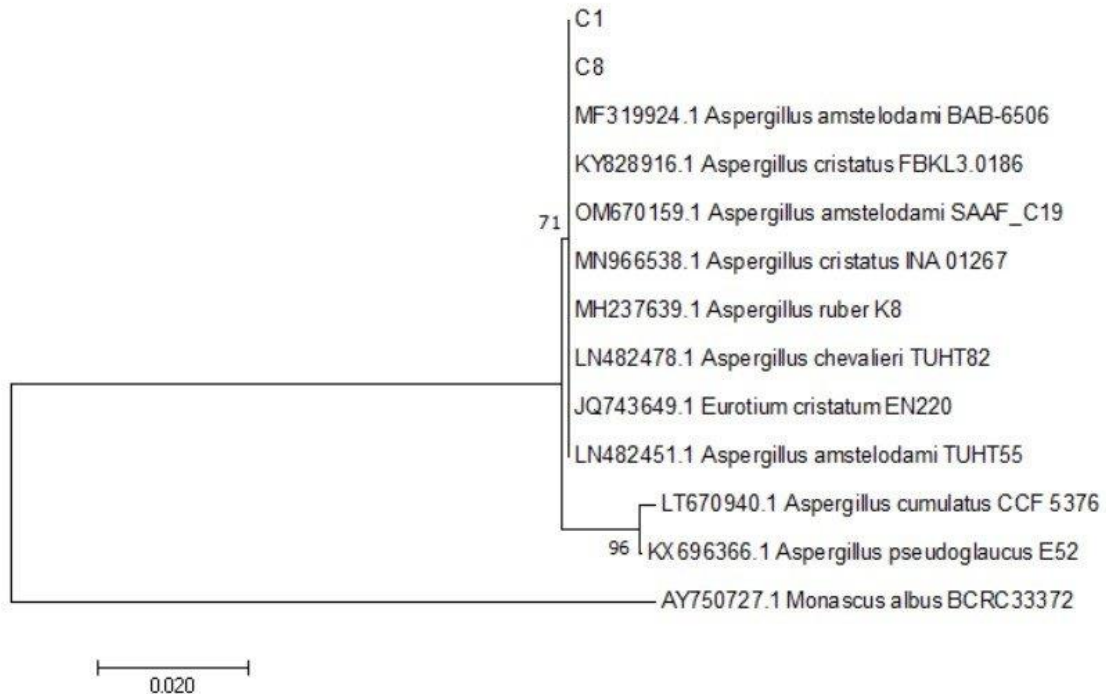
học để định hướng ứng dụng các hợp chất thiên nhiên này.

Enzyme lipase tuyến tụy (triacylglycerol acylhydrolase) là một enzyme quan trọng được tổng hợp ở tụy xúc tác cho quá trình hấp thụ triglycerides trong thức ăn, phân giải lên đến 50-70% tổng lượng triglyceride từ thức ăn [115]. Khả năng phân giải các triacylglycerol thành các monoglyceride và acid béo của enzyme phụ thuộc chủ yếu vào một số amino acid Ser152, Asp176 và His263 [116]. Quá trình phân giải các lipid trong thức ăn dưới sự xúc tác của các loại enzyme là bước đầu tiên cũng như tiền đề cho toàn bộ các cơ chế chuyển hóa lipid trong cơ thể. Tiếp theo, các monoglyceride, acid béo cùng phospholipid và apolipoprotein B48 cấu thành nên chylomicron trong tế bào chất của tế bào biểu mô ruột. Khi một phần cholesterol và TG từ thức ăn được vận chuyển đến gan, các phân tử này cùng với apolipoprotein B100 tham gia tạo lipoprotein có tỉ trọng rất thấp (VLDL). Các phân tử chylomicron và VLDL này sẽ đi vào mạch máu để vận chuyển acid béo đến các mô mỡ, cơ hay tim nhằm mục đích chuyển hóa hoặc dự trữ năng lượng [117]. Một trong những nguyên nhân chính dẫn đến béo phì là sự tích tụ triglyceride tại các tế bào và mô. Do đó, các chất ức chế gắn vào các khu vực hoạt động của lipase, thay đổi cấu trúc và bất hoạt chức năng xúc tác của nó có tác dụng chống béo phì thông qua việc kiềm hãm quá trình phân giải và hấp thụ lipid bên ngoài và sự tích tụ các mô mỡ [118]. Hiện tại, các loại sử dụng để giảm cân và điều trị được phân ra làm hai loại chính: chất ức chế lipase như orlistat và thuốc hạn chế cơn thèm ăn như sibutramine. Do cơ chế của loại sau dựa vào việc hạn chế sự dẫn truyền tín hiệu của hệ thần kinh nên nhiều những tác dụng phụ không mong muốn được ghi nhận bao gồm đau đầu, chóng mặt, khó tiêu và mất ngủ, hoặc nghiêm trọng hơn là các rối loạn về tinh thần cũng như tim mạch [119]. So sánh với các chất ức chế lipase không ảnh hưởng trực tiếp đến hàm lượng ion và sự cân bằng nội môi, cũng như xâm nhập vào mạch máu và hệ thần kinh, việc ứng dụng các chất này trong các phác đồ điều trị có thể làm giảm các tác dụng phụ nghiêm trọng.

3.5 Kết quả định danh các chủng vi sinh vật

3.5.1 Kết quả định danh chủng C1 và C8

3.5.1.1 Kết quả định danh theo phương pháp phân tử



Hình 3.4. Cây phả hệ của chủng C1 và C8 dựa trên trình tự ITS, sử dụng phần mềm MEGA7 theo phương pháp Neighbor joining với giá trị bootstrap 1000

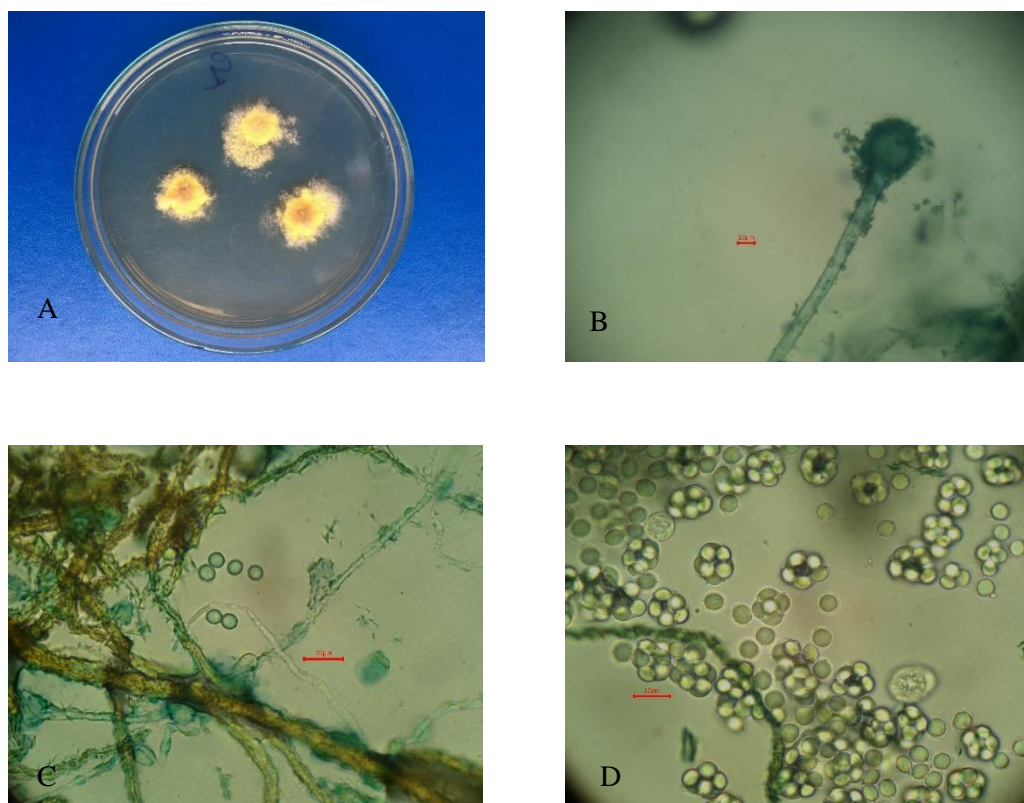
Hai mẫu C1 và C8 được sử dụng để định danh chủng nấm. Theo như kết quả, chuỗi ITS của C1 và C8 có sự tương đồng lớn với nhiều loài của chi *Aspergillus* như là *A. ruber* K8 (MH237639.1), *A. amstelodami* BAB-6506 (MF319924.1), *A. cristatus* FBKL3.0186 (KY28916.1), *A. chevalieri* TUHT82 (LN482478.1), *Eurotium cristatum* EN220 (JQ743649.1) (Hình 3.4).

3.5.1.2 Kết quả định danh theo hình thái

Chủng C1

Mô tả: Khuẩn lạc trên môi trường DG18 phát triển đạt 1,5-2,0 cm/7 ngày ở 25⁰C, mặt dạng nhung hoặc xốp nhẹ, mép mỏng màu vàng nhạt, vùng trung tâm có màu nâu xám hoặc lục vàng đậm. Giọt tiết không có hoặc ít; không mùi; mặt trái lúc đầu không màu sau chuyển sang màu nâu tối khi già; cuống sinh bào tử thẳng, sinh ra từ hệ sợi nền, kích thước 150-550 μm x 6,0-16,5 μm, ngắn, màu nâu nhạt đến nâu ở phần gần bong; bong hình gần cầu đến quả lê, với

đường kính 11-37 μm ; thể bình một tầng, bao phủ 1/2 đến 3/4 bề mặt bông, kích thước 5,0-10 μm x 3,0-4,0 μm . Bào tử hình elíp khi non, sau hình gần cầu khi già, 3,5-6,5 μm x 2,8-6,0 μm , gai hoặc ráp. Thể quả màu vàng, hình gần cầu đến cầu, chiều rộng 55-150 μm ; túi bào tử hình gần cầu đến cầu, có 8 bào tử, kích thước 8,0-11 μm ; bào tử túi hình cầu dẹt, bề mặt gai ráp với 2 gờ xích đạo mảnh, kích thước 3,7-5,5 μm x 3,0-4,5 μm (Hình 3.5).



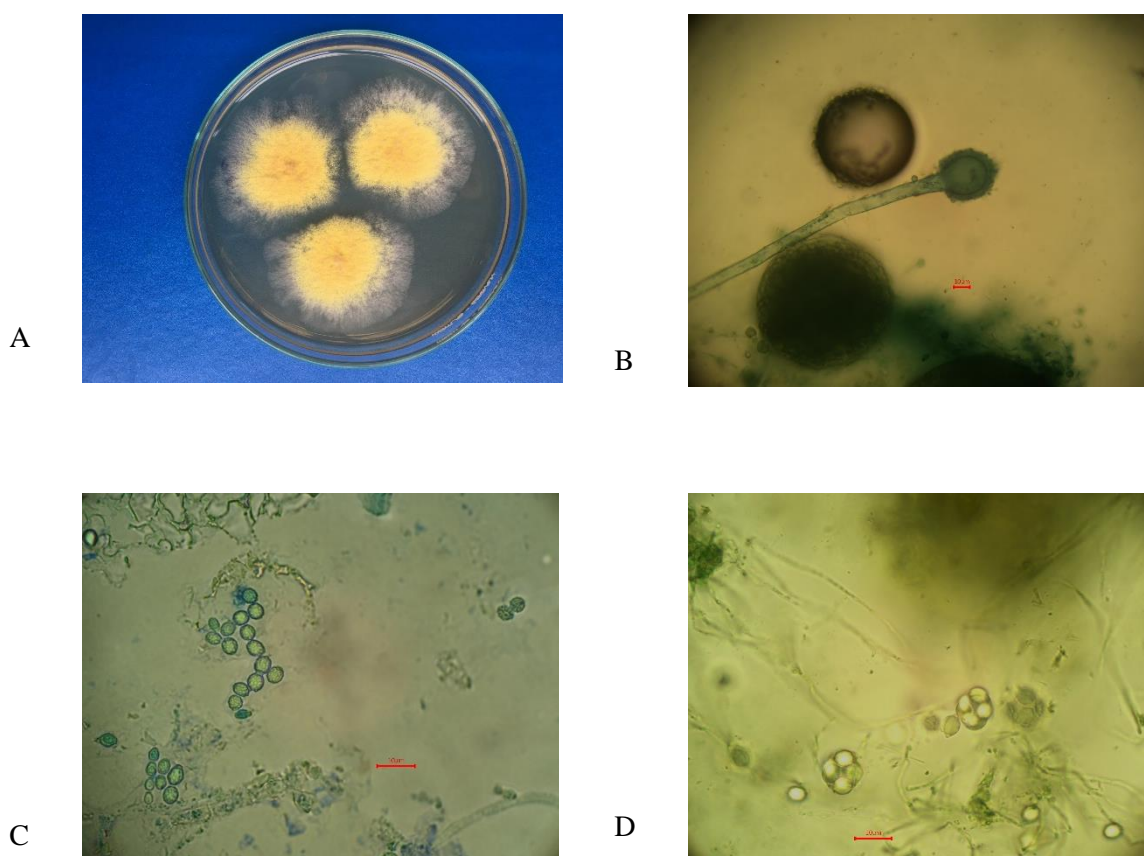
Hình 3.5. Đặc điểm hình thái của *Eurotium cristatum* C1:

(A) Khuẩn lạc trên môi trường DG18 ở 25⁰C/7 ngày; (B) Đầu sinh bào tử trần x400; (C) Bào tử trần x1000; (D) Túi bào tử (asci) và bào tử túi (ascospore) x1000.

Chủng C8

Mô tả: Khuẩn lạc trên môi trường DG18 phát triển đạt 1,5-2,0 cm/7 ngày ở 25⁰C, mặt dạng nhung hoặc xốp nhẹ, mép mỏng màu vàng nhạt, vùng trung tâm có màu nâu xám hoặc lục vàng đậm. Giọt tiết không có hoặc ít; không mùi; mặt trái lúc đầu không màu sau chuyển sang màu nâu tối khi già; cuống sinh bào tử thẳng, sinh ra từ hệ sợi nền, kích thước 150-550 μm x 6,0-16,5 μm , nhẵn,

màu nâu nhạt đến nâu ở phần gần bong; bong hình gần cầu đến quả lê, đường kính 11-37 μm ; thể bình một tầng, bao phủ 1/2 đến 3/4 bề mặt bong, kích thước 5,0-10 μm x 3,0-4,0 μm . Bào tử hình elíp khi non, sau hình gần cầu khi già, 3,5-6,5 μm x 2,8-6,0 μm , gai hoặc ráp. Thể quả màu vàng, hình gần cầu đến cầu, chiều rộng 55-150 μm ; túi bào tử hình gần cầu đến cầu, 8 bào tử, kích thước 8,0-11 μm ; bào tử túi hình cầu dẹt, bề mặt gai ráp với 2 gờ xích đạo mảnh, kích thước 3,7-5,5 μm x 3,0-4,5 μm (Hình 3.6).



Hình 3.6. Đặc điểm hình thái của *Eurotium cristatum* C8:

(A) Khuẩn lạc trên môi trường DG18 ở 25⁰C/7 ngày; (B) Đầu sinh bào tử trần x400; (C) Bào tử trần x1000; (D) Túi bào tử (asci) và bào tử túi (ascospore) x1000.

3.5.1.3 Kết quả định danh theo đặc điểm sinh hóa

Đặc điểm sinh hóa của chủng C1 và C8 được thể hiện thông qua việc xác định các hoạt động enzyme ngoại bào

Bảng 3.5. Đặc điểm sinh hóa của chủng C1 và C8

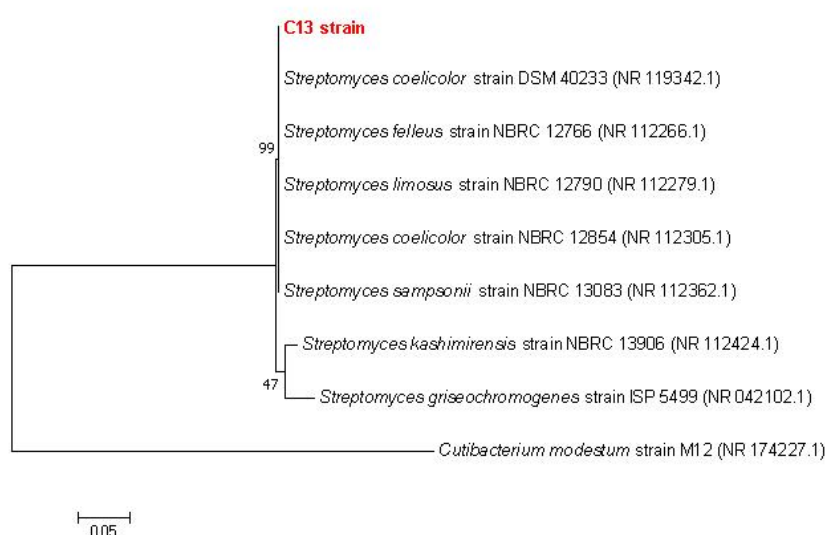
Chủng	Đặc điểm sinh hóa						
	Cellulase	Xylanase	Pectinase	Amylase	β -glucosidase	Lipase	Casein hydroxylase
C1	+	+	+	+	+	+	+
C8	+	+	+	+	+	+	+

Thông qua việc quan sát các sự thay đổi của các đĩa thạch có bổ sung cơ chất, cả hai chủng C1 và C8 cho thấy các hoạt tính enzyme đáng kể như: cellulase, xylanase, pectinase, amylase, β -glucosidase, lipase and casein hydrolase (Bảng 3.5).

3.5.2 Kết quả định danh chủng C13

3.5.2.1 Kết quả định danh theo phương pháp phân tử

Mẫu C13 được sử dụng để định danh chủng xạ khuẩn. Theo như kết quả, chuỗi 16S rARN có sự tương đồng với nhiều loài của chi *Streptomyces* như *Streptomyces violascens* HQA018 (KT758350.1)(98,19%), *Streptomyces somaliensis* IMB16-027 (MG190689.1) (98.28%), *Streptomyces hydrogenans* IMB16-136 (MG190735.1) (98.28%) . (Hình 3.7)



Hình 3.7 Cây phả hệ của chủng C13 dựa trên trình tự 16S rARN, sử dụng phần mềm MEGA7 theo phương pháp Neighbor joining với giá trị bootstrap 1000

3.5.2.2 Kết quả định danh theo hình thái

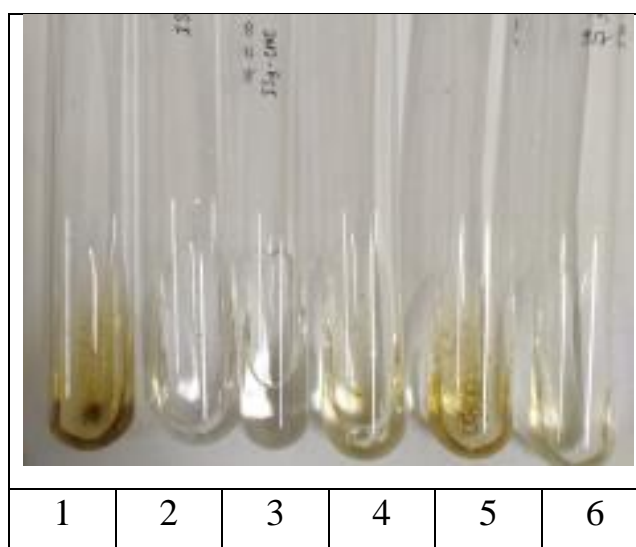
Trên đĩa thạch ISP4, khuẩn lạc chủng C13 có bề mặt màu trắng sữa. Tâm khuẩn lạc xạ khuẩn có dạng bụi phấn, lấm tấm vàng, xốp. Viền khuẩn lạc màu vàng chanh với mặt sần sau màu cam vàng. Đường kính khuẩn lạc 1-2 mm sau 7 ngày cấy (Hình 3.8).



Hình 3.8. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc C13 trên môi trường ISP4.

3.5.2.3 Kết quả định danh theo đặc điểm sinh hóa

Các loại xạ khuẩn có thể được phân loại dựa trên khả năng đồng hòa các nguồn carbon trong môi trường ISP. Vì vậy, chủng xạ khuẩn C13 đã được nuôi trên môi trường ISP4 có chứa một số nguồn carbon khác nhau, gồm maltose, sucrose, glucose, inositol và CMC (Hình 3.9). Với inositol và mannitol sinh trưởng kém và gần như không sinh trưởng trong môi trường có chứa CMC.



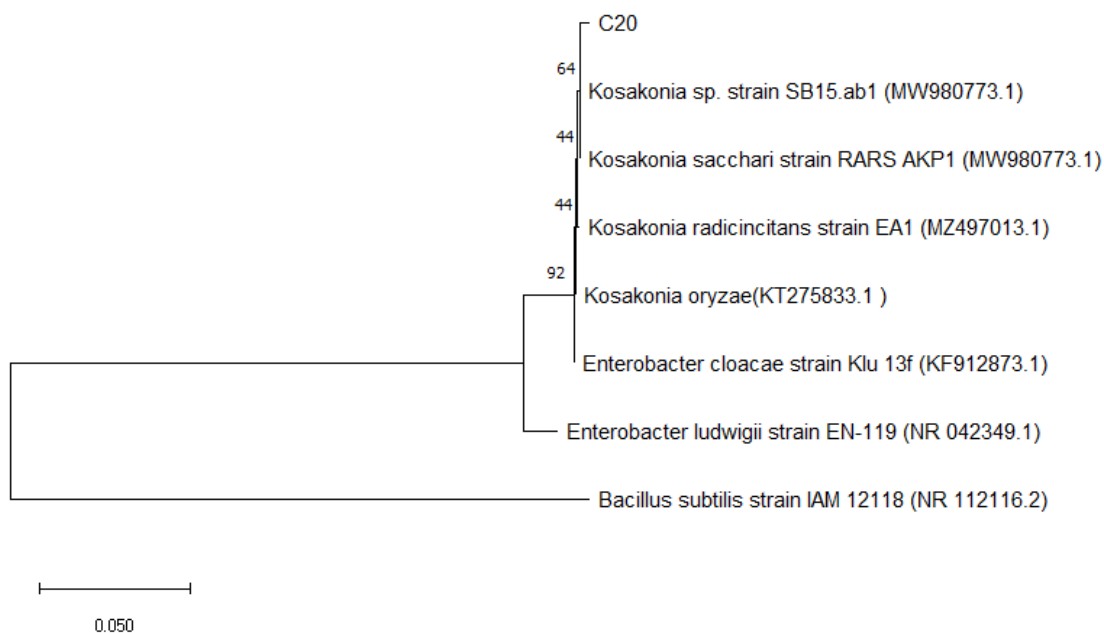
Maltose; 2- Mannitol; 3- CMC; 4- Glucose; 5-Sucrose; 6- Inositol

Hình 3.9: Kết quả đồng hòa nguồn carbon của chủng C13

3.5.3 Kết quả định danh chủng C20

3.5.3.1 Định danh theo phương pháp phân tử

Mẫu C20 được sử dụng để định danh chủng vi khuẩn. Theo như kết quả, chuỗi 16S rARN có sự tương đồng với nhiều loài của chi *Kosakonia* như *Kosakonia sacchari* RARS_AKP1 (MW980773.1), *Kosakonia oryzae* (KT275833.1) (Hình 3.10).



Hình 3.10 Cây phả hệ của chủng C20 dựa trên trình tự 16S rARN, sử dụng phần mềm MEGA7 theo phương pháp Neighbor joining với giá trị bootstrap 1000

3.5.3.2 Định danh theo hình thái

Trên đĩa thạch LB, khuẩn lạc của chủng vi khuẩn C20 có màu trắng ngà, hình dạng tròn nhỏ đều, đường kính 0,7-1,0 mm, bề mặt trơn bóng, lồi, không sản sinh sắc tố. Chủng C20 được xác định là vi khuẩn Gram (-) sau phép thử nhuộm màu (Hình 3.11).



Hình 3.11. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc vi khuẩn C20 trên đĩa thạch LB.

3.5.3.3 Định danh theo đặc điểm sinh hóa

Các đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn C20 tiếp tục được xác định bằng kit định danh API 20E (Biomérieux, Pháp). Kết quả cụ thể được thể hiện trong Bảng 3.6 dưới đây.

Bảng 3.6. Đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn C20.

Thử nghiệm	Kết quả
Ortho – Nitro – Phenyle – Galactoside (ONPG)	-
Arginine (ADH)	-
Lysine (LDC)	+
Ornithine (ODC)	+
Na Citrate (CIT)	+
Na Thiosulfate (H ₂ S)	-
Urease (URE)	-
Tryptophane (TDA)	+
Indol	+
Voges-Proskauer (VP)	+
Gelatinase (GE)	+
Glucose (GLU)	+
Mannitol (MAN)	+
Inositol (INO)	-
Sorbitol (SOR)	+
Rhamanose (RHA)	+

Sucrose (SAC)	+
Melibiose (MEL)	+
Amygladin (AMY)	+
Arabinose (ARA)	+
Nitrate reduction (NIT)	+

Khi so sánh với các dữ liệu trên hệ thống định danh của hãng Biomerieux, các đặc điểm của chủng C20 cho kết quả độ tương đồng cao nhất với các loài *Enterobacter cloacea* (86,11%) và *E. aerogen* (85,97%) của chi *Enterobacter*, là tên gọi khác của chi vi khuẩn *Kosakonia*.

Dựa trên kết quả phân tử và đặc điểm hình thái, chủng C1 và C8 có thể xác định thuộc loài *Eurotium cristatum*, chủng C13 thuộc chi *Kosakonia*, chủng 20 thuộc chi *Streptomyces* sp.

Eurotium spp. là nhóm nấm sinh sản bằng cách hữu tính của chi *Aspergillus*, họ Tricomaceae, bộ Eurotiales, lớp Eurotimycetes, ngành Ascomycota. Chủng nấm này bao gồm 81 loài, trong đó phổ biến nhất là 4 loài *E. amstelodami*, *E.chevalieri*, *E. herbariorum* và *E. repens*, phân bố phổ biến ở các khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới trên thế giới và có tốc độ phát triển tương đối nhanh [120]. Các cụm nấm thường có màu vàng, xanh lá nhạt hoặc hơi ngả sang màu xanh dương, với các bào tử nguyên phân hình cầu hoặc hình elip và có thành bào tử dày và mọc thành các chuỗi [121]. Trong trường hợp sinh sản hữu tính, các quả thể màu trắng hoặc vàng nhạt chứa các nang cầu, mỗi nang lại gồm 8 bào tử nang. Điều kiện sống của các chủng nấm *Eurotium* spp khá đa dạng. Một số loài có thể chịu hạn hoặc phát triển trong các môi trường có áp lực thẩm thấu cao, chẳng hạn như *E. amstelodami*, *E. repens* và *E. herbariorum* được tìm thấy trong nước có nồng độ NaCl 17% [122]. Nhiều chủng nấm có khả năng phát triển trong các môi trường có hoạt độ nước thấp hơn $0.75 a_w$, nhóm *E. amstelodami* có thể phát triển ở điều kiện hoạt độ $0.67a_w$.Trong điều kiện nhân tạo, giới hạn hoạt độ thấp nhất cho sự sinh trưởng của *E. chevalieri* là 0.6-0.65 a_w [123].Bên cạnh đó., một số chủng nấm *Euroitum* spp cũng có giới hạn nhiệt độ tương đối rộng. *E. repens* có thể phát triển trong khoảng nhiệt độ tối thiểu là 4-5°C và tối đa là 38-40°C [124]. *E. chevalieri* có khả năng chịu nhiệt tốt, với 18-25% bào tử sống sót sau khi bị

đun nóng ở 70°C trong 10 phút và 0.5% với nhiệt độ 80°C [125]. *Eurotium cristatum* thuộc bộ Eurotiales, họ Asperillaceae, chi *Eurotium*. *Eurotium cristatum*, hay còn được biết đến là nấm “kim hoa”, là một loại nấm đóng vai trò chủ đạo trong sự lên men của các loại trà đậm. Các nghiên cứu đã chỉ ra nhiều hoạt tính sinh học đa dạng của cặn chiết *Eurotium cristatum* và các chất thứ cấp tổng hợp bởi vi sinh vật này. *Eurotium cristatum* EN-220, một chủng nấm nội sinh có thể được phát hiện ở tảo nước mặn *Sargassum thunbergia*. Từ chủng nấm này, Feng Yu Du tách chiết được 4 loại indole alkaloid mới và 6 loại congener đã biết. Trong số đó, Cristatumins A-D 1 và congeners 10 cho thấy khả năng kháng khuẩn đối với chủng *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*, Cristatumins A-D 2 và congeners 6,7 cho thấy khả năng gây chết tôm nước mặn (*Artemia salina*) [126]. Chất chuyển hóa thứ cấp 2-(2', 3-Epoxy-1', 3'-heptadienyl)-6-hydroxy-5-(3-methyl-2-butenyl) benzaldehyde của *Eurotium cristatum* phân lập từ một loại hải miên *Mycale* sp. có hoạt tính chống ung thư, thể hiện qua sự kiềm hãm sinh trưởng tế bào ung thư [127]. Chất chuyển hóa thứ cấp 2-(2', 3-Epoxy-1', 3'-heptadienyl)-6-hydroxy-5-(3-methyl-2-butenyl) benzaldehyde của *Eurotium cristatum* phân lập từ một loại hải miên *Mycale*.sp có hoạt tính kháng ung thư, thể hiện qua sự kiềm hãm sinh trưởng tế bào ung thư [127]. Nghiên cứu của Qiannan Zhao (2020) đã cho thấy *E.cristatum* có khả năng kiềm hãm sự sinh trưởng và sản xuất aflatoxin B₁ của nấm *Aspergillus flavus*. Aflatoxin B₁ là một chất gây ung thư, biến đổi gen và suy giảm các hoạt động miễn dịch, và được cho là nguyên nhân lớn dẫn đến các ca ung thư gan trên toàn thế giới [128, 129]. *E.cristatum* có thể làm biến đổi cấu trúc của sợi nấm và giảm sự biểu hiện của các gen *aflR*, *aflS*, *aflD*, *aflQ*, *VeA*, và *LaeA* (có liên quan đến sự tổng hợp aflatoxin B₁). Ngoài ra, kết quả thí nghiệm cũng cho thấy *E.cristatum* có thể phân giải aflatoxin B₁ thành các hợp chất mới ít gây độc tính cho tế bào HepG2. Cơ chế đằng sau hoạt tính của *E.cristatum* được cho là có liên quan đến các chất thứ cấp có trong nấm như: 1-hexanol, 1-octen-3-ol, (*E*)-2-pentenal, acetaldehyde, hay octanal,...[130]

Streptomyces là một chi xạ khuẩn dạng sợi phân nhánh thuộc họ Streptomycetaceae, bao gồm hơn 500 loài được phát hiện trong đất [131]. Đây là những vi khuẩn Gram dương hiếu khí có thể tạo nên các cấu trúc thể sợi chứa các bào tử [132]. Hoạt tính của xạ khuẩn *Streptomyces* được phát hiện lần đầu bởi nhà vi sinh vật Selman Waksman sau khi nghiên cứu các chủng xạ khuẩn

trong hệ sinh thái đất. Nhóm nghiên cứu của Selman đã phân lập thành công streptomycin từ *Streptomyces griseus* – chất kháng sinh đầu tiên hiệu quả trên *Mycobacterium tuberculosis* [133]. Kể từ đó, nhiều hoạt tính của các chất thứ cấp tổng hợp bởi *Streptomyces sp.* đã được nghiên cứu và xác định, bao gồm kháng khuẩn và nấm, điều hòa các phản ứng miễn dịch và kích thích sự sinh trưởng của thực vật [134]. Nghiên cứu của Kim (2018) cho thấy cặn chiết butanol của chủng *Streptomyces blastmyceticus* 12-6 phân lập từ đất có hoạt tính kháng nấm đối với một số loại nấm gây bệnh trên thực vật *Colletotrichum acutatum*, *C. coccodes*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* và *T. roseum*. Hoạt tính kháng nấm của chủng vi sinh vật này dựa trên tổng hợp các chất thứ cấp như cyclo-(Leu-Pro) và 9-octadecenamide và phá hủy màng plasma của các bào tử và sợi nấm [135]. Hợp chất thứ cấp echinomycin tổng hợp bởi chủng *Streptomyces fuscichromogenes* LS462 phân lập từ đất cho thấy hoạt tính kháng vi sinh vật đối với *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv với giá trị MIC = 0.5 µg/ml. Ngoài ra, echinomycin còn cộng hưởng với posaconazole hạn chế hoàn toàn sự sinh trưởng của *Candida albicans* SC5314 [136]. Nghiên cứu của Koh (2017) đã xác định hoạt tính chống oxi hóa của chủng *Streptomyces sp.* MUM212 được phân lập từ đất ngập mặn. Dịch chiết của MUM212 cho thấy khả năng loại bỏ các gốc oxi hóa tự do DPPH, ABTS và superoxide lần lượt là $22.03 \pm 3.01\%$, $61.52 \pm 3.13\%$, $37.47 \pm 1.79\%$ ở nồng độ 4 mg/mL. Bên cạnh đó, dịch chiết MUM212 cũng cho thấy khả năng cải thiện các tổn thương gây ra bởi sự oxi hóa thể hiện qua việc giảm sự oxi hóa lipid và bảo vệ tế bào Vero cells chống lại các tổn thương oxi hóa gây ra bởi H₂O₂. Hoạt tính chống oxi hóa của vi sinh vật là có mối quan trọng trực tiếp đến hàm lượng các hợp chất polyphenol cũng như hydrocarbon và dipeptide dạng vòng có trong dịch chiết [137].

Kosakonia sp. (trước đây là *Enterobacter sp.*) là những vi khuẩn Gram âm, có hình que di chuyển nhờ roi thuộc họ *Enterobacteriaceae* [138]. Nhiều vi khuẩn *Kosakonia sp.* như *K. radicincitans* hay *K. oryzae* được phát hiện sống cộng sinh trong thực vật hoặc trong đất và góp phần thúc đẩy các quá trình sinh trưởng và phát triển của vật chủ như tăng sự phát triển ngọn, rễ; rút ngắn thời gian ra hoa kết trái, thay đổi thành phần hóa học của quả [139, 140]. Các ảnh hưởng này được xác định là dựa trên cơ chế vi khuẩn *Kosakonia* có thể tổng hợp các hormone thực vật (phytohormone) như auxin hay cytokine, cùng

với khả năng cố định nitrogen và hòa tan phosphate [141-143]. Ngoài kích thích sự sinh trưởng của thực vật, một số vi khuẩn thuộc chi này đóng vai trò như các tác nhân gây bệnh ở người như chủng *Kosakonia cowanii* 888-76 [144].

3.6 Kết quả xác định độ an toàn trên động vật thử nghiệm

Thử nghiệm *in vivo* về độ an toàn của các mẫu vi sinh vật C1, C8, C13 và C20 cho thấy không có trường hợp nào gây chết hoàn toàn đối với chuột BALB/c. Đặc biệt, khi tiêm dung dịch chứa sinh khối 2 chủng nấm C1 và C8 thông qua cả tiêm vào xoang bụng (IP) và tiêm vào tĩnh mạch (IM) thì không gây chết 100% số chuột thử nghiệm. Tỷ lệ tử vong cũng như tình trạng của chuột 10 ngày sau khi tiêm được trình bày trong Bảng 3.7.

Bảng 3.7. Kết quả độ an toàn của nấm trên chuột BALB/c

Mẫu	Số lượng chuột thử nghiệm	Tiêm	Tỷ lệ tử vong (%)	Kết luận
Đối chứng (Dịch BHI)	5	IM	0	An toàn
	5	IP	0	An toàn
Dịch BHI chứa sinh khối C1	5	IM	0	An toàn
	5	IP	0	An toàn
Dịch BHI chứa sinh khối C8	5	IM	0	An toàn
	5	IP	0	An toàn
Dịch BHI chứa sinh khối C13	5	IM	0	An toàn
	5	IP	20	Không an toàn
Dịch BHI chứa sinh khối C20	5	IM	20	Không an toàn
	5	IP	0	An toàn

Kết quả thử độc tính cho thấy chủng nấm C1 và C8 không gây ảnh hưởng đến sự sống của các mẫu chuột thử nghiệm, còn kết quả tiêm khoang bụng của 2 chủng xạ khuẩn C13 và vi khuẩn C20 ghi nhận tỷ lệ tử vong 20% ở các mẫu khi tiêm khoang bụng. Các kết quả trên có điểm tương đồng với công bố của một số nghiên cứu trước đây. Nhóm nghiên cứu của Kang (2019) đã xác định

hoạt tính chống béo phì của cặn chiết *Eurotium cristatum* trong mô hình *in vitro*. *Eurotium cristatum* không gây ảnh hưởng đến sự sống của các mẫu chuột đồng thời cải thiện các tổn thương của béo phì bằng cách giảm các phản ứng viêm và cải thiện cân bằng nội môi cũng như điều hòa hệ vi sinh vật trong đường ruột [145]. Đối với xạ khuẩn *Streptomyces*, một số chủng là các tác nhân gây bệnh ở thực vật như *S. luridiscabiei*, *S. puniscabiei*, *S. niveiscabiei* hay *S. sudanensis* và *S. somaliensis* gây bệnh viêm da ở người [146, 147]. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu đã khẳng định về độc tính của bào tử *Streptomyces griseus* và một số hợp chất thứ cấp như teleociclin trong mô hình cá và chuột [148, 149]. Một số vi khuẩn thuộc *Kosakonia* cũng được ghi nhận là tác nhân gây bệnh ở người như chủng *Kosakonia cowanii* 888-76 [144].

Từ các kết quả trên, chủng nấm C1 và C8 với hoạt tính sinh học tương đối cao và độc tính không đáng kể, biểu hiện tiềm năng cao trong các ứng dụng tương lai ở lĩnh vực công nghệ thực phẩm hay y dược.

Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

- 1) Đã phân lập được 19 chủng vi sinh vật thuộc nhóm nấm, xạ khuẩn và vi khuẩn từ một số mẫu thực vật.
- 2) Đã tiến hành lên men và thu được cặn chiết etyl axetat của 19 chủng vi sinh vật để thử nghiệm các hoạt tính sinh học theo định hướng kháng viêm và chống béo phì.
- 3) Kết quả thử nghiệm hoạt tính của 19 mẫu cặn chiết từ vi sinh vật cho thấy :
 - Có 5 cặn chiết (kí hiệu: C1, C2, C8, C13, C20) biểu hiện hoạt tính chống oxi hóa trên hệ DPPH với SC_{50} trong khoảng từ 96,07 đến 121,12 $\mu\text{g/mL}$.
 - Cặn chiết của chủng nấm C1 biểu hiện hoạt tính kháng viêm trên đại thực bào RAW264.7 với khả năng ức chế sự sản sinh NO tại 100 $\mu\text{g/mL}$ ở mức $61,34 \pm 1,03\%$.
 - Cặn chiết của chủng nấm C1 biểu hiện khả năng ức chế enzyme lipase với $IC_{50} = 518,46 \mu\text{g/mL}$.
- 4) Đã nghiên cứu và xác định được đặc điểm phân loại học của một số chủng vi sinh vật có tiềm năng ứng dụng theo định hướng hoạt tính kháng viêm và chống béo phì :
 - 02 chủng nấm có kí hiệu C1 và C8 được xác định thuộc loài *Eurotium cristatum* ;
 - Chủng xạ khuẩn có kí hiệu C13 được xác định là thuộc chi *Streptomyces*;
 - Chủng vi khuẩn có kí hiệu C20 được xác định thuộc chi *Kosakonia*.
- 5) Đã thử nghiệm và xác định tính an toàn của hai chủng nấm *E. cristatum* C1 và *E. cristatum* C8 đối với động vật, qua đó khẳng định tiềm năng ứng dụng cao của hai chủng vi nấm.

Kiến nghị

- Việc xác định hoạt tính kháng viêm, chống oxy hóa cũng như chống béo phì của các chủng vi sinh vật mới được thực hiện ở mức độ *in vitro*. Để có thể một cơ sở dữ liệu chi tiết và toàn diện hơn, cần tiến hành bổ sung các nghiên cứu hoạt tính ở mức độ phân tử và tế bào, đặc biệt là thử nghiệm trên nguyên bào mỡ biệt hóa.

- Các thử nghiệm hoạt tính ở mức *in vitro* trong khuôn khổ luận văn cần tiếp tục được xác định lại ở mức độ sâu hơn, đặc biệt là trong mô hình *in vivo* hoặc chiết tách nâng cao.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

Hồ Lý Phương, Hoàng Kim Chi, Lê Hữu Cường, Nguyễn Tiến Quân, Trần Thị Hồng Hà, Trần Thị Như Hằng, *In vitro* biological activities of plant associated *Eurotium* fungal strains in Vietnam, *International journal for innovative research in multidisciplinary field*, 37, pp 101-110.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Conway B., Rene A., 2004, Obesity as a disease: no lightweight matter, *Obes Rev*, 5(3), pp. 145-51.
2. Afshin A., Forouzanfar M. H., Reitsma M. B., Sur P., Estep K., , 2017, Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years, *N Engl J Med*, 377(1), pp. 13-27.
3. Allison D. B., Fontaine K. R., Manson J. E., Stevens J., VanItallie T. B., 1999, Annual deaths attributable to obesity in the United States, *Jama*, 282(16), pp. 1530-8.
4. Blumenthal S. J., 2002, *Prescriptions for a new year*, US News and World Report.
5. Wensveen F. M., Valentić S., Šestan M., Turk Wensveen T., Polić B., 2015, The "Big Bang" in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation, *Eur J Immunol*, 45(9), pp. 2446-56.
6. Hursting S. D., Dunlap S. M., 2012, Obesity, metabolic dysregulation, and cancer: a growing concern and an inflammatory (and microenvironmental) issue, *Ann N Y Acad Sci*, 1271(1), pp. 82-7.
7. Musunuru K., 2010, Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention, *Lipids*, 45(10), pp. 907-914.
8. Young, 1997, Major microbial diversity initiative recommended, 63, pp. 417-421.
9. O'Brien J., Wright G. D., 2011, An ecological perspective of microbial secondary metabolism, *Curr Opin Biotechnol*, 22(4), pp. 552-8.
10. Jenke-Kodama H., Müller R., Dittmann E., 2008, Evolutionary mechanisms underlying secondary metabolite diversity, *Prog Drug Res*, 65, pp. 119, 121-40.
11. Guerriero G., Berni R., Muñoz-Sanchez J. A., Apone F., Abdel-Salam E. M., Qahtan A. A., Alatar A. A., Cantini C., Cai G., Hausman J. F., Siddiqui K. S., Hernández-Sotomayor S. M. T., Faisal M., 2018, Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists, *Genes (Basel)*, 9(6).
12. Dreyfuss M., Chapela I., 1994, Potential of fungi in the discovery of natural products with therapeutic potential (Gull, VP ed.) Bulterworth, Heinemann, Boston MA.
13. Clay K., Holah J., 1999, Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields, *Science*, 285(5434), pp. 1742-5.
14. Bulgarelli D., Schlaeppi K., Spaepen S., Ver Loren van Themaat E., Schulze-Lefert P., 2013, Structure and functions of the bacterial microbiota of plants, *Annu Rev Plant Biol*, 64, pp. 807-38.
15. Compant S., Clément C., Sessitsch A., 2010, Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization,

- mechanisms involved and prospects for utilization, *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), pp. 669-678.
16. Vorholt J. A., 2012, Microbial life in the phyllosphere, *Nat Rev Microbiol*, 10(12), pp. 828-40.
 17. McCully M., 2001, Niches for bacterial endophytes in crop plants: A plant biologist's view, *Functional Plant Biology*, 28, pp. 983-990.
 18. Atamna-Ismaeel N., Finkel O., Glaser F., von Mering C., Vorholt J. A., Koblížek M., Belkin S., Bèjà O., 2012, Bacterial anoxygenic photosynthesis on plant leaf surfaces, *Environ Microbiol Rep*, 4(2), pp. 209-16.
 19. Freeman E., 1904, I.—The seed-fungus of *Lolium temulentum*, L., the darnel, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 196(214-224), pp. 1-27.
 20. Horn W. S., Simmonds M. S. J., Schwartz R. E., Blaney W. M., 1995, Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp, *Tetrahedron*, 51(14), pp. 3969-3978.
 21. Li J. Y., Strobel G., Harper J., Lobkovsky E., Clardy J., 2000, Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*, *Org Lett*, 2(6), pp. 767-70.
 22. Strobel G. A., Miller R. V., Martinez-Miller C., Condrón M. M., Teplow D. B., Hess W. M., 1999, Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*, 145(8), pp. 1919-1926.
 23. Lu H., Zou W. X., Meng J. C., Hu J., Tan R. X., 2000, New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*, *Plant Science*, 151(1), pp. 67-73.
 24. Zou W. X., Meng J. C., Lu H., Chen G. X., Shi G. X., Zhang T. Y., Tan R. X., 2000, Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*, *J Nat Prod*, 63(11), pp. 1529-30.
 25. Castillo U. F., Strobel G. A., Ford E. J., Hess W. M., Porter H., Jensen J. B., Albert H., Robison R., Condrón M. A. M., Teplow D. B., Stevens D., Yaver D., 2002, Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*, *Microbiology (Reading)*, 148(Pt 9), pp. 2675-2685.
 26. Findlay J. A., Li G., Johnson J. A., 1997, Bioactive compounds from an endophytic fungus from eastern larch (*Larix laricina*) needles, *Canadian Journal of Chemistry*, 75(6), pp. 716-719.
 27. Harper J. K., Arif A. M., Ford E. J., Strobel G. A., Porco Jr J. A., Tomer D. P., Oneill K. L., Heider E. M., Grant D. M., 2003, Pestacin: a 1, 3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing

- antioxidant and antimycotic activities, *Tetrahedron*, 59(14), pp. 2471-2476.
28. Strobel G., Ford E., Worapong J., Harper J. K., Arif A. M., Grant D. M., Fung P. C., Ming Wah Chau R., 2002, Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities, *Phytochemistry*, 60(2), pp. 179-83.
 29. Panche A., Diwan A., Chandra S., 2016, Flavonoids: an overview, *Journal of nutritional science*, 5.
 30. Calabrese V., Cornelius C., Dinkova-Kostova A. T., Iavicoli I., Di Paola R., Koverech A., Cuzzocrea S., Rizzarelli E., Calabrese E. J., 2012, Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(5), pp. 753-783.
 31. Huang W. Y., Cai Y. Z., Hyde K. D., Corke H., Sun M., 2007, Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity, *World journal of microbiology biotechnology*, 23(9), pp. 1253-1263.
 32. Qiu M., Xie R. S., Shi Y., Zhang H., Chen H. M., 2010, Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L, *Annals of Microbiology*, 60(1), pp. 143-150.
 33. Wang Y., Xu L., Ren W., Zhao D., Zhu Y., Wu X., 2012, Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*, *Phytomedicine*, 19(3-4), pp. 364-368.
 34. Brown A. G., Smale T. C., King T. J., Hasenkamp R., Thompson R. H., 1976, Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*, *J Chem Soc Perkin 1*(11), pp. 1165-70.
 35. Endo A., Kuroda M., Tsujita Y., 1976, ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*, *J Antibiot (Tokyo)*, 29(12), pp. 1346-8.
 36. Endo A., Hasumi K., Yamada A., Shimoda R., Takeshima H., 1986, The synthesis of compactin (ML-236B) and monacolin K in fungi, *J Antibiot (Tokyo)*, 39(11), pp. 1609-10.
 37. Endo A., 1979, Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species, *J Antibiot (Tokyo)*, 32(8), pp. 852-4.
 38. Alberts A. W., Chen J., Kuron G., Hunt V., Huff J., Hoffman C., Rothrock J., Lopez M., Joshua H., Harris E., Patchett A., Monaghan R., Currie S., Stapley E., Albers-Schonberg G., Hensens O., Hirshfield J., Hoogsteen K., Liesch J., Springer J., 1980, Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase

- and a cholesterol-lowering agent, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(7), pp. 3957-61.
39. Serizawa N., Matsuoka T., 1991, A two component-type cytochrome P-450 monooxygenase system in a prokaryote that catalyzes hydroxylation of ML-236B to pravastatin, a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, *Biochim Biophys Acta*, 1084(1), pp. 35-40.
 40. Weibel E. K., Hadvary P., Hochuli E., Kupfer E., Lengsfeld H., 1987, Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity, *J Antibiot (Tokyo)*, 40(8), pp. 1081-5.
 41. Tsujita T., Takaichi H., Takaku T., Aoyama S., Hiraki J., 2006, Antiobesity action of ϵ -polylysine, a potent inhibitor of pancreatic lipase, *Journal of lipid research*, 47(8), pp. 1852-1858.
 42. Puls W., 1996, *Pharmacology of glucosidase inhibitors, Oral antidiabetics*, Springer, pp. 497-534.
 43. Maury J., Issad T., Perdereau D., Gouhot B., Ferré P., Girard J., 1993, Effect of acarbose on glucose homeostasis, lipogenesis and lipogenic enzyme gene expression in adipose tissue of weaned rats, *Diabetologia*, 36(6), pp. 503-9.
 44. El-Korany S. M., Helmy O. M., El-Halawany A. M., Ragab Y. E.M., Zedan H. H., 2020, Kojic acid repurposing as a pancreatic lipase inhibitor and the optimization of its production from a local *Aspergillus oryzae* soil isolate, *BMC Biotechnology*, 20(1), p 52.
 45. Liu D., Wang F., Liao T., Tang J., Steglich W., Zhu H., Liu J., 2006, Vibralactone: A Lipase Inhibitor with an Unusual Fused β -Lactone Produced by Cultures of the Basidiomycete *Boreostereum vibrans*, *Organic Letters*, 8(25), pp. 5749-5752.
 46. Kim M.J., Kim O.H., Cheong C., Jang K.H., Kim C.H., Kang S. A., 2015, β -Glucan from *Aureobasidium* species inhibits fat accumulation in 3T3-L1 adipocyte differentiation, *Food Science and Biotechnology*, 24(3), pp. 1147-1150.
 47. Seoung Rak L., Heesun K., Min Jeong Y., Jae Sik Y., Seulah L., Sang Ah Y., Christine B., Jaecheol L., Ki Hyun K., 2020, Anti-adipogenic Pregnane Steroid from a *Hydractinia*-associated Fungus, *Cladosporium sphaerospermum* SW67, *Natural Product Sciences*, 26.
 48. Kojima-Yuasa A., Deguchi Y., Konishi Y., Matsui-Yuasa I., 2012, Effect of 1,5-anhydro-D-fructose on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes, *Nat Prod Commun*, 7(11), pp. 1501-6.
 49. Cheng M.J., Wu M.D., Hsieh S.Y., Su Y.S., Chen I.S., Yuan G.F., 2011, Secondary metabolites from the endophytic fungus *Annulohyphoxylon*

- boveri var. microspora BCRC 34012, *Chemistry of Natural Compounds*, 47(4), pp. 536-540.
50. Li J., Li X., Li Z., Zhang L., Liu Y., Yin S., Ding H., 2017, Isofraxidin, a coumarin component improves high-fat diet induced hepatic lipid homeostasis disorder and macrophage inflammation in mice, *Food Funct.*, 8.
 51. Herold K., Mrowka R., 2019, Inflammation-Dysregulated inflammatory response and strategies for treatment, *Acta Physiol (Oxf)*, 226(3), p e13284.
 52. Sharma J. N., Al-Omran A., Parvathy S. S., 2007, Role of nitric oxide in inflammatory diseases, *Inflammopharmacology*, 15(6), pp. 252-9.
 53. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T., 2014, IL-6 in inflammation, immunity, and disease, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(10), p a016295.
 54. Borel J. F., 2002, History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development, *Wien Klin Wochenschr*, 114(12), pp. 433-7.
 55. Fretz H., Albers M. W., Galat A., Standaert R. F., Lane W. S., Burakoff S. J., Bierer B. E., Schreiber S. L., 1991, Rapamycin and FK506 binding proteins (immunophilins), *Journal of the American Chemical Society*, 113(4), pp. 1409-1411.
 56. Kim K., Jung S. Y., Lee D. K., Jung J. K., Park J. K., Kim D. K., Lee C. H., 1998, Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A2, *Biochem Pharmacol*, 55(7), pp. 975-85.
 57. Zhang Y., Liu C., Dong B., Ma X., Hou L., Cao X., Wang C., 2015, Anti-inflammatory activity and mechanism of surfactin in lipopolysaccharide-activated macrophages, *Inflammation*, 38(2), pp. 756-64.
 58. Park S. Y., Kim Y., 2009, Surfactin inhibits immunostimulatory function of macrophages through blocking NK-kappaB, MAPK and Akt pathway, *Int Immunopharmacol*, 9(7-8), pp. 886-93.
 59. Park S. Y., Kim J. H., Lee S. J., Kim Y., 2013, Involvement of PKA and HO-1 signaling in anti-inflammatory effects of surfactin in BV-2 microglial cells, *Toxicol Appl Pharmacol*, 268(1), pp. 68-78.
 60. Yang X., Kang M.C., Li Y., Kim E.A., Kang S.M., Jeon Y.J., 2017, Asperflavin, an Anti-Inflammatory Compound Produced by a Marine-Derived Fungus, *Eurotium amstelodami*, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(11), p 1823.
 61. Yang X., Kang M. C., Li Y., Kim E. A., Kang S. M., Jeon Y. J., 2014, Anti-inflammatory activity of questinol isolated from marine-derived fungus *Eurotium amstelodami* in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages, *J Microbiol Biotechnol*, 24(10), pp. 1346-53.

62. Zhang P., Jia C., Deng Y., Chen S., Chen B., Yan S., Li J., Liu L., 2019, Anti-inflammatory prenylbenzaldehyde derivatives isolated from *Eurotium cristatum*, *Phytochemistry*, 158, pp. 120-125.
63. Li H., Huang H., Hou L., Ju J., Li W., 2017, Discovery of Antimycin-Type Depsipeptides from a wbl Gene Mutant Strain of Deepsea-Derived *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66 and Their Effects on Pro-inflammatory Cytokine Production, *Frontiers in Microbiology*, 8.
64. Liu J., Gu B., Yang L., Yang F., Lin H., 2018, New Anti-inflammatory Cyclopeptides From a Sponge-Derived Fungus *Aspergillus violaceofuscus*, 6.
65. Shin H. J., Heo C.S., Anh C. V., Yoon Y. D., Kang J. S., 2022, Streptoglycerides E–H, Unsaturated Polyketides from the Marine-Derived Bacterium *Streptomyces specialis* and Their Anti-Inflammatory Activity, *Marine Drugs*.
66. Wang X.J., Min C.L., Ge M., Zuo R.H., 2014, An endophytic sanguinarine-producing fungus from *Macleaya cordata*, *Fusarium proliferatum* BLH51, *Current microbiology*, 68(3), pp. 336-341.
67. Niu X., Fan T., Li W., Xing W., Huang H., 2012, The anti-inflammatory effects of sanguinarine and its modulation of inflammatory mediators from peritoneal macrophages, *Eur J Pharmacol*, 689(1-3), pp. 262-9.
68. Strobel G., Daisy B., 2004, Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67, pp. 491-502.
69. Phani Kumar G., Navya K., Ramya E. M., Venkataramana M., Anand T., Anilakumar K. R., 2013, DNA damage protecting and free radical scavenging properties of *Terminalia arjuna* bark in PC-12 cells and plasmid DNA, *Free Radicals and Antioxidants*, 3(1), pp. 35-39.
70. Kumar S., Pandey A. K., 2013, Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview, *The Scientific World Journal*, 2013, pp. 162750-162750.
71. Chen L. G., Yang L. L., Wang C. C., 2008, Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*, *Food Chem Toxicol*, 46(2), pp. 688-93.
72. Tsikas D., 2007, Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 851(1-2), pp. 51-70.
73. Berridge M. V., Herst P. M., Tan A. S., 2005, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction, *Biotechnol Annu Rev*, 11, pp. 127-52.

74. Lewis D. R., Liu D. J., 2012, Direct Measurement of Lipase Inhibition by Orlistat Using a Dissolution Linked In Vitro Assay, *Clin Pharmacol Biopharm*, 1.
75. Mishra A., Gond S. K., Kumar A., Sharma V. K., Verma S. K., Kharwar R. N., Sieber T. N., 2012, Season and tissue type affect fungal endophyte communities of the Indian medicinal plant *Tinospora cordifolia* more strongly than geographic location, *Microb Ecol*, 64(2), pp. 388-98.
76. White T., Bruns T., Lee S., Taylor J., Innis M., Gelfand D., Sninsky J., 1990, *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*, pp. 315-322.
77. Bavaro S. L., Susca A., Frisvad J. C., Tufariello M., Chytiri A., Perrone G., Mita G., Logrieco A. F., Bleve G., 2017, Isolation, Characterization, and Selection of Molds Associated to Fermented Black Table Olives, *Frontiers in microbiology*, 8, pp. 1356-1356.
78. Rigby C., 1984, Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology, Fourth Edition, *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 25(12), pp. 442-442.
79. Foti M., 2015, The Use and Abuse of the dpph• Radical, *Journal of agricultural and food chemistry*, 63.
80. Miyake Y., Ito C., Itoigawa M., Osawa T., 2009, Antioxidants produced by *Eurotium herbariorum* of filamentous fungi used for the manufacture of karebushi, dried bonito (Katsuobushi), *Biosci Biotechnol Biochem*, 73(6), pp. 1323-7.
81. Miyake Y., Ito C., Kimura T., Suzuki A., Nishida Y., Itoigawa M., 2014, Isolation of Aromatic Compounds Produced by *Eurotium herbariorum* NU-2 from Karebushi, a Katsuobushi, and their DPPH-Radical Scavenging Activities, *Food Science and Technology Research*, 20(1), pp. 139-146.
82. Susilowati D., Radiastuti N., Nurhasni N., Rustanti L., Roostika I., 2021, Potential of endophytic fungi deriving from Asiatic Pennyworth to produce antioxidants, *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 22, p 58.
83. Choi G., Lee M. S., Park Y. G., Choi I. W., Lee D. S., 2020, Antioxidant, Anti-inflammatory, and Antibacterial Activities of Actinobacteria Isolated from Marine Sediment, *Journal of Marine Biology & Oceanography*, 9(4).
84. Kemung H. M., Tan L. T. H., Chan K. G., Ser H. L., Law J. W. F., Lee L. H., Goh B. H., 2020, Antioxidant Activities of *Streptomyces* sp. strain MUSC 14 from Mangrove Forest Soil in Malaysia, *BioMed Research International*, 2020, p 6402607.

85. Pieniz S., Andrezza R., Okeke B. C., Camargo F. A., Brandelli A., 2015, Antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus* species isolated from meat and dairy products, *Braz J Biol*, 75(4), pp. 923-31.
86. Ďuračková Z., 2010, Some current insights into oxidative stress, *Physiol Res*, 59(4), pp. 459-469.
87. Chan J. K., Roth J., Oppenheim J. J., Tracey K. J., Vogl T., Feldmann M., Horwood N., Nanchahal J., 2012, Alarmins: awaiting a clinical response, *The Journal of clinical investigation*, 122(8), pp. 2711-2719.
88. Imai Y., Kuba K., Neely G. G., Yaghubian-Malhami R., Perkmann T., van Loo G., Ermolaeva M., Veldhuizen R., Leung Y. H., Wang H., Liu H., Sun Y., Pasparakis M., Kopf M., Mech C., Bavari S., Peiris J. S., Slutsky A. S., Akira S., Hultqvist M., Holmdahl R., Nicholls J., Jiang C., Binder C. J., Penninger J. M., 2008, Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury, *Cell*, 133(2), pp. 235-49.
89. Powers K. A., Szászi K., Khadaroo R. G., Tawadros P. S., Marshall J. C., Kapus A., Rotstein O. D., 2006, Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages, *The Journal of experimental medicine*, 203(8), pp. 1951-1961.
90. Aronson D., Rayfield E. J., 2002, How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms, *Cardiovasc Diabetol*, 1, p 1.
91. Bełtowski J., Wójcicka G., Górny D., Marciniak A., 2000, The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity, *J Physiol Pharmacol*, 51(4 Pt 2), pp. 883-96.
92. Strauss R. S., 1999, Comparison of serum concentrations of alpha-tocopherol and beta-carotene in a cross-sectional sample of obese and nonobese children (NHANES III). National Health and Nutrition Examination Survey, *J Pediatr*, 134(2), pp. 160-5.
93. Salvadori A., Fanari P., Fontana M., Buontempi L., Saezza A., Baudo S., Miserocchi G., Longhini E., 1999, Oxygen uptake and cardiac performance in obese and normal subjects during exercise, *Respiration*, 66(1), pp. 25-33.
94. Jung R. T., 1997, Obesity as a disease, *Br Med Bull*, 53(2), pp. 307-21.
95. Pi-Sunyer F. X., 1991, Health implications of obesity, *Am J Clin Nutr*, 53(6 Suppl), pp. 1595s-1603s.
96. Hirosumi J., Tuncman G., Chang L., Görgün C. Z., Uysal K. T., Maeda K., Karin M., Hotamisligil G. S., 2002, A central role for JNK in obesity and insulin resistance, *Nature*, 420(6913), pp. 333-6.
97. Harmon J. S., Stein R., Robertson R. P., 2005, Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing

- mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells, *J Biol Chem*, 280(12), pp. 11107-13.
98. Olson L. K., Sharma A., Peshavaria M., Wright C. V., Towle H. C., Rodertson R. P., Stein R., 1995, Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20), pp. 9127-31.
 99. Abdel-Monem N., Abdel-Azeem A., El Ashry E. S., Ghareeb D., Nabil A., 2013, Assessment of Secondary Metabolites from Marine-Derived Fungi as Antioxidant, *Open Journal of Medicinal Chemistry*, 03, pp. 60-73.
 100. Shin M. R., Lee J. H., Lee J. A., Kim M. J., Park H. J., Park B. W., Seo S. B., Roh S. S., 2021, Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Phellinus linteus* mycelium, *BMC Complement Med Ther*, 21(1), p 269.
 101. Ellulu M. S., Patimah I., Khaza'ai H., Rahmat A., Abed Y., 2017, Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications, *Archives of medical science : AMS*, 13(4), pp. 851-863.
 102. Jagers J. R., Sui X., Hooker S. P., LaMonte M. J., Matthews C. E., Hand G. A., Blair S. N., 2009, Metabolic syndrome and risk of cancer mortality in men, *Eur J Cancer*, 45(10), pp. 1831-8.
 103. Stephens J. M., Lee J., Pilch P. F., 1997, Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction, *J Biol Chem*, 272(2), pp. 971-6.
 104. Senn J. J., Klover P. J., Nowak I. A., Zimmers T. A., Koniaris L. G., Furlanetto R. W., Mooney R. A., 2003, Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes, *J Biol Chem*, 278(16), pp. 13740-6.
 105. Kim H. J., Higashimori T., Park S. Y., Choi H., Dong J., Kim Y. J., Noh H. L., Cho Y. R., Cline G., Kim Y. B., Kim J. K., 2004, Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo, *Diabetes*, 53(4), pp. 1060-7.
 106. Leal V., Mafra D., 2013, Adipokines in obesity, *Clinica Chimica Acta*, 419, pp. 87-94.
 107. Hauner H., 2005, Secretory factors from human adipose tissue and their functional role, *Proc Nutr Soc*, 64(2), pp. 163-9.
 108. Thomson C. A., Delaquis P. J., Mazza G., 1999, Detection and measurement of microbial lipase activity: a review, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 39(2), pp. 165-87.

109. Alias N., Leow T., Mohamad Ali M. S., Tajudin A., Salleh A., Rahman R., 2017, Anti-obesity Potential of Selected Tropical Plants via Pancreatic Lipase Inhibition, *Advances in Obesity, Weight Management & Control*, 6, pp. 1-11.
110. Lee J. A., Cho Y. R., Hong S. S., Ahn E. K., 2017, Anti-Obesity Activity of Saringosterol Isolated from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt Extract in 3T3-L1 Cells, 31(11), pp. 1694-1701.
111. Wan-Loy C., Siew-Moi P., 2016, Marine Algae as a Potential Source for Anti-Obesity Agents, *Mar Drugs*, 14(12).
112. Gulyamova T. G., Ruzieva D. M., Yoldosheva M., Rasulova G. A., Kondrasheva K. V., 2022, Screening of Pancreatic Lipase Inhibitors of Endophytic Fungi of Medicinal Plants in Uzbekistan, *Biosci Biotech Res Asia*(19), p 4.
113. Gupta M., Saxena S., Goyal D., 2015, Potential pancreatic lipase inhibitory activity of an endophytic *Penicillium* species, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(1), pp. 15-21.
114. Fadillah W., Sukarno N., Iswantini D., Rahminiwati M., Hanif N., Waite M., 2021, In Vitro Pancreatic Lipase Inhibition by Marine Fungi *Purpureocillium lilacinum* Associated with *Stylissa* sp. Sponge as Anti-obesity Agent, *HAYATI Journal of Biosciences*, 29, pp. 76-86.
115. Birari R. B., Bhutani K. K., 2007, Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential, *Drug discovery today*, 12(19-20), pp. 879-889.
116. Bourne Y., Martinez C., Kerfelec B., Lombardo D., Chapus C., Cambillau C., 1994, Horse pancreatic lipase. The crystal structure refined at 2.3 Å resolution, *J Mol Biol*, 238(5), pp. 709-32.
117. Jain K. S., Kathiravan M. K., Somani R. S., Shishoo C. J., 2007, The biology and chemistry of hyperlipidemia, *Bioorg Med Chem*, 15(14), pp. 4674-99.
118. Sánchez J., Priego T., Palou M., Tobaruela A., Palou A., Pico C. J. E., 2008, Oral supplementation with physiological doses of leptin during lactation in rats improves insulin sensitivity and affects food preferences later in life, 149(2), pp. 733-740.
119. Williams G., 2010, Withdrawal of sibutramine in Europe, *Bmj*, 340, p c824.
120. Hocking A. D., 2014, *Spoilage Problems: Problems Caused by Fungi*, pp. 471-481.
121. Egbuta M., Mwanza M., Babalola O., 2016, A Review of the Ubiquity of Ascomycetes Filamentous Fungi in Relation to Their Economic and Medical Importance, *Advances in Microbiology*, 06, pp. 1140-1158.

122. Butinar L., Zalar P., Frisvad J. C., Gunde-Cimerman N., 2005, The genus *Eurotium* - members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns, *FEMS Microbiol Ecol*, 51(2), pp. 155-66.
123. Pitt J. I., 1997, *Fungi and food spoilage / J.I. Pitt and A.D. Hocking*, ed. Hocking, Ailsa D., Blackie Academic & Professional, London ; New York.
124. Greco M., Pardo A., Pose G., Patriarca A., 2018, Effect of water activity and temperature on the growth of *Eurotium* species isolated from animal feeds, *Rev Iberoam Micol*, 35(1), pp. 39-48.
125. Yildiz A., Çoksöyler F. N., 2002, Heat-resistance characteristics of ascospores of *Eurotium chevalieri* isolated from apricot juice, *Die Nahrung*, 46, pp. 28-30.
126. Du F. Y., Li X. M., Li C. S., Shang Z., Wang B. G., 2012, Cristatamins A-D, new indole alkaloids from the marine-derived endophytic fungus *Eurotium cristatum* EN-220, *Bioorg Med Chem Lett*, 22(14), pp. 4650-3.
127. Salazar A., Almeida A., Dethoup T., Singburadom N., Lima R., Vasconcelos M., Pinto M., Kijjoa A., 2010, The in vitro anticancer activity of the crude extract of the sponge-associated fungus *Eurotium cristatum* and its secondary metabolites, *Journal of natural Pharmaceuticals*, 1.
128. Liu Y., Wu F., 2010, Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment, *Environ Health Perspect*, 118(6), pp. 818-24.
129. Santini A., Ritieni A., 2013, Aflatoxins: risk, exposure and remediation, *Aflatoxins-recent advances and future prospects*, pp. 343-376.
130. Zhao Q., Qiu Y., Wang X., Gu Y., Zhao Y., Wang Y., Yue T., Yuan Y., 2020, Inhibitory Effects of *Eurotium cristatum* on Growth and Aflatoxin B(1) Biosynthesis in *Aspergillus flavus*, *Frontiers in microbiology*, 11, pp. 921-921.
131. Kämpfer P., Glaeser S. P., Parkes L., Keulen G. V., Dyson P., 2014, *The family streptomycetaceae*, Springer.
132. Flärdh K., Buttner M. J., 2009, *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium, *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), pp. 36-49.
133. Schatz A., Waksman S. A., 1944, Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and Related Organisms, *Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine*, 57(2), pp. 244-248.
134. Hopwood D. A., 2007, *Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers*, Oxford University Press.

135. Kim Y. J., Kim J., Rho J. Y., 2019, Antifungal Activities of *Streptomyces blastmyceticus* Strain 12-6 Against Plant Pathogenic Fungi, *Mycobiology*, 47(3), pp. 329-334.
136. Chen C., Chen X., Ren B., Guo H., Abdel-Mageed W. M., Liu X., Song F., Zhang L., 2021, Characterization of *Streptomyces* sp. LS462 with high productivity of echinomycin, a potent antituberculosis and synergistic antifungal antibiotic, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 48(9-10).
137. Tan L. T., Chan K., Khan T. M., Bukhari S. I., Saokaew S., Duangjai A., Pusparajah P., Lee L., Goh B., 2017, *Streptomyces* sp. MUM212 as a Source of Antioxidants with Radical Scavenging and Metal Chelating Properties, *Frontiers in pharmacology*, 8, pp. 276-276.
138. Brady C., Cleenwerck I., Venter S., Coutinho T., De Vos P., 2013, Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*, *Syst Appl Microbiol*, 36(5), pp. 309-19.
139. Berger B., Baldermann S., Ruppel S., 2017, The plant growth-promoting bacterium *Kosakonia radicincitans* improves fruit yield and quality of *Solanum lycopersicum*, *J Sci Food Agric*, 97(14), pp. 4865-4871.
140. Peng G., Zhang W., Luo H., Xie H., Lai W., Tan Z., 2009, *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*, *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(Pt 7), pp. 1650-5.
141. Schilling G., Gransee A., Deuhel A., Ležoviž G., Ruppel S., 1998, Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere, *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 161(4), pp. 465-478.
142. Scholz-Seidel C., Ruppel S., 1992, Nitrogenase- and phytohormone activities of *Pantoea agglomerans* in culture and their reflection in combination with wheat plants, *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 147(5), pp. 319-328.

143. Merbach W., Mirus E., Knof G., Remus R., Ruppel S., Russow R., Gransee A., Schulze J., 1999, Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance+, *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 162(4), pp. 373-383.
144. Inoue K., Sugiyama K., Kosako Y., Sakazaki R., Yamai S., 2000, *Enterobacter cowani* sp. nov., a new species of the family Enterobacteriaceae, *Curr Microbiol*, 41(6), pp. 417-20.
145. Kang D., Meng S., Duan Y., Huang Y., 2019, *Eurotium cristatum*, a potential probiotic fungus from Fuzhuan brick tea, alleviated obesity in mice by modulating gut microbiota, *Food & Function*, 10.
146. Park D. H., Kim J. S., Kwon S. W., Wilson C., Yu Y. M., Hur J. H., Lim C. K., 2003, *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea, *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 53(6), pp. 2049-2054.
147. Quintana E. T., Wierzbicka K., Mackiewicz P., Osman A., Fahal A. H., Hamid M. E., Zakrzewska-Czerwinska J., Maldonado L. A., Goodfellow M., 2008, *Streptomyces sudanensis* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93(3), pp. 305-313.
148. Lewis J. W., Morley N. J., Drinkall J., Jamieson B. J., Wright R., Parry J. D., 2009, Toxic effects of *Streptomyces griseus* spores and exudate on gill pathology of freshwater fish, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(1), pp. 173-181.
149. Takashima M., Sakai H., Mori R., Arima K., 1962, A New Toxic Substance, Teleocidin, Produced by *Streptomyces*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 26(10), pp. 660-678.