

Phân lập và sàng lọc các chủng vi sinh vật nội sinh có hoạt tính chống oxy hóa từ một số cây họ Zingiberaceae và Rutaceae

• **Võ Thị Ngọc Mỹ**

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

• **Nguyễn Văn Thanh**

Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

• **Nguyễn Đình Nga**

Trường Đại học Y – Dược Tp. Hồ Chí Minh

(Bài nhận ngày 30 tháng 07 năm 2015, nhận đăng ngày 30 tháng 08 năm 2016)

TÓM TẮT

Họ Zingiberaceae và Rutaceae có nhiều ứng dụng trong việc điều trị bệnh. Lá, thân, thân rễ và vỏ quả của các cây trong họ chứa nhiều tinh dầu, hứa hẹn là nơi cung cấp một môi trường sống hữu ích cho các nhóm vi sinh vật nội sinh khác nhau. Trong nghiên cứu này, các chủng vi sinh vật nội sinh *Streptomyces* sp., *Aspergillus terreus*, *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. đã được phân lập từ các bộ phận của cây tắc, riềng,

Từ khóa: *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Streptomyces*, vi sinh vật nội sinh

gừng, nguyệt quế và được xác định có khả năng sản sinh các hoạt chất chống oxy hóa. Hoạt tính đánh bắt gốc tự do DPPH của các chủng cũng đã được định lượng như sau: chủng R-TN3 (62,32 %) cho hoạt tính chống oxy hóa cao nhất, các chủng G1-TL3 và NQ-TN3 cho hoạt tính chống oxy hóa trung bình và thấp nhất là chủng T-TG3 (30,95 %).

MỞ ĐẦU

Gần đây các nhà khoa học đã chứng minh có mối liên hệ giữa sự gia tăng gốc tự do trong cơ thể với việc tăng nguy cơ ung thư, bệnh tim mạch ở người. Gốc tự do thúc đẩy quá trình oxy hóa, gây tổn hại cấu trúc DNA, tổn thương làm DNA sao mã không chính xác dẫn đến sự hình thành tế bào ung thư. Bên cạnh đó gốc tự do gây tổn thương tế bào, gây ra các bệnh thoái hóa, suy yếu hệ thống miễn dịch, sớm xuất hiện hiện tượng lão hóa. Do vậy, các nghiên cứu về chất chống oxy hóa ngày càng được quan tâm để tìm cách hạn chế các gốc tự do tạo ra nhằm phòng ngừa những bệnh trên một cách hiệu quả nhất [1, 3].

Chất chống oxy hóa ngoại sinh cung cấp cho cơ thể được sản xuất từ nhiều con đường như chiết xuất từ thực vật, sinh vật, hóa tổng hợp...

So với các chất chống oxy hóa tổng hợp, việc sử dụng các chất chống oxy hóa tự nhiên như vitamin C, carotenoid, flavonoid, các hợp chất phenol... an toàn, ít tác dụng phụ hơn. Trước đây, các chất chống oxy hóa tự nhiên thường được chiết xuất từ thực vật, tuy nhiên nguồn này cũng chịu ảnh hưởng của đất và các yếu tố môi trường, quy trình chiết sử dụng các dung môi phân nào làm mất tính tự nhiên của hoạt chất. Việc sử dụng nguồn cung cấp hoạt chất chống oxy hóa từ vi sinh vật có ưu thế so với từ thực vật như phân bố rộng rãi trong tự nhiên, dễ nuôi cấy với quy mô lớn, môi trường ít tốn kém, và tăng trưởng nhanh, tuy nhiên lại chưa được quan tâm nhiều. Do đó, việc nghiên cứu tìm kiếm nguồn cung cấp hoạt chất chống oxy hóa từ vi sinh vật

nội sinh mở ra một hướng nghiên cứu mới trong việc phòng bệnh và tăng cường sức khỏe [1, 2].

Vi sinh vật nội sinh được tìm thấy trong hầu hết ở các loài thực vật, chúng cư trú ở trong nội mô của cây chủ và giữa chúng hình thành một loạt các mối quan hệ khác nhau như cộng sinh tương hỗ, cộng sinh dinh dưỡng, hội sinh... Hầu hết các dạng nội sinh này bắt đầu xuất hiện từ vùng rễ hay bề mặt lá, tuy nhiên, một số loài có thể nội sinh trên hạt. Vi sinh vật nội sinh thúc đẩy thực vật tăng trưởng, tăng năng suất và đóng vai trò là một tác nhân điều hòa sinh học. Bên cạnh đó, chúng còn sản xuất hàng loạt các sản phẩm tự nhiên có lợi cho cây chủ mà con người có thể khai thác những tác nhân đó để ứng dụng trong y học, nông nghiệp hay công nghiệp. Ngoài ra chúng còn có tiềm năng loại bỏ các chất gây ô nhiễm trong đất bằng cách tăng cường khả năng khử độc trên thực vật và làm cho đất trở nên màu mỡ thông qua chu trình phosphate và cố định đạm. Ngày càng có nhiều quan tâm trong việc

phát triển các ứng dụng tiềm năng công nghệ sinh học của vi sinh vật nội sinh để phát triển các giống cây trồng có khả năng khử độc đồng thời các khả năng sản xuất sinh khối và nhiên liệu sinh học. Vi sinh vật nội sinh là một tác nhân cân bằng hệ vi sinh vật trên cây chủ nhằm ngăn chặn những tác nhân gây bệnh. Nhiều tài liệu cho thấy khi sống cộng sinh trong mô thực vật, chúng đã sản xuất ra nhiều chất có tác dụng sinh học như kháng khuẩn, kháng nấm, chống ung thư. Do đó, chúng đang là nguồn nghiên cứu dồi dào để chiết tách được những hoạt chất từ vi sinh vật nội sinh dùng chữa trị nhiều bệnh ứng dụng trong y học [2, 4].

VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu phân lập

Nguồn mẫu được thu thập từ vườn nhà và vườn được liệu. Các mẫu sau khi cắt khỏi cây được cho vào túi nylon và xử lý trong vòng 24 giờ.

Bảng 1. Danh sách cây sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên địa phương	Tên khoa học	Thời gian thu mẫu
1	Tắc	<i>Fortunella japonica</i> Thunb.	22/11/2013
2	Riềng	<i>Alpinia officinarum</i> Hance.	22/11/2013
3	Gừng	<i>Zingiber officinale</i> Rose.	29/11/2013
4	Nguyệt quế	<i>Murraya paniculata</i> L. Jack.	29/11/2013

Xử lý và phân lập mẫu

Chọn các cây sống trong môi trường tự nhiên, khỏe mạnh, không còi cọc, không bị sâu hại hay biểu hiện bệnh như đốm lá, vàng cây... Mẫu cây thu thập được rửa sạch với nước, để ráo nơi khô mát sau đó được xử lý tại phòng thí nghiệm trong điều kiện vô trùng. Mẫu được đặt trên môi trường thạch nước, không chứa các chất dinh dưỡng khác. Theo dõi sự phát triển của vi sinh vật nội sinh từ mẫu cây trong thời gian khoảng 5 - 14 ngày. Tiếp tục cấy chuyển vi sinh vật nội sinh sang môi trường chứa chất dinh dưỡng (PDA) rồi ủ ở nhiệt độ phòng và theo dõi sự phát triển, xác định đặc điểm vi sinh vật và khảo sát hoạt tính chống oxy hóa.

Định tính hoạt tính chống oxy hóa của các chủng vi sinh vật nội sinh

Đối với các chủng nấm thu được tiến hành như sau: lấy một ít nấm ở rìa khuẩn lạc trên thạch PDA cấy sang môi trường Czapek - Dox, ủ ở nhiệt độ phòng/7 ngày. Sau 7 ngày nuôi cấy, đổ dung dịch NaCl 0,85 % ngập mặt thạch Czapek - dox, sử dụng que trải nhẹ để thu hỗn dịch bào tử nấm. Sử dụng dung dịch NaCl 0,85 % để điều chỉnh T % của hỗn dịch trong khoảng 80–85 % (tương ứng $1,2 - 1,4 \times 10^6$ bào tử/mL). Cấy hỗn dịch đã điều chỉnh với tỉ lệ 5 % (1,5 mL) vào 30 mL môi trường PDB, ủ ở nhiệt độ phòng/7 ngày. Tiến hành thu toàn bộ dịch nuôi cấy, đặt hỗn hợp

thu được trong bể siêu âm 30 phút. Sau đó ly tâm hỗn hợp sau siêu âm ở 10.000 g ở 4 °C trong 10 phút, thu dịch nổi, lọc dịch nổi với giấy lọc Whatman No1. Dịch lọc thu được là mẫu thử cho các thử nghiệm tiếp theo [6].

Xác định hoạt chất chống oxy hóa bằng phương pháp nhuộm DPPH nhanh

Phương pháp trên được đưa ra bởi Gao và cộng sự năm 2008, dựa trên cơ chế chống oxy hóa bằng cách đánh bắt gốc tự do hay các chất cho hydrogen nhằm làm giảm các gốc tự do hữu cơ DPPH. Sản phẩm thu được sau phản ứng có màu vàng đến vàng trắng. Bằng cách cô đặc và cô định mẫu thử trên bản silica gel sau đó cho mẫu tiếp xúc với một lượng xác định dung dịch DPPH có thể phát hiện hoạt tính chống oxy hóa ở nồng độ chất chống oxy hóa rất thấp [6].

Mẫu có hoạt tính chống oxy hóa (dương tính) khi xuất hiện vòng trắng trên nền tím. Mẫu không có hoạt tính chống oxy hóa (âm tính) khi không xuất hiện vòng trắng, giống với mẫu nước cất và môi trường không có vi sinh vật. Khả năng chống oxy hóa được đánh giá bằng độ chênh lệch màu giữa chứng dương vitamin C với nước cất, được đánh giá ở 3 mức độ +, ++, ++++. Các chủng vi sinh vật có hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp nhuộm DPPH nhanh tiếp tục được thử nghiệm định lượng hoạt chất chống oxy hóa.

Định lượng hoạt chất chống oxy hóa

Định lượng dựa trên khả năng đánh bắt gốc tự do DPPH, mỗi thử nghiệm lặp lại 3 lần, ghi

nhận kết quả trung bình. Phương pháp được dựa trên cơ chế chống oxy hóa bằng cách dập tắt gốc tự do nhằm làm giảm các gốc tự do hữu cơ DPPH. Hoạt tính chống oxy hóa được xác định dựa trên sự giảm độ hấp thụ DPPH ở bước sóng 517 nm. Khả năng đánh bắt gốc tự do được xác định bằng cách đo sự giảm hấp thụ ở bước sóng 517 nm, được tính dựa trên công thức sau:

$$S (\%) = (1 - (A_1 - A_2) / A_0) * 100$$

A1: giá trị OD của dịch nuôi cấy sau khi phản ứng với DPPH; A2: giá trị OD của phản ứng khi không có DPPH; A0: giá trị OD của phản ứng khi không có dịch nuôi cấy [6].

Định danh những chủng vi sinh vật nội sinh có hoạt tính chống oxy hóa cao

Tên khoa học của vi sinh vật nội sinh cho chất biến dưỡng ra môi trường có hoạt tính chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp quan sát đặc điểm khuẩn lạc và đặc điểm vi học (đặc điểm khuẩn lạc, mặt phải, mặt trái, tốc độ phát triển, đặc điểm vi học,...). Sử dụng chuyên luận của nhóm phân loại để định danh theo Guy St. Germain (1995) [5].

KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

Phân lập và sàng lọc vi sinh vật nội sinh có hoạt tính chống oxy hóa từ một số cây thuộc họ Rutaceae và Zingiberaceae

Phân lập được một số chủng vi sinh vật nội sinh từ cây tắc, riềng, gừng, nguyệt quế thuộc họ Rutaceae và Zingiberaceae (Bảng 2).

Bảng 2. Số lượng các chủng chống oxy hóa

STT	Thực vật	Số lượng chủng	Chủng chống oxy hóa
1	Tắc	8	1
2	Riềng	17	2
3	Gừng	11	2
4	Nguyệt quế	25	1
Tổng cộng		61	6

Định lượng các chủng vi sinh vật nội sinh có hoạt tính chống oxy hóa

Sau khi trải qua quá trình định lượng, chúng tôi đã thu được kết quả sau với từng chủng cụ thể dựa trên phương pháp đánh bắt gốc tự do DPPH.

Qua quá trình định lượng bằng phương pháp đánh bắt gốc tự do DPPH, chúng tôi thu nhận được các kết quả sau: Chủng R-TN3 (62,32 %)

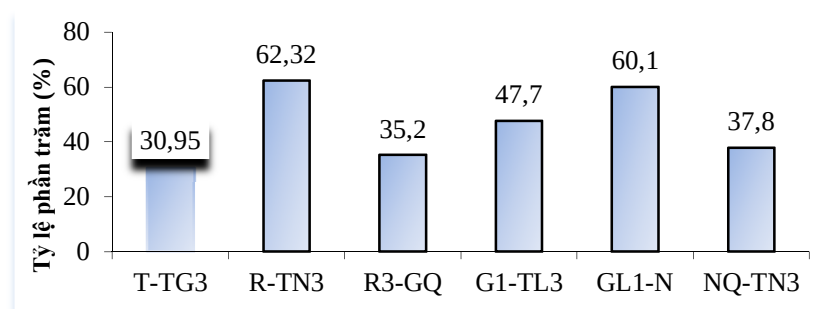
cho hoạt tính chống oxy hóa cao nhất; chủng T-TG3 (30,95 %) cho hoạt tính chống oxy hóa thấp nhất so với các chủng còn lại.

Mức độ chống oxy hóa của các chủng tương đối cao, trung bình khoảng 44,69 %. Các chủng đa số có mức chống oxy hóa trên 30 %, trong đó có một chủng ở trên 60 %.

Bảng 3. Kết quả chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH

STT	Các chủng chống oxy hóa	Kết quả định tính	Định lượng % đánh bắt gốc tự do DPPH
1	T-TG3	+	30,95
2	R-TN3	+++	62,32
3	R3-GQ	+	35,20
4	G1-TL3	++	47,70
5	GL1-N	+++	60,10
6	NQ-TN3	+	37,80

Chú thích: (+): hoạt tính chống oxy hóa yếu; (++) : hoạt tính chống oxy hóa trung bình; (+++): hoạt tính chống oxy hóa mạnh; (-): không có tác động chống oxy hóa.



Hình 1. Tỷ lệ % khả năng đánh bắt gốc tự do của các chủng vi sinh vật nội sinh

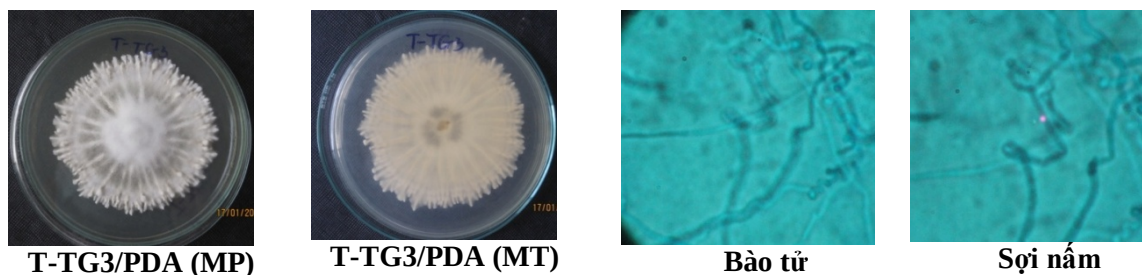
Định danh các chủng vi sinh vật nội sinh có hoạt tính chống oxy hóa

Chủng T-TG3

Đặc điểm khuẩn ty trên môi trường PDA: tốc độ phát triển nhanh $\Phi = 6 \text{ cm}/7 \text{ ngày}$. Khóm nấm hình tròn, cấu tạo sợi trên bề mặt có dạng hình tia giống dạng phóng xạ, khuẩn lạc có màu trắng rắn

chắc, xù xì, tiết sắc tố màu vàng nhạt ra môi trường. Mặt trái có hình vàng nhạt.

Đặc điểm khi quan sát bằng kính hiển vi: cuống sinh bào tử lượn sóng, hơi xoắn. Bào tử có hình bầu dục, màng bào tử nhẵn. Chủng T-TG3 thể hiện đầy đủ các tính chất của xạ khuẩn *Streptomyces* sp.

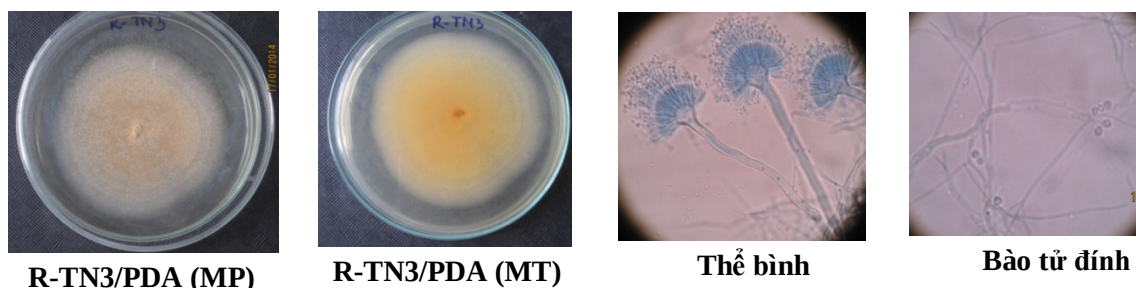


Hình 2. Chủng T-TG3

Chủng R-TN3

Đặc điểm khóm nấm trên môi trường PDA: nấm phát triển tương đối nhanh $\Phi = 6 \text{ cm}/7 \text{ ngày}$. Khóm nấm tròn, dạng bột, mịn như nhung, có màu nâu vàng đến màu nâu, vòng ngoài có màu trắng dần chuyển sang nâu. Mặt trái có màu vàng sẫm.

Đặc điểm khi quan sát bằng kính hiển vi: các bào tử có nguồn gốc xuất phát từ các tế bào chân đáy trên trụ đỡ và kết thúc bằng một túi nấm ở đầu, bào tử đính ngắn, tròn. Thể bình có 2 dây, túi nấm tròn. Chủng R-TN3 thể hiện đầy đủ các tính chất của *Aspergillus terreus*.



Hình 3. Chủng R-TN3

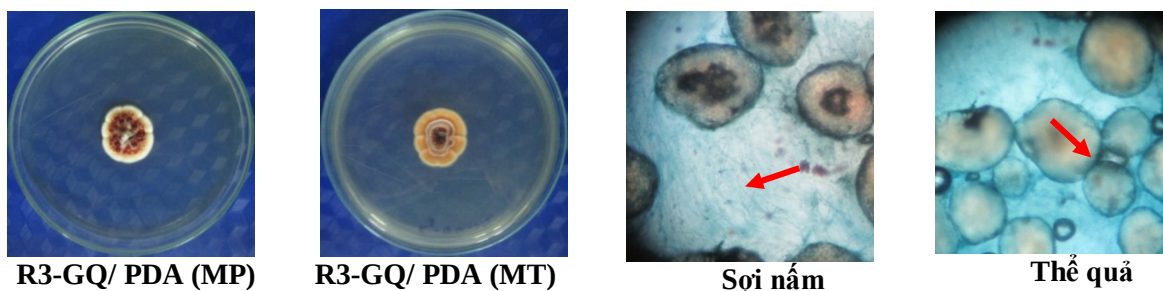
Chủng R3-GQ

Chủng R3-GQ đã quan sát được hình thái, chưa định danh được.

Đặc điểm trên môi trường PDA: Tốc độ phát triển chậm $\Phi = 1 \text{ cm}/7 \text{ ngày}$. Khóm có hình tròn, bề mặt mịn, có màu nâu, trên bề mặt có các giọt

tiết màu nâu, sinh sắc tố màu nâu đỏ ra ngoài môi trường. Mặt trái có màu vàng

Đặc điểm quan sát trên kính hiển vi: Có thể quả phát quang, sợi nấm mảnh.



Hình 4. Chủng R3-GQ

Chủng G1-TL3

Đặc điểm khóm nấm trên môi trường PDA: nấm phát triển rất nhanh. Khóm nấm tròn, dạng bông, hơi xòe nhô lên, màu đen xám. Mặt trái có màu tối.

Đặc điểm khi quan sát bằng kính hiển vi: sợi nấm có vách ngăn, bào tử tạo thành chuỗi có

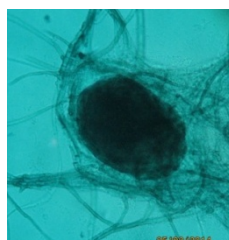
phân nhánh, những bào tử ở gốc nhánh hình khiên 2 tế bào, những tế bào ở ngọn là tế bào đơn, hình bầu dục đến tròn và có sẹo lõi. Chủng G1-TL3 thể hiện đầy đủ các tính chất của *Cladosporium* sp.



**G1-TL3/PDA
(MP)**



**G1-TL3/PDA
(MT)**



Thể quả



Bào tử G1-TL3

Hình 5. Chủng G1-TL3

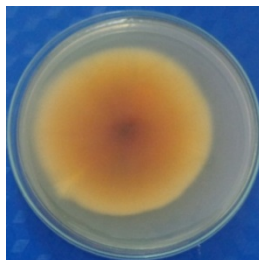
Chủng GL1-N

Đặc điểm khóm nấm trên môi trường PDA: nấm phát triển nhanh, $\Phi = 7$ cm/7 ngày. Khóm nấm ban đầu có màu trắng sau chuyển sang vàng nâu và thành nâu. Sợi nấm dạng bột mịn, mặt phải có màu vàng nâu sau chuyển sang nâu đậm theo thời gian, mặt trái có màu vàng nâu, khuếch tán sắc tố vàng nâu ra mặt thạch.

Đặc điểm khi quan sát bằng kính hiển vi: các bào tử xuất phát từ các tế bào chân đáy trên trụ đỡ và kết thúc bằng một túi nấm ở đầu, bào tử dính ngắn, tròn. Thể bình có 2 lớp, túi nấm tròn. Chủng GL1-N mang đặc điểm của chủng *Aspergillus terreus*.



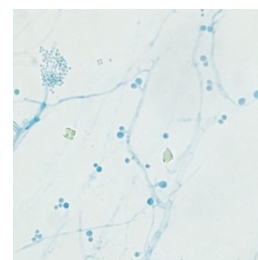
**GL1-N/PDA
(MP)**



GL1-N/PDA (MT)



Thể bình

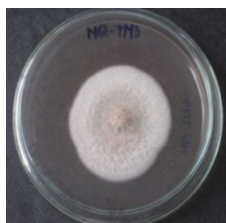
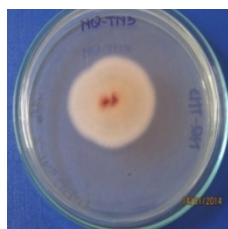


Bào tử dính

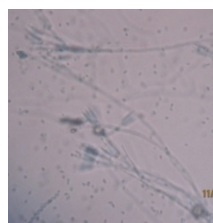
Hình 5. Chủng G1-N

Chủng NQ-TN3

Đặc điểm khóm nấm trên môi trường PDA: khóm nấm phát triển nhanh, $\Phi = 5 \text{ cm}/7 \text{ ngày}$. Khóm nấm tròn, dạng bông mượt, có màu trắng, khi già chuyển dần sang màu xanh đậm, sinh sắc tố màu đỏ khuếch tán ra môi trường. Mặt trái có màu hồng đỏ đậm dần.

**NQ-TN3/PDA (MP)****NQ-TN3/PDA (MT)**

Đặc điểm khi quan sát bằng kính hiển vi: đính bào đài phân nhánh ít hay nhiều. Tiểu bào đài hình thể bình tận cùng bằng một chuỗi bào tử đính, bào tử đính có hình cầu. Chủng NQ-TN3 thể hiện đầy đủ các tính chất của *Penicillium* sp.

**Bào tử NQ-TN3****Thể bình****Hình 6.** Chủng NQ-TN3**KẾT LUẬN**

Chúng tôi đã phân lập và sàng lọc được 6 chủng vi sinh vật nội sinh có hoạt tính chống oxy hóa trên các cây tắc, riềng, gừng, nguyệt quế. Cụ thể, ở cây tắc là thu được 1 chủng, riềng 2 chủng, gừng 2 chủng, nguyệt quế 1 chủng. Định danh được 5 chủng vi sinh vật, trong đó 2 chủng *Asergillus terreus* cho hoạt chất chống oxy hóa mạnh nhất. Hầu hết những cây được phân lập đều có sự hiện diện của vi sinh vật nội sinh, chiếm tỷ

lệ 6/61 chủng phân lập cho hoạt tính chống oxy hóa, những vi sinh vật nội sinh sản sinh chất biến dưỡng có hoạt tính rất đa dạng về hình thức lẫn cách sinh sản.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Bộ môn Vi sinh – Kí sinh, Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Tp.HCM; Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành đã hỗ trợ và tạo điều kiện tốt đa để chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

Isolation and screening of the endophytes possessing antioxidant activity from Rutaceae and Zingiberaceae plants

• **Vo Thi Ngoc My**

University of Science, VNU-HCM

Nguyen Tat Thanh University

• **Nguyen Van Thanh**

Nguyen Tat Thanh University

• **Nguyen Dinh Nga**

University of Medicine and Pharmacy, Ho Chi Minh City

ABSTRACT

Zingiberaceae and Rutaceae have been many applications in the treatment of diseases. Their leaves, stems, rhizomes and fruits... containing essential oils which could offer useful habitats for different endophyte groups. In this research, the strains of endophyte Streptomyces sp., Aspergillus terreus, Cladosporium sp., Penicillium sp. were isolated from different plant

parts of galangal, ginger, laurel and their antioxidant activities were determined. The antioxidant activity by using DPPH methos applied on these strain was with the following results: R-TN3 strain showed the highest antioxidant activity (62.32 %), followed by G1-TL3 and NQ-TN3 and the T-TG3 was the lowest (30.95 %).

Keywords: *Cladosporium, Aspergillus, Penicillium, Streptomyces, endophyte*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. T. Hùng, Chuyên đề: Các chất chống oxy hóa trong tự nhiên, Đại học Y Dược TP. HCM (2006).
- [2]. G.R. Buettner, The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate, *Arch Biochem Biophys*, 300, 2, 534–43 (1993).
- [3]. T.P. Devasagayam, J.C. Tilak, K.K. Bloor, et al., Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects, *J. Assoc. Physicians India*, 52, 794–804 (2004).
- [4]. Y.Z. Fang, S. Yang, G. Wu, Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition*, 18, 10, 872-9 (2002).
- [5]. G.S. Germain, Identifying Filamentous Fungi, Star Publish Company (1995).
- [6]. L.P. Zheng at al, Antioxidant activity of aqueous extract of a *Tolypocladium* sp. fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis*, *African Journal of Biotechnology*, 7, 17, 3004–3010 (2008).