

HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI NẤM NỘI SINH PHÂN LẬP TỪ CÂY DƯỢC LIỆU HỌ THÔNG ĐẤT VIỆT NAM

*Phạm Thanh Hà**, *Trịnh Thị Thu Hà**, *Phạm Thị Thoa**,
Đào Thị Hồng Vân†, *Lê Thị Minh Thành**
Email: minhthanh.ibt@gmail.com

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 03/05/2023

Ngày phản biện đánh giá: 01/11/2023

Ngày bài báo được duyệt đăng: 27/11/2023

DOI: 10.59266/houjs.2023.326

Tóm tắt: *Vi nấm là một trong những nguồn tiềm năng cung cấp các hợp chất tự nhiên. Trong nghiên cứu này, 5 chủng nấm nội sinh có khả năng sinh tổng hợp huperzine phân lập từ một số loài thảo dược thuộc họ Thông đất Việt Nam đã được đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và sinh enzyme ngoại bào. Các chủng đều có khả năng kháng từ 2-5 chủng vi sinh vật (VSV) gây bệnh kiểm định và sinh tổng hợp từ 2-7 loại enzyme ngoại bào. Chủng TĐ02-2.7 có phổ kháng khuẩn rộng nhất, kháng 5/6 chủng VSV kiểm định bao gồm *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, và *Candida albicans*; sau đó đến chủng HG02-27 ức chế 4/6 chủng ngoại trừ 2 chủng *S. enterica* và *C. albicans*. Các chủng có hoạt tính đối kháng VSV kiểm định khá cao, đường kính vòng đối kháng *S. aureus* từ 35-42 mm, *P. aeruginosa* từ 28-35 mm, *C. albicans* từ 28-34 mm và *B. cereus* từ 26-32 mm. Đáng chú ý là các chủng THG1-18 có khả năng sinh tổng hợp cả 7 loại enzyme được thử nghiệm (lipase, protease, cellulose, gelatinase, phosphatase, amylase và β -galactosidase); chủng TTD2-2,7 và THG2-27 vừa có phổ kháng rộng VSV gây bệnh (4-5 loài VSV thử nghiệm) cũng như khả năng sinh đa dạng enzyme ngoại bào (5-6 loại). Nghiên cứu này bước đầu cho thấy, các chủng vi nấm ngoài khả năng sinh tổng hợp huperzine còn có thể mang đến tiềm năng ứng dụng làm nguồn nguyên liệu trong sản xuất các sản phẩm khác phục vụ trong nông nghiệp, môi trường hoặc công nghiệp chế biến.*

Từ khóa: *đối kháng vi sinh vật gây bệnh, enzyme ngoại bào, vi nấm nội sinh, Lycopodiaceae*

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

† Trường Đại học Mở Hà Nội

I. Đặt vấn đề

Các loài Thông đất có ở Việt Nam cũng như các nước nhiệt đới khác có nhiều tác dụng sinh học và công dụng đã được công bố. Chúng đang được đánh giá là loại cây thuốc quan trọng trong việc điều trị nhiều bệnh của con người. Những nghiên cứu gần đây của các nhà khoa học Ấn Độ cho thấy dịch chiết của một số loài thông đất có khả năng kháng khuẩn mạnh mẽ với một số chủng vi khuẩn như: Trục khuẩn mũ xanh, tụ cầu vàng, trục khuẩn cỏ khô, vi khuẩn gram dương *B. cereus*. Tại Trung Quốc, người ta đã sử dụng cây Thông đất để cải thiện triệu chứng của các bệnh có liên quan tới tim mạch, hệ thống thần kinh cơ, hoặc các triệu chứng có liên quan đến cholinesterase bao gồm sốt, xuất huyết, căng thẳng, tiêu ra máu, tâm thất phân liệt. Thông đất cũng được sử dụng như một chất chống viêm và là thuốc giải độc cho ngộ độc phospho hữu cơ (Tổng quan về cây Thông đất).

Nấm nội sinh rất tiềm năng như nguồn sản phẩm tự nhiên mới, có hoạt tính sinh học để khai thác trong y học, nông nghiệp và công nghiệp. Các nghiên cứu đã cho thấy có rất nhiều chủng vi nấm nội sinh thuộc các chi khác nhau có khả năng sản sinh ra các hợp chất có hoạt tính sinh học giống hoặc tương tự như cây ký chủ của chúng.

Vi sinh vật (VSV) nội sinh đã được tìm thấy có một số vai trò và ứng dụng: - Sản xuất ra chất kích thích sinh trưởng (Phytostimulate) - Sản xuất ra chất tạo màu (Pigment Product) - Sản xuất ra enzyme (Enzyme Product) - Sản xuất ra chất kháng khuẩn (Antimicrobial activity) - Sản xuất ra chất có hoạt tính

sinh học và các hợp chất khác (Source - Bio-active and Novel-Compound) - Giúp mối liên hệ giữa VSV trên và dưới đất (Reciprocal-Interact Community) - Ứng dụng trong phòng chống tác nhân sinh học (Bio-control-Agent) - Ứng dụng vào trong chu trình tuần hoàn dinh dưỡng (Nutrient-Cycle) - Ứng dụng vào việc cải tạo môi trường (Bioremediate/Bio-degrade) - Ứng dụng vào sản xuất các hợp chất hữu cơ bay hơi (Product- Organic Compound) (Jia & cs., 2016).

Vi nấm nội sinh là một nguồn phong phú các sản phẩm có hoạt tính sinh học, hiện đang được sử dụng trong nông nghiệp, y học và công nghiệp dược phẩm. Trong bối cảnh các vấn đề sức khỏe như mầm bệnh mới/ kháng thuốc, cùng nhiều vấn đề khác, việc nghiên cứu các sản phẩm tự nhiên mới, an toàn hơn đã đóng một vai trò quan trọng trong cuộc chiến toàn cầu (Meenu & cs., 2017).

Các chủng vi nấm được chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu là các chủng nấm nội sinh được phân lập từ các cây dược liệu họ Thông đất (*Lycopodiaceae*) có khả năng sinh tổng hợp Huperzine - nguyên liệu cho điều chế thuốc, thực phẩm chức năng hỗ trợ chữa trị bệnh suy giảm trí nhớ, đặc biệt là Alzheimer. Ngoài hoạt tính quý này các chủng vi nấm còn có thể có một số hoạt tính sinh học có lợi khác cần được tìm hiểu và khai thác nhằm hướng tới các tiềm năng ứng dụng đa dạng khác của chúng.

II. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

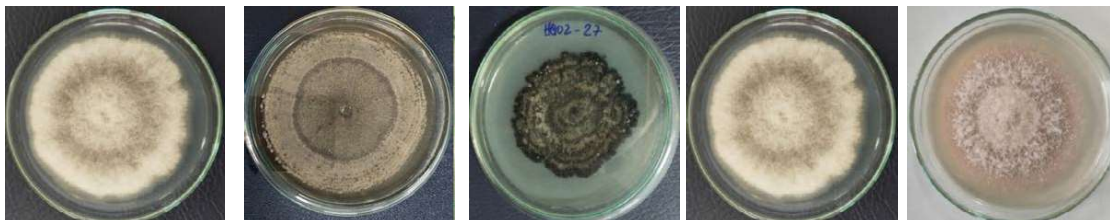
2.1. Vật liệu

Các chủng giống vi sinh vật do Trung tâm Giống & Bảo tồn nguồn gen Vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện

Hàn lâm KH & CN Việt Nam cung cấp, bao gồm:

- 05 chủng vi nấm nội sinh cây dược liệu họ Thông đất được sử dụng để nghiên cứu đã được xác định là có khả năng sinh tổng hợp huperzine A và huperzine B.

- Chủng VSV kiểm định: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231.



*Colletotrichum
siamense
THG01-17*

*Epicoccum
sorghinum
THG01-18*

*Phyllosticta sp.
HG02-27*

*Aspergillus sp.
TĐ02-2.7*

*Phoma sp.
TKH3-2*

Thông đất nhám (*Phlegmariurus squarrosus* (G. Forst.) Á. Löve & D. Löve)

Thông đất râu (*Phlegmariurus phlegmaria* (L.) T. Sen & U. Sen)

Thông đất lá phi lao (*Lycopodium casuarinoides* Spring.)

Thông đá (*Lycopodium clavatum* L.)

Hình 1. Hình thái các chủng vi nấm nghiên cứu trên môi trường thạch đĩa PDA và nguồn phân lập các chủng

2.2. Phương pháp

2.2.1. Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng vi nấm

Hoạt tính kháng VSV kiểm định của các chủng vi nấm được xác định theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Rios & cs., 1988). (1) Các chủng vi nấm nghiên cứu được nuôi trên môi trường dịch thể PDB ở 28°C trong 5 ngày. (2) Đổ đĩa LB agar dày khoảng 5 mm. (3) Cấy trái các chủng VSV kiểm định đã chuẩn bị lên đĩa thạch (4) Khoan lỗ giếng có đường kính 8 mm trên đĩa đã cấy trái chủng VSV kiểm định sao cho mỗi giếng cách nhau từ 2 - 3 cm. (5) Dùng pipet hút 100µl dịch nuôi cấy vi nấm đã loại sinh khối nhỏ vào các lỗ đã khoan. 100µl môi trường dịch thể PDB không nuôi cấy vi nấm được sử dụng làm đối chứng âm, kháng sinh

Ampicillin 1 mg/ml được sử dụng làm đối chứng dương. (6) Đặt các đĩa petri có VSV kiểm định vào tủ lạnh ở 4°C trong khoảng 5-6 giờ để kháng sinh kịp khuếch tán vào trong thạch, sau đó đem ủ ấm ở 37°C cho VSV phát triển. Đường kính vòng vô khuẩn (D, mm) trên các đĩa thạch được xác định sau 24 giờ. Vi nấm có hoạt tính kháng VSV kiểm định tạo ra các vòng ức chế sự phát triển của VSV kiểm định. Đường kính vòng vô khuẩn D-d (mm) (D - đường kính vòng vô khuẩn, d - đường kính giếng). (Thí nghiệm lặp lại 3 lần).

2.2.2. Nghiên cứu khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng vi nấm

a. Xác định hoạt tính của các enzyme: bằng cách cho enzyme tác động với cơ chất đặc hiệu trong môi trường, cơ chất bị phân hủy tạo thành vòng trong

suốt, độ lớn của vòng trong suốt phản ánh hoạt động của enzyme.

Hoạt tính sinh tổng hợp enzyme của các chủng vi nấm được xác định theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Hankin & Anagnostakis, 1975). (1) Các chủng vi nấm được nuôi trên môi trường dịch thể PDB ở 28°C trong 5 ngày. (2) Chuẩn bị môi trường cơ chất chứa agar 20 g/l có bổ sung 1% tinh bột, casein, carboxyl methyl cellulose (CMC), tributyrin hoặc $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ để đánh giá khả năng sinh các enzyme amylase, protease, cellulase, lipase hay phosphatase (tương ứng). Khử trùng môi trường chứa cơ chất và đổ đĩa Φ 12, dày 5 mm. (3) Khoan lỗ giống trên đĩa có đường kính 8 mm bằng dụng cụ đục lỗ đã khử trùng. (4) Dùng pipet hút 100 μl dịch ngoại bào vi nấm bổ sung vào các lỗ đã khoan. Môi trường dịch thể PDB không nuôi cấy vi nấm được sử dụng làm đối chứng âm. (5) Để lạnh 4°C qua đêm cho enzyme khuếch tán ra môi trường. (6) Ủ tiếp ở 37°C trong khoảng 24 giờ để enzyme hoạt động. Hoạt độ tương đối của enzyme được xác định dựa trên hiệu số D-d (mm). Trong đó D là đường kính vòng phân giải (mm), d là đường kính lỗ thạch (mm). D-d > 25 mm: hoạt tính enzyme rất mạnh; D-d = 20 - 25 mm: hoạt tính enzyme mạnh; D-d = 10 - 20 mm: hoạt tính enzyme trung bình; D-d < 10 mm: hoạt tính enzyme yếu. (Thí nghiệm lặp lại 3 lần).

b. Đánh giá khả năng sinh gelatinase (Dela & Torres, 2016)

(1) Chuẩn bị môi trường cơ chất chứa agar 10 g/l có bổ sung 5% gelatin. Chia môi trường vào các ống nghiệm 5 ml/ống và khử trùng. (2) Cấy sợi nấm

lên ống môi trường và ủ ở 30°C trong 5 ngày. (3) Sau khi nấm sinh trưởng cấy vào tủ lạnh ở 4°C trong 5 ngày. Sự thủy phân gelatin được biểu thị bằng việc hóa lỏng môi trường. (Thí nghiệm lặp lại 3 lần).

c. Kiểm tra khả năng sinh enzyme β -galactosidase (Eriana & cs., 2000)

Các chủng nấm sản xuất lactase ban đầu sàng lọc bằng cách thêm X-gal vào môi trường nuôi cấy. Sự có mặt của enzyme β -galactosidase được xác định dựa trên nguyên tắc β -galactosidase xúc tác thủy phân X-gal hình thành nên kết tủa màu xanh da trời. Vi nấm nội sinh với enzyme này tạo nên nấm có màu xanh khi nuôi cấy với sự có mặt của chỉ thị X-gal trong môi trường nuôi cấy.

(1) X-gal được hòa tan trong dimethyl sulphoxide ở nồng độ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Bảo quản dung dịch gốc này trong tối ở nhiệt độ -20°C. (2) Môi trường PDA sau khi hấp vô trùng được đổ đĩa, sau đó gạt đều 50 μl chỉ thị X-gal. (3) Cấy chấm điểm các chủng vi nấm nội sinh trên môi trường thạch đĩa có chỉ thị X-gal. (4) Sau đó đem nuôi ở tủ ấm 30°C trong 3-10 ngày, các chủng nấm nội sinh tạo màu xanh trên đĩa chỉ thị là các chủng có khả năng sinh tổng hợp enzyme β -galactosidase. (Thí nghiệm lặp lại 3 lần).

III. Kết quả và thảo luận

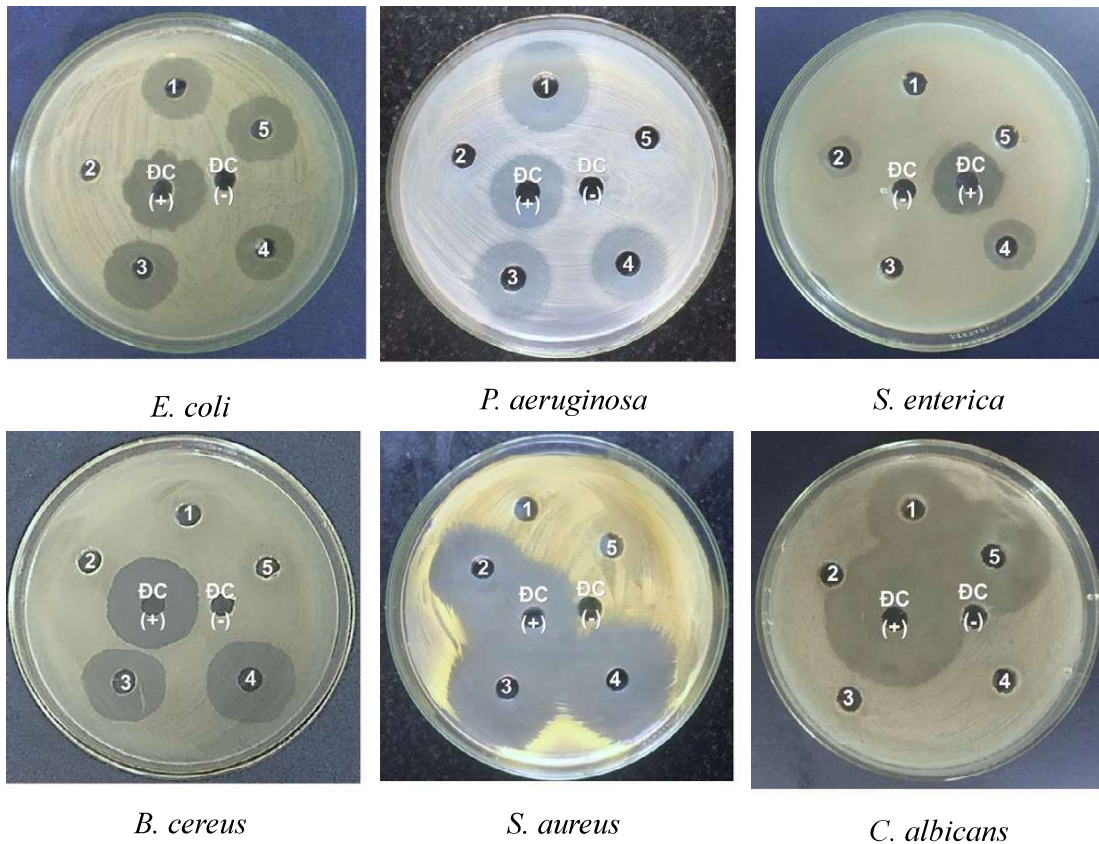
Việc sàng lọc hoạt tính sinh học là bước cần thiết để tuyển chọn chủng vi nấm có hoạt tính cao cho các nghiên cứu phát triển hợp chất tự nhiên có giá trị.

3.1. Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng vi nấm

Nhiều sản phẩm tự nhiên được sinh ra từ vi nấm nội sinh được cho là có khả

năng ngăn chặn, kìm hãm hay diệt nhiều mầm bệnh khác nhau xâm nhập mô thực vật. Một số nghiên cứu cho thấy chúng có khả năng trị liệu trên vi khuẩn, nấm, virus và những sinh vật đơn bào gây bệnh cho người và động vật. Các chất kháng sinh có nguồn gốc từ nấm sợi chiếm tỉ lệ khá lớn.

Khả năng kháng VSV kiểm định của 5 chủng vi nấm nội sinh được đánh giá trên 6 chủng VSV kiểm định, bao gồm: 02 chủng vi khuẩn gram dương (*B. cereus*, *S. aureus*), 03 chủng vi khuẩn gram âm (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*) và 01 chủng nấm men *C. albicans* (hình 2, bảng 1).



Hình 2. Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của 5 chủng vi nấm
(1. THG01-17, 2. THG01-18, 3. THG01-17, 4. TĐ02-2.7, 5. TKH3-2)

Bảng 1. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của 5 chủng vi nấm nghiên cứu

TT	Chủng vi nấm	Vùng ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây bệnh kiểm định (mm)					
		Vi khuẩn G (-)			Vi khuẩn G (+)		Nấm men
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	
1	THG01-17	22±0,8	35±1,1	-	-	-	28±0,9
2	THG01-18	-	-	8±0,4	-	35±1,5	-
3	HG02-27	25±1,0	30±1,0	-	26±1,0	40±1,0	-
4	TĐ02-2.7	16±0,6	28±0,9	10±0,5	32±1,0	42±1,1	-
5	TKH3-2	28±1,0	-	-	-	-	34±1,2

Kết quả cho thấy, 5 chủng đều có khả năng kháng từ 2 đến 5 chủng VSV gây bệnh kiểm định. Trong đó, 4/5 chủng (trừ chủng THG1-18) có khả năng kháng vi khuẩn *E. coli*; 3/5 chủng có khả năng kháng vi khuẩn *P. aeruginosa* hoặc *S. aureus*; 2/5 chủng có khả năng kháng vi khuẩn *S. enterica* hoặc *B. cereus* và nấm men *C. albicans*. Không có chủng nào có khả năng kháng tất cả các chủng VSV kiểm định, tuy nhiên, chủng TĐ02-2.7 có khả năng kháng tới 5/6 chủng VSV kiểm định trừ chủng nấm men, tiếp theo chủng HG02-27 có khả năng kháng 4/6 chủng VSV kiểm định không bao gồm chủng *S. enterica* và *C. albicans*. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy các chủng nấm nội sinh được kiểm tra có hoạt tính đối kháng VSV kiểm định khá cao, đường kính vòng đối kháng từ 35-42 mm (*S. aureus*), từ 28-35 mm (*P. aeruginosa*), từ 28-34 mm (*C. albicans*) và từ 26-32 mm (*B. cereus*). *Salmonella enterica* là khó kháng nhất, đường kính vòng đối kháng thấp chỉ từ 8-10 mm.

Một số nghiên cứu của các nhà khoa học đã khẳng định về khả năng của vi nấm tạo ra các kháng sinh mới chống lại các VSV gây bệnh. Theo nghiên cứu của Phan Thị Hoài Trinh & cs. (2019), trong số 117 chủng vi nấm kiểm tra có 46,2% số chủng kháng *B. cereus*, 37,6% kháng *S. faecalis* và 39,6% kháng *S. aureus*. Đồng thời hoạt tính kháng các chủng *E. coli*, *P. aeruginosa* và *K. pneumonia* có tỷ lệ thấp lần lượt là 9,4%, 8,5% và 19,7%. Nhóm nghiên cứu của Cao Ngọc Diệp (2016) đã đánh giá hoạt tính kháng sinh của 33 chủng vi nấm biến cho kết quả 28 chủng thể hiện hoạt tính kháng sinh đối với VSV kiểm định gồm *S. enterica*, *Edwardsiella ictaluri*, *E. coli*, *B. cereus* và *C. albicans*. Các nghiên cứu đã thống kê có từ 38-59% các hợp chất chiết xuất từ vi nấm biến thể hiện hoạt tính kháng sinh (Zhang & cs., 2013).

3.2. Nghiên cứu khả năng sinh enzyme của các chủng vi nấm

Enzyme là chìa khoá quan trọng của rất nhiều phản ứng thủy phân, được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là trong ngành chế biến thực phẩm. Đến nay các nhà khoa học đã tìm được khoảng 3500 loại enzyme. Nguồn cung cấp enzyme phổ biến nhất hiện nay là từ VSV, bởi những ưu điểm nổi trội của chúng như: sản lượng lớn, sinh sản nhanh trên môi trường đơn giản, rẻ tiền, cho hoạt tính thủy phân cao. Nấm sợi có tiềm năng lớn nhất sinh các loại enzyme ngoại bào mạnh, phân giải và chuyển hóa các hợp chất hữu cơ, vô cơ khó tan trong tự nhiên. Một số enzyme đã được tinh sạch, nghiên cứu kỹ và ứng dụng phổ biến như: cellulase, protease, amylase, pectinase, kinase ... (Nguyễn Thị Minh Khanh & cs., 2020).

Amylase là một enzyme giúp thủy phân liên kết alpha của các polysaccharide như tinh bột và glycogen, tạo ra những cơ chất đơn giản như glucose và maltose. Enzyme amylase được ứng dụng rất rộng rãi trong nhiều lĩnh vực: ngành công nghiệp sản xuất rượu bia, bánh mì, sản xuất tương, mạch nha, mật, đường glucose, làm thức ăn cho gia súc, trong ngành dệt may, công nghiệp sản xuất dược phẩm, chế biến bột ngọt Nguyễn Thị Minh Khanh & cs., 2020). Cellulase là một nhóm gồm endocellulase, exocellulase và cellobiase có tác dụng thủy phân cellulose thành glucose. Các chủng nấm sợi thuộc chi *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, ... có khả năng sinh enzyme cellulase được sử dụng trong chăn nuôi để nâng cao sự tiêu hóa cellulose ở động vật. Ngoài ra chúng còn được dùng trong sản xuất glucose từ bã và sản phẩm thải của công nghiệp rừng, làm phân bón, xử lý rác thải ... (Nguyễn Thị Minh Khanh & cs., 2020).

Protease là enzyme xúc tác quá trình thủy phân protein thành peptit và axit amin.

Protease gồm proteinase và peptidase có tính đặc hiệu tương đối rộng. Protease nấm sợi có khoảng pH hoạt động rộng hơn so với protease động vật và vi khuẩn. Người ta chia protease nấm sợi thành 3 nhóm: protease acid, protease kiềm và protease trung tính. Nấm sợi có khả năng phân giải mạnh protein thường gặp thuộc các chi *Penicillium*, *Aspergillus*, ... Protease nấm sợi thường được dùng nhiều trong chế biến thực phẩm, công nghiệp dệt, công nghiệp thuộc da, chế biến các loại bột giặt, mỹ phẩm ... (Nguyễn Thị Minh Khanh & cs., 2020).

Nấm được công nhận là một trong những nguồn lipase tốt nhất. Lipase nấm được chú ý trong các ngành công nghiệp do đặc tính bề mặt và tính ổn định dưới các điều kiện vật lý, hóa học. Trong tự nhiên, đất bị ô nhiễm từ quá trình sản xuất dầu và các nơi sản xuất bơ sữa, các loài nấm có khả năng tiết ra lipase để làm giảm mỡ và dầu. Đặc tính lipase ngoại bào của một số loài nấm như *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum candidum*, *Pencillium*, *Candida rugosa*, *Humicola lanuginosa*, *Cunninghamella verticillata* và *Aspergillus* có khả năng phân hủy chất béo đã được tập trung vào nghiên cứu để hướng tới các ứng dụng khác của enzyme. Lipase đóng vai trò quan trọng trong công nghiệp thực phẩm, công nghiệp tẩy rửa, xử lý nước thải ...

Việc phân lập các chủng nấm có khả năng phân giải photphat khó tan từ rễ của

các cây dược liệu rất có triển vọng để ứng dụng trong sản xuất chế phẩm hỗ trợ cây trồng như hòa tan các chất khoáng, sản sinh các chất điều hòa tăng trưởng thực vật và kiểm soát mầm bệnh (Nguyễn Thị Mai Hương & cs., 2021).

Gelatinase là một enzyme quan trọng không chỉ cho ngành công nghiệp hóa chất mà còn cho công nghiệp thực phẩm như một dung môi, chất kết dính, chất ổn định cũng như chất chống ung thư, kháng sinh và dược phẩm khác.

β -galactosidase được sử dụng trong các sản phẩm từ sữa như sữa chua, kem chua và một số loại pho mát được xử lý bằng enzyme để phân hủy bất kỳ loại đường lactose nào trước khi tiêu thụ cho con người. Trong những năm gần đây, β -galactosidase đã được nghiên cứu như một phương pháp điều trị tiềm năng cho tình trạng không dung nạp lactose thông qua liệu pháp thay thế gen (Eriana & cs., 2000).

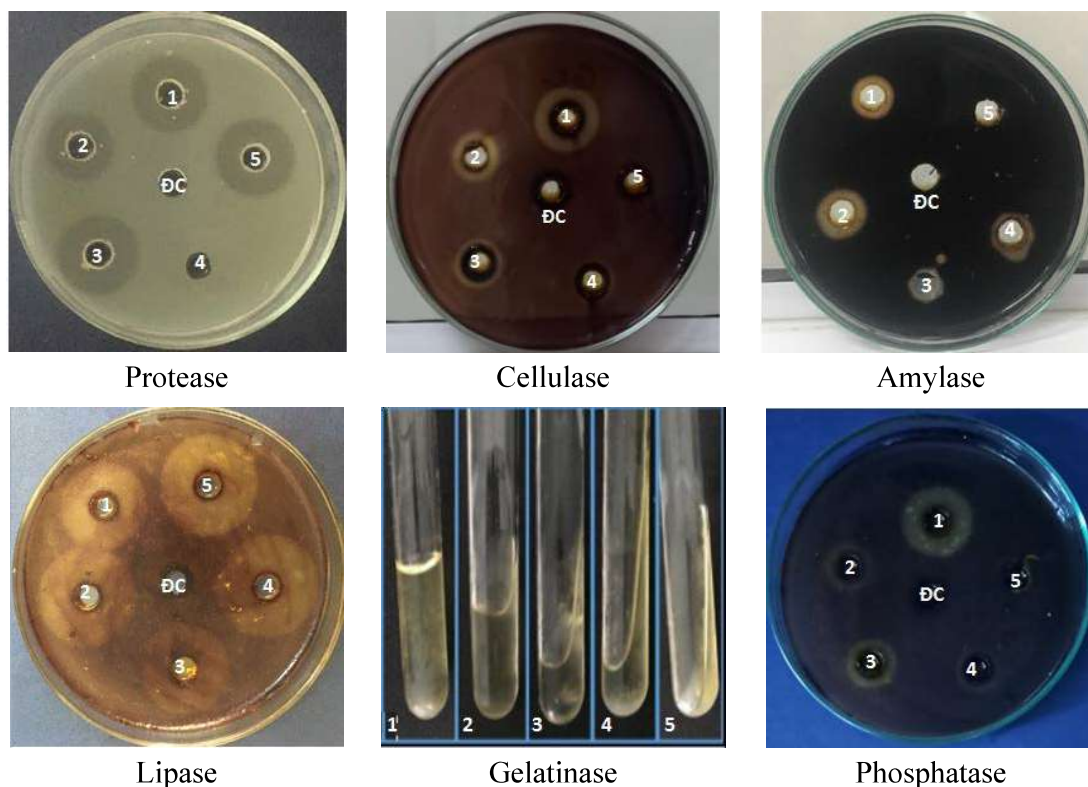
Khả năng sinh tổng hợp enzyme của 5 chủng vi nấm nội sinh được đánh giá thử nghiệm với khả năng sinh 7 loại enzyme, bao gồm protease, amylase, lipase, cellulase, phosphatase, gelatinase và β -galactosidase. Kết quả thể hiện trong bảng 2, hình 3 và hình 4.

Bảng 2. Khả năng sinh tổng hợp enzyme của các chủng vi nấm nội sinh

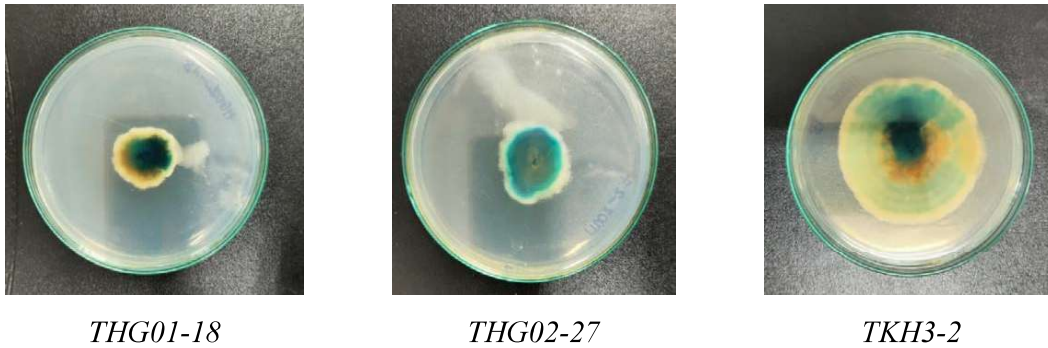
Chủng	Hoạt tính sinh enzyme ngoại bào (mm)					Gelatinase	β -galactosidase
	Protease	Amylase	Lipase	Cellulase	Phosphatase		
THG1-17	25±1,3	7±0,7	25±1,5	12±1,0	21±1,5	-	-
THG1-18	18±1,0	9±0,8	33±1,6	7±0,8	7±0,8	+	+
THG2-27	28±1,1	-	27±1,5	5±0,5	8±0,5	+	+
TTĐ2-2.7	-	5±0,5	34±1,3	2,5±0,5	5±0,5	+	-
TKH3-2	27±1,4	-	32±1,5	-	-	+	+

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các chủng vi nấm đều có khả năng sinh tổng hợp các enzyme quan trọng. Trong đó, cả 5 chủng đều có khả năng sinh lipase; 4/5 chủng có khả năng sinh 4 enzyme proteinase, cellulase, gelatinase, phosphatase; 3/5 chủng sinh tổng hợp 2 enzyme amylase và β -galactosidase. Chủng THG2-27 không có khả năng sinh amylase. Chủng THG1-17 không có khả năng sinh gelatinase và β -galactosidase. Chủng TĐ2-2.7 không có khả năng sinh protease và β -galactosidase. Chủng TKH3-2 không có khả năng sinh 3 loại enzyme được kiểm tra là amylase, cellulase và phosphatase. Khi nuôi trên môi trường có chất chỉ thị X-gal, các chủng bắt màu xanh ở các thời gian và có độ đậm nhạt khác nhau cho thấy khả năng sinh β -galactosidase là khác nhau. Các chủng

có thời gian bắt màu nhanh, có độ màu đậm sẽ có khả năng sinh β -galactosidase cao hơn. Chủng THG02-27 và THG01-18 có khuẩn lạc chuyển màu xanh trong thời gian hình thành khuẩn lạc rất ngắn (sau 2 ngày nuôi cấy), khả năng bắt màu mạnh chứng tỏ chúng có khả năng sinh β -galactosidase cao (hình 4). Hoạt tính sinh tổng hợp lipase và protease của các chủng là khá cao, đường kính vòng hoạt tính đạt lần lượt từ 25-33 mm và từ 18-28 mm (bảng 2). Trong 5 chủng có chủng THG1-18 có khả năng sinh tổng hợp cả 7 loại enzyme được kiểm tra. Các chủng này cho thấy tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo hướng tới làm nguyên liệu ứng dụng sản xuất sản phẩm trong xử lý môi trường cũng như trong công nghiệp chế biến.



Hình 3. Đánh giá hoạt tính sinh tổng hợp 6 loại enzyme của các chủng vi nấm (1. THG01-17, 2. THG01-17, 3. THG01-17, 4. TĐ02-2.7, 5. TKH3-2)



Hình 4. Chủng nấm có hoạt tính sinh β -galactosidase

IV. Kết luận

Các chủng vi nấm nội sinh cây dược liệu họ Thông đất được nghiên cứu cho thấy ngoài khả năng sinh huperzine còn có một số hoạt tính sinh học có lợi khác. Các chủng đều có khả năng kháng từ 2-5 chủng VSV gây bệnh kiểm định và có khả năng sinh tổng hợp từ 2-7 loại enzyme ngoại bào. Chủng TĐ02-2.7 có phổ kháng khuẩn rộng nhất với khả năng kháng tới 5/6 chủng VSV kiểm định, sau đó đến chủng HG02-27 có khả năng kháng 4/6 chủng VSV kiểm định được kiểm tra. Các chủng nấm nội sinh được kiểm tra có hoạt tính đối kháng VSV kiểm định khá cao, đường kính vòng đối kháng *S. aureus* từ 35-42 mm, *P. aeruginosa* từ 28-35 mm, *C. albicans* từ 28-34 mm) và *B. cereus* từ 26-32 mm. Cả 5 chủng đều có khả năng sinh lipase; 4/5 chủng có khả năng sinh 4 enzyme protease, cellulose, gelatinase và phosphatase; 3/5 chủng sinh tổng hợp 2 enzyme amylase và β -galactosidase. Đáng chú ý là các chủng THG1-18 có khả năng sinh tổng hợp cả 7 loại enzyme được thử nghiệm; chủng TTD2-2,7 và THG2-27 vừa có phổ kháng rộng VSV gây bệnh (4-5 loài VSV thử nghiệm) cũng như khả năng sinh đa dạng enzyme ngoại bào (5-6 loại).

Nghiên cứu bước đầu cho thấy, các chủng vi nấm ngoài khả năng sinh tổng hợp huperzine còn có thể mang đến tiềm năng ứng dụng làm nguồn nguyên liệu trong sản xuất các sản phẩm khác phục vụ trong nông nghiệp, môi trường hoặc công nghiệp chế biến. Tuy nhiên, cần thiết có các nghiên cứu sâu hơn tiếp theo về các hoạt tính sinh học của từng chủng cũng như các thử nghiệm mang tính ứng dụng.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Dela Cruz T E E, J M O Torres (2016). Gelatin hydrolysis test protocol. American: Society for Microbiology. 10p
- [2]. Diep C. N., Phong N. T., Tam H. T. (2016). Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with sponges *Leucosolenia* sp. and *Hexactinosa* sp. In Ha Tien sea, Kien Giang, Viet Nam. Int. J. Pharm. Sci., 12: 294-308.
- [3]. Eriana S. B., Daison O. S., Flavia M. L. P. (2000). A practical method for screening for β -galactosidase secreting microbial colonies. Braz. J. Microbiol. 31:37-38.
- [4]. Hankin L., Anagnostakis S.L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia. 67:597-607.

- [5]. <https://123docz.net/document/3585870-phan-lap-tuyen-chon-nhung-chung-nam-moc-co-kha-nang-sinh-tong-hop-enzyme-cellulase-cao-ung-dung-vao-qua-trinh-u-phan-huu-co-tu-vo-trai-cacao.htm>
- [6]. Jia M., Chen L., Xin H. L. (2016). A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review. *Front. Microbiol.* 7: 906-921.
- [7]. Meenu K., Arshia S., Gurpreet S., Priya W., Rajinder K. (2017). Phylogeny, antimicrobial, antioxidant and enzyme-producing potential of fungal endophytes found in *Viola odorata*. *Ann. Microbiol.* 67: 529-540.
- [8]. Nguyễn Thị Mai Hương, Hoàng Văn Tuấn, Đặng Thảo Yến Linh, Chu Xuân Quang, Phạm Thị Thu Hoài (2021). Phân lập và sàng lọc các chủng nấm cộng sinh vùng rễ cây dược liệu được trồng tại Việt Nam có khả năng phân giải photphat và sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA. *Tạp chí Khoa học & Công nghệ.* 68:7-14.
- [9]. Nguyễn Thị Minh Khanh, Nguyễn Thị Trang, Lê Hồng Quang, Phạm Thị Lan Anh (2020). Nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp protease của một số chủng nấm mốc thuộc chi *Aspergillus*. *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam.* 62 (11): 33-37.
- [10]. Phan Thị Hoài Trinh, Trần Thị Thanh Vân, Ngô Thị Duy Ngọc, Cao Thị Thúy Hằng, Lê Thị Hoa, Đinh Thành Trung, Huỳnh Hoàng Như Khánh, Lê Đình Hùng (2019). Đánh giá hoạt tính kháng sinh và chống oxy hóa của một số chủng vi nấm phân lập ở vùng biển Nha Trang. *Tạp chí sinh học.* 41: 409-417.
- [11]. Reserch Institute for functional food. Tổng quan về cây thông đất. <https://riff.vn/vi/cay-thong-dat>
- [12]. Rios J. L., Recio M. C., Villar A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharmacol.* 23:127-149.
- [13]. Zhang X. Y., Zhang Y., Xu X. Y., Qi S. H. (2013). Diverse deep-sea fungi from the South China Sea and their antimicrobial activity. *Curr. Microbiol.* 67(5): 525-530.

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài hợp phần trọng điểm cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số TĐCNSH.04/20-22.

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SOME ENDOPHYTIC FUNGAL STRAINS ISOLATED FROM VIETNAM LYCOPODIACEAE SPECIES

*Pham Thanh Ha[‡], Trinh Thi Thu Ha[‡], Pham Thi Thoa[‡],
Dao Thi Hong Van[§], Le Thi Minh Thanh[‡]*

Abstract: *Fungi are considered as a potential source of natural compounds. In the present study, five endophytic fungal strains isolated from Vietnam Lycopodiaceae species were evaluated for antimicrobial and extracellular enzyme biosynthesis activities. The five research strains were resistant from 2 to 5 tested strains of pathogenic microorganisms, and were capable of synthesizing 2-7 types of extracellular enzymes. Strain TD02-2.7 had the broadest inhibitory activity, which was resistant to 5/6 tested microbial strains including *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*; then strain HG02-27 was inhibited 4/6 strains except 2 strains *S. enterica* and *C. albicans*. The antibacterial activity of strains was quite high with the diameter of the antagonistic ring as 35-42 mm for *S. aureus*, 28-35 mm of *P. aeruginosa*, 28-34 mm for *C. albicans* and 26-32 mm with *B. cereus*. Notably, strains THG1-18 was capable of biosynthesizing all 7 enzymes including lipase, protease, cellulose, gelatinase, phosphatase, amylase and β -galactosidase; strains TTD2-2,7 and THG2-27 had both broad antibacterial activity (4-5 species of pathogenic bacteria) as well as the ability to produce diverse extracellular enzymes (5-6 types). This study initially shows that, in addition to the ability to biosynthesize huperzine, fungal strains can also have potential for application as a raw material source in the production of other products for agriculture, environment or processing industry.*

Keywords: *antimicrobial, extracellular enzymes, endophytic fungi, Lycopodiaceae*

[‡] Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

[§] Hanoi Open University