BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đặng Việt Anh

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA SINH KHỐI BA CHỦNG VI NẤM *Aspergillus* sp. DVXT-221, *Trichoderma* sp. GXT-22.1 VÀ *Aspergillus* sp. BCXT-22.1

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Chuyên ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 9.44.01.14

Hà Nội – 2026

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

Người Hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: PGS.TS. Trần Hồng Quang

Cơ quan công tác: Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

2. Người hướng dẫn 2: PGS.TS. Nguyễn Ngọc Tùng

Cơ quan công tác: Trung tâm đổi mới sáng tạo công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ

2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

Trong những thập niên gần đây, việc tìm kiếm các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học từ nguồn tài nguyên sinh học đang trở thành một hướng nghiên cứu trọng tâm của khoa học sự sống, đặc biệt trong bối cảnh gia tăng tình trạng kháng thuốc và nhu cầu phát triển các dược chất mới có nguồn gốc tự nhiên. Trong số các sinh vật được quan tâm nghiên cứu, vi nấm được xem là một trong những nguồn cung cấp hợp chất thứ cấp phong phú và đa dạng nhất, với nhiều cấu trúc hóa học mới lạ và hoạt tính sinh học có giá trị.

Hệ sinh thái rừng ngập mặn là môi trường đặc thù, chịu tác động đồng thời của điều kiện mặn, ngập nước, biến động thủy triều và áp lực sinh học cao. Chính những điều kiện khắc nghiệt này đã thúc đẩy các vi sinh vật, đặc biệt là vi nấm nội sinh ở thực vật ngập mặn, hình thành các cơ chế thích nghi đặc biệt, dẫn đến khả năng sinh tổng hợp nhiều hợp chất thứ cấp độc đáo. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh rằng vi nấm từ thực vật ngập mặn là nguồn tiềm năng của các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, chống oxy hóa và chống ung thư.

Vườn Quốc gia Xuân Thủy là khu Ramsar đầu tiên của Việt Nam, đại diện tiêu biểu cho hệ sinh thái đất ngập nước ven biển, với tính đa dạng sinh học cao và hệ thực vật ngập mặn phong phú. Tuy nhiên, cho đến nay, các nghiên cứu tại khu vực này chủ yếu tập trung vào đa dạng loài động, thực vật bậc cao và bảo tồn sinh thái, trong khi nguồn tài nguyên vi sinh vật, đặc biệt là vi nấm liên quan đến thực vật ngập mặn, vẫn chưa được nghiên cứu một cách đầy đủ và có hệ thống, nhất là về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các hợp chất do chúng tạo ra.

Xuất phát từ thực tiễn đó, việc nghiên cứu phân lập vi nấm từ thực vật ngập mặn tại Vườn Quốc gia Xuân Thủy, kết hợp phân tích thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất thu được, không chỉ góp phần bổ sung cơ sở dữ liệu khoa học về đa dạng hóa học của vi nấm mà còn mở ra triển vọng ứng dụng trong lĩnh vực y dược và công nghệ sinh học. Trên cơ sở đó, đề tài ***"Nghiên cứu thành phần hóa học, hoạt tính sinh học của sinh khối ba chủng vi nấm Aspergillus* sp. DVXT-221, *Trichoderma* sp. GXT-22.1 và *Aspergillus* sp. BCXT-22.1"*** được thực hiện nhằm góp phần khai thác hợp lý nguồn tài nguyên sinh học, gắn nghiên cứu cơ bản với định hướng ứng dụng và phát triển bền vững. Luận án gồm các mục tiêu cũng như các nội dung như sau:

- Mục tiêu của luận án:

  1. Phân lập và xác định được cấu trúc các hợp chất thứ cấp từ 03 chủng vi nấm ở một số thực vật rừng ngập mặn thu thập ở vườn Quốc gia Xuân Thủy.

  2. Đánh giá được hoạt tính gây độc tế bào ung thư trên 02 dòng tế bào [ung thư gan (Hep-G2) và ung thư vú (MCF-7)] và ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào RAW264.7/BV2 của các hợp chất sạch phân lập được.

- Nội dung của luận án:

  1. Nghiên cứu phân lập các hợp chất sạch từ 03 chủng vi nấm phân lập từ thực vật ngập mặn.

  2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất sạch phân lập được.

  3. Nghiên cứu đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư trên 02 dòng tế bào [ung thư gan (Hep-G2) và ung thư vú (MCF-7)] và

ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào RAW264.7/BV2 của các hợp chất phân lập được.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Các hợp chất thứ cấp từ vi nấm ở thực vật ngập mặn phân bố ở VQG Xuân Thủy

Các nghiên cứu về vi nấm ngập mặn trên thế giới cho thấy sự đa dạng về thành phần loài của vi nấm ở thực vật ngập mặn và đây là nguồn tài nguyên phong phú các hợp chất mới, có hoạt tính sinh học. Trong số đó, thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của vi nấm ở một số loài chiếm ưu thế ở vườn Quốc gia Xuân Thủy như Bần chua (*Sonneratia caseolaris*), Đước vòi (*Rhizophora stylosa*), Giá (*Excoecaria agallocha*) cho thấy nhiều kết quả thú vị và giàu tiềm năng khai thác làm dược liệu [20, 45].

Các nghiên cứu trên đối tượng vi nấm nội sinh ở cây *S. caseolaris* cho thấy một số hợp chất mới, có hoạt tính sinh học đã được phân lập. Theo Ebrahim và cs (2012), một số hợp chất peptide pullularin A (**83**) và C (**84**), và verticilin (**85**) từ vi nấm *Bionectria ochroleuca* thể hiện hoạt tính gây độc mạnh đối với dòng tế bào L5178Y (IC_{50} = 0.1-6.7 μg/mL) [17]. Nghiên cứu của Rönsberg và cs (2013) đã phân lập và xác định được một số hợp chất mới α-pyrone mới là pestalotiopyrone I–L (**83-86**) từ vi nấm *Pestalotiopsis virgatula* nội sinh ở *S. caseolaris* [46], tuy nhiên các hợp chất đều không thể hiện hoạt tính gây độc đối với tế bào L5178Y ở nồng độ 10 μg/mL cũng như kháng khuẩn (MIC > 125 μg/mL). Theo Liu và cs (2016), 5 hợp chất altenusin mới và một

số hợp chất đã biết đã được phân lập từ chủng vi nấm *Alternaria* sp. SK6YW3L phân lập từ quả *S. caseolaris*, trong đó hợp chất **87-89** thể hiện hoạt tính ức chế hoạt động của enzym α-glucosidase, với giá trị IC_{50} lần lượt là 78.2, 78.1, and 64.7 μM [47]. Theo Zhu và cs (2016), 2 cặp đồng phân mới là campyridone A (**90**) và B (**91**) và campyridone C (**92**) và D (**93**) đã được phân lập từ chủng vi nấm *Campylocarpon* sp. HDN13-307, trong đó hợp chất **93** có hoạt tính gây độc đối với dòng tế bào HeLa (IC50 = 8.8 μM) [48].

Các nghiên cứu về vi nấm nội sinh ở cây *R. stylosa* cũng cho thấy nhiều kết quả rất thú vị về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học. Theo Peng và cs (2011), 5 hợp chất cerebroside mới, chrysogeside A-E (**94-98**) và 2 hợp chất 2-pyridone alkaloid mới, chrysogedone A và B (**99** và **100**) đã được phân lập từ chủng *Penicillium chrysogenum* PXP-55 phân lập từ rễ cây *R. stylosa* ở Trung Quốc, trong đó hợp chất **95** thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với Enterobacter aerogenes (MIC = 1.72 μM) [49]. Theo Zang và cs (2012), 9 hợp chất sesquiterpenoid mới là diaporol A−I (**101-109**) đã được phân lập từ chủng vi nấm *Diaporthe* sp. ở lá cây cây *R. stylosa* ở Trung Quốc, tuy nhiên các hợp chất không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở nồng độ 20 μM [50]. Cũng từ chủng vi nấm này, 10 hợp chất brasilane-type sesquiterpnoid mới là diaporol J-S (**110-119**) cũng đã được phân lập, tuy nhiên hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất không thể hiện ở nồng độ 30 μM, ngoại trừ hợp chất **118** thể hiện hoạt tính trung bình đối với tế bào SW480 (IC_{50} = 8.72 ± 1.32 μM) [51]. Từ chủng vi nấm *Cytospora heveae* NSHSJ-2 phân lập từ thân cây *S.*

caseolaris, một số hợp polyketide đã được phân lập và thể hiện hoạt tính thu dọn gốc tự do DPPH [52].

Từ vi nấm *Aspergillus nidulans* MA-143 phân lập từ lá cây *R. stylosa*, 6 hợp chất 4-phenyl-3,4-dihydroquinolone mới là aniduquinolones A−C (**120-122**), 6-deoxyaflaquinolone E (**123**), isoaflaquinolone E (**124**), và 14-hydroxyaflaquinolone F (**125**) đã được phân lập, trong đó hợp chất **121** và **122** thể hiện độc tính đối với ấu trùng *Artemia saline*, với giá trị IC_{50} lần lượt là 7.1 và 4.5 μM [53]. Cũng từ chủng vi nấm này, An và cs (2013) đã phân lập được 4 hợp chất quinazolinone alkaloid là aniquinazolines A–D (**126-129**) và các hợp chất này đều thể hiện độc tính đối với *Artemia saline* (IC_{50} = 1.27-4.95 μM) [54]. Từ vi nấm *Mucor irregularis* QEN-189 phân lập từ rễ cây *R. stylosa* ở đảo Hainan, Trung Quốc, 6 hợp chất indole-diterpenoid mới là rhizovarins A-F đã được phân lập, trong đó hợp chất rhizovarin A (**130**), B (**131**), và E (**132**) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào HL-60 và A-549 (IC_{50} = 6.3-11.5 μM) [55]. Theo Zhang et al (2015), từ chủng *Penicillium oxalicum* EN-201 phân lập từ lá cây *R. stylosa*, 2 hợp chất alkaloid mới là penioxamide A (**133**) và 18-hydroxydecaturin B (**134**) đã được phân lập, và cả 2 hợp chất đều thể hiện độc tính đối với *Artemia saline* (LD_{50} = 5.6 và 2.3 μM) [56]. Một số chủng vi nấm phân lập từ *R. stylosa* thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn *Pseudomonas adaceae*, *Enterococcus faecalis*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) và nấm gây bệnh *Monilia albicans* và hoạt tính gây độc tế bào đối với một số dòng tế bào ung thư như A549, HeLa, và HepG2 [57].

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- ***Chủng vi nấm XT37 (Aspergillus sp. DVXT-221)***

Chủng vi nấm XT37 (*Aspergillus* sp. DVXT-221) được phân lập từ lá cây Đước vòi (*Rhizophora stylosa*) thu thập ở VQG Xuân Thủy. Tên khoa học của chủng vi nấm này được xác định bằng phương pháp sinh học phân tử, bao gồm PCR và giải trình tự gen ITS rDNA. Trình tự gen ITS rDNA của chủng vi nấm này đã được đăng ký trên Genbank ,với mã số: PQ119563. Chủng vi nấm này hiện đang được bảo quản tại phòng Hóa sinh phân tử, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

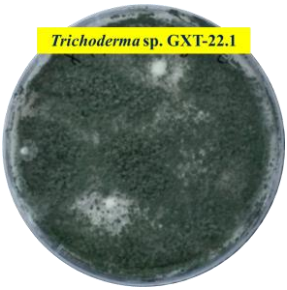


Hình 2.1. Chủng vi nấm XT37 (Aspergillus sp. DVXT-221)

- ***Chủng vi nấm XT47 (Trichoderma sp. GXT-22.1)***

Chủng vi nấm XT47 (*Trichoderma* sp. GXT-22.1) được phân lập từ rễ cây Giá (*Excoecaria agallocha*) thu thập ở VQG Xuân Thủy. Tên khoa học của chủng vi nấm này được xác định bằng phương pháp PCR và giải trình tự gen ITS rDNA (mã số đăng ký Genbank: PQ559788). Chủng vi nấm này hiện đang được bảo quản tại phòng

Hóa sinh phân tử, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình 2.2. Chủng vi nấm XT47 (*Trichoderma* sp. GXT-22.1)

- ***Chủng vi nấm XT49 (Aspergillus sp. BCXT-22.1)***

Chủng vi nấm XT49 (*Aspergillus* sp. BCXT-22.1) được phân lập từ rễ cây Bần chua (*Sonneratia caseolaris*) thu thập ở VQG Xuân Thủy. Tên khoa học của chủng vi nấm này được xác định bằng phương pháp PCR và giải trình tự gen ITS rDNA (mã số đăng ký Genbank: PV425981). Chủng vi nấm này hiện đang được bảo quản tại phòng Hóa sinh phân tử, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

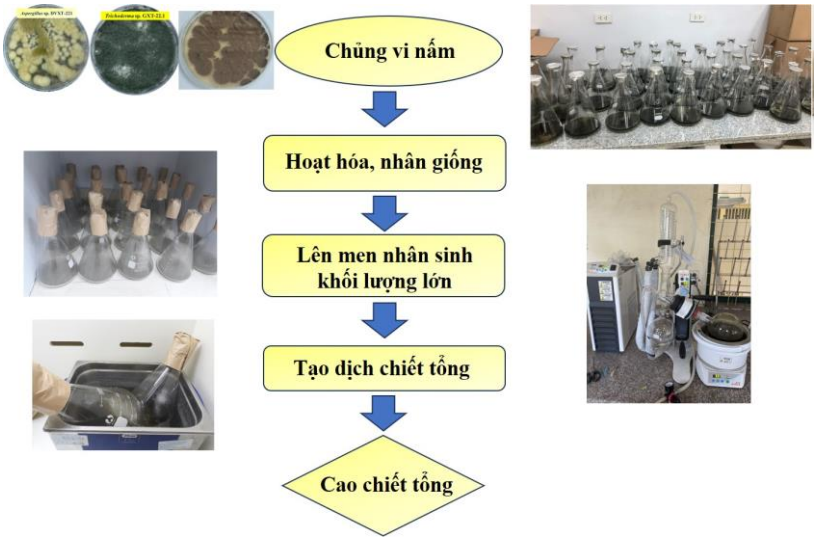


Hình 2.3. Chủng vi nấm XT49 (*Aspergillus* sp. BCXT-22.1)

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả lên men sinh khối, tạo cao chiết tổng các chủng vi nấm

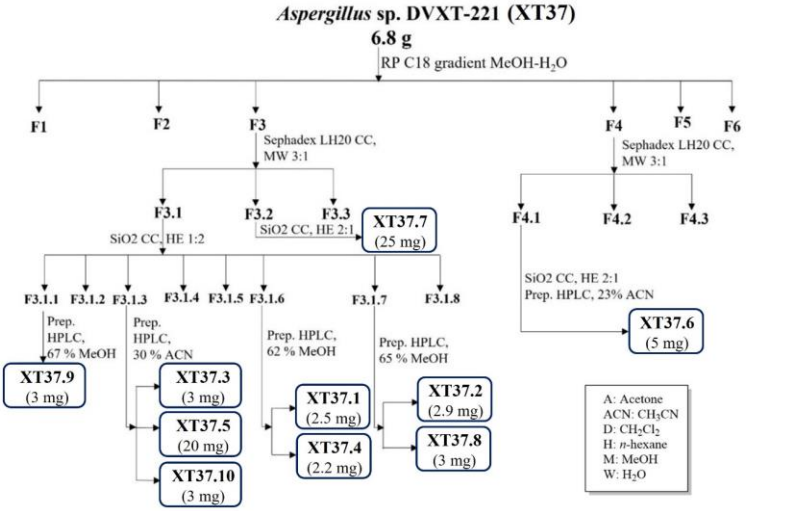
Các chủng vi nấm XT37, XT47 và XT49 được lên men nhân sinh khối lượng lớn, tạo cao chiết tổng với EtOAc. Kết quả là đã thu được cao chiết tổng EtOAc của 3 chủng vi nấm XT37 (6.8 g), XT47 (20 g) và XT49 (7.0 g). Cao chiết tổng của các chủng vi nấm này được bảo quản ở 0-4 ^{o}C cho đến khi thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 0.1. Sơ đồ các bước lên men nhân sinh khối lượng lớn, tạo cao chiết tổng các chủng vi nấm XT37, XT47 và XT49

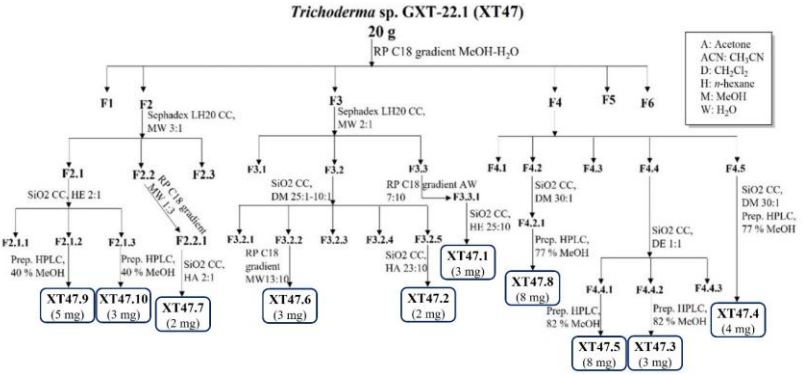
3.2. Kết quả phân lập các hợp chất

3.2.1. Kết quả phân lập các hợp chất từ chủng vi nấm XT37



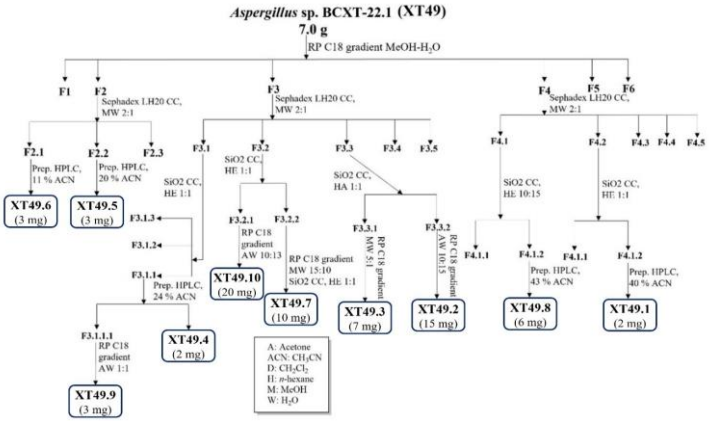
Hình 3.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ chủng vi nấm XT37

3.2.2. Kết quả phân lập các hợp chất từ chủng XT47



Hình 3.3. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ chủng vi nấm XT47

3.2.3. Kết quả phân lập các hợp chất từ chủng XT49



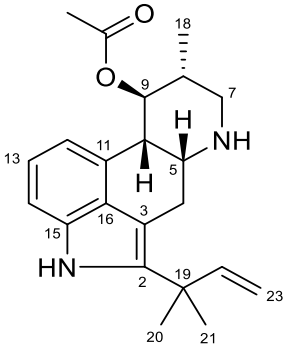
Hình 3.4. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ chủng vi nấm XT49

CHƯƠNG 4. THẢO LUẬN KẾT QUẢ

3.1. Xác định cấu trúc các hợp chất

3.1.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ chủng Aspergillus sp. DVXT-221 (XT37)

3.1.1.1. Hợp chất XT37.1: Fumigaclavine K (chất mới)



Hình 0.1. Cấu trúc hóa học của hợp chất XT37.1

Hợp chất **XT37.1** được thu nhận dưới dạng bột trắng. Công thức phân tử được xác định là $C_{22}H_{28}N_2O_5$ thông qua tín hiệu phân tử proton hóa $[M+H]^+$ tại *m/z* 353.2226 (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $C_{22}H_{29}N_2O_2$ là 353.2229) trên phổ HRESIMS (Hình 4.5). Trên phổ ^{1}H NMR xuất hiện các tín hiệu proton vòng thơm đặc trưng với hệ spin ABC tại δ_H 6.71 (dd, *J* = 7.2 Hz, H-12), 7.03 (t, *J* = 7.8 Hz, H-13), và 7.18 (d, J = 7.8 Hz, H-14), cùng một liên kết đôi tại δ_H 6.18 (dd, *J* = 10.8, 17.4 Hz, H-22), 5.12 (dd, *J* = 2.4, 17.4 Hz, Ha-23) và 5.10 (dd, *J* = 1.8, 10.8 Hz, Hb-23), cùng với bốn nhóm methyl tại δ_H 1.39 (d, *J* = 7.8 Hz, H-18), 1.56 (s, H-20), 1.55 (s, H-21) và 1.89 (s, 9-OAc) (Bảng 4.1). Phổ ^{13}C NMR ghi nhận 22 tín hiệu carbon, bao gồm một nhóm carbonyl tại δ_C 172.0 (9-OAc), 10 carbon sp^2 và 11 carbon sp^3. Trong số các carbon sp^2, ngoài các tín hiệu của liên kết đôi và ba

carbon methine, còn ghi nhận năm carbon không liên kết proton, bao gồm hai carbon mang nitrogen tại δ_C 139.5 (C-2) và 134.8 (C-15), gợi ý hợp chất **XT37.1** có vòng indole trong phân tử (Bảng 4.1) [89, 90]. Phân tích phổ HSQC cho thấy sự có mặt của các carbon sp^3, bao gồm hai carbon methylene [bao gồm một carbon mang nitơ tại δ_C 46.4 (C-7)], bốn carbon methine [trong đó có một carbon mang nitơ tại δ_C 55.1 (C-5) và một carbon mang oxy tại δ_C 70.5 (C-9), bốn nhóm methyl và một carbon không liên kết proton tại δ_C 40.3 (C-19). Thông qua các phân tích chi tiết phổ COSY và HSQC, các mảnh liên kết từ vị trí C-4/C-5 và từ vị trí C-7 đến C-10 được xác định. Trên cơ sở những phân tích này, kết hợp với các tương tác HMBC ghi nhận được từ H-18 đến C-7, C-8 và C-9 giúp xác định được vị trí nhóm methyl tại C-8. Tín hiệu HMBC từ nhóm methyl tại δ_H 1.89 (s) đến carbonyl tại δ_C 172.0 cho thấy có sự hiện diện của một nhóm acetyl. Nhóm acetyl này được xác định ở vị trí C-9 thông qua độ dịch chuyển hóa học dịch chuyển xa về phía trường dưới của vị trí C-9 (δ_C 70.5 / δ_H 5.77). Ngoài ra, các tương tác HMBC từ H-23 đến C-19 và C-22, từ H-22 đến C-19 và C-2, và từ H-20 đến C-2, C-19 và C-21, cho thấy sự có mặt của một nhóm thế 2-methylbut-3-en-2-yl gắn tại vị trí C-2 (Hình 4.3). Trên cơ sở các kết quả phân tích phổ trên, tiến hành so sánh số liệu NMR của hợp chất **XT37.1** với một hợp chất ergot alkaloid đã biết là fumigaclavine D cho thấy sự tương đồng cao, ngoại trừ khác biệt đáng kể ở độ dịch chuyển hóa học của phần cấu trúc 3-methyldecahydroquinolin-4-yl acetate, gợi ý **XT37.1** là một diastereoisomer của hợp chất fumigaclavine D đã biết [90]. Điều này phù hợp với các phân tích phổ NOESY (Hình 4.3). Cụ thể, H-9 thể hiện tương tác NOE với H-18 nhưng không có tương tác với H-5, cho thấy H-18 và H-9 cùng hướng về phía mặt phẳng α, trong khi H-5 và

H-8 hướng về phía mặt phẳng β. Phân tích này cho thấy hợp chất **XT37.1** và fumigaclavine D có cấu hình tương đối tương đồng tại các vị trí C-5, C-8 và C-9 [90]. Tuy nhiên, H-8 thể hiện tương tác NOE với H-10, cho thấy hai proton này có cùng hướng trong không gian. Từ các kết quả phân tích phổ NOESY này, kết hợp với sự khác biệt về độ dịch chuyển hóa học của phần cấu trúc methyldecahydroquinolin-4-yl acetate cho thấy hợp chất **XT37.1** là 10-epimer của hợp chất fumigaclavine D. Dựa trên cấu hình tương đối này, phổ ECD lý thuyết được tính toán bằng phương pháp TD-DFT với phần mềm Gaussian 16 W. Kết quả cho thấy phổ ECD tính toán lý thuyết cho cấu hình 5*R*8*R*9*S*10*S* phù hợp hoàn toàn với phổ ECD thực nghiệm, qua đó cấu hình tuyệt đối của hợp chất **XT37.1** được xác định (Hình 4.4). Trên cơ sở các kết quả phân tích phổ nêu trên, cấu trúc hóa học của hợp chất **XT37.1** được xác định, với tên gọi là fumigaclavine K (Hình 4.1).

Bảng 0.1. Số liệu phổ NMR của hợp chất **XT37.1**

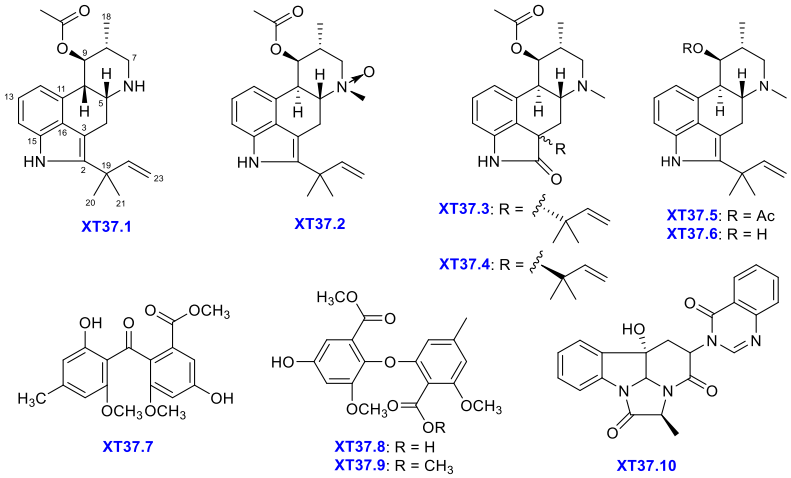
Vị trí	δ_C[a,b]	δ_H[a,c] (*J* = Hz)
2	139.5	-
3	103.6	-
4	29.1	3.51 (m) 3.03 (m)
5	55.1	3.67 (m)
7	46.4	3.52 (m) 3.27 (br d, 7.2)
8	32.8	2.41 (m)
9	70.5	5.77 (br s)
10	38.8	3.52 (m)
11	126.6	-
12	113.3	6.71 (d, 7.2)
13	122.8	7.03 (t, 7.8)
14	110.1	7.18 (d, 7.8)
15	134.8	-
16	128.7	-

18	15.3	1.39 (d, 7.8)
19	40.3	-
20	28.1	1.56 (s)
21	28.0	1.55 (s)
22	147.2	6.18 (dd, 10.8, 17.4)
23	112.0	5.12 (dd, 2.4, 17.4) 5.10 (dd, 1.8, 10.8)
9-OAc	172.0	
	20.7	1.89 (s)

[a] *Đo trong CD_3OD;* [b] *150 MHz,* [c] *600 MHz*

3.1.2. Tổng hợp kết quả xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ chủng Aspergillus sp. DVXT-221 (XT37)

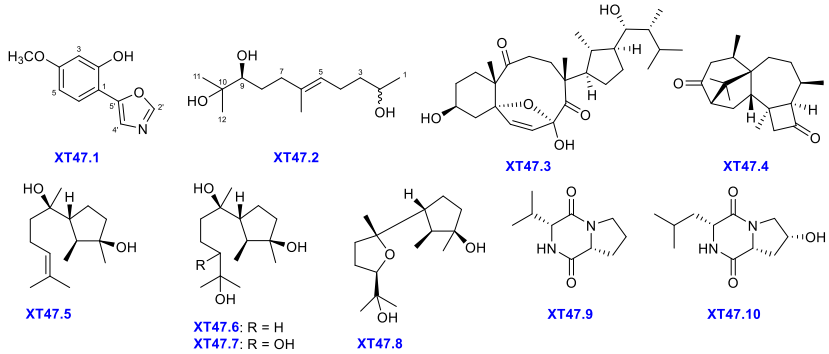
Thông qua phân tích chi tiết dữ liệu phổ NMR (^{1}H, ^{13}C, HSQC, HMBC, COSY, NOESY), phổ khối HRESIMS, phổ ECD và góc quay cực, kết hợp với so sánh với các số liệu đã công bố, cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được từ chủng *Aspergillus* sp. DVXT-221 (XT37) đã được xác định, bao gồm 3 hợp chất mới fumigaclavine K (**XT37.1**), fumigaclavine L (**XT37.2**), và fumigaclavine M (**XT37.3**) và 7 hợp chất đã biết là: fumigaclavine I (**XT37.4**) [89], fumigaclavine C (**XT37.5**) [90], và fumigaclavine E (**XT37.6**) [90], monomethylsulochrin (**XT37.7**) [91], 8′-*O*-methylasterric acid (**XT37.8**) [86], 2,3′-dimethylosoate (**XT37.9**) [92] và chaetominine (**XT37.10**) [86] (Hình 4.2).



Hình 0.2. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ chủng *Aspergillus* sp. DVXT-221 (XT37)

4.1.2. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ chủng Trichoderma sp. GXT-22.1

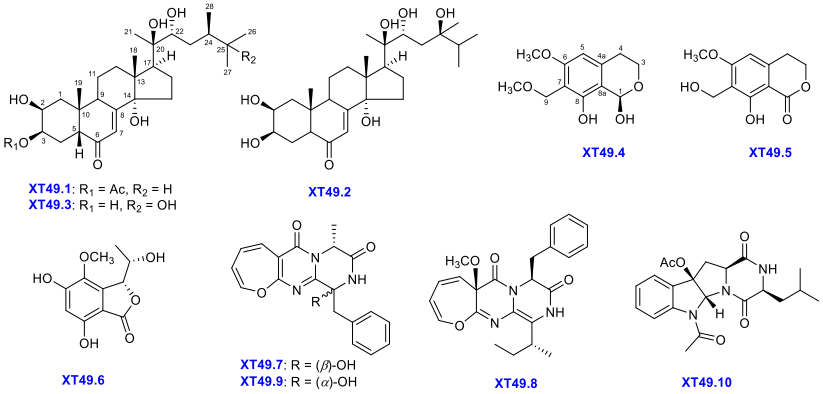
Cấu trúc hóa học của các hợp chất **XT47.1–XT47.10** được xác định bằng các phương pháp phân tích phổ kết hợp, bao gồm phổ NMR, HRESIMS, kết hợp với so sánh với tài liệu tham khảo. Kết quả đã xác định được 2 hợp chất mới: 5′-(4-methoxyphenyl)-1′,3′-oxazole (**XT47.1**) và (*E*)-6,10-dimethyl-5-undecene-2,9,10-triol (**XT47.2**) và 8 hợp chất đã biết: tricholumin A (**XT47.3**) [96], harzianol J (**XT47.4**) [97], cyclonerodiol (**XT47.5**) [98], 10,11-dihydro-11-hydroxycyclonerodiol (**XT47.6**) [99], cyclonerodiol B (**XT47.7**) [100], epicyclonerodiol oxide (**XT47.8**) [101], cyclo(Val-Pro) (**XT47.9**) [102] và cyclo-(4-hydroxyprolinyl-leucine) (**XT47.10**) [103] (Hình 4.53)



Hình 0.2. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ chủng Trichoderma sp. GXT-22.1 (XT47)

4.1.3. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ chủng Aspergillus sp. BCXT-22.1 (XT49.1)

Bằng các phương pháp phân tích phổ NMR và HRESIMS, kết hợp với so sánh với các hợp chất đã biết, cấu trúc hóa học của 10 hợp chất sạch đã được xác định, trong đó có 2 hợp chất mới: polyporusterone H (**XT49.1**) và stellatinol A (**XT49.4**) và 8 hợp chất đã biết: panuosterone (**XT49.2**) [110], makisterone A (**XT49.3**) [111], stellatin (**XT49.5**) [112], embeurekol C (**XT49.6**) [113], oxepinamide D (**XT49.7**) [114], oxepinamide F (**XT49.8**) [114], oxepinamide J (**XT49.9**) [115] và protubonine B (**XT49.10**) [116] (Hình 4.79)



Hình 0.3. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ chủng *Aspergillus* sp. BCXT-22.1 (XT49.1)

4.2. Hoạt tính sinh học của các hợp chất

4.2.1. Hoạt tính ức chế sự sản sinh NO và gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ chủng Aspergillus sp. DVXT-221 (XT37)

Thử nghiệm hoạt tính ức chế sự sản sinh NO và gây độc tế bào ung thư của 10 hợp chất sạch được phân lập từ chủng ***Aspergillus* sp. DVXT-221** kết quả cho thấy 2 hợp chất **XT37.1** và **XT37.9** ức chế mạnh sự sản sinh NO ở tế bào đại thực bào RAW264.7 kích thích bằng LPS (Bảng 3.1). So sánh cấu trúc và hoạt tính sinh học của một số đồng phân ergot alkaloid (**XT37.1-XT37.5**) cho thấy các yếu tố như cấu hình H-10(β), hướng quay α của nhóm prenyl tại vị trí C-3 ảnh hưởng tích cực đến khả năng ức chế NO. Sự hiện diện của nhóm methyl ester đóng góp hoạt tính ức chế NO tốt hơn so với nhóm carboxyl ở 2 hợp chất **XT37.8** và **XT37.9**.

Trên cơ sở kết quả thử nghiệm khả năng ức chế sản sinh NO, hợp chất **XT37.1** và **XT37.9** được tiến hành nghiên cứu khả năng liên kết với trung tâm hoạt động của enzyme iNOS - enzyme xúc tác cho

quá trình tổng hợp NO trong các đại thực bào. Theo đó, nghiên cứu mô phỏng docking phân tử của 2 hợp chất **XT37.1** và **XT37.9** với cấu trúc tinh thể của enzyme iNOS (PDB ID: 3E6T) được phân tích thông qua công cụ docking AutoDock 4.2 (Hình 4.112). Kết quả cho thấy chất **XT37.1** có khả năng gắn kết tốt tại vùng hoạt động của enzym (năng lượng liên kết −12.71 kcal/mol), thể hiện qua sự hình thành liên kết hydro với gốc amino acid Val346, cùng với nhiều tương tác kỵ nước với các acid amin quan trọng như Ala345, Phe363, Gly365, Trp366, Glu371, Pro344, Tyr367, Asp376, Tyr341, Gln257 và Asn364. Sự hiện diện đồng thời của liên kết hydrogen và tương tác kỵ nước này cho thấy chất **XT37.1** có thể chiếm giữ vùng hoạt động một cách hiệu quả, từ đó ức chế hoạt động xúc tác của enzym iNOS. Ngoài ra, hợp chất **XT37.9** thể hiện tương tác với trung tâm hoạt động của iNOS, với năng lượng liên kết −6.62 kcal/mol, thông qua các liên kết H với các gốc Phe363 và Pro344 và Gln257 và các tương tác kỵ nước với các gốc amino acid như Tyr341, Tyr367, Val346, Ala345 và Asn364. Kết quả docking phân tử cho thấy sự hiện diện đồng thời của liên kết hydrogen và tương tác kỵ nước cho thấy 2 hợp chất **XT37.1** và **XT37.9** có thể chiếm giữ vùng hoạt động một cách hiệu quả, từ đó có thể ức chế hoạt động xúc tác của enzym iNOS trong sản sinh NO. Điều này củng cố giả thuyết rằng cả 2 hợp chất ức chế sự sản sinh quá mức NO thông qua điều hòa hoạt động của iNOS trên dòng tế bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS. Những phát hiện cho thấy tiềm năng nghiên cứu sâu hơn về hoạt tính kháng viêm của 2 hợp chất **XT37.1** và **XT37.9**.

Trên cơ sở kết quả hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất **XT37.5, XT37.7, XT37.8**, và **XT37.10** đã được nghiên cứu và công bố trên thế giới [85-87], hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất của

XT37.1-XT37.4, XT37.6 và **XT37.9** đối với 2 dòng tế bào ung thư biểu mô HepG2 và MCF7 được đánh giá bằng phương pháp SRB [77, 88]. Kết quả cho thấy, các hợp chất **XT37.1** và **XT37.3** thể hiện độc tính tế bào yếu đối với cả dòng tế bào HepG2 và MCF7, với giá trị IC_{50} dao động từ 61.1 ± 3.1 đến 77.2 ± 1.5 μM (Bảng 3.1), trong khi các hợp chất **XT37.2**, **XT37.4**, **XT37.6** và **XT37.9** không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả hai dòng tế bào (IC_{50} > 100 μM).

4.2.2. Hoạt tính ức chế sự sản sinh NO và gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ chủng Trichoderma sp. BCXT-22.1 (XT47)

Các hợp chất **XT47.1-XT47.8** và **XT47.10** phân lập được từ chủng *Trichoderma* sp. BCXT-22.1 (XT47) được thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO ở tế bào RAW264.7 kích thích bởi LPS bằng phương pháp Griess. Kết quả cho thấy hợp chất **XT47.1** thể hiện hoạt tính sinh học nổi bật, với khả năng ức chế sự sản sinh NO, với giá trị IC_{50} đạt 37.5 ± 2.6 μM, trong khí các hợp chất còn lại (trừ **XT47.6** và **XT47.7** không có hoạt tính) chỉ thể hiện tác dụng ức chế tương đối thấp với NO, với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 60.2 đến 86.5 μM (Bảng 3.2). Kết quả mô phỏng docking phân tử cho thấy hợp chất **XT47.1** có khả năng tương tác hiệu quả với vị trí hoạt động của enzyme iNOS, với năng lượng liên kết −6.34 kcal/mol (Hình 4.113). Cụ thể, hợp chất **XT47.1** hình thành liên kết hydro với gốc Glu371 và tương tác kỵ nước với nhiều gốc amino acid quan trọng khác như Tyr341, Gln257, Tyr367, Ala345, Pro344, Val346, Gly365, Phe363 và Asn364. Những tương tác này cho thấy hoạt tính ức chế NO của hợp chất **XT47.1** có thể liên quan mật thiết đến khả năng gắn kết với iNOS để điều hòa hoạt động của enzyme này.

Các hợp chất **XT47.1–XT47.8** được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào đối với hai dòng tế bào ung thư là MCF-7 và HepG2. So với chất đối chứng dương ellipticine (tỷ lệ chết tế bào đạt 80.7% trên MCF-7 và 84.6% trên HepG2 ở nồng độ 2 μg/mL), tất cả các hợp chất thử nghiệm đều có gây chết tế bào thấp hơn ở nồng độ 100 μM ((Bảng 3.2). Đối với dòng tế bào MCF-7, hợp chất **XT47.4** thể hiện hoạt tính cao nhất, với tỷ lệ gây chết tế bào đạt 39.3 ± 2.3%, tiếp theo là **XT47.1** (32.9 ± 1.9%) và **XT47.3** (25.4 ± 1.9%), trong khi các hợp chất **XT47.7, XT47.5, XT47.6** và **XT47.8** gây chết tế bào từ 15% đến 22%. Ở dòng tế bào HepG2, hợp chất **XT47.1** cho thấy hoạt tính cao nhất, với tỷ lệ gây chết tế bào đạt 41.5 ± 3.0%, trong khi các hợp chất **XT47.3, XT47.4** và **XT47.7** gây chế tế bào ở mức thấp hơn, trong khoảng từ 21–23%. Các kết quả cho thấy chỉ có hợp chất **XT47.1** và **XT47.4** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào vẫn ở mức yếu, các hợp chất còn lại không gây ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sống sót của tế bào và được xem là không có độc tính ở nồng độ thực nghiệm.

4.2.3. Hoạt tính ức chế sự sản sinh NO và gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ chủng Aspergillus sp. GXT-22.1 (XT49)

Trên cơ sở kết quả sàng lọc, chủng *Aspergillus* sp. GXT-22.1 (**XT49**) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh trên các dòng tế bào ung thư thử nghiệm, các hợp chất **XT49.1–XT49.10** phân lập từ chủng *Aspergillus* sp. GXT-22.1 được thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào đối với 2 dòng tế bào ung thư người, bao gồm MCF-7 và HepG2 bằng phương pháp SRB. Kết quả cho thấy, trong các hợp chất thử nghiệm, hợp chất **XT49.1** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả 2 dòng tế bào MCF-7 và HepG2, với giá trị IC_{50} lần lượt là từ 75.41 ± 5.76 và 87.65 ± 3.49 μM (Bảng 3.3). Các hợp chất **XT49.2–XT49.7**, **XT49.9**

và **XT49.10** chỉ thể hiện hoạt tính gây độc ở mức yếu trên dòng tế bào MCF-7, với giá trị IC_{50} trong khoảng từ 78.05 ± 2.24 đến 94.20 ± 3.41 µM. Tuy nhiên, ngoại trừ hợp chất **XT49.1**, tất cả các hợp chất đều không thể hiện hoạt tính trên dòng tế bào HepG2 (IC_{50} > 100 µM).

Ngoài ra, tất cả các hợp chất được khảo sát cũng được đánh giá hoạt tính chống viêm thông qua khả năng ức chế sản xuất NO trong tế bào vi thần kinh BV2 được kích thích bởi LPS. Ở nồng độ không gây độc (40 µM), hầu hết các hợp chất chỉ thể hiện tác dụng ức chế yếu, với tỷ lệ ức chế NO dao động từ 10.4 ± 0.9 đến 36.6 ± 1.3% (Bảng 3.3). Trong đó, hai hợp chất **XT49.4** và **XT49.8** cho thấy mức ức chế cao hơn rõ rệt so với các hợp chất còn lại, lần lượt đạt 36.6 ± 1.3% và 31.7 ± 2.9%. Trên cơ sở kết quả sàng lọc này, 2 hợp chất **XT49.4** và **XT49.8** đã được chọn để tiến hành mô phỏng docking phân tử nhằm khảo sát khả năng gắn kết với vị trí hoạt động của enzyme iNOS (PDB ID: 3E6T). Kết quả docking cho thấy cả hai hợp chất **XT49.4** và **XT49.8** đều có khả năng tương tác với vị trí hoạt động của iNOS thông qua liên kết hydro và các tương tác kỵ nước với các gốc amino acid đặc hiệu, với năng lượng liên kết lần lượt là –7.02 và –10.31 kcal/mol, cho thấy ái lực gắn kết với vị trí hoạt động của enzyme (Hình 4.114). Tương tự như với các nghiên cứu trên thế giới, hợp chất **XT49.4** hình thành liên kết hydro với amino acid Glu371, đây được xem là một amino acid quan trọng trong cơ chế xúc tác của iNOS, và tương tác kỵ nước với các gốc Gln257, Tyr367, Pro344 và Val346. Trong khi đó, hợp chất **XT49.8** có liên kết hydro với amino acid Tyr367 và nhóm Hem901, đồng thời tương tác kỵ nước với các amino acid quan trọng khác như Gln257, Arg260, Glu371, Tyr341 và Pro344. Những kết quả này cho thấy hoạt tính ức chế NO của các hợp chất **XT49.4** và **XT49.8**

có thể liên quan đến khả năng điều hòa hoạt động của iNOS thông qua tương tác với vùng hoạt động của enzyme.

KẾT LUẬN

- Đã phân lập và xác định cấu trúc của 30 hợp chất sạch từ 3 chủng vi nấm thực vật ngập mặn *Aspergillus* sp. DVXT-221, *Trichoderma* sp. BCXT-22.1 và *Aspergillus* sp. GXT-22.1, trong đó có 6 hợp chất mới: fumigaclavine K–M **(XT37.1–XT37.3),** 5′-(4-methoxyphenyl)-1′,3′-oxazole **(XT47.1),** polyporusterone H **(XT49.1)** và stellatinol A **(XT49.4)** và một hợp chất lần đầu tiên phân lập từ thiên nhiên: (*E*)-6,10-dimethyl-5-undecene-2,9,10-triol **(XT47.2)**.

- Đã đánh giá hoạt tính ức chế sự sản sinh quá mức NO của các hợp chất sạch. Trong đó 2 hợp chất **XT37.1** và **XT37.9** thể hiện hoạt tính mạnh nhất (IC_{50} = 5.3 ± 0.2 và 8.7 ± 0.4 μM), 16 hợp chất **XT37.1–XT37.4, XT37.8–XT37.10, XT47.1–XT47.5, XT47.8, XT47.10, XT49.4,** và **XT49.8** thể hiện hoạt tính yếu hơn. Mô hình hóa docking phân tử cho thấy các hợp chất **XT37.1, XT37.9, XT47.1, XT49.4**, và **XT49.8** đều thể hiện ái lực liên kết với trung tâm hoạt động của enzyme iNOS, với năng lượng liên kết từ –12.71 đến –6.34 kcal/mol.

- Đã đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên 2 dòng tế bào ung thư HepG2 và MCF7 của các hợp chất sạch. Trong đó 2 hợp chất **XT37.1**, **XT37.3** và **XT49.1** thể hiện hoạt tính trên cả 2 dòng tế bào HepG2 và MCF7 (IC_{50} = 61.1 ± 3.1 – 87.65 ± 3.49 μM). Các hợp chất **XT49.2–XT49.7**, **XT49.9** và **XT49.10** gây độc dòng tế bào MCF7 (IC_{50} = 76.56 ± 4.70 – 94.20 ± 3.41 μM).

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Đã phân lập và xác định cấu trúc của 6 hợp chất mới, bao gồm: fumigaclavine K **(XT37.1),** fumigaclavine L **(XT37.2),** fumigaclavine K **(XT37.1),** fumigaclavine M **(XT37.4),** 5′-(4-methoxyphenyl)-1′,3′-oxazole **(XT47.1),** polyporusterone H **(XT49.1)** và stellatinol A **(XT49.4),** và 1 hợp chất lần đầu tiên phân lập từ thiên nhiên: (*E*)-6,10-dimethyl-5-undecene-2,9,10-triol **(XT47.2)** từ cao chiết lên men lượng lớn của 3 chủng vi nấm ở thực vật ngập mặn *Aspergillus* sp. DVXT-221, *Trichoderma* sp. BCXT-22.1 và *Aspergillus* sp. GXT-22.1.

2. Hoạt tính gây độc tế bào của 19 hợp chất, bao gồm **XT37.1**, **XT37.3**, **XT47.1**–**XT47.8, XT49.1–XT49.7**, **XT49.9** và **XT49.10** được thử nghiệm. Trong đó, 2 hợp chất ergot alkaloid **XT37.1** và **XT37.3** thể hiện hoạt tính trên cả 2 dòng tế bào HepG2 và MCF7 (IC_{50} = 61.1 ± 3.1 – 87.65 ± 3.49 μM); hợp chất ecdysteroid mới **XT49.1** thể hiện hoạt tính trên cả 3 dòng tế bào HepG2, MCF7, và SK-Mel-2 (IC_{50} = 75.41 ± 5.76 – 87.65 ± 3.49 μM). Các hợp chất **XT49.2**–**XT49.7, XT49.9**, và **XT49.10** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả 2 dòng tế bào MCF7 và SK-Mel-2 (IC_{50} = 76.30 ± 1.96 – 94.20 ± 3.41 μM).

3. Hoạt tính ức chế sản sinh quá mức NO của 24 hợp chất, bao gồm **XT37.1–XT37.4**, **XT37.8**–**XT37.10, XT47.1**–**XT47.5, XT47.8, XT47.10** và **XT49.1-XT49.10** được thử nghiệm. Trong đó, hai hợp chất **XT37.1** và **XT37.9** thể hiện hoạt tính mạnh nhất (IC_{50} = 5.3 ± 0.2 và 8.7 ± 0.4 μM); 16 hợp chất **XT37.1–XT37.4, XT37.8–XT37.10, XT47.1–XT47.5, XT47.8, XT47.10, XT49.4,** và **XT49.8** thể hiện

hoạt tính yếu hơn. Mô hình hóa docking phân tử cho thấy các hợp chất **XT37.1, XT37.9, XT47.1, XT49.4**, và **XT49.8** đều thể hiện ái lực liên kết với trung tâm hoạt động của enzyme iNOS, với năng lượng liên kết từ –12.71 đến –6.34 kcal/mol.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Dang Viet Anh**, Tran Hong Quang, Ninh Thi Ngoc, Tran Thi Hong Hanh, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Thi Thanh Ngan, Nguyen Ngoc Tung, Nguyen Hoai Nam, Chau Van Minh. Fumigaclavines K-M, undescribed ergot alkaloids from the mangrove-derived fungus *Aspergillus* sp. DVXT-221 with cytotoxic and NO inhibitory activities. ***Tetrahedron***, 2025; 171: 134414. DOI: 10.1016/j.tet.2024.134414.

2. **Dang Viet Anh**, Do Hoang Anh, Le Thi Vien, Pham Thi Mai Huong, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Thi Thanh Ngan, Nguyen Ngoc Tung, Tran Hong Quang. An Oxazole Alkaloid, Terpenoids, and Cyclodipeptides with Cytotoxic and NO Inhibitory Effects from a Mangrove-Derived Fungus *Trichoderma* sp. GXT-22.1. ***Chemistry & Biodiversity***, 2025; 22(5): e202402986. DOI: 10.1002/cbdv.202402986.

3. **Dang Viet Anh**, Le Thi Vien, Pham Thi Cham, Nguyen Hoang Nam, Nguyen Quoc Vuong, Nguyen Thi Thanh Ngan, Do Thi Thao, Dong-Sung Lee, Tran Hong Quang. Ecdysteroids, Phenolics, and Alkaloids from a Mangrove-Derived Fungus *Aspergillus* sp. BCXT-22.1 with Cytotoxic and NO Inhibitory Activities. ***Chemistry & Biodiversity***, 2025; 22(11): e01213. DOI: 10.1002/cbdv.202501213.