

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN HỒNG NHUNG

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY CHỦNG
VI NẤM SINH TỔNG HỢP MYCOPHENOLIC ACID**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Hà Nội – 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN HỒNG NHUNG

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY CHỦNG
VI NẤM SINH TỔNG HỢP MYCOPHENOLIC ACID**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

1. PGS.TS. Nguyễn Phương Nhuệ

2. TS. Hoa Thị Minh Tú

Hà Nội – 2023

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 trước pháp luật.

Học viên



Nguyễn Hồng Nhung

LỜI CẢM ƠN

Luận văn này được hoàn thành tại Phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong quá trình nghiên cứu, tôi đã nhận được nhiều sự giúp đỡ quý báu của các thầy cô, các nhà khoa học, các đồng nghiệp, gia đình và bạn bè.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc đến PGS.TS Nguyễn Phương Nhuệ và TS. Hoa Thị Minh Tú – những người thầy đã tận tâm hướng dẫn, chỉ dạy cho tôi về chuyên môn, đồng thời động viên, khích lệ và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn cũng như quá trình tôi làm việc tại Phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam .

Tôi xin cảm ơn lãnh đạo và các đồng nghiệp phòng công nghệ lên men, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện giúp đỡ, truyền kinh nghiệm đưa ra những lời khuyên bổ ích và góp ý quý báu trong suốt thời gian tôi làm việc tại phòng.

Tôi xin trân trọng cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học Công nghệ và tất cả các thầy cô, cán bộ của Học viện Khoa học và Công nghệ đã giảng dạy, cung cấp cho tôi các kiến thức mới và giúp tôi hoàn thành Chương trình đào tạo.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới toàn thể gia đình, người thân và bạn bè đã quan tâm, khích lệ, động viên tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Luận văn được giúp đỡ về mặt kinh phí và thực hiện trong khuôn khổ Đề tài độc lập cấp nhà nước: “*Nghiên cứu ứng dụng một số chủng vi nấm phân lập tại Việt Nam sinh hoạt chất Mycophenolic acid (MPA) làm nguyên liệu để sản xuất thuốc*” . Mã số: ĐTĐL.CN.06/21.

Học viên

Nguyễn Hồng Nhung

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

CCD	: Cấu trúc trung tâm
CYA	: Czapek Dox Yeast Autolysate
FDA	: Dược phẩm Mỹ
IGS	: Vùng biến động hơn
IMPDH	: Enzyme inosine monophosphate dehydrogenase
ITS	: Internal transcribed spacer
ITS	: Vùng phiên mã bên trong
MMF	: Mycophenolat mofetil
MPA	: Mycophenolic acid
MPA	: Mycophenolic acid (Cục quản lý Thực phẩm)
PCR	: Polymerase Chain Reaction
SAM	: S-adenosyl-L-methionine
YM	: Yeast Malt

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1	3
TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Tổng quan sơ lược về mycophenolic acid.....	3
1.2. Quá trình sinh tổng hợp MPA.....	3
1.3. Tổng quan về quá trình lên men mycophenolic acid.....	5
1.4. Tình hình nghiên cứu trên thế giới về vi nấm sinh tổng hợp mycophenolic acid	6
1.5. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam về vi nấm sinh tổng hợp mycophenolic acid	8
1.6. Nghiên cứu định danh vi nấm	9
1.6.1. Phương pháp truyền thống.....	9
1.6.2. Kỹ thuật sinh học phân tử dùng trong định danh vi nấm.....	10
1.7. Ảnh hưởng của nuôi cấy đến sự sinh trưởng phát triển của vi sinh vật	12
1.7.1 Ảnh hưởng của yếu tố lý học.....	12
1.7.2 Ảnh hưởng của yếu tố hoá học	12
1.8. Điều kiện nuôi cấy vi nấm	13
1.8.1. Nhiệt độ.....	13
1.8.2. pH.....	13
1.8.3. Độ thông khí.....	13
1.9. Nguồn dinh dưỡng cacbon và nitơ của vi sinh vật.....	14
1.9.1. Nguồn dinh dưỡng cacbon	14
1.9.2. Nguồn dinh dưỡng nitơ	14
Chương 2.	16
ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu.....	16
2.1.1. Vật liệu.....	16
2.1.2. Hóa chất và các trang thiết bị thí nghiệm.....	16
2.2. Phương pháp nghiên cứu	16
2.2.1. Môi trường nuôi cấy, lên men chủng vi nấm	16
2.2.2 Phương pháp tách chiết MPA	17

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy lên sinh tổng hợp MPA của chủng nghiên cứu	19
2.2.4 Lựa chọn môi trường nuôi cấy sinh MPA cao	19
2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu.....	19
2.3. Định danh vi nấm.....	19
2.3.1. Định danh sơ bộ bằng phương pháp truyền thống các chủng vi nấm.....	19
2.3.2. Định danh vi nấm bằng phương pháp sinh học phân tử các chủng vi nấm.....	20
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	22
3.1. Tuyển chọn chủng vi nấm có khả năng sinh mycophenolic acid (MPA) cao từ bộ sưu tập giống.....	22
3.2. Phân loại chủng vi nấm N18	26
3.2.1. Phân loại chủng nấm N18 theo phương pháp truyền thống.....	26
3.2.2. Phân loại chủng bằng phương pháp sinh học phân tử	29
3.3. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp MPA của chủng nghiên cứu	32
3.3. 1 Ảnh hưởng của nhiệt độ	32
3.3.2 Ảnh hưởng của pH	32
3.3.3 Ảnh hưởng của tốc độ lắc.....	34
3.3.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy	34
3.3.5. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng và sinh tổng hợp hoạt chất MPA của chủng N18	36
3.3.6. Ảnh hưởng của nguồn C lên khả năng sinh tổng hợp MPA của chủng nấm N18.....	37
3.3.7. Ảnh hưởng của nguồn N lên khả năng sinh tổng hợp MPA của chủng nấm N18.....	39
3.3.8 Khả năng sinh tổng hợp MPA của chủng <i>Penicillium oxalicum</i> N18 nghiên cứu trên môi trường CDYA đã lựa chọn nguồn C,N và điều kiện nuôi cấy thích hợp	42
KẾT LUẬN.....	44
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	46

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1 Nguồn Cacbon được vi sinh vật sử dụng.....	14
Bảng 1.2 Nguồn Nitơ được vi sinh vật sử dụng.....	15
Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái các chủng vi nấm có khả năng sinh tổng hợp MPA.....	22
Bảng 3.2. Đặc Điểm hình thái chủng N18 sinh tổng hợp MPA.....	28
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nguồn C lên khả năng sinh tổng hợp MPA và tích lũy sinh khối của chủng P. oxalicum N18.....	38
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nguồn N lên khả năng sinh tổng hợp MPA của chủng P. oxalicum N18	40

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Sơ đồ chuyển hóa MPA ở chủng <i>P. brevicompactum</i>	4
Hình 1.2 Sơ đồ cấu trúc vùng ITS - rADN.....	11
Hình 3.1 Hàm lượng MPA được sinh tổng hợp từ các chủng sàng lọc	24
Hình 3.2. Sắc ký đồ HPLC của mẫu MPA chuẩn (Sigma)	25
Hình 3.3. Sắc ký đồ HPLC của mẫu dịch nuôi cấy chủng N18	26
Hình 3.4 Khuẩn lạc chủng N18	27
Hình 3.5 cuống đính bào tử chủng N18	27
Hình 3.6. Sản phẩm PCR trên gel agarosa 1%. Băng 1: Chủng đối chứng dương (<i>Penicillium</i> sp.) Băng 2: Chủng N18, Băng 3: thang ADN chuẩn (Marker Biolabs (0.1-10kb)).....	30
Hình 3.7 Cây phát sinh chủng loài của N18 được suy ra từ việc so sánh trình tự ITS	31
Hình 3.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sinh MPA của chủng N18 ..	32
Hình 3.9 . Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy ban đầu đến sinh tổng hợp MPA (mg/L) của chủng <i>Penicillium oxalicum</i> N18	33
Hình 3.10. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh MPA (mg/L) của chủng N18 nghiên cứu.....	34
Hình 3.11. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh tổng hợp MPA (mg/L) của chủng nấm tuyển chọn	35
Hình 3.12. Hình ảnh sinh khối nấm chủng <i>Penicillium</i> N18	36
Hình 3.13. Khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp MPA của chủng nấm N18 trên một số môi trường sau 14 ngày nuôi cấy	37
Hình 3.14. Hình ảnh sinh khối nấm chủng <i>Penicillium</i> N18 nuôi trong môi trường CDYA + Surcrose, CDYA + Glucose, có nguồn cacbon thích hợp nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp MPA.....	39
Hình 3.15. Hình ảnh sinh khối nấm chủng <i>Penicillium</i> N18 nuôi trong môi trường CDYA + Peptone, CDYA + NaNO ₃ , có nguồn cacbon thích hợp nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp MPA.....	41
Hình 3.16. So sánh khả năng sinh MPA trên môi trường và các điều kiện ban đầu với môi trường và các điều kiện đã lựa chọn của chủng <i>Penicillium</i> <i>oxalicum</i> N18.....	43

- Hình 3.17 . So sánh khả năng sinh trưởng trên môi trường và các điều kiện ban đầu với môi trường và các điều kiện đã lựa chọn của chủng *Penicillium oxalicum* N18.....43
- Hình 3.18. Lên men chủng *Penicillium oxalicum* N18 sinh tổng hợp MPA trên môi trường và các điều kiện đã lựa chọn trong bình dung tích 10 lít44

MỞ ĐẦU

Mycophenolic acid (MPA) là sản phẩm trao đổi chất bậc hai của một số chi nấm như *Penicillium*, *Acremonium*, *Byssoschlamys nivea* [1] có khả năng ức chế hoạt động của enzyme inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), do đó ức chế quá trình sinh tổng hợp DNA, RNA và phân chia tế bào. MPA vừa là chất ức chế miễn dịch, vừa là chất chống thải ghép, vừa chống lại sự phát triển của khối u, chống virus (virus viêm gan C), chống nấm, chống vi khuẩn. MPA đã được Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ (FDA) công nhận như 1 loại thuốc ức chế miễn dịch dùng trong điều trị các bệnh tự miễn và hỗ trợ chống thải ghép ở người được ghép mô, tạng cũng như hỗ trợ điều trị ung thư [2,3,4].

Trên thế giới, MPA được tổng hợp chủ yếu bằng con đường hóa học, tuy nhiên sản phẩm MPA tổng hợp hóa học thường tạp nhiễm các dẫn xuất không mong muốn nên tốn nhiều công sức và hóa chất cho việc tinh sạch. Vì vậy, hướng tổng hợp MPA tự nhiên từ vi sinh vật hiện nay đang được quan tâm nghiên cứu và đã có nhiều kết quả khả quan. Theo nghiên cứu của Vinokurova và cộng sự năm 2015 và Bjarne G Hansen và cộng sự năm 2011 đã chỉ ra MPA được sinh tổng hợp từ các chủng vi nấm [5,6]. Mycophenolic acid được sinh ra trong quá trình lên men chìm và lên men rắn một số chủng vi sinh vật như *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium stoloniferum*, *Penicillium roqueforti*, *Byssoschlamys nivea*,

Hiện nay trên thị trường, các loại thuốc ức chế miễn dịch (trong đó có MPA) sử dụng trong điều trị ức chế miễn dịch, hỗ trợ điều trị chống đào thải trong ghép mô và tạng có giá khá đắt nên không tiếp cận được với người bệnh. Tại Việt Nam đa phần trong số đó là các sản phẩm nhập khẩu, có giá thành cao, các sản phẩm trong nước từ nguồn nguyên liệu bản địa chưa có, chủ yếu là sản phẩm của Ấn Độ và giá rất cao, ví dụ: sản phẩm chứa MPA với tên thương mại CellCept^R có giá bán khoảng 3 triệu đồng/ 1hộp 100 viên, hay Myfortic giá khoảng 700 đô la Mỹ/hộp 360 viên hàm lượng 180 mg....

Để sản xuất được MPA tự nhiên thì việc nghiên cứu, phân lập các chủng vi nấm bản địa có khả năng sản sinh MPA cần được quan tâm và là một hướng đi mới nhằm hướng tới một nguồn nguyên liệu lớn có hiệu quả kinh tế cho

ngành công nghiệp dược trong nước và trong hỗ trợ điều trị ức chế miễn dịch và chống thải ghép khi ghép mô, tạng. Việc nghiên cứu nguồn thu nhận MPA từ vi sinh vật bản địa và sản xuất MPA trong nước là cần thiết, sản phẩm tạo ra có khả năng ứng dụng thực tiễn, giúp người dân tiếp cận được và có điều kiện hơn trong chữa trị bệnh góp phần đảm bảo và nâng cao sức khỏe cộng đồng, có ý nghĩa khoa học và mang tính thời sự, tăng hiệu quả kinh tế, xã hội. Chính vì vậy, chúng tôi đã lựa chọn đề tài: ***“Nghiên cứu một số điều kiện nuôi cấy chủng vi nấm sinh tổng hợp mycophenolic acid”***, nhằm xác định được điều kiện nuôi cấy thích hợp cho chủng vi nấm sinh tổng hợp mycophenolic acid tạo tiền đề cho việc nghiên cứu thu nhận hoạt chất này làm nguyên liệu cho sản xuất thuốc.

Mục tiêu của đề tài

1. ***Tuyển chọn được chủng vi nấm có khả năng sinh tổng hợp mycophenolic acid và phân loại chủng tuyển chọn đến loài.***
2. ***Xác định được một số điều kiện nuôi cấy thích hợp cho chủng vi nấm tuyển chọn sinh tổng hợp MPA cao.***

Nội Dung nghiên cứu

1. ***Tuyển chọn chủng vi nấm có khả năng sinh mycophenolic acid (MPA) cao***
2. ***Phân loại chủng vi nấm N18***
3. ***Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp MPA của chủng nghiên cứu***

Chương 1

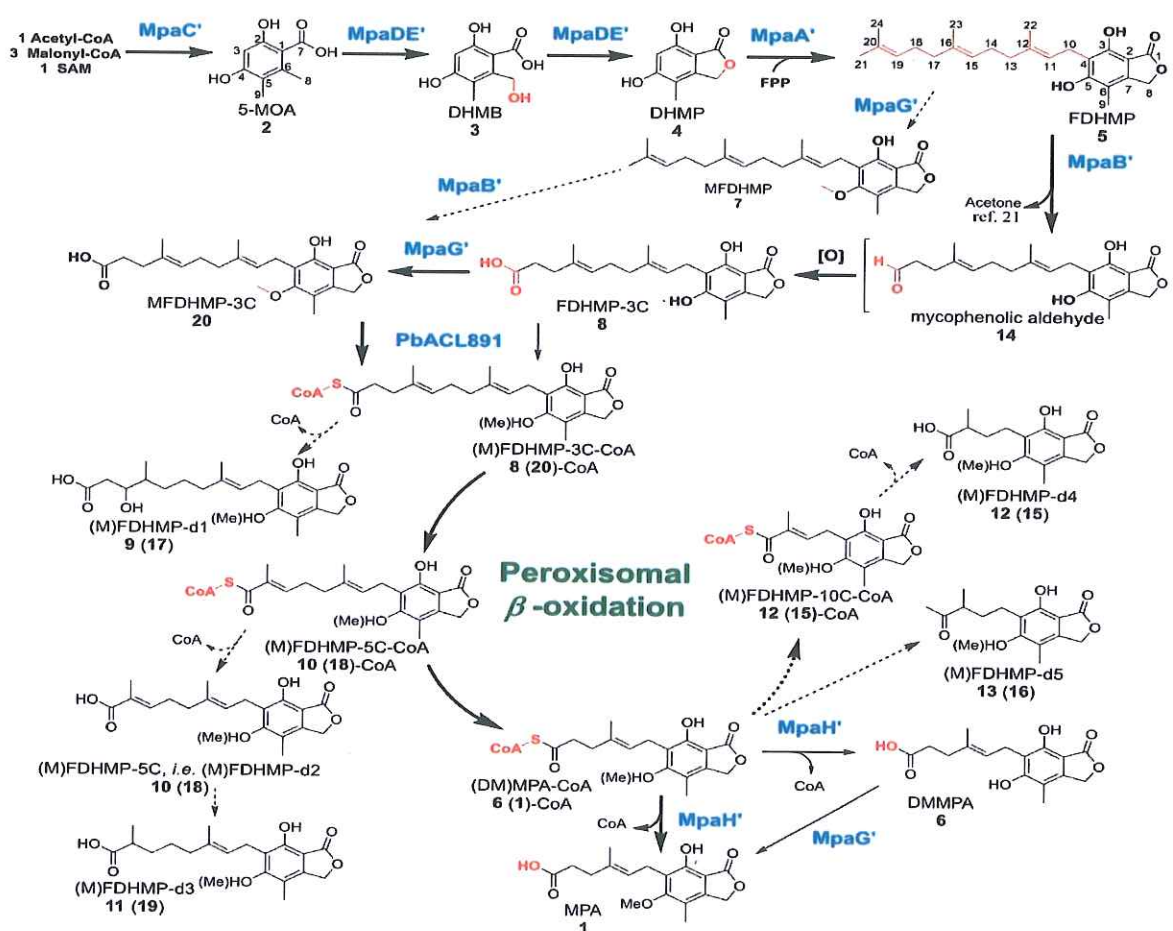
TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan sơ lược về mycophenolic acid

Mycophenolic acid (6- (4-hydroxy-6-metoxi-7-metyl-3- oxophthalanyl) -4-metyl-4-axit hexenic) (MPA) và các dẫn xuất của nó như mycophenolat mofetil (MMF) và natri mycophenolat đã được cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm (FDA) chấp thuận là thuốc ức chế miễn dịch. Các chất này có thể áp dụng trong việc giảm tỷ lệ thải ghép sau khi ghép tạng cũng như trong điều trị các bệnh tự miễn dịch khác nhau [7,5]. MPA ức chế enzym inosine monophosphat dehydrogenase (IMPDH) của tế bào lympho B và T tăng sinh. Điều này dẫn đến sự ngừng hoạt động của con đường tổng hợp purin và do đó làm giảm hiệu giá của các tế bào miễn dịch này và làm giảm cơ chế đào thải [8]. Do đó, nó dường như là lựa chọn thay thế chính để thay thế các thuốc ức chế miễn dịch như cyclo-sporin A [9]. Ngoài ra, nó có các hoạt tính kháng virus, kháng nấm, kháng khuẩn, chống khối u và chống bệnh vẩy nến [10,11] và được sử dụng làm chỉ thị phân tử khi nghiên cứu tính kháng của nấm men *Candida albicans* đối với các chế phẩm diệt nấm. MPA đôi khi được xếp vào loại độc tố nấm mốc vì nó có một số độc tính đối với động vật (liều gây chết 50% qua đường miệng ở chuột là 700 mg/ kg trọng lượng cơ thể) [12].

1.2. Quá trình sinh tổng hợp MPA

Những thông tin về quá trình sinh tổng hợp mycophenolic acid đã thu thập từ hơn bốn thập kỷ trước từ các nghiên cứu nuôi cấy bằng cách sử dụng tiền chất gắn đồng vị phóng xạ tổng hợp, cho thấy bộ khung của nó có nguồn gốc từ axit 5-methylorsellinic và farnesyl pyrophosphate (FPP), cũng như sự phân cắt oxy hóa giả định của chuỗi bên farnesyl (C15). Nhóm C-metyl ở C6 và nhóm O-metyl ở C5 được đề xuất có nguồn gốc từ S-adenosyl-L-methionine (SAM). Tuy nhiên, các cơ sở di truyền và enzym học cho 1 quá trình sinh tổng hợp vẫn còn chưa rõ ràng cho đến khi những phát hiện độc lập gần đây của Zhang và cộng sự về 3 cụm gen sinh tổng hợp MPA. Sau khi xác định các cụm enzyme này, 9 loại enzyme cần thiết cho con đường sinh tổng hợp MPA đã được tiết lộ thông qua đặc điểm chức năng của ba enzym sinh tổng hợp (Hình 1.1).



Hình 1.1. Sơ đồ chuyển hóa MPA ở chủng *P. brevicompactum*

1.3. Tổng quan về quá trình lên men mycophenolic acid

Nấm sợi có liên quan rộng rãi với khả năng tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học có các ứng dụng được phẩm quan trọng. Một trong những chi lớn nhất của nấm sợi là *Penicillium*, với hơn 354 loài được công bố, nhiều loài trong số đó có tầm quan trọng cao do khả năng sản xuất dược phẩm và các chất chuyển hóa thứ cấp. Chất chuyển hóa thứ cấp MPA được sản xuất bởi một số loài *Penicillium* như *P. brevicompactum*, *P. roqueforti*, *P. puberulum*, và *P. stoloniferum* cũng như các loại nấm khác thuộc chi *Byssosclamyces nivea*.

Trên cơ sở ứng dụng lâm sàng rộng rãi của MPA, các quy trình lên men đã được thực hiện bằng cách sử dụng nuôi cấy ở trạng thái chìm và ở trạng thái rắn của một số loài *Penicillium*, đặc biệt là *P. brevicompactum* cho thấy khả năng sản xuất tương đối cao [13]. Chiết xuất của một số chủng *P. roqueforti* nhưng cho nồng độ thấp hơn so với nồng độ được tổng hợp bởi *P. brevicompactum* [14]. Theo nghiên cứu của Parekh S và cộng sự năm 2000 chỉ ra các chủng vi sinh vật được đột biến và cải tiến môi trường để thực hiện lên men thương mại sản phẩm công nghiệp. Các chủng cải tiến như vậy có thể làm giảm chi phí của quy trình với năng suất tăng và cũng có thể có một số đặc điểm mong muốn chuyên biệt [15]. Tia cực tím có tác dụng trung bình, gây ra dime hóa pyrimidine bằng cách chuyển khung dịch chuyển từ cặp bazơ GC sang AT [16]. Trong số các bức xạ ion hóa, tia gamma là tia năng lượng mạnh nhất gây ra các đột biến như đứt gãy sợi đơn hoặc sợi đôi của DNA do mất đoạn hoặc thay đổi cấu trúc, liên kết chéo DNA-protein, bazơ bị oxy hóa và các vị trí cơ bản [17]. Chiếu xạ bằng tia gamma có thể gây ra một số đột biến đối với gen của tế bào thông qua cơ chế sửa chữa DNA trong tế bào [18].

Sự khác biệt trong các hiệu suất MPA có thể đạt được một phần liên quan đến các chủng đột biến. Ví dụ, sử dụng chủng MUCL 19011, Ardestani và cộng sự (2010) nhận thấy không vượt quá hiệu suất 3,63 g/L trong bình lắc và trong các chế độ lên men theo mẻ và liên tục.

Việc sản xuất MPA cũng bị ảnh hưởng bởi tỉ lệ nhân giống và môi trường nhân giống. Sản lượng MPA tối đa của chủng *Penicillium* thu được khi sử dụng bình Erlenmeyer 250 ml chứa 50 ml môi trường sản xuất với dịch nhân giống là 3 ml tương đương với 6% (v/v) và nồng độ bào tử là $2.9 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Tương tự, đã sử dụng cùng một tỉ lệ môi trường nuôi cấy để tạo ra sản lượng

cao nhất của MPA [5, 1,19]. Khi nghiên cứu về tỷ lệ giống, Vinokurova NG và cộng sự 2005 đã chỉ ra tỉ lệ giống 4% và 5% được sử dụng trong quy trình lên men MPA [5]. Ardestani F., và cộng sự (2011) đã sử dụng dịch nhân giống 0,5 ml (5.9×10^7 ml⁻¹) để cấy vào bình lắc 250 ml chứa môi trường 50 ml trong quá trình tạo MPA tối đa [1]. Xiang-tian và cộng sự (2005) nhận thấy rằng 10% giống cho sản lượng cao nhất của MPA [20]. Điều này phụ thuộc phần lớn vào nồng độ bào tử ban đầu trong môi trường. MPA được tích lũy cao trong môi trường nuôi khi cấy ở mật độ bào tử 10^7 ml⁻¹ và khi ít hơn 10^5 ml⁻¹ sản lượng MPA được tạo ra ít hơn [21].

1.4. Tình hình nghiên cứu trên thế giới về vi nấm sinh tổng hợp mycophenolic acid

Mycophenolic acid có công thức là C₁₇H₂₀O₆, (4-hydroxy – 6 methoxy – 7 – methyl – 3 oxophthalanyl – 4 methyl – 4 hexenic). Do phổ ứng dụng rộng của MPA mà nhu cầu tìm ra quy trình cải tiến để sản xuất MPA năng suất cao bằng lên men các chủng vi nấm đang rất được quan tâm.

Các chủng giống vi nấm có khả năng sinh tổng hợp MPA là nguồn cung cấp hoạt chất dễ kiểm soát và thao tác, có thể thu với lượng lớn với thời gian nhanh nhất. Tuy nhiên, chủng sản phân lập từ tự nhiên thường có khả năng tổng hợp hoạt chất sinh học thấp. Thông thường, để chủng có khả năng tổng hợp hoạt chất sinh học cao, có giá trị trong công nghiệp cần phải áp dụng các phương pháp nâng cao hoạt tính như lựa chọn các điều kiện, môi trường nuôi cấy thích hợp, tối ưu thành phần môi trường lên men, hoặc gây đột biến chủng.

Mặc dù có các phương pháp tổng hợp được công bố để sản xuất MPA, tuy nhiên, phương pháp lên men được sử dụng phổ biến nhất. Sản lượng MPA trong các phương pháp lên men được báo cáo phụ thuộc vào một số thông số như điều kiện lên men, cơ chất dinh dưỡng và tỷ lệ bổ sung, và cuối cùng là loại chủng được sử dụng. Mặc dù tất cả các thông số khác là rất quan trọng, loại chủng đột biến có thể cho được sản lượng cao hơn. Các phương pháp tối ưu môi trường, điều kiện nuôi cấy, bổ sung tiền chất hoặc các chất kích thích sinh tổng hợp là rất cần thiết để cải thiện hiệu quả sinh tổng hợp MPA của các chủng giống. Vinokurova và cộng sự (2005) đã tìm ra 36 loài thuộc chi *Penicillium* có khả năng sinh tổng hợp MPA [5]. Trong đó một số chủng có hoạt tính cao, đồng thời tác giả cũng nghiên cứu môi trường và yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp MPA, hàm lượng tích lũy trong môi trường

đạt cao nhất là 300-500 mg/L. Năm 2005, Sircar và cộng sự đã lên men chủng *P. brevicompactum* sinh tổng hợp MPA trên môi trường rắn có 20% glycerol trong điều kiện lên men tối ưu trong 5 ngày, ở 30°C [22]. Cơ chất dùng cho lên men được lựa chọn từ cám gạo, cám mì, bột đậu tương, bột mì, bột gạo, bột hạt bông, trấu. Tuy nhiên phương pháp lên men rắn không kinh tế, đặc biệt ở quy mô công nghiệp, do cần diện tích lớn, dễ tạp nhiễm.

Sun và cộng sự năm 2011 đã công bố rằng trong lên men lỏng chủng *P. brevicompactum* ATCC 16024 có thể sản xuất mycophenolic acid là 5,7 g /L [23]. Để giảm thiểu các tạp chất tạo thành trong quá trình lên men sinh tổng hợp MPA, Gulyas và cộng sự (2008) đã kiểm soát nguồn cacbon bổ sung vào môi trường và dùng một tạp chất được biết đến là homo-mycophenolic acid như một chất chỉ thị để đánh giá mức độ sản sinh tạp chất [24]. Trong 10 ngày lên men, nguồn glucose được duy trì ở mức 0,02-0,8% bằng cách bổ sung glucose một lượng 0,05-0,2%/ ngày từ ngày thứ 4 cho đến kết thúc lên men, đồng thời glycine cũng được bổ sung cùng thời điểm một lượng 0,1-0,3%/ ngày. Kết thúc lên men tạp chất sinh ra chỉ chiếm 0,5% khi xác định bằng HPLC và pH cũng tăng không đáng kể. Theo Ardestani F. và cộng sự (2010), quá trình sinh tổng hợp MPA của vi nấm *P. brevicompactum* MUCL 19011 được tiến hành trong bình tam giác 2 lít hoặc trong thiết bị lên men có cánh khuấy, sau từ 7 - 10 ngày thu được sản phẩm là 1,46 g/L; trong quá trình lên men tác giả duy trì nhiệt độ 27°C và pH 5,5 – 6,0. Các nghiên cứu trong môi trường nuôi cấy bình lắc (250 mL) sử dụng *P. brevicompactum* ATCC 8010 đã tạo ra 1,7 g/ L MPA [25].

Khi nghiên cứu lên men sinh tổng hợp MPA từ vi nấm thuộc chi *Penicillium*, Kumar và cộng sự (2011) nhận thấy các chủng đại cho sản lượng MPA tích lũy thấp hơn các chủng đột biến bằng hóa chất [26]. Bên cạnh đó các điều kiện nuôi cấy, dinh dưỡng cũng ảnh hưởng nhiều tới hoạt tính MPA của chủng. Lên men cần thực hiện ở nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của chủng giống, thông thường ở nhiệt độ phòng cho đến 37°C, thích hợp nhất là 25-30°C. Thời gian lên men tùy chủng, dao động từ 100 giờ đến khoảng 4-16 ngày, thông thường là 8-10 ngày. Trong quá trình lên men, pH được duy trì ở giá trị 6 và nhiệt độ duy trì ở 25°C. Lên men đến 146 giờ, dầu đậu nành 250 ml và saccharose được bổ sung vào môi trường. Kết thúc lên men hàm lượng MPA đạt 4,8 g/L. Nguồn cacbon được sử dụng gồm glucose, saccharose, tinh bột,

malto-dextrin, ...; nguồn N gồm amino acid, muối amoni nitrate, pepton, cao nấm men, cao thịt, ure,.....; Photphat buffer được dùng để duy trì pH trong suốt quá trình lên men, lượng oxy trong môi trường cũng cần được cung cấp đầy đủ và duy trì ổn định. Các nghiên cứu của Liqiang Chen và cộng sự (2008) đã phân lập các chủng *Penicillium* từ trầm tích biển Trung Quốc và các chủng này đều có khả năng sinh tổng hợp MPA [2].

Trong nghiên cứu sự tổng hợp MPA của chủng nấm *Byssoschlamys nivea* JSR2 trên cơ chất nước ép dừa và táo, ảnh hưởng tới sự tương tác của MPA với thụ thể NS5B của virus viêm gan C, Rikita và cộng sự (2014) đã nhận thấy chủng nấm này sinh tổng hợp MPA cao hơn trên cơ chất nước ép dừa [4].

Gopal Patel và cộng sự (2016) đã nghiên cứu sinh tổng hợp MPA bằng cách lên men chìm chủng nấm *Penicillium brevicompactum* MTCC 8010. Các thí nghiệm sàng lọc đã được sử dụng để xác định: thành phần môi trường phù hợp; pH ban đầu tối ưu; và nhiệt độ tối ưu để tối đa hóa việc sản xuất MPA trong môi trường nuôi cấy. Nồng độ ban đầu của các nguồn carbon (glucose), nito (peptone) và tiền chất được chọn (methionine, glycine) sau đó được tối ưu hóa bằng cách: (1) thay đổi từng yếu tố một lần; và (2) thiết kế thí nghiệm theo cấu trúc trung tâm (CCD), trong môi trường nuôi cấy 12 ngày ở pH ban đầu là 5.0, nhiệt độ 25 °C và tốc độ khuấy trộn 200 vòng / phút. Môi trường được tối ưu hóa bằng cách thay đổi từng yếu tố mang lại hiệu suất MPA cao nhất là 1232 ± 90 mg / L. Môi trường được tối ưu hóa bằng phương pháp CCD mang lại hiệu suất MPA cao hơn 40% là 1737 ± 55 mg / L. Hàm lượng MPA tích lũy theo phương pháp CCD lớn hơn gần 9 lần so với giá trị đạt được trước khi tối ưu hóa [27].

Anand và cộng sự (2020) đã nghiên cứu để tối ưu hóa sản xuất MPA thông qua quá trình lên men nấm *Penicillium brevicompactum* và tối ưu hóa quá trình tinh chế. Trong quy trình lên men theo mẻ, nồng độ MPA tối đa (1,84 g/ L) đã đạt được trong bình lên men dung tích 3,7 L có khuấy trộn [28].

1.5. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam về vi nấm sinh tổng hợp mycophenolic acid

Tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào chuyên sâu về vi nấm sinh tổng hợp MPA như các nghiên cứu về nuôi cấy, lên men, tách chiết, tinh sạch MPA từ vi nấm.

Gần đây, Chu Thanh Bình (2015) đã khảo sát khả năng sinh tổng hợp MPA của 10 chủng vi nấm thuộc chi *Penicillium* có khả năng sinh MPA đạt từ 0,0113 - 0,4306 mg/l, các chủng này phát triển thích hợp ở pH 6-7 và nguồn cacbon là glucose, saccharose, lactose (Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga) [29]. Nguyễn Đăng Quân (2016) đã nghiên cứu hiệu quả kháng ung thư của MPA trên mô hình tế bào *in vitro* và mô hình chuột [30].

Nguyễn Phương Huệ (2017) (Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) đã thực hiện đề tài cấp cơ sở thăm dò một số điều kiện nuôi cấy sinh tổng hợp mycophenolic acid (MPA) từ vi nấm định hướng tạo thực phẩm chức năng dùng hỗ trợ điều trị cho bệnh nhân ung thư. Bước đầu đã xác định được môi trường, một số điều kiện nuôi cấy (pH, nhiệt độ) của 04 chủng vi nấm thuộc chi *Penicillium* phân lập từ các mẫu trầm tích biển và nước biển Hòn Khô – Quy Nhơn, Đảo Cô Tô – Quảng Ninh có khả năng sản sinh MPA [31].

1.6. Nghiên cứu định danh vi nấm

1.6.1. Phương pháp truyền thống

Phương pháp định danh truyền thống thường được áp dụng trong phòng thí nghiệm là nuôi cấy, quan sát đặc điểm hình thái và đặc điểm vi hình thái. Bằng các phương pháp nhận dạng chủng nấm qua màu sắc, đặc điểm hình thái khuẩn lạc; quan sát hệ sợi, hình thái, vách ngăn sợi nấm, bào tử và cuống sinh bào tử,... theo các khóa phân loại của Nguyễn Lân Dũng & cs., (1982), Bùi Xuân Đồng (1984), Ainsworth & cs., (1973)... để sơ bộ nhận dạng, phân loại các chủng nấm đến chi/loài [32,33,34,35].

Định loại chủng nấm dựa trên các đặc điểm:

Đặc điểm hình thái

- Hình thái về khuẩn lạc được nuôi trên các môi trường khác nhau (màu sắc và kích thước khuẩn lạc).
- Đặc điểm bề mặt hệ sợi của khuẩn lạc: nhung mướt, mịn, len xốp, dạng hạt, lồi lõm, có khía hay không...
- Màu sắc khuẩn lạc mặt trên và mặt dưới, có sinh sắc tố hay không, màu gì?
- Dạng mép viền khuẩn lạc (mỏng, dày, phẳng, nhăn nheo...)
- Giọt tiết trên bề mặt khuẩn lạc nếu có màu gì?

Đặc điểm tế bào

- Hệ sợi nấm (hyphae): được mô tả dựa trên các đặc điểm khi nuôi tiêu bản để quan sát hệ sợi nấm trên kính hiển vi như vách ngăn (có hay không), có mấu?...

- Bào tử trần (conidia): hình dạng bào tử, cách sắp xếp, màu sắc bào tử, bề mặt bào tử

- Bộ máy mang bào tử (spore apparatus): nang bào tử và nang bào tử nhỏ (nếu có) (Sporangia & Sporangiola) hình dáng, kích thước, màu sắc, bề mặt của nang, cuống nang, không hoặc có nhánh (nhánh mọc vòng, mọc cách, hợp trục vv...); bào tử nang (hình dạng, kích thước, bề mặt, ...) ở nấm tiếp hợp.

Một đặc điểm rất quan trọng phân biệt giữa các chi là cách đính bào tử: Cuống bào tử đính dạng bình phân nhánh như ở *Aspergillus* hay dạng thẻ phân nhánh như ở *Penicillium*. Bào tử đính hình thành từ những cụm (cluster) trên những cuống bào tử đính ở *Trichoderma*

Tuy nhiên trong cùng một chi Nấm lại có rất nhiều loài và dưới loài. Vì vậy, để phân loại chủng đến loài bằng phương pháp truyền thống, cần tốn rất nhiều nhiều thời gian, công sức và chi phí mà đôi khi chỉ bằng cảm quan còn cho kết quả không chính xác. Gần đây, với sự ra đời của phương pháp sinh học phân tử, ngay từ khi ra đời đã giúp cho quá trình phân loại trở lên thuận lợi và chính xác hơn. Vì vậy, trong nghiên cứu này phân loại chủng N18 được kết hợp hai phương pháp: đặc điểm hình thái và giải trình tự vùng gen ITS để phân loại đến loài các chủng có tiềm năng ứng dụng vào thực tiễn.

1.6.2. Kỹ thuật sinh học phân tử dùng trong định danh vi nấm

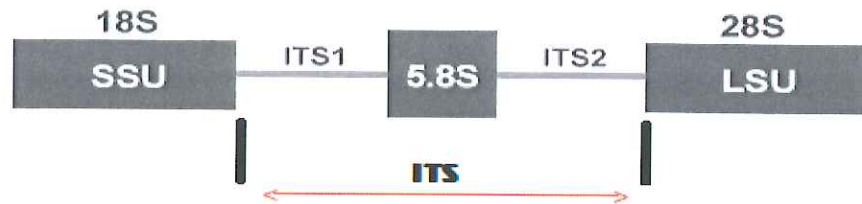
1.6.2.1. Cấu trúc ITS - rADN của nấm

ADN ribosome (rADN) là nhóm gen mã hóa ARN ribosome (rARN); rADN gồm những đoạn gen: 18S - 5.8S - 28S được xếp liên tiếp nhau và vùng IGS (intergenic spacer). Vùng phiên mã 18S kết thúc tiểu đơn vị nhỏ (SSU), trong khi 28S cộng với 5.8S và một gen 5S thêm vào từ những phần khác của genome hình thành tiểu đơn vị nhỏ (LSU) của rARN. Trong đoạn gen 18S - 5.8S - 28S, vùng ITS (internal transcribed spacer) nằm giữa đơn vị 18S và 28S [36]. Vùng ITS có ba phần: ITS1- 5.8S - ITS (hình 1.2).

ITS có chức năng trong sự hình thành ribosome; rADN 18S thường được quan tâm nghiên cứu, rADN 5.8S có kích thước rất nhỏ. Ở đầu kết thúc 5' của 18S và đầu kết thúc 3' của 28S, cũng có một vùng được biết đến là ETS (external transcribed spacer); IGS (intergenic spacer) là vùng kém bảo tồn nhất của rADN. Các rADN 5.8S, 18S, 28S phiên mã thành các tiền rARN riêng rẽ,

nằm xen kẽ với các vùng phiên mã bên trong (ITS) và các vùng phiên mã bên ngoài (ETS) (hình 1.2).

Vùng ITS là vùng có rất nhiều biến động, mặc dù vùng ITS thường được sử dụng trong nghiên cứu tiến hóa của sinh vật tuy nhiên phần lớn các so sánh trên vùng này chỉ thường sử dụng ở mức độ xác định các biệt hóa trong cùng loài [37].



Hình 1.2 Sơ đồ cấu trúc vùng ITS - rADN

1.6.2.2. Cấu trúc ITS - rADN của vi nấm để phân loại và xác định tính đa dạng di truyền

Việc phân loại nấm dựa vào đặc điểm hình thái, vi hình thái, cơ chế trao đổi chất thường cho kết quả không chính xác và cần khoảng thời gian dài. Việc so sánh dựa trên trình tự nucleotid được giải mã của vùng rADN được xem là cơ sở chính xác để phân loại nấm cũng như xác định tính đa dạng di truyền của sinh vật cũng như các dòng nấm.

rADN chứa những vùng bảo tồn (18S - 5.8S - 28S), vùng ít bảo tồn (ITS) và những vùng biến động hơn (IGS). Những vùng này có thể được sử dụng để phân tích sự phát sinh loài và sự đa dạng di truyền của vi sinh vật (Kenneth & cs, 1998). Tuy nhiên, vùng 18S - 5.8S - 28S là vùng có tính bảo toàn cao, không tiến hóa nhanh, chỉ đủ để xác định loài nấm ở mức phân loại thấp. Vùng ITS được cho là có tính bảo toàn thấp, tiến hóa nhanh dẫn đến có sự thay đổi trình tự lớn giữa các loài có quan hệ chặt chẽ, do đó được sử dụng như một mã vạch ADN để nhận dạng nấm. Vùng ITS1 và ITS2 được tìm thấy giữa gen của tiểu đơn vị ribosome nhỏ (18S) và tiểu đơn vị ribosome lớn (28S) chỉ ra sự biến thiên trong cùng loài; vùng ITS2 có sự biến thiên kém hơn vùng ITS1, ngoài ra vùng ITS2 lại có tính bảo toàn cao hơn ở một vài vùng 18S. Bên cạnh đó, vùng ITS có kích thước nhỏ nên dễ dàng được khuếch đại; vì thế cho nên trình tự nucleotid vùng ITS đã được nghiên cứu nhiều và số lượng các trình tự nucleotide của vùng này được công bố trên ngân hàng gen khá phong phú, thuận lợi cho việc phân tích so sánh. Với những ưu điểm nói trên, phân tích

vùng ITS được chọn để nghiên cứu phát sinh loài và đánh giá đa dạng di truyền của vi nấm.

1.6.2.4. Một số nghiên cứu vùng rADN-ITS

Năm 2002, Kubicek ứng dụng kỹ thuật PCR giải mã trình tự vùng ITS1 và ITS2 nghiên cứu trên 96 mẫu nấm *Trichoderma* sp. [38]. Trên cơ sở nghiên cứu này đã xác định được tương quan của các dòng *Trichoderma* sp. được phân lập từ những địa điểm khác nhau. rADN được nghiên cứu bằng cách tách gen, nhân dòng và đọc trình tự. Ngoài ra phương pháp PCR được cải tiến thay vào đó là các phương pháp RFLP, RAPD, AFLP được đưa vào để nghiên cứu tính đa dạng di truyền dựa vào vùng rADN thay vì đọc trình tự vùng rADN [39].

1.7. Ảnh hưởng của nuôi cấy đến sự sinh trưởng phát triển của vi sinh vật

1.7.1 Ảnh hưởng của yếu tố lý học

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ là một trong các yếu tố quan trọng cho sự sinh trưởng và sinh tổng hợp các hoạt chất sơ cấp và thứ cấp (enzyme, kháng sinh, peptite...) của chủng nghiên cứu.

Một số nghiên cứu đã chỉ ra vi sinh vật có thể sinh trưởng và tồn tại trong khoảng nhiệt độ dài -18° - 140°C . Tùy theo khả năng sinh trưởng, ngưỡng chịu đựng và sống sót của từng chủng [40,41]:

- *Nhiệt độ tối ưu*: Là nhiệt độ thích hợp nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp các chất có hoạt tính ở vi sinh vật.

- *Nhiệt độ cao nhất*: Mức nhiệt độ cao nhất mà vi sinh vật có thể chịu đựng và sống sót

- *Nhiệt độ thấp nhất*: là ở ngưỡng nhiệt độ thấp nhất mà vi sinh vật vẫn có thể tồn tại và phát triển yếu. Nếu dưới ngưỡng nhiệt độ đó vi sinh vật sẽ bị tiêu diệt.

1.7.2 Ảnh hưởng của yếu tố hoá học

Ảnh hưởng của nồng độ ion hydro (pH)

Trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật, pH là yếu tố tác động trực tiếp lên sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Ion hydro trong thành phần môi trường làm thay đổi trạng thái điện tích của thành tế bào. Dẫn đến, tăng hoặc giảm khả năng thẩm thấu của tế bào ở vi sinh vật, từ đó ảnh hưởng đến các enzyme có mặt trên thành tế bào, ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp hoạt chất của vi sinh vật [42].

Ở vi sinh vật mỗi chi mỗi loài đều có khả năng thích nghi ở một môi trường axit hay kiềm. Ở môi trường trung tính hoặc kiềm yếu thường thích nghi đối với vi khuẩn. Trong môi trường axit yếu thường thích nghi với nấm men và nấm mốc.

Thông thường khi pha môi trường trong các phòng thí nghiệm, môi trường cho vi khuẩn thường pH 6,5 đến 7,5; đối với nấm men và nấm mốc 3,0 - 6,0.

Sự sinh trưởng hệ sợi nấm trong môi trường dịch thể được mô tả bằng khả năng hình thành các pellet, kích thước của các pellet và sinh khối sợi nấm thu được. Trong đó, sinh khối sợi là tiêu chí quan trọng nhất để đánh giá khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm trong môi trường dịch thể [42,43].

1.8. Điều kiện nuôi cấy vi nấm

Các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và sinh tổng hợp các hoạt chất của nấm như: Nhiệt độ, pH, độ thông khí trong quá trình nuôi cấy. Những điều kiện này ảnh hưởng đến lượng sinh khối nấm thu được, cũng như hàm lượng hoạt chất sinh học do nấm tiết ra [42,43].

1.8.1. Nhiệt độ

Thông thường ở nhiệt độ 20-35°C thích hợp cho vi nấm phát triển, ở ngoài ngưỡng nhiệt độ này vi nấm sinh trưởng yếu, sinh khối tích lũy và lượng hoạt chất sinh học tạo ra thấp.

1.8.2. pH

Vi nấm pH trung tính thích hợp cho tổng hợp hoạt chất sinh học. pH môi trường có ảnh hưởng đến các enzyme cũng như các ion trên màng tế bào. Dẫn đến một số thay đổi như hình thái và cấu trúc tế bào, độ hòa tan của các muối, các ion, sự hấp thụ các chất dinh dưỡng và quá trình sinh tổng hợp các chất khác nhau.

1.8.3. Độ thông khí

Ở mỗi chi mỗi loài nấm nhu cầu về độ thông khí là khác nhau. Theo nhiều nghiên cứu, nếu nuôi trên máy lắc, thì thể tích môi trường chỉ nên bằng 15-20% so với thể tích bình lên men là tối ưu cho sinh trưởng và sinh tổng hợp hoạt chất sinh học, ngược lại nếu ngoài ngưỡng trên đều ảnh hưởng tiêu cực đến quá trình này. Lên men khối lượng lớn hơn phải thường xuyên cấp khí vô trùng và khuấy trộn cho phân tử oxy hòa tan đều trong môi trường lên men, đảm bảo lượng oxy hoà tan cân bằng với nhu cầu sinh lý của vi nấm. Thông

thường, chế độ sục khí là 1 lít không khí/1 lít môi trường/1 phút và tốc độ khuấy khoảng 150-300 vòng/phút. Khuấy trộn quá mạnh làm tăng lượng ôxy hòa tan, sinh trưởng tăng, nhưng có thể tạo thêm nhiều sản phẩm không mong muốn.

Tốc độ lắc phù hợp khoảng từ 150 - 200 vòng/phút thì lượng sinh khối sợi nấm thu được cao, kéo theo sẽ thu được nhiều hoạt chất sinh học thứ cấp.

1.9. Nguồn dinh dưỡng cacbon và nitơ của vi sinh vật

1.9.1. Nguồn dinh dưỡng cacbon

Nguồn Cacbon trong môi trường đóng vai trò quan trọng trong sinh trưởng và sinh tổng hợp hoạt chất của các chủng vi sinh vật. Cacbon là thành phần chính tạo nên khung và cấu trúc của tế bào, chúng có thể chiếm đến khoảng một nửa trọng lượng khô của tế bào [44].

Mỗi loài vi sinh vật có khả năng đồng hóa các nguồn cacbon khác nhau. Thông thường đường là nguồn Cacbon và nguồn năng lượng tốt cho sinh trưởng và sinh tổng hợp hoạt chất của vi sinh vật.

Nguồn C chủ yếu được vi sinh vật sử dụng gồm có đường, acid hữu cơ, rượu, lipid, hydrocarbon, CO_2 , carbonat... được thể hiện ở Bảng 1.1 [44].

Bảng 1.1 Nguồn Cacbon được vi sinh vật sử dụng

Nguồn C	Các dạng hợp chất
Đường	glucose, fructose, maltose, saccharose, tinh bột, galactose, lactose, mannite, cellobiose, cellulose, hemicellulose, chitin...
Acid hữu cơ	acid lactic, acid citric, acid fumaric, acid béo bậc cao, acid béo bậc thấp, aminoacid...
Rượu	Ethanol
Lipid	lipid, phospholipid
Hydrocarbon	khí thiên nhiên, dầu thô, dầu paraffin
Carbonate	NaHCO_3 , CaCO_3 , đá phấn
Các nguồn C khác	Hợp chất nhóm thơm, cyanide, protein, pepton, acid nucleic...

Tham khảo nguồn Vietsciences- Nguyễn Lâm Dũng & Bùi Thị Việt Hà - 06/03/2009

1.9.2. Nguồn dinh dưỡng nitơ

Nguồn nitơ cũng ảnh hưởng nhiều đến tốc độ sinh trưởng và sinh tổng hợp hoạt chất của vi sinh vật.

Nguồn N thường được vi sinh vật sử dụng là protein và các sản phẩm phân huỷ của protein (peptone, peptide, amino acid...), muối amoni, nitrate, N phân tử (N_2), purine, pyrimidine, urea, amine, amide, cyanide...(bảng 1.2) [44]

Bảng 1.2 Nguồn Nitor được vi sinh vật sử dụng

Nguồn N	Các dạng hợp chất
Protein và các sản phẩm phân giải của protein	peptone, peptide, aminoacid... (một số vi sinh vật tiết men proteinase phân giải protein thành các hợp chất phân tử nhỏ hơn rồi mới hấp thu được vào tế bào)
Ammonia và muối ammonia	NH_3 , $(NH_4)_2SO_4$,... (dễ được hấp thu)
Nitrate	KNO_3 (dễ được hấp thu)
N phân tử	N_2 (với vi sinh vật cố định N)
Các nguồn N khác	purine, pyrimidine, urea, amine, amide, cyanide (chỉ một số nhóm vi sinh vật mới có thể đồng hoá được)

Tham khảo nguồn Vietsciences- Nguyễn Lâm Dũng & Bùi Thị Việt Hà - 06/03/2009

Trong sản xuất và lên men lớn các nguồn N pepton, bột cá, bột nhộng tằm, bột đậu tương, bột khô lạc, cao ngô, cao thịt, cao nấm men... là nguồn nguyên liệu rẻ tiền sẵn có thường được sử dụng trong sản xuất [44,45,46].

Chương 2.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng Công nghệ Lên men Viện Công nghệ sinh học, Viện hàn lâm KH&CN Việt Nam, thời gian từ ngày 01 tháng 6 năm 2022 đến 30 tháng 5 năm 2023

2.2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Vật liệu

Sáu mươi tám chủng vi nấm biến từ Bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật của phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học.

2.2.2. Hóa chất và các trang thiết bị thí nghiệm

Hóa chất:

- Hóa chất sử dụng trong môi trường nuôi cấy: glucose, khoai tây, cao nấm men, pepton, tryton, cao malt, cao thịt, fructose, saccharose, maltose, NaNO_3 , MgSO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaCl , FeSO_4 , CaCl_2 , ZnSO_4 , MgCl_2 , NH_4Cl , ethanol, streptomycin, tinh bột; casein, CMC tributyrin, nước cất...

- Hóa chất sử dụng tách chiết ADN: nitor lỏng, proteinase K, SDS, phenol, chloroform, isoamyl alcohol, lyzozyme, TE buffer...

- Hóa chất sử dụng trong điện di: gel agarose (1%), TAE 1X, dung dịch nhuộm gel EtBr (Ethidium bromide solution), bromophenol blue...

Trang thiết bị:

Cân điện thường. Cân phân tích (Mettelex, Toledo). Máy li tâm (Eppendorf, Đức). Tủ cấy vô trùng (Esco, Singapore). Máy lắc ổn nhiệt (Gerharat, Đức). Nồi khử trùng (Tommy, Nhật). Tủ ẩm (Friocell, Đức). (Nikon, Nhật). Kính hiển vi (Nikon, Nhật). Máy đọc trình tự ADN (Vilber Lourmat, Đức).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Môi trường nuôi cấy, lên men chủng vi nấm

Môi trường nuôi cấy Czapek-dox (CD) có thành phần (g/L): Sucrose 30, NaNO_3 2, K_2HPO_4 1, MgSO_4 0,5, KCl 0,5, FeSO_4 0,01, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5, agar 20, pH 6.

Môi trường nuôi cấy PDB có thành phần (g/L): Dịch chiết khoai tây 200, dextrose 20, pH 6.

Môi trường nhân giống Potato Dextrose Agar (PDA, g/L): Potato extract 4, Glucose 20, Agar 20, nước cất 1L.

Môi trường hoạt hóa giống nấm: Môi trường Yeast Malt (YM) có thành phần (g/L): Yeast extract 3, Malt extract 3, Peptone 5, Glucose 10, nước cất 1L.

Môi trường lên men sinh MPA: Môi trường Czapek-Dox Yeast Autolysate (CDYA): Môi trường Czapek 10ml; Sucrose 30 g/l; Cao nấm men 5 g/l; K_2HPO_4 1 g/l; Muối vi lượng 1 ml; Nước cất 1000 ml; pH $6,2 \pm 0,2$. Dung dịch nguyên tố vi lượng: 10 g $FeSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,7 g $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,056 g axit Boric, 0,1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,025 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,01 g amoni molybdat.

Môi trường Xu (Wu, 1994) (g/L): glucose, 100; glyxin, 14; l-methionine, 0,5; KH_2PO_4 , 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,2; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,3; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,4; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,16; và $KMoO_4$, 0,2. Trước khi hấp tiệt trùng, pH được điều chỉnh đến 6,0 bằng dung dịch HCl 1 N hoặc NaOH.

Môi trường Malt Extract agar: Cao Malt 50 g; Muối vi lượng 1 mL; Agar 20 g; Nước cất 1000 mL; pH $5,4 \pm 0,2$.

Môi trường Yeast extract sucrose agar (YES): Cao nấm men 20 g; Sucrose 150 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g; Muối vi lượng 1 mL; Agar 20 g; Nước cất 885 mL; pH $6,5 \pm 0,2$.

MT3 (g/L): Glucoza - 30; K_2HPO_4 - 5; $MgSO_4$ - 1; bột đậu tương - 20; pH từ 6,5-7,0

2.3.2 Phương pháp tách chiết MPA

* *Tách chiết MPA*: (1) Chủng nấm sau nuôi cấy được lọc qua giấy lọc loại bỏ sinh khối nấm, thu dịch nổi. (2) Dịch ngoại bào được điều chỉnh đến pH 2,0 bằng H_2SO_4 2M và chiết bằng ethyl acetate (tỷ lệ 1:1). Pha hữu cơ được làm bay hơi chân không trên thiết bị cô quay ở $56^\circ C$. Lặp lại 3 lần. Cặn được hòa tan trong 1000 μl methanol.

* *Xác định hàm lượng MPA*: bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên hệ thống Sắc ký lỏng hiệu năng cao detector PAD (PerkinElmer)

- Hóa chất, thiết bị: Dung môi hóa chất: Acetonitrile, amoni axetat, axit axetic, ethylenglycol và nước cất loại dùng cho phân tích và chạy HPLC; Cột sắc ký: Cột Zorbax SB - C18 (150 x 4.6 mm, 5 μm) và cột bảo vệ C18 của hãng Agilent; Màng lọc 0,45 μm cho kim bơm mẫu dùng để lọc mẫu trước khi bơm vào hệ thống.

- Thiết lập các thông số cho hệ thống HPLC: Lượng mẫu bơm: 1 μL ; Tốc độ dòng: 0,7 mL/phút; Hệ thống HPLC được kết nối với phần mềm Agilent

OpenLAB Control Panel. Khí nitơ được bơm với tốc độ dòng 5,0 L/phút, áp suất đầu phun đạt 60 psi, nhiệt độ làm khô đạt 250°C.

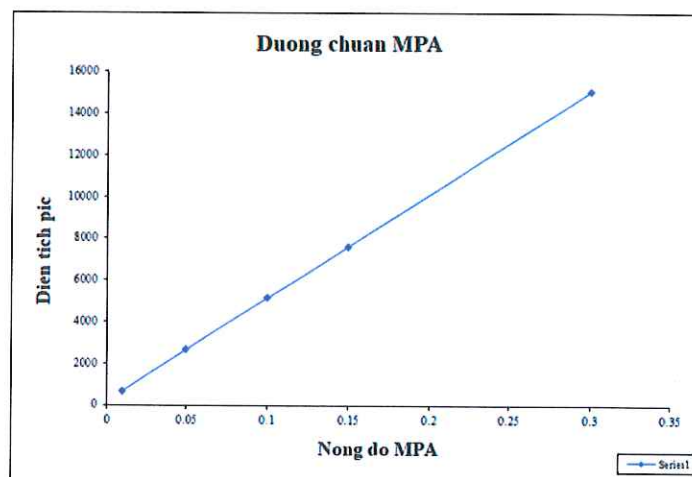
Chuẩn bị mẫu, thiết lập đường chuẩn định lượng: Chuẩn bị chất chỉ thị: mẫu chất chỉ thị được pha trong hỗn hợp dung môi MeOH thành nồng độ 1 mg/ml, sau đó pha loãng thành dãy các nồng độ khác nhau để thiết lập đường chuẩn định lượng. Các dung dịch chất chỉ thị và mẫu phân tích đều được lọc qua màng lọc 0,45µm trước khi bơm vào hệ thống LC/MS-Trap.

Thiết lập đường chuẩn định lượng: MPA chuẩn được cân chính xác 25 mg cho vào bình định mức (25 ml) sau đó thêm MeOH cho đến vạch ta được dung dịch gốc. Pha loãng dung dịch gốc thành các dung dịch có nồng độ 0.01 ; 0.05; 0.1; 0.15; và 0.3 mg/ml.

Ở mỗi nồng độ MPA ở trên được chạy lần lượt qua hệ thống LC/MS với cột phân tích: Zorbax SB -C18 RP (4.6 x 150 mm), Detector DAD và MS.

Thời gian chạy 30 phút/ mẫu thử. Mỗi nồng độ khác nhau, sẽ có kết quả khác nhau của giá trị cường độ pic ion phân tử, giá trị tích phân cường độ hấp thụ tử ngoại của pic, từ kết quả đó sử dụng phương pháp phân tích phương sai hồi qui tuyến tính một lớp (ANOVA) để xây dựng đường chuẩn để phục vụ cho việc định lượng MPA trong mẫu. Các thông số tối ưu, bao gồm:

Thông số của HPLC :



Pha động : Kênh A : H₂O + 0,1% axit fomic; Kênh B : methano; Tốc độ dòng 0,4 ml/phút, chạy gradient kênh A từ 80% - 0%, kênh B từ 20% - 100%. Detector DAD: bước sóng 254 nm

Thông số của MS:

Nguồn ion hoá ESI - MS; Dry temp 325°C; Dry gas 11lít/phút; Nebulizer 20psi; chân không ổn định 2,53 x 10⁻⁵mbar; Multiplier 1188Volt;

Dynode Voltage 3,5 kV. Các nồng độ MPA chuẩn 0.01; 0.05; 0.1; 0.15; và 0.3 mg/ml đã được đo lặp lại 3 lần bằng LC/MS, tiến hành xây dựng đường chuẩn. Thu được đường chuẩn theo phương trình hồi qui: $Y = 49678.x + 170$ (x-nồng độ MPA, Y-diện tích pic).

Định lượng MPA trong dịch chiết: Dịch chiết được cô quay chân không sau đó hòa tan lại trong methanol với thể tích 1ml. Đo trên máy LC/MS theo đúng điều kiện đã đo mẫu chuẩn và tính theo phương trình hồi qui thu được.

2.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy lên sinh tổng hợp MPA của chủng nghiên cứu

Chủng giống được nuôi trên đĩa thạch Czapeck-Dox ở 27-28 °C trong 3 ngày. Dịch huyền phù bào tử được hoà tan trong nước cất vô trùng để đạt mật độ $2,5 \times 10^7$ bào tử /ml và được sử dụng để cấy giống.

Ảnh hưởng của nhiệt độ: Nuôi lắc tốc độ 180 vòng/phút, ở nhiệt độ 20, 25, 28, 30, 32°C, thời gian nuôi 12 ngày.

Ảnh hưởng của pH: Nuôi lắc tốc độ 180 vòng/phút, ở nhiệt độ lựa chọn được, pH môi trường thay đổi gồm 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 trong 12 ngày.

Ảnh hưởng của tốc độ lắc: Nuôi lắc tốc độ 100, 120, 150, 180 và 200 vòng/phút, ở nhiệt độ và pH môi trường đã lựa chọn, thời gian nuôi 12 ngày.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy: Nuôi lắc ở tốc độ, nhiệt độ và pH ban đầu lựa chọn được, sau thời gian nuôi 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16 ngày.

2.3.4 Lựa chọn môi trường nuôi cấy sinh MPA cao

Trên cơ sở các điều kiện nuôi cấy đã chọn được, tiến hành nuôi cấy chủng nghiên cứu cho sinh tổng hợp MPA trên một số môi trường dịch thể, xác định sinh khối ướt và hàm lượng MPA.

2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được tính toán theo phương pháp phân tích thống kê toán học. Quá trình xử lý số liệu được thực hiện trên máy tính với ứng dụng chương trình excel, với ba lần lặp lại thí nghiệm.

2.4. Định danh vi nấm

2.4.1. Định danh sơ bộ bằng phương pháp truyền thống các chủng vi nấm

Định danh với phương pháp truyền thống là nhận dạng chủng nấm qua màu sắc, hình thái khuẩn lạc: hệ sợi, hình thái, vách ngăn sợi nấm, bào tử và cuống bào tử,... theo các khóa phân loại của Nguyễn Lâm Dũng & cs., (1982),

Bùi Xuân Đồng (1984), Ainsworth & cs., (1973), Đặng Vũ Hồng Miên (2015) và (Mohamed et al., 2015) để sơ bộ nhận dạng, phân loại các chủng nấm đến chi [32, 33, 34, 35, 47].

Các bước tiến hành:

(1) Nuôi cấy chủng nấm đã được phân lập trên đĩa peptri chứa môi trường Czapek/PDA ở 30°C. (2) quan sát sự phát triển, hình thái, màu sắc, kích thước khuẩn lạc. (3) Chuẩn bị một miếng thạch hình lập phương 0,5cm x 0,5cm đặt lên lam kính và đặt vào đĩa peptri đã được khử trùng lấy que cấy, cấy bào tử vi nấm xung quanh miếng thạch rồi lấy lamén đặt lên bề mặt miếng thạch. Sau đó đặt lam kính chứa lamén đó vào trong đĩa peptri, bổ sung thêm vào đĩa peptri ít nước cất vô trùng. Nuôi ở 28°C trong khoảng thời gian 3÷10 ngày tùy từng chủng nấm cho đến khi sợi nấm mọc lan đều bề mặt lamén. (4) Đặt lam kính và lamén lên soi dưới kính hiển vi quang học. Chỉnh tiêu cự và độ phóng đại thích hợp quan sát và chụp ảnh hệ sợi, bào tử, cuống bào tử, vách ngăn,... của các chủng nấm. (5) Nhận dạng vi nấm qua màu sắc - hình thái khuẩn lạc cùng bào tử theo các khóa phân loại.

2.4.2. Định danh vi nấm bằng phương pháp sinh học phân tử các chủng vi nấm

a. Chuẩn bị sinh khối nấm

(1) Chủng vi nấm được cấy chuyển sang các bình tam giác chứa môi trường PDB-I lỏng. (2) Nuôi lắc 150 vòng/phút, ở 28°C, từ 3 ngày. Thu sinh khối bằng ly tâm ở 6000v/p trong 10 phút. (3) Bảo quản ở 4-8°C.

b. Tách chiết ADN

(1) Nghiền khoảng 10÷50 mg mẫu nấm trong nito lỏng (hỗn dịch). (2) Chuyển hỗn dịch sang ống Falcon 50ml. Bổ sung 500 µl Lysozyme (20mg/ml), mix đều. (3) Chuyển sang ống eppendorf sạch vô trùng. Ủ ở 37°C trong 30 phút. (4) Bổ sung 20 µl SDS 10% và 20 µl protease K. Ủ ở 55°C trong 30 phút. (5) Thêm 1 lần thể tích Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25:24:1). Ly tâm 10000 rpm/10 phút, hút pha trên. (6) Thêm 1 lần thể tích cồn 95%. Giữ ở -20°C trong 1 giờ. (7) Ly tâm 10000 rpm/ 10 p thu cặn sinh khối. Rửa 2 lần với cồn 75% (ly tâm 5000 rpm/ 5). Hòa lẫn lại trong 50÷100 µl TE buffer. (8) Bổ sung 20 µl ARNase (20 µg/ml). Ủ ở 37°C trong 1 giờ. (9) Lặp lại các bước (5, 6, 7). (10) Giữ ở -20°C.

c. Thực hiện phản ứng PCR

- Mồi ITS1: 5' - CCGTAGGTGAACCTGCGG - 3'; ITS4: 5' - CCTCCGCTTATTGATATGC - 3'

Trình tự gen 16S rRNA được phân tích tự động bằng máy đọc trình tự gen PRISM@3700 Genetic Analyzer (ThermoFisherScientific, Hoa Kỳ), phân tích bằng phần mềm BioEdit, so sánh với dữ liệu trên NCBI bằng chương trình BLAST.

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA X.

Chương 3

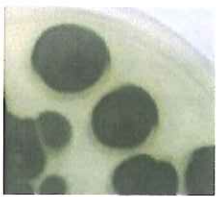
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn chủng vi nấm có khả năng sinh mycophenolic acid (MPA) cao từ bộ sưu tập giống

Từ bộ sưu tập giống của phòng Công nghệ lên men, 68 chủng vi nấm biến được tiến hành sàng lọc đặc điểm chủng, khả năng sinh tổng hợp MPA (mycophenolic acid). Về khả năng tổng hợp MPA bằng phương pháp sắc ký bản mỏng đã xác định được 10 chủng có khả năng sinh MPA ký hiệu N07, N18, N19, N20, N21, N22, N23, N24, N27 và N29 [1]. Sau đó cả 10 chủng được tiến hành nghiên cứu các đặc điểm hình thái khuẩn lạc trong môi trường MPA như mô tả như trong Bảng 1.

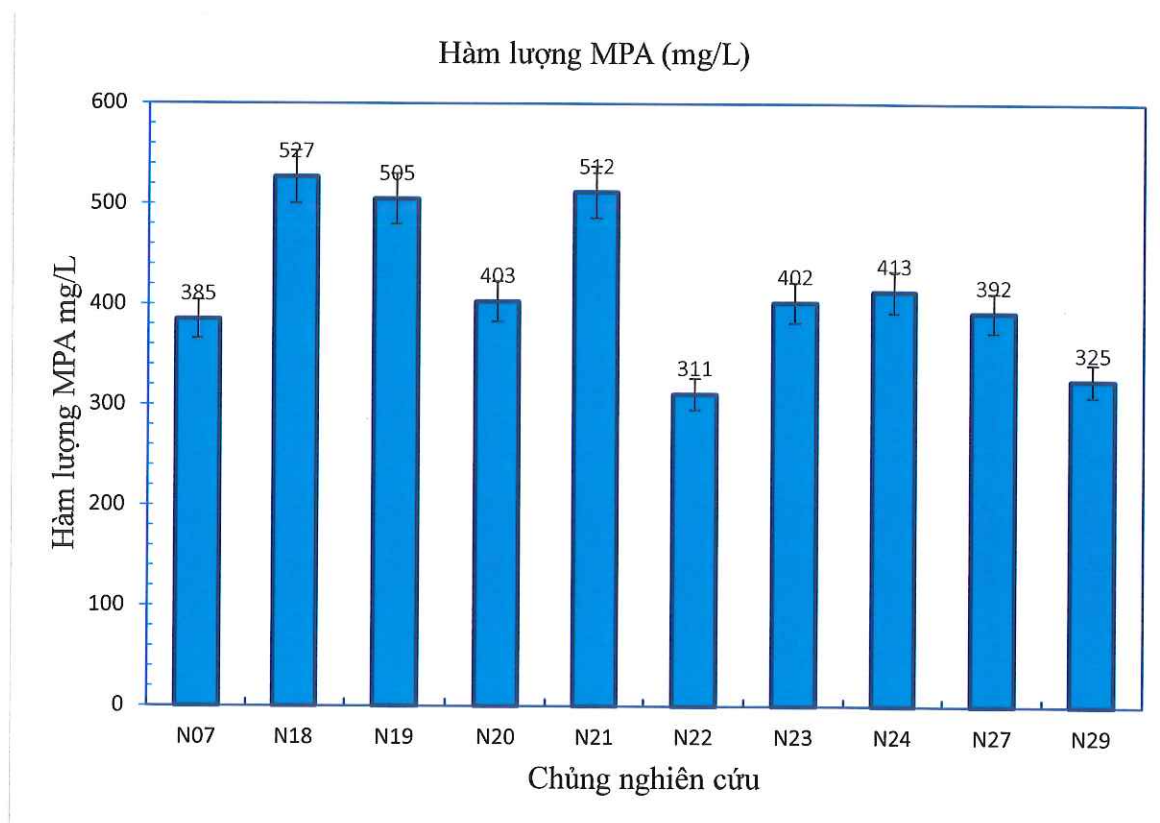
Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái các chủng vi nấm có khả năng sinh tổng hợp MPA

T T	Tên chủng	Số ngày nuôi cấy	Đặc điểm hình thái			
			Khuẩn lạc	Sợi khí sinh	Sợi cơ chất	Hình ảnh khuẩn lạc
1	N07	7	Khuẩn lạc không cân đối, có các khía đồng tâm	Đen, viền ngoài xám nhạt	Xanh đen	
2	N18	7	Khuẩn lạc hơi có rãnh hoặc phẳng, có viền màu trắng	Trắng bông, bào tử kết đám có màu xanh hơi vàng vừa phải	Vàng, vàng xám đậm đến xanh oliu	

3	N19	7	Khuẩn lạc không cân đối, dạng bột	Xanh đậm	Xám đậm	
4	N20	7	Khuẩn lạc cân đối, viền xẻ	Trắng bông, bào tử xanh nhạt	Vàng nhạt	
5	N21	7	Khuẩn lạc tròn không đều, viền liền	Xanh đậm	Xám	
6	N22	7	Không cân đối, viền xẻ	Xanh đậm	Vàng nhạt	
7	N23	7	Cân đối, có các khía đồng tâm	Xanh đậm viền xám mờ	Vàng nhạt	
8	N24	7	Khuẩn lạc cân đối	Xanh nhạt	Xám nhạt	
9	N27	7	Khuẩn lạc tròn, cân đối, dạng bột	Xanh lá cây nhạt viền trắng	Xám nhạt	

10	N29	7	Khuẩn lạc tròn	Xanh đậm, viền trắng	Vàng xám	
----	-----	---	----------------	----------------------	----------	---

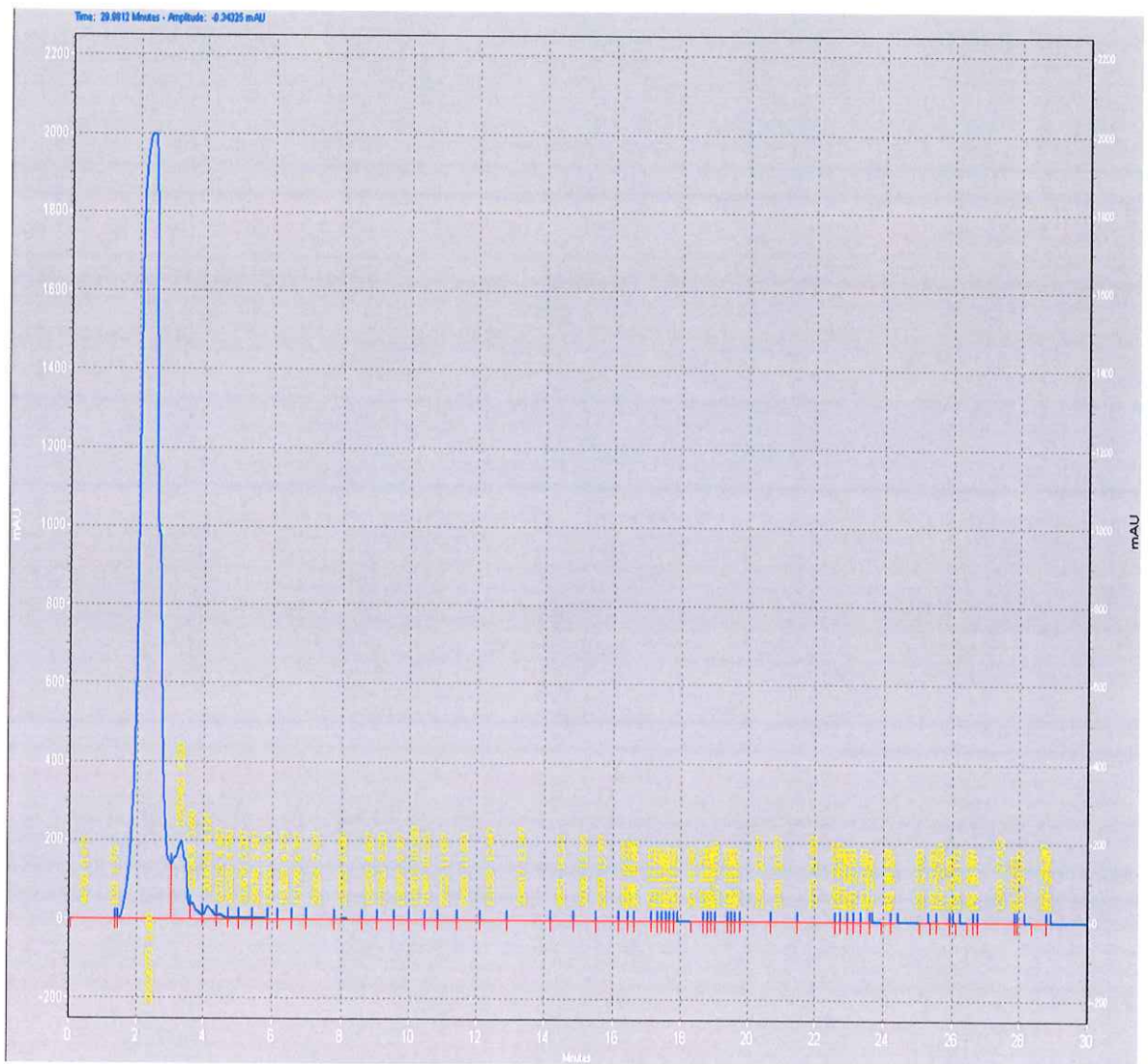
Mười chủng vi nấm ký hiệu N07, N18, N19, N20, N21, N22, N23, N24, N27 và N29 được nuôi cấy trên môi trường MT3. Sau 12 ngày nuôi cấy, MPA trong dịch nuôi cấy được chiết bằng dung môi ethylacetat với thể tích 1:1. Dựa vào đường chuẩn MPA đã xác định được bằng cách hòa tan chất chuẩn MPA vào dung môi ethylacetate với các nồng độ 0,1375 mg/l; 0,375 mg/l; 0,625 mg/l; 1,25 mg/l; 2,5 mg/l đến 5 mg/l hấp thụ ở bước sóng 250 nm trên thiết bị UV-Vis, khả năng sinh tổng hợp của các chủng được trình bày ở Hình 3.1.



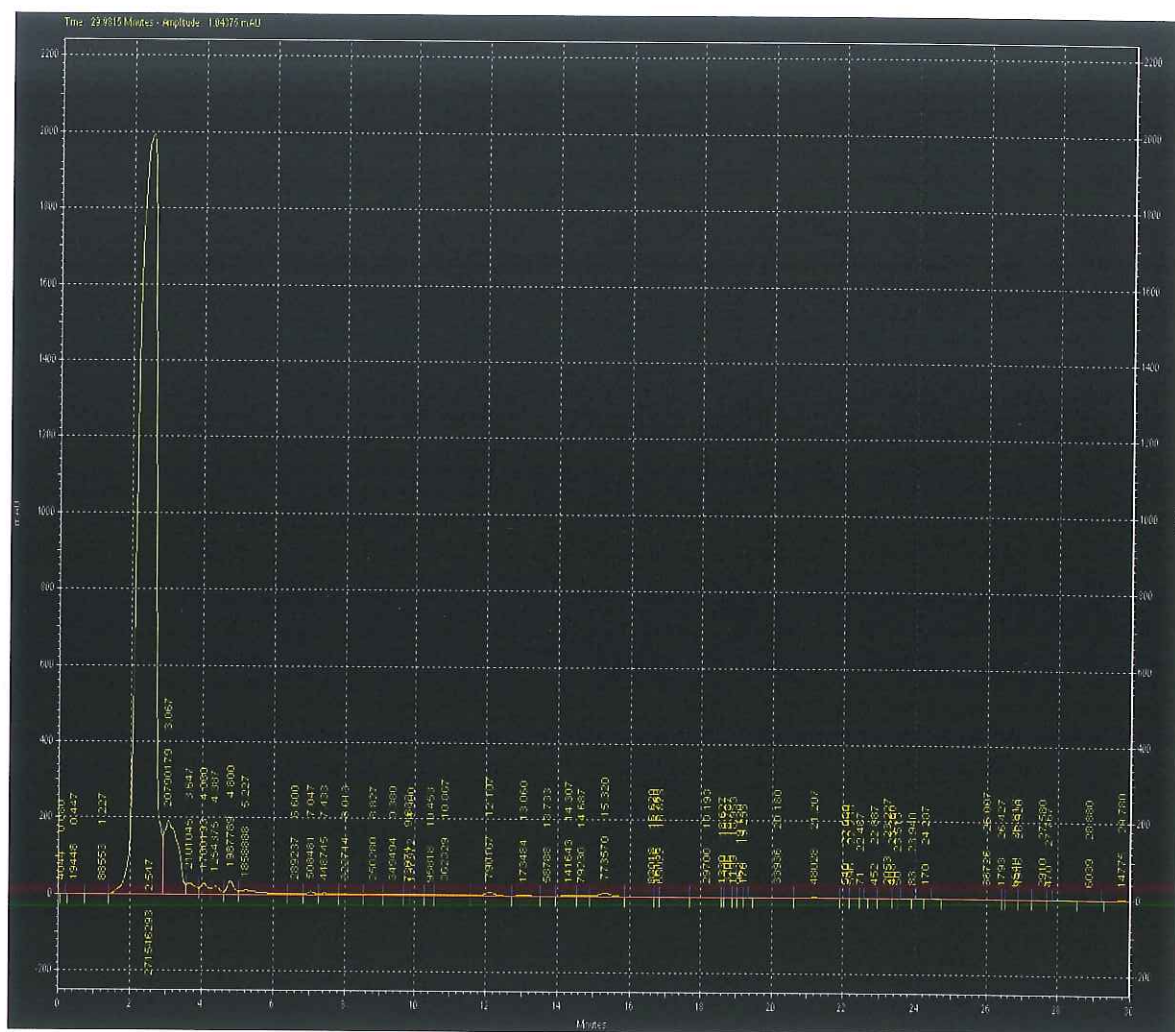
Hình 3.1. Hàm lượng MPA được sinh tổng hợp từ các chủng sàng lọc

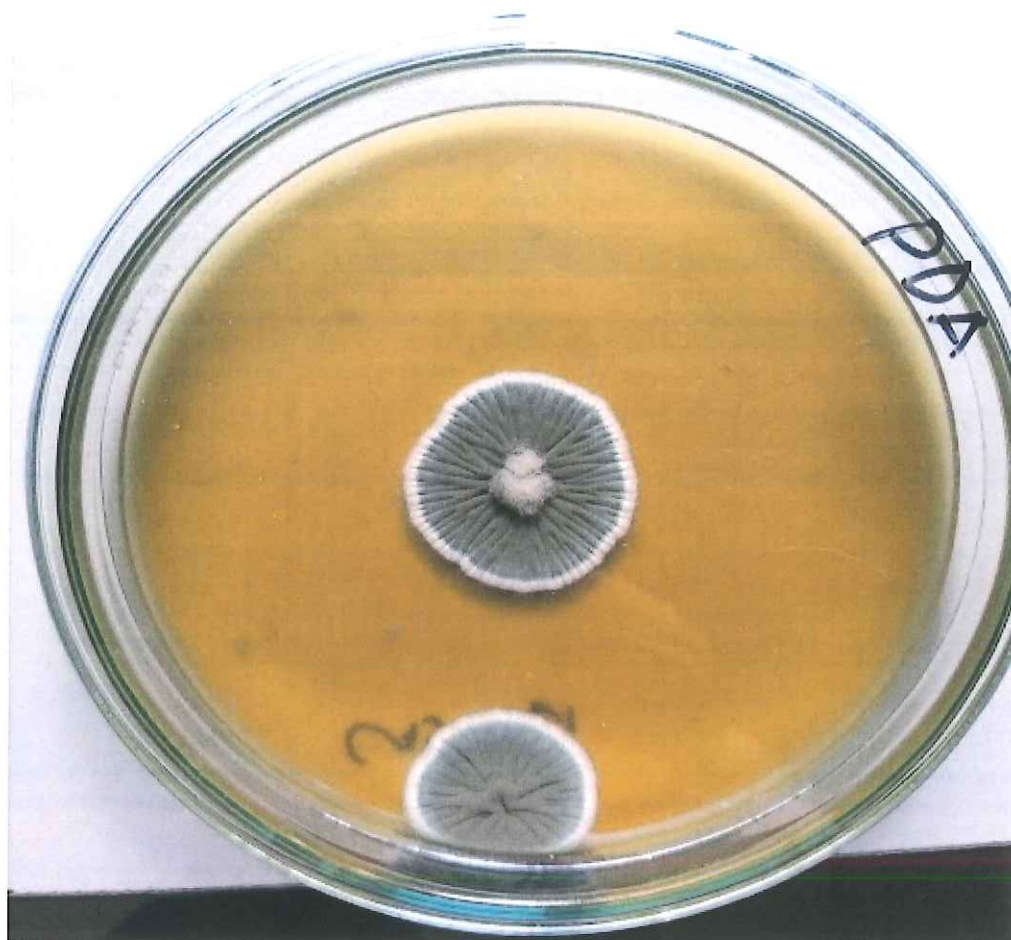
Theo như so sánh với các chủng nấm *Penicillium* đã được công bố cho thấy, hàm lượng MPA của các mẫu thu được có sự khác biệt nhiều từ 0,02-35 (mg/Kg) đối với sinh khối khô của nấm hoặc từ 150- 600 (mg/L) trong dịch nuôi (Anand et al., 2020; O'Brien et al., 2006; Puel et al., 2005; Queener & Nash, 1978). Như vậy các chủng nấm được sơ bộ sàng lọc ở trên có khả năng

sinh MPA ở mức từ trung bình đến cao. Từ kết quả nghiên cứu trên đã xác định được chủng N18 có khả năng sinh tổng hợp MPA cao nhất trong số các chủng được sàng lọc sơ bộ. Do vậy chủng N18 được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Để khẳng định chính xác chủng N18 sinh tổng hợp chất MPA, phương pháp HPLC được sử dụng để đánh giá khả năng sản xuất MPA của chủng tuyển chọn. Chất MPA chuẩn của hãng Sigma được sử dụng làm mẫu đối chứng dương. Chủng N18 được nuôi trên môi trường MT3 ở 28°C, 12 ngày. Hai mươi microlit dung dịch mẫu chủng N18 được chuẩn bị từ dịch nổi nuôi cấy được tiêm vào cột HPLC. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và chủng N18 có thời gian lưu mẫu trùng nhau (khoảng 2,5 phút) (Hình 3.2&3.3). Kết quả so sánh hai sắc ký đồ đã khẳng định rằng chủng N18 sinh tổng hợp MPA.



Hình 3.2. Sắc ký đồ HPLC của mẫu MPA chuẩn (Sigma)





Hình 3.4 Khuẩn lạc chủng N18



Hình 3.5 cuống đính bào tử chủng N18 ở vật kính 40X

Bảng 3.2. Đặc Điểm hình thái chủng N18 sinh tổng hợp MPA

Các đặc điểm	Chủng N18 sinh tổng hợp MPA
Trên môi trường nuôi, 25 °C	PDA
Khuẩn lạc	- Sau 7 ngày nuôi đường kính khuẩn lạc 30-32 mm. - Khuẩn lạc hơi có rãnh, mép viền màu trắng, kết cấu nhung đến hơi bông (Hình 3.4a)
Bào tử	-Bào tử dày, kết thành đám, màu xanh (ISCC-NBS số 136) đến màu xanh ô liu xám (số 127). -Hình cầu, kích thước 2,5-4 μm hoặc hình elip, kích thước 2-5 x 1-3 μm
Bề mặt bào tử	Gai nhám.
Hình thái chỗi	Phát triển từ sợi cơ chất và sợi khí sinh có nhiều tầng không cân đối, kích thước 100 - 300 x 2,5 μm
Cuống chỗi	Cuống phát triển ra từ cơ chất, kích thước 75- 425 x 2,5 μm ,
Sợi khí sinh	Thẳng, vách dày, nhám, có vách ngăn, phân nhánh ít, không đều, kích thước 10- 19 x 2,5 μm
Thể bình	Quan sát có từ 2- 5 cái trên 1 metulae, hình chai cổ ngắn, kích thước 5-10 x 2,5 μm (Hình 3.4b)
Sắc tố hòa tan	Không tiết sắc tố
Tạo ra axit trên CREA	Tạo ra axit trên CREA, điều này giúp phân biệt P. Oxalicum với P. diatomitis và P. soosanum không tạo thành axit trên CREA

Theo nghiên cứu của Kubátová và cộng sự năm 2018 đã mô tả đầy đủ về *P. oxalicum sensu stricto* được cung cấp cho so sánh với các loài mới được mô tả. *Penicillium oxalicum* có đặc điểm là bào tử nặng, màu xanh đậm khuẩn lạc có bề ngoài sáng bóng hoặc mượt và conidia có hình elip lớn. Tất cả những đặc điểm này đều có chung với *P. diatomitis*, nhưng *P. diatomitis* không tạo ra axit trên CREA, giúp phân biệt nó *P. oxalicum*. *Penicillium soosanum* hình cầu hơn conidia (tỷ lệ L/W 1,1–1,2) và không tạo thành axit trên CREA. Ở tất cả các loài, các chủng phân lập mới sinh bào tử mạnh, trong khi việc cấy truyền lặp đi lặp lại dẫn đến các khuẩn lạc có vùng màu trắng không sinh bào tử [48].

Chủng nấm N18 được nuôi cấy trên môi PDA ở 25 °C, sau 7 ngày nuôi cho thấy khuẩn lạc chủng phát triển tốt, đường kính khuẩn lạc đạt 30-32 mm. Khuẩn lạc hơi có rãnh, mép viền màu trắng, kết cấu nhung đến hơi bông. Bào tử dày đặc, kết thành đám có màu xanh hơi vàng vừa phải (ISCC-NBS số 136) đến màu xanh ô liu xám (số 127); không tiết sắc tố; mặt dưới khuẩn lạc có màu vàng nhạt hoặc vàng vừa phải (số 87) sang màu vàng xám đậm (số 91) (Hình 3.4).

Quan sát cơ quan sinh sản của chủng N18 cho thấy, hình thái chồi phát triển từ sợi cơ chất và sợi khí sinh có nhiều tầng không cân đối, kích thước 100 - 300 x 2,5 µm (trên cơ chất), nhỏ hơn 50-125 x 2,5 µm (từ khuẩn ty khí sinh) (Hình 3.5). Cuống phát triển ra từ cơ chất, kích thước 75- 425 x 2,5 µm, hoặc từ sợi khí sinh, thẳng, vách dày, nhám, có vách ngăn, phân nhánh ít, không đều, kích thước 10- 19 x 2,5 µm; cuống nhỏ (metulae) trên 1 nhánh. Thê bình của chủng quan sát có từ 2- 5 cái trên 1 metulae, hình chai cổ ngắn, kích thước 5- 10 x 2,5 µm. Conidi hình cầu, kích thước 2,5-4 µm hoặc hình elip, kích thước 2-5 x 1-3 µm gai nhám (Bảng 3.2). Hình thái cơ quan sinh sản của chủng N18 có nhiều đặc điểm giống với cơ quan sinh sản của loài *Penicillium oxalicum* trong nghiên cứu của Kubátová và cs năm 2018 [48]. Tuy nhiên, những đặc điểm này đều có chung với *Penicillium diatomitis*, *Penicillium soosanum* nhưng *P. diatomitis* không tạo ra axit trên môi trường CREA, giúp phân biệt nó với *P. oxalicum*. Để khẳng định chủng N18 thuộc về loài *P. oxalicum* chúng tôi tiếp tục định loại đến loài bằng phương pháp sinh học phân tử.

3.2.2. Phân loại chủng bằng phương pháp sinh học phân tử

Cặp mồi ITS1 và ITS2 khuếch đại đoạn gen ITS1 của các chủng nấm có kích thước tính toán theo lý thuyết 500 ÷ 600 bp. Kết quả phản ứng PCR được

kiểm tra trên gel agarose 1% (Hình 3.6). Theo Hình 3.6 kết quả điện di cho thấy trên giếng xuất hiện duy nhất một băng có kích thước phân tử khoảng $500 \div 600$ bp tương đương với tính toán lý thuyết. Như vậy, đã khuếch đại thành công đoạn gen ITS của chủng nấm N18 cần định danh. Các sản phẩm PCR này được tinh sạch theo Kit tinh sạch sản phẩm PCR của hãng và được xác định trình tự nucleotide bằng máy giải trình tự gen tự động.



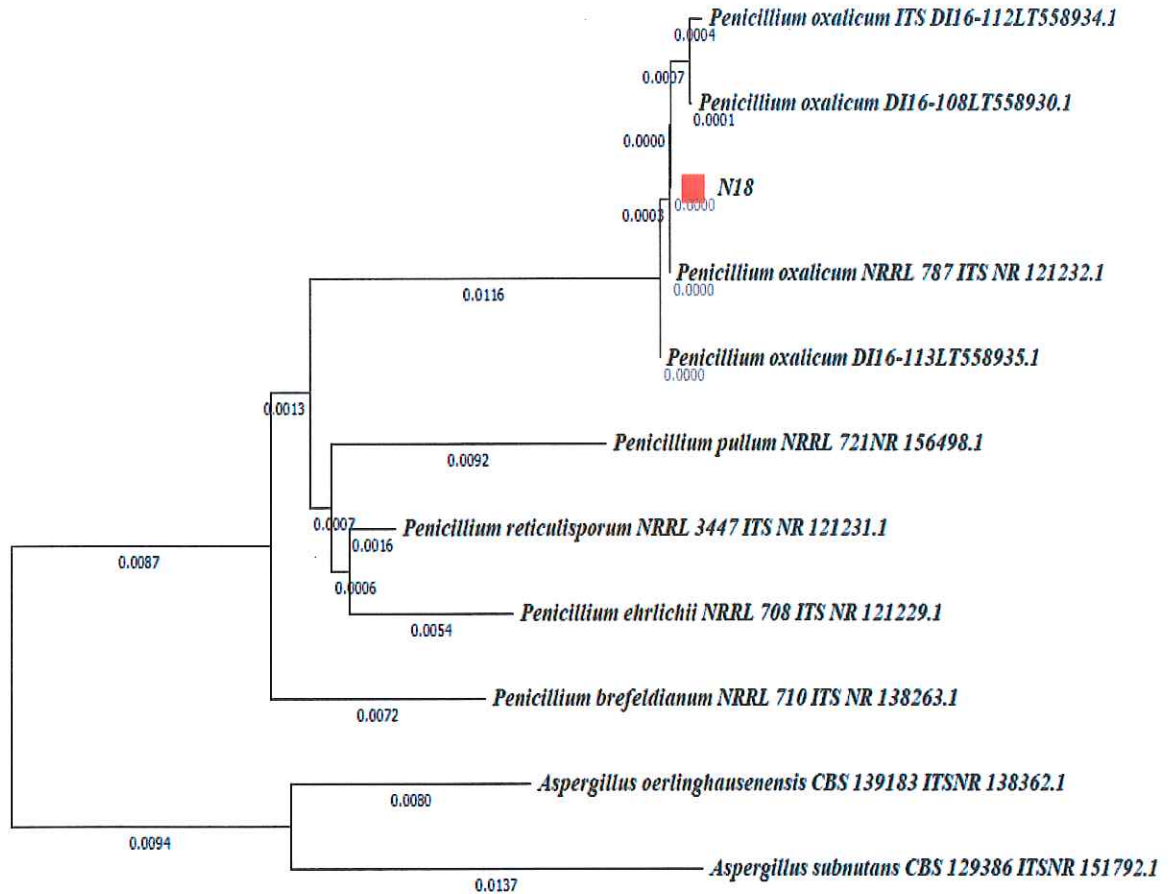
Hình 3.6. Sản phẩm PCR trên gel agarose 1%. Băng 1: Chủng đối chứng dương (*Penicillium* sp.) Băng 2: Chủng N18, Băng 3: thang ADN chuẩn (Marker Biolabs (0.1-10kb))

Kết quả giải trình tự thu được một đoạn gen có trình tự như sau:

>Chủng N18

```
AAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTAT
CGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCCGCCGGGGGGCATCCGCC
CCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACACAAACGAACCTCTTGTCTGAAGATTGC
AGTCTGAGTACTTGACTAAATCAGTTAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT
CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGG
GGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGG
CTCTCGCCCCCGCTTCCGGGGGGGCGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCG
TCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGC
GCCCCGCCGGCGAACACCATCAATCTTAACCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAG
GGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAA
```

Bằng công cụ BLAST trên NCBI đã chỉ ra trình tự gen chủng N18 có độ tương đồng cao 100% với loài *Penicillium oxalicum* NRRL 787 trên GenBank.



Hình 3.7 Cây phát sinh chủng loài của N18 được suy ra từ việc so sánh trình tự ITS

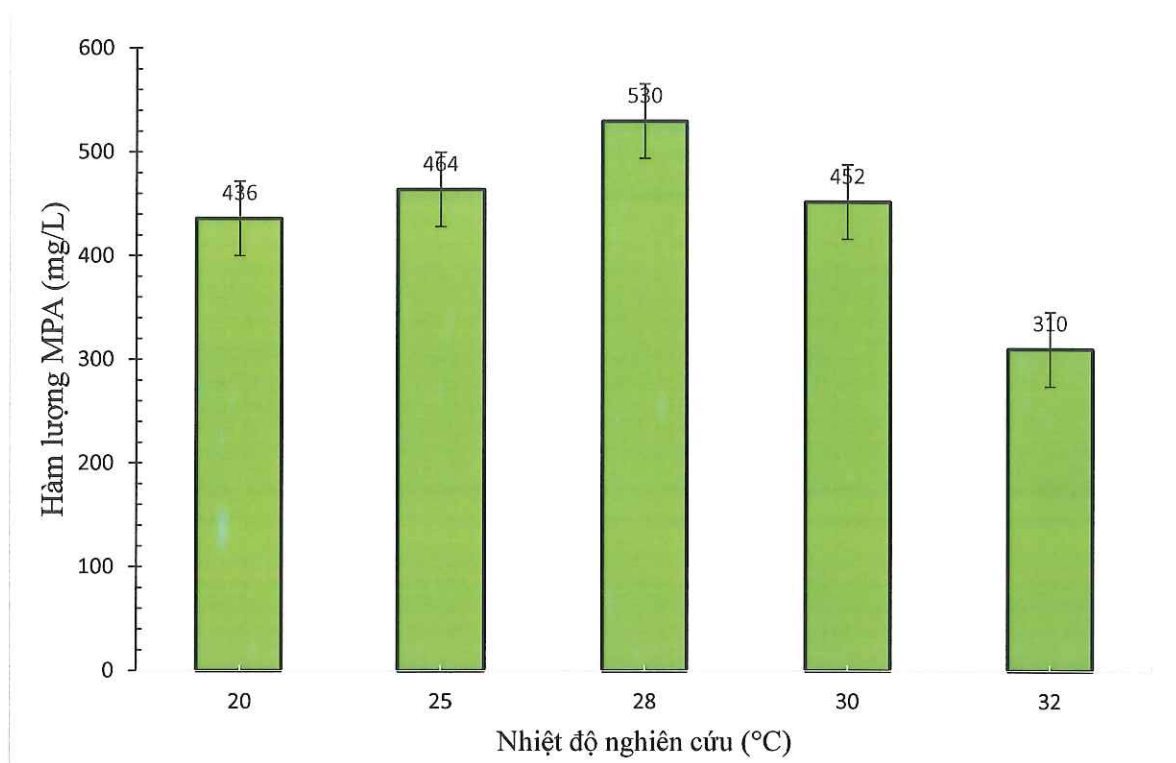
Vị trí phát sinh loài của N18 được suy ra từ việc so sánh trình tự ITS của nó với trình tự ITS của các chủng *P. oxalicum* DI16-112, *P. oxalicum* DI16-113, *P. oxalicum* DI16-108, *P. reticulisporum* NRRL 3447, *P. brefeldianum* NRRL 710, *P. ehrlichii* NRRL 708, *P. pullum* NRRL 721, *Aspergillus oerlinghausenensis* CBS 139183, và *Aspergillus subnutans* CBS 129386. Cây phát sinh chủng loài được dựng dựa vào phần mềm MEGA X (Hình 3.7).

Từ kết quả định danh bằng phương pháp truyền thống kết hợp với cây phát sinh loài đã phân loại đến loài chủng N18. Kết luận chủng N18 thuộc loài *Penicillium oxalicum* và đặt tên chủng là *Penicillium oxalicum* N18

3.3. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp MPA của chủng nghiên cứu

3.3.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh tổng hợp MPA của chủng *P.oxalicum* N18



Hình 3.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sinh MPA của chủng N18

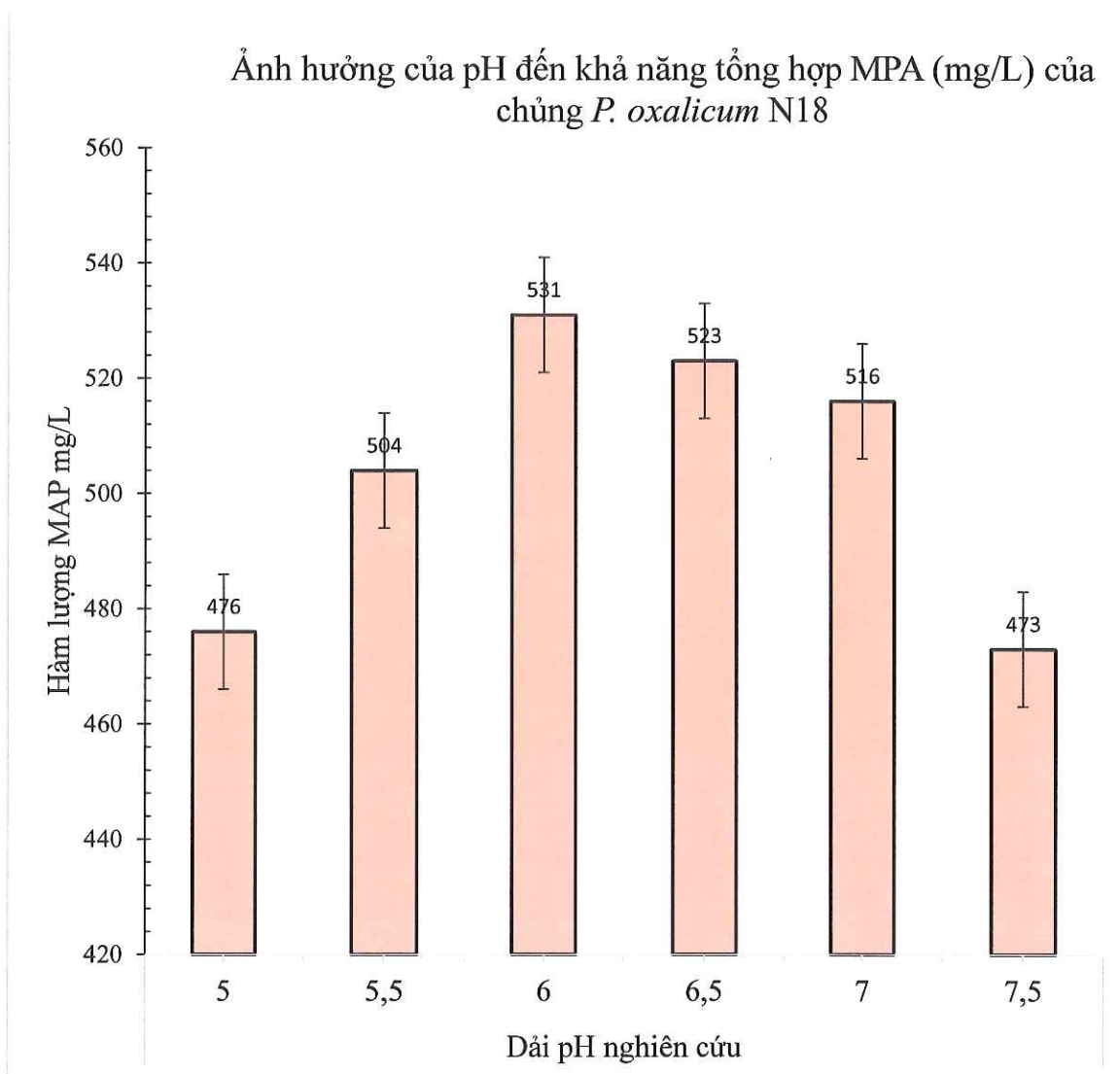
Kết quả (Hình 3.8) cho thấy, trong khoảng nhiệt độ nghiên cứu 20, 25, 28, 30, 32 °C, chủng *P. oxalicum* N18 đều có khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp MPA. Chủng *P. oxalicum* N18 sinh tổng hợp MPA cao nhất khi nuôi ở nhiệt độ 28°C giá trị MPA thu được cao nhất 530 mg/L trong khi MPA thu được thấp nhất 301mg/L khi nuôi ở nhiệt độ 32 °C. Vì vậy nhiệt độ nuôi cấy 28°C sẽ được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo

3.3.2 Ảnh hưởng của pH

pH là một trong những thông số môi trường quan trọng nhất ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào và sự hình thành sản phẩm. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng pH đóng một vai trò trung tâm trong sự phát triển của vi sinh vật và tích lũy chất chuyển hóa [49, 50, 51, 52]. Nói chung, ảnh hưởng của pH

đến sự phát triển của tế bào và sự tích lũy sản phẩm khác nhau tùy theo vi sinh vật, thành phần môi trường và điều kiện hoạt động [49, 53]

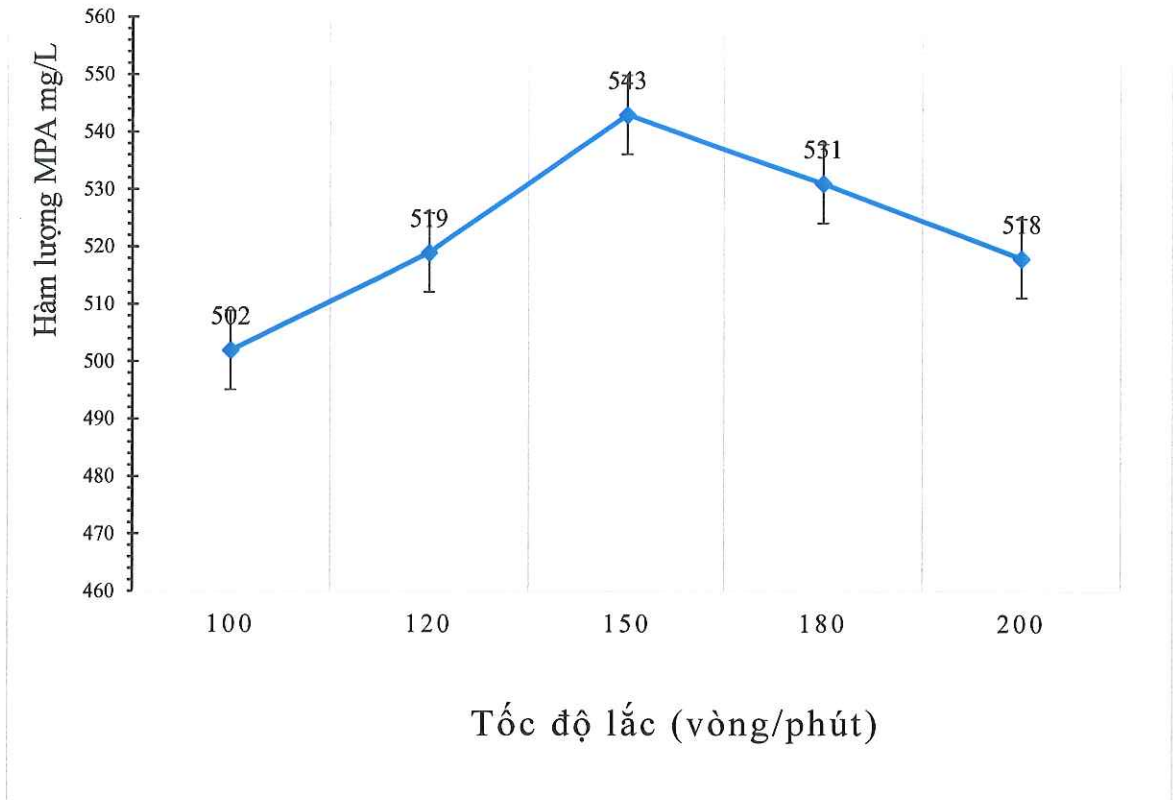
Chủng N18 nghiên cứu được nuôi trên môi trường dịch thể có pH môi trường 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5. Nuôi lắc tốc độ 180 vòng/phút, ở nhiệt độ nuôi cấy 28°C kết quả được thể hiện ở Hình 3.9. Kết quả cho thấy, tại pH 6, hàm lượng MPA của chủng đạt giá trị cao nhất là 531 mg/L. Lượng MPA của chủng đều giảm khi độ pH môi trường có tính acid và tính bazơ tăng, thấp nhất là ở môi trường pH 5 và 7,5 (Hình 3.9). Vì vậy pH 6 được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.9 . Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy ban đầu đến sinh tổng hợp MPA (mg/L) của chủng *Penicillium oxalicum* N18

3.3.3 Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến khả năng tổng hợp MPA của chủng N18



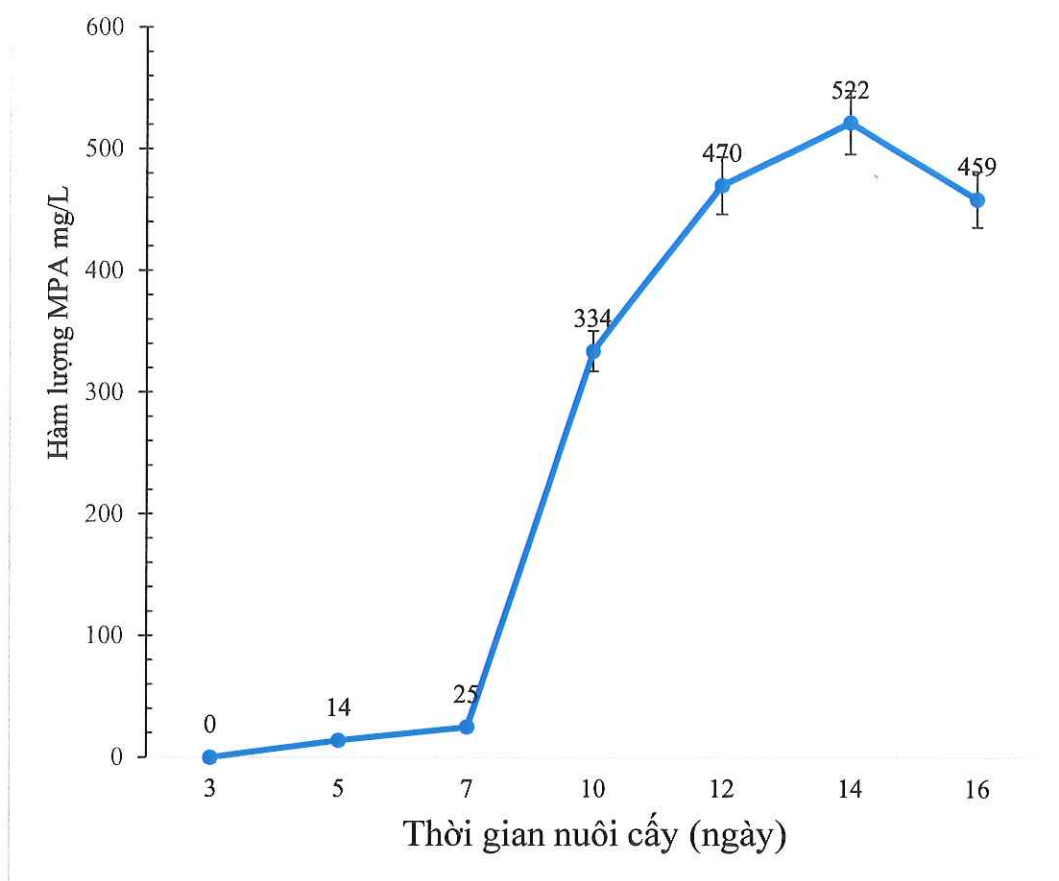
Hình 3.10. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh MPA (mg/L) của chủng N18 nghiên cứu

Chủng nghiên cứu *P. oxalicum* N18 được tiến hành nuôi cấy lắc ở 100, 120, 150, 180 và 200 vòng/phút. Kết quả (Hình 3.10) cho thấy, hàm lượng MPA của chủng đạt giá trị cao nhất 543mg/L khi nuôi cấy lắc ở 150 vòng/phút. Khi tăng hoặc giảm tốc độ lắc, hàm lượng MPA do chủng *P. oxalicum* N18 sinh tổng hợp đều giảm. Vì vậy tốc độ lắc 150 vòng/phút sẽ được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3.4 Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Chủng N18 được cấy 5% giống vào 200 ml môi trường dịch thể có pH 6, lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C. Sau thời gian nuôi 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16 ngày tiến hành định lượng hàm lượng MPA của các chủng nghiên cứu.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy để khả năng tổng hợp
MPA của chủng *P. oxalicum* N18



Hình 3.11. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh tổng hợp MPA (mg/L) của chủng nấm tuyến chọn

Sau khoảng thời gian nuôi cấy động thái sinh tổng hợp của chủng N18 chỉ ra sản lượng MPA được tổng hợp có sự khác nhau (Hình 3.11). Trong quá trình lên men lỏng chìm, chủng N18 đi vào thời kỳ phát triển ổn định ở 12-14 ngày, cao nhất ở 14 ngày hàm lượng MPA đạt cao nhất 522mg/L và giai đoạn suy giảm ở 16 ngày (Hình 3.12). Như vậy từ kết quả nghiên cứu chỉ ra chủng sẽ được thu hồi MPA sau 14 ngày nuôi cấy.

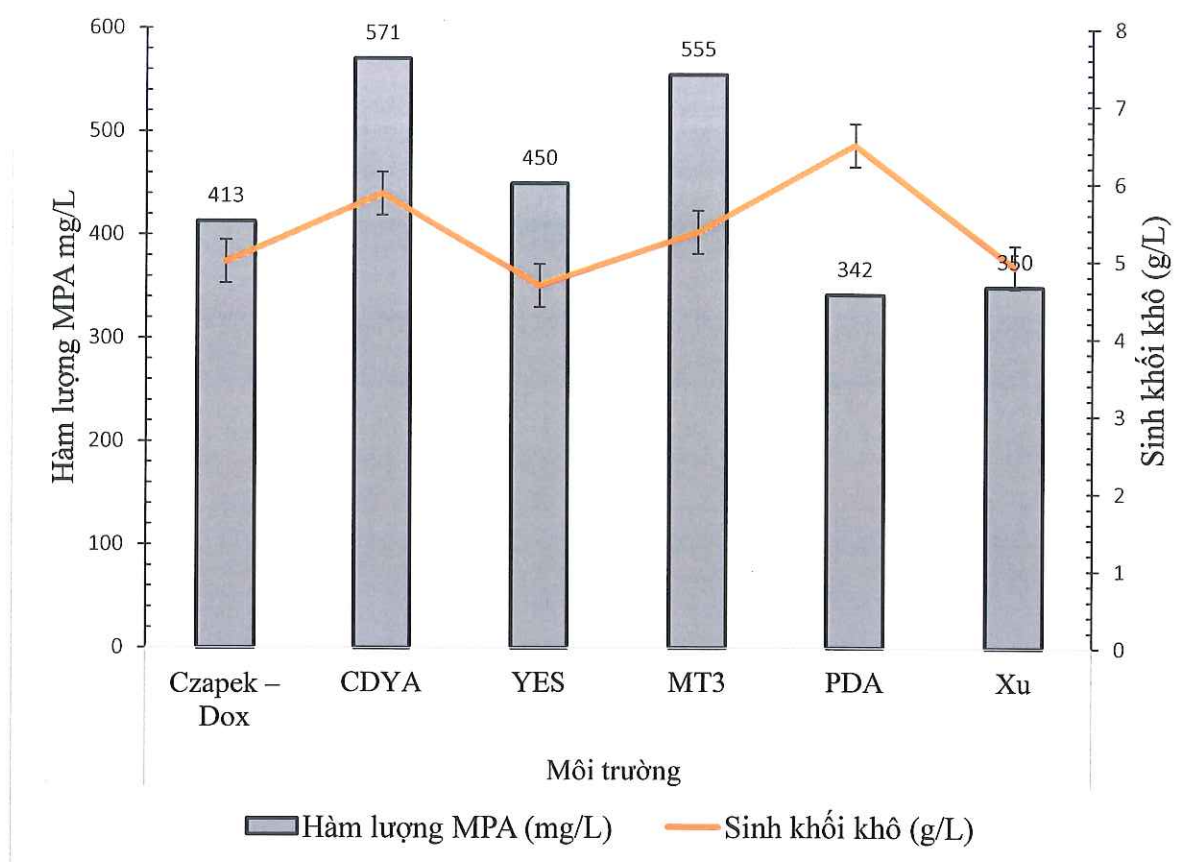


**Hình 3.12. Hình ảnh sinh khối nấm chủng *Penicillium* N18 nuôi 14 ngày
hàm lượng MPA đạt 522mg/L**

3.3.5. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng và sinh tổng hợp hoạt chất MPA của chủng N18

Một số môi trường với thành phần khác nhau đã được thử nghiệm để sản xuất MPA bởi chủng nấm tuyển chọn gồm MT3, Czapek – Dox, PDA, CDYA, Xu, YES. Trên các môi trường chủng nghiên cứu đều sinh MPA nhưng với hàm lượng khác nhau sau 14 ngày nuôi cấy. CDYA là môi trường thích hợp nhất cho quá trình sản xuất MPA của các chủng nấm. Sử dụng môi trường này nuôi cấy chủng nấm cho nồng độ của MPA được tạo ra là $571,30 \pm 14$ mg/L (Hình 3.13). Mặc dù, môi trường PDA (khoai tây dextrose) cho thấy tích lũy sinh khối cao nhất, nhưng nồng độ MPA thấp nhất được tạo ra bởi môi trường này. Như vậy, môi trường CDYA sẽ được sử dụng là môi trường nuôi cấy cho sinh tổng hợp MPA.

Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp MPA mg/L



Hình 3.13. Khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp MPA của chủng nấm N18 trên một số môi trường sau 14 ngày nuôi cấy

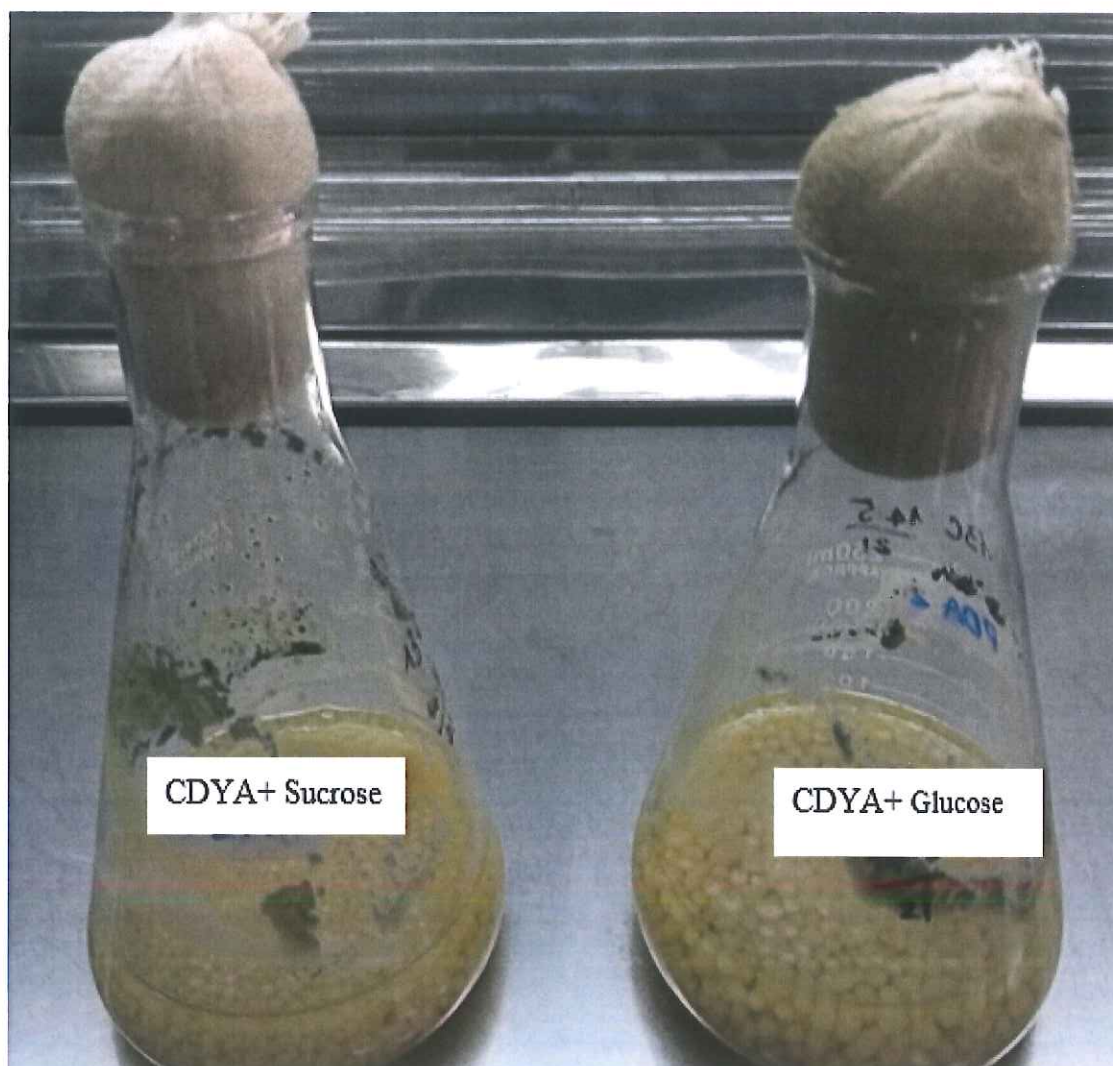
3.3.6. Ảnh hưởng của nguồn C lên khả năng sinh tổng hợp MPA của chủng nấm N18

Nuôi chủng nấm N18 trong môi trường CDYA lần lượt thay đổi các nguồn C. Các nguồn C khác nhau trong môi trường đã ảnh hưởng khác nhau đến việc sản xuất MPA của chủng nấm. Sucrose được coi là nguồn cơ chất hiệu quả nhất trong số các nguồn C, tạo sự khác biệt đáng kể hàm lượng MPA, sản lượng đạt 572,1 mg/L. Với các nguồn C khác trong môi trường nuôi cấy, hàm lượng MPA tích lũy của chủng nấm đều thấp hơn đáng kể so với khi nuôi chủng trong môi trường có sucrose. Nguồn glucose trong môi trường nuôi cấy cho sự tích lũy sinh khối của chủng nấm đạt cao nhất, sinh khối khô đạt khoảng 6,15 g/L. Số liệu cụ thể được trình bày trong Bảng 3.3 minh họa cho ảnh hưởng của nguồn C trong môi trường tới sinh tổng hợp MPA và sự sinh trưởng của chủng nấm N18.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nguồn C lên khả năng sinh tổng hợp MPA và tích lũy sinh khối của chủng *P. oxalicum* N18

Nguồn cacbon	<i>P. oxalicum</i> N18	
	SKK (g/L)	MPA (mg/L)
Sucrose (ĐC)	5,8	572,1
Galactose	3,97	413,64
Tinh bột	5,96	316,36
Maltose	3,43	500,00
Mannitol	3,52	359,09
Lactose	4,91	409,09
Glucose	6,15	529,19
Cellulose	3,07	300,10
Glycerol	3,77	459,95
Fructose	5,03	404,57

Nồng độ MPA cao nhất thu được của chủng N18 là **572,1** mg/L sử dụng nguồn cacbon là sucrose. Chủng N18 cho sinh khối khô đạt cực đại (6,15g/ L) trên nguồn cơ chất glucose (Hình 3.12). Tuy nhiên glucose chỉ tạo ra 92,5 % nồng độ tương ứng của MPA được tạo ra bởi sucrose.



Hình 3.14. Hình ảnh sinh khối nấm chủng *Penicillium* N18 nuôi trong môi trường CDYA + Sucrose, CDYA + Glucose, có nguồn cacbon thích hợp nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp MPA

3.3.7. Ảnh hưởng của nguồn N lên khả năng sinh tổng hợp MPA của chủng nấm N18

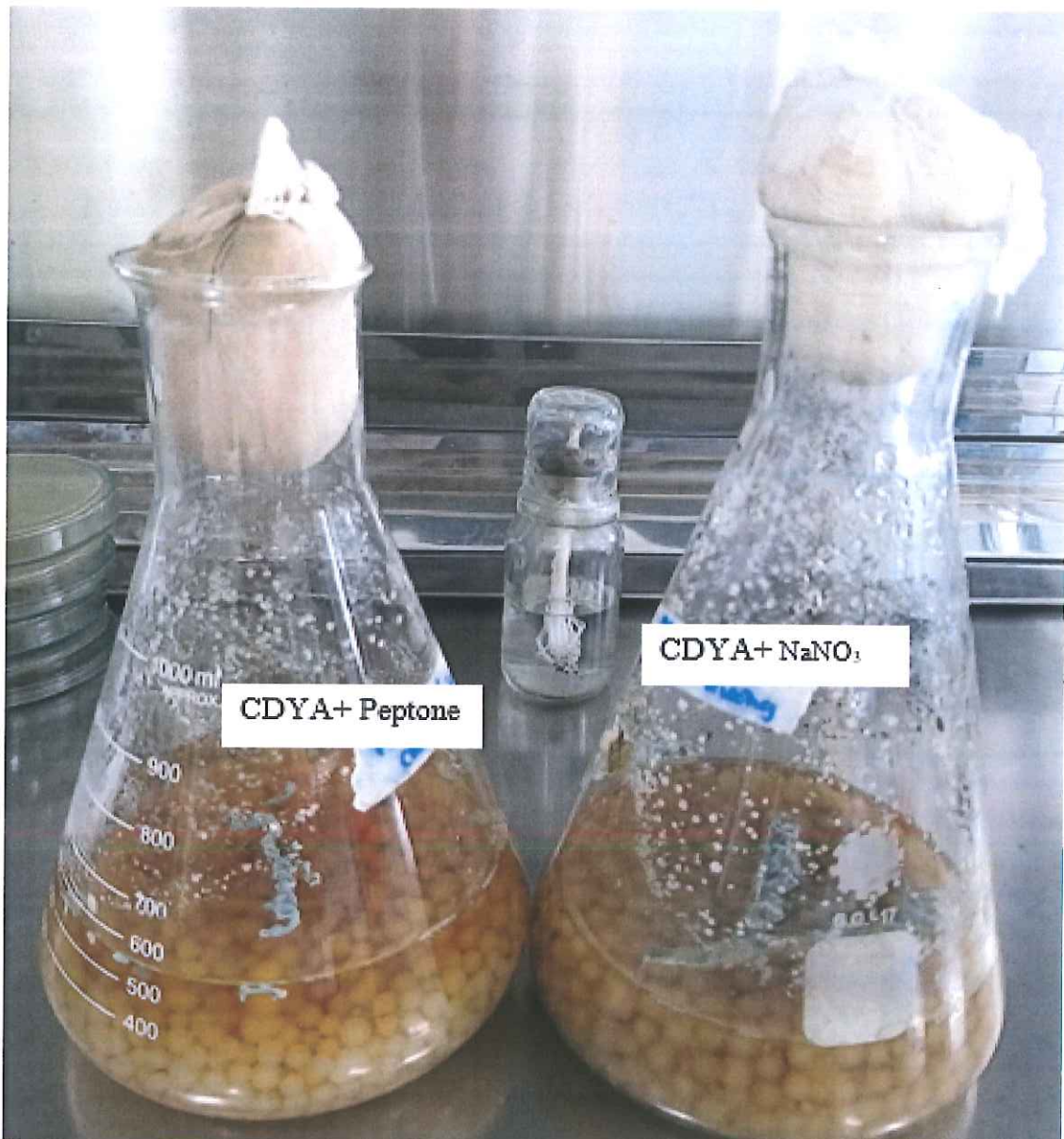
Nuôi chủng nấm N18 trong môi trường CDYA. Các nguồn N hữu cơ và vô cơ khác nhau đã được thay đổi tương đương bổ sung thay thế cao nấm men (5 %) trong môi trường CDYA. Kết quả thu được cho thấy nguồn N hữu cơ cho sản lượng MPA và sinh khối cao hơn so với nguồn N vô cơ.

Trong các nguồn N hữu cơ được thử nghiệm, pepton cho hàm lượng MPA tích lũy của chủng nấm đạt cao nhất đạt 698,08 mg/L với MPA, sinh khối khô đạt 5,75 g/L. Đối với nguồn N vô cơ, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là chất cho sinh trưởng

thuận lợi nhất, trong khi NaNO_3 hiệu quả nhất để sản xuất MPA. Số liệu cụ thể được trình bày trong Bảng 3.2 minh họa cho ảnh hưởng của nguồn N trong môi trường tới sinh tổng hợp MPA và sự phát triển của chủng nấm.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nguồn N lên khả năng sinh tổng hợp MPA của chủng *P. oxalicum* N18

Nguồn nitơ	<i>P. oxalicum</i> N18	
	SKK (g/L)	MPA (mg/L)
Cao nấm men (ĐC)	5,8	572,1
Peptone	5,75	698,08
Casein	4,71	539,95
Cao thịt	4,26	526,10
Urea	3,04	509,95
NaNO_3	4,16	527,60
KNO_3	4,38	500,13
NH_4Cl	3,65	397,29
NH_4NO_3	4,64	515,66
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,58	441,81
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	3,38	329,41
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,11	356,11



Hình 3.15. Hình ảnh sinh khối nấm chủng *Penicillium* N18 nuôi trong môi trường CDYA + Peptone, CDYA + NaNO₃, có nguồn cacbon thích hợp nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp MPA

Kết quả trên chỉ ra rằng các nguồn N hữu cơ (peptone, casein, cao nấm men và cao thịt) tạo ra nồng độ MPA cao hơn các nguồn vô cơ (trừ NaNO₃).

Nghiên cứu của Rho (2011) cũng cho kết luận tương tự, casein, peptone, axit casamino và chiết xuất thịt bò (nồng độ 1%, w / v mỗi loại) làm tăng năng suất lên men của MPA khoảng 3,4 lần so với nguồn nitơ vô cơ là NH₄NO₃. Peptone và axit casamino cũng làm tăng sự phát triển tế bào của nấm *P. brevicompactum*. Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác (Ardestani và cộng sự 2010, 2011) đã phát hiện ra rằng hỗn hợp nguồn N bao gồm casein thủy phân

1,5 %, glycine 0,9 % và methionine 0,05 % là tối ưu cho sản xuất MPA bởi *P. brevicompactum*. Vinokurova và cộng sự (2005) đã thay thế natri nitrat của môi trường Czapek bằng asparagin 1 % để tạo ra tối đa MPA bởi các loài *Penicillium*. Trong nghiên cứu này, nguồn nitơ vô cơ (NaNO_3) là một nguồn tốt để sản xuất MPA, nhưng năng suất cao nhất thu được khi sử dụng peptone. Trong các nghiên cứu trước đây, peptone 1 % là nguồn N tối ưu nhất để tạo ra hợp chất ức chế miễn dịch cyclosporin A của loài *Tolypocladium*.

3.3.8 Khả năng sinh tổng hợp MPA của chủng *Penicillium oxalicum* N18 trên môi trường CDYA đã lựa chọn nguồn C, N và điều kiện nuôi cấy thích hợp

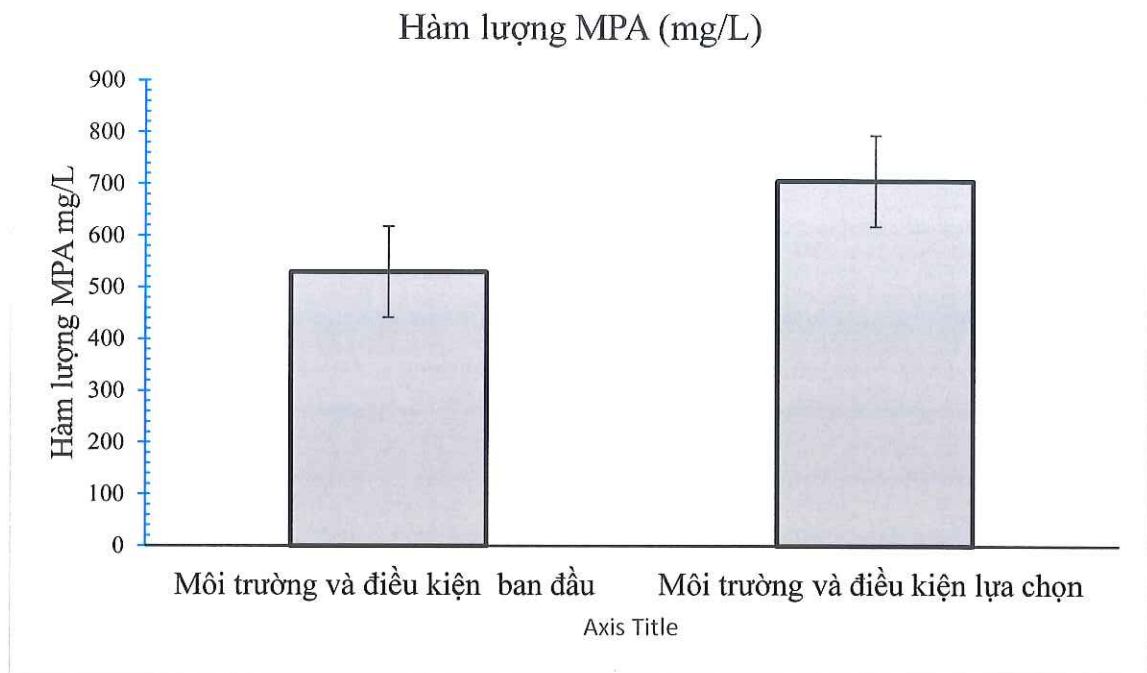
Trong các thí nghiệm ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy, môi trường nuôi cấy, ảnh hưởng của nguồn N và C, đã lựa chọn được điều kiện nuôi: nhiệt độ nuôi 28, thời gian nuôi 14 ngày, tốc độ lắc 150 vòng/phút, pH = 6, nguồn nitơ là peptone, nguồn cacbon là sucrose, môi trường CDYA là thích hợp cho sinh tổng hợp MPA của chủng *Penicillium oxalicum* N18.

Môi trường lên men sinh tổng hợp MPA có thành phần được lựa chọn như sau: môi trường Czapek 10ml; Sucrose 30 g/l; peptone 5 g/l; K_2HPO_4 1 g/l; Muối vi lượng 1 ml; Nước cất 1000 ml; pH $6,2 \pm 0,2$. Dung dịch nguyên tố vi lượng: 10 g $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,7 g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,056 g axit Boric, 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,025 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g amoni molypdat.

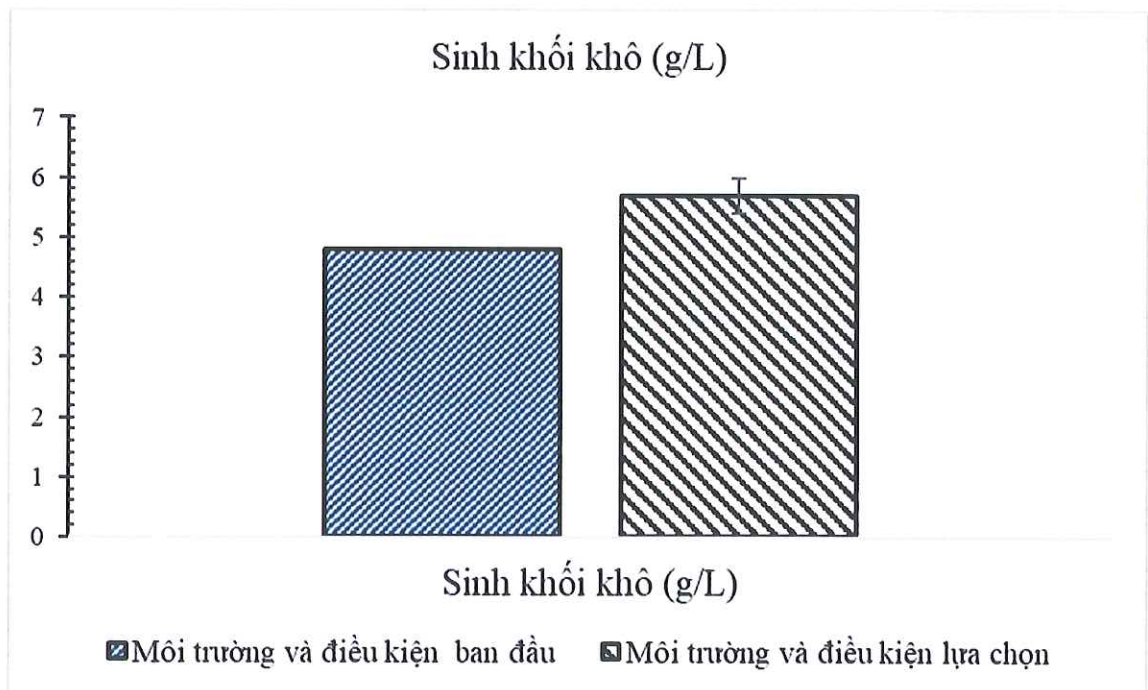
Sử dụng môi trường và các điều kiện đã lựa chọn trên để đánh giá khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp MPA của chủng nghiên cứu trên bình lên men dung tích 10 lít. Kết quả được trình bày trên Hình 3.16, 3.17 và 3.18.

Khi được nuôi cấy trong điều kiện thích hợp sau 14 ngày chủng N18 sinh hàm lượng MPA đạt 705,98 mg/L, sinh khối khô đạt 5,7 g/L, tăng hàm lượng MPA tích lũy lên 1,33 lần so với điều kiện nuôi cấy ban đầu.

Đây là những kết quả ban đầu tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo để thu nhận MPA từ chủng nấm *Penicillium oxalicum* N18.



Hình 3.16. So sánh khả năng sinh MPA trên môi trường và các điều kiện ban đầu với môi trường và các điều kiện đã lựa chọn của chủng *Penicillium oxalicum* N18



Hình 3.17. So sánh khả năng sinh trưởng trên môi trường và các điều kiện ban đầu với môi trường và các điều kiện đã lựa chọn của chủng *Penicillium oxalicum* N18



Hình 3.18. Lên men chủng *Penicillium oxalicum* N18 sinh tổng hợp MPA trên môi trường và các điều kiện đã lựa chọn trong bình dung tích 10 lít

KẾT LUẬN

1. Từ Bộ sưu tập giống đã sàng lọc được 10 chủng vi nấm biển có khả năng sinh tổng hợp MPA.
2. Tuyển chọn được chủng vi nấm N18 có khả năng tổng hợp MPA cao.
3. Chủng N18 được phân loại thuộc về loài *Penicillium oxalicum* và được ký hiệu là chủng *Penicillium oxalicum* N18.
4. Điều kiện nuôi cấy thích hợp cho chủng *Penicillium oxalicum* N18 gồm pH = 6, nhiệt độ 28 °C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian nuôi cấy 14 ngày, môi trường CDYA là môi trường thích hợp nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp MPA. Nguồn cacbon sucrose và nguồn nitơ peptone là nguồn dinh dưỡng thích hợp nhất cho sinh tổng hợp MPA.
5. Khi được nuôi cấy trong môi trường và điều kiện thích hợp sau 14 ngày chủng N18 sinh hàm lượng MPA đạt 705,98 mg/L, sinh khối khô đạt 5,7 g/L, tăng hàm lượng MPA tích lũy lên 1,33 lần so với điều kiện nuôi cấy ban đầu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ardestani F., (2011), Enhanced Mycophenolic Acid Production by *Penicillium brevicompactum* with Enzymatically Hydrolyzed Casein, World Academy of Science, Engineering and Technology.
2. Liqiang Chen, Daniel J. Wilson (2008), Mycophenolic acid analogs with a modified metabolic profile, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 16:9340-9345.
3. Torsen Bak Regueira (2011), Molecular Basis for mycophenolic Acid Biosynthesis in *Penicilium brevicompactum*. App. And Environment Micro, p.3035-3043.
4. Rikita Chauhan, Jerusha Emmanuel and Jayanthi Abraham (2014), Production, characterization and molecular docking of mycophenolic acid by *Byssoschlamys Nivea* strain JSR2. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6 (3), 2014: 227-230.
5. Vinokurova NG., Ivanushkina G., Kochkina GA., Arinbasarov MU., Ozer-skaya SM. (2005), Production of Mycophenolic acid by fungi of the genus *Penicillium* link. *Appl Biochem Microbiol.*: 83-86.
6. Bjarne G Hansen, Hans J Genée, Christian S Kaas, Jakob B Nielsen, Torsten B Regueira, Uffe H Mortensen, Jens C Frisvad and Kiran R Patil (2011), A new class of IMP dehydrogenase with a role in self-resistance of mycophenolic acid producing fungi. *BMC Microbiology* 11:202, <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/202>
7. Mele TS, Halloran PF (2000) The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. *J Immunopharmacol* 47:215–245.
8. Jonsson CA, Carlesten H (2003) Mycophenolic acid inhibits inosine 50 - monophosphate dehydrogenase and suppresses immunoglobulin and cytokine production of B cells. *Int Immunopharmacol* 3:31–37.
9. Allison AC, Eugui EM (1996) Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil. *Clin Transplant* 10:77–84 Applegate KL, Chipley JR (1974).
10. Tressler RJ, Garvin LJ, Slate DL (1994) Anti-tumor activity of mycophenolate mofetil against human and mouse tumors in vivo. *Int J Cancer* 57:568–573

11. Diamond MS, Zachariah M, Harris E (2002) Mycophenolic acid inhibits Dengue virus infection by preventing replication of viral RNA. *Virology* 304:211–221.
12. Bentley R (2000) Mycophenolic acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chem Rev* 100:3801–3826
13. Doerfler DL, Bartman CD, Campbell IM (1979) Mycophenolic acid production by *Penicillium brevicompactum* in two media. *Can J Microbiol* 25:940–943
14. Lafont P, Debeaupuis J-P, Gaillardin M, Payen J (1979a) Production of mycophenolic acid by *Penicillium roqueforti* strains. *Appl Environ Microbiol* 37:365–368.
15. Parekh S, Vinci VA, Strobel RJ (2000) Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:287–301
16. Chopra VL (2005) Mutagenesis: investigating the process and processing the outcome for crop improvement. *Curr Sci* 89:353–359
17. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 424:9–21
18. Thacker J (1999) Repair of ionizing radiation damage in mammalian cells. Alternative pathways and their fidelity. *CR Acad Sci III* 322:103–108
19. Ramos-Ponce LM, Contreras-Esquivel JC, Saenz JM, Lara-Cisneros G, Garza-Garcia Y (2012) Study on production of mycophenolic acid by *Penicillium pinophilum* using response surface methodology. 2nd Portuguese Meeting, Institute of Electrical and Electronics Engineers, Bioengineering (ENBENG) pp 1–4
- Rho Y-T (2011) Effects of carbon and nitrogen sources on immunosuppressant mycophenolic acid fermentation by *Penicillium brevicompactum*. *Korean J Microbiol* 47:249–254
20. Xiang-tian Q, Yong-feng X, Zhao-bing C (2005) Studies on mutagenesis and fermentation of mycophenolic acid producing strain. *Chin J Antibiot* 30:426–427
21. Ozaki H, Kubota K, Takahashi H (1987) Effects of various adsorbents on mycelium formation and mycophenolic acid production by *Penicillium brevicompactum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 51:2503–2508

22. Sircar A., Suryanarayan S., Khedkar A., Subramaniam P., Tambe SP. (2005), Manufacture and purification of mycophenolic acid. *US Patent 6927047*.
23. Sun Aiyou Wei Dongzhi Dong Yu Wang Lihua Xu Rui Jiang Wenbiao (2011), Method for producing mycophenolic acid from *Penicillium brevicompactum* by high-efficiency accumulation. Patent CN102127572A
24. Gulyas E., Balogh G., Erdei J., Toth L., Szikszai B., Jegorov A., Faustmann J. (2008), Method for reducing impurity level in mycophenolic acid fermentation. *US 2008/0254520 A1*.
25. Ardestani F., Seyed Safa – AliFatemi (2010), Evaluation of mycophenolic acid production by *Penicillium brevicompactum* MUCL1n9011 in batch and continuous submerged cultures. *Biochemical Engineering Journal* 50: 99-103.
26. Kumar A., Singh D., Luthara U., Yogesh Mohandhai Patel (2011), Process for preparation of mycophenolic acid, its salt and ester derivatives. *Patent US 2011/0166347 A1*.
27. Gopal Patel, Mahesh D.Patil, Surbhi Soni, Taresh P. Khobragade, Yusuf Chisti, Uttam Chand Banerjee (2016), Production of mycophenolic acid by *Penicillium brevicompactum* - A comparison of two methods of optimization. *Biotechnology Report* 11: 77-85.
28. Shubhankar Anand, Pradeep Srivastava (2020), Optimization Strategies for Purification of Mycophenolic Acid Produced by *Penicillium brevicompactum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03204-w>.
29. Chu Thanh Bình (2015), Sinh tổng hợp mycophenolic acid từ vi nấm. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ nhiệt đới* 09: 103-108.
30. Nguyễn Đăng Quân (2016), Nghiên cứu hiệu quả kháng ung thư của MPA trên mô hình tế bào *in vitro* và mô hình chuột, Đề tài cơ sở - Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.
31. Nguyễn Phương Nhuệ (2017), Thăm dò một số điều kiện nuôi cấy sinh tổng hợp Mycophenolic acid (MPA) từ vi nấm định hướng tạo thực phẩm chức năng dùng hỗ trợ điều trị cho bệnh nhân ung thư, Đề tài cơ sở - Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

32. Nguyễn Lâm Dũng, Bùi Xuân Đồng, Lê Đình Lương (1982) Vi nấm. Nhà Xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
33. Bùi Xuân Đồng (1977). Một số vấn đề về nấm học. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
34. Đặng Vũ Hồng Miên (2015) *Hệ nấm mốc ở Việt Nam phân loại, tác hại, độc tố, cách phòng chống*. NXB Khoa học và Kỹ thuật.
35. Ainsworth, GC. (1973). Introduction and keys to higher taxa. In. The Fungi, An Advanced Treatise. Vol. IV A. pp.1-7 (G.C. Ainsworth, F. K. Sparrow and A. S. Sussman, eds). Academic Press Newyork and London.
36. Rolf Henrik Nilsson, Martin Ryberg, Kessy Abarenkov, Elisabet Sjökvist, Erik Kristiansson, The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 296, Issue 1, July 2009, Pages 97–101, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01618.x>
37. Kenneth W. Cullings, Detlev R. Vogler (1998) A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. *Molecular Ecology* (7), 919-923.
38. Kubicek, C.P., Bissett, J., Druzhi nina, I., Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G., 2003. Genetic and metabolic diversity of Trichoderma: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genet Biol*, 38:310-319.
39. Robbertse B, Strope PK, Chaverri P, Gazis R, Ciufo S, Domrachev M, Schoch CL. Improving taxonomic accuracy for fungi in public sequence databases: applying 'one name one species' in well-defined genera with Trichoderma/Hypocrea as a test case. *Database (Oxford)*. 2017 Jan 1; 2017: bax072. doi: 10.1093/database/bax072. PMID: 29220466; PMCID: PMC 5641268.
40. Huang QY, Lin WF, Chen Z (2009) Optimization of submerged fermentation conditions for longan vinegar production. *Modern Food Sci Technol* 12:1419–142
41. Jagadeeshbabu PE, Viswanathan R (2010) Studies on the effect of pH, temperature and metal ions on the production of pectinase from tamarind kernel powder by submerged fermentation using *Aspergillus foetidus* (NCIM 505). *Asia-Pacific J Chemic Eng* 5(2):396–400

42. Wu Q, Li M, Bilal M, Yang Y, Zhang J, Li X. Enhanced Production of Mycophenolic Acid from *Penicillium brevicompactum* via Optimized Fermentation Strategy. *Appl Biochem Biotechnol*. 2022 Jul;194(7):3001-3015. doi: 10.1007/s12010-022-03886-9. Epub 2022 Mar 22. PMID: 35316476; PMCID: PMC8938742.
43. Cong Min, Hao Dong, Xingbin Liu, Zongshen Zhang, Screening and identification of a *Penicillium brevicompactum* strain isolated from the fruiting body of *Inonotus obliquus* and the fermentation production of mycophenolic acid, *Annals of Microbiology*, 10.1007/s13213-019-01517-z, **69**, 13, (1351-1360), (2019).
44. <http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/visv13.htm>
45. Chen, M., Wang, J., Lin, L., Xu, X., Wei, W., Shen, Y., & Wei, D. (2022). Synergistic Regulation of Metabolism by Ca(2+)/Reactive Oxygen Species in *Penicillium brevicompactum* Improves Production of Mycophenolic Acid and Investigation of the Ca(2+) Channel. *ACS Synthetic Biology*, 11, 273–285
46. Rho Y-T (2011) Effects of carbon and nitrogen sources on immunosuppressant mycophenolic acid fermentation by *Penicillium brevicompactum*. *Korean J Microbiol* 47:249–254
47. Mohamed R., Heidy A. E.Y. and Wael T. (2015) Monograph On The genus *Penicillium* A guide for historical, classification and identification of penicilli, their industrial applications and detrimental effects. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University and Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Misr University for Science and Technology.
48. Kubátová, A., Hujslová, M., Frisvad, J. C., Chudíčková, M., & Kolařík, M. (2019). Taxonomic revision of the biotechnologically important species, *Penicillium oxalicum* with description of two new species from acidic and saline soils. *Mycological Progress*, 18(1-2), 215-228. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1420-7>.
49. Luo HH, Niu YY, Duan CQ, Su HJ, Yan GL (2013). A pH control strategy for increased β -carotene production during batch fermentation by recombinant industrial wine yeast. *Process Biochem* 48:195–200.

50. Li SY, Srivastava R, Suib SL, Li Y, Parnas RS (2011). Performance of batch, fedbatch, and continuous A–B–E fermentation with pH-control. *Bioresour Technol* 102:4241–50.
51. Mao XZ, Wang F, et al (2009). The pH shift and precursor feeding strategy in a low-toxicity FR-008/candicidin derivative CS103 fermentation bioprocess by a mutant of *Streptomyces* sp. FR-008. *Appl Biochem Biotechnol* 159:673–86.
52. Choi SU, Paik HD, Lee SC, Nihira T, Hwang YI (2007). Enhanced productivity of human lysozyme by pH-controlled batch fermentation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* 98:132–5.
53. Chauhan AK, Arora D, Khanna N (1999). A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem* 34:139–45.

Số: 1080 /QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 28 tháng 09 năm 2023

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ

GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 303/QĐ-VHL ngày 01/03/2023 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 15/2014/TT-BGDĐT ngày 15/5/2014 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 775/QĐ-HVKHCN ngày 21/11/2016 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 850/QĐ-HVKHCN ngày 31/05/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học trúng tuyển đợt 1 năm 2021;

Căn cứ Quyết định số 1404/QĐ-HVKHCN ngày 16/09/2022 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và cử người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 300/QĐ-HVKHCN ngày 20/04/2023 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc gia hạn thời gian học tập lần 1 cho học viên Nguyễn Hồng Nhung;

Xét đề nghị của Trưởng khoa Khoa Công nghệ sinh học, Trưởng phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Nguyễn Hồng Nhung với đề tài: “Nghiên cứu một số điều kiện nuôi cấy chủng vi nấm sinh tổng hợp mycophenolic acid”.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận văn kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ. Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký.

Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính và Truyền thông, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng Khoa Công nghệ sinh học, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. /s. *me*

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ học viên;
- Lưu: VT, ĐT, MT.14.

GIÁM ĐỐC

GS.TS. Vũ Đình Lãm

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 1080/QĐ-HVKHCN ngày 28/09/2023
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)



Chợ luận văn của học viên: Nguyễn Hồng Nhung

Tên đề tài: Nghiên cứu một số điều kiện nuôi cấy chủng vi nấm sinh tổng hợp mycophenolic acid.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn: 1. PGS. TS. Nguyễn Phương Nhuệ

- Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. TS. Hoa Thị Minh Tú

- Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1.	GS.TS. Chu Hoàng Hà	Công nghệ sinh học	Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam	Chủ tịch
2.	PGS. TS. Nguyễn Xuân Cảnh	Công nghệ sinh học	Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn	Phản biện 1
3.	TS. Lê Thị Thanh Thủy	Vi sinh vật học	Viện Thổ nhưỡng Nông hóa, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam	Phản biện 2
4.	TS. Đinh Thị Thu Hằng	Hóa sinh học	Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
5.	TS. Phan Thị Hồng Thảo	Công nghệ sinh học	Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên

(Hội đồng gồm 05 thành viên)./. *ĐTC*

Hà Nội, ngày 24 tháng 10 năm 2023

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 1080/QĐ-HVKHCN ngày 28/09/2023 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Nguyễn Hồng Nhung

Tên đề tài: Nghiên cứu một số điều kiện nuôi cấy chủng vi nấm sinh tổng hợp mycophenolic acid.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 24/10/2023 Hội đồng đã họp tại phòng 1710, A28, Học viện Khoa học và Công nghệ vào lúc 14 giờ 00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

1. GS.TS. Chu Hoàng Hà
2. TS. Đinh Thị Thu Hằng
3. PGS.TS. Nguyễn Xuân Cảnh
4. TS. Lê Thị Thanh Thủy
5. TS. Phan Thị Hồng Thảo

- Chủ tịch hội đồng
Thư ký hội đồng
Phản biện 1
Phản biện 2
Ủy viên hội đồng



Thành viên vắng mặt: (Phản biện hoặc ủy viên, đã có bản nhận xét đồng ý cho phép học viên được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ).

NỘI DUNG LÀM VIỆC

1. Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
2. Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
3. Thư ký HĐ, đọc lí lịch khoa học và bảng điểm của học viên
4. Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng

5. Phản biện 1: Tổng quan định danh vi nấm rất ngắn gọn hơn, lý luận p...
...lúc...định...MPA...hệ...nấm...bên...sung...hệ...sinh...cho...mục...3...2...lưu ý
...hỏi...chánh...tức...lưu ý...Mục...1...4...đ...1...7
...Câu hỏi...1)...Chỉ ra...đ...khác...nhau...về...p...đ...tách...chất...MPA
...2)...Đều...p...x...đ...bào...hệ...nấm...bào...hệ...nấm...trong...p...2...4...3...
...3)...Việc...sống...lọc...1...0...chuẩn...có...KN...S.T.H.MPA...hệ...GB...chúng...bản...đầu...theo...hình...chỉ
4) Bảng cách nào đi lên mức nấm trong bình lên đến 10 lít nào?

6. Phản biện 2: Rã soát lỗi chính tả, tài liệu tham khảo, bổ sung
p² xử lý số liệu thống kê.....
Câu hỏi: Em cái... KQ thu được trong luận văn, t/g có ý kiến
gì để bổ sung MPA trong phòng lái.....

7. Học viên trả lời:

Đáp ứng yêu cầu.....

8. Các thành viên HĐ và những người tham dự nêu câu hỏi

KP: Thạc Sĩ Hồng Châu... rà soát lại TLTK, lỗi chính tả...
Câu hỏi: Em... VSV đi thu được MPA cần chú ý trong cái
yêu tố nào?
Em qt một cây ĐH MPA, chất cảm ứng... vào
Lai... sau... ng/c... đến... để... để... sinh... hợp
MPA của... mẫu... và... tạo ra hình thái... pellet có
ảnh hưởng đến... qt... ĐH... này... không?

9. Học viên trả lời

Đáp ứng yêu cầu.....

10. Hội đồng họp kín và cho điểm

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên:

Trưởng ban: TS. Phan Thị Hồng Thảo.....

Ủy viên: PGS. TS. Nguyễn Xuân Cảnh.....

Ủy viên: TS. Đinh Thị Thu Hằng.....

- Kết quả kiểm phiếu như sau:

Số phiếu phát ra:.....05.....

Số phiếu thu về:.....05.....

Tổng số điểm:.....42,6.....

Điểm trung bình: ..8,5.....

Điểm thưởng công trình công bố:.....0.....

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố:.....8,5.....

- Kết luận của Hội đồng:

+ Luận văn Đạt yêu cầu (đạt/không đạt yêu cầu)

+ Tính không trùng lặp nội dung và tên đề tài với các công trình công bố:

Đề tài không trùng lặp với các nghiên cứu đang và
nguồn nước.....

11. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

Đề tài có tính khoa học và thực tiễn, đáp ứng yêu cầu của
một luận văn thạc sĩ chuyên ngành Earth Science và
Đề nghị chỉnh sửa theo các góp ý của các thành viên
Hội đồng.....

Buổi họp đã kết thúc vào 16... giờ 45... phút, ngày 24/10/2023

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

Hà Nội, ngày 24 tháng 10 năm 2023

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG


Đinh Thị Thu Hằng


Chu Công Tu

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO



KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC

Nguyễn Thị Trung

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Nguyễn Xuân Cảnh

Học hàm, học vị: PGS. TS

Chức danh trong Hội đồng: Phản biện

Cơ quan công tác: Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Họ và tên học viên: Nguyễn Hồng Nhung

Tên đề tài: Nghiên cứu một số điều kiện nuôi cấy chủng vi nấm sinh tổng hợp Mycophenolic acid.

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm.

Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Mycophenolic acid (MPA) được biết đến với khả năng ức chế hoạt động của enzyme inosine monophosphate dehydrogenase, từ đó ức chế sự sinh tổng hợp ADN, ARN cũng như sự phân chia tế bào. Trong y học, MPA được sử dụng với nhiều công dụng khác nhau như chất ức chế miễn dịch, chất chống thải ghép, ức chế sự phát triển của khối u, ức chế sự phát triển của một số vi sinh vật gây bệnh. Trên thị trường các sản phẩm có chứa MPA có nguồn gốc chủ yếu từ tổng hợp hóa học. Ngoài ra, MPA cũng được xác định là sản phẩm trao đổi chất từ một số vi nấm, việc phát hiện này đã mở ra hướng nghiên cứu mới với mục tiêu là sản xuất MPA từ vi sinh vật nhằm nâng cao năng suất và hạ giá thành sản phẩm. Để đạt được mục tiêu này yêu cầu đầu tiên là phải có chủng giống có khả năng sinh tổng hợp MPA cao, an toàn, đồng thời xác định được các điều kiện nuôi cấy tối ưu cho chủng giống đã tuyển chọn. Chính vì vậy các nội dung đặt ra trong nghiên cứu này có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao, đảm bảo tính cấp thiết và thời sự.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Có rất nhiều các nghiên cứu tập trung vào việc tuyển chọn chủng giống vi sinh vật và xác định điều kiện nuôi cấy nhằm mục đích thu nhận các sản phẩm trao đổi chất. Tuy nhiên các nghiên cứu về tuyển chọn chủng vi nấm có khả năng sinh tổng hợp MPA, đồng thời xác định các điều kiện nuôi cấy phù hợp còn rất hạn chế, hiện chưa có công bố nào có liên quan đến nội dung nghiên cứu này. Chính vì vậy, các nội dung nghiên cứu của luận văn đảm bảo tính không trùng lặp.

Tác giả đã tham khảo 55 tài liệu khác nhau, các tài liệu này đều liên quan đến nội dung nghiên cứu và được trích dẫn đầy đủ. Tuy nhiên tính cập nhật của các tài liệu tham khảo chưa cao.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Nội dung được thực hiện trong đề tài sát với đề cương đã đặt ra và đảm bảo tính phù hợp với tên đề tài.

Nội dung nghiên cứu, tên đề tài phù hợp với chuyên ngành nghiên cứu là Sinh học thực nghiệm với mã số 8420114.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Nghiên cứu được tiến hành với các quy trình, vật liệu, thời gian, địa điểm được mô tả rõ ràng. Phương pháp nghiên cứu là thường quy và hợp lý đảm bảo độ tin cậy của kết quả nghiên cứu.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Các nội dung nghiên cứu đã được thực hiện và mang lại một số kết quả chính như sau:

- Đã tuyển chọn được chủng N18 trong số 10 chủng vi nấm biển có khả năng sinh tổng hợp MPA. Bằng việc phân tích các đặc điểm sinh học và trình tự ITS đã xác định chủng N18 thuộc loài *Penicillium oxalicum*.

- Đã xác định được một số điều kiện nuôi cấy thích hợp cho chủng *Penicillium oxalicum* N18 sinh MPA cao gồm: pH môi trường là 6, nhiệt độ nuôi cấy là 28°C, tốc độ lắc 150 vòng/ phút, nuôi cấy 14 ngày trên môi trường CDYA với nguồn carbon là sucrose và nguồn nitro là peptone. Trong điều kiện này hàm lượng MPA sinh ra đạt 705,98 mg/l, sinh khối khô đạt 5,7g/l.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

- Nội dung tổng quan về nghiên cứu định danh nấm viết khá lan man, cần trọng tâm hơn chỉ rõ phương pháp truyền thống sẽ đánh giá những tiêu chí nào, phương pháp sinh học phân tử sẽ sử dụng trình tự nào để phân tích. Nội dung tổng quan 1.7 cũng chỉ nên tập trung vào giới thiệu ảnh hưởng các điều kiện nuôi cấy tới nấm chứ không nên nói chung là vi sinh vật. Nếu có thể bổ sung thêm tổng quan về các phương pháp xác định và thu nhận MPA từ nấm.

- Phương pháp định danh vi nấm bằng sinh học phân tử (mục 2.3.2) hiện đang được mô tả chưa đầy đủ, cần bổ sung. Bổ sung phương pháp xác định khả năng tạo axit trên CREA, phương pháp xác định sinh khối khô của nấm.

- Bổ sung tối đa hình ảnh, số liệu minh chứng cho bảng kết quả 3.2.

- Còn rất nhiều lỗi chính tả, dịch thuật, danh pháp... cần rà soát và chỉnh sửa: sucrose, "quá trình lên men MPA",

- Một số hình ảnh nên chuyển sang phụ lục: 3.14, 3.15, 3.18.

Câu hỏi

1. Chỉ ra sự khác biệt về chức năng khi tách chiết MPA bằng HPLC và LC/MS (mục 2.2.2)?
2. Nêu phương pháp xác định mật độ bào tử nấm trong phương pháp 2.2.3?
3. Việc sàng lọc 10 chủng có khả năng sinh MPA từ 68 chủng ban đầu dựa trên tiêu chí nào?
4. Bằng cách nào để thực hiện việc lên men trong bình dung tích 10 lít với tốc độ lắc 150 vòng/ phút?
7. **Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học** thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?
 - Tác giả chưa có công bố nào từ kết quả nghiên cứu của mình, tuy nhiên kết quả này có tiềm năng để viết thành bài báo gửi đăng trên tạp chí khoa học hoặc hội nghị khoa học quốc gia.
8. **Kết luận chung** (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):
 - Nội dung nghiên cứu của đề tài đáp ứng yêu cầu của một luận văn cao học để có thể đưa ra Hội đồng bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ.

Hà Nội, ngày 09 tháng 10 năm 2023

Người nhận xét



Nguyễn Xuân Cảnh

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: **Lê Thị Thanh Thủy**

Học hàm, học vị: Tiến sĩ, Nghiên cứu viên cao cấp

Chức danh trong Hội đồng: Phản biện 2

Cơ quan công tác: Viện Thổ nhưỡng Nông hóa (Viện Khoa học Nông nghiệp VN)

Họ và tên học viên: **Nguyễn Hồng Nhung**

Tên đề tài: Nghiên cứu ứng dụng một số chủng vi nấm phân lập tại Việt Nam sinh hoạt chất Mycophenolic acid (MPA) làm nguyên liệu để sản xuất thuốc

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm.

Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Mycophenolic acid (MPA) là một chất ức chế chọn lọc quá trình tổng hợp guanine và do đó nó có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, kháng vi-rút, ức chế miễn dịch và chống ung thư. Các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng MPA có tác dụng hữu hiệu hoạt động chống vi-rút chống lại MERS-CoV, coronavirus ở người và SARS-CoV-2 (Shen L, et al., 2019; Kato F, et al., 2020; Dowran R, et al., 2020). MPA và các dẫn xuất của nó đã thu hút nhiều sự chú ý từ các nhà hóa học, sinh học và dược lý học...

Trên thế giới, MPA được tổng hợp chủ yếu bằng con đường hóa học, tuy nhiên sản phẩm MPA hóa học thường tạp nhiễm các dẫn xuất không mong muốn nên tốn nhiều công sức và hóa chất cho việc tinh sạch. Vì vậy, hướng tổng hợp MPA tự nhiên từ vi sinh vật đã và đang được quan tâm nghiên cứu và hiện có nhiều kết quả khả quan. Mycophenolic acid được sinh ra trong quá trình lên men một số chủng vi sinh vật chi *Penicillium* như *P. brevicompactum*, *P. stoloniferum*, *P. roqueforti*, ...v.v

Vì vậy đề tài luận văn rất có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, góp phần cung cấp dữ liệu khoa học về một số điều kiện nuôi cấy chủng vi nấm sinh tổng hợp mycophenolic acid chi *Penicillium* tạo tiền đề cho việc nghiên cứu thu nhận hoạt chất này làm nguyên liệu cho sản xuất thuốc điều trị ức chế miễn dịch và chống thải ghép khi ghép mô, tạng.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài luận văn không trùng lặp với các nghiên cứu khác ở Việt Nam và Thế giới.

Luận văn là một phần kết quả nghiên cứu của Đề tài độc lập cấp nhà nước: “Nghiên cứu ứng dụng một số chủng vi nấm phân lập tại Việt Nam sinh hoạt chất *Mycophenolic acid* (MPA) làm nguyên liệu để sản xuất thuốc”. Mã số: ĐTDL.CN.06/21.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Tên đề tài và nội dung nghiên cứu phù hợp với Chuyên ngành Sinh học thực nghiệm và mã số đào tạo

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Đề tài luận văn sử dụng các phương pháp nghiên cứu chuẩn đã được công bố nên đảm bảo độ tin cậy

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Về hình thức của luận văn: Luận văn gồm 52 trang. Phần mở đầu: 03 trang; Chương 1- tổng quan tài liệu: 15 trang; Chương 2-vật liệu và phương pháp nghiên cứu: 5 trang; Chương 3-kết quả thảo luận nghiên cứu: 22 trang; Kết luận và kiến nghị: 1 trang; Tài liệu tham khảo: 55 tài liệu (tiếng Việt: 6 tài liệu)

Luận văn đã nêu và minh chứng được sự cần thiết tiến hành đề tài; Nội dung nghiên cứu rõ ràng, phù hợp với mục tiêu đề ra; Bố cục luận văn phù hợp, hình thức đạt yêu cầu: Các bảng biểu, đồ thị minh họa rõ ràng, hình ảnh in màu đẹp

Kết quả:

- a) Từ Bộ sưu tập giống đã sàng lọc được 10 chủng vi nấm biến có khả năng sinh tổng hợp MPA.
- b) Tuyển chọn được chủng vi nấm N18 có khả năng tổng hợp MPA cao.
- c) Chủng N18 được phân loại thuộc về loài *Penicillium oxalicum*
- d) Điều kiện nuôi cấy thích hợp cho chủng *Penicillium oxalicum* N18 gồm pH = 6, nhiệt độ 28 °C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian nuôi cấy 14 ngày, môi trường CDYA là một trường thích hợp nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp MPA. Nguồn cacbon sucrose và nguồn nitơ peptone là nguồn dinh dưỡng thích hợp nhất cho sinh tổng hợp MPA.
- e) Khi được nuôi cấy trong môi trường và điều kiện thích hợp sau 14 ngày chủng N18 sinh hàm lượng MPA đạt 705,98 mg/L, sinh khối khô đạt 5,7 g/L, tăng hàm lượng MPA tích lũy lên 1,33 lần so với điều kiện nuôi cấy ban đầu.
- f) Luận văn cũng đã có những bình luận về kết quả và liên hệ với nhiều tài liệu nghiên cứu mới nhất về các ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến sinh tổng hợp MPA của các chủng vi sinh vật chi *Penicillium*

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

Luận văn đã thể hiện được các kết quả nghiên cứu đạt mục tiêu đề ra, tuy nhiên cần chỉnh sửa cho logic và khoa học hơn

- Phần mở đầu: trang 1- Bổ sung tên tác giả, năm xuất bản vào trích dẫn và sửa đoạn văn “Các nhà khoa học [5,6], đã sinh tổng hợp MPA từ các chủng vi nấm”. Nên có dẫn

dắt thêm về thực trạng nghiên cứu hiện nay về sử dụng vi sinh vật sinh tổng hợp MPA để nêu bật tính cấp thiết của đề tài luận văn

- Bổ sung các nội dung nghiên cứu của đề tài luận văn

- Tổng quan tài liệu:

+ Rà soát, chỉnh sửa lỗi chính tả và nghĩa của một số đoạn văn, nên có trích tên tác giả, năm xuất bản trước mỗi đoạn trích dẫn và chốt cuối câu là số thứ tự tài liệu tham khảo

+ Ví dụ: trang 5- Các chủng vi sinh vật được đột biến và cải tiến môi trường để thực hiện lên men thương mại sản phẩm công nghiệp. Các chủng cải tiến như vậy có thể làm giảm chi phí của quy trình với năng suất tăng và cũng có thể có một số đặc điểm mong muốn chuyên biệt [16].

+ Trang 6- Tuy nhiên, tỉ lệ nhân giống khác nhau trong các nghiên cứu trước đây. Tỉ lệ nhân giống 4% và 5% được sử dụng trong quy trình lên men MPA [5]. Tuy nhiên, đã sử dụng dịch nhân giống 0,5 ml (5.9×10^7 ml⁻¹) để cấy vào bình lắc 250 ml chứa môi trường 50 ml trong quá trình tạo MPA tối đa [1].

+ Trang 10: bỏ đoạn văn “Vì vậy, trong nghiên cứu này phân loại chủng N18 được kết hợp hai phương pháp: đặc điểm hình thái và giải trình tự vùng gen ITS để phân loại đến loài các chủng có tiềm năng ứng dụng vào thực tiễn”

+ Tài liệu tham khảo số 37 (năm 1989) quá cũ có thể thay thế bằng tài liệu mới hơn

- Chương 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

- Bổ sung địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Phương pháp nghiên cứu:

+ Mục 2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy lên sinh tổng hợp MPA của chủng nghiên cứu (trang 21) bổ sung chỉ tiêu theo dõi

+ Bổ sung phương pháp xử lý số liệu

- Kết quả và thảo luận:

+ Bảng 3.1 Bổ sung thông tin hình thái khuẩn lạc được mô tả trên môi trường nuôi cấy nào

+ Bổ sung tài liệu tham khảo cho kết quả trang 30: “Bào tử dày đặc, kết thành đám có màu xanh hơi vàng vừa phải (ISCC-NBS số 136) đến màu xanh ô liu xám (số 127); không tiết sắc tố; mặt dưới khuẩn lạc có màu vàng nhạt hoặc vàng vừa phải (số 87) sang màu vàng xám đậm (số 91) (Hình 3.4)”

+ Bổ sung kết quả nhận xét định lượng hàm lượng MPA của chủng N18 (hàm lượng bao nhiêu là cao?)

- Kết luận: Bổ sung kết quả định lượng hàm lượng MPA của chủng N18

- Rà soát lỗi chính tả

- Tài liệu tham khảo: cần sắp xếp lại

***Câu hỏi:** Từ các kết quả thu được của đề tài luận văn, học viên cơ dự định gì trong tương lai để tiếp tục hướng nghiên cứu này “Ứng dụng các vi sinh vật sinh tổng hợp MPA”

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

Tuy cần phải sửa chữa và bổ sung một số điểm cho chính xác hơn nhưng nhìn chung Luận văn đã nêu được tính cấp thiết, nội dung nghiên cứu phù hợp, các kết quả nghiên cứu đạt được đáp ứng mục tiêu đề ra và đạt yêu cầu của một Luận văn Thạc sĩ chuyên ngành Sinh học thực nghiệm. Luận văn có thể đưa ra Hội đồng chấm luận văn để học viên nhận bằng Thạc sĩ.

Hà Nội, ngày 9 tháng 10 năm 2023

Người nhận xét

(Ký, ghi rõ họ tên)



TS. Lê Thị Thanh Thủy

- Nhận xét được làm thành 02 bản, có chữ ký của người nhận xét và gửi về phòng Đào tạo 02 ngày trước buổi bảo vệ.
- Địa chỉ liên hệ: CV. Nguyễn Thị Minh Tâm phòng Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội. ĐT02438689977- 0946082099

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN
THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ tên học viên: Nguyễn Hồng Nhung

Lớp: BIO21A

Tên đề tài luận văn: Nghiên cứu một số điều kiện nuôi cấy chủng vi nấm sinh tổng hợp Mycophenolic acid

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Nguyễn Phương Nhuệ
2. TS. Hoa Thị Minh Tú

Ngày bảo vệ luận văn: 24/10/2023

Căn cứ biên bản họp hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ, học viên đã chỉnh sửa luận văn như sau:

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	Tổng quan định danh nên viết ngắn gọn hơn	Do đây là phương pháp rất cơ bản đã lược bỏ bớt phần kỹ thuật PCR trang 10,11,12
2	Bổ sung phương pháp xác định MPA từ nấm, bổ sung hình ảnh	Đã bổ sung độ phóng đại ảnh: Hình 3.5 cường độ ánh sáng tử ngoại N18 ở vật kính 40X, trang 27
3	Phần mở đầu bổ sung tên tác giả	Đã bổ sung tên tác giả trích dẫn phần [5,6] trang 1
4	Bổ sung mục tiêu và nội dung nghiên cứu	Đã bổ sung mục tiêu và nội dung nghiên cứu trong phần cuối mở đầu trang 2



5	Rà soát lỗi chính tả, tài liệu tham khảo phương pháp xử lý số liệu thống kê	Đã rà soát lỗi chính tả, đã bổ sung phương pháp xử lý thống kê, trang 19.
---	---	---

Hà Nội, ngày 03 tháng 11 năm 2023

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

HỌC VIÊN


Chu Hồng Tà


Nguyễn Phương Như


Hoa Thị Minh Tú


Nguyễn Hồng Nhung

XÁC NHẬN CỦA HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC




Nguyễn Thị Trung

