

Phân lập, định tên và đánh giá hoạt tính sinh học của một số chủng nấm lớn phân lập từ vườn quốc gia Cát Bà – Hải Phòng

Vũ Đình Giáp^{1*}, Đỗ Hữu Nghị¹, Trần Thị Hồng Hà¹,
Trần Thị Như Hằng¹, Lê Mai Hương¹, Martin Hofrichter²

¹Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên –
Viện Khoa học & Công nghệ Việt Nam

²Zittau International University, Markt 23, Zittau 02763, Germany

Đặt vấn đề

Hiện nay trên thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng, nấm lớn được nuôi trồng rộng rãi và ngày càng có nhiều loài mới được phát hiện có những đặc tính rất quan trọng đối với con người^[1]. Do có giá trị dinh dưỡng cao, nấm lớn có thể được sử dụng để tạo ra dược liệu, các sản phẩm dinh dưỡng và mỹ phẩm. Nấm không chỉ mang lại giá trị dinh dưỡng cho con người mà một số chủng loại nấm còn chứa giá trị dược liệu rất tốt cho sức khỏe con người^[2].

Rất nhiều các chất có hoạt tính sinh học có giá trị đã được tìm thấy trong thành phần của nấm lớn. Các chất có khả năng điều chỉnh hệ miễn dịch, các chất kháng khuẩn, kháng virus, kháng kí sinh trùng, hỗ trợ điều trị bệnh tim mạch, đặc biệt là khả năng ức chế phát triển của các khối u^[1]. Điều này mở ra những hướng nghiên cứu mới cho y học hiện đại.

Theo hướng này, chúng tôi nghiên cứu phân lập, định tên và đánh giá hoạt tính sinh học của một số chủng nấm lớn phân lập từ vườn quốc gia Cát Bà.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu và môi trường nuôi cấy

Mẫu

Các mẫu nấm lớn ở dạng quả thể thu thập từ rừng quốc gia Cát Bà (Hải Phòng) được đưa về phân lập, tinh sạch và nuôi cấy tại Phòng sinh học thực nghiệm Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên - Viện Khoa học & Công nghệ Việt Nam.

Môi trường

Môi trường phân lập nấm lớn Malt agar: Malt extract: 20 g/l; Agar: 15-18 g/l; H₂O: 1000 ml. Khử trùng 121°C/ 1 atm/30 phút. Môi trường Malt agar sau đó được bổ sung: Cloramphenicol: 50 mg/l; penicillin: 50 mg/l; streptomycin: 50 mg/l; nystatin: 40 mg/l; benomyl: 50 mg/l. Các chất kháng sinh được khử trùng riêng bằng ethanol 70%, bổ sung vào môi trường sau đó đổ ra đĩa thạch.

Phương pháp

Phương pháp phân lập và giữ giống

Quả thể nấm tươi được thu thập từ rừng quốc gia Cát Bà rửa bằng cồn và nước cất thật sạch. Dùng dao lam tách gọt phần mô bên ngoài làm lộ ra lớp mô vỏ trùng bên trong. Cắt phần mô vỏ trùng này thành những mảnh có kích thước 5 – 10 mm². Cấy các mảnh vỏ trùng này vào môi trường Malt-agar vô trùng có bổ sung chất kháng sinh, sau đó cho vào tủ nuôi cấy 25 - 30°C, sau khoảng thời gian từ 24 – 27 giờ cho tới khi thấy hệ sợi bắt đầu mọc thu được sợi nấm tinh khiết ta đem đi tinh sạch rồi đưa đi bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4 – 10°C, để giữ giống gốc và làm giống cấp một.

Phương pháp xác định hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định (Antimicrobial activity)

Thử hoạt tính kháng sinh của các mẫu chiết theo phương pháp hiện đại của Vandenberg và Vilellink (1994), tiến hành trên phiên 96 giống^[4]. Các chủng vi sinh vật kiểm định hiện đang được lưu giữ tại Phòng Sinh học Thực nghiệm - Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên.

+ Vi khuẩn Gr(+): *Bacillus subtilis* ATCC 27212; *Staphylococcus aureus* ATCC 12222.

● Nghiên cứu – Kỹ thuật

+ Vi khuẩn Gr(-): *Escherichia coli* ATCC 25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923.

+ Nấm men: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754; *Candida albicans* SH 20.

+ Nấm mốc: *Aspergillus niger* 439; *Fusarium oxysporum* M42.

Phương pháp xác định khả năng gây độc tế bào (cytotoxicity)

Theo phương pháp của Likhiviyawuid và cs., 1993^[3] đang được tiến hành tại Viện Nghiên cứu Ung thư Quốc gia của Mỹ (NCI). Phương pháp này đã được Phòng Thí nghiệm Thử hoạt tính Sinh học - Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên triển khai áp dụng từ năm 1996.

Dòng RD: *Rhabdosarcoma* - ung thư màng tim

Dòng Hep-G2: *Hepatocellular carcinoma* tế bào ung thư gan

Dòng tế bào được giữ trong nitơ lỏng, đánh thức và duy trì trong các môi trường dinh dưỡng MEME, hoặc DEME có bổ sung huyết thanh bê tươi 7-10%.

Sàng lọc sơ cấp tìm giá trị CS % (% Cell Survival)

Giá trị CS: là khả năng sống sót của tế bào ở

nồng độ nào đó của chất thử tính theo % so với đối chứng, kết quả được tính toán độ lệch theo công thức của Duncan. Mẫu nào cho giá trị CS < 50% được đánh giá là có hoạt tính.

Phương pháp xác hoạt tính chống oxy hoá

Phần ứng được tiến hành theo phương pháp của Shela G., Olga, M. B., Elena, K., và cs (2003) dựa trên nguyên tắc 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) có khả năng tạo ra các gốc tự do bên trong dung dịch ethanol bão hoà. Khi cho các chất thử nghiệm vào hỗn hợp này, nếu chất có khả năng làm trung hoà hoặc bao vây các gốc tự do sẽ làm giảm cường độ hấp phụ ánh sáng của các gốc tự do DPPH. Hoạt tính chống oxy hoá được đánh giá thông qua giá trị hấp phụ ánh sáng của dịch thí nghiệm so với đối chứng khi đọc trên máy Elisa ở bước sóng 515 nm.

Khả năng bẫy các gốc tự do SC% (Scavenging capacity)

Giá trị trung bình của SC% ở các nồng độ mẫu được đưa vào chương trình xử lý số liệu Exell theo công thức:

$$SC\% = \left[100 - \frac{OD \text{ thí nghiệm} - OD \text{ mẫu trắng}}{OD \text{ chứng âm tính}} \times 100 \right] \pm \sigma$$

Độ lệch tiêu chuẩn σ tính theo công thức của Duncan như sau:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Các mẫu có biểu hiện hoạt tính ($SC \geq 50\%$) sẽ được thử nghiệm bước 2 để tìm giá trị SC_{50} .

Giá trị SC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)

Mẫu được pha theo 5 thang nồng độ. Giá trị SC_{50} được xác định bằng chương trình table curve thông qua nồng độ chất thử và % hoạt động của chất thử mà ở đó 50% các gốc tự do tạo bởi DPPH được trung hoà bởi chất thử.

Kết quả và thảo luận

Kết quả phân lập các chủng nấm lớn ở rừng Quốc gia Cát Bà

Mẫu nấm được phân lập trên môi trường thạch malt 20% có bổ sung các chất kháng sinh: Cloramphenicol, penicillin, streptomycin, benomy 50 g/l và nystatin 40 g/l. Chúng tôi đã

phân lập tinh sạch được 7 chủng nấm lớn có ký hiệu: CB1, CB2, CB3, CB5, CB12, VP9, VP11.

Kết quả xác định hoạt tính dược học của các chủng nấm

Các chủng nấm được nuôi cấy xác định môi trường ở các điều kiện tối ưu (nhiệt độ, pH, thời gian, nguồn carbon, nguồn nitơ).

Sau đó được lên men tách với dung môi ethyl acetat, cô loại dung môi, các phần dịch chiết ethyl acetat của các dịch nuôi cấy nấm được pha trong dung môi DMSO 10%, ở nồng độ 4-8 mg/ml. Sau đó tiến hành thử các hoạt tính sinh học của các chủng nấm.

Kết quả xác định hoạt tính kháng vi sinh vật kềm định trên phiên 96 geling

Qua bảng 1 (trang sau) chúng tôi nhận thấy chủng nấm CB2 và CB3 có hoạt tính kháng 3 loại vi sinh vật kiểm định với giá trị MIC (nồng độ ức chế tối thiểu) đối với Vi khuẩn là 100 $\mu\text{g/ml}$. Còn với chủng CB5, CB12, VP9, VP11 không có biểu hiện kháng vi sinh vật kiểm định.

● Nghiên cứu – Kỹ thuật

Bảng 1: Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật trên phần 96 giếng

STT	Kí hiệu mẫu	Nồng độ ức chế tối thiểu(MIC: µg/ml)							
		Vi khuẩn Gr(-)		Vi khuẩn Gr(+)		Nấm mốc		Nấm men	
		<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>A.niger</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.albicans</i>
1	CB1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	CB2	100	(-)	100	100	(-)	(-)	(-)	(-)
3	CB3	100	(-)	100	200	(-)	(-)	(-)	(-)
4	CB5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	CB12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	VP9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	VP11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Kết quả xác định hoạt tính gây độc tế bào

Tiến hành nuôi cấy và thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư theo phương pháp của Skehan & CS (1990) và Likhitiyayawuid & CS(1993), trên 2 dòng tế bào: dòng Hep-G2 (Hepatocellular

carcinoma - Ung thư gan) và dòng RD (ung thư màng tim - Rhabdosarcoma) từ Viện VSDT TƯ.

Kết quả thu được sau khi tính toán theo phương pháp nêu trên giúp tôi thu được kết quả:

Bảng 2: Kết quả thực nghiệm thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư với 2 dòng tế bào

STT	Ký hiệu mẫu	Dòng tế bào Cell survival (%)		Kết luận
		Hep-G2	RD	
1	DMSO	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	Âm tính
2	Chứng (+)	0,02 ± 0,0	2,5 ± 0,4	Dương tính
3	VP9	86,3 ± 0,7	79,3 ± 0,7	Âm tính
4	CB12	43,8 ± 0,9	13,2 ± 0,7	Dương tính với dòng Hep G2 và RD
5	CB5	98,1 ± 0,4	96,3 ± 0,9	Âm tính
6	VP11	96,3 ± 0,7	97,3 ± 0,5	Âm tính
7	CB1	94,4 ± 0,8	92,7 ± 1,1	Âm tính
8	CB2	41,2 ± 0,3	39,5 ± 0,7	Dương tính với dòng Hep G2 và RD
9	CB3	60,3 ± 0,5	65,3 ± 0,4	Âm tính

Qua bảng 2 chúng tôi nhận thấy các chủng CB12, CB2 đều có giá trị dương tính với hai dòng tế bào; các chủng còn lại không thể hiện hoạt tính. Từ những kết quả thu

được trên đây đã mở ra những hướng nghiên cứu mới trong y học giúp ngăn ngừa và điều trị các bệnh ung thư từ các dịch chiết nuôi cấy nấm.

Kết quả xác định hoạt tính chống oxy hoá tế bào (thông qua phản ứng bao vây gốc tự do DPPH)

Bảng 3: Kết quả xác định hoạt tính chống oxy hoá tế bào

STT	Kí hiệu mẫu	Nồng độ mẫu (µg/ml)	Khả năng bắt các gốc tự do (SC, %)	SC ₅₀ (µg)	Kết quả
1	Chứng (+)	50	83,5 ± 0,6	24,3	Dương tính
2	Chứng (-)	-	0,0 ± 0,0	-	Âm tính
3	CB 1	200	43,56 ± 1,1	-	Âm tính
4	CB 2	200	28,95 ± 0,9	-	Âm tính
5	CB 3	200	32,99 ± 1,2	-	Âm tính
6	CB 5	200	70,90 ± 1,9	118,5	Dương tính
7	VP9	200	3,2 ± 0,1	-	Âm tính
8	VP11	200	7,2 ± 0,0	-	Âm tính
9	CB12	200	5,3 ± 0,4	-	Âm tính

● Nghiên cứu – Kỹ thuật

Qua bảng kết quả trên chúng tôi nhận thấy chỉ có chủng CB5 có hoạt tính chống oxy hoá trên hệ DPPH, các mẫu còn lại không biểu hiện hoạt tính.

Xác định tên chủng có biểu hiện hoạt tính bằng phương pháp sinh học phân tử

Dựa trên kết quả thử hoạt tính sinh học chúng tôi đã chọn chủng CB2 có hoạt tính tốt nhất đem đi xác định tên bằng phương pháp sinh học phân tử kết quả đạt được như sau:

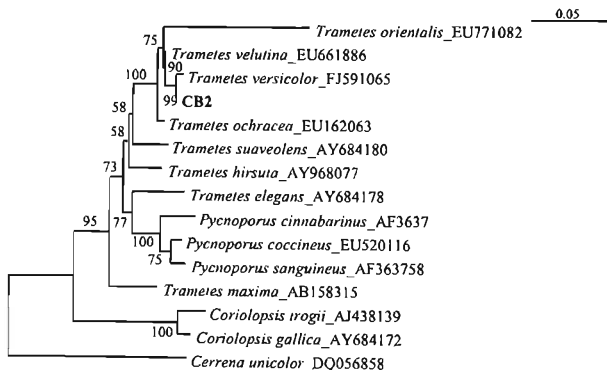
Trình tự ADNr vùng ITS

ACGAGTTTTGAAACGAGTTGTAGCTGGC
CTTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCT
CATCCACTTACCCCTGTGCACTTACTGTA

Vị trí phân loại

GGTTGGCGTGGGCTCCTAACGGGAGCATT
CTGCCGGCCTATGTATACTACAAACACTT
TAAAGTATCAGAATGTAAACGCGTCTAACGC
ATCTATAATACAACCTTTAGCAACGGATCT
CTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC
CTTGGCGCTCCTTGGTATCCGAGGAGCAT
GCCTGTTGAGTGCATGGAATCTCAACTT
ATAAATCCTTGTGATCTATAAGCTTGGAC
TTGGAGGCTTGCTGGCCCTTG

Trình tự ADNr vùng ITS của chủng CB2 tương đồng 99,5 % (398/400 bp) với ADNr vùng ITS của *Trametes versicolor*_FJ591065



Sơ đồ 1: Vị trí phân loại của chủng CB2 và các loài có quan hệ họ hàng gần

Kết luận

Chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm nghiên cứu đề tài trên tại Phòng Sinh học thực nghiệm thuộc Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên và thu được một số kết quả sau đây:

1. Đã tiến hành phân lập được 07 chủng nấm lớn từ vùng nghiên cứu: CB1, CB2, CB3, CB5, VP9, VP11, CB12 đồng thời tiến hành lên men, chiết xuất và thử hoạt tính sinh học của tất cả các chủng phân lập.

2. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định các chủng phân lập cho thấy: Chủng

CB2, CB3 có khả năng ức chế vi khuẩn ở nồng độ ức chế tối thiểu MIC là 100 µg/ml. Các chủng còn lại không có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định.

3. Hoạt tính gây độc tế bào trên 2 dòng Hep – G2 và RD: chủng CB2, CB12 dương tính với 2 dòng tế bào.

4. Hoạt tính chống oxy hoá, thông qua phản ứng bao vây gốc tự do (DPPH): chỉ có chủng nấm CB5 là có hoạt tính chống oxy hoá, các chủng còn lại không biểu hiện có hoạt tính.

5. Định tên bằng phương pháp sinh học phân tử với chủng CB2.

Lời cảm ơn: Đề tài được thực hiện dưới sự bảo trợ của đề tài cấp cơ sở - Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Summary

From large mushrooms collected in the National Park of Cat Ba (Hal Phong, Vietnam) 07 strains of large mushroom were isolated and investigated on fermentation, chemical extraction, and antimicrobial, cytotoxic and antioxidant bioactivity. The strains CB2, CB3 exhibited antimicrobial activity at the minimal inhibitory concentration (MIC) of 100 micrograms/ml; the strains CB2, CB12 proved cytotoxic and the strain CB5 antioxidant. The taxonomy of the most biologically active strain

CB5 was identified by molecular biology.

Keywords: Large mushrooms, National Park Cat Ba, collected, bioactivity.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Lân Dũng (2003), "Công nghệ nuôi trồng nấm", tập 1, tập 2, Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội
2. Nguyễn Hữu Đồng, Đinh Xuân Linh (1999), "Nấm ăn, nấm dược liệu công dụng và công nghệ nuôi trồng" - Nhà xuất bản Hà Nội.
3. Likhitayawulid K., Angerhofer C. K. (1993), "Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Sephania vesca*", *Journal of Natural Products*, 56 (1), pp. 30-38.
4. Vanden B. D. A., Vietlinck A.J., (1991), "Screening methods for antibacterial and antiviral agents from high plants", *Methods in Plant Biochemistry*, 6, pp. 47-68.

Tổng hợp và thử hoạt tính kháng tế bào ung thư của 5-(3'-clorobenzyliden)hydantoin và dẫn chất base Mannich

Đỗ Thị Thu Hằng, Vũ Trần Anh

Bộ môn Hóa Hữu cơ - Trường Đại học Dược Hà Nội

Đặt vấn đề

Các dẫn chất hydantoin là dãy chất đã được quan tâm nghiên cứu về tổng hợp hoá học, tác dụng sinh học và ứng dụng làm thuốc. Trong những năm qua, các nhà nghiên cứu trên thế giới và trong nước tiếp tục nghiên cứu, tổng hợp và sàng lọc tác dụng sinh học của các dẫn chất hydantoin, đã tìm thấy nhiều dẫn chất 5-arylidenhydantoin có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, và tác dụng chống ung thư rất đáng quan tâm^[2-5]. Tiếp tục và phát triển hướng nghiên cứu này, trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả tổng hợp và thử sàng lọc hoạt tính kháng tế bào ung thư của 5-(3'-clorobenzyliden)hydantoin và dẫn chất base Mannich.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Các hóa chất và dung môi dùng trong nghiên cứu đều nhập của hãng Merck và Aldrich.

Phương pháp nghiên cứu

- Tổng hợp 5-(3'-clorobenzyliden)hydantoin (1) bằng phản ứng ngưng tụ hydantoin với 3-clorobenzaldehyd trong dung môi acid acetic băng và xúc tác natri acetat khan.

- Tổng hợp các dẫn chất base Mannich (2-5) bằng phản ứng ngưng tụ chất 1 với formol và các amin bậc 1, bậc 2.

- Thử hoạt tính kháng các dòng tế bào ung thư người (theo phương pháp MTT^[6, 7] tại Khoa Dược lý - Sinh hóa, Viện Dược liệu. Giá trị IC₅₀ được tính theo phương pháp Probit. Trong phép thử này, IC₅₀ ≤ 20 µg/ml được coi là có hoạt tính.

- Sắc ký lớp mỏng (SKLM) được thực hiện trên bản mỏng silicagel Kieselgel 60F254. Nhiệt