

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Tiên Quân

**ẢNH HƯỞNG CỦA NẤM *EUROTIIUM CRISTATUM* ĐẾN MỘT SỐ HOẠT
TÍNH SINH HỌC CỦA LÁ TRÀ HOA VÀNG SAU LÊN MEN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Tiến Quân

**ẢNH HƯỞNG CỦA NẤM *EUROTIVUM CRISTATUM* ĐẾN MỘT SỐ HOẠT
TÍNH SINH HỌC CỦA LÁ TRÀ HOA VÀNG SAU LÊN MEN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

1. TS. Trần Thị Như Hằng

Handwritten signature of Trần Thị Như Hằng in blue ink.

2. TS. Hoàng Kim Chi

Handwritten signature of Hoàng Kim Chi in blue ink.

Hà Nội - 2024

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 cùng với sự hướng dẫn của TS. Trần Thị Như Hằng và TS. Hoàng Kim Chi. 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.

Hà Nội, ngày 18 tháng 11 năm 2024

Tác giả luận văn



Nguyễn Tiến Quân

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin được bày tỏ sự biết ơn sâu sắc đến TS. Trần Thị Như Hằng và TS. Hoàng Kim Chi đã tận tình hướng dẫn, và định hướng nghiên cứu cho tôi trong suốt quá trình thực tập cũng như hoàn thiện luận văn tốt nghiệp.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành tới tập thể cán bộ phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên đã tạo điều kiện về cơ sở vật chất, trang thiết bị máy móc để tôi có thể thực hiện các thí nghiệm một cách tốt nhất trong suốt quá trình thực tập.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới ban lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng và toàn thể quý thầy cô tại Học viện Khoa học và công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giảng dạy kiến thức, cũng như truyền đạt kinh nghiệm cho tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận văn.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến gia đình, người thân, bạn bè. Những người đã định hướng, ủng hộ, tạo động lực trong những lúc khó khăn nhất để tôi có thể tiếp tục phấn đấu học tập, theo đuổi đam mê nghiên cứu khoa học cũng như hoàn thiện khóa luận tốt nghiệp này.

Xin chân trọng cảm ơn !

Tác giả luận văn



Nguyễn Tiến Quân

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	vi
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. SƠ LƯỢC VỀ CÂY TRÀ HOA VÀNG	3
1.1.1. Đặc điểm sinh học của cây trà hoa vàng	3
1.1.2. Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của lá trà hoa vàng	4
1.2. TỔNG QUAN VỀ NẤM <i>Eurotium cristatum</i>	5
1.2.1. Phân loại.....	5
1.2.2. Đặc điểm hình thái	6
1.2.3. Điều kiện sinh trưởng, phát triển của nấm <i>E. cristatum</i>	7
1.2.4. Vai trò của nấm kim hoa trong công nghệ lên men thực phẩm	7
1.3. MỘT SỐ QUY TRÌNH NGHIÊN CỨU, SẢN XUẤT TRÀ ĐẬM CÓ SỬ DỤNG NẤM <i>E. cristatum</i>	9
1.4. SỰ CHUYỂN HÓA CỦA CÁC HỢP CHẤT HÓA HỌC TRONG LÁ TRÀ LÊN MEN BỞI VI NẤM	10
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	13
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	13
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.2.1. Tuyển chọn bộ chủng nấm kim hoa cho lên men lá trà.	16
2.2.1.1. Lên men các chủng nấm.....	16
2.2.1.2. Chiết tách cao tổng số từ dịch lên men các chủng nấm.....	16
2.2.1.3. Đánh giá hoạt tính sinh học của các cặn chiết	16
2.2.3. Đánh giá hoạt tính sinh học của mẫu lá trà hoa vàng lên men bởi chủng nấm lựa chọn.	17
2.2.3.1. Lên men lá trà hoa vàng với sinh khối chủng nấm lựa chọn.	17
2.2.3.2. Chiết tách cao tổng số từ sinh khối lá THV lên men bởi chủng nấm lựa chọn	18
2.2.4. Nghiên cứu so sánh và xác định thành phần có hoạt tính trong lá THV lên men bởi nấm kim hoa lựa chọn.....	19

2.2.4.1. Xác định hàm lượng các nhóm chất trong dịch chiết lá trà hoa vàng lên men	19
2.2.4.2. Phân lập các hợp chất có hoạt tính trong lá THV lên men bởi bộ chủng nấm kim hoa lựa chọn	20
2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu.....	21
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	22
3.1. TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG NẤM KIM HOA ĐỂ LÊN MEN LÁ TRÀ HOA VÀNG	22
3.2. ĐÁNH GIÁ MẬT ĐỘ VI SINH VẬT VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA LÁ THV LÊN MEN BỞI BỘ CHỦNG NẤM KIM HOA.....	23
3.2.1. Mật độ của chủng nấm kim hoa trong lá THV sau khi lên men. .	23
3.2.2. Hoạt tính sinh học của lá THV lên men.....	23
3.3. NGHIÊN CỨU SO SÁNH VÀ XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN CÓ HOẠT TÍNH TRONG LÁ TRÀ THV LÊN MEN BỞI NẤM KIM HOA	27
3.3.1. Hàm lượng polyphenol tổng số.....	27
3.3.2. Hàm lượng axit amin tổng số.....	28
3.3.3. Thành phần hợp chất có hoạt tính trong lá trà THV lên men bởi nấm kim hoa.....	28
3.3.3.1. Phân lập các hợp chất và đánh giá hoạt tính sinh học	28
3.3.3.2. Xử lý các mẫu cao chiết phân đoạn, tách chất tinh.....	30
Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	40
KẾT LUẬN	40
KIẾN NGHỊ.....	40
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	42
PHỤ LỤC	PL1

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Tên viết tắt	Tên Tiếng Anh	Nghĩa Tiếng Việt
BLAST	Basic local alignment search tools	Công cụ so sánh mức độ tương đồng về trình tự nucleotide/axit amin
bp	Base pair	Cặp base
CFU	Colony forming unit	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
CSDL		Cơ sở dữ liệu
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối đa một nửa
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry	Sắc ký lỏng ghép khối phổ
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Hoa Kỳ
OCOP	One Commune One Product	Mỗi địa phương một sản phẩm
PNPG	p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside	
SC	Scavenging capacity	Khả năng bao vây/ trung hòa gốc tự do
THV		Trà hoa vàng
TPC	Total polyphenol compounds	Hợp chất polyphenol tổng số
VSV		Vi sinh vật

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Các nhóm chất có trong một số loại trà đậm phổ biến.....	11
Bảng 3.1. Khả năng ức chế α -glucosidase của cặn chiết các chủng nấm.....	22
Bảng 3.2. Mật độ vi sinh vật trong quá trình lên men lá THV sau 21 ngày lên men.....	23
Bảng 3.3. Hoạt tính chống oxy hóa của các cặn chiết.....	24
Bảng 3.4. Hoạt tính ức chế α glucosidase của các cặn chiết.....	25
Bảng 3.5. Hàm lượng polyphenol tổng số trong lá trà lên men và mẫu lá trà thô.....	278
Bảng 3.6. Hàm lượng axit amin tổng số từ cặn chiết của lá trà thô và lá trà lên men bởi nấm kim hoa.....	28
Bảng 3.7. Hoạt tính sinh học ở 2 mẫu cao phân đoạn n-hexan và etyl acetate.....	29
Bảng 3.8. Hoạt tính sinh học ở ba phân đoạn chiết tách từ cao tổng số THV-LM/Et.....	30
Bảng 3.9. Hoạt tính sinh học của 5 hợp chất tinh sạch.....	38

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Hình vẽ lá, hoa <i>C. chrysantha</i>	3
Hình 1.2. Ảnh chụp SEM bào tử nấm <i>E. cristatum</i>	6
Hình 1.3. Sơ đồ quy trình sản xuất trà đậm lên men bởi nấm <i>E. cristatum</i>	9
Hình 1.4. Bào tử nấm kim hoa <i>E. cristatum</i> trên bánh trà đậm.....	10
Hình 1.5. Sơ đồ chuyển hóa các thành phần hóa học có trong lá trà xanh <i>C. sinensis</i> sau khi lên men bởi chủng nấm <i>E. cristatum</i> MF800948.....	11
Hình 2.1. Lá THV (mặt trước, mặt sau).....	13
Hình 2.2. Bộ chủng nấm <i>E.cristatum</i> (E1, E3 và E8) được kế thừa cấy truyền trong ống thạch nghiêng PDA.....	14
Hình 2.3 .Sơ đồ nghiên cứu tổng quát.....	15
Hình 2.4. Phản ứng phân cắt cơ chất pNPG bởi enzyme α -glucosidase.....	16
Hình 2.5. Sơ đồ quy trình phân tích hàm lượng axit amin.....	20

Hình 3.1. Đường chuẩn dựng theo hàm lượng axit gallic tương đương.....	27
Hình 3.2. Sơ đồ tạo cao chiết tổng số và các cao chiết phân đoạn.	29
Hình 3.3. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cặn chiết là THV lên men bởi các chủng nấm kim hoa	32
Hình 3.4. Cấu trúc hóa học của hợp chất hợp chất 1 (quercitrin).....	33
Hình 3.5. Cấu trúc hóa học của hợp chất hợp chất 2 (afzelin).....	34
Hình 3.6. Cấu trúc hóa học của hợp chất hợp chất 3 ((-)-epicatechin).....	35
Hình 3.7. Cấu trúc hóa học của hợp chất hợp chất 4 (engelitin)	36
Hình 3.8. Cấu trúc hóa học của hợp chất Hợp chất 5 (22-O-Tigloyloxycamelliagenin A)	37

MỞ ĐẦU

Việt Nam là một trong những quốc gia phân bố trà hoa vàng *Camellia chrysantha* tự nhiên lớn trên thế giới, các nghiên cứu về loài cây này trong những năm gần đây được coi là các công trình có ý nghĩa cao không chỉ đối với khoa học trong nước mà còn đối với quốc tế. Một số công trình nghiên cứu trong nước được thực hiện với mục đích nhằm bảo tồn và nhân giống trà hoa vàng bản địa, cũng như xác định thành phần và cấu trúc hóa học của các hợp chất chứa hoạt tính sinh học từ loài cây thực vật quý này.

Trên thế giới, các công bố liên quan đến trà hoa vàng (THV) không chỉ tập trung chủ yếu về phân lập hoạt chất quý trong hoa và lá của cây mà còn ứng dụng chúng vi sinh vật trong quá trình lên men, chuyển biến sinh học góp phần tối ưu hoá công dụng của lá THV. Theo kết quả của một số nghiên cứu đã thực hiện trên trà lên men, các vi sinh vật chuyển hóa trà chủ yếu gồm *Aspergillus niger*, *Eurotium cristatum*, ngoài ra còn một số vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* [1, 2]. Đặc biệt, một số hợp chất có hoạt tính y dược học trong trà lên men đã được xác định bản chất là sản phẩm tiết ra bởi các chủng vi sinh, chẳng hạn như echinulin và cristatumin D với hoạt tính kháng sinh, chống tiêu đường, chống oxy hóa và giảm tích tụ mỡ trong tế bào [3].

Tuy nhiên, ở Việt Nam, hiện chưa có nghiên cứu sử dụng nấm *E. cristatum* để tạo trà lên men từ nguyên liệu lá THV, cũng như chưa phát triển công nghệ lên men, chế biến làm gia tăng giá trị sử dụng của cây THV. Việc áp dụng công nghệ lên men vi sinh vật sẽ làm tăng sức hấp dẫn của sản phẩm, đặc biệt tối ưu hoá công dụng, cụ thể là hoạt tính y sinh học của lá trà hoa vàng, sẽ làm tăng mức độ cạnh tranh cả về chất và lượng đối với các sản phẩm có nguồn gốc nước ngoài, tạo sinh kế cho bà con nông dân ở các vùng khó khăn.

Xuất phát từ các lý do trên, đề tài “Ảnh hưởng của nấm *Eurotium cristatum* đến một số hoạt tính sinh học của lá trà hoa vàng sau lên men” đã được thực hiện nhằm khảo sát tác dụng của vi nấm trong lên men lá trà hoa vàng, từ đó làm cơ sở để sử dụng tối ưu nguồn nguyên liệu quý này, để phát triển sản phẩm lá trà lên men mang thương hiệu của Việt Nam.

❖ Mục đích nghiên cứu

Đề tài được tiến hành với mục đích nghiên cứu và tuyển chọn được các chủng nấm *E. cristatum* hữu hiệu cho lên men lá trà hoa vàng, tạo sản phẩm có hoạt tính chống oxy hóa và ức chế enzyme α -glucosidase, giúp làm tăng chất

lượng lá trà sau lên men.

❖ Nội dung nghiên cứu

Đề tài được tiến hành với một số nội dung chính sau:

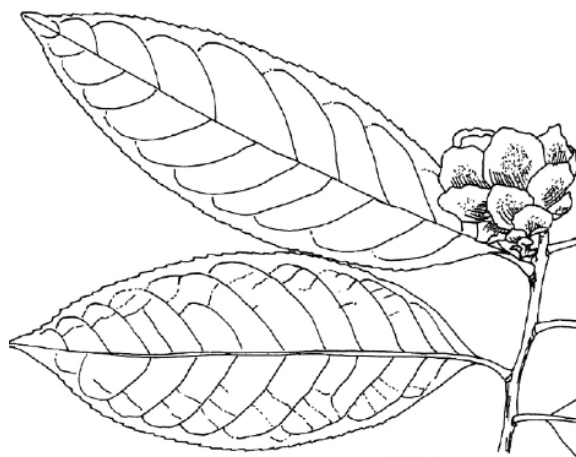
- Đánh giá hoạt tính sinh học (hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase) của cặn chiết từ các chủng nấm *E. cristatum*;
- Nghiên cứu độ an toàn, khả năng tập nhiễm và xác định một số đặc điểm của chủng nấm có hoạt tính tốt;
- Đánh giá hoạt tính sinh học, so sánh hàm lượng các nhóm chất của mẫu lá trà hoa vàng lên men bởi chủng nấm lựa chọn;
- Xác định thành phần các hợp chất có hoạt tính sinh học trong dịch chiết lá trà lên men bởi chủng nấm lựa chọn.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. SƠ LƯỢC VỀ CÂY TRÀ HOA VÀNG

1.1.1. Đặc điểm sinh học của cây trà hoa vàng

Trà hoa vàng (THV) là nhóm thực vật có hoa màu vàng thuộc chi *Camellia* L., chi lớn nhất của họ Theaceae, phân bố rộng khắp từ Bhutan, đông bắc Ấn Độ, Trung Quốc, Nhật Bản tới Indonesia và Philippines [4]. Về mặt phân loại học, các loài thực vật thuộc THV được xếp vào nhóm *Chrysantha* (*Camellia* sect. *Chrysantha* Hung T.Chang) [5], được tìm thấy chủ yếu tại khu vực tây nam Trung Quốc và bắc Việt Nam, trong vùng tọa độ 20°32'–23°53'N và 104°–108°56'E [4, 6]. Trên thực tế, loài THV lần đầu được phát hiện ở tỉnh Quảng Tây, Trung Quốc vào năm 1964 và được đặt tên khoa học là *Camellia chrysantha* Hu [7]. Tại Việt Nam, THV có mật độ phân bố ở một số tỉnh phía Bắc như Bắc Giang, Lạng Sơn, Quảng Ninh, Vĩnh Phúc,...[8]. Theo mô tả của PGS.TS. Trần Ninh cây THV *C. chrysantha* là loài cây thân bụi cao từ 3-5 m, cành non có bề mặt nhẵn, màu xám nhạt. Lá của loài cây này được mô tả có hình bầu dục, dài 14,5-15 cm và rộng 6,8-8 cm, cuống lá dài 1,3-2 cm, mặt trên phiến lá có màu xanh sáng, mặt dưới xanh đậm, gốc lá có hình nêm, phần chóp có mũi nhọn, mép lá hình răng cưa không đều, gân bên từ 8-9 cặp (Hình 1.1). Hoa của loài cây này được mô tả có màu vàng đặc trưng, mọc đơn độc ở đỉnh hoặc nách lá với đường kính hoa khi nở từ 3-3,5 cm [7].



Hình 1.1. Hình vẽ lá, hoa *C. chrysantha*

Theo điều tra khảo sát, PGS.TS. Trần Ninh đã thống kê trong 24 loài THV ở Việt Nam, có tới 7 loài THV được tìm thấy ở vườn Quốc gia Tam Đảo (chiếm 29%) như: *C. petelotii*, *C. crassiphylla*, *C. hakodae*, *C. crassiphylla*,....

và nhiều loài THV (*C. gilberti*, *C. crassiphylla*,...) được tìm thấy các địa phương khác như Quảng Ninh, Lạng Sơn, Thái Nguyên. Theo thống kê, một số loài THV đặc hữu ở nước ta có khu phân bố hẹp, và nằm trong khu vực mà người dân khai thác làm chất đốt do đó hai loài *C. petelotii*, *C. crassiphylla* được xếp vào nhóm thực vật có nguy cơ đe dọa, cần được bảo tồn [7]. Tóm lại, từ các nghiên cứu điều tra phân loại thực vật của TS. Trần Ninh và cộng sự, một số loài THV tại nước ta có ý nghĩa rất lớn trong khoa học, y dược cổ truyền do đó việc nhân giống, bảo tồn và phát triển nguồn gen quý này là điều vô cùng cần thiết.

1.1.2. Thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của lá trà hoa vàng

Giống như trà xanh (*C. sinensis*), THV thường được sử dụng làm trà uống, tuy nhiên bộ phận được thu hái và sử dụng chính của THV là phần hoa [9]. Trong những năm gần đây, giá trị thương phẩm của THV tại Việt Nam và trên thế giới luôn ở mức khá cao. Số liệu năm 2018 tại Việt Nam cho thấy, hoa của THV luôn có mức giá dao động từ 600–700 USD/kg khô [10]. Sở dĩ, giá trị của THV luôn cao trong những năm gần đây không chỉ bởi tính quý hiếm, khả năng khai thác hạn chế, mà còn nhờ những hoạt tính sinh học đa dạng và tác dụng có lợi đối với sức khỏe con người đến từ loài thực vật này. Nghiên cứu lâm sàng cho thấy một số hoạt chất trong THV *C. nitidissima* và *C. euphlebica* có khả năng ức chế quá trình di căn của một số dòng tế bào ung thư, ổn định huyết áp, ngăn ngừa rối loạn lipid máu, xơ vữa động mạch bằng cách làm giảm hàm lượng cholesterol và triglycerid [11, 12]. Dịch chiết nước từ lá THV *C. euphlebica* đã được minh chứng là có hiệu quả trong điều trị rối loạn lo âu và trầm cảm được thử nghiệm trên chuột [13].

- Thành phần hóa học

Một số nhóm chất chính được cô lập từ lá của THV gồm: các flavonoid như quercetin, kaempferol, epicatechin, isovitexin, vitexin, quercetin-7-O- β -D-glucopyranoside. Trong đó, catechin và epicatechin chiếm tỉ lệ cao nhất với hàm lượng 32.23 – 55.56 μ g/g [14, 15]. Ngoài các thành phần hoạt tính đặc trưng của chi *Camellia* có thể kể đến như polysaccharide, polyphenol, saponin và flavonoid [16], THV được chứng minh là có chứa nhiều loại hợp chất phenolic phong phú hơn so với *C. sinensis*, đặc biệt hàm lượng các hợp chất ellagitannins, proanthocyanidins, taxifolin deoxyhexose, các gốc apigenin,

kaempferol và quercetin trong THV luôn ở mức rất cao [17]. Theo nhóm tác giả Li và các cộng sự, trong hoa của 6 loài THV là *C. insulari*, *C. rosmanni*, *C. longzhouensis*, *C. euphlebia*, *C. xiashienis* và *C. perpetua* đều có chứa 17 loại amino acid, bao gồm cả các amino acid thiết yếu cho con người với hàm lượng trung bình dao động trong khoảng 3,73 – 5,93 g/100g, trong đó loại cao nhất là axit glutamic, và thấp nhất là leucine và valine [18].

- Hoạt tính sinh học

Bằng kỹ thuật phân tích hóa học hiện đại LC-MS, tác giả Nguyễn Văn Minh Khôi đã xác định được 46 hợp chất từ cặn chiết tổng cồn nước và 20 hợp chất từ cặn chiết phân đoạn ethyl acetate của hoa cây trà hoa vàng *C. quephongensis*, thu thập tại Quê Phong, Nghệ An. Những hợp chất chính được tìm thấy trong hai loại cao chiết bao gồm flavonoid, phenol và este, có tác dụng hỗ trợ và cải thiện hệ miễn dịch, gia tăng khả năng cung cấp oxy cho cơ thể, tiêu diệt các gốc tự do gây hại và bảo vệ cơ thể khỏi tác động của tia bức xạ môi trường [19]. Dựa trên những công bố khoa học về loài cây dược liệu này, nhóm tác giả Nguyễn Trang và các cộng sự đã tách chiết và sàng lọc hoạt tính oxi hóa, hoạt tính ức chế alpha amylase từ lá trà hoa vàng *C. quephongensis*. Kết quả chỉ ra, nhóm hợp chất polyphenol như catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate có tính oxi hóa mạnh với hàm lượng là 6,20 mg/g khi được chiết bởi dung môi methanol, và 5,31-5,34 mg/g khi chiết với dung môi ethanol. Khả năng trung hòa gốc tự do trong dung dịch DPPH của hai cặn chiết với methanol và ethanol trên thể hiện thông qua giá trị IC₅₀ lần lượt là 58,38 và 47,87 µg/mL [20].

Nhìn chung, các nghiên cứu đã cho thấy các loài THV là một nhóm thực vật có hoạt tính sinh học phong phú. Ngoài khả năng trung hòa các gốc tự do có ở hầu hết các loại trà xanh, các hoạt chất phân lập từ lá THV có hoạt tính ức chế 3CL^{pro} / M^{pro}, ACE2 hứa hẹn trong việc nghiên cứu và phát triển thuốc điều trị (SARS-CoV2) [21].

1.2. TỔNG QUAN VỀ NẤM *Eurotium cristatum*

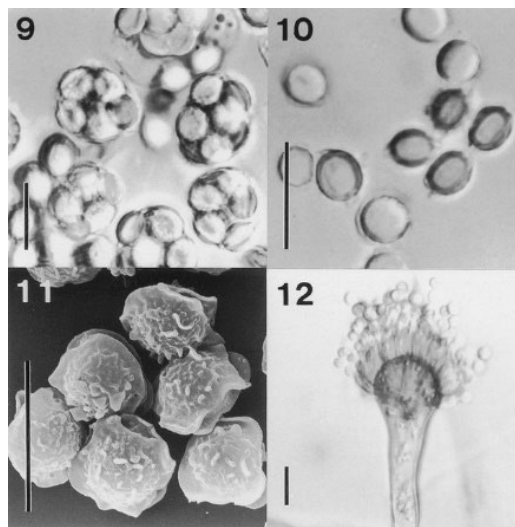
1.2.1. Phân loại

E. cristatum thuộc bộ Eurotiales, họ Asperillaceae, chi *Eurotium*. *E. cristatum*, hay còn được biết đến là nấm “kim hoa”, là một loại nấm phân bố rộng rãi trong tự nhiên, thường xuất hiện trong cách bánh trà đậm. Chúng đóng

vai trò chủ đạo trong sự lên men của các loại trà đậm (còn gọi là trà Phổ Nhĩ) nổi tiếng như Fu-Brick (trà Phục Chuyên) hay Liu Pao (Lục Bảo) [22]. Sự có mặt của các thể nấm vàng mọc thành các đốm rải rác trên bề mặt và phía trong bánh trà - đặc trưng quả thể của chi *Eurotium* - được coi là một tiêu chuẩn để xác định chất lượng của trà [23]. Ban đầu, nấm kim hoa có tên khoa học là *Aspergillus cristatus* theo phân loại của GS. Wen Qiongying vào năm 1983. Tuy nhiên chỉ vài năm sau, *A. cristatus* bị thay thế bằng tên *E. cristatum* do mâu thuẫn trong Điều 59 của Hệ thống quy tắc về tên khoa học quốc tế. Cho đến nay, tên *E. cristatum* được sử dụng phổ biến trong các bài báo khoa học cũng như tài liệu, sách chuyên khảo [23].

1.2.2. Đặc điểm hình thái

Giống như nhiều loài nấm thuộc *Eurotium* khác, *E. cristatum* thường được đặc trưng bởi các quả thể có màu vàng, bào tử nang trong suốt, cuống bào tử dính và không phân nhánh, các bào tử dính có hình cầu hoặc elip [24]. Tuy nhiên, với mỗi chủng nấm khác nhau lại có những đặc trưng riêng biệt về hình thái, chủ yếu đến từ sự khác biệt về các cấu trúc sinh sản.



Hình 1.2. Ảnh chụp SEM bào tử nấm *E. cristatum* [24]

Với nấm *E. cristatum*, các cụm nấm thường có màu vàng, xanh lá nhạt hoặc hơi ngả sang màu xanh dương, với các bào tử nguyên phân hình cầu hoặc hình elip và có thành bào tử dày và mọc thành các chuỗi. Trong trường hợp sinh sản hữu tính, các quả thể màu trắng hoặc vàng nhạt chứa các nang cầu, mỗi nang lại gồm 8 bào tử nang [24].

1.2.3. Điều kiện sinh trưởng, phát triển của nấm *E. cristatum*

Tương tự như các nấm *Eurotium* spp., trong tự nhiên *E. cristatum* có thể phân bố phổ biến ở các khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới trên thế giới và có tốc độ phát triển tương đối nhanh. Điều kiện sống của nấm *Eurotium* spp. khá đa dạng, một số nấm *Euroitum* spp. cũng có giới hạn nhiệt độ tương đối rộng. Có thể kể đến, loài *E. repens* có khoảng nhiệt độ sinh trưởng và phát triển rộng với giới hạn dưới là 4-5°C và giới hạn trên là 38-40°C. Hầu hết các loài thuộc chi *Eurotium* trong đó có *E. cristatum* có thể sinh trưởng và phát triển trong môi trường có hoạt độ nước từ 0,7-0,96 a_w [25]. Đáng chú ý, *E. cristatum* mang đặc điểm nổi bật về khả năng chịu muối của các nấm *Eurotium* spp., như *E. repens* và *E. herbariorum* có thể tồn tại trong nước có nồng độ NaCl ở mức 17% [26].

1.2.4. Vai trò của nấm kim hoa trong công nghệ lên men thực phẩm

Phần lớn các loài nấm thuộc chi *Eurotium* được chứng minh là lành tính, không chứa độc tố nấm mốc, nên chúng được ứng dụng phổ biến trong ngành công nghệ thực phẩm. Trong số 20 loài nấm thuộc chi *Eurotium* thì *E. amstelodami*, *E. cristatum*, *E. herbariorum* và *E. repens* được nghiên cứu nhiều nhất [27]. Hai chủng nấm *E. herbariorum* NE-1 và NE-4 được sử dụng để lên men cá ngừ làm giảm hàm lượng chất béo, tăng cường các chất có hoạt tính chống oxy hóa trong món Katsuo-bushi của Nhật Bản [28]. Ngoài ra, nấm *E. cristatum* là chủng nấm chiếm ưu thế (chiếm 98% tổng số vsv) trong quá trình lên men trà đậm (trà gạch Fuzhuan) [27]. Chất lượng của trà đậm được cho là có liên quan tới một số chất chuyển hóa thứ cấp như anthraquinone, alkaloid, terpenoid, ... được tạo ra dưới tác động của nấm *E. cristatum*. Dưới đây là một số nghiên cứu về các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học từ thực phẩm lên men bởi loài nấm *E. cristatum*.

Hiện nay nhờ các hệ thống thiết bị hiện đại, việc xác định thành phần cấu trúc hóa học của các hoạt chất có hoạt tính sinh học trong tự nhiên đã được thực hiện dễ dàng hơn. Bằng phân tích quang phổ (NMR), gần 180 hợp chất đã được tách chiết chạy phổ và xác định cấu trúc phân tử từ các loài nấm thuộc chi *Eurotium*. Một số hợp chất được tìm thấy gồm: varicolorquinone A, questin, physcion, erythroglauicin, emodin, catenarin, questinol, và asperflavin được phân lập từ chủng nấm *E. cristatum* KUFC 7356 được minh chứng khả năng

chống hình thành mạch máu, và ứng dụng tiềm năng trong việc ngăn ngừa và điều trị các bệnh ác tính [29].

Một số chất chuyển hóa hình thành từ sản phẩm tiết của nấm *E. cristatum* được chứng minh là có hoạt tính sinh học. Trong mô hình chuột được nuôi bằng chế độ ăn giàu chất béo (HFD), *E. cristatum* đã được chứng minh là làm giảm tình trạng béo phì của chuột gây ra do HFD thông qua sự giảm viêm và cân bằng lượng glucose trong cơ thể. Kang và nhóm nghiên cứu đã phân tích tác động chống béo phì trên chuột thực nghiệm khi được điều trị bằng *E. cristatum* [30]. Nghiên cứu của Zhang năm 2020 cũng đã chỉ ra *E. cristatum* có thể sản xuất ra các polysaccharide ngoại bào, đóng vai trò quan trọng trong việc giảm mỡ máu thông qua việc điều hòa quá trình oxi hóa của cơ thể. Eurocristatine (ECT) là một alkaloid được phân lập từ *E. cristatum*, được cho là có tác dụng chống tiểu đường tuýp 2 nhờ vào khả năng cải thiện chuyển hóa glucose và giảm tình trạng kháng insulin thông qua kích hoạt con đường tín hiệu PI3K/AKT ở chuột [31].

Ngoài ra nấm *E. cristatum* có khả năng thủy phân tannin thành gallic acid dưới sự xúc tác của enzyme tannase. Gallic acid cũng có thể tổng hợp theo 3 con đường khác nhau: oxi hóa 3,4,5-trihydroxycinnamic acid, quá trình dehydrogenase shikimic acid với sản phẩm trung gian là 3-dehydroshikimic acid, và quá trình hydroxyl của protocatechuic acid [32]. Gallic acid biểu hiện hoạt tính chống oxi hóa trong các mô hình *in vitro* [30].

Hiện nay, nấm *E. cristatum* đang được ứng dụng trong chế biến một số loại thực phẩm hay trong việc sản xuất các đồ uống lên men như loại trà đậm. Đặc biệt, một số nghiên cứu đã chứng minh sự tham gia của loài nấm này trong quá trình lên men có thể làm tăng hoạt tính sinh học của thực phẩm (các loại trà lên men, okara,..) [33]. Ngoài ra, nấm kim hoa *E. cristatum* đã được biết đến với khả năng lên men các loại lá cây khác như lá táo, lá liễu, tạo thành sản phẩm phân tử lượng thấp hơn thuộc nhóm phenol, axit amin, có tác dụng an thần, bảo vệ tế bào thần kinh [1].

Từ các nghiên cứu hóa sinh, dược học đã khẳng định rằng các hợp chất có cấu trúc đặc biệt được chiết tách, phân lập từ các loài *Eurotium* biểu hiện đa dạng hoạt tính sinh học ở khả năng chống oxy hóa, kháng khuẩn, gây độc tế bào, chống hình thành mạch máu, khối u, kháng viêm, ... Dữ liệu về các hợp

chất trao đổi thứ cấp đa dạng này là cơ sở khoa học cho việc phát triển các loại thực phẩm, dược phẩm sử dụng *Eurotium* làm nhân tố lên men.

1.3. MỘT SỐ QUY TRÌNH NGHIÊN CỨU, SẢN XUẤT TRÀ ĐẬM CÓ SỬ DỤNG NẤM *E. cristatum*

Từ lâu, trà được biết đến là nét văn hóa độc đáo đặc trưng của người Trung Quốc. Cho đến nay, trà có rất nhiều hình thức sản xuất chế biến và là thức uống phổ biến trên toàn thế giới. Trải qua rất nhiều năm, trà đậm của Trung Quốc vẫn giữ được những nét đặc trưng về hương vị, cảm quan, hình thức dù được sản xuất bằng kỹ thuật thủ công hay dây chuyền máy móc hiện đại. Việc sản xuất trà đậm khác nhau tùy nguyên liệu, vùng miền (Chiết Giang, Hồ Nam, Vân Nam, Phúc Kiến, An Huy, v.v.). Tuy nhiên, các quy trình chung có thể được tinh gọn thành các bước chính tại hình 1.3.



Hình 1.3. Sơ đồ quy trình sản xuất trà đậm lên men bởi nấm *E. cristatum* [34]

Trong quy trình sản xuất trà đậm, không thể bỏ qua giai đoạn xử lý lá trà tươi. Trà tươi nguyên liệu được xử lý hơi nóng (đun nóng tới 300°C), lên men và sấy khô để tạo trà đậm thô. Tiếp theo, giai đoạn lên men vi sinh vật được cho là rất quan trọng mật độ VSV được bổ sung vào trà trong khoảng (10^5 - 10^6 CFU/ml), nhiệt độ từ 25°C- 28°C trong 16-21 ngày và độ ẩm khoảng 40-60%, Tiếp theo là giai đoạn làm khô, độ ẩm trà 12-14% [35].

Khi nhắc đến trà đậm hay trà phổ nhĩ, người ta thường nhắc đến nấm kim hoa (*E. cristatum*), bởi các bánh trà lâu năm khi xuất hiện các đốm vàng đặc

trung tạo ra bởi nấm này thường cho ra hương vị rất khác biệt so với những bánh trà thông thường (Hình 1.4). Trước kia, kim hoa xuất hiện trong các bánh trà phổ nhĩ, trà đậm một cách tự nhiên và rất hiếm gặp, tuy nhiên trong giai đoạn gần đây, các chủng nấm *E. cristatum* được phân lập, làm thuần, để sử dụng trực tiếp vào một trong các bước lên men trà phổ nhĩ hoặc các loại trà thảo mộc khác.



Hình 1.4. Bào tử nấm kim hoa *E. cristatum* trên bánh trà đậm.

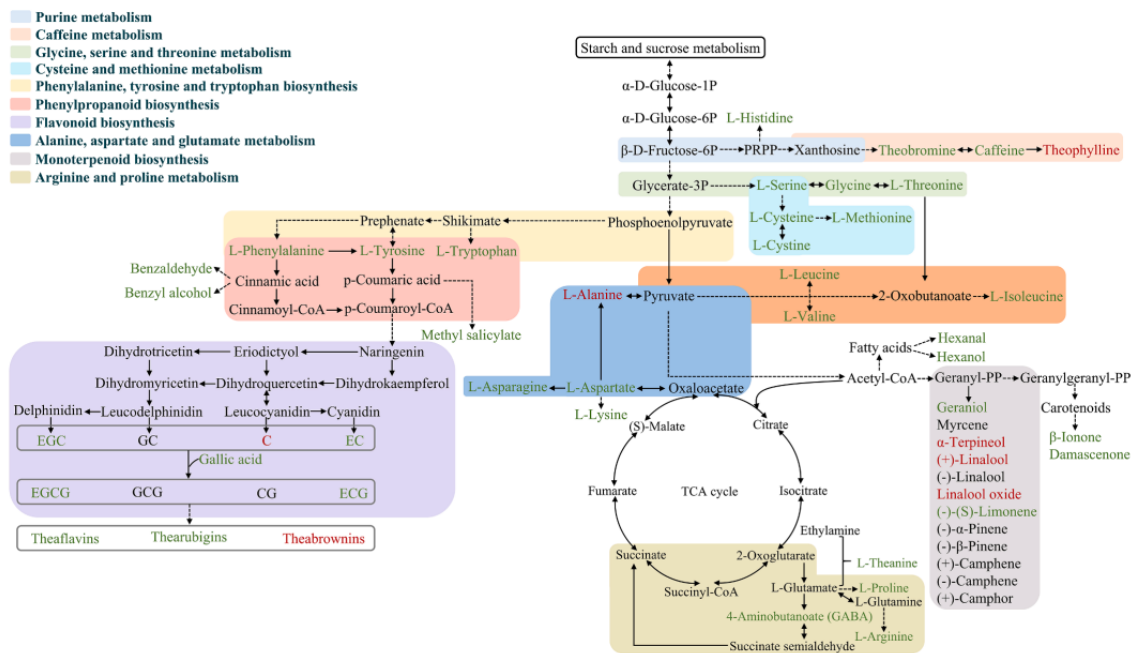
1.4. SỰ CHUYỂN HÓA CỦA CÁC HỢP CHẤT HÓA HỌC TRONG LÁ TRÀ LÊN MEN BỞI VI NẤM

Về thành phần hóa học, trong trà đậm có các axit amin như dihydroxyphenylalanine, valine, betaine, and theophylline [36]. Hàm lượng các chất hóa học chính trong 4 loại trà đậm tiêu biểu của Trung quốc (trà gạch Fuzhuan, trà Phổ Nhĩ và trà Lục Bảo) (Bảng 1.1) thay đổi và có khác biệt thống kê, thành phần axit amin chủ yếu trong các loại trà này là Theanine, tiếp theo là Alanine, Asparagine và Serine [22, 37]. Để tạo thành trà đậm, lá trà *C. sinensis* var. *sinensis* và var. *assamica* sau khi được diệt men, lá trà sẽ được ủ với một số VSV đặc trưng, chẳng hạn như một số chủng thuộc *Aspergillus*, *Eurotium* và *Penicillium*. Nhờ hoạt động của các vi nấm này mà thành phần catechin trong trà xanh sẽ được chuyển hóa thành các gốc catechin mới, đặc trưng của trà đậm [38].

Bảng 1.1. Các nhóm chất có trong một số loại trà đậm phổ biến [22].

Thành phần	Trà Phổ Nhĩ	Trà gạch	Trà Lục bảo
Polyphenols tổng	10,591 ± 1,15 ^a	9,745 ± 2,12 ^a	10,051 ± 1,61 ^a
Axit amin tổng %	10,593 ± 1,15 ^a	9,746 ± 2,12 ^a	10,052 ± 1,61 ^a
Flavonoids tổng %	5,241 ± 0,04 ^a	3,332 ± 0,22 ^c	4,455 ± 0,62 ^b
Theaflavins %	0,197 ± 0,02 ^a	0,132 ± 0,03 ^a	0,126 ± 0,02 ^a
Thearubigins %	1,222 ± 0,18 ^{ab}	1,445 ± 0,04 ^a	0,978 ± 0,11 ^b
Thebrowns %	13,375 ± 0,28 ^a	6,951 ± 0,86 ^c	9,961 ± 0,93 ^b
Caffeine mg/g	30,921 ± 2,70 ^a	27,510 ± 2,12 ^a	25,81 ± 2,66 ^a
Gallic acid mg/g	4,741 ± 2,51 ^a	3,760 ± 1,22 ^b	2,353 ± 0,48 ^c
Theanine	3,671 ± 0,119 ^b	2,318 ± 0,116 ^c	1,194 ± 0,063 ^c
Alanine	0,056 ± 0,002 ^b	0,065 ± 0,003 ^d	0,024 ± 0,009 ^a
Asparagine	0,105 ± 0,007 ^b	0,102 ± 0,001 ^c	0,029 ± 0,001 ^c
Serine	0,179 ± 0,003 ^d	0,122 ± 0,009 ^b	0,169 ± 0,011 ^a
GC mg/g	2,713 ± 0,72 ^a	1,201 ± 0,68 ^b	2,829 ± 0,27 ^a
EGCG mg/g	0,232 ± 0,05 ^b	2,032 ± 0,72 ^a	1,191 ± 0,33 ^a
EC mg/g	0,715 ± 0,13 ^{ab}	0,886 ± 0,07 ^a	0,441 ± 0,26 ^b

Ngoài ra, axit amin cũng đóng vai trò quan trọng trong việc quyết định hương vị của trà. Các axit amin như valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tryptophan, lysine và tyrosine hình thành nên vị đắng, trong khi proline, cysteine, serine, glycine và alanine tạo nên vị ngọt dịu khi pha trà [37].



Hình 1.5. Sơ đồ chuyển hóa các thành phần hóa học có trong lá trà xanh *C. sinensis* sau khi lên men bởi chủng nấm *E. cristatum* MF800948 [39]

Lá trà xanh *C. sinensis* chứa nhiều hợp chất, trong đó chất polyphenol được cho là thành phần chức năng chính của trà. Trong số polyphenol, thì catechin (gồm EGC, C, EGCG, EC và ECG) là chiếm ưu thế, và có thể bị oxi hóa trong quá trình lên men, tạo thành các polyphenol oxi hóa khác nhau, bao gồm theaflavin, thearubigins, và theabrownin. Catechin ở lá trà xanh cao hơn so với các loại trà khác nhau, bởi enzyme polyphenol oxidase và sự lên men bị bất hoạt do quá trình sấy khô hoặc hấp bằng hơi. Tuy nhiên, trong quá trình lên men trà, các enzyme oxi hóa polyphenol sẽ xúc tác biến catechin thành theaflavin, và giảm hàm lượng catechin. Sự tạo thành màu nâu đỏ, giảm độ đắng và chát, và giảm mùi lá là do quá trình oxi hóa, dẫn đến trà màu đen. Trong khi lên men, catechin đặc biệt là EGCG và ECG giảm mạnh bởi sự oxi hóa của các enzyme vi sinh vật, trong khi đó, EGC tăng lên. Các gallic acid cũng tăng lên ở ngày thứ 6 lên men, và giảm sau 9 ngày lên men. Catechin ở chè bị phá vỡ, tạo thành các dẫn xuất catechin hai vòng B [37] Ngoài sự biến đổi của catechin, các alkaloid cũng biến đổi, điển hình là caffein, theobromine và theophylline do vậy hàm lượng caffein được cho là giảm đi đáng kể bởi ở trà lên men [39] (Hình 1.5).

Các terpenoid có vai trò đối với vị thơm của trà đậm, bao gồm monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes và triterpenes. Wang và các cộng sự đã công bố rằng chất tạo mùi thơm là aldehyde và ketones, đã tăng đáng kể trong khi lên men lá trà. Các flavonoid và chất sơ thô giảm đáng kể. Hàm lượng các chất phân tử nhỏ tăng lên, góp phần tạo nên mùi thơm ở trà thành phẩm [40].

Từ tổng quan nghiên cứu, có thể thấy việc sử dụng nấm *E. cristatum* để lên men lá THV là một hướng tiếp cận hợp lý. Trong mục tiêu ứng dụng vi nấm trong công nghệ lên men làm đa dạng các hoạt tính, thay đổi hương vị, cảm quan trong lá THV thông qua các chất chuyển hóa thứ cấp, đề tài nghiên cứu “Ảnh hưởng của nấm *Eurotium cristatum* đến một số hoạt tính sinh học của lá trà hoa vàng sau lên men” bước đầu được thực hiện nhằm tuyển chọn được các chủng nấm *E. cristatum* có khả năng tổng hợp chất chống oxy hóa và ức chế enzyme α -glucosidase, làm tăng chất lượng trà hoa vàng sau lên men. Kết quả của đề tài được kỳ vọng sẽ đóng góp cho sự phát triển sản phẩm trà lên men mang thương hiệu Việt Nam.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Lá trà hoa vàng

Lá trà hoa vàng được thu hoạch tại vùng trồng THV, vào vụ hè thu (tháng 8, năm 2023) tại xã Đạp Thanh, huyện Ba Chẽ, tỉnh Quảng Ninh có tọa độ 21°19'34.2"N 107°06'07.7"E.



Hình 2.1. Lá THV (mặt trước, mặt sau)

Theo mô tả sơ bộ, lá THV thu thập tại vùng trồng THV ở Đạp Thanh có đặc điểm: Hình bầu dục, chiều dài lá từ 14-15 cm và rộng 6,5-7.5 cm, gốc lá có hình nêm, phần chóp lá có mũi nhọn, mép lá hình răng cưa không đều, gân bên từ 8-9 cặp. Các đặc điểm hình thái của mẫu hoàn toàn phù hợp với mô tả về loài *C. chrysantha* theo tài liệu của Trần Ninh và Hakoda Naotoshi [7].

Bộ chủng nấm kim hoa

Các chủng nấm sử dụng trong đề tài được kế thừa từ bộ chủng giống vi sinh vật lưu trữ tại phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên. Về nguồn gốc, 6 chủng nấm có ký hiệu lần lượt là E1, E2, E3, E6, E7 và E8 được phân lập từ sáu mẫu trà đậm thương phẩm (hãng Baishaxi, tỉnh Hồ Nam, Trung Quốc) từ năm 2020 đến 2023. Trong đó 3 chủng nấm ký hiệu là E1, E3, và E8 biểu hiện hoạt tính chống oxy hóa với DPPH và không gây độc trên chuột BALB/c. Qua định danh sơ bộ về đặc điểm hình thái, trình tự ITS, và đặc tính sinh lý sinh hóa các chủng E1, E3, và E8 được xác định là loài *Eurotium cristatum*.

Các chủng nấm được lưu trữ trong môi trường Sabouraud lỏng bổ sung 20% glycerol và bảo quản ở nhiệt độ lạnh sâu -20°C. Đồng thời, các chủng được cấy truyền duy trì trong ống thạch nghiêng môi trường PDA (Hình 2.2)

để lưu trữ ngắn hạn và sử dụng cho việc hoạt hóa chủng, lên men sinh khối ở các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2.2. Bộ chủng nấm *E.cristatum* (E1, E3 và E8) được kế thừa cây truyền trong ống thạch nghiêng PDA.

Nguyên vật liệu

Dụng cụ, thiết bị

Các dụng cụ cơ bản dùng trong các kỹ thuật vi sinh gồm: Bình tam giác các loại từ 100-1000ml, ống nghiệm, đĩa petri, que cấy thủy tinh, que cấy móc.

Các dụng cụ sử dụng đánh giá hoạt tính sinh học gồm: Phiến 96 giếng, pipetman các loại, đầu tuýp các loại, ống falcon, ống eppendorf, giấy bạc, bình chiết quả lê.

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

<i>TT</i>	<i>Tên thiết bị</i>	<i>Hãng, xuất xứ</i>
1	Tủ cấy vi sinh AC2-4E8	Esco, Singapore
2	Máy lắc ngang HS 260	IKA, Trung Quốc
4	Máy cô quay chân không N1300V-W	EYELA, Nhật Bản
5	Nồi hấp tiệt trùng MaXterile 80	Daihan Scientific, Hàn
6	Máy đo quang phổ UV-Vis	Tecan SPARK, Thụy Sĩ

Hóa chất

<i>TT</i>	<i>Tên hóa chất</i>	<i>Hãng, xuất xứ</i>
1	Acid ascorbic	Sigma Aldrich, Đức
2	Acarbose	Sigma Aldrich, Đức
3	Gallic acid	Sigma Aldrich, Đức
4	DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)	Sigma Aldrich, Đức
5	pNPG (p-Nitrophenyl- α -D-	Sigma Aldrich, Đức

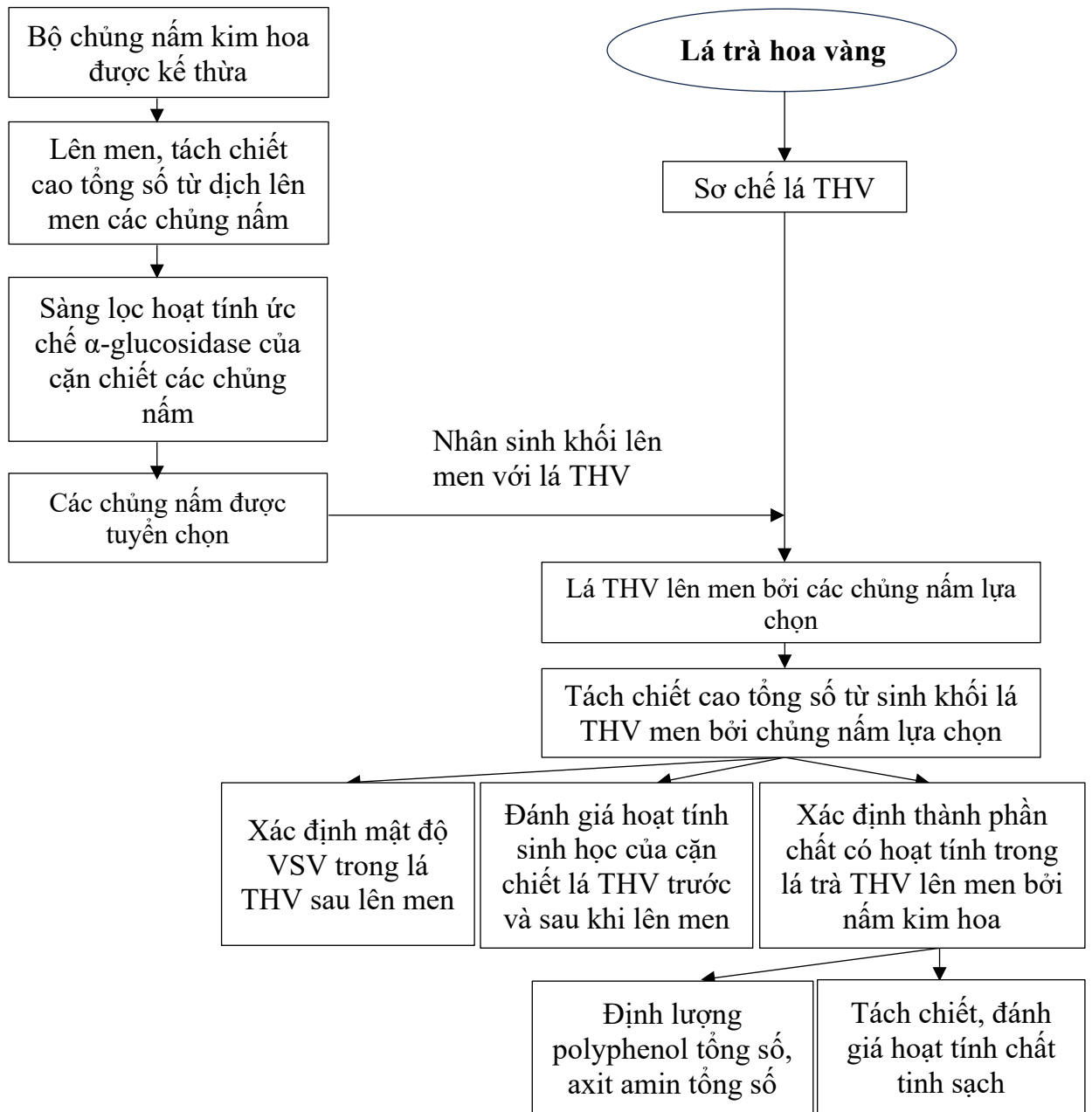
6	α -glucosidase từ nấm <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 100U	Sigma Aldrich, Đức
7	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich, Đức

Môi trường nuôi cấy vi sinh

Môi trường thạch khoai tây (Potato Detroxe Agar, PDA), môi trường Sabouraud, môi trường đếm khuẩn lạc (Plate Count Agar, PCA) (Phụ lục 1)

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đề tài được thực hiện theo sơ đồ tổng quát sau đây:



Hình 2.3 .Sơ đồ nghiên cứu tổng quát

2.2.1. Tuyển chọn bộ chủng nấm kim hoa cho lên men lá trà.

2.2.1.1. Lên men các chủng nấm

3 chủng nấm được nuôi hoạt hóa trong ống môi trường lỏng Sabouraud tại 28°C trong 48 giờ. Sau đó, toàn bộ sinh khối của các chủng nấm ở quá trình hoạt hóa được chuyển sang bình tam giác chứa 250mL môi trường lỏng Sabouraud Dextrose Broth (SDB) để tiếp tục lên men nhân sinh khối. Giai đoạn lên men diễn ra ở 28°C, tốc độ lắc 120 vòng/ phút trong 14 ngày thì kết thúc quá trình.

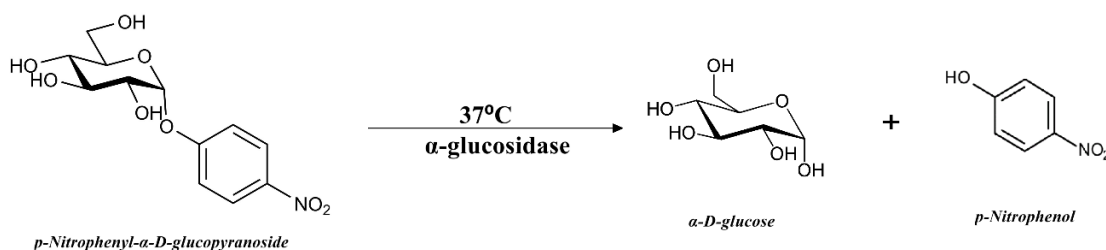
2.2.1.2. Chiết tách cao tổng số từ dịch lên men các chủng nấm

Dịch lên men bao gồm sinh khối nấm được tách chiết sử dụng ethyl acetate (EtOAc, China) (với tỉ lệ thể tích 1:1). Cặn chiết tổng số được thu lại bằng cách loại bỏ dung môi sử dụng máy cô quay chân không (EYELA, Japan). Sau đó, hòa tan cặn chiết thô với dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma Aldrich, Đức) để xác định hoạt tính.

2.2.1.3. Đánh giá hoạt tính sinh học của các cặn chiết

- Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

Theo Tadera và các cộng sự, hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các cặn chiết được định lượng dựa trên phản ứng phân cắt cơ chất p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside nhờ tác động của enzyme α -glucosidase (Hình 1.6). p-Nitrophenol được tạo thành có màu vàng có độ hấp thụ tại bước sóng 405 nm. Hoạt độ enzyme α -glucosidase được định lượng dựa theo sản phẩm p-nitrophenol tạo thành [41].



Hình 2.4. Phản ứng phân cắt cơ chất pNPG bởi enzyme α -glucosidase

Các thành phần trong phản ứng gồm 7.5 μ L dịch chiết ở các dải nồng độ khác nhau, 1.5 μ L α -glucosidase 1U/mL, 91 μ L đệm kali phosphate nồng độ 100mM pH 6.8, 50 μ L cơ chất p-NPG 1M. Phản ứng diễn ra ở 37°C với điều kiện tránh ánh sáng. Sau 30 phút, 50 μ L dd Na_2CO_3 0.1M được thêm vào như chất làm dừng phản ứng. Độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước

sóng 405 nm với đối chứng âm được chuẩn bị tương tự sử dụng 1 % DMSO thay vì mẫu thử và đối chứng dương sử dụng Acarbose 50 mM. Kết quả tính bằng giá trị trung bình của 3 lần lặp lại \pm độ lệch chuẩn σ ($p \leq 0,05$). Hoạt độ chất ức chế enzyme α -glucosidase của mẫu thử được tính toán theo công thức:

$$\text{Khả năng ức chế (\%)} = \left(1 - \frac{\text{OD mẫu thử}}{\text{OD đối chứng âm}}\right) \times 100$$

Giá trị IC_{50} được tính toán thông qua giá trị % ức chế và nồng độ mẫu thử tương ứng.

2.2.3. Đánh giá hoạt tính sinh học của mẫu lá trà hoa vàng lên men bởi chủng nấm lựa chọn.

2.2.3.1. Lên men lá trà hoa vàng với sinh khối chủng nấm lựa chọn

Quy trình sơ chế và lên men lá THV được tiến hành dựa theo các mô hình lên men trà đậm đã được công bố [34]. Đầu tiên là quá trình sơ chế lá trà, lá trà tươi sau khi thu hoạch được trải đều trên nền khô thoáng để làm héo tự nhiên. Giai đoạn diễn ra trong thời gian từ 6-8 tiếng tại nhiệt độ phòng. Khi làm héo, hàm lượng nước của lá trà giảm đi tương đối làm cho lá trà dẻo dai hơn thuận lợi cho các bước vò cuộn về sau. Tiếp đến, lá trà được hấp ở 300°C trong 3 phút, lúc này màu lá chuyển sang nâu sẫm, lá trà vô cùng dẻo dai [34]. Tại bước này, các enzyme tự nhiên có trong trà như polyphenoloxidase (PPO), peroxidase (POD) bị bất hoạt ở nhiệt độ cao. Bước cuối của quá trình sơ chế là cán trà, quá trình này làm giải phóng các chất trong lá trà, độ ẩm được phân phối đồng đều.

Tiếp theo là quá trình bổ sung chủng vi sinh vào lá trà đã sơ chế. Các chủng nấm được hoạt hóa với môi trường SDB ở 28°C trong 3 ngày. Sau đó, toàn bộ sinh khối của các chủng nấm ở quá trình hoạt hóa được chuyển sang bình tam giác chứa 250mL môi trường SDB để tiếp tục lên men nhân sinh khối. Giai đoạn này diễn ra tại 28°C trong 5-7 ngày đến khi mật độ vi sinh trong dung dịch đạt 5×10^5 CFU/ml thì kết thúc quá trình. Cuối cùng, bổ sung 20mL dịch lên men của các chủng nấm vào lần lượt các bình tam giác chứa 200g lá Trà hoa vàng đã khử trùng. Quá trình lên men lá THV với chủng nấm kim hoa lên diễn ra ở nhiệt độ 25-28°C, độ ẩm 65-80% trong 21 ngày.

Theo dõi đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng nấm tại các giai đoạn trên bằng phương thức đếm khuẩn lạc dựa theo TCVN 13876:2023. Cụ thể, 10g

mẫu lá trà lên men được đồng nhất trong 90mL dung dịch Saline Peptone Water (SPW) bằng cách vortex ở tốc độ cao trong vòng 5 phút. Tiến hành pha loãng dung dịch đồng nhất trên theo dải nồng độ từ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , ... Sau khi pha loãng, hút 50 μ l dung dịch ở các nồng độ trải mẫu trên môi trường thạch đếm khuẩn lạc (PCA) có bổ sung kháng sinh chloramphenicol ở nồng độ 50 μ g/mL (Phụ lục 1) ủ ở 25°C trong 72 giờ. Mỗi nồng độ được trải đều trên các đĩa thạch lặp lại 3 lần. Chọn những đĩa có số lượng khuẩn lạc trong khoảng 30-300 để tính kết quả. Mật độ tổng số nấm mốc được tính như sau:

$$N = \frac{\sum C}{V \times (n1 + 0,1 * n2) \times d}$$

Trong đó: $\sum C$ là tổng số khuẩn lạc trên hai đĩa petri có nồng độ pha loãng kế tiếp

$n1$, $n2$ là số đĩa petri ở các nồng độ pha loãng kế tiếp

V là thể tích mẫu trải trên mỗi đĩa (đơn vị mL)

d là độ pha loãng nhỏ hơn (tương ứng với $n1$)

2.2.3.2. Chiết tách cao tổng số từ sinh khối lá THV lên men bởi chủng nấm lựa chọn

Chiết tách cao tổng số từ sinh khối lá THV lên men được đánh giá như mô tả mục 2.2.1.2. Ngoài ra, dung môi sử dụng để chiết tách lá THV lên men là methanol thay vì ethyl acetate như các bước trên.

- Hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa của các mẫu cao chiết được xác định thông qua phản ứng khử DPPH theo phương pháp của Brand-Williams và cộng sự. Phương pháp này hoạt động dựa trên nguyên tắc khi các chất thử nghiệm được thêm vào dung dịch DPPH, nếu chúng có khả năng trung hòa các gốc tự do, cường độ hấp thụ ánh sáng của dung dịch sẽ giảm.[42].

Thành phần trong một phản ứng bao gồm 10 μ L cặn chiết pha ở các dải nồng độ khác nhau và 190 μ L dung dịch DPPH nồng độ 300 μ M pha trong ethanol. Hỗn hợp sau đó được ủ ở 37°C trong 30 phút với điều kiện tránh ánh sáng. Độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 515 nm với đối chứng âm được chuẩn bị tương tự sử dụng 1 % DMSO thay vì mẫu thử và đối chứng dương sử dụng Ascorbic acid 50mM. Kết quả tính bằng giá trị trung bình của 3 lần lặp lại \pm độ lệch chuẩn σ ($p \leq 0,05$). Giá trị SC (%) ở các nồng độ

mẫu thử được tính toán trong phần mềm Excel với công thức:

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

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

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

Giá trị IC_{50} được tính toán dựa theo đồ thị hàm số của giá trị SC và nồng độ của mẫu thử nghiệm.

- Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các cặn chiết được thực hiện như mô tả ở mục 2.2.1.3

2.2.4. Nghiên cứu so sánh và xác định thành phần có hoạt tính trong lá THV lên men bởi nấm kim hoa lựa chọn

2.2.4.1. Xác định hàm lượng các nhóm chất trong dịch chiết lá trà hoa vàng lên men

a. Định lượng hàm lượng polyphenol tổng số

Hàm lượng Polyphenol tổng trong mẫu thử được xác định bằng phương pháp sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu với chất chuẩn Gallic acid. Các phenolic tạo phức màu xanh với thuốc thử Folin-Ciocalteu và hấp thụ bước sóng $\lambda = 765 \text{ nm}$. Đường chuẩn của nồng độ Gallic acid và giá trị đo OD của mẫu thử được sử dụng nhằm xác định hàm lượng phenolic trong dung dịch mẫu thử ở cùng điều kiện.

Cụ thể, hút dung dịch mẫu thử đã pha loãng thành dải nồng độ vào các ống eppendorf 2 mL chứa thuốc thử Folin – Ciocalteu 10%, trộn đều. Thêm dung dịch dung dịch Na_2CO_3 6%, trộn đều và ủ 15 phút ở nhiệt độ $40^\circ C$. Dùng micropipet hút 200 μL các dung dịch vừa chuẩn bị trên ra phiến 96 giếng và đo mật độ quang ở bước sóng 765 nm.

Hàm lượng Phenolic tổng trong mẫu được tính theo công thức:

$$TPC \text{ (mg GAE/g)} = \frac{C_{dc} \times V \times K \times H}{m \times 1000}$$

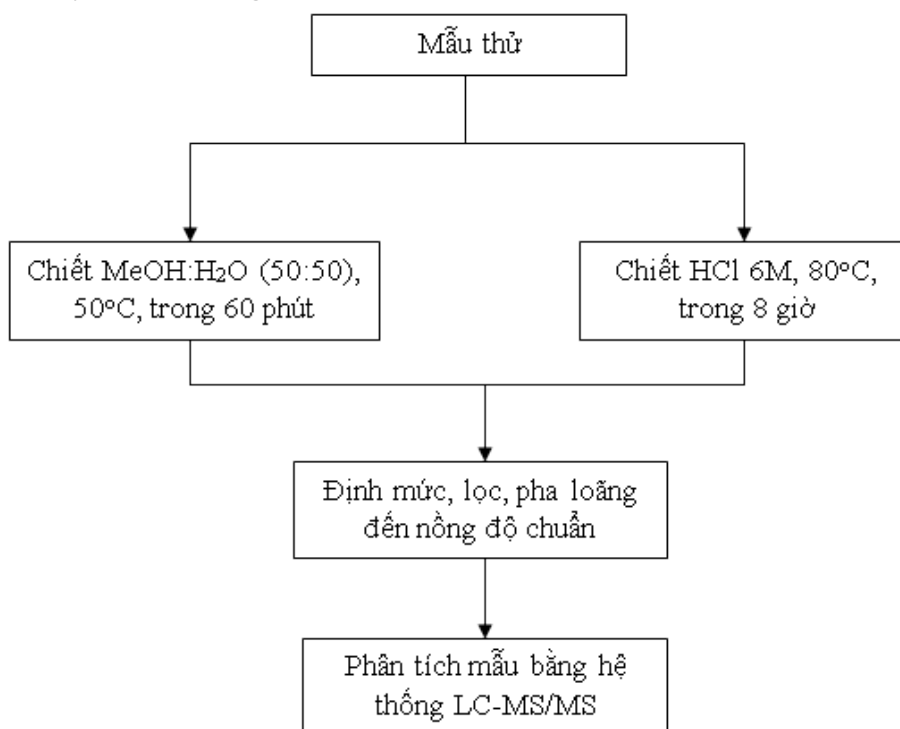
$$TPC (\%) = \frac{TP \text{ (mg GAE/g)}}{10}$$

Trong đó:

TPC: hàm lượng polyphenol tổng tương đương Gallic acid (mg GAE/g mẫu); $C_{đc}$: nồng độ tương đương Gallic acid được suy ra từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$); K: hệ số pha loãng; H: độ sạch chuẩn Gallic acid (97%) V: thể tích mẫu định mức (100 mL); m: Khối lượng mẫu thử nghiệm (g); 1000: hệ số đổi từ $\mu\text{g/g}$ sang mg/g .

b. Xác định hàm lượng axit amin tổng số

Hàm lượng axit amin tổng số được xác định bằng phương pháp sắc ký khối phổ. Quy trình thí nghiệm được thực hiện như mô tả sau:



Hình 2.5. Sơ đồ quy trình phân tích hàm lượng axit amin

2.2.4.2. Phân lập các hợp chất có hoạt tính trong lá THV lên men bởi bộ chủng nấm kim hoa lựa chọn

- Phương pháp chiết mẫu

Mẫu được xay nhỏ rồi ngâm chiết trong dung môi ethanol có kết hợp siêu âm và gia nhiệt ở 50°C. Quá trình chiết được thực hiện như sau: chiết lặp lại 3 lần, mỗi lần cách nhau 2 ngày. Các dịch chiết được gộp lại, sau đó cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao tổng ethanol. Tiếp đó, cao ethanol được chiết phân bố lại với các dung môi có độ phân cực tăng dần: n-hexane, ethyl acetate. Loại bỏ dung môi dưới áp suất thấp thu được các cặn chiết tương ứng.

- Đánh giá hoạt tính sinh học của cặn chiết các phân đoạn, và chất tinh sạch

Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học bao gồm (Hoạt tính chống oxy hóa, ức chế enzyme α -glucosidase) của các mẫu được tiến hành như mô tả ở mục 2.2.1.3

- Phương pháp phân lập các hợp chất:

Sử dụng kết hợp các phương pháp sắc ký để phân tách các chất sạch từ phần dịch chiết của cây: sắc ký bản mỏng (TLC), sắc ký cột (CC) với các pha tĩnh là silica gel (Merck), YMC RP 18 (Merck):

Sắc ký bản mỏng (TLC): Chất mang (DC-Aluofolien 60F254 (0.25mm, Merck), RP-18 F254S (0.25mm, Merck). Một số dung môi thông thường dùng để triển khai bản mỏng như: n-hexane, ethyl acetate, chloroform, methanol, acetone và nước. Các chất được phát hiện bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254nm và 365nm hoặc H₂SO₄ 10 % trong ethanol hoặc thuốc thử Dragendorff.

Sắc ký cột (CC): Quá trình sắc ký cột thực hiện với chất hấp phụ silica gel pha thường (0.040-0.063 mm, 60-230 mesh, Merck) và 0.063-0.200 mm, 230-400 mesh, Merck) và pha đảo RP-18 F254 (30-50 μ m, Merck). Các vết chất được phát hiện bằng đèn UV $\lambda = 254$ nm và 365 nm và sử dụng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10 % pha trong ethanol hoặc Dragendorff.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) thực hiện trên thiết bị của hãng Bruker AM600 FT spectrometer (Đức) tại Viện Hóa học - VAST tại Viện Hóa học, bao gồm các kỹ thuật phổ: một chiều ¹H NMR (600 MHz) và ¹³C NMR (150 MHz); phổ hai chiều COSY, HMQC và HMBC.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm về đánh giá hoạt tính sinh học của các mẫu cặn chiết được thực hiện 3 lần lặp lại độc lập. Kết quả được biểu diễn bằng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn. Giá trị trung bình được phân tích bằng ANOVA sử dụng phần mềm Excel 2019, kết quả được cho là có ý nghĩa thống kê khi giá trị $P < 0,05$.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG NẤM KIM HOA ĐỂ LÊN MEN LÁ TRÀ HOA VÀNG

Trong số 6 chủng nấm kế thừa, 3 chủng nấm *E.cristatum* E1, E3 và E8 biểu hiện hoạt tính chống oxy hóa thông qua khả năng vây bắt gốc tự do trong dung dịch DPPH với giá trị IC₅₀ lần lượt là 96,07 µg/mL, 167,11 µg/mL và 121,12 µg/mL [43]. Từ kết quả trên, các chủng nấm được khảo sát thêm hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase để lựa chọn ra những chủng nấm có đa dạng các hoạt tính sinh học nhằm lên men chuyển hóa lá trà hoa vàng.

- Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

Khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của 6 cặn chiết nấm kim hoa được xác định dựa trên hoạt tính xúc tác thủy phân cơ chất p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside tạo sản phẩm p-nitrophenol có màu vàng. Kết quả xác định được tóm tắt tại Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của cặn chiết các chủng nấm

TT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ thử nghiệm (µg/mL)	Phần trăm ức chế (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
	Đối chứng (+) [Acarbose]	50	83,02±0,47	10,47
	Đối chứng (-) [DMSO 1%]	-	0	-
1	E1	200	38,32±0,29	-
2	E2	200	46,71±0,18	-
3	E3	200	74,64±0,34	121,17
4	E6	200	29,53±0,27	-
5	E7	200	14,06±0,33	-
6	E8	200	58,45±0,17	159,72

Từ bảng kết quả trên, nhận thấy có 2 trong số 6 mẫu cặn chiết biểu hiện khả năng ức chế enzyme α -glucosidase ở mức trên 50%. Trong đó, cặn chiết từ chủng *E.cristatum* E3 biểu hiện hoạt tính ức chế cao nhất với giá trị IC₅₀ là 121,17µg/mL. Trong khi đó cặn chiết từ chủng *E.cristatum* E8 có hiệu quả ức chế enzyme tương đối với IC₅₀ đạt giá trị 159,72 µg/mL. Tương tự như hoạt tính chống oxy hóa, các nghiên cứu đánh giá độc lập về hoạt tính sinh học của

nấm *Eurotium* còn rất hạn chế. Các công bố đều tập trung vào khả năng chuyển hóa các chất trao đổi thứ cấp biểu hiện hoạt tính có lợi. Kết quả trên là tiền đề để lựa chọn ra những chủng nấm có hoạt tính sinh học ứng dụng trong quá trình lên men chuyển hóa lá THV.

3.2 ĐÁNH GIÁ MẬT ĐỘ VI SINH VẬT VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA LÁ THV LÊN MEN BỞI BỘ CHỨNG NẤM KIM HOA

3.2.1. Mật độ của chủng nấm kim hoa trong lá THV sau khi lên men.

Từ các kết quả trên, 3 chủng nấm *E. cristatum* E1, E3, và E8 có hoạt tính chống oxy hóa và ức chế enzyme α -glucosidase được lựa chọn để lên men lá THV. Sau khi tiến hành lên men riêng lẻ và tập hợp 3 chủng nấm, mật độ vi sinh vật trong mẫu lá trà được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc nhằm khảo sát khả năng sinh trưởng phát triển của các chủng vi nấm trên sản phẩm lá THV lên men. Kết quả được trình bày tại bảng dưới đây:

Bảng 3.2. Mật độ vi sinh vật trong quá trình lên men lá THV sau 21 ngày lên men

TT	Ký hiệu mẫu	Mật độ vi sinh vật (CFU/g)
1	IF-E1	$4,3 \times 10^7$
2	IF-E3	$7,1 \times 10^7$
3	IF-E8	$8,9 \times 10^7$
4	IF-HH	$7,3 \times 10^7$

Mật độ của các chủng nấm trong các mẫu trà lên men duy trì ở $4,3-8,9 \times 10^7$ CFU/g sau 21 ngày. Mốc thời gian này được chọn để đánh giá hiệu quả chuyển hóa của vi nấm trong quá trình lên men trà đậm [35]. Tuy nhiên hiện chưa có công trình nghiên cứu về ảnh hưởng của thời gian đến quá trình chuyển hóa của nấm kim hoa trong trà lên men. Do đó việc kiểm tra mật độ vi sinh trong mẫu THV lên men được thực hiện nhằm khảo sát khả năng sinh trưởng, cũng như phát hiện trong mẫu có nhiễm các chủng vsv ngoại lai hay không.

3.2.2. Hoạt tính sinh học của lá THV lên men

- Hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa của các mẫu cặn chiết trà lên men bởi chủng nấm E1 (IF-E1), E3 (IF-E3), E8 (IF-E8), cũng như bởi hỗn hợp 3 chủng nấm

trên (IF-HH) bằng khả năng trung hòa các gốc tự do trong dung dịch DPPH được tính thông qua giá trị SC (%) và IC₅₀ (µg/mL) trình bày tại bảng 3.3.

Bảng 3.3. Hoạt tính chống oxy hóa của các cặn chiết

TT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ thử nghiệm (µg/mL)	SC (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
	Đôi chứng (+) [ascorbic acid]	50	80,18±0,54	16,42
	Đôi chứng (-) [DMSO+DPPH]		0,0±0,0	-
1	IF-E1	500	70,78±0,32	173,62
2	IF-E3	500	72,33±0,52	195,56
3	IF-E8	500	69,61±0,27	252,56
4	IF-HH	500	79,46±0,21	141,30
5	Lá trà thô	500	71,21±0,14	174,49

Kết quả cho thấy, khả năng trung hòa các gốc tự do DPPH của các mẫu cặn chiết không có nhiều khác biệt, giá trị SC của các mẫu giao động trong khoảng từ 69,62 đến 79,46 %. Giá trị IC₅₀ của mẫu IF-HH được cho là thấp nhất, ở mức 141,30 µg/mL. Giá trị IC₅₀ thấp gợi ý khả năng trung hòa các gốc tự do nói riêng và hoạt tính chống oxy hóa nói chung cao. Các hoạt chất có khả năng chống oxy hóa phổ biến nhất trong lá THV là nhóm catechin bao gồm catechin (C); epigallocatechin (EGC), gallocatechin (GC), epicatechin (EC), và epigallocatechin gallate (EGCG). Tuy nhiên, vị đắng và chát của nước sắc pha trà được cho là có liên quan tới hàm lượng nhóm polyphenol tự nhiên trong lá trà như catechin và tannin. Ngược lại, lá trà sau khi lên men với chủng nấm *E.cristatum* không chỉ có đặc tính chống oxy hóa ở mức cao hơn với lá trà tự nhiên mà còn giảm đi đáng kể vị chát và vị đắng khi uống. Lý giải cho điều này, Liu và cộng sự đã phát hiện ra sự chuyển biến về hàm lượng, thành phần các nhóm chất trong lá trà xanh khi được lên men cùng với nấm *E. cristatum*. Hàm lượng EGCG và ECG được cho là giảm đi đáng kể do tác động bởi nhóm enzyme oxi hóa tiết từ nấm *E. cristatum* trong suốt thời gian lên men. Thay vào đó các hợp chất thuộc nhóm flavonoids, terpenoids và alkaloids có trọng lượng phân tử thấp được hình thành như daidzin, genistin, puerarin,.. Các hợp chất được hình thành có khả năng chống oxy hóa và tạo nên tính đa dạng các hoạt

tính sinh học trong lá trà lên men như ức chế ACE, ức chế α -glucosidase, α -amylase, ức chế lipase,... Các enzyme tham gia vào quá trình chuyển hóa gồm: polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD), cellulase, α -amylase,..[44]. Chính vì thế, việc sử dụng nấm *E. cristatum* để lên men lá THV không chỉ góp phần tăng hàm lượng chất chống oxy hóa mà còn mở ra tiềm năng nghiên cứu các hoạt tính sinh học khác.

- Hoạt tính ức chế α glucosidase

Cặn chiết lá THV lên men bởi các chủng nấm *Eurotium cristatum* E1, E3, E8 có ký hiệu lần lượt là IF-E1, IF-E3 và IF-E8 được đánh giá khả năng ức chế enzyme α -glucosidase theo cơ chế thủy phân cơ chất pNPG tạo ra p-Nitrophenol có màu vàng và hấp thụ ở bước sóng 405 nm. Ngoài ra, mẫu IF-HH là lá THV lên men với tổ hợp 3 chủng nấm trên. Các dịch nuôi các chủng nấm được bổ sung với tỉ lệ 1:1:1 với tổng thể tích là 20mL, và được phối trộn trong 200g lá trà, mẫu NF là lá THV lên men tự nhiên không bổ sung chủng nấm kim hoa. Các mẫu trên được tiến hành đồng thời để so sánh hiệu quả ức chế enzyme α -glucosidase.

Bảng 3.4. Hoạt tính ức chế α glucosidase của các cặn chiết

TT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ thử nghiệm ($\mu\text{g/mL}$)	Phần trăm ức chế (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	Đối chứng (+) [Acarbose]	50	80,05 \pm 0,33	11,65
	Đối chứng (-) [DMSO 10%]	-	0	-
1	IF-E1	500	85,74 \pm 0,22	111,14
2	IF-E3	500	82,95 \pm 0,38	187,84
3	IF-E8	500	80,29 \pm 0,16	135,08
4	IF-HH	500	85,28 \pm 0,09	87,52
5	NF	500	81,12 \pm 0,25	135,17

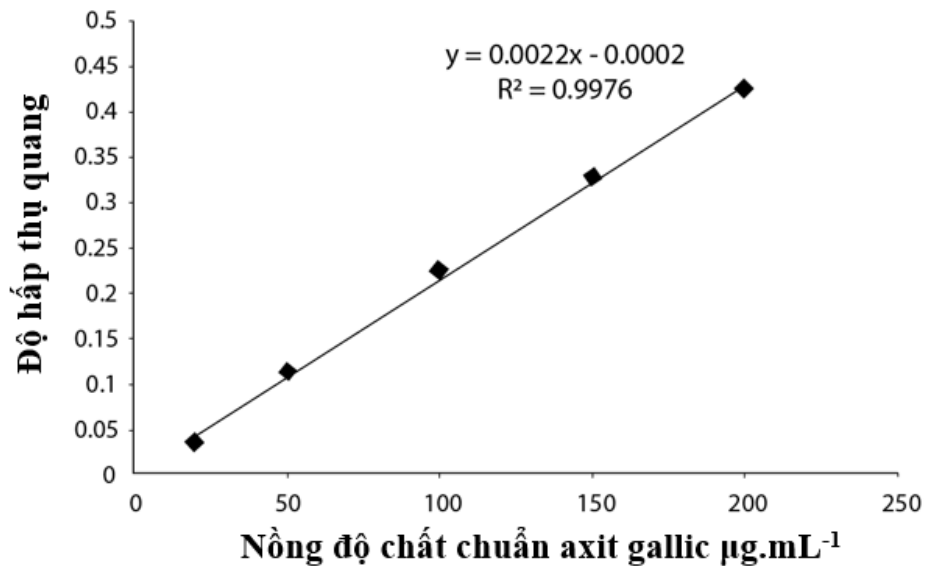
Từ bảng kết quả trên, tất cả các mẫu đều biểu hiện hoạt tính ức chế enzyme α glucosidase dao động trong khoảng từ 80,22 đến 85,74 %. Khả năng ức chế enzyme ở nồng độ thử nghiệm 500 $\mu\text{g/mL}$ có sự khác biệt không đáng kể. Tuy nhiên khi xem xét đến giá trị IC₅₀ của các mẫu thử, có thể nhận thấy, hoạt tính ức chế α -glucosidase của mẫu IF-HH (IC₅₀ = 87,52 $\mu\text{g/mL}$) mạnh mẽ

hơn so với 3 mẫu lá THV lên men riêng lẻ với các chủng nấm, và mẫu lá THV lên men tự nhiên. Sự khác biệt về hoạt tính của các mẫu cận chiết có thể do sự biến đổi về hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học sau quá trình lên men, phương pháp chiết tách mẫu. Hiện nay, các nhóm thuốc ức chế enzyme α -glucosidase như acarbose, voglibose, miglitol, v.v. được thương mại hóa một cách rộng rãi trên thị trường. Tuy nhiên những người bệnh tiểu đường tuýp II đang phải đối mặt với các nguy cơ về sức khỏe như đầy hơi, khó tiêu, men gan cao, xơ gan, khi sử dụng nhóm thuốc làm chậm hấp thu glucose này. Chính vì vậy các nghiên cứu về chất có hoạt tính ức chế α -glucosidase từ các sản phẩm thiên nhiên không gây tác dụng phụ đang được thế giới quan tâm. Yang và các cộng sự đã chỉ ra theabrownins là nhân tố trong việc tăng cường hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase trong lá dâu tằm lên men với chủng nấm *E. cristatum* HBES3-06 với giá trị IC_{50} là 0,29 mg/mL [45]. Cũng theo một nghiên cứu khác về việc sử dụng chủng nấm *E. cristatum* YL-1 để lên men kiều mạch khiến hoạt tính ức chế α glucosidase được cải thiện rõ rệt, phần trăm ức chế enzyme tăng từ 0,92% với mẫu kiều mạch không lên men (BW) lên tới 52,58% với mẫu kiều mạch lên men với nấm *Eurotium* (FBW). Từ các nghiên cứu đã công bố, có thể thấy các đối tượng sử dụng để lên men cùng với nấm *E. cristatum* là khá đa dạng. Sau khi phân tích bằng UPLC-MS/MS, Xiao và các cộng sự đã tìm ra 103 hợp chất từ mẫu kiều mạch lên men rắn với nấm kim hoa. Trong đó, 68 hợp chất (bao gồm các nhóm chất alkaloids, phenolic,..) được xác định là khác biệt so với mẫu chưa lên men [46]. Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các mẫu có thể khác nhau giữa bởi nguồn nguyên liệu ban đầu nhưng về cơ bản các mẫu sau khi lên men với nấm *Eurotium* cho hiệu quả về hoạt tính là tốt hơn so với các mẫu không lên men.

Trong nghiên cứu này, kết quả về hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase từ cận chiết tổng số của lá THV lên men bởi các chủng nấm *E. cristatum* E1, E3, E8 lần đầu được công bố, giúp cung cấp dữ liệu một cách sơ bộ cho các nghiên cứu phân tích hóa học về chất, cơ chế chuyển hóa của lá THV lên men bởi nấm *Eurotium*. Việc sử dụng đồng thời cả ba chủng nấm E1, E3, và E8 để lên men lá THV cho biểu hiện hoạt tính sinh học cao hơn lá trà lên men với riêng lẻ từng chủng nấm. Do đó, các thí nghiệm về định lượng, phân lập chất tinh sạch có hoạt tính đều được thực hiện với mẫu lá trà lên men bởi hệ ba chủng nấm, ký hiệu là HH.

3.3. NGHIÊN CỨU SO SÁNH VÀ XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN CÓ HOẠT TÍNH TRONG LÁ TRÀ THV LÊN MEN BỞI NẤM KIM HOA

3.3.1. Hàm lượng polyphenol tổng số



Hình 3.1. Đường chuẩn định lượng theo hàm lượng axit gallic tương đương

Hàm lượng polyphenol tổng số trong mẫu THV sau khi lên men bởi tập hợp các chủng nấm *E. cristatum* (E1, E3, E8) (ký hiệu là IF-HH) đạt giá trị là $129,14 \pm 12,05$ mgGAE/g, tương ứng 12,914%, thấp hơn đáng kể so với 19,417% của mẫu lá THV chưa lên men (ký hiệu là NF) (Bảng 3.5). Kết quả này có tính tương đồng với các công bố trước đó về trà đậm, không giống như các loại trà tươi thông thường, hàm lượng polyphenol ở các loại trà lên men như trà đậm, trà phổ nhĩ luôn ở ngưỡng thấp trong khoảng 100-120 mgGAE/g hay 10-12%. Lý giải cho điều này, Lin và các cộng sự đã phân tích trên 44 mẫu trà đậm khác nhau, kết quả chỉ ra các chất tạo sắc tố như thebrownin, thearubigin, theaflavin được hình thành thông qua quá trình oxy hóa hoàn toàn các catechin, EGCG, axit gallic. Trong đó, thebrownsin có hàm lượng vượt trội hơn 13% so với các chất sắc tố còn lại. Đây cũng là hợp chất làm tăng cường khả năng ức chế α -glucosidase và tạo nên màu nâu sẫm đặc trưng ở các loại trà lên men bằng nấm *E. cristatum* [47].

Bảng 3.5. Hàm lượng polyphenol tổng số trong lá trà lên men và mẫu lá trà thô

TT	Ký hiệu mẫu (ghi chú)	Chỉ tiêu thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
1	IF-HH	Phenolic tổng số	mgGAE/g	$129,14 \pm 12,05$

2	NF	Phenolic tổng số	mgGAE/g	194,17±10,34
---	----	------------------	---------	--------------

3.3.2. Hàm lượng axit amin tổng số

Các axit amin đóng vai trò quan trọng trong việc tạo nên hương vị, mùi thơm của trà. Các axit amin được tìm thấy trong trà Phổ Nhĩ gồm có: alanine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, theanine, và tyrosine. Trong khi đó, alanine, asparagine, aspartic acid, γ -aminobutyric acid (GABA), theanine, and threonine chiếm hàm lượng ưu thế trong các bánh trà đậm. Hàm lượng axit amin trong các loại trà lên men bằng nấm *Eurotium* thường cao hơn so với các loại trà thô chưa qua chế biến [47]. Hàm lượng axit amin tổng số trong lá THV lên men bởi hỗn hợp các chủng nấm *Eurotium cristatum* (E1, E3, E8) đạt giá trị là 29,48 mg/100 g, cao gần gấp 3 lần so với hàm lượng axit amin tổng số trong lá THV tự nhiên. Kết quả được trình bày ở bảng 3.6 dưới đây.

Bảng 3.6. Hàm lượng axit amin tổng số từ cặn chiết của lá trà thô và lá trà lên men bởi nấm kim hoa

TT	Ký hiệu mẫu (ghi chú)	Chỉ tiêu thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
1	IF-HH	Hàm lượng axit amin tổng số	mg/100g	29,48±1,98
2	NF	Hàm lượng axit amin tổng số	mg/100g	10,90±2,37

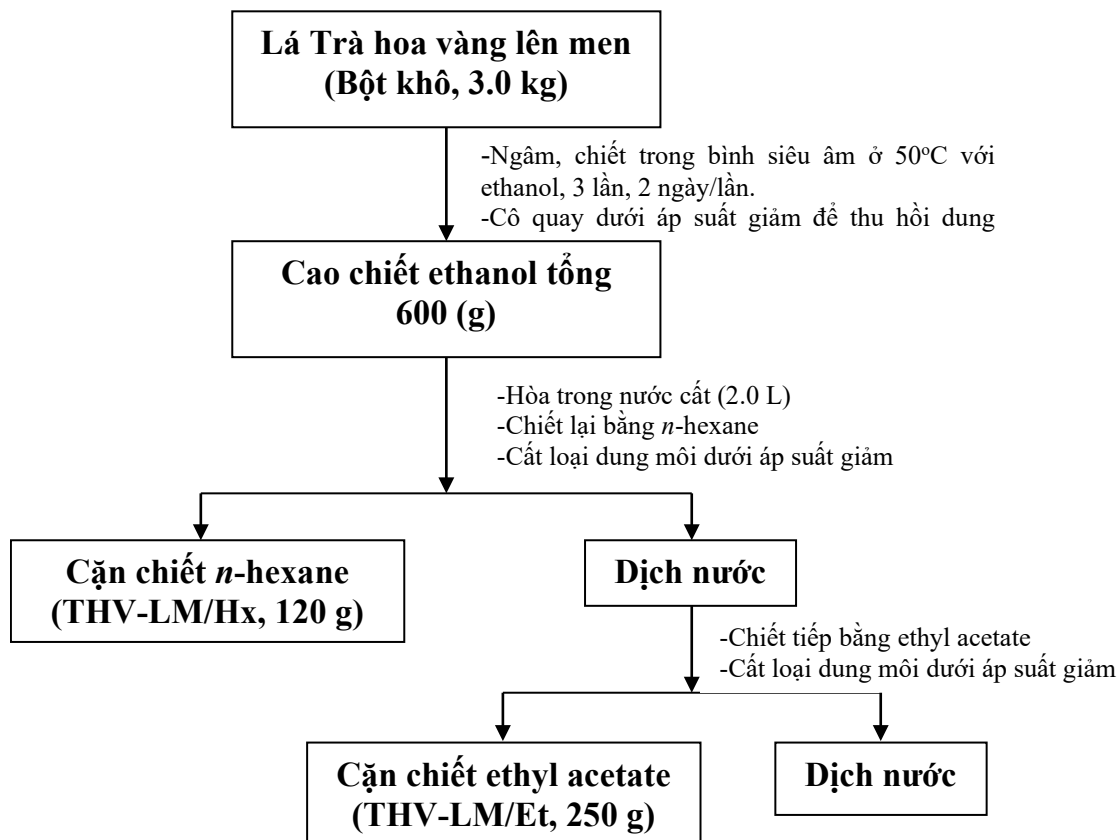
3.3.3. Thành phần hợp chất có hoạt tính trong lá trà THV lên men bởi nấm kim hoa

Từ những kết quả khả quan về hoạt tính sinh học và hàm lượng axit amin tổng số trong các mẫu lá THV lên men bởi hỗn hợp ba chủng nấm kim hoa (*E. cristatum* E1, E3 và E8), chúng tôi đã tiến hành tách chiết và xác định các thành phần hợp chất có hoạt tính trong các mẫu trà lên men này.

3.3.3.1. Phân lập các hợp chất và đánh giá hoạt tính sinh học

3 kg lá Trà hoa vàng *C. chrysantha* lên men với các chủng nấm *Eurotium cristatum* (E1, E3, E8) được xay nhỏ rồi ngâm chiết trong dung môi ethanol kết hợp siêu âm ở 50°C. Quá trình chiết được thực hiện lặp lại 3 lần, mỗi lần cách nhau 2 ngày. Các dịch chiết được gộp lại, sau đó 600g cao tổng ethanol thu được bằng cách cất loại dung môi dưới áp suất thấp. Tiếp đó, cao ethanol được

hòa trong 2 lít nước và tiến hành chiết phân bố lại với các dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexane, ethyl acetate. Loại bỏ dung môi dưới áp suất thấp thu được các cặn chiết tương ứng *n*-hexane (THV-LM/Hx, 120g), EtOAc (THV-LM/Et, 250g).



Hình 3.2. Sơ đồ tạo cao chiết tổng số và các cao chiết phân đoạn.

Các cặn chiết tổng số được sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa và ức chế enzyme α -glucosidase nhằm định hướng cho việc phân lập chất có hoạt tính sinh học ở các bước tinh sạch tiếp theo

Bảng 3.7. Hoạt tính sinh học ở 2 mẫu cao phân đoạn *n*-hexan và ethyl acetate

T T	Ký hiệu mẫu	Nồng độ thử ($\mu\text{g/ml}$)	Chống oxy hóa		Ức chế enzyme α -glucosidase	
			SC (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Tỉ lệ ức chế (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
1	THV-LM/Hx	400	47.68 \pm 0,27	-	78.03 \pm 0,34	66.21
2	THV-LM/Et	400	81.81 \pm 0,19	121.39	84.24 \pm 0,25	24.32
	Đối chứng (-) [DMSO]	-	-	-	-	-
	Ascorbic acid	50	85,48 \pm 0,21	10,65	-	-

	Acarbose	50	-	-	83,87±0,24	10.06
--	----------	----	---	---	------------	-------

Từ bảng 3.7 có thể thấy, mẫu lá trà lên men chiết bởi dung môi ethyl acetate có hoạt tính chống oxy hóa và ức chế enzyme α -glucosidase với giá trị IC_{50} lần lượt là 121.39 $\mu\text{g/ml}$ và 24.32 $\mu\text{g/ml}$ và có hoạt tính tốt hơn mẫu chiết bởi dung môi n-Hexan. Do đó cao chiết phân đoạn ethyl acetate được lựa chọn để chiết tách và phân lập chất tinh.

Sau đó, cao chiết phân đoạn THV-LM/Et được tiến hành sắc kí silica gel cột pha thường, với hệ dung môi rửa giải dichloromethane:methanol:water (4:1:0.05 to 0:100:0, v:v:v) thu được ba phân đoạn kí hiệu THV-LM/E1-THV-LM/E3. Bằng việc tiến hành đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết ở ba phân đoạn trên có thể lựa chọn phân đoạn chứa hợp chất có hoạt tính sinh học cần phân lập.

Bảng 3.8. Hoạt tính sinh học ở ba phân đoạn chiết tách từ cao tổng số THV-LM/Et

TT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ thử ($\mu\text{g/ml}$)	Chống oxy hóa		Ức chế enzyme α -glucosidase	
			SC (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Tỉ lệ ức chế (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
1	THV-LM/E1	400	75,52±0,42	103,26	91,65±0,21	12,84
2	THV-LM/E2	400	77,01±0,6	155,15	83,16±0,35	36,13
3	THV-LM/E3	400	41,83±0,91	-	27,38±0,33	-
	Đối chứng (-) [DMSO]	-	-	-	-	-
	Ascorbic acid	50	86,72±0,22	10,17	-	-
	Acarbose	50	-	-	83,02±0,47	10,47

Theo bảng kết quả 3.8, mẫu cao chiết phân đoạn THV-LM/E1 biểu hiện đặc tính chống oxy hóa (IC_{50} : 103,26±0,35 $\mu\text{g/mL}$) và ức chế enzyme α -glucosidase (IC_{50} : 12,84 $\mu\text{g/ml}$) ở mức cao hơn so với 2 phân đoạn còn lại. Đáng chú ý, hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của cặn chiết tại phân đoạn THV-LM/E1 gần tương đương khi so sánh với mẫu đối chứng dương Acarbose. Do đó, phân đoạn THV-LM/E1 được lựa chọn để chiết tách phân lập các hợp chất tinh sạch.

3.3.3.2. Xử lý các mẫu cao chiết phân đoạn, tách chất tinh

Từ phân đoạn THV-LM/E1, các chất sạch phân lập từ 3 phân đoạn THV-LM/E1.1, THV-LM/E1.2, và THV-LM/E1.3 cũng được xác định hoạt tính sinh

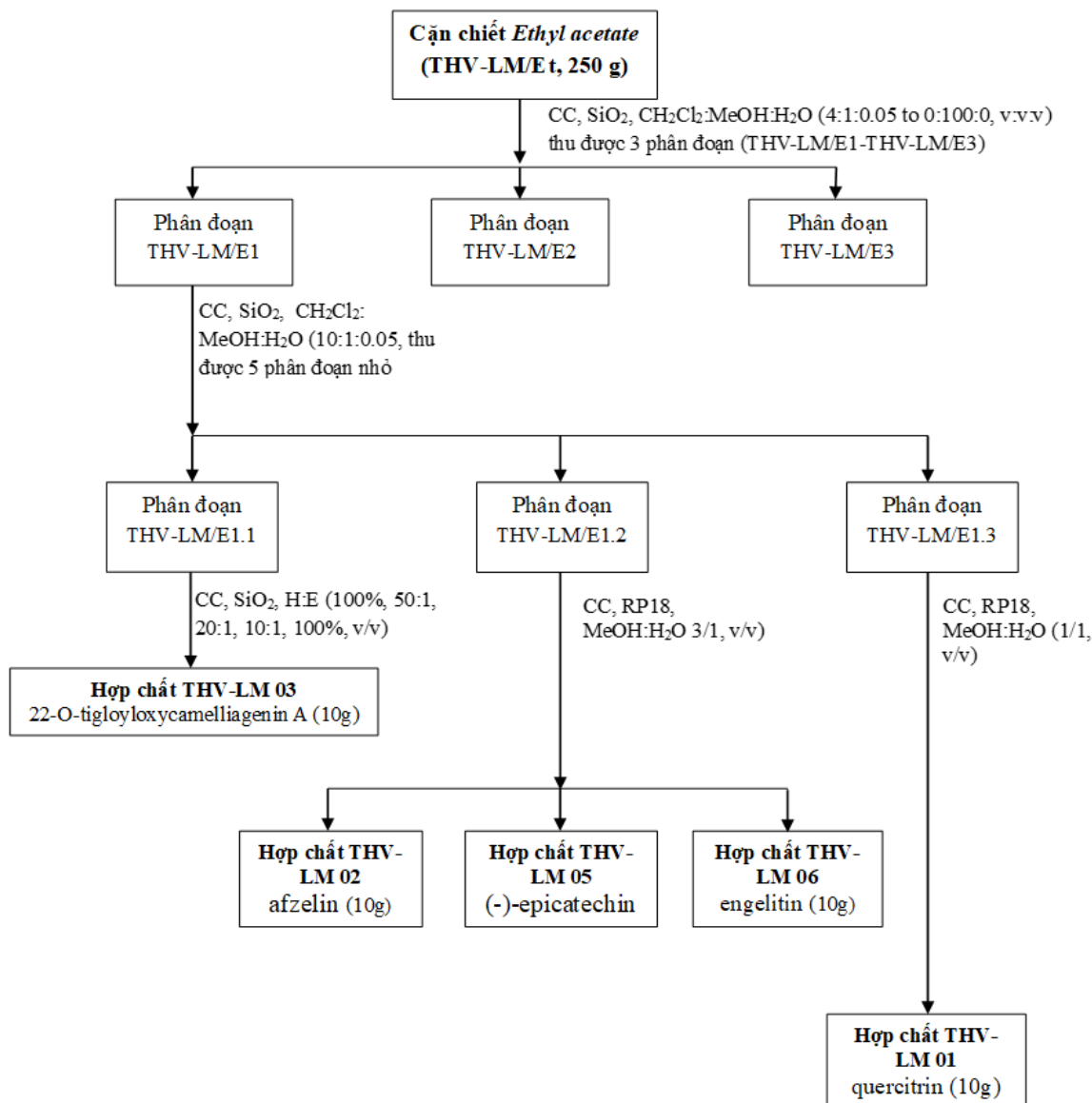
học để đưa ra luận điểm, cung cấp dữ liệu tổng quát về tác động của các chủng nấm *Eurotium* trong quá trình lên men lá THV.

Phân đoạn THV/LM/E1 được chạy qua cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi rửa water:methanol:dichloromethane (0.05:1:10, v:v:v), năm phân đoạn thu được có kí hiệu THV-LM/E1.1 - THV-LM/E1.5.

Phân đoạn THV-LM/E1.1 được phân tách bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải n-hexane:EtOAc (100%, 50:1, 20:1, 10:1, 100%, v:v), hợp chất **THV-LM 03** thu được có màu trắng, dạng tinh thể, 10.0 mg.

Phân đoạn TH-LM/E1.2 được tiến hành sắc ký cột RP-18 sử dụng hệ rửa giải là nước: methanol (1:3, v:v), thu được ba hợp chất là **THV-LM 02** (10mg), **THV-LM 05** (8mg) và **THV-LM 06** (7mg).

Từ phân đoạn THV-LM/E1.3, tiến hành sắc ký cột PR-18 với hệ dung môi rửa giải là nước:methanol (1:1, v:v) cô lập được duy nhất hợp chất là **THV-LM 01** (10 mg). Sơ đồ tổng quát quá trình phân lập tách chất được trình bày tại hình sau.

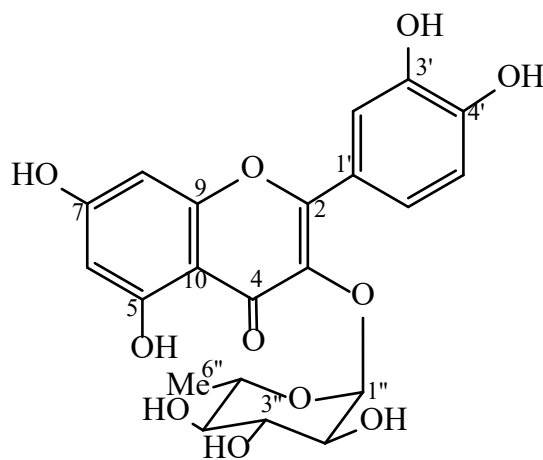


Hình 3.3. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cặn chiết là THV lên men bởi các chủng nấm kim hoa

Hợp chất THV-LM01 (**1**) là chất rắn màu vàng. Phổ NMR của hợp chất **1** xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của một flavonoid glycoside, chứa một gốc đường rhamnopyranosyl. Cụ thể, trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **1** xuất hiện hai tín hiệu doublet của hai proton thơm cặp *meta* của vòng A tại δ_{H} 6.22 (d, $J=2.4\text{Hz}$, H-6), 6.39 (d, $J=2.4\text{Hz}$, H-8), ba tín hiệu đặc trưng cho ba proton của vòng thơm tương tác kiểu ABX tại δ_{H} 7.35 (d, $J_{\text{meta}}=2.4\text{Hz}$, H-2'), 6.93 (d, $J_{\text{octo}}=7.8\text{Hz}$, H-5') và 7.32 (dd, $J_{\text{octo/meta}}=8.4/2.4\text{Hz}$, H-6') thể hiện sự có mặt của vòng thơm B bị thế ở ba vị trí 1, 3 và 4, những tín hiệu phổ trên đặc trưng của một quercetin aglycone. Ngoài ra, những tín hiệu proton của methine trong khoảng từ 3.35 ppm đến 4.23 ppm, một tín hiệu khác của proton anomeric tại

δ_H 5.37 (d, $J=1.8\text{Hz}$) và một tín hiệu của nhóm methyl tại δ_H 0.96 (d, $J=6.0\text{Hz}$) đã chứng minh sự có mặt của gốc đường α -L-rhamnopyranosyl. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **1** xuất hiện tín hiệu của 21 carbon, bao gồm 15 carbon của khung flavonoid và 6 carbons của gốc đường. Phổ HMBC cho thấy sự tương tác giữa proton H-1" (δ_H 5.37) và carbon C-3 (δ_C 136.24) chứng tỏ vị trí gắn kết của gốc đường tại C3.

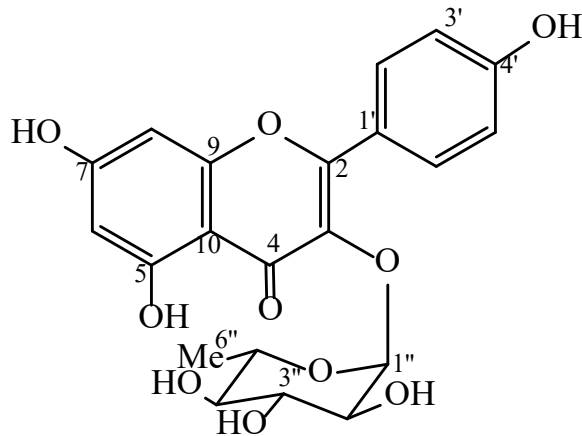
Khi kết quả phổ ^1H -NMR, ^{13}C NMR, HMBC và HSQC của hợp chất **1** được đối chiếu với dữ liệu tham chiếu [48], hợp chất **1** được nhận dạng là quercitrin (quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranoside).



Hình 3.4. Cấu trúc hóa học của hợp chất hợp chất **1** (quercitrin)

Hợp chất THV-LM02 (**2**) là chất rắn màu vàng. Phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất **2** tương như hợp chất **1**, gợi ý rằng cấu trúc của hợp chất **2** cũng là một flavonoid glycoside. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **2** xuất hiện tín hiệu của hai proton vòng thơm A thế ở vị trí *meta* tại δ_H 6.21 (d, $J=2.4\text{Hz}$, H-6), 6.38 (d, $J=2.4\text{Hz}$, H-8) và bốn proton vòng thơm thế ở vị trí *para* tại δ_H 7.79 (dd, $J=1.8/9.0\text{Hz}$, H-2', H-6'), 6.96 (d, $J=2.4/9.0\text{Hz}$, H-3', H-5') của vòng B, ngoài ra sự tín hiệu của gốc đường α -L-rhamnopyranosyl được xác định bởi một tín hiệu của một proton anomeric tại 5.39 (d, $J=1.8\text{Hz}$), tín hiệu của proton của nhóm methyl tại δ_H 0.94 (d, $J=5.4\text{Hz}$) và các tín hiệu proton của nhóm oximethine tại δ_H 3.34-4.24 ppm. Trên phổ ^{13}C -NMR xuất hiện tín hiệu carbon của một nhóm carbonyl tại δ_C 179.59 (C-4), một nhóm methyl tại δ_C 17.65 (C-6''). Khi xem xét phổ HMBC thấy có tương tác giữa proton H-1" (δ_H 5.39) và carbon C-3 (δ_C 136.19) gợi ý rằng gốc đường được gắn vào vị trí C3.

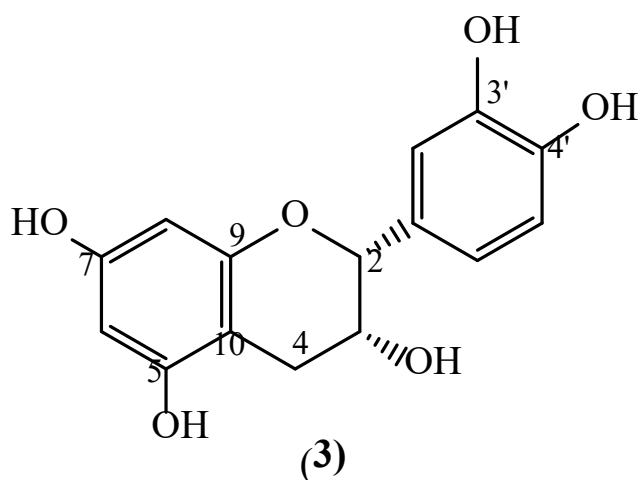
Sau khi đối chiếu kết quả phổ HMBC, ^{13}C -NMR, ^1H -NMR và HSQC của hợp chất **2** với dữ liệu tham khảo [49], có thể kết luận hợp chất **2** là afzelin.



Hình 3.5. Cấu trúc hóa học của hợp chất hợp chất **2** (afzelin)

Hợp chất THV-LM05 (**3**) là chất rắn màu vàng. Phổ $^1\text{D-NMR}$ và $^2\text{D-NMR}$ của hợp chất **3** gợi ý cấu trúc của một flavan-3-ol. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **3** xuất hiện một tín hiệu multiplet tại δ_{H} 4.17ppm (m, H-3) cho thấy có sự tương tác giữa proton H-3 với proton H-2 và H-4; hai tín hiệu doublet tại δ_{H} 2.73 (dd, $J=3.0/16.8\text{Hz}$) và 2.85 (dd, $J=4.8/16.8\text{Hz}$) của proton nhóm methylene tại vị trí 4; ba tín hiệu của proton thơm tương tác kiểu ABX đặc trưng cho vòng B tại δ_{H} 6.97 (d, $J=1.8\text{Hz}$), 6.75 (d, $J=7.8\text{Hz}$) và 6.79 (dd, $J=1.8/7.8\text{Hz}$); hai tín hiệu proton thơm khác đặc trưng cho vòng A tại δ_{H} 5.93 (d, $J=2.4\text{Hz}$, H-6) và δ_{H} 5.91 (d, $J=2.4\text{Hz}$, H-8). Độ chuyển dịch hóa học của proton H-2 xuất hiện tại δ_{H} 4.81 dưới dạng tín hiệu broad singlet, điều này chứng tỏ, trong cấu trúc của hợp chất **3**, hai proton H-2 và H-3 ở vị trí *cis* và đặc trưng cho hợp chất epicatechin. Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **3** cho thấy tín hiệu của 15 carbon xuất hiện tại δ_{C} 29.25 (C-4), 79.88 (C-2), 67.48 (C-3), 96.40 (C-6) 95.89 (C-8), 115.90 (C-2'), 115.32 (C-5'), 119.40 (C-6'), 157.37 (C-5), 158.0 (C-7), 157.67 (C-9), 100.08 (C-10), 132.29 (C-1'), 145.94 (C-3'), 145.78 (C-4'). Phổ HMBC của hợp chất **3** xuất hiện các tương tác xa giữa proton H-2 với carbon C-1', C-2', C-6', giữa proton H-4 với carbon C-2, C-3, C-5, C-9, C-10, giữa proton H-8 với carbon C-6, C-10, cũng như giữa proton H-6 với carbon C-8, C-10.

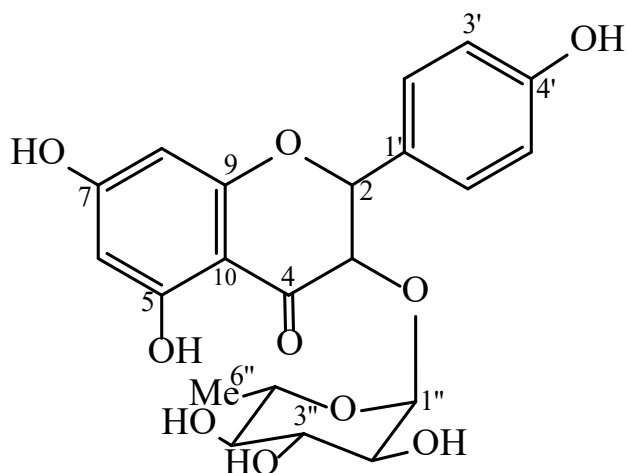
Các dữ liệu về phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC và HSQC của hợp chất **3** và nguồn tài liệu tham chiếu [50] là trùng khớp với nhau hoàn toàn. Do đó, hợp chất **3** được xác định là (-)-epicatechin.



Hình 3.6. Cấu trúc hóa học của hợp chất hợp chất **3** ((-)-epicatechin)

Hợp chất THV-LM06 (**4**) là chất rắn có màu vàng. Kết quả phổ NMR của hợp chất **4** minh chứng đây là một hợp chất flavonoid glycoside. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **4** xuất hiện tín hiệu của một dihydrokaempferol skeleton, bao gồm tín hiệu của proton thơm thế vị trí 1,4 tại δ_{H} 7.37 (d, $J=8.4\text{Hz}$, H-2', H-6'), 6.86 (d, $J=8.8\text{Hz}$, H-3', H-5'), hai tín hiệu của hai proton thơm thế ở vị trí *meta* xuất hiện tại δ_{H} 5.90 (d, $J=1.8\text{Hz}$, H-8), 5.93 (d, $J=2.4\text{Hz}$, H-6) và hai tín hiệu của hai proton aliphatic tại δ_{H} 5.15 (d, $J=10.8\text{Hz}$, H-2), 4.62 (d, $J=10.8\text{Hz}$, H-3). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của α -rhamnopyranoside bao gồm δ_{H} 4.03 (d, $J=1.2\text{Hz}$, H-1'') và δ_{C} 102.2 (C-1''), 71.78 (C-2''), 73.78 (C-3''), 70.53 (C-4''), 72.16 (C-5''), 17.84 (C-6''). Trên phổ HMBC thể hiện các tương tác xa giữa proton anomeric của rhamnose (δ_{H} 4.02) với carbon C-3 (δ_{C} 78.69), điều này chứng tỏ gốc đường được gắn vào vị trí C-3 của khung dihydrokaempferol skeleton.

Các phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$, HMBC và HSQC của hợp chất **4** được đối chiếu với tài liệu tham khảo [51] chứng tỏ đây là hợp chất engelitin (dihydrokaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranoside)

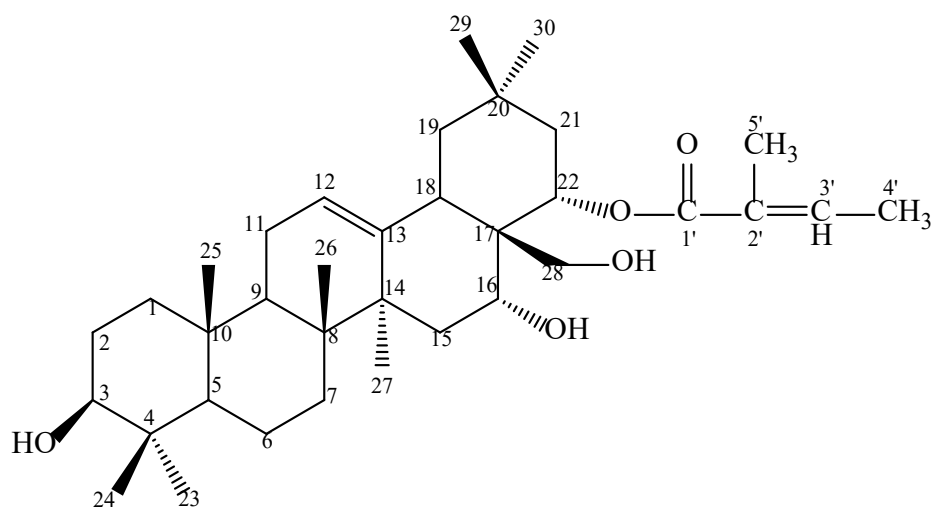


Hình 3.7. Cấu trúc hóa học của hợp chất hợp chất 4 (engelitin)

Hợp chất THV-LM03 (**5**) là chất rắn màu trắng, trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của hợp chất 5 cho thấy sự xuất hiện của ba mươi carbon đặc trưng cho một oleanolic acid triterpene. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **5** xuất hiện những tín hiệu singlet của proton của bảy nhóm methyl tại δ_{H} 0.80 (3H, s, CH_3 -23), 1.0 (3H, s, CH_3 -24), 1.0 (3H, s, CH_3 -25), 0.98 (3H, s, CH_3 -26), 1.50 (3H, s, CH_3 -27), 0.93 (3H, s, CH_3 -29), 1.92 (3H, s, CH_3 -30) ppm; một tín hiệu của proton olefinic tại δ_{H} 5.36 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12); một tín hiệu của proton của nhóm oximethine tại δ_{H} 3.18 (1H, dd, $J = 4.8/11.4$ Hz, H-3). Hơn nữa, trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **5** có thêm hai nhóm methyl tại δ_{H} 1.99 (3H, d, $J = 7.2$ Hz) và 1.92 (3H, s), một proton olefinic tại δ_{H} 6.08 (1H, dq), hai nhóm oximethine tại δ_{H} 4.13 (1H, br s) và 5.45 (1H, dd, $J = 6.0/12.0$ Hz). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của hợp chất **5** cho thấy sự xuất hiện của ba mươi carbon đặc trưng cho một oleanolic acid triterpene với tín hiệu của bảy nhóm methyl tại δ_{C} 16.31 (C-23), 28.72 (C-24), 16.15 (C-25), 17.30 (C-26), 27.72 (C-27), 33.59 (C-29), 25.25 (C-30); hai tín hiệu của hai nguyên tử carbon sp^2 tại δ_{C} 124.51 (C-12), 144.0 (C-13) thể hiện liên kết đôi giữa C-12 và C-13 của oleanane skeleton; một tín hiệu carbon của carbinol tại δ_{C} 64.84 (C-28). Độ chuyển dịch hóa học tại δ_{C} 79.70 (C-3) và δ_{H} 3.18 (1H, dd, $J = 4.8/11.4$ Hz) cho thấy có một nhóm β -OH xuất hiện tại C-3. Bên cạnh đó, phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của hợp chất **5** xuất hiện thêm năm carbon khác của nhóm tigloyl bao gồm một carbon carbonyl tại δ_{C} 169.75 (C-1'), một carbon methin tại δ_{C} 138.08 (C-3') tương ứng với δ_{H} 6.08 (1H, m, H-3'), hai nhóm methyl tại δ_{C} 15.92 (C-4'), 20.91 (C-5') tương ứng với δ_{H} 1.99 (3H, d, $J = 7.2$, CH_3 -4') và 1.92 (3H, s, CH_3 -5'), và carbon không liên kết với hydro tại δ_{C} 129.98 (C-2'). Trên phổ

HMBC xuất hiện tín hiệu tương tác xa giữa proton tại δ_H 5.45 (1H, dd, $J = 6.0/12.0$ Hz, H-22) với carbon tại δ_C 169.75 (C-1') điều này cho thấy nhóm tigloyl gắn vào vị trí C-22. Tương tự, tín hiệu tương tác giữa proton tại δ_H 3.08 (1H, m, CH₂-28a)/3.29 (1H, m, CH₂-28b) với carbon tại δ_C 45.32 (C-17) xác định được vị trí gắn của nhóm hydroxymethyl tại C-17.

Khi xem xét đối chiếu kết quả phổ ¹H-NMR, HMBC, ¹³C NMR và HSQC của hợp chất **5** với dữ liệu tham khảo [51] thì xác định hợp chất **5** là 22-O-Tigloyloxycamelliagenin A.



Hình 3.8. Cấu trúc hóa học của hợp chất Hợp chất **5** (22-O-Tigloyloxycamelliagenin A)

Quercitrin, afzelin, (-)-epicatechin, engelitin, và 22-O-Tigloyloxycamellia genin A là các hợp chất lần đầu được phân lập từ lá THV lên men, do đó việc đánh giá hoạt tính sinh học của 5 hợp chất trên là cần thiết để xác định vai trò của từng hợp chất đến chất lượng lá THV lên men bởi các chủng nấm kim hoa.

b. Đánh giá hoạt tính sinh học của các chất tinh

Sau khi xác định thành phần cấu trúc, tên gọi của các hợp chất, việc xác định hoạt tính của 5 chất trên là cần thiết nhằm đánh giá vai trò của từng chất đối với hoạt tính của lá THV sau khi lên men bởi nấm kim hoa.

Bảng 3.9. Hoạt tính sinh học của 5 hợp chất tinh sạch

TT	Tên mẫu	Nồng độ thử ($\mu\text{g/ml}$)	Hoạt tính chống oxy hóa		Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase	
			SC (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	Tỉ lệ ức chế (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
1	Hợp chất 1	100	62.67 \pm 0.61	52.38	0.865 \pm 0.72	-
2	Hợp chất 2	100	20.13 \pm 0.65	-	61.13 \pm 0.36	78.25
3	Hợp chất 3	100	73.5 \pm 0.41	28.74	39.42 \pm 0.27	-
4	Hợp chất 4	100	41.94 \pm 0.47	-	27.38 \pm 0.81	-
5	Hợp chất 5	100	11.08 \pm 0.28	-	90.96 \pm 0.15	16.30
	Đối chứng âm DMSO 10%	-	-	-	-	-
	Ascorbic acid	50	85.72 \pm 0.31	10.87	0.0 \pm 0.0	-
	Acarbose	50	0.0 \pm 0.0	-	79.62 \pm 0.42	12.28

- Hoạt tính chống oxy hóa

Từ bảng kết quả trên có thể nhận thấy khả năng trung hòa các gốc tự do được biểu hiện chủ yếu ở quercitrin (**1**) và (-)-epicatechin (**3**) có giá trị IC₅₀ tương ứng là 28.74 và 52.38 $\mu\text{g/ml}$. Quercitrin và epicatechin là các hợp chất flavonol được tìm thấy trong thực vật, Quercitrin được hình thành bởi các liên kết glucoside với vị trí C3 vòng C của Quercetin. Hiện nay, dữ liệu về con đường tổng hợp quercitrin trong trà lên men còn rất hạn chế, và quercitrin được cho rằng tổng hợp từ quercetin bằng phản ứng đề glycosyl hóa [52]. Tại nghiên cứu này, hợp chất quercitrin (**1**) có biểu hiện hoạt tính chống oxy hóa ở mức trung bình với phần trăm bao vây các gốc tự do là 62.67 \pm 0.61 % tại nồng độ thử nghiệm 100 $\mu\text{g/ml}$. Điều này có thể lý giải bởi, quercitrin có hoạt tính sinh kháng viêm, và kháng vi sinh vật mạnh mẽ hơn so với các hoạt tính còn lại [52].

Trong khi đó, tuy cùng là hợp chất thuộc nhóm flavonoid nhưng epicatechin (**3**) biểu hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh mẽ hơn so với quercitrin (**1**) do có các nhóm hydroxyl trong cấu trúc phân tử. Epicatechin được tìm thấy trong lá trà xanh cũng như trong trà đậm lên men bởi vi nấm.

Tuy nhiên hàm lượng Epicatechin trong trà đậm được cho rằng thấp hơn đáng kể so với lá trà không lên men, bởi các enzyme ngoại bào tiết bởi *E. cristatum* như polyphenol oxidase và peroxidase, tannase,...thúc đẩy quá trình oxy hóa các polyphenol, flavonoid thành các chất thứ cấp như thebrownins, thearubigins, theaflavins,...làm đa dạng hoạt tính sinh học của trà lên men [53].

- Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

Theo bảng kết quả 3.10, afzelin (**2**) và 22-O-Tigloyloxycamelliagenin A (**5**) là 2 trong 5 hợp chất biểu hiện hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase với giá trị IC_{50} lần lượt là 78.25 và 16.30 $\mu\text{g/ml}$. Afzelin (hay kaempferol 3-O-rhamnoside) được biết đến như một glycoside flavonoid, được phân lập từ một số loài thực vật *Annona purpurea*, *Phyllanthus emblica*, v.v.) trong trà đậm lên men bởi vi sinh vật [53, 54]. Afzelin được tổng hợp từ kaempferol dưới xúc tác của enzyme kaempferol 3-Orhamnosyl transferase trong quá trình lên men trà đậm [53]. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng nhiều hoạt tính sinh học của afzelin, bao gồm chất chống oxy hóa, chống viêm, bảo vệ thần kinh, chống ung thư và ức chế α -glucosidase. Theo Torres-Naranjo và cộng sự, afzelin chiết từ lá cây *Muehlenbeckia tamnifolia* ức chế đáng kể hoạt động ức chế α -glucosidase với giá trị IC_{50} là 3,56 μM [55]. Cũng theo nghiên cứu của Lee năm 2018, afzelin được tách chiết và phân lập từ lá cây *Acer okamotoanum* sở hữu hiệu quả ức chế α -glucosidase với giá trị IC_{50} là 1,13 $\mu\text{g} / \text{mL}$ [56].

Trong khi đó, 22-O-Tigloyloxycamelliagenin A (**5**) là một oleanolic acid triterpene thuộc nhóm terpenoid có hoạt tính gây độc tế bào mạnh mẽ với dòng tế bào HCT 116 và A549 liên quan đến bệnh ung thư phổi [57]. Trong nghiên cứu này, 22-O-Tigloyloxycamelliagenin A (**5**) phân lập từ lá THV lên men có biểu hiện hoạt tính ức chế α -glucosidase mạnh mẽ, 22-O-Tigloyloxycamelliagenin A (**5**) cũng chưa từng xuất hiện trong nghiên cứu thành phần cấu trúc hóa học của lá cây THV [58]. Chính vì thế, đây là những phát hiện mới mẻ, có tiềm năng lớn trong việc ứng dụng nấm *E.cristatum* trong lên men THV hay các loại trà khác tại Việt Nam.

Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Quá trình thực hiện luận án đã thu được một số kết quả chính như sau:

Đã tuyển chọn được ba chủng nấm kim hoa *Eurotium cristatum* E1, E3 và E8 dựa trên sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa và khả năng ức chế enzyme α -glucosidase.

Đã so sánh hoạt tính sinh học và hàm lượng chất của lá trà hoa vàng (THV) được lên men bởi các chủng nấm kim hoa (*E. cristatum* E1, E3 và E8) riêng lẻ, và lá THV lên men đồng thời bởi hỗn hợp 3 chủng nấm. Kết quả cho thấy, hoạt tính chống oxy hóa và ức chế enzyme α -glucosidase của mẫu lá trà lên men bởi hỗn hợp ba chủng nấm (IF-HH) tốt hơn so với khi được lên men bởi các chủng riêng lẻ, và có sự khác biệt tương đối so với mẫu lá THV không lên men bởi nấm kim hoa (NF). Đáng chú ý, hàm lượng các axit amin tổng số ở mẫu IF-HH cao hơn đáng kể mẫu NF.

Từ cặn chiết lá THV lên men bởi hỗn hợp 3 chủng nấm kim hoa (*E. cristatum* E1, E3 và E8), đã phân lập được bốn hợp chất flavonoids gồm: quercitrin (**1**), afzelin (**2**), (-)-epicatechin (**3**), engelitin (**4**), và một hợp chất oleanolic acid triterpene là O-Tigloyloxycamelliagenin A (**5**). Trong đó, quercitrin (**1**) và (-)-epicatechin (**3**) biểu hiện tính chống oxy hóa ở mức cao với giá trị IC_{50} lần lượt là 52,38 và 28,74 $\mu\text{g/mL}$. Hợp chất afzelin (**2**) và O-Tigloyloxycamelliagenin A (**5**) ức chế enzyme α -glucosidase với giá trị IC_{50} lần lượt là 78,25 và 16,30 $\mu\text{g/mL}$ trong khi hợp chất engelitin (**4**) không biểu hiện hai hoạt tính trên.

Từ kết quả nghiên cứu trên có thể thấy, sử dụng nấm kim hoa có khả năng giúp chuyển hóa tạo các hợp chất có lợi, và làm tăng cường hoạt tính của lá THV lên men. Các kết quả của đề tài có thể được sử dụng làm tài liệu tham khảo phục vụ mục đích nghiên cứu mở rộng và ứng dụng tạo sản phẩm.

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả thu được trong đề tài nghiên cứu, tác giả kiến nghị:

- Cần đánh giá độc lập tại từng thời điểm lên men khác nhau ngoài mốc thời gian đã thực hiện ở đề tài để xác định khách quan ảnh hưởng của các chủng nấm *E. cristatum* đến quá trình lên men lá THV.

- Ngoài việc xác định hàm lượng tổng số, cần phân tích định lượng các thành phần trong nhóm chất sắc tố (theabrownins, theaubigins, theaflavins), các hợp chất phenolic (catechin, EGCG, axit gallic) sử dụng phương pháp chạy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) giúp nghiên cứu có tính logic và trực quan hơn.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1 Shanenko, E.F., Efremenkova, O.V., Mukhamedzanova, T.G., Nikolaev, Y.A., Efimenko, T.A., Gernet, M.V., Bilanenko, E.N., Serykh, I.N., Shevelev, S.S., and Vasilyeva, B.F., 2020, 'Using the Eurotium cristatum Fungus for Preparing Fermented Herbal Teas', *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 10, (6), pp. 341-361
- 2 Zhang, L., Deng, W.-W., and Wan, X.-c., 2014, 'Advantage of LC-MS metabolomics to identify marker compounds in two types of Chinese dark tea after different post-fermentation processes', *Food science and biotechnology*, 23, pp. 355-360
- 3 Gong, Z.-p., Ouyang, J., Wu, X.-l., Zhou, F., Lu, D.-M., Zhao, C.-j., Liu, C.-f., Zhu, W., Zhang, J.-c., and Li, N.-x. , 2020, 'Dark tea extracts: Chemical constituents and modulatory effect on gastrointestinal function', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, pp. 110514
- 4 Parks, C.R., 2005,': 'Collected species of the genus Camellia, an illustrated outline' (Bright Sparks)
- 5 HD, Z. et al., 1979, 'Chrysantha, a section of golden camellias from Cataysian flora (华夏植物区系的金花茶组)', *A cta Univ Sunyatseni, Sci Nat Edi (中山大学学报自然科学版)*, 18, (3), pp. 69-74
- 6 Hung Ta, C., and Bartholomew, B., 1984, 'Camellias. Portland', in Editor (Ed.)^(Eds.): 'Book Camellias. Portland' (*Timber Press, edn.*), pp.
- 7 Tran Ninh, H.N., 2009 'Các loài trà của vườn Quốc gia Tam Đảo'
- 8 N. T. M. Duyệt, N.Q.H., L. S. Doanh, N. V. Khương, 2011, 'Đánh giá tình hình sinh trưởng và khả năng tái sinh của trà hoa vàng tại một số tỉnh phí Bắc', *Tạp chí Khoa học lâm nghiệp*, 4, pp. 1-11
- 9 Manh, T.D., Thang, N.T., Son, H.T., Thuyet, D.V., Trung, P.D., Tuan, N.V., Duc, D.T., Linh, M.T., Lam, V.T., and Thinh, N.H., 2019, 'Golden camellias: A review', *Archives of Current Research International*, 16, (2), pp. 1-8
- 10 Tran, V. et al, , 2018, 'Overview of golden camellias in Cao Bang', *Scientific Report. Silviculture Research Institute. Vietnamese Academy of Forest Sciences. Hanoi, Vietnam*
- 11 Lin, J.-N., Lin, H.-Y., Yang, N.-S., Li, Y.-H., Lee, M.-R., Chuang, C.-H., Ho, C.-T., Kuo, S.-C., and Way, T.-D., 2013, 'Chemical constituents and anticancer activity of yellow camellias against MDA-MB-231 human breast cancer cells', *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, (40), pp. 9638-9644
- 12 Huang, Y., Chen, Y., Wen, Y., Li, D., Liang, R., and Wei, X., 2009, 'Effects of the extracts from Camellia nitidissimas leaves on blood lipids', *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 20, (4), pp. 776-777
- 13 He, D., Wang, X., Zhang, P., Luo, X., Li, X., Wang, L., Li, S., and Xu, Y., 2015, 'Evaluation of the anxiolytic and antidepressant activities of the

- aqueous extract from *Camellia euphlebia* Merr. ex Sealy in mice', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (1), pp. 618409
- 14 Liu, B., Chen, J., Zhang, W., Huang, Y., and Zhao, Y., 2021, 'Biochemical components evaluation and optimal harvest period of the leaves of *Camellia Sect*', *Chrysantha. Chin. J. Trop. Crops*, 42, pp. 159-167
- 15 Wei, J.-B., Li, X., Song, H., Liang, Y.-H., Pan, Y.-Z., Ruan, J.-X., Qin, X., Chen, Y.-X., Nong, C.-L., and Su, Z.-H., 2015, 'Characterization and determination of antioxidant components in the leaves of *Camellia chrysantha* (Hu) Tuyama based on composition–activity relationship approach', *Journal of food and drug analysis*, 23, (1), pp. 40-48
- 16 Ghosh Hajra, N., 2006, 'Tea and health: science behaind the myths'.
- 17 Song, L., Wang, X., Zheng, X., and Huang, D., 2011, 'Polyphenolic antioxidant profiles of yellow camellia', *Food Chemistry*, 129, (2), pp. 351-357
- 18 Li, X., Li, C., Bu, Z., Huang, Z., Huang, C., and Lu, J. , 2020, 'Analysis of amino acids composition and evaluation of nutritional value in flowers of 6 species of *Camellia sect. Chrysantha Chang*'
- 19 Khôi, N.V.M., Trung, P.V., Hảo, H.M., Lan, N.T.N., Liên, G.T.K., Phương, N.T., and Thành, T.Q. , 2017, 'A study of chemical constituents of the *Camellia quephongnensis* Hakoda et Ninh flowers with high resolution mass spectrometry', *Tạp chí Khoa học và Công nghệ-Đại học Đà Nẵng*, pp. 121-125
- 20 Nguyen, T.H., Vu, D.C., Nguyet, N.T., Tran-Trung, H., Nguyen, L.L., and Baranyai, L., 2023, 'Evaluation of phenolics and bioactivities of *Camellia quephongensis* leaf extracts as affected by various extraction solvents', *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, pp. 100914
- 21 Van, N.T.H., Nghi, D.H., Bach, P.C., Tuyen, T.T., Bich, H.T., Toan, T.Q., Lam, D.T., Hoang, L.V., Quan, P.M., and Minh, P.T.H., 2023, 'Triterpenoids from the leaves of *Camellia chrysantha* growing in Quang Ninh (Vietnam) and their activities on main protease (Mpro) and ACE2', *Vietnam Journal of Chemistry*, 61, pp. 140-147
- 22 Lv, H.-p., Zhang, Y., Shi, J., and Lin, Z., 2017, 'Phytochemical profiles and antioxidant activities of Chinese dark teas obtained by different processing technologies', *Food Research International*, 100, pp. 486-493
- 23 Zhang, Q., and Zhang, J., 2024, 'Overview of *Eurotium cristatum* and its Fermentation Application in Tea', *Future Integrative Medicine*, 3, (1), pp. 11-20
- 24 Abliz, P., Horie, Y., Hui, Y., Nishimura, K., and Li, R., 2001, 'New and interesting species of *Eurotium* from Chinese soil', *Mycoscience*, 42, pp. 289-294
- 25 Pitt, J.I., and Hocking, A.D., 2022, 'Aspergillus and related teleomorphs', *Fungi and food spoilage*, pp. 351-439
- 26 Butinar, L., Zalar, P., Frisvad, J.C., and Gunde-Cimerman, N., 2005, 'The genus *Eurotium*–members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns', *FEMS Microbiology Ecology*, 51, (2), pp. 155-166

- 27 Deng, J., Li, Y., Yuan, Y., Yin, F., Chao, J., Huang, J., Liu, Z., Wang, K., and Zhu, M., 2023, 'Secondary Metabolites from the Genus *Eurotium* and Their Biological Activities', *Foods*, 12, (24)
- 28 Miyake, Y., Ito, C., Itoigawa, M., and Osawa, T., 2009, 'Antioxidants produced by *Eurotium herbariorum* of filamentous fungi used for the manufacture of karebushi, dried bonito (Katsuoobushi)', *Biosci Biotechnol Biochem*, 73, (6), pp. 1323-1327
- 29 Gomes, N.M., Dethoup, T., Singburauodom, N., Gales, L., Silva, A.M., and Kijjoa, A., 2012, 'Eurocristatine, a new diketopiperazine dimer from the marine sponge-associated fungus *Eurotium cristatum*', *Phytochemistry Letters*, 5, (4), pp. 717-720
- 30 Kang, D., Su, M., Duan, Y., and Huang, Y., 2019, '*Eurotium cristatum*, a potential probiotic fungus from Fuzhuan brick tea, alleviated obesity in mice by modulating gut microbiota', *Food & Function*, 10, (8), pp. 5032-5045
- 31 Zhang, H., Hui, J., Yang, J., Deng, J., and Fan, D., 2020 'Eurocristatine, a plant alkaloid from *Eurotium cristatum*, alleviates insulin resistance in db/db diabetic mice via activation of PI3K/AKT signaling pathway', *European Journal of Pharmacology*, 887, pp. 173557
- 32 Zhang, H.M., Wang, C.F., Shen, S.M., Wang, G.L., Liu, P., Liu, Z.M., Wang, Y.Y., Du, S.S., Liu, Z.L., and Deng, Z.W., 2012, 'Antioxidant phenolic compounds from Pu-erh tea', *Molecules*, 17, (12), pp. 14037-14045
- 33 Chan, L.Y., Takahashi, M., Lim, P.J., Aoyama, S., Makino, S., Ferdinandus, F., Ng, S.Y.C., Arai, S., Fujita, H., Tan, H.C., Shibata, S., and Lee, C.-L.K., 2019, '*Eurotium Cristatum* Fermented Okara as a Potential Food Ingredient to Combat Diabetes', *Scientific Reports*, 9, (1), pp. 17536
- 34 Zheng, W.-J., Wan, X.-C., and Bao, G.-H., 2015, 'Brick dark tea: a review of the manufacture, chemical constituents and bioconversion of the major chemical components during fermentation', *Phytochemistry Reviews*, 14, pp. 499-523
- 35 Xiao, Y., Zhong, K., Bai, J.R., Wu, Y.P., and Gao, H., 2020, 'Insight into effects of isolated *Eurotium cristatum* from Pingwu Fuzhuan brick tea on the fermentation process and quality characteristics of Fuzhuan brick tea', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, (9), pp. 3598-3607
- 36 Wang YiJun, W.Y., Kan ZhiPeng, K.Z., Thompson, H., Ling TieJun, L.T., Ho ChiTang, H.C., Li DaXiang, L.D., and Wan XiaoChun, W.X., 2019, 'Impact of six typical processing methods on the chemical composition of tea leaves using a single *Camellia sinensis* cultivar, Longjing 43'
- 37 Zhu, Y.-F., Chen, J.-J., Ji, X.-M., Hu, X., Ling, T.-J., Zhang, Z.-Z., Bao, G.-H., and Wan, X.-C., 2015, 'Changes of major tea polyphenols and production of four new B-ring fission metabolites of catechins from post-fermented Jing-Wei Fu brick tea', *Food chemistry*, 170, pp. 110-117
- 38 Zhang, L., Zhang, Z.-z., Zhou, Y.-b., Ling, T.-j., and Wan, X.-c., 2013, 'Chinese dark teas: Postfermentation, chemistry and biological activities', *Food Research International*, 53, (2), pp. 600-607

- 39 Xiao, Y., Li, M., Liu, Y., Xu, S., Zhong, K., Wu, Y., and Gao, H., 2021, 'The effect of *Eurotium cristatum* (MF800948) fermentation on the quality of autumn green tea', *Food Chemistry*, 358, pp. 129848
- 40 Wang, Y., Kan, Z., Thompson, H.J., Ling, T., Ho, C.-T., Li, D., and Wan, X., 2018, 'Impact of six typical processing methods on the chemical composition of tea leaves using a single *Camellia sinensis* cultivar, Longjing 43', *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 67, (19), pp. 5423-5436
- 41 Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., and Matsuoka, T., 2006, 'Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids', *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 52, (2), pp. 149-153
- 42 Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., and Berset, C., 1995, 'Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity', *LWT-Food science and Technology*, 28, (1), pp. 25-30
- 43 Ho Ly Phuong, Hoang Kim Chi, Le Huu Cuong, Nguyen Tien Quan, Tran Thi Hong Ha, and Tran Thi Nhu Hang, 2022, 'In vitro biological activities of plant-associated *Eurotium* fungal strains in Vietnam.', *International Conference on Science, Engineering & Technological Innovations*, pp. 101-110
- 44 Liu, L., Shi, J., Yuan, Y., and Yue, T., 2022, 'Changes in the metabolite composition and enzyme activity of fermented tea during processing', *Food Research International*, 158, pp. 111428
- 45 Yang, S., Fan, L., Tan, P., Lei, W., Liang, J., and Gao, Z., 2023, 'Effects of *Eurotium cristatum* on chemical constituents and α -glucosidase activity of mulberry leaf tea', *Food Bioscience*, 53, pp. 102557
- 46 Xiao, Y., Wu, X., Yao, X., Chen, Y., Ho, C.-T., He, C., Li, Z., and Wang, Y., 2021, 'Metabolite profiling, antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of buckwheat processed by solid-state fermentation with *Eurotium cristatum* YL-1', *Food Research International*, 143, pp. 110262
- 47 Lin, F.-J., Wei, X.-L., Liu, H.-Y., Li, H., Xia, Y., Wu, D.-T., Zhang, P.-Z., Gandhi, G.R., Li, H.-B., and Gan, R.-Y., 2021, 'State-of-the-art review of dark tea: From chemistry to health benefits', *Trends in Food Science & Technology*, 109, pp. 126-138
- 48 Zhong, X.-N., Otsuka, H., Ide, T., Hirata, E., Takushi, A., and Takeda, Y., 1997, 'Three flavonol glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*', *Phytochemistry*, 46, (5), pp. 943-946
- 49 Chaturvedula, V.S.P., and Prakash, I., 2011, 'Kaempferol glycosides from *Siraitia grosvenorii*', *J. Chem. Pharm. Res*, 3, (6), pp. 799-804
- 50 Davis, A.L., Cai, Y., Davies, A.P., and Lewis, J., 1996, '1H and 13C NMR assignments of some green tea polyphenols', *Magnetic resonance in Chemistry*, 34, (11), pp. 887-890
- 51 Choi, J., Cho, J.Y., Kim, Y.-D., Htwe, K.M., Lee, W.-S., Lee, J.C., Kim, J., and Yoon, K.D., 2015, 'Phenolic compounds and triterpenes from the barks of *Diospyros burmanica*', *Natural Product Sciences*, 21, (2), pp. 76-81

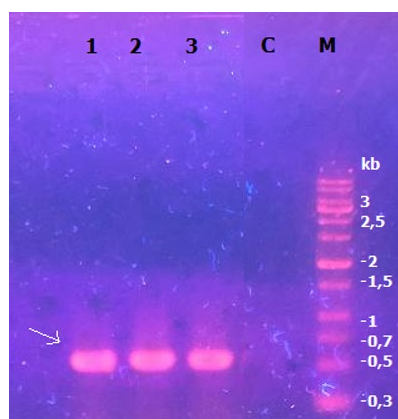
- 52 Chen, J., Li, G., Sun, C., Peng, F., Yu, L., Chen, Y., Tan, Y., Cao, X., Tang, Y., and Xie, X., 2022, 'Chemistry, pharmacokinetics, pharmacological activities, and toxicity of Quercitrin', *Phytotherapy Research*, 36, (4), pp. 1545-1575
- 53 Zhu, M.-z., Li, N., Zhou, F., Ouyang, J., Lu, D.-m., Xu, W., Li, J., Lin, H.-y., Zhang, Z., and Xiao, J.-b., 2020, 'Microbial bioconversion of the chemical components in dark tea', *Food Chemistry*, 312, pp. 126043
- 54 Mediani, A., Hamezah, H.S., Rohani, E.R., Kamal, N., Perumal, V., Salim, F., Rozlan, I.N.A., Hellal, K., Mahmood, S., and Al-Mekhlafi, N.A., 2023, 'Afzelin: Advances on Resources, Biosynthesis Pathway, Bioavailability, Bioactivity, and Pharmacology': *Handbook of Dietary Flavonoids*, pp. 1-45
- 55 Torres-Naranjo, M., Suárez, A., Gilardoni, G., Cartuche, L., Flores, P., and Morocho, V., 2016, 'Chemical constituents of Muehlenbeckia tamnifolia (Kunth) Meisn (Polygonaceae) and its in vitro α -amilase and α -glucosidase inhibitory activities', *Molecules*, 21, (11), pp. 1461
- 56 Lee, J., Lee, D.-G., Rodriguez, J.P., Park, J.Y., Cho, E.J., Jacinto, S.D., and Lee, S., 2018, 'Determination of flavonoids in Acer okamotoanum and their aldose reductase inhibitory activities', *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 59, pp. 131-137
- 57 Ragasa, C.Y., Espineli, D.L., and Shen, C.-C., 2014, 'Cytotoxic triterpene from Barringtonia asiatica', *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 48, pp. 529-533
- 58 Van, N.T.H., Bach, P.C., Ich, C.T., Phuong, D.L., Toan, T.Q., and Long, P.Q., 2019, 'Flavonoids isolated from the flowers of Camellia chrysantha', *Vietnam Journal of Science and Technology*, 57, (3), pp. 287-293

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Thành phần môi trường nuôi cấy vi sinh sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên môi trường	Thành phần	Khối lượng (g/L)
1	Môi trường thạch khoai tây (Potato Detroxe Agar) pH 5.6±0.2	Khoai tây	200
		Glucose	20
		Agar	15
2	Môi trường Sabourand pH 5.6±0.2	Peptone	40
		Glucose	10
3	Môi trường đếm khuẩn lạc (Plate Count Agar) pH 6.0±0.2	Peptone	5
		Glucose	10
		KH ₂ P0 ₄	1
		MgSO ₄	0.5
		Agar	15
Chloramphenicol 50µg/mL (Bổ sung sau khi thanh trùng)			

Phụ lục 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR gồm thang chuẩn và các băng hiển thị trình tự ITS của các chủng nấm.



Hình: Điện di sản phẩm PCR gene ITS của các nấm.

Đường chạy số 1-3 tương ứng với 3 chủng nấm *E.cristatum* E1, *E.cristatum* E3, *E.cristatum* E8 ; đường chạy C: đối chứng không có DNA; M: marker 1kb (hãng Intron)

Trên hình là sản phẩm PCR nhân gen ITS của 3 mẫu DNA . Kết quả cho thấy với mỗi mẫu cho hiển thị băng DNA đặc hiệu và đậm (hình mũi tên, đường 1). Kích thước của các băng là giống nhau, và khoảng 0,5-0,6kb (trên bản gel agarose 0,8%). Kích thước trong khoảng 0,5kb nằm trong kích thước các gen

ITS của đa số các loài nấm. Tùy từng loài nấm, kích thước gen ITS dao động 0,4-0,7 kb, và đa số là 0,5kb.

Sản phẩm PCR được tinh sạch, sử dụng KIT MEGAquick spin plus (hãng Intron) và được đọc trình tự gene (đọc bởi hãng First BASE).

- Trình tự gen ITS của các chủng nấm:

Trình tự ITS của chủng nấm *Eurotium cristatum* E1:

TCTGGGTCCAACCTCCCATCCGTGTCTATCTGTACCCTGTTGCTTCG
GCGTGGCCACGGCCCGCCGGAGACTAACATTTGAACGCTGTCTGA
AGTTTGCAGTCTGAGTTTTTAGTTAAACAATCGTTAAAACCTTCAA
CAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTT
TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCC
GAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTTCCG
TCCCTGGCAACGGGGACGGGGCCAAAAGGCAGTGGCGGCACCATG
TCTGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCCCGTAGGTC
CAGCTGGCAGCTAGCCTCGCAACCAATCTTTTTAACCAGGTTGACC
TCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
AGCCGGA

Trình tự ITS của chủng nấm chủng *Eurotium cristatum* E3:

CCTCCCATCCGTGTCTATCTGTACCCTGTTGCTTCGGCGTGGCCAC
GGCCCGCCGGAGACTAACATTTGAACGCTGTCTGAAGTTTGCAGTC
TGAGTTTTTAGTTAAACAATCGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAATTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG
CTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTTCCGTCCCTGGCAAC
GGGGACGGGGCCAAAAGGCAGTGGCGGCACCATGTCTGGTCCTCG
AGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCCCGTAGGTCCAGCTGGCAGC
TAGCCTCGCAACCAATCTTTTTAACCAGGTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAA

Trình tự ITS của chủng nấm chủng *Eurotium cristatum* E8:

ACCTCCCATCCGTGTCTATCTGTACCCTGTTGCTTCGGCGTGGCCA
CGGCCCGCCGGAGACTAACATTTGAACGCTGTCTGAAGTTTGCAGT
CTGAGTTTTTAGTTAAACAATCGTTAAAACCTTCAACAACGGATCT

CTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAATTA
 ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACA
 TTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATT
 GCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTTCCGTCCCTGGCAA
 CGGGGACGGGCCCAAAGGCAGTGGCGGCACCATGTCTGGTCCTC
 GAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCCCGTAGGTCCAGCTGGCAG
 CTAGCCTCGCAACCAATCTTTTTAACCAGGTTGACCTCGGATCAGG
 TAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAA

Phụ lục 3. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất 1, 2, 3, 4 và quercitrin

Pos.	1	2	3	4	Quercitrin [5]
	$\delta_{\text{H}}^{a,b}, J$ (Hz)	$\delta_{\text{H}}^{a,b}, J$ (Hz)	$\delta_{\text{H}}^{a,b}, J$ (Hz)	$\delta_{\text{H}}^{a,b}, J$ (Hz)	$\delta_{\text{H}}^{d,e}, J$ (Hz)
Aglycone					
2	-	-	4.81 (br s)	5.15 (d, 10.8)	-
3	-	-	4.17 (m)	4.62 (d, 10.8)	-
4	-	-	2.85 (dd, 4.8/16.8), 2.73 (dd, 3.0/16.8)	-	-
5	-	-	-	-	-
6	6.22 (d, 2.4)	6.21 (d, 2.4)	5.93 (d, 2.4)	5.93 (d, 2.4)	6.21 (d, 2.0)
7	-	-	-	-	-
8	6.39 (d, 2.4)	6.38 (d, 2.4)	5.91 (d, 2.4)	5.90 (d, 1.8)	6.47 (d, 2.0)
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
1'	-	-	-	-	-
2'	7.35 (d, 2.4)	7.79 (dd, 1.8/9.0)	6.75 (d, 7.8)	7.37 (d, 8.4)	7.64 (d, 2.0)
3'	-	6.96 (dd, 2.4/9.0)	-	6.86 (d, 8.4)	-
4'	-	-	-	-	-
5'	6.93 (d, 7.8)	6.96 (dd, 2.4/9.0)	6.97 (d, 1.8)	6.86 (d, 8.4)	6.95 (d, 8.0)
6'	7.32 (dd, 2.4/8.4)	7.79 (dd, 1.8/9.0)	6.79 (dd, 1.8/7.8)	7.37 (d, 8.4)	7.51 (d, 2.0/8.0)

3-O-L-Rham					
1''	5.37 (d, 1.8)	5.37 (d, 1.8)	5.39 (d, 1.8)	4.03 (d, 1.2)	5.33 (d, 2.0)
2''	4.23 (m)	4.23 (m)	3.35 (m)	3.52 (dd, 1.8/3.0)	-
3''	3.43 (m)	3.43 (m)	3.73 (m)	3.3 (d, 10.2)	-
4''	3.36 (m)	3.36 (m)	3.34 (m)	4.27 (m)	-
5''	3.76 (m)	3.76 (m)	4.24 (m)	3.67 (dd, 3.6/9.6)	-
6''	0.96 (d, 6.0)	0.96 (d, 6.0)	0.94 (d, 5.4)	1.20 (d, 6.6)	0.79 (d, 6.0)

^a in CD₃OD, ^b 600 MHz, ^d 400MHz, ^e 100MHz, ⁵: in DMSO-d₆

Phụ lục 4. Dữ liệu phổ ¹³C-NMR của hợp chất 1, 2, 3, 4 và quercitrin

Pos.	1	2	3	4	Quercitrin [5]
	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{d,e}$
Aglycone					
2	159.33	161.59	79.88	83.84	158.6
3	136.24	136.19	67.48	78.69	136.3
4	179.67	179.59	29.25	195.91	179.7
5	163.23	163.21	157.37	165.54	163.3
6	99.81	99.97	96.40	97.52	99.8
7	165.87	166.29	158.0	169.11	165.9
8	94.70	94.85	95.89	96.41	94.7
9	158.54	158.59	157.67	164.13	159.3
10	105.91	105.83	100.08	102.40	105.9
1'	122.98	122.65	132.29	128.64	122.9
2'	116.94	131.89	115.90	130.04	116.4
3'	146.43	116.53	145.94	116.43	146.4
4'	149.81	159.24	145.78	159.46	149.8
5'	116.37	116.53	115.32	116.43	116.4
6'	122.86	131.89	119.40	130.04	123.0
3-O-L-Rham					
1''	103.55	103.51		102.22	103.6
2''	71.91	72.03		71.78	72.1
3''	72.03	72.13		73.78	72.1
4''	73.26	73.20		70.53	73.3
5''	72.13	71.92		72.16	71.9
6''	17.65	17.65		17.84	17.7

^a CD₃OD, ^b 150MHz; ^d 400MHz, ^e 100MHz, ⁵: in DMSO-d₆

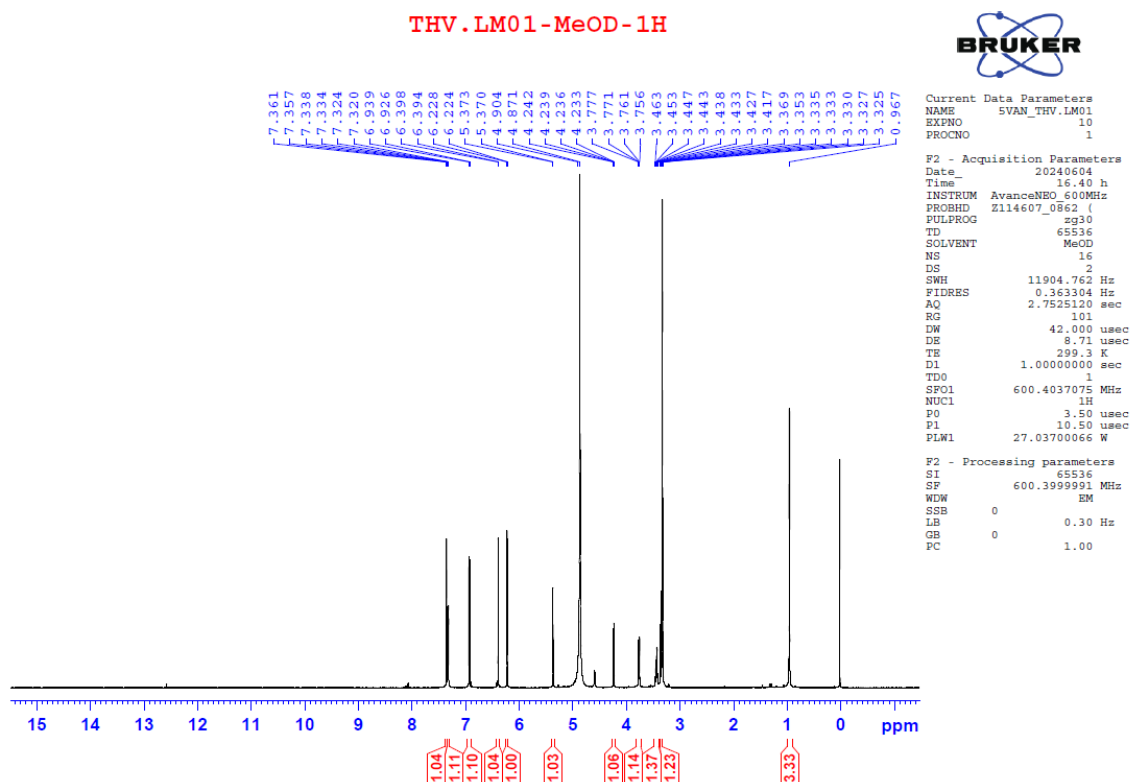
Phụ lục 5. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của 22-O-Tigloyloxycamelliagenin A

Pos.	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ mult. (<i>J</i> in Hz)	HMBC
1	38.6	40.03	CH ₂	1.03 (1H, m), 1.67 (1H, m)	C-3, C-5, C-10
2	27.0	27.91	CH ₂	1.58 (1H, m), 1.65 (1H, m)	C-3, C-4
3	79.0	79.70	CH	3.18 (1H, dd, 4.8/11.4)	C-1, C-4, C-23, C-24
4	38.8	41.00	C	-	
5	55.5	56.79	CH	0.78 (1H, br s)	C-1, C-23, C-24, C-25
6	18.2	19.47	CH ₂	1.45 (1H, m), 1.59 (1H, m)	C-4
7	32.7	33.98	CH ₂	1.37 (1H, m), 1.62 (1H, m)	C-26
8	39.7	39.86	C	-	
9	46.6	48.09	CH	1.70 (1H, m)	C-25, C-26
10	36.9	38.05	C	-	
11	23.3	24.63	CH ₂	1.95 (2H, m)	C-9
12	124.1	124.51	CH	5.36 (1H, t, 3.6/7.2)	C-9, C-14, C-19, C-27
13	141.6	144.0	C	-	
14	41.4	42.45	C	-	
15	33.1	35.28	CH ₂	1.36 (1H, m), 1.77 (1H, m)	C-27
16	71.0	70.99	CH	4.13 (1H, br s)	C-22, C-28
17	45.0	45.32	C	-	
18	42.4	41.76	CH	2.55 (1H, m)	C-22, C-28
19	46.9	48.04	CH ₂	1.08 (1H, m), 2.48 (1H, m)	C-30
20	31.6	32.50	C	-	
21	42.1	42.07	CH ₂	1.58 (1H, m), 2.28 (1H, m)	C-29, C-30
22	72.4	73.92	CH	5.45 (1H, dd, 6.0/12.0)	C-1', C-16, C-17, C-18, C-21, C-28
23	15.6	16.31	CH ₃	0.80 (3H, s)	C-4, C-24, C-25
24	28.1	28.72	CH ₃	1.00 (3H, s)	C-4, C-25
25	16.7	16.15	CH ₃	1.00 (3H, s)	C-4, C-8, C-9
26	16.1	17.30	CH ₃	0.98 (3H, s)	C-7

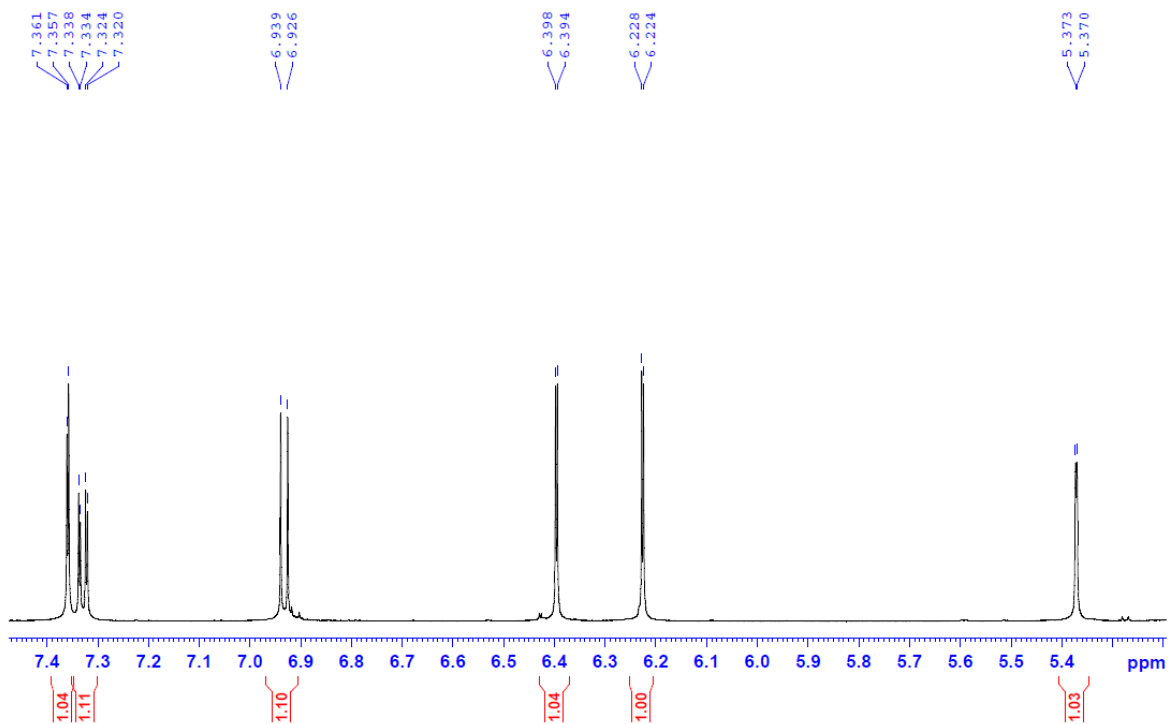
27	27.0	27.72	CH ₃	1.50 (3H, s)	C-13, C-14, C-15
28	64.6	64.84	CH ₂	3.08 (1H, m), 3.29 (1H, m)	C-17, C-18, C-22
29	33.0	33.59	CH ₃	0.93 (3H, s)	C-19, C-20, C-21
30	24.6	25.25	CH ₃	1.92 (3H, s)	C-19, C-20, C-21
1'	168.9	169.75	C	-	
2'	128.5	129.98	C	-	
3'	138.1	138.08	CH	6.08 (1H, m)	C-5'
4'	12.1	15.92	CH ₃	1.99 (3H, 3H, d, 7.2)	C-2', C-3'
5'	14.5	20.91	CH ₃	1.92 (3H, s)	C-3'

^arecorded in CD₃OD, ^b150 MHz, ^c600 MHz. $\delta_C^{\#}$: 22-O-Tigloyloxycamelliagenin A (in CDCl₃)

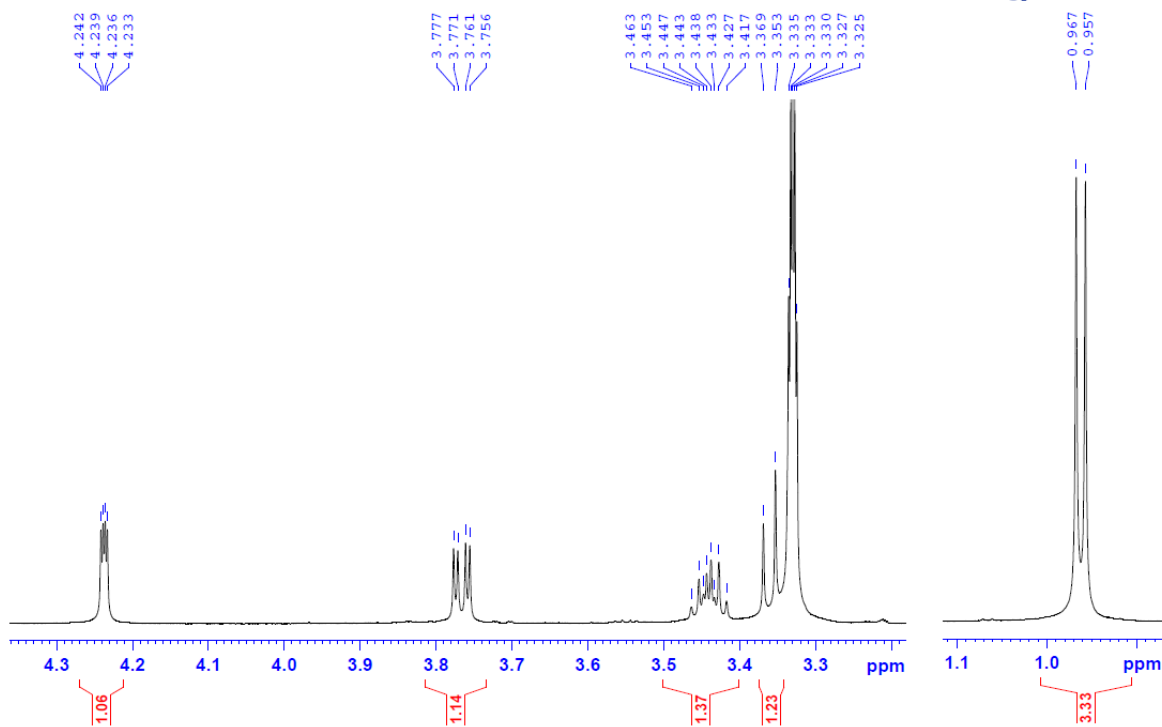
Phụ lục 6. Hình ảnh phổ ¹H-NMR:



THV.LM01-MeOD-1H

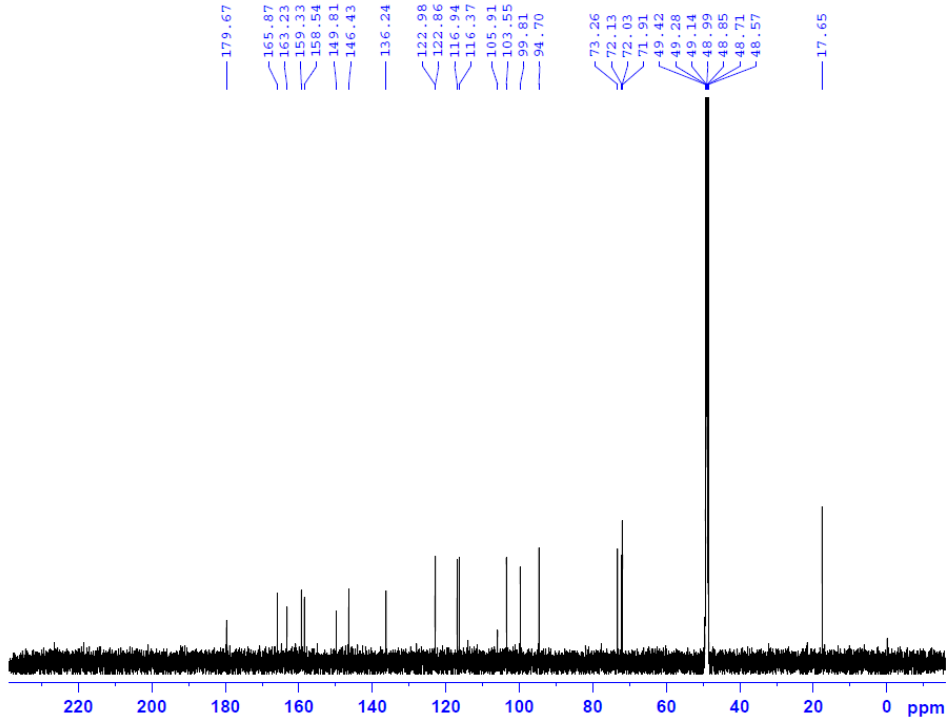


THV.LM01-MeOD-1H



Phụ lục 7. Hình ảnh phổ ^{13}C -NMR:

THV.LM01-MeOD-C13CPD



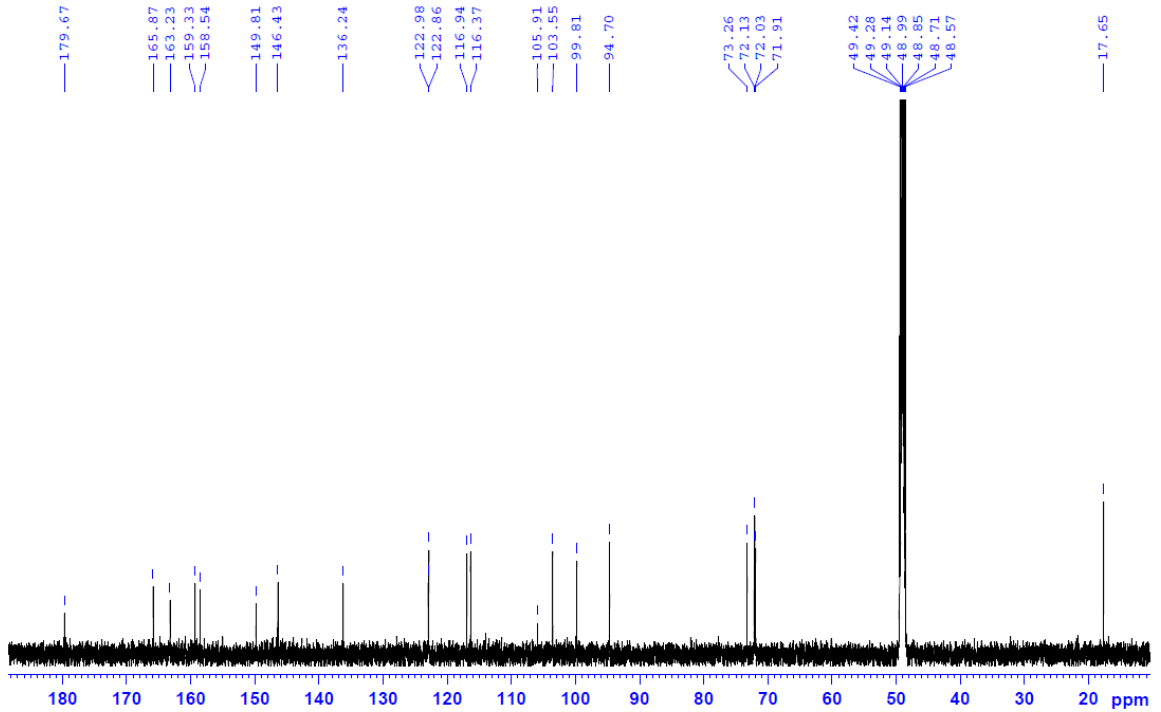
```

Current Data Parameters
NAME      SVAN_THV.LM01
EXPNO    2
PROCNO   1

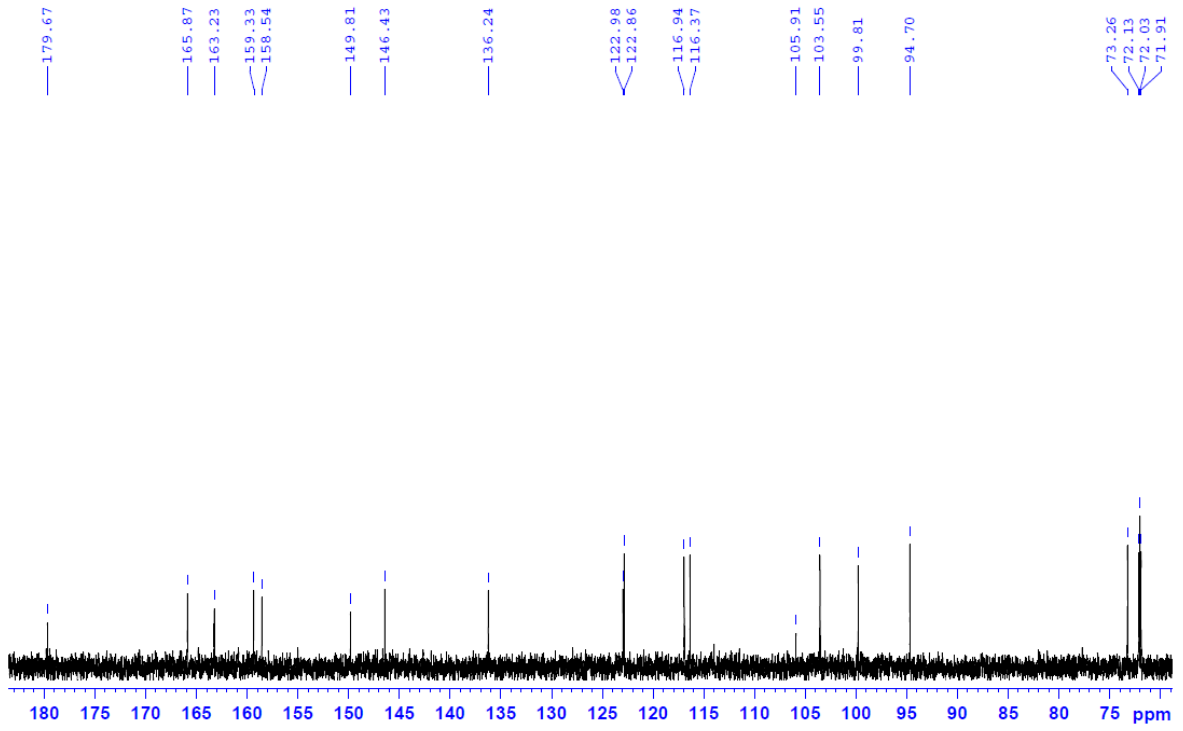
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20240604
Time     17.38 h
INSTRUM  AvanceNBO 600MHz
PROBHD   Z114607_0862
PULPROG  zgpg30
TD       65536
SOLVENT  MeOD
NS       512
DS       4
SWH      38461.539 Hz
FIDRES   1.173753 Hz
AQ       0.8519680 sec
RG       101
DW       13.000 usec
DE       6.50 usec
TE       300.1 K
D1       2.00000000 sec
D11      0.03000000 sec
TDO      0
SFO1     150.9873069 MHz
NUC1     13C
P0       4.20 usec
P1       12.60 usec
PLW1     86.32800393 W
SFO2     600.4024016 MHz
NUC2     1H
CPDPRG2  waltz65
PCPD2    80.00 usec
PLW2     27.03700066 W
PLW12    0.46575001 W
PLW13    0.30599001 W

F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       150.9707001 MHz
WMW      EM
SB       0
LB       1.00 Hz
GB       0
PC       1.40
    
```

THV.LM01-MeOD-C13CPD

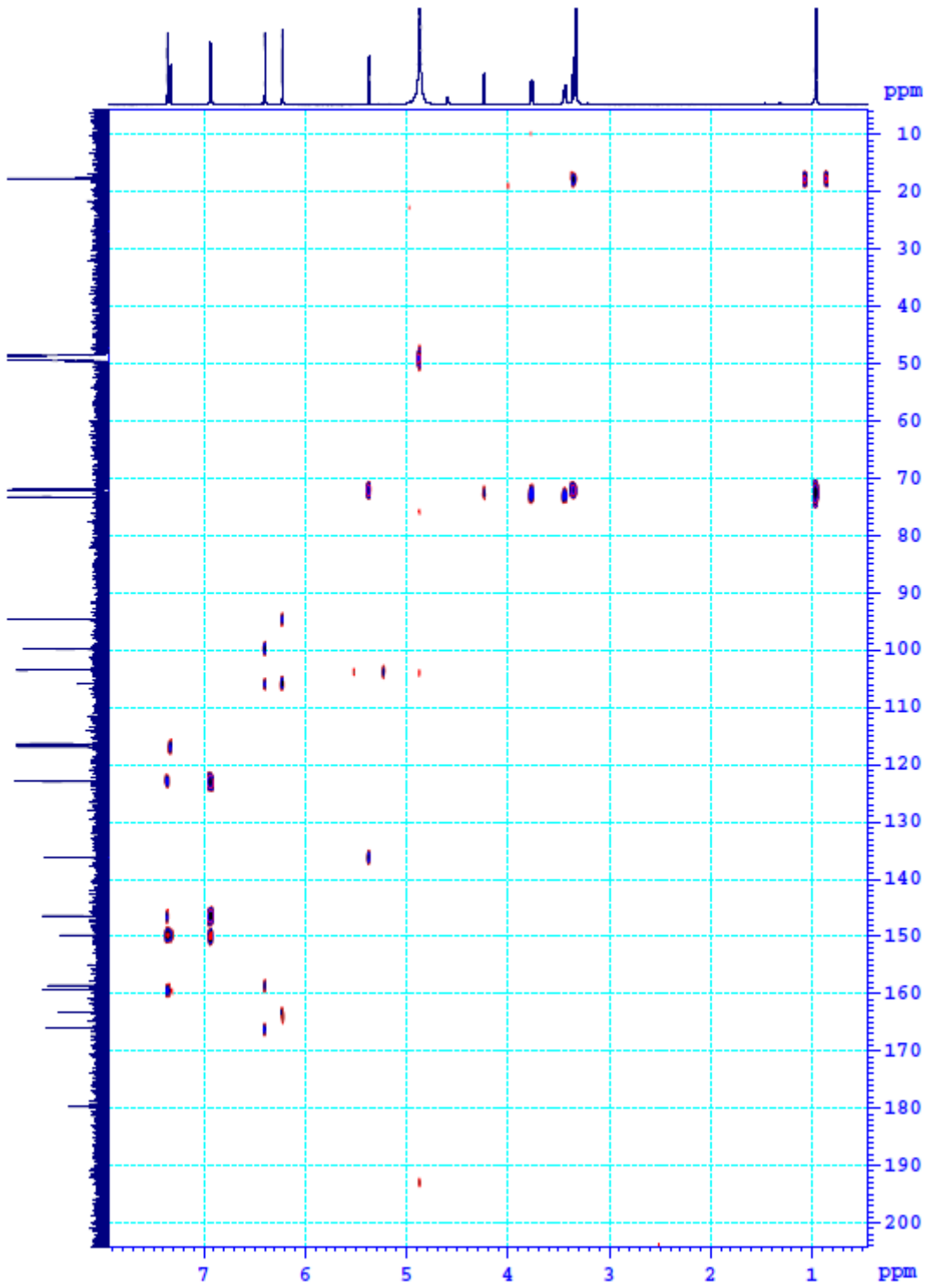


THV.LM01-MeOD-C13CPD



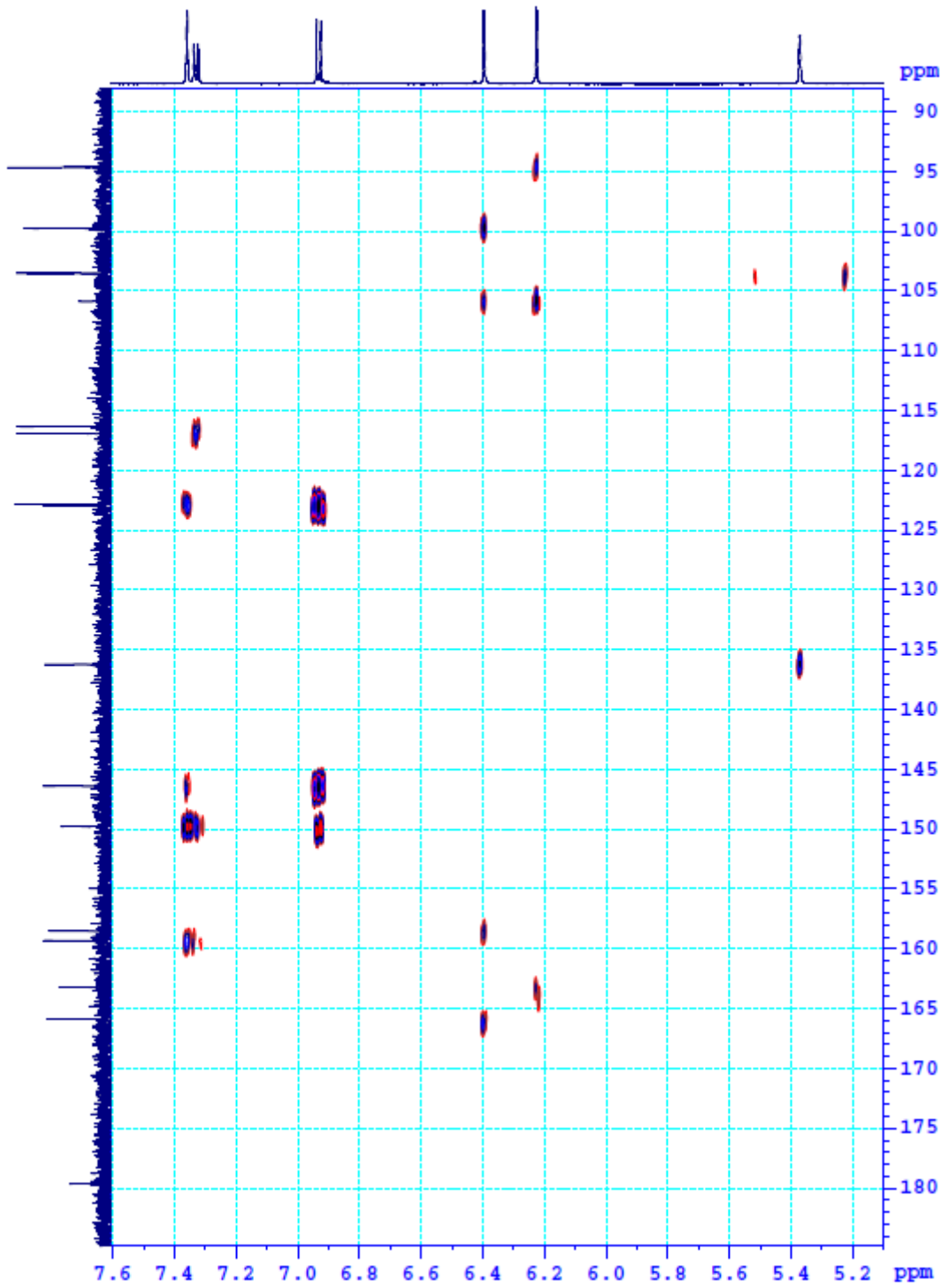
Phụ lục 8. Hình ảnh phổ HMBC:

THV.LM01-MeOD-HMBC

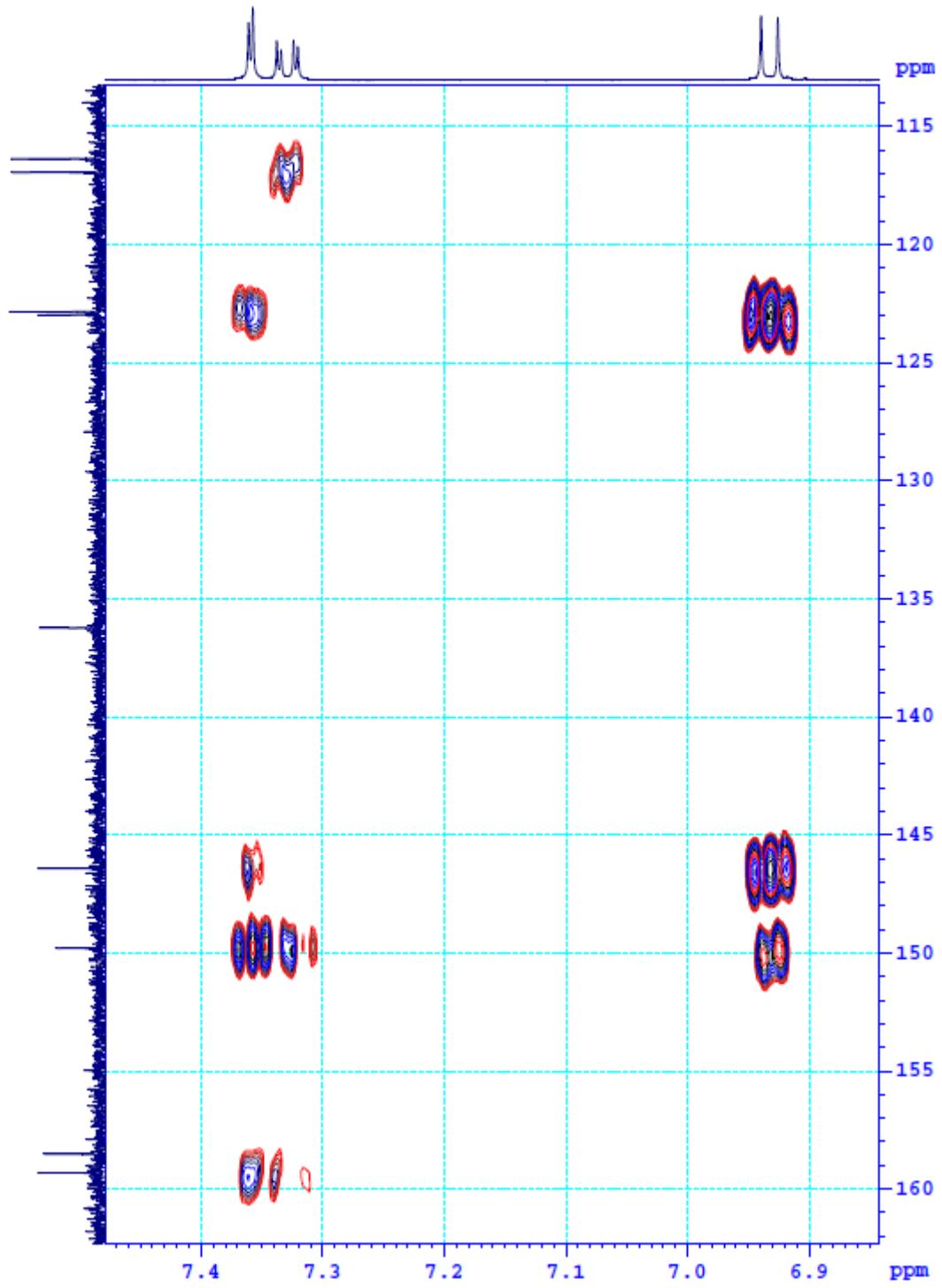


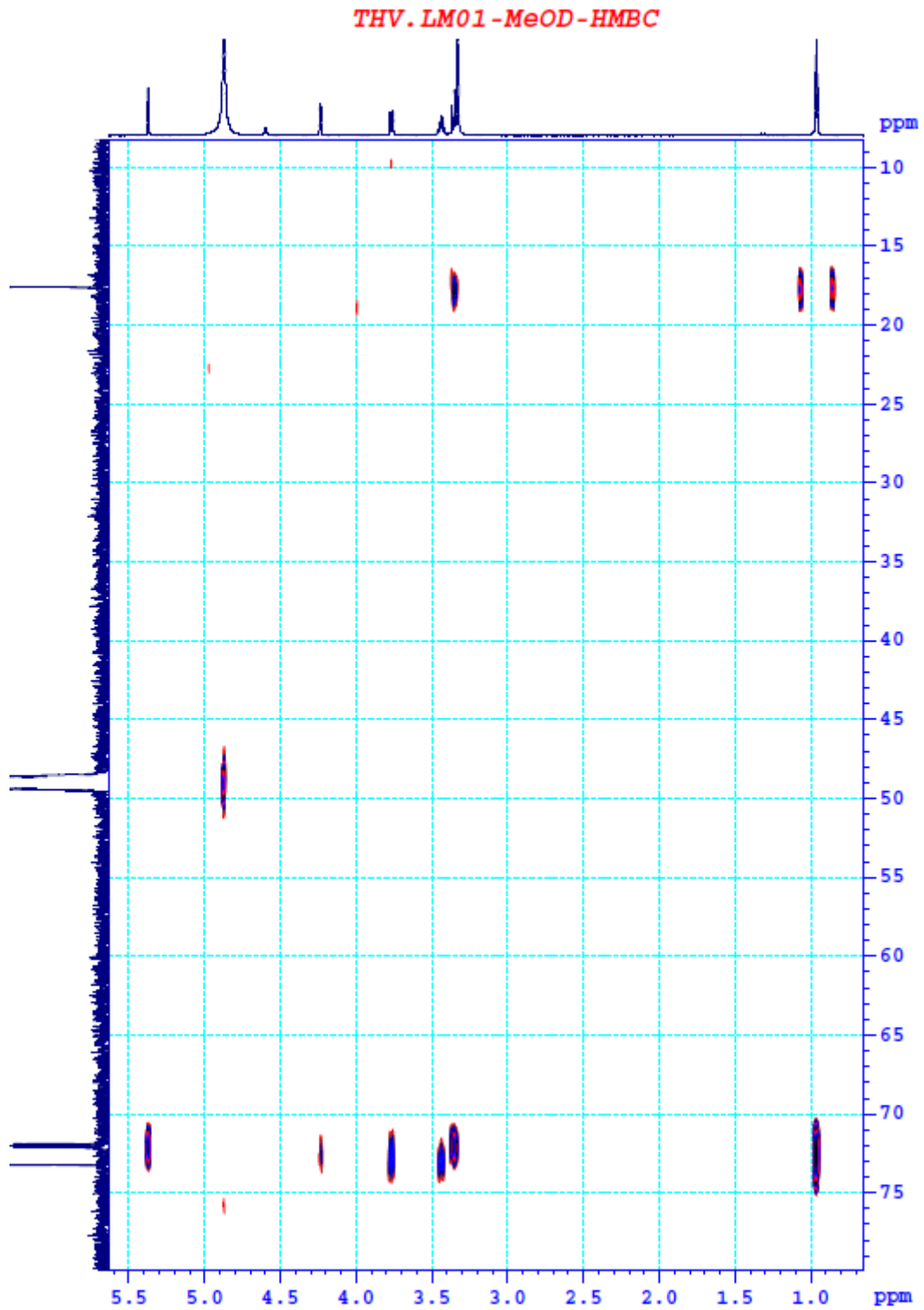
PL11

THV.LM01-MeOD-HMBC



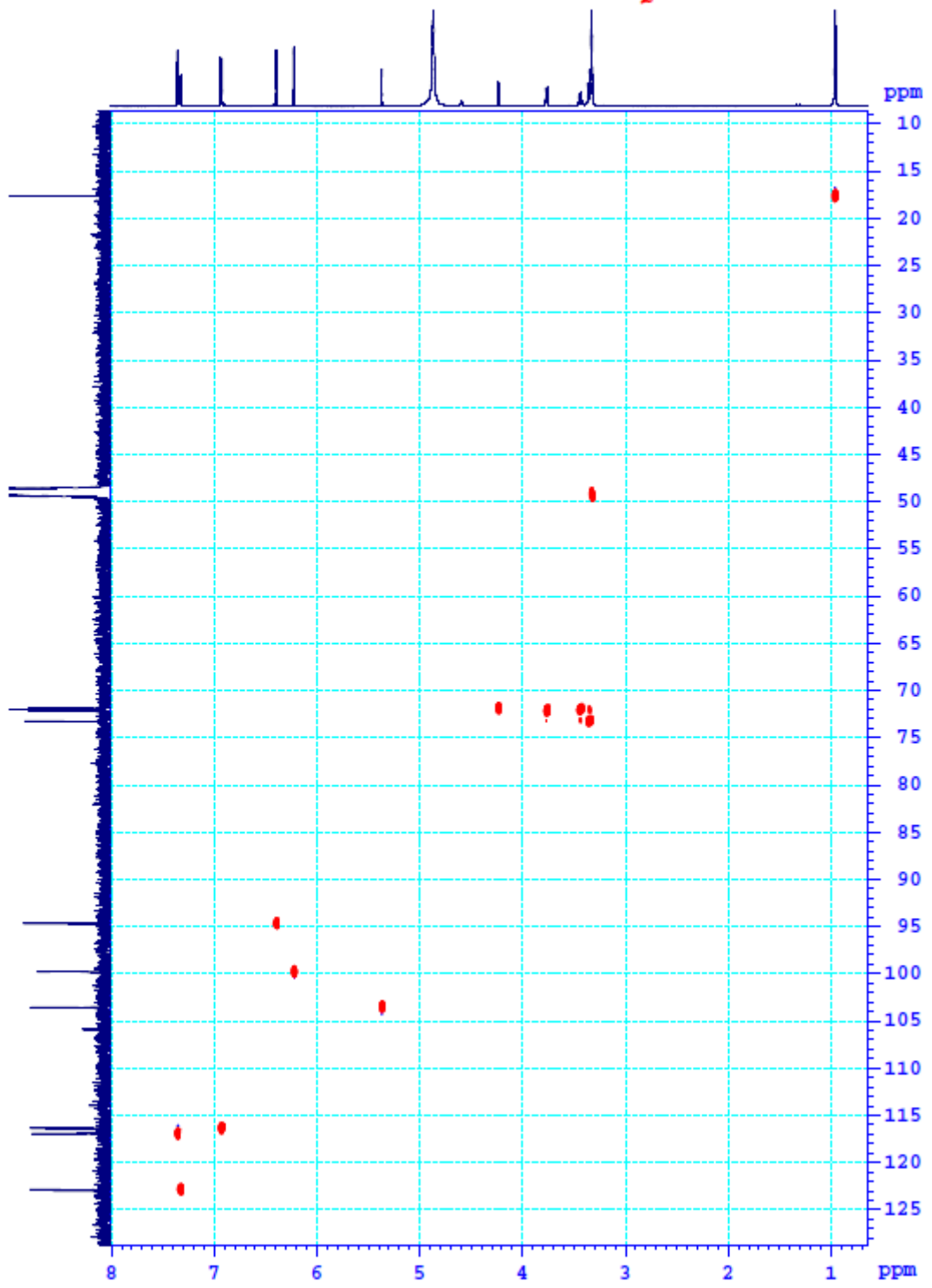
THV.LM01-MeOD-HMBC



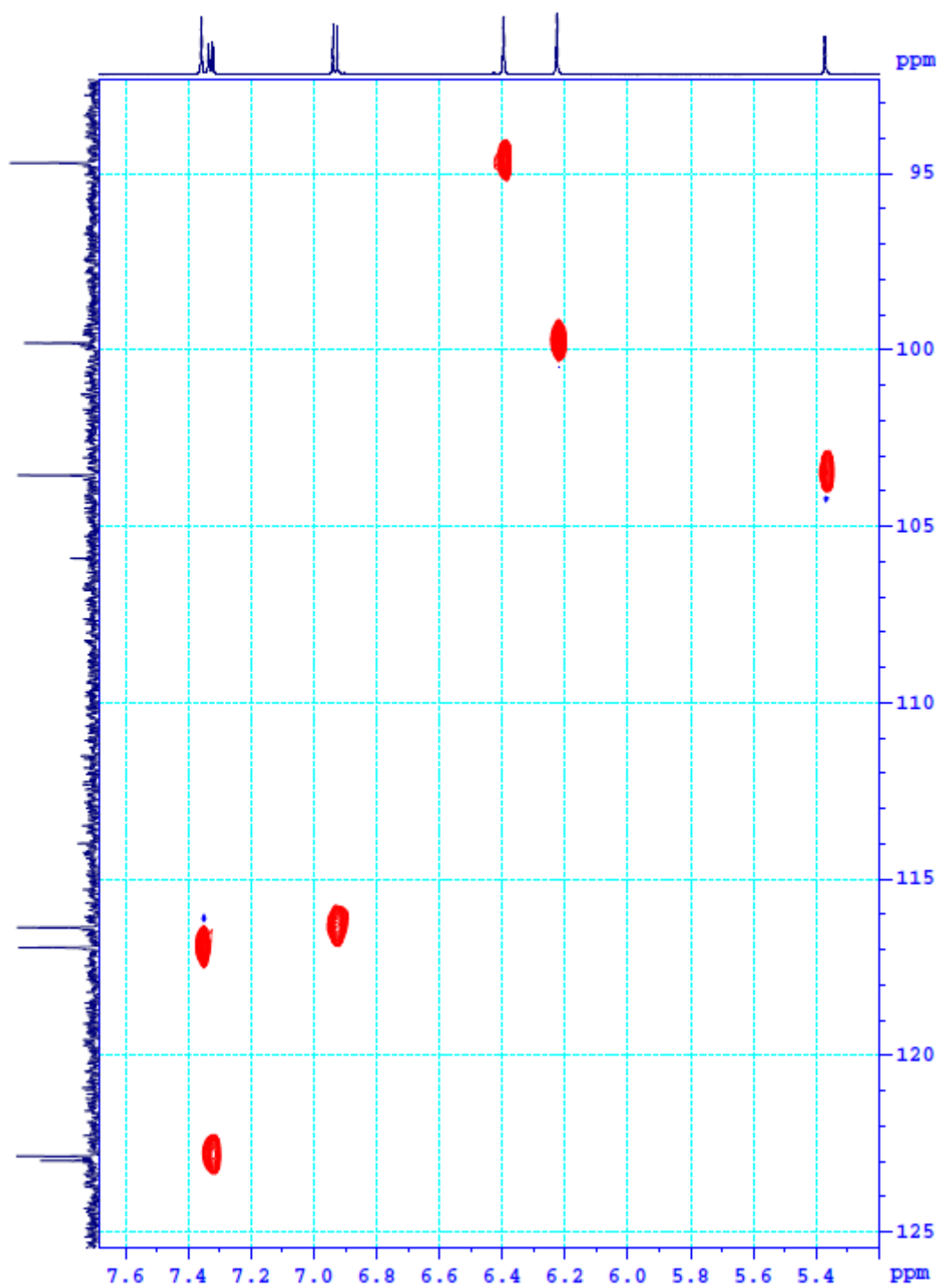


Phụ lục 9. Hình ảnh phổ HSCQ:

THV.LM01-MeOD-HSQC



THV.LM01-MeOD-HSQC



THV.LM01-MeOD-HSQC

