

## SÀNG LỌC VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG NẤM NỘI SINH CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT ENZYME L-ASPARAGINASE TỪ LÁ DÂY CỐC (*Tinospora cordifolia*)

Nguyễn Phạm Tuấn<sup>1</sup>, Bằng Hồng Lam<sup>2</sup> và Nguyễn Phạm Tú<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Trung tâm Công nghệ sinh học tỉnh An Giang

<sup>2</sup> Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm kiếm các dòng nấm nội sinh có khả năng sản xuất enzyme L-asparaginase để phòng ung thư và góp phần gia tăng giá trị cây dược liệu. Nấm nội sinh sản xuất enzyme L-asparaginase khi quá trình thủy phân L-asparagine thành aspartic acid và ammonia làm chuyển đổi màu chất chỉ thị phenol đỏ từ màu vàng (acid) sang màu hồng (kiềm). Kết quả, phân lập được 76 dòng nấm nội sinh từ lá cây dây cóc. Trong 76 dòng nấm, 55/76 dòng nấm phân lập có khả năng sản xuất L-asparaginase khi tiến hành sinh trắc nghiệm. Dòng nấm DC19 có khả năng sinh L-asparaginase cao nhất với hoạt tính enzyme là 6,17 U/mL. Kết quả giải và phân tích trình tự vùng ITS của gene 18S-rRNA cho thấy, dòng nấm DC19 tương đồng với dòng nấm *Colletotrichum chlorophyti* MH290362.1 với tỷ lệ 98,91%. Kết quả nghiên cứu góp phần tạo nguồn ban đầu cho quá trình tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học góp phần tạo nguồn nguyên liệu cho phát triển thuốc hỗ trợ và điều trị bệnh ung thư.

*Từ khóa:* Dây cóc, L-asparaginase, nấm nội sinh, trình tự.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, các hợp chất có hoạt tính sinh học được nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như kháng sinh, chống ung thư, chống oxy hóa và các chất chống viêm. Nấm nội sinh bao gồm các vi khuẩn, nấm và xạ khuẩn sống nội sinh trong các bộ phận khác nhau của cây và sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học và được ứng dụng trong điều trị các bệnh như ung thư (campthothecin, maytansine và cajanol) (Zhao *et al.*, 2013). L-asparaginase (EC3.5.1.1) là một enzyme xúc tác quá trình thủy phân L-asparagine thành L-aspartate và ammonia. Trong điều trị ung thư, L-asparaginase giúp loại bỏ L-asparagine trong các tế bào khối u, do đó kiểm soát tăng trưởng khối u hiệu quả. Trong thực tế, L-asparaginase được sử dụng để điều trị bệnh ung thư Bạch cầu lympho ác tính. L-asparaginase chủ yếu được sản xuất từ vi khuẩn (*E. coli* và *E. carotovora*) do chi phí sản xuất thấp nhưng có nhiều tác dụng phụ, chủ yếu là quá mẫn cảm dẫn đến phản ứng dị ứng và sốc phản vệ. Ngày nay, nấm nội sinh được xem là nguồn của L-asparaginase bởi vì là đối tượng mới và chưa có nhiều (Patil *et al.*, 2012). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn dòng nấm nội sinh tiềm năng từ cây Dây cóc có khả năng sản xuất L-asparaginase cao trong tự nhiên. Kết quả nghiên cứu giúp gia tăng giá trị cây dược liệu cũng như làm nguồn nguyên liệu cho quá trình sản xuất các sản phẩm có khả năng hỗ trợ và điều trị bệnh.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu nghiên cứu

Dây cóc thu từ nhà lưới của Trung tâm Công nghệ sinh học tỉnh An Giang. Hóa chất và thiết bị: L-asparagine (Sigma, Mỹ), glucose (Sigma, Mỹ), cân phân tích (Ohaus, Mỹ), máy đo quang phổ (Human, Hàn Quốc)...

#### Phương pháp nghiên cứu

##### Phân lập các dòng nấm nội sinh từ Dây cóc

Dây cóc được thu thập từ nhà lưới, rửa sạch và phân loại thành các bộ phận khác nhau, rửa kỹ với nước và nước cất vô trùng trước khi phân lập. Chuẩn bị môi trường PDA trong các đĩa petri vô trùng và có bổ sung chloramphenicol 50 mg/L để ngăn ngừa sự phát triển của vi khuẩn. Các mẫu lá được cắt thành các mẫu nhỏ (5 mm x 2 mm), rửa với nước cất vô trùng và khử trùng bề mặt bằng cách ngâm trong 70% ethanol trong khoảng 1 - 3 phút và rửa với nước cất vô trùng 3 lần. Tiếp tục khử trùng mẫu cây bằng natri hypochloride 2% trong 2 - 3 phút và rửa lại với nước cất vô trùng 3 lần. Các mẫu sau khi khử trùng được cấy trên đĩa petri có chứa môi trường PDA và ủ ở nhiệt độ phòng trong 4 - 6 ngày (Strobel, Daisy, 2003). Sau đó, tiến hành tách rông các dòng nấm trên môi trường PDA.

### Sàng lọc và tuyển chọn các dòng nấm nội sinh sản xuất L-asparaginase

Các dòng nấm nội sinh phân lập được sàng lọc và tuyển chọn theo Gulati *et al.* (1997), sự thay đổi màu sắc môi trường từ màu vàng sang màu hồng là do amoniac giải phóng, là sản phẩm phụ của quá trình thủy phân L-asparagine bằng enzyme L-asparaginase. Môi trường Czapek Dox (g/L): glucose 2g; L-asparagine 10 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,52 g; KCl 0,52 g; MgSO<sub>4</sub> 0,52 g; FeSO<sub>4</sub> 0,01 g; agar 18 g và thêm 3 mL thuốc thử phenol đỏ 2,5%, điều chỉnh về pH = 6,2. Cây mẫu nấm (đường kính 1 cm) và ủ điều kiện nhiệt độ 28 ± 2°C trong thời gian 7 - 9 ngày.

### Phân tích hoạt tính L-asparaginase của các dòng nấm nội sinh

Các mẫu nấm được tuyển chọn, lên men chìm trên môi trường Czapek Dox. Chuẩn bị 100 mL môi trường trong bình tam giác 250 mL và điều chỉnh pH = 6,2. Chủng nấm với đường kính của sợi nấm khoảng 1 cm (3 mẫu), lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 96 giờ. Sau đó, tiến hành ly tâm với tốc độ 8.500 vòng/phút trong 15, thu phần dịch, bảo quản ở nhiệt độ 4°C và phân tích hoạt tính. Hoạt tính của enzyme L-asparaginase được xác định theo phương pháp của Imada *et al.* (1973), bao gồm: 0,5 mL L-asparagine 4M và 0,5 mL Tris-HCl (pH = 7,2), thêm 0,5 mL enzyme thô và ủ nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Sau đó, dừng phản ứng bằng cách thêm 0,5 mL trichloroacetic acid (TCA). Mẫu đối chứng được thực hiện tương tự nhưng cho TCA vào trước enzyme thô. Tiếp theo 0,1 mL dung dịch, 3,75 mL nước cất và 0,2 mL thuốc thử Nessler, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và đo độ hấp thụ ở λ = 450 nm. Một đơn vị hoạt độ của L-asparaginase là lượng enzyme giải phóng 1 μmol amoniac trong 1 phút ở điều kiện 37°C.

$$\frac{\text{Unit}}{\text{mL enzyme}} = \frac{\mu\text{mol NH}_3 \text{ phóng thích} * 2,5}{30 * 1 * 0,1}$$

Trong đó:

2,5: tổng thể tích phản ứng của hỗn hợp (mL).

0,1: thể tích hỗn hợp enzyme sử dụng phản ứng cuối (mL).

30: thời gian phản ứng; 1: thể tích enzyme sử dụng (mL).

Hàm lượng protein theo phương pháp của Lowry *et al.* (1953) và hoạt độ riêng của enzyme theo công thức: UI/mL hoặc UI/mg = hoạt tính enzyme/hàm lượng protein.

### Phân tích trình tự gene của dòng nấm nội sinh được tuyển chọn

Dòng nấm được tuyển chọn thông qua kết quả phân tích sinh trắc nghiệm và hoạt tính của enzyme L-asparaginase được tuyển chọn và tiến hành khuếch đại và giải trình tự gene 18S-rRNA với vùng trình tự ITS sử dụng cặp mồi: mỗi xuôi ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' và mỗi ngược ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White *et al.*, 1990). Sử dụng chương trình BLAST để so sánh trình tự đoạn gene 18S rRNA của dòng nấm đã được giải trình tự với các trình tự đoạn gen của dòng nấm trên ngân hàng gene để định danh.

### Phương pháp thống kê

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và thống kê bằng Statgraphis plus 16.0.

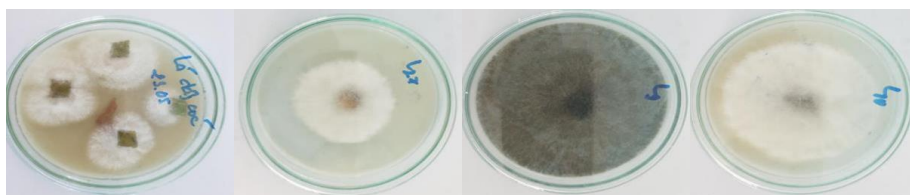
## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### Phân lập các dòng nấm nội sinh từ Dây cóc

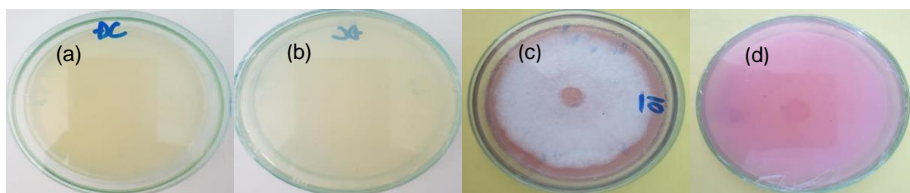
Tiến hành phân lập các dòng nấm nội sinh theo phương pháp của Stobel and Daisy (2003) từ lá cây Dây cóc trên môi trường PDA có bổ sung chloramphenicol 50 mg/L để hạn chế sự phát triển của vi khuẩn. Kết quả đã phân lập được 76 dòng nấm nội sinh từ lá của cây dây cóc (Hình 1). Hình dạng và màu sắc của các giống nấm nội sinh phân lập từ lá cây dây cóc có sự khác nhau theo từng loại nấm. Các mẫu nấm nội sinh phân lập từ lá có hình dạng (từ trắng tới trắng ngà) và màu sắc (màu trắng hoặc màu xanh đen).

### Sàng lọc và tuyển chọn các dòng nấm nội sinh sản xuất L-asparaginase

Các mẫu nấm nội sinh phân lập từ lá của dây cóc được tiến hành sàng lọc tuyển chọn các dòng nấm nội sinh theo phương pháp của Gulati *et al.*, (1997), trên môi trường Czapek Dox. Sự thay đổi màu sắc của môi trường từ màu vàng (môi trường acid) sang màu hồng (môi trường kiềm) là do amoniac giải phóng, là sản phẩm phụ của quá trình thủy phân L-asparagine bằng enzyme L-asparaginase. Điều này chứng tỏ, các dòng nấm nội sinh phân lập có khả năng sản xuất enzyme L-asparaginase (Hình 2). Kết quả phân tích trên môi trường chọn lọc Czapek Dox, các mẫu nấm nội sinh có đường kính biểu hiện khác nhau (Bảng 1). Trong 76 dòng nấm nội sinh phân lập chỉ có 55/76 dòng có khả năng sản xuất enzyme L-asparaginase do làm thay đổi màu sắc của môi trường Czapek Dox, khi thay đổi màu sắc môi trường từ màu vàng (môi trường acid) sang màu hồng (môi trường kiềm) (Hình 2). 21/76 dòng nấm nội sinh phân lập không có khả năng sản xuất L-asparaginase do không làm thay đổi màu sắc của môi trường.



Hình 1. Các mẫu nấm đại diện phân lập từ lá và màu sắc của nấm từ lá cây Dây cóc trên môi trường PDA



Hình 2. Sự thay đổi màu sắc của môi trường Czapek Dox  
(a; b) mẫu đối chứng; (c; d) mẫu nấm phân lập được từ lá Dây cóc

Ghi chú: (a; b) không sinh enzyme L-asparaginase (mặt trước và sau); (c; d) sinh enzyme L-asparaginase (mặt trước và sau).

55/76 dòng nấm nội sinh phân lập từ mẫu Dây cóc có khả năng tạo vòng halo xung quang mẫu nấm được cấy trên môi trường Czapek Dox có sự bổ sung cơ chất L-asparagine và phenol đỏ. Đường kính vòng halo của các mẫu nấm phân lập có sự khác biệt giữa các mẫu nấm (Bảng 1 và Hình 3). Cụ thể như sau, đường kính biểu hiện thể hiện cao nhất là dòng nấm nội sinh DC19 đạt 7,2 cm; kế đến là dòng nấm nội sinh DC14 đạt 6,35 cm; và thấp nhất là dòng nấm nội sinh DC71 đạt 3,30 cm. Các dòng nấm nội sinh có khả năng sản xuất enzyme L-asparaginase từ lá Dây cóc được phân loại dựa trên đường kính biểu hiện, cụ thể: Đường kính biểu hiện < 3 cm, không có dòng nấm nội sinh; 3 cm < Đường kính biểu hiện ≤ 4 cm, gồm 08 dòng nấm nội sinh (chiếm 14,28%); 4 cm < Đường kính biểu hiện < 5 cm, gồm 31 dòng nấm nội sinh (chiếm 55,56%); 5 cm ≤ Đường kính biểu hiện < 6 cm, gồm 15 dòng nấm nội sinh (chiếm 26,79%) và Đường kính biểu hiện > 6 cm, gồm 02 dòng nấm nội sinh (chiếm 3,57%).

### Phân tích hoạt tính L-asparaginase của các dòng nấm nội sinh

Từ kết quả sàng lọc và tuyển chọn các dòng nấm nội sinh cây dây cóc có khả năng sinh tổng hợp L-asparaginase đã tuyển chọn được 55/76 dòng nấm nội sinh tiềm năng, tiến hành phân tích hoạt tính của enzyme L-asparaginase từ các dòng nấm được tuyển chọn trên môi trường Czapek Dox. Kết quả cho thấy, 55 dòng nấm nội sinh đều có khả năng sản xuất enzyme L-asparaginase nhưng với hoạt tính enzyme L-asparaginase khác nhau. Hoạt tính enzyme L-asparaginase thể hiện cao nhất ở dòng nấm nội sinh DC19 với hoạt tính enzyme đạt 6,17 U/mL; kế đến là dòng nấm nội sinh DC58 với hoạt tính enzyme đạt 6,01 U/mL và thấp nhất là dòng nấm nội sinh DC71 với hoạt tính enzyme là 1,17 U/mL. Tương tự, hàm lượng protein tổng số thể hiện cao nhất ở dòng nấm nội sinh DC15 với hàm lượng protein đạt 0,579 mg/mL; kế đến là dòng nấm nội sinh DC21 với hàm lượng protein là 0,575 mg/mL và thấp nhất là dòng nấm nội sinh DC36 với hàm lượng protein là 0,275 mg/mL. Trong khi đó, hoạt độ riêng của enzyme L-asparaginase thể hiện cao nhất ở dòng nấm nội sinh DC19 với hoạt độ riêng là 16,90 IU/mL; kế đến là dòng nấm nội sinh DC39 với hoạt độ riêng của enzyme L-asparaginase là 12,55 IU/mL và thấp nhất là dòng nấm nội sinh DC71 với hoạt độ riêng của enzyme L-asparaginase là 3,41 IU/mL. Như vậy, dòng nấm nội sinh DC19 là dòng nấm tiềm năng để sản xuất enzyme L-asparaginase từ cây Dây cóc rừng, với hoạt tính enzyme đạt 6,17 U/mL và hoạt độ riêng enzyme đạt 16,90 IU/mL (Bảng 1).

Bảng 1. Đường kính biểu hiện (cm), hoạt tính enzyme (U/mL), hàm lượng protein (mg/mL) và hoạt độ riêng enzyme L-asparaginase (IU/mL) của các nấm nội sinh sản xuất L-asparaginase

Stt	Tên mẫu	Đường kính biểu hiện (cm)	Hoạt tính enzyme L-asparaginase (U/mL)	Hàm lượng protein (mg/mL)	Hoạt độ riêng L-asparaginase (IU/mL)
1	DC1	4,20 ± 0,16	2,98 ± 0,06	0,463 ± 0,05	6,44 ± 0,12
2	DC2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	DC3	4,05 ± 0,19	3,45 ± 0,36	0,525 ± 0,13	6,57 ± 0,21
4	DC4	4,45 ± 0,20	3,9 ± 0,09	0,514 ± 0,15	7,59 ± 0,12
5	DC5	5,10 ± 0,09	4,51 ± 0,19	0,496 ± 0,25	9,09 ± 0,17
6	DC6	4,55 ± 0,11	4,66 ± 0,01	0,476 ± 0,17	9,79 ± 0,08
7	DC7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	DC8	4,50 ± 0,12	4,77 ± 0,17	0,491 ± 0,04	9,71 ± 0,02

HỘI NGHỊ CÔNG NGHỆ SINH HỌC TOÀN QUỐC 2020

9	DC9	0,00 ± 0,22	0,00	0,00	0,00
10	DC10	4,50 ± 0,30	4,12 ± 0,32	0,536 ± 0,22	7,69 ± 0,10
11	DC11	4,45 ± 0,38	4,85 ± 0,09	0,542 ± 0,31	8,95 ± 0,06
12	DC12	0,00	0,00	0,00	0,00
13	DC13	0,00	0,00	0,00	0,00
14	DC14	6,35 ± 0,09	4,89 ± 0,11	0,516 ± 0,01	9,48 ± 0,09
15	DC15	4,10 ± 0,19	5,34 ± 0,21	0,579 ± 0,09	9,22 ± 0,05
16	DC16	4,00 ± 0,13	4,31 ± 0,12	0,509 ± 0,16	8,47 ± 0,10
17	DC17	5,25 ± 0,29	5,61 ± 0,19	0,513 ± 0,09	10,94 ± 0,19
18	DC18	0,00	0,00	0,00	0,00
19	DC19	7,20 ± 0,34	6,17 ± 0,25	0,365 ± 0,21	16,90 ± 0,16
20	DC20	4,80 ± 0,36	5,14 ± 0,29	0,515 ± 0,27	9,98 ± 0,15
21	DC21	4,40 ± 0,25	4,57 ± 0,09	0,575 ± 0,29	7,95 ± 0,25
22	DC22	0,00	0,00	0,00	0,00
23	DC23	4,00 ± 0,29	3,29 ± 0,03	0,526 ± 0,31	6,25 ± 0,30
24	DC24	4,40 ± 0,06	3,67 ± 0,15	0,52 ± 0,35	7,06 ± 0,26
25	DC25	0,00	0,00	0,00	0,00
26	DC26	5,45 ± 0,46	3,97 ± 0,36	0,492 ± 0,16	8,07 ± 0,14
27	DC27	5,05 ± 0,40	4,05 ± 0,11	0,488 ± 0,17	8,30 ± 0,01
28	DC28	4,10 ± 0,18	2,88 ± 0,26	0,54 ± 0,20	5,33 ± 0,08
29	DC29	0,00	0,00	0,00	0,00
30	DC30	4,45 ± 0,08	4,09 ± 0,35	0,531 ± 0,08	7,70 ± 0,25
31	DC31	3,90 ± 0,61	3,01 ± 0,33	0,525 ± 0,10	5,73 ± 0,18
32	DC32	5,20 ± 0,18	5,07 ± 0,14	0,536 ± 0,19	9,46 ± 0,19
33	DC33	3,80 ± 0,29	3,70 ± 0,05	0,385 ± 0,02	9,61 ± 0,15
34	DC34	0,00	0,00	0,00	0,00
35	DC35	4,75 ± 0,01	4,04 ± 0,10	0,394 ± 0,19	10,25 ± 0,22
36	DC36	5,20 ± 0,46	2,95 ± 0,07	0,275 ± 0,13	10,73 ± 0,28
37	DC37	0,00	0,00	0,00	0,00
38	DC38	4,80 ± 0,19	5,39 ± 0,24	0,498 ± 0,16	10,82 ± 0,24
39	DC39	4,55 ± 0,21	5,67 ± 0,15	0,495 ± 0,25	11,45 ± 0,16
40	DC40	5,40 ± 0,17	4,82 ± 0,10	0,459 ± 0,20	10,50 ± 0,27
41	DC41	5,20 ± 0,10	3,97 ± 0,16	0,425 ± 0,14	9,34 ± 0,09
42	DC42	4,80 ± 0,05	3,53 ± 0,19	0,511 ± 0,11	6,91 ± 0,19
43	DC43	0,00	0,00	0,00	0,00
44	DC44	5,30 ± 0,09	4,59 ± 0,28	0,519 ± 0,18	8,84 ± 0,11
45	DC45	4,35 ± 0,19	5,19 ± 0,23	0,528 ± 0,06	9,83 ± 0,17
46	DC46	5,30 ± 0,18	5,29 ± 0,17	0,53 ± 0,03	9,98 ± 0,06
47	DC47	0,00	0,00	0,00	0,00
48	DC48	4,20 ± 0,01	4,92 ± 0,06	0,548 ± 0,08	8,98 ± 0,13
49	DC49	4,50 ± 0,11	3,97 ± 0,09	0,533 ± 0,16	7,45 ± 0,18
50	DC50	4,70 ± 0,08	5,72 ± 0,16	0,518 ± 0,14	11,04 ± 0,22
51	DC51	4,50 ± 0,18	4,78 ± 0,28	0,529 ± 0,19	9,04 ± 0,28
52	DC52	5,10 ± 0,07	5,74 ± 0,23	0,509 ± 0,24	11,28 ± 0,30
53	DC53	4,25 ± 0,13	3,09 ± 0,22	0,375 ± 0,26	8,24 ± 0,09
54	DC54	0,00	0,00	0,00	0,00
55	DC55	5,05 ± 0,21	3,19 ± 0,14	0,389 ± 0,19	8,20 ± 0,01
56	DC56	4,95 ± 0,12	4,07 ± 0,18	0,459 ± 0,08	8,87 ± 0,07
57	DC57	5,00 ± 0,12	5,02 ± 0,01	0,496 ± 0,04	10,12 ± 0,18
58	DC58	4,90 ± 0,19	6,01 ± 0,26	0,479 ± 0,09	12,55 ± 0,25
59	DC59	4,35 ± 0,08	5,91 ± 0,36	0,547 ± 0,18	10,80 ± 0,21
60	DC60	0,00	0,00	0,00	0,00
61	DC61	0,00	0,00	0,00	0,00

## CÔNG NGHỆ SINH HỌC Y DƯỢC

62	DC62	5,27 ± 0,11	4,31 ± 0,06	0,559 ± 0,13	7,71 ± 0,9
63	DC63	5,15 ± 0,13	5,11 ± 0,01	0,497 ± 0,11	10,28 ± 0,01
64	DC64	3,95 ± 0,19	1,87 ± 0,06	0.365 ± 0,19	5,12 ± 0,09
65	DC65	4,00 ± 0,26	3,19 ± 0,19	0.568 ± 0,21	5,62 ± 0,12
66	DC66	3,85 ± 0,22	1,81 ± 0,28	0.499 ± 0,16	3,63 ± 0,25
67	DC67	0,00	0,00	0,00	0,00
68	DC68	4,35 ± 0,08	5,16 ± 0,08	0.501 ± 0,07	10,30 ± 0,18
69	DC69	0,00	0,00	0,00	0,00
70	DC70	4,70 ± 0,19	5,31 ± 0,11	0,506 ± 0,09	10,49 ± 0,14
71	DC71	3,30 ± 0,06	1,71 ± 0,13	0,502 ± 0,14	3,41 ± 0,04
72	DC72	0,00	0,00	0,00	0,00
73	DC73	0,00	0,00	0,00	0,00
74	DC74	5,30 ± 0,18	3,28 ± 0,09	0,487 ± 0,21	6,74 ± 0,01
75	DC75	0,00	0,00	0,00	0,00
76	DC76	4,35 ± 0,05	3,98 ± 0,07	0,495 ± 0,19	8,04 ± 0,22

Ghi chú: Các số liệu được tính dựa trên giá trị trung bình và sai số chuẩn.

### Phân tích trình tự gene của dòng nấm nội sinh được tuyển chọn

Từ kết quả phân lập, sàng lọc và tuyển chọn cũng như xác định hoạt tính của enzyme L-asparaginase từ dòng nấm nội sinh cây dây cóc, đã tuyển chọn được dòng nấm nội sinh tiềm năng là DC19. Để xác định chính xác dòng nấm nội sinh được tuyển chọn, tiến hành định danh bằng phương pháp sinh học phân tử. Kết quả phân tích trình tự vùng ITS gene đoạn 18S rRNA (sử dụng cặp mồi ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' và mồi ngược ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') và kích thước sản phẩm PCR khoảng 800 bp. Sử dụng chương trình BLAST N để so sánh mức độ tương đồng của trình tự được giải với trình tự của các dòng nấm trong Genbank trên NCBI. Kết quả phân tích cho thấy, dòng nấm DC19 có độ tương đồng với dòng nấm *Colletotrichum chlorophyti* MH290362.1 với tỷ lệ 98,91% (Hình 3 và Hình 4).

AAKRRRTTWCCGCTCTATACCCTTTGTGACATACCTTACTGTTGCTTCGGCGGGCAGGACGGCGGCTCSCCCCGGCT  
 CCCGGCCTCCGCCCTCTGCGGGGCGGCGGGSCCCGCCGGAGGATAACCAACTCTGTTTTAACGTCGTCTCTTCTGA  
 GTGGCACAAGCAAATAAATAAAAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCAAAATGCGATA  
 AGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCC  
 TGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCTCAGCTTGGTGGTGGGCCCACGCCTGGCGTAGTCCCCTAAAGGTAGTGGC  
 GGACCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTAAGCTCGACTGGGATCCGGAGGACCTCTCGCCGTAACCCCC  
 AATTTTTCTTAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA.

**Hình 3. Trình tự gene vùng ITS gene 18S-rRNA của dòng nấm nội sinh DC19.**

**Hình 4. Kết quả so sánh trình tự vùng ITS gene 18S-rRNA của dòng nấm nội sinh DC19 được tuyển chọn từ dây cóc trên Genbank.**

Các sinh vật nội sinh được sự quan tâm và chú ý của các nhà khoa học do chúng có khả năng bảo vệ vật chủ chống lại côn trùng gây hại, bệnh hại, các động vật khác và là nguồn của các hợp chất có hoạt tính sinh học trong tự nhiên (Strobel *et al.*, 2004). Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về sinh vật nội sinh trong cây dược liệu ở Việt Nam và đánh giá khả năng sản xuất các hợp chất sinh học. L-asparaginase là một enzyme được sử dụng trong điều trị bệnh bạch cầu (Kumar *et al.*, 2013) và được tổng hợp từ nhiều nguồn như vi khuẩn, thực vật, xạ khuẩn, nấm men và nấm. Nấm nội sinh thường được phân lập bằng 03 phương pháp khác nhau: môi trường PDA, môi trường nước agar và môi trường sử dụng giấy lọc (Xuan *et al.*, 2011). Từ lá của Dây cóc đã phân lập được 76 dòng nấm nội sinh, tuyển chọn được 55/76 dòng nấm nội sinh có khả năng sản xuất L-asparaginase tiềm năng bằng phương pháp sinh trắc nghiệm. Uama *et al.* (2016) sàng lọc, tuyển chọn được 25 dòng nấm nội sinh có khả năng sản xuất enzyme L-asparaginase từ cây Dây cóc, trong đó có 11 dòng có khả năng sản xuất

enzyme L-asparaginase với hoạt tính enzyme đạt 23,66-79,66 U/mL. Trong khi đó, dòng nấm nội sinh DC19 có khả năng sản xuất enzyme L-asparaginase với hoạt tính là 6,17 U/mL (hoạt độ riêng đạt 19,60 UI/mL). Sự khác nhau về kết quả phân lập, tuyển chọn và hoạt tính enzyme L-asparaginase từ các dòng nấm nội sinh là do các yếu tố như bộ phận mẫu tiến hành phân lập, sự khác biệt về điều kiện sinh thái học, các chủng nấm sản xuất enzyme L-asparaginase khác nhau. Các nghiên cứu tiếp theo cần nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất L-asparaginase cũng như cải thiện hoạt tính của nấm sản xuất L-asparaginase. Đồng thời, nghiên cứu đánh giá hiệu quả hỗ trợ và điều trị bệnh của L-asparaginase trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 76 mẫu nấm nội sinh từ cây dây cóc rừng và 56/76 dòng nấm nội sinh có khả năng sinh enzyme L-asparaginase. Chọn lọc được dòng nấm cho hoạt tính enzyme L-asparaginase cao nhất đạt 6,17 U/mL là dòng nấm DC19 và tương đồng với dòng nấm *Colletotrichum chlorophyti* MH290362.1 với tỷ lệ 98,91%.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Kumar S, Dasu V, Pakshirajan K (2011). Purification and characterization of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. *Bioresour Technol* 102(2): 2077-2082.
- Patil MP, Patil RH, Mahjeshwari VL (2012). A novel and sensitive agar plug assay for screening of asparagine-producing endophytic fungi from *Aegle marmelos*. *Acta Biol Szeged* 56: 175-177.
- Strobel G, Daisy B (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 491-502.
- Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J (2004). Natural Product from endophytic microorganisms. *J Nat Prod* 67: 257-268.
- Uzma F, Narasimha MK, Srinivas C (2016). Optimization of physiological conditions for L-asparaginase production by endophytic fungi (*Fusarium solani*) isolated from *Tinospora cordifolia* (Willd.) Hook. F & Thomson. *Eur J Exper Biol* 6(3): 37-45.
- Xuan Q, Bao FK, Pan HM, Liu AH (2011). Isolating fungal endophyte from *Paris polyphylla* Smith var. yunnanensis and identifying their antibacterial ability. *Afr J Microbiol Res* 4(10): 1001-1004.
- Zhao J, Li C, Wang W, Zhao C, Luo M, Mu F (2013). *Hypocrea lixii*, novel endophytic fungi producing anticancer agent cajanol, isolated from pigeon pea (*Cajanus cajan* [L]. Mill sp.). *J Appl Microb* 115: 102-113.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, 315-322.

## SCREENING AND SELECTION OF ENDOPHYTIC FUNGAL STRAINS WITH L-ASPARAGINASE PRODUCING ABILITY FROM *Tinospora cordifolia* OF VIET NAM

Nguyen Pham Tuan<sup>1</sup>, Bang Hong Lam<sup>2</sup> and Nguyen Pham Tu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> An Giang Biotechnology center

<sup>2</sup> An Giang University, Viet Nam National University Ho Chi Minh City

## SUMMARY

This study was conducted to isolate endogenous fungi which was capable of producing L-asparaginase for cancer prevention, treatment, and contributing to increasing the value of medicinal plants. Mushrooms produced L-asparaginase when the hydrolysis of L-asparagine into aspartic acid and ammonia caused the color change of red phenol indicator from yellow (acid) to pink (alkaline). As a result, 76 endogenous fungi strains were isolated from leaf of *Tinospora cordifolia*. Of the 76 fungal lines, 55/76 were able to produce L-asparaginase and their L-asparaginase activities were between 1.71 and 6.17 unit/mL. And the isolate designated as DC19 being the most potent with enzyme activity was 6.17 U/mL compared to other isolated fungal strains. The 18S-RNA sequence alignment showed that, the DC19 strain was similar to *Colletotrichum chlorophyti* MH290362.1 with 98.91% similarity. These results contributed to creating an initial source for the synthesis of bioactive compounds, which could be utilized as raw materials for development of drug and cancer treatment.

**Keywords:** Endophytic fungi, L-asparaginase, *Tinospora cordifolia*, sequencing.