

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thị Hoa

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VI NẤM
NỘI SINH TỪ CÂY DƯỢC LIỆU BÁT GIÁC LIÊN
VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH HOẠT CHẤT
PODOPHYLLOTOXIN VÀ CÁC DẪN XUẤT**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Hà Nội - 2025

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: TS. Trần Hồ Quang, Viện Sinh học, Viện
Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
2. Người hướng dẫn 2: PGS.TS. Phạm Bích Ngọc, Viện Sinh học,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Phản biện 1: PGS.TS. Trần Văn Tuấn

Phản biện 2: PGS.TS. Nguyễn Phương Nhuệ

Phản biện 3: PGS.TS. Dương Minh Lam

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học
viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa
học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ, ngày
..... tháng năm 2025

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Podophyllotoxin, aryltetralin lignan, là nguồn gốc của thuốc chống ung thư quan trọng như etoposide, teniposide và etopophos. Podophyllotoxin hiện được thu nhận chủ yếu từ một số cây thuộc chi *Podophyllum* (*Podophyllum hexandrum*), cây Táo ma (*Podophyllum peltatum*) thành phần chính của cây là podophylloxin hay một số cây thuộc chi *Juniperus* như *Juniperus sabina*, *Juniperus thurifera*, *Juniperus chinensis*...), và một số loài thuộc chi *Linum* (Xiang et al., 2017). Hiện nay, rễ /thân rễ của *Podophyllum hexandrum* tạo thành một trong những nguồn quan trọng nhất của podophyllotoxin. Sự tổng hợp hóa học của podophyllotoxin được coi là rất phức tạp và không hiệu quả bởi vì sự có mặt của 4 trung tâm bất đối xứng với một C lactone và mức độ oxy hóa cao. Thêm vào đó, việc sử dụng công nghệ nuôi cấy sinh khối tế bào thực vật, nuôi cấy cơ quan thực vật ở các loài có khả năng sản sinh podophyllotoxin khó khả thi do hàm lượng podophyllotoxin thu hồi ít.

Gần đây, nấm nội sinh được phân lập từ các loại cây trồng thuộc chi *Podophyllum* (*Dysosma*) hay *Juniperus* đã được chứng minh có khả năng tạo ra podophyllotoxin. Việc nghiên cứu phân lập thành công các chủng nấm nội sinh *Fusarium oxysporum* từ *Juniperus recurve*; *Penicillium* sp., *Phialocephala fortinii*, *Trametes hirsuta*, *Alternaria neesex* từ *Podophyllum hexandrum*; *Monilia* sp., *Penicillium implication* từ *Dysosma veitchii* có khả năng tạo ra podophyllotoxin cho thấy cơ sở khoa học và khả năng thay thế nguồn nguyên liệu đang dần cạn kiệt hiện nay. Tại Việt Nam, có các loài thuộc chi Bát Giác liên là *Podophyllum tonkinense* Gagnep, 1938 – Bát giác liên và *Podophyllum versipelle* Hence, 1883 phân bố chủ yếu ở các tỉnh phía Bắc như Lai Châu, Lào Cai, Yên Bái, Hà Giang, Lạng Sơn. Ngoài ra, hiện có hai loài *Juniperrus chinensis* (Tùng sà) và *Juniperrus squamata* (Tùng vảy) du nhập Việt Nam (Nguyễn Tiên Bân, 2003). Đây là các loài đã được các nhà nghiên cứu trong và ngoài nước chứng minh có khả năng tổng hợp

podophyllotoxin và deoxypodophyllotoxin và là nguồn nguyên liệu thực vật tiềm năng để phân lập vi nấm có khả năng sản sinh podophyllotoxin và deoxypodophyllotoxin thay thế nguồn nguyên liệu đang dần cạn kiệt hiện nay.

Trên cơ sở đó, chúng tôi thực hiện luận án “*Nghiên cứu phân lập vi nấm nội sinh từ cây dược liệu Bát giác liên và đánh giá khả năng sinh hoạt chất podophyllotoxin và các dẫn xuất*”.

2. Mục tiêu nghiên cứu:

Phân lập và tuyển chọn được các chủng vi nấm nội sinh cây Bát Giác Liên có khả năng sinh tổng hợp podophyllotoxin và các dẫn xuất có hoạt tính sinh học. Giải mã hệ gen chủng vi nấm tuyển chọn. Xác định các điều kiện thích hợp cho lên men sinh tổng hợp podophyllotoxin và các dẫn xuất. Tinh chế và xác định được cấu trúc của chất/tiền chất podophyllotoxin từ vi nấm nội sinh tuyển chọn.

3. Nội dung nghiên cứu:

- Phân lập, định danh và sàng lọc chủng nấm nội sinh sản sinh hoạt chất podophyllotoxin
- Giải mã hệ gen chủng vi nấm nội sinh tuyển chọn và đề xuất con đường sinh tổng hợp chất/tiền chất podophyllotoxin.
- Nghiên cứu một số điều kiện thích hợp sinh tổng hợp podophyllotoxin và các dẫn xuất của chủng vi nấm nội sinh lựa chọn bằng công nghệ lên men.
- Lên men, thu hồi, xác định cấu trúc và đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất từ vi nấm nội sinh tuyển chọn.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

Cây Bát giác liên thuộc chi *Podophyllum* (*Dysosma*), loài dược liệu này được thu thập tại các tỉnh phía Bắc như Lai Châu, Lào Cai, Yên Bái, Hà Giang, Lạng Sơn. Trong khuôn khổ của luận án, cây Bát giác liên được thu mẫu tại Hà Giang và Lai Châu. Trong Từ điển cây thuốc Việt Nam, Sách đỏ Việt Nam thì “rễ và thân rễ chứa Berberin, thường dùng trị mụn nhọt, lở ngứa, tràng nhạc, sung huyết hầu, đờn ngã, dao chém, giải độc, tiêu phù, sát trùng và rắn độc cắn”. Từ đó cho thấy tiềm năng cây Bát giác liên sẽ cung cấp nguồn gen quý hiếm có giá trị cao.

Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh được Podophyllotoxin (PTOX) là một chất hoá học nổi tiếng trong số hàng trăm chất từ thực vật, được phân lập chủ yếu từ rễ và thân của một số loài thuộc chi *Podophyllum* (hay *Dysosma*). Một số nghiên cứu trong nước đã đưa ra kết quả chiết xuất và phân lập thành phần các chất từ phần dưới mặt đất của cây Bát giác liên (*Podophyllum tonkinense* Gagnep.). Kết quả đã phân lập được 7 hợp chất từ phần dưới mặt đất (rễ và thân rễ) của cây bát giác liên thu tại Sa Pa (Lào Cai) và được xác định là quercetin (1), rutin (2), kaempferol (3), nicotiflorin (4), α -peltatin (5), deoxypodophyllotoxin (6), và podophyllotoxin (7). Như vậy tiềm năng khai thác các hợp chất quý từ loài dược liệu này rất có cơ sở và đang được quan tâm. Từ đó định hướng nghiên cứu các gen liên quan đến các quá trình trao đổi chất trên con đường tổng hợp các hợp chất có hoạt tính làm thuốc cũng như các phương pháp để tăng cường sản xuất các hợp chất có hoạt tính nhằm bảo tồn, thay thế nguồn nguyên liệu quý hiếm này. Tuy nhiên, những thực vật này đang đứng trước nguy cơ bị suy thoái do khai thác quá mức. Như vậy để vẫn có thể lấy được nguồn gen quý lại không gây ra sự mất cân bằng sinh thái, một cách tiếp cận an toàn và đầy triển vọng đó là khai thác thông qua việc phân lập vi nấm nội sinh loài dược liệu này.

PTOX ngoài tiềm năng là một hợp chất chống ung thư tự nhiên thì nó còn có nhiều đặc tính chữa bệnh khác được tìm thấy trong một số loài thuộc

chi *Podophyllum* như *P. hexandrum*, *P. peltatum*, *P. emodi*, v.v. Nó không chỉ giới hạn ở chi *Podophyllum* mà còn được tìm thấy ở một số chi khác chẳng hạn như *Jeffersonia*, *Diphylleia* và *Dysosma* (*Berberidaceae*), *Catharanthus* (*Apocynaceae*), *Polygala* (*Polygalaceae*), *Anthriscus* (*Apiaceae*), *Linum* (*Linaceae*), *Hyptis* (*Verbenaceae*), *Teucrium*, *Nepeta* and *Thymus* (*Labiaceae*), *Thuja*, *Juniperus*, *Callitris* and *Thujopsis* (*Cupressaceae*), *Cassia* (*Fabaceae*), *Haplophyllum* (*Rutaceae*), *Commiphora* (*Burseraceae*), *Hernandia*. Trên thế giới cũng đã có nhiều nghiên cứu về podophyllotoxin và dẫn xuất của nó, chúng được biết đến là những chất chuyển hóa thứ cấp quan trọng về mặt y học của thực vật với nhiều hoạt tính sinh học như PTOX có khả năng gây độc tế bào và hoạt động như một chất ức chế lắp ráp các vi ống. Chất này được chứng minh sử dụng hiệu quả cho ung thư phổi, u tinh hoàn, u nguyên bào thần kinh, u gan và các khối u khác. podophyllotoxin còn được biết đến với khả năng kháng vi rút, chống oxy hóa, kháng khuẩn, kích thích miễn dịch và chống thấp khớp, chủ yếu xảy ra ở các chi *Juniperus* và *Podophyllum* và PTOX cũng có nguồn gốc nội sinh.

Vi nấm nội sinh thực vật được định nghĩa là những loại nấm dành toàn bộ hoặc một phần trong vòng đời của chúng tồn tại trong các mô khỏe mạnh của cây chủ, ở các cơ quan khác nhau như lá, thân, rễ, cành...thường không gây ra triệu chứng bệnh rõ ràng. Vùng rễ là nơi xuất phát nhiều vi sinh vật nội sinh chui vào, sau khi xâm nhập vào cây chủ, vi nấm có thể tập trung tại vị trí xâm nhập hoặc di chuyển đi khắp nơi trong cây đến các hệ mạch của rễ, thân, lá... thúc đẩy các quá trình chuyển hóa trong cây, sự phát triển lông rễ một cách mạnh mẽ và giảm sự kéo dài rễ. Trong suốt thời gian dài đồng tiến hóa một số vi sinh vật nội sinh cùng tồn tại với các cây chủ của chúng, đã thiết lập một mối quan hệ đặc biệt với nhau và có thể ảnh hưởng đáng kể đến sự hình thành các sản phẩm trao đổi chất trong thực vật. Điều này thật phù hợp khi chúng ta khi nghiên cứu các mối quan hệ giữa các vi sinh vật nội sinh và cây ký chủ của chúng, đây là cách tiếp cận mới có thể thay thế

để sản xuất hiệu quả các hợp chất hoạt tính sinh học khan hiếm và có giá trị.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

- Mẫu cây được liệu Bát Giác Liên (Loài *Dysosma difformis* (hemsl.&E.H.Wilson) T.H.Wang) khoẻ mạnh được thu thập ngẫu nhiên tại tỉnh Hà Giang và tỉnh Lai Châu.

- Các chủng vi khuẩn sử dụng: Gram âm (*Escherichia coli* DH5) và Gram dương (*Staphylococcus* sp., *Bacillus* 7TM11, *Bacillus* 2TM6, *Enterobacter* 14RM7-1) được lưu giữ tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học, VAST.

- Các dòng tế bào ung thư ở người: SK-LU-1 (tế bào ung thư phổi); HepG2 (tế bào ung thư gan); HL-60 (tế bào bạch cầu cấp tính) do GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island, US và GS. Jeanette Maier, trường Đại học Milan, Italia cung cấp.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp thu thập và định danh mẫu cây Bát Giác Liên

Mẫu cây Bát Giác Liên được thu thập với sự hợp tác từ các chuyên gia lĩnh vực sinh thái và phân loại bởi Trịnh Ngọc Bon, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam và Nguyễn Thị Thanh Hương, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.2. Phương pháp chiết xuất thực vật từ mẫu rễ cây Bát Giác Liên

Mẫu cây Bát Giác Liên được rửa sạch nhiều lần với nước cất, khử trùng bề mặt với ethanol 70 %, cắt rễ thành các đoạn nhỏ 1 cm trong điều kiện vô trùng, nghiền nát và sấy khô đến trọng lượng không đổi. Ngâm 100g bột khô trong 100 ml metanol trong 24 giờ và siêu âm trong 1 giờ, lặp lại 3 lần để thu được dung dịch chiết xuất. Tiếp theo chiết xuất được bay hơi bằng thiết bị bay cô quay R300 ở 30 °C để thu cao chiết phục vụ các nghiên cứu tiếp theo

2.2.3. Phương pháp phân lập và định loại vi nấm nội sinh

Quy trình khử trùng bề mặt

Tiến hành khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 3 phút (đối với mẫu lá) hoặc 5 phút (đối với mẫu rễ và thân), sau đó rửa bằng natri hypochlorit 5% cho 2 phút (đối với mẫu lá) hoặc 3 phút (đối với rễ và thân), ngâm trong dung dịch natri thiosulfat 2,5% trong 5 phút, tiếp theo rửa sạch trong ethanol 75%. Mẫu được tráng lại bằng nước cất vô trùng vài lần, thấm khô bằng giấy thấm vô trùng, sau đó đặt mẫu trên các đĩa chứa môi trường thạch LB. Sau 5 ngày ở 25°C mẫu nào không có dấu hiệu phát triển của vi khuẩn hoặc vi nấm xung quanh vùng cấy sẽ được xác nhận là sạch và đủ điều kiện cho việc phân lập vi nấm nội sinh.

Phân lập nấm nội sinh

Bước 1. Các mẫu thân, lá và rễ sau khi được khử trùng bề mặt, nghiền nát bằng cối và chày sứ vô trùng.

Bước 2. Mẫu nghiền được phết lên thạch đĩa PDA, mỗi mẫu được lặp lại ít nhất 3 lần và được ủ ở 25±2 °C trong 1-2 tuần. Từ mô thực vật sau khi được nghiền nát xuất hiện các khuẩn lạc nấm được coi là vi nấm nội sinh. Những loại nấm này được thuần khiết thêm trên các đĩa PDA mới để thu được các chủng nấm sạch.

Định danh vi nấm bằng phương pháp truyền thống và sinh học phân tử

- Trước tiên, nhận dạng chủng nấm qua màu sắc, hình dạng, kích thước, dạng mặt, dạng mép khuẩn lạc, màu sắc hệ sợi, màu sắc mặt dưới, giọt tiết, sắc tố khuếch tán ra môi trường, vách ngăn sợi nấm, bào tử và cuống bào tử để sơ bộ nhận dạng, phân loại các chủng nấm đến chi.

- DNA của nấm được tách chiết và thực hiện phản ứng PCR nhằm nhân dòng các gene quan tâm thông qua cặp mồi đặc hiệu:

ITS1(forward): 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4(reverse): 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Chu trình nhiệt bao gồm: 95°C trong 1 phút; tiếp theo là 36 chu kỳ nhiệt: 94°C trong 30 giây, 53°C trong 20 giây, 72°C trong 30 giây; kéo dài ở 72°C trong 5 phút; giữ ở 15 °C cho đến khi lấy mẫu. Sau khuếch đại, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarosa 1%. Đoạn gen được xác định trình

tự nucleotit bằng máy giải trình tự và được so sánh với cơ sở dữ liệu trên Genbank (NCBI) bằng công cụ BLAST SEARCH.

- Kết hợp kết quả của 2 phương pháp truyền thống và sinh học phân tử đã xác định được đến loài các chủng VNNS.

Phương pháp xây dựng cây phân loại

Tất cả các trình tự đã được điều chỉnh bằng cách loại bỏ các khoảng trống và dữ liệu bị thiếu trong phần mềm Chromas 2.5 trước khi được sử dụng để phân tích phát sinh loài trong phần mềm MEGA7.

Phương pháp phân tích chỉ số đa dạng

Sự đa dạng của nấm nội sinh đã được phân tích bằng cách sử dụng các chỉ số khác nhau như chỉ số ưu thế Simpson (D), chỉ số đa dạng Simpson (1- D), chỉ số đa dạng Shannon (H'), chỉ số giàu có Margalef (Dmg), chỉ số giàu có Menhinick (Dmn), chỉ số ưu thế Camargo (1/Dmn) và chỉ số đồng đều Pielou (P).

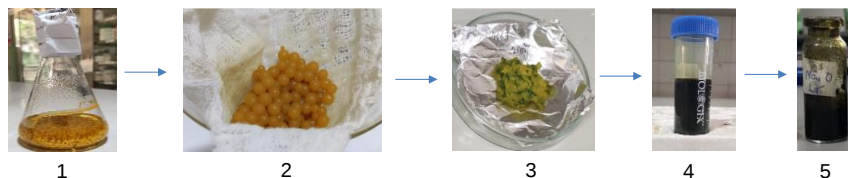
Phương pháp xác định đặc điểm sinh học

Xác định các đặc điểm sinh lý sinh hoá bao gồm pH (từ 5-8), nhiệt độ (22 °C - 37 °C), khả năng sinh các enzyme ngoại bào (cellulase tác động lên cơ chất là cellulose 0,2% và chitinase tác động lên cơ chất là chitin 0,2%). Độ lớn của vòng phân giải Cơ chất làm độ đục của môi trường bị giảm và trở nên trắng đục khi nhuộm bằng dung dịch Lugol.

2.2.4. Phương pháp sàng lọc các chủng nấm nội sinh sinh hoạt chất podophyllotoxin và các dẫn xuất

Phương pháp thu chiết xuất nấm

Các chủng nấm được lắc trong 100 mL môi trường PDA, pH 7 với tốc độ 150 vòng/phút, 25±2 °C trong 5 ngày. Tiến hành lọc thu sinh khối nấm tươi, sấy khô ở 45 °C –60 °C, ngâm trong 100 mL dung môi hữu cơ methanol trong 24 giờ, siêu âm phá vỡ tế bào trong 1 giờ lặp lại 3 lần để thu được chiết xuất sinh khối nấm



1: lên men; 2: lọc thu sinh khối nấm tươi; 3: sinh khối khô; 4: dịch chiết methanol tổng; 5: chiết xuất nấm

Phương pháp xác định hoạt chất podophyllotoxin và dẫn xuất

- *Sắc ký bản mỏng TLC* (Thin layer Chromatography) là một phương pháp phát hiện nhanh sự có mặt của PTOX và các dẫn xuất thông qua phân tích 5 μL chiết xuất nấm trên bản silica gel 0,25 mm và được thực hiện trong hệ dung môi Diclomethan:methanol (9:1, v/v). Chất chuẩn podophyllotoxin (1 mg/ml metanol) được sử dụng như đối chứng dương. Bản silica gel được phun H_2SO_4 10 % để phát hiện PTOX hoặc được soi dưới tia UV bước sóng 254 nm để phát hiện các chất trong chiết xuất

- *Phương pháp phân tích mẫu bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC*, PTOX trong chiết xuất nấm được phân tích trong điều kiện sau:

Hệ thống HPLC Agilent 1200 được trang bị đầu dò detector (DAD) (Agilent Technologies, PaloAlto, CA, Hoa Kỳ).

Detector DAD, bước sóng phát hiện 210 nm.

Cột sắc ký Eclipse XDB-C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm)

Nhiệt độ cột 25 °C.

Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút

Nồng độ mẫu: 10 mg/ml

Nồng độ chất chuẩn (podophyllotoxin trong metanol): 1 mg/ml

Thể tích tiêm mẫu 10 μL .

Pha động ACN- H_2O , chương trình rửa giải gradient dung môi:

Thời gian (phút):	0	10	23	35	60
ACN (% thể tích):	10	20	50	90	90

Việc xác định PTOX và các dẫn xuất được thực hiện bằng cách so sánh thời gian lưu (Rt) và phổ UV với PTOX chuẩn.

2.2.5. Đánh giá khả năng gây độc tế bào của các chiết xuất nấm nội sinh

Phép thử này được thực hiện xác định Hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng sulforhodamine B (SRB).

2.2.6. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất nấm

Khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn bởi chiết xuất nấm được đánh giá theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Theo đó, chiết xuất nấm và các đối chứng được tẩm vào khoanh giấy thấm vô trùng và đặt trên cùng 1 đĩa môi trường PDA đã trải khuẩn trước đó. Đường kính kháng khuẩn được đo bằng mm, thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.7. Phương pháp nghiên cứu hệ gen của các chủng nấm nội sinh có khả năng sinh podophyllotoxin

Giải trình tự genome của các chủng vi nấm trên máy Pacbio Sequel theo hướng dẫn của các bộ kit.

Lắp ráp bộ gen và phân tích chú giải chức năng: Bộ gen được dòng với dữ liệu Kyoto Encyclopedia of Genes và Genomes (KEGG) gene dùng BLAST để thu được thông tin chú giải KO từ KEGG database. Chuỗi gene được dùng bằng BLAST để so sánh với Carbohydrate-Active enzymes database (CAZy) để có được thông tin về nguồn các loài, phân loại chức năng của EC, chuỗi gene và proteins, và cấu trúc protein của CAZymes (Kanehisa et al., 2004), (Lombard et al., 2014).

Xác định các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp PTOX ở *Penicillium herquei* từ cơ sở dữ liệu UniProtKB đã thu thập 11 trình tự protein mục tiêu, bao gồm 10 gen tổng hợp PTOX ở cây *Podophyllum hexandrum* và 1 gen tổng hợp viriditoxin ở nấm (*VdtD*). Sau đó, các trình tự này được sử dụng làm "mồi" để tìm kiếm các gen tương đồng trong bộ gen của nấm *Penicillium herquei* bằng công cụ BLASTP trên NCBI

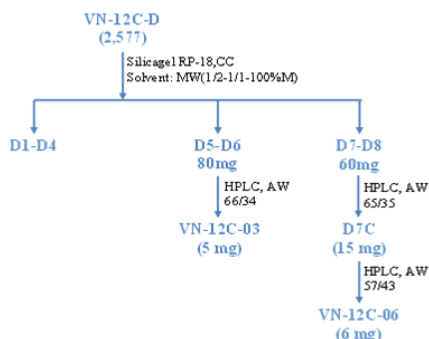
2.2.8. Phương pháp xác định điều kiện lên men thích hợp cho nấm sinh tổng hợp podophyllotoxin và các dẫn xuất

Trong nghiên cứu này, các yếu tố được khảo sát bao gồm: Môi trường, thời gian nhân giống và tỷ lệ giống, pH và nhiệt độ, độ thông khí, nguồn cacbon, nitơ, muối khoáng, ảnh hưởng của tiền chất phenylalanine và chiết xuất rễ cây Bát giác liên theo (Medawar et al., 2003) có sửa đổi bổ sung. Từ đó, Nghiên cứu động thái quá trình lên men sinh tổng hợp Chất/tiền chất podophyllotoxin và các dẫn xuất nhằm xác định được đúng thời điểm kết thúc lên men trước khi vi nấm bị phân hủy làm giảm hàm lượng Chất/tiền chất podophyllotoxin tạo thành.

2.2.9. Phương pháp phân lập chất và xác định cấu trúc hóa học các chất từ chiết xuất nấm lên men.

- Phân lập các chất từ chiết xuất nấm

- Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định bằng sự kết hợp các phương pháp phổ hiện đại như phổ khối (ESI-, HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (^1H -, ^{13}C -NMR, DEPT) và hai chiều (HSQC, HMBC, ^1H - ^1H -COSY).



2.2.10. Phương pháp đánh giá tác dụng chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết đã được xác định bằng cách đo khả năng trung hòa gốc tự do DPPH theo Yuvaraj và cs (2013). Giá trị EC_{50} (Effective Concentration at 50% - nồng độ dịch chiết cho khả năng trung hòa 50% gốc tự do DPPH) sẽ được xác định theo phần mềm TableCurve. Mẫu nào có giá trị EC_{50} càng thấp thì hoạt tính chống oxy hóa càng cao.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu thập mẫu cây Bát giác liên

Nhóm đề tài đã tiến hành thu ngẫu nhiên những mẫu cây khỏe mạnh tại 2 địa điểm: (1) thôn Phìn Sảng, xã Minh Tân, Huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang (23°0'40.14"N 104°53'6.92"E, độ cao 1074m) (2) bản Ngải Thầu, xã Khun Há, huyện Tam Đường, tỉnh Lai Châu (22°13'2.55"N 103°35'0.58"E, độ cao: 1890m).

Việc xác thực mẫu thực vật được phân loại bởi Trịnh Ngọc Bon từ Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam và Nguyễn Thị Thanh Hương, phòng Thực vật học Viện Sinh học. Theo đó, về hình thái cả hai mẫu được phân loại là loài *Dysosma difformis* (Hemsl. & E.H.Wilson) T.H.Wang (Synonym: *Podophyllum tonkinense* Gagnep.). Cây có thân rễ dạng chuỗi gồm nhiều đốt, có cấu trúc thô ráp, phát triển theo phương ngang. Thân khí sinh thường chỉ mang 1 hoặc 2 lá có cuống. Lá có phiến rộng khoảng 20 đến 30 cm, cuống lá gắn gần trung tâm phiến. Phiến lá chia thành 6 đến 8 thùy nông, các thùy có hình tam giác rộng hoặc hình trứng, đầu thùy nhọn và mép lá có răng cưa nhỏ. Các mẫu thu được mọc dưới tán rừng nguyên sinh.



Hà Giang



Lai Châu



Hình 3.1. Thân và rễ cây Bát giác liên, mẫu thu tại Hà Giang và Lai Châu

3.2. Phân lập nấm nội sinh

Qua các công đoạn khử trùng bề mặt, nấm nội sinh được phân lập từ các mẫu rễ (hoặc củ), thân, lá cây BGL. Từ hai mẫu vật liệu *Dysosma difformis* được thu từ Hà Giang và Lai Châu, nhóm nghiên cứu đã phân lập được 53 chủng vi nấm nội sinh trên môi trường PDA, ở 25 °C. Trong đó 28 chủng được phân lập từ Hà Giang, 25 chủng từ mẫu Lai Châu. Ở Hà Giang,

phần lớn nấm nội sinh được phân lập từ rễ (hoặc củ) với 82% (23 chủng), tiếp theo là lá với gần 11% (3 chủng) và thân 7% (2 chủng). Ngược lại, ở Lai



Châu, chỉ có bốn chủng được tìm thấy ở rễ (hoặc củ) (14%) trong khi số liệu ở lá và thân lần lượt là mười một và mười (44% và 40%). Với vi nấm nội sinh được phân lập từ củ ký hiệu (C), vi nấm nội sinh được phân lập từ rễ ký hiệu (R). Để thuận tiện cho việc nhận biết và quản lý, nhóm quy ước chuyển ký hiệu (C) thành ký hiệu (R) và ký hiệu (R) thành ký hiệu (.1R), ví dụ: HGN3C → HGN3R; HGN3R → HGN3.1R

Hình 3.2. Khử trùng bề mặt mẫu trước khi phân lập



Hình 3.3. Phân lập vi nấm nội sinh

3.3. Xây dựng cây phát sinh loài vi sinh vật

Từ 53 chủng VNNS phân lập được, quan sát nhận dạng chủng nấm qua màu sắc, hình dạng, kích thước, dạng mặt, dạng mép khuẩn lạc, màu sắc hệ sợi, màu sắc mặt dưới, giọt tiết, sắc tố khuếch tán ra môi trường kết hợp phân tích trình tự các mẫu nấm đã xác định được 53 chủng VNNS thuộc về 27 chi. Tần suất xâm chiếm của mỗi loại nấm phân lập đã được tính toán, cho thấy *Fusarium* là chi phổ biến nhất (11,11%), tiếp theo là *Trametes* (9,26%) và *Penicillium* (7,41%). Hai cây phát sinh loài mô tả mối quan hệ phân loại giữa các loại nấm nội sinh tại hai địa điểm thu thập được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7.

Ở Hà Giang, các loại nấm nội sinh được xây dựng thành hai cụm, trong đó cụm 1 bao gồm các chi thuộc ngành nấm *Ascomycota*, và cụm 2 bao gồm các chi thuộc ngành nấm *Mucoromycota* và *Basidiomycota*. Trong khi đó, hầu hết các chi thuộc ngành nấm *Ascomycota* nằm trong cụm 1 với *Mucor*, các chi thuộc ngành nấm *Basidiomycota* nằm trong cụm 2. Duy nhất LCN12.1L được xác định là *Penicillium herquei* 50SG10-một loài nấm thuộc ngành *Ascomycota* nằm trong cụm 3. Sự khác biệt trong cấu trúc của cây phát sinh loài giữa hai địa điểm thu thập cho thấy các môi trường sống khác nhau có thể ảnh hưởng đến sự tiến hóa di truyền và đa dạng của các loài VSV nội sinh sống trong *D. difformis*.

3.4. Phân tích chỉ số đa dạng VSV

Sự đa dạng về các loài VNNS trong các mô thực vật của *D. difformis* được phân tích cụ thể hơn thông qua bảy chỉ số đa dạng khác nhau. Cụ thể, chỉ số Shannon cho thấy tính đa dạng cao nhất ở rễ ($H' = 2,673$), tiếp theo là thân ($H' = 2,162$) và lá ($H' = 2,054$). Tương tự như vậy, tính đa dạng loài cao nhất ở rễ ($Dmg = 4,551$; $Dmn = 3,079$) và thân ($Dmg = 4,024$; $Dmn = 3,175$) và thấp nhất ở lá ($Dmg = 3,41$; $Dmn = 2,405$). Tuy nhiên, chỉ số đa dạng Simpson cho thấy quần thể nấm nội sinh có nhiều nhất ở lá ($1-D = 0,911$), tiếp theo là thân ($1-D = 0,897$) và rễ ($1-D = 0,867$) (Bảng 3.4). Cuối cùng, chỉ số tương tự là cao nhất ($S = 0,538$) đối với so sánh lá so với rễ, điều này cho thấy số lượng các loài nấm nội sinh được phân bố ở lá và rễ cao hơn so với lá và thân (0,286) hoặc thân và rễ (0,148) (Bảng 3.5). Ngoài ra, chỉ số Sorensen là 0,615 cho thấy mức độ tương đồng trung bình về thành phần loài giữa hai địa điểm, Hà Giang và Lai Châu (Bảng 3.6). Đây là báo cáo đầu tiên về sự đa dạng của nấm nội sinh được phân lập từ *D. Difformis*, mở ra một hướng đi tiềm năng để sàng lọc các chủng nấm nội sinh có khả năng sản xuất các hợp chất thứ cấp quan trọng.

3.5. Sàng lọc các chủng vi nấm có khả năng sinh hoạt chất podophyllotoxin và dẫn xuất

3.5.1. Đánh giá khả năng gây độc tế bào của các chiết xuất nấm nội sinh

Chiết xuất nấm được đánh giá khả năng gây độc tế bào, từ đó tìm ra các chủng tiềm năng để nghiên cứu sâu hơn về các hợp chất hoạt tính sinh học có trong chiết xuất nấm, cũng như cơ chế hoạt động của chúng. Theo đó, giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) càng thấp, chiết xuất nấm càng có độc tính cao, tức là cần nồng độ thấp hơn để tiêu diệt tế bào ung thư.

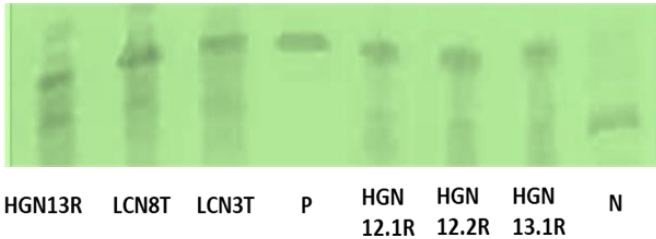
Kết quả hoạt tính gây độc tế bào trong ống nghiệm (in vitro) của chiết xuất nấm đã được nghiên cứu trên ba dòng tế bào ung thư (SK-LU1, HL 60 và Hep2) so với chiết xuất *D. difformis* và các đối chứng dương như podophyllotoxin và ellipticine. Kết quả cho thấy hai mươi tám chiết xuất thể hiện hoạt động gây độc tế bào trên tế bào SK-LU-1 với IC_{50} từ 0,036 đến 80,23 $\mu\text{g/ml}$ (Bảng 3.7). Các chiết xuất này đã được nghiên cứu thêm về hoạt động chống ung thư đối với HL-60 (Bệnh bạch cầu cấp tính ở người) và HepG2 (ung thư biểu mô tế bào gan ở người). Chúng tôi thu được sáu chiết xuất nấm thuộc các chi *Penicillium* (hai chủng), *Trametes*, *Purpureocillium*, *Aspergillus*, và *Ganoderma* cho thấy hoạt động gây độc tế bào rất mạnh đối với HL-60 và HepG2 với IC_{50} từ 0,073 đến 0,31 $\mu\text{g/ml}$ và từ 1,60 đến 10,84 $\mu\text{g/ml}$, tương ứng (Bảng 3.8) trong khi những chiết xuất khác không cho thấy hoạt tính gây độc tế bào (dữ liệu không được hiển thị).

3.5.2. Phát hiện và sàng lọc chủng HGN12.1R sinh podophyllotoxin và các dẫn xuất bằng phương pháp TLC (sắc ký bản mỏng) và HPLC (sắc ký lỏng hiệu suất cao)

Trên cơ sở xác định được 06 chiết xuất nấm là HGN13R, LCN8T, LCN3T, HGN12.1R, HGN12.2R và HGN13.1R được sàng lọc có hoạt tính gây độc tế bào rất mạnh trên cả 03 dòng tế bào ung thư, nhóm nghiên cứu tiếp tục phân tích nhanh bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Kết quả chỉ ra cả 6 chủng đều có sự hiện diện của PTOX (Hình 3.5).

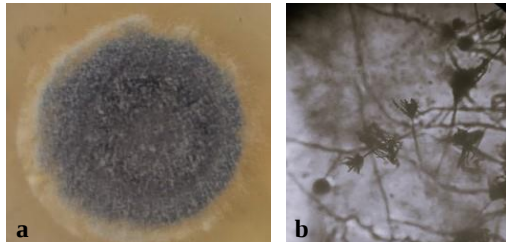
Phân tích HPLC được mô tả là công cụ chính xác cao để xác định PTOX trong chiết xuất thực vật và chiết xuất nấm. Trong cả 2 lần phân tích HPLC cho thấy 06 chiết xuất nấm đều có thời gian lưu (R_t) tương tự chất chuẩn PTOX. Trong đó HGN12.1R là một trong những ứng viên tiềm năng

để khai thác khả năng sản xuất các hợp chất có nguồn gốc từ vật chủ do có hoạt tính gây độc tế bào mạnh nhất trên cả ba dòng tế bào ung thư. Phương pháp phân tích TLC và HPLC cho thấy HGN12.1R có phổ UV trùng khớp với phổ UV của PTOX chuẩn, mặc dù chưa rõ ràng, điều này có thể là do sự phức tạp của các dẫn xuất khác ngoài PTOX, đó sẽ là cơ hội tìm ra nhiều hợp chất thứ cấp quan trọng mang lại tiềm năng ứng dụng cao. Bên cạnh đó, trong nghiên cứu trước đây *Penicillium* đã được chứng minh là nguồn dự trữ PTOX cũng như một số lượng lớn các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có cấu trúc mới và hoạt tính sinh học được phát hiện từ các chủng thuộc chi *Penicillium*.



Hình 3.5. Phân tích TLC của chiết xuất nấm nội sinh podophyllotoxin được sử dụng làm chuẩn, đối chứng dương (P); môi trường không có nấm được sử dụng làm đối chứng âm (N)

3.5.3. Đặc điểm sinh học của chủng *HGN12. 1R*



Khuẩn lạc màu xanh rêu, tròn, đường kính 6-8 mm. Bề mặt sợi khuẩn tì khí sinh mịn như bụi phấn, tâm hơi lõm, viền liền trắng đục, không tiết sắc tố hoà tan (a). Đặc điểm hình thái vi nấm (b) có sợi phân nhánh, cuống sinh bào tử thể bình. Bề mặt cuống ráp, có nhiều gai mịn, đều. Bào tử lúc non hình cầu, xé rách tạo dạng chuỗi bào tử dài khi già. Nhận dạng sơ bộ chủng

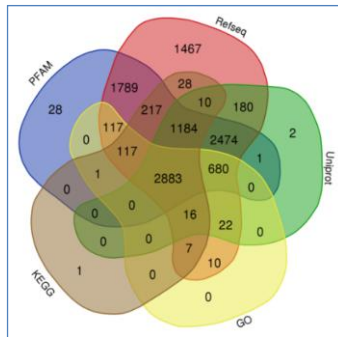
vi nấm HGN12.1R qua màu sắc, hình thái khuẩn lạc cùng đặc điểm vi hình thái theo các khóa phân loại thuộc chi nấm *Penicillium*. Kết hợp phương pháp sinh học phân tử đã đưa đến kết quả định danh HGN12.1R là *Penicillium herquei* HGN12.1R.

Chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R sinh trưởng thích hợp nhất ở 25 °C, pH 6-7. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, kết quả cho thấy chủng vi nấm đối kháng tốt các chủng vi khuẩn Gram dương *Staphylococcus* sp., *Bacillus* 7TM11, *Bacillus* 2TM6, *Enterobacter* 14RM7-1, dường như không có hoặc rất ít tác dụng với Gram âm *Escherichia coli* DH5. Phát hiện này phù hợp với một số nghiên cứu trước đây khi mà nấm nội sinh loài *Dysosma* có cả đặc tính chống ung thư và kháng khuẩn. Khảo sát hoạt tính enzyme ngoại bào của chủng *P. herquei* HGN12.1R cho thấy khả năng phân giải chitinase, cellulase. Vòng phân giải trung bình đối với chitinase là $6,3 \pm 0,08$ mm và đối với cellulase là $8,5 \pm 0,05$ mm

3.5.4. Kết quả nghiên cứu đặc điểm hệ gen *Penicillium herquei* HGN12.1R nội sinh *Dysosma difformis* và dự đoán con đường chuyển hoá

Trình tự bộ gen của *Penicillium herquei* HGN12.1R đã được lắp ráp, chú thích và phân tích bằng một số công cụ tin sinh học. Trình tự hệ gen của chủng HGN12.1R được giải toàn bộ và đọc trình tự đoạn dài trên hệ máy PacBio Sequel. Sau khi tập hợp dữ liệu giải trình tự de novo, chúng tôi đã xác định được toàn bộ bộ gen của *Penicillium herquei* HGN12.1R với kích thước xấp xỉ 34,96 bp với 9 đoạn contig, trong đó có 7 đoạn lớn hơn 1000 bp. Hệ gen này có đầy đủ các gen cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp protein và có thể được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo về sinh học phân tử và ứng dụng công nghệ sinh học.

Kết quả chú giải hệ gen nhằm xác định vị trí và chức năng của các gen và các yếu tố di truyền khác trong hệ gen. Cung cấp thông tin chi tiết về các gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp podophyllotoxin. Biểu đồ Venn (Hình 3.10) biểu diễn sự giao nhau giữa các tập hợp gen được chú giải khi chúng tôi đã sử dụng OmicsBox là một phần mềm tin sinh học toàn diện với 5 cơ sở dữ liệu RefSeq Nonredundant (Nr), Uniprot, Gene Ontology, Pfam và KEGG.

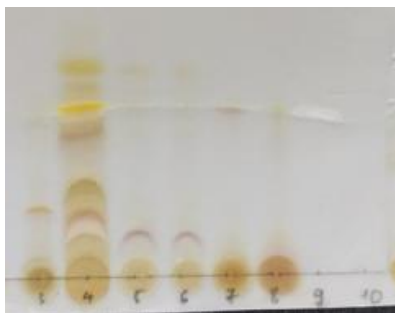


Hình 3.10. Biểu đồ Venn chú giải gen chức năng

Để xác định các gen chính liên quan đến con đường tổng hợp podophyllotoxin ở *Penicillium herquei* HGN12.1R, chúng tôi đã sàng lọc và tìm kiếm các gen ứng viên trong hệ gen bằng cách sử dụng tìm kiếm BLASTP (với giới hạn giá trị E là $1e-05$) với 10 gen trong thực vật và 01 gen từ nấm (gen VdtD) sử dụng làm gen tham chiếu. Lựa chọn các lần truy cập BLAST có giá trị ngưỡng $E < 1e-10$ và kết quả được xác minh bằng cơ sở dữ liệu Pfam, kết quả phát hiện 517 gen mã hoá 10 enzyme tương tự như những loại tìm thấy ở thực vật từ hệ gen HGN12.1R, bao gồm 91 SDH, 79 CYP71BE54, 73 CYP82D61, 70 CYP719A23, 54 CYP71CU1, 48 VdtD, 22 OMT3, 19 OMT1, 4 2-ODD và 1 PLR. Trong số đó, VdtD một gen duy nhất được tìm thấy ở nấm, có chức năng tương tự như gen dirigent (DIR) ở thực vật.

3.5.5. Xác định điều kiện thích hợp cho sản sinh podophyllotoxin và các dẫn xuất từ *Penicillium herquei* HGN12.1R bằng công nghệ lên men

Để xác định điều kiện thích hợp cho sản sinh podophyllotoxin và các dẫn xuất, chúng tôi đã khảo sát các yếu tố lên men và thu được các kết quả như sau: Lựa chọn được môi trường PDA với nguồn đường dextrose đạt hàm lượng SKK $14,09 \pm 0,06$ g/l cao nhất trong 06 môi trường khảo sát, với kết quả này chúng tôi đã kiểm chứng lại bằng phân tích TLC và cho thấy một kết quả tương tự khi phát hiện được đa dạng band khi nuôi cấy *Penicillium herquei* HGN12.1R trên PDA (Hình 3.12).



Hình 3.12. TLC xác định sự có mặt của Chất/tiền chất ở các môi trường khác nhau (đường số 3: Czapek-Dox, đường số 4: PDA, đường số 5: Zhao, đường số 6: YMA, đường số 7: PGA, đường số 8: Sabouraud broth, đường số 9: Chất chuẩn PTOX, đường số 10: ĐC-)

Penicillium herquei HGN12.1R thích hợp ở dải pH khoảng 5–7 và ở 25° trên môi trường PDA. Nghiên cứu thời gian nhân giống và tỷ lệ giống gốc cấy vào môi trường là những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng của giống, tới mật độ và kích thước của nấm. Khoảng thời gian 48-60 giờ nấm phát triển rất nhanh, khỏe, mật độ nấm cao và đây là thời điểm thích hợp để chuyển nấm sang môi trường lên men tạo điều kiện tiếp tục phát triển cho sinh tổng hợp PTOX tốt hơn. Kết hợp tỷ lệ giống cấy khoảng 5% cho kích thước hạt đồng đều, không kết vón, dòng chảy lưu thông tăng khả năng hấp thu dinh dưỡng và trao đổi oxy.

Khảo sát tốc độ lắc và thể tích dịch nuôi là các điều kiện chính cung cấp oxy hòa tan tốt hơn vào môi trường và sợi nấm được đảo trộn do đó có sự tiếp xúc đều nhau với môi trường từ trên xuống dưới. Nghiên cứu chỉ ra

chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R thích nghi với số vòng lắc 150 vòng/phút và thể tích môi trường đạt 20% thể tích bình.

Nguồn cacbon thích hợp đóng một vai trò thiết yếu trong quá trình tăng sinh khối sợi nấm. Cacbon là thành phần quan trọng tham gia vào cấu trúc của các monosaccharides, disaccharides và polysaccharides, nguồn cung cấp năng lượng chính cho sinh trưởng của tế bào. Nghiên cứu đối với *Penicillium herquei* HGN12.1R cho thấy dextrose là nguồn đường thích hợp nhất. Trong khi đó, nitơ cung cấp nguyên liệu cho tế bào tổng hợp các amino acid, protein và chitin của thành tế bào sợi nấm. Nấm có thể sử dụng nhiều nguồn nitơ hữu cơ và nitơ vô cơ khác nhau. Trong nghiên cứu này HGN12.1R thích hợp với nguồn nitơ hữu cơ và có thể thay thế cao nấm men bằng 1 trong 3 loại cao thịt, cao thịt bò và pepton đều cho kết quả tốt.

Muối khoáng đóng vai trò duy trì độ pH và áp suất thẩm thấu thích hợp cho từng loại vi sinh vật, chiếm khoảng 2 – 5 % khối lượng khô của tế bào, khả năng hấp thụ chất khoáng của nấm phụ thuộc vào chủng nấm, giai đoạn phát triển của nấm. Nấm *Penicillium herquei* HGN12.1R thích nghi với nguồn khoáng $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ cho hàm lượng sinh khối cao hơn K_2HPO_4 và KCl.

Quá trình lên men nấm nội sinh đã được sử dụng trong quá trình sản xuất các chất chuyển hóa tự nhiên, mang lại những lợi thế rõ ràng như môi trường đơn giản, chi phí thấp, tiết kiệm thời gian. Tuy nhiên, năng suất thấp. Một số chiến lược đã được tiến hành để cải thiện năng suất của các chất chuyển hóa mong muốn bao gồm các kỹ thuật biến đổi gen, tối ưu hóa môi trường nuôi cấy và thêm elicitor. Nghiên cứu của chúng tôi đã từng bước hoàn thiện quá trình lên men của chủng vi nấm nội sinh *Penicillium herquei* HGN12.1R, sử dụng chiết xuất thực vật và phenylalanine để tăng cường khả năng sản sinh PTOX và các dẫn xuất. Kết quả cho thấy, cả 2 chất đều có tác dụng tốt lên khả năng sinh trưởng trong lên men của chủng nấm nghiên cứu và phân tích TLC cũng cho kết quả tương đồng. Tuy nhiên, chiết xuất thực vật không phải lúc nào cũng sẵn, hơn nữa loài thực vật này hiện đang nằm

trong sách đỏ đang cần được bảo tồn. Vì vậy việc bổ sung tiền chất kích thích tăng trưởng và sinh tổng hợp PTOX ưu tiên với lựa chọn Phenylalanine.

Trên cơ sở có đầy đủ các yếu tố lên men thích hợp, động thái lên men của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R được tiến hành để xác định thời điểm thu hồi lên men. Các kết quả kiểm tra cho thấy ở khoảng 168h, hàm lượng PTOX và các dẫn xuất cũng như lượng sinh khối tạo ra là cao, ổn định. Từ đó, nhóm nghiên cứu thu hồi lên men, tách chiết, tinh sạch và xác định cấu trúc các hợp chất từ *Penicillium herquei* HGN12.1R. Sau quá trình chiết phân lớp lần lượt với các dung môi hữu cơ n-hexane, ethyl acetate và methylene chloride chúng tôi thu được các phân đoạn khác nhau. Các phân đoạn có band tương tự nhau trên bản TLC được gộp chung chạy HPLC (Agilent 1260 Infinity II) và thu được 02 hợp chất VN12C - 03 (5 mg) và VN-12C - 06 (6 mg)

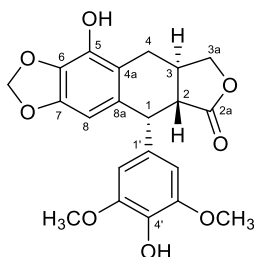
Phản dịch nước được tiến hành sắc ký cột diaion HP-20 thu được 3 phần kí hiệu là W1, W2, W3. Tuy nhiên, sử dụng các phương pháp sắc ký kết hợp như TLC, CC, HPLC đối với các phân đoạn dịch nước cũng như các phân đoạn khác không thu được hợp chất sạch.

3.5.6. Xác định cấu trúc phân tử của 2 hợp chất VN12C - 03 và VN-12C - 06

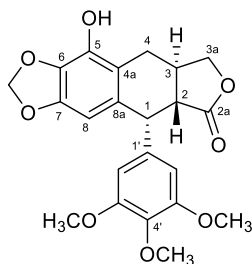
Hợp chất VN-12C-03 thu được có dạng bột màu trắng. Qua phân tích phổ NMR ^1H , phổ cộng hưởng từ ^{13}C NMR và phổ 2 chiều HSQC cho thấy VN-12C-03 có khung lignan – một dạng phenolic khá phổ biến ở thực vật. Khi so sánh số liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của hợp chất VN-12C-03 với hợp chất lignan đã biết là α -Peltatin cho kết quả hoàn toàn tương đồng, gợi ý sự đồng nhất về cấu trúc của cả 2 hợp chất. So sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất VN-12C-03 đã được xác định là α -Peltatin, với công thức phân tử $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_8$, khối lượng phân tử 400 g/mol và được xem là một dẫn xuất của podophyllotoxin.

Hợp chất VN-12C-06 thu được có dạng bột màu trắng. Các tín hiệu phổ NMR ^1H , phổ cộng hưởng từ ^{13}C NMR và phổ HSQC cho gợi ý hợp chất

VN-12C-06 có dạng khung lignan, tương tự với hợp chất VN-12C-03. Các kết quả phân tích phổ và so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất VN-12C-06 đã được xác định là β -Peltatin, với công thức phân tử $C_{22}H_{22}O_8$, khối lượng phân tử 414 g/mol. β -Peltatin cũng được xem là một dẫn xuất của podophyllotoxin



Hình 3.29. Cấu trúc phân tử của hợp chất VN12C.03



Hình 3.30. Cấu trúc hóa học của hợp chất VN-12C-06

3.5.7. Đánh giá hoạt tính sinh học của hai hợp chất VN12C - 03 và VN-12C - 06

Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp loại gốc tự do DPPH

Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của mẫu thử thể hiện qua việc làm giảm màu DPPH, được xác định bằng phép đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 517 nm trên máy đọc ELISA. Nhìn chung, đối với tất cả các phân đoạn (VN12C.03, VN12C.06) và Resveratrol, phần trăm ức chế gốc tự do DPPH tăng lên khi nồng độ tăng lên. Điều này là phù hợp với cơ chế hoạt động của các chất chống oxy hóa, khi nồng độ cao hơn sẽ có nhiều phân tử hơn để trung hòa gốc tự do.

Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào

Kết quả gây độc với dòng tế bào SK-LU-1: Ung thư phổi ở người (human lung carcinoma). Phần trăm ức chế tế bào trung bình (TB) và sai số

tương ứng ở các nồng độ khác nhau (20; 4; 0,8; 0,16; 0,032 $\mu\text{g/ml}$) cho từng mẫu nghiên cứu. Kết quả cho thấy các mẫu nghiên cứu đã thể hiện hoạt tính gây độc tế bào SK-LU-1 với giá trị IC_{50} từ 0,04 -18,61 $\mu\text{g/mL}$. Chất đối chứng dương Ellipticine hoạt động ổn định trong thí nghiệm. Nhìn chung, phần trăm ức chế có xu hướng giảm khi nồng độ giảm.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã phân lập được 53 chủng vi nấm nội sinh từ 2 mẫu vật liệu *Dyosma difformis* được thu thập từ Hà Giang và Lai Châu. Trong đó đã tuyển chọn được 06 chủng có hoạt động gây độc tế bào rất mạnh đối với 3 dòng tế bào SK-LU-1 (Ung thư phổi ở người), HL-60 (Bệnh bạch cầu cấp tính ở người) và HepG2 (Ung thư biểu mô tế bào gan ở người). Kết hợp các phương pháp phân tích TLC, HPLC xác định khả năng tổng hợp chất/dẫn xuất PTOX đã lựa chọn được chủng HGN12.1R tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo.
2. Đã giải trình tự và lắp ráp hệ gen chủng vi nấm *Penicillium herquei* HGN12.1R bằng công nghệ PacBio. Bộ gen chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R có kích thước khoảng 35,0 Mb tương ứng với độ hoàn thiện 98,3%. Đã chú giải hệ gen và dự đoán các nhóm gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp podophyllotoxin và các dẫn xuất.
3. Đã xác định điều kiện thích hợp cho sản sinh podophyllotoxin và các dẫn xuất của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R bằng công nghệ lên men ở quy mô phòng thí nghiệm.
4. Đã tách chiết, tinh sạch và xác định được cấu trúc của 02 hợp chất α -peltatin và β -peltatin là dẫn xuất của podophyllotoxin. Cả hai hợp chất đều thể hiện hoạt tính chống oxy hoá và hoạt tính gây độc tế bào.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu tối ưu điều kiện lên men và các nghiên cứu sâu hơn để tăng hiệu suất sinh tổng hợp PTOX và các dẫn xuất của chủng *Penicillium herquei* HGN12.1R.
- Đánh giá chức năng các gen dự đoán con đường sinh tổng hợp PTOX và các dẫn xuất của chủng nấm nghiên cứu.
- Nghiên cứu thử nghiệm *in vivo* hoạt tính của VN12C.03 và VN12C.06.
- Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của VN12C.06 trên nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau để xác định tính chọn lọc và phổ hoạt tính của nó

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Luận án là nghiên cứu mới có hệ thống về phân lập, định danh và đánh giá khả năng sinh hoạt chất podophyllotoxin và các dẫn xuất của các chủng vi nấm nội sinh phân lập từ cây dược liệu Bát Giác Liên. Đề tài đóng góp một phần quan trọng trong việc tạo ra nguồn nguyên liệu thay thế nguồn nguyên liệu tự nhiên đang dần cạn kiệt hiện nay mang lại hiệu quả kinh tế trong việc sản xuất podophyllotoxin cho ngành công nghiệp dược, tập trung vào các điểm chính sau:

- Đã phân lập được 6 chủng vi nấm nội sinh từ các mẫu cây Bát Giác Liên ở Việt Nam có khả năng gây độc tế bào ung thư mạnh. Đồng thời đã đánh giá được sự đa dạng về vi nấm nội sinh ở cây Bát Giác Liên bản địa.
- Tuyển chọn được chủng vi nấm nội sinh ở cây Bát Giác Liên *P. herquei* HGN12.1R có khả năng tổng hợp PTOX và giải trình tự hệ gen bằng công nghệ PacBio, chú giải gen và dự đoán con đường sinh tổng hợp podophyllotoxin và các dẫn xuất.
- Tách chiết, tinh sạch và xác định được cấu trúc của 02 hợp chất α -peltatin và β -peltatin là dẫn xuất của podophyllotoxin từ chủng vi nấm nội sinh *P. herquei* HGN12.1R và chứng minh được hoạt tính của chúng.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

▪ Công bố khoa học:

1. **Hoa Thi Tran**, Giang Thu Nguyen, Hong Ha Thi Nguyen, Huyen Thi Tran, Quang Hong Tran, Quang Ho Tran, Ngoc Thi Ninh, Phat Tien Do, Ha Hoang Chu & Ngoc Bich Pham (2022). “*Isolation and Cytotoxic Potency of Endophytic Fungi Associated with Dysosma difformis, a Study for the Novel Resources of Podophyllotoxin*”. Mycobiology, 50(5):389-398. DOI: 10.1080/12298093.2022.2126166.

2. **Tran Thi Hoa**, Nguyen Thu Giang, Nguyen Thi Hong Ha, Tran Thi Huyen, Do Tien Phat, Chu Hoang Ha, Pham Bich Ngoc, Tran Ho Quang (2023). “*Diversity of endophytic fungi from medicinal plants Dysosma difformis (Hemsl & E.H. Wilson) T.H. Wang collected in Ha Giang and Lai Chau*”. Vietnam Journal of Biotechnology, 21(2): 365-373. DOI:10.15625/1811-4989/18344.

3. **Trần Thị Hoa**, Nguyễn Thị Hồng Hà, Nguyễn Thu Giang, Trần Hồ Quang, Đỗ Tiến Phát, Chu Hoàng Hà, Phạm Bích Ngọc (2023). “*Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất vi nấm nội sinh HGN12.1R phân lập từ cây dược liệu bất giác liên (Dysosma difformis (Hemsl & E.H. Wilson) T.H. Wang)*”. Báo cáo khoa học - Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2023. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ: 540-544.

4. Duong Huy Nguyen, Quang Ho Tran, Lam Tung Le, Ha Hong Thi Nguyen, **Hoa Thi Tran**, Thuy Phuong Do, Anh Ngoc Ho, Quang Hong Tran, Hien Thi Nguyen Thu, Van Ngoc Bui, Hoang Ha Chu, Ngoc Bich Pham (2024). “*Genomic characterization and identification of candidate genes for putative podophyllotoxin biosynthesis pathway in Penicillium herquei HGN12.1C*”, Microb Biotechnol, 17(9):e70007. DOI: 10.1111/1751-7915.70007.

▪ Giải pháp hữu ích:

5. Bằng độc quyền giải pháp hữu ích “*Chủng vi nấm Penicillium herquei HGN12.1C thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất Podophyllotoxin*”. Nhóm tác giả: **Trần Thị Hoa**, Nguyễn Thị Hồng Hà, Trần Thị Huyền, Trần Hồ Quang, Đỗ Tiến Phát, Phạm Bích Ngọc. Số đơn: 2-2021-00393. Số bằng: 3352 theo Quyết định số 66238/QĐ-SHTT ngày 05 tháng 09 năm 2023 của Cục sở hữu trí tuệ.