

SINH TỔNG HỢP MYCOPHENOLIC ACID TỪ VI NẤM

CHU THANH BÌNH

1. MỞ ĐẦU

Ghép tạng được thế giới nghiên cứu từ thế kỷ thứ 19. Năm 1954, trường hợp ghép thận đầu tiên được thực hiện bởi Murray ở Boxtton (Hoa Kỳ). Sau đó lần lượt là việc ghép phổi năm 1962, ghép gan năm 1963 (Hoa Kỳ) và ghép tim 1967 (Nam Phi).

Hiện nay, nhiều bộ phận của cơ thể được ghép thành công như thận, tim, phổi, tụy, giác mạc, gan, ruột non... Tuy nhiên có vấn đề mà công nghệ ghép tạng đang phải đối mặt như nguồn tạng, chống thải ghép...

Ở Việt Nam, nhu cầu ghép tạng là rất lớn, với số dân khoảng 90 triệu người, có khoảng 10.000 bệnh nhân chờ ghép tạng mỗi năm (điều tra mới nhất của ngành y tế tính đến ngày 23/3/2015).

Một trong những vấn đề khó khăn trong quá trình ghép tạng đó là quá trình thải ghép sau phẫu thuật. Hiện nay, các nhà chuyên môn đã tìm ra Mycophenolic axit (MPA) được dùng cho những bệnh nhân sau khi cấy ghép tạng và được sử dụng để tạo nên cơ chế chống đào thải hiệu quả nhất.

Mycophenolic axit (MPA) có công thức là $C_{17}H_{20}O_6$ (4-hydroxy - 6 methoxy - 7 - methyl - 3 oxophthalanyl - 4 methyl - 4 hexenic), được chuyển hóa tại gan, có khả năng ức chế enzyme inosine monophotphat dehydrogenase (IMPDH) mà enzyme này làm chuyển IMP thành xanthosine - 5' - monophotphat (XMP) [1, 5]. XMP dẫn tới ức chế tổng hợp GMP (guanine monophotphat). Từ đó, chúng làm ức chế bước sinh tổng hợp nucleotid guanin và làm dừng quá trình sinh tổng hợp DNA và RNA [5].

Theo tác giả Fatemeh Ardestani và cộng sự, 2010 thì MPA được sinh tổng hợp từ một vài chi nấm [3, 5], là sản phẩm trao đổi chất bậc hai của một số nấm thuộc chi *Penicillium* sp. và ngoài ra còn có chủng *Byssoschlamys nivea* [1].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các chủng *Penicillium* được hoạt hóa từ bộ sưu tập chủng của Phòng Vi sinh, Phân viện Công nghệ sinh học.

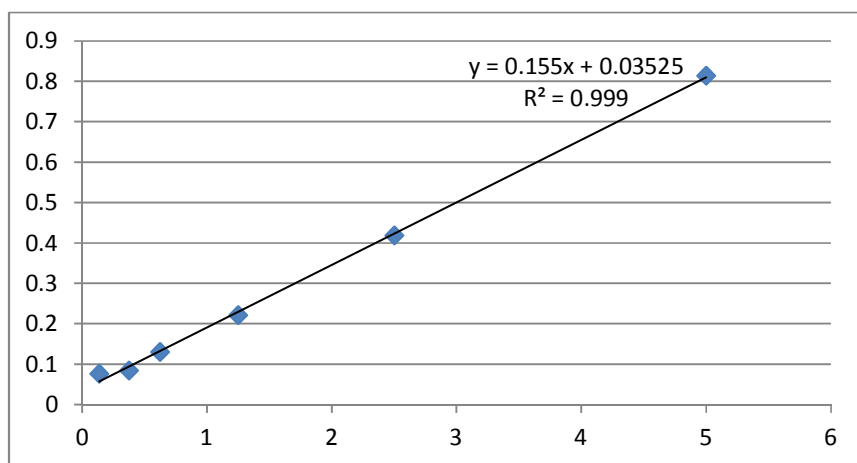
Nghiên cứu có sử dụng các môi trường nuôi cấy vi sinh vật thông thường: Môi trường PDA (Potato Dextro Agar); môi trường MEA (Malt Extract Agar); môi trường Czapeck - Dox...

Thiết bị sử dụng tại Phân viện Công nghệ sinh học: Kính hiển vi Olympus CH30; máy lắc IKA (Đức); Box nuôi cấy Laminar; thiết bị đo UV-Vis; tủ nuôi cấy Sanyo; nồi hấp tiệt trùng; máy ly tâm; máy đo pH...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp hoạt hóa chủng giống theo phương pháp của Viện Giữ giống Hoa Kỳ ATCC: Từ ống nghiệm giữ trong tủ lạnh, giống được hoạt hóa bằng cách cấy chuyển sang đĩa thạch.

- Định tính và định lượng MPA bằng phương pháp sắc ký bản mỏng [1]: Dịch nuôi cấy sau 10 ngày được ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút. Bổ sung một lượng tương đương về thể tích dung môi etylaxetat, vortex, thu nhận phần dịch nổi. Dịch được chạy sắc ký bản mỏng với dung môi là etylaxetat, đồng thời được hấp thụ ở bước sóng 250 nm trên UV-Vis. Kết quả tính toán dựa vào phương trình đường chuẩn MPA được xác định như sau [1]: 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 $r^2 = 0,999$.



Hình 1. Đồ thị đường chuẩn MPA

- Một số phương pháp nhằm xác định đặc tính sinh lý, sinh hóa của chủng: Các chủng được lựa chọn lên men sinh tổng hợp MPA được nghiên cứu sơ bộ về sự thay đổi pH từ 3 đến 7; nguồn các bon là nguồn dinh dưỡng chủ yếu cho vi nấm sinh trưởng như: saccaroza, lactoza, glucoza, manosa, D-maltoza.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp MPA từ vi nấm

Từ 5 chủng *Penicillium* đó là: *P. roqueforti*; *P. oxalium*; *P. citrinum*; *P. lanoso*; *P. adametzi* có trong bộ sưu tập chủng của Phòng Vi sinh, đã tiến hành hoạt hóa và nuôi cấy các chủng *Penicillium* thời gian 10 ngày, dịch nuôi cấy được chiết bằng dung môi etylaxetat với thể tích 1:1



M. MPA chuẩn;
 1. *P. roqueforty*;
 2. *P. adametzi*;
 3. *P. oxalicum*;
 4. *P. citrinum*;
 5. *P. lanoso*

3.2. Định lượng MPA

Dựa vào đường chuẩn đã nêu ở phần 2.2, hàm lượng MPA được trình bày ở bảng 1.

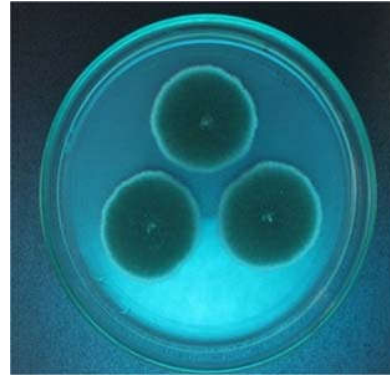
Bảng 1. Hàm lượng MPA (mg/l)

STT	Tên loài	X (mg/l)
1	<i>P. roqueforty</i>	0,4306
2	<i>P. adametzi</i>	Quá nhỏ
3	<i>P. oxalicum</i>	0,0113
4	<i>P. citrinum</i>	0,3371
5	<i>P. lanoso</i>	0,1087

Từ kết quả bảng 1, nhận thấy chủng số 1 (*P. roqueforty*) cho hàm lượng MPA cao nhất, kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả Ardestani F. và cộng sự, 2012 [2]. Tác giả cũng đã sử dụng chủng này để lên men sinh tổng hợp MPA, tuy nhiên đã tối ưu quá trình lên men nên hàm lượng đạt tới 200 mg/l. Theo số liệu mới đây, chủng *P. brevicompactum* đã cho hàm lượng đạt 300 mg/l. Chủng số 2 (*P. adametzi*) có hàm lượng quá nhỏ nên không nghiên cứu sâu. Vì vậy đã lựa chọn 4 chủng *P. roqueforty*, *P. oxalicum*, *P. citrinum*, *P. lanoso* để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Đặc điểm hình thái 4 loài thuộc chi *Penicillium*

Các chủng *Penicillium* được nuôi cấy trên môi trường MEA, nhiệt độ 27°C trong thời gian 7 ngày.

*P. roqueforti**P. oxalicum**P. citrinum**P. lanoso*

3.4. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của các chủng *Penicillium*

Nhằm mục đích nghiên cứu sơ bộ đặc điểm sinh học của các chủng, đã tiến hành khảo sát khả năng sinh trưởng của chúng trong các điều kiện pH, nguồn cơ chất khác nhau. Đồng thời dựa vào kết quả nghiên cứu nhằm đưa ra pH thích hợp cho sự sinh trưởng của chúng. Các chủng nghiên cứu được nuôi cấy trên môi trường có pH là 3, 4, 5, 6, 7. Sau 7 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 27°C, kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của chủng

pH	<i>P. roqueforty</i>	<i>P. oxalicum</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>P. lanoso</i>
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	++	++	++	++
7	++	++	++	++

Ghi chú: (+): Hệ sợi phát triển, chưa làm thay đổi màu sắc môi trường;

(++): Cả hệ sợi, bào tử đều phát triển, tạo màng trên bề mặt, thay đổi màu sắc môi trường.

Như vậy, với pH từ 3 đến 7, các chủng đều sinh trưởng, các kết quả này cũng trùng với nghiên cứu của tác giả Liqiang Chen và cộng sự, 2008 [4]. Các tác giả sử dụng chủng *P. roqueforty* nuôi cấy trên môi trường MEA với sự thay đổi của pH từ 3 đến 7 và chọn sử dụng pH = 7 cho những nghiên cứu tiếp theo.

3.5. Ảnh hưởng nguồn các bon đến sự sinh trưởng của chủng

Với mục đích lựa chọn nguồn các bon phù hợp cho sự phát triển của chủng, tiến hành nuôi cấy các chủng trên môi trường có saccaroza, lactoza, glucoza, manozo, D-matoza. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nguồn các bon đến sự phát triển của chủng

Nguồn các bon	<i>P. roqueforty</i>	<i>P. oxalicum</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>P. lanoso</i>
Saccaroza	++	++	++	++
Lactoza	++	++	++	++
Glucoza	++	++	++	++
Manozo	+	+	+	+
D-maltoza	+	+	+	+

Ghi chú: (+): Hệ sợi phát triển, chưa làm thay đổi màu sắc môi trường

(++): Cả hệ sợi, bào tử đều phát triển, tạo màng trên bề mặt, thay đổi màu sắc môi trường.

Từ kết quả ở bảng 3 cho thấy các chủng sinh trưởng tốt trên các nguồn đường saccaroza, lactoza, glucoza. Kết quả này cũng trùng với các nghiên cứu của tác giả Ardestani F., Fatemi S.A. và cộng sự, 2010 [3]. Đã tiến hành nuôi cấy các chủng trên các nguồn các bon khác nhau, trong đó có 5 nguồn các bon trên.

4. KẾT LUẬN

- Từ bộ sưu tập chủng của Phòng Vi sinh (hoạt hóa 10 chủng thuộc chi *Penicillium*) lựa chọn được bốn loài *Penicillium* có khả năng sinh tổng hợp MPA là: *P. roqueforty*, *P. oxalicum*, *P. citrinum*, *P. lanoso*.

- Khảo sát sơ bộ đặc điểm sinh học của các chủng: Tất cả đều sinh trưởng trên môi trường pH từ 3 đến 7, trong đó ở pH = 6 hoặc pH = 7 phát triển tốt hơn; các chủng đều phát triển tốt trên nguồn đường là Glucoza, Saccaroza, Lactoza.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ardestani F., *Enhanced Mycophenolic Acid Production by Penicillium brevicompactum with Enzymatically Hydrolyzed Casein*, World academy of Science, Engineering and technology, 2011, 49.
2. Ardestani and Ghasem Najafpour, *Mycophenolic Acid Production*, World Applied Science Journal, 2012, **17**(10):1337-1341.
3. Ardestani F., Fatemi S.A., *Evaluation of mycophenolic acid production by Penicillium brevicompactum MUCL 19011 in batch and continuous submerged cultures*, Biochemical Engineering Journal, 2010, **50**:99-103.
4. Liqiang Chen, Daniel J. Wilson, *Mycophenolic acid analogs with a modified metabolic profile*, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2008, **16**:9340-9345.
5. Torsen Bak Regueira, *Molecular Basis for mycophenolic Acid Biosynthesis in Penicillium brevicompactum*. App. And Enviroment Micro. May, 2011, p.3035-3043.

Nhận bài ngày 14 tháng 9 năm 2015

Hoàn thiện ngày 21 tháng 11 năm 2015

Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga