

## PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG NẤM SỢI CÓ KHẢ NĂNG TẠO LOVASTATIN TỪ RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ

NGUYỄN THIỆN PHÚ\*, VŨ THỊ THƯƠNG\*\*

### TÓM TẮT

Lovastatin (mevinolin) là một chất ức chế sinh tổng hợp cholesterol và làm giảm lượng cholesterol trong huyết tương ở người và động vật. Từ các mẫu đất thu nhận tại rừng ngập mặn (RNM) Cần Giờ, chúng tôi đã tiến hành phân lập và tuyển chọn được 6 chủng nấm sợi (NS) có khả năng tạo lovastatin. Khả năng ức chế sinh trưởng của nấm men xung quanh lỗ thạch là một dấu hiệu liên quan đến khả năng tạo lovastatin. Các chủng nấm được nuôi cấy chìm trong 7 ngày và đều thể hiện khả năng kháng *Saccharomyces cerevisiae* khi thử nghiệm. Chủng NS có hoạt tính mạnh được định danh bằng cách giải trình tự 28S rRNA. Kết quả cho thấy chủng thuộc loài *Aspergillus terreus*.

**Từ khóa:** *Aspergillus terreus*, lovastatin, rừng ngập mặn.

### ABSTRACT

#### *Isolating and selecting filamentous fungi strains capable of producing lovastatin in Can Gio mangrove*

Lovastatin (mevinolin) is a competitive inhibitor of cholesterol biosynthesis that reduces cholesterol in the plasma of humans and animals. From soil samples collected in Can Gio mangrove, 6 filamentous fungi strains capable of producing lovastatin were isolated and selected. The inhibition of growth of yeast surrounding the wells loaded with fungal filtrate was an indication of inhibition activity of fungal extracts proportionately related to lovastatin producing ability. Filamentous fungi strains for lovastatin production in submerged fermentation after 7 days of fermentation showed positive results when screened through bioassay method by the zone of inhibition exhibited by the fungus against *Saccharomyces cerevisiae*. Based on 28S rRNA, a strain which has the best activity has been classified to *Aspergillus terreus*.

**Keywords:** *Aspergillus terreus*, lovastatin, mangrove.

### 1. Mở đầu

Theo thống kê của tổ chức Y tế Thế giới, mỗi năm có khoảng 17 triệu người trên hành tinh chết vì bệnh tim mạch, con số này được dự đoán sẽ tăng lên 25 triệu vào năm 2020. Nguyên nhân chính gây ra bệnh tim mạch được xác định là do tăng nồng độ cholesterol trong máu. Chính vì vậy, việc duy trì nồng độ cholesterol trong máu ở mức ổn định là rất quan trọng. [7], [9]

\* ThS, Trường Đại học Sư phạm TP HCM; Email: thienphu48@gmail.com

\*\* CN, Trường Đại học Sư phạm TP HCM

Hiện nay, có nhiều biện pháp để giúp cải thiện nồng độ cholesterol trong máu như thay đổi chế độ ăn, luyện tập thể dục thường xuyên, không hút thuốc... Bên cạnh đó, người ta còn sử dụng một số thuốc như resin, các statin có thể làm giảm tới 40% nồng độ cholesterol trong máu. Các statin bao gồm lovastatin, fluvastatin, simvastatin, pravastatin, atorvastatin và rosuvastatin, trong đó lovastatin được chú ý hơn cả. [11]

Lovastatin là một trong số các hợp chất statin thương mại có nguồn gốc từ một số loài nấm *Aspergillus terreus*, *Penicillium*, *Monascus*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Scopolariopsis*, *Doratomyces*, *Phoma*, *Phythium*, *Gymnoascus*, *Hypomyces*, *Pleurotus*... thông qua quá trình lên men. Hiện nay, các nhà khoa học đang tập trung vào việc phân lập các chủng nấm có khả năng sinh lovastatin, đem lại năng suất cao từ nguồn nguyên liệu tự nhiên có trên thế giới. Theo kết quả của nhiều nghiên cứu cho thấy, các chủng vi sinh vật (VSV) phân lập từ đất thường tạo ra các chất có hoạt tính sinh học cao, đặc biệt là từ đất RNM. [7]

RNM nói chung và RNM Cần Giờ nói riêng là nơi có chứa nhiều nguồn gen sinh vật. Đây cũng là nơi có hệ VSV vô cùng phong phú như NS, vi khuẩn, xạ khuẩn... Trong đó NS chiếm một số lượng vô cùng lớn. Những chủng NS phân lập từ RNM Cần Giờ có hoạt tính sinh học cao và được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực.

Xuất phát từ nhu cầu thực tế đó, chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài: “Phân lập, tuyển chọn các chủng nấm sợi có khả năng tạo lovastatin từ rừng ngập mặn Cần Giờ”.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

#### 2.1.1. Đối tượng

Nghiên cứu được thực hiện trên các đối tượng:

- Các chủng NS phân lập từ đất RNM Cần Giờ – TPHCM;
- VSV kiểm định: *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 2.1.2. Các môi trường nghiên cứu đã sử dụng

Để thực hiện các nội dung nghiên cứu, chúng tôi tiến hành sử dụng các loại môi trường sau:

<b>MT1: Malt Extract Agar</b>		<b>MT2: Peptone Dextrose Agar</b>	
- Cao malt:	20 g	- Cao nấm men:	10 g
- Peptone:	1 g	- Peptone:	20 g
- Glucose:	20 g	- Dextrose:	20 g
- Agar:	20 g	- Agar:	15 g
- Nước cất:	1 lít	- Nước cất:	1 lít

<p><b>MT3: MT Potato Dextrose Agar</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Khoai tây:300 g</li> <li>- D – Glucose:30 g</li> <li>- Agar:20 g</li> <li>- Nước cất:1 lít</li> </ul>	<p><b>MT4: MT bột đậu nành [8]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sucrose:50 g</li> <li>- Bột đậu tương:20 g</li> <li>- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:1 g</li> <li>- NaNO<sub>3</sub>:1 g</li> <li>- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O:0,5 g</li> <li>- pH:6,5</li> </ul>
---	---

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Phương pháp lấy mẫu

Mẫu đất từ các địa điểm khác nhau ở RNM Cần Giờ được thu thập như sau: Thu 100 gam đất cách bề mặt 5cm vào các túi vô trùng, bảo quản ở 4°C không quá 24 giờ.

### 2.2.2. Phương pháp phân lập

Pha loãng mẫu theo dãy thập phân đến 10<sup>-6</sup>, trải 0,1ml dịch pha loãng ở nồng độ 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> lên đĩa môi trường MEA, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần, ủ đĩa ở 30°C từ 4 - 7 ngày. Chọn đĩa có các khuẩn lạc riêng rẽ để tiếp tục làm thuần. [2], [6]

### 2.2.3. Phương pháp thời thạch

NS được cấy trên đĩa Petri chứa môi trường MEA ở 30°C. Sau 7 ngày, khi sợi nấm mọc tốt thì dùng khoan nút chai đục lấy các thời thạch chứa trên bề mặt, đặt chúng vào đĩa Petri chứa môi trường PDA đã được cấy trải nấm men.

Đề các đĩa này trong tủ lạnh 4 – 5 giờ cho chất khuếch tán vào môi trường thạch và sau đó đặt vào tủ ẩm 300°C và đọc kết quả sau 48 giờ.

Hoạt tính kháng nấm men (NM) được xác định theo đường kính vòng kháng nấm (D – d; đơn vị: mm): D là đường kính vòng kháng nấm, d là đường kính thời thạch. [3]

### 2.2.4. Phương pháp lên men chìm để thử hoạt tính lovastatin

Chuẩn bị môi trường bột đậu tương cho vào các bình tam giác 250ml, mỗi bình chứa 100ml bột đậu tương, sau đó đem hấp vô trùng ở nhiệt độ 121°C trong vòng 30 phút. Đề môi trường vừa chuẩn bị nguội sau đó cấy các chủng NS vào. Đem các chủng nấm vừa nuôi cấy lên máy lắc trong vòng 7 ngày, với tốc độ 100 vòng/ phút.

Chiết xuất lovastatin: Sau khi nuôi lắc 7 ngày, các chủng nấm sợi được đem lọc với giấy lọc để thu lấy dịch lọc có chứa lovastatin. Điều chỉnh pH của dịch nuôi về 2, sau đó thêm vào một lượng ethyl acetate tương đương với lượng dịch lọc thu được. Đem dung dịch vừa pha trộn trên lên máy lắc 100 vòng/ phút trong 2 giờ. Sau 2 giờ đem đi cô quay để ethyl acetate bay hơi còn khoảng 1ml. [7]

### 2.2.5. Phương pháp khoan lỗ thạch

Sau khi cố định giá trị khuẩn lạc *S. cerevisiae*, dùng khoan nút chai vô trùng khoan một lỗ trên đĩa Petri có chứa sẵn nấm men với số lượng thích hợp. Sau đó, nhỏ 0,3 ml cao ethyl acetate đã cô quay vào lỗ thạch vừa đục. Ủ các đĩa vừa nhỏ cao ethyl

acetate ở nhiệt độ phòng trong vòng 24 giờ rồi đo đường kính vòng kháng NM để xác định khả năng sinh lovastatin.

#### 2.2.6. Nghiên cứu một số đặc điểm đại thể, vi thể của các chủng nấm nội sinh có khả năng sinh lovastatin

NS khi cấy truyền sang thạch nghiêng, tiến hành tạo khuẩn lạc không lồ bằng cách sử dụng que cấy đầu vuông vô trùng lấy một ít bào tử từ ống giống cấy chấm điểm vào mặt giữa thạch của đĩa Petri chứa môi trường PDA rồi ủ trong tủ ẩm một tuần để tạo KL. Hằng ngày, lấy ra quan sát các đặc điểm hình thái của KL (kích thước, hình dạng, màu sắc mặt trên, mặt dưới và sự thay đổi màu sắc, màu sắc của môi trường do sắc tố nấm tạo ra, dạng sợi nấm mọc ở mặt trên môi trường, đặc điểm của mép khuẩn lạc, giọt nước đọng, chất hữu cơ kết tinh trên bề mặt khuẩn lạc.

Quan sát vi thể nấm: Chuẩn bị môi trường PDA, đổ một lớp mỏng (khoảng 1mm) lên các đĩa Petri. Sau đó, dùng khoan nút chai vô trùng có  $d = 8\text{mm}$ , khoan các khối thạch. Đặt một hoặc hai khối thạch trên mỗi lam kính, cấy một ít bào tử lên bề mặt xung quanh khối thạch và đặt lamen vô trùng lên bề mặt các khối thạch. Các phiến kính có khối thạch cấy nấm sợi nghiên cứu được đặt trong các đĩa Petri có sẵn một ít bông thấm nước được làm ẩm bằng nước cất vô trùng. Giữ các đĩa Petri này trong tủ ẩm 3 – 4 ngày. Lúc quan sát nhỏ vài giọt xanh methylen Löffler gần lammel và đặt giấy thấm ở phía đối diện để thuốc nhuộm thấm vào trong tiêu bản.

Dùng kính hiển vi quan sát và mô tả các đặc điểm: Hình dạng cuống sinh bào tử, hình dạng thể bình, hình dạng các thể bông, sợi nấm có hay không có sự phân nhánh và vách ngăn, đặc điểm bào tử đính, màu sắc, kích thước bào tử. Chụp hình trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 40 – 100 lần. [5]

#### 2.2.7. Phương pháp phân tích lovastatin

Dịch chiết có chứa lovastatin sau khi cô quay sẽ được hòa tan trong 200 $\mu\text{l}$  hỗn hợp acetonitril:  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,1% (60:40, v/v). Hỗn hợp sau đó được li tâm 13.000 vòng/phút và sử dụng 5 $\mu\text{l}$  nôi để phân tích bằng HPLC với cột C18, pha động acetonitril:  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,1% (60:40). Tín hiệu được ghi nhận bằng detector UV ở bước sóng 238nm.

### 3. Kết quả và bàn luận

#### 3.1. Phân lập các chủng nấm sợi từ đất RNM Cần Giờ

Kết quả phân lập cho thấy ở cả 6 địa điểm lấy mẫu, chúng tôi đều thu được một số lượng NS tương đối lớn. Điều này cho thấy NS ở RNM Cần Giờ có số lượng phong phú, chúng phân bố ở hầu hết các vùng đất của RNM.

Chúng tôi tiến hành phân nhóm các chủng NS dựa vào đặc điểm hình thái KL sau 7 ngày. 120 chủng NS được phân thành 6 nhóm sau:

**Bảng 3.1.** Kết quả phân lập các chủng NS ở đất RNM Cần Giờ

Nhóm 1	Đặc điểm hình thái KL	Số lượng	Tỉ lệ %
1	KL có màu trắng, dạng xốp hoặc bông, mép nhẵn hoặc răng cưa	76	63,3
2	KL có màu xanh, có thể viền màu trắng hoặc vàng, mép nhẵn hoặc răng cưa	11	9,2
3	KL có màu vàng, hoặc vàng nâu, viền trắng, có tiết sắc tố	5	4,2
4	KL có màu xám, viền trắng, mép nhẵn hoặc răng cưa	21	17,5
5	KL có màu đen, hoặc màu nâu, viền trắng, mép nhẵn hoặc răng cưa	4	3,3
6	KL có màu cam hoặc hồng, mép nhẵn hoặc có răng cưa	3	2,5
<b>Tổng</b>		<b>120</b>	<b>100</b>

Sau khi phân lập, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng kháng nấm men của 120 chủng NS để tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

### 3.2. Khảo sát khả năng kháng nấm men của các chủng nấm sợi phân lập được

*Saccharomyces cerevisiae* có chứa lớp lipid kép trong màng tế bào, có cấu trúc tương tự cholesterol. Thành phần của thành tế bào NM bao gồm các sterol, là mục tiêu của hoạt tính kháng nấm, cản trở sự tham gia của enzyme vào quá trình tổng hợp vách tế bào. [7]

Do số lượng chủng tương đối nhiều, thời gian nghiên cứu tương đối ngắn nên chúng tôi tiến hành tuyển chọn sơ bộ các chủng NS có khả năng kháng NM để làm tiền đề cho các nghiên cứu phía sau. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.2.

**Bảng 3.2.** Kết quả khảo sát khả năng kháng NM của các chủng NS phân lập

STT	Chủng	Đường kính vòng kháng nấm men D – d (cm)
1	T8	0,63 <sup>a</sup> ± 0,06
2	<b>T22</b>	<b>2,11<sup>f</sup> ± 0,08</b>
3	T25	1,50 <sup>d</sup> ± 0,10
4	T26	1,70 <sup>e</sup> ± 0,10
5	T34	0,97 <sup>b</sup> ± 0,12
6	T35	1,45 <sup>d</sup> ± 0,09

7	T51	1,47 <sup>d</sup> ± 0,06
8	T70	0,67 <sup>a</sup> ± 0,06
9	T73	1,00 <sup>b</sup> ± 0,17
10	T76	1,80 <sup>e</sup> ± 0,10
11	T80	1,17 <sup>c</sup> ± 0,06

Ghi chú: a, b, c, d, e, f: sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Kết quả cho thấy trong 120 chủng NS phân lập được có 11 chủng có khả năng kháng nấm *Saccharomyces cerevisiae* (chiếm 9,17%).

### 3.3. Khảo sát khả năng sinh lovastatin của các chủng NS được tuyển chọn

Từ 11 chủng NS có khả năng kháng NM, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng sinh lovastatin. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.3.

**Bảng 3.3.** Kết quả khảo sát khả năng sinh lovastatin của các chủng NS

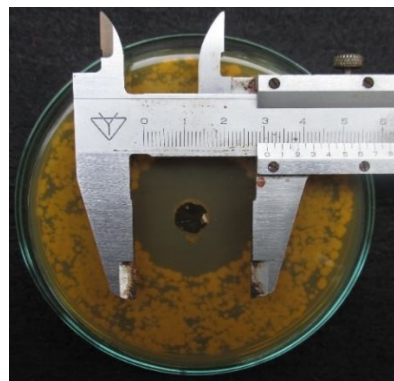
STT	Chủng	Đường kính vòng kháng nấm men D – d (cm)
1	T8	0,00
2	<b>T22</b>	<b>2,15<sup>e</sup> ± 0,05</b>
3	T25	1,43 <sup>b</sup> ± 0,06
4	T26	1,60 <sup>c</sup> ± 0,10
5	T34	0,00
6	T35	1,93 <sup>d</sup> ± 0,06
7	T51	0,00
8	T70	0,00
9	T73	1,83 <sup>d</sup> ± 0,06
10	T76	1,13 <sup>a</sup> ± 0,06
11	T80	0,00

Ghi chú: a, b, c, d, e: sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

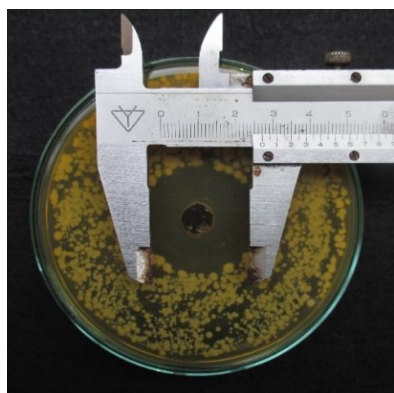
Kết quả cho thấy trong 11 chủng có khả năng kháng nấm men chỉ có 6 chủng có khả năng sinh lovastatin (chiếm 54,55%).

Chủng T22 cho hoạt tính sinh lovastatin mạnh nhất, đường kính vòng kháng nấm men D – d = 2,15cm.

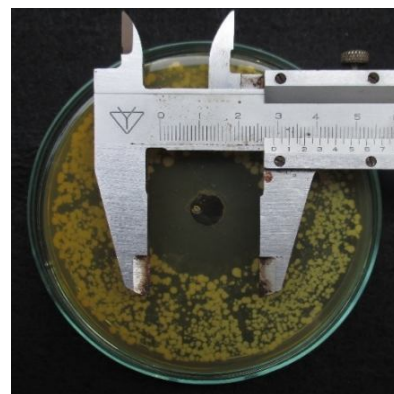
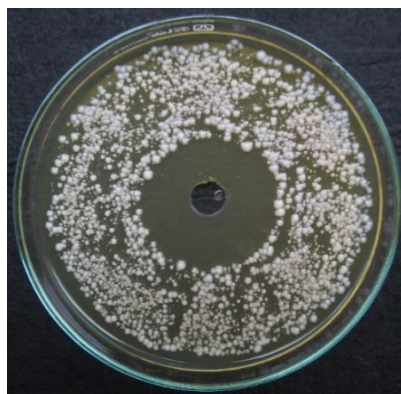
Sự khác biệt giữa các chủng có ý nghĩa về mặt thống kê. Vì vậy, chúng tôi quyết định chọn chủng T22 để tiến hành nghiên cứu đặc điểm sinh học và định danh đến loài bằng sinh học phân tử.



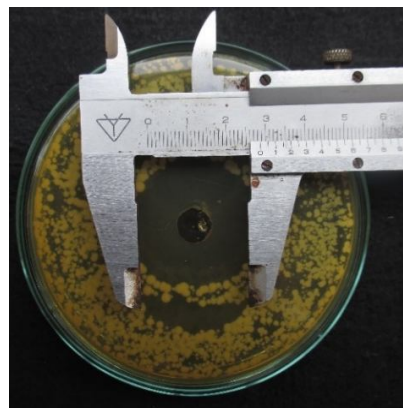
*Hình 3.1. Khả năng kháng S. cerevisiae của dịch lên men chủng T22*



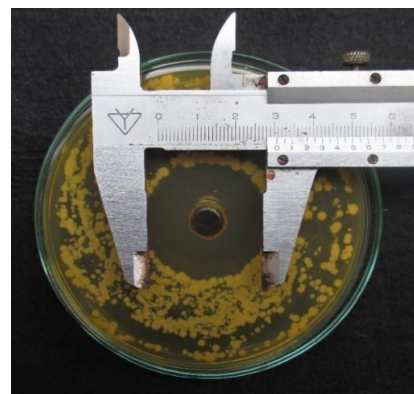
*Hình 3.2. Khả năng kháng S. cerevisiae của dịch lên men chủng T25*



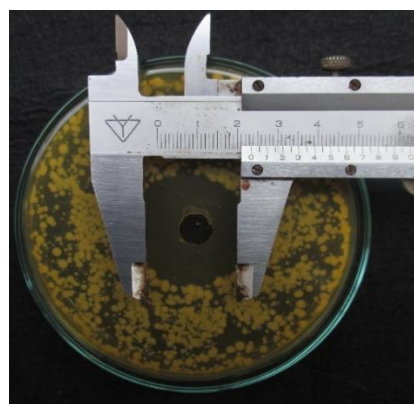
*Hình 3.3. Khả năng kháng S. cerevisiae của dịch lên men chủng T26*



*Hình 3.4. Khả năng kháng S. cerevisiae của dịch lên men chủng T35*



*Hình 3.5. Khả năng kháng S. cerevisiae của dịch lên men chủng T73*

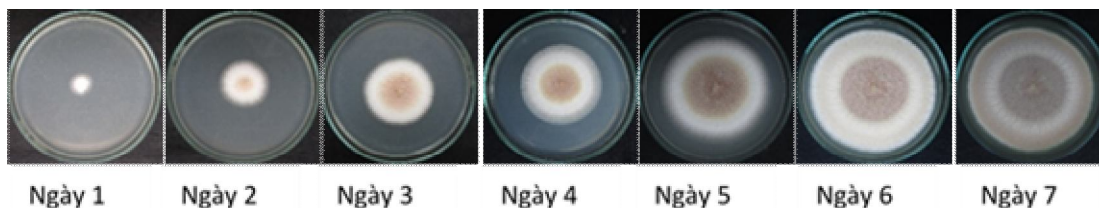


*Hình 3.6. Khả năng kháng S. cerevisiae của dịch lên men chủng T76*



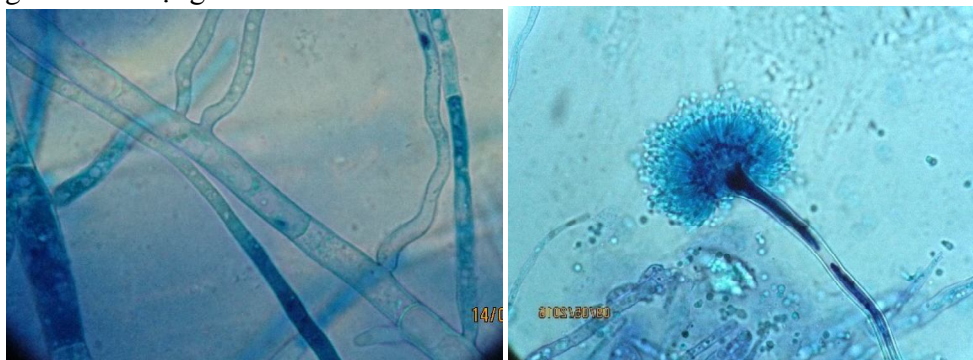
### 3.4. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng T22

**Đặc điểm đại thể:** KL thường phát triển nhanh. Ban đầu KL có màu trắng, sau chuyển thành vàng nâu, cuối cùng chuyển thành màu nâu. Nấm không tiết sắc tố vào MT.



**Hình 3.7.** Hình dạng KL chủng T22 sau 7 ngày quan sát

**Đặc điểm vi thể:** Sợi nấm phân nhánh, không màu, có vách ngăn. Giá bào tử trần không phân nhánh, có phần đỉnh phình ra thành bong hình nửa cầu. Khối bào tử đính bên ngoài thành dạng hình tia tỏa tròn.



**Hình 3.8.** Hình thái vi thể chủng T22

### 3.5. Định danh đến loài bằng sinh học phân tử

Để định danh, chúng tôi gửi mẫu chủng T22 đến Công ti xét nghiệm Nam Khoa để giải trình tự gen 28S rRNA. Kết quả như sau:

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1716 bits(929)	0.0	929/929(100%)	0/929(0%)	Plus/Minus
Query 1	TCGTCGAAGGAGCTTCACACGGACGCAGACACCCCGCCCCATACGGGATTCTCACCCCTCT				60
Sbjct 937	TCGTCGAAGGAGCTTCACACGGACGCAGACACCCCGCCCCATACGGGATTCTCACCCCTCT				878
Query 61	ATGACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGACGGGGGCTGCACCCGAAGCATCCTCTGCAAATT				120
Sbjct 877	ATGACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGACGGGGGCTGCACCCGAAGCATCCTCTGCAAATT				818

**Kết quả tra cứu trên BLAST SEARCH**

JX188057 Aspergillus terreus strain TN01 18S ribosomal RNA gene,.. S=1716 E=0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Aspergillus terreus strain TN01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer</a>	1716	1716	97%	0.0	100%	<a href="#">JX188057.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Aspergillus terreus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos</a>	1679	1679	96%	0.0	99%	<a href="#">KM491895.1</a>

Aspergillus terreus strain TN01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
 Sequence ID: [gb|JX188057.1](#)|Length: 1341|Number of Matches: 1  
 Related Information  
 Range 1: 9 to 937 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1716 bits(929)	0.0	929/929(100%)	0/929(0%)	Plus/Minus
Query	1	TCGTCGAAGGAGCTTCACACGGACGCAGACACCCCGCCCCATACGGGATTCTCACCCCTCT	60		
Sbjct	937	TCGTCGAAGGAGCTTCACACGGACGCAGACACCCCGCCCCATACGGGATTCTCACCCCTCT	878		
Query	61	ATGACGGCCCCTCCAGGGCACTTAGACGGGGCTGCACCCGAAGCATCCTCTGCAAATT	120		
Sbjct	877	ATGACGGCCCCTCCAGGGCACTTAGACGGGGCTGCACCCGAAGCATCCTCTGCAAATT	818		
Query	121	ACAATGCGGACCCCGAAGGAGCCAGCTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCG	180		
Sbjct	817	ACAATGCGGACCCCGAAGGAGCCAGCTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCG	758		
Query	181	TTACTGAGGCAATCCCGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGC	240		
Sbjct	757	TTACTGAGGCAATCCCGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGC	698		
Query	241	GGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGaaaaaaaaCAAGTTGCAAATAAATGCGTC	300		
Sbjct	697	GGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAAAAAAAGTTGCAAATAAATGCGTC	638		
Query	301	GGCGGGCGCCGGCCGGCCCTACGGAGCGGAAGACGAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGA	360		
Sbjct	637	GGCGGGCGCCGGCCGGCCCTACGGAGCGGAAGACGAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGA	578		
Query	361	CGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCGGGAGCCGGGGACGAGGGCCCAAC	420		
Sbjct	577	CGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCGGGAGCCGGGGACGAGGGCCCAAC	518		
Query	421	ACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCA	480		
Sbjct	517	ACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCA	458		

Query	481	GGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGT	540
Sbjct	457	GGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGT	398
Query	541	TATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTT	600
Sbjct	397	TATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTT	338
Query	601	TTAACTGATTGCAAAGAATCACA CT CAGACTGCAAGCTTTCAGAACAGGGTTCATGTTGG	660
Sbjct	337	TTAACTGATTGCAAAGAATCACA CT CAGACTGCAAGCTTTCAGAACAGGGTTCATGTTGG	278
Query	661	GGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCCGGGGCGAGTCGCCCCCGGGCCAGCAACGCTGGCG	720
Sbjct	277	GGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCCGGGGCGAGTCGCCCCCGGGCCAGCAACGCTGGCG	218
Query	721	GGCCCCCGAAGCAACAAGGTACAATAGTCACGGGTGGGAGGTTGGGCCATAAAGACCCG	780
Sbjct	217	GGCCCCCGAAGCAACAAGGTACAATAGTCACGGGTGGGAGGTTGGGCCATAAAGACCCG	158

Query	781	CACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTC	840
Sbjct	157	CACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTC	98
Query	841	CTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTCCGGCTCTGGGGGTCGTTGCCAACCCCTGG	900
Sbjct	97	CTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTCCGGCTCTGGGGGTCGTTGCCAACCCCTGG	38
Query	901	AGCCAGTCCGAAGGCCTCACCGAGCCATT	929
Sbjct	37	AGCCAGTCCGAAGGCCTCACCGAGCCATT	9

**KẾT LUẬN**

***Aspergillus terreus***

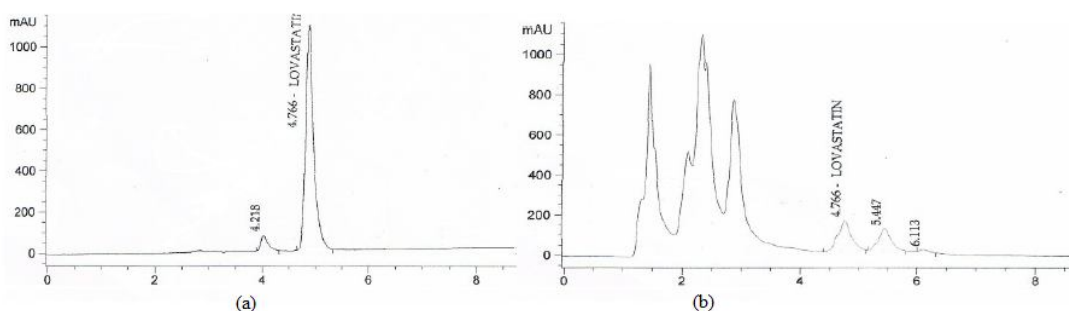
**Hình 3.9.** Kết quả giải trình tự 28S rRNA của chủng T22

So sánh với ngân hàng gen NCBI, trình tự gen 28S rRNA của chủng T22 có độ tương đồng 100% với loài *Aspergillus terreus*. Kết luận chủng T22 thuộc loài *Aspergillus terreus*.

Nhiều công trình trên thế giới cho thấy, *Aspergillus terreus* là chủng sinh lovastatin khá cao và được ứng dụng nhiều trong sản xuất. [1], [6], [10]

### 3.6. Kết quả phân tích lovastatin

Kết quả phân tích cho thấy, có sự tương đồng về thời gian lưu (RT) trong sắc kí đồ của lovastatin chuẩn (RT = 4,766) và lovastatin mẫu (RT = 4,766) chiết từ chủng T22. Điều này khẳng định có sự hiện diện của lovastatin trong mẫu.



Hình 3.10. Kết quả phân tích HPLC phát hiện lovastatin

(a): Chất chuẩn; (b): Mẫu tách chiết từ chủng T22

## 4. Kết luận và kiến nghị

### 4.1. Kết luận

Qua kết quả thí nghiệm, chúng tôi đưa ra một số kết luận sau:

- Đã phân lập được 120 chủng NS từ 6 mẫu đất tương ứng với 6 địa điểm ở RNM Cần Giờ.
- Đã xác định được 6 chủng NS khả năng sinh lovastatin, trong đó 1 chủng sinh lovastatin mạnh (chiếm 16,67%); 3 chủng sinh lovastatin trung bình (chiếm 50%); 2 chủng sinh lovastatin yếu (chiếm 33,33%).
- Kết quả định danh chủng T22 bằng việc giải trình tự gen 28S rRNA cho thấy chủng này thuộc loài *Aspergillus terreus*.
- Đã phân tích HPLC và phát hiện sự hiện diện của lovastatin trong mẫu tách chiết từ chủng T22.

### 4.2. Kiến nghị

Tiếp tục khảo sát các loại dung môi tách chiết lovastatin hiệu quả nhất và tiến hành định lượng lovastatin sinh ra khi nuôi cấy NS.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chu Thanh Bình, Nguyễn Thu Hoài (2013), “Đặc điểm sinh học của chủng *Aspergillus terreus* VNA 05 và khả năng sinh tổng hợp lovastatin”, *Nghiên cứu khoa học công nghệ, Tạp chí Khoa học và Công nghệ nhiệt đới*, (5), tr. 44 - 50.
2. Nguyễn Lâm Dũng (1978), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, Tập III, Nxb Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
3. Trần Thị Như Hằng (2010), *Xác định hoạt tính sinh học và bản chất hóa học của một số hoạt chất từ nấm nội sinh trên cây khổ sâm (*Croton tonkinensis* Gagnep.) và cây bùm bụp (*Mallotus apelta* Lour.)*, Luận án Tiến sĩ, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Hà Nội, tr. 57.
4. Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết (2006), *Thí nghiệm công nghệ sinh học – tập 2, Thí nghiệm vi sinh vật học*, Nxb Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.
5. Trần Thanh Thùy (1999), *Hướng dẫn thực hành vi sinh vật học*, tái bản lần thứ nhất, Nxb Giáo dục.
6. Casas López, J. L., Sánchez Pérez, J. A., Fernández Sevilla, J. M., Acien Fernández, F. G., Molina Grima, E., Chistib, Y. (2003), “Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production”, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 33 , pp. 270 - 277.
7. Prakash, C., Shivakumar, S. (2014), “Bioprospecting of Lovastatin Producing Fungi Isolated from Soil Samples”, *International Research Journal of Biological Sciences*, Vol. 3(9), pp. 42 – 46.
8. Quek, R. F. (2007), *A study on Higher Marine Fungal Interaction, A Thesis Submitted For the Degree of Master of Science*, National University of Singapore, pp. 4 – 18.
9. Radhakv, L. (2013), “Lovastatin production and applications”, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical research*, Vol. 6, pp. 21 – 26.
10. Rizna, T. D., Nina, A., Hani, M., Puspa Dewi, N. L., and Minarti (2011), “Production of lovastatin and sulochrin by *Aspergillus terreus* using solid state fermentation”, *Makara journal of technology*, Vol. 15, pp. 1 – 4.
11. <http://www.tienphong.vn/Suc-Khoe-Bac-Si-Cua-Ban/lam-gi-de-phong-ngua-tang-cholesterol-mau-572746.tpo>, Truy cập lúc 22h00, ngày 15/09/2015.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 17-6-2016; ngày phản biện đánh giá: 08-9-2016;  
ngày chấp nhận đăng: 13-9-2016)