

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN VÀ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP MYCOPHENOLIC ACID CỦA CHŨNG VI NẤM BIỂN

PGS.TS. NGUYỄN PHƯƠNG NHUỆ, TS. HOA THỊ MINH TÚ
Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam
TS. CHU THANH BÌNH - Viện Y học dự phòng Quân đội
Phản biện khoa học: (1) PGS.TS. NGUYỄN THÁI SƠN
(2) TS. HÀ THẾ TẤN

TÓM TẮT: Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn và khả năng sinh tổng hợp Mycophenolic acid của các chủng vi nấm phân lập được từ trầm tích biển Việt Nam bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. **Kết quả:** Trong 12 chủng nấm, có 9 chủng kháng 2 đến 5 vi sinh vật kiểm định; trong đó, có các chủng G 1.1, CS 5.1, GS 1.3, GS 1.5 và K 7.1 kháng cả 5 vi sinh vật kiểm định với đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất từ 18-25 mm. Đồng thời, cả 5 chủng nấm này đều có khả năng sinh tổng hợp Mycophenolic acid. Chủng G 1.1 có hoạt tính sinh tổng hợp Mycophenolic acid cao nhất và cũng là chủng có phổ kháng vi sinh vật kiểm định rộng, hoạt tính cao nhất. Chủng vi nấm biển tiềm năng G 1.1 được định danh bằng đặc điểm hình thái kết hợp với phân tích trình tự đoạn gen ITS (ITS1 - 5.8S - ITS4) và được gọi là *Penicillium roqueforti* G 1.1. Kết quả này là cơ sở khoa học để nghiên cứu khai thác chủng vi nấm biển *Penicillium roqueforti* G 1.1 ứng dụng trong y dược tại Việt Nam.

Từ khóa: Vi nấm biển, kháng khuẩn, MPA, *Penicillium* sp.

ABSTRACT: Study on antibacterial activities and mycophenolic acid (MPA) biosynthesis of some fungi isolated from Vietnam marine sediments by agar diffusion method. **Results:** Among 12 marine fungal strains, 9 strains can inhibit 2-5 tested microorganism, of which five strains G 1.1, CS 5.1, GS 1.3, GS 1.5 and K 7.1 was stated that they inhibited 5 tested microorganism with maximum diameter of inhibition zone from 18 to 25 mm (D-d). Besides, these 5 strains are capable of biosynthesis of MPA. Fungal strains G1.1 has the highest mycophenolic acid biosynthesis, antimicrobial activities and broad antibacterial spectrum. Regarding combination of morphological characteristics and sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITS1 - 5.8S - ITS4), the marine fungus G1.1 was named as *Penicillium roqueforti* G1.1. These results are the scientific basis for studying on marine fungi *Penicillium roqueforti* G 1.1 to apply in pharmacy and medicine in Vietnam.

Keywords: marine fungus, antibacterial, MPA, *Penicillium* sp.

Chịu trách nhiệm nội dung: TS. Chu Thanh Bình, Email: chuthanhbinhvn@gmail.com

Ngày nhận bài: 01/6/2021; mời phản biện khoa học: 6/2021; chấp nhận đăng: 24/7/2021.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Hai phần ba số thuốc điều trị có nguồn gốc trực tiếp hoặc gián tiếp từ các sản phẩm tự nhiên và khoảng 10% các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ vi sinh vật [1, 2, 3]. Sản phẩm trao đổi chất của các vi sinh vật này đóng vai trò quan trọng trong việc phát triển các loại thuốc điều trị một số bệnh nguy hiểm [3]. Những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc sàng lọc các chất chuyển hóa mới hoặc các chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật và đã có những thành tựu nhất định với một số sản phẩm tự nhiên có nguồn gốc từ vi sinh vật có thể được ứng dụng trong y dược, như anthraquinon [4], cyclohexadepsipeptides [5], dẫn xuất diketopiperazine và equisetin [6].

Đến năm 2016, các sản phẩm tự nhiên có nguồn gốc từ biển, bao gồm các chất chuyển hóa sơ cấp, thứ cấp đã phát hiện được 28.609 chất, trong đó có 1.277 hợp chất mới được mô tả [1]. Các loại nấm biển thuộc chi *Penicillium* có khả năng tạo ra các loại kháng sinh đa dạng, như Penicillin (kháng vi khuẩn Gram dương) [7] và Griseofulvin (kháng nấm) [8]. Đây là một trong những nguồn nguyên liệu dồi dào để tổng hợp ra các chất dẫn thuốc. Mycophenolic acid (MPA) là một trong những sản phẩm trao đổi chất bậc hai của chi *Penicillium*. Về cấu trúc hóa học, MPA là một meroterpenoid bao gồm một gốc phthalide được thay thế bởi một chuỗi bên terpenoid.

Kể từ khi được phát hiện đến nay, ứng dụng lâm sàng quan trọng nhất của MPA là sử dụng nó như một chất ức chế miễn dịch ở bệnh nhân cấy ghép tạng. Các dẫn xuất của MPA dùng cho mục đích này hiện đã và đang được phép lưu hành trên thị trường nhiều quốc gia.

Với định hướng khai thác và phát triển các chất có hoạt tính sinh học từ vi nấm biển ứng dụng trong y dược, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm mục tiêu lựa chọn chủng vi nấm biển có hoạt tính kháng khuẩn và sinh tổng hợp MPA cao, định danh chủng, để làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu sau này; ứng dụng chủng vi nấm biển bản địa tạo ra nguyên liệu cho sản xuất thuốc dùng trong điều trị.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

- Đối tượng nghiên cứu: 12 chủng nấm sợi được phân lập từ trầm tích biển Việt Nam.

- Các chủng vi sinh vật kiểm định: *Staphylococcus epidemidis* (*S. epidemidis*) ATCC 12228, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 11105, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) ATCC 6633, *B. cereus* ATCC21778, *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 10231, trong Bộ sưu tập vi sinh vật của Phòng Công nghệ lên men - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Hoạt hóa chủng giống theo Viện Giữ giống Hoa Kỳ ATCC: từ ống nghiệm giữ trong tủ lạnh, hoạt hóa giống bằng cách cấy chuyển sang đĩa thạch chứa môi trường Czapeck-Dox (g/l) (Saccaroza - 20; K₂HPO₄ - 1; KCl - 0,5; FeSO₄ - 0,01; NaNO₃ - 2; MgSO₄ - 0,5; Agar - 15; pH từ 6,5-7,0). Kiểm tra độ thuần khiết chủng bằng soi kính hiển vi.

- Lên men sinh tổng hợp MPA: Môi trường MT3 (g/l) Glucoza - 30; K₂HPO₄ - 5; MgSO₄ - 1; bột đậu tương - 20; pH từ 6,5-7,0, nuôi cấy trên máy lắc (220 vòng/phút) ở 28°C, từ 7-10 ngày tùy theo chủng.

- Định tính và định lượng MPA bằng phương pháp sắc kí bản mỏng [9]: li tâm dịch nuôi cấy sau 10 ngày ở 4.000 vòng/phút, trong thời gian 10 phút. Bổ sung một lượng tương đương về thể tích dung môi etylaxetat, voltex. Thu nhận phần dịch nổi, sau đó dịch được chạy sắc kí bản mỏng với dung môi etylaxetat. Đường chuẩn MPA được xác định theo Ardestani, 2011 [9]: hòa tan chất chuẩn MPA vào dung môi etylaxetat với các nồng độ 0,1375 mg/l; 0,375 mg/l; 0,625 mg/l; 1,25 mg/l; 2,5 mg/l đến 5 mg/l, hấp thụ ở bước sóng 250 nm trên thiết bị UV-Vis. Kết quả được phương trình đường chuẩn: $y = 0,155x + 0,03525$ (với hệ số $r^2 = 0,99$):

- Xác định hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định: xác định hoạt tính ức chế vi sinh vật theo phương pháp khuếch tán đĩa thạch của Hadacek và cộng sự (2000) [7]: cấy trái vi sinh vật kiểm định (mật độ tế bào 10⁸ cfu/ml) lên bề mặt môi trường nuôi cấy LBA (luria bertani agar) trên đĩa petri, để khô, khoan các lỗ trên đĩa với đường kính khoảng 6 mm/lỗ, mỗi lỗ cách nhau 2-3 cm. Dùng pipet hút 0,1 ml dịch nuôi cấy vi nấm vào các lỗ thạch và giữ các đĩa ở nhiệt độ phòng trong 2-4 tiếng tới khi dịch chiết từ các giếng khuếch tán ra môi trường nuôi cấy vi sinh vật kiểm định. Đặt nuôi các đĩa vào tủ ấm 37°C trong 24 giờ đối với 4 chủng vi khuẩn *E. coli* ATCC 11105, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC21778, *S. epidemidis* ATCC 12228; ở 30°C trong 48-72 giờ đối với chủng nấm men *C. albicans* ATCC 10231. Thí nghiệm được lặp lại ba lần và lấy giá trị trung bình. Hoạt tính ức chế được đánh giá bằng cách đo đường kính (ĐK) vòng ức chế vi sinh vật bằng công thức:

$$\text{ĐK (mm)} = D - d$$

Trong đó, ĐK là đường kính vòng ức chế vi sinh vật; D là đường kính vòng vô khuẩn; d: đường kính lỗ khoan thạch.

- Phương pháp nhận dạng vi nấm bằng hình thái theo khóa phân loại của Bùi Xuân Đồng và Ainsworth G.C [11, 12]. Phương pháp định danh bằng sinh học phân tử: sử dụng cặp mồi ITS1/ITS4 [13], trong đó, IST1 (5' - TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG - 3'); ITS4 (5' - GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC - 3') (1st Base).

Kết quả giải trình tự được so sánh với cơ sở dữ liệu Genbank trên trang web NCBI bằng công cụ BLAST SEARCH. Cây phát sinh chủng loại dựa trên cơ sở trình tự cặp mồi này.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN.

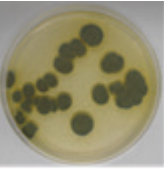
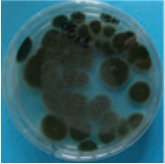
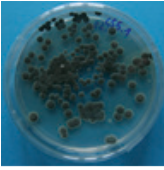
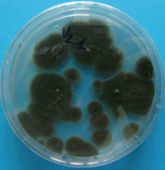


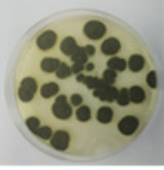
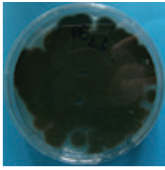
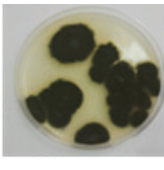

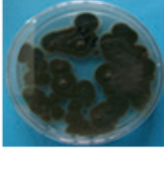
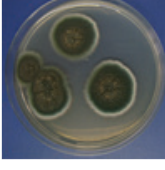
3.1. Hình thái khuẩn lạc các chủng vi nấm biển:



Hình 1. Hình thái cuống sinh bào tử của chủng G 1.1 (x 1500).

- Đặc điểm hình thái các chủng vi nấm biến trên môi trường Czapeck-Dox sau 7-10 ngày nuôi cấy:

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của 12 chủng vi nấm phân lập từ trầm tích biển Việt Nam.

Kí hiệu chủng	Mô tả hình thái	Hình thái khuẩn lạc	Kí hiệu chủng	Mô tả hình thái	Hình thái khuẩn lạc
G 1.1	Khuẩn lạc màu xanh lục, sau 7 ngày chuyển màu xanh sẫm, bào tử mịn trên môi trường Czapeck - Dox. Đường kính khuẩn lạc 2,2 cm sau 7-10 ngày nuôi cấy. Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh, không màu, cuống sinh bào tử hầu như không phân nhánh, gồm 4-6 thể bình, bào tử hình elip.		PE 1.1	Khuẩn lạc xanh sẫm, bào tử mịn. Trên môi trường Czapeck - Dox sau 7-10 ngày nuôi cấy đường kính khuẩn lạc 2,5 cm. Cuống sinh bào tử không phân nhánh. Thể bình có phần đỉnh ngắn và thon nhỏ dần. Bào tử hình cầu.	
CS 5.1	Khuẩn lạc màu xanh, sau 7 ngày chuyển màu xanh sẫm, có viền trắng xung quanh, bào tử mịn trên môi trường Czapeck - Dox. Đường kính khuẩn lạc 1,5 cm sau 7-10 ngày nuôi cấy. Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh, màu nhạt, cuống sinh bào tử gồm các thể bình có đỉnh ngắn, bào tử hình elip.		V 2.1	Khuẩn lạc xanh sẫm, bào tử mịn. Đường kính khuẩn lạc 1,5 cm sau 7 ngày nuôi cấy. Cuống sinh bào tử không phân nhánh mang nhiều thể bình. Bào tử hình elip hoặc trụ.	
CS 3.1	Khuẩn lạc xanh sẫm, đường kính 3-4 cm, bào tử mịn. Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh, không màu, cuống sinh bào tử gồm các thể bình có đỉnh thon dần, bào tử hình gần trụ.		V 1.1	Khuẩn lạc xanh sẫm, đường kính 2-4 cm, bào tử mịn. Cuống sinh bào tử không phân nhánh mang nhiều thể bình. Bào tử hình elip.	
GS 1.3	Khuẩn lạc màu xanh, sau 7 ngày chuyển màu xanh sẫm, đường kính 2-2,5 cm, bào tử mịn, bần. Cuống sinh bào tử phân nhánh, bào tử hình cầu.		PE 2.3	Khuẩn lạc xanh sẫm, đường kính 3-4 cm, bào tử mịn. Cuống sinh bào tử phân nhánh. Bào tử hình elip.	
GS 1.5	Khuẩn lạc xanh sẫm, đường kính 3-4 cm, bào tử mịn. Cuống sinh bào tử tạo chạc ba, bào tử hình trụ.		CS 4.2	Khuẩn lạc xanh sẫm, bào tử mịn. Đường kính khuẩn lạc 1,5 cm sau 7 ngày nuôi cấy. Cuống sinh bào tử phân nhánh. Bào tử hình elip hoặc trụ.	
M 1.1	Khuẩn lạc xanh sẫm, bào tử mịn. Trên môi trường Czapeck - Dox sau 7 ngày, khuẩn lạc có đường kính 3,5 cm. Cuống sinh bào tử không phân nhánh. Thể bình có phần đỉnh ngắn và thon nhỏ dần. Bào tử hình cầu.		K 7.1	Khuẩn lạc xanh sẫm, bào tử mịn, có viền trắng xung quanh. Đường kính khuẩn lạc 4-4,5 cm sau 7 ngày nuôi cấy. Cuống sinh bào tử phân nhánh. Bào tử hình elip.	

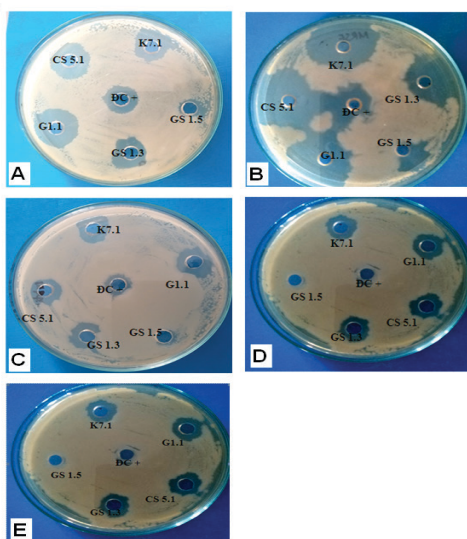
Các chủng vi nấm được nghiên cứu hình thái khuẩn lạc, cấu trúc sinh bào tử, kết quả cho thấy, khuẩn lạc của các chủng vi nấm có dạng không tròn đều, kích thước dao động từ 1,5-4,5 cm trên môi trường Czapeck - Dox sau 7-10 ngày nuôi cấy, mặt trên khuẩn lạc có màu xanh lam đến xanh lam sẫm, tạo bào tử mịn. Theo khóa phân loại của Bùi Xuân Đồng [11], 12 chủng nấm trên đều thuộc chi *Penicillium*.

3.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng vi nấm biển:

Bảng 2. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng vi nấm biển.

Chủng nấm	Đường kính vòng kháng vi sinh vật kiểm định (D - d, mm)				
	<i>B. cereus</i> ATCC21778	<i>S. epidemidis</i> ATCC 12228	<i>E. coli</i> ATCC 11105	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
G 1.1	18	25	21	20	19
CS 5.1	17	18	15	16	15
CS 3.1	9	12	-	7	-
GS 1.3	13	16	15	12	14
GS 1.5	10	14	9	13	12
M 1.1	-	16	17	-	-
PE 1.1	20	-	-	15	-
PE 2.3	-	-	-	-	13
V 1.1	11	-	-	12	-
V 2.1	-	-	-	-	20
CS 4.2	-	-	-	-	12
K7.1	15	16	14	13	10

Với mục đích khai thác các chủng vi nấm biển bản địa để ứng dụng trong y dược, chúng tôi đã khảo sát phổ kháng khuẩn của 12 chủng nấm trên. Kết quả cho thấy các chủng có khả năng kháng vi sinh vật kiểm định ở mức độ khác nhau, bao gồm vi khuẩn Gram âm, Gram dương và nấm men (bảng 2). Trong 12 chủng nấm, có 9 chủng kháng 2-5 vi sinh vật kiểm định; trong đó, có các chủng G 1.1, CS 5.1, GS 1.3, GS 1.5, K7.1 kháng cả 5 vi sinh vật kiểm định với đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất từ 18-25 mm (hình 2).



Hình 2. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của chủng G 1.1, CS 5.1, GS 1.3, GS 1.5, K 7.1. (A) Kháng *B. cereus* ATCC21778; (B) Kháng *S. epidemidis* ATCC 12228; (C) Kháng *B. subtilis* ATCC 6633; (D) Kháng *C. albicans* ATCC 10231; (E) Kháng *E. coli* ATCC 11105.

3.3. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp MPA từ các chủng vi nấm biển:

Theo nghiên cứu của Torrent (2017) và Song (2019) [14, 15], một số chủng nấm sợi thuộc chi *Penicillium* có khả năng sinh tổng hợp MPA. Vì vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng sinh MPA của các chủng. 12 chủng nấm sợi trên được nuôi cấy trên môi trường MT3. Sau 7-10 ngày tùy chủng, dịch nuôi cấy được chiết bằng dung môi etylaxetat với thể tích 1:1. Dựa vào đường chuẩn MPA, kết quả định lượng như sau:

Bảng 3. Khả năng sinh tổng hợp MPA của các chủng vi nấm biển.

TT	Kí mã hiệu	Hàm lượng (mg/L)
1	G 1.1	0,4306 ^a
2	CS 5.1	0,3371 ^b
3	K7.1	0,1087 ^a
4	GS 1.3	0,1012 ^c
5	GS 1.5	0,0031 ^d
6	M 1.1	Quá nhỏ
7	PE 1.1	Quá nhỏ
8	PE 2.3	Quá nhỏ
9	V 1.1	Quá nhỏ
10	V 2.1	Quá nhỏ
11	CS 4.2	Quá nhỏ
12	CS 3.1	Quá nhỏ

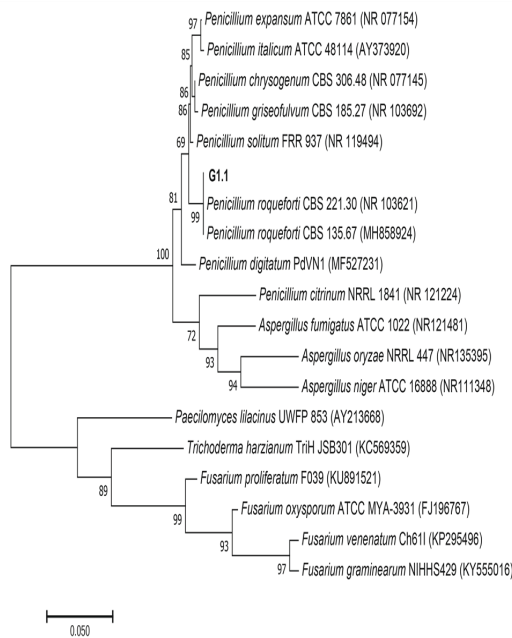
a, b, c, d thống kê Duncan với sai số $p < 0,05$.

Trong 12 chủng nấm khảo sát, chủng G 1.1 sinh tổng hợp MPA cao nhất. Đây cũng là chủng có phổ kháng vi sinh vật kiểm định rộng với hoạt tính cao nhất. Vì vậy, chủng G 1.1 được chọn để phân loại

theo phương pháp giải trình tự gen vùng ITS1-5,8S-ITS2, định hướng dùng cho các nghiên cứu sâu hơn, nhằm ứng dụng trong thực tế.

3.4. Định danh chủng nấm G 1.1 có phổ kháng khuẩn rộng và tổng hợp MPA cao:

Chủng nấm G 1.1 được giải trình tự gen dựa trên cặp môi ITS1/ITS4 nhằm khuếch đại vùng ITS với chiều dài 550-600 bps. Kết quả trình tự chủng G 1.1 có độ tương đồng cao (99%) so với chủng *Penicillium roqueforti* trên GenBank (mã số NR103621). Cây phát sinh phân loại được xây dựng thông qua sự so sánh và phân tích về trình tự nucleotide chủng G 1.1 với các loài tương đồng giữa các loài nấm trên GenBank (hình 3). Trong đó, chủng G 1.1 cùng nhóm với chủng *Penicillium roqueforti* với hệ số tương đồng 99%. Như vậy, kết hợp kết quả nghiên cứu này với đặc điểm hình thái (bảng 1 và hình 1) có thể kết luận, chủng G 1.1 thuộc loài *Penicillium roqueforti* và được kí hiệu là chủng *Penicillium roqueforti* G 1.1.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại G 1.1.

4. BÀN LUẬN.

MPA là chất được sinh tổng hợp từ vi nấm, có khả năng ức chế miễn dịch, kháng virus, kháng u, kháng khuẩn, kháng nấm và có một số hoạt tính sinh học khác. Hiện nay, MPA được sử dụng rộng rãi trong các phác đồ ức chế miễn dịch sau khi ghép thận, gan hoặc tim [17, 18, 19, 20]. Do đó, việc tìm kiếm các chủng vi sinh vật tổng hợp MPA và tối ưu hóa quá trình thu nhận MPA là mối quan tâm đặc biệt của các nhà khoa học. Các nghiên cứu trước đã chỉ ra, một số chủng vi nấm thuộc chi *Penicillium* có khả năng sinh tổng hợp MPA [14, 15]. Vино Kurova N.G (2005) đã phân lập được 36 chủng thuộc chi *Penicillium* từ lớp băng vĩnh cửu

có khả năng tổng hợp MPA [16]; trong đó, 4 chủng thuộc loài *P. brevicompactum* (VKM F-457, VKM F-477 và VKM F-1150) và 3 chủng *P. rugulosum* (VKM FW-665, VKM FW-717, và VKM FW-733) có khả năng tổng hợp MPA.

Trong nghiên cứu này, với mục đích khai thác các chủng vi nấm biển ứng dụng trong y dược, 12 chủng nấm được phân lập từ trầm tích biển Việt Nam được khảo sát phổ kháng khuẩn với 5 chủng kiểm định *S. epidemidis* ATCC 12228, *E. coli* ATCC 11105, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC21778, *C. albicans* ATCC 1023. Phương pháp khuếch tán đĩa thạch đã chỉ ra 9/12 chủng có khả năng kháng từ 2-5 chủng vi sinh vật kiểm định; trong đó có chủng G 1.1, CS 5.1, GS 1.3, GS 1.5, K 7.1 kháng cả 5 vi sinh vật kiểm định với đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất từ 18-25 mm. Sử dụng phương pháp định lượng MPA dựa vào đường chuẩn theo Ardestani F (2011) [9] để khảo sát khả năng tổng hợp MPA của 12 chủng vi nấm, kết quả về khả năng kháng khuẩn và sinh MPA của các chủng nấm nghiên cứu tương ứng với nhiều công bố quốc tế; ghi nhận một số chủng vi nấm biển có khả năng sinh tổng hợp MPA - chất có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm. Kết quả cũng chỉ ra, trong tổng số 12 chủng vi nấm khảo sát, chủng G 1.1 sinh tổng hợp MPA cao nhất (0,4306 mg/L dịch nuôi cấy). Đây cũng là chủng có phổ kháng vi sinh vật kiểm định rộng (kháng cả 5 vi sinh vật kiểm định thử nghiệm) với hoạt tính cao nhất. Vì vậy, chủng G 1.1 có tiềm năng ứng dụng trong thực tế và được chọn để phân loại đến loài. Phương pháp phân loại truyền thống dựa trên các đặc điểm hình thái, màu sắc khuẩn lạc, đặc điểm nuôi cấy, sự phân nhánh sợi, vách ngăn của khuẩn ty và cách đính bào tử... cho thấy, chủng G 1.1 có khuẩn lạc màu xanh lục, sau 7 ngày chuyển màu xanh sẫm, bào tử mịn trên môi trường Czapeck - Dox. Đường kính khuẩn lạc 2,2 cm sau 7-10 ngày nuôi cấy. Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh, không màu, cuống sinh bào tử hầu như không phân nhánh, gồm 4-6 thể bình, bào tử hình elip. Theo khóa phân loại của Bùi Xuân Đồng (1977), đã nhận dạng sơ bộ chủng G 1.1 thuộc chi *Penicillium* [11]. Tuy nhiên, có rất nhiều đặc điểm gần giống nhau giữa các loài trong cùng một chi nấm. Vì vậy, chủng G 1.1 đã được phân loại tiếp bằng giải trình tự gen vùng ITS1-5,8S-ITS2, cho kết quả thuộc chi *Penicillium* và thuộc loài *Penicillium roqueforti*. Như vậy, *Penicillium roqueforti* G 1.1 được phân lập từ trầm tích biển của Việt Nam có khả năng kháng khuẩn mạnh (kháng 5 chủng kiểm định thử nghiệm), đồng thời tổng hợp MPA (0,4306 mg/L dịch nuôi cấy). Kết quả này tương đương với nghiên cứu của Cakmakci S và cộng sự (2015) trên chủng

Penicillium roqueforti phân lập từ phô mai chín, có khả năng tổng hợp MPA đạt 0,1-23,1 mg/kg [21]. Nghiên cứu này sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo, hướng tới thu nhận hoạt chất MPA và một số hoạt chất nhằm ứng dụng trong y dược tại Việt Nam.

5. KẾT LUẬN.

Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn và sinh tổng hợp MPA của 12 chủng vi nấm biển, kết quả:

- Chọn được 5 chủng nấm có khả năng ức chế cao nhóm vi sinh vật kiểm định với đường kính vòng kháng khuẩn từ 18-25 mm. Đồng thời, cả 5 chủng nấm này đều có khả năng sinh tổng hợp MPA.

- Chọn được chủng vi nấm G 1.1 có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và sinh MPA cao nhất, định danh bằng hình thái kết hợp với sinh học phân tử và đặt tên là *Penicillium roqueforti* G 1.1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

- Blunt John W, Carroll Anthony R, Brent R Copp, Rohan A Davis, Robert A Keyzers, Mich ele R Prinsep (2018), *Marine natural products*, The Royal Society of Chemistry 2018.
- Blunt John W, Copp B.R, Keyzers R.A, Munro M.H.G, Prinsep M.R (2017), *Nature Product*, 34, 235-294.
- Demain A.L, Sanchez S (2009), "Microbial drug discovery: 80 years of progress", *J Antibiot* (Tokyo) 62, 5-16.
- Huang Yu-Tuan, Lowe David J, Churchman G Jock, Louis A Schipper, Nicolas J Rawlence, Alan Cooper (2014), *Carbon Storage and DNA Adsorption in Allophanic Soils and Paleosols*.
- Shi Y, Eissenstat D.M, He Y, Davis K.J (2018), "Using a spatially-distributed hydrologic biogeochemistry model with a nitrogen transport module to study the spatial variation of carbon processes in a Critical Zone Observatory", *Ecological Modelling*, 380: 8-21.
- Luo Arong, Ling Cheng, Simon Y.W, Zhu Chao (2018), "Comparison of Methods for Molecular Species Delimitation Across a Range of Speciation Scenarios", *Systematic Biology*, 67 (5).
- Leclercq S, Mian M.F, Stanisiz A.M, Bindels L, Cambier E, Amram H, Koren O, Forsythe P, Bienenstock J (2017), "Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior", *Nature communications*, 8: 15062.
- Marto A, Mohd Y, Pakir F, Latifi N, Hakimi A, Choy Soon Tan (2015), "Stabilization of Marine Clay by Biomass Silica (non-traditional) Stabilizers", *Applied Mechanics and Materials*, 695, 93-97.
- Ardestani F (2011), "Enhanced Mycophenolic acid production by *Penicillium brevicompactum* with enzymatically hydrolyzed casein", *World academy of Science, engineering and technology* 49.
- Franz Hadacek, Harald Greger (2000), "Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice", *Phytochemical Analysis*.
- Bùi Xuân Đồng (1977), *Một số vấn đề về nấm học*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- Ainsworth G.C, Sussman A.S (1969), (Editors), *The Fungi*, Vol. III - The Fungal Population.
- Kurtzman C.P (2014), "Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics", *Evolution Microbiology*, 64 (2): 325-332.
- Torsen Bak Regueira (2011), *Molecular Basis for mycophenolic Acid Biosynthesis in Penicillium brevicompactum*. App. and Environment Micro: 3035-3043.
- Song L (2019), "Regulating the Golgi apparatus sorting of proteinase A to decrease its excretion in *Saccharomyces cerevisiae*", *Microbiol Biotechnol*, 46 (5): 601-612.
- Vinokurova N.G, Ivanushkina G, Kochkina G.A, Arinbasarov M.U (2005), "Production of Mycophenolic acid by fungi of the genus *Penicillium* link", *Appl Biochem Microbiol*: 83-86.
- Juki N, John R, Juliet B, Daniel W, Jacobson P.A (2006), "A limited sampling model for estimation of total and unbound mycophenolic acid (MPA) area under the curve (AUC) in hematopoietic cell transplantation (HCT)", *Ther Drug Monit*, 28 (3): 394-401.
- Domhan S, Muschal S, Schwager C, Morath C, Wirkner U, Ansorge W, Maercker C, Zeier M, Huber P.E (2008), "Molecular mechanisms of the antiangiogenic and antitumor effects of mycophenolic acid", *Mol Cancer Ther*, 7 (6): 1656-1668.
- Morales R.R, Agrapart V, Mencacci C, Moretti C, Frajese G (2008), "Functional re-differentiation of prostate cancer derived cell lines by the anti-tumoral drug mycophenolic acid", *EJC Suppl*, 6 (9): 146-146.
- Heischmann S, Dzieciatkowska M, Hansen K, Leibfritz D, Christians U (2017), "The immunosuppressant mycophenolic acid alters nucleotide and lipid metabolism in an intestinal cell model", *Sci Rep*, 7 (1): 45088.
- Cakmakci S, Gurses M, Hayaloglu A.A, Cetin B, Sekerci P, Dagdemir E (2015), "Mycotoxin production capability of *Penicillium roqueforti* in strains isolated from mould-ripened traditional Turkish civil cheese", *Food Addit Contam*, 32 (2): 245-249. □