

có nguy cơ rất thấp do LCKBTNA và không cần sử dụng test phát hiện nhanh hoặc cấy khuẩn, không cần điều trị kháng sinh. Những bệnh nhân có 2, 3 điểm nên sử dụng test phát hiện nhanh hoặc phết họng cấy khuẩn, kết quả dương tính áp dụng kháng sinh điều trị. Những bệnh nhân với 4 điểm trở lên có nguy cơ do LCKBTNA rất cao điều trị kháng sinh theo kinh nghiệm có thể được tiến hành ngay [1].

## V. KẾT LUẬN

Tỉ lệ nhiễm liên cầu khuẩn Streptococcus beta nhóm A trong viêm họng cấp Centor cải tiến trên 2 điểm là 51,4%, trên 3 điểm là 86,7%, trên 4 điểm là 100%. Tại điểm cắt điểm Centor cải tiến 2 điểm có giá trị chẩn đoán tiên lượng viêm họng cấp do LCKBTNA cao nhất với độ nhạy 100%, độ đặc hiệu 70%.

Thang điểm Centor cải tiến là thang điểm dựa trên các triệu chứng lâm sàng có giá trị trong chẩn đoán viêm họng cấp do liên cầu khuẩn beta nhóm A

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Beth A. Choby** (2009), "Diagnosis and Treatment of Streptococcal Pharyngitis", Am Fam Physician, 79(5), pp: 383-390.

2. **G. Worrall, J. Hutchinson, G. Sherman, et al.** (2007), "Diagnosing streptococcal sore throat in adults", Can Fam Physician, 53, pp: 666-671.
3. **Robert M. Centor, John M. Witherspoon, Harry P. Dalton, et al.** (1981), "The Diagnosis of Strep Throat in Adults in the Emergency Room", Med. Decision Making, 1(3), pp: 239-246.
4. **Lindgren C., Neuman M. I., Monuteaux M.C., et al.** (2016), "Patient and Parent-Reported Signs and Symptoms for Group A Streptococcal Pharyngitis", Pediatrics, 138(1), pp: 1-7.
5. **Atlas S.J., McDermott S.M., Mannone C., et al.** (2005), "BRIEF REPORT: The Role of Point of Care Testing for Patients with Acute Pharyngitis", J Gen Intern Med, 20, pp: 759-761.
6. **M.G. Kalra, K.E. Higgins, E.D. Perez** (2016), "Common Questions About Streptococcal Pharyngitis", Am Fam Physician, 94(1), pp: 24-31.
7. **W.J. McIsaac, D. White, D. Tannenbaum, et al.** (1998), "A clinical score to reduce unnecessary antibiotic use in patients with sore throat", Can Med Assoc J, 158, pp: 75-83.
8. **Fine A. M., Victor Nizet V., Mandl K. D.** (2012), "Large-Scale Validation of the Centor and McIsaac Scores to Predict Group A Streptococcal Pharyngitis", Arch Intern Med., 172(11), pp: 847-852.
9. **J. Aalbers, K.K. O'Brien, W.S. Chan, et al.** (2011), "Predicting streptococcal pharyngitis in adults in primary care: a systematic review of the diagnostic accuracy of symptoms and signs and validation of the Centor score", BMC Med, 9(67), pp: 1-11.

# KHẢO SÁT KHẢ NĂNG SINH ACID KOJIC CỦA NẤM MỐC ASPERGILLUS ORYZAE VTCC-F045

Nguyễn Khắc Tiệp<sup>1</sup>, Đàm Thanh Xuân<sup>1</sup>, Lê Ngọc Khánh<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Acid kojic là một acid hữu cơ được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt trong công nghiệp mỹ phẩm nhờ tác dụng làm trắng da do khả năng ức chế hoạt động của enzym tyrosinase. Các nghiên cứu đã cho thấy *Aspergillus oryzae* là chủng vi sinh vật có khả năng sinh acid kojic với sản lượng cao, có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất nhờ công nghệ lên men. Ở Việt Nam, các nghiên cứu về lên men tạo acid kojic từ nấm mốc và đánh giá tác dụng làm trắng da của sản phẩm thu được còn hạn chế. Do đó, nhóm nghiên cứu đã tiến hành lên men tạo acid kojic từ *Aspergillus oryzae* VTCC-F045, tách chiết và đánh giá acid kojic thu được từ dịch lên men, khảo sát được các thông số lên men đồng thời đánh giá hoạt tính ức chế enzym tyrosinase của môi trường lên men. Kết quả cho thấy tại quy mô phòng thí nghiệm, lên men *Aspergillus*

*oryzae* trong môi trường lỏng chứa 10% glucose, 0,3% pepton ở nhiệt độ 30°C, hiếu khí trong 12 ngày, kiểm soát pH ban đầu 5,5; sau 2-3 ngày lên men kiểm soát pH 2,5 cho hiệu suất sinh tổng hợp acid kojic vào khoảng 12,2 g/l. Đồng thời, dịch lên men thu được thể hiện hoạt tính ức chế enzym tyrosinase lên tới 93,73% tại điều kiện thử nghiệm.

**Từ khóa:** Acid kojic, *Aspergillus oryzae*, lên men, ức chế tyrosinase.

## SUMMARY

### INVESTIGATION ON KOJIC ACID FERMENTATION FROM ASPERGILLUS ORYZAE VTCC-F045

Kojic acid is widely used for its skin-whitening effect by inhibiting the activity of the tyrosinase enzyme in many fields, particularly in the cosmetic industry. Studies have shown that *Aspergillus oryzae* is capable of producing high yields of kojic acid, with potential for application in industrial production through fermentation. In Vietnam, studies on kojic acid fermentation from mold and assessment of the skin-whitening effects are limited. Our study focused on fermenting, purifying, and analyzing kojic acid in *Aspergillus oryzae* VTCC-F045 fermented media. We

<sup>1</sup>Trường Đại học Dược Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Lê Ngọc Khánh

Email: lengockhanh@hup.edu.vn

Ngày nhận bài: 22.4.2024

Ngày phản biện khoa học: 14.6.2024

Ngày duyệt bài: 8.7.2024

also looked at the fermentation parameters and tested how well the fermented media could inhibit the enzyme tyrosinase. The results showed that on a laboratory scale, *Aspergillus oryzae* can produce 12.2 g/l kojic acid from 10% glucose and 0.3% pepton culture media at 30°C, aerated for 12 days, with an initial pH control of 5.5; after 2-3 days, the pH is controlled to 2.5. At the same time, under test conditions, the fermented fluid showed enzyme tyrosinase inhibitory activity of up to 93.73%.

**Keywords:** *Aspergillus oryzae*, fermentation, kojic acid, tyrosinase inhibition.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Acid kojic là một acid hữu cơ được sử dụng trong nhiều lĩnh vực: y học, công nghiệp thực phẩm, nông nghiệp, công nghiệp hóa chất và đặc biệt là công nghiệp mỹ phẩm. Các nghiên cứu đã chỉ ra tác dụng làm trắng da của acid kojic nhờ sự ức chế hoạt động của enzym tyrosinase. Acid kojic là sản phẩm chuyển hóa thứ cấp của nhiều chủng nấm mốc thuộc chi *Penicilium*, *Mucor*, *Aspergillus* và vi khuẩn nhóm *Gluconoacetobacter* [3],[4],[5]. Trong đó, *Aspergillus oryzae* được biết đến là chủng có khả năng sinh acid kojic với sản lượng cao [2], [6], [7], [9]. Nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng hiệu suất sinh acid kojic của *Aspergillus oryzae* phụ thuộc vào đặc tính của chủng và điều kiện nuôi cấy [5]. Ở Việt Nam, các công bố về lên men tạo acid kojic từ nấm mốc và đánh giá tác dụng làm trắng da của sản phẩm thu được còn chưa nhiều. Từ những lý do trên, nghiên cứu "Khảo sát khả năng sinh acid kojic của nấm mốc *Aspergillus oryzae*" được tiến hành với mục tiêu lên men, chiết tách và đánh giá acid kojic từ dịch nuôi cấy nấm mốc *Aspergillus oryzae*. Đồng thời, bước đầu lựa chọn điều kiện lên men thích hợp và đánh giá hoạt tính ức chế enzym tyrosinase của môi trường lên men.

## II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**Nguyên liệu.** Chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae* VTCC-F045 do Viện vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội cung cấp, được bảo quản ở - 80°C, tại Khoa Công nghệ sinh học, Đại học Dược Hà Nội. Acid kojic nguyên liệu (Brilliant, Trung Quốc) đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích, Tyrosinase (Sigma, Mỹ), Cao nấm men, Pepton (Merck, Đức). Hóa chất pha môi trường nuôi cấy: glucose, kali dihydro phosphat, magie sulfat, thạch bột (Trung Quốc); hóa chất định tính, định lượng: methanol, ethyl acetat, acetone, chloroform, kali natri tartrat, natri hydroxyd, đồng sulfat, kali iodua, acid sulfuric 98%, natri thiosulfat, tinh bột, sắt III clorid 3% (Trung Quốc) đạt tiêu chuẩn tinh khiết hóa học.

**Thiết bị.** Tủ an toàn sinh học Sanyo Clean Bench (Nhật), tủ ấm Memmert (Đức), máy lắc ổn nhiệt Bio-shaker BR-300LF (Nhật), kính hiển vi quang học gắn camera Nikon Eclipse Ci- L (Nhật), thiết bị đo nhiệt độ nóng chảy Melting Point M-560 (Thụy Sĩ), bản mỏng sắc ký (Merck KGaA), thiết bị đo phổ hồng ngoại Jasco (Nhật), thiết bị đo phổ khối ESI – MS (Nhật).

### Phương pháp nghiên cứu

**Phương pháp lên men *Aspergillus oryzae* thu acid kojic.** *Aspergillus oryzae* được lên men trong bình nón 250ml chứa 100ml môi trường lên men gồm các thành phần: glucose, pepton;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Điều kiện lên men: tốc độ lắc 150 vòng/phút, ở 30°C trong 12 ngày.

Khảo sát các thông số của quá trình lên men bao gồm: nguồn carbon (glucose, saccharose, maltose); nguồn nitơ (pepton, cao nấm men, amoni sulfat); nồng độ glucose (nồng độ 6%, 8%, 10%, 12%); pH; thời gian nuôi cấy (8, 10, 12, 14 ngày).

### Phương pháp tách chiết và tinh chế

Acid kojic là sản phẩm ngoại bào nên sau khi lên men, tiến hành lọc loại sinh khối, thu lấy dịch lọc. Cô cách thủy đến 20% thể tích. Để kết tinh lạnh ở 4°C trong 24 giờ, lọc thu tinh thể. Sấy ở nhiệt độ 50°C trong 12 giờ, thu được sản phẩm thô. Để tinh chế, hòa tan sản phẩm thô bằng ethanol 96°C, đun cách thủy ở nhiệt độ 70°C để hòa tan. Lọc nóng trên phễu lọc Buchner, thu dịch lọc, tiến hành cô đến 20% thể tích. Để kết tinh lạnh, thu tinh thể, và sấy tinh thể như ở trên thu được acid kojic.

### Phương pháp đánh giá acid kojic

- Định tính bằng thuốc thử  $\text{FeCl}_3$  3%: lấy khoảng 1-2 ml mẫu thử vào ống nghiệm, nhỏ 1-2 giọt dung dịch  $\text{FeCl}_3$  3%, lắc đều. Acid kojic có trong mẫu sẽ phản ứng với ion  $\text{Fe}^{3+}$  tạo phức màu đỏ.

- Quan sát hình thái tinh thể: Sản phẩm được đem quan sát dưới kính hiển vi quang học (vật kính 10) tại Bộ môn Hóa Lý, Khoa Công nghệ Dược phẩm và Bào chế, Trường Đại học Dược Hà Nội.

- Đo nhiệt độ nóng chảy: Sản phẩm được đo nhiệt độ nóng chảy bằng thiết bị Melting Point M- 560 tại phòng thí nghiệm Hóa phân tích tiêu chuẩn, Khoa Hóa phân tích tiêu chuẩn, Viện Dược liệu.

- Phương pháp sắc ký lớp mỏng: Mẫu được hòa tan trong methanol, tiến hành sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi được lựa chọn. Bản mỏng Silica gel 60 F<sub>254</sub> được để khô và kích hoạt bằng cách để trong tủ sấy trong 30 phút ở nhiệt độ 110°C. Chuẩn bị hệ dung môi: tiến hành pha

dung môi sắc ký trong tủ hút. Bão hòa dung môi trong khoảng 20-30 phút. Đưa mẫu lên bản mỏng, tiến hành song song các mẫu đã chuẩn bị. Hết thời gian sắc ký, lấy bản mỏng ra, để khô, hiện vết bằng cách soi dưới đèn tử ngoại tại bước sóng 254 nm.

- Phương pháp đo phổ hồng ngoại (IR): Mẫu được đo phổ hồng ngoại bằng thiết bị FT-IR, phòng Thí nghiệm, Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia với kỹ thuật viên nền KBr trong vùng 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Các mẫu rắn được phân tán trong KBr đã sấy khô với tỉ lệ khoảng 1:200, rồi ép dưới dạng film mỏng dưới áp lực cao có hút chân không để loại bỏ hơi ẩm.

- Phương pháp đo phổ khối lượng (ESI-MS): Mẫu được đo phổ khối lượng bằng thiết bị Bruker EVOQ QUBE, phòng Thí nghiệm, Viện Thực phẩm chức năng, Hà Nội.

**Phương pháp thử hoạt tính ức chế enzym tyrosinase.** Dịch lên men được đông khô, sau đó thử hoạt tính ức chế enzym tyrosinase. Các mẫu bột đông khô được pha thành dung dịch gốc nồng độ 10 mg/mL trong DMSO, sau đó pha loãng đến các nồng độ làm việc trong đệm kali phosphat. Hỗn hợp phản ứng gồm: 30  $\mu\text{l}$  dung dịch đệm kali phosphat 0,1M, pH 7; 50  $\mu\text{l}$  dung dịch cơ chất L-tyrosin 2mM; 20  $\mu\text{l}$  dung dịch mẫu thử. Ủ đĩa trong vòng 5 phút ở nhiệt độ 37°C, bổ sung 100  $\mu\text{l}$  dung dịch enzym tyrosinase 250U/ml (trong dung dịch đệm kali phosphat 0,1M) và lắc 30 giây trong máy ELISA. Ủ đĩa 30 phút ở nhiệt độ 37°C và đo quang ở bước sóng 490nm. Hydroquinone được dùng làm chất đối chứng dương. Mẫu trắng có các thành phần tương tự như mẫu thử nhưng dung dịch mẫu thử được thay bằng dung dịch đệm kali phosphat. Kết quả được tính theo công thức:

$$\% \text{ Ức chế} = 1 - \frac{A_{\text{Thử}}}{A_{\text{Trắng}}} \times 100$$

Trong đó:

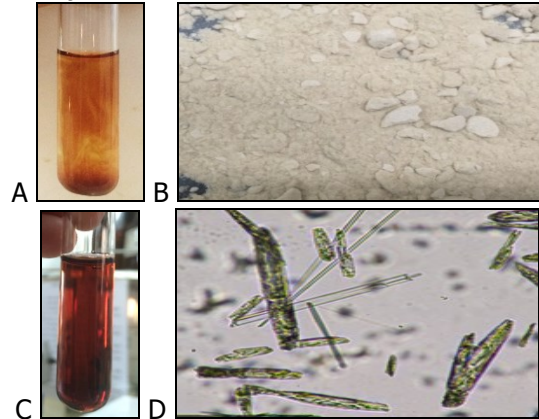
$A_{\text{Thử}}$ : Mật độ quang của mẫu thử

$A_{\text{Trắng}}$ : Mật độ quang của mẫu trắng.

### III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

**Lên men thu acid kojic từ dịch nuôi cấy *Aspergillus oryzae*.** Để đánh giá sơ bộ khả năng sinh acid kojic từ nấm mốc, nhóm nghiên cứu tiến hành lên men *Aspergillus oryzae* VTCC-F045 trong môi trường và điều kiện lên men như mô tả ở phương pháp nghiên cứu. Dịch sau khi lên men được lọc loại sinh khối, kiểm tra pH và thực hiện phản ứng định tính với  $\text{FeCl}_3$ . Kết quả cho thấy, pH dịch nuôi cấy giảm từ 6,5 xuống 5,5; đồng thời tạo màu đỏ đặc trưng cho phản ứng của acid kojic với ion  $\text{Fe}^{3+}$  (Hình 1A). Sau

đó, tiếp tục tiến hành tách chiết theo phương pháp ở trên để thu sản phẩm từ dịch lên men. Sản phẩm thu được có dạng bột tơi xốp, màu trắng ngà (Hình 1B), cho màu đỏ tươi đặc trưng khi phản ứng với ion  $\text{Fe}^{3+}$  (Hình 1C). Tiến hành quan sát trên kính hiển vi ở vật kính 10 cho thấy dạng tinh thể kết tinh hình kim trong suốt, đặc trưng cho hình thái tinh thể của acid kojic (Hình 1D). Từ các kết quả sơ bộ trên, có thể thấy sản phẩm thu được trong quá trình lên men có thể là acid kojic.



**Hình 1. Hình ảnh các sản phẩm thu được từ dịch lên men *Aspergillus oryzae* VTCC-F045**

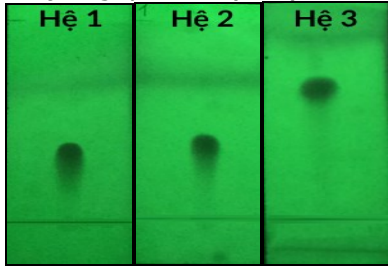
A. Dịch lên men tạo màu đỏ khi định tính với  $\text{FeCl}_3$ . B. Sản phẩm thu được sau khi chiết và tinh chế từ dịch lên men. C. Sản phẩm sau khi chiết và tinh chế tạo màu đỏ tươi khi định tính với  $\text{FeCl}_3$ . D. Tinh thể kết tinh hình kim khi quan sát sản phẩm thu được trên kính hiển vi ở vật kính 10.

Nhóm nghiên cứu tiếp tục đánh giá, kiểm nghiệm sản phẩm trên bằng các phương pháp được mô tả ở trên với các kết quả cụ thể như sau:

Nhiệt độ nóng chảy: Nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm thu được là khoảng 153,2°C-154,9°C, phù hợp với nhiệt độ nóng chảy đã mô tả của acid kojic là khoảng 150-160°C [4], đồng thời khoảng nóng chảy hẹp đo được sơ bộ cho thấy sản phẩm sau khi tinh chế lẫn ít tạp.

Sắc ký lớp mỏng: Sản phẩm thu được và acid kojic nguyên liệu được hòa tan bằng methanol và tiến hành chạy sắc ký lớp mỏng với ba hệ dung môi: Aceton-Cloroform (7:3), Ethylacetat-Methanol (15:1) và Methanol-Cloroform (1:1). Ở cả 3 hệ dung môi, khi quan sát sản phẩm thu được dưới đèn tử ngoại bước sóng 254 nm đều cho thấy 1 vết duy nhất, chứng tỏ sản phẩm thu được là tinh khiết (Hình 2) [1]. Khi tính toán  $R_f$  của sản phẩm thu được và acid kojic nguyên liệu với hệ dung môi Methanol-Cloroform (1:1), cho thấy  $R_f$  của sản

phẩm thu được (0,57) tương đương với R<sub>f</sub> của mẫu acid kojic nguyên liệu (0,55).



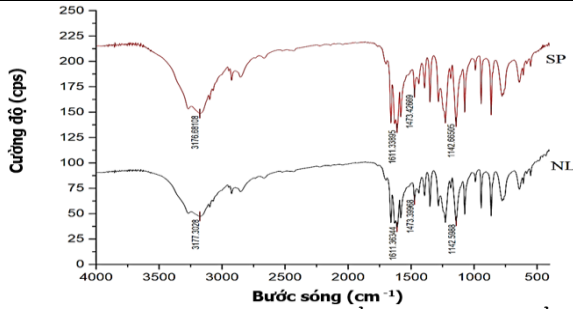
**Hình 2. Hình ảnh sắc ký lớp mỏng sản phẩm thu được khi chạy trên các hệ dung môi khác nhau**

Hệ 1: Aceton-Cloroform (7:3), Hệ 2: Ethylacetat-Methanol (15:1) và Hệ 3: Methanol-Cloroform (1:1)

Phổ hồng ngoại IR: Sản phẩm thu được tiến hành đo phổ hồng ngoại, đồng thời so sánh với kết quả phổ của acid kojic nguyên liệu. Kết quả được thể hiện trong bảng 1 và hình 3.

**Bảng 1. Kết quả phân tích phổ IR của sản phẩm thu được và acid kojic nguyên liệu**

Công thức cấu tạo	Đỉnh hấp thụ (cm <sup>-1</sup> )		Liên kết đặc trưng
	Sản phẩm thu được	Acid kojic nguyên liệu	
	3176, 3268	3177, 3267	-OH
	1228, 1142, 1074	1227, 1142, 1074	C – O
	1660	1660	C = O
	1582–1611	1582–1611	C = C (vòng)



**Hình 13. Kết quả chồng phổ IR của sản phẩm thu được (SP) và acid kojic nguyên liệu (NL)**

Kết quả phân tích phổ hồng ngoại cho thấy các đỉnh hấp thụ của các nhóm chức đặc trưng theo công thức cấu tạo của acid kojic. Đỉnh hấp thụ tại 3176 cm<sup>-1</sup> và 3268 cm<sup>-1</sup> (liên kết -OH) đặc trưng cho 2 nhóm chức -OH trong phân tử acid kojic. Đỉnh hấp thụ tại 1228 cm<sup>-1</sup>, 1142 cm<sup>-1</sup> và 1074 cm<sup>-1</sup> đặc trưng cho liên kết C – O và đỉnh hấp thụ tại 1660 cm<sup>-1</sup> đặc trưng cho liên kết C = O (ceton). Ngoài ra, trên phổ IR của sản phẩm còn xuất hiện các tín hiệu hấp thụ tại bước sóng từ 1582 cm<sup>-1</sup> đến 1611 cm<sup>-1</sup>, đặc trưng cho các liên kết C = C vòng của phân tử. Kết quả chồng

phổ IR cho thấy có sự tương đồng trên phổ IR của sản phẩm thu được và acid kojic nguyên liệu với các nhóm chức điển hình bao gồm: -OH, C – O, C = O, C = C (vòng).

Phổ khối lượng (ESI-MS): Kết quả đo phổ khối lượng của sản phẩm thu được cho thấy khối lượng phân tử của sản phẩm khoảng 142,1 đơn vị C, đồng thời cả 2 phổ [M+H]<sup>+</sup> và [M-H]<sup>-</sup> của sản phẩm thu được cùng có peak (đỉnh) phù hợp với giá trị số khối dự kiến của acid kojic với cường độ mạnh.

Từ các kết quả thu được ở trên, có thể kết luận sản phẩm thu được sau khi tách chiết và tinh chế từ dịch nuôi cấy nấm mốc *Aspergillus oryzae* VTCC-F045 là acid kojic, tương đối tinh khiết và có khả năng kết tinh dưới dạng tinh thể hình kim đặc trưng.

**Khảo sát điều kiện lên men *Aspergillus oryzae*.** Nhóm nghiên cứu tiến hành khảo sát sơ bộ các thông số của quá trình lên men để lựa chọn được các thông số tối ưu cho sự tổng hợp acid kojic. Kết quả được tóm tắt ở Bảng 2 và Bảng 3.

**Bảng 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các thông số về môi trường lên men đến lượng sản phẩm thu được**

Yếu tố	Nguồn carbon			Nguồn nitơ			Nồng độ glucose (%)			
	G	S	M	P	CNM	AS	6	8	10	12
Điều kiện cụ thể	G	S	M	P	CNM	AS	6	8	10	12
Lượng acid kojic (g/l)	4,8	3,3	0	4,9	2,6	0	0	2,3	10,3	8,7

G: Glucose, S: Saccharose, M: Maltose, P: Pepton, CNM: Cao nấm men, AS: Amoni sulfat. Các nguồn nitơ được sử dụng với nồng độ 0,3%.

**Bảng 3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các thông số về điều kiện lên men đến lượng sản phẩm thu được**

Yếu tố	pH môi trường			Thời gian (ngày)			
	5,5*	2,5**	5,5/2,5***	8	10	12	14
Điều kiện cụ thể	5,5*	2,5**	5,5/2,5***	8	10	12	14
Lượng acid kojic (g/l)	4,6	0	5,9	6,8	9,4	12,2	8,5

\*: Môi trường được kiểm soát pH ở 5,5; \*\*: Môi trường được kiểm soát pH ở 2,5; \*\*\*: Môi trường được điều chỉnh về pH 5,5 trước khi lên men, sau 2-3 ngày lên men pH được kiểm soát ở 2,5

Khi tiến hành lên men với các nguồn carbon khác nhau, kết quả cho thấy glucose là nguồn carbon cho lượng sản phẩm thu được lớn nhất; gấp 1,5 lần so với saccharose. Với môi trường sử dụng maltose là nguồn carbon, không thu được acid kojic, điều này có thể do nấm mốc không có enzym để thủy phân maltose hiệu quả, do đó không sử dụng được nguồn carbon này. Khi thay đổi nồng độ glucose từ 6 đến 10%, lượng acid kojic thu được tăng dần, đạt 10,3g/l ở nồng độ 10%. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng nồng độ đường lên 12%, lượng acid thu được lại giảm xuống còn 8,7 g/l (giảm 1,2 lần). Kết quả khảo sát các nguồn nitơ khác nhau cho thấy nitơ hữu cơ (pepton, cao nấm men) cho hiệu quả sinh acid kojic tốt hơn nitơ vô cơ (amoni sulfat), đồng thời môi trường lên men chứa pepton cho lượng sản phẩm nhiều hơn gấp 1,9 lần môi trường chứa cao nấm men. Từ những kết quả trên, nhóm nghiên cứu sơ bộ đề xuất môi trường lên men tối ưu cho sinh tổng hợp acid kojic là môi trường có sử dụng glucose 10% và pepton 0,3%. Kết quả này là tương đồng với khảo sát sơ bộ của nhóm tác giả Trương Phương vào năm 2013.

Khi khảo sát ảnh hưởng của việc kiểm soát pH môi trường lên men lên lượng sản phẩm thu được, kết quả cho thấy việc kiểm soát pH môi trường lên men ở 5,5 cho hiệu suất lên men tốt, trong khi đó nếu kiểm soát pH ở 2,5 thì không thu được sản phẩm. Bên cạnh đó, nếu ban đầu pH được kiểm soát ở 5,5; sau 2-3 ngày pH được kiểm soát ở 2,5 thì lượng sản phẩm thu được là tốt nhất (tăng 1,3 lần so với điều kiện pH 5,5). Kết quả khảo sát thời gian lên men cho thấy khi tiến hành lên men từ 8 – 14 ngày, lượng acid kojic tăng dần và đạt giá trị lớn nhất là 12,2 g/l vào ngày thứ 12, sau đó giảm xuống còn 8,5 g/l ở ngày thứ 14 (giảm 1,4 lần). Như vậy, có thể thấy điều kiện lên men tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp acid kojic là ban đầu kiểm soát pH ở 5,5; sau 2-3 ngày kiểm soát pH ở 2,5; trong vòng 14 ngày.

Tóm lại, tại điều kiện phòng thí nghiệm, quá trình sinh tổng hợp acid kojic từ *Aspergillus oryzae* VTCC-F045 được đề xuất thực hiện trên môi trường chứa 10% glucose, 0,3% pepton, 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> và 0,05% MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; ở nhiệt độ 30°C với điều kiện hô hấp hiếu khí (lắc 150 vòng/phút) trong thời gian 12 ngày với lượng acid kojic thu được đạt khoảng 12,2 g/l.

**Hoạt tính ức chế enzym tyrosinase của dịch nuôi cấy.** Dịch lên men thu được khi kết thúc được đem đông khô và bột đông khô được xác định tỉ lệ ức chế enzym tyrosinase theo như phương pháp mô tả ở trên. Nồng độ thử của các mẫu thử nghiệm là 100 µg/ml và 500 µg/ml; với chất chứng dương Hydroquinone nồng độ thử là 50 µg/ml. Kết quả cho thấy dịch lên men chứa acid kojic có khả năng ức chế enzym tyrosinase với tỷ lệ khoảng 29,51% ở nồng độ 100 µg/ml và 93,73% ở nồng độ 500 µg/ml, so với chất đối chứng hydroquinone là 87,5%.

#### IV. KẾT LUẬN

Nấm mốc *Aspergillus oryzae* VTCC-F045 có khả năng lên men sinh tổng hợp acid kojic trên môi trường chứa 10% glucose, 0,3% pepton, 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> và 0,05% MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; ở nhiệt độ 30°C với điều kiện hô hấp hiếu khí (lắc 150 vòng/phút) trong thời gian 12 ngày. Trong điều kiện thí nghiệm nêu trên, lượng acid kojic thu được đạt khoảng 12,2 g/l. Acid kojic thu được có độ tinh khiết cao và được kiểm nghiệm bằng nhiệt độ nóng chảy, chỉ số R<sub>f</sub> (sắc ký lớp mỏng), phổ IR, phổ MS, cho kết quả phù hợp với đặc tính tương ứng của acid kojic nguyên liệu. Ngoài ra, dịch lên men chứa acid kojic có khả năng ức chế hoạt động của enzym tyrosinase lên tới 93,73% tại nồng độ thử nghiệm.

#### V. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu xin cảm ơn sinh viên Hoàng Lê Thảo Nguyên, Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Thị Huyền, Trường Đại học Dược Hà Nội đã hỗ trợ kỹ thuật cho nghiên cứu.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trương Phương, Trần Cát Đông, Nguyễn Tri Thành (2013), "Nghiên cứu điều chế kojic dipalmitat. Phần 1: Sàng lọc chủng *Aspergillus oryzae* và nghiên cứu điều kiện lên men thu nhận acid kojic", Tạp chí Dược học, 8, tr. 35-41.
2. Barbesgaard Peder, Heldt-Hansen Hans Peter, et al. (1992), "On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review", Applied Microbiology and Biotechnology, 36(5), pp. 569-572
3. Burdock George A, Soni Madhusudan G, et al. (2001), "Evaluation of health aspects of kojic acid in food", Regulatory toxicology and pharmacology, 33(1), pp. 80-101.
4. Chaudhary Jignesh, Pathak AN, et al. (2014), "Production technology and applications of kojic acid", Annual Research & Review in Biology, 4(21), pp. 3165.
5. Hazzaa MM, Saad AM, et al. (2013), "High Production of Kojic acid crystals by isolated *Aspergillus oryzae* var. *effusus* NRC14", J Appl Sci Res, 9(3), pp. 1714-1723.
6. Kwak Moo Young, Rhee Joon Shick (1992), "Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus*

- oryzae for kojic acid production", *Biotechnology and bioengineering*, 39(9), pp. 903-906.
7. Liljegren K, Svendsen A, et al. (1988), "Mycotoxin and exoenzyme production by members of *Aspergillus* section flavi", *JSM Mycotoxins*, 1988(1Supplement), pp. 35-36.
  8. MASUDA T., YAMASHITA D., et al. (2005), "Screening for Tyrosinase Inhibitors among Extracts of Seashore Plants and Identification of Potent Inhibitors from *Garcinia subelliptica*", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(1), pp. 197-201.
  9. Wakisaka Yasushi, Segawa Takayuki, et al. (1998), "Development of a cylindrical apparatus for membrane-surface liquid culture and production of kojic acid using *Aspergillus oryzae* NRRL484", *Journal of fermentation and bioengineering*, 85(5), pp. 488-494.

## TỶ LỆ ANA DƯƠNG TÍNH TRÊN NGƯỜI KHÁM SỨC KHỎE TỔNG QUÁT TẠI PHÒNG XÉT NGHIỆM SINH HÓA- MIỄN DỊCH - HUYẾT HỌC BẰNG PHƯƠNG PHÁP ELISA, VIỆN PASTEUR TP.HCM 2018-2019

Cao Hữu Nghĩa<sup>2</sup>, Nguyễn T. Kim Ngọc<sup>2</sup>, Ngô Thị Loan<sup>2</sup>, Vương T. Thiên Phước<sup>2</sup>, Phạm T. Ngọc Hân<sup>2</sup>, Phạm Thanh Hằng<sup>2</sup>, Lưu Ngọc Thanh Nguyệt<sup>2</sup>, Trần Văn Hải<sup>2</sup>, Hồ Nguyễn Lộc Thùy<sup>1</sup>, Phạm Lê Duy<sup>1</sup>, Nguyễn Đức Trúc<sup>2</sup>

### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Lupus đỏ hệ thống (SLE) là một bệnh đa cơ quan nghiêm trọng, tấn công vào mô liên kết và mạch máu; với tỷ lệ mắc mới 0,3 - 31,5/100.000 dân; phân bố: nữ/nam = 10/1 tùy từng quốc gia. Tại Việt Nam, công tác sàng lọc phát hiện sớm SLE từ cộng đồng vẫn chưa được quan tâm. **Đối tượng - Phương pháp:** Khách hàng đến khám sức khỏe có triệu chứng thỏa 11 tiêu chí lâm sàng của SLICC-2012 được thu ngẫu nhiên vào nghiên cứu; tiến hành đo ANA và đưa vào phân tích thống kê; kiểm định bằng Chi bình phương hay Anova tùy biến. **Kết quả:** Có 73.218 khách hàng, qua chẩn đoán lâm sàng: phát hiện 128 (nam: nữ = 33: 95) trường hợp SLE ( $p < 0.01$ ). Khi đối chiếu với chẩn đoán bằng xét nghiệm ANA: 14 trường hợp ANA (+) được phát hiện; 100% là nữ giới, chiếm tỷ lệ 10,94% (14/128). Đặc biệt nhóm 33 nam giới chẩn đoán lâm sàng SLE, toàn bộ đều có kết quả ANA (-) ( $F = 221,8 > F_{crit} = 1.96$ ). **Kết luận:** Lupus đỏ hệ thống (SLE) là bệnh lý ít được phát hiện trong cộng đồng. Qua nghiên cứu (2018-2019): ghi nhận lần lượt có 0,18% và 0,02% trường hợp SLE qua chẩn đoán lâm sàng và bằng thử nghiệm ANA; theo SLICC 2012. Cần có những nghiên cứu dài hạn và sâu hơn với đủ 7 tiêu chuẩn miễn dịch để có cái nhìn tổng quát hơn về SLE tại cộng đồng dân cư tại Việt Nam.

**Từ khóa:** SLE; chẩn đoán lâm sàng; phương pháp ELISA; ANA

### SUMMARY

#### ANA POSITIVE PREVALENCE AMONG THE HEALTH CHECK UP POPULATION AT THE

<sup>1</sup>Đại học Y Dược TP.HCM

<sup>2</sup>Viện Pasteur TP.HCM

Chịu trách nhiệm chính: Cao Hữu Nghĩa

Email: drcaonghia@gmail.com

Ngày nhận bài: 22.4.2024

Ngày phản biện khoa học: 12.6.2024

Ngày duyệt bài: 3.7.2024

### BIOCHIMIE, IMMUNOLOGY AND HEMATOLOGY LABORATORY, BY ELISA TEST, IN PASTEUR INSTITUT IN HO CHI MINH CITY 2018-2019

**Objective:** Systemic lupus erythematosus - SLE is the severe disease that affected to their body organs, connective tissues and vascular systems; with its incidence 0,3 - 31,5/100.000; M:F = 10/1 up to every countries. In Vietnam, the SLE health screening by check-up, every years, did not be interested. **Methods:** The health screening customers who are having their symptoms that met to the 11 clinical indicators up to SLICC-2012 have been recruited; ANA examination performed by ELISA and statistical analysis with Chi-square or Anova (up to its variants). **Results:** Among 73.218 customers records, there are 128 SLE (+) by clinical check-up (M: F = 33: 95) that have been preliminary diagnosed; ( $p < 0.01$ ). Combining with ANA result by ELISA test, there are 14 ANA (+) cases that have been confirmed; 100% female, account for 10,94% (14/128). It is very interesting within male group what have diagnosed clinical SLE but in laboratory, they have been confirmed negative SLE with ANA (-) ( $F = 221,8 > F_{crit} = 1.96$ ). **Conclusion:** (SLE) is the rarely diseases and not be attention in communities health check-up. Through this research (2018-2019): there are 0,18% and 0,02% SLE cases have been diagnosis by general examination in clinical and by ELISA ANA test in laboratory, respectively up to SLICC 2012. It is needs to have more long term and deeply scientific researches with all 7 immunological indicators fully for understanding clearly about the SLE situation in the Vietnamese communities. **Keywords:** SLE; health check up; ELISA test; ANA

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lupút đỏ hệ thống (systemic lupus erythematosus - SLE) là một bệnh đa cơ quan nặng, nghiêm trọng; thường tấn công vào mô liên kết và mạch máu, với biểu hiện lâm sàng