

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 Nguyễn^{1,2}, Phạm Quỳnh Anh¹, Quách Ngọc Tùng^{1,2},
Phạm Ngọc Sơn^{2,3}, Nguyễn Việt Cường⁴, Phí Quyết Tiến^{1,2*}

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

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

³Viện Khoa học hình sự, Bộ Công an

⁴Trường 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 ($IC_{50} = 28,75 \pm 1,94 \mu\text{g/mL}$) và MCF7 ($IC_{50} = 43,47 \pm 3,66 \mu\text{g/mL}$). Thử nghiệm định lượng thành phần các hợp chất phenolic cho thấy cao chiết có hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng lần lượt là $68,07 \pm 0,6 \mu\text{g GAE/mg}$ và $97,24 \pm 1,3 \mu\text{g QE/mg}$. Ngoài ra, cao chiết ở nồng độ $0,6 \text{ mg/mL}$ thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất với ba gốc tự do hydroxyl ($58,04 \pm 2,6\%$), DPPH ($60,71 \pm 1,2\%$) và superoxide ($65,31 \pm 1,9\%$). 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 thủy 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 Sẻ 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 khỏe 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 *Penicillium* và *Aspergillus* nội sinh trong rễ cây thông đỏ Nam (*Taxus wallichiana*) được chứng minh có hoạt tính trung hòa 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, MgSO₄ 0,5, K₂HPO₄ 1, KCl 0,5, NaNO₃ 2, FeSO₄ 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 28°C trong 5 ngày để quan sát hình Thái khuẩn lạc. Sợi nấm được sử dụng làm tiêu bản để quan sát cường độ 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 28°C 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, MI) 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 lý 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 28°C, 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 đường 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 NaNO₂-Al(NO₃)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 đường 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).

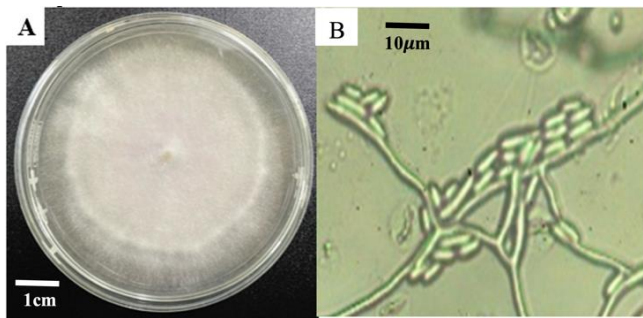
Xử lý số liệu: Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả nghiên cứu được xử lý và tính giá trị trung bình theo lý thuyết thống kê sinh học trên phần mềm Microsoft Excel 2019 (Microsoft, Mỹ).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

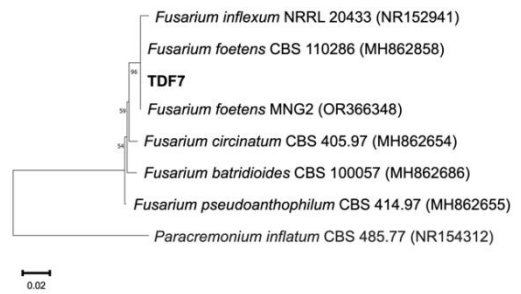
Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và bào tử vi nấm

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 xoắn, 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 chlamyosporium* 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 IC₅₀ 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 (IC₅₀ = 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 (OD₇₀₀ = 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. bac-tridioides* 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 | <i>F. foetens</i> MNG2 | <i>F. foetens</i> CBS 110286 | <i>F. inflexum</i> NRRL 20433 | <i>F. pseudoanthophilum</i> CBS 414.97 | <i>F. circinatum</i> CBS 405.97 | <i>F. bac-tridioides</i> CBS 100057 |
|---|--------|------------------------|------------------------------|-------------------------------|--|---------------------------------|-------------------------------------|
| TDF7 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 99,10 | 98,65 | 98,91 | 98,60 |
| <i>F. foetens</i> CBS 110286 (MH862858) | 100,00 | 99,36 | 100,00 | 95,99 | 95,50 | 95,88 | 95,69 |
| <i>F. foetens</i> MNG2 (OR366348) | 100,00 | 100,00 | 99,36 | 98,86 | 98,52 | 98,50 | 98,33 |
| <i>F. inflexum</i> NRRL 20433 (NR_152941) | 99,10 | 98,96 | 95,99 | 100,00 | 98,27 | 98,65 | 98,46 |
| <i>F. pseudoanthophilum</i> CBS 414.97 (MH862655) | 98,65 | 98,52 | 95,50 | 98,27 | 100,00 | 99,63 | 99,45 |
| <i>F. circinatum</i> CBS 405.97 (MH862654) | 98,91 | 98,50 | 95,88 | 98,65 | 99,63 | 100,00 | 99,82 |
| <i>F. bac-tridioides</i> 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. Chúng vi nấm *F. foetens* AQF6 nội sinh trên cây dễ tung 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 IC₅₀ 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 chúng 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 IC₅₀ = 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. Chúng vi nấm *Fusarium perseae* WDF12 nội sinh trên cây đinh 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 IC₅₀ 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 IC₅₀ = 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 ellipticine | |
|-------------------------------|--|------------|----------------------------|--|------------|
| | 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 |

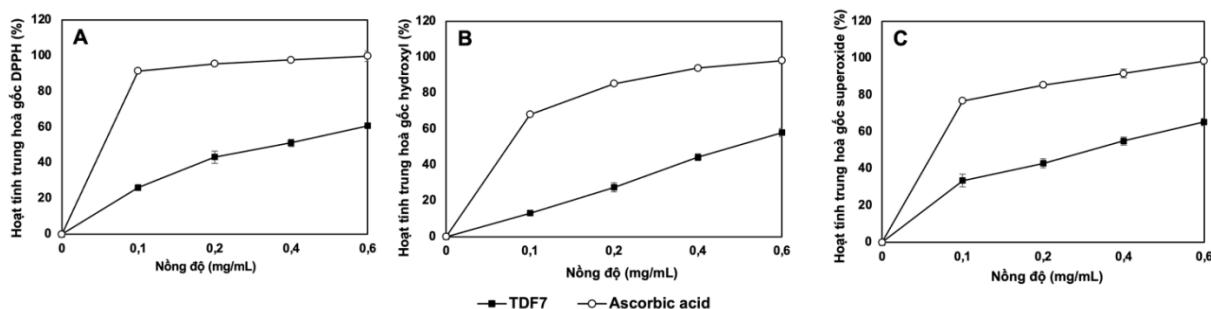
Chú thích: Ellipticine là đối chứng dương.

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 (IC₅₀ = 28,75±1,94 µg/mL) và MCF7 (IC₅₀ = 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 x 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 Anh¹, Quach Ngoc Tung^{1,2},
Pham Ngoc Son^{2,3}, Nguyen Viet Cuong⁴, 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 ($IC_{50} = 28.75 \pm 1.94 \mu\text{g/mL}$) and MCF7 ($IC_{50} = 43.47 \pm 3.66 \mu\text{g/mL}$) cancer cell lines. In addition, the quantitative assay revealed the total total polyphenol and flavonoid contents of *F. foetens* TDF7 extract were $68.07 \pm 0.6 \mu\text{g GAE/mg}$ and $97.24 \pm 1.3 \mu\text{g QE/mg}$, respectively. At the concentration of 0.6 mg/mL, the *F. foetens* TDF7 extract exhibited the highest antioxidant activity against hydroxyl ($58.04 \pm 2.6\%$), DPPH ($60.71 \pm 1.2\%$) and superoxide ($65.31 \pm 1.9\%$). 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