

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Phạm Thị Phương Anh

**NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC MỘT SỐ HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH
KHÁNG VI SINH VẬT KIỀM ĐỊNH CỦA CHỦNG VI NẤM ĐƯỢC
PHÂN LẬP TỪ VÙNG BIỂN CÔN CỎ, VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2025

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Phạm Thị Phương Anh

**NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC MỘT SỐ HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH
KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH CỦA CHỦNG VI NẤM ĐƯỢC
PHÂN LẬP TỪ VÙNG BIỂN CỒN CỎ, VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- 1. TS. Vũ Thị Thu Huyền**
- 2. TS. Đinh Thị Thu Hằng**

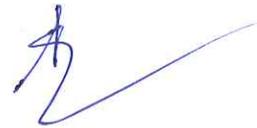
Two handwritten signatures in blue ink are present. The first signature is above the name "TS. Vũ Thị Thu Huyền" and the second is above "TS. Đinh Thị Thu Hằng".

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn và hoàn thiện bởi TS. Vũ Thị Thu Huyền và TS. Đinh Thị Thu Hằng 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 chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả



Phạm Thị Phương Anh

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn trân trọng nhất đến TS. Vũ Thị Thu Huyền, phòng Công nghệ Sinh học, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, là người cô đã tận tâm định hướng, chỉ dẫn, giảng dạy cho tôi về chuyên môn cùng người cô đồng hướng dẫn TS. Đinh Thị Thu Hằng, Học viện Khoa học Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đồng thời động viên, khích lệ và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn lãnh đạo và các anh chị phòng Công nghệ Sinh học, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện giúp đỡ, hỗ trợ và truyền đạt kinh nghiệm, đưa ra những lời khuyên hữu ích và góp ý quý báu trong suốt thời gian tôi làm luận văn tại phòng.

Tôi xin trân trọng cảm ơn ban lãnh đạo và các cán bộ đang công tác tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ tôi trong việc học tập và thực hiện luận văn.

Luận văn được giúp đỡ về mặt kinh phí và thực hiện trong khuôn khổ Đề tài Khoa học và Công nghệ thuộc các hướng KHCN ưu tiên cấp Viện Hàn lâm KHCNVN: "Nghiên cứu phát hiện các hợp chất có hoạt tính kháng sinh và gây độc tế bào ung thư từ nguồn vi nấm thuộc vùng biển đảo Côn Cỏ, tỉnh Quảng Trị", mã số: VAST.01/24-25.

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

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

Hà Nội, 13 tháng 5 năm 2025

Học viên



Phạm Thị Phương Anh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	
LỜI CẢM ƠN	
DANH MỤC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	
DANH MỤC HÌNH	
DANH MỤC BẢNG	
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1 TỔNG QUAN VỀ VI NẤM BIỂN	4
1.2. NGUỒN HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TIỀM NĂNG.....	5
1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRÊN THẾ GIỚI	7
1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TẠI VIỆT NAM.....	10
1.5. SỰ CẦN THIẾT KHI TIẾN HÀNH NGHIÊN CỨU	12
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	14
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	14
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu.....	14
2.1.2. Hóa chất và thành phần nuôi cấy	15
2.1.2.1. Thành phần môi trường nuôi cấy	15
2.1.2.2. Các hóa chất sử dụng.....	22
2.1.3. Dụng cụ và máy móc thiết bị nghiên cứu.....	16
2.1.3.1. Dụng cụ nghiên cứu	16
2.1.3.2. Máy móc thiết bị	16
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	17
2.2.1. Phương pháp phân lập vi sinh vật biển.....	17
2.2.1.1. Xử lý mẫu biển.....	17
2.2.1.2 Phân lập	17
2.2.2. Phương pháp giữ giống vi sinh vật sau phân lập	18
2.2.3. Phương pháp nuôi cấy	18
2.2.4. Phương pháp định danh vi nấm bằng SHPT	18
2.2.4.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ vi nấm biển.....	18

2.2.4.2. Xác định nồng độ DNA	19
2.2.4.3. Kỹ thuật PCR.....	19
2.2.4.4. Xác định trình tự nucleotide của gene	19
2.2.4.5. Xử lý trình tự DNA và phân tích số liệu	20
2.2.5. Phương pháp thu nhận cặn chiết từ dịch ngoại bào	20
2.2.6. Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định	20
2.2.7. Độ đục chuẩn (McFarland)	21
2.2.8. Phương pháp phân lập các hợp chất thứ cấp	21
2.2.8.1. Sắc ký lớp mỏng (TLC)	22
2.2.8.2. Sắc ký cột (CC)	22
2.2.8.3. Phương pháp HPLC	22
2.2.9. Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất	23
2.2.9.1. Phổ khối lượng phân giải cao	24
2.2.9.2. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR	24
2.2.10. Phương pháp xử lý số liệu	24
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	25
3.1. PHÂN LẬP VÀ LÀM SẠCH CÁC CHỦNG VI NẤM	25
3.2. THỬ HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH	27
3.3. ĐỊNH DANH CHỦNG NGHIÊN CỨU QT8.....	29
3.3.1. Tách chiết DNA tổng số và khuếch đại đoạn gene 18S rRNA	29
3.3.2. Giải trình tự gene 18S rRNA.....	29
3.3.3. Xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng QT8	30
3.4. PHÂN LẬP CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP TỪ CHỦNG VI NẤM <i>Penicillium</i> sp. QT8	33
3.4.1. Hợp chất QT8-1 (ergosterol).....	34
3.4.2. Hợp chất QT8-2 ((22E)-ergosta-5,8,22-trien-7-one-3 β -ol)	36
3.4.3. Hợp chất QT8-3 (ergosterol peroxide)	39

3.4.4. Hợp chất QT8-4 (5 α ,6 α -Epoxy-(22E, 24R)-ergosta-8,22-diene-3 β ,7 α -diol)	42
3.4.5. Hợp chất QT8-5 (Tryptophan).....	45
3.5. HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH CỦA 5 CHẤT SẠCH PHÂN LẬP ĐƯỢC.....	47
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	49
4.1. Kết luận	49
4.2. Kiến nghị	49
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	50
PHỤ LỤC	55

DANH MỤC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Axit Deoxyribonucleic
RNA	Ribonucleic Acid	Axit Ribonucleic
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl sulfoxide
¹³ C-NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon 13
¹ H-NMR	Proton Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
ATCC	American Type Culture Collection	Bộ sưu tập chủng vi sinh vật chuẩn Hoa Kỳ
CC	Column Chromatography	Sắc ký cột
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity	Phổ tương tác đa liên kết hai chiều dị hạt nhân
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ tương tác hai chiều trực tiếp dị hạt nhân ¹ H- ¹³ C
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50%	Nồng độ ức chế 50%
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc lý bản lớp mỏng
VSVKĐ		Vi sinh vật kiểm định
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
COSY	Correlation Spectroscopy	Phổ tương quan
18S rRNA	18S ribosomal RNA	18S ARN Riboxom
SHPT		Sinh học phân tử
MeOH	Methanol	
cs		Cộng sự
đnc		Điểm nóng chảy
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> kháng kháng sinh
EtOAc	Ethyl Acetate	Etyl axetat

DANH MỤC HÌNH

Hình 3.1. Cây phát sinh chủng loại của chủng nghiên cứu QT8.....	30
Hình 3.2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của chủng QT8.....	31
Hình 3.3. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cặn EtOAc của chủng QT8.....	33
Hình 3.4. Cấu trúc hóa học hợp chất QT8-1.....	34
Hình 3.5. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất QT8-1 (CDCl_3 , 500 MHz).....	34
Hình 3.6. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của chất QT8-1 (CDCl_3 , 125 MHz).....	35
Hình 3.7. Phổ DEPT của chất QT8-1.....	36
Hình 3.8. Cấu trúc hóa học hợp chất QT8-2.....	36
Hình 3.9. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất QT8-2 (CDCl_3 , 500 MHz).....	37
Hình 3.10. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của chất QT8-2 (CDCl_3 , 125 MHz).....	38
Hình 3.11. Phổ DEPT của chất QT8-2.....	38
Hình 3.12. Cấu trúc hóa học hợp chất QT8-3.....	39
Hình 3.13. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất QT8-3 (CDCl_3 , 500 MHz).....	40
Hình 3.14. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của QT8-3 (CDCl_3 , 150 MHz).....	41
Hình 3.15. Phổ DEPT của chất QT8-3.....	41
Hình 3.16. Phổ MS của chất QT8-3.....	42
Hình 3.17. Cấu trúc hóa học hợp chất QT8-4.....	43
Hình 3.18. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất QT8-4 (CDCl_3 , 600 MHz).....	43
Hình 3.19. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của chất QT8-4 (CDCl_3 , 150 MHz).....	44
Hình 3.20. Phổ DEPT của chất QT8-4.....	45
Hình 3.21. Cấu trúc hóa học hợp chất QT8-5.....	45
Hình 3.22. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất QT8-5 (CD_3OD , 600 MHz).....	46
Hình 3.23. Phổ MS của chất QT8-5.....	46

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Ký hiệu và vị trí lấy mẫu của 17 mẫu sinh vật tại vùng biển Côn Cỏ.....	14
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR.....	19
Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của 26 chủng vi nấm phân lập từ các mẫu thu thập ở vùng biển Côn Cỏ.....	25
Bảng 3.2. Khối lượng cặn chiết từ dịch ngoại bào của 26 nghiên cứu.....	27
Bảng 3.3. Giá trị MIC cặn chiết thô của 26 chủng nghiên cứu.....	28
Bảng 3.5. Giá trị MIC cặn chiết của 5 chất sạch phân lập từ chủng QT8.....	47

MỞ ĐẦU

Hiện nay, các hợp chất tự nhiên với hoạt tính sinh học nổi bật và mức độ an toàn cao đã trở thành tâm điểm nghiên cứu do tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực y. Trong đó, khai thác và nghiên cứu các hợp chất có nguồn gốc từ biển hiện đang được xem là một hướng nghiên cứu đầy triển vọng đối với giới khoa học. Hơn 70% bao phủ bề mặt trái đất là đại dương, tuy nhiên tiềm năng sinh học của môi trường này vẫn chưa được khai thác đầy đủ. Trong số hơn một triệu loài vi sinh vật biển đã được ghi nhận, chỉ khoảng 0,01% là đã được xác định rõ về hình thái, di truyền học và hoạt tính sinh hóa [1]. Vi sinh vật biển là một nhóm sinh vật có khả năng thích nghi với các điều kiện môi trường khắc nghiệt, nhờ đó trở thành nguồn sinh học tiềm năng trong việc sinh tổng hợp các phân tử phức tạp và hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học. So với các vi sinh vật trên cạn, vi sinh vật biển có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp với cấu trúc hóa học độc đáo và hoạt tính sinh học nổi bật hơn, điều này có thể bắt nguồn từ đặc điểm đặc thù của môi trường biển như áp suất cao, nhiệt độ thấp, độ mặn lớn, điều kiện ánh sáng hạn chế và hàm lượng dinh dưỡng đặc biệt. Trong số đó, vi nấm biển là một nhóm có tính đa dạng sinh hóa cao, được xem là nguồn sinh học đầy triển vọng trong việc khai thác các hợp chất tự nhiên mới có hoạt tính sinh học [2].

Sự gia tăng và lan rộng của vi sinh vật kháng thuốc hiện đang là một trong những vấn đề sức khỏe nghiêm trọng trên toàn cầu. Tình trạng kháng kháng sinh trong cộng đồng không chỉ làm tăng tỷ lệ mắc bệnh và tử vong, mà còn khiến số lượng kháng sinh còn hiệu quả ngày càng suy giảm. Các bệnh truyền nhiễm vi thể tiếp tục là mối đe dọa lớn đối với sức khỏe cộng đồng, trong đó có Việt Nam. Do đó, nhu cầu tìm kiếm và phát triển các hợp chất có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định (VSVKD) là rất cấp thiết. Trong vài thập kỷ gần đây, nhiều nghiên cứu trên thế giới đã khẳng định sự đa dạng của các hợp chất tự nhiên từ môi trường biển. Đặc biệt vi sinh vật biển được coi là nguồn cung cấp các hợp chất có hoạt tính sinh học tốt trong đó có vi nấm biển với khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp có cấu trúc hóa học mới [1].

Vi nấm biển được phân lập từ các nguồn như tảo biển, hải miên, động vật không xương sống và trầm tích biển, là nguồn tài nguyên tự nhiên dồi dào cho việc phát hiện và phát triển các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học cao, bao gồm các nhóm hợp chất như alkaloid, terpenoid, quinon, isoprenoid,...

[2]. Theo thống kê từ Tổ chức Nghiên cứu về Nấm tính đến ngày 16/01/2025, số lượng loài vi nấm biển đã được ghi nhận là 2.138 loài, thuộc 855 chi, 294 họ, 111 bộ, 35 lớp và phân bố trong 11 ngành khác nhau.

Nhiều hợp chất từ nguồn vi nấm biển đã được phát hiện có hoạt tính sinh học, chủ yếu theo các hướng kháng khuẩn, kháng nấm, và gây độc tế bào ung thư. Như vậy, tiềm năng khai thác các hợp chất mới có hoạt tính sinh học vẫn còn rất lớn, đặc biệt là khu vực có hệ sinh vật biển rất phong phú và đa dạng như Việt Nam. Mặc dù hàm lượng các hợp chất thu được từ vi nấm phân lập thường ở mức thấp, tuy nhiên, khi được nuôi cấy ở quy mô lớn, vi nấm có thể trở thành nguồn cung cấp ổn định và tiềm năng cho các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng.

Biển đảo Côn Cỏ là vùng hải đảo tiền tiêu của tỉnh Quảng Trị, được hình thành bởi hoạt động núi lửa giữa biển, tạo nên giá trị địa chất và sinh thái đặc sắc. Côn Cỏ được coi như một bảo tàng thiên nhiên với các thềm đá bazan ven biển, bãi tắm hoang sơ hình thành từ vụn san hô, sò điệp và cát trắng. Nước biển nơi đây trong xanh quanh năm với nhiệt độ ổn định, không thấp hơn 21°C. Khu vực xung quanh đảo rộng hơn 5.300 ha hiện được bảo vệ và bảo tồn, là nơi cư trú của nhiều loài sinh vật biển quý hiếm. Với vị trí địa lý đặc biệt – cửa ngõ phía Nam của Vịnh Bắc Bộ – Côn Cỏ còn đóng vai trò chiến lược trong bảo vệ chủ quyền quốc gia. Trên cơ sở đó, chúng tôi lựa chọn thực hiện đề tài:

“Nghiên cứu sàng lọc một số hợp chất có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của chúng vi nấm được phân lập từ vùng biển Côn Cỏ, Việt Nam”

Mục tiêu của luận văn:

- Phân lập và sàng lọc một số chủng vi nấm từ vùng biển Côn Cỏ, Việt Nam có hoạt tính kháng VSVKD
- Đánh giá được hoạt tính kháng VSVKD của các hợp chất phân lập được từ chúng có hoạt tính tốt nhất.

Nội dung luận văn bao gồm:

1. Phân lập các chủng vi nấm biển từ các mẫu sinh vật và trầm tích đã thu thập ở vùng biển Côn Cỏ.
2. Sàng lọc hoạt tính kháng VSVKD từ cặn chiết của các chủng vi nấm phân lập được.

3. Nghiên cứu phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất thứ cấp từ chủng vi nấm có hoạt tính cao nhất.
4. Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các hợp chất phân lập được.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TỔNG QUAN VỀ VI NẤM BIỂN

Vi nấm là nhóm sinh vật phổ biến, phân bố rộng khắp trong nhiều hệ sinh thái khác nhau, bao gồm cả môi trường biển. Chúng đóng vai trò quan trọng không chỉ trong hệ sinh thái trên cạn mà còn trong hệ sinh thái dưới nước, và được xem là một trong những thành phần chính đại diện cho sự đa dạng vi sinh vật toàn cầu. Môi trường biển, chiếm khoảng 70% diện tích bề mặt Trái đất, được coi là đại diện về mặt đa dạng sinh học [3].

Vi nấm biển đóng vai trò quan trọng trong chu trình tái tạo chất dinh dưỡng và tham gia vào quá trình phân hủy và tái chế chất hữu cơ hòa tan trong môi trường biển. Ngoài vai trò sinh thái trong chuỗi thức ăn đại dương, vi nấm biển còn là nguồn sinh tổng hợp các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học tiềm năng. Trong những năm gần đây, các sinh vật biển, bao gồm vi nấm, đã được nghiên cứu rộng rãi nhằm phát hiện các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn, kháng virus và chống ung thư. Sự phát triển của công nghệ giải trình tự thế hệ mới (NGS) và kỹ thuật khối phổ hiện đại đã hỗ trợ mạnh mẽ cho các tiếp cận dựa trên bộ gene và con đường chuyển hóa, từ đó nâng cao hiệu quả trong khai thác và phát hiện các hợp chất tự nhiên mới. Do đó, việc tiếp tục khám phá hệ vi sinh vật biển bao gồm cả các môi trường sống, kể cả những khu vực biển khó tiếp cận là điều cần thiết để đánh giá đầy đủ sự đa dạng và tiềm năng sinh học thực sự của hệ vi sinh vật biển trên Trái đất. Tuy nhiên, hệ sinh vật biển vẫn chưa được nghiên cứu và khai thác đầy đủ, đặc biệt là về mặt sinh học phân tử và tiềm năng ứng dụng [3].

Theo thời gian, nhiều định nghĩa khác nhau về vi nấm biển đã được sử dụng. Jones *et al.* đã đưa ra định nghĩa vi nấm biển 'bắt buộc' là những loại nấm được phân lập từ các chất nền hoặc trầm tích ngập nước từ môi trường biển. Thuật ngữ "vi nấm có nguồn gốc từ biển" đã được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực hóa học hợp chất thiên nhiên [4]. Gần đây, Pang *et al.* [5] đã đề xuất một định nghĩa rộng hơn trên cơ sở sử dụng các thuật ngữ "vi nấm biển" và "nấm có nguồn gốc từ biển". Vi nấm biển được định nghĩa là bất kỳ loại nấm nào có khả năng: (i) phát triển và/hoặc hình thành bào tử trên nền tảng hoặc trong môi trường biển; (ii) hình thành mối quan hệ cộng sinh với các sinh vật biển khác; hoặc (iii) thích nghi và tiến hóa hoặc hoạt động trao đổi chất trong môi trường biển.

Trước đây, vi nấm biển từng được xem là một nhóm sinh vật tương đối ít loài và số lượng hạn chế. Tuy nhiên, trong hai thập kỷ trở lại đây, nhờ ứng dụng các phương pháp không phụ thuộc vào nuôi cấy và công nghệ giải trình tự gene thế hệ mới, sự đa dạng tiềm ẩn của vi nấm biển trong nhiều môi trường khác nhau đã được khám phá rõ hơn. Những phát hiện này đã làm gia tăng đáng kể sự quan tâm từ cộng đồng khoa học đối với nhóm sinh vật này [6].

Vi nấm biển là sinh vật có sự đa dạng sinh hóa và là nguồn cung cấp các hợp chất chuyển hóa tự nhiên tiềm năng. Các chất chuyển hóa tự nhiên mới có hoạt tính sinh học do vi nấm tạo ra bao gồm terpen, steroid, polyketide, peptide, alkaloid và polysaccharides, liên quan đến hoạt tính kháng khuẩn, kháng vi-rút, chống oxy hóa, chống ung thư và chống viêm [7]. Trong phạm vi hoạt động rộng, các chất chuyển hóa có thể được sử dụng để phát triển thuốc và các ứng dụng y tế, dược phẩm, nông nghiệp và mỹ phẩm [3]. Bên cạnh là nguồn hợp chất có hoạt tính sinh học, vi nấm biển còn có vai trò phục hồi sinh học do chúng có khả năng sinh tổng hợp các enzyme catalase, laccase, peroxidase phân hủy các hợp chất bền vững và các chất gây ô nhiễm môi trường [8].

1.2. NGUỒN HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TIỀM NĂNG

Việc xác định các sản phẩm tự nhiên mới là một cách tiếp cận để tìm kiếm các loại thuốc và liệu pháp mới. Do đó, việc tạo ra các chất mới là an toàn hơn, thân thiện với môi trường và bền vững. Các sản phẩm tự nhiên là các hợp chất hoặc phân tử hóa học có hoạt tính dược lý hoặc sinh học (thường dưới 1000 Da), được tìm thấy trong tự nhiên và được sản xuất bởi một nguồn sinh học [9]. Ngoài ra, các hợp chất có trọng lượng phân tử cao như protein và polysaccharide cũng có thể có tiềm năng điều trị. Chúng được gọi chung là chất chuyển hóa thứ cấp, các hợp chất này không tham gia trực tiếp vào bất kỳ chức năng chính nào liên quan đến sự sinh trưởng, phát triển và sinh sản của một sinh vật. Tuy nhiên, chúng thường liên quan nhiều đến khả năng sống sót của sinh vật, chẳng hạn như phòng thủ, cạnh tranh và giao tiếp [10].

Penicillin là kháng sinh sản phẩm tự nhiên đầu tiên được sản xuất bởi nấm *Penicillium notatum* (*Penicillium rubens* và trước đây được gọi là *Penicillium chrysogenum*) đã được Sir Alexander Fleming phát hiện vào năm 1928 [11]. Phát hiện này đã thúc đẩy việc khám phá các vi sinh vật làm nguồn kháng sinh, mở đầu cho kỷ nguyên vàng cho việc khám phá các sản phẩm tự nhiên khác từ nấm. Một số nghiên cứu tập trung phát hiện các sản phẩm tự

nhiên mới có hoạt tính sinh học từ biển. Ban đầu, nghiên cứu về các sản phẩm tự nhiên biển chỉ giới hạn ở các sinh vật dễ thu thập như san hô và bọt biển. Ví dụ, độc tố tedanolide được phân lập từ bọt biển *Tedania ignis*, trong khi prostaglandin được phân lập từ roi biển Caribe *Plexaura homomalla* [12]. Hơn nữa, nhiều sản phẩm tự nhiên được phát hiện tổng hợp bởi các vi sinh vật biển liên kết với sinh vật lớn [13]. Cho đến nay, chỉ có khoảng 5% các loài nấm trên thế giới được phát hiện và nghiên cứu. Do đó, vi nấm biển gần đây đã thu hút sự quan tâm như một nguồn phong phú để tìm kiếm các hợp chất hóa học mới, cho thấy chúng vẫn là một nhóm sinh vật tiềm năng với nhiều giá trị chưa được khai thác hết trong công nghệ sinh học [14].

Năm 1945, nhóm sản phẩm tự nhiên đầu tiên từ vi nấm biển được mô tả là cephalosporin, một lớp kháng sinh β -lactam được phân lập từ *Acremonium chrysogenum* (trước đây gọi là *Cephalosporium chrysogenum*) [15]. Sau đó, vào năm 1977, Okutani đã xác định gliotoxin là một loại kháng sinh diketopiperazine mới được phân lập từ một loại vi nấm biển *Aspergillus* sp. thu được từ trầm tích biển sâu [16]. Cho đến nay, số lượng hợp chất kháng sinh được phân lập từ vi nấm biển tăng nhanh chóng. Hơn 3.500 chất chuyển hóa thứ cấp của nấm biển đã được ghi nhận [17], nhưng chắc chắn vẫn còn một số lượng lớn chưa được khai thác.

Hầu hết các nghiên cứu về hợp chất thứ cấp của vi nấm biển đều tập trung vào một số chi: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* và *Cladosporium*. Tuy nhiên, các nghiên cứu về sản phẩm tự nhiên từ vi nấm biển vẫn tiếp tục tăng và đã được mở rộng sang các chi khác. Các nghiên cứu này đã chứng minh rằng vi nấm biển là nguồn chất chuyển hóa thứ cấp khổng lồ để khám phá thuốc [14]. Số lượng nghiên cứu được công bố tăng lên hàng năm, với hầu hết trong số chúng đến từ các loài liên quan đến các nền khác nhau và môi trường sống mới. Hầu hết các chất chuyển hóa này là dẫn xuất của những chất được tìm thấy trên nấm trên cạn nhưng có sự khác biệt đáng kể về hoạt động sinh học của chúng (đôi khi hiệu quả hơn và đặc hiệu hơn).

Năm 2022, có 14 hợp chất có nguồn gốc từ biển được cấp phép sử dụng trong dược phẩm và hơn 30 sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên đang trong các giai đoạn thử nghiệm lâm sàng khác nhau [18]. Trong số đó, Plinabulin là một hợp chất thuộc lớp diketopiperazine, được phân lập từ vi nấm biển *Aspergillus* sp. và hiện đang được BeyondSpring Pharmaceuticals tiến hành thử nghiệm lâm sàng.

Hợp chất này đã bước vào giai đoạn cuối của thử nghiệm lâm sàng pha III trên quy mô toàn cầu nhằm đánh giá hiệu quả điều trị ung thư phổi không tế bào nhỏ và khả năng giảm tình trạng giảm bạch cầu trung tính do hóa trị [18]. Mặc dù các nghiên cứu về vi nấm biển đã ghi nhận tiềm năng ứng dụng trong dược phẩm, phần lớn các nghiên cứu hiện nay vẫn chủ yếu tập trung vào việc mô tả các hợp chất tự nhiên mới có hoạt tính sinh học trong điều kiện *in vitro*.

1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRÊN THẾ GIỚI

Hiện nay, hướng nghiên cứu tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật biển nhằm phục vụ cho phát triển dược phẩm đang được các nhà khoa học trên thế giới rất quan tâm. Trong đó, vi nấm biển được xem là nguồn khai thác tiềm năng các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học như: chống ung thư, kháng khuẩn, kháng virus, kháng nấm, kháng viêm và các hợp chất ức chế enzyme... Kể từ khi penicillin được phân lập, hoạt tính kháng khuẩn của các chất chuyển hóa từ vi nấm có hoạt tính kháng khuẩn đã trở thành trọng tâm của các nghiên cứu. Từ năm 1998 đến năm 2019, hơn 3500 hợp chất có đặc tính kháng khuẩn đã được phân lập từ nhiều loại nấm có nguồn gốc từ biển [19].

Hợp chất kháng khuẩn đầu tiên là Gliotoxin được phân lập từ chủng *Aspergillus fumigatus* từ trầm, tích biển Seto (Nhật Bản). Chất này có hoạt tính ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Bacillus subtilis*. Đây là loại kháng sinh diketopiperazine lần đầu tiên thu được từ một loại vi nấm có nguồn gốc từ trầm tích biển sâu. Từ đó, một số lượng lớn các sản phẩm tự nhiên mới từ vi nấm biển đã được phân lập và nghiên cứu đặc tính, chủ yếu là từ các chi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* và *Cladosporium* [20].

Chất chuyển hóa thuộc các nhóm chất như polyketide, alkaloid, peptide, lactone, terpenoid và steroid đã được nghiên cứu với cấu trúc đặc biệt và hoạt tính sinh học nổi bật được phân lập từ vi nấm biển. Hầu hết các hợp chất này có hoạt tính chống ung thư, hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, chống viêm, chống oxi hóa và gây độc tế bào [21].

Năm 2018, 2 hợp chất mới được phân lập từ dịch nuôi cấy lỏng của chủng *Penicillium* sp. có nguồn gốc từ biển trong nghiên cứu của Youssef *et al.*, penicillatide A và B. Các hợp chất mới thể hiện hoạt động gây độc tế bào và kháng khuẩn khác nhau [22].

Mười hợp chất được phân lập từ *Penicillium* sp. Z-16, trong đó xác định 1 hợp chất mới có tên là methyl 2-(2,6-dihydroxy-4-methylbenzoyl)-4,5-

dihydroxy-3-methoxybenzoate. Các thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn chứng minh rằng hợp chất 1 có hoạt tính vừa phải đối với *Candida albicans* với giá trị MIC là 125 µg/ml, trong khi 2 hợp chất khác cho thấy giá trị MIC là 62,5 µg/ml đối với *Staphylococcus aureus* [23].

Axit helvolinic và axit helvolic được phân lập từ vi nấm biển *Aspergillus fumigatus* MF071 hoạt tính kháng mạnh với *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* đã được báo cáo. Phân tích dữ liệu bộ gene đã tiết lộ các cụm gene sinh tổng hợp được cho là ftm đối với fumitremorgins, pso đối với pseurotins, fga đối với fumigaclavines và hel đối với axit helvolinic. Các cụm gene sinh tổng hợp được cho là nền tảng cho nghiên cứu chức năng cơ học và enzym đối với quá trình sinh tổng hợp các hợp chất này [24].

Năm 2020, nấm *Aspergillus ochraceus* được phân lập từ hải miên *Acanthostrongylophora ingenes* cho thấy có hoạt tính kháng một số chủng vi khuẩn: *Vibrio cholerae inaba*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29252, *Pseudomonas aeruginosa*, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 và *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [25].

Một nghiên cứu khác, dẫn xuất anthraquinone mới được phân lập từ chủng vi nấm biển *Nigrospora* sp. 1403. Hợp chất này có hoạt tính mạnh kháng lại *Bacillus subtilis* (MIC = 0,625 µM), *Bacillus cereus* (MIC = 10,0 µM), *Micrococcus luteus* (MIC = 20,0 µM), *Streptomyces albus* (MIC = 5,00 µM), *Staphylococcus aureus* (MIC = 2,5 µM), *Micrococcus terageneus* (MIC = 1,25 µM), *Escherichia coli* (MIC = 2,5 µM), *Vibrio anguillarum* (MIC = 2,5 µM), và *Vibrio parahaemolyticus* (MIC = 1,25 µM) [26].

Chủng *Aspergillus flavipes* KUFA1152 có nguồn gốc từ hải miên *Mycale* sp. được thu thập từ Vịnh Thái Lan và bốn phenylbutyrolactone mới đã được phân lập từ chủng này là aspulvinone R, S, T, U và aspulvinone A, B', H, và 4-hydroxy-3,5-bis(3-metylbut-2-en-1-yl)benzaldehyd. Trong đó, 2 hợp chất thể hiện có hoạt tính mạnh nhất đối với *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 và *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MIC từ 4 đến 16 µg/ml), và đối với các chủng đa kháng thuốc (*Enterococcus faecalis* kháng vancomycin (VRE) B3/101 và MRSA) 66/1) với giá trị MIC từ 8 đến 32 µg/ml [27].

Hai pyridone bất thường, trichodin A và trichodin B, cùng với pyridoxatin được phân lập bởi chủng vi nấm biển *Trichoderma* sp. MF106 từ biển

Greenland. Trichodin A cho thấy hoạt tính kháng sinh ức chế vi khuẩn gram dương *Staphylococcus cholermidis* và *Staphylococcus epidermidis* với IC₅₀ lần lượt là 27,05 μ M và 24,28 μ M ; và chủng nấm *C. albicans* với IC₅₀ là 25,38 μ M [28].

Tám hợp chất đã được phân lập từ chủng *Penicillium steckii* HNNU-5B18, trong đó hợp chất *Monome anserinone* B thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với các chủng *S. aureus* ATCC 29213 và MRSA với giá trị MIC lần lượt là 2 và 8 μ g/ml [29].

Hợp chất aladothalen được Fan và cs phân lập từ chủng nấm *Cladosporium* sp. HDN17-58 có nguồn gốc từ một mẫu trầm tích biển sâu thu thập tại Tây Thái Bình Dương. Hợp chất này thể hiện hoạt tính ức chế chống lại *B. cereus*, *Proteus* sp., *M. phlei*, *B. subtilis*, *V. parahemolyticus*, *Edwardsiella tarda* và MRSA [30].

Zhang và cs đã phân lập được 16 hợp chất, trong đó có một indoloditerpene mới và 15 hợp chất đã biết. Hợp chất mới này đã thể hiện hoạt tính ức chế các chủng với *E. coli* và *C. albicans* với giá trị MIC là 20,6 μ M và 22,8 μ M [31].

Chủng *Aspergillus* sp. IMCAS180035 được phân lập từ mẫu bùn biển, 8 hợp chất được phân lập từ chủng này. Trong đó có 4 hợp chất mới gồm aspergiloxathene A, một chất tương tự penicillide là Δ^2 '-1'- dehydropenicillide, 5-methyl-3-methoxyepicoccone và 7-carboxy-4-hydroxy-6-methoxy-5-methylphthalide. Trong đó hợp chất mới aspergiloxathene A được xác định là phân tử liên kết đầu tiên bởi các gốc xanthene và anthracenone sở hữu khung carbon chưa từng có với hệ thống vòng spiro. Hợp chất này có hoạt tính ức chế tốt đối với *S. aureus*, MRSA, với giá trị MIC là 5,60 và 22,40 μ M [32].

Năm 2021, nghiên cứu về các sản phẩm tự nhiên từ môi trường biển (MNPs) tiếp tục gia tăng, có 1425 hợp chất mới được công bố từ 416 bài báo (so với 1407 hợp chất mới được công bố trong 420 bài báo trong năm 2020). Các hợp chất được báo cáo từ vi nấm biển vẫn là nguồn MNPs dồi dào nhất. Mặc dù số lượng MNPs mới đã tăng nhẹ kể từ năm 2020, nhưng xu hướng báo cáo về các chất chuyển hóa từ vi khuẩn lam, nấm rừng ngập mặn, tảo đỏ, hải miên trong vài năm qua đang giảm dần. Xu hướng này có thể liên quan đến các hạn chế trong việc đi lại trong nước và quốc tế, do đại dịch COVID-19 làm hạn chế cơ hội thu thập mẫu thực địa [33].

Như vậy, các kết quả nghiên cứu công bố trên thế giới đã cho thấy, vi nấm biển là nguồn sinh tổng hợp các hợp chất có sự đa dạng cao về cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học. Với hệ sinh thái biển bao phủ khoảng 70% bề mặt trái đất và rất phong phú về đa dạng sinh học, đặc biệt ở môi trường nhiệt đới. Sự đa dạng sinh học của vi sinh vật trong môi trường biển là rất lớn, ước tính mới chỉ có tỷ lệ rất nhỏ sự đa dạng vi sinh vật biển đã được nghiên cứu.

1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TẠI VIỆT NAM

Việt Nam là quốc gia nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới, sở hữu đường bờ biển dài hơn 3.260 km cùng hơn 3.000 hòn đảo lớn nhỏ, bao gồm cả hai quần đảo Trường Sa và Hoàng Sa. Nhờ đó, Việt Nam được đánh giá là một trong những khu vực có mức độ đa dạng sinh học biển cao trên thế giới. Đồng thời, vị trí địa lý đặc thù cùng điều kiện khí hậu nhiệt đới gió mùa đã góp phần hình thành nên các hệ sinh thái biển phong phú và đa dạng.

Năm 2022, 31 chủng vi nấm biển được phân lập từ 105 mẫu biển, kết quả được công bố trong nghiên cứu của nhóm Cao Đức Tuấn & cs., đều thể hiện hoạt tính kháng VSVKĐ. Trong đó, 8/31 chủng kháng ít nhất 4/7 chủng VSVKĐ, 4/31 chủng kháng vi khuẩn Gram âm và 26/31 chủng kháng nấm. Các chủng vi nấm biển đã được định danh dựa trên hình thái hoặc trình tự gene 18S rRNA.

Hai hợp chất andrastin A và citreohybridonol được phân lập từ chủng vi nấm *Penicillium chrysogenum* 045-357-2 có nguồn gốc từ san hô mềm thu thập ở vịnh CaNa, Ninh Thuận, Việt Nam. Hợp chất andrastin A có hoạt tính kháng khuẩn đối với *B. Bacillus cereus* ATCC11778 và *Staphylococcus faecalis* ATCC19433 với các giá trị MIC tương ứng là 32 và 64 $\mu\text{g/ml}$. Tuy nhiên, hoạt tính kháng khuẩn đối với các chủng thử nghiệm không phát hiện được trong hợp chất citreohybridonol [34].

Ba dibenzospiroketal mới được phân lập từ loài nấm nội sinh *Aspergillus micronesiensis* là aspermicrones A - B - C (28, 29, 30). Hợp chất aspermicrones B có tác dụng gây độc tế bào chọn lọc đối với dòng tế bào HepG2 ($\text{IC}_{50} = 9,9 \mu\text{M}$). Ngoài ra, cả hai hợp chất aspermicrones B và aspermicrones C đều có hoạt tính kháng khuẩn đối với *Staphylococcus aureus* ($\text{MIC} = 123,2 \mu\text{M}$ cho mỗi hợp chất) [35].

Chủng *Ascomycota* sp. VK12 có nguồn gốc từ mẫu hải miên được thu thập ở vùng biển Quảng Nam -Việt Nam, trong đó có hợp chất (3R) - (3',5'-

dihydroxyphenyl) butan-2-one là hợp chất mới và năm hợp chất đã được công bố. Hợp chất mới có hoạt tính gây độc tế bào đối với các dòng tế bào ung thư biểu mô HepG2, MCF-7 và SK-Mel2, với các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 48,6 đến 96,5 μ M [36].

Đề án về dược liệu biển đã được tiến hành nghiên cứu tại vùng biển Đông Bắc Việt Nam và vùng biển Bắc Trung bộ đến Trung Trung bộ Việt Nam, do GS. Viện sĩ Châu Văn Minh làm chủ nhiệm [37]. Nhiều hợp chất từ các dịch nuôi cấy của các chủng xạ khuẩn biển đã được phân lập bởi nhóm nghiên cứu thuộc Viện Hóa sinh. Trong đó, một số hợp chất mới được đánh giá có hoạt tính kháng VSVKD, kháng vi khuẩn lao và một số hợp chất có tác dụng ức chế sự phát triển của dòng tế bào ung thư và ức chế enzyme α -glucosidase... 25 chủng vi nấm biển từ 6 mẫu trầm tích thu thập được ở vùng biển Cô Tô, Thanh Lân đã được phân lập, nuôi cấy và lưu giữ được. [38].

Mười hợp chất đã được phân lập từ cặn chiết của chủng vi nấm *Penicillium* sp. M30. Trong đó, hợp chất 3-acetyl-4-hydroxycinnoline (M30-7) được lần đầu phân lập từ chi *Penicillium*, hợp chất này ức chế 4/7 chủng VSVKD với MIC từ 64 -256 μ g/ml ; và hợp chất 1H-indole-3-acetic (M30-8) có phổ hoạt tính rộng kháng 6/7 chủng VSVKD với giá trị MIC từ 32 -256 μ g/ml. Ngoài ra, hợp chất 2-[(5-methyl-1, 4-dioxan-2-yl)methoxy]ethanol (M30-3) ức chế mạnh đối với *Enterococcus faecalis* và *Candida albicans* với giá trị MIC tương ứng là 32 và 64 μ g/ml, hợp chất 2-[(2Rhydroxypropanoyl)amino]benzamide (M30-4) và 4-hydroxybenzandehide (M30-5) và chrysogine (M30-6) ức chế chọn lọc *E. coli* với giá trị MIC lần lượt là 16 μ g/ml, 8 μ g/ml và 64 μ g/ml [39].

Mười hai hợp chất được phân lập từ chủng vi nấm *Hamigera avellanea* M253 có nguồn gốc từ hải miên thu thập ở vùng Bái Tử Long, trong đó có 1 hợp chất mới hamiavemin A. Trong số các hợp chất được phân lập, hợp chất helvolic acid cho thấy hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất đối với *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. enterica* và *C. albicans* với giá trị MIC lần lượt là 2, 2, 16, 32, 64 và 16 μ g/ml. Ngoài ra, hợp chất hamiavemin A, monomethylsulochrin 5-sulfonic acid và ergosterol cho thấy hoạt tính gây độc tế bào vừa phải đối với ba dòng tế bào ung thư, HepG2, A549 và MCF-7 với giá trị IC_{50} dao động từ $55,35 \pm 1,70$ đến $83,02 \pm 2,85$ μ g/ml [40].

Trong nghiên cứu của Nguyễn Phương Huệ và cộng sự vào năm 2021, chủng *Penicillium roqueforti* G 1.1 đã được phân lập từ trầm tích biển Việt Nam và được xác định có khả năng sinh tổng hợp Mycophenolic acid với phổ kháng khuẩn rộng và hoạt tính cao. Như vậy, việc nghiên cứu và khai thác các chủng vi nấm biển không chỉ góp phần làm sáng tỏ tiềm năng sinh học của chúng mà còn mở ra hướng phát triển các hợp chất kháng khuẩn mới phục vụ y học hiện đại tại Việt Nam [41].

1.5. SỰ CẦN THIẾT KHI TIẾN HÀNH NGHIÊN CỨU

Một số kết quả nghiên cứu được trình bày trong phần tổng quan cho thấy vi nấm biển là nguồn tiềm năng trong việc tạo ra các hợp chất có cấu trúc hóa học phong phú và đa dạng về hoạt tính sinh học. Trong những năm gần đây, hơn 50% số hợp chất mới có nguồn gốc từ biển được xác định là do vi nấm biển tạo ra và nhiều hợp chất trong số này đang được tiếp tục nghiên cứu nhằm hướng đến ứng dụng thực tiễn [17]. Với đặc điểm là quốc gia nhiệt đới có đường bờ biển dài và diện tích vùng biển rộng lớn, Việt Nam được xếp vào nhóm các trung tâm có mức độ đa dạng sinh học biển cao trên thế giới [42]. Tuy nhiên, mặc dù sở hữu tiềm năng sinh vật biển phong phú, các nghiên cứu về vi nấm biển ở Việt Nam vẫn còn hạn chế. Đến nay, mới chỉ có một số ít công trình được thực hiện, chủ yếu do các nhà khoa học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam hợp tác với các tổ chức trong và ngoài nước [43].

Việt Nam hiện nằm trong nhóm các quốc gia có tỷ lệ kháng kháng sinh ở mức cao trên thế giới. Do đó, việc nghiên cứu và phát triển các loại kháng sinh mới từ nguồn trong nước là yêu cầu cần thiết và mang ý nghĩa chiến lược trong bối cảnh hiện nay. Vùng biển của Việt Nam được ghi nhận có hệ sinh thái đa dạng với nhiều loài động thực vật sinh sống, đây cũng chính là nơi cư ngụ lý tưởng của hệ vi sinh vật biển. Tuy nhiên cho đến nay nguồn vi sinh vật biển nói chung, vi nấm biển nói riêng vẫn chưa được khai thác nhiều. Chính vì vậy, việc nghiên cứu đánh giá tiềm năng hoạt tính sinh học của vi nấm biển là rất cần thiết. Đây là hướng nghiên cứu với nguồn nguyên liệu được khai thác chủ động, an toàn và không ảnh hưởng đến bảo tồn nguồn tài nguyên thiên nhiên biển. Các chủng vi nấm biển được phân lập chỉ từ một lượng mẫu nhỏ, sau đó được nuôi sinh khối với lượng lớn trong phòng thí nghiệm để nghiên cứu tách chiết các hợp chất thứ cấp.

Vùng biển Cồn Cỏ, thuộc tỉnh Quảng Trị - Việt Nam, được coi là cửa

ngõ của vùng biển Việt Nam, đa dạng sinh học. Từ tình hình nghiên cứu trên, chưa thấy có nhiều khai thác từ vi nấm biển tại vùng biển này. Vùng biển này được tiến hành lựa chọn và khai thác nghiên cứu. Đồng thời, việc công bố kết quả nghiên cứu về các vùng biển trong nước trên các tạp chí quốc tế uy tín góp phần khẳng định chủ quyền biển đảo của Việt Nam.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu này kế thừa 17 mẫu sinh vật bao gồm rong, hải miên, san hô mềm, động vật biển, sên biển, ốc, cầu gai và trầm tích đã được lấy tại các địa điểm khác nhau tại vùng biển Côn Cỏ tỉnh Quảng Trị, Việt Nam (Bảng 2.1), được lưu trữ tại Phòng Công nghệ Sinh học, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Bảng 2.1. Ký hiệu và vị trí lấy mẫu của 17 mẫu sinh vật tại vùng biển Côn Cỏ

TT	Mẫu	Ký hiệu mẫu	Tọa độ	Địa điểm
1	Trầm tích	TT37	17.16601° – 107.33353°	Côn Cỏ 2
2	Rong	R48	17.16059° – 107.33080°	Côn Cỏ 1
3	Hải miên	HN39	17.16601° – 107.33353°	Côn Cỏ 2
4	Trầm tích	TT 38	17.16059° – 107.33080°	Côn Cỏ 1
5	San hô mềm	SHM34	17.16059° – 107.33080°	Côn Cỏ 1
6	Có bao	ĐVB02	17.15245° – 107.34443°	Côn cỏ 4
7	Rong	R50	17.16680° – 107.33902°	Côn cỏ 3
8	San hô mềm	SHM36	17.16680° – 107.33902°	Côn cỏ 3
9	San hô mềm	SHM40	17.15245° – 107.34443°	Côn cỏ 4
10	Trầm tích	TT39	17.16680° – 107.33902°	Côn cỏ 3
11	Rong	R46	17.16601° – 107.33353°	Côn Cỏ 2
12	Trầm tích	TT40	17.15245° – 107.34443°	Côn cỏ 4
13	Hải miên	HM42	17.16059° – 107.33080°	Côn Cỏ 1

TT	Mẫu	Ký hiệu mẫu	Tọa độ - Độ sâu	Địa điểm
14	Sên biển	TM42	17.16059° – 107.33080°	Cồn Cỏ 1
15	Hải miên	HM40	17.16601° – 107.33353°	Cồn Cỏ 2
16	Cầu Gai	DG10	17.16059° – 107.33080°	Cồn Cỏ 1
17	Hải miên	HM45	17.16680° – 107.33902°	Cồn cỏ 3

Các chủng vi sinh vật kiểm định được sử dụng để thử hoạt tính gồm: 3 chủng vi khuẩn Gram âm (-): *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076; 3 chủng vi khuẩn Gram dương (+): *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579; 1 chủng Nấm men *Candida albicans* ATCC10231 (Microbiologics, Mỹ).

2.1.2. Hóa chất và thành phần nuôi cấy

2.1.2.1. Thành phần môi trường nuôi cấy

Bảy loại môi trường phân lập [44]:

- A1 (g/l): Tinh bột hòa tan: 10, cao nấm men: 4, peptone: 2, muối biển nhân tạo: 30, agar: 15.
- SWA (g/l): Muối biển nhân tạo: 30, agar: 15.
- SCA: Muối biển nhân tạo: 30 g/l, CaCO₃: 2 mg/l, FeSO₄.7H₂O: 10 mg/l, MgSO₄.7H₂O: 50 mg/l, casitone: 300 mg/l, K₂HPO₄: 2 g/l, KNO₃: 2 g/l, agar: 15.
- NZSG (g/l): Tinh bột hòa tan: 20, cao nấm men: 5, glucose: 10, NZ amin A: 5, muối biển nhân tạo: 30, agar: 15.
- PMDA (g/l): Chiết xuất khoai tây: 30, dextrose: 20, mạch nha: 10; muối biển nhân tạo: 30, agar: 15.
- PDA (g/l): Chiết xuất khoai tây: 30, dextrose: 20; muối biển nhân tạo: 30, agar: 15.
- ISP2 (g/l): Tinh bột hòa tan: 5, cao nấm men: 2, glucose: 10, chiết xuất mạch nha: 10, muối biển nhân tạo: 30, agar: 15.

Các môi trường được điều chỉnh đến pH 7.0 ± 0.2, khử trùng ở 121 °C, 30 phút

- Môi trường lên men các chủng vi nấm: Môi trường PDA/PDB (g/l): Chiết xuất khoai tây: 30; dextrose: 20; muối biển nhân tạo: 30; Nước cất: 1 lít.

- Môi trường LB dùng trong nuôi vi sinh vật kiểm định: Cao nấm men: 5g; Trypton: 10g; NaCl: 5g; agar: 15g; Nước cất vừa đủ 1 lít.

2.1.2.2. Các hóa chất sử dụng

Dung môi: Ethyl acetate, MeOH, nước cất, DMSO, Ethanol 100%, Ethanol 70%, cao nấm men, peptone, muối biển nhân tạo, agar, CaCO₃, FeSO₄.7H₂O, MgSO₄.7H₂O, casitone, K₂HPO₄, KNO₃, NZSG, tinh bột hòa tan, glucose, NZ aamin A, chiết xuất khoai tây, dextrose, mạch nha; muối biển nhân tạo, agar, chiết xuất mạch nha, trypton, NaCl, Tris HCl, EDTA, SDS, proteinaseK, phenol: chloroform: isomylalcohol (25:24:1), NaOAc 3M, cồn tuyệt đối, RNase. Kháng sinh làm đối chứng dương Kanamycin (10 mg/ml), đối với 6 loại vi khuẩn và Cycloheximide (10 mg/ml) đối với nấm *Candida albicans*. Bộ Master Mix của hãng Thermo fisher; bộ BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) dùng cho phản ứng đọc trình tự DNA; chỉ thị marker DNA chuẩn (Invitrogene); Cặp môi để khuếch đại gene 18S rRNA: NS3F (5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3') và NS8R (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') được thiết kế và đặt tổng hợp tại hãng Invitrogene.

2.1.3. Dụng cụ và máy móc thiết bị nghiên cứu

2.1.3.1. Dụng cụ nghiên cứu

Đĩa petri, que cấy, bình tam giác, que ria, đèn cồn, que trang, pipette 20, 200, 1000 ; đầu tít ; ống eppendorf 2 ml, 15 ml, 50 ml ; kéo cắt, băng dính ; kẹp y tế, túi mép các loại, bình giữ lạnh dung tích 30 lit, đá khô, lọ thủy tinh có nắp vặn 4 ml, giấy không bụi đã khử trùng, bình xịt cồn 500 ml, tủ lạnh. Tất cả những thứ cần vô trùng đều được khử trùng ở nhiệt độ 121 °C trong 30 phút.

2.1.3.2. Máy móc thiết bị

Kính hiển vi ngược (Axiovert 40 CFL); Buồng đếm tế bào (Fisher, Hoa kỳ); máy sóc nhiệt mini ; máy ảnh ; Tủ lạnh sâu -80 °C, bình nitơ lỏng, Box cấy Class II; tủ nuôi cấy (Sanyo, nhật); máy ly tâm 5415C (Eppendorf, Đức); Cân phân tích (Sartorius, Đức); máy đo pH Meter Delta 320 (Mettler Toledo, Thụy sỹ), Bể ổn nhiệt mini (Mỹ), Máy đo Quang phổ Biotect Mỹ, Máy xác định trình tự nucleotide tự động – ABI 3100 Avant (Applied Biosystems, Mỹ); máy ly tâm Eppendorf (Đức); máy PCR-PTC 100 (MJ Research, Mỹ); bộ điện di DNA (Advance Tech, Nhật bản); máy soi gel (Bio-Rad, Mỹ).

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp phân lập vi sinh vật biển

2.2.1.1. Xử lý mẫu biển

a. *Đối với bùn biển*: Các mẫu được xử lý và chia ra các loại ống khác nhau: Ống eppendorf 50 ml cho việc lưu giữ. Ống eppendorf 2 ml với một lượng nhỏ khoảng 0.5 g bùn biển (nếu là loại bùn có cấu trúc nhỏ mịn thì hòa với 0,75 ml nước cất đã khử trùng, đối với những loại bùn có cấu trúc nhỏ vừa thì hòa với 0,5 ml nước, còn với những loại bùn biển có cấu trúc to giống cát thì hòa với 0,25 ml nước).

b. *Đối với hải miên, san hô mềm, rong và một số vật liệu khác*: Ống eppendorf 50 ml cho việc lưu giữ. Ống eppendorf 2 ml với một mẫu nhỏ khoảng 0,5 g (nếu là Hải miên và San hô mềm hòa với 0,75 ml nước cất đã khử trùng. Đối với rong và một số vật liệu khác thì hòa với 0,5 ml nước)

c. *Đối với tằm bông*: Đây là những mẫu vật được lấy từ dịch thể hoặc quệt trên bề mặt của các động vật thân mềm, sứa biển... bằng tằm bông đã khử trùng. Ống eppendorf 2 ml: Cắt mẫu tằm bông cho vào rồi bổ sung 1 ml nước cất.

2.2.1.2 Phân lập

Sử dụng Ethanol 70% và đèn cồn để khử trùng các dụng cụ như kéo cắt, kẹp que trang..., Máy sóc nhiệt mini và một số vật dụng cần thiết.

a. *Đối với Bùn biển*: Thanh inox được khử trùng bằng cách hơ trực tiếp trên ngọn lửa đèn cồn, sau đó để nguội. Khi đã nguội, thanh này được sử dụng để đảo mẫu từ 3 đến 4 lần nhằm đảm bảo trộn đều. Nếu dịch trong ống chuyển sang trạng thái đục, quá trình được coi là đạt yêu cầu. Mẫu sau đó được sóc nhiệt ở 60°C trong vòng 8 phút, rồi trộn đều bằng máy vortex. Tiếp theo, lấy 50 µl dịch này chuyển sang một ống eppendorf khác chứa sẵn 450 µl nước cất đã tiệt trùng. Dùng máy vortex để trộn đều hỗn hợp, tạo thành dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:10. Từ dung dịch này, hút 50 µl cho vào các loại môi trường khác nhau và dàn đều trên bề mặt đĩa thạch để nuôi cấy

b. *Đối với Hải miên, San hô mềm, rong và một số vật liệu khác*: Thanh inox được khử trùng bằng cách đưa qua ngọn lửa đèn cồn, sau đó để nguội trước khi sử dụng. Khi đã nguội, thanh được dùng để nghiền mẫu từ 3 đến 4 lần. Quan sát thấy dịch trong ống chuyển sang trạng thái đục là đạt yêu cầu. Mẫu sau đó được xử lý sóc nhiệt ở 60°C trong 8 phút và tiếp tục trộn đều bằng máy vortex. Từ dịch đã sóc nhiệt, lấy 50 µl chuyển vào ống eppendorf chứa 450 µl nước cất vô

trùng, lắc đều bằng máy vortex để tạo dung dịch pha loãng. Sau đó, hút 50 μ l từ dung dịch này để cấy vào các loại môi trường, và dàn đều mẫu lên bề mặt đĩa thạch.

c. Đối với tảo bông: Dùng máy vortex trộn mẫu cho đều cho tới khi dịch trong ống đục là được, hút 30 μ l cho vào 7 loại môi trường rồi trang đều ra mặt thạch.

Phương pháp phân lập sử dụng 7 loại môi trường được Stanley và Holt (1989) tham khảo cải tiến từ Đại học Illinois Chicago, Hoa Kỳ [44] để phân lập vi nấm từ trầm tích và sinh vật biển. Tất cả các đĩa petri đã được trải mẫu đều được quấn kín bằng Parafin, nuôi ở 28 °C, quan sát hàng ngày trong 5-30 ngày.

2.2.2. Phương pháp giữ giống vi sinh vật sau phân lập

Các chủng vi nấm phân lập được cấy chuyển định kỳ trên môi trường thạch nghiêng (1 tháng/1 lần). Giữ vi sinh vật trong glycerol vô trùng 30% ở nhiệt độ 4-5°C (trong thời gian ngắn). Giữ ở nhiệt độ -20 °C hoặc -80 °C trong khoảng thời gian lâu dài hoặc sử dụng phương pháp đông khô v.v...

2.2.3. Phương pháp nuôi cấy

Các chủng nghiên cứu được cấy vào môi trường lỏng đã chuẩn bị sẵn trong bình tam giác dung tích 100 ml, mỗi bình chứa 30 ml môi trường và đã được tiệt trùng ở 121°C trong 30 phút. Quá trình nuôi lắc được thực hiện ở tốc độ 120 vòng/phút, duy trì trong 5-7 ngày ở nhiệt độ 28°C. Sau thời gian này, cổ bình được khử trùng bằng cách hơ qua lửa cồn trước khi toàn bộ dịch nuôi được chuyển sang bình mới có dung tích 500 ml chứa môi trường nuôi cấy tương tự (đã tiệt trùng ở 121°C trong 30 phút). Quá trình nuôi lắc ở 120 vòng/phút trong thời gian 10-12 ngày ở 28°C. Độ thuần khiết của chủng được đánh giá bằng cách chấm điểm mẫu lên môi trường thạch và quan sát sự phát triển khuẩn lạc.

Nuôi cấy chủng vi nấm được tiến hành trên môi trường PDA trong thời gian 7-10 ngày ở 28°C. Sau đó, các đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên đĩa thạch được theo dõi và ghi nhận.

2.2.4. Phương pháp định danh vi nấm bằng SHPT

Sử dụng các phương pháp tách DNA tổng số, PCR, điện di, giải trình tự gene 18S rRNA [45, 46].

2.2.4.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ vi nấm biển

Nuôi lắc vi nấm trong bình tam giác 25ml có chứa 10ml môi trường PDB đã được khử trùng, ở 30 °C trong 3 ngày. Hút 2 ml dịch nuôi vào ống

Eppendorf, ly tâm 10:000 vòng/phút thu tế bào, bổ sung 500 μ l dung dịch đệm với các thành phần như sau:

- NaCl 0.1 M
- EDTA (pH 8) 0.025 M
- Tris HCl (pH 8) 0.01 M
- SDS 0,5%

Thêm proteinase K, trộn đều, ủ 37 °C trong 1 giờ giúp phá vỡ màng tế bào và phân giải protein; thêm NaCl 5 M đảo đều và ủ ở 65 °C trong 10 phút; thêm hỗn dịch phenol:chloroform:isoamyl (25:24:1) để tủa Protein; Ly tâm để thu dịch nổi; DNA được tủa bằng cách bổ sung NaOAc 3 M và Ethanol 100% để ở 20 °C tối thiểu trong 1 giờ; Ly tâm thu cặn, rửa cặn DNA bằng Ethanol 70 %; Thêm đệm TE chứa RNase (100 μ g/ml), ủ 37 °C trong 1 giờ.

2.2.4.2. Xác định nồng độ DNA

Nồng độ DNA sau khi tách chiết được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ tại bước sóng 260 nm (A_{260}) bằng máy quang phổ Hewlett Packard (Mỹ), với mẫu được pha loãng 50 lần trong nước khử ion. Theo nguyên tắc, một đơn vị hấp thụ quang học tại 260 nm tương ứng với 50 μ g/ml DNA. Nồng độ DNA được tính theo công thức: $A_{260} \times 50 \times$ hệ số pha loãng = μ g/ml.

Độ tinh sạch của DNA cũng được đánh giá bằng tỷ số hấp thụ A_{260}/A_{280} , với phép đo thực hiện thêm ở bước sóng 280 nm. Nếu tỷ số này nằm trong khoảng từ 1,8 đến 2,0 thì có thể coi DNA sau tách chiết là đạt độ tinh sạch, phù hợp để sử dụng trong các kỹ thuật sinh học phân tử tiếp theo.

2.2.4.3. Kỹ thuật PCR

Cặp mồi NS3F và NS8R được sử dụng để tiến hành PCR nhân đoạn gene 18S rRNA từ DNA sau tách chiết của chủng vi nấm, với chu trình nhiệt: 94 °C - 3 phút, 94 °C - 1 phút, 58 °C - 1 phút, 72 °C - 1 phút 20 giây, 30 chu kỳ, 72 °C - 8 phút, kết thúc ở 4 °C.

Tổng thể tích 1 phản ứng PCR là 25 μ l với các thành phần được trình bày trong Bảng 2.2.

Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR

STT	Thành phần phản ứng	Lượng (μ l)	Nồng độ
1	NS3F	1	10pmol/ μ l
2	NS8R	1	10pmol/ μ l
3	Master Mix 2X	12,5	μ l
4	DNA khuôn	1	50ng/ μ l
5	H ₂ O	9,5	
Tổng thể tích		25 μl	

Quá trình PCR được kiểm tra bằng điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1%, để tiến hành các kỹ thuật tiếp theo.

2.2.4.4. Xác định trình tự nucleotide của gene

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit tinh sạch của hãng Invitrogene. Giải trình tự gene 18S rRNA đã được thực hiện bởi máy xác định trình tự DNA tự động ABI 3100 Avant (Applied Biosystems) với bộ kit xác định trình tự BigDye® Terminater v3.1 Cycle Sequencing Kit của hãng Applied Biosystems.

2.2.4.5. Xử lý trình tự DNA và phân tích số liệu

Trình tự thô được phân tích, ráp 2 đầu bằng phần mềm BioEdit, trình tự hoàn chỉnh của đoạn gene 18S rRNA được so sánh trong BLAST để tìm ra độ tương đồng của chủng nghiên cứu với các dữ liệu đã được công bố trên ngân hàng gene tại www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Xây dựng cây phát sinh loài của các chủng chọn lọc bằng phần mềm MEGAX [47].

2.2.5. Phương pháp thu nhận cặn chiết từ dịch ngoại bào

Các chủng vi sinh vật được nuôi cấy trong bình nón dung tích 1000 ml chứa 500 ml môi trường PDB, ở điều kiện 28–30°C và lắc với tốc độ 120 vòng/phút. Sau 7 ngày nuôi cấy, dịch nuôi được chiết xuất bằng 400 ml ethyl acetate (EtOAc), lặp lại 5 lần, mỗi lần trong 15 phút. Dịch chiết sau đó được cô đặc dưới áp suất giảm (250 mbar), sử dụng bể gia nhiệt ở 45°C để loại bỏ dung môi, thu được cặn chiết thô dùng cho các bước nghiên cứu tiếp theo (Carroll *et al.*, 2020) [48].

2.2.6. Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Hoạt tính kháng vi sinh vật của mẫu thử được đánh giá bằng phương pháp pha loãng nhiều nồng độ [49], nhằm xác định khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn hoặc vi nấm thông qua giá trị MIC (Minimum Inhibitory Concentration – nồng độ ức chế tối thiểu).

Mẫu thử ban đầu được hòa tan trong dung môi DMSO và pha thành dải nồng độ gồm: 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml và 2 µg/ml (với số lần lặp lại $n = 3$).

Huyền phù vi sinh vật được chuẩn hóa về mật độ khoảng 2×10^5 CFU/ml trước khi tiến hành thử nghiệm. Các bước thực hiện như sau:

- Hút 5,12 µl mẫu thử (nồng độ gốc 10 mg/ml) vào giếng đầu tiên chứa 100 µl môi trường LB.
- Tiến hành pha loãng theo tỷ lệ 1:2 bằng cách chuyển 50 µl từ giếng trước

sang giếng tiếp theo, mỗi giếng chứa sẵn 50 μ l môi trường LB. Quá trình được lặp lại cho đến khi đạt nồng độ thấp nhất là 2 μ g/ml.

- Thêm 50 μ l vi khuẩn hoặc nấm (2×10^5 CFU/ml) vào từng giếng.
- Ủ các giếng ở 37°C và quan sát kết quả sau thời gian quy định.

Sau 24 giờ, xác định giá trị MIC bằng mắt thường. MIC được xác định tại giếng có nồng độ thấp nhất mà tại đó không có sự phát triển của vi sinh vật. Để khẳng định kết quả, dịch từ giếng MIC được trải đều lên đĩa thạch có môi trường phù hợp để kiểm tra sự phát triển của vi sinh vật.

Đối chứng dương: Sử dụng kháng sinh streptomycin (đối với vi khuẩn) và cycloheximide (đối với nấm).

Đối chứng âm: DMSO được sử dụng để đảm bảo dung môi không ảnh hưởng đến vi sinh vật.

2.2.7. Độ đục chuẩn (McFarland)

Độ đục chuẩn 0,5 McFarland phải được chuẩn bị và kiểm định chất lượng trước khi làm thử nghiệm vi sinh vật kiểm định, hàn kín để chống bay hơi và bảo quản trong bóng tối thì có thể sử dụng trong vòng 6 tháng. Độ đục chuẩn McFarland được sử dụng để điều chỉnh độ đục của huyền dịch nuôi cấy vi khuẩn cho thử nghiệm vi sinh vật kiểm định.

Độ đục chuẩn 0,5 Mcfarland hiện nay sẵn có trên thị trường của hãng BBL, hoặc có thể tự chuẩn bị bằng cách trộn:

- | | |
|--|---------|
| - Dung dịch BaCl ₂ 1%: | 0,5ml |
| - Dung dịch H ₂ SO ₄ 1%: | 99,5 ml |

Chia vào các tube thủy tinh và hàn kín để tránh bay hơi, các ống đục chuẩn này có thể giữ trong vòng 6 tháng trong bóng tối ở nhiệt độ phòng. Lắc đều trước khi sử dụng để làm tan các hạt BaSO₄ kết tủa trong tube. Kiểm tra độ chính xác của độ đục chuẩn 0,5 Mcfaland bằng máy đo độ đục bước sóng 625nm: OD = 0,08-0,1.

2.2.8. Phương pháp phân lập các hợp chất thứ cấp

Các hợp chất được phân lập bằng các phương pháp sắc ký kết hợp, bao gồm: sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký lớp mỏng điều chế (PTLC), sắc ký cột (CC), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

2.2.8.1. Sắc ký lớp mỏng (TLC)

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên các bản mỏng trắng sẵn: DC-Alufolien 60 F254 và RP18 F245S (Merck, mã số 1.05715). Sau

khi phát triển sắc ký, các vết chất được phát hiện bằng cách quan sát dưới đèn UV tại hai bước sóng phổ biến là 254 nm và 365 nm. Ngoài ra, để tăng độ nhạy phát hiện, có thể sử dụng thuốc thử H_2SO_4 10%: dung dịch này được phun đều lên bề mặt bản mỏng, sau đó sấy khô và gia nhiệt nhẹ cho đến khi các vết chất hiện màu rõ ràng.

2.2.8.2. Sắc ký cột (CC)

Phương pháp sắc ký cột được thực hiện với chất hấp phụ silica gel có kích thước hạt 0,040 – 0,063 mm (240 – 430 mesh) và pha đảo RP-18 (150 μm , Fuji Silysia Chemical Ltd.). Hỗn hợp chất được nạp lên cột, sau đó tiến hành rửa giải bằng các hệ dung môi để thu nhận các phân đoạn nhỏ để tiếp tục phân tích.

2.2.8.3. Phương pháp HPLC

Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là kỹ thuật được sử dụng để phân tách, nhận diện và định lượng từng thành phần trong một hỗn hợp hợp chất. Phương pháp này vận hành dựa trên hệ thống bơm áp suất cao để đưa dung môi – có chứa mẫu phân tích – đi qua một cột sắc ký. Cột thường được nhồi đầy vật liệu hấp phụ rắn, phổ biến nhất là pha tĩnh C18 với kích thước hạt nhỏ (khoảng 2–50 μm), giúp tăng hiệu quả phân giải trong quá trình tách. Cấu trúc cơ bản của hệ thống HPLC bao gồm: cổng lấy mẫu, bơm, cột sắc ký và đầu dò. Cổng lấy mẫu kết hợp với dòng pha động để đưa mẫu vào hệ thống, trong khi bơm đảm bảo tốc độ dòng ổn định cũng như thành phần dung môi chính xác. Đầu dò (thường là UV/Vis hoặc khối phổ MS) ghi nhận tín hiệu tỉ lệ với nồng độ các chất tách ra từ cột, cho phép xác định định lượng. Hệ thống còn tích hợp bộ vi xử lý và phần mềm chuyên dụng để điều khiển thiết bị và thu thập dữ liệu phân tích. Một số dung môi thường dùng trong HPLC là nước, methanol và acetonitrile,...

2.2.9. Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất

Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất được thực hiện thông qua sự kết hợp giữa các thông số vật lý và các phương pháp phổ hiện đại, bao gồm:

2.2.9.1. Phổ khối lượng phân giải cao

Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS được đo trên máy AGILENT 6530 Accurate Mass QTOF LC/MS của Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.9.2. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR

Phổ NMR được đo bằng máy Bruker AVANCE III HD 600 MHZ NMR (Bruker, Germany) của Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chất nội chuẩn là tetramethylsilane (TMS). Các kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân được sử dụng bao gồm:

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$

2.2.10. Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý thống kê số liệu bằng phân tích ANOVA với phần mềm Statgraphics plus 5.1, p values < 0.05.

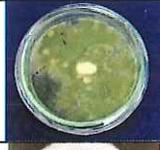
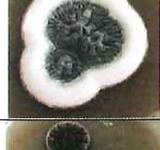
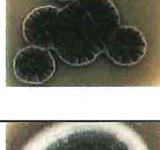
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÂN LẬP VÀ LÀM SẠCH CÁC CHỦNG VI NẤM

Mười bảy mẫu sinh vật bao gồm rong, hải miên, san hô mềm, động vật có bao, sên biển, ốc, cầu gai và trầm tích từ vùng biển Côn Cỏ đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Các mẫu nghiên cứu sau khi được xử lý và cấy chài trên 7 môi trường khác nhau, nuôi ở 28 °C và quan sát hàng ngày (Phụ lục hình 1). Sau khi xuất hiện các khuẩn lạc riêng rẽ, chúng được cấy chuyển sang các môi trường mới để nhận các chủng vi nấm sạch (Phụ lục hình 2).

Hai mươi sáu chủng vi nấm có hình thái và màu sắc khuẩn lạc khác nhau từ vùng biển Côn Cỏ được lựa chọn và được trình bày ở Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của 26 chủng vi nấm được phân lập từ thu thập ở vùng biển Côn Cỏ - tỉnh Quảng Trị

TT	Tên chủng	Phân lập từ mẫu	Đặc điểm hình thái	Hình ảnh khuẩn lạc
1	QT01	TT37 - Trầm tích	màu nâu nhạt hơi bột, mép mỏng	
2	QT02	TT37 - Trầm tích	màu xanh nhạt, bề mặt nhẵn, mép khuẩn lạc mỏng màu trắng	
3	QT03	R48 - Rong	màu rêu, bề mặt nhẵn, mép khuẩn lạc bông trắng	
4	QT04	R48 - Rong	màu rêu vàng, bề mặt nhẵn, ăn sâu vào môi trường, mép khuẩn lạc mỏng màu trắng	
5	QT05	R48 - Rong	màu rêu đậm, bề mặt nhẵn, mép khuẩn lạc hơi bông, mỏng màu trắng	
6	QT06	HN39 - Hải miên	bột màu rêu đậm, bề mặt nhẵn, mép khuẩn lạc mỏng màu trắng	
7	QT08	TT 38 - Trầm tích	hơi bông màu trắng, sau chuyển sang màu xanh đen, mép khuẩn lạc mỏng.	

TT	Tên chủng	Phân lập từ mẫu	Đặc điểm hình thái	Hình ảnh khuẩn lạc
8	QT09	SHM34 - San hô mềm	màu rêu đậm, bề mặt nhẵn, mép khuẩn lạc mỏng màu trắng	
9	QT10	TT38 - Trâm tích	màu rêu, bề mặt phủ lớp bông trắng, mép khuẩn lạc mỏng màu trắng	
10	QT11	ĐVB02 - Có bao	màu nâu nhạt, bề mặt nhẵn, ăn sâu vào môi trường, mép khuẩn lạc mỏng	
11	QT12	R50 - Rong	màu rêu nhạt, bề mặt phủ lớp bông trắng, mép khuẩn lạc mỏng màu trắng	
12	QT13	SHM36 San hô mềm	màu xanh rêu, bề mặt phủ lớp bông trắng, mép khuẩn lạc mỏng màu trắng	
13	QT14	SHM40 San hô mềm	màu rêu đậm, bề mặt phủ lớp bông trắng, mép khuẩn lạc màu trắng	
14	QT15	TT39 - Trâm tích	màu rêu nhạt, bề mặt nhẵn, mép khuẩn lạc mỏng màu trắng	
15	QT16	R46 - Rong	màu xám, bề mặt phủ lớp bông trắng	
16	QT17	TT40 - Trâm tích	màu rêu nhạt, bề mặt nhẵn, mép mỏng	
17	QT18	HM42 - Hải miên	màu đen, bề mặt nhẵn, mép mỏng ăn sâu vào môi trường	
18	QT20	TM42 - Sên biển	màu rêu, bề mặt nhẵn, mép mỏng màu trắng	
19	QT21	HM40 - Hải miên	bột màu xanh, bề mặt nhẵn, mép mỏng màu trắng	

TT	Tên chủng	Phân lập từ mẫu	Đặc điểm hình thái	Hình ảnh khuẩn lạc
20	QT22	DG10 Cầu Gai	hơi bông màu vàng nhạt, mép mỏng màu trắng	
21	QT24	R46 Rong	hơi bột màu rêu nhạt, bề mặt chia thùy, mép mỏng màu trắng xám	
22	QT26	TM42 - Sên biển	màu rêu xám, mép mỏng màu rêu nhạt	
23	QT29	R50 - Rong	màu nâu bề mặt hơi bông màu trắng, mép mỏng	
24	QT30	R50 - Rong	màu nâu hơi bông, mép mỏng, bề mặt tạo thành các vòng vân	
25	QT31	HM45 - Hải miên	màu nâu, đậm mép mỏng ăn sâu vào môi trường	
26	QT32	TT38 - Trầm tích	màu nâu hơi bột, giữa nhân, mép mỏng	

3.2. THỬ HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH

Các chủng vi nấm được nuôi cấy ở quy mô 500ml trong môi trường PDB lắc 120 vòng/phút, ở 28 °C trong 10 ngày.

Từ dịch ngoại bào của 26 chủng nghiên cứu, cặn chiết của chúng được xử lý từ cao chiết EtOAc có khối lượng khác nhau (từ khoảng 100 - 700mg với chủng QT16 có khối lượng cặn chiết nhỏ nhất: 139 mg, chủng QT06 có khối lượng cặn chiết cao nhất: 681 mg) và được trình bày trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Khối lượng cặn chiết từ dịch ngoại bào 26 chủng nghiên cứu từ nguồn sinh vật biển và trầm tích đã thu thập ở vùng biển Cồn Cỏ

Số TT	Tên mẫu	Khối lượng cặn chiết (mg)	Số TT	Tên mẫu	Khối lượng cặn chiết (mg)
1	QT01	326	14	QT15	375
2	QT02	285	15	QT16	139
3	QT03	189	16	QT17	244

Số TT	Tên mẫu	Khối lượng cặn chiết (mg)	Số TT	Tên mẫu	Khối lượng cặn chiết (mg)
4	QT04	251	17	QT18	199
5	QT05	502	18	QT20	201
6	QT06	681	19	QT21	353
7	QT08	343	20	QT22	353
8	QT09	279	21	QT24	197
9	QT10	167	22	QT26	293
10	QT11	157	23	QT29	331
11	QT12	197	24	QT30	365
12	QT13	239	25	QT31	245
13	QT14	109	26	QT32	431

Cặn chiết thô của 26 chủng nghiên cứu được pha trong DMSO và tính giá trị MIC. Kết quả giá trị MIC của các cặn chiết thô được trình bày trong Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Giá trị MIC cặn chiết thô của 26 chủng nghiên cứu

TT	Tên chủng	MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
		Gram +			Gram -			Nấm men
		<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>	<i>C.albicans</i>
1	QT1	128	-	256	-	-	-	256
2	QT2	256	128	64	-	-	-	-
3	QT3	256	-	258	-	-	-	-
4	QT4	128	256	256	-	-	-	-
5	QT5	128	-	256	-	-	-	128
6	QT6	256	-	-	-	-	-	-
7	QT8	32	64	16	128	-	64	16
8	QT9	128	-	-	-	-	-	-
9	QT10	128	-	256	-	-	-	-
10	QT11	-	-	-	-	-	-	-
11	QT12	128	-	-	-	-	-	64
12	QT13	256	-	-	-	-	-	128
13	QT14	256	-	-	-	-	-	128
14	QT15	256	-	256	-	-	-	-
15	QT16	128	-	-	-	-	-	128
16	QT17	256	-	-	-	-	-	256
17	QT18	256	-	-	-	-	-	128
18	QT20	-	64	-	-	-	-	256
19	QT21	32	-	128	-	-	128	16
20	QT22	128	-	-	-	-	-	-
21	QT24	-	-	-	-	-	-	32
22	QT26	32	-	256	-	-	-	32
23	QT29	64	128	256	-	-	-	256
24	QT30	128	256	128	-	-	-	128
25	QT31	64	128	256	-	-	-	128
26	QT32	128	-	128	-	-	-	128
Streptomycin		256	256	128	32	256	128	x
Cyclohexamide		x	x	x	x	x	x	32

(-): Không thể hiện hoạt tính ở nồng độ thử nghiệm, (x): Không thử

Kết quả trong Bảng 3.3, cho thấy 26 cặn chiết đều có khả năng kháng các vi sinh vật kiểm định. Trong đó, 22/26 cặn chiết có hoạt tính kháng ít nhất 2 chủng vi sinh vật kiểm định trở lên, với 5/22 cặn chiết (chủng QT8, QT21, QT29, QT30, QT31) kháng 4 chủng vi sinh vật kiểm định trở lên.

Đặc biệt, cặn chiết thô từ chủng QT8 có hoạt tính kháng 6/7 loại vi sinh vật kiểm định bao gồm: *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella enterica* ATCC13076, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579, Nấm men *Candida albicans* ATCC10231. Do đó, chủng QT8 được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. ĐỊNH DANH CHỦNG NGHIÊN CỨU QT8

3.3.1. Tách chiết DNA tổng số và khuếch đại đoạn gene 18S rRNA

DNA tổng số của chủng QT8 đã được tách chiết và được kiểm tra độ tinh sạch. Độ tinh sạch của DNA tổng số sau tách chiết của chủng QT8 là 1.83, với giá trị A_{260}/A_{280} trong khoảng 1,80 - 2,0 cho thấy mẫu DNA tách chiết được có độ tinh sạch đạt yêu cầu. DNA thu được được sử dụng làm khuôn cho các phản ứng PCR.

Từ DNA tổng số của chủng QT8, với cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự bảo thủ của gene 18S rRNA của vi nấm, theo lý thuyết sản phẩm PCR có độ dài xấp xỉ 1.200 bp. Kết quả điện di đồ sản phẩm PCR cho thấy sản phẩm PCR của chủng nghiên cứu QT8 chỉ xuất hiện một băng duy nhất có kích thước khoảng 1.200bp (Phụ lục hình 3).

Như vậy, đoạn gene 18S rRNA của chủng nghiên cứu đã được khuếch đại. Trên cơ sở đó, sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit S.N.A.P Miniprep trước khi tiến hành giải trình tự gene.

3.3.2. Giải trình tự gene 18S rRNA

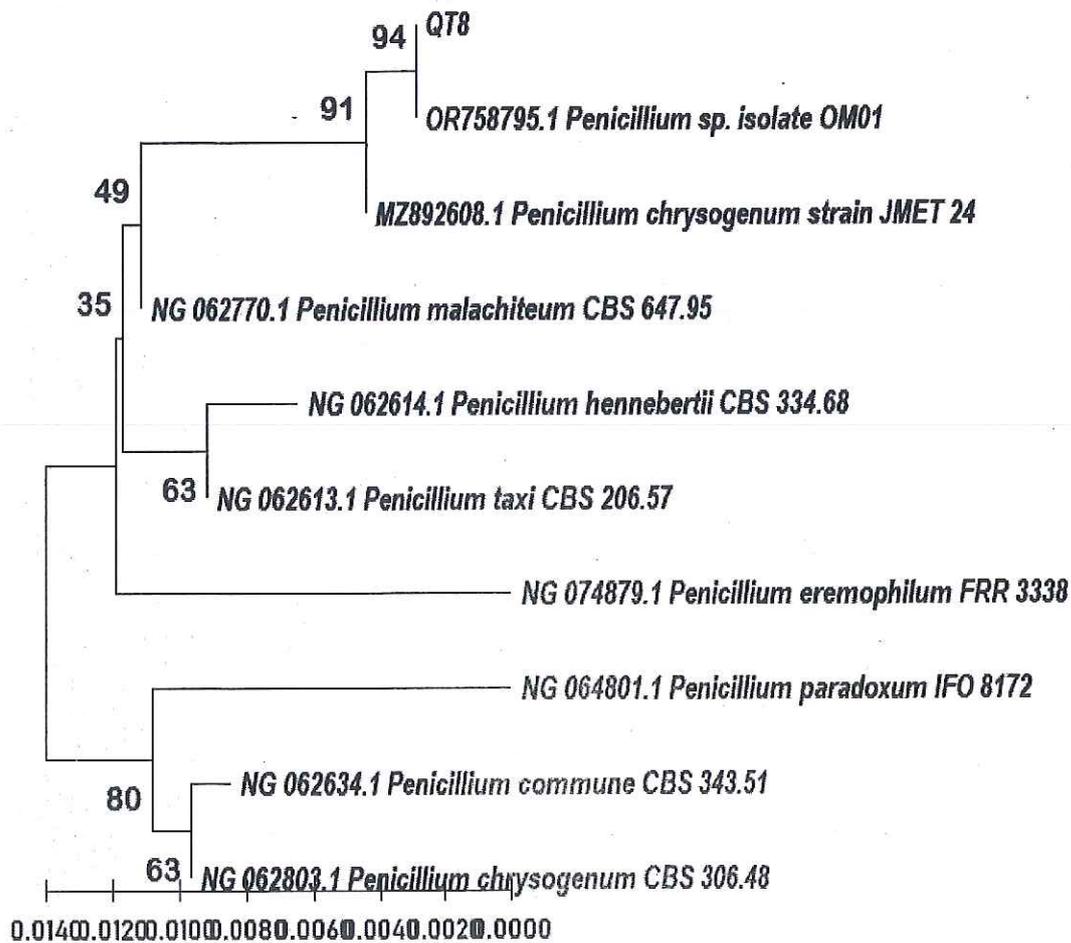
Trình tự nucleotide của đoạn gene 18S rRNA của chủng QT8 đã được xác định thông qua phương pháp giải trình tự Sanger. Sau đó, các dữ liệu thu được từ quá trình giải trình tự đã được xử lý và phân tích bằng phần mềm BioEdit phiên bản 7.2, từ đó thu nhận được trình tự hoàn chỉnh của đoạn gene mục tiêu (Phụ lục hình 4).

So sánh trình tự đoạn gene 18S rRNA của chủng QT8 với các trình tự gene 18S rRNA của các chủng vi nấm khác đã được đăng ký trong Genebank, kết quả cho thấy đoạn gene này có độ tương đồng cao (99%) so với trình tự gene của các chủng thuộc chi *Penicillium* và có độ tương đồng 99,30% so với chủng

chuẩn *Penicillium malachiteum* CBS 647.95 (NG_062770.1), tương đồng 98,44% với *Penicillium commune* CBS 343.51 (NG_062634.1).

3.3.3. Xây dựng cây phát sinh chủng loại

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining, với giá trị bootstrap thu được từ 1.000 phép lặp nhằm đánh giá độ tin cậy tại các điểm phân nhánh. Cây biểu thị mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gene 18S rRNA của chủng QT8, so sánh với các loài đại diện thuộc chi *Penicillium* (Hình 3.1).



Hình 3.1. Cây phát sinh chủng loại của chủng nghiên cứu QT8

Từ các kết quả nghiên cứu định danh khoa học bằng marker sinh học phân tử được trình bày ở trên cho thấy: Chủng QT8 thuộc chi *Penicillium* và đã được đăng kí dữ liệu trình tự gene 18S rRNA lên genebank với mã số PV093550 (*Penicillium* sp. QT8).

Chủng vi nấm QT8 có đặc điểm hình thái: khuẩn lạc khô, có các sợi nấm bông, xốp, màu trắng, sau 2 tuần khuẩn lạc già chuyển sang màu đen xám, mép khuẩn lạc mỏng.



Hình 3.2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của chủng QT8

Dựa trên dữ liệu từ Web of Science, PubMed, Elsevier, Hiệp hội Hóa học Hoa Kỳ (ACS) và Google Scholar, 56 hợp chất tự nhiên mới có hoạt tính kháng khuẩn được phân lập từ vi nấm biển, được công bố vào năm 2024. Trong số này, 33,3% có nguồn gốc từ *Penicillium* cho thấy tiềm năng to lớn của các chất chuyển hóa thứ cấp từ *Penicillium* trong việc tìm kiếm kháng sinh mới [51].

Penicillium chermesinum 2104NT-1.3 được phân lập từ tảo nâu *Hormorphysa cuneiformis* ở Nha Trang của Ngoc *et al.*. Một dẫn xuất ergosterol đã biết, $3\beta,15\beta$ -dihydroxy-(22E, 24R)-ergosta-5,8(14), 22-trien-7-one (diHET), và các dẫn xuất axit béo, este glycerol của axit (E,E) 9,12-octadienoic, axit hexadeca-5-enoic và este glycerol, đã được phân lập. Trong đó, diHET gây ra sự tăng sinh của tế bào cơ tim H9c2 bằng cách đẩy nhanh quá trình chuyển đổi từ pha G1 sang pha S của chu kỳ tế bào. Hơn nữa, dẫn xuất triterpene này bảo vệ tế bào cơ tim H9c2 khỏi độc tính do coban clorua (II) gây ra, ngăn chặn chu kỳ tế bào và apoptosis. Sử dụng 4-hydroxytamoxifen làm chất đối kháng thụ thể estrogen (ER) và các thí nghiệm in silico, người ta đã chứng minh rằng tác dụng của diHET có thể phụ thuộc vào ER do quá trình chuyển hóa của nó trong các dẫn xuất hoạt động hơn [52].

Các chủng vi nấm thuộc chi *Penicillium* nằm trong số những loại nấm được nghiên cứu nhiều nhất và được coi là nguồn hợp chất thiên nhiên để nghiên

cứu và sản xuất thuốc. Các loại thuốc có nguồn gốc từ nấm nổi bật bao gồm kháng sinh penicillin từ *Penicillium chrysogenum* và thuốc chống nấm griseofulvin từ *Penicillium griseofulvum*. Ngày nay, chi *Penicillium* vẫn là nguồn chất chuyển hóa thứ cấp với nhiều hoạt tính sinh học đa dạng, như đã được báo cáo trong nhiều bài đánh giá gần đây [53].

Một số báo cáo đánh giá về các sản phẩm tự nhiên được phân lập từ các loài *Penicillium* có nguồn gốc từ biển đã được công bố. Tổng cộng 390 chất chuyển hóa thứ cấp mới từ nấm *Penicillium* có nguồn gốc từ biển đã được nêu bật từ năm 1991- 2014 [53] và 188 chất chuyển hóa thứ cấp mới đã được tóm tắt từ năm 2015 - 2020 [54]. Hơn 200 hợp chất độc tế bào hoặc chống khối u được phân lập từ nấm *Penicillium* biển đã được đưa vào từ năm 1991 đến năm 2017 [55,56]

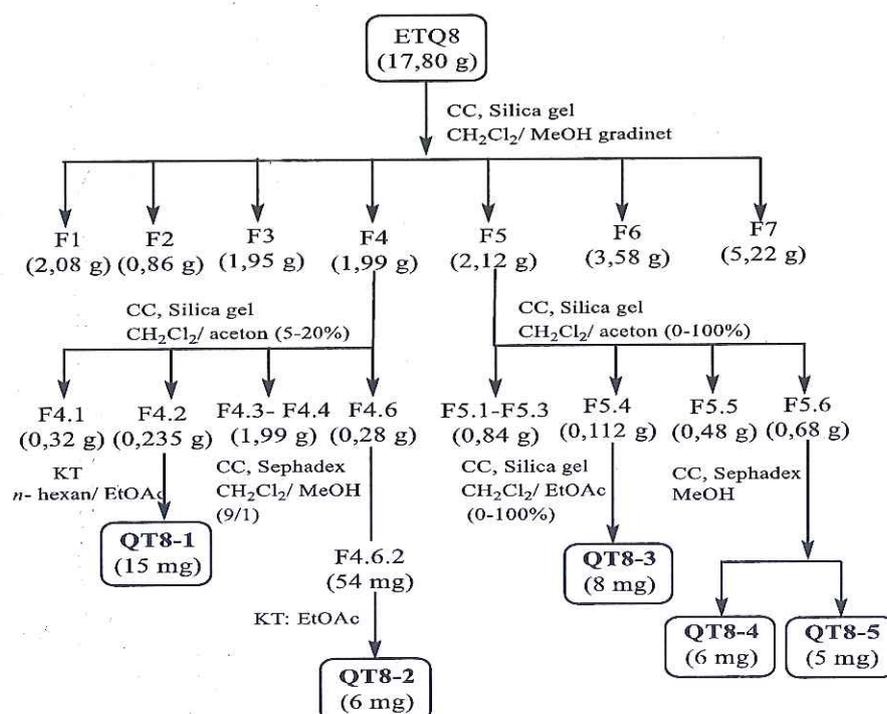
Các sản phẩm tự nhiên mới từ *Penicillium* có cấu trúc hóa học đa dạng bao gồm polyketide, alkaloid, terpenoid, steroid, peptide và các loại khác. Hình 2 cho thấy tỷ lệ các hợp chất hoạt tính sinh học mới trong mỗi lớp hóa chất. Tổng cộng có 194, 107 và 107 hợp chất mới thuộc về polyketide, alkaloid và terpenoid, chiếm hơn 90% trên tổng số [55].

Theo báo cáo năm 2024, trong giai đoạn 2021–2023, đã có 452 hợp chất chuyển hóa thứ cấp mới được phân lập từ *Penicillium* có nguồn gốc biển [55]. Con số này cho thấy sự gia tăng đáng kể so với 578 hợp chất mới được báo cáo trong suốt ba thập kỷ từ năm 1991 đến 2020 [53, 54]. Điều này có thể khẳng định được sự phát triển trong việc nuôi cấy vi nấm quy mô lớn trong điều kiện phòng thí nghiệm, cùng với những tiến bộ trong phương pháp nuôi cấy, kỹ thuật chiết xuất và phân tách hợp chất, công nghệ xác định cấu trúc, cũng như các chiến lược sàng lọc sinh học, qua đó nâng cao hiệu quả phát hiện và khai thác hợp chất mới.

Dựa trên kết quả phân tích trình tự gene 18S rRNA, chủng vi nấm QT8 được xác định thuộc chi *Penicillium* với tên gọi *Penicillium* sp. QT8. Chủng QT8 được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu do có khả năng kháng vi sinh vật kiểm định cao nhất trong số 26 chủng đã được phân lập. Những kết quả này là cơ sở để tiến hành phân lập và đánh giá các hợp chất chuyển hóa thứ cấp từ chủng này.

3.4. PHÂN LẬP CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP TỪ CHŨNG VI NẤM *Penicillium* sp. QT8

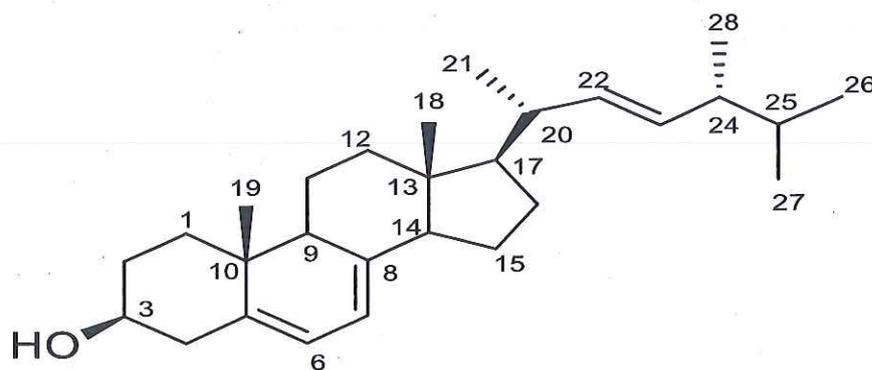
Cặn chiết EtOAc (EQ8 17,80 g) được phân tách trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ gradient (0- 100% MeOH, v/v) thu được 7 phân đoạn kí hiệu F1-F7. Phân đoạn F4 (1,99 g) được phân tách tiếp trên cột silica gel với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}$ (5-20% acetone, v/v) thu được 6 phân đoạn nhỏ ký hiệu F4.1-F4.6, phân đoạn F4.2 (235 mg) được kết tinh trong dung môi *n*-hexan/ EtOAc thu được hợp chất **QT8-1** (15 mg). Phân đoạn F4.6 (0,28 g) được tinh chế trên cột Sephadex LH-20 rửa giải với hệ $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (9/1, v/v) thu được 5 phân đoạn nhỏ kí hiệu F4.6.1-F4.6.5. Phân đoạn F4.6.2 (54 mg) được kết tinh trong dung môi EtOAc thu được 6 mg hợp chất **QT8-2**. Phân đoạn F5 (2,12 g) được phân tách trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetone}$ gradient (0-100%, v/v) thu được 6 phân đoạn. Phân đoạn F5.4 (112 mg) được tinh chế tiếp trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ gradient (0-100%, v/v) thu được hợp chất **QT8-3** (8,0 mg). Hợp chất **QT8-4** (6 mg) và **QT8-5** (5 mg) thu được khi tinh chế phân đoạn F5.6 (0,68 g) trên cột Sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là MeOH. Sơ đồ phân lập chất được chỉ ra ở Hình 3.2.



Hình 3.3. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cặn EtOAc của chủng QT8

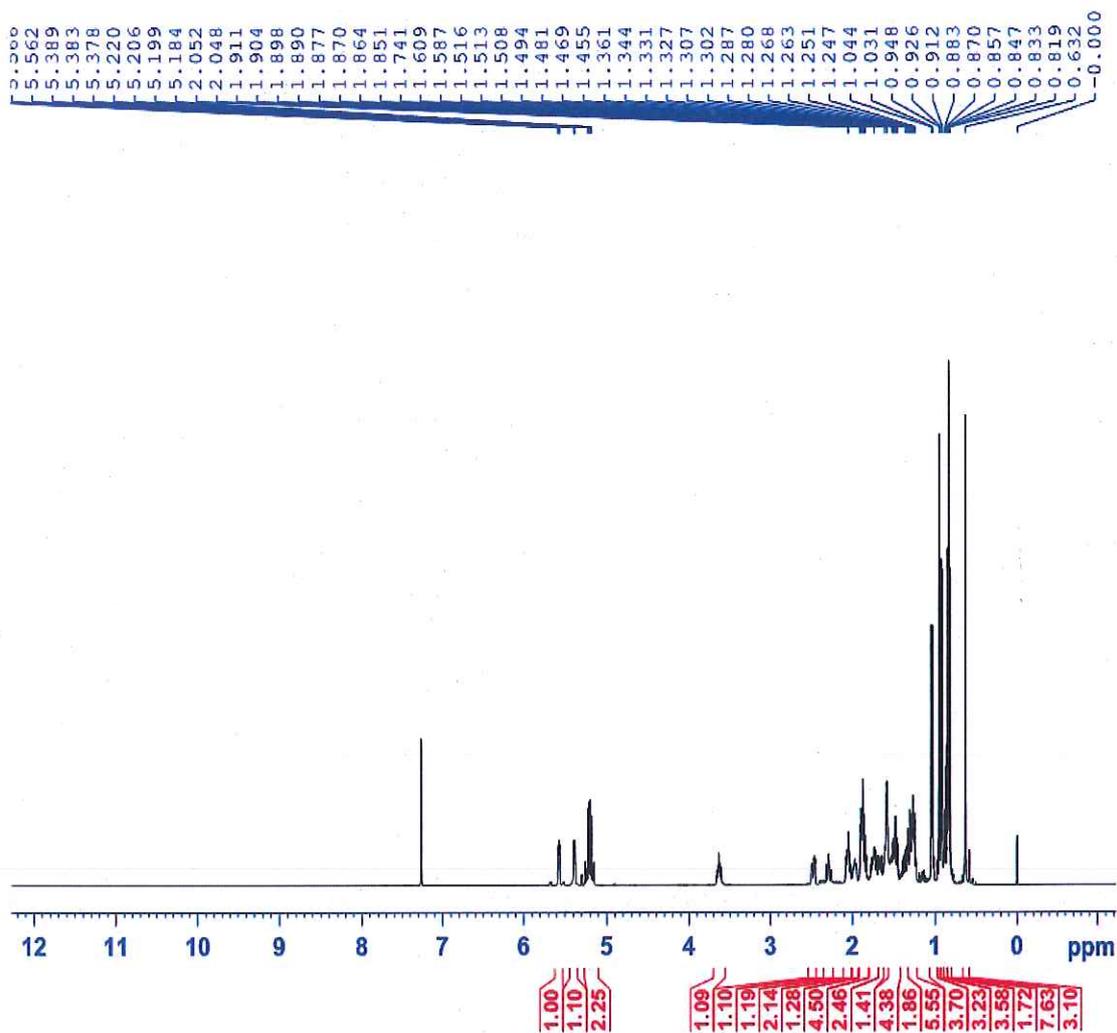
3.4.1. Hợp chất QT8-1 (ergosterol)

Đặc điểm hóa lý: Chất rắn không màu, đnc 163-164°C, $[\alpha]_D^{25} = -102^\circ$ (c 0.05, CHCl_3), $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{H} : 0,63 (3H, s, CH_3 -18); 0,82 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, CH_3 -26); 0,84 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, CH_3 -27), 0,91 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, CH_3 -28); 0,95 (3H, s, CH_3 -19); 1,03 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -21); 3,63 (1H, m, H-3); 5,18 (1H, dd, $J = 7,0; 15,5$ Hz, H-22); 5,23 (1H, dd, $J = 7,0; 15,0$ Hz, H-23); 5,38 (1H, m, H-7); 5,57 (1H, dd, $J = 2,5; 6,0$ Hz, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{C} (ppm): 12,1 (C-18), 16,3 (C-19); 17,6 (C-28); 19,6 (C-26); 19,9 (C-27), 21,1 (C-21), 21,13 (C-11), 23,0 (C-15); 28,3 (C-16); 32,0 (C-2); 33,1 (C-25); 37,0 (C-10); 38,4 (C-1); 39,1 (C-12), 40,4 (C-20); 40,8 (C-4); 42,8 (C-13); 42,9 (C-24); 46,3 (C-9); 54,6 (C-14); 55,8 (C-17); 70,5 (C-3); 116,3 (C-7); 119,6 (C-6); 132,0 (C-23); 135,6 (C-22); 139,8 (C, C-5); 141,3 (C, C-8).



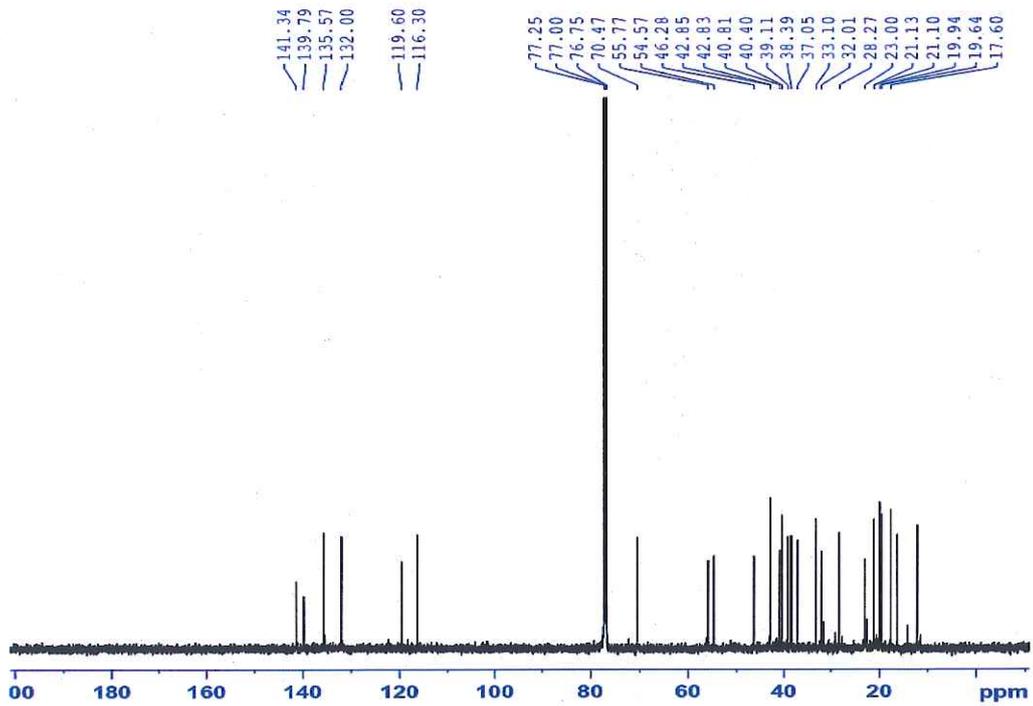
Hình 3.4. Cấu trúc hóa học hợp chất QT8-1

Hợp chất QT8-1 được phân lập dưới dạng chất rắn không màu, đnc 163-164 °C, độ quay cực $[\alpha]_D^{25} = -102^\circ$ (c 0.05, CHCl_3). Các dữ liệu trên phổ NMR của hợp chất QT8-1 (Hình 3.5) cho các tín hiệu đặc trưng của hợp chất steroid với sự có mặt của 6 nhóm methyl có độ chuyển dịch hóa học ở δ_{H} 0,63 (3H, s, CH_3 -18); 0,82 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, CH_3 -26); 0,84 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, CH_3 -27); 0,91 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, CH_3 -28); 0,95 (3H, s, CH_3 -19); 1,03 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -21); 1 nhóm oxymethine ở δ_{H} 3,63 (1H, m, H-3), và 4 proton olefin ở δ_{H} 5,18 (1H, dd, $J = 7,0; 15,0$ Hz, H-22); 5,23 (1H, dd, $J = 7,0; 15,0$ Hz, H-23); 5,38 (1H, m, H-7); 5,57 (1H, dd, $J = 2,5; 6,0$ Hz, H-6). Hằng số tương tác lớn ($J = 15,0$ Hz) giữa H-22 và H-23 chứng tỏ 2 proton này có cấu hình *trans*.



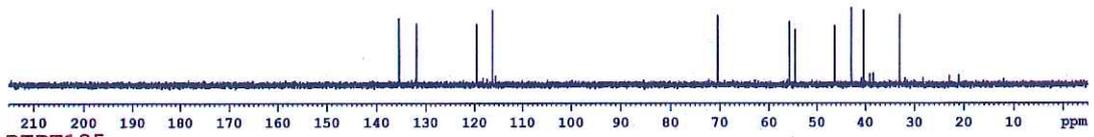
Hình 3.5. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất QT8-1 (CDCl_3 , 500 MHz)

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT của hợp chất **QT8-1** (Hình 3.6 và 3.7) xuất hiện các tín hiệu của 28 carbon bao gồm 6 nhóm methyl có δ_{C} 12,1 (C-18); 16,3 (C-19); 17,6 (C-28); 19,6 (C-26); 19,9 (C-27); 21,1 (C-21); 7 nhóm methylene có δ_{C} 21,1 (C-11); 23,0 (C-15); 28,3 (C-16); 32,0 (C-2); 38,4 (C-1); 39,1 (C-12); 40,8 (C-4), 11 nhóm methine trong đó có một nhóm oxymethine δ_{C} 70,5 (C-3); 6 nhóm methine lai hóa sp^3 có [δ_{C} 33,1 (C-25); 40,4 (C-20), 46,3 (C-9); 42,9 (C-24); 54,6 (C-14); 55,8 (C-17), 4 nhóm methine lai hóa sp^2 δ_{C} 116,3 (C-7); 119,6 (C-6); 132,0 (C-23); 135,6 (C-22), 4 carbon không liên kết trực tiếp với hidro có δ_{C} 139,8 (C-5); 141,3 (C-8), 37,0 (C-10); 42,8 (C-13). Từ các dữ liệu phổ 1D-NMR và so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất **QT8-1** được xác định là ergosterol [57].

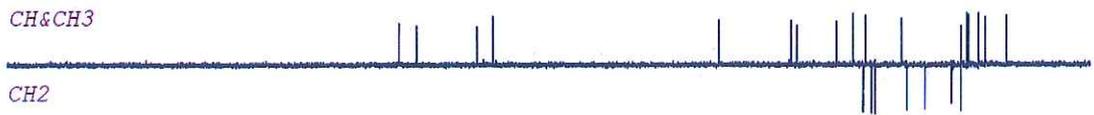


Hình 3.6. Phổ ^{13}C -NMR của chất QT8-1 (CDCl_3 , 125 MHz)

DEPT90

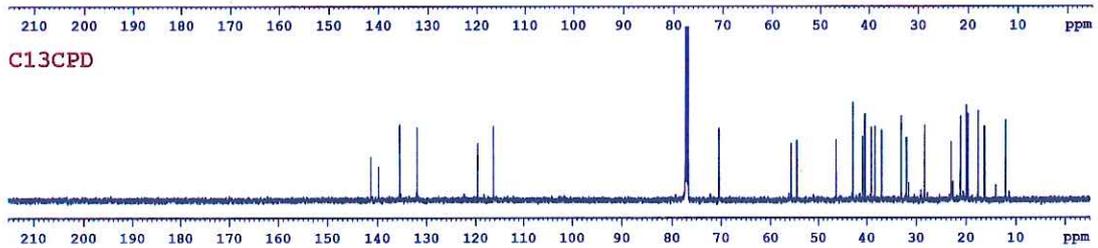


DEPT135



CH&CH3

CH2

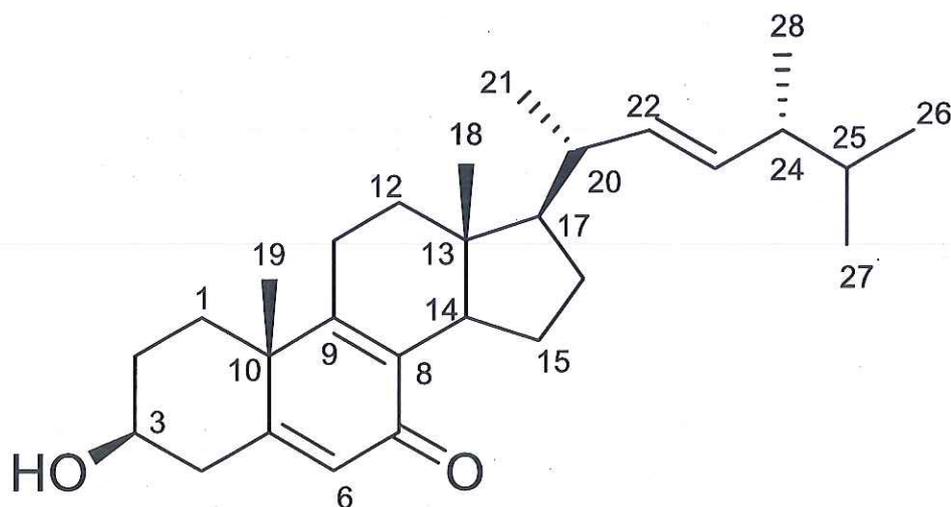


C13CPD

Hình 3.7. Phổ DEPT của chất QT8-1

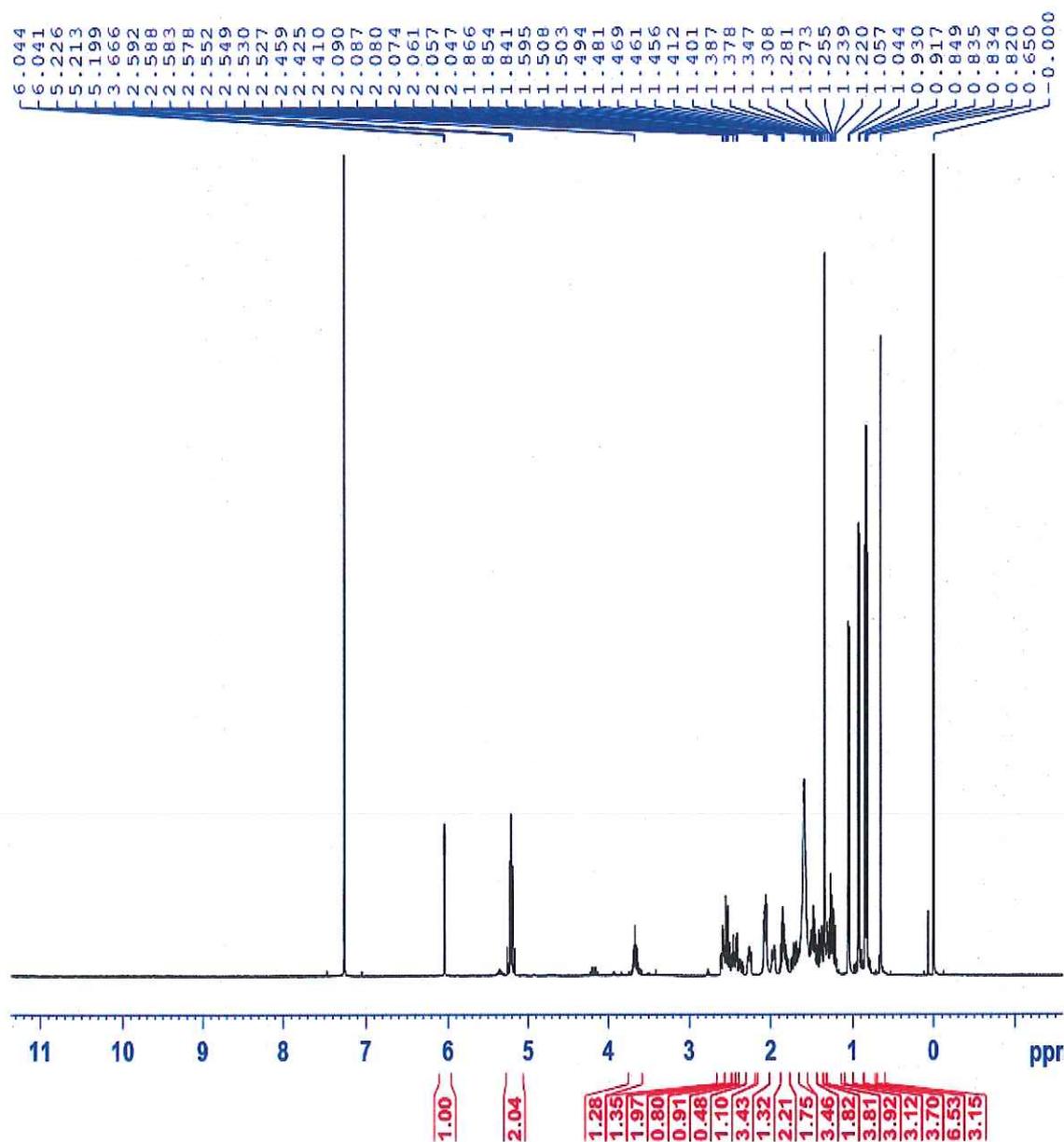
3.4.2. Hợp chất QT8-2 ((22E)-ergosta-5,8,22-trien-7-one-3 β -ol)

Đặc điểm hóa lý: Chất bột vô định hình màu trắng, $[\alpha]_D^{25} = -19,2^\circ$ (c 0,05, CHCl_3), $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} (ppm) 0,65 (3H, s, CH_3 -18); 0,82 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-26); 0,84 (3H, $J = 6,5$ Hz, H-27); 0,92 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-28); 1,04 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -21); 1,35 (3H, s, H-19); 3,67 (1H, m, H-3); 5,20 (1H, dd, $J = 7,0$; 15,0 Hz, H-22); 5,23 (1H, dd, $J = 6,5$; 15,0 Hz, H-23), 6,04 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ_{C} (ppm) 12,0 (C-18); 17,7 (C-19); 19,7 (C-28); 20,0 (C-26); 21,1 (C-27); 23,7 (C-21); 24,6 (C-11); 24,8 (C-15); 29,5 (C-16); 30,7 (C-2); 33,1 (C-25); 34,7 (C-1); 35,6 (C-12), 40,3 (C-20); 41,9 (C-4); 41,9 (C-13); 42,8 (C-10); 42,9 (C-24); 48,5 (C-14); 53,4 (C-17), 71,9 (C-3); 126,8 (C-6); 132,2 (C-23); 134,1 (C-8); 135,5 (C-22); 161,1 (C-9); 161,7 (C-5); 186,3 (C-7).



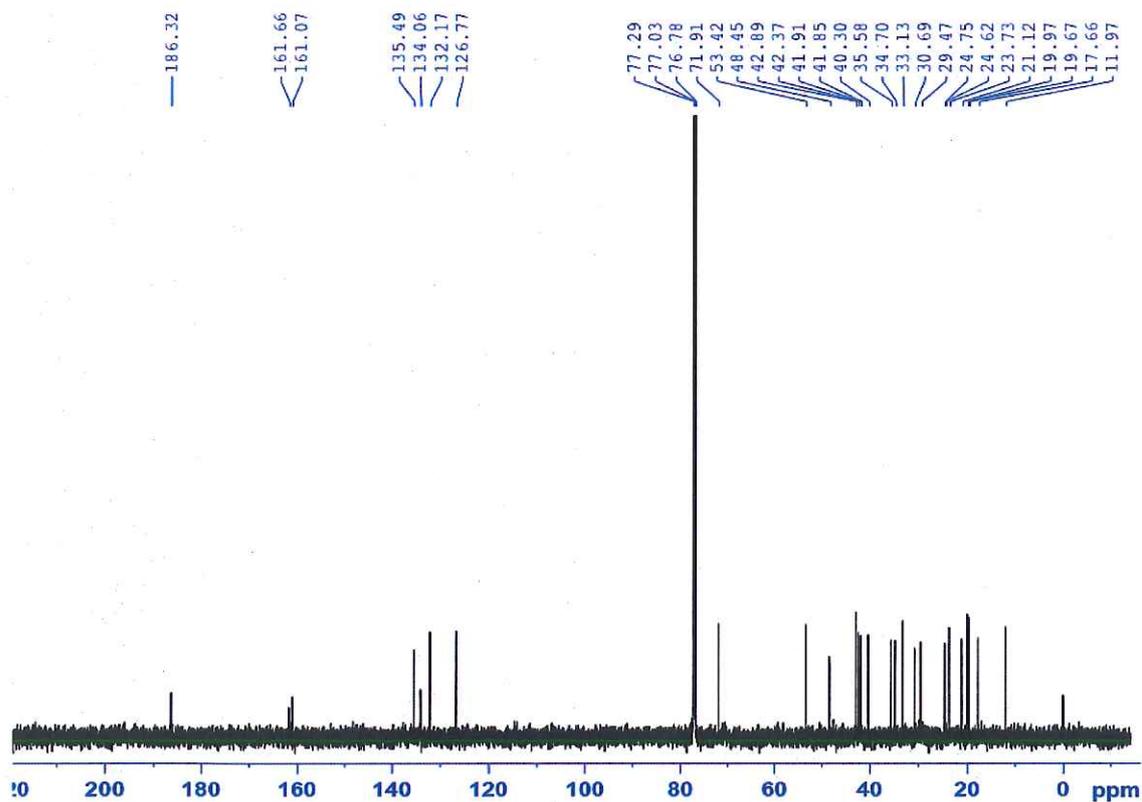
Hình 3.8. Cấu trúc hóa học hợp chất QT8-2

Chất QT8-2 được phân lập dưới dạng chất bột vô định hình màu trắng, $[\alpha]_D^{25} = -19,2^\circ$ (c 0,05, CHCl_3). Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất QT8-2 (Hình 3.9) xuất hiện tín hiệu gần tương tự với phổ của chất QT8-1, trong đó có tín hiệu singlet và doublet của 6 nhóm methyl ở δ_{H} 0,65 (3H, s, CH_3 -18); 0,82 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-26); 0,84 (3H, $J = 6,5$ Hz, H-27); 0,92 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-28); 1,04 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -21); 1,35 (3H, s, H-19), 3 nhóm methine sp^2 ở δ_{H} 6,04 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-6), 5,20 (1H, dd, $J = 7,0$; 15,0 Hz, H-22); 5,23 (1H, dd, $J = 6,5$; 15,0 Hz, H-23), 1 nhóm oxy methine ở δ_{H} 3,67 (1H, m, H-3).



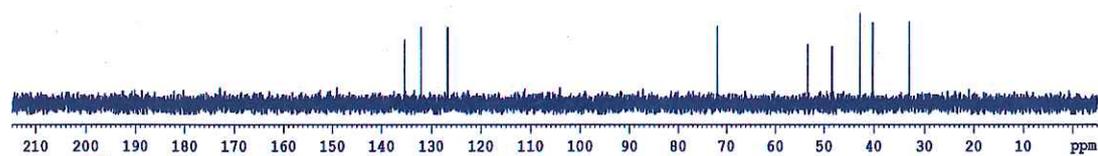
Hình 3.9. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất QT8-2 (CDCl_3 , 500 MHz)

Phân tích phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT (Hình 3.10 và 3.11) xác định chất QT8-2 có 28 nguyên tử carbon gồm có 6 nhóm methyl, 9 nhóm methine trong đó có 3 nhóm methine lai hóa sp^2 , 1 nhóm oxy methine, 5 nhóm methine lai hóa sp^3 , 7 nhóm methylene, 1 nhóm carbonyl ở δ_{C} 186,3 (C-7) và 5 carbon không liên kết trực tiếp với hidro. Từ phổ 1D-NMR và tham khảo tài liệu để xác định chất QT8-2 là (22E)-ergosta-5,8,22-trien-7-one-3 β -ol, chất có hoạt tính đối với dòng tế bào ung thư HCT-116 với IC_{50} là 40 μM [58].

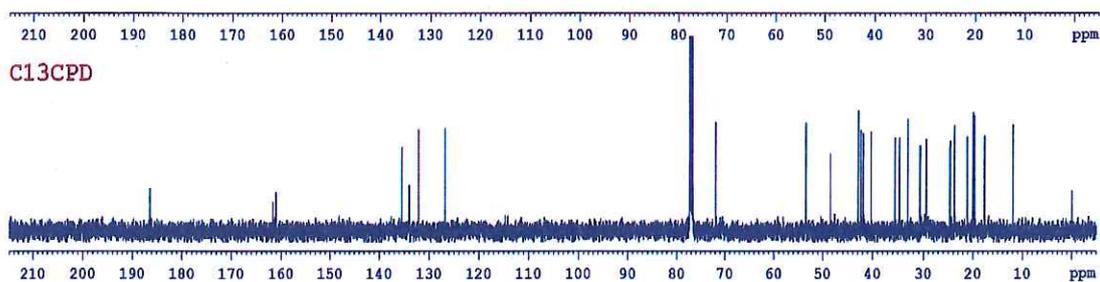


Hình 3.10. Phổ ^{13}C -NMR của chất QT8-2 (CDCl_3 , 125 MHz)

DEPT90



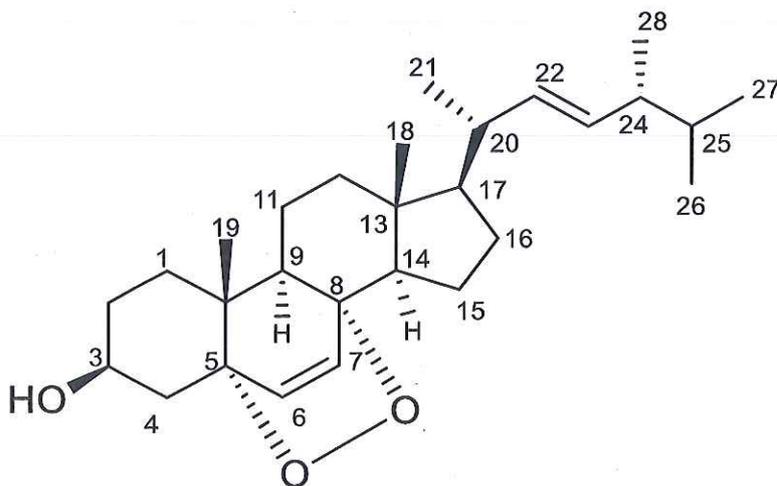
DEPT135



Hình 3.11. Phổ DEPT của chất QT8-2

3.4.3. Hợp chất QT8-3 (ergosterol peroxide)

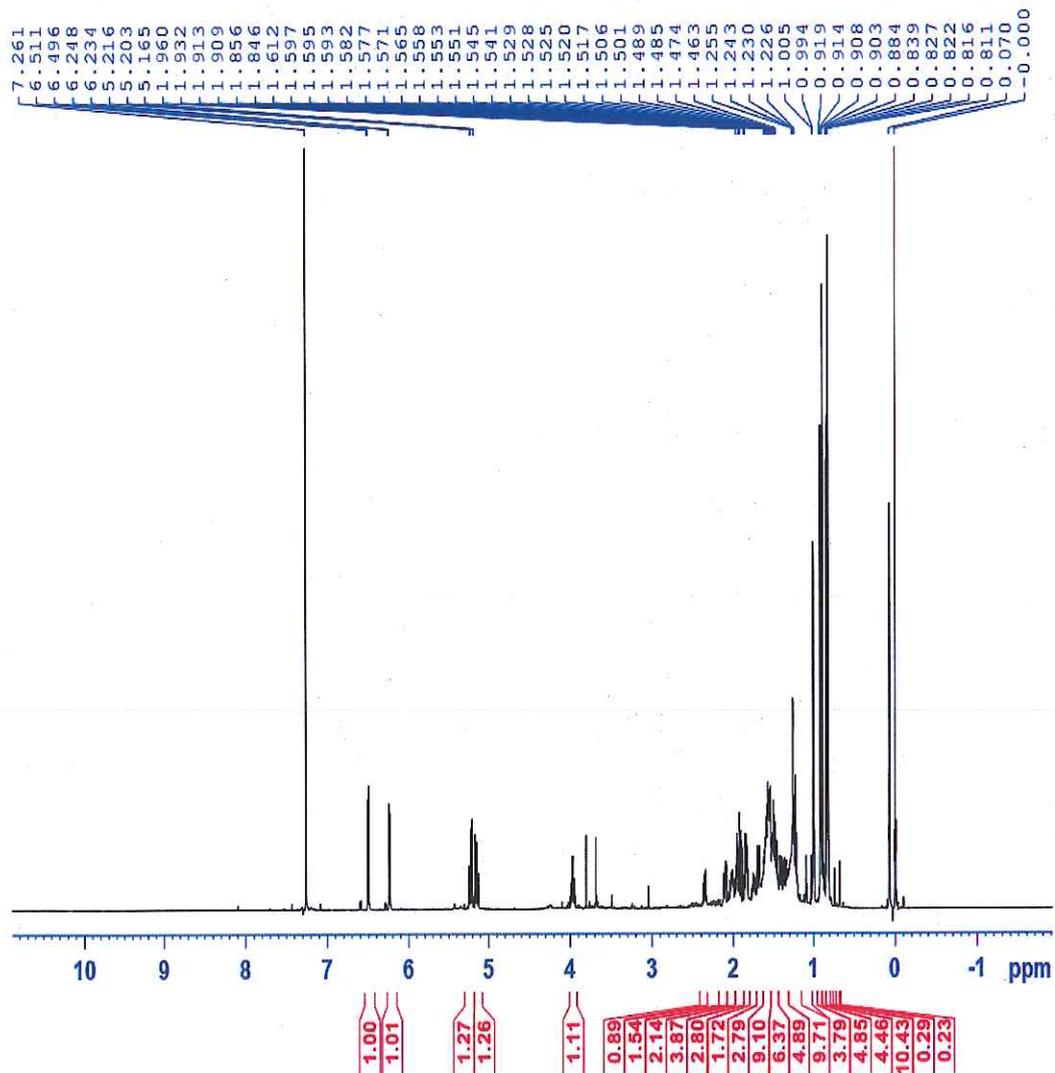
Đặc điểm hóa lý: Chất rắn vô định hình màu trắng, mp. 183-184°C, $[\alpha]_D^{25} = -42,6^\circ$ (c 0,05, CHCl_3), ESI-MS: m/z 429 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ_{H} (ppm) 0,81 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-27); 0,82 (3H, s, H-18); 0,83 (3H, d, $J = 7,2$ Hz, H-26); 0,88 (3H, s, H-19); 0,91 (3H, d, $J = 7,2$ Hz, H-28); 1,00 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-21); 3,97 (1H, m, H-3); 5,14 (1H, dd, $J = 7,8; 15,0$ Hz, H-22); 5,22 (1H, dd, $J = 7,8; 15,0$ Hz, H-23); 6,24 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7); 6,50 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ_{C} 12,9 (C-18); 17,6 (C-28); 18,3 (C-19); 19,6 (C-26); 19,9 (C-27); 20,6 (C-15); 20,9 (C-21); 23,4 (C-11); 28,6 (C-16); 30,1 (C-2); 33,1 (C-25); 34,7 (C-1); 36,9 (C-4); 36,9 (C-10); 39,4 (C-12); 39,7 (C-20); 42,8 (C-24); 44,6 (C-13); 51,1 (C-9); 51,7 (C-14); 56,2 (C-17); 66,5 (C-3); 79,4 (C-8); 82,2 (C-5); 130,8 (C-7); 132,3 (C-23); 135,2 (C-22); 135,4 (C-6).



Hình 3.12. Cấu trúc hóa học hợp chất QT8-3

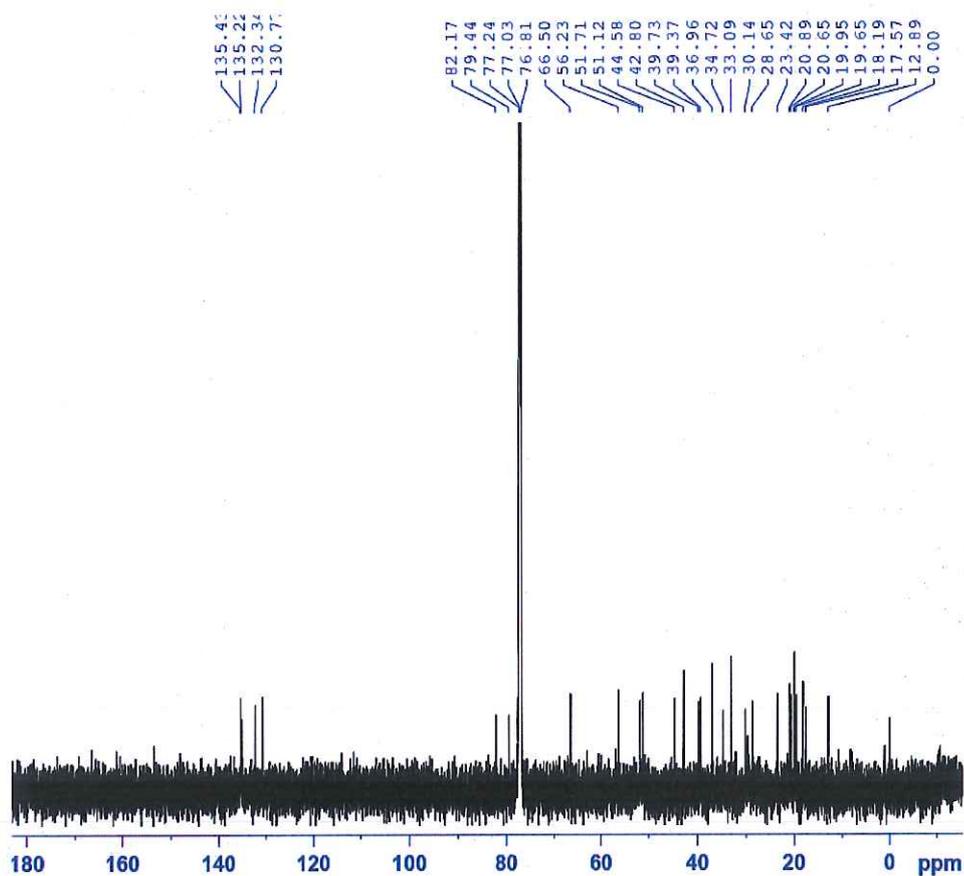
Hợp chất QT8-3 thu được dưới dạng chất rắn vô định hình màu trắng, mp. 183-184°C, phổ khối ESI-MS cho peak ion giả phân tử có m/z 429 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ (Hình 3.13) có các tín hiệu đặc trưng của khung steroid ergosta gồm sáu tín hiệu nhóm methyl ở δ_{H} 0,81 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-27); 0,82 (3H, s, H-18); 0,83 (3H, d, $J = 7,2$ Hz, H-26); 0,88 (3H, s, H-19); 0,91 (3H, d, $J = 7,2$ Hz, H-28); 1,00 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-21); một nhóm oxymethine ở δ_{H} 3,97 (1H, m, H-3) và bốn proton olefin ở δ_{H} 5,14 (1H, dd, $J = 7,8; 15,0$ Hz, H-

22); 5,22 (1H, dd, $J = 7,8; 15,0$ Hz, H-23); 6,24 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7); 6,50 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6).



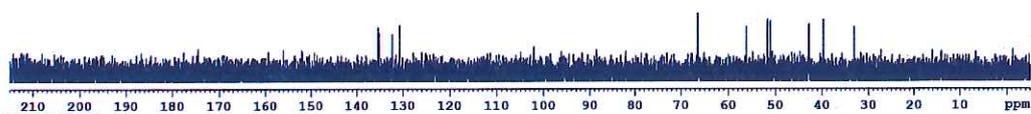
Hình 3.13. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất QT8-3 (CDCl_3 , 500 MHz)

Phân tích phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT (Hình 3.14 và 3.15) của chất **QT8-3** thấy tín hiệu của 28 carbon, trong đó có 6 nhóm methyl ở δ_{C} 12,9 (C-18); 17,6 (C-28); 18,3 (C-19); 19,6 (C-26); 19,9 (C-27); 20,9 (C-21); 7 nhóm methylene, 11 nhóm methine trong đó có 4 nhóm methine sp^2 ở δ_{C} 130,8 (C-7); 132,3 (C-23); 135,2 (C-22); 135,4 (C-6) và một nhóm oxymethine sp^3 ở δ_{C} 66,5 (C-3), bốn nguyên tử carbon không liên kết trực tiếp với hydro ở δ_{C} 79,4 (C-8); 82,2 (C-5); 44,6 (C-13); 36,9 (C-10). Độ chuyển dịch hóa học của C-5 và C-8 gợi ý hai nguyên tử carbon liên kết với dị tố oxy.



Hình 3.14. Phổ ^{13}C -NMR của QT8-3 (CDCl_3 , 150 MHz)

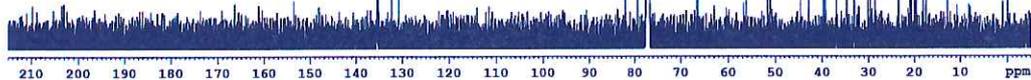
DEPT90



DEPT135



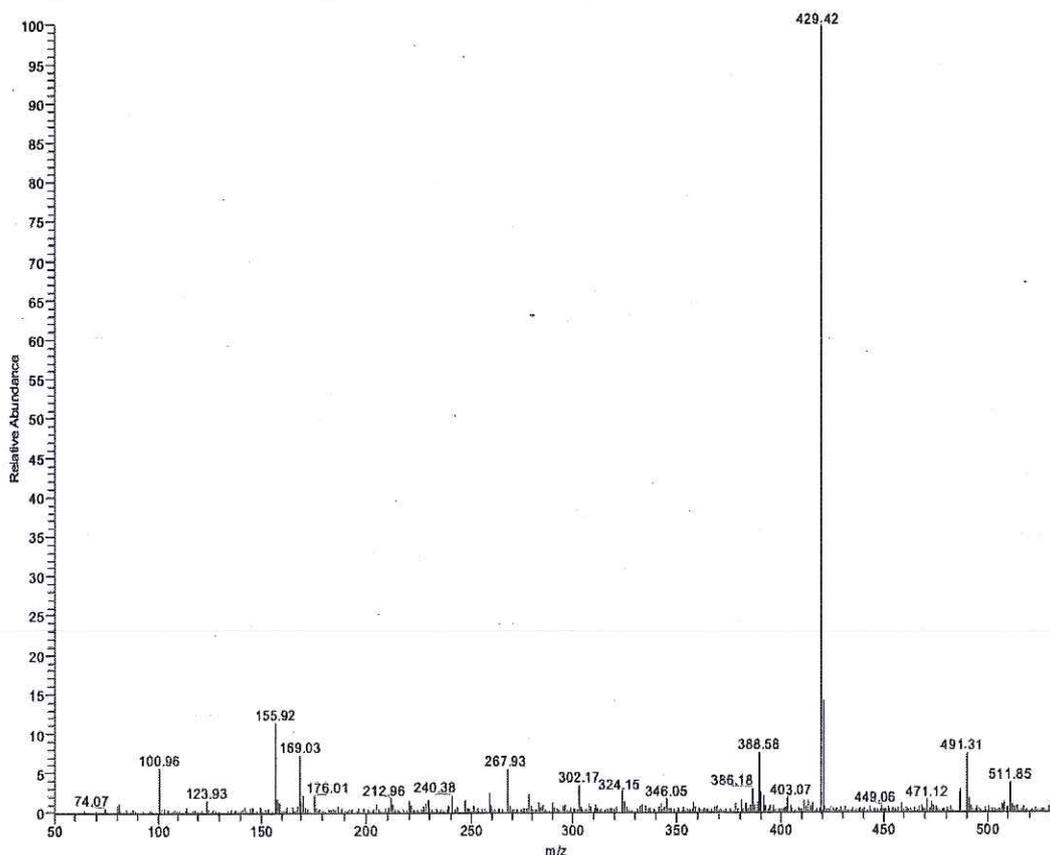
CH&CH3



C13CPD

Hình 3.15. Phổ DEPT của chất QT8-3

Từ dữ liệu phổ MS (Hình 3.16), 1D-NMR và so sánh với dữ liệu NMR trong tài liệu tham khảo, hợp chất QT8-3 được xác định là ergosterol peroxide [50]. Chất được công bố có hoạt tính gây độc tế bào đối với các dòng tế bào ung thư A549, SK-OV3, SK-MEL-2, XF498 và HCT15 với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 9,76 đến 15,81 μM [59].

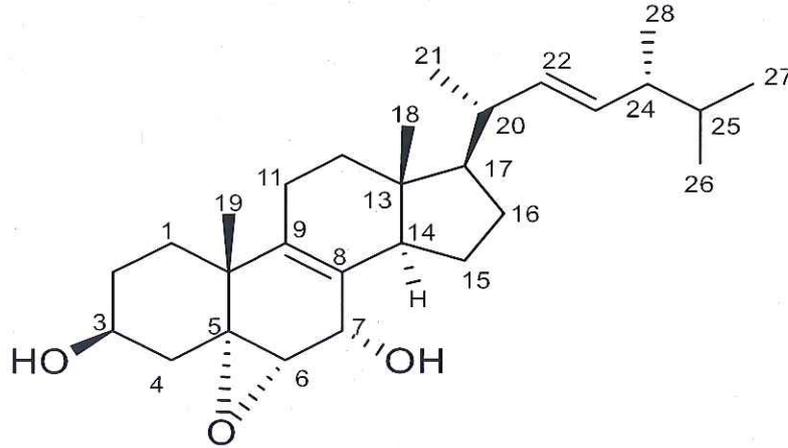


Hình 3.16. Phổ MS của chất QT8-3

3.4.4. Hợp chất QT8-4 (5 α ,6 α -Epoxy-(22E, 24R)-ergosta-8,22-diene-3 β ,7 α -diol)

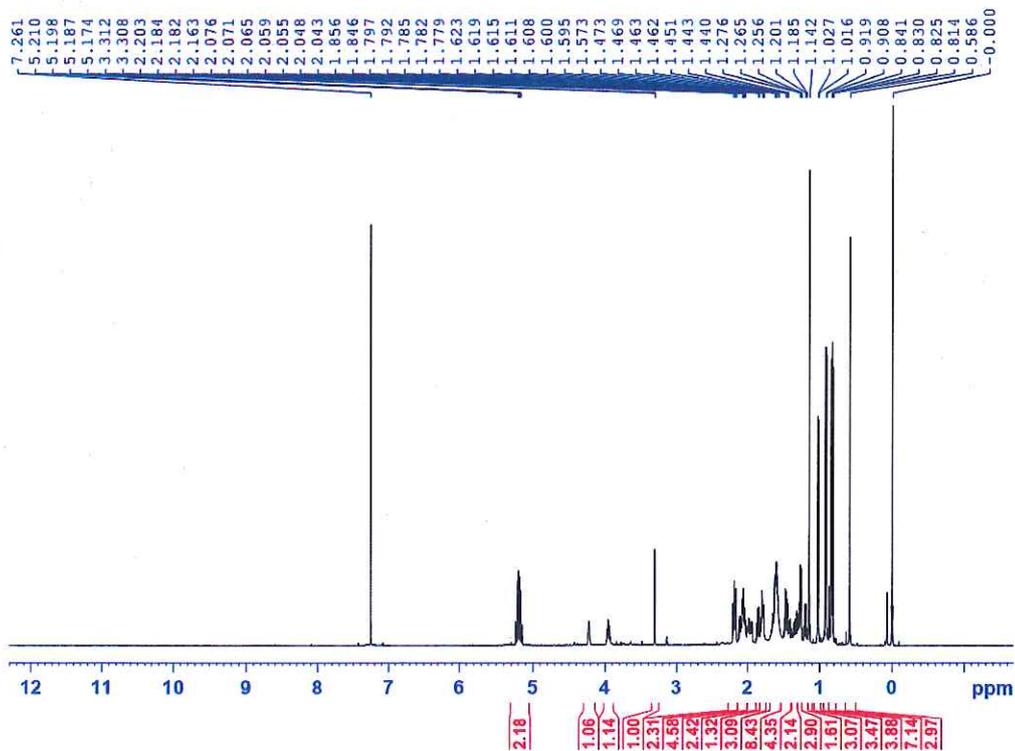
Đặc điểm hóa lý: Chất rắn màu trắng; đnc 169-170°C, $[\alpha]_D^{25} = -35,2^\circ$ (c 0,05, $CHCl_3$), 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ_H (ppm) 0,59 (3H, s, H-18); 0,82 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-26); 0,83 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-27); 0,91 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-28); 1,02 (3H, dd, $J = 6,6$ Hz, H-21); 1,14 (3H, s, H-19); 3,31 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-6); 3,95 (1H, m, H-3); 4,22 (1H, br. s, H-7); 5,17 (1H, $J = 7,8; 15,5$ Hz, H-22); 5,22 (1H, dd, $J = 7,2; 15,5$ Hz, H-23); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ_C (ppm) 11,3 (C-18); 17,6 (C-28); 19,6 (C-26); 20,0 (C-27); 21,0 (C-21); 22,8 (C-19); 23,4 (C-11); 23,9 (C-15); 29,0 (C-16); 30,2 (C-2); 30,9 (C-1); 33,1 (C-25); 35,7 (C-12); 38,0 (C-10); 39,2 (C-4); 40,4 (C-20); 42,1 (C-13); 42,9 (C-24);

49,6 (C-14); 53,7 (C-17); 62,3 (C-6); 65,7 (C-5); 67,1 (C-7); 68,6 (C-3); 127,0 (C-8); 132,0 (C-23); 134,5 (C-22); 135,6 (C-9).



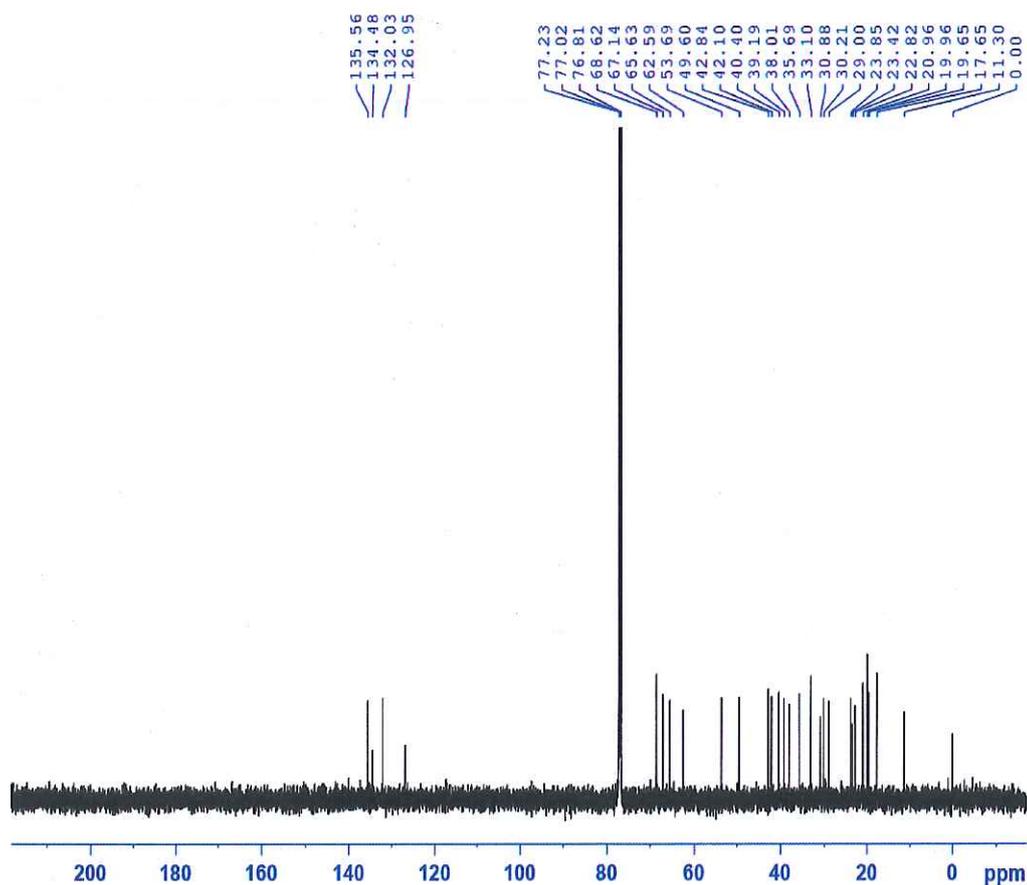
Hình 3.17. Cấu trúc hóa học hợp chất QT8-4

Hợp chất QT8-4 được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (Hình 3.18) của chất QT8-4 xuất hiện tín hiệu tương tự phổ của chất QT8-3 ngoại trừ mất đi tín hiệu của 2 proton ở vùng trường thấp, thay vào đó là 2 proton ở vùng trường cao hơn ở δ_{H} 4,22 (1H, br. s, H-7); 3,31 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-6).



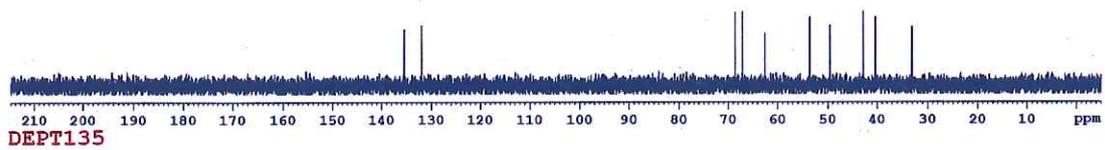
Hình 3.18. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất QT8-4 (CDCl_3 , 600 MHz)

Phân tích phổ ^{13}C -NMR kết hợp với phổ DEPT (Hình 3.19 và 3.20) thấy xuất hiện tín hiệu của 28 carbon bao gồm 6 nhóm methyl ở δ_{C} 11,3 (C-18); 17,6 (C-28); 19,6 (C-26); 20,0 (C-27); 21,0 (C-21); 22,8 (C-19), 7 nhóm methylene, 10 nhóm methine trong đó có 3 nhóm oxymethine ở δ_{C} 68,6 (C-3); 67,1 (C-7); 62,3 (C-6); 2 nhóm methine lai hóa sp^2 ở δ_{C} 135,2 (C-22); 132,3 (C-23) và 5 nhóm methine sp^3 ở δ_{C} 49,6 (C-14); 42,9 (C-24); 53,7 (C-17); 40,4 (C-20); 33,1 (C-25), 5 carbon không liên kết trực tiếp với hydro trong đó có 2 carbon lai hóa sp^2 ở δ_{C} 135,4 (C-9); 130,7 (C-8). Phân tích các dữ liệu phổ 1D-NMR và so sánh tài liệu tham khảo [3, 4] cho phép xác định hợp chất **QT8-4** là $5\alpha, 6\alpha$ -Epoxy-($22E, 24R$)-ergosta-8,22-diene- $3\beta, 7\alpha$ -diol. Chất có hoạt tính gây độc tế bào đối với các dòng tế bào ung thư A549, SK-OV3, SK-MEL-2 và XF498 với giá trị IC_{50} tương ứng là 23,17; 20,86; 20,41 18,04 μM [60].



Hình 3.19. Phổ ^{13}C -NMR của chất QT8-4 (CDCl_3 , 150 MHz)

DEPT90

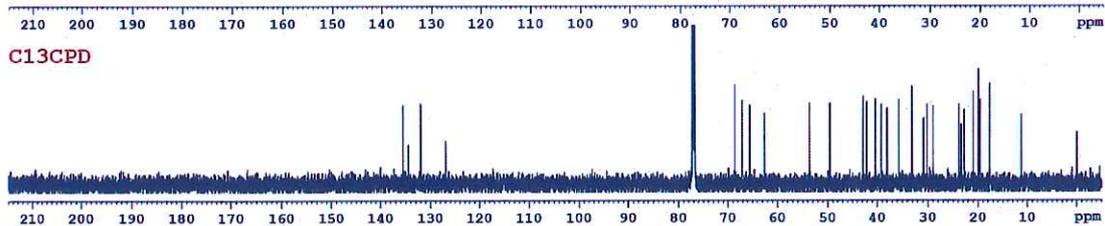


DEPT135



CH&CH3

CH2

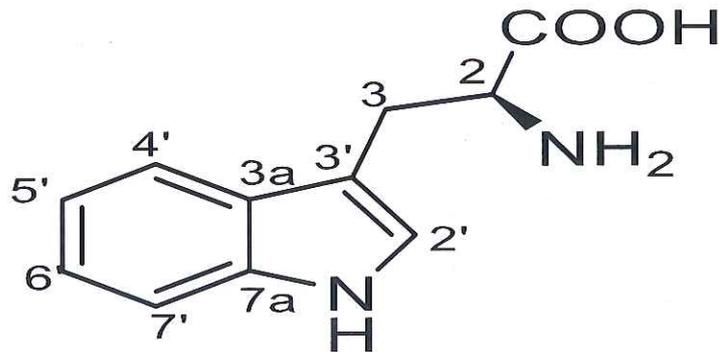


C13CPD

Hình 3.20. Phổ DEPT của chất QT8-4

3.5.5. Hợp chất QT8-5 (Tryptophan)

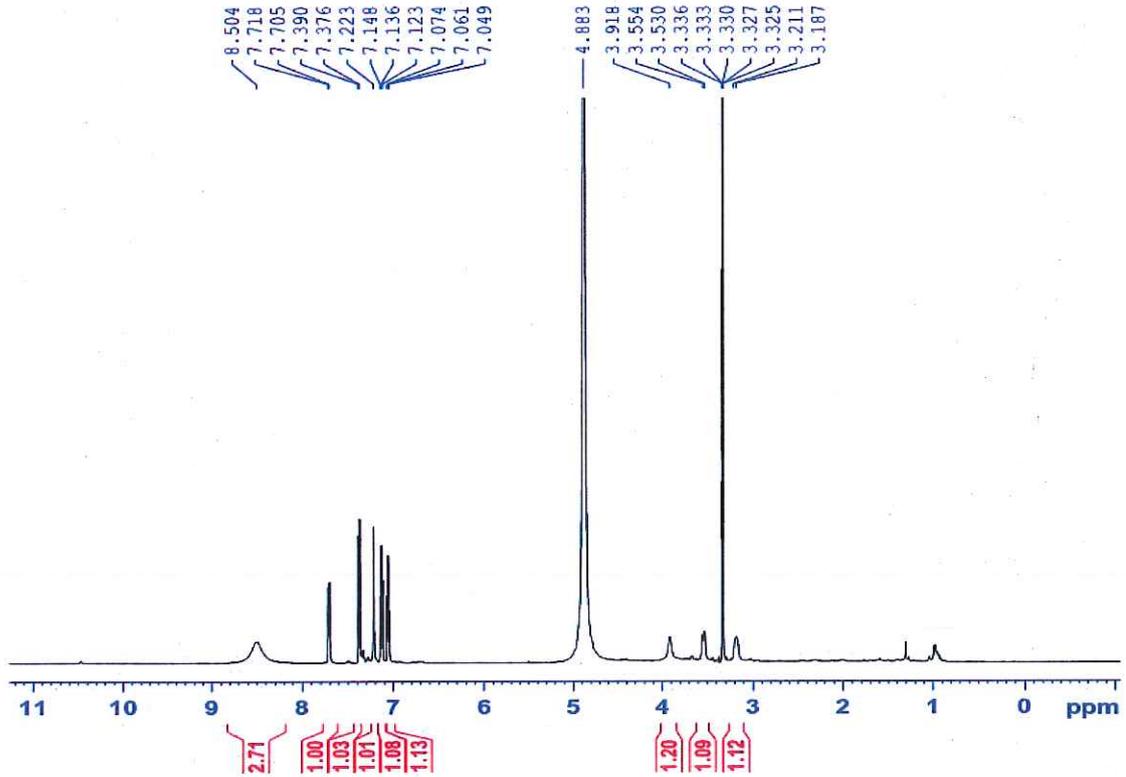
Đặc điểm hóa lý: Chất bột màu trắng, ESI-MS: m/z 205 $[M+H]^+$; 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD): δ_H (ppm) 3,19 (1H, m, H-3a); 3,54 (1H, m, H-3b), 3,92 (1H, m, H-2); 7,06 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, H-5'); 7,14 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, H-6'); 7,22 (1H, s, H-2'); 7,38 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-7'); 7,71 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-4').



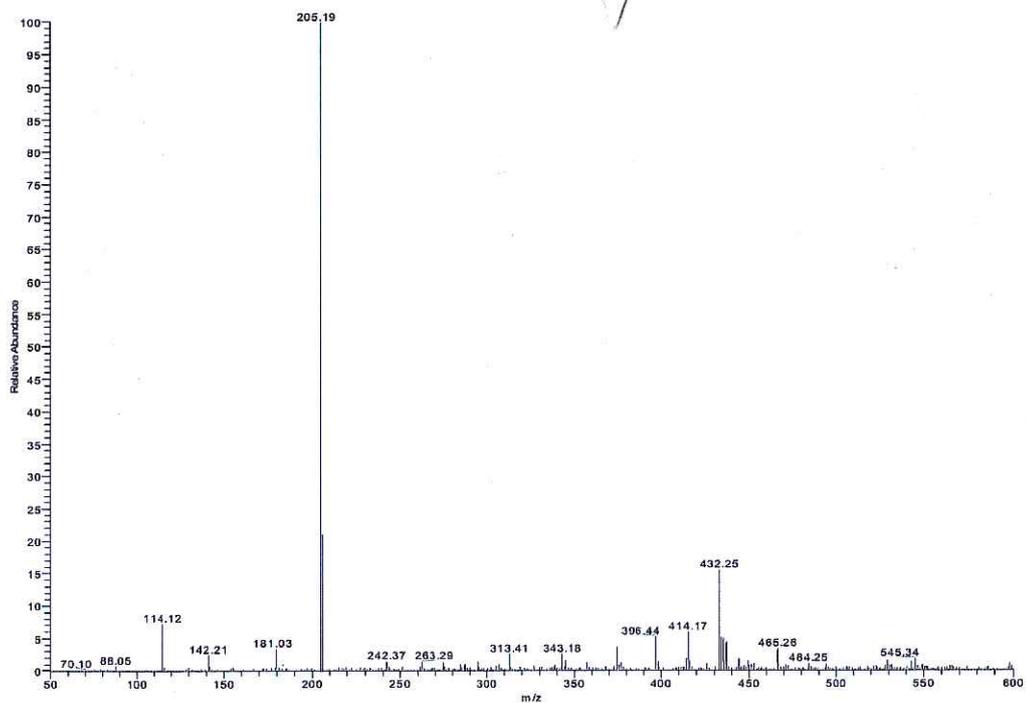
Hình 3.21. Cấu trúc hóa học hợp chất QT8-5

Chất QT8-5 thu được dưới dạng chất bột màu trắng, phổ khối ESI-MS của QT8-5 cho pic ion giả phân tử ở m/z 205 $[M+H]^+$. Phổ 1H -NMR (Hình 3.22) cho tín hiệu của 5 proton đặc trưng cho khung indol ở δ_H 7,06 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, H-5'); 7,14 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, H-6'); 7,22 (1H, s, H-2'); 7,38 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-7'); 7,71 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-4'). Ngoài ra còn có các proton aliphatic ở δ_H

3,19 (1H, m, H-3a); 3,54 (1H, m, H-3b), 3,92 (1H, m, H-2). Kết hợp các dữ liệu phổ (Hình 3.23) và so sánh với tài liệu tham khảo [61, 62] cho phép xác định chất **QT8-5** chính là tryptophan.



Hình 3.22. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất QT8-5 (CD_3OD , 600 MHz)



Hình 3.23. Phổ MS của chất QT8-5

3.5. HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH CỦA 5 CHẤT SẠCH PHÂN LẬP ĐƯỢC

Năm chất sạch phân lập được: Ergosterol (QT8-1); (22E)-ergosta-5,8,22-trien-7-one-3 β -ol (QT8-2); Ergosterol peroxide (QT8-3); 5 α ,6 α -epoxy-ergosta-8(9), 22-diene-3 β ,7 α -diol (QT8-4); Tryptophan (QT8-5) được thử hoạt tính kháng VSVKĐ

Hoạt tính kháng VSVKĐ của 5 chất sạch phân lập được thể hiện qua giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC). Các phép thử đều được thực hiện lặp lại 3 lần. Kết quả thử hoạt tính kháng VSVKĐ được trình bày chi tiết tại Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Bảng giá trị MIC cận chiết EtOAc của 5 chất sạch phân lập

Tên chất	Gram-positive			Gram-negative			Yeast
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>	<i>C. albicans</i>
	MIC (μ g/ml)						
QT8-1	128	128	16	-	-	-	16
QT8-2	64	64	128	-	-	-	32
QT8-3	128	64	256	128	-	-	64
QT8-4	32	128	64	-	-	-	64
QT8-5	-	-	-	-	-	-	-
Streptomycin	256	256	128	32	256	128	x
Cyclohexamide	x	x	x	x	x	x	32

(x): không thử. (-): không thể hiện hoạt tính ở nồng độ thử nghiệm.

Trong số 5 hợp chất được thử nghiệm, 4 hợp chất thể hiện hoạt tính kháng khuẩn ở nồng độ thử nghiệm, đặc biệt có tác dụng mạnh hơn đối với vi khuẩn Gram dương và nấm men *Candida albicans* so với vi khuẩn Gram âm. Đáng chú ý, các hợp chất QT8-1, QT8-2, QT8-4 đều có khả năng ức chế 4/7 chủng VSVKĐ với giá trị MIC dao động từ 16-256 μ g/ml. Trong số các hợp chất thử nghiệm, QT8-3 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn vượt trội khi có khả năng ức chế 5/7 chủng VSVKĐ bao gồm: *Escherichia coli* ATCC25922, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579, Nấm men *Candida albicans* ATCC10231.

Hợp chất ergosterol peroxide (QT8-3) được báo cáo trong nghiên cứu của Kwon và cs với hoạt tính gây độc tế bào ung thư A549, SK-OV3, SK-MEL-2, XF498 và HCT15 với giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng từ 9,76 đến 15,81 μ M. Cùng trong nghiên cứu này, hợp chất (22 E)-ergosta-5,8,22-trien-7-one-3 β -ol (3) 2

(QT8-2) được công bố có hoạt tính gây độc tế bào đối với dòng tế bào ung thư HCT-116 (ung thư đại trực tràng) với $IC_{50} = 40 \mu M$ [59].

Nghiên cứu vào năm 2001 của nhóm các nhà khoa học Yue và cộng sự công bố hợp chất 5 α , 6 α -Epoxy-(22E, 24R)-ergosta-8,22-diene-3 β ,7 α -diol (QT8-4) được phân lập từ nấm *Lactarium volemus* (hiện nay thường gọi là *Lactarius volemus*), một loài nấm thuộc họ *Russulaceae*. Nghiên cứu này cũng chỉ ra hợp chất thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với các dòng tế bào ung thư A549, SK-OV3, SK-MEL-2, và XF498, với giá trị IC_{50} trong khoảng 18,04–23,17 μM [60].

Như vậy, từ các kết quả thu được trong nghiên cứu này về hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định từ chủng *Penicillium* sp. QT8 đã chứng minh được tiềm năng sinh học đáng chú ý của vi nấm biển phân lập tại Côn Cỏ, Quảng trị. Trong 5 hợp chất được thử nghiệm, 4 hợp chất thể hiện hoạt tính kháng VSVKD, đặc biệt là QT8-3 có khả năng ức chế 5/7 chủng VSVKD cao nhất. Tuy nhiên, mức độ hoạt tính vẫn còn ở mức trung bình và cần được nghiên cứu thêm để xác định cơ chế tác động cũng như tối ưu hóa hiệu quả sinh học. Những kết quả này tuy có ý nghĩa bước đầu trong việc xác định tiềm năng sinh học của các hợp chất từ vi nấm biển, nhưng cần được nghiên cứu chuyên sâu hơn, bao gồm đánh giá cơ chế tác động, tính chọn lọc và khả năng ứng dụng thực tế trong y dược.

Nhìn chung, dữ liệu về hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các hợp chất này mở ra một hướng mới về tiềm năng nghiên cứu kháng khuẩn, chuyên sâu hơn về phát triển thuốc từ nguồn tự nhiên trong tương lai. Do đó, nghiên cứu này giúp gợi mở thêm các hướng nghiên cứu về các hoạt tính sinh học khác như hoạt tính gây độc tế bào,.. với chủng vi nấm *Penicillium* sp. QT8 cũng như các hợp chất thứ cấp phân lập được từ chủng vi nấm này.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

- Đã phân lập được 26 chủng vi nấm từ 17 mẫu sinh vật và trầm tích biển được thu thập tại vùng biển đảo Côn Cỏ, Quảng Trị, Việt Nam.
- Đã tạo cặn chiết và sàng lọc hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định từ 26 chủng vi nấm phân lập được, trong đó 5/26 chủng thể hiện hoạt tính kháng ít nhất 4 chủng vi sinh vật kiểm định. Chủng QT8 có khả năng kháng 6/7 vi sinh vật kiểm định bao gồm: *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella enterica* ATCC13076, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579, Nấm men *Candida albicans* ATCC10231.
- Đã định danh chủng QT8 thuộc chi *Penicillium*, và đặt tên là *Penicillium* sp. QT8. Trình tự đoạn gene 18S rRNA của chủng QT8 có kích thước 1165bp đã được đăng ký trên GeneBank với mã số PV093550.
- Đã xác định cấu trúc hóa học của 5 hợp chất được phân lập từ cặn chiết ethyl acetat của chủng vi nấm *Penicillium* sp. QT8 như sau: có 4 chất thuộc lớp chất steroid là ergosterol (QT8-1), (22E)-ergosta-5,8,22-trien-7-one-3 β -ol (QT8-2), ergosterol peroxide (QT8-3), 5 α ,6 α -Epoxy-(22E, 24R)-ergosta-8,22-diene-3 β ,7 α -diol (QT8-4) và 1 hợp chất indol là tryptophan (QT8-5).
- Chất QT8-1, QT8-2, QT8-4 từ chủng QT8 kháng 4/7 chủng vi sinh vật kiểm định với giá trị MIC từ 16-256 μ g/ml. Đặc biệt, chất QT8-3 kháng 5/7 chủng kiểm định bao gồm: *Escherichia coli* ATCC25922, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579, nấm men *Candida albicans* ATCC10231.

4.2. KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu sàng lọc hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định, hoạt tính sinh học từ một số chủng vi nấm khác phân lập được từ vùng biển Côn Cỏ.
- Mở rộng hướng nghiên cứu tại các vùng biển khác của Việt Nam nhằm phát hiện các chủng vi nấm có tiềm năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học cao.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Micael F.M.G., Ana C.E., Artur A, 2022, Marine Fungi: Opportunities and Challenges, *Encyclopedia*, 2(1), 559–577.
2. Liming J., Chunshan Q., Xiyan H., Shengdi F, 2016, Potential pharmacological resources: Natural bioactive compounds from marine-derived fungi, *Mar Drugs*, 14(4), 76.
3. Tarman K., 2020, Marine fungi as a source of natural products. *Encycl. Mar. Biotechnol*, 4, 2147–2160.
4. Jones E.B.G., Sakayaroj J., Suetrong S., Somrithipol S., Pang K.L., 2009, Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota, *Fungal Divers*, 35, 187.
5. Pang K.L., Overy D.P., Jones E.B.G., Calado M., Burgaud G., Walker A.K., Johnson J.A., Kerr R.G., Cha H.J., Bills G.F, 2016, ‘Marine fungi’ and ‘marine-derived fungi’ in natural product chemistry research: Toward a new consensual definition, *Fungal Biol. Rev*, 30, 163–175.
6. Richards T.A., Jones M.D., Leonard G., Bass D., 2012, Marine fungi: Their ecology and molecular diversity. *Ann. Rev. Mar. Sci.* , 4, 495–522.
7. Queirós B., Barreira J.C., Sarmiento A.C., Ferreira I.C, 2009, In search of synergistic effects in antioxidant capacity of combined edible mushrooms. *Int. J. Food Sci. Nutr.* , 60, 160–172.
8. Zeghal E., Vaksmaa A., Vielfaure H., Boekhout T., Niemann H., 2021, The potential role of marine fungi in plastic degradation - A review. *Front. Mar. Sci.* , 8, 738877.
9. Reich M., Labes A, 2017, How to boost marine fungal research: A first step towards a multidisciplinary approach by combining molecular fungal ecology and natural products chemistr. *Geneom.* , 36, 57–75.
10. Demain A.L., Fang A, 2000, The natural functions of secondary metabolites, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*, 69, 1–39.
11. Houbraken J., Frisvad J.C., Samson R.A., 2011, Fleming’s penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*, *IMA Fungus*, 2, 87–95.
12. Gerwick W.H., Moore, B.S., 2012, Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology, *Chem. Biol.* , 19, 85–98.
13. Jimenez C, Marine natural products in medicinal chemistry, 2018, *ACS Med. Chem. Lett.* , 9, 959–961.
14. Micael F. M. Gonçalves, Ana C. Esteves, Artur Alves, 2022, Marine Fungi: Opportunities and Challenges, *Encyclopedia of fungi*, 2(1), 559–577.
15. Silber J., Kramer A., Labes A., Tasdemir D, 2016, From discovery to production: Biotechnology of marine fungi for the production of new antibiotics, *Mar. Drugs*, 14, 137.
16. Okutani K, 1977, Gliotoxin produced by a strain of *Aspergillus* isolated from marine mud, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* , 43, 995–1000.

17. Carroll A.R., Copp B.R., Davis R.A., Keyzers R.A. Prinsep, 2019, *M.R. Marine natural products*, Natural Product Reports, Royal Society of Chemistry: London, UK, pp. 122–173.
18. Papon N., Copp B.R. Courdavault, 2022, Marine drugs: Biology, pipelines, current and future prospects for production, *Biotechnol. Adv*, 54, 107-171.
19. Wang C., Tang S., Cao S., 2020 Antimicrobial compounds from marine fungi, *Phytochem. Rev*, 1–33.
20. Shabana S., Lakshmi K. R., and Satya A. K., 2021, An updated review of secondary metabolites from marine fungi, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 21(5), 602–642.
21. Jin L., Quan C., Hou X., Fan S., 2016, Potential pharmacological resources: Natural bioactive compounds from marine-derived fungi. *Marine drugs*, 14(4), pp 76.
22. Youssef D.T.A., Alahdal A.M., 2018, Cytotoxic and Antimicrobial Compounds from the Marine-Derived Fungus, *Penicillium* Species, *Molecules*, 23(2):394.
23. Huang R., Ma S., Wu J., Riaz A., Song L., Zhou S., 2024, He J. A new tetrahydroxybenzophenone from a marine-associated fungus of *penicillium* sp. and its potential antibacterial activity, *Natural Product Research*, 1–8.
24. Han J., Liu M., Jenkins I., Liu X., Zhang L., Quinn R.J., Feng Y., 2020, Genome-Inspired Chemical Exploration of Marine Fungus *Aspergillus fumigatus* MF071, *Mar. Drugs*, 18, p.352.
25. Aminah I, Putra A.E, Arbain D, Handayani D. 2020, Antibacterial potential of fungi derived extracts of marine sponge *Acanthostrongylophora ingenes*. *AAFL Bioflux.*, 13(2), 18-25.
26. Yang K.L., Wei M.Y., Shao C.L., Fu X.M., Guo Z.Y., Xu R.F., Zheng C.J., She Z.G., Lin Y.C., Wang C.Y., 2012, Antibacterial anthraquinone derivatives from a sea anemone-derived fungus, *Nigrospora* sp. *J. Nat. Prod.*, 75, 935–941.
27. Machado F.P., Kumla D., Pereira J. A., Sousa E., Dethoup T., Freitas-Silva J., Costa P.M., Mistry S., Silva A.M.S. and Kijjoa A., 2021, Prenylated phenylbutyrolactones from cultures of a marine sponge-associated fungus *Aspergillus flavipes* KUFA1152, *Phytochemistry*, 185, 112-709.
28. Wu B., Oesker V., Wiese J., Schmaljohann R., Imhoff J.F., 2014, Two new pyridones produced by a marine fungus *Trichoderma* sp. strain MF106, *Mar. Drugs*, 12, 1208–1219.
29. Wu X.Z., W. Huang J., Liu W., Mándi A., Zhang Q., Zhang L., Zhang W., Kurtán T., Yuan C.S. and Zhang C. J., 2021, Penicisteckins A–F, Isochroman-Derived Atropisomeric Dimers from *Penicillium steckii* HNNU-5B18, *Natural Products*, 84, 2953–2960.

30. Fan C., Zhou G., Wang W., Zhang G., Zhu T., Che Q. and Li D., 2021, Tetralone Derivatives From a Deep-Sea-Derived Fungus *Cladosporium* Sp. HDN17-58, *Natural Products Commun.*, 16(4).
31. Zhang D., Yi W., Ge H., Zhang Z. and Wu B., 2021, A new antimicrobial indoloditerpene from a marine-sourced fungus *Aspergillus versicolor* ZZ761. *Nat. Prod. Res.*, 35, 3114–3119.
32. Song F., Lin R., Yang N., Jia J., Wei S., Han J., Li J., Bi H. and Xu X., 2021, Antibacterial Secondary Metabolites from Marine-Derived Fungus *Aspergillus* sp. IMCASMF180035, *Antibiotics*, 10, 377.
33. Anthony R. C., Brent R. C., Rohan A. D., Robert A. K., and Michèle R. P., 2021, Marine natural products, *Natural Products Reports*, 40, 275-325.
34. Trinh P.T.H., Chanh N.T.K., Ngoc N.T.D., Tien P.Q., Ly B.M., Van T.T.T., 2017, Secondary metabolites from a marine – derived fungus *Penicillium chrysogenum* 045-357-2, *Journal of Science and Technology*, 55 (1A), 6572.
35. Luyen N. D., Ha T.T.H., Yen D.T.H., Nhiem N.X., Tai B.H., Gardes, A., ... & Kiem P.V., 2019, Aspermicrones AC, novel dibenzospiroketal from the seaweed-derived endophytic fungus *Aspergillus micronesiensis*. *The Journal of antibiotics.*, 72(11), 843-847.
36. Quang T. H., Phong N. V., Hanh T. T. H., Cuong N. X., Ngan N. T. T., Oh H., Nam N. H. and Minh C.V., 2021, Cytotoxic and immunomodulatory phenol derivatives from a marine sponge-derived fungus *Ascomycota* sp. VK12, *Nat. Prod. Res.*, 35, 5153–5159.
37. Minh L.T.H., Anh N.M., Huyen V.T.T., Quyen V.T., Dao P.T., Huong D.T.M, Cuong P.V., Minh C.V., 2018, Isolation, screening antimicrobial activity and identification of fungi from marine sediments of the area Thanh Lan, Co To, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 16(4): 721-728.
38. Anh T.T., Nam V.V., Minh L.T.H., Anh N.M., Huyen V.T.T., Quyen V.T., Dao P.T., Vuong N.V., Huong D.T.M, Cuong P.V., 2017, Secondary metabolites from marine fungus *Neurospora* sp. M45, *Vietnam Journal of chemistry*, 55(6e) 131-134.
39. Minh L.T.H., Anh N.M., Huyen V.T.T., Quyen V.T., Dao P.T., Huong D.T.M, Dang N.H., Hung T.M., Minh C.V, Cuong P.V., 2019, Chemical composition and biological activities of metabolites from the marine fungi *Penicillium* sp. isolated from sediments of Co To Island, Vietnam. *Molecules*.
40. Minh L.T.H., Anh N.M., Huyen V.T.T., Quyen V.T., Dao P.T., Huong D.T.M, Cuong P.V., 2020, A Pair of Undescribed Alkaloid Enantiomers from Marine Sponge-Derived Fungus *Hamigera avellanea* and Their Antimicrobial and Cytotoxic Activities, *Chemistry & Biodiversity*, 20, 11.
41. PGS.TS. Nguyễn Phương Huệ, TS. Hoa Thị Minh Tú, TS. Chu Thanh Bình, 2021, Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn và khả năng sinh tổng hợp

- Mycophenolic Acid của chủng vi nấm biển, Tạp Chí Y học Quân sự, (353), 9-14.
42. Trần Hồng Quang và cs, 2020, *Nghiên cứu các hợp chất thứ cấp từ một số vi nấm biển Việt Nam giai đoạn 2015-2020*, Đa dạng sinh học và các hoạt chất có hoạt tính sinh học, Hà Nội.
 43. Anh N.M., Minh L.T.H., Huyen V.T.T., Dao P.T., Huong D.T.M, Dang N.H., Hung T.M., Cuong P.V and Dat T.T.H., 2024, *Secondary metabolites from marine fungus Penicillium chrysogenum VH17 and their antimicrobial and cytotoxic potential*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.
 44. Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượn, Nguyễn Phùng Tiên, Đặng Đức Trạch và Phạm Văn Ty, 1977, *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, Nxb Khoa học Kỹ thuật, tập 3.
 45. Sambrook J., Frisch E.F., Maniatis T., 1989. *Molecular cloning I, II, III: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 46. White T. J., Bruns T., Lee S. *et al.*, 1990, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. *Academic Press, New York, USA.*, pp. 315–322.
 47. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K., 2018, MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549.
 48. Carroll RA, Copp RB, Davis AR, Keyzers AR, Prinsep RM (2023) Marine natural products. Natural product reports 2. DOI: 10.1039/c9np00069k.
 49. Andrews J. M., 2001, Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 48 (1), 5-16.
 50. Choi B.K., Trinh P.T.H., Lee H.S., Choi B.W., Kang J.S., Ngoc N.T.D., Van T.T.T., Shin H.J., 2019, New Ophiobolin Derivatives from the Marine Fungus *Aspergillus flocculosus* and their cytotoxicities against cancer cells. *Mar Drugs*, 17(6), p.346.
 51. Pan C.Q., Hassan S.S.U., Muhammad I., Jin H., 2024, A review (2009–2018). Marine fungi as a goldmine for novel antibiotics: a 2024 perspective. *Marine Biotechnology and Bioproducts*, 11, 356–372.
 52. Ngoc N.T.D., Yurchenko E.A., Trinh P.T.H, Menchinskaya E.S., Dieu V.T.K., Savagina A.D., Minin A., Thinh P.D., Khanh H.H.N., Van T.T.T., Yurchenko A.N., 2025, Secondary metabolites of Vietnamese marine fungus *Penicillium chermesinum* 2104NT-1.3 and their cardioprotective activity, *Regional Studies in Marine Science*, Volume 81, 104003, ISSN 2352-4855.
 53. Ma H.G., Liu Q., Zhu G.L., Liu H.S., Zhu W.M., 2016, Marine natural products sourced from marine derived *Penicillium* fungi., *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 18, 92–115.

54. Yang X.L., Liu J.P., Mei J.H., Jiang R., Tu S.Z., Deng H.F., Liu J., Yang S.M., Li J., 2021, Origins, structures, and bioactivities of secondary metabolites from marine-derived *Penicillium* Fungi., *Mini-Rev. Med. Chem.*, 21, 2000–2019.
55. Lv F., Zeng Y., 2024, Novel Bioactive Natural Products from Marine-Derived *Penicillium* Fungi: A Review (2021–2023), *Mar. Drugs*, 22, 191.
56. Liu S., Su M.Z., Song S.J., Jung J.H., 2017, Marine-derived *Penicillium* species as producers of cytotoxic metabolites, *Mar. Drugs*, 15, 329.
57. Seo H.W., Hung T.M., Na M., *et al.*, 2009, Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity, *Arch Pharm Res.*, 32(11), 1573-1579.
58. Youssef D.T.A., Badr J.M., Shaala L.A., Mohameda G.A., Bamanie F.H., 2015, Ehrenasterol and biemnic acid; new bioactive compounds from the Red Sea sponge *Biemna ehrenbergi*, *Phytochem. Lett.*, 12, 296–301.
59. Kwon H.C., Zee S.D., Cho S.Y., Choi S.U., Lee K.R., 2002, Cytotoxic ergosterols from *Paecilomyces* sp. J300, *Archives of pharmacal research*, 25, 851-855.
60. Yue J. M., Chen S. N., Lin Z.W. and Sun H D., 2001, Sterol from the fungus *Lactarium volemus*. *Phytochemistry*, 56, 801-806.
61. Fathi F., Brun A., Rott K.H., Falco C.P., Tonelli M., Eghbalnia H.R., Caviedes V.E., Karasov W. H., Markley J.L., 2017, NMR-Based Identification of Metabolites in Polar and Non-Polar Extracts of Avian Liver. *Metabolites*, 7(4), p.61.
62. Xu X.B., Tang F., Guo X.F., Wang J., Yao X., Sun J., Xun H., 2015, Isolation, identification and determination of six nucleosides and two amino acids from bamboo shoots of *Gramineae Phyllostachys prominens* (WY Xiong). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.*, 14(12), 2239-2246.

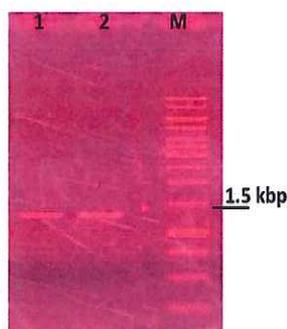
PHỤ LỤC



Hình 1. Một số hình ảnh các khuẩn lạc mọc sau 5-30 ngày nuôi cấy



Hình 2. Hình ảnh một số hình thái khuẩn lạc khác nhau khi làm sạch chủng



Hình 3. Điện di đồ sản phẩm PCR gene 18S rRNA của chủng QT8

Giếng M: Thang DNA chuẩn 1kb plus của Fermentas

Giếng 1, 2: Sản phẩm PCR gene 18S rRNA của chủng QT8

Độ dài: 1165 bp; 280 A; 259 C; 335 G; 291 T.

ATAGCGTATA	TTAAAGTTGT	TGCAGTTAAA	AGCTCGTAGT	TGAACCTTGG	GCCTGGCTGG	60
CCGGTCCGCC	TCACCGCGAG	TACTGGTCCG	GCTGGGCCTT	TCCTTCTGGG	GAACCTCATG	120
GCCTTCACTG	GCTGTGGGGG	GAACCAGGAC	TTTTACTGTG	AAAAAATTAG	AGTGTTCAAA	180
GCAGGCCTTT	GCTCGAATAC	ATTAGCATGG	AATAATAGAA	TAGGACGTGC	GGTCTATTT	240
TGTTGGTTTC	TAGGACCGCC	GTAATGATTA	ATAGGGATAG	TCGGGGGCGT	CAGTATTCAG	300
CTGTCAGAGG	TGAAATTCTT	GGATTTGCTG	AAGACTAACT	ACTGCGAAAG	CATTGCCCCA	360
GGATGTTTTC	ATTAATCAGG	GAACGAAAGT	TAGGGGATCG	AAGACGATCA	GATACCGTCG	420

TAGTCTTAAC	CATAAACTAT	GCCGACTAGG	GATCGGACGG	GATTCTATGA	TGACCCGTTC	480
GGCACCTTAC	GAGAAATCAA	AGTTTTTGGG	TTCTGGGGGG	AGTATGGTCG	CAAGGCTGAA	540
ACTTAAAGAA	ATTGACGGAA	GGGCACCACA	AGGCGTGGAG	CCTGCGGCTT	AATTTGACTC	600
AACACGGGGA	AACTCACCAG	GTCCAGACAA	AATAAGGATT	GACAGATTGA	GAGCTCTTTC	660
TTGATCTTTT	GGATGGTGGT	GCATGGCCGT	TCTTAGTTGG	TGGAGTGATT	TGTCTGCTTA	720
ATTGCGATAA	CGAACGAGAC	CTCGGCCCTT	AAATAGCCCG	GTCCGCATCT	GCGGGCCGCT	780
GGCTTCTTAG	GGGACTATC	GGCTCAAGCC	GATGGAAGTG	CGCGGCAATA	ACAGGCTCTGT	840
GATGCCCTTA	GATGTTCTGG	GCCGCACGCG	CGCTACACTG	ACAGGGCCAG	CGAGTACATC	900
ACCTTGCCCG	AGAGGTCTGG	GTAATCTTGT	TAAACCTGT	CGTGCTGGGG	ATAGAGCATT	960
GCAATTATTG	CTCTTCAACG	AGGAATGCCT	AGTAGGCACG	AGTCATCAGC	TCGTGCCGAT	1020
TACGTCCCTG	CCCTTTGTAC	ACACCGCCCG	TCGCTACTAC	CGATTGAATG	GCTCAGTGAG	1080
GCCTTCGGAC	TGGCGCCGGA	GGGTGGCAA	CGACCCCCCA	GCGCCGGAAA	GTTGGTCAAA	1140
CTCGGTCATT	AGAGGAAGTA	AAAGT				1165

Hình 4. Trình tự gene 18S của chủng *Penicilium*.sp QT8.