

Nghiên cứu vi nấm nội sinh cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) có khả năng sinh tổng hợp enzyme β -galactosidase

**Lê Thị Minh Thành^{1,*}, Hoàng Thị Hồng Anh¹, Dương Anh Tùng¹, Đỗ Thị Tuyên¹,
Mẫn Hồng Phước¹, Hà Thị Quyển²**

¹*Viện Công nghệ sinh học, Hà Nội*

²*Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội*

TÓM TẮT

Enzyme β -galactosidase được khai thác ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau như y tế, công nghiệp chế biến thực phẩm, công nghệ sinh học. Trong nghiên cứu này, 45 chủng vi nấm nội sinh phân lập từ cây thảo dược Thạch tùng răng cưa phân bố tại Việt Nam được sàng lọc khả năng sinh tổng hợp enzyme β -galactosidase. Kết quả tuyển chọn được 2 chủng có khả năng tổng hợp β -galactosidase, trong đó chủng TĐL28.1 có hoạt tính enzyme đạt 1,92 IU/ml cao hơn chủng TĐL5v (0,36 IU/ml). Hai chủng đã được định danh là *Aspergillus niger* TĐL28.1 và *Fungal* sp. Tsp5v.

Từ khóa: Vi nấm nội sinh, Thạch tùng răng cưa, β -galactosidase .

* Tác giả chính: Lê Thị Minh Thành

Địa chỉ: Viện Công nghệ sinh học, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội

Điện thoại: 0979769703

Email: minhthanh.ibt@gmail.com

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo thống kê có khoảng 70% dân số thế giới gặp tình trạng bất dung nạp lactose hay còn gọi là thiếu năng chuyển hóa lactose do sự thiếu hụt enzyme β -galactosidase trên niêm mạc ruột non làm ảnh hưởng không nhỏ tới sức khỏe người dân [1]. β -galactosidase còn gọi là lactase là một trong những enzyme chính, có tiềm năng đáng kể trong ngành công nghiệp chế biến thực phẩm và trị liệu. β -galactosidase là enzyme xúc tác cho phản ứng thủy phân lactose thành β -D-galactose và α -D-glucose và phản ứng galactosyl chuyển hóa các gốc β -D-galactosyl của lactose tạo ra galacto-oligosaccharides (GOS) [2]. GOS là một trong

những loại oligosaccharides được bổ sung trong chế biến thực phẩm, thực phẩm chức năng... có tác dụng nâng cao sức khỏe góp phần giúp người dân phòng chống lại một số bệnh dịch. Việc bổ sung GOS cùng với các oligosaccharides khác làm giảm nguy cơ mắc bệnh ung thư nhất là ung thư ruột kết, bảo vệ hệ tiêu hóa và giúp cải thiện các bệnh về đường ruột. GOS còn giúp giảm lượng cholesterol trong máu, nhờ thúc đẩy sự phát triển của vi khuẩn axit lactic, lượng cholesterol giảm làm giảm nguy cơ mắc các bệnh về tim mạch, xơ vữa động mạch. Enzyme β -galactosidase tự nhiên có nhiều trong hạnh nhân, đào, mơ, các loại trái cây và một số nội tạng động vật khác [3]. Tuy nhiên việc chiết xuất enzyme từ các nguồn này không nhiều để có thể cung cấp nguyên liệu tự nhiên cho ngành công nghiệp dược và thực phẩm, bên cạnh đó chi phí sản xuất cũng đòi hỏi cao. Do đó, hướng nghiên cứu trọng tâm đã được chuyển sang sản xuất enzyme chi phí thấp từ các vi sinh vật như vi khuẩn, nấm men và vi nấm. So với nấm men và vi khuẩn, β -galactosidase chiết xuất từ vi nấm thường được ưa thích vì thường là enzym ngoại bào và chịu nhiệt trong tự nhiên, thường có hoạt tính cao và là nguồn nguyên liệu dễ kiểm soát, có thể thu lượng lớn với thời gian nhanh nhất và kỹ thuật đơn giản. β -galactosidase thường được chiết xuất từ một số chủng vi nấm như *Aspergillus fonsecaeus*, *A. oryzae*, *A. niger*, *Rhizomucor pusillus*, *Chaetomium thermophile*, *Thermomyces lanuginosus*...[3-5]. Vi nấm nội sinh cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) đã được công bố là có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất Huperzine A hỗ trợ phòng trị bệnh rối loạn trí nhớ và Alzheimer, và có khả năng kháng một số vi sinh vật gây bệnh cho người như *E. coli*, *S.aureus* và *S. typhimurium* [6]. Tại Việt Nam, Thạch tùng răng cưa (TTRC) được phát hiện ở Sapa (Lào Cai) và Đà Lạt (Lâm Đồng) và thuộc danh sách "đỏ" trong Chương trình Nghiên cứu bảo tồn và phát triển nguồn gen quý hiếm về cây thuốc của Việt Nam, nhưng chưa được quan tâm nghiên cứu và khai thác ứng dụng. Nghiên cứu bước đầu tuyển chọn và đánh giá được hoạt tính β -galactosidase thu nhận được từ các chủng vi nấm nội sinh cây TTRC Việt Nam.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Các chủng vi nấm nội sinh được phân lập từ cây TTRC phân bố ở Lâm Đồng - Việt Nam trong Bộ sưu tập Vi nấm 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.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp hoạt hóa và thu dịch chiết nấm

Hoạt hóa chủng: Các chủng được giữ trong glycerol 15% ở 4°C được cấy chuyển sợi nấm sang đĩa peptri chứa môi trường thạch PDA (potato dextrose agar) và nuôi ở 28°C từ 3-10 ngày tùy chủng. Kiểm tra độ thuần khiết của chủng.

Nhân nuôi thu dịch trích sinh khối nấm: Các sợi nấm thuần được cấy chuyển sang các bình tam giác chứa 200 ml môi trường PDB (potato dextrose broth), nuôi lắc 150 rpm, ở 28°C trong 5-10 ngày tùy chủng. Ly tâm ở 6000 vòng/phút, thu dịch trích sinh khối nuôi nấm

2.2.2. Phương pháp sàng lọc chủng nấm có hoạt tính enzyme β -galactosidase.

X-gal được hòa tan trong DMSO ở nồng độ 20 mg/mL (bảo quản trong tối ở nhiệt độ -20°C). Gạt đều 50 μ l chất chỉ thị X-gal trên bề mặt đĩa thạch môi trường PDA. Cấy chấm điểm các chủng vi nấm nội sinh đã phân lập được trên môi trường thạch đĩa có chỉ thị X-gal, nuôi ở tủ ẩm 28°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.

2.2.3. Phương pháp xác định hoạt độ enzyme β -galactosidase trên cơ chất ONPG (*Ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside*)

Hoạt tính β -galactosidase được xác định theo phương pháp của Reczey và cộng sự [7]. Trộn 0,2 ml dịch trích sinh khối nấm với 1ml cơ chất ONPG được chuẩn bị trong dung dịch đệm sodium acetate 0,1M, pH 4,5. Hỗn hợp này được ủ ở 50°C trong 5 phút. Dừng phản ứng lại bằng cách bổ sung 1 ml dung dịch Na₂CO₃ 10%, đo hấp thụ bước sóng ở 420 nm. Một đơn vị hoạt tính được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng ra 1 μ mol ONP (O- nitrophenol) trong một phút ở điều kiện phân tích chính xác.

2.2.4. Phương pháp phân loại vi nấm

- *Phương pháp nhận dạng truyền thống:* Theo các khóa phân loại về vi nấm [8, 9].

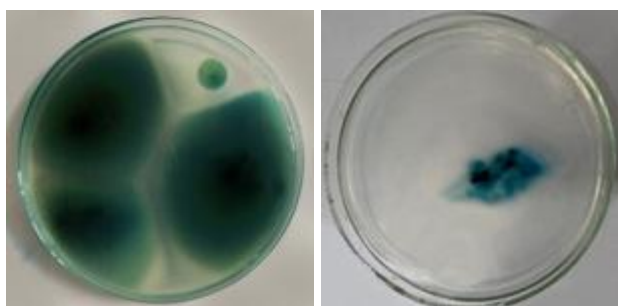
- *Phương pháp định danh bằng sinh học phân tử:* Nghiền sợi nấm trong ni tơ lỏng, tách ADN tổng số bằng kit G-spin Total DNA extraction (INTRON, Hàn quốc). Vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-CCTCCGCTTATTGATATGC-3') theo phương pháp của White và cộng sự [10]. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Đoạn gen ITS1-5,8S-ITS4 được phân tích tự

động bằng máy đọc trình tự gen tự động AEI PRISM@ 3700 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific, Mỹ). Trình tự ITS được phân tích bằng phần mềm BioEdit và so sánh với dữ liệu trên NCBI bằng chương trình BLAST. Cây phát sinh được xây dựng bằng phần mềm MEGA 6.06. Các trình tự gen tương đồng với trình tự gen của chủng nấm được lấy từ cơ sở dữ liệu GenBank bằng mô hình ClustalW trong chương trình MegAlign. Cây phát sinh gen được xây dựng bằng việc sử dụng mô hình Maximum Likelihood (ML) với các giá trị Bootstrap lặp lại 1000 lần. Mô hình 2 tham số Kimura và các giá trị bất biến (K2+G+I) được sử dụng để ước tính khoảng cách tiến hóa giữa các loài.

III. KẾT QUẢ

3.1. Sàng lọc chủng vi nấm có hoạt tính enzyme β -galactosidase

Hoạt hóa và nhân nuôi sinh khối của 45 chủng vi nấm đại diện cho các nhóm hình thái khuẩn lạc trong Bộ sưu tập vi nấm nội sinh phân lập từ cây TTRC phân bố ở Lâm Đồng, Việt Nam. 45 chủng được tiến hành xác định khả năng sinh tổng hợp enzyme β -galactosidase trên môi trường thạch có X-gal. Kết quả trong đã xác định được 2 chủng sinh tổng hợp β -galactosidase khi khuẩn lạc nuôi cấy trên môi trường X-gal có sắc tố màu xanh da trời (Hình 1), cả 2 chủng TĐL28.1 và TĐL5v đều được phân lập từ thân cây TTRC. Khi nuôi trên môi trường có chất chỉ thị X-gal, chủng TĐL28.1 có độ bắt màu đậm và đồng đều hơn chủng TĐL5v nên có thể có khả năng sinh tổng hợp β -galactosidase cao hơn.



Hình 1. Khuẩn lạc 2 chủng TĐL28.1 và TĐL5v khi nuôi cấy trên môi trường thạch PDA có bổ sung chất chỉ thị X-gal.

3.2. Xác định hoạt độ enzyme β -galactosidase trên cơ chất ONPG

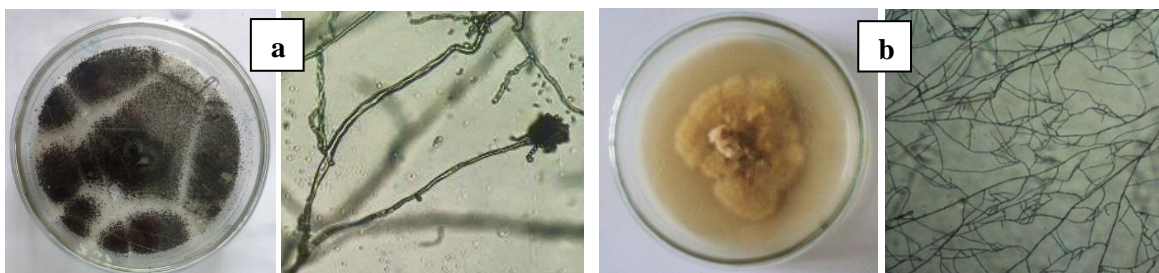
Xác định hoạt độ enzyme β -galactosidase của dịch chiết 2 chủng nấm TĐL28.1 và TĐL5v trên cơ chất ONPG cho thấy, chủng TĐL28.1 cho hoạt tính enzyme β -galactosidase đạt 1,92 IU/ml cao gấp 5,3 lần so với chủng TĐL5v chỉ đạt 0,36 IU/ml (Bảng 1).

Bảng 1. Hoạt tính enzyme β -galactosidase của 2 chủng vi nấm nghiên cứu

TT	Chủng	Hoạt tính enzyme (IU/ml)
1	TĐL 28.1	1,92
2	TĐL5v	0,36

3.3. Định danh các chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp enzyme β -galactosidase

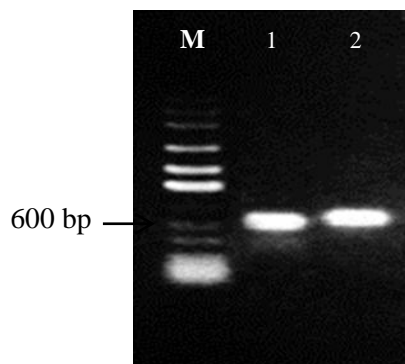
Bằng phương pháp nhận dạng theo các đặc điểm màu sắc, đặc điểm hình thái nuôi cấy; màu sắc, hình thái, sự phân nhánh, vách ngăn của khuẩn ty, bào tử... cho thấy, chủng TĐL28.1 có khuẩn lạc màu đen, bề mặt dạng xốp; khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn; túi bào tử có cuống, các chuỗi bào tử trần tạo thành từ các thể bình hợp thành hình bông nấm. Chủng TĐL5v khuẩn lạc mọc không cân đối, màu vàng, khuẩn ty kích thước to có vách ngăn và không sinh bào tử. Từ kết quả trên nhận dạng sơ bộ được chủng TĐL28.1 thuộc chi *Aspergillus* và chủng Tsp5v thuộc nhóm nấm bất thụ không sinh bào tử (Hình 2).



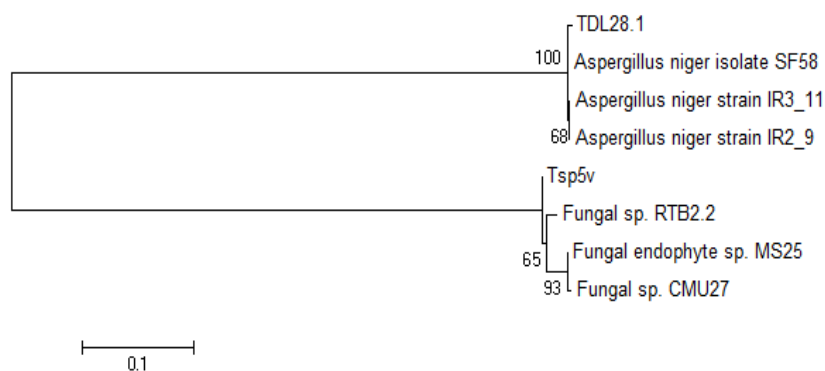
Hình 2. Hình ảnh khuẩn lạc và vi hình thái chủng TĐL28.1 (a) và TĐL5v (b)

Bằng phương pháp PCR phân tích trình tự vùng rADN - ITS của 2 chủng vi nấm, với cặp mồi ITS1 và ITS4 đã khuếch đại được 2 đoạn gen ITS1-5,8S-ITS4 của 2 chủng có kích thước khoảng 500-600 bp như tính toán theo lý thuyết (Hình 3), trong đó chủng TĐL28.1 có kích thước vùng ITS1-5,8S-ITS4 là 608 bp và chủng TĐL5v là 630 bp. So sánh, đối chiếu dữ liệu nguồn gen trên ngân hàng gen NCBI, kết quả cho thấy: vùng ITS1-5,8S-ITS4 của chủng TĐL28.1 có độ tương đồng cao so với chủng *Aspergillus niger* SF58 (độ dài đoạn so sánh 100%, mức độ tương đồng 99% nên được xác định thuộc nấm *A. niger*. Trình tự chủng TĐL5v có mức tương đồng $\leq 97\%$ và có độ dài đoạn so sánh $\leq 96\%$ so với trình tự gen của các chủng được đối chiếu trên GenBank *Fungal* sp., *Fungal endophyte* sp. MS25 và *Fungal* sp. CMU27 nên được xác định thuộc về nấm *Fungal* sp.

Cây phát sinh phân loại loài được xây dựng thông qua sự so sánh và phân tích về trình tự nucleotide 2 chủng vi nấm với các loài tương đồng giữa các loài nấm trên cơ sở dữ liệu ngân hàng GenBank (Hình 4). Chủng TĐL28.1 có hệ số Bootstrap đạt 100% khi nhóm với 2 chủng *A. niger*; chủng TĐL5v thuộc nhóm với các chủng *Fungal* sp. có hệ số Bootstrap đạt 65%. Theo đó, chủng TĐL28.1 được định danh là *A. niger* TĐL28.1 và chủng TĐL5v là *Fungal* sp. TĐL5v.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% (Giếng M – Marker ADN, 1 – TĐL28.1, 2 – TĐL5v)



Hình 4. Cây phát sinh phân loại 2 chủng vi nấm với các loài tương đồng dựa trên phân tích trình tự vùng ITS1–5,8S–ITS2

IV. BÀN LUẬN

Enzyme β -galactosidase được thu nhận từ nhiều nguồn vi sinh vật khác nhau. Trong đó nguồn enzyme công nghiệp được tách chiết từ các loài chủ yếu như nấm mốc *Aspergillus* sp. và nấm men *Kluyveromyces* sp. [1]. Mặc dù các loài vi sinh vật khác nhau đã được khai thác để sản xuất β -galactosidase nhưng β -galactosidase từ nấm mốc được đặc biệt quan tâm vì enzyme tổng hợp là ngoại bào và có khả năng chịu nhiệt [3]. Việc lựa chọn chất nền phù hợp cùng với vi sinh vật cho năng suất enzyme cao hơn, kỹ thuật xử lý hiệu quả là yếu tố chính quyết định chi phí sản xuất enzyme; enzyme ngoại bào có ý nghĩa kinh tế vì chi

phí sản xuất phát sinh từ các kỹ thuật để chiết xuất enzyme thấp so với enzyme nội bào. Trên thế giới và Việt Nam đã có một số nghiên cứu về tách chiết thu nhận β -galactosidase từ nấm mốc, theo đó chủng *R. pusillus* được phân lập từ nguồn chất thải công nghiệp thực phẩm có khả năng sinh tổng hợp β -galactosidase với hoạt tính enzyme đạt 2,14 IU/ml [3]; 3 chủng *Aspergillus oryzae* từ phòng thí nghiệm Hóa sinh - Đại học Bách Khoa Hà Nội cho hoạt tính β -galactosidase cao từ 70,3 - 307,5 mU/g [11]. Các nghiên cứu vi nấm nội sinh thực vật sinh β -galactosidase ở Việt Nam là chưa có công bố. Nghiên cứu này là một phần trong quá trình nghiên cứu tìm kiếm liên tục của chúng tôi từ các chủng vi nấm nội sinh cây TTRC Việt Nam nhằm tìm ra một số hợp chất sinh học tiềm năng của chúng hướng tới có thể ứng dụng trong một số ngành nông - công nghiệp và y dược Việt Nam. Việc xác định được 2 chủng vi nấm nội sinh từ cây TTRC Việt Nam *A. niger* TĐL28.1 và chủng *Fungal* sp. TĐL5v có khả năng sinh tổng hợp enzyme β -galactosidase ngoại bào bước đầu góp phần bổ sung nguồn nguyên liệu tiềm năng trong sản xuất nguồn enzyme tự nhiên phục vụ ngành công nghiệp dược và chế biến thực phẩm trong tương lai nhằm nâng cao sức khỏe cộng đồng giúp phòng chống một số bệnh tật.

V. KẾT LUẬN

Từ 45 chủng vi nấm nội sinh được phân lập từ cây Thạch tùng răng cưa phân bố ở lâm Đồng, Việt Nam đã tuyển chọn được 2 chủng *A. niger* TĐL28.1 và *Fungal* sp. TĐL5v có khả năng sinh tổng hợp enzyme β -galactosidase ngoại bào. Các chủng này là nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo hướng tới nghiên cứu tách chiết và thu nhận β -galactosidase có thể phục vụ trong ngành công nghiệp dược, chế biến thực phẩm và sữa tại Việt Nam.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này là một phần kết quả của đề tài KC10.01/16-20 (2016-2019), Chương trình KC10/16-20, Bộ Khoa học Công nghệ do Viện Công nghệ sinh học chủ trì và Chương trình đào tạo thạc sỹ tại Trường Đại học Quốc tế Glasgow, Vương quốc Anh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Husaim Q. β -galactosidases and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2010; 30 (1): 41-62.
2. Toru N. and Teruo A. *Beta Galactosidases, enzymology*. University Sendai and Tokyo; 199: 1291-1305.

3. Panesar PS, Kaur R, Singh RS. Isolation and screening of fungal strain for β -Galactosidases production. World Academy of Science, Engineering and Technology. International Journal of Nutrition and Food Engineering, 2016; 10 (7).
4. Sen S, Ray L, Chattopadhyay P. Production, purification, immobilization, and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus alliaceus*. Appl. Biochem. Biotechnol, 2012; 167: 1938-1953.
5. El-Gindy A, Ibrahim Z, Aziz H. Improvement of extracellular β - galactosidase production by thermophilic fungi *Chaetomium thermophile* and *Thermomyces lanuginosus*. Australian J. Basic Appl. Sci, 2009; 3: 1925-1932.
6. Yang YH, Yang DS, Li GH *et al.* Antibacterial diketopiperazines from an endophytic fungus *Bionetria* sp. Y1085. The Journal of Antibiotics, 2019.
7. Reczey K, Stalbrand H, Hahn-Hegerdal B, Tijernal F. Myceliaassociated β -galactosidase activity in microbial pellets of *Aspergillus* and *Penicillium* strains". Appl. Microbiol. Biotechnol, 1992; 38: 393- 397.
8. Bùi Xuân Đồng. Nhóm nấm Hyphomycetes ở Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật 1984, tập I.
9. Ainsworth GC *et al.* Introduction and keys to higher taxa. In. The Fungi, An Advanced Treatise. Academic Press Newyork and London, 1973; Vol. IVA.
10. White TJ, Bruns T, Lee S, Talor J. Amplicfication and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In PCR Protocols: A guide to methods and applications ed, 1990; 315-322.
11. Đặng Thị Thu, Nguyễn Văn Cách, Bùi Thị Hải Hòa. Tuyển chọn và nghiên cứu điều kiện lên men sinh tổng hợp β -galactosidase từ chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 2007; 45(1): 23-31.

Study on β -galactosidase production of endophytic fungi from *Huperzia serrata* in Vietnam

**Le Thi Minh Thanh^{1,*}, Hoang Thi Hong Anh¹, Duong Anh Tung¹, Do Thi Tuyen¹,
Man Hong Phuoc¹, Ha Thi Quyen²**

¹*Institute of Biotechnology*

²*University of Engineering and Technology*

The enzyme β -galactosidase has many applications in biotechnology, pharmaceuticals and food processing industries. In the present study, 45 endophytic fungi isolated from *H. serrata* plants in Lam Dong Vietnam were screened their potential in β -galactosidases enzyme production. Two strains TDL5v and TDL28.1 were capable of producing β -galactosidases enzyme. Among, TDL28.1 strain was found to be the active strain producing a considerable amount of β -galactosidase (1,92 IU/ml), which was considerably higher than that of TDL5v strain (0,36 IU/ml). Based on their morphological characteristics and sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITS1-5.8S-ITS2), 2 strains were identified as *Aspergillus niger* TDL 28.1 và *Fungal* sp. Tsp5v.

Keywords: Endophytic fungi, *Huperzia serrata*, β -galactosidase.