CÔNG NGHỆ HÓA SINH VÀ PROTEIN

NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH VÀ SINH ENZYME PHÂN GIẢI CHẤT HỮU CƠ CỦA CÁC CHỦNG VI NẤM PHÂN LẬP TỪ TRẦM TÍCH VÙNG BIỂN QUẢNG BÌNH

Vũ Thị Thu Huyền*, Nguyễn Mai Anh, Lê Thị Hồng Minh

Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Trầm tích biển là bề mặt giàu dinh dưỡng, tốt cho vi sinh vật nói chung, vi nấm nói riêng, sinh trưởng và phát triển. Các chất chuyển hóa thứ cấp được phân lập từ vi nấm biển được báo cáo có hoạt tính sinh học đáng kể về mặt sinh dược phẩm, bao gồm kháng sinh, kháng virus, chống oxy hóa và chống viêm.

Trong nghiên cứu này, từ 3 mẫu trầm tích thu được ở vùng biển Quảng Bình, 13 chủng vi nấm đã được phân lập và thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định bằng phương pháp đục lỗ thạch. Kết quả cho thấy, 3 chủng có khả năng kháng vi sinh vật kiểm định tốt nhất là chủng M6, M7 và M16 với đường kính kháng *Candida albicans* ATCC1023 tương ứng là 26 mm, 14 mm, 6 mm; kháng *Staphylococcus aureus* ATCC25923 tương ứng là 25 mm, 13 mm, 6 mm; chủng M6 kháng *Bacillus cereus* ATCC13245 với đường kính kháng khuẩn 12 mm.

Ngoài ra, cả 3 chủng này đều biểu hiện khả năng sinh enzyme phân giải cơ chất với mức độ khác nhau. Từ một số đặc điểm hình thái và kết quả xác định trình tự gene 18S rRNA, cho thấy chủng M6 thuộc chi *Penicillium*, M7 và M16 đều thuộc chi *Aspergillus*. Cây phát sinh chủng loại của M6, M7, M16 được xây dựng bằng phần mềm MegaX. Trình tự 18S rRNA của các chủng đã được đăng kí trên GENBANK với các mã số: PP425224 (*Aspergillus* sp. strain M7), PP425226 (*Aspergillus* sp. strain M16), PP425221 *(Penicillium* sp. strain M6). Kết quả của nghiên cứu sẽ là tiền đề cho việc nghiên cứu các hợp chất thứ cấp từ sinh khối lên men lượng lớn của các chủng tiềm năng này, nhằm phát hiện các chất sạch có hoạt tính kháng sinh, gây độc tế bào cao có giá trị ứng dụng trong thực tiễn và là hướng nghiên cứu cần thiết, hứa hẹn nhiều triển vọng.

Từ khóa: Aspergillus, enzyme phân giải cơ chất, vi nấm biển, hoạt tính kháng khuẩn, *Penicillium*, trầm tích.

MỞ ĐẦU

Vi nấm có nguồn gốc từ môi trường biển rất cần thiết trong quá trình tuần hoàn các chất hữu cơ hòa tan. Chúng đã được tìm thấy ở mọi ngóc ngách của đại dương, từ vùng nước nông đến sâu, từ vùng nước mặt, đầm lầy đến trầm tích hoặc cộng sinh cùng tảo, động vật giáp xác, động vật thân mềm, san hô, bọt biển, động, thực vật biển…

Trước đây, vi nấm biển chưa được quan tâm nhiều. Gần đây, việc sử dụng các phương pháp nuôi cấy độc lập để nghiên cứu và các phương pháp giải trình tự thế hệ mới đã cho thấy sự đa dạng của vi nấm (Amend *et al*., 2019). Theo báo cáo mới nhất trên www.marinefungi.org đến ngày 05/03/2024, có 2041 loài vi nấm biển phân bố ở 814 chi, 278 họ, 107 bộ, 34 lớp và 10 ngành thuộc *Aphelidiomycota, Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Mortierellomycota* và *Mucoromycota*. Các số liệu trên được ghi nhận từ vật liệu sinh bào tử trong vật liệu ngập trong nước biển (gỗ trôi dạt và bám vào, lá mục, quả mục…), các loại vi nấm phân lập từ nước biển, bùn, đất, trầm tích biển sâu và rừng ngập mặn, vi nấm nội sinh phân lập từ các loại mẫu biển như tảo, san hô, hải miên và các bộ phận ngập nước của thực vật ngập mặn và ký sinh trên sinh vật phù du ở thảm cỏ biển.

Mặc dù sự tiến bộ của công nghệ sinh học phân tử với kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới và metagenomic chắc chắn đã cải thiện sự hiểu biết của chúng ta về vi nấm biển, nhưng việc phân lập, nuôi cấy vi nấm biển sống rất quan trọng để nghiên cứu sinh học tế bào, vai trò sinh thái, sự tiến hóa cũng như tách chiết các chất chuyển hóa thứ cấp từ vi nấm.

Năm 1945, vi nấm biển bắt đầu thu hút sự chú ý khi một nhóm kháng sinh β-lactam được phân lập từ loài *Cephalosporium chrysogenum* (Carroll *et al*., 2019). Các chất chuyển hóa thứ cấp được phân lập từ vi nấm biển có hoạt tính sinh học đáng kể về mặt dược phẩm, bao gồm ức chế tế bào ung thư, kháng sinh, kháng virus, chống oxy hóa và chống viêm. Những chất chuyển hóa này có thể được sử dụng trong y tế, dược phẩm, nông nghiệp và mỹ phẩm. Mặt khác, vi nấm biển có thể biểu hiện sản xuất một số enzyme có hoạt tính xúc tác (ví dụ: catalase, laccase, protease, cellulase và peroxidase) nên chúng còn hỗ trợ xử lý sinh học trong quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ (Zeghal *et al*., 2021).

Mặc dù những nỗ lực lớn đã được thực hiện để nuôi trồng vi nấm biển từ giữa thế kỷ 19, nhiều hợp chất thứ cấp phức tạp và có hoạt tính sinh học đã được chiết xuất từ vi nấm biển và số lượng các chất chuyển hóa thứ cấp

mới từ vi nấm biển được phát hiện ngày càng gia tăng. Tuy nhiên, các nhà khoa học cho rằng, các loài vi nấm được ghi nhận từ môi trường biển vẫn còn rất thấp so với tổng số lượng vi nấm được mô tả và ước tính, vai trò chức năng của các loại vi nấm trong hệ sinh thái biển vẫn chưa được nghiên cứu rõ ràng và hầu hết tiềm năng của vi nấm biển còn chưa được khám phá (https://marinefungi.org) .

Vi nấm là sinh vật đầu tiên phân giải lignin và chuyển nó thành carbon dioxide và nước, dẫn đến sự tái phân phối carbon toàn cầu (Amend *et al*., 2019). Nghiên cứu sinh học về vi nấm biển đã cho phép xác định một số chất chuyển hóa có hoạt tính kháng khuẩn, có tác dụng chống lại các chủng đa kháng thuốc. Nhiều hợp chất hoạt tính sinh học khác đã tiếp tục được phân lập từ vi nấm biển: Hơn 3.500 chất chuyển hóa thứ cấp của vi nấm biển đã được báo cáo (Carroll *et al*., 2019). Cephalosporin C là kháng sinh phổ rộng được coi là thuốc có nguồn gốc phân lập từ vi nấm biển *Acremonium chrysogenum* thu được trong mẫu nước thải từ bờ biển Sardinia vào năm 1940 và hợp chất Plinabulin (lớp diketopiperazine) được phân lập từ một loại vi nấm biển (*Aspergillus* sp.) đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng của Beyond Spring Pharmaceuticals (Papon *et al*., 2019). Việc chiết xuất các hợp chất hóa sinh dược phẩm từ thực vật hoặc các nguồn sinh vật vĩ mô, cần phải khai thác lượng lớn nguyên liệu, có thể gây đến việc mất cân bằng sinh thái và đe dọa đến việc bảo tồn sinh vật quý hiếm. Trong khi đó, ở quy mô công nghiệp vi sinh vật có thể đạt được sinh khối mong muốn để tổng hợp sản phẩm bằng cách tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy. Vì vậy, công việc nghiên cứu vi sinh vật nói chung và vi vi nấm nói riêng rất có ý nghĩa trong việc bảo vệ nền kinh tế đại dương bền vững nhằm tìm kiếm, phát triển các loại thuốc thay thế theo hướng thân thiện với môi trường.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu: Ba mẫu trầm tích được lấy tại các tọa độ khác nhau bằng phương pháp dùng cuốc và SCUBA từ đáy vùng biển Quảng Bình, được lưu giữ lạnh trong glycerol 30% tại phòng Công nghệ Sinh học, viện Hóa sinh biển. Các mẫu trầm tích được thừa kế từ đề tài "Nghiên cứu phát hiện các hợp chất kháng lao và kháng sinh từ nguồn vi sinh vật đáy biển vùng biển trung bộ (Vùng biển Bắc trung bộ đến Trung trung bộ, Việt Nam).

Các chủng vi sinh vật kiểm định: Vi khuẩn Gram - (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076), vi khuẩn Gram + (*Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579) và chủng vi nấm men *Candida albicans* ATCC1023, trong bộ sưu tập các chủng vi khuẩn kiểm định phòng Công nghệ sinh học, Viện Hóa sinh biển, VAST.

Hóa chất, sinh phẩm và môi trường: Hóa chất và sinh phẩm được sử dụng trong nghiên cứu được mua từ các hãng Sigma, Merck, Invitrogen, Himedia.

- Trình tự cặp mồi khuếch đại gen 18S rRNA (Tham khảo Daniel *et al*., 2022):

NS3F (5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3')

NS8R (5'-TCCGCAGGTTCACCTACGGA-3').

- Môi trường phân lập vi nấm:

A1 (g/L): Tinh bột hòa tan: 10, chiết xuất vi nấm men: 4, peptone: 2, muối biển nhân tạo: 30; M1 (g/L): Tinh bột hòa tan: 1, chiết xuất vi nấm men: 0.4, peptone: 0.2, muối biển nhân tạo: 30; SWA (g/L): Muối biển nhân tạo: 30; SCA: Muối biển nhân tạo: 30 g/L, $CaCO_3$: 2 mg/L, $FeSO_4.7H_2O$: 10 mg/L, $MgSO_4.7H_2O$: 50 mg/L, casitone: 300 mg/L, K_2HPO_4: 2 g/L, KNO_3: 2 g/L; NZSG (g/L): Tinh bột hòa tan: 20, chiết xuất vi nấm men: 5, glucose: 10, NZ amin A: 5, muối biển nhân tạo: 30; PMDA (g/L): Chiết xuất khoai tây: 30, dextrose: 20, mạch nha: 10; muối biển nhân tạo: 30; PDA (g/L): Chiết xuất khoai tây: 30, dextrose: 20; muối biển nhân tạo: 30; ISP1 (g/L): casiton: 5, chiết xuất men: 3, đại dương hòa tan: 30; ISP2 (g/L): Tinh bột hòa tan: 5, chiết xuất vi nấm men: 2, glucose: 10, chiết xuất mạch nha: 10, muối biển nhân tạo: 30.

Môi trường LB nuôi cấy vi sinh vật kiểm định (g/L): Cao vi nấm men: 10; Peptone: 20; NaCl: 10.

Môi trường xác định hoạt tính enzyme ngoại bào (g/L): Muối biển nhân tạo: 30; cơ chất tương ứng: 2.

Các môi trường được điều chỉnh đến pH 7.0 ± 0.2. Môi trường đặc bổ sung agar 16 g/L.

Phương pháp nghiên cứu (Nguyễn Lân Dũng *et al*., 2001; Honghua *et al*., 2023, Ole *et al.,* 2019).

Phân lập vi nấm: Cân 1 g mẫu trầm tích, bổ sung 9 mL nước muối sinh lý, votex đều và lắc trên máy lắc trong 30'. Dùng pipette vô trùng hút 0.5 mL dịch sang ống nghiệm có chứa 4,5 mL nước muối sinh lý và tiếp tục pha loãng đến 10^{-2}, 10^{-3}. Từ mỗi nồng độ pha loãng, nhỏ 0,1 mL dịch sang đĩa peptri chứa môi trường phân lập có bổ sung kháng sinh polymyxin B sulfate với nồng độ 25 mg/L, ủ đĩa ở nhiệt độ 28^oC trong 14 - 28 ngày.

Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh bằng khuếch tán trên đĩa thạch: Khuẩn lạc vi nấm sạch, cấy chuyển vào môi trường PDA lỏng, nuôi lắc qua đêm trên máy lắc 170 rpm trong 14 ngày, li tâm thu dịch trong, nhỏ 0.15 mL vào lỗ thạch đã đục sẵn trong đĩa peptri đã cấy trải 10^8 CFU vi sinh vật kiểm định (đã được nuôi lắc trong môi trường LB 170 rpm/ 16 h). Đĩa khi hoàn thành, giữ yên 30 phút tại nhiệt độ phòng, sau đó được đem đi nuôi ấm ở 37^oC. Quan sát kết quả vòng phân giải cơ chất sau 16 h.

Xác định khả năng sinh enzyme của các chủng vi nấm: Vi nấm tiết ra enzyme amylase, protease, cellulase, các enzyme này khuếch tán ra xung quanh khuẩn lạc, phân giải cơ chất tinh bột, protein, CMC tương ứng có trong môi trường. Khi nhỏ dung dịch thuốc thử lugol, khu vực xung quanh khuẩn lạc vi nấm không còn cơ chất (đã bị enzyme tiết ra từ vi nấm phân giải) sẽ có màu trong.

Định danh vi nấm: Phương pháp tách chiết DNA tổng số gồm 3 giai đoạn cơ bản: phá vỡ màng tế bào và màng nhân, loại protein, tủa DNA. DNA tổng số sẽ được sử dụng để làm khuôn khuếch đại lượng lớn đoạn gen 18S rRNA của vi nấm có kích thước khoảng 1300 bp. Thành phần PCR (µL): Temp: 1; 18sFP: 1; 18sRP: 1; H_2O: 9.5; Master Mix 2X: 12.5. Chu kì nhiệt của phản ứng: 94^oC - 2', (94^oC - 1', 62^oC - 1', 72^oC - 1'20'') × 30 chu kỳ, 72^oC - 8', kết thúc ở 4^oC. Sản phẩm khuếch đại được kiểm tra bằng cách chạy điện di trên gel agarose để phát hiện đoạn DNA đặc hiệu. Trình tự của gen được xác định theo phương pháp của Sanger. Trình tự thô được ráp và hiệu chỉnh với phần mềm Bioedit 7.2. Trình tự DNA được so sánh trong BLAST để tìm ra độ tương đồng của chủng nghiên cứu với các dữ liệu đã được công bố trên GenBank. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa vào phần mềm MegaX.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập vi nấm biển: Các mẫu trầm tích được lấy tại các tọa độ và độ sâu khác nhau tại vùng đáy biển Quảng Bình, Việt Nam. Mẫu được xử lý, cấy trải trên các môi trường phù hợp, đĩa phân lập được nuôi trong tủ ổn nhiệt 28^oC, từ 14-28 ngày, hàng ngày quan sát sự phát triển các khuẩn lạc, đánh dấu, ghi chép thông số. Tiến hành lựa chọn các khuẩn lạc riêng rẽ và quan sát bằng mắt thường thấy có sự khác nhau của các mẫu. Tổng số 13 chủng có hình thái tế bào giống vi nấm đã thu nhận được và có màu sắc hệ khuẩn ty rất đa dạng. Trong đó nhóm khuẩn lạc thuộc nhóm màu xám, xanh rêu và trắng vẫn chiếm ưu thế. Sự khác biệt về màu sắc của hệ khuẩn ty có thể do nhiều nguyên nhân như: điều kiện tự nhiên, độ mặn, pH,… Các chủng này được nuôi trong môi trường PDA và thử hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính sinh enzyme.

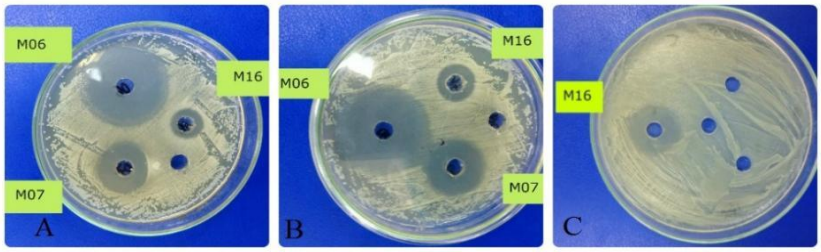
Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định: Kết quả thử hoạt tính kháng một số vi sinh vật kiểm định của các chủng chọn lựa được trình bày ở Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

STT	Tên chủng	Đường kính kháng các vi sinh vật kiểm định (D-d=mm)						
		Escherichia coli	***Pseudomonas aeruginosa***	***Salmonella enterica***	***Enterococcus faecalis***	***Staphylococcus aureus***	***Bacillus cereus***	***Candida albicans***
1	M1	-	-	-	-	10	-	-
2	M2	-	-	-	-	-	-	-
3	M3	-	-	-	-	-	11	-
4	M4	-	-	-	-	-	-	-
5	M5	-	12	-	-	-	-	-
6	M6	-	-	-	-	25	-	26
7	M7	-	-	-	-	13	-	14
8	M8	13	-	-	-	-	6	-
9	M9	-	-	-	-	-	-	-
10	M13	-	-	-	-	-	-	-
11	M16	-	-	-	-	6	12	6
12	M19	-	-	-	-	-	-	-
13	M21		-	-	-	5	-	6

(-): không thể hiện hoạt tính

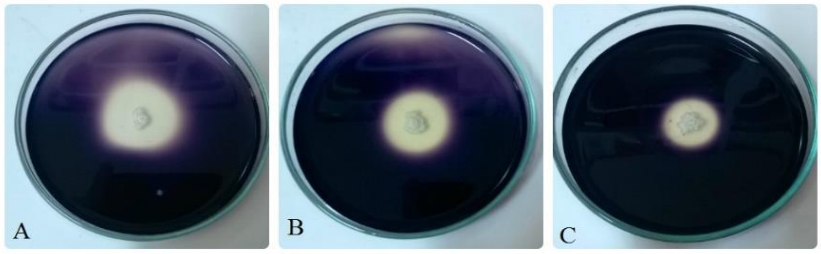
Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng nghiên cứu cho thấy, 9/13 chủng phân lập đều có hoạt tính kháng chủng gây bệnh, nhưng khả năng kháng của các chủng là rất khác nhau. Trong đó, 3 chủng M6, M7 và M16 có khả năng kháng các tác nhân gây bệnh mạnh nhất. Các chủng này được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Hình ảnh thử hoạt tính kháng VSVKĐ

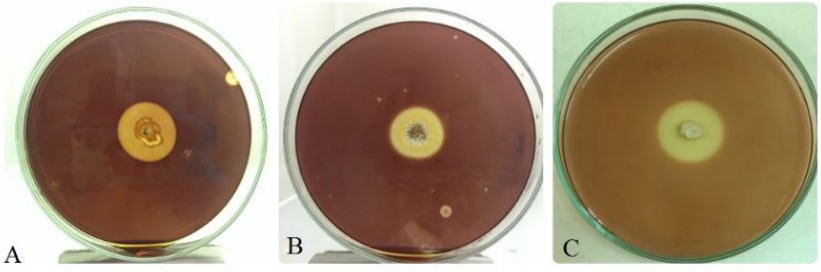
A: Kết quả thử hoạt tính kháng Stapphylococcus aureus của 3 chủng M6, M7 và M16; B: Kết quả thử hoạt tính kháng Candida albicans của 3 chủng M6, M7 và M16. C: Kết quả thử hoạt tính kháng Bacillus cereus của chủng M16.

Thử hoạt tính phân giải cơ chất (Casein, CMC, Tinh bột): Kết quả thử hoạt tính sinh enzyme phân giải cơ chất của 3 chủng tiềm năng được thể hiện qua Hình 2, 3, 4.



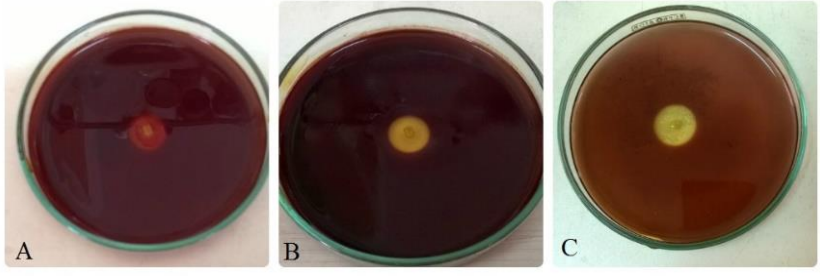
Hình 2. Hình ảnh thử khả năng phân giải tinh bột

A: Khả năng phân giải tinh bột tan của chủng M6 (16 mm); B: Khả năng thủy phân tinh bột tan của chủng M7 (12 mm); C: Khả năng thủy phân tinh bột tan của chủng M16 (7 mm)



Hình 3. Hình ảnh thử khả năng phân giải casein

A: Khả năng phân giải casein của chủng M6 (13 mm); B: Khả năng phân giải casein của chủng M7 (11 mm); C: Khả năng phân giải casein của chủng M16 (13 mm)

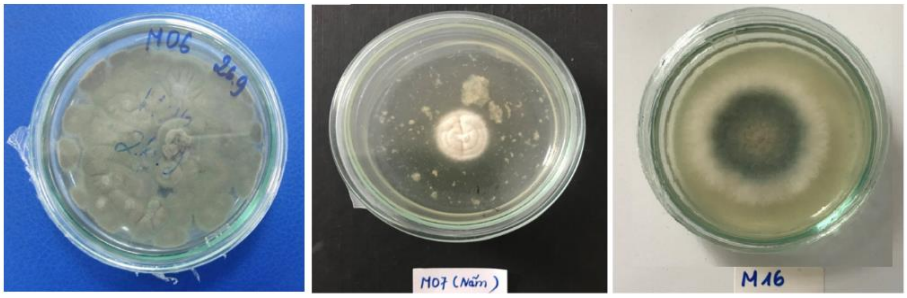


Hình 4. Hình ảnh thử khả năng phân giải cellulose

A: Chủng M6 (9 mm); B: Chủng M7 (10 mm); C: Chủng M16 (11 mm)

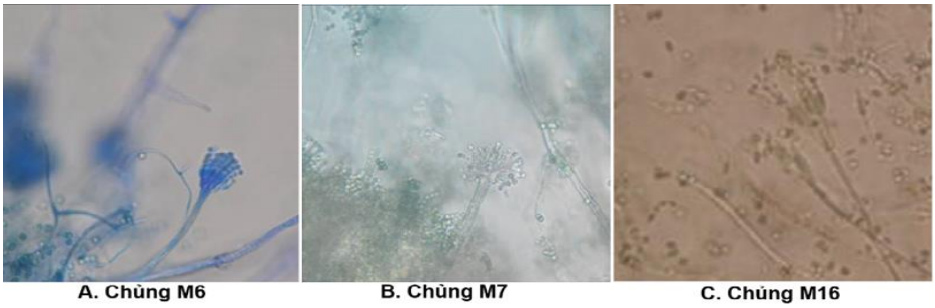
Kết quả thử nghiệm cho thấy cả 3 chủng nghiên cứu đều có khả năng sinh enzyme amylase, cellulase, protease khá tốt với các mức độ hoạt tính khác nhau.

Hình thái các chủng được lựa chọn: Một số hình ảnh hình thái 3 chủng tiềm năng được thể hiện qua Hình 5 và 6.



A. Chủng M6 B. Chủng M7 C. Chủng M16

Hình 5. Hình ảnh khuẩn lạc 3 chủng tiềm năng



A. Chủng M6 B. Chủng M7 C. Chủng M16

Hình 6. Một số hình ảnh ở độ phóng đại 1000 lần, quan sát các chủng tiềm năng qua soi kính hiển vi điện tử Japan's Nikon ECLIPSE 80i optical microscope

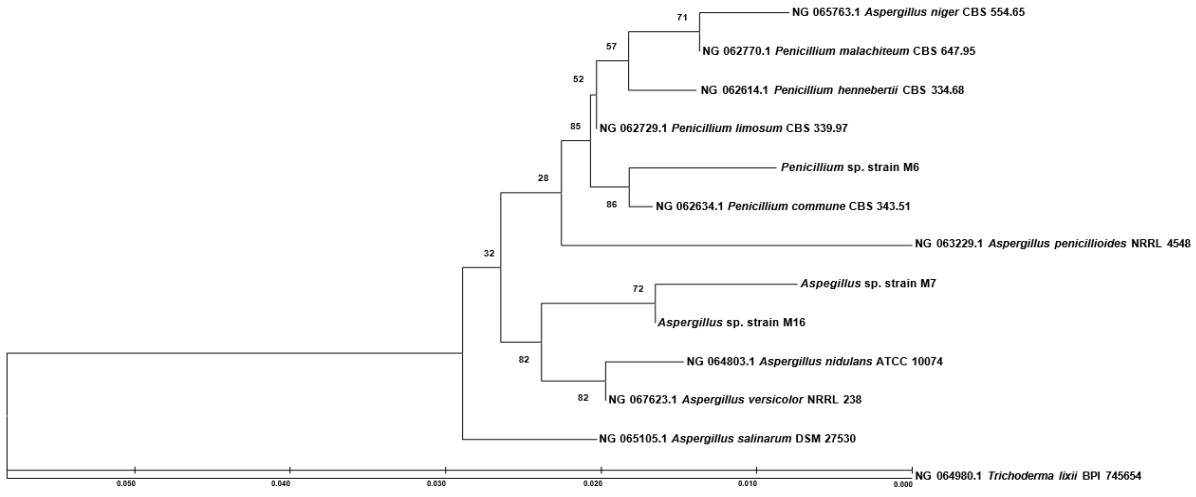
Chủng M6: Khuẩn lạc mọc tương đối nhanh trên môi trường Czapek đạt 4-5 cm/10 ngày ở nhiệt độ 28^{o}C, bề mặt mịn nhung, phân vùng, mép trắng mỏng, màu xanh rêu nhạt sáng xen kẽ các sợi màu nâu trắng; không xuất hiện giọt tiết; mặt trái màu nâu xanh đen. Cuống sinh bào tử được sinh ra từ hệ sợi nền hoặc từ hệ sợi khí sinh, kích thước 50-110 µm x 2.5-3.5 µm, thành nhẵn, tận cùng là chổi gồm 2 vòng thể bình, nhưng thỉnh thoảng có các chổi lớn hơn gồm 2-3 vòng thể bình, đối xứng hoặc không đối xứng; cuống thể bình tạo thành vòng 2-5 cái, kích thước 10-15 µm x 2.5-3.0 µm; thể bình thuôn nhọn ở đỉnh, kích thước thay đổi 10-15 x 2.2-2.5 µm; bào tử hình elip hoặc hạt chanh, 2.5-4.5 x 2.5-3.5 µm, thành dày, nhẵn đến ráp nhẹ, tạo thành cột dài. Các cấu trúc đầu nhỏ sinh bào tử thường được sinh ra có dạng thể bình đơn độc hoặc cấu trúc chổi của chi *Penicillium*.

Chủng M7: Khuẩn lạc trên môi trường Czapek phát triển bình thường, đạt 2,5-3 cm/10 ngày ở 28 ^{o}C. Bề mặt khuẩn lạc phẳng, dạng nhung trắng mịn; giọt tiết không màu đến nâu trắng; mặt trái màu vàng sạm. Cuống sinh bào tử kích thước 140-550 µm x 3,5-8,0 µm, không màu đến nâu nhạt, thành dày, nhẵn. Bọng hình clavat đến gần cầu, kích thước 5.0-16 µm. Thể bình 2 tầng, bao phủ 1/2 đến 3/4 bề mặt bọng. Cuống thể bình 3,2-7.1 µm x 2.5-4.5 µm; thể bình 3.5-6.5 x 2.5-3.0 µm. Bào tử hình gần cầu hoặc cầu, kích thước 3.0-4.0 µm, gai ráp. Tế bào Hüll thỉnh thoảng được sinh ra, hình gần cầu đến cầu, kích thước 8-13 µm.

Chủng M16: Khuẩn lạc trên môi trường Czapek phát triển chậm vừa, đường kính đạt 3.0-4.0 cm/10 ngày ở 28^{o}C, bề mặt bông xốp, giữa màu rêu đậm, viền rộng trắng bông, mặt trái xanh đen. Đầu sinh bào tử hình cột, kích thước 90-280 µm x 4.0-5.5 µm; Các sợi vi nấm bất thụ thường ráp, có các mụn rộp. Cuống sinh bào tử 45-75 µm x 4-6 µm, thành dày, nhẵn; Bọng hình cầu đến gần cầu, đường kính 7-12 µm; thể bình 2 tầng; cuống thể bình 5.5-7.0 µm x 2.5-3.0 µm; thể bình 5-7 x 2-2.5 µm. Bào tử trần hình cầu đến gần cầu, nhẵn đến ráp, 2.5-3.5 µm.

Định danh các chủng lựa chọn: Sau khi kiểm tra định tính kích thước sản phẩm khuếch đại đoạn gen bảo thủ 18S rRNA, bằng điện di trên gel agarose 1%. Sản phẩm khuếch đại gen được tinh sạch để tiến hành đọc trình tự bằng máy ABI PRISM 3100, Applied Bioscience. Trình tự thô được khi xử lý, lắp ráp 2 chiều qua chương trình Bioedit, kết quả nhận được trình tự của đoạn gen 18S rRNA của chủng M6 có độ dài 1185 bp, có tương đồng 99.04% so với trình tự *Penicillium malachiteum* CBS 647.95. Trình tự của đoạn gen 18S rRNA của chủng M7 có độ dài 1183 bp, tương đồng 99.32% với NG_067623.1 *Aspergillus versicolor* NRRL 238. Trình tự của đoạn gen 18S rRNA của chủng M16 có độ dài 1185 bp, tương đồng 99.39% với NG_067623.1 *Aspergillus versicolor* NRRL 238.

Từ kết quả so sánh trình tự gene 18S rRNA của 3 chủng phân lập, cho thấy chủng M7 và chủng M16 thuộc chi *Aspegillus*, chủng M6 thuộc chi *Penicillium*. Bằng phần mềm MegaX, trình tự 18S rRNA của ba chủng tiềm năng được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại. Lịch sử tiến hóa xây dựng cây được suy ra bằng phương pháp Neighbor-Joining với giá trị bootstrap 1000, kết quả được thể hiện trên Hình 7.



Hình 7. Cây phát sinh chủng loại của 3 chủng vi nấm tiềm năng

Từ một số đặc điểm hình thái, kết quả so sánh trình tự gen 18S rRNA và cây phát sinh chủng loại của 3 chủng phân lập, chúng tôi có thể kết luận chủng M6 thuộc chi *Penicillium*, M7 và M16 thuộc chi *Aspergillus*, hai chi này đều là những chi vi nấm lớn, có tầm quan trọng trong môi trường tự nhiên cũng như ứng dụng sản xuất thực phẩm và dược phẩm.

THẢO LUẬN

Vi nấm biển phát triển tốt trên hoặc bên trong các sinh vật sống khác như tảo, động vật giáp xác, động vật thân mềm, san hô và bọt biển, ngay cả ở hố sâu của đại dương. Kết quả nghiên cứu tích cực về vi nấm biển trong những năm gần đây hứa hẹn vi nấm biển sẽ là nguồn cung cấp phong phú để sản xuất các chất chống khối u, kháng virus, kháng vi nấm, và chống viêm, kháng sinh (Zhou *et al.,* 2022). *Aspergillus* biển là nguồn cung cấp các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học quan trọng. Li và đồng nghiệp đã có một nghiên cứu cấu trúc và hoạt động kháng khuẩn của các hợp chất phân lập từ các loài thuộc *Aspergillus* biển khác nhau trong hai năm (tháng 1 năm 2021 - tháng 3 năm 2023), nghiên cứu cho thấy 98 hợp chất có nguồn gốc từ *Aspergillus* đã được mô tả. Sự đa dạng về cấu trúc hóa học và hoạt động kháng khuẩn của các chất chuyển hóa này thế hiện hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh rất tốt, hứa hẹn cho một nguồn cung cấp dồi dào nguồn hóa dược thiên nhiên chống vi trùng gây bệnh (Honghua *et al.,* 2023). Một sesterterpenoid mới, terretonin G, được tách chiết từ vi nấm biển *Aspergillus* sp. OPMF00272 cho thấy hoạt động kháng khuẩn tốt chống lại *Staphylococcus aureus* FDA209P, *Bacillus subtillis* PCI219 và *Micrococcus luteus* ATCC9341 (Fukuda *et al.,* 2014). Hợp chất 5-Methoxy dihydro sterigmatocystin thu được từ *Aspergillus versicolor* MF359 phân lập từ hải miên *Hymeniaccidon*; hợp chất này ức chế sự phát triển của *Staphylococcus aureus* và *Bacillus subtillis* với giá trị MIC tương đối thấp (Song *et al.,* 2014). Dịch lên men của *Aspergillus niger* chứa dẫn xuất axid itaconic nipyrones A - C, hợp chất này có hoạt tính kháng khuẩn chống lại *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtillis* và *Mycobacterium tuberculosis* có giá trị MIC trong khoảng 8 - 64 μg/mL (Ding *et al.,* 2018). Cottoquinazoline D được phân lập từ môi trường lên men của *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4, cho thấy hoạt tính ức chế *Candida albicans* với giá trị MIC là 22.6 μM (Zhuang *et al.,* 2011). Trong nghiên cứu mới năm 2024 về vi vi nấm biển, thu nhận từ vùng biển PhangNga, Thái Lan, nhóm nghiên cứu của Wingfield đã phân lập được 23 chi vi nấm, trong đó số lượng vi vi nấm phần lớn thuộc chi *Aspergillus* và *Penicillium*, kết quả nghiên cứu chỉ ra có 32 chủng thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định với đường kính kháng khuẩn của chủng *Aspergillus unguis* B22M1 đạt 24.7 mm và trong đó có 16 chủng có hoạt tính sinh enzyme protease và amylase phân giải cơ chất.

KẾT LUẬN

Từ 3 mẫu trầm tích biển thu được ở vùng biển Quảng Bình Việt Nam, 13 chủng vi vi nấm đã tuyển chọn được và thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định bằng phương pháp đục lỗ thạch, với 3 chủng có khả năng kháng vi sinh vật kiểm định tốt nhất. Chủng M6, M7 và M16 có đường kính kháng *Candida albicans* ATCC1023 tương ứng là 26 mm, 14 mm, 6 mm; kháng *Staphylococcus aureus* tương ứng là 25 mm, 13 mm, 6 mm. Chủng M16 kháng *Bacillus cereus* với đường kính phân giải 12 mm.

Ngoài ra, cả 3 chủng đều có khả năng sinh enzyme amylase, protease và cellulase với mức độ khác nhau: Chủng M6 có khả năng sinh enzyme cao nhất với đường kính vòng phân giải với các enzyme tương ứng là 16 mm, 13 mm, 9 mm; Chủng M7 có khả năng sinh enzyme với vòng phân giải tương ứng là 12 mm, 11 mm, 10 mm; Chủng M16 có khả năng sinh enzyme với vòng phân giải tương ứng là 7 mm, 13 mm, 11 mm.

Từ một số đặc điểm hình thái và so sánh trình tự gene 18S rRNA của 3 chủng tiềm năng. Chúng tôi có thể xác định chủng M6 thuộc chi *Penicillium*, M7 và M16 thuộc chi *Aspergillus*.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí của Đề tài cấp cơ sở, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mã số đề tài HSB 24-CS02.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amend A, Burgaud G, Cunliffe M, Edgcomb V P, Ettinger CL, Gutiérrez MH, Heitman J, Hom EFY, Ianiri G, Jones AC, Kagami M, Picard KT, Quandt CA, Raghukumar S, Riquelme M, Stajich J, Vargas-Muñiz J, Walker AK, Yarden O, and Gladfelter AS (2019). Fungi in the marine environment: Open questions and unsolved problems. *MBio*, *10*(2): 01189–18.

Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, and Prinsep MR (2019). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 36(1): 122–173.

Daniel V, Stefan G, Frédéric M, David B (2022). pr2-primers: an 18S rRNA primer database for protists. *Molecular Ecology Resources*, 22 (1): 168-179.

Ding L, Li T, Liao X, He S, and Xu S (2018). Asperitaconic acids A–C, antibacterial itaconic acid derivatives produced by a marine-derived fungus of the genus *Aspergillus*. *The Journal of Antibiotics*, *71*(10): 902-904.

Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty (2001). *Vi sinh vật học*, NXB Giáo dục, Hà Nội.

Fukuda T, Kurihara Y, Kanamoto A, and Tomoda H (2014). Terretonin G, a new sesterterpenoid antibiotic from marine-derived *Aspergillus* sp. OPMF00272. *The Journal of Antibiotics*, *67*(8): 593–595.

Honghua L, Yanqi F, and Fuhang S. Marine *Aspergillus*: A Treasure Trove of Antimicrobial Compounds (2023). *Mar Drugs*, May; 21(5): 277.

Ole CH, Jeanette HA, Bjørn A, Espen H & Teppo R (2020). Cultivable marine fungi from the Arctic Archipelago of Svalbard and their antibacterial activity. *Mycology,* 11(3): 230-242.

Papon N, Copp BR, and Courdavault V (2022). Biology, pipelines, current and future prospects for production. *Biotechnology Advances*, *54:* 107871.

Song F, Ren B, Chen C, Yu K, Liu X, Zhang Y, Yang N, He H, Liu X, Dai H, and Zhang L (2014). Three new sterigmatocystin analogues from marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* MF359. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98:* 3753–3758.

Zeghal E, Vaksmaa A, Vielfaure H, Boekhout T, and Niemann H (2021). The potential role of marine fungi in plastic degradation–a review. *Frontiers in Marine Science*, *8:* 738877.

Zhou J, Feng Z, Zhang W, and Xu J (2022). Evaluation of the antimicrobial and cytotoxic potential of endophytic fungi extracts from mangrove plants *Rhizophora stylosa* and *R. mucronata*. *Scientific Reports*, *12*(1): 2733.

Zhuang Y, Teng X, Wang Y, Liu P, Wang H, Li J, Li G, and Zhu W (2011). Cyclopeptides and polyketides from coral-associated fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4. *Tetrahedron*, *67*(37): 7085–7089.

RESEARCH ON SOME MARINE FUNGI ISOLATED FROM SEDIMENT SAMPLES IN VIETNAM CENTRAL COASTAL REGION WITH ANTIMICROBIAL AND SUBSTANCES DEGRADING ENZYME ACTIVITIES

Vu Thi Thu Huyen*, Nguyen Mai Anh, Le Thi Hong Minh

Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Marine sediment is a nutrient-rich surface that becomes an good environment for microorganisms in general, fungi in particular to grow and develop. In addition, the ability of marine fungi to support extremes of temperature, salinity and pressure demonstrates their potential for medical, pharmaceutical, biotechnological processes. The secondary metabolites isolated from marine fungi displayed biopharmaceutically significant bioactivities, including antibiotic, antiviral, antioxidant, and anti-inflammatory. In this study, from 3 sediment samples collected in the central sea of Vietnam, 13 fungal strains were isolated and tested for their antibacterial activity. The results found that the 3 strains with the best antibacterial ability against tested microorganisms are strains M6, M7 and M16 with anti-*Candida albicans* ATCC1023 diameters of 26 mm, 14 mm, 6 mm, respectively; resistance to *Staphylococcus aureus* ATCC25923 is 25 mm, 13 mm, 6 mm, respectively. Additionally, M16 showed effect antimicrobrial activity against pathogenic strain *Bacillus cereus* ATCC13245 with a diameter of 12 mm. These three strains have the ability to produce enzymes that degrade substrates at different levels. From some morphological characteristics and 18S rRNA gene sequencing results of 3 selected strains, it shows that strain M6 belongs to the genus *Penicillium*, M7 and M16 both belong to the genus *Aspergillus*. Phylogenetic trees M6, M7, M16 were built using MegaX software. The 18S rRNAs of 3 strains were registered on genbank with code numbers: PP425224 (*Aspergillus* sp. strain M7), PP425226 (*Aspergillus* sp. strain M16), PP425221 (*Penicillium* sp. strain M6).

Keywords: Antibacterial activity, *Aspergillus*, marine fungi, *Penicillium* sediment, substrate-degrading enzyme.

* Author for Corresponding: Tel: 978057679; *E-mail: huyenvuibt@gmail.com*

ISOLATION AND SCREENING OF *Bacillus* sp. PRODUCING FIBRINOLYTIC ENZYME WITH LOW CULTURE BROTH VISCOSITY

Thi-Thu-Trang Nguyen, Quoc-Phong Truong, Lan-Huong Nguyen, Tuan Le*

Department of Bioengineering, School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology.

SUMMARY

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of deaths worldwide. Prevention and treatment of CVDs can differ by the type of condition but generally includes a healthy lifestyle (diet, exercise) and medication regulating blood pressure and cholesterol. In this context, fibrinolytic enzymes naturally produced by *Bacillus* genus are a potential agent for fighting against CVDs thanks to its blood clot breaking ability. However, the presence of poly-γ-glutamic acid (γ-PGA), a by-product of fermentation, leads to several limiting factors for enzyme downstream processing. This research concentrated on isolating and screening *Bacillus* strains producing fibrinolytic enzymes with low culture viscosity. From 25 samples of Vietnamese traditional fermented sauce (*Tuong-ban*), soil, seawater, and commercial natto samples, 73 isolates producing protease were selected. Among them, 40 isolates were able to produce fibrinolytic enzyme ranging from 6.4 to 98.5 FU/mL. Considering the culture viscosity during submersion cultivation, the strain TVY.04 was selected because of the highest fibrinolytic enzyme (98.5 FU/mL) and the lowest viscosity (3.87 cP). This was then identified as *Bacillus amyloliquefaciens* using 16S rRNA sequence. SDS-PAGE and TLC analyses suggested that *B. amyloliquefaciens* TVY.04 is a nattokinase- and γ-PGA producing strain.

Keywords: Isolation, screening, Bacillus. sp, fibrinolytic enzymes, traditional fermented soybean, viscosity, γ-PGA.

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases (CVDs) are defined by the World Health Organization as a group of disorders of heart and blood vessels. They include stroke and heart diseases, which are considered the leading cause of death worldwide. Due to the important effects of CVDs on people's quality of life, there have been many successful studies in finding ways to prevent and treat these diseases. CVDs are treated by the extensive use of tissue-type plasminogen activator (t-PA), urokinase, and streptokinase, among other fibrinolytic agents. However, they are expensive and cause side effects such as allergic reactions, bleeding complications, and short half-lives. Therefore, the safety and efficacy of fibrinolytic enzymes from microorganisms, especially nattokinase (NK), have attracted much attention in recent years.

In 1987, nattokinase was first discovered in natto, a traditional Japanese fermented soybean food. Other fermented foods known as sources of fibrinolytic enzymes and fibrinolytic producing strains were Tofuyo (Japan); Chungkook-Jang soy sauce, Meju soybean paste, Doenjang (Korea); Douchi (China); and Thua Nao (Thailand) (Mine *et al.*, 2005). *Tuong-ban* is a Vietnamese traditional fermented sauce, that which has appeared in Vietnam since the 19th century and is widely used until now. The *Tuong-ban* making process included two fermentation steps of the main ingredients, sticky rice and soybean, by fungi and bacteria, respectively. Therefore, *Tuong-ban* is a potential source to isolate *Bacillus* producing fibrinolytic enzymes, thanks to the natural soybean fermentation step. Previously, Huy *et al.* (2016) isolated four strains of *Bacillus amyloliquefaciens* from commercial *Tuong-ban* sauces, and the highest fibrinolytic activity among all isolates reached 77.95 FU/g. More recently, Bui *et al.* (2022) reported *Bacillus* sp. isolated from *Tuong-ban*, which represented fibrinolytic activity of 49.2 FU/mL. Besides, soil and seawater were also used as sources for isolating strains producing fibrinolytic enzymes, but with significantly lower activities compared to isolates from soybean fermented foods. From published studies, fibrinolytic enzymes were successively discovered from different species of bacteria, namely, *Streptococcus, Paenibacillus, Pseudomonas*, and *Bacillus*. In addition, the most potential bacteria producing fibrinolytic enzymes were *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* (Peng *et al.*, 2005).

Poly-γ-glutamic acid (γ-PGA) is a positively charged polypeptide composed of D/L-glutamic acid units linked by γ-amide bonds. Possessing several attractive properties, such as being water soluble, biodegradable, biocompatible, non-toxic, and non-immunogenic, γ-PGA can be widely used as a green and friendly biomaterial. However, for enzyme production, γ-PGA is an undesirable by-product. The presence of γ-PGA causes an increase in viscosity of the fermentation broth, reduces enzyme yield, and alleviates foaming, thereby hindering the downstream processing of the enzyme. Several *Bacillus* species, especially *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* were known as glutamic acid-independent strains producing γ-PGA (Ogunleye *et al.*, 2015).

Therefore, both fibrinolytic activity and γ-PGA accumulation were important criteria when screening enzyme production strains.

From these above contexts, this work focused on isolating *Bacillus* strains producing high fibrinolytic activity in parallel with low γ-PGA accumulation during submerged fermentation. Various natural samples from Vietnamese biodiversity (soil, seawater, *Tuong-ban*) and some commercial Japanese natto products will be used as isolation sources.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Sample collection for isolation

Eleven Vietnamese soy fermented samples were collected from different households that traditionally produce *Tuong-ban* in Bac Ninh (TBN, TBN2, TT, TTL, TTS), Ha Noi (THD, TDA), Hung Yen (THY, THY2), Nghe An (TNA), and Vinh Yen (TVY). Eleven soil samples were collected at different positions and depths in Da Nang (SDN), Cuc Phuong (SCP2, SCP3, SCP4, SCP5, SCP6, SCP7), Sapa (SSP10, SSP30), Tam Dao (STD), Thanh Hoa (STH). Two samples of commercialized Natto from Dashi Tappurigohan (CND) and Okame Takano (CNO) were purchased from Aeon Mall Long Bien in Ha Noi. One seawater sample was collected from Ghenh Da Dia, Phu Yen (SBG).

Medium composition

The skim-milk agar (SMA) plate consisting of (% w/v) peptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%, agar 1.8%, and skimmed milk 1% was used for isolation and screening of protease-producing strains. The Luria-Bertani broth (LB) contains (%w/v): peptone 1%; yeast extract 0.5%; NaCl 1%, pH 7.0~7.2. The fermentation medium (GPY) includes (% w/v): glucose 1%, peptone 1%, yeast extract 1%, NaCl 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4$ 0.05%, and $CaCl_2$ 0.1%.

Methods

Isolation and screening of bacterial strains

The isolation and screening was performed according to Bui *et al.* (2022) with minor modification. One milliliter (liquid sample) or one gram (solid sample) was mixed with 9 mL sterilized NaCl 0.9% (w/v) and heated to 80°C for 20 min. The supernatant was then diluted in sterilized NaCl 0.9% (w/v) and spread onto the SMA plates. After 24 h of incubation at 37°C, colonies with clear halo (indicating skimmed milk degradation zone) were selected and isolated by streaking on fresh SMA plates repeatedly. One single colony from the SMA plate was inoculated into 5 mL of LB medium at 37°C, 150 rpm for 16 h. The seed culture broth was transferred to 10 mL of GPY medium at the initial $OD_{600\ nm}$ value of 0.2 and then incubated at 37°C, 150 rpm for 24 h. Culture broth was centrifuged at 10000 rpm for 10 min, and the supernatant was used for measurement of fibrinolytic activity.

Enzyme assay

The fibrinolytic activity was measured according to Liu *et al.* (2005) with fibrin 4 g/L as substrate. One unit of the fibrinolytic activity was defined as the amount of enzyme that gave an increase in absorbance at 275 nm equivalent to 1 µg of tyrosine per minute at 37°C. The standard curve was $y = 0.0091x$ ($R^2 = 0.999$) with y is the absorbance at 275nm, x is the concentration of tyrosine (µg/ml).

Viscosity analysis

The viscosity of the cell-free culture was determined by a Brookfield DV2T Viscometer (Brookfield, Middleboro, MA, USA) using an LV spindle at room temperature, 100 rpm. After 1 min of torque stabilization, suspension viscosity was calculated as the average value for 30 seconds at the end of the step.

SDS – PAGE analysis

Electrophoresis analysis was carried out using 12% polyacrylamide for separating gel and 4% polyacrylamide for stacking gel (Laemmli, 1970). A fixed volume (15 µL) of samples was loaded, and the electrophoresis was carried out at 15 mA. Protein bands were visualized by staining with Coomassie brilliant blue R 250. Gangnam stain protein ladder (Amersham Biosciences CAT.NO.24052) was used as standard.

Identification of bacterial strain

A strain was identified on the basis of 16S rRNA gene sequence analysis. The 16S rRNA gene of the isolate was amplified using the corresponding 16S primer pairs: 27F and 1429R. PCR products were checked by 0.8% agarose gel electrophoresis with the DNA marker LADDER, DirectloadTM, 1 KB (0.5–10 kb) (Sigma-Aldrich) before being sequenced (1st BASE DNA Sequencing Services). The sequences were then analyzed and compared on a gene bank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) to identify the bacterial strain.

Analysis of exo-polysaccharide (EPS)

Samples (cell-free culture broth) were treated according to Goto and Kunioka (1992), and then deproteinized using the Sevag method (Fang *et al.*, 2013). The deproteinized EPS was hydrolyzed by 6M HCl at 110°C for 1 h, then thin layer chromatography (TLC Silica gel 60 F_{254}) was performed using mobile phase n-butanol: acetic acid: H_2O (3:1:1. v/v/v) to analyze its main components (Song *et al.*, 2019). L-glutamic acid (Sigma-Aldrich) was used as standard.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Isolation of protease producing bacteria

Fibrinolytic enzyme is a sub-class of proteases, and consequently it is able to degrade skimmed milk. Therefore, protease producing strains were selected based on the formation of a clear skimmed milk degradation zone on SMA plates. Hence, a total of 73 protease producing isolates were obtained: 41 isolates from *Tuong-ban*, 23 isolates from soil, 7 isolates from Natto, and 2 isolates from seawater. The morphologies of colonies isolated from samples were milky, milky white, or pale yellow with elevated or flat surfaces that were smooth or wrinkled. In addition, these colonies had rounded, undulated, and serrated edges; and they were either mucinous or dried. Then, all isolates were screened to find out the strain producing fibrinolytic enzyme by submerged fermentation.

Screening of isolates producing fibrinolytic enzymes

Bacterial strains were grown on GYP and the fibrinolytic activity of the cell-free culture broth was measured (*Fig. 1)*. In general, 40 out of 73 isolates showed the ability to produce fibrinolytic enzyme at significant levels, which ranged from 6.4 to 98.5 FU/mL. Among them, five isolates, namely THY2.04, THY2.05, TVY.04, THD.01, TTS.05, indicated the highest fibrinolytic activities of 56 ± 4.0, 50 ± 0.5, 98.5 ± 3.5, 49 ± 3.0, and 47 ± 3.0 FU/mL, respectively. Interestingly, these five best isolates were all obtained from the Vietnamese traditional fermented soybean sauce (*Tuong-ban*). These results were consistent with Mine *et al.* (2005), who reported that Asian foods, especially fermented products, are the best source to isolate bacteria producing fibrinolytic enzyme. The strain TVY.04 exhibited the highest fibrinolytic enzyme among the five isolates, reaching 98.5 ± 3.5 FU/mL. This fibrinolytic activity showed great potential compared to values from literature. Using fibrin as substrate for determination of enzyme activity, the marine bacterium *Bacillus subtilis* A26 exhibited 63.45 FU/mL (Agrebi *et al.*, 2009), and strain *Bacillus* sp. HY6 isolated from *Tuong-ban* showed 49.2 FU/mL (Bui *et al.*, 2022). Using fibrinogen as substrate, nattokinase activity of the strain *B. amyloliquefaciens* CB1 isolated from soybean fermented food was 77.95 FU/g (Huy *et al.*, 2016).

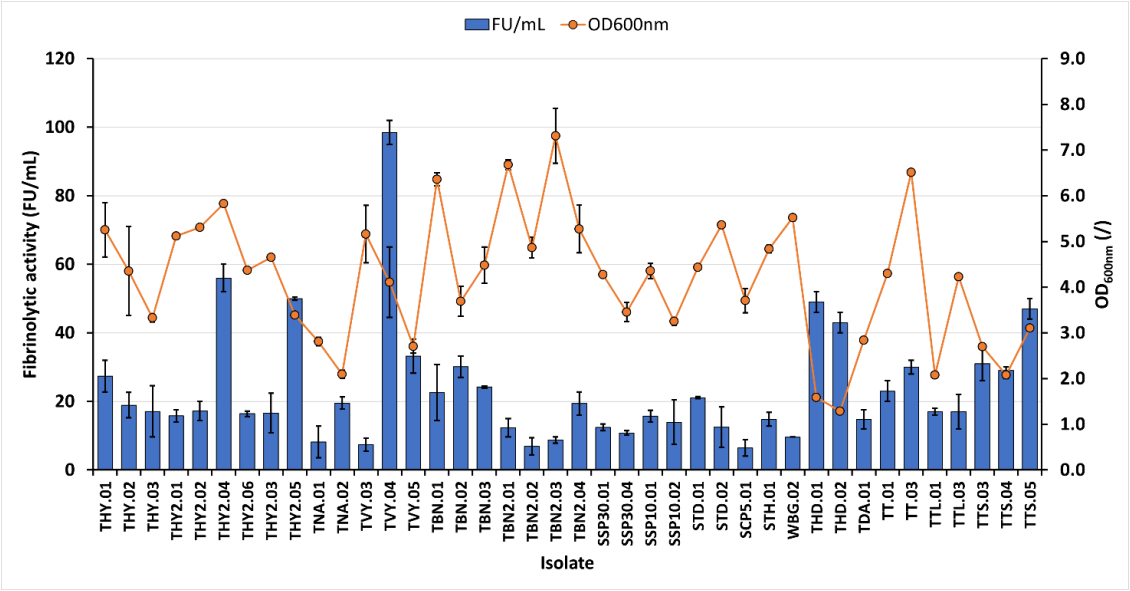


Figure 1. The fibrinolytic activity and OD 600nm measured at t = 24h of 40 isolates

The names of isolates were given according to the sample's code and numbers were added as suffixes to distinguish different isolates from the same sample.

Five isolates (THY2.04, THY2.05, THD.01, TTS.05, TVY.04) were grown on 50 mL GYP medium to evaluate their culture broth's viscosity. Obtained results were represented in *Fig. 2.* In general, the culture viscosity of five isolates showed average differences. Three isolates, THY2.04, THY2.05, and TTS.05, had approximately the same culture viscosity of approximately 5 cP. In contrast, the strain TVY.04 indicated the lowest viscosity and reached 3.87 ± 0.03 cP. Thus, the strain TVY.04 was selected for further experiments.

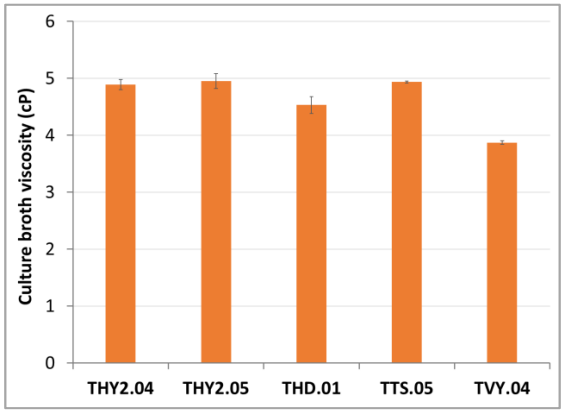


Figure 2. The culture broth viscosity of the best five isolates

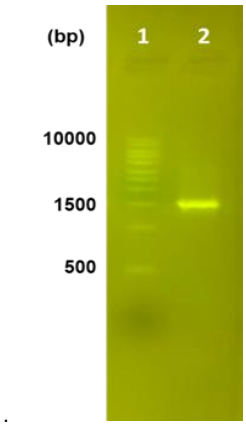


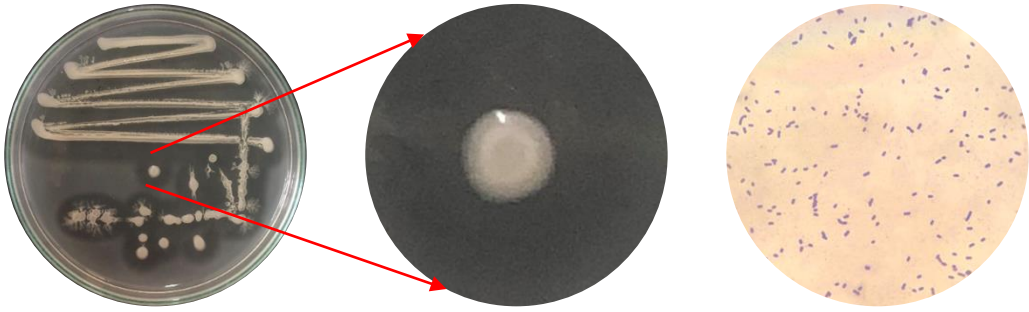
Figure 3. Electrophoresis of 16S rRNA amplified PCR product of the strain TVY.04

Lane 1: Marker; lane 2: The sequence of the strain TVY.04

Morphology and identification of the strain TVY.04

The morphology of strain TVY.04 was shown in *Fig. 3*. The strain TVY.04 had a clear halo on the SMA plate after incubation at 37°C for 15 h. The colony of this strain was milky white, with a smooth and elevated surface, and a rounded edge, and it was a mucinous colony (*Fig. 4A)*. The strain TVY.04 was a gram-positive, rod-shaped, chain-formed, or single-stranded cell (*Fig. 4B).* Based on gram staining and morphology, the strain TVY.04 showed highly homogeneity with the genus *Bacillus*.

The strain TVY.04's DNA was extracted and PCR amplification of 16S rRNA gene sequences was carried out using a pair of primers 27F, 1429R. As expected, the length of the 16S rRNA amplified product was about 1500 bp (*Fig 3*). The amplified PCR products were submitted for sequencing analysis using the Sanger Sequencing technique (1st BASE Sequencing Services) and then the nucleotide sequences were compared with the Genbank database. The sequence of the strain TVY.04 was up to 99.93% homologous with the 16S RNA of *Bacillus amyloliquefaciens* TBMAX73 (Genbank accession number MK834711). Based on these results, the strain TVY.04 was suggested *as Bacillus amyloliquefaciens* TVY.04.



A **B**

Figure 4. Morphology of strain *B amyloliquefaciens* TYV.04 isolated from *Tuong-ban*

A. Colony on SBM plate, 15 h; B. Gram coloration, magnification 100×

Analysis of exo-polysaccharide (ESP)

In this study, TLC was used to examine the crude EPS produced by *B. amyloliquefaciens* TVY.04. The analysis of hydrolyzed EPS products showed three bands on lane V *(Fig. 5)*. Among these bands, the retention factor of the largest band was similar to L-glutamic acid (lane G). This result suggested that γ-PGA may exist as the main component of EPS from *B. amyloliquefaciens* TVY.04. Previously, Song *et al.* (2019) also pointed out the presence of γ-PGA in *Bacillus* culture broth by TLC analysis.

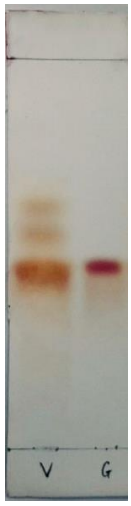


Figure 5. Thin layer chromatography analysis of EPS hydrolysis products

Lane V: EPS hydrolysis products; lane G: standard L-glutamic acid.

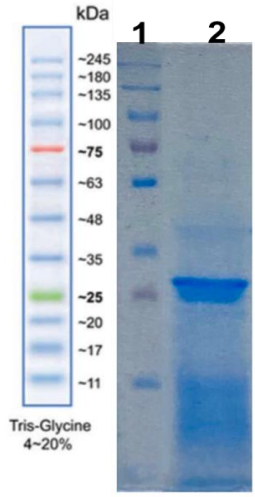


Figure 6. SDS – PAGE analysis of crude fibrinolytic enzyme from *B amyloliquefaciens* TVY.04

Lane 1: Molecular weight of marker protein; lane 2: Crude enzyme. On the left: Gangnam stain protein ladder.

SDS – PAGE analysis

The crude enzyme produced by *B. amyloliquefaciens* TVY.04 was analyzed with SDS-Page. Several bands were observed on stained gel (*Fig. 6*, lane 2). Referring to the protein ladder, the main protein band was identified as 27 kDa, with one extra band at 42 kDa and several at lower than 20 kDa. From the literature, the molecular weight of the bacterial fibrinolytic enzyme, in most cases, Nattokinase, showed some variation from 27 to 30 kDa. (Tran *et al.*, 2015, Yao *et al.*, 2017). It was then strongly recommended that the fibrinolytic enzyme from *B. amyloliquefaciens* TVY.04 is nattokinase.

CONCLUSION

In this study, 73 isolates producing protease on SMA plates were obtained from 25 samples, wherein 40 isolates could produce fibrinolytic enzymes ranging from 6.4 to 98.5 FU/mL. Among them, five isolates had the highest fibrinolytic activity, namely TVY.04, THY2.04, THY2.05, THD.01, and TTS.05. The strain TVY.04 showed the lowest viscosity, reaching 3.87 ± 0.03 cP, and the highest fibrinolytic activity of 98.5 FU/mL. The strain TVY.04 was then identified as *Bacillus amyloliquefaciens* with 99.93% of identity using the 16S rRNA sequence. The analysis of exo-polysaccharide by TLC revealed the presence of γ-PGA as the main component causing viscosity of the culture broth. The result of SDS – PAGE analysis indicated that the molecular weight of fibrinolytic enzyme from *B. amyloliquefaciens* TVY.04 was 27 kDa.

REFERENCES

Agrebi R, Haddar A, Mohamed H, Frikha F, Manni L, Jellouli K (2009). Fibrinolytic enzymes from a newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: Characterization and statistical media optimization. *Can J Microbiol*, 55: 1049-1061.

Bui TT, Dam TH, Pham TA, Nguyen LH (2022). Enhanced production of fibrinolytic enzyme by *Bacillus* sp. isolated from Vietnamese traditional fermented soybean (Tuong ban) using ultraviolet irradiation and chemical mutation. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 11: 67-80.

Fang Y, Liu S, Lu M, Jiao Y, Wang S (2013). A novel method for promoting antioxidant exopolysaccharidess production of *Bacillus licheniformis*. *Carbohydrate Polymers*, 92: 1172-1176.

Goto A, Kunioka M (1992). Biosynthesis and hydrolysis of poly(γ-glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IF03335. *Biosci Biotech Biochem*, 56: 1031-1035.

Huy DNA, Hao PA, Hung PV (2016). Screening and identification of *Bacillus* sp. isolated from traditional Vietnamese soybean-fermented products for high fibrinolytic enzyme production. *Int Food Res J*, 23: 326-331.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Liu J, Xing J, Chang T, Ma Z, Liu H (2005). Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. *Process Biochem*, 40: 2757-2762.

Mine Y, Kwan Wong AH, Jiang B (2005). Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. *Food Res Int*, 38: 243-250.

Ogunleye A, Bhat A, Irorere VU, Hill D, Williams C, Radecka I (2015). Poly-γ-glutamic acid: production, properties and applications. *Microbiology*, 161: 1-17.

Peng Y, Yang X, Zhang Y (2005). Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69: 126-132.

Song D-Y, Reddy LV, Charalampopoulos D, Wee Y-J (2019). Poly-(γ-glutamic acid) production and optimization from agro-industrial bioresources as renewable substrates by *Bacillus* sp. FBL-2 through response surface methodology. *Biomolecules*, 9: 754-766.

Tran QT, Le TTA, Dinh MH, Tran CD (2015). Purification and characterization of recombinant nattokinase from *Bacillus subtilis*. *Vietnam J Biotechnol*, 37: 75-84.

Yao Z, Liu X, Shim JM, Lee KW, Kim HJ, Kim JH (2017). Properties of a fibrinolytic enzyme secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* RSB34, isolated from Doenjang. *J Microbiol Biotechnol*, 27: 9-18.

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG *Bacillus* sp. SINH TỔNG HỢP ENZYME PHÂN GIẢI FIBRIN VÀ TẠO ĐỘ NHỚT THẤP

Nguyễn Thị Thu Trang, Trương Quốc Phong, Nguyễn Lan Hương, Lê Tuân*

Khoa Kỹ thuật Sinh học, Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

TÓM TẮT

Các bệnh về tim mạch (CVDs) được cho là nguyên nhân hàng đầu dẫn tới các ca tử vong trên thế giới do sự hình thành của các cục máu đông. CVDs có thể được phòng ngừa và điều trị bởi các phương thức khác nhau như áp dụng một lối sống lành mạnh hoặc sử dụng các loại thực phẩm chức năng giúp hỗ trợ giảm thiểu sự hình thành cục máu đông trong mạch máu. Trong bối cảnh này, enzyme tiêu sợi huyết (fibrinolytic enzymes) do các chủng *Bacillus* tự nhiên sản xuất là một tác nhân tiềm năng trong phòng ngừa các bệnh về tim mạch nhờ khả năng làm tan cục máu đông, và có nhiều ứng dụng rộng rãi, đặc biệt được quan tâm trong phòng chống và điều trị CVDs. Tuy nhiên, sự có mặt γ-PGA – một sản phẩm phụ của quá trình lên men – dẫn tới một vài trở ngại trong quá trình thu hồi enzyme. Do đó, nghiên cứu này đã tập trung vào việc phân lập và sàng lọc các chủng *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp enzyme tiêu sợi huyết đồng thời tạo độ nhớt canh trường thấp. Từ 25 mẫu phân lập gồm tương bần – sản phẩm lên men từ đậu tương, đất, nước biển và sản phẩm natto thương mại đã phân lập được 73 chủng vi khuẩn sinh protease. Trong đó, 40 chủng có khả năng sinh tổng hợp enzyme tiêu sợi huyết với hoạt lực enzyme nằm trong khoảng từ 6,4 tới 98,5 FU/mL. Dựa trên độ nhớt của canh trường được tạo ra trong quá trình lên men lỏng, chủng TVY.04 được lựa chọn do tạo độ nhớt thấp (3,8 cP) đồng thời sản xuất enzyme tiêu sợi huyết cao nhất (98,5 FU/mL). Chủng TVY.04 được nhận định là chủng *Bacillus amyloliquefaciens* với độ tương đồng là 99,93 % bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA. Cùng với các kết quả phân tích SDS-PAGE và sắc ký bản mỏng (TLC), bước đầu có thể nhận định chủng *B. amyloliquefaciens* TVY.04 là chủng sinh enzyme nattokinase và tiết ra các polysaccharide ngoại bào có thành phần bao gồm poly-γ-glutamic acid (γ-PGA).

Từ khóa: Bacillus, độ nhớt, enzyme phân giải fibrin, phân lập, sàng lọc, *γ-PGA.*

* Author for correspondence: Tel: 37 33 66 233; Email: tuan.le1@hust.edu.vn

CÁC CHỈ SỐ SINH HÓA MÁU CỦA DÊ BOER KHI SỬ DỤNG THỨC ĂN Ủ CHUA

Nguyễn Thị Thu Hiền*

Khoa Y Dược, Trường Đại học Thủ Dầu Một, Bình Dương, Việt Nam

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là theo dõi các thông số sinh hóa máu của dê Boer khi sử dụng một số loại thức ăn ủ chua. Nghiên cứu được thực hiện trên 32 con dê Boer 6-9 tháng tuổi, khối lượng trùng bình 15,5 kg nuôi tại Trung tâm Công nghệ sinh học chăn nuôi. Dê được được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên theo khối thành 3 nghiệm thức (NT); NT1: hạt điều giả ủ chua, NT2: bã mì ủ chua và NT3: thân lá cây ngô ủ chua và 1 lô đối chứng (sử dụng thức ăn tiêu chuẩn tại trung tâm). Mẫu máu được lấy bằng phương pháp chọc hút tĩnh mạch cổ của mỗi con vật vào buổi sáng, trước khi cho ăn vào các ngày 1, 45 và 90 của quá trình thí nghiệm. Các chỉ số sinh hóa máu: Glucose, Protein, Albumin, Globulin, BUN, Creatinine, AST, ALT, ALP, chỉ số điện giải (Na, K, Ca, P) được đo bằng máy phân tích hóa học Abaxis Vetscan 2. Các thông số sinh hóa của nhóm đối chứng và 3 nghiệm thức 1, 2, 3 ở ngày thứ 90 lần lượt là Glucose là 4,35±2,58; 4,29±3,83; 4,33±3,86; 4,21±3,82 mmol/L; Protein là 77,33±7,35; 76,64±6,58; 77,53±7,19; 77,69±8,33 g/L; Albumin là 29,67±3,29; 29,15±5,62; 29,46±5,35; 30,96 ±5,32 g/L; BUN là 3,76±0,99; 3,81±1,61; 3,82±1,27; 3,74±1,38 mmol/L; Creatinine là 148,36±11,86; 147,75±11,88; 149,35±11,26; 151,93±11,35 µmol/L; AST là 132,57±10,83; 127,82±9,91; 128,66±11,45; 119,44±12,28 U/L; ALT là 31,45±6,64; 32,58±5,84; 32,43±6,53; 30,86±6,32 U/L. Kết quả đánh giá các thông số sinh hóa máu của dê ở mức bình thường khi sử dụng khẩu phần thức ăn ủ chua. Không có sự khác biệt về thống kê giữa các nhóm và đối chứng. Kết quả xác nhận rằng, việc sử dụng thức ăn ủ chua bổ sung trong chăn nuôi dê Boer không ảnh hưởng đến các chỉ số sinh hóa máu. Những dữ liệu này hữu ích cho các nghiên cứu tiếp theo, gợi ý sử dụng thức ăn ủ chua trong chăn nuôi dê từ các phụ phẩm nông nghiệp.

Từ khoá: Dê Boer, thức ăn ủ chua, sinh hóa máu.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, trong bối cảnh của biến đổi khí hậu toàn cầu, đặc trưng bởi lượng mưa giảm dần, đặc biệt là ở các khu vực khô cằn và bán khô hạn; cùng với tình hình đô thị hóa tăng cao, diện tích đất chăn thả giảm, lượng cỏ tự nhiên giảm, đã dẫn đến giảm lượng thức ăn thô xanh truyền thống cho gia súc (Foley *et al.*, 2020). Trong tình hình đó, việc thiết lập các hệ thống sản xuất thức ăn thô xanh bền vững, vừa có năng suất và chất lượng cao, tận dụng triệt để các phụ phẩm nông nghiệp có ý nghĩa hết sức quan trọng trong bối cảnh ngành chăn nuôi đang phát triển (Xu *et al.*, 2021).

Việc chuẩn bị thức ăn ủ chua giúp tạo ra thức ăn có thể được dự trữ trong thời gian dài, tận dụng nguồn thức ăn thô xanh dư thừa, đảm bảo sự đa dạng về chủng loại thức ăn, nâng cao chất lượng dinh dưỡng trong khẩu phần ăn cho gia súc (Du *et al.*, 2023). Do sự giảm thiểu về diện tích đồng cỏ và khả năng cung cấp thức ăn thô xanh trong chăn nuôi, có sự gia tăng đáng kể trong việc nhập khẩu số lượng lớn thức ăn thô để bù đắp cho sự thiếu hụt các nguồn thức ăn chất lượng cao. Khi tính đến chi phí, việc sử dụng thức ăn ủ chua nổi lên như một lựa chọn thực tế hơn cho sản xuất và sử dụng ở các vùng khô cằn hoặc bán khô cằn. Việc sử dụng hợp lý thức ăn thô xanh chất lượng thấp, sau khi xử lý thích hợp, có khả năng giảm đáng kể chi phí thức ăn mà không ảnh hưởng đến hiệu suất sản xuất. Hơn nữa, cách tiếp cận này mở ra những con đường mới cho việc cho dê ăn thức ăn thô xanh chất lượng thấp, từ đó giảm chi phí thức ăn mà không gây ảnh hưởng bất lợi đến năng suất chăn nuôi. Các nghiên cứu khoa học đã làm sáng tỏ rằng việc sử dụng và chế biến thức ăn thô xanh một cách thận trọng có thể cắt giảm chi phí tiêu thụ thức ăn đậm đặc, góp phần kéo dài tuổi thọ, sức sản xuất và khả năng sinh sản của động vật (Guo *et al.*, 2022). Khả năng tiêu hóa cao của chất xơ trong các loại thức ăn thô xanh này có thể làm giảm cảm giác no trong ruột, tạo điều kiện tăng tiêu thụ thức ăn và tăng cường sản xuất sữa (Wang *et al.*, 2021). Hơn nữa, thức ăn ủ chua đã được chứng minh là có hiệu quả giảm thiểu việc sản xuất và phát thải khí methane (Khan *et al.*, 2012).

Ở Việt Nam, với chi phí đáng kể liên quan đến việc sản xuất, lưu trữ và nhập khẩu thức ăn thô khô, việc sản xuất thức ăn ủ chua là một chiến lược hiệu quả. Có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của thức ăn ủ chua lên các thông số tăng trưởng của bò (Nguyễn Hải Quân và Nguyễn Xuân Bả, 2008; Nguyễn Hữu Văn *et al.*, 2008). Gần đây, đã có nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của thức ăn ủ chua đến các thông số sinh trưởng, sinh lý máu ở cừu Phan Rang (Nguyễn Đức Thịnh *et al.*, 2021; Nguyễn Bình Phương *et al.*, 2023). Mặt khác, các chỉ số sinh hóa và sinh

lý của máu có thể được sử dụng để theo dõi và đánh giá tình trạng sức khỏe, dinh dưỡng và sinh lý của động vật nhai lại (Al-Eissa *et al.*, 2012). Trong số các yếu tố ảnh hưởng, dinh dưỡng đã được báo cáo là có ảnh hưởng sâu sắc đến đặc điểm sinh hóa máu của động vật nhai lại nhỏ (Mohammed *et al*., 2016). Nghiên cứu về các chỉ số sinh lý, sinh hóa máu của dê Boer cũng đã được công bố bởi Nguyễn Thị Thu Hiền (2022). Trong bối cảnh này, giả thuyết của chúng tôi thừa nhận rằng việc bổ sung thức ăn ủ chua, có thể tạo ra ảnh hưởng tích cực đến sức khoẻ và năng suất của dê. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá tác động của việc bổ sung một số loại thức ăn ủ chua (hạt điều ủ chua, thân cây ngô ủ chua, củ mì ủ chua) đến các chỉ số sinh hóa máu của dê Boer - một giống dê nhập nội tại Việt Nam. Bởi vì các thông số sinh hóa huyết học là dấu hiệu rõ ràng về tình trạng sức khỏe của động vật không thể quan sát được; do đó, đánh giá ảnh hưởng của khẩu phần ăn thức ăn ủ chua đối với các thông số sinh hóa máu của dê Boer nhằm đưa ra những đề xuất hợp lý mang lại hiệu quả kinh tế cho ngành chăn nuôi dê và giải quyết một số vấn đề môi trường do phụ phẩm từ một số loại cây trồng nông nghiệp gây ra.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu và địa điểm nghiên cứu

Động vật thí nghiệm: Dê Boer (6-9 tháng tuổi), được nuôi tại Trung tâm Công nghệ sinh học chăn nuôi, Khu phố 6, đường An Mỹ, phường An Mỹ, thành phố Thủ Dầu Một, Bình Dương.

Một số loại thực phẩm: Hạt điều ủ chua, thân cây ngô ủ chua, mì ủ chua; cỏ voi xanh, cám tổng hợp (Tongwei thuộc Công ty TNHH TONWEI Việt Nam).

Dụng cụ: Lưới, dụng cụ thiết kế lồng, máng đựng thức ăn, ống tiêm lấy máu 3cc, ống chống đông EDTA, máy phân tích sinh hóa máu (Abaxis Vetscan 2, Union City, CA, USA).

Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm (TN) gồm 32 con dê (có tỷ lệ đực cái là 1:1; 6-9 tháng tuổi), được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên theo khối thành 3 nghiệm thức (NT) và 1 lô đối chứng (ĐC). Dê được nhốt riêng trong các chuồng có kích thước 1,5×1,0 m, ký hiệu NT và tên cá thể gắn trên thành chuồng, dê được tiêm phòng, làm quen với môi trường và điều kiện TN trong hai tuần, sau đó là 90 ngày TN.

Chuồng trại được che nắng, máng ăn được phun thuốc khử trùng trước khi đưa vào TN. Có nước sạch cho dê uống tự do. Quá trình chăm sóc dê được thực hiện thống nhất trên tất cả các NT. Ngày cho ăn 4 lần, theo khung giờ 6, 10, 14, 16. Khi cho ăn xác định đúng NT và vệ sinh máng ăn trước khi cho ăn. Bố trí TN theo Bảng 1, Bảng 2.

Bảng 1. Bố trí thức ăn của lô ĐC

Giờ cho ăn	Loại thức ăn	Khối lượng (kg)
6	Cám tổng hợp	0,5
10	Cỏ voi xanh	2
14	Cám tổng hợp	0,5
16	Cỏ voi xanh	2

Bảng 2. Bố trí thức ăn cho NT1, 2, 3

Giờ cho ăn	Loại thức ăn		Khối lượng (kg)	
6	Thức ăn ủ chua	Cám tổng hợp	1	0,1
10	Cỏ voi xanh		2	
14	Thức ăn ủ chua	Cám tổng hợp	1	0,1
16	Cỏ voi xanh		2	

Ghi chú: Thức ăn ủ chua cho mỗi nghiệm thức 1, 2, 3 lần lượt là: Quả điều ủ chua, thân ngô ủ chua, bã mì ủ chua.

Phương pháp lấy mẫu máu

Mẫu máu được lấy bằng phương pháp chọc hút tĩnh mạch cổ của mỗi con vật vào buổi sáng (7-8 giờ), trước khi cho ăn.

Bước 1-Cố định dê: Chọn vị trí cố định sát tường có điểm tựa, tốt nhất là góc chuồng (vì dê thường có thói quen lùi lại khi cố định), dùng một tay che mắt để tránh việc dê nhảy về phía trước.

Bước 2-Xác định vị trí lấy mẫu: Đầu dê phải cao và hơi nghiêng sang một bên sao cho cổ cong, ấn ngón tay cái vào tĩnh mạch cảnh ở cuối cổ làm nổi tĩnh mạch cảnh, đâm kim vào tĩnh mạch, đẩy kim theo tĩnh mạch, hút 2-3 mL máu.

Bước 3-Xử lý mẫu: Sau khi lấy máu, mẫu nhanh chóng được cho vào ống chống đông (EDTA), lắc nhẹ dung dịch chống đông, ghi tên, ký hiệu của từng cá thể, ngày lấy mẫu.

Bước 4-Phân tích mẫu: Các mẫu được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút (Roto x 32®-Hettich). Thời gian ly tâm càng sớm càng tốt (dưới 2 giờ). Huyết thanh được thu và giữ ở âm 20°C để phân tích. Các chỉ số sinh hóa máu được đo bằng máy phân tích hóa học (Abaxis Vetscan 2, Union City, CA, USA).

Chỉ tiêu sinh hóa máu phân tích: Protein tổng (g/L), Globulin (g/L), Albumin (g/L), Glucose (mmol/L), Blood urea nitrogen-BUN (mmol/L); Creatinine (µmol/L); Aspartate transaminase-AST (U/L); Alanin amino transferase-ALT (U/L); Alkaline phosphatase-ALP (U/L), Na (mmol/L), K (mmol/L), Ca (mmol/L), P (mmol/L), Cl (mmol/L).

Xử lý số liệu

Sử dụng ANOVA và Post hoc test với Tukey-Kramer test để đánh giá sự khác biệt giữa các nhóm (P<0,05). Các thông số thống kê được xử lý bằng phần mềm MS-Excel 2020. Các kết quả được biểu thị dưới dạng Mean±SD.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả theo dõi các chỉ tiêu sinh hóa máu của dê Boer khi sử dụng thức ăn ủ chua ở ngày 1, 45 và 90 lần lượt được thể hiện ở Bảng 3, Bảng 4 và Bảng 5.

Bảng 3 cho thấy, ở ngày TN thứ nhất, hàm lượng Protein của các NT dao động 75,33-76,56 g/L; Globulin là 43,56-45,45 g/L; Albumin là 27,61-29,22 g/L; hàm lượng Glucose là 4,28-4,48 mmol/L; BUN là 3,53-3,62 mmol/L; Creatinine là 146,13-152,03 µmol/L; AST là 127,23-131,12 U/L. Mặc dù ở mỗi chỉ số, nồng độ cao nhất có thể ở NT1, NT2 hoặc NT3, nhưng sự sai khác giữa các NT không có ý nghĩa thống kê (P>0,05).

Bảng 3. Các chỉ số sinh hóa ở ngày TN1

Chỉ tiêu	ĐC	NT1	NT2	NT3
Protein, g/L	75,33±5,38	74,72±5,72	76,56±5,53	75,81±6,15
Globulin, g/L	43,56 ±3,83	44,65±4,36	45,45±5,71	44,36±4,58
Albumin, g/L	27,61±5,32	27,65±4,63	27,84±4,85	29,22 ±6,12
Glucose, mmol/L	4,28 ±1,51	4,37±1,46	4,48±2,08	4,32±1,39
BUN, mmol/l	3,62±1,19	3,53±1,25	3,54±1,32	3,61±1,13
Creatinine,µmol/L	146,13±10,73	149,51±10,61	148,25±11,52	152,03±11,62
AST, U/L	127,75±7,83	131,12±11,51	128,85±11,09	127,23±18,15
ALT, U/L	29,83±4,81	29,71±3,62	30,04±3,54	31,41±4,22
ALP, U/L	156,71±11,51	157,62±11,36	156,91±10,73	158,25±10,32
Na, mmol/L	152,83± 6,73	153,42±6,83	153,64±6,57	152,51±7,64
K, mmol/L	4,94±0,87	4,91±1,22	4,86±0,79	4,93± 0,89
Ca, mmol/L	2,93±0,82	2,96±0,81	2,91±0,81	3,12±0,83
P, mmol/L	2,13±0,78	2,26±0,83	2,23±0,84	2,16±0,83
Cl, mmol/L	108,68±6,59	107,36±6,93	106,94±6,62	107,36±6,58

Ở bảng 4 cho thấy, sau 45 ngày TN sử dụng thức ăn ủ chua, việc kết hợp các loại thức ăn ủ chua vào khẩu phần không có tác động đáng kể đến nồng độ Glucose, Albumin, Protein tổng số và tỷ lệ Albumin trên Globulin trong huyết tương ở dê Boer (P>0,05). Các chỉ số sinh hóa máu của dê có hàm lượng Protein ở các NT dao động 75,26-77,23 g/L, hàm lượng Globulin là 45,53-46,84 g/L; hàm lượng Albumin là 27,61-28,94 g/L, hàm lượng glucose là 4,53-4,81 mmol/L. Kết quả sinh hóa máu sau 45 ngày cho ăn thức ăn ủ chua của 3 NT và ĐC cho thấy các chỉ số Urea Nitrogen (BUN), Creatinine, AST, ALT, ALP, Na, K, Ca, P không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các NT (P>0,05), các chỉ số nằm trong giới hạn bình thường của dê (Merk, 2022), phù hợp với các chỉ số sinh lý hóa máu của dê Boer đã được công bố bởi Nguyễn Thị Thu Hiền (2022).

Bảng 4. Các chỉ số sinh hóa ở ngày TN45

Chỉ tiêu	ĐC	NT1	NT2	NT3
Protein, g/L	76,51±6,16	75,26±6,58	76,65±6,64	77,23±6,53
Globulin, g/L	45,53 ±5,35	46,38±4,37	46,52±5,74	46,84±4,73
Albumin, g/L	27,61±4,74	28,55±4,65	28,94±5,18	28,77 ±6,13

Glucose, mmol/L	4,63 ±2,56	4,81±7,72	4,53±2,36	4,62±2,56
BUN, mmol/L	3,73±1,56	3,66±1,53	3,74±1,81	3,64±1,43
Creatinine,µmol/L	153,18±11,27	152,75±10,83	152,55±11,86	155,53±11,56
AST, U/L	134,55±8,38	129,52±12,51	135,56±11,94	136,85±11,52
ALT, U/L	31,82±5,76	30,54±3,38	32,12±3,23	31,53±3,53
ALP, U/L	157,75±11,53	158,62±11,61	159,51±10,32	156,62±11,32
Na, mmol/L	153,53± 6,15	154,37±7,64	155,71±6,49	156,63±7,38
K, mmol/L	4,92±0,83	4,88±1,02	4,96±0,93	4,91± 1,22
Ca, mmol/L	2,87±0,81	2,99±0,83	3,01±0,91	2,95±0,93
P, mmol/L	2,16±0,81	2,28±0,81	2,33±0,83	2,25±0,69
Cl, mmol/L	107,12±8,58	106,26±9,94	109,99±10,33	99,66±9,17

Bảng 5 trình bày ảnh hưởng của việc thay thế thức ăn thô xanh thông thường bằng thức ăn ủ chua đối với các chỉ số sinh hóa máu khi kết thúc thí nghiệm sau 90 ngày. Đáng chú ý là, không có thông số nào được đánh giá có sự khác biệt đáng kể (P > 0,05). Việc thay thế thức ăn thô xanh bằng thức ăn ủ chua không có tác động đáng kể về mặt thống kê đối với các chỉ số này. Hàm lượng Protein của các thí nghiệm dao động 76,64-77,69 g/L, hàm lượng Globulin, Albumin dao động lần lượt là 46,25 (ĐC); 48,35 (NT3); 29,15 (NT1); 30,86 (NT3) g/L; hàm lượng glucose là 4,21-4,35 mmol/L. Kết quả này cho thấy các chỉ số sinh lý máu vẫn nằm trong giới hạn bình thường theo công bố của Merk (2022), (P>0,05). Không có sự thay đổi đáng kể về giá trị Na, K, Ca, P giữa các NT tại các ngày lấy mẫu 1, 45 và 90 của TN (P>0,05). Khi so sánh các chỉ số này với các giá trị tham chiếu của dê bình thường (Merk, 2022), chúng đều nằm trong phạm vi bình thường của dê Boer (Nguyễn Thị Thu Hiền, 2022). Như vậy, kết quả này đã chứng minh rằng sau 90 ngày cho ăn thức ăn ủ chua không ảnh hưởng đến các thông số sinh hóa máu của dê trong tất cả các nghiệm thức.

Bảng 5. Các chỉ số sinh hóa ở ngày TN90

Chỉ tiêu	ĐC	NT1	NT2	NT3
Protein, g/L	77,33±7,35	76,64±6,58	77,53±7,19	77,69±8,33
Globulin, g/L	46,25 ±4,58	46,87±4,36	47,27±4,88	48,35±5,19
Albumin, g/L	29,67±3,29	29,15±5,62	29,46±5,35	30,96 ±5,32
Glucose, mmol/L	4,35 ±2,58	4,29±3,83	4,33±3,86	4,21±3,82
BUN, mmol/L	3,76±0,99	3,81±1,61	3,82±1,27	3,74±1,38
Creatinine, µmol/L	148,36±11,86	147,75±11,88	149,35±11,26	151,93±11,35
AST, U/L	132,57±10,83	127,82±9,91	128,66±11,45	119,44±12,28
ALT, U/L	31,45±6,64	32,58±5,84	32,43±6,53	30,86±6,32
ALP, U/L	154,89±11,53	158,37±11,48	157,05±9,66	155,32±10,56
Na, mmol/L	149,25± 6,56	154,61±7,88	147,19±7,76	152,33±8,09
K, mmol/L	4,88±0,91	4,91±1,32	4,83±0,80	4,96± 0,59
Ca, mmol/L	3,05±1,26	3,08±0,68	3,01±0,93	3,02±0,82
P, mmol/L	2,77±0,81	2,82±0,55	2,83±0,96	2,78±0,72
Cl, mmol/L	112,25±10,67	109,63±9,96	108,26±10,37	110,78±9,63

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu xác định hiệu suất sinh trưởng, một số thông số sinh hóa huyết thanh ở một số gia súc khi sử dụng cỏ khô, thức ăn ủ chua, ngô ủ chua làm nguồn thức ăn thô (Khaing *et al*., 2015). Nguồn thức ăn ủ chua không ảnh hưởng đến các chỉ số sinh hóa máu của vật nuôi. Nguồn thức ăn thô xanh cũng không ảnh hưởng đến nồng độ Glucose huyết thanh, tổng lượng Protein và Albumin của động vật (Bernes và Stengarde, 2012). Nghiên cứu này cũng đã báo cáo rằng mức tăng khối lượng sống và lượng ăn vào không khác nhau giữa những con cừu được nuôi bằng cỏ khô hoặc thức ăn ủ chua, họ cũng nhận thấy mức tăng khối lượng và lượng thức ăn ăn vào của gia súc ăn cỏ khô cao hơn. Tương tự, nhiều nghiên cứu trên dê sữa Saanen đã báo cáo không có sự khác biệt về khối lượng và tăng khối lượng khi được cho ăn thức ăn thô xanh hoặc thức ăn ủ chua có chất lượng tốt: thức ăn ủ chua bằng ngô và cỏ + thức ăn ngô ủ chua); cỏ linh lăng và ngô ủ chua hoặc bột ngô và củ cải ủ chua (Wang *et al*., 2016).

Trong nghiên cứu này, việc kết hợp thức ăn ủ chua vào khẩu phần không có tác động đáng kể đến nồng độ Glucose, Albumin, Protein tổng số và tỷ lệ Albumin, Globulin trong huyết tương ở dê Boer (Bảng 5, 6, 7) (P > 0,05). Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Shohre và đồng tác giả (2023), ở những con dê Mahabadi được cho ăn chế độ ăn bao gồm ngô ủ chua, đã quan sát thấy sự giảm đáng kể nồng độ nitơ urê huyết tương (Blood Urea Nitrogen - BUN) (P = 0,01). Wang và đồng tác giả (2016), cũng báo cáo rằng việc bổ sung ngô ủ chua vào chế độ ăn không ảnh hưởng đến nồng độ Glucose huyết thanh và tổng lượng Protein nhưng lại làm tăng nồng độ chất béo trung tính trong huyết thanh. Ngược lại, ở nghiên cứu của Wang và đồng tác giả (2021), xác định có sự giảm nồng độ BUN khi cỏ linh lăng/rơm khô được thay thế bằng ngô ủ chua, xu hướng hàm lượng nitơ urê huyết tương này phù hợp với kết quả về nitơ urê trong sữa. Sự khác biệt này có thể được cho là do sự sẵn có đồng bộ của cả protein và năng lượng trong dạ cỏ (Khaing *et al*., 2015). Việc sử dụng ngô ủ chua, với hàm lượng tinh bột cao và cung cấp năng lượng, có thể là một yếu tố góp phần làm giảm nồng độ nitơ dạ cỏ được quan sát thấy. Tuy nhiên, điều đáng chú ý là Wang và đồng tác giả (2016) cũng báo cáo rằng không có tác động đáng kể đến nồng độ nitơ urê trong máu khi dê đang cho con bú được cung cấp chế độ ăn có chứa ngô ủ chua.

Ở Việt Nam, nghiên cứu về tác dụng của bã sắn ủ chua cũng cho thấy tác dụng tích cực ở động vật nhai lại (Nguyễn Hải Quân và Nguyễn Xuân Bả, 2008; Nguyễn Hữu Văn *et al*., 2008). Gần đây, một nghiên cứu về ảnh hưởng của thức ăn ủ chua đến các thông số sinh trưởng của cừu Phan Rang cũng cho thấy dê có tốc độ sinh trưởng bình thường khi sử dụng thức ăn ủ chua (Nguyễn Đức Thịnh *et al*., 2021); trong đó khối lượng ngày thứ 90 ở các NT dao động 19-19,9 kg, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (P>0,05) giữa các NT và so với ĐC. Thức ăn ủ chua cũng không ảnh hưởng đến các chỉ tiêu sinh lý máu của cừu Phan Rang (Nguyễn Bình Phương *et al*., 2023). Như vậy, dựa trên kết quả của các nghiên cứu khác và kết quả của nghiên cứu này, cho thấy rằng việc sử dụng ngô, mì và quả điều giả ủ chua làm nguồn thức ăn thô không ảnh hưởng đến sức khỏe ở dê Boer.

KẾT LUẬN

Nhìn chung, việc bổ sung ngô ủ chua vào khẩu phần thay thế cho thức ăn thô xanh thông thường cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về các chỉ số sinh hóa máu ở dê Boer. Do đó, việc sử dụng thức ăn ủ chua được đề xuất nhờ các lợi ích của nó, đặc biệt là ở những vùng có khả năng tiếp cận thức ăn thô xanh hạn chế. Những phát hiện này cung cấp những hiểu biết có giá trị về lợi ích tiềm năng của việc kết hợp ngô ủ chua làm thức ăn thay thế thức ăn thô xanh cho dê. Nghiên cứu này góp phần mở rộng kiến thức hiện có của chúng ta và cung cấp thêm các khuyến nghị về chế độ ăn uống cho dê.

Lời cảm ơn: *Chúng tôi xin cảm ơn Trung tâm Công nghệ sinh học chăn nuôi đã tạo điều kiện thuận lợi; Các bác sĩ thú y, nhân viên chăn nuôi tại trung tâm và các sinh viên Nguyễn Đức Thịnh, Ngô Huỳnh Bảo Trinh, Lê Mỹ Thanh đã hỗ trợ thực hiện đề tài này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bernes G and Stengärde L (2012). Sheep fed only silage or silage supplemented with concentrates. Effects on ewe performance and blood metabolites. *Small Rum Res*, 102: 108-13.

Du Z, Yang F, Fang J, Yamasaki S, Oya T, Nguluve D, Hajime K, Yimin C (2023). Silage preparation and sustainable livestock production of natural woody plant. *Frontiers in Plant Science*, 14: Article 1 253178.

Foley DJ, Thenkabail PS, Aneece I P, Teluguntla PG, Oliphant A J (2020). A metaanalysis of global crop water productivity of three leading world crops (wheat, corn, and rice) in the irrigated areas over three decades. *International Journal of Digital Earth*, 13: 939–975.

Guo C, Wu Y, Li S, Cao Z, Wang Y, Mao J, Shi H, Shi R, Sun X, Zhnng Y, Kong F, Hao Y, Xu X (2022). Effects of different forage types on rumen fermentation, microflora, and production performance in peak- lactation dairy cows. *Fermentation*, 8: 507.

Nguyễn Thị Thu Hiền (2022). Các chỉ số sinh hóa máu của dê Bách Thảo, Boer và Saanen. *Tạp chí KHKT Chăn nuôi*, 276: 79-85.

Khaing KT, Loh TC, Ghizan S, Halim R A, Samsudian AA (2015). Feed intake, growth performance and digestibility in goats fed whole corn plant silage and Napier grass. *Malaysian Journal of Animal Science*, 18: 87–98.

Merk "Merk Manual" (2022). Truy cập 10/06/2024, từ https://www.merckvetmanual.com/special-subjects/reference-guides/hematology-reference-ranges.

Nguyễn Bình Phương, Nguyễn Đức Thịnh và Nguyễn Thị Thu Hiền (2023). Các chỉ tiêu sinh lý máu của cừu phan rang khi sử dụng thức ăn ủ chua. *Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc*, 1426-1431.

Nguyễn Hải Quân và Nguyễn Xuân Bả (2008). Ảnh hưởng của mức bổ sung bã sắn ủ chua đến lượng ăn vào, tỷ lệ tiêu hóa và một số chỉ tiêu môi trường dạ cỏ của cừu được nuôi bằng rơm lúa. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 46: 97-05.

Nguyễn Đức Thịnh, Ngô Huỳnh Bảo Trinh, Lê Mỹ Thanh và Nguyễn Thị Thu Hiền (2021). Khảo sát các chỉ tiêu sinh trưởng của Cừu Phan Rang khi sử dụng thức ăn ủ chua. *Tạp chí KH Đại học Thủ Dầu Một*, 2(51): 40-47.

Nguyễn Hữu Văn, Nguyễn Xuân Bả và Bùi Văn Lợi (2008). Đánh giá giá trị dinh dưỡng của bã sắn công nghiệp ủ chua với các phụ gia để làm thức ăn cho gia súc nhai lại. *Tạp chí KH Đại học Huế*, 46: 129-35.

Shohre TS, Amir F, Nader P, Sayyed REM (2023). Impact of corn silage substitution for dry alfalfa on milk fatty acid profile, nitrogen utilization, plasma biochemical markers, rumen fermentation, and antioxidant capacity in Mahabadi lactating goats. *Veterinary and Animal Science*, 22: 100323

Wang E, Wang J, Lv J, Sun X, Kong F, Wang S (2021). Comparison of ruminal degradability, indigestible neutral detergent fiber, and total-tract digestibility of three main crop straws with alfalfa hay and corn silage. *Animals*, 11 (11): 3218.

Wang P, Xue Y, Ma G, Luo J (2016). Effects of corn silage levels on methane emissions and blood metabolite concentrations of drying-off Xinong Saanen dairy goats. *Journal of Animal Science*, 94: 835.

Xu L, Liu Q, Nie Y, Li F, Yang G, Tao Y, Lv S, Wu X, Ye L (2021). A multi-site evaluation of winter hardiness in indigenous alfalfa cultivars in northern China. *Atmosphere*, 12 (11): 1538.

BLOOD BIOCHEMICAL INDICATORS OF BOER GOATS WHEN USING SILAGE

Nguyen Thi Thu Hien*

Faculty of Medicine and Pharmacy, Thu Dau Mot University, Binh Duong Province, Vietnam

SUMMARY

The purpose of the study was to monitor blood biochemical parameters of Boer goats when using certain types of silage. The study was conducted on 32 Boer goats 6-9 months old, with an average weight of 15.5 kg raised at the Center for Livestock Biotechnology. Goats were completely randomized in blocks into 3 treatments (NT); NT1: silage of fake cashew nuts, NT2: silage of wheat residue and NT3: silage of corn stalks and leaves and 1 control group (using standard feed at the center). Blood samples were taken by jugular venipuncture from each animal in the morning, before feeding on days 1, 45, and 90 of the experiment. Blood biochemical indices: Glucose, Protein, Albumin, Globulin, BUN, Creatinine, AST, ALT, ALP, electrolyte index (Na, K, Ca, P) were measured by Abaxis Vetscan 2 chemical analyzer. The biochemical parameters of the control group and 3 treatments 1, 2, 3 at day 90 were respectively Glucose 4.35±2.58; 4.29±3.83; 4.33±3.86; 4.21±3.82 mmol/L; Protein is 77.33±7.35; 76.64±6.58; 77.53±7.19; 77.69±8.33 g/L; Albumin was 29.67±3.29; 29.15±5.62; 29.46±5.35; 30.96 ±5.32 g/L; BUN was 3.76±0.99; 3.81±1.61; 3.82±1.27; 3.74±1.38 mmol/L; Creatinine was 148.36±11.86; 147.75±11.88; 149.35±11.26; 151.93±11.35 µmol/L; AST was 132.57±10.83; 127.82±9.91; 128.66±11.45; 119.44±12.28 U/L; ALT was 31.45±6.64; 32.58±5.84; 32.43±6.53; 30.86±6.32 U/L. The results of evaluating blood biochemical parameters of goats were at normal levels when using silage diets. There were no statistical differences between groups and controls. The results confirm that the use of silage supplement in Boer goat farming does not affect blood biochemical indicators. These data are useful for further research, suggesting that using silage in goat farming helps reduce livestock costs and limit environmental pollution from agricultural by-products.

Keywords: Boer goats, blood chemical indicator, silage.

* Author for correspondence: Tel: 0708535001; Email: hiennt@tdmu.edu.vn

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA QUÁ TRÌNH TIỀN XỬ LÝ NẤM VÀ THỦY PHÂN RƠM LÚA MÌ BẰNG HỖN HỢP CHẾ PHẨM ENZYME THƯƠNG MẠI

Dương Hiếu Linh[1*], Dietmar Schlosser[2]

[1]Đại học Việt Đức (VGU), đường Vành đai 4, khu phố 4, phường Thới Hòa, thành phố Bến Cát, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

[2]Khoa Sinh thái Vi sinh vật Ứng dụng, Trung tâm Nghiên cứu môi trường Helmholtz - UFZ, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Đức

TÓM TẮT

Quá trình lên men ở trạng thái rắn sử dụng nấm có thể chuyển đổi trực tiếp chất thải từ nông nghiệp và lâm nghiệp thành các hóa chất hữu ích, chất hoạt động bề mặt sinh học, vật liệu composite, và năng lượng sinh học trong khuôn khổ ứng dụng tinh chế sinh học hoặc đơn giản được sử dụng để sản xuất nấm. Việc tiền xử lý bằng nấm đối với chất thải nông nghiệp lignocellulose cho mục đích tinh chế sinh học là thân thiện với môi trường và đồng thời kết hợp các ưu điểm như điều kiện phản ứng nhẹ, tính đặc hiệu của quá trình thủy phân bằng enzyme, không hình thành chất ức chế, và yêu cầu năng lượng thấp. Do sinh khối lignocellulose có thành phần và đặc tính hóa học khác nhau nên cần xác định hiệu quả thủy phân bằng enzyme đối với từng loại sinh khối. Mặc dù hỗn hợp các chế phẩm enzyme thương mại đã cho thấy khả năng thủy phân sinh khối lignocellulose nhưng hiệu quả của quá trình thủy phân enzyme của hỗn hợp trên rơm lúa mì vẫn chưa được đánh giá. Do đó, nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá hiệu quả của quá trình đường hóa của rơm lúa mì thông qua quá trình thủy phân bằng enzyme bằng cách sử dụng hỗn hợp của các chế phẩm enzyme thương mại (hỗn hợp Celluclast 1.5 L/ Viscozyme L). Hơn nữa, tác động của hỗn hợp lên rơm lúa mì đã được xử lý trước bằng nấm cũng được đánh giá. Kết quả thử nghiệm của chúng tôi cho thấy rằng thủy phân bằng hỗn hợp Celluclast 1.5 L/Viscozyme L nên được áp dụng với hàm lượng cơ chất là 2,5% (w/v). Tiền xử lý bằng *Stropharia rugosoannulata* dẫn đến lượng đường cao hơn đáng kể so với đối chứng, với lượng đường đạt được lần lượt là 63,0 và 32,6 mg/g trọng lượng khô.

Từ khóa: Chế phẩm enzyme thương mại, lignocellulose, phụ phẩm nông nghiệp, thủy phân enzyme, tiền xử lý nấm.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Chất thải nông nghiệp rất dồi dào và thường không được sử dụng đúng mức có thể được sử dụng làm cơ chất có giá trị cho mục đích công nghệ sinh học (Duong, 2024). Những cơ chất rắn này bao gồm bã mía, bã sắn, cám ngũ cốc, bã cà phê, vỏ và bã trái cây, rơm rạ và vỏ trấu. Cấu trúc cơ bản của các vật liệu này (bao gồm cellulose, hemicellulose, lignin, tinh bột và pectin) quyết định tính chất của cơ chất rắn. Ví dụ, rơm lúa mì bao gồm 37-41% cellulose, 27-32% hemicellulose và 13-15% lignin (Saini *et al*., 2015), trong khi các con số tương ứng đối với ngũ cốc dao động từ khoảng 45-55% cellulose, 26-32% hemicellulose, và 16-21% lignin (Janusz *et al*., 2017). Cấu trúc (ví dụ như diện tích bề mặt đặc trưng của cellulose, độ kết tinh của cellulose, mức độ trùng hợp, kích thước và thể tích lỗ rỗng) và các yếu tố hóa học (ví dụ như thành phần và hàm lượng trong các nhóm hemicelluloses và acetyl) cũng góp phần vào tính "trơ" của sinh khối lignocellulose, tạo thành một trở ngại cho việc sử dụng các cơ chất này trong sản xuất năng lượng sinh học và vật liệu sinh học (Zoghlami và Paës, 2019). Mặt khác, một số nghiên cứu chỉ ra rằng quá trình lên men rắn sử dụng nấm có thể chuyển đổi trực tiếp các cơ chất lignocellulose và chất thải từ nông nghiệp và lâm nghiệp thành các hóa chất hữu ích, chất hoạt động bề mặt, vật liệu composite và năng lượng sinh học trong khuôn khổ các ứng dụng tinh chế sinh học hoặc đơn giản là được sử dụng để sản xuất nấm (Duong, 2024). Việc tiền xử lý bằng nấm đối với chất thải nông nghiệp lignocellulose cho mục đích tinh chế sinh học là thân thiện với môi trường và đồng thời kết hợp các ưu điểm như điều kiện phản ứng nhẹ, tính đặc hiệu của quá trình thủy phân bằng enzyme, không hình thành chất ức chế, và yêu cầu năng lượng thấp (Duong, 2024).

Do sinh khối lignocellulose có thành phần và đặc tính hóa học khác nhau nên cần xác định hiệu quả thủy phân bằng enzyme đối với từng loại sinh khối (López-Gutiérrez *et al*., 2021). Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân enzyme bao gồm nồng độ enzyme, nồng độ cơ chất, kích thước hạt và điều kiện phản ứng (nhiệt độ, pH, thời gian phản ứng, khuấy trộn, dung dịch đệm). Sự tương tác của các yếu tố này làm cho việc tối ưu hóa quá trình thủy phân bằng enzyme trở nên khó khăn. Hỗn hợp các chế phẩm enzyme thương mại như Celluclast 1.5 L và Viscozyme L cho phép tạo ra hỗn hợp enzyme với nhiều cellulase và hemicellulase để thủy phân lignocellulose. Celluclast 1.5 L/Viscozyme L được thiết kế cho các ứng dụng thực phẩm (López-Gutiérrez *et al*., 2021). Hỗn hợp Celluclast 1.5 L và Viscozyme L đã được tối ưu hóa cho quá trình thủy phân enzyme của bã táo,

rong biển đã qua tiền xử lý, và đậu bắp (López-Gutiérrez *et al*., 2021). Mặc dù hỗn hợp của các chế phẩm enzyme thương mại này đã cho thấy khả năng thủy phân sinh khối lignocellulose nhưng hiệu quả của quá trình thủy phân enzyme của hỗn hợp trên rơm lúa mì vẫn chưa được đánh giá. Do đó, nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá hiệu quả của quá trình đường hóa của rơm lúa mì thông qua quá trình thủy phân bằng enzyme bằng cách sử dụng hỗn hợp của các chế phẩm enzyme thương mại Celluclast 1.5 L/ Viscozyme L. Việc sử dụng hỗn hợp của các chế phẩm enzyme thương mại có thể thúc đẩy sức mạnh liên hợp của enzyme. Hơn nữa, tác động của hỗn hợp lên rơm lúa mì đã được xử lý trước bằng nấm cũng được đánh giá.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Tất cả các hóa chất đều thuộc loại dùng cho phân tích (cấp gradient trong trường hợp dung môi sắc ký). Tất cả các hóa chất được mua từ Merck, Sigma-Aldrich và Th. Geyer GmbH (Renningen, Đức). Hỗn hợp Celluclast 1.5L và Viscozyme L được mua từ Sigma-Aldrich (Tập đoàn Merck, Darmstadt, Đức). Celluclast 1.5L là cellulase từ *Trichoderma reesei*, có hoạt tính enzyme là 756 đơn vị glucanase (GU)/g và có nồng độ 1,22 g/mL. Viscozyme L là hỗn hợp enzyme thương mại từ *Aspergillus* sp., là sự pha trộn của beta-glucanase, pectinase, hemicellulase và xylanase. Theo nhà sản xuất (Novozymes Corp.), hoạt tính enzyme chính của Viscozyme L được thể hiện bằng beta-glucanase ở nồng độ 108 GU/g, tương ứng với nồng độ 1,21 g/mL.

Tiền xử lý rơm lúa mì thông qua nấm

Stropharia rugosoannulata (DSM 11372) là loài nấm được dùng cho nghiên cứu, thu được từ bộ sưu tập của Khoa Sinh thái Vi sinh vật Ứng dụng tại Trung tâm Nghiên cứu Môi trường Helmholtz - UFZ (Leipzig, Đức). Chủng nấm này cũng có sẵn tại Bộ sưu tập Vi sinh vật và Nuôi cấy Tế bào Đức (DSMZ; Braunschweig, Đức). Chủng nấm được duy trì trên đĩa thạch chiết xuất mạch nha 2% (w/v) (thạch 1,5%; pH 5,7) ở 28°C trong bóng tối. Tiền xử lý rơm lúa mì bằng nấm đã được mô tả chi tiết bởi Duong, 2024. Tóm lại, các thí nghiệm được thực hiện trong lọ polypropylene. Các lọ được trang bị nắp vặn màng thông hơi (màng PTFE có đường kính 25 mm và độ xốp 0,2 µm (Whatman/GE Healthcare, Đức)). Để cấy nấm, các phần thạch (được lấy từ các cạnh của cụm nấm mọc trên đĩa thạch mạch nha) được đồng nhất hóa trong môi trường chiết xuất mạch nha 2% (một phần thạch trên 1 mL môi trường chiết xuất mạch nha) với sự trợ giúp của Ultra-Turrax (Staufen, Đức). Sau đó, 0,5 mL huyền phù nấm thu được được sử dụng để cấy vào 0,5 g rơm lúa mì đã được cắt nhỏ và hấp khử trùng. Lượng sinh khối nấm được cấy vào ở mức 1.8 ± 0.3 mg (sinh khối nấm được xác định dựa trên ergosterol; Vui lòng xem mô tả chi tiết về phương pháp xác định sinh khối nấm dựa trên ergosterol trong luận án của Duong, 2024). Rơm lúa mì được hấp khử trùng và không qua xử lý trước bằng nấm được dùng làm đối chứng. Mỗi nghiệm thức được thực hiện ba lần, mẫu được ủ ở 28°C trong 14 ngày. Mẫu sau khi ủ đã được lưu trữ ở -20°C, sau đó được làm sạch bằng 0.1 M McIlvaine buffer (pH 7.0). Phần chất rắn sau đó được làm khô ở 50°C trong 48 giờ và được xác định trọng lượng khô. Khả năng phân hủy rơm lúa mì của *S. rugosoannulata* đã được nghiên cứu và trình bày chi tiết trong luận án của Duong, 2024.

Thủy phân bằng enzyme

Phần chất rắn sau khi được làm khô ở trên được đồng nhất bằng máy nghiền bi (Pulverisiette 23; Fritsch, Idar-Oberstein, Đức) ở tốc độ 50 oscillations mỗi giây trong 5 phút và được bảo quản ở nhiệt độ phòng trong điều kiện khô ráo trong bóng tối cho đến khi phân hủy bằng enzyme. Các chế phẩm enzyme thương mại Celluclast 1.5L và Viscozyme L được áp dụng dựa trên dữ liệu đã được công bố trước đó (López-Gutiérrez *et al*., 2021) trong hỗn hợp ở 121 (đối với Celluclast 1.5L) và 15,8 (đối với Viscozyme L) GU/g chất rắn lignocellulose khô. Quá trình thủy phân bằng enzyme được thực hiện trong ống Eppendorf 2 mL sử dụng dung dịch đệm Na-citrate 0,1M (pH 4,8) có chứa 0,2 g/L tetracycline để ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn trong hỗn hợp phản ứng. Các mẫu rắn lignocellulose được áp dụng ở mức 2,5% hoặc 5% (w/v). Quá trình ủ được thực hiện ở tốc độ 150 vòng/phút và 40°C trong 18 giờ. Sau đó, mẫu được đông lạnh ngay ở -20°C và bảo quản ở nhiệt độ này cho đến khi phân tích.

Sau khi rã đông các mẫu thu được từ quá trình phân hủy bằng enzyme, chúng được ly tâm ở 4°C và 20817 × g trong 10 phút (Eppendorf, Hamburg, Đức). Dịch chiết thu được được giữ ở -20°C để xác định lượng đường khử tổng số.

Xác định hàm lượng đường khử tổng số theo phương pháp DNSA

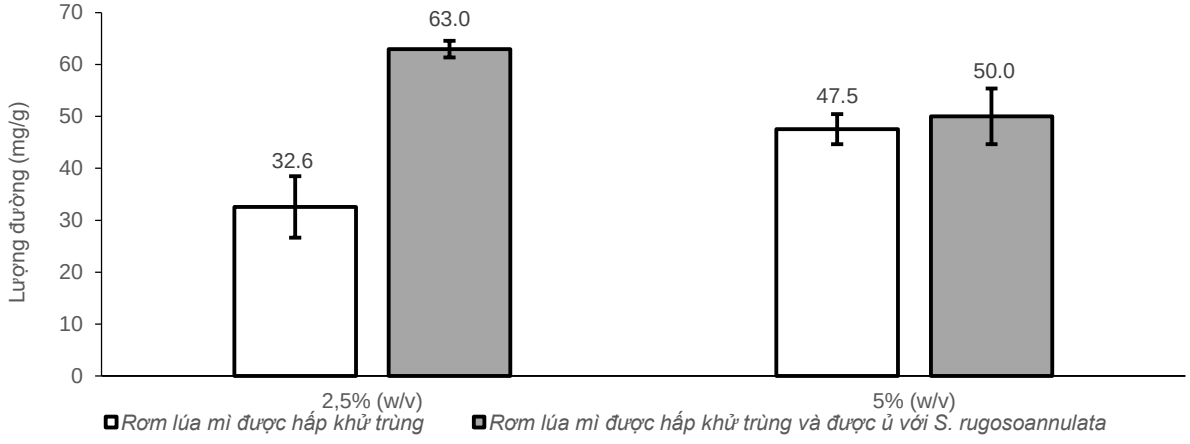
Tổng lượng đường khử trong dịch chiết được xác định bằng phương pháp axit dinitrosalicylic (DNSA) (Gonçalves *et al*., 2010). Tóm lại, 25 µL thuốc thử DNSA (1% [w/v] DNSA, 30% [w/v] kali natri tartrat, 1,6% [w/v] NaOH) được thêm vào 25 µL mẫu trong các giếng của đĩa 96 giếng (đáy phẳng). Sau đó, đĩa 96 giếng (có nắp) được đặt trên máy lắc ở tốc độ 150 vòng / phút trong 30 giây, sau đó ủ ở 85°C trong 10 phút. Sau đó, đĩa 96 giếng được làm nguội trên đá và ngay lập tức thêm 250 µL nước cất vào giếng. Độ hấp thụ được đọc ở bước sóng 530nm, sử dụng đầu đọc GENios Plus (Tecan, Männedorf, Thụy Sĩ). Việc hiệu chuẩn phương pháp được thực hiện bằng cách sử dụng hỗn hợp có lượng D-glucose và D-xylose bằng nhau, dựa trên lượng glucan và xylan về cơ bản có thể so sánh được trong rơm lúa mì được báo cáo trước đó (García-Torreiro *et al*., 2016).

Phân tích thống kê

Các ngoại lệ (outlier) trong số các bộ dữ liệu ba lần được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm Dean-Dixon. Bài kiểm tra f-tests và Student's t-tests hai mẫu (hai mặt) không ghép đôi được thực hiện bằng Microsoft® Excel® 2013 (phiên bản 15.0.5327.1000).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hình 1 mô tả lượng đường thu được lần lượt từ quá trình xử lý bằng hỗn hợp Celluclast 1.5 L/Viscozyme L cho rơm lúa mì được hấp khử trùng (dùng làm đối chứng) hoặc rơm được hấp khử trùng và tiền xử lý bằng nấm mục trắng *S. rugosoannulata*. Các mẫu rắn lignocellulose được áp dụng ở mức 2,5% hoặc 5% (w/v). Hình 1 cho thấy rằng lượng đường cao nhất là 63,0 mg/g trọng lượng khô đạt được khi tiền xử lý bằng *S. rugosoannulata* và thủy phân bằng hỗn hợp Celluclast 1.5 L/Viscozyme L với hàm lượng cơ chất là 2,5%. Lượng đường khử thu được này cao gấp đôi so với đối chứng (rơm lúa mì được hấp khử trùng và thủy phân bằng hỗn hợp Celluclast 1.5 L/Viscozyme L với hàm lượng cơ chất là 2,5%). Xa hơn nữa, các bài kiểm tra f-tests và Student's t-tests hai mẫu (hai mặt) không ghép đôi đã được thực hiện để kiểm định sự khác nhau trong hiệu quả thủy phân khi sử dụng hỗn hợp Celluclast 1.5 L/ Viscozyme L cho các nghiệm thức. Kết quả của các bài kiểm tra được trình bày trong Bảng 1 và Bảng 2. Trước hết, bài kiểm tra f-tests đã được áp dụng và kết quả bài kiểm tra f-tests cho thấy rằng phương sai của hai mẫu không khác nhau đáng kể ($P > 0,05$), do đó bài kiểm tra Student's t-tests hai mẫu (hai mặt) không ghép đôi (phương sai bằng nhau) đã được áp dụng. Kết quả bài kiểm tra Student's t-tests hai mẫu (hai mặt) không ghép đôi cho thấy rằng có sự khác biệt đáng kể trong hiệu quả thủy phân ở hàm lượng cơ chất 2,5% hoặc 5% (w/v) ($P < 0,05$) (Bảng 1). Ở mức hàm lượng 2,5%, có sự khác biệt đáng kể trong hiệu quả thủy phân cho rơm lúa mì được hấp khử trùng hoặc rơm được hấp khử trùng và tiền xử lý bằng *S. rugosoannulata* ($P < 0,05$), tuy nhiên sự khác biệt là không đáng kể khi hàm lượng cơ chất là 5% ($P > 0,05$) (Bảng 2). Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng hàm lượng cơ chất 2,5% (w/v) nên được áp dụng cho các nghiên cứu tương lai và hiệu quả của tiền xử lý bằng chủng nấm mục trắng *S. rugosoannulata* cho mục đích tăng cường quá trình đường hóa của rơm lúa mì đã được chứng minh.



Hình 1. Lượng đường thu được từ các công thức thí nghiệm

Bảng 1. Kết quả kiểm tra f-tests và Student's t-tests hai mẫu (hai mặt) không ghép đôi được thực hiện bằng Microsoft® Excel® 2013 khi so sánh kết quả thủy phân bằng hỗn hợp Celluclast 1.5 L/ Viscozyme L ở hàm lượng cơ chất 2,5% và 5% (w/v). Sự so sánh được thực hiện cho rơm lúa mì được hấp khử trùng hoặc rơm được hấp khử trùng và tiền xử lý bằng *S. rugosoannulata*

	f-tests	Student's t-tests
Rơm lúa mì được hấp khử trùng	0,383	0,017
Rơm lúa mì được hấp khử trùng và được ủ với *S. rugosoannulata*	0,165	0,016

Bảng 2. Kết quả kiểm tra f-tests và Student's t-tests hai mẫu (hai mặt) không ghép đôi được thực hiện bằng Microsoft® Excel® 2013 khi so sánh kết quả thủy phân bằng hỗn hợp Celluclast 1.5 L/ Viscozyme L của rơm lúa mì được hấp khử trùng hoặc rơm được hấp khử trùng và tiền xử lý bằng *S. rugosoannulata*. Sự so sánh được thực hiện cho hàm lượng cơ chất 2,5% và 5% (w/v)

Hàm lượng cơ chất (w/v) %	f-tests	Student's t-tests
2,5	0,137	0,001
5	0,449	0,522

Hiệu quả của hỗn hợp Celluclast 1.5 L/ Viscozyme L đã được chứng minh và so sánh với những hỗn hợp khác bởi một số nhóm nghiên cứu. Ví dụ, hai hỗn hợp nhị phân của các chế phẩm enzyme thương mại có hoạt tính cellulase và hemicellulase (Celluclast 1.5 L/Viscozyme L và Cellic® Ctec2/Cellic® Htec2) đã được sử dụng để thủy phân bã cây thùa (không qua tiền xử lý) (López-Gutiérrez *et al*., 2021). Hỗn hợp Celluclast 1.5 L với Viscozyme L đã được chứng minh là có khả năng đường hóa bã cây thùa cao hơn, mặc dù hỗn hợp nhị phân của Cellic® Ctec2 với Cellic® Htec2 được thiết kế để đường hóa sinh khối lignocellulose (López-Gutiérrez *et al*., 2021). Một ưu điểm khác của Celluclast 1.5 L và Viscozyme L là chúng rẻ hơn và có sẵn trên toàn thế giới (López-Gutiérrez *et al*., 2021).

Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy rằng chủng nấm mục trắng phân hủy lignin *S. rugosoannulata* đã dẫn đến việc tiền xử lý nấm hiệu quả vượt quá giá trị kiểm soát tương ứng. Quan sát này đã chứng thực cho những phát hiện trước đó. Từ lâu, người ta đã chỉ ra rằng quá trình phân giải lignin (delignification) là điều kiện tiên quyết quan trọng để quá trình đường hóa thủy phân hiệu quả lignocellulose và do đó là thách thức lớn đối với việc sử dụng thành công lignocellulose (Andlar *et al*., 2018). Đối với vấn đề này, nấm mục trắng là chủng nấm phân hủy lignin chính trong tự nhiên và khả năng phân hủy lignin của chúng rõ ràng vượt trội so với nấm mục nâu và nấm mục mềm (Andlar *et al*., 2018). Do đó, nấm mục trắng là chất xúc tác sinh học hấp dẫn để tiền xử lý sinh khối lignocellulose và hứa hẹn mang lại sản lượng đường cao nhờ quá trình đường hóa bằng enzyme. Ví dụ, việc ứng dụng thành công nấm mục trắng *Trametes hirsuta* để xử lý sơ bộ rơm rạ và thân cây ngô đã được mô tả trước đây (Sun *et al*., 2011; Saritha *et al*., 2012). Nấm mục trắng *Irpex lacteus* được sử dụng để xử lý sinh học thân cây ngô, đi kèm với việc sản xuất nhiều loại enzyme thủy phân và oxy hóa ngoại bào (Du *et al*., 2011).

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, quá trình đường hóa của rơm lúa mì đã được đánh giá thông qua việc sử dụng hỗn hợp chế phẩm enzyme thương mại là Celluclast 1,5 L và Viscozyme L. Kết quả thử nghiệm cho thấy thủy phân bằng hỗn hợp enzyme Celluclast 1.5 L/Viscozyme L nên được áp dụng ở hàm lượng cơ chất là 2,5%. Tiền xử lý bằng chủng nấm mục trắng phân hủy lignin *S. rugosoannulata* cho lượng đường khử thu nhận được cao hơn đáng kể so với đối chứng, với lượng đường lần lượt là 63,0 và 32,6 mg/g trọng lượng khô.

Lời cảm ơn: *Chúng tôi xin cảm ơn Hauke Harms, Thomas Maskow, Sven Paufler, Madlen Schubert, Stefanie Loth, Claudia Heber, Martina Kolbe, Katrin Lübke, Chau Nguyen, Quynh Nguyen, và Han Nguyen vì sự hỗ trợ tuyệt vời về thực nghiệm và kỹ thuật cũng như hỗ trợ về mặt phương pháp. Chúng tôi cũng chân thành cảm ơn sự tài trợ từ Đề án Đào tạo giảng viên có trình độ tiến sĩ cho các trường đại học, cao đẳng giai đoạn 2010-2020 (Đề án 911) của Chính phủ Việt Nam cho học bổng Tiến sĩ của Dương Hiếu Linh tại Đức. Công trình này được hỗ trợ bởi Hiệp hội các Trung tâm Nghiên cứu Đức Helmholtz trong khuôn khổ Nền tảng Tích hợp "Tapping nature's potential for sustainable production and a healthy environment" tại UFZ.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Andlar M, Rezić T, Marđetko N, Kracher D, Ludwig R, Šantek B (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng Life Sci,* 18(11):768–778.

Du W, Yu H, Song L, Zhang J, Weng C, Ma F, Zhang X (2011). The promoting effect of byproducts from *Irpex lacteus* on subsequent enzymatic hydrolysis of bio-pretreated cornstalks. *Biotechnol Biofuels,* 4:1–8.

Duong HL (2024). Fungal Decomposition of Lignocellulosic Solid Substrates: Applicability and Information Value of Biocalorimetry for Ecological and Biotechnological Research. *PhD dissertation. Faculty of Life Sciences, University of Leipzig, Germany.* Available at: https://phucvu.thuvientphcm.gov.vn/Viewer/EBook/794048

García-Torreiro M, López-Abelairas M, Lu-Chau TA, Lema JM (2016). Fungal pretreatment of agricultural residues for bioethanol production. *Ind Crops Prod,* 89:486–492.

Gonçalves C, Rodriguez-Jasso RM, Gomes N, Teixeira JA, Belo I (2010). Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods,* 2:2046–2048.

Janusz G, Pawlik A, Sulej J, Świderska-Burek U, Jarosz-Wilkolazka A, Paszczyński A (2017). Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol Rev,* 41:941–962.

López-Gutiérrez I, Razo-Flores E, Méndez-Acosta HO, Amaya-Delgado L, Alatriste-Mondragón F (2021). Optimization by response surface methodology of the enzymatic hydrolysis of non-pretreated agave bagasse with binary mixtures of commercial enzymatic preparations. *Biomass Convers Biorefin*, 11:2923–2935.

Saini JK, Saini R, Tewari L (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech,* 5:337–353.

Saritha M, Arora A, Nain L (2012). Pretreatment of paddy straw with *Trametes hirsuta* for improved enzymatic saccharification. *Bioresour Technol,* 104:459–465.

Sun FH, Li J, Yuan YX, Yan ZY, Liu XF (2011). Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsuta* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover. *Int Biodeterior Biodegradation,* 65:931–938.

Zoghlami A, Paës G (2019). Lignocellulosic biomass: Understanding recalcitrance and predicting hydrolysis. *Front Chem,* 7:1–11.

INVESTIGATE THE EFFECTIVENESS OF FUNGAL PRETREATMENT AND ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WHEAT STRAW WITH A MIXTURE OF COMMERCIAL ENZYMATIC PREPARATIONS

Duong Hieu Linh[1*], Dietmar Schlosser[2]

[1]*Vietnamese-German University (VGU), Ring Road 4, Quarter 4, Thoi Hoa Ward, Ben Cat City, Binh Duong Province, Vietnam*

[2]*Department of Applied Microbial Ecology, Helmholtz-Centre for Environmental Research - UFZ, Permoserstraβe 15, 04318 Leipzig, Germany*

SUMMARY

Solid-state fermentation using fungi could directly convert lignocellulosic by-products and waste from agriculture and forestry into useful chemicals, building blocks, biosurfactant molecules, composite materials and bioenergy within the frame of biorefinery applications, or simply be used for mushroom production. Fungal pretreatment of lignocellulosic agricultural wastes and their qualification for biorefinery purposes is environmentally friendly and concomitantly combines advantages such as mild reaction conditions, the specificity of enzymatic hydrolysis, no inhibitor formation, and low energy requirements. Lignocellulosic biomass has the different composition and chemical characteristics, thus, it is necessary to determine the effectiveness of enzymatic hydrolysis for each type of biomass. Although the mixtures of commercial enzymatic preparations have shown the capabilities to hydrolyze lignocellulosic biomass, the effectiveness of the enzymatic hydrolysis of the mixtures on wheat straw has not yet been evaluated. Therefore, the present study aims to investigate the effectiveness of the saccharification of wheat straw through the enzymatic hydrolysis by the use of a mixture of commercial enzymatic preparations (namely Celluclast 1.5 L/ Viscozyme L). Moreover, the impact of the mixture on fungal pretreated wheat straw is also assessed. Our experimental results showed that enzymatic hydrolysis with the mixture of Celluclast 1.5 L/Viscozyme L should be applied at the solid loading of 2.5% (w/v). Pretreatment with *Stropharia rugosoannulata* results in a significantly higher sugar amount than the control, with 63.0 and 32.6 mg/g dry mass, respectively.

Keywords: Agricultural wastes, commercial enzymatic preparations, enzymatic hydrolysis, fungal pretreatment, lignocellulose.

[*] Author for correspondence: Tel: 906464666; Email: linh.duong@vgu.edu.vn

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA CỦA TINH DẦU CÂY BÁCH XANH (*Calocedrus macrolepis* Kurz) TẠI KHU BẢO TỒN THIÊN NHIÊN PÙ HUỐNG, NGHỆ AN

Trần Đức Dũng[1*], Nguyễn Quốc Bình[2], Trần Đình Thắng[3]

[1]*Ban quản lý Khu bảo tồn thiên nhiên Pù Huống*

[2]*Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

[3]*Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh*

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, tinh dầu Bách xanh (*Calocedrus macrolepis* Kurz) thu hái ở Khu bảo tồn thiên nhiên (BTTN) Pù Huống, Nghệ An đã được xác định thành phần hóa học bằng hệ thống sắc ký khí ghép nối khối phổ (GC/MS). Kết quả phân tích có tổng số 30 hợp chất được xác định. Trong đó, nhóm chất chính là oxygenated monoterpene chiếm 71,5%. Các hợp chất chính có trong tinh dầu Bách xanh bao gồm methyl cumate (32,7%), α-terpineol (12,4%), 2-methoxybenzyl alcohol, n-propyl ether (11%) và myrtenoic acid (10,5%). Ngoài ra, dựa trên thử nghiệm hoạt tính kháng (Chống – Oxi hóa) DPPH, tinh dầu Bách xanh thể hiện khả năng kháng oxy hoá với giá trị IC_{50} = 3,19 ± 0,38 mg/mL (đối chứng dương, ascorbic acid có giá trị IC_{50} = 0,02 mg/mL). Trong nghiên cứu hiện tại của chúng tôi, lần đầu tiên hoạt tính kháng oxy hóa của tinh dầu Bách xanh (*C. macrolepis*) ở Việt Nam được công bố. Kết quả nghiên cứu cũng góp phần cung cấp thông tin khoa học về hoá thực vật, hoạt tính sinh học và sự đa dạng về nguồn thực vật của Khu BTTN Pù Huống, tỉnh Nghệ An.

Từ khóa: Bách Xanh (*Calocedrus macrolepis* Kurz), Hoạt tính kháng oxi hóa, Khu bảo tồn thiên nhiên Pù Huống, thành phần hóa học tinh dầu.

MỞ ĐẦU

Nằm trong hệ thống các khu rừng đặc dụng của Việt Nam, Khu BTTN Pù Huống cùng với Vườn quốc gia Pù Mát, Khu BTTN Pù Hoạt là vùng lõi quan trọng của khu dự trữ sinh quyển Miền Tây Nghệ An. Khu BTTN Pù Huống là nơi trú ẩn và phân bố của các loài động, thực vật quý hiếm. Bách xanh (*Calocedrus macrolepis* Kurz) thuộc họ Hoàng Đàn (Cupressaceae) ngành Thông (Pinophyta) được ghi nhận phân bố ở Ấn Độ, Đông bắc Mianma, Thái Lan, Lào, Mỹ (Nam Caliphonia), Đài Loan, Đông Nam Trung Quốc và ở Việt Nam phân bố chủ yếu ở Lào Cai, Sơn La (Yên Châu: Mường Lựm, Vân Hồ), Hà Giang, Hoà Bình (Mai Châu: Hang Kia, Pà Cò; Đà Bắc), Hà Tây (Ba Vì), Đắk Lắk (Krông Bông: Chư Yang Sinh), Lâm Đồng (Đà Lạt, Bì Đúp), Khánh Hoà (Nha Trang, Hòn Bà), Ninh Thuận, Nghệ An (Khu BTTN Pù Huống, Khu BTTN Pù Hoạt). Trên thế giới Chi Bách xanh (*Calocedrus*) có khoảng 3 loài và 1 thứ là *Calocedrus decurrens, Calocedrus macrolepis, Calocedrus macrolepis* var. *formosana*, *Calocedrus rupestris* (Fajon, 2005; Fu *et al.,* 1999). Bách xanh là loài thực vật quý hiếm có trong sách Đỏ Việt Nam 2007 với cấp cần bảo vệ là nguy cấp. Bách xanh cho gỗ có giá trị do vân đẹp, thớ thẳng, chịu mối mọt, dễ gia công. Gỗ được sử dụng cho xây dựng, làm bàn tủ, đồ gỗ văn phòng và đồ mỹ nghệ. Gỗ còn được dùng làm hương liệu và chiết tinh dầu.

Hình ảnh về cây Bách xanh được minh hoạ ở Hình 1.

Hình 1. Bách xanh (*C. macrolepis*) ở khu BTTN Pù Huống, Nghệ An

Cho đến nay đã có một số tài liệu nghiên cứu về thành phần hóa học tinh dầu Bách xanh. Nghiên cứu của Adams và đồng tác giả (2006) đã cho thấy thành phần hóa học chủ yếu của tinh dầu từ lá ở loài *Calocedrus decurrens* là δ-3-carnen (20,2%) và limonen (23,6%), ở loài *Calocedrus macrolepis* thành phần chính là α-pinen (67,1%) và mycren (11,2%); và ở thứ *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* là α-pinen (57,2%) và limonen (13,9%). Trong một nghiên cứu khác, Cheng và đồng tác giả (2008) đã nghiên cứu hoạt tính sinh học từ vỏ thân của loài *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* và cho biết chúng có khả năng chống oxy hóa mạnh. Wang và đồng tác giả (2006) phân tích tinh dầu một số loài hạt trần ở Đài Loan trong đó loài Bách xanh (*Calocedrus macrolepis)* có thành phần hóa học chính của tinh dầu là β-elemen (15,8%), γ-cadinen (12,1%), α-pinen (11,1%) và limonen (10,8%). Ở Việt Nam, Nguyễn Quang Hưng và đồng tác giả (2011) đã báo cáo thành phần hóa học chủ yếu của tinh dầu từ cành loài *Calocedrus decurrens* thu hái tại Hà Giang gồm có các thành phần chính là axít benzoic (23,3%) và dodecan-7-ol (14,6%). Các nghiên cứu khoa học hiện đại đã chỉ ra rằng, cây Bách xanh có chứa tinh dầu với nhiều hoạt tính sinh học quý, như hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxy hóa, ức chế enzyme, kháng nấm (Chang *et al.,* 2008; Shyu *et al.,* 2023). Trong nghiên cứu hiện tại của chúng tôi, thành phần hoá học và hoạt tính kháng oxy hoá của tinh dầu Bách xanh thu hái ở Khu BTTN Pù Huống, Nghệ An đã được báo cáo. Nghiên cứu góp phần cung cấp cơ sở dữ liệu cho loài thực vật này ở Khu BTTN Pù Huống, Nghệ An.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Cành và thân của loài Bách xanh (*Calocedrus macrolepis*) được thu hái ở Khu BTTN Pù Huống (khu vực huyện Tương Dương, tỉnh Nghệ An) vào tháng 5 năm 2023. Mẫu thực vật được định danh bởi Tiến sĩ Nguyễn Quốc Bình (Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam). Tiêu bản của loài này (số hiệu PH26) hiện đang được lưu trữ tại Ban quản lý Khu bảo tồn thiên nhiên Pù Huống.

Phương pháp nghiên cứu

Chưng cất tinh dầu

Mẫu để chưng cất tinh dầu là cành và thân cây Bách xanh (*C. macrolepis*). Mẫu nghiên cứu (3,0 kg tươi) được làm sạch, cắt nhỏ, để khô tự nhiên trong bóng râm. Sau khi đã khô, mẫu nghiên cứu được chưng cất theo phương pháp lôi cuốn hơi nước sử dụng bộ chưng cất tinh dầu Clevenger ở áp suất thường đến khi thu được lượng tinh dầu tối đa (khoảng 4 giờ), theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V (2017).

Xác định hiệu suất chưng cất tinh dầu

Tinh dầu của cành và thân cây Bách xanh được xác định hàm lượng theo phương pháp I (Dược điển Việt Nam V, 2017). Hàm lượng tinh dầu tươi được tính theo công thức:

$$X\ (\%) = \frac{a}{b} \times 100\ (\%)$$

Trong đó: a là khối lượng của tinh dầu tính bằng gam; b là khối lượng của mẫu tính bằng gam.

Tinh dầu được làm khô bằng Na_2SO_4 khan (Merck). Sau đó tinh dầu được đựng trong các lọ tiêu chuẩn đậy kín, bảo quản ở 0-5^oC trước khi phân tích.

Phân tích và xác định thành phần hoá học

Thành phần hóa học của cành và thân cây Bách xanh được phân tích trên hệ thống sắc ký khí ghép khối phổ (GC/MS) của hãng Agilent Technologies, bao gồm thiết bị sắc ký khí GC 7890B ghép nối thiết bị khối phổ MS 5977BƠ. Cột sắc ký sử dụng là cột HP-5MS Ultra Inert có kích thước 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm. Helium (He) được sử dụng làm khí mang với tốc độ 1,0 mL/phút. Mẫu tinh dầu được pha loãng trong dung môi dichloromethan (CH_2Cl_2) theo tỉ lệ thể tích là 1/100, sau đó được bơm (1,0 µL) vào hệ thống sắc ký khí GC theo tỉ lệ chia 25/1. Chương trình nhiệt được thiết lập như sau: Ban đầu, nhiệt độ lò GC được giữ ở 60°C trong 3 phút, sau đó tăng lên 180°C với tốc độ 3°C/phút, tiếp tục tăng lên 240°C với tốc độ 5°C/phút và cuối cùng giữ nhiệt độ ở 240°C trong 5 phút.

Thành phần hoá học của tinh dầu được xác định dựa trên sự so sánh chỉ số lưu giữ (RI) kết hợp với phổ khối định danh sử dụng thư viện NIST17 và tài liệu tham khảo (Dai *et al.,* 2013). Thành phần phần trăm của mỗi chất trong mẫu tinh dầu được định lượng bằng cách chia diện tích pic tương ứng của chúng cho tổng diện tích pic của tất cả các thành phần, sau đó nhân kết quả với 100 (Fajon, 2005). Quá trình xử lý số liệu được thực hiện trên phần mềm Qualitative Navigator (Version B.08.00).

Xác định hoạt tính kháng oxy hóa

Hoạt tính kháng oxy hoá của mẫu tinh dầu được đánh giá thông qua khả năng bắt giữ gốc tự do (DPPH) thực hiện bằng phương pháp quang phổ UV, chất chuẩn là ascorbic acid.

Nguyên tắc: Phương pháp dựa trên phản ứng các chất kháng oxy hóa có trong mẫu thử với gốc DPPH*, chất kháng oxy hóa sẽ khử DPPH* (màu tím) thành DPPH (màu vàng nhạt) làm giảm độ hấp thu.

Các bước thực hiện:

- Chuẩn bị dung dịch DPPH: Cân 0,012 g DPPH, hòa tan trong methanol trong bình định mức. Khuấy trong 30 phút đến khi tan hết, hạn chế tiếp xúc ánh sáng. Định mức lại bằng methanol. Bảo quản ở nhiệt độ lạnh (4ºC), và sử dụng trong 3 tuần.

- Chuẩn bị dung dịch chuẩn: ascorbic acid được pha loãng trong nước ở các nồng độ 0-100 µg/mL.

- Chuẩn bị mẫu: mẫu tinh dầu được pha loãng bằng DMSO thành dãy nồng độ phù hợp.

- Mẫu hoặc chất đối chứng sẽ được phản ứng với dung dịch DPPH theo tỉ lệ 1/1, thực hiện ở nhiệt độ phòng, thời gian 30 phút, trong bóng tối. Sau đó hỗn hợp phản ứng được đo quang phổ hấp thu ở bước sóng 517 nm.

- Khả năng bắt giữ gốc tự do được tính theo công thức sau:

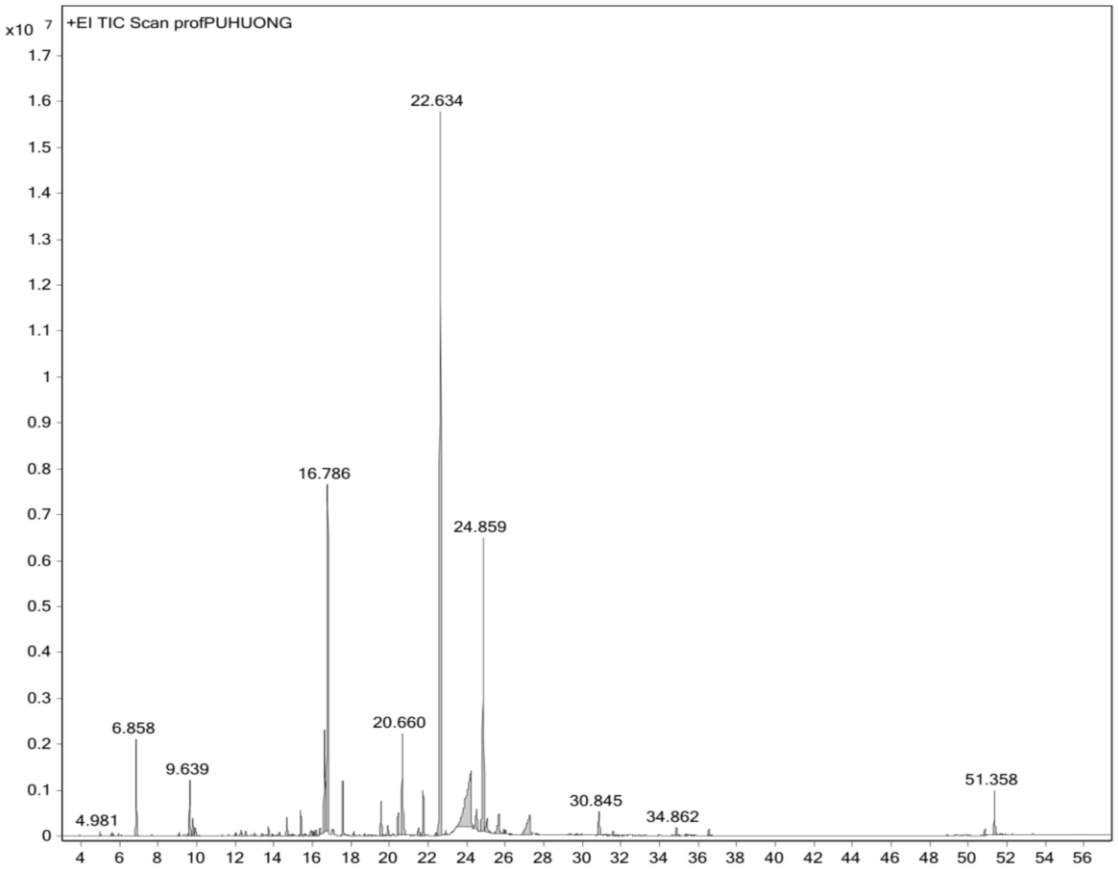
$$\text{Tỉ lệ \% hoạt tính bắt gốc tự do DPPH} = \frac{\text{OD (a)-OD (b)}}{\text{OD (a)}} \times 100$$

Trong đó, OD (a): giá trị mật độ quang OD của chứng âm; OD (b): giá trị mật độ quang OD của mẫu. Giá trị IC_{50} là nồng độ mẫu (mg/mL) có khả năng ức chế 50% gốc tự do, với giá trị IC_{50} càng thấp, hoạt tính kháng oxy hóa càng cao.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thành phần hóa học của tinh dầu Bách xanh

Tinh dầu Bách xanh có dạng lỏng, nhẹ hơn nước, màu vàng nhạt, mùi thơm đặc trưng. Hàm lượng tinh dầu được tính theo nguyên liệu khô là 0,35%. Sắc khí đồ GC và thành phần hoá học của tinh dầu được trình bày ở Hình 2 và Bảng 1 sau đây:



Hình 2. Sắc ký đồ GC của tinh dầu Bách xanh (*Calocedrus macrolepis*) ở Pù Huống

Kết quả phân tích GC/MS cho thấy có tổng số 30 hợp chất đã được xác định, chiếm 91,8% thành phần các hợp chất bay hơi.

Bảng 1. Thành phần hóa học của tinh dầu Bách xanh tại Pù Huống, Nghệ An

STT	RT	RI (a)	RI (b)	Hợp chất	%
1	5,588	907	908	2-Bornene	0,1
2	6,858	950	950	α-Fenchene	2,6
3	9,078	1011	1011	3-Carene	0,1
4	9,542	1024	1023	m-Cymene	0,1
5	9,639	1027	1025	p-Cymene	1,7
6	9,793	1031	1030	Limonene	0,5
7	9,919	1034	1032	Eucalyptol	0,3
8	12,014	1084	1082	Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethenyl)-	0,1
9	12,305	1090	1090	p-Cymenene	0,2
10	12,551	1095	1094	Methyl benzoate	0,2
11	12,986	1105	1103	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 7,7-dimethyl-	0,1
12	14,669	1146	1143	2-Bornanone	0,6
13	15,390	1162	1160	(E)-Pinocamphone	0,9
14	15,985	1175	1170	Isoneral	0,2
15	16,076	1177	1173	Isocamphopinone	0,2
16	16,151	1178	1177	Terpinen-4-ol	0,3
17	16,625	1188	1183	p-Cymen-8-ol	3,7
18	16,786	1191	1189	α-Terpineol	12,4
19	17,564	1208	1204	Verbenone	2,1
20	19,549	1255	1253	Piperitone	1,2
21	19,698	1258	1255	Carvenone	0,1
22	20,436	1275	1276	Phellandral	0,8
23	20,660	1279	1273	4-Thujen-2-α-yl acetate	3,9
24	21,735	1302	1299	Carvacrol	1,6
25	22,634	1325	1321	Methyl cumate	32,7
26	24,224	1362	1359	Myrtenoic acid	10,5
27	24,859	1377	1383	2-Methoxybenzyl alcohol, n-propyl ether	11
28	27,257	1434	1426	Benzenemethanol, 4-hydroxy-	2,3
29	30,845	1523	1518	β-Cadinene	1
30	36,555	1674	1674	Cadalene	0,3
Các hợp chất monoterpene hydrocarbon					5,3
Các hợp chất oxygenated monoterpene					71,5
Các hợp chất sesquiterpene hydrocarbon					1,3
Các hợp chất khác					13,7
Tổng (%)					**91,8**

Chú thích: STT: số thứ tự; RT: thời gian lưu (phút); RI (a): chỉ số lưu giữ thực nghiệm; RI (b): chỉ số lưu giữ tham khảo.

Cụ thể, nhóm chất oxygenated monoterpene chiếm hàm lượng lớn nhất trong tinh dầu Bách xanh với 71,5%. Các nhóm chất khác bao gồm monoterpene hydrocarbon (5,3%), nhóm chất sesquiterpene hydrocarbon (1,3%) và các hợp chất khác (13,7%). Các hợp chất chính (> 5%) của tinh dầu Bách xanh thu hái ở Pù Huống, Nghệ An là methyl cumate (32,7%), α-terpineol (12,4%), 2-methoxybenzyl alcohol, n-propyl ether (11%) và myrtenoic acid (10,5%). Bên cạnh đó, một số hợp chất đáng chú ý khác (> 2%) bao gồm 4-thujen-2-α-yl acetate (3,9%), p-cymen-8-ol (3,7%), α-fenchene (2,6%), benzenemethanol, 4-hydroxy- (2,3%) và verbenone (2,1%).

Các kết quả nghiên cứu về thành phần hoá học tinh dầu Bách xanh trong nghiên cứu hiện tại của chúng tôi và các nghiên cứu trước đây có một số điểm khác biệt. Ví dụ, tinh dầu của lá Bách xanh ở rừng thực nghiệm của Đại học Quốc gia Đài Loan có các thành phần chính là a-pinene (44,2%), limonene (21,6%), b-myrcene (8,9%), b-caryophyllene (8,2%) (Chang *et al.,* 2008). Trong khi đó, tinh dầu lá Bách xanh ở núi Dalong, Miaoli, Đài Loan gồm có α-pinene (36,4%), limonene (23,6%); tinh dầu cành cây gồm có α-pinene (36,2%), ferruginol (22,5%) và limonene (13,1%) (Shyu *et al.,* 2023). Tinh dầu gỗ Bách xanh thu hái ở tỉnh Khánh Hoà, Việt Nam có các thành phần chính là α-terpineol (11,6%) và myrtenal (10,6%), bornyl acetate (5,6%) và carvacrol methyl ester (5,6%) (Dai *et al.,* 2013). Trong khi đó, tinh dầu cành Bách xanh ở tỉnh Hà Giang, Việt Nam có các thành phần chính là benzoic acid (23,3%), dodecan-7 ol (14,6%), triethylenehexane (7,3%), α-terpineol (6,6%) và 1,3-cyclooctadiene (5,8%) (Hung *et al.,* 2011). Sự khác biệt về thành phần hoá học tinh dầu Bách xanh giữa các nghiên cứu có thể do các yếu tố sau: thời gian và địa điểm thu mẫu, phương pháp chưng cất tinh dầu, ...

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng oxy hoá bằng thử nghiệm DPPH

Khả năng kháng oxy hóa là một trong các đặc tính sinh học quan trọng của tinh dầu. Kết quả xác định khả năng kháng oxy hóa bằng thử nghiệm DPPH của mẫu tinh dầu Bách xanh ở Khu BTTN Pù Huống, Nghệ An được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Hoạt tính kháng oxy hoá của mẫu tinh dầu Bách xanh

Nồng độ (mg/mL)	% Ức chế gốc tự do	IC_{50} (mg/mL)
0,5	0,36 ± 0,01	3,19 ± 0,38
1,0	12,48 ± 0,17	
2,0	29,84 ± 0,42	
4,0	64,35 ± 0,21	

Trong nghiên cứu hiện tại của chúng tôi, hoạt tính kháng oxy hoá của tinh dầu Bách xanh thu hái tại Pù Huống, Nghệ An có giá trị IC_{50} = 3,19 ± 0,38 mg/mL, cao hơn nhiều so với đối chứng dương (ascorbic acid) có giá trị IC_{50} = 0,02 mg/mL. Giá trị này cũng cao hơn đối với tinh dầu Bách xanh ở Miaoli, Đài Loan (IC_{50} = 0,12 mg/mL) trong một nghiên cứu trước đây (Adam *et al.,* 2006). Sự khác nhau về hoạt tính sinh học của các mẫu tinh dầu phụ thuộc vào thành phần và hàm lượng phần trăm của các hợp chất có trong các mẫu tinh dầu nghiên cứu.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu nhằm xác định thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa của tinh dầu Bách xanh thu hái ở Khu BTTN Pù Huống, tỉnh Nghệ An. Kết quả nghiên cứu cho thấy các thành phần hóa học chính của tinh dầu Bách xanh bao gồm methyl cumate (32,7%), α-terpineol (12,4%), 2-methoxybenzyl alcohol, n-propyl ether (11%) và myrtenoic acid (10,5%). Bên cạnh đó, kết quả thử nghiệm DPPH cho thấy tinh dầu này có hoạt tính kháng oxy hóa với giá trị IC_{50} = 3,19 ± 0,38 mg/mL. Nghiên cứu hiện tại của chúng tôi góp phần bổ sung thêm bằng chứng khoa học cho loài Bách xanh ở Việt Nam, đồng thời đóng góp thêm cơ sở cho các loài thực vật có giá trị ở Khu BTTN Pù Huống, tỉnh Nghệ An.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Adams RP, Sanko N, Chang-Fu H, Guyan K (2006). The Leaf Essential Oils of the Genus Calocedrus. *J Essent Oil Res*, 18(11): 554-558.

Adams RP. (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. *Allured publishing corporation*.

Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007). *Sách Đỏ Việt Nam (phần Thực vật),* NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.

Chang HT, Cheng YH, Wu CL, Chang ST, Chang TT, Su YC (2008). Antifungal activity of essential oil and its constituents from Calocedrus macrolepis var. formosana Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresour Technol,* 99(14), 6266-6270.

Cheng SS, Wu CL, Chang HT, Kao YT, Chang ST (2004). Antitermitic and antifungal activities of essential oil of Calocedrus formosana leaf and its composition. *J Chem Ecol*, 30(10):1957-1967.

Dai DN, Thang TD, Thai TH, Thanh BV, Ogunwande IA (2013). Composition of the wood oils of Calocedrus macrolepis, Calocedrus rupestris and Cupressus tonkinensis (Cupressaceae) from Vietnam. *Am J Ess Oils Nat prod*, 1(1): 28-33.

Fajon A (2005). A monograph of Cupressaceae and Sciandopitys, *Royal Botanic Gardens Press, Kew, London*.

Hung NQ, Thai TH, Laffont-Schwob I (2011). Chemical composition of the essential oil of Calocedrus macrolepis Kurz from Ha Giang province. *Academia Journal of Biology*, 33(2), 57-59.

Fu LK, Yu YF, Farjon A (1999). Cupressaceae. In: Wu ZY, Raven PH, eds. Flora of China 4. *Beijing: Science Press, & St. Louis: Missouri Botanical Garden Press.*

Shyu JG, Hsu KP, Yang ML, Hsu CK, Wei LY, Ho HT, Ho CL (2023). Chemical Composition and In Vitro Antimicrobial, Antioxidant, and Tyrosinase-Inhibiting Activity of Essential Oils Extracted From the Leaves and Twigs of Calocedrus macrolepis var. formosana. *Nat Prod Commun*, 18(8), 1934578X231189159.

Thu NT, Tran-Trung H, Huong HTD, Manh DH, Van Trung H, Tuan NH, Ha DT (2024). Chemical compositions and cytotoxicity effects of essential oils from the leaves and pseudo-stems of Curcuma zedoaroides Chaveer. & Tanee collected in Vietnam. *J Biol Active Prod Nature*, 14(2), 161-170.

Wang SY, Wang YS, Tseng YH, Lin CT, Liu CP (2006). Analysis of fragrance compositions of precious coniferous woods grown in Taiwan. *Holzforschung*, 60: 528-532.

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Calocedrus macrolepis* Kurz FROM PU HUONG NATURE RESERVE, NGHE AN PROVINCE

Tran Duc Dung[1*], Nguyen Quoc Binh[2], Tran Dinh Thang[3]

[1]Management Board of Pu Huong Nature Reserve, Nghe An, Vietnam;

[2]Viet Nam Academy of Science and Tecnology;

[3]Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam

SUMMARY

The present study aimed to investigate the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Calocedrus macrolepis* branches and stems collected in Pu Huong Nature Reserve. A total of 30 compounds were identified (accounting for 91.8%) of total essential oil content. Oxygenated monoterpene was identified as the major group. Among them, methyl cumate (32.7%), α-terpineol (12.4%), 2-methoxybenzyl alcohol, n-propyl ether (11%) and myrtenoic acid (10.5%) were the main constituents of the essential oil of *Calocedrus macrolepis* branches and stems. Further, the antioxidant activity of the essential oil of *Calocedrus macrolepis* branches and stems was studied using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The essential oil showed average antioxidant activity with IC50 values of 3,19 ± 0,38 mg/mL mg/mL. This is the first report on the antioxidant activity of *Calocedrus macrolepis* essential oil from Vietnam.

Keywords: Bach Xanh (*Calocedrus macrolepis* Kurz), Antioxidant activity, Pu Huong Nature reserve, chemical compostiton of the essential oil.

[*] Author for correspondence: Tel: 0973072168; Email: trandung.ph@gmail.com

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CHIẾU XẠ TIA GAMMA NGUỒN Co60 ĐẾN HÌNH THÀNH RỄ THỨ CẤP VÀ TÍCH LŨY HỢP CHẤT THỨ CẤP CỦA RỄ CÂY ĐẢNG SÂM (*Codonopsis javanica*) NUÔI CẤY *IN VITRO*

Lê Thị Thúy*, Trịnh Thị Hương, Tạ Nguyễn Minh Hằng, Đỗ Thanh Như

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Việc sản xuất một số hợp chất thứ cấp quan trọng từ thực vật bằng chiếu xạ tia gamma là một lĩnh vực đang được quan tâm. Nghiên cứu được thực hiện để đánh giá ảnh hưởng của cường độ tia gamma nguồn Co60 (20, 40 và 60 Gy) lên tỷ lệ sống, khả năng tạo rễ thứ cấp và hàm lượng hợp chất thứ cấp từ sinh khối rễ của cây đảng sâm *in vitro* chiếu xạ. Kết quả cho thấy, ở các liều chiếu xạ tăng dần, tỷ lệ sống, tỷ lệ mẫu tạo rễ và số rễ trên mẫu giảm dần. Khi rễ thứ cấp được chuyển sang môi trường nuôi cấy lỏng, hệ số tăng sinh của rễ ở các nồng độ chiếu xạ đều giảm so với mẫu đối chứng. Mặc dù ở các cường độ chiếu xạ, khả năng tạo rễ và tăng sinh của rễ giảm nhưng khả năng tích lũy một số hợp chất thứ cấp quan trọng có trong rễ cây đảng sâm có xu hướng tăng. Hàm lượng saponin tổng số ở cường độ chiếu xạ từ 20 Gy đến 40 Gy tăng gấp 2 lần và hàm lượng polysaccharide ở cường độ 20 Gy cao hơn 1,2 lần so với mẫu đối chứng.

Từ khóa: *Codonopsis javanica*, Co60, nuôi cấy *in vitro*, Gy, tia gamma, hợp chất thứ cấp, rễ thứ cấp.

MỞ ĐẦU

Đảng sâm (*Codonopsis javanica*) là một loài cây có giá trị dược liệu cao và được xem như là "nhân sâm của người nghèo" vì có tác dụng chữa bệnh tương tự như nhân sâm nhưng giá rẻ hơn nhân sâm. Trong y học cổ truyền, đảng sâm có tác dụng tăng cường sức khỏe, kích thích miễn dịch, dùng làm thuốc bổ dạ dày, bổ máu, chán ăn, lợi tiểu, chữa ho, tiêu đờm (Đỗ Tất Lợi, 2006). Ngoài ra, dịch chiết từ củ của *C. javanica* có tác dụng hỗ trợ hạ đường huyết và chữa bệnh đái tháo đường (Chen *et al*., 2013). Theo nghiên cứu của He và đồng tác giả (2014), các loài đảng sâm chứa các hoạt chất chính là polyacetylene, polysaccharide, phenylpropanoid, alkaloid, triterpenoid. Trong những năm qua, nguồn cung cấp cây dược liệu quý đảng sâm phụ thuộc vào khai thác từ tự nhiên và trồng tự phát của người dân địa phương. Do khai thác quá mức và nạn phá rừng, số lượng cây thuốc ngày càng giảm. Trong Sách Đỏ Việt Nam, đảng sâm được xếp vào danh sách loài "sẽ nguy cấp" (bậc V). Trước tình trạng ngày càng cạn kiệt nguồn nguyên liệu tự nhiên, nuôi cấy tế bào, mô và cơ quan thực vật là một trong những phương pháp được quan tâm nghiên cứu, đặc biệt là phương pháp nuôi cấy thu nhận sinh khối rễ để thu nhận hợp chất thứ cấp có giá trị. Rễ thứ cấp là rễ được hình thành từ các vùng ngoại vi của trụ bì trưởng thành của rễ. Sơ khởi của rễ thứ cấp phát triển thông qua một chương trình phân chia tế bào rất đặc trưng để tạo ra một cấu trúc y như khuôn mẫu của rễ chính (Dương Tấn Nhựt, 2011). Nuôi cấy rễ *in vitro* trong môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp sẽ giúp thu nhận sinh khối lớn trong thời gian ngắn, tuy nhiên ngoài việc gia tăng sinh khối rễ, sự tích lũy các hợp chất thứ cấp cũng đóng vai trò hết sức quan trọng. Trên thực tế, rễ nuôi cấy *in vitro* có hàm lượng dược chất thấp hơn nhiều so với rễ thu ngoài tự nhiên.

Trong các biện pháp khác nhau với mục đích gia tăng hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy *in vitro*, ảnh hưởng của bức xạ gamma được các nhà khoa học rất quan tâm trong thời gian gần đây. Chiếu xạ tia gamma kích thích sản xuất các gốc oxy hóa tự do có nguồn gốc từ oxy dẫn đến stress oxy hóa (Villegas *et al*., 2023), kết quả thực vật thực hiện các phản ứng thích nghi như tăng cường điều chỉnh bằng cách tạo ra nhiều loại enzyme bảo vệ và chất chống oxy hóa, nhiều loại trong số đó tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp, từ đó làm giảm bớt tình trạng stress oxy hóa gây ra (Dương Tấn Nhựt, 2011). Một số nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng việc xử lý bằng chiếu xạ tia gamma làm tăng đáng kể hàm lượng của các hợp chất thứ cấp trong tế bào. Hàm lượng ginsenoside tổng số ở các dòng tế bào rễ bất định cây nhân sâm (*Panax ginseng* Meyer) khi chiếu xạ ở liều lượng 20 Gy cao hơn 4,2 lần so với đối chứng (Le *et al*., 2019). Mô sẹo được tạo ra từ lá cây *Hypericum triquetrifolium* Turra được chiếu xạ với liều 10 Gy cho thấy hàm lượng hypericin và pseudohypericin cao hơn so với mẫu đối chứng (Azeez *et al*., 2017). Hàm lượng phenolic tổng và hàm lượng flavonoid tổng tăng lần lượt 5 và 5,6 lần trong mô sẹo 4 tuần tuổi của cây hương thảo (*Rosmarinus officinalis* L.) được chiếu xạ với liều 20 Gy (EI-Betagi *et al*., 2011).

Hiện nay, những nghiên cứu về ảnh hưởng của tia gamma nguồn cobalt 60 lên hình thành rễ thứ cấp và tích lũy hợp chất thứ cấp của rễ cây đảng sâm (*C. javanica*) chưa được nghiên cứu rộng rãi. Đề tài được thực hiện mục đích xác định liều chiếu xạ thích hợp cho việc hình thành rễ thứ cấp và tích lũy hợp chất thứ cấp của rễ cây đảng sâm nuôi cấy *in vitro*, bước đầu làm cơ sở cho việc nuôi cấy sinh khối rễ cây đảng sâm ở quy mô lớn.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Cây đảng sâm hoàn chỉnh có đầy đủ lá, thân, rễ được cung cấp từ Phòng Công nghệ Tế bào – Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh, cây có chiều cao 8 cm, đường kính chồi 1,5 mm và được nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar được sử dụng làm nguyên liệu để chiếu xạ.

Cây đảng sâm *in vitro* được chiếu xạ tia gamma nguồn Co60 (cobalt 60) tại Phòng Công nghệ Sinh học vật liệu và nano, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh. Cường độ tia gamma được sử dụng cho thí nghiệm ở các liều 0 (đối chứng), 20, 40, 60 Gy (Gray).

Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của cường độ tia gamma đến tỷ lệ sống và khả năng tạo rễ thứ cấp từ rễ của cây đảng sâm in vitro chiếu xạ

Sử dụng bộ phận rễ của cây đảng sâm *in vitro* (cây đã được chiếu xạ), rễ *in vitro* được cắt với chiều dài 1 cm được cấy vào môi trường MS bổ sung 8,0 g/L agar, 30 g/L sucrose và 0,5 mg/L IBA (Trinh *et al*., 2021). Mẫu cấy được nuôi cấy trong điều kiện tối, ở nhiệt độ 22±2°C và độ ẩm 40%. Theo dõi và đánh giá tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu tạo rễ, số rễ/mẫu và hình thái rễ sau 45 ngày nuôi cấy.

Ảnh hưởng của cường độ tia gamma đến khả năng tăng sinh rễ

Mẫu rễ từ thí nghiệm 1 với khối lượng 0,5 g được chuyển sang môi trường MS lỏng có bổ sung 0,5 mg/L IBA, 50 g/L sucrose, pH 5,8. Mẫu được đặt trên máy lắc với tốc độ lắc 120 vòng/phút trong điều kiện tối, nhiệt độ 22±2°C và độ ẩm 40%. Sau 30 ngày nuôi cấy tiến hành theo dõi khối lượng tươi của rễ (g)/ bình nuôi cấy và hệ số nhân nhanh (lần).

Hệ số nhân nhanh (lần) = (KLT rễ thu được – KLT rễ ban đầu)/ KLT rễ ban đầu (*KLT: khối lượng tươi*).

Định lượng hợp chất thứ cấp trong sinh khối rễ

Chuẩn bị dịch chiết: Nghiền 1 g sinh khối rễ được nuôi cấy sau 30 ngày, sau đó ngâm rễ đã nghiền với 10 mL dung môi ethanol 70%, ủ trong tủ ấm nhiệt độ 50°C trong 2 giờ. Mẫu được ly tâm ở 10.000 vòng/phút và hút dịch để thu được dịch chiết ethanol thô. Tiến hành định lượng polyphenol, polysaccharide và saponin tổng số từ dịch chiết ethanol thô.

Định lượng polyphenol tổng số: Hàm lượng polyphenol tổng số được xác định theo phương pháp Folin-Ciocalteu (Folin, Ciocalteu, 1927), mẫu được đo ở mật độ quang có bước sóng 765 nm. Hàm lượng polyphenol được tính dựa trên đường chuẩn acid galic (GAE).

Định lượng polysaccharide tổng số: Hàm lượng polysaccharide trong mẫu được xác định theo phương pháp phenol-acid sulfuric (Masuko *et al*., 2005), mẫu được tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 490 nm. Hàm lượng polysaccaride được tính dựa trên đường chuẩn glucose.

Định lượng saponin tổng số: Hàm lượng saponin tổng số được xác định tại Trung tâm Phân tích Quốc tế - Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh, dựa trên phương pháp quang phổ sử dụng chất chuẩn acid oleanolic và được tính bằng đơn vị mg oleanolic/g nguyên liệu.

Xử lý thống kê

Mỗi nghiệm thức của thí nghiệm được lặp lại 5 lần, các số liệu thí nghiệm được phân tích thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion XVI, sử dụng trắc nghiệm phân hạng LSD với độ tin cậy 95%. Sử dụng thống kê tương quan Pearson để tìm mối tương quan giữa cường độ chiếu xạ với khả năng năng sinh rễ và khả năng tích lũy hợp chất thứ cấp của rễ thứ cấp cây đảng sâm *in vitro* chiếu xạ bằng phần mềm thống kê IBM SPSS.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả ảnh hưởng của của cường độ tia gamma lên khả năng hình thành rễ và tăng sinh rễ thứ cấp của cây đảng sâm *in vitro*

Kết quả ở Bảng 1 và Hình 1 đã cho thấy ảnh hưởng của các liều chiếu xạ khác nhau đến tỷ lệ sống, khả năng tạo rễ thứ cấp và hình thái rễ của cây đảng sâm *in vitro* được chiếu xạ. Mặc dù liều chiếu xạ 20 Gy không ảnh hưởng đến tỷ lệ mẫu sống và khả năng tạo rễ của mẫu, nhưng số rễ tạo ra giảm một nửa so với mẫu đối chứng. Khi tăng liều chiếu xạ lên 40 Gy, mẫu không chết nhưng mẫu xuất hiện màu nâu đen và khả năng tạo rễ giảm đáng kể. Ở liều chiếu xạ 60 Gy xuất hiện mẫu chết, số lượng rễ tạo ra rất ít, hình thái rễ ngắn và mảnh hơn. Như vậy, chiếu xạ tia gamma có tác động tiêu cực lên khả năng tạo rễ thứ cấp của cây đảng sâm *in vitro*.

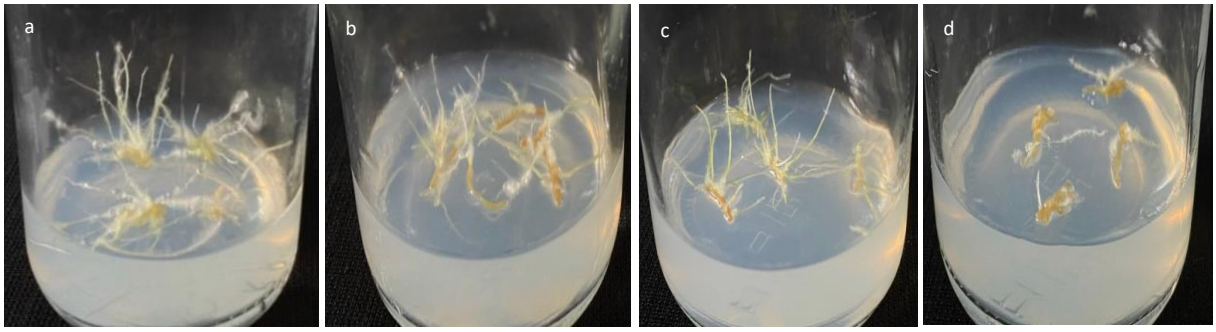
Bảng 1. Tỷ lệ mẫu sống và khả năng hình thành rễ thứ cấp của cây đảng sâm *in vitro* sau 45 ngày nuôi cấy

Cường độ tia gamma (Gy)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số rễ/mẫu
0	$100^{b} \pm 0,00$	$91^{c} \pm 14,43$	$42,60^{d} \pm 2,52$
20	$100^{b} \pm 0,00$	$87^{c} \pm 10,50$	$22,67^{c} \pm 5,13$
40	$100^{b} \pm 0,00$	$75^{b} \pm 4,62$	$15,67^{b} \pm 2,08$
60	$97^{a} \pm 4,61$	$25^{a} \pm 0,00$	$3,33^{a} \pm 0,58$

^{a,b,c,d} các mẫu kí tự khác nhau trong cùng một cột biểu diễn sự sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

Vì số lượng rễ tạo ra rất ít ở cường độ chiếu xạ 60 Gy nên chỉ có mẫu rễ được cảm ứng từ các cường độ chiếu xạ từ 20 đến 40 Gy chuyển sang nuôi cấy lỏng trong bình tam giác để đánh giá khả năng tăng sinh của rễ. Khi chuyển rễ sang môi trường nuôi cấy lỏng lắc, khả năng tăng sinh của rễ được thể hiện ở Bảng 2, kết quả cho thấy hệ số nhân nhanh của rễ ở các nồng độ chiếu xạ đều giảm so với mẫu đối chứng. Như vậy, các liều chiếu xạ không chỉ ức chế sự tạo rễ mà còn tác động tiêu cực lên sự tăng sinh của rễ. Tia gamma là bức xạ ion hóa năng lượng cao có thể tác động trực tiếp lên các phân tử DNA bằng cách làm phá vỡ chuỗi DNA và xáo trộn các thành phần của phân tử DNA. Kết quả của những thay đổi này có thể ức chế và làm giảm sự phát triển của mô thực vật (Villegas *et al*., 2023).

Trong nghiên cứu trước đây về ảnh hưởng của tia xạ gamma lên khả năng sống và tạo rễ của cây nhân sâm (*P. ginseng* Mayer) cho thấy tỷ lệ sống và tạo rễ cao nhất ở cường độ chiếu xạ 20 Gy và giảm dần ở các cường độ từ 40 Gy đến 100 Gy (Le *et al*., 2019). Vì vậy, đối với loài cây khác nhau thì ảnh hưởng của tia gamma lên loài đó cũng khác nhau.



Hình 1. Rễ thứ cấp của cây đảng sâm *in vitro* chiếu xạ tia gamma ở các cường độ khác nhau

(a: 0 Gy; b: 20 Gy; c: 40 Gy; d: 60 Gy)

Bảng 2. Ảnh hưởng của tia gamma lên khả năng tăng sinh rễ sau 30 ngày nuôi cấy

Liều chiếu xạ (Gy)	Khối lượng rễ tươi (g)	Hệ số nhân nhanh (lần)
0	$2,66^{b} \pm 0,72$	$4,32^{b} \pm 1,45$
20	$1,57^{a} \pm 0,27$	$2,15^{a} \pm 0,54$
40	$1,22^{a} \pm 0,29$	$1,45^{a} \pm 0,14$

^{a,b,c,d} các mẫu kí tự khác nhau trong cùng một cột biểu diễn sự sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

Ảnh hưởng của cường độ tia gamma lên hàm lượng hợp chất thứ cấp

Một trong những phương pháp nhằm cải thiện hàm lượng hợp chất thứ cấp tích lũy trong nuôi cấy tế bào là sử dụng các elicitor và những phương pháp khác liên quan đến cơ chế của chúng. Trong những năm gần đây, tia gamma thường được sử dụng như là một chất cảm ứng kích thích sự gia tăng hợp chất thứ cấp trong vật liệu nuôi cấy. Bảng 3 trình bày kết quả định lượng saponin, polysaccharide và polyphenol từ rễ thứ cấp ở các cường độ chiếu xạ khác nhau.

Mặc dù ở các cường độ chiếu xạ, khả năng tạo rễ và tăng sinh của rễ giảm nhưng khả năng tích lũy một số hợp chất thứ cấp quan trọng có trong rễ cây đảng sâm có xu hướng tăng. Hàm lượng saponin tổng số ở cường độ chiếu xạ từ 20 Gy đến 40 Gy tăng gấp gần 2 lần, hàm lượng polysaccharide ở cường độ 20 Gy cao hơn 1,2 lần so với mẫu đối chứng.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tia gamma lên hàm lượng một số hợp chất thứ cấp của cây đảng sâm

Liều chiếu xạ (Gy)	Saponin (mg oleanoic acid/g)	Polysaccharide (mg/g)	Polyphenol (mg GAE/g)
0	1,80[a] ± 0,05	181,17[a] ± 3,87	0,98[b] ± 0,05
20	3,47[b] ± 0,63	222,63[b] ± 10,09	1,01[b] ± 0,02
40	3,70[b] ±0,14	190,13[a] ± 23,57	0,78 [a] ± 0,03

[a,b,c,d] các mẫu kí tự khác nhau trong cùng một cột biểu diễn sự sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

Tia gamma là bức xạ ion hóa tương tác với các nguyên tử và phân tử trong tế bào thực vật để kích thích sản xuất các gốc tự do sơ cấp và thứ cấp, các gốc tự do này đóng vai trò chính trong kích thích các phản ứng phòng vệ ở thực vật bao gồm cả việc tích lũy các chất chuyển hóa thứ cấp. Trong các nghiên cứu trước đây trên các đối tượng khác nhau đã cho thấy hợp chất thứ cấp tăng lên khi thực hiện chiếu xạ tia gamma. Hàm lượng ginsenoside tăng đối với nuôi cấy rễ bất định nhân sâm (*P. ginseng* Meyer) ở liều chiếu xạ 20 Gy (Le *et al*., 2019). Hàm lượng phenolic tổng và hàm lượng flavonoid tổng tăng lần lượt 5 và 5,6 lần trong mô sẹo 4 tuần tuổi của cây hương thảo (*R. officinalis* L.) được chiếu xạ với liều 20 Gy (El-Beltagi *et al*., 2011). Mô sẹo được tạo ra từ lá cây *H. triquetrifolium* Turra được chiếu xạ với liều 10 Gy cho thấy hàm lượng hypericin và pseudohypericin cao hơn so với mẫu đối chứng (Azeez *et al*., 2017). Đối với các loài thực vật khác nhau, sự gia tăng các chất chuyển hóa thứ cấp để đáp ứng với các stress sẽ khác nhau. Vì vậy, xác định liều lượng chiếu xạ thích hợp là bước quan trọng trong sản xuất quy mô lớn các hợp chất thứ cấp. Trong nghiên cứu này, cường độ chiếu xạ 20 Gy thích hợp cho việc tích lũy saponin và polysaccharide trong rễ thứ cấp của cây đảng sâm. So với kết quả từ các nghiên cứu trước đây được thực hiện trên các loài khác, trong nghiên cứu này, chiếu xạ tia gamma không kích thích đáng kể quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp.

Mối tương quan giữa cường độ chiếu xạ, khả năng tăng sinh rễ và hàm lượng hợp chất thứ cấp

Tia gamma thường được sử dụng như là một chất cảm ứng kích thích sự gia tăng hợp chất thứ cấp trong vật liệu nuôi cấy. Trong quá trình sản xuất hợp chất thứ cấp từ nuôi cấy mô tế bào thực vật, thông thường các elicitor sẽ làm giảm quá trình sinh trưởng của tế bào đồng thời tăng cường sản xuất hợp chất thứ cấp, bên cạnh đó, sự truyền tín hiệu của elicitor thường liên quan đến nhiều con đường biến dưỡng thứ cấp khác nhau. Bảng 4 trình bày kết quả về mối quan hệ giữa hệ số tăng sinh khối rễ thứ cấp và hàm lượng các chất chuyển hóa thứ cấp dưới ảnh hưởng của cường độ tia gamma khác nhau qua phân tích thống kê tương quan Pearson.

Bảng 4. Tương quan giữa cường độ chiếu xạ lên hệ số tăng sinh khối rễ và hàm lượng các hợp chất thứ cấp

	Liều chiếu xạ	Hệ số tăng sinh	Saponin	Polysaccharide	Polyphenol
Liều chiếu xạ	1	-0,822**	0,876**	0,169	-0,743*
Hệ số tăng sinh		1	-0,819**	-0,374	0,383
Saponin			1	0,520	-0,383
Polysaccharide				1	0,452
Polyphenol					1

** Tương quan có ý nghĩa ở mức 0,05; ** Tương quan có ý nghĩa ở mức 0,01.*

Mối tương quan nghịch, rất chặt được tìm thấy giữa cường độ chiếu xạ và hệ số tăng sinh (r=-0,822) và hàm lượng polyphenol (r=-0,743), tuy nhiên mối tương quan giữa cường độ chiếu xạ và hàm lượng saponin lại là mối tương quan thuận rất chặt (r=0,876), điều này có nghĩa cường độ chiếu xạ tăng thì hệ số tăng sinh rễ giảm và hàm lượng polyphenol trong rễ cũng giảm nhưng hàm lượng saponin tích lũy trong sinh khối rễ lại tăng lên. Như vậy tia gamma có thể đã kích thích các gen trong con đường sinh tổng hợp saponin nhưng cũng bất hoạt một số gen khác ở con đường sinh tổng hợp polyphenol. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Nhật Linh và đồng tác giả (2017) cũng cho thấy việc bổ sung elicitor vào trong môi trường nuôi cấy rễ sâm Ngọc Linh đều có tác dụng gia tăng khả năng tích lũy saponin tuy nhiên các elicitor lại có tác dụng ngược lại lên sự phát triển của rễ thứ cấp.

KẾT LUẬN

Ở cường độ chiếu xạ từ 20 Gy đến 60 Gy khả năng tạo rễ và tăng sinh rễ giảm dần. Tuy nhiên, hàm lượng hợp chất thứ cấp quan trọng có trong rễ đảng sâm có xu hướng tăng. Hàm lượng saponin, polyphenol và polysaccharide cao nhất ở cường độ chiếu xạ 20 Gy.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này do Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 98/HĐ-DCT ngày 15 tháng 8 năm 2023.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Azeez H, Ibrahim K, Pop R, Pamfil D, Hârţa M, Bobiș O (2017). Changes induced by gamma ray irradiation on biomass production and secondary metabolites accumulation in *Hypericum triquetrifolium* Turra callus cultures. *Industrial Crops and Products*, 108: 183-189.

Chen KN, Peng WH, Hou CW, Chen CY, Chen HH, Kuo CH, Korivi M (2013). *Codonopsis javanica* root extracts attenuate hyperinsulinemia and lipid peroxidation in fructose-fed insulin-resistant rats. *Journal of food and drug analysis*, 21: 347 – 355.

Dương Tấn Nhựt (2011). *Công nghệ sinh học thực vật: Nghiên cứu cơ bản và Ứng dụng*, Tập 1, NXB Nông Nghiệp, TP Hồ Chí Minh.

Đỗ Tất Lợi (2006). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Thời Đại (Hà Nội).

El-Beltagi HS, Ahmed OK, El-Desouky W (2011). Effect of low doses γ-irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture. *Radiation Physics and Chemistry*, 80: 968-976.

Folin O, Ciocalteu V (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. Journal of Biological Chemistry, 73**:** 627-650.

He JY, Zhu S, Komatsu K (2014). HPLC/UV analysis of polyacetylenes, phenylpropanoid and pyrrolidine alkaloids in medicinally used *Codonopsis* species. *Phytochemical analysis*, 25: 213-219.

Le KC, Ho TT, Paek K Y, Park SY (2019). Low-dose gamma radiation increases the biomass and ginsenoside content of callus and adventitious root cultures of wild ginseng (*Panax ginseng* Mayer). *Industrial Crops and Products*, 130:16-24.

Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura S, Lee YC (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339: 69-72.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

Nguyễn Thị Nhật Linh, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Hoàng Lộc, Dương Tấn Nhựt (2017). Ảnh hưởng của các elicitor sinh học và phi sinh học đến sinh khối và hàm lượng saponin của rễ thứ cấp trong nuôi cấy lỏng lắc rễ bất định sâm Ngọc Linh. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 15: 285-291.

Trinh TH, Nguyen QT, Nguyen T HT, Do DG, Tran TT (2021). Induction and evaluation of secondary metabolite and antioxidant activity in adventitious root of *Codonopsis javanica*. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 63: 11-16.

Villegas D, Sepúlveda C, Ly D (2023). Seed Biology-New Advances, Use of low-dose gamma radiation to promote the germination and early development in seeds, *IntechOpen, United Kingdom London*.

STUDY ON THE EFFECTS OF Co60 GAMMA RADIATION ON SECONDARY ROOT FORMATION AND SECONDARY METABOLITE ACCUMULATION OF *Codonopsis javanica IN VITRO* CULTURE

Thi Thuy Le*, Thi Huong Trinh, Nguyen Minh Hang Ta, Thanh Nhu Do

Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

SUMMARY

The profitable production of some important plant-based secondary metabolites *in vitro* by gamma irradiation is a current area of interest. This research aimed to determine the impact of gamma irradiation (20-60 Gy range) on the survival sample rate, root induction, and secondary metabolites in root biomass. The results showed that the survival rate, the rate of rooting samples, and the number of roots per sample gradually decreased with varying irradiation doses. When secondary roots were transferred to a liquid culture medium, the root biomass at all irradiation doses decreased compared to the control sample. Despite the decrease in root formation and proliferation rate at different irradiation doses, there was an observed tendency for the accumulation of crucial secondary metabolites in the root biomass to increase. The total saponin content at irradiation doses ranging from 20 Gy to 40 Gy and the total polysaccharide content at 20 Gy were 2.0-fold and 1.2-fold higher than the control sample, respectively.

Keywords: Co60, *Codonopsis javanica*, gamma-ray, root, secondary metabolite, *in vitro*.

* Author for correspondence: SĐT: 0918631699, Email: thuylt@huit.edu.vn

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ ĐIỀU KIỆN LÊN MEN SINH TỔNG HỢP PECTINASE CỦA CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus licheniformis* V114

Nguyễn Thị Hồng Liên, Nguyễn Văn Hiếu, Trần Thị Hương, Đặng Thị Nhung, Lê Thị Trà, Phan Thị Hồng Thảo*

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Pectinase, một trong những enzyme thương mại hàng đầu, chiếm 10% lượng enzyme được sản xuất ra, được sử dụng trong nhiều ngành công nghiệp, nông nghiệp và y dược… Việc tìm kiếm các nguồn sinh tổng hợp pectinase mới với hoạt tính cao, mở rộng khả năng ứng dụng pectinase luôn được chú trọng. Trong nghiên cứu này, 82 chủng vi khuẩn phân lập từ các mẫu vỏ cây và mùn gỗ keo được sàng lọc khả năng sinh tổng hợp pectinase. Chủng V114 sinh pectinase cao được nghiên cứu định danh và lựa chọn môi trường cũng như điều kiện lên men thích hợp cho sản xuất pectinase. Trực khuẩn Gram dương V114 có khuẩn lạc tròn không đều, mép trơn và có khả năng sinh bào tử. Chủng V114 có thể sinh trưởng trên nhiều môi trường nhờ vào khả năng đồng hóa nhiều nguồn carbon, trong khoảng nhiệt độ và pH khá rộng (15-55°C, pH 3-10) và chịu được muối NaCl cao đến 7%. Vi khuẩn V114 có hệ enzyme ngoại bào phong phú, với pectinase đạt 980,6 U/L trong môi trường có vỏ cây làm cơ chất. Chủng V114 có đặc điểm tương đồng cao (99%) với loài *Bacillus licheniformis* và được định danh là *Bacillus licheniformis* V114. Trình tự vùng 16S rDNA của chủng V114 được đăng ký trên GenBank với mã số là PP479114. Môi trường và điều kiện lên men thích hợp được lựa chọn giúp tăng khả năng sinh tổng hợp pectinase của chủng *B. licheniformis* V114. Hoạt độ pectinase của chủng *B. licheniformis* V114 đạt 1273,8 U/L trong môi trường M2 chứa 0,3% (w/v) pectin ở 37°C, pH ban đầu 7,0 sau 5 ngày lên men.

Từ khóa: Bacillus licheniformis, 16S rDNA, đặc điểm sinh học, lên men, pectinase.

MỞ ĐẦU

Pectinase là nhóm enzyme thủy phân pectin, sản phẩm tạo thành acid galacturonic, glucose, galactose, arabinose, methanol… Pectinase có nhiều loại nhưng có hai loại được nghiên cứu nhiều hơn cả là pectinesterase (3.1.1.11) và polygalacturonase (3.2.1.1.15). Pectinase là enzyme thương phẩm chiếm thị phần hàng đầu, khoảng 10% enzyme được sản xuất là pectinase. Pectinase được ứng dụng nhiều trong các ngành công nghiệp như làm trong và lọc nước ép trái cây, quy trình sản xuất rượu vang để tăng chất lượng rượu, lên men cà phê và trà, khử chất xơ thực vật, chiết xuất dầu, dệt, sản xuất giấy, phân lập nguyên sinh chất và tinh chế virus thực vật, tiền xử lý nước thải chứa pectin… (Kohli, Gupta, 2015). Dù được sinh tổng hợp từ nhiều nguồn nhưng pectinase được sản xuất ở quy mô công nghiệp chủ yếu là từ vi sinh vật (vi khuẩn và nấm). Pectinase là enzyme được phân bố rộng rãi ở vi khuẩn có mặt ở những vị trí giàu pectin, có tới 10% vi sinh vật trong đất là có khả năng phân giải pectin. Chúng bao gồm các vi khuẩn thuộc chi *Pantoea*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, nhiều loại nấm men, nấm mốc, động vật nguyên sinh và tuyến trùng. Hoạt tính pectolytic cũng được tìm thấy ở loài *Leuconostoc mesenteroides* (Alqahtani *et al.*, 2021). Là một trong những chi vi khuẩn lớn, trực khuẩn *Bacillus* mang bào tử, thuộc họ *Firmicutes*, bao gồm nhiều loài cả hiếu khí hoàn toàn và kỵ khí tùy tiện. *Bacillus* đặc biệt là *Bacillus subtilis* và *Bacillus licheniformis* là những loài có tiềm năng cho việc sản xuất quy mô lớn các enzyme thương mại quan trọng. Vi khuẩn hoại sinh *B. licheniformis* có khả năng phát triển trên nhiều nguồn dinh dưỡng đa dạng do tổng hợp và tiết ra các enzyme thủy phân khác nhau và đặc tính này làm cho *B. licheniformis* trở thành một vi sinh vật quan trọng trong công nghiệp (Shrestha *et al.*, 2021). Trong nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn khác nhau được phân lập từ vỏ cây và mùn gỗ keo có hoạt tính pectinase và đã sàng lọc được chủng vi khuẩn V114 sinh tổng hợp pectinase cao nhất, định danh bằng cách kết hợp một số đặc điểm sinh học và phân tích trình tự vùng 16S rDNA, đồng thời đã lựa chọn được môi trường và điều kiện lên men thích hợp cho sinh pectinase của chủng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu: Các mẫu vỏ cây, mùn gỗ keo được thu từ nhà máy giấy Bãi Bằng-Phú Thọ và An Hòa-Tuyên Quang. Các hóa chất sử dụng từ hãng Sigma-Aldrich (Mỹ), Merck, Serva (Đức), Himedia (Ấn Độ) và Trung Quốc.

Môi trường nghiên cứu*:* Môi trường MPA (g/L): cao thịt 5,0; Peptone 10,0; NaCl 5,0, agar 20; Nước cất vừa đủ 1 lít; pH 7. Môi trường lên men pectinase cơ bản (M1) (g/L): K_2HPO_4 2,27; KH_2PO_4 0,95; $(NH_4)_2SO_4$ 0,67; rỉ đường 10; vỏ cây keo 10, nước cất vừa đủ 1 lít; pH 7 (Ghani *et al.*, 2013).

Phân lập vi khuẩn có hoạt tính pectinase

Các mẫu vỏ cây, mùn gỗ keo cắt nhỏ được hoà trong nước muối sinh lý 0,9% (w/v) đã khử trùng, lắc 150 vòng/phút trong 60 phút. Dịch pha loãng được trang lên các đĩa chứa môi trường MPA và ủ ở 37°C. Sau 2 - 3 ngày các khuẩn lạc vi khuẩn riêng rẽ có hình thái khác nhau được cấy ria sang các đĩa có chứa môi trường MPA mới để làm thuần ở 30°C. Khả năng sinh pectinase của chủng vi khuẩn được kiểm tra trên môi trường có cơ chất pectin 0,5% (w/v), nuôi ở 30°C trong 2 - 3 ngày. Bổ sung thuốc thử Lugol (1 g I_2 và 5 g KI trong 330 mL H_2O). Các chủng vi khuẩn có vòng sáng trong to bao xung quanh khuẩn lạc được chọn và lên men trên môi trường M1, lắc 180 vòng/phút, ở 30°C trong 7 ngày (Alqahtani *et al.*, 2021). Dịch sau lên men được ly tâm 10000 vòng/phút, trong 10 phút, loại bỏ sinh khối thu dịch enzyme thô. Hoạt độ pectinase được xác định bằng phương pháp đo lượng đường khử sinh ra từ 0,5% (w/v) pectin phản ứng với acid 3,5-dinitrosalicylic (DNSA) hấp thụ cực đại ở 540 nm. Một đơn vị hoạt độ pectinase được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 µmol acid galacturonic trong điều kiện thí nghiệm (Alqahtani *et al.*, 2021).

Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học

Khả năng sử dụng các nguồn carbon của các chủng vi khuẩn được kiểm tra bằng kit API 50CHB (BioMerieux). Khả năng sinh enzyme ngoại bào (xylanase, amylase, protease và laccase) của chủng được kiểm tra trên môi trường khoáng có bổ sung 1% (w/v) cơ chất (xylan, tinh bột tan, casein) và 400 µl/L guaiacol trong 72 - 120 giờ ở 30^oC, vòng phân giải cơ chất được xác định bằng thuốc thử Congo đỏ 0,5% (w/v), dung dịch Lugol và dung dịch acid tricloacetic 50% (w/v) (Whitman *et al*., 2011). Nhiệt độ, pH thích hợp cho sinh trưởng và khả năng chịu muối của chủng V114 được kiểm tra khi nuôi cấy chủng trên môi trường MPA trong 48 giờ ở nhiệt độ 15 - 55°C, pH 3 - 10 và nồng độ NaCl bổ sung là 0 - 7% (w/v).

Phân tích trình tự vùng 16S rDNA

Tách chiết DNA tổng số của chủng V114 theo phương pháp của Sambrook và Green (2012) và thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F:5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3' và 1492R:5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3' khuếch đại vùng 16S rDNA. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra, tinh sạch và phân tích trên máy đọc trình tự ABI PRISM 3100, xử lý bằng phần mềm BioEdit. Sử dụng chương trình BLAST đánh giá mức độ tương đồng vùng 16S rDNA của chủng V114 với các trình tự nucleotide tương ứng trong GenBank (NCBI). Cây phả hệ được thiết lập trên cơ sở khoảng cách di truyền theo Kimura (1980) bằng việc sử dụng phương pháp Neighbor-joining.

Nghiên cứu môi trường và điều kiện nuôi cấy cho sinh tổng hợp pectinase

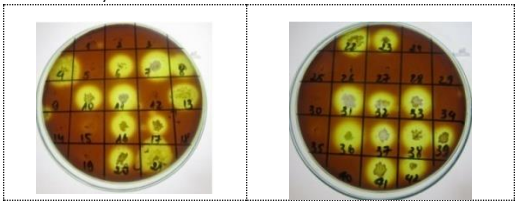
Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong các môi trường cơ bản M1 (Alqahtani *et al.*, 2021), M2 (Ghani *et al.*, 2013), M3 (Aslam *et al.*, 2020), M4 (Akinyemi *et al.*, 2017), M5 (Bibi *et al.*, 2018), M6 (Ikani *et al.*, 2021). Ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ và pH được nghiên cứu trong dải nhiệt độ 25 - 55°C và pH 4 - 9. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành trong bình tam giác 250 mL chứa 50 mL dịch môi trường, bổ sung 0,5 mL dịch nhân giống 24 giờ (mật độ 10^8 CFU/mL) nuôi cấy trên máy lắc tròn với tốc độ 150 vòng/phút. Sau 7 ngày, xác định hoạt độ pectinase theo phương pháp của Alqahtani và đồng tác giả (2021).

Các kết quả thu được là các giá trị trung bình, được xử lý theo phương pháp thống kê trong chương trình Excel 2010.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

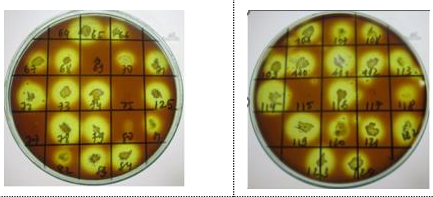
Tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính pectinase

Từ 11 mẫu vỏ gỗ trục cây keo 3 năm tuổi và 3 mẫu mùn gỗ đã phân lập và thuần khiết được 82 chủng vi khuẩn, định tính pectinase bằng cách cấy chấm điểm trên môi trường có chứa pectin 0,5% (w/v) (Hình 1). Thu được 53 chủng có hoạt tính pectinase trong đó có 22 chủng có vòng phân hủy pectin $5 \le D_{VPH} \le 10$ mm chiếm 41,52%, 21 chủng có vòng phân hủy pectin $10 \le D_{VPH} \le 15$ mm chiếm 39,62% và 10 chủng có vòng phân hủy pectin >15 mm chiếm 18,86%.



Bảng 1. Hoạt độ pectinase của các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Hoạt độ pectinase (U/L)	Chủng vi khuẩn	Hoạt độ pectinase (U/L)
V7	838,2 ± 40,1	V111	799,3 ± 39,1
V10	561,1 ± 26,5	**V114**	**980,6** ± 48,3



Hình 1. Định tính pectinase của các chủng vi khuẩn

V11	613,1 ± 29,7	V132	788,3 ± 39,5
V31	783,4 ± 38,8	V142	900,5 ± 44,7
V129	761,4 ± 37,2	V139	723,7 ± 36,6

Kiểm tra khả năng sinh tổng hợp pectinase của 10 chủng vi khuẩn có vòng phân hủy pectin >15 mm. Trên môi trường có bổ sung vỏ cây gỗ keo, sau 7 ngày, hoạt độ pectinase của chủng V114 đạt cao nhất 980,6 U/L. Các chủng còn lại đều có hoạt độ pectinase dao động từ 500 - 900 U/L. Từ đó lựa chọn chủng V114 cho các nghiên cứu tiếp theo.

Một số đặc điểm sinh học chủng vi khuẩn V114

Đặc điểm hình thái

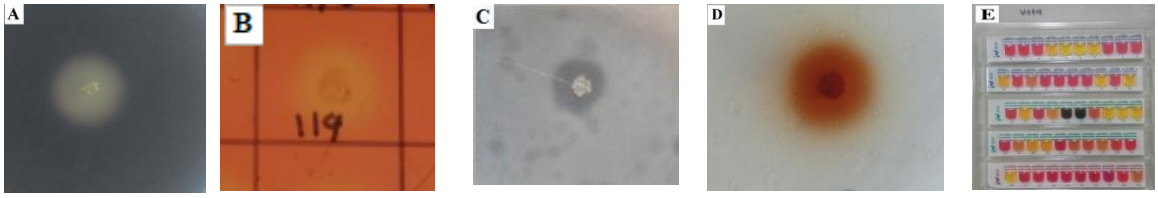
Trên môi trường MPA, chủng vi khuẩn V114 có khuẩn lạc tròn không đều, kích thước 1 - 1,5 mm, có màu trắng sữa sau 2 ngày, bề mặt hơi bóng, mép trơn. Tế bào hình que dài (0,49 - 0,51 × 3,20 - 3,58 µm), Gram (+), có khả năng di động và sinh bào tử.

Hình 2. Hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào (B,C) của chủng vi khuẩn V114

(A-Khuẩn lạc trên môi trường MPA; B-tế bào nhuộm Gram; C-Tế bào dưới kính hiển vi điện tử (× 5000 lần).

Đặc điểm sinh lý-sinh hóa của chủng V114

Chủng V114 có khả năng đồng hóa nhiều loại đường, phát triển tốt trên các môi trường có bổ sung D-glucose, D-fructose, Methyl-β-D-xylopyranoside, D-galactose, D- maltose, D-lactose, D-Inositol, D-manitol, D-sorbitol, Methyl-β-D-glucopyranside, D-saccharose, D-trehalose, D-raffinose, L-arabinose nhưng không phát triển trên môi trường có glycerol, erythritol, L-xylose, D-manose, L-sorbose, L-rhamnose, D-melibiose, Methyl-β-D-manopyranoside, D,L-fucose, D,L-arabitol (Hình 3E). Chủng V114 sinh trưởng trong dải nhiệt độ 15-55°C nhưng tốt nhất ở 30-37°C. Có thể kết luận chủng này thuộc nhóm ưa ấm (mesophilic). Chủng phát triển được trên môi trường có dải pH 3-10, phát triển tốt nhất ở pH 6-7. Chủng có thể chịu được nồng độ NaCl tới 7% (w/v) và có khả năng sinh tổng hợp một số enzyme ngoại bào như protease, xylanase, amylase và laccase.

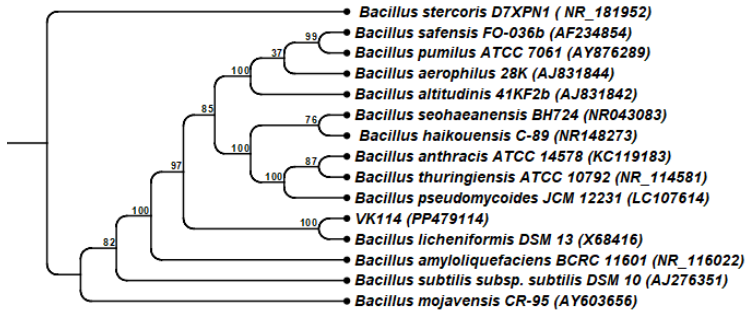


Hình 3. Khả năng sinh enzyme ngoại bào và đồng hoá nguồn C của chủng vi khuẩn V114

(A - amylase; B - xylanase; C - protease; D - laccase; E: kit API 50 CHB, Biomeriux)

Phân loại chủng vi khuẩn V11

Vùng 16S rDNA của chủng V114 có độ tương đồng (99%) so với vùng tương ứng của chủng *B. licheniformis* DSM13 (X68416). Đối chiếu các đặc điểm phân loại của chủng V114 và kết hợp so sánh trình tự vùng 16S rDNA, chúng tôi cho rằng, chủng vi khuẩn V114 có các đặc điểm rất gần gũi và có độ tương đồng cao với loài *B. licheniformis*. Vậy nên chủng V114 được đặt tên là *B. licheniformis* V114. Trình tự vùng 16S rDNA của chủng *B. licheniformis* V114 đã được đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) với mã số truy cập là *PP479114. B. licheniformis* đã được nhiều nhóm nghiên cứu báo cáo là có khả năng sinh tổng hợp pectinase được phân lập từ các nguồn như rau thối, đất bãi thải sắn, phụ phẩm quả chà là, đất trồng rau (Alqahtani *et al.*, 2021; Aslam *et al*., 2020; Ghani *et al.*, 2013).



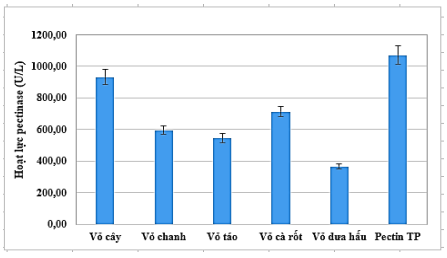
Hình 4. Mức độ tương đồng di truyền giữa chủng V114 với các loài vi khuẩn có họ hàng gần

Lựa chọn môi trường và điều kiện lên men sinh tổng hợp pectinase của chủng *B. licheniformis* V114

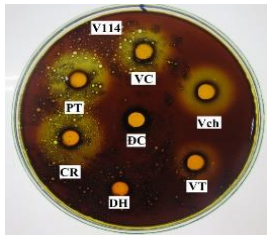
Sự thay đổi thành phần môi trường nuôi cấy có vai trò rất quan trọng, ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào vi sinh vật và sản xuất enzyme. Do đó, hoạt độ enzyme của một chủng vi sinh vật phụ thuộc trực tiếp vào các chất dinh dưỡng có sẵn trong môi trường nuôi cấy (Aslam *et al.*, 2020). Chủng *B. licheniformis* V114 sinh trưởng và sinh pectinase kém trên các môi trường M1, M5 và M6. Trên môi trường M3 giàu dinh dưỡng sau 7 ngày, chủng sinh trưởng tốt và đạt cao nhất trên LB ($OD_{600nm} \cong 6,3$). Tuy nhiên, hoạt độ pectinase thu được cao nhất (986,2 U/L) trên môi trường M2 có thành phần muối $(NH_4)_2SO_4$ vốn có lợi cho sinh tổng hợp pectinase (Aslam *et al.*, 2020). Do vậy, môi trường M2 được lựa chọn làm môi trường lên men chính cho sinh tổng hợp pectinase của chủng *B. licheniformis* V114. Trong sinh tổng hợp pectinase, cơ chất cảm ứng là pectin, acid pectic, D-galacturonate và một số nguồn carbohydrate khác. Tuy nhiên, việc sử dụng cơ chất pectin từ nguồn phụ phẩm nông nghiệp như cám mì, bã mía, bã củ cải đường, bã đậu cove, vỏ trái cây (cam, chanh, bưởi, cà rốt, khoai tây…) và bã táo cũng được quan tâm do không chỉ có hàm lượng pectin cao (0,5 - 5%) mà còn cung cấp một số thành phần nitrogen, chất xơ và khoáng cần thiết cho quá trình lên men sản xuất pectinase từ vi sinh vật (Haile, Ayele, 2022). Các cơ chất bổ sung vào môi trường lên men đã có tác động đáng kể đến khả năng sinh tổng hợp peptinase của chủng *B. licheniformis* V114. Pectin thực phẩm (0,3%, w/v) là chất cảm ứng tốt nhất cho chủng *B. licheniformis* V114 sinh pectinase. Các chất còn lại cũng đều có tác dụng kích thích sinh pectinase (Hình 5 và Hình 6).

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường đến sinh trưởng và hoạt độ pectinase của chủng *B. licheniformis* V114

Môi trường	Pectinase (U/L)	OD_{600nm}
M1	914,5 ± 44,6	4,7 ± 0,2
M2	**986,2 ± 49,3**	**5,9 ± 0,3**
M3	931,8 ± 46,8	6,3 ± 0,4
M4	869,7 ± 45,6	5,7 ± 0,3
M5	823,4 ± 41,1	3,6 ± 0,2
M6	909,6 ± 45,5	4,4 ± 0,2



Hình 5. Ảnh hưởng của cơ chất bổ sung đến hoạt tính pectinase của chủng *B. licheniformis* V114

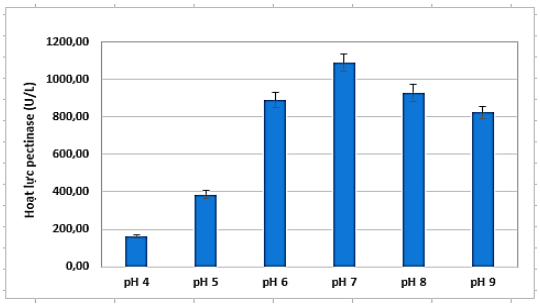


Hình 6. Định tính pectinase khi lên men với các cơ chất khác nhau

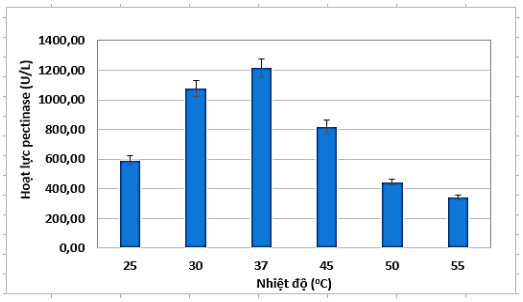
VC: Vỏ cây; Vch: Vỏ chanh; VT: Vỏ táo; DH: Vỏ dưa hấu; CR: Vỏ cà rốt; PT: Pectin thực phẩm.

Độ pH của môi trường có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của vi sinh vật, tính thấm của màng, cũng như quá trình sinh tổng hợp và tính ổn định của enzyme. Hàm lượng ion H^+ hay OH^- có thể tác động trực tiếp vào tế bào hay tác động gián tiếp bằng cách thay đổi mức độ phân ly của các chất trong môi trường. Nhiều loại nấm mốc sinh tổng hợp pectinase tối ưu trong phạm vi pH acid, với vi khuẩn là trong điều kiện hơi trung tính đến kiềm. Tuy nhiên, cơ chế tác động của độ pH lên quá trình sản xuất pectinase vẫn chưa được biết rõ (Widowati *et al*., 2017). Chủng *B. licheniformis* V114 sinh tổng hợp pectinase trong môi trường trung tính đến môi trường kiềm tính. Hoạt

độ pectinase của chủng vi khuẩn này rất thấp khi được sinh trưởng và và sinh enzyme trong môi trường acid (pH 4,0 - 5,0). Môi trường trung tính pH 7,0 thích hợp nhất cho chủng *B. licheniformis* V114 sinh tổng hợp pectinase, hoạt độ enzyme đạt cao nhất (1089 U/L) (Hình 7). Một số chủng *B. licheniformis* khác như *B. licheniformis* GD2a, *B. licheniformis* KIBGE-IB3 cũng sinh tổng hợp pectinase cao nhất ở pH 7,0 mặc dù nhiệt độ lên men của các chủng này khác nhau (Widowati *et al.*, 2017; Aslam *et al.*, 2020).

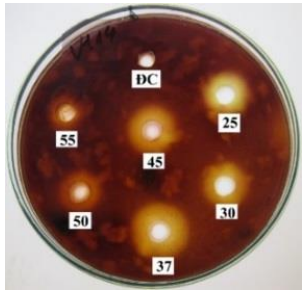


Hình 7. Ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng sinh pectinase của chủng *B. licheniformis* V114



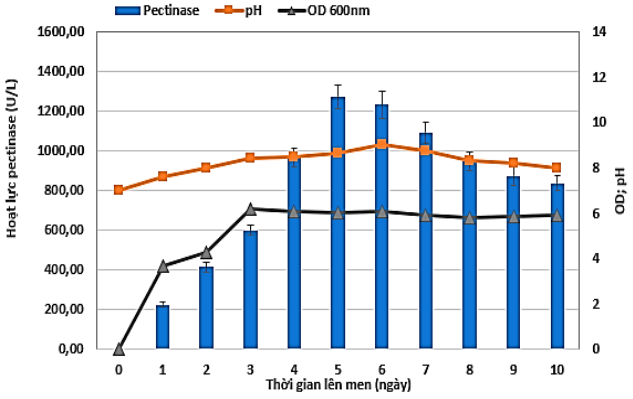
Hình 8. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh pectinase của chủng *B. licheniformis* V114

Nhiệt độ phát triển thích hợp nhất của vi khuẩn *B. licheniformis* V114 là 30°C, OD_{600} đạt 6,3 sau 3 ngày. Nhiều khảo sát cho thấy, nhiệt độ dao động trong khoảng 28 - 30°C là giá trị tối thích cho việc sản sinh pectinesterase (Haile, Ayele, 2022). Nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng và nhiệt độ tối ưu cho sinh tổng hợp pectinase của chủng *B. licheniformis* V114 là hoàn toàn khác nhau. 37°C là nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn *B. licheniformis* V114 sinh enzyme, hoạt độ pectinase đạt 1214 U/L (Hình 8 và hình 9). Ngoài ra, chủng *B. licheniformis* V114 vẫn có thể sinh tổng hợp pectinase ở các nhiệt độ cao hơn. Kết quả này cũng tương ứng với công bố của một số tác giả khi nghiên cứu nhiệt độ thích hợp cho lên men sinh tổng hợp pectinase của vi khuẩn *B. licheniformis* (Aslam *et al.*, 2020; Ghani *et al*., 2013), thậm chí có những chủng sinh enzyme tối ưu ở nhiệt độ 50 - 65°C như chủng *B. licheniformis* GD2a (Widowati *et al.*, 2017), *B. stearothermophillus*, *B. cereus, B. furmus, B. monjavensis* (Haele, Ayele, 2022).



Hình 9. Định tính pectinase khi lên men ở nhiệt độ khác nhau của *chủng B. licheniformis* V114

Dịch lên men có pH tăng dần trong 5 ngày đầu sau đó cũng giảm nhẹ, nhưng duy trì khoảng pH hơn 8. Tốc độ sinh trưởng và sinh tổng hợp pectinase của chủng *B. licheniformis* V114 khác nhau. Do môi trường lên men có rỉ đường, thành phần mà vi khuẩn có thể sử dụng cho sinh trưởng nên vi khuẩn sinh tổng hợp pectinase với một lượng nhỏ, hoạt độ pectinase sau 1 ngày chỉ đạt khoảng 200 U/L. Sau khi sinh trưởng tối đa tại ngày lên men thứ 3, vi khuẩn tiếp tục sinh tổng hợp pectinase để phân cắt cơ chất là pectin thực phẩm, hoạt độ pectinase cao nhất, đạt 1273,8 U/L tại ngày thứ 5. Thời gian thích hợp cho lên men sinh pectinase của chủng *B. licheniformis* V114 là 5 ngày (Hình 10), dài hơn so với thời gian cần thiết để một số chủng như *B. licheniformis* FMB9 trong công bố của Alqahtani và đồng tác giả (2021) và *B. licheniformis* KIBGE-IB3 trong công bố của Aslamvà đồng tác giả (2020) sinh tổng hợp pectinase tối đa 3 ngày. Trong các nghiên cứu tiếp theo, thành phần môi trường (nguồn carbon, nitrogen, hàm lượng chất cảm ứng...) và điều kiện lên men (tỷ lệ tiếp giống, độ thông khí...) sẽ tiếp tục được khảo sát nhằm nâng cao hoạt độ pectinase thu nhận và rút ngắn thời gian lên men sinh tổng hợp enzyme của chủng *B. licheniformis* V114 từ quy mô phòng thí nghiệm đến quy mô lên men trên thiết bị 50 và 500 lít.



Hình 10. Động thái quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp pectinase của chủng *B. licheniformis* V114

KẾT LUẬN

Trong số các chủng vi khuẩn phân lập được, chủng vi khuẩn V114 thể hiện khả năng sinh tổng hợp pectinase tốt nhất. Đây là trực khuẩn Gram dương, sinh bào tử và sinh enzyme ngoại bào cao. Chủng V114 có khả năng đồng hóa nhiều loại đường như D-glucose, D-fructose, D-galactose, D- maltose, D-lactose, D-inositol, D-manitol, D-sorbitol, D-saccharose, D-trehalose, D-raffinose, L-arabinose, sinh trưởng tốt trong khoảng 15 - 55°C, pH 3 - 10 và

nồng độ muối là 0 - 7%. Đối chiếu với khóa phân loại của Bergey và trình tự 16S rDNA, chủng V114 có đặc điểm rất gần với loài *Bacillus licheniformis* nên được định tên là *Bacillus licheniformis* V114 và trình tự vùng 16S rDNA của chủng được đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu Genbank với mã số truy cập *PP479114*. Chủng B. *licheniformis* V114 sinh tổng hợp pectinase cao nhất trên môi trường M2 bổ sung cơ chất pectin thực phẩm với điều kiện pH ban đầu 7,0 ở 37°C, sau 5 ngày, hoạt độ pectinase đạt cao nhất là 1273,8 U/L.

Lời cảm ơn: *Công trình được sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài "Nghiên cứu quy trình công nghệ và mô hình thiết bị sản xuất chế phẩm enzyme pectinase và hemicellulase ứng dụng bóc vỏ cây nguyên liệu gỗ cứng" mã số ĐTKHCN.017/22 cấp Bộ Công Thương và trang thiết bị của Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Akinyemi BT, Buraimoh OM, Ogunrinde OO, Amund OO (2017). Pectinase production by *Bacillus megaterium*, *Bacillus bataviensis*, and *Paenibacillus* sp. isolated from decomposing wood residues in the Lagos Lagoon. *J Trop Life Sci*, 7(3): 204-207.

Alqahtani F, Aly M, Bokhari F, et al. (2021). Isolation and characterization of exopectinase from *Bacillus licheniformis* FMB9 isolated from agricultural soil. *J Contemp Med Sci,* 7(5): 308-314.

Aslam F, Ansari A, Aman A, et al. (2020). Production of commercially important enzymes from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB3 using date fruit wastes as substrate. *J Gen Eng Biotechnol,* 18: 46.

Bibi N, Ali S, Tabassum R (2018). Isolation and identification of novel indigenous bacterial strain as a low cost pectinase source. *Braz Arch Biol Technol,* 61: e18160653.

Ghani M, Ansari A, Aman A, et al. (2013). Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pak J Pharm Sci,* 26(4): 691-697.

Haile S and Ayele A (2022). Pectinase from microorganisms and its industrial applications. *Sci World J*, 2022: 1881305.

Ikani E, Ado SA and Abdullahi IO (2021). Screening of moulds from soil for pectinase production. *Niger J Microbiol,* 35(1): 5550-5555.

Kohli P, Gupta R (2015). Alkaline pectinases: a review. *Biocatal Agric Biotechnol,* 4(3): 279-85.

Sambrook J and Green MR (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.*

Shrestha S, Khatiwada JR, Zhang X, Chio C, Kognou ALM, Chen F, Han S, Chen X, Qin W (2021). Screening and molecular identification of novel pectinolytic bacteria from forest soil. *Ferment*, 7(1): 40.

Whitman WB, Vos P, Garrity GM, et al. (2011). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Second Edition). Vol. 3, *Springer-Verlag, NY*.

Widowati E, Utami R, Mahadjoeno E and Saputro GP (2017). Effect of temperature and pH on polygalacturonase production by pectinolytic bacteria *Bacillus licheniformis* strain GD2a in submerged medium from Raja Nangka (Musa paradisiaca var. formatypica) banana peel waste. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng*, 193: 012018.

BIOLOGICAL CHARACTERISTIC AND FERMENTATION CONDITION FOR PECTINASE BIOSYNTHESIS OF *Bacillus licheniformis* V114

Nguyen Thi Hong Lien, Nguyen Van Hieu, Tran Thi Huong, Dang Thi Nhung, Le Thi Tra, Phan Thi Hong Thao*

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Pectinase, one of the leading commercial enzymes, accounts for 10% of enzyme production, is used in many industries, agriculture, medicine... The search for new sources of biosynthesis pectinase with high activity, expanding the possibilities application of pectinase is always emphasized. In this paper, 82 bacterial strains isolated from bark and *Acacia* wood humus samples were screened for pectinase biosynthesis. The high pectinase-producing strain V114 was studied to identify and selected the medium and fermentation conditions for pectinase production. Gram-positive *Bacillus* V114 has irregular round colonies, smooth edges, and is capable of producing spores. Strain V114 can grow in many environments thanks to its ability to assimilate many carbon sources, in a fairly wide temperature and pH range (15-55°C, pH 3-10) and tolerate NaCl salt up to 7%. Strain V114 has a rich extracellular enzyme system, the pectinase activity reached 980.6 U/L in a medium with tree bark as a substrate. Strain V114 has high similarity (99%) to *Bacillus licheniformis* and is named *Bacillus licheniformis* V114. The 16S rDNA gene sequence of strain *B. licheniformis* V114 was registered on GenBank with code PP479114. The medium and conditions fermentation suitable were selected to help increase the pectinase biosynthesis ability of strain *B. licheniformis* V114. This strain exhibited the maximum pectinase activity of 1273.8 U/L in M2 medium with 0.3% (w/v) pectin was used as a substrate at 37°C, initial pH 7.0 after 5 days of fermentation.

Keywords: Bacillus licheniformis, 16S rDNA, biological characteristics, classification, fermentation, pectinase.

*Author for correspondence: Tel: 02437916882; Email: pthongthao@ibt.ac.vn

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA LIỀU CHIẾU XẠ GAMMA ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP PROTEASE CỦA VI KHUẨN *Bacillus* spp.

Võ Thị Thúy Huệ[1*], Phan Hữu Tín[2], Nguyễn Thị Thu Trang[1] , Nguyễn Thị Thuỳ Trang[2], Nguyễn Minh Quang[2]

[1]Khoa Khoa học sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

[2]Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Protease là một trong những enzyme thương mại quan trọng được sử dụng phổ biến trong nhiều ngành công nghiệp (thực phẩm, thuộc da, chất tẩy rửa…). Vi sinh vật có vai trò quan trọng trong việc sản xuất các enzyme ngoại bào, đặc biệt là *Bacillus*. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu sàng lọc được chủng *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp protease cao bằng chiếu xạ gamma. Sau chiếu xạ, tỷ lệ sống sót, dải liều tối ưu tạo đột biến sinh tổng hợp protease cao và liều chiếu tạo đột biến sinh tổng hợp protease cao ở 2 chủng *Bacillus* được xác định. Hoạt tính enzyme của chủng thuần và chủng sau đột biến được xác định bằng phương pháp cấy điểm trên đĩa thạch chứa cơ chất casein. Kết quả cho thấy cả 4 chủng *Bacillus* thuần chủng đều có khả năng sinh tổng hợp protease, cao nhất là 2 chủng *Bacillus velezensis* (BS1) và *Bacillus licheniformis* (BL4) với đường kính vòng phân giải lần lượt là 19,75 mm và 27,15 mm. Sau chiếu xạ, khả năng sống sót của 2 chủng *Bacillus* bị ảnh hưởng nhiều bởi bức xạ gamma, tỷ lệ sống sót của vi khuẩn giảm dần khi liều bức xạ tăng. Tần số đột biến cao ở khoảng liều 1 - 1,25 kGy và cao nhất tại liều 1 kGy đối với chủng *B. velezensis* (BS1) và *B. licheniformis* (BL4) lần lượt là 36,67% và 40%. Bốn khuẩn lạc từ 2 chủng BS1 và BL4 sau chiếu xạ sàng lọc được có khả năng sinh tổng hợp protease vượt trội và ổn định ít nhất sau 3 thế hệ.

Từ khóa: *Bacillus*, chiếu xạ gamma, đột biến, protease, sống sót.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Protease là nhóm enzyme có chức năng phân giải liên kết peptide của protein để tạo thành peptide ngắn hơn và các amino acid. Protease có tiềm năng ứng dụng to lớn trong nhiều lĩnh vực nên thu hút được nhiều mối quan tâm của nhiều nhà khoa học và các công ty hóa dược ở Việt Nam cũng như trên Thế giới (Hoàng Đăng Sáng *et al.*, 2018). Mặc dù nguồn vi sinh vật để sản xuất protease có rất nhiều nhưng chỉ một số ít được công nhận để sản xuất protease ở quy mô công nghiệp. Nhóm vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* như *B. subtilis, B. velezensis, B. licheniformis, B. megaterum* chiếm ưu thế trong lĩnh vực công nghiệp, là nguyên liệu thích hợp để sản xuất protease ở quy mô lớn nhờ việc thu nhận sản phẩm dễ dàng, điều kiện nuôi cấy đơn giản, có hoạt tính ổn định ở nhiệt độ cao và các điều kiện pH. Khảo sát tác động của chiếu xạ gamma làm tăng khả năng sinh tổng hợp protease là một hướng nghiên cứu nhiều hứa hẹn cho ngành công nghiệp sản xuất protease. Đột biến ngẫu nhiên thường được tạo ra bằng các phương pháp vật lý và hóa học, chiếu xạ gamma, tia UV, tia X là các loại bức xạ ion hóa thường được sử dụng để gây đột biến (Hing *et al*., 2022). Các tác nhân vật lý như: các tia X, tia γ, α, β, neutron có bước sóng ngắn nên có khả năng ion hóa và khả năng xuyên sâu cao. Các tia phóng xạ có thể gây đột biến bằng cách làm đứt gãy DNA, thay đổi cấu trúc của DNA hoặc hình thành các hợp chất có hoạt tính không ổn định làm biến đổi DNA. Bức xạ ion hóa có thể tạo ra đột biến tại những vị trí xác định nhằm cải thiện hoạt tính của vi sinh vật (Khavari, 2020). Năm 2018, Huỳnh Đăng Sáng và đồng tác giả (2018) đã thực hiện chiếu xạ ba chủng *B. subtilis* B5, H12, VI bằng bức xạ gamma trên nguồn Co-60, kết quả cho thấy đột biến sinh tổng protease cao ở tất cả các liều chiếu xạ, tỷ lệ đột biến dường như cao hơn trong khoảng liều 700-1500 KGy. Tại khoảng liều này các tác giả nhận thấy số lượng tế bào sống sót sau chiếu xạ giảm từ 1000-10000 lần (3-4 đơn vị Log) so với dạng thuần không chiếu xạ. Như vậy, việc xử lý chiếu xạ có thể giúp tăng khả năng sinh tổng hợp protease. Với mong muốn sử dụng bức xạ gamma tạo dòng vi khuẩn *Bacillus* biến dị có khả năng sinh tổng hợp protease cao, nghiên cứu này bước đầu khảo sát ảnh hưởng của liều chiếu xạ gamma tới khả năng sống sót và sinh tổng hợp protease của vi khuẩn *Bacillus* spp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các chủng vi khuẩn *B. velezensis (*BS1*), B. subtilis (*BS2*), B. megaterum (*BS3*), B. licheniformis* (BL4) có khả năng sinh tổng hợp protease được lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ lên men, Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* lỏng NB có thành phần (g/L): peptone 5, NaCl 5, yeast extract 1,5, HM peptone 1,5, nước cất. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus* NA thạch có thành phần (g/L): peptone 5, NaCl 5,

Yeast extract 1,5, HM peptone 1,5, Agar 15, nước cất. Môi trường chứa cơ chất casein 0,1% có thành phần (g/L): casein 1, peptone 5, NaCl 5, yeast extract 1,5, HM peptone 1,5, agar 15, nước cất. Hóa chất nhuộm khảo sát vòng phân giải: amido black (Sigma), acetic acid (Sigma).

Phương pháp

Xác định hoạt tính protease bằng phương pháp cấy điểm

Môi trường chứa cơ chất casein 0,1% được hấp khử trùng và tiến hành đổ đĩa, các đĩa có đường kính bằng nhau được đổ cùng một thể tích (25 mL/1 đĩa ϕ9) để đảm bảo độ dày của lớp thạch casein là như nhau ở tất cả các đĩa thí nghiệm. Các chủng *Bacillus* sẽ được nuôi cấy trong môi trường NB và cấy ria trên đĩa thạch chứa môi trường NA. Sau đó, dùng que cấy lấy các khuẩn lạc riêng rẽ đưa vào đĩa thạch môi trường môi trường casein 0,1%, mỗi đĩa cấy 1 điểm. Mỗi chủng vi khuẩn sẽ được cấy 2 đĩa và lặp lại 3 lần. Ủ trong 48 giờ ở 37°C. Sau khi ủ tiến hành nhuộm các đĩa thạch bằng amido black 0,1% trong 30 phút, rửa nhuộm và quan sát vòng phân giải casein. Các chủng có vòng phân giải casein lớn là chủng có khả năng sinh tổng hợp protease cao.

Kích thước vòng phân giải casein được tính theo công thức:

$$A = D – d$$

Trong đó: A: Kích thước vòng phân giải (mm).

D: Đường kính vòng phân giải (mm).

d: Đường kính khuẩn lạc (mm).

Từ đó, chọn ra hai chủng *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp protease cao nhất.

Nuôi cấy huyền dịch tế bào

Dùng que cấy truyền các khuẩn lạc riêng rẽ của 2 chủng *Bacillus* vào bình tam giác chứa 100 mL môi trường NB, nuôi cấy lắc 120 vòng/phút, ở 37°C trong 24 giờ để thu huyền dịch tế bào sơ cấp. Sau khi nuôi cấy sơ cấp, chuyển 100 µL huyền dịch tế bào vào các ống nghiệm chứa môi trường NB (tỷ lệ 1/100) và tiếp tục nuôi cấy lắc 120 vòng/phút ở 37°C trong 24 giờ. Các ống nghiệm sau khi nuôi cấy thứ cấp được dán nhãn (ghi liều chiếu xạ dự kiến) và được xử lý chiếu xạ trên thiết bị gamma Co-60 tại Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

Chiếu xạ dung dịch nuôi cấy

Các ống nghiệm chứa huyền dịch tế bào vi khuẩn được đem xử lý chiếu xạ trên nguồn gamma Co-60 dải liều 0 - 1,25 kGy được chia làm 5 liều chiếu (0,25; 0,5; 0,75; 1,0 và 1,25 kGy) và 1 liều đối chứng (0 kGy), lặp lại 3 ống nghiệm cho mỗi liều chiếu.

Xác định số lượng tế bào vi sinh vật

Số lượng tế bào vi khuẩn của 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* trước và sau chiếu xạ được xác định thông qua đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa môi trường NA. Dịch nuôi cấy vi khuẩn (trước và sau xử lý chiếu xạ) được pha loãng theo dãy thập phân. 100 µL dịch nuôi cấy ở các độ pha loãng thích hợp được cấy vào đĩa petri chứa môi trường NA. Ba đĩa petri cho mỗi nồng độ pha loãng. Sử dụng que cấy trang dàn đều dịch nuôi cấy trên bề mặt thạch. Số khuẩn lạc được đếm sau 24 giờ nuôi cấy ở 37°C và từ đó tính ra số lượng tế bào trong 1 mL mẫu theo công thức:

$$Mi\ (CFU/mL) = Ai \times Di/V$$

Trong đó: Ai: Số khuẩn lạc trung bình trên đĩa.

Di: Nồng độ pha loãng.

V: Thể tích huyền dịch tế bào cấy vào mỗi đĩa (mL).

Sàng lọc các khuẩn lạc sinh tổng hợp protease cao từ 2 chủng *Bacillus* bằng xử lý chiếu xạ

Dịch huyền phù tế bào sau nuôi cấy thứ cấp được xử lý chiếu xạ dải liều 0 - 1,25 kGy. Tiến hành pha loãng dung dịch sau chiếu xạ tới nồng độ thích hợp và cấy trang trên đĩa petri chứa môi trường NA sao cho mỗi đĩa chứa khoảng 50 - 200 khuẩn lạc đơn, ủ đĩa trong 24 giờ. Lựa chọn 30 khuẩn lạc đơn ở mỗi liều chiếu để tiến hành kiểm tra khả năng sinh tổng hợp protease bằng phương pháp cấy chấm điểm trên đĩa thạch - casein. So sánh vòng phân giải, những khuẩn lạc có kích thước vòng phân giải lớn 10% so với chủng thuần được coi là các đột biến sinh tổng hợp protease cao. Tần số đột biến sinh tổng hợp protease cao ở mỗi liều chiếu xạ được tính theo công thức:

$$\text{Tần số đột biến (\%)} = (\text{Số khuẩn lạc đột biến} / \text{Số khuẩn lạc khảo sát}) \times 100$$

Đánh giá sự ổn định khả năng sinh tổng hợp protease của các khuẩn lạc tiềm năng qua các thế hệ

Các khuẩn lạc đột biến của các chủng *Bacillus* tiềm năng được kiểm tra khả năng sinh tổng hợp protease bằng phương pháp định tính dựa vào vòng phân giải casein qua các thế hệ. Trong nghiên cứu này, mỗi lần cấy truyền được xem là một thế hệ.

Xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được nhập và xử lý sơ bộ, tính giá trị trung bình và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Excel 2019, phân tích ANOVA một nhân tố các chỉ tiêu khảo sát bằng phần mềm Minitab 16.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp protease cao làm nguyên liệu chiếu xạ gamma

Bốn chủng vi khuẩn *Bacillus* thuần chủng có khả năng sinh tổng hợp protease được cung cấp, nuôi cấy riêng rẽ trên môi trường NB. Hoạt tính protease của chúng được khảo sát qua vòng phân giải casein xuất hiện trên đĩa thạch chứa cơ chất casein 0,1% và nhuộm bằng thuốc nhuộm amido black 0,1%, kết quả thu được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Kích thước vòng phân giải casein của 04 chủng vi khuẩn Bacillus

Thời gian (giờ)	Kích thước vòng phân giải (mm)				P -value
	BS1	BS2	BS3	BL4	
48	$19,75^{b} \pm 0,67$	$17,06^{c} \pm 0,78$	$16,28^{c} \pm 1,65$	$27,15^{a} \pm 1,29$	0,000

Trong đó, các chữ cái a, b, c chỉ sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (P < 0,01).

Ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ tới khả năng sống sót và khả năng sinh tổng hợp protease tới hai chủng vi khuẩn *Bacillus*

Ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ tới khả năng sống sót của vi khuẩn *Bacillus*

Sau khi khảo sát khả năng sinh tổng hợp protease, hai chủng vi khuẩn *Bacillus* được chọn sẽ được nuôi cấy để thu huyền dịch tế bào thứ cấp và các ống nghiệm chứa dịch tế bào sẽ được đem đi chiếu xạ bằng nguồn gamma Co-60 dải liều 0 – 1,25 kGy (0; 0,25; 0,75; 1,0 và 1,25 kGy). Tác động của bức xạ gamma tại các liều chiếu khác nhau tới khả năng sống sót tới hai chủng *Bacillus* được xác định thông qua việc đếm số khuẩn lạc ở cả dịch nuôi cấy xử lý chiếu xạ và không chiếu xạ. Khả năng sống sót của vi khuẩn bị ảnh hưởng đáng kể bởi bức xạ gamma, tỷ lệ sống sót ở cả 2 chủng đều giảm dần khi tăng liều bức xạ. Tác động của bức xạ được biểu hiện dưới hàm logarit của mật số vi khuẩn sống sót (log10 CFU/mL) tại các liều chiếu xạ sau 24 giờ nuôi cấy (Bảng 2).

Bảng 2. Khả năng sống sót 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* tại các liều chiếu sau 24 giờ nuôi cấy

Liều chiếu (kGy)	Mật số vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy			
	BS1		BL4	
	Log10 (CFU/mL)	CFU/mL	Log10 (CFU/mL)	CFU/mL
ĐC	$8,366^{a} \pm 0,004$	$2,33 \times 10^{8}$	$6,724^{a} \pm 0,035$	$0,55 \times 10^{7}$
0,25	$8,193^{b} \pm 0,016$	$1,56 \times 10^{8}$	$6,639^{ab} \pm 0,007$	$0,42 \times 10^{7}$
0,5	$7,741^{c} \pm 0,012$	$5,51 \times 10^{7}$	$6,544^{b} \pm 0,018$	$0,31 \times 10^{7}$
0,75	$7,406^{d} \pm 0,029$	$2,55 \times 10^{7}$	$6,423^{c} \pm 0,012$	$0,24 \times 10^{7}$
1	$6,971^{e} \pm 0,059$	$0,94 \times 10^{7}$	$6,203^{d} \pm 0,038$	$0,9 \times 10^{6}$
1,25	$6,842^{f} \pm 0,022$	$0,67 \times 10^{7}$	$6,060^{e} \pm 0,027$	$0,8 \times 10^{6}$

Trong cùng một cột các giá trị trung bình có các ký tự theo sau khác nhau có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (P<0,01).

Kết quả cũng cho thấy sự sống sót của vi khuẩn *Bacillus* phụ thuộc vào liều chiếu xạ. Sau 24 giờ nuôi cấy, mật số vi khuẩn có trong dịch chiếu xạ giảm dần khi liều chiếu xạ tăng. Ở chủng BS1 mật số vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy giảm dần từ 8,366 log10 (CFU/mL) tương đương $2,33 \times 10^{8}$ CFU/mL ở đối chứng xuống còn 6,842 log10 (CFU/mL) tương đương $0,67 \times 10^{7}$ (CFU/mL) ở liều 1,25 kGy. Tương tự ở chủng BL4 giảm dần từ 6,724 log10 (CFU/mL) tương đương 0,55 × 107 CFU/mL ở đối chứng xuống còn 6,060 log10 (CFU/mL) tương đương $0,8 \times 10^{6}$ CFU/mL ở liều 1,25 kGy.

Nghiên cứu thực hiện với *Bacillus* sp. NMBCC 10023 được phân lập từ mẫu đất cho thấy sau khi được chiếu xạ gamma với liều lượng từ 1 kGy đến 40 kGy thì số lượng vi khuẩn sống sót trên đĩa thạch giảm khi liều chiếu xạ

gamma tăng (Chyan *et al*., 2010). Không có mẫu phân lập nào được phục hồi ở liều chiếu xạ lớn hơn 10 kGy. Nghiên cứu cũng đã xác định liều gây chết 90% (LD90) của bức xạ gamma đối với *Bacillus* sp. NMBCC 0023 nằm trong khoảng 2 - 4 kGy. Trong một nghiên cứu khác cho thấy tỷ lệ chết của *B. subtilis* NCD-2 tăng theo liều chiếu xạ gamma trong khoảng 100 đến 2000 Gy và ở liều 1000 Gy tỷ lệ chết lên đến 99,5% (Liu *et al*., 2011). Sự khác biệt này cũng có thể giải thích khi cho rằng các yếu tố nhiệt độ, môi trường sinh trưởng, thành phần hóa học của môi trường cấy,… cũng như điều kiện sinh lý và khả năng tự sửa chữa của tế bào đã ảnh hưởng tới khả năng sống sót của vi khuẩn sau khi chiếu xạ.

Ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ tới khả năng sinh tổng hợp protease của hai chủng vi khuẩn *Bacillus*

Khả năng sinh tổng hợp protease của hai chủng *Bacillus* sau chiếu xạ

Các khuẩn lạc đơn kháng xạ đã được cấy trang và lựa chọn 30 khuẩn lạc đơn có khả năng phát triển tốt cho mỗi liều chiếu để kiểm tra khả năng sinh tổng hợp protease bằng phương pháp cấy chấm điểm trên đĩa thạch casein. Những khuẩn lạc có kích thước vòng phân giải casein lớn hơn 10% so với chủng thuần được xem là các khuẩn lạc đột biến có khả năng sinh tổng hợp protease cao. Từ kết quả khảo sát tính ra tần số đột biến sinh tổng hợp protease cao tại mỗi liều chiếu xạ khác nhau.

Bảng 3. Tần số đột biến sinh tổng hợp protease cao của 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* tại các liều chiếu xạ

Liều chiếu (kGy)	BS1		BL4	
	Kích thước vòng phân giải (mm)	Tần số đột biến (%)	Kích thước vòng phân giải (mm)	Tần số đột biến (%)
0(ĐC)	19,98	-	26,99	-
0,25	$19,92^{d} \pm 0,020$	16,67	$27,87^{c} \pm 0,010$	20,00
0,5	$20,29^{c} \pm 0,053$	16,67	$27,64^{d} \pm 0,045$	23,33
0,75	$18,90^{e} \pm 0,023$	10,00	$25,95^{e} \pm 0,026$	16,67
1	$20,86^{a} \pm 0,040$	36,67	$29,82^{a} \pm 0,030$	40,00
1,25	$20,72^{b} \pm 0,020$	26,67	$29,40^{b} \pm 0,050$	33,33

Trong cùng một cột các giá trị trung bình có các ký tự theo sau khác nhau có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (P<0,01).

Chiếu xạ là quá trình chuyền năng lượng của bức xạ cho đối tượng bị chiếu xạ. Khi chiếu xạ các chủng vi khuẩn ở dạng dung dịch nuôi cấy có thể làm tăng ảnh hưởng của xử lý chiếu xạ lên vi khuẩn do sự gia tăng quá trình hình thành các gốc tự do từ các phân tử nước gây ra bởi bức xạ. Vì vậy, chiếu xạ vi khuẩn trong dung dịch nuôi cấy có thể gây ảnh hưởng tới vi khuẩn nhiều hơn so với chiếu xạ chúng trên môi trường thạch. Việc sử dụng phương án chiếu xạ dung dịch nuôi cấy vi khuẩn sẽ được lựa chọn để sàng lọc chủng *Bacillus* đột biến có khả năng sinh tổng hợp protease cao.

Tần số đột biến thường bị ảnh hưởng bởi liều chiếu xạ (Hoe *et al*., 2016). Từ Bảng 3 cho thấy đột biến làm tăng khả năng sinh tổng hợp protease cao xuất hiện ở tất cả các liều chiếu xạ và dường như tần số đột biến sinh tổng hợp protease cao hơn ở khoảng liều 1 – 1,25 kGy. Trong đó, tần số đột biến cao nhất ở liều chiếu 1,0 kGy và lặp lại ở cả 2 chủng BS1 và BL4 lần lượt với tần số là 36,67% và 40%. Như vậy, dựa vào khả năng sống sót phụ thuộc vào liều chiếu xạ của 2 chủng này (bảng 2) cho thấy tần số đột biến sinh tổng hợp protease cao thu được nhiều hơn khi số lượng tế bào sống sau chiếu xạ giảm khoảng 1000 lần so với chủng thuần không chiếu xạ. Nghiên cứu của Trần Băng Diệp và đồng tác giả (2017) sử dụng huyền dịch tế bào ở giai đoạn phát triển theo hàm mũ và đĩa thạch dinh dưỡng có cấy tế bào của 3 chủng vi khuẩn *B. subtilis* này được xử lý chiếu xạ ở dải liều 0-3000 Gy trên nguồn Co-60 tại Trung tâm Chiếu xạ Hà Nội. Kết quả cho thấy dù xử lý chiếu xạ theo cách nào thì tỷ lệ vi khuẩn sống sót đều giảm theo liều chiếu và đường cong sống sót của chúng dường như tuân theo lý thuyết mô hình truyền năng lượng. Đột biến sinh protease cao ở các chủng *B. subtilis* xuất hiện ở tất cả các liều xạ và tỷ lệ đột biến cao hơn trong khoảng liều từ 700-1500 Gy là khoảng liều mà số lượng tế bào sống sót sau chiếu xạ giảm từ 3-4 đơn vị Log so với dạng thuần không chiếu xạ. Nghiên cứu cho thấy tỷ lệ tế bào sống của chủng vi khuẩn *B. megaterium* NMBCC50018, *B. subtilis* NMBCC50025 giảm dần theo liều chiếu xạ, LD50 của *B. megaterium* NMBCC50018, *B. subtilis* NMBCC50025 được xác định lần lượt là 1,2 kGy, 0,2 kGy. Mỗi loài vi khuẩn bị ảnh hưởng khác nhau khi được chiếu xạ bằng bức xạ gamma (Hing *et al*., 2022).

Để tạo ra các đột biến vi sinh vật bằng bức xạ gamma, các phương pháp với liều lượng bức xạ và điều kiện chiếu xạ khác nhau đã được công bố và tổng hợp (Hoe *et al*., 2016). Tuy nhiên, không có bất kỳ một khuyến cáo chung nào về khoảng liều tối ưu để đạt được tỷ lệ đột biến cao do ảnh hưởng của bức xạ tới mỗi loài hay chủng vi sinh vật là không giống nhau. Do đó, việc xác định liều chiếu tối ưu gây đột biến vi khuẩn là không đơn giản. Tổng hợp các nghiên cứu có liên quan để có được thông tin về hiệu quả của liều xử lý, điều kiện chiếu xạ là cần thiết để xác định khoảng liều phù hợp cho các đột biến mong muốn.

Đánh giá sự ổn định khả năng sinh tổng hợp protease của các khuẩn lạc tiềm năng sau ba thế hệ

Nhằm mục đích xác định sự ổn định về khả năng sinh tổng hợp protease của các khuẩn lạc tiềm năng ở các thế hệ tiếp theo trong nghiên cứu này tiến hành khảo sát khả năng sinh tổng hợp protease của các khuẩn lạc sau ba thế hệ liên tục (ba lần cấy truyền, mỗi lần cách nhau 1 tháng). Từ kết quả khảo sát khả năng sinh tổng hợp protease của hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sau chiếu xạ gamma thu được các khuẩn lạc sinh tổng hợp protease cao, từ đó chọn ra 5 khuẩn lạc có kích thước vòng phân giải casein lớn nhất từ mỗi chủng vi khuẩn *Bacillus* (Bảng 4).

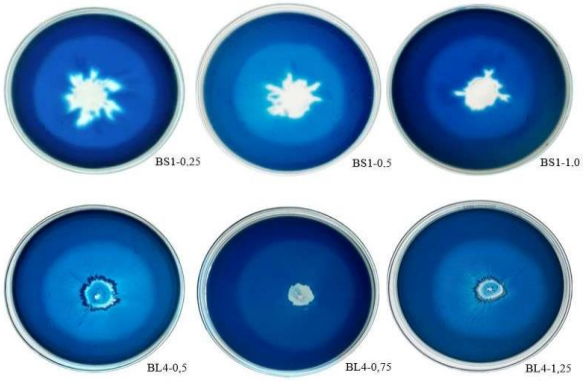
Bảng 4. Kích thước vòng phân giải casein của 5 khuẩn lạc có khả năng sinh tổng hợp protease vượt trội của hai chủng vi khuẩn *Bacillus*

Ký hiệu	Liều chiếu (kGy)	Kích thước (mm)	Ký hiệu	Liều chiếu (kGy)	Kích thước (mm)
B. velezensis BS1	Đối chứng	19,98	*B. licheniformis* BL4	Đối chứng	26,99
BS1.1	0,25	$26,60^{b} \pm 0,113$	BL4.1	0,5	$41,30^{b} \pm 0,114$
BS1.2	0,25	$25,55^{c} \pm 0,141$	BL4.2	0,75	$42,35^{a} \pm 0,080$
BS1.3	0,5	$26,95^{a} \pm 0,050$	BL4.3	0,75	$42,35^{a} \pm 0,070$
BS1.4	1	$24,85^{d} \pm 0,157$	BL4.4	1,25	$40,60^{c} \pm 0,854$
BS1.5	1	$24,85^{d} \pm 0,132$	BL4.5	1,25	$40,25^{c} \pm 0,087$

Trong cùng một cột các giá trị trung bình có các ký tự theo sau khác nhau có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (P<0,01).

Ở chủng vi khuẩn *B. velezensis* (BS1), các khuẩn lạc thu nhận có kích thước vòng phân giải casein từ 24,85 mm đến 26,95 mm và lớn hơn so với chủng thuần từ 1,24 – 1,35 lần. Đối với chủng vi khuẩn *B. licheniformis* (BL4) các khuẩn lạc có kích thước vòng phân giải casein từ 40,25 mm đến 42,35 mm và lớn hơn so với chủng thuần từ 1,49 – 1,57 lần.

Các khuẩn lạc tiềm năng sinh tổng hợp protease cao nhất đã chọn từ hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sẽ được cấy truyền và khảo sát khả năng sinh tổng hợp protease thế hệ thứ hai thông qua kích thước vòng phân giải casein xuất hiện trên đĩa thạch - casein.



Hình 1. Vòng phân giải casein của các khuẩn lạc sinh tổng hợp protease cao nhất của chủng BS1 và BL4

Bảng 5. Kết quả đánh giá khả năng sinh tổng hợp protease của 5 khuẩn lạc vượt trội từ hai chủng *Bacillus* ở thế hệ thứ hai

Ký hiệu	Liều chiếu (kGy)	Kích thước (mm)	Ký hiệu	Liều chiếu (kGy)	Kích thước (mm)
BS1	ĐC	$20,03^{c} \pm 0,205$	BL4	ĐC	$27,04^{d} \pm 0,238$
BS1.1	0,25	$26,60^{a} \pm 0,350$	BL4.1	0,5	$41,42^{ab} \pm 0,202$
BS1.2	0,25	$25,43^{b} \pm 0,202$	BL4.2	0,75	$42,23^{a} \pm 0,535$
BS1.3	0,5	$26,72^{a} \pm 0,202$	BL4.3	0,75	$42,12^{a} \pm 0,202$
BS1.4	1	$25,08^{b} \pm 0,202$	BL4.4	1,25	$40,48^{bc} \pm 0,202$
BS1.5	1	$25,20^{b} \pm 0,350$	BL4.5	1,25	$39,78^{c} \pm 0,535$

Kích thước vòng phân giải được tính bằng trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các giá trị trung bình có các ký tự theo sau khác nhau có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê (P<0,01).

Từ kết quả đánh giá khả năng sinh tổng hợp protease của các khuẩn lạc tiềm năng ở thế hệ thứ 2 bằng phương pháp định tính dựa vào đường kính vòng phân giải casein, có thể nhận thấy, ở chủng BS1 có khuẩn lạc BS1.1 ở liều chiếu 0,25 kGy và BS1.3 từ liều chiếu 0,5 kGy có kích thước vòng phân giải casein lớn hơn, có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các khuẩn lạc còn lại lần lượt là 26,60 mm và 26,72 mm (Bảng 5). Chủng BL4 có khuẩn lạc BL4.2 và BL4.3 đều ở liều chiếu 0,75 kGy có kích thước vòng phân giải casein lần lượt là 42,23 mm và 42,12 mm. Các khuẩn lạc này cho kích thước vòng phân giải casein có khả năng sinh enzyme vượt trội hơn so với chủng thuần và các khuẩn lạc đột biến còn lại.

Bốn khuẩn lạc tiềm năng từ hai chủng vi khuẩn *Bacillus* BS1 và BL4 ở thế hệ thứ hại (BS1.1, BS1.3, BL4.2 và BL4.3) được lựa chọn để tiếp tục cấy truyền và đánh giá sự ổn định khả năng sinh tổng hợp protease ở thế hệ thứ ba. Kết quả khảo sát sau 3 thế hệ được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Kích thước vòng phân giải casein của các khuẩn lạc tiềm năng từ chủng vi khuẩn BS1 và BL4 sau 3 thế hệ

Thế hệ	Kích thước vòng phân giải (mm)			
	BS1.1	**BS1.3**	**BL4.2**	**BL 4.3**
ĐC	$20,03^{b} \pm 0,205$	$20,03^{b} \pm 0,205$	$27,09^{b} \pm 0,269$	$27,09^{b} \pm 0,269$
Thế hệ thứ 1	$26,60^{a} \pm 0,173$	$26,95^{a} \pm 0,492$	$42,35^{a} \pm 0,132$	$42,35^{a} \pm 0,150$
Thế hệ thứ 2	$26,60^{a} \pm 0,350$	$26,72^{a} \pm 0,202$	$42,23^{a} \pm 0,535$	$42,12^{a} \pm 0,202$
Thế hệ thứ 3	$26,72^{a} \pm 0,115$	$26,76^{a} \pm 0,064$	$42,23^{a} \pm 0,350$	$42,00^{a} \pm 0,120$

Kích thước vòng phân giải được tính bằng trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các giá trị trung bình có các ký tự theo sau có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê (P<0,01).

Từ kết quả đánh giá sự ổn định về khả năng sinh tổng hợp protease của 4 khuẩn lạc BS1.1, BS1.3, BL4.2 và BL4.3 cho thấy kích thước vòng phân giải casein của các khuẩn lạc này lớn hơn so với chủng thuần và ổn định ít nhất sau 3 thế hệ liên tiếp.

KẾT LUẬN

Tuyển chọn được 2 chủng *B. velezensis* (BS1), *B. licheniformis* (BL4) có kích thước vòng phân giải casein lớn nhất lần lượt là 19,75 mm và 27,15 mm. Tỷ lệ sống sót của *B. velezensis*, *B. licheniformis* giảm dần theo sự tăng dần liều chiếu xạ. Khoảng liều chiếu xạ phù hợp để sàng lọc các chủng sau chiếu xạ có khả năng sinh tổng hợp protease cao là 1 – 1,25 kGy. Sau chiếu xạ sàng lọc được 4 khuẩn lạc có khả năng sinh tổng hợp protease cao vượt trội từ mỗi chủng BS1 và BL4. Đối với *B. velezensis* (BS1) chọn được 2 khuẩn lạc BS1.1 và BS1.3 ở liều chiếu 0,25 kGy và 0,5 kGy có kích thước vòng phân giải casein cao nhất lần lượt là 26,60 mm và 26,95 mm. Đối với chủng *B. licheniformis* (BL4) chọn được 2 khuẩn lạc BL4.2 và BL4.3 đều ở liều chiếu 0,75 kGy với kích thước vòng phân giải casein cao nhất là 42,35 mm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chyan JB, Ying LPW, Dzomir AZM, Hadin SKA, Tumirin NM (2010). Effects of gamma-rays on an indigenous *Bacillus* isolate. *RnD Seminar 2010: Research and Development Seminar 2010, Malaysia*.

Hoàng Đăng Sáng (2018). Nghiên cứu tạo chủng *Bacillus subtilis* đột biến có khả năng sinh protease cao bằng chiếu xạ gamma kết hợp với xử lý kháng sinh. *Luận văn Tốt nghiệp thạc sỹ*.

Hoe PCK, Rahim KA, Saud HM (2016). A review on microbial mutagenesis through gamma irradiation for agricultural applications. *Jurnal Sains Nuklear Malaysia,* 28(2), 20-29.

Liu G, Meng Y, Yang S, Bao F, Shang H (2011). Study on γ-ray irradiation mutation of *Bacillus subtilis* NCD-2. *Agricultural Science & Technology-Hunan*, 12(11), 1633-1743.

Khavari AP (2020). Role of oxidative stress response in radiosensitivity. *PhD dissertation*. *Stockholm University*.

Hing JN, Jong BC, Liew PWY, Elly Ellyna R, Shuhaimi (2022). Gamma radiation dose-response of gram-positive and gram-negative bacteria. *Malaysian Applied Biology,* 51(5): 107-112.

Trần Băng Diệp (2017). Nghiên cứu ứng dụng bức xạ ion hóa kết hợp công nghệ ribosome nhằm cải thiện khả năng sinh tổng hợp protease của vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Đề tài Nghiên cứu Khoa học cấp Bộ.

EVALUATION THE INFLUENCE OF GAMMA IRRADIATION ON THE PROTEASE ACTIVITY IN *Bacillus* spp.

Vo Thi Thuy Hue[1*], Phan Huu Tin[2], Nguyen Thi Thu Trang[1], Nguyen Thị Thuy Trang[2], Nguyen Minh Quang[2]

[1]*Department of Biological Sciences, Nong Lam University*

[2]*Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University*

SUMMARY

Protease is one of the most important commercially available enzymes. Proteases have a wide range of applications in different industries like detergent, leather and food industries. Microorganisms are known to play a vital role in technology for the production of extracellular enzymes on an industrial scale. A mong bacteria, *Bacillus* species are specific producers of extracellular proteases. The aim of this study was to produce *Bacillus* strains with high protease production by gamma irradiation treatment. After treatment, the irradiated cells were cultured in the nutrient agar plates. The survival rate, the mutation frequency of *Bacillus* strains were determined. The use of gamma radiation increased the production of enzyme by *Bacillus* compared to tests without radiation. The results showed that *Bacillus velezensis* (BS1) and *Bacillus licheniformis* (BL4) were capable of high protease production with a clear zone diameter of 19,75 mm and 27,15 mm, respectively. The radiation effects on their viability and mutant frequency were studied with radiation dose ranging form 0.25 to 1.25 kGy. The viability of *Bacillus* strains was much affected by gamma radiation and the survival rate of bacteria decreased with the increasing dose. The mutation frequency of *B. velezensis* (BS1) and *B. licheniformis* increasing with radiation dose ranging form 1 to 1.25 kGy. The greatest mutation frequency was determined as 36,67% (BS1) and 40% (BL4) obtained by irradiation at 1 kGy. Four bacteria from the two strains BS1 and BL4 following screening radiation were able to produce superior and stable proteases after at least three generations. Thus, gamma radiation treatment is an effective mutant method in enhancing the protease bioactivity of *Bacillus.*

Keywords: *Bacillus*, gamma radiation, mutation, protease, survival.

[*] Author for correspondence: Tel: 0765359935; Email: thuyhue@hcmuaf.edu.vn

KHẢO SÁT MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG TỚI QUÁ TRÌNH CHIẾT β-GLUCAN TỪ ĐẾ NẤM *Cordyceps militaris*

Vũ Thị Lan Anh, Võ Thị Kiều Thanh, Nguyễn Thị Lan Thanh

Viện Sinh học nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Cordyceps militaris (*C. militaris*), hay còn gọi là nấm đông trùng hạ thảo, là một loại nấm có giá trị dược liệu cao và được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền. Hiện nay *C. militaris* đã được nuôi trồng nhân tạo ở nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Tuy nhiên, quá trình nuôi trồng *C. militaris* sẽ tạo ra một lượng lớn phụ phẩm là đế nấm sau khi thu hoạch quả thể. Đế nấm *C. militaris* còn chứa nhiều hoạt chất trong đó có β-glucan nên có thể được tận dụng để chiết xuất thu nhận β-glucan. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm lựa chọn các điều kiện chiết thích hợp cho quá trình chiết xuất β-glucan từ đế nấm *C. militaris*. Trong nghiên cứu, điều kiện xử lý nguyên liệu trước khi chiết thích hợp là ngâm bột đế nấm bằng cồn 95° trong thời gian 12 giờ. Phương pháp tách chiết có sự hỗ trợ siêu âm với các điều kiện siêu âm ở nhiệt độ 80°C, công suất 200 W, tần số 37 kHz và thời gian 30 phút cho hàm lượng β-glucan trong dịch chiết cao hơn so với phương pháp không có hỗ trợ sóng siêu âm. Các điều kiện thích hợp cho quá trình chiết β-glucan là nhiệt độ chiết 100°C, giá trị pH dung môi là 10, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/50 (g/mL) và thời gian chiết 5 giờ. Hàm lượng β-glucan thu được sau quá trình chiết xuất là 12,418 g/100 g bột đế nấm.

Từ khóa: β-glucan, chiết kiềm, *Cordyceps militaris*, hỗ trợ siêu âm, polysaccharide.

MỞ ĐẦU

β-glucan là một nhóm polysaccharide được tạo nên từ các đơn phân là D-glucose gắn với nhau bằng liên kết β-(1-3), β-(1-4) hoặc β-(1-6) glycoside. β-glucan được chứng minh có nhiều tác dụng hữu ích đối với sức khỏe con người như giảm đường huyết, điều hòa miễn dịch, chống ung thư, chống oxy hóa, chống viêm và được tìm thấy trong thành tế bào của nấm, nấm men, vi khuẩn, tảo, địa y cũng như các loại ngũ cốc như yến mạch, lúa mạch (Susanti *et al.*, 2018). Trong các loại nấm, *Cordyceps militaris* được đánh giá là một trong những nguồn giàu β-glucan, với hàm lượng trong quả thể chiếm khoảng 34,3% trọng lượng khô (McCleary và Draga, 2016).

Nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris* chứa nhiều hoạt chất sinh học quý (cordycepin, adenosine, acid γ-aminobutyric, polysaccharide…) và hiện đang được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp dược phẩm, mỹ phẩm, thực phẩm chức năng... (Jędrejko *et al*., 2021). Với giá trị dược liệu cao và nhu cầu sử dụng ngày càng tăng, việc nuôi trồng nhân tạo *C. militaris* đã được phát triển mạnh trong những năm gần đây. Để sản xuất quả thể nấm *C. militaris* với quy mô lớn, giống nấm được nuôi trên các giá thể giàu dinh dưỡng, chứa nhiều thành phần khác nhau như gạo lứt, lúa mạch, đậu nành, cám gạo, nhộng tằm, nước dừa… và trong các điều kiện môi trường như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng được kiểm soát nghiêm ngặt. Khi đạt kích thước thích hợp, quả thể nấm *C. militaris* sẽ được thu hoạch, sản phẩm phụ là đế nấm còn lại bao gồm hệ sợi nấm, một phần quả thể còn sót lại và môi trường cơ chất chưa sử dụng hết. Đế nấm *C. militaris* còn chứa nhiều chất dinh dưỡng và các hoạt chất trong đó có β-glucan nên việc nghiên cứu tìm hướng phát triển các sản phẩm thương mại từ đế nấm sẽ giúp tận dụng tối đa lợi ích từ nguồn nấm *C. militaris* nuôi trồng nhân tạo, đồng thời góp phần bảo vệ môi trường. Hiện nay đã có một số nghiên cứu tận dụng đế nấm *C. militaris* làm thức ăn chăn nuôi hoặc dùng để chiết xuất adenosine và cordycepin (Nguyen *et al*., 2018). Mặc dù vậy, cho đến nay vẫn chưa có một nghiên cứu nào về việc thu nhận β-glucan từ đế nấm *C. militaris*.

β-glucan đã được thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau như từ các loại nấm ăn, nấm men, ngũ cốc và các nguồn nguyên liệu khác. Trong các phương pháp chiết xuất β-glucan thông dụng thì chiết kiềm được sử dụng rộng rãi nhờ có hiệu quả cao và chi phí thấp. Ngoài ra các kỹ thuật chiết xuất mới như chiết có hỗ trợ siêu âm, vi sóng, enzyme,… cũng đã được sử dụng để tăng hiệu quả chiết xuất (Leong *et al*., 2021). Nghiên cứu này sẽ khảo sát một số điều kiện chiết xuất β-glucan từ đế nấm *C. militaris*, làm tiền đề cho việc sản xuất thực phẩm chức năng chứa β-glucan từ đế nấm, giúp tận dụng được nguồn phụ phẩm từ việc nuôi trồng *C. militaris* để tạo sản phẩm có giá trị kinh tế cao hơn.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Đế nấm *C. militaris* được thu nhận tại hộ kinh doanh Hoàng Thảo, phường Long Trường, Tp. Thủ Đức, Tp. Hồ Chí Minh. Đế nấm được phơi khô, sau đó xay thành bột và rây qua rây lọc 1 mm. Bộ Kit thử β-glucan (nấm men và nấm) do hãng Megazyme - Ireland sản xuất.

Phương pháp nghiên cứu

Sơ đồ tách chiết β-glucan từ đế nấm *C. militaris*

Quá trình tách chiết β-glucan từ đế nấm *C. militaris* được tiến hành theo sơ đồ tổng quát trong Hình 1. Dịch lọc sau khi chiết được trung hòa bằng dung dịch H_2SO_4 0,1 N để điều chỉnh về giá trị pH là 7 trước khi tiến hành phân tích hàm lượng β-glucan.

Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng tới quá trình chiết β-glucan

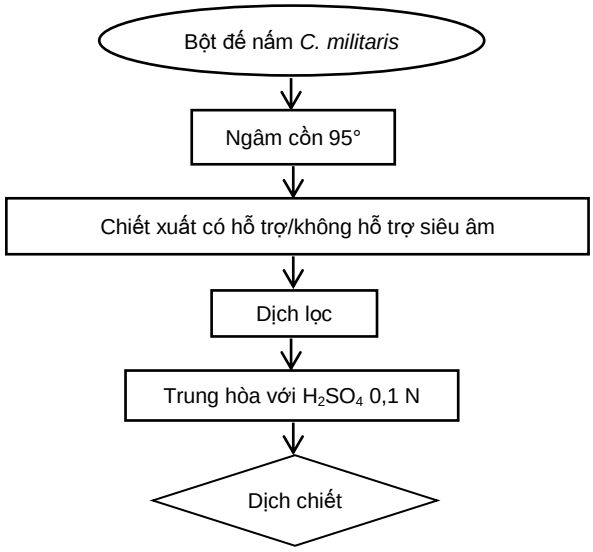
Khảo sát quá trình xử lý bột đế nấm bằng cồn và phương pháp tách chiết có hỗ trợ hoặc không hỗ trợ siêu âm: Cân chính xác mỗi mẫu 4 g bột đế nấm *C. militaris*. Các mẫu bột đế nấm được bố trí ba nghiệm thức: không ngâm cồn, ngâm với 120 mL cồn 95° trong 5 phút và ngâm với 120 mL cồn 95° trong 12 giờ (tỷ lệ nguyên liệu/cồn là 1/30 (g/mL)). Sau thời gian ngâm, lọc bỏ phần dịch nổi bằng giấy lọc Whatman số 1 (Anh). Sau đó thêm vào 120 mL nước cất để tiến hành chiết β-glucan. Đối với phương pháp tách chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm, các mẫu được siêu âm với các điều kiện là công suất siêu âm 200 W, tần số 37 kHz, nhiệt độ 80°C trong thời gian 30 phút. Quá trình chiết xuất được tiến hành ở 90°C trong 4 giờ. Sau đó lọc bằng giấy lọc Whatman số 1 để thu dịch chiết và xác định hàm lượng β-glucan trong dịch chiết.

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình chiết β-glucan với các nhiệt độ khảo sát lần lượt là 70, 80, 90 và 100°C. Các thông số được giữ cố định bao gồm: ngâm bột đế nấm với cồn 95° trong 12 giờ, tách chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm (80°C, 200 W, 37 kHz, 30 phút), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30 (g/mL), dung môi chiết là nước cất có giá trị pH là 7, thời gian chiết 4 giờ.

Khảo sát ảnh hưởng của pH dung môi đến quá trình chiết β-glucan với các giá trị pH khảo sát lần lượt là 7, 8, 9, 10, 11 và 12. Dung môi là nước cất được điều chỉnh về các giá trị pH khảo sát bằng dung dịch NaOH 1 N. Các thông số được giữ cố định bao gồm: ngâm bột đế nấm với cồn 95° trong 12 giờ, tách chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm (80°C, 200 W, 37 kHz, 30 phút), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30 (g/mL), nhiệt độ chiết 100°C, thời gian chiết 4 giờ.

Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến quá trình chiết β-glucan với các tỷ lệ khảo sát lần lượt là 1/30, 1/40 1/50, 1/60 và 1/70 (g/mL). Các thông số được giữ cố định bao gồm: ngâm bột đế nấm với cồn 95° trong 12 giờ, tách chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm (80°C, 200 W, 37 kHz, 30 phút), nhiệt độ chiết 100°C, pH dung môi là 10, thời gian chiết 4 giờ.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến quá trình chiết nước β-glucan với các thời gian chiết khảo sát lần lượt là 3, 4, 5, 6 và 7 giờ. Các thông số được giữ cố định bao gồm: ngâm bột đế nấm với cồn 95° trong 12 giờ, tách chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm (80°C, 200 W, 37 kHz, 30 phút), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/50 (g/mL), nhiệt độ chiết 100°C, pH dung môi là 10.



Hình 1. Sơ đồ tách chiết β-glucan từ đế nấm *C. militaris*

Phương pháp phân tích

Hàm lượng β-glucan được xác định bởi sự chênh lệch giữa tổng glucan và α-glucan bằng bộ Kit thử β-glucan cho nấm men và nấm của Megazyme (Ireland), cách thực hiện được tiến hành theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

Xác định tổng glucan: Cân chính xác khoảng 90 mg mẫu cho vào ống nghiệm có nắp vặn, thêm vào 2 mL dung dịch H_2SO_4 12 M (giữ lạnh trong đá), vặn nắp ống và trộn đều bằng máy vortex, ủ trong bể nước đá 2 giờ.Thêm 4 mL nước cất vào mỗi ống, vặn nắp và trộn đều trong 10 giây. Sau đó thêm 6 mL nước cất, vặn nắp và trộn đều thêm 10 giây. Nới lỏng nắp và đặt ống nghiệm trong bể nước sôi. Sau 5 phút, vặn chặt nắp và tiếp tục ủ trong 2 giờ. Làm nguội ống nghiệm đến nhiệt độ phòng và cẩn thận nới lỏng nắp. Chuyển toàn bộ nội dung của từng ống nghiệm vào một bình định mức 100 mL, tráng ống bằng đệm sodium acetate 200 mM (pH 4,5). Thêm 6 mL dung dịch NaOH 8 M vào bình định mức và điều chỉnh thể tích với đệm sodium acetate 200 mM (pH 4,5) cho đủ 100 mL. Trộn các thành phần bằng cách đảo ngược. Ly tâm một phần dung dịch ở 13000 vòng/phút trong 10 phút. Chuyển 0,1 mL dịch nổi vào phần đáy của một ống nghiệm, thêm 0,1 mL hỗn hợp exo-1,3-β-glucanase (20 U/mL) và β-glucosidase (4 U/mL) trong đệm sodium acetate 200 mM (pH 4,5) vào đáy của ống nghiệm, trộn đều bằng máy vortex và ủ ở 40°C trong 60 phút. Tiếp tục thêm 3 mL thuốc thử GOPOD vào ống nghiệm và ủ ở 40°C trong 20 phút. Đo độ hấp thụ quang của dung dịch ở 510 nm, đây là độ hấp thụ của mẫu thử nghiệm tổng glucan. Mẫu thử không bao gồm 0,2 mL đệm sodium acetate 200 mM (pH 4,5) và 3 mL thuốc thử GOPOD. Mẫu D-glucose chuẩn bao gồm 0,1 mL dung dịch D-glucose chuẩn (1 mg/mL); 0,1 mL đệm sodium acetate 200 mM (pH 4,5) và 3 mL thuốc thử GOPOD. Mẫu thử không và mẫu D-glucose chuẩn được ủ ở 40°C trong 20 phút và đo độ hấp thụ quang ở 510 nm.

Xác định α-glucan: Cân chính xác khoảng 100 mg mẫu cho vào ống nghiệm. Thêm vào một cục khuấy từ (5 × 15 mm), tiếp theo là 2 mL NaOH 1,7 M và khuấy 20 phút trong một bể nước đá trên một máy khuấy từ. Thêm 8 mL đệm sodium acetate 1,2 M (pH 3,8) vào mỗi ống và trộn đều bằng máy vortex. Ngay lập tức thêm 0,2 mL hỗn hợp amyloglucosidase (1630 U/mL) và invertase (500 U/mL) vào ống nghiệm, trộn đều bằng máy vortex và để ống nghiệm trong bể ổn nhiệt ở 40°C. Ủ ống nghiệm ở 40°C trong 30 phút. Chuyển toàn bộ dung dịch trong ống nghiệm vào bình định mức 100 mL và điều chỉnh thể tích bằng nước cất. Sau đó ly tâm một phần dung dịch ở 13000 vòng/phút trong 10 phút. Chuyển 0,1 mL dịch nổi vào một ống nghiệm, thêm vào 0,1 mL đệm sodium acetate 200 mM (pH 4,5) cùng 3 mL thuốc thử GOPOD và ủ ở 40°C trong 20 phút. Đo độ hấp thụ của dung dịch ở 510 nm, đây là độ hấp thụ của mẫu thử nghiệm α-glucan.

Tổng glucan (% w/w) = $\Delta A \times \frac{F}{W} \times 90$ α-glucan (% w/w) = $\Delta A \times \frac{F}{W} \times 90$ β-glucan = Tổng glucan − α-glucan

Trong đó: ΔA: độ hấp thụ của mẫu thử nghiệm (tổng glucan hoặc α-glucan) − độ hấp thụ của mẫu thử không

F: hệ số chuyển đổi độ hấp thụ thành µg của D-glucose, $F = \frac{100\ (\mu g \text{ của D-glucose chuẩn})}{\text{Độ hấp thụ GOPOD của 100 µg D-glucose chuẩn}}$

W: khối lượng của mẫu phân tích (mg)

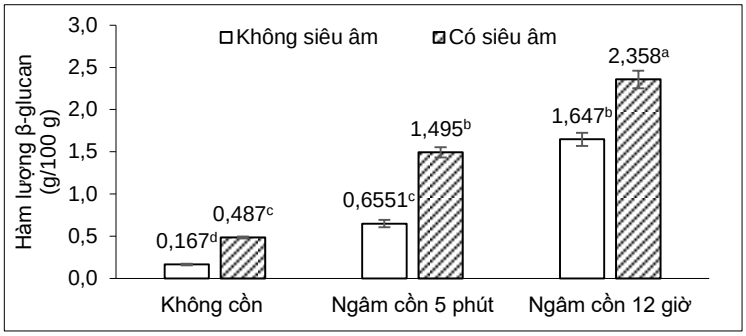
Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và phần mềm thống kê JMP ® 11. Các thí nghiệm trong nghiên cứu được lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trung bình được so sánh bằng phân tích One-way Anova và kiểm định Tukey.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát quá trình xử lý nguyên liệu và phương pháp chiết

Kết quả khảo sát quá trình xử lý nguyên liệu bằng cồn và lựa chọn phương pháp chiết được trình bày trong Hình 2. Xử lý bột đế nấm bằng cồn 95° trước khi chiết sẽ thu được hàm lượng β-glucan cao hơn so với khi không xử lý bằng cồn. Đồng thời, phương pháp chiết có hỗ trợ siêu âm (80°C, 200 W, 37 kHz, 30 phút) cho hàm lượng β-glucan cao hơn phương pháp không hỗ trợ siêu âm. Hàm lượng β-glucan thu được là cao nhất khi bột đế nấm được ngâm cồn trong 12 giờ và chiết xuất có hỗ trợ siêu âm (2,358 ± 0,104 g/100 g bột đế nấm). Thành phần chất béo trong quả thể *C. militaris* chiếm 8,8% và trong hệ sợi nấm chiếm 2,2% trọng lượng khô (Chan *et al*., 2015). Việc xử lý bột đế nấm *C. militaris* bằng cồn sẽ giúp hòa tan chất béo và loại bỏ các hợp chất phân tử thấp làm cho thành tế bào dễ thẩm thấu hơn, do đó làm tăng hiệu quả chiết xuất (Frioui *et al.*, 2018). Trong nghiên cứu của Liu và đồng tác giả (2020), bột nấm *C. militaris* cũng được ngâm cồn 95° trong 12 giờ trước khi trích ly để thu nhận polysaccharide. Kết quả thí nghiệm cho thấy phương pháp chiết có sự hỗ trợ của sóng siêu âm giúp cải thiện khả năng chiết β-glucan từ đế nấm. Sóng siêu âm sẽ tạo ra các bong bóng khí trong dung môi và khi các bong bóng này vỡ ra sẽ dẫn đến sự phá vỡ các màng sinh học, giúp giải phóng của các hợp chất, tăng cường sự thâm nhập của dung môi vào các nguyên liệu, từ đó có thể tăng hiệu suất chiết xuất (Villares *et al.*, 2012). Như vậy, việc xử lý bột đế nấm bằng cách ngâm cồn 95° trong thời gian 12 giờ và chiết có hỗ trợ sóng siêu âm cho hàm lượng β-glucan trong dịch chiết cao nhất và được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

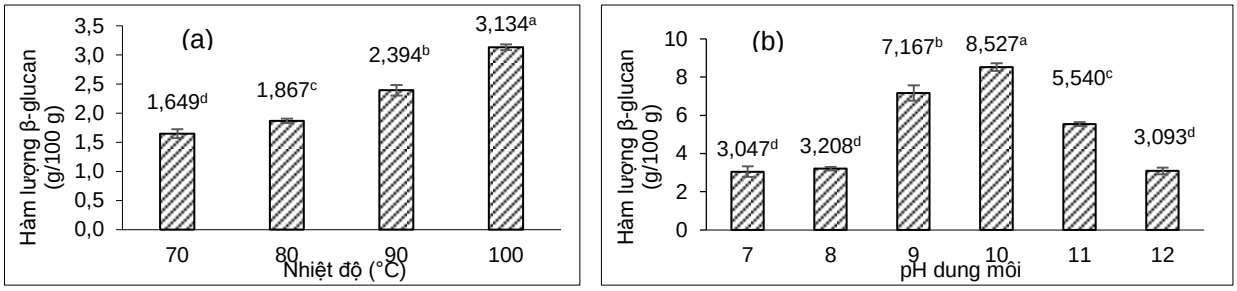


Hình 2. Ảnh hưởng của phương pháp xử lý nguyên liệu với cồn và phương pháp chiết lên quá trình chiết β-glucan

(Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05))

Ảnh hưởng của nhiệt độ lên quá trình chiết β-glucan

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên quá trình chiết β-glucan (Hình 3a) cho thấy khi nhiệt độ chiết tăng thì hàm lượng β-glucan cũng tăng theo. Hàm lượng β-glucan thu được thấp nhất khi ở nhiệt độ 70°C (1,649 ± 0,076 g/100 g bột đế nấm) và đạt giá trị cao nhất ở nhiệt độ chiết là 100°C (3,134 ± 0,049 g/100 g bột đế nấm). Nhiệt độ là một yếu tố có tác động mạnh lên khả năng chiết xuất polysaccharide trong nấm. Nhiệt độ tăng làm gia tăng độ khuếch tán và hòa tan của polysaccharide từ tế bào nấm vào trong dung môi chiết, từ đó làm tăng hiệu suất chiết xuất (Smiderle *et al*., 2017). Wang và đồng tác giả (2021) sử dụng nhiệt độ 95°C để chiết β-glucan từ quả thể nấm *C. militaris.* Trong khi đó, nghiên cứu của Liu và đồng tác giả (2020) sử dụng nhiệt độ chiết là 90°C để trích ly polysaccharide từ sợi nấm *C. militaris*. Trong nghiên cứu này, nhiệt độ chiết 100°C cho hàm lượng β-glucan trong dịch chiết cao nhất do đó được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH dung môi lên quá trình chiết β-glucan. (a) Nhiệt độ, (b) pH dung môi

(Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05))

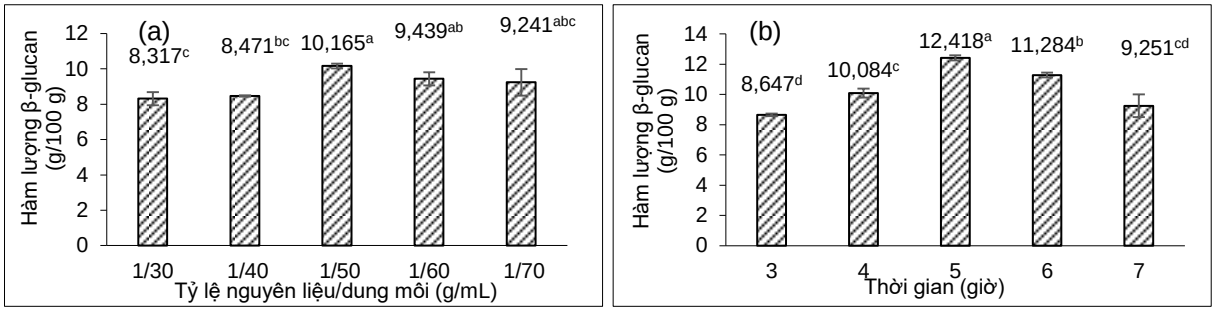
Ảnh hưởng của pH dung môi lên quá trình chiết β-glucan

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH dung môi lên quá trình chiết β-glucan (Hình 3b) cho thấy ban đầu khi pH dung môi tăng từ pH 7 lên pH 10 thì hàm lượng β-glucan cũng tăng theo, nhưng khi giá trị pH dung môi tăng lên 11 thì hàm lượng β-glucan lại giảm mạnh. Trong các pH dung môi khảo sát thì hàm lượng β-glucan thu được cao nhất khi dung môi có giá trị pH là 10 (8,527 ± 0,198 g/100 g bột đế nấm). Kết quả thí nghiệm cho thấy môi trường kiềm thích hợp cho quá trình trích ly β-glucan từ bột đế nấm. Việc chiết xuất bằng kiềm giúp phá hủy vách tế bào nấm, phân cắt liên kết giữa glucan và protein trong vách tế bào, cho phép sự giải phóng của polysaccharide nội bào và chiết xuất các glucan tan trong kiềm (Leong *et al*., 2021). Nghiên cứu của Lee và đồng tác giả (2017) cũng lựa chọn dung môi có pH 10 để trích ly β-glucan từ cám yến mạch. Trong nghiên cứu này, ban đầu việc tăng giá trị pH của dung môi sẽ làm tăng hàm lượng β-glucan, nhưng khi giá trị pH của dung môi quá cao thì hàm lượng β-glucan lại giảm xuống. Nguyên nhân có thể là do trong môi trường kiềm mạnh, một phần β-glucan bị phân giải do sự thủy phân của liên kết (1,3)-glycoside (Gangopadhyay *et al.*, 2015). Như vậy, sử dụng dung môi có giá trị pH là 10 cho hàm lượng β-glucan trong dịch chiết cao nhất và được chọn để chiết β-glucan từ đế nấm *C. militaris* trong các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lên quá trình chiết β-glucan

Theo kết quả thể hiện trong Hình 4a, hàm lượng β-glucan tăng dần khi tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thay đổi từ 1/30 đến 1/50 (g/mL). Giữa các tỷ lệ 1/50, 1/60 và 1/70 (g/mL) thì hàm lượng β-glucan thu được không có sự khác biệt về mặt thống kê. Ở tỷ lệ 1/30 và 1/40 (g/mL), lượng dung môi sử dụng ít sẽ dẫn đến việc khả năng tách chiết không hoàn toàn nên hàm lượng β-glucan thu được trong dịch chiết thấp. Khi tăng lượng dung môi lên sẽ làm tăng khả năng tiếp xúc của nguyên liệu với dung môi, tăng khả năng khuếch tán của chất rắn vào dung môi, dẫn đến hiệu quả chiết xuất tăng lên. Tuy nhiên, hàm lượng hoạt chất sẽ không tiếp tục tăng khi quá trình trích ly

đạt trạng thái cân bằng, khi đó việc tiếp tục tăng lượng dung môi sẽ gây lãng phí dung môi và làm loãng dịch chiết (Nguyễn *et al*., 2018). Nghiên cứu của Liu và đồng tác giả (2020) đã chọn 1/40 (g/mL) là tỷ lệ nguyên liệu/dung môi để chiết nước nóng polysaccharide từ sợi nấm *C. militaris*. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/50 (g/mL) cho hàm lượng β-glucan trong dịch chiết cao, đồng thời sử dụng lượng dung môi ít hơn tỷ lệ 1/60 và 1/70 (g/mL) nên được chọn để chiết β-glucan từ đế nấm *C. militaris* trong các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi và thời gian lên quá trình chiết β-glucan. (a) Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, (b) Thời gian chiết

(Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05))

Ảnh hưởng của thời gian chiết lên quá trình chiết β-glucan

Kết quả phân tích hàm lượng β-glucan theo thời gian chiết cho thấy khi tăng thời gian từ 3 đến 5 giờ thì hàm lượng β-glucan tăng lên, nhưng khi tiếp tục kéo dài thời gian chiết lên 6 giờ thì hàm lượng β-glucan giảm xuống (Hình 4b). Hàm lượng β-glucan đạt giá trị cao nhất ở thời gian chiết là 5 giờ và thấp nhất ở thời gian chiết là 3 giờ và 7 giờ. Trong quá trình chiết xuất, thời gian chiết tăng thì các hoạt chất trong nguyên liệu khuếch tán từ tế bào ra dung môi nhiều hơn dẫn đến hàm lượng β-glucan tăng lên. Tuy nhiên, thời gian chiết quá dài lại làm hàm lượng β-glucan thu được giảm xuống, có thể là do một phần β-glucan đã bị hao hụt do sự phân cắt của liên kết 1-3 glycoside trong môi trường kiềm (Gangopadhyay *et al.*, 2015). Thời gian chiết quá dài còn gây lãng phí năng lượng và kéo dài quá trình sản xuất. Kết quả thu được cho thấy thời gian trích ly 5 giờ cho hàm lượng β-glucan trong dịch chiết cao nhất và được chọn để tiến hành trích ly β-glucan từ đế nấm *C. militaris*. Hàm lượng β-glucan thu được trong dịch chiết qua quá trình chiết xuất đế nấm *C. militaris* là 12,418 g/100 g bột đế nấm.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã khảo sát và tuyển chọn một số điều kiện chiết xuất β-glucan từ đế nấm sau khi thu hoạch quả thể *C. militaris*. Các điều kiện thích hợp cho quá trình chiết β-glucan từ đế nấm *C. militaris* là bột đế nấm được xử lý bằng cách ngâm cồn 95° trong 12 giờ; chiết xuất có sự hỗ trợ của sóng siêu âm ở các điều kiện 80°C, 200 W, 37 kHz, 30 phút; nhiệt độ chiết 100°C; giá trị pH của dung môi là 10; tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/50 (g/mL) và thời gian chiết 5 giờ. Hàm lượng β-glucan thu được trong dịch chiết là 12,418 g/100 g bột đế nấm.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí cho đề tài khoa học công nghệ cấp cơ sở năm 2024 của Viện Sinh học nhiệt đới.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chan JSL, Barseghyan GS, Asatiani MD, Wasser SP (2015). Chemical composition and medicinal value of fruiting bodies and submerged cultured mycelia of caterpillar medicinal fungus *Cordyceps militaris* CBS-132098 (Ascomycetes). *Int J Med Mushrooms*, 17(7): 649-659.

Gangopadhyay N, Hossain MB, Rai DK, Brunton NP (2015). Optimisation of yield and molecular weight of β-glucan from barley flour using response surface methodology. *J Cereal Sci*, 62: 38-44.

Jędrejko KJ, Lazur J, Muszyńska B (2021), *Cordyceps militaris*: An oversview of its chemical constituents in relation to biological activity. *Foods*, 10(11): 2634.

Lee YT, Puligundla P, Schwarz PB (2017). Molecular weight, solubility and viscosity of β-glucan preparations from barley pearling byproducts. *Sains Malays*, 46(5): 713-718.

Leong YK, Yang FC, Chang JS (2021). Extraction of polysaccharides from edible mushrooms: Emerging technologies and recent advances. *Carbohydr Polym*, 251: 117006.

Liu Y, Li Y, Zhang H, Li C, Zhang Z, Liu A, Wu W (2020). Polysaccharides from *Cordyceps miltaris* cultured at different pH: Sugar composition and antioxidant activity. *Int J Biol Macromol*, 162: 349-358.

McCleary BV, Draga A (2016). Measurement of β-glucan in mushrooms and mycelial products. *J AOAC Int*, 99(2): 364-373.

Nguyen TT, Le TLC, Do TTH, La TQN, Tran TPT, Truong QP, Khuat HT (2018). Extraction of adenosine and cordycepin from spent solid medium of *Cordyceps militaris* culture. *Vietnam J Sci Technol*, 56(4A): 221-228.

Nguyễn TNT, Nguyễn TTH, Trương QD, Phan HTN, Cao TCT (2018) Ảnh hưởng của dung môi và pH đến quá trình trích ly các hợp chất có khả năng kháng oxy hóa từ tía tô (*Perilla frutescens*). *Tạp chí Khoa học công nghệ và Thực phẩm*, 14(1): 66-74.

Smiderle FR, Morales D, Gil-Ramírez A, de Jesus LI, Gilbert-López B, Iacomini M, Soler-Rivas CJCp (2017). Evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extractions to obtain β-d-glucans from mushrooms. *Carbohydr Polym*, 156: 165-174.

Villares A, Mateo-Vivaracho L, Guillamón E (2012). Structural features and healthy properties of polysaccharides occurring in mushrooms. *Agriculture*, 2(4): 452-471.

Wang J, Wang Y, Yang X, Lin P, Liu N, Li X, Zhang B, Guo S (2021). Purification, structural characterization, and PCSK9 secretion inhibitory effect of the novel alkali-extracted polysaccharide from *Cordyceps militaris*. *Int J Biol Macromol*, 179: 407-417.

RESEARCH ON SOME FACTORS AFFECTING THE EXTRACTION OF β-GLUCAN FROM SPENT MUSHROOM SUBSTRATE OF *CORDYCEPS MILITARIS*

Vu Thi Lan Anh*, Vo Thi Kieu Thanh, Nguyen Thi Lan Thanh

Institute of Tropical Biology - Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Cordyceps militaris, also known as Dong Trung Ha Thao, is a highly valued medicinal fungus widely used in traditional medicine. Currently, *Cordyceps militaris* is being cultivated in many countries around the world, including Vietnam. However, the cultivation process of *Cordyceps militaris* generates a large amount of by-product, which is the spent mushroom substrate after harvesting the fruiting bodies. The spent mushroom substrate still contains many active ingredients, including β-glucan, and can be utilized to extract β-glucan. This study was conducted to obtain suitable extraction conditions for the extraction of β-glucan from the spent mushroom substrate. In this study, the suitable pre-treatment condition for the raw material before extraction was to soak the spent mushroom substrate powder in ethanol 95° for 12 hours. The ultrasound-assisted extraction (80°C, 200 W, 37 kHz, 30 minutes) gave a higher content of β-glucan in the extract than the extraction without ultrasound wave. The suitable conditions for β-glucan extraction were a temperature of 100°C, a solvent pH of 10, a material-to-solvent ratio of 1/50 (g/mL), and an extraction time of 5 hours. The β-glucan content obtained after the extraction process was 12.418 g/100 g spent mushroom substrate powder.

Keywords: β-glucan, alkali extraction, *Cordyceps militaris*, ultrasound-assisted, polysaccharide.

* Author for correspondence: Tel: +84-933099020; Email: lananh06sh@gmail.com

NGHIÊN CỨU THU NHẬN LACTOFERRIN TÁI TỔ HỢP TỪ *Escherichia coli* VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA LACTOFERRIN DẠNG THỦY PHÂN

Trương Quốc Phong[1,2*], Lê Minh Khôi[2], Ngô Thu Hường[3]

[1]*Viện Khoa học và Công nghệ Sức khỏe, Đại học Bách khoa Hà Nội*

[2]*Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội*

[3]*Trung tâm Nghiên cứu sản xuất vắc xin và sinh phẩm y tế*

TÓM TẮT

Lactoferrin (Lf) là một loại glycoprotein cation đa chức năng gắn sắt thuộc họ transferrin (TF) đã được chứng minh là có liên quan đến nhiều tác dụng sinh lý và bảo vệ bao gồm hoạt động kháng khuẩn, kháng vi-rút, tăng sinh và biệt hóa tế bào, điều hòa cytokine, phản ứng viêm và hoạt động điều hòa miễn dịch. Các báo cáo cho rằng các peptide có nguồn gốc từ lactoferrin cho tác dụng kháng khuẩn vượt trội so với lactoferrin dạng nguyên. Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp mang cấu trúc pET28b::*bLf* đã được sử dụng để tổng hợp protein lactoferrin. Quá trình sinh tổng hợp protein lactoferrin của chủng *E.coli* BL21(DE3)/pET28b::*bLf* sử dụng chất cảm ứng IPTG được tối ưu hóa gồm: nồng độ IPTG 0,01 mM, thời gian cảm ứng 4 giờ, nhiệt độ 37°C, lượng cấp giống theo OD600nm đạt 0,25. Protein Lf dạng thể vùi được tinh sạch theo quy trình gồm 2 bước rửa bằng các đệm 1X PBS chứa 1% Triton X100 và 1X PBS chứa 3 M urea. Dịch thủy phân protein Lf thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tăng lên 30% so với protein nguyên vẹn. Điều kiện thủy phân protein Lf dạng thể vùi tối ưu là: tỷ lệ pepsin/protein Lf (0,0005 U/mg), thời gian thủy phân 60 phút.

Từ khóa: Dịch thủy phân, *Escherichia coli* (*E. coli*), kháng khuẩn, lactoferrin, tái tổ hợp.

MỞ ĐẦU

Lactoferrin là một loại glycoprotein cation đa chức năng gắn sắt thuộc họ transferrin (TF) (Elzoghby *et al*., 2020). Lactoferrin có ái lực cao với các ion sắt, khoảng 250–300, cao gấp nhiều lần so với TF. Hoạt động như một chất điều hòa cân bằng nội môi oxi hóa khử sắt (Fe-R-H), Lf, chelat sắt và trung hòa các gốc tự do qua trung gian sắt, làm giảm stress oxy hóa và cải thiện khả năng phòng vệ của vật chủ bằng cách tối ưu hóa quá trình chuyển hóa sắt (Naidu *et al*., 2023).

Ở người và động vật, Lf chủ yếu được tìm thấy trong các sản phẩm của tuyến ngoại tiết nằm ở cửa ngõ của hệ thống tiêu hóa, hô hấp và sinh sản (Dierick *et al*., 2020). Điều này cho thấy Lf đóng vai trò phòng vệ không đặc hiệu chống lại các mầm bệnh xâm nhập và là tuyến phòng thủ đầu tiên chống lại nhiễm trùng do vi khuẩn và virus (Albar *et al*., 2014). Năm 1972, Bullen và đồng tác giả (1972) lần đầu tiên cho rằng Lf có tác dụng kháng khuẩn phụ thuộc vào nồng độ sắt (Bullen *et al*., 1972). Sử dụng phương pháp miễn dịch huỳnh quang, Arnold và đồng tác giả (1981) phát hiện ra rằng apo-Lf có thể liên kết với bề mặt của vi khuẩn và ngăn các chất dinh dưỡng đi vào tế bào vi khuẩn, khiến vi khuẩn bị chết (Arnold *et al*., 1981).

Lactoferricin lần đầu tiên được thu nhận từ lactoferrin bò bởi Tomita và đồng tác giả (1991) (Tomita *et al*.,1991). Sau quá trình thủy phân lactoferrin bởi pepsin, dịch thủy phân thu được đã ức chế sự phát triển của nhiều vi khuẩn gram dương và gram âm, bao gồm một số vi khuẩn kháng lactoferrin. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng hoạt tính kháng khuẩn của lactoferricin của bò lớn hơn so với các loài khác và vi khuẩn Gram dương thường nhạy cảm hơn với lactoferricin của bò so với vi khuẩn Gram âm.

Khi mô tả đặc điểm của các peptide khác nhau được tạo ra bởi quá trình thủy phân Lf, người ta nhận thấy rằng những biến đổi tối thiểu trong trình tự axit amin làm thay đổi hoạt tính kháng khuẩn của peptide. Ví dụ, LFampin 268–284 và LFampin 265–284, các đoạn được tổng hợp hóa học từ trình tự đầu N của bLF, chỉ khác nhau ở ba axit amin (265Asp-Leu-267Ile) nhưng thể hiện cường độ khác nhau của hoạt tính kháng khuẩn (Van Der Kraan *et al*., 2006). Khi được thu nhận từ phân tử tự nhiên, đầu N và C thể hiện hoạt động sinh lý thông qua các cơ chế độc lập với cơ chế cô lập sắt. Lactoferricin là lõi kháng khuẩn của lactoferrin, có thể được tạo ra thông qua sự phân cắt được xúc tác bởi pepsin. Thùy N bao gồm các miền hoạt động để thực hiện chức năng diệt khuẩn và liên kết heparin, trong khi thùy C bao gồm một miền để thực hiện các chức năng liên kết và nội hóa tế bào gan (Jin *et al*., 2019).

Protein Lf tái tổ hợp đã được nghiên cứu tổng hợp trong các vật chủ khác nhau như *Escherichia coli*, nấm men *Pichia pastoris*. Protein lactoferrin và N-lobe lactoferrin tổng hợp từ *E.coli* đều tồn tại ở dạng thể vùi (Wang *et al*., 2010).

Trong nghiên cứu này, protein Lf được tổng hợp trong *E. coli* BL21(DE3) cũng được thu nhận ở dạng thể vùi. Hoạt tính kháng khuẩn của protein Lf dạng thể vùi và dịch thủy phân đã được khảo sát.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, USA) được lựa chọn làm đối tượng để biểu hiện; plasmid pET28b::*bLf* mang gen tối ưu mã hóa Lactoferin (khoảng 80 kDa) được cung cấp bởi phòng nhóm nghiên cứu của chúng tôi tại Đại học Bách khoa Hà Nội. Môi trường LB (Luria Bertani) sử dụng để hoạt hóa và biểu hiện: 1% peptone; 0,5% yeast extract; 1% NaCl; bổ sung 2% agar đối với môi trường đặc. Môi trường PYG sử dụng trong khảo sát hoạt tính kháng khuẩn dạng thủy phân Lf: 1% peptone; 0,05% yeast extract; 1% glucose, pH 7 ± 0,2. Pepsin (SERVA, Đức) sử dụng để thủy phân protein Lf thể vùi. Một đơn vị hoạt độ pepsin giải phóng 0,001 đơn vị A280 mỗi phút ở pH 2,0 nhiệt độ 37°C dưới dạng sản phẩm thủy phân hòa tan trong axit tricloacetic (TCA) với cơ chất sử dụng là Hemoglobin. Các hóa chất dùng cho điện di SDS-PAGE, đệm 1X PBS, Urea, Triton X100 được mua của hãng Sigma (Mỹ), Merck (Đức). Protein marker (PageRuler plus prestain protein ladder, 10-250 kDa) được mua của hãng Thermo Scientific (Mỹ).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp lên men sinh tổng hợp lactoferrin

Chủng vi khuẩn tái tổ hợp *E.coli* BL21(DE3)/pET28b::*bLf* được hoạt hóa trong môi trường LB có bổ sung kanamycin nồng độ cuối 100 µg/mL, nuôi ở 37°C với tốc độ lắc 120 vòng/phút, từ 16-18 tiếng. Canh trường sau hoạt hóa được cấy chuyển sang môi trường LB có kháng sinh kanamycin để biểu hiện protein Lf với mật độ ban đầu OD600 là 0,25. Sau 2 giờ, bổ sung chất cảm ứng IPTG 0,01 mM, nuôi ở 37°C với tốc độ lắc 120 vòng/phút, trong 4 giờ. Thu sinh khối bằng cách ly tâm 6000 vòng/phút, trong 5 phút.

Phương pháp tối ưu hóa biểu hiện protein tái tổ hợp

Các thí nghiệm biểu hiện protein Lf tái tổ hợp được thực hiện ở các điều kiện khác nhau. Sau khi nuôi cấy trong hai giờ ở 37°C, protein tái tổ hợp được biểu hiện ở các nồng độ IPTG khác nhau trong dải 0 – 1 mM. Biểu hiện được thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau 10°C, 25°C và 37°C và ở các thời điểm cảm ứng khác nhau là 4, 8, 20, 24 và 28 giờ.

Phương pháp tách chiết protein tái tổ hợp

Sinh khối tế bào được thu nhận bằng cách ly tâm, sau đó hòa tan lại bằng đệm 1X PBS chứa 1% Triton X100. Tế bào được phá bằng siêu âm trong 3 phút, 5 giây hoạt động, 5 giây nghỉ, mức năng lượng 27%. Sau đó, mẫu được tiến hành ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 20 phút. Phần cặn tiếp tục được rửa 5 lần bằng đệm 1X PBS chứa 1% Triton X100 để thu thể vùi. Sau đó, thể vùi được hòa tan trong đệm 1X PBS chứa 3M Urea và siêu âm trong 3 phút, 5 giây hoạt động, 5 giây nghỉ, mức năng lượng 27%; ly tâm 3000 vòng/phút, 4°C trong 2 phút, thu dịch nổi. Dịch nổi được ly tâm 8000 vòng/phút, 4°C trong 20 phút, thu thể vùi protein Lf.

Phương pháp điện di SDS-PAGE

Các mẫu protein được tiến hành điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 12% theo phương pháp Laemmli (1970).

Phương pháp thủy phân protein bằng pepsin

Protein LF thể vùi thu được hòa trong đệm 1X PBS, chỉnh pH 2 bằng HCl, sau đó được ủ với pepsin ở 37°C với các tỷ lệ pepsin : cơ chất khác nhau: 0,0005 – 0,01 U/mg và ở các giá trị thời gian khác nhau là 10 phút, 30 phút, 1 giờ và 2 giờ.

Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của lactoferrin dạng thủy phân

Trong khuôn khổ nghiên cứu này, chủng *E.coli* BL21(DE3) sẵn có được sử dụng làm chủng kiểm định; sau khi được hoạt hóa 16 – 18 tiếng được đo soi kiểm tra tỷ lệ sống chết, độ thuần khiết. Sau đó, vi sinh vật được cấp giống vào môi trường PYG có và không có chứa dịch thủy phân Lf với nồng độ giống ban đầu đạt 10^5 cfu/ml. Canh trường được ủ ở 37°C trong 6 tiếng, tốc độ lắc 120 vòng/phút. Độ sinh trưởng được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 600nm tại thời điểm 6 tiếng sau khi cấp giống. Khả năng ức chế của dịch thủy phân Lf đến chủng vi sinh vật được đánh giá theo tỷ lệ phần trăm OD của chủng ở mẫu có xử lý với dịch thủy phân Lf trên OD của mẫu kiểm chứng trong cùng điều kiện thí nghiệm.

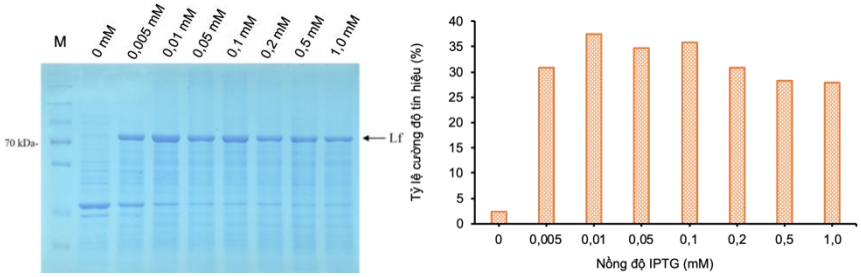
Phương pháp phân tích hình ảnh gel điện di: Cường độ băng trên hình ảnh gel điện di được phân tích bằng phần mềm ImageQuant TL verion 10.2. Tỷ lệ cường độ tín hiệu của băng Lf = Cường độ tín hiệu băng Lf/Tổng cường độ tín hiệu các băng trong đường chạy điện di * 100.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa protein lactoferrin trong *E. coli*

Ảnh hưởng của nồng độ IPTG đến biểu hiện protein lactoferrin

Trong cấu trúc vector biểu hiện tái tổ hợp pET28b::*bLf* thì gen đích mã hóa protein lactorerrin (Lf) được điều khiển phiên mã bởi T7 promotor và chất cảm ứng IPTG. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy, nồng độ chất cảm ứng ITPG ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của protein đích (Ashayeri-Panah *et al*., 2017).

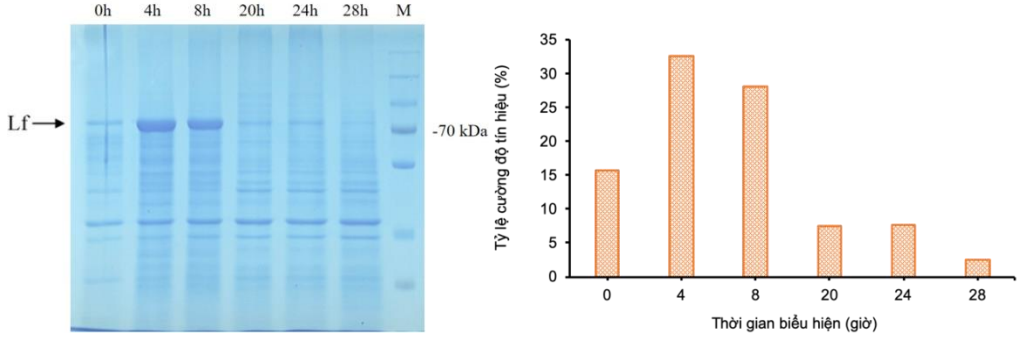


Hình 1. Ảnh hưởng của các nồng độ IPTG khác nhau đến sự biểu hiện protein Lf thể vùi

Do đó, trong nghiên cứu này một dải nồng độ IPTG 0 – 1 mM đã được khảo sát. Kết quả cho thấy nồng độ IPTG ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của protein Lactoferrin tái tổ hợp trong *E. coli*. Ở nồng độ 0mM không có sự xuất hiện của protein lactoferrin trên phổ điện di. Mức độ biểu hiện protein tăng lên khi nồng độ IPTG tăng lên đến 0,01 mM và giữ mức thay đổi không nhiều đến nồng độ 0,1 mM, sau đó giảm dần khi tiếp tục tăng nồng độ IPTG (Hình 1). Điều này có thể giải thích rằng ở nồng độ IPTG cao có thể gây độc cho sự sinh trưởng của tế bào (Malakar, Venkatesh, 2012) hoặc do xuất hiện sự cạnh tranh vị trí bám trên protein Lac I dẫn đến giảm mức độ phiên mã và tổng hợp protein đích. Dựa vào kết quả thu được, nồng độ IPTG 0,01 mM được chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

Ảnh hưởng của thời gian cảm ứng đến mức độ biểu hiện protein lactoferrin

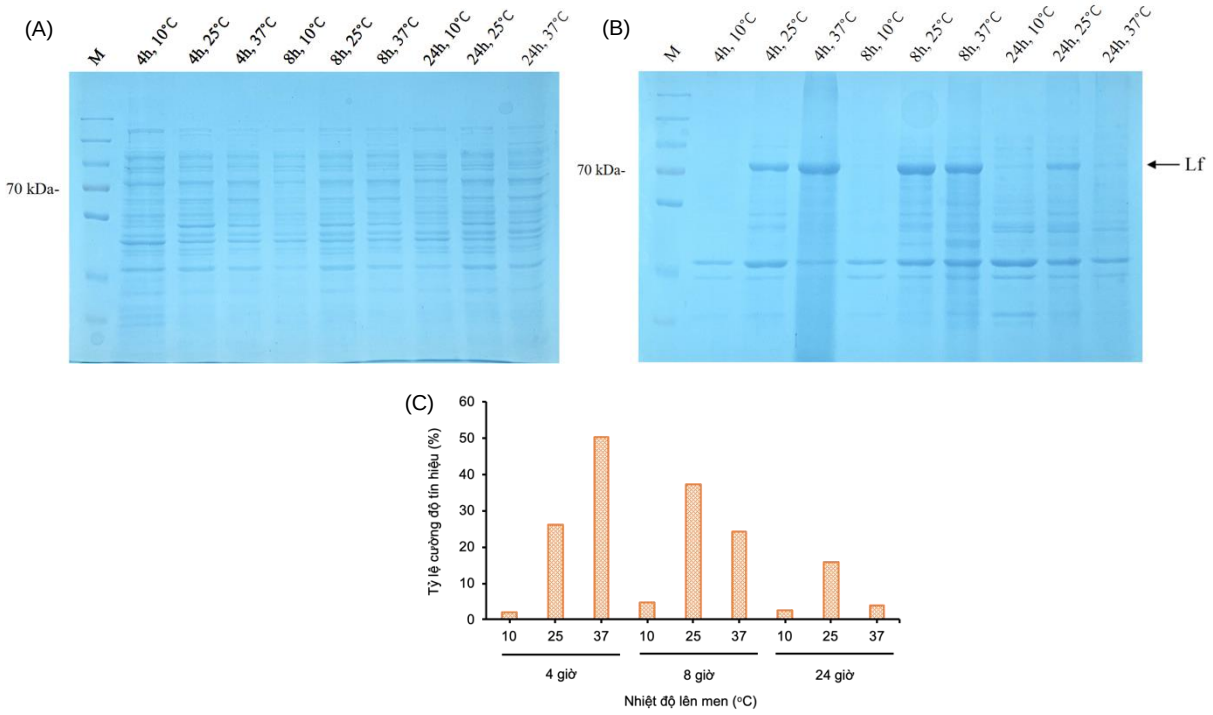
Để lựa chọn thời gian cảm ứng thích hợp, mức độ biểu hiện protein Lf của chủng *E. coli* BL21(DE3) mang pET28b::*bLf* được đánh giá ở các mốc thời gian khác nhau 0, 4, 8, 20, 24 và 28 giờ. Kết quả cho thấy lượng protein Lf thu được sẽ khác nhau ở các thời điểm cảm ứng khác nhau. Mức độ biểu hiện protein Lf là cao nhất sau 4 giờ cảm ứng và giảm dần khi tăng thời gian cảm ứng lên đến 28 giờ (Hình 2). Hiện tượng giảm này có thể do sự phân hủy Lf bởi protease tạo ra bởi tế bào *E. coli* nhằm phân hủy protein không bình thường được biểu hiện quá mức gây độc cho tế bào. Thời gian cảm ứng 4 giờ được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian đến biểu hiện protein Lf thể vùi

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến biểu hiện protein lactoferrin

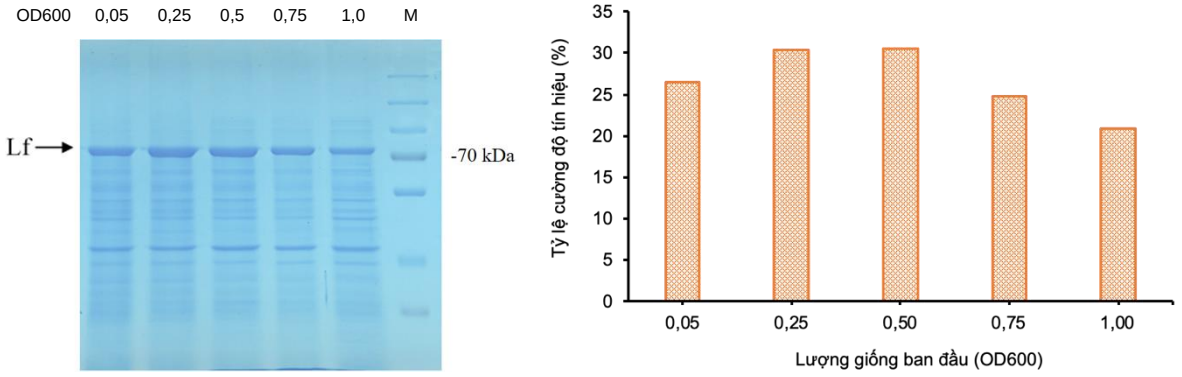
Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng nhiệt độ có ảnh hưởng đến tốc độ sinh tổng hợp protein cũng như khả năng cuộn gấp của protein. Khi ở nhiệt độ thấp, tốc độ trao đổi chất ở tế bào chậm dẫn đến quá trình sinh tổng hợp protein kéo dài hơn khiến tỉ lệ protein trong tế bào có nhiều thời gian để cuộn gấp đúng cấu trúc sẽ tăng lên, khiến cho protein có khả năng tan cao hơn giúp ngăn ngừa việc tích lũy protein dưới dạng thể vùi khi cảm ứng với IPTG. Trong nghiên cứu này, sự biểu hiện protein Lf trong *E. coli* BL21(DE3) mang pET28b::*bLf* được thực hiện ở 10^oC, 25^oC và 37^oC. Kết quả cho thấy protein Lf được biểu hiện chủ yếu ở thể vùi (protein không tan) và biểu hiện mạnh nhất ở 37^oC (Hình 3).



Hình 3. Phổ điện di ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến biểu hiện protein Lf thể tan (A) và thể vùi (B). Tỷ lệ cường độ tín hiệu băng protein Lf thể vùi theo thời gian và nhiệt độ biểu hiện

Ảnh hưởng của lượng cấp giống đến biểu hiện protein lactoferrin

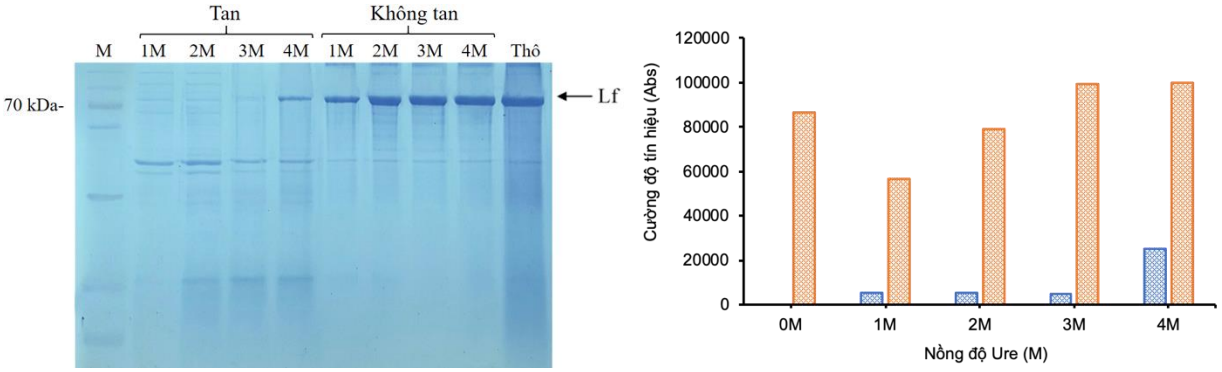
Kết quả điện di cho thấy tín hiệu protein Lf đạt tối đa ở mẫu có lượng cấp giống OD600 đạt 0,25 – 0,5 (Hình 4). Lượng cấp giống OD600 đạt 0,25 được chọn là điều kiện phù hợp cho biểu hiện protein Lf sử dụng chất cảm ứng IPTG.



Hình 4. Ảnh hưởng của lượng cấp giống đến biểu hiện protein Lf

Khảo sát điều kiện thu nhận lactoferrin dạng thể vùi

Như kết quả thu được ở trên cho thấy protein Lf được biểu hiện ở dạng thể vùi, do đó việc tinh sạch protein Lf có thể thực hiện thông qua việc tinh sạch thể vùi. Hướng tiếp cận này đã được thực hiện bởi nhiều nghiên cứu trước đây *(Singh et al.*, 2015), tuy nhiên điều kiện tối ưu để thu nhận được tối đa thể vùi dạng tinh sạch sẽ cần được nghiên cứu cho từng loại protein khác nhau. Trong nghiên cứu này, thể vùi được rửa 5 lần với đệm PBS chứa 1% TritonX100 để loại bỏ các protein tan và sau đó hòa tan bằng đệm 1X PBS chứa urea ở nồng độ khác nhau. Các nồng độ urea được khảo sát là 1M, 2M, 3M, 4M với mục tiêu hòa tan các phức protein có trọng lượng tương hoặc lớn hơn thể vùi nhưng không làm tan thể vùi. Kết quả điện di cho thấy ở nồng độ urea 3M, protein tạp trong thể vùi được hòa tan tốt nhất đồng thời chỉ hòa tan lượng nhỏ protein Lf (Hình 5). Do đó, quy trình tinh sạch thể vùi gồm 02 bước rửa: (1) năm lần với đệm PBS chứa 1% Triton X100, (2) một lần với đệm PBS chứa 3 M urea.

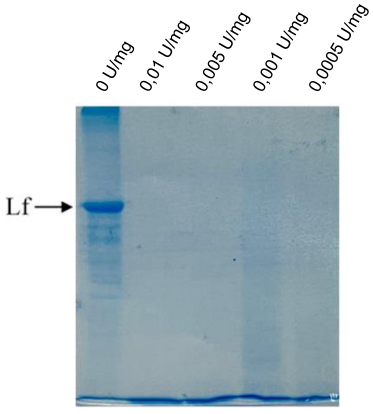


Hình 5. Khảo sát nồng độ Urea sử dụng trong quá trình rửa thể vùi Lf

Khảo sát các điều kiện thủy phân tạo peptide có hoạt tính kháng khuẩn từ Lf tái tổ hợp

Kiểm tra hiệu suất thủy phân thể vùi Lf bằng pepsin

Các nghiên cứu chỉ ra rằng protein Lf thủy phân bởi pepsin giải phóng ra các đoạn pepide thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh mẽ hơn so với protein Lf ban đầu (Ripolles *et al.*, 2015). Để kiểm tra hiệu suất thủy phân của pepsin, protein Lf dạng thể vùi được thủy phân với tỷ lệ hoạt độ pepsin/protein là 0,0005 U/mg, 0,001 U/mg, 0,005 U/mg, 0,01 U/mg. Sản phẩm thủy phân được điện di kiểm tra trên gel SDS-PAGE.

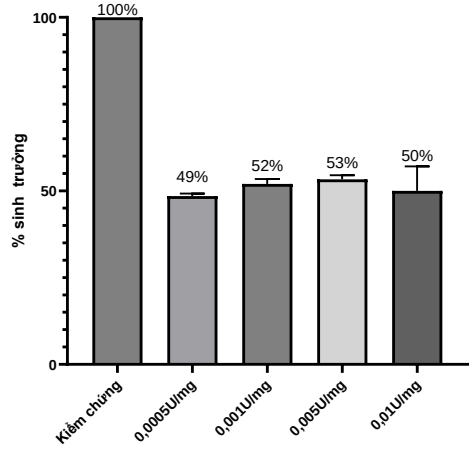


Hình 6. Kết quả điện di thể vùi Lf sau thủy phân với các tỷ lệ hoạt độ pepsin/protein Lf khác nhau

Kết quả điện di cho thấy tại các tỷ lệ phản ứng từ 0,0005U/mg đến 0,01U/mg, protein Lf được thủy phân hoàn toàn thành các đoạn peptide ngắn, không thể xác định trên gel 12% (Hình 6). Các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng hoạt động kháng khuẩn mạnh mẽ sẽ bộc lộ ở các peptide có kích thước < 5 kDa (Dini *et al*., 2022). Hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân thu được được đánh giá trên chủng *E.coli* BL21(DE3).

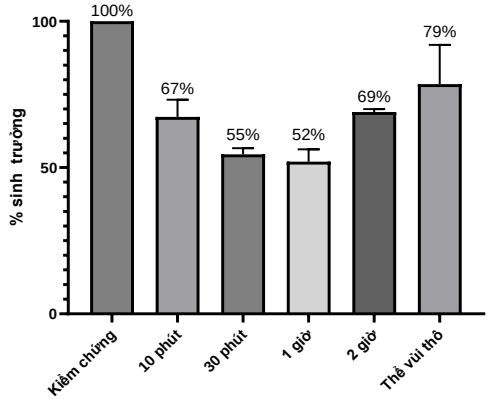
Kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân lactoferrin

Các đoạn peptide có hoạt tính kháng khuẩn được tạo ra nhờ quá trình thủy phân sẽ ức chế sự sinh trưởng của chủng kiểm định khiến cho OD600 của canh trường có chứa dịch thủy phân lactoferrin có xu hướng thấp hơn so với OD600 của canh trường không bổ sung dịch thủy phân lactoferrin. Các peptide có kích thước khác nhau sẽ có hoạt tính kháng khuẩn khác nhau (Huan *et al*., 2020), theo nghiên cứu trước đây peptide có hoạt tính kháng khuẩn thường có kích thước 10-25 amino acids, do đó trong nghiên cứu này hoạt tính kháng khuẩn của hỗn hợp peptide sinh ra sau thủy phân Lf trong các điều kiện khác nhau về nồng độ pepsin đã được khảo sát. Kết quả cho thấy dịch thủy có khả năng ức chế khoảng 50% sự sinh trưởng của vi khuẩn *E. coli* và không có sự khác nhau nhiều giữa các nồng độ enzyme được sử dụng (Hình 7).



Hình 7. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân Lf với các nồng độ pepsin khác nhau (0,0005; 0,001; 0,005; 0,01 U/mg)

Thời gian thủy phân khác nhau cũng sẽ tạo ra hỗn hợp peptide với kích thước khau nhau và có thể bộc lộ hoạt tính kháng khuẩn khác nhau. Do đó, protein Lf đã được thủy phân ở các khoảng thời gian khác nhau: 10, 30, 60, 120 phút. Dịch sau thủy phân được kiểm tra khả năng kháng khuẩn và được thể hiện trên Hình 8. Kết quả cho thấy hoạt tính kháng khuẩn tăng dần khi thời gian thủy phân tăng từ 10 phút đến 60 phút, sau đó hoạt tính kháng khuẩn giảm khi tiếp tục tăng thời gian thủy phân lên 120 phút (Hình 8). Kết quả thu được có thể được giải thích như sau: Khi tăng thời gian thủy phân từ 10 đến 60 phút sẽ tạo ra nhiều peptide có kích thước ngắn hơn và các peptide này bộc lộ hoạt tính kháng khuẩn; tuy nhiên khi tăng thời gian thủy phân lên 120 phút có thể các peptide đã bị cắt nhỏ hơn và không còn khả năng kháng khuẩn. Kết quả trong nghiên cứu này cũng cho thấy protein Lf nguyên vẹn chỉ thể hiện hoạt tính ức chế vi khuẩn *E. coli* là 20%, khi được thủy phân thành các peptide ngắn thì hoạt tính kháng khuẩn đã tăng lên đến 50% (Hình 8).



Hình 8. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân Lf theo thời gian khác nhau

KẾT LUẬN

Điều kiện tối ưu cho sự sinh tổng hợp protein lactoferrin của chủng *E.coli* BL21(DE3)/pET28b::*bLf* sử dụng chất cảm ứng IPTG gồm: nồng độ IPTG 0,01mM, thời gian cảm ứng 4 giờ, nhiệt độ 37°C, lượng cấp giống theo OD600nm đạt 0,25. Protein Lf dạng thể vùi được tinh sạch theo quy trình gồm 2 bước rửa bằng các đệm 1X PBS chứa 1% Triton X100 và 1X PBS chứa 3 M urea. Dịch thủy phân protein Lf thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tăng lên 30% so với protein nguyên vẹn. Điều kiện thủy phân protein Lf dạng thể vùi tối ưu là: tỷ lệ pepsin/protein Lf (0,0005 U/mg), thời gian thủy phân 60 phút.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Albar AH, Almehdar HA, Uversky VN, Redwan EM (2014). Structural Heterogeneity and Multifunctionality of Lactoferrin. *Curr Protein & Peptide Sci*, 15(8): 778–797.

Arnold RR, Russell JE, Champion WJ, Gauthier JJ (1981). Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism. *Infect Immun*, 32(2): 655–660.

Ashayeri-Panah M, Eftekhar F, Kazemi B, Joseph J (2017). Cloning, optimization of induction conditions and purification of Mycobacterium tuberculosis Rv1733c protein expressed in *Escherichia coli*. *Iran J Microbiol*, 9(2): 64.

Bullen JJ, Rogers HJ, Leigh L (1972). Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *Br Med J*, 1(5792): 69–75.

Dierick M, Vanrompay D, Devriendt B, Cox E (2020). Lactoferrin, a versatile natural antimicrobial glycoprotein that modulates the host's innate immunity. *Biochem Cell Biol*, 99(1): 61–65.

Dini I, De Biasi MG, Mancusi A (2022). An Overview of the Potentialities of Antimicrobial Peptides Derived from Natural Sources. *Antibiotics*, 11(11): 1–22.

Elzoghby AO, Abdelmoneem MA, Hassanin IA, Abd Elwakil MM, Elnaggar MA, Mokhtar S, Fang JY, Elkhodairy KA (2020). Lactoferrin, a multi-functional glycoprotein: Active therapeutic, drug nanocarrier & targeting ligand. *Biomaterials*, 263: 120355.

Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol*, 11: 582779.

Jin L, Li L, Zhou L, Zhang R, Xu Y, Li J (2019). Improving Expression of Bovine Lactoferrin N-Lobe by Promoter Optimization and Codon Engineering in Bacillus subtilis and Its Antibacterial Activity. J *Agric and Food Chem*, 67(35): 9749–9756.

Malakar P, Venkatesh KV (2012). Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of Escherichia coli on glycerol due to the expression of Lac proteins. *Appl Microbiol Biot*, 93(6): 2543–2549.

Naidu SAG, Clemens RA, Naidu AS (2023). SARS-CoV-2 Infection Dysregulates Host Iron (Fe)-Redox Homeostasis (Fe-R-H): Role of Fe-Redox Regulators, Ferroptosis Inhibitors, Anticoagulants, and Iron-Chelators in COVID-19 Control. *J Diet Suppl*, 20(2): 312–371.

Ripolles D, Harouna S, Parrón JA, Calvo M, Pérez MD, Carramiñana JJ, Sánchez L (2015). Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin and its hydrolysates prepared with pepsin, chymosin and microbial rennet against foodborne pathogen Listeria monocytogenes. *Int Dairy J*, 45: 15–22.

Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK (2015). Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microb Cell Fact*, 14(1): 1–10.

Tomita M, Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K (1991). Potent Antibacterial Peptides Generated by Pepsin Digestion of Bovine Lactoferrin. *J Dairy Sci*, 74(12): 4137–4142.

Van Der Kraan MIA, Nazmi K, Van't Hof W, Nieuw Amerongen AV, Veerman ECI, Bolscher JGM (2006). Distinct bactericidal activities of bovine lactoferrin peptides LFampin 268-284 and LFampin 265-284: Asp-Leu-Ile makes a difference. *Biochem Cell Biol*, 84(3): 358–362.

Wang J, Tian Z, Teng D, Yang Y, Hu J, Wang J (2010). Cloning, expression and characterization of Kunming mice lactoferrin and its N-lobe. *Biometals*, 23(3): 523–530.

STUDY ON THE PRODUCTION OF RECOMBINANT LACTOFERRIN FROM *Escherichia coli* AND THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ITS HYDROLYSATE

Truong Quoc Phong[1,2*], Le Minh Khoi[2], Ngo Thu Huong[3]

[1]*Institute of Health Science and Technology, Hanoi University of Science and Technology*

[2]*School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology*

[3]*Center for Reseach and Production of Vaccines and Biologicals*

SUMMARY

Lactoferrin (Lf) is a multifunctional iron-binding cationic glycoprotein of the transferrin (TF) family that has been shown to be involved in many physiological and protective effects, including antibacterial, antiviral, and cell proliferation and differentiation, cytokine regulation, inflammatory response, and immunomodulatory activity. Reports suggest that lactoferrin-derived peptides have superior antibacterial effects compared to intact lactoferrin. In this study, the recombinant *E. coli* strain carrying the pET28b::bLf structure was used to synthesize lactoferrin protein. Optimal conditions for the production of recombinant lactoferrin by *E. coli* L21(DE3)/pET28b::bLf strain was investigated, including IPTG concentration of 0.01 mM, induction time of 4 hours, temperature of 37 °C, and seeding amount according to OD600nm reaching 0.25. The inclusion body of Lf protein was purified following a two-step washing procedure with 1X PBS buffers containing 1% Triton X100 and 1X PBS containing 3M urea. Lf protein hydrolyzate exhibited 30% increased antibacterial activity compared to intact protein. Optimal conditions for hydrolysis of inclusion-type Lf protein are: pepsin/Lf protein ratio (0.0005 U/mg), hydrolysis time of 60 minutes.

Keywords: Antibacteria, *Escherichia coli* (*E. coli*), hydrolysate, lactoferrin, recombinant.

[*] Author for correspondence: Tel: 0988793468; Email: phong.truongquoc@hust.edu.vn

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN TÁCH CHIẾT POLYPHENOL TỔNG TỪ CAO CHIẾT LÁ TÀU BAY *Crassocephalum crepidioides*

Đoàn Thiên Thanh*, Chu Thị Thanh Vy

Khoa Khoa học ứng dụng, Đại học Tôn Đức Thắng

TÓM TẮT

Cây Tàu bay (*Crassocephalum crepidioides*) là loại dược liệu quý với nhiều công dụng được sử dụng phổ biến tại Việt Nam. Tuy nhiên, hiện nay các nghiên cứu về loài cây này còn khá hạn chế, đặc biệt là hàm lượng polyphenol, nhóm hợp chất sinh học chính trong lá Tàu bay. Nghiên cứu này đã tối ưu hóa được quy trình tách chiết polyphenol từ lá Tàu bay để thu được hàm lượng polyphenol tổng số hiệu quả nhất thông qua khảo sát sự tương tác giữa các yếu tố như nồng độ dung môi ethanol, tỷ lệ giữa dung môi và chất khô, thời gian tách chiết bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (Response surface methodology-RSM). Bên cạnh đó, hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn của cao chiết cũng được khảo sát. Kết quả tối ưu bằng thiết kế RSM – BBD cho thấy tại điều kiện dung môi ethanol 78,48% với tỷ lệ giữa dung môi và nguyên liệu là 4,58/1 (mL/g) trong 11,36 giờ ở nhiệt độ phòng, hàm lượng polyphenol của cao chiết thu được là 63,24 ± 0,39 (mgGA/g cao chiết). Đồng thời, cao chiết còn cho hoạt tính kháng oxy hóa khá cao với giá trị IC_{50} là 26,84 ± 0,22 (µg/mL). Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết cũng được thể hiện qua khả năng kháng lại vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* với giá trị MIC lần lượt là 5 và 8 (mg/mL). Do đó có thể thấy cao chiết lá Tàu bay có hoạt tính sinh học cao và cần sự quan tâm nghiên cứu sâu hơn để nâng cao giá trị của loại dược liệu tiềm năng này.

Từ khóa: Crassocephalum crepidioides, polyphenol, tối ưu hóa, RSM-BBD, kháng oxy hóa, kháng khuẩn.

MỞ ĐẦU

Cây Tàu bay (***Crassocephalum crepidioides*** (Benth.) S. Moore) hay còn gọi là Kim thất, Ngải rét, … là cây rau dại ưa ẩm, được phân bố rộng rãi khắp các địa phương tại nước ta. Trong dân gian, Tàu bay được biết đến như một loài thực vật được sử dụng để điều trị một số bệnh trong dân gian như tiêu viêm, tán uất, tiêu hòn cục, cầm máu, sát trùng… Một số nghiên cứu trước đây cho thấy loài cây có nhiều lợi ích cho sức khỏe như kháng viêm, kháng khuẩn, chống oxy hóa, làm lành vết thương, chống đông máu (Awang-Kanak *et al.*, 2019; Can *et al.*, 2020; Karki *et al.*, 2021; Opeyemi *et al.*, 2020). Cụ thể, chiết xuất hydroethanolic từ lá Tàu bay có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, tăng sinh nguyên bào sợi, co vết thương và hình thành mạch (Can *et al.*, 2020). Ngoài ra, trong cao chiết lá Tàu Bay còn có sự hiện diện của một số hợp chất sinh học khác nhau bao gồm hexadecenoic metyl este và axit α-Linolenic với các đặc tính hạ cholesterol; benzofuranone và benzofuran có khả năng chống ung thư và kháng khuẩn (Karki *et al.*, 2021). Các nhóm hợp chất phenolic và flavonoid với các hoạt tính kháng oxy hóa, kháng viêm và kháng nấm cũng được tìm thấy trong lá Tàu bay (Opeyemi *et al.*, 2020). Tuy nhiên, các nghiên cứu hoạt tính sinh học và hợp chất của cây Tàu bay nhìn chung vẫn còn hạn chế.

Thông thường, khi tối ưu hóa các thông số cho nghiên cứu thực nghiệm, các nhà khoa học thường dùng phương pháp cổ điển là tối ưu các đơn yếu tố. Tuy nhiên, phương pháp này có một số giới hạn, chính là không thể hiện cụ thể sự tương tác giữa các thông số với nhau và tổng số thí nghiệm thực hiện tăng khi số lượng khảo sát tăng. Để khắc phục nhược điểm đó, phương pháp đáp ứng bề mặt (Response surface methodology – RSM) đã được ứng dụng trong quá trình tối ưu hóa các thông số thực nghiệm và cho hiệu quả cao. RSM bao gồm một nhóm các thuật toán và xử lí thống kê dựa trên sự phù hợp của các mô hình thực nghiệm với dữ liệu thực nghiệm thu được liên quan đến thiết kế thử nghiệm. Từ đó cho phép nghiên cứu sự tương tác giữa các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả của quy trình nghiên cứu và đưa ra dự đoán về giá trị tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng. Phương pháp này đang được ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu, đặc biệt là các quá trình tách chiết hợp chất nhằm tối ưu hóa được số lượng thí nghiệm và nâng cao hiệu suất tách chiết hợp chất mong muốn (Bezerra *et al.*, 2008).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng thiết kế Box – Behnken (RSM-BBD) cơ bản trong phương pháp RSM (Bezerra *et al.*, 2008) để tối ưu hóa các điều kiện tách chiết có thể ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol có trong lá Tàu bay sau khi đã khảo sát với từng đơn yếu tố như nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi và nguyên liệu, và thời gian chiết. Đồng thời, tiến hành khảo sát khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* từ cao chiết tối ưu đã thu được. Từ đó cung cấp thêm những dữ liệu khoa học về hoạt tính sinh học của loại dược liệu tiềm năng này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Lá Tàu bay được thu hái tại xã Liên Hiệp, huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng vào tháng 5/2022. Mẫu lá được định danh và lưu trữ tại Bộ môn Công nghệ sinh học, Khoa Khoa học Ứng dụng, trường Đại học Tôn Đức Thắng theo mã định danh LCC1024. Lá Tàu bay sau khi thu hái sẽ được rửa sạch với nước để loại bỏ tạp chất và sấy khô ở nhiệt độ 55°C cho đến khối lượng không đổi (từ 2-3 ngày), xay nhuyễn và bảo quản kín gió ở 30-35°C. Bột lá khô sau đó được đem tách chiết với ethanol theo các yếu tố khảo sát bao gồm: nồng độ dung môi, tỷ lệ nguyên liệu và dung môi, thời gian thích hợp theo mô hình thiết kế thí nghiệm RSM-BBD.

Phương pháp nghiên cứu

Định lượng polyphenol tổng

Hàm lượng polyphenol tổng số có trong mẫu cao chiết được xác định bằng phương pháp Folin – Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). 1 mL mẫu (chất chuẩn acid gallic hoặc mẫu thử) vào ống nghiệm đã có sẵn 6 mL nước cất, lắc đều sau đó thêm 0,5 mL thuốc thử Folin – Ciocalteu 10%. Lắc đều, để yên các mẫu ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sau đó, thêm 1,5 mL dung dịch Na_2CO_3 7% vào các ống nghiệm, lắc đều, thêm 1 mL nước cất. Để các mẫu ở nhiệt độ phòng trong tối 30 phút. Cuối cùng, đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 760 nm. Hàm lượng polyphenol tổng số chứa trong mẫu cao chiết được thể hiện bằng hàm lượng gallic acid đương lượng (GA) và được tính bằng công thức:

$$TPC = \frac{x}{C_{ban\ đầu}} \times F \quad (1)$$

Trong đó: TPC là hàm lượng polyphenol tổng số (mgGA/g cao chiết); x là nồng độ polyphenol tính được theo đường chuẩn gallic acid (y = 0.0129x + 0.0668, R^2 = 0.9905) (µg/mL); $C_{ban\ đầu}$ là nồng độ mẫu ban đầu (mg/mL); F là độ pha loãng.

Tối ưu hóa quá trình tách chiết polyphenol bằng phương pháp RSM

Sau khi các biến được sàng lọc thông qua các thí nghiệm khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự tách chiết của lá tàu bay, tiến hành lựa chọn kiểu thiết kế thí nghiệm phù hợp. Mô hình RSM-BBD (Box–Behnken Design) được sử dụng cho ba biến độc lập với ba cấp bậc: Nồng độ dung môi , tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu, thời gian tách chiết (Bezerra *et al.*, 2008). Từ đó, tìm ra khoảng giới hạn của các yếu tố (Bảng 1), sử dụng phần mềm thống kê minitab để chạy mô hình RSM-BBD dự đoán sự ảnh hưởng và tối ưu của các biến.

Bảng 1. Các yếu tố mã hóa được sử dụng trong mô hình RSM-BBD

Biến thực	Biến mã hóa	Đơn vị	Mức nghiên cứu		
			-1	0	1
Nồng độ ethanol	X_1	%	70	80	90
Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu	X_2	mL/g	3/1	5/1	7/1
Thời gian chiết	X_3	giờ	9	12	15

Hàm lượng polyphenol tổng trong cao chiết được kí hiệu là Y, đơn vị là mgGA /g cao chiết. Mô hình được biểu diễn bằng phương trình bậc 2 như sau:

$$Y = B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_0$$

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_{13}, B_{23}: là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố.

B_0: là hệ số tự do.

X_1, X_2, X_3, X_{11}, X_{22}, X_{33}, X_{12}, X_{13}, X_{23}: là các biến độc lập.

Đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa theo phương pháp DPPH

Hoạt tính kháng oxy hóa được thực hiện theo phương pháp DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Villaño *et al.*, 2007). Cụ thể, Hút 1 mL dịch chiết mẫu từ dãy nồng độ pha loãng cho lần lượt vào các ống nghiệm, tiếp theo đó thêm vào 1 mL DPPH 0,06 mM, đậy kín và ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút. Thao tác tương tự đối với mẫu đối chứng âm (methanol 70%) và mẫu đối chứng dương (vitamin C). Đo OD của dung dịch ở bước sóng 517 nm. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Giá trị OD phản ánh khả năng kháng oxy hóa của mẫu. Phần trăm hoạt tính kháng oxy hóa được xác định theo công thức sau:

$$I\% = \frac{OD\ chuẩn - OD\ mẫu}{OD\ chuẩn} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó: I%: phần trăm ức chế gốc DPPH; $OD_{chuẩn}$: Giá trị mật độ quang OD của dung dịch chuẩn; $OD_{mẫu}$: Giá trị mật độ quang OD của dung dịch mẫu. Từ tỷ lệ % hoạt tính bắt gốc tự do DPPH, xây dựng phương trình đường chuẩn, từ đó xác định giá trị IC_{50} (là nồng độ mà tại đó bắt 50% gốc tự do DPPH) để làm cơ sở so sánh khả năng kháng oxy hóa của cao chiết. Giá trị IC_{50} càng thấp thì hoạt tính kháng oxy hóa càng cao và ngược lại.

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết trên 02 chủng vi khuẩn *S. aureus* CC59 và *E. coli* 0145 được xác định dựa vào nồng độ ức chế tối thiểu (MIC – minimum inhibitory concerntration) (Ngan *et al.*, 2017). Cao chiết đã được tối ưu hóa theo mô hình RSM-BBD được pha loãng trong dung dịch DMSO thành các nồng độ khảo sát từ 10-100 mg/mL. Dịch vi khuẩn được pha loãng sao cho mật độ đạt 10^8 CFU/mL. Mỗi eppendorf chứa 50 µL môi trường LB lỏng, 10 µL cao chiết ở các nồng độ pha loãng khác nhau trong dung dịch DMSO và 40 µL dịch vi khuẩn. Mẫu blank bao gồm 50 µL môi trường LB lỏng, 10 µL cao chiết ở các nồng độ pha loãng khác nhau trong DMSO và 40 µL nước muối sinh lý. Các mẫu thử nghiệm và đối chứng sau đó được ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, thêm 20 µL resazurin 0,001% vào mỗi eppendorf. Quan sát sự thay đổi màu, ghi nhận giá trị MIC. Chất chỉ thị resazurin có màu xanh trong dung dịch. Những eppendorf có sự đổi màu của dung dịch resazurin từ màu xanh sang màu hồng cho thấy có sự phát triển của vi khuẩn trong giếng. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được định nghĩa là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ thử nghiệm của cao chiết thực vật có thể ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn (không làm đổi màu resazurin).

Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được phân tích và xử lý thống kê theo phương pháp RSM- BBD bằng phần mềm Minitab (Minitab® phiên bản 19.2020.1, Minitab LLC, State College, PA, USA). Các biểu đồ được vẽ bằng phần mềm OriginLab (OriginLab 2022, OriginLab Corporation, Northampton, USA). Số liệu được biểu diễn dưới dạng X± SD (X: giá trị trung bình của mẫu thử, SD: độ lệch chuẩn).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tối ưu hóa hàm lượng polyphenol tổng

Trong các nghiên cứu đã được công bố trước đó thì chưa tìm thấy đề tài nào đi sâu vào tối ưu hóa điều kiện tách chiết polyphenol trong lá Tàu bay. Và trong nghiên cứu này, phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) được sử dụng để tối ưu hóa điều kiện tách chiết polyphenol từ cao chiết ethanol của lá Tàu bay cho ra kết quả phương trình tương quan giữa các yếu tố với các biến mã hóa như sau:

$$Y= -229+ 6,78X_1 + 12,03X_2 - 0,64X_3 - 0,0546X_1^2 - 1,536X_2^2 - 0,865X_3^2 - 0,1137X_1X_2 + 0,202X_1X_3 + 0,960X_2X_3 + 0,960X_2X_3$$

Trong đó: Y là hàm lượng polyphenol tổng (mgGA/g cao chiết); X_1 là nồng độ dung môi ethanol (%); X_2 là tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (mL/g); X3 là thời gian chiết (giờ).

Với hệ số hồi quy (R^2) là 95,16%; điều này có nghĩa là có 95,16% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu dự đoán từ mô hình. Bên cạnh đó, sự thiếu phù hợp của mô hình (0,098>0,05) không có ý nghĩa về mặt thống kê cho thấy phương trình hồi quy có sự tương thích với kết quả thực nghiệm.

Bảng 2. Mối tương quan tuyến tính giữa các yếu tố tách chiết polyphenol tổng từ lá Tàu bay

Biến số	Hệ số tương tác	SS chuẩn	Giá trị T	Giá trị P
Hằng số	60,39	1,60	37,84	0,000*
X1	-0,872	0,977	-0,89	0,413
X2	-1,796	0,977	-1,84	0,126
X3	-1,105	0,977	-1,13	0,310
X1*X1	-5,46	1,44	-3,79	0,013*
X2*X2	-6,14	1,44	-4,27	0,008*
X3*X3	-7,78	1,44	-5,41	0,003*
X1*X2	-2,27	1,38	-1,65	0,161
X1*X3	6,09	1,38	4,40	0,007*
X2*X3	5,76	1,38	4,17	0,009*

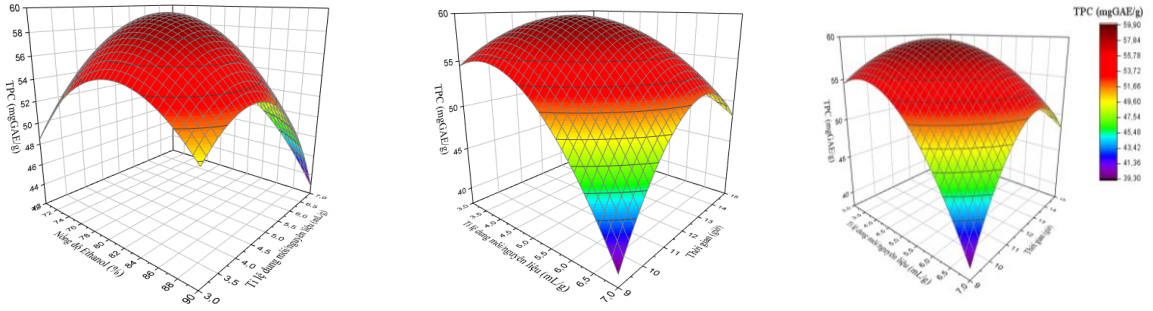
"*" *cho biết giá trị có ý nghĩa về mặt thống kê (p≤0,05).*

Kết quả thể hiện trong Bảng 2 cho thấy hàm lượng polyphenol được tách chiết từ lá Tàu bay chịu ảnh hưởng bởi cả 3 yếu tố (nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và thời gian chiết) ở bậc 2, với $p \leq 0,05$ thể hiện giá trị

có ý nghĩa về mặt thống kê. Cụ thể là khi tăng giá trị các đơn yếu tố về nồng độ dung môi, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và nhiệt độ lên một khoảng thích hợp thì hàm lượng polyphenol cũng tăng theo. Sự tương quan giữa kết quả thực nghiệm và mô hình dự đoán được thể hiện qua Bảng 3. Từ đó, cho thấy kết quả thực tế có độ tin cậy cao so với mô hình, vì vậy có thể sử dụng mô hình này để xác định điều kiện tối ưu tách chiết polyphenol từ lá Tàu bay và cho các đối tượng khác.

Bảng 3. Kết quả thực nghiệm và dự đoán từ mô hình RSM-BBD

NT	Biến số thực			TPC (mg GA/g cao chiết)	
	X_1(%)	X_2(mL/g)	X_3 (giờ)	Thực nghiệm	Mô hình
1	70	3/1	12	47,111	49,185
2	90	3/1	12	53,571	51,988
3	70	7/1	12	48,558	50,141
4	90	7/1	12	45,922	43,849
5	70	5/1	9	58,067	55,212
6	90	5/1	9	40,496	41,297
7	70	5/1	15	41,633	40,832
8	90	5/1	15	48,403	51,258
9	80	3/1	9	54,346	55,128
10	80	7/1	9	38,739	40,012
11	80	3/1	15	42,667	41,394
12	80	7/1	15	50,109	49,327
13	80	5/1	12	59,256	60,394
14	80	5/1	12	61,514	60,394
15	80	5/1	12	60,411	60,394



(A) Nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu

(B) Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và thời gian

(C) Nồng độ ethanol và thời gian

Hình 1. Bề mặt đáp ứng thể hiện sự tương quan của các cặp yếu tố đến hàm lượng polyphenol trong cao chiết Tàu bay

Phương trình hồi quy còn được sử dụng để thiết lập các bề mặt đáp ứng, thể hiện sự tương tác giữa các cặp yếu tố (nồng độ dung môi với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu; tỷ lệ dung môi/nguyên liệu với thời gian chiết và nồng độ dung môi với thời gian chiết) đến hàm lượng polyphenol tách chiết được từ lá Tàu bay. Hình 1A thể hiện sự ảnh hưởng của cặp yếu tố nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu đến hàm lượng polyphenol tách chiết được từ lá Tàu bay. Khi tăng riêng lẻ nồng độ ethanol từ 74% đến khoảng 80% và tỷ lệ khoảng từ 4/1 mL/g đến 4,5/1 mL/g thì hàm lượng chiết được cũng tăng đến lượng xấp xỉ 60,7708 mgGA/g cao chiết. Nhưng khi tiếp tục tăng nồng độ ethanol hoặc lượng dung môi/ nguyên liệu riêng lẻ thì hàm lượng polyphenol có xu hướng giảm đi khá nhiều (khoảng 10 mgGA/g cao chiết). Tuy nhiên, khi kết hợp giữa 02 yếu tố trên thì hàm lượng polyphenol cao nhất đạt 59,70 mgGA/g cao chiết lại không có khác biệt đáng kể. Vì thế, cặp yếu tố nồng độ ethanol – tỷ lệ dung môi/nguyên liệu thông qua phân tích phương sai ($p \leq 0,05$) cũng không có ý nghĩa tương tác.

Ảnh hưởng của cặp yếu tố tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và thời gian đến lượng polyphenol tách chiết từ lá Tàu bay được thể hiện qua Hình 1B. Kết quả cho thấy khi tăng tỷ lệ nguyên liệu đến khoảng 4,5/1 mL/g và thời gian ngâm khoảng 12 giờ thì hàm lượng polyphenol cũng tăng theo và đạt gần 60 mgGA/g cao chiết, điều đó cho thấy 2 yếu

tố này tỷ lệ thuận với hàm lượng polyphenol tách chiết được. Tuy nhiên khi càng tăng tỷ lệ và thời gian ngâm thì hàm lượng polyphenol lại giảm mạnh (gần 20 mgGA/g cao chiết) chỉ còn 39,3 mgGA/g cao chiết. Điều này cũng phù hợp với kết quả khảo sát tỷ lệ và thời gian trước đó.

Tương tự như cặp yếu tố tỷ lệ và thời gian thì nồng độ ethanol và thời gian cũng ảnh hưởng rõ rệt đến hàm lượng polyphenol tách chiết được với phân tích phương sai ($p \leq 0,05$) có ý nghĩa về mặt thống kê. Cụ thể là khi tăng thời gian ngâm thì các hợp chất khác ngoài polyphenol cũng được tách chiết và tan vào dung môi làm hạn chế tính thấm của dung môi chiết (Toma *et al.*, 2001). Và khi tăng nồng độ dung môi thì độ phân cực của dung môi cũng thay đổi theo nên khi tăng nồng độ dung môi từ 70% lên khoảng 78% thì hàm lượng polyphenol đạt cực đại khoảng 59,7 (mgGA/g cao chiết) nhưng khi tăng nồng độ lên đến 90% thì hàm lượng giảm khá đáng kể. Kết quả từ hình 1C cho thấy hàm lượng polyphenol thấp nhất là khoảng 39,9 (mgGA /g cao chiết) ở nồng độ dung môi 90% và thời gian chiết là 15 giờ.

Theo dự đoán từ mô hình, hàm lượng polyphenol đạt tối đa là 60,7708 (mgGA/g cao chiết) tương ứng với các điều kiện tối ưu như sau: nồng độ dung môi ethanol (X_1) là 78,4848% ; tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 4,5758/1 (mL/g) và thời gian chiết là 11,3636 giờ. Để kiểm tra kết quả của mô hình, chúng tôi tiến hành thí nghiệm với các giá trị dự đoán để thu hàm lượng polyphenol cực đại với điều kiện tiệm cận là nồng độ ethanol 78.48% ; tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 4,58/1 (mL/g) và thời gian chiết là 11,36 giờ. Hàm lượng polyphenol thu được từ kết quả thực nghiệm là 63,235 ± 0,39 mgGA/g cao chiết với sai số không vượt quá 5% so với kết quả dự đoán từ mô hình. Vì vậy cho thấy sự tương quan chặt chẽ giữa hai kết quả tính toán giúp khẳng định tính chính xác của mô hình và sự tồn tại của điểm tối ưu. Qua nghiên cứu, có thể thấy sự tương tác qua lại giữa các yếu tố đến khả năng tách chiết polyphenol khi sử dụng phương pháp RSM. Từ đó, áp dụng các thông số này vào thực nghiệm để tối ưu về kinh tế và thời gian cho người thực hiện.

Hoạt tính kháng oxy của cao chiết lá tàu bay

Hoạt tính kháng oxy hóa của Vitamin C và cao chiết được thể hiện thông qua Bảng 4, với giá trị IC_{50} của vitamin C là 2,418 ± 0,15 µg/mL và của cao chiết là 26,837 ± 0,22 µg/mL cho thấy hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết khá cao mặc dù thấp hơn so với vitamin C khoảng 11,1 lần. Theo Kähkönen và đồng tác giả (1999), những loại thực vật có hàm lượng polyphenol lớn hơn 20 mgGA/g, được xem là có hoạt tính chống oxy hóa mạnh. Với hàm lượng polyphenol khoảng 63,235 mgGA /g cao chiết, các hợp chất kháng oxy hóa có trong cao chiết đã trung hòa các gốc tự do DPPH khá tốt với nồng độ khá thấp (giá trị IC_{50} = 26,837 ± 0,22 µg/mL). Theo Awang-Kanak và đồng tác giả (2019) khi tiến hành khảo sát khả năng kháng oxy hóa của cao chiết lá tàu bay từ Kota Belud, Sabah thuộc Malaysia từ ethanol, nước nóng và nước cất, giá trị IC_{50} lần lượt là 180,39 ± 1,94; 386,84 ± 0,96 và 659,61 ± 0,87 µg/mL. Một nghiên cứu khác của Karki và đồng tác giả (2021) cho thấy giá trị IC_{50} của cao chiết lá tàu bay bằng methanol có nguồn gốc từ Nepal là 6,95 µg/mL, chỉ thấp hơn IC_{50} của vitamin C (4,21 µg/mL) khoảng 1,65 lần. Sỡ dĩ kết quả khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa từ lá tàu bay của nghiên cứu này và những nghiên cứu trước đây có sự khác nhau có thể là do điều kiện môi trường, khí hậu và thổ nhưỡng khác nhau. Ngoài ra, điều kiện và phương pháp tách chiết khác nhau cũng có thể là một trong những nguyên nhân ảnh hưởng đến khả năng kháng oxy của cao chiết. Kết quả nghiên cứu này cho thấy lá tàu bay *C. crepidioides* có chứa các hợp chất kháng oxy hóa khá mạnh.

Bảng 4. Khả năng bắt gốc tự do DPPH của vitamin C và cao chiết lá tàu bay

Mẫu	IC_{50} (µg/mL)	Phương trình
Vitamin C	2,418 ± 0,15	y = 19,614x + 2,5371 (R^2 = 0,989)
Cao ethanol Tàu bay	26,837 ± 0,22	y = 1,7155x + 3,9616 (R^2 = 0,9885)

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết lá tàu bay

Kết quả ở Bảng 5 dựa vào phản ứng màu của thuốc thử resazurin, cho thấy giá trị MIC của cao chiết đối với chủng vi khuẩn *S. aureus* là 5 mg/mL vì tại nồng độ này không có sự chuyển màu từ xanh sang hồng chứng tỏ không có sự phát triển của vi khuẩn. Trong khi đó, với chủng vi khuẩn *E. coli* thì giá trị MIC đạt tại nồng độ cao chiết là 8 mg/mL, điều này chứng tỏ cao chiết có khả năng kháng lại chủng vi khuẩn gram dương *S. aureus* tốt hơn so với chủng vi khuẩn gram âm là *E. coli*. Tuy nhiên, hoạt tính kháng 02 chủng vi khuẩn này của cao chiết lá Tàu bay vẫn thấp hơn so với đối chứng dương là amoxicillin với giá trị MIC là 0.05 mg/mL. So với các nghiên cứu trước của Karki và đồng tác giả (2021) với giá trị MIC của cao chiết acetone và methanol lá tàu bay kháng lại vi khuẩn *S. aureus* lần lượt là 50 và 30 mg/mL, cao chiết lá tàu bay trong nghiên cứu này có hoạt tính kháng khuẩn cao hơn hẳn. Điều này có thể do hàm lượng hợp chất polyphenol trong cao ethanol tốt hơn so với các loại dung môi khác.

Bảng 5. Khả năng ức chế sinh trưởng vi khuẩn (MIC) của cao chiết lá tàu bay

Vi khuẩn	*Cao Tàu bay* (mg/mL)
S. aureus	5 < MIC < 4
E. coli	8 < MIC < 7

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công tối ưu hóa được hàm lượng polyphenol tổng số từ cao ethanol của lá Tàu bay với giá trị là 63,235 ± 0,39 (mgGA/g cao chiết) tại điều kiện tách chiết tốt nhất là nồng độ ethanol 78,48% với tỷ lệ giữa dung môi và nguyên liệu là 4,58/1 (mL/g) trong 11,36 giờ ở nhiệt độ phòng. Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết tối ưu hóa của lá Tàu bay khá cao với IC_{50} đạt 26,837± 0,22 µg/mL và có khả năng kháng tốt ở cả 02 chủng vi khuẩn *S. aureus* và *E. coli*. Các kết quả trên cho thấy việc sử dụng mô hình tối ưu hóa RSM-BBD sẽ có thể tối đa được hiệu suất cũng như số lượng các thí nghiệm trong nghiên cứu; góp phần đánh giá đúng hơn về sự tương quan giữa các yếu tố tách chiết ảnh hưởng đến hiệu suất chiết tách chất mang hoạt tính sinh học. Nghiên cứu này đã bước đầu cho thấy tiềm năng về dược tính của cao chiết từ lá Tàu bay; tuy nhiên, cần có thêm nhiều các nghiên cứu chuyên sâu trong tương lai để đánh giá toàn diện hơn về giá trị của cây này trong y học và đời sống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Awang-Kanak F, Fadzelly M, Mohamed M (2019). Ethnobotanical note, total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidative activities of wild edible vegetable. *Crassocephalum crepidioides* from Kota Belud, Sabah. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, 269(1): 012012.

Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 76: 965–977.

Can NM, Thao DTP, Gil G (2020). Wound healing activity of *Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore. leaf hydroethanolic extract. *Oxid Med Cell Longev*, 2020(1): 2483187.

Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 47(10): 3954–3962.

Karki A, Baral R, Karki S, Neupane B, Koirala P, Baral S, Panta S (2021). Phytochemical screening, free radical scavenging, and *In-vitro* anti-bacterial activity study of chloroform, acetone and methanol extracts of selected medicinal plants of nepal. *CUPMAP*. 4(1): 22-35.

Ngan LTM, Dung PP, Nhi NVTY, Hoang NVM, Hieu TT (2017). Antibacterial activity of ethanolic extracts of some Vietnamese medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *AIP Conf Proc*, 1878: 020030.

Opeyemi OA, Funmilayo DO, Omolaja RO (2020). Phytochemical profiling of the hexane fraction of *Crassocephalum crepidioides* Benth S. Moore leaves by GC-MS. *Afr J Pure Appl* Chem, 14(1), 1–8.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM(1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299: 152–178.

Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, Mason TJ (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrason Sonochem*, 8(2): 137–142.

Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1): 230–235.

OPTIMIZING CONDITIONS FOR TOTAL POLYPHENOL EXTRACTION FROM *Crassocephalum crepidioides* LEAF EXTRACT

Doan Thien Thanh*, Chu Thi Thanh Vy

Faculty of Applied Sciences, Ton Duc Thang University

SUMMARY

Crassocephalum crepidioides is a precious herb with many potentials in traditional medicine in Vietnam. However, study on the plant species is still limited, particularly in polyphenol content, the major biological compounds in *C. crepidioides*. This study has optimized the extraction conditions from the leaves to obtain the most effective total polyphenol content by investigating the interaction between factors such as ethanol concentration, ratio between solvent and material (v/w), extraction time using response surface methodology (RSM). Besides, the antioxidant and antibacterial activities of the extract were also examined. The optimal result obtained by the RSM – Box Behnken design is 78.48% ethanol solvent with a solvent to material ratio of 4.58/1 (mL/g) for 11.36 hours at room temperature, the obtained polyphenol content of the extract was 63.24 ± 0.39 (mgGA/g extract). The extract also showed high antioxidant activity with IC_{50} value of 26.84 ± 0.22 (µg/mL). The antibacterial activity of the extract is also revealed against two bacteria strains, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, with MIC values of 5 and 8 mg/mL, respectively. Therefore, it can be seen that *C. crepidioides* leaf extract has high biological activity and requires further research attention to improve the value of this potential medicinal herb.

Keywords: *Crassocephalum crepidioides*, total polyphenol content, optimization, RSM-BBD, antioxidant, antibacterial activity.

* Author for correspondence: Tel: 0905902096; Email: doanthienthanh@tdtu.edu.vn

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC PHƯƠNG PHÁP THU NHẬN PROTEIN ĐẾN HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CHIẾT XUẤT TRÙN QUẾ (*Perionyx excavatus*)

Nguyễn Thị Dung*, Bùi Bảo Thịnh, Nguyễn Thị Nữ Trinh, Phạm Hải Sơn, Bùi Lê Khả Tú, Võ Nguyễn Thanh Thảo, Lê Quang Luân

Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm khảo sát ảnh hưởng của các phương pháp thu nhận protein sử dụng các dung môi khác nhau (nước, ethanol, acetone và phosphate) đến hiệu suất chiết xuất, hàm lượng protein và hoạt tính sinh học của chiết xuất trùn quế (*Perionyx excavatus*). Kết quả cho thấy dung môi nước cho hiệu suất chiết xuất cao nhất đạt 10,6%, tiếp theo là ethanol (8,9%), acetone (4,9%) và phosphate (3,5%). Hàm lượng protein cao nhất được ghi nhận trong chiết xuất acetone (70%), sau đó là ethanol (68,8%), nước (67,5%) và phosphate (50,3%). Phân tích SDS-PAGE cho thấy các dải protein đặc trưng xuất hiện trong tất cả các chiết xuất ngoại trừ phosphate. Chiết xuất nước thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa vượt trội với giá trị IC_{50} lần lượt là 0,838 mg/mL cho DPPH và 0,864 mg/mL cho ABTS. Ngược lại, chiết xuất phosphate và ethanol có khả năng ức chế enzyme elastase mạnh nhất lần lượt đạt 20,8% và 19,6%, vượt trội so với acetone và nước. Các kết quả này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc lựa chọn dung môi đối với các tính chất và hoạt tính sinh học của chiết xuất từ trùn quế, mở ra tiềm năng ứng dụng trong ngành công nghiệp dược phẩm và mỹ phẩm để sản xuất các sản phẩm bảo vệ da, kháng oxy hóa và ức chế enzyme.

Từ khóa: Dung môi, hoạt tính kháng oxy hóa, hoạt tính ức chế enzyme elastase, *Perionyx excavatus*, trùn quế.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trùn quế, hay còn gọi là giun quế hay giun đỏ (*Perionyx excavatus*), là một loài thuộc họ Megascolecidae (Bertrand *et al.,* 2015). Đây là một loài giun đất phổ biến, được nuôi dưỡng chủ yếu để sản xuất phân hữu cơ, xử lý chất thải và làm thức ăn cho gia súc. *P. excavatus* nổi bật với khả năng sinh sản nhanh và sức chịu đựng tốt trong nhiều điều kiện môi trường khác nhau, làm cho chúng trở thành một lựa chọn phổ biến trong nông nghiệp hữu cơ và sản xuất phân hữu cơ (Bertrand *et al.*, 2015).

Chiết xuất từ trùn quế rất giàu protein và có nhiều hoạt tính sinh học đáng kể. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng chiết xuất từ trùn quế có hàm lượng protein cao, làm cho nó trở thành một nguồn dinh dưỡng quan trọng trong thức ăn gia súc và thậm chí có thể được sử dụng trong thực phẩm chức năng dành cho con người (Ding *et al.*, 2019). Ngoài ra, chiết xuất này còn chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học như chất kháng oxy hóa và các enzyme có lợi (Azmi *et al.*, 2014; Gudeta *et al.*, 2020). Các hoạt tính kháng oxy hóa giúp bảo vệ tế bào khỏi sự tổn hại của các gốc tự do, góp phần ngăn ngừa nhiều bệnh lý liên quan đến stress oxy hóa. Trong khi hoạt tính ức chế enzyme elastase có thể hữu ích trong việc làm giảm sự thoái hóa của elastin trong da, giúp duy trì độ đàn hồi và sự trẻ trung của da.

Việc lựa chọn dung môi trong quá trình chiết xuất có vai trò vô cùng quan trọng, ảnh hưởng lớn đến hiệu quả, chất lượng và thành phần của chiết xuất thu được (Chemat *et al.*, 2019). Các dung môi khác nhau có khả năng hòa tan các hợp chất khác nhau, do đó ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất chiết xuất, hàm lượng protein, và các hoạt tính sinh học của sản phẩm cuối cùng (Chemat *et al.*, 2019). Một số dung môi thường được sử dụng trong quá trình chiết xuất bao gồm nước, ethanol, methanol, acetone, và hexane. Mỗi dung môi này có đặc điểm riêng về độ phân cực và khả năng tương tác với các thành phần hóa học khác nhau. Ngoài ra, dung môi cũng ảnh hưởng đến sự ổn định của các hợp chất sinh học trong chiết xuất. Một số hợp chất nhạy cảm với nhiệt độ hoặc ánh sáng có thể bị phân hủy hoặc mất hoạt tính nếu dung môi không được chọn lựa cẩn thận hoặc quy trình chiết xuất không được kiểm soát chặt chẽ (Chemat *et al.*, 2019). Hơn nữa, sự lựa chọn dung môi cũng ảnh hưởng đến khả năng loại bỏ các tạp chất và độc tố, điều này đặc biệt quan trọng khi chiết xuất được sử dụng trong thực phẩm hoặc y dược (Syamittra *et al.*, 2014).

Nghiên cứu và tối ưu hóa dung môi chiết xuất không chỉ giúp tăng hiệu suất chiết xuất và hàm lượng các hợp chất có giá trị, mà còn giúp bảo toàn và nâng cao các hoạt tính sinh học của chiết xuất. Cho đến nay, nghiên cứu ảnh hưởng của dung môi đến hiệu suất, hàm lượng protein và các hoạt tính sinh học của chiết xuất trùn quế là hạn chế. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của các phương pháp thu nhận protein sử dụng các dung môi khác nhau đến (1) hiệu suất chiết xuất, (2) hàm lượng protein, (3) hoạt tính kháng oxy hóa và (4) hoạt tính ức chế enzyme elastase của chiết xuất trùn quế được thu thập tại Thành phố Hồ Chí Minh.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Trùn quế (*P. excavatus*) từ 8-9 tuần tuổi được thu thập từ một trang trại tại huyện Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh. Sau khi thu thập, chúng được vận chuyển nhanh chóng đến Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Tại đây, trùn quế được rửa sạch dưới vòi nước chảy để loại bỏ bám bẩn trên bề mặt cơ thể. Tiếp theo, chúng được ngâm trong dung dịch NaCl 1,0% trong 15 phút, sau đó là dung dịch acid citric 0,3% trong 20 phút. Sau quá trình xử lý này, trùn quế được sấy khô bằng phương pháp đông lạnh để tạo ra bột trùn quế và được bảo quản ở nhiệt độ 40°C.

Phương pháp nghiên cứu

Thu nhận chiết xuất protein bằng nước

Bột trùn quế (50 g) sau khi xử lý được đưa vào cốc thủy tinh dung tích 1000 mL và pha cùng 700 mL nước cất, sau đó lắc kỹ. Mẫu tiếp tục được phá bằng sóng siêu âm cường độ dao động 50% trong 5 phút và sau đó đun sôi trong 30 phút. Sau khi chiết xuất, hỗn hợp được lọc qua giấy lọc Whatman để thu dịch lọc. Quá trình chiết xuất được lặp lại 2 lần và các dịch lọc của hai lần chiết được kết hợp và cô quay chân không (ở áp suất 46 mbar, gia nhiệt ở 50°C, nhiệt độ làm lạnh ở 10°C) để thu cao lỏng. Cuối cùng, bột chiết xuất được thu được sau khi đông khô.

Thu nhận chiết xuất protein bằng đệm phosphate

Bột trùn quế đã xử lý (50 g) được cân vào cốc thủy tinh dung tích 500 mL, sau đó bổ sung 100 mL dung dịch đệm phosphate 50 mM với pH = 7. Mẫu được phá bằng sóng siêu âm (Qsonica - Q700) cường độ dao động 50% trong 5 phút. Dung dịch sau đó được ly tâm ở 3000 rpm trong 20 phút và quy trình này được lặp lại 2 lần để thu dịch nổi. Tiếp theo, ammonium sulfate 60% được bổ sung vào dịch nổi, và sau đó lắc đều và ly tâm ở 4°C, 3000 rpm trong 20 phút, lặp lại 2 lần để loại bỏ dịch và thu được kết tủa. Kết tủa được hòa tan lại với đệm phosphate 50 mM, sau đó tiến hành đông khô để thu bột chiết xuất trùn quế.

Thu nhận chiết xuất protein bằng ethanol

Bột trùn quế đã xử lý (50 g) được cân vào túi dập mẫu với 250 mL nước và tiếp tục phá mẫu bằng máy dập mẫu trong 25 phút, sau đó ly tâm để thu được dịch trích ly thô. Dịch trích ly thô sau đó được tủa với ethanol lạnh nồng độ 99,6% (v/v) với tỷ lệ dịch thô và dung môi là 1:0,4. Hỗn hợp sau đó được ủ ở 4°C trong 20 phút và sau đó tiến hành ly tâm ở 7500 rpm trong 40 phút để thu được kết tủa. Kết tủa được hòa tan lại với đệm phosphate (pH = 6,5), sau đó tiến hành đông khô để thu bột chiết xuất trùn quế.

Thu nhận chiết xuất protein bằng acetone

Bột trùn quế đã xử lý (50 g) được cân vào túi dập mẫu với 250 mL nước và tiếp tục phá mẫu bằng máy dập mẫu trong 25 phút. Sau đó ly tâm để thu được dịch trích ly thô. Dịch trích ly thô sau đó được tủa với acetone lạnh với tỷ lệ dịch thô và dung môi là 1:2. Hỗn hợp sau đó được ủ ở 4°C trong 20 phút và sau đó tiến hành ly tâm ở 7500 rpm trong 40 phút để thu được kết tủa. Kết tủa được hòa tan lại với đệm phosphate (pH = 6,5), sau đó tiến hành đông khô để thu bột chiết xuất trùn quế.

Phương pháp xác định hiệu suất chiết xuất

Hiệu suất chiết xuất của mỗi chiết xuất trùn quế được tính toán dựa trên công thức: Hiệu suất (%) = $W_1/W_2 \times 100$, trong đó W_1 là trọng lượng của bột chiết xuất thu được (g) và W_2 là trọng lượng của mẫu ban đầu (g).

Phương pháp xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein tổng được xác định bằng phương pháp Kjeldahl (Goyal *et al.*, 2022). Mẫu được cân 5 g vào bình Kjeldahl sau đó cho chất xúc tác K_2SO_4 và $CuSO_4$ và 10 mL dung dịch H_2SO_4 đậm đặc. Tiến hành đun chậm cho đến khi dung dịch trong suốt không màu hay có màu xanh nhạt của $CuSO_4$ khi để nguội. Sau đó, cho nước cất vào bình Kjeldahl để tráng rồi đưa vào bình định mức 500 mL, tiếp theo cho khoảng 10 - 15 mL NaOH 40% và vài giọt phenolphthalein vào bình định mức. Định mức bằng nước cất đến vạch. Cho 10 mL acid boric vào bình hứng, sau đó lắp bình vào hệ thống và bắt đầu quá trình cất đạm đến khi dung dịch trong bình hứng đạt được 150 mL. Thu dung dịch từ bình hứng cho vào erlen và chuẩn độ bằng dung dịch H_2SO_4 0,1 N, sau đó tính toán hàm lượng protein theo công thức sau:

$$Hàm\ lượng\ protein\ = \frac{(0{,}0014 \times (V_{H2SO4} - V'_{H2SO4}) \times 100 \times 6{,}25)}{m}$$

Trong đó: 0,0014: Lượng nitơ (g) tương đương với 1 mL H_2SO_4 0,1 N.

V: Dung dịch H_2SO_4 dùng cho mẫu trắng (mL).

V': Dung dịch H_2SO_4 dùng cho mẫu thử (mL).

m: Khối lượng của mẫu thử (g).

Phương pháp điện di SDS-PAGE

Các mẫu trùn quế thu được từ các phương pháp tách chiết được phân tích khối lượng phân tử của các thành phần protein bằng phương pháp điện di SDS-PAGE. Tiến hành theo phương pháp của Hua và đồng tác giả (2011), với một số điều chỉnh. Phương pháp SDS-PAGE sử dụng nồng độ gel tách và gel gom lần lượt là 12,5% và 5% nhằm đánh giá độ tinh khiết và khối lượng phân tử của sản phẩm thu nhận, gel phân tích được nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue R-250.

Phương pháp xác định khả năng bắt gốc tự do DPPH

Hoạt tính kháng oxy hóa được khảo sát bằng phương pháp DPPH theo mô tả của Kim và đồng tác giả (2017) với một số điều chỉnh. Bổ sung 4 mL DPPH 0,1 mM pha trong ethanol vào mỗi ống nghiệm có chứa 1 mL chiết xuất trùn tại các nồng độ khác nhau từ 0,1 - 1 mg/mL. Ủ dung dịch phản ứng 30 phút trong bóng tối. Sau đó, tiến hành đo mật độ quang OD tại bước sóng 517 nm bằng máy Elisa (VERSA max microplate reader). Giá trị mật độ quang OD của mẫu phản ánh khả năng kháng oxy hóa của mẫu. Đối chứng dương trong thí nghiệm là acid ascorbic với dãy nồng độ từ 1 - 50 µg/mL. Chứng âm là nước Milli - Q, mẫu blank. Phần trăm bắt gốc tự do DPPH được xác định theo công thức sau: % ức chế = $(A_C - A_M)/Ac \times 100$. Trong đó, A_C: Mật độ quang của mẫu blank; A_M: Mật độ quang của mẫu thử. Giá trị IC_{50}, biểu thị nồng độ mẫu gây ra sự giảm 50% nồng độ DPPH ban đầu, được xác định từ đường cong nồng độ của chiết xuất so với tỷ lệ ức chế gốc tự do thu được thông qua phân tích hồi quy tuyến tính.

Phương pháp xác định khả năng bắt gốc tự do ABTS

Hoạt tính kháng oxy hóa được khảo sát bằng phương pháp ABTS theo mô tả của Kim và đồng tác giả (2017) với một số điều chỉnh. Pha các dung dịch stock: (1) dung dịch $K_2S_2O_8$ 2,6 mM và (2) dung dịch ABTS 7,4 mM. Trộn dung dịch stock (1) và (2) theo tỉ lệ (1:1), lắc kỹ và để yên trong bóng tối, ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ để cho phản ứng xảy ra hoàn toàn và độ hấp thu của dung dịch đạt mức ổn định. Pha loãng bằng nước cất và điều chỉnh độ hấp thu ở bước sóng 734 nm về 0,7 ± 0,02 ngay trước khi dùng. Dung dịch mẫu được chuẩn bị thành các dãy nồng độ từ 0,1 - 1 mg/mL. Acid ascorbic được sử dụng làm đối chứng dương với dãy nồng độ từ 1 - 50 µg/mL. Mẫu chiết xuất trùn quế (1 mL) tại các nồng độ khác nhau cho phản ứng với 5 mL ABTS vortex, để yên trong bóng tối 15 phút và đem đo ở bước sóng 734 nm bằng máy Elisa (VERSA max microplate reader). Mẫu trắng được chuẩn bị tương tự nhưng thay ABTS bằng methanol. Mẫu chứng âm thay 1 mL mẫu bằng 1 mL methanol. Phần trăm bắt gốc tự do ABTS+ và giá trị IC_{50} được tính toán tương tự như phương pháp DPPH.

Phương pháp xác định hoạt tính ức chế enzyme elastase

Hoạt tính ức chế elastase được xác định theo phương pháp của Azmi và đồng tác giả (2014). Hỗn hợp phản ứng bao gồm 100 µL dung dịch đệm Tris-HCl 0,2 M (pH = 8), 25 µL dung dịch N-(methoxysuccinyl)-ala-ala-pro-val-4-nitroanilide (MAAPVN) 10 mM và 100 µL mẫu được trộn đều và ủ ở 25°C trong 15 phút. Sau đó, bổ sung 50 µL elastase 0,3 U/mL và ủ thêm 15 phút ở 25°C. Độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng được đo bằng máy đọc đĩa Elisa (VERSA max microplate reader) với bước sóng 410 nm. Sử dụng EGCG làm đối chứng dương. Phần trăm ức chế elastase được tính toán theo công thức sau: % ức chế = $(A_C - A_M)/ A_C \times 100$. Trong đó: A_C: Mật độ quang của mẫu chứng âm; A_M: Mật độ quang của mẫu thử.

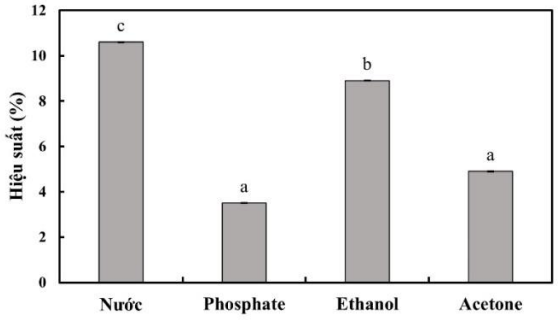
Phương pháp xử lý số liệu

Dữ liệu được phân tích và tính toán bằng phần mềm R (phiên bản 4.3.1) và trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD). Phân tích phương sai một chiều (ANOVA) với thử nghiệm HSD của Tukey đã được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa tất cả các mẫu. Phương pháp phân tích hồi quy tuyến tính đã được sử dụng để thiết lập dạng chuẩn phương trình tuyến tính cho hoạt tính kháng oxy hóa.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của dung môi đến hiệu suất của chiết xuất trùn quế

Mỗi loại dung môi có tính chất hóa học khác nhau, do đó, khả năng hoà tan và chiết xuất các thành phần khác nhau từ mẫu vật cũng khác nhau (Chemat *et al.*, 2019). Việc so sánh hiệu suất thu nhận chiết xuất giữa các dung môi giúp xác định dung môi tối ưu để thu được lượng chiết xuất cao nhất, đồng thời duy trì hoặc cải thiện hàm lượng protein và hoạt tính sinh học. Kết quả ở Hình 1 cho thấy hiệu suất thu nhận chiết xuất ở mẫu dung môi nước cao nhất, đạt 10.6%. Tiếp theo là mẫu chiết xuất ethanol (8,9%), acetone (4,9%) và phosphate (3,5%). Kết quả này cho thấy rằng nước là dung môi hiệu quả nhất để chiết xuất các hợp chất từ trùn quế, tiếp theo là ethanol. Chiết xuất bằng nước cho hiệu suất cao nhất do khả năng hòa tan mạnh mẽ của nước, giúp chiết xuất nhiều loại hợp chất sinh học từ trùn quế (Chemat *et al.*, 2019). Các dung môi khác như acetone và phosphate có hiệu suất thấp hơn do tính chất hóa học của chúng không phù hợp với việc hòa tan và chiết xuất các thành phần từ mẫu vật này.

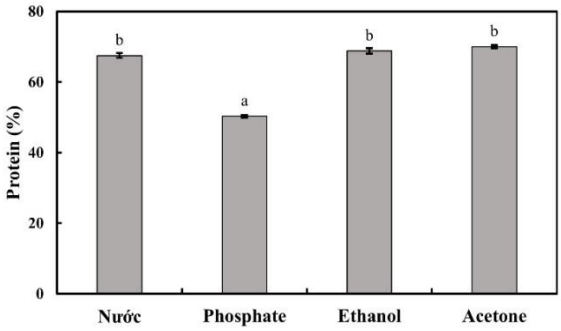


Hình 1. Hiệu suất của chiết xuất trùn quế sử dụng các dung môi khác nhau

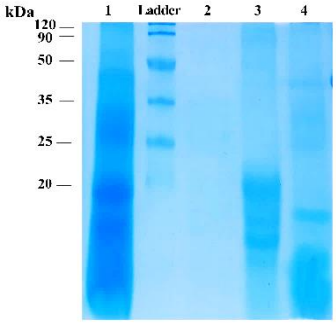
Ảnh hưởng của dung môi đến hàm lượng protein của chiết xuất trùn quế

Trong nghiên cứu về chiết xuất từ trùn quế, hàm lượng protein trong các mẫu chiết xuất là một chỉ số quan trọng để đánh giá chất lượng và hiệu quả của quá trình chiết xuất (Ding *et al.*, 2019). Protein có nhiều chức năng sinh học quan trọng và là một trong những thành phần chính cần được chiết xuất. Kết quả ở Hình 2 cho thấy hàm lượng protein của chiết xuất acetone cao nhất, đạt 70%. Tiếp theo là mẫu chiết xuất ethanol (68,8%), nước (67.5%) và phosphate (50,3%). Tuy nhiên, hàm lượng protein khác nhau của nước, ethanol và acetone không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cho thấy acetone là dung môi hiệu quả nhất để chiết xuất protein từ trùn quế, tiếp theo là ethanol và nước. Acetone là chất kết tủa mạnh, tập trung chủ yếu vào việc kết tủa protein và loại bỏ các tạp chất không cần thiết, nên dù hiệu suất chiết xuất tổng thể thấp, hàm lượng protein trong chiết xuất acetone lại cao. Nước và dung dịch phosphate có hàm lượng protein thấp hơn, có thể do tính chất hóa học của chúng không phù hợp để chiết xuất và tập trung protein một cách hiệu quả.

Các peptide có hoạt tính sinh học được biết đến với nhiều đặc tính sinh học quan trọng, bao gồm khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm và ức chế các enzyme liên quan đến quá trình lão hóa như elastase, collagenase, tyrosinase và hyaluronidase (Ngoc *et al.*, 2023). Đặc biệt, việc lựa chọn các peptide hoặc protein có hoạt tính sinh học có trọng lượng phân tử thấp là rất cần thiết, vì những peptide này thường thể hiện hoạt tính sinh học cao và khả năng hấp thụ tốt hơn trong cơ thể (Nongonierma, FitzGerald, 2017). Để đánh giá trọng lượng phân tử của các protein trong chiết xuất trùn quế, kỹ thuật điện di SDS-PAGE đã được sử dụng (Hình 3).



Hình 2. Hàm lượng protein của chiết xuất trùn quế sử dụng các dung môi khác nhau



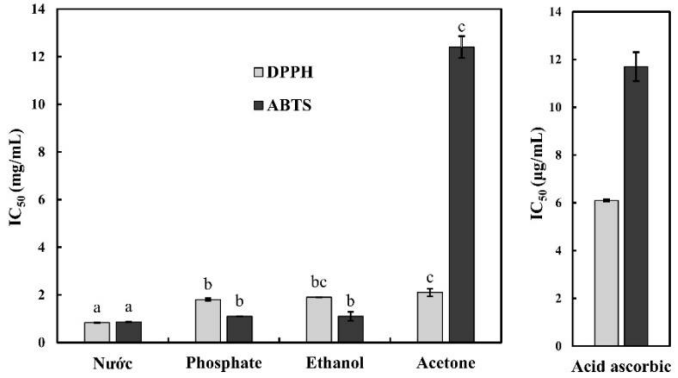
Hình 3. Phân tích SDS-PAGE của chiết của chiết xuất trùn quế sử dụng các dung môi khác nhau
1: Ethanol, 2: Phosphate, 3: Nước, 4: Acetone.

Kết quả điện di ở Hình 3 cho thấy rằng chiết xuất bằng dung dịch phosphate (giếng 2) không biểu hiện rõ các dải protein. Điều này có thể là do dung dịch phosphate không hiệu quả trong việc chiết xuất protein hoặc do protein không được phân giải đủ trong dung dịch này. Ngược lại, các mẫu chiết xuất bằng nước (giếng 3) và acetone (giếng 4) cho thấy các dải protein rõ ràng, chủ yếu tập trung ở các phân đoạn nhỏ hơn 25 kDa. Các protein có trọng lượng phân tử thấp này thường là các peptide hoạt tính sinh học, có thể đóng vai trò quan trọng trong các hoạt động sinh học, chẳng hạn như các hoạt động chống oxy hóa và kháng khuẩn (Nongonierma, FitzGerald, 2017). Trong khi đó, các mẫu chiết xuất bằng ethanol (giếng 1) lại cho thấy sự hiện diện của các dải protein có trọng lượng phân tử cao. Điều này chỉ ra rằng ethanol có khả năng chiết xuất các protein có trọng lượng phân tử cao tốt hơn. Sự khác biệt trong khả năng chiết xuất của các dung môi này cho thấy rằng việc lựa chọn dung môi phù hợp là quan trọng trong việc chiết xuất các protein hoặc peptide có hoạt tính sinh học cụ thể từ trùn quế.

Ảnh hưởng của dung môi đến hoạt tính kháng oxy hóa của chiết xuất trùn quế

Hoạt động kháng oxy hóa là một trong những đặc tính sinh học quan trọng của các peptide và protein có hoạt tính sinh học, đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể khỏi các tổn thương do gốc tự do gây ra. Các gốc

tự do như DPPH và ABTS là những hợp chất gây oxy hóa mạnh, và khả năng loại bỏ các gốc này của các chiết xuất có thể được đo lường thông qua giá trị IC_{50} – nồng độ cần thiết để ức chế 50% hoạt động của gốc tự do (Munteanu, Apetrei, 2021). Kết quả nghiên cứu cho thấy chiết xuất từ trùn quế sử dụng các dung môi khác nhau có khả năng bắt gốc DPPH và ABTS khác nhau (Hình 4). Chiết xuất bằng dung môi nước cho thấy hoạt động bắt gốc DPPH tốt nhất với giá trị IC_{50} là 0,838 mg/mL, tiếp theo là chiết xuất phosphate (1,8 mg/mL), ethanol (1,9 mg/mL) và acetone (2,1 mg/mL). Tương tự, về hoạt động bắt gốc tự do ABTS, chiết xuất bằng dung môi này cũng cho thấy giá trị IC_{50} tốt nhất, đạt 0,864 mg/mL, tiếp theo là chiết xuất phosphate (1,1 mg/mL), ethanol (1,1 mg/mL) và acetone (12,4 mg/mL).

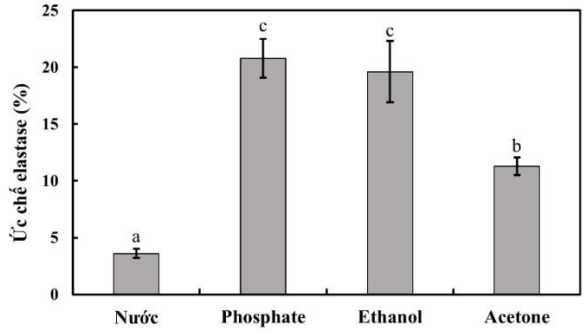


Hình 4. Hoạt tính kháng oxy hóa của chiết xuất trùn quế sử dụng các dung môi khác nhau

Việc chiết xuất nước đạt được hiệu quả cao nhất trong cả hai thử nghiệm có thể giải thích do khả năng hòa tan tốt hơn các hợp chất kháng oxy hóa trong môi trường nước, giúp tăng cường hoạt động kháng oxy hóa của chiết xuất. Acid ascorbic, một chất kháng oxy hóa mạnh đã được biết đến, cho thấy hoạt động kháng oxy hóa đáng kể với giá trị IC_{50} là 6,1 μg/mL đối với thử nghiệm DPPH và 11,7 μg/mL đối với thử nghiệm ABTS. Mặc dù giá trị IC_{50} của các chiết xuất từ trùn quế cao hơn nhiều so với acid ascorbic tuy nhiên đây mới chỉ là chiết xuất dạng thô do đó kết quả này cũng cho thấy thấy tiềm năng như là nguồn cung cấp chất kháng oxy hóa tự nhiên. Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa của chiết xuất trùn quế trong nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu trước đây (Gudeta *et al.*, 2020).

Ảnh hưởng của dung môi đến hoạt tính ức chế elastase của chiết xuất trùn quế

Hoạt động ức chế enzyme elastase là một trong những chỉ số quan trọng để đánh giá tiềm năng của các chiết xuất từ tự nhiên trong điều trị và phòng ngừa các tình trạng liên quan đến quá trình lão hóa da (Donarska, Łączkowski, 2020). Elastase là một enzyme phân huỷ elastin, một thành phần chính của sợi collagen trong da, và hoạt động quá mức của nó có thể dẫn đến lão hóa da. Kết quả nghiên cứu từ Hình 5 cho thấy chiết xuất từ trùn quế sử dụng các dung môi khác nhau có khả năng ức chế elastase khác nhau. Chiết xuất phosphate cho thấy hoạt động ức chế elastase cao nhất, đạt 20,8%. Tiếp theo là chiết xuất ethanol (19,6%), acetone (11,3%) và nước (3,6%). Tuy nhiên, sự khác nhau kết quả ức chế elastase của phosphate và ethanol không có ý nghĩa thống kê. Điều này cho thấy đệm phosphate hiệu quả nhất trong việc chiết xuất các hoạt chất có khả năng ức chế elastase từ trùn quế. Việc các dung môi khác nhau ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của chiết xuất có thể được giải thích bằng khả năng hòa tan và chiết xuất các thành phần sinh học từ nguyên liệu. Đệm phosphate có thể cung cấp điều kiện tối ưu để chiết xuất các hoạt chất có hoạt tính ức chế elastase cao, trong khi đó, các dung môi khác như nước và acetone lại cho hiệu quả thấp hơn. Kết quả hoạt tính ức chế elastase của chiết xuất trùn quế trong nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu trước đây (Azmi *et al.*, 2014).



Hình 5. Hoạt tính ức chế elastase của chiết xuất trùn quế sử dụng các dung môi khác nhau

KẾT LUẬN

Tổng hợp các kết quả nghiên cứu từ các thí nghiệm về chiết xuất từ trùn quế cho thấy rằng dung môi chiết xuất có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất chiết xuất, hàm lượng protein và hoạt tính sinh học của sản phẩm cuối cùng. Dung môi nước đã cho thấy hiệu suất thu nhận chiết xuất cao nhất (10,6%) và chiết xuất này cũng thể hiện hoạt động kháng oxy hóa mạnh mẽ nhất đối với cả DPPH và ABTS. Trong khi đó, dung môi acetone làm tăng hàm lượng protein trong chiết xuất (70%) và đệm phosphate cho hoạt động ức chế elastase mạnh nhất (20,8%). Việc lựa chọn dung môi phù hợp không chỉ quan trọng để tối ưu hóa hiệu suất chiết xuất mà còn ảnh hưởng đến tính chất sinh học của sản phẩm cuối cùng. Các kết quả này cung cấp cơ sở cho việc phát triển các ứng dụng của chiết xuất từ trùn quế trong các lĩnh vực dược phẩm và mỹ phẩm, nhằm hỗ trợ trong việc bảo vệ và tái tạo da, cũng như trong các sản phẩm chăm sóc sức khỏe và làm đẹp.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này đã được hỗ trợ kinh phí bởi Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (số 05/2023/HĐ-QKHCN).*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Azmi N, Hashim P, Hashim DM, Halimoon N, Majid NMN (2014). Anti–elastase, anti–tyrosinase and matrix metalloproteinase–1 inhibitory activity of earthworm extracts as potential new anti–aging agent. *Asian Pac J Trop Biomed*, 4: S348-S352.

Bertrand M, Barot S, Blouin M, Whalen J, de Oliveira T, Roger-Estrade J (2015). Earthworm services for cropping systems. A review. *Agron Sustain Dev*, 35: 553-567.

Chemat F, Abert Vian M, Ravi HK, Khadhraoui B, Hilali S, Perino S, Fabiano Tixier AS (2019). Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. *Molecules*, 24(16): 3007.

Ding S, Lin X, He S (2019). Earthworms: A source of protein. *J Food Sci Eng*, 9(5): 159-170.

Donarska B, Z Łączkowski K (2020). Recent advances in the development of elastase inhibitors. *Future Med Chem*, 12(20): 1809-1813.

Goyal K, Singh N, Jindal S, Kaur R, Goyal A, Awasthi R (2022). Kjeldahl method. Goyal A, Kumar H, eds. Advanced Techniques of Analytical Chemistry. *Bentham Science Publishers*: 105-112.

Gudeta K, Kumari S, Bhagat A, Julka JM, Goyal R, Adama E (2020). Mitogenic, antioxidative and antimicrobial activities of g-90 and coelomic fluid from earthworm as a therapeutic agent, a review. *Int J Pharm Sci Res*, 11: 5298-5307.

Hua Z, Wang YH, Cao HW, Pu LJ, Cui YD (2011). Purification of a protein from coelomic fluid of the earthworm Eisenia foetida and evaluation of its hemolytic, antibacterial, and antitumor activities. *Pharm Biol*, 49(3), 269-275.

Kim HJ, Park CG, Varghese R, Lee JY, Kim Y, Sung GH (2017). In-vitro antioxidative, antiinflammatory properties of Aurea helianthus leaf extract a Korean traditional medicinal plant. *Saudi J Biol Sci*, 24(8): 1943-1947.

Munteanu IG, Apetrei C (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int J Mol Sci*, 22(7): 3380.

Ngoc LTN, Moon JY, Lee YC (2023). Insights into bioactive peptides in cosmetics. *Cosmetics*, 10(4): 111.

Nongonierma AB, FitzGerald RJ (2017). Strategies for the discovery and identification of food protein-derived biologically active peptides. *Trends Food Sci Technol*, 69: 289-305.

Syamittra B, Parasuraman S, Yeng WY, Ping WY, Thujithra J, Kumar J, Dhanaraj SA (2014). A review on adverse health effects of laboratory volatile solvents. *Int J Clin Ther Diagn*, 2: 59-63.

EFFECTS OF PROTEIN EXTRACTION METHODS ON THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF EARTHWORM EXTRACT (*Perionyx excavatus*)

Nguyen Thi Dung*, Bui Bao Thinh, Nguyen Thi Nu Trinh, Pham Hai Son, Bui Le Kha Tu, Vo Nguyen Thanh Thao, Le Quang Luan

Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

SUMMARY

This study aims to investigate the effects of protein extraction methods using different solvents (water, ethanol, acetone, and phosphate) on the extraction efficiency, protein content, and biological activity of earthworm extract (*Perionyx excavatus*). The results indicate that water yielded the highest extraction efficiency at 10.6%, followed by ethanol (8.9%), acetone (4.9%), and phosphate (3.5%). The highest protein content was recorded in the acetone extract (70%), followed by ethanol (68.8%), water (67.5%), and phosphate (50.3%). SDS-PAGE analysis revealed characteristic protein bands in all extracts except for phosphate. The water extract exhibited superior antioxidant activity with IC_{50} values of 0.838 mg/mL for DPPH and 0.864 mg/mL for ABTS. In contrast, the phosphate and ethanol extracts demonstrated the strongest elastase inhibitory activity at 20.8% and 19.6%, respectively, surpassing those of acetone and water. These findings underscore the importance of solvent selection concerning the properties and bioactivity of earthworm extract, highlighting their potential applications in the pharmaceutical and cosmetic industries for the production of skin-protective, antioxidant, and enzyme-inhibitory products.

Keywords: Solvent, antioxidant activity, elastase inhibitory activity, *Perionyx excavatus*, earthworm.

*Author for correspondence: Tel: 0935358270; Email: thuydung9810@gmail.com

PHÂN LOẠI VÀ NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA, KHÁNG SINH CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN *Streptomyces tubercidicus* PCS11 NỘI SINH TRÊN CÂY TRINH NỮ HOÀNG CUNG (*Crinum latifolium* L.)

Nguyễn Văn Thế[1], Quách Ngọc Tùng[1,2], Vũ Thị Hạnh Nguyên[1,2], Lê Thị Thanh Xuân[1], Nguyễn Thị Thanh Lợi[1], Phí Quyết Tiến[1,2*]

[1]Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

[2]Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Xạ khuẩn nội sinh cũng có thể sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp tương tự như các hoạt chất từ cây chủ. Xạ khuẩn nội sinh đã được chứng mình là nguồn cung cấp các hợp chất hoạt tính sinh học tự nhiên, trong số đó là chất kháng sinh, chống oxy hóa. Mục đích của nghiên cứu này là sàng lọc các chủng xạ khuẩn nội sinh trên cây trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium* L.) có hoạt tính kháng sinh và khảo sát hoạt tính chống oxy hóa từ chủng tuyển chọn. Kết quả sàng lọc 16 chủng xạ khuẩn nội sinh cho thấy, chủng *Streptomyces tubercidicus* PCS11 thể hiện phổ kháng khuẩn rộng khi ức chế sự phát triển của tất cả 6 chủng vi sinh vật gây bệnh thử nghiệm với đường kính vòng ức chế lần lượt đạt 16 ± 0,01 mm; 16 ± 0,02 mm; 23,33 ± 1,53 mm; 19,67 ± 0,58 mm; 14,33 ± 1,15 mm; 19,67 ± 2,89 mm. Phân tích đặc điểm hình thái kết hợp với cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự vùng gen 16S rDNA đã định danh chủng nghiên cứu là *S. tubercidicus* PCS11 (mã số GenBank OP881434). Đáng chú ý, cao chiết thô của chủng *S. tubercidicus* PCS11 thể hiện hoạt tính trung hòa các gốc tự do hydroxyl (89,13 ± 3,1%) và superoxide (45,19 ± 1,3%) ở nồng độ 1 mg/mL. Đặc biệt, khả năng trung hòa gốc tự do DPPH đạt 85,71 ± 2,3%, tại nồng độ cao chiết thô 0,1 mg/mL. Kết quả từ nghiên cứu này cho thấy chủng xạ khuẩn *S. tubercidicus* PCS11 có nhiều tiềm năng khai thác để ứng dụng trong lĩnh vực y dược.

Từ khóa: Chống oxy hóa, hoạt tính kháng sinh, xạ khuẩn nội sinh, 16S rDNA, *Streptomyces tubercidicus.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, xã hội phát triển kéo theo sự phát sinh nhiều vấn đề như môi trường ô nhiễm, gia tăng chất phụ gia trong thức ăn và các chất có hại trong mỹ phẩm, kèm theo chế độ ăn mất cân bằng và lạm dụng các chất kích thích như thuốc lá, rượu bia, hoặc căng thẳng thần kinh (stress). Các yếu tố này có thể là những tác nhân gây gia tăng gốc tự do trong cơ thể. Các gốc tự do là các chất hoạt động chứa oxy (reactive oxygen species, ROS) và nitơ (reactive nitrogen species, RNS), tồn tại dưới dạng khử của oxy và nitơ phân tử, gây ra nhiều bệnh nguy hiểm cho con người như ung thư, bệnh tim mạch, đục thủy tinh thể, hen suyễn, viêm gan, tổn thương gan và các bệnh suy giảm miễn dịch (Lee *et al*., 2014). Những nghiên cứu trên thế giới đã khẳng định vai trò của xạ khuẩn trong sinh tổng hợp chất kháng sinh. Trong số 8.000 chất kháng sinh đã được biết đến trên thế giới thì trên 75% là do xạ khuẩn sinh ra (Berdy, 2005). Nhiều loài xạ khuẩn nội sinh, đặc biệt là những loài được phân lập từ cây dược liệu có khả năng ức chế hoặc tiêu diệt nhiều loại vi sinh vật gây bệnh như vi khuẩn, nấm và virus, có tiềm năng để phát triển các loại thuốc kháng sinh mới (Christina *et al*., 2013). Vi khuẩn đa kháng thuốc (MDR) gồm các mầm bệnh (*Enterococcus feacium, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* và *Enterobacter*) đang là mối đe dọa toàn cầu với sức khỏe con người dẫn đến các bệnh nhiễm trùng nặng khó điều trị, có thể dẫn đến tử vong. Các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có nguồn gốc từ vi sinh vật đã trở thành nguồn chính để sản xuất các loại kháng sinh và được sử dụng thường xuyên trong phòng và điều trị bệnh.

Năm 2018, Vu và đồng tác giả (2020) đã phân lập được 105 chủng xạ khuẩn nội sinh trên cây quế, trong đó 36 chủng có hoạt tính kháng khuẩn chống lại ít nhất 1/9 chủng vi khuẩn gây bệnh thử nghiệm. Trong số đó, chủng *Streptomyces cavourensis* YBQ59 ức chế được 7/9 chủng vi khuẩn gây bệnh và có vùng ức chế dao động từ 20-25 mm, cao chiết thô từ chủng YBQ59 thể hiện giá trị MIC là 10,5-22,5 µg/mL (Vu *et al*., 2018). Tới nay, tại Việt Nam chưa có công bố nào liên quan đến khả năng sinh các chất có hoạt tính kháng sinh và chống oxy hóa từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces tubercidicus* nội sinh trên cây trinh nữ hoàng cung. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành phân loại, phân tích hoạt tính kháng sinh và hoạt tính chống oxy hóa từ cao chiết thô của chủng xạ khuẩn *S. tubercidicus* phân lập từ cây trinh nữ hoàng cung.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Tổng số 16 chủng xạ khuẩn nội sinh trên cây trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium* L.) thu thập tại tỉnh Bắc Ninh (21°8’41” B, 106°1’51” Đ) và tỉnh Phú Thọ (21°5’89” B, 105°1’76” Đ) nhận từ Bộ sưu tập giống của Trung tâm

Giống và Bảo tồn nguồn gen Vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Môi trường ISP2 (g/L): Cao nấm men 3; cao malt 10; dextrose 4; agar 20; H_2O đủ thể tích 1000 mL; pH 7-7,2.

Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Dựa vào sự khuếch tán của chất ức chế trong dịch nuôi cấy xạ khuẩn vào môi trường thạch, hoạt tính ức chế dịch nuôi xạ khuẩn là tạo vòng vô khuẩn quanh lỗ đục (Damayanti et al., 2014).

Nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn PCS11

Quán sát đặc điểm hình thái của xạ khuẩn PCS11 thông qua màu sắc khuẩn ty kí sinh và cơ chất, sắc tố dựa trên Khoá phân loại ISP (Shirling *et al*., 1966). Hình dạng chuỗi bào tử được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quang học sau 10 ngày nuôi cấy.

Nghiên cứu đặc điểm sinh lý của chủng PCS11 trên môi trường ISP2 gồm các yếu tố: dải nhiệt độ (20, 25, 30, 37, 40, 45 và 50°C), dải pH ban đầu (3-10) và dải nồng độ muối (0-8%) (Shirling *et al*., 1966). Đánh giá khả năng đồng hoá nguồn cacbon trên môi trường ISP2 có bổ sung 1,0% các nguồn đường (Vu *et al*., 2018).

Phân loại chủng PCS11 bằng phương pháp giải trình tự và phân tích vùng 16S rDNA

DNA tổng số được tách chiết bằng G-spin™ Total DNA Extraction Mini Kit (Intron Bio, Korea) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vùng 16S rDNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR, sử dụng cặp mồi 27F (5′-TAACACATGCAAGTCGAACG-3′) và 1429R (5′-GGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3′) (Quach et al*.,* 2022). Sản phẩm PCR được kiểm tra, tinh sạch và gửi đến First BASE Laboratories Sdn. Bhd. (Malaysia) để giải trình tự. Kết quả giải trình tự gen hai chiều được kiểm tra bằng phần mềm BioEdit 7.2, so sánh với các gen tương ứng đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI. Cây phân loại được xây dựng dựa trên mức độ tương đồng của trình tự nucleotide giữa các loài được tính toán thống kê bằng phần mềm MEGA 7.0.

Tách chiết các hoạt chất sinh học thô từ dịch lên men xạ khuẩn nội sinh

Chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường ISP2 ở 30ºC với tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 8 ngày. Sau đó, dịch nuôi được ly tâm với tốc độ 8.000 vòng/10 phút để thu dịch lên men. Dịch lên men được chiết 3 lần với ethyl acetate theo tỉ lệ 1:1 (dịch lên men : dung môi). Phần dung môi phía trên được thu lại và cô quay để thu được cao chiết thô tổng số và được bảo quản ở 4^oC cho các thí nghiệm tiếp theo (Qi *et al*., 2019).

Hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*

Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết thô từ chủng xạ khuẩn được xác định theo sự chuyển màu của 2,2-diphenyl-1-picrylhy drazyl (DPPH). Cao chiết thô được hòa tan trong ethanol 70% ở nồng độ 0,1 mg/mL chủng xạ khuẩn và dải nồng độ cao chiết thô chủng PCS11 từ 0,01 – 0,1 mg/mL và được phản ứng với 0,2 mL DPPH ở nồng độ 0,1 mM sau đó là 2,0 mL nước khử ion. Phản ứng được ủ trong bóng tối 30 phút và độ hấp thụ sau đó được đo ở bước sóng 517 nm. Hoạt động khử gốc DPPH của cao chiết thô PCS11 được tính theo công thức: I% = 1- [((As-A0)/Ab)) × 100%, trong đó As: độ hấp thụ của hỗn hợp bao gồm cao chiết thô PCS11, A0: độ hấp thụ của ethanol 70% và dung dịch 0,1 mM DPPH, Ab: độ hấp thụ của ethanol 70% (Quach *et al*., 2022).

Cao chiết thô chủng PCS11 dải nông độ từ 0,1 - 1 mg/mL được bổ sung vào phản ứng chứa 0,75 mM 1,10-phenanthroline, 0,75 mM $FeSO_4$, 0,01% H_2O_2, 0,15 M đệm sodium phosphate (pH 7,4). Hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 30 phút và đo ở bước sóng 536 nm. Hoạt tính ức chế gốc hydroxyl được tính theo công thức : I% = [(As-Ab)/(Ao-Ab)] × 100%. Trong đó: Ao: giá trị mật độ quang của phản ứng không bổ sung cao chiết thô và H_2O_2; As: giá trị mật độ quang của mẫu thử; Ab: giá trị mật độ quang của mẫu nước cất.

Hoạt tính loại bỏ gốc tự do superoxide được xác định bằng phản ứng màu dựa trên sự oxy hoá của pyrogallol (Quach *et al*., 2022). Hỗn hợp phản ứng gồm 0,05 M Tris–HCl (pH 8,2), 2,5 mM pyrogallol và cao chiết thô của chủng PCS11 dải nồng độ từ 0,1 - 1 mg/mL. Phản ứng được ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút và đo ở bước sóng 299 nm. Hoạt tính loại bỏ gốc tự do superoxide được tính theo công thức : I% = [(Ab-As)/Ab] × 100%. Trong đó: Ab và As là giá trị mật độ quang của mẫu không có cao chiết thô và mẫu thử, tương ứng (Quach *et al*., 2022). Các thí nghiệm thử hoạt tính chống oxy hóa sử dụng chất chống oxy hoá ascobic acid làm đối chứng dương và thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả nghiên cứu được xử lý và lấy số liệu trung bình theo lý thuyết thống kê sinh học trên phần mềm Excel 2010 (Microsoft Office, Mỹ).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sàng lọc xạ khuẩn nội sinh có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Kết quả sàng lọc khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh của 16 chủng xạ khuẩn nội sinh trên cây trinh nữ hoàng cung (Bảng 1). Tất cả các chủng đều có khả năng kháng ít nhất 1 chủng vi sinh vật kiểm định. Trong đó, 2 chủng kháng 1 loại vi sinh vật gây bệnh, 4 chủng kháng 2 loại vi sinh vật gây bệnh, 3 chủng kháng 3 loại vi sinh vật gây bệnh; 2 chủng kháng 4 loại vi sinh vật gây bệnh và 4 chủng kháng 5 loại vi sinh vật gây bệnh. Riêng chủng PCS11 ức chế sự phát triển của tất cả 6 chủng vi sinh vật gây bệnh gồm *P. aeruginosa* ATCC 9027*, E. coli* ATCC 8739*, Enterobacter aerogenes* ATCC 13048*, S. aureus* ATCC 6538*, S. epidermidis* ATCC 12228 *và Candida albicans* ATCC 10231 với đường kính vòng ức chế trong khoảng 14,33-23,33 mm (Bảng 1). Nghiên cứu của Vu và cộng sự (2020), chủng *S. tubercidicus* HBQ07 có khả năng kháng 6/9 chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm đồng thời ghi nhận sự hiện diện của các gen sinh tổng hợp chuyển hóa thứ cấp mã hóa cho polyketide synthase (*pks-I* và *pks-II*) (Vu *et al*., 2020). Chi *Streptomyces* có tiềm năng trong việc sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp, bao gồm các chất kháng sinh, chống ung thư, chống oxy hóa, kháng khuẩn và ức chế miễn dịch (Rammali *et al*., 2022).

Bảng 1. Sàng lọc khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của 16 chủng xạ khuẩn nội sinh trên cây trinh nữ hoàng cung

STT	Ký hiệu chủng	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-d, mm)					
		P. aeruginosa ATCC 9027	*E. coli* ATCC 8739	*E. aerogenes* ATCC 13048	*S. aureus* ATCC 6538	*S. epidermidis* ATCC 12228	*C. albicans* ATCC 10231
1	BCF2	-	-	16 ± 1	8,33 ±0,58	9,67 ±0,155	-
2	BCF6	-	18,3 ±0,58	23,3 ±2,31	25 ±0	-	14,67 ±3,51
3	PCF1	-	10 ±0	17,67 ±2,08	-	18,67 ±0,58	-
4	PCF2	-	14,67 ±1,53	-	-	13,67 ±0,58	-
5	PCF6	-	-	-	-	15,67 ±0,58	-
6	PCF7	-	-	-	-	14,33 ±0,58	-
7	PCF10	-	22,33 ±1,15	25,67 ±1,53	8 ±0	17 ±1,73	16,33 ±0,58
8	PCF12	-	-	14,33 ±1,53	8 ±0	-	-
9	PCS8	-	21,33 ±0,58	21,67 ±4,04	24,33 ±1,53	-	-
10	**PCS11**	**16 ±0,01**	**16 ±0,02**	**23,33 ±1,53**	**19,67 ±0,58**	**14,33 ±1,15**	**19,67 ±2,89**
11	PCS13	-	-	-	-	16,33 ±2,89	8,33 ±0,58
12	PCS14	23 ±1	20,33 ±3,21	22 ±1,73	16 ±1	15 ±1	-
13	PCS17	16 ±1	-	15,67 ±2,31	-	-	-
14	PCS19	14,33 ±0,58	12 ±1,73	12,67 ±0,58	23,33 ±2,52	10,33 ±1,15	-
15	PCT2	11,33 ±0,58	9 ±0	-	10,33 ±0,58	11 ±0	15 ±1
16	PCT7	13,33 ±0,58	13,33 ±0,58	19 ±3	-	12,33 ±1,15	-

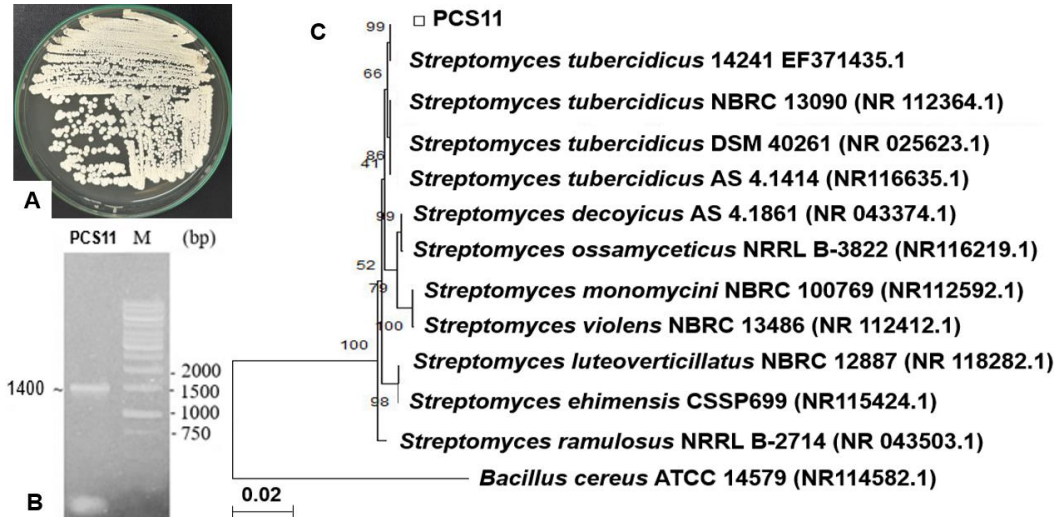
Ghi chú: (-) không xác định.

Theo nghiên cứu của Ratti và đồng tác giả (2011), chủng *S. tubercidicus* được nuôi cấy trên môi trường ISP2 có khả năng ức chế 3 chủng vi sinh vật gây bệnh *S. aureus* ATCC 25923; *E. coli* ATCC 25922 và *C. albicans* ATCC 10231 với đường kính lần lượt đạt 35 mm; 40 mm và 19 mm. Có thể thấy rằng chủng xạ khuẩn PCS11 lựa chọn trong nghiên cứu này có phổ kháng khuẩn rộng hơn (06 chủng vi sinh vật kiểm định) so với nghiên cứu của Ratti và đồng tác giả (2011) . Chính vì vậy, chủng PCS11 được chọn để tiến hành phân loại và nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*.

Phân loại chủng xạ khuẩn PCS11

Sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường thạch ISP2, chủng xạ khuẩn PCS11 hình thành khuẩn ty hình tròn, màu trắng, dạng phấn, đường kính khuẩn lạc 2-4 mm (Hình 1A). Quan sát dưới kính hiển vi có độ phóng đại 100×, cho thấy các sợi chủng PCS11 uốn cong và sự sắp xếp của các bào tử trong một chuỗi bên trong sợi dạng hơi cong. Chủng PCS11 thuộc nhóm ưa ấm, sinh trưởng ở dải nhiệt độ 25-45°C và tối ưu ở 30°C. Chủng có khả năng phát triển ở dải pH trung tính (pH 5,0-8,0) tối ưu ở pH 7,0 và chịu được NaCl 5%, tối ưu ở 1% NaCl. Kết quả này khá phù hợp với các công bố về xạ khuẩn nội sinh trên thực vật (Nguyen *et al*., 2018). Chủng xạ khuẩn PCS11 có khả năng sinh một số enzyme ngoại bào quan trọng như catalase, amylase, oxidase, protease,

cellulase. Ngoài ra, chủng đồng hóa 5/9 nguồn carbon nghiên cứu như glucose, fructose, xylose, maltose, galactose. Có thể kết luận chủng xạ khuẩn PCS11 thuộc chi *Streptomyces.*

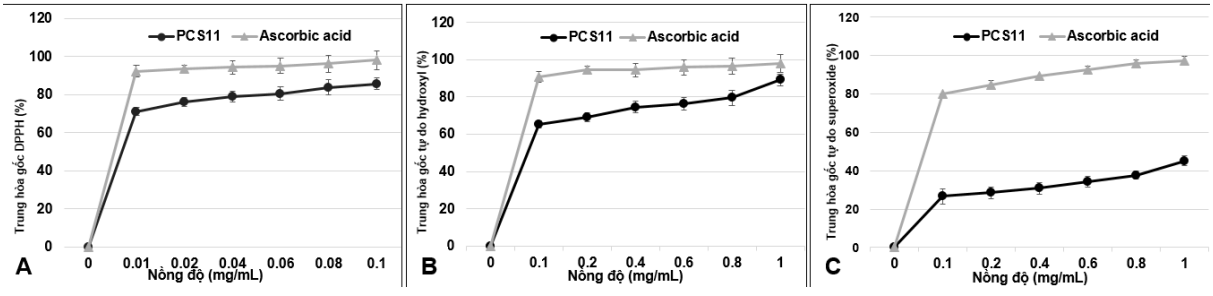


Hình 1. Hình thái khuẩn lạc trên môi trường ISP2 của chủng PCS11 (A), Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rDNA của chủng PCS11 (B) và cây phát sinh loài biểu diễn mối quan hệ giữa chủng nghiên cứu với các loài có quan hệ gần dựa trên phân tích trình tự vùng 16S rDNA (C)

Để phân loại chủng PCS11 tới loài, vùng gen 16S rDNA được khuếch đại với sản phẩm PCR có băng sáng, rõ nét với kích thước khoảng 1500 bp (Hình 1B). Phân tích trình tự vùng gen 16S rDNA và so sánh với các trình tự gen tham chiếu từ ngân hàng GenBank bằng công cụ BLAST (NCBI) cho thấy trình tự vùng gen 16S rDNA của chủng PCS11 có độ tương đồng cao nhất với gen tương ứng của chủng *S. tubercidicus* 14241 (>99,99%) và *S. tubercidicus* NBRC 13090 (99,99%). Cây phát sinh loài khẳng định chủng PCS11 tạo thành nhánh riêng biệt với các chủng thuộc loài *S. tubercidicus* (Hình 1C). Dựa vào kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và phân tích trình tự gen 16S rDNA, chủng xạ khuẩn PCS11 được định danh là *S. tubercidicus* PCS11 (mã số GenBank OP881434).

Hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của chủng *S. tubercidicus* PCS11

Các chất chống oxy hóa đóng vai trò quan trọng trong quá trình bảo vệ tế bào khỏi những tác động tiêu cực từ các gốc tự do như phá hủy DNA, protein và các phân tử sinh học khác. Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết thô thu nhận từ *S. tubercidicus* PCS11 được đánh giá qua trung hòa gốc tự do DPPH. Kết quả cho thấy khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH của cao chiết thô PCS11 tăng dần khi tăng dần nồng độ (Hình 2A). Khi nồng độ cao chiết tăng từ 0,01 - 0,08 mg/mL, hoạt tính trung hòa gốc tự do DPPH tăng dần từ 0 - 83,90%. Tại nồng độ 0,1 mg/mL, hoạt tính trung hòa gốc DPPH đạt cao nhất với 85,71 ± 2,3%, chỉ thấp hơn 12,5 % so với chất chống oxy hóa ascorbic acid. Điều này gợi ý rằng khi nồng độ cao chiết thô tăng, hoạt tính có thể sẽ tiếp tục được cải thiện và đạt mức tương đương với ascorbic acid.



Hình 2. Hoạt tính trung hòa các gốc tự do DPPH (A), gốc hydroxyl (B), gốc superoxide (C) của cao chiết thô từ dịch lên men của chủng *S. tubercidicus* PCS11

Trong số các loại gốc oxy phản ứng, gốc hydroxyl là gốc phản ứng mạnh nhất và là nguyên nhân tiềm tàng dẫn đến viêm, ung thư, hoặc lão hoá. Gốc hydroxyl được sinh ra từ phản ứng Fenton và phản ứng Haber - Weiss thông qua sự chuyển hoá của ion sắt (Quach *et al*., 2022). Tương tự phản ứng với DPPH, kết quả thử hoạt tính trung hoà gốc hydroxyl cho thấy hoạt tính trung hoà gốc hydroxyl tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết thô. Hoạt tính trung hòa hydroxyl tăng từ 0 đến 79,55 ± 2,1 % ở dải nồng độ từ 0 - 0,8 mg/mL (Hình 2B). Khi tăng đến 1 mg/mL cao chiết thô, hoạt tính đạt mức cao nhất với 89,13 ± 3,1% gốc hydroxyl bị trung hòa. Đối với gốc superoxide, xu

hướng tăng dần hoạt tính cũng được quan sát thấy, tuy nhiên, hoạt tính chống oxy hóa chỉ đạt 45,19 ± 1,3% ở nồng độ thử nghiệm cao nhất tại 1 mg/mL (Hình 2C). Nghiên cứu của nhóm tác giả Tan và đồng tác giả (2019) cho thấy, cao chiết thô của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. MUM265 thể hiện hoạt tính òa gốc tự do ABTS tăng từ 9,40 ± 3,17% đến 88,50 ± 0,37% ở nồng độ cao chiết từ 0,125 – 4 mg/mL và hoạt tính trung hòa gốc superoxide tăng từ 9,73 ± 5,72% đến 55,99 ± 1,03% khi tăng nồng độ cao chiết từ 0,0625 – 4 mg/mL (Tan *et al*., 2019), có thể thấy hoạt tính trung hòa gốc tự do của chủng PCS11 cao hơn so với chủng *Streptomyces* sp. MUM265. Trong ba thử nghiệm, cao chiết thô từ *S. tubercidicus* PCS11 nhạy cảm với gốc DPPH hơn hydroxyl và superoxide, tuy nhiên hoạt tính oxy hóa đều rõ rệt trên cả ba gốc tự do. Tại Việt Nam, chúng tôi chưa tìm được tài liệu nào liên quan tới việc chủng xạ khuẩn *S. tubercidicus* thể hiện hoạt tính chống oxy hóa từ cao chiết thô.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chứng minh hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn *S. tubercidicus* PCS11 phân lập từ cây trinh nữ hoàng cung (*C. latifornium* L.). Đánh giá khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh, chủng PCS11 thể hiện phổ kháng khuẩn rộng trên tất cả 6 chủng vi sinh vật gây bệnh thử nghiệm với đường kính vòng ức chế lần lượt đạt 16 ± 0,01 mm; 16 ± 0,02 mm; 23,33 ± 1,53 mm; 19,67 ± 0,58 mm; 14,33 ± 1,15 mm; 19,67 ± 2,89 mm. Đáng chú ý, hoạt tính chống oxy hóa trong điều kiện *in vitro* cho thấy cao chiết thô từ dịch lên men của chủng PCS11 thể hiện hoạt tính trung hòa các gốc tự do hydroxyl và superoxide lần lượt đạt 89,13 ± 3,1% và 45,19 ± 1,3% ở nồng độ cao chiết thô 1 mg/mL. Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH đạt 85,71 ± 2,3%, tại nồng độ cao chiết thô 0,1 mg/mL. Trong tương lai, cần nghiên cứu điều kiện thích hợp nhằm nâng cao hoạt tính chống oxy hóa của PCS11 và kết hợp giải trình tự hệ gen nhằm dự đoán con đường sinh tổng hợp các chất chống oxy hóa và chống ung thư để khai thác ứng dụng trong y dược.

Lời cảm ơn: *Công trình được thực hiện nhờ kinh phí của Nhiệm vụ cơ sở cho cán bộ trẻ năm 2022 cấp Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và hỗ trợ của Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (www.vccm.vast.vn).*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Berdy J (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1): 1-26.

Christina A, Christappher V, Bhore SJ (2013). Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: an overview. *Pharmacognosy Reviews* 7(13): 11-16.

Damayanti E, Julendra H, Sofyan A, Hayati SN (2014). Bile salt and acid tolerant of lactic acid bacteria isolated from proventriculus of broiler chicken. *Tropical Animal science journal*, 37(2): 80-80.

Lee DR, Lee SK, Choi BK, Cheng J, Lee YS, Yang SH, & Suh JW (2014). Antioxidant activity and free radical scavenging activities of *Streptomyces* sp. strain MJM 10778. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7(12): 962-967.

Qi D, Zou l, Zhou D, Chen Y, Gao Z, Feng R, Wang W (2019). Taxonomy and broad-spectrum antifungal activity of *streptomyces* sp. Sca3-4 isolated from rhizosphere soil of *Opuntia stricta*. *Frontiers in Microbiol*, 10: 1390.

Quach NT, Vu THN, Nguyen TTA, Ha H, Ho PH, Chu-Ky S, Lan-Huong N, Nguyen HV, Tanh TTT, Nguyen NA, Chu HH, Phi QT (2022). Structural and genetic insights into a poly-γ-glutamic acid with in vitro antioxidant activity of *Bacillus velezensis* VCN56. *World Journal microbiology and Biotechnology*, 38: 173.

Rammali S, Hilali L, Dari K, Bencharki B, Rahim A, Timinouni M, & Khattabi A (2022). Antimicrobial and antioxidant activities of *Streptomyces species* from soils of three different cold sites in the Fez-Meknes region Morocco. *Scientific Reports*, 12(1): 17233.

Ratti RP, Piza AT, Granato AC, Hokka CO, Dubreuil JD, & de Sousa CP (2011). Growing kinetics and antimicrobial activity of *Streptomyces tubercidicus* crude extracts. In *Microorganisms In Industry And Environment: From Scientific and Industrial Research to Consumer Products* (pp. 589-592).

Shirling ET and Gottlieb D (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3): 313-340.

Tan LTH, Chan KG, Pusparajah P, Yin WF, Khan TM, Lee LH, & Goh BH (2019). Mangrove derived *Streptomyces* sp. MUM265 as a potential source of antioxidant and anticolon-cancer agents. *BMC microbiology*, 19: 1-16.

Vu HNT, Nguyen DT, Nguyen HQ, Chu HH, Chu SK, Chau MV & Phi QT (2018). Antimicrobial and cytotoxic properties of bioactive metabolites produced by *Streptomyces cavourensis* YBQ59 isolated from *Cinnamomum cassia* Prels in Yen Bai Province of Vietnam. *Current microbiology*, 75: 1247-1255.

Vu THN, Nguyen QH, Dinh TML, Quach NT, Khieu TN, Hoang H, & Phi QT (2020). Endophytic actinomycetes associated with *Cinnamomum cassia* Presl in Hoa Binh province, Vietnam: Distribution, antimicrobial activity and, genetic features. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 66(1): 24-31.

IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF AN ENDOPHYTIC ACTINOMYCETE *Streptomyces tubercidicus* PCS11 ISOLATED FROM *Crinum latifolium* L.

Nguyen Van The[1], Quach Ngoc Tung[1,2], Vu Thi Hanh Nguyen[1,2], Le Thi Thanh Xuan[1], Nguyen Thi Thanh Loi[1], Phi Quyet Tien[1,2*]

[1]*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

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

SUMMARY

Endophytic actinomycetes are known for their ability to synthesize various antioxidant compounds with great potential for applications in the field of medicine and pharmacy. Their secondary metabolites have been shown to have antibacterial, antifungal and antioxidant properties. The objective of the study was to evaluate the antibacterial and antioxidant activities of an endophytic actinomycete isolated from *Crinum latifolium* L.. The results showed that *Streptomyces tubercidicus* PCS11 exhibited a broad spectrum of antibacterial activity with inhibition against all 6 tested strains of pathogenic microorganisms with the diameter of the inhibition zone of 16 ± 0,01 mm; 16 ± 0,02 mm; 23,33 ± 1,53 mm; 19,67 ± 0,58 mm; 14,33 ± 1,15 mm; 19,67 ± 2,89 mm, respectively. Analysis of morphological characteristics combined with phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence identified the strain as *S. tubercidicus* PCS11 (GenBank accession number OP881434). Notably, the crude extract of *S. tubercidicus* PCS11 strain showed scavenging activity against hydroxyl radicals (89,13 ± 3,1%) and superoxide (45,19 ± 1,3%) at a concentration of 1 mg/mL. Moreover, the ability to neutralize DPPH free radicals reached 85,71 ± 2,3%, at a crude extract concentration of only 0.1 mg/mL, comparable to that of the ascorbic acid. Results from this study show that the actinomycete strain *S. tubercidicus* PCS11 has great potential for exploitation in medicinal and pharmaceutical applications.

Keywords: Crude extract, antioxidant, actinomycetes, 16s rDNA, *Streptomyces tubercidicus.*

[*] Author for correspondence: Tel: 2437917973; Email: tienpq@ibt.ac.vn

PHÂN LOẠI VÀ NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA, GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ CỦA CHỦNG *Fusarium foetens* TDF7 NỘI SINH TRÊN CÂY THÔNG ĐỎ BẮC (*Taxus chinensis*)

Vũ Thị Hạnh Nguyên[1,2], Phạm Quỳnh Anh[1], Quách Ngọc Tùng[1,2], Phạm Ngọc Sơn[2,3], Nguyễn Việt Cường[4], Phí Quyết Tiến[1,2*]

[1]*Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

[2]*Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

[3]*Viện Khoa học hình sự, Bộ Công an*

[4]*Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*

TÓM TẮT

Các hợp chất có hoạt tính sinh học tự nhiên được phân lập từ vi sinh vật là nguồn cung cấp phong phú cho các loại thuốc mới. Vi nấm nội sinh là nguồn dồi dào các chất có hoạt tính sinh học như gây độc tế bào ung thư, chống oxy hóa và nhiều hoạt tính khác ứng dụng trong y dược. Cây thông đỏ Bắc (*Taxus chinensis*) là loài cây dược liệu thuộc chi *Taxus* đã được chứng minh có chứa các hợp chất gây độc tế bào ung thư và chống oxy hóa, đồng thời có sự tồn tại của vi nấm nội sinh. Nghiên cứu này công bố chủng vi nấm TDF7 nội sinh trên cây thông đỏ Bắc ở tỉnh Hà Giang có hoạt tính gây độc tế bào ung thư và hoạt tính chống oxy hóa. Dựa trên những đặc điểm khuẩn lạc, bào tử và phân tích trình tự vùng gen ITS, chủng vi nấm nghiên cứu được định danh là *Fusarium foetens* TDF7 (mã số GenBank PP940016). Cao chiết thô từ dịch lên men chủng *F. foetens* TDF7 thể hiện độc tính trên cả hai dòng tế bào ung thư A549 (IC_{50} = 28,75±1,94 µg/mL) và MCF7 (IC_{50} = 43,47±3,66 µg/mL). Thử nghiệm định lượng thành phần các hợp chất phenolic cho thấy cao chiết có hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng lần lượt là 68,07±0,6 µg GAE/mg và 97,24±1,3 µg QE/mg. Ngoài ra, cao chiết ở nồng độ 0,6 mg/mL thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất với ba gốc tự do hydroxyl (58,04±2,6%), DPPH (60,71±1,2%) và superoxide (65,31±1,9%). Những dữ liệu nghiên cứu trên cho thấy chủng vi nấm *F. foetens* TDF7 nội sinh trên cây thông đỏ Bắc có khả năng sinh tổng hợp cao chiết thô gây độc tế bào ung thư và chống oxy hóa, hứa hẹn những tiềm năng mới cho ứng dụng sinh tổng hợp các hoạt tính này trên cây thông đỏ Bắc ở Việt Nam.

Từ khóa: chống oxy hóa, gây độc tế bào ung thư, *Fusarium foetens*, *Taxus chinensis*, vi nấm nội sinh.

MỞ ĐẦU

Stress oxy hóa là tình trạng rối loạn chuyển hóa xuất phát từ sự mất cân bằng giữa các gốc tự do và chất chống oxy hóa trong cơ thể, hiện nay đang trở nên rất phổ biến trong đời sống con người. Stress oxy hóa cũng được chứng minh là một trong những nguyên nhân trực tiếp dẫn đến bệnh ung thư. Cho đến nay các nhà nghiên cứu đã và đang không ngừng tìm kiếm những hoạt chất mới chống ung thư, ngăn ngừa oxy hóa chiết xuất từ cây dược liệu. Kể từ khi paclitaxel – hoạt chất có nguồn gốc từ vỏ cây thuỷ tùng Thái Bình Dương (*Taxus brevifolia*) vào năm 1971 – trở thành thuốc điều trị ung thư hàng đầu trên thế giới với quy mô thị trường 1,6 tỉ đô la vào năm 2005 (Gordon, 2011), các cây *Taxus* được xem là nhóm cây dược liệu triển vọng với nhiều tiềm năng khai thác những hợp chất chống ung thư hoặc có các hoạt tính khác. Cây thông đỏ Bắc (*Taxus chinensis* Pilg. Rehder.) là một trong hai loài thông đỏ được tìm thấy ở Việt Nam. Loài cây dược liệu này phân bố ở các rừng thứ sinh ở độ cao 1200 – 1400 m và được xếp vào nhóm Sẽ nguy cấp (Vulnerable) theo Sách đỏ Việt Nam (2007). Paclitaxel và một số hoạt chất chống ung thư khác như anandamide và axit 4-hydroxybenzoic đã được chiết xuất từ cây thông đỏ Bắc (Cao *et al*., 2022).

Vi nấm nội sinh trên cây dược liệu là những chủng vi nấm sống bên trong các mô khoẻ mạnh của cây, duy trì mối quan hệ nội cộng sinh trong một phần hoặc suốt vòng đời thực vật mà không gây bệnh cho cây chủ. Những năm qua, các hướng nghiên cứu hoạt chất làm dược phẩm đang tập trung vào vi nấm nội sinh bởi đây là nguồn thay thế mới cung cấp các hợp chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt khi nhiều chất chuyển hóa thứ cấp không có sẵn trên thị trường, khó tổng hợp trực tiếp do cấu trúc phân tử phức tạp, và có nguồn gốc từ cây dược liệu phát triển chậm hoặc có nguy cơ tuyệt chủng. Cao chiết thô của 5 chủng vi nấm thuộc hai chi *Penicllium* và *Aspergillus* nội sinh trong rễ cây thông đỏ Nam (*Taxus wallichiana*) được chứng minh có hoạt tính trung hoà hai gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhy drazyl (DPPH) và 2,2′-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) (Adhikari, Pandey, 2024). Phân tích sắc kí khí - quang phổ khối (GC-MS) cho thấy trong cao chiết thô các chủng này có

chứa ba hợp chất chống oxy hóa điển hình là quercetin, axit ascorbic và axit gallic. Ở Việt Nam, một số hoạt chất chống ung thư như paclitaxel hoặc tiền chất của nó đã được phát hiện ở vi nấm nội sinh trên loài *T. wallichiana* (Đàm Sao Mai, Võ Trung Âu, 2014). Tuy nhiên, số lượng nghiên cứu đi sâu vào vi nấm nội sinh có hoạt tính chống oxy hóa trên các cây thông đỏ vẫn còn hạn chế, đặc biệt là ở loài *T. chinensis*. Bài báo này tập trung vào nghiên cứu một số hoạt tính sinh học của chủng vi nấm *F. foetens* TDF7 nội sinh trên cây thông đỏ Bắc: xác định hoạt tính gây độc hai dòng tế bào ung thư A549, MCF7 và hoạt tính chống oxy hóa đối với ba gốc tự do hydroxyl, DPPH và superoxide.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng giống vi sinh vật: Chủng vi nấm nội sinh TDF7 được phân lập từ thân cây thông đỏ Bắc (*Taxus chinensis* (Pilg.) Rehder) thu thập tại huyện Đồng Văn, tỉnh Hà Giang (23°15'24" N 105°17'39" E). Chủng được lưu giữ trong Bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật tại Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen Vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tế bào ung thư: Hai dòng tế bào ung thư ở người gồm ung thư phổi A549 và ung thư vú MCF7 do GS. Jeanette Maier, trường Đại học Milan, Ý và GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island, Mỹ cung cấp.

Môi trường nuôi cấy: **PDA** (g/L): Dịch chiết khoai tây 200, dextrose 20, thạch 20, pH 6,5; **PDB** (g/L): Dịch chiết khoai tây 200, dextrose 20, pH 6,5; **Czapek-Dox** (g/L): Saccarose 30, $MgSO_4$ 0,5, K_2HPO_4 1, KCl 0,5, $NaNO_3$ 2, $FeSO_4$ 0,01, thạch 18, pH 7.

Phương pháp

Nghiên cứu đặc điểm hình thái vi nấm: Chủng vi nấm TDF7 được hoạt hóa trên môi trường thạch Czapek – Dox và nuôi ở nhiệt độ 28ºC trong 5 ngày để quan sát hình Thái khuẩn lạc. Sợi nấm được sử dụng làm tiêu bản để quan sát cuống sinh bào tử qua kính hiển vi quang học (Zeiss, Đức) ở độ phóng đại 400 lần (Vu *et al*., 2023).

Phân loại vi nấm bằng trình tự vùng gen ITS: Chủng vi nấm TDF7 được hoạt hóa trên môi trường PDB và nuôi ở 28ºC trong 48 giờ. Sinh khối nấm sau khi li tâm loại bỏ dịch được sử dụng để tách DNA tổng số. Quá trình tách DNA tổng số được thực hiện với bộ kit QIA Amp Mini kit (Qiagen, Mĩ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vùng gen ITS được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi ITS1 (5′–TCCGTAGGTGAACCTGCGG–3′) và ITS4 (5′–TCCTCCGCTTATTGATATGC–3′). Sản phẩm khuếch đại sau khi tinh sạch được giải trình tự Sanger (First BASE Laboratories, Malaysia). Dữ liệu thô trình tự gen được xử lí bằng phần mềm BioEdit (ver 7.2.5) và so sánh với các trình tự gen sẵn có trên cơ sở dữ liệu GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) bằng công cụ BLAST. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA (ver 11) sử dụng thuật toán Neighbor-Joining với chỉ số bootstrap 1000 (Vu *et al*., 2023).

Lên men vi nấm và thu cao chiết thô chứa hoạt tính sinh học: Chủng vi nấm nội sinh TDF7 được hoạt hóa và lên men trong môi trường PDB ở 28ºC, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 10 ngày. Toàn bộ dịch lên men chứa sinh khối được xay nhuyễn và bổ sung ethyl acetate theo tỉ lệ thể tích 1:3 (dung môi : dịch lên men). Quá trình chiết bằng ethyl acetate được thực hiện 3 lần. Dung môi sau khi chiết được cô cạn bằng thiết bị cô quay chân không ở 45°C, thu được cao chiết thô vi nấm TDF7 (Vu *et al*., 2023).

Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của cao chiết vi nấm: Cao chiết thô được hoà tan trong dimethyl sulfoxide (DMSO) ở các nồng độ 0,8; 4; 20 và 100 µg/mL. Dung dịch cao chiết ở các nồng độ trên được thử nghiệm độc tính trên hai dòng tế bào A549 và MCF7 bằng phương pháp nhuộm màu protein với thuốc thử sulforhodamine B (SRB). Ellipticine ở các nồng độ 0,08; 0,4; 2 và 10 µg/mL được sử dụng làm đối chứng dương, DMSO 1% được sử dụng làm đối chứng âm (Vu *et al*., 2023).

Xác định hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng trong cao chiết thô: Hàm lượng polyphenol tổng của cao chiết được đánh giá bằng phương pháp so màu Folin-Ciocalteu, và được tính toán dựa trên đường chuẩn axit gallic với phương trình: Y=0,0262x – 0,013 (R^2=0,9986). Kết quả được biểu thị dưới dạng đương lượng axit gallic tính bằng microgram trên mỗi gram cao chiết thô (µg GAE/g FW). Hàm lượng flavonoid tổng của cao chiết thô được xác định bằng phương pháp quang phổ sử dụng phép đo màu $NaNO_2$-$Al(NO)_3$, và được tính toán dựa trên đường chuẩn quercetin với phương trình Y = 0,0291x – 0,015 (R^2=0,9989). Kết quả được biểu thị dưới dạng đương lượng quercetin tính bằng microgram trên mỗi gram cao chiết thô (µg QE/g FW). Các thí nghiệm được thực hiện 3 lần (Vu *et al*., 2023).

Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết vi nấm: Cao chiết thô được hoà tan trong ethanol ở các nồng độ 0,1; 0,2; 0,4 và 0,6 mg/mL và thử nghiệm khả năng trung hoà ba gốc tự do hydroxyl, DPPH và superoxide. Ascorbic acid ở cùng dải nồng độ trên được sử dụng làm đối chứng dương. Phản ứng trung hoà gốc hydroxyl sử dụng phép đo màu với thuốc thử brilliant green 0,45 mM ở bước sóng 624 nm. Hoạt tính trung hoà gốc DPPH được đánh giá bằng khả năng gây mất màu dung dịch DPPH ở bước sóng 517 nm. Đối với gốc superoxide, phản ứng sử dụng thuốc thử pyrogallol 2,5 mM và được đo mật độ quang ở bước sóng 299 nm (Vu *et al*., 2023).

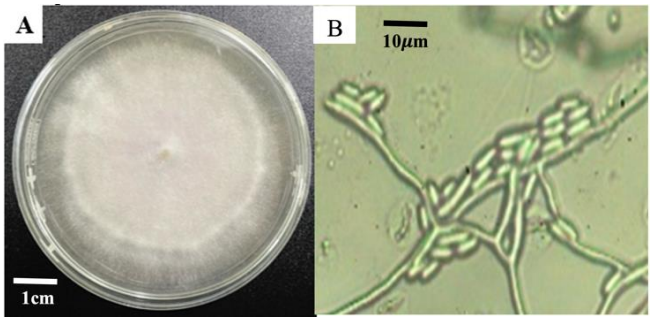
Xử lí số liệu: Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả nghiên cứu được xử lý và tính giá trị trung bình theo lý thuyết thống kê sinh học trên phần mềm Microsoft Excel 2019 (Microsoft, Mỹ).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

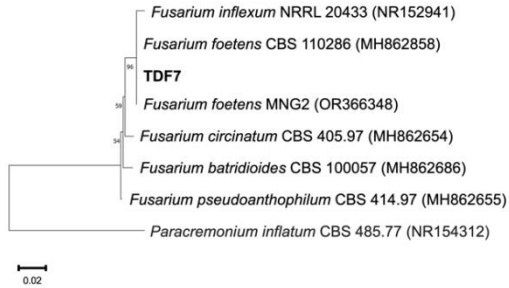
Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và bào tử vi nấm

Chủng vi nấm TDF7 sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường Czapek Dox tạo khuẩn lạc tròn đều với đường kính đạt 72±1,7 mm (Hình 1A). Bề mặt khuẩn lạc bông xốp, sợi nấm xoăn, ban đầu có màu trắng sau đó chuyển dần sang hồng, tím nhạt. Cuống sinh bào tử được quan sát sau 6-7 ngày nuôi cấy. Dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần, cuống sinh bào tử mọc đơn độc hoặc phân nhánh, phần đỉnh sinh ra nhiều bào tử dạng thể bình, hình que với bề mặt nhẵn. Các bào tử có kích thước từ 6x2,3 µm đến 8,5x2,1 µm, mọc thành cụm (Hình 1B). Tham khảo khóa phân loại của Booth (1971), các đặc điểm sợi, bào tử và cuống sinh bào tử cho thấy chủng TDF7 mang đặc điểm hình thái cơ bản của chi *Fusarium*. Do đó, chủng TDF7 có thể được phân loại sơ bộ thuộc chi nấm *Fusarium*.

Vi nấm *Fusarium* nội sinh trên cây dược liệu đã được chứng minh có một số hoạt tính sinh học có tính dược như gây độc tế bào ung thư và chống oxy hóa. Vi nấm nội sinh thuộc loài *Fusarium chlamydosporium* khi lên men có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất fusarithioamide B gây độc nhiều dòng tế bào ung thư như MCF7, BT549, SKOV3 và HCT116 với các giá trị IC_{50} lần lượt đạt 0,21; 0,09; 1,23 và 0,59 µM (Ibrahim *et al*., 2018).Vi nấm nội sinh *Fusarium napiforme* khi lên men thu được cao chiết thô có khả năng gây độc tế bào ung thư A549 (IC_{50} = 249,8 µg/mL). Ở nồng độ 1 mg/mL cao chiết có hoạt tính chống oxy hóa với gốc DPPH (75,46±0,5%) và khử sắt (OD_{700} = 0,882±0,01). Những báo cáo trên cho thấy vi nấm nội sinh thuộc chi *Fusarium* có khả năng sinh tổng hợp chiết xuất thô cũng như các hoạt chất có hoạt tính sinh học quan trọng có thể ứng dụng trong y dược.



Hình 1. Đặc điểm khuẩn lạc (A) và bào tử (B) của chủng vi nấm TDF7 khi quan sát qua kính hiển vi ở độ phóng đại 400 lần



Hình 2. Cây phát sinh loài thể hiện mối quan hệ giữa chủng TDF7 và các chủng tham chiếu trên GenBank

Phân loại vi nấm bằng trình tự vùng gen ITS

Chủng TDF7 tiếp tục được phân loại đến loài thông qua so sánh trình tự vùng gen ITS. Kết quả so sánh với các trình tự sẵn có trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) cho thấy vùng gen ITS của chủng TDF7 tương đồng 100% với gen của hai chủng *F. foetens* MNG2 và *F. foetens* CBS 110286 (Bảng 1). Ngoài ra, chủng TDF7 có độ tương đồng đạt 99,10% với chủng *F. inflexum* NRRL 20433 và trên 98% với các chủng *F. pseudoanthophilum* CBS 414.97 (98,65%), *F. circinatum* CBS 405.97 (98,91%) và *F. bactridioides* 100057 (98,60%). Bên cạnh đó, cây phát sinh loài cho thấy chủng TDF7 thuộc chung nhóm với hai chủng *F. foetens* MNG2 và *F. foetens* CBS 110286 (Hình 2). Như vậy, kết hợp giữa đặc điểm hình thái khuẩn lạc, bào tử và so sánh trình tự gen ITS, chủng vi nấm TDF7 được định danh là *Fusarium foetens* TDF7 (mã số GenBank PP940016).

Bảng 1. Ma trận biểu hiện mức độ tương đồng của chủng TDF7 với các chủng tham chiếu trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI)

Chủng vi nấm	TDF7	*F. foetens* MNG2	*F. foetens* CBS 110286	*F. inflexum* NRRL 20433	*F. pseudoanthophilum* CBS 414.97	*F. circinatum* CBS 405.97	*F. bactridioides* CBS 100057
TDF7	100,00	100,00	100,00	99,10	98,65	98,91	98,60
F. foetens CBS 110286 (MH862858)	100,00	99,36	100,00	95,99	95,50	95,88	95,69
F. foetens MNG2 (OR366348)	100,00	100,00	99,36	98,86	98,52	98,50	98,33
F. inflexum NRRL 20433 (NR_152941)	99,10	98,96	95,99	100,00	98,27	98,65	98,46
F. pseudoanthophilum CBS 414.97 (MH862655)	98,65	98,52	95,50	98,27	100,00	99,63	99,45
F. circinatum CBS 405.97 (MH862654)	98,91	98,50	95,88	98,65	99,63	100,00	99,82
F. bactridioides CBS 100057 (MH862686)	98,60	98,33	95,69	98,46	99,45	99,82	100,00

Vi nấm *Fusarium foetens* nội sinh đã được nghiên cứu khả năng tạo ra sản phẩm lên men có hoạt tính sinh học. Chủng vi nấm *F. foetens* AQF6 nội sinh trên cây dẻ tùng Vân Nam khi lên men trên môi trường giàu glucose cho cao chiết thô có hoạt tính chống oxy hóa với hai gốc tự do DPPH (95,75±1,06%) và hydroxyl (85,66±1,91%) (Vu *et al*., 2024). Phân tích các thành phần của cao chiết thô cho thấy sự có mặt của 6 hợp chất vòng thơm có hoạt tính trung hoà hydroxyl và DPPH, với các giá trị IC_{50} đều nhỏ hơn 10 mM. Có thể thấy, khả năng chống oxy hóa của cao chiết từ vi nấm *F. foetens* có được do thành phần các hợp chất chống oxy hóa trong cao chiết. Như vậy chủng vi nấm *F. foetens* TDF7 có tiềm năng sinh tổng hợp những hợp chất có hoạt tính sinh học cần được nghiên cứu khai thác thêm.

Khả năng gây độc tế bào ung thư của cao chiết vi nấm

Cao chiết thô từ dịch lên men chủng vi nấm *F. foetens* TDF7 được thử nghiệm khả năng gây độc trên hai dòng tế bào A549 và MCF7 tại các nồng độ 20 và 100 µg/mL. Kết quả cho thấy ở nồng độ 20 µg/mL, cao chiết gần như không gây độc với hoạt tính đạt mức dưới 50% trên hai dòng tế bào. Khi tăng nồng độ cao chiết phản ứng gấp 5 lần, hoạt tính tăng đáng kể và lần lượt đạt 83,94±1,5% đối với A549 và 86,86±2,2% trên dòng tế bào MCF7 (Bảng 2). Cao chiết vi nấm *F. foetens* TDF7 thể hiện hoạt tính gây độc mạnh hơn trên dòng tế bào A549 với giá trị IC_{50} = 28,75±1,94 µg/mL, cao hơn 1,5 lần so với kết quả trên dòng tế bào MCF7. Vi nấm nội sinh thuộc chi *Fusarium* đã được chứng minh có hoạt tính gây độc tế bào ung thư nhờ khả năng sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp trong quá trình lên men trong một số nghiên cứu trước đây. Chủng vi nấm *Fusarium perseae* WDF12 nội sinh trên cây đỉnh tùng (*Cephalotaxus mannii*) khi lên men và chiết xuất bằng ethyl acetate thu được cao chiết có hoạt tính gây độc trên hai dòng tế bào A549 và MCF7, với giá trị IC_{50} đều nhỏ hơn 20 µg/mL (Vu *et al*., 2023). Kết quả này cho thấy cao chiết chủng *F. perseae* WDF12 thể hiện độc tính mạnh hơn so với cao chiết chủng *F. foetens* TDF7 trên cả hai dòng tế bào. Trong một thử nghiệm khác trên chủng vi nấm nội sinh *Fusarium solani* ATLOY-8, các cấu trúc nano vàng được sinh tổng hợp từ chiết xuất chủng này thể hiện hoạt tính gây độc dòng tế bào MCF7 với giá trị IC_{50} = 0,8±0,5 µg/mL (Clarance *et al*., 2020), cao hơn đáng kể so với hoạt tính của cao chiết chủng *F. foetens* TDF7. Sự chênh lệch hoạt tính này có thể liên quan đến sự khác biệt giữa chiết xuất thô từ dịch lên men vi nấm và các hạt nano kim loại được chuyển hóa từ chiết xuất vi nấm.

Bảng 2. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của cao chiết thô từ dịch lên men chủng vi nấm *F. foetens* TDF7

Nồng độ cao chiết thô (µg/mL)	Khả năng gây độc tế bào ung thư của cao chiết thô của chủng TDF7		Nồng độ chất chuẩn (µg/mL)	Khả năng gây độc tế bào ung thư của chất chuẩn elliptincine	
	A549	MCF7		A549	MCF7
100	83,94±1,50	86,86±2,20	10	92,81±1,06	93,97±1,07
20	45,11±0,80	29,50±0,70	2	72,24±2,81	72,80±2,33
IC_{50}	28,75±1,94	43,47±3,66	IC_{50}	0,46±0,02	0,45±0,04

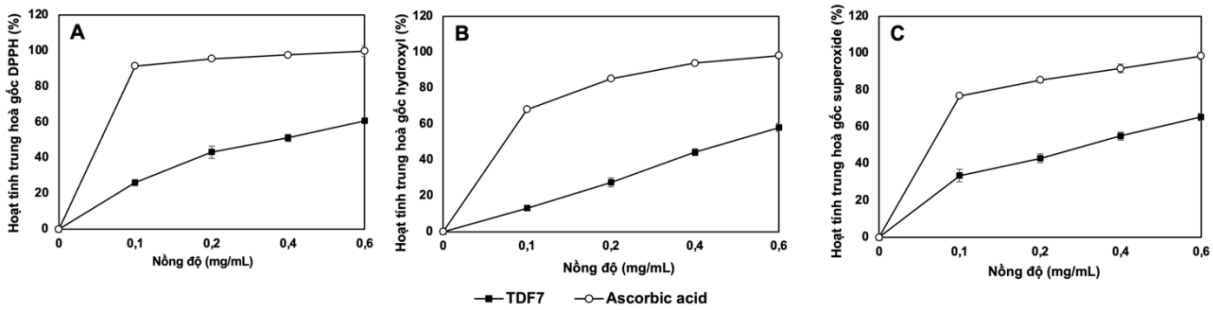
Chú thích: Ellipticine là đối chứng dương.

Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng trong cao chiết thô vi nấm

Các hợp chất polyphenol và flavonoid là những yếu tố chống oxy hóa đang ngày càng được quan tâm trong những nghiên cứu tìm kiếm hoạt chất chống oxy hóa mới từ vi nấm nội sinh. Trong nghiên cứu này, chiết xuất thô từ dịch lên men chủng *F. foetens* TDF7 được định lượng thành phần polyphenol và flavonoid tổng trên 1 mg/ml cao chiết. Kết quả cho thấy thành phần polyphenol toàn phần đạt mức 68,07±0.6 µg GAE/mg, và hàm lượng flavonoid tổng là 97,24±1,3 µg QE/mg. So sánh với báo cáo của Vu và đồng tác giả (2023), hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần của chủng *F. foetens* TDF7 thấp hơn 3,3 lần so với chủng *F. perseae* WDF12. Trong khi đó, cao chiết chủng *F. foetens* TDF7 có hàm lượng flavonoid tổng cao hơn trên 10 lần so với chủng vi nấm nội sinh *Fusarium napiforme* (Chutulo *et al*., 2020). Sự chênh lệch về hàm lượng tổng các hợp chất phenolic trong cao chiết từ dịch lên men các chủng vi nấm nội sinh kể trên có thể phụ thuộc vào loại dung môi hữu cơ chiết xuất bởi đây là yếu tố quyết định hiệu quả hoà tan các nhóm chất này. Ngoài ra, hiệu suất sinh tổng hợp hoạt chất cũng khác biệt nhau giữa những chủng vi nấm không cùng loài.

Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết vi nấm

Hoạt động chống oxy hóa của cao chiết thô từ dịch lên men vi nấm nội sinh *F. foetens* TDF7 được đánh giá trên dải nồng độ từ 0,1 đến 0,6 mg/mL. Cao chiết thô thể hiện rõ khả năng trung hoà cả ba gốc tự do tại nồng độ 0,4 mg/mL với hoạt tính đều đạt mức trên 50% (Hình 3). Đáng chú ý, ở nồng độ 0,6 mg/mL hoạt tính của cao chiết đạt mức cao nhất, tương ứng là 58,04±2,6%; 60,71±1,2% và 65,31±1,9% đối với hydroxyl, DPPH và superoxide (Hình 3). Hoạt tính chống oxy hóa của acid ascorbic ở nồng độ 0,1 mg/mL tương ứng đạt mức 68,06±0,9% (với hydroxyl); 91,34±0,7% (với DPPH) và 76,73±0,8% (với superoxide). Hoạt tính tiếp tục tăng khi tăng dần nồng độ acid ascorbic và đều đạt trên 99% ở nồng độ 0,6 mg/mL đối với cả ba gốc tự do.



Hình 3. Hoạt tính trung hoà gốc DPPH (A), hydroxyl (B) và superoxide (C) của cao chiết vi nấm *F. foetens* TDF7

Hoạt tính trung hoà gốc hydroxyl của cao chiết chủng *F. foetens* TDF7 tương đồng với kết quả nghiên cứu trên chủng *F. perseae* WDF12. Từ nồng độ 0,4 đến 0,6 mg/mL, hoạt tính trung hoà hydroxyl của cao chiết chủng này dao động trong khoảng 40 đến dưới 60% (Vu *et al.*, 2023). Cao chiết chủng *F. foetens* TDF7 có hoạt tính chống oxy hóa với DPPH thấp hơn so với cao chiết vi nấm *Fusarium napiforme* nội sinh (69,04±0,7%) ở cùng nồng độ 0,6 mg/mL. Khả năng trung hoà các gốc tự do nói trên có liên quan đến thành phần các hợp chất polyphenol và flavonoid trong cao chiết. Theo Zhang và đồng tác giả (2021), một số chất chống oxy hóa như axit 4-hydroxybenzoic, axit pyruvic và axit dehydroshikimic, epicatechin, và anandamide đã được chiết xuất trực tiếp từ cây thông đỏ Bắc. Các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học chủ yếu được hình thành trong suốt vòng đời của vi nấm nội sinh và tương tác của vi nấm với cây chủ. Những kết quả trong nghiên cứu này gợi mở ra mối quan tâm sâu hơn đến các thành phần hoạt chất trong cao chiết thô *F. foetens* TDF7 có đặc tính chống oxy hóa, gây độc tế bào ung thư và một số hoạt tính sinh học khác.

KẾT LUẬN

Dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc và bào tử, kết hợp phân tích trình tự vùng gen ITS, chủng vi nấm TDF7 đã nội sinh trên cây thông đỏ Bắc được định danh là *Fusarium foetens* TDF7 (mã số GenBank PP940016). Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư cho thấy cao chiết *F. foetens* WQF7 có khả năng gây độc hai dòng tế bào A549 (IC_{50} = 28,75±1,94 µg/mL) và MCF7 (IC_{50} = 43,47±3,66 µg/mL. Cao chiết *F. foetens* TDF7 có hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng tương ứng đạt 68,07±0,6 µg GAE/mg và 97,24±1,3 µg QE/mg. Bên cạnh đó, cao chiết thể hiện hoạt tính chống oxy hóa với cả 3 gốc tự do hydroxyl, DPPH và superoxide. Ở nồng độ 0,6 mg/mL, hoạt tính đạt mức cao nhất trên cả 3 gốc tự do tương ứng là 58,04±2,6%; 60,71±1,2% và 65,31±1,9%. Chủng vi nấm *F. foetens* TDF7 nội sinh trên cây thông đỏ Bắc đã cho thấy khả năng tạo chiết xuất thô có chứa các hoạt chất gây độc tế bào ung thư và chống oxy hóa, được đánh giá là có nhiều tiềm năng cho việc tìm kiếm những hoạt chất mới ứng dụng trong công nghệ sinh học y dược.

Lời cảm ơn: *Công trình được thực hiện nhờ kinh phí của đề tài mã số TĐCNSH.05/20-22 cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và hỗ trợ của Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (www.vccm.vast.vn).*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Adhikari P, Pandey A (2024). Phytochemicals, and antioxidants and antibacterial activities of *Taxus wallichiana* Zucc. root associated endophytic fungi. *Biol*, 1–13.

Booth C (1971). *The genus Fusarium*. Kew, UK, Commonwealth Mycological Institute.

Cao X, Xu L, Wang J, Dong M, Xu C, Kai G, Wan W . Jiang J (2022). Endophytic fungus *Pseudodidymocyrtis lobariellae* KL27 promotes taxol biosynthesis and accumulation in *Taxus chinensis*. *BMC Plant Biol*, *22*(1): 1–18.

Chutulo E, Chalannavar R, Kumar P, Chutulo E, Chalannavar R, Kumar P (2020). Chemical compositions, cytotoxicity and antioxidant activity of the endophytic fungus *Fusarium napiforme* isolated from *Psidium guajava*. *Studies in Fungi*, *5*(1): 332–352.

Clarance P, Luvankar B, Sales J, Khusro A, Agastian P, Tack J, Khulaifi M, AL-Shwaiman A, Elgorban M, Syed A, Kim J (2020). Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using endophytic fungi *Fusarium solani* and its *in-vitro* anticancer and biomedical applications. *Saudi J Biol Sci*, *27*(2): 706–712.

Đàm Sao Mai, Võ Trung Âu (2014). Nghiên cứu phân lập và xác lập môi trường nuôi cấy vi nấm cộng sinh phân lập từ rễ cây thông đỏ tại vùng Lạc Dương, tỉnh Lâm Đồng. *Tạp Chí Sinh Học*, *36*(1): 84–89.

Gordon J (2011). Spotlights: dissecting a diterpenoid cyclase. *ACS Chem Biol*, *6*: 124–126.

Ibrahim SRM, Mohamed GA, Al-Haidari RA, Zayed MF, El-Kholy AA, Elkhayat ES, Ross SA (2018). Fusarithioamide B, a new benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium* with potent cytotoxic and antimicrobial activities. *Bioorg Med Chem*, *26*(3): 786–790.

Vu THN, Pham NS, Quach NT, Le PC, Pham QA, Ngo CC, Nguyen VT, Do HA, Tran HQ, Chu HH, Phi QT (2024). *Fusarium foetens* AQF6 isolated from *Amentotaxus yunnanensis* H.L.Li as a prolific source of antioxidant compounds. *Appl Sci*, *14*(5): 2048.

Vu THN, Quach NT, Le PC, Pham QA, Do TT, Chu HH, & Phi QT (2023). Bioprospecting endophytic fungi isolated from *Cephalotaxus mannii* Hook f. as prolific sources of antibacterial, anticancer, and antioxidant agents. *Microbiology*, *92*(2): 284–292.

Vu THN, Quach NT, Pham QA, Le PC, Nguyen VT, Le TTX, Do TT, Do HA, Tran HQ, Chu HH, Phi QT (2023). *Fusarium solani* PQF9 isolated from *Podocarpus pilgeri* growing in Vietnam as a new producer of paclitaxel. *Indian J Microbiol*, *63*(4): 596–603.

Zhang S, Lu X, Zheng T, Guo X, Chen Q, Tang Z (2021). Investigation of bioactivities of *Taxus chinensis*, *Taxus cuspidata*, and *Taxus* × *media* by gas chromatography-mass spectrometry. *Open Life Sci*, *16*(1): 287–296.

IDENTIFICATION AND ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT, CYTOTOXIC ACTIVITIES BY THE ENDOPHYTIC FUNGUS *Fusarium foetens* TDF7 RESIDING ON *Taxus chinensis*

Vu Thi Hanh Nguyen[1,2], Pham Quynh Anh[1], Quach Ngoc Tung[1,2], Pham Ngoc Son[2,3], Nguyen Viet Cuong[4], Phi Quyet Tien[1,2*]

[1]*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

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

[3]*Institute of Criminal sciences, Ministry of Public Security*

[4]*Hanoi University of Science, Vietnam National University*

SUMMARY

Novel therapeutic candidates can be derived from natural bioactive compounds extracted from microorganisms. Endophytic fungi are known to be a new alternative source of metabolites with anticancer, antioxidant and other bioactivities applicable to pharmaceutical medicine. *Taxus chinensis* is a medicinal plant species of the *Taxus* genus, which has been demonstrated for cytotoxic or antioxidant compounds, and the existence of fungal endophytes. This study aims to report the endophytic fungal strain TDF7 residing on *Taxus chinensis* in Ha Giang province that exhibited anticancer and antioxidant activity. Based on morphological characteristics and ITS sequence analysis, the endophyte was identified as *Fusarium foetens* TDF7 (GenBank accession number PP940016). The crude extract from fungal fermentation broth showed cytotoxic activity against A549 (IC_{50} = 28.75±1.94 µg/mL) and MCF7 (IC_{50} = 43.47±3.66 µg/mL) cancer cell lines. In addition, the quantitative assay revealed the total total polyphenol and flavonoid contents of *F. foetens* TDF7 extract were 68.07±0.6 µg GAE/mg and 97.24±1.3 µg QE/mg, respectively. At the concentration of 0.6 mg/mL, the *F. foetens* TDF7 extract exhibited the highest antioxidant activity against hydroxyl (58.04±2.6%), DPPH (60.71±1.2%) and superoxide (65.31±1.9%). The above research data proves that the endophytic fungus *F. foetens* TDF7 residing on *Taxus chinensis* showed promising anticancer and antioxidant activity. This study provides new insights into fungal endophytes with bioactivities from *Taxus chinensis* in Vietnam.

Keywords: Antioxidant, cytotoxicity, *Fusarium foetens*, *Taxus chinensis*, endophytic fungi.

* Author for correspondence: Tel: 2437917973; Email: tienpq@ibt.ac.vn

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN THỦY PHÂN α-CHITIN THÔ SỬ DỤNG CHITINASE TỪ CHỦNG *Vibrio proteolyticus* B02

Vũ Thị Kiều Oanh, Lê Thanh Hà*

Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

TÓM TẮT

Alpha chitin - một dạng chitin tinh thể khó phân giải có nhiều trong phế thải thủy sản như vỏ tôm, cua. Việc chuyển hóa α-chitin về dạng hòa tan như chitooligosaccharide (COS) và N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) bằng phương pháp enzyme là phương pháp thân thiện môi trường vừa giúp giải quyết vấn nạn ô nhiễm môi trường vừa tạo ra nhiều sản phẩm có hoạt tính sinh học ứng dụng trong nhiều lĩnh vực. Trong nghiên cứu này, hệ enzyme chitinase từ vi khuẩn biển *Vibrio proteolyticus* B02 đã được nghiên cứu tối ưu điều kiện thủy phân trực tiếp α-chitin thành GlcNAc và $(GlcNAc)_2$. Các điều kiện thủy phân được khảo sát bao gồm ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ chitin, nồng độ NaCl và thời gian thủy phân cũng như các phương pháp tiền xử lý chitin. 10 g/L của α-chitin thô chứa 86,6% chitin được chuyển đổi thành 5,47 g/L GlcNAc, đạt hiệu suất thủy phân lên đến 68,69% sau 90 giờ (h) thủy phân ở điều kiện tối ưu.

Từ khóa: α-chitin, chitinase, thủy phân, *Vibrio proteolyticus,* vi khuẩn biển.

MỞ ĐẦU

Chitin là một polysaccharides phổ biến trong tự nhiên với lượng lớn thứ hai sau cellulose và lớn nhất trong môi trường biển. Trong các loài thủy sản đặc biệt là trong vỏ tôm, chitin liên kết chặt chẽ với thành phần khoáng và protein, trong đó hàm lượng chitin chiếm khá cao từ 12-42% trọng lượng khô. Ba dạng chitin tinh thể được tìm thấy trong tự nhiên bao gồm α-chitin, β-chitin và γ-chitin trong đó α-chitin (có nhiều trong vỏ tôm, cua) được phân bố rộng rãi nhất và là dạng kết tinh rắn chắc nhất. Beta-chitin ít phổ biến hơn có chủ yếu trong mai mực với cấu trúc tinh thể lỏng lẻo hơn α-chitin (Cardozo *et al.*, 2019). Do đó, có rất nhiều công bố về việc thủy phân hiệu quả trực tiếp β-chitin (Chen *et al.*, 2010; Kuk *et al.*, 2006). Gamma-chitin được tìm thấy với số lượng ít trong tự nhiên có cấu trúc tinh thể dạng trung gian giữa hai dạng α và β-chitin (Cardozo *et al.*, 2019). Do α-chitin được xem là nguồn cơ chất dồi dào, rẻ tiền nên việc chuyển đổi sinh học α-chitin có thể giải quyết các vấn đề về vấn nạn ô nhiễm môi trường do lượng phế thải không lồ này gây ra.

Chuyển đổi sinh học α-chitin mang nhiều thách thức với các nhà công nghệ sinh học do cấu trúc nén chặt và mức độ kết tinh cao của nó làm hạn chế khả năng tiếp cận của chitinase với các liên kết β-glycoside. Do đó, nhiều công trình nghiên cứu đã sử dụng phương pháp tiền xử lý chitin bằng hóa học (Cardozo *et al.*, 2019), nghiền bi và bằng sóng siêu âm (Guadalupe *et al.*, 2013) kết hợp với thủy phân enzyme để nâng cao hiệu quả thủy phân chitin. Hệ enzyme chitinase bao gồm endochitinase, chitobiosidase và N-acety-hexosaminidase (NAHase) đóng vai trò chính trong việc thủy phân chitin thành đơn phân N-acetyl glucosamine GlcNAc (Cardozo *et al.*, 2019). Trong đó, endochitinase được xem là enzyme quan trọng giúp chuyển hóa chitin tinh thể thành dạng hòa tan.

Hệ enzyme chitinase từ vi khuẩn biển *Vibrio proteolyticus* B02 đã được nhóm công bố trước đó là có khả năng sinh tổng hợp đầy đủ hệ enzyme cần thiết cho việc thủy phân chitin thành GlcNAc. Đồng thời trong nghiên cứu này các điều kiện thủy phân chitin keo cũng đã được khảo sát. Tuy nhiên việc chuyển đổi chitin thô thành chitin keo là không mong muốn do sử dụng nhiều acid có thể gây ô nhiễm môi trường (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023). Bên cạnh đó, loài *Vibrio proteolyticus* đã được chứng minh có khả năng sinh tổng hợp endochitinase thủy phân α-chitin thô, tuy nhiên điều kiện thủy phân α-chitin thô của loài này chưa được đề cập (Itoi *et al.*, 2007). Do đó, nghiên cứu ứng dụng hệ enzyme của loài này thủy phân α-chitin thô là hướng đi tiềm năng.

Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên điều kiện thủy phân α-chitin thô bằng hệ enzyme của chủng B02 được khảo sát. Nghiên cứu này được xem là nghiên cứu tiền đề về khả năng thủy phân α-chitin thô, hướng tới những nghiên cứu sâu hơn về hệ enzyme đặc biệt là endochitinase được sinh tổng hợp từ chủng B02. Đồng thời sản phẩm thủy phân cuối cùng cũng sẽ được kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng TLC để đánh giá tiềm năng ứng dụng của chúng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng giống vi sinh vật

Chủng *Vibrio proteolyticus* B02 (Mã số ON003467 trên ngân hàng gen NCBI) được phân lập từ nước biển Cát Hải, tỉnh Hải Phòng và được lưu giữ tại phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách Khoa Hà Nội.

Nguyên liệu và hóa chất sử dụng

Alpha-chitin thô được thu nhận từ vỏ tôm thẻ chứa 86,6% chitin, 1,24% khoáng, 2,1% protein, độ ẩm 10%; β-chitin được thu nhận từ mai mực chứa 88,37% chitin, 0,07% khoáng, 2,15% protein, 9,4% độ ẩm.

Các hóa chất chính sử dụng trong nghiên cứu bao gồm Na_2HPO_4, KH_2PO_4, NH_4Cl, NaCl được mua của hãng Samchun (Hàn Quốc); Chiết xuất nấm men, peptone của Angel (Trung Quốc); GlcNAc và $(GlcNAc)_2$ của sigma (Mỹ); n-propanol và NH_3 của Trung Quốc.

Phương pháp thu nhận chitinase

Chủng *V. proteolyticus* B02 được nhân giống trên môi trường LB 2% NaCl trong 18 giờ và cấp giống theo tỷ lệ 1% sang 50 ml môi trường khoáng tối thiểu M9 (Salas-Ovilla *et al.*, 2019) bổ sung 2% (w/v) α-chitin thô và 0,05% chiết xuất nấm men chứa trong bình tam giác 250 ml. Tiến hành nuôi cấy ở 30°C, lắc 150 v/p trong 96 giờ. Dịch enzyme thô được thu bằng cách ly tâm ở 10°C, 6000 rpm trong 30 phút và được dùng để đo hoạt độ enzyme và thuỷ phân chitin.

Hoạt độ enzyme chitinase, endochitinase, hexosaminidase và chitobiosidase đo được trong nghiên cứu này lần lượt là: 0,088 ± 0,002 (U/mL); 0,183 ± 0,008 (U/mL); 0,559 ± 0,067 (U/mL); 4,973 ± 0,179 (U/mL) (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023).

Phương pháp xác định điều kiện thủy phân chitin thô

Khảo sát pH thủy phân trong dải từ 4 đến 8, nhiệt độ thủy phân từ 30ºC đến 40ºC, nồng độ NaCl thêm vào dịch enzyme từ 1% đến 6% với cơ chất 1% α-chitin thô. Khảo sát nồng độ α-chitin thô trong khoảng từ 1% đến 3%, nhiệt độ 35^{o}C, pH 6.

Các phương pháp tiền xử lý vật lý chitin bao gồm:

Xử lý nhiệt: Chitin được hòa trong đệm phosphate pH 6 và xử lý nhiệt ở 121^{o}C trong 20 phút hoặc 100^{o}C trong 20 phút (Đặng Thị Hường, Lê Thanh Hà, 2019).

Siêu âm gián đoạn 50 Hz ở 40^{o}C 15 phút/lần lặp lại 4 lần: Hòa chitin trong đệm phosphate pH 6 (SA) và hòa trực tiếp chitin trong dịch enzyme (SA+E) (Đặng Thị Hường, Lê Thanh Hà, 2019). Lấy mẫu đo đường khử tạo thành sau 72h.

Công thức tính hiệu suất thủy phân (HSTP): $H = \frac{M_1.0,92}{M_2}.100\%$ (1)

Trong đó: H: hiệu suất thủy phân (%); M_1: lượng GlcNAc tạo thành trong dịch thủy phân (g/L) được xác định bằng phương pháp DNS (g); M_2: khối lượng chitin tính theo % chitin trong nguyên liệu (g); 0,92: hệ số chuyển đổi chitin thành GlcNAc theo lý thuyết.

Phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC) xác định phổ sản phẩm thuỷ phân

Dịch sau thủy phân được chấm trên bản silica gel (Kieselgel 60 F245 Merck), sử dụng n-propanol 99%: amoniac 27% theo tỷ lệ 2:1 (v/v) làm dung môi phân tách. Sản phẩm thủy phân được quan sát trên bản sắc ký sau khi phun bản sắc ký bằng dung dịch 5% H_2SO_4 pha trong EtOH tuyệt đối và sấy ở nhiệt độ 140ºC trong 30 phút.

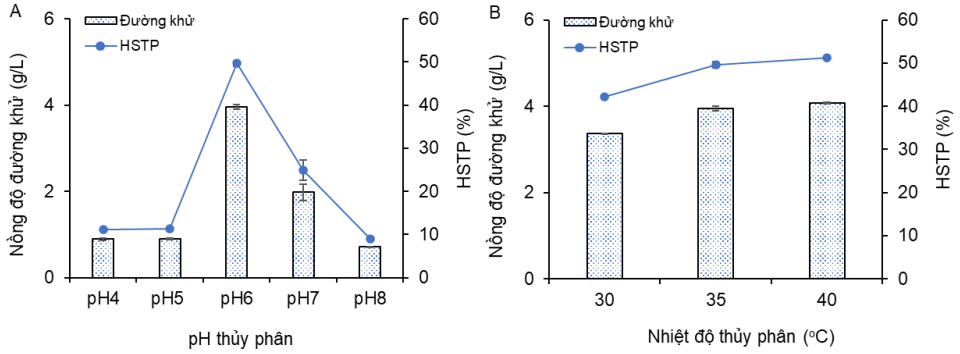
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ đến hiệu suất thủy phân α-chitin thô

Khảo sát ảnh hưởng của pH (4, 5, 6, 7, 8) được thực hiện tại nhiệt độ 35^{o}C, ảnh hưởng của nhiệt độ (30^{o}C, 35^{o}C, 40^{o}C) được thực hiện tại pH 6. Bổ sung 1% α-chitin thô vào dịch enzym và tiến hành thủy phân. Sau 72h dịch thủy phân đem ly tâm loại cặn chitin, thu dịch nổi phía trên và xác định lượng đường khử tạo thành.

Kết quả hình 1A cho thấy, nồng độ đường khử và hiệu suất thủy phân (HSTP) cao nhất đạt được ở pH 6 sau 72h thủy phân tương ứng với 3,96 g/L và 49,65%, cao gấp 3 lần nồng độ đường khử tạo thành ở pH 5 và gấp 1,5 lần ở pH 7. Điều này có thể giải thích do pH 6 là pH tối ưu cho hoạt động của endochitinase sinh tổng hợp bởi chủng B02 và pH từ 5 đến 7 cũng là pH tối ưu cho hoạt độ của các enzyme thành phần khác là chitobiosidase và NAHase (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023) . Tại pH 4,5 và pH 8 quá trình thủy phân gần như không diễn ra, trong khi tại pH 7 HSTP bằng ½ so với pH 6 (Hình 1A). Kết quả này khác với thủy phân chitin keo đã công bố trước đây là tại pH 5 và pH 7 hiệu suất thủy phân tương tự với pH 6 (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023). Điều này có thể được giải thích là do sự khác biệt về cấu trúc tinh thể của cơ chất sử dụng. Theo các công bố trước đây, không phải tất cả chitinase sinh tổng hợp bởi vi sinh vật đều có khả năng thủy phân chitin thô. Kết quả này cho thấy endochitinase từ B02 chịu trách nhiệm chính thủy phân chitin tinh thể về dạng hòa tan do endochitinase hoạt động tối ưu tại pH 6 (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023), trong khi hexosaminidase hoạt động tối ưu tại pH 7 còn chitobiosidase tại pH 5. *V. proteolyticus* đã được công bố có khả năng sinh endochitinase thủy phân α-chitin (Itoi *et al.*, 2007). Chitobiosidase và hexosaminidase đều có thể thủy phân chitin keo nên hiệu quả thủy phân có thể tương đương nhau tại pH 5, pH 6 và pH 7.

Sau 72h thủy phân, lượng đường khử tạo thành và HSTP tăng lên khi nhiệt độ thủy phân tăng từ 30°C lên 40°C (Hình 1B), cao nhất ở 40°C đạt 4,08 g/L. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nhiệt độ tối ưu của endochitinase từ chủng B02 đã khảo sát là trong khoảng từ 35°C đến 45°C (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023). Khi kéo dài thủy phân đến 144h, lượng đường khử tạo thành lại cao nhất ở 35°C do tại 30°C và 40°C lượng đường khử tạo thành tăng chậm hơn so với ở 35°C (dữ liệu không hiển thị). Khi kéo dài thời gian thủy phân, hoạt độ của enzyme kém bền ở nhiệt độ cao (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023). Bên cạnh đó sự ức chế ngược có thể xảy ra, trong đó sự tích lũy của sản phẩm tạo thành làm giảm tốc độ thủy phân (Jamialahma *et al.*, 2011). Kết quả này cũng có sự khác biệt với thủy phân chitin keo khi nhiệt độ thủy phân tối ưu là 30 °C thể hiện sự khác nhau của từng hoạt độ enzym thành phần trong hệ chitinase với các cơ chất chitin khác nhau (Vũ Thị Kiều Oanh *et al.*, 2023). Do đó, 35°C được chọn làm nhiệt độ thủy phân cho quá trình thủy phân α-chitin thô.



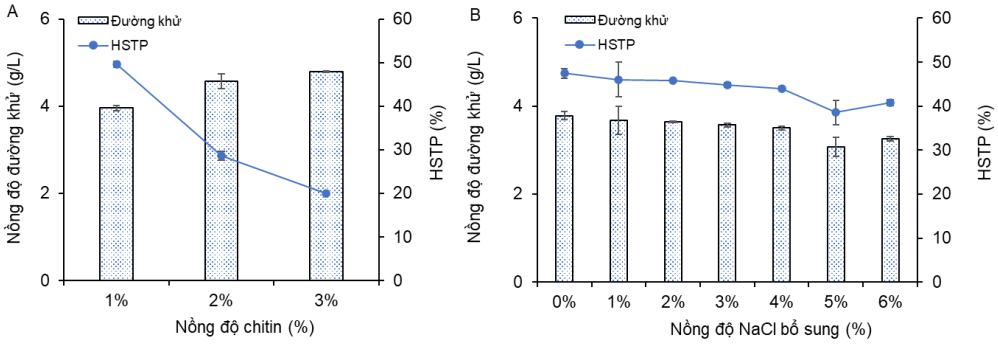
Hình 1. Ảnh hưởng của pH (A) và nhiệt độ (B) đến nồng độ đường khử tạo thành và hiệu suất thủy phân

Kết quả trên phù hợp với các nghiên cứu đã chỉ ra, rằng điều kiện nhiệt độ và pH tối ưu của các chitinase ở các loài vi sinh vật ưa ấm khác nhau thường nằm trong khoảng 35–50°C và pH 5–8 (Cardozo *et al.*, 2019).

Ảnh hưởng của nồng độ chitin đến hiệu suất thủy phân α-chitin thô

Ảnh hưởng của nồng độ chitin thô (1%, 2%, 3%) đến HSTP được thực hiện tại nhiệt độ 35°C, pH 6, sau 72h (Hình 2A).

Khi tăng nồng độ chitin mặc dù lượng đường khử tăng (3,96 g/L ở 1% và 4,8 g/L ở 3%), nhưng HSTP giảm mạnh (Hình 2A). Cụ thể, HSTP đạt được giảm dần lần lượt là 49,65%, 28,67%, 20,06% sau 72h thủy phân tương ứng với 1%, 2% và 3% cơ chất chitin được sử dụng. Sự giảm HSTP xảy ra khi tăng nồng độ cơ chất có thể do sự khuếch tán kém của enzyme vào cơ chất vì nồng độ chitin cao gây ra độ nhớt cao (Jamialahmadi *et al.*, 2011). Do đó, 1% α-chitin thô là nồng độ chitin phù hợp được lựa chọn cho quá trình thủy phân.



Hình 2. Ảnh hưởng nồng độ chitin thô (A) và nồng độ NaCl bổ sung (B) đến nồng độ đường khử tạo thành và hiệu suất thủy phân

Ảnh hưởng của nồng độ muối bổ sung vào dịch enzyme đến hiệu suất thủy phân α-chitin thô

Do *V. proteolyticus* là vi khuẩn biển sống trong điều kiện nồng độ muối từ 3,1-3,8%, NaCl có thể ảnh hưởng đến hoạt tính chitinase. Do vậy NaCl được thêm vào dịch enzyme trong quá trình thủy phân ở các nồng độ khác nhau từ 1% đến 6%. Kết quả mức độ ảnh hưởng của nồng độ muối bổ sung được đánh giá bằng sự thay đổi nồng độ đường khử và hiệu suất thủy phân so với kết quả không bổ sung NaCl thể hiện ở Hình 2B.

Kết quả Hình 2B thể hiện rằng, mặc dù chitinase sinh tổng hợp từ vi khuẩn biển *V. proteolyticus* B02 vẫn hoạt động tốt trong điều kiện có sự hiện diện nồng độ NaCl cao là 6%, tuy nhiên nồng độ đường khử và hiệu suất thủy

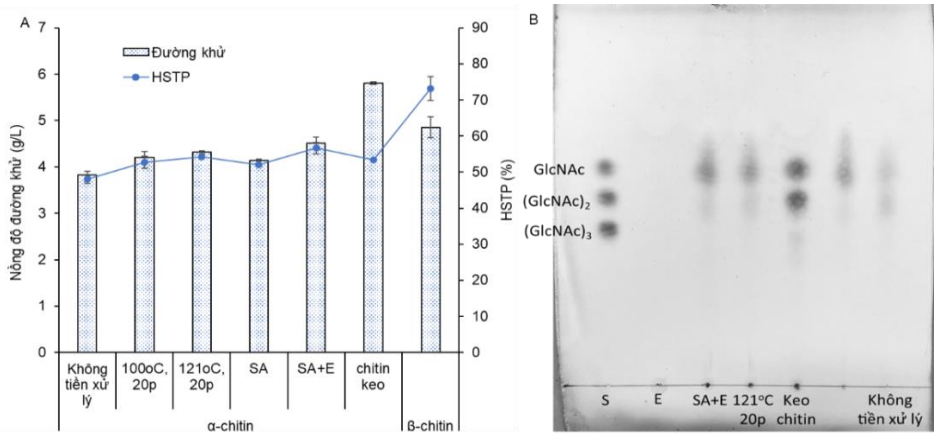
phân vẫn có xu hướng giảm khi nồng độ NaCl tăng (từ 47,45 % ở 0% NaCl giảm xuống còn 38,53% ở 5%). Tại 0% NaCl được bổ sung, chúng tôi quan sát thấy hiện tượng tạp nhiễm làm giảm nồng độ đường khử xảy ra sau 120h thủy phân (dữ liệu không hiển thị) và điều này không được phát hiện ở các mẫu bổ sung 3%, 4%, 5% và 6% NaCl. Việc bổ sung NaCl trong quá trình thủy phân có thể ngăn chặn hoặc kìm hãm sự phát triển của các vi sinh vật, tạo điều kiện vô trùng cho quá trình thủy phân kéo dài (Rivera-Solís *et al.*, 2023). Do đó 3% NaCl được bổ sung vào dịch thủy phân để giảm sự nhiễm tạp xảy ra trong quá trình thủy phân.

Ảnh hưởng của các phương pháp tiền xử lý đến hiệu suất thủy phân

Đặc tính của cơ chất sử dụng trong quá trình thủy phân là yếu tố quan trọng quyết định đến hiệu suất thủy phân cũng như sản phẩm tạo thành. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các loại cơ chất chitin khác nhau đến hiệu quả thủy phân. Kết quả thể hiện ở Hình 3.

Kết quả hình 3 cho thấy mặc dù các điều kiện thủy phân đã được tối ưu cho α-chitin thô, tuy nhiên lượng đường khử thu được trên α-chitin thô vẫn nhỏ hơn trên β-chitin thô và chitin keo cụ thể là 3,8 g/L, 4,8 g/L và 5,8 g/L tương ứng. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với cấu trúc tinh thể rắn chắc hơn của α-chitin so với β-chitin và phù hợp với các kết quả đã công bố (Muzzarelli, 1977). Chitin keo, một dạng tiền xử lý hóa học của α-chitin sử dụng nồng độ acid cao làm giảm số lượng liên kết hydro hoặc tương tác kỵ nước của cấu trúc tinh thể α-chitin, tạo điều kiện thuận lợi cho khả năng tiếp cận của chitinase với các liên kết glycoside (Cardozo *et al.*, 2019). Tuy nhiên quá trình chuyển đổi α-chitin về chitin keo tốn nhiều thời gian, công sức và sử dụng lượng lớn acid HCl nồng độ cao (Salas-Ovilla *et al.*, 2019), điều này có thể ảnh hưởng nghiêm trọng đến môi trường. Do đó các phương pháp tiền xử lý vật lý bằng siêu âm hay nhiệt được ưa thích hơn.

Kết quả thủy phân các loại α-chitin được tiền xử lý vật lý cho thấy chỉ siêu âm chitin hay xử lý nhiệt 100^{o}C trong 20p không cải thiện đáng kể khả năng thủy phân chitin (HSTP tăng tương ứng từ 48% lên 51,98% và 52,68%). Phương pháp xử lý nhiệt ở nhiệt độ cao hơn 121^{o}C trong 20p hay siêu âm cùng enzyme cho HSTP tăng lên rõ rệt hơn (HSTP đạt 54,18% và 56,64% tương ứng). Guadalupe và đồng tác giả (2013) cũng nhận thấy hiệu quả thủy phân cao hơn khi siêu âm chitin trong 20p so với nguyên liệu không được xử lý trước khi thực hiện thủy phân bằng chitinase từ *Lecanicillium lecanii* (Guadalupe *et al.*, 2013).



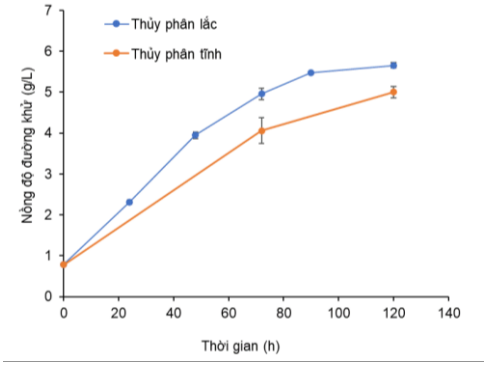
Hình 3. Ảnh hưởng của phương pháp tiền xử lý, loại chitin đến HSTP (A), kết quả xác định phổ sản phẩm thủy phân bằng TLC (B)

SA: cho enzyme vào sau siêu âm mẫu chitin 15 phút x 4 lần; SA + E: cho chitin vào dịch enzyme rồi siêu âm 15 phút x 4 lần

Sóng siêu âm tạo nhiều lỗ hổng, phá vỡ một phần liên kết hydro bên trong nguyên liệu, đồng thời làm chỉ số kết tinh của chitin giảm (Wang *et al.*, 2024). Các lỗ hổng tạo ra sẽ tạo điều kiện cho enzyme dễ xâm nhập sâu để tiếp xúc với cơ chất. Đặc biệt khi siêu âm có mặt cả enzyme, trong điều kiện cường độ thấp và tần số phù hợp, siêu âm tạo ra hiệu ứng tạo lỗ rỗng và dao động cơ học làm thay đổi cấu hình của enzyme để tăng tốc độ tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất. Do đó, hoạt động sinh học của enzyme được thúc đẩy, đẩy quá trình thủy phân nhanh hơn so với phương pháp chỉ siêu âm nguyên liệu mà không có mặt enzyme (Huang *et al.*, 2017). Kết quả này cũng được thể hiện rõ ở kết quả xác định phổ sản phẩm thủy phân hình 3B, khi thủy phân chitin không tiền xử lý tạo ra lượng đường đơn GlcNAc và đường đôi $(GlcNAc)_2$ là tương đương nhau trong khi chitin được tiền xử lý trước với nhiệt và siêu âm kết hợp enzyme tạo ra được nhiều đường đơn hơn (thể hiện ở vạch đậm hơn). Ảnh hưởng tích cực của siêu âm cùng enzyme đến hiệu quả thủy phân chitin cũng đã được quan sát trong thí nghiệm của Đặng Thị Hường và Lê Thanh Hà (2019).

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian thủy phân và khuấy trộn đến nồng độ đường khử tạo thành

Thực hiện thí nghiệm tại các điều kiện như sau: pH6, nhiệt độ 35^{o}C, 3% NaCl, 1% cơ chất α-chitin. Lượng đường khử tạo thành được xác định sau mỗi 24h.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và việc khuấy trộn đến nồng độ đường khử

Kết quả cho thấy thủy phân kết hợp lắc cho hiệu quả thủy phân tăng nhanh hơn so với thủy phân tĩnh (Hình 4). Cụ thể, sau 72h thủy phân tại điều kiện lắc, nồng độ đường khử tạo thành đạt 4,96 g/L cao hơn ở điều kiện thủy phân tĩnh 1,35 lần. So với nghiên cứu của Rath năm 2002 về enzyme thô từ *Burkholderia cepacia* TU09 và *B. licheniformis* SK-1, HSTP 1% α-chitin thô đạt lần lượt là 54% và 40% sau 72h thì kết quả của chúng tôi là khả quan hơn (đạt 62,27% sau 72h) (Pichyangkura *et al*., 2002). Tuy nhiên, nồng độ đường khử bắt đầu tăng chậm từ sau 90h thủy phân đạt 5,47 g/L tương ứng với HSTP 68,69%. Sự tăng chậm HSTP và nồng độ đường khử từ 90h đến 120h có thể do sự ức chế ngược của sản phẩm cuối kèm theo sự suy giảm hoạt độ enzyme (Jamialahma *et al*., 2011). Như vậy sau quá trình tối ưu thủy phân, lượng đường khử thu được đạt 5,47 g/L chỉ thấp hơn không đáng kể so với thủy phân chitin keo 5,8 g/L.

KẾT LUẬN

Enzyme thô được sinh tổng hợp từ chủng *Vibrio proteolyticus* B02 có khả năng thủy phân α-chitin thô với sản phẩm tạo thành chủ yếu là đường đơn N-acetyl-d-glucosamine. Điều kiện thủy phân tối ưu thu được tại pH6, 35^{o}C, 1% cơ chất được trộn cùng với enzyme và thực hiện siêu âm gián đoạn 15 phút 4 lần ở 40^{o}C, 3% NaCl được bổ sung, lắc 150rpm. Hiệu suất thủy phân đạt 68,69% sau 90h, tương ứng với lượng đường khử thu được là 5,47 g/L. Với các kết quả khảo sát thu được, nhận thấy hệ enzyme sinh tổng hợp từ chủng B02 có nhiều tiềm năng ứng dụng trong thủy phân α-chitin thô, tuy nhiên cần được nghiên cứu thêm để có thể xử lý được lượng chitin lớn hơn chuyển hóa thành lượng đường đơn cao hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cardozo FA, Facchinatto WM, Colnago LA, Campana-Filho SP, Pessoa A (2019). Bioproduction of N-acetyl-glucosamine from colloidal α-chitin using an enzyme cocktail produced by *Aeromonas caviae* CHZ306. *World J Microbiol Biotechnol,* 35(8): 114.

Chen JK, Shen CR, Liu CL (2010). N-Acetylglucosamine: *Production and Applications*. *8*(9): 2493-2516.

Đặng Thi Hường, , Lê Thanh Hà (2019). Tiền xử lý nâng cao khả năng thủy phân chitin bằng chitinsae từ *Penicillium oxalicum* 20B. *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*.

Guadalupe VL, Humberto GM, Gimeno M, Lospez-Luna A, Basrzana E, Shirai K (2013). Ultrasonication and steam-explosion as chitin pretreatments for chitin oligosaccharide production by chitinases of *Lecanicillium lecanii*. *Bioresour Technol,* 146*:* 794–798.

Huang G, Chen S, Dai C, Sun L, Sun W, Tang Y, Xiong F, He R, Ma H (2017). Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrason Sonochem,* 37: 144-149.

Itoi S, Kanomata Y, Koyama Y, Kadokura K, Uchida S, Nishio T, Oku T, Sugita H (2007). Identification of a novel endochitinase from a marine bacterium Vibrio proteolyticus strain No. 442. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom,* 1774(9): 1099-1107.

Jamialahma K, Behravan J, Najafi M, Yazdi M, Shahverdi AR, Faramarzi M (2011). Enzymatic Production of N-Acetyl-D-Glucosamine from Chitin Using Crude Enzyme Preparation of Aeromonas sp. PTCC1691. *Biotechnology(Faisalabad),* 10: 292-297.

Kuk JH, Jung WJ, Jo GH, Kim KY, Park RD (2006). Production of N,N′-diacetylchitobiose from chitin using temperature-sensitive chitinolytic enzyme preparations of Aeromonas sp. GJ-18. *World J Microbiol Biotechnol,* 22(2): 135-139.

Muzzarelli RAA (1977). Chitin. *Pergamon Press, Oxford, Great Britain*, 1-309.

Pichyangkura R, Kudan S, Kuttiyawong K, Sukwattanasinitt M, Aiba S (2002). Quantitative production of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose from crystalline chitin by bacterial chitinase. *Carbohydr Res,* 337(6): 557-559.

Rivera-Solís RA, Granados-Baeza MJ, Solís-Pereira SE, Lizama-Uc G, Magaña-Ortiz D, Sánchez-González MN, Rojas-Herrera RA, Rivera-Muñoz G (2023). Establishment of the colloidal chitin enzymatic hydrolysis conditions to obtain N-acetyl glucosamine. *Front Sustain Food Syst,* 7.

Salas-Ovilla R, Gálvez-López D, Vázquez-Ovando A, Salvador-Figueroa M, Rosas-Quijano R (2019). Isolation and identification of marine strains of Stenotrophomona maltophilia with high chitinolytic activity. *PeerJ,* 7: e6102.

Vũ Thị Kiều Oanh, Trần Thị Vân Anh, Phạm Thu Hà, Vy Thị Thanh Hlền, Lê Thanh Hà (2023). Đặc tính chitinaza từ vi khuẩn *Vibrio proteolyticus* BO2 và tiềm năng ứng dụng trong thủy phân chitin. *Nông nghiệp và phát triển nông thôn,* 1: 371-379.

Wang Y, Feng Y, Wang X, Ji C, Xiao Z, Luo Y (2024). Ultrasonication-based preparation of raw chitin nanofiber and evaluation of its reinforcement effect on chitosan film for functionalization with curcumin. *Food Hydrocoll,* 15: 110193.

INVESTIGATION HYDROLYSIS CONDITIONS FOR CRUDE α-CHITIN USING THE CHITINASE FROM *Vibrio proteolyticus* B02 STRAIN

Vu Thi Kieu Oanh, Le Thanh Ha*

School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology

SUMMARY

Alpha chitin is a hard-to-decompose crystalline form of chitin with high concentrations in shrimp and crab shell wastes. Enzymatic conversion of α-chitin to soluble forms such as chitooligosaccharide (COS) and N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) reduces the environmental pollution problem and produces high bioactive compounds for various applications. In the presentudy, chitinases deliveried form *Vibrio proteolyticus* B02 were optimized for the reaction conditions on α-chitin hydrolysis into GlcNAc and $(GlcNAc)_2$. The hydrolysis conditions included temperature, pH, chitin concentration, NaCl concentration, hydrolysis time and pre-tremeant conditions. 10 g/L of crude α-chitin containing 86.6% chitin was converted into 5.47 g/L GlcNAc and the hydrolysis efficiency reached up to 68.69% after 90 h of hydrolysis under optimal conditions.

Keyword: α-chitin, chitinase, hydrolysis*, Vibrio proteolyticus,* marine bacteria.

* Author for correspondence: Tel: 0904831516; Email: ha.lethanh@hust.edu.vn

SULFATION OF NARINGENIN BY SULFOTRANSFERASES FROM *Arabidopsis thaliana*: AN *INSILICO* ANALYSIS

Nguyen Thi Quynh Trang[1], Pham Ngoc Huyen[1], Luan Luong Chu[2*]

[1]*Faculty of Biotechnology, Chemistry and Environmental Engineering, Phenikaa University, Hanoi 12116, Vietnam*

[2]*National Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi (VNU), 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi 10000, Vietnam*

SUMMARY

Sulfotransferase (ST) is a family of enzymes responsible for transferring a sulfate group from a donor molecule, typically 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS), to an acceptor molecule. This process regulates the activity of natural compounds and xenobiotics in the body. Meanwhile, naringenin is a flavonoid widely found in foods such as fruits and vegetables, with various medical applications due to its antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory properties. This study aims to use molecular docking techniques to investigate the interaction between ST and naringenin. In this study, we will employ molecular docking methods to analyze how sulfotransferase and naringenin interact with each other. Following molecular docking using AutoDock Tools, we made predictions to assess the binding potential between ST from *Arabidopsis thaliana* (PDB ID: 1Q44) and naringenin using Discover Studio 3.5. The designed compound showed favorable binding characteristics with naringenin, with key interacting amino acids including Leu 44, Phe 115, Glu 117, Ile 141, Ser 142, Ile 201, Gly 202, and His 208. The binding energy was determined to be -7.99 kCal/mol^{-1}. This binding energy indicates a strong and stable interaction, which is essential for the effective regulation of enzyme activity by the ligand. Therefore, the findings of this study are significant for understanding naringenin as a ligand of sulfotransferase. The strong binding affinity and specific interactions suggest that naringenin could be a potent binder to ST. These results pave the way for further experimental validation and may inform the design of new drugs targeting sulfotransferase. Additionally, this study lays a solid foundation for future efforts in drug discovery and protein engineering, particularly in developing new therapeutic agents exploiting the beneficial properties of naringenin.

Keyword: Arabidopsis thaliana, in silico, naringenin, sulfotransferase.

INTRODUCTION

Sulfation (also known as sulfurylation), is a fundamental biochemical process that mediates essential post-translational modifications of various molecules, including proteins, carbohydrates, and lipids (Gallo *et al.*, 2018). Sulfotransferases (ST) play a pivotal role in regulating biological processes by catalyzing the transfer of sulfate groups from sulfate donors to acceptor molecules, a process referred to as sulfation. These enzymes are key players in catalyzing the sulfation of numerous hormones, neurotransmitters, drugs, and xenobiotic compounds, thereby modulating the activities of diverse endogenous and exogenous substances. Through this mechanism, STs not only regulate biological functions but also participate in adjusting the structure and function of proteins and lipids in the body. In plants, particularly in *Arabidopsis thaliana* - a widely studied model organism in plant biology - sulfotransferases are essential for regulating physiological processes related to growth, defense, and environmental adaptation. *A. thaliana*, a widely studied model organism in plant biology, harbors a plethora of ST enzymes involved in sulfating secondary metabolites within its metabolic pathways. Recent studies have highlighted that these enzymes exhibit high specificity towards sulfate donor molecules, interacting strongly with individual ligands.

Naringenin (4',5,7-trihydroxyflavone), is a natural flavonoid predominantly found in citrus fruits including grapes, oranges, lemons, and grapefruits, with particularly high concentrations in grapefruit peels (Den, Tsiani, 2019). The molecular structure of naringenin includes three hydroxyl groups attached to the flavone backbone, which contribute to its potent biological properties. This structure allows naringenin to interact with various biological targets, affecting numerous physiological processes. Studies have demonstrated that naringenin serves as a substrate for several sulfotransferase enzymes. Through the process of sulfation, naringenin is converted into naringenin-sulfate derivatives, which exhibit distinct biological properties and varying levels of bioavailability. For instance, sulfation can modify naringenin's solubility, stability, and cellular uptake, thereby affecting its biological activity and therapeutic potential. Understanding the molecular structure and molecular interactions underlying the sulfation process of naringenin in plants is of considerable interest due to its significance in plant metabolism, secondary metabolite biosynthesis, and potential applications in agriculture and pharmacology. Despite its low bioavailability, naringenin exhibits numerous promising biological properties with medical significance, including

anti-inflammatory and antioxidant activities (Arafah *et al*., 2020). Additionally, this compound is associated with various beneficial effects.

In this study, we aim to elucidate the molecular mechanisms governing the molecular interactions between *A. thaliana* ST and naringenin using homology modeling and molecular docking techniques. By employing these methods, we seek to gain a deeper understanding of the three-dimensional structure of *A. thaliana* ST and its functions related to the binding and catalysis of naringenin sulfation. Furthermore, molecular docking simulations will allow us to predict the binding modes and binding energies between ST and naringenin, providing valuable insights into the substrate recognition and catalytic mechanism of ST enzymes in plants. The findings from this research are expected to contribute to a comprehensive understanding of the molecular basis of sulfation reactions mediated by ST intermediates and shed light on the structural characteristics and potential binding modes of ST enzymes in plant metabolism. Moreover, elucidating the interaction between *A. thaliana* ST and naringenin may facilitate the design of novel studies in plant secondary metabolite biosynthesis and enhance the production of bioactive compounds with potential agricultural and pharmaceutical applications in daily life.

MATERIALS AND METHODS

Preparation and Refinement of Protein Structure

The sulfotransferase (ST) enzyme from *A. thaliana* was extracted from the Protein Data Bank (PDB) **(Figure 1)** and meticulously prepared for molecular docking studies. Initial processing involved the removal of all ligands using Discovery Studio 3.5 to obtain a pristine, uncomplexed protein structure suitable for detailed analysis. Subsequently, the structure underwent refinement using AutoDockTools 1.5.7 to optimize its suitability for docking simulations.

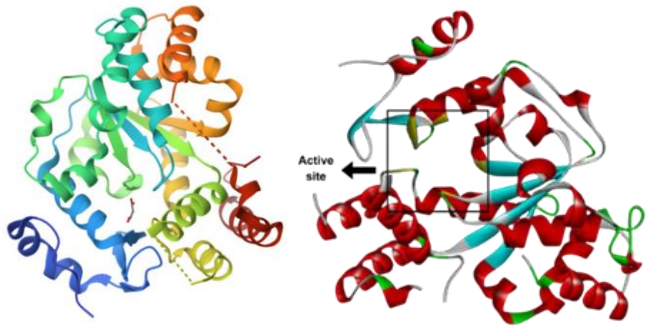


Figure 1. Sulfotransferase enzyme from *A. thaliana*. (A) Crystal structure, (B) Active site region

The refinement protocol included essential steps: computation of Gasteiger charges to accurately depict the protein's electrostatic potential, addition of polar hydrogens to facilitate precise modeling of hydrogen bonding interactions crucial for binding affinity, and merging of nonpolar hydrogens to streamline the structure while maintaining structural integrity and computational efficiency. These methodical refinements ensured the protein structure was well-prepared for subsequent molecular docking studies. The enhanced accuracy in electrostatic potential calculations and representation of hydrogen bonding sites provides a robust foundation for exploring the interactions of sulfotransferase with potential ligands. This rigorous preparation was pivotal for obtaining reliable and reproducible results in docking simulations, contributing to a deeper understanding of the enzyme's binding mechanisms and functional implications. The refined sulfotransferase structure now stands ready for comprehensive investigations into its interactions with specific ligands, such as naringenin, offering insights into potential applications in enzymology and drug design.

Prediction of Active Sites in the Modeled Protein

Accurately predicting active sites in the modeled protein structure is pivotal for comprehending the intricate interactions between Sulfotransferase from *A.thaliana* and its substrate, naringenin. Several sophisticated methodologies are employed for active site prediction, encompassing advanced cavity search algorithms that scan the protein surface, sequence-based analyses aimed at identifying crucial residues, and direct examination of the three-dimensional (3D) structure to locate potential binding sites.

Among these methodologies, PrankWeb emerges as a powerful tool specifically designed for predicting active sites in modeled protein structures. This tool integrates state – of – the – art prediction algorithms with the protein's 3D structure, offering a user-friendly interface that visually highlights potential binding sites. By presenting predictions alongside the protein's sequence and a comprehensive catalog of binding pockets, PrankWeb facilitates immediate and insightful analysis.

The utilization of PrankWeb significantly enhances the accuracy and efficiency of molecular docking studies. It provides researchers with a robust framework to explore and validate potential binding sites, thereby deepening

our understanding of the specific interactions between the sulfotransferase enzyme and naringenin. This comprehensive approach not only aids in unraveling the enzyme's functional properties but also holds promise for guiding rational drug design and enzyme engineering strategies.

Ligand Preparation and Optimization

The preparation and optimization of the ligand, naringenin, initiates with the retrieval of its chemical structure from PubChem, a widely utilized repository for molecular data. This step ensures the accurate representation of naringenin's molecular geometry and chemical properties essential for subsequent computational analyses. Following data acquisition, the ligand undergoes rigorous optimization procedures using AutoDock Tools 1.5.7. The "Prepare Ligand" function within this software suite is employed to minimize energy and adjust bond lengths, thereby enhancing the ligand's conformational stability and geometric accuracy. This optimization step is critical as it ensures that the ligand adopts a suitable conformation for effective binding interactions with the sulfotransferase enzyme. Further refinement and screening of the ligand's structure are facilitated through custom Python 3.8.2 scripts. These scripts provide advanced computational capabilities for optimizing molecular geometry and evaluating physicochemical properties pertinent to ligand-receptor interactions. Such evaluations are essential for predicting and validating potential binding modes and affinity between naringenin and the enzyme. Lastly, the optimized ligand structure is converted into the (.pdbqt) format using AutoDock. This file format is specifically designed for molecular docking simulations, ensuring compatibility with docking software and precise representation of ligand-receptor interactions during computational studies (Huyen *et al., 2023*).

Protein-ligand Interaction Study

The interaction study between the sulfotransferase enzyme from *A. thaliana* and naringenin began by importing the protein molecule into AutoDock 4.2.6. The protein was formatted in PDBQT to ensure compatibility with the docking software. To define docking parameters, PrankWeb was employed to predict active sites, providing crucial information for setting up the GridBox. Defining the GridBox accurately is essential as it guides the ligand towards the protein's binding site during docking simulations. The center coordinates and dimensions of the GridBox were carefully selected to cover the entire three-dimensional structure of the sulfotransferase enzyme. A grid spacing of 0.375 Å was chosen to achieve high resolution in mapping potential binding interactions. The GridBox was centered at coordinates x = 54.534, y = 24.220, and z = 7.374, ensuring comprehensive coverage of the binding site. The dimensions of the grid were set to 70 x 70 x 74 points along the x, y, and z axes, respectively, to explore potential binding interactions thoroughly. The grid parameters were saved in a grid parameter file (GPF).

AutoGrid, a preparatory step in the AutoDock suite, was then used to calculate interaction energies between the protein and probe atoms on the defined 3D grid. Running AutoGrid with the GPF file generated a grid log file (GLG), confirming the successful setup of the grid parameters. Following this, a docking parameter file (DPF) was prepared for the actual docking simulations. This file contained detailed information about the flexible ligand, the grid maps generated by AutoGrid, and docking parameters such as the number of genetic algorithm runs and the maximum number of energy evaluations. AutoDock was executed using the DPF file, converting the docking instructions into a docking log file (DLG). The DLG file provided comprehensive details of the docking simulation, including various binding poses, binding energies, and specific interactions of the ligand at the protein's active site.

The results from AutoDock were meticulously analyzed to identify the most favorable binding interactions between sulfotransferase and naringenin. The docked complexes were ranked based on their binding energies, reflecting the stability and affinity of the ligand-protein complexes. The complex with the lowest binding energy, indicating the most stable and favorable interaction, was selected for further study. This optimal complex was saved in PDBQT format for detailed examination and subsequent analyses.

Docking Results Examination

The docking results were examined using Discovery Studio 3.5 by Biovia, which offers advanced capabilities for analyzing and visualizing protein-ligand interactions in both two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) formats. This comprehensive software provides detailed visualization tools that allow researchers to observe the spatial arrangement and specific interactions between the protein and the ligand.

To gain a thorough understanding of the binding interactions, surface annotation features were utilized to identify and highlight binding pockets and interaction hotspots on the protein surface. These features provided a detailed map of the ligand binding mode, illustrating how naringenin fits within the active site of the sulfotransferase enzyme.

The 2D interaction diagrams generated by Discovery Studio showcased hydrogen bonds, hydrophobic contacts, and other non-covalent interactions between the protein and naringenin. These diagrams are crucial for identifying key residues involved in binding and for understanding the nature of the interactions that stabilize the protein-ligand complex. In the 3D visualizations, the software provided an immersive view of the protein-ligand complex, allowing for a detailed examination of the ligand's orientation and the spatial arrangement of amino acid residues in the binding site. This three-dimensional perspective is essential for appreciating the depth and contour

of the binding pocket and for identifying any conformational changes in the protein upon ligand binding (Chu *et al.*, 2022).

Additionally, Discovery Studio's surface annotation tools highlighted hydrophobic and hydrophilic regions, charge distribution, and the overall topology of the binding site. These annotations helped in pinpointing critical areas of interaction and provided insights into the molecular mechanisms underlying the binding specificity and affinity of naringenin to the sulfotransferase enzyme.

RESULTS AND DISCUSSION

Active site identification

Using PrankWeb, we predicted the active sites within the sulfotransferase protein from *A. thaliana*. This analysis was based on the protein's three-dimensional (3D) structure, focusing on identifying pockets or cavities that are likely to serve as active sites based on their geometric properties, size, and the presence of key residues. The analysis identified several residues contributing to potential active sites, highlighting three main residues: Thr 47, Lys 75, and His 140. Identifying Thr 47 displayed a high probability and significant score, positioning it as a crucial active site component. Lys 75, with its favorable z-score and probability, was identified as another key residue, while His 140 contributed significantly to the structural integrity and interaction dynamics of the binding site. Focusing on these specific residues is essential for comparative binding analysis, enabling researchers to observe how naringenin interacts with the sulfotransferase protein and compare these interactions with those of other ligands. This approach aids in understanding the binding dynamics and structural relationships between the protein and various ligands, which is invaluable for drug design and development. Identifying Thr 47, Lys 75, and His 140 as primary active sites provides a foundation for further investigations into the binding mechanisms of naringenin, offering insights that are crucial for advancing enzyme-ligand interaction studies and informing future therapeutic strategies.

Molecular Docking

A comprehensive molecular docking analysis was conducted to elucidate the interaction between naringenin and the sulfotransferase (ST) enzyme from *A. thaliana*. The primary objective was to understand the binding affinity and interaction dynamics of naringenin with ST, providing valuable insights for future research and potential therapeutic applications. **Table 1** provides detailed information on the interaction and binding energy of the ligand naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavonone) with the enzyme sulfotransferase. The docking results revealed that naringenin has a binding energy of -7.99 kcal/mol, indicating a stable and favorable interaction. This binding energy reflects the effective interaction influenced by several types of non-covalent interactions, including hydrogen bonds, van der Waals forces, and Pi-Pi stacking interactions.. Such interactions are crucial as they determine the likelihood of naringenin effectively binding and undergoing catalysis within the enzyme's active site.

Table 1. Interaction and binding energies of ligand with ST

Pubchem ID	Compound Name	Binding Energy Kcal/mol	Interaction	Amino Acid Residues
439246	Naringenin (4′,5,7-Trihydroxyflavonone)	-7,99	2-H Bonds	Thr 47, Lys 75, His 140
			van der Waal	Leu 44; Phe 115, Glu 117, Ile 141, Ser142, Ile 201, Gly 202, His 208
			Pi-Pi and Pi - Alkyl	Ile 50, Pro 74
			Pi-Cation	His 46

The catalytic potential of the sulfotransferase enzyme is highly dependent on the active site residues that facilitate the transfer of the sulfo group. In this study, key residues involved in the catalysis include Thr 47, Lys 75, and His 140. Thr 47 and His 140 are particularly significant as they are directly involved in the catalysis process. Thr 47 plays a critical role in substrate positioning and stabilization, ensuring that naringenin is correctly oriented for efficient catalysis. His 140 is essential for the activation of the sulfo group donor, acting as a proton donor or acceptor during the transfer process, which is a crucial step in the catalytic mechanism. Additionally, Lys 75 is important for maintaining the structural integrity of the active site, which indirectly supports the catalytic activity by ensuring the correct spatial arrangement of the critical residues.

Van der Waals interactions involving residues like Leu 44, Phe 115, and Glu 117 create a supportive hydrophobic environment that further stabilizes the enzyme-substrate complex, further enhancing the efficiency of the catalytic process.These interactions ensure that naringenin remains in a conformation conducive to effective catalysis. Naringenin forms significant hydrogen bonds with Thr 47 and Lys 75, which are essential for maintaining the ligand's position within the active site. Furthermore, Pi-Pi stacking and Pi-Alkyl interactions contribute to the stability and orientation of naringenin, enhancing its binding affinity.

The low docking energy correlates with the presence of strong hydrogen bonds and Pi interactions, which stabilize the enzyme-ligand complex, suggesting that the active site of ST is highly complementary to the molecular structure of naringenin. This complementarity leads to efficient binding and potential catalytic activity. The compatibility between naringenin's size and the ST active site is further evidenced by the favorable docking energy, indicating that the ligand forms optimal interactions without steric hindrance. Visualizations from Discovery Studio 3.5 highlight these interactions in both 2D and 3D diagrams, providing a comprehensive depiction of the spatial arrangement and specific interactions between the protein and ligand. This molecular docking study confirms that naringenin exhibits strong and stable binding to the sulfotransferase enzyme, primarily through hydrogen bonds, van der Waals forces, and Pi interactions, which are crucial for the enzyme's catalytic efficiency.

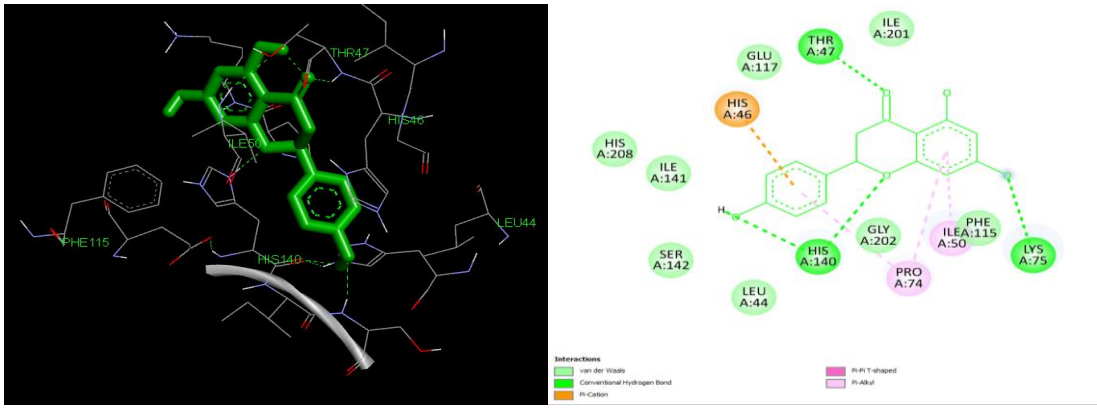


Figure 2. Illustration of naringenin interactions at the active site

(A) 3D: The three-dimensional representation highlights the spatial configuration of naringenin within the active site, showing how it interacts with various residues through hydrogen bonds, van der Waals forces, and Pi interactions, (B) 2D: The two-dimensional diagram provides a clear view of the interaction space, emphasizing the role of key residues in maintaining the ligand's position and facilitating catalysis.

Figure 2 illustrates the interactions between naringenin and the sulfotransferase enzyme at the active site in detail, including three-dimensional (A) and two-dimensional (B) views. The docking analysis results showed that naringenin interacts strongly and stably with the enzyme, with a relatively low binding energy indicating a high interaction between the ligand and the enzyme. The combination of strong hydrogen bonds, hydrophobic interactions, and Pi-cation interactions, particularly at His 46, suggests a robust and stable enzyme-ligand complex. These interactions not only stabilize the complex but also maintain the appropriate conformation of naringenin for effective catalysis. The detailed molecular docking study confirms that naringenin is a strong and stable ligand for the ST enzyme, potentially making it a good substrate for sulfotransferase processes. This discovery could pave the way for new research avenues, particularly in the biological and pharmacological applications of naringenin.

CONCLUSIONS

In this study, molecular docking analysis was employed to investigate the interaction between naringenin and sulfotransferase (ST) originating from *A. thaliana*. The results elucidated the binding capability and interaction characteristics of naringenin with ST, offering valuable insights for further biochemical and pharmacological research. The docking results revealed highly favorable and stable interactions between the ligand and enzyme, assessed through low binding energies and critical interactions, including hydrogen bonds, van der Waals forces, and Pi-cation interactions. Notably, these interactions involved key residues such as Thr 47, Lys 75, and His 140, suggesting that naringenin could serve as an effective ligand for sulfotransferase, potentially influencing its catalytic activity.

These findings underscore the promising potential of naringenin as a biologically active compound in modulating the function of sulfotransferase from *A. thaliana*. The insights gained could be leveraged to design new inhibitors or activators targeting sulfotransferase enzymes, potentially leading to novel therapeutic strategies. Furthermore, these discoveries support the theoretical framework of our model and encourage further research to explore the broader potential functions of ST in drug discovery and protein engineering. Overall, this study highlights the importance of naringenin as a compound of interest, providing a foundation for future exploration in both plant biology and pharmacology, and paving the way for innovative approaches to modulate sulfotransferase activity.

REFERENCES

Arafah A, Rehman MU, Mir TM, Wali AF, Ali R, Qamar W, Khan R, Ahmad A, Aga SS, Alqahtani S (2020). Multi-therapeutic potential of naringenin (4′, 5, 7-trihydroxyflavonone): experimental evidence and mechanisms. *Plants*, 9(12): 1784.

Chu LL, Linh QM, Sohng JK, Huy NQ (2022). Homology modeling, molecular docking and site directed mutagenesis of putative UDP-glucosyltransferase from *Bacillus licheniformis* DSM13 using genistein as an acceptor. *Proceedings of Vietnam National Conference on Biotechnology,* 9-14.

Den HDJ, Tsiani E (2019). Antidiabetic properties of naringenin: A citrus fruit polyphenol. *Biomolecules*, 9(3): 99.

Gallo C, Nuzzo G, d'Ippolito G, Manzo E, Sardo A, Fontana A (2018). Sterol sulfates and sulfotransferases in marine diatoms. *Methods Enzymol,* 605: 101-138.

Huyen PN, Trang NTQ, Hanh NTY, Chu LL (2023). Homology modeling and Molecular docking of O-methyltransferase from *Oryza sativa* using resveratrol as a receptor. *Proceedings of Vietnam National Conference on Biotechnologyl*, 79-85.

QUÁ TRÌNH SUNFAT HÓA NARINGENIN BẰNG SULFOTRANSFERASE TỪ *Arabidopsis thaliana*: PHÂN TÍCH *INSILICO*

Nguyen Thi Quynh Trang[1], Pham Ngoc Huyen[1], Luan Luong Chu[2*]

[1]Khoa Công nghệ Sinh học, Hóa học và Kỹ thuật Môi trường, Trường Đại học Phenikaa, Hà Nội, Việt Nam

[2]Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

TÓM TẮT

Sulfotransferase (ST) là một họ enzyme chịu trách nhiệm chuyển một nhóm sunfat từ phân tử cho điển hình là 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS), sang phân tử nhận. Trong khi đó, naringenin là một flavonoid được tìm thấy rộng rãi trong các loại thực phẩm như trái cây và rau quả, có nhiều ứng dụng trong y học vì các tính chất chống oxy hóa, chống vi khuẩn và chống viêm của nó. Nghiên cứu này nhằm mục đích sử dụng kỹ thuật lắp ghép phân tử để điều tra sự tương tác giữa ST và naringenin. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ sử dụng các phương pháp lắp ghép phân tử để phân tích cách sulfotransferase và naringenin tương tác với nhau. Sau khi ghép nối phân tử bằng AutoDock Tools, chúng tôi đã đưa ra dự đoán để đánh giá khả năng liên kết giữa ST từ *Arabidosis thaliana* (ID PDP: 1Q44) và naringenin bằng Discovery Studio 3.5. Hợp chất được thiết kế cho thấy các đặc điểm kết nối thuận lợi với naringenin, với các axit amin tương tác chính bao gồm acid amin Leu 44; Phe 115, Glu 117, Ile 141, Ser142, Ile 201, Gly 202 và His 208. Năng lượng liên kết được xác định là -7,99 kCal/mol^{-1}. Năng lượng liên kết này cho thấy sự tương tác mạnh mẽ và ổn định, điều này rất cần thiết cho sự điều chỉnh hiệu quả hoạt động của enzyme bằng phối tử. Do đó, những phát hiện của nghiên cứu này có ý nghĩa quan trọng đối với sự hiểu biết về naringenin như một phối tử của sulfotransferase. Ái lực gắn kết mạnh mẽ và các tương tác cụ thể cho thấy naringenin có thể là chất có sự kết nối mạnh mẽ đến với ST. Những kết quả này mở đường cho việc xác nhận thử nghiệm sâu hơn và có thể cung cấp thông tin cho việc thiết kế các loại thuốc mới nhắm vào sulfotransferase. Ngoài ra, nghiên cứu này đặt nền tảng vững chắc cho những nỗ lực trong tương lai trong việc phát hiện thuốc và kỹ thuật protein, đặc biệt là phát triển các tác nhân trị liệu mới khai thác các đặc tính có lợi của naringenin.

Từ khóa: Arabidopsis thaliana, in silico, naringenin, sulfotransferase.

[*] Author for correspondence: Tel: 985464929; Email: luancl@vnu.edu.vn

INVESTIGATE THE CHARACTERISTICS AND ABILITY TO EXTRACT SERICIN FROM SILKWORM COCOONS USING HIGH TEMPERATURE

Khanh Dung Pham, Thi Lan Tran, Duy Bang Le, Van Quy Nguyen

HCMC University of Technology and Education, Vietnam

SUMMARY

Sericin is a natural polymer found in the cocoon of the *Bombyx mori* silkworm, connecting with fibroin molecules through hydro bonds, constituting 25-30% of the total cocoon weight. Sericin is a hydrophilic protein with the ability to dissolve in hot water. To separate sericin from fibroin or the silkworm cocoon, degumming techniques can be employed and implemented through various methods such as heat, urea, acid, alkaline. The hot water extraction method is the most common due to the mentioned constraints for sericin extraction. Both time and temperature play important roles in the amount of extracted sericin. Therefore, the effects of high-temperature methods on sericin extraction were investigated in this study. Temperature ranged from 80 to 130°C and time extraction changed from 15-30-45-60 minutes was investigated. It was established that 120°C in 30 minutes extraction leads to the highest sericin content. Then, sericin from this extraction method was studied the characterization of secondary structure using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), antibacterial and antioxidant properties. The presence of water and a high concentration of hydroxyl groups contributes to a broad absorption peak around 3273.57 cm^{-1}. Antibacterial properties against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* depend on sericin concentration, which affects the ability to prevent microorganisms from growing and reduce bacterial density. Antioxidant properties were determined by 2,2′-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) (ABTS) radical scavenging showed the strong antioxidant activity of sericin. It was suggested that sericin from silkworm cocoon has high potential source to apply in the food preservers and other industries.

Keywords: Antibacteria, *Bombyx mori*, extraction, high temperature, sericin.

INTRODUCTION

Silk is a natural fiber produced by silkworms, including those belonging to the *Bombycidae*, *Saturnidae*, and *Lasiocampidae* families, as well as spiders. *Bombyx mori*, a member of the *Bombycidae* family, is the source of mulberry silk, which is extracted from worms that have been fed mulberry leaves. Sericulture is the term used to describe the historical domestication that resulted in the need for human care when growing these silkworms. The two primary proteins involved in the structural makeup of the silk cocoon layer are sericin and fibroin. The primary component, fibrin, is a fibrous protein; the adhesive component, sericin, is a globular protein that encircles the fibers and bonds them together. The silk cocoon's ability to repel water is also enhanced by some impurities known as "non-sericin" ingredients, which include salts, sugars, and waxes. In terms of different kinds of silkworms and how the components are extracted according to the sources of nourishment, the main components of the cocoon are fibroin and sericin, along with other contaminants such colors, waxes, sugars, and phytochemicals. These constituents comprise roughly 75-83%, 17-25%, and 1-4 percent of the cocoon, in that order (Biganeh *et al*., 2022). Sericin is a hydrophilic amino acid macromolecule that consists of eighteen hydrophilic amino acids. Strong polar groups like amino, carboxyl, and hydroxyl groups are present in it, and these groups have the ability to copolymerize, create crosslinks, and combine with other polymers (Lamboni *et al*., 2015). Sericin's elemental composition analysis shows that it is composed of 6.9% sulfur, 0.9% hydrogen, 46.5% carbon, 16.5% nitrogen, and 31% oxygen. There is a relationship between the C/N ratio and solubility in hot water; a lower ratio corresponds to greater solubility in hot water (Jena *et al*., 2018; Kunz *et al*., 2016).

Heat, urea, acid, and alkaline represent the amino acid composition of sericin that was extracted using different techniques. The primary amino acid components of sericin are constant, despite minor differences in the percentage of amino acids recovered by various techniques. About 30% of sericin is made up of the amino acid serine, with the remaining 10-20% being aspartic acid and glycine. Methionine content in sericin drops with temperature, with considerably larger levels than in sericin extracted using other techniques. Furthermore, urea-extracted sericin has much less tyrosine than sericin extracted using other techniques. Moreover, the largest concentrations of sulfur-containing amino acids that can form double helix structures methionine and cysteine are found in sericin that has been heatedly removed (Aramwit *et al*., 2012).

Currently, research on sericin in the field of food technology is attracting attention from the scientific community and the food industry worldwide. Sericin, a protein derived from silk, is being explored and applied in various applications within the food industry.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The *B. mori* silkworm cocoons used in the study are from silkworm farms in the Nam Dinh provice, Vietnam in the fall from September to ends in November.

Methods

Extraction sericin

A purified cocoon that is a cocoon that has been cleaned of silk and pupa inside the cocoon were chopped into strands with diameters 1-2 mm to increase extraction efficiency. 0.5 g of chopped silkworm cocoons was soaked into 30 mL of distilled water, high temperature degumming method is used to extract sericin from silkworm cocoons at various temperatures and time. After gumming, the sericin and fibroin-mixed solution was filtrated through Qualitative Filter Paper. The sericin is separated from the sericin solution using a centrifuge machine following filtration to obtain pure sericin in the final.

Determination sericin content

Estimation of sericin quality and quantity the protein content by Lowry's method. Folin-Ciocalteu reagent was diluted 5 times with distilled water before use. Based on the standard protein chart (BSA), the sericin content to be analyzed can be determined at 660 nm wavelength of a spectrophotometer.

FTIR analysis

To identify the functional groups found in sericin, the FTIR spectra of samples of the compound were recorded using an FTIR spectrometer (Jasco, Japan). Spectra in the range of 4000-400 cm^{-1} were acquired using the KBr pelleting process.

Evaluation of the antioxidant activity of sericin

$ABTS^{+}$ is a stable free radical cation. ABTS is soluble in water at a concentration of 7 mM. Prepare a potassium persulfate solution with a concentration of 2.45 mM. Prepare a cationic solution ABTS+, including 250 µL of ABTS (7 mM) and 250 µL of $K_2S_2O_8$ (2.45 mM). Allow the mixture to stand in the dark at room temperature for 12-16 hours before use. Stoichiometrically, ABTS and potassium on sulfate react in a 1:0.5 ratio, resulting in incomplete oxidation of ABTS, with absorbance peaking over 6 hours. The radical was stable in this form for more than two days when stored in the dark at room temperature. Dilute the ABTS solution with distilled water until the absorbance is 0.7±0.02 at 734 nm.

Evaluation of antibacterial activity of sericin

Escherichia coli (VTCC-B-482) and *Staphylococcus aureus* (VTCC-B-480) bacterial strains used in this study were purchased from the Institute of Microbiology and Biotechnology (Vietnam National University, Hanoi). *S. aureus* and *E. Coli* were cultivated in Peptone solution at 37°C for 24 hours. Sericin agar dilution was prepared by adding 0.56, 0.66, 0.75, 0.84, 0.94, and 1.03 mg sericin/mL. 100 µL of bacteria solution (OD660 nm = 0.01) was applied into petri plate. Then, 20 mL sericin agar dilution with various sericin concentration was applied. Mix the medium with the bacteria thoroughly by rotating the petri dish clockwise and counterclockwise. Let it stand for 15 minutes. Finally, the sample was incubated in an incubator at 37°C for 24 hours and read the results.

Statistical analysis

All the analysis are repeat at least 3 times to take the mean data and standard deviation is analyzed following ANOVA and SPSS with Ducan's Multiple Range test ($p < 0.05$) to distinguish the difference.

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of the optimal temperature during the sericin extraction process

To investigate the effect of temperature on the extraction process of sericin with distilled water as solvent under temperature conditions of 80, 90, 100, 110, and 120, 130°C for a fixed time of 30 minutes. Based on the results in Figure 1.A, it showed that sericin concentration progressively was raised from low to high at under 100°C temperatures. At temperatures of 80°C, 90°C, and 100°C, there is a slight increase in sericin concentration. The sericin concentration obtained at the above temperatures is relatively low, and the sericin yield is correspondingly lower (Wang *et al*., 2021). This also indicated that molecular decomposition of sericin hardly occurred until treatment at temperatures (80, 90, and 100°C) for 30 minutes.

The concentration of sericin increased dramatically at extraction temperatures above 100°C. For instance, three times higher than below 100°C are 30.7±0.5, 37.17±0.6, and 30.5±0.4 mg/mL at 110°C, 120°C, and 130°C, respectively. The temperature increased from 110°C to 120°C, which increased the sericin content. But the

greater sericin content did not occur beyond 120°C. In comparison to the sericin concentration at 120°C, the concentration of sericin dropped to 130°C. It revealed that, in comparison to the temperatures examined, the sericin concentration is maximum at 120°C. The conclusion is consistent with Wang's earlier research in that processing temperature affects how sericin breaks down molecularly. Temperature may have an impact on how well sericin concentration is absorbed (Wang *et al*., 2021). Since the molecules' thermodynamics improve with temperature, the extraction procedure proceeded smoothly, and the amount of sericin that was extracted progressively rose as well. Since sericin is a protein, temperature and extraction time may cause it to become denatured. As a result, throughout the filtration and centrifugation stages, sericin would start to denature and be eliminated once the ideal sericin content extraction conditions were reached, resulting in a drop in sericin content.

Additionally, the results demonstrated that the recovered sericin concentration at 130°C was 30.25±0.4 mg/mL, which was much lower than the extraction at 120°C. Protein molecules underwent structural changes and lost activity as the temperature rose. The molecule dilated as a result of the temperature's influence because some functional groups (SH, NH_2, and COOH) were released when the secondary bonds were broken. Subsequently, the protein molecules create an unruly connection and precipitate.

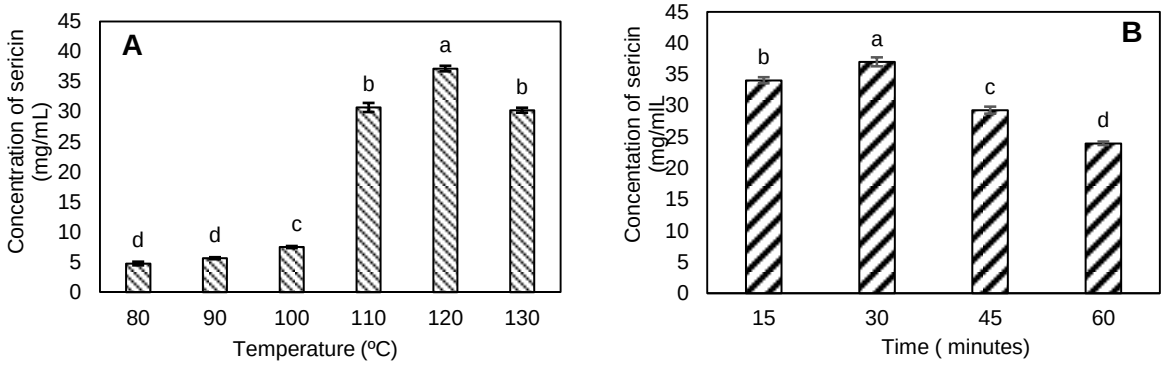


Figure 1. Sericin concentration from various temperature (A) and time (B) extraction

Error bars show SD derived from triplicate biological experiments. The letters show a significant ($p < 0.05$) difference between the mean.

Determine the optimal time during the sericin extraction process

According to Figure 1B's data, the sericin concentration increased from 15 to 30 minutes but subsequently reduced after 30 minutes of extraction at the times of 15, 30, 45, and 60 minutes. The concentration of sericin was only 34.05±0.51 mg/mL at 15 minutes, whereas at 30 minutes, it was measured to be 37.02±0.72 mg/mL. Nevertheless, the concentration of sericin dropped to 29.28±0.55 mg/mL and 23.96±0.28 mg/mL, respectively, after a longer extraction period of 45 and 60 minutes. The findings demonstrated that the sericin concentration started to gradually drop after 45 minutes and started to considerably drop after 60 minutes. It was proposed that the 30-minute interval in the survey at the time intervals yields the highest concentration of sericin. Similar to previous studies (Biswal *et al*., 2022; Saha *et al.*, 2019), 30 minutes was found to be the ideal duration for sericin extraction in this investigation. The autoclave's high pressure and temperature environment may have affected the sericin protein, causing protein chain separation and a decrease in molecular weight, which could account for the decreased sericin concentration after a longer extraction period. As the autoclaving extraction time increases, the molecular weight of protein will decrease. It is evident that meticulous management is necessary during the autoclave decalcification time, and that preserving the sericin structure is the preferred outcome. This demonstrated that protein denaturation and sericin molecular weight significantly decrease with extended duration (Biswal *et al*., 2022). As a result, it was demonstrated that the amount of sericin extracted is significantly influenced by the temperature and time of the extraction process.

FTIR Analysis

The C–O vibrations are linked to absorption maxima about 1238.075 cm^{-1} in the high temperature research of sericin. Water and a high hydroxyl group concentration cause sericin to absorb light, with a broad peak around 3273.57 cm^{-1}. Concurrently, observation bands at around 2363.8 cm^{-1} showed how the amino groups in the sericin structure's N–H vibrations were absorbed (Figure 2). FTIR spectral analysis is essential because it sheds light on how sericin solutions' gelation process is affected, which in turn affects the mechanical characteristics of sericin films. This knowledge is crucial for a variety of uses in food products containing sericin as well as for varying heat treatment techniques used in the creation of sericin materials including gels, coatings, films, fibers, etc.

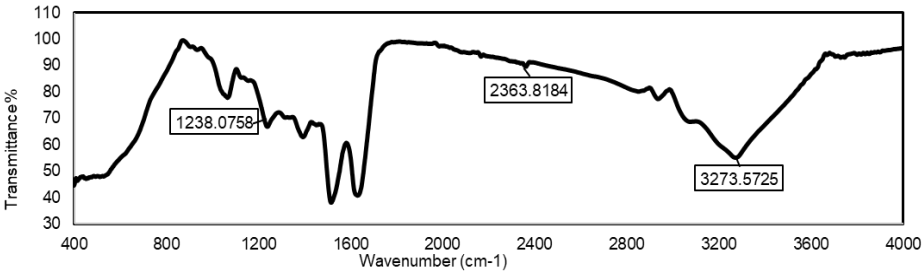


Figure 2. FTIR spectrum of sericin from high temperature extraction method

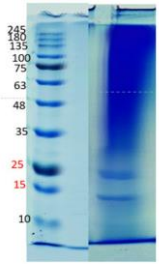


Figure 3. SDS-PAGE analysis of sericin samples

SDS – Page Analysis

The molecular weight distribution of the sericin sample was determined by the SDS-PAGE method, and the results are shown in Figure 3. Sericin extract of our group's sample showed diffuse bands in the molecular weight range of 13 kDa and 24 kDa. According to a number of studies, the extraction technique and source of sericin affect its molecular weight. Additionally, thermal extraction produces a faint band due to the decomposition of the polypeptide protein into smaller molecular-weight fractions (Sahu *et al*., 2016). According to research by Sahu *et al*, the molecular weight of the sericin was consistent with previous research using the boiling method. The evidence reported by Sprague *et al*, indicated that sercin is a mixture of at least 15 different polypeptide chains. However, because variable extraction and processing circumstances impact the complex components of sericin, the precise molecular weight of sericin has not been determined (Noosak et al., 2022). In addition, sericin also contains low-molecular-weight amino acids (< 20 kDa) that can be used in biological materials, health, cosmetics, and medicine production, while substances with high molecular weight are usually used as biomaterials, membranes, hydrogels, and complex polymers (Cao & Zhang, 2016).

Evaluation of the antioxidant activity of sericin

Figure 4's results demonstrate how sericin extract's capacity to scavenge radicals progressively increases with concentration. The capacity of sericin ABTS to scavenge free radicals is 30.22±0.72; 40.57±0.82; 49.91±0.51; 65.52±0.63; 77.63±0.74; and 88.22±0.38% at doses of 1, 2, 3, 4, 5, and 6 mg/100 mL. As a result, experimental findings demonstrated that the concentration at which sericin is extracted affects its capacity to scavenge free radicals (ABTS). The more sericin present, the more efficient it is at snaring free radicals. When proton radicals are scavenged, the typical absorption maximum of ABTS, a proton radical, lowers to 734 nm.

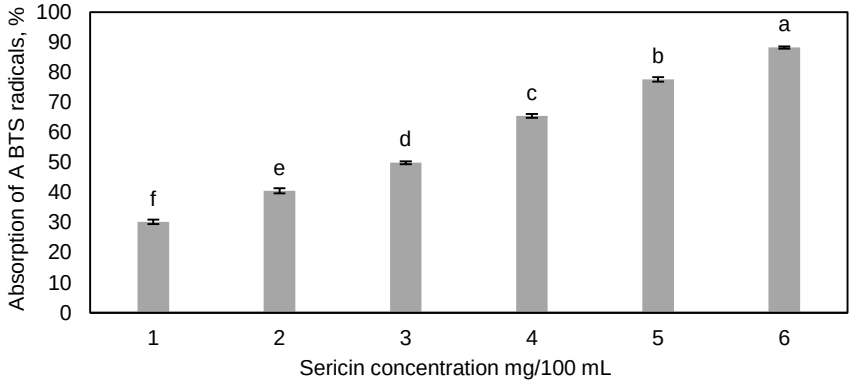


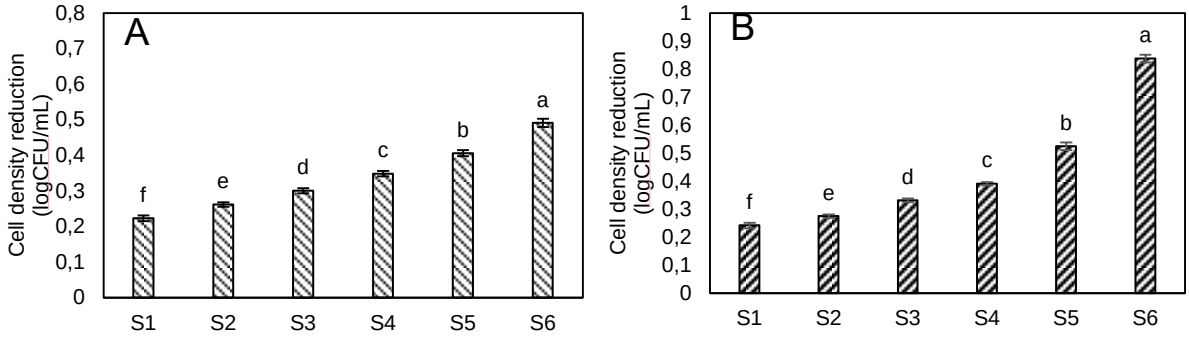
Figure 4. Antioxidant activity of sericin from high temperature extraction method

Error bars show SD derived from triplicate biological experiments. The letters show a significant ($p < 0.05$) difference between the mean

Both the radical scavenging capacity and the sericin extraction technique vary depending on the strain of silkworm cocoons. Since the structure and content of amino acids in proteins mostly determine their antioxidant capacity (Sangwong *et al*., 2016). The presence of sericin extract has been linked by some writers to anti-tyrosinase action, lipid peroxidation inhibition, and free radical neutralization (Miguel, Álvarez-López, 2020). The technique of extraction utilized affects the antioxidant ability of sericin protein.

Evaluation of antibacterial activity of sericin

The capacity to lower the *E. coli* bacteria's cell density from a low dilution of 0.56 mg sericin/mL medium to 1.03 mg sericin/mL medium was demonstrated in Figure 5A. This ability to lower the cell density also ranged from low to high, from 0.22 to 0.5 (log CFU/mL). This demonstrated that the ability to suppress *E. coli* cell density was positively correlated with sericin concentration. Stated differently, the capacity of E. coli to decrease cell density rose substantially with the amount of sericin present in the sample. This might be stated as follows: larger dilutions of sericin lead to higher concentrations of sericin, which in turn enhances the compound's ability to suppress *E. coli* growth.



Sample	S1	S2	S3	S4	S5	S6
mg sericin/mL	0.56	0.66	0.75	0.84	0.94	1.03

Figure 5. Cell density reduction in the various sericin concentrations in the A. *E. coli* and B. *S. aureus*

Error bars show SD derived from triplicate biological experiments. The letters show a significant ($p < 0.05$) difference between the mean

The capacity to decrease S*. aureus* bacterial cell density grew gradually when the concentration of sericin extract was 0.56, 0.66, 0.75, 0.84, 0.94, and 1.03 mg/mL medium, respectively, at 0.21, 0.24, 0.29, and 0.36 (log CFU/mL) (Figure 5B). Furthermore, there is a high ability to diminish the microbial density at 0.84 and 1.03 mg sericin/mL medium. In comparison to 0.56, 0.66, 0.75, and 0.84 mg sericin/mL medium, the findings of these sericin content ranged from 0.51 (log CFU/mL) to 0.79 (log CFU/mL) and demonstrated a two-fold reduction in microbial density. The results, as illustrated in Figure 5B, demonstrated that a higher dosage of sericin had a greater antibacterial impact on the tested gram-positive bacteria (*S. aureus*). According to some research, sericin's potent antibacterial qualities rely on its concentration, which influences its capacity to inhibit the growth of germs and lower the density of bacteria. The experiment described above is comparable to earlier research (Hong *et al*., 2019). Certain investigations also indicate that the degumming procedure had an impact on sericin's antibacterial qualities. Sericin from the water degumming technique has the capacity to suppress *S. aureus* bacteria that are found in food (Seo *et al*., 2023).

CONCLUSION

The results showed that the optimal sericin content of the distilled water solvent was 37.1 ± 0.72 mg/mL at the optimal temperature and time conditions of 120 °C for 30 minutes. Furthermore, the degumming method affects the sericin extraction process. To maximize sericin recovery, minimize protein damage, and protect the environment, extraction using the high temperature method is an effective choice

Acknowledgements: *Thanks for your support from HCM University of Technology and Education for all experiments.*

REFERENCES

Aramwit P, Siritientong T, Srichana T (2012). Potential applications of silk sericin, a natural protein from textile industry by-products. *Waste Manag Res*, 30(3): 217–224.

Biganeh H, Kabiri M, Zeynalpourfattahi Y, Brancalhão RMC, Karimi M, Ardekani MRS, Rahimi R (2022). *Bombyx mori* cocoon as a promising pharmacological agent: A review of ethnopharmacology, chemistry, and biological activities. *Heliyon*, 8(9): e10496.

Biswal B, Dan AK, Sengupta A, Das M, Bindhani BK, Das D, Parhi PK (2022). Extraction of Silk Fibroin with Several Sericin Removal Processes and its Importance in Tissue Engineering: A Review. *J Polym Environ*, 30(6): 2222–2253.

Cao TT, Zhang YQ (2016). Processing and characterization of silk sericin from *Bombyx mori* and its application in biomaterials and biomedicines. *Mater Sci Eng C*, 61: 940–952.

Hong SM, Choi SC, Park HM, Seok YS (2019). Preparation and characterization of sericin powder extracted with deep sea water. *3 Biotech*, 9(1): 30.

Jena K, Pandey JP, Kumari R, Sinha AK, Gupta VP, Singh GP (2018). Tasar silk fiber waste sericin: New source for anti-elastase, anti-tyrosinase and anti-oxidant compounds. *Int J Biol Macromol*, 114: 1102–1108.

Kunz RI, Brancalhão RMC, Ribeiro LFCR, Natali MRM (2016). Silkworm Sericin: Properties and Biomedical Applications. *Biomed Res Int*, 2:1-19.

Lamboni L, Gauthier M, Yang G, Wang Q (2015). Silk sericin: A versatile material for tissue engineering and drug delivery. *Biotechnol Adv*, 33(8): 1855–1867.

Miguel GA, Álvarez-López C (2020). Extraction and antioxidant activity of sericin, a protein from silk. *Braz J Food Technol*, 23: 1–14.

Noosak C, Jantorn P, Meesane J, Voravuthikunchai S, Saeloh D (2022). Dual-functional bioactive silk sericin for osteoblast responses and osteomyelitis treatment. *PLoS ONE*, 17(3): e0264795.

Saha J, Mondal IH, Sheikh RK, Habib A (2019). Extraction, Structural and Functional Properties of Silk Sericin Biopolymer from *Bombyx mori* Silk Cocoon Waste. *J Text Sci Eng*, 09(01): 1–5.

Sahu N, Pal S, Sapru S, Kundu J, Talukdar S, Singh NI, Yao J, Kundu SC (2016). Non-Mulberry and Mulberry Silk Protein Sericins as Potential Media Supplement for Animal Cell Culture. *Biomed Res Int*, 2016: 7461041.

Sangwong G, Sumida M, Sutthikhum V (2016). Antioxidant activity of chemically and enzymatically modified sericin extracted from cocoons of Bombyx mori. *Biocatal Agric Biotechnol*, 5: 155–161.

Seo SJ, Das G, Shin HS, Patra JK (2023). Silk Sericin Protein Materials: Characteristics and Applications in Food-Sector Industries. *Int J Mol Sci*, 24(5): 4951.

Wang WH, Lin WS, Shih CH, Chen CY, Kuo SH, Li WL, Lin YS (2021). Functionality of silk cocoon (*Bombyx mori* l.) sericin extracts obtained through high-temperature hydrothermal method. *Materials*, 14(18): 5314.

KHẢO SÁT ĐẶC TÍNH VÀ KHẢ NĂNG TRÍCH LY SERICIN TỪ KÉN TẰM BẰNG NHIỆT ĐỘ CAO

Phạm Khánh Dung*, Trần Thị Lan, Lê Duy Bằng, Nguyễn Văn Quý

Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Sericin là một loại polymer tự nhiên có trong kén của tằm *Bombyx mori*, liên kết với các phân tử fibroin thông qua liên kết hydro, chiếm 25-30% tổng trọng lượng kén tằm. Sericin là một protein ưa nước có khả năng hòa tan trong nước nóng. Để tách sericin khỏi fibroin hoặc kén tằm, kỹ thuật khử keo có thể được sử dụng và thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau như sử dụng nhiệt, urê, axit hoặc kiềm. Trong đó, phương pháp chiết xuất bằng nước nóng là phổ biến nhất do những hạn chế đã đề cập đối với việc chiết xuất sericin bằng phương pháp khác. Cả thời gian và nhiệt độ đều đóng vai trò quan trọng trong lượng sericin được chiết xuất. Vì vậy, ảnh hưởng của phương pháp nhiệt độ cao đến việc chiết xuất sericin đã được tìm hiểu trong nghiên cứu này. Nhiệt độ dao động từ 80 đến 130°C và thời gian chiết thay đổi từ 15-30-45-60 phút đã được thí nghiệm. Người ta xác định rằng chiết xuất ở nhiệt độ 120°C trong 30 phút sẽ dẫn đến hàm lượng sericin cao nhất. Sau đó, sericin thu được từ phương pháp chiết này được phân tích đặc tính cấu trúc bậc hai bằng phương pháp quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), đặc tính kháng khuẩn và chống oxy hóa. Sự có mặt của nước và nồng độ cao của các nhóm hydroxyl góp phần tạo ra đỉnh hấp thụ rộng khoảng 3273.57 cm^{-1}. Đặc tính kháng khuẩn chống lại *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* phụ thuộc vào nồng độ sericin, ảnh hưởng đến khả năng ngăn chặn vi sinh vật phát triển và làm giảm mật độ vi khuẩn. Đặc tính chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp quét gốc tự do 2,2′-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) (ABTS) cho thấy hoạt tính chống oxy hóa mạnh của mẫu sericin thu được. Vì vậy, sericin từ kén tằm có tiềm năng ứng dụng cao trong bảo quản thực phẩm và một số lĩnh vực khác.

Từ khóa: Kháng khuẩn, *Bombyx mori*, chiết xuất, nhiệt độ cao, sericin.

* Author for correspondence: Tel: 789097058; Email: dungpk@hcmute.edu.vn

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LACTIC CÓ TIỀM NĂNG SINH HỌC TỪ NEM CHUA ĐỂ ỨNG DỤNG SẢN XUẤT PROBIOTIC

Phạm Hồng Nhung, Nguyễn Kim Thủy, Luyện Thị Ngọc Phương, Trần Khánh Linh, Bùi Đoàn Trang Nhung, Trần Liên Hà*

Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

TÓM TẮT

Đời sống con người ngày một nâng cao, con người ngày càng quan tâm đến sức khỏe hơn nên các sản phẩm có lợi cho sức khỏe cũng được quan tâm nhiều hơn. Một trong những sản phẩm sinh học được sử dụng nhiều là probiotic với khả năng hỗ trợ tăng cường sức khỏe đường ruột, hỗ trợ điều trị một số bệnh cũng như quyết định tuổi thọ con người. Vi khuẩn lactic được đánh giá là an toàn và được sử dụng nhiều để sản xuất probiotic do có tiềm năng sinh học rất lớn đối với sức khỏe con người. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng Nem chua làm nguồn phân lập nhằm chọn ra chủng vi khuẩn lactic để ứng dụng tạo ra sản phẩm probiotic. Từ 296 khuẩn lạc vi khuẩn lactic phân lập từ 4 mẫu Nem chua sau nhiều phương pháp tuyển chọn cuối cùng chọn ra được hai chủng *Pediococcus pentosaceus* NC4 và chủng *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3 đều có khả năng sinh enzyme β-galactosidase và exopolysaccharide. Chủng *Pediococcus pentosaceus* NC4 có khả năng sinh enzyme thủy phân muối mật trong khi chủng *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3 không có hoạt tính này. Tuy nhiên khả năng kháng khuẩn của chủng *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3 tốt hơn chủng *Pediococcus pentosaceus* NC4 đối với các vi khuẩn gây bệnh: *Escherichia coli* ATTC 25922 *(1,6 cm; 1,4 cm), Bacillus cereus* ATTC 11778 *(1,6 cm; 1,2 cm), Listeria monocytogenes* ATTC 19111 *(3 cm; 1,1 cm), Salmonella typhimurium* ATTC 14028 *(2,3cm; 1,3cm)* và được chứng minh nguyên nhân kháng chủ yếu là do bacteriocin được tạo ra. Chủng *Pediococcus pentosaceus* NC4 và *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3 có hoạt tính sinh học tốt để ứng dụng sản xuất sản phẩm probiotic, để đem lại lợi ích cho sức khỏe con người.

Từ khóa: β-galactosidase, enzyme hydrolase muối mật, exopolysaccharide, probiotic, vi khuẩn lactic.

MỞ ĐẦU

Tỷ lệ người bị thiểu năng hấp thụ lactose ở Việt Nam năm 2018 được báo cáo ở mức rất cao lên đến 86,8%, tỷ lệ này trên toàn thế giới được ghi nhận đạt gần 65% (Đào Việt Hằng *et al*., 2020). Theo báo cáo của Bộ Y Tế Việt Nam, có đến gần 50% người trưởng thành bị mỡ máu cao, đây cũng là vấn đề nhức nhối trên cả thế giới khi thống kê về Gánh nặng bệnh tật toàn cầu vào năm 2019 đã chỉ ra mỡ máu cao gây ra gần 4.4 triệu ca tử vong, tương đương 7,78% số ca tử vong trên toàn cầu. Cũng theo Bộ Y tế Việt Nam, trong năm 2023, toàn quốc ghi nhận 125 vụ ngộ độc thực phẩm làm hơn 2.100 người mắc, 28 trường hợp tử vong với nguyên nhân chính là do vi khuẩn gây bệnh có trong thực phẩm. Đây là những vấn đề đang được con người đặc biệt quan tâm vậy nên các sản phẩm có thể cái thiện tình trạng sức khỏe ngày càng được chú ý đến nhiều hơn, đặc biệt là các sản phẩm probiotic. Vi khuẩn lactic là một trong những nhóm vi khuẩn probiotic thiết yếu, vừa được công nhận là an toàn, vừa có lợi cho sức khỏe con người.

Vi khuẩn lactic có khả năng sinh enzyme β-galactosidase tác động tốt tới khả năng dung nạp lactose ở người. Các exopolysaccharide và enzyme hydrolase muối mật tạo ra bởi vi khuẩn lactic có khả năng hỗ trợ giảm cholesterol trong máu (Shehata *et al*., 2016). Vi khuẩn lactic còn có thể tạo ra nhiều hợp chất kháng khuẩn khác nhau, như hydro peroxide, carbon dioxide, diacetyl và bacteriocin. Vi khuẩn lactic ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây bệnh, làm suy giảm độc tố nấm mốc (Mokoena, 2017). Chúng an toàn cho người tiêu dùng và không làm thay đổi chất lượng cũng như độ an toàn của thực phẩm. Mục đích của nghiên cứu này là phân lập, tuyển chọn và xác định vi khuẩn lactic có tiềm năng sinh enzyme β-galactosidase, sinh exopolysaccharide, enzyme thủy phân muối mật và khả năng kháng một số vi khuẩn gây bệnh để ứng dụng sản xuất thực phẩm và sản phẩm probiotic, đem lại lợi ích cho sức khỏe con người.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu Nem chua được lấy từ 4 cửa hàng bán khác nhau tại Thanh Hóa, ngày lấy 30/05/2023.

Môi trường và hóa chất

Môi trường MRS Broth (Himedia, Ấn Độ). Chế độ thanh trùng: 110°C, 30 phút.

Hóa chất: X-gal (Trung Quốc), Aniline blue (Trung Quốc), $CaCO_3$ (Trung Quốc), $CaCl_2$ (Trung Quốc), muối mật (Trung Quốc).

Phương pháp phân lập

Vi khuẩn lactic có khả năng sinh axit lactic phản ứng với $CaCO_3$ tạo thành muối Ca-lactic và H_2CO_3 là axit kém bền nên sẽ tạo thành H_2O và CO_2 từ đó tạo thành vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc vi khuẩn lactic. Các mẫu Nem chua được pha loãng theo hệ số 10 rồi bổ sung 100 µL dịch ở ba nồng độ pha loãng cuối cùng lên mặt thạch MRS có bổ sung 0,5% $CaCO_3$. Các đĩa được nuôi trong điều kiện yếm khí ở 30°C trong 48 giờ.

Tuyển chọn chủng sinh enzyme β-galactosidase

Enzyme β-galactosidase phân cắt 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) giải phóng màu xanh lam của indole. Sử dụng X-gal làm chất nền, pha với nồng độ 20 mg/ml rồi lấy 100 µL từ dịch pha loãng lên mặt thạch MRS. Các chủng vi khuẩn được cấy chấm điểm lên đĩa thạch MRS đã bổ sung X-gal. Các đĩa được nuôi trong điều kiện yếm khí ở 30°C trong 48 giờ. Kết quả enzyme dương tính được thể hiện bằng việc quan sát thấy màu xanh lam bao quanh sự phát triển của khuẩn lạc (Gheytanchi *et al*., 2010).

Tuyển chọn chủng sinh exopolysaccharide

Aniline blue là một chất nhuộm màu có khả năng bắt màu với liên kết β-(1,3)-glucan của exopolysaccharide. Các chủng vi khuẩn lactic được nuôi cấy trên đĩa thạch MRS có bổ sung Aniline (1 mg/ml). Các đĩa được nuôi trong điều kiện yếm khí ở 30°C trong 48 giờ. Khuẩn lạc màu xanh chứng tỏ khả năng sinh exopolysaccharide (Rühmann *et al*., 2015).

Tuyển chọn chủng sinh enzyme hydrolase muối mật (Bile salt hydrolase, BSH)

Enzyme hydrolase muối mật khử liên kết của axit mật và taurine tạo ra axit deoxycholic, axit deoxycholic kết hợp với Ca^{2+} tạo thành kết tủa. Các chủng vi khuẩn lactic được nuôi cấy trên đĩa thạch MRS chứa 0,3% $CaCO_3$; 0,5% muối mật (muối natri của axit taurodeoxycholic) và 0,037% $CaCl_2$. Các đĩa được nuôi trong điều kiện yếm khí ở 30°C trong 72 giờ. Vùng kết tủa xung quanh khuẩn lạc cho thấy hoạt động hydrolase muối mật của vi khuẩn (Shehata *et al*., 2016).

Xác định khả năng kháng khuẩn và sinh bacteriocin

Nuôi lỏng các chủng vi khuẩn lactic trong 24 giờ. Sau đó ly tâm 10.000 vòng trong 20 phút. Cấy 150 µL dịch chứa chủng vi khuẩn gây bệnh lên mặt thạch. Tiến hành đục lỗ thạch khoảng 4 mm và cấp 20 µL dịch sau ly tâm vào giếng. Các đĩa được nuôi trong bình yếm khí, nhiệt độ 30°C trong 16 giờ.

Bacteriocin có bản chất là protein và peptide của vi khuẩn kìm hãm hay ức chế sự phát triển của vi khuẩn khác, không gây ra các vấn đề về sức khỏe và đặc biệt bị phân hủy nhanh bởi protease Sử dụng pepsin để phân hủy bacteriocin, sau đó dựa vào sự chênh lệch vòng kháng khuẩn khi cho pepsin và khi không cho pepsin để xác định khả năng sinh bacteriocin của chủng. Dựa trên phương pháp của Techo và đồng tác giả (2018), nuôi các chủng vi khuẩn lactic trong môi trường MRS lỏng trong 24 giờ. Tiến hành ly tâm 10.000 vòng trong 20 phút. Ủ dịch ly tâm với pepsin (1 mg/ml) trong 3 giờ. Sau đó nhỏ dịch vào giếng thạch, nuôi trong bình yếm khí 30°C trong 16 giờ.

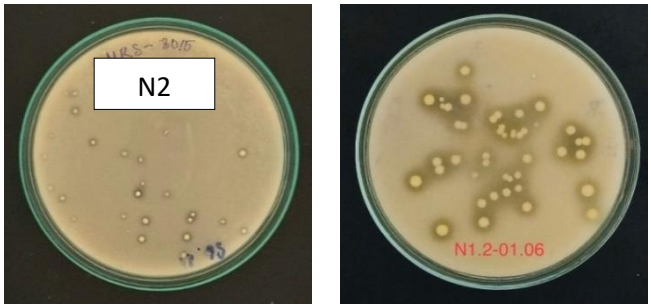
Định danh chủng

Định danh chủng vi khuẩn lactic thực hiện như sau: Tách chiết DNA và thực hiện PCR với mồi đặc hiệu 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3', 1492R: 5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT- 3'. Sau đó giải trình tự (Công Ty Cổ Phần Phù Sa Genomics) rồi so sánh trình tự với ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST SEARCH từ đó xác định được loài của mẫu vi khuẩn.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập vi khuẩn lactic

Từ bốn mẫu Nem chua đã phân lập được 296 khuẩn lạc vi khuẩn lactic có khả năng tạo vòng phân giải với $CaCO_3$. Các khuẩn lạc phân lập được có kích thước khuẩn lạc (d) và kích thước vòng phân giải (D) khác nhau. Tỷ lệ D/d < 2 chiếm khoảng 38,9% trong khi tỷ lệ D/d ≥ 2 chiếm 61,1%, các khuẩn lạc có khả năng sinh axit lactic tốt chiếm đa số. Chọn đại diện 10 chủng từ mỗi mẫu, các chủng được chọn có kích thước khuẩn lạc và kích thước đường kính vòng phân giải khác nhau, 5 chủng vi khuẩn lactic có D/d < 2 và 5 chủng vi khuẩn lactic có D/d ≥ 2. Từ đó, 40 chủng được chọn để tiến hành kiểm tra hoạt tính sinh học.

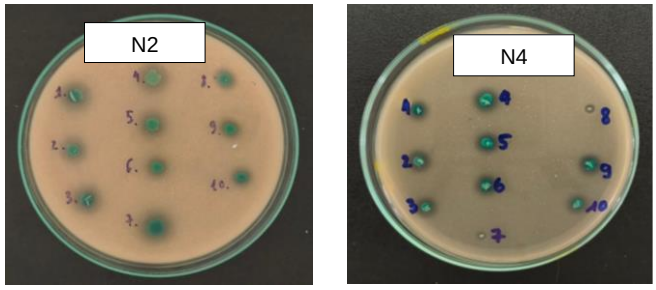


Hình 1. Mẫu khuẩn lạc phân lập

(N2 ký hiệu các chủng phân lập từ Nem chua 2; N1.2 ký hiệu các chủng phân lập từ Nem chua 1)

Tuyển chọn chủng sinh β-galactosidase

Từ kết quả phân lập chọn ra 40 chủng có sự đa dạng về kích thước khuẩn lạc cũng như khả năng sinh axit lactic. Các chủng được lựa chọn được cấy lên đĩa thạch có bổ sung X-gal để kiểm tra khả năng sinh enzyme β-galactosidase. Các chủng có khả năng sinh enzyme β-galactosidase sẽ cho khuẩn lạc có màu xanh.



Hình 2. Khả năng sinh β-galactosidase của các chủng từ mẫu N2, N4

Sau 48 giờ, kết quả thu được 35 chủng cho khuẩn lạc màu xanh nên có khả năng sinh enzyme β-galactosidase và 5 chủng không có khả năng sinh enzyme β-galactosidase do khuẩn lạc không có màu xanh. 41 chủng *Lactobacilli* phân lập từ mẫu nem chua tại thành phố Hồ Chí Minh (Le *et al*., 2015), các chủng vi khuẩn phân lập từ sữa và phô mai cũng cho kết quả có khả năng sinh β-galactosidase (Gheytanchi *et al*., 2010).

Tuyển chọn chủng sinh exopolysaccharide

35 chủng phân lập từ Nem chua sau khi tuyển chọn với khả năng sinh β-galactosidase được tiếp tục tuyển chọn khả năng sinh exopolysaccharide. Sử dụng Aniline làm thuốc nhuộm để xác định exopolysaccharide do sự biểu hiện màu khi liên kết với β-(1-3)-glucan.

Bảng 1. Biểu hiện hoạt tính exopolysaccharide

Tên chủng	NC1.2	NC1.6	NC4	NC5	NC2.6	NC3.1.2	NC3.1.3	NC4.4	NC4.5
Biểu hiện	++	+	++	++	+	+	+	++	++

(+: biểu hiện màu xanh nhạt, ++: biểu hiện màu xanh đậm)

Hình 3. Khả năng sinh exopolysaccharide

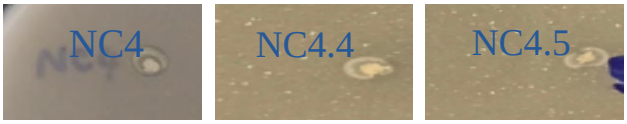
(A: Chủng NC4, B: Chủng NC5, C: Chủng NC4.5, D: Chủng NC4.4)

Trong số 35 chủng sau tuyển chọn β-galactosidase chỉ có 9 chủng có khuẩn lạc màu xanh khi tác dụng với Aniline, được đánh giá là có khả năng sinh exopolysaccharide. Chủng NC4, NC4.4, NC4.5 có biểu hiện dương tính tốt hơn 6 chủng còn lại chứng tỏ khả năng sinh exopolysaccharide tốt hơn. Khả năng sinh exopolysaccharide cũng từng được phát hiện trên một số chủng vi khuẩn lactic *Weissella confusa* (SKP 173), *Weissella cibaria* (SKP 182), và *Leuconostoc citreum* (SKP 281) phân lập từ kim chi bằng phương pháp thay thế glucose thành sucrose

(Kang *et al*., 2023). Theo Broder Rühmann, việc sử dụng nuôi cấy chủng vi khuẩn lactic lên môi trường đĩa thạch có bổ sung sucrose có thể tạo ra hiện tượng âm tính giả do phương pháp này lựa chọn chủng thông qua hình thái khuẩn lạc xảy ra theo cách giải thích của con người và khó có thể được tiêu chuẩn hóa. Các polyme mới có thể không được phát hiện do thiếu sự hình thành chất nhầy rõ ràng. Ruas-Madiedo và De Los Reyes-Gavilán (2005) cũng chỉ ra rằng từ ngữ được sử dụng để mô tả các hình thức tổng hợp exopolysaccharide khác nhau của vi khuẩn lactic có thể gây nhầm lẫn. Vì vậy nghiên cứu này đã sử dụng Aniline làm thuốc nhuộm để có tính chính xác cao hơn.

Tuyển chọn chủng sinh enzyme hydrolase muối mật

Khả năng của các chủng probiotic giải độc muối mật bằng cách tạo ra hoạt tính enzyme hydrolase muối mật thường được đưa vào một trong các tiêu chí để lựa chọn chủng probiotic (Shehata *et al*., 2016). Khi các chủng vi khuẩn lactic sản xuất enzyme BSH được cấy trên các đĩa MRS chứa muối mật, axit mật liên kết taurine được khử liên kết tạo ra axit deoxycholic. Hoạt tính sinh enzyme hydrolase muối mật của các chủng vi khuẩn lactic phân lập được thể hiện trong Hình 4, axit deoxycholic kết tủa xung quanh các khuẩn lạc và khuếch tán vào môi trường xung quanh.



Hình 4. Khả năng sinh enzyme hydrolase muối mật của chủng NC4, NC4.4, NC4.5

Từ 9 chủng có khả năng sinh exopolysaccharide tiếp tục được đánh giá khả năng sinh enzyme hydrolase muối mật. Sau 72 giờ quan sát thấy có 5 chủng có tạo vòng kết tủa chứng tỏ khả năng sinh enzyme BSH. Các chủng NC4, NC4.4 và NC4.5 tạo vòng kết tủa tốt nhất (đường kính vòng kết tủa lần lượt là 6 mm, 4 mm, 6 mm), chủng NC5, NC2.6 có biểu hiện kém hơn. Sự hiện diện của enzyme thủy phân muối mật làm cho chúng có khả năng chịu đựng muối mật tốt hơn, điều này cũng giúp làm giảm mức cholesterol trong máu của vật chủ.

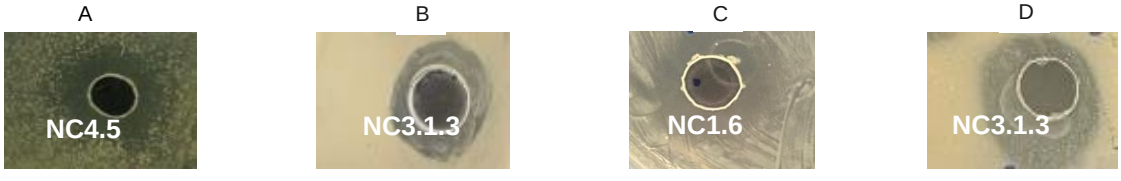
Trái ngược với kết quả của nghiên cứu hiện tại, có nghiên cứu đã báo cáo rằng hoạt động của enzyme hydrolase muối mật chưa được phát hiện ở vi khuẩn phân lập từ môi trường không có muối mật (Begley *et al*., 2006). Đặc biệt cả 5 chủng vi khuẩn lactic dương tính với enzyme thủy phân muối mật đều không liên quan đến môi trường đường tiêu hóa. Một số chủng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa và các sản phẩm từ sữa cũng đã được xác định có khả năng sinh enzyme BSH trong báo cáo của Shehata và đồng tác giả (2016) theo phương pháp này.

Xác định khả năng kháng khuẩn và sinh bacteriocin

Sử dụng 4 chủng vi khuẩn gây bệnh: *Escherichia coli* ATTC 25922, *Bacillus cereus* ATTC 11778, *Listeria monocytogenes* ATTC 19111, *Salmonella typhimurium* ATTC 14028 để đánh giá khả năng kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn lactic.

Bảng 2. Đường kính vòng kháng khuẩn (Đơn vị: cm)

Tên chủng	NC1.2	NC1.6	NC4	NC5	NC2.6	NC3.1.2	NC3.1.3	NC4.4	NC4.5
Bacillus cereus ATTC 11778	-	-	1,4	1,6	1,3	1,0	1,6	-	-
Escherichia coli ATTC 25922	1,1	1,2	1,2	1,5	1,3	1,6	1,6	0,9	1,2
Listeria monocytogenes ATTC 19111	-	-	1,1	-	-	1,0	2,5	-	1,0
Salmonella typhimurium ATTC 14028	-	1,5	1,3	1,5	1,7	1,3	1,75	-	1,0



Hình 5. Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh

(A: Vi khuẩn chỉ thị Escherichia coli ATTC 25922, B: Vi khuẩn chỉ thị Bacillus cereus ATTC 11778, C: Vi khuẩn chỉ thị Salmonella typhimurium ATTC 14028, D: Vi khuẩn chỉ thị Listeria monocytogenes ATTC 19111)

Từ kết quả Bảng 2. cho thấy chủng NC3.1.3 và NC4 có khả năng kháng cả 4 loại vi khuẩn gây bệnh (*Escherichia coli* ATTC 25922*, Bacillus cereus* ATTC 11778*, Listeria monocytogenes* ATTC 19111*, Salmonella typhimurium* ATTC 14028*)* nhưng khả năng kháng của chủng NC3.1.3 tốt hơn chủng NC4 với biểu hiện vòng kháng khuẩn có đường kính lớn*.* Tiến hành khảo sát khả năng sinh bacteriocin của chủng NC3.1.3.

Hình 6. Khả năng sinh bacteriocin của chủng NC3.1.3

(A: Vi khuẩn chỉ thị Escherichia coli ATTC 25922, B: Vi khuẩn chỉ thị Salmonella typhimurium ATTC 14028, C: Vi khuẩn chỉ thị Listeria monocytogenes ATTC 19111; Ký hiệu P: có bổ sung pepsin)

Sau khi ủ pepsin trong 12 giờ, không quan sát thấy vòng kháng khuẩn xung quanh giếng thạch chứng tỏ yếu tố kháng khuẩn có bản chất protein hoặc peptide đã bị phân hủy bởi pepsin. Các hợp chất kháng khuẩn có bản chất là peptide hay protein do vi khuẩn sản xuất ra được gọi là bacteriocin nên trong nghiên cứu này đã sử dụng pepsin làm enzyme để phân giải bacteriocin, các protein và peptide bị phân hủy dẫn đến chủng NC3.1.3 không còn khả năng kháng các vi khuẩn gây bệnh trên. Do đó, có thể kết luận chủng NC3.1.3 kháng một số vi khuẩn gây bệnh là do có bacteriocin. Hoạt tính kháng khuẩn do bacteriocin của vi khuẩn lactic phân lập từ Nem chua đã được nghiên cứu trước đây và được báo cáo với đường kính vòng kháng khuẩn trung bình từ 9,75 mm – 16 mm (Võ Ngọc Chi *et al*., 2021). Theo Le và đồng tác giả (2015) đã báo cáo, các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ Nem chua có khả năng kháng *Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* có thể do yếu tố khác không phải axit hữu cơ.

Như vậy, sau khi trải qua quá trình tuyển chọn về các đặc tính sinh học, cuối cùng chọn ra 2 chủng NC4 và NC3.1.3 là hai chủng có nhiều tiềm năng sinh học để đem đi định danh.

Định danh chủng

Các phương pháp phân tử rất quan trọng để nhận dạng vi khuẩn và có thể chính xác hơn đối với các phương pháp kiểu hình thông thường. Trong nghiên cứu này, 16S-rARN của 2 chủng vi khuẩn lactic NC4 và NC3.1.3 đã được khuếch đại và giải trình tự để nhận dạng. Sau khi thu được trình tự 16S-rARN chủng NC4 với độ dài 1436bp và chủng NC3.1.3 là 1414bp, tiến hành chạy trên chương trình BLAST SEARCH để xem mức độ tương đồng với các chủng trong ngân hàng dữ liệu NCBI. Kết quả giải trình tự gen cho thấy chủng NC4 thuộc loài *Pediococcus pentosaceus* với mức tương đồng 100% với chủng *Pediococcus pentosaceus* LB_34, *Pediococcus pentosaceus* LB_38 và *Pediococcus pentosaceus* LB_39. Chủng NC3.1.3 thuộc loài *Lactobacillus plantarum* với mức tương đồng 99,93% với chủng *Lactobacillus plantarum* AR513 và chủng *Lactobacillus plantarum strain* LAG1. Vì vậy, chủng NC4 định tên là *Pediococcus pentosaceus* NC4, và chủng NC3.1.3 định tên là *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3.

KẾT LUẬN

Từ 4 mẫu Nem chua phân lập được 296 khuẩn lạc, sau khi đánh giá hoạt tính sinh học, chọn ra 2 chủng tốt nhất là NC4 và NC3.1.3. Chủng NC4 cho màu xanh đậm khi tác dụng với X-gal và Aniline nên có khả năng sinh β-galactosidase và exopolysaccharide tốt. Khả năng sinh enzyme hydrolase muối mật của NC4 biểu hiện tốt với vòng kết tủa lớn (6mm), chủng NC3.1.3 không có khả năng sinh enzyme BSH, khả năng sinh β-galactosidase và exopolysaccharide kém hơn chủng NC4. Khả năng kháng khuẩn của chủng NC3.1.3 và chủng NC4 lần lượt đối với *Escherichia coli* ATTC 25922 là 1,6 cm và 1,4 cm*; Bacillus cereus* ATTC 11778 1,6 cm và 1,2 cm*; Listeria monocytogenes* ATTC 19111 2,5 cm và 1,3 cm; *Salmonella typhimurium* ATTC 14028 1,75 cm và 1,3 cm. Đồng thời đã xác định nguyên nhân kháng chủ yếu của chủng NC3.1.3 là do bacteriocin. Chủng NC4 và NC3.1.3 được định danh bằng 16S-rARN và xác định tên của chủng lần lượt là *Pediococcus pentosaceus* NC4 và chủng *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Begley M, Hill C, Gahan CG (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl Environ Microbiol*, 72(3): 1729-1738.

Gheytanchi E, Heshmati F, Shargh BK, Nowroozi J, Movahedzadeh F (2010). Study on β-galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. *Afr J Microbiol Res,* 4(6): 454-458.

Đào Việt Hằng, Trần Thị Phụng, Hall R, Đào Văn Long (2020). Bước đầu khảo sát tình trạng kém hấp thu lactose ở người Việt Nam. *Journal of 108 - Clinical Medicine and Phamarcy*, 13(7): 57-62.

Kang YJ, Kim TJ, Kim MJ, Yoo JY, Kim JH (2023). Isolation of Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacteria from Pa-Kimchi and Characterization of Exopolysaccharides. *Microbiol Biotechnol Lett*, 51(2): 157–166.

Nguyen Thi My Le, Nguyen Thuy Huong, Pham Viet Nam (2015). Probiotic properties of Lactobacilli isolated from Vietnam traditional fermented foods. *Int J Energy Environ Eng*, 3(1): 06-12.

Mokoena MP (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22(8): 1255

Ruas-Madiedo P, De Los Reyes-Gavilán CG (2005). Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*, 88(3): 843-856.

Rühmann B, Schmid J, Sieber V (2015). Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides. *Front Microbiol*, 6: 565.

Shehata MG, El Sohaimy SA, El-Sahn MA, Youssef MM (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Ann Agric Sci*, 61(1): 65-75.

Techo S, Visessanguan W, Vilaichone RK, Tanasupawat S (2019). Characterization and Antibacterial Activity Against Helicobacter pylori of Lactic Acid Bacteria Isolated from Thai Fermented Rice Noodle. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 11(1): 92-102.

Võ Ngọc Chi, Nguyễn Thị Phượng, Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Đinh Anh Khoa, Phan Bích Tuyết, Hoàng Diễm Hằng, Lê Thị Thủy, Kha Chấn Tuyền (2021). Khảo sát khả năng sinh bacteriocin của vi khuẩn lactic phân lập trên nem chua Thủ Đức. *Tạp Chí Nông nghiệp Và Phát triển*, 20(2): 62-68.

ISOLATION AND SCREENING OF LACTIC ACID BACTERIA WITH PROBIOTIC POTETIALS FROM NEM CHUA FOR APPLYCATION IN PROBIOTIC PRODUCTION

Pham Hong Nhung, Nguyen Kim Thuy, Luyen Thi Ngoc Phuong, Tran Khanh Linh, Bui Doan Trang Nhung, Tran Lien Ha*

School of Chemistry and Life Science, Hanoi university of Science and Technology

SUMMARY

In an era of advancing human lifestyles, heightened awareness of health issues has intensified interest in health-promoting products. Probiotics, particularly those derived from lactic acid bacteria, have gained significant attention for their potential to enhance gut health, aid in disease management, and potentially extend human lifespan. Lactic acid bacteria are considered safe and are extensively used in probiotic production due to their significant biological potential for human health. This study focused on isolating lactic acid bacteria strains from Nem chua, a Vietnamese traditional fermented pork sausage, to explore their probiotic potential. Among 296 lactic acid bacteria strains isolated from 4 Nem chua samples, after various selection methods, we identified two strains: *Pediococcus pentosaceus* NC4 and *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3. Both strains exhibited enzymatic activity in β-galactosidase and exopolysaccharide production. *Pediococcus pentosaceus* NC4 showed bile salt hydrolase enzyme activity, while *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3 did not. However, *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3 demonstrated superior antibacterial activity compared to *Pediococcus pentosaceus* NC4 strains of *Escherichia coli* ATTC 25922 *(1,6 cm; 1,4 cm), Bacillus cereus* ATTC 11778 *(1,6 cm; 1,2 cm), Listeria monocytogenes* ATTC 19111 *(3 cm; 1,1 cm), Salmonella typhimurium* ATTC 14028 *(2,3 cm; 1,3 cm),* primarily attributed to bacteriocin production. The enzymatic and antimicrobial properties observed in *Pediococcus pentosaceus* NC4 and *Lactobacillus plantarum* NC3.1.3 highlight their suitability for further development into probiotic formulations. These findings contribute to advancing the understanding and application of probiotics in promoting human health.

Keywords: β-galactosidase lactic acid bacteria, enzyme bile salt hydrolase, exopolysaccharide, probiotic.

* Author for correspondence: Tel: 934138189; Email: Nhung.ph201203@sis.hust.edu.vn

SÀNG LỌC HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC CAO CHIẾT TỪ LÁ CHUỐI TIÊU THU HÁI TẠI VĂN GIANG, HƯNG YÊN, VIỆT NAM

Nguyễn Trường Quốc Anh[1], Dương Minh Yến[2], Nguyễn Đức Huy[2], Hoàng Quốc Phương[2], Nguyen Hoang Anh[2], Trịnh Thị Thúy[2], Hà Thị Dung[3], Lục Quang Tấn[4], Cao Thị Huệ[2*]

[1]Vinschool The Harmony, Phúc Đồng, Long Biên, Hà Nội

[2]Trường Đại học Thủy lợi, 175 Tây Sơn, Đống Đa, Hà Nội

[3]Trường Đại học Công nghiệp, 298 Cầu Diễn, Nam Từ Liêm, Hà Nội

[4]Phân hiệu Đại học Thái Nguyên tại tỉnh Hà Giang, phường Nguyễn Trãi, TP Hà Giang, tỉnh Hà Giang

TÓM TẮT

Cây chuối tiêu (*Musa acuminata AAA*) là một loài thực vật được trồng phổ biến ở nhiều nơi trên thế giới, quả được dùng làm thực phẩm dinh dưỡng hàng ngày ở nhiều quốc gia. Tại Việt Nam, lá chuối tiêu được dùng từ xa xưa để gói các loại bánh truyền thống và các sản phẩm chế biến từ thịt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành tạo các cao chiết lá chuối tiêu với các dung môi khác nhau (cồn, cồn-nước tỉ lệ 7/3, 5/5) (E100, EW73, EW55); đánh giá hiệu suất, hàm lượng flavonoid và polyphenol cũng như sàng lọc hoạt tính sinh học của cao chiết. Hiệu suất của ba cao chiết với các dung môi tương ứng: cồn, cồn-nước tỉ lệ 7/3 và 5/5 lần lượt là 12,5; 9,7 và 7,8% (*w/w*). Hàm lượng polyphenol của cao chiết E100, EW73, EW55 lần lượt là 110,18; 52,37 và 26,47 mg/g, trong khi hàm lượng flavonoid có giá trị là 12,83; 21,57 và 12,32 mg/g. Giá trị EC_{50} của hoạt tính chống oxy hóa tổng và quét gốc tự do DPPH của E100, EW73, EW55 có giá trị tương ứng là 353,19; 422,63; 561,84 µg/mL và 73,48; 81,53; 95,49 µg/mL. Cả ba cao chiết đều thể hiện khả năng ức chế sản sinh NO với giá trị ức chế đạt 78,79-95,59% ở nồng độ 100 µg/mL; giá trị IC_{50} của E100, EW73, EW55 lần lượt là 63,17; 50,29 và 54,44 µg/mL.

Từ khóa: Chống oxy hóa, hoạt tính sinh học, kháng vi sinh vật, lá chuối tiêu, ức chế sản sinh NO.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây chuối tiêu có tên khoa học là *Musa acuminata AAA*, là một loại cây trồng thuộc chi Musa và tất cả các loài của chi này đều là loài bản địa ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới. Loài chuối tiêu đã được trồng hơn 4000 năm và một số giống của nó là lương thực chủ yếu ở các vùng nhiệt đới trên thế giới. Chúng là những loại cây có chiều cao lên tới 9 mét và được sản xuất chủ yếu ở các khu vực châu Á, châu Phi và Nam Mỹ (Alabi *et al*., 2013).

Ở nước ta, chuối là loại trái cây có diện tích và sản lượng cao. Do đặc điểm là loại cây ngắn ngày, nhiều công dụng và kỹ thuật canh tác đơn giản nên chuối được trồng ở rất nhiều nơi trong các vườn cây ăn trái và hộ gia đình. Với diện tích chiếm 19% tổng diện tích cây ăn trái của Việt Nam, hàng năm chuối tiêu cho sản lượng khoảng 1,4 triệu tấn. Tuy nhiên, diện tích trồng chuối lại không tập trung. Một số tỉnh miền Trung và miền Nam có diện tích trồng chuối khá lớn (Thanh Hóa, Nghệ An, Khánh Hòa, Đồng Nai, Sóc Trăng, Cà Mau có diện tích từ 3.000 ha đến gần 8.000 ha). Trong khi đó, các tỉnh miền Bắc có diện tích trồng chuối lớn nhất như: Hải Phòng, Nam Định, Phú Thọ…chưa đạt đến 3.000 ha. Tại tỉnh Hưng Yên, chuối được trồng ở các xã ven sông Hồng thuộc huyện Văn Giang như Thắng Lợi, Mễ Sở, hay xã Bình Minh, Hàm Tử thuộc huyện Khoái Châu.

Trên thế giới có rất nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của quả chuối và một số bộ phận của cây chuối. Nghiên cứu của nhóm tác giả Kappel và đồng tác giả (2013) đã chứng minh sự hiện diện của các chất chống oxy hóa như: flavonoid và rutin có trong các cao chiết thô. Nhóm tác giả Behiry và đồng tác giả (2019) cũng báo cáo rằng, trong chiết xuất cồn của lá chuối tiêu chứa nhiều hợp chất phenolic và flavonoid có khả năng chống oxy hóa, bao gồm: axit ellagic, axit gallic, rutin, myricetin và naringenin. Kết quả phân tích GC-MS chỉ ra trong lá chuối tiêu có sự hiện diện của phytol, axit octadecatrienoic, axit hexadecanoic và axit octadecadienoic. Trong quả chuối tiêu có chứa vitamin E, octadecenamide, *β*-sitosterol và stirysterol. Tất cả các hợp chất cấu thành này đều được báo cáo là có khả năng chống oxy hóa (Aziz *et al*., 2020; Ahmed *et al*., 2020). Nghiên cứu của Boadi và đồng tác giả (2021) cho thấy, chất chiết xuất từ vỏ và lá chuối tiêu thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với các chủng *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* và *Proteus mirabilis*. Ngoài ra, dịch chiết từ các bộ phận khác nhau của *cây* chuối tiêu cho thấy khả năng chống tiêu chảy, hạ đường huyết, chống oxy hóa, hạ huyết áp, chữa lành vết thương, chống dị ứng, chống sốt rét và làm trung hòa nọc độc của rắn.

Ở Việt Nam từ thời xa xưa ta đã dùng lá chuối tiêu để gói các loại bánh trái, hay các loại giò, chả với mục đích làm tăng hương vị và bảo quản các loại thực phẩm này trong thời gian dài hoặc dùng để đắp lên các vết thương,

vết bỏng. Tuy nhiên, các nghiên cứu khoa học về lá chuối còn hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này tập trung vào mục tiêu sàng lọc hoạt tính sinh học của lá chuối như khả năng kháng oxi hóa, kháng vi sinh vật kiểm định hoặc ức chế sản sinh nitric oxide (NO) nhằm giải thích cho các ứng dụng trên và mở rộng tiềm năng sử dụng của lá chuối trong nhiều lĩnh vực.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu lá chuối tiêu được thu hái tại cánh đồng chuối tiêu tại thôn Sâm Hồng, xã Thắng Lợi, huyện Văn Giang, tỉnh Hưng Yên. Mẫu được thu vào ngày 1/3/2024. Mẫu cây được định danh khoa học bởi TS. Vũ Hương Giang, Viện Hóa Sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, tham khảo tài liệu của Valmayor và đồng tác giả (2000). Mẫu lá chuối tiêu sau khi thu hái được làm sạch sơ bộ, rửa sạch các chất bụi bẩn bám trên lá, sau đó cắt nhỏ, phơi khô dưới bóng râm và nghiền nhỏ. Tiêu bản lá chuối được lưu tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Thủy lợi. Mẫu khô được bảo quản trong túi nilon kín tại vị trí khô ráo, tránh ánh nắng trực tiếp cho đến khi tiến hành tạo các cao chiết, khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính sinh học.

Các chủng vi sinh vật kiểm định chuẩn quốc tế ATCC, bao gồm: *Enterococcus faecalis* ATCC299212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076, *Candida albicans* ATCC10231 được cung cấp bởi viện Kiểm nghiệm vệ sinh an toàn thực phẩm quốc gia.

Hóa chất

Cồn thực phẩm 90^{o}C được mua của Công ty hóa chất Đức Giang. Nước tinh khiết được tạo ra tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học – Trường Đại học Thủy lợi bởi máy lọc nước siêu sạch (Labaqua Bio, Biosand, Latvia). Các hóa chất để định tính sự có mặt của các chất hữu cơ có trong các cao chiết có xuất xứ Việt Nam và Trung Quốc. Các loại hóa chất dùng để xác định hàm lượng flavonoid và polyphenol tổng số; đánh giá hoạt tính sinh học như: acid gallic, thuốc thử Folin-Ciocalteu, Na_2CO_3, $AlCl_3$, CH_3COOK, quercetin, ascorbic acid, sodium phosphate, ammolium molybdate, DPPH và các hóa chất khác để đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO, kháng vi sinh vật kiểm định có xuất xứ Merck, Đức.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tạo cao chiết và tính hiệu suất của cao chiết

Nhóm nghiên cứu tiến hành tạo cao chiết với các dung môi cồn/nước theo tỉ lệ khác nhau. Ba loại dung môi được sử dụng là cồn 100%, cồn-nước tỉ lệ 7/3 và cồn nước tỉ lệ 5/5 (*v/v*). Phương pháp chiết được thực hiện như sau: 100 gram bột lá chuối tiêu nghiền nhỏ được chiết với ba loại dung môi nêu trên. Trong đó, quá trình chiết được thực hiện ở nhiệt độ thường. Đối với mỗi lần chiết, tỉ lệ dung môi/mẫu là 3/1 (*v/w*), thời gian chiết là 24 giờ. Sau đó, dịch chiết được thu qua giấy lọc và được gom lại, cô quay để loại dung môi bằng máy cất quay chân không và thu được cao chiết cồn 100%, cồn-nước 7/3, cồn-nước 5/5 được kí hiệu lần lượt là: E100, EW55, EW73. Hiệu suất cao hồi thu chiết được tính bằng tỉ lệ khối lượng của cao chiết (sau khi đã cô khô) và khối lượng của bột dược liệu khô (tính theo đơn vị phần trăm).

Phương pháp định tính sự có mặt của các hợp chất trong các cao chiết

Định tính sự có mặt của các hợp chất chứa trong cao chiết bao gồm: flavonoid, polyphenol, terpenoid, quinone, coumarin và saponin được thực hiện bằng phương pháp hóa học theo mô tả của Cao và đồng tác giả (2023).

Phương pháp xác định hàm lượng polyphenol tổng số của các cao chiết

Hàm lượng polyphenol tổng được xác định theo mô tả của Cao và đồng tác giả (2023). Sử dụng nước pha loãng các mẫu cao chiết để đạt nồng độ khoảng 1 mg/mL và dung dịch polyphenol chuẩn gallic acid nồng độ 20, 40, 60, 80, 100 và 120 µg/mL; thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% được pha loãng với nước. Lần lượt cho 1 mL dung dịch gallic acid với các nồng độ kể trên vào 2,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% và để phản ứng trong 5 phút; sau đó, thêm tiếp vào 2 mL dung dịch Na_2CO_3 2%. Sau 45 phút phản ứng ở nhiệt độ phòng, độ hấp thụ được xác định bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 765 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị OD được ghi nhận và tiến hành vẽ đường chuẩn để sử dụng xác định hàm lượng polyphenol tổng trong các mẫu cao chiết. Các mẫu cao chiết được tiến hành tương tự với acid gallic.

Phương pháp xác định hàm lượng flavonoid tổng số của các cao chiết

Hàm lượng flavonoid tổng được xác định theo mô tả của Chang và đồng tác giả (2002). Ethanol được sử dụng để pha loãng các cao chiết để đạt nồng độ 1 mg/mL và dung dịch flavonoid chuẩn quercetin đạt nồng độ 20; 40; 60; 80 và 100 µg/mL; dung dịch $AlCl_3$ 10% và dung dịch CH_3COOK 1M được pha loãng với nước. Lần lượt cho 0,5 mL dung dịch quercetin (nồng độ 20; 40; 60; 80 và 100 µg/mL) vào 1,5 mL ethanol và để phản ứng trong 5 phút. Sau đó, thêm tiếp 0,1 mL $AlCl_3$ 10% và để phản ứng trong 6 phút. Cuối cùng, hỗn hợp được thêm vào 0,1 mL CH_3COOK 1M và 2,8 mL nước cất, lắc đều rồi để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 45 phút. Sau 45 phút, tiến

hành xác định độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 415 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả OD được ghi nhận và tiến hành vẽ đường chuẩn để sử dụng xác định hàm lượng flavonoid trong các mẫu cao chiết. Các mẫu cao chiết được tiến hành tương tự như quercetin.

Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết

Hoạt tính chống oxy hóa tổng của các cao chiết được thực hiện theo phương pháp phosphomolybradenum theo mô tả của Cao và đồng tác giả (2023). Pha loãng bốn cao chiết để đạt nồng độ 10-100 µg/mL. Lần lượt cho 0,1 mL mỗi dung dịch cao chiết pha loãng với nồng độ tương ứng ở trên vào ống eppendorf dung tích 2 mL, bổ sung thêm 1 mL dung dịch phản ứng (0,6 M H_2SO_4, 28 mM sodium phosphate và 4 mM ammolium molybdate). Ống eppendorff được đóng nắp chặt, sau đó được ủ ở nhiệt độ 95^{0}C trong thời gian 90 phút. Ống mẫu thí nghiệm được làm nguội tới nhiệt độ phòng, sau đó đo nồng độ hấp thụ ở bước sóng 760 nm bằng máy đo quang. Ascorbic acid được dùng làm chất chuẩn.

Phương pháp quét gốc tự do DPPH của các cao chiết

Gốc tự do bền DPPH được sử dụng để xác định hoạt tính ức chế gốc tự do của các mẫu cao chiết. Phép thử được thực hiện theo mô tả của Cao và đồng tác giả (2023). Thêm 1,5 mL dung dịch DPPH 0,1 mM vào 1,5 mL dung dịch mẫu lần lượt có nồng độ 10, 25, 50, 100 µg/mL trong ethanol 90^o. Sau đó, ủ dung dịch trong bóng tối (30 phút) và đo độ hấp thụ quang tại 517 nm. Các mẫu có hoạt tính mạnh, ức chế trên 50% tại nồng độ 10 µg/mL, được tiếp tục tiến hành ở các nồng độ thấp hơn là 1, 2, 5 µg/mL. Tất cả thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Dựa vào mật độ quang của dung dịch control và dung dịch mẫu thử để tính khả năng quét gốc tự do DPPH (%), từ đó xác định giá trị IC_{50}. Giá trị IC_{50} được định nghĩa là nồng độ của mẫu mà tại đó nó có thể ức chế 50% gốc tự do. Mẫu có hoạt tính càng cao thì IC_{50} càng thấp. Quercetin được sử dụng làm chất đối chứng dương.

Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các cao chiết

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được thực hiện tại Phòng Công nghệ Sinh học – Viện Hóa sinh biển dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ của Andrews (2001) dùng các thiết bị: box cấy Esco (AC2-4E1, Singapore); máy lắc ổn nhiệt (ThermoStable IS-20R, Korea) và máy đo mật độ quang (722N INESA, Trung Quốc). Đây là phương pháp thử nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là MIC (nồng độ ức chế tối thiểu). Mẫu ban đầu được pha loãng trong DMSO ở dải nồng độ giảm dần: 256, 128, 64 , 32, 16, 8, 4 và 2 µg/mL với số thí nghiệm lặp lại 3 lần. Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn hoặc nấm với nồng độ 2×10^5CFU/mL.

Tiến hành thử: lấy 5,12 µL dung dịch mẫu thử có nồng độ 10 mg/mL vào hàng đầu tiên có chứa 100 µL môi trường LB rồi pha loãng nối tiếp giảm ½ nồng độ vào các hàng có chứa 50 µL cho đến khi đạt được nồng độ là 2 µg/mL, thêm 50 µL dung dịch vi khuẩn và nấm ở nồng độ 2×10^5 CFU/mL, ủ ở 37^{o}C. Sau 24 giờ, xác định sơ bộ giá trị MIC. Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất gây ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật sau 24 giờ nuôi cấy. Chất đối chứng là kháng sinh Ciprofloxacin cho các chủng vi khuẩn và cyclohexamide cho nấm.

Phương pháp đánh giá khả năng ức chế NO của các cao chiết

Phương pháp đánh giá khả năng ức chế nitric oxide (NO) trên mô hình tế bào RAW 264.7 được cảm ứng viêm bằng lipopolysaccharide (LPS). *Bước 1 tiến hành đánh thức tế bào RAW 264.7 từ nitơ lỏng (dòng tế bào RAW 264.7 do GS. TS. Domenico Delfino, Đại học Perugia, Italia cung cấp). Tiếp theo, tế bào RAW 264.7 được nuôi trong môi trường DMEM (Dulbecco s Modified Eagle Medium) bổ sung 2 mM L-glutamine, 10 mM dung dịch đệm HEPES, 1 mM sodium pyruvate và 10% fetal bovine serum (FBS), để trong tủ ấm CO_2 ở điều kiện 37°C, 5% CO_2. Sau 3-5 ngày, tùy theo tình trạng tế bào sau khi đánh thức, tế bào được cấy chuyển với tỉ lệ 1:3. Sau đó, tế bào được cấy chuyển vào trong đĩa 96 giếng với mật độ 2 × 10^5 tế bào/giếng, nuôi trong 24 giờ trong tủ ấm ở điều kiện 37°C, 5% CO_2. Sau đó tiến hành hút bỏ môi trường cũ và thay bằng môi trường mới DMEM không có FBS để trong 3 giờ. Tiếp theo, thay môi trường cũ bằng môi trường có chứa mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau và ủ trong 2 giờ. Môi trường của một số giếng không chứa mẫu nghiên cứu mà chỉ có dung dịch pha mẫu được gọi là đối chứng âm. Đối chứng dương được sử dụng là Dexamethasone (Sigma) ở các nồng độ 100 µM, 20 µM, 4 µM và 0.8 µM. Tiến hành kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS nồng độ 1 µg/mL trong 24 giờ. Sau đó, hút 100 µL dịch nổi trong mỗi giếng sang đĩa 96 giếng mới và bổ sung 100 µL thuốc thử Griess reagent (gồm 50 µL of 1% (w/v) sulfanilamide trong 5% (v/v) phosphoric acid và 50 µL 0,1% (w/v) N-1- naphthylethylenediamine dihydrochloride pha trong nước) và ủ tiếp hỗn hợp trên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó, đo OD bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không có FBS được sử dụng làm giếng trắng (blank). Hàm lượng nitrite của mỗi giếng được xác định dựa vào đường cong hàm lượng chuẩn $NaNO_2$ và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).* Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định bằng công thức:

$$\%\ \text{ức chế}\ (\%) = 100 - \frac{\mathrm{OD}_1 - \mathrm{OD}_{\mathrm{blank}}}{\mathrm{OD}_{\mathrm{DMSO}} - \mathrm{OD}_{\mathrm{blank}}} * 100$$

*Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) được tính toán bằng phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4 (*Cheenpracha *et al*., 2010; *Liao* et al*., 2014).*

Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Đồ thị và số liệu được xử lý trên phần mềm Microsoft Office 2020. Phân tích thống kê được thực hiện với sự giúp đỡ của phần mềm Thống kê mô tả Turkey - Test, giá trị P < 0,05 được sử dụng để biểu hiện sự khác biệt đáng kể có ý nghĩa thống kê.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hiệu suất thu hồi của cao chiết

Nhóm nghiên cứu đã tiến hành tạo các cao chiết thô với cồn 100% (E100), cồn-nước theo tỉ lệ 7/3 (EW73) và cồn-nước theo tỉ lệ 5/5 (EW55) với mục đích sàng lọc hoạt tính sinh học và đánh giá sơ bộ thành phần hóa học. Dựa vào kết quả nghiên cứu trình bày ở Bảng 1 cho thấy, cao chiết E100 có hiệu suất cao nhất, đạt 12,5%. Cao chiết EW55 có hiệu suất thấp nhất, đạt 7,83%, trong khi cao chiết EW73 sử dụng dung môi ethanol và nước theo tỉ lệ 7/3 có hiệu suất 9,74%. Hiệu suất thu hồi cao chiết phụ thuộc vào các yếu tố như: bản chất dược liệu, độ mịn của dược liệu và kỹ thuật chiết (dung môi, tỉ lệ dung môi/bột dược liệu, thời gian chiết và kỹ thuật chiết). Tuy nhiên, bên cạnh hiệu suất cần phải tiến hành sàng lọc thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các cao chiết như: hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính kháng viêm, hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định, v.v. để khẳng định giá trị của các hợp chất thứ cấp đối với tác dụng dược lý của lá chuối tiêu nói riêng và các loài cây dược liệu nói chung.

Kết quả định tính sự có mặt của các nhóm chất trong các cao chiết

Đối với thực nghiệm định tính các hợp chất có trong các cao chiết từ lá chuối tiêu bằng phản ứng hóa học, kết quả có thể được đánh giá bằng các phản ứng có thể quan sát được bằng mắt thường. Kết quả định tính này cho biết rằng trong lá cây lá chuối tiêu chứa một số hoạt tính sinh học quan trọng. Kết quả thực nghiệm được trình bày ở Bảng 1.

Trong cao chiết E100, EW73 và EW55 của lá chuối tiêu chứa phần lớn các hợp chất polyphenol, flavonoid, terpenoid. Trong đó, sự xuất hiện của polyphenol thể hiện mạnh nhất ở cao chiết E100. Đối với phép thử sự có mặt của các hợp chất flavonoid, phản ứng thể hiện sự thay đổi màu mạnh nhất thu được đối với cao chiết E100 và EW73. Trong cả ba cao chiết không thấy sự có mặt của quinone, trong khi coumarin và saponin chỉ xuất hiện ở cao chiết E100, không thấy xuất hiện trong hai cao chiết còn lại.

Bảng 1. Hiệu suất thu hồi cao chiết và kết quả định tính sự có mặt của một số nhóm chất có trong cao chiết lá chuối tiêu

Các cao chiết	Hiệu suất thu hồi cao chiết	Các nhóm hợp chất					
		Polyphenol	Flavonoid	Terpenoid	Quinone	Coumarin	Saponin
E100	12,5 ± 0,5	+++	++	+	-	+	+
EW73	7,8 ± 0,7	++	++	+	-	-	-
EW55	9,7 ± 0,4	+	+	+	-	-	-

Ghi chú: (+) có; (-) không; kí hiệu: +, ++, +++ thể hiện cường độ có mặt của các chất trong các loại cao chiết;E100, EW73, EW55: các cao chiết của lá cây chuối tiêu lần lượt với các dung môi: cồn (100%), cồn-nước (7/3), cồn-nước (5/5)

Hàm lượng flavonoid tổng và polyphenol tổng có trong các cao chiết

Các hợp chất polyphenol và flavonoid là những thành phần quan trọng và chiếm tỷ lệ cao trong nhiều loài thực vật, đặc biệt là những loài thảo dược được dùng với vai trò tác nhân oxy hóa. Những nhóm hợp chất này đã được chứng minh có tác dụng bảo vệ sức khỏe cho con người. Vì vậy, việc xác định hàm lượng các nhóm chất này là cần thiết trong việc nghiên cứu các hoạt tính sinh học của dược liệu. Hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trong các cao chiết được xác định tương đương hàm lượng gallic acid và quercetin với phương trình đường chuẩn y = 0,0175x + 0,0829 (R^2 = 0,9944) (đối với polyphenol) và y = 0,0148 x – 0,1296 (R^2 = 0,9913) (đối với flavonoid). Qua đồ thị đường chuẩn đã xác định được hàm lượng của flavonoid và polyphenol tổng, kết quả nghiên cứu được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng flavonoid và polyphenol có trong các cao chiết của lá chuối tiêu

Các cao chiết	Hàm lượng polyphenol, mg QE /g cao chiết	Hàm lượng flavonoid, mg GAE/g cao chiết
E100	110,18 ± 3,16^a	12,83 ± 1,25^a
EW73	52,37 ± 1,45^b	21,57 ± 1,42^b
EW55	26,47 ± 1,70^c	12,32 ± 1,35^c

Ghi chú: E100, EW73, EW55: Các cao chiết của lá chuối tiêu lần lượt với các dung môi: cồn (100%), cồn-nước (7/3), cồn-nước (5/5); GAE: Tương đương gallic acid; QE: tương đương quercetin; giá trị được tính = giá trị trung bình ± dung sai; các chữ số a, b, c trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (Tukey's test, p < *0,05).*

Từ kết quả ở Bảng 2 cho thấy, các mẫu cao chiết với các dung môi khác nhau sẽ cho kết quả hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid khác nhau một cách rõ rệt. Cụ thể, dùng dung môi cồn 100% sẽ thu được cao chiết có hàm lượng polyphenol cao nhất, đạt giá trị 110,18 mg/g. Mẫu EW73 cũng có hàm lượng polyphenol tương đối cao, đạt 52,37 mg/g cao chiết, trong khi mẫu EW55 có hàm lượng polyphenol tổng thấp nhất.

Đối với hàm lượng flavonoid, khi dùng dung môi cồn 100% hoặc cồn-nước theo tỉ lệ 5/5 sẽ cho cao chiết có hàm lượng flavonoid chênh lệch không đáng kể. Hàm lượng flavonoid cao nhất thuộc về mẫu cao chiết EW73 khi dùng hỗn hợp dung môi cồn-nước tỉ lệ 7/3.

Như vậy, với mục đích tạo cao chiết theo định hướng thu được sản phẩm giàu polyphenol sẽ sử dụng dung môi cồn 100%, với mục đích thu được sản phẩm giàu flavonoid sẽ dùng dung môi cồn-nước theo tỉ lệ 7/3. Dùng dung môi cồn-nước theo tỉ lệ 7/3 sẽ thu được cao chiết có hàm lượng flavonoid và polyphenol cao ở mức tương đối.

Kết quả sàng lọc hoạt tính sinh học của các cao chiết

Hoạt tính oxy hóa tổng và quét gốc tự do DPPH của các cao chiết lá chuối tiêu

Trong khuôn khổ đề tài này, nhóm nghiên cứu tiến hành đánh giá hoạt tính chống oxy hóa tổng của cao chiết E100, EW55, EW73 theo phương pháp phosphomolybdenum. Thí nghiệm được tiến hành đối với mẫu đối chứng dương là ascorbic acid. Trên cơ sở thực nghiệm xây dựng đường tuyến tính về sự phụ thuộc của mật độ quang vào nồng độ mẫu ở bước sóng 760 nm của các mẫu thử (số liệu tại các nồng độ 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µg/mL đã xác định được giá trị EC_{50}. Ngoài ra, nhóm nghiên cứu cũng thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH là một trong những phương pháp đánh giá hoạt tính kháng oxi hóa *in vitro* tổng thể cho mẫu nghiên cứu (Bảng 3).

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, tất cả các cao chiết từ lá chuối tiêu thu hái tại Văn Giang, Hưng Yên đều có khả năng chống oxy hóa trên hai phép thử. Đặc biệt, cao chiết E100 được chiết từ 100% cồn có hoạt tính chống oxy hóa tổng và hoạt tính quét gốc tự do tốt hơn so với các cao chiết còn lại. Đối với hoạt tính chống oxy hóa tổng theo phương pháp phosphomolybdenum, giá trị EC_{50} đối với các cao chiết E100, EW73, EW55 lần lượt là 353,19; 422,63 và 561,84 µg/mL, thể hiện hoạt tính kém hơn so với ascorbic acid. Tuy nhiên, kết quả thử nghiệm đối với gốc tự do DPPH cho kết quả rất khả quan. Giá trị EC_{50} đối với các cao chiết đều nhỏ hơn 100 µg/mL (thông thường đối với các cao chiết thô, giá trị EC_{50} nhỏ hơn 100 µg/mL được coi là có hoạt tính).

Bảng 3. Giá trị EC_{50} của hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết từ cây lá chuối tiêu

Các cao chiết	Giá trị EC_{50}, µg/mL	
	Hoạt tính chống oxy hóa tổng	Hoạt tính quét gốc tự do DPPH,
E100	353,19 ± 7,49[a]	73,48 ± 2,28[a]
EW73	422,63 ± 8,55[b]	81,53 ± 2,61[a]
EW55	561,84 ± 7,63[c]	95,49 ± 3,10[c]
Ascorbic acid	27,74 ± 1,49[d]	6,96 ± 0,22[d]

Ghi chú: E100, EW73, EW55 – các cao chiết của lá cây chuối tiêu lần lượt với các dung môi: cồn (100%), cồn-nước (7/3) và cồn-nước (5/5); giá trị được tính = giá trị trung bình ± dung sai; các chữ số a, b, c, d trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (Tukey's test, $P < 0,05$*).*

Hoạt tính kháng vi sinh vật của các cao chiết lá chuối tiêu

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định cho thấy, cao chiết E100 có hoạt tính đối với 1 chủng gram dương *Escherichia coli* ATCC25922 và 1 chủng gram âm *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 với giá trị MIC tương ứng là 128 và 256 µg/mL. Cao chiết EW73 có hoạt tính đối với chủng *Escherichia coli* ATCC25922 và chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231 với giá trị MIC như nhau là 256 µg/mL. Trong khi cao chiết EW55 chỉ có hoạt tính đối với chủng nấm *Candida albicans* ATCC10231 với giá trị MIC 256 µg/mL (Bảng 4).

Bảng 4. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các cao chiết từ lá chuối tiêu

Tên mẫu	*Enterococcus faecalis* ATCC299212[(1)]	*Staphylococcus aureus* ATCC25923[(1)]	*Bacillus cereus* ATCC14579[(1)]	*Escherichia coli* ATCC25922[(1)]	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853[(2)]	*Salmonella enterica* ATCC13076[(2)]	*Candida albicans* ATCC10231[(3)]
E100	> 256	> 256	>256	**128**	**256**	>256	>256
EW73	>256	>256	>256	**256**	>256	> 256	**256**
EW55	>256	>256	>256	>256	>256	>256	**256**
Ciprofloxacin	128	32	8	0,5	32	1	-
Cyclohexamide	-	-	-	-	-	-	32

Ghi chú: (1): gram dương, (2): gram âm, (3): nấm men

Hoạt tính ức chế sản sinh NO của các cao chiết lá chuối tiêu

Để xác định khả năng ức chế sản sinh NO, các cao chiết được thử nghiệm về tác dụng kiểm soát lipopolysaccharide (LPS) chịu trách nhiệm kích thích việc sản xuất nitric oxide (NO), việc phóng thích yếu tố hoại tử khối u α (TNF-α) và interleukin-6 (IL-6) của tế bào RAW 264.7. Các đại thực bào được xử lý với nồng độ 0,8-100 µg/mL cao chiết, kết quả thu được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Hoạt tính ức chế sản sinh nitric oxide (NO) của các cao chiết lá chuối tiêu

Nồng độ cao chiết, µg/mL	Khả năng ức chế sản sinh NO, %		
	E100	EW73	EW55
0,8	$0,72 \pm 0,03^a$	$1,40 \pm 0,11^b$	$0,89 \pm 0,03^c$
4	$8,36 \pm 0,55^a$	$12,64 \pm 0,57^b$	$12,34 \pm 0,62^c$
20	$18,49 \pm 0,82^a$	$26,93 \pm 0,93^b$	$22,44 \pm 0,69^c$
100	$78,79 \pm 0,47^a$	$95,59 \pm 1,10^b$	$87,22 \pm 1,05^c$

Ghi chú: E100, EW73, EW55 – các cao chiết của lá cây chuối tiêu lần lượt với các dung môi: cồn (100%), cồn-nước (7/3) và cồn-nước (5/5); giá trị được tính = giá trị trung bình ± dung sai; các chữ số a, b, c trong cùng một hàng thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (Tukey's test, $P < 0,05$*).*

Dựa trên phương trình hồi quy tuyến tính mối quan hệ giữa nồng độ cao chiết và khả năng ức chế sản sinh nitric oxide xác định được nồng độ ức chế 50% sự sản sinh NO (giá trị IC_{50}). Theo đó, giá trị IC_{50} của các cao chiết E100, EW73 và EW55 lần lượt là: 63,17 ± 0,98; 50,29 ± 2,64 và 54,44 ± 1,78 µg/mL. Chất đối chứng dương dexamethasone hoạt động ổn định trong thí nghiệm, thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh nictric oxide ở các nồng độ 0,8; 4; 20 µg/mL lần lượt là: 32,24; 36,88; 57,74. Giá trị IC_{50} của dexamethasone là 14,68 µg/mL.

KẾT LUẬN

Ở công trình này chúng tôi đã tạo cao chiết tổng của lá chuối tiêu, sàng lọc thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cao chiết tổng. Hiệu suất thu hồi các cao chiết ethanol (100%), cao chiết cồn - nước (7/3), cao chiết cồn - nước (5/5) lần lượt là 12,5; 9,74 và 7,83%. Kết quả sàng lọc thành phần hóa học cho thấy, trong các cao chiết đều chứa polyphenol, flavonoid và terpenoid. Trong cao chiết ethanol còn thấy sự có mặt của coumarin và saponin. Hàm lượng flavonoid và polyphenol của các cao chiết tương đối cao, đạt giá trị tương ứng trong khoảng 12,32-21,57 mg/g và 26,47-110,18 mg/g, trong đó cao chiết ethanol chứa hàm lượng polyphenol cao nhất; cao chiết cồn-nước 7/3 có hàm lượng flavonoid cao nhất. Kết quả sàng lọc hoạt tính sinh học cho thấy, các cao chiết đều thể hiện hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp phosphomolybdenum và quét gốc tự do DPPH, trong đó cao chiết E100 thể hiện hoạt tính tốt nhất. Cả ba cao chiết đều thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật yếu đối với các dòng vi sinh vật kiểm định, trong đó cao chiết E100, E73 thể hiện hoạt tính đối với 02 chủng, còn cao chiết EW55 thể hiện hoạt tính đối với duy nhất chủng nấm. Cả ba cao chiết đều thể hiện khả năng ức chế sản sinh nitric oxide, đạt giá trị 78,78; 95,59 và 87,22%% ở nồng độ 100 µg/mL lần lượt đối với ba cao chiết E100, EW73 và EW55. Giá trị IC_{50} của cả 3 cao chiết đều nhỏ hơn 100 µg/mL.

Kết quả thực nghiệm của chúng tôi cho phép đưa ra cơ sở ban đầu về việc sử dụng lá chuối trong việc bảo quản thực phẩm để bao gói các loại bánh truyền thống và các loại thực phẩm từ thịt. Việc nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các chất có trong lá chuối tiêu sẽ được thực hiện ở các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahmed OM, El-Twab SMA, Al-Muzafar HM, Amin KA, Aziz SMA, and Abdel-Gabbar M (2021). *Musa paradisiaca* L. leaf and fruit peel hydroethanolic extracts improved the lipid profile, glycemic index and oxidative stress in nicotinamide/streptozotocin-induced diabetic rats. *Vet Med and Sci,* 7(2): 500-511.

Alabi AS, Omotoso GO, Enaibe BU, Akinola OB, Tagoe CNB (2013). Beneficial effects of low dose *Musa paradisiaca* on the semen quality of male Wistar rats. *Niger Med J*, 54(2): 92-5.

Andrews JM (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 48 (1), 5-16.

Aziz SMA, Ahmed OM, EL-Twab SMA, Al-Muzafar HM, Amin KA, and Abdel-Gabbar M (2020). Antihyperglycemic Effects and Mode of Actions of *Musa paradisiaca* Leaf and Fruit Peel Hydroethanolic Extracts in Nicotinamide/Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Evid Based* Complement Alternat Med, (9276343):15.

Kappel VD, Cazarolli LH, Pereira DF, Postal B., Madoglio FA, Bus ZS, Reginatto F, Silva F (2013). Beneficial effects of banana leaves (*Musa paradisiaca*) on glucose homeostasis: Multiple sites of action. *Rev Bras de Farmacia*, 23(4):706-715.

Behiry SI, Okla MK, Alamri SA, EL-Hefny M, Salem MZ, Alaraidh IA, Al-Ghtani SM, Monroy JC, Salem AZM (2019). Antifungal and Antibacterial Activities of *Musa paradisiaca* L. Peel Extract: HPLC Analysis of Phenolic and Flavonoid Contents. *Processes*, 7(4): 215.

Boadi EO, Essuman MA, Mensah G, Ayimbissa EA, and Boye A (2021). Antimicrobial Activity against Oral Pathogens Confirms the Use of *Musa paradisiaca* Fruit Stalk in Ethnodentistry. *Evid Based* Complement Alternat Med, (10159):1-9.

Cao TH, Ninh TCV, Luc QT, Nguyen KT, Nguyen TKY, Dinh TTT, Ha TD (2023). Assessment of Antioxidant Activities, Total Phenolics, and Flavonoids of Different Extracts of Strobilanthes Schomburgkii Leaves. *J Adv Zool, 44(2), 1179-1187.*

Chang C, Yang M, Wen H, Chem J (2002). Estimation of flavonoid total content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*,10(3): 178-182.

Cheenpracha S, Park EJ, Rostama B, Pezzuto JM, Chang LC (2010). Inhibition of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine macrophage RAW 264.7 cells by the norsesterterpene peroxide, epimuqubilin A. *Marine drugs*, 8(3): 429-437.

Liao H, Banbury L, Liang H, Wang X, Lü X, Hu L, Wu J (2014). Effect of Honghua (*Flos Carthami*) on nitric oxide production in RAW 264.7 cells and *α*-glucosidase activity. *J Trad Chinese Med,* 34(3): 362-368.

Valmayor RV, Jamaluddin, SH, Silayoi B, Kusumo S, Danh LD, Pascua OC, Espino RRC. (eds.) (2000*).* Banana cultivar names and synonyms in Southeast Asia*.* n. 48 p. *https://cgspace.cgiar.org/server/api/core/bitstreams/c4134028-f51a-4e57-8d23-908dd05c0bdd/content).*

SCREENING OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF BANANA LEAF EXTRACTS HARVESTED IN VAN GIANG, HUNG YEN, VIETNAM

Nguyễn Trường Quốc Anh[1], Dương Minh Yến[2], Nguyễn Đức Huy[2], Hoàng Quốc Phương[2], Nguyen Hoang Anh[2], Trịnh Thị Thúy[2], Hà Thị Dung[3], Lục Quang Tấn[4], Cao Thị Huệ[2*]

[1]Vinschool The Harmony, Phúc Đồng, Long Biên, Hà Nội

[2]Trường Đại học Thủy lợi, 175 Tây Sơn, Đống Đa, Hà Nội

[3]Trường Đại học Công nghiệp, 298 Cầu Diễn, Nam Từ Liêm, Hà Nội

[4]Phân hiệu Đại học Thái Nguyên tại tỉnh Hà Giang, phường Nguyễn Trãi, TP Hà Giang, tỉnh Hà Giang

SUMMARY

Banana *Musa acuminata AAA* is a widely cultivated plant species in Vietnam, and its fruits are used as a daily nutritional food in countries around the world. In Vietnam, banana leaves have been traditionally used to wrap various types of cakes and processed meat products. In this study, we created extracts using different solvents (ethanol, 70% ethanol-water mixture, 50% ethanol-water mixture) (E100, EW73, EW55) and evaluated the yield, flavonoid and polyphenol contents, as well as the biological activity screening of these extracts. The yields of the three extracts were 12.5%, 9.7%, and 7.8% (*w/w*), respectively. The flavonoid content of the E100, EW73, and EW55 extracts were 110.18, 52.37, and 26.47 mg/g, while the flavonoid content gained values of 12.83, 21.57, and 12.32 mg/g, respectively. The EC_{50} values of the total antioxidant activity and DPPH free radical scavenging activity for E100, EW73, and EW55 were 353.19, 422.63, 561.84 µg/mL, and 73.48, 81.53, 95.49 µg/mL, respectively. All three extract samples demonstrated the ability to inhibit nitric oxide (NO) production, with inhibition rates ranging from 78.79% to 95.59% at a concentration of 100 µg/mL. The IC_{50} values of the E100, EW73, and EW55 were 63.17, 50.29, and 54.44 µg/mL, respectively.

Keywords: Banana leaf, biological activity, antioxidant, antimicrobial activity, inhibit NO production.

[*] Author for correspondence: Tel: 0972356688; Email: caohue@tlu.edu.vn

ĐẶC TÍNH PROBIOTIC CỦA *Bifidobacterium bifidum* BFH1 PHÂN LẬP TỪ PHÂN TRẺ SƠ SINH

Nguyễn Hoàng Minh Đức*, Nguyễn Văn Năm, Nguyễn Thị Thơm, Đào Thị Lương

Công ty Cổ phần Công nghệ Hóa sinh Việt Nam

TÓM TẮT

Probiotic là các vi sinh vật sống xâm chiếm đường ruột và mang lại những lợi ích cho sức khỏe con người và động vật. Probiotic hoàn toàn khác với các loại vi sinh vật khác ở chỗ chúng được coi là vi sinh vật "tốt" hoặc không gây bệnh ở người khỏe mạnh. Chi *Bifidobacterium* là vi khuẩn chính sống trong ruột của con người và nó có tác dụng tích cực đối với sức khỏe của vật chủ. Từ những lợi ích sức khỏe được công nhận, nó được đưa vào một số loại thực phẩm có mục đích. Mục tiêu chính của nghiên cứu này là tìm kiếm các đặc tính probiotic tiềm năng của vi khuẩn *Bifidobacterium* bản địa *sử dụng trong thực phẩm chức năng.* Trong điều kiện *in vitro*, các đặc tính probiotic và khả năng sinh enzyme của chủng vi khuẩn BfH1, phân lập từ phân trẻ sơ sinh đã được đánh giá. Chủng BfH1 được định danh là *Bifidobacterium bifidum* dựa vào phân tích trình tự gene 16S rRNA, là loài được công nhận là an toàn (GRAS). Chủng này mang các đặc tính probiotic và an toàn như: chịu muối mật (0,5%), tồn tại tốt trong điều kiện khắc nghiệt của dạ dày và ruột mô phỏng, chịu phenol (0,4%), chịu NaCl (8%), có khả năng bám dính vào các tế bào biểu mô ruột, kháng 4 loại vi sinh vật gây bệnh, nhạy cảm với 8/12 kháng sinh thử nghiệm. Ngoài ra, chủng BfH1còn có khả năng sinh nhiều loại enzyme phân giải các cơ chất giúp chuyển hoá thức ăn trong đường ruột. Chủng *Bifidobacterium bifidum* BfH1 có khả năng tồn tại tốt trong đường tiêu hóa, khả năng kết dính cao và bản chất không độc hại, cho phép nó được sử dụng như probiotic tiềm năng ứng dụng trong thực phẩm chức năng.

Từ khóa: Bifidobacterium bifidum, enzyme, *in vitro,* probiotic.

MỞ ĐẦU

Trong nhiều thế kỷ, probiotic đã được sử dụng rộng rãi trong các loại thực phẩm chức năng khác nhau, ví dụ như sữa chua, sữa, phô mai, sữa bột cho trẻ sơ sinh và thực phẩm bổ sung. Các probiotic phổ biến nhất bao gồm Lactobacilli và Bifidobacteria chủ yếu sống trong đường ruột của động vật hoặc con người (Chen *et al*., 2021). Bifidobacteria được phân lập từ phân trẻ sơ sinh bú sữa mẹ và nhiều nguồn khác nhau (nước thải, sữa lên men và các nguồn tiêu hóa kỵ khí) và thường gặp nhất có liên quan đến đường tiêu hóa của người và động vật (Chen *et al*., 2021). Bifidobacteria là các trực khuẩn gram dương, catalase âm tính.Tế bào có nhiều hình dạng khác nhau (tế bào ngắn, đều, mảnh với tế bào đầu nhọn, tế bào dài hơi uốn cong hoặc lồi lên) hoặc phân nhánh nhiều (nhọn, hơi phân nhánh, hình chùy hoặc hình thìa); có nhiều cách sắp xếp khác nhau đơn lẻ hoặc chuỗi, dạng tập hợp giống như ngôi sao hoặc được sắp xếp theo kiểu chữ "V", chữ "Y" hoặc cách sắp xếp "hàng rào" (Huidrom, Sharma, 2018). Các điều kiện sinh trưởng (nhiệt độ, pH, nồng độ oxy) của Bifidobacteria không khác nhau đáng kể giữa các chủng. Ví dụ, nhiệt độ sinh trưởng tối ưu từ 36 - 38°C và 41–43°C đối với các chủng phân lập ở người và động vật; độ pH tối ưu là pH 6,5–7,0. Hầu hết các loài Bifidobacteria là vi khuẩn kỵ khí nghiêm ngặt (Chen *et al*., 2021). Bifidobacteria có hàm lượng G+C cao (55-67 mol%) và plasmid hiếm khi được tìm thấy trong tế bào chất (ngoại trừ *B. longum*). Bifidobacteria rất khó tính về mặt dinh dưỡng. Các loài Bifidobacteria có nguồn gốc từ con người có thể sử dụng fructose, galactose và lactose. Chúng là vi khuẩn phân giải đường chính được tìm thấy trong ruột kết của con người và có thể sử dụng các oligosaccharide không tiêu hóa được trong ruột kết để tạo ra acetic acid cũng như lactic acid thông qua con đường phosphoketolase fructose-6-phosphate (*Shori, 2022*).

Bifidobacteria có một số tác dụng có lợi đối với sức khỏe của vật chủ như điều hòa miễn dịch, loại bỏ các chất gây ung thư, sản xuất vitamin, giảm táo bón, ngăn ngừa tiêu chảy và nhiễm trùng đường ruột. Chúng còn sản xuất các chất chống lại vi khuẩn có hại cho đường ruột và bảo vệ biểu mô niêm mạc chống lại sự xâm nhập của vi khuẩn gây bệnh (Huidrom, Sharma, 2018). Ngoài ra, Bifidobacteria còn chuyển hóa một số chất trong thực phẩm thành các hợp chất có hoạt tính sinh học và tăng cường một số chức năng miễn dịch, ví dụ như kích hoạt đại thực bào và tế bào lympho, sản xuất kháng thể, phản ứng phân bào ở lá lách, các mảng Peyer và chức năng của các tế bào tiêu diệt tự nhiên (*Shori, 2022).*

Ngày nay, thực phẩm bổ sung có chức năng probiotic có xu hướng ngày càng tăng trên thị trường. Trong đó, các loài Bifidobacteria cũng được sử dụng khá phổ biến trong nhiều loại sản phẩm thực phẩm chức năng cũng như các dạng thuốc. Hầu hết các loài Bifidobacteria hiện đang được nghiên cứu và sử dụng đều an toàn, không có tác dụng phụ đối với sức khỏe. Vì vậy, có thể kết luận chắc chắn rằng các loài Bifidobacteria có tiềm năng lớn làm probiotic (Yakoob, Pradeep, 2019).

Ở Việt Nam, có rất ít các nghiên cứu về vi khuẩn Bifidobacteria bản địa, (nhất là *Bifidobacterium bifidum*) dùng trong sản xuất thực phẩm chức năng, thường là dùng các sản phẩm hoặc chủng nhập ngoại. Với mục đích tìm kiếm và làm giàu các chủng bản địa có đặc tính probiotic dùng trong sản xuất thực phẩm chức năng, chúng tôi thực hiện các nghiên cứu đánh giá đặc tính probiotic tiềm năng của vi khuẩn *Bifidobacterium bifidum* BfH1 phân lập từ phân trẻ sơ sinh.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn BfH1 được phân lập từ phân trẻ sơ sinh 20 ngày tuổi và được lưu giữ tại Công ty CP Công nghệ Hóa sinh Việt Nam.

Vi sinh vật kiểm định: *Escherichia coli* VTCC 10482, *Micrococcus luteus* VTCC 10644, *Salmonella enterica* VTCC 10480, *Staphylococcus aureus* VTCC 10658, nhận từ Bảo tàng Giống chuẩn Việt Nam (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Phương pháp

Điều kiện sinh trưởng của vi khuẩn

Chủng BfH1 được nuôi trên môi trường MRS-Cys, bao gồm:MRS (g/L: peptone-10,0; `Lab-Lemco' powder-8,0; yeast extract-4,0; glucose-20,0, tween 80-1,0 mL; K_2HPO_4-2,0; CH_3COONa-$3H_2O$-5,0; triammonium citrate-2,0; $MgSO_4.7H_2O$-0,2; $MnSO_4.4H_2O$-0,05; agar-10; pH 6,2 ± 0,2; Oxoid) bổ sung 0,05% (w/v) cysteine (Sigma), ủ kỵ khí ở 37°C trong 36 đến 72 giờ. Các chủng vi khuẩn kiểm định được nuôi trên môi trường NA (g/L: peptone-5,0; `Lab-Lemco' powder-1,0; yeast extract-2,0; NaCl-5,0; agar-15,0; pH 7,4 ± 0,2; Oxoid), ủ hiếu khí ở 37^oC trong 24 giờ.

Phân loại

Xác định trình tự gene 16S rRNA: Tách chiết, khuếch đại và xác định trình tự gene 16S rRNA theo phương pháp của Gabor và đồng tác giả (2003). So sánh mức độ tương đồng cao nhất về trình tự gene 16S rRNA của chủng vi khuẩn nghiên cứu so với các chủng chuẩn đã công bố trên Genbank bằng công cụ Blast. Trình tự gene 16S rRNA của chủng vi khuẩn được gửi lên trang web của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (NCBI).

Đánh giá đặc tính probiotic

Khả năng chịu muối mật của chủng BfH1 được đánh giá theo mô tả của Huidrom và Sharma (2018) với một chút thay đổi, nuôi trên đĩa thạch môi trường MRS-Cys có bổ sung oxgall ở các nồng độ: 0,0%, 0,3%, 0,5% và 1% (w/v); Quan sát khả năng sinh trưởng trên đĩa thạch.

Khả năng tồn tại (CFU/mL) của chủng BfH1 trong điều kiện đường tiêu hóa (GI) mô phỏng đã được thực hiện theo mô tả của Campana và đồng tác giả (2017) sau khi qua dạ dày, tá tràng và hồi tràng.

Khả năng chịu phenol và NaCl được thực hiện trên môi trường dịch MRS- Cys với nồng độ NaCl: 5, 8 và 12% (w/v); phenol (0,1; 0,2 và 0,4 %), ủ yếm khí trong 48 giờ ở 37^oC, quan sát độ đục (Huidrom, Sharma, 2018).

Khả năng tự kết tụ của chủng vi khuẩn BfH1 được xác định theo Campana và đồng tác giả (2017).

Tính kỵ nước trên bề mặt tế bào được thực hiện theo Huidrom và Sharma (2018) thử nghiệm trên dung môi xylen.

Khả năng kháng các vi sinh vật kiểm định được thực hiện theo phương pháp phủ thạch trên 4 loại vi khuẩn kiểm định (Astó *et al*., 2022).

Thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh được tiến hành bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch MRS-Cys với các khoanh kháng sinh (Himedia, Mumbai) theo mô tả của Huidrom và Sharma (2018), bao gồm amoxicillin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10µg), kanamycin (30µg), nalidixic acid (30 µg), ofloxacin (5 µg), oxacillin (5 µg), rifampicin (5 µg), penicillin G (10 units), tetracycline (30µg), vancomycin (30 µg).

Khả năng sinh enzyme ngoại bào

Khả năng sinh enzyme ngoại bào (amylase, chitinase, cellulase, pectinase,protease và xylanase) được định tính bằng phương pháp thỏi thạch chứa 0,1% cơ chất (tinh bột, chitin, carboxymethyl cellulose-CMC, pectin, casein và xylan) theo mô tả của Eldy và đồng tác giả (2021).

Các kết quả là trung bình cộng của 3 lần thí nghiệm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Probiotic được coi là thực phẩm chức năng vì chúng mang lại những lợi ích sức khỏe tích cực cho vật chủ khi ăn vào với một lượng nhất định. Một số yêu cầu phải được các chủng đáp ứng để trở thành probiotic hiệu quả. Chủng này phải có nguồn gốc từ con người để ứng dụng cho con người, vi khuẩn phải tồn tại qua đường tiêu

hóa, nghĩa là chúng phải tồn tại cả dạ dày và axit mật và phải có hoạt động kháng khuẩn chống lại mầm bệnh. Tiềm năng probiotic của các chủng vi khuẩn khác nhau ngay cả trong cùng một loài cũng khác nhau. Các chủng khác nhau của cùng một loài luôn là duy nhất. Vì vậy, việc đánh giá các đặc tính probiotic của chủng vi khuẩn là cần thiết để lựa chọn probiotic (Huidrom, Sharma, 2018).

Phân loại chủng vi khuẩn BfH1

Chủng vi khuẩn BfH1 phân lập từ phân trẻ sơ sinh, được phân loại dựa vào phân tích trình tự gene16S rRNA. Trên cơ sở trình tự thu được, chủng BfH1 được xác định là *Bifidobacterium bifidum* bằng cách so sánh trình tự của nó với các trình tự các chủng chuẩn sẵn có trong cơ sở dữ liệu GenBank, sử dụng công cụ online BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Trình tự gene16S rRNA của chủng BfH1 tương đồng cao nhất (100 %) và có quan hệ họ hàng gần nhất với chủng chuẩn *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521.Trình tự 1.375 bp gene16S rRNA của *Bifidobacterium bifidum* BfH1 đã được lưu giữ trên Genbank với mã số PP783528 tại NCBI. Đây là loài an toàn (GRAS) và sản phẩm của loài này được liệt kê vào danh mục các chất an toàn được dùng trong thực phẩm do Cơ quan quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) và Cơ quan quản lý an toàn thực phẩm châu Âu (EFSA) cho phép sử dụng.

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc cộng sinh với các loài Bifidobacteria mang lại nhiều tác dụng có lợi cho sức khỏe con người. Trong số các loài Bifidobacteria liên quan đến đường ruột của con người, có đặc điểm di truyền khác nhau đáng kể ở cấp loài, *Bifidobacterium bifidum* khác biệt ở chỗ nó được tìm thấy trong ruột người từ trẻ sơ sinh đến người già. Loài này có khả năng đã thích nghi để làm suy giảm hiệu quả các chuỗi carbohydrate có nguồn gốc từ vật chủ, chẳng hạn như oligosacaride sữa mẹ (HMO) và chất nhầy *O* - glycan, giúp cho sự xâm chiếm theo chiều dọc của ruột. *B. bifidum* giải phóng mono- và disacaride khỏi glycan của vật chủ và giải phóng chúng vào các môi trường sống hoặc môi trường nuôi cấy *in vitro.* Nhờ những đặc điểm này, *B. bifidum* có thể hỗ trợ sự phát triển của các vi khuẩn Bifidobacteria khác bằng cách chia sẻ các sản phẩm phân giải glycan trong cộng đồng. *B. bifidum* là loài xuất hiện phổ biến trong ruột của động vật có vú. Loài này có đặc tính bám dính vào niêm mạc được tạo ra bởi sự hiện diện của pili phụ thuộc vào loại enzyme, có thể liên quan đến gắn glycan của hydrolase glycoside ngoại bào. Ngoài sự tương tác giữa vi khuẩn với vi khuẩn, các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng *B. bifidum* có hoạt động điều hòa miễn dịch bằng cách tạo ra các tế bào T điều hòa bằng tương tác vi khuẩn-vật chủ với các polysaccharide bề mặt tế bào của nó (Katoh *et al*., 2020). *B. bifidum* là thành viên duy nhất trong số tất cả các loài Bifidobacteria được công nhận có khả năng phát triển nhờ chuyển hóa chất nhầy. Sự chuyển hóa chất nhầy do *B. bifidum* thực hiện có thể kích hoạt việc tăng cường sản xuất chất nhầy, do đó tăng cường độ sâu của lớp chất nhầy bao bọc niêm mạc và do đó, tăng cường chức năng hàng rào biểu mô. Nhiều chủng *B. bifidum* đã được mô tả là có tác dụng có lợi, bao gồm các đặc tính kháng khuẩn chống lại mầm bệnh như *Helicobacter pylori*, giảm apoptosis trong niêm mạc ruột của trẻ sinh non bị ảnh hưởng bởi viêm ruột hoại tử, thay đổi hệ thống miễn dịch vật chủ và giảm bớt các hoạt động viêm liên quan đến một số rối loạn chức năng đường ruột mãn tính. Các chủng *B. bifidum* probiotic tồn tại tốt trong đường tiêu hóa và có thể xâm chiếm ruột người và do đó tác động đến cộng đồng vi khuẩn cư trú trong đường ruột. Một đặc điểm đáng chú ý khác được thể hiện ở các *B. bifidum* là khả năng thay thế và cạnh tranh với mầm bệnh (Turroni *et al*., 2019).

Đặc tính probiotic của chủng BfH1

Khả năng chịu mật được coi là một đặc điểm quan trọng của các chủng probiotic, giúp chúng tồn tại, phát triển và phát huy tác dụng trong quá trình vận chuyển qua đường tiêu hóa. Trong nghiên cứu này, chủng BfH1 sinh trưởng tốt trên đĩa thạch ở nồng độ muối mật ở 0,5% (Bảng 1). Nghiên cứu của Huidrom và Sharma (2018) phân lập Bifidobacteria từ sữa mẹ, 40/47 chủng phân lập có khả năng sống sót ở muối mật 0,3%. Chủng *B. bifidum* CECT 7366 có tỷ lệ sống 62,78% ở nồng độ muối mật ở 3% (Chenoll *et al*., 2011). Tất cả 5 chủng *B. bifidum* phân lập từ phân trẻ sơ sinh đều tăng trưởng ở nồng độ dịch mật 0,5 % (w/v) sau 3 giờ tiếp xúc (Ali, Doumandjia, 2018). Trong đường tiêu hóa của con người, nồng độ muối mật được cho là 3000 ppm (0,3%), được coi là quan trọng và đủ cao để sàng lọc các chủng kháng mật (Huidrom, Sharma, 2018).

Khả năng sống sót của chủng BfH1 trong điều kiện dịch dạ dày và ruột mô phỏng được đánh giá. Qua dạ dày mô phỏng (pepsine lợn và pH 2,5) sau 165 phút, số lượng tế bào của chủng BfH1 giảm so với ban đầu (từ 8,92 log CFU/mL còn 8,54 log CFU/mL). Chuyển sang điều kiện ở tá tràng mô phỏng (dịch chiết mật lợn và pancreatin lợn, pH 6,5) sau 3 giờ, số lượng tế bào còn 8,21 log CFU/mL. Sau điều kiện hồi tràng mô phỏng (6 giờ, pH 6,5), số lượng tế bào tăng lên 8,68 log CFU/mL (Bảng 1). Kết quả này cũng tương tự ở chủng *B. bifidum* W23*,* số lượng tế bào qua dạ dày giảm (9,23 log CFU/mL) so với ban đầu (9,51 log CFU/mL); đi qua tá tràng, số lượng tế bào giảm còn 9,12 log CFU/mL và tăng nhẹ (9,16 log CFU/mL) sau khi qua hồi tràng mô phỏng (Campana *et al*., 2017). Khả năng chịu dịch dạ dày mô phỏng (pepsin trong HCl, pH 2,0) của 7 chủng *B. bifidum phân lập từ phân trẻ sơ sinh* sau 3 giờ có tỷ lệ sống sót đạt 69,32-116,25% (Zhang *et al*., 2023). Trong khi đó, chủng *B. bifidum* CECT 7366 có tỷ lệ sống sót sau 2 giờ qua dạ dày (pepsin, pH3) là 9%, và sau 4 giờ qua ruột (pancreatin, pH8) là 7% (Chenoll *et al*., 2011). Những dữ liệu trên cho thấy khả năng tiềm tàng của BfH1 có thể tồn tại một cách hiệu quả khi di chuyển qua đường tiêu hóa.

Khả năng tự kết tụ là xác định khả năng của một chủng vi khuẩn tương tác với chính nó, theo cách không đặc hiệu và được biết đến như một điều kiện tiên quyết cho sự xâm chiếm và lây nhiễm đường tiêu hóa của mầm

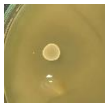
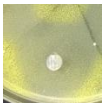
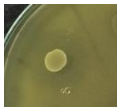
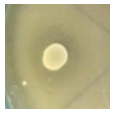
bệnh thông qua khả năng bám dính (Huidrom, Sharma, 2018). Chủng *B. bifidum* BfH1 có tỷ lệ kết tụ 66,7% (Bảng 1). Kết quả này, cũng tương đồng với các báo cáo trước đây, tỷ lệ tự kết tụ ở 4 chủng Bifidobacteria phân lập từ sữa mẹ (Smk4 Smk5, Smk9 và Dbs18) sau 24 giờ đạt 43,9-70,8 (Huidrom, Sharma, 2018). Bảy chủng *B. bifidum* phân lập từ phân trẻ sơ sinh, có tỷ lệ tự kết tụ từ 30,36-90,72% sau 6 giờ (Zhang *et al*., 2023). Chủng *B. bifidum* W23 có tỷ lệ tự kết tụ 21,37% sau 6 giờ (Campana *et al*., 2017). Trong nghiên cứu này, chủng BfH1 cho thấy khả năng tự kết tụ tương đối cao, có thể cho phép nó tồn tại với số lượng đủ và xâm chiếm đường tiêu hóa.

Kiểm tra khả năng bám dính của probiotic với pha kỵ nước của dung môi (khả năng kỵ nước bề mặt) là cần thiết để xác định khả năng bám dính của vi khuẩn vào niêm mạc ruột, ngăn chặn mầm bệnh bám vào ruột và làm ô nhiễm hệ tiêu hóa (Goudarzi *et al*., 2024). Kết quả bảng 1 cho thấy giá trị kỵ nước trên bề mặt tế bào của chủng BfH1 là 52,6% trên dung môi xylene. Tương tự với các nghiên cứu khác, giá trị kỵ nước của 4 chủng Bifidobacteria trong nghiên cứu của Huidrom và Sharma (2018) từ 28,4–56,8% trên xylene. Giá trị kỵ nước của 4 chủng vi khuẩn lactic phân lập từ sữa chua lên men nằm trong khoảng từ 53,3–73,2% trên xylene và 51,4–67,1% trên toluene (Goudarzi *et al*., 2024). Kết quả này cho thấy chủng BfH1 có tính kỵ nước cao và có khả năng bám vào lớp biểu mô ruột.

Khả năng kháng phenol là một đặc tính đặc trưng của probiotic vì phenol có thể được hình thành trong ruột bởi vi khuẩn khử amin một số axit amin thơm được cung cấp qua chế độ ăn uống hoặc được sản xuất bởi các protein nội sinh (Huidrom, Sharma, 2018). Trong thử nghiệm kháng phenol, sinh trưởng của chủng BfH1 không thay đổi nhiều khi thay đổi nồng độ phenol từ 0-0,2%; giảm đi khi nồng độ phenol tăng lên 0,4% (Bảng 1). Trong nghiên cứu của Huidrom và Sharma (2018) trên 4 chủng Bifidobacteria phân lập từ sữa mẹ (Smk4 Smk5, Smk9 và Dbs18) có thể sinh trưởng ở phenol 0,4% với giá trị OD_{600} từ 0,31-0,5.

Trong kết quả thử nghiệm NaCl ở Bảng 1, chủng BfH1 có thể sinh trưởng trên môi trường NaCl 8%. Trong nghiên cứu khác, cả bốn chủng Bifidobacteria phân lập đều có thể chịu NaCl tới 12% (Huidrom, Sharma, 2018). Chủng Bifidobacterium bifidum CECT 7366 có tỷ lệ sống sót 12,17% ở nồng độ NaCl 10% (Chenoll et al., 2011). Khả năng phát triển ở nồng độ muối cao rất quan trọng đối với probiotic vì chúng có thể ức chế sự phát triển của mầm bệnh.

Bảng 1. Một số đặc tính probiotic của *B. bifidum* BfH1

<table>
<tr><td rowspan="2">Chịu muối mật</td><td colspan="12">Sinh trưởng trên muối mật (%)</td></tr>
<tr><td colspan="3">0</td><td colspan="3">0,3</td><td colspan="3">0,5</td><td colspan="3">1,0</td></tr>
<tr><td></td><td colspan="3">+</td><td colspan="3">+</td><td colspan="3">+</td><td colspan="3">-</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Khả năng tồn tại trong điều kiện đường tiêu hóa mô phỏng</td><td colspan="12">Số lượng tế bào sống sót (Log CFU/mL)</td></tr>
<tr><td colspan="3">Ban đầu</td><td colspan="3">Đi qua dạ dày</td><td colspan="3">Đi qua tá tràng</td><td colspan="3">Đi qua hồi tràng</td></tr>
<tr><td colspan="3">8,92</td><td colspan="3">8,54</td><td colspan="3">8,21</td><td colspan="3">8,68</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Tự kết tụ và Tính kị nước</td><td colspan="6">Tự kết tụ (%)</td><td colspan="6">Tỷ lệ kị nước (%) trên xylene</td></tr>
<tr><td colspan="6">66,7</td><td colspan="6">52,6</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Chịu phenol và NaCl</td><td colspan="4">Sinh trưởng (OD_{600}) ở nồng độ phenol (%)</td><td colspan="4">Sinh trưởng (OD_{600}) ở nồng độ NaCl (%)</td></tr>
<tr><td colspan="2">0</td><td colspan="2">0,2</td><td colspan="2">0,4</td><td colspan="2">5</td><td colspan="2">8</td><td colspan="2">12</td></tr>
<tr><td colspan="2">1,84</td><td colspan="2">1,67</td><td colspan="2">0,62</td><td colspan="2">1,72</td><td colspan="2">0,93</td><td colspan="2">-</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Khả năng chịu kháng sinh</td><td colspan="12">Vòng kháng chất kháng sinh (mm)</td></tr>
<tr><td>AMO</td><td>CLO</td><td>ERY</td><td>GEN</td><td>KAN</td><td>NAL</td><td>OFL</td><td>OXA</td><td>RIF</td><td>PEN</td><td>TET</td><td>VAN</td></tr>
<tr><td>28</td><td>32</td><td>26</td><td>7</td><td>13</td><td>0</td><td>9</td><td>29</td><td>25</td><td>30</td><td>27</td><td>17</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định</td><td colspan="12">Vòng kháng vi sinh vật kiểm định (mm)</td></tr>
<tr><td colspan="3">Esc</td><td colspan="3">Mic</td><td colspan="3">Sal</td><td colspan="3">Sta</td></tr>
<tr><td colspan="3">19</td><td colspan="3">25</td><td colspan="3">18</td><td colspan="3">13</td></tr>
<tr><td colspan="3">  </td><td colspan="3">  </td><td colspan="3">  </td><td colspan="3">  </td></tr>
</table>

Ghi chú: "+": sinh trưởng; "-": không sinh trưởng; AMO-amoxicillin, CLO-cloramphenicol, ERY-erythromycin, GEN-gentamycin, KAN-Kanamycin, NAL-nalidixic acid, OFL-ofloxacin, OXA-oxacillin, RIF-Rifampicin; PEN- penicillin G, TET- tetracyclin, VAN-vancomycin; Esc-*Escherichia coli* VTCC 10482, Mic-*Micrococcus luteus* VTCC 10644, Sal-*Salmonella enterica* VTCC 10480, Sta-*Staphylococcus aureus* VTCC 10658.

Mối lo ngại về khả năng lây lan của các yếu tố quyết định kháng kháng sinh từ vi khuẩn được sử dụng trong các sản phẩm probiotic. Việc kiểm tra độ nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn lactic acid (LAB) và Bifidobacteria có thể được khuyến khích để kiểm tra độ an toàn sinh học của các chủng probiotic tiềm năng (Huidrom, Sharma, 2018). Trong nghiên cứu này, chủng *B. bifidum* BfH1 nhạy cảm với 8 loại kháng sinh thử nghiệm ở các mức độ khác nhau với các vòng kháng từ 17-32 mm (Bảng 1) và kháng với 4 loại kháng sinh (Gentamycin, kanamycin, nalidixic acid và ofloxacin). Điều này phù hợp với báo cáo của Huidrom và Sharma (2018) sàng lọc độ nhạy cảm với kháng sinh trên 15 chủng Bifidobacteria phân lập từ sữa mẹ, cho thấy tất cả các chủng phân lập đều nhạy cảm với rifampicin, chloramphenicol, amoxycillin và tetracycline; 13 chủng nhạy cảm với erythromycin; 13 chủng nhạy cảm với penicillin và 9 chủng nhạy cảm với oxacillin. Có 14 chủng kháng vancomycin, 13 chủng kháng nalidixic acid, 10 chủng kháng kanamycin, 10 chủng kháng ofloxacin, 8 chủng kháng gentamicin. Trong khi *B. bifidum* W23 có khả năng kháng oxacillin, penicillin, cefoxitin; kháng trung bình với amoxicillin, gentamicin, cefotaxime và nhạy cảm với các loại kháng sinh ampicillin, fusidic axit, erythromycin, cloramphinicol, streptomycin (Ali, Doumandjia, 2018). Độ nhạy cảm với kháng sinh của *B. bifidum* CECT 7366 không có giá trị MIC cao hơn ngưỡng EFSA quy định đối với 20 chất kháng sinh (Chenoll *et al*., 2011). Trong nghiên cứu của Kim và đồng tác giả (2018) về khả năng kháng kháng sinh của 10 chủng Bifidobacteria dùng cho sản xuất probiotic thương mại cho thấy tất cả đều nhạy cảm với ampicillin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, penicillin G, rifampicin và vancomycin (MIC dao động từ 0,01 đến 4 µg/mL), thường kháng với các kháng sinh gentamicin, kanamycin, neomycin và streptomycin (MIC dao động từ >32 µg/mL). Giá trị MIC của *B. bifidum* BGN4 và *B. longum* BORI, ngoại trừ gentamicin và tetracycline, bằng hoặc thấp hơn giá trị ngưỡng EFSA đã được thiết lập do Hội đồng phụ gia và sản phẩm hoặc chất sử dụng trong thức ăn chăn nuôi của EFSA đề xuất. Nghiên cứu về khả năng chuyển giao kháng kháng sinh đã được tiến hành để xác nhận bản chất của tình trạng kháng gentamicin và tetracycline của 2 chủng này. Kết quả cho thấy khả năng kháng gentamicin của *B. bifidum* BGN4 và khả năng kháng gentamicin và tetracycline của *B. longum* BORI không được chuyển sang các chủng nhận, đồng thời cho rằng khả năng kháng kháng sinh của chúng là nội tại. Điều đáng chú ý là một báo cáo năm 2011 do Cơ quan Nghiên cứu và Chất lượng Y tế (AHRQ) công bố đã xem xét rộng rãi 622 nghiên cứu về sáu chi (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*, *Enterococcus* và *Bacillus*), và không tìm thấy bằng chứng lâm sàng nào về khả năng chuyển gen từ probiotic sang các vi sinh vật khác về mặt lý thuyết (Kim *et al*., 2018).

Bifidobacteria có thể chống lại sự xâm nhập của một số mầm bệnh trong đường ruột của con người, điều này có ý nghĩa rất lớn trong việc duy trì sức khỏe cơ thể và bảo vệ cân bằng nội môi đường ruột. Vì vậy, việc đánh giá khả năng kháng khuẩn của nhóm vi khuẩn này là đặc biệt quan trọng (Zhang *et al*., 2023). Trong nghiên cứu này, khả năng kháng các mầm bệnh Gram dương và Gram âm của chủng BfH1 được xác định bằng phương pháp phủ thạch. Kết quả bảng 1, chủng *B.bifidum* BfH1 ức chế sinh trưởng của tất cả 4 loại vi khuẩn kiểm định với các vòng kháng từ 13-25 mm. Tương tự, *Bifidobacterium longum* KABP042 và *Pediococcus pentosaceus* KABP041 phân lập từ phân trẻ sơ sinh cũng kháng tất cả các vi khuẩn kiểm định (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteric* subsp. *enterica* serovar *typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* và *Enterococcus faecalis*) với vòng kháng 0,7-2,6 mm (KABP041) và 0,6-1,7 mm (KABP042) bằng phương pháp phủ thạch (Astó *et al*., 2022). *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 có giá trị ức chế *Helicobacter pylori* với đường kính ức chế trung bình là 6,59 mm từ dịch nuôi và ức chế sinh trưởng 81,94% trong môi trường lỏng (Chenoll *et al*., 2011). Kết quả trong nghiên cứu của Huidrom và Sharma (2018) cho thấy không phải tất cả Bifidobacteria có trong sữa mẹ đều có đặc tính kháng khuẩn, chỉ có 4 chủng Smk4 và Smk5, Smk9 và Dbs18 kháng với tất cả các mầm bệnh thử nghiệm (*E. coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella boydii*) với đường kính vòng kháng 6-13 mm. Có 9/10 chủng chủng Bifidobacteria phân lập từ phân trẻ sơ sinh kháng *Escherichia coli* ATCC 25922 với đường kính vòng kháng từ 10,67-13,67 mm. Nhiều loài Bifidobacteria khác nhau có thể tạo ra các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn, bao gồm axit hữu cơ (acetic, lactic và butyric), các hợp chất có trọng lượng phân tử thấp và peptide kháng khuẩn (bacteriocin) (Zang *et al*., 2023).

Khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng BfH1

Kết quả bảng 2 cho thấy chủng BfH1 có khả năng sinh các enzyme ngoại bào phân giải các cơ chất, được thể hiện qua các vùng quầng sáng xung quanh các thỏi thạch: CMC (cellulase), chitin (chitinase), pectin (pectinase), tinh bột (amylase), và xylan (xylanase) với đường kính từ 8-14 mm và không phân giải casein (protease). Nghiên cứu của EL-Sayed và đồng tác giả (2022) cho thấy *Lactobacillus acidophilus* SAM1 sinh lipase (11 mm), *Lactiplantibacillus plantarum* SAM2 sinh protease và amylase thấp (4mm và 3mm), ngoài các đặc tính probiotic. Cả hai chủng *P. pentosaceus* KABP041 và *B. longum* KABP042 đều không sinh gelatinase phân giải gelatin (Astó *et al*., 2022). Quá trình sản xuất các enzyme liên quan đến quá trình tiêu hóa các loại đại phân tử khác nhau như polysaccharide, lipid, protein... Việc sản xuất tại chỗ các enzyme này trong ruột vật chủ có thể đóng một vai trò tích cực trong việc cải thiện quá trình tiêu hóa thức ăn.Từ kết quả này cho thấy khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng *B. bifidum* BfH1 rất đa dạng, đây là đặc điểm quý với các chủng *Bifidobacterium* sử dụng trong sản xuất các sản phẩm dùng cho con người.

Bảng 2. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng BfH1

Vòng phân giải cơ chất (mm)					
Casein	Chitin	CMC	Pectin	Tinh bột	Xylan
0	14	12	8	10	11

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu *in vitro*, chủng vi khuẩn BfH1 phân lập từ phân trẻ sơ sinh mang đầy đủ các đặc tính probiotic: là loài *Bifidobacterium bifidum* an toàn, có khả năng tồn tại tốt trong các điều kiện khắc nghiệt của đường tiêu hóa, chịu phenol, chịu NaCl, có khả năng bám dính vào tế bào biểu mô ruột; kháng một số loại vi sinh vật gây bệnh, nhạy cảm với nhiều kháng sinh, sinh các enzyme ngoại bào phân giải các cơ chất hữu cơ. *Bifidobacterium bifidum* BfH1có thể là ứng cử viên tiềm năng để trở thành probiotic sử dụng trong thực phẩm chức năng. Cần có các nghiên cứu sâu hơn để cho thấy hiệu quả ở người và động vật.

Lời cảm ơn: *Các tác giả cảm ơn Công ty CP Hóa Sinh Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện công trình này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ali IH, Doumandjia A (2018). Characterization and screening of the potential probiotic lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* strains isolated of different biotopes. *Mediterr J Nutr Metab*, 11: 145–173.

Astó E, Huedo P, Altadill T, Aguiló García M, Sticco M, Perez M, Espadaler-Mazo J (2022). Probiotic Properties of *Bifidobacterium longum* KABP042 and *Pediococcus pentosaceus* KABP041 Show Potential to Counteract Functional Gastrointestinal Disorders in an Observational Pilot Trial in Infants. *Front Microbiol*, 12:741391.

Campana R, van Hemert S, Baffone W (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathog*, 9(12).

Chen J, Chen X, Ho CL (2021). Recent Development of Probiotic *Bifidobacteria* for Treating Human Diseases. *Front Bioeng Biotechnol*, 9: 770248.

Chenoll E, Casinos B, Bataller E, Astals P, Echevarrı ´a J, Iglesias JR, Balbarie P, Ramo´n D, Genove ´s S (2011). Novel Probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 Strain Active against the Pathogenic Bacterium *Helicobacter pylori. Appl Environ Microbiol,* 77(4): 1335–1343.

Eldy J, Daquioag L, Penuliar GM (2021). Isolation of Actinomycetes with Cellulolytic and Antimicrobial Activities from Soils Collected from an Urban Green Space in the Philippines.*Int J Microbiol*, 2021: 14.

Garbor EM, de Vries EJ, Janssen DB (2003). Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirection methods. *FEMS Microbiol Ecol,* 44(2):153-163.

Goudarzi F, Kiani A, Nami Y, Shahmohammadi A, Mohammadalipour A, Karami A, Haghshenas B (2024). Potential probiotic *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KUMS-Y33 suppresses adipogenesis and promotes osteogenesis in human adipose-derived mesenchymal stem cell. *Sci Rep*,14:9689.

Huidrom S, Sharma N (2018). "Isolation and Screening of Novel Isolates of Bifidobacteria from Human Milk as Potential Probiotic with Antidiarrheal Activity". *Ann Appl Microbiol Biotech J*, 2(1): 1007-1015.

Kim MJ, Ku S , Kim SY, Lee HH, Jin H, Kang S, Li R, Johnston TV, Park MS, Ji GE (2018). Safety Evaluations of *Bifidobacterium bifidum* BGN4 and *Bifidobacterium longum* BORI. *Int J Mol Sci*, 19(5): 1422.

Katoh T, Ojima MN, Sakanaka M, Ashida H, Gotoh A, Katayama T (2020). Enzymatic Adaptation of *Bifidobacterium bifidum* to Host Glycans, Viewed from Glycoside Hydrolyases and Carbohydrate-Binding Modules. *Microorganisms, 8*(4): 481.

Shori MB (2022). Application of *Bifidobacterium* spp. in beverages and dairy food products: an overview of survival during refrigerated storage. *Food Sci Technol*, 42(9).

Turroni F, Duranti S, Milani C, Lugli GA, van Sinderen D, Ventura M (2019). *Bifidobacterium bifidum*: A Key Member of the Early Human Gut Microbiota. *Microorganisms*, 7(11): 544.

Yakoob R, Pradeep BV (2019). *Bifidobacterium* sp. as Probiotic Agent - Roles and Applications. *J Pure Appl Microbiol*, 13(3): 1407-1417.

Zhang G, Sun H, Xu Z, Tan Z, Xiao L, He M, Shang J, Tsapieva AN, Zhang L (2023). Screening of Bifidobacteria with Probiotic Potential from Healthy Infant Feces by Using 2′-Fucosyllactose. *Foods,*12(4): 858.

PROBIOTIC PROPERTIES OF *Bifidobacterium bifidum* BFH1 ISOLATED FROM INFANTS FECES

Nguyen Hoang Minh Duc*, Nguyen Van Nam, Nguyen Thi Thom, Dao Thi Luong

Vietnam Biochemical Technology Joint Stock Company

SUMMARY

Probiotics are live microorganisms that colonize the gut and supply helpful benefits. Probiotics are completely different from other varieties of microorganism in that they are considered "good" microorganism or non-pathogenic in healthy individuals. Genus *Bifidobacterium* is the primary microbe that colonizes human channel, and it has positive health effects on its host. Because of the acknowledged health benefits, it is included in several purposeful foods. The main objective of this study was to search for potential probiotic properties of native Bifidobacteria for use in functional foods. The probiotic properties and enzyme-producing ability of bacterial strain BfH1, isolated from infants feces, were evaluated *in vitro*. Strain BfH1 was identified as *Bifidobacterium bifidum* based on 16S rRNA gene sequence analysis, which is on the Generally Recognized As Safe (GRAS). Probiotic and safety properties of this strain were demonstrated: bile salt tolerance (0.5%), survives well in harsh conditions of simulated stomach and intestine, phenol tolerance (0.4%), NaCL tolerance (8%), adherence to intestinal epithelial cells, growth inhibition of 4 pathogenic bacteria, sensitive to 8/12 tested antibiotics. In addition, strain BfH1 producing multy- enzymes break down substrates to help convert food in the intestine. Therefore, the good survive through the gastrointestinal tract, high adhesion and non-toxic nature of the *Bifidobacterium bifidum* BfH1 mean that it can be used as potential probiotic in functional food.

Keywords: Bifidobacterium bifidum, enzyme, in vitro, probiotic.

* Author for correspondence: Tel: 0902254556; Email: duc.nhm@bccgroup.com.vn

KHẢO SÁT MỘT SỐ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC CAO CHIẾT THU ĐƯỢC TỪ SINH KHỐI *Cordyceps militaris* CMT01

Võ Thị Xuyến[1]*, Phạm Ngọc Châu[1], Hồ Ngọc Gia Hân[1], Hồ Văn Thảo[2], Nguyễn Hoàng Đăng Khoa[3], Đinh Minh Hiệp[4]

[1]Khoa Công nghệ Ứng Dụng, Trường Đại học Văn Lang, Thành phố Hồ Chí Minh

[2]Văn phòng Ủy ban nhân dân tỉnh Sóc Trăng - Phòng Nông nghiệp - Tài nguyên

[3]Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

[4]Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Cordyceps militaris là loài nấm ký sinh côn trùng, phân bố rộng khắp nơi. Nhiều nghiên cứu cho thấy đây là loài nấm có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học cao, được sử dụng tốt cho mục đích thương mại và ứng dụng. Tuy nhiên, ở nước ta hiện chưa có nhiều nghiên cứu đi sâu tìm hiểu về thành phần hoạt chất, hoạt tính sinh học (HTSH) của cao chiết thu được từ sinh khối sợi nấm *C. militaris*. Do vậy, nghiên cứu này tập trung khảo sát một số HTSH của các cao chiết thu được từ sinh khối *C. militaris* CMT01 nhằm tạo cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn, hướng tới ứng dụng cao chiết của nấm này trong việc chăm sóc sức khỏe. Cao chiết ngấm kiệt bằng ethanol 96% (EtOH) từ sinh khối sợi nấm được chiết lỏng - lỏng để thu được cao phân đoạn ether dầu hỏa (PE), ethyl acetat (EtOAc), n-butanol (Bu) và nước; Cao polysaccharide (PS) thu được từ bã nguyên liệu sau khi chiết ngấm kiệt bằng ethanol 96%. Kết quả khảo sát cho thấy, cao chiết $EtOA_C$ thể hiện khả năng bắt gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) và $ABTS^+$ (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) đạt cao nhất với IC_{50} lần lượt là 728 ± 39,15 µg/mL và 1.244 ± 13,99 µg/mL, cao EtOH có khả năng kháng viêm cao nhất với IC_{50} đạt 526,09 ± 1,51 µg/mL và cao PS thể hiện khả năng ức chế XO cao nhất với IC_{50} đạt 22,69 ± 0,72 µg/mL.

Từ khóa: Cordyceps militaris, kháng oxy hóa, kháng viêm, sinh khối sợi nấm, ức chế xanthine oxydase (XO).

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cordyceps là nấm ký sinh trên côn trùng, được sử dụng trong y học Cổ truyền Trung Quốc từ rất lâu. Có nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học (HTSH) được tìm thấy từ *Cordyceps* như adenosine, cordycepin, polysaccharide , sterol, acid amin, vitamin,… Nhiều nghiên cứu cho thấy cao chiết từ sinh khối nấm *Cordyceps* thể hiện đa dạng các HTSH bao gồm: Hoạt tính kháng oxy hóa, kháng tế bào ung thư, điều hòa miễn dịch, kháng khuẩn, kháng viêm,…(Yue *et al.*, 2013). Trong số các loài nấm ký sinh trên côn trùng thì *Ophiocordyceps sinensis* (*Cordyceps sinensis* - Đông trùng hạ thảo) và *Cordyceps militaris* (Nhộng trùng thảo) được nghiên cứu và ứng dụng nhiều nhất. Mặc dù *C. sinensis* là loài được sử dụng như loại dược liệu quý nhưng phân bố rất hạn chế trong tự nhiên và không dễ dàng nuôi cấy trong điều kiện nhân tạo. Trong khi *C. militaris*, phân bố rộng rãi khắp nơi, có hàm lượng các hoạt chất có HTSH tương đương, thậm chí còn cao hơn của loài *C. sinensis;* hơn nữa dễ dàng nuôi trồng trong môi trường nhân tạo (Dong *et al.*, 2012). Do vậy, từ lâu *C. militaris* được sử dụng hiệu quả như là chủng thay thế cho *C. sinensis* trong việc ngăn ngừa và điều trị nhiều loại bệnh (Guo *et al.*, 2016).

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về nuôi cấy thu quả thể và sinh khối sợi nấm từ *C. militaris*; đồng thời, cũng có nhiều nghiên cứu tiến hành xác định các thành phần hoạt chất, HTSH của cao chiết thu được từ quả thể hoặc sinh khối nấm *C. militaris;* từ đó, tạo ra nhiều sản phẩm hỗ trợ sức khỏe. Ở nước ta, đã có các nghiên cứu về nuôi trồng tạo quả thể *C. militaris* (Lê Văn Vẻ *et al.*, 2015; Nguyễn Minh Đức *et al.*, 2017); về khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ sấy và chế độ ngâm chiết tới sự biến đổi thành phần hóa học và cảm quan của giá thể sau thu hoạch từ *C. militaris* của Nguyễn Thị Thanh Thủy và đồng tác giả (2017). Bên cạnh đó, có một số báo cáo về xây dựng quy trình chiết xuất cordycepin và adenosine từ *C. militaris* (Lê Thị Huyền Trang *et al.*, 2017; Đoàn Thị Phương Thúy *et al.*, 2018). Tuy nhiên, vẫn chưa có nhiều nghiên cứu đi sâu tìm hiểu về thành phần hoạt chất, hoạt tính sinh học của cao chiết thu được từ sinh khối sợi nấm *C. militaris.* Do đó, nghiên cứu này tập trung khảo sát một số HTSH của các cao chiết từ sinh khối *C. militaris*, tạo cơ sở cho những nghiên cứu sâu hơn hướng tới ứng dụng cao chiết từ loài nấm này trong chăm sóc sức khỏe.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng nấm *Cordyceps militaris* CMT01 do Công ty TNHH Nấm sinh học Việt Nam cung cấp.

Môi trường nuôi cấy: Khoai tây 200 g/L, sucrose (≥ 99,5%, Trung Quốc) 60 g/L, pepton (≥ 98%, Trung Quốc) 10 g/L, $K_2HPO_4.3H_2O$ (≥ 99%, Trung Quốc) 0,655 g/L và pH 6 (Trần Nguyễn Phúc Nhàn *et al.*, 2020). Môi trường (Potato Glucose Agar) PGA dùng để cấy truyền và bảo quản giống.

Hóa chất: Ethanol (96%, Việt Nam), PE (petroleum ether, 60-90%, Trung Quốc), EtOAc (ethylacetate, 99,5%, Trung Quốc), BuOH (n-Butanol, 99%, Đức), H_2SO_4 (98%, Trung Quốc), phenol (99%, Trung Quốc), saccharose (≥ 99,5% Trung Quốc), $ABTS^+$ (≥ 98%, Đức), vitamin C (≥ 98%, Việt Nam), DMSO (≥ 99,9%, Trung Quốc), DPPH (>95%, Đức), methanol (99,5%, Trung Quốc), diclofenac (99,8%, Việt Nam), albumin huyết thanh bò (≥ 98%, Đức), K_2HPO_4 (98,5%, Trung Quốc), KH_2PO_4 (99,5%, Trung Quốc), xanthine oxidase (≥ 99,5%, Đức), allopurinol (>99,5%, Đức),...

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị giống

Nuôi cấy *C. militaris* CMT01 trên môi trường PGA và ủ ở nhiệt độ 20 ± 2^oC. Sau 7 ngày, dùng dụng cụ vô trùng lấy khối thạch (5 mm) có hệ sợi nấm chuyển vào bình tam giác 250 mL có chứa 100 mL môi trường Potato Glucose (PG - khoai tây 200 g, glucose 20 g/1 lít nước cất) vô trùng, nuôi cấy ở 20 – 25 ^oC trong 7 ngày. Tiến hành đồng nhất dịch nuôi cấy bằng que vô trùng trước khi đưa vào môi trường nuôi cấy.

Nuôi cấy và thu sinh khối sợi nấm

Sử dụng phương pháp nuôi cấy bề mặt trong điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh. Giống sau khi được chuẩn bị, tiến hành chuyển 6% dịch giống vào các hộp 500 mL có chứa 200 mL môi trường nuôi cấy (Trần Nguyễn Phúc Nhàn *et al.*, 2020) đã được vô trùng. Ủ nuôi trong tối, ở 25^oC. Sau 42 ngày, thu sinh khối sợi nấm bằng cách lọc qua giấy lọc Whatman No.1, rửa với nước cất, đem sấy ở 60 – 70^oC đến trọng lượng không đổi. Thí nghiệm bố trí 10 lít (50 hộp), lặp lại ít nhất 3 lần.

Thu nhận cao chiết từ sinh khối nấm

Chiết phân đoạn để thu nhận cao chiết được thực hiện theo Nguyễn Kim Phi Phụng (2007). Bột sinh khối *C. militaris* CMT01 được chiết ngấm kiệt với EtOH 96%, sau đó cô cạn dịch chiết bằng thiết bị cô quay Eyela SB1000 ở 55^oC; khi đã bay hơi hầu hết dung môi, tiếp tục đem sấy trong tủ Memmert ở 55^oC cho đến khi bay hơi hết dung môi, thu được cao EtOH (cao tổng). Cao EtOH tiếp tục được chiết phân đoạn bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng với các dung môi PE, EtOAc, BU và nước; cô quay để thu được cao PE, cao EtOAc, cao BU và cao nước. Bã nguyên liệu lại được chiết kiệt với nước nóng ở nhiệt độ 65^oC, tủa dịch chiết với cồn 96% theo tỷ lệ 1:4 thu được cao PS.

Định lượng một số hợp chất

Định lượng polysaccharide dựa trên phản ứng màu đặc trưng bởi đường với sự hiện diện của phenol và acid sulfuric đậm đặc. Đo độ hấp thu màu của dung dịch ở bước sóng 490 nm (Nielsen, 2009). Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Định lượng adenosine và cordycepin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) tại Trung tâm Kiểm nghiệm TSL - Công ty TNHH Khoa học TSL.

Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa (KOH)

Khả năng bắt gốc tự do DPPH: Các chất KOH có khả năng trung hòa DPPH tự do tạo thành sản phẩm khử DPPH-H, dung dịch chuyển từ màu tím sang màu vàng cam, đo độ hấp thu quang ở bước sóng 517 nm. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần (Zheng *et al*., 2008).

Khả năng bắt gốc tự do $ABTS^+$: Các hợp chất có tính KOH tác dụng với dung dịch chứa $ABTS^+$, $ABTS^+$ sẽ bị khử thành dạng không màu ABTS - R^+ làm giảm giá trị hấp thu tại bước sóng 734 nm. Dựa vào tính chất này để xác định khả năng bắt gốc tự do $ABTS^+$ của mẫu phân tích. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần (Mamta *et al*., 2015).

Khảo sát khả năng kháng viêm

Hoạt tính kháng viêm được thực hiện dựa trên khảo sát ức chế biến tính albumin trong *in vitro* của Trần Quốc Tuấn và đồng tác giả (2014) với diclofenac là chứng dương. Cao chiết được xác định khả năng kháng viêm thông qua hoạt động ức chế sự biến tính protein khi giữ hỗn hợp phản ứng ở 67°C trong 3 phút. Mẫu được đo độ hấp thu quang phổ ở bước sóng 660 nm. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Khảo sát hoạt tính ức chế XO

XO xúc tác quá trình oxy hóa hypoxanthine thành xanthine và oxy hóa xanthine thành uric acid, đồng thời hình thành gốc tự do O^{2-}. Uric acid có bước sóng hấp thụ cực đại tại 290 nm. Nếu mẫu thử có khả năng kháng XO càng cao sẽ hạn chế sự hình thành uric acid, do đó sẽ giảm giá trị mật độ quang. Mẫu có chất thử được so sánh với mẫu không có chất thử để đánh giá tác dụng ức chế XO của chất thử. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần (Huỳnh Thư *et al.*, 2017).

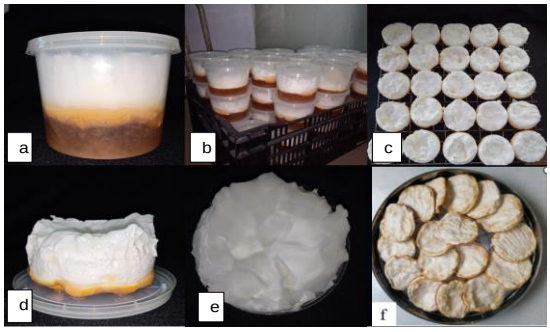
Xử lý số liệu

Các kết quả được lặp lại và tính giá trị trung bình. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2016 và SPSS 20.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu nhận sinh khối sợi nấm

Nấm *C. militaris* CMT01 được nuôi cấy trong môi trường lỏng tĩnh. Sau 42 ngày, tiến hành thu nhận sinh khối sợi nấm. Lượng sinh khối khô thu được từ 1 lít và 54 lít môi trường nuôi cấy là 23,75 g và 1.260 g. Lượng sinh khối nấm này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo về chiết cao để thử nghiệm các hoạt tính sinh học.



Hình 1. Sinh khối của C. militaris CMT01 sau 42 ngày nuôi cấy

a, b: C. militaris CMT01 trong môi trường lỏng sau 42 ngày nuôi cấy;
c,d: sinh khối tươi sau thu hoạch;
e: mặt trên của sinh khối tươi; f: sinh khối khô sợi nấm

Trích ly và thu nhận cao chiết

Sử dụng ethanol 96% để chiết xuất và thu cao tổng từ sinh khối sợi nấm *C. militaris* CMT01. Kết quả cho thấy hàm lượng cao EtOH thu được đạt 13,36 ± 0,58% (Bảng 1). Từ cao EtOH, tiếp tục chiết phân đoạn bằng các loại dung môi có độ phân cực tăng dần như PE, EtOAc, BU và nước để thu được các cao tương ứng. Kết quả cho thấy, hàm lượng cao PE đạt 7,98 ± 0,29%, hàm lượng cao nước đạt 3,46 ± 0,15%, hàm lượng cao Bu đạt 2,16 ± 0,10% và thấp nhất là hàm lượng cao EtOAc chỉ với 0,31 ± 0,01%. Điều này chứng tỏ, sinh khối nấm *C. militaris* CMT01 có chứa nhiều hợp chất không phân cực, chứa ít hợp chất có độ phân cực trung bình. Hàm lượng cao PS thu được sau trích ly đạt 15,36 ± 0,71%, cao này chứa các hợp chất có khả năng hòa tan tốt trong nước.

Bảng 1. Hàm lượng cao chiết thu được từ sinh khối *C. militaris* CMT01

STT	Loại cao		Hàm lượng cao (%)	Độ ẩm (%)
1	**EtOH**		13,36 ± 0,58	1,03
2	**Cao phân đoạn**	**PE**	7,98 ± 0,29	1,06
3		**EtOAc**	0,31 ± 0,01	5,81
4		**Bu**	2,16 ± 0,10	2,15
5		**Nước**	3,46 ± 0,15	2,85
6	**Cao PS**		15,36 ± 0,71	2,08

Ghi chú: Hàm lượng cao EtOH, cao PS tính theo nguyên liệu và các cao phân đoạn tính theo cao EtOH từ C. militaris CMT01

Định lượng một số hợp chất

Tiến hành xác định các hợp chất chính có HTSH như adenosine, cordycepin và polysaccharide từ sinh khối *C. militaris* CMT01 và các mẫu cao chiết. Kết quả định lượng được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2 cho thấy, hàm lượng polysaccharide từ sinh khối khô đạt 72,91 ± 3,52 mg/g. Trong số các cao chiết, hàm lượng polysaccharide đạt cao nhất là cao BU (866,28 ± 41,16 mg/g), kế đến là cao PS (810,47 ± 38,52 mg/g); cao PE có hàm lượng polysaccharide đạt mức thấp nhất. Bảng trên cũng cho thấy, sinh khối sợi nấm và cao EtOH có chứa adenosine và cordycepin. Trong đó, hàm lượng adenosine của cao EtOH đạt 684 ± 33 mg/kg, gấp khoảng 2,5 lần so với sinh khối sợi nấm (267 ± 12 mg/kg). Tương tự, hàm lượng cordycepin của cao EtOH (43,712 ± 1.01 mg/kg) gấp khoảng 4,1 lần so với sinh khối khô (10.460 ± 140 mg/kg). Khi so với nghiên cứu của Huang và đồng tác giả (2015) về hàm lượng cordycepin (50 mg/kg) và adenosine (2,560 mg/kg) từ *C. militaris* cho thấy mẫu sinh khối nấm này có hàm lượng adenosine cao hơn nhiều lần nhưng hàm lượng cordycepin lại thấp hơn rất nhiều so với mẫu sinh khối *C. militaris* CMT01. Trong công bố khác, Chiang và đồng tác giả (2017) đã chỉ ra hàm lượng cordycepin và adenosine của sinh khối *C. militaris* đạt lần lượt là 3,970 mg/kg và 950 mg/kg; qua đó cho thấy, hàm lượng cordycepin thu được từ sinh khối *C. militaris* CMT01 là cao hơn nhưng hàm lượng adenosine lại có phần thấp hơn. Sự khác biệt này có thể do chủng sử dụng trong nuôi cấy, thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy…

Bảng 2. Hàm lượng polysaccharid, adenosin và cordycepin trong các mẫu khảo sát

Mẫu khảo sát	Polysaccharide (mg/g)	Adenosine (mg/kg)	Cordycepin (mg/kg)
Sinh khối khô	72,91 ± 3,52[a]	267 ± 12[a]	10.460 ± 140[a]
Cao EtOH	736,32 ± 35,62[e]	684 ± 33[b]	43.712 ± 1.01[b]
Cao PE	485,55 ± 21,28[b]	-	-
Cao EtOAc	675,15 ± 32,15[d]	-	-
Cao Bu	**866,28 ± 41,16[g]**	-	-
Cao nước	590,29 ± 27,51[c]	-	-
Cao PS	810,47 ± 38,52[f]	-	-

Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị TB ± ĐLC để đánh giá sự khác biệt về mặt ý nghĩ thống kê với p<0,05; (-) không thực hiện khảo sát.

Khả năng bắt gốc tự do DPPH và ABTS$^+$

Khả năng bắt gốc tự do DPPH, ABTS$^+$ được dựa trên độ hấp thụ cực đại tại bước sóng 517 nm và 734 nm với chứng dương là vitamin C, cao PS không tan trong MeOH nên không tiến hành khảo sát khả năng bắt gốc tự do DPPH. Kết quả được thể hiện bằng giá trị IC_{50} (Bảng 3).

Bảng 3. Khả năng bắt gốc tự do DPPH và ABTS$^+$ của các cao chiết từ sinh khối *C. militaris* CMT01

Mẫu cao chiết	Giá trị IC_{50} DPPH (µg/mL)	Giá trị IC_{50} ABTS$^+$ (µg/mL)
Cao EtOH	911 ± 7,07[b]	3,356 ± 81,66[e]
Cao PE	3,703 ± 27,56[d]	5,838 ± 113,47[f]
Cao EtOAc	728 ± 39,15[a]	1,244 ± 13,99[a]
Cao Bu	700 ± 14,60[a]	1,518 ± 6,53[b]
Cao nước	1,030 ± 12,15[c]	2,965 ± 47,68[d]
Cao PS	-	1,795 ± 34,83[c]
Vitamin C (chứng dương)	4,67 ± 0,04	99,51 ± 0,18
DMSO 5% (chứng âm) có phần trăm ức chế I(%)	0,72 ± 0,003%	0,32 ± 0,002%

Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị TB ± ĐLC để đánh giá sự khác biệt về mặt ý nghĩ thống kê với p<0,05; (-) không thực hiện khảo sát.

Kết quả từ Bảng 3 cho thấy, tất cả các mẫu cao đều có khả năng bắt gốc tự do DPPH. Trong đó, cao Bu và cao EtOAc có khả năng bắt gốc tự do DPPH mạnh nhất với giá trị IC_{50} nhỏ nhất lần lượt là 700 ± 14,60 µg/mL và 728 ± 39,15 µg/mL. Trong khi cao PE có giá trị IC_{50} lớn nhất (3.703 ± 27,56 µg/mL), nghĩa là khả năng bắt gốc tự do DPPH kém nhất. Kết quả cũng cho thấy cao EtOH và cao nước có thể hiện khả năng bắt gốc tự do DPPH nhưng ở mức không cao. Tương tự, khi khảo sát khả năng bắt gốc tự do ABTS$^+$, nhận thấy cao EtOAc có khả năng bắt gốc tự do ABTS$^+$ mạnh nhất với IC_{50} là 1.244 ± 13,99 µg/mL, kế đến là cao Bu (1.518 ± 6,53 µg/mL) và thấp nhất là cao PE (5.838 ± 113,47 µg/mL).

Nhìn chung, các cao chiết từ sinh khối nấm *C. militaris* CMT01 đều có khả năng KOH ở cả hai phương pháp thử nghiệm tuy mức độ khác nhau. Trong đó cao EtOAc và cao Bu có giá trị IC_{50} nhỏ hơn so với các cao chiết còn lại, tức là khả năng KOH mạnh hơn; chứng tỏ hai phân đoạn này có chứa các hợp chất có khả năng KOH cao.

Kết quả đạt được có phần tương đồng với một số công bố; trong đó, cao chiết nước từ hệ sợi của *C. militaris* (Kim *et al.,* 2015), cao chiết nước và các cao EtOH từ *C. sinensis* (Mamta *et al.*, 2015) thể hiện được khả năng bắt gốc tự do DPPH và ABTS$^+$. Hơn nữa, khi so sánh với nghiên cứu của Won và Park (2005) về khả năng bắt gốc tự do DPPH, thì mẫu cao EtOH 70% từ sợi nấm *C. militaris* (IC_{50} là 26 mg/mL) thấp hơn nhiều so với mẫu cao EtOH từ *C. militaris* CMT01. Tuy nhiên, cao nước từ *C. militaris* CMT01 lại có hoạt tính bắt gốc tự do DPPH (IC50 là 1.030 ± 12,15 µg/mL) thấp hơn so với cao nước từ hệ sợi của *C. militaris* (IC50 là 318 ± 0,021 µg/mL) (Kim *et al.*, 2015) và cao nước từ *C. pseudomilitaris* DL0015 (IC_{50} là 362,71 ± 4,70 µg/mL) (Xuyến *et al.,*2018).

Khả năng kháng viêm

Các mẫu cao chiết được khảo sát khả năng ức chế biến tính albumin dưới tác dụng của nhiệt độ. Kết quả khảo sát được thể hiện qua Bảng 4.

Bảng 4. Khả năng kháng viêm của các cao chiết từ sinh khối *C. militaris* CMT01

Mẫu cao chiết	IC_{50} (µg/mL)
Cao EtOH	526,09 ± 1,51[a]
Cao PE	949,96 ± 18,86[b]
Cao EtOAc	1.283,67 ± 31,52[d]
Cao Bu	3.121,27 ± 37,28[e]
Cao nước	Không có hoạt tính
Cao PS	1.035,43 ± 22,88[c]
Diclofenac (chứng dương)	48,05 ± 2,07
DMSO 5% (chứng âm) có phần trăm ức chế I(%) = 0,63 ± 0,02	

Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị TB ± ĐLC để đánh giá sự khác biệt về mặt ý nghĩ thống kê với p<0,05.

Kết quả cho thấy, cao EtOH có khả năng kháng viêm cao nhất với giá trị IC_{50} là 526,09 ± 1,51 µg/mL, kế đến là cao PE (949,96 ± 18,86 µg/mL) và thấp nhất là cao Bu (IC_{50} là 3.121,27 ± 37,28 µg/mL), trong khi cao nước không thể hiện hoạt tính kháng viêm. Như vậy, có thể thấy cao EtOH và cao PE có chứa các hợp chất tạo được liên kết với protein và tạo nên cấu trúc ổn định để bảo vệ protein khỏi sự biến tính bởi nhiệt. Kết quả thu được tương đồng với nghiên cứu của Lâm Khắc Kỷ và đồng tác giả (2021) khi cũng chỉ ra cao EtOH và cao PE có khả năng chứa những hợp hợp chất ức chế sự biến tính protein. Hơn nữa, Lê Quốc Phong và đồng tác giả (2020) cũng nhận định rằng các hoạt chất có độ phân cực thấp có khả năng kháng viêm cao.

Khả năng ức chế xanthine oxidase (XO)

Tiến hành khảo sát khả năng ức chế enzym XO của các mẫu cao chiết ở các nồng độ khác nhau. Kết quả khảo sát dựa trên giá trị IC_{50} và được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Khả năng ức chế XO của các cao chiết từ sinh khối *C. militaris* CMT01

Mẫu cao chiết	IC_{50} (µg/mL)
Cao EtOH	363,93 ± 5,56[e]
Cao PE	200,64 ± 5,97[c]
Cao EtOAc	420,20 ± 17,10[f]
Cao Bu	280,51 ± 1,49[d]
Cao nước	169,67 ± 5,04[b]
Cao PS	22,69 ± 0,72[a]
Allopurinol (chứng dương)	99,42 ± 0,75
DMSO 5% (chứng âm) có phần trăm ức chế I(%) = 0,59 ± 0,02	

Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị TB ± ĐLC để đánh giá sự khác biệt về mặt ý nghĩ thống kê với p<0,05.

Bảng 5 cho thấy, cao PS có giá trị IC_{50} thấp nhất (22,69 ± 0,72 µg/mL), nghĩa là khả năng ức chế XO cao nhất. Tiếp đó là cao nước, cao PE, cao Bu và cao EtOH có giá trị IC_{50} lần lượt là 169,67 ± 5,04 µg/mL, 200,64 ± 5,97 µg/mL, 280,51 ± 1,49 µg/mL và 363,93 ± 5,56 µg/mL. Khả năng ức chế XO của cao EtOAc kém nhất với giá trị IC_{50} là 420,20 ± 17,10 µg/mL. Qua đó, cho thấy khả năng ức chế hoạt động của XO chủ yếu từ các mẫu cao có độ phân cực mạnh (cao nước) và độ phân cực yếu (cao PE). Nghiên cứu của Huỳnh Thư và đồng tác giả (2017) cho thấy, cao PE của *O. sinensis* thể hiện hoạt tính ức chế XO cao nhất đạt 26,21 ± 0,52% tại nồng độ 250 µg/mL, tuy nhiên nhóm tác giả không đưa ra giá trị IC_{50}. Bên cạnh đó, Yin và đồng tác giả (2018) cho thấy các polysaccharide từ *C. militaris* có hoạt tính ức chế XO, trong khi cao chiết EtOH không thể hiện hoạt tính ức chế XO ở nồng độ 0,5 - 3,0 mg/mL và cao nước có hoạt tính ức chế XO rất thấp (<10%).

KẾT LUẬN

Từ kết quả khảo sát cho thấy, mẫu cao $EtOA_C$ thể hiện khả năng bắt gốc tự do DPPH và $ABTS^+$ đạt cao nhất với giá trị IC_{50} lần lượt là 728 ± 39,15 µg/mL và 1.244 ± 13,99 µg/mL. Trong khi đó, cao EtOH có khả năng ức chế kháng viêm cao nhất với IC_{50} đạt 526,09 ± 1,51 µg/mL. Thêm vào đó, mẫu cao PS thể hiện khả năng ức chế hoạt động của XO cao nhất với IC_{50} đạt 22,69 ± 0,72 µg/mL. Kết quả thu được là cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn, hướng tới ứng dụng cao chiết từ sinh khối sợi nấm *C. militaris* CMT01 trong chăm sóc sức khỏe.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chiang SS, Liang ZC, Wang YC, Liang CH (2017). Effect of Light-Emitting Diodes on The Production of Cordycepin, Mannitol and Adenosine in Solid-State Fermented Rice by *Cordyceps militari. Journal of Food Composition and Analysis,* 60: 51-56.

Dong JZ, Lei C, Ai XR (2012). Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* Link and analysis on its main active components. *Appl Biochem Biotechnol*, 166: 1215-1224.

Đoàn Thị Phương Thúy, Trần Thị Ngọc Ánh, Nguyễn Thị Mai (2018). Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện tách chiết đến hiệu quả thu nhận hoạt chất cordycepin từ nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris* Linn. Link). *Tạp chí khoa học Đại học mở TP HCM*, Tập 61, Số 4: 13-20.

Guo M, Guo S, Huaijun Y, Bu N, Dong C, (2016). Comparison of major bioactive compounds of the caterpillar medicinal mushroom, *Cordyceps militaris* (Ascomycetes), Fruiting bodies bultured on wheat substrate and pupae. *Int J Med Mushrooms*, 18(4): 327-336.

Huỳnh Thư, Vũ Anh Tùng, Nguyễn Trọng Hiếu, Đặng Ngọc Hồng Cẩm, Đinh Minh Hiệp (2017). Nghiên cứu hoạt tính ức chế xanthine oxidase của một số cao chiết từ nấm dược liệu. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên Và Công nghệ,* Tập 33, Số 2S: 192-198.

Huang SJ, Lin CP, Mau JL, Li YS, Tsai SY (2015). Effect of UV-B Irradiation on Physiologically Active Substance Content and Antioxidant Properties of the Medicinal Caterpillar Fungus *Cordyceps militaris* (Ascomycetes). *Int J Med Mushrooms,* 17(3): 241-253.

Kim YS, Kim EK, Hwang JW, Han YK, Kim SE, Jeong JH, Moon SH, Jeon BT, Park PJ (2015). Radical scavenging activities of Undaria pinnatifida extracts fermented with *Cordyceps militaris* mycelia. *J Microbiol Biotechnol,* 25(6): 820-827.

Lê Thị Huyền Trang, Lê Minh Hoàng, Nguyễn Duy Bắc, Ngô Xuân Trình, Phạm Văn Hiển, Nguyễn Thị Thu Hằng, Vũ Bình Dương (2017). Nghiên cứu xây dựng quy trình chiết xuất adenosin và cordycepin từ đông trùng hạ thảo nuôi cấy (*Cordyceps militaris*). *Tạp chí Dược học,* Tập 57, Số 492: 24-28.

Lê Văn Vẻ, Trần Thu Hà, Nguyễn Thị Bích Thùy và Ngô Xuân Nghiễn (2015). Bước đầu nghiên cứu công nghệ nuôi trồng nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris* L. ex Fr) ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, Tập 13, Số 3: 445-454.

Lâm Khắc Kỷ, Lê Thị Kim Cương, Văn Thị Xuân Thương, Đinh Minh Hiệp, Ngô Đại Hùng (2021). Hoạt tính kháng oxy hóa và kháng viêm in vitro của cao chiết nấm *Cordyceps takaomontana* DL0038A phân lập tại Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Đại học Thủ Dầu Một,* Tập 2*,* Số 51.

Lê Quốc Phong, Nguyễn Hoàng Đăng Khoa, Đặng Tú Quyên, Nguyễn Tài Hoàng, Đinh Minh Hiệp, Ngô Kế Sương (2020). Đánh giá hoạt tính kháng viêm, kháng khuẩn và ức chế enzyme α-glucosidase *in vitro* của nấm *Ophiocordyceps sinesis* giàu selen, *Tạp chí Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam*, Tập 62, Số 8.

Mamta P, Mehrotra S, Amitabh, Kirar V, Vats P, Nandi SP, Negi PS, Misra K (2015). Phytochemical and antimicrobial activities of Himalayan *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. *Indian J Exp Biol,* 53(1): 36-43.

Nielsen S S (2009). Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. *Food Analysis Laboratory Manual*, pp. 47 – 53.

Nguyễn Kim Phi Phụng (2007). *Phương pháp cô lập các hợp chất hữu cơ*. NXB Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Nguyễn Thị Thanh Thủy, Phí Quyết Tiến (2017). Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy và chế độ ngâm chiết tới sự biến đổi thanh phần hóa học và cảm quan của giá thể sau thu hoạch đông trùng hạ thảo. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam,* Tập 7, Số 80: 52-56.

Trần Quốc Tuấn, Lê Thị Oanh, Đinh Minh Hiệp và Ngô Đại Nghiệp (2014). Chuẩn hóa mô hình sàng lọc Invitro các hợp chất kháng viêm dựa trên khả năng ức chế biến tính albumin bò do nhiệt. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ,* Tập 52: 532-538.

Võ Thị Xuyến, Phan Thị Loan, Vương Lợi, Đinh Minh Hiệp, Trương Bình Nguyên, Ngô Kế Sương (2018). Khảo sát khả năng kháng oxy hóa của cao chiết từ sinh khối hệ sợi *Cordyceps pseudomilitaris* DL0015. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, 457-462.

Won SY, Park EH (2005). Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *J Ethnopharmacol,* 96(3): 555-561.

Yin C, Fan X, Fan Z, Shi D, Gao H (2018). Effects of Various Treatments on Extraction of The Main Bioactive Components and Determination of Biological Activity of Extracts from The Caterpillar Medicinal Mushroom *Cordyceps militaris* (Ascomycetes). *Int J Med Mushrooms,* 20(9): 873-885.

Yue K, Ye M, Zhou Z, Sun W, Lin X (2013). The genus *Cordyceps*: a chemical and pharmacological review. *J Pharm Pharmacol* 65 (4): 474-493.

Zheng LP, Gao LW, Zhou JQ, Sima YH, Wang JW (2008). Antioxidant activity of aqueous extract of a *Tolypocladium* sp. fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis*. *Afr J Biotechnol,* 7(17): 3004-3010.

STUDY ON BIOLOGICAL ACTIVITIES OF BIOMASS EXTRACTS FROM *Cordyceps militaris* CMT01

Vo Thi Xuyen[1*], Pham Ngoc Chau[1], Ho Ngoc Gia Han[1], Ho Van Thao[2], Nguyen Hoang Dang Khoa[3], Dinh Minh Hiep[4]

[1]*Faculty of Applied Technology, Van Lang University, Ho Chi Minh City*

[2]*Office of the People's Committee of Soc Trang province - Department of Agriculture - Natural Resources*

[3]*University of Natural Sciences - Vietnam National University, Ho Chi Minh City*

[4]*Department of Agriculture and Rural Development of Ho Chi Minh City*

SUMMARY

Cordyceps militaris is a species of insect-parasitic fungus with a wide distribution. Many studies have shown that this species can produce many compounds with high biological activity, which can be used for commercial and application purposes. However, in Vietnam, there have been few in-depth investigations to learn about the active ingredients and biological activities of extracts obtained from *C. militaris* mycelium biomass. Therefore, this study focuses on investigating some biological activities of extracts obtained from *C. militaris* CMT01 biomass to create a basis for further research, aiming to apply extracts of this species in health care. The exhausted extraction with ethanol 96% (EtOH) from mycelium biomass by liquid-liquid extraction method to obtain petroleum ether extract (PE), ethyl acetate extract (EtOAc), n-butanol extract (Bu) and water extract. Polysaccharide extract (PS) was obtained from raw material residue after exhausted extraction with 96% ethanol. The results showed that EtOAC extract showed the highest ability to scavenge DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and $ABTS^+$ (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) free radicals with IC_{50} values of 728 ± 39.15 µg/mL and 1.244 ± 13.99 µg/mL, respectively, EtOH extract has the highest ability to anti-inflammatory with an IC_{50} value of 526.09 ± 1.51 µg/mL, and the PS extract showed the highest ability to inhibit the activity of the enzyme XO (Xanthine oxidase) with IC_{50} value of 22.69 ± 0.72 µg/mL.

Keywords: Cordyceps militaris, anti-oxidant, anti-inflammatory, mycelial biomass, inhibits xanthine oxidase (XO).

[*] Author for correspondence: Tel: 0933757447; Email: xuyen.vt@vlu.edu.vn

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG Endo-β-1,4-glucanase CHIẾT XUẤT FUCOIDAN TỪ *Sargassum* sp. VÀ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH SINH HỌC

Nguyễn Thị Minh Nga[1], Nguyễn Trâm Anh[2], Võ Thị Hồng Ngân[2], Phan Thị Thúy Hằng[3], Đặng Thị Thanh Hà[4], Trần Thúy Lan[1], Trương Thị Phương Lan[5], Nguyễn Đức Chung[2], Nguyễn Đức Huy[1*]

[1]*Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế*

[2]*Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*

[3]*Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế*

[4]*Trường Đại học Tây Nguyên*

[5]*Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế*

TÓM TẮT

Fucoidan là một polysaccharide sunfat có ở tảo được ứng dụng trong các ngành công nghiệp dược phẩm, thực phẩm và mỹ phẩm. Quá trình chiết xuất các hoạt chất sinh học từ tảo bằng enzyme được chứng minh hiệu quả vì chúng làm suy giảm thành tế bào mà không ảnh hưởng đến các thành phần bên trong. Nghiên cứu này đã xác định điều kiện thủy phân tối ưu của rong mơ *Sargassum* sp. bằng endo-β-1,4-glucanase để thu nhận fucoidan. *Sargassum* sp. xử lý với endo-β-1,4-glucanase ở tỷ lệ 1/25 (w/v) cho lượng fucoidan thu được lớn nhất tương ứng 0,0026g. Khảo sát điều kiện chiết suất cho thấy fucoidan thu được cao nhất ở điều kiện nhiệt độ 50°C, thời gian chiết suất 24 giờ. Hiệu suất chiết fucoidan bằng endo-β-1,4-glucanase cao gấp 2,8 lần so với phương pháp hóa học sử dụng HCl 0,1 M. Fucoidan thu được có khả năng ức chế vi khuẩn *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus.* Kết quả nghiên cứu này là tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về tách chiết fucoidan từ rong mơ và các loại rong biển khác sử dụng enzyme để thủy phân, từ đó ứng dụng trong các ngành thực phẩm, dược phẩm.

Từ khóa: Chiết xuất dựa trên enzyme, *endo-β-1,4-glucanase*, fucoidan, kháng khuẩn, *Sargassum*.

MỞ ĐẦU

Rong mơ *Sargassum* là loại rong giàu các chất có hoạt tính sinh học, thành phần chính của rong mơ là các polysaccharide (cellulose, alginate, laminaran, fucoidan), ngoài ra còn có mannitol, gibberellin, cytokinin,…và nhiều loại vitamin (Vũ Ngọc Bội *et al*., 2015). Fucoidan là một polysaccharide sunfat có trong thành tế bào của rong mơ *Sargassum* với nhiều công dụng như chống đông máu, kháng vi-rút, chống ung thư, chống viêm và chống oxy hóa (Hanjabam *et al*., 2019; Alboofetileh *et al*., 2019; Rhein-Knudsen *et al*., 2023). Fucoidan có thể được chiết xuất từ rong biển bằng nhiều quy trình và các giai đoạn khác nhau bằng cách sử dụng các phương pháp hóa học, vật lý và enzyme nhưng vẫn giữ được các đặc tính sinh học tự nhiên (Suprunchuk, 2019).

Chiết xuất dựa trên enzyme (EAE) là một phương pháp xanh sử dụng các enzyme thủy phân tế bào như protease, cellulase, hemicellulase,… (Heo *et al*., 2005). Chiết xuất fucoidan từ rong biển bằng enzyme có hiệu quả vì phá vỡ thành tế bào mà không ảnh hưởng đến các thành phần bên trong rong biển. Quá trình chiết xuất fucoidan bằng phương pháp EAE phụ thuộc vào loại enzyme sử dụng thích hợp, điều kiện chiết xuất (nhiệt độ, pH) và nguyên liệu sử dụng (Rhein-Knudsen *et al*., 2023; Adadi *et al*., 2018). Nghiên cứu của Rhein-Knudsen và đồng tác giả (2023) chứng minh EAE giảm thời gian chiết, nâng cao hiệu quả thu hồi, duy trì hoạt tính sinh học của fucoidan và giảm thiểu sử dụng dung môi hữu cơ (Rhein-Knudsen *et al*., 2023). Vì vậy, EAE hiện được nghiên cứu sử dụng trong chiết xuất các hoạt chất sinh học nói chung và fucoidan từ tảo biển nói riêng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Rong mơ sử dụng cho thí nghiệm được thu thập tại các vùng biển Khánh Hòa của Việt Nam vào tháng 7/2023. Mẫu rong mơ sau khi thu về được rửa sạch và loại bỏ tạp chất, sau đó đem sấy khô ở 55-60°C đến khối lượng không đổi thì tiến hành xay nhỏ bằng máy xay sinh tố, phần bột rong được bảo quản ở ống falcon trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu.

Endo-β-1,4-glucanase được sản xuất từ chủng tái tổ hợp *Pichia pastoris* trên môi trường YP (Huy *et al*., 2016).

Xác định hoạt tính enzyme

Hoạt độ endo-β-1,4-glucanase tái tổ hợp được xác định bằng phản ứng với cơ chất carboxymethyl cellulose và phát hiện sản phẩm thủy phần bằng đo mật độ hấp phụ ở bước sóng 540 nm sử dụng thuốc thử DNS

(Miller,1972). Đường chuẩn được xây dựng sử dụng glucose tinh khiết và với phương trình tuyến tính y = 2.8986 - 0,0574x (R^2 =0.9873), trong đó y là độ hấp phụ (OD) ở bước sóng 540 nm, x là nồng độ glucose (mg/mL). Một đơn vị enzyme được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết nhằm giải phóng 1 µmol đường khử ở điều kiện phản ứng.

Chiết xuất fucoidan bằng enzyme

Quá trình tách chiết fucoidan dựa theo quy trình tách chiết của Nguyễn Thị Thuận và đồng tác giả (2020) (Nguyen *et al*., 2020). Nguyên liệu bột rong mơ cho vào ống falcon bổ sung dd HCl 0,1M hoặc dung dịch enzyme với tỉ lệ cần khảo sát. Hỗn hợp được lắc đều ủ ở nhiệt độ 40°C trong 24 giờ. Tiến hành ly tâm trong 5 phút ở 10.000 vòng/phút. 500 µL dịch nổi được thu nhận và bổ sung thêm 200 µL CaCl2 ly tâm 15 phút ở 10.000 vòng/phút để loại bỏ kết tủa alginate. Bổ sung 700 µL ethanol 72°, ly tâm 15 phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút, loại bỏ phần dịch và sấy khô kết tủa để xác định khối lượng fucoidan.

Khảo sát ảnh hưởng điều kiện phản ứng

Tỷ lệ nguyên liệu: Enzyme được tiến hành khảo sát trong ống falcon 10 mL chứa 0,05 g bột rong mơ và enzyme. Thêm enzyme vào với tỉ lệ rong/enzyme khảo sát lần lượt là 1/20; 1/25; 1/30; 1/35; 1/40 (lượng enzyme tương ứng là 1 mL; 1,25 mL; 1,5 mL; 1,75 mL và 2 mL). Hỗn hợp được lắc đều ủ ở nhiệt độ 40°C trong 24 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được đun sôi trong 5 phút để bất hoạt enzyme và tiến hành ly tâm trong 5 phút ở 10.000 vòng/phút. 500 µL dịch nổi được thu nhận và bổ sung thêm 200 µL $CaCl_2$ ly tâm 15 phút ở 10.000 vòng/phút để loại bỏ kết tủa alginate. Thu dịch nổi, bổ sung 700 µL ethanol 72°, ly tâm 15 phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút, loại bỏ phần dịch và sấy khô kết tủa để xác định khối lượng fucoidan.

Tỷ lệ nguyên liệu: Enzyme tối ưu ở thí nghiệm trên được chọn để tiếp tục khảo sát nhiệt độ phản ứng. Ống falcon chứa 0,05 g bột rong mơ và enzyme được lắc đều ủ ở nhiệt độ ở 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C trong 24 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được đun sôi trong 5 phút để bất hoạt enzyme và tiến hành ly tâm trong 5 phút ở 10.000 vòng/phút. 500 µL dịch nổi được thu nhận và bổ sung thêm 200 µL $CaCl_2$ ly tâm 15 phút ở 10.000 vòng/phút để loại bỏ kết tủa alginate. Thu dịch nổi, bổ sung 700 µL ethanol 72°, ly tâm 15 phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút, loại bỏ phần dịch và sấy khô kết tủa để xác định khối lượng fucoidan.

Ống falcon chứa 0,05 g bột rong mơ và enzyme được lắc đều ủ ở nhiệt độ tối ưu ở trên trong các khoảng thời gian 12, 18, 24, 30 và 36 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được đun sôi trong 5 phút để bất hoạt enzyme và tiến hành ly tâm trong 5 phút ở 10.000 vòng/phút. 500 µL dịch nổi được thu nhận và bổ sung thêm 200 µL $CaCl_2$ ly tâm 15 phút ở 10.000 vòng/phút để loại bỏ kết tủa alginate. Thu dịch nổi, bổ sung 700 µL ethanol 72°, ly tâm 15 phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút, loại bỏ phần dịch và sấy khô kết tủa để xác định khối lượng fucoidan.

Chiết xuất fucoidan bằng acid

Quá trình tách chiết fucoidan bằng dung dịch HCl 0.1M dựa theo quy trình tách chiết của Nguyễn Thị Thuận và đồng tác giả (2020) (Nguyen *et al*., 2020) với một số thay đổi. Ống falcon chứa 0,05 g bột rong mơ, bổ sung HCl 0,1M với tỉ lệ rong mơ/HCl (0,1M) là 1/20. Hỗn hợp được lắc đều ủ ở nhiệt độ 40°C trong 24 giờ. Tiến hành ly tâm trong 5 phút ở 10.000 vòng/phút. 500 µL dịch nổi được thu nhận và bổ sung thêm 200 µL $CaCl_2$ ly tâm 15 phút ở 10.000 vòng/phút để loại bỏ kết tủa alginate. Bổ sung 700 µL ethanol 72°, ly tâm 15 phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút, loại bỏ phần dịch và sấy khô kết tủa để xác định khối lượng fucoidan.

Khảo sát hoạt tính sinh học của fucoidan

Hoạt tính kháng khuẩn của fucoidan được xác định theo nguyên lý của phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu. Phương pháp được mô tả bởi Ayrapetyan và đồng tác giả (2021) (Ayrapetyan *et al*., 2021) và với một số thay đổi. Vi sinh vật được nuôi lỏng qua đêm trong môi trường LB ở 37°C. Các mẫu fucoidan được hòa tan trong nước đến nồng độ cuối cùng là 10, 20, 30, 40, 50 mg/mL. 10 µL dung dịch chứa vi khuẩn ở mật độ khoảng 10^3 CFU/mL được trộn với 90 µL dung dịch fucoidan và ủ trong 4 giờ ở 37°C. Sau đó, 100 µL dung dịch được trải đều trên đĩa petri chứa môi trường LB, ủ ở 37°C trong 16 giờ. Số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa được đếm và so sánh giữa các nghiệm thức khác nhau.

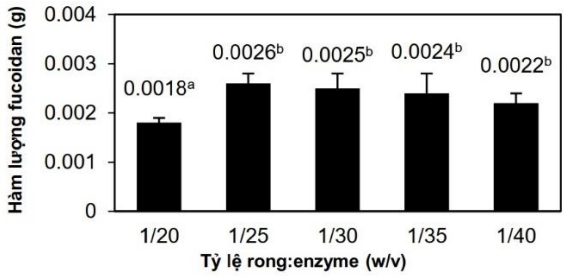
Phương pháp xử lý số liệu

Phần mềm Microsoft Office Excel được sử dụng để xử lý số liệu thô thu được từ các thí nghiệm và sử dụng phép phân tích phương sai (ANOVA) kết hợp so sánh Ducan test trong SPSS nhằm xác định sự sai khác giữa các trung bình của các công thức thí nghiệm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định tỷ lệ nguyên liệu rong: enzyme

Các mẫu rong mơ *Sargassum* sp. xử lý với endo-β-1,4-glucanase ủ ở nhiệt độ 40°C trong 24 giờ với các tỉ lệ khác nhau. Khối lượng fucoidan thu được từ các mẫu nghiệm thức được thể hiện trong Hình 1.



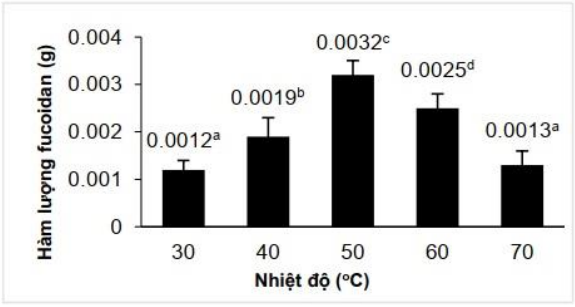
Hình 1. Hàm lượng fucoidan thu nhận với tỷ lệ nguyên liệu rong/enzyme khác nhau

Kết quả ở Hình 1 cho thấy, mẫu rong mơ *Sargassum* sp. xử lý với endo-β-1,4-glucanase ở tỷ lệ 1/20 (w/v) có lượng fucoidan thu được là 0,0018 g và lượng fucoidan thu hồi tăng lên 0,0026 g khi tỷ lệ nguyên liệu rong mơ và enzyme đạt 1/25 (w/v). Như vậy, khi tăng tỷ lệ nguyên liệu rong mơ và endo-β-1,4-glucanase thì hàm lượng fucoidan thu được cũng tăng theo. Tuy nhiên, khi tăng tỷ lệ nguyên liệu rong mơ và endo-β-1,4-glucanase sử dụng lên 1/30 (w/v), 1/35 (w/v) và 1/40 (w/v) thì hàm lượng fucoidan thu được lại giảm chỉ đạt giá trị tương ứng là 0,0025 g; 0,0024 g và 0,0022 g. Có thể thấy khi tỷ lệ nguyên liệu rong mơ và enzyme đạt đến ngưỡng giới hạn thì dù có tăng tỷ lệ lên hàm lượng fucoidan thu được cũng không thay đổi và cũng không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Do đó, để tiết kiệm enzyme và chiết xuất kinh tế hơn thì chọn tỷ lệ nguyên liệu rong mơ và enzyme là 1/25 cho các khảo sát tiếp theo.

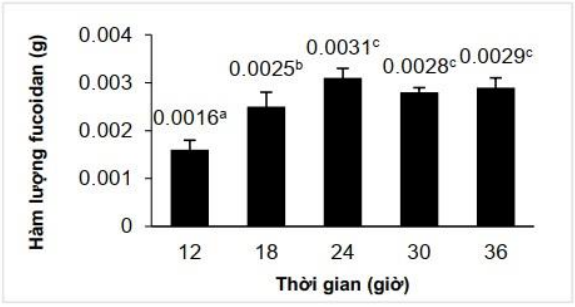
Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Cao Thị Thúy Hằng và đồng tác giả (2022) khi tiến hành khảo sát tỷ lệ dịch chiết trên rong nguyên liệu đến hiệu suất của fucoidan từ rong nâu *S. mcclurei*. Kết quả tỷ lệ rong nguyên liệu trên dịch chiết là 1/25 thì hàm lượng fucoidan thu được đạt 4,22% và không thay đổi nhiều cho đến khi tăng tỉ lệ dịch chiết lên 1/30. Ngoài ra, nghiên cứu của Võ Phan Tuấn Vũ và đồng tác giả (2023) cũng đã khảo sát các tỉ lệ chiết 1/5; 1/10; 1/15; 1/20 và 1/25 dùng để chiết *S. oligocystum* bằng Viscoenzyme L cho thấy tỉ lệ 1/20 và 1/25 (w/v) không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê và cho hiệu suất thu hồi lipid là 57.34 ± 3.44% và 62.14 ± 2.52%.

Ảnh hưởng điều kiện lên chiết xuất fucoidan

Mỗi loại enzyme có một khoảng nhiệt độ tối ưu khác nhau vì vậy để xác định được khoảng nhiệt độ phù hợp cho quá trình ủ rong mơ nhằm thu được khối lượng fucoidan cao nhất, thí nghiệm được thực hiện ở các mức nhiệt độ là 30°C, 40°C, 50°C, 60°C và 70°C trong 24 giờ. Kết quả khối lượng fucoidan thu được từ các mẫu nghiệm thức được thể hiện trong Hình 2.



Hình 2. Biến thiên khối lượng fucoidan thu nhận ở nhiệt độ chiết xuất khác nhau



Hình 3. Biến thiên khối lượng fucoidan thu nhận với thời gian chiết xuất khác nhau

Khi nhiệt độ tăng từ 30°C lên đến 50°C, lượng fucoidan thu hồi được tăng đáng kể từ 0,0012 g lên 0,0032 g và đạt ở mức cao nhất ở nhiệt độ 50°C. Khi hỗn hợp phản ứng tăng lên 60°C và 70°C thì lượng fucoidan thu được giảm lần lượt là 0,0025 g và 0,0013 g. Nhiệt độ là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thu hồi fucoidan vì mỗi enzyme đều có nhiệt độ tối ưu riêng, khi thay đổi nhiệt độ tối ưu thì sẽ làm giảm khả năng hoạt động của enzyme, thậm chí có thể làm biến tính enzyme. Endo-β-1,4-glucanase tái tổ hợp được sử dụng trong nghiên cứu này có nhiệt độ hoạt động tối ưu trong khoảng 50-60°C (Huy *et al*., 2016), do đó đây cũng là nhiệt độ thích hợp cho việc chiết fucoidan từ rong mơ sử dụng endo-β-1,4-glucanase. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Hoàng Thị Ngọc Nhơn và Lê Thị Thanh Thủy (2020) khi tiến hành nghiên cứu chiết rong *Ceratophyllum submersum* bằng cellulase ở 50°C, lượng fucoidan thu được là 1022,22 µg/gck. Theo nghiên cứu của Trần Thị Ngọc Mai (2020) ở nhiệt độ tối ưu 50°C tỉ lệ thu hồi cao chiết lần lượt là 7,5% và 8% cho rong nâu *S. feldmannii* và *S. polycystum,* khi sử dụng dung môi chiết là có bổ sung Viscozyme L. Do vậy, sẽ lựa chọn nhiệt độ 50°C để làm thông số cố định cho các thí nghiệm tiếp theo.

Xác định thời gian ủ thích hợp

Để xác định hàm lượng fucoidan thu được theo thời gian thì hỗn hợp phản ứng được ủ trong thời gian 12 giờ, 18 giờ, 24 giờ, 30 giờ và 36 giờ. Hỗn hợp thí nghiệm tiến hành với các điều kiện cố định tương ứng tỷ lệ chiết giữa nguyên liệu rong mơ/enzyme là 1/25 (w/v) và nhiệt độ của mẫu chứa endo-β-1,4-glucanase là 50°C. Kết quả thu hồi fucoidan được thể hiện ở Hình 3.

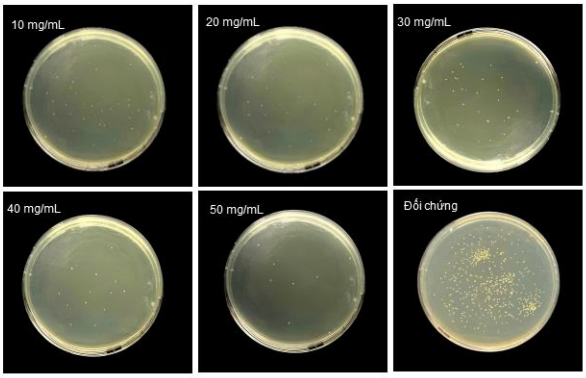
Kết quả ở Hình 3 cho thấy, lượng fucoidan thu được tăng dần khi tăng thời gian ủ 12 giờ, 18 giờ và 24 giờ với lượng fucoidan thu được tương ứng là 0,0016 g; 0,0025 g và 0,0031 g. Tuy nhiên, khi tăng thời gian ủ lên 30 giờ và 36 giờ lượng fucoidan thu được lại giảm dần còn 0,0028 g và 0,0029 g. Kết quả này cho thấy, thời gian ủ ở 24 giờ thì hàm lượng fucoidan thu được cao nhất có hàm lượng 0,0031 g. Endo-β-1,4-glucanase phá vỡ thành tế bào của rong mơ, tăng sự giải phóng các hoạt chất sinh học bên trong. Khi thời gian xúc tác quá dài, cơ chất đã được phân giải đến cực đại, thì sản phẩm thu được hầu như không thay đổi. Do khi thời gian ủ quá dài thì hoạt tính enzyme có thể bị ảnh hưởng bởi chính thành phần các chất có trong dịch chiết. Không những thế còn làm tăng khả năng trích ly các hợp chất không mong muốn, tiêu tốn năng lượng, thời gian không cần thiết. Kết quả nghiên cứu phù hợp với nghiên cứu của Cao Thị Thuý Hằng và đồng tác giả (2022) khi khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất của fucoidan trên rong nâu *S. mcclurei* bằng Viscozyme. Kết quả sau 24 giờ thì hàm lượng chiết fucoidan đạt cao nhất với hàm lượng là 4,31%.

So sánh hiệu quả chiết fucoidan của phương pháp enzyme với phương pháp hóa học

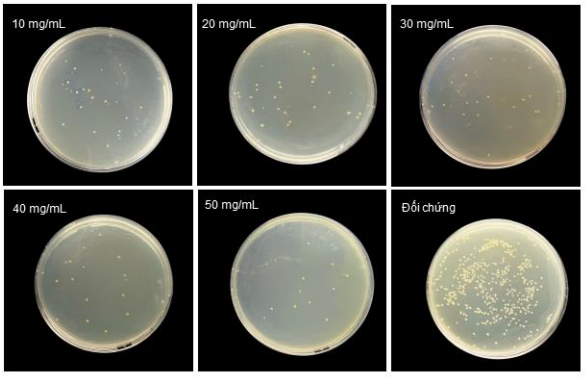
Quy trình chiết xuất fucoidan sử dụng HCl (0,1 M) để tách chiết fucoidan từ rong *Sargassum* sp. dựa theo mô tả của Nguyễn Thị Thuận và đồng tác giả (2020) với một số thay đổi, kết quả thu hồi được 2,2% fucoidan thô. Với phương pháp tách chiết bằng enzyme với các điều kiện đã tối ưu tỷ lệ rong: enzyme là 1/25, nhiệt độ 50°C, thời gian chiết ở 24 giờ lượng fucoidan thu nhận được đạt 0,0031 g tương ứng 6,2%. Kết quả này cho thấy phương pháp tách chiết bằng enzyme có hiệu quả hơn gấp 2,8 lần so với phương pháp hóa học. Kết quả này cũng khá tương đồng với nghiên cứu của Phạm Đức Thịnh và đồng tác giả (2013) đã sử dụng HCl để chiết fucoidan từ rong *S. mcclurei* với hàm lượng fucoidan thô là 2,7%. Kết quả này cao hơn so với hàm lượng fucoidan thu được từ rong mơ *S. glaucescens, S. horneri* và *L. japonica* lần lượt là 4,20%, 4,80% và 4,64% bằng phương pháp chiết bằng nước nóng (Wang & Chen, 2016).

Hoạt tính kháng khuẩn dịch chiết fucoidan

Hoạt tính kháng khuẩn đã được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc có trên đĩa peptri ở 5 mức nồng độ của fucoidan là 10 mg/mL; 20 mg/mL; 30 mg/mL; 40 mg/mL và 50 mg/mL, kết quả được thể hiện trong Hình 4; Hình 5.



Hình 4. Khả năng kháng *E. coli* của chiết xuất fucoidan



Hình 5. Khả năng kháng *S. aureus* của chiết xuất fucoidan

Kết quả ở Hình 4 và 5 cho thấy fucoidan có khả năng đối kháng với hai dòng vi khuẩn là *E. coli* thuộc Gram âm và *S. aureus* thuộc Gram dương. Tăng nồng độ fucoidan cũng đồng thời tăng khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn thể hiện qua sự giảm của số khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa nuôi cấy. Đối với *E. coli* là vi khuẩn Gram âm thì số khuẩn lạc phát triển trung bình từ mẫu kháng ở nồng độ 10 mg/mL là 39 khuẩn lạc/đĩa và khi tăng nồng độ lên 20 mg/mL thì số khuẩn lạc giảm xuống còn 32 khuẩn lạc /đĩa. Khi nồng độ fucoidan tăng lên 30 mg/mL, 40 mg/mL và 50 mg/mL thì số khuẩn lạc trung bình xuất hiện trên đĩa peptri lần lượt là 25; 21 và 13 khuẩn lạc/đĩa. Kết quả này chứng minh hiệu quả ức chế của fucoidan sau tách chiết lên sự sinh trưởng và phát triển *E. coli*. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận khi thử nghiệm hiệu quả đối kháng của fucoidan trên vi khuẩn Gram dương *S. aureus* cho thấy có sự tương quan giữa nồng độ fucoidan và khả năng ức chế vi khuẩn. Số khuẩn lạc trung bình phát triển khi được xử lý ở nồng độ 10 mg/mL là 33 khuẩn lạc/đĩa và giảm dần về 27; 23; 14 và 8 khuẩn lạc/đĩa sau khi được xử lý với dung dịch chứa fucoidan ở nồng độ theo tuần tự 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL. Tương đồng với kết quả đạt được ở nghiên cứu này, Marudhupandi và Kumar (2013) trong nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của fucoidan từ *S. wightii* cho thấy fucoidan ức chế tốt *E. coli* và

Salmonella (Marudhupandi & Kumar, 2013). Chotigeat và đồng tác giả (2004) đã chiết xuất fucoidan thô từ *S. polycystum* và sử dụng để kiểm soát nhóm vi sinh vật gây hại bao gồm *Vibrio harveyi*, *S. aureus* và *E. coli* (Chotigeat *et al*., 2004). Fucoidan tách chiết từ *Fucus vesiculosus* cũng cho thấy khả năng ức chế tốt các dòng vi khuẩn Gram âm là *E. coli* và vi khuẩn Gram dương là *Bacillus subtilis* và *Listeria innocua* (Cabral *et al*., 2021).

KẾT LUẬN

Endo-β-1,4-glucanase tăng hiệu quả chiết xuất fucoidan từ rong mơ *Sargassum* sp. với tỷ lệ rong: enzyme là 1/25 (w/v), nhiệt độ chiết xuất là 50°C, thời gian chiết xuất là 24 giờ. Ở điều kiện này, hàm lượng fucoidan thu nhận được bằng enzyme là 6,2% cao hơn khi tách chiết bằng phương pháp hóa học là 2,2%. Kết quả cho thấy fucoidan thu nhận được có khả năng kháng khuẩn đối với cả hai loại vi khuẩn Gram âm (*E. coli*) và Gram dương (*S. aureus*) với nồng độ ức chế tối thiểu là 10 mg/mL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Adadi P, Barakova NV, Krivoshapkina EF (2018). Selected methods of extracting carotenoids, characterization and health concerns: a review. *J Agric Food Chem*, 66(24): 5925-5947.

Alboofetileh M, Rezaei M, Tabarsa M (2019). Enzyme-assisted extraction of *Nizamuddinia zanardinii* for the recovery of sulfated polysaccharides with anticancer and immune-enhancing activities. *J Appl Phycol*, 31: 1391-1402.

Ayrapetyan ON, Obluchinskaya ED, Zhurishkina EV, Skorik YA, Lebedev DV, Kulminskaya AA, Lapina IM (2021). Antibacterial properties of fucoidans from the brown algae *Fucus vesiculosus* of the barents sea. *Biology*, 10(67): 1-17.

Cabral EM, Mondala JRM, Oliveira M, Przyborska J, Fitzpatrick S, Rai DK, Sivagnanam SP, Garcia-Vaquero M, O'Shea D, Devereux M, Tiwari B K, Curtin J (2021). Influence of molecular weight fractionation on the antimicrobial and anticancer properties of a fucoidan rich-extract from the macroalgae *Fucus vesiculosus*. *Int J Biol Macromol*, 186: 994-1002.

Vũ Ngọc Bội, Nguyễn Thị Mỹ Trang, Đặng Xuân Cường (2015). Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian chần tiền sấy đến hàm lượng, hoạt tính sinh học của dịch chiết từ rong mơ *Sargassum polycystum* Ninh Thuận.*Tạp chí Khoa Học - Công nghệ Thủy sản*, 3: 9–16.

Cao Thị Thuý Hằng, Trần Thị Thanh Vân, Nguyễn Thị Khánh Vy, Nguyễn Thị Thuận, Trần Nguyễn Hà Vy, Võ Mai Như Hiếu, Phạm Đức Thịnh (2022). Khảo sát điều kiện hoạt động của Viscozyme trên rong nâu *Sargassum mcclurei* để thu nhận fucoidan. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 64(8): 22–26.

Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K, Phongdara A (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, 233 (1-4): 23-30.

Hanjabam MD, Kumar A, Tejpal CS, Krishnamoorthy E, Kishore P, Ashok Kumar K (2019). Isolation of crude fucoidan from *Sargassum wightii* using conventional and ultra-sonication extraction methods. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 20: 100200.

Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technol*, 96(14): 1613-1623.

Hoàng Thị Ngọc Nhơn, Lê Thị Thanh Thủy (2020). Nghiên cứu ảnh hưởng của enzyme cellulase và vi sóng đến trích ly fucoidan từ rong *Ceratophyllum submersum. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng*, 18(3): 5–9.

Huy ND, Nguyen CL, Park HS, Loc NH, Choi MS, Kim DH, Seo JW, Park SM (2016). Characterization of a novel manganese dependent endoglucanase belongs in GH family 5 from *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biosci Bioeng*, 121(2): 154-159.

Marudhupandi T, Kumar TTA (2013). Antibacterial effect of fucoidan from *Sargassum wightii* against the chosen human bacterial pathogens. *Inter Cur Pharma J*, 2(10):156–158.

Trần Thị Ngọc Mai (2020). So sánh quá trình thu nhận cao chiết rong nâu *Sargassum* bằng các phương pháp chiết khác nhau và đánh giá khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 62(6): 34 – 38.

Nguyen TT, Mikkelsen MD, Tran VHN, Trang VTD, Rhein-Knudsen N, Holck J, Meyer AS (2020). Enzyme-assisted fucoidan extraction from brown macroalgae *Fucus distichus* subsp. *evanescens* and *Saccharina latissima*. *Marine drugs*, 18(6): 296.

Rhein-Knudsen N, Reyes-Weiss D, Horn SJ (2023). Extraction of high purity fucoidans from brown seaweeds using cellulases and alginate lyases. *Int J Biol Macromol*, 229: 199-209.

Suprunchuk VE (2019). Low-molecular-weight fucoidan: Chemical modification, synthesis of its oligomeric fragments and mimetics. *In Carbohydrate Research*, 485: 107806.

Thinh PD, Menshova RV, Ermakova SP, Anastyuk SD, Ly BM, Zvyagintseva TN (2013). Structural characteristics and anticancer activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum mcclurei*. *Marine Drugs*, 11(5): 1456-1476.

Võ Phan Tuấn Vũ,Trần Thị Yến Nhi, Nguyễn Ngọc Thư, Thành Hoàng Phi Yến, Hoàng Thị Ngọc Nhơn (2023). So sánh hiệu quả chiết xuất lipid từ rong *Sargassum oligocystum* bằng phương pháp enzyme và siêu âm. *Tạp chí Khoa học công nghệ và thực phẩm*, 23(2): 150-157.

Wang CY, Chen YC (2016). Extraction and characterization of fucoidan from six brown macroalgae. *Journal of Marine Science and Technology*, 24(2): 319- 328.

APPLICATION OF ENDO-B-1,4-GLUCANASE FOR FUCOIDAN EXTRACTION FROM *Sargassum* sp. AND EVALUATION ITS BIOACTIVITY

Nguyen Thi Minh Nga[1], Nguyen Tram Anh[2], Vo Thi Hong Ngan[2], Phan Thi Thuy Hang[3], Dang Thi Thanh Ha[4], Tran Thuy Lan[1], Truong Thi Phuong Lan[5],Nguyen Duc Chung[2], Nguyen Duc Huy[1*]

[1]*Institute of Biotechnology, Hue University*

[2]*University of Agriculture and Forestry, Hue University*

[3]*University of Sciences, Hue University*

[4]*Tay Nguyen University*

[5]*University of Medicine and Pharmacy, Hue University*

SUMMARY

Fucoidan is a sulfated polysaccharide found in algae which is widely applied in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries. The extraction process of bioactive compounds from algae by enzyme-assisted has been demonstrated to have high effective because it hydrolyzed the cell walls with less effect on biological subtances. This study investigated the effect on using endo-β-1,4-glucanase to extract fuoidan from brown algae *Sargassum* sp.. The treament at a ratio of 1/25 (w/v) of biomass:enzyme yielded the highest fucoidan, reaching 0.0026g. The optimal conditions for the extraction was temperature of 50°C and incubation time of 24 hours. The extraction efficiency of fucoidan by endo-β-1,4-glucanase was 2.8 times higher than the chemical method using HCl 0.1M. The extracted fucoidan exhibited *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* inhibitory activities. The present results provide helpful information for fucoidan extraction process from *Sargassum* sp. in intergration with enzyme-assisted which are further applicable in food and pharmaceutical industries.

Keywords: Enzyme-assisted extraction, *endo-β-1,4-glucanase*, fucoidan, antibacterial, *Sargassum*.

* Author for correspondence: Tel: 916066357; Email: ndhuy@hueuni.edu.vn;

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN KHẢ NĂNG SINH ENZYME β-1,3-GLUCANASE CỦA CHỦNG *Bacillus siamensis* ML3

Phạm Thị Diễm Thi[1*], Nguyễn Thị Bích Thảo[2], Nguyễn Đức Chung[2], Trương Thị Phương Lan[3], Hoàng Tấn Quảng[1]

[1]*Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế*

[2]*Trường đại học Nông Lâm, Đại học Huế*

[3]*Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế*

TÓM TẮT

Nấm bệnh là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến hư hỏng nông sản trước và sau thu hoạch, làm giảm năng suất và hiệu quả kinh tế. Sử dụng β-1,3-glucanase trong phòng chống nấm bệnh cho rau củ sau thu hoạch là hướng phát triển tiềm năng trong tương lai. Nghiên cứu này tập trung vào việc xác định môi trường và điều kiện nuôi cấy tối ưu để thu được enzyme β-1,3-glucanase có hoạt độ cao nhất từ chủng *Bacillus siamensis* ML3. Các kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường tốt nhất cho sự tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase từ chủng ML3 là môi trường có chứa 0,65 g/L K_2HPO_4; 2,5 g/L KH_2PO_4; 0,5 g/L $(NH_4)_2SO_4$; 2,5 g/L NaCl; 0,12 g/L $MgSO_4.7H_2O$; 40 g/L rỉ đường; 1,5 g/L bột đậu nành; pH 7,0. Điều kiện nuôi cấy tối ưu là ở 30^oC, tốc độ lắc 180 rpm, tỷ lệ tiếp giống là 1,5%. Hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase khi nuôi cấy chủng ML3 trong các điều kiện tối ưu đạt 2,88 U/mL. Dịch enzyme β-1,3-glucanase thô từ chủng ML3 với hoạt độ 1,44 U/ml có khả năng ức chế nấm *Lasiodiplodia theobromae* KBTD NHA, *Fusarium salawesiensi* HUCL4 và *Collectotrichum endophyticum* HUPV2 với tỷ lệ lần lượt là 40,28%; 15,22% và 28,57%.

Từ khóa: Bacillus siamensis, β-1,3-glucanase, điều kiện nuôi cấy, hoạt độ enzyme, kháng nấm bệnh.

MỞ ĐẦU

Nhiễm nấm bệnh là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến hư hỏng rau củ trước và sau thu hoạch, trong quá trình phân phối và bảo quản. Thông thường, các chất diệt nấm hóa học được sử dụng để kiểm soát vấn đề này. Tuy nhiên, nếu dùng nhiều loại thuốc hóa học với liều lượng cao trong thời gian dài sẽ tạo môi trường bất lợi đối với các sinh vật có ích; tạo điều kiện để nấm bệnh, các loài côn trùng có hại kháng thuốc phát triển. Ở một số nước phát triển, thuốc diệt nấm có nguồn gốc hóa học bị hạn chế hoặc cấm sử dụng do dư lượng còn sót lại ngày càng tăng trên nông sản, trong đất gây ô nhiễm môi trường và các vấn đề có liên quan đến sức khỏe con người. Vì vậy, việc hướng tới sử dụng một giải pháp thay thế an toàn hơn để giảm thiểu sự hư hỏng của nông sản sau thu hoạch là cần thiết. Trong đó, biện pháp sử dụng các chế phẩm enzyme được tạo ra từ vi sinh vật đối kháng được xem là hướng đi đầy triển vọng (Jeong *et al.*, 2019; Tram *et al.*, 2023).

Các loại nấm bệnh nói chung thường có thành tế bào được cấu tạo bởi các thành phần là glucan, cellulose, chitin, chitosan, prorein, lipid,… trong đó glucan và chitin là hai thành phần chính (Fesel, Zuccaro, 2016). Để tiêu diệt các loài nấm bệnh, phương pháp sử dụng chế phẩm enzyme để phân hủy glucan và chitin của thành tế bào nấm là phương pháp ưu việt hơn so với việc dùng thuốc hóa học. Sử dụng chế phẩm có nguồn gốc từ vi sinh vật đối kháng mang lại lợi ích lâu dài, giảm chi phí đầu tư, thân thiện với môi trường và an toàn cho sức khỏe. Đồng thời, phương pháp này còn góp phần phát triển nền nông nghiệp hữu cơ bền vững. Nhiều loài *Bacillus* đã được chứng minh là có hiệu quả chống lại nhiều mầm bệnh thực vật. Chúng được báo cáo là chất kích thích tăng trưởng thực vật, được sử dụng để sản xuất nhiều loại hợp chất đối kháng và là đối thủ cạnh tranh về các yếu tố tăng trưởng như không gian và chất dinh dưỡng với các vi sinh vật gây bệnh khác thông qua quá trình xâm chiếm (Jeong *et al.*, 2019; Tram *et al.*, 2023).

Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã phân lập được một số chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme β-1,3-glucanase ngoại bào mạnh đồng thời có khả năng kháng lại các loài nấm bệnh thán thư hại ớt, trong đó có chủng *Bacillus siamensis* ML3 (Tram *et al.*, 2023). Nghiên cứu này trình bày ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy lên khả năng sản xuất β-1,3-glucanase từ chủng ML3, một enzyme rất tiềm năng để phát triển chế phẩm phòng trừ nấm bệnh trong tương lai.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật

Chủng vi khuẩn *Bacillus siamensis* ML3 có khả năng sinh enzyme β-1,3-glucanase, các chủng nấm *Fusarium*

salawesiensi HUCL4 và *Collectotrichum endophyticum* HUPV2 gây bệnh trên cây ớt, chủng nấm *Lasiodiplodia theobromae* KBTD NHA gây bệnh trên cây sen do Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế cung cấp.

Xây dựng đường cong sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase

Chủng *Bacillus siamensis* ML3 được nuôi theo phương pháp của Dewi *et al.* (2016). Dịch giống mật độ 0,5 × 10^8 CFU/mL (1% v/v) được cấy vào 100 mL môi trường cơ bản có bổ sung 1% laminarin như là chất cảm ứng, nuôi cấy trong tủ lắc. Dịch huyền phù vi khuẩn được thu từ 0-33 giờ nuôi cấy để xác định mật độ tế bào và 12-33 giờ để xác định hoạt độ enzyme.

Mật độ tế bào được xác định thông qua đo mật độ quang (OD) dịch huyền phù trên máy quang phổ (Spectro UV-2650, Labomed, Mỹ) ở bước sóng 600 nm.

Dịch nuôi cấy được thu bằng ly tâm 11.000 vòng/phút trong 7 phút để xác định hoạt độ enzyme. Hoạt độ β-1,3-glucanase được xác định bằng phương pháp so màu (Wu *et al.*, 2018): trộn 500 µL dịch enzyme với 500 µL đệm 100 mM sodium acetate chứa 0,5% laminarin (pH 7,0), ủ ở 40^{o}C trong 30 phút. Bổ sung 2 mL dung dịch 1% 3,5-dinitro salicylic acid (DNS), đun sôi trong 10 phút để phát triển màu. Mật độ quang được đo ở bước sóng 540 nm. Nồng độ glucose trong dịch phản ứng được xác định dựa trên đường chuẩn glucose. Một đơn vị hoạt độ của β-1,3-glucanase được xác định bằng lượng enzyme cần thiết để tạo ra 1 µmol đường khử trong thời gian 1 phút ở điều kiện thí nghiệm (Wu *et al.*, 2018).

Ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase

Ảnh hưởng của nguồn carbon

Ảnh hưởng của nguồn carbon đến quá trình sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase được đánh giá bằng cách lên men chủng ML3 trong môi trường cơ bản (0,65 g/L K_2HPO_4; 2,5 g/L KH_2PO_4; 0,5 g/L $(NH_4)_2SO_4$; 2,5 g/L NaCl, 0,12 g/L $MgSO_4.7H_2O$; 1,5 g/L dịch chiết nấm men (YE)) (Dewi *et al.* (2016) có bổ sung laminarin, đại mạch, yến mạch, bột mì, rỉ đường hoặc glucose ở nồng độ 1% (w/v). Điều kiện nuôi cấy: tiếp giống 1%, lắc 180 vòng/phút, nhiệt độ phòng, 21 giờ. Nguồn carbon tối ưu (1-5%) tiếp tục được sử dụng để khảo sát nồng độ thích hợp nhất (Phạm Thị Tuyết Ngân *et al.*, 2021).

Ảnh hưởng của nguồn nitrogen

Ảnh hưởng của nguồn nitrogen được đánh giá bằng cách nuôi cấy chủng ML3 trong môi trường có bổ sung các nguồn nitrogen khác nhau như peptone, bột đậu nành hoặc YE với nồng độ 0,15% (w/v). Nguồn nitrogen tối ưu (0,05-0,5%) được sử dụng để khảo sát nồng độ thích hợp nhất (Phạm Thị Tuyết Ngân *et al.*, 2021).

Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống

Chủng ML3 được nuôi cấy trên môi trường tối ưu với tỷ lệ tiếp giống từ 1-3% (Phạm Thị Tuyết Ngân *et al.*, 2021).

Ảnh hưởng của pH môi trường

Chủng ML3 được nuôi cấy trên môi trường tối ưu với pH môi trường nuôi cấy được khảo sát trong khoảng 4,0-8,0 (Nguyễn Thị Lâm Đoàn, 2021).

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Chủng ML3 được nuôi cấy trên môi trường tối ưu với nhiệt độ nuôi cấy được khảo sát trong khoảng từ 25-45^{o}C (Nguyễn Thị Lâm Đoàn, 2021).

Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Chủng ML3 được nuôi cấy trên môi trường tối ưu với tốc độ lắc được khảo sát trong khoảng 140-200 vòng/phút với các điều kiện tối ưu ở trên.

Đánh giá khả năng kháng nấm của chế phẩm β-1,3-glucanase từ chủng *Bacillus siamensis* ML3

Dịch enzyme β-1,3-glucanase thô từ chủng ML3 được thu bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy ở tốc độ 14.000 rpm trong 15 phút. Để đánh giá khả năng kháng nấm của enzyme, các chủng nấm được nuôi cấy trên môi trường PDA có bổ sung dịch enzyme nồng độ 50%. Khả năng ức chế nấm bệnh của enzyme được đánh giá sau 5 ngày cấy theo công thức:

$$H = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100\ (\%)$$

Trong đó: R_1 là đường kính nấm bệnh trên đĩa đối chứng (mm) và R_2 đường kính nấm bệnh trên đĩa thí nghiệm (mm).

Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Kết quả thí nghiệm được xử lý để thu giá trị trung bình và phân tích Duncan's test bằng phần mềm SPSS 20.0 với mức xác suất có ý nghĩa $p<0,05$, đồ thị được xây dựng dựa trên phần mềm Microsoft Excel.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đường cong sinh trưởng và khả năng sinh enzyme của vi khuẩn *Bacillus siamensis* ML3

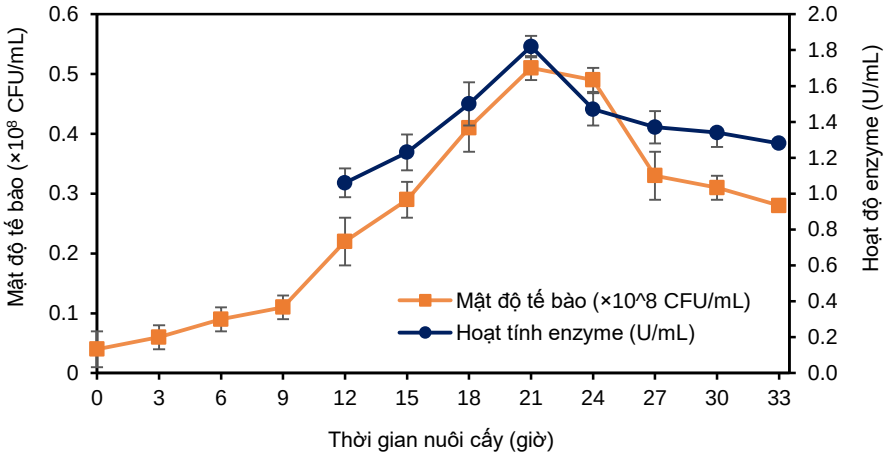
Mỗi chủng vi sinh vật có tốc độ sinh trưởng không giống nhau; tốc độ phân chia tế bào ở mỗi giai đoạn là khác nhau nên việc xây dựng đường cong sinh trưởng và sinh enzyme ngoại bào là cần thiết để xác định được thời điểm thu sinh khối và enzyme tốt nhất. Kết quả xác định mật độ tế bào và hoạt độ β-1,3-glucanase trên môi trường chứa 1% laminarin được thể hiện ở Hình 1.

Trong khoảng thời gian từ 0-9 giờ, vi khuẩn ở pha lag và sinh trưởng chậm. Sau đó, tốc độ sinh trưởng của tế bào tăng nhanh do bước vào pha log. Mật độ tế bào chủng ML3 thu được sau 12 giờ là 0,22 × 10^8 CFU/mL, sau đó tăng dần và đạt giá trị cao nhất là 0,51 × 10^8 CFU/mL sau 21 giờ nuôi cấy. Sau 21 giờ, mật độ tế bào giảm liên quan đến sự suy giảm nguồn dinh dưỡng trong môi trường. Hoạt độ enzyme cũng thay đổi theo xu hướng tương tự với sự phát triển của mật độ tế bào. Hoạt độ enzyme ở thời điểm 12 giờ là 1,06 U/mL, tăng dần và đạt giá trị lớn nhất ở 21 giờ nuôi cấy với 1,82 U/mL; đây là giai đoạn cuối của pha tăng trưởng và bước vào pha tĩnh. Kết quả này tương đồng với một số nghiên cứu đã công bố. Enzyme β-glucanase có nguồn gốc từ chủng *Bacillus subtilis* SAHA 32.6 (Dewi *et al.*, 2016) hay từ chủng *B. subtilis* ZJF - 1A5 (Ting *et al.*, 2004) đều có hoạt độ cao nhất khi vi khuẩn sinh trưởng ở cuối pha log và bước vào giai đoạn ổn định.

Ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy đến hoạt độ β-1,3-glucanase

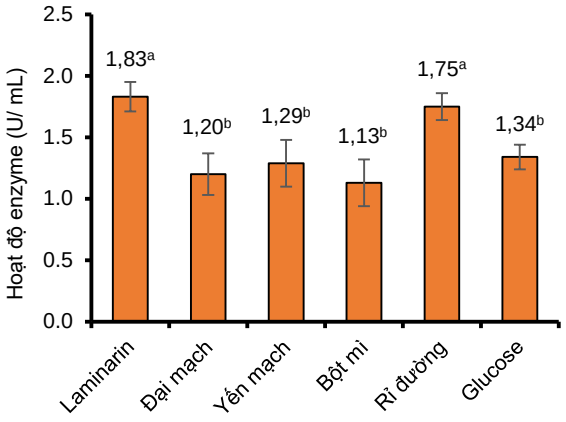
Ảnh hưởng của nguồn carbon

Để đánh giá ảnh hưởng của nguồn carbon lên sinh trưởng và sinh enzyme, chủng ML3 được nuôi cấy trong môi trường cơ bản với nguồn carbon là laminarin được thay thế bằng một trong các nguồn đại mạch, yến mạch, bột mì, rỉ đường và glucose. Dịch nuôi cấy được thu sau 21 giờ để xác định hoạt độ enzyme. Kết quả Hình 2 cho thấy, hoạt độ β-1,3-glucanase của chủng ML3 khi nuôi cấy ở các nguồn carbon thay thế thấp hơn so với môi trường chứa laminarin và đạt hiệu quả cao nhất khi sử dụng rỉ đường là nguồn carbon với hoạt độ là 1,75 U/mL (Hình 2). Sử dụng laminarin và rỉ đường làm nguồn carbon cho kết quả không có sự khác biệt thống kê về khả năng sinh enzyme sau 21 giờ nuôi cấy. Tuy nhiên, với nguồn carbon là rỉ đường, sản phẩm phụ của công nghiệp đường mía có giá thành thấp, dễ tìm nên được chọn làm nguồn carbon thay thế cho laminarin trong các nghiên cứu tiếp theo.

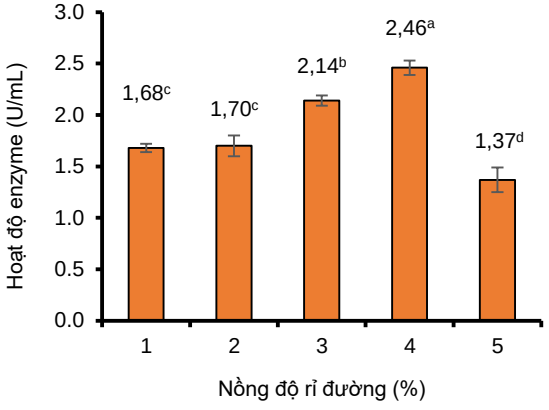


Hình 1. Đường cong sinh trưởng và hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase của chủng *Bacillus siamensis* ML3

Khả năng sinh tổng hợp β-1,3-glucanase của chủng ML3 có sự khác biệt rõ rệt ở các nồng độ rỉ đường khác nhau. Hoạt độ enzyme tăng dần theo nồng độ rỉ đường từ 1-4%, đạt giá trị lần lượt là 1,68 U/m, 1,7 U/mL, 2,14 U/mL và cao nhất là 2,46 U/mL ở nồng độ 4%. Khi bổ sung nguồn carbon ở nồng độ cao hơn (5%), hoạt độ enzyme thu được giảm chỉ còn 1,37 U/mL (Hình 3). Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Shabeb *et al.* (2010), nhóm tác giả đã cho rằng nồng độ rỉ đường khác nhau từ 2-20% là phù hợp để sản xuất cellulase đối với chủng *B. subtilis* BM1. Rỉ đường (4%) được chọn làm nguồn carbon cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn carbon

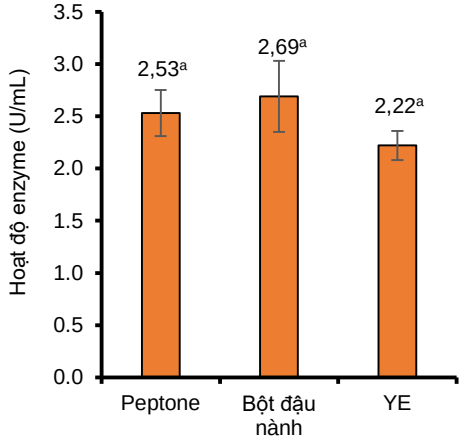


Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ nguồn carbon

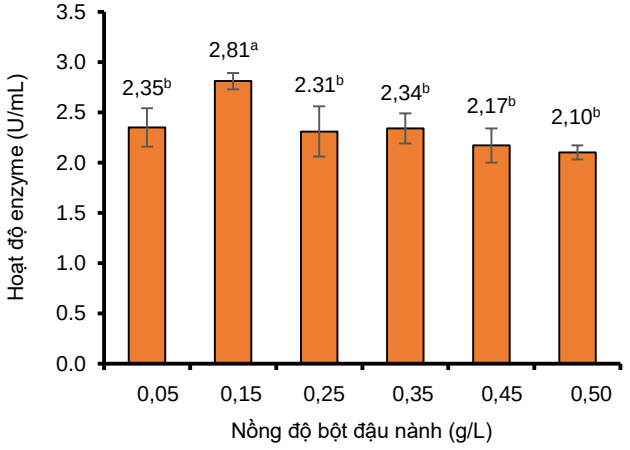
Ảnh hưởng của nguồn nitrogen

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase từ Hình 4 cho thấy, hoạt độ enzyme trong môi trường có sử dụng peptone, bột đậu nành, YE đạt từ 2,22-2,69 U/mL và không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa p<0,05. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Ting *et al.* (2004), cả YE và bột đậu nành đều thích hợp làm nguồn nitrogen cho *B. subtilis* ZJF-1A5 sinh trưởng và sinh enzyme β-glucanase. Nizamudeen, Bajaj (2009) cũng đã công bố rằng bột đậu nành là nguồn nitrogen thích hợp kích thích sản xuất endoglucanase từ chủng *Bacillus* sp. NZ. Do bột đậu nành có giá thành rẻ hơn so với các nguồn nitrogen còn lại nên được lựa chọn cho quá trình nghiên cứu và sản xuất enzyme β-1,3-glucanase từ chủng ML3.

Ảnh hưởng của nồng độ bột đậu nành đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase được thể hiện ở Hình 5. Hoạt độ enzyme tăng dần khi bổ sung bột đậu nành nồng độ 0,05 đến 0,15% và đạt giá trị cao nhất là 2,81 U/mL tại nồng độ 0,15%. Hoạt độ giảm dần ở các nồng độ cao hơn (0,25-0,5%), đạt giá trị thấp nhất là 2,1 U/mL tại nồng độ 0,5%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nồng độ bột đậu nành thích hợp cho sản xuất enzyme là 0,15%, thấp hơn nghiên cứu của Nizamudeen, Bajaj (2009) với nồng độ bột đậu nành tối ưu là 0,5% khi sản xuất endoglucanase từ chủng *Bacillus* sp. NZ.



Hình 4. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen



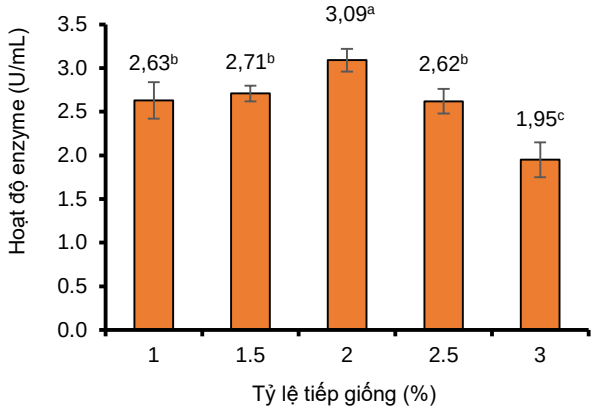
Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ nguồn nitrogen

Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống

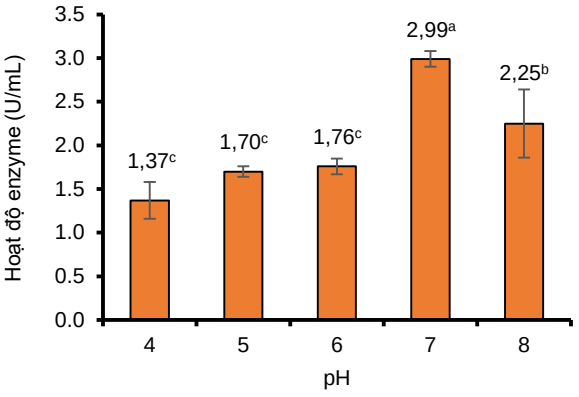
Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống được tiến hành với 5 tỷ lệ khác nhau từ 1-3% (v/v) nhằm tối ưu được lượng giống cần thiết cho quá trình lên men. Kết quả trình bày ở hình 6 cho thấy, hoạt độ enzyme tăng dần theo tỷ lệ tiếp giống từ 1-2% với giá trị lần lượt là 2,63; 2,71 và 3,09 U/mL. Hoạt độ enzyme giảm dần ở các tỷ lệ tiếp giống cao hơn và đạt giá trị thấp nhất là 1,95 U/mL khi tỷ lệ giống bổ sung là 3%. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Shankar, Isaiarasu (2011) khi sản xuất cellulase từ chủng *B. pumilus* EWBCM1 trong các điều kiện môi trường khác nhau. Hoạt độ cellulase tối đa thu được khi nuôi cấy ở 37^{o}C trong 72 giờ với tỷ lệ giống 2%.

Ảnh hưởng của pH môi trường

Hoạt động của enzyme phụ thuộc vào quá trình gấp cuộn của protein và nhạy cảm với các yếu tố môi trường như nhiệt độ, pH và nồng độ muối (Moran, 2018). Khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy (4,0-8,0) lên hoạt độ β-1,3-glucanase cho thấy, hoạt độ enzyme tăng dần từ pH acid đến trung tính và giảm xuống khi pH base. *Bacillus siamensis* ML3 sinh trưởng tốt ở môi trường có pH 7,0 với hoạt độ cao nhất đạt 2,99 U/mL (Hình 7). Đa số các công trình nghiên cứu sản xuất β-1,3-glucanase từ chi *Bacillus* đều nhận thấy pH 7,0 là phù hợp cho sản xuất enzyme, chẳng hạn, sản xuất β-1,3-glucanase từ *B. subtilis* J1 (Narasimhan *et al.*, 2013) hay *B. subtilis* AF1 (Manjula, Podile, 2005).



Hình 6. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống



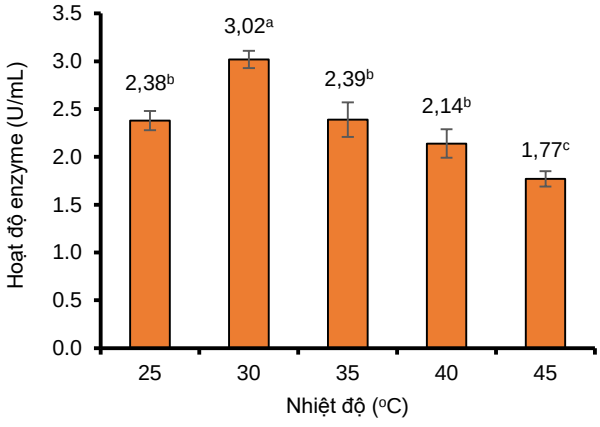
Hình 7. Ảnh hưởng của pH môi trường

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

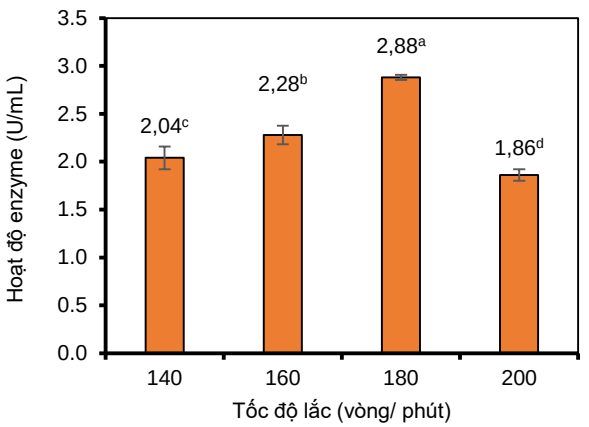
Khả năng tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của chủng ML3 tăng dần từ nhiệt độ 25-30^{o}C và mạnh nhất khi nhiệt độ nuôi cấy 30^{o}C với giá trị 3,02 U/mL. Hoạt độ β-1,3-glucanase giảm dần khi nhiệt độ nuôi cấy tăng lên 35, 40 và 45^{o}C lần lượt là 2,39; 2,14 và 1,77 U/mL (Hình 8). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Narasimhan *et al.* (2013) khi tối ưu hóa quá trình sản xuất enzyme phân giải nấm (chitinase, β-1,3-glucanase và cellulose) từ *B. subtilis* J1. Hoạt độ tối đa của cả ba enzyme đều đạt được khi nhiệt độ của môi trường ở 30^{o}C. Manjula, Podile (2005) cũng thu được hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase cao nhất khi nuôi cấy chủng *B. subtilis* AF1 ở nhiệt độ 30^{o}C.

Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Tốc độ lắc trong quá trình nuôi cấy có ảnh hưởng đến khả năng sinh enzyme cũng như hoạt độ của enzyme β-1,3-glucanase của chủng ML3. Hoạt độ enzyme tăng dần theo tốc độ lắc từ 140-180 vòng/phút với các giá trị lần lượt là 2,04; 2,28; 2,88 U/mL và thấp nhất khi nuôi ở tốc độ 200 vòng/phút (1,86 U/mL). Theo Manjula, Podile (2005), chủng *B. subtilis* AF1 được nuôi trong môi trường có laminarin 1%, YE 0,3%, pH 7, ở 30^{o}C với tốc độ lắc 180 vòng/phút thu được enzyme tối đa sau 3 ngày nuôi cấy, tương tự như tốc độ lắc đối với nuôi cấy chủng ML3.



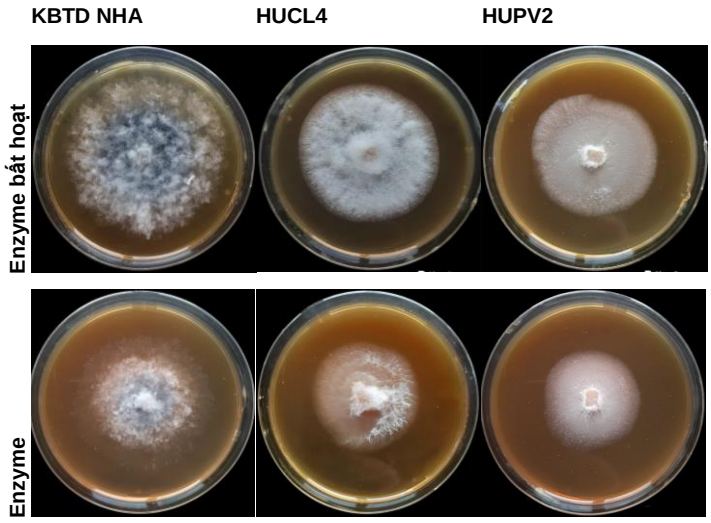
Hình 8. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi



Hình 9. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Khả năng kháng một số loài nấm của chế phẩm enzyme β-1,3-glucanase

Bacillus nói chung và *Bacillus siamensis* ML3 nói riêng được biết đến như một tác nhân phòng trừ sinh học đối với một số loại nấm gây bệnh ở thực vật vì chúng có khả năng sinh ra các enzyme ngoại bào như chitinase, β-glucanase, protease, cellulase,… làm suy giảm thành tế bào, ức chế sự phát triển của nấm bệnh (Tram *et al.*, 2023). Chitin và β-glucan là các polysaccharide chính trong thành tế bào của nấm. Kết quả thử nghiệm khả năng ức chế sinh trưởng của nấm bệnh cho thấy, dịch enzyme β-1,3-glucanase thô từ chủng ML3 có khả năng ức chế sự phát triển của các chủng nấm được khảo sát. Chủng nấm KBTD NHA, HUCL4 và HUPV2 sinh trưởng trên đĩa đối chứng (bổ sung dịch enzyme đã bị bất hoạt) có đường kính tản nấm lần lượt là 72, 46 và 63 mm. Trong khi đó, các chủng nấm này khi sinh trưởng trên môi trường có enzyme β-1,3-glucanase đường kính tảng nấm đạt lần lượt là 43, 39 và 45 mm; tương ứng với tỷ lệ ức chế 40,28%, 15,22% và 28,57% (Hình 10).



Hình 10. Khả năng ức chế sự phát triển của một số loài nấm bởi enzyme β-1,3-glucanase từ chủng ML3

KẾT LUẬN

Môi trường tốt nhất cho sự tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase từ chủng ML3 là môi trường có chứa 0,65 g/L K_2HPO_4; 2,5 g/L KH_2PO_4; 0,5 g/L $(NH_4)_2SO_4$; 2,5 g/L NaCl, 0,12 g/L $MgSO_4.7H_2O$; 40 g/L rỉ đường; 1,5 g/L bột đậu nành; pH 7. Điều kiện nuôi cấy tối ưu là ở 30^oC, tốc độ lắc 180 rpm, tỷ lệ tiếp giống là 1,5%. Hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase khi nuôi cấy chủng ML3 trong các điều kiện tối ưu đạt 2,88 U/mL. Dịch enzyme β-1,3-glucanase thô từ chủng ML3 với hoạt độ 1,44 U/ml có khả năng ức chế nấm *Lasiodiplodia theobromae* KBTD NHA, *Fusarium salawesiensi* HUCL4 và *Collectotrichum endophyticum* HUPV2 với tỷ lệ lần lượt là 40,28%; 15,22% và 28,57%.

Lời cảm ơn: *Công trình được thực hiện bằng kinh phí của đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo năm 2022, mã số CT.2022.09.DHH.03.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Dewi RTK, Mubarik NR, Suhartono MT (2016) Medium optimization of beta-glucanase production by *Bacillus subtilis* SAHA 32.6 used as biological control of oil palm pathogen. *Emir J Food Agric* 28: (2).

Fesel PH, Zuccaro A (2016) β-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genet Biol* 90: 53-60.

Jeong H, Choi SK, Ryu CM, Park SH (2019) Chronicle of a soil bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a tiny guardian of plant and human health. *Front Microbiol* 10: 467.

Manjula K, Podile AR (2005) Production of fungal cell wall degrading enzymes by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF 1. *Ind J Exper Biol* 43: (10) 892-896.

Moran S (2018) Chapter 3 - Biology. *An Applied Guide to Water and Effluent Treatment Plant Design,*(Moran S, ed.^eds.), p.^pp. 25-37. Butterworth-Heinemann.

Narasimhan A, Bist D, Suresh S, Shivakumar S (2013) Optimization of mycolytic enzymes (chitinase, β-1,3-glucanase and cellulose) production by *Bacillus subtilis*, a potential biocontrol agent using one-factor approach. *J Sci Ind Res* 72: 172-178.

Nguyễn Thị Lâm Đoàn (2021) Xác định điều kiện và môi trường thay thế để nuôi cấy khuẩn *Bacillus* spp. tạo chế phẩm vi khuẩn phục vụ xử lý nước thải. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* 2: (123) 103-110.

Nizamudeen S, Bajaj B (2009) A novel thermo-alkalitolerant endoglucanase production using cost-effective agricultural residues as substrates by a newly isolated *Bacillus* sp. NZ. *Food Technol Biotechnol* 47: 435-440.

Phạm Thị Tuyết Ngân, Vũ Hùng Hải, Huỳnh Trường Giang, Vũ Ngọc Út (2021) Tối ưu các điều kiện sinh enzyme protease ngoại bào của vi khuẩn Streptomyces DH3.4. *Can Tho University Journal of Science* 57: (4) 186-193.

Shabeb MSA, Younis MAM, Hezayen FF, Nour-Eldein MA (2010) Production of cellulase in low-cost medium by *Bacillus subtilis* KO strain. *World Appl Sci J* 8: 35-42.

Shankar T, Isaiarasu L (2011) Cellulase production by *Bacillus pumilus* EWBCM1 under varying cultural conditions. *Middle East J Sci Res* 8: (1) 40-45.

Ting XJ, He GQ, Chen QH, Zhang XY, Ali MA (2004) Medium optimization for the production of thermal stable glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. *J Bioresour Technol* 93: 175-181.

Tram TTN, Quang HT, Vu NQH, Nguyen PTT, Thi TNM, Phuong TTB, Thi PTD (2023) Isolation of bacteria displaying potent antagonistic activity against fungi causes anthracnose disease in chilli. *Biodiversitas* 24: (9) 4919-4926.

Wu Q, Dou X, Wang Q, Guan Z, Cai Y, Liao X (2018) Isolation of β-1,3-glucanase-producing microorganisms from *Poria cocos* cultivation soil via molecular biology. *Molecules* 23: (7) 1555.

EFFECTS OF MEDIUM AND CULTURE CONDITIONS ON β-1,3-GLUCANASE PRODUCTION OF *Bacillus siamensis* ML3

Pham Thi Diem Thi[1*], Nguyen Thi Bich Thao[2], Nguyen Duc Chung[2], Truong Thi Phuong Lan[3], Hoang Tan Quang[1]

[1]*Institute of Biotechnology, Hue University*

[2]*University of Agriculture and Forestry, Hue University*

[3]*University of Medicine and Pharmacy, Hue University*

ABSTRACT

Fungal diseases are the leading cause of damage to agricultural products, reducing productivity and economic efficiency. Using β-1,3-glucanase in preventing post-harvest vegetables against fungal diseases in is a potential method in the future. The aims of this study is determining the optimal medium and culture conditions to obtain the highest activity β-1,3-glucanase from *Bacillus siamensis* ML3. The results shown that the suitable culture medium for β-1,3-glucanase production from ML3 strain containing 0.65 g/L K_2HPO_4; 2.5 g/L KH_2PO_4; 0.5 g/L $(NH_4)_2SO_4$; 2.5 g/L NaCl; 0.12 g/L $MgSO_4.7H_2O$; 40 g/L molasses and 1.5 g/L soybean powder (pH 7.0). ML3 strain was culture at 30^{o}C, shaking speed 180 rpm with the inoculum ratio of 1.5% (v/v). The β-1,3-glucanase activity of ML3 strain reached 2.88 U/mL under optimal conditions. Crude β-1,3-glucanase enzyme solution from ML3 strain (1.44 U/mL) has the ability to inhibit the growth ability of *Lasiodiplodia theobromae* MPA NHA, *Fusarium salawesiensi* HUCL4 and *Colletotrichum endophyticum* HUPV2 at a rate of 40.28%, 15.22% and 28.57%, respectively.

Keywords: Antifungal, Bacillus siamensis, β-1,3-glucanase, culture conditions, enzyme activity.

[*] Author for correspondence: Tel: 0983336019. Email: ptdiemthi@hueuni.edu.vn

TÍNH CHẤT HÓA LÝ, HOẠT TÍNH SINH HỌC VÀ THÀNH PHẦN HOẠT CHẤT CỦA MẬT ONG HOA CÀ PHÊ THU THẬP TẠI HUYỆN CƯ KUIN VÀ XÃ EA KAO, THÀNH PHỐ BUÔN MA THUỘT NĂM 2023

Nguyễn Minh Trung[1,2], Bùi Thị Bích Huyên[1], Mai Quốc Quân[1], Nguyễn Thị Huyền[1], Đoàn Mạnh Dũng[1], Nguyễn Quang Vinh[1*]

[1]*Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên*

[2]*Khoa Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Trường Đại học Tây Nguyên*

TÓM TẮT

Nghiên cứu này tiến hành đánh giá mối tương quan giữa các thông số hóa lý, hoạt tính sinh học và thành phần hoạt chất của mật ong hoa cà phê thu nhận tại huyện Cư Kuin và xã Ea Kao, Tp. Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk được thu thập năm 2023. Kết quả cho thấy chất lượng hoa cà phê đạt yêu cầu đối theo tiêu chuẩn quốc tế, Codex Alimentarius. Hàm lượng chất khô ≥ 77%, hàm lượng acid tổng số < 14 meq/kg, pH < 5, chỉ số HMF < 55 mg/kg, chỉ số Diastase trong khoảng 16,087 đến 20,240 DN. Hàm lượng polyphenol tổng số (TPC) dao động từ 46,451 đến 75,720 mgGAE/100g, hàm lượng TFC thay đổi trong khoảng 1,855 đến 8,792 mgQE/100g. Khả năng chống oxy hóa tốt hơn các mẫu thu thập năm 2022 với giá trị 13,429 đến 33,412 mgTE/100g đối với khả năng trung hòa gốc tự do DPPH và 180,574 đến 254,515 mgTE/100g đối với ABTS. Các mẫu mật ong vẫn duy trì khả năng kháng khuẩn tốt với giá trị nồng độ ức chế tối thiểu từ 250 đến 500 mg/mL đối với *Escherichia coli* và *Pseudomonas aeruginosa*, và từ 25 đến 400 mg/mL đối với *Staphylococcus aureus*. Bên cạnh đó, khả năng ức chế tyrosinase cũng đáng chú ý với giá trị IC_{50} trong khoảng 0,587 đến 0,871 g/mL. Hàm lượng cao đáng kể các hợp chất phenolic và alkaloid được ghi nhận trong các mẫu. Trong đó, salicylic acid và quercitrin có vai trò quan trọng đối với việc duy trì hoạt tính diastase và chỉ số HMF thấp; apigenin liên quan chặt chẽ đến khả năng kháng khuẩn và duy trì hoạt tính chống oxy hóa khi các hoạt tính này có thể bị suy giảm do sự gia tăng hàm lượng saccharose trong các mẫu mật.

Từ khóa: Hợp chất polyphenol và flavonoid, kháng oxy hóa, kháng khuẩn, mật ong hoa cà phê, phân tích thành phần chính (PCA).

ĐẶT VẤN ĐỀ

Mật ong có nhiều tác dụng có lợi đối với sức khỏe con người nhờ sở hữu đa dạng các hoạt tính sinh học liên quan đến khả năng kháng oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn,… (Samarghandian *et al.*, 2017). Do đó, mật ong có giá trị kinh tế cao và nghề nuôi ong lấy mật đã giúp cải thiện đời sống của người dân và đóng góp có giá trị vào tăng trưởng kinh tế chung của tỉnh Đắk Lắk. Thống kê cho thấy, Đắk Lắk hiện có khoảng 220.000 đàn ong mật di chuyển theo các mùa hoa với sản lượng mật ong đạt trên 15.000 tấn, kim ngạch xuất khẩu đạt gần 30 triệu USD (Sở Công Thương Đắk Lắk, 2022). Đắk Lắk là địa phương có diện tích trồng cà phê robusta lớn nhất cả nước. Cùng với đó, mùa hoa cà phê hằng năm là một đặc điểm nổi bật và cũng là nguồn cung cấp mật hoa cho các đàn ong sản xuất của Tỉnh. Các nghiên cứu cho thấy, mật ong hoa cà phê có những tính chất hóa lý, thành phần hoạt chất và hoạt tính sinh học đáng chú ý (Pham *et al.*, 2022; Nguyễn Thị Huyền *et al.*, 2022; Nguyễn Minh Trung *et al.*, 2023). Do đó, việc nghiên cứu sâu về các đặc điểm đã nêu nhằm tạo cơ sở dữ liệu xây dựng bộ nhận diện thương hiệu mật ong hoa cà phê Đắk Lắk là một yêu cầu cấp thiết.

Trên cơ sở đó, các nghiên cứu về mật ong hoa cà phê thu nhận tại các vị trí địa lý khác nhau tại Đắk Lắk đã được tiến hành. Kết quả cho thấy, các mẫu mật ong thu nhận tại Cư M'gar, Cư Kuin, Krông Pắk và Tp. Buôn Ma Thuột có sự khác biệt đáng kể về các đặc điểm hóa lý, thành phần hoạt chất và hoạt tính sinh học (Nguyễn Thị Huyền *et al.*, 2022; Nguyễn Minh Trung *et al.*, 2023; Nguyen *et al.*, 2024). Các nghiên cứu cho thấy, các hoạt tính sinh học có mối liên hệ mật thiết với thành phần hợp chất tự nhiên trong mật ong như các polyphenol, flavonoid, các enzyme, dẫn xuất carotenoid hay các vitamin (Cianciosi *et al.*, 2018; Pham *et al.*, 2022; Nguyen *et al.*, 2024). Bên cạnh đó, các tính chất hóa lý, hoạt tính sinh học và thành phần các hoạt chất trong mật ong có thể thay đổi phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nguồn phấn hoa, mật hoa (Gašić *et al.*, 2017) cũng như các yếu tố về loài thực vật, kĩ thuật nuôi, vị trí địa lý, điều kiện khí hậu và môi trường nơi thu mẫu (Cheung *et al.*, 2019). Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá mối liên quan giữa các chỉ tiêu chất lượng, hoạt tính sinh học và thành phần các hoạt chất của một số mẫu mật ong hoa cà phê thu thập tại huyện Cư Kuin và xã Ea Kao, Tp. Buôn Ma Thuột năm 2023.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu và hóa chất

Thuốc thử Folin-Ciocalteu, MeOH được cung cấp bởi hãng Merck (Đức), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl), Gallic acid, Chlorogenic acid, Caffein, Epicatechin gallate, Trigonellin, Salicylic acid, Apigetrin, Quercitrin, Quercetin, Kaempferol, Apigenin của hãng Sigma Aldrich. Các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích.

Địa điểm và phương pháp lấy mẫu

Các mẫu mật ong được thu thập tại các cơ sở nuôi ong thuộc huyện Cư Kuin và xã Ea Kao, Tp. Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk vào tháng 2 năm 2023. Các cơ sở nuôi ong cách nhau tối thiểu 4 km. Mỗi địa điểm nghiên cứu thu 2 lít mật, đựng trong các dụng cụ đựng mẫu khô đã được khử trùng bằng cồn thực phẩm 70%. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 20 - 25°C trong bóng tối không quá 1 tháng tính từ thời điểm thu mẫu. Thông tin về địa điểm thu mẫu và mã hóa thể hiện trong Bảng 1.

Phương pháp xác định các chỉ tiêu hóa lý và hoạt tính kháng oxy hóa

Các mẫu mật ong được phân tích bằng các phương pháp quy định trong tiêu chuẩn Quốc Gia về mật ong (TCVN 12605:2019) bao gồm các chỉ tiêu như sau: hàm lượng chất khô hoà tan, hàm lượng tro khoáng, độ dẫn điện (EC), hàm lượng đường tổng, hàm lượng đường khử, hàm lượng saccharose, pH, độ axit tự do, hàm lượng hydroxymethylfurfural (HMF), hoạt tính diastase (1DN ứng với số ml dung dịch tinh bột tan 1% bị phân huỷ bởi các enzyme amylase có trong 1g mật ong trong 1 giờ ở điều kiện nhiệt độ 40 °C).

Bảng 1. Thông tin các mẫu mật ong thu thập tại Cư Kuin và Ea Kao năm 2023

STT	Kí hiệu mẫu	Địa điểm thu mẫu
1	CK1	T14 Ea Tiêu, Cư Kuin
2	CK2	Dray Bhăng, Cư Kuin
3	CK3	T9 Ea Tiêu, Cư Kuin
4	EK1	Buôn H'Dơk, Eakao
5	EK2	Buôn Tăng Ju, Ea Kao
6	EK3	Eakao

Phương pháp xác định hàm lượng polyphenol, flavonoid tổng số, hoạt tính sinh học của mật ong

Hàm lượng polyphenol, flavonoid tổng số, khả năng dập tắt gốc tự do DPPH và năng lực khử (Reducing Power) được tiến hành theo phương pháp được mô tả bởi Nguyen và Eun (2011); Khả năng dập tắt gốc tự do ABTS được đánh giá theo phương pháp của Cano và đồng tác giả (2000). Khả năng ức chế tyrosinase được xác định theo phương pháp được mô tả bởi Masamoto và đồng tác giả (2003).

Phương pháp đánh giá khả năng kháng khuẩn

Khả năng ức chế vi khuẩn gram âm (*Escherichia coli* và *Pseudomonas aeroginosa*) và vi khuẩn gram dương (*Staphylococcus aureus*) được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch (Singh *et al.*, 2016). Hoạt tính ức chế vi khuẩn mô tả thông qua kích thước vùng ức chế (zone of inhibition, ZOI, mm) sau 24 giờ nuôi cấy. Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) đối với các vi khuẩn được xác định bằng phương pháp resazurin-based turbidometric (TB) được mô tả bởi Teh và đồng tác giả (2017).

Phương pháp xác định hàm lượng các hợp chất bằng sắc ký lỏng cao áp (UPLC)

Thành phần các hợp chất phenolic được phân tích trên thiết bị Thermo-Ultimate 3000UPLC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) sử dụng cột sắc ký PEP-C18 (dài x đường kính cột x kích thước hạt nhồi: 150mm x 4,6mm x 3 µm). Mẫu mật ong được ly tâm, loại cặn trước khi cân chính xác 1 g mẫu hoàn tan trong 5 mL nước pH 2. Mẫu được chiết pha rắn SPE, rửa giải bằng MeOH trước khi lọc qua màng 0,45 µm và bơm vào hệ thống với dung tích 2 µL/lần, 3 lần. Hệ dung môi nhị phân gồm methanol (pha động A) và 0,1% orthophosphoric acid trong nước Mili-Q (pha động B). Tốc độ dòng 0.2 mL/phút với gradient nồng độ thay đổi: 95% B (0 – 0,5 phút); 95% – 83% B (0,5 – 8,0 phút); 83% – 70% B (8,0 – 10,0 phút); 70% –55% B (10,0 – 15,0 phút); 55% – 5% B (15 – 20 phút); 5% – 95% B (20 – 22 phút) và 95% B (22 – 26 phút). Nhiệt độ cột chiết 30^{o}C và các hợp chất được theo dõi bằng cảm biến tử ngoại (UV) bước sóng 265 nm. Các hợp chất được định lượng dựa trên phương trình đường chuẩn được xây dựng cho từng chất chuẩn.

Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

Các thí nghiệm trong nghiên cứu được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion 18. Phân tích tương quan (Pearson's Correlation Analysis), phân tích thành phần chính (Principal Component Analysis, PCA) và phân tích đa nhân tố (Multiple Factor Analysis, MFA) thực hiện bằng phần mềm R version 4.3.3. Các kết quả được thể hiện dưới dạng trung bình của 3 lần lặp lại ± độ chênh lệch tiêu chuẩn (SD). Sai khác có nghĩa về mặt thống kê của các kết quả được so sánh tại mức ý nghĩa $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Một số chỉ tiêu chất lượng của mật ong

Các chỉ tiêu chất lượng mật ong có thể ảnh hưởng đến các hoạt tính sinh học và giá trị thị trường của sản phẩm mật ong. Các chỉ tiêu hóa lý phản ánh chất lượng mật ong có thể thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố như loại

hoa, mùa hoa, vị trí địa lý, các yếu tố môi trường cũng như quá trình xử lý của cơ sở nuôi ong. Bảng 2 cho thấy, có sự khác nhau nhất định về các chỉ tiêu hóa lý giữa các mẫu mật ong thu nhận tại huyện Cư Kuin và xã Ea Kao, Buôn Ma Thuột trong năm 2023.

Bảng 2. Một số chỉ tiêu chất lượng mật ong hoa cà phê thu thập tại huyện Cư Kuin và xã Ea Kao, Tp. Buôn Ma Thuột

Mẫu	Chất khô (%)	Tro khoáng (%)	EC (mS/cm)	pH	TAC (meq/kg)	HMF (mg/kg)	TSC (g/100g)	RSC (g/100g)	Glu (g/100g)	Fru (g/100g)	Sac (g/100g)
CK1	77,233^{c} ±0,058	0,170^{f} ±0,001	0,66^{e} ±0,00	4,10^{b} ±0,00	13,973^{e} ±0,055	52,587^{a} ±0,065	69,147^{f} ±0,035	62,130^{f} ±0,046	29,967^{d} ±0,051	32,08^{f} ±0,036	7,017^{c} ±0,064
CK2	78,967^{a} ±0,058	0,176^{e} ±0,001	0,79^{b} ±0,00	4,02^{c} ±0,00	18,130^{d} ±0,036	51,933^{b} ±0,057	69,810^{e} ±0,062	62,337^{e} ±0,031	30,127^{c} ±0,021	32,170^{e} ±0,046	7,473^{b} ±0,04
CK3	77,767^{b} ±0,058	0,189^{d} ±0,001	0,73^{d} ±0,00	4,20^{a} ±0,00	13,797^{f} ±0,040	47,233^{d} ±0,040	69,977^{d} ±0,065	63,483^{c} ±0,040	30,113^{c} ±0,021	33,343^{c} ±0,031	6,493^{d} ±0,025
EK1	77,867^{b} ±0.058	0,221^{b} ±0,001	0,78^{c} ±0,00	3,99^{d} ±0,00	18,530^{c} ±0,046	46,537^{e} ±0,055	70,300^{b} ±0,046	65,143^{b} ±0,042	30,923^{b} ±0,055	34,207^{b} ±0,035	5,157^{e} ±0,064
EK2	77,200^{c} ±0,000	0,249^{a} ±0,001	0,94^{a} ±0,00	3,94^{e} ±0,00	18.76^{b} ±0,036	35,877^{f} ±0,045	70,097^{c} ±0,031	65,723^{a} ±0,045	31,247^{a} ±0,051	34,423^{a} ±0,035	4,373^{f} ±0,047
EK3	77,230^{c} ±0,398	0,197^{c} ±0,001	0,54^{f} ±0,00	3,93^{f} ±0,00	19,167^{a} ±0,060	49,400^{c} ±0,036	70,973^{a} ±0,040	63,180^{d} ±0,040	30,053^{c} ±0,032	33,103^{d} ±0,050	7,793^{a} ±0,035

Ghi chú: Giá trị trung bình ± Độ lệch chuẩn. Các chữ số a-f chỉ sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê (p < 0,05). HMF: Hydroxymethylfurfural; meq: mili đương lượng acid hữu cơ; TAC: Hàm lượng acid tổng số; EC: Độ dẫn điện; TSC: Hàm lượng đường tổng số; RSC: Hàm lượng đường khử; Glu, Fru, Sac lần lượt là hàm lượng Glucose, Fructose, Saccharose.

Hàm lượng chất khô đều cao hơn so với giới hạn tiêu chuẩn yêu cầu theo quy định quốc tế (≥ 75%) (Commission, 2001), trong đó mẫu CK2 đạt cao nhất (78,967%). Trong khi đó, hàm lượng tro khoáng đạt giá trị trung bình trong khoảng 0,170 – 0,249% với mẫu cao nhất là EK2 (0,249%), thấp nhất là CK1 (0,170%). Giá trị độ dẫn điện cao nhất và thấp nhất lần lượt là EK2 và EK3 với giá trị là 0,94 và 0,54 mS/cm. Giá trị pH phản ánh mức độ nhiễm khuẩn cũng như ảnh hưởng của các thành phần hóa học, độ ổn định và thời hạn bảo quản của mật ong. Giá trị pH dao động trong khoảng 3,94 đến 4,20 cho thấy mẫu mật có tính acid nhất định, có thể giúp hạn chế nhiễm khuẩn và nấm. Hàm lượng acid tổng số (TAC) của các mẫu đều thấp hơn nhiều so với giới hạn cho phép theo chuẩn quốc tế (< 50 meq/kg) (Commission, 2001), với giá trị dao động từ 13,797 đến 19,167 meq/kg. Việc duy trì hàm lượng acid hữu cơ ở mức vừa phải có thể giúp ổn định giá trị pH mật, từ đó ổn định mật trong các điều kiện bảo quản. Chỉ tiêu HMF (hydroxymethylfurfural) của các mẫu dao động trong khoảng 35.877 đến 45,587 mg/kg, thấp hơn đáng kể so với cho phép của mật ong ở các nước nhiệt đới (< 80 mg/kg), cho thấy các mẫu mật ong đều có độ tươi ổn định trong ngưỡng. Hàm lượng đường tổng số (TSC) dao động trong khoảng 69,147 đến 70,973 g/100g mật, trong khi hàm lượng đường khử (RSC) trong khoảng 62,130 đến 65,723 g/100g mật, cho thấy đường khử là thành phần chủ yếu trong các mẫu mật ong. Trong đó, hàm lượng đường khử cao nhất là mẫu EK2 (65,723 g/100g mật) với thành phần các loại đường khử điển hình là glucose và fructose lần lượt là 31,247 và 34,423 g/100g. Dễ dàng nhận thấy, fructose là loại đường khử chủ yếu trong các mẫu. Bên cạnh đó, mật ong còn chứa một ít đường saccharose với giá trị khác nhau giữa các mẫu. Hàm lượng saccharose ở mẫu EK3 là cao nhất, dẫn đến sự gia tăng hàm lượng đường tổng nhưng giảm hàm lượng đường khử.

Các kết quả trên cho thấy, đa số các chỉ tiêu mật ong của các mẫu mật ong thu thập được đều đạt so với tiêu chuẩn chất lượng mật ong quốc tế. So với kết quả được công bố bởi Nguyễn Thị Huyền và đồng tác giả (2022), các mẫu mật ong thu nhập tại Ea Kao có sự gia tăng nhất định về hàm lượng acid tổng số, giá trị pH, HMF, đồng thời có sự ổn định ở hàm lượng chất khô, đường tổng số và giảm nhẹ hàm lượng đường khử. Kết quả này cho thấy, chất lượng mật ong có thể dao động theo các năm do sự biến động của các yếu tố môi trường. Tuy nhiên, nhìn chung sự thay đổi này không ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng tổng thể của mật.

Hàm lượng polyphenol, flavonoid tổng số và hoạt tính sinh học của mật ong

Thành phần, hàm lượng các hợp chất polyphenol và flavonoid có tác động đáng kể đến sự khác nhau về hoạt tính sinh học của mật ong (Machado De-Melo *et al.*, 2018). Bảng 3 cho thấy sự khác biệt đáng kể về hàm lượng polyphenol và flavonoid giữa các mẫu mật ong khác nhau. Hàm lượng polyphenol tổng số (TPC) thay đổi trong khoảng từ 46,451 đến 75,720 mgGAE/100g mật, và hàm lượng flavonoid tổng số (TFC) thay đổi từ 1,855 đến 8,792 mgQE/100g mật. Trong đó, mẫu EK2 có hàm lượng TPC cao nhất (75,720 mgGAE/100g mật) và mẫu CK2 có hàm lượng TFC cao nhất (8,792 mgQE/100g mật). Giá trị TPC của EK1 và EK2 là tương đương với mẫu mật ong thu được vào năm 2022 theo báo cáo của Nguyễn Thị Huyền và đồng tác giả (2022), tuy nhiên TFC của hai mẫu này có sự thay đổi đáng kể, trong đó mẫu EK1 gia tăng và mẫu EK2 suy giảm. Trong khi đó, các mẫu tại Cư Kuin có sự suy giảm đáng kể hàm lượng TPC so với mẫu thu thập năm 2022 theo báo cáo của Nguyễn Minh Trung và đồng tác giả (2023). Sự khác nhau về hàm lượng polyphenol và flavonoid có thể phụ thuộc vào loài

hoa, vùng nuôi ong, điều kiện chế biến hay độ chín của mật (Nagai *et al.*, 2018; Cheung *et al.,* 2019). Sự thay đổi hàm lượng polyphenol và flavonoid của các mẫu năm 2023 so với 2022 có thể liên quan đến chất lượng mật hoa, điều kiện khí hậu theo các năm khác nhau. Do đó, các phân tích tổng thể về các yếu tố tác động đến sự thay đổi hàm lượng hoạt chất trong mật ong là cần thiết nhằm dự báo chất lượng mật ong cho từng năm thu nhận.

Bảng 3. Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số, hoạt tính sinh học của mật ong hoa cà phê thu thập tại huyện Cư Kuin và xã Ea Kao, Tp. Buôn Ma Thuột

Mẫu	TPC (mgGAE/100g)	TFC (mgQE/100g)	DPPH (mgTE/100g)	ABTS (mgTE/100g)	RP OD_{700nm} (200 mg/mL)	Diastase (DN)	TI (IC_{50}, g/mL)
CK1	$50,365^{c}$±0,012	$2,696^{e}$ ±0,263	$23,111^{d}$±0,528	$190,101^{e}$±5,927	$1,361^{e}$±0,005	$15,827^{f}$±0,060	$0,738^{b}$±0,010
CK2	$47,451^{e}$±0,066	$8,792^{a}$±0,129	$25,529^{c}$±0,073	$222,619^{c}$±3,732	$1,426^{c}$±0,001	$16,210^{d}$±0,040	$0,587^{d}$±0,012
CK3	$46,514^{f}$±0,043	$5,181^{c}$±0,077	$21,148^{e}$±1,023	$205,014^{d}$±6,237	$1,379^{d}$±0,001	$16,310^{c}$±0,040	$0,710^{bc}$±0,008
EK1	$60,631^{b}$±0,012^{b}	$7,333^{b}$±0,140	$31,182^{b}$±0,424	$254,515^{a}$±3,601	$1,544^{b}$±0,001	$18,733^{b}$±0,025	$0,871^{a}$±0,042
EK2	$75,720^{a}$±0,078	$1,855^{f}$±0,162	$33,412^{a}$±0,800	$235,356^{b}$±4,137	$1,56^{a}$±0,002	$20,240^{a}$±0,056	$0,593^{d}$±0,011
EK3	$47,726^{c}$±0,000	$3,809^{d}$±0,093	$13,429^{f}$±2,636	$180,574^{f}$±6,872	$1,346^{f}$±0,001	$16,087^{e}$±0,055	$0,693^{c}$±0,019

Ghi chú: Giá trị trung bình ± Độ lệch chuẩn. Các chữ số a-f chỉ sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$); QE: hàm lượng tương đương quercetin; GAE: hàm lượng tương đương gallic acid; TE: hàm lượng tương đương Trolox; RP: năng lực khử; TI: Khả năng ức chế enzyme tyrosinase.

Khả năng chống oxy hóa là tính chất quan trọng giúp mật ong duy trì được tính ổn định, đồng thời thể hiện các lợi ích về sức khỏe cho người sử dụng. Hoạt tính chống oxy hóa thể hiện qua khả năng trung hòa gốc tự do DPPH và ABTS với giá trị mô tả tương đương với Trolox. Bảng 3 cho thấy có sự khác nhau đáng kể về hoạt tính chống oxy hóa của các mẫu mật ong. Trong đó, khả năng trung hòa gốc tự do DPPH thay đổi theo thứ tự EK2 > EK1 > CK2 > CK1 > CK3 > EK3. Hoạt tính trung hòa gốc tự do ABTS mạnh hơn DPPH với thứ tự thay đổi hoạt tính EK1 > EK2 > CK2 > CK3 > CK1 > EK3. Kết quả này tương đồng với các báo cáo về mật ong hoa cà phê (Pham *et al.*, 2022; Nguyễn Thị Huyền *et al.*, 2022; Nguyễn Minh Trung *et al.*, 2023); đồng thời cho thấy thành phần chống oxy hóa trong mật ong có khả năng trung hòa tốt các gốc tự do ưa nước và ưa béo. Bên cạnh đó, khả năng hoạt động kết hợp của các hợp chất chống oxy hóa thể hiện qua Năng lực khử (Reducing Power) cũng cho thấy sự khác biệt giữa các mẫu, giá trị OD_{700nm} thay đổi từ 1,346 đến 1,544. Khả năng chống oxy hóa của các mẫu mật ong trong nghiên cứu này cao hơn các mẫu thu được ở cùng địa điểm trong năm 2022 (Nguyễn Thị Huyền *et al.*, 2022; Nguyễn Minh Trung *et al.*, 2023). Các kết quả này cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của mật ong có thể phụ thuộc đáng kể vào sự thay đổi thành phần các hoạt chất và liên quan đến sự thay đổi chất lượng mật ong qua các năm thu nhận khác nhau.

Diastase (α-amylase) là enzyme thủy phân tinh bột tự nhiên được tìm thấy trong mật ong. Sự suy giảm giá trị Diastase phản ánh mức độ thoái hóa của mật dưới tác động của điều kiện bảo quản, bao gồm nhiệt độ. Do đó, quy chuẩn chất lượng mật ong quốc tế xác định giá trị diastase tối thiểu cần đạt là ≥ 8 DN đối với mật ong tự nhiên. Bảng 3 cho thấy giá trị Diastase của các mẫu mật thu được đều đạt từ 15,827 đến 20,240 DN, trong đó cao nhất là mẫu EK2 (20,24 DN). Kết quả này phù hợp với giá trị của các mẫu mật ong thu nhận năm 2022 tại Cư Kuin (17,037 đến 19,807 DN) (Nguyễn Minh Trung *et al.*, 2023) và Ea Kao (17,96 đến 20,00 DN) (Nguyễn Thị Huyền *et al.*, 2022).

Hoạt tính ức chế tyrosinase, enzyme quan trọng điều hòa quá trình tổng hợp sắc tố melanin ở da, phản ánh khả năng ứng dụng trong lĩnh vực mỹ phẩm và thực phẩm của mật ong. Trong đó, khả năng ức chế tyrosinase có thể giúp kiểm soát các rối loạn chuyển hóa sắc tố da. Bảng 3 cho thấy hoạt tính ức chế tyrosinase khác nhau ở các mẫu thu thập được với giá trị IC_{50} dao động trong khoảng 0,587 đến 0,871 g/mL, tương đương với các mẫu mật thu nhận ở Buôn Đôn, Cư M'gar và Krông Pắk theo báo cáo của Nguyen và đồng tác giả (2024). Trong các mẫu thu thập được, mẫu CK2 và EK2 cho thấy hoạt tính tốt nhất với giá trị IC_{50} lần lượt là 0,587 và 0,593 g/mL.

Khả năng kháng khuẩn của mật ong

Mật ong có hoạt tính kháng khuẩn mạnh mẽ với nhiều tác dụng khác nhau (Almasaudi, 2021). Khả năng ức chế sinh trưởng các vi khuẩn gram âm (*E. coli, P. aeruginosa*) và vi khuẩn gram dương (*S. aureus*) thể hiện qua kích thước vòng kháng khuẩn và giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) ở Bảng 4. Kết quả đánh giá trên đĩa thạch cho thấy, hoạt tính kháng khuẩn khác nhau giữa các mẫu và giữa các nhóm vi khuẩn. Các mẫu thể hiện khả năng ức chế trung bình đối với *E. coli* với kích thước vòng kháng khuẩn dao đồng từ 6,0 đến 8,0 mm, mạnh nhất là mẫu CK1 (ZOI = 10,0 mm). Hoạt tính tương tự cũng ghi nhận với *S. aureus*. Đáng chú ý, các mẫu thể hiện hoạt tính mạnh đối với *P. aeruginosa* với kích thước vùng kháng khuẩn dao động từ 11,7 đến 15,0 mm, trong đó chủng EK1 thể hiện hoạt tính tốt nhất (ZOI = 15,0 mm). Kết quả này khác với báo cáo của Nguyễn Minh Trung và đồng tác giả (2023) đối với các mẫu ở Cư Kuin năm 2022, không thể hiện hoạt tính ức chế *S. aureus*. Tương tự, các mẫu tại Ea Kao trong nghiên cứu này cũng thể hiện hoạt tính ức chế *E. coli* thấp hơn so với báo cáo của Pham và đồng tác giả (2022). Sự khác biệt này có thể liên quan đến tính chất mật cũng như thành phần các hoạt chất có khả năng kháng khuẩn.

Bảng 4. Khả năng kháng khuẩn của mật ong thu thập tại huyện Cư Kuin và xã Ea Kao, Buôn Ma Thuột năm 2023

Mẫu mật ong	Kích thước vùng kháng khuẩn (mm)			Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC, mg/mL)		
	E. coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
CK1	10,0^{a} ± 00,0	14,7^{ab} ± 0,6	8,3^{a} ± 0,6	400^{b} ± 0	400^{b} ± 0	25^{c} ± 0
CK2	8,7^{b} ± 0,6	8,2^{d} ± 0,3	6,0^{c} ± 0,0	250^{d} ± 0	300^{c} ± 0	25^{c} ± 0
CK3	6,0^{e} ± 0,0	7,3^{e} ± 0,6	6,0^{c} ± 0,0	350^{c} ± 0	400^{b} ± 0	25^{c} ± 0
EK1	8,0^{c} ± 0,0	15,0^{a} ± 0,0	7,0^{b} ± 0,0	500^{a} ± 0	400^{b} ± 0	50^{b} ± 0
EK2	7,3^{d} ± 0,6	14,2^{b} ± 0,3	6,7^{b} ± 0,6^{b}	350^{c} ± 0	400^{b}± 0	50^{b} ± 0
EK3	6,0^{e} ± 0,0	11,7^{c} ± 0,6	8,0^{a} ± 0,0	400^{b} ± 0	500^{a} ± 0	400^{a} ± 0

Ghi chú: Giá trị trung bình ± Độ lệch chuẩn. Các chữ số a-f chỉ sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê (p < 0,05).

Khả năng kháng khuẩn trên môi trường lỏng thể hiện qua giá trị MIC cho thấy sự khác biệt trong khả năng ức chế của các mẫu mật ong với các chủng vi khuẩn khác nhau. Cụ thể, khả năng ức chế *E. coli* và *P. aeruginosa* mạnh nhất là mẫu CK2 với giá trị MIC lần lượt là 250 và 300 mg/mL. Đáng chú ý, các mẫu tại Cư Kuin thể hiện hoạt tính ức chế mạnh đối với *S. aureus* (MIC = 25 mg/mL). Kết quả này tương đồng một phần với báo cáo của Nguyễn Minh Trung và đồng tác giả (2023) cho thấy hoạt tính ức chế *S. aureus* của các mẫu mật ong thu nhận tại Cư Kuin năm 2022 trong môi trường lỏng tăng lên rõ rệt và mạnh hơn so với hai chủng vi khuẩn còn lại, trong khi không thể hiện hoạt tính trên đĩa thạch. Các kết quả này cho thấy rằng, dạng phân tán của mật ong trong các điều kiện môi trường khác nhau có thể tác động mạnh đến hoạt tính kháng khuẩn của chúng.

Thành phần các hợp chất phenolic và alkaloid

Thành phần các hợp chất tự nhiên có vai trò quan trọng đối với các hoạt tính sinh học của mật ong (Qadir *et al.*, 2020). Nghiên cứu này đánh giá hàm lượng của 10 phenolic và 01 alkaloid (Trigonelline) trong các mẫu mật ong thu thập (Bảng 5). Kết quả cho thấy, các mẫu mật khác nhau có hàm lượng các hợp chất được phân tích khác nhau. Mẫu CK3 và EK3 có hàm lượng cao đáng chú ý Gallic acid và Chlorogenic acid. Trong đó, mẫu EK3 có hàm lượng Caffein cao nhất trong khi mẫu CK3 hàm lượng Caffein thấp nhất nhưng tập trung Epicatechin gallate cao vượt trội so với các mẫu còn lại (p < 0,05). Mẫu EK3 còn chứa Apigetrin, Querectin và Kaempferol với hàm lượng cao. Trong khi đó, mẫu EK2 tập trung hàm lượng cao Trigonelline, Salicylic acid và Quercetin so với các mẫu còn lại. Đáng chú ý, Apigenin chỉ được tìm thấy trong các mẫu CK2, CK3, và EK2 (Bảng 5).

Bảng 5. Hàm lượng hoạt chất trong các mẫu mật ong thu thập tại huyện Cư Kuin và xã Ea Kao, Tp. Buôn Ma Thuột

Mẫu	Hàm lượng các hoạt chất trong mật ong (µg/g mật ong tươi)										
	GA	**ChlA**	**Caf**	**ECG**	**Tri**	**Sal**	**Apt**	**Querci**	**Querce**	**Kae**	**Apn**
CK1	3,144^{e} ±0,006	8,512^{f} ±0,092	61,357^{c} ±0,064	0,741^{e} ±0,004	5,197^{f} ±0,001	35,503^{f} ±0,171	-	1,236^{e} ±0,014	0,443^{d} ±0,005	4,404^{d} ±0,007	-
CK2	3,295^{d} ±0,004	14,615^{d} ±0,038	88,281^{b} ±0,038	0,680^{f} ±0,008	5,565^{e} ±0,005	63,708^{d} ±0,154	4,343^{c} ±0,005	2,140^{c} ±0,011	0,414^{e} ±0,002	5,366^{b} ±0,006	0,512^{b} ±0,007
CK3	**28,148^{a} ±0,005**	**24,965^{a} ±0,038**	16,503^{f} ±0,182	**2,453^{a} ±0.012**	6,009^{b} ±0,000	39,452^{e} ±0.215	0,098^{e} ±0,003	0,608^{f} ±0,019	0,377^{f} ±0,002	2.673^{f} ±0,008	0,305^{c} ±0,003
EK1	4,947^{c} ±0,005	10,133^{e} ±0,000	50,460^{d} ±0,088	1,623^{c} ±0,030	5,813^{d} ±0,002	75,063^{b} ±0,206	5,491^{b} ±0,043	2,247^{b} ±0,016	0,657^{c} ±0,002	5,066^{c} ±0,055	-
EK2	4,947^{c} ±0,005	17,352^{c} ±0,052	37,282^{e} ±0,117	1,477^{d} ±0,023	**6,044^{a} ±0,004**	**110,61^{a} ±0,181**	2,801^{d} ±0,035	**3,237^{a} ±0,012**	0,696^{b} ±0,002	3,665^{e} ±0,006	0,590^{a} ±0,002
EK3	26,280^{b} ±0,003	22,828^{b} ±0,037	**109,50^{a} ±0,654**	1,696^{b} ±0,019	5,993^{c} ±0,001	68,05^{c} ±0,209	**71,51^{a} ±0,043**	1,518^{d} ±0,01	**0,799^{a} ±0,011**	**6,532^{a} ±0,006**	-

Ghi chú: Giá trị trung bình ± Độ lệch chuẩn. Các chữ số a-f chỉ sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê (p < 0,05). GA: Gallic acid; ChlA: Chlorogenic acid; Caf: Caffeine; ECG: epicatechin gallate; Tri: Trigonelline; Sal: salicylic acid; Apt: apigetrin; Querci: quercitrin; Querce: querectin; Kae: kaempferol; Apn: apigenin.

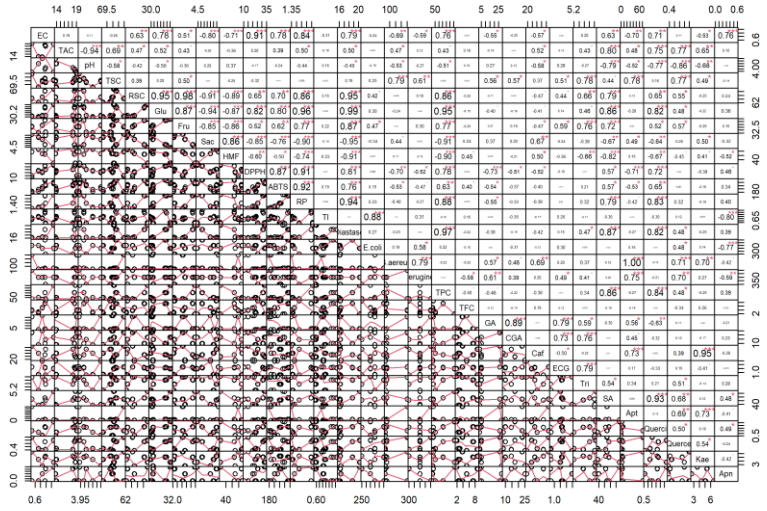
Dễ dàng nhận thấy rằng, tỷ lệ thành phần các hợp chất được phân tích là khác nhau đáng kể giữa các mẫu mật ong khác nhau. Hàm lượng các hợp chất thường được tìm thấy trong mật ong hoa cà phê như Chlorogenic acid, Caffeine, Salicylic acid, hay Apigetrin có sự khác nhau đáng kể giữa các mẫu mật ong (Bảng 5). Những sự khác biệt này có thể đã dẫn đến sự khác nhau về các hoạt tính sinh học của các mẫu mật ong thu thập được. Vị trí địa lý và nguồn hoa có thể tác động đến hàm lượng các hợp chất trong các mẫu mật ong (Cheung *et al.*, 2019). Hàm lượng cao các hợp chất như caffeine và salicylic acid có thể đóng vai trò là chỉ thị sinh học nhận diện và đánh giá

chất lượng của mật ong hoa cà phê. Hàm lượng cao hai hợp chất này trong các mẫu mật ong thu thập được khá tương đồng với báo cáo của Pham và đồng tác giả (2022). Tuy nhiên, sự khác biệt về tỷ lệ thành phần các hợp chất này cần được đánh giá trong mối liên hệ với hoạt tính sinh học và chỉ tiêu chất lượng mật để đưa ra các dẫn liệu khoa học quan trọng để nhận diện mật ong hoa cà phê tại Buôn Ma Thuột.

Tương quan giữa thành phần hợp chất và hoạt tính sinh học của mật ong hoa cà phê

Mối tương quan giữa thành phần hợp chất và hoạt tính sinh học của mật ong hoa cà phê tại Ea Kao thể hiện ở Bảng 6. Mối tương quan thuận (+1) và tương quan nghịch (-1) thể hiện thông qua hệ số tương quan Pearson, giá trị r. Mối liên hệ chặt chẽ giữa hàm lượng acid tổng số và giá trị pH của mật (r = -0,94, p < 0,001) cho thấy tính acid của mật do thành phần các acid hữu cơ quyết định. Hàm lượng đường khử có tương quan cao với chỉ số diastase (r ≥ 0,77, p < 0,001) cho thấy hoạt tính diastase có vai trò quan trọng đối với hàm lượng đường khử trong mật. Chỉ số HMF có liên quan nhất định với các hoạt tính chống oxy hóa (r dao động từ -0,50 đến – 0,74), hoạt tính diastase (r = - 0,91), hàm lượng polyphenol tổng số (r = -0.91) và một số phenolic acid như salicylic acid (r = -0,82), quercitrin (r = - 0,67), trigonellin (r = - 0,66), apigenin (r = - 0.52) cho thấy các hoạt tính và thành phần hoạt chất này có thể giúp duy trì độ tươi của mật ong.

Bảng 6. Hệ số tương quan giữa các tính chất hóa lý, hoạt tính sinh học, và thành phần hợp chất của các mẫu mật ong

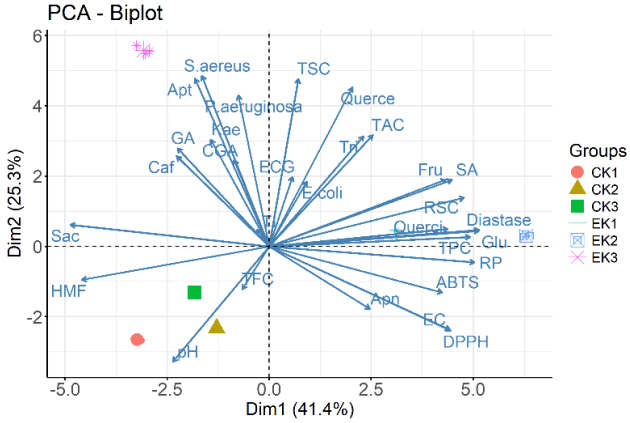


Ghi chú: EC: Độ dẫn điện; TAC: Hàm lượng acid tổng số; TSC: Hàm lượng đường tổng; RSC: Hàm lượng đường khử tổng; Glu: Glucose; Fru: Fructose; Sac: Saccharose; TPC, TFC lần lượt là hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số; DPPH và ABTS: hoạt tính dập tắt gốc tự do DPPH và ABTS tương ứng; TI: Ức chế Tyrosinase; E.coli, P.aeroginosa, S.aureus là giá trị MIC lần lượt của các chủng vi khuẩn này;; GA: Gallic acid; ChlA: Chlorogenic acid; Caf: Caffeine; ECG: epicatechin gallate; Tri: Trigonellin ; Sal: salicylic acid; Apt: apigetrin; Querci: quercitrin; Querce: querectin; Kae: kaempferol; Apn: apigenin; p > 0,05 (.), p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***).

Hoạt tính chống oxy hóa liên quan chặt chẽ với hàm lượng polyphenol tổng số (r ≥ 0, 63, p < 0,001), và liên quan mật thiết với salicylic acid (r = 0,57–0,79, p < 0,05) và quercitrin (r = 0,72–0,83, p < 0,001). Kết quả này tương tự với báo cáo của Nguyễn Minh Trung và đồng tác giả (2023) cho thấy salicylic acid và quercitrin là hai trong số những nhóm chất có liên hệ chặt chẽ với khả năng chống oxy hóa của các mẫu mật ong thu thập tại Cư Kuin năm 2022. Mối liên hệ chặt chẽ giữa khả năng trung hòa ABTS, DPPH và năng lực khử cho thấy các mẫu mật ong thu nhận năm 2023 thể hiện các khả năng chống oxy hóa đa dạng theo các cơ chế khác nhau. Mối tương quan nghịch chặt chẽ giữa apigenin với khả năng ức chế sinh trưởng của *E. coli* (r = -0,77, p < 0,0001), *P. aeruginosa* (r = -0,59, p < 0,001) trong khi thể hiện mối liên hệ ở mức độ vừa phải đối với *S. aureus* (r = -0,42, p < 0,05) cho thấy hợp chất này có thể liên quan đến khả năng ức chế sinh trưởng của các vi khuẩn này.

Sự khác biệt giữa các mẫu mật ong dựa trên phân tích thành phần chính (PCA)

Phân tích thành phần chính có thể giúp đánh giá mức độ khác biệt giữa các mẫu mật ong dựa trên các tính chất hóa lý, hoạt tính sinh học cũng như thành phần các hoạt chất. Hình 1 cho thấy tổng mức độ biến động dữ liệu là 66,7%, trong đó Dim1 mô tả 41,4% và Dim2 mô tả 25,3%. Sự phân bố dữ liệu cho thấy sự khác biệt của các mẫu mật về các chỉ tiêu được phân tích ở các vùng dữ liệu khác nhau. Các mẫu mật ong thu nhập tại Cư Kuin có tính tương đồng nhất định khi tập trung ở vùng âm của Dim1 và Dim2. Trong khi đó, các mẫu mật ong thu nhận tại Ea Kao có sự khác biệt lớn hơn, với mẫu EK1 và EK2 tách biệt trong vùng dương của Dim1 và Dim2, trong khi EK3 tách biệt rõ về phân vùng âm Dim1 và dương của Dim2.



Hình 1. PCA-Biplot mô tả mức độ khác biệt về tính chất giữa các mẫu mật ong dựa trên các thông số về tính chất hóa lý, hoạt tính sinh học, và thành phần hợp chất

Ghi chú: EC: Độ dẫn điện; TAC: Hàm lượng acid tổng số; TSC: Hàm lượng đường tổng; RSC: Hàm lượng đường khử tổng; Glu: Glucose; Fru: Fructose; Sac: Saccharose; TPC, TFC lần lượt là hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số; DPPH và ABTS: hoạt tính dập tắt gốc tự do DPPH và ABTS tương ứng; TI: Ức chế Tyrosinase; E.coli, P.aeroginosa, S.aureus là giá trị MIC lần lượt của các chủng vi khuẩn này;; GA: Gallic acid; ChlA: Chlorogenic acid; Caf: Caffeine; ECG: epicatechin gallate; Tri: Trigonellin ; Sal: salicylic acid; Apt: apigetrin; Querci: quercitrin; Querce: querectin; Kae: kaempferol; Apn: apigenin.

Sự khác biệt thuộc tính giữa các mẫu được mô tả trên sự phân bố của các điểm mô tả các chỉ tiêu được phân tích. Kết quả cho thấy, mẫu EK1, EK2 tập trung chủ yếu các hợp chất polyphenol với năng lực khử tốt cùng với khả năng dập tắt gốc tự do ABTS. Sự tập trung cao các chỉ tiêu đường khử, chỉ số diastase ngược chiều với saccharose và HMF cho thấy mối liên hệ mật thiết giữa các yếu tố này đối với chất lượng mật của mẫu EK1 và EK2 nổi bật hơn so với các mẫu còn lại. Ngoài ra, Salicylic acid và Quercitin có mối liên quan chặt chẽ với các yếu tố nêu trên. Ngược lại, các mẫu thu thập tại Cư Kuin năm 2023 không có thấy mức độ tập trung cao các hợp chất có hoạt tính sinh học, tuy nhiên lại cho thấy mối liên quan đến khả năng ức chế *E. coli* tốt hơn. Điều này có thể liên quan đến tỷ lệ flavonoid tổng số của các mẫu này tốt hơn so với các mẫu tại Ea Kao. Đáng chú ý, apigenin thể hiện mối liên hệ chặt chẽ với hoạt tính chống oxy hóa và ức chế *P.aeruginosa* và *S.aureus*, cho thấy sự có mặt của apigenin có thể giúp ổn định và duy trì các hoạt tính nêu trên ở các mẫu CK2, CK3, và EK2. Mặt khác, mẫu EK3 tương đồng với các mẫu thu thập tại Cư Kuin về hàm lượng Saccharose, do đó, tuy tập trung một số hợp chất như apigetrin, gallic acid, caffein và chlorgenic acid nhưng không thể hiện các hoạt tính sinh học vượt trội hơn các mẫu còn lại. Điều này cho thấy, sự gia tăng hàm lượng saccharose trong các mẫu có thể đã tác động đến các hoạt tính sinh học cũng như các chỉ tiêu chất lượng mật ong hoa cà phê.

KẾT LUẬN

Các mẫu mật ong thu thập tại Cư Kuin và Ea Kao, Buôn Ma Thuột năm 2023 có các chỉ tiêu chất lượng đạt chuẩn, hoạt tính chống oxy hóa cao và hàm lượng cao các hợp chất đóng vai trò là chỉ thị sinh học. Hàm lượng cao saccharose trong các mẫu mật ong có thể dẫn đến sự suy giảm các chỉ tiêu chất lượng mật ong cũng như khả năng chống oxy hóa. Salicylic acid và quercetrin liên quan đến sự ổn định chỉ số diastase của mật ong trong khi apigenin là thành phần kháng khuẩn và duy trì sự ổn định của khả năng chống oxy hóa. Nghiên cứu tiếp theo cần đánh giá thêm tác động của các nhân tố thổ nhưỡng và khí hậu, chất lượng mật hoa đến các chỉ tiêu chất lượng của mật ong hoa cà phê, từ đó cung cấp thêm dữ liệu nhằm kiểm soát chất lượng mật qua từng mùa hoa.

Lời cảm ơn: *Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ Đắk Lắk đã hỗ trợ về kinh phí thực hiện nhiệm vụ khoa học và công nghệ của Sở: Nghiên cứu một số đặc điểm hóa lý, cảm quan và hoạt tính sinh học của mật ong hoa cà phê làm cơ sở xây dựng thương hiệu mật ong hoa cà phê Đắk Lắk.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Almasaudi S (2021). The antibacterial activities of honey. *Saudi J Biol Sci,* 28(4): 2188-2196.

Cheung Y, Meenu M, Yu X, Xu B (2019). Phenolic acids and flavonoids profiles of commercial honey from different floral sources and geographic sources. *Int J Food Prop,* 22(1): 290-308.

Cianciosi D, Forbes-Hernández TY, Afrin S, Gasparrini M, Reboredo-Rodriguez P, Manna PP, Zhang J, Bravo Lamas L, Martínez Flórez S, Agudo Toyos P, Quiles JL, Giampieri F, Battino M (2018). Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules,* 23(9).

Commission CA (2001). Draft revised standard for honey (at step 10 of the codex procedure). *Codex Alimentarius Commission, FAO: Rome, Italy,* 25: 19-26.

Gašić UM, Milojković-Opsenica DM and Tešić ŽL (2017). Polyphenols as possible markers of botanical origin of honey. *J AOAC Int*, 100(4): 852-861.

Machado De-Melo AA, Almeida-Muradian L, Sancho MT, Maté AP. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *J Apic Sci,* 57(1): 5-37.

Nguyễn Minh Trung, Bùi Thị Bích Huyên, Mai Quốc Quân, Nguyễn Thị Huyền, Đoàn Mạnh Dũng, Nguyễn Quang Vinh (2023). Thành phần các hợp chất phenolic, hoạt tính kháng oxy hóa và kháng khuẩn của mật ong hoa cà phê thu thập tại Cư Kuin, Đắk Lắk. *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2023*. 455-461.

Nguyen QV, Nguyen MT, Thi BHB, Mai QQ, Doan MD, Nguyen TH, Nguyen PV, Pham TN, Le TM (2024). Physicochemical Characterization, Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of Coffea Robusta Monofloral Honey from Dak Lak Province, Vietnam. *Chem Biodivers,* 21(6): e202400379.

Nguyễn Thị Huyền, Bùi Thị Bích Huyên, Nguyễn Minh Trung, Đoàn Mạnh Dũng, Nguyễn Quang Vinh (2022). Thành phần hóa lý và hoạt tính kháng oxy hóa của mật ong hoa cà phê ở một số cơ sở nuôi ong tại huyện Cư M'gar và thành phố Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk. *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2022*. 696-702.

Pham TN, Nguyen TV, Le DT, Diep LMN, Nguyen KN, To THN, Le TH, Nguyen QV (2022). Phenolic Profiles, Antioxidant, Antibacterial Activities and Nutritional Value of Vietnamese Honey from Different Botanical and Geographical Sources. *AgriEngineering,* 4(4): 1116-1138.

Qadir J, Wani JA, Ali S, Yatoo AM (2020) Heath Benefits of Phenolic Compounds in Honey: An Essay. In: Rehman MU and Majid S (eds) *Therapeutic Applications of Honey and its Phytochemicals: Vol.1*. Singapore: Springer Singapore, pp.361-388.

Samarghandian S, Farkhondeh T and Samini F (2017). Honey and health: A review of recent clinical research. *Pharmacognosy Res,* 9(2): 121.

Sở Công Thương Đắk Lắk (2022). Thị trường ong mật Đắk Lắk cần hướng đi mới trong thời gian tới. Epub ahead of print 26/03/2022 08:06. Ngày truy cập 26/06/2024 09:30

PHYSIOCHEMICAL PROPERTIES, BIOLOGICAL ACTIVITIES AND BIOACTIVE COMPONENTS OF COFFEE FLOWER HONEY COLLECTED IN CU KUIN DISTRICT AND EA KAO COMMUNE, BUON MA THUOT CITY IN 2023

Nguyen Minh Trung[2], Bui Thi Bich Huyen[1], Mai Quoc Quan[1], Nguyen Thi Huyen[1], Doan Manh Dung[1], Nguyen Quang Vinh[1*]

[1]*Institue of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University*

[2]*Faculty of Natural Science and Technology, Tay Nguyen University*

SUMMARY

This study investigated the relationship between the physicochemical parameters, biological activities, and active ingredients of coffee flower honey collected from the Cu Kuin district and Ea Kao commune, Buon Ma Thuot, Dak Lak province, in 2023. The results demonstrated that the honey meets international quality standards (Codex Alimentarius), with a dry matter content of at least 77%, total acid content less than 14 meq/kg, pH below 5, HMF less than 55 mg/kg, and a diastase index ranging from 16,087 to 20,240 DN. The total polyphenol content (TPC) ranged from 46,451 to 75,720 mg GAE/100 g, and the total flavonoid content (TFC) varied from 1,855 to 8,792 mg QE/100 g. The antioxidant capacity exceeded that of samples collected in 2022, with DPPH free radical neutralizing values between 13,429 and 33,412 mg TE/100 g and ABTS values from 180,574 to 254,515 mg TE/100 g. The honey samples exhibited strong antibacterial properties, with minimum inhibitory concentration values ranging from 250 to 500 mg/mL for *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and 25 to 400 mg/mL for *Staphylococcus aureus*. Additionally, the tyrosinase inhibition was noteworthy, with IC_{50} values between 0.587 g/mL and 0.871 g/mL. Significant levels of phenolic compounds and alkaloids, including salicylic acid and quercitrin, were present in all samples, contributing to maintaining diastase activity and a low HMF index. These compounds are closely associated with the honey's antibacterial and antioxidant activities, which can be diminished by increased sucrose content in samples.

Keywords: Polyphenol and flavonoid, antioxidant, antibacterial, coffee flower honey, principal component analysis (PCA).

[*] Author for correspondence: Tel: 948337164; Email: nqvinh@ttn.edu.vn

NÂNG CAO HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN *Escherichia coli* BẰNG PHỨC HỢP NANO CHITOSAN/TINH BỘT MANG AMPICILLIN

Nguyễn Vĩnh Nghi[1], Nguyễn Thị Huyền[2], Nguyễn Anh Dũng[2*]

[1]*Bệnh viện Đa khoa Ninh Thuận, Tp. Phan Rang-Tháp Chàm.*

[2]*Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên*

TÓM TẮT

Nano chitosan/tinh bột composite được tạo bằng phương pháp sấy phun với tỷ lệ chitosan và tinh bột khác nhau. Hình thái hạt nano chitosan/tinh bột được nghiên cứu bằng chụp ảnh SEM. Kết quả cho thấy hạt nano chitosan/tinh bột composite có hình cầu, bề mặt trơn nhẵn. Phân bố kích thước hạt từ 100-600 nm, kích thước hạt trung bình biến động từ 300-400 nm, phụ thuộc vào tỷ lệ giữa chitosan và tinh bột. Tỷ lệ tinh bột trong copolymer càng cao thì hạt có kích thước càng nhỏ. Điện thế hạt zeta potential từ +60mV đến +90mV. Hạt nano chitosan/tinh bột composite được mang kháng sinh ampicillin và thử khả năng kháng khuẩn kháng thuốc kháng sinh *E. coli*. Kết quả cho thấy hiệu quả kháng khuẩn *E.coli* của nanochitosan/tinh bột mang ampicillin là trên 95%, cao hơn khi chỉ sử dụng ampicillin (92,1%) ở cùng nồng độ 5µg/mL sau khi xử lý 12h. Kết quả bước đầu cho thấy nano chitosan/tinh bột composite là vật liệu nano tiềm năng cho dẫn truyền thuốc để chống lại vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh.

Từ khóa: Ampicillin, chitosan, *E. coli*, kháng kháng sinh, tinh bột.

GIỚI THIỆU

Escherichia coli là nguyên nhân gây bệnh tiêu chảy, nhiễm trùng huyết và các triệu chứng lâm sàng khác, là một trong những mầm bệnh đường ruột chính ảnh hưởng đến sức khoẻ người và động vật. Hiện nay, theo WHO (2018) gần như tất cả các vi khuẩn gây bệnh nặng đều kháng với thuốc kháng sinh. *Tính kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh (AMR: antimicrobial resistance) đang lan rộng và là thách thức nghiêm trọng đối với hệ thống y tế, chăm sóc sức khoẻ.* Ampicillin (AMP), một loại kháng sinh beta-lactam bán tổng hợp, được sử dụng rộng rãi để điều trị nhiễm khuẩn *E. coli* ở người và gia súc nhưng thời gian gần đây tỷ lệ kháng thuốc đã tăng nhanh chóng (Li *et al.,* 2019). *E. coli* kháng Ampicillin cao nhất với tỷ lệ trên 82,7% (Vranic *et al*., 2016).

Để chống lại vi khuẩn kháng thuốc trong đó có *E. coli*, hiện nay có giải pháp hiệu quả là sử dụng các vật liệu nano để mang các thuốc kháng sinh. *Vật liệu nano mang kháng sinh có các hướng tác động như: Phân huỷ thành tế bào; phân huỷ và chống tạo thành màng sinh học (biofilm); giải phóng oxygen hoạt hóa (ROS) phá màng tế bào; phá huỷ DNA và ngăn cản quá trình tổng hợp của protein* (Eleraky *et al*., 2020; Ssekatawa *et al*., 2020). Vật liệu nano chitosan được tạo ra từ chitosan có diện tích bề mặt tiếp xúc và điện tích dương lớn hơn chitosan thông thường nên có hoạt tính kháng khuẩn cao hơn (Sharma *et al*., 2018; *Yanat và Schoen (2021*). Những nghiên cứu gần đây chứng minh rằng nano chitosan là một vật liệu mang và dẫn truyền thuốc rất tiềm năng. Chúng có khả năng bảo vệ thuốc khỏi sự phân hủy của enzyme trong đường ruột. Nhờ có kích thước nhỏ, chúng có tác dụng thấm sâu vào cơ thể, đưa thuốc đến đúng mô, tế bào mục tiêu để nâng cao hiệu quả điều trị. Nano chitosan mang kháng sinh như amoxicilline, ciprofloxacin, chlortetracycline và gentamycin để nâng cao hiệu quả sử dụng và chống tính kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh (Rozman *et al*., 2019; Nguyen *et al*., 2017; La *et al*., 2014; Cong *et al*., 2019). Costa và đồng tác giả (2018) đã nghiên cứu sử dụng hạt nano chitosan có khả năng ức chế các vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh như vancomycin-resistant *Staphylococus aureus* (VRSA), vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VREF), *Pseudomonas aeruginosa* R (ATCC 700699, BAA-2365 và ATCC10145), *Acinetobacter baumannii* R. Tuy nhiên, hạn chế của nano chitosan là giá thành cao và không ổn định trong môi trường axit.

Xuất phát từ thực tế thực trạng kháng thuốc của các vi khuẩn gây bệnh ở bệnh viện, cơ sở chăn nuôi và nuôi trồng thuỷ sản, nghiên cứu giải pháp kháng lại tính kháng thuốc và đa kháng thuốc của vi khuẩn *E. coli* gây bệnh ở Việt Nam bằng sử dụng công nghệ nano chitosan/tinh bột có hiệu quả, giá thành thấp và ổn định trong môi trường pH axit là rất cấp thiết.

VẬT LIỆU PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chitosan sản phẩm của Sigma (Hoa Kỳ), Khối lượng phân tử Mw 500-750 kDa, DD >75%. Tinh bột tan (Himedia, Ấn Độ). Chủng *E. coli* do Viện Pastuer Tp. Hồ Chí Minh cung cấp. Kháng sinh Ampicillin (Sigma, Hoa Kỳ). Môi trường Nutrient Broth của Himedia (Ấn Độ).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nhốt Ampicillin trong cấu trúc hạt nano chitosan/tinh bột composite

Pha dung dịch acetic acid 0,1N bằng nước khử ion. Chitosan dạng bột khô được hòa tan trong dung dịch acetic acid trên bằng máy khuấy từ cho đến khi tan hoàn toàn. Nồng độ dung dịch chitosan sau hòa tan là 0,1% (w/v). Tinh bột được hồ hóa tạo gel với nồng độ 0,1% (w/v) trong nước khử ion ở nhiệt độ 100^{o}C.

Hỗn hợp dung dịch chitosan với gel tinh bột theo tỷ lệ 1:0 (C100); 1:1 (C1S1); 1: 2 (C1S2); 1:3 (C1S3); và 0:1 (S100) (w/w), khuấy hỗn hợp trong 60 phút. Lượng kháng sinh ampicillin được bổ sung vào hỗn hợp dung dịch gel chitosan/tinh bột sao cho đạt các nồng độ cuối cùng: 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 µg/mL. Tiến hành sấy phun tạo hạt nano chitosan/tinh bột composite và ampicillin bằng thiết bị sấy phun nano (B90, Buchi, Thuỵ sĩ) theo quy trình với thông số: Nhiệt độ đầu vào 120ºC; Nhiệt độ đầu ra 80ºC; Tốc độ dòng phun: 120 mL/h. Áp suất khí nén: 1,2m^3/phút, kích thước đầu phun là 5,0 µm. Các thông số đã được nghiên cứu tối ưu theo phương pháp của Nguyen Tan Vui và đồng tác giả (Nguyen *et al*. 2017).

Tính chất của nano chitosan/tinh bột composite được xác định bằng ảnh SEM (Thermo, Hoa Kỳ), kích thước trung bình, thế zeta potential và sự phân bố kích thước hạt đo bằng thiết bị Nanosizer SZ 100, Horiba, Nhật Bản (Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên).

Phương pháp đánh giá hiệu quả kháng khuẩn của phức hợp nano chitosan/tinh bột composite mang ampicillin

Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nồng độ ampicillin trong nano đến hiệu quả kháng khuẩn

Các mẫu nano chitosan/tinh bột composite là C100; C2S1; và S100 (Tinh bột 100%) chứa 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 µg/mL ampicilin. Mỗi lô thí nghiệm lặp lại 3 lần. Hút 1 mL dung dịch vi khuẩn *E. coli* từ bình tăng sinh cho vào mỗi bình thí nghiệm nuôi cấy lắc trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng, tốc độ lắc 120 vòng/phút. Xác định khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp đo độ đục ở 620 nm bằng máy quang phổ UV-Vis Jasco (Nhật Bản) ở các khoảng thời gian sau khi ủ là 12 giờ.

Tỷ lệ kháng khuẩn được tính theo công thức theo mô tả của Asadpoor và đồng tác giả (2021) như sau:

$$I\ (\%) = (B-K)/B*100\%$$

Trong đó: I: Tỷ lệ kháng khuẩn. B: Chỉ số OD620 nm trung bình 3 lần lặp của dịch vi khuẩn đối chứng. K: Chỉ số OD620 nm trung bình 3 lần lặp ở lô thí nghiệm.

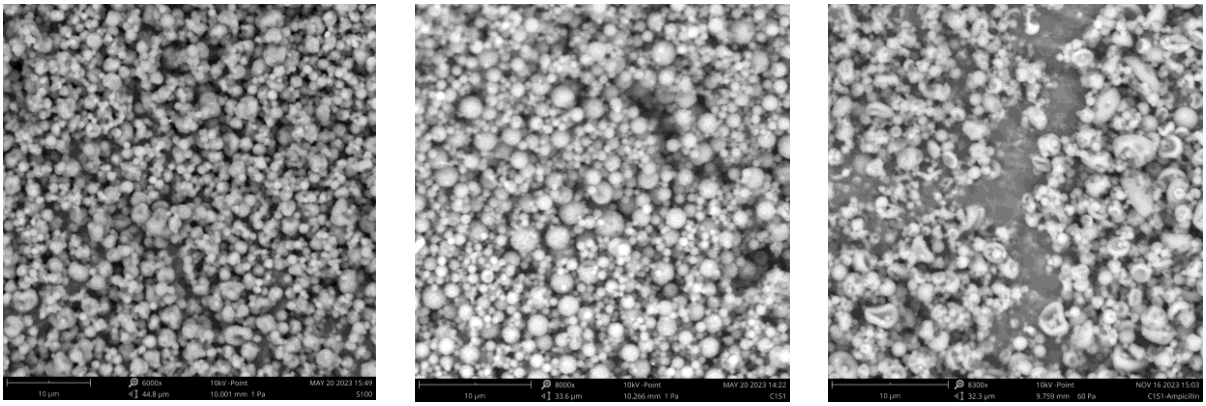
Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của nano chitosan/tinh bột composite mang ampicillin đến hiệu quả kháng khuẩn

Các mẫu nano nghiên cứu là: C100; C1S1; C1S2; C1S3; C2S1; C3S1; S100 mang 5,0 µg/mL ampicillin và mẫu đối chứng 5,0 µg/mL ampicillin. Thí nghiệm được thực hiện như trên trong thời gian ủ là 48 giờ.

KẾT QUẢ THẢO LUẬN

Tính chất vật liệu nano chitosan/tinh bột mang kháng sinh ampicillin

Chitosan là một polymer tự nhiên, tương hợp sinh học, phân huỷ sinh học có nhiều ứng dụng trong sinh y học và nông nghiệp. Tuy nhiên, rào cản lớn nhất của polymer này khi ứng dụng là giá thành cao. Để giảm bớt chi phí đầu vào và gia tăng khả năng ứng dụng nghiên cứu đã phối hợp chitosan với tinh bột. Tính chất hạt nano chitosan/tinh bột composite được ghi nhận (Hình 1) cho thấy kích thước hạt nano giảm dần khi tỷ lệ chitosan trong phức hợp nano giảm: từ 816,9 nm (100% chitosan C100) xuống 372,4 nm ở công thức có tỷ lệ 50% chitosan: 50% tinh bột (C1S1) và 133,2nm ở công thức S100 (100% tinh bột). Kích thước hạt nano chitosan/tinh bột composite trung bình nằm trong khoảng khoảng 300-750 nm, thế zeta 70-90 mV. Theo nghiên cứu của Nguyễn Tấn Vui và đồng tác giả (2017) cho thấy kích thước hạt nano chitosan bằng phương pháp sấy phun trung bình từ 420-970 nm, thế zeta potential từ +40 đến +50 mV. So với nghiên cứu này công thức C1S3, hạt nano chitosan/tinh bột có kích thước nhỏ hơn (190 nm). Nghiên cứu của Lã Thị Kim Ngân và đồng tác giả (2014) cũng cho thấy hạt nano chitosan tạo bằng phương pháp sấy phun có kích thước trung bình từ 100-400 nm, thế zeta từ 39-45 mV. Hạt nano chitosan cũng được sử dụng làm chất mang kháng sinh amoxicillin để kháng khuẩn *S. aureus.* Kích thước và tính chất hạt nano chitosan phụ thuộc vào khối lượng phân tử, nồng độ chitosan khi sấy phun (La *et al*., 2014).

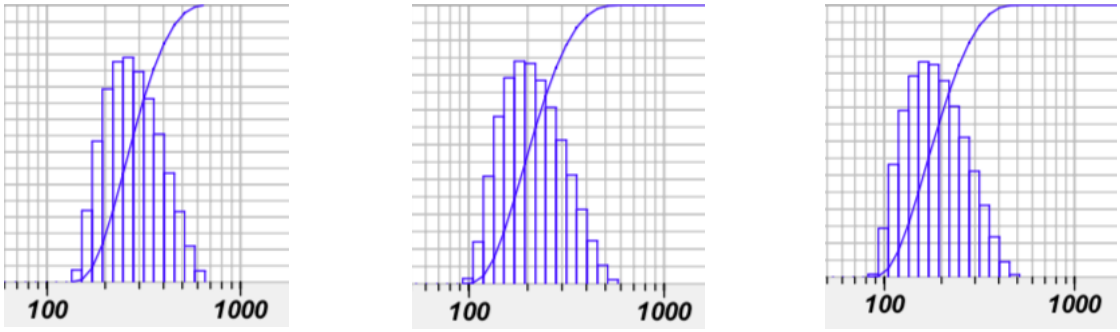


a) Tinh bột 100% (S100) b) Mẫu C1S1 c) Mẫu C1S1+ampicillin

Hình 1. Ảnh chụp SEM hạt nano tinh bột S100(a) chitosan/tinh bột C1S1(b) và phức hợp nano chitosan/tinh bột C1S1 mang ampicillin (c). (Chụp bằng thiết bị SEM Phenom X, Thermo, Hoa Kỳ. Độ phóng đại x8000; 10 kV. Bar 10 μm)

Đặc điểm cấu trúc hạt và bề mặt hạt bằng ảnh chụp SEM (Hình 1) cho thấy: Mẫu S100 (100% tinh bột) (a) hạt có cấu trúc chắc chắn, hình cầu nhưng bề mặt bị lõm do tinh bột khi hồ hóa (gel hóa) ngậm nhiều nước nên khi sấy phun mất nước nhanh so với các mẫu có thành phần bổ sung chitosan. C1S1 (50% Chitosan + 50% Tinh bột) (b) hạt nano có cấu trúc chắc chắn, hình cầu chuẩn và bề mặt trơn nhẵn. Cấu trúc hình cầu cho thể tích và diện tích bề mặt lớn nhất có ưu thế trong nhốt, và phóng thích chậm thuốc hơn các cấu trúc khác. Cấu trúc hạt nano chitosan/tinh bột mang ampicilin (c) có hình thành nhiều hạt có cấu trúc lõm bề mặt hơn so với mẫu tinh bột (a).

Phân bố kích thước hạt thể hiện sự đồng đều về kích thước của hạt nano (Hình 2). Đặc điểm này có ảnh hưởng đến diện tích bề mặt hạt, khả năng xâm nhập của hạt nano vào tế bào. Kết quả ảnh hưởng của tỷ lệ chitosan và tinh bột trong cấu trúc nano composite được ghi nhận ở hình cho thấy các mẫu đều tuân theo phân bố chuẩn Gause và phụ thuộc vào tỷ lệ tinh bột. Tỷ lệ tinh bột trong copolymer càng lớn thì kích thước hạt càng nhỏ và có phân bố kích thước hẹp. Kết quả cho thấy mẫu C1S1 có phân bố từ 140-600nm; mẫu C1S2 có phân bố 100-500 nm; C1S3 từ 90-400 nm (Hình 2).

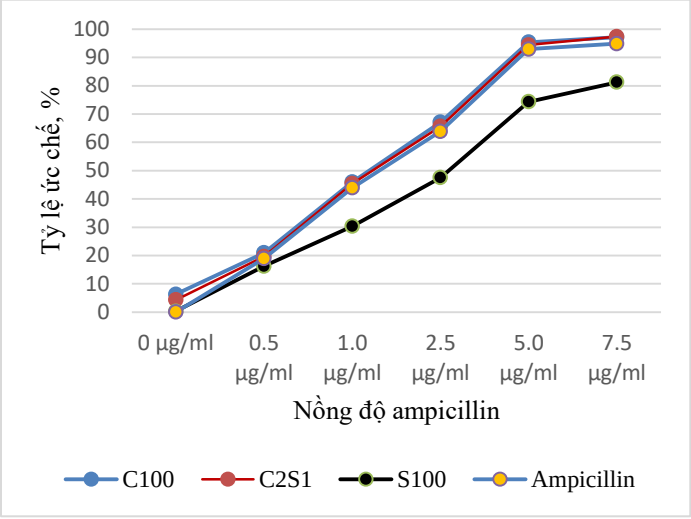


C1S1 C1S2 C1S3

Hình 2. Phân bố kích thước hạt các mẫu nano chitosan/tinh bột composite (Nanosizer SZ 100, Horiba, Nhật Bản)

Ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh ampicilin bao gói trong nano chitosan/tin bột composite đến khả năng kháng khuẩn *E. coli*

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ ampicillin đến hiệu quả kháng khuẩn *E. coli* được thực hiện với nồng độ từ 0-7,5 μg/mL ampicillin trong hạt nano chitosan/tinh bột composite, thời gian ủ là 12 giờ. Sau đó mẫu được đo độ đục ở OD620 nm và xác định hiệu quả ức chế. Kết quả được ghi nhận trong hình 3 cho thấy sự gia tăng nồng độ kháng sinh làm gia tăng hiệu quả kháng khuẩn *E. coli.* Ở nồng độ 1,0 μg/mL với chất mang nano chitosan/tinh bột và không có chất mang thì hiệu quả kháng khuẩn đạt xấp xỉ 50% và đạt 65-70% ở nồng độ 2,5 μg/mL. Ở nồng độ 5,0 μg/mL amipicillin có chất mang nanochitosan/tinh bột composite (C100, C2S1) có hiệu quả ức chế trên 95% so với 92,1% của ampicillin. Ampicillin đạt tỷ lệ ức chế 95% ở nồng độ 7,5 μg/mL. Do các chất mang nano chitosan/tinh bột composite có điện tích dương từ +70 đến +90 mV nên khả năng gắn và xâm nhập qua màng tế bào vi khuẩn điện tích âm tốt hơn ampicillin và nano tinh bột (S100). Kháng sinh ampicillin được nhốt trong hạt nano nên sẽ phóng thích chậm. Vì vậy, nồng độ ampicillin hiện hữu trong tế bào và ức chế vi khuẩn sẽ thấp hơn nhiều so với tổng lượng kháng sinh được bao gói. Ngoài ra, hiệu quả kháng khuẩn sẽ kéo dài hơn và hạn chế khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn.

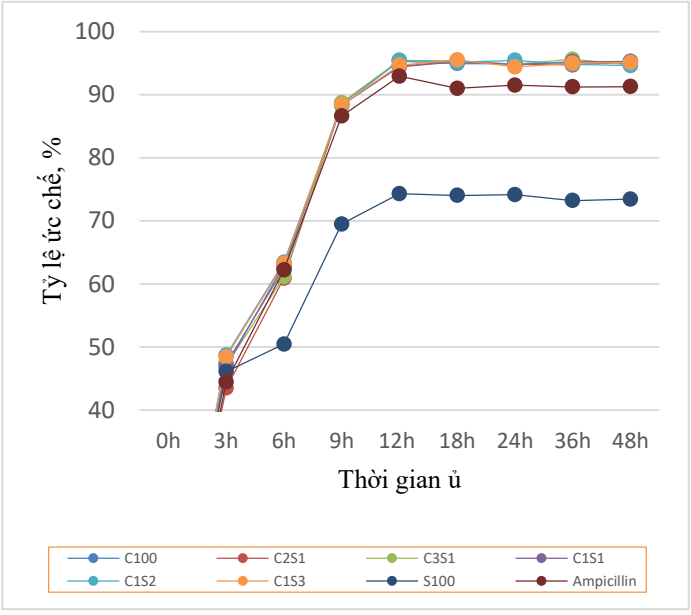


Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ ampicillin trong hạt nano chitosan/tinh bột composite đến kháng khuẩn *E. coli*

Kết quả Hình 3 cũng cho thấy khi ampicillin được bao gói trong hạt nano tinh bột sẽ cho hiệu quả kháng khuẩn *E. coli* thấp hơn ampicillin đơn và ampicillin trong hạt nano chitosan/tinh bột composite. Nguyên nhân có thể là do hạt nano tinh bột (S100) mang điện tích -19,7 mV nên khả năng tiếp cận màng tế bào mang điện tích âm khó hơn. Ngoài ra, cấu trúc hạt nano tinh bột (S100) khi mang kháng sinh ampicillin có hiện tượng dính thành chuỗi dẫn đến khả năng xâm nhập tế bào vi khuẩn sẽ bị hạn chế, dẫn đến hiệu quả kháng khuẩn *E. coli* thấp.

Ảnh hưởng của thời gian ủ đến khả năng kháng khuẩn *E. coli*

Để nghiên cứu hiệu quả kháng khuẩn và khả năng ức chế *E. coli được thực hiện ở nồng độ* ampicillin 5,0 µg/mL trong hạt nano chitosan/tinh bột composite. Thí nghiệm được tiến hành với 7 loại nano chitosan/tinh bột composite và thời gian ủ từ 0 giờ tới 48 giờ (Hình 4). Kết quả hình 4 cho thấy tất cả các mẫu nano chitosan/tinh bột composite C100; C1S1; C1S2; C1S3 và C2S1; C3S1 đều cho hiệu quả kháng khuẩn cao 95,0-95,41% ở nồng độ ampicillin 5 µg/mL sau 12h ủ, cao hơn khi chỉ có ampicillin là 92,9%. Kết quả cũng cho thấy hiệu quả kháng khuẩn hạt nano tinh bột (S100) mang ampicillin là 74,3%. Điều quan trọng là hiệu quả kháng khuẩn của các hạt nano chitosan/tinh bột tiếp tục duy trì ổn định sau 18h, 24h, 36h và 48h. Trong khi đó, mẫu ampicillin sẽ giảm nhanh liên tục sau thời gian từ 12-48 h. Cụ thể là từ 92,9% ở 12h, giảm xuống 90,97% ở 18h. Điều này chứng tỏ có biểu hiện vi khuẩn *E. coli* gia tăng tính kháng thuốc làm cho hiệu quả của ampicillin giảm dần theo thời gian sử dụng (Hình 4).



Hình 4. Hiệu quả kháng khuẩn *E. coli* của phức hợp nano chitosan/tinh bột composite mang kháng sinh ampicillin ở nồng độ 5,0 µg/mL

Li và đồng tác giả (2019) nghiên cứu cơ chế kháng thuốc ampicillin của *E. coli* cho thấy *E. coli* có thể: 1) cảm ứng enzyme beta lactamse để phân giải làm mất hoạt tính ampicillin; 2) thay đổi protein target trên màng 3) thay đổi tính thấm của màng với kháng sinh; 4) bơm ngược kháng sinh ra ngoài màng tế bào. Khi kháng sinh ampicillin được bọc trong hạt nano chitosan/tinh bột composite có thể ngăn cản một số cơ chế đề kháng kháng sinh của vi khuẩn. Hạt nano mang kháng sinh có kích thước siêu nhỏ và mang điện tích dương lớn (+70 đến +90 mV) sẽ gia tăng quá trình xâm nhập của thuốc qua màng, cản trở cơ chế kháng như thay đổi tính thấm, thay đổi protein target và cơ chế bơm ngược kháng sinh ra ngoài. Ngoài ra, khi kháng sinh được nhốt, bao gói trong hạt nano chitosan/tinh bột composite sẽ cản trở tiếp xúc trực tiếp của enzyme beta lactamase của vi khuẩn để phân giải thuốc ampicillin. Cũng theo nghiên cứu của Li và đồng tác giả (2019) thì *E. coli* khi được cảm ứng kháng sinh ampicillin ở nồng độ thấp thì tính kháng sau đó tăng lên nhiều lần, giá trị MIC ban đầu là 4,0 μg/mL sẽ tăng lên 32 μg/mL và thậm chí 256 μg/mL.

KẾT LUẬN

Hạt nano chitosan/tinh bột composite tạo bằng phương pháp sấy phun có dạng hình cầu, đồng nhất và cấu trúc ổn định, kích thước hạt trung bình từ 300-500 nm, tuỳ theo tỷ lệ giữa chitosan và tinh bột trong phức hợp nanocomposite. Tỷ lệ tinh bột càng cao thì kích thước hạt càng nhỏ. Tỷ lệ thích hợp giữa chitosan và tinh bột là 1:1 hoặc 1:2. Hạt nano chitosan/tinh bột composite mang ampiciline có hoạt tính kháng khuẩn *E. coli* cao hơn và ổn định hơn so với ampicillin tự do. Từ các kết quả thu được cho thấy hạt nano chitosan/tinh bột composite tạo bằng phương pháp sấy phun là vật liệu ổn định, tiềm năng để mang và phân phối thuốc cho các ứng dụng y dược học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Asadpoor M, Varasteh S, Pieters RJ; Folkerts G, Braber S (2021). Differential effects of oligosaccharides on the effectiveness of ampicillin against *Escherichia coli* in vitro. *Pharma Nutition,* 16; 100264.

Cong Y; Geng J, Liu C (2019). Ureido-modified carboxymethyl chitosan-graft-stearic acid polymeric nano-micelles as a targeted delivering carrier of clarithromycin for Helicobacter pylori: Preparation and in vitro evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129: 686–692.

Costa EM, Silva S, Veiga M, Freni K, Maria T, Pintado M (2018). Exploring chitosan nanoparticles as effective inhibitors of antibiotic resistant skin microorganisms – From in vitro to ex vitro testing- *Carbohydrate Polymers*, 201: 340-346.13.

Deng Z, Wang T, Chen X, Liu Y (2020). Applications of chitosan-based biomaterials: a focus on dependent antimicrobial properties. *Marine Life Science & Technology*, 2(4) : 398-413.

Eleraky NE, Allam A, Hassan SB and Omar MM (2020). Nanomedicine Fight against Antibacterial Resistance: An Overview of the Recent Pharmaceutical Innovations, *Pharmaceutics; 12*, 142.

La TKN, Wang SL, Nguyen AD (2014). Preparation of chitosan nanoparticles by spray drying, and their antibacterial activity, *Research on Chemical Intermediate*, 40: 2165-2175.

Li M, Liu Q, Teng Y (2019). The resistance mechanism of E. coli induced by ampicillin in laboratory. *Infection and Drug Resitance*, 12: 2853-2863.

Maria VR, Blanca G (2019). Nanomaterials as promising alternative in infection treatment*, International Journal of Molecular Science*, MDPI, 20: 3608.

Nguyen TV, Phung ML, Vo, TPK, Nguyen AD (2017). Preparation of chitosan nanoparticles by TPP ionic gelation combined with spray drying, and the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and a chitosan nanoparticle–amoxicillin complex, *Research on Chemical Intermediate,* 43: 3527–3537.

Rozman NAS; Yen TW, Ring LC (2019). Potential Antimicrobial application of chitosan nanoparticles (ChNP). *Journal of Microbiological Biotechnolology,* 29 (7): 1009-1013.

Sharma D, Sharma N, Pathak K (2018). Nanotechnology-based drug delivery systems: challenges and opportunities. In: *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems* (ed. A. Grumezescu), 39–79. UK: Elsevier.

Ssekatawa K, Byarugaba DK, Kato CD, Ejobi F, Tweyongyere R, Lubwama M, Kirabira JB, Wampande EM (2020). Nanotechnological solutions for controlling transmission and emergence of antimicrobial-resistant bacteria, future prospects, and challenges: a systematic review. *Journal of Nanoparticle Research,* 22:117.

Vranic SM, Uzunovic A (2016). Antimicrobial Resistance of E. coli strains isolated from urin at outpatient population: A single laboratory experience. *Materia Socio Medica*, 28(2): 121-124.

WHO. High Levels of Antibiotic Resistance Found Worldwide, New Data Shows. WHO, News Release. Available online: https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistancefound/en/ (accessed on 29 January 2018).

Yanat M, Schoen K (2021). Preparation methods and applications of chitosan nanoparticles; with an outlook toward reinforcement of biodegradable packaging. *Reactive and Function Polymers,* 16: 104849.

IMPROVING ANTI-BACTERIAL ACTIVITY OF *Escherichia coli* BY USING NANO CHITOSAN/STARCH COMPOSITE LOADED AMPICILLIN

Nguyễn Vĩnh Nghi[1], Nguyễn Thị Huyền[2], Nguyễn Anh Dũng[2*]

[1]*Ninh Thuan Hospital, Phan Rang-Tháp Chàm City*

[2]*Institute of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University*

SUMMARY

Chitosan/starch nanocomposite was prepared by spray drying method with different ratio of chitosan and starch. The morphology of chitosan/starch nanoparticles was studied by SEM imaging. The results showed that the chitosan/starch composite nanoparticles have a spherical shape, smooth surface, and stable structure. Nanoparticle size distribution was ranged from 100-600 nm, average particle size of 300-400 nm that was depended on the ratio between chitosan to starch. The higher the ratio of starch in the copolymer, the smaller the particle size. Zeta potential of the nanoparticles was ranged from +70mV to +90mV. Chitosan/starch composite nanoparticles were loaded with the ampicillin and tested for their ability to fight antibiotic-resistant *E. coli.* The results showed that the antibacterial effectiveness of nanochitosan/starch carrying ampicillin against *E. coli* was over 95%, higher than 92.1% when only using ampicillin at the same concentration of 5 micg/mL after 12h treatment. Initial results show that chitosan/starch nanocomposite is a potential nanomaterial for antibiotic drug delivery.

Keywords: Ampicillin, antibiotics resistance, chitosan, *E.coli*, nanocomposite, starch.

[*] Author for correspondence: Phone: 905426524; Email: nadzung@ttn.edu.vn

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYM ACETYLCHOLINESTERASE CỦA MỘT SỐ LOÀI DƯƠNG XỈ BẢN ĐỊA VIỆT NAM

Chu Nhật Huy, Ngô Văn Hiếu, Chu Hoàng Hà, Dương Thị Huyền Trang, Nguyễn Minh Hà, Trần Hải Nam, Bùi Long Vũ, Hồ Ngọc Anh*

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Hoạt tính ức chế enzyme Acetylcholinesterase (AChE) có nhiều ứng dụng quan trọng trong y học, đặc biệt là trong điều trị các bệnh liên quan đến hệ thần kinh. Nghiên cứu về khả năng ức chế enzyme AChE của dương xỉ đang mở ra nhiều triển vọng trong y học, đặc biệt là trong điều trị các bệnh lý thần kinh như Alzheimer. Nhiều lớp chất chiết xuất từ dương xỉ như flavonoid, alkaloid và terpenoid, đã được chứng minh có khả năng ức chế AChE, giúp tăng cường nồng độ acetylcholine trong não, cải thiện chức năng nhận thức và trí nhớ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thu thập và chiết tách với các dung môi có độ phân cực khác nhau của 05 loài Dương xỉ bản địa Việt Nam là *Drynaria bonni, Cyrtomium hemionitis, Alsophila podophylla, Alsophila latebrosa*, *Diplazium esculentum* và đánh giá hoạt tính ức chế enzyme AChE của chúng. Kết quả cho thấy 13 trên tổng số 20 cao chiết có khả năng ức chế enzyme AChE tại nồng độ 128 µg/mL cao nhất đạt 45% với cao chiết ethylacetate của loài *A. podophylla*. Đối với cao chiết có hoạt tính trong các mẫu thử từ loài *A. podophylla,* đã tiến hành tách phân đoạn. Trong 03 phân đoạn tinh sạch được, xuất hiện phân đoạn H2 thể hiện hoạt tính ức chế enzyme AChE với IC_{50} 10,87 ± 0,36 µg/mL. Từ đó, phân đoạn này có thể trở thành mục tiêu cho nghiên cứu tiếp theo về cấu trúc, cũng như phát triển thêm theo hướng ứng dụng cho phòng và điều trị các bệnh sa sút trí tuệ hay Alzheimer.

Từ khóa: Alsophila latebrosa, Alsophila podophylla, Cyrtomium hemionitis, dương xỉ, *Drynaria bonni, Diplazium esculentum,* enzyme acetylcholinesterase.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sa sút trí tuệ (SSTT, dementia) là một thuật ngữ chung cho sự suy giảm khả năng nhận thức đủ nghiêm trọng để cản trở cuộc sống hàng ngày. Bệnh Alzheimer (AD) chiếm gần 3/4 các trường hợp SSTT, với phần còn lại do SSTT mạch máu (VaD), hỗn hợp Alzheimer và VaD, SSTT với thể Lewy, và SSTT vùng trán. SSTT là nguyên nhân chính gây ra tình trạng khuyết tật và phụ thuộc ở những người lớn tuổi trên toàn thế giới, đặt ra gánh nặng to lớn cho cá nhân, gia đình, cộng đồng và xã hội (Ehab *et al*, 2019). Trong khi đó, khả năng ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE) có vai trò quan trọng trong điều trị Alzheimer. Các chất ức chế AChE như Donepezil, Rivastigmine và Galantamine giúp ngăn chặn phân giải acetylcholine, tăng cường nồng độ của chất dẫn truyền thần kinh này trong não. Điều này cải thiện chức năng nhận thức và trí nhớ của bệnh nhân Alzheimer, giảm các triệu chứng hành vi và tâm lý, và nâng cao chất lượng cuộc sống (Enz *et al.*, 1995).

Nghiên cứu về khả năng ức chế AChE của dương xỉ đang mở ra nhiều triển vọng trong y học, đặc biệt là trong điều trị các bệnh lý thần kinh như Alzheimer. Các hợp chất chiết xuất từ dương xỉ, bao gồm flavonoid, alkaloid và terpenoid, đã được chứng minh có khả năng ức chế AChE, giúp tăng cường nồng độ acetylcholine trong não, cải thiện chức năng nhận thức và trí nhớ. Một trong những chất phân lập từ dương xỉ đang được ứng dụng rộng rãi từ nghiên cứu cơ bản đến các sản phẩm thương mại, thực phẩm chức năng là Huperzine A chiết xuất từ cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*). Hợp chất này nổi bật với khả năng ức chế enzyme AChE, giúp tăng nồng độ acetylcholine trong não, cải thiện trí nhớ và chức năng nhận thức. Điều này khiến huperzine A trở thành một ứng viên tiềm năng trong điều trị bệnh Alzheimer và các rối loạn thần kinh khác (Yuan *et al*., 2012). Dương xỉ là nguồn tài nguyên thiên nhiên phong phú và đa dạng, dễ dàng tiếp cận và khai thác. Việc nghiên cứu các hợp chất ức chế AChE từ dương xỉ không chỉ giúp phát triển các liệu pháp điều trị mới mà còn góp phần bảo tồn và sử dụng bền vững nguồn dược liệu tự nhiên. Tuy nhiên, việc nghiên cứu vẫn còn một số thách thức. Cần xác định chính xác hoạt chất từ đối tượng nghiên cứu này và đánh giá đầy đủ về độ an toàn và hiệu quả qua các thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng. Bên cạnh đó, việc chuẩn hóa quy trình chiết xuất và điều chế các hợp chất từ dương xỉ cũng là một yếu tố quan trọng để đảm bảo tính nhất quán và chất lượng của sản phẩm cuối cùng. Tóm lại, nghiên cứu về khả năng ức chế enzyme AChE của dương xỉ là một hướng đi đầy triển vọng, đòi hỏi sự đầu tư và hợp tác từ các nhà khoa học, nhà nghiên cứu và các cơ quan y tế để mang lại những hướng nghiên cứu mới trong điều trị các bệnh lý thần kinh.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thu thập được 05 loài Dương xỉ bản địa: *Drynaria bonni*, *Cyrtomium hemionitis*, *Alsophila podophylla*, *Alsophila latebrosa* và *Diplazium esculentum*. Các mẫu thu được trên đều chưa được nghiên cứu về khả năng ức chế enzyme AChE hay nghiên cứu theo định hướng ứng dụng chúng cho khả

năng phòng và điều trị Alzheimer. Trong đó, những loài này đều chưa xuất hiện nhiều công bố theo hướng hóa hợp chất thiên nhiên, như loài *A. podophylla* chỉ có những nghiên cứu về phân loại, định loại phân bố. Bộ mẫu thực vật này chứa đầy đủ các dạng phát triển theo hình thái như thân gỗ, thân thảo, leo bám của các loài dương xỉ điển hình. Từ đó, chúng tôi triển khai nghiên cứu, đánh giá khả năng ức chế enzyme AChE của các dịch chiết với dung môi có độ phân cực khác nhau của chúng. Nghiên cứu này có thể đặt nền móng, định hướng cho những nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo cho phân lập, xác định các hoạt chất có tiềm năng từ các loài dương xỉ bản địa Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các mẫu dương xỉ được thu hái và định danh theo hình thái bởi Lữ Thị Ngân, Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam, Viện HL KH CN VN và Đỗ Thị Xuyến, Trường Đại học KHTN, Đại học QGHN.

Bảng 1. Các mẫu dương xỉ sử dụng trong nghiên cứu

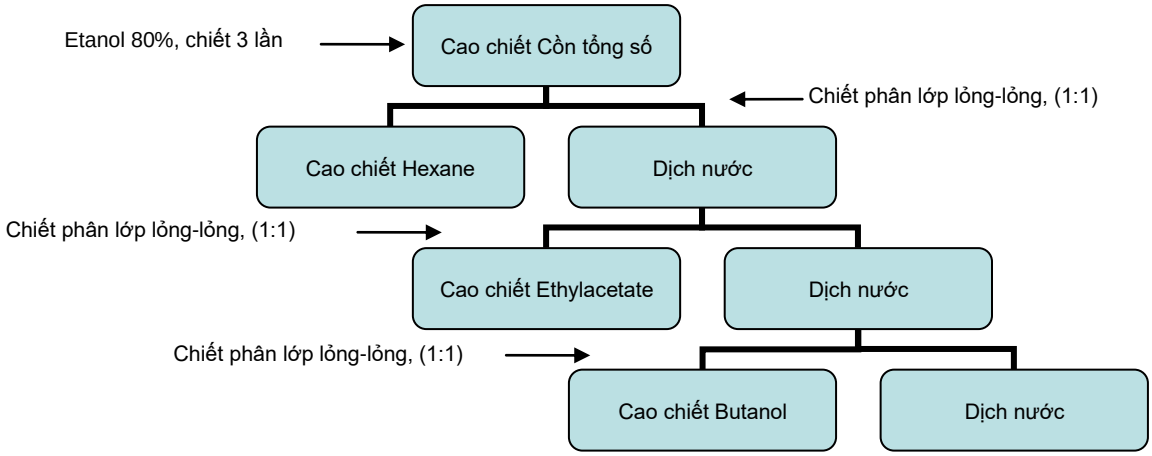
STT	Tên Khoa học	Họ	Nơi thu mẫu	Ký hiệu mẫu
1	*Drynaria bonni*	Polypodiaceae	Vườn Quốc Gia Dù Già	DX01
2	*Cyrtomium hemionitis*	Dryopteridaceae	Pà Cò (Mai Châu – Hòa Bình)	DX02
3	*Alsophila podophylla*	Cyatheaceae	Tam Đảo – Vĩnh Phúc	DX04
4	*Alsophila latebrosa*	Cyatheaceae	Tam Đảo – Vĩnh Phúc	DX06
5	*Diplazium esculentum*	Athyriaceae	Tam Đảo – Vĩnh Phúc	DX08

Các dung môi có độ phân cực khác nhau như n-Hexane, Ethylacetate, n-Butanol, nước. Các hóa chất cho phép thử hoạt tính ức chế enzyme AChE: dung dịch đệm phosphat (200 mM, pH 7,7), enzyme AChE, Acetylthiocholine (ACTI), Acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB), chất chuẩn dopenezil.

Phương pháp nghiên cứu

Xử lý và chiết tách mẫu thực vật với các dung môi có độ phân cực khác nhau

Sau khi sấy khô, xay nhỏ, mẫu dược liệu được ngâm chiết với EtOH 80% ở nhiệt độ 40^{o}C trong bể siêu âm trong vòng 1 giờ. Thực nghiệm chiết bằng siêu âm này được thực hiện lặp lại 3 lần với mỗi mẫu vật và gộp chung dịch chiết. Sau đó lọc loại bã dược liệu, gộp dịch chiết và cô quay dưới áp suất giảm để loại bỏ các dung môi dễ bay hơi, thu được cao dược liệu toàn phần, tiến hành cân khối lượng cao toàn phần trên cân phân tích. Cao dược liệu toàn phần được hòa tan trong 200 mL nước cất, chiết phân đoạn lần lượt với các dung môi có độ phân cực khác nhau như n-Hexane, Ethylacetate, n-Butanol theo tỉ lệ 1:1, mỗi dung môi thực hiện chiết 3 lần (Zhang *et al.*, 2018). Với mỗi mẫu vật tổng cộng sẽ có 4 loại dịch chiết sau phân lớp (3 loại dịch chiết với dung môi tương ứng và dịch cuối cùng là dịch nước sau khi chiết phân lớp với n-Butanol). Quy trình chiết phân đoạn dương xỉ được tóm tắt như ở Hình 1.



Hình 1. Sơ đồ chiết xuất phân đoạn dương xỉ

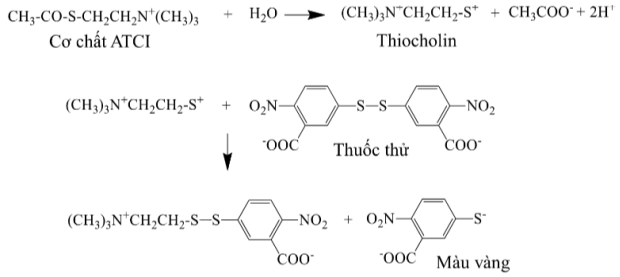
Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Các cao chiết hoặc phân đoạn được định tính sơ bộ bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Cao chiết các phân đoạn được hòa tan với dung môi thích hợp, khảo sát các hệ dung môi chạy sắc ký lớp mỏng phù hợp để phân tách các chất trong cao chiết. Tiến hành chấm lượng khoảng 5 µL cao chiết đã hòa tan trong dung môi lên bản

sắc ký lớp mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1.05715) và RP-18 F254s (Merck). Các chất sau đó được phát hiện bằng đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm (Vũ Thị Ngọc *et al.*, 2016).

Phương pháp sàng lọc hoạt tính ức chế Acetylcholinesterase của các cao chiết

Phương pháp đo quang *in vitro* dùng để đánh giá tác dụng ức chế AChE được xây dựng và sử dụng trong nghiên cứu rất phổ biến hiện nay theo phương pháp của Ellman và đồng tác giả (1961). Cơ chất acetylthiocholin iodid (ACTI) bị thủy phân nhờ xúc tác của AChE tạo thiocholin. Sản phẩm thiocholin phản ứng với thuốc thử acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) tạo thành hợp chất acid 5-thio-2-nitro benzoic có màu vàng. Lượng hợp chất màu được tạo thành này tỷ lệ thuận với hoạt độ của AChE. Phương trình phản ứng được trình bày như ở Hình 2:



Hình 2. Quá trình phản ứng diễn ra trong phương pháp đo quang sử dụng thuốc thử Ellman

Phương pháp thử được tiến hành như sau: thêm lần lượt từng dung dịch gồm: dung dịch đệm phosphat (200 mM, pH 7,7) + 15 µL dịch thử nghiệm + 80 µL DTNB (3,96 mg DTNB và 1,5 mg $NaHCO_3$ hòa tan trong 10 mL phosphate đệm pH 7,7) + 10 µl AChE (2 U/mL), trộn đều hỗn hợp, ủ trong 5 phút ở 25^oC. Sau đó, thêm 15 µL acetylthiocholine iodide (10,85 mg trong 5 mL phosphate buffer) và ủ lại trong 5 phút. Lắc đều, đo ngay ở bước sóng 412 nm. Hoạt độ enzym AchE được tính toán dựa trên độ hấp thụ tại bước sóng 412 ở trên. Phản ứng được thực hiện trên đĩa 96 giếng ở nhiệt độ phòng (25^oC). Mỗi thử nghiệm được làm lặp lại 3 lần, mỗi lần được làm trên 3 giếng. Giá trị tính toán là % giảm hoạt độ enzym so với nhóm đối chứng thông qua đo hoạt độ enzym AchE theo công thức:

$$I\% = \frac{Ac - At}{Ac - A0} \times 100$$

Trong đó: I%: Phần trăm hoạt tính AChE bị ức chế.

Ac: Độ hấp thu của mẫu chứng.

At: Độ hấp thu của mẫu thử.

Ao: Độ hấp thu của mẫu trắng.

Từ giá trị I% xác định được, tiến hành tính giá trị IC_{50} (nồng độ của mẫu ức chế 50% hoạt tính enzyme) của từng mẫu thử như sau: Pha 1 dãy nồng độ của mẫu thử, xác định I% của từng nồng độ mẫu thử đó. Với những mẫu thử có sự tương quan tuyến tính giữa giá trị I% và nồng độ, tiến hành xây dựng đường hồi quy tuyến tính y = a.x + b, trong đó, y là giá trị % tác dụng ức chế enzym và x là nồng độ mẫu thử. Với những mẫu không có sự tương quan tuyến tính giữa I% và nồng độ, tiến hành xây dựng đường hồi quy tuyến tính y = a.log(x) + b. Thay giá trị y = 50% vào phương trình tuyến tính mới xây dựng được từ đó tính được giá trị của nồng độ x. Giá trị tìm được này chính là giá trị IC_{50}. Để có cơ sở đánh giá tác dụng ức chế AChE *in vitro* của mẫu nghiên cứu, dopenezil được sử dụng làm mẫu chứng dương. Hợp chất này đã được nghiên cứu và chứng minh tác dụng ức chế AChE khá mạnh được sử dụng làm mẫu chứng dương trong nhiều nghiên cứu (Ferreira *et al.*, 2020).

Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Kết quả nghiên cứu được xử lý và phân tích có ý nghĩa thống kê sinh học bằng phần mềm Excel 2013 (Microsoft Office, Mỹ) và Origin Pro 10.1.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo cao chiết với các dung môi có độ phân cực khác nhau

Từ các mẫu dương xỉ đã thu thập, chúng tôi đã xử lý và chiết tách với 03 loại dung môi có độ phân cực khác nhau n-Hexane, Ethylacetate, n-Butanol và nước để thu được các cao chiết tương ứng. Với mỗi loại mẫu thực vật tương ứng sẽ có 04 loại cao chiết đó là cao chiết Hexane, cao chiết Ethylacetate, cao chiết Butanol và cao chiết nước. Kết quả thu được trình bày ở bảng sau:

Bảng 2. Khối lượng các cao chiết thu được

STT	Tên khoa học	Mẫu khô (g)	Dịch chiết tổng (g)	Cao chiết Hexane (g)	Cao chiết Ethylacetate (g)	Cao chiết Butanol (g)	Cao chiết nước (g)
1	*Drynaria bonni*	271,3	4,387	0,8034	1,2335	0,9105	1,0619
2	*Cyrtomium hemionitis*	540,0	8,6121	1,8352	2,401	2,027	2,1794
3	*Alsophila podophylla*	1268,0	20,931	3,7165	5,7138	6,2	6,2107
4	*Alsophila latebrosa*	405,7	12,723	2,0142	3,5841	3,1054	3,002
5	*Diplazium esculentum*	619,2	8,590	1,7602	2,3818	1,9017	2,0599

Với mục tiêu, khảo sát, điều tra, đánh giá sơ bộ hoạt tính ức chế enzym AChE của các loài dương xỉ bản địa Việt Nam thì lượng cao chiết như bảng trên đáp ứng được về số lượng mẫu dùng cho phép thử nghiệm này. Kết quả ở bảng trên cho thấy ở cả 05 loài nghiên cứu trọng lượng của cao chiết Ethylacetate luôn chiếm lượng cao nhất trong các cao chiết thu được. Điều này một phần xuất phát từ độ phân cực trung bình nhưng trải rộng của dung môi này khi so sánh với n-Hexane hay n-Butanol, nhưng kết quả này cũng cho thấy trong các loài dương xỉ thì các hợp chất thứ cấp triển vọng có khoảng độ phân cực này chiếm một phần lớn; vì những lớp chất như flavonoid, alkaloid, terpene, triterpene đều có khả năng hòa tan tốt trong dung môi này. Đồng thời các acid béo, các chất tinh dầu, kém phân cực dễ hòa tan hơn trong n-Hexane, và các chất có độ phân cực mạnh hay đường, aglycon lại dễ dàng hòa tan hơn trong Butanol và nước. Ngoài ra, trọng lượng cần thiết của cao chiết cho phép thử hoạt tính *in-vitro* này chỉ cần lượng tối thiểu 30 mg. Trong điều kiện một hoặc một số cao chiết thể hiện hoạt tính, thì lượng mẫu cần dùng cho hướng hóa học các hợp chất thiên nhiên cần phải có số lượng nhiều hơn, ví dụ như trong trường hợp của Huperzine A chỉ chiếm từ 0,0171 mg/g đến 0,0925 mg/g mẫu khô (Vũ Thị Ngọc *et al.*, 2016). Cho những nghiên cứu tiếp theo, với một đơn chất 5 mg cần thiết cho đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân, xác định cấu trúc của hợp chất tinh sạch được lượng mẫu khô tối thiểu cần từ khoảng 500 g mẫu khô do Huperzine A đã được xác định là chất chiếm hàm lượng cao trong Thạch tùng răng cưa. Trong khi đó với đối tượng là 05 loài dương xỉ của nghiên cứu này, chưa từng được nghiên cứu sâu về thành phần hóa học, khả năng xuất hiện hoạt tính ức chế enzym AChE có thể do một số chất với hàm lượng thấp trong cao chiết. Vì vậy tại bước nghiên cứu này chúng tôi đề xuất cần thu thập thêm về số lượng cũng như chủng loài của nhóm thực vật nghiên cứu.

Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme AChE của các cao chiết thu được

Các cao chiết thu được tương ứng với số lượng mẫu và các dung môi có độ phân cực khác nhau tổng số 20 mẫu cao chiết. Vì các mẫu đều chưa được nghiên cứu về thành phần hóa học, nên chúng tôi đặt vấn đề khảo sát với các dung môi khác nhau. Đối với mỗi dung môi có độ phân cực khác nhau số lượng các chất trong mẫu nghiên cứu sẽ giảm xuống so với dịch chiết tổng ban đầu. Đồng thời hàm lượng của chúng trong cao chiết riêng biệt cũng sẽ tăng lên, từ đó chúng ta có thể dễ dàng hơn phát hiện sự có mặt của các chất cho hoạt tính sinh học này khi thử nghiệm đánh giá với các cao chiết từ các dung môi có độ phân cực khác nhau. Các cao chiết được ký hiệu như Bảng 1 kèm theo ký hiệu của loại dung môi sử dụng chiết tương ứng như n-Hx: n-Hexane; EtoAc: Ethylacetate; BuOH: n-Butanol; N: cao chiết nước. Kết quả thu được ở bảng sau:

Bảng 3. Hoạt tính ức chế enzyme AChE của các cao chiết

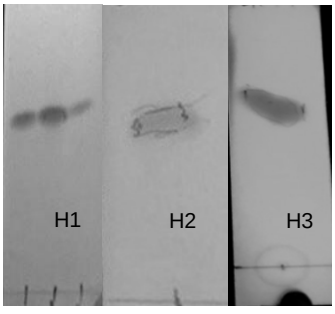
STT	Mẫu thử	Nồng độ % ức chế tương ứng			
		128 µg/mL	32 µg/mL	8 µg/mL	2 µg/mL
1	DX01-n-Hx	23	0	0	0
2	DX01-EtoAc	21	0	0	0
3	DX01-BuOH	12	0	0	0
4	DX01 - N	30	0	0	0
5	DX02-nHx	21	0	0	0
6	DX02-EtoAc	15	0	0	0
7	DX02-BuOH	39	25	0	0
8	DX02-N	35	21	0	0
9	DX04-nHx	35	25	0	0
10	DX04-EtoAc	45	36	25	0
11	DX04-BuOH	30	22	0	0

12	DX04-N	0	0	0	0
13	DX06-nHx	0	0	0	0
14	DX06-EtoAc	0	0	0	0
15	DX06-BuOH	35	16	0	0
16	DX06-N	0	0	0	0
17	DX08-nHx	0	0	0	0
18	DX08-EtoAc	27	10	0	0
19	DX08-BuOH	0	0	0	0
20	DX08-N	0	0	0	0

Kết quả cho thấy, trong 20 mẫu được thử hoạt tính ức chế AChE, có 7 mẫu không thể hiện hoạt tính, đó là các mẫu DX04-N, DX06-nHx, DX06-EtoAc, DX06-N, DX08-nHx, DX08-BuOH và DX08-N. Ở nồng độ 128 µg/mL, lượng mẫu thể hiện hoạt tính ức chế enzyme AChE là 13 mẫu, trong đó, cao chiết Ethylacetate của mẫu DX04 vẫn thể hiện hoạt tính ức chế tốt nhất với 45% hoạt tính AChE bị ức chế, tiếp theo sau là cao chiết BuOH của DX02 với 39%. Trong 13 mẫu, cao chiết EtOAc của DX08 thể hiện hoạt tính thấp nhất với chỉ 10% hoạt tính AChE bị ức chế. Tuy vậy kết quả ở bảng trên cho thấy hoạt tính này không được thể hiện rõ rệt với các mẫu thử, vì ở nồng độ cao nhất khả năng ức chế enzyme AChE vẫn chưa vượt quá 50%. Vì vậy chúng tôi tiếp tục thực hiện chiết tách các phân đoạn từ cao chiết có hoạt tính tốt nhất là DX04-EtoAc. Thí nghiệm này được tiếp tục bằng sắc ký cột mở pha thuận.

Đánh giá hoạt tính của một số phân đoạn tinh sạch được từ cao chiết mẫu DX04

Để làm sáng tỏ thêm về khả năng thể hiện hoạt tính ức chế enzyme AChE của cao chiết mẫu DX04, bằng phương pháp sắc ký trên cột silica-gel pha thuận chúng tôi thu được 03 phân đoạn bao gồm: H1, H2, H3. Các phân đoạn này được kiểm tra định tính độ tinh sạch trên sắc ký lớp mỏng bản TLC tráng sẵn RP-18 với hệ dung môi methanol (MeOH) / nước (H_2O) là 3:2, 3:2 và 2:1 tương ứng với H1, H2, H3 tại bước sóng 254 nm.



	Hệ dung môi triển khai	
	MeOH	H_2O
H1	3	2
H2	3	2
H3	2	1

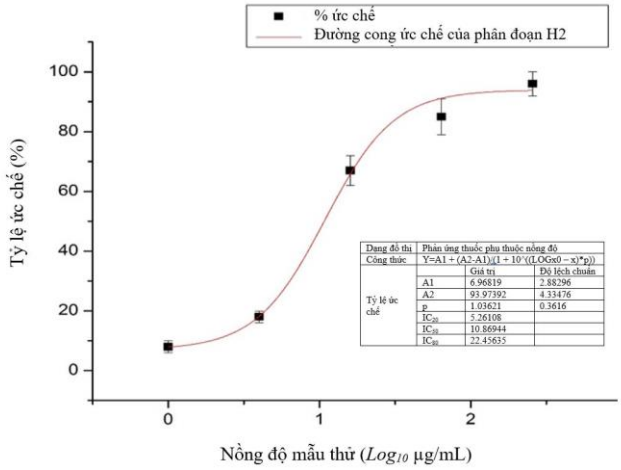
Hình 3. Sắc ký lớp mỏng của các phân đoạn tinh sạch được

Các phân đoạn đã tinh sạch tiếp tục được đánh giá hoạt tính ức chế enzyme AChE cho kết quả như sau:

Bảng 4. Khả năng ức chế enzyme AChE của các phân đoạn

STT	Mẫu thử	Nồng độ % ức chế tương ứng					IC_{50} (µg/mL)
		256 µg/mL	64 µg/mL	16 µg/mL	4 µg/mL	1 µg/mL	
1	H1	8	0	0	0	0	>256
2	H2	96	85	67	18	8	10,87 ± 0,36
3	H3	14	0	0	0	0	>256
4	Donepezil					0	0,029 ± 0,004

Nhìn vào kết quả ở Bảng 4 thấy ở nồng độ 256 µg/mL cả 3 phân đoạn H1, H2, H3 đều có % ức chế và H2 có % ức chế cao nhất, còn tại những nồng độ khác % ức chế của phân đoạn H1, H3 đều bằng không nên các chất H1, H3 không có khả năng ức chế enzyme AChE. Từ nồng độ 256 µg/mL đến 1 µg/mL chất H2 có % ức chế giảm dần với IC_{50} = 10,87 ± 0,36 µg/mL.



Hình 4. Khả năng ức chế enzyme AChE của chất H2 phụ thuộc nồng độ

Đối chứng dương là Donepezil là một loại thuốc dùng để điều trị bệnh Alzheimer. Chất này phần nào cải thiện chức năng tinh thần và khả năng hoạt động. Donepezil đã được chấp thuận cho sử dụng y tế tại Hoa Kỳ vào năm 1996. Năm 2016, đây là loại thuốc được kê đơn nhiều thứ 98 tại Hoa Kỳ với hơn 7 triệu đơn thuốc. Trong trường hợp của phân đoạn H2, tuy thể hiện hoạt tính là thấp hơn so với một đơn chất thương mại kể trên, nhưng khi so sánh với giá trị IC_{50} của các hoạt chất chiết tách từ thực vật đã công bố như Huperzine A (18,04 µg/mL) (Dang *et al.*, 2023) phân lập từ cây thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*), hay {[(7S)-8'-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-7-hydroxypropyl]benzene-2,4-diol} (10.2 µg/mL) và malabaricone C (15,6 µg/mL) (Cuong *et al.*, 2014) phân lập được từ cây Nhục đậu khấu (*Myristica fragrans*) thì phân đoạn này cũng có mức hoạt tính đáng kể. Như vậy dựa vào kết quả so sánh trên ta có thể thấy phân đoạn H2 với nồng độ ức chế 50% (IC_{50}) bằng 10,87 µg/mL có khả năng ức chế enzyme AChE theo triển vọng phát triển tạo ra sản phẩm hỗ trợ điều trị các bệnh sa sút trí tuệ và bệnh Alzheimer.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, 05 loài dương xỉ đã được thu hái, xử lý và chiết tách với các dung môi có độ phân cực khác nhau. Tổng cộng thu được 20 mẫu cao chiết tương ứng. Với đánh giá trên hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase thể hiện đây là nguồn mẫu có tiềm năng nghiên cứu mới từ kết quả của 13 trên tổng số 20 cao chiết đều có thể hiện hoạt tính. Tuy nhiên hoạt tính thu được là thấp khi ở nồng độ thử nghiệm cao nhất 128 µg/mL đều không có mẫu thử đạt trên 50% ức chế, điều này có thể do hàm lượng các chất có hoạt tính là thấp trong mẫu vật nghiên cứu. Khi thực hiện tiếp tục nghiên cứu các phân đoạn từ cao chiết DX04 có khả năng ức chế 45% ở nồng độ 128 µg/mL, chúng tôi đã thu được phân đoạn sạch, ký hiệu H2 có IC_{50} đạt 10,87 µg/mL. Mặc dù khi so sánh với Donepezil (0,029 µg/mL) hay Huperzine A (18,04 µg/mL) (Dang *et al.*, 2023), phân đoạn H2 vẫn thể hiện hoạt tính đáng kể. Phân đoạn này cần tiếp tục tiến hành xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ hiện đại.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu được thực hiện nhờ kinh phí của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với mã số đề tài ĐL0000.09/22-24.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cuong TD, Hung TM, Han HY, Roh HS, Seok JH, Lee JK, Jeong JY, Choi JS, Kim JA, Min BS (2014). Potent Acetylcholinesterase Inhibitory Compounds from Myristica fragrans. *Nat Prod Commun,* 9 (4): 499-502.

Dang TK, Hong SM, Dao VT, Phuong TTT, Hiep TT, Giang DH, Hai NT, Hang PTN, Sun YK (2023). Anti-neuroinflammatory effects of alkaloid-enriched extract from *Huperzia serrata* on lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells. *PharmBiol,* 61: 135-143.

Enz A (1995). Acetylcholinesterase Inhibitors (AChE-I) as a Potential Use for Alzheimer's Disease (AD) Therapy: Differences in Mechanisms of Enzyme Inhibition. *Enzymes of the Cholinesterase Family,* 475-476.

Ferreira J, Santos S, Pereira H (2020). *In vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of *Quercus suber* cork and corkback extracts. *eCAM,* 2020: 3825629.

Vũ Thị Ngọc, Phạm Thị Hạnh, Lê Thị Lan Anh, Nguyễn Tiến Đạt, Lê Thị Bích Thủy (2016). Định tính và định lượng Huperzine A trong cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrate*) ở Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng. *Tạp chí Công nghệ sinh học Việt Nam*, 14: 473-478.

Yuan JQ, Zhou XL, Wang S, Miao JH, Yan ZG, Feng SX, Ma XJ (2012). Advances in studies on chemical constituents of *Huperzia serrata* and their pharmacological effects. *Chinese traditional and herbal drugs,* 43: 399-407.

Zhang QW, Lin LG, Ye WC (2018).Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med,* 13: 1-26.

EVALUATION OF ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY OF SOME VIETNAMESE NATIVE FERN

Nhat Huy Chu, Van Hieu Ngo, Hoang Ha Chu, Thi Huyen Trang Duong, Minh Ha Nguyen, Hai Nam Tran, Long Vu Bui, Ngoc Anh Ho*

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

The inhibitory activity of the acetylcholinesterase (AChE) enzyme holds significant applications in medicine, particularly in the treatment of neurological disorders. Research on the AChE inhibitory potential of ferns is promising, especially for conditions such as Alzheimer's disease. Various classes of fern extracts, including flavonoids, alkaloids, and terpenoids, have demonstrated AChE inhibition, thereby enhancing acetylcholine levels in the brain and improving cognitive function and memory. In this study, we collected and extracted five native fern species of Vietnam as *Drynaria bonii*, *Cyrtomium hemionitis*, *Alsophila podophylla*, *Alsophila latebrosa*, and *Diplazium esculentum*; using solvents of different polarities and evaluated their AChE inhibitory activity. The results showed that 13 out of 20 extracts were able to inhibit the AChE enzyme at a concentration of 128 µg/mL, with the highest inhibition of 45% observed in the ethyl acetate extract of *A. podophylla*. For the active extract from *A. podophylla*, fractionation was performed. Among the three purified fractions, the H2 fraction exhibited AChE inhibitory activity with an IC_{50} of 10.87 ± 0.36 µg/mL. This fraction presents a promising target for further structural analysis and development towards applications in the prevention and treatment of dementia or Alzheimer's disease.

Keywords: Alsophila latebrosa, *Alsophila podophylla*, *Cyrtomium hemionitis*, fern, *Drynaria bonii*, *Diplazium esculentum*, acetylcholinesterase enzyme.

* Author for correspondence: Tel: 0988832488; Email: hongocanh1612@gmail.com

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO NANO Se-ZnO ỔN ĐỊNH TRONG *β*-GLUCAN BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHIẾU XẠ

Nguyễn Văn Linh, Nguyễn Thanh Vũ, Nguyễn Thị Ngọc Anh, Phan Lê Trâm Anh, Lê Thanh Giàu, Lê Quang Luân*

Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Dung dịch keo nano (Se-ZnONPs) ổn định trong *β*-glucan (Se-ZnONPs/*β*-glucan) với kích thước hạt khoảng 17 nm đã được chế tạo thành công bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma Co-60. Kết quả phân tích phổ UV-Vis cho thấy, đỉnh hấp thu cực đại của hạt nano kẽm oxit (ZnONPs) xuất hiện ở 354 nm. Thêm vào đó, kết quả phân tích phổ hồng ngoại (FTIR) đã chỉ ra rằng phân tử oxy trong các nhóm chức (COO) và (OH) đã tham gia vào quá trình ổn định Se-ZnONPs trong chế phẩm. Bên cạnh đó, cấu trúc tinh thể của Se-ZnONPs/*β*-glucan đã được phân tích bằng nhiễu xạ tia X (XRD) và kích thước hạt của chế phẩm được tính toán từ giản đồ XRD. Hơn nữa, kết quả phân tích phổ Raman của mẫu Se-ZnONPs/*β*-glucan còn cho thấy các dao động photon quang học của nano selen (SeNPs) và ZnONPs cũng xuất hiện lần lượt ở 250 và 422 cm^{-1}. Kết quả thử nghiệm khả năng kháng oxy hóa cho thấy hoạt tính Se-ZnONPs/*β*-glucan cao hơn hẳn các mẫu SeNPs ổn định trong *β*-glucan (SeNPs/*β*-glucan), ZnONPs ổn định trong *β*-glucan (ZnONPs/*β*-glucan) và *β*-glucan. Thêm vào đó, giá trị IC_{50} của Se-ZnONPs/*β*-glucan được xác định là 0,22 mM. Các kết quả đạt được cho thấy chế phẩm Se-ZnONPs/*β*-glucan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ gamma có tiềm năng ứng dụng làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

Từ khóa: Chiếu xạ, *β-glucan,* kháng oxy hóa, tia gamma.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong cơ thể người, vi chất dinh dưỡng đóng vai trò quan trọng trong các quá trình trao đổi chất, duy trì chức năng tế bào, hỗ trợ tăng cường miễn dịch và giảm nguy cơ mắc các bệnh. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), tình trạng thiếu hụt vi chất dinh dưỡng đang dần phổ biến với hơn hai triệu người mắc phải, trong đó 30% người bị thiếu kẽm (Zn) và 15% bị thiếu selen (Se) (Dapkekar *et al.*, 2020). Thêm vào đó, một phần ba dân số thế giới đã và đang bị ảnh hưởng bởi tình trạng thiếu Zn. Ước tính 50% trẻ em không nhận được các loại vitamin và khoáng chất cần thiết cho sự phát triển của chúng (Elemike *et al.*, 2019). Sự thiếu hụt vi chất dinh dưỡng lâu ngày làm suy giảm sức đề kháng dẫn đến mắc các bệnh nhiễm khuẩn đường hô hấp, tiêu chảy và suy dinh dưỡng. Se và Zn là những nguyên tố vi lượng thiết yếu cung cấp dinh dưỡng và đóng vai trò quan trọng trong nhiều chức năng đối với cơ thể sống. Tuy nhiên, việc hấp thụ quá nhiều Se và Zn gây rối loạn khác nhau đến cơ thể sinh vật sống và có thể dẫn tới ngộ độc và tử vong. Một số nghiên cứu cho thấy khi sử dụng Se quá 0,4 mg/ngày có thể gây độc và nguy cơ gây ra bệnh tiểu đường (Kristal *et al.*, 2014). Bên cạnh đó, ngưỡng gây độc của Zn chưa được làm rõ nhưng việc tiêu thụ Zn với mức 75 mg/ngày gây nguy cơ mắc các bệnh ung thư liên quan đến tuyến tiền liệt (Zhang *et al.*, 2022). Để khắc phục những nhược điểm về ngưỡng sử dụng, Se và Zn tồn tại ở dạng nguyên tố được biết đến với khả năng kháng oxy hóa cũng như có độc tính với tế bào ung thư cao hơn, ngưỡng sử dụng rộng hơn. SeNPs, ZnONPs với kích thước nhỏ, độc tính thấp, khả năng tương thích sinh học, kháng oxy hóa, kháng khuẩn và hoạt tính kháng ung thư cao hơn các khi tồn tại ở các dạng hữu cơ và vô cơ khác đã và đang được chú ý đến.

Ngày nay với sự phát triển của công nghệ nano, nanocomposite được hình thành bởi sự kết hợp giữa các hạt nano kim loại và oxit kim loại ở cấp độ nguyên tử làm tăng hoạt tính sinh học so với các nano đơn thành phần (Podporska-Carroll *et al.*, 2017; Medhi *et al.*, 2020). Se và Zn là hai nguyên tố dinh dưỡng điển hình có thể kết hợp với nhau, sự kết hợp này tạo ra nhiều chỗ trống oxy hơn dẫn đến làm tăng hoạt động bề mặt (Ahmad *et al.*, 2020) và tăng khả năng kháng oxy hóa của vật liệu thông qua việc ghép cặp với các electron đơn của các gốc tự do. Tuy nhiên, Se và Zn tồn tại ở dạng nano dễ dàng bị kết cụm lại với nhau, làm tăng kích thước hạt và giảm hoạt tính của chúng. Vậy nên những hạt nano này cần một mạng lưới nâng đỡ để ngăn sự kết cụm, nhằm gia tăng hoạt tính của vật liệu người ta thường sử dụng các loại polysaccharide có khả năng tương thích và phân hủy sinh học để ổn định các loại nano này. *β*-glucan được biết đến là một polysaccharide có nguồn gốc từ tự nhiên, không độc, có khả năng tăng cường miễn dịch, chống ung thư và làm lành vết thương. Với những hoạt tính vượt trội như vậy, *β*-glucan được lựa chọn để làm chất ổn định hỗn hợp nano này.

Cho đến nay, có nhiều phương pháp để tổng hợp Se-ZnONPs như phương pháp thủy nhiệt, đồng kết tủa hoặc tổng hợp xanh sử dụng các tác nhân sinh học, v.v. Tuy nhiên các phương pháp này còn nhiều hạn chế như tồn dư chất khử, điều kiện phản ứng nghiêm ngặt, sản phẩm cần phải tinh chế cũng như sử dụng các tác nhân vi sinh vật và enzyme đặc hiệu, v.v. Ngoài ra, việc sử dụng bức xạ tia gamma Co-60 để tổng hợp loại Se-ZnONPs được cho là phương pháp hiệu quả với nhiều ưu điểm như quy trình chế tạo đơn giản an toàn,

kiểm soát được kích thước tinh thể tạo thành, không sử dụng các chất khử độc hại, phản ứng xảy ra ở nhiệt độ thường và thân thiện với môi trường.

Từ những lý do trên mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm ứng dụng bức xạ tia gamma để chế tạo hỗn hợp chứa cả hai loại nano này (SeNPs và ZnONPs) ổn định trong *β*-glucan có hoạt tính sinh học cao và phát triển thành sản phẩm, thực phẩm giúp hỗ trợ sức khỏe.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

β-glucan, SeNPs/*β*-glucan và ZnONPs/*β*-glucan (Phòng CNSH Vật liệu & Nano, TT CNSH Tp.HCM), Selendioxit (Scharlau, Tây Ban Nha), 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle (DPPH) (HiMedia laboratories LLC, Ấn Độ), Kẽm Chloride (Xilong, Trung Quốc), Potassium bromide (HiMedia Laboratories LLC, Mỹ), Sodium hydroxide (Xilong, Trung Quốc) và một số hóa chất ở dạng tinh khiết khác.

Phương pháp nghiên cứu

Tổng hợp Se-ZnONPs/β-glucan bằng phương pháp chiếu xạ

Dung dịch Se^{4+}-Zn^{2+}/*β*-glucan có nồng độ Se^{4+} 1,25 mM; Zn^{2+} 2,5 mM và *β*-glucan 1% được chuẩn bị bằng cách: 1 g *β*-glucan cho vào 80 mL H_2O và điều chỉnh pH ~11 bằng NaOH 1 M. Tiếp đến, bổ sung 5 mL Zn^{2+} từ dung dịch gốc 50 mM và đồng hóa trên máy khuấy từ (Stuart, UK) với thời gian 5 phút. Sau đó, cho 5 mL Se^{4+} từ dung dịch gốc 25 mM và định mức lên 100 mL. Hỗn hợp Se^{4+}-Zn^{2+}/*β*-glucan được chiếu ở liều xạ 10 kGy (liều xạ chuyển hóa bão hòa của ZnO và Se đã được xác định bởi các công bố trước đây của Dung và đồng tác giả (2020), Linh và đồng tác giả (2022)) trên nguồn xạ gamma Co-60 (Gamma cell model GC5000, BRIT, Ấn Độ) với suất liều 5,5 kGy/giờ để tạo Se-ZnONPs/*β*-glucan.

Xác định các đặc trưng cấu trúc của Se-ZnONPs/β-glucan

Quang phổ UV-Vis: Đặc tính quang hóa của vật liệu được xác định bằng máy quang phổ UV-Vis (Thermo, Hoa Kỳ). Dung dịch keo Se-ZnONPs/*β*-glucan được phân tích ở nồng độ là 25 µg/mL, nhiệt độ phòng và dải phân tích 200 - 800 nm.

Phổ hồng ngoại FTIR: Đặc trưng cấu trúc của Se-ZnONPs/*β*-glucan được phân tích trên máy quang phổ hồng ngoại FTIR-4700 (Jasco, Nhật Bản). 5 mg mẫu được trộn đều với 145 mg KBr và sấy khô ở 105^oC trong 3 giờ. Các mẫu được nén thành viên bằng máy nén chuyên dụng. Sau đó, mẫu được phân tích ở số sóng 500-4000 cm^{-1}, độ phân giải 2 cm^{-1} với tần số quét là 45.

Quang phổ Raman: Cấu trúc mạng tinh thể Se-ZnONPs/*β*-glucan được xác định bằng hệ thống hiển vi Raman LabRAM HR Evolution (Horiba, Nhật Bản) sử dụng nguồn laser 785 nm, vật kính với độ phóng đại 10X và độ lọc ánh sáng 100% với dải phân tích 0-800 cm^{-1}.

Nhiễu xạ tia X: Đặc trưng cấu trúc của Se-ZnONPs/*β-glucan* được xác định bằng máy nhiễu xạ X'Pert PRO (Bruker, Đức) sử dụng nguồn phát tia X với CuKα (λθ = 1,5418 Å, U = 40 kV, I = 25 mA), góc (2θ) 20-80° ở nhiệt độ phòng. Mẫu bột Se-ZnONPs/*β*-glucan được cán phẳng trên đế phân tích bằng các phiến kính hiển vi. Sử dụng phần mềm HighScore Plus để phân tích dữ liệu.

Xác định kích thước hạt Se-ZnONPs/*β-glucan:* Kích thước hạt Se-ZnO trong chế phẩm được xác định bằng kỹ thuật XRD, được tính dựa trên phương trình Debye - Scherrer:

$$D = \frac{k\lambda}{\beta cos\theta} \quad (nm)$$

Trong đó:

- k là hằng số có giá trị là 0,89.

- λ là bước sóng của bức xạ tia X (λ = 1,5406 Å).

- β là độ rộng ứng với nửa chiều cao của đỉnh cực đại.

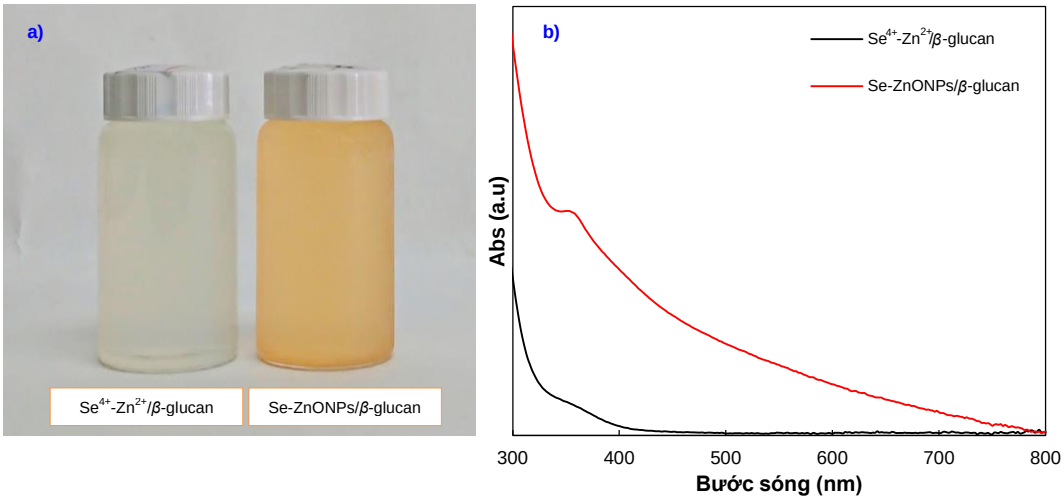
- θ là góc nhiễu xạ Bragg ứng với đỉnh cực đại.

Xác định khả năng kháng oxy hóa của Se-ZnONPs/β-glucan: Thử nghiệm hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của vật liệu được thực hiện theo phương pháp của Yang và đồng tác giả (2008). Trong đó, 1,5 mL mẫu ở các nồng độ khác nhau (0 - 10 µg/mL) được trộn đều trong 1,5 mL dung dịch gốc tự do DPPH 1 mM (pha trong ethanol), ủ trong tối với thời gian 30 phút, ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ của các mẫu được đo ở bước sóng 517 nm trên máy quang phổ UV-Vis (Thermo, Hoa Kỳ). Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH được tính theo công thức: H (%) = ([1-(A_2-A_1)])/A_0 x 100. Trong đó A_0: độ hấp thụ của mẫu đối chứng, A_1 độ hấp thụ của mẫu trắng, A_2 độ hấp thụ của mẫu.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Các đặc trưng cấu trúc của Se-ZnONPs/*β*-glucan

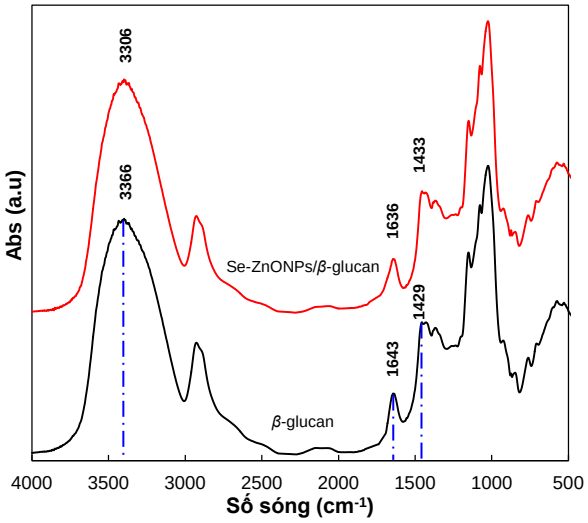
Quang phổ UV-Vis



Hình 1. Mẫu Se^{4+}-Zn^{2+}/*β*-glucan trước và sau khi chiếu ở liều xạ 10 kGy (a), phổ UV-Vis (b)

Phổ UV-vis của các mẫu *β*-glucan và Se-ZnONPs/*β*-glucan được phân tích ở dải sóng 300 - 800 nm. Kết quả từ hình 1a cho thấy mẫu vật liệu trước và sau khi chiếu xạ có sự thay đổi từ màu trắng (Se^{4+}-Zn^{2+}/*β*-glucan) sang cam đỏ (Se-ZnONPs/*β*-glucan). Điều này đã cho thấy sự hình thành SeNPs, Se^{4+} được khử thành Se^0 bởi các tác nhân bức xạ (e^-_{aq} và $H^\bullet$) sinh ra từ quá trình xạ ly nước. Theo Lin và đồng tác giả (2005), đỉnh hấp thu của SeNPs chỉ quan sát được khi các hạt có kích thước > 100 nm. Sau khi chiếu xạ mẫu Se-ZnONPs/*β*-glucan xuất hiện đỉnh hấp thu cực đại ở 354 nm, đây được cho là sự xuất hiện của ZnONPs. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Musa và đồng tác giả (2017) khi tổng hợp ZnONPs bằng phương pháp sol-gel.

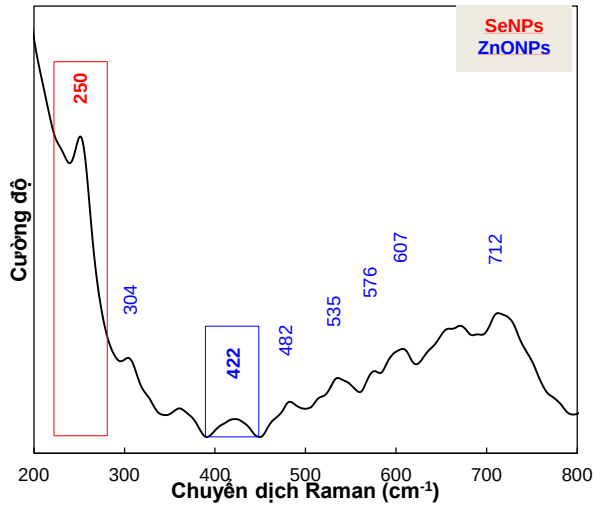
Phổ hồng ngoại FTIR



Hình 2. Phổ FTIR của mẫu *β*-glucan và Se-ZnONPs/*β*-glucan chiếu ở liều xạ 10 kGy

Kết quả phân tích phổ FTIR của mẫu *β*-glucan và Se-ZnONPs/*β*-glucan đã cho thấy có sự dịch chuyển các đỉnh đặc trưng của các nhóm chức (OH) và (COO) với các số sóng lần lượt là 1429, 3366 và 1643 cm^{-1} của mẫu *β*-glucan sang số sóng 1433, 3306 và 1636 cm^{-1} ở mẫu Se-ZnONPs/*β*-glucan được chiếu với liều xạ 10 kGy. Điều này đã chỉ ra rằng phân tử oxy có trong các nhóm chức nói trên đã tham gia vào quá trình ổn định Se-ZnONPs trong chế phẩm. Kết quả này cũng phù hợp với các công bố trước đây của Dung và đồng tác giả (2021) khi sử dụng bức xạ tia gamma Co-60 để tổng hợp vật liệu SeNPs/*β*-glucan.

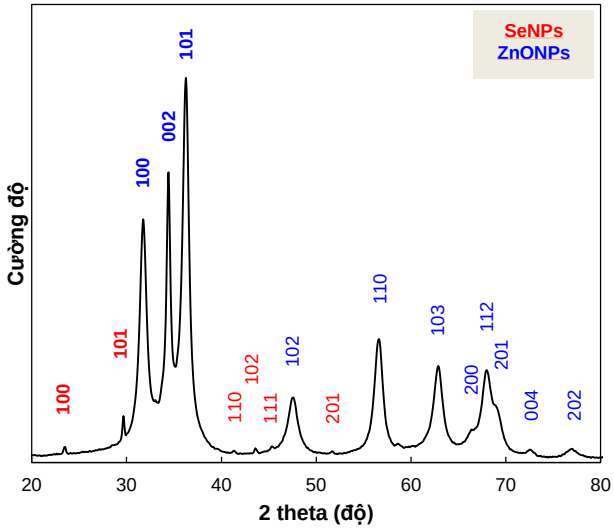
Quang phổ Raman



Hình 3. Phổ raman của mẫu Se-ZnONPs/*β*-glucan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ

Mẫu bột Se-ZnONPs/*β*-glucan sau khi tổng hợp cũng được phân tích bằng kỹ thuật Raman, kỹ thuật này được biết đến với công dụng hữu ích trong việc xác định tính chất mạng tinh thể của vật liệu. Kết quả phân tích từ Hình 3 cho thấy dao động photon ở số sóng 250 cm^{-1}, đây được cho là sự hình thành của SeNPs. Linh và đồn tác giả (2020) đã chỉ ra rằng khi sử dụng bức xạ gamma Co-60 để tổng hợp SeNPs/Fucoidan, dao động photon tại 237 và 250 cm^{-1} tương ứng với Se^{4+} và Se^{0}. Thêm vào đó, dao động photon tại số sóng 422 cm^{-1} là đặc trưng cho liên kết Zn và Oxy (Willander *et al.*, 2009; Moussa *et al.*, 2021). Bên cạnh đó, phổ raman của Se-ZnONPs/*β*-glucan còn cho thấy các dao động photon của các mặt phẳng tinh thể ZnONPs (B1), (E2-E2), (A1-TO), (E2), (B1) và (E1) ứng với các đỉnh hấp thụ 304, 330, 383, 422, 535 và 576 cm^{-1}. Theo Musa và đồng tác giả (2017) đây được cho là các dao động photon đặc trưng của ZnO thuộc pha tinh thể wurtzite.

Giản đồ XRD



Hình 4. Giản đồ XRD của mẫu Se-ZnONPs/*β*-glucan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ

Kết quả từ Hình 4 cũng cho thấy đã tổng hợp thành công hỗn hợp Se-ZnONPs/*β*-glucan khi xuất hiện các đỉnh nhiễu xạ các tinh thể SeNPs và ZnONPs. Bên cạnh đó, kết quả này cho thấy vùng 2θ từ 20 - 30° có sự xuất hiện các nhiễu xạ ở 23,41; 29,61° tương ứng với các mặt phẳng tinh thể (100) và (101), đây được cho là tinh thể của selen nguyên tử (Se^{0}). Ngoài ra, kết quả phân tích mẫu Se-ZnONPs/*β*-glucan cho thấy các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng của tinh thể SeNPs còn xuất hiện ở các dải 2θ có giá trị 23, 29, 41, 43, 45 và 51° lần lượt tương ứng với các mặt phẳng tinh thể (110), (102), (111), (201), (112) và (202). Kết quả này cũng phù hợp với công bố trước đây của Dung và đồng tác giả (2021) khi tổng hợp SeNPs/*β*-glucan bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60.

Thêm vào đó, các đỉnh nhiễu xạ của ZnONPs cũng được quan sát thấy bằng kỹ thuật này. Theo đó, giản đồ XRD của vật liệu còn cho thấy các mặt phẳng (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004) và (202) tương ứng với các đỉnh nhiễu xạ 31, 34, 36, 47, 56, 62, 66, 68, 69 72 và 76^{o}. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Musa và đồng tác giả (2017) khi tổng hợp ZnONPs bằng phương pháp sol-gel.

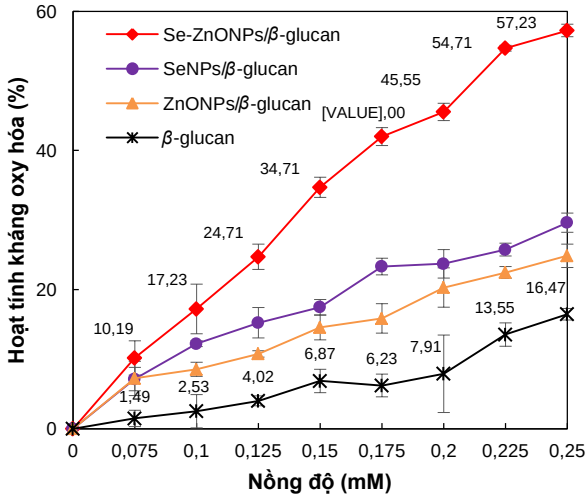
Kích thước hạt chế phẩm Se-ZnONPs/*β*-glucan

Bảng 1. Kích thước hạt của chế phẩm Se-ZnONPs/*β*-glucan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ

STT	Tên	2θ	FWHM	Kích thước hạt (nm)	Kích thước hạt trung bình (nm)
1	ZnONPs	31,74	0,77	5,39	10,49
		34,41	0,42	7,62	
		36,25	0,70	7,63	
		47,54	1,12	8,78	
		56,58	1,01	8,82	
		62,86	1,04	10,55	
		68,00	1,75	11,74	
		72,59	0,68	14,33	
		76,91	1,31	19,58	
2	SeNPs	23,47	0,29	25,68	29,52
		29,66	0,21	27,57	
		41,32	0,30	27,99	
		43,61	0,29	28,59	
		45,75	0,33	29,29	
		51,69	0,29	37,98	

Trong nghiên cứu này, kích thước hạt của chế phẩm được xác định bằng giản đồ XRD dựa trên phương trình Debye - Scherrer. Kích thước hạt trung bình của Se-ZnONPs/*β*-glucan ghi nhận từ bảng 1 là khoảng 17 nm và có phân bố kích thước từ 5-38 nm. Bên cạnh đó, kích thước hạt của ZnONPs và SeNPs trong chế phẩm cũng được xác định lần lượt là 10,49 và 29,52 nm. Hơn nữa, các kết quả phân tích được từ hình 3, 4 và bảng 1 cho thấy đã tổng hợp thành công chế phẩm Se-ZnONPs/*β*-glucan ở cấp độ nano.

Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH



Hình 5. Khả năng bắt gốc tự do của các mẫu *β*-glucan, SeNPs/*β*-glucan, ZnONPs/*β*-glucan và Se-ZnONPs/*β*-glucan chiếu ở liều xạ 10 kGy

Kết quả từ hình 5 cho thấy khả năng kháng oxy hóa của các mẫu *β*-glucan, SeNPs/*β*-glucan, ZnONPs/*β*-glucan và Se-ZnONPs/*β*-glucan tăng khi gia tăng nồng độ thử nghiệm. Kết quả này cũng cho thấy mẫu Se-ZnONPs/*β*-glucan có khả năng bắt gốc tự do cao hơn hẳn các mẫu còn lại. Cụ thể, chế phẩm thử nghiệm ở nồng độ 0,075 - 0,25 mM có hoạt tính kháng oxy hóa lần lượt là 10,19 và 57,23%. Ở nồng độ 0,2 mM thì hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của chế phẩm cao hơn các mẫu *β*-glucan, ZnONPs/*β*-glucan và SeNPs/*β*-glucan lần lượt là 37,6; 25,2 và 21,8%. Ở tại nồng độ 0,25 mM thì khả năng bắt gốc tự do của chế phẩm gấp ~2 lần so với các mẫu ZnONPs/*β*-glucan, SeNPs/*β*-glucan. Từ đó, có thể thấy rằng việc tạo ra chế phẩm với sự kết hợp của hai loại nano (SeNPs và ZnONPs) đã cho thấy hiệu ứng cộng gộp của chúng và cao hơn hẳn khi tổng hợp vật liệu nano đơn thành phần. Sự kết hợp này đã làm gia tăng các hạt nano có trong chế phẩm dẫn đến gia tăng các hoạt động bề mặt hay các electron bề mặt của Se-ZnONPs đã ghép cặp với gốc tự do DPPH. Theo đó, việc bao bọc *β*-glucan bên ngoài các hạt Se-ZnONPs cũng đã góp phần trung hòa các gốc tự do bằng cách cho nguyên tử hydro. Ngoài ra, nồng độ trung hòa 50% gốc tự do DPPH (giá trị IC_{50}) của Se-ZnONPs/*β*-glucan cũng được xác định là 0,22 mM. Kết quả này cũng phù hợp với công bố trước đây của Dung và đồng tác giả (2021) khi cho rằng nồng độ chế phẩm càng cao thì hoạt tính kháng oxy hóa càng tăng.

KẾT LUẬN

Đã chế tạo thành công chế phẩm Se-ZnONPs/*β*-glucan bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma Co-60 với kích thước hạt trung bình được xác định từ giản đồ XRD là ~17 nm. Se-ZnONPs/*β*-glucan chế tạo được có khả năng kháng oxy hóa (57,23%) cao hơn hẳn các mẫu SeNPs/*β*-glucan (29,63%), ZnONPs/*β*-glucan (24,87%) và *β*-glucan (16,47%) ở cùng nồng độ thử nghiệm là 0,25 mM. Từ những kết quả đạt được có thể thấy chế phẩm tổng hợp được với sự kết hợp của hai loại nano cho hoạt tính kháng oxy hóa cao và cao hơn hẳn các mẫu nano đơn thành phần, đây được cho là chế phẩm rất có triển vọng để phát triển làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

Lời cảm ơn: *Chân thành cảm ơn tới Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã tài trợ toàn bộ kinh phí cho nghiên cứu này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahmad A, Ullah S, Ahmad W, Yuan Q, Taj R, Khan AU, Rahman AU, Khan, UA (2020). Zinc oxide-selenium heterojunction composite: synthesis, characterization and photo-induced antibacterial activity under visible light irradiation. *J Photochem Photobiol B*, 203: 111743.

Dapkekar A, Deshpande P, Oak MD, Paknikar KM, Rajwade JM (2020). Getting more micronutrients from wheat and barley through agronomic biofortification. *In Wheat and barley grain biofortification, Woodhead Publishing*, 53-99.

Dung NT, Trong TD, Vu NT, Binh NT, Minh TTL, Luan LQ (2021). Radiation synthesis of selenium nanoparticles capped with *β*-Glucan and its immunostimulant activity in cytoxan-induced immunosuppressed mice. *Nanomaterials*, 11(9): 2439.

Elemike EE, Uzoh IM, Onwudiwe DC, Babalola OO (2019). The role of nanotechnology in the fortification of plant nutrients and improvement of crop production. *Applied Sciences*, 9(3): 499.

Kristal AR, Darke AK, Morris JS, Tangen CM, Goodman PJ, Thompson IM, Meyskens FL, Goodman GE, Minasian LM, Parnes HL, Lippman SM, Klein EA (2014). Baseline selenium status and effects of selenium and vitamin e supplementation on prostate cancer risk. *JNCI Cancer Spectr,* 106(3): 456.

Lin ZH, Wang CC (2005). Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles. *Mater Chem Phys*, 92(2-3): 591-594.

Linh NV, Trong TD, Nghia NT, Vu NT, Luan LQ (2022). Hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan HepG2 của SeNPs/OligoFucoidan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma (Co-60). *Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn Quốc*, 501-506.

Medhi R, Marquez MD, Lee TR (2020). Visible-light-active doped metal oxide nanoparticles: review of their synthesis, properties, and applications. *ACS Appl Nano Mater*, 3(7): 6156-6185.

Moussa NB, Lajnef M, Jebari N, Villebasse C, Bayle F, Chaste J, Madouri A, Chtourou R, Herth E (2021). Synthesis of ZnO sol-gel thin-films CMOS-Compatible. *RSC advances*, 11(37): 22723-22733.

Musa I, Qamhieh N, Mahmoud ST (2017). Synthesis and length dependent photoluminescence property of zinc oxide nanorods. *Results Phys*, 7: 3552-3556.

Podporska-Carroll J, Myles A, Quilty B, McCormack DE, Fagan R, Hinder SJ, Dionysiou DD, Pillai SC (2017). Antibacterial properties of F-doped ZnO visible light photocatalyst. *J Hazard Mater Adv*, 324: 39-47.

Willander M, Yang LL, Wadeasa A, Ali SU, Asif MH, Zhao QX, Nur O (2009). Zinc oxide nanowires: controlled low temperature growth and some electrochemical and optical nano-devices. *J Mater Chem,* 19(7): 1006-1018.

Yang B, Zhao M, Shi J, Yang N, Jiang Y (2008). Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp. *Food Chem*, 106(2): 685-690.

Zhang Y, Song M, Mucci LA, Giovannucci EL (2022). Zinc supplement use and risk of aggressive prostate cancer: a 30-year follow-up study. *Eur J Epidemiol*, 37(12): 1251-1260.

STUDY ON THE PREPARATION OF Se-ZnO IN β-GLUCAN BY IRRADIATION METHOD

Nguyen Van Linh, Nguyen Thanh Vu, Nguyen Thi Ngoc Anh, Phan Le Tram Anh, Le Thanh Giau, Le Quang Luan*

Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

SUMMARY

The colloidal solution of (Se-ZnONPs) nanoparticles stabilized in *β*-glucan (Se-ZnONPs/*β*-glucan) with particle size about 17 nm was successfully prepared by gamma ray (Co-60) irradiation. The UV-Vis spectrum showed that the maximum absorption peaks of zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) was found at 354 nm. In addition, the analysis results from (FTIR) Fourier Transform Infrared Spectrophotometer spectra also indicated that the oxygen atom in (COO), and (OH) groups played an important role in stabilizing the Se-ZnONPs in the product. Besides, the crystalline structure of Se-ZnONPs/*β*-glucan sample was analyzed by X-ray diffraction (XRD) and its particle size was calculated based on XRD pattern. Furthermore, the Raman spectral analysis results of Se-ZnONPs/*β*-glucan indicated that the optical phonon mode of selenium nanoparticles (SeNPs) and ZnONPs were observed at 250 and 422 cm^{-1}, respectively. The antioxidant activity of Se-ZnONPs/*β*-glucan product was higher than this of SeNPs stabilized in *β*-glucan (SeNPs/*β*-glucan), ZnONPs stabilized in *β*-glucan (ZnONPs/*β*-glucan), and *β*-glucan. In addition, the IC_{50} value of Se-ZnONPs/*β*-glucan was determined to be about 0.22 mM. The results above revealed that Se-ZnONPs/*β*-glucan product prepared by gamma irradiation method has potential to be applied as health protection food.

Keywords: Antioxidant, *β-glucan,* gamma ray, irradiation.

* Author for correspondence: Tel: 913711223; Email: lequangluan@gmail.com

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN TRÍCH LY POLYPHENOL TỪ VỎ QUẢ CHÔM CHÔM (*Nephelium lappaceum*) VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA CAO CHIẾT

Đỗ Thị Hiền

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Chôm chôm là loài trái cây phổ biến, vỏ và hạt chôm chôm chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học trong đó polyphenol là thành phần điển hình có trong vỏ chôm chôm. Để tận dụng nguồn phế phẩm nghiên cứu tiến hành khảo sát điều kiện trích ly polyphenol từ vỏ quả chôm chôm. Nghiên cứu này khảo sát vỏ quả loại chôm chôm thái, nhãn, Java chọn ra loại vỏ chứa nhiều polyphenol nhất, sau đó khảo sát loại dung môi trích ly nước, ethanol 80%, ethanol 96% - acetone (4:1), acetone 70% và các phương pháp trích ly ngâm chiết, soxhlet, ngâm chiết kết hợp siêu âm, ngâm chiết kết hợp vi sóng. Đồng thời khảo sát tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lần lượt 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 (g/mL), thời gian siêu âm 20, 30, 40 và 50 phút, nhiệt độ siêu âm 45÷75°C, tần số 50/60 Hz. Kết quả cho thấy vỏ chôm chôm nhãn, phương pháp ngâm chiết kết hợp với siêu âm, sử dụng ethanol 80%, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:10 (w/v), thời gian siêu âm 30 phút và nhiệt độ 55°C cho TPC (total polyphenol content) cao nhất 61,93 mg/g. Đánh giá hoạt tính chống oxi hóa IC_{50} của cao chiết 7,191 (µg/mL), thấp hơn ascorbic acid. Kết quả chạy phổ FTIR của cao chiết cho thấy xuất hiện các nhóm chức đặc trưng của polyphenol. Nghiên cứu đã trích ly thành công polyphenol bằng phương pháp ngâm chiết kết hợp siêu âm, có thể nghiên cứu thêm khả năng kháng khuẩn để ứng dụng.

Từ khóa: Chôm chôm, dung môi trích ly, kháng oxy hóa bằng DPPH, polyphenol, trích ly hỗ trợ siêu âm.

MỞ ĐẦU

Chôm chôm (*Nephelium lappaceum*) là một loại trái cây nhiệt đới có nguồn gốc từ Đông Nam Á, thuộc họ bồ hòn. Nó có màu đỏ hoặc vàng, hình trứng, trái cây ngọt, mọng nước, giàu vitamin C. Trái cây này được tiêu thụ tươi, đóng hộp hoặc chế biến và việc tiêu thụ nó dẫn đến việc tạo ra một lượng lớn chất thải từ hạt và vỏ. Các sản phẩm phụ này rất giàu phenolic với hơn 50 hợp chất được xác định. Trong số này, các thành phần chính là acid gallic, acid ellagic, corilagin và geraniin (Hernández *et al.*, 2017). Nhiều nghiên cứu đã cho thấy rằng hàm lượng polyphenol trong vỏ chôm chôm có hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng virus, chống ung thư, chống dị ứng, chống béo phì, trị tiểu đường, chống viêm khớp, cũng như là một chất thúc đẩy sức khỏe tim mạch (Thitilertdecha *et al.*, 2008; Yunusa *et al.*, 2018). Một số hợp chất sinh học trong vỏ và hạt có tác dụng tăng cường sức khỏe, đánh giá an toàn có thể ứng dụng tiềm năng trong các ngành công nghiệp thực phẩm – dược phẩm (Rakariyatham *et al.*, 2020)

Gusman và Tsai (2015) đã nghiên cứu chiết xuất các hợp chất kháng oxy hóa trong đó có polyphenol từ vỏ chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.). Quá trình chiết được tiến hành dựa trên tỷ lệ dung môi (1:10 ÷ 1:30 g/mL), nồng độ ethanol (0 ÷ 95%), nhiệt độ chiết siêu âm (30 ÷70°C) và phương pháp chiết (thông thường từ 6 đến 36 giờ ở nhiệt độ phòng và siêu âm từ 0,5 đến 10 phút ở 50°C). Sun và đồng tác giả (2012) đã nghiên cứu tối ưu hóa chiết xuất hợp chất phenolic từ vỏ chôm chôm bằng phương pháp chiết xuất có hỗ trợ vi sóng (MAE). Các điều kiện tối ưu thu được là nồng độ ethanol của 80,85%, thời gian chiết là 58,39 giây cho kết quả tốt nhất. Estrada-Gil và đồng tác giả (2022) đã nghiên cứu trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học bằng cách chiết xuất có hỗ trợ bằng sóng siêu âm/vi sóng từ vỏ chôm chôm Mexico (*Nephelium lappaceum* L.). Mendez-Flores và đồng tác giả (2018) đã nghiên cứu chiết xuất các hợp chất polyphenolic kháng oxy hóa có hỗ trợ sóng siêu âm từ vỏ *Nephelium lappaceum* L. (giống Mexico) khối lượng/thể tích 1/7, thời gian chiết siêu âm 10 phút và tỷ lệ phần trăm ethanol/nước 10%. Palanisamy và đồng tác giả(2008) đã nghiên cứu vỏ của quả chôm chôm, một nguồn chất chống oxy hóa tự nhiên, dung môi trích ly ethanol với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 10:1 (w/v), quá trình trích ly được thực hiện trong 24 giờ trong máy lắc ổn nhiệt. Cao chiết thu được cho hoạt tính kháng oxy hóa tương đương vitamin C và tốt hơn nhiều so với hạt nho.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chôm chôm (*Nephelium lappaceum*) sử dụng trong nghiên cứu này được thu mua tại vựa trái cây ấp Mỹ Điền, xã Phú Điền, huyện Tháp Mười, tỉnh Đồng Tháp.

Các trang thiết bị chính sử dụng nghiên cứu: Máy đo OD (UV-Vis Jenway 7305, Anh), máy ly tâm (Z206A, Đức), máy lắc ổn nhiệt (LWB-211D, Hàn Quốc), bơm chân không (Rocker 300- Đài Loan), chạy phổ FTIR (Tensor 37, Bruker, US), bể siêu âm Elmasonic S300H (Elma – Đức), máy cô quay chân không (BUCHI I – 300 Pro, Thụy Sỹ).

Gallic acid, DPPH, Folin – Ciocalteau, ascorbic acid (Sigma Aldrich Pty. Ltd), ethanol, Na2CO3, acetone (Trung Quốc).

Phương pháp chuẩn bị nguyên liệu

Chôm chôm tươi, không dập nát, không hư hỏng mua tại vựa ấp Mỹ Điền, xã Phú Điền, huyện Tháp Mười, tỉnh Đồng Tháp được bóc tách lấy vỏ, rửa sạch, để ráo nước, thái nhỏ. Sau đó, sấy ở nhiệt độ 50 – 55°C trong khoảng 6 – 7 giờ cho đến khi độ ẩm đạt 5 – 6% thì kết thúc quá trình sấy. Vỏ chôm chôm sau khi sấy được đem đi xay, cho vào rây đường kính 0,06 µm, lấy phần bột mịn để đạt độ đồng nhất về mặt nguyên liệu. Để hạn chế sự oxy hóa, bột vỏ chôm chôm sau khi xay được cân 5 g bỏ vào các túi hút chân không, bảo quản lạnh sử dụng cho tất cả các thí nghiệm.

Phương pháp xác định hàm lượng polyphenol (Ainsworth, Gillespie, 2007)

Dựa vào phản ứng oxy hóa các hợp chất polyphenol bằng thuốc thử Folin – Ciocalteau, dùng acid gallic làm chất chuẩn. Phản ứng này liên quan đến việc làm giảm hàm lượng polyphenol, các hợp chất này sẽ bị oxy hóa trong môi trường kiềm dẫn đến sự hình thành các ion superioxide, các ion này sẽ lần lượt phản ứng với molybdate để hình thành dạng molybdenum oxide (Mo^{+4}). Mylybdenum oxide là dạng phức chất có màu xanh lam, hấp thụ bước sóng 760 nm. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ polyphenol trong một phạm vi nhất định. Dựa vào cường độ màu đo được và đồ thị chuẩn của acid gallic với thuốc thử có thể xác định được hàm lượng polyphenol trong mẫu.

Đối với mẫu: pha loãng mẫu 100 lần,hút 2 mL dung dịch vào từng falcon, Thêm 1 mL Folin-Ciocalteau 10%, vortex ủ trong 5 phút. Thêm 3 mL Na_2CO_3 2%, vortex, ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó tiến hành đo OD (UV-Vis Jenway 7305) ở bước sóng 760 nm.

$$\text{TPC} = \frac{\boldsymbol{X \times V \times F}}{\boldsymbol{m \times 1000}} \text{ (mg GAE/g chất khô)}$$

Trong đó: X: giá trị x từ đường chuẩn acid gallic (µg/mL), V: thể tích dịch chiết (mL), m: khối lượng cao chiết có trong thể tích V (g), F: hệ số pha loãng, 1000 là hệ số chuyển đổi đơn vị (µg → mg)

Khảo sát hàm lượng polyphenol của vỏ chôm chôm từ các loại chôm chôm khác nhau

Cân 5 g bột vỏ chôm chôm thái, nhãn, Java cho vào bình tam giác 250 mL. Thêm vào đó dung môi ethanol 80% với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (1:10 g/mL). Tiến hành ủ mẫu trong máy lắc ổn nhiệt (LWB-211D- Hàn Quốc) ở 55°C trong 180 phút. Sau đó tiến hành ly tâm (Z206A - Đức) mẫu ở 4500 vòng/phút trong 10 phút và được lọc bằng bơm chân không để thu dịch. Dịch sau khi trích ly tiến hành định lượng TPC.

Khảo sát một số loại dung môi trích ly polyphenol

Cân 5 g bột vỏ chôm chôm tối ưu từ thí nghiệm trên cho vào bình tam giác 250 mL. Thêm vào đó dung môi nước, ethanol 80%, ethanol 96% – acetone (4:1), acetone 70% với tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (1:10 g/mL). Tiến hành ủ mẫu trong máy lắc ổn nhiệt ở 55°C trong 180 phút. Sau đó tiến hành ly tâm mẫu ở 4500 vòng/phút trong 10 phút và được lọc bằng bơm chân không (Rocker 300- Đài Loan) để thu dịch. Dịch sau khi trích ly tiến hành định lượng TPC.

Khảo sát các phương pháp trích ly polyphenol

Nhằm tìm ra phương pháp trích ly tối ưu nhất, thí nghiệm này tiến hành khảo sát các phương pháp trích ly ngâm chiết, soxhlet, ngâm chiết kết hợp siêu âm, ngâm chiết kết hợp vi sóng.

Ngâm chiết

Cân 5 g bột vỏ chôm chôm cho vào bình tam giác 250 mL.Thêm vào đó vào dung môi tối ưu ở thí nghiệm trên với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (1:10 g/mL). Tiến hành ủ mẫu trong máy lắc ổn nhiệt ở 55°C trong 180 phút. Sau đó tiến hành ly tâm mẫu ở 4500 vòng/phút trong 10 phút và được lọc bằng bơm chân không để thu dịch.

Chiết Soxhlet

Cân 5 g bột vỏ chôm chôm tối cho vào bình cầu. Thêm vào đó dung môi tối ưu ở từ thí nghiệm trên với tỷ lệ với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (1:10 g/mL). Tiến hành chiết trong 4 giờ thu dịch định lượng TPC.

Ngâm chiết kết hợp siêu âm

Tiến hành tương tự như ngâm chiết sau đó lấy mẫu ra ngoài và cho hỗn hợp trở lại nhiệt độ phòng. Tiến hành siêu âm trong với tần số 50/60 Hz, công suất 1500 W với thời gian 30 phút, nhiệt độ 55°C. Sau đó ly tâm mẫu ở 4500 vòng/phút trong 10 phút và được lọc bằng bơm chân không để thu dịch.

Ngâm chiết kết hợp vi sóng

Tiến hành tương tự như ngâm chiết sau đó lấy mẫu ra ngoài và cho hỗn hợp trở lại nhiệt độ phòng, tiến hành quay trong lò vi sóng 2 phút. Sau đó tiến hành ly tâm mẫu ở 4500 vòng/phút trong 10 phút và được lọc bằng bơm chân không để thu dịch.

Dịch sau khi trích ly thu được từ các phương pháp chiết tiến hành định lượng TPC.

Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi

Cân 5 g bột vỏ chôm chôm cho vào bình tam giác 250 mL. Thêm vào đó dung môi tối ưu ở thí nghiệm TN2 với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lần lượt 1:5 (g/mL), 1:10 (g/mL), 1:15 (g/mL), 1:20 (g/mL). Tiến hành ủ mẫu trong máy lắc ổn nhiệt ở 55°C trong 180 phút, lấy mẫu ra ngoài và cho hỗn hợp trở lại nhiệt độ phòng. Sau đó, tiến hành siêu âm (tối ưu TN3) trong 30 phút, nhiệt độ 55°C. Sau khi siêu âm tiến hành ly tâm mẫu ở 4500 vòng/phút trong 10 phút và được lọc bằng bơm chân không để thu dịch. Dịch sau khi trích ly tiến hành định lượng polyphenol tổng trong dịch.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nhiệt độ siêu âm đến quá trình trích ly polyphenol

Cân 5 g bột vỏ chôm chôm cho vào bình tam giác 250 mL. Thêm vào đó dung môi và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi tối ưu từ các thí nghiệm trên. Tiến hành ủ mẫu trong máy lắc ổn nhiệt ở 55°C trong 180 phút, lấy mẫu ra ngoài và cho hỗn hợp trở lại nhiệt độ phòng. Sau đó, tiến hành siêu âm với thời gian lần lượt 20 phút, 30 phút, 40 phút và 50 phút, nhiệt độ 45°C, 55°C, 65°C, 75°C. Sau khi siêu âm tiến hành ly tâm mẫu ở 4500 vòng/phút trong 10 phút và được lọc bằng bơm chân không để thu dịch. Dịch sau khi trích ly tiến hành định lượng polyphenol tổng trong dịch.

Chạy phổ hồng ngoại FTIR

Chạy phổ FTIR (Tensor 37, Bruker, US) nhằm đánh giá sự hiện diện của polyphenol trong cao chiết

Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa

Mẫu cao chiết: pha mẫu với methanol theo các dãy nồng độ: 1000, 500, 250, 125 và 62.5 µg/mL. Ở mỗi nồng độ hút 0.1 mL dịch đã pha loãng thêm 0.1 mL DPPH. Ủ các mẫu trong 30 phút, sau đó đi đo OD (UV-Vis Jenway 7305) ở bước sóng 517 nm. Phần trăm bắt gốc tự do được tính theo công thức:

$$I\ (\%) = 100 \times \frac{(A_0 - A_1)}{A_0}$$

Trong đó I (%): % khử gốc tự do của mẫu ở bước sóng 517 nm; A_o: Độ hấp thụ của DPPH. A_1: Độ hấp thụ của mẫu khảo sát. Mẫu trắng là dung dịch methanol

Trong thí nghiệm này, ascorbic acid làm dung dịch chuẩn để so sánh với mẫu thử thông qua giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% gốc tự do). Pha ascorbic acid với nước cất theo các dãy nồng độ: 2 - 6 µg/mL. Ở mỗi nồng độ hút 0,1 mL dịch đã pha loãng thêm 0,1 mL DPPH. IC50 là một giá trị dùng để đánh giá khả năng ức chế mạnh hoặc yếu của mẫu khảo sát được. Hoạt tính kháng oxy hóa càng cao thì giá trị IC50 sẽ càng thấp.

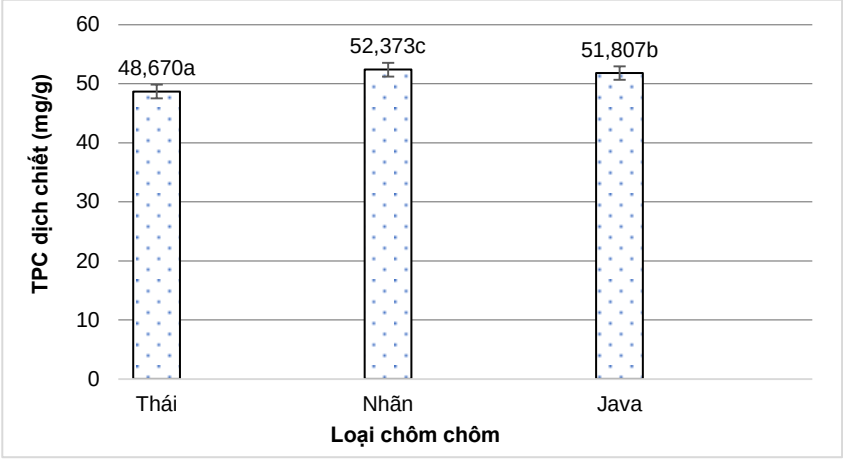
Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Số liệu thí nghiệm được phân tích phương sai ANOVA bằng phần mềm Stagraphic 18,0 ($P < 0,05$). Đồ thị được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2010.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả khảo sát hàm lượng polyphenol của các loại chôm chôm

Theo những nghiên cứu trước đây cho thấy vỏ chôm chôm là nguyên liệu chứa hợp chất có hoạt tính sinh học điển hình polyphenol (Hernández *et al*., 2017). Tuy nhiên, các hợp chất polyphenol có thể thay đổi tùy theo điều kiện môi trường, đất đai, giống cây trồng. Vì vậy, ở thí nghiệm này khảo sát vỏ ở ba giống chôm chôm là chôm chôm Thái, chôm chôm nhãn và chôm chôm Java (chôm chôm thường loại tróc hạt) với dung môi ethanol 80%, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:10, nhiệt độ 55°C với thời gian 180 phút. Dịch chiết sau khi trích ly được đem đi phân tích. Kết quả thu nhận được thể hiện qua hình Hình 1.



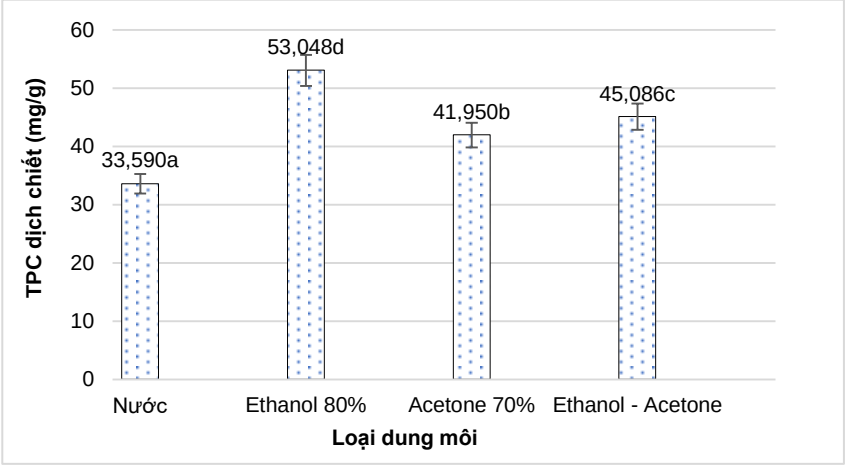
Hình 1. TPC theo từng loại chôm chôm

(a-c là các chữ cái thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê độ tin cậy p<0,05)

Kết quả trên cho thấy có sự khác biệt về hàm lượng polyphenol giữa các giống chôm chôm. Hàm lượng polyphenol có trong vỏ của ba giống chôm chôm nhãn, chôm chôm Thái, chôm chôm Java lần lượt là 52,373 ± 0,1 mg/g, 48,67 ± 0,131 mg/g và 51,807 ± 0,065 mg/g. Chôm chôm nhãn có hàm lượng TPC cao nhất. Điều này có thể là do điều kiện thổ nhưỡng cũng như đặc điểm của từng giống nên làm ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol và các chất khác có trong vỏ. Kết quả thu được tương tự với nghiên cứu của Huỳnh Ngọc Trung Dung và đồng tác giả (2022) nhóm tác giả đã thu được hàm lượng polyphenol từ chôm chôm nhãn là 199,65 mg GAE/g. Từ các kết quả trên chọn chôm chôm nhãn làm nguyên liệu cho thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả khảo sát một số loại dung môi trích ly polyphenol

Việc chiết xuất các hợp chất polyphenol từ nguyên liệu thực vật bị ảnh hưởng bởi độ hòa tan của các hợp chất polyphenol trong dung môi được sử dụng cho quá trình chiết. Hơn nữa sự phân cực của dung môi đóng một vai trò quan trọng trong việc tăng khả năng hòa tan các hợp chất polyphenol. Vì vậy, việc lựa chọn dung môi là một yếu tố vô cùng quan trọng trong trích ly polyphenol. Thí nghiệm này khảo sát khả năng trích ly polyphenol của các loại dung môi khác nhau như nước, ethanol 80%, acetone 70%, ethanol:acetone (4:1) với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:10, nhiệt độ 55°C với thời gian 180 phút. Dịch chiết sau khi trích ly được đem đi phân tích. Kết quả thu nhận được thể hiện qua Hình 2.



Hình 2. TPC theo từng loại dung môi

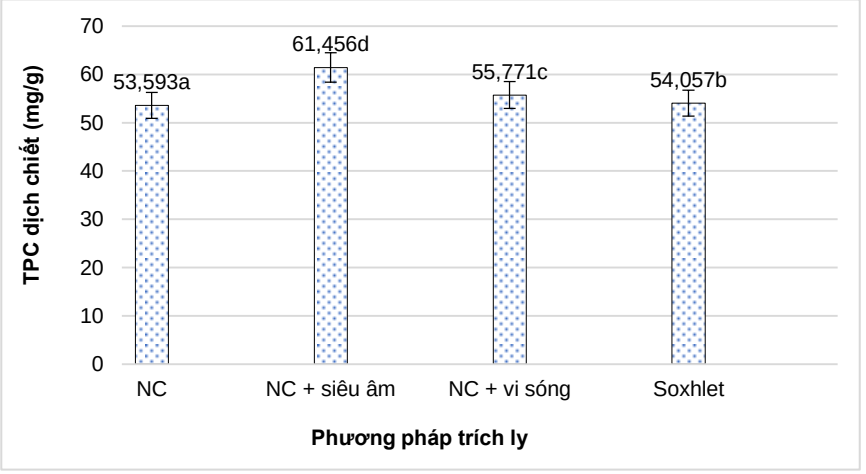
(a-d là các chữ cái thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê độ tin cậy p<0,05)

Dựa vào kết quả thể hiện ở Hình 2 cho thấy hàm lượng polyphenol giữa các loại dung môi có sự thay đổi. TPC trong vỏ chôm chôm cao nhất khi sử dụng dung môi ethanol 80% là 53,048 ± 0,131 mg/g, tiếp theo đến dung môi ethanol – acetone 45,086 ± 0,758 mg/g; acetone 70% là 41,950 ± 0,136 mg/g. Việc sử dụng các dung môi hữu cơ được pha theo các tỷ lệ khác nhau tạo ra một môi trường có độ phân cực vừa phải, tăng khả năng hòa tan và khuếch tán của các hợp chất polyphenol sẽ làm tăng hiệu quả chiết. Khi sử dụng nước để chiết xuất cho hàm lượng thấp nhất 33,591 ± 0,082 mg/g.

Theo nghiên cứu của Chirinos và đồng tác giả (2007) nước có độ phân cực rất cao, năng xuất chiết không cao đối với các hợp chất polyphenol. Còn theo nghiên cứu của Yunusa và đồng tác giả (2018) về hàm lượng polyphenol của vỏ và hạt cho thấy hàm lượng TPC vỏ chôm chôm khi chiết bằng ethanol là 244 ± 4,34 mg GAE/g cao hơn đáng kể so với nước. Trong polyphenol có chứa các vòng thơm và các nhóm -OH có khả năng phân cực. Trong 3 dung môi sử dụng thì nước có độ phân cực mạnh nhất sau đó là ethanol và yếu nhất là acetone. Bên cạnh đó ethanol còn có nhóm -OH có khả năng tạo liên kết hydrogen với polyphenol nên khả năng polyphenol hòa tan nhiều nhất trong ethanol. Do có các vòng thơm nên polyphenol khó hòa tan trong nước. Vì vậy, hiệu quả trích ly cao nhất trong ethanol. Ethanol còn được biết đến là một dung môi thân thiện với môi trường, tương đối an toàn với sức khỏe con người. Vậy dung môi ethanol 80% được sử dụng trong thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả khảo sát các phương pháp trích ly polyphenol

Ở thí nghiệm này tiến hành khảo sát các phương pháp trích ly khác nhau như ngâm chiết, shoxlet, ngâm chiết kết hợp siêu âm, ngâm chiết kết hợp vi sóng với dung môi ethanol 80%, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:10. Hàm lượng polyphenol trong vỏ chôm chôm tách chiết với các phương pháp khác nhau được thể hiện ở Hình 3. Kết quả cho thấy hàm lượng polyphenol của phương pháp ngâm chiết kết hợp với siêu âm là cao nhất 61,456 ± 0,1 mg/g, tiếp đến là phương pháp ngâm chiết kết hợp vi sóng 55,771 ± 0,164 mg/g và phương pháp Soxhlet 54,057 ± 0,219 mg/g, phương pháp ngâm chiết thông thường cho hàm lượng TPC thấp nhất 52,242 ± 0,1 mg/mL.



Hình 3. TPC của các phương pháp trích ly

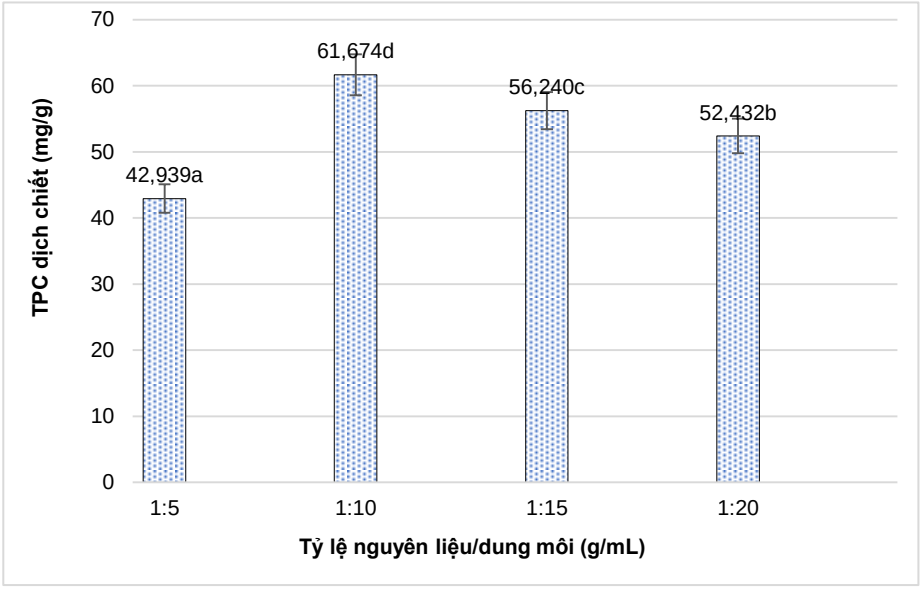
(a-d là các chữ cái thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê độ tin cậy p<0,05)

Theo nghiên cứu của Phuong và đồng tác giả (2020) đã kết luận rằng phương pháp siêu âm giúp tăng hàm lượng polyphenol lên 15% với phương pháp chiết thông thường với tổng hàm lượng là 250 – 300 mg GAE/g. Chiết bằng Soxhlet thì thời gian chiết lâu, khó kiểm soát được nhiệt độ, tế bào ít khuếch tán nên cấu trúc tế bào phá vỡ ít, cho hàm lượng thấp, hiệu quả trích ly thấp. Phương pháp ngâm chiết kết hợp với vi sóng dưới tác dụng của sóng điện từ, các phân tử dung môi và các hợp chất phân cực (polyphenol) sẽ dao động sinh ra ma sát lớn và từ đó sản sinh ra nhiệt làm hỗn hợp chiết nóng lên, màng tế bào vỡ ra, dung môi sẽ khuếch tán vào bên trong, tăng khả năng hòa tan của các chất vào dung môi (Hà, 2006). Tuy nhiên trích ly sử dụng vi sóng gặp hạn chế khi ứng dụng vì vấn đề thiết bị, khó kiểm soát được nhiệt độ trích ly, các dung môi đạt nhiệt độ sôi nhanh và dễ gây nổ dẫn đến hiệu suất trích ly thấp. Những vấn đề này phương pháp trích ly có hỗ trợ siêu âm đã khắc phục được dù thời gian trích lâu hơn so với phương pháp có sự hỗ trợ của vi sóng. Hiệu quả trích ly polyphenol khi sử dụng sóng siêu âm tăng lên là nhờ sự tạo thành các bọt khí trong dung môi khi sóng truyền qua. Dưới tác dụng của sóng, các bọt khí bị kéo nén, sự tăng áp suất và nhiệt độ làm các bọt khí nổ vỡ, cấu trúc tế bào bị phá vỡ nhiều hơn làm tăng sự thoát nước của các chất nội bào vào dung dịch do đó tăng hiệu quả trích ly polyphenol. Vì thế, phương pháp ngâm chiết kết hợp với siêu âm được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi

Động lực của quá trình trích ly là do sự chênh lệch nồng độ giữa cấu tử trong nguyên liệu và dung môi. Sự vận chuyển chất tan từ bên trong tế bào thực vật ra bên ngoài dung môi qua con đường khuếch tán là chủ yếu. Sự khuếch tán này sẽ giúp cho quá trình chiết rút các cấu tử cần trích ly từ trong nguyên liệu vào dung môi xảy ra nhanh và triệt để hơn. Do đó, lượng dung môi khác nhau sẽ dẫn đến hàm lượng chất tan được chiết rút ra từ nguyên liệu là khác nhau (Nguyễn Thị Tuyết, Trần Thị Duyên, 2020). Vì vậy, thí nghiệm này thực hiện với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lần lượt là lần lượt 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 (g/mL) bằng phương pháp siêu âm (kết quả tối ưu

từ thí nghiệm trên), nhiệt độ 55°C, thời gian 30 phút. Kết quả thu nhận được thể hiện qua Hình 4. Hàm lượng polyphenol ở tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:5 thấp nhất 42,939 ± 0,091 mg/g. Nhưng khi tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ở các tỷ lệ 1:10; 1:15; 1:20 thì TPC có xu hướng giảm. Nguyên nhân của sự thay đổi trên là do khi lượng dung môi quá ít (ở tỷ lệ 1:5) không đủ để hòa tan và khuếch tán polyphenol ra khỏi tế bào. Khi tiếp tục tăng lượng dung môi thì hàm lượng polyphenol tăng (1:10) do tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đạt đến giá trị nhất định, các tế bào có khả năng hấp thụ nhanh chóng, trương nở tối đa và vỡ ra đồng thời hòa tan triệt để polyphenol nên lượng polyphenol cao nhất. Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng lượng dung môi (1:15 và 1:20) làm hiệu quả trích ly polyphenol không tăng do lượng polyphenol đã hòa tan tối đa và các pha đã đạt đến trạng thái cân bằng.



Hình 4. TPC theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi

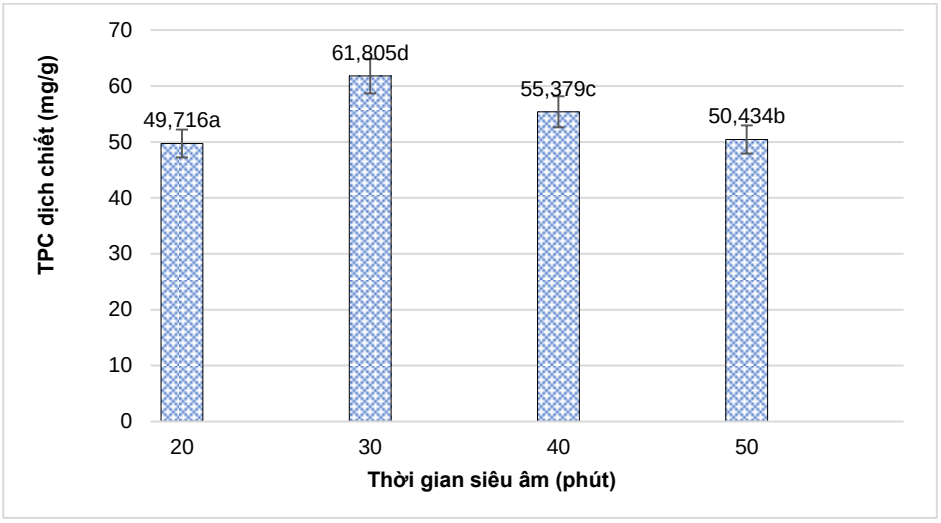
(a-d là các chữ cái thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê độ tin cậy p<0,05)

Theo Hernández và đồng tác giả (2017) khi nghiên cứu xác định hàm lượng polyphenolic, hoạt tính kháng oxy hóa và thành phần hóa học từ vỏ chôm chôm đã sử dụng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:10 để chiết xuất polyphenol, thu được hàm lượng polyphenolic cao nhất. Còn theo nghiên cứu của Prakash Maran và đồng tác giả (2013) tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:18,6 g/mL. Cùng với thí nghiệm thực tế tỷ lệ 1:10 cho hàm lượng polyphenol cao nhất và tỷ lệ này được sử dụng ở các thí nghiệm sau.

Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến quá trình trích ly polyphenol

Trong quá trình trích ly các hợp chất polyphenol, thời gian chiết kéo dài có thể dẫn đến sự phân hủy của polyphenol, làm giảm hoạt tính sinh học. Ở thí nghiệm này, thực hiện với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1:10 (tối ưu từ thí nghiệm trên), thời gian siêu âm 20, 30, 40, 50 phút ở nhiệt độ 55°C, kết quả được trình bày ở Hình 5.

Kết quả cho thấy khi tăng thời gian siêu âm thì hàm lượng TPC tăng dần rồi giảm. Hàm lượng polyphenol siêu âm ở thời gian 20 phút là 49,716 ± 0,131 mg/g, TPC tăng lên ở thời gian siêu âm 30 phút 61,805 ± 0,113 mg/g nhưng lại giảm dần khi thời gian siêu âm 40 và 50 phút với TPC lần lượt là 55,379 ± 0,42 mg/g, 50,434 ± 0,113 mg/g. Khi kéo dài thời gian siêu âm, kéo theo sự gia tăng hiệu suất trích ly, nhưng không nên kéo dài vì điều này sẽ làm giảm hiệu suất trích ly bởi vì sóng siêu âm sẽ tác động đến cấu trúc của polyphenol. Bên cạnh đó, siêu âm càng lâu, nhiệt độ của dịch siêu âm sẽ tăng lên gây biến tính polyphenol làm cho hàm lượng giảm xuống. Kết quả nghiên cứu khá tương đồng với nghiên cứu của Prakash Maran và đồng tác giả (2013) đã tối ưu hóa hỗ trợ siêu âm chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học từ vỏ quả chôm chôm bằng phương pháp bề mặt đáp ứng theo mô hình CCD đã kết luận rằng thời gian chiết siêu âm là 20 phút với công suất 20W thu được hàm lượng polyphenol cao nhất.

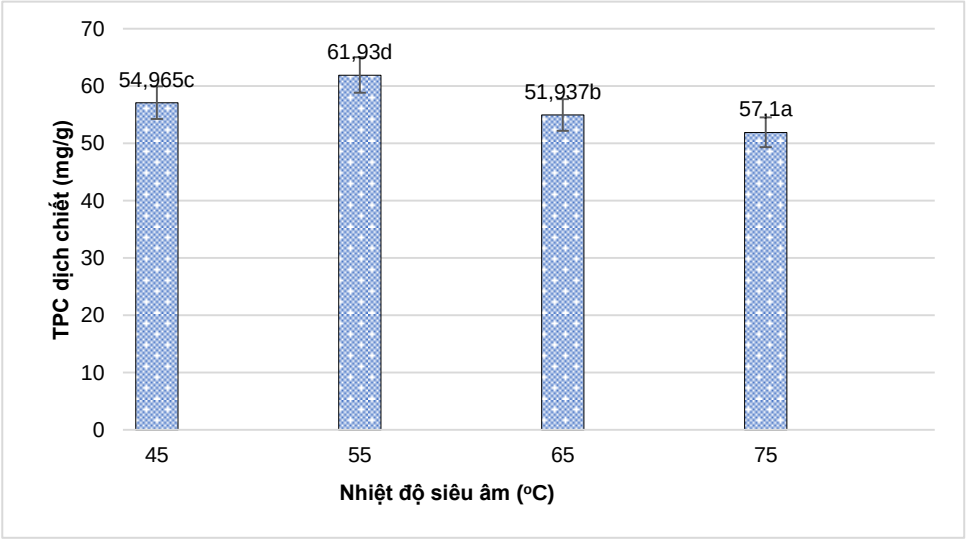


Hình 5. TPC theo thời gian siêu âm

(a-d là các chữ cái thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê độ tin cậy p<0,05)

Ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm đến quá trình trích ly polyphenol

Bên cạnh việc khảo sát ảnh hưởng của thời gian siêu âm, nghiên cứu cũng đã khảo sát thêm về ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm đến quá trình chiết. Thí nghiệm này được khảo sát ở các nhiệt độ 45÷75°C với thời gian siêu âm 30 phút (tối ưu từ thí nghiệm trên) thu được kết quả ở Hình 6.



Hình 6. TPC theo nhiệt độ siêu âm

(a-d là các chữ cái thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê độ tin cậy p<0,05)

Từ kết quả ở Hình 6 cho thấy các nhiệt độ siêu âm khác nhau hàm lượng polyphenol thu được có sự khác biệt. Khi tăng nhiệt độ siêu âm từ 45 lên 55°C thì TPC cũng tăng. Cụ thể hàm lượng polyphenol trong dịch chiết tăng từ 57,1 ± 0,065 mg/g lên 61,93 ± 0,168 mg/g. Nguyên nhân là do khi tăng nhiệt độ, vách tế bào của bột chôm chôm sẽ mềm dần, dung môi dễ thẩm thấu vào bên trong. Bên cạnh đó, nhiệt độ tăng lên cũng góp phần làm giảm độ nhớt của dung môi cũng như tăng quá trình tiếp xúc giữa dung môi và nguyên liệu nên lượng polyphenol tăng. Mặt khác, nhiệt giúp cho quá trình trích ly dễ dàng bằng cách phá hủy màng tế bào bởi việc làm biến tính màng tế bào và các bọt khí tạo thành, nó làm tăng khả năng hoà tan của bột cần trích ly. Nhiệt độ trích ly thấp quá hàm lượng TPC không cao vì polyphenol trong bã còn nhiều (Phạm Ngọc Khôi Khôi, Nguyễn Thị Mỹ Duyên, 2017). Khi tăng nhiệt độ từ 55°C lên 75°C, hàm lượng polyphenol giảm từ 61.93 ± 0.168 mg/g xuống còn 51,937 ± 0,261 mg/g. Vì nhiệt độ tăng cao làm cho các hợp chất polyphenol trong nguyên liệu bị phân hủy do các phản ứng thủy phân, oxy hóa nội tại và polymer hóa. Đồng thời sinh ra một số hợp chất không mong muốn (Nguyễn Hải Hà, 2006). Bên cạnh đó nhiệt độ quá cao sẽ làm biến tính và giảm hiệu quả trích ly.

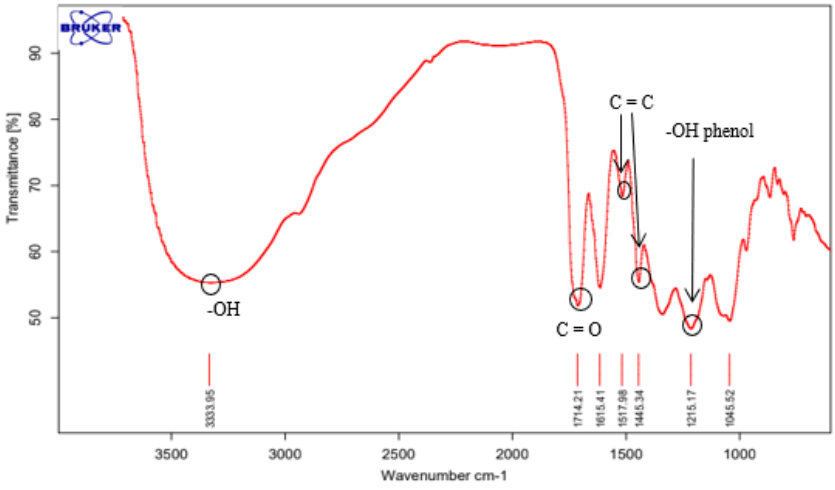
Theo Gusma và Tsai (2015) đã tiến hành khảo sát nhiệt độ siêu âm kết quả cho thấy rằng siêu âm ở nhiệt độ 50°C cho kết quả thu hồi polyphenol cao nhất. Bên cạnh đó, Phuong và đồng tác giả (2020) đã sử dụng nhiệt độ siêu âm là 40°C để hỗ trợ ngâm chiết tốt nhất.

Kết quả khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa

Sau khi đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm tiến hành xây dựng được biểu đồ hồi quy tuyến tính thể hiện khả năng bắt gốc tự do (DPPH) của acid ascorbic là $y = 15,652x – 19,919$ ($R^2 = 0.9932$), giá trị IC_{50} = 4,467 µg/mL, cao chiết vỏ chôm chôm là $y = 0,0324x + 49,767$ ($R^2 = 0,9977$), giá trị IC_{50} = 7.191 µg/mL. Như vậy, IC_{50} của cao chiết cao hơn của vitamin C 1,610 lần. Có thể kết luận, cao chiết vỏ chôm chôm có khả năng kháng oxy hóa khá tốt nhưng thấp hơn acid ascorbic. Theo nghiên cứu của Perera và đồng tác giả (2021) đã nghiên cứu trích ly polyphenol từ vỏ chôm chôm của vùng Sri Lanka bằng phương pháp soxlet thu được kết quả IC_{50} của phương pháp ngâm chiết bằng ethanol là 8,31 ± 0,5 µg/mL. Bên cạnh đó, Thitilertdecha và đồng tác giả (2008) hoạt tính kháng oxy hóa của chiết xuất vỏ chôm chôm thu được kết quả IC_{50} của phương pháp ngâm chiết bằng ethanol là, 4,94 µg/mL. Như vậy, kết quả nghiên cứu khá tương đồng với 2 nghiên cứu trên khi sử dụng dung môi trích ly là ethanol, có thể phương pháp trích ly khác nhau.

Kết quả quét phổ hồng ngoại FTIR

Kết quả chạy phổ FTIR của mẫu cao chiết thể hiện hình 7. Trục tung thể hiện cường độ hấp thụ của các mũi phổ, trục hoành là vị trí các mũi hấp thụ được biểu diễn dưới dạng số sóng (cm-1). Polyphenol có cấu trúc phức tạp gồm các vòng benzenoid thơm (C = C, C = O) gắn với nhóm hydroxyl (– OH). Theo nghiên cứu của Jantapaso và Mittraparp-Arthorn (2022) về thành phần hóa học thực vật và hoạt tính sinh học của nước chiết xuất từ quả chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L. cv. Rong Rian), nhóm tác giả đã cho thấy phổ FTIR của polyphenol được thể hiện bởi peak 1446 và 1524 cm^{-1} đại diện nhóm C = C và peak 1708 cm^{-1} đại diện cho nhóm C = O của vòng thơm – đặc trưng của polyphenol. Đỉnh ở 1217 cm^{-1} xác nhận sự hiện diện của nhóm hydroxyl của polyphenol. Nhóm chức đặc trưng của nước có peak tại đỉnh 3412 cm^{-1}. Phổ FTIR của mẫu cao chiết polyphenol được thể hiện bởi peak 1445,34 và 1517,98 cm^{-1} đại diện nhóm C = C và peak 1714,21 cm^{-1} đại diện cho nhóm C = O của vòng thơm – đặc trưng của polyphenol. Đỉnh ở 1215,17 cm^{-1} xác nhận sự hiện diện của nhóm hydroxyl của polyphenol. Một đỉnh kéo dài ở peak 3333,95 cm^{-1} cho thấy sự có mặt của nhóm chức O–H. Kết quả phổ FTIR của mẫu polyphenol từ cao chiết chôm chôm có xuất hiện các peak gần tương đồng với các phổ chuẩn của bài báo đối chứng. Bên cạnh đó, trong nghiên cứu của Mendez-Flores và đồng tác giả (2018) về chiết xuất các hợp chất polyphenolic chống oxy hoá có hỗ trợ sóng siêu âm từ vỏ Naphelium lappaceum L. (giống Mexico) và của Monrroy và đồng tác giả (2020) nghiên cứu xác định hợp chất có hoạt tính sinh học trong chiết xuất vỏ chôm chôm và đánh giá khả năng kháng oxy, cũng cho thấy ở kết quả chạy phổ FTIR đã cho ra các dải peak tương đồng với phổ FTIR của mẫu. Do đó trong cao chiết có chứa polyphenol.



Hình 7. Kết quả chạy phổ FTIR của cao chiết polyphenol từ vỏ chôm chôm

KẾT LUẬN

Khảo sát 3 loại chôm chôm: Thái, nhãn, Java cho kết quả thu nhận được chôm chôm nhãn cho hàm lượng polyphenol cao nhất là 52,373 mg/g. Sử dụng ethanol 80% để trích ly bằng phương pháp ngâm chiết kết hợp với siêu âm thu,tỷ lệ trích ly giữa nguyên liệu và dung môi tốt nhất là 1:10 (w/v), thời gian siêu âm tốt nhất là 30 phút và nhiệt độ siêu âm tốt nhất là 55°C cho 61,93 mg/g. Cao chiết có khả năng kháng oxy hóa tốt, IC_{50} = 7,191 µg/mL.

Lời cảm ơn: *Cảm ơn sự hỗ trợ của sinh viên Trần Kiều Vĩ. Đồng thời cảm ơn trường Đại học Công thương Tp.HCM đã hỗ trợ trang thiết bị thực hiện nghiên cứu này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ainsworth EA, Gillespie KM (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols,* 2(4): 875-877.

Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R, Larondelle Y (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Separation Purification Technology,* 55(2): 217-225.

Estrada-Gil L, Contreras-Esquivel JC, Flores-Gallegos C, Zugasti-Cruz A, Govea-Salas M, Mata-Gómez MA, & Ascacio-Valdés JA (2022). Recovery of bioactive Ellagitannins by ultrasound/microwave-assisted extraction from Mexican Rambutan Peel (*Nephelium lappaceum L.*). *Molecules,* 27(5): 1592-1611.

Gusman JA, Tsai PJ (2015). Extraction of antioxidant compounds from rambutan (*Nephelium lappaceum L*.) peel as agricultural waste in Taiwan. *Journal of Tropical Crop Science,* 2(2): 1011-1019.

Hernández C, Ascacio-Valdés J, De la Garza H, Wong-Paz J, Aguilar CN, Martínez-Avila GC, & Aguilera-Carbó A (2017). Polyphenolic content, *in vitro* antioxidant activity and chemical composition of extract from *Nephelium lappaceum* L.(Mexican rambutan) husk. *Asian Pacific journal of tropical medicine,* 10(12): 1201-1205.

Huỳnh Ngọc Trung Dung, Hà Đăng Huy, Nguyễn Ngọc An, Nguyễn Phú Quý, Phạm Đoan Vi (2022). Khảo sát hàm lượng polyphenol, flavonoid và hoạt tính sinh học của cao chiết từ vỏ chôm chôm (*Nephelium lappacium* L.). *Tạp chí Khoa học Đại học cần Thơ,* 58: 74-82.

Jantapaso H, Mittraparp-Arthorn P (2022). Phytochemical composition and bioactivities of aqueous extract of rambutan (*Nephelium lappaceum* L. cv. Rong Rian) peel. *Antioxidants,* 11(5): 956-1005.

Mendez-Flores A, Hérnandez-Almanza A, Sáenz-Galindo A, Morlett-Chávez J, Aguilar CN, & Ascacio-Valdés J (2018). Ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenolic compounds from *Nephelium lappaceum* L. (Mexican variety) husk. *Asian Pacific journal of tropical medicine,* 11(12): 676-681.

Monrroy M, Araúz O, García JR (2020). Active compound identification in extracts of *N. lappaceum* peel and evaluation of antioxidant capacity. *Journal of Chemistry,* 2020(1): 4301891.

Nguyễn Hải Hà (2006). Nghiên cứu trích ly Polyphenol từ trà *Camellia sinensis (L.). Luận văn tốt nghiệp cao học*. *Trường Đại học Bách khoa Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.*

Nguyễn Thị Tuyết, Trần Thị Duyên (2020). Nghiên cứu quy trình chiết tách chất màu tự nhiên từ hoa đậu biếc (*CLITORIA TERNATEAN*) và ứng dụng trong chế biến một số thực phẩm. *Đề tài nghiên cứu khoa học*. *Trường Đại học Bà Rịa Vũng Tàu*

Palanisamy U, Cheng HM, Masilamani T, Subramaniam T, Ling LT, & Radhakrishnan AK (2008). Rind of the rambutan, *Nephelium lappaceum*, a potential source of natural antioxidants. *Food Chemistry,* 109(1): 54-63.

Perera MPJ, Binuwangi AKDM, Silva AAG, Attanayake RN, Wickramarachchi SR, & Rajapakse CSK (2021). Antioxidant activity and chemical constituents of methanolic extract of *Durio zibethinus* Murr.(durian) peels. *Medicinal plants-international journal of phytomedicines related industries,* 13(2): 275-282.

Phạm Ngọc Khôi Khôi, Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2017). Khảo sát điều kiện tách chiết và hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn của hợp chất poliphenol từ vỏ thân cây quao nước (*Dolichandrone spathacea*). *Tạp chí Khoa học,* 14(12): 181-190.

Phuong NNM, Le TT, Dang MQ, Van Camp J, Raes K (2020). Selection of extraction conditions of phenolic compounds from rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) peel. *Food Bioproducts Processing,* 122 (2): 222-229.

Prakash Maran J, Sivakumar V, Thirugnanasambandham K, Sridhar R (2014). Extraction, multi-response analysis, and optimization of biologically active phenolic compounds from the pulp of Indian jamun fruit. *Food Science Biotechnology,* 23 (2): 9-14.

Rakariyatham K, Zhou D, Rakariyatham N, Shahidi F (2020). Sapindaceae (*Dimocarpus longan* and *Nephelium lappaceum*) seed and peel by-products: Potential sources for phenolic compounds and use as functional ingredients in food and health applications. *Journal of Functional Foods,* 67*(2)*: 103846.

Sun L, Zhang H, Zhuang Y (2012). Preparation of free, soluble conjugate, and insoluble-bound phenolic compounds from peels of rambutan (*Nephelium lappaceum*) and evaluation of antioxidant activities *in vitro*. *Journal of Food Science,* 77(2): C198-C204.

Thitilertdecha N, Teerawutgulrag A, Rakariyatham N (2008). Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. *LWT-Food Science,* 41(10): 2029-2035.

Yunusa AK, Abdullahi N, Rilwan A, Abdulkadir AR, Dandago MA (2018). DPPH radical scavenging activity and total phenolic content of rambutan (*Nephelium lappaceum*) peel and seed. Annals: *Food Science & Technology,* 19(4): 220-228.

INVESTIGATION OF THE EXTRACTION CONDITIONS OF POLYPHENOL FROM RAMBUTAN FRUIT (*Nephelium lappaceum*) AND THE EVALUATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY OF THE EXTRACT

Do Thi Hien[1*]

Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

SUMMARY

Rambutan is one kind of popular fruits, peels and seeds which contains lots of biologically active compounds. Among those, polyphenol is one of typical ingredients of rambutan peels. To effectively use of peel by-products, researchs should be done to extract polyphenols from rambutan peels. This study investigated the peels of Thai rambutan, longan rambutan, and Java rambutan to select the peels containing the highest polyphenols. Next we investigated the types of extraction solvents including pure water, 80% ethanol, 96% ethanol - acetone (4:1), and 70% acetone as well as extraction methods such as conventional extraction, soxhlet, and combination extraction methods with ultrasounds or microwaves assisted. Also, we investigated the ratios of raw materials and solvents, which were 1:5, 1:10, 1:15, and 1:20 (g/mL) respectively. The ultrasound time in 20, 30, 40 and 50 minutes and the ultrasound temperature at 45÷75°C with the frequency at 50/60 Hz were inspected as well. The best results showed that the highest polyphenol content was extracted from the longan rambutan peels under following conditions: the extraction method was the one with ultrasound combined, the concentration of solvent was 80% ethanol, the ratio of solvent and materials was 1:10 (w/v), and the conducted time of ultrasound was 30 minutes and the temperature at 55°C. Under these conditions, the TPC (total polyphenol content) was found to be highest as 61.93 mg/g of raw material. Evaluation of the IC_{50} antioxidant activity of the extract (7,191 µg/mL) was lower than ascorbic acid. The results of FTIR spectroscopy of the extract showed the appearance of specific functional groups of polyphenol. As a result, it could be concluded that polyphenols have been successfully extracted from rambutan peels by conventional extraction method with ultrasonic-assisted combination. In addition, the investigation of antibacterial ability should be done more for further application.

Keywords: DPPH antioxidant activity, extraction solvents, polyphenol, Rambutan, ultrasound-assisted extraction.

[*] Author for correspondence: Tel: 0985958605; Email: hiendt@huit.edu.vn

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ TIỀM NĂNG PROBIOTIC CỦA VI KHUẨN *Bacillus spp.* TỪ TÔM THẺ CHÂN TRẮNG

Trần Văn Bé Năm[1], Huỳnh Đoàn Phượng Nga[1], Nguyễn Chí Nguyện[1], La Hoàng Châu[2], Trần Hữu Hậu[1*]

[1]Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

[2]Công ty TNHH Khoa học Công nghệ ATREM

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn những dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. từ ruột tôm thẻ chân trắng có tiềm năng kiểm soát vi khuẩn gây bệnh đường ruột và đồng thời xử lý môi trường ao nuôi tôm. Các mẫu tôm được thu mua ở chợ An Hòa, chợ Hưng Lợi, chợ Xuân Khánh và chợ Tân An, thuộc quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ. Các dòng vi khuẩn được phân lập bằng phương pháp phân lập bào tử trên môi trường LB agar. Khả năng phân giải protein và tinh bột của chúng được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch. Khả năng ức chế *Vibrio parahaemolyticus* của các chủng vi khuẩn được đánh giá bằng phương pháp vạch thẳng vuông góc. Tiếp đó, khả năng kháng kháng sinh của chúng được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán qua đĩa giấy. Cuối cùng, các dòng vi khuẩn tiềm năng thu được sau các đánh giá trên được định danh bằng kỹ thuật phân tích trình tự gen 16S. Nhóm nghiên cứu đã phân lập được 5 dòng vi khuẩn BAH1, BHL5, BXK2, BXK4 và BTA4. Trong đó, dòng BHL5 có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus* mạnh với đường kính vô khuẩn đạt 5,50 mm. Dòng BTA4 có khả năng phân giải protein và tinh bột mạnh nhất với đường kính phân giải lần lượt là 23,50 mm và 16,50 mm. Hơn thế, dòng BTA4 có thể kháng được 2 loại kháng sinh ampicillin (10 µg/mL) và tetracycline (30 µg/mL). Phân tích trình tự gen 16S đã xác định dòng BHL5 và BTA4 là *Bacillus* sp. và có độ tương đồng cao với các dòng vi khuẩn trong nhóm *Bacillus subtilis*.

Từ khóa: *Bacillus*, chịu mặn, chịu pH, phân giải hữu cơ, probiotic.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ứng dụng vi sinh, nhất là các chế phẩm sinh học probiotic, để xử lý chất thải hữu cơ, kiểm soát vi khuẩn gây bệnh và hỗ trợ tăng trưởng cho động vật thủy sản luôn là ưu tiên hàng đầu. Probiotic làm tăng số lượng vi khuẩn có lợi, sản xuất các hợp chất kháng khuẩn (bacteriocin), cạnh tranh dinh dưỡng và vị trí bám với mầm bệnh. Hơn nữa, probiotic còn tăng cường đáp ứng miễn dịch và tăng hiệu suất tăng trưởng của vật chủ (Natesan *et al.*, 2014). *Bacillus* là một trong những loài vi khuẩn được sử dụng làm probiotic vì chúng có khả năng phân giải chất hữu cơ, ức chế sự phát triển của vi khuẩn… *Bacillus subtilis* có thể giúp tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) và tôm sú (*Penaeus monodon*) chống lại bệnh Vibriosis do có khả năng tiết bacitracin, gramicidin, polymyxin, tyrothricin và có thể giúp kích thích hệ thống miễn dịch (Bestha *et al.*, 2013). Một số thử nghiệm đã được thực hiện về khả năng ứng ức chế vi khuẩn của probiotic. Sự kết hợp giữa *B. subtilis* và *B. licheniformis* có thể ức chế được vi khuẩn *Yersinia ruckeri* gây bệnh trên cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*). *Bacillus* spp. cũng có thể ức chế được vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh ở cá ngựa vằn (*Danio rerio*) với liều sử dụng $1,5x10^9$ CFU/mL trong 28 ngày (Doan *et al.*, 2021). Thêm vào đó, *Bacillus* còn có thể phân hủy các chất thải hữu cơ. *B. subtilis* BTV1 có khả năng tiết enzyme protease và amylase ngoại bào để phân hủy cơ chất là skim milk, tinh bột và thể hiện tiềm năng trong ứng dụng xử lý nước trong ao nuôi tôm (Hau *et al.*, 2024). Bên cạnh đó, việc phân lập probiotic trực tiếp từ môi trường nuôi hoặc từ cơ thể sinh vật thủy sản giúp cho việc ứng dụng chúng sau này trở nên thuận lợi do các chủng vi sinh vật đấy đã thích nghi với môi trường ao nuôi thực tế. Với những ưu điểm của *Bacillus* spp. cùng khả năng thích nghi với môi trường, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn những dòng *Bacillus* spp. từ ruột tôm thẻ chân trắng có tiềm năng probiotic để ứng dụng trong kiểm soát vi khuẩn gây bệnh, phân hủy chất hữu cơ và xử lý môi trường trong ao nuôi tôm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu tôm thẻ chân trắng được thu mua ở chợ An Hòa, chợ Hưng Lợi, chợ Xuân Khánh và chợ Tân An, thuộc quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ.

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* - phân lập từ ao nuôi tôm thẻ chân trắng ở huyện Trần Đề, tỉnh Sóc Trăng - được nhận từ Bộ môn Vi sinh vật, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm.

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập vi khuẩn Bacillus từ ruột tôm thẻ chân trắng

Vi khuẩn *Bacillus* được phân lập bằng phương pháp phân lập bào tử theo mô tả của Hau và đồng tác giả (2024). Cụ thể, tôm sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm được khử trùng bề mặt với cồn 70%, tách lấy phần ruột, đồng nhất với 10 mL môi trường LB lỏng và đun cách thủy ở 80℃ trong 20 phút (để loại bỏ tế bào sinh dưỡng). Sau khi xử lý với nhiệt độ, mẫu được pha loãng, trải trên môi trường LB agar, ủ ở nhiệt độ phòng (27±3℃) trong 24 giờ, quan sát hình thái và tách ròng các dòng vi khuẩn trên môi trường LB agar.

Khả năng phân giải chất hữu cơ

Khả năng phân giải protein và tinh bột được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch theo mô tả của Hau và đồng tác giả (2024). Huyền phù vi khuẩn được ly tâm lạnh (4℃) với tốc độ 12.000 rpm trong 15 phút và thu phần dịch nổi phía trên. Chuyển 10 µL vào các giếng (đường kính 6 mm) trên môi trường protein (skim milk agar) hoặc môi trường tinh bột (starch agar), ủ nhiệt độ phòng và sau 24 giờ tiến hành quan sát khả năng phân giải. Khả năng phân giải chất hữu cơ được tính bằng công thức:

$$\text{Khả năng phân giải } (\Delta D) = D - d$$

Trong đó: D: Đường kính vòng phân giải cơ chất (mm); d: Đường kính lỗ đục (mm).

Khả năng ức chế vi khuẩn Vibrio parahaemolyticus

Khả năng ức chế vi khuẩn được khảo sát bằng phương pháp vạch thẳng vuông góc theo mô tả của Purivirojkul và đồng tác giả (2007). Cấy vi khuẩn *Bacillus* theo một đường thẳng trên môi trường LB agar, ủ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Tiến hành cấy vi khuẩn gây bệnh theo các vạch ngang vuông góc với vạch vi khuẩn *Bacillus*, tiếp tục ủ ở nhiệt độ phòng và sau 24 giờ tiến hành đo chiều rộng vùng kháng khuẩn.

Khả năng chịu kháng sinh

Khả năng chịu kháng sinh của các dòng vi khuẩn *Bacillus* được xác định bằng phương pháp khuếch tán qua đĩa giấy. Trải vi khuẩn trên môi trường LB agar, để khô tự nhiên trong 30 phút, sau đó đặt các đĩa giấy đã được tẩm kháng sinh (ampicillin - 10 µg/mL và tetracycline - 30 µg/mL) lên môi trường agar. Mức độ nhạy cảm với kháng sinh được đánh giá theo mô tả của Nithya và đồng tác giả (2013).

Khả năng chịu pH

Khả năng chịu pH được xác định bằng phương pháp nuôi trong môi trường LB lỏng và đếm khuẩn lạc theo mô tả của Arici và đồng tác giả (2004). Chuyển 1 mL vi khuẩn vào 9 mL môi trường LB lỏng (pH của môi trường ở các mức từ 7, 8 và 9, đây là ngưỡng thích hợp cho tôm thẻ phát triển). Sau đó, mẫu được ủ lắc (120 rpm) ở nhiệt độ phòng và xác định mật độ vi khuẩn sau 24 giờ.

Khả năng chịu mặn

Khả năng chịu mặn được xác định bằng phương pháp nuôi trong môi trường LB lỏng và đếm khuẩn lạc theo mô tả của Hau và đồng tác giả (2022). Chuyển 1mL vi khuẩn vào 9 mL môi trường LB lỏng (độ mặn của môi trường ở các mức từ 1, 2 và 3% NaCl, đây là ngưỡng thích hợp cho tôm thẻ phát triển). Sau đó mẫu được ủ lắc (120 rpm) ở nhiệt độ phòng và xác định mật độ vi khuẩn sau 24 giờ.

Khả năng bám dính

Khả năng tự bám dính được thực hiện theo mô tả của Algburi và đồng tác giả (2016). Sau khi được tăng sinh trong môi trường LB lỏng, vi khuẩn được thu thập bằng phương pháp ly tâm dịch nuôi cấy ở tốc độ 2.000 rpm trong 20 phút và thu tế bào vi khuẩn. Tế bào vi khuẩn được rửa 2 lần với dung dịch đệm PBS (NaCl 8,00 g/L; KCl 0,20 g/L; Na_2HPO_4 1,44 g/L; KH_2PO_4 0,24 g/L; pH = 7,4). Tiến hành đo OD ở bước sóng 600 nm và điều chỉnh mật độ vi khuẩn là 10^8 CFU/mL. Vi khuẩn được nuôi trong ống nghiệm và kiểm tra mật số ở các mốc thời gian 0, 1, 2, 3 và 4 giờ. Khả năng bám dính được xác định bằng công thức:

$$\text{Khả năng tự bám dính } (\%) = (A_0 - A_t)/A_0 \times 100$$

Trong đó: A_0: Giá trị OD_{600} của dung dịch ở 0 giờ; A_t: Giá trị OD_{600} của dung dịch ở các mốc thời gian tương ứng.

Nhận diện vi khuẩn tuyển chọn

Dòng vi khuẩn *Bacillus* đã tuyển chọn được xác định loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Vùng trình tự 16S rDNA được khuếch đại bằng cặp mồi 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') và 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') với thành phần phản ứng và chu kỳ nhiệt được thực hiện theo mô tả của Thi và đồng tác giả (2022). Thành phần phản ứng với thể tích 50 µL gồm 25 µL nước khử ion, 20 µL Mytaq mix (Bioline, Anh), 1 µL mỗi mồi 27F và 1492R (20 µM), 3µL DNA mẫu. Chu kỳ nhiệt gồm các giai đoạn: tiền biến tính 95℃ trong 3 phút; sau đó lặp lại 35 chu kỳ với các bước: biến tính ở 95℃ trong 1 phút, bắt cặp ở 56℃ trong 1 phút, kéo dài ở 72℃ trong 2 phút; giai đoạn ổn định ở 72℃ trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra chất lượng bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2%. Băng DNA sáng, rõ và không có băng phụ được giải trình tự tại công ty Trách nhiệm hữu hạn DNA

Sequencing. Kết quả giải trình tự được kiểm tra bằng phần mềm Bioedit và trình tự DNA được so sánh với cơ sở dữ liệu của Ngân hàng gen thông qua công cụ BLASTN (NCBI) để xác định ở mức độ loài.

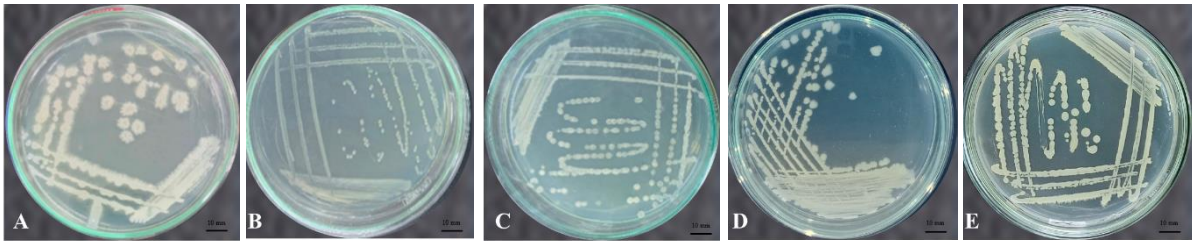
Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Minitab 16.0 để phân tích phương sai ANOVA và so sánh trung bình sự khác biệt bằng kiểm định Tukey. Sử dụng phần mềm Microsoft Office Excel 2016 để vẽ các biểu đồ thể hiện các kết quả.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập vi khuẩn *Bacillus*

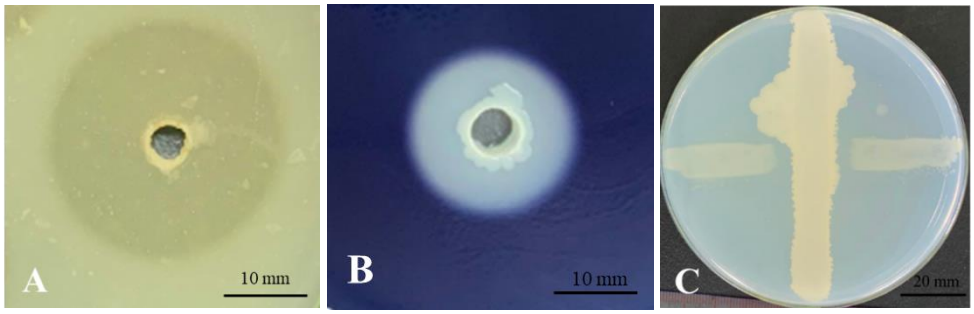
Năm dòng vi khuẩn đã được phân lập từ ruột tôm thẻ chân trắng dựa trên hình thái khuẩn lạc trên môi trường LB agar và hình thái tế bào được ghi nhận dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 100X sau 24 giờ nuôi cấy (Hình 1). Khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn đa số có hình dạng không đều, lài, màu trắng đục, bìa nguyên hoặc chia thùy và kích thước từ 1,5 đến 6,7 mm. Tất cả đều có tế bào hình que, Gram dương và có khả năng chuyển động.



Hình 1. Khuẩn lạc các dòng vi khuẩn
A: BHA1; B: BHL5; C: BXK2; D: BXK4; E: BTA4 trên môi trường LB agar.

Khả năng phân giải chất hữu cơ

Các dòng vi khuẩn đều có khả năng sinh ra enzyme ngoại bào (amylase và protease) nhằm phân giải protein và tinh bột (bảng 1 và hình 2). Trong đó, khả năng phân giải protein và tinh bột của dòng BTA4 mạnh nhất lần lượt là 23,50 mm và 16,50 mm (khác biệt có ý nghĩa thống kê với các dòng còn lại). Dòng BAH1, BXK2, BXK4 và BHL5 cũng có khả năng phân giải mạnh với đường kính vòng phân giải protein từ 19,50 mm và tinh bột từ 15,00 mm. Trong các công trình nghiên cứu trước đây, *Bacillus* có thể phân hủy được protein với đường kính vòng phân giải lớn hơn 20 mm, *Bacillus cereus* có thể phân giải tinh bột rất mạnh với đường kính vòng phân giải đạt 49,55 mm (Yerobessor *et al.*, 2022). Khả năng tiết enzyme của vi khuẩn giúp cho tôm tiêu hóa tốt hơn và dễ dàng hấp thu chất dinh dưỡng. Bên cạnh đó, những dòng vi khuẩn trong nghiên cứu còn có thể ức chế được vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, nổi trội nhất là dòng BHL5 (Bảng 1).



Hình 2. Kết quả thí nghiệm khả năng phân giải
A: Protein; B: Phân giải tinh bột; C: Ức chế V. parahaemolyticus.

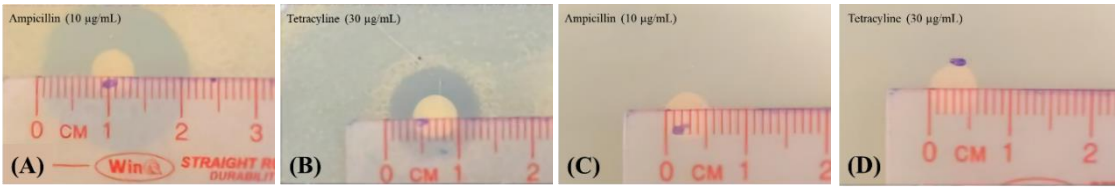
Bảng 1. Khả năng phân giải chất hữu cơ và ức chế *Vibrio parahaemolyticus*

Vi khuẩn	Phân giải protein (mm)	Phân giải tinh bột (mm)	Ức chế *V. parahaemolyticus* (mm)
BAH1	$21,17^{b}$±0,29	$15,33^{b}$±0,29	$4,50^{ab}$±0,20
BHL5	$21,50^{b}$±0,00	$15,00^{b}$±0,00	$5,50^{a}$ ±0,17
BXK2	$21,00^{b}$±0,00	$15,33^{b}$±0,29	$4,00^{b}$ ±0,26
BXK4	$19,50^{c}$±0,50	$15,17^{b}$±0,50	$3,80^{b}$ ±0,82
BTA4	$23,50^{a}$±0,50	$16,50^{a}$±0,50	$3,90^{b}$ ±0,36

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột đi kèm theo các ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

Khả năng chịu kháng sinh và khả năng bám dính

Các dòng vi khuẩn phân lập đều có thể chịu được điều kiện bất lợi như môi trường có chứa kháng sinh, môi trường có pH cao và môi trường có độ mặn cao. Dòng BTA4 có khả năng kháng lại ampicillin (10 µg/mL) và tetracycline (30 µg/mL). Dòng BHA1, BHL5, BXH2 và BHX4 đều nhạy cảm với 2 lại kháng sinh ở nồng độ như trên (Bảng 2 và Hình 3). Trong nghiên của Melody và đồng tác giả (2021) đã phân lập và khảo sát khả năng kháng kháng sinh của 44 dòng vi khuẩn *Bacillus* và kết quả có 47,70% kháng lại với ampicillin (10 µg) và 4,50% dòng vi khuẩn kháng lại tetracyline (30 µg). Khả năng bám dính giúp vi khuẩn có thể sống bên trong hệ tiêu hóa của vật chủ tốt hơn. Sau 180 phút khảo sát, có hơn 60% lượng vi khuẩn BTA4, BHL5 bám vào bề mặt giá thể. BXK2, BXK4, BAH1 khả năng bám dính thấp hơn chỉ từ 46% (Bảng 2).



Hình 3. Kết quả kiểm tra khả năng kháng kháng sinh bằng đĩa giấy
A: Vi khuẩn BHA1 với ampicillin; B: Tetracyline; C: Vi khuẩn BTA4 với ampicillin; D: Tetracyline.

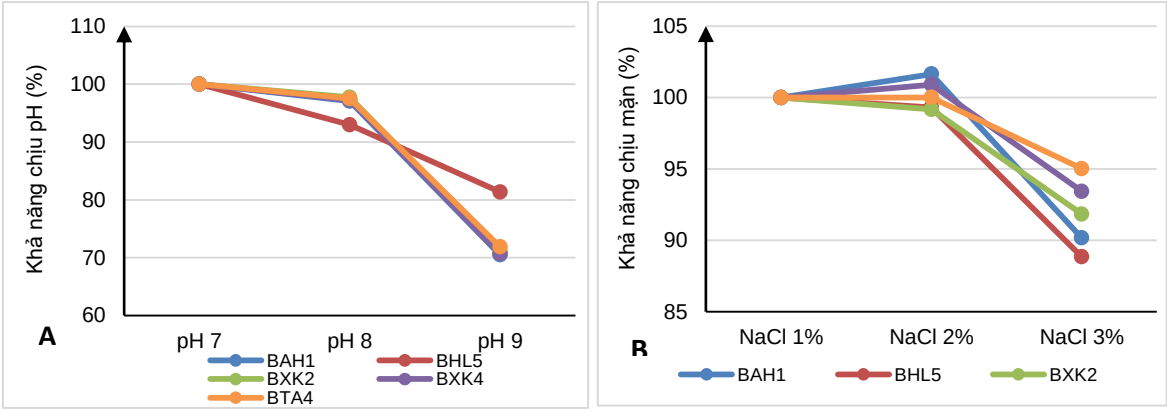
Bảng 2. Khả năng chịu kháng sinh và bám dính trên bề mặt giá thể

Vi khuẩn	Ampicillin (10 µg/mL)		Tetracycline (30 µg/mL)		Khả năng bám dính (%)		
	Đường kính (mm)	Tính nhạy cảm	Đường kính (mm)	Tính nhạy cảm	60 phút	120 phút	180 phút
BAH1	11,50	S^{+}	10,67	S^{+}	$15,31^{d} \pm 0,83$	$39,04^{c} \pm 1,50$	$46,29^{c} \pm 1,22$
BHL5	11,33	S^{+}	9,83	S^{+}	$22,99^{bc} + 1,21$	$47,22^{b} \pm 0,88$	$61,24^{a} \pm 0,76$
BXH2	19,67	S^{++}	12,83	S^{+}	$19,02^{a} + 1,61$	$35,38^{a} \pm 2,33$	$49,96^{a} \pm 1,47$
BXH4	21,17	S^{++}	13,17	S^{+}	$25,30^{ab} + 3,26$	$38,23^{c} \pm 1,69$	$51,01^{bc} \pm 2,60$
BTA4	6,00	R	6,00	R	$28,77^{b} + 0,89$	$56,14^{c} \pm 0,55$	$62,40^{b} \pm 0,89$

Ghi chú: R: Kháng (≤ 6 mm); S^{+}: Nhạy cảm yếu ($6 < S^{+} \leq 15$ mm); S^{++}: Nhạy cảm vừa ($15 < S^{++} \leq 26$ mm); S^{+++}: Nhạy cảm mạnh ($26 < S^{+++} \leq 35$ mm) (Nithya et al., 2013).

Khả năng chịu pH cao, độ mặn cao

Môi trường trung tính với pH 7 và mật số các dòng vi khuẩn khảo sát là 100%, khi pH môi trường tăng lên, mật số vi khuẩn có biểu hiện giảm xuống. Khi tăng pH đến 9, tỉ lệ sống sót của BHL5 là 81% và các dòng vi khuẩn còn lại đạt 71% (Hình 4A). Độ mặn phù hợp cho các dòng vi khuẩn phát triển từ 1 đến 2% (NaCl) và mật số giảm xuống khi độ mặn đạt 3% (hình 4B). Độ mặn từ 1,5 đến 2% và pH 7,5 đến 8,5 là phù hợp cho tôm thẻ chân trắng phát triển, nên dòng BTA4 rất có tiềm năng trong việc nghiên cứu chế phẩm sinh học trong xử lý môi trường nước trong ao nuôi tôm.



Hình 4. Kết quả khả năng chống chịu
A: Môi trường pH cao; B: Môi trường độ mặn cao.

Định danh vi khuẩn được tuyển chọn bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Nhìn chung, dòng BHL5 có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* mạnh, bám dính tốt, chịu pH cao. Dòng BTA4 có khả năng phân giải mạnh, chịu được độ mặn cao. Nên cả 2 dòng BHL5 và BTA4 được lựa chọn để định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Qua phân tích và so sánh trình tự vùng gen 16S rRNA với dữ liệu trên cơ sở dữ liệu về gen (NCBI) bằng công cụ BLASTN đã xác định BHL5 và BTA4 thuộc chi *Bacillus* (Bảng 3).

Bảng 3. Độ tương đồng trình tự vùng gen của khuẩn BHL5 và BTA4 với cơ sở dữ liệu NCBI

Vi khuẩn	Độ dài (nt)	Độ phủ (%)	Độ tương đồng (%)	Loài
BHL5	969	100	99,69	*Bacillus subtilis* (AY971362.1)
			99,59	*Bacillus velezensis* (PP930596.1)
			99,59	*Bacillus inaquosorum* (PP917517.1)
			99,59	*Bacillus tequilensis* (PP813694.1)
			99,59	*Bacillus stercoris* (PP794961.1)
BTA4	988	100	99,60	*Bacillus velezensis* (CP014990.2)
			99,60	*Bacillus siamensis* (OP317184.1)
			99,60	*Bacillus amyloliquefaciens* (CP082283.1)
			99,50	*Bacillus subtilis* (PP930724.1)

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá và tuyển chọn được 2 dòng vi khuẩn có tiềm năng probiotic sử dụng cho nuôi trồng tôm thẻ chân trắng. *Bacillus* sp. BHL5 và *Bacillus* sp. BTA4 có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus*, phân hủy chất hữu cơ, chống chịu lại điều kiện môi trường có kháng sinh, chịu được pH cao và độ mặn cao. Nghiên cứu cần tiếp tục đánh giá khả năng ức chế các chủng vi khuẩn gây bệnh cho tôm thẻ chân trắng và khả năng xử lý chất hữu cơ ở quy mô bể nuôi tôm 1 m^3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Algburi A, Volski A, Cugini C, Walsh EM, Chistyakov VA, Mazanko MS, Bren AB, Dicks LM, Chikindas ML (2016). Safety properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *J Adv Microbiol*, 6 (6): 432.

Arici M, Bilgin B, Sagdic O, Ozdemir C (2004). Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. *Food Microbiol*, 21(1): 19-24.

Bestha L, Buddolla V, Gopal DVRS (2013). Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. *J Pathog,* 2013: 1-13.

Doan HV, Soltani M, Ring E (2021). In vitro antagonistic effect and in vivo protective efficacy of Gram-positive probiotics versus Gram-negative bacterial pathogens in finfish and shellfish. *Aquaculture*, 540.

Hau TH, Van TTB, Quynh CNT, Oanh TTH, Huy LAG, Luu NH, Thi NPA (2024). Inhibition of biofilm-forming bacteria and probiotic potential of *Bacillus* spp, isolated from aquaculture ponds. *Malays J Microbiol*, 20(4): 1-8.

Hau TH, Viet NA, Khang HN, Van TTB, Thi NPA (2022). Seclection of bacteria capable of proteolytic and inhibitory *Vibrio* spp. from traditional fish sauce. *Can Tho University Journal of Science*, 58(2): 192-199.

Melody AA, Kwaku A, Yuan L, Yishan L, Felix K AK, Berchie A, Iddrisu S (2021). Prevalence of virulence genes and antibiotic susceptibility of *Bacillus* used in commercial aquaculture probiotics in China. *Aquac Rep*, 21: 1-14.

Natesan S, Gopal S, Perumal V, Balasubramaniem A (2014). *Lactobacillus* sp. a potent probiotic for disease free shrimp aquaculture. *Int J Recent Sci Res*, 5(6): 1031-1045.

Nithya V, Halami PM (2013). Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. *Ann Microbiol*, 63 (1): 129-137.

Purivirojkul W, Areechon N (2007). Application of *Bacillus* spp. isolated from the intestine of blacktiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) from natural habitat for control pathogenic bacteria in aquaculture. *Kasetsart J (Nat Sci)*, 41: 125-132.

Thi NPA, Hau TH, Huynh NTN, Liem HV, Thi TKD, Hoa DH, Van TTB, Khang DT (2022). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Vietnamese sour-fermented fish product. *Malays J Microbiol*, 18(2): 222-226.

Yerobessor D, Namwin SS, Marius KS, Clarisse BC, Iliassou M, Lewis IE, Alfred ST, Jerry OU, Mamoudou HD (2022). Assessment of probiotic and technological properties of *Bacillus* spp. isolated from Burkinabe Soumbala. *BMC Microbiol*, 22: 228.

ISOLATION AND EVALUATION OF PROBIOTIC POTENTIAL OF BACTERIA *Bacillus* spp. FROM WHITE LEG SHRIMP

Tran Van Be Nam[1], Huynh Doan Phuong Nga[1], Nguyen Chi Nguyen[1], La Hoang Chau[2], Tran Huu Hau[1*]

[1]*Institue of Food and Biotechnology, Can Tho university*

[2]*Scientific and Technological ATREM Co. Ltd.*

SUMMARY

This study aimed to isolate *Bacillus* spp. from the gut of white-leg shrimp with potential for controlling gut-associated pathogens and treating aquaculture environments. Shrimp samples were collected from An Hoa, Hung Loi, Xuan Khanh, and Tan An markets in Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam. Bacterial strains were isolated using the spore isolation method on LB agar medium. Their protein and starch degradation abilities were assessed using the well diffusion method. The ability of the isolated strains to inhibit *Vibrio parahaemolyticus* was evaluated using the perpendicular streak method. Subsequently, their antibiotic resistance was assessed using the paper disc diffusion method. Finally, the potential bacterial strains obtained after these evaluations were identified using 16S rRNA gene sequence analysis. Among five isolated bacterial strains (BHA1, BHL5, BXK2, BXK4, and BTA4), the strain BHL5 exhibited strong inhibition of *V. parahaemolyticus* with a diameter of inhibition of 5.50 mm. Strain BTA4 showed the strongest protein and starch degradation abilities with degradation diameter of 23.50 mm and 16.50 mm, respectively. Moreover, strain BTA4 was resistant to two antibiotics, ampicillin (10 µg/mL) and tetracycline (30 µg/mL). 16S rRNA gene sequence analysis identified strains BHL5 and BTA4 as *Bacillus* sp. and showed high similarity to strains in the *Bacillus subtilis* group.

Keywords: Bacillus, salt tolerance, pH tolerance, organic decomposition, probiotic.

* Author for correspondence: Tel: 903836469; Email: thhau@ctu.edu.vn

ĐẶC TÍNH LÝ HÓA VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN *Streptococcus agalactiae* CỦA HẠT NANOCHITOSAN TỪ CHITOSAN RUỒI LÍNH ĐEN

Nguyễn Ngọc Hà[1,2], Vũ Thị Huyền Trang[2], Thái Thị Thanh Thủy[1], Nguyễn Thị Thùy Dung[1], Nguyễn Phúc Cẩm Tú[3*]

[1]*Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*

[2]*Khoa Khoa học sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*

[3]*Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành để tối ưu các điều kiện ảnh hưởng đến quy trình tạo hạt nano chitosan (nanoCS) từ chitosan của nhộng ruồi lính đen bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Đồng thời, đánh giá các đặc tính lý hóa và kháng khuẩn của hạt nanoCS đối với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi. Kết quả của nghiên cứu đã đưa ra được các điều kiện tối ưu tạo hạt nanoCS theo phương pháp tạo gel ion giữa CS và TPP bao gồm nồng độ CS 0,625 mg/mL; nồng độ TPP là 0,3 mg/mL; pH 4 và tốc độ khuấy 500 rpm. Các hạt nanoCS có kích thước trung bình là 179,11 nm. Hình dáng hạt nanoCS có dạng hình cầu, kích thước tương đối đồng đều. Hạt nanoCS không thể hiện tính kháng đối với vi khuẩn *S. agalactiae*, điều này có lẽ liên quan đến tính ổn định của hạt trong dung dịch.

Từ khóa: Chitosan, hạt nano chitosan, phương pháp bề mặt đáp ứng, phương pháp tạo gel, ruồi lính đen.

MỞ ĐẦU

Hiện nay, các nhà khoa học trên thế giới đang có xu hướng nghiên cứu các chất có hoạt tính sinh học có nguồn gốc tự nhiên và từ đó cải biến để tạo ra các chất mới có hoạt tính được nâng cao, trong đó có chitosan (CS). CS là một hợp chất deacetyl hóa từ chitin, một polymer tự nhiên được tạo thành từ các đơn phân N-acetyl glucosamine, hiện diện trong vỏ của các loài giáp xác, côn trùng và trong vách của tế bào nấm. CS có nhiều ứng dụng do đặc tính kháng khuẩn, kháng viêm, kháng oxi hóa, giảm cholesterol, giảm huyết áp. CS có nguồn gốc tự nhiên và không gây độc hại, ngày càng được ưa chuộng và ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực như công nghệ thực phẩm, công nghiệp giấy, mỹ phẩm, lĩnh vực nông nghiệp, lĩnh vực xử lý nước thải,…(Triunfo *et al*., 2022). Ấu trùng ruồi lính đen (RLĐ), *Hermetia illucens*, được ứng dụng trong việc xử lý chất thải hữu cơ, sản xuất các sản phẩm có giá trị cao như protein, dầu, phân bón hữu cơ. Trong những năm gần việc nuôi ruồi lính đen nhận được sự quan tâm và mở rộng của các doanh nghiệp và hộ gia đình. Vỏ là vật liệu được thải ra trong quá trình sản xuất ấu trùng RLĐ và được xem là nguồn vật liệu rất phù hợp để sản xuất ra CS.

Để tăng cường và mở rộng hơn nữa tiềm năng ứng dụng của CS trong công nghệ sinh học và hóa học, công nghệ chế tạo hạt nanochitosan (nanoCS) đang là hướng nghiên cứu được nhiều nhóm nghiên cứu quan tâm. Do có kích thước siêu nhỏ nên hạt nanochitosan dễ dàng đi qua màng tế bào, ảnh hưởng đến các quá trình sinh hóa của vi sinh vật và ức chế khả năng phát triển của vi sinh vật. Trong những năm gần đây, nhiều công trình nghiên cứu đã cho thấy vai trò đặc biệt quan trọng của vật liệu hạt nanoCS trong lĩnh vực y dược và nông nghiệp như sử dụng làm chất mang, giải phóng thuốc có kiểm soát và nâng cao tính ổn định của thuốc (Chauhan *et al*., 2017), (González-Reza *et al*., 2021). Ngoài ra, các hạt nanoCS có kích thước nano còn được ứng dụng trong liệu pháp gen (Gaspar *et al*., 2011). Trong lĩnh vực nông nghiệp, nanoCS đã được sử dụng làm chất bao gói cho các hợp chất thực vật có hoạt tính sinh học và hóa chất nông nghiệp bằng các công nghệ khác nhau, chẳng hạn như sấy phun và nhũ tương nano, để tăng cường hoạt độ kháng khuẩn (Mujtaba *et al*., 2020). Hạt nanoCS trên vật liệu cơ bản là CS có thể chế tạo bằng phương pháp tạo gel ion với tác nhân tạo liên kết ngang là sodium tripolyphosphate (TPP). So với những chất tạo liên kết ngang hóa học khác như glutaraldehyde, glyoxal, 2,2-dimethoxy phenylacetophenone,… TPP là chất không có độc tính; ngoài ra nó còn là một muối dễ tan, kích thước nhỏ.

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định các điều kiện tối ưu để chế tạo hạt nanoCS từ CS của vỏ nhộng RLĐ và đánh giá các tính chất lý hóa và hoạt tính kháng khuẩn của hạt nanoCS.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 3 đến tháng 11 năm 2023 tại Viện Nghiên cứu Công Nghệ Sinh học và Môi trường (RIBE), Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh (NLU). Vỏ nhộng RLĐ được thu nhận từ khu

thực nghiệm Black Soldier Fly Project RIBE - CJ KOREA, RIBE. CS được tổng hợp theo phương pháp hóa học theo quy trình của RIBE. Vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Bệnh học Thủy Sản, Khoa Thủy Sản, NLU.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát các điều kiện tối ưu tạo hạt kích thước nano

Phương pháp phối hợp có tâm (*central composite design* - CCD) được lựa chọn để ước tính tác động của các yếu tố đầu vào đối với hàm mục tiêu và đánh giá kết quả thực nghiệm. Bốn yếu tố được lựa chọn là nồng độ CS (X_1, 0,35–0,9 mg/mL), nồng độ TPP (X_2, 0,3–0,8 mg/mL), pH (X_3, 4–6) và tốc độ khuấy (X_4, 500–1500 rpm) với hàm mục tiêu là kích thước hạt nanoCS (nm) nhỏ nhất bằng cách sử dụng quy hoạch trực giao đối xứng, mỗi yếu tố tiến hành tại 3 mức (-1, 0, +1). Số thí nghiệm được thực hiện là $N = 2k(k - 1) + Co$ ($N = 29$, $k = 4$) gồm 24 thí nghiệm thừa số và 5 thí nghiệm ở tâm được trình bày cụ thể tại Bảng 1. Hàm mục tiêu là kích thước hạt nanoCS (nm), kích thước càng nhỏ càng tốt.

Tổng hợp hạt nano chitosan bằng phương pháp tạo gel ion

Các hạt nanoCS được điều chế theo phương pháp tạo gel ion (Tang *et al*., 2006). CS được hòa hòa tan trong dung dịch acid acetic 2,0% (v/v). Sau đó, 20 mL dung dịch TPP được nhỏ giọt từ từ vào 40 mL dung dịch CS đã điều chỉnh pH trong khoảng thực nghiệm và tiến hành khuấy theo các tốc độ trong Bảng 1. Dung dịch xuất hiện huyền phù màu trắng đục.

Bảng 1. Bảng ma trận thực nghiệm và kết quả kích thước hạt nanoCS

Nghiệm thức	**Nồng độ CS** (X_1, mg/mL)	**Nồng độ TPP** (X_2, mg/mL)	**pH** (X_3)	**Tốc độ khuấy** (X_4, rpm)	**Kích thước hạt** (nm)
1	0,625	0,55	6	1500	354,8
2	0,900	0,55	4	1000	190,6
3	0,625	0,55	6	500	556,6
4	0,900	0,30	5	1000	243,9
5	0,900	0,55	6	1000	472,2
6	0,625	0,55	5	1000	448
7	0,625	0,80	5	500	-
8	0,625	0,30	5	500	242,3
9	0,625	0,80	6	1000	-
10	0,900	0,55	5	500	207,6
11	0,625	0,30	5	1500	174,7
12	0,350	0,55	5	500	-
13	0,350	0,55	4	1000	-
14	0,350	0,55	6	1000	-
15	0,625	0,55	5	1000	343,7
16	0,350	0,55	5	1500	-
17	0,625	0,55	4	500	172,8
18	0,625	0,55	5	1000	413,7
19	0,625	0,80	4	1000	-
20	0,625	0,80	5	1500	-
21	0,350	0,30	5	1000	208
22	0,900	0,80	5	1000	1013,7
23	0,625	0,30	4	1000	-
24	0,625	0,55	4	1500	702,5

25	0,625	0,55	5	1000	325,9
26	0,350	0,80	5	1000	-
27	0,900	0,55	5	1500	229,3
28	0,625	0,55	5	1000	474,3
29	0,625	0,30	6	1000	483,4

- kích thước vượt quá dải đo kích cỡ hạt của máy (> 10 µm).

Đặc tính lý hóa của hạt nano chitosan

Xác định hình dáng hạt nanoCS bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử quét FESEM Hitachi SU – 8010 tại Viện Công nghệ Nano, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh. Đường kính hạt và độ phân tán của hạt được đo bằng máy phân tích kích thước hạt DLS Horiba SZ – 100V2 tại Trung tâm Phân tích Quốc tế, Trường Đại học Công Thương TP. Hồ Chí Minh.

Hoạt tính kháng khuẩn của hạt nano chitosan

Hoạt tính kháng khuẩn của hạt nanoCS được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trong môi trường thạch. Cấy trang vi khuẩn *S. agalactiae* trên bề mặt môi trường thạch TSA (350 µL dịch vi khuẩn ở nồng độ 10^5 (gần bằng 5 x 10^6 CFU/mL), sau đó đĩa thạch được để khô 15 phút. Tiến hành đục các lỗ đường kính 6 mm, sử dụng 40 µL dịch thử cho mỗi lỗ. Đối chứng dương được sử dụng là Penicillin, đối chứng âm là acid acetic 2%. Ủ đĩa thạch trong tủ ấm ở 35 - 37°C. Đọc kết quả sau 24 giờ. Mẫu thử có tác động kháng khuẩn cho vòng ức chế xung quanh giếng chứa mẫu thử. Kích thước vòng kháng khuẩn = D – 6 (D là đường kính vòng kháng khuẩn, đơn vị mm). Dựa vào đường kính vòng vô khuẩn để xác định khả năng kháng khuẩn của các dung dịch (Faikoh *et al*., 2014).

Xử lý số liệu

Phần mềm Design Expert (Version 11.0.4.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) được dùng để xử lý các số liệu thực nghiệm và phân tích các hệ số hồi quy, bề mặt đáp ứng và tối ưu hóa với thuật toán hàm mong đợi. Phân tích phương sai ANOVA một yếu tố được sử dụng để so sánh sự khác nhau về đường kính vòng kháng khuẩn với phép thử LSD là kiểm định so sánh đối chiếu. Mức ý nghĩa $\alpha \leq 0,05$. Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tối ưu hóa các điều kiện chế tạo nano chitosan

Sau khi tiến hành các thí nghiệm, kích thước hạt của hạt nanoCS được thể hiện trong Bảng 1. Kết quả cho thấy kích thước hạt dao động trong khoảng 172,8 nm đến 1013,7 nm.

Ảnh hưởng của bốn yếu tố là nồng độ CS (X_1), nồng độ TPP (X_2), pH (X_3) và tốc độ khuấy (X_4) cũng như sự tương tác giữa các yếu tố đến hàm mục tiêu (kích thước hạt nanoCS) được tiến hành xây dựng bởi hàm hồi qui bậc 2 cho hàm mục tiêu (Y) như sau:

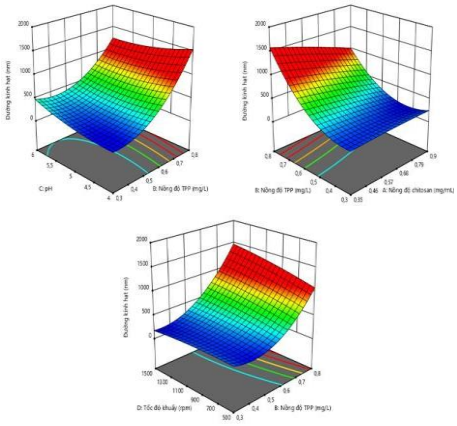
$$Y = 401,12 - 132,73X_1 + 535,58X_2 + 9,03X_3 + 81,98X_4 - 150,67X_1X_2 + 131,78X_1X_3 - 71,13X_1X_4 - 152,92X_2X_3 + 115,78X_2X_4 - 182,88X_3X_4 - 16,25X_1^2 + 376,65X_2^2 + 79,25X_3^2 - 33,70X_4^2$$

Bảng 2. Kết quả phân tích ANOVA ảnh hưởng của các yếu tố đến kích thước hạt

Yếu tố	Tổng bình phương	Độ tự do	Trung bình bình phương	F-value	p-value	Ghi chú
Mô hình	7.99E+08	14	57086,02	13,70	0,0108	Có ý nghĩa
X_1-Nồng độ CS	10066,24	1	10066,24	2,42	0,1951	
X_2-Nồng độ TPP	1.64E+08	1	1.64E+08	39,34	0,0033	
X_3-pH	325,80	1	325,80	0,0782	0,7936	
X_4-Tốc độ khuấy	26879,60	1	26879,60	6,45	0,0640	
X_1X_2	10090,20	1	10090,20	2,42	0,1947	
X_1X_3	23152,87	1	23152,87	5,56	0,0779	
X_1X_4	6745,02	1	6745,02	1,62	0,2722	
X_2X_3	8504,02	1	8504,02	2,04	0,2263	
X_2X_4	17871,80	1	17871,80	4,29	0,1071	

X_3X_4	1.34E+08	1	1.34E+08	32,11	0,0048
X_1^2	193,75	1	193,75	0,0465	0,8398
X_2^2	1.65E+08	1	1.65E+08	39,48	0,0033
X_3^2	17326,78	1	17326,78	4,16	0,1110
X_4^2	3132,47	1	3132,47	0,7518	0,4348
Sai số thuần	16666,41	4	4166,60		
Tổng tương quan	8.16E+08	18			
R^2				0,9796	
R^2 hiệu chỉnh				0,9081	
Độ chính xác phù hợp (Adeq Precision)				14,6617	

Giá trị F của mô hình là 13,7 với p = 0,0108 (p < 0,05) (Bảng 2) cho thấy các hệ số hồi quy có nghĩa. Mô hình có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy là 95% và Adeq Precision là 14,662 lớn hơn so với 4, cho thấy mô hình đủ độ chính xác. Các giá trị p < 0,05 cho thấy các biến riêng lẻ hoặc tương tác của mô hình có ý nghĩa. Do đó, X_2, X_3X_4 và X_2^2 là các biến có ý nghĩa và có ảnh hưởng nhiều hơn những biến còn lại.



Hình 1. Đồ thị 3D biểu diễn sự ảnh hưởng của bốn yếu tố nồng độ chitosan (X_1), nồng độ TPP (X_2), pH (X_3) và tốc độ khuấy (X_4) đến kích thước hạt nano chitosan

Hệ số của X_1, X_1X_2, X_1X_4, X_2X_3 và X_3X_4 của phương trình hồi quy mang dấu (-) nói lên mối quan hệ nghịch biến giữa các biến và hàm mục tiêu Y. Đồng thời các hệ số của X_2, X_3 và X_4 mang dấu (+) cho thấy trong vùng quy hoạch, hàm mục tiêu Y tỷ lệ thuận với các yếu tố nồng độ TPP, pH dung dịch và tốc độ khuấy. Một số nghiên cứu cũng ghi nhận kết quả kích thước hạt nanoCS nhỏ hơn ở pH thấp (Mattu *et al*., 2013; Gokce *et al*., 2014) vì chuỗi chitosan được kéo dài hơn ở độ pH thấp hơn do sự proton hóa của các nhóm amino. Nếu giữ cố định tỷ lệ khối lượng CS/TPP = 4:1, Liu và Gao (2009) nhận thấy khi tăng nồng độ CS thì kích thước hạt tăng; trái lại tăng nồng độ TPP thì kích thước hạt lại giảm. Tương tự, theo Gokce và đồng tác giả (2014) tỷ lệ khối lượng CS/TPP có ảnh hưởng quan trọng lên kích thước hạt nanoCS. Hạt nanoCS có thể thu nhận được ở tất cả tỷ lệ CS/TPP từ 3:1 đến 7:1, nhưng các hạt mịn nhất là ở tỷ lệ 5:1. Điều này là hợp lí vì trong phản ứng tạo gel ion TPP là thành phần chính tạo liên kết ngang. Ở nồng độ TPP cao hơn thì mức độ liên kết ngang của các hạt nanoCS cũng cao hơn.

Kiểm định giá trị tối ưu và thực nghiệm

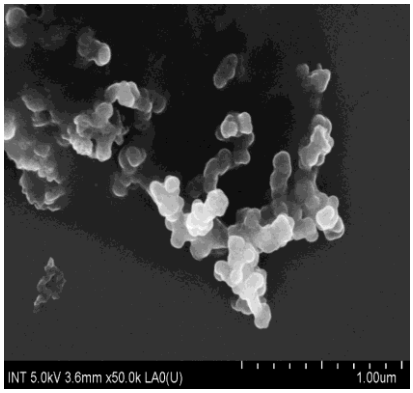
Dựa vào kết quả phân tích thống kê, mô hình đã đưa ra được điều kiện tối ưu để tạo ra kích thước hạt nanoCS nhỏ nhất (196,32 – 188,90 nm) là ở nồng độ CS = 0,625 mg/mL, nồng độ TPP = 0,55 mg/mL, pH = 4 và ở tốc độ khuấy 500 rpm. Để kiểm chứng lại tính đúng đắn của mô hình, tiến hành thí nghiệm thực nghiệm với 10 lần lặp lại. Kích thước hạt nanoCS trung bình thu được là 180,17 ± 5,52 nm, dao động trong khoảng 173,08 – 188,18 nm (Bảng 3). Kiểm định bằng t hai mẫu độc lập cho thấy không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa các giá trị tối ưu từ mô hình và thực nghiệm (p > 0,05). Do đó điều kiện tối ưu cho quá trình tạo hạt nanoCS là ở nồng độ CS = 0,625 mg/mL, nồng độ TPP = 0,55 mg/mL, pH = 4 và tốc độ khuấy 500 rpm cho ra hạt có kích thước trung bình đạt 180,17 ± 5,52 nm.

Bảng 3. Bảng đánh giá khác biệt ý nghĩa của thực nghiệm

Điều kiện	Nồng độ CS (mg/ml)	Nồng độ TPP (mg/ml)	pH	Tốc độ khuấy (rpm)	Kích thước hạt (nm)
Mô hình	0,625	0,55	4	500	196,32 - 188,90
Thực nghiệm	0,625	0,55	4	500	173,08 – 188,18

Đặc điểm lý hóa của hạt nano chitosan

Hình thái của hạt nanoCS được kiểm tra bằng FE-SEM. Các hạt nanoCS có dạng hình cầu, kích thước tương đối đồng đều (Hình 2). Các hạt tròn kích thước nhỏ tập hợp lại thành các khối kích thước lớn hơn phù hợp với các nghiên cứu trước đây (Calvo *et al*., 1997; Liu, Gao, 2009). Hình dạng hình cầu là mong muốn của thí nghiệm vì hình cầu giúp đảm bảo sự đóng gói kín của hạt nanoCS.



Hình 2. Hình chụp FESEM của hạt nano chitosan ở độ phóng đại 50.0k

Bảng 4. Kết quả kích thước và phân bố hạt

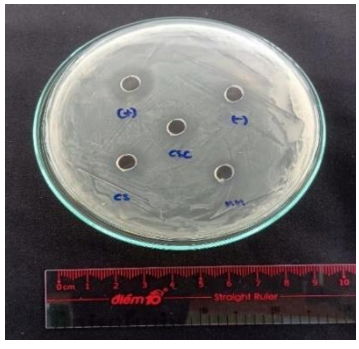
Kích thước hạt (nm)	**Phân bố (%)**
93,02	0,51
105,1	3,35
118,74	9,70
134,16	15,58
151,57	18,74
171,25	18,72
193,48	15,90
218,6	11,10
246,98	5,56

Bảng 4 cho thấy kích thước hạt nanoCS trung bình là 171,8 nm và hạt chủ yếu phân bố ở hai kích thước là 151,57 và 171,25 nm. Giá trị PI (Polydispersity Index) là 0,388 cho thấy mẫu có sự đồng nhất cao với kích thước hạt gần nhau.

Hoạt tính kháng khuẩn của hạt nano chitosan

Bảng 5. Kết quả thí nghiệm đo vòng kháng khuẩn

Tác nhân	**Đường kính vòng kháng khuẩn** (mm)	**Mức độ kháng**
Đối chứng dương (+)	$16,67^{a}$ ± 1,53	Kháng mạnh
Đối chứng âm (-)	$7,33^{c}$ ± 1,53	Không kháng
Chitosan từ RLĐ	$11,00^{b}$ ± 1,00	Kháng vừa
Chitosan của Sigma	$11,00^{b}$ ± 1,00	Kháng vừa
Hạt nanoCS	$7,00^{c}$ ± 1,73	Không kháng



Hình 3. Khả năng kháng khuẩn của hạt nano chitosan

Đối chứng dương (+), đối chứng âm (-), Chitosan từ RLĐ (CS), Chitosan của Sigma (CSC), hạt nanoCS (NN).

Vòng kháng khuẩn của hạt nanoCS có kích thước 7 mm cho thấy hạt nanoCS không có khả năng kháng khuẩn đối với vi khuẩn *S. agalactiae* (Bảng 5, Hình 3). Đối chứng dương cho vòng kháng khuẩn kích thước 16,7 mm thể hiện khả năng kháng khuẩn mạnh. CS từ RLĐ và CS của Sigma đều cho ra vòng kháng khuẩn kích thước 11 mm cho thấy CS có khả năng kháng khuẩn khá tốt (Bảng 5, Hình 3). Kết quả cho thấy hạt nanoCS không thể hiện tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn *S. agalactiae*.

Hoạt tính kháng khuẩn của nanoCS phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố, bao gồm loại vi khuẩn, giai đoạn tăng trưởng, thế zeta (ảnh hưởng độ bền của hạt nanoCS trong dung dịch), nồng độ, pH, trọng lượng phân tử (MW) và độ khử nhóm acetyl (DA)(Chandrasekaran *et al*., 2020). Hạt nanoCS có phổ kháng khuẩn rộng, nhưng chúng biểu hiện hiệu quả ức chế khác nhau đối với các loài vi khuẩn gram âm và gram dương và hiệu quả diệt khuẩn đối với hai loại vi khuẩn này còn gây tranh cãi. Lê Hồ Khánh Hỷ và đồng tác giả (2015) ghi nhận nanoCS ở các nồng độ từ 0,125 - 0,5 mg/mL đều không thể hiện tính kháng khuẩn đối với vi khuẩn *Salmonella typhi*. Các tác giả này cho rằng kích thước hạt nanoCS nhỏ có thể ảnh hưởng đến độ bền dung dịch nanoCS do bị biến tính. Chattopadhyay và Inamdar, 2012 báo cáo nanoCS mất hoạt tính kháng khuẩn có thể liên quan đến tính ổn định của hạt nanoCS trong dung dịch. Ngoài ra, Sarwar và đồng tác giả(2014) báo cáo các hạt nanoCS tạo từ CS có MW thấp thể hiện tính kháng khuẩn tốt hơn từ CS có MW cao. Bên cạnh đó, cấu trúc và thành phần hóa học của màng tế bào cũng có ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn của hạt nanoCS (Sarwar *et al*., 2014).

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đưa ra quy trình tạo hạt nanoCS từ CS ruồi lính đen theo phương pháp tạo gel ion giữa CS và TPP với các điều kiện tối ưu là nồng độ CS = 0,625 mg/mL; nồng độ TPP = 0,3 mg/mL; pH = 4; tốc độ khuấy 500 rpm. Các hạt nanoCS có kích thước trung bình là 179,11 nm. Hình dáng hạt viên bao được xác định bằng phương pháp chụp FESEM cho thấy hạt có dạng hình cầu, kích thước tương đối đồng đều. Hạt nanoCS không thể hiện khả năng kháng khuẩn đối với vi khuẩn *S. agalactiae.* Cần có các nghiên cứu tiếp theo để đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố như thế zeta, nồng độ nanoCS, pH, MW và DA lên hoạt tính kháng với các nhóm vi khuẩn khác nhau.

Lời cảm ơn: *Tập thể tác giả xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh đã tài trợ kinh phí thực hiện (Mã số đề tài: CS-CB22-VienCNSH-02).*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci*, 63: 125-132.

Chattopadhyay DP, Inamdar MS (2012). Studies on synthesis, characterization and viscosity behaviour of nano chitosan. *Res J Eng Sci*, 1: 9-15.

Chandrasekaran M, Kim KD, Chun SC (2020). Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: a review. *Processes* 8 (9):1173.

Chauhan N, Dilbaghi N, Gopal M, Kumar R, Kim KH, Kumar S (2017). Development of chitosan nanocapsules for the controlled release of hexaconazole. *Int J Biol Macromol*, 97: 616-624.

Faikoh EN, Hong YH, Hu SY (2014). Liposome-encapsulated cinnamaldehyde enhances zebrafish (*Danio rerio*) immunity and survival when challenged with *Vibrio vulnificus* and *Streptococcus agalactiae. Fish Shellfish Immunol*, 38: 15-24.

Gaspar VM, Sousa F, Queiroz JA, Correia IJ (2011). Formulation of chitosan-TPP-pDNA nanocapsules for gene therapy applications. *Nanotechnology*, 22: 015101.

Gokce Y, Cengiz B, Yildiz N, Calimli A, Aktas Z (2014). Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp*, 462: 75-81.

González-Reza RM, Hernández-Sánchez H, Quintanar-GuerreroD, Alamilla-Beltrán L, Cruz-Narváez Y, Zambrano-Zaragoza ML (2021). Synthesis, controlled release, and stability on storage of chitosan-thyme essential oil nanocapsules for food applications. *Gels*, 7: 212.

Lê Hồ Khánh Hỷ, Nguyễn Thu Hồng, Phan Bảo Vy, Đặng Quốc Minh, Đoàn Thị Thiết, Đào Việt Hà, Phạm Xuân Kỳ (2015). Một số đặc tính của nanochitosan có kích thước nhỏ được tổng hợp bằng phương pháp tạo gel ion. *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, Tập 37: 8-15.

Liu H, Gao C (2009). Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles. *Polym Adv Technol,* 20: 613–619.

Mattu C, Li R, Ciardelli G, (2013). Chitosan nanoparticles as therapeutic protein nanocarriers: The effect of pH on particle formation and encapsulation efficiency. *Polym Compos*, 34: 1538-1545.

Mujtaba M, Khawar KM, Camara MC, Carvalho LB, Fraceto LF, Morsi RE, Elsabee MZ, Kaya M, Labidi J, Ullah H, Wang D (2020). Chitosan-based delivery systems for plants: A brief overview of recent advances and future directions. *Int J Biol Macromol*, 154: 683–697.

Sarwar A, Katas H, Zin NM (2014). Antibacterial effects of chitosan–tripolyphosphate nanoparticles: impact of particle size molecular weight. *J Nanoparticle Res* 16: 2517.

Tang ZX, Qian JQ, Shi LE (2006). Preparation of chitosan nanoparticles as carrier for immobilized enzyme. *Appl Biochem Biotechnol*, 136: 77-96.

Triunfo M, Tafi E, Guarnieri A, Salvia R, Scieuzo C, Hahn T, Zibek S, Gagliardini A, Panariello L, Coltelli MB, De Bonis A, Falabella P (2022). Characterization of chitin and chitosan derived from *Hermetia illucens*, a further step in a circular economy process. *Scientific Reports*, 12: 6613.

PHYSICOCHEMICAL AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF CHITOSAN NANOPARTICLES FROM CHITOSAN OF BLACK SOLDIER FLY AGAINST *Streptococcus agalactiae*

Nguyen Ngoc Ha[1,2], Vu Thi Huyen Trang[2], Thai Thi Thanh Thuy[1], Nguyen Thi Thuy Dung[1], Nguyen Phuc Cam Tu[3*]

[1]*Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam*

[2]*Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam*

[3]*Faculty of Fisheries, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam*

SUMMARY

Using the response surface methodology, this study optimized the conditions of chitosan nanoparticle (CSNP) production from chitosan (CS) of black soldier fly larvae. The obtained CSNPs were characterized by the physicochemical and antibacterial properties against *Streptococcus agalactiae* bacteria causing disease in tilapia. Optima conditions for CSNP production using an ionic gelation process with TPP were established at a CS concentration of 0.625 mg/mL, TPP concentration of 0.3 mg/mL, pH 4, and stirring speed of 500 rpm. The average size of the CSNP was 179.11 nm. The shape of the CSNP showed a spherical shape with a relatively uniform size. The CSNPs did not show resistance to *S. agalactiae*, which is probably related to the stability of the nanoparticles in the solution.

Keywords: Black soldier fly, chitosan, chitosan nanoparticles, ionic gelation process, response surface methodology.

[*] Author for correspondence: Tel: 949881001; Email: npctu@hcmuaf.edu.vn

TẠO HẠT NANO BẠC TỪ DỊCH CHIẾT VỎ QUẢ *Hylocereus costaricensis* VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA DUNG DỊCH NANO BẠC

Nguyễn Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Lê Na*

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT

Ngày nay, hạt nano bạc có đặc tính kháng khuẩn cao được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực của đời sống như y học, dược phẩm, mỹ phẩm.. Trong nghiên cứu này, các hạt nano bạc được tổng hợp bằng cách sử dụng chiết xuất từ vỏ quả thanh long (*Hylocereus costaricensis*). Các điều kiện tạo hạt nano bạc được khảo sát bao gồm khối lượng nguyên liệu/nước, tỷ lệ dung dịch AgNO3/dịch chiết, nhiệt độ, pH và thời gian tạo hạt nano. Kết quả đã cho thấy hạt nano bạc được tạo ra nhiều nhất ở tỷ lệ vỏ quả trong nước là 0,1g/1mL; tỷ lệ dung dịch $AgNO_3$/dịch chiết là 1/4; ở nhiệt độ 100^oC; pH: 9; thời gian phản ứng: 60 phút. Phân tích bằng kính hiển vi điện tử SEM khẳng định sự tạo thành của hạt nano có dạng hình cầu, tương đối đồng nhất với kích thước khoảng từ 20 – 50 nm. Hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch nano bạc được khảo sát trên các chủng vi sinh vật *E.coli* và *Streptoccocus aureus* với kích thước vòng kháng khuẩn từ 5 – 9 mm ở các thể tích dung dịch thử nghiệm 50, 25, 15 (µL). Những kết quả này cho thấy dung dịch nano bạc được tạo ra từ dịch chiết thực vật có thể ứng dụng trong việc ức chế các vi sinh vật gây bệnh trong môi trường.

Từ khóa: Nano bạc, công nghệ nano, dịch chiết, *Hylocereus costaricensis*, hoạt tính kháng khuẩn.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Công nghệ nano được đặt nền móng bởi nhà vật lý học Richard P. Feynman vào năm 1959 và ngày càng được ứng dụng nhiều hơn trong các lĩnh vực của đời sống, đặc biệt là ở lĩnh vực chế tạo vật liệu. Các vật liệu nano được sản xuất ở quy mô công nghiệp có kích thước một chiều của hạt đạt đến giá trị nanomet (nm, 1nm = 10 – 9 m) (Bayda *et al.*, 2019). Trong đó, độ kết tinh, hình dạng của hạt nano được kiểm soát bởi nhiệt độ, pH, nồng độ và thành phần hóa học (Raab *et al.*, 2011). Sự thu nhỏ kích thước và tăng diện tích bề mặt dẫn đến tạo ra các vật liệu bền hơn, nhẹ hơn, dẫn điện tốt hơn và đòi hỏi ít năng lượng hơn. Chúng có nhiều tính chất đặc biệt mà vật liệu ở dạng khối không có được như tính chất cơ, điện, quang, từ tính,..

Bạc là nguyên tố kim loại nặng tương tự với chì, thủy ngân, cadmium, tuy nhiên bạc không gây tác hại nặng nề với con người và động vật. Hơn nữa, bạc có hoạt tính kháng khuẩn rất tốt, được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực của đời sống như mỹ phẩm, môi trường, dược phẩm, đặc biệt ở lĩnh vực y học. Các ion bạc tự do mang điện tích dương có khả năng liên kết với màng tế bào vi khuẩn. Chúng có thể làm tăng tính thấm của màng tế bào, tạo ra các loại oxy phản ứng (ROS) và làm gián đoạn quá trình sao chép hoặc đứt gãy DNA và phá hủy tế bào vi khuẩn (Yin *et al.*, 2020; Klueh *et al.*, 2000). Trước khi có phát minh về thuốc kháng sinh, các bác sĩ đã sử dụng kim khâu bằng bạc để giảm khả năng viêm nhiễm sau phẫu thuật. Trong chiến tranh thế giới thứ nhất, những người lính mang băng lá bạc vào vết thương để tránh nhiễm trùng. Ngày nay, các hạt bạc được chế tạo ở kích thước nano để tăng diện tích tiếp xúc với tế bào vi khuẩn và làm tăng khả năng kháng khuẩn của dung dịch nano bạc.

Nhiều phương pháp vật lý, hóa học, sinh học được sử dụng để tạo hạt nano bạc. Nổi bật trong đó là sử dụng các hợp chất hóa học có khả năng khử ion bạc về dạng hạt nano và sử dụng thêm các hợp chất bổ sung như polyvinylpyrrolidone, polyethylene glycol (Ge *et al.*, 2014) để tăng tính ổn định cho phản ứng. Hầu hết các phương pháp tổng hợp hóa học thường tạo hạt nano dễ dàng tuy nhiên cần thiết phải sử dụng trang thiết bị hiện đại, tốn nhiều năng lượng hay hóa chất tổng hợp độc hại. Vì vậy, sử dụng phương pháp sinh học để tổng hợp nano bạc như dịch chiết từ vi khuẩn, nấm, tảo và các dịch chiết từ thực vật là một trong những hướng ưu tiên nghiên cứu để hướng đến tạo hạt nano bạc thân thiện với môi trường.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng dịch chiết từ vỏ quả *Hylocereus costaricensis* để tạo nano bạc. Trong vỏ quả *Hylocereus costaricensis* chứa nhiều hợp chất như steoids, carbohydrates, alkoloids, tannins, flavanoids, saponins. Các nhóm hợp chất này đóng vai trò là tác nhân ion bạc về dạng bạc kim loại có kích thước nano (Saenjum *et al.*, 2021) trong dung dịch. Chúng tôi cũng khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch nano bạc đối với các chủng vi sinh vật *Escherichia Coli* và *Staphylococcus aureus.*

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Vỏ quả *Hylocereus costaricensis* được mua ở siêu thị trên địa bàn Hà Nội và xác định lại tên khoa học tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Quả *Hylocereus costaricensis* được loại

bỏ phần ruột bên trong, rửa sạch, vỏ cắt thành từng mảnh nhỏ có kích thước <5 mm và được bảo quản ở $4^{O}C$ cho các thí nghiệm phân tích.

Chủng vi sinh vật: *Escherichia Coli* và *Staphylococcus aureus* được cung cấp bởi bộ môn Vi sinh vật, Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội. Hóa chất: peptone, cao nấm men (Biobasic), NaCl (Trung Quốc), agar (Việt Nam), dung dịch $AgNO_3$ (nồng độ 15mM), NaOH, HCl (Trung Quốc).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân tích bằng phổ UV-VIS.

Đặc tính cơ bản của quang phổ UV-VIS của dung dịch nano bạc được xác định bằng phương pháp đo phổ trong dải bước sóng 300 - 600 nm bằng máy đo quang phổ UV-VIS (Thermo Scientific, USA) (Ashraf *et al.*, 2016). Phổ UV-VIS của dung dịch nano bạc xuất hiện một đỉnh duy nhất ở bước sóng 415 nm.

Tối ưu các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình tạo nano bạc

Tối ưu các điều kiện tạo nano bạc bao gồm khảo sát ảnh hưởng của khối lượng nguyên liệu lên khả năng tạo nano bạc; khảo sát ảnh hưởng tỷ lệ dịch chiết/AgNO3 lên khả năng tạo nano bạc; khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng tạo nano bạc; khảo sát ảnh hưởng của pH lên khả năng tạo nano bạc; khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên khả năng tạo nano bạc.

Xác định khả năng kháng khuẩn của mẫu nano bạc tạo từ dịch chiết vỏ quả Hylocereus costaricensis

Hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch nano bạc được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch (Balouiri *et al.*, 2016). Mẫu dung dịch nano bạc (thể tích dung dịch 50, 25, 15 (µL)) được sử dụng để thử nghiệm. Đối chứng dương (+) là kháng sinh ampicillin (20 µg/mL); đối chứng âm (-) là dịch chiết vỏ quả *Hylocereus costaricensis*. Đường kính vòng kháng khuẩn được xác định bằng đơn vị mm.

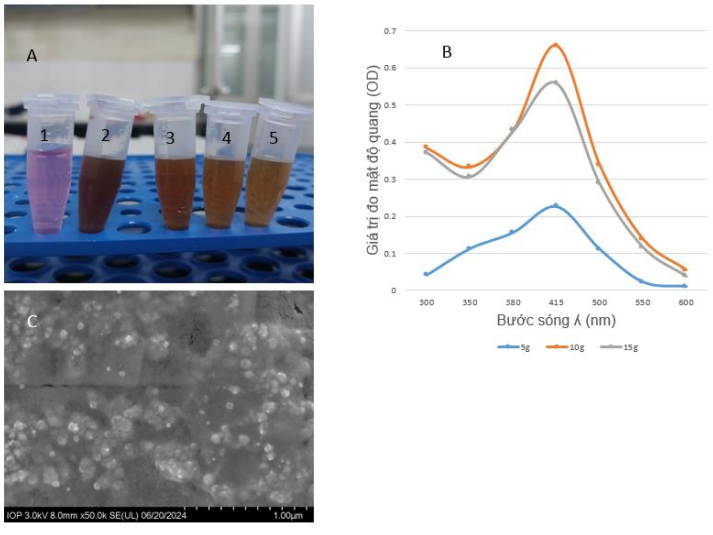
Phương pháp xác định kích thước và hình thái của hạt nano bạc bằng hình ảnh SEM

Kính hiển vi điện tử quét (SEM) là một loại kính hiển vi điện tử có thể chụp được hình ảnh bề mặt vật liệu với độ phân giải và phóng đại lớn. Hình ảnh của hạt nano bạc được chụp bằng hình ảnh SEM và kích thước của hạt nano được phân tích hiển thị trên hình ảnh.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của khối lượng vỏ quả *Hylocereus costaricensis*

Sự hình thành nano bạc được quan sát bằng sự thay đổi màu sắc và quang phổ UV-VIS. Khi nano bạc được hình thành, màu dung dịch chuyển dần sang màu nâu vàng trong khoảng mười phút và chuyển sang màu nâu đỏ trong khoảng một giờ (Hình 1A). Do đặc tính cộng hưởng plasmon bề mặt, các hạt nano bạc có phổ UV-Vis đặc trưng xuất hiện đỉnh trong khoảng 400 –450 nm (Hình 1B) và nano bạc được tạo thành có kích thước trong khoảng 20-50 nm (Hình 1C).



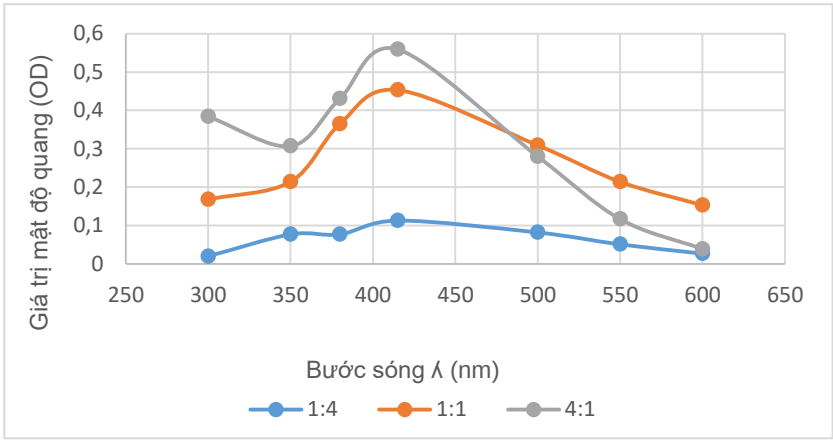
Hình 1. A. (1) Dịch chiết vỏ quả *Hylocereus costaricensis*, (2-5), dung dịch nano bạc được tạo thành ở các nồng độ khác nhau; B. Phổ UV-VIS của dung dịch nano bạc với các khối lượng nguyên liệu (Vỏ quả *Hylocereus costaricensis*) khác nhau; C. Hình ảnh SEM của nano bạc tạo bởi dịch chiết vỏ quả *Hylocereus costaricensis.*

Với cùng một thể tích dung môi chiết là nước, ở khối lượng vỏ quả *Hylocereus costaricensis* 5, 10, 15 g cho thấy

một đỉnh phổ bước sóng λ=415 nm được tạo thành trong khoảng bước sóng khảo sát từ 300-600 nm. Ở tỷ lệ 10 g vỏ quả/100 mL nước cất cho thấy có giá trị mật độ quang ở bước sóng 415 nm là lớn nhất. Khi tăng lượng vỏ lên 15 g, giá trị mật độ quang ở bước sóng 415 nm giảm có thể do keo tụ các hạt nano bạc tạo thành hạt có kích thước lớn làm giảm giá trị mật độ quang (Hồ Thị Phương *et al.*, 2019). Vì vậy chúng tôi lựa chọn tỷ lệ chiết 10 g vỏ trong 100 mL nước cất cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng tỷ lệ giữa dịch chiết và dung dịch $AgNO_3$ đến khả năng tạo nano bạc

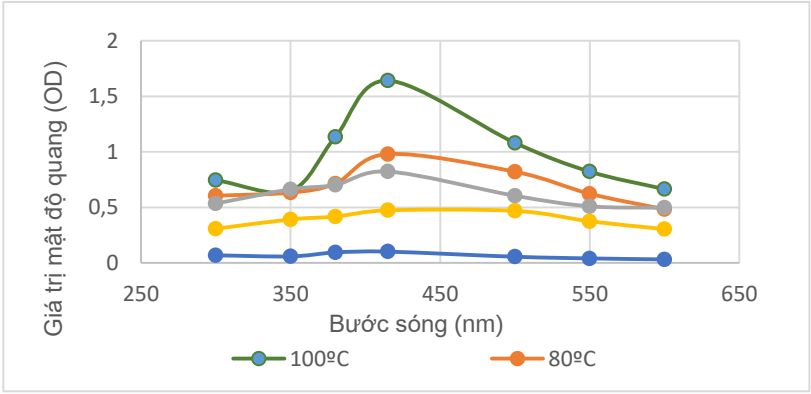
Nano bạc được tạo ra bởi sự pha trộn giữa dịch chiết và dung dịch AgNO3 với các tỷ lệ khác nhau (4:1; 1:1 và 1:4). Tỷ lệ dung dịch AgNO3 với dịch chiết vỏ *Hylocereus costaricensis* tạo lượng nano bạc nhiều nhất là 4:1, giá trị mật độ quang là Amax = 0.559 tại bước sóng λ=415nm. Tỷ lệ dịch chiết vỏ *Hylocereus costaricensis*/dung dịch AgNO3 giảm dần từ 4:1; 1:1 và 1:4, Tỷ lệ thuận với giá trị mật độ quang lần lượt là A4:1=0,559, A1:1=0,453, A1:4 =0,13 ở bước sóng λ=415nm. Điều này được giải thích bởi khi giảm tỷ lệ thể tích dịch chiết, hàm lượng chất khử có trong dung dịch càng giảm. Do đó, lượng nano bạc được tạo ra càng ít, tỷ lệ thuận với giá trị mật độ quang ở bước sóng λ=415nm. Tỷ lệ giữa dịch chiết và dung dịch $AgNO_3$ là 1:4 được lựa chọn cho các thử nghiệm sau:



Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ giữa dịch chiết/dung dịch $AgNO_3$ (1:4, 1:1, 4:1) đến khả năng tạo nano bạc

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tạo nano bạc

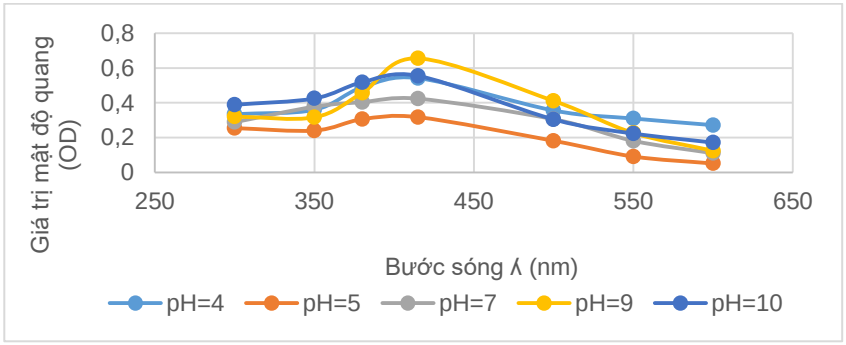
Nhiệt độ là một yếu tố ảnh hưởng lớn đến khả năng tạo nano bạc. Dải nhiệt độ được khảo sát bao gồm: 100^{o}C; 80^{o}C; 60^{o}C; 40^{o}C và nhiệt độ phòng. Hình 3 cho thấy, ở 100^{o}C, lượng nano bạc được tạo ra nhiều nhất với giá trị mật độ quang là 1,238 ở bước sóng λ=415 nm. Ở nhiệt độ phòng dung dịch vỏ *Hylocereus costaricensis* không tạo ra nano bạc. Từ nhiệt độ 40^{o}C đến 100^{o}C, giá trị mật độ quang tăng dần, cho thấy có sự tạo thành hạt nano bạc, tuy nhiên ở 40^{o}C và 60^{o}C lượng hạt nano được tạo ra còn thấp khi đỉnh phổ ở bước sóng 415 nm chưa rõ nét. Nhiệt độ 100^{o}C được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng tạo nano bạc

Ảnh hưởng của pH môi trường tới khả năng hình thành nano bạc

Giá trị pH môi trường ảnh hưởng lớn tới khả năng tạo nano bạc trong dung dịch. Các giá trị pH môi trường được khảo sát là 4, 5, 7, 9,10. Ở Hình 4 cho thấy, khi môi trường có pH=9, lượng nano bạc được tạo ra nhiều nhất thể hiện ở giá trị quang phổ A=0,655 ở bước sóng λ=415 nm. Kết quả thu được cho thấy, môi trường acid (pH thấp) ức chế sự tạo thành của hạt nano bạc, môi trường bazo (pH cao) tăng cường sự tạo thành của hạt nano bạc.

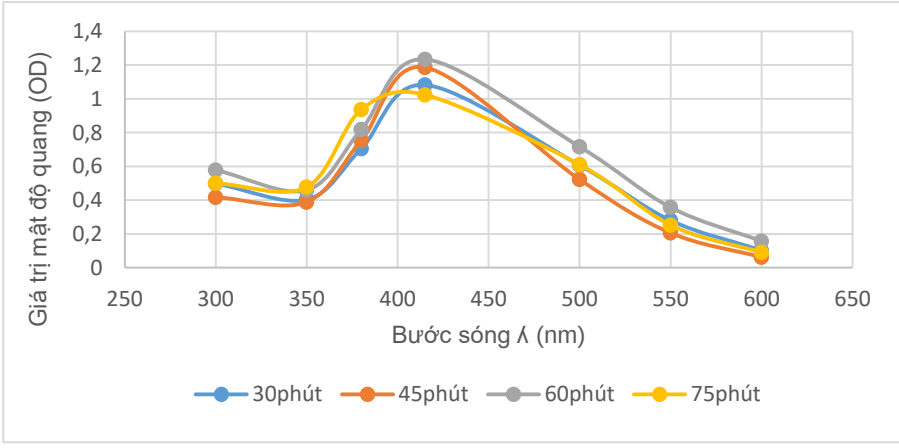


Hình 4. Ảnh hưởng của điều kiện pH lên khả năng tạo nano bạc

Dịch chiết được điều chỉnh pH=9 cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của thời gian tạo nano bạc

Thời gian tạo nano bạc được khảo sát sau 30, 45, 60, 75 phút phản ứng. Ở hình 5 cho thấy, nano bạc được tạo thành sau 30, 45, 60, 75 phút, và giá trị mật độ quang tương ứng lần lượt là 0,780; 0,698; 1,026, 0,923 tại bước sóng λ=415 nm. Thời gian để tạo nano bạc nhiều nhất là 60 phút với giá trị mật độ quang cao nhất ở bước sóng λ=415 nm. Thời gian tạo nano bạc ở 60 phút được lựa chọn để thực hiện thí nghiệm tạo nano bạc.



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian tạo nano bạc

Khi thời gian tăng từ 60 phút đến 75 phút, giá trị mật độ quang giảm do lượng chất khử trong dịch chiết đã khử hết $AgNO_3$, lượng nano bạc tạo thành kết tụ lại với nhau làm giảm giá trị mật độ quang.

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

Bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, kết quả cho thấy hạt nano bạc được tạo nên từ dịch chiết vỏ *Hylocereus costaricensis* có tác dụng ức chế hai chủng vi sinh vật gây bệnh *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*. Dịch chiết từ vỏ *Hylocereus costaricensis* được sử dụng làm đối chứng âm không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, điều này chứng tỏ tác dụng kháng khuẩn là do nano bạc được tạo ra ức chế sự phát triển của vi khuẩn, không do thành phần của dịch chiết. Kích thước vòng kháng khuẩn đạt 5 – 9 mm (Bảng 1) ở các thể tích thử nghiệm 50, 25, 15 (µL).

Bảng 1. Kích thước vòng kháng khuẩn của dung dịch nano bạc

Nồng độ	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	
	E. coli	***S. aureus***
Đối chứng dương (Ampicillin)	8.7±2.22	23.0±2.0
Đối chứng âm	-	-
50 µL	9.0±2.0	8.0±0.67
25 µL	7.7±1.56	6.3±1.11
10 µL	6.7±1.56	5.0±0.67

Hạt nano bạc thể hiện hoạt tính kháng khuẩn với chủng vi khuẩn Gram âm *Escherichia coli* tốt hơn chủng vi khuẩn Gram dương *Staphylococcus aureus*. Điều này do sự khác nhau về thành tế bào của hai chủng vi khuẩn. Hạt nano bạc tích điện dương dễ dàng xâm nhập vào tế bào có ái lực với nhóm phosphate của acid teichoic và nhóm –COOH của acid glutamic trên thành tế bào vi khuẩn Gram âm (Jung *et al.*, 2008). Trong khi đó, thành tế bào vi khuẩn Gram dương dày hơn nên hạt nano bạc khó xâm nhập vào bên trong tế bào vi khuẩn.

KẾT LUẬN

Nano bạc được tổng hợp từ dịch chiết vỏ quả *Hylocereus costaricensis* (10 g vỏ/100 mL nước cất) với các điều kiện tối ưu tạo nano bạc bao gồm ở nhiệt độ 100ºC, thời gian 60 phút, pH = 9, tỷ lệ dịch chiết và dung dịch $AgNO_3$ là 4:1. Dung dịch nano bạc được tạo ra từ dịch chiết vỏ *Hylocereus costaricensis* có kích thước trong khoảng 20 – 50 nm và có hoạt tính kháng khuẩn với hai chủng vi sinh vật *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*. Tuy nhiên dung dịch nano bạc thể hiện hoạt tính mạnh hơn với chủng *Escherichia coli*, ở các nồng độ thử nghiệm khác nhau 50, 25, 15 (µL) với kích thước vòng kháng khuẩn trong khoảng từ 7 – 9 mm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ashraf JM, Ansari MA, Khan HM, Alzohairy MA, Choi I (2016). Green synthesis of silver nanoparticles and characterization of their inhibitory effects on AGEs formation using biophysical techniques. *Sci Rep*, 6:20414.

Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*, 6(2): 71-79.

Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(1):112.

Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing MM (2014). Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int J Nanomedicine*, 9:2399-2407.

Hồ Thị Phương, Nguyễn Thị Lê Na, Nguyễn Trung Thành, Nguyễn Đình Thắng (2019). Nghiên cứu khả năng ứng dụng dịch chiết củ gừng (*Zingiber officinale* Rosc) để chế tạo nano bạc và đánh giá khả năng kháng khuẩn. *Tạp chí Đại học Quốc Gia Hà Nội*, 35(3):118-127.

Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol*, 74(7):2171-2178.

Klueh U, Wagner V, Kelly S, Johnson A, Bryers JD (2000). Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *J Biomed Mater Res*, 53(6):621-631.

Raab C, Simko M, Fiedeler U, Nentwich M, Gazsó A (2011). Production of nanoparticles and nanomaterials. *NanoTrust Dossiers*, 1-4.

Saenjum C, Pattananandecha T, Nakagawa K (2021). Antioxidative and Anti-Inflammatory Phytochemicals and Related Stable Paramagnetic Species in Different Parts of Dragon Fruit. *Molecules*, 26(12):3565.

Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomedicine*, 15:2555-2562.

CREATION SILVER NANO PARTICLES FROM *Hylocereus costaricensis* FRUIT EXTRACT AND INVESTIGATING THE ANTIBATERIAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES SOLUTION

Nguyễn Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Lê Na*

Faculty of Biology, VNU University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

SUMMARY

Nowadays, silver nanoparticles with high antibacterial properties are applied in many areas of life, such as medicine, pharmacy, and cosmeceuticals. Silver nanoparticles were synthesised in this work using plant extracts derived from dragonfruit peels. The conditions for creating silver nanoparticles were investigated, including the volume ratio of AgNO3 solution/plant extract, temperature, pH, and time. The results showed that silver nanoparticles were most produced at a mass of dragonfruit peels/water of 0.1 g/1mL, a ratio of AgNO3 solution to extract of 1/4, a temperature of 100 ^{o}C, a pH of 9, and a reaction time of 60 minutes. Analysis by SEM electron microscopy confirmed the formation of spherical, relatively uniform nanoparticles with sizes ranging from 20 to 50 nm. The antibacterial activity of silver nanoparticles solution was investigated on microbial strains *E. coli* and *Staphylococcus aureus* with antibacterial inhibition zone from 5 – 9 mm at test volumes of 50, 25, and 15 (µL). These results show that silver nanosolutions created from plant extracts can be applied to inhibit pathogenic microorganisms in the environment.

Keywords: Silver nanoparticle, nanotechnology, extraction, *Hylocereus costaricensis*, antibaterial activity.

* Author for Correspondence: Tel: 0396025889; Email: nguyenthilena.hus@gmail.com

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN TRÍCH LY POLYPHENOL VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA CAO CHIẾT TỪ HOA HÒE (*Styphnolobium japonicum*)

Ngô Đại Nghiệp[1*], Nguyễn Liêu Thảo My[1], Nguyễn Hoàng Thảo Ly[2]

[(1)]Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh

[(2)]Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Khảo sát ảnh hưởng các điều kiện trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng từ hoa Hòe (*Styphnolobium japonicum*) có sự hỗ trợ sóng siêu âm. Đồng thời khảo sát hàm lượng polyphenol tổng, hoạt tính kháng oxy hóa thông qua năng lực khử (FRAP) và khả năng bắt gốc tự do DPPH của cao chiết tổng và cao ethyl acetate. Kết quả cho thấy điều kiện trích ly thích hợp: dung môi ethanol 50%, tỷ lệ mẫu: dung môi 1:45 g/ml, nhiệt độ 50°C, thời gian 30 phút. Hàm lượng polyphenol tổng ở cao chiết tổng 218,47 mg GAE/g mẫu khô và cao ethyl acetate 68,69 mg GAE/g mẫu khô. Cao chiết tổng thể hiện năng lực khử ở nồng độ 50 µg/ml, cao ethyl acetate ở nồng độ 200 µg/ml. Khả năng bắt gốc tự do DPPH, giá trị IC_{50} của cao chiết tổng 18,255 µg/ml và cao ethyl acetate là 32,067 µg/ml. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hoa Hòe có tiềm năng về khả năng kháng oxy hóa để ứng dụng trong điều trị một số bệnh như tăng huyết áp, giãn tĩnh mạch,…

Từ khóa: DPPH, hoa Hòe *Styphnolobium japonicum*, polyphenol, sóng siêu âm,

MỞ ĐẦU

Polyphenol là các hợp chất tự nhiên chiết xuất từ thực vật, đóng vai trò là chất chuyển hóa thứ cấp ở thực vật và được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực y học và một số lĩnh vực khác bởi có nhiều hoạt tính sinh học như: kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm,… Các gốc tự do khi được sản xuất quá mức có thể gây thiệt hại đến DNA, lipid, protein dẫn đến ảnh hưởng tim mạch, nguy cơ ung thư. Polyphenol sẽ giúp loại bỏ các gốc tự do, điều này sẽ giúp cải thiện các thiệt hại về đại phân tử cũng như cải thiện được tình trạng sức khỏe (Rudrapal *et al*., 2022; Uttara *et al.*, 2009). Trong hoa Hòe chứa nhiều thành phần hóa học như flavonoid, triterpenoid, glycoside, polysaccharides. Flavonoid là nhóm hợp chất có nhiều hoạt tính dược lý. Rutin thuộc nhóm hợp chất flavonoid được tìm thấy nhiều nhất trong nụ hoa Hòe 6 – 30%, đối với phần cánh hoa có thể lên đến 70% (Wang *et al.*, 2019). Trong y học, hoa Hòe được dùng để điều trị giãn tĩnh mạch, chuột rút, chữa dị ứng, tăng huyết áp. Tuy nhiên, hiện nay còn rất ít nghiên cứu về các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly hợp chất polyphenol như: thời gian, nhiệt độ, nồng độ dung môi, tỷ lệ mẫu: dung môi hay dung môi ethanol kết hợp hỗ trợ sóng siêu âm để giúp tăng hiệu suất trích ly và thu được hoạt tính tốt nhất là điều cần thiết. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện để xác định được các điều kiện thích hợp cho việc trích ly polyphenol từ hoa Hòe.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Hoa Hoè (*Styphnolobium japonicum)* được thu hái tại Thái Bình, Việt Nam. Sấy khô ở 50^{o}C đến khối lượng không đổi. Sau đó, xay nhỏ, chứa trong túi PE.

Hóa chất: Ethanol, ethyl acetate, methanol, $FeCl_3$, HCl, Mg, Na_2CO_3, thuốc thử Wagner, thuốc thử Folin Ciocalteu, DPPH, đệm phosphate, $K_3Fe(CN)_6$,TCA, acid gallic, acid ascorbic của hãng Merck, Mỹ.

Thiết bị: máy quang phổ UV-Vis (Phoenix – Đức), cân kĩ thuật (Ohaus – Mỹ), máy cô quay chân không (Heidolph - Đức), bể siêu âm (Elma – Đức), tủ sấy mẫu (Binder – Đức), …

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly polyphenol từ hoa Hòe

Trong quá trình trích ly có sự hỗ trợ của sóng siêu âm, các yếu tố được khảo sát như sau:

Nồng độ ethanol (30, 50, 70, 90%) với tỷ lệ mẫu: dung môi, nhiệt độ, thời gian cố định (1:15 g/ml, 50^{o}C, 30 phút).

Tỷ lệ mẫu: dung môi (1:15, 1:25, 1:35, 1:45 g/ml) với nồng độ ethanol được xác định ở trên. Nhiệt độ, thời gian cố định (50^{o}C, 30 phút).

Nhiệt độ (40, 50, 60, 70^{o}C) với nồng độ ethanol, tỷ lệ mẫu: dung môi được xác định ở trên. Thời gian cố định 30 phút.

Thời gian (20, 30, 40, 50 phút) với nồng độ ethanol, tỷ lệ mẫu: dung môi, nhiệt độ được xác định ở trên.

Quá trình trích ly được lặp lại 3 lần. Sau trích ly, lọc lấy dịch chiết, cô đuổi dung môi ở 50^{o}C để thu nhận cao chiết tổng. Xác định hàm lượng polyphenol tổng, định tính sơ bộ hợp chất.

Thu nhận cao phân đoạn ethyl acetate từ hoa Hòe

Hòa tan 1g cao tổng với 100ml nước cất. Sau đó, cho vào bình lóng cùng với 100ml ethyl acetate, lắc đều trong 60 giây, để yên. Sau 15 phút, lọc thu dung dịch. Dung dịch các lần chiết được gộp lại, cô đuổi dung môi ở 50^{o}C thu được cao phân đoạn ethyl acetate. Xác định hàm lượng polyphenol tổng, định tính sơ bộ hợp chất.

Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết tổng, cao phân đoạn ethyl acetate từ hoa Hòe

Cao chiết tổng ethanol và cao phân đoạn ethyl acetate được đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa thông qua năng lực khử (FRAP) và khả năng bắt gốc tự do DPPH.

Phương pháp phân tích một số chỉ tiêu

Xác định hàm lượng polyphenol tổng bằng phương pháp đo màu dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu

Định tính sơ bộ hợp chất bằng phương pháp hóa học:

Polyphenol: 2 ml dịch chiết mẫu được thêm 2 – 3 giọt $FeCl_3$ 5%, lắc đều, để yên và quan sát. Kết quả dương tính khi dịch chiết chuyển từ vàng nhạt sang xanh rêu, xanh đen.

Flavonoid: Cho 4-5 giọt HCl đậm đặc và một ít bột Mg vào 2 ml dịch chiết mẫu, lắc đều, để yên và quan sát. Kết quả dương tính khi dịch chiết chuyển từ vàng nhạt sang hồng, đỏ.

Xác định năng lực khử (FRAP) dựa theo mô tả của Vijayalakshmi và đồng tác giả (2016).

Xác định khả năng bắt gốc tự do DPPH dựa theo mô tả của Anshu và đồng tác giả (2011).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến quá trình trích ly polyphenol từ hoa Hòe

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hàm lượng polyphenol tổng

Nồng độ ethanol (%)	30	50	70	90
Polyphenol tổng (mg GAE/g mẫu khô)	$81,20^{a} \pm 0,22$	$108,60^{c} \pm 3,23$	$99,05^{b} \pm 0,93$	$97,47^{b} \pm 0,26$

Khi so sánh trên cùng một hàng, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức α=0,05

Kết quả bảng 1 cho thấy, ở ethanol 50% cho hàm lượng polyphenol tổng cao nhất chứng tỏ polyphenol được trích ly từ hoa Hòe chứa nhiều nhóm chức phân cực hơn, độ phân cực cao vì thế tan tốt trong dung môi ethanol/ nước. Và cao hơn 3.62 lần (108.60 mg GAE/g mẫu khô) so với nghiên cứu của Abdelhady và đồng tác giả (2015) (30.04 mg GAE/g mẫu khô) khi chiết xuất polyphenol từ lá được trồng ở Ai cập bằng methanol 80% kết hợp đun cách thủy ở 60°C.

Ảnh hưởng của tỷ lệ mẫu: ethanol đến quá trình trích ly polyphenol từ hoa Hòe

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ mẫu: ethanol đến hàm lượng polyphenol tổng

Tỷ lệ mẫu: ethanol (g/ml)	1:15	1:25	1:35	1:45
Polyphenol tổng (mg GAE/g mẫu khô)	$48,53^{a} \pm 0,12$	$52,51^{b} \pm 0,20$	$67,03^{c} \pm 0,14$	$69,16^{d} \pm 0,78$

Khi so sánh trên cùng một hàng, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức α=0,05

Dưới sự hỗ trợ của sóng siêu âm tạo nên phản ứng giữa dung môi và sóng dẫn đến hình thành bong bóng khí. Lượng dung môi càng lớn thì bong bóng khí được tạo sẽ càng nhiều, khi đạt điểm tới hạn bong bóng sẽ vỡ, tạo nên sự ma sát giữa các hạt rắn, phá vỡ thành tế bào, giúp tăng tốc độ khuếch tán và chiết xuất được nhiều hợp chất polyphenol hơn. Tuy nhiên nếu lượng dung môi quá lớn sẽ tạo khoảng cách lớn giữa các hạt rắn, làm giảm sự ma sát và hiệu suất trích ly giảm, gây lãng phí dung môi. Với tỷ lệ mẫu: dung môi là 1:45 (g/ml) cho hàm lượng polyphenol tổng cao nhất với 69,16 mg GAE/g mẫu khô. Kết quả khá giống so với nghiên cứu của Liao và đồng tác giả (2015) khi chiết xuất rutin, hàm lượng rutin có xu hướng tăng dần khi tăng tỷ lệ mẫu: dung môi từ 1:5 đến 1:50 g/ml.

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình trích ly polyphenol từ hoa Hòe

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng polyphenol tổng

Nhiệt độ (ºC)	40	50	60	70
Polyphenol tổng (mg GAE/g mẫu khô)	$38,52^{a} \pm 0,14$	$53,37^{c} \pm 0,17$	$49,65^{b} \pm 0,22$	$38,34^{a} \pm 0,09$

Khi so sánh trên cùng một hàng, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức α=0,05

Ở nhiệt độ trích ly là 40ºC và 50ºC thì hàm lượng polyphenol tổng tăng và đạt cao nhất ở 50^{o}C (53,37 mg GAE/g mẫu khô) chứng tỏ nhiệt độ càng cao thì khả năng thẩm thấu, khuếch tán của dung môi vào tế bào sẽ hiệu quả hơn, làm mềm mô thực vật, độ nhớt của dung môi giảm giúp tạo nhiều bọt khí hơn khi kết hợp với sóng siêu âm và khả năng hòa tan hợp chất polyphenol vào dung môi tăng. Khi tăng nhiệt độ lên 60ºC và 70ºC, hàm lượng polyphenol tổng giảm do polyphenol là một hợp chất không ổn định với nhiệt độ cao.

Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình trích ly polyphenol từ hoa Hòe

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng polyphenol tổng

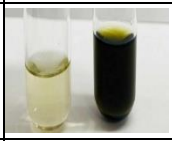
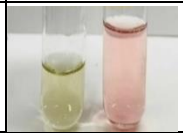
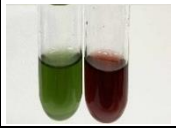
Thời gian (phút)	20	30	40	50
Polyphenol tổng (mg GAE/g mẫu khô)	45,74^{a} ± 0,13	68,75^{d} ± 0,53	63,33^{c} ± 0,30	56,37^{b} ± 0,10

Khi so sánh trên cùng một hàng, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức α=0,05

Khi trích ly có hỗ trợ sóng siêu âm, hợp chất từ mẫu được vận chuyển vào dung môi theo cơ chế khuếch tán và thẩm thấu. Thời gian càng lâu sẽ giúp tăng sự tiếp xúc giữa dung môi và sóng siêu âm, bong bóng khí cũng được hình thành nhiều hơn, dẫn đến thành tế bào bị phá vỡ nhiều hơn và hiệu suất trích ly tăng. Do đó ở 30 phút, hàm lượng polyphenol tổng đạt cao nhất (68,75 mg GAE/g mẫu khô). Khi tăng thời gian lên 40 và 50 phút thì hàm lượng polyphenol giảm do quá trình khuếch tán chất tan vào dung môi đã đạt trạng thái cân bằng, khi tiếp tục tăng thời gian trích ly, hợp chất sẽ tiếp xúc nhiều với oxy, ánh sáng đồng thời tích tụ được những hợp chất có khả năng thúc đẩy quá trình oxy hóa dẫn đến tình trạng bị oxy hóa tăng dần, hàm lượng polyphenol tổng giảm. Bên cạnh đó, thời gian quá dài còn làm phân hủy các hợp chất tự nhiên tương đồng với nghiên cứu của Paniwnyk và đồng tác giả (2001).

Kết quả định tính một số hợp chất trong dịch chiết cao tổng, cao phân đoạn ethyl acetate ở mẫu hoa Hòe

Bảng 5. Kết quả định tính một số nhóm hợp chất bằng phương pháp hóa học

Hợp chất	Kết quả	
	Cao tổng	Cao phân đoạn ethyl acetate
Polyphenol	 Có sự hiện diện của polyphenol với hiện tượng dương tính là dịch chiết chuyển từ vàng nhạt sang xanh đen	Có sự hiện diện của polyphenol với hiện tượng dương tính là dịch chiết chuyển từ vàng nhạt sang xanh đen
Flavonoid	 Có sự hiện diện của flavonoid với hiện tượng dương tính là dịch chiết chuyển từ vàng nhạt sang hồng (đỏ)	 Có sự hiện diện của flavonoid với hiện tượng dương tính là dịch chiết chuyển từ vàng nhạt sang hồng (đỏ)

Thông qua kết quả định tính sơ bộ hợp chất trong dịch chiết hoa Hòe bằng một số phản ứng hóa học, kết luận trong cao tổng và cao phân đoạn ethyl acetate có sự hiện diện của polyphenol, flavonoid.

Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết tổng, cao phân đoạn ethyl acetate ở mẫu hoa Hòe

Bảng 6. Kết quả hàm lượng polyphenol tổng số (mg GAE/g mẫu khô) ở cao chiết tổng, cao phân đoạn ethyl acetate

Mẫu	Cao chiết tổng	Cao phân đoạn ethyl acetate
Polyphenol tổng (mg GAE/g mẫu khô)	218,46 ± 3,00	68,65 ± 1,04

Khi trích ly polyphenol từ bột hoa Hòe với các điều kiện thích hợp: ethanol 50%, tỷ lệ mẫu: dung môi 1:45 g/ml, nhiệt độ 50^{o}C, thời gian 30 phút thì hàm lượng polyphenol tổng của cao chiết đạt 218,46 mg GAE/g mẫu khô.

Đối với cao phân đoạn ethyl acetate, hàm lượng polyphenol tổng đạt 68.65 mg GAE/g mẫu khô thấp hơn cao chiết tổng do ethyl acetate là dung môi chỉ chiết được hợp chất có tính phân cực trung bình còn ethanol là dung môi có thể chiết xuất nhiều hợp chất từ thực vật, do đó hàm lượng polyphenol tổng có sự chênh lệch. Khi so với nghiên cứu của Abdelhady và đồng tác giả (2014) thu polyphenol từ lá thì cao phân đoạn ethyl acetate do chúng tôi thực hiện cao hơn 1,831 lần. Nhưng lại thấp hơn nghiên cứu của Saffidine và đồng tác giả (2023) hàm lượng polyphenol tổng đạt 310,16 mg GAE/g mẫu khô do sử dụng phần hạt và có chiết phân đoạn hexane trước khi chiết bằng ethyl acetate.

Bảng 7. Giá trị OD của vitamin C, cao chiết tổng, cao phân đoạn ethyl acetate trong khảo sát năng lực khử (FRAP)

Nồng độ vitamin C (µg/ml)	0	4	8	12	16	20
$\triangle OD_{700nm}$	0	0,011	0,029	0,047	0,071	0,087

Nồng độ cao chiết tổng (µg/ml)	**0**	**25**	**50**	**100**	**150**	**200**
$\triangle OD_{700nm}$	0	0,027	0,06	0,110	0,164	0,195
Nồng độ cao phân đoạn ethyl acetate (µg/ml)	**0**	**25**	**50**	**100**	**150**	**200**
$\triangle OD_{700nm}$	0	0,003	0,012	0,031	0,043	0,055

Vitamin C thể hiện hoạt tính khử cao gấp 3,774 lần so với cao chiết tổng, cao gấp 14,209 lần so với cao phân đoạn ethyl acetate và cao chiết tổng có hoạt tính khử cao gấp 3,765 lần so với cao phân đoạn ethyl acetate. So với nghiên cứu của Wang và đồng tác giả (2020) khi tiến hành khảo sát năng lực khử với nồng độ từ 20 đến 200 µg/ml thì hoạt tính khử giảm, tuy nhiên khi tăng lên 400 µg/ml thì hoạt tính khử có xu hướng tăng lại. Chứng tỏ khả năng kháng oxy hóa phụ thuộc vào hàm lượng của các chất kháng oxy hóa có trong mẫu và nồng độ mẫu. Ở nồng độ 200 µg/ml, giá trị $\triangle$OD gần 0,44 trong khi ở cùng nồng độ, cao tổng và cao phân đoạn ethyl acetate mà chúng tôi thực hiện giá trị $\triangle$OD đạt 0,195 và 0,055. Do đó, mẫu của nghiên cứu trên thể hiện năng lực khử tốt hơn.

Bảng 8. Hiệu suất bắt gốc tự do DPPH, IC_{50} của vitamin C, cao chiết tổng, cao phân đoạn ethyl acetate

Nồng độ vitamin C (µg/ml)	**0**	**2**	**4**	**6**	**8**
Hiệu suất bắt gốc tự do DPPH (%)	0	26,632	47,089	67,615	83,426
IC_{50} (µg/ml)	4,486				
Nồng độ cao chiết tổng (µg/ml)	**0**	**15**	**20**	**25**	**30**
Hiệu suất bắt gốc tự do DPPH (%)	0	43,676	52,963	68,959	78,185
IC_{50} (µg/ml)	18,255				
Nồng độ cao phân đoạn ethyl acetate (µg/ml)	**0**	**20**	**30**	**40**	**50**
Hiệu suất bắt gốc tự do DPPH (%)	0	35,690	49,940	60,478	73,175
IC_{50} (µg/ml)	32,067				

Kết quả thể hiện ở Bảng 8 qua giá trị IC_{50} cho thấy khả năng kháng oxy hóa theo thứ tự giảm dần là vitamin C, cao tổng và cao phân đoạn ethyl acetate. Khả năng bắt gốc tự do DPPH ở vitamin C cao gấp 4,069 lần so với cao chiết tổng và cao gấp 7,148 lần so với cao phân đoạn ethyl acetate. Khi so sánh hoạt tính bắt gốc tự do DPPH giữa 2 loại cao, cao chiết tổng có khả năng bắt gốc tự do tốt hơn, cao hơn 1,757 lần so với cao phân đoạn ethyl acetate. Hai loại cao thu được trong nghiên cứu này có khả năng kháng oxy hóa tốt hơn nghiên cứu của Zhu và đồng tác giả (2023) (IC_{50} cao tổng 352 µg/ml, cao ethyl acetate 169 µg/ml).

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được các điều kiện thích hợp để trích ly polyphenol từ hoa Hòe với dung môi ethanol 50%, tỷ lệ mẫu: dung môi 1:45 g/ml, nhiệt độ 50^{o}C, thời gian là 30 phút. Bên cạnh đó, cao chiết tổng và cao phân đoạn ethyl acetate có khả năng kháng oxy hóa cho thấy hợp chất polyphenol chiết từ hoa Hòe có tiềm năng trong việc cải thiện vấn đề về huyết áp, giãn tĩnh mạch và trong một số lĩnh vực khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abdelhady MIS, Kamal AM, Othman SM, Mubarak MS, Hadda TB (2014). Total polyphenolic content, antioxidant, cytotoxic, antidiabetic activities, and polyphenolic compounds of Sophora japonica grown in Egypt. *Med Chem Res*, 24(2): 482-495.

Anshu S, Arindam K, Geetanjali Y, Rintu B (2011). Process Optimization for the Extraction of Polyphenols from Okara. *Food Technol Biotech*, 49 (3): 322–328.

Liao J, Qua B, Liu D, Zheng N (2015). New method to enhance the extraction yield of rutin from Sophora japonica using a novel ultrasonic extraction system by determining optimum ultrasonic frequency. *Ultrason Sonochem*, 27:110-116.

Paniwnyk L, Beaufoy E, Lorimer J P , Mason TJ (2001). The extraction of rutin from flowers buds of *Sophora japonica. Ultrason Sonochem,* 8: 299-301.

Rudrapal M, Khairnar SJ, Khan J, Dukhyil A, Ansari MA, Alomary M, Alshabrmi FM, Palai S, Deb PK, Devi R (2022). Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: Insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism (s) of action. *Front Pharmacol,* 13: 1-15.

Saffidine K, Zerargui F, Guemaz T, Lameche C, Sahli F, Baghiani A (2023). Antioxidant, Antibacterial Activities and Synergistic Effect with Antibiotics of Fruits and Stems Extracts from *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott. *Turk J Agric - Food Sci Tech*, 11(2): 383-389.

Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*, 7(1): 65-74.

Vijayalakshmi M, Ruckmani K (2016). Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. *Bangladesh J Pharmac*, 11(3): 570-572.

Wang JR, Li LY, Song XH, Chen D X, Xu J, Ding G (2019). Variations in the Components and Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott Extract during Flower Maturity Stages. *Chem Biodivers*, 16(3): 1-11.

Wang Y, Wang J, Wang Y, Zhang Z (2020). Investigation of the impact on the antioxidant capacity and Flavonoids components of different drying methods for *Sophora japonica* L. *IOP C Ser Earth Env*, 615(1): 1-9.

Zhu Y, Wang W, Ruan R, Chen J (2023). Retracted: Oxidative Potential and Nanoantioxidant Activity of Flavonoids and Phenolic Acids in *Sophora flavescens. Int J Anal Chem*, 1-7.

CHARATERIZATION OF EXTRACTION CONDITIONS POLYPHENOL AND OXIDATION RESISTANCE OF EXTRACTS FROM FLOWERS *Styphnolobium japonicum*

Ngo Dai-Nghiep[1*], Nguyen Lieu Thao My[1], Nguyen Hoang Thao Ly[2]

[1]*VNUHCM - University of Science, Ho Chi Minh City*

[2]*Nong Lam University, Ho Chi Minh City*

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the effects of extraction conditions on the total polyphenol content from *Styphnolobium japonicum* flowers using ultrasound. Additionally, the total polyphenol content, the antioxidant activity through reducing power (FRAP) and DPPH free radical scavenging ability of the total extract and ethyl acetate extract were investigated. The results showed that the most effective extraction conditions were: 50% ethanol solvent, sample: solvent ratio of 1:45 g/ml, temperature of 50°C, and a duration of 30 minutes. The total polyphenol content in the total extract was found to be 218.47 mg GAE/g dry sample, while the ethyl acetate extract had a content of 68.69 mg GAE/g dry sample. Furthermore, the total extract exhibited reducing power at a concentration of 50 µg/ml, while the ethyl acetate extract showed this ability at a concentration of 200 µg/ml. The DPPH free radical scavenging ability was also evaluated, with the IC_{50} value of the total extract being 18.255 µg/ml and the ethyl acetate extract being 32.067 µg/ml. These findings suggest that *Styphnolobium japonicum* flowers have potential as a source of antioxidants for the treatment of diseases such as hypertension and varicose veins.

Keywords: DPPH, Pagoda tree flower *Styphnolobium japonicum*, polyphenol, ultrasound.

[*] Author for correspondence: Tel: 0908283498; Email: ndnghiep@hcmus.edu.vn

HIỆU QUẢ ỨC CHẾ *Fusarium oxysporum* CỦA CAO CHIẾT LÁ ĐIỀU (*Anacardium occidentale* L.) GIÀU POLYPHENOL

Nguyễn Thị Bé Thư[1], Vũ Thị Mỹ Tâm[1], Lê Nguyễn Thanh Đông[2], Nguyễn Dương Hoàng Vinh[2], Trịnh Thị Phi Ly[1,2*]

[1]Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

[2]Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Fusarium oxysporum là mầm bệnh phổ biến gây thiệt hại nghiêm trọng trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau. Sử dụng chiết xuất thực vật giàu các hợp chất sinh học để kiểm soát bệnh do *Fusarium oxysporum* gây ra là một giải pháp an toàn và hiệu quả đang được quan tâm phát triển hiện nay. Nghiên cứu này đánh giá hiệu quả ức chế nấm *Fusarium oxysporum* của các loại cao chiết lá Điều trong điều kiện *in vitro*. Đồng thời hàm lượng phenolic tổng số và acid gallic được phân tích để làm rõ cơ chế tác động của các loại cao chiết. Kết quả cho thấy các loại cao chiết lá Điều đều thể hiện khả năng ức chế nấm *F. oxysporum*, trong đó cao ethanol có hiệu quả kháng nấm cao nhất đạt 67,50%. Khả năng kháng nấm tương quan với hàm lượng polyphenol trong cao chiết, cao ethanol chứa polyphenol nổi trội nhất với 332,68 mg/g. Cao ethyl acetate chứa hàm lượng acid gallic cao nhất 65,91 mg/g nhưng hiệu quả kháng nấm thấp nhất.

Từ khóa: Acid gallic, cây Điều, *Fusarium oxysporum*, kháng nấm, polyphenol.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nông nghiệp là ngành sản xuất góp phần duy trì sự ổn định an ninh lương thực cũng như đóng vai trò quan trọng đến sự phát triển của nền kinh tế quốc gia. Bệnh trên thực vật đã làm hạn chế sản lượng cây trồng trên toàn thế giới, dẫn đến thiệt hại về năng suất từ 50 – 70%. Những thiệt hại kể trên là do mầm bệnh tồn tại trong đất hoặc tàn dư nông nghiệp, bao gồm các tác nhân vi sinh như vi khuẩn, nấm, virus, tuyến trùng. Hiện nay, các quy trình nông nghiệp thường áp dụng các tác nhân kiểm soát sinh học như một giải pháp thay thế thích hợp hơn để giải quyết các mối lo ngại về sức khỏe liên quan đến việc tiếp xúc liên tục với các hóa chất tổng hợp, trong đó các chiết xuất thực vật giàu hợp chất có hoạt tính sinh học ngày càng nhận được nhiều sự chú ý (Fenibo *et al*., 2022).

Fusarium oxysporum là nấm gây bệnh héo vàng trên nhiều loại cây trồng (Edel-Hermann, Lecomte, 2019). Sự phân bố và mức độ gây hại của *F. oxysporum* ở mỗi vùng sinh thái sẽ khác nhau. Sợi nấm và bào tử vô tính tồn tại và nảy mầm trong tàn dư cây bệnh, trong đất qua mỗi mùa vụ, chúng xâm nhập vào rễ non, gốc rễ hay vết thương của cây trồng ký chủ để tiếp cận mạch xylem (Petrovic *et al.*, 2009). Cây trồng nhiễm bệnh do *F. oxysporum* sẽ xuất hiện những thay đổi về hình dạng cũng như các hoạt động sinh lý, ảnh hưởng đến các cơ quan khác nhau ở thực vật, làm suy yếu và gây chết cây (Okungbowa, Shittu, 2012). Trong số các mầm bệnh nghiêm trọng, *F. oxysporum* gây bệnh héo Fusarium, được xếp vào danh sách bệnh gây thiệt hại nặng nề thứ 5 trên thế giới và làm giảm năng suất cây trồng tới 80 – 90% (Srinivas *et al*., 2019).

Cây Điều (*Anacardium occidentale* L.) thuộc họ *Anacardiaceae* là một loài cây công nghiệp lâu năm ở Việt Nam với tổng diện tích trồng đạt 320 nghìn ha. Các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng dịch chiết lá Điều có khả năng ức chế một số nấm gây bệnh cây trồng như *Fusarium* sp., *Pyricularia grisea, Alternaria solani, Aspergillus flavus* và *Aspergillus niger* (Tafinta *et al*., 2020). Nghiên cứu gần đây của nhóm đã cho thấy lá Điều chứa hàm lượng acid gallic cao vượt trội 377,29 mg/100 g so với một số thực vật khác như tỏi (*Allium sativum*), vỏ măng cụt (*Garcinia mangostana* L.), lá bàng (*Terminalia catappa*), chiêu liêu nghệ (*Terminalia nigrovenulosa*) và quả nho. Acid gallic là một loại acid phenolic có trong nhiều loài thực vật với khả năng chống oxy hóa, kháng nấm và kháng khuẩn mạnh do cấu trúc hóa học đặc trưng của nó (Cushnie, Lamb, 2005; Nguyen *et al.*, 2013). Các nghiên cứu về hàm lượng acid gallic và đặc tính sinh học của chiết xuất lá Điều còn hạn chế. Nghiên cứu này đánh giá hiệu quả ức chế *F. oxysporum* của cao chiết lá Điều giàu acid gallic trong điều kiện *in vitro*. Kết quả của nghiên cứu cung cấp nền tảng để phát triển thuốc bảo vệ thực vật sinh học có hiệu quả và an toàn trong tương lai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

- Nguyên liệu: Lá Điều (*Anacardium occidentale* L.) được thu tại huyện Hớn Quản, tỉnh Bình Phước.

- Chủng nấm *Fusarium oxysporum* được phân lập và định danh tại Viện nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường (RIBE), Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

- Hóa chất: Acid gallic (Sigma-Aldrich, USA), acetonitrile, acid acetic và chloroform (loại HPLC) được cung cấp bởi Thermo Fisher Scientific Co., Ltd. (Waltham, Hoa Kỳ), thuốc thử Folin-Ciocalteu (Merck, Đức), tất cả các hóa chất khác đều thuộc loại phân tích.

- Thiết bị: Bộ chiết sinh hàn hồi lưu (Isolab, Đức), hệ thống quang phổ hấp thu phân tử (8453 Spectrophotometer, Hewlett Packard, Mỹ), thiết bị cô quay chân không (Hei-VAP Value G3, Heidolph, Đức), thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò DAD (Agilent 1260 Infinity II, Santa Clara, United States).

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị cao chiết

Lá Điều sau khi sấy khô, được nghiền và sàng qua rây có đường kính lỗ ϕ = 1mm. Bột lá Điều được chiết với các dung môi khác nhau bao gồm ethyl acetate, ethanol 70% và ethanol 96% với tỉ lệ nguyên liệu: dung môi là 1:10 (w/v) bằng cách sử dụng hệ thống đun hồi lưu (Isolab, Đức) trong 1 giờ, ở nhiệt độ sôi của dung môi. Phần dịch chiết được tách khỏi bã rắn bằng cách lọc qua giấy lọc Whatman No.1. Phần bã rắn được chiết thêm 2 lần nữa với dung môi tương ứng. Cao chiết thực vật thu được bằng cách loại bỏ dung môi bằng thiết bị bay hơi chân không. Sau đó, cao chiết được hòa tan ở nồng độ thích hợp trước khi xác định hàm lượng phenolic tổng và sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

Xác định hàm lượng phenolic tổng số

Hàm lượng phenolic tổng (TPC) trong cao chiết lá Điều được xác định bằng phương pháp quang phổ UV/Vis sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteau (Singleton *et al*,. 1999). Cao chiết được hòa tan trong dung môi tương ứng ở nồng độ thích hợp, sử dụng 100 µL dịch chiết cho vào ống nghiệm, sau đó thêm vào 100 µL thuốc thử Folin – Ciocalteu. Sau 5 phút, cho thêm 300 µL dung dịch Na_2CO_3 20% lắc đều sau đó thêm 4,5 mL nước cất. Để yên 60 phút trong tối ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ của hỗn hợp được đo ở bước sóng 760 nm bằng máy đo quang phổ UV-Vis (8453 Spectrophotometer, Hewlett Packard, Mỹ). Acid gallic được sử dụng làm chất chuẩn với khoảng nồng độ 100 – 500 mg/L. Tổng hàm lượng phenolic được biểu thị bằng mg acid gallic tương đương trên g cao chiết khô (mg GAE/g).

Định lượng acid gallic trong cao chiết bằng HPLC

Hàm lượng acid gallic trong cao chiết được xác định bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với đầu dò DAD (Agilent 1260 Infinity II, Santa Clara, United States) ở bước sóng 270 nm. Pha động bao gồm A: 1% acid acetic trong acetonitrile và B: 1% acid acetic trong nước. Cột pha đảo Poroshell 120-EC C18 (100 mm × 4,6 mm, kích thước hạt 2,7 µm) được sử dụng để phân tách ở nhiệt độ cột 35℃. Chương trình rửa giải gradient là 0 phút (5% B), 0 – 2 phút (5 – 5% B), 2 – 17 phút (5 – 40% B), 17 – 20 phút (40 – 40% B), 20 – 21 phút (40 – 5% B) và 21 – 25 phút (5 – 5% B). Thể tích tiêm mẫu là 5 µL và pha động được bơm với tốc độ dòng 1 mL/phút.

Đánh giá hoạt tính ức chế nấm F. oxysporum của cao chiết lá Điều in vitro

Các nghiệm thức được thực hiện bằng cách đặt một tảng nấm có đường kính 8 mm lên đĩa petri (đường kính 80 × 15 mm). Môi trường PDA được bổ sung cao chiết từ 1 – 5%. Các đĩa đã cấy được ủ ở 28 ± 2°C. Sự phát triển của sợi nấm và đường kính của tảng nấm được quan sát và ghi nhận vào ngày 1, 3, 5 và 7. Khả năng ức chế nấm (H) được tính bằng công thức sau:

$$H = \frac{D_c - D}{D_c} \times 100$$

Trong đó:

H: Khả năng ức chế nấm (%);

D: Đường kính tăng trưởng tảng nấm của đĩa bổ sung dịch chiết (mm);

D_c: Đường kính tăng trưởng tảng nấm của đĩa đối chứng (mm).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tổng hàm lượng phenolic và acid gallic

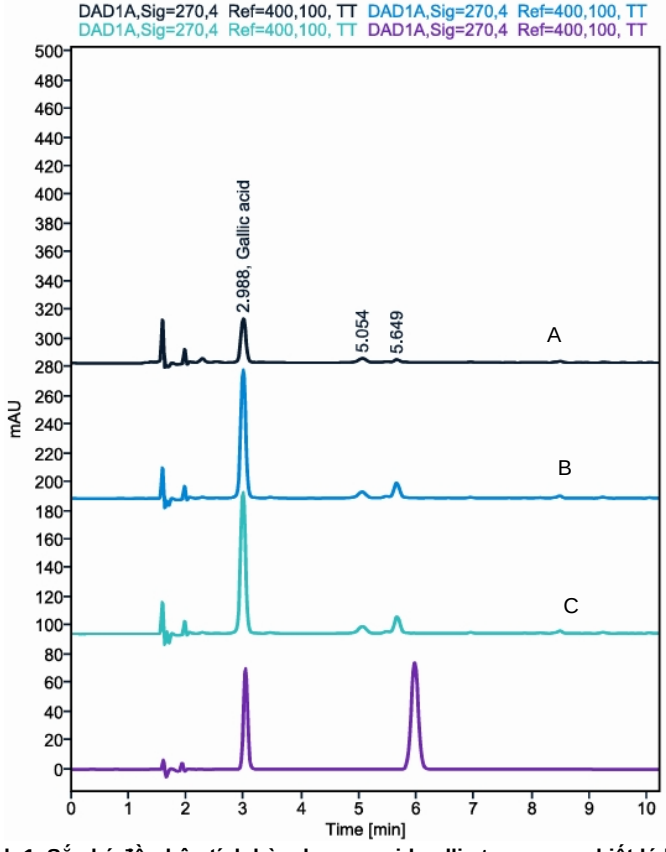
Phenolic là hợp chất thực vật được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi vì có chứa nhiều hoạt tính sinh học đã được chứng minh bao gồm khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, chống viêm và kháng oxy hóa (Montenegro-Landívar *et al*., 2021). Trong nghiên cứu này, bột lá Điều được chiết kiệt bằng các loại dung môi khác nhau, hàm lượng phenolic tổng và acid gallic trong các loại cao chiết được xác định.

Bảng 1. Hàm lượng phenolic tổng và acid gallic trong cao lá Điều

Mẫu cao chiết	Phenolic tổng (mg GAE/g)	Hiệu suất chiết cao (%)	Acid gallic/cao chiết (mg/g)	Acid gallic/ nguyên liệu (mg/g)
Cao ethyl acetate	143,81 ± 0,22	5,11 ± 0,17	65,91 ± 0,32	3,37 ± 0,016
Cao ethanol 70%	318,54 ± 1,05	27,98 ± 0,89	12,96 ± 0,11	3,62 ± 0,03
Cao ethanol 96%	332,68 ± 1,33	21,45 ± 0,47	11,83 ± 0,14	2,54 ± 0,03

Kết quả Bảng 1 cho thấy tổng hàm lượng phenolic trong các mẫu dao động từ 143,81 đến 332,68 mg GAE/g tùy vào loại dung môi chiết. Độ phân cực của dung môi ảnh hưởng đến hàm lượng các chất chiết. Trong đó các hợp chất phenolic chứa nhiều nhóm hydroxyl phân cực nên hòa tan tốt trong các dung môi phân cực. Ethanol và nước có độ phân cực cao hơn ethyl acetate nên hàm lượng phenolic tổng trong hai loại cao này đạt 318,54 – 332,68 mg GAE/g, cao gấp 2,2 – 2,3 lần so với cao ethyl acetate. Duangjan và đồng tác giả (2019) đã ghi nhận chiết xuất lá Điều bằng dung môi methanol có hàm lượng phenolic tổng số 160,35 mg GAE/g, chứa các thành phần như flavonoid, tanin, saponin và anthocyanin. Dịch chiết lá Điều có khả năng ức chế nhiều loài vi sinh vật gây bệnh như *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Candida albican* và *Aspergillus niger.*

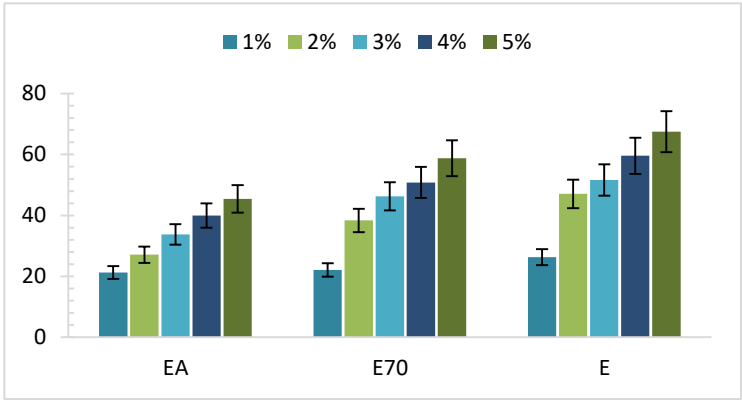
Acid gallic là một chất chống oxy hóa phổ biến và thể hiện nhiều chức năng sinh học khác nhau như kháng vi sinh vật, kháng viêm và ức chế một số dòng tế nào ung thư. Theo nghiên cứu của El-Nagar và đồng tác giả (2020), acid gallic ức chế sự phát triển của sợi nấm và khả năng ức chế nấm tỷ lệ thuận với nồng độ của hợp chất. Trong nghiên cứu này, mẫu cao chiết lá Điều có sự hiện diện của acid gallic với hàm lượng khác nhau, trong đó cao ethyl acetate có hàm lượng acid gallic cao nhất đạt 65,91 mg/g, cao gấp 5,1 – 5,6 lần so với 2 loại cao còn lại (Bảng 1 và Hình 1). Bên cạnh đó, hiệu suất chiết cao của ethanol 96% và ethanol 70% cao hơn ethyl acetate 4,2 – 5,5 lần; chứng tỏ ethyl acetate chiết xuất chọn lọc một số hợp chất trong đó có acid gallic dẫn đến hàm lượng acid gallic trong cao chiết ethyl acetate cao hơn 2 loại cao còn lại. Nguyễn Đặng Minh Chánh và đồng tác giả (2013) đã cho thấy acid gallic từ lá và vỏ của cây chiêu liêu nghệ có khả năng ức chế nấm *Fusarium solani* với hiệu quả ức chế từ 33,75 – 81% ở nồng độ 100 ppm, 500 ppm và 1000 ppm. Một trong những cơ chế mà hợp chất này phát huy được hoạt tính kháng nấm là thông qua sự phân hủy thành tế bào sợi nấm và khả năng ngăn chặn sự hình thành chitin trong thành tế bào (Nguyen *et al*., 2013).



Hình 1. Sắc ký đồ phân tích hàm lượng acid gallic trong cao chiết lá Điều

A: Cao ethyl acetate; B: Cao ethanol 70%; C: cao ethanol 96%; D: chất chuẩn acid gallic.

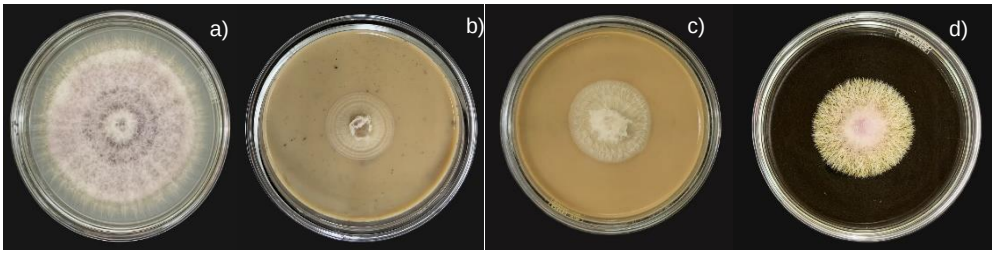
Hoạt tính ức chế nấm *F. oxysporum* của cao chiết lá Điều *in vitro*



Hình 2. Khả năng ức chế nấm *F.oxysporum* của cao chiết lá Điều từ 1% - 5%

EA: Cao ethyl acetate; E70: Cao ethanol 70%; E: Cao ethanol 96%

Kết quả hoạt tính ức chế nấm *F. oxysporum* của cao chiết được thể hiện thông qua Hình 2 và 3. Môi trường được bổ sung cao chiết lá Điều với nồng độ từ 1 đến 5% cho hiệu quả ức chế nấm tăng dần. Cao ethanol ở nồng độ 5% có khả năng ức chế nấm *F. oxysporum* cao nhất 67,50% sau 7 ngày cấy, cao ethyl acetate kém hiệu quả nhất. Kết quả cũng cho thấy khả năng ức chế nấm *F. oxysporum* tương quan với hàm lượng polyphenol có trong cao chiết, trong đó cao ethanol với hàm lượng polyphenol cao nhất có hiệu quả kháng nấm cao nhất. Ngược lại cao ethyl acetate có hàm lượng polyphenol thấp nhất và khả năng kháng nấm thấp nhất. Quan sát hình thái sợi nấm trên đĩa thạch bổ sung cao ethanol (96%) cho thấy sợi nấm mịn, thưa, ít lan ra bề mặt môi trường thạch, sợi tơ nấm xẹp xuống có màu trắng, mất sắc tố tím đặc trưng ở nồng độ cao chiết 2%. Trong khi môi trường bổ sung cao ethyl acetate có mật độ sợi tơ nấm dày hơn, lan rộng hơn và sắc tố tím biến mất hoàn toàn ở nồng độ cao chiết 5%. Một kết quả đáng chú ý khác là hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* không tương quan với hàm lượng acid gallic có trong cao chiết như một số nghiên cứu trước đây. Cao ethyl acetate có hàm lượng acid gallic cao nhất 65,91 mg/g nhưng hiệu quả kháng nấm thấp nhất. Trong cao chiết lá Điều ngoài acid gallic còn có các hợp chất phenolic khác như acid protocatechuic, epicatechin, acid p-courmaric, quercetin và kaempherol với hàm lượng nhỏ hơn nhưng đây cũng là các hợp chất ảnh hưởng đến sự phát triển của nấm (Shen *et al*., 2022). Muốn đánh giá hoạt chất có vai trò chính ức chế sự phát triển của nấm cần những nghiên cứu sâu hơn. Các loại cao chiết có hiệu quả ức chế sự phát triển của nấm không giống nhau, phụ thuộc vào hàm lượng và cấu trúc nhóm hợp chất có trong từng loại cao chiết. Theo các nghiên cứu trước đây các hợp chất phenolic có khả năng tương tác với protein và lipid trên màng tế bào, ức chế enzyme và phá vỡ màng tế bào của vi khuẩn làm thay đổi sự thẩm thấu của màng tế bào, dẫn đến rò rỉ các ion, proton và các phân tử nội bào. Các hợp chất này cũng ngăn cản sự phát triển của sợi nấm và ức chế hình thành màng sinh học dẫn đến tổn thương vách tế bào và giải phóng chất nội bào (El-Nagar *et al*., 2020).



Hình 3. Ảnh hưởng của cao chiết lá Điều đến sự phát triển của tản nấm sau 7 ngày ở nồng độ 4%.

a) Đối chứng; b) cao ethanol 96%; c) cao ethanol 70%; d) cao ethyl acetate

KẾT LUẬN

Cao ethanol lá Điều có hiệu quả kháng nấm *F. oxysporum* cao nhất đạt 67,50% với hàm lượng polyphenol nổi trội nhất 332,68 mg GAE/g. Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy lá Điều có thể là một nguồn nguyên liệu kháng nấm *F. oxysporum* tiềm năng. Do đó, cần tiếp tục thực hiện các thử nghiệm trên quy mô nhà lưới và đồng ruộng để đánh giá hiệu quả kiểm soát *F. oxysporum* của cao ethanol từ lá Điều. Cao ethyl acetate có hàm lượng acid gallic cao nhất với 65,91 mg/g nhưng không phải là hoạt chất chính ức chế sự phát triển của nấm *F. oxysporum*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cushnie TT and Lamb AJ (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicro Agents*, 26: 343-356.

Duangjan C, Rangsinth P, Gu X, Wink M, and Tencomnao T (2019). Lifespan extending and oxidative stress resistance properties of a leaf extracts from *Anacardium occidentale* L. in *Caenorhabditis elegans*. *Oxi Med Cell Longev*, 2019: 9012396.

Edel-Hermann V, and Lecomte C (2019). Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology*, 109: 512-530.

El-Nagar A, Elzaawely AA, Taha N A, and Nehela Y (2020). The antifungal activity of gallic acid and its derivatives against *Alternaria solani*, the causal agent of tomato early blight. *Agronomy*, 10: 1402.

Fenibo EO, Ljoma GN, and Matambo T (2022). New and future development in biopesticide research: Biotechnological exploration. *Springer Nature Singapore:* 1-53.

Montenegro-Landívar MF, Tapia-Quirós P, Vecino X, Reig M, Valderrama C, Granados M, Cortina JL, and Saurina J (2021). Polyphenols and their potential role to fight viral diseases: An overview. *Sci Total Environ*, 801: 149719.

Nguyen DMC, Seo DJ, Lee HB, Kim IS, Kim KY, Park RD, and Jung WJ (2013). Antifungal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Fusarium solani*. *Microb Pathog*, 56: 8-15.

Okungbowa FI and Shittu HO (2012). Fusarium wilts: An overview. *Environ Res J*, 6: 83-102.

Petrovic T, Walsh JL, Burgess LW, and Summerell BA (2009). Fusarium species associated with stalk rot of grain sorghum in the northern grain belt of eastern Australia. *Australas Plant Pathol*, 38: 373-379.

Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, and Jin B (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem*, 383: 132531.

Srinivas C, Devi DN, Murthy KN, Mohan CD, Lakshmeesha TR, Singh B, Kalagatur NK, Niranjana SR, Hashem A, Alqaraw AA, Tabassum B, Abd-Allah EF, Chandra Nayakan S, and Srivastava RK (2019*). Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity–A review. *Saudi J Biol Sci*, 26: 1315-1324.

Tafinta IY, Okoye NH, Batagarawa US, Hamma II, and Abubakar M (2020). Phytochemical screening and antifungal activities of cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) leaves extract on some fungal isolates. *Asian Plant Res J*, 5: 30-37.

INHIBITORY EFFECT OF POLYPHENOL-RICH CASHEW LEAVES EXTRACTS (*Anacardium occidentale* L.) ON *Fusarium oxysporum*

Nguyen Thi Be Thu[1], Vu Thi My Tam[1], Le Nguyen Thanh Dong[2], Nguyen Duong Hoang Vinh[2], Trinh Thi Phi Ly[1,2*]

[1]*Faculty of Biological sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City*

[2]*Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City*

SUMMARY

Fusarium oxysporum is a common pathogen causing severe damage to many different crops. The use of plant extracts rich in bioactive compounds to control diseases caused by *Fusarium oxysporum* is an environmental friendly and effective solution that has attracted increasing attentions. This study investigated the inhibitory effects of cashew leaf extracts on *F.oxysporum in vitro*. In addition, the total phenolic and gallic acid content in the extracts were analyzed to clarify the effects of cashew leaf extracts. As results, all cashew leaf extracts showed the ability to inhibit *F.oxysporum*, in which ethanolic extract had the highest antifungal efficiency of 67.50%. Additionally, ethanolic extract contained the highest polyphenol at 332.68 mg GAE/g. The data demonstrated that antifungal activity correlated with the polyphenol content in the cashew leaf extract. Ethyl acetate extract contained the highest gallic acid content of 65.91 mg/g but it had the lowest antifungal capacity.

Keywords: Antifungal activity, cashew leaves, *Fusarium oxysporum*, gallic acid, phenolic compounds.

* Author for correspondence: Tel: 0379700703; Email: phily@hcmuaf.edu.vn

KIỂM SOÁT NẤM *Colletotrichum capsici* BẰNG CAO CHIẾT THỰC VẬT GIÀU POLYPHENOL

Nguyễn Thành Danh[1], Phạm Phương Trinh[1], Lê Mỹ Huyền[1], Nguyễn Dương Hoàng Vinh[2], Nguyễn Quỳnh Anh[3], Trịnh Thị Phi Ly[1,2*]

[1]Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

[2]Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

[3]Công ty TNHH Khoa học và Công nghệ Lab2Life

TÓM TẮT

Polyphenol là nhóm hợp chất chuyển hóa thứ cấp của thực vật có hiệu quả cao trong việc kiểm soát vi sinh vật gây hại cây trồng. Nghiên cứu sử dụng cao chiết thực vật giàu polyphenol từ lá Bạch đàn, Xuyến chi, Yên bạch, Neem và vỏ Măng cụt để ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum capsici* gây bệnh thán thư trên ớt trong điều kiện *in vitro*. Kết quả cho thấy cả năm loại cao chiết đều thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của nấm *C. capsici*, trong đó cao chiết Bạch đàn có hiệu quả kháng nấm cao nhất đạt 61,31% sau 9 ngày cấy. Kết quả định lượng cho thấy Bạch đàn là cao chiết có hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số đạt 284,97 mg/g và 16,15 mg/g nổi bật nhất trong năm loại cao chiết khảo sát. Hợp chất gallic acid trong cao chiết lá Bạch đàn đạt 0,68%, rutin chiếm hàm lượng cao nhất trong cao chiết Yên bạch đạt 0,69% và trong lá Neem 0,65%, chlorogenic acid hiện diện dồi dào trong Xuyến chi với 1,80%, vỏ Măng cụt giàu epicatechin với 1,18%. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở để sử dụng nguồn nguyên liệu giàu polyphenol thay thế các biện pháp bảo vệ thực vật truyền thống hướng đến nền nông nghiệp bền vững.

Từ khóa: Cao chiết thực vật, *Colletotrichum capsici*, flavonoid, hoạt tính kháng nấm, polyphenol.

MỞ ĐẦU

Cây ớt (Capsicum annum L.) là cây gia vị có nguồn gốc từ miền Trung và Nam Mỹ được trồng ở nhiều vùng nhiệt đới trên thế giới. Theo Tổ chức FAO năm 2021, tổng diện tích trồng ớt tại Việt Nam đạt khoảng 67,654 ha với sản lượng 99,038 tấn. Tuy có sản lượng lớn nhưng kinh tế do cây trồng này mang lại chưa cao vì nhiều lí do trong đó có dịch bệnh thán thư do chi nấm Colletotrichum sp. gây ra, bệnh diễn ra không chỉ ở giai đoạn cây trưởng thành mà còn diễn ra ở giai đoạn sau thu hoạch gây ảnh hưởng từ 10% đến 80% năng suất hầu hết ở tất cả các vùng trồng ớt tại Việt Nam. Chi nấm này gây bệnh phổ biến ở nhiều loại cây trồng bao gồm xoài, thanh long, chuối, bơ, ớt,... Ở ớt năm 2008 đã ghi nhận ít nhất 7 loài *C. gloeosporioides, C. capsici, C. acutatum, C. coccodes, C. dematium, C. nigrum* và *C. atramentarium* gây bệnh thán thư trên cây trồng này. Trong đó, loài *C. capsici* được ghi nhận là tác nhân gây bệnh ở nhiều địa phương trồng ớt, cây trồng nhiễm bệnh do *C. capsici* gây ra sẽ xuất hiện những thay đổi về hình dạng cũng như các hoạt động sinh lý, làm suy yếu và gây chết cây (Don *et al*., 2007). Hiện nay, việc phòng trừ và điều trị bệnh thán thư trên ớt phụ thuộc đa phần vào các biện pháp hóa học, gây ra những hệ lụy về an toàn thực phẩm, sức khỏe con người, cũng như ảnh hưởng tiêu cực đến hệ sinh thái. Trong bối cảnh đó, người nông dân đã và đang quan tâm hơn việc đến việc không chỉ kiểm soát hiệu quả bệnh, còn quan trọng hơn là an toàn cho sức khỏe và các ảnh hưởng đến hệ sinh thái. Các thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc sinh học được xem là lựa chọn tiềm năng trong kiểm soát bệnh ở cây trồng, không gây tình trạng kháng thuốc và thân thiện cho môi trường và không có ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Việt Nam là quốc gia có nguồn dược liệu, cây trồng phong phú gồm khoảng 12.000 loài, nhiều thực vật đã được ứng dụng trong các chế phẩm sinh học phòng ngừa bệnh cây trồng (Li *et al*., 2014; Shen *et al*., 2022).

Chiết xuất thực vật giàu các hợp chất có hoạt tính sinh học như polyphenol, flavonoid và tannin là một trong những giải pháp thay thế giảm tác động xấu đến môi trường và không gây ảnh hưởng đến sự đa dạng sinh học đã được ứng dụng rộng rãi để phòng trừ và ức chế các tác nhân gây hại trên cây trồng như nấm và vi khuẩn. Polyphenol là các hợp chất mà trong cấu trúc của chúng có ít nhất một vòng phenyl mang một hay nhiều nhóm chức hydroxyl (–OH). Hơn 10.000 hợp chất thuộc lớp chất polyphenol đã được tìm thấy trong nhiều loài thực vật khác nhau (Wu et al., 2013). Các nghiên cứu khảo sát bước đầu cho thấy lá Bạch đàn, lá Neem, Xuyến chi, Yên bạch, vỏ Măng cụt chứa hàm lượng polyphenol nổi trội là những nguyên liệu tiềm năng cho hoạt tính kháng nấm *C. capsici* trên cây ớt. Nghiên cứu này đánh giá khả năng ức chế nấm *C. capsici* của 5 loại cao chiết thực vật Bạch đàn, Xuyến chi, Yên bạch, Neem và vỏ Măng cụt, tạo tiền đề để phát triển chế phẩm sinh học bảo vệ thực vật hiệu quả và an toàn.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Nguồn mẫu thực vật được thu thập ở các tỉnh Đông Nam Bộ bao gồm năm loại là vỏ Măng cụt (Garcinia mangostana), lá Neem (*Azadirachta indica*), lá Bạch đàn (*Eucalyptus camaldulensis*), lá và cành Xuyến chi (*Bidens pilosa*), lá Yên bạch (*Chromolaena odorata*). Mẫu sau khi được thu nhận được rửa sạch và loại bỏ phần hư hỏng, sâu bệnh. Sau đó tiến hành sấy ở 50 ± 2°C đến khi độ ẩm dưới 13%. Tiến hành xay nhuyễn thành dạng bột và sàng qua rây có đường kính lỗ ϕ = 1 mm, bảo quản trong túi kính khí đặt trong bình hút ẩm ở nhiệt độ phòng trước khi tiến hành các thí nghiệm.

Khảo sát khả năng ức chế nấm *C. capsici* của cao chiết thực vật trong điều kiện *in vitro*

Cao chiết thực vật được tiến hành pha loãng bằng nước cất vô trùng đến nồng độ 1% tiến hành khảo sát sự ức chế nấm *C. capsici* của cao chiết thực vật bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Nấm *C. capsici* được nuôi cấy trên môi trường PDA có bổ sung 1% cao chiết thực vật (200 g/L khoai tây, 20 g/L Dextrose, 20 g/L Agar) pH 6,5 ở 28 ± 2°C. Thí nghiệm gồm 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Theo dõi sự phát triển của sợi nấm thông qua đường kính tản nấm sau khi cấy tại thời điểm 3, 5, 7, 9 ngày sau cấy, đánh giá bằng cách đo giá trị trung bình của đường kính phát triển tản nấm. Khả năng ức chế nấm được đánh giá bởi công thức:

$$E = \frac{DC - D}{DC} \times 100$$

Trong đó: E : phần trăm ức chế (%).

DC : là đường kính tăng trưởng tản nấm ở nghiệm thức đối chứng (mm).

D : là đường kính tăng trưởng tản nấm ở nghiệm thức bổ sung dịch chiết (mm).

Xác định hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số

Cân chính xác 1,00 ± 0,01 g mẫu thực vật thêm vào dung môi ethanol 70% với tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là 1:10, sau đó tiến hành chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm với tần số bước sóng là 20 Hz trong thời gian 15 phút. Bã thực vật được chiết kiệt với ethanol 70%, dịch chiết được lọc qua giấy lọc (Whatman, Anh), tiến hành cô quay loại bỏ dung môi và sấy ở nhiệt độ 40℃ thu cao chiết và bảo quản ở 4℃. Cân 0,1 ± 0,01 g cao chiết hòa tan vào ethanol tiến hành định lượng các hợp chất.

Hàm lượng polyphenol được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thu phân tử dựa trên phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu được tối ưu theo quy trình của Trinh và đồng tác giả (2018). Sử dụng 100 µL dịch chiết thêm vào 100 µL thuốc thử Folin-Ciocalteu, để yên trong 5 phút rồi thêm vào 300 µL dung dịch Na_2CO_3 20% lắc đều định mức lên 5 mL. Để yên trong 60 phút trước khi đo độ hấp thu ở bước sóng 735 nm. Galic acid (GA) được sử dụng làm chất chuẩn với dãy nồng độ 50 – 250 mg/L. Xây dựng đồ thị chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ GA và độ hấp thu. Hàm lượng polyphenol tổng số tính theo công thức:

$$TPC = \frac{C \times V \times f}{m}$$

Trong đó: TPC : hàm lượng polyphenol tổng số (mg/g).

C : nồng độ polyphenol xác định theo đồ thị chuẩn (mg/L).

V : thể tích dịch chiết (L).

f : hệ số pha loãng của dịch chiết.

m : khối lượng của nguyên liệu chiết (g).

Hàm lượng flavonoid được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thu phân tử dựa trên phản ứng với $AlCl_3$ được tối ưu theo quy trình của Woisky và Salatino (1998). Lấy 0,5 mL dịch chiết thêm vào 1,5 mL nước, 0,1 mL $AlCl_3$ 10%, 0,1 mL potassium acetate 1 M và 2,8 mL nước cất. Sau khi ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, độ hấp thụ hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 430 nm bằng máy quang phổ hấp thu phân tử. Mẫu đối chứng được thực hiện như trên bằng cách thay 0,5 mL dịch chiết bằng nước cất. Quercetin được sử dụng làm chất chuẩn chuẩn với dãy nồng độ 30 – 150 mg/L. Hàm lượng flavonoid tổng số tính theo công thức:

$$TFC = \frac{C \times V \times f}{m}$$

Trong đó: TFC : hàm lượng flavonoid tổng số (mg/g).

C : nồng độ flavonoid xác định theo đồ thị chuẩn (mg/L).

V : thể tích dịch chiết (L).

f : hệ số pha loãng của dịch chiết.

m : khối lượng của nguyên liệu chiết (g).

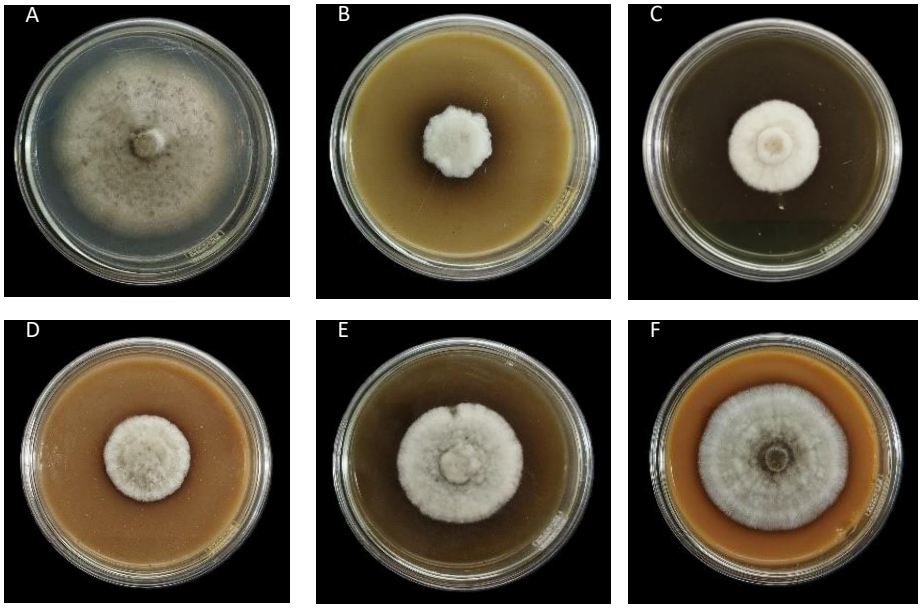
Định lượng một số polyphenol chủ yếu bằng RP-HPLC

Gallic acid (GA), Protocatechuic acid (PCA), Chlorogenic acid (CGA), Epicatechin (EC), Quercetin (QE), Rutin (RU) trong cao chiết thực vật được xác định bằng kĩ thuật sắc kí lỏng cao áp (HPLC) kết nối với đầu dò DAD (Agilent 1260 Infinity II, Santa Clara, United States). Cột đảo pha ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 x 150 mm, kích thước hạt 5 µm) được sử dụng để tách ở nhiệt độ cột 35°C. Pha động bao gồm A (nước chứa 1% acetic acid) và B (acetonitril chứa 1% acetic acid). Chương trình rửa giải gradient được thiết lập như sau: 0-4 phút (5% B), 4–34 phút (5–40% B), 34–40 phút (34-40% B), 40-42 phút (50–5% A), 42-50 phút (5–5% A). Thể tích tiêm mẫu là 5 µL và pha động với tốc độ dòng 1 mL/phút. GA, PCA và EC được phát hiện ở bước sóng 280 nm, CGA được phát hiện ở bước sóng 320 nm, QE và RU được phát hiện ở bước sóng 360 nm (Trinh *et al.*, 2018).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

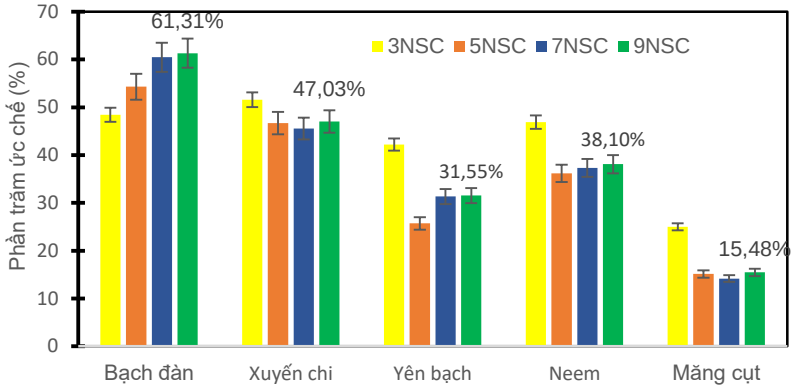
Khả năng ức chế *C. capsici in vitro* của các loại cao chiết

Kết quả Hình 1 và Hình 2. cho thấy ảnh hưởng của cao chiết thực vật đối với sự phát triển của nấm *C. capsici.* Cao chiết Bạch đàn có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *C. capsici* tốt nhất và hiệu quả kháng nấm tăng dần từ 48,44% vào ngày 3 đến ngày 9 đạt 61,31%. Cao chiết Xuyến chi đạt hiệu quả ức chế 47,03%, tiếp theo là cao lá Neem 38,10% và Yên bạch với 31,55%. Măng cụt là cao chiết thể hiện hoạt tính ức chế nấm *C. capsici* thấp nhất chỉ với 15,48% sau 9 ngày cấy. Quan sát hình thái cho thấy sợi nấm mọc dâng lên cao mà không lan ra trên môi trường PDA bổ sung cao chiết Bạch đàn và Xuyến chi, đồng thời khả năng sản sinh bào tử bị ức chế. Trừ Bạch đàn, khả năng kháng nấm của các loại cao chiết đạt cao nhất vào ngày 3 và hiệu quả kháng nấm giảm theo thời gian. Nghiên cứu của Lê Thanh Toàn và Mai Hữu Tín (2020), cho thấy dịch chiết Bạch đàn có hiệu quả ức chế *C. gloeosporioides in vitro* đạt 57,45% sau 7 ngày; xử lý quả ớt bằng cách phun dịch chiết Bạch đàn một ngày trước khi lây bệnh cho thấy tỷ lệ bệnh 29,61% sau 14 ngày lây nhiễm. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra các hợp chất trong Bạch đàn như eucalyptol, thymol, carvone và terpinen-4-ol có khả năng ức chế các loài nấm bệnh như *Fusarium* sp.*, Aspergillus* sp. và *Penicillium* sp. Ngoài ra, hiệu quả kháng nấm *C. capsici* của Bạch đàn và Xuyến chi có thể do sự hiện diện nổi trội các hợp chất polyphenol. Nghiên cứu gần đây của nhóm cũng cho thấy Bạch đàn, Yên bạch, Xuyến chi và lá Neem có khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* và hiệu quả ức chế nấm tương quan chặt chẽ với nồng độ polyphenol có trong dịch chiết thực vật (Nguyen *et al*., 2024). Vì vậy, nhóm tiến hành xác định hàm lượng polyphenol và các hợp chất chủ yếu có trong các loại cao chiết.



Hình 1. Kết quả khả năng ức chế nấm *C. capsici* sau 9 ngày cấy

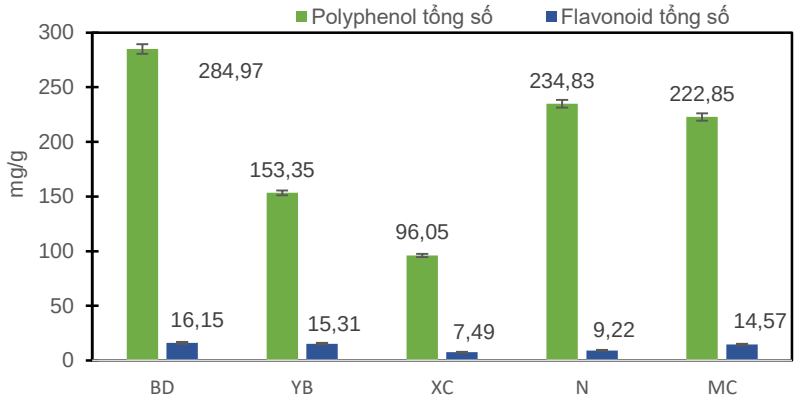
A) đối chứng; B) Cao chiết Bạch đàn 1%; C) Cao chiết Xuyến chi 1%;
D) Cao chiết Neem 1%; E) Cao chiết Yên bạch 1%; F) Cao chiết Măng cụt 1%.



Hình 2. Khả năng ức chế nấm *C. capcisi* của các cao chiết thực vật

Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số

Kết quả hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng được thể hiện trong Hình 3. Hàm lượng polyphenol khác nhau ở các nguyên liệu dao động từ 96,05 – 284,97 mg/g. Flavonoid là các hợp chất thuộc nhóm polyphenol chiếm hàm lượng nhỏ hơn dao động từ 7,49 – 16,15 mg/g. Cao chiết Bạch đàn nổi trội với hàm lượng polyphenol cao nhất đạt 284,97 mg/g; tiếp theo là cao chiết lá Neem và vỏ Măng cụt với hàm lượng polyphenol lần lượt là 234,83 mg/g. Bạch đàn cũng là nguyên liệu có hàm lượng flavonoid cao nhất đạt 16,15 mg/g và tiếp theo là cao chiết Yên bạch 15,31 mg/g. Xuyến chi có hàm lượng polyphenol và flavonoid thấp nhất trong năm nguyên liệu khảo sát. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu trước đây của nhóm khi phân tích trên các loại nguyên liệu, trong đó Bạch đàn cũng là đối tượng có hàm lượng polyphenol cao nhất (Nguyen *et al*., 2024). Polyphenol là sản phẩm trao đổi chất thứ cấp của thực vật, được xem là các phân tử tín hiệu trong cơ chế tự bảo vệ của thực vật nhằm chống tại các tác nhân gây bệnh (Shen *et al.*, 2022). Các phenolic acid trong nhóm polyphenol được cho là có khả năng kháng khuẩn và kháng nấm nhờ các tương tác kỵ nước với các thành phần của màng tế bào dẫn đến rò rỉ các nội chất bên trong tế bào; ngoài ra khả năng kháng khuẩn của flavonoid còn được ghi nhận nhờ hoạt tính ức chế DNA gyrase và giảm tính lưu động của màng tế bào vi khuẩn (Singh *et al.*, 2017). Việc sử dụng các cao chiết Bạch đàn, Neem, Xuyến chi, Yên bạch và Măng cụt có hàm lượng polyphenol và falvonoid cao để sản xuất thuốc bảo vệ thực vật sinh học được xem là có tiềm năng phát triển với nguồn nguyên liệu thực vật sẵn có, phong phú và dễ tìm kiếm tại Việt Nam. Khả năng kháng nấm và kháng khuẩn hiệu quả của nhóm hợp chất polyphenol đã được chứng minh từ nhiều nghiên cứu tuy nhiên khả năng ức chế mầm bệnh không chỉ dựa vào hàm lượng polyphenol tổng số mà dựa vào đặc tính hóa học của từng hợp chất đơn lẻ. Các hợp chất điển hình phổ biến ở thực vật là gallic acid (GA), protocatechuic acid (PCA), cholorogenic acid (CGA), epicatechin (EC), quercetin (QE) và rutin (RU). Các hợp chất này ngày càng được quan tâm nhờ các hoạt tính sinh học như chống oxi hóa, kháng khuẩn và kháng nấm vượt trội, đó là lí do nhóm tiến hành xác định hàm lượng các hợp chất này ở các mẫu cao chiết.



Hình 3. Hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng của các loại cao chiết
BD) cao chiết Bạch đàn; YB) cao chiết Yên bạch; XC) cao chiết Xuyến chi; N) cao chiết lá Neem; MC) cao chiết vỏ Măng cụt

Định lượng một số polyphenol chủ yếu bằng RP-HPLC

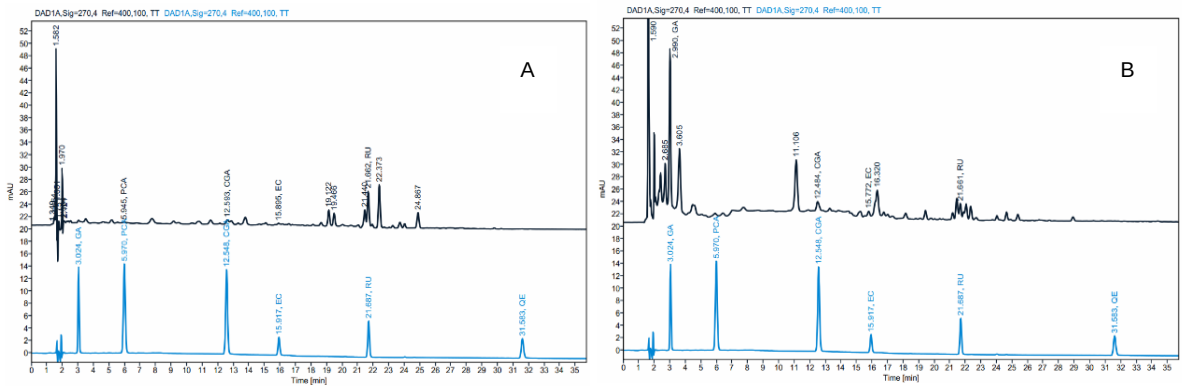
Bảng 1. Kết quả định lượng GA, PCA, CGA, EC, QE và RU trong cao chiết thực vật

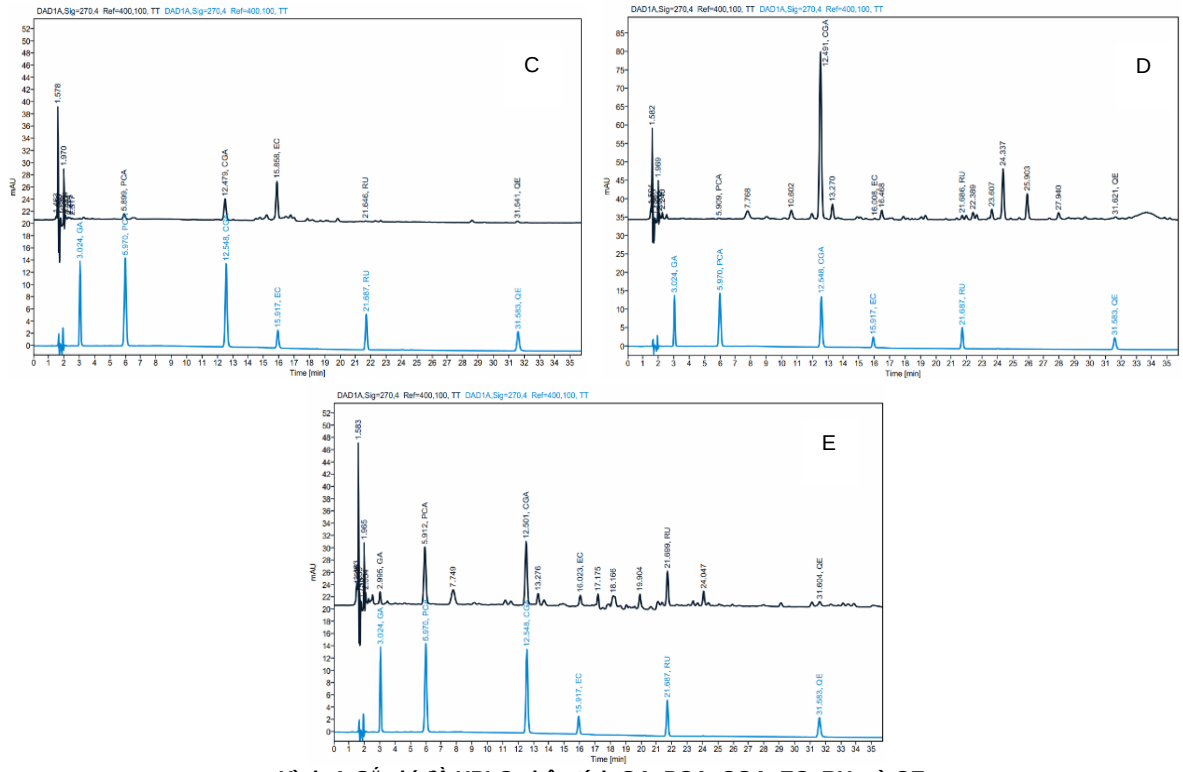
Nguyên liệu	Gallic acid (GA), mg/100 g	Protocatechuic acid (PCA), mg/100 g	Chlorogenic acid (CGA), mg/100 g	Epicatechin (EC), mg/100 g	Quercetin (QE), mg/100 g	Rutin (RU), mg/100 g
Bạch đàn	681,05 ± 101,06^{a}	ND	87,23 ± 27,59^{c}	272,55 ± 27,97^{b}	ND	367,33 ± 5,61^{ab}
Neem	ND	48,74 ± 5,32^{b}	77,54 ± 17,01^{c}	234,69 ± 16,07^{b}	ND	649,13 ± 55,81^{a}
Xuyến chi	71,69 ± 14,67^{b}	ND	1803,74 ± 130,44^{a}	200,42 ± 9,93^{b}	136,06 ± 6,05^{a}	250,99 ± 1,86^{bc}
Yên bạch	56,61 ± 0,69^{b}	478,20 ± 42,89^{a}	490,89 ± 27,33^{b}	164,01 ± 7,65^{c}	131,71 ± 14,99^{a}	687,17 ± 47,08^{a}
Măng cụt	ND	76,51 ± 4,61^{b}	169,93 ± 13,03^{c}	1180,89 ± 55,57^{a}	106,38 ± 5,33^{b}	29,40 ± 0,72^{c}

"ND" không phát hiện

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự a,b,c theo sau khác nhau có sự khác biệt về mặt thống kê (p<0,05).

Kết quả phân tích một số hợp chất phenolic acid và flavonoid chính có trong cao chiết thực vật được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 4. Các loại cao chiết chứa các hợp chất với hàm lượng khác nhau, mỗi loại sẽ chứa 1 – 2 thành phần nổi trội. Cao chiết lá Bạch đàn giàu GA nhất (681,05 mg/100 g); RU là thành phần nổi trội nhất trong cao chiết Yên bạch (687,17 mg/100 g) và lá Neem (649,13 mg/100 g), Xuyến chi chứa CGA cao nhất đạt 1803,74 mg/100 g, vỏ Măng cụt giàu EC nhất đạt 1180,89 mg/100 g, PCA được tìm thấy nhiều nhất trong cao chiết Yên bạch (478,20 mg/100 g). Ba hợp chất CGA, EC và RU đều hiện diện trong năm loại cao chiết trên và Yên bạch là cao chiết chứa 6 hợp chất khảo sát. Theo Shen và đồng tác giả (2022), các phenolic acid như là CGA, caffeic acid và *p*-coumaric acid được cho là các hợp chất có khả năng gây độc cho vi khuẩn và nấm bệnh; các hợp chất này tích lũy trong mô nhiễm bệnh ức chế sự phát triển của bào tử, sợi nấm cũng như bất hoạt các enzyme do nấm bệnh tạo ra. Hoạt động đối kháng *Aspergillus ochraceus* được chứng minh bởi cơ chế liên quan đến sự hình thành phức giữa các protein kinase, RU và QE làm ảnh hưởng đến quá trình truyền tín hiệu hoặc điều hòa cơ chế phát triển của nấm (Gómez-Maldonado *et al*., 2020). Ngoài ra, nghiên cứu chỉ ra khi kết hợp QE và RU và thuốc kháng nấm Amphotericin B, giúp tăng hiệu quả kháng trên các chủng nấm Candida sp. và Cryptococcus neoformans (Nguyen et al., 2024). Kết quả nghiên cứu tất cả các polyphenol (QE, quercetin 3-D-galactoside, cyanidin clorua và cyanidin 3-*O*-galactoside) đều có hoạt tính kháng nấm chống lại *C. gloeosporioides* (Sudheeran *et al.*, 2020). Ngoài ra, GA và RU được chứng minh có khả năng hỗ trợ tăng cường hệ thống phòng thủ bằng cách thúc đẩy sự biểu hiện của gen và tích lũy phenol, flavonoid và callose trong lúa (*Oryza sativa*) chống lại mầm bệnh (Singh *et al*., 2017). Tương tự, nghiên cứu của Zhou và đồng tác giả (2020) đã sử dụng GA chuyển đổi thành methyl gallate (MG) từ cây trà *Camellia sinensis* và cho thấy khả năng kháng nấm *C. camelliae* với EC_{50} lần lượt là 6,47 mg/mL và 2,44 mg/mL đối với GA và MG. Gómez-Maldonado và đồng tác giả (2020) đã báo cáo rằng GA, ellagic acid, ferulic acid, caffeic acid, và CGA có hoạt tính kháng nấm mạnh mẽ. Cơ chế hoạt động của các hợp chất này chống lại các vi sinh vật là khác nhau, CGA có tác dụng kháng nấm dựa trên khả năng phá vỡ cấu trúc màng tế bào, ly giải tế bào; ngoài ra CGA còn có tác dụng tăng cường hoạt động của các enzyme liên quan đến hệ thống phòng thủ thực vật và biểu hiện các gene quan trọng liên quan đến con đường truyền tính hiệu salicylic acid.





Hình 4. Sắc kí đồ HPLC phân tích GA, PCA, CGA, EC, RU, và QE

A. Neem; B. Bạch đàn; C. Măng cụt; D. Xuyến chi và E. Yên bạch. Đường màu xanh là sắc kí đồ của hỗn hợp chất chuẩn

KẾT LUẬN

Cao chiết lá Bạch đàn thể hiện hoạt tính kháng nấm *Colletotrichum capsici* cao nhất đạt 61,31% sau 9 ngày cấy, tiếp theo là cao chiết Xuyến chi 47,02% và thấp nhất là Măng cụt. Cao chiết Bạch đàn chứa hàm lượng polyphenol và flavonoid nổi trội đạt lần lượt 284,97 mg/g và 16,15 mg/g. Hàm lượng gallic acid cao nhất ở cao chiết lá Bạch đàn 681,05 mg/100 g, Xuyến chi chứa chlorogenic acid vượt trội đạt 1803,74 mg/100 g. Cao chiết Yên bạch đặc trưng với sự hiện diện hầu hết các hợp chất khảo sát, tiêu biểu là protocatechuic acid và rutin đạt lần lượt 478,2 mg/100 g và 687,17 mg/100 g. Rutin còn là thành phần chính của lá Neem với 649,13 mg/100 g, vỏ Măng cụt giàu epicatechin nhất đạt 1180,89 mg/100 g. Cơ chế tác động cụ thể của các hợp chất cần phải được nghiên cứu sâu hơn để sử dụng hiệu quả nguồn nguyên liệu giàu các hợp chất sinh học

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Don L, Van T, Phuong Vy T, and Kieu P (2007). *Colletotrichum* spp. attacking on chilli pepper growing in Vietnam, Country Report. The First International Symposium on Chilli Anthracnose. *National Horticultural Research Institute, Rural Development of Administration, Republic of Korea*: 24-29.

Gómez-Maldonado D, Lobato-Calleros C, Aguirre-Mandujano E, Leyva-Mir SG, Robles-Yerena L, and Vernon-Carter EJ (2020). Antifungal activity of mango kernel polyphenols on mango fruit infected by anthracnose. *LWT,* 126: 109337-109340.

Lê Thanh Toàn và Mai Hữu Tín (2020). Hiệu quả của dịch trích thực vật đối với nấm *Colletotrichum* sp. gây thán thư trên trái ớt. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 129: 113-124.

Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, and Li HB (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients,* 6: 6020-6047.

Nguyen DHV, Nguyen TVA, Truong QT, and Trinh TPL (2019). Optimization of total phenolic extraction of *Chromolaena odorata* leaf for antifungal activity against plant pathogens. *JAD,* 18: 38-48.

Nguyen VDV, Nguyen TT, Huynh TN, Ho HH, Nguyen AT, and Trinh LTP (2024). Effective control of Fusarium wilt on tomatoes using a combination of phenolic-rich plant extracts. *Eur J Plant Pathol:* 1-18.

Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, and Jin B (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem,* 383: 132531-132539.

Singh A, Gupta R, and Pandey R (2017). Exogenous application of rutin and gallic acid regulate antioxidants and alleviate reactive oxygen generation in *Oryza sativa* L. *Physio Mol Bio Plants,* 23: 301-309.

Sudheeran PK, Ovadia R, Galsarker O, Maoz I, Sela N, Maurer D, Feygenberg O, Oren SM, and Alkan N (2020). Glycosylated flavonoids: fruit's concealed antifungal arsenal. *New Phytol,* 225: 1788-1798.

Trinh LTP, Choi YS, and BaeHJ (2018). Production of phenolic compounds and biosugars from flower resources via several extraction processes. *Ind Crops Prod,* 125: 261-268.

Woisky RG, and Salatino A (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Api Res,* 37: 99-105.

Wu T, Zang X, He M, Pan S, and Xu X (2013). Structure–activity relationship of flavonoids on their anti-Escherichia coli activity and inhibition of DNA gyrase. *J Agri Food Chem,* 61: 8185-8190.

Zhou X, Zeng L, Chen Y, Wang X, Liao Y, Xiao Y, Fu X, and Yang Z (2020). Metabolism of gallic acid and its distributions in tea (*Camellia sinensis*) plants at the tissue and subcellular levels. *In J Mol Sci,* 21: 5684-5697.

INHIBITORY EFFECT OF POLYPHENOL-RICH PLANT EXTRACTS ON *Colletotrichum capsici*

Nguyen Thanh Danh[1], Pham Phuong Trinh[1], Le My Huyen[1], Nguyen Duong Hoang Vinh[2], Nguyen Quynh Anh[3], Trinh Thi Phi Ly[1,2*]

[1]*Faculty of Biological sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City*

[2]*Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City*

[3]*Lab2Life Science and Technology Co., Ltd*

SUMMARY

Polyphenols are plant secondary metabolites that display inhibitory effect on plant pathogens. This study investigated antifungal activity of polyphenol-rich extracts including *Eucalyptus camaldulensis*, *Bidens pilosa*, *Chromolaena odorata*, *Azadirachta indica* leaves and *Garcinia mangostana* peel against *Colletotrichum capsici,* which causes anthranose in chilli peppers. As results, all plant extracts showed the ability to inhibit the growth of *C. capsici*, in which *Eucalyptus camaldulensis* extract exhibited the highest antifungal activity of 61.31% at 1% extract after 9 days of culture. Quantitative analysis revealed that eucalyptus extract had the highest total polyphenol and flavonoid content of 284.97 mg/g and 16.15 mg/g, respectively. The main phenolic compounds included gallic acid in eucalyptus extract; rutin with the highest levels in *Chromolaena odorata* and *Azadirachta indica* extract*;* chlorogenic acid presented in *Bidens pilosa*; and epicatechin in mangosteen peel extract. The results provided knowledge to develop polyphenol-derived products as an alternative to chemical protectants towards sustainable agriculture.

Keywords: Antifungal activity, *Colletotrichum capsici,* flavonoid, plant extracts, polyphenol.

* Author for correspondence: Tel: 0379700703; Email: phily@hcmuaf.edu.vn

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN QUÁ TRÌNH SINH TRƯỞNG VÀ SINH PROTEASE NGOẠI BÀO CỦA CHỦNG *Bacillus subtilis* NT20

Ngô Đức Quốc, Hồ Thị Diệu Hiền, Đinh Thị Hòa, Phùng Thị Bích Hòa*

Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

TÓM TẮT

Phần lớn các chủng *Bacillus subtilis* biểu hiện protease cũng như lượng enzyme tiết ra thay đổi tùy thuộc vào chủng và điều kiện môi trường được sử dụng. Nghiên cứu này nhằm lựa chọn một số điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào của chủng *Bacillus subtilis* NT20. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng được đánh giá dựa trên mật độ tế bào trong dịch nuôi cấy đo ở bước sóng 600 nm bằng máy đo màu quang phổ và hoạt độ protease được đánh giá dựa trên sự thủy phân casein. Các điều kiện nuôi cấy được lựa chọn bao gồm nguồn carbon, nguồn nitrogen, pH và độ thoáng khí của môi trường LB cơ bản. Chủng *B. subtilis* NT20 đạt năng suất sinh khối cao nhất là OD_{600} 2,0 với hoạt độ protease đạt 235,6 U/mL trong điều kiện nuôi cấy sử dụng 2,0% (w/v) glucose là nguồn carbon chính, 2,5% (w/v) peptone là nguồn nitrogen chính, pH 8, độ thoáng khí 92%, nhiệt độ 37^{o}C và lắc 200 rpm sau 24 giờ.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, điều kiện nuôi cấy, mật độ tế bào, protease, vi khuẩn.

MỞ ĐẦU

Protease là một trong những enzyme công nghiệp quan trọng nhất, chiếm gần 60% tổng sản lượng enzyme trên toàn thế giới (Kalisz *et al*., 2006). Protease có trong động vật, thực vật và vi sinh vật (Sharma *et al*., 2017). Protease được sử dụng rộng rãi trong chất tẩy rửa, ngành công nghiệp da, chẩn đoán y tế, phim X-quang, trong ngành công nghiệp dệt, thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Do đó, nhiều công ty đã bắt đầu sản xuất protease thương mại (Keshapaga *et al*., 2023).

Khi phân lập enzyme protease ở quy mô công nghiệp cho mục đích thương mại, tối ưu hóa chi phí là vấn đề được quan tâm. Vì vậy, protease vi khuẩn là một trong những lựa chọn tốt nhất. Ở vi khuẩn, protease chủ yếu được sản xuất ngoại bào, có hiệu suất cao, chịu được nhiệt độ cao và hoạt động trong phạm vi pH rộng nên phù hợp hơn cho các ứng dụng công nghiệp (Adrio, Demain, 2014).

Chi *Bacillus* là nguồn vi khuẩn quan trọng nhất trong sản xuất protease ngoại bào và có khả năng sản xuất ra nhiều enzyme phân giải protein trung tính và kiềm với các đặc tính đáng chú ý, như độ ổn định cao đối với nhiệt độ khắc nghiệt, độ pH, dung môi hữu cơ, chất tẩy rửa và hợp chất oxy hóa. *B. subtilis* được sử dụng rộng rãi như một nhà máy "tế bào" sản xuất các enzyme, hợp chất kháng vi sinh vật cho ngành hóa công nghiệp, nông nghiệp và y học (Zhang *et al*., 2023). Mỗi vi sinh vật hoặc chủng có các điều kiện cụ thể để sản xuất enzyme tối đa (Sharma *et al*., 2017). Do đó, đã có một số nghiên cứu để sản xuất protease từ chi *Bacillus* có hiệu quả về mặt chi phí, bao gồm xác định các điều kiện nuôi cấy và điều kiện sản xuất enzyme (Işık *et al*., 2024).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định các điều kiện nuôi cấy tối ưu của chủng *B. subtilis* NT20 để cải thiện khả năng sinh protease kiềm ngoại bào.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* NT20 được phân lập từ cỏ khô và được lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Di truyền và Vi sinh, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế.

Chủng được giữ trong glycerol 30% (v/v) ở -80^{o}C. Trước khi sử dụng, chủng được hoạt hóa trên môi trường LB (Luria-Bertani) rắn và giữ ở 4^{o}C. Môi trường LB cơ bản (w/v) gồm: 1% tryptone, 0,5% cao nấm men, 1% NaCl.

Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy

Các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của chủng *B. subtilis* NT20 được nghiên cứu độc lập với nhau bằng cách thay đổi các yếu tố khảo sát trong môi trường LB cơ bản. Kết quả của thí nghiệm trước sẽ được áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Các yếu tố của môi trường cơ bản không thay đổi trong quá trình khảo sát bao gồm: nhiệt độ 30^{o}C, nuôi lắc 200 vòng/phút (rpm), thời gian nuôi 24 giờ.

Ảnh hưởng của nồng độ đường glucose

Nguồn carbon được bổ sung vào môi trường LB cơ bản là glucose (w/v) với nồng độ khảo sát 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 và 3%.

Ảnh hưởng của nồng độ nitrogen

Nguồn nitrogen được bổ sung để thay thế nguồn nitrogen trong môi trường LB cơ bản là peptone với nồng độ khảo sát 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 và 3%.

Ảnh hưởng của pH

Tiến hành lên men chủng *B. subtilis* NT20 trong các nghiệm thức chứa môi trường LB với các giá trị pH lần lượt là 6; 6,5; 7; 7,5; 8 và 8,5.

Ảnh hưởng của độ thoáng khí

Độ thoáng khí được tính bằng tỉ lệ thể tích bình trống (không chứa môi trường) trên thể tích toàn bình, độ thoáng khí càng cao thì nồng độ oxy hòa tan vào môi trường càng lớn. Chủng *B. subtilis* NT20 được lên men trong các bình 250 mL chứa môi trường với thể tích lần lượt 10; 20; 30; 40; 50 và 60 mL.

Xác định mật độ vi khuẩn

Dịch nuôi cấy của chủng *B. subtilis* NT20 sau 24 giờ nuôi cấy lỏng với tốc độ lắc 200 rpm ở 30^{o}C ở các điều kiện khảo sát khác nhau được pha loãng 40 lần với nước cất 2 lần và được đo bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm (OD_{600}) để xác định mật độ vi khuẩn (Li *et al*., 2023). Đối chứng là môi trường LB cơ bản.

Thu nhận protease

Song song với việc xác định mật độ vi khuẩn, tiến hành thu protease thô từ canh trường nuôi cấy bằng cách ly tâm 14000 rpm trong 10 phút ở 4^{o}C. Dịch enzyme thô được bảo quản ở 4^{o}C và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo (*Shad et al*., 2024).

Xác định hoạt độ protease

Hoạt độ protease trong dịch enzyme thô được xác định dựa trên sự thủy phân protein bằng protease (Chandrasekaran *et al*., 2015), sử dụng casein làm chất nền. Dung dịch casein (0,65%) được chuẩn bị trong đệm Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5). 5 mL dung dịch casein 0,65% được cho vào các ống nghiệm, ủ ở 37^{o}C trong 5-10 phút. 1 mL enzyme thô được thêm vào mỗi ống nghiệm, lắc nhẹ và ủ ở 37^{o}C trong 30 phút. Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm 10% (w/v) Trichloroacetic acid lạnh (TCA). Các ống nghiệm được ủ ở 37^{o}C trong 30 phút, sau đó mẫu được ly tâm ở 4°C, 14000 rpm trong 10 phút. Sau đó, 2 mL dịch nổi được cho vào ống nghiệm mới, thêm vào đó 5 mL Na_2CO_3 0,5 M và 1 mL thuốc thử Follin's Ciocalteus 1 N. Hỗn hợp này được khuấy nhẹ, ủ trong 30 phút ở 37°C đến khi xuất hiện màu xanh lam. Độ hấp thụ màu xanh lam được ghi nhận ở bước sóng 660 nm so với mẫu thuốc thử trắng (môi trường LB cơ bản) bằng máy quang phổ.

Sau đó, dựa vào đồ thị chuẩn của tyrosin để tính lượng sản phẩm do enzyme xúc tác tạo nên. Đồ thị đường chuẩn tyrosin và hoạt độ enzyme được xác định theo mô tả bởi Lowry và đồng tác giả (1951) có cải tiến.

Nồng độ tyrosine được tính toán bằng phương trình hồi quy từ đường cong tyrosine chuẩn. Hoạt độ của enzyme (U/mL) được tính toán bằng công thức được đưa ra bởi Tunga và đồng tác giả (2003).

Hoạt độ protease (U/mL) = $\frac{T \times V1}{t \times V2 \times V3}$

Trong đó:

T: µM tyrosine giải phóng

V1: Tổng thể tích hỗn hợp phản ứng (mL)

t: Thời gian phản ứng (phút)

V2: Thể tích enzyme dùng cho phản ứng (mL)

V3: Thể tích dùng để đo cường độ quang sau khi phản ứng với thuốc thử Folin (mL)

Một đơn vị hoạt độ protease được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để thủy phân casein giải phóng 1 µM tyrosine trong một phút ở điều kiện thử nghiệm chuẩn về pH và nhiệt độ.

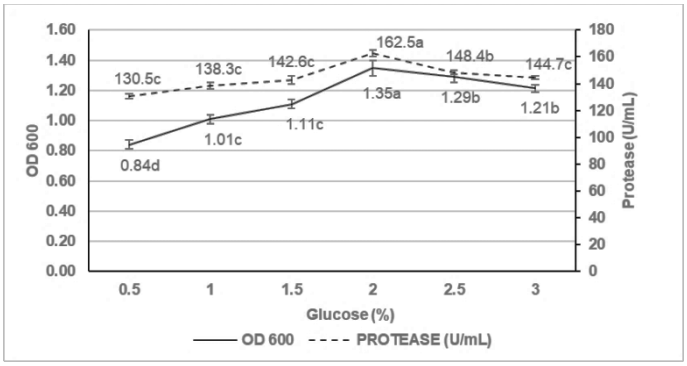
Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần để tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Số liệu thu thập được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học bằng chương trình thống kê trong Excel 2010 và dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình của ba lần lặp lại ± sai số chuẩn trong one-way ANOVA với Duncan's test ($p<0,05$) bằng chương trình SPSS (ver. 20.0).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ carbon đến sinh khối và khả năng sinh protease ngoại bào của *B. subtilis* NT20

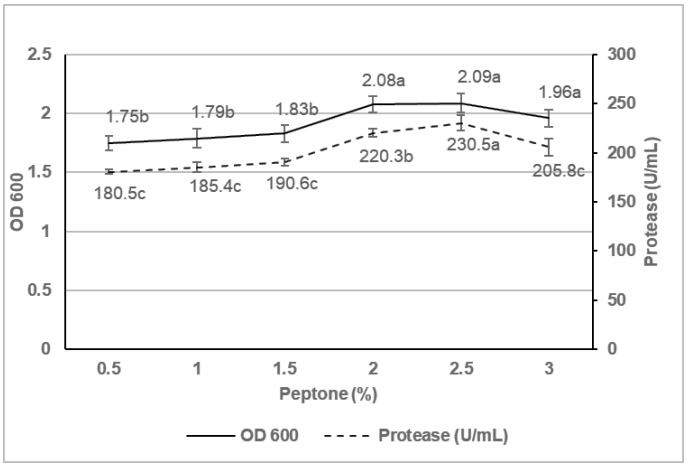
Nguồn carbon là glucose cho thấy, mật độ chủng *B. subtilis* NT20 đạt giá trị cao nhất là 1,35 ở nồng độ 2% (Hình 1). Khi nồng độ glucose thấp hơn (từ 0,5% đến 1,5%), mật độ vi khuẩn đạt từ 0,84 đến 1,11, quá thấp không đủ để kích thích quá trình sinh tổng hợp protease mạnh. Ngược lại, khi bổ sung nồng độ glucose cao từ 2,5% đến 3%, mật độ vi khuẩn giảm dần từ 1,29 còn 1,21. Đồng thời với xác định mật độ vi khuẩn trong các nồng độ glucose khảo sát, chúng tôi tiến hành xác định hoạt độ của protease ngoại bào, kết quả cho thấy hoạt độ protease tỉ lệ thuận với mật độ vi khuẩn. Hoạt độ protease ở glucose 2% đạt cao nhất (162,5 U/mL). Trên cơ sở đó, glucose 2% được chọn là nguồn carbon cho các thí nghiệm khảo sát tiếp theo. Protease từ *Bacillus* phần lớn được sản xuất trong pha tĩnh và do đó, việc điều chỉnh hàm lượng carbon ảnh hưởng đến mật độ vi khuẩn và khả năng sinh protease ngoại bào của vi khuẩn. Quá trình sản xuất protease tiêu tốn nhiều năng lượng. Khi nguồn glucose dồi dào, vi khuẩn sẽ tiết kiệm năng lượng bằng cách giảm tổng hợp các protein không cần thiết, bao gồm cả protease để tối đa hóa hiệu quả tăng trưởng (Adeniyi, 2023). Hàm lượng glucose cao cũng có thể làm thay đổi quá trình chuyển hóa bên trong tế bào, dẫn đến sự thay đổi các con đường chuyển hóa glucose có lợi cho tế bào thay vì tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp như protease (Liu *et al.,* 2024).



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ glucose đến mật độ vi khuẩn và hoạt độ protease của *B. subtilis* NT20

Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến sinh khối và khả năng sinh protease ngoại bào của *B. subtilis* NT20

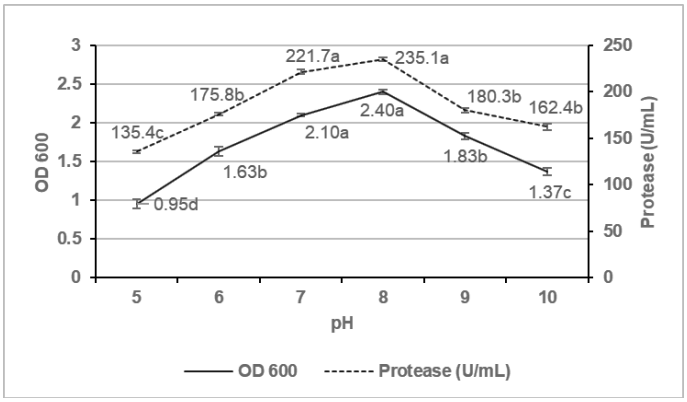
Kết quả Hình 2 cho thấy, với nồng độ 2,5% peptone trong môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự tăng trưởng của chủng *B. subtilis* NT20 với mật độ đạt cao nhất là 2,98. Khi nồng độ peptone thấp hơn (từ 0,5% đến 2,0%), mật độ vi khuẩn đo được từ 1,75 đến 2,08. Ngược lại khi bổ sung nồng độ peptone cao trên 2,5% mật độ vi khuẩn giảm dần từ 2,09 còn 1,96. Đồng thời với sự tăng mật độ vi khuẩn ở nồng độ peptone từ 2-2,5%, hoạt độ protease cũng đạt cao nhất ở peptone 2,5% (230,5 U/mL). Do đó, peptone nồng độ 2,5% được chọn là nguồn peptone cho các thí nghiệm khảo sát tiếp theo. Nguồn nitrogen và nồng độ của nó trong môi trường nuôi cấy là những yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp protease (Zhang *et al*., 2023). Mỗi loài vi khuẩn khác nhau sẽ thích hợp với tỉ lệ carbon/nitrogen trong môi trường sống nhất định (Carvalho *et al*., 2010). Nguồn nitrogen đóng vai trò cung cấp cơ chất để vi khuẩn tổng hợp nên các hợp chất chứa nitrogen cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của chúng. Do đó nguồn nitrogen bổ sung vào môi trường cần phải cân đối với nguồn carbon mà vi khuẩn đang sử dụng.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ peptone đến mật độ vi khuẩn và hoạt độ protease của *B. subtilis* NT20

Ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh khối và khả năng sinh protease ngoại bào của *B. subtilis* NT20

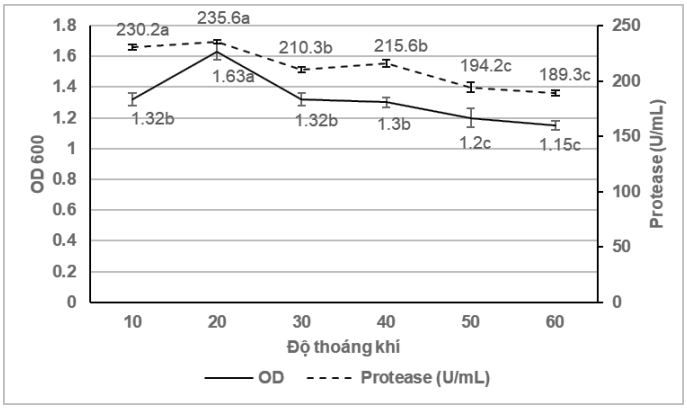
pH ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh trưởng của vi sinh vật. Kết quả cho thấy (Hình 3), mật độ chủng *B. subtilis* NT20 khi nuôi cấy trong môi trường pH 8,0 đạt hiệu quả cao nhất là 2,40, đồng thời hoạt độ protease của dịch enzyme thô cũng thu được với kết quả cao nhất, đạt 235 U/mL, sau đó hoạt độ protease giảm dần ở pH 9-10. Ở pH acid (pH 5-6) cũng làm giảm sự sinh trưởng của vi khuẩn và khả năng sản xuất enzyme (Pan *et al.*, 2023). Vì vậy, pH 8 được chọn là pH môi trường trong các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả pH của chủng *B. subtilis* NT20 trong nghiên cứu này phù hợp với các nghiên cứu khác. Theo nghiên cứu của Anandharaj và đồng tác giả (2016) cho thấy, pH 8,0 là thích hợp nhất để thu protease có hoạt tính cao nhất từ *B. alkalitelluris* TWI3. Kết quả nghiên cứu của Sun và đồng tác giả (2023) cũng cho thấy pH 8,0 tạo ra hoạt độ của protease kiềm tối đa (640 U/mL).



Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến mật độ vi khuẩn và hoạt độ protease của *B. subtilis* NT20

Ảnh hưởng của độ thoáng khí đến sinh khối và khả năng sinh protease ngoại bào của *B. subtilis* NT20

Các loài *Bacillus* là vi khuẩn kỵ khí tùy ý, và chúng có thể phát triển trong điều kiện kỵ khí hoặc hiếu khí (Carlso *et al.*, 2020). Tuy nhiên, dưới sự hiện diện của oxy, các loài này phát triển tốt hơn so với các điều kiện mà oxy bị hạn chế hoặc không có. Thông thường, đối với các vi khuẩn hiếu khí nồng độ oxy cao làm tăng khả năng sinh trưởng, rút ngắn pha tiềm phát. Nồng độ oxy thấp có thể ức chế, làm suy giảm khả năng sinh trưởng của vi khuẩn (Zhang *et al*., 2023).



Hình 4. Ảnh hưởng của độ thoáng khí đến mật độ vi khuẩn và hoạt độ protease của *B. subtilis* NT20

Kết quả ở Hình 4 cho thấy, mật độ vi khuẩn tỷ lệ thuận với độ thoáng khí trong bình nuôi cấy. Mật độ vi khuẩn đạt cao nhất 1,63 khi nuôi cấy trong môi trường có độ thoáng khí 92% với thể tích môi trường nuôi cấy là 20 mL dịch môi trường nuôi cấy/thể tích bình nuôi cấy 250 mL, mật độ vi khuẩn giảm dần khi tăng lượng môi trường nuôi cấy. Hoạt độ protease của *B. subtilis* NT20 cao nhất ở môi trường có độ thoáng khí 92%. Lượng môi trường nuôi cấy ban đầu tối ưu là điều cần thiết cho quá trình sản xuất protease. Nếu lượng môi trường nuôi cấy quá ít, số lượng vi khuẩn không đủ, từ đó sẽ kéo dài thời gian lên men và làm giảm sản lượng sản phẩm mục tiêu tạo ra; ngược lại, lượng môi trường nuôi cấy quá lớn cũng sẽ gây ra tình trạng thiếu oxy hòa tan và ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp sản phẩm mục tiêu. Việc tìm ra độ thoáng khí tối ưu là rất quan trọng trong quá trình lên men (Zhang *et al*., 2023). Điều này phù hợp với nghiên cứu của Suttikul và đồng tác giả (2022) ở chủng *B. subtilis* GD5 tạo ra nồng độ 2,3-BD cao nhất (7,28 g/L) ở điều kiện hiếu khí. Hoạt động của enzyme protease tăng khi dịch nuôi cấy tăng và đạt tối đa ở mức 5%. Khi dịch nuôi cấy tiếp tục tăng, hoạt động của enzyme protease có xu hướng giảm.

KẾT LUẬN

Chủng *B. subtilis* NT20 trong nghiên cứu này cho thấy khả năng sinh trưởng và sinh protease ngoại bào cao nhất (OD_{600} 2,0; 235,6 U/mL) khi nuôi cấy trong môi trường tối ưu chứa nguồn carbon là glucose với nồng độ 2%, nitrogen là peptone với nồng độ 2,5%, pH 8,0 và độ thoáng khí 92% (20/250 mL) ở nhiệt độ 30^{o}C, nuôi lắc 200 rpm và thời gian nuôi 24 giờ.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được tài trợ từ Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế qua đề tài khoa học và công nghệ cấp Trường với mã số T.24.TN.106.10.*

Tài liệu tham khảo

Adeniyi AT (2023). *Development of Bioprocessing for Biological Ammonia Production* (Master's thesis, North Dakota State University).

Adrio J, Demain AL (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomol*, *4*(1): 117-139.

Carlson HK, Lui LM, Price MN, Kazakov AE, Carr AV, Kuehl JV, Owens TK, Nielsen T, Arkin AP, Deutschbauer AM (2020). Selective carbon sources influence the end products of microbial nitrate respiration. *ISME J*, *14*(8): 2034-2045.

Carvalho ALUD, Oliveira FHPCD, Mariano RDLR, Gouveia ER, Souto-Maior AM (2010). Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. *Braz Arch Biol Technol*, *53*: 643-652.

Chandrasekaran S, Kumaresan SSP, Manavalan M (2015). Production and optimization of protease by filamentous fungus isolated from paddy soil in Thiruvarur District Tamilnadu. *J Appl Biol Biotechnol*, *3*(6): 66-69.

Işık K, Yırtıcı Ü, Güldeste B, Ergene A (2024). Molecular identification of protease producer ORSK-4 strain and determination of optimum enzyme production conditions. *Eurasian J Bio Chem Sci*, *7*(1): 26-40.

Kalisz HM (2006). Microbial proteinases. *Enzyme studies*, 1-65.

Keshapaga UR, Jathoth K, Singh SS, Gogada R, Burgula S (2023). Characterization of high-yield *Bacillus subtilis* cysteine protease for diverse industrial applications. *Braz J Microbiol*, 54(2): 739-752.

Li J, Yang J, Xin W, Wu S, Wang X, Wang C, Zhang Z (2023). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by a combination of high-pressure thermal treatment and potassium sorbate. *Food Microbiol*, *115*: 104345.

Liu Y, Sun G, Li J, Cheng P, Song Q, Lv W, Wang C (2024). Starter molds and multi-enzyme catalysis in koji fermentation of soy sauce brewing: A review. *Food Res Int*, 114273.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A L, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, *193*(1): 265-275.

Pan I, Nanjundan K, Achuthan A, Issac P K, Rajagopal R, Chang SW, Bhat SA, Ravindran B (2023). Exploration of compost soil for the production of thermo-stable Bacillus protease to synthesize bioactive compounds through soy protein hydrolysis. *Agronomy*, *13*(4): 1019.

Sharma KM, Kumar R, Panwar S, Kumar A (2017). Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *J Genet Eng Biotechnol*, *15*(1): 115-126.

Sun B, Zou K, Zhao Y, Tang Y, Zhang F, Chen W, Tang X, Chang C, Zheng Y (2023). The fermentation optimization for alkaline protease production by *Bacillus subtilis* BS-QR-052. *Front Microbio*, 14: 1301065.

Suttikul S, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A (2022). Biotechnological production of optically pure 2, 3-butanediol by *Bacillus subtilis* based on dissolved oxygen control Strategy. *Fermentation*, *9*(1): 15.

Tunga R, Shrivastava B, Banerjee R (2003). Purification and characterization of a protease from solid state cultures of Aspergillus parasiticus. *Process Biochem*, *38*(11): 1553-1558.

Zhang Y, Hu J, Zhang Q, Cai D, Chen S, Wang Y (2023). Enhancement of alkaline protease production in recombinant Bacillus licheniformis by response surface methodology. *Bioresour Bioprocess*, *10*(1): 27.

EFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON GROWTH AND EXTRACELLULAR PROTEASE PRODUCTION FROM *Bacillus subtilis* NT20

Ngo Duc Quoc, Ho Thi Dieu Hien, Dinh Thi Hoa, Phung Thi Bich Hoa*

University of Education, Hue University

SUMMARY

This study aims to select the optimal culture conditions for the growth and improvement of extracellular protease production of the *Bacillus subtilis* NT20 strain. The effect of culture conditions on extracellular protease production was evaluated by measuring the biomass in the culture medium at 600 nm using a spectrophotometer and assessing the resulting protease activity. The selected culture conditions included carbon source, nitrogen source, pH and aeration in basical LB (Luria-Bertani) broth medium. The highest biomass and protease activity of *B. subtilis* NT20 strain (OD600 2.0; 235.6 U/mL, respectively) were found in the culture conditions using 2.0% (w/v) glucose as the main carbon source, peptone concentration of 2.5% (w/v), pH 8 of liquid culture, 92% breathability, 37^{o}C of incubation and shaking 200 rpm, 24 hours of culture time.

Keywords: *Bacillus subtilis*, fermentation condition, cell biomass, protease, microorganism.

* Author for correspondence: Tel: 0905197959; Email: ptbhoa@hueuni.edu.vn

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN NHỮNG CHỦNG XẠ KHUẨN TRIỂN VỌNG CÓ KHẢ NĂNG SINH ENZYME NGOẠI BÀO TỪ ĐẤT VÙNG RỄ CÂY TRỒNG VÀ THỬ NGHIỆM KHẢ NĂNG HẠN CHẾ TUYẾN TRÙNG

Trịnh Thị Sen[1], Nguyễn Thị Hoài[1], Lê Văn Chánh[1], Ngô Thị Diễm My[2], Nguyễn Quang Cơ[3*]

[1]*Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*

[2]*Trường Cao đẳng Sư phạm Đắk Lắk*

[3]*Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế*

TÓM TẮT

Xạ khuẩn là vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra nhiều loại kháng sinh, enzyme được sử dụng nhiều trong nông nghiệp. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành phân lập nhằm tìm ra các chủng xạ khuẩn bản địa từ 3 tỉnh Thừa Thiên Huế, Quảng Trị và Nghệ An. Kết quả thu được 18 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh chitinase, trong đó có 4 chủng có khả năng sinh chitinase mạnh với đường kính vòng phân giải lớn hơn 20mm. 3 chủng xạ khuẩn NR1, QC1 và QC2 có khả năng sinh đồng thời chitinase và protease được lựa chọn để thử nghiệm khả năng diệt tuyến trùng. Kết quả cho thấy, dịch xạ khuẩn của các chủng tiềm năng đều có khả năng tiêu diệt tuyến trùng, trong đó hỗn hợp dịch xạ khuẩn NR1 + QC1 + QC2 có khả năng diệt tuyến trùng lên tới 75% ở thời điểm 48 giờ sau khi xử lý. Đây là những chủng xạ khuẩn có tiềm năng ứng dụng trong phòng trừ sinh học và sản xuất các chế phẩm vi sinh.

Từ khóa: Chitinase, dịch xạ xuẩn, protease, enzyme ngoại bào, tuyến trùng.

MỞ ĐẦU

Xạ khuẩn là các vi sinh vật quan trọng trong hệ sinh thái đất, với nhiều vai trò và đóng góp đáng kể trong việc sản xuất ra các enzyme ngoại bào như: protease, lipase, amylase, cellulase, urease … Các enzyme này có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các chất đơn giản hơn để xạ khuẩn và các sinh vật khác trong đất có thể hấp thu và sử dụng (Sharma *et al.,* 2019). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh xạ khuẩn có khả năng ức chế các tác nhân gây bệnh thực vật như nấm và vi khuẩn gây hại trên cây trồng. Xạ khuẩn *Streptomyces rochei* kết hợp với *Trichoderma harzianum* được sử dụng để kiểm soát bệnh thối rễ trên cây ớt do *Phytophthora* sp. (Ezziyyani *et al.,* 2007). *Streptomyces lavendulae* và *Streptomyces coelicolor* kháng vi khuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gây bệnh thối củ hành (Abdallah *et al.,* 2013). Bên cạnh đó, xạ khuẩn còn được ứng dụng trong hạn chế bệnh thán thư trên cây ớt cho hiệu quả cao (Nguyễn Thị Yến *et al.,* 2016). Tiềm năng của xạ khuẩn là rất lớn do xạ khuẩn có khả năng sinh ra các enzyme ngoại bào trong đó có chitinase. Chitinase từ xạ khuẩn *Streptomyces sporovirgulis* cũng được sản xuất và có tác dụng ngăn ngừa bệnh đốm lá bắp cải (Swiontek Brzezinska *et al.,* 2013) và được xem là tác nhân kiểm soát sinh học hiệu quả.

Hiện nay, tuyến trùng đang được quan tâm nghiên cứu do những tác hại mà chúng gây ra cho sản xuất nông nghiệp. Tuyến trùng tấn công hệ thống mạch rễ gây ra sự thiếu hụt chất dinh dưỡng và cản trở quá trình vận chuyển nước dẫn đến cây bị vàng lá và làm giảm năng suất cây trồng, cây bị nhiễm tuyến trùng nặng có thể chết (Bertrand *et al.,* 2000). Việc phòng tuyến trùng khá phức tạp do khả năng di chuyển và đặc tính có thể tồn tại lâu trong đất của tuyến trùng, nên sử dụng thuốc hóa học thường phải dùng nhiều lần và chi phí cao (Lê Đức Khánh, 2015). Một trong những giải pháp có tiềm năng thay thế cho các thuốc hoá học chính là sử dụng các biện pháp sinh học trong đó có sử dụng các chất ức chế sinh sản, phá vỡ thành tế bào của tuyến trùng. Vì vậy, việc phân lập và chọn lọc các chủng có khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào mạnh từ các nguồn xạ khuẩn bản địa đóng vai trò quan trọng trong việc tạo tiền đề sản xuất các chế phẩm vi sinh an toàn cho sản xuất nông nghiệp.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phương pháp phân lập xạ khuẩn

Các mẫu đất vườn ở tầng đất 5 - 20 cm được thu thập tại 3 tỉnh Thừa Thiên Huế, Quảng Trị và Nghệ An để tuyển chọn các chủng xạ khuẩn Sau khi thu thập, các mẫu đất được cho vào túi nilon và mang về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập theo phương pháp của Biền Văn Minh (2012) 10 g đất được hoà tan hoàn toàn bằng máy lắc trong 90 mL nước cất đã hấp vô trùng; Lấy 100 µL dung dịch đất sau pha loãng được trải đều lên đĩa Petri có chứa môi trường Gause cải tiến (tinh bột 20,0 g/L; KNO_3 1,0 g/L; $K_2HPO_4.3H_2O$ 3,0 g/L; $MgSO4.7H_2O$ 3,0 g/L; $FeSO_4$ 0,01 g/L; NaCl 0,5 g/L; agar 20,0 g/L) và ủ ở nhiệt độ 35 °C từ 5 – 7 ngày. Khi các khuẩn lạc xuất hiện, quan sát và nhận diện các khuẩn lạc đặc trưng của xạ khuẩn, tiến hành tuyển chọn các khuẩn lạc mọc tách biệt,

hình dạng to để cấy chuyền vào các ống thạch nghiêng để bảo quản (Nguyễn Lân Dũng *et al.,* 2012). Các chủng xạ khuẩn được bảo quản ở 4°C để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Đánh giá khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của xạ khuẩn

Khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn được đánh giá thông qua đường kính vòng phân giải cơ chất trên môi trường agar (Nguyễn Thị Diệu Hạnh *et al.,* 2021). Môi trường Gause cải tiến có chứa 1% chitin được sử dụng để đánh giá khả năng sinh tổng hợp chitinase ngoại bào. Nguồn chitin trong nghiên cứu này được cung cấp từ hãng Himedia, Ấn Độ. Chitin huyền phù 1% được chuẩn bị như sau: 1g bột chitin được cho từ từ vào 20 mL HCl đậm đặc, khuấy đều và để qua đêm ở 4 o C. Thêm vào hỗn hợp 200 mL ethanol lạnh, khuấy đều và ủ qua đêm. Ly tâm hỗn hợp ở 5000 vòng/phút trong 20 phút, thu lấy kết tủa và rửa bằng nước cất cho đến khi pH trung tính. Thêm nước cất vào tủa cho đủ thể tích 100 mL. Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường thích hợp ở 37°C trong 7 ngày. Sau thời gian nuôi ủ, đường kính vòng phân giải thể hiện hoạt tính chitinase được kiểm tra bằng thuốc thử lugol. Đánh giá và ghi nhận khả năng sinh chitinase của các chủng xạ khuẩn ở thời điểm 7 ngày sau khi cấy.

Các chủng xạ khuẩn có khả năng tổng hợp chitinase cao được lựa chọn nhằm khảo sát tiềm năng sản xuất enzyme protease. Môi trường Gause cải tiến được bổ sung casein 1%. Enzyme protease ngoại bào được đánh giá ở các mốc thời gian 5 ngày thông qua phương pháp khuếch tán vòng phân giải casein và được nhận diện bằng dung dịch TCA 5% (Trichloroacetic Acid).

Thử nghiệm khả năng diệt tuyến trùng của dịch xạ khuẩn

Chuẩn bị dịch của xạ khuẩn

Các dòng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp chitinase và protease mạnh được nuôi cấy trên môi trường Gause cải tiến trong vòng 7 ngày. Sau khi thu hoạch huyền phù xạ khuẩn, thực hiện đếm và đưa về mật số 10^8 CFU/mL. 1 mL huyền phù xạ khuẩn được chuyển vào bình tam giác chứa 100 mL môi trường lỏng, nuôi lắc ở 150 vòng/phút trong vòng 7 ngày. Dịch nuôi cấy chứa các enzyme ngoại bào của xạ khuẩn được ly tâm ở 5.000 vòng/phút trong vòng 5 phút và được bảo quản ở 4°C để chuẩn bị cho các thí nghiệm tiếp theo.

Nguồn tuyến trùng được thu thập từ vùng rễ của những cây cà phê bị vàng lá ở huyện Hướng Hóa, tỉnh Quảng Trị. Tuyến trùng được tách lọc từ mẫu đất và mẫu rễ đã thu thập theo phương pháp tách lọc, định danh hình thái tuyến trùng theo mô tả bởi Nguyễn Ngọc Châu (2003).

Sử dụng các ống có dung tích 2 mL để đánh giá khả năng diệt tuyến trùng của các dịch xạ khuẩn. Đánh giá khả năng diệt tuyến trùng của dịch xạ khuẩn theo phương pháp mô tả của Huỳnh Văn Nghi và đồng tác giả (2022). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm có 5 lần lặp lại với 4 công thức trong đó công thức đối chứng được xử lý bằng nước cất, công thức xử lí dịch xạ khuẩn lần lượt là NR1, QC1, QC2và hỗn hợp NR1, QC1 và QC2. Khả năng tiêu diệt tuyến trùng bằng dịch xạ khuẩn được xác định bằng cách: Bổ sung 100 µL dịch xạ khuẩn vào 900 µL nước cất chứa 200 con tuyến trùng và ủ trong khoảng thời gian 48 giờ ở mức nhiệt độ phòng. Thực hiện đếm mật số tuyến trùng ở 3 thời điểm 24, 36 và 48 giờ sau khi xử lý để xác định số lượng tuyến trùng còn sống ở các công thức thí nghiệm. Thu dung dịch chứa tuyến trùng, cho vào lam kính đếm tuyến trùng dưới kính hiển vi và đếm số lượng tuyến trùng còn di chuyển. Xác định độ hữu hiệu của dịch xạ khuẩn bằng công thức sau:

Độ hữu hiệu (%) = [(C-T)/C]*100

Trong đó: C: Số lượng tuyến trùng sống ở công thức đối chứng. T: Số lượng tuyến trùng sống ở công thức xử lý.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

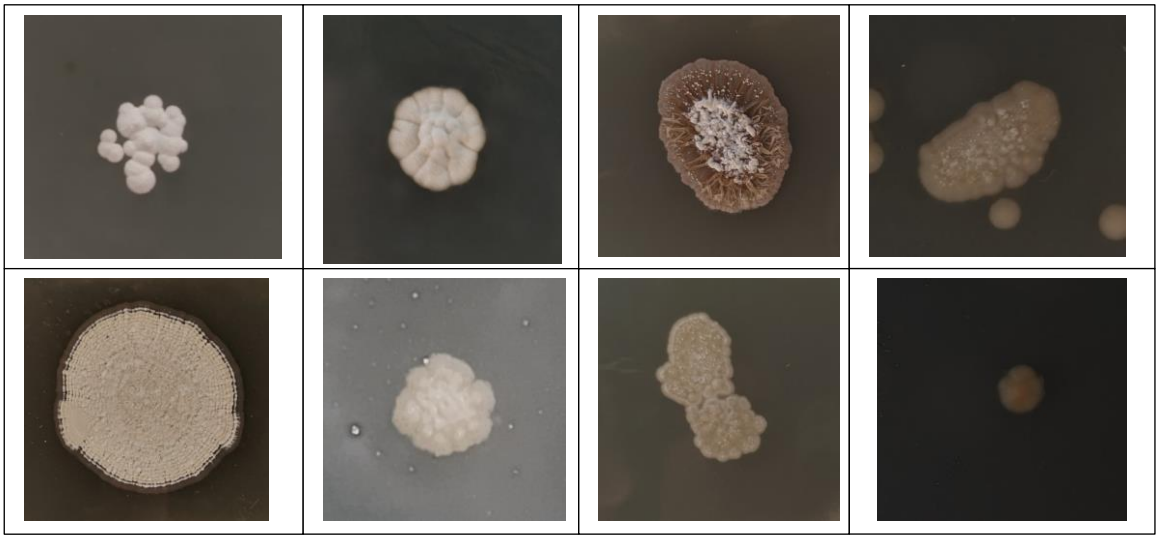
Phân lập xạ khuẩn

Từ 12 mẫu đất lấy ở 3 tỉnh: Thừa Thiên Huế, Quảng Trị và Nghệ An, sau khi phân lập đã thu được 54 chủng xạ khuẩn. Số lượng chủng xạ khuẩn và đặc điểm hình thái được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Phân bố của xạ khuẩn ở các mẫu đất khác nhau

Địa điểm	Loại đất	Số lượng mẫu	Số chủng xạ khuẩn phân lập (chủng)	Tỉ lệ phân bố chủng xạ khuẩn (%)
Thừa Thiên Huế	Đất trồng cà phê	2	5	9,3
	Đất trồng rừng	1	6	11,1
Quảng Trị	Đất vườn cà phê	3	18	33,3
	Đất trồng cây ăn quả	2	8	14,8
Nghệ An	Đất trồng cà phê	2	10	18,5
	Đất trồng rau	1	7	13,0
Tổng số		11	54	100,0

Sự phân bố xạ khuẩn trong mẫu đất khá phong phú và phụ thuộc vào đặc điểm, tính chất của từng loại đất. Xạ khuẩn thường phân bố nhiều ở các loại đất tơi xốp, thoáng khí, giàu chất hữu cơ. Số lượng xạ khuẩn gặp nhiều ở đất trồng cà phê nhất là trồng cà phê hữu cơ chiếm tới 33,3%, tiếp theo là đất trồng cây ăn quả (14,8%), đất trồng rau (13,0%) và trồng rừng (11,1%). Trong tự nhiên, xạ khuẩn phân bố rộng rãi trong đất, nước, rác, bùn, phân chuồng. Trong đất, xạ khuẩn chiếm khoảng 20 - 40% tổng số vi sinh vật trong đất, tập trung nhiều ở lớp đất bề mặt (Mitra *et al.,* 2008). Từ các mẫu đất khác nhau, 54 chủng xạ khuẩn đã được phân lập với các đặc điểm hình thái và màu sắc khuẩn lạc khác nhau. Màu sắc của các chủng xạ khuẩnphân lập có màu như xám, trắng, đen (Hình 1). Bề mặt khuẩn lạc khô ráo, hình dạng chủ yếu hình tròn, một số chủng tạo thành vòng tròn đồng tâm, hệ sợi cơ chất phát triển ăn sâu vào môi trường và đây cũng là đặc điểm giúp phân biệt giữa xạ khuẩn với vi khuẩn và nấm (Nguyễn Lân Dũng *et al.,* 2002).



Hình 1. Hình thái của một số chủng xạ khuẩn phân lập từ vùng rễ cây trồng

Khảo sát khả năng sinh enzyme chitinase của các chủng xạ khuẩn

Sơ tuyển khả năng sinh chitinase được thực hiện trên 54 chủng xạ khuẩn cho thấy: Có 18 chủng có khả năng sinh chitinase. Đánh giá khả năng sinh chitinase được thực hiện ở ngày thứ 7 sau khi cấy được ghi nhận ở Bảng 2.

Bảng 2. Khả năng sinh chitinase của một số chủng xạ khuẩn phân lập từ vùng rễ cây trồng

STT	Tên chủng	Vòng phân giải chitin (mm)	STT	Tên chủng	Vòng phân giải chitin (mm)
1	HC1	9,20 ± 0,52	10	QC1	22,18 ± 0,33
2	HC3	9,82 ± 0,17	11	QC2	35,73 ± 0,27
3	HC4	17,18 ± 0,25	12	QC3	14,45 ± 0,30
4	NR1	26,32 ± 0,54	13	QR1	11,70 ± 0,16
5	NR2	11,54 ± 0,16	14	QR4	10,35 ± 0,75
6	NR3	25,42 ± 0,50	15	QR5	12,03 ± 0,17
7	NV1	9,45 ± 0,63	16	QR6	14,47 ± 0,34
8	NV3	15,30 ± 0,22	17	QC7	15,03 ± 0,47
9	NV5	16,40 ± 0,53	18	QC11	12,06 ± 0,63

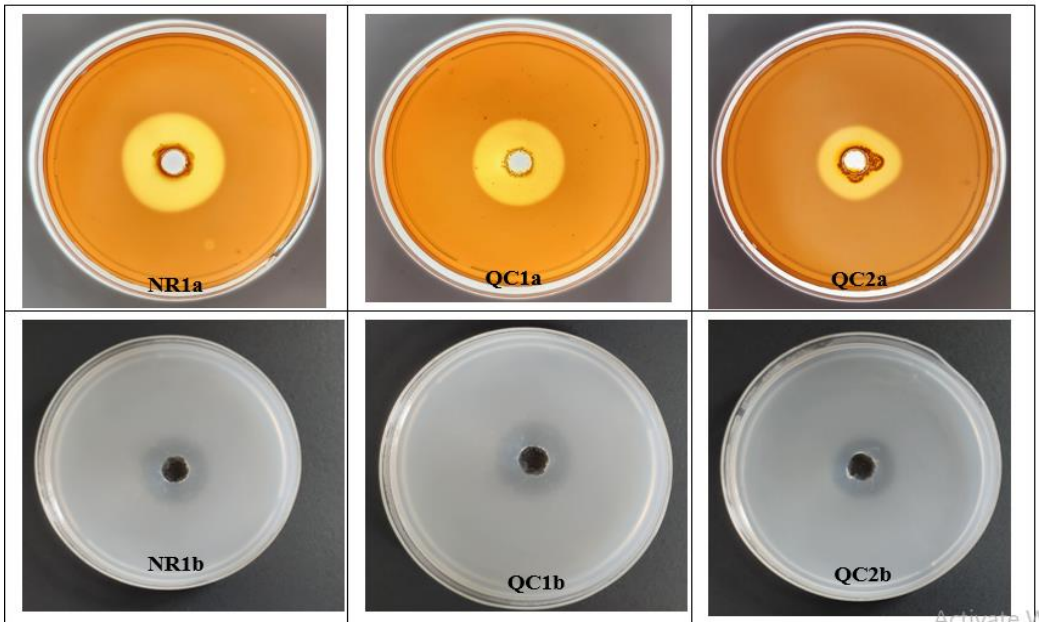
Ở thời điểm 7 ngày, thực hiện đo đường kính vòng phân giải chitin của các chủng xạ khuẩn thông qua hiệu số: V (mm) = D (kích thước vòng phân giải cơ chất) – d (kích thước lỗ thạch) để chọn các chủng có hoạt tính enzyme mạnh. Chỉ số V càng lớn cho thấy hoạt lực của enzyme càng cao. Kết quả khảo sát khả năng sinh enzyme chitinase từ các chủng xạ khuẩn phân lập từ đất vùng rễ cây trồng được thể hiện ở Bảng 2, cho thấy tỷ lệ chủng xạ khuẩn sinh enzyme chitinase chiếm hơn 33%. Trong đó, các chủng có đường kính vòng phân giải < 10 mm chiếm 16,7%. Có 11 chủng có đường kính vòng phân giải từ 10 – 20 mm chiếm 61,1%, và có 4 chủng có đường kính vòng phân giải trên 20 mm, chiếm 22,2%. Các chủng NR1, NR3, QC1 và QC2 có khả năng sinh chitinase cao hơn so với các chủng xạ khuẩn còn lại. So sánh với kết quả nghiên cứu của Lê Minh Tường và Trần Thị Thu Em (2014); Trương Thanh Thảo và đồng tác giả (2019) về phân lập xạ khuẩn cho thấy, 4 chủng xạ khuẩn này có khả năng sinh tổng hợp chitinase mạnh, nhất là chủng NR1 (26,32 mm) và QC2 (35,73 mm). 4 chủng xạ khuẩn tiềm năng này được lựa chọn để đánh giả khả năng sinh protease.

Khả năng phân giải protein của các chủng xạ khuẩn chọn lọc

Bảng 3. Khả năng sinh protease của các chủng xạ khuẩn chọn lọc

STT	Tên chủng	Vòng phân giải protein (mm)
1	NR1	17,40 ± 0,15
2	NR3	11,43 ± 0,27
3	QC1	16,82 ± 0,43
4	QC2	19,50 ± 0,17

Đánh giá khả năng sinh protease của các chủng xạ khuẩn được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 2. Xác định đường kính vòng phân giải ở thời điểm 5 ngày sau khi cấy cho thấy: Các chủng xạ khuẩn đều có khả năng phân giải protein với đường kính vòng phân giải protein từ 11,43 – 19,7 mm. Nhìn chung, các chủng có khả năng phân giải protein với các mức độ khác nhau. Đường kính phân giải protein của chủng xạ khuẩn QC1 là 16,82 mm, chủng xạ khuẩn NR1 là 17,4 mm, chủng xạ khuẩn QC2 là 19,5 mm. So sánh hoạt tính phân giải protease của các chủng xạ khuẩn được Nguyễn Thị Diệu Hạnh và đồng tác giả (2021), Nguyễn Thị Đông Phương và đồng tác giả (2023) cho thấy, 3 chủng xạ khuẩn trong nghiên cứu có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào thấp hơn so với chủng xạ khuẩn CXNK28.1 (đường kính vòng phân giải là 24± 2 mm), chủng xạ khuẩn Q5 (đường kính vòng phân giải là 3,05± 0,07cm) và N7 (đường kính vòng phân giải là 3,55± 0,21 cm).



Hình 2. Vòng phân giải chitin và phân giải protein của một số chủng xạ khuẩn phân lập từ đất vùng rễ cây trồng. a: thể hiện hoạt tính chitinase; b: thể hiện hoạt tính protease

Đánh giá khả năng gây chết tuyến trùng của dịch nuôi cấy từ xạ khuẩn được chọn lọc

3 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh đồng thời chitinase và protease cao được nuôi cấy để lấy dịch và thử nghiệm khả năng tiêu diệt tuyến trùng trong điều kiện phòng thí nghiệm. Xác định số lượng tuyến trùng còn sống và hiệu lực phòng trừ tuyến trùng của dịch nuôi cấy từ xạ khuẩn ở các công thức thí nghiệm xác định vào thời điểm 24, 36 và 48 giờ sau khi xử lý. Kết quả thu được ở Bảng 4 cho thấy:

Bảng 4. Hiệu lực của dịch xạ khuẩn đối với tuyến trùng trong phòng thí nghiệm

Chủng xạ khuẩn	Mức độ hữu hiệu (%)		
	Sau xử lý 24 giờ	Sau xử lý 36 giờ	Sau xử lý 48 giờ
NR1	33,23^{b}	46,93^{b}	67,47^{b}
QC1	32,41^{b}	57,87^{a}	70,99^{b}
QC2	44,22^{ab}	50,86^{b}	52,73^{c}
NR1 + QC1 + QC2	51,70^{a}	60,04^{a}	75,24^{a}

Ghi chú: a, b, c biểu thị mức độ sai khác giữa các công thức ở mức ý nghĩa 0,05; các công thức có cùng chữ cái thì không có sự sai khác.

Dịch xạ khuẩn đều có khả năng tiêu diệt tuyến trùng và thể hiện mức độ hữu hiệu ở 24, 36 và 48 giờ sau khi xử lý. Ở thời điểm 24h sau khi xử lý, hiệu lực của xạ khuẩn QC2 tốt hơn so với 2 chủng xạ khuẩn còn lại. Tuy nhiên sau 48 giờ, hiệu lực của dịch xạ khuẩn QC2 tăng thấp hơn với 2 chủng xạ khuẩn còn lại và hỗn hợp xạ khuẩn.

Hiệu lực phòng trừ tuyến trùng của hỗn hợp dịch xạ khuẩn tăng từ 51,7% đến 75,24% và thể hiện hiệu lực cao nhất ở thời điểm 48 giờ sau khi xử lý. Hiệu lực phòng trừ của hỗn hợp dịch xạ khuẩn thể hiện giá trị cao hơn so với dịch của từng chủng xạ khuẩn. Vì vậy, có thể đề xuất phối trộn dịch xạ khuẩn để làm tăng khả năng hạn chế tuyến trùng trên cây trồng. So với thuốc bảo vệ thực vật, dịch xạ khuẩn tuy có hiệu lực phòng trừ chậm hơn nhưng hiệu quả gây chết kéo dài qua các thời điểm khảo sát (Huỳnh Văn Nghi *et al.,* 2022; Trương Thành Thảo *et al.,* 2019). Ba chủng xạ khuẩn NR1, QC1 và QC2 đều có khả năng tiết đồng thời chitinase và protease cao sẽ phá hủy thành tế bào của tuyến trùng. Đây là cơ sở để sản xuất các chế phẩm sinh học có hoạt tính enzyme cao dùng trong sản xuất nông nghiệp.

KẾT LUẬN

4 chủng xạ khuẩn NR1, NR3, QC1, QC2 thể hiện khả năng sinh enzyme ngoại bào cao hơn trong 54 chủng xạ khuẩn đã được phân phân lập.. Bên cạnh đó 3 chủng xạ khuẩn NR1, QC1 và QC2 thể hiện khả năng sinh chitinase và protease cao hơn so với các chủng còn lại.

Dịch xạ khuẩn của các chủng NR1, QC1 và QC2 và hỗn hợp dịch xạ khuẩn của NR1 + QC1 + QC2 đều có khả năng tiêu diệt tuyến trùng, trong đó dịch hỗn hợp xạ khuẩn thể hiện hiệu quả cao hơn và khả năng diệt trừ tuyến trùng lên tới 75,24% sau 48 giờ xử lý.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo Việt Nam (Mã số đề tài: CT-2022-09-DHH-02).*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abdallah ME, Haroun SA, Gomah AA, El-Naggar NE, Badr HH (2013). Application of actinomycetes as biocontrol agents in the management of onion bacterial rot diseases. *Arch Phytopathol Pfl*, 46 (15): 1797-1808.

Bertrand B, Nunez C, Sarah JL (2000). Disease complex in coffee involving Meloidogyne arabicida and Fusarium oxysporum. *Plant Pathol*, 49 (3): 383-388.

Nguyễn Ngọc Châu (2003). *Tuyến trùng thực vật và cơ sở phòng trừ*. Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật.

Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty, 2002. Vi sinh vật học. Nhà xuất bản Giáo Dục, Hà Nội.

Ezziyyani M, Requena ME, Egea-Gilabert C, Candela ME (2007). Biological control of Phytophthora root rot of pepper using Trichoderma harzianum and Streptomyces rochei in combination. *J Phytopathol* 155 (6): 342-349.

Nguyễn Thị Diệu Hạnh, Hứa Trường Chinh, Đặng Bích Ngân, Nguyễn Thị Thanh Thúy, Nguyễn Ngọc Ẩn, Phạm Tấn Việt, 2021. Phân lập và tuyển chọn xạ khuẩn có khả năng sinh các hợp chất có hoạt tính cao. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, số 53B.

Lê Đức Khánh (2015). Nghiên cứu tuyến trùng hại cây hồ tiêu, cà phê và các giải pháp khoa học và công nghệ phòng trừ hiệu quả ở các vùng sản xuất trọng điểm. *Báo cáo tổng hợp kết quả khoa học công nghệ đề tài cấp Bộ*.

Biền Văn Minh (2012). Phương Pháp phân lập xạ khuẩn chi *Streptomyces.* (https://csdlkhoahoc.hueuni.edu.vn/data/article/pp_phanlapxakhuan.pdf).

Mitra A, Santra SC, Mukherjee J (2008). Distribution of Actinomycetes, their antagonistic behavior and physico- chemical characteristics of worlds largest tidal mangrove forest. *Appl Microbiol Biotechnol,* 80: 685-695.

Huỳnh Văn Nghi, Nguyễn Xuân Hòa, Trần Vũ Phến, Nguyễn Hữu Quảng, Sylvia Hui Xue, Tim Thoden,John Wiles (2022). Hiệu quả của SalibroTM (Fluazaindolizine) trong phòng trừ tuyến trùng *Pratylenchus coffeae* trên cây cà phên trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới. *Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ*, 58 (2B): 205-212.

Nguyễn Thị Đông Phương, Nguyễn Trần Huyền Anh, Nguyễn Hoàng Trung Hiếu (2023). Isolation and screeing for Streptomyces strain capable of efficienct feather degradation. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng*, 21(8.2).

Sharma M, Dangi P and Choudhary M (2019). Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 3 (2): 801–832.

Swiontek Brzezinska M, Jankiewicz U, Lisiecki K (2013). Optimization of cultural conditions for the production of antifungal chitinase by Streptomyces sporovirgulis. *Applied biochemistry and microbiology*, *49*: 154-159.

Trương Thanh Thảo, Võ Quốc Cảnh, Nguyễn Thị Thu Nga (2019). Phân Lập và tuyển chọn những chủng xạ khuẩn triển vọng đối kháng với tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm. *Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ*, 55(2B):19-27.

Lê Minh Tường và Trần Thị Thu Em (2014). Khảo sát khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm Pyricularia oryzae gây bệnh đạo ôn hại lúa. *Tạp chí khoa học trường đại học Cần Thơ*, (4): 120 – 126.

Nguyễn Thị Yến, Trương Văn Tươi, Trần Hoàn Nhân, Lưu Thái Danh và Nguyễn Thị Thu Nga (2016). Nghiên cứu xạ khuẩn và thuốc hóa học trong phòng trừ bệnh thán thư trên ớt. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. (3): 153-159.

ISOLATION AND SELECTION OF STREPTOMYCES STRAINS WITH POTENTIAL TO PRODUCE EXTRACELLULAR ENZYMES FROM RHIZOSPHER AND TESTING THEIR ABILITY TO SUPPRESS NEMATODES

Trinh Thi Sen[1], Nguyen Thi Hoai[1], Le Van Chanh[1], Ngo Thi Diem My[2], Nguyen Quang Co[3*]

[1]*University of Agriculture and Forestry, Hue University*

[2]*Dak Lak College of Pedagory*

[3]*Institute of Biotechnology, Hue University*

SUMMARY

Actinomycetes are microorganisms that play a crucial role in producing a wide variety of antibiotics and enzymes that are widely used in agriculture. This study involved isolating indiginous actinomycete strains from Thua Thien Hue, Quang Tri, and Nghe An provinces. The results revealed 18 actinomycete strains capable of producing chitinase, with 4 strains showing strong chitinase production, exhibiting chitinase activities greater than 20 mm. Among these, the strains NR1, QC1, and QC2 were able to simultaneously produce chitinase and protease. These strains were then tested for their ability to kill nematodes, and the results indicated that the extract from these potential strains effectively killed nematodes. The mixture of extracts NR1 + QC1 + QC2 showed the eficacy up to 75% after 48 hours treatment. Overall, these actinomycete strains show great potential for applications in biological pest control and the production of microbial preparations..

Keywords: Chitinase, streptomyces extract, protease, extracellular enzymes, nematodes.

[*] Author for correspondence: Tel: 0914848365; Email: nguyenquangco@hueuni.edu.vn

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN TÁCH CHIẾT ALKALOID SỬ DỤNG ENZYME HỖ TRỢ VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA, GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ CỦA CAO CHIẾT TỪ VỎ THÂN CÂY GÁO VÀNG NINH BÌNH (*Nauclea orientalis* L.)

Phạm Minh Tân*, Mai Trần Bảo Trâm, Trần Thị Dung

Khoa Khoa học ứng dụng, Đại học Tôn Đức Thắng

TÓM TẮT

Gáo vàng (*Nauclea orientalis* L.) là loại cây bản địa có nhiều dược tính giá trị, đặc biệt trong vỏ thân chứa nhiều alkaloid, là hợp chất sinh học với nhiều hoạt tính hữu dụng. Nghiên cứu này xác định giá trị của các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng alkaloid tách chiết và tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt RSM (Response Surface Methodology) với thiết kế Box-Behnken Design (BBD). Kết quả thu nhận được trên vỏ thân Gáo vàng với sự hỗ trợ của enzyme pectinase (nồng độ 8 U/mL) là tỷ lệ nguyên liệu: dung môi 1:20,96 g/mL, nhiệt độ tách chiết 72,12 ℃ và thời gian tách chiết 81,82 phút, đạt hàm lượng alkaloid cao nhất là 74,25 ± 0,04 (mg AE/g cao chiết). Cao chiết phân đoạn ethyl acetate dựa theo khả năng bắt gốc tự do DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) cho hoạt tính kháng oxy hóa tốt nhất với giá trị IC_{50} là 36,79 ± 1,17 µg/mL, thấp hơn vitamin C 1,91 lần. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan *HepG2* của cao chiết ở nồng độ 900 µg/mL cho tỷ lệ ức chế cao nhất là 39,94% thực hiện theo phương pháp MTT (3 – [4,5 - dimethylthiazol - 2 – yl] - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromide). Nhờ tác dụng sinh học của chiết xuất alkaloid từ vỏ thân qua khảo sát hoạt tính *in vitro,* Gáo vàng Ninh Bình đáp ứng tiềm năng phát triển nguồn dược liệu quý trong y học tương lai.

Từ khóa: Alkaloid, enzyme hỗ trợ, Gáo vàng, gây độc tế bào, kháng oxy hóa.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Gáo vàng (*Nauclea orientalis* L.) thuộc họ Rubiaceae, một loại cây gỗ lớn nhanh, mọc hoang ở những vùng ẩm thấp, ven sông suối, được tìm thấy nhiều tại tỉnh Ninh Bình và rải rác ở miền Tây nam bộ, là dược liệu quý của Việt Nam. Một số bộ phận của cây Gáo vàng như lá, thân và rễ được dùng làm thuốc chữa bệnh. Trên thế giới, Gáo vàng phân bổ tương đối hạn hẹp ở vùng Nam Á, Đông Nam Á, New Guinea và Australia. Theo kết quả phân tích hóa sinh, nhiều hợp chất thực vật quan trọng đã được thu nhận trên chi Gáo (*Nauclea)* như phenolic, alkaloid, triterpene, steroid, saponin và tannin (Putri *et al.,* 2019; Liu *et al.*, 2022). Nghiên cứu trước đây đã cho thấy các hoạt tính sinh học tiềm năng của chi Gáo là tác dụng loại bỏ các gốc tự do (Raghavamma *et al.*, 2011; Ayeleso *et al.,* 2014), ức chế tế bào ung thư tăng trưởng (Sichaem *et al.,* 2010; Wang *et al.*, 2015), kháng viêm (Liu *et al.,* 2017; Wang *et al.*, 2018), kháng khuẩn (He *et al*., 2012; Xu *et al.,* 2018), kháng virus (Liu *et al.,* 2019; Mai *et al.*, 2021). Riêng đối với Gáo vàng, khảo sát ghi nhận hàm lượng hợp chất phenolic cao trong vỏ thân có ý nghĩa tương quan đến hoạt tính kháng oxy hóa (Attanayaka *et al.*, 2016). Chiết xuất từ vỏ thân Gáo vàng làm giảm stress oxy hóa gây rối loạn chức năng cơ tim (Sandamali *et al.*, 2022). Alkaloid tách chiết từ rễ Gáo vàng có tác dụng chống ngưng tập tiểu cầu ở người trong quá trình đông máu (Chaikham *et al.,* 2017). Đáng chú ý là indole alkaloids từ thân và lá Gáo vàng ức chế đáng kể một số dòng tế bào ung thư ở người (Liu *et al.,* 2019).

Trong các chất chuyển hóa thứ cấp được biết đến ở thực vật, alkaloid chiếm khoảng 20% và có vai trò thiết yếu trong y học (Kaur, Arora, 2015). Về mặt điều trị, các alkaloid đặc biệt là chất gây mê, bảo vệ tim mạch và chống viêm (Heinrich *et al.,* 2021). Alkaloid được xem là hợp chất thực vật ý nghĩa và hiệu quả nhất trong điều kiện trị liệu (Eze *et al.,* 2014). Trong những năm gần đây, từ việc xem xét mở rộng nguồn dược liệu, người ta ngày càng chú ý đến thành phần và hoạt tính sinh học của chi Gáo. Alkaloid, hợp chất thứ cấp chính được tìm thấy trong vỏ thân của Gáo vàng, là thành phần tác động chính đem lại nhiều giá trị dược lý, được xác định trong nghiên cứu này qua các khảo sát về tối ưu hóa điều kiện tách chiết. Đồng thời, sử dụng enzyme hỗ trợ giúp phá hủy thành tế bào, tăng diện tích bề mặt tiếp xúc của nguyên liệu với dung môi, tạo sự thâm nhập và thúc đẩy giải phóng các hợp chất nội bào (Lubek-Nguyen *et al.,* 2022). Nghiên cứu thực hiện phương pháp tối ưu hóa đáp ứng bề mặt RSM (Response Surface Methodology) để thiết kế thí nghiệm, sau đó phân tích thống kê và hồi quy thông qua phương trình mô hình nhằm xác định hiệu quả điều kiện tách chiết (Said, Amin, 2015). Thêm vào đó, khả năng kháng oxy hóa được khảo sát với các cao chiết phân đoạn và hoạt tính gây độc được thử nghiệm *in vitro* trên dòng tế bào ung thư gan *HepG2.*

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vỏ thân cây Gáo vàng nguồn gốc từ tỉnh Ninh Bình (Việt Nam) được phơi khô đạt độ ẩm 9,82 ± 0,08%, sau đó xay mịn và bảo quản ở 30^0C. Enzyme cellulase và pectinase do công ty Novaco Pharmaceuticals (Việt Nam) cung cấp. Các hóa chất được mua từ hãng Sigma-Aldrich (Singapore).

Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm đơn yếu tố về điều kiện tách chiết alkaloid

Khảo sát ảnh hưởng của loại enzyme (cellulase, pectinase, cellulase + pectinase và đối chứng), nồng độ enzyme (2, 4, 6, 8, 10 U/mL), loại dung môi (ethanol, methanol, ethyl acetate, hexane, nước cất), nồng độ dung môi (40, 50, 60, 70, 80%), tỷ lệ nguyên liệu:dung môi (1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30 mg/L), thời gian tách chiết (40, 60, 80, 100, 120 phút), nhiệt độ tách chiết (40, 50, 60, 70, 80 ^{0}C) đến hàm lượng alkaloid của vỏ thân cây Gáo vàng, Các thí nghiệm thực hiện tuần tự, bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

Định lượng alkaloid toàn phần

Cao chiết được hòa tan vào HCl 2N và lọc. Hút 1 mL dung dịch này vào phễu chiết và rửa 3 lần với 10 mL chloroform. pH của dung dịch được điều chỉnh tới trung tính với 0,1 N NaOH. Sau đó, thêm 5 mL đệm phosphate và 5 mL dung dịch bromocresol green. Dung dịch đệm phosphate (pH=7,4) được chuẩn bị bằng cách hiệu chỉnh pH của sodium phosphate 2 M (71,6 g Na_2HPO_4 trong 1 L nước cất) tới pH=4,7 bằng acid citric 0,2 M (42,02 g acid citric trong 1 L nước cất). Hỗn hợp được lắc và chiết lần lượt với 1, 2, 3 và 4 mL chloroform. Sau đó, đo độ hấp thu ở bước sóng 470 nm. Mẫu trắng làm tương tự nhưng không có cao chiết. Các alkaloid phản ứng với bromocresol green tạo thành phức màu vàng. Đo độ hấp thu của phức này ở bước sóng 470 nm và dựa vào đường chuẩn atropine tính ra hàm lượng alkaloid toàn phần có trong mẫu phân tích (Ajanal *et al.*, 2012). Hàm lượng alkaloid tổng được tính theo mg đương lượng atropine (mg AE)/g cao chiết. Atropine được sử dụng làm chất chuẩn với nồng độ từ 0 – 100 μg/mL.

Tối ưu hóa điều kiện tách chiết alkaloid bằng phương pháp RSM-BBD

Tiến hành thiết kế thí nghiệm theo mô hình BBD gồm 3 biến độc lập (3 yếu tố) là X_1, X_2, X_3 với X_1 là tỷ lệ nguyên liệu : dung môi (theo kết quả thí nghiệm) (g/mL), X_2 là nhiệt độ chiết (°C) và X_3 là thời gian chiết (phút). Mỗi yếu tố được nghiên cứu ở 3 mức -1, 0 và +1. Mô hình có 15 nghiệm thức với 15 tổ hợp điều kiện chiết xuất khác nhau về các thông số khảo sát của 3 yếu tố thí nghiệm. Thực hiện các nghiệm thức, phân tích biến lượng và tương quan bằng phần mềm Minitab 21 với độ tin cậy 95% để thiết lập mô hình thực nghiệm và dự đoán điều kiện tách chiết tối ưu nhằm đạt hàm lượng alkaloid tối đa. Hàm đáp ứng được chọn là hàm lượng alkaloid được chiết xuất từ vỏ thân cây Gáo vàng (Y, mg/g cao chiết). Phân tích hồi quy đa biến theo phương trình bậc hai.

$$Y= \beta_0+ \beta_1X_1+ \beta_2X_2+ \beta_3X_3+ \beta_{12}X_1X_2+ \beta_{13}X_1X_3+ \beta_{23}X_2X_3+ \beta_{11}X_1^2+ \beta_{22}X_2^2+ \beta_{33}X_3^2$$

(β_0: Hệ số tự do; β_1, β_2, β_3: Các hệ số bậc 1; β_{11}, β_{22}, β_{33}: Các hệ số bậc 2; β_{12}, β_{13}, β_{23}: Hệ số tương tác của các cặp yếu tố)

Hoạt tính kháng oxy hóa của cao phân đoạn

Điều chế cao phân đoạn: Cao ethanol tiếp tục được tiến hành chiết lỏng – lỏng với các dung môi có độ phân cực tăng dần lần lượt là n-hexan, chloroform, ethyl acetate và nước. Hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro* của các cao phân đoạn được xác định theo phương pháp khử gốc tự do DPPH của Raghavamma và đồng tác giả (2011). Tất cả cao chiết (nồng độ 10-50 μg/mL) được thêm vào 2 mL dung dịch DPPH (nồng độ 100 μM pha trong methanol). Ủ trong điều kiện tối thời gian 30 phút ở 37 ^{o}C. Thực hiện tương tự với vitamin C (nồng độ 5-25 μg/mL). Sau đó tiến hành đo mật độ quang OD ở bước sóng 517 nm. Tính giá trị ức chế gốc tự do DPPH (I%).

Xây dựng đường chuẩn: y = ax+b cho mẫu cao chiết và vitamin C với các giá trị phần trăm ức chế DPPH ở các nồng độ khác nhau. Sau cùng, tính và so sánh giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% gốc tự do DPPH) của các cao chiết phân đoạn và vitamin C.

Hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan HepG2

Phương pháp MTT thử nghiệm độ độc tế bào: đánh giá khả năng sống sót của tế bào *HepG2* qua khả năng khử MTT (màu vàng) thành phức hợp formazan (màu tím) bởi hoạt động của enzyme dehydrogenase trong tế bào sống. Lượng tinh thể formazan được tạo ra trong thử nghiệm nhiều hay ít sẽ phản ánh hoạt tính ức chế tế bào của cao chiết mạnh hay yếu. Số lượng tinh thể formazan tạo thành được đánh giá bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 540 nm.

Nuôi cấy và xử lý tế bào: Tế bào *HepG2* được nuôi cấy trong môi trường RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), bổ sung 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 100 IU/mL penicillin, 100 μg/ml streptomycin, ủ ở 37 ^{o}C, 5%

CO_2. Khi tế bào đạt độ phủ 80 - 90%, hút bỏ môi trường và rửa với PBS (Phosphate Buffered Saline) 1 X. Bổ sung Trypsin – EDTA, ủ ở 37 ^oC trong 3 – 5 phút cho tới khi tế bào tách khỏi bề mặt đĩa nuôi cấy. Bổ sung một lượng môi trường bằng lượng Trypsin – EDTA, thu dịch và ly tâm 250 g trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi và hòa phần tế bào vào môi trường mới. Tế bào sau đó được đếm số lượng, chia vào đĩa nuôi cấy 96 giếng để kiểm tra hoạt tính gây độc của mẫu thử thông qua test MTT.

Tế bào *HepG2* được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng với mật độ $3,7x10^4$ tế bào/giếng. Sau 24 giờ ủ ở 37 ^oC, 5% CO_2, tiến hành loại bỏ môi trường cũ và bổ sung môi trường mới có chứa mẫu thử đã chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau 500, 600, 700, 800, 900 µg/mL (100 µL/giếng). Các nhóm đối chứng gồm có control (mẫu không xử lý) và chứng dương (mẫu xử lý với Cisplatin thương mại, nồng độ 4 ppm).

Mẫu tiếp tục được ủ trong 24 giờ ở điều kiện 37 ^oC, 5% CO_2. Sau đó, tiến hành loại bỏ môi trường nuôi cấy, bổ sung 100 uL môi trường nuôi cấy mới có chứa MTT (0,5 mg/mL) vào mỗi giếng. Ủ tránh sáng trong 3 giờ ở 37 ^oC, 5% CO_2. Loại bỏ môi trường chứa MTT, bổ sung 100 uL DMSO và lắc nhẹ trong 15 phút, nhiệt độ phòng. Đo OD ở bước sóng 540 nm Kết quả đánh giá hoạt tính cao chiết ảnh hưởng đến tế bào nuôi cấy bằng sự nguyên vẹn về hình thái tế bào khi quan sát dưới kính hiển vi soi ngược và sự tăng sinh của tế bào bằng kết quả đo OD lượng tinh thể formazan của phản ứng MTT.

Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả thu được thể hiện ở dạng trung bình ± độ lệch chuẩn. Sử dụng Minitab 21 để thiết kế thí nghiệm RSM-BBD, phân tích thống kê ANOVA và trắc nghiệm phân hạng sự khác biệt ý nghĩa LSD ở $p \leq 0.05$. Tính toán và vẽ biểu đồ bằng Excel 2019. Mô hình 3D được vẽ bằng Origin Pro 9.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của các đơn yếu tố đến hàm lượng alkaloid

Các yếu tố về loại enzyme, nồng độ enzyme, tỷ lệ nguyên liệu:dung môi, thời gian tách chiết và nhiệt độ tách chiết ảnh hưởng đến hàm lượng alkaloid từ vỏ thân Gáo vàng được thực hiện.

Chiết xuất có sự hỗ trợ của enzyme liên quan đến việc sử dụng các enzyme thủy phân để phân hủy thành tế bào giúp cho sự khuếch tán của dung môi vào vật liệu thực vật, dẫn đến các chất biến dưỡng được phóng thích dễ dàng hơn (Lubek-Nguyen *et al.,* 2022). Hàm lượng alkaloid thu nhận được từ vỏ thân Gáo vàng khi sử dụng enzyme pectinase ở nồng độ 2 U/mL đạt kết quả 26,52 ± 0,06 mg/g cao chiết, khác biệt này có ý nghĩa thống kê so với đối chứng và nghiệm thức sử dụng cellulase hoặc pectinase + cellulase. Thêm vào đó, nếu pectinase được tăng nồng độ là 8 U/mL, hàm lượng alkaloid đạt được cao nhất là 38,53 ± 0,08 mg/g cao chiết. Nghiên cứu tương tự cho thấy pectinase phá vỡ thành tế bào, tạo hiệu quả tốt nhất trong ly trich anthocyanin từ khoai lang tím (*Ipomea batata)* so với các enzyme sử dụng là protease, amylase và cellulase *(*Sirven*,* 2015). Enzyme pectinase ở nồng độ 1% (v/w) hỗ trợ tách chiết thảo dược *Aster scaber,* đạt được hàm lượng polysaccharide cao nhất là 3,8% so với amylase, cellulase (Song *et al.,* 2018). Trên lá Rosemary (*Rosmarinus officinalis*), sử dụng protease và pectinase làm tăng hơn 18% hàm lượng hợp chất phenolic ly trích so với cellulase và hemicellulase (Pontillo *et al.,* 2021).

Trong các loại dung môi khảo sát, ethanol là loại dung môi phổ biến trong chiết tách alkaloid do tương đối ít độc hại và hòa tan hiệu quả alkaloid trong phạm vi rộng, ethanol cho kết quả thu được hàm lượng alkaloid cao nhất đạt 31,88 ± 0,04 (mg AE/ g cao chiết) từ vỏ thân Gáo vàng. Khảo nghiệm về nồng độ của dung môi này, nghiệm thức 70% đạt hàm lượng alkaloid 68,61 ± 0,05 (mg AE/ g cao chiết), khác biệt có ý nghĩa so với các nồng độ khác. Một số kết quả khảo sát cho thấy cao chiết ethanol của lá cây Gáo vàng có hàm lượng phenols cao nhất (Raghavamma *et al.*, 2011), cao chiết ethanol của vỏ rễ cây Gáo lá (*Nauclea latifolia)* cho hàm lượng alkaloid cao hơn vỏ thân (Egbung *et al.,* 2013), hiệu suất cũng như hàm lượng flavonoid đạt cao nhất khi chiết tách vỏ thân cây Gáo trắng (*Neolamarckia cadamba*) với dung môi ethanol 70% (Yadav *et al.,* 2022).

Tỷ lệ nguyên liệu:dung môi là yếu tố làm ảnh hưởng tới hàm lượng alkaloid được tách chiết từ vỏ thân cây Gáo vàng. Với tỷ lệ là 1:20 (g/mL), kết quả tách chiết cao nhất cho hàm lượng alkaloid đạt 72,67 ± 0,01 (mg AE/ g cao chiết). Qua khảo sát về thời gian và nhiệt độ tách chiết, kết quả hàm lượng alkaloid được ghi nhận đạt 74,55 ± 0,02 (mg AE/ g cao chiết) trong thời gian 80 phút ở nhiệt độ 70 ^oC. So với kết quả nghiên cứu trước đây về ly trích alkaloid cho thấy, trên thân rễ cây *Coptis chinensis*, hàm lượng alkaloid thu nhận được đạt 140,49 (mg AE/ g cao chiết), với dung môi ethanol 50%, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi 1:35 (w/v) trong điều kiện nhiệt độ 80^0C và thời gian 60 phút (Teng *et al.,* 2012).

Các khảo sát trên đưa tới kết quả hàm lượng alkaloid từ vỏ thân cây Gáo vàng Ninh Bình đạt được cao nhất (74,55 mg/g) trong điều kiện tách chiết với dung môi ethanol 70%, tỷ lệ nguyên liệu:dung môi 1:20 (g/mL), thời gian 80 phút và nhiệt độ 70 ^oC, cùng sự hỗ trợ của enzyme pectinase ở nồng độ 8 U/mL.

Tối ưu hóa điều kiện tách chiết alkaloid

Dựa trên kết quả về điều kiện tách chiết của các thí nghiệm trên, 3 yếu tố về tỷ lệ nguyên liệu: dung môi, thời gian và nhiệt độ tách chiết được chọn là những biến số chính để đạt hàm lượng alkaloid tối đa từ thân rễ cây Gáo vàng. Nhằm xác định sự kết hợp tốt nhất của các điều kiện tách chiết, thiết kế tối ưu hóa được thực hiện. Ma trận thí nghiệm được xử lý và thiết lập bằng phần mềm Minitab 21 theo mô hình RSM – BBD với 3 yếu tố được mã hóa ở 3 mức là -1, 0, +1. Bảng 1 trình bày các giá trị mã hóa của 3 yếu tố sử dụng trong thí nghiệm. Với 15 thí nghiệm được tiến hành theo ma trận BBD, kết quả hàm lượng alkaloid dự đoán và thực nghiệm được trình bày trong Bảng 2. Phương trình hồi quy biểu diễn ảnh hưởng giữa các yếu tố với các biến mã hóa được thiết lập như sau:

$$Y = 74,1237 + 0,08413\ X_1 + 0,02625\ X_2 + 0,02512\ X_3 – 0,2461\ X_1X_1 – 0,0853\ X_2X_2 – 0,0666\ X_3X_3 + 0,0598\ X_1X_2 – 0,0380\ X_1X_3 – 0,0228\ X_2X_3$$

Trong đó, Y: Hàm lượng alkaloid (mg AE/g cao chiết), X_1: Tỷ lệ nguyên liệu và dung môi (g/mL), X_2: Nhiệt độ tách chiết (℃), X_3: Thời gian tách chiết (giờ)

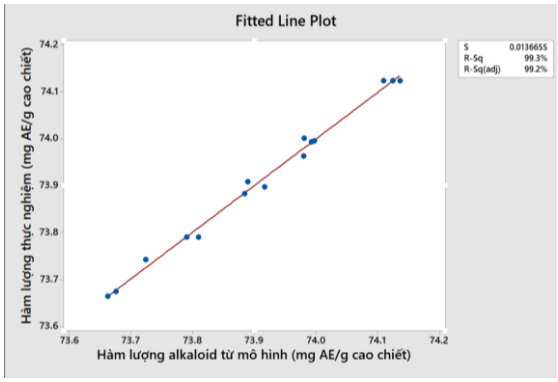
Bảng 1. Phạm vi và mức biến đổi của các đơn yếu tố

Yếu tố	Ký hiệu	Mức biến mã		
		-1	0	1
Tỷ lệ nguyên liệu: dung môi (g/mL)	X_1	1:15	1:20	1:25
Nhiệt độ tách chiết (°C)	X_2	60	70	80
Thời gian tách chiết (phút)	X_3	60	80	100

Bảng 2. Kết quả thực nghiệm và dự đoán từ mô hình RSM-BBD

Nghiệm thức	Yếu tố						Hàm lượng alkaloid (mg AE/g cao chiết)	
	X_1	X_2	X_3	Tỷ lệ NL:DM (g/mL)	Nhiệt độ tách chiết (°C)	Thời gian tách chiết (phút)	Kết quả thực nghiệm	Kết quả dự đoán từ mô hình
1	-1	0	-1	1:15	70	60	73,662	73,664
2	-1	1	0	1:15	80	80	73,675	73,675
3	0	0	0	1:20	70	80	74,136	74,124
4	-1	-1	0	1:15	60	80	73,724	73,742
5	1	1	0	1:25	80	80	7,980	73,962
6	0	1	1	1:20	80	100	73,981	74,000
7	0	0	0	1:20	70	80	74,110	74,124
8	1	0	1	1:25	70	100	73,884	73,882
9	0	-1	1	1:20	60	100	73,992	73,993
10	0	-1	-1	1:20	60	60	73,917	73,898
11	0	0	0	1:20	70	80	74,125	74,124
12	-1	0	1	1:15	70	100	73,809	73,790
13	1	-1	0	1:25	60	80	73,790	73,790
14	0	1	-1	1:20	80	60	73,997	73,996
15	1	0	-1	1:25	60	60	73,889	73,908

Kết quả phân tích biến lượng ANOVA của mô hình đáp ứng RSM được trình bày ở Bảng 3. Giá trị P-value <0,05 của mô hình được thiết lập chứng minh mô hình có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Thêm vào đó, sự phù hợp của mô hình được đánh giá bởi hệ số R^2 (R-sq) cho thấy sự tương quan cao giữa giá trị dự đoán và thực nghiệm (Hình 1). Theo Bảng 4, R^2 đạt 99,28% chứng tỏ mức độ đáp ứng phù hợp của số liệu thu nhận được từ thực nghiệm so với mô hình, tương tự với giá trị hiệu chỉnh R-sq(adj) là 97,22% gần với R^2. Hơn nữa, giá trị dự đoán có mối tương quan cao do trị số R-sq(pred) cao (89,83%), giải thích mô hình cho kết quả chính xác tương ứng trong thực nghiệm.



Hình 1. Sự tương quan giữa hàm lượng alkaloid của vỏ thân cây Gáo vàng theo thực nghiệm và dự đoán từ mô hình RSM-BBD

Giá trị P-value <0,05 của các yếu tố khảo sát chứng tỏ sự thay đổi của X_1 (tỷ lệ nguyên liệu:dung môi), X_2 (nhiệt độ) và X_3 (thời gian) có ảnh hưởng đến hàm lượng alkaloid tách chiết từ vỏ thân cây Gáo vàng, khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê. Thêm vào đó, tác động của 2 cặp yếu tố khảo sát là X_1*X_2 (tỷ lệ nguyên liệu:dung môi và nhiệt độ tách chiết) và X_1*X_3 (tỷ lệ nguyên liệu:dung môi và thời gian tách chiết) được phân tích và đánh giá với giá trị P-value <0.05 chứng tỏ sự tương tác kết hợp của 2 cặp yếu tố này ảnh hưởng đến hàm lượng alkaloid với khác biệt thống kê có ý nghĩa. Riêng cặp yêu tố X_2*X_3 (thời gian và nhiệt độ tách chiết) với P-value = 0,095 cho thấy tác động kết hợp của cặp yếu tố này không đem lại ảnh hưởng khác biệt đến hàm lượng alkaloid.

Ảnh hưởng kết hợp của các cặp yếu tố khảo sát (khi yếu tố còn lại được giữ cố định) được minh họa ở Hình 3. Với X_1 và X_2, hàm lượng alkaloid tăng khi tỷ lệ nguyên liệu:ethanol và nhiệt độ tăng nhưng sau đó giảm dần, tuy nhiên yếu tố nhiệt độ cho sự suy giảm hàm lượng alkaloid chậm hơn. Hàm lượng alkaloid cao nhất nhất ở tỷ lệ nguyên liệu: ethanol khoảng 1:20 (g/mL) và thấp nhất khoảng 1:30 (g/mL) với nhiệt độ tách chiết nhất định. Hàm lượng alkaloid tăng theo nhiệt độ tách chiết cao nhất ở khoảng 70 ^{o}C và thấp nhất ở 40 ^{o}C với tỷ lệ nguyên liệu: ethanol nhất định (Hình 2a).

Bảng 3. Kết quả phân tích phương sai của mô hình hồi quy

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	0,336153	0,037350	76,38	0,000*
Linear	3	0,067179	0,022393	45,79	0,000*
X1	1	0,056616	0,056616	115,78	0,000*
X2	1	0,005513	0,005513	11,27	0,020*
X3	1	0,005050	0,005050	10,33	0,024*
Square	3	0,246847	0,082282	168,27	0,000*
X1*X1	1	0,223595	0,223595	457,27	0,000*
X2*X2	1	0,026887	0,026887	54,98	0,001*
X3*X3	1	0,016369	0,016369	33,48	0,002*
2-Way Interaction	3	0,022126	0,007375	15,08	0,006*
X1*X2	1	0,014280	0,014280	29,20	0,003*
X1*X3	1	0,005776	0,005776	11,81	0,018*
X2*X3	1	0,002070	0,002070	4,23	0,095
Error	5	0,002445	0,000489		
Lack-of-Fit	3	0,002104	0,000701	4,12	0,202
Pure Error	2	0,000341	0,000170		
Total	14	0,338598			

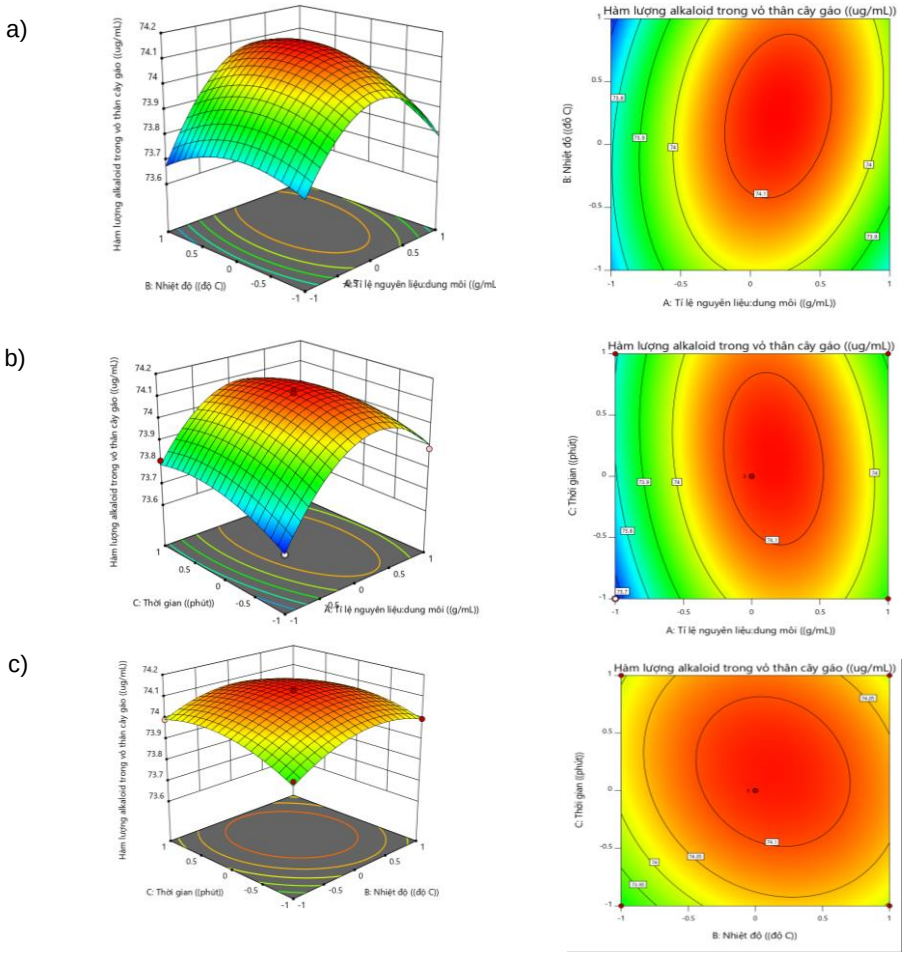
**: Các giá trị p < 0,05 cho biết các yếu tố ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê.*

Bảng 4. Các giá trị về hệ số tương quan R^2 trong mô hình hồi quy

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,022	99,28%	97,22%	89,83%

Tương tự với X_1 và X_3, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi và thời gian tăng làm tăng hàm lượng alkaloid và suy giảm sau đó, tuy nhiên yếu tố thời gian không tạo được hiệu quả gia tăng cao. Khi thời gian tách chiết khác nhau, hàm lượng alkaloid thấp nhất là ở khoảng thời gian tách chiết 120 phút và bắt đầu tăng dần đến giá trị lớn nhất ở khoảng 80 phút và sau đó giảm dần. Với ảnh hưởng của thời gian tách chiết, hàm lượng alkaloid tăng từ tỷ lệ nguyên liệu: ethanol 1:10 (g/mL) và đạt cực đại ở khoảng tỷ lệ 1:20 (g/mL) rồi bắt đầu giảm dần. Hàm lượng alkaloid thấp nhất ở tỷ lệ nguyên liệu:ethanol khoảng 1:30 (g/mL) và thời gian tách chiết 60 phút. Với X_2 và X_3, mức độ ảnh hưởng kết hợp của cặp yếu tố này là không đáng kể do có cùng ảnh hưởng tương đương tới hàm lượng alkaloid. Khi tăng đồng thời hoặc riêng lẻ từng yếu tố trong khoảng 70 ^oC và thời gian tách chiết từ 80 phút, thì hàm lượng alkaloid cũng gần như bằng nhau (Hình 2c).

Sau cùng, theo dự đoán từ mô hình, giá trị cực đại của Y là 74,14 (mg AE/g cao chiết) khi giá trị của biến X_1 là 0,1919, X_2 là 0,2121 và X_3 là 0,0909 (Hình 3). Điều này tương ứng với hàm lượng alkaloid tách chiết từ cây Gáo vàng Ninh Bình được tối ưu khi tỷ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:20,96 (g/mL), nhiệt độ tách chiết là 72,12 ^oC và thời gian tách chiết là 81,82 (phút).



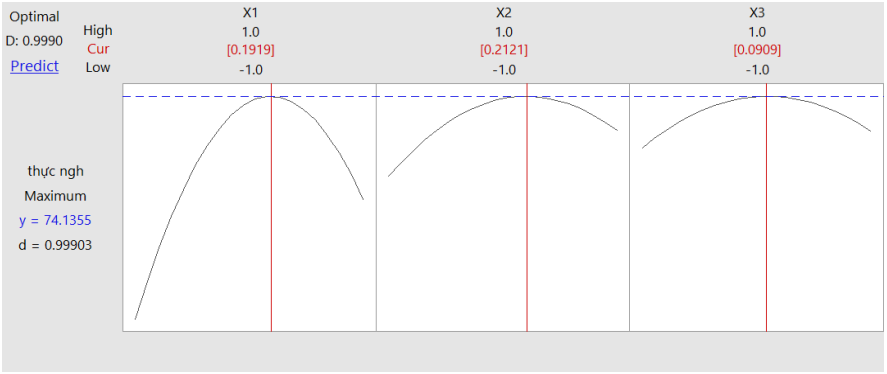
Hình 2. Tác động tương tác giữa các yếu tố theo mô hình RSM-BBD về hàm lượng alkaloid trong vỏ thân cây Gáo vàng

a) Nhiệt độ và tỷ lệ nguyên liệu: dung môi, b) Thời gian và tỷ lệ nguyên liệu:dung môi, c) Thời gian và nhiệt độ

Kiểm chứng mô hình thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa

Tiến hành thí nghiệm với các điều kiện được tối ưu từ đó đánh giá mức độ chính xác của mô hình. Kết quả đạt được từ thực nghiệm kiểm chứng cho hàm lượng alkaloid là 74,25 ± 0,04 (mg AE/g cao chiết), so với giá trị tiên đoán là 74,13 (mg AE/g cao chiết). Như vậy, kết quả kiểm chứng có giá trị tương đương với mô hình, không có sự khác biệt ý nghĩa. Điều này có nghĩa là mô hình thiết lập có thể được áp dụng để mô tả sự liên quan giữa hàm

lượng alkaloid và các điều kiện tách chiết từ vỏ thân cây Gáo vàng. Đáng ghi nhận, hàm lượng alkaloid này cao hơn đáng kể so với 30,9 mg/g của lá *Carica papaya* (Devi *et al.,* 2020), 22,3 mg/g của củ *Stephania cambodica* (Dary *et al.,* 2018), 14,86 mg/g của lá *Grewia tiliaefolia* (Devia *et al.*, 2021), 7,48 mg/g của vỏ quả *Annona muricata* (Aguilar-Hernández *et al.,* 2020), chứng tỏ rằng vỏ thân cây Gáo vàng Ninh Bình là nguồn alkaloid tiềm năng.



Hình 3. Giá trị tối ưu của các yếu tố dự đoán từ mô hình RSM-BBD về hàm lượng alkaloid trong vỏ thân cây Gáo vàng

Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa của các cao phân đoạn

Các cao phân đoạn được điều chế từ cao tổng ethanol với các dung môi có độ phân cực tăng dần: n-hexane, chloroform, ethyl acetate, nước. Khả năng kháng oxy hóa của các cao phân đoạn được đánh giá bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH thể hiện qua giá trị IC_{50} theo Bảng 5. Nhìn chung, các cao chiết có giá trị IC_{50} thấp, hoạt tính kháng oxy hóa theo thứ tự từ cao tới thấp là vitamin C > cao ethyl acetate > cao ethanol > cao chloroform > cao n – hexane > cao nước. Theo số liệu cho thấy, cao phân đoạn ethyl acetate từ vỏ thân cây Gáo vàng có khả năng kháng oxy hóa, tuy thấp hơn vitamin C (IC_{50}=19,27±1,34 µg/mL), nhưng cao nhất so với cao tổng và các cao phân đoạn khác trong hoạt động trung hòa gốc tự do DPPH với IC_{50}=36,79±1,17 µg/mL. Cao tổng ethanol cũng chứng tỏ khả năng bắt gốc tự do cao với IC_{50} 59,85±0,96 so với cao n – hexane, cao chloroform và cao nước. Ghi nhận thêm khi so sánh với cao chiết ethanol từ lá cây Gáo vàng có hoạt tính kháng oxy hóa DPPH là IC_{50} 61,23±6,41 µg/mL (Raghavamma *et al.,* 2011), cao phân đoạn ethyl acetate của thân lá *Ruta chalepensis* với IC_{50} 54,98 ± 0,54 µg/mL (Gali,Bedjou, 2019), cao phân đoạn ethyl acetate của vỏ thân *Aidia genipiflora* với IC_{50} 121,5±1,2 µg/mL (Anokwah *et al.,* 2022), cho thấy hiệu quả kháng oxy hóa của vỏ thân cây Gáo vàng Ninh Bình là cao hơn, đem lại giá trị ứng dụng tiềm năng trong y học.

Bảng 5. Giá trị IC 50 của cao tổng và cao phân đoạn vỏ thân cây Gáo vàng

Mẫu	Giá trị IC_{50}
Cao tổng	$59,85^{d}$ ± 0,96
Cao n – hexane	$78,49^{b}$ ± 0,95
Cao chloroform	$64,59^{c}$ ± 0,99
Cao ethyl acetate	$36,79^{e}$ ± 1,17
Cao nước	$96,32^{a}$ ± 1,43
Vitamin C	$19,27^{g}$ ± 1,34

Chú thích: Trong cùng một cột các chữ cái theo sau các giá trị trung bình giống nhau thì không có sự khác biệt có ý nghĩa (p < 0,05).

Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào bằng phương pháp MTT

Cao chiết vỏ thân cây Gáo vàng thể hiện tác động ức chế sự tăng trưởng của tế bào ung thư gan *HepG2.* Theo Bảng 6, sau 24 giờ, ở nồng độ 700-900 µg/mL, cao chiết làm giảm mạnh tế bào sống, gây ức chế được 35,64 - 39,94% tế bào *HepG2*, gần tương đương với chứng dương cisplatin ức chế 41,63% ở nồng độ 4 ppm. Tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào đạt thấp hơn từ 24,38 – 27,48% được ghi nhận ở các nồng độ cao chiết 500-600 µg/mL. Ở giếng đối chứng không xử lý, các tế bào *HepG2* có sự tăng sinh so với ban đầu, tỷ lệ tế bào sống là 100%. Ở các giếng bổ sung cao chiết với nồng độ 700-900 µg/mL, nhiều tế bào *HepG2* co lại, không còn giữ hình dạng như ban đầu và hầu như không tăng sinh, tỷ lệ tế bào *HepG2* sống chỉ còn 60,06±6,58 - 64,36±9,87%, nồng độ cao chiết cao làm cho tỷ lệ tế bào *HepG2* sống được thấp hơn. Điều này gần như tương đương khi so sánh với giếng chứa cisplatin, tỷ lệ tế bào ung thư gan *HepG2* còn tồn tại là 58,37±8,56%. Do vậy, kết quả này đã chứng tỏ giá trị truyền thống của cây Gáo vàng trong hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Theo các nghiên cứu trước, Shichaem và đồng tác giả (2010) đã tìm thấy 2 hợp chất alkaloid đồng phân trong rễ cây Gáo vàng đem lại hoạt tính gây độc tế bào ung thư biểu mô KB và tế bào Hela. Liu và đồng tác giả (2017)

cho biết trong 8 nhóm hợp chất alkaloid được phân lập từ thân và lá cây Gáo vàng, có 4 nhóm được đánh giá hiệu quả ý nghĩa đem lại khả năng kháng 5 dòng tế bào ung thư ở người (HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7 và SW48) so với đối chứng cisplatin. Wang và đồng tác giả (2015) đã xác định 2 nhóm hợp chất alkaloid tách chiết từ vỏ thân cây Gáo cam (*N. officinalis)* có tác dụng ức chế trung bình 3 dòng tế bào ung thư ở người (HT29, SGC7901 và PLC/PRF/5) so với đối chứng cisplatin. Razali và đồng tác giả (2021) đã chứng minh rằng chiết xuất ethanol của lá cây Gáo trắng (*Neolamarckia cadamba)* có tác dụng chống tế bào ung thư vú MCF-7 ở người thông qua việc gây ra quá trình chết theo chu trình tế bào.

Bảng 6. Ức chế tăng trưởng tế bào ung thư gan *HepG2* của cao chiết vỏ thân Gáo vàng ở các nồng độ khác nhau

Mẫu	Nồng độ (µg/mL)	OD_{540}			Trung bình	Tỷ lệ tế bào sống (%)			Trung bình
		Lần 1	Lần 2	Lần 3		Lần 1	Lần 2	Lần 3	
Đối chứng không xử lý	-	1,18	1,25	1,38	1,27±0,10	93,47	99,12	107,41	100,00±7,01
Cao chiết vỏ thân cây Gáo vàng Ninh Bình	900	0,73	0,69	0,85	0,76±0,08	57,98	54,77	67,43	60,06±6,58
	800	0,83	0,71	0,75	0,76±0,06	65,59	56,38	59,14	60,37±4,73
	700	0,68	0,85	0,92	0,81±0,13	53,46	66,95	72,68	64,36±9,87
	600	1,03	0,87	0,96	0,96±0,08	81,87	68,85	76,22	75,62±6,49
	500	1,06	1,01	1,05	1,04±0,03	84,25	80,13	83,18	82,52±2,14
Đối chứng dương (Cisplatin)	4 ppm	0,79	0,61	0,81	0,74±0,11	62,73	48,51	63,85	58,37±8,56

KẾT LUẬN

Kết quả kiểm chứng mô hình tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt RSM-BBD, hàm lượng alkaloid tách chiết từ vỏ thân cây Gáo vàng có giá trị tương đương với thực nghiệm, không có sự khác biệt ý nghĩa. Cao phân đoạn ethyl acetate từ vỏ thân cây Gáo vàng có khả năng kháng oxy hóa chống lại gốc DPPH cao nhất với giá trị IC_{50} là 36,79 µg/mL, thấp hơn vitamin C 1,91 lần. Đáng lưu ý là cao chiết vỏ thân cây Gáo vàng gây độc dòng tế bào ung thư gan *HepG2* với tỷ lệ đạt 35,64-39,94% tại nồng độ 800-900 µg/mL. Kết quả thu được định hướng cho việc nghiên cứu và phát triển sử dụng vỏ thân cây Gáo vàng Ninh Bình trong y học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chaikham S, Buatana J, Meethangdee M, Luang-apirom J, Sopin N, Jantabut K, Kloypan C and Surapinit S (2017). Alkaloids from *Nauclea orientalis* Inhibited *in vitro* ADP and Thrombin Induced Human Platelet Aggregation. University of Phayao, Thailand. *Thammasat Int J Sci Tech*, 22: 2.

Heinrich M, Mah J, Amirkia V (2021). Alkaloids Used as Medicines: Structural Phytochemistry Meets Biodiversity—An Update and Forward Look. *Molecules*, 26: 1836.

Kaur R, Arora S (2015). Alkaloids—Important Therapeutic Secondary Metabolites of Plant Origin. J Crit Rev, 2:1–8.

Lubek-Nguyen A, Ziemichód W, Olech M (2022). Application of Enzyme-Assisted Extraction for the Recovery of Natural Bioactive Compounds for Nutraceutical and Pharmaceutical Applications. Appl Sci,12: 3232.

Liu C, Yang S, Wang K, Bao X, Liu Y, Zhou S, Liu H, Qiu Y, Wang T, Yu H (2019). Alkaloids from Traditional Chinese Medicine against hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother*, 120: 109543.

Raghavamma S, Rao N, Rao K, Rao G (2011). *In Vitro* antioxidant potential of crude extract from leaves of *Nauclea orientalis* Linn. *J Pharm Res*, 4 (5): 1548-1549.

Said K & Amin M (2015). Overview on the response surface methodology (RSM) in extraction processes. *J Appl Eng Sci*, *2*(1): 8-17.

Sandamali J, Hewawasam R, Jayatilaka K, Mudduwa L (2022). *Nauclea orientalis* (L.) bark extract protects rat cardiomyocytes from doxorubicin-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and DNA fragmentation. University of Ruhuna, Sri Lanka. *Oxid Med Cell Longev,* 2022: 19.

Sichaem J, Surapinit S, Siripong P, Khumkratok S, Jong-Aramruang J, Tip-pyang S (2010). Two new cytotoxic isomeric indole alkaloids from the roots of *Nauclea orientalis. Fitoterapia,* 81: 830–833.

Sichaem J, Worawalai W, Tip-pyang S (2012). Chemical constituents from the roots of *Nauclea orientalis. Chem Nat Compd*, 48(5): 827–830.

Sirven MA (2015). Effect of Enzyme-Assisted Extraction of Anthocyanins from Purple Sweet Potato on Total Soluble Solids and Yield of Pigment. PhD dissertation. Department of Nutrition and Food Science, Texas A&M University, US.

Zhang Z, ElSohly HN, Jacob MR, Pasco DS, Walker LA, Clark AM (2001). New indole alkaloids from the bark of *Nauclea orientalis*. J Nat Prod, 64: 1001–5.

Zhu F, Wang J, Yin R, Song J, Li X, Jia X (2014). Review on chemical constituents of genus *Nauclea*. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 29(09): 2877–80.

OPTIMIZATION OF THE ENZYME-ASSISTED EXTRACTION OF ALKALOID CONTENT AND ANTIOXIDANT, CYTOTOXIC ACTIVITIES FROM *Nauclea orientalis* STEM BARK EXTRACT

Minh Tan Pham*, Tran Bao Tram Mai, Thị Dung Tran

Faculty of Applied Sciences, Ton Duc Thang University

SUMMARY

Nauclea orientalis L. is a native plant with many valuable medicinal properties, due to biological compounds which have useful activities, especially in its stem bark containing alkaloid. This study determined the maximum value of the factors affecting the extracted alkaloid content on the basis of single-factor experiments and optimized under the Response Surface Methodolgy (RSM) with a Box-Behnken Design (BBD). The results showed that the optimal conditions for enzyme-assissted (8 U/mL pectinase) alkaloid extraction from *N. orientalis* stem bark was the ratio of raw material: solvent 1:20.96 (g/mL), temperature extraction 72.12 (℃) and time extraction 81.82 (min) to achieve the highest alkaloid content of 74.25 ± 0.04 (mg AE/g), which was well matched with the predicted yield. The ethyl acetate of stem bark fraction exhibited the remarkable 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DDPH) radical scavenging capacity with IC_{50} 36.79 ± 1.17 µg/mL, only 1.91 times lower than vitamin C. The cytotoxic activity of *HepG2* on liver cancer by 3 – [4,5 - dimethylthiazol - 2 – yl] - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromide (MTT) method with the highest inhibitory ability obtained 39.94% at the concentration of 900 µg/mL extract. Due to the biological effects of alkaloid extract from stem bark through *in vitro* activity investigation, Ninh Bình *N. orientalis* will have good potential for medicinal development in future.

Keywords: Alkaloid, cytotoxic activity, enzyme-assissted extraction, *Nauclea orientalis*, scavenging capacity.

* Author for correspondence: Tel: 0963717643; Email: phamminhtan@tdtu.edu.vn