

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



BÙI BÌNH AN

**NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP VÀ
TINH SẠCH CHẤT ỨC CHẾ ALPHA-GLUCOSIDASE TỪ CHỦNG
STREPTOMYCES SP. PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI - 2026

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

-----oOo-----





BÙI BÌNH AN

**NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP VÀ
TINH SẠCH CHẤT ỨC CHẾ ALPHA-GLUCOSIDASE TỪ CHỦNG
STREPTOMYCES SP. PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. ĐỖ THỊ TUYÊN 
2. TS. NGUYỄN THỊ TRUNG 

HÀ NỘI - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan rằng tất cả các kết quả trong luận văn này đều do tôi thực hiện. Toàn bộ nội dung luận văn chưa từng được nộp để lấy bằng cấp tại bất kỳ cơ sở đào tạo nào khác. Theo hiểu biết của tôi, luận văn này không chứa bất kỳ tài liệu nào đã được xuất bản trước đó hoặc viết bởi người khác, trừ những trường hợp được trích dẫn.

Hà Nội, ngày 16 tháng 06 năm 2026

Học viên



Bùi Bình An

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin trân trọng bày tỏ lòng biết ơn tới Ban Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ cùng Ban lãnh đạo Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, và toàn thể các thầy cô đào tạo ngành Sinh học thực nghiệm đã tạo điều kiện và cung cấp cho tôi những kiến thức quý giá xuyên suốt quá trình nghiên cứu.

Quan trọng hơn cả, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng, biết ơn và trân trọng sâu sắc đến PGS.TS. Đỗ Thị Tuyên, Trưởng phòng Công nghệ sinh học Enzyme, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về sự hướng dẫn học tập, định hướng nghiên cứu và những lời phê bình mang tính xây dựng cùng sự động viên không ngừng. Cô cũng đã giúp đỡ tôi rất nhiều trong quá trình viết luận văn và tạo điều kiện cho tôi thực hiện luận văn tại phòng Công nghệ sinh học Enzyme.

Ngoài ra, tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô và các nghiên cứu sinh, sinh viên thực tập tại phòng Công nghệ sinh học Enzyme, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vì sự giúp đỡ tận tình trong suốt quá trình thí nghiệm và viết luận văn này.

Luận văn này được thực hiện thông qua kinh phí của Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (Nafosted): “Sàng lọc, tinh sạch, xác định cấu trúc và cơ chế kích hoạt AMPK trong tế bào mô mỡ 3T3-L1 của một số hoạt chất thứ cấp mới ức chế α -glucosidase có nguồn gốc từ *Aspergillus*, *Oceanimonas* và *Streptomyces* phân lập ở Việt Nam” (Mã số: 106.02-2023.47). Giai đoạn 2024-2026.

Cuối cùng nhưng không kém phần quan trọng, tôi muốn bày tỏ lòng biết ơn đến cha mẹ, gia đình và bạn bè thân yêu vì sự ủng hộ, lời chúc phúc, nguồn cảm hứng và sự hy sinh không ngừng nghỉ trong suốt sự nghiệp học tập của tôi.

Hà Nội, ngày 16 tháng 06 năm 2026

Học viên

Bùi Bình An

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC BẢNG.....	vii
DANH MỤC HÌNH.....	viii
DANH MỤC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	x
TÓM TẮT	xi
CHƯƠNG 1. GIỚI THIỆU	1
1.1. Mở đầu.....	1
1.2. Mục tiêu.....	2
1.2.1. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
1.2.2. Nội dung.....	2
CHƯƠNG 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
2.1. Chất ức chế α -glucosidase.....	3
2.1.1. Khái niệm	3
2.1.2. Cơ chế hoạt động.....	3
2.1.3. Phân loại.....	4
2.1.4. Ý nghĩa trong điều trị đái tháo đường.....	5
2.2. Giới thiệu về α -glucosidase.....	5
2.2.1. Cấu trúc của α -glucosidase	6
2.2.2. Chức năng của α -glucosidase.....	7
2.2.3. Cơ chế hoạt động của α -glucosidase.....	7
2.2.4. Vai trò của α -glucosidase trong điều trị đái tháo đường.....	8

2.3. Chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces</i> sp.....	8
2.3.1. Giới thiệu về <i>Streptomyces</i> sp.....	8
2.3.2. Cơ chế sinh tổng hợp chất ức chế α -glucosidase ở <i>Streptomyces</i> sp.....	9
2.4. Đái tháo đường.....	10
2.4.1. Khái niệm.....	10
2.4.2. Phân loại.....	10
2.4.3. Đái tháo đường type II.....	11
2.4.4. Các biến chứng của bệnh đái tháo đường.....	12
2.4.5. Điều trị đái tháo đường.....	13
2.5. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước.....	15
2.5.1. Trên thế giới.....	15
2.5.2. Tại Việt Nam.....	16
CHƯƠNG 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP.....	18
3.1. Vật liệu.....	18
3.1.1. Chủng vi sinh vật.....	18
3.1.2. Hóa chất.....	18
3.1.3. Thiết bị & vật tư.....	18
3.2. Địa điểm và thời gian thực hiện đề tài.....	18
3.2.1. Địa điểm.....	18
3.2.2. Thời gian nghiên cứu.....	18
3.3. Phương pháp nghiên cứu.....	19
3.3.1. Phân loại chủng.....	20
3.3.2. Nuôi cấy và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp chất ức chế α -glucosidase.....	20
3.3.3. Lên men chủng xạ khuẩn sinh tổng hợp AGIs.....	20

3.3.4. Xác định hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase.....	20
3.3.5. Phương pháp nghiên cứu tối ưu khả năng sinh tổng hợp chất AGIs bằng phương pháp đáp ứng bề mặt	21
3.3.6. Phương pháp nghiên cứu lựa chọn các dung môi tách chiết.....	24
3.3.7. Phương pháp sắc ký lớp mỏng.....	24
3.3.8. Tách chiết và tinh sạch hoạt chất ức chế α -glucosidase.....	25
3.3.9. Xác định giá trị IC_{50}	28
3.3.10. Xử lý số liệu	28
CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	29
4.1. Tuyển chọn chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces</i> sp. có khả năng sinh tổng hợp chất ức chế α -glucosidase	29
4.1.1. Tuyển chọn chủng xạ khuẩn có hoạt tính ức chế α -glucosidase.....	29
4.1.2. Đặc điểm hình thái	30
4.1.3. Phân tích trình tự 16S rRNA từ chủng <i>Streptomyces</i> sp. S12.2	31
4.1.4. Kết quả lên men chủng <i>Streptomyces</i> sp. S12.2	33
4.2. Tối ưu hóa thành phần môi trường nuôi cấy theo RSM	35
4.3. Tinh sạch hoạt chất ức chế α -glucosidase từ chủng <i>Streptomyces</i> sp. S12.2 ..	39
4.3.1. Lựa chọn các dung môi chiết	39
4.3.2. Tinh sạch hoạt chất ức chế α -glucosidase.....	41
4.4.1. Giá trị IC_{50} của dịch chiết bởi isopropanol	49
4.4.2. Giá trị IC_{50} của sản phẩm tinh sạch cuối	50
CHƯƠNG 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	53
5.1. Kết luận	53
5.2. Kiến nghị.....	53
DANH MỤC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU	54

TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	55
PHỤ LỤC.....	60

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Nồng độ ba yếu tố dùng trong RSM-CCD.....	22
Bảng 3.2. Kế hoạch thực nghiệm theo RSM-CCD để tối ưu hóa hoạt tính ức chế alpha glucosidase của hợp chất sinh tổng hợp	23
Bảng 4.1. Hoạt tính ức chế α -glucosidase của các chủng <i>Streptomyces</i> sp.	29
Bảng 4.2. Phân tích phương sai (ANOVA).....	35
Bảng 4.3. Tóm tắt quá trình tinh sạch thu nhận hoạt chất ức chế α -glucosidase từ chủng <i>Streptomyces</i> sp. S12.2.....	48

DANH MỤC HÌNH

Hình 2.1. Cơ chế hoạt động của AGIs [10].....	4
Hình 2.2. Cấu trúc 3D của GH13 [17].....	6
Hình 2.3. Cấu trúc 3D của GH31 [17].....	6
Hình 2.4. Cơ chế bệnh đái tháo đường type II	11
Hình 3.1. Sơ đồ nghiên cứu	19
Hình 3.2. Sơ đồ tóm tắt quá trình tinh sạch hợp chất ức chế α -glucosidase	26
Hình 4.1. Hình ảnh khuẩn lạc (A) và hình ảnh SEM x 10 000 (B) của chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces</i> sp. S12.2 được hoạt hóa trên môi trường ISP2 agar	31
Hình 4.2. Ảnh điện di	32
Hình 4.3. Cây phát sinh chủng loài của gen 16S rRNA chủng <i>Streptomyces</i> sp. S12.2 với các chủng tham chiếu trong Genbank.....	33
Hình 4.4. Hoạt tính AGIs của mẫu dịch lên men so với đối chứng acarbose	34
Hình 4.5. Mặt đáp ứng hoạt tính ức chế AGIs theo nồng độ cao nấm men và nồng độ đường glucose	37
Hình 4.6. Mặt đáp ứng hoạt tính ức chế AGIs theo nồng độ glucose và độ pH	37
Hình 4.7. Hoạt tính AGIs của các pha dung môi khác nhau khi chiết lỏng-lỏng với dịch lên men	40
Hình 4.8. Sắc ký đồ TLC hai mẫu dịch lên men (LM) và dịch chiết (DC) chạy trong 5 hệ dung môi khác nhau.....	42
Hình 4.9. Sắc ký lớp mỏng các phân đoạn qua cột silica gel 60 với hệ dung môi n-butanol : acid acetic : ethylacetate : H ₂ O = 3:1:1:1.....	43
Hình 4.10. Hoạt tính AGIs của các phân đoạn sau khi qua cột silica gel 60	44
Hình 4.11. Sắc ký đồ TLC các phân đoạn qua cột Sephadex LH 20 lần 1	45
Hình 4.12. Hoạt tính AGIs của các phân đoạn qua cột LH 20 lần 1	46

Hình 4.13. Sắc ký đồ TLC các phân đoạn qua cột Sephadex LH 20 lần 2	47
Hình 4.14. Xây dựng đường chuẩn hoạt tính AGIs của dịch chiết isopropanol	49
Hình 4.15. Xây dựng đường chuẩn hoạt tính ức chế α -glucosidase của sản phẩm tinh sạch	50
Hình 4.16. Xây dựng đường chuẩn hoạt tính AGIs của chất acarbose chuẩn.....	50

DANH MỤC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ADA	American Diabetes Association	Hiệp hội đái tháo đường Hoa Kỳ
AGEs	Advanced glycation end products	Sản phẩm glycat hóa bền vững
AGIs	Alpha glucosidase inhibitors	Chất ức chế α -glucosidase
ATP	Adenosine Triphosphate	
ĐTĐ		Đái tháo đường
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
pNPG	p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside	
SEM	Scanning Electron Microscope	Kính hiển vi điện tử quét
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng
UV	Ultraviolet	Tia tử ngoại
μ L	microlite	
WHO	The World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, từ 36 chủng *Streptomyces* sp. phân lập từ mẫu đất và nước ở Nha Trang, Việt Nam, tuyển chọn được chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. S12.2 có hoạt tính ức chế α -glucosidase cao nhất, đạt 27,49%. Chủng được nuôi trong môi trường lên men hoạt tính đạt 87,71%, tăng 3,2 lần. Chủng *Streptomyces* sp. S12.2 đã được xác định loài và đăng ký trình tự trên Genbank là *Streptomyces murinus* S12.2 với mã số PV300249.1. Chủng *Streptomyces murinus* S12.2 được nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện để nâng cao khả năng sinh tổng hợp, tinh sạch sơ bộ và xác định giá trị IC_{50} của hoạt chất ức chế α -glucosidase. Phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM-CCD) được áp dụng để tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy, giúp nâng cao đáng kể hoạt tính ức chế enzyme. Dung môi isopropanol được dùng cho quá trình chiết tách, trong khi các bước tinh sạch được thực hiện bằng phương pháp sắc ký cột silica gel và sephadex LH 20 với hệ dung môi chọn lọc bao gồm n-butanol : acid acetic : ethyl acetate : H₂O = 3:1:1:1, cho hiệu quả phân tách tốt. Kết quả cho thấy giá trị IC_{50} của cặn chiết isopropanol là 34,12 mg/mL. Giá trị IC_{50} của hoạt chất tinh sạch đạt 391,06 μ g/mL trong khi hoạt chất acarbose (đôi chứng dương) đạt 30,38 μ g/mL. Từ các số liệu thu được cho thấy chủng *Streptomyces* sp. S12.2 là nguồn sinh vật tiềm năng của các hợp chất ức chế α -glucosidase, tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về tinh sạch sâu và xác định cấu trúc hoạt chất.

CHƯƠNG 1. GIỚI THIỆU

1.1. Mở đầu

Bệnh đái tháo đường type II là một trong nhiều bệnh chuyển hóa phổ biến và có xu hướng gia tăng nhanh chóng trên toàn cầu. Tăng đường huyết sau ăn kéo dài là nguyên nhân chính làm gia tăng biến chứng nghiêm trọng của ĐTD type II. Năm 2021, theo báo cáo của Liên đoàn Đái tháo đường Quốc tế (IDF) số người trưởng thành mắc đái tháo đường là 537 triệu người và xu hướng sẽ tăng lên 783 triệu người vào năm 2045 [1]. ĐTD đã được xem là một đại dịch không lây nhiễm với tỷ lệ tử vong xếp hàng thứ 3 chỉ sau ung thư và tim mạch.

Enzyme α -glucosidase có vai trò then chốt trong việc phân giải carbohydrate thành glucose, và sử dụng chất ức chế α -glucosidase đã được chứng minh là có khả năng làm chậm quá trình hấp thụ glucose, hiệu quả đối với việc kiểm soát đường huyết. Mặc dù, các AGIs truyền thống như acarbose và voglibose có thể kiểm soát tốt đường huyết sau ăn, tuy nhiên những tác dụng không mong muốn của những thuốc này cũng phần nào hạn chế việc sử dụng chúng trên lâm sàng. Do đó, trong những thập kỷ gần đây, các nhà khoa học rất nỗ lực để tìm kiếm những AGIs mới, vừa có tác dụng điều trị tốt mà lại ít tác dụng không mong muốn.

Các nghiên cứu chiết tách hoạt chất ức chế α -glucosidase từ thực vật đã thu được nhiều kết quả khả quan. Tuy vậy, hạn chế lớn của chúng là hàm lượng hoạt chất thấp, chu kỳ sản xuất kéo dài và chịu ảnh hưởng mạnh của điều kiện môi trường. Ngược lại, vi sinh vật lại có lợi thế sản xuất nhanh, linh hoạt chủ động nguồn giống và khả năng nhân quy mô lớn. Trong số các vi sinh vật tiềm năng, xạ khuẩn *Streptomyces* sp. là một trong các chủng đang được nghiên cứu sinh tổng hợp các chất ức chế α -glucosidase ứng dụng để điều trị bệnh ĐTD [2-4]. Ở Việt Nam, các nghiên cứu về hợp chất AGIs từ chủng *Streptomyces* sp. vẫn còn khá hạn chế. Một số nghiên cứu mới chỉ tập trung vào việc phân lập, tuyển chọn và tinh sạch các chất ức chế α -glucosidase từ các chủng vi khuẩn (Nguyễn Tiến Cường và cộng sự (2021), Nguyễn Thị Hiền Trang và cộng sự (2021),...) [5, 6]. Năm 2022, Nguyễn Thị Trung và cộng sự đã phân lập các chủng *Streptomyces* sp. từ cây cam Cao Phong, Hòa Bình và thu được chủng có hoạt tính ức chế α -glucosidase [7].

Chính vì vậy, đề tài “Nghiên cứu tối ưu hóa khả năng sinh tổng hợp và tinh sạch chất ức chế α -glucosidase từ chủng *Streptomyces* sp. phân lập ở Việt Nam” được tiến hành để mở rộng nghiên cứu chủng xạ khuẩn tiềm năng này tại Việt Nam, định hướng điều trị ĐTD type II an toàn, hiệu quả.

1.2. Mục tiêu

1.2.1. Mục tiêu nghiên cứu

- Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn sinh tổng hợp hoạt chất ức chế enzyme α -glucosidase.
- Nâng cao khả năng sinh tổng hợp chất AGIs bằng nghiên cứu đáp ứng bề mặt (RSM - Response Surface Methodology).
- Tối ưu các điều kiện nhằm tinh sạch chất ức chế α -glucosidase từ chủng *Streptomyces* sp. phân lập ở Việt Nam.

1.2.2. Nội dung

- Nghiên cứu sàng lọc chủng *Streptomyces* sp. có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất ức chế enzyme α -glucosidase.
- Nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy tăng khả năng sinh tổng hợp AGIs bằng tối ưu đáp ứng bề mặt (RSM-CCD) từ xạ khuẩn *Streptomyces* sp.
- Nghiên cứu các điều kiện chiết tách, thu nhận và bước đầu tinh sạch sơ bộ hoạt chất ức chế α -glucosidase từ xạ khuẩn *Streptomyces* sp.
- Đánh giá hoạt tính ức chế α -glucosidase và xác định giá trị IC_{50} của hoạt chất tinh sạch sơ bộ so với đối chứng dương (chất acarbose chuẩn).

CHƯƠNG 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

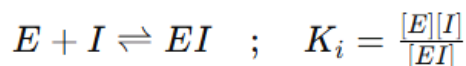
2.1. Chất ức chế α -glucosidase

2.1.1. Khái niệm

Chất ức chế α -glucosidase là các hợp chất với khả năng ức chế hoạt tính của α -glucosidase tại bờ bàn chải ruột non, từ đó làm chậm quá trình thủy phân carbohydrate thành phân tử glucose. Nhờ tác động này, chúng làm giảm và trì hoãn sự gia tăng glucose máu sau ăn, góp phần quan trọng trong việc kiểm soát đường huyết ở bệnh nhân ĐTĐ type II [8].

2.1.2. Cơ chế hoạt động

Các chất AGIs thường mang cấu trúc tương đồng với các disaccharide hoặc oligosaccharide, nhờ vậy chúng có khả năng gắn tại vùng liên kết carbohydrate của enzyme α -glucosidase. Cơ chế ức chế của các AGIs chủ yếu là ức chế cạnh tranh, trong đó chất ức chế sẽ liên kết với trung tâm hoạt động của enzyme, ngăn cản sự gắn kết của cơ chất.



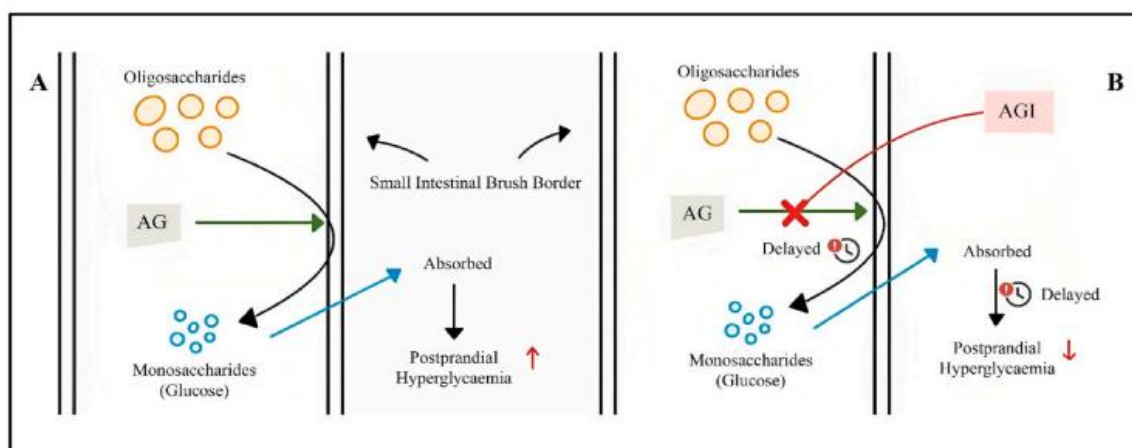
Trong những trường hợp này, chất ức chế (I) có cấu trúc tương tự cơ chất, cho phép chiếm vị trí tại vùng hoạt động, làm giảm số lượng enzyme tự do sẵn sàng xúc tác phản ứng. Điều này dẫn đến tăng giá trị K_m biểu kiến nhưng không ảnh hưởng đến V_{max} của phản ứng.

Khi gắn vào vùng hoạt động, các chất ức chế này ngăn cản sự phân cắt liên kết α -1,4-glycoside, từ đó làm chậm quá trình tạo glucose. Kết quả là tốc độ hấp thu đường tại ruột giảm, làm giảm glucose máu sau ăn mà không gây hạ đường huyết khi đói [9].

Ở mức độ phân tử, các tương tác giữa chất ức chế và enzyme bao gồm: liên kết hydro với các residue xúc tác (Asp, Glu); tương tác kỵ nước với vùng pocket của trung tâm hoạt động; tương tác π - π với các vòng thơm của enzyme. Những tương tác này quyết định ái lực liên kết và hiệu quả ức chế của từng hợp chất.

Theo nhiều đánh giá, các loại thuốc có nguồn gốc AGIs phổ biến hiện nay như

acarbose hoặc miglitol, còn hỗ trợ tăng cường bài tiết GLP-1, giúp hạn chế cơn đói cũng như giảm nhu cầu ăn uống. Hơn nữa, AGIs cũng không gây ảnh hưởng đến cân nặng. Tuy nhiên, chúng gây ra một vài tác dụng phụ không mong muốn chủ yếu đối với đường tiêu hóa, như đầy hơi, tiêu chảy. Do vậy, ưu tiên hiện nay là tìm ra một nguồn cung cấp AGIs mới như một loại thuốc điều trị ĐTĐ hiệu quả cao và làm giảm các tác dụng phụ.



Hình 2.1. Cơ chế hoạt động của AGIs [10]

A – Không có AGIs: oligosaccharide phân giải thành glucose

B – Có AGIs: ngăn cản oligosaccharide phân giải thành glucose

2.1.3. Phân loại

Dựa trên nguồn gốc và đặc tính hóa học, các chất ức chế α -glucosidase hiện nay có thể chia thành ba nhóm chính: Thuốc tổng hợp; Chất ức chế tự nhiên; Peptide và các dẫn xuất peptide.

Thuốc tổng hợp và bán tổng hợp: ví dụ như acarbose (có tác dụng ức chế α -glucosidase ở ruột); miglitol (có cấu trúc tương đồng với glucose, hấp thu tốt tại ruột non); voglibose (có ái lực cao với α -glucosidase). Đây là các hợp chất có cấu trúc tương tự oligosaccharide, cho phép chúng cạnh tranh với cơ chất tự nhiên tại trung tâm hoạt động của enzyme. Trong đó, acarbose là một pseudo-tetrasaccharide có khả năng gắn mạnh vào vùng hoạt động thông qua nhiều liên kết hydro với các amino acid xúc tác, từ đó ức chế hiệu quả hoạt tính enzyme [11].

Bên cạnh đó, nhiều hợp chất có nguồn gốc tự nhiên đã được phát hiện có khả

năng ức chế α -glucosidase, bao gồm: alkaloid, flavonoid, terpenoid và phenolic compounds được chứng minh có hoạt tính ức chế α -glucosidase. Các hợp chất này thường có cấu trúc đa vòng, giàu nhóm hydroxyl, cho phép tương tác với enzyme thông qua liên kết hydro và tương tác π - π .

Peptide và dẫn xuất peptide: Một số peptide tự nhiên và peptide tổng hợp đã được kiểm tra có khả năng ức chế α -glucosidase thông qua tương tác với vùng xúc tác của enzyme.

2.1.4. Ý nghĩa trong điều trị đái tháo đường

Các chất AGIs đã được ứng dụng rộng rãi trong điều trị ĐTD type II, đặc biệt trong kiểm soát tăng glucose máu sau ăn. Khác với các loại thuốc kích thích tiết insulin, AGIs không gây ra triệu chứng hạ đường huyết quá mức, do cơ chế tác động phụ thuộc vào lượng carbohydrate được hấp thu [12].

Ngoài ra, việc giảm tốc độ hấp thu glucose còn giúp hạn chế sự Hình thành các sản phẩm glycat hóa bền vững (AGEs) và giảm stress oxy hóa, từ đó góp phần làm chậm tiến triển của các biến chứng vi mạch. Tuy nhiên, việc sử dụng AGIs cũng có thể gây ra các tác dụng phụ trên đường tiêu hóa như đầy hơi và tiêu chảy, do sự lên men carbohydrate chưa được tiêu hóa tại đại tràng. Điều này đưa ra một mục tiêu nghiên cứu các chất ức chế mới với hiệu quả cao và ít tác dụng phụ hơn.

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về hợp chất AGIs vẫn còn khá hạn chế. Một số nghiên cứu mới chỉ tập trung vào việc phân lập, tuyển chọn và tinh sạch các chất ức chế α -glucosidase từ các chủng vi khuẩn (Nguyễn Tiến Cường và cộng sự (2021), Nguyễn Thị Hiền Trang và cộng sự (2021),...) [5, 6].

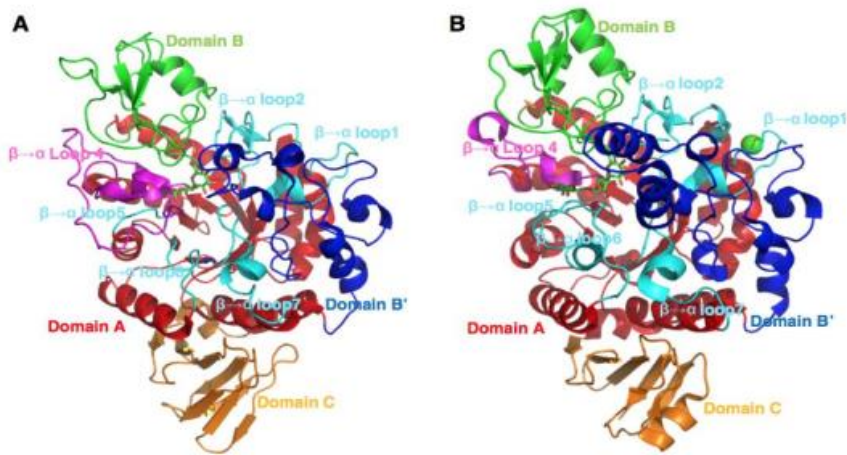
2.2. Giới thiệu về α -glucosidase

Alpha glucosidase là một loại enzyme thủy phân thuộc họ hydrolase, có vai trò xúc tác cho quá trình cắt liên kết α -1,4-glycoside ở đầu không khử của carbohydrate, giúp giải phóng glucose và các monosaccharide từ các oligosaccharide và disaccharide trong quá trình tiêu hóa [13, 14]. Đây là loại enzyme quan trọng đối với quá trình chuyển hóa carbohydrate, có mặt phổ biến trong các sinh vật khác nhau như vi khuẩn, nấm, thực vật và động vật bậc cao [15]. Do đó, α -glucosidase được coi là mục tiêu điều trị quan trọng trong kiểm soát tăng glucose máu sau ăn ở bệnh

nhân đại tháo đường type II.

2.2.1. Cấu trúc của α -glucosidase

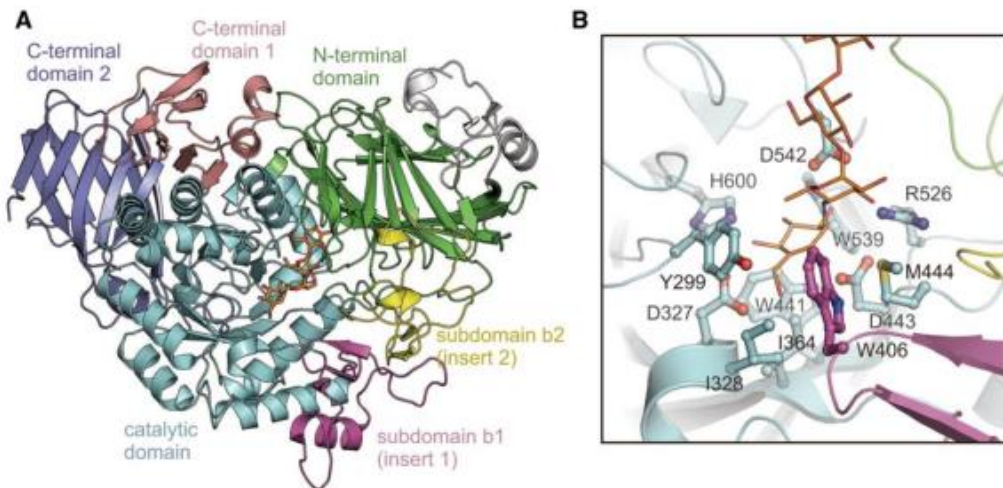
Alpha glucosidase là một protein màng nằm trên bề mặt vi nhung mao của tế bào biểu mô ruột, thường tồn tại dưới dạng glycoprotein. Ở người, enzyme này bao gồm hai phức hợp chính là maltase-glucoamylase và sucrase-isomaltase, mỗi phức hợp chứa hai domain xúc tác với đặc điểm cấu trúc và tính đặc hiệu cơ chất khác nhau [16].



Hình 2.2. Cấu trúc 3D của GH13 [17]

A –Halomonas sp. α -glucosidase và maltose (PDB, 3WY4)

B –Streptococcus mutans DG và isomaltotriose (PDB, 2ZID)



Hình 2.3. Cấu trúc 3D của GH31 [17]

A –N-terminal maltase-glucoamylase

B – Vùng hoạt động của N-terminal maltase-glucoamylase

Về cấu trúc, α -glucosidase là một glycoprotein, thường tồn tại ở dạng homodimer hoặc monomer với khối lượng phân tử khoảng 95 - 105 kDa. Enzyme

này thuộc lớp glycoside hydrolase (GH), trong đó các họ GH31, GH13, GH97 là phổ biến nhất [18]. Trung tâm hoạt động của enzyme thường nằm trong một rãnh sâu, có cấu trúc dạng “pocket”, cho phép gắn đặc hiệu với đầu không khử của cơ chất. Các acid amin xúc tác quan trọng thường là các gốc aspartate (Asp) và glutamate (Glu), đóng vai trò như acid/base trong phản ứng thủy phân [19].

Ngoài ra, enzyme còn có các vùng glycosyl hóa, giúp ổn định cấu trúc không gian và tăng khả năng chống lại sự phân giải bởi protease trong môi trường tiêu hóa. Cấu trúc không gian ba chiều (3D) của enzyme cho phép tương tác đặc hiệu với các phân tử carbohydrate thông qua liên kết hydro và tương tác kỵ nước, quyết định tính chọn lọc cơ chất của enzyme.

2.2.2. Chức năng của α -glucosidase

Chức năng của α -glucosidase là tham gia vào giai đoạn cuối của quá trình tiêu hóa carbohydrate ở ruột non, nơi nó thủy phân các oligosaccharide, maltose, maltotriose và dextrin thành glucose để hấp thu vào máu. Nhờ vậy, enzyme này có vai trò quan trọng đối với việc điều hòa nồng độ glucose máu sau bữa ăn [8].

Alpha glucosidase giúp cơ thể chuyển hóa tinh bột thành dạng đường đơn, đảm bảo cung cấp năng lượng nhanh chóng. Tuy nhiên, sự hoạt động quá mức của enzyme này dẫn đến tình trạng tăng đường huyết sau ăn – một đặc trưng của đái tháo đường type II. Do đó, α -glucosidase trở thành đối tượng nghiên cứu hàng đầu trong điều trị: các thuốc ức chế α -glucosidase (như acarbose, miglitol, voglibose,...) có vai trò làm chậm quá trình hấp thụ glucose, kiểm soát đường huyết sau ăn và ngăn ngừa biến chứng mạch máu [9].

2.2.3. Cơ chế hoạt động của α -glucosidase

Cơ chế xúc tác của α -glucosidase thuộc loại cơ chế giữ cấu Hình, diễn ra qua hai bước chính với sự Hình thành trung gian glycosyl-enzyme.

Trong bước đầu tiên, enzyme liên kết với cơ chất (S) tại trung tâm hoạt động, Hình thành một phức hợp enzyme–cơ chất (ES). Một gốc acid amin (thường là Asp) đóng vai trò nucleophile tấn công vào carbon anomeric của liên kết glycosidic, trong khi một gốc Glu hoạt động như acid proton hóa nhóm rời. Kết quả là tạo thành trung

gian glycosyl-enzyme và giải phóng phần còn lại của phân tử cơ chất [20].

Trong bước thứ hai, một phân tử nước được hoạt hóa bởi residue base (Glu), tấn công vào trung gian này, giải phóng glucose và tái tạo enzyme ban đầu. Đặc điểm quan trọng của cơ chế này là giữ nguyên cấu Hình α của glucose sau phản ứng, khác với cơ chế đảo cấu Hình ở một số glycosidase khác.

Cơ chế xúc tác này phụ thuộc mạnh vào độ pH môi trường, thường tối ưu ở pH hơi acid (khoảng 5,5–6,8), phù hợp với điều kiện trong lòng ruột non. Ngoài ra, hoạt tính enzyme còn chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố như nồng độ cơ chất, sự hiện diện của ion kim loại và các chất ức chế enzyme.

2.2.4. Vai trò của α -glucosidase trong điều trị đái tháo đường

Do vai trò trung tâm trong quá trình thủy phân carbohydrate, α -glucosidase trở thành mục tiêu hàng đầu trong điều trị ĐTD type II. Các chất ức chế enzyme này (AGIs - α -glucosidase inhibitors) như acarbose, miglitol hoạt động bằng cách cạnh tranh với cơ chất tại trung tâm hoạt động của enzyme, làm chậm quá trình phân giải carbohydrate và hấp thụ glucose [12].

Hệ quả là làm giảm đỉnh glucose máu sau ăn, một yếu tố rất được coi trọng trong cơ chế sinh bệnh học của biến chứng mạch máu ở đái tháo đường. Từ góc độ enzyme học, các chất ức chế này thường có cấu trúc tương tự carbohydrate, cho phép gắn mạnh vào vùng hoạt động thông qua mạng lưới liên kết hydro với các xúc tác dị thể.

2.3. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp.

2.3.1. Giới thiệu về *Streptomyces* sp.

Streptomyces được xem là chi lớn nhất trong ngành *Actinobacteria* và thuộc họ *Streptomycetaceae*. Cho đến hiện nay, đã ghi nhận hơn 500 loài thuộc chi này. Tương tự nhiều *Actinobacteria* khác, *Streptomyces* là loài vi khuẩn Gram dương, có bộ gen đặc trưng với hàm lượng GC% cao. Đặc điểm nổi bật của *Streptomyces* là khả năng hình thành bào tử và tạo mùi đặc trưng do hợp chất geosmin sinh ra trong quá trình chuyển hóa. Đây là nhóm vi khuẩn được nghiên cứu sâu rộng và được biết đến phổ biến nhất trong số các xạ khuẩn (*Actinomycetes*).

Streptomyces có hình thái tương đối giống nấm, vì vậy đôi khi dễ gây lầm tưởng

Streptomyces là nấm. Các tế bào của chúng phát triển thành dạng sợi, liên kết với nhau tạo nên một hệ thống mạng lưới tương tự như sợi nấm.

Nhóm vi sinh vật này nổi bật nhờ khả năng sinh tổng hợp đa dạng các hợp chất thứ cấp mang hoạt tính sinh học cao, bao gồm kháng sinh, enzyme, chất chống ung thư và các chất ức chế enzyme. Với hệ gen lớn (thường >8 Mb) và chứa nhiều cụm gen sinh tổng hợp, *Streptomyces* được xem là “nhà máy sinh học tự nhiên” quan trọng trong sản xuất dược phẩm [21], như kháng sinh, thuốc chống ung thư, thuốc kháng virus, thuốc ức chế enzyme (trong đó có các chất ức chế α -glucosidase) và chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Ước tính khoảng hai phần ba các kháng sinh mà nguồn gốc đến từ vi sinh vật được phát hiện cho đến nay có nguồn gốc từ *Streptomyces*, trong đó có nhiều kháng sinh quan trọng như streptomycin, tetracycline, erythromycin và chloramphenicol [22].

Điển hình, hợp chất acarbose – một thuốc điều trị ĐTĐ type II rất phổ biến hiện nay, được sản xuất bởi *Streptomyces* (cụ thể là *Streptomyces glaucescens*) [23]. Acarbose là một pseudooligosaccharide có cấu trúc tương tự cơ chất tự nhiên của α -glucosidase, cho phép nó gắn vào trung tâm hoạt động của enzyme và ức chế cạnh tranh quá trình thủy phân carbohydrate. Cấu trúc đặc biệt này là kết quả của các con đường sinh tổng hợp phức tạp trong *Streptomyces*, liên quan đến nhiều enzyme xúc tác phản ứng glycosyl hóa và biến đổi đường [24].

Ngoài acarbose, nhiều chủng *Streptomyces* khác đã được chứng minh có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất mang hoạt tính ức chế α -glucosidase. Các nghiên cứu gần đây đã phân lập được nhiều hợp chất mới từ *Streptomyces* với hoạt tính ức chế mạnh, mở ra tiềm năng phát triển thuốc mới có hiệu quả cao hơn và ít tác dụng phụ hơn so với các thuốc hiện hành [25].

2.3.2. Cơ chế sinh tổng hợp chất ức chế α -glucosidase ở *Streptomyces* sp.

Quá trình sinh tổng hợp chất ức chế α -glucosidase trong *Streptomyces* sp. thường liên quan đến các con đường chuyển hóa carbohydrate phức tạp, trong đó các enzyme đóng vai trò trung tâm. Các enzyme như glycosyltransferase xúc tác việc gắn các đơn vị đường vào khung phân tử, tạo nên các cấu trúc tương tự

oligosaccharide có khả năng tương tác với α -glucosidase.

Ngoài ra, các enzyme biến đổi như oxidoreductase, aminotransferase và cyclase tham gia vào việc xây dựng cấu trúc không gian đặc thù của các AGIs, giúp tăng ái lực liên kết với enzyme đích. Sự phối hợp hoạt động của các enzyme này trong các cụm gen sinh tổng hợp cho phép *Streptomyces* sp. tạo ra các phân tử có tính đặc hiệu cao đối với α -glucosidase [26].

2.4. Đái tháo đường

2.4.1. Khái niệm

Đái tháo đường là một nhóm bệnh gây nên tình trạng rối loạn chuyển hóa không đồng nhất, được mô tả đặc trưng bởi tình trạng tăng glucose máu mạn tính [27]. Thời gian dài tăng glucose máu có thể gây ra các rối loạn chuyển hóa carbohydrate và gây tổn thương cho nhiều cơ quan khác nhau như tim, mạch máu, thận, mắt và thần kinh [28]. Đây là hội chứng bệnh có khả năng gây tử vong hàng đầu, cần được phát hiện và ưu tiên điều trị sớm để đảm bảo chất lượng cuộc sống.

2.4.2. Phân loại

Theo Hiệp hội Đái tháo đường Hoa Kỳ (ADA) năm 2021, dựa theo đặc điểm và tình trạng, ĐTD được chia làm đái tháo đường type I, type II, đái tháo đường thai kì và đái tháo đường do các nguyên nhân khác.

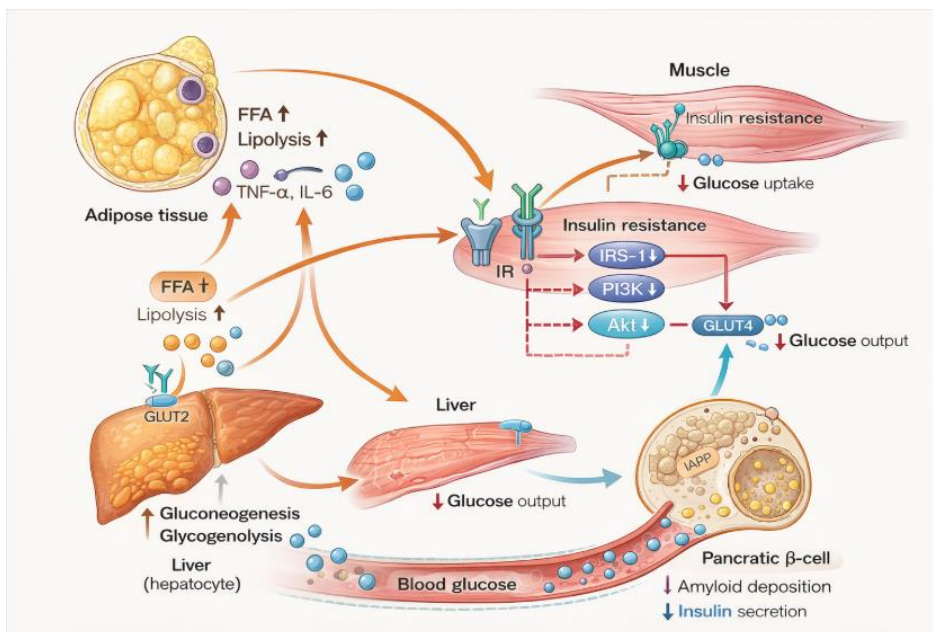
Đái tháo đường type I là loại bệnh tự miễn, gây nên tình trạng thiếu hụt hoàn toàn insulin, nguyên do là hệ miễn dịch đã phá hủy tế bào β của tuyến tụy,. Bệnh thường được tìm thấy ở trẻ em và người trẻ tuổi, chiếm khoảng 5 - 10% tổng số ca mắc ĐTD.

Đái tháo đường type II chiếm 90 - 95% các trường hợp, tình trạng bệnh đặc trưng bởi khả năng kháng insulin và suy giảm chức năng tiết insulin. Bệnh thường liên quan đến béo phì do ít vận động, chế độ ăn nhiều đường và chất béo bão hòa. Theo WHO (2020), tỷ lệ đái tháo đường type II toàn cầu đã tăng gấp hơn 4 lần trong 40 năm qua, với khoảng 422 triệu người mắc bệnh vào năm 2014 và dự kiến đạt hơn 570 triệu vào năm 2030. Tại Việt Nam, thống kê của Bộ Y tế năm 2020 cho thấy tỷ lệ ĐTD ở người trưởng thành là 5,7%, trong đó phần lớn là type II.

Đái tháo đường thai kì gây ra tình trạng rối loạn dung nạp đường glucose và được phát hiện trong thời kỳ mang thai. Cơ chế bệnh sinh chủ yếu liên quan đến tình trạng kháng insulin tăng cao do tác động của các hormon nhau thai như human placental lactogen, progesterone, cortisol, và prolactin. Theo International Diabetes Federation, ước tính khoảng 16,7% phụ nữ mang thai trên thế giới bị ảnh hưởng bởi ĐTDĐ thai kỳ [1]. Ở Việt Nam, đã có một vài nghiên cứu cho thấy tỷ lệ này dao động từ 5 - 20% tùy theo khu vực. ĐTDĐ thai kỳ không chỉ làm tăng nguy cơ biến chứng trong sản khoa như tiền sản giật, sinh non, thai to, mà còn làm tăng nguy cơ mẹ và con mắc ĐTDĐ type II trong tương lai.

Ngoài ba thể bệnh chính trên, còn có một số dạng ĐTDĐ ít gặp hơn, liên quan đến một vài nguyên nhân xác định được. Bao gồm: khiếm khuyết di truyền chức năng tế bào β ; khiếm khuyết di truyền tác động insulin;... Mặc dù tần suất thấp hơn nhiều so với ĐTDĐ type II, song các dạng này có ý nghĩa lâm sàng quan trọng do liên quan đến các căn nguyên cụ thể và định hướng điều trị bệnh đặc hiệu.

2.4.3. Đái tháo đường type II



Hình 2.4. Cơ chế bệnh đái tháo đường type II

Đái tháo đường type II là một bệnh rối loạn chuyển hóa mạn tính gây ra tình trạng kháng insulin kết hợp với suy giảm chức năng tế bào β , dẫn đến thiếu hụt

insulin tương đối. Không giống ĐTĐ type I, cơ chế bệnh sinh của ĐTĐ type II mang tính đa yếu tố và tiến triển chậm.

Đề kháng insulin là yếu tố trung tâm trong giai đoạn sớm của bệnh. Tình trạng này xảy ra khi các mô đích như gan, cơ và mô mỡ giảm đáp ứng với insulin. Ở mức phân tử, đề kháng insulin liên quan đến sự suy giảm hoạt động của các thành phần trong con đường tín hiệu insulin, đặc biệt là IRS-1 (insulin receptor substrate-1), PI3K và Akt, dẫn đến giảm vận chuyển glucose qua GLUT4 vào trong tế bào [29].

Béo phì, nổi bật là béo phì nội tạng, đóng vai trò quan trọng trong cơ chế này thông qua việc tăng tiết các adipokine gây viêm như TNF- α , IL-6 và giảm adiponectin. Các cytokine tiền viêm này gây rối loạn tín hiệu insulin và thúc đẩy tình trạng viêm mạn tính mức độ thấp [30].

Ở giai đoạn đầu, tế bào β đáp ứng bằng cách tăng tiết insulin để bù cho tình trạng kháng insulin. Tuy nhiên, theo thời gian, sự quá tải chức năng dẫn đến suy giảm tế bào β do stress oxy hóa, stress lưới nội chất và tích tụ amyloid từ amylin (IAPP – islet amyloid polypeptide) trong đảo tụy [31].

Ngoài ra, tăng sản xuất glucose tại gan (do tăng tân tạo đường) và giảm ức chế quá trình phân giải glycogen cũng góp phần làm tăng đường huyết. Rối loạn chức năng tế bào α khiến tăng tiết glucagon càng làm trầm trọng tình trạng tăng glucose máu [32].

Như vậy, cơ chế bệnh sinh của ĐTĐ type II là kết hợp của kháng insulin với suy giảm chức năng tế bào β , trong đó các yếu tố di truyền và lối sống, môi trường đều đóng vai trò quan trọng.

2.4.4. Các biến chứng của bệnh đái tháo đường

ĐTĐ là bệnh lý mạn tính, được mô tả đặc trưng với tình trạng tăng glucose máu kéo dài, dẫn đến nhiều biến chứng nghiêm trọng trên nhiều cơ quan cơ thể. Các biến chứng của ĐTĐ được chia thành hai nhóm chính: cấp tính và mạn tính, trong đó biến chứng mạn tính là nguyên nhân chủ yếu gây tàn phế và tử vong ở bệnh nhân.

Các biến chứng cấp tính xảy ra nhanh chóng và có thể đe dọa tính mạng nếu không xử trí kịp thời. Phổ biến là tình trạng nhiễm toan ceton (diabetic ketoacidosis – DKA) và hội chứng tăng áp lực thẩm thấu (HHS)

Biến chứng mạn tính của ĐTĐ xuất phát từ nguyên do tăng glucose máu kéo dài, dẫn đến tổn thương mạch máu và rối loạn chức năng protein/enzyme nội bào. Bao gồm biến chứng vi mạch và biến chứng đại mạch (bệnh mạch vành, đột quy, động mạch ngoại biên).

Tăng glucose máu kích hoạt 4 con đường chính: con đường polyol (aldose reductase), Hình thành AGEs, hoạt hóa PKC và tăng flux hexosamine. Các con đường này đều dẫn đến stress oxy hóa, rối loạn chức năng protein/enzyme và tổn thương tế bào nội mô [33].

2.4.5. Điều trị đái tháo đường

2.4.5.1. Điều trị đái tháo đường type I

Đái tháo đường type I đặc trưng bởi nguyên nhân phá hủy tế bào β tụy làm thiếu hụt insulin hoàn toàn, do đó nguyên tắc điều trị cốt lõi là liệu pháp thay thế insulin. Insulin ngoại sinh được sử dụng nhằm tái lập cân bằng nội môi glucose, mô phỏng gần nhất sự bài tiết sinh lý của tuyến tụy.

Về cơ chế phân tử, insulin gắn vào thụ thể insulin (IR), kích hoạt hoạt tính tyrosine kinase nội tại của thụ thể, dẫn đến phosphoryl hóa các protein nền như IRS1 (insulin receptor substrate-1). Quá trình này tiếp tục hoạt hóa chuỗi tín hiệu PI3K/Akt, làm tăng vận chuyển chất mang glucose GLUT4 đến màng tế bào, từ đó tăng hấp thu glucose tại cơ và mô mỡ, đồng thời ức chế tái tạo glucose tại gan [29].

Các chiến lược điều trị hiện đại như bơm insulin liên tục hoặc hệ thống “tuyến tụy nhân tạo” cho phép kiểm soát glucose máu chính xác hơn, giảm nguy cơ hạ đường huyết. Bên cạnh đó, các hướng tiếp cận mới như cấy ghép tế bào đảo tụy hoặc liệu pháp miễn dịch nhằm bảo tồn tế bào β đang được nghiên cứu, mở ra triển vọng điều trị căn nguyên [34].

2.4.5.2. Điều trị đái tháo đường type II

Không giống ĐTĐ type I, cơ chế điều trị ĐTĐ type II tập trung vào việc cải thiện đề kháng insulin và bảo tồn chức năng tế bào β . Điều trị bắt đầu bằng việc thay đổi thói quen sống, bao gồm chế độ ăn hợp lý và tăng cường hoạt động thể lực, nhằm cải

thiện độ nhạy insulin và giảm glucose máu.

Ở mức phân tử, các thuốc hạ đường huyết tác động vào nhiều con đường khác nhau trong chuyển hóa glucose. Metformin, thuốc hàng đầu trong điều trị ĐTĐ type II, chủ yếu ức chế quá trình tái tạo glucose tại gan thông qua hoạt hóa AMPK, từ đó giảm sản xuất glucose nội sinh và cải thiện độ nhạy insulin [35].

Các thuốc nhóm sulfonylurea và meglitinide kích thích tế bào β sản sinh insulin bằng cách đóng kênh K_{ATP} phụ thuộc ATP trên màng tế bào, gây khử cực màng và tăng dòng Ca^{2+} nội bào, từ đó thúc đẩy bài tiết insulin. Trong khi đó, các thuốc nhóm thiazolidinedione (TZDs) hoạt hóa thụ thể nhân PPAR- γ , điều hòa biểu hiện gen liên quan đến chuyển hóa lipid và glucose, giúp cải thiện tình trạng kháng insulin tại mô mỡ và cơ [36].

Một hướng điều trị quan trọng khác là hệ incretin, bao gồm GLP-1. Các chất đồng vận thụ thể GLP-1 và thuốc ức chế enzyme DPP-4 giúp kéo dài hiệu quả của incretin, từ đó tăng sản xuất insulin phụ thuộc glucose, giảm tiết glucagon và chậm làm rỗng dạ dày. Cơ chế này giúp cải thiện kiểm soát đường huyết mà còn có lợi trên cân nặng và hệ tim mạch [37].

Ngoài ra, các thuốc ức chế SGLT2 tại thận làm giảm tái hấp thu glucose ở ống lượn gần, tăng đào thải glucose qua đường tiểu, từ đó hạ glucose máu độc lập với insulin. Đây là nhóm thuốc mới với nhiều lợi ích trên tim mạch và thận [38].

Nhìn chung, cơ chế điều trị ĐTĐ type II là sự phối hợp đa mục tiêu nhằm điều chỉnh các rối loạn sinh lý bệnh, trong đó việc tác động vào các enzyme và protein tín hiệu đóng vai trò trung tâm. Alpha glucosidase làm chậm lại quá trình hấp thụ glucose tại ruột, α -glucosidase tại bờ bàn chải ruột non có vai trò phân cắt tinh bột, disaccharide thành glucose để hấp thu. Khi dùng thuốc ức chế α -glucosidase (như acarbose, miglitol, voglibose), cơ chế tác động được mô tả là: Ức chế cạnh tranh với enzyme tại ruột non; Làm chậm thủy phân carbohydrate phức tạp thành glucose; Giảm tốc độ hấp thụ glucose \rightarrow hạn chế tăng đường huyết sau ăn (postprandial hyperglycemia). Đây là cơ chế điều trị đặc hiệu nhằm kiểm soát đường huyết sau bữa ăn – một yếu tố quan trọng đối với phòng ngừa các biến chứng tim mạch ở bệnh ĐTĐ type II [9].

2.5. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước

Trong những năm gần đây, với sự gia tăng chóng mặt của bệnh ĐTĐ type II trên toàn cầu, nghiên cứu về α -glucosidase và các chất ức chế của nó đã trở thành một lĩnh vực trọng điểm trong sinh học phân tử, công nghệ enzyme và phát triển thuốc thu hút sự quan tâm mạnh mẽ. Đặc biệt, các vi sinh vật thuộc chi *Streptomyces* được xem là nguồn sinh học tiềm năng cho việc phát hiện và sản xuất các AGIs thế hệ mới, góp phần kiểm soát tăng glucose máu sau ăn. Các nghiên cứu được triển khai rộng khắp trên thế giới và tại Việt Nam, với xu hướng chuyển dịch từ khai thác tự nhiên sang kết hợp công nghệ sinh học hiện đại.

2.5.1. Trên thế giới

Các nghiên cứu về AGIs trên thế giới đã được tiến hành bắt đầu trong những năm 1970 với việc phát hiện các hợp chất bắt nguồn từ vi sinh vật. Một trong những thành tựu tiêu biểu là việc phát hiện acarbose – một pseudooligosaccharide có khả năng ức chế α -glucosidase mạnh – được sản xuất từ các chủng vi sinh vật như *Actinoplanes sp.* và *Streptomyces glaucescens* [39]. Công trình nghiên cứu của Wehmeier và Piepersberg (2004) đã làm sáng tỏ cơ chế sinh tổng hợp acarbose, cho thấy sự tham gia của nhiều enzyme trong con đường chuyển hóa carbohydrate phức tạp [23].

Bên cạnh đó, nhiều công trình tập trung vào việc tối ưu hóa nâng cao khả năng sinh tổng hợp AGIs. Tadera và cộng sự (2006) đã chứng minh hoạt tính ức chế mạnh của các flavonoid tự nhiên đối với enzyme này [40]. Schwientek và cộng sự (2012) đã sử dụng phân tích hệ gene để xác định cụm gene sinh tổng hợp acarbose, mở ra khả năng khai thác và biến đổi các con đường này [41]. Chen và cộng sự (2016) đã phân lập được các hợp chất mới từ chủng *Streptomyces sp.* OUCMDZ-3434, được thu nhận từ mẫu tảo biển *Enteromorpha prolifera*, cho thấy khả năng sinh tổng hợp các chất AGIs [2]. Tiếp đó, Wei và cộng sự (2017) đã phân lập 24 hợp chất thứ cấp từ dịch nuôi cấy của chủng *S. xanthophaeus* với hoạt tính ức chế α -glucosidase mạnh, trong đó một số hợp chất có hiệu lực tương đương hoặc vượt trội so với chất đối chứng dương acarbose [3]. Abdulkhair và cộng sự (2018) tiến hành phân lập 55 chủng xạ khuẩn biển, kết quả cho thấy 7 chủng có khả năng ức chế α -glucosidase và

thể hiện tiềm năng điều trị bệnh đái tháo đường. Đáng chú ý, khả năng sinh tổng hợp các chất ức chế của các chủng này được tăng cường sau khi xử lý bằng tia UV trong 10 giây nhằm tạo ra các dòng đột biến có hoạt tính cao hơn [4].

Đáng chú ý, các phương pháp in silico như docking phân tử và mô phỏng động lực học phân tử đang được ứng dụng rộng rãi để nghiên cứu tương tác enzyme–chất ức chế và thiết kế thuốc mới. Năm 2019, Kaur và cộng sự đã sử dụng mô phỏng phân tử để dự đoán ái lực liên kết của các hợp chất với α -glucosidase, góp phần rút ngắn thời gian sàng lọc thuốc [42]. Li và cộng sự (2022) đã ứng dụng transcriptomics để xác định các gen điều hòa quan trọng cho quá trình sinh tổng hợp acarbose ở *Actinoplanes sp.*, từ đó cải thiện hiệu suất sản xuất thông qua điều chỉnh điều kiện lên men [43]. Lu và cộng sự (2023) đã phân lập và tuyển chọn thành công hai chủng xạ khuẩn có nguồn gốc từ rừng ngập mặn là *Streptomyces sp.* WHUA03267 và *Streptomyces sp.* WHUA03072, trong đó cả hai đều biểu hiện hoạt tính ức chế α -glucosidase mạnh, khẳng định tiềm năng to lớn của *Streptomyces* trong việc cung cấp nguồn hợp chất tự nhiên phục vụ điều trị đái tháo đường type II [44].

2.5.2. Tại Việt Nam

Ở trong nước, các nghiên cứu về hợp chất AGIs từ chi *Streptomyces* tuy chưa phổ biến nhưng đã bước đầu thu được nhiều thành tựu đáng ghi nhận, đặc biệt trong việc khai thác nguồn tài nguyên sinh học bản địa. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces sp.*, là một nguồn tiềm năng cho việc tìm kiếm các chất ức chế α -glucosidase phục vụ điều trị đái tháo đường. Quy trình nghiên cứu thường bao gồm các bước: phân lập, tuyển chọn chủng, sàng lọc hoạt tính sinh học, tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy, và tiến tới chiết tách, tinh sạch hợp chất.

Nguyễn Ngọc Trai và cộng sự (2018) nghiên cứu trên chủng *Streptomyces sp.* TVS1 phân lập từ đất nhiễm mặn Trà Vinh cho thấy môi trường nuôi cấy, pH và thời gian lên men ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng sinh tổng hợp chất ức chế α -glucosidase [45]. Nguyễn Thị Trung và cộng sự (2021) nghiên cứu tối ưu hóa và tinh sạch chất ức chế α -glucosidase từ *Streptomyces costaricanus* phân lập tại Việt Nam đã chứng minh khả năng nâng cao hiệu suất thu nhận hoạt chất thông qua điều chỉnh điều kiện

nuôi cấy và quy trình tinh sạch [5].

Nguyễn Thị Trung và cộng sự (2022) đã phân lập 30 chủng vi sinh vật nội sinh từ cây có múi tại Hòa Bình, trong đó một chủng *Streptomyces* được tuyển chọn nhờ hoạt tính ức chế α -glucosidase cao (~69%) [7]. Ngọc Khanh Van Nguyen và cộng sự (2023) nghiên cứu theo hướng “bioassay-guided isolation” tại Việt Nam (dù chủ yếu trên thực vật) cũng đã phân lập thành công nhiều hợp chất có hoạt tính mạnh, cho thấy tiềm năng áp dụng tương tự đối với vi sinh vật [46]. Hoàng Kim Chi và cộng sự (2025), các chủng xạ khuẩn từ hệ sinh thái rừng ngập mặn Việt Nam cũng được chứng minh có khả năng ức chế α -glucosidase đáng kể, với dịch chiết đạt hiệu suất ức chế trên 60% [47]. Những kết quả này cho thấy tiềm năng lớn của nguồn vi sinh vật bản địa trong sàng lọc hoạt chất sinh học.

Tổng thể, các nghiên cứu tại Việt Nam đã đạt được những kết quả đáng kể trong việc tuyển chọn và sàng lọc các chủng *Streptomyces* sp. có hoạt tính ức chế α -glucosidase, đồng thời bước đầu triển khai các kỹ thuật chiết tách và tinh sạch. Tuy nhiên, so với quốc tế, số lượng nghiên cứu đi sâu vào phân lập cấu trúc hóa học và cơ chế tác dụng của hợp chất vẫn còn hạn chế. Các kết quả này cho thấy nguồn tài nguyên vi sinh vật trong tự nhiên, đặc biệt là ở Việt Nam, là tiềm năng quan trọng để khai thác các hợp chất sinh học mới, góp phần vào việc tìm kiếm và phát triển chất ức chế α -glucosidase từ tự nhiên.

CHƯƠNG 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

3.1. Vật liệu

3.1.1. Chủng vi sinh vật

36 chủng *Streptomyces* sp. được phân lập từ mẫu nước và đất ở vùng ven biển Nha Trang. Các chủng xạ khuẩn được cung cấp từ Phòng Công nghệ sinh học Enzyme, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

3.1.2. Hóa chất

Các loại hóa chất chính sử dụng trong nghiên cứu bao gồm α -glucosidase, p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, chất acarbose chuẩn (Sigma); cao nấm men, cao malt (Bio Basic Canada INC); các loại dung môi n-butanol, ethylacetate, acid acetic, chloroform, dichlormethane, n-hexan, methanol, isopropanol và ethanol (Trung Quốc); silica gel 60, Sephadex LH 20 và bản mỏng silica gel 60 F254 20x20 (Merck, Đức)... Các hóa chất sử dụng trong thí nghiệm đều ở dạng tinh khiết.

Thành phần môi trường ISP2 (g/L) bao gồm: 4 cao nấm men, 10 cao malt, 4 glucose. Bổ sung 20 agar nếu là môi trường thạch ISP2. Môi trường lên men (g/L) bao gồm 16 cao nấm men, 4 glucose điều kiện pH 6,5.

3.1.3. Thiết bị & vật tư

Các thiết bị và vật tư chính phục vụ đề tài bao gồm: box cấy vi sinh Clean Bench TCV.02, cân phân tích BL150S, lò vi sóng, hệ thống elisa, máy lắc nuôi cấy Wise Cube, máy vortex OSI, nồi khử trùng ES-315, tủ hút, máy cắt cô quay (Buchi), tủ âm, máy đo pH-827, máy khuấy từ,... được cung cấp tại Viện Sinh học; kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường FE-SEM Hitachi-S4800 cung cấp bởi Viện Vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; máy ly tâm để bàn hãng Hanil Combi 408 (Hàn Quốc) và máy ủ nhiệt khô Labnet AccuBlock™ Digital (Mỹ) cung cấp tại Phòng nghiên cứu R&D, Công ty Cổ phần Sinh học phân tử GeneViet.

3.2. Địa điểm và thời gian thực hiện đề tài

3.2.1. Địa điểm

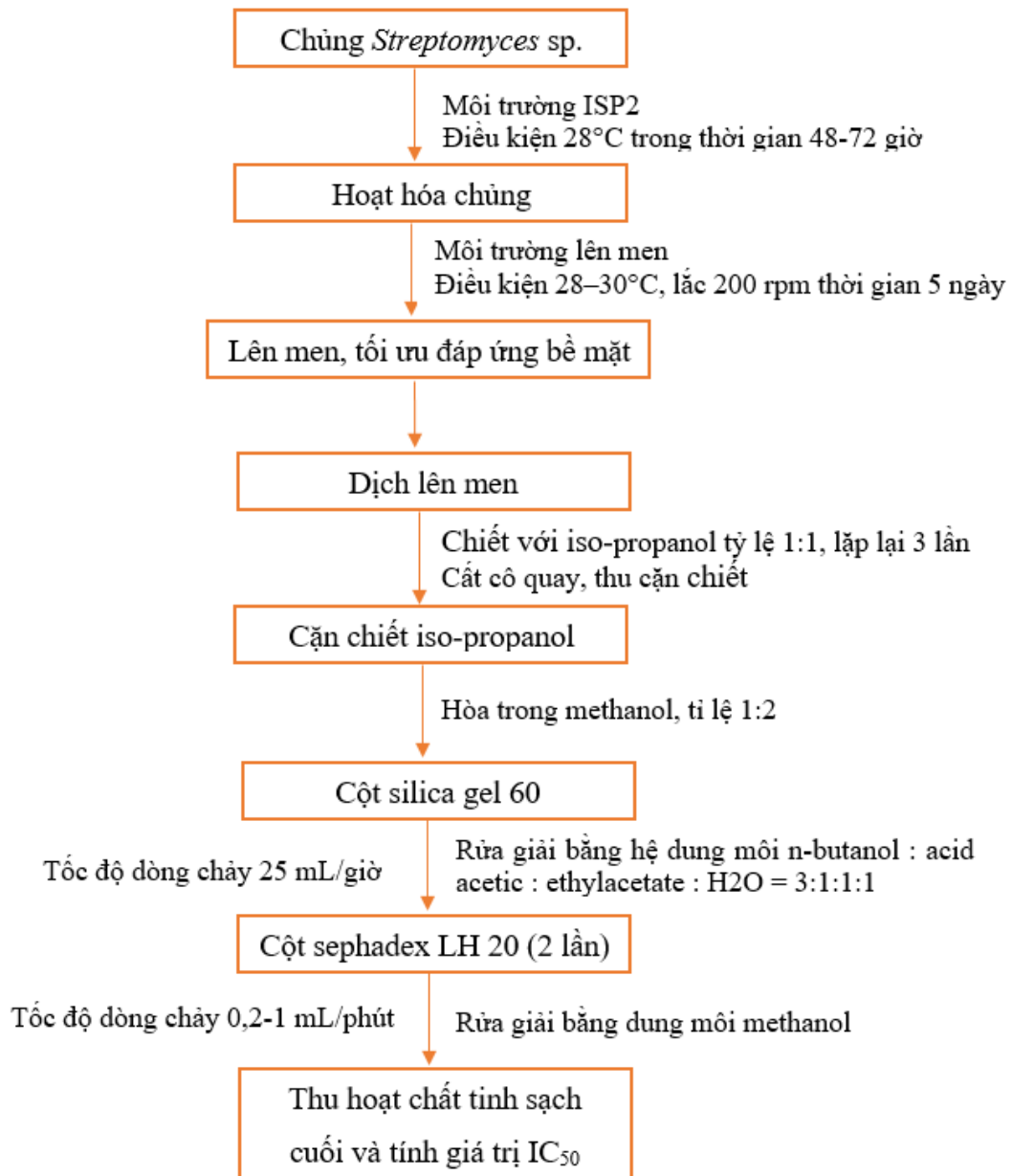
Đề tài được thực hiện tại Phòng Công nghệ sinh học Enzyme – Viện Sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

3.2.2. Thời gian nghiên cứu

Luận văn này được thực hiện từ tháng 08 năm 2025 đến tháng 05 năm 2026 trong nội dung của đề tài: “Sàng lọc, tinh sạch, xác định cấu trúc và cơ chế kích hoạt AMPK trong tế bào mô mỡ 3T3-L1 của một vài hoạt chất thứ cấp mới mà ức chế α -glucosidase có nguồn gốc từ *Aspergillus*, *Oceanimonas* và *Streptomyces* phân lập ở Việt Nam”, mã số: 106.02-2023.47, Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (Nafosted), giai đoạn 2024-2026.

3.3. Phương pháp nghiên cứu

Với mục tiêu của đề tài, chúng tôi đưa ra nội dung nghiên cứu được thực hiện theo sơ đồ sau:



Hình 3.1. Sơ đồ nghiên cứu

3.3.1. Phân loại chủng

Các chủng xạ khuẩn được phân loại dựa trên đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh hóa và trình tự gene 16S rRNA. Hình thái khuẩn lạc được xác định sử dụng kính hiển vi điện tử FE-SEM (Hitachi-S4800, Nhật Bản) và tiến hành tại Viện Vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trình tự gen 16S rRNA được khuếch đại với phản ứng PCR [26] sử dụng cặp mồi có trình tự: 27F.1: 5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3' và 1429R.1: 5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3'. Kết quả trình tự được kiểm tra trên máy ABI PRISM 3100. Phần mềm DNASTar và BLAST được sử dụng để phân tích trình tự nucleotide.

3.3.2. Nuôi cấy và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp chất ức chế α -glucosidase

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. được hoạt hóa trên môi trường ISP2 agar ở điều kiện 28°C – 30°C trong thời gian 5 ngày. Sau đó được cấy nuôi giống cấp 1 trong môi trường ISP2 lỏng ở 28°C, lắc 200 vòng/phút trong 24 giờ, rồi chuyển sang môi trường mới cùng loại và tiếp tục nuôi lắc ở cùng điều kiện trong 7 ngày. Sau 7 ngày nuôi cấy, dịch nuôi cấy ngoại bào được ly tâm ở 10000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch trong thử hoạt tính ức chế α -glucosidase để làm tiêu chí tuyển chọn chủng vi sinh vật sinh tổng hợp các hoạt chất ức chế α -glucosidase mạnh.

3.3.3. Lên men chủng xạ khuẩn sinh tổng hợp AGIs

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. đã tuyển chọn được hoạt hóa trong môi trường ISP2 lỏng ở nhiệt độ 28-30°C, lắc 200 vòng/phút. Sau 48-72 giờ, chủng được cấy chuyển trên đĩa thạch ISP2, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5-7 ngày cho đến khi hình thành khuẩn lạc rõ và bào tử phát triển đầy đủ. Sau đó, xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường lên men ở điều kiện nhiệt độ 28-30°C, lắc 200 vòng/phút trong 5 ngày [7]. Dịch nuôi cấy ngoại bào được ly tâm ở 10000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch trong để xác định hoạt tính ức chế α -glucosidase.

3.3.4. Xác định hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

α -glucosidase là enzym xúc tác phản ứng thủy phân liên kết α -1,4-glycosid. Cơ chất được dùng trong thí nghiệm này là p-nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (*pNPG*);

khi bị enzyme phân giải sẽ giải phóng ra p-nitrophenyl có màu vàng, hấp thụ mạnh tại bước sóng 405 nm. Khi có sự hiện diện của chất ức chế, hoạt tính của α -glucosidase sẽ bị suy giảm một phần, dẫn đến lượng p-nitrophenyl tạo thành thấp hơn so với mẫu không chứa chất ức chế. Giá trị mật độ quang khi đo tại bước sóng 405 nm được xác định cho sự thay đổi này [48].

Trong mỗi giếng phản ứng, bổ sung 40 μ L đệm 0,1 M potassium phosphate pH 6,9; thêm 100 μ L α -glucosidase 1-2 U/mL đã được pha trong cùng loại đệm. Sau đó, thêm 10 μ L dung dịch mẫu (mẫu đối chứng thay bằng đệm 0,1 M potassium phosphate pH 6,9). Hỗn hợp ủ ở 30°C trong 10 phút và lắc ở tốc độ 300 vòng/phút. Tiếp theo, bổ sung thêm 50 μ L cơ chất pNPG (pha trong cùng loại đệm), trộn đều hỗn hợp và tiếp tục ủ ở 25°C trong 5 phút, lắc 300 vòng/phút. Giá trị OD đo tại bước sóng 405 nm ở thời điểm ban đầu (0 phút) và sau 5 phút sau khi bổ sung cơ chất. Nồng độ ức chế α -glucosidase (%) được tính theo công thức:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\Delta OD_{control} - \Delta OD_{sample}}{\Delta OD_{control}} \times 100$$

Trong đó:

$\Delta OD_{control}$ - là độ biến thiên giá trị OD_{405 nm} ở thời điểm 0 phút và 5 phút của mẫu đối chứng.

ΔOD_{sample} - là độ biến thiên giá trị OD_{405 nm} ở thời điểm 0 phút và 5 phút của mẫu thử.

3.3.5. Phương pháp nghiên cứu tối ưu khả năng sinh tổng hợp chất AGIs bằng phương pháp đáp ứng bề mặt

3.3.5.1. Nguyên lý

Phương pháp đáp ứng bề mặt là tập hợp các kỹ thuật toán học và thống kê để quy hoạch thực nghiệm. Một trong các ứng dụng phổ biến của phương pháp này là tối ưu hóa giá trị đầu ra (đáp ứng) chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố (biến) bằng cách tìm ra các điểm (trong giới hạn của mỗi biến) mà tại đó đáp ứng được dự đoán là tối ưu [6].

3.3.5.2. Quy trình

Toàn bộ quy trình sử dụng phần mềm Design expert 10.0.0® của Stat-Ease Inc. USA, tiến hành lần lượt các bước như sau:

Xác định hàm đáp ứng, biến và phạm vi nghiên cứu: Hàm đáp ứng được chọn là hoạt tính ức chế α -glucosidase (IU/mL). Ba yếu tố RSM-CCD được lựa chọn để tối ưu là nồng độ cao nấm men, nồng độ glucose và độ pH, các yếu tố này được thiết kế theo 5 mức: $-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$ tương ứng phạm vi nghiên cứu.

Bảng 3.1. Nồng độ ba yếu tố dùng trong RSM-CCD

Biến thực	Đơn vị	Biến mã hóa	Phạm vi nghiên cứu	Mức				
				-1,316 ($-\alpha$)	-1	0	+1	+1,316 ($+\alpha$)
Yeast extract	(g/L)	A	5,0 – 20,0	0,26	5,0	12,5	20,0	22,37
Glucose	(g/L)	B	2,0 – 10,0	0,74	2,0	6,0	10,0	11,26
Độ pH		C	6,0 – 8,0	5,68	6,0	7,0	8,0	8,32

Quy hoạch thực nghiệm: Kế hoạch thực nghiệm gồm 20 thí nghiệm tương ứng 20 môi trường với các nồng độ khác nhau của các yếu tố tối ưu. Tiến hành nuôi cấy chủng *Streptomyces* sp. trong các môi trường này, ly tâm môi trường lên men ở 10000 rpm trong 10 phút, thu dịch nổi và xác định hoạt tính bằng phương pháp chuẩn độ pH tự động.

Thiết lập phương trình hồi quy: Từ kết quả nghiên cứu, thiết lập một phương trình hồi quy đặc trưng cho sự phụ thuộc của hàm đáp ứng Y vào các biến A, B, C. Mô hình được biểu diễn qua phương trình bậc 2:

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{33}C^2 + b_{12}AB + b_{23}BC + b_{13}AC$$

Trong đó: b_1, b_2, b_3 là các hệ số bậc 1;

b_{11}, b_{22}, b_{33} là các hệ số bậc 2;

b_{12}, b_{23}, b_{13} là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố;

A, B, C, $A^2, B^2, C^2, AB, BC, AC$ là các biến độc lập.

Xây dựng mô hình tối ưu: Cài đặt các yêu cầu riêng cho từng biến (tối thiểu, tối đa, trong khoảng giới hạn) sau đó xây dựng một mô hình tối ưu từ phương trình hồi quy gồm các phương án tương ứng với các môi trường thỏa mãn yêu cầu cài đặt và mức kì vọng của phương án.

Số liệu được phân tích bằng chương trình Design expert 7.0.0[®] của Stat-Ease Inc. USA. Từ kết quả phân tích, lựa chọn phương án tối ưu là phương án thỏa mãn đồng thời 2 điều kiện: hoạt tính ức chế α -glucosidase cao và mức kì vọng cao.

Bảng 3.2. Kế hoạch thực nghiệm theo RSM-CCD để tối ưu hóa hoạt tính ức chế alpha glucosidase của hợp chất sinh tổng hợp

Thí nghiệm	A	B	C	Hoạt tính ức chế AGIs (%)	
				Thực nghiệm	Suy từ mô hình
1	1,000	-1,000	-1,000	45,08	
2	0,000	0,000	-1,316	57,8	
3	0,000	0,000	0,000	76,8	
4	1,316	0,000	0,000	57,8	
5	0,000	-1,316	0,000	45,4	
6	-1,000	1,000	1,000	42,48	
7	-1,000	1,000	-1,000	70,0	
8	1,000	-1,000	1,000	46,2	
9	-1,316	0,000	0,000	31,2	
10	-1,000	-1,000	1,000	9,68	
11	0,000	0,000	0,000	80,48	
12	0,000	0,000	0,000	78,08	
13	0,000	0,000	1,316	46,6	
14	0,000	0,000	0,000	77,2	
15	0,000	1,316	0,000	84,88	

16	-1,000	-1,000	-1,000	4,2	
17	0,000	0,000	0,000	75,68	
18	1,000	1,000	1,000	37,76	
19	0,000	0,000	0,000	78,6	
20	1,000	1,000	-1,000	55,84	

3.3.6. Phương pháp nghiên cứu lựa chọn các dung môi tách chiết

Dịch ngoại bào được chiết với các dung môi hữu cơ có độ phân cực khác nhau để khảo sát chọn lựa các dung môi có khả năng tách các hoạt chất AGIs tốt nhất.

Các dung môi được sử dụng có độ phân cực khác nhau: n-butanol, ethyl acetat, chloroform, dichlormethane, n-hexan, methanol và isopropanol với tỉ lệ nguyên liệu : dung môi (v/v) là 1:1, lắc 1 giờ (lặp lại 3 lần), thu pha dung môi. Pha dung môi được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng và xác định hoạt tính ức chế α -glucosidase.

3.3.7. Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Nguyên tắc: Phương pháp sắc ký lớp mỏng dựa trên sự phân bố khác nhau của các chất giữa hai pha: pha tĩnh (là lớp chất hấp phụ được phủ mỏng trên bề mặt kính hoặc nhôm) và pha động (là hệ dung môi thích hợp chứa trong bình kín, bên trong đặt bản mỏng). Dưới tác dụng của lực mao dẫn, dung môi pha động di chuyển dọc theo pha tĩnh, đồng thời kéo theo các cấu tử trong mẫu. Do mỗi chất có tốc độ di chuyển khác nhau nên chúng được tách riêng, Hình thành các vết tại những vị trí khác nhau trên bản mỏng. Khả năng phân tách của từng chất thường được đánh giá thông qua giá trị R_f , phản ánh tốc độ di chuyển của chất [49].

$$R_f = \frac{a}{b}$$

Trong đó :

a – Khoảng cách di chuyển của chất cần phân tích

b – Khoảng cách di chuyển của dung môi

Các chất sau khi tách trên bản mỏng có thể được phát hiện bằng các phản ứng

tạo màu đặc trưng và đối chiếu với chất chuẩn. Trong trường hợp sự phân tách chưa rõ ràng, có thể điều chỉnh thành phần hoặc tỷ lệ các dung môi trong pha động để cải thiện hiệu quả. Việc bổ sung dung môi kém phân cực hoặc tăng tỷ lệ của chúng sẽ làm các hợp chất ít phân cực di chuyển nhanh hơn khỏi vị trí ban đầu, và ngược lại.

Cách tiến hành:

- Chuẩn bị bản TLC: Sử dụng bản mỏng silica gel 60 F254 (phổ biến nhất), có lớp mỏng đồng đều dày 0,2 – 0,25 mm, sấy bản mỏng (khoảng 110°C) bằng máy sấy hoặc tủ sấy nếu độ ẩm hơn 60%.

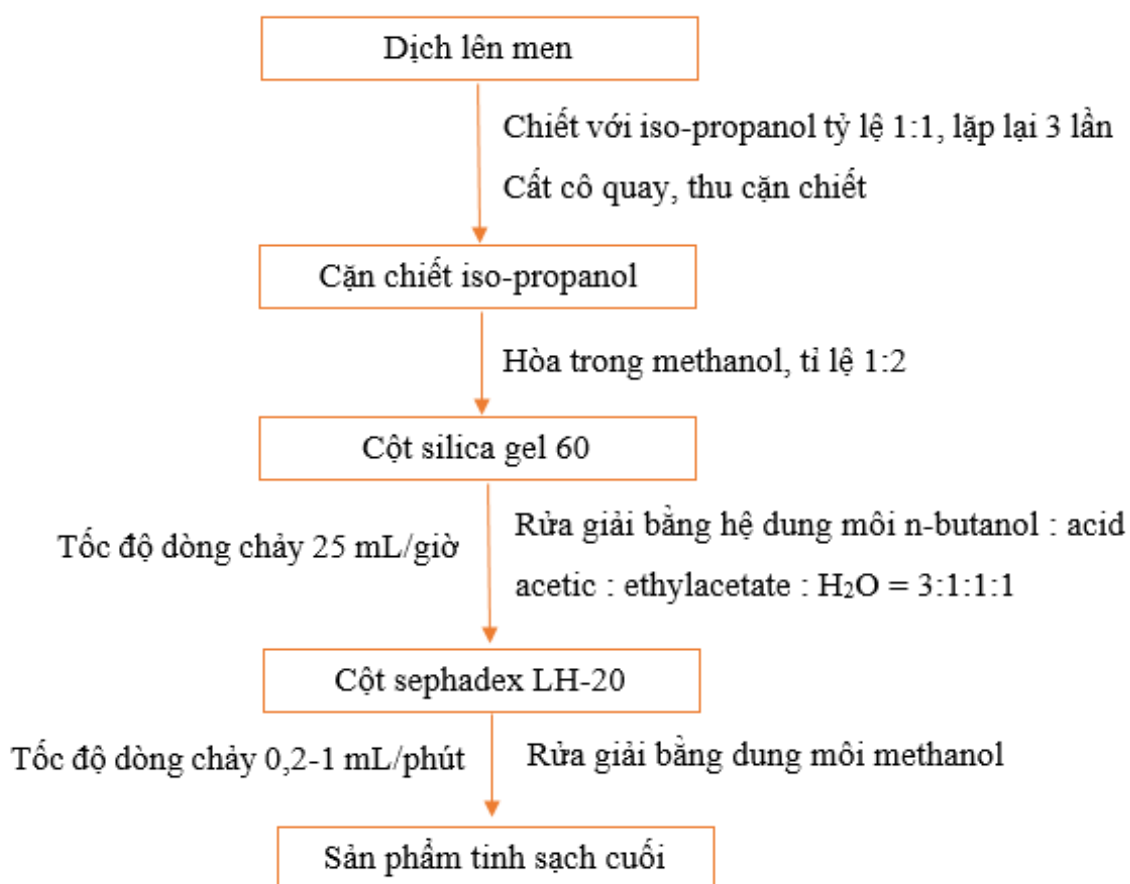
- Tra mẫu: Kẻ vạch xuất phát cho mẫu, cách mép dưới của bản mỏng khoảng 1,0 - 1,5 cm. Sử dụng micropipet (5 - 10 μ L) để lấy mẫu và chấm lên các vị trí đã đánh dấu trên bản mỏng. Các điểm chấm cần nhỏ gọn, tập trung, tránh lan rộng nhằm đảm bảo độ phân giải cao. Sau đó, để các vết chấm khô hoàn toàn (có thể sấy khô) trước khi tiến hành bước tiếp theo.

- Chạy sắc ký: Đặt cân bằng bản gel đã chấm mẫu vào bình sắc ký có nắp kín. Lưu ý mức dung môi cần luôn thấp hơn vạch xuất phát của mẫu. Dung môi rửa giải (pha động) dâng lên nhờ mao dẫn, kéo theo các phân tử mẫu di chuyển với tốc độ khác nhau. Khi dung môi di chuyển gần tới mép trên của bản sắc ký (khoảng cách 3/4 chiều dài bản) thì ngừng quá trình sắc ký. Bản gel được lấy ra, sấy khô và đánh dấu vị trí dung môi.

- Hiện thị và phân tích kết quả: Các vết chất được quan sát bằng phản ứng nhuộm màu đặc trưng dưới tác dụng của thuốc thử hóa học. Khoảng cách di chuyển của các vết được đo, từ đó tính giá trị R_f để nhận diện hợp chất.

3.3.8. Tách chiết và tinh sạch hoạt chất ức chế α -glucosidase

Sau khi thu được dịch lên men, tiến hành thí nghiệm chiết xuất dịch ngoại bào với các dung môi hữu cơ có độ phân cực khác nhau để khảo sát chọn lựa các dung môi có khả năng tách các hoạt chất ức chế α -glucosidase tốt nhất. Sau khi khảo sát, quá trình tinh sạch hoạt chất có hoạt tính ức chế α -glucosidase từ môi trường nuôi cấy của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. S12.2 được mô tả tóm tắt như Hình 3.2.



Hình 3.2. Sơ đồ tóm tắt quá trình tinh sạch hợp chất ức chế α -glucosidase

3.3.8.1. Nghiên cứu lựa chọn các hệ dung môi pha động cho sắc ký

Tiến hành sắc ký lớp mỏng đối với mẫu dịch lên men và dịch chiết cuối bằng 5 hệ dung môi khác nhau với các tỷ lệ khác nhau, nhằm đánh giá khả năng tách các thành phần có trong mẫu trên bản mỏng silica gel.

- (1) n-butanol : acid acetic : H_2O = 3:1:1
- (2) n-butanol : ethanol : H_2O = 5:3:2
- (3) isopropanol : ethylacetate : H_2O = 3:1:1
- (4) n-butanol : methanol : H_2O = 5:3:2
- (5) n-butanol : acid acetic : ethylacetate : H_2O = 3:1:1:1

3.3.8.2. Phương pháp sắc ký cột silica gel 60

Nguyên lý của sắc ký cột silica gel 60 dựa trên sự khác biệt về ái lực của các phân tử mẫu đối với pha tĩnh (silica gel) và pha động (dung môi rửa giải). Các phân tử có độ phân cực cao sẽ tương tác mạnh với bề mặt silica gel, di chuyển chậm hơn

trong cột; ngược lại, các phân tử ít phân cực hoặc kỵ nước hơn sẽ được rửa giải ra khỏi cột nhanh hơn khi sử dụng dung môi phù hợp. Sự lựa chọn dung môi và hệ dung môi có vai trò quyết định đến khả năng phân tách, thường được xây dựng dựa trên nguyên tắc tăng dần độ phân cực (gradient elution) [50].

Cách tiến hành:

- Chuẩn bị cột: Đặt 1 lớp bông thủy tinh dưới đáy cột rồi đổ từ từ hỗn hợp silica gel và hệ dung môi lựa chọn, gõ nhẹ thành cột để loại bỏ bọt khí. Để ổn định cột khoảng 1-2 giờ. Sau đó mở khóa cột cho dung môi dư chảy từ từ đến mặt phẳng cột.

- Nạp mẫu lên cột: Hòa tan cặn chiết với 3 mL methanol. Nhẹ nhàng cho mẫu lên cột. Rửa cột bằng dung môi để đảm bảo mẫu đi vào lớp silica gel.

- Rửa giải: Bổ sung thêm hệ dung môi lựa chọn và duy trì ở tốc độ dòng chảy khoảng 25 mL/giờ.

- Thu phân đoạn: Thu dịch rửa giải theo từng ống. Mỗi phân đoạn được thu với thể tích 2 mL. Các phân đoạn sau đó được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp TLC và đánh giá hoạt tính.

3.3.8.3. Phương pháp sắc ký cột lọc gel Sephadex LH 20

Cơ chế tách của Sephadex LH 20 dựa trên sự khác biệt về kích thước và mức độ tương tác giữa các phân tử với mạng lưới gel. Các phân tử có kích thước lớn sẽ di chuyển nhanh hơn và được rửa giải trước, trong khi các phân tử nhỏ hơn hoặc có tương tác mạnh hơn với pha tĩnh sẽ bị giữ lại lâu hơn trong cột. Ngoài ra, các tương tác π - π và liên kết hydro giữa gel và các hợp chất giàu vòng thơm cũng góp phần vào quá trình phân tách [51].

Cách tiến hành:

- Chuẩn bị cột: Cân khoảng 5mg Sephadex LH 20 và ngâm trong methanol khoảng 2-4 giờ. Dùng đĩa thủy tinh khuấy nhẹ để trương nở gel hoàn toàn và loại bỏ bọt khí. Đặt 1 lớp bông thủy tinh dưới đáy cột rồi đổ từ từ hỗn hợp gel đã trương nở, gõ nhẹ thành cột để loại bỏ bọt khí. Để ổn định cột khoảng 1-2 giờ, đảm bảo không có bọt khí và bề mặt gel phẳng. Sau đó mở khóa cột cho methanol dư chảy từ

từ đến mặt phẳng cột.

- Chuẩn bị và nạp mẫu lên cột: hòa tan cặn chất cần tinh sạch trong 1-2 mL methanol sau đó nạp mẫu nhẹ nhàng lên cột. Rửa cột bằng methanol để đảm bảo mẫu đi vào lớp gel Sephadex LH 20.

- Rửa giải: bổ sung liên tục dung môi methanol và duy trì tốc độ dòng chảy khoảng 0,2-1 mL/phút. Chú ý không làm thay đổi đột ngột tốc độ dòng chảy.

- Thu phân đoạn: Thu dịch rửa giải theo từng ống. Mỗi phân đoạn được thu với thể tích 2 mL. Các phân đoạn sau đó được kiểm tra độ tinh sạch bằng sắc ký đồ TLC.

3.3.9. Xác định giá trị IC_{50}

IC_{50} (nồng độ gây ức chế 50% hoạt tính) là một chỉ số dùng để đánh giá khả năng ức chế của một chất đối với chức năng sinh học hoặc quá trình hóa sinh cụ thể. Đây là thông số định lượng phản ánh lượng chất ức chế cần thiết để làm giảm 50% hoạt động của một hệ sinh học hoặc thành phần sinh học nhất định. Thành phần này có thể bao gồm enzyme, tế bào, thụ thể tế bào hoặc vi sinh vật.

Các bước xác định IC_{50} bao gồm : (1) Chuẩn bị các dung dịch mẫu thử với dải nồng độ khác nhau; (2) Đo hoạt tính ức chế α -glucosidase của từng mẫu; (3) Thiết lập phương trình đường chuẩn với hệ số tương quan R^2 gần bằng 1 được xem là tối ưu; (4) Từ đó xác định nồng độ mẫu tương ứng với mức ức chế 50% hoạt tính.

3.3.10. Xử lý số liệu

Phần mềm DNASTar: xử lý kết quả giải trình tự DNA.

Phần mềm Excel: xử lý số liệu thống kê, các giá trị được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$ (\bar{X} là giá trị trung bình, SD là độ lệch chuẩn của các giá trị đo).

Phần mềm Design-Expert 7: xử lý số liệu tối ưu đáp ứng ma trận.

CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

4.1. Tuyển chọn chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. có khả năng sinh tổng hợp chất ức chế α -glucosidase

4.1.1. Tuyển chọn chủng xạ khuẩn có hoạt tính ức chế α -glucosidase

Dựa vào những đặc điểm chung về hình thái của xạ khuẩn, sau khi phân lập từ 50 mẫu đất và 50 mẫu nước thu thập ở ven vùng bờ biển Nha Trang, chúng tôi thu được 36 chủng xạ khuẩn thuộc vào chi *Streptomyces* sp. Các chủng xạ khuẩn sau khi được hoạt hóa trên môi trường ISP2 agar được nhật nuôi giống cấp 1 ở 28°C, lắc 200 vòng/phút trong 24 giờ, sau đó chuyển sang môi trường ISP2 lỏng và tiếp tục nuôi lắc ở cùng điều kiện trong 7 ngày. Sau 7 ngày nuôi cấy, dịch nuôi cấy ngoại bào được ly tâm ở 10000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch trong để thử hoạt tính ức chế α -glucosidase.

Bảng 4.1. Hoạt tính ức chế α -glucosidase của các chủng *Streptomyces* sp.

STT	Chủng	Hoạt tính ức chế α -glucosidase (%)	STT	Chủng	Hoạt tính ức chế α -glucosidase (%)
1	S12.2	27,49 \pm 1,21	19	H08	âm tính
2	S21	21,47 \pm 0,84	20	H09	7,98 \pm 0,22
3	S37	âm tính	21	H10	6,92 \pm 0,48
4	S39	7,30 \pm 0,46	22	H11	4,77 \pm 0,14
5	S23	âm tính	23	H12	âm tính
6	S50	âm tính	24	H13	26,35 \pm 1,43
7	S11	âm tính	25	H14	âm tính
8	S13	24,42 \pm 1,52	26	H15	âm tính
9	S70	21,20 \pm 0,66	27	H16	21,75 \pm 1,90
10	S74	23,18 \pm 1,84	28	H17	19,36 \pm 0,5
11	S2	âm tính	29	H18	9,30 \pm 0,50
12	H01	6,60 \pm 0,46	30	H19	4,38 \pm 0,90
13	H02	âm tính	31	H20	âm tính

14	H03	24,90 ±1,23	32	H21	âm tính
15	H04	âm tính	33	H22	âm tính
16	H05	âm tính	34	H23	âm tính
17	H06	âm tính	35	H24	âm tính
18	H07	âm tính	36	H25	âm tính

Kết quả thu được ở Bảng 4.1 cho thấy trong tổng số 36 chủng xạ khuẩn phân lập được đã sàng lọc ra 16 chủng có hoạt tính ức chế α -glucosidase, trong đó chủng S12.2 có hoạt tính ức chế α -glucosidase là cao nhất đạt 27,49%.

Các nghiên cứu gần đây đã cho thấy tiềm năng đáng kể của xạ khuẩn, đặc biệt là chi *Streptomyces*, trong việc sinh tổng hợp các hợp chất ức chế α -glucosidase có ý nghĩa trong điều trị đái tháo đường. Abdulkhair và cộng sự (2018) khi tiến hành phân lập 55 chủng xạ khuẩn biển đã cho thấy 7 chủng có khả năng ức chế α -glucosidase. Trong đó, chủng mạnh nhất, được đánh dấu là AD-7, được xác định là *Streptomyces coelicolor*, có hoạt tính ổn định trong điều kiện khảo sát [4]. Nguyễn Thị Trung và cộng sự (2022) cũng cho thấy tiềm năng tương tự khi đã phân lập 30 chủng vi sinh vật nội sinh từ cây có múi tại Hòa Bình, trong đó chủng *Streptomyces costaricanus* EBL.HB6 được tuyển chọn nhờ hoạt tính ức chế α -glucosidase cao (68,98%) [7]. Lu và cộng sự (2023) đã phân lập và tuyển chọn thành công hai chủng xạ khuẩn có nguồn gốc từ rừng ngập mặn là *Streptomyces* sp. WHUA03267 và *Streptomyces* sp. WHUA03072, trong đó cả hai đều biểu hiện hoạt tính ức chế α -glucosidase mạnh (~80%), khẳng định tiềm năng to lớn của *Streptomyces* trong việc cung cấp nguồn hợp chất tự nhiên phục vụ điều trị đái tháo đường type II [44]. Kết quả này không chỉ khẳng định nguồn vi sinh vật nội sinh là một hướng khai thác tiềm năng mà còn cho thấy sự hiện diện phổ biến của các chủng *Streptomyces* sp. có hoạt tính sinh học trong các hệ sinh thái khác nhau.

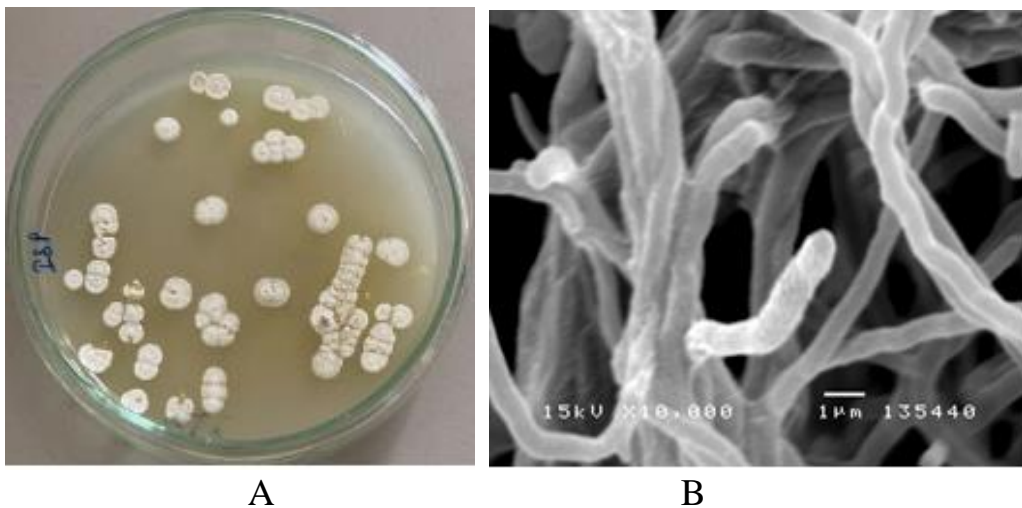
4.1.2. Đặc điểm hình thái

Hình ảnh khuẩn lạc và hình ảnh SEM của chủng *Streptomyces* sp. S12.2 với các đặc điểm đặc trưng như: khuẩn lạc phát triển nhanh, nhiệt độ 28°C, hệ sợi khí

sinh có màu trắng ngà. Đĩa giá thể được hình thành, phát triển thành từng khối trên bề mặt đệm nấm, có màu ngà, cấu trúc cứng, kích thước dao động từ 1–3 mm, hình dạng từ đĩa đến gần hình cầu hoặc hơi kéo dài.

Cuống sinh bào tử có dạng hình trụ, kích thước khoảng $5,0-1,5 \times 2,0-5,0 \mu\text{m}$, phân bố xen kẽ với các sợi sinh dưỡng. Bào tử có dạng elip, không màu khi còn non, sau đó chuyển sang màu vàng xanh khi trưởng thành, có một vách ngăn ngang, với 7–9 rãnh dọc; kích thước phổ biến khoảng $20-26 \times 10-15 \mu\text{m}$. Quá trình trưởng thành của bào tử diễn ra tương đối chậm.

Đối với xạ khuẩn thì các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc, khuẩn ty, chuỗi bào tử, đặc điểm bào tử, số lượng bào tử, sự phân chia cành trên một cuống bào tử là các đặc điểm quan trọng được sử dụng trong phân loại và nghiên cứu.



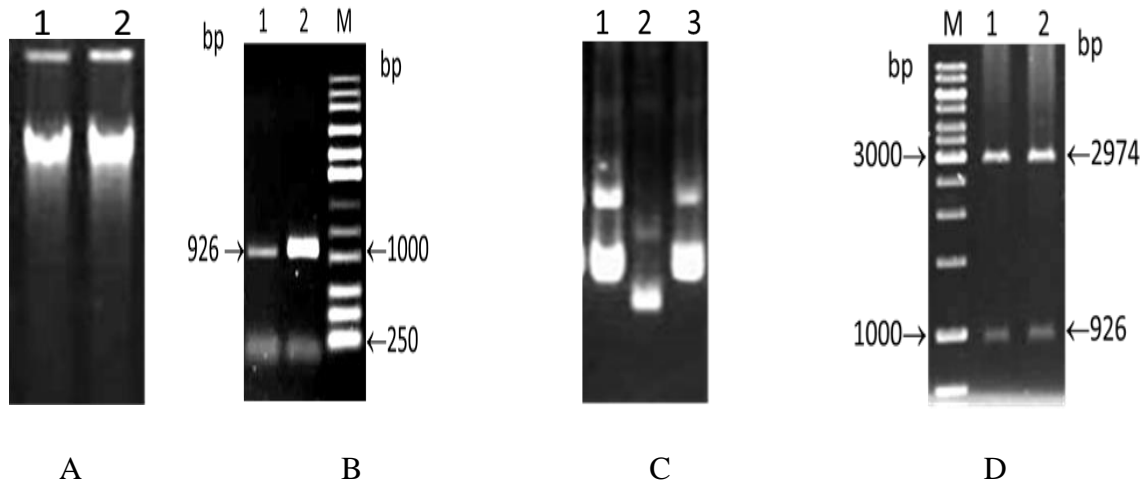
Hình 4.1. Hình ảnh khuẩn lạc (A) và hình ảnh SEM x 10 000 (B) của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. S12.2 được hoạt hóa trên môi trường ISP2 agar

4.1.3. Phân tích trình tự 16S rRNA từ chủng *Streptomyces* sp. S12.2

Kết quả chiết DNA tổng số của chủng *Streptomyces* sp. S12.2 được kiểm tra điện di với gel agarose 0,8%. Kết quả biểu thị trên Hình 4.2A cho thấy DNA tương đối sạch, không bị đứt gãy, đảm bảo cho các nghiên cứu chuyên sâu về nhân dòng và đọc trình tự. Phản ứng PCR được khuếch đại bằng cặp mồi 27F và 1429R, sau khi kiểm tra điện di, sản phẩm thu được có kích thước khoảng 926 bp.

Kết quả trên cho thấy sản phẩm PCR sau khi được gắn vào vector pJET 1.2/blunt và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α đã được tách plasmid (Hình 4.2C) và

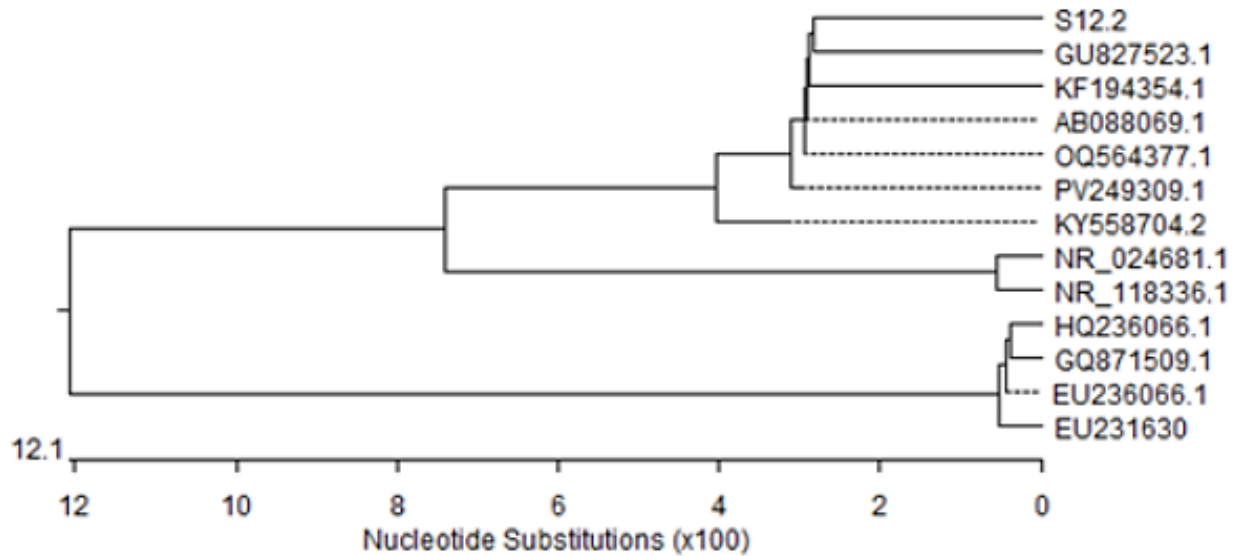
cắt để kiểm tra bằng cặp enzyme cắt hạn chế *Xba*I và *Xho*I. Sản phẩm cắt ở Hình 4.2D cho một đoạn có kích thước ~3kb (2974 bp) tương ứng với kích thước vector pJET1.2, và một đoạn có kích thước ~1,0 kb (926 bp) tương ứng với đoạn 16S rRNA được nhân lên, do vậy plasmid tái tổ hợp có khả năng mang gene chèn.



Hình 4.2. Ảnh điện di

(A) Điện di đồ sản phẩm DNA (1-2: mẫu DNA tổng số tách ra từ chủng *Streptomyces sp.* S12.2); (B) và sản phẩm PCR đoạn gene 16S rRNA với khuôn DNA tách chiết từ chủng *Streptomyces sp.* S12.2 (1-2: mẫu sản phẩm PCR từ khuôn DNA chủng *Streptomyces sp.* S12.2; M: Marker); (C) Điện di đồ Sản phẩm plasmid (1,3: plasmid có phân đoạn chèn từ chủng *Streptomyces sp.* S12.2; 2: plasmid đối chứng); (D) Sản phẩm cắt vector tái tổ hợp bằng *Xba*I và *Xho*I (1,2: từ chủng *Streptomyces sp.* S12.2; M: Marker)

So sánh trình tự đoạn gene 16S rRNA của chủng *Streptomyces sp.* S12.2 so với một số trình tự gene 16S rRNA của các chủng *Streptomyces sp.* đã công bố trên Genbank cho thấy, chủng *Streptomyces sp.* S12.2 có quan hệ họ hàng gần gũi với một số đại diện thuộc chi *Streptomyces sp.* Phân tích số liệu bằng phần mềm DNASTAR cho thấy chủng *Streptomyces sp.* S12.2 được phân lập ở mẫu đất Nha Trang Việt Nam có độ tương đồng 99,89% với *Streptomyces murinus* (số hiệu truy cập OQ564377.1 và PV249309.1) (Hình 4.3) trên ngân hàng Genbank. Như vậy có thể kết luận chủng *Streptomyces sp.* S12.2 là chủng *Streptomyces murinus* S12.2 và chủng này được đăng ký trên Genbank với tên là chủng *Streptomyces murinus* EBL140325 với mã số PV300249.1.

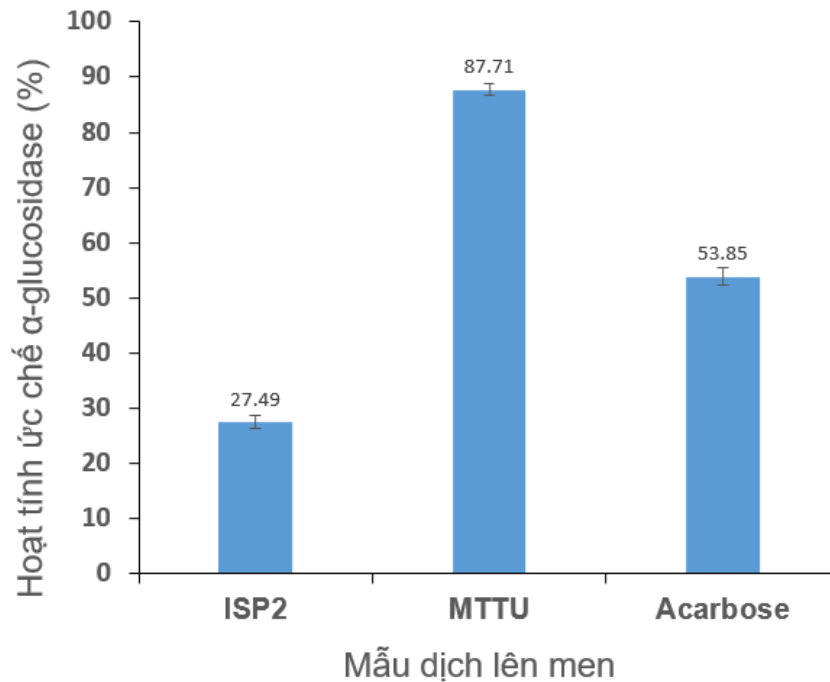


Hình 4.3. Cây phát sinh chủng loài của gen 16S rRNA chủng *Streptomyces* sp. S12.2 với các chủng tham chiếu trong Genbank (*GU827523.1*: *Streptomyces* sp. INBIO2579, *KF194354.1*: *Streptomyces* sp. HW56, *AB088069.1*: *Streptomyces* sp. TP.A0274, *OQ564377.1*: *Streptomyces murinus* CL12, *PV249309.1*: *Streptomyces murinus* ZMA01 và *KY558704.2*: *Streptomyces* sp.RB17; Chủng *Actinoplanes* sp. bao gồm các mã NR.024681.1 và NR 118336.1. Chủng *Bacillus* sp. bao gồm các mã HQ 236066.1, GQ871509.1, EU236066.1 và EU231630.1)

Hiện nay, đa số các nhà nghiên cứu đều chấp nhận nguyên tắc phân loại mà theo đó các cá thể có độ tương đồng của gene 16S rRNA lớn hơn 99% được xếp cùng một đơn vị phân loài (operational taxonomic unit). Với nguyên tắc như vậy cùng với các dữ liệu so sánh trên, các chủng *Streptomyces murinus* phân lập ở Việt Nam tương ứng được xác định chính xác là loài *Streptomyces murinus* EBL140325.

4.1.4. Kết quả lên men chủng *Streptomyces* sp. S12.2

Chủng *Streptomyces murinus* S12.2 với hoạt tính ức chế α -glucosidase đạt cao nhất trong các chủng khảo sát (27,49%) được nuôi lên men trong môi trường bao gồm cao nấm men 16 g/L, glucose 4 g/L, pH 6,5. Sau khi lên men ở điều kiện 200 vòng/phút, nhiệt độ 28°C trong thời gian 5 ngày. Dịch chiết ngoại bào có hoạt tính ức chế α -glucosidase là 87,71%, tăng gấp >3 lần so với môi trường ISP2 ban đầu (Hình 4.4), trong khi đối chứng dương acarbose đạt 53,85%.



Hình 4.4. Hoạt tính AGIs của mẫu dịch lên men so với đối chứng acarbose (Ghi chú: ISP2 - lên men bằng môi trường ISP2; MTTU - lên men bằng môi trường tối ưu)

Thành phần môi trường lên men có ảnh hưởng quyết định đến khả năng sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp của xạ khuẩn, đặc biệt là các hợp chất ức chế α -glucosidase. Trong nghiên cứu này, điều kiện tối ưu gồm glucose 4 g/L, cao nấm men 16 g/L và pH 6,5 cho thấy hiệu quả rõ rệt trong việc kích thích chủng *Streptomyces* sp. sinh tổng hợp hoạt chất ức chế α -glucosidase.

Sanchez và cộng sự (2002) đã tối ưu hóa lên men trên *Streptomyces* sp. cũng cho thấy việc kiểm soát nồng độ carbon ở mức vừa phải là yếu tố quan trọng để tăng năng suất sản xuất hợp chất sinh học. Trong khi đó, nguồn nitơ hữu cơ có thể kích thích biểu hiện các cụm gen sinh tổng hợp chất thứ cấp ở xạ khuẩn, đặc biệt đối với các hợp chất có cấu trúc chứa nitrogen [52]. Nguyễn Tiến Cương và cộng sự (2021) đã chứng minh việc tối ưu hóa môi trường nuôi cấy đã giúp tăng đáng kể khả năng sinh tổng hợp chất ức chế α -glucosidase từ các chủng vi sinh vật [5]. Nguyễn Thị Trung và cộng sự (2022) cho thấy pH môi trường 6,5 được xem là tối ưu cho cả sinh trưởng và hoạt tính enzyme của *Streptomyces*. Nồng độ pH này phù hợp với khoảng pH tối ưu đã được ghi nhận cho nhiều chủng xạ khuẩn sinh tổng hợp chất ức chế α -glucosidase tại Việt Nam (khoảng 5–10) [7]. Nguyễn Hồng Ngọc và cộng sự (2023)

cũng cho thấy tiềm năng lớn của vi sinh vật và nguồn tự nhiên trong việc tạo ra các chất ức chế α -glucosidase, với sự kết hợp giữa nuôi cấy, LC-MS và docking phân tử để sàng lọc hợp chất [53]. Điều này khẳng định rằng việc tối ưu môi trường lên men là bước then chốt nhằm nâng cao hiệu quả khai thác các hợp chất có giá trị dược học.

Tóm lại, sự kết hợp giữa glucose 4 g/L, cao nấm men 16 g/L và pH 6,5 đã tạo điều kiện thuận lợi cho cân bằng giữa sinh trưởng và sinh tổng hợp chất thứ cấp, phù hợp với xu hướng tối ưu hóa đã được ghi nhận trong và ngoài nước.

4.2. Tối ưu hóa thành phần môi trường nuôi cấy theo RSM

Dựa vào kết quả môi trường tối ưu từng yếu tố trên, chúng tôi lựa chọn ba yếu tố RSM-CCD là nồng độ cao nấm men, nồng độ glucose và độ pH 6,5 làm ba biến để tối ưu giá trị đáp ứng là hoạt tính ức chế α -glucosidase.

Từ đó, bài toán tối ưu được thiết lập dựa trên một phương trình hồi quy xác định với phương pháp quy hoạch thực nghiệm là hàm mô tả sự phụ thuộc của hoạt tính ức chế AGIs của hoạt chất sinh tổng hợp được vào các nhân tố nồng độ cao nấm men, độ pH và nồng độ glucose trong quá trình biểu hiện. Điều kiện ràng buộc là giới hạn của vùng nghiên cứu.

Bảng 4.2. Phân tích phương sai (ANOVA)

Std. Dev.	2,74	R-Squared	0,9920
Mean	55,09	Adj R-Squared	0,9861
C.V. %	4,97	Pred R-Squared	0,9596
PRESS	414,81	Adeq Precision	43,845

Sau khi phân tích phương sai (ANOVA), phần mềm Design-Expert đã xây dựng một phương trình hồi quy để mô tả mối quan hệ giữa hoạt tính ức chế AGIs với các biến mã hóa như sau:

$$Y = 77,39 + 8,16A + 13,34B - 4,69C - 12,04AB - 6,52BC - 18,42A^2 - 6,51B^2 - 13,98C^2$$

Trong đó: Y là hoạt tính ức chế AGIs (%)

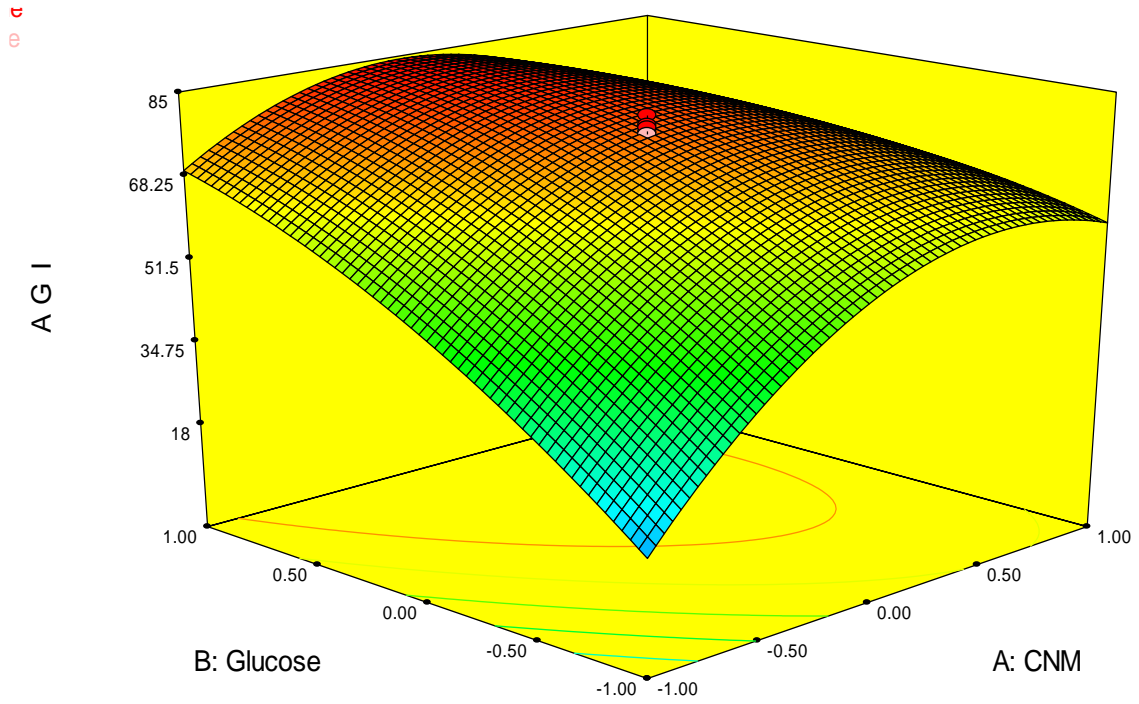
A, B, C lần lượt là các biến mã hóa cho nồng độ cao nấm men, nồng độ glucose và độ pH

Hệ số hồi quy (R^2) thu được đạt 0,9920, cho thấy 99,20% dữ liệu thực nghiệm phù hợp với giá trị dự đoán của mô hình. Giá trị R^2 lớn hơn 0,75 chứng tỏ mô hình có độ tương thích cao với kết quả thực nghiệm, đồng thời phản ánh mối tương quan chặt chẽ rõ ràng giữa các yếu tố thí nghiệm và hoạt chất ức chế AGIs sinh tổng hợp. Tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu đạt $44,845 > 4$ cho thấy tín hiệu thu được là đáng tin cậy và đủ mạnh. Hệ số biến thiên (CV) của thí nghiệm ở mức thấp (4,97%) chứng minh độ phân tán của hoạt tính ức chế AGIs thấp.

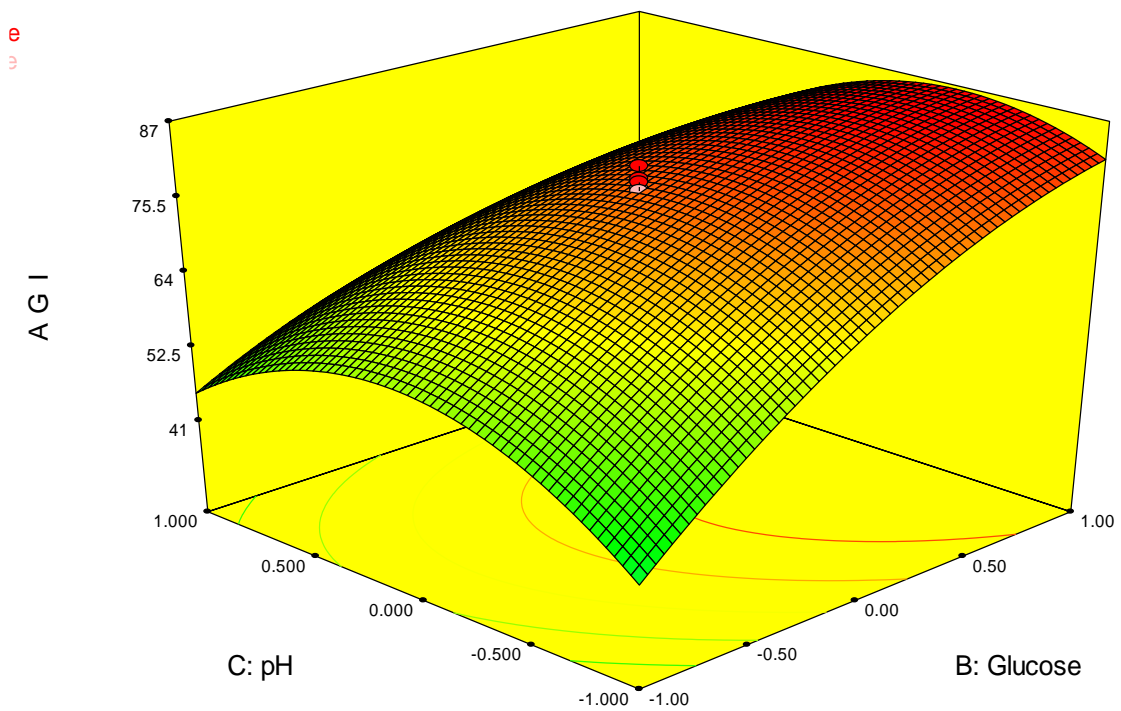
Trong khảo sát, phương trình hồi quy thể hiện hoạt tính enzyme tái tổ hợp chịu ảnh hưởng bậc 1 của cả ba nhân tố nghiên cứu A, B, C, và chịu ảnh hưởng của đồng thời hai cặp yếu tố nồng độ cao nấm men - nồng độ glucose ($A*B$) và nồng độ glucose - độ pH ($B*C$), cặp yếu tố nồng độ cao nấm men - độ pH có ảnh hưởng không đáng kể ($A*C$).

Ảnh hưởng của các yếu tố độc lập có thể được giải thích dựa vào phương trình hồi quy. Nồng độ glucose có ảnh hưởng tích cực bậc 1 đối với hoạt tính ức chế AGIs nhưng lại có ảnh hưởng tiêu cực bậc 2 đối với hoạt tính ức chế này. Điều này có thể giải thích là do khi nồng độ đường ở trong môi trường quá cao sẽ làm tăng áp suất thẩm thấu và hoạt độ nước thấp, dẫn đến ức chế sự phát triển, hấp thu oxy của vi sinh vật. Tương tự đối với nồng độ cao nấm men cũng như vậy, khi sử dụng cao nấm men ở nồng độ cao, hàm lượng muối và các chất hòa tan tạo ra áp suất thẩm thấu lớn, rút nước từ trong tế bào ra ngoài ngoài, gây mất nước và ức chế sự phát triển.

Độ pH có ảnh hưởng tiêu cực thấp nhất đến hoạt tính ức chế AGIs so với hai yếu tố còn lại. Có thể khoảng khảo sát pH từ 6,0 – 8,0 là khoảng ưa thích với đa số các loài xạ khuẩn, nên ảnh hưởng của dải pH khảo sát đến sự sinh trưởng và tổng hợp chên lệch không lớn. Tác động đồng thời của yếu tố này cùng với nồng độ cao nấm men được xác định là ảnh hưởng không lớn đến hàm mục tiêu, nên sau phương trình rút gọn cặp yếu tố này đã được loại bỏ qua thống kê.



Hình 4.5. Mặt đáp ứng hoạt tính ức chế AGIs theo nồng độ cao nấm men và nồng độ đường glucose



Hình 4.6. Mặt đáp ứng hoạt tính ức chế AGIs theo nồng độ glucose và độ pH

Mặt đáp ứng thể hiện trong Hình 4.5 và Hình 4.6 cho thấy sự tương tác của từng cặp yếu tố và từ đó tính toán giá trị tối ưu của từng yếu tố làm cho hàm lượng đáp ứng đạt cực đại. Xử lý kết quả bằng phần mềm đã thu được 7 giải pháp cho hoạt tính ức chế AGIs được cao nhất, mô hình đã dự đoán hoạt tính ức chế AGIs tối đa đạt được ở giải pháp số 1 là 86,672 % ở các giá trị yếu tố nồng độ cao nấm men (11,71 g/L), độ pH (6,6), và nồng độ glucose (10 g/L).

Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) kết hợp thiết kế tâm xoay trung tâm (CCD) được áp dụng trong nghiên cứu này nhằm tối ưu hóa các điều kiện ảnh hưởng đến hoạt tính ức chế α -glucosidase. Kết quả thực nghiệm cho thấy hoạt tính AGIs biến thiên trong khoảng từ 4,2% đến 84,88%, phản ánh sự ảnh hưởng đáng kể của các yếu tố khảo sát cũng như sự tồn tại của các tương tác phi tuyến giữa chúng. Điều này phù hợp với bản chất của quá trình sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp ở vi sinh vật, vốn chịu tác động đồng thời của nhiều yếu tố như dinh dưỡng và môi trường.

Việc áp dụng RSM–CCD cho phép xây dựng mô hình hồi quy bậc hai nhằm mô tả mối quan hệ giữa các biến độc lập và đáp ứng. Ưu điểm nổi bật của phương pháp này là khả năng đánh giá đồng thời các yếu tố riêng lẻ và sự tương tác giữa các yếu tố, trong khi phương pháp cổ điển (OFAT) không thể thực hiện được. Nhiều nghiên cứu đã khẳng định rằng RSM là một công cụ hiệu quả để tối ưu hóa các quá trình lên men phức tạp, giúp giảm số lượng thí nghiệm nhưng vẫn đạt được độ chính xác cao trong dự đoán [54].

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy sự phù hợp tốt giữa giá trị dự đoán và giá trị thực nghiệm, chứng minh tính tin cậy của mô hình. Xu hướng này cũng được ghi nhận trong nhiều công bố trước đây. Ví dụ, nghiên cứu trên chủng *Actinobacillus succinogenes* cho thấy sai số giữa một giá trị dự đoán và một giá trị thực nghiệm chỉ dao động từ 3,02% đến 6,38%, khẳng định về khả năng tính toán chính xác của mô hình RSM–CCD [55]. Tương tự, trong nghiên cứu tối ưu hóa môi trường nuôi cấy, hoạt tính enzyme dự đoán đạt 2210,76 U/g và giá trị thực nghiệm đạt 2207,19 U/g, cho thấy sự sai lệch không đáng kể [56].

Đặc biệt, hiệu quả của RSM–CCD trong việc nâng cao hiệu suất sinh tổng

hợp đã được chứng minh rõ ràng qua nhiều hệ vi sinh vật khác nhau. Nghiên cứu trên *Streptomyces* sp. cho thấy hoạt tính β -mannanase tăng từ 74,83 IU/mL lên 415,96 IU/mL sau tối ưu hóa, tương đương mức tăng 5,5 lần [57]. Một nghiên cứu khác ghi nhận năng suất α -amylase tăng khoảng 90% sau khi áp dụng RSM-CCD [58]. Ngoài ra, trong các nghiên cứu về xạ khuẩn, việc tối ưu hóa bằng RSM đã giúp tăng sản lượng các hợp chất thứ cấp như rapamycin khoảng 45% (từ 151,9 mg/L lên 220,7 mg/L) và fungichromin đạt tới 5741,7 mg/L.

Các kết quả trên cho thấy một xu hướng chung là RSM-CCD không chỉ giúp xác định điều kiện tối ưu mà còn làm tăng đáng kể hiệu suất sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học. Điều này được đánh giá hoàn toàn phù hợp với kết quả của nghiên cứu hiện tại, khi hoạt tính ức chế α -glucosidase được cải thiện rõ rệt sau tối ưu hóa.

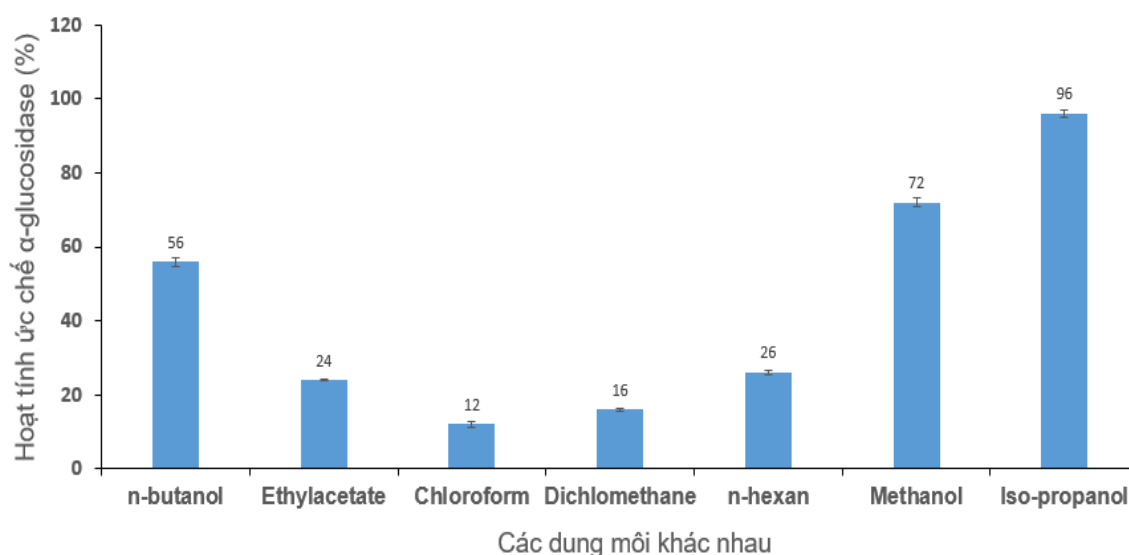
Một điểm đáng chú ý là các yếu tố trong mô hình không chỉ tác động độc lập mà còn tương tác lẫn nhau, thể hiện qua các hệ số bậc hai và hệ số tương tác trong phương trình hồi quy. Hiện tượng này đã được xác nhận rộng rãi đối với các nghiên cứu lên men vi sinh vật, trong đó sự thay đổi nhỏ về thành phần môi trường có thể ảnh hưởng đáng kể đến quá trình trao đổi chất và sinh tổng hợp sản phẩm [59]. Do đó, việc sử dụng RSM-CCD là cần thiết để xác định chính xác vùng tối ưu thay vì chỉ khảo sát từng yếu tố riêng lẻ.

4.3. Tinh sạch hoạt chất ức chế α -glucosidase từ chủng *Streptomyces* sp. S12.2

4.3.1. Lựa chọn các dung môi chiết

Từ các kết quả trên, chủng *Streptomyces murinus* S12.2 được lựa chọn lên men trong môi trường tối ưu RSM gồm glucose 10 g/L, cao nấm men 11,71 g/L, pH 6,6. Sau khi thu được dịch lên men, tiến hành chiết xuất dịch ngoại bào bằng các dung môi hữu cơ có độ phân cực khác nhau để khảo sát chọn lựa dung môi có khả năng tách các hoạt chất ức chế α -glucosidase tốt nhất. Việc lựa chọn này dựa trên đặc tính hóa học của các hợp chất mục tiêu cũng như nguyên tắc phân cực trong hóa học hợp chất tự nhiên.

Các dung môi được sử dụng bao gồm: n-butanol, ethylacetate, chloroform, dichlormethan, n-hexan, methanol, isopropanol với tỉ lệ nguyên liệu và dung môi là 1:1, lắc 200 vòng/phút trong 1 giờ, chiết 3 lần ở nhiệt độ phòng, thu được pha dung môi và pha nước. Pha dung môi được kiểm tra sắc ký đồ TLC và xác định hoạt tính ức chế α -glucosidase (Hình 4.7).



Hình 4.7. Hoạt tính AGIs của các pha dung môi khác nhau khi chiết lỏng-lỏng với dịch lên men

Kết quả trên Hình 4.7 cho thấy trong bảy loại dung môi khảo sát thì dung môi isopropanol cho hoạt tính ức chế α -glucosidase cao nhất, đạt 96%. Tiếp theo là dung môi methanol đạt 72%. Trong khi các dung môi khác chỉ đạt từ 12-56% (Hình 4.7).

Hai dung môi methanol và isopropanol đều có khả năng hòa tan tốt tất cả các hợp chất phân cực và bán phân cực, đặc biệt là các hợp chất chứa nhóm hydroxyl hoặc vòng thơm như flavonoid, alkaloid và các dẫn xuất phenolic [40, 60]. Điều này dẫn đến tăng độ tinh sạch tương đối của phân đoạn làm hoạt tính sinh học tăng mạnh. So với methanol hoặc ethanol, isopropanol có độ kỵ nước cao hơn, giúp tăng khả năng chiết các hợp chất có tính chất trung gian giữa phân cực và không phân cực. Điều này đặc biệt phù hợp với các hợp chất ức chế α -glucosidase, vốn thường có cấu trúc đa dạng và mang cả đặc tính phân cực lẫn kỵ nước [40, 61]. Ngoài ra, isopropanol cũng ít bay hơi hơn methanol, giúp hạn chế thất thoát mẫu trong quá trình xử lý.

Kết quả thu được trong nghiên cứu cho thấy dung môi isopropanol có khả năng thu nhận hiệu quả các hợp chất có hoạt tính sinh học từ chủng *Streptomyces murinus* S12.2, thể hiện qua hoạt tính ức chế α -glucosidase đáng kể của dịch chiết ban đầu với 96%, trong khi đó dung môi methanol cho hoạt tính thấp hơn với 72%. Xu hướng này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, trong đó các dung môi alcohol bậc trung được ghi nhận có hiệu quả tốt trong chiết xuất hợp chất thứ cấp từ vi sinh vật [61].

Từ đó ghi nhận trong các dung môi được khảo sát, isopropanol cho hiệu quả tách chiết thu được hoạt tính AGIs cao nhất, đạt 96%. Qua kết quả khảo sát, chúng tôi sử dụng dung môi isopropanol để tiến hành các bước tinh sạch tiếp theo nhằm xác định hoạt tính AGIs từ chủng *Streptomyces murinus* S12.2.

4.3.2. Tinh sạch hoạt chất ức chế α -glucosidase

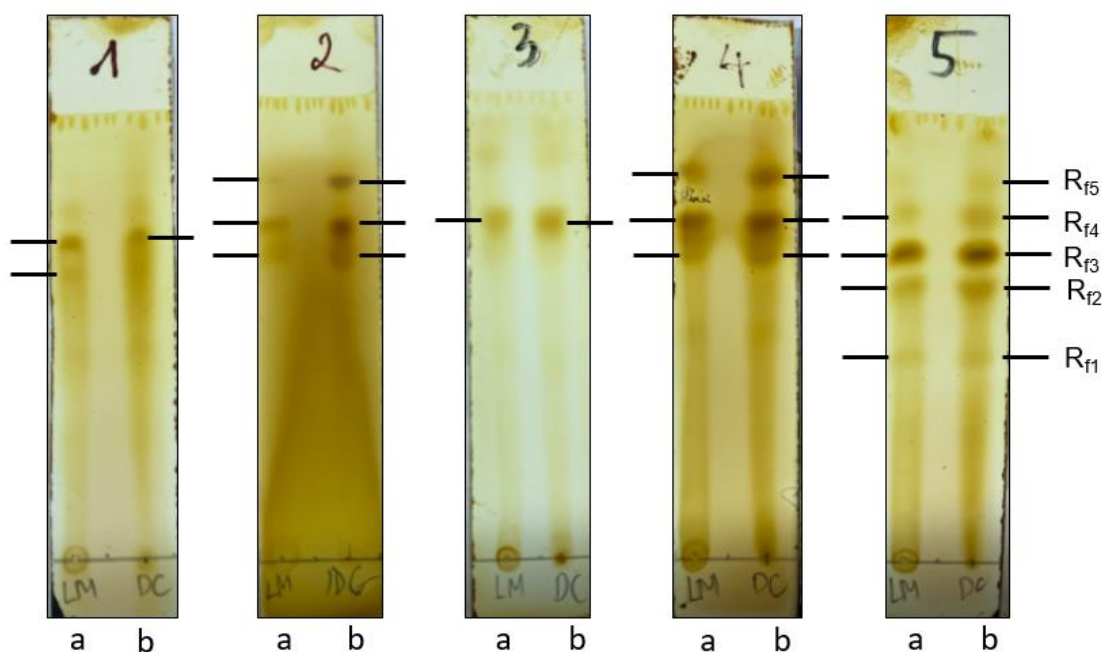
4.3.2.1. Lựa chọn các hệ dung môi pha động chạy sắc ký cột silica gel 60

Kiểm tra TLC với 2 mẫu dịch đồng thời là dịch lên men (LM) và dịch chiết (DC) nhằm lựa chọn hệ dung môi sắc ký pha động. Việc lựa chọn này dựa trên đặc tính hóa học của các hợp chất mục tiêu cũng như nguyên tắc phân cực trong hóa học hợp chất tự nhiên. Bản mỏng thu được sau TLC được nhuộm màu bằng hơi iod, thu được kết quả ở Hình 4.8.

Từ kết quả sắc ký đồ TLC (Hình 4.8) cho thấy khả năng tách các chất trong các mẫu dịch chiết ở các hệ dung môi khác nhau. Kết quả cho thấy hệ dung môi (1), (2) và (4) cho khả năng tách chất không rõ ràng, băng vết bị kéo vệt. Hệ dung môi (3) tuy băng vết gọn và rõ ràng hơn nhưng khả năng tách chất không tốt, chỉ tách được 1 vết có $R_f = 0,71$. Trong khi đó, hệ dung môi (5) cho khả năng tách chất tốt, băng vết cũng gọn, rõ ràng. Mẫu dịch chiết qua hệ dung môi (5) thu được 5 vết lần lượt có hệ số là $R_{f1} = 0,45$; $R_{f2} = 0,61$; $R_{f3} = 0,69$; $R_{f4} = 0,77$ và $R_{f5} = 0,85$. Từ đó, chúng tôi lựa chọn hệ dung môi (5) n-butanol : acid acetic : ethylacetate : H₂O = 3:1:1:1 để tạo thành một hệ pha đa thành phần có khả năng phân tách tốt các hợp chất dựa trên sự khác biệt về độ phân cực và khả năng phân bố giữa các pha làm dung môi để tiến hành bước đầu tinh sạch qua cột sắc ký silica gel 60.

Trong hệ này, n-butanol đóng vai trò là dung môi hữu cơ có độ phân cực trung

bình, giúp hòa tan các hợp chất mục tiêu; ethyl acetate góp phần điều chỉnh độ phân cực của pha hữu cơ; trong khi nước và acid acetic tạo môi trường phân cực và điều chỉnh pH của hệ dung môi.



Hình 4.8. Sắc ký đồ TLC hai mẫu dịch lên men (LM) và dịch chiết (DC) chạy trong 5 hệ dung môi khác nhau

(Ghi chú: (a) dịch lên men, (b) dịch chiết lỏng;

Thành phần các hệ dung môi lần lượt là: (1) *n*-butanol : acid acetic : H_2O = 3:1:1; (2) *n*-butanol : ethanol : H_2O = 5:3:2; (3) isopropanol : ethylacetate : H_2O = 3:1:1; (4) *n*-butanol : methanol : H_2O = 5:3:2; (5) *n*-butanol : acid acetic : ethylacetate : H_2O = 3:1:1:1)

Mangold và cộng sự (1969) đã chứng minh sự có mặt của acid acetic trong hệ dung môi đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định các hợp chất có nhóm chức dễ ion hóa, đồng thời hạn chế hiện tượng kéo vệt trên TLC bằng cách giảm tương tác mạnh giữa hợp chất và pha tĩnh silica gel. Hostettmann và cộng sự (1986) cũng kết luận hệ dung môi này giúp cải thiện độ phân giải giữa các hợp chất có cấu trúc tương tự, đặc biệt là các hợp chất phenolic hoặc alkaloid yếu [62, 63]. Sarker và cộng sự (2012) đã công bố hệ dung môi chứa *n*-butanol – acid acetic – nước thường được sử dụng trong phân tích và tinh sạch các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học [64].

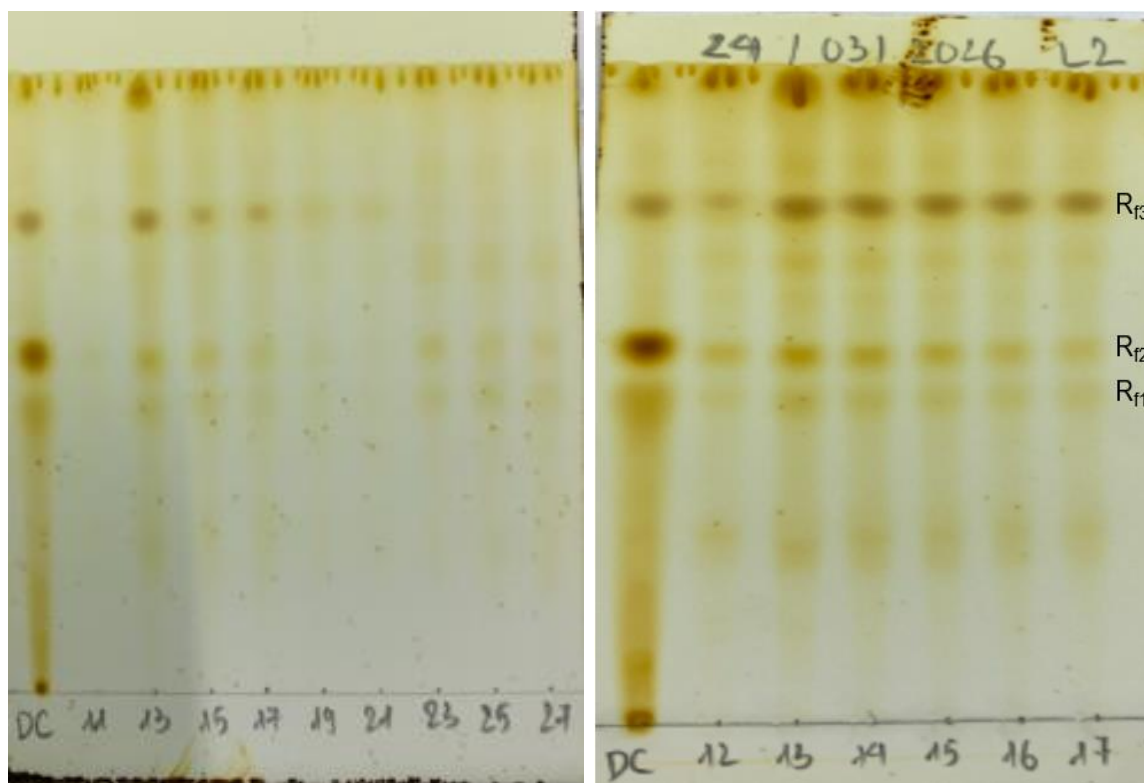
Kết quả sắc ký đồ TLC trong nghiên cứu cho thấy hệ dung môi *n*-butanol : acid acetic : ethylacetate : H_2O = 3:1:1:1 cho khả năng tách tốt, với các băng vết rõ nét và ít chồng lấp. Điều này phù hợp với các công bố trước đây. Tuy nhiên, việc sử

dụng hệ dung môi đa thành phần cũng đòi hỏi kiểm soát chặt chẽ tỷ lệ pha và điều kiện thực nghiệm, do sự thay đổi nhỏ về thành phần có thể ảnh hưởng đến khả năng phân tách. Ngoài ra, sự có mặt của nước trong hệ dung môi có thể làm giảm tốc độ bay hơi, kéo dài thời gian xử lý mẫu.

Tóm lại, việc lựa chọn isopropanol làm dung môi tách chiết và hệ dung môi n-butanol : acid acetic : ethyl acetate : H₂O (3:1:1:1) trong quá trình tinh sạch là phù hợp với đặc tính hóa học của các hợp chất AGIs từ chủng *Streptomyces murinus* S12.2. Sự lựa chọn này đã góp phần nâng cao hiệu quả thu nhận và phân tách hoạt chất, đồng thời phù hợp với các nguyên tắc và xu hướng nghiên cứu trong lĩnh vực hóa học hợp chất tự nhiên.

4.3.2.2. Tinh sạch hoạt chất ức chế α -glucosidase qua cột silica gel 60

Sau khi kiểm tra bằng TLC và chọn được hệ dung môi phù hợp để làm pha động chạy sắc ký cột bao gồm n-butanol : acid acetic : ethylacetate : H₂O = 3:1:1:1. Tiến hành bước tiếp theo tinh sạch sơ bộ lần đầu qua cột silica gel 60.

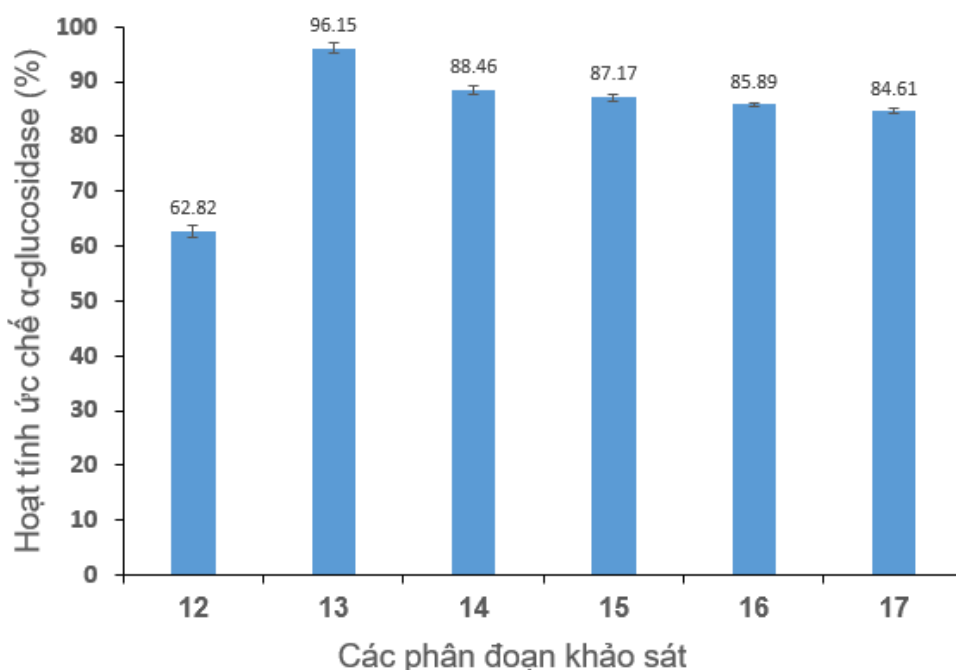


Hình 4.9. Sắc ký lớp mỏng các phân đoạn qua cột silica gel 60 với hệ dung môi n-butanol : acid acetic : ethylacetate : H₂O = 3:1:1:1 (DC: Dịch chiết; các phân đoạn thu được sau khi tinh sạch qua cột)

Sau khi qua cột, thu được 35 phân đoạn, mỗi phân đoạn 2 mL. Lựa chọn các phân đoạn cách đoạn từ phân đoạn 11 đến phân đoạn 27 (là vùng phân đoạn được dự đoán có hợp chất ức chế α -glucosidase) để kiểm tra vùng phân chất bằng TLC với hệ dung môi số (5) đã lựa chọn và kiểm tra hiện màu bằng hơi iod.

Kết quả sắc ký đồ TLC (Hình 4.9) cho thấy vùng phân đoạn từ 13 đến 17 thu được 3 băng vết rõ nổi bật lần lượt là $R_{f1} = 0,46$; $R_{f2} = 0,54$ và $R_{f3} = 0,77$. Từ đó chúng tôi tiếp tục kiểm tra sắc ký đồ TLC cho các phân đoạn từ 12 đến 17 và đo hoạt tính ức chế α -glucosidase để đánh giá phân đoạn chứa hoạt chất AGIs mong muốn.

Sắc ký đồ TLC cũng cho thấy các phân đoạn thu được sau khi qua cột so với dịch chiết thu được kết quả với các vết băng rõ và gọn hơn, không bị kéo vệt chứng tỏ rằng qua quá trình tinh sạch sơ bộ đã loại bỏ một số tạp không tan trong dung môi này. Tuy nhiên, ở giai đoạn đầu sử dụng silica gel 60, các hợp chất được phân tách chủ yếu dựa trên độ phân cực. Kết quả sắc ký đồ TLC cho thấy vẫn tồn tại hiện tượng kéo vệt và chồng lấp băng vết, chứng tỏ các hợp chất có cấu trúc tương tự chưa được phân tách hoàn toàn. Hiện tượng này là phổ biến trong nghiên cứu hợp chất tự nhiên do cơ chế hấp phụ mạnh nhưng độ chọn lọc hạn chế của silica gel đối với các hợp chất có cấu trúc tương đồng [65].



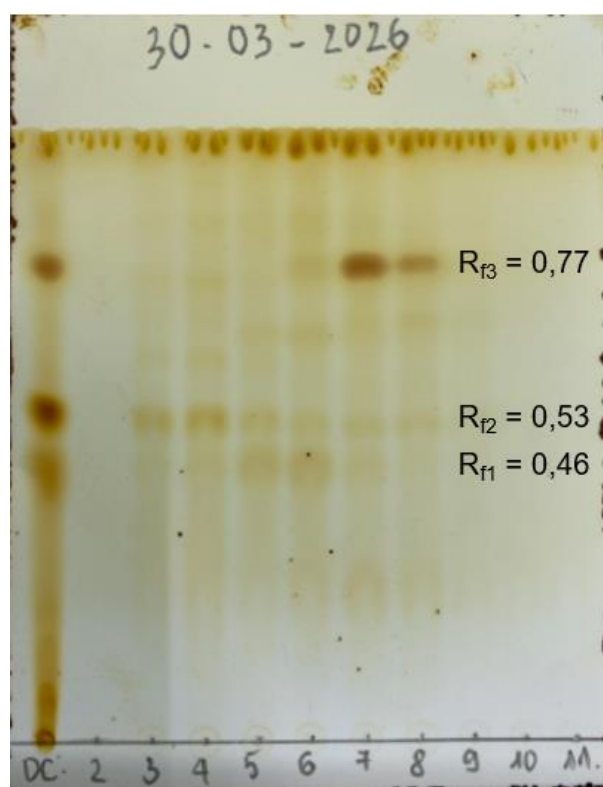
Hình 4.10. Hoạt tính AGIs của các phân đoạn sau khi qua cột silica gel 60

Các phân đoạn từ 12 đến 17 được đo hoạt tính để kiểm tra khả năng ức chế α -glucosidase (Hình 4.10). Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế α -glucosidase cho thấy phân đoạn 13 và 14 có hoạt tính AGIs cao nhất, lần lượt là 96,15% và 88,46%.

Vì kết quả băng vết khá tương đồng (Hình 4.9), lại có nồng độ hoạt tính ức chế α -glucosidase cao, chúng tôi quyết định gộp 2 phân đoạn 13 và 14 để tiếp tục tiến hành tinh sạch bước tiếp theo qua cột Sephadex LH 20.

4.3.2.3. Tinh sạch qua cột Sephadex LH 20 lần 1

Để tiếp tục loại bỏ các tạp chất (Hình 4.9) sau khi qua cột silica gel 60, cột Sephadex LH 20 được sử dụng để tinh sạch lần hai. Kết quả thu được 12 phân đoạn, mỗi phân đoạn thể tích 2 mL. Sử dụng sắc ký bản mỏng TLC để kiểm tra độ tinh sạch cho các phân đoạn từ 2 đến 11 (Hình 4.11) và đo hoạt tính ức chế α -glucosidase cho các phân đoạn lựa chọn.



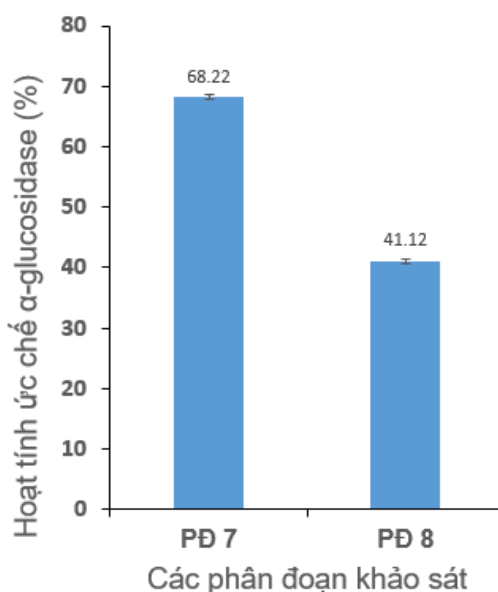
Hình 4.11. Sắc ký đồ TLC các phân đoạn qua cột Sephadex LH 20 lần 1

Kết quả kiểm tra sắc ký bản mỏng TLC của các phân đoạn qua cột Sephadex LH 20 lần 1 cho thấy khả năng cải thiện đáng kể hiệu quả phân tách. Các phân đoạn thu được sau bước này cho thấy băng vết rõ nét hơn, giảm hiện tượng kéo vệt và tạp

chất. Đặc biệt, các phân đoạn 7 và 8 thể hiện hoạt tính ức chế α -glucosidase cao (Hình 4.12), đồng thời có băng vết đặc trưng trên TLC ($R_f = 0,77$), chứng tỏ sự tập trung của hợp chất mục tiêu. Hiệu quả này có thể được giải thích bởi cơ chế hoạt động lai của Sephadex LH 20, kết hợp giữa lọc theo kích thước và tương tác hấp phụ, đặc biệt là tương tác π - π với các hợp chất có vòng thơm [62].

Hiệu quả của Sephadex LH 20 trong tinh sạch hợp chất thứ cấp đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu trước đây. Cos và cộng sự (2006) đã kết luận sephadex LH 20 đặc biệt hiệu quả trong phân lập các hợp chất phenolic và flavonoid nhờ khả năng tương tác chọn lọc với hệ vòng thơm, đồng thời giúp nâng cao độ tinh sạch trước khi phân tích cấu trúc [66]. Điều này phù hợp với kết quả thu được trong nghiên cứu hiện tại.

Bên cạnh đó, hoạt tính sinh học của các phân đoạn sau tinh sạch vẫn được duy trì hoặc tăng cường, cho thấy quy trình tinh sạch không làm biến tính hoặc phân hủy hợp chất mục tiêu. Tadera và cộng sự (2006) đã chứng minh rằng nhiều hợp chất tự nhiên như flavonoid có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase với giá trị IC_{50} dao động trong khoảng 10–200 μ M [40]. Ren và cộng sự (2023) cũng chứng minh các hợp chất có nguồn gốc vi sinh vật cũng đã được ghi nhận có khả năng ức chế enzyme này thông qua nhiều cơ chế khác nhau [61].



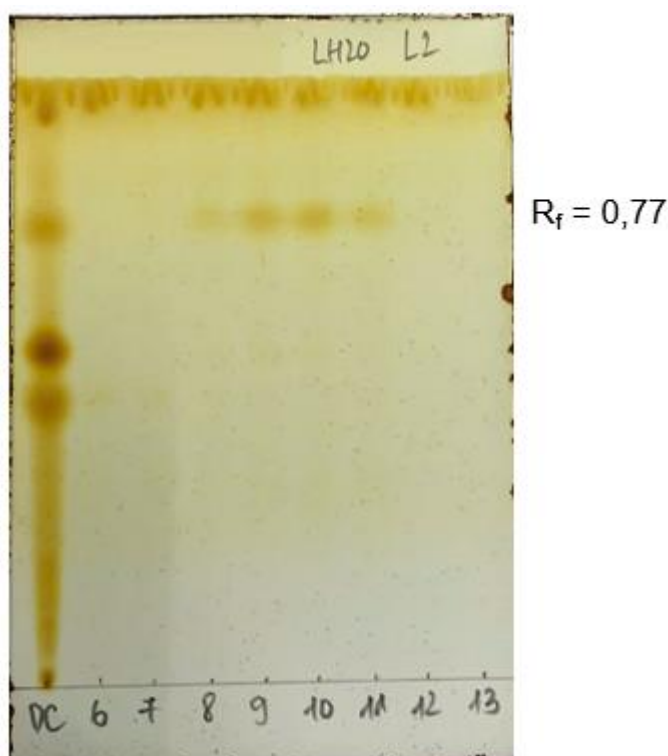
Hình 4.12. Hoạt tính AGIs của các phân đoạn qua cột LH 20 lần 1

Từ kết quả sắc ký đồ TLC các phân đoạn qua cột sephadex LH 20 lần 1, chúng tôi lựa chọn hai phân đoạn 7 và 8 để tiến hành đo nồng độ ức chế α -glucosidase. Kết quả thu được mô tả ở Hình 4.12.

Đối chiếu kết quả kiểm tra qua TLC (Hình 4.11) và đo nồng độ ức chế α -glucosidase (Hình 4.12) cho thấy phân đoạn 7 có hoạt tính AGIs là 58,22% trong khi phân đoạn 8 cho hoạt tính 41,12%. Chúng tôi tiếp tục tiến hành gộp các phân đoạn này để chạy cột Sephadex LH 20 lần 2 nhằm loại bỏ tạp chất.

4.3.2.4. Tinh sạch qua cột Sephadex LH 20 lần 2

Phân đoạn 7 và 8 qua cột LH 20 lần 1 được gộp cô quay, hòa trong 2mL đệm methanol và tiến hành qua cột Sephadex LH 20 lần 2. Kết quả thu được 13 phân đoạn, mỗi phân đoạn thể tích 2 mL. Sử dụng sắc ký bản mỏng TLC để kiểm tra độ tinh sạch cho các phân đoạn từ 6 đến 13, kết quả mô tả trong Hình 4.13.



Hình 4.13. Sắc ký đồ TLC các phân đoạn qua cột Sephadex LH 20 lần 2

Kết quả sắc ký bản mỏng TLC các phân đoạn qua cột Sephadex LH 20 lần 2 cho thấy khả năng phân tách và loại bỏ tạp chất tốt. Các phân đoạn thu được sau

bước này cho thấy khả năng tinh sạch tốt, băng vết rõ, giảm đáng kể các hiện tượng kéo vệt và tạp chất. Chúng tôi thu phân đoạn từ 8-11 qua cột LH 20 để cất cô quay thu cặn chiết và xác định giá trị IC_{50} . Kết quả tổng quát về hiệu suất thu hồi và hoạt tính ức chế α -glucosidase của các mẫu từ dịch nuôi cấy đến sản phẩm tinh sạch cuối cùng được trình bày trong Bảng 4.3.

Bảng 4.3. Tóm tắt quá trình tinh sạch thu nhận hoạt chất ức chế α -glucosidase từ chủng *Streptomyces* sp. S12.2

Mẫu	Khối lượng cặn khô (mg)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hoạt tính ức chế α -glucosidase (%)
Dịch lên men	1270		87,71
Dịch chiết isopropanol	419	32,99	96
Silica gel 60	35,2	2,77	80,72
Sephadex LH 20 lần 1	9,7	0,76	68,22
Sephadex LH 20 lần 2	5,3	0,42	41,12

Chi *Streptomyces* được xem là nguồn phong phú các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học. Theo Berdy, hơn 70% các hợp chất kháng sinh tự nhiên có nguồn gốc từ chi này, cùng với nhiều chất ức chế enzyme có giá trị [67]. Một số nghiên cứu đã phân lập thành công các hợp chất AGIs từ *Streptomyces* với hoạt tính đáng kể, với giá trị IC_{50} trong khoảng 20–150 $\mu\text{g/mL}$ [68]. Ngoài ra, các nghiên cứu khác cũng cho thấy hoạt tính ức chế α -glucosidase tăng rõ rệt sau các bước tinh sạch, chứng minh hiệu quả của quy trình phân lập đa bước [5].

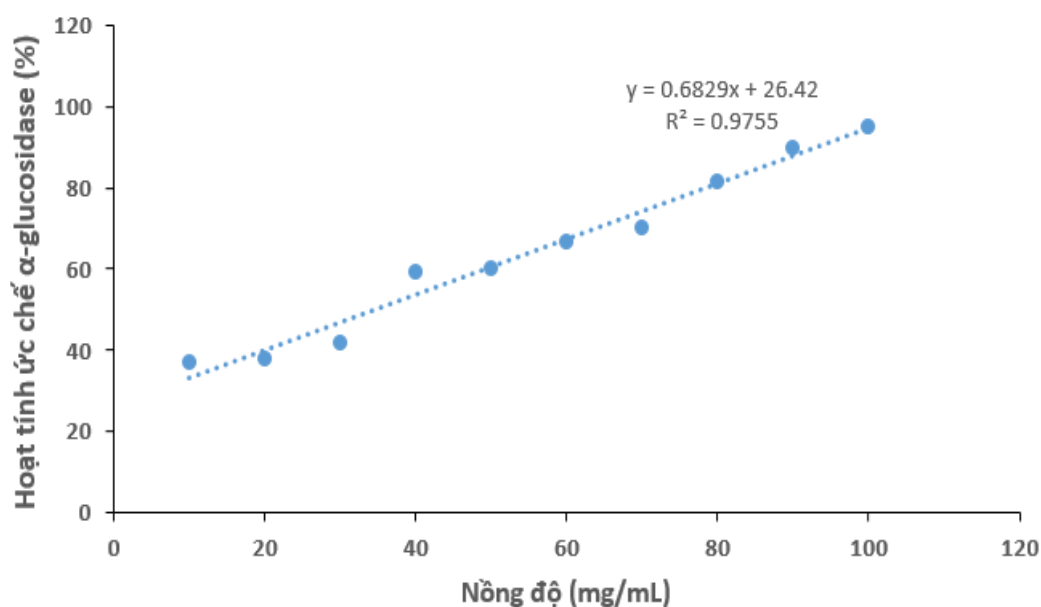
Việc kết hợp tinh sạch qua cột silica gel 60 và Sephadex LH 20 trong nghiên cứu này phù hợp với quy trình tinh sạch đa bước đã được áp dụng rộng rãi trong lĩnh vực hóa sinh hợp chất tự nhiên. Trong đó, silica gel đóng vai trò phân tách sơ bộ theo độ phân cực, trong khi Sephadex LH 20 giúp tinh sạch sâu, loại bỏ các hợp chất có cấu trúc tương tự [62, 64]. Cách tiếp cận này đã được chứng minh là hiệu quả trong nhiều nghiên cứu phân lập hợp chất sinh học.

Tuy nhiên, quy trình tinh sạch hiện tại vẫn tồn tại một số hạn chế như thời gian thực hiện kéo dài và khả năng thất thoát mẫu trong quá trình thu phân đoạn. Ngoài ra, độ tinh sạch đạt được có thể chưa đủ để xác định cấu trúc hóa học bằng các phương pháp phổ hiện đại như NMR hoặc MS. Do đó, trong các nghiên cứu tiếp theo, cần kết hợp thêm các kỹ thuật sắc ký có độ phân giải cao như HPLC để nâng cao độ tinh sạch [64].

4.4. Xác định giá trị IC_{50} của mẫu dịch chiết và hoạt chất tinh sạch

4.4.1. Giá trị IC_{50} của dịch chiết bởi isopropanol

Sau khi thu dịch lên men, dịch ngoại bào chiết bằng dung môi isopropanol, dịch chiết cất cô quay thu được 100 mg căn khô. Tiến hành pha loãng cạn với 10 nồng độ tăng dần, lần lượt là 10, 20, 30, ..., 100 mg/mL bởi dung môi methanol. Các mẫu được kiểm tra hoạt tính ức chế α -glucosidase và xây dựng phương trình hồi quy bằng biểu đồ scatter trên excel, kết quả được biểu thị trên Hình 4.14. Từ đó tính được giá trị IC_{50} .

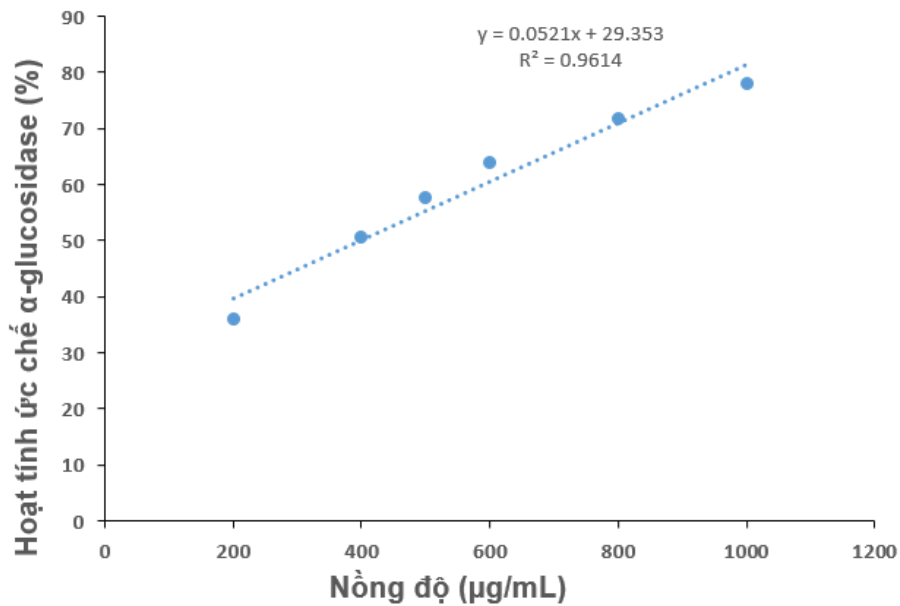


Hình 4.14. Xây dựng đường chuẩn hoạt tính AGIs của dịch chiết isopropanol

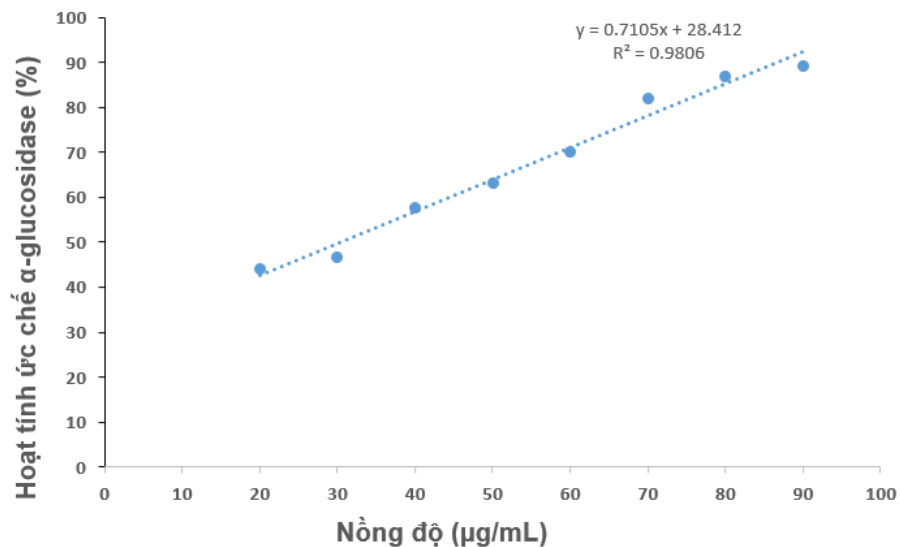
Giá trị IC_{50} là thông số quan trọng phản ánh khả năng ức chế enzyme của một hợp chất, trong đó IC_{50} càng thấp thì hoạt tính ức chế càng mạnh. Trong nghiên cứu này, giá trị IC_{50} của dịch chiết thô từ chủng *Streptomyces murinus* sp. S12.2 được xác định là 34,53 mg/mL.

4.4.2. Giá trị IC_{50} của sản phẩm tinh sạch cuối

Các phân đoạn có hoạt tính AGIs (phân đoạn 8-11 qua cột Sephadex LH 20 tinh sạch lần hai) được gộp lại, cô quay thu cạn. Lượng cạn thu được đem hòa lại với dung môi methanol ở 6 nồng độ khác nhau. Xác định hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase và xây dựng phương trình hồi quy bằng biểu đồ scatter thu được kết quả trên Hình 4.15. Từ đó tính được giá trị $IC_{50} = 396,3 \mu\text{g/mL}$.



Hình 4.15. Xây dựng đường chuẩn hoạt tính ức chế α -glucosidase của sản phẩm tinh sạch



Hình 4.16. Xây dựng đường chuẩn hoạt tính AGIs của chất acarbose chuẩn

Với phương pháp tương tự, xây dựng phương trình đường chuẩn hoạt tính ức chế α -glucosidase của chất acarbose tinh khiết (Sigma) và tính giá trị IC_{50} . Kết quả được biểu thị trên Hình 4.16. Qua đó xác định giá trị IC_{50} của chất acarbose tinh khiết = 30,38 $\mu\text{g/mL}$.

Kết quả này cho thấy quá trình tinh sạch đã làm tăng đáng kể hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase. Cụ thể, giá trị IC_{50} giảm khoảng 87 lần sau tinh sạch (từ 34,53 mg/mL xuống còn 396,3 $\mu\text{g/mL}$), chứng tỏ sự gia tăng đáng kể hàm lượng hoặc độ tinh khiết của hợp chất có hoạt tính trong mẫu. Điều này phù hợp với nguyên lý của quá trình tinh sạch, trong đó các tạp chất không có hoạt tính được loại bỏ, giúp làm giàu các hợp chất mục tiêu và từ đó làm tăng hiệu quả sinh học.

Tuy nhiên, khi so sánh với đối chứng dương là chất acarbose chuẩn, hoạt tính của mẫu nghiên cứu vẫn thấp hơn đáng kể. Cụ thể, IC_{50} của mẫu tinh sạch cao hơn khoảng 13 lần so với acarbose (396,3 so với 30,38 $\mu\text{g/mL}$). Điều này cho thấy mặc dù các hợp chất AGIs từ chủng *Streptomyces* sp. S12.2 có hoạt tính ức chế enzyme, nhưng hiệu lực vẫn chưa đạt mức của thuốc chuẩn thương mại.

Sự khác biệt này có thể được giải thích bởi một số yếu tố. Thứ nhất, acarbose là một chất ức chế enzyme đã được tinh sạch và tối ưu hóa cấu trúc, có khả năng tương tác mạnh với trung tâm hoạt động của enzyme α -glucosidase. Trong khi đó, mẫu tinh sạch trong nghiên cứu có thể vẫn là hỗn hợp của nhiều hợp chất, trong đó chỉ một phần có hoạt tính mạnh. Thứ hai, các hợp chất tự nhiên thường có hoạt tính sinh học ở mức trung bình nhưng có ưu điểm về độ an toàn và khả năng ứng dụng lâu dài [69].

So sánh với các nghiên cứu trước đây cho thấy kết quả thu được là hợp lý. Theo Tadera và cộng sự (2006), nhiều hợp chất flavonoid tự nhiên có hoạt tính ức chế α -glucosidase với IC_{50} ở mức μM đến mM, tùy thuộc vào cấu trúc [40]. Ngoài ra, các nghiên cứu về hợp chất từ vi sinh vật cũng được ghi nhận giá trị IC_{50} thường cao hơn so với các chất chuẩn như acarbose, đặc biệt ở giai đoạn chưa tinh sạch hoàn toàn [61]. Điều này cho thấy các hợp chất trong nghiên cứu vẫn còn tiềm năng được cải thiện hoạt tính thông qua các bước tinh sạch sâu hơn hoặc biến đổi cấu trúc.

Một điểm đáng chú ý là sự giảm mạnh IC_{50} sau quá trình tinh sạch chứng tỏ

phương pháp phân lập được áp dụng là hiệu quả. Điều này cũng gợi ý rằng các hợp chất có hoạt tính cao đã được tập trung vào một số phân đoạn nhất định, tạo cơ sở cho việc tiếp tục tinh sạch và xác định cấu trúc hóa học trong các nghiên cứu tiếp theo.

Tuy nhiên, cần lưu ý rằng giá trị IC_{50} có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như điều kiện thí nghiệm, độ tinh khiết của enzyme, nồng độ cơ chất và phương pháp đo. Do đó, việc so sánh trực tiếp với các nghiên cứu khác cần được thực hiện một cách thận trọng [66].

CHƯƠNG 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

5.1. Kết luận

- Trong tổng số 36 chủng xạ khuẩn phân lập được đã sàng lọc ra 16 chủng có hoạt tính ức chế α -glucosidase, trong đó chủng S12.2 có hoạt tính ức chế α -glucosidase là cao nhất đạt 27,49%.

- Mô hình tối ưu đáp ứng bề mặt RSM-CCD khẳng định các yếu tố khảo sát có ảnh hưởng đáng kể và có sự tương tác lẫn nhau, đồng thời đã dự đoán hoạt tính ức chế AGIs tối đa đạt được là 86,672 % ở các giá trị yếu tố nồng độ cao nấm men (11,71 g/L), độ pH (6,6), và nồng độ glucose (10 g/L).

- Trong 7 dung môi khảo sát cho quá trình chiết tách, đã lựa chọn được dung môi isopropanol phù hợp nhất, cho hiệu suất tách tốt nhất. Và trong 5 hệ dung môi khảo sát cho tinh sạch chất ức chế α -glucosidase, đã lựa chọn được hệ dung môi n-butanol : acid acetic : ethyl acetate : H₂O (3:1:1:1).

- Đã tinh sạch được hoạt chất có hoạt tính ức chế α -glucosidase. Sau khi qua cột silica gel 60 và sephadex LH 20 đã thu được phân đoạn có hệ số $R_f = 0,77$ với giá trị IC_{50} đạt 396,3 μ g/mL so với IC_{50} của acarbose là 30,38 μ g/mL.

5.2. Kiến nghị

Từ các kết quả nghiên cứu hiện tại, một số hướng nghiên cứu tiếp theo được đề xuất như sau:

- Tiếp tục tinh sạch sâu hơn các phân đoạn có hoạt tính cao bằng các kỹ thuật sắc ký có độ phân giải cao như HPLC hoặc prep-HPLC nhằm thu nhận hợp chất đơn lẻ và nâng cao độ tinh khiết.

- Tiến hành xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất có hoạt tính bằng các phương pháp phổ hiện đại như NMR, MS và IR, từ đó làm rõ bản chất hóa học của các chất AGIs thu nhận được.

- Mở rộng nghiên cứu theo hướng tối ưu hóa quy mô lớn và cải tiến quy trình nuôi cấy nhằm nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp hoạt chất từ chủng *Streptomyces* sp. S12.2.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU

1. **Bui Binh An**, Le Thanh Hoang, Luu Minh Duc, Nguyen Thi Thao, Nguyen Thi Trung, Do Thi Tuyen (2025). Selection, and classification of *Streptomyces* sp. strains capable producing α -glucosidase inhibitors isolated from coastal regions of Nha Trang, Vietnam. Hội nghị The 9th Academic Conference on Natural Science for Young Scientists, Master and PhD. Students from ASEAN Countries, 28 September - 01 October, Nha Trang City, Vietnam: 587-595.

The 9th Academic Conference on Natural Science for Young Scientists, Master and PhD.
Students from ASEAN Countries, 28 September - 01 October, Nha Trang City, Vietnam

SELECTION, AND CLASSIFICATION OF *STREPTOMYCES* SP. STRAINS CAPABLE PRODUCING α -GLUCOSIDASE INHIBITORS ISOLATED FROM COASTAL REGIONS OF NHA TRANG, VIETNAM

Bui Binh An^{1,2}, Le Thanh Hoang^{1,2}, Luu Minh Duc¹, Nguyen Thi Thao¹, Nguyen Thi Trung², Do Thi Tuyen^{1,2*}

¹*Institute of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

Abstract

This study focuses on the selection, and classification of *Streptomyces* sp. strain producing the α -glucosidase inhibitory activity isolated from soil and water samples collected in coastal regions of Nha Trang, Vietnam. From 36 *Streptomyces* sp. strains were isolated, among which S12.2 strain exhibited the highest α -glucosidase inhibitory activity reached 27.9%. Based on morphological and microscopic characteristics, S12.2 strain was identified as belonging to the genus *Streptomyces* sp. These features include: Aerial mycelium: Ivory white in color. Substrate mycelium: Forming a compact, hard mat with a yellowish-green ivory color. The mat's diameter ranged from 400– 1500 μ m, with shapes from discoid to nearly spherical or elongated. Sporophores: Cylindrical, measuring 5.0– 15 \times 2.0– 5.0 μ m, and interspersed with vegetative hyphae. Spores: Elliptical, colorless when young, and turning yellowish– green upon maturation. Spore maturation was a slow process, with mature spores developing septa. Furthermore, 16S rRNA gene sequencing of the *Streptomyces* sp. S12.2 strain was 926 bp long and deposited in Genbank with the accession number PV300249.1 and was officially named *Streptomyces murinus* EBL140325. The 16S rRNA gene from *Streptomyces* sp. S12.2 strain showed the highest identity 100% with to 16S rRNA gene from *Streptomyces murinus* (accession number CP094483.1) and a 99.89% with two other *Streptomyces murinus* strains (accession numbers AB088069.1 and CP107838.1).

Key words: *Streptomyces* sp. S12.2, screening, α -glucosidase

*Corresponding author: Do Thi Tuyen,

E-mail: dtuyen@ibt.ac.vn or dtuyen@ib.ac.vn; Tel.: +84-024-37568260; Fax: +84-024-38363144

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Magliano D.J., Boyko E.J., 2021, *IDF diabetes atlas*, pp.
2. Chen Z., Hao J., Wang L., Wang Y., Kong F., Zhu W., 2016, *New α -glucosidase inhibitors from marine algae-derived Streptomyces sp. OUCMDZ-3434*, *Scientific reports*, 6(1), pp. 20004.
3. Wei J., Zhang X.-Y., Deng S., Cao L., Xue Q.-H., Gao J.-M., 2017, *α -Glucosidase inhibitors and phytotoxins from Streptomyces xanthophaeus*, *Natural Product Research*, 31(17), pp. 2062-2066.
4. Abdulkhair W.M., Abdel-all W.S., Bahy R.H., 2018, *Genetic improvement of antidiabetic alpha-glucosidase inhibitor producing Streptomyces sp.*, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, pp. 77-84.
5. Nguyen T.C., Le T.H., Hoang T.Y., Nguyen T.T., Dao T.M.A., Nguyen M.C., Tuyen D.T., 2021, *Optimization and purification of α -glucosidase inhibitor from Bacillus subtilis yt20 isolated in Vietnam*, *Vietnam Journal of Science and Technology*, 59(2), pp. 179-188.
6. Trang N.T.H., Tang D.Y.Y., Chew K.W., Linh N.T., Hoang L.T., Cuong N.T., Yen H.T., Thao N.T., Trung N.T., Show P.L., 2021, *Discovery of α -glucosidase inhibitors from marine microorganisms: Optimization of culture conditions and medium composition*, *Molecular biotechnology*, 63(11), pp. 1004-1015.
7. Trung N.T., Thao N.T., Thao P.T.H., Tuan T.T., Nam P.D., Hoang L.T., Tuyen D.T., 2022, *Isolation, selection and evaluation of α -glucosidase inhibitory activity from endophytic Streptomyces sp. isolated from Citrus myrtifolia cultivar in Hoa Binh, Vietnam*, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 20(4), pp. 693-704.
8. Van de Laar F.A., Lucassen P.L., Akkermans R.P., Van de Lisdonk E.H., Rutten G.E., Van Weel C., 2005, *α -Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: results from a Cochrane systematic review and meta-analysis*, *Diabetes care*, 28(1), pp. 154-163.
9. Chiasson J.-L., Josse R.G., Gomis R., Hanefeld M., Karasik A., Laakso M., 2002, *Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial*, *The Lancet*, 359(9323), pp. 2072-2077.
10. Benjamin M.A.Z., Mokhtar R.A.M., Iqbal M., Abdullah A., Azizah R., Sulistyorini L., Mahfudh N., Zakaria Z.A., 2024, *Medicinal plants of Southeast Asia with anti- α -glucosidase activity as potential source for type-2 diabetes mellitus treatment*, *Journal of Ethnopharmacology*, 330, pp. 118239.
11. Bischoff H., 1994, *Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition*, *European journal of clinical investigation*, 24, pp. 3-10.
12. Lebovitz H.E., 1997, *Alpha-glucosidase inhibitors*, *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 26(3), pp. 539-551.
13. Pan G., Lu Y., Wei Z., Li Y., Li L., Pan X., 2024, *A review on the in vitro and in vivo screening of α -glucosidase inhibitors*, *Heliyon*, 10(18), pp.

14. Hossain U., Das A.K., Ghosh S., Sil P.C., 2020, *An overview on the role of bioactive α -glucosidase inhibitors in ameliorating diabetic complications*, *Food and chemical toxicology*, 145, pp. 111738.
15. Schlegel-Haueter S., Hore P., Kerry K., Semenza G., 1972, *The preparation of lactase and glucoamylase of rat small intestine*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 258(2), pp. 506-519.
16. Naumoff D., 2007, *Structure and evolution of the mammalian maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase genes*, *Molecular Biology*, 41(6), pp. 962-973.
17. Lê M.N., 2022, *Nghiên cứu tác dụng ức chế enzym α -glucosidase của cây Chè vàng (*Jasminum subtriplinerve*) trên mô hình in vitro và in silico*, pp.
18. Henrissat B., Bairoch A., 1996, *Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases*, *Biochemical Journal*, 316(Pt 2), pp. 695.
19. Henrissat B., Davies G., 1997, *Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases*, *Current opinion in structural biology*, 7(5), pp. 637-644.
20. Davies G., Henrissat B., 1995, *Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases*, *Structure*, 3(9), pp. 853-859.
21. Hopwood D.A., *Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers*. 2007: Oxford University Press.
22. Bérđy J., 2012, *Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading*, *The Journal of antibiotics*, 65(8), pp. 385-395.
23. Wehmeier U., Piepersberg W., 2004, *Biotechnology and molecular biology of the α -glucosidase inhibitor acarbose*, *Applied microbiology and biotechnology*, 63(6), pp. 613-625.
24. Mahmud T., Lee S., Floss H.G., 2001, *The biosynthesis of acarbose and validamycin*, *The Chemical Record*, 1(4), pp. 300-310.
25. Dharmaraj S., 2010, *Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substances*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(12), pp. 2123-2139.
26. Blin K., Kim H.U., Medema M.H., Weber T., 2019, *Recent development of antiSMASH and other computational approaches to mine secondary metabolite biosynthetic gene clusters*, *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), pp. 1103-1113.
27. Dirir A.M., Daou M., Yousef A.F., Yousef L.F., 2022, *A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes*, *Phytochemistry Reviews*, 21(4), pp. 1049-1079.
28. Bộ Y Tế, 2020, *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị đái tháo đường típ 2*, Quyết định số 5481, pp.
29. Saltiel A.R., Kahn C.R., 2001, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*, *Nature*, 414(6865), pp. 799-806.
30. Kahn S.E., Hull R.L., Utzschneider K.M., 2006, *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*, *Nature*, 444(7121), pp. 840-846.

31. Hull R.L., Westermark G.T., Westermark P., Kahn S.E., 2004, *Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes*, *The Journal of clinical endocrinology & metabolism*, 89(8), pp. 3629-3643.
32. Leahy J.L., 2005, *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*, *Archives of medical research*, 36(3), pp. 197-209.
33. Brownlee M., 2001, *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*, *Nature*, 414(6865), pp. 813-820.
34. De Kort H., de Koning E.J., Rabelink T.J., Bruijn J.A., Bajema I.M., 2011, *Islet transplantation in type 1 diabetes*, *Bmj*, 342, pp.
35. Rena G., Hardie D.G., Pearson E.R., 2017, *The mechanisms of action of metformin*, *Diabetologia*, 60(9), pp. 1577-1585.
36. Semple R.K., Chatterjee V.K.K., O'Rahilly S., 2006, *PPAR γ and human metabolic disease*, *The Journal of clinical investigation*, 116(3), pp. 581-589.
37. Drucker D.J., 2018, *Mechanisms of action and therapeutic application of glucagon-like peptide-1*, *Cell metabolism*, 27(4), pp. 740-756.
38. Plodkowski R.A., McGarvey M.E., Huribal H.M., Reisinger-Kindle K., Kramer B., Solomon M., Nguyen Q.T., 2015, *SGLT2 inhibitors for type 2 diabetes mellitus treatment*, *Federal Practitioner*, 32(Suppl 11), pp. 8S.
39. Martin A.E., Montgomery P.A., 1996, *Acarbose: An α -glucosidase inhibitor*, *American journal of health-system pharmacy*, 53(19), pp. 2277-2290.
40. Tadera K., Minami Y., Takamatsu K., Matsuoka T., 2006, *Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids*, *Journal of nutritional science and vitaminology*, 52(2), pp. 149-153.
41. Schwientek P., Szczepanowski R., Rückert C., Kalinowski J., Klein A., Selber K., Wehmeier U.F., Stoye J., Pühler A., 2012, *The complete genome sequence of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110*, *BMC genomics*, 13(1), pp. 112.
42. Kaur R., Palta K., Kumar M., 2019, *Hybrids of Isatin-Pyrazole as Potential α -Glucosidase Inhibitors: Synthesis, Biological Evaluations and Molecular Docking Studies*, *ChemistrySelect*, 4(45), pp. 13219-13227.
43. Li Z., Yang S., Zhang Z., Wu Y., Tang J., Wang L., Chen S., 2022, *Enhancement of acarbose production by genetic engineering and fed-batch fermentation strategy in *Actinoplanes* sp. SIFI12-34*, *Microbial Cell Factories*, 21(1), pp. 240.
44. Lu X., Zhang M., Qiu Y., Liu X., Wang C., Chen J., Zhang H., Wei B., Yu Y., Ying Y., 2023, *α -Glucosidase inhibitors from two mangrove-derived actinomycetes*, *Molecules*, 28(9), pp. 3822.
45. Trai N.N., Giang N.C.T., Huệ L.Á., Chơn N.M., 2019, *Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên khả năng sinh tổng hợp chất ức chế α -amylase và α -glucosidase của dòng *Streptomyces* sp. TVS1*, *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 55, pp. 49-56.
46. Van Nguyen N.K., Duong T.-H., Pham N.K.T., Nguyen T.Q.T., Nguyen T.N.T., Chavasiri W., Nguyen N.-H., Nguyen H.T., 2023, *Bio-guided isolation of alpha-glucosidase inhibitory compounds from Vietnamese*

- liverwort Marchantia polymorpha: in vitro and in silico studies*, *RSC advances*, 13(50), pp. 35481-35492.
47. Hoang K.C., Tran T.H.H., Le H.C., Tran T.N.H., 2025, *Antidiabetic components from a mangrove actinobacterial culture in Vietnam*, *Vietnam Journal of Marine Science and Technology*, 25(2), pp. 151-156.
 48. Koh W., Uthumporn U., Rosma A., Irfan A., Park Y., 2018, *Optimization of a fermented pumpkin-based beverage to improve Lactobacillus mali survival and α -glucosidase inhibitory activity: A response surface methodology approach*, *Food Science and Human Wellness*, 7(1), pp. 57-70.
 49. Santiago M., Strobel S., 2013, *Thin layer chromatography*, in *Methods in enzymology*, Elsevier. p. 303-324.
 50. Miller J.M., *Chromatography: concepts and contrasts*. 2005: John Wiley & Sons.
 51. Harborne J., 1999, *Preparative Chromatography Techniques, Applications in Natural Product Isolation, Phytochemistry*, 50, pp. 1419-1419.
 52. Sanchez S., Demain A.L., 2002, *Metabolic regulation of fermentation processes*, *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), pp. 895-906.
 53. Nguyen N.-H., Vu Y.T., Nguyen T.-D., Cao T.-T., Nguyen H.T., Le T.-K.-D., Sichaem J., Mai D.-T., An T.N.M., Duong T.-H., 2023, *Bio-guided isolation of alpha-glucosidase inhibitory compounds from Vietnamese Garcinia schomburgkiana fruits: in vitro and in silico studies*, *RSC advances*, 13(50), pp. 35408-35421.
 54. Chen J., Lan X., Jia R., Hu L., Wang Y., 2022, *Response surface methodology (RSM) mediated optimization of medium components for mycelial growth and metabolites production of Streptomyces alfalfae XN-04*, *Microorganisms*, 10(9), pp. 1854.
 55. Zhang Y.-j., Li Q., Zhang Y.-x., Wang D., Xing J.-m., 2012, *Optimization of succinic acid fermentation with Actinobacillus succinogenes by response surface methodology (RSM)*, *Journal of Zhejiang University Science B*, 13(2), pp. 103-110.
 56. Liu C., Chen Q., Tang B., Ruan H., He G., 2007, *Response surface methodology for optimizing the fermentation medium of alpha-galactosidase in solid-state fermentation*, *Letters in applied microbiology*, 45(2), pp. 206-212.
 57. Bhatariwala R., Bagban M., Mansuri A., Modi H., 2022, *Successive approach of medium optimization using one-factor-at-a-time and response surface methodology for improved β -mannanase production from Streptomyces sp*, *Bioresource Technology Reports*, 18, pp. 101087.
 58. Saad W.F., Othman A.M., Abdel-Fattah M., Ahmad M.S., 2021, *Response surface methodology as an approach for optimization of α -amylase production by the new isolated thermotolerant Bacillus licheniformis WF67 strain in submerged fermentation*, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32, pp. 101944.

59. Ahsan T., Chen J., Wu Y., Irfan M., 2017, *Application of response surface methodology for optimization of medium components for the production of secondary metabolites by Streptomyces diastatochromogenes KX852460*, *Amb Express*, 7(1), pp. 96.
60. Harborne J., 1998, *Phytochemical Methods Harborne JB ed*, Chapman & Hall, London, pp.
61. Ren F., Ji N., Zhu Y., 2023, *Research progress of α -glucosidase inhibitors produced by microorganisms and their applications*, *Foods*, 12(18), pp. 3344.
62. Hostettmann K., Hostettmann M., Marston A., 1986, *Preparative chromatography techniques, Applications in Natural Product Isolation*, pp.
63. Mangold H., Stahl E., 1969, *Thin layer chromatography*, pp.
64. Sarker S.D., Nahar L., 2012, *An introduction to natural products isolation, Natural products isolation*, pp. 1-25.
65. Harborne A., *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. 1998: springer science & business media.
66. Cos P., Vlietinck A.J., Vanden Berghe D., Maes L., 2006, *Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'*, *Journal of ethnopharmacology*, 106(3), pp. 290-302.
67. Berdy J., 2005, *Bioactive microbial metabolites*, *The Journal of antibiotics*, 58(1), pp. 1-26.
68. Kim Y.-M., Jeong Y.-K., Wang M.-H., Lee W.-Y., Rhee H.-I., 2005, *Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia*, *Nutrition*, 21(6), pp. 756-761.
69. Van de Laar F.A., 2008, *Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes*, *Vascular health and risk management*, 4(6), pp. 1189-1195.

PHỤ LỤC

1. Danh sách chủng xạ khuẩn nghiên cứu

STT	Tên chủng	STT	Tên chủng	STT	Tên chủng
1	<i>Streptomyces</i> sp. S12.2	13	<i>Streptomyces</i> sp. H02	25	<i>Streptomyces</i> sp. H14
2	<i>Streptomyces</i> sp. S21	14	<i>Streptomyces</i> sp. H03	26	<i>Streptomyces</i> sp. H15
3	<i>Streptomyces</i> sp. S37	15	<i>Streptomyces</i> sp. H04	27	<i>Streptomyces</i> sp. H16
4	<i>Streptomyces</i> sp. S39	16	<i>Streptomyces</i> sp. H05	28	<i>Streptomyces</i> sp. H17
5	<i>Streptomyces</i> sp. S23	17	<i>Streptomyces</i> sp. H06	29	<i>Streptomyces</i> sp. H18
6	<i>Streptomyces</i> sp. S50	18	<i>Streptomyces</i> sp. H07	30	<i>Streptomyces</i> sp. H19
7	<i>Streptomyces</i> sp. S11	19	<i>Streptomyces</i> sp. H08	31	<i>Streptomyces</i> sp. H20
8	<i>Streptomyces</i> sp. S13	20	<i>Streptomyces</i> sp. H09	32	<i>Streptomyces</i> sp. H21
9	<i>Streptomyces</i> sp. S70	21	<i>Streptomyces</i> sp. H10	33	<i>Streptomyces</i> sp. H22
10	<i>Streptomyces</i> sp. S74	22	<i>Streptomyces</i> sp. H11	34	<i>Streptomyces</i> sp. H23
11	<i>Streptomyces</i> sp. S2	23	<i>Streptomyces</i> sp. H12	35	<i>Streptomyces</i> sp. H24
12	<i>Streptomyces</i> sp. H01	24	<i>Streptomyces</i> sp. H13	36	<i>Streptomyces</i> sp. H25

2. Kết quả thử hoạt tính ức chế α -glucosidase của mẫu dịch lên men

Mẫu	Nồng độ (%)	Sai số
Đo lần 1	92,31	1,21
Đo lần 2	83,33	0,99
Đo lần 3	87,5	0,8
Trung bình	87,71	1

3. Kết quả thử hoạt tính ức chế α -glucosidase tại các nồng độ khác nhau của dịch chiết isopropanol

STT	Nồng độ (mg/mL)	Hoạt tính ức chế α -glucosidase (%)
1	10	37,04±0,38
2	20	37,96±0,72
3	30	41,67±0,57
4	40	59,26±0,95

5	50	60,19±0,66
6	60	66,67±1,12
7	70	70,37±0,92
8	80	81,48±0,67
9	90	89,81±0,72
10	100	96±0,35

4. Kết quả thử hoạt tính ức chế α -glucosidase tại các nồng độ khác nhau của acarbose tinh khiết

STT	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Hoạt tính ức chế α -glucosidase (%)
1	20	44,05±0,14
2	30	46,72±0,51
3	40	57,82±0,42
4	50	63,06±0,52
5	60	70,12±0,37
6	70	81,96±0,5
7	80	87,07±0,21
8	90	89,14±0,46

5. Kết quả thử hoạt tính ức chế α -glucosidase tại các nồng độ khác nhau của mẫu tinh sạch cuối

STT	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Hoạt tính ức chế α -glucosidase (%)
1	200	35.94±0,25
2	400	50.78±0,69
3	500	57.81±0,67
4	600	64,06±1,10
5	800	71,88±0,59
6	1000	78.13±0,56

Số 255 - QĐ/HVKHCN

Hà Nội, ngày 20 tháng 5 năm 2026

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

-
- Căn cứ Quyết định số 175-QĐ/VHLKHCNVN ngày 28/4/2026 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam ban hành Quy chế Tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;
 - Căn cứ Thông tư số 23/2021/TT-BGDĐT ngày 30/08/2021 của Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;
 - Căn cứ Quyết định số 1966/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;
 - Căn cứ Quyết định số 724/QĐ-HVKHCN ngày 28/06/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học khóa 2024A - Đợt 1 năm 2024;
 - Căn cứ Quyết định số 999/QĐ-HVKHCN ngày 02/10/2025 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và cử người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;

- Xét đề nghị của Trưởng khoa Sinh học, Trưởng phòng Đào tạo,

GIÁM ĐỐC HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

QUYẾT ĐỊNH

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Bùi Bình An với đề tài: “Nghiên cứu tối ưu hóa khả năng sinh tổng hợp và tinh sạch chất ức chế α -glucosidase từ chủng *Streptomyces* sp. phân lập ở Việt Nam”

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

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

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

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

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng khoa Sinh học, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. *Ju*

Nơi nhận:

- Như Điều 3,
- Lưu hồ sơ học viên,
- Lưu: VT, ĐT, MT.07.

GIÁM ĐỐC



Handwritten signature
PGS.TS. Hoàng Anh Sơn

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 255 - QĐ/HVKHCN ngày 20 / 5 / 2026
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)



Cho luận văn của học viên: Bùi Bình An

Tên đề tài: Nghiên cứu tối ưu hóa khả năng sinh tổng hợp và tinh sạch chất ức chế α -glucosidase từ chủng *Streptomyces* sp. phân lập ở Việt Nam

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn: 1. PGS.TS. Đỗ Thị Tuyên

- Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. TS. Nguyễn Thị Trung

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

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1.	PGS.TS. Phí Quyết Tiến	Công nghệ sinh học	Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2.	TS. Phan Thị Hồng Thảo	Công nghệ sinh học	Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 1
3.	PGS.TS. Nguyễn Quang Huy	Hóa sinh học	Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội	Phản biện 2
4.	TS. Hoàng Thị Thu Hằng	Di truyền - Truyền nhiễm	Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
5.	PGS.TS. Nguyễn Hải Hà	Sinh học phân tử	Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên

Hội đồng gồm 05 thành viên. *Đ.T.*

Hà Nội, ngày 11 tháng 6 năm 2026

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số 255 - QĐ/HVKHCN ngày 20/5/2026 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Bùi Bình An

Tên đề tài: Nghiên cứu tối ưu hóa khả năng sinh tổng hợp và tinh sạch chất ức chế α -glucosidase từ chủng *Streptomyces* sp. phân lập ở Việt Nam

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 11/06/2026 Hội đồng đã họp tại phòng họp 1710, A28, Học viện Khoa học và Công nghệ vào lúc 09 giờ 00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

- | | |
|-----------------------------|-------------------|
| 1. PGS.TS. Phí Quyết Tiến | Chủ tịch hội đồng |
| 2. TS. Hoàng Thị Thu Hằng | Thư ký hội đồng |
| 3. TS. Phan Thị Hồng Thảo | Phản biện 1 |
| 4. PGS.TS. Nguyễn Quang Huy | Phản biện 2 |
| 5. PGS.TS. Nguyễn Hải Hà | Ủy viên hội đồng |

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

NỘI DUNG LÀM VIỆC

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

Đề tài không trung lập, có tính cấp thiết nghiên cứu khoa học, nghiên cứu sâu, logic, bài bản, khả năng đảm bảo số lượng & chất lượng. Bổ sung hình ảnh hình thái vi khuẩn; phương pháp trước mỗi đề mục; chất dịch tốt, thuật ngữ vi sinh; thảo luận về "Xa khuẩn"; khả năng 4.1.4 khi thay đổi thành phần môi trường; khả năng về định lượng; Xa khuẩn... nấm mốc & vi khuẩn? Khả năng tối ưu tăng... danh... lại? lần; Hoạt chất thu nhận có tương ứng dự đoán mô hình ko? Mth sau đó vẫn có những khác?



6. Phản biện 2:

- Lứa vận có hạn lượng k giá s chất lượng đáp ứng yêu cầu.
- Về chính sách số lượng kết luận từ 4 tầng 3 kết luận.
- Các chính sách chính tả, thuật ngữ; thống nhất có hình ảnh bằng biểu
- Những chất tương tự thì đã có nghiên cứu nào khác chưa?
- Những pháp tắc viết có khác khác TN nào khác?.....

7. Học viên trả lời:

- Thành tố của vi khuẩn là peptide glycan.....
- Sau khi tới ưu bằng đáp ứng bị mất s thực nghiệm, hoạt tính tăng lên khoảng 3 lần
- Kháng YFP2 & ứng tới ưu số sự khác biệt về nồng độ nucleos, carba, & pH;.....
- Thời gian nuôi cấy từ 5 + 7 ngày
- Một số sai lệch nhỏ giữa mô hình dự đoán & qua thực nghiệm
- Học viên sẽ bổ sung TTT cho phần giải quyết
- Học viên sẽ từ việc & bổ sung thêm thông tin về nhóm hợp chất

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

- Học viên cần bổ sung phần mô đun, ưu tiên; bổ sung tổng quan về hợp chất để có thể có bức tranh tổng quan (TS. Nguyễn Hải Hà)
- Học viên nên bổ sung, cần nhắc, sắp xếp lại tổng quan (TS. Hằng)
- Học viên nên sắp xếp tổng quan (từ 1-7 câu hỏi liên tiếp)
- nên rõ phương pháp tách chiết, sắp xếp lại để mục kết quả & thảo luận, các hoạt chất từ xa khác có ghi IC50 min = ?

9. Học viên trả lời

- Học viên sẽ tiếp thu & chỉnh sửa theo góp ý (PGS.TS. Phan Đức)
- Một số nghiên cứu về hoạt chất với các gtn IC50 trên
- đang đang tiếp tục điều chỉnh hình thức & số lần

10. Hội đồng họp kín và cho điểm

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên:
 - Trưởng ban: PGS.TS. Nguyễn Hải Hà.....
 - Ủy viên: TS. Phan Thị Hồng Thảo.....
 - Ủy viên: TS. Hoàng Thị Thu Hằng.....
- Kết quả kiểm phiếu như sau:
 - Số phiếu phát ra:..... 05.....
 - Số phiếu thu về:..... 05.....
 - Tổng số điểm:..... 42,7.....

Điểm trung bình: 8,5

Điểm thưởng công trình công bố: 0,5

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố: 9,0

- Kết luận của Hội đồng:

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

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

..... Không trùng lặp

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

..... luận văn có các khía cạnh kỹ thuật học học, nghiên cứu thực tiễn
cao và hoàn thành các mục tiêu đề ra
..... Hội đồng xem xét & đánh giá với dung của 01 công bố của
học viên có liên quan chặt chẽ với nội dung của luận văn
..... luận văn đáp ứng đủ yêu cầu & điều kiện theo quy
định của luận văn. Thay đổi sau khi chỉnh sửa theo góp ý.

Buổi họp đã kết thúc vào 11 giờ 15 phút, ngày 17/6/2026

Hà Nội, ngày 11 tháng 6 năm 2026

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]



TS. Hoàng Thị Thu Hằng

PGS. TS. Phó Quyết Tiến

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO
KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC



[Handwritten signature]

Nguyễn Thị Trung

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập- Tự do- Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Phan Thị Hồng Thảo

Học hàm, học vị: Tiến sĩ

Chức danh trong Hội đồng: *phản biện*.

Cơ quan công tác: Viện Sinh học, Viện Hàn Lâm KH và CN Việt Nam

Họ và tên học viên: Bùi Bình An

Tên đề tài: Nghiên cứu tối ưu hoá khả năng sinh tổng hợp và tinh sạch chất ức chế Alpha-glucosidase từ chủng Streptomyces sp. phân lập ở Việt Nam

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

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

Bệnh đái tháo đường type II là một trong những bệnh chuyển hoá phổ biến và đang có xu hướng gia tăng nhanh chóng trên toàn cầu và ở Việt Nam. Enzym α -glucosidase có vai trò then chốt trong việc phân giải carbohydrate thành glucose, sử dụng chất ức chế enzym α -glucosidase đã được chứng minh là có khả năng làm chậm quá trình hấp thụ glucose, hiệu quả đối với việc kiểm soát đường huyết. Trên thế giới đã có các chất ức chế enzym này truyền thống như acarbose và voglibose có thể kiểm soát đường huyết tốt sau ăn, tuy nhiên tác dụng không mong muốn của những thuốc này cũng phần nào hạn chế việc sử dụng chúng trên lâm sàng. Do đó, các nhà khoa học trên thế giới không ngừng tìm kiếm các chất ức chế enzym α -glucosidase mới, vừa có tác dụng điều trị lại ít tác dụng phụ và các chất ức chế tự nhiên được quan tâm tìm kiếm nhiều. Chính vì vậy, nghiên cứu của học viên Bùi Bình An; "*Nghiên cứu tối ưu hoá khả năng sinh tổng hợp và tinh sạch chất ức chế Alpha-glucosidase từ chủng Streptomyces sp. phân lập ở Việt Nam*" là vấn đề cần thiết, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước, tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo: Theo tôi các kết quả của tác giả không trùng lặp với các công trình khoa học, luận văn đã công bố trong và ngoài nước. Tài liệu tham khảo được trích dẫn tương đối đầy đủ và rõ ràng.

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

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

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn: Có sơ đồ nghiên cứu nên dễ theo dõi. Các phương pháp nghiên cứu sử dụng

gồm phương pháp nuôi cấy vi sinh, phương pháp phân tích hoá sinh,... phù hợp với các Nội dung nghiên cứu và kết quả đạt được, các kết quả nghiên cứu được xử lý thống kê nên đảm bảo độ tin cậy.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn

Luận văn đã có được các kết quả nghiên cứu như sau:

- Từ 36 chủng xạ khuẩn phân lập từ các mẫu đất và nước thu thập ở ven vùng bờ biển Nha Trang, đã tuyển chọn được 16 chủng xạ khuẩn có khả năng ức chế alpha-glucosidase từ đó chọn ra chủng S12.2 có khả năng ức chế cao nhất đạt trên 27,49%.
- Thông qua giải trình tự gen 16S-rRNA, chủng S12.2 có độ tương đồng cao 99,89% với các loài *Streptomyces murinus* và được định danh là *Streptomyces murinus* S12.2.
- Đã nghiên cứu tối ưu các yếu tố như: nồng độ cao nấm men, nồng độ glucose và độ pH cho sinh tổng hợp hoạt chất ức chế alpha-glucosidase của chủng xạ khuẩn S12.2, lần lượt là: 11,71 g/L; 10 g/L và pH 6,6.
- Đã khảo sát 7 dung môi cho tách chiết hoạt chất ức chế alpha-glucosidase từ dịch lên men của xạ khuẩn S12.2, và lựa chọn được dung môi phù hợp là isopropanol và hệ dung môi sử dụng cho tinh sạch hoạt chất là n-butanol:acid acetic và ethyl acetate: H₂O tỷ lệ (3:1:1:1).
- Đã tinh sạch được hoạt chất có hoạt tính ức chế alpha-glucosidase từ chủng xạ khuẩn S12.2 có giá trị IC₅₀ đạt 396,3 microgam/mL.

Thông qua phân tích và so sánh cho thấy hoạt chất ức chế alpha-glucosidase từ chủng xạ khuẩn S12.2 có giá trị IC₅₀ thấp hơn acarbose, tuy nhiên cũng cần các nghiên cứu sâu hơn để khẳng định vấn đề này. Luận văn được trình bày tương đối logic, nghiên cứu bài bản từ phân lập tuyển chọn, phân loại đến nghiên cứu tối ưu môi trường và điều kiện sinh tổng hợp, tách chiết thu nhận hoạt chất ức chế alpha-glucosidase từ xạ khuẩn *Streptomyces murinus* S12.2. Các kết quả nghiên cứu mà học viên đạt được đảm bảo số liệu cho một luận văn Thạc Sĩ và tôi đánh giá cao các kết quả mà học viên đạt được.

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

- Bổ sung vào phần tổng quan giới thiệu về xạ khuẩn đặc biệt mô tả thêm về hình thái,... và xem lại phần mô tả trang 13.
- Phần phương pháp nghiên cứu nên sử dụng cụm từ Phương pháp trước tiêu đề phương pháp thay vì dùng cụm từ Nghiên cứu.
- Phần kết quả nghiên cứu nên loại bỏ các đoạn mô tả phương pháp ở đầu VD mục 4.1.1; mục 4.1.4.
- Xem lại cách sử dụng thuật ngữ
- Kiểm tra lại các đoạn bình luận trang 30, trang 31 .
- Xem lại tiêu đề 4.1.4.
- Kiểm tra lại mục 4.1.4.

- Kiểm tra lại tài liệu tham khảo và trích dẫn.
- Bổ sung kết luận về định danh chủng xạ khuẩn.

Câu hỏi:

1. Theo em xạ khuẩn giống và khác nấm mốc và vi khuẩn như thế nào ?
2. Sau khi tối ưu khả năng sinh tổng hợp hoạt chất ức chế alpha-glucosidase từ xạ khuẩn *Streptomyces murinus* S12.2 tăng lên bao nhiêu lần so với trước tối ưu ?
3. Môi trường ISP2 và môi trường ở mục 4.1.4 của em có gì khác mà hoạt tính ức chế tăng lên 3 lần, hay do thời gian thu nhận thay đổi ?
4. Em thực nghiệm lại ở phương án tối ưu mà mô hình đưa ra thì hoạt chất thu nhận có tương ứng với dự đoán của mô hình không ?
7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không ?
Các kết quả nghiên cứu của luận văn đã được đăng tải tại tuyển tập của Hội nghị tại Nha Trang, 2025.
8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):
Kết quả mà Học viên đạt được đáp ứng yêu cầu của một luận văn Thạc sĩ và tôi đồng ý đưa Luận văn ra bảo vệ trước hội đồng chấm Luận văn để nhận học vị Thạc sĩ.

Hà Nội, ngày 10 tháng 6 năm 2026

Người nhận xét

(Ký, ghi rõ họ tên)



Phan Thị Hồng Thảo

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Nguyễn Quang Huy..... Học hàm, học vị: PGS.TS
Chức danh trong Hội đồng: Phản biện 2
Cơ quan công tác: Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên
Họ và tên học viên: Bùi Bình An
Tên đề tài: N/C tổng về hóa khả năng sinh tổng hợp và tinh sạch chất ức chế α -glucosidase từ chủng *Streptomyces* sp. phân lập tại VN
Ngành: Sinh học thực nghiệm. Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

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

- Enzym α -glucosidase có vai trò chính trong việc phân giải carbohydrate thành glucose nên việc tìm kiếm các chất ức chế enzyme này có hiệu quả rất tốt về việc kiểm soát đường huyết.
- Các chất ức chế α -glucosidase từ VSV có lợi thế trong sản xuất và hiệu quả, dễ tách sạch nên được quan tâm nghiên cứu, may lại tìm thấy thực tiễn cao và có tính mới trong khoa học.

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

Đề tài được thực hiện thì không trùng lặp với các nghiên cứu trước đây trong và ngoài nước. Các trích dẫn từ bài có trong danh mục tài liệu tham khảo, rõ ràng và đầy đủ.

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

Đề tài nghiên cứu về lĩnh vực chất có hoạt tính sinh học, dễ chiết tách sạch hợp chất từ chủng vi sinh vật nên tên đề tài và nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành sinh học thực nghiệm, mã số đào tạo.

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

36. Chứng tỏ sự vật có nguyên gốc và lưu trữ tại địa điểm có rừng
Phương pháp nghiên cứu gồm (i) phân loại dung dịch (ii) thu
nhận sản phẩm và đánh giá hoạt tính enzyme α -glucosidase bằng cách
(iii) Test nếu không sử dụng tổng hợp AGIS bằng 1^o tập ứng bề mặt
(iv) Test hệ số hoạt chất: các phương pháp phức tạp, chi phí cao và
có độ tin cậy. Có thể làm rõ xử lý thống kê.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

- Sản phẩm 16/3C có hoạt tính ức chế α -glucosidase và tuyến
chẩn định S122 có hoạt tính mạnh nhất 27,45%
- Hệ số chọn lọc cao nhất khi sử dụng tập ứng bề mặt KSM-CCD với
các giá trị 5/1 khác biệt đáng kể trước hoặc hoạt tính
đạt tới 86,67% với các giá trị này ở cao nhất men (M, 715/L
pH 6,6 và nồng độ glucose 10g/L
- Test và hệ số tách hoạt chất qua cột silicagel và
ceplax LH20 chỉ số $R_f = 0,77$ có giá trị IC_{50} đạt 396,3 μ g/ml
thấp hơn so với acarbose 30,38 μ g/ml
- o Nhận góp kết luận 3 và 4
- o Nhận thức hơn lên men với các thí nghiệm hệ số tách và kiểm
chứng thực tiễn

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

- Luận văn viết rõ ràng, mạch lạc, ít lỗi chính tả.
- Các bố trí các địa bàn, hình vẽ và các sơ đồ hình ảnh
tray đổi rõ ràng theo dõi, cần có thêm bản luận kết quả
khi kết quả thu thập, số, vật α hay alpha; cao
nhất men là yeast extract,

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

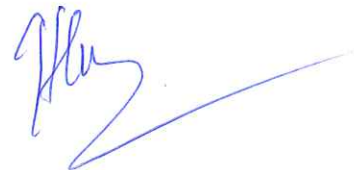
6.1.50. Bộ môn văn tại Hội nghị năm 2025 (Kể
lễ hội An)

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

Đáp ứng yêu cầu của một luận văn Thạc sĩ và có thể
đưa ra bảo vệ trước HĐ ĐT để nhận học vị Thạc sĩ

Hà Nội, ngày 23 tháng 5 năm 2024

Người nhận xét
(Ký, ghi rõ họ tên)



PGS. TS. Nguyễn Duy Hùng

Lưu ý:

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

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

Họ tên học viên: Bùi Bình An

Lớp: SHTN2024A

Tên đề tài luận văn: Nghiên cứu tối ưu hóa khả năng sinh tổng hợp và tinh sạch chất ức chế alpha-glucosidase từ chủng *Streptomyces* sp. phân lập ở Việt Nam

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Đỗ Thị Tuyên

2. TS. Nguyễn Thị Trung

Ngày bảo vệ luận văn: 11/06/2026

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

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	Sắp xếp lại phần tổng quan tài liệu theo từ khóa tiêu đề nghiên cứu	Đã sửa tổng quan tài liệu mục 2. từ chất ức chế α -glucosidase, enzyme α -glucosidase, chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces</i> sp., đại tháo đường.
2	Thay hình phương pháp nghiên cứu tổng quát cụ thể hơn	Đã sửa hình mô tả tổng quát mục 3.3. cụ thể hơn
3	Chỉnh sửa phần tiêu đề phương pháp nghiên cứu	Đã thay các cụm "Nghiên cứu" thành "Phương pháp nghiên cứu" mục 3.3.5 và 3.3.6.
4	Sửa các lỗi chính tả	Đã sửa các lỗi chính tả thống nhất alpha- glucosidase là α -glucosidase, thống nhất viết nghĩa tiếng việt.
5	Sửa format ảnh, bảng biểu	Đã sửa format, thống nhất kích thước ảnh, bảng biểu
6	Đưa các kiến thức tổng quát từ phần kết quả lên phần tổng quan	Đã đưa các kiến thức, khái niệm của xạ khuẩn từ mục 4.1.1. và 4.1.4 lên phần tổng quan tài liệu mục 2.4.

Lưu ý: Các chữ ký xác nhận cần gắn với nội dung trên cùng một trang giấy. Học viện sẽ không xác nhận nếu phần chữ ký tách rời với nội dung



7	Xem lại tiêu đề phân kết quả 4.1.4.	Đã sửa tiêu đề mục 4.1.4. Nuôi lên men chủng <i>Streptomyces</i> sp. S12.2 thành 4.1.4. Kết quả lên men chủng <i>Streptomyces</i> sp. S12.2
8.	Phân mở đầu cần nêu rõ tính cấp thiết	Đã bổ sung thêm ngắn gọn tình hình nghiên cứu hiện nay trên thế giới và ở Việt Nam, từ đó cho thấy tính cấp thiết của đề tài trong mục 1.1
9	Bổ sung thêm tài liệu tổng quan chất ức chế α -glucosidase	Đã bổ sung thêm tài liệu nghiên cứu tổng quan mục 2.1.4.
10	Bổ sung tài liệu tham khảo cho phương pháp	Đã bổ sung trích dẫn các nguồn tài liệu tham khảo cho mục 3.3.

Hà Nội, ngày 15 tháng 06 năm 2026

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

HỌC VIÊN

Phạm Nguyệt Tiên

N.T. Trung Đỗ Thị Tuyết

An Bùi Bình An

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

**KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**



Trần Thị Phương Anh

Lưu ý: Các chữ ký xác nhận cần gắn với nội dung trên cùng một trang giấy. Học viện sẽ không xác nhận nếu phần chữ ký tách rời với nội dung