

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Vũ Thanh Tùng

**SÀNG LỌC VÀ NGHIÊN CỨU CÁC ĐIỀU KIỆN TĂNG
KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP LOVASTATIN TỪ
CHỦNG NẤM *RHIZOPUS* SP. PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

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



Vũ Thanh Tùng

**SÀNG LỌC VÀ NGHIÊN CỨU CÁC ĐIỀU KIỆN
TĂNG KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP LOVASTATIN
TỪ CHỨNG NẤM *RHIZOPUS* SP. PHÂN LẬP Ở
VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

1. TS. Nguyễn Thị Trung

2. PGS.TS. Đỗ Thị Tuyên

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. 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.

Tác giả luận văn



Vũ Thanh Tùng

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến TS. Nguyễn Thị Trung, Phó Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Cô không chỉ là người hướng dẫn tận tình mà còn là người đã tạo mọi điều kiện thuận lợi, cung cấp kinh phí để tôi hoàn thành đề tài luận văn này. Nhờ những định hướng và góp ý quý báu của thầy, tôi đã có những bước tiến quan trọng trong nghiên cứu.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành đến PGS.TS. Đỗ Thị Tuyên, Trưởng phòng Công nghệ sinh học enzyme, Viện Công nghệ sinh học. Nhờ sự hướng dẫn tận tâm và những chia sẻ kinh nghiệm quý báu của cô, tôi đã hoàn thành luận văn một cách tốt đẹp.

Khóa luận này được thực hiện nhờ kinh phí của đề tài “Sàng lọc, chiết xuất, tinh sạch và xác định cấu trúc của một số hợp chất thứ cấp định hướng ứng dụng trong điều trị bệnh mỡ máu từ chủng nấm phân lập ở Việt Nam” (Mã số: KHCBSS.01/23-25).

Tôi xin trân trọng cảm ơn tập thể Phòng Công nghệ sinh học Enzyme đã luôn hỗ trợ, chia sẻ kinh nghiệm và tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong quá trình thực hiện thí nghiệm. Đồng thời, tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến các thầy cô giáo Khoa Sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ đã luôn quan tâm, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình và bạn bè, những người luôn đồng hành, động viên tôi trong suốt thời gian qua.

Hà Nội, ngày 14 tháng 11 năm 2024

Học viên cao học



Vũ Thanh Tùng

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
CVD	Cardiovascular Disease	Bệnh tim mạch
HDL	High density lipoprotein	Lipoprotein mật độ cao
HMG-CoA reductase	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
LDL	Low density lipoprotein	Lipoprotein mật độ thấp
SEM	Canning Electron Microscope	Kính hiển vi điện tử quét
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng
WHO	The World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Bệnh lý mỡ máu, tim mạch	3
1.1.1. Khái niệm	3
1.1.2. Cơ chế phát sinh bệnh.....	3
1.1.3. Các nguyên tắc điều trị bệnh lý mỡ máu, tim mạch	5
1.2. Enzyme HMG – CoA reductase	6
1.2.1. Giới thiệu chung về enzyme HMG – CoA reductase	6
1.2.2. Cấu trúc của enzyme HMG – CoA reductase	6
1.2.3. Vai trò của enzyme HMG – CoA reductase	6
1.3. Chất ức chế enzyme HMG – CoA.....	7
1.3.1. Khái niệm và vai trò của các chất ức chế enzyme HMG – CoA.	7
1.3.2. Phân loại statin.....	9
1.3.3. Tính chất và ưu điểm của statin tự nhiên – lovastatin	9
1.4. Chủng nấm sợi <i>Rhizopus</i> sp.	11
1.4.1. Phân loại sinh học	11
1.4.2. Đặc điểm sinh học	12
1.4.3. Vai trò của <i>Rhizopus</i>	13
1.5. Tình hình nghiên cứu trong nước và thế giới.....	16
Chương 2: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.1. VẬT LIỆU VÀ CHŨNG GIỐNG.....	19
2.2. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ	19
2.2.1. Hóa chất	19
2.2.2. Thiết bị.....	19
2.2.3. Môi trường.....	20
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.3.1. Nuôi cấy các chủng nấm <i>Rhizopus</i> sp.	21
2.3.2. Phương pháp ức chế nấm men [4, 57]	21
2.3.3. Phương pháp xác định đặc điểm hình thái	21
2.3.4. Tách chiết DNA tổng số của nấm	21
2.3.5. Phản ứng PCR khuếch đại vùng gene 28S.....	22
2.3.6. Tinh sạch sản phẩm PCR	22
2.3.7. Định danh chủng.....	22

2.3.8.	<i>Lựa chọn môi trường khác nhau</i>	22
2.3.9.	<i>Phương pháp sắc ký lớp mỏng</i>	23
2.3.10.	<i>Định lượng lovastatin bằng HPLC</i>	23
2.3.11.	<i>Nghiên cứu các điều kiện tinh sạch</i>	24
2.3.12.	<i>Tinh sạch qua cột silica gel [60]</i>	24
2.3.13.	<i>Phương pháp xử lý số liệu</i>	24
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN		25
3.1	Chọn lọc các chủng nấm <i>Rhizopus</i> sp. có khả năng sinh tổng hợp lovastatin cao.....	25
3.1.1	<i>Tuyển chọn các chủng bằng sắc ký lớp mỏng</i>	25
3.1.2	<i>Định lượng Lovastatin bằng HPLC</i>	29
3.1.3	<i>Hoạt tính kháng nấm của các chủng Rhizopus sp.</i>	30
3.1.4	<i>Định danh chủng Rhizopus sp. BMM 313</i>	33
3.2	Khảo sát môi trường tăng khả năng sinh tổng hợp lovastatin của chủng <i>Rhizopus microsporus</i> BMM 313.....	33
3.3	Bước đầu nghiên cứu các điều kiện thu nhận, tinh sạch lovastatin từ chủng <i>Rhizopus</i> sp.	37
3.3.1	<i>Lựa chọn hệ dung môi pha động chạy sắc ký cột silica gel</i>	37
3.3.2	<i>Kết quả tinh sạch lovastatin</i>	39
3.4	Nghiên cứu và đánh giá hoạt tính ức chế vi sinh vật của lovastatin tách ra từ chủng nấm <i>Rhizopus</i> sp.....	43
KẾT LUẬN.....		45
KIẾN NGHỊ.....		46
TÀI LIỆU THAM KHẢO		47
PHỤ LỤC		1

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Danh sách hóa chất sử dụng trong thí nghiệm.....	19
Bảng 2.2. Danh sách thiết bị sử dụng trong thí nghiệm	20
Bảng 2.3. Các môi trường dùng trong thí nghiệm	20
Bảng 3.1. Đường kính vòng kháng nấm <i>Saccharomyces</i> sp. của các mẫu dịch chiết ethyl acetate	31
Bảng 3.2. Đường kính vòng kháng nấm <i>Candida albicans</i> của các mẫu dịch chiết ethyl acetate	32
Bảng 3.3. Kết quả so sánh trình tự gen 28S rRNA của chủng <i>Rhizopus</i> sp. BMM 313 với gen tương ứng của các chủng <i>Rhizopus</i> sp. được đăng ký trên GenBank	33
Bảng 3.4. Hàm lượng lovastatin trong các môi trường	35

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc của phân tử cholesterol	4
Hình 1.2. Cơ chế phát sinh bệnh lý mỡ máu, tim mạch.....	5
Hình 1.3. Quá trình tổng hợp cholesterol trong cơ thể	7
Hình 1.4. Cơ chế hoạt động của statins	8
Hình 1.5. Lovastatin có cấu trúc tương tự như HMG-CoA	11
Hình 1.6. Hai dạng tồn tại của lovastatin	11
Hình 1.7. Nấm <i>Rhizopus</i> sp. mọc trên đĩa petri	13
Hình 1.8. Nấm <i>Rhizopus</i> sp. phát triển gây thối rữa hoa quả.....	15
Hình 3.1. Hình ảnh khuẩn lạc (A) và sắc ký lớp mỏng (B) của các mẫu dịch chiết ethyl acetate có chứa lovastatin ức chế enzyme HMG-CoA reductase từ các chủng <i>Rhizopus</i> sp.....	25
Hình 3.2. Hình thái khuẩn lạc trên môi trường PDA chuẩn (A) và sợi nấm (B) của ba chủng <i>Rhizopus</i> sp. BMM 313, <i>Rhizopus</i> sp. 5154 và <i>Rhizopus</i> sp.5280 trên kính hiển vi quang học 1000x có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất ức chế enzyme HMG-CoA reductase	27
Hình 3.3. Đặc điểm vi thể của chủng <i>Rhizopus microsporus</i> 5280 có khả năng sinh tổng hợp lovastatin (chất ức chế enzyme HMG-CoA reductase) trên môi trường PDA ((A): Sợi nấm chủng <i>Rhizopus microsporus</i> 5280 trên kính hiển vi quang học 1000 x; (B): Hình ảnh SEM của chủng <i>Rhizopus microsporus</i> 5280	28
Hình 3.4. Đặc điểm vi thể của chủng <i>Rhizopus microsporus</i> BMM 313 có khả năng sinh tổng hợp lovastatin (chất ức chế enzyme HMG-CoA reductase) trên môi trường PDA (A): Sợi nấm chủng <i>Rhizopus microsporus</i> BMM 313 trên kính hiển vi quang học 1000 x; (B): Tế bào (thanh chèn 10 µm) của chủng <i>Rhizopus microsporus</i> BMM 313.....	28
Hình 3.5. Sắc đồ HPLC của lovastatin từ mẫu dịch chiết chủng nấm <i>R. microsporus</i> ((A): Đường chuẩn có sử dụng lovastatin (Sigma); (B) sắc ký đồ lovastatin chuẩn (Sigma); (C) mẫu lovastatin từ dịch chiết ethyl acetate của chủng <i>R. microsporus</i> 5280; (D) mẫu lovastatin từ dịch chiết ethyl acetate của chủng <i>R. microsporus</i> 5154; (E) mẫu lovastatin từ dịch chiết ethyl acetate của chủng <i>R. microsporus</i> BMM 313)	29
Hình 3.6. Khả năng kháng nấm men của dịch chiết ethyl acetate chứa lovastatin thu nhận từ các chủng <i>Rhizopus</i> sp. ((+): lovastatin chuẩn; (-): ethyl acetate; 313, 5154, 5155, 5278, 5280: là dịch chiết ethyl acetate của các chủng <i>Rhizopus</i> sp.).....	30
Hình 3.7. Khả năng kháng nấm <i>Candida albicans</i> của dịch chiết ethyl acetate chứa lovastatin thu nhận từ các chủng <i>Rhizopus</i> sp. ((+): đối chứng lovastatin; 313, 5154, 5155, 5278, 5280: là dịch chiết chứa hoạt chất lovastatin của các chủng <i>Rhizopus</i> sp.).....	32
Hình 3.8. Sắc ký đồ TLC của 6 mẫu dịch chiết ethyl acetate từ chủng <i>R. microsporus</i> BMM 313 nuôi trong 6 môi trường lên men khác nhau.....	34

Hình 3.9. Khả năng phân tách chất của 5 hệ dung môi (C: đối chứng lovastatin, 313: Dịch chiết ethyl acetate chủng <i>Rhizopus microsporus</i> BMM 313).....	38
Hình 3.10. Sắc ký đồ TLC 20 phân đoạn tinh sạch từ chủng <i>R. microsporus</i> BMM 313 sau khi qua cột silicagel (C: lovastatin chuẩn, 313: dịch chiết ethyl acetate trước khi lên cột; 1-20: các phân đoạn tinh sạch từ phân đoạn 1 đến phân đoạn 20).....	40
Hình 3.11. Sắc đồ dịch chiết chủng ethyl acetate <i>Rhizopus microsporus</i> BMM 313 trước khi tinh sạch.....	42
Hình 3.12. Sắc đồ phân đoạn sạch 11.....	42
Hình 3.13. Sắc đồ phân đoạn sạch 12.....	42
Hình 3.14. Khả năng kháng nấm <i>Saccharomyces</i> sp. (A) và <i>Candida albicans</i> (B) của 2 mẫu phân đoạn sau khi qua cột silica gel 60. ((+): đối chứng lovastatin; (-): đối chứng âm ethyl acetate 11, 12: phân đoạn 11 và 12)	43

MỞ ĐẦU

Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) báo cáo rằng gần 17,3 triệu người đã tử vong do bệnh tim mạch (CVD) vào năm 2008 và hơn 80% số ca tử vong do CVD phổ biến ở các nước thu nhập thấp và trung bình. WHO cũng ước tính rằng hơn 23,6 triệu người sẽ chết vào năm 2030 do CVD (WHO, 2012). Các bệnh tim mạch là do sử dụng thuốc lá và tăng cholesterol máu. Tăng cholesterol máu là một trong những nguyên nhân chính của các bệnh tim mạch, khi cholesterol lắng đọng trong các mạch máu. Tăng cholesterol máu được điều trị bằng thuốc để giảm lipoprotein mật độ thấp, khi chế độ ăn uống và tập thể dục không đủ.

Lovastatin được biết đến với khả năng giảm cholesterol trong máu và ngăn ngừa các bệnh lý tim mạch. Đây là thành phần chính của nhiều loại thuốc hạ lipid máu, đặc biệt là statin, vì chúng ức chế enzyme HMG-CoA reductase, enzyme tại gan chịu trách nhiệm tổng hợp cholesterol. Trong công nghiệp, lovastatin chủ yếu được sản xuất thông qua quá trình lên men sinh học nhờ các vi sinh vật, đặc biệt là từ các loài nấm như *Aspergillus terreus* và *Monascus ruber* [1-3]. Tuy nhiên, để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của thị trường, các nhà khoa học không ngừng tìm kiếm những chủng nấm mới có năng suất cao hơn và khả năng thích nghi tốt hơn với điều kiện nuôi cấy. Việt Nam, với hệ sinh thái đa dạng, được xem là một nguồn gen quý giá cho việc nghiên cứu và phát triển các chủng nấm sinh tổng hợp các hoạt chất quý như lovastatin.

Chi nấm *Rhizopus*, thuộc nhóm nấm sợi Mucorales, là một trong những đối tượng tiềm năng trong việc nghiên cứu và khai thác các hợp chất sinh học có giá trị. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các chủng nấm thuộc chi này có khả năng sinh tổng hợp lovastatin. Ở Việt Nam, nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất quý từ chủng *Rhizopus sp.* còn nhiều hạn chế, đặc biệt là khả năng sinh tổng hợp hoạt chất lovastatin. Một số nghiên cứu gần đây mới chỉ phân lập được các chủng *Monascus sp.* sinh tổng hợp lovastatin [4, 5], nâng cao khả năng sinh tổng hợp lovastatin từ chủng *Aspergillus terreus* bằng công nghệ lên

men hay bằng kỹ thuật đột biến từ chủng *Aspergillus terreus* [6]. Do đó, đề tài "**Sàng lọc và nghiên cứu các điều kiện tăng khả năng sinh tổng hợp lovastatin từ chủng nấm *Rhizopus sp.* phân lập ở Việt Nam**" được thực hiện với mục tiêu chính là tìm kiếm các chủng nấm *Rhizopus sp.* có khả năng sinh tổng hợp lovastatin cao, nghiên cứu các môi trường nuôi cấy nhằm nâng cao năng suất sinh tổng hợp lovastatin và bước đầu tinh sạch sơ bộ đánh giá hoạt tính ức chế vi sinh vật của hoạt chất lovastatin từ chủng *Rhizopus sp.* đã được tuyển chọn.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Bệnh lý mỡ máu, tim mạch

1.1.1. Khái niệm

Mỡ máu là tình trạng rối loạn chuyển hóa lipid trong máu, biểu hiện bằng sự tăng cao bất thường của cholesterol xấu (LDL) và triglyceride. Những chất béo này khi tích tụ trong thành mạch sẽ gây ra xơ vữa động mạch, làm tăng nguy cơ mắc các bệnh tim mạch như đau thắt ngực, nhồi máu cơ tim và đột quỵ. Ngược lại, cholesterol tốt (HDL) có tác dụng bảo vệ tim mạch [7].

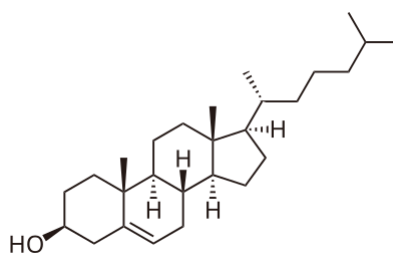
Bệnh lý tim mạch là nhóm các bệnh liên quan đến tim và hệ mạch máu, bao gồm bệnh động mạch vành, tăng huyết áp, đột quỵ, và suy tim. Đây là những bệnh lý nghiêm trọng, có thể dẫn đến tử vong hoặc tàn phế nếu không được phát hiện và điều trị kịp thời. Các yếu tố nguy cơ chính của bệnh tim mạch bao gồm mỡ máu cao, tăng huyết áp, tiểu đường, hút thuốc lá, và lối sống ít vận động [7].

1.1.2. Cơ chế phát sinh bệnh

Bệnh lý mỡ máu và bệnh tim mạch thường song hành với nhau, trở thành một mối đe dọa nghiêm trọng đối với sức khỏe con người. Đối với bệnh lý mỡ máu, nồng độ các loại chất béo trong máu, đặc biệt là cholesterol và triglyceride, tăng cao hơn mức bình thường. Mỡ máu cao là một yếu tố nguy cơ chính, góp phần đáng kể vào sự phát triển của các bệnh lý tim mạch nguy hiểm như nhồi máu cơ tim và đột quỵ [7].

Cholesterol là một chất hóa học hữu cơ quan trọng, đóng vai trò thiết yếu trong quá trình chuyển hóa của cơ thể và vận chuyển qua màng. Cholesterol là một sterol đặc trưng bởi có bốn vòng trong công thức cấu tạo. Cấu trúc bốn vòng này tạo ra độ cứng cho phân tử cholesterol, khiến nó trở thành thành phần lý tưởng của màng tế bào. Vì phân tử cholesterol có nhiều liên kết carbon – carbon và carbon – hydro nên phân tử này hầu như không hòa tan trong nước [8]. Vì lý do này các tế bào phải có khả năng duy trì cholesterol ở phạm vi hẹp sao cho lượng cholesterol được sản xuất đủ cho nhu cầu của tế bào và tránh sự

tích tụ quá mức độc hại của cholesterol. Sự tích tụ quá nhiều cholesterol có thể gây độc ở cấp độ tế bào. Cholesterol thực sự cần thiết cho sự sống, một trong những vai trò quan trọng nhất của cholesterol là duy trì tính lưu động tối ưu của màng tế bào. Cholesterol là tiền thân của các phân tử rất quan trọng như hormone steroid. Ngoài ra cholesterol còn giúp gan sản xuất mật, hỗ trợ tiêu hóa và dinh dưỡng bằng cách hòa tan chất béo trong chế độ ăn uống và vitamin tan trong chất béo. Cuối cùng cholesterol có nhiều trong não, được tìm thấy trong vỏ myelin bao quanh các sợi trục giúp truyền tín hiệu thần kinh [9].

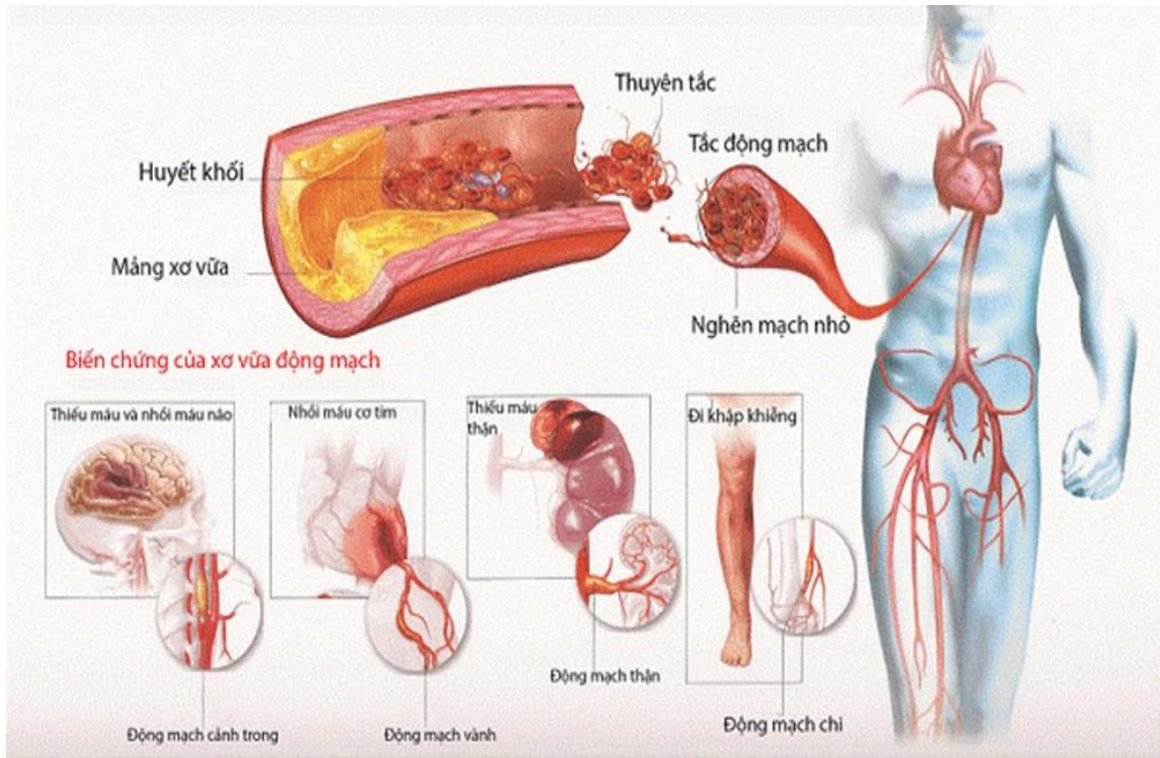


Hình 1.1. Cấu trúc của phân tử cholesterol (Nguồn:

<http://hoathucpham.saodo.edu.vn/nguyen-cuu-trao-doi/cholesterol-va-cach-su-dung-thuc-pham-tranh-gay-ra-cac-benh-lien-quan-den-tac-nghen-dong-mach-196.html>)

Hai loại chính của cholesterol trong máu là LDL cholesterol (low density lipoprotein cholesterol) và HDL cholesterol (high density lipoprotein cholesterol). LDL cholesterol, hay "cholesterol xấu", tác nhân chính trong quá trình hình thành xơ vữa động mạch. Khi nồng độ LDL tăng cao, các phân tử cholesterol này sẽ kết hợp với các chất khác tạo thành các mảng bám bám chặt vào thành mạch máu. Các mảng bám này ngày càng lớn dần, làm hẹp lòng mạch và cản trở dòng chảy máu. Khi một mảng bám bị vỡ, cục máu đông hình thành có thể làm tắc nghẽn hoàn toàn mạch máu, dẫn đến nhồi máu cơ tim hoặc đột quỵ - những biến chứng nguy hiểm có thể đe dọa tính mạng. Ngược lại với LDL cholesterol, HDL cholesterol được ví như một "người bảo vệ" sức khỏe tim mạch. Chiếm khoảng 1/4 đến 1/3 tổng lượng cholesterol trong máu với khả năng vận chuyển cholesterol dư thừa từ các mạch máu về gan để loại bỏ, HDL cholesterol giúp làm sạch thành mạch, ngăn ngừa sự hình thành và phát triển

của các mảng xơ vữa. Nhờ đó, nguy cơ mắc các bệnh tim mạch nguy hiểm như nhồi máu cơ tim và đột quỵ cũng giảm đi đáng kể [10].



Hình 1.2. Cơ chế phát sinh bệnh lý mỡ máu, tim mạch (Nguồn: https://soytecantho.vn/default.aspx?tabid=985&NDID=2693&key=Nhung_dieu_can_biet_ve_benh_xo_vua_dong_mach)

1.1.3. Các nguyên tắc điều trị bệnh lý mỡ máu, tim mạch

Bệnh tim mạch, một căn bệnh không còn xa lạ, đang là mối đe dọa hàng đầu đối với sức khỏe con người trên toàn cầu. Các thống kê đáng báo động cho thấy, bệnh tim mạch là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu, cướp đi sinh mạng của hàng triệu người mỗi năm. Theo các nghiên cứu phòng ngừa sơ cấp, tỷ lệ mắc bệnh tim mạch dao động từ 5-10 trường hợp trên 1000 người trong một năm, một con số thực sự đáng lo ngại [11].

Để kiểm soát tình trạng tăng lipid máu và giảm thiểu nguy cơ mắc bệnh tim mạch, các chuyên gia y tế khuyến cáo nên áp dụng các biện pháp điều trị tích cực. Điều trị bao gồm cả việc thay đổi lối sống lành mạnh như ăn uống cân đối, giàu rau xanh, trái cây, hạn chế chất béo bão hòa và cholesterol, tăng cường hoạt động thể lực đều đặn, và bỏ thuốc lá. Bên cạnh đó, việc sử dụng các loại

thuốc hạ lipid máu cũng rất quan trọng. Các loại thuốc này giúp làm giảm lượng cholesterol xấu trong máu, ngăn ngừa sự hình thành và phát triển của các mảng xơ vữa [11].

1.2. Enzyme HMG – CoA reductase

1.2.1. Giới thiệu chung về enzyme HMG – CoA reductase

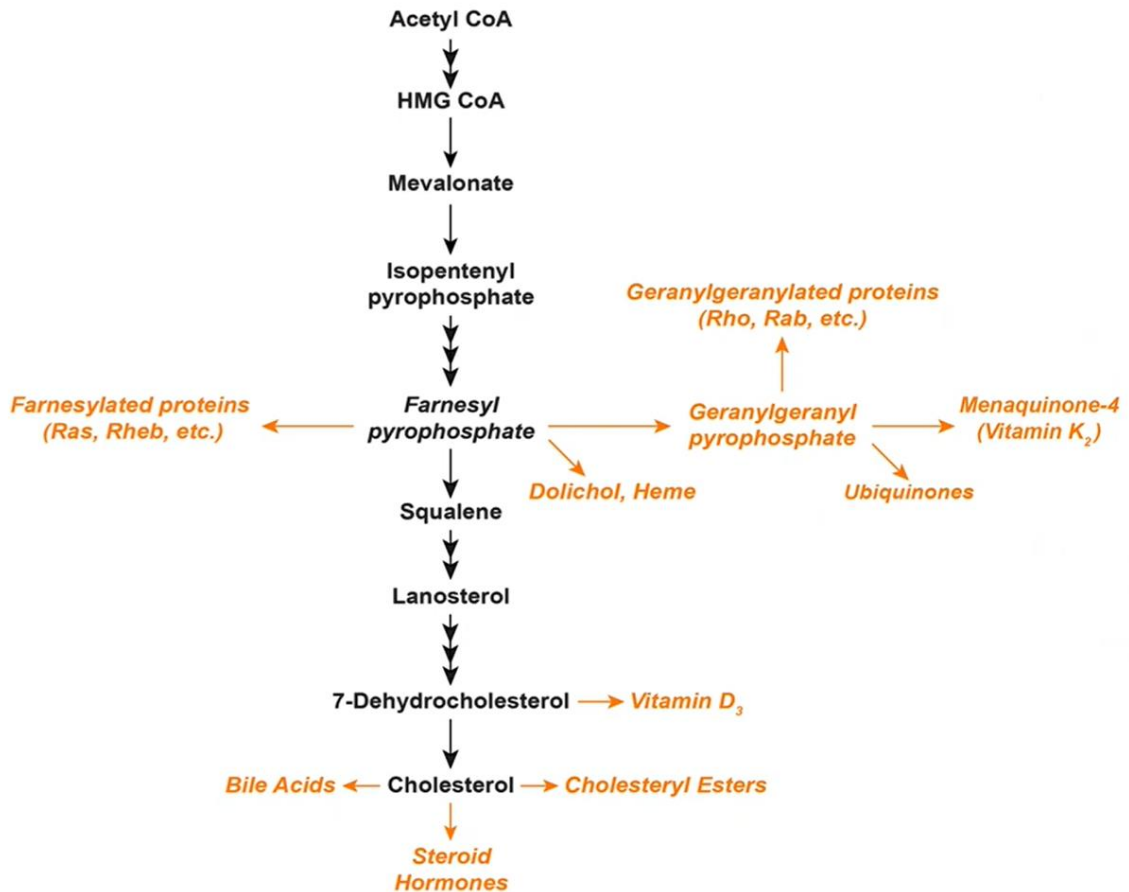
Enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase là một nhân tố không thể thiếu trong quá trình tổng hợp cholesterol và các chất isoprenoid khác. Nó đóng vai trò xúc tác cho phản ứng chuyển đổi HMG-CoA thành mevalonate, một phản ứng oxy hóa khử quan trọng. Phản ứng này được coi là bước hạn chế tốc độ trong quá trình tổng hợp cholesterol, có nghĩa là tốc độ của phản ứng này quyết định tốc độ của toàn bộ quá trình. HMG-CoA reductase có mặt ở cả sinh vật nhân chuẩn và nhân sơ. Các nghiên cứu phân tích hệ thống phát sinh loài đã chia enzyme này thành hai lớp chính. Lớp I bao gồm các enzyme được tìm thấy ở sinh vật nhân chuẩn và một số loài archaea. Lớp II bao gồm các enzyme được tìm thấy ở eubacteria và một số loài archaea khác [12].

1.2.2. Cấu trúc của enzyme HMG – CoA reductase

Enzyme HMG-CoA reductase được neo vào màng của lưới nội chất và từng được cho là có bảy miền xuyên màng. Miền hoạt động của enzyme này được cho là nằm trong một miền dài ở đầu carboxyl, nằm trong tế bào chất. Tuy nhiên, những nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng HMG-CoA reductase thực tế có tám miền xuyên màng. Cấu trúc phức tạp này cho phép enzyme này tương tác với các thành phần khác của lưới nội chất, bao gồm các protein khác và các lipid. Điều này giúp đảm bảo rằng enzyme hoạt động hiệu quả trong môi trường tế bào và được điều chỉnh thích hợp để đáp ứng nhu cầu của tế bào về cholesterol [13].

1.2.3. Vai trò của enzyme HMG – CoA reductase

HMG – CoA reductase xúc tác cho việc chuyển đổi HMG-CoA thành axit mevalonic, một bước cần thiết trong quá trình sinh tổng hợp cholesterol:



Hình 1.3. Quá trình tổng hợp cholesterol trong cơ thể (Nguồn: <https://www.ibiology.org/biochemistry/regulation-cholesterol-synthesis/>)

Thông thường, trong các tế bào động vật có vú, enzyme này bị ức chế cạnh tranh bởi cholesterol có nguồn gốc từ quá trình nội hóa và thoái hóa lipoprotein mật độ thấp thông qua thụ thể LDL cũng như các dạng cholesterol bị oxy hóa. Các chất ức chế cạnh tranh của reductase gây ra sự biểu hiện của các thụ thể LDL trong gan, điều này làm tăng sự phân giải của LDL huyết tương và làm giảm nồng độ cholesterol huyết tương, được coi là một yếu tố quan trọng trong việc xác định xơ vữa động mạch, theo quan điểm của những người chấp nhận giả thuyết lipid tiêu chuẩn. Do đó, enzyme này là mục tiêu của các loại thuốc hạ cholesterol phổ biến được biết đến với tên gọi chung là statin [14, 15].

1.3. Chất ức chế enzyme HMG – CoA

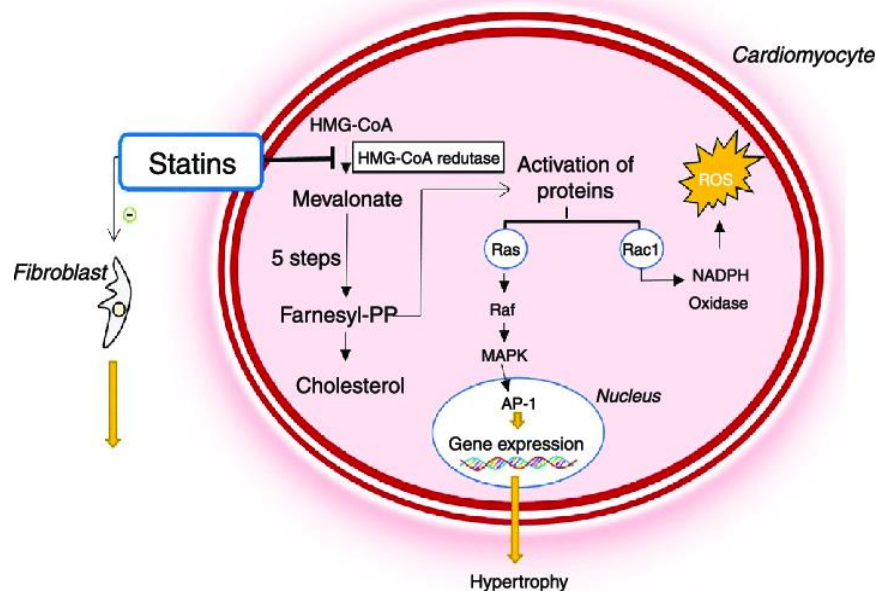
1.3.1. Khái niệm và vai trò của các chất ức chế enzyme HMG – CoA

Statin là một nhóm thuốc được chứng minh và sử dụng rộng rãi để giảm mức cholesterol trong máu, qua đó giúp ngăn ngừa các bệnh tim mạch như nhồi

máu cơ tim, đột quy, và các biến chứng liên quan đến động mạch vành. Statins hoạt động bằng cách ức chế enzyme HMG-CoA reductase, enzyme đóng vai trò trung tâm trong việc sản xuất cholesterol [16].

Lipoprotein mật độ thấp là một yếu tố nguy cơ chính gây xơ vữa động mạch. Bằng cách ức chế quá trình tổng hợp cholesterol trong gan, statin làm giảm đáng kể lượng LDL trong máu. Nhờ cơ chế hoạt động này, statin đã trở thành một trong những loại thuốc hạ lipid hiệu quả nhất, được sử dụng rộng rãi để phòng ngừa và điều trị các bệnh lý tim mạch. Statin không chỉ giúp giảm nguy cơ mắc bệnh tim mạch ở những người có nguy cơ cao mà còn cải thiện tiên lượng cho bệnh nhân đã mắc bệnh [17-19].

Bước đầu tiên để kiểm soát cholesterol thường là thay đổi lối sống, bao gồm ăn uống lành mạnh và tập thể dục đều đặn. Tuy nhiên, đối với nhiều người, việc chỉ dựa vào thay đổi lối sống thôi chưa đủ. Trong những trường hợp này, thuốc statin có thể là một giải pháp hiệu quả. Thuốc dường như hoạt động tốt như nhau ở cả hai giới [20] mặc dù một số khác biệt liên quan đến giới tính trong đáp ứng điều trị đã được mô tả [21].



Hình 1.4. Cơ chế hoạt động của statins (Nguồn: https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-action-of-statins-and-their-role-in-the-pathophysiology-of-hypertrophic_fig2_341196998)

1.3.2. Phân loại statin

Statin có thể được phân loại dựa trên nhiều tiêu chí khác nhau, bao gồm nguồn gốc, tính chất hóa học, thế hệ, và hiệu lực.

Phân loại theo nguồn gốc: Statin có thể được phân loại thành statin tự nhiên và statin tổng hợp. Statin tự nhiên được chiết xuất từ các nguồn tự nhiên như nấm, tiêu biểu là lovastatin, pravastatin, và simvastatin. Trong khi đó, statin tổng hợp, như atorvastatin và rosuvastatin, được tổng hợp hoàn toàn bằng phương pháp hóa học và thường có hiệu lực mạnh hơn.

Phân loại theo tính chất hóa học: Dựa trên tính chất hóa học, statin được chia thành hai nhóm: statin tan trong mỡ (lipophilic) và statin tan trong nước (hydrophilic). Statin tan trong mỡ, bao gồm atorvastatin và simvastatin, có khả năng xâm nhập vào các loại tế bào khác nhau trong cơ thể, không chỉ riêng gan. Ngược lại, statin tan trong nước như pravastatin và rosuvastatin chủ yếu tác động đến gan, hạn chế ảnh hưởng đến các mô khác.

Phân loại theo thế hệ: Statin còn được phân loại theo thế hệ, với các statin thế hệ đầu tiên như lovastatin và pravastatin có nguồn gốc tự nhiên hoặc bán tổng hợp. Thế hệ thứ hai bao gồm các statin tổng hợp hoàn toàn như atorvastatin và rosuvastatin, được cải tiến về hiệu lực và thời gian bán thải, giúp giảm tần suất sử dụng và tăng hiệu quả điều trị.

1.3.3. Tính chất và ưu điểm của statin tự nhiên – lovastatin

Statin tự nhiên có khả năng ức chế enzyme HMG-CoA reductase, đóng một vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp cholesterol ở gan. Chúng có thể được tìm thấy trong môi trường tự nhiên, chẳng hạn như vi khuẩn, nấm và thực vật. Statin tự nhiên hoạt động theo cách tương tự như statin tổng hợp, nhưng chúng được coi là an toàn hơn và có ít tác dụng phụ hơn. Thực phẩm chức năng hoặc thực phẩm có thể bổ sung statin tự nhiên, giúp điều chỉnh mức cholesterol trong cơ thể một cách tự nhiên [22].

Monacolin K hay còn gọi là lovastatin, hợp chất có trong gạo men đỏ, là một trong những loại statin tự nhiên phổ biến nhất. Ngoài ra, có các chất khác,

chẳng hạn như polycosanol, một hợp chất từ sáp mía giúp giảm cholesterol LDL (cholesterol xấu) và tăng cholesterol HDL (cholesterol tốt), và phytosterol từ dầu thực vật, có khả năng cạnh tranh với cholesterol trong quá trình hấp thụ của ruột [23].

Một lợi thế lớn của statin tự nhiên là chúng có thể được tiêu thụ trực tiếp thông qua thực phẩm hàng ngày. Ví dụ, dầu thực vật giàu phytosterol có thể được sử dụng trong chế độ ăn uống hàng ngày, hoặc gạo men đỏ có thể được bổ sung vào bữa ăn như một thành phần thực phẩm chức năng. Điều này giúp người dùng dễ dàng điều chỉnh mức cholesterol mà không cần phải dùng thuốc.

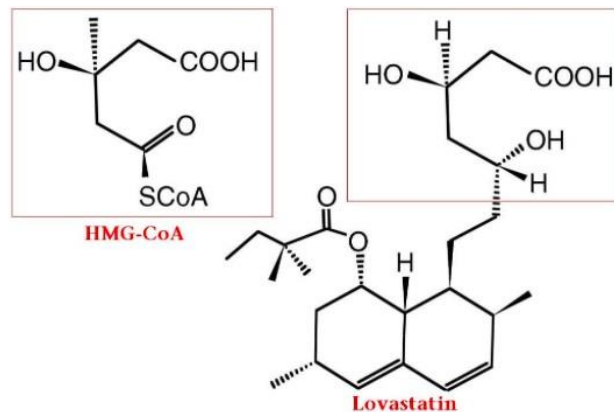
Nguồn gốc từ tự nhiên làm cho statin tự nhiên trở thành một giải pháp bền vững hơn so với các sản phẩm tổng hợp trong phòng thí nghiệm. Việc khai thác từ các nguồn tài nguyên thiên nhiên, chẳng hạn như cây cỏ, vi khuẩn hay nấm, có thể mang lại tác động tích cực đối với môi trường, đặc biệt khi chúng được sản xuất theo quy trình thân thiện với môi trường.

Lovastatin chủ yếu do một nhóm gene gọi là gene cụm sinh tổng hợp điều khiển. Cụm gene này gồm các gene mã hóa enzyme tham gia vào quá trình hình thành lovastatin như gene lovB và lovF là các gene mã hóa cho enzyme polyketide synthase (PKS), enzyme chính trong quá trình tổng hợp chuỗi carbon của lovastatin. Gene lovC mã hóa cho enzyme enoyl reductase, có chức năng hỗ trợ quá trình hình thành chuỗi carbon thông qua các phản ứng oxy hóa khử. Gene lovD mã hóa cho enzyme acyltransferase, giúp gắn phần acid methylbutyrate vào khung polyketide để tạo ra lovastatin. Các gene lovA, lovE và lovG: Các gene này mã hóa cho các enzyme khác tham gia vào các bước chuyển hóa trung gian trong quá trình tổng hợp. Cụm gene này được điều hòa cẩn thận và hoạt động dưới sự kiểm soát của các yếu tố môi trường, điều kiện nuôi cấy, và các yếu tố điều hòa gene khác của tế bào [24-27].

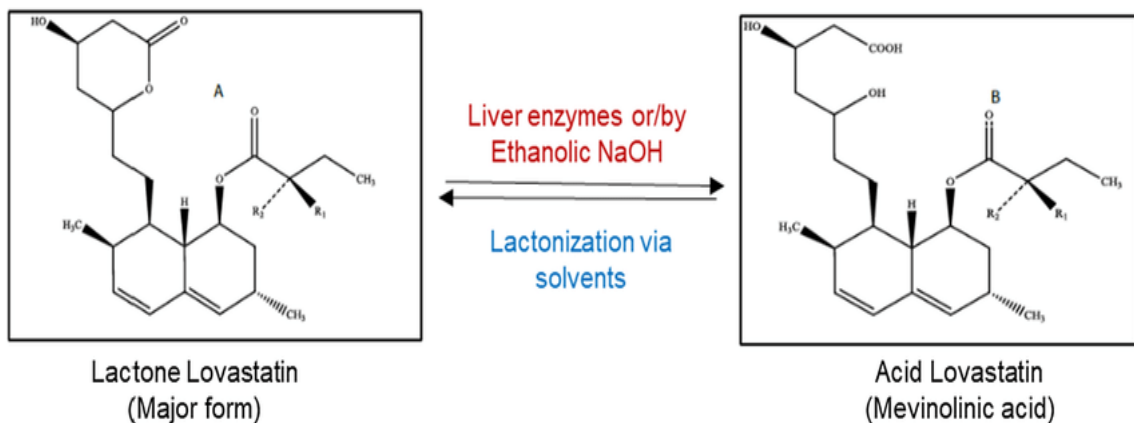
Hiện nay một số loại statin phổ biến đang được sử dụng trong điều trị các bệnh lý mỡ máu, tim mạch bao gồm lovastatin, fluvastatin, simvastatin,

pravastatin, atorvastatin và rosuvastatin. Tuy nhiên lovastatin nhận được sự quan tâm nhiều hơn cả.

Lovastatin thuộc nhóm statin tự nhiên. Đây là một trong những statin đầu tiên được phát hiện và phát triển từ nguồn gốc sinh học. Lovastatin thường được thu nhận từ các chi nấm sợi như *Aspergillus*, *Monascus*, *Penicillium*,... [28, 29]



Hình 1.5. Lovastatin có cấu trúc tương tự như HMG-CoA [30])



Hình 1.6. Hai dạng tồn tại của lovastatin (Nguồn:

https://www.researchgate.net/figure/Closed-ring-lactone-inactive-and-open-ring-hydroxy-form-active-of-lovastatin-produced_fig1_358597527)

1.4. Chủng nấm sợi *Rhizopus* sp.

1.4.1. Phân loại sinh học

Rhizopus, một chi nấm thuộc họ Mucoraceae, là một nhóm nấm mốc sợi phổ biến và đa dạng. Chúng được phân loại trong giới nấm, lớp Zygomycetes (hay Mucormycetes), và đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình sinh thái và công nghiệp. Nấm *Rhizopus* thường được tìm thấy trên các chất hữu cơ đang phân hủy như trái cây, rau củ, bánh mì, góp phần vào quá trình chuyển hóa chất

hữu cơ thành các hợp chất đơn giản hơn. Một số loài *Rhizopus* còn được ứng dụng trong sản xuất thực phẩm, chẳng hạn như tempeh – một món ăn truyền thống của Indonesia được làm từ đậu nành lên men bằng nấm *Rhizopus*[31-34]. Tuy nhiên, mặt trái của chúng là khả năng gây bệnh ở người và động vật, đặc biệt là ở những đối tượng có hệ miễn dịch suy yếu. Các bệnh do nấm *Rhizopus* gây ra thường liên quan đến các tổn thương ở đường hô hấp, da và các cơ quan nội tạng. Việc nghiên cứu chi tiết về sinh lý, sinh hóa và di truyền học của nấm *Rhizopus* không chỉ giúp chúng ta hiểu rõ hơn về vai trò của chúng trong tự nhiên mà còn mở ra những triển vọng mới trong ứng dụng công nghiệp và y học.

Chi *Rhizopus* là một nhóm nấm mốc sợi phổ biến, có khả năng phân bố rộng khắp trên toàn cầu. Chúng thường sinh trưởng mạnh trong các môi trường giàu chất hữu cơ, ẩm ướt và có nhiệt độ tương đối cao. Các điều kiện lý tưởng này thường được tìm thấy trong đất, trên các loại thực phẩm giàu tinh bột như trái cây, rau củ, bánh mì, và thậm chí cả trong các môi trường nhân tạo như kho chứa nông sản.

Rhizopus phát triển mạnh trên các chất hữu cơ phân hủy, đặc biệt là các loại thực phẩm như bánh mì, trái cây thối rữa (chuối, nho, dâu) và rau củ (cà chua, khoai tây). Đây là lý do tại sao chúng thường xuất hiện trên thực phẩm hỏng và được biết đến như là "mốc đen bánh mì". Ngoài ra, *Rhizopus* cũng phổ biến trong đất, đặc biệt là đất giàu dinh dưỡng và mùn. Trong môi trường này, chúng đóng vai trò quan trọng trong việc phân hủy chất hữu cơ và tái chế các chất dinh dưỡng trở lại đất. Các bào tử của *Rhizopus* dễ dàng phát tán qua không khí và khi gặp điều kiện ẩm ướt, chúng có thể bám vào bề mặt hữu cơ, từ đó nảy mầm và phát triển.

1.4.2. Đặc điểm sinh học

Đặc điểm sinh học của Chi *Rhizopus* cho phép chúng phát triển và sinh sản tốt trong nhiều môi trường khác nhau. Đặc điểm nổi bật nhất của *Rhizopus* là cấu trúc sợi nấm dạng hợp bào, nghĩa là các sợi nấm không phân vách có nhiều nhân (đa nhân) trong một tế bào kéo dài. Những sợi nấm này kết nối với

nhau trên bề mặt chất nền, cho phép chúng dễ dàng xâm nhập và hấp thụ chất dinh dưỡng từ môi trường.

Nhờ cấu trúc sợi nấm đơn giản và cách sinh sản linh hoạt của nó, *Rhizopus* cũng có khả năng thích nghi với nhiều điều kiện môi trường khác nhau. Điều này giúp chúng không chỉ tồn tại mà còn phát triển mạnh trong nhiều loại môi trường từ đất, không khí, thực phẩm, cho đến cơ thể sinh vật.



Hình 1.7. Nấm *Rhizopus* sp. mọc trên đĩa petri (Nguồn: <https://www.microbiologybook.org/mycology/2018mycology-5.htm>)

1.4.3. Vai trò của *Rhizopus*

Chi *Rhizopus* là một yếu tố quan trọng trong các môi trường tự nhiên và công nghiệp, đồng thời cũng có thể là một tác nhân gây bệnh nghiêm trọng. Trước hết, *Rhizopus* là một loại nấm hoại sinh trong môi trường, làm việc để phân hủy chất hữu cơ. Chúng có khả năng phân giải các chất hữu cơ phức tạp như cellulose và tinh bột trong thực vật. Điều này giúp tái chế chất dinh dưỡng và hỗ trợ phát triển của các sinh vật khác. *Rhizopus* tham gia vào chu trình carbon tự nhiên bằng cách phân hủy chất hữu cơ và giải phóng carbon dioxide, giúp cân bằng lượng khí CO₂ trong khí quyển.

Ngoài vai trò sinh thái, *Rhizopus* còn được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực công nghiệp. Trong ngành thực phẩm, một số loài như *Rhizopus oryzae* được sử dụng để sản xuất tempeh, một loại thực phẩm lên men từ đậu nành phổ biến ở Indonesia. Quá trình lên men nhờ *Rhizopus* không chỉ cải thiện giá trị dinh dưỡng của đậu nành mà còn giúp tăng cường khả năng tiêu hóa và hương vị của sản phẩm. Bên cạnh đó, *Rhizopus* còn được sử dụng để sản xuất các enzyme

quan trọng như amylase và lipase trong ngành dược phẩm và công nghiệp sinh học, giúp phân giải tinh bột và chất béo. Một số loài *Rhizopus* còn có thể sản xuất axit lactic, một hợp chất quan trọng trong việc sản xuất nhựa phân hủy sinh học và các sản phẩm dược phẩm.

Zhang và cộng sự (2007) đã công bố acid lactic là một axit hữu cơ phổ biến, có giá trị do ứng dụng rộng rãi trong ngành thực phẩm và các ngành liên quan đến thực phẩm, cũng như tiềm năng sản xuất polyme polylactate có thể phân hủy sinh học và tương thích sinh học. Axit lactic có thể được sản xuất từ các vật liệu tái tạo bằng cách sử dụng các loài nấm khác nhau thuộc chi *Rhizopus*. Việc sản xuất acid acetic từ các chủng nấm thuộc chi *Rhizopus* có lợi thế hơn so với vi khuẩn ở chỗ có đặc tính thủy phân tinh bột, nhu cầu dinh dưỡng thấp và quá trình hạ nguồn chi phí thấp để tách sinh khối. Sinh khối nấm có giá trị có thể được sử dụng trong các quá trình hấp phụ sinh học để làm sạch nước thải bị ô nhiễm, để sản xuất chitosan nấm và như chất phụ gia trong thức ăn chăn nuôi [35].

Ghosh và Ray (2011) đã cho thấy nấm *Rhizopus oryzae* đã chứng minh được vai trò quan trọng trong nhiều lĩnh vực. Trong công nghiệp thực phẩm, nó được sử dụng rộng rãi làm chất khởi đầu cho quá trình lên men các sản phẩm truyền thống như tempeh, đồng thời cung cấp các enzyme có giá trị để cải thiện hương vị thực phẩm và sản xuất đường dextrose. Ngoài ra, sinh khối nấm còn là một nguồn protein thay thế tiềm năng trong thức ăn chăn nuôi [36]. Thậm chí, nhiều nghiên cứu còn hé lộ khả năng ứng dụng nấm này trong y học, đặc biệt là trong việc phát triển các liệu pháp chống ung thư. Việc phát hiện ra sự hiện diện của một hoặc nhiều yếu tố hòa tan trong nước có thể gây ra apoptosis trong dòng tế bào ung thư ở người có thể phát triển một phương pháp mới để điều trị ung thư ở người [37]. Điều đáng chú ý là tất cả những ứng dụng này đều được đảm bảo về mặt an toàn và tuân thủ các quy định nghiêm ngặt của các cơ quan quản lý [38]

Tuy nhiên, *Rhizopus* không chỉ có tác dụng tốt mà còn gây bệnh cho con người. Một số loài, chẳng hạn như *Rhizopus arrhizus* (*Rhizopus oryzae*), có thể gây ra bệnh mucormycosis (hay zygomycosis) [39-41], một dạng nhiễm trùng nấm hiếm gặp nhưng rất nguy hiểm. Nó thường xảy ra ở những người có hệ miễn dịch suy yếu, chẳng hạn như bệnh nhân tiểu đường. Nấm có thể xâm nhập vào cơ thể thông qua đường hô hấp hoặc qua vết thương hở. Nó có thể gây hại cho phổi, xoang mũi và thậm chí là não. Mucormycosis là một bệnh khó điều trị và có tỷ lệ tử vong cao nếu không được phát hiện và chữa trị kịp thời.

Nấm *Rhizopus* sp. còn là mối đe dọa nghiêm trọng đối với ngành nông nghiệp. Chúng gây ra bệnh thối nhũn trên nhiều loại trái cây và rau củ sau thu hoạch, khiến sản phẩm bị hư hỏng, giảm giá trị dinh dưỡng và gây thiệt hại kinh tế lớn cho nông dân [42, 43]. Những loại nông sản thường bị nấm *Rhizopus* sp. tấn công có thể kể đến như trái cây họ cam quýt, táo, lê, chuối, khoai tây, cà chua,... Mặc dù đóng vai trò quan trọng trong việc phân hủy chất hữu cơ và có một số ứng dụng trong công nghiệp, nhưng sự phát triển quá mức của nấm *Rhizopus* sp. trên cây trồng và sản phẩm nông nghiệp lại là một vấn đề nan giải. Chúng không chỉ làm giảm năng suất mà còn gây khó khăn cho việc bảo quản và vận chuyển nông sản [44, 45], gây ảnh hưởng đến an toàn thực phẩm và sức khỏe của người tiêu dùng.



Hình 1.8. Nấm *Rhizopus* sp. phát triển gây thối rữa hoa quả (Nguồn: <https://gardenerspath.com/how-to/disease-and-pests/rhizopus-rot-stone-fruits/>)

1.5. Tình hình nghiên cứu trong nước và thế giới

Một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy khả năng sinh tổng hợp lovastatin từ chủng *Rhizopus* sp. bằng phương pháp lên men chìm trong các môi trường dinh dưỡng khác nhau [46, 47]. Sử dụng *Saccharomyces cerevisiae* như một vi sinh vật chỉ thị, sàng lọc thành công chủng *Rhizopus oryzae* có khả năng sinh tổng hợp lovastatin, dịch chiết ethyl acetate sau khi phân tích bằng HPLC đã cho kết quả định lượng lovastatin đạt 20,39 mg/l [46]. Ở một nghiên cứu khác, 1% trifluoroacetic được thêm vào dịch chiết ethyl acetate của *Rhizopus oryzae* SSM9 rồi chạy sắc ký HPLC nhằm thu được toàn bộ hàm lượng lovastatin dạng lactone, hàm lượng đo được ở bước sóng 238 nm đạt 90 mg/l [46, 47].

Mặt khác, lên men bề mặt SSF đang trở nên phổ biến hơn do chi phí môi trường thấp hơn và năng suất cao hơn, chủ yếu là do mật độ sợi nấm tăng lên khi gặp độ ẩm thích hợp [48]. Các chất nền được sử dụng trong quá trình lên men bao gồm cám lúa mì, cám gạo, các thành phần bao gồm gạo tẻ, vỏ cam và vỏ trấu; trong đó, cám lúa mì dường như cho hiệu quả sản xuất lovastatin tốt nhất [48]. Trong nghiên cứu của Valera và cộng sự (2005), hàm lượng lovastatin từ chủng *Aspergillus flavipes* đạt 16,78 mg / 1 gam chất rắn khô sau 6 ngày lên men trong điều kiện dinh dưỡng đã tối ưu trên nền cơ chất được chọn lọc chính là cám lúa mì [49]. Tuy nhiên, phương pháp này yêu cầu diện tích bề mặt rất lớn khi cần tăng quy mô sản xuất.

Dù lên men bằng phương pháp nào, quy trình tách chiết vẫn thường được tuân thủ chặt chẽ do bản chất hóa học của lovastatin. Lovastatin là một acid yếu với giá trị pKa là 4,31, trong khi ở dạng lacton, pKa cao hơn đáng kể (13,5) [50]. Do đó, trong môi trường có tính acid, cả hai dạng của monacolin K đều tồn tại, tuy nhiên dạng acid chiếm ưu thế (>90%). Với pKa = 4,31, dạng acid không phân ly chiếm phần lớn (>94%) khi pH ≤ 3, giúp nâng cao hiệu suất chiết bằng dung môi. Ngược lại, dạng lacton với pKa cao hơn tồn tại chủ yếu ở dạng không phân ly trong dung dịch, nhưng có thể chuyển đổi thành acid tự do

khi pH tăng lên[50]. Do vậy, việc acid hóa dịch lên men trước khi chiết xuất là cần thiết để cải thiện hiệu suất chiết lovastatin.

Ngoài ra, hiệu quả của quá trình chiết statin ra khỏi môi trường nuôi cấy còn phụ thuộc vào loại dung môi, thường ưu tiên sử dụng các ester của acid acetic [50]. Các acetate có độ phân cực Hansen ở mức trung bình theo thứ tự ethyl acetate > isopropyl acetate > butyl acetate và khả năng liên kết hydro ở mức trung bình như các chất nhận proton theo thứ tự isopropyl acetate > ethyl acetate > butyl acetate. Tỷ lệ giữa liên kết hydro và sự phân cực trong dung môi theo thứ tự isopropyl acetate > butyl acetate > ethyl acetate và được cho là lý do giúp isopropyl acetate và butyl acetate có tính chọn lọc tốt hơn đối với lovastatin lactone, một este tuần hoàn có khả năng liên kết hydro vừa phải với vai trò là chất nhận (tính bazơ) và làm tăng độ phân cực nhờ sự hiện diện của các nguyên tử khác loại O trong cấu trúc của phân tử.

Mặt khác, trong khi lovastatin acid có hoạt tính trong việc làm giảm nồng độ lipid trong máu, dạng lactone có thể kết tinh và sấy khô nên thường được chọn là sản phẩm cuối cùng của quá trình tinh sạch [23, 50]. Do đó, sau khi thu được dịch chiết, có thể thực hiện quá trình lacton hóa bằng 1% trifluoroacetic acid [46, 47]. Bên cạnh các phương pháp truyền thống, có thể xử lý monacolin K bằng acid khoáng rồi chiết tách trong bằng toluen và kết tinh lại bằng cách bay hơi dung môi [51].

Ở Việt Nam, công nghệ sản xuất các nguyên liệu làm thuốc bằng kỹ thuật lên men, chuyển hoá sinh học sử dụng vi sinh vật còn chưa phát triển nên đa số các loại thuốc đặc trị và nguyên liệu chính để sản xuất thuốc đều phải nhập khẩu. Việc ứng dụng các thành tựu công nghệ sinh học đã được quan tâm đến lĩnh vực dược liệu và y học để nâng cao sức khỏe và chất lượng cuộc sống. Đây cũng là những hướng phát triển được quan tâm hàng đầu tại các nước trong khu vực và thế giới.

Năm 2006, Vũ Nguyên Thành và cộng sự, Viện Công nghiệp thực phẩm đã thực hiện đề tài “*Bảo tồn, lưu giữ và nghiên cứu khai thác nguồn gen vi sinh*

vật công nghiệp thực phẩm”, trong đó khảo sát khả năng tổng hợp chất màu đỏ và lovastatin từ hai chủng vi nấm *Monascus purpureus*. Kết quả chỉ ra khi nuôi cấy theo phương pháp lên men bề mặt trên cơ chất gạo tẻ đã được hấp chín, chủng *M. purpureus* 3403 tổng hợp lovastatin từ 0,003 – 0,06 mg/gam cơ chất [4].

Lê Đức Mạnh (2007) đã khảo sát khả năng tạo sắc tố lovastatin và độc tố citrinin của hai chủng nấm mốc đỏ *Monascus purpureus* [5]. Năm 2016, Nguyễn Thiện Phú đã phân lập, tuyển chọn các chủng nấm sợi có khả năng tạo lovastatin từ rừng ngập mặn cần giờ [52]. Năm 2012, Phạm Đức Toàn và cộng sự, đã nghiên cứu sàng lọc, lựa chọn và nâng cao hiệu suất tổng hợp lovastatin từ các chủng *Aspergillus terreus* [53].

Trong những năm gần đây nhóm nghiên cứu của chúng tôi cũng có những nghiên cứu bước đầu về phân lập, sàng lọc và tạo các chủng đột biến nâng cao khả năng sinh tổng hợp hoạt chất lovastatin từ các chủng *Aspergillus terreus* [6, 54, 55].

Mặc dù đã có một số thành tựu trong công nghệ sinh học, nhưng ở Việt Nam, việc nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng các chế phẩm sinh học có hoạt tính sinh dược từ chủng nấm *Rhizopus* sp. còn hạn chế. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh các chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có khả năng ức chế HMG-CoA reductase giảm cholesterol như *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monascus*... Trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ tập trung vào sàng lọc, chọn lựa, nghiên cứu lựa chọn các môi trường để nâng cao khả năng sinh tổng hợp lovastatin từ các chủng nấm *Rhizopus* sp. và bước đầu tinh sạch cũng như đánh giá hoạt tính kháng nấm men của lovastatin tinh sạch từ chủng nấm *Rhizopus* sp. đã được tuyển chọn.

Chương 2: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU VÀ CHỦNG GIỐNG

Các chủng nấm *Rhizopus* sp. đã được phân lập tại Việt Nam được cung cấp từ Viện Công nghiệp thực phẩm bao gồm: *Rhizopus* sp. 5154, *Rhizopus* sp. 5155, *Rhizopus* sp. 5278, *Rhizopus* sp. 5280 và *Rhizopus* sp. BMM313

Chủng nấm men *Saccharomyces* sp. và *Candida albicans* được cung cấp từ Phòng Công nghệ sinh học enzyme – Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ

2.2.1. Hóa chất

Các hóa chất được sử dụng trong các thí nghiệm đều ở dạng tinh khiết và được liệt kê ở bảng 2.1.

Bảng 2.1. Danh sách hóa chất sử dụng trong thí nghiệm

Tên hóa chất	Hãng sản xuất (Nước)
Agar	Việt Nam
D-glucose, cao malt, cao nấm men, peptone	Bio Basic Canada INC (Canada)
Các dung môi: methanol, ethanol, dichloromethane, n-hexane, acid acetic, toluen, ethyl acetate	(Trung Quốc)
Na ₃ PO ₄ , acetonitril, lovastatin	Sigma
Bản mỏng Silica gel 60 F254 20x20	Merck (Đức)
Silica gel 60	Merck (Đức)
HCl	Xilong Scientific (Trung Quốc)
Iod	Việt Nam
Sodium citrate, ammonium sulfate, sodium nitrate	Trung Quốc

2.2.2. Thiết bị

Các thiết bị sử dụng trong thí nghiệm được liệt kê đầy đủ trong bảng 2.2.

Bảng 2.2. Danh sách thiết bị sử dụng trong thí nghiệm

Tên thiết bị	Xuất xứ
Box cấy vi sinh vật Clean Bench TCV.02-Box cấy vi sinh vật Laminar LB-1234	Trung tâm chuyển giao công nghệ (Việt Nam) Hàn quốc
Cân phân tích BL150S	Sartorius (Đức)
Lò vi sóng	Samsung (Hàn Quốc)
Máy đo pH-827	Metrohm (Thụy Sĩ)
Máy lắc nuôi cấy Wise Cube	Certomat HK (Đức)
Máy Vortex OSI	Rotolab (Đức)
Nồi khử trùng ES-315	Nồi khử trùng ES-315
Tủ hút	Việt Nam
Kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường FE-SEM Hitachi-S4800	Hitachi (Nhật Bản)
Máy cô quay	Buchi (Thụy Sĩ)
Máy khuấy từ	Metrohm (Thụy Sĩ)
Tủ âm sâu	Sanyo (Nhật Bản)

2.2.3. Môi trường**Bảng 2.3.** Các môi trường dùng trong thí nghiệm

Tên môi trường	Thành phần
PDA	20% dịch chiết khoai tây, 2% glucose, 2% agar
PDB	20% dịch chiết khoai tây, 2% glucose
YPD	1% cao nấm men, 2% peptone, 2% D-glucose
YPD agar	1% cao nấm men, 2% peptone, 2% D-glucose, 2% agar
GYP	2% D-glucose, 0,5% cao nấm men, 1% peptone
MEB	2% cao malt, 0,1% peptone, 2% D-glucose
GP	2% glucose, 1% peptone
YM	1% D-glucose, 0,3% cao malt, 0,3% cao nấm men, 0,5% peptone
Vogel's medium	0,25% sodium citrate, 0,25% ammonium sulfate, 1% D-glucose, 0,5% peptone, 0,5% cao nấm men

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Nuôi cấy các chủng nấm *Rhizopus* sp.

Chủng *Rhizopus* sp. được hoạt hóa trong môi trường PDB (potato dextrose broth) ở nhiệt độ 28 - 30°C, lắc 200 vòng/phút. Sau 24 – 48 giờ, nuôi chủng trên đĩa thạch PDA ở nhiệt độ phòng trong 5 – 7 ngày đến khi lên khuẩn lạc to, rõ sợi hoặc bào tử. Sau đó, chủng *Rhizopus* sp. được lên men trong môi trường PDB, lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 28 - 30°C trong 7 ngày [46, 47]. Sau 7 ngày thu dịch ngoại bào, ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút, ở 4°C để loại bỏ sinh khối tế bào. Dịch sau ly tâm được định tính bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) và xác định hàm lượng lovastatin bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

2.3.2. Phương pháp ức chế nấm men [46, 56]

Lovastatin có thể ức chế sự phát triển của nấm men. Chủng nấm men *Saccharomyces* sp. và *Candida albicans* sau khi được hoạt hóa trong môi trường YPD lỏng sau 24 giờ được trải đều trên đĩa petri. Dùng dụng cụ đột thạch vô trùng đục một lỗ trên đĩa petri có chứa sẵn nấm men với số lượng thích hợp. Sau đó, nhỏ khoảng 100 µl dịch chiết ethyl acetate có chứa hoạt chất lovastatin vào lỗ thạch. Ủ các đĩa ở nhiệt độ phòng trong vòng 24 giờ rồi quan sát đường kính vòng kháng nấm men.

2.3.3. Phương pháp xác định đặc điểm hình thái

Xác định đặc điểm hình thái bao gồm hình dạng khuẩn lạc nấm, đặc điểm cơ quan sinh sản và bào tử phân sinh. Đặc điểm vi thể được xác định bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscope - FE-SEM, Hitachi-S4800, Nhật Bản) tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3.4. Tách chiết DNA tổng số của nấm

DNA tổng số của mẫu nấm được tách chiết theo phương pháp CTAB [57]. Mẫu nấm được cắt nhỏ và được nghiền thành bột mịn trong cối chày sứ cùng với cát thủy tinh để phá vỡ thành tế bào. Sau đó hỗn hợp bột nghiền được đưa vào ống 2 ml. Bổ sung 1 ml đệm 2% CTAB vào hỗn hợp, trộn đều hỗn hợp

bằng máy vortex và ủ ở 65°C trong 10 phút. Sau đó hỗn hợp được chiết với 1 ml dung dịch phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25 : 24 : 1). Hỗn hợp dịch chiết được ly tâm 12000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, thu dịch trong ở pha trên sang ống 2 ml mới. Bước chiết này được lặp lại hai lần. Dịch chiết thu được sau khi chiết lần hai được bổ sung isopropanol với tỉ lệ 1:1 (v/v), lắc đều để tủa DNA. Tủa DNA thu được sau khi ly tâm 12000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C được rửa với 0,5 ml dung dịch 70% ethanol. Tủa DNA sau đó được làm khô và hòa trong 100 µl TE. DNA tổng số được kiểm tra bằng điện di trên gel 0,8% agarose.

2.3.5. Phản ứng PCR khuếch đại vùng gene 28S

Vùng gene đặc hiệu được nhân lên từ khuôn DNA tổng số với các cặp mồi đã được thiết kế: NL1: gcatatcaataagcggaggaaaag và NL4: ggtccgtgtgtttcaagacgg. Phản ứng PCR gồm 2,5 µl 10 x buffer, 1 µl DNA khuôn (50 ng), 1 µl mỗi mồi (10 pmol/µl), 2 µl 2,5 mM dNTPs và 0,5 µl *Taq* polymerase (1,25 U), 2 µl 25 mM MgSO₄, 15 µl H₂O. Phản ứng được thực hiện với chu trình nhiệt: 95°C/3 phút, 35 chu kỳ (95°C/45 giây, 56-60°C/30 giây và 72°C/45 giây) và 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel 0,8% agarose.

2.3.6. Tinh sạch sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR đặc hiệu được tinh sạch qua kit trước khi xác định trình tự nucleotide.

2.3.7. Định danh chủng

Chương trình DNA star dùng để phân tích, so sánh trình tự và xây dựng cây phân loại chủng. Trình tự DNA vùng 28S của chủng nấm nghiên cứu được so sánh với một số trình tự đã công bố trên Genbank bằng phần mềm Blast trực tuyến.

2.3.8. Lựa chọn môi trường khác nhau

Chủng *Rhizopus* sp. sau khi hoạt hóa trong môi trường PDB được nuôi vào các môi trường khác nhau: GYP, MEB, GP, YM, Vogel's medium và PDB

nhằm lựa chọn môi trường thích hợp để chủng nấm *Rhizopus* sp. sinh tổng hợp chất ức chế HMG-CoA reductase cao nhất. Nuôi lắc ở 28°C, 200 vòng/phút, trong 7 ngày, ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút, ở 4°C. Dịch sau ly tâm hạ pH=3 và được chiết trong ethyl acetate. Dịch chiết ethyl acetate được sắc ký bản mỏng TLC và xác định hàm lượng lovastatin bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

2.3.9. Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Sắc ký lớp mỏng là phương pháp nghiên cứu hiệu quả để phân tích và xác định số lượng các nhóm chất khác nhau có trong thành phần dịch chiết hoặc các phân đoạn tách ra. Dựa trên nguyên tắc các chất khác nhau có độ phân cực khác nhau nên được tách ra ở các vị trí khác nhau. Đây là phương pháp vi lượng, hiệu quả tách cao và thời gian thực hiện ngắn.

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng silica gel Merck 60 F254, dày 0,25 mm, với hệ dung môi dichloromethane : ethyl acetate = 7 : 3, sau đó hiện màu bằng thuốc thử iot [58].

2.3.10. Định lượng lovastatin bằng HPLC

Sử dụng phương pháp HPLC. Điều kiện sắc ký: Cột Zorbax SB- C18 (50 mm × 2,1 mm; 1,8µm); Pha động ACN : Na₃PO₄ 0,025M, pH 4,5(80:20); Tốc độ dòng 0,3 ml/phút; Thể tích mẫu 5µL; Nhiệt độ 40°C; Bước sóng: 238 nm.

Dung dịch lovastatin chuẩn: Cân chính xác một lượng lovastatin chuẩn, hòa tan và pha loãng bằng acetonitril để đạt dãy nồng độ khoảng 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml.

Dung dịch thử: Lấy 5 ml dịch nuôi bào tử nấm + 5 ml etyl acetat lắc trộn trong 2h, hút toàn bộ pha hữu cơ, bay hơi hoàn toàn dưới dòng khí N₂, ở 40°C, hòa tan và pha loãng bằng 1ml acetonitril để phân tích trên HPLC.

Tiến hành sắc ký lần lượt với dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Tính hàm lượng Lovastatin từ diện tích pic trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và hàm lượng của Lovastatin trong dung dịch chuẩn.

2.3.11. *Nghiên cứu các điều kiện tinh sạch*

Dịch sau lên men được lọc hoặc ly tâm ở 10000 vòng/phút trong 10 phút thu dịch trong. Dịch sau ly tâm được hạ pH xuống $\text{pH} \leq 3,0$ bằng acid HCl 2 M, dịch được chiết bằng ethyl acetate với tỷ lệ 1:1, lắc 200 vòng/phút, trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, thu pha dung môi. Dịch chiết ethyl acetate được cô đặc bằng cất cô quay trên máy cất cô Buchi 10 lần [46, 47].

Tiến hành TLC dịch chiết ethyl acetate đã cô đặc trên bản mỏng silica gel 60 với 5 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau nhằm tìm ra hệ dung môi phù hợp nhất để tinh sạch qua cột sắc ký silicagel. Các hệ dung môi khảo sát bao gồm:

Hệ I: n-hexan : ethyl acetate = 8 : 2

Hệ II: ethyl acetate : methanol = 8 : 2

Hệ III: n-hexan : ethyl acetate : acetic acid = 8 : 2 : 0.5

Hệ IV: toluene : ethyl acetate : methanol = 5 : 4 : 1

Hệ V: dichloromethane : ethyl acetate = 7 : 3

2.3.12. *Tinh sạch qua cột silica gel [59]*

50 ml dịch chiết được tinh sạch bằng cột sắc ký silica gel 60. 25 gam silica gel được hòa tan với 25 ml methanol và được nhồi vào cột kích thước 52×2 cm và loại hết bọt khí. 50 ml dịch chiết được cho bay hơi hết bằng máy cô quay và hòa tan lại trong 2,5 ml ethyl acetate. Toàn bộ 2,5 ml dịch chiết sau đó được cho lên cột và đẩy bằng hệ dung môi dichloromethane : ethyl acetate tỉ lệ 7:3. Tốc độ dòng đạt 25 ml/giờ. Thu 20 phân đoạn, mỗi phân đoạn 3 ml. Các phân đoạn sau đó được xác định độ sạch và hàm lượng lovastatin bằng HPLC có sử dụng đường chuẩn lovastatin (Sigma).

2.3.13. *Phương pháp xử lý số liệu*

Các kết quả HPLC được ghi lại trực tiếp trên máy tính và tất cả các số liệu đều được xử lý bằng phần mềm microsoft excel.

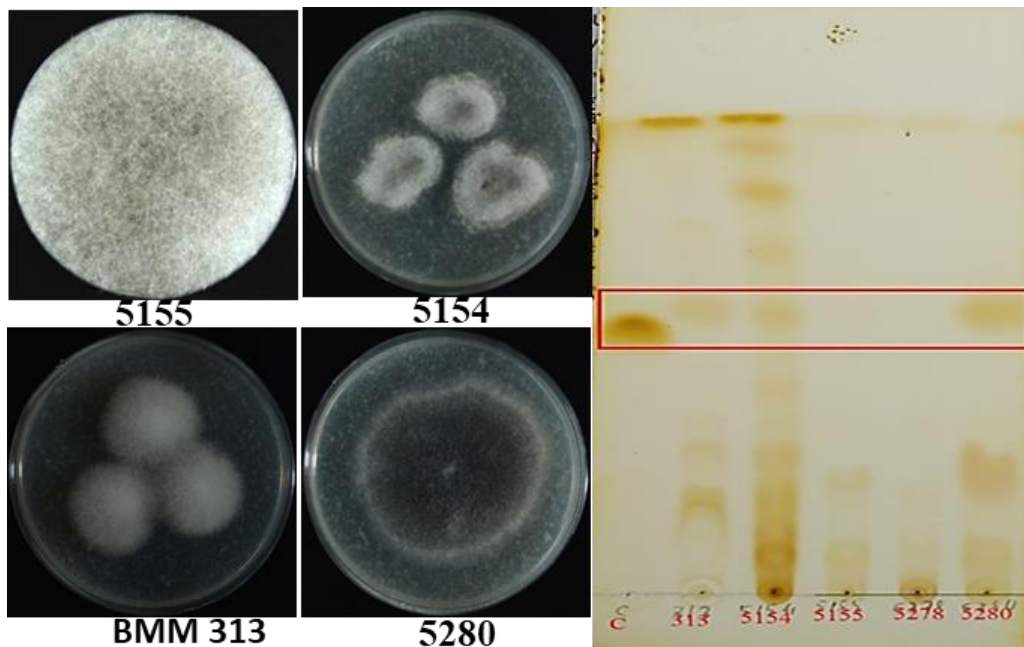
Chương trình DNASTar, phần mềm BLAST được dùng để phân tích, so sánh trình tự nucleotide.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Chọn lọc các chủng nấm *Rhizopus* sp. có khả năng sinh tổng hợp lovastatin cao

3.1.1 Tuyển chọn các chủng bằng sắc ký lớp mỏng

Nấm chủng nấm *Rhizopus* sp. được hoạt hóa trong môi trường PDA và lên men trong môi trường PDB pH 5,5- 6, lắc 200 vòng/phút, thời gian lên men là 7 ngày [46, 47]. Các chủng nấm *Rhizopus* sp. sau khi được lên men sẽ được tiến hành tách chiết sơ bộ theo phương pháp đã mô tả ở trên sử dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng với chất chuẩn là lovastatin (Sigma).



A

B

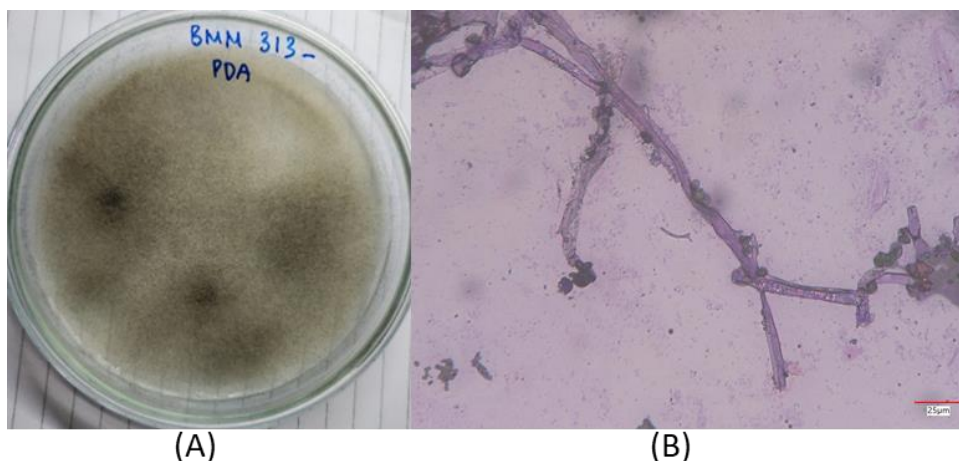
Hình 3.1. Hình ảnh khuân lạc (A) và sắc ký lớp mỏng (B) của các mẫu dịch chiết ethyl acetate có chứa lovastatin ức chế enzyme HMG-CoA reductase từ các chủng *Rhizopus* sp.

Kết quả thu được cho thấy ở các mẫu tương ứng với 03 chủng *Rhizopus* sp. BMM 313, *Rhizopus* sp. 5154 và *Rhizopus* sp. 5280 có xuất hiện một băng đậm với $R_f = 0,57$ ngang với chất chuẩn lovastatin (Hình 3.1), ngoài ra các mẫu này còn chứa một số băng khác. Trong khi 2 mẫu tương ứng với 2 chủng *Rhizopus* sp. 5155 và *Rhizopus* sp. 5278 không thấy xuất hiện băng ngang chuẩn. Như vậy là chúng tôi đã chọn được 03 chủng *Rhizopus* sp. có mã số

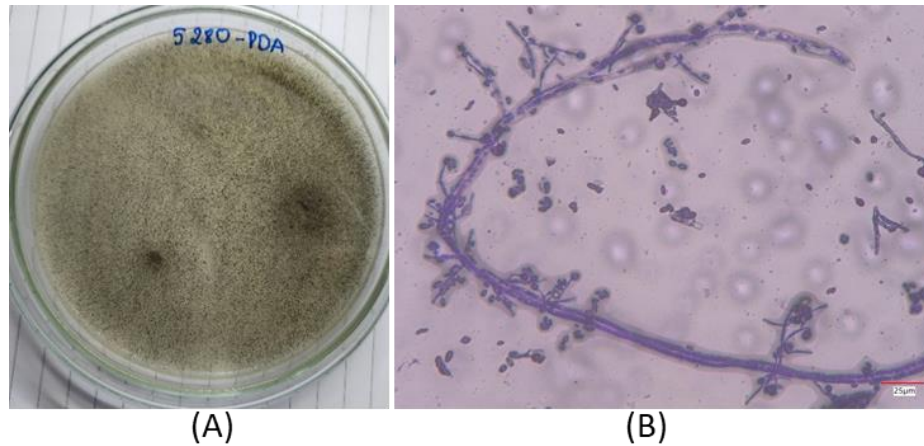
BMM 313, 5154 và 5280 có khả năng sinh tổng hợp lovastatin, trong đó 2 chủng *Rhizopus* sp. BMM 313 và *Rhizopus* sp.5280 có khả năng sinh tổng hợp lovastatin tốt nhất.

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng chất chuẩn lovastatin (Sigma) là chuẩn. Như chúng ta đã biết các thuốc chống tăng lipid máu bao gồm 5 nhóm chủ yếu [60]. Trong đó nhóm thuốc statin ngăn chặn tổng hợp cholesterol tại gan bằng cách ức chế cạnh tranh hoạt động của men HMG-CoA reductase, làm giảm tổng hợp cholesterol ở toàn bộ cơ thể. Statin là nhóm thuốc đã được chứng minh có hiệu quả tốt trong phòng ngừa bệnh lý tim mạch, kể cả bệnh mạch vành lẫn bệnh lý mạch máu não [60]. Vào năm 1987, Cục Quản lý Thuốc và Thực phẩm Mỹ (FDA) chấp thuận cho thuốc lovastatin (Mevacor) được bán ra ở Hoa Kỳ. Thuốc này được tạo ra từ nấm mốc. Lovastatin là một khám phá lớn trong lịch sử thuốc trị bệnh cholesterol cao, là thuốc đầu tiên thuộc nhóm thuốc statins hiện đang được sử dụng nhiều vì ít tác dụng phụ xấu mà lại có hiệu quả điều trị bệnh [61, 62].

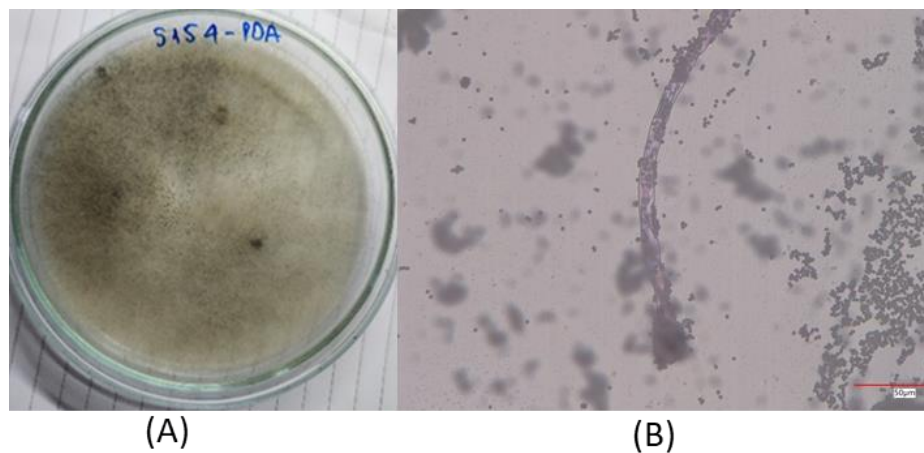
Các chủng có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất lovastatin – một chất ức chế enzyme HMG-CoA reductase sẽ tiếp tục được nuôi trên đĩa môi trường PDA để tiến hành quan sát hình thái các khuẩn lạc và các đặc điểm vi thể (SEM) trên kính hiển vi điện tử (Hình 3.2).



Chủng *Rhizopus* sp. BMM 313 (thước đo 25µm)



Chủng *Rhizopus* sp. 5280 (thước đo 25µm)



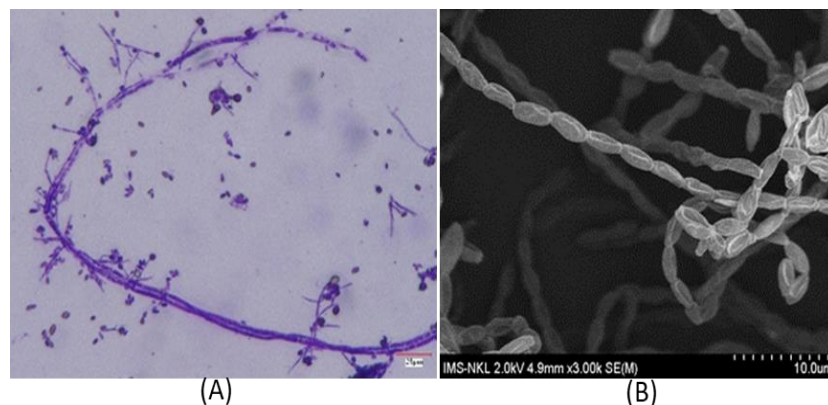
Chủng *Rhizopus* sp. 5154 (thước đo 25µm)

Hình 3.2. Hình thái khuẩn lạc trên môi trường PDA chuẩn (A) và sợi nấm (B) của ba chủng *Rhizopus* sp. BMM 313, *Rhizopus* sp. 5154 và *Rhizopus* sp.5280 trên kính hiển vi quang học 1000x có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất ức chế enzyme HMG-CoA reductase

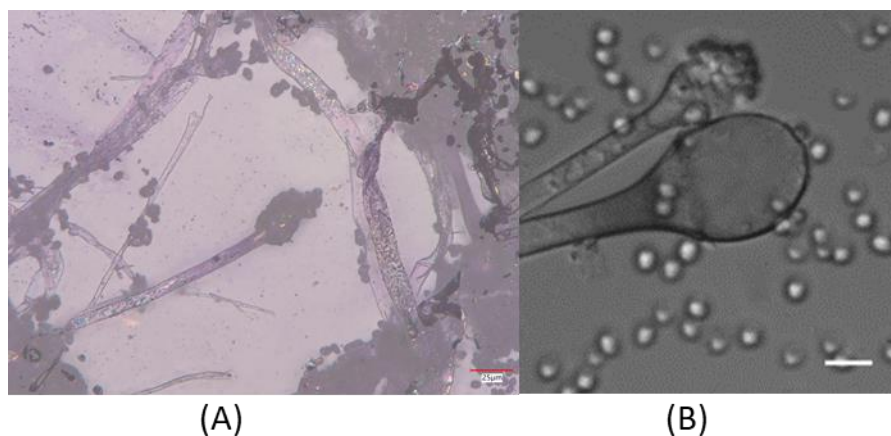
Nhìn chung, hầu hết tất cả các chủng nấm phân lập đều có khuẩn lạc phát triển nhanh chóng chuyển từ màu trắng sang tối khi chúng tạo ra các bào tử và có kết cấu tương tự như kẹo bông trên môi trường Czapek [63]. Qua phân tích đặc điểm của khuẩn lạc và vi thể của 03 chủng sinh tổng hợp lovastatin là chủng *Rhizopus* sp. BMM 313 và *Rhizopus* sp. 5154, *Rhizopus* sp. 5280, chúng tôi nhận thấy 03 chủng này đều có đặc điểm thuộc loài *Rhizopus microsporus* với các đặc điểm như:

Sợi nấm: *Rhizopus microsporus* bao gồm các sợi nấm dài, phân nhánh và có vách ngăn hoặc vách ngăn phân chia sợi nấm thành các ô riêng lẻ.

Túi bào tử: Túi bào tử là những cấu trúc giống như túi được gắn vào các đầu của sợi nấm trên không, có dạng hình cầu hoặc hình elip và có lớp vỏ ngoài màu sẫm. Túi bào tử chứa nhiều bào tử. Túi bào tử thường mọc thẳng và có thể phân nhánh để tạo ra nhiều túi bào tử. Bào tử: vô tính gọi là túi bào tử, bào tử có màu tối và xuất hiện dưới dạng khối bột. Bào tử được giải phóng khỏi túi bào tử và có thể phân tán trong không khí. Nghiên cứu về đặc điểm khuẩn lạc và đặc điểm vi thể đều cho các đặc điểm phù hợp với chủng nấm *Rhizopus microsporus* [64].



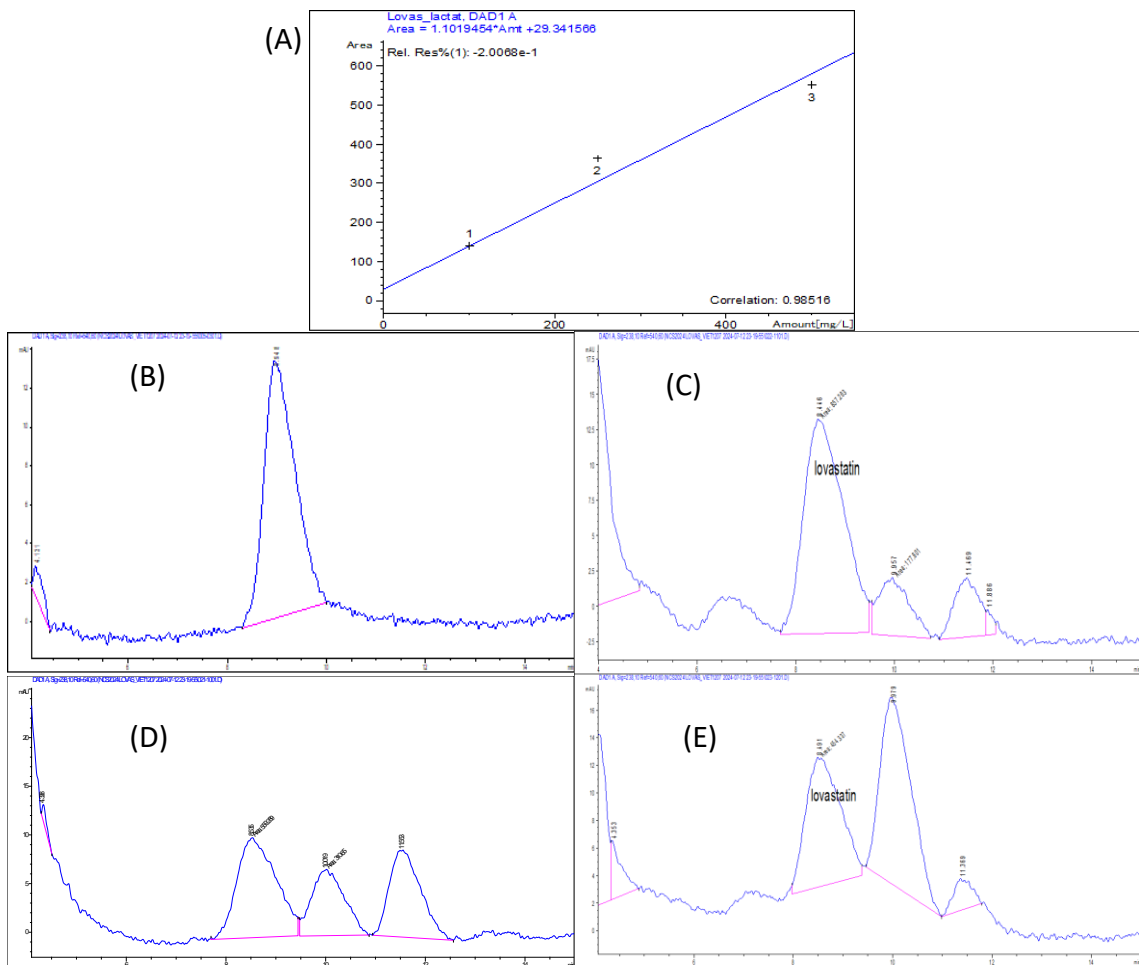
Hình 3.3. Đặc điểm vi thể của chủng *Rhizopus microsporus* 5280 có khả năng sinh tổng hợp lovastatin (chất ức chế enzyme HMG-CoA reductase) trên môi trường PDA ((A): Sợi nấm chủng *Rhizopus microsporus* 5280 trên kính hiển vi quang học 1000 x; (B): Hình ảnh SEM của chủng *Rhizopus microsporus* 5280



Hình 3.4. Đặc điểm vi thể của chủng *Rhizopus microsporus* BMM 313 có khả năng sinh tổng hợp lovastatin (chất ức chế enzyme HMG-CoA reductase) trên môi trường PDA (A): Sợi nấm chủng *Rhizopus microsporus* BMM 313 trên kính hiển vi quang học 1000 x; (B): Tế bào (thanh chèn 10 μ m) của chủng *Rhizopus microsporus* BMM 313

3.1.2 Định lượng Lovastatin bằng HPLC

Lovastatin được tách chiết bằng ethyl acetate từ môi trường lên men đã axit hóa, cô đặc bằng cô chân không, lọc qua màng lọc 0,45 μm và được phân tích định lượng bằng phương pháp HPLC. Kết quả cho thấy 3 chủng *Rhizopus microsporus* BMM 313, *Rhizopus microsporus* 5280 và *Rhizopus microsporus* 5154 tổng hợp lovastatin đạt tương ứng 6,95 mg/L, 34,59 mg/L và 10,85 mg/L (Hình 3.5, Phụ lục 4.1)



Hình 3.5. Sắc đồ HPLC của lovastatin từ mẫu dịch chiết chủng nấm *R. microsporus* ((A): Đường chuẩn có sử dụng lovastatin (Sigma); (B) sắc ký đồ lovastatin chuẩn (Sigma); (C) mẫu lovastatin từ dịch chiết ethyl acetate của chủng *R. microsporus* 5280; (D) mẫu lovastatin từ dịch chiết ethyl acetate của chủng *R. microsporus* 5154; (E) mẫu lovastatin từ dịch chiết ethyl acetate của chủng *R. microsporus* BMM 313)

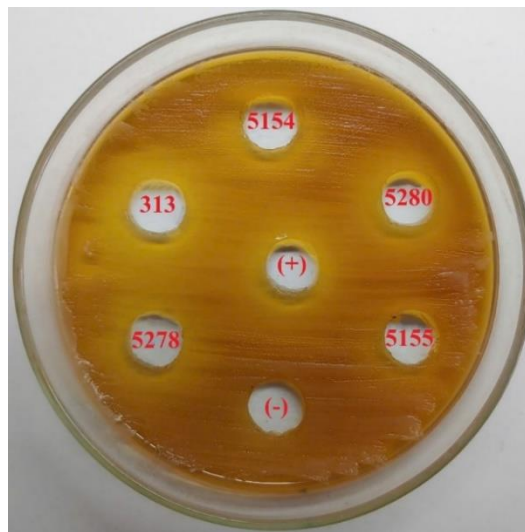
Theo nghiên cứu của Immanuel và Anusha (2019) khi nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp lovastatin từ chủng *Rhizopus oryzae* phân lập từ đất cho thấy chủng *Rhizopus oryzae* sau khi được xác định phân loài bằng xác định

trình tự gene 18S rDNA, mẫu dịch chiết bằng ethyl acetate có hàm lượng lovastatin đạt 20,39 mg/lít (HPLC). Các chủng nấm *Aspergillus terreus* trong nghiên cứu của Samiee và cộng sự (2003) có khả năng tổng hợp lovastatin cao nhất đạt 55 mg/lít [65], 194-289 mg/lít [66]. Seydametova và cộng sự (2015) nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp một chất ức chế HMG- CoA reductase (Pravastatin) được sinh tổng hợp từ chủng *P. janthinellum* phân lập từ mẫu đất cho thấy hàm lượng đạt 15,8 mg/lít khi được xác định bằng sắc ký HPLC.

Trong nghiên cứu này hàm lượng lovastatin từ chủng *R. microsporus* đạt từ 6,95- 34,59 mg/L là phù hợp với một số nghiên cứu trên thế giới 15,8- 55 mg/L [46, 58] và thấp hơn đạt 194-289 mg/L [66], điều này có thể lý giải là do các chủng khác nhau và các chủng được nuôi cấy trong môi trường khác nhau thì khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất là khác nhau.

3.1.3 Hoạt tính kháng nấm của các chủng *Rhizopus sp.*

Đối với nấm men *Saccharomyces sp.*



Hình 3.6. Khả năng kháng nấm men của dịch chiết ethyl acetate chứa lovastatin thu nhận từ các chủng *Rhizopus sp.* ((+): lovastatin chuẩn; (-): ethyl acetate; 313, 5154, 5155, 5278, 5280: là dịch chiết ethyl acetate của các chủng *Rhizopus sp.*)

Từ những số liệu thu được, có thể thấy chủng *Rhizopus sp.* Với mã BMM 313, 5154 và 5280 cho hoạt tính kháng nấm men tốt hơn rõ rệt so với đối chứng dương. Trong đó, chủng *Rhizopus sp.* BMM 313 cho kết quả bán kính lượng tốt nhất với đường kính vòng ức chế nấm men đạt được $1,50 \pm 0,08$ cm. Ngược lại, *Rhizopus sp.* 5155 lại thể hiện hoạt tính này rất yếu, vòng kháng nấm không rõ ràng.

Bảng 3.1. Đường kính vòng kháng nấm *Saccharomyces* sp. của các mẫu dịch chiết ethyl acetate

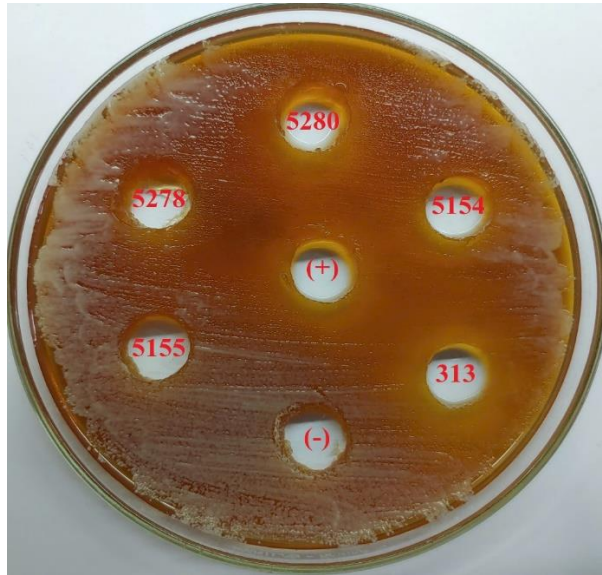
Dịch chiết	Đường kính vòng kháng nấm (cm)
ĐC+	0,63 ± 0,02
ĐC-	0
<i>Rhizopus</i> sp. BMM 313	1,50 ± 0,08
<i>Rhizopus</i> sp. 5154	0,94 ± 0,04
<i>Rhizopus</i> sp. 5155	0,40 ± 0,03
<i>Rhizopus</i> sp. 5278	0,63 ± 0,03
<i>Rhizopus</i> sp. 5280	1,19 ± 0,03

Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới. Cabral và cộng sự (2013) đã nghiên cứu việc kết hợp statin và azole để tăng cường hiệu quả kháng nấm. Kết quả cho thấy hiệu quả hiệp đồng của lovastatin giúp hạn chế đáng kể sự phát triển của nấm *Saccharomyces cerevisiae* và *Candida utilis*. Hiệu ứng này liên quan đến việc ức chế tổng hợp ergosterol, một thành phần quan trọng của màng tế bào nấm. Kết quả gợi ý tiềm năng sử dụng kết hợp giữa hoạt chất lovastatin và azole để cải thiện điều trị kháng nấm [67]

Năm 2018, Zhou và cộng sự đã cho thấy sự kết hợp giữa lovastatin và itraconazole tạo hiệu ứng hiệp đồng chống lại các tế bào dạng planktonic và biofilm của *Candida albicans*. Hiệu quả này đạt được thông qua việc điều hòa con đường tổng hợp ergosterol, một thành phần quan trọng trong màng tế bào nấm. Kết quả cho thấy sự kết hợp này có tiềm năng cải thiện hiệu quả điều trị đối với các bệnh nhiễm nấm [68].

Đối với nấm *Candida albicans*

Theo Ferron et al. (2005) cho rằng phương pháp sàng lọc nhanh các chủng *A. terreus* có khả năng sinh tổng hợp lovastatin thông qua khả năng kháng nấm *Candida albicans* nhiều hay ít [69]. Kết quả trên cho thấy hoạt chất lovastatin từ các chủng đều có khả năng ức chế mạnh sự sinh trưởng và phát triển chủng *C. albicans*. Đặc biệt khả năng kháng nấm men của lovastatin từ chủng 313 thể hiện mạnh hơn các chủng *Rhizopus* sp. được khảo sát.



Hình 3.7. Khả năng kháng nấm *Candida albicans* của dịch chiết ethyl acetate chứa lovastatin thu nhận từ các chủng *Rhizopus* sp. ((+): đối chứng lovastatin; 313, 5154, 5155, 5278, 5280: là dịch chiết chứa hoạt chất lovastatin của các chủng *Rhizopus* sp.)

Bảng 3.2. Đường kính vòng kháng nấm *Candida albicans* của các mẫu dịch chiết ethyl acetate

Dịch chiết	Đường kính vòng kháng nấm (cm)
ĐC+	$0,82 \pm 0,02$
ĐC-	0
<i>Rhizopus</i> sp. BMM 313	$0,88 \pm 0,04$
<i>Rhizopus</i> sp. 5154	$0,44 \pm 0,03$
<i>Rhizopus</i> sp. 5155	$0,12 \pm 0,02$
<i>Rhizopus</i> sp. 5278	$0,19 \pm 0,02$
<i>Rhizopus</i> sp. 5280	$0,60 \pm 0,05$

Từ các số liệu thu được cho thấy, chủng *Rhizopus* sp. BMM 313 cho khả năng kháng nấm mạnh hơn so với các chủng khác (Hình 3.6, Hình 3.7). Kết quả TLC cũng cho thấy xuất hiện ít băng phụ hơn các chủng khác điều này sẽ thuận lợi cho việc tinh sạch để thu nhận hoạt chất lovastatin sau khi qua cột silicagel. Do vậy chủng *Rhizopus* sp. BMM 313 sẽ được sử dụng làm chủng

ngiên cứu trong các thí nghiệm tối ưu các môi trường để nâng cao khả năng sinh tổng hợp hoạt chất và tinh sạch thu nhận hoạt chất lovastatin.

3.1.4 Định danh chủng *Rhizopus sp.* BMM 313

Gen 28S rRNA của chủng *Rhizopus sp.* BMM 313 sau khi được nhân dòng, được giải trình tự bằng máy đọc trình tự gen tự động (ABI Prism 100 Sequencer) cho kết quả đoạn gen gồm 678 nucleotid (Phụ lục 4.2).

Khi so sánh trình tự gen với các trình tự tương ứng trên ngân hàng dữ liệu cơ sở GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI cho thấy: trình tự gen 28S rRNA của chủng *Rhizopus sp.* BMM 313 có độ tương đồng cao trên 98% đến 100% so với các chủng như bảng sau:

Bảng 3.3. Kết quả so sánh trình tự gen 28S rRNA của chủng *Rhizopus sp.* BMM 313 với gen tương ứng của các chủng *Rhizopus sp.* được đăng ký trên GenBank

Trình tự gen 28S rDNA của chủng <i>Rhizopus microsporus</i> được so sánh	Mã số truy cập trên GenBank	Độ tương đồng (%)
<i>Rhizopus microsporus</i> isolate FBKL3.0103	KY828856.1	100
<i>Rhizopus microsporus</i> strain CBS 344.29	KC206523.1	100
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> solate VPCI 314/P/10	KJ417573.1	99,85
<i>Rhizopus microsporus</i> isolate RL242	MT557150.1	99,85
<i>Rhizopus microsporus</i> strain DTO 402-G1	MT316365.1	98,82
<i>Rhizopus microsporus</i> strain VT60	OR536570.1	98,82

Đồng thời dựa trên đặc điểm hình thái cho thấy chủng *Rhizopus sp.* BMM 313 có đặc điểm phân loại tương đồng với *Rhizopus microsporus*.

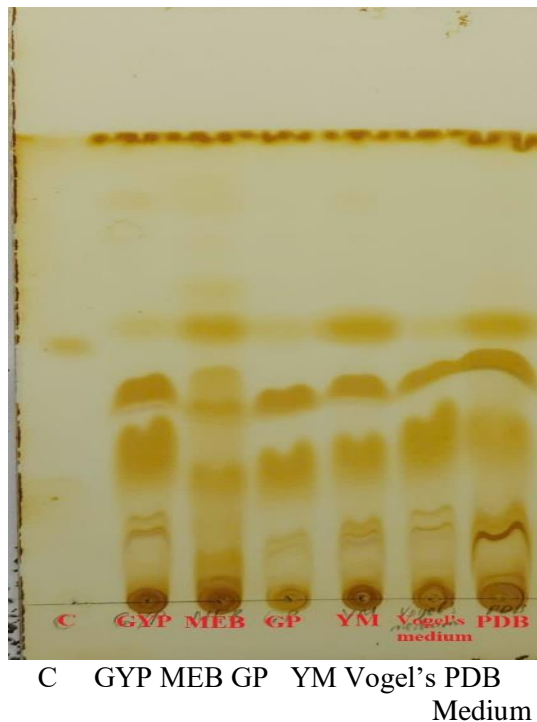
3.2 Khảo sát môi trường tăng khả năng sinh tổng hợp lovastatin của chủng *Rhizopus microsporus* BMM 313

Phân tích sắc ký lớp mỏng cho thấy sự hiện diện của các băng ngang chuẩn với giá trị $R_f = 0,57$ ở dịch chiết cả sáu môi trường nuôi cấy khác nhau, chứng tỏ chủng *Rhizopus microsporus* BMM 313 đều có khả năng sinh tổng hợp lovastatin khi phát triển trên cả 6 môi trường. Đặc biệt, các môi trường MEB,

YM và PDB đã thể hiện khả năng sinh tổng hợp lovastatin hiệu quả, với các băng ngang chuẩn có màu tương đối đậm. Trong đó, môi trường YM nổi bật với băng ngang chuẩn chuẩn đậm nhất, cho thấy hiệu suất sinh tổng hợp lovastatin cao của chủng *Rhizopus microsporus* BMM 313 trên môi trường này.

Một điểm đáng chú ý khác là môi trường YM cho thấy số lượng băng tạp ít hơn so với các môi trường còn lại. Hơn nữa, các băng trên bản mỏng TLC khi mẫu lên men trong môi trường YM có xu hướng sắc nét, ít bị kéo vệt, điều này cho thấy độ phân giải cao của hệ thống sắc ký. Kết quả này cho thấy môi trường YM là một môi trường phù hợp tăng khả năng sinh tổng hợp lovastatin từ chủng nấm *Rhizopus microsporus* BMM 313.

Việc lựa chọn môi trường YM dựa trên kết quả TLC sẽ giúp tối ưu hóa quy trình tách chiết trong các nghiên cứu tiếp theo. Một môi trường nuôi cấy lý tưởng không chỉ đảm bảo hiệu suất tách chiết cao mà còn giúp giảm thiểu các bước tinh sạch, qua đó có thể giảm thiểu thời gian, tiết kiệm hóa chất và quan trọng hơn là tránh được việc thất thoát mẫu qua mỗi lần tinh sạch. Do đó, việc sử dụng môi trường YM sẽ góp phần nâng cao hiệu quả nghiên cứu và phát triển các quy trình sản xuất lovastatin từ nguồn nguyên liệu tự nhiên.



Hình 3.8. Sắc ký đồ TLC của 6 mẫu dịch chiết ethyl acetate từ chủng *R. microsporus* BMM 313 nuôi trong 6 môi trường lên men khác nhau

Bảng 3.4. Hàm lượng lovastatin trong các môi trường

Các môi trường khác nhau	Hàm lượng lovastatin (mg/L)*
GYP	7,12
MEB	7,45
GP	7,39
YM	9,47
Vogel's medium	7,19
PDB	3,36

*Ghi chú: Định lượng bằng HPLC

Mặt khác, kết quả định lượng hàm lượng lovastatin bằng HPLC cho thấy hàm lượng lovastatin thu được từ chủng nấm *Rhizopus microsporus* BMM 313 có sự thay đổi đáng kể tùy thuộc vào thành phần dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy. Trong số các môi trường được thử nghiệm, môi trường YM đã thể hiện hiệu quả cao nhất trong việc thúc đẩy quá trình sinh tổng hợp lovastatin, với hàm lượng đạt 9,47 mg/L (Bảng 3.4; Phụ lục 4.3). Điều này cho thấy thành phần dinh dưỡng của môi trường YM rất phù hợp với chủng nấm *Rhizopus microsporus* BMM 313.

Glucose là nguồn carbon chính, cung cấp năng lượng cho các quá trình sinh tổng hợp. Cao malt và cao nấm men đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp các vitamin, khoáng chất và các yếu tố tăng trưởng thiết yếu. Peptone cung cấp nguồn nitơ hữu cơ cần thiết cho quá trình tổng hợp protein và các chất chuyển hóa khác. Sự kết hợp hài hòa giữa các thành phần này có thể đã kích thích nấm sản sinh ra nhiều enzyme liên quan đến quá trình sinh tổng hợp lovastatin hơn so với các môi trường khác.

Ngược lại, môi trường PDB lại cho kết quả thấp nhất với hàm lượng lovastatin chỉ đạt 3,36 mg/L. Mặc dù cung cấp một nguồn dinh dưỡng tự nhiên, nhưng có thể chứa các chất ức chế hoặc cạnh tranh với quá trình sinh tổng hợp

lovastatin. Các môi trường khác như MEB, GP và Vogel's, mặc dù cũng cho kết quả khá tốt, nhưng thành phần của chúng có thể không đủ đa dạng hoặc cân đối để tối ưu hóa quá trình sản xuất lovastatin. Sự khác biệt này cho thấy thành phần dinh dưỡng của môi trường PDB có thể thiếu hoặc không phù hợp với các yếu tố cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp lovastatin. Các môi trường MEB, GP và Vogel's cũng cho kết quả khá tốt, với hàm lượng lovastatin dao động từ 7,19 đến 7,45 mg/L.

Các yếu tố như nguồn nitơ, nguồn carbon, pH, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy đều có thể ảnh hưởng đến hiệu quả sinh tổng hợp lovastatin. Sự khác biệt về hàm lượng lovastatin thu được giữa các môi trường có thể giải thích bởi sự khác biệt về thành phần và tỷ lệ các yếu tố này.

Môi trường nuôi cấy YM, với thành phần dinh dưỡng đa dạng và cân đối, đã mở ra một hướng đi mới đầy hứa hẹn trong nghiên cứu sinh tổng hợp lovastatin. So với các môi trường truyền thống như PDB, YM cung cấp một nền tảng lý tưởng để nấm *Rhizopus microsporus* BMM 313 phát triển và sản xuất lovastatin. So với các nghiên cứu trước đây về *Rhizopus* sinh tổng hợp lovastatin, hầu hết chỉ sử dụng môi trường cơ bản PDB [46, 47]. Tuy nhiên, hàm lượng lovastatin tạo ra từ *R. microsporus* BMM 313 còn khá khiêm tốn, so với *Rhizopus oryzae* SSM9 nồng độ 90 mg/l, hay *R. oryzae* phân lập từ sỏi là 20,39 mg/l [46, 47].

Trong một nghiên cứu tác động của điều kiện sản xuất lovastatin của *Aspergillus terreus* PU-PCSIR-1 trong lên men chìm, năng suất lovastatin tối đa (198,90 mg/L) đạt được sau 14 ngày ủ ở nhiệt độ 28°C và pH 7,4. Sữa pepton, acid linoleic, glucose, cao nấm men và các nguyên tố vi lượng đều có tác động tích cực đến quá trình này [70]. Thiết kế Plackett-Burman được sử dụng nhằm thử nghiệm thống kê để tối ưu hóa sản xuất lovastatin bằng nấm *Pleurotus ostreatus* OBCC 1031 trong quá trình lên men chìm. Sản xuất lovastatin tối đa (114,82 mg/L) đạt được sau 6 ngày lên men trong điều kiện nuôi cấy tối ưu (30 g/L glucose, 10 g/L chiết xuất nấm men, 200 vòng/phút,

28°C và pH 6); cao hơn 50 lần so với lượng được sản xuất trong điều kiện môi trường chưa tối ưu hóa của *P. ostreatus* [71].

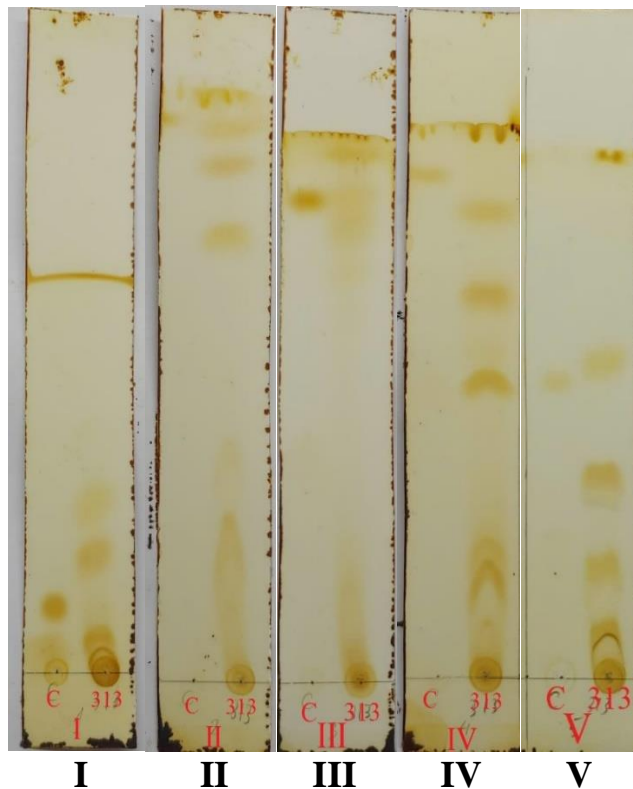
Để tối ưu hóa quá trình sinh tổng hợp lovastatin, chúng ta cần xem xét một cách toàn diện các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình này. Đầu tiên, chủng nấm đóng vai trò quan trọng. Việc sàng lọc và chọn lọc các chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp cao là một hướng đi cần thiết. Bên cạnh đó, điều kiện nuôi cấy cũng là một yếu tố quyết định. Bằng cách điều chỉnh các thông số như nhiệt độ, pH, độ khuấy, cung cấp oxy và thành phần môi trường, chúng ta có thể tạo ra một môi trường tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp. Cuối cùng, cơ chế sinh tổng hợp lovastatin cần được nghiên cứu sâu hơn để tìm ra các điểm nghẽn và các mục tiêu để can thiệp. Cuối cùng, các yếu tố khác như tuổi của bào tử, mật độ tế bào, sự có mặt của các chất ức chế cũng cần được xem xét.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy môi trường YM đã chứng tỏ là một môi trường nuôi cấy rất tiềm năng trong các môi trường nghiên cứu để sản xuất lovastatin. Tuy nhiên, để khai thác tối đa tiềm năng của chủng nấm này, cần tiếp tục nghiên cứu và tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy. Việc hiểu rõ cơ chế sinh tổng hợp lovastatin sẽ giúp chúng ta phát triển các quy trình sản xuất hiệu quả và bền vững, góp phần cung cấp một nguồn thuốc hạ lipid máu tự nhiên và chất lượng cao.

3.3 Bước đầu nghiên cứu các điều kiện thu nhận, tinh sạch lovastatin từ chủng *Rhizopus* sp.

3.3.1 Lựa chọn hệ dung môi pha động chạy sắc ký cột silica gel

Để lựa chọn được hệ dung môi phù hợp dùng cho tinh sạch bằng sắc ký cột silica gel 60, tiến hành chạy thử TLC mẫu dịch chiết chủng *Rhizopus microporus* BMM 313 với 5 hệ dung môi khác nhau.



Hình 3.9. Khả năng phân tách chất của 5 hệ dung môi
(C: đối chứng lovastatin, 313: Dịch chiết ethyl acetate chủng *Rhizopus microporus* BMM 313)

Hệ I: n-hexan : ethyl acetate = 8 : 2

Hệ II: ethyl acetate : methanol = 8 : 2

Hệ III: n-hexan : ethyl acetate : acetic acid = 8 : 2 : 0.5

Hệ IV: toluene : ethyl acetate : methanol = 5 : 4 : 1

Hệ V: dichloromethane : ethyl acetate = 7 : 3

Kết quả trên hình 3.9 cho thấy hệ dung môi V là dichloromethane : ethyl acetate với tỉ lệ 7:3 có khả năng tách các chất trong dịch chiết một cách rõ ràng nhất, với các vạch rõ ràng, riêng rẽ. Do sự kết hợp giữa dichloromethane là một dung môi có khả năng rửa giải kém với một dung môi rửa giải tốt ethylacetate với một tỷ lệ thích hợp, khả năng tách hỗn hợp các chất có bản chất khác nhau sẽ trở nên rất hiệu quả. Hơn nữa, hệ dung môi này còn tiết kiệm và ít độc hơn so với các hệ có methanol hay các dung môi mang hệ vòng. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu khác trong nước và trên thế giới khi sử dụng cặp dung môi phổ biến này với tỷ lệ 7:3 [58]. Tương tự kết quả mà chúng tôi thu được, báo cáo của Dhar và Nigam cũng cho kết quả TLC

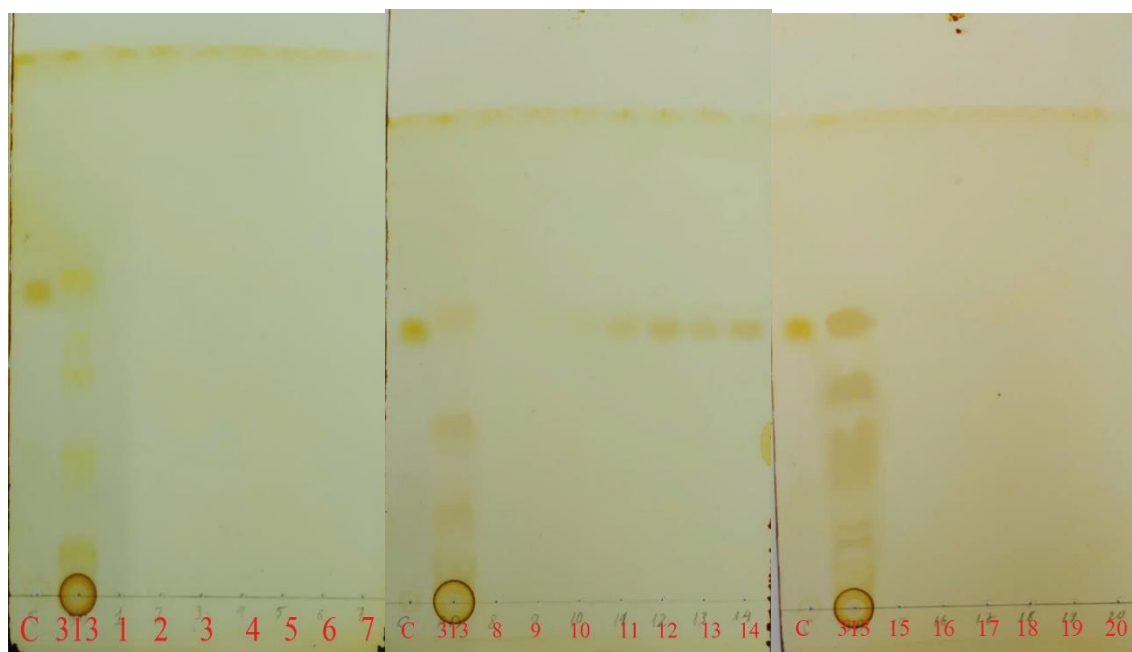
bằng hệ dung môi này với $R_f = 0,58$ và hiệu quả tách lovastatin ra khỏi dịch chiết cũng rất rõ ràng [72].

Tuy nhiên, trong dịch chiết của một số loài, có thể tồn tại cùng lúc nhiều hoạt chất có hoạt tính ức chế HMG-CoA reductase như lovastatin, mevastatin, pravastatin và monacolin K [73]. Do đó, để xác định chính xác các chất này, cần chạy thêm các mẫu chuẩn tương ứng trên sắc ký lớp mỏng và HPLC. Hơn nữa, việc đo hoạt tính ức chế HMG-CoA reductase của dịch chiết có thể cung cấp thông tin chính xác hơn về tiềm năng của dịch chiết này thay vì chỉ đánh giá trên hàm lượng lovastatin thu được, dựa trên phương pháp đo tín hiệu phóng xạ tạo ra [74] hoặc đo lượng NADPH hụt đi [75].

Ngoài ra, với hàm lượng lovastatin tương đối thấp trong dịch chiết, có thể nghĩ đến việc xử lý hệ sợi rồi tách chiết và đo hàm lượng các statin cũng như hoạt tính ức chế HMG-CoA reductase của hệ sợi này. Nghiên cứu của Manzoni và cộng sự (1998) đã chỉ ra rằng năng suất thu hồi lovastatin bao gồm 83% lovastatin chiết được từ sợi nấm và chỉ 17% là dạng tự do trong dịch lên men [73].

3.3.2 Kết quả tinh sạch lovastatin

Từ những kết quả khả quan khi TLC, chủng *Rhizopus microsporus* BMM 313 được lựa chọn để lên men, tinh sạch thu nhận lovastatin. Chủng *Rhizopus microsporus* BMM 313 được lên men trong môi trường YM bao gồm các thành phần 1% D-glucose, 0,3% cao malt, 0,3% cao nấm men, 0,5% peptone trong 7 ngày. Dịch lên men sau khi loại bỏ hết sinh khối được hạ pH xuống 3 và chiết bằng ethyl acetate với tỉ lệ 1 : 1 trong 2 giờ, tốc độ lắc 200 vòng/phút, thu phần dịch chiết (pha dung môi). 50 ml dịch chiết ethyl acetate được cất cô quay và hòa tan lại trong 2,5 ml ethyl acetate. Toàn bộ 2,5 ml này được tinh sạch lần 1 bằng cột silica gel 60 kích thước 52 x 2 cm. Sử dụng hệ dung môi chạy cột là dichloromethane : ethyl acetate tỉ lệ 7 : 3, điều chỉnh tốc độ dòng 25 ml/phút. Thu 20 phân đoạn, mỗi phân đoạn 3 ml. Các phân đoạn này được kiểm tra lại bằng TLC và xác định độ sạch bằng HPLC.



Hình 3.10. Sắc ký đồ TLC 20 phân đoạn tinh sạch từ chủng *R. microsporus* BMM 313 sau khi qua cột silicagel (C: lovastatin chuẩn, 313: dịch chiết ethyl acetate trước khi lên cột; 1-20: các phân đoạn tinh sạch từ phân đoạn 1 đến phân đoạn 20)

Trên sắc ký đồ TLC, các phân đoạn từ 9 đến 14 đều xuất hiện một băng duy nhất ngang với băng chuẩn lovastatin và rõ nhất là phân đoạn 11 và 12. Kết quả kiểm tra các phân đoạn tinh sạch bằng HPLC cho thấy các phân đoạn thu được lovastatin với độ tinh sạch đạt từ 70,13 %- 99,99 %. Mẫu dịch chiết chủng *Rhizopus microsporus* BMM 313 ban đầu chưa tinh sạch lovastatin chiếm 40,3% so với tổng các chất chiết được từ dịch nuôi cấy (Phụ lục 4.4).

Từ các số liệu thu được cho thấy sau khi tinh sạch qua cột silicagel hầu như đã loại bỏ phần lớn các tạp chất không mong muốn. Đặc biệt phân đoạn tinh sạch 11, 12, thu được với hàm lượng lovastatin có độ sạch cao, hàm lượng tổng lovastatin bao gồm lovastatin dạng lacton và dạng acid chiếm 99,99 % (Phụ lục 4.5). Như vậy, chúng tôi đã tinh sạch thành công lovastatin từ dịch lên men của chủng *R. microsporus* BMM 313.

Bảng 3.5. Hiệu suất thu hồi của hai phân đoạn 11 và 12

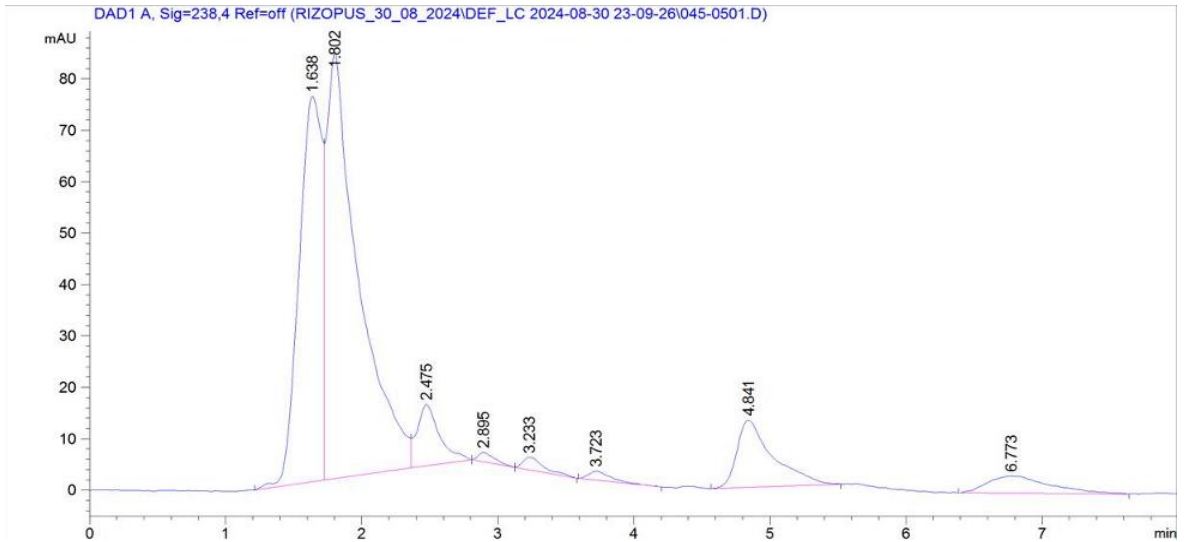
	Hàm lượng lovastatin (mg)*	Hiệu suất thu hồi (%)
Dịch lên cột	0,4735	
Phân đoạn 11	0,1076	22,73
Phân đoạn 12	0,1694	35,78

**Ghi chú: Định lượng bằng HPLC*

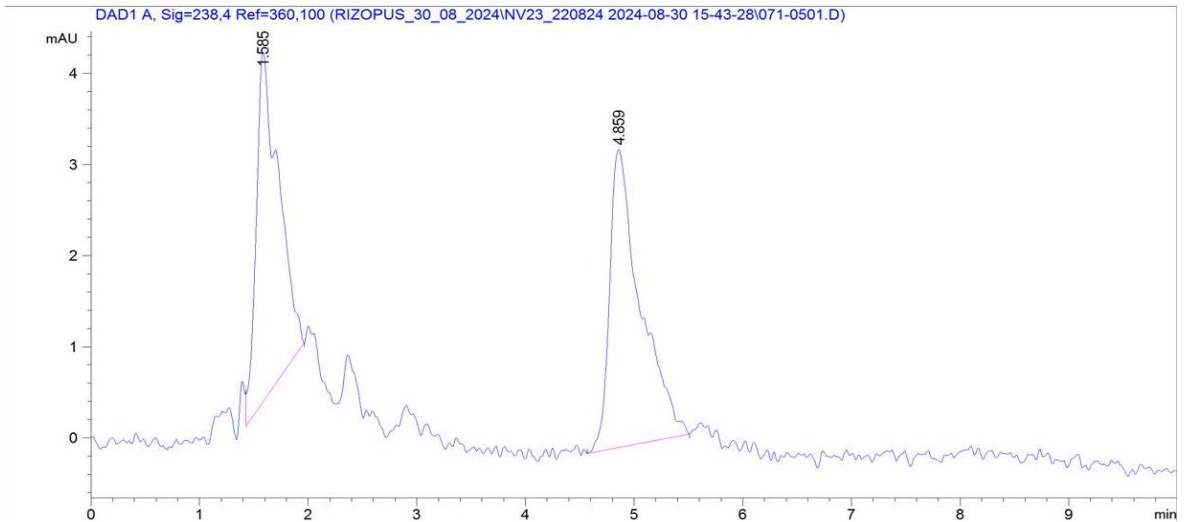
Định lượng hàm lượng lovastatin bằng HPLC cho thấy hai phân đoạn 11 và 12 có hàm lượng lovastatin lần lượt đạt 35,87 mg/L và 56,48 mg/L. Hiệu suất thu hồi của hai phân đoạn này tương ứng đạt 22,73% và 35,78%. Hiệu suất thu hồi khi gộp cả hai phân đoạn 11 và 12 là 58,50%.

Trước đây, người ta định lượng lovastatin dựa trên quang phổ hấp thụ (UV-VIS). Tuy nhiên, việc phân tích dịch lên men có chứa lovastatin dường như không chính xác do các chất tương tự và/hoặc chất trung gian của lovastatin được tổng hợp trong dịch lên men và các sản phẩm lên men gây ra hiệu ứng chông chát trên phổ hấp thụ, đặc biệt là sự ảnh hưởng của phosphate lên phổ hấp thụ UV. Do đó, việc định lượng lovastatin do các chủng nấm sợi sản xuất và lovastatin tinh khiết đã được thực hiện bằng máy HPLC với detector UV-VIS [76].

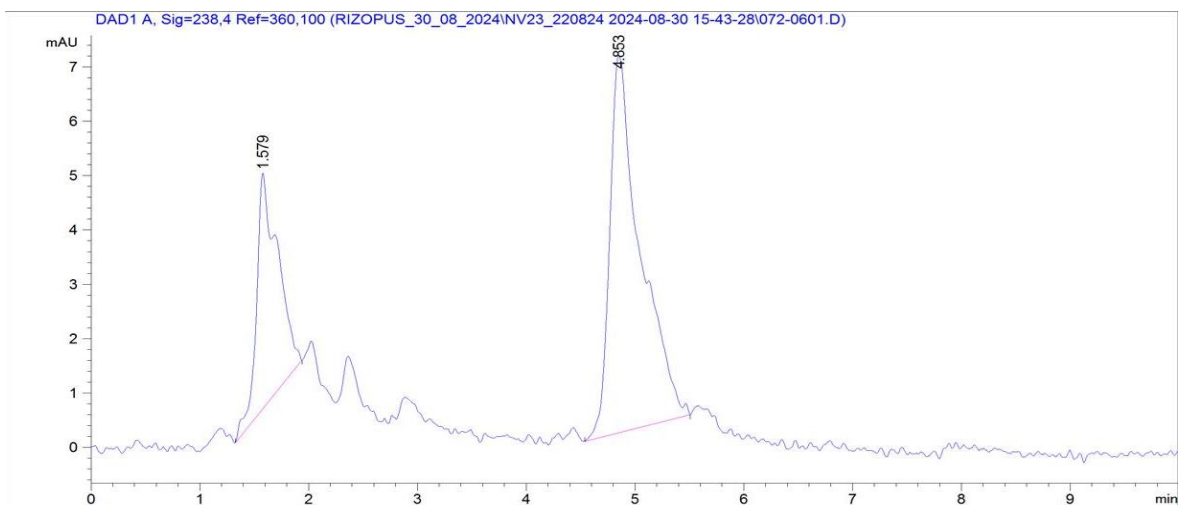
Sau khi tinh sạch, do chưa lactone hóa, lovastatin trong dung dịch tồn tại dưới hai dạng acid và lactone [50]. Trong khi đó, chỉ có dạng lactone có thể kết tinh và sấy khô nên thường được chọn là sản phẩm cuối [23, 50]. Bởi vậy, trong các nghiên cứu tiếp theo, cần lactone hóa bằng dung môi toluen [51] hoặc bằng 1% trifluoroacetic acid trước khi tinh sạch [46, 47].



Hình 3.11. Sắc đồ dịch chiết chủng ethyl acetate *Rhizopus microporus* BMM 313 trước khi tinh sạch



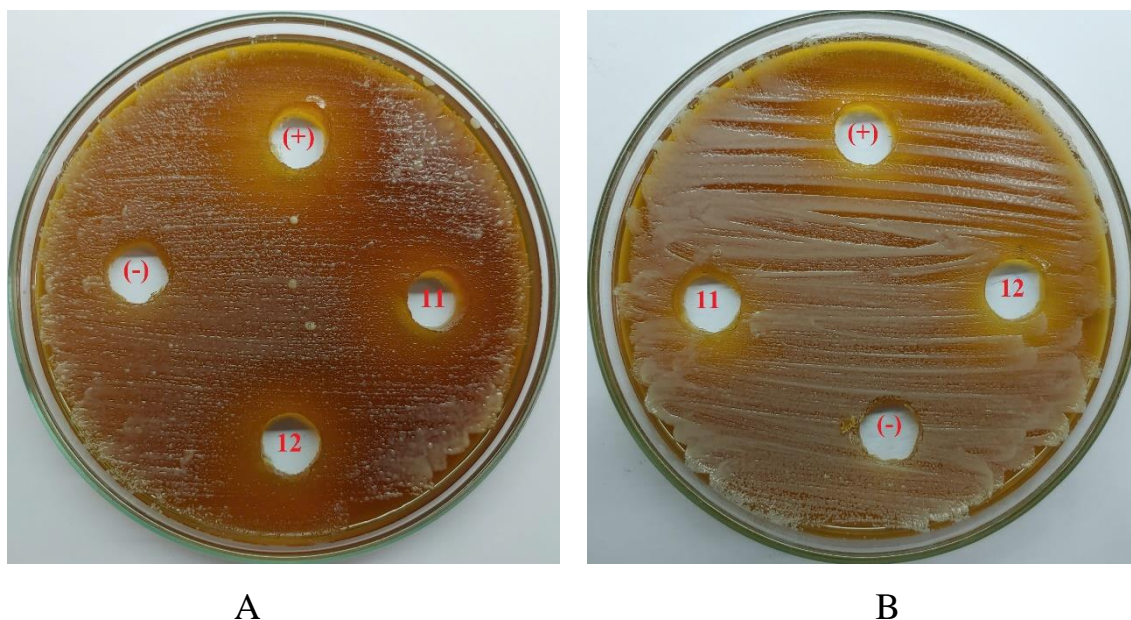
Hình 3.12. Sắc đồ phân đoạn sạch 11



Hình 3.13. Sắc đồ phân đoạn sạch 12

3.4 Nghiên cứu và đánh giá hoạt tính ức chế vi sinh vật của lovastatin tách ra từ chủng nấm *Rhizopus* sp.

Hai phân đoạn 11 và 12 có độ tinh sạch đạt 99,99% sẽ được tiến hành thử nghiệm khả năng ức chế nấm men *Saccharomyces* sp. và *Candida albicans* với chất đối chứng dương là lovastatin chuẩn (Sigma)



Hình 3.14. Khả năng kháng nấm *Saccharomyces* sp. (A) và *Candida albicans* (B) của 2 mẫu phân đoạn sau khi qua cột silica gel 60. ((+): đối chứng lovastatin; (-): đối chứng âm ethyl acetate 11, 12: phân đoạn 11 và 12)

Bảng 3.6. Đường kính vòng kháng nấm men *Saccharomyces* sp. 2 phân đoạn tinh sạch 11 và 12

Mẫu	Đường kính vòng kháng nấm <i>Saccharomyces</i> sp. (cm)
ĐC +	1,74 ± 0,09
ĐC -	0
Phân đoạn 11	1,54 ± 0,03
Phân đoạn 12	1,65 ± 0,05

Bảng 3.7 Đường kính vòng kháng nấm men *Candida albicans* 2 phân đoạn tinh sạch 11 và 12

Mẫu	Đường kính vòng kháng nấm <i>Candida albicans</i> (cm)
ĐC +	1,16 ± 0,08
ĐC -	0
Phân đoạn 11	0,88 ± 0,04
Phân đoạn 12	0,98 ± 0,05

Kết quả hình 3.14 cho thấy hai phân đoạn này thể hiện khả năng ức chế sinh trưởng nấm men tốt. Trong đó, hoạt tính kháng nấm men của phân đoạn 12 mạnh hơn phân đoạn 11. Khả năng kháng nấm *Saccharomyces* sp. cũng mạnh hơn so với *Candida albicans*, với đường kính vòng kháng nấm tương ứng đạt $1,65 \pm 0,05$ cm và $0,98 \pm 0,05$ cm.

Như vậy, hoạt tính kháng nấm men của lovastatin đã được biểu hiện đầy đủ trong phân đoạn tinh sạch 11 và 12. Trong các nghiên cứu tiếp theo, sau khi thu được các tinh thể lovastatin, có thể tiến hành kiểm tra EC_{50} của lovastatin từ chủng *Rhizopus microsporus* BMM 313 trên nấm men và kiểm tra tác dụng hiệp đồng với các thuốc thuộc nhóm azol nhằm kháng lại các loại nấm cơ hội [77, 78].

KẾT LUẬN

Từ những số liệu thu được, chúng tôi đưa ra được các kết luận sau:

(1) Tuyển chọn thành công chủng *Rhizopus* sp. BMM 311 có khả năng sinh tổng hợp lovastatin trong tổng số 5 chủng *Rhizopus* sp. đã khảo sát. Chủng *Rhizopus* sp. BMM311 có khả năng sinh tổng hợp lovastatin trên môi trường PDB đạt 6,95 mg/L (xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao). Hoạt tính ức chế nấm men *Saccharomyces* sp. và *Candida albicans* mạnh với vòng ức chế đạt tương ứng là 1,50 cm và 0,88 cm. Chủng *Rhizopus* sp. BMM 313 đã được phân loại bằng hình thái và trình tự gene 28S rRNA xác định chính xác là *Rhizopus microsporus* BMM 313.

(2) Nghiên cứu được các thành phần dinh dưỡng để nâng cao khả năng sinh tổng hợp lovastatin từ chủng *R. microsporus* BMM 313. Môi trường tốt nhất cho chủng *R. microsporus* BMM 313 là môi trường YM bao gồm: 1% D-glucose, 0,3% cao malt, 0,3% cao nấm men, 0,5% peptone, 30°C, 200 vòng/phút, thời gian 7 ngày. Hàm lượng hoạt chất lovastatin - chất ức chế HMG-CoA reductase- trong môi trường YM đạt cao gấp 2,82 lần so với môi trường nuôi cấy ban đầu.

(3) Bước đầu tinh sạch được hoạt chất lovastatin sau khi qua cột sắc ký silica gel với độ sạch đạt 99,99% (xác định bằng HPLC), hiệu suất thu hồi của phân đoạn lovastatin tinh sạch đạt 58,5%. Lovastatin khi tinh sạch có hoạt tính kháng nấm men *Saccharomyces* sp. và *Candida albicans* với đường kính kháng nấm tương ứng đạt 1,65 cm và 0,98 cm (phân đoạn 12); 1,54 cm và 0,88 cm (phân đoạn 11).

KIẾN NGHỊ

- Nghiên cứu tối ưu các điều kiện nuôi cấy và tối ưu hóa đáp ứng bề mặt để nghiên cứu được các thành phần môi trường cũng như điều kiện nuôi cấy chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất ức chế HMG-CoA reductase (lovastatin) cao nhất.
- Tiếp tục nghiên cứu tinh sạch thu nhận hoạt chất, xác định cấu trúc hóa học để nhận dạng chính xác công thức phân tử của hoạt chất, và đánh giá hiệu quả hiệp đồng kháng nấm khi kết hợp với các thuốc thuộc nhóm azol.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wu Y., Liu S., Han X., Ying W., Mao J., 2021, Screening of *Monascus* strains with high lovastatin production for brewage, *Journal of Food Science and Technology (Beijing)*, 39(6), pp. 77-86.
2. Barrios-González J., Miranda R.U., 2010, Biotechnological production and applications of statins, *Applied microbiology and biotechnology*, 85, pp. 869-883.
3. Panda B.P., Javed S., Ali M., 2010, Optimization of fermentation parameters for higher lovastatin production in red mold rice through co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*, *Food Bioprocess Technology*, 3, pp. 373-378.
4. Vũ Nguyễn Thành, 2006 Báo cáo tổng kết nhiệm vụ khoa học công nghệ thường xuyên: Bảo tồn, lưu giữ và nghiên cứu khai thác nguồn gen vi sinh vật công nghiệp thực phẩm, *Bộ Công nghiệp*.
5. Lê Đức Mạnh, 2007, Khảo sát khả năng tạo sắc tố lovastatin và độc tố citrinin của hai chủng nấm mốc đỏ *Monascus purpureus* *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 23(2007), pp. 238-244.
6. Đỗ Thị Tuyên, Lê Thanh Hoàng, Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Hoài Trâm, 2012, Tạo các dòng đột biến *Asperillus terreus* để nâng cao tổng hợp lovastatin, *Tạp chí Khoa học và công nghệ* 50(3B), pp. 105-112.
7. Nabel E.G., 2003, Cardiovascular disease, *New England Journal of Medicine*, 349(1), pp. 60-72.
8. Shieh H.-S., Hoard L., Nordman C., 1981, The structure of cholesterol, *Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography Crystal Chemistry*, 37(8), pp. 1538-1543.
9. Tabas I., 2002, Cholesterol in health and disease, *The Journal of clinical investigation*, 110(5), pp. 583-590.
10. Holmes M.V., Ala-Korpela M., 2019, What is 'LDL cholesterol'?, *Nature Reviews Cardiology*, 16(4), pp. 197-198.
11. Hsu H.Y., Lin C.J., Lee Y.S., Wu T.H., Chien K.L., 2020, Efficacy of more intensive lipid-lowering therapy on cardiovascular diseases: a systematic review and meta-analysis, *BMC Cardiovasc Disord*, 20(1), pp. 334.
12. Friesen J.A., Rodwell V.W., 2004, The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases, *Genome Biol*, 5(11), pp. 248.
13. Roitelman J., Olender E.H., Bar-Nun S., Dunn W.A., Jr., Simoni R.D., 1992, Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum, *J Cell Biol*, 117(5), pp. 959-73.

14. Rodwell V.W., Nordstrom J.L., Mitschelen J., 1976, Regulation of HMG-CoA reductase, *Advances in lipid research*, 14, pp. 1-74.
15. Haines B.E., Wiest O., Stauffacher C.V., 2013, The increasingly complex mechanism of HMG-CoA reductase, *Accounts of chemical research*, 46(11), pp. 2416-2426.
16. Lewington S., Whitlock G., Clarke R., Sherliker P., Emberson J., Halsey J., Qizilbash N., Peto R., Collins R., 2007, Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths, *Lancet*, 370(9602), pp. 1829-39.
17. Alenghat F.J., Davis A.M., 2019, Management of blood cholesterol, *JAMA*, 321(8), pp. 800-801.
18. Taylor F., Huffman M.D., Macedo A.F., Moore T.H., Burke M., Davey Smith G., Ward K., Ebrahim S., 2013, Statins for the primary prevention of cardiovascular disease, *Cochrane Database Syst Rev*, 2013(1), pp. CD004816.
19. in *Lipid Modification: Cardiovascular Risk Assessment and the Modification of Blood Lipids for the Primary and Secondary Prevention of Cardiovascular Disease*. 2014: London.
20. Fulcher J., O'Connell R., Voysey M., Emberson J., Blackwell L., Mihaylova B., Simes J., Collins R., Kirby A., Colhoun H., Braunwald E., La Rosa J., Pedersen T.R., Tonkin A., Davis B., Sleight P., Franzosi M.G., Baigent C., Keech A., 2015, Efficacy and safety of LDL-lowering therapy among men and women: meta-analysis of individual data from 174,000 participants in 27 randomised trials, *Lancet*, 385(9976), pp. 1397-405.
21. Cangemi R., Romiti G.F., Campolongo G., Ruscio E., Sciomer S., Gianfrilli D., Raparelli V., 2017, Gender related differences in treatment and response to statins in primary and secondary cardiovascular prevention: The never-ending debate, *Pharmacol Res*, 117, pp. 148-155.
22. Stancu C., Sima A.J., 2001, Statins: mechanism of action and effects, *Journal of cellular molecular medicine*, 5(4), pp. 378-387.
23. Xiong Z., Cao X., Wen Q., Chen Z., Cheng Z., Huang X., Zhang Y., Long C., Zhang Y., Huang Z., 2019, An overview of the bioactivity of monacolin K/lovastatin, *Food Chemical Toxicology*, 131, pp. 110585.
24. Zhgun A., 2021, Random mutagenesis of filamentous fungi strains for high-yield production of secondary metabolites: The Role of Polyamines, *Genotoxicity Mutagenicity—Mechanisms Test Methods*, pp. 25-41.
25. Zhgun A., Nuraeva G., Eldarov M., 2019, The role of LaeA and LovE regulators in lovastatin biosynthesis with exogenous polyamines in *Aspergillus terreus*, *Applied biochemistry microbiology*, 55, pp. 639-648.

26. Zhgun A., Dumina M., Voinova T., Dzhavakhiya V., Eldarov M., 2018, Role of acetyl-CoA synthetase and LovE regulator protein of polyketide biosynthesis in lovastatin production by wild-type and overproducing *Aspergillus terreus* strains, *Applied biochemistry microbiology*, 54, pp. 188-197.
27. Barrios-González J., Pérez-Sánchez A., Bibián M.E., 2020, New knowledge about the biosynthesis of lovastatin and its production by fermentation of *Aspergillus terreus*, *J Applied Microbiology Biotechnology*, 104, pp. 8979-8998.
28. Chaynika P., Srividya S., 2014, Bioprospecting of lovastatin producing fungi isolated from soil samples, *Int Res J Biol Sci*, 3, pp. 42-46.
29. Endo A., Kuroda M., Tsujita Y., 1976, ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*, *J Antibiot (Tokyo)*, 29(12), pp. 1346-8.
30. Vadlamani S., 2015, Review on statins: future perspective, *Research journal of pharmaceutical biological chemical sciences*, 6(2), pp. 471-475.
31. Hartanti A.T., Rahayu G., Hidayat I., 2015, *Rhizopus* species from fresh tempeh collected from several regions in Indonesia, *HAYATI Journal of Biosciences*, 22(3), pp. 136-142.
32. Handoyo T., Morita N., 2006, Structural and functional properties of fermented soybean (tempeh) by using *Rhizopus oligosporus*, *International Journal of food properties*, 9(2), pp. 347-355.
33. Sjamsuridzal W., Khasanah M., Febriani R., Vebliza Y., Oetari A., Santoso I., Gandjar I., 2021, The effect of the use of commercial tempeh starter on the diversity of *Rhizopus tempeh* in Indonesia, *Scientific reports*, 11(1), pp. 23932.
34. Chang C.T., Hsu C.K., Chou S.T., Chen Y.C., Huang F.S., Chung Y.C., 2009, Effect of fermentation time on the antioxidant activities of tempeh prepared from fermented soybean using *Rhizopus oligosporus*, *International Journal of Food Science Technology*, 44(4), pp. 799-806.
35. Zhang Z.Y., Jin B., Kelly J.M., 2007, Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi, *Biochemical engineering journal*, 35(3), pp. 251-263.
36. Jamal P., Alam M.Z., Umi N., 2007, Potential strain to produce bioprotein from cheaper carbon source: Hope for millions, *American Journal of Biotechnology and Biochemistry* 3, pp. 42-46.
37. Suzuki T., Ushikoshi S., Morita H., Fukuoka H., 2007, Aqueous extracts of *Rhizopus oryzae* induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cell line HL-60, *Journal of health science*, 53(6), pp. 760-765.
38. Ghosh B., 2011, Current commercial perspective of *Rhizopus oryzae*: a review, *J Appl Sci*, 11(14), pp. 2470-2486.
39. Corzo-León D.E., Uehling J.K., Ballou E.R., 2023, *Rhizopus arrhizus*, *Trends in Microbiology*, 31(9), pp. 985-987.

40. Gebremariam T., Alkhazraji S., Alqarihi A., Wiederhold N.P., Shaw K.J., Patterson T.F., Filler S.G., Ibrahim A.S., 2020, Fosmanogepix (APX001) is effective in the treatment of pulmonary murine mucormycosis due to *Rhizopus arrhizus*, *Antimicrobial agents chemotherapy*, 64(6), pp. 10.1128/aac.00178-20.
41. Rodríguez-Lobato E., Ramírez-Hobak L., Aquino-Matus J.E., Ramírez-Hinojosa J.P., Lozano-Fernández V.H., Xicohtencatl-Cortes J., Hernández-Castro R., Arenas R., 2017, Primary cutaneous mucormycosis caused by *Rhizopus oryzae*: a case report and review of literature, *Mycopathologia*, 182, pp. 387-392.
42. Hanson L.E., 2010, Interaction of *Rhizoctonia solani* and *Rhizopus stolonifer* causing root rot of sugar beet, *Plant Dis*, 94(5), pp. 504-509.
43. Qing F., Shiping T., 2007, Postharvest biological control of *Rhizopus* rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*, *Plant Dis*, 84(11), pp. 1212-1216.
44. Wang R., Gao B., Chen S., Ma J., Li X., Xue C., 2017, First report of *Rhizopus oryzae* causing soft rot on storage roots of sweetpotato in China, *Plant Disease*, 101(6), pp. 1039.
45. Shtienberg D., 1997, *Rhizopus* head rot of confectionery sunflower: effects on yield quantity and quality and implications for disease management, *J Phytopathology*, 87(12), pp. 1226-1232.
46. Immanuel S., Anusha P., 2019, Production of lovastatin by soil microfungi *Rhizopus oryzae*, *Acta Scientific Med Sci*, 3(1), pp. 70-74.
47. Upendra R., Pratima K., Amiri Z., Shwetha L., Ausim M., 2013, Screening and molecular characterization of natural fungal isolates producing lovastatin, *J Microb Biochem Technol*, 5(2), pp. 25-30.
48. Praveen V., Savitha J., 2012, Solid State Fermentation: An effective method for lovastatin production by fungi—a mini review, 5, pp. 1-5.
49. Valera H.R., Gomes J., Lakshmi S., Gururaja R., Suryanarayan S., Kumar D., 2005, Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*, *Enzyme and Microbial Technology*, 37(5), pp. 521-526.
50. Lisec B., Radež I., Žilnik L.F., 2012, Solvent extraction of lovastatin from a fermentation broth, *Separation purification technology*, 96, pp. 187-193.
51. Kumar P., Raman S., Narula P., 2006, *Process for the isolation of lovastatin*, Google Patents.
52. Nguyễn Thiện Phú, 2016, Phân lập, tuyển chọn các chủng nấm sợi có khả năng tạo lovastatin từ rùng ngập mặn Cần Giờ, *Tạp chí Khoa học ĐHSP TPHCM*, 9(87), pp. 113-126.
53. Phạm Đức Toàn, Đỗ Thị Thanh Huyền, Bùi Thị Hồng Phương, Đỗ Thị Thủy Lê, Trâm Nguyễn Thị Hoài., 2012, Nghiên cứu sàng lọc, lựa chọn và nâng cao hiệu suất tổng hợp lovastatin từ các chủng *Aspergillus terreus*, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ 3C*(50), pp. 553-562.

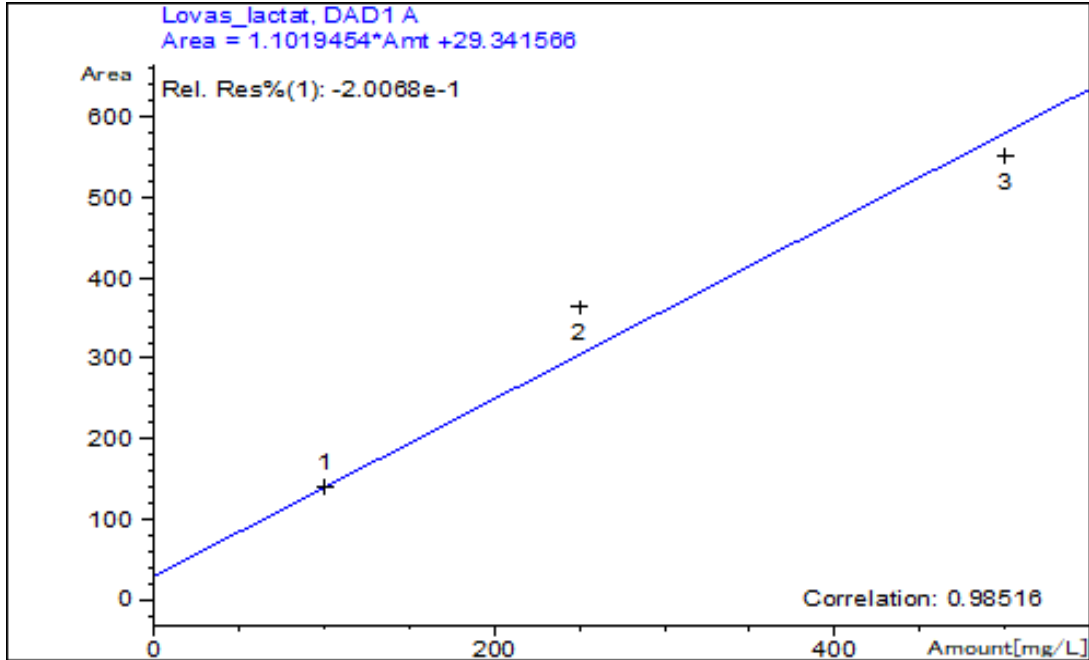
54. Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Lê Thanh Hoàng, Đỗ Thị Tuyên, Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Hoài Trâm, 2013, Tối ưu sinh tổng hợp Lovastatin của *Aspergillus terreus* VTCC-F702 và *A. terreus* VTCC-F916 dưới các điều kiện lên men rắn, *Tạp chí Y học Việt nam* 2, pp. 12- 17.
55. Vũ Thanh Tùng, Lê Thanh Hoàng, Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Nguyễn Thị Thảo, Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Nguyễn Thị Hiền Trang, Nguyễn Thị Trung, Đào Thị Mai Anh, Nguyễn Mạnh Đạt, Đỗ Thị Thanh Huyền, Lưu Minh Đức, Đỗ Thị Tuyên, 2023, Sàng lọc và nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất có hoạt tính ức chế enzyme HMG-CoA reductase (lovastatin) từ chủng nấm *Aspergillus* phân lập ở Việt Nam., *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2023.*, pp. 184-190.
56. Phú N.T., Thương V.T., 2016, Phân lập, tuyển chọn các chủng nấm sợi có khả năng tạo lovastatin từ rừng ngập mặn Cần Giờ, *Tạp chí Khoa học*, 9 (87), pp. 113.
57. Wu Z., Wang T., Huang W., Qu Y., 2001, A simplified method for chromosome DNA preparation from filamentous fungi, *Mycosystema*, 20(4).
58. Samiee S.M., Moazami N., Haghghi S., Aziz Mohseni F., Mirdamadi S., Bakhtiari M.R., 2003, Screening of lovastatin production by filamentous fungi, *Iranian Biomedical Journal*, 7(1), pp. 29-33.
59. Al-Sa'ady A.J., Aziz G.M., Purification and characterization of lovastatin produced from local isolate *Aspergillus terreus* A50 by solid state fermentation.
60. Di Napoli M., 2004, Benefit of statins in cerebrovascular disease, *Current opinion in investigational drugs*, 5(3), pp. 295-305.
61. Seenivasan A., Subhagar S., Aravindan R., Viruthagiri T., 2008, Microbial production and biomedical applications of lovastatin, *Indian J Pharm Sci*, 70(6), pp. 701-70.
62. Wei P.l., Xu Z.N., Cen P.l., 2007, Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation, *J Zhejiang University - Science A*, 8, pp. 1521-1526.
63. Andrii P., Gryganskyi A.P., Golan J., Dolatabadi S., Mondo S., et al, 2018, Phylogenetic and phylogenomic definition of *Rhizopus* species., *G3 (Bethesda)* 8(6), pp. 2007-2018.
64. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyền, Phạm Văn Ty, 1997, Vi sinh vật học, *NXB Giáo Dục*.
65. Samiee S.M., Moazami N., Haghghi S., Mohseni F.A., Mirdamadi S., Bakhtiari M.R., 2003, Screening of lovastatin production by filamentous fungi, *Iran Biomed J*, 7(1), pp. 29-33.
66. Sree D.K., Venkateswara R.J., Lakshmi N.M., Sai K.K., 2011, Isolation and screening of lovastatin producing *Aspergillus terreus* fungal strains from soil samples, *International Journal of Pharmacy & Techonology*, 3(2), pp. 2772-2782

67. Cabral M.E., Figueroa L.I., Fariña J.I., 2013, Synergistic antifungal activity of statin–azole associations as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae*-and *Candida utilis*-bioassays and ergosterol quantification, *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), pp. 31-38.
68. Zhou Y., Yang H., Zhou X., Luo H., Tang F., Yang J., Alterovitz G., Cheng L., Ren B., 2018, Lovastatin synergizes with itraconazole against planktonic cells and biofilms of *Candida albicans* through the regulation on ergosterol biosynthesis pathway, *Applied microbiology biotechnology*, 102, pp. 5255-5264.
69. Ferro V.M.A., Lopez C.J.L., Perez S.J.A., Sevilla F.J.M., Chisti Y., 2005 Rapid screening of *Aspergillus terreus* mutants for overproduction of lovastatin, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, pp. 123-125.
70. Azeem M., Saleem Y., Hussain Z., Zahoor S., Javed M.M., 2018, Optimization of culture conditions for the production of lovastatin by *Aspergillus Terreus* in submerged fermentation, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 52(3), pp. 284-289.
71. Atli B., Yamac M., Yildiz Z., 2013, Optimization of submerged fermentation conditions for lovastatin production by the culinary-medicinal oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Higher Basidiomycetes), 15(5).
72. Dhar R., Nigam K., 2015, Studies on process parameters for production of lovastatin, *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 5(51), pp. 25.
73. Manzoni M., Rollini M., Bergomi S., Cavazzoni V., 1998, Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains, *Biotechnology Techniques*, 12(7), pp. 529-532.
74. Liu L., Zhang R., Zhao J.J., Rogers J.D., Hsieh J.Y.K., Fang W., Matuszewski B.K., Dobrinska M.R., 2003, Determination of simvastatin-derived HMG-CoA reductase inhibitors in biomatrices using an automated enzyme inhibition assay with radioactivity detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(1), pp. 107-123.
75. Hartanti L., Yonas S.M.K., Mustamu J.J., Wijaya S., Setiawan H.K., Soegianto L., 2019, Influence of extraction methods of bay leaves (*Syzygium polyanthum*) on antioxidant and HMG-CoA Reductase inhibitory activity, *Heliyon*, 5(4).
76. Seenivasan A., Gummadi S.N., Panda T., Théodore T., 2015, Quantification of lovastatin produced by *Monascus purpureus*, *The Open Biotechnology Journal*, 9(1).
77. Lorenz R.T., Parks L.W., 1990, Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(9), pp. 1660-1665.
78. Chamilos G., Lewis Russell E., Kontoyiannis Dimitrios P., 2006, Lovastatin has significant activity against *Zygomycetes* and interacts

synergistically with voriconazole, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), pp. 96-103.

PHỤ LỤC

Phụ lục 4.1 Đường chuẩn xác định nồng độ lovastatin bằng HPLC



Phụ lục 4.2. Trình tự gene 28S rRNA của chủng *Rhizopus microporus* BMM 313

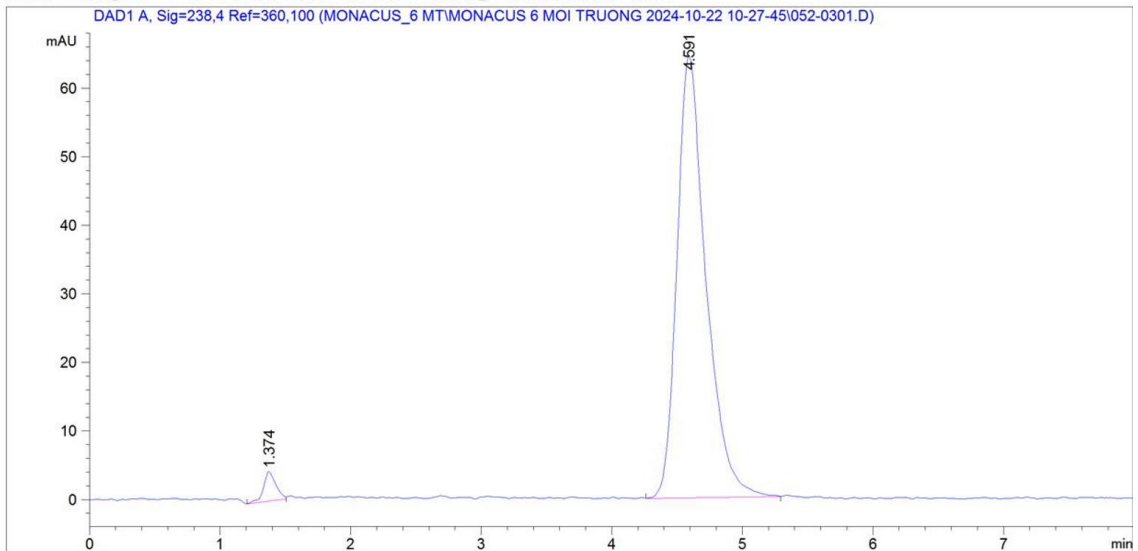
ACTTCTCAGTATTGTTTGCTTCTATACTGTGAACCTCTGGCGATGAAGGT
CGTAACTGACCTTCGGGAGAGACTCAGGACATATAGGCTATAATGGGTA
GGCCTGTTCTGGGGTTTGATCGATGCCAATCAGGATTACCTTTCTTCCTT
TGGGAAGGAAGGCGCCTGGTACCCTTTACCATATACCATGAATTCAGAA
TTGAAAGTATAATATAATAACAACCTTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCTC
GCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATA
TTCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACTCTATGGATCTTCT
ATAGAGTACGCTTGCTTCAGTATCATAACCAACCCACACATAAAATTTA
TTTTATGTGGTGATGGACAAATTCGGTTAGATTTAATTATTATACCGATT
GTCTAAAATACAGCCTCTTTGTAATTTTCATTAAATTACGAACTACCTAG
CCATCGTGCTTTTTTGGTCCAACCAAAAAACATTTAATCTAGGGGTTCTG
CCAGCCAGCAGATATTTTAATGCTCTTTAACTATGATCTGAAGTCAAGTG
GGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAAA
TAACAATGATTTCCCTAGTAACGGCGAGTGAAC

Phụ lục 4.3. Sắc ký đồ HPLC của mẫu chuẩn lovastatin (Sigma) và mẫu từ 6 môi trường nuôi cấy khác nhau

Mẫu chuẩn lovastatin

Data File C:\CHEM32\...TA\MONACUS_6 MT\MONACUS 6 MOI TRUONG 2024-10-22 10-27-45\052-0301.D
Sample Name: lovas 250 mg/l

```
=====
Acq. Operator   : trinh minh viet           Seq. Line :    3
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 52
Injection Date  : 10/22/2024 11:08:24 AM    Inj       :    1
                                           Inj Volume: 6.000 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\MONACUS_6 MT\MONACUS 6 MOI TRUONG 2024-10-22 10-27-45\
                LOVASTASTIN.M
Last changed    : 9/16/2024 2:47:47 PM by trinh minh viet
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA\R_V\DEF_LC 2024-10-21 15-57-22\ROPI_DAD.M
Last changed    : 10/21/2024 3:56:20 PM by trinh minh viet
=====
```



Area Percent Report

```
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=238,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.374	BV	0.0968	28.03501	4.25631	2.7487
2	4.591	BB	0.2254	991.90234	64.51907	97.2513

Totals : 1019.93735 68.77538

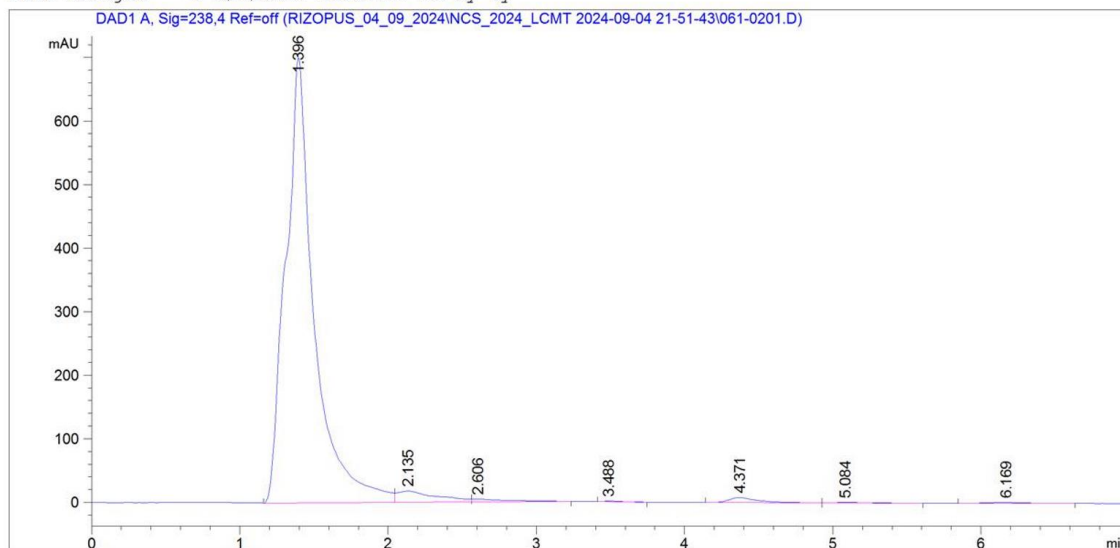
Data File C:\CHEM32\...\TA\MONACUS_6 MT\MONACUS 6 MOI TRUONG 2024-10-22 10-27-45\052-0301.D
Sample Name: lovas 250 mg/l

=====
*** End of Report ***

Môi trường GYP

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\061-0201.D
Sample Name: MT1

```
=====
Acq. Operator   : trinh minh viet           Seq. Line :    2
Acq. Instrument : Instrument 1             Location  : Vial 61
Injection Date  : 9/4/2024 10:17:46 PM    Inj       :    1
                                           Inj Volume: 6.000 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\
                : LOVASTASTIN.M
Last changed    : 9/4/2024 10:22:41 PM by trinh minh viet
                : (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\LOGGEL2024.M
Last changed    : 9/4/2024 10:58:17 AM by Ky
=====
```



Area Percent Report

```
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=238,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.396	BV	0.1766	9293.49902	701.43585	94.2279
2	2.135	VV	0.2520	330.92856	17.87323	3.3553
3	2.606	VB	0.2116	75.68399	4.65603	0.7674
4	3.488	BB	0.1306	9.86462	1.12157	0.1000

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\061-0201.D
Sample Name: MT1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
5	4.371	BV	0.1941	106.80917	7.88276	1.0830
6	5.084	VB	0.2267	19.58606	1.04496	0.1986
7	6.169	BB	0.2414	26.41554	1.35547	0.2678

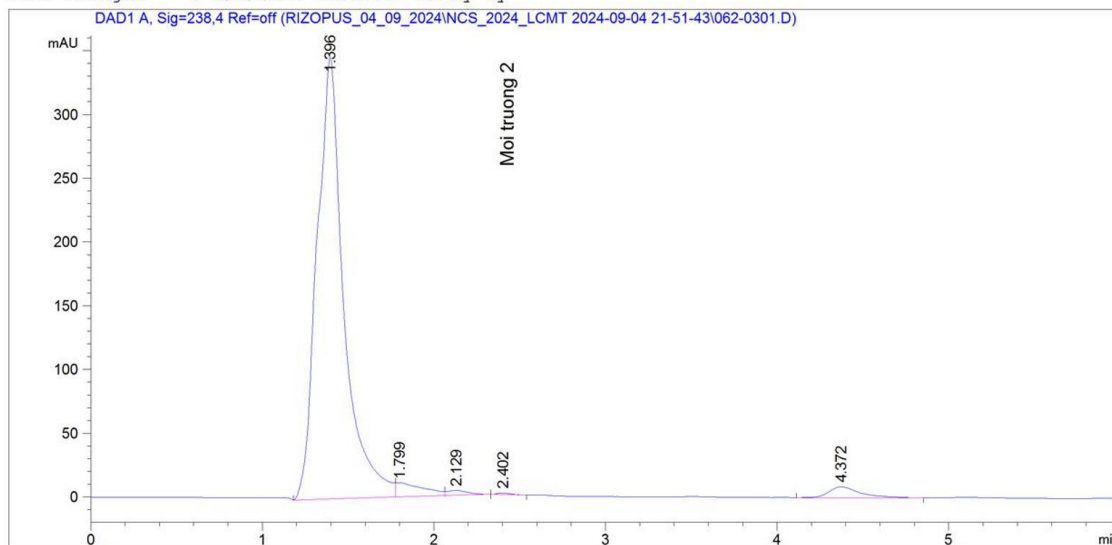
Totals : 9862.78696 735.36987

=====
*** End of Report ***

Môi trường MEB

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\062-0301.D
Sample Name: MT2

```
=====
Acq. Operator   : trinh minh viet           Seq. Line :    3
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 62
Injection Date  : 9/4/2024 10:28:39 PM     Inj       :    1
                                           Inj Volume: 6.000 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\
                : LOVASTASTIN.M
Last changed    : 9/4/2024 10:27:48 PM by trinh minh viet
                : (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\LOGGEL2024.M
Last changed    : 9/4/2024 10:58:17 AM by Ky
=====
```



Area Percent Report

```
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=238,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.396	BV	0.1462	3751.84619	346.96707	93.2999
2	1.799	VV	0.1442	121.10323	11.01691	3.0116
3	2.129	VB	0.1204	30.64205	3.63368	0.7620
4	2.402	BB	0.0868	6.32093	1.17400	0.1572

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\062-0301.D
Sample Name: MT2

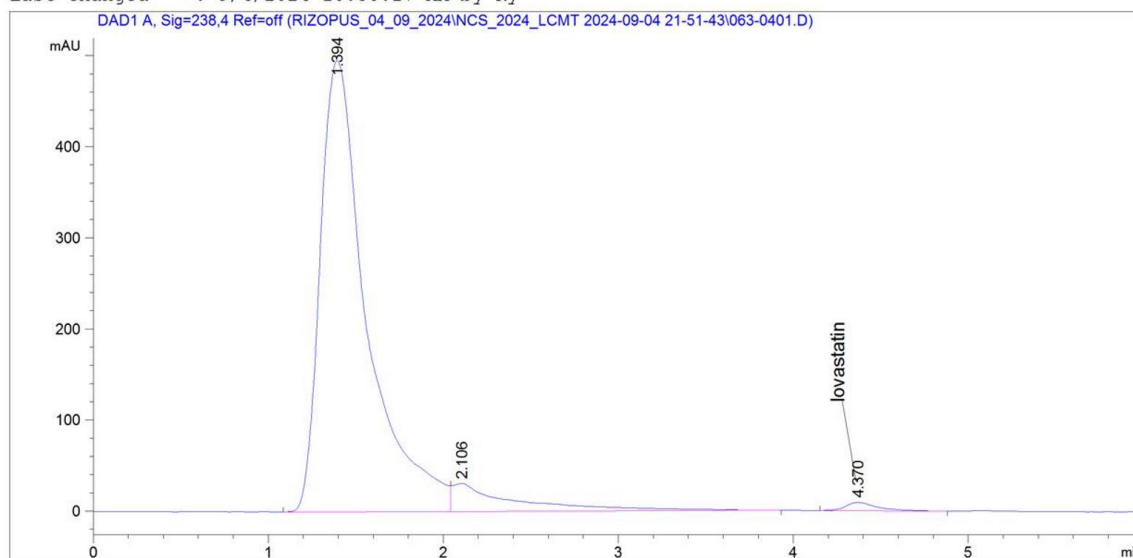
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
5	4.372	BB	0.1900	111.36398	8.66160	2.7694
Totals :				4021.27638	371.45326	

=====
*** End of Report ***

Môi trường GP

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\063-0401.D
Sample Name: MT3

```
=====
Acq. Operator   : trinh minh viet           Seq. Line :    4
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 63
Injection Date  : 9/4/2024 10:36:40 PM     Inj       :    1
                                           Inj Volume: 6.000 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\
                LOVASTASTIN.M
Last changed   : 9/4/2024 10:27:48 PM by trinh minh viet
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\LOGGEL2024.M
Last changed   : 9/4/2024 10:58:17 AM by Ky
=====
```



Area Percent Report

```
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=238,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.394	BV	0.2746	9120.16992	495.80701	91.1280
2	2.106	VB	0.3203	777.37335	30.60749	7.7674
3	4.370	BB	0.1819	110.54764	8.96420	1.1046

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\063-0401.D
Sample Name: MT3

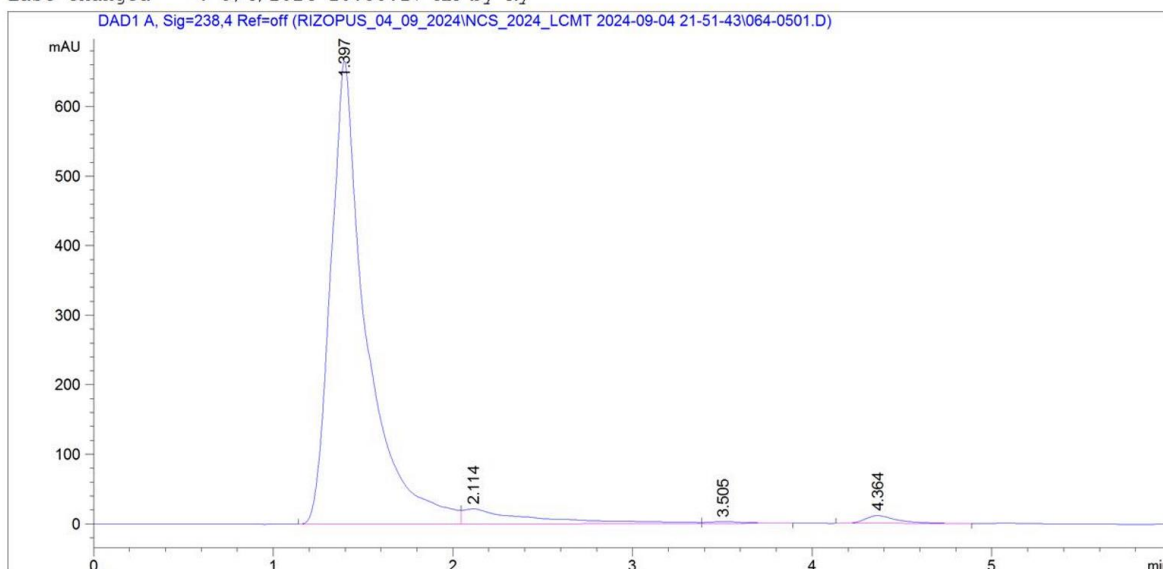
Totals : 1.00081e4 535.37870

=====
*** End of Report ***

Môi trường YM

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\064-0501.D
Sample Name: MT4

```
=====
Acq. Operator   : trinh minh viet           Seq. Line :    5
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 64
Injection Date  : 9/4/2024 10:44:35 PM     Inj       :    1
                                           Inj Volume: 6.000 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\
                : LOVASTASTIN.M
Last changed    : 9/4/2024 10:27:48 PM by trinh minh viet
                : (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\LOGGEL2024.M
Last changed    : 9/4/2024 10:58:17 AM by Ky
=====
```



Area Percent Report

```
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=238,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.397	BV	0.1796	9119.67480	666.63666	92.4036
2	2.114	VV	0.3316	573.75818	21.76200	5.8135
3	3.505	VB	0.1720	34.51014	2.68440	0.3497
4	4.364	BB	0.1818	141.45070	11.32123	1.4332

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\064-0501.D
Sample Name: MT4

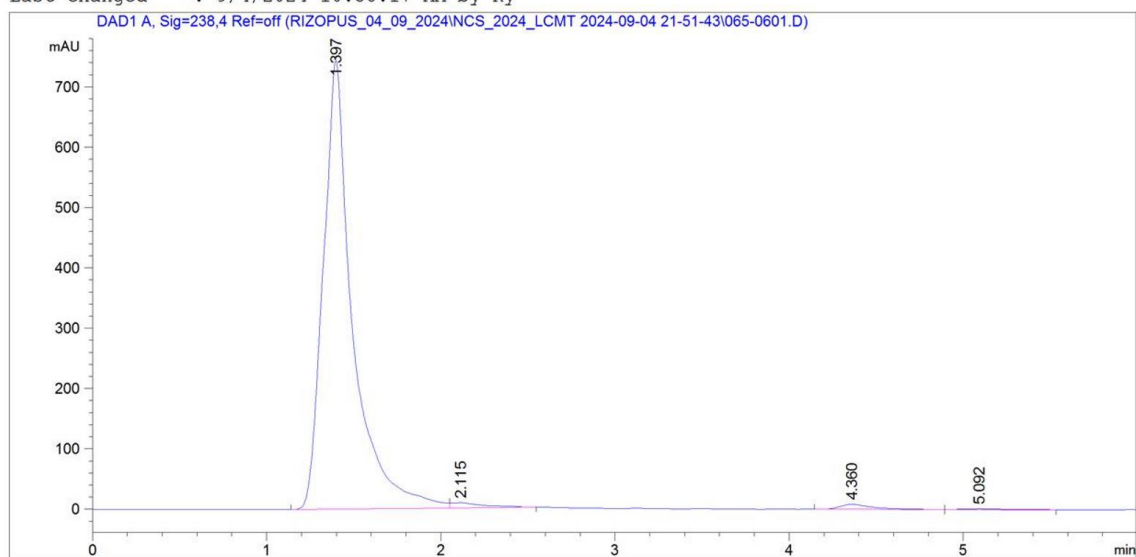
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
Totals :				9869.39383	702.40428	

=====
*** End of Report ***

Môi trường Vogel's medium

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\065-0601.D
Sample Name: MT5

```
=====
Acq. Operator   : trinh minh viet           Seq. Line :    6
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 65
Injection Date  : 9/4/2024 10:52:32 PM     Inj       :    1
                                           Inj Volume: 6.000 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\
                : LOVASTASTIN.M
Last changed    : 9/4/2024 10:27:48 PM by trinh minh viet
                : (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\LOGGEL2024.M
Last changed    : 9/4/2024 10:58:17 AM by Ky
=====
```



Area Percent Report

```
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=238,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.397	BV	0.1544	8701.45508	744.30011	97.2211
2	2.115	VB	0.1768	119.94712	8.81465	1.3402
3	4.360	BV	0.1936	107.68449	8.18000	1.2032
4	5.092	VB	0.1921	21.08070	1.36583	0.2355

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\065-0601.D
Sample Name: MT5

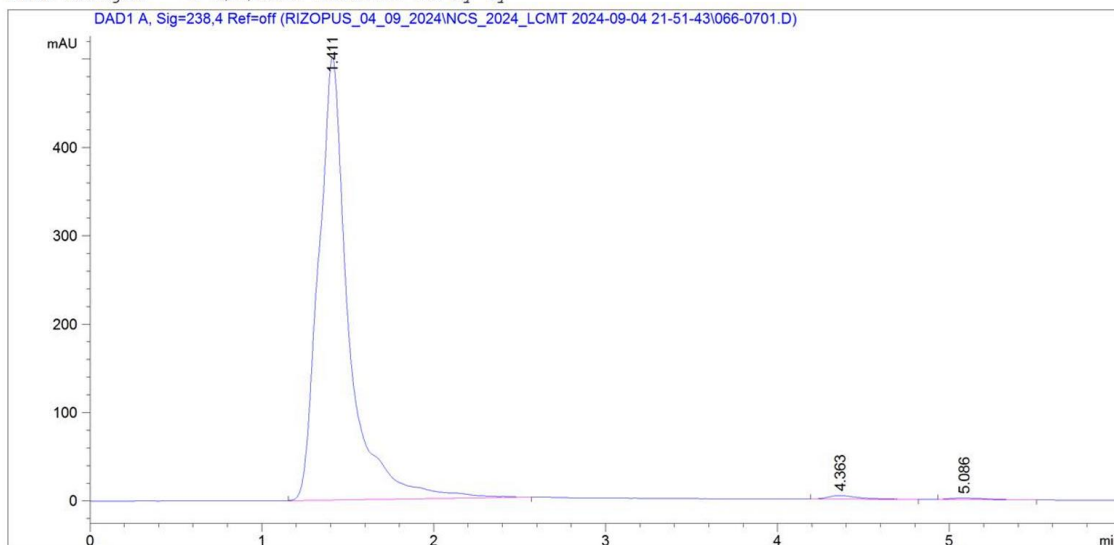
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
Totals :				8950.16740	762.66059	

=====
*** End of Report ***

Môi trường PDB

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\066-0701.D
Sample Name: MT6

```
=====
Acq. Operator   : trinh minh viet           Seq. Line :    7
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 66
Injection Date  : 9/4/2024 11:00:32 PM     Inj       :    1
                                           Inj Volume: 6.000 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\
                : LOVASTASTIN.M
Last changed    : 9/4/2024 10:27:48 PM by trinh minh viet
                : (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\LOGGEL2024.M
Last changed    : 9/4/2024 10:58:17 AM by Ky
=====
```



Area Percent Report

```
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=238,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.411	BB	0.1654	6074.82617	501.06091	98.7862
2	4.363	BB	0.1849	50.63248	4.07714	0.8234
3	5.086	BB	0.1731	24.01257	1.76058	0.3905

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_04_09_2024\NCS_2024_LCMT 2024-09-04 21-51-43\066-0701.D
Sample Name: MT6

Totals : 6149.47121 506.89863

=====
*** End of Report ***

Phụ lục 4.4 Kết quả độ tinh khiết lovastatin sau tinh sạch qua cột silicagel

Phân đoạn	Tỷ lệ % lovastatin tính theo tỷ lệ % diện tích peak lovastatin/ tổng diện tích peak các chất thu được		Tổng % lovastatin sau tinh sạch
	Lovastatin dạng lacton	Lovastatin dạng acid	
1	74,49	8,02	82,51
2	69,64	6,17	75,81
3	71,14	11,13	82,27
4	71,36	8,09	79,45
5	76,13	3,96	80,09
6	74,64	6,44	81,08
7	76,57	13,05	89,62
8	64,71	20,35	85,06
9	55,72	22,04	77,76
10	47,69	28,79	76,48
11	53,73	46,26	99,99
12	69,72	30,27	99,99
13	52,37	17,64	70,01
14	54,57	18,34	72,91
15	53,28	16,85	70,13
16	58,57	12,60	71,17
17	62,86	10,02	72,88
18	79,09	6,81	85,90
19	59,90	10,97	70,86
20	66,77	9,51	76,28
Mẫu 313 trước tinh sạch	8,56	31,74	40,30

Phụ lục 4.5. Phổ HPLC của mẫu dịch chiết và mẫu hai phân đoạn tinh sạch 11 và 12 sau khi qua cột silicagel 60

Mẫu dịch chiết ethyl acetate của chủng *Rhizopus microporus* BMM 311 trước tinh sạch

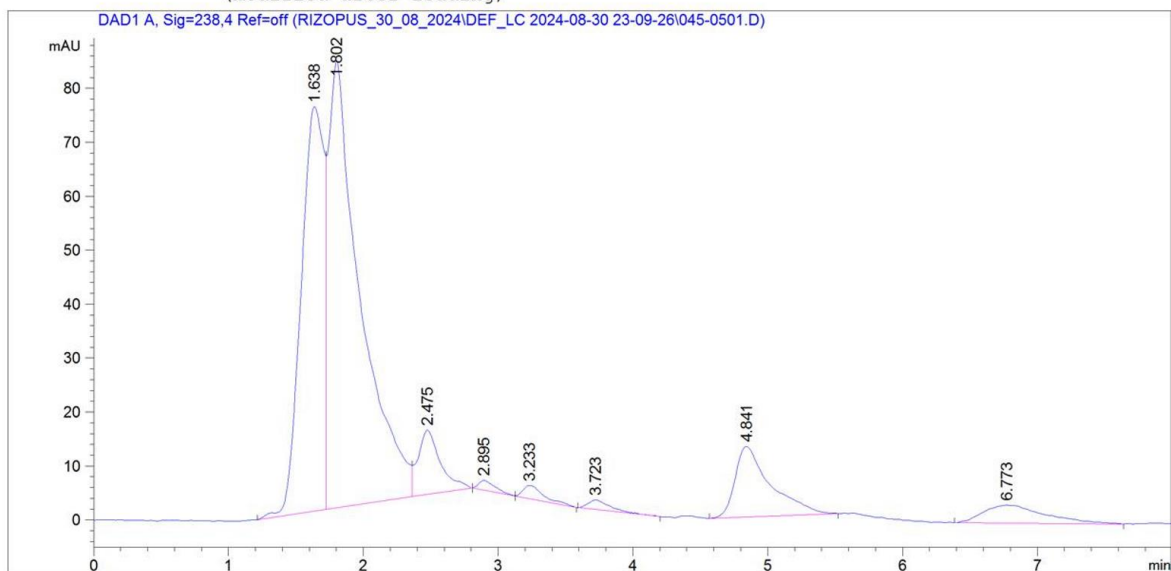
Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_30_08_2024\DEF_LC 2024-08-30 23-09-26\045-0501.D

Sample Name: 313

```
=====
Acq. Operator   : Viet                      Seq. Line :    5
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 45
Injection Date  : 8/31/2024 12:19:54 AM    Inj       :    1
                                           Inj Volume: 6.000 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\DEF_LC 2024-08-30 23-09-26\LOVASTASTIN.M
Last changed    : 8/31/2024 12:08:44 AM by Viet
                 (modified after loading)

Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\LOGGEL2024.M
Last changed    : 9/5/2024 11:03:58 AM by trinh minh viet
                 (modified after loading)
=====
```



Area Percent Report

```
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

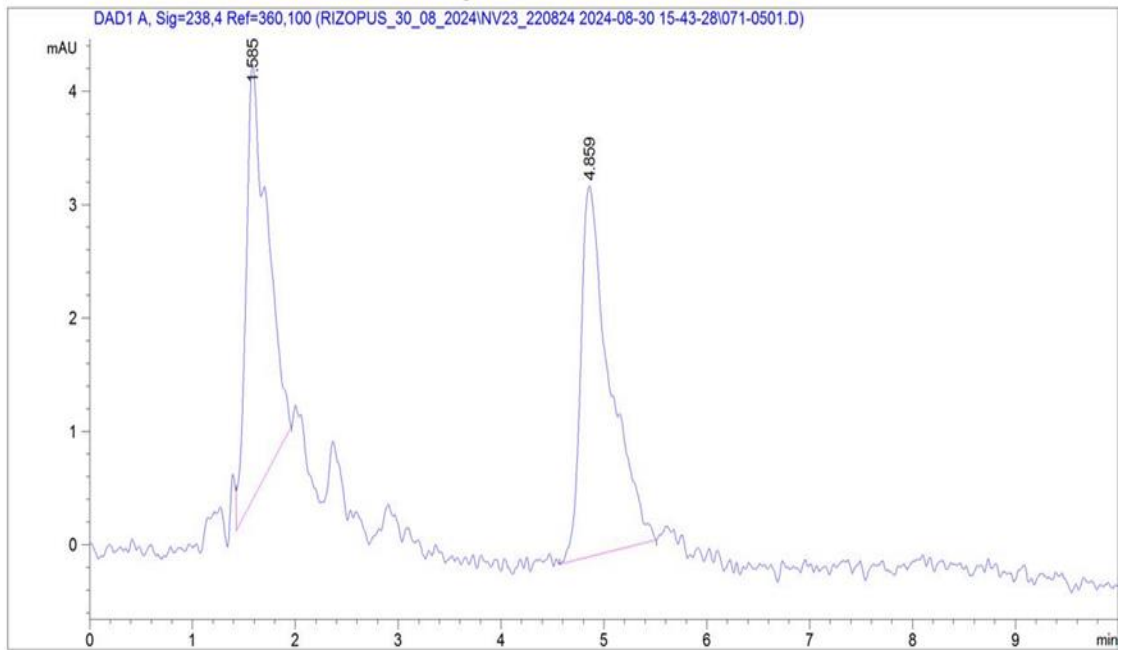
Signal 1: DAD1 A, Sig=238,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.638	BV	0.1773	882.33838	74.98560	31.7415
2	1.802	VV	0.2165	1354.71289	82.94462	48.7349
3	2.475	VB	0.1651	138.65700	11.97375	4.9881
4	2.895	BV	0.1152	14.87352	1.82346	0.5351

Phân đoạn 11

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_30_08_2024\NV23_220824_2024-08-30_15-43-28\071-0501.D
Sample Name: 11

```
=====
Acq. Operator   : Viet                               Seq. Line :    5
Acq. Instrument : Instrument 1                       Location  : Vial 71
Injection Date  : 8/30/2024 4:44:04 PM              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 6.000 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_30_08_2024\NV23_220824_2024-08-30_15-43-28\
                LOVASTASTIN.M
Last changed    : 8/30/2024 3:43:01 PM by Viet
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\LOCCEL2024.M
Last changed    : 9/5/2024 11:03:58 AM by trinh minh viet
                (modified after loading)
=====
```



Area Percent Report

```
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=238,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.585	VB	0.1943	55.30898	3.83473	46.2601
2	4.859	BB	0.2632	64.25191	3.26999	53.7399

Totals : 119.56089 7.10472

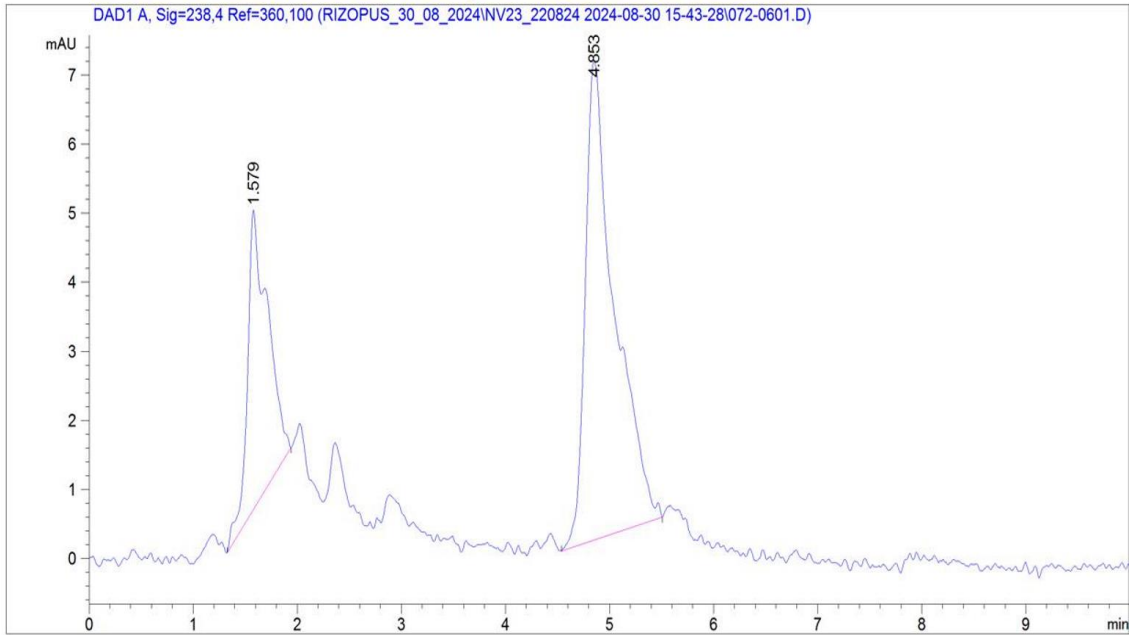
Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_30_08_2024\NV23_220824_2024-08-30_15-43-28\071-0501.D
Sample Name: 11

=====
*** End of Report ***

Phân đoạn 12

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_30_08_2024\NV23_220824_2024-08-30_15-43-28\072-0601.D
Sample Name: 12

```
=====
Acq. Operator   : Viet                               Seq. Line :    6
Acq. Instrument : Instrument 1                       Location  : Vial 72
Injection Date  : 8/30/2024 4:55:56 PM              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 6.000 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_30_08_2024\NV23_220824_2024-08-30_15-43-28\
                  LOVASTASTIN.M
Last changed    : 8/30/2024 3:43:01 PM by Viet
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\LOGGEL2024.M
Last changed    : 9/5/2024 11:03:58 AM by trinh minh viet
                  (modified after loading)
=====
```



Area Percent Report

```
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=238,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.579	BB	0.1787	58.92165	4.33233	30.2724
2	4.853	BB	0.2700	135.71683	6.94444	69.7276

Totals : 194.63848 11.27677

Data File C:\CHEM32\1\DATA\RIZOPUS_30_08_2024\NV23_220824 2024-08-30 15-43-28\072-0601.D
Sample Name: 12

=====
*** End of Report ***

Hà Nội, ngày 30 tháng 09 năm 2024

Số: 1104/QĐ-HVKHCN

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

GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

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

Căn cứ Thông tư số 23/2021/TT-BGDĐT ngày 30/08/2021 của Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1966/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1899/QĐ-HVKHCN ngày 15/11/2022 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học trúng tuyển đợt 2 năm 2022;

Căn cứ Quyết định số 218/QĐ-HVKHCN ngày 29/03/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và cử người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;

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

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Vũ Thanh Tùng với đề tài: “Sàng lọc và nghiên cứu các điều kiện tăng khả năng sinh tổng hợp lovastatin từ chủng nấm *Rhizopus* sp. phân lập ở Việt Nam”.

Ngành: Sinh học thực nghiệm Mã số: 8 42 01 14

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

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ.

Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký và phải đảm bảo thời hạn đào tạo theo quy định của Học viện. Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

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

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Giám đốc Học viện (để b/c);
- Lưu hồ sơ học viên;
- Lưu: VT, ĐT, MT.07.

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC

Trần Thị Phương Anh



DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 1104 /QĐ-HVKHCN ngày 30/09/2024
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)

Cho luận văn của học viên: Vũ Thanh Tùng

Tên đề tài: Sàng lọc và nghiên cứu các điều kiện tăng khả năng sinh tổng hợp lovastatin từ chủng nấm *Rhizopus* sp. phân lập ở Việt Nam.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn: 1. TS. Nguyễn Thị Trung

- Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. PGS.TS. Đỗ Thị Tuyên

- Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1.	GS.TS. Chu Hoàng Hà	Công nghệ sinh học	Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam	Chủ tịch
2.	PGS.TS. Trần Văn Tuấn	Vi sinh vật học	Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội	Phản biện 1
3.	TS. Đỗ Trọng Hưng	Công nghệ sinh học	Viện Công nghiệp thực phẩm, Bộ Công thương	Phản biện 2
4.	TS. Đinh Thị Thu Hằng	Hóa sinh học	Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
5.	TS. Phan Thị Hồng Thảo	Vi sinh vật học	Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên

(Hội đồng gồm 05 thành viên)./. *Đỗ Thị Tuyên*

6. Phản biện 2: TS. Đỗ Công Hùng

Cần phải có tiêu chí lựa chọn chứng 313, luận ý thống nhất trong phần kết luận.....

7. Học viên trả lời:

TS. Phan Thị Hồng Thảo: Cần nhiều bộ chứng tài không nên bỏ dụng từ đó nêu rõ chi tiết chọn ra những bộ chứng để phân đại, cần có hình thức và trích dẫn, cần nhiều dẫn văn dịch rõ ràng, chuẩn xác.....

..... Theo em có cách nào để tăng tỷ lệ lovastatin hay không?

TS. Đinh Thị Thu Hằng: Khi làm luận các kết quả nghiên cứu thu được, cần viết lại kết luận cho rõ ràng, chặt chẽ và khoa học hơn.....

..... Ina vào hình ảnh gene 28 S rRNA ở các đ. hình thái có đủ để xác định

8. Các thành viên HĐ và những người tham dự nêu câu hỏi đến loài của chủng 313 k^o?

GS. Chu Hoàng Thảo: Mục tiêu song học được chúng tôi thực hiện lovastatin có hàm lượng cao nhưng đạt được..... Học viên có ý kiến gì về việc này? Nếu làm tăng hoạt tính thì bằng cách tiếp cận nào.....

9. Học viên trả lời

Đáp ứng yêu cầu.....

10. Hội đồng họp kín và cho điểm

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

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

Ủy viên: TS. Đỗ Công Hùng.....

Ủy viên: TS. Đinh Thị Thu Hằng.....

- Kết quả kiểm phiếu như sau:

Số phiếu phát ra: 05.....

Số phiếu thu về: 05.....

Tổng số điểm: 42,8.....

Điểm trung bình: ... 8,6.....

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

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố:....8,6.....

- Kết luận của Hội đồng:

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

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

.....Đề tài không trùng lặp với các nghiên cứu, đề tài đã công bố.....

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

.....Nội dung đáp ứng được yêu cầu của một luận văn thạc sĩ Sinh học thực nghiệm.....

.....Đề nghị chỉnh sửa, bổ sung theo các góp ý của các thành viên Hội đồng.....

Buổi họp đã kết thúc vào 11... giờ 05..phút, ngày 09/11/2024

Hà Nội, ngày 09 tháng 11 năm 2024

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

Glauw
Đinh Thị Lưu Hằng

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

[Signature]
Cầm Hoàng Hà



XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

KT. GIÁM ĐỐC

PHÓ GIÁM ĐỐC



[Signature]
Nguyễn Thị Trung

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

Họ tên học viên: VŨ THANH TÙNG

Lớp: BIO2022B

Tên đề tài luận văn: SÀNG LỌC VÀ NGHIÊN CỨU CÁC ĐIỀU KIỆN TĂNG KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP LOVASTATIN TỪ CHŨNG NẤM *RHIZOPUS* SP. PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

Người hướng dẫn khoa học:

- TS. Nguyễn Thị Trung
- PGS.TS. Đỗ Thị Tuyên

Ngày bảo vệ luận văn: 09/11/2024

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

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	Cần lưu ý đến phần trình bày, lỗi trích dẫn, tài liệu tham khảo không có tên tạp chí, phần mở đầu là dẫn dắt, tóm tắt không cần trích dẫn nhiều. Bổ sung các nghiên cứu về gene lovastatin. Cần làm rõ kích thước trên hình ảnh hiển vi điện tử, không cần đưa trình tự gene vào kết quả, các hình cần phải rõ các ký hiệu.	<ul style="list-style-type: none">- Phần trình bày, lỗi trích dẫn, tài liệu tham khảo không có tên tạp chí đã chỉnh sửa và bổ sung 8 trích dẫn bao gồm các tài liệu tham khảo số 7, 8, 9, 10, 14, 15, 22, 23.- Phần mở đầu là dẫn dắt, tóm tắt không cần trích dẫn nhiều: đã lược bỏ bớt trích dẫn.- Bổ sung các nghiên cứu về gene lovastatin: đã bổ sung tài liệu tham khảo số 24, 25, 26 và 27.- Cần làm rõ kích thước trên hình ảnh hiển vi điện tử: đã bổ sung- Các hình cần phải rõ các ký hiệu: đã bổ sung
2	Cần phải bổ sung các tiêu chí lựa chọn chủng 313, lưu ý thống nhất trong phần kết luận.	<ul style="list-style-type: none">- Dựa trên những nghiên cứu trước đây, một số tiêu chí được sử dụng để lựa chọn chủng 313 bao gồm:<ul style="list-style-type: none">+ Tiêu chí định tính bằng TLC+ Tiêu chí định lượng bằng HPLC+ Tiêu chí đánh giá khả năng ức chế nấm men <i>Candida</i>



		<p><i>albicans</i> và <i>Saccharomyces</i> sp.</p> <p>- Lưu ý thống nhất trong phần kết luận: đã chỉnh sửa</p>
3	<p>Còn nhiều lỗi chính tả, không nên sử dụng từ tối ưu vì mới chỉ lựa chọn môi trường, bổ sung độ phóng đại, cần có bình luận và trích dẫn, còn nhiều đoạn văn dịch và chưa chính xác.</p>	<p>- Lỗi chính tả, dịch thuật: đã kiểm tra và chỉnh sửa.</p> <p>- Không nên sử dụng từ tối ưu vì mới chỉ lựa chọn môi trường: đã chỉnh sửa</p> <p>- Bổ sung độ phóng đại, cần có bình luận và trích dẫn: đã bổ sung</p> <p>- Đã kiểm tra và loại bỏ những đoạn văn chưa chính xác.</p>
4	<p>Thiếu bản luận các kết quả nghiên cứu thu được, cần viết lại kết luận cho rõ ràng, chặt chẽ và khoa học hơn.</p>	<p>- Thiếu bản luận các kết quả nghiên cứu thu được, cần viết lại kết luận cho rõ ràng, chặt chẽ và khoa học hơn: đã chỉnh sửa</p>
5	<p>Câu hỏi: Dựa vào trình tự gene 28S rRNA và các đặc điểm hình thái có đủ để xác định đến loài của chủng 313 không?</p>	<p>Trình tự gen 28S rRNA của chủng <i>Rhizopus</i> sp. BMM 313 có độ tương đồng cao trên 98% đến 100% so với các chủng thuộc loài <i>Rhizopus microporus</i> đã được công bố trước đây tuy nhiên để xác định chính xác đến loài có thể kết hợp thêm với một số phương pháp như:</p> <p>- Phân tích đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh hóa: Các đặc điểm hình thái như cấu trúc bào tử, hình dạng, và màu sắc khuẩn lạc, đặc điểm vi thể. Các đặc điểm sinh hóa, ví dụ như khả năng sử dụng chất nền cụ thể hoặc phản ứng với các enzyme, có thể bổ sung cho việc định danh loài.</p> <p>- Phân tích trình tự gen đa vùng (Multi-locus Sequence Analysis - MLSA): các gene thường được sử dụng là ITS (Internal Transcribed Spacer), Gene beta-tubulin (<i>benA</i>), calmodulin (<i>CaM</i>), actin, và elongation factor 1-alpha (<i>EF1-α</i>)</p> <p>- Giải trình tự toàn bộ genome (Whole Genome Sequencing - WGS).</p>
6	<p>Mục tiêu sàng lọc được chủng có hoạt tính lovastatin có hàm lượng cao nhưng chưa đạt được. Học viên có ý kiến gì về việc này? Câu hỏi: Theo em có cách nào để tăng tổng hợp lovastatin hay không?</p>	<p>- Một trong những nguyên nhân khiến hàm lượng lovastatin thu được từ các chủng <i>Rhizopus</i> sp. phân lập còn hạn chế có thể là do đặc điểm sinh học vốn có của loài. Cụ thể, các gen quy định quá trình sinh tổng hợp lovastatin ở <i>Rhizopus</i> sp. có thể chưa hoạt động hiệu quả bằng các gen tương đồng ở các loài nấm khác đang được sử dụng trong sản xuất công nghiệp. Bên cạnh đó, việc chưa tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy cũng là yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến năng suất lovastatin. Điều này cho thấy, để nâng cao hiệu quả sản xuất lovastatin từ các chủng <i>Rhizopus</i> sp., cần có những nghiên cứu sâu hơn về đặc điểm di truyền và sinh lý của loài, đồng thời tối ưu hóa quy trình nuôi cấy.</p> <p>- Một số cách có thể làm tăng khả năng sinh tổng hợp</p>



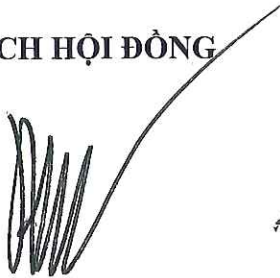
		<p>lovastatin như:</p> <ul style="list-style-type: none"> + Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy như nhiệt độ, pH, tối ưu nguồn nitơ, nguồn carbon. + Thay đổi phương pháp nuôi cấy như sử dụng phương pháp lên men bề mặt thay cho phương pháp lên men chìm. + Tạo đột biến bằng cách sử dụng tác nhân hóa học hoặc vật lý để tạo ra các chủng <i>Rhizopus</i> sp. có khả năng sinh tổng hợp lovastatin cao hơn. + Sử dụng các kỹ thuật như chuyển gene, điều chỉnh biểu hiện gene, hoặc chỉnh sửa gene bằng CRISPR/Cas9 để tăng khả năng sản xuất lovastatin ở các chủng có tiềm năng.
--	--	---

Hà Nội, ngày 14 tháng 11 năm 2024

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

HỌC VIÊN





GS.TS. Chu Hoàng Hà - TS. Nguyễn Thị Trung PGS.TS. Đỗ Thị Tuyên Vũ Thanh Tùng

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC




Trần Thị Phương Anh



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

Các phương pháp sử dụng là thiếp quy về đảm bảo độ tin cậy để thu nhận kết quả nghiên cứu.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

— Để tái luận văn trên chọn được 05 chủng *Rhizopus* có khả năng sản xuất lovastatin, trong đó chủng BMM 313 có hoạt tính cao nhất.

— Đã phân loại được chủng BMM 313 dựa trên hình thái và giải trình tự đoạn 28S rDNA. Kết quả chỉ ra chủng BMM 313 thuộc loài *Rhizopus microsporus*.

— Đã chọn được môi trường phù hợp để nuôi chủng BMM 313 sản xuất lượng cao lovastatin.

— Đã tìm được các điều kiện phân đoạn lovastatin.

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

— Luận văn có nhiều lỗi chính tả, thiếu trích dẫn cho các hình ảnh trong phần tổng quan, tài liệu tham khảo cần kiểm tra kỹ và ghi đầy đủ tên.

— Phương pháp phân giải hoạt tính chưa nói rõ của dịch nuôi cấy lovastatin và phân đoạn từ sản phẩm nên cần ghi rõ phương pháp sử dụng.

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

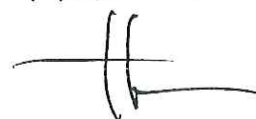
Nội dung của luận văn đã được viết thành bài báo khoa học gửi đăng tạp chí trong nước.

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

Luận văn đáp ứng yêu cầu để đưa ra bảo vệ trước hội đồng để nhận học vị Thạc sĩ.

....., ngày tháng năm 20...

Người nhận xét
(Ký, ghi rõ họ tên)



Trần Văn Tuấn

Lưu ý:

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

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Đỗ Trọng Hưng

Học hàm, học vị: Tiến sĩ

Chức danh trong Hội đồng: Phản biện 2

Cơ quan công tác: Viện Công nghiệp thực phẩm – Bộ Công Thương

Họ và tên học viên: Vũ Thanh Tùng

Tên đề tài: Sàng lọc và nghiên cứu các điều kiện tăng khả năng sinh tổng hợp Lovastatin từ chủng nấm *Rhizopus* sp. phân lập ở Việt Nam

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

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

Lovastatin được ứng dụng nhiều loại thuốc hạ lipid máu có khả năng giảm cholesterol trong máu và ngăn ngừa các bệnh lý tim mạch. Chúng ức chế enzyme HMG-CoA reductase – một enzyme tại gan chịu trách nhiệm tổng hợp cholesterol. Do vậy vấn đề nghiên cứu luôn có tính thời sự trong cuộc sống hiện đại ngày nay.

Ở Việt Nam, nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất như Lovastatin từ chủng *Rhizopus* sp. còn nhiều hạn chế, do vậy đây là kết quả bước đầu nhằm khai thác nguồn gen chủng nấm này.

Kết quả nghiên cứu bước đầu đánh giá hình thái, định tên được chủng *Rhizopus microsporus* BMM 313 – một nguồn gen đa dạng được phân lập tại VN để sinh trưởng và phát triển và đã lựa chọn được môi trường thích hợp cho chủng nấm mốc này phát triển và sinh tổng hợp Lovastatin. Đánh giá hoạt tính kháng nấm của dịch lên men sinh tổng hợp Lovastatin. Bước đầu xây dựng được phương pháp thu hồi, tinh sạch Lovastatin có độ tinh sạch cao. Kết quả này góp phần mở ra triển vọng sản xuất Lovastatin từ nấm *Rhizopus* có ý nghĩa khoa học và thực tiễn

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

Luận văn được nghiên cứu trên đối tượng vi sinh vật khác so với các nghiên cứu trước đây do vậy không có sự trùng lặp với các công trình khoa học trước đây.

Kết quả nghiên cứu đảm bảo tính trung thực và rõ ràng

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

Nội dung nghiên cứu phù hợp với tên đề tài cũng như với chuyên ngành đào tạo

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

Luận văn sử dụng các phương pháp hiện đại và thông dụng trong các phòng nghiên cứu nên số liệu đảm bảo độ tin cậy

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

- Từ nấm chủng nấm mốc *Rhizopus* sp. có nguồn gốc, đã lựa chọn được chủng BMM311 có khả năng sinh tổng hợp lovastatin trên môi trường PDB đạt 6,95 mg/L (xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao). Hoạt tính ức chế nấm men *Saccharomyces* sp. và *Candida albicans* mạnh với vòng ức chế đạt tương ứng là 1,50 cm và 0,88 cm. Chủng *Rhizopus* sp. BMM 313 đã được phân loại bằng hình thái và trình tự gene 28S rRNA xác định chính xác là *Rhizopus microsporus* BMM 313.

- Đã lựa chọn được môi trường tốt nhất cho chủng *R. microsporus* BMM 313 là môi trường YM bao gồm: 1% D-glucose, 0,3% cao malt, 0,3% cao nấm men, 0,5% peptone và các điều kiện lên men thích hợp : 30°C, 200 vòng/phút, thời gian 7 ngày. Hàm lượng hoạt chất lovastatin - chất ức chế HMG-CoA reductase- trong môi trường YM đạt cao gấp 1,87 lần so với môi trường nuôi cấy ban đầu.

- BƯỚC ĐẦU tinh sạch được hoạt chất lovastatin sau khi qua cột sắc ký silica gel với độ sạch đạt 99,99% (xác định bằng HPLC), hiệu suất thu hồi của hai phân đoạn 11, 12 đạt lần lượt 22,73% và 35,78%. Lovastatin khi tinh sạch có hoạt tính kháng nấm men *Saccharomyces* sp. và *Candida albicans* với đường kính kháng nấm tương ứng đạt 1,65 cm và 0,98 cm (phân đoạn 12); 1,54 cm và 0,88 cm (phân đoạn 11).

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

- Bổ sung tiêu chí lựa chọn chủng nấm *Rhizopus*

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

- Kết quả nghiên cứu của luận văn có thể viết bài báo đăng trên tạp chí khoa học

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

- Luận văn có nội dung nghiên cứu với hàm lượng khoa học đủ của một luận văn Thạc sĩ

- Đề nghị Học viện xem xét cho phép học viên bảo vệ luận văn theo qui định để nhận học

vị Thạc sĩ

Hà Nội, ngày 27 tháng 10 năm 2024

Người nhận xét



Đỗ Trọng Hưng