



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0026781

(51)⁷ C12N 1/14

(13) B

(21) 1-2018-03576

(22) 14/08/2018

(45) 25/12/2020 393

(43) 26/11/2018 368A

(73) VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC (VN)

18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) LÊ THỊ MINH THÀNH (VN); HOÀNG THỊ HỒNG ANH (VN).

(54) CHỦNG VI NẤM *PENICILLIUM* SP. LĐL4.4 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT HUPERZIN A

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi nấm *Penicillium* sp. LĐL4.4 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ lá của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam, trong đó chủng này có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng đạt 1,38mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 531bp được nêu trong SEQ ID NO:1. Huperzin A có tác dụng trong việc điều trị bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh vật học và công nghệ sinh học liên quan đến các chủng vi nấm sống nội sinh trong cây thuốc có khả năng sinh tổng hợp huperzin A cao. Cụ thể, sáng chế đề xuất chủng vi nấm nội sinh *Penicillium* sp. LĐL4.4 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ lá của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A, chất này có tác dụng trong việc điều trị bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh Alzheimer là một bệnh thần kinh thoái hóa tác động đến trí nhớ, suy nghĩ và hành vi của con người. Bệnh Alzheimer ảnh hưởng đến hơn 20 triệu người trên toàn thế giới bao gồm cả 4,5 triệu người Mỹ và được coi là nguyên nhân lớn thứ ba gây tử vong ở các nước phát triển sau bệnh tim mạch và ung thư (Wimo và cộng sự, 2007). Hiện tại không có phương thức chữa trị cho bệnh Alzheimer. Tuy nhiên, việc sử dụng các chất ức chế cholinesteraza (AChEI) là một trong những chiến lược được chấp nhận trong điều trị bệnh Alzheimer (Darvesh và cộng sự, 2003). Trong những năm 1980, huperzin A, một lycopodium alkaloid, được tách chiết lần đầu tiên từ một cây thảo được truyền thống của Trung Quốc, đó là cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) (Liu và cộng sự, 1986 a,b). Sau khi các công trình nghiên cứu của các nhà khoa học Trung Quốc được công bố, thì các nhà khoa học phương Tây đã kết luận rằng chất này có tác dụng trong việc chữa trị các bệnh suy giảm về trí nhớ, đặc biệt đối với bệnh Alzheimer của người già. Alkaloid này có khả năng xuyên qua hàng rào mạch máu não và tác động trực tiếp lên não bộ với liều lượng rất thấp tính bằng microgram. Trên thực tế, alkaloid này ức chế việc sản sinh ra axetylcholinesteraza, một enzym tạo ra sự suy thoái của axetylcholin. Khi enzym này bị thiếu hụt hoặc chỉ có với hàm lượng rất thấp, thì hàm lượng axetylcholin trong não tăng lên, giúp cho trí nhớ và các chức năng nhận thức được cải thiện. So với các loại thuốc được phẩm tacrin, donepezil, rivastigmin và galanthamin; huperzin A và dẫn xuất bán tổng hợp của ZT-1 có hoạt động chống AChE tốt hơn, thời gian dài hơn, khả dụng sinh học đường uống cao hơn và ít tác dụng độc hại hơn (Liang & Tang, 2004; Ma và cộng sự, 2007). Huperzin A đã được phê duyệt trong năm 1990 ở Trung Quốc như là một thuốc điều trị bệnh Alzheimer và bán trên thị trường ở Mỹ ở dạng thực phẩm bổ sung, và ZT-1 đã được hoàn thành giai đoạn II thử nghiệm lâm sàng ở cả Trung Quốc và châu Âu. Năm 2007, nước Pháp coi đây là vấn đề phải quan tâm hàng đầu của quốc gia (Ma và cộng sự, 2007).

Hầu hết các huperzin A đang được sử dụng trong các loại thuốc thảo dược hiện nay được chiết xuất từ cây *Huperzia serrata* và một số loài khác trong Họ Thạch sam. Tuy nhiên, *Huperzia serrata* và các cây khác trong Họ Thạch sam yêu cầu điều kiện canh tác ngặt nghèo và sinh trưởng phát triển rất chậm, khối lượng cây xanh thấp, phải mất rất nhiều năm (có khi tới 15 năm) phát triển trong tự nhiên mới có thể để sử dụng làm thuốc. Chính vì vậy, nguồn cung cấp hoạt chất huperzin A từ cây Thạch tùng rừng làm nguyên liệu cho sản xuất thuốc là không cao (khoảng 0,1%). Bởi vậy, có rất nhiều sự nỗ lực để thực hiện việc sản xuất huperzin A như nuôi cấy *in vitro* cây *Huperzia serrata* và tổng hợp hóa học (Ma & Gang, 2008). Tuy nhiên, với đường hướng chiết xuất hoạt chất huperzin A từ cây *Huperzia serrata* đòi hỏi phải mất nhiều thời gian, chi phí nhiều cho trồng trọt để có thể thu được sản lượng cây đủ cho chiết xuất hoạt chất huperzin A làm nguyên liệu cho ngành công nghiệp sản xuất thuốc, từ đó dẫn đến hiệu quả kinh tế không cao. Mặc dù các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng nhân giống *in vitro* có thể sản xuất huperzin A cao hơn cây trồng tự nhiên, nhưng nó cũng chưa đáp ứng được nhu cầu của ngành công nghiệp dược, bởi thời gian nhân được giống cây để thu làm nguyên liệu sản xuất thuốc cũng kéo dài hàng năm (Szypula và cộng sự, 2005; Ma & Gang, 2008).

Vi nấm nội sinh thường sống trong mô thực vật được tìm thấy ở vùng rễ, thân, lá và quả của thực vật. Vùng rễ là nơi xuất phát nhiều vi nấm nội sinh chui vào rễ, thân và lá để sống nội sinh; sau khi xâm nhập vào cây chủ có thể tập trung tại vị trí xâm nhập hoặc di chuyển đi khắp nơi trong cây đến các hệ mạch của rễ, thân, lá và hoa (Zinniel và cộng sự, 2002), thúc đẩy các quá trình chuyển hóa trong cây, sự phát triển lông rễ một cách mạnh mẽ và giảm sự kéo dài rễ (Harari và cộng sự, 1988).

Gần đây, nấm nội sinh được phân lập từ các loại cây trồng đã được chấp nhận như là một nguồn nguyên liệu quan trọng của ngành công nghiệp dược. Một lượng lớn các hợp chất có cấu trúc mới và hoạt tính sinh học khác nhau đã được chiết xuất từ các nấm nội sinh này (Strobel & Daisy, 2003). Do đó, việc nghiên cứu phân lập các chủng nấm nội sinh trong cây *Huperzia serrata* có khả năng sản sinh hoạt chất huperzin A đã được các nhà khoa học quan tâm nhằm thay thế, tăng cường lượng huperzin A cho ngành công nghiệp dược. Đã có nhiều kết quả nghiên cứu khả quan được công bố, đặc biệt là ở Trung Quốc, nơi có cây *Huperzia serrata* phân bố nhiều. Hoạt chất huperzin A được tìm thấy sinh tổng hợp bởi các loài nấm nội sinh trong cây *Huperzia serrata* bao gồm các chi chủ yếu như *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Coniochaeta*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Plectosphaerella*, *Podospora*, *Penicillium*, *Cyphellophora*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces* và *Botrytis*. Bằng kỹ thuật phân tích sắc ký màng lỏng (TLC) và sắc ký màng lỏng hiệu năng cao (HPLC), Li và cộng sự (2007) đã phân lập được chủng *Acremonium* sp. 2F09P03B sản sinh huperzin A với hàm lượng 8,32mcg/L; Wang và cộng sự (2011) đã phân lập được 127 chủng nấm, đã định dạng

được 69 chủng thuộc 19 chi nấm *Aspergillus*, *Podospora*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces*, *Botrytis*, v.v. và đã xác định được 39 chủng có khả năng sản sinh huperzin A, trong đó chủng *Shiraia* sp. Slf14 cho sản lượng huperzin A cao nhất là 327,8mcg/L. Cũng bằng kỹ thuật TLC và HPLC, Yang và cộng sự (2011) cũng đã phân lập và xác định được chủng *Colletotrichum gloeosporioides* ES026 sản sinh 30mcg huperzin A/g CDW. Năm 2015, Su và Yang đã phân lập được chủng *Paecilomyces tenuis* YS-13 có khả năng sản sinh huperzin A được 21mcg/L. Các chủng này đều đã được đăng ký bảo hộ tại Trung Quốc, đã tìm được các điều kiện lên men thích hợp và là chủng giống gốc làm nguyên liệu cho sản xuất huperzin A quy mô công nghiệp.

Theo các tài liệu đã công bố hoạt tính huperzin A của các chủng nấm nội sinh khác nhau dao động từ 8,32 đến 327,8 mcg/L dịch lên men. Tuy nhiên, nhiều chủng nấm đại phân lập có hoạt tính thấp, cần có sự nghiên cứu về thành phần môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy và điều kiện lên men để tăng khả năng sản sinh huperzin A. Các chủng nấm nội sinh tổng hợp huperzin A cần nhiều chất dinh dưỡng đặc biệt trong môi trường sống, chúng phát triển tốt trong cây Thạch tùng và ở độ cao và nhiệt độ đặc biệt cho nên trong môi trường tổng hợp huperzin A có lẽ cũng cần một số chất đặc biệt. Tuy nhiên, hai yếu tố nguồn cacbon và nguồn nitơ trong môi trường vẫn đóng vai trò quan trọng trong tổng hợp huperzin A. Các chủng vi nấm khác nhau có khả năng sử dụng các nguồn cacbon và nitơ khác nhau để sinh tổng hợp huperzin A.

Theo Zhao và cộng sự (2013), nghiên cứu tối ưu các điều kiện lên men khác nhau để sản xuất huperzin A từ chủng *C. gloeosporioides* ES026 đã làm tăng 25,58% sản lượng huperzin A. Môi trường khoai tây bổ sung glucoza hoặc sucroza nhưng không có mantoza đã làm tăng khả năng sản xuất huperzin A từ nấm. Etanol được bổ sung vào môi trường đạt nồng độ cuối cùng 0,5-2% đã kích thích sự phát triển của nấm trong khi metanol với lượng tương tự đã ức chế sự tăng trưởng. Tuy nhiên, cả metanol và etanol đã làm tăng khả năng sản xuất huperzin A (năng suất cao nhất của huperzin A tăng 51,89% khi bổ sung etanol).

Theo Zhu và cộng sự (2010), chủng nấm *Shiraia* sp. Slf14 sau khi lên men 14 ngày ở 28°C cho lượng huperzin A đạt 327,8mcg/L dịch lên men. Nhằm tăng khả năng sinh tổng hợp huperzin A của chủng *Shiraia* sp. Slf14, Yan và cộng sự (2014) đã bổ sung vào môi trường lên men một số chất cảm ứng HSE (dịch chiết cây *Huperzia serrata* được tách chiết từ cây và lá Thạch tùng răng cưa), L-lysin và axit axetic với các nồng độ khác nhau, lên men ở 28°C trong 14 ngày. Việc bổ sung L-lysin và HSE đã kích thích khả năng sinh huperzin A và hệ sợi nấm, với axit axetic thì ngược lại. Bổ sung 1 lượng rất nhỏ HSE đã làm tăng khả năng sinh huperzin A, đạt 40mcg/g sinh

khô. Đặc biệt, khi bổ sung 0,2g/L L-lysin trong môi trường nuôi cấy, năng suất huperzin A cao hơn so với đối chứng không bổ sung L-lysin khoảng 40%.

Chủng *Colletotrichum gloeosporioides* isolate YLJ-13 (Hu Weixin và cộng sự, patent Trung Quốc số CN102168017B) có khả năng sản xuất huperzin A được lên men trong môi trường khoai tây cải tiến. Huperzin A được tiết ra khỏi tế bào, môi trường khoai tây cải tiến được sử dụng như nguồn chất cảm ứng và sản lượng lên đến 199,6mg huperzin A/L dịch lên men.

Ở Việt Nam, Thạch tùng răng cưa mới được phát hiện tại Sa Pa và Lâm Đồng ở độ cao 1000m. Đây là loài cây dược liệu quý hiếm, thuộc danh sách "đỏ" trong Chương trình Nghiên cứu bảo tồn và phát triển nguồn gen quý hiếm về cây thuốc, nhưng chưa được quan tâm nghiên cứu và khai thác ứng dụng trong điều trị bệnh tại Việt Nam. Gần đây, Bộ Khoa học và Công nghệ giao cho Viện Công nghệ sinh học chủ trì đề tài cấp Nhà nước "Khai thác và phát triển nguồn gen loài Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* Thunb. Trev.) tại Sapa và Đà Lạt" (2014-2017) nhằm bảo tồn, khai thác phát triển *ex situ* cây *Huperzia serrata* trong các vùng có điều kiện sinh thái thuận lợi để bước đầu hướng tới có thể làm nguyên liệu cho sản xuất huperzin A hỗ trợ chữa trị bệnh suy giảm trí nhớ. Hiện tại, đề tài đã thực hiện được 02 khu vườn trồng bảo tồn *Huperzia serrata* tại Langbiang (Đà Lạt) và Vườn Quốc gia Hoàng Liên (Sa Pa) và đang thực hiện bảo tồn *in vitro* trong phòng thí nghiệm. Ở Việt Nam trước đây đã có nhiều đề tài nghiên cứu về vi nấm nội sinh; tuy nhiên, các nghiên cứu về nấm nội sinh ở cây Thạch tùng răng cưa Việt Nam đến nay chưa có công bố.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chủng vi nấm *Penicillium* sp. LĐL4.4 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ lá của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A, chất này có tác dụng trong việc điều trị rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

Chủng vi nấm *Penicillium* sp. LĐL4.4 thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 531bp được nêu trong SEQ ID NO:1 và có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A cao với hàm lượng đạt 1,38 mg/L dịch lên men trong môi trường PBD-I.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng *Penicillium* sp. LĐL4.4 trên môi trường PDA-I sau 5 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc màu xanh lục, viền trắng, khuẩn lạc tròn, có các khía đồng tâm, có giọt tiết.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái sợi khuẩn ty và bào tử của chủng *Penicillium* sp. LĐL4.4 chụp trên kính hiển vi quang học (độ phóng đại 100 và 400 lần). Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh, tận cùng là các bào tử trần đỉnh dạng cầu.

Hình 3 là hình ảnh thể hiện kết quả sắc kí lớp mỏng (TLC) của chất chỉ thị huperzin A (a) và dịch chiết huperzin A của chủng *Penicillium* sp. LĐL4.4 (b).

Hình 4 là biểu đồ thể hiện sắc kí đồ HPLC (UV 310nm), phổ UV, phổ LC-MSD của dịch chiết nấm *Penicillium* sp. LĐL4.4 trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PAD (PerkinElmer).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi nấm *Penicillium* sp. LĐL4.4 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ lá của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại vùng Langbiang, Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A cao.

Việc phân lập chủng thuần khiết về mặt sinh học từ lá của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) được thực hiện theo phương pháp của Dobranic và cộng sự (1995) và Shen và cộng sự (2000) có cải tiến như mô tả sau đây. Mẫu lá cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) tươi thu từ vùng Langbiang, Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam được rửa sạch bằng nước sạch rồi khử trùng lần lượt bằng etanol 70%, NaOCl 10% và HgCl₂ 0,1% trong khoảng thời gian thích ứng 2-3 phút. Sau đó, rửa lại bằng nước cất khử trùng 4 lần. Các mẫu lá cây được cắt thành từng lát nhỏ (0,2 - 1cm), đặt các lát nhỏ lên đĩa peptri chứa môi trường PDA-I (Môi trường PDA-I cải tiến có thành phần môi trường (g/l) như sau: 150g khoai tây; 10g đường glucoza; 10g cao nấm men; 5g pepton; 5g tryton; 2g NaNO₃; 0,5g MgSO₄; 1g KH₂PO₄; 0,5g K₂HPO₄; 0,5 Na₂HPO₄.2H₂O; 0,3g KCl; 0,3g NaCl, 16g agar và 1 lít nước cất) có độ pH = 7 với khoảng cách đồng đều và được đánh số kí hiệu, thứ tự riêng tương ứng. Các đĩa được nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 5-7 ngày, theo dõi các đĩa hàng ngày để kiểm tra sự phát triển của các khuẩn lạc nấm. Cấy chuyển các sợi nấm của các chủng nấm phân lập được từ các đĩa ban đầu sang đĩa thạch PDA-I mới và nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 5-7 ngày, theo dõi và cấy chuyển đến khi thu được các chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học.

Các chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học được phân loại bằng phương pháp truyền thống theo các khóa phân loại (Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự, 1982; Bùi Xuân Đồng, 1984; Ainsworth và cộng sự, 1973). Sau đó, tách chiết hệ gen của các chủng nấm thu được bằng kit tách chiết ADN (G-spinTMTotal ADN Extraction Kit) và khuếch đại đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 bằng cặp mồi đặc hiệu ITS1 (5'-

CCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') và ITS4 (5' – CCTCCGCTTATTGATATGC – 3'). Tiếp theo, đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 thu được được xác định trình tự nucleotit bằng máy giải trình tự AEI PRISM @ 3700 Genetic Analyzer. Trình tự nucleotit được phân tích bằng phần mềm PCGENE và trình tự vùng được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI (GenBank) với phần mềm Bioedit, Blast và định danh.

Chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học sau khi định danh được đưa đi nuôi cấy và thử nghiệm khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A. Chủng nấm thử nghiệm được nuôi cấy trong 3 lít môi trường PDB-I (Môi trường PDB-I cải tiến có thành phần môi trường (g/l) như sau: 150g khoai tây; 10g đường glucoza; 10g cao nấm men; 5g pepton; 5g tryton; 2g NaNO₃; 0,5g MgSO₄; 1g KH₂PO₄; 0,5g K₂HPO₄; 0,5g Na₂HPO₄.2H₂O; 0,3g KCl; 0,3g NaCl và 1 lít nước cất) ở nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 5 ngày và tiến hành thu sinh khối bằng ly tâm ở 6000 vòng/phút, loại bỏ dịch. Sinh khối được sấy ở 45- 60°C và được tách chiết bằng dung môi hữu cơ thu được dịch chiết nấm, chính là dịch chiết alkaloid toàn phần. Dịch chiết nấm được xác định khả năng sinh tổng hợp huperzin A bằng phương pháp sắc ký màng mỏng (TLC) và bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PAD (PerkinElmer).

Thực hiện việc phân lập và xác định các đặc tính sinh trưởng và phát triển như nêu trên, tác giả sáng chế đã thu được chủng vi nấm thuộc chi *Penicillium* thuần khiết về mặt sinh học. Chủng vi nấm này có đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 531bp và có độ tương đồng $\leq 99\%$ và có độ dài đoạn so sánh $\leq 88\%$ so với các chủng *Penicillium* được đối chiếu trên hàng dữ liệu gen NCBI và được định danh là *Penicillium* sp. LĐL4.4.

Chủng vi nấm *Penicillium* sp. LĐL4.4 thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng 1,38mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I.

Chủng vi nấm *Penicillium* sp. LĐL4.4 thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế là chủng tự nhiên được phân lập từ lá của cây thuốc phân bố tại Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A, chất này có tác dụng trong điều trị rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer. Đây là một trong các nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam và là chủng có tiềm năng ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất hoạt chất huperzin A quy mô lớn đơn giản mà lại cho hiệu suất huperzin A cao, phục vụ hỗ trợ điều trị các bệnh suy giảm về trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer, mở ra hướng đi mới có hiệu quả trong việc điều trị bệnh Alzheimer tại Việt Nam, góp phần giảm giá thành sản phẩm, nâng cao sức khỏe cộng đồng và tăng hiệu quả kinh tế và xã hội.

Chủng vi nấm *Penicillium* sp. LĐL4.4 theo sáng chế hiện đang được lưu giữ tại 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 dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học, trong môi trường PDA-I trong điều kiện lạnh sâu -20°C và -86°C, đồng thời bào tử của chủng được lưu giữ trong cát.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Mẫu lá của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) tươi phân bố tại vùng Langbiang, Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam được rửa sạch bằng nước, khử trùng lần lượt bằng etanol 70%, NaOCl 10% và HgCl₂ 0,1% trong khoảng thời gian 2-3 phút; sau cùng, các mẫu được rửa lại bằng nước cất khử trùng 4 lần. Sau khi được xử lý, các mẫu lá cây được cắt thành từng lát nhỏ (0,2 - 1cm) và được đặt lên đĩa peptri chứa môi trường PDA-I với khoảng cách đồng đều và được đánh số kí hiệu, thứ tự riêng tương ứng. Các đĩa được nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 5-7 ngày, theo dõi các đĩa hàng ngày để kiểm tra sự phát triển của các khuẩn lạc nấm nội sinh trong cây. Cây chuyển các sợi nấm của chủng phân lập từ các đĩa ban đầu sang đĩa thạch PDA-I mới, nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 5-7 ngày, theo dõi và cấy chuyển đến khi thu được chủng nấm thuần.

Kết quả đã phân lập được chủng được ký hiệu là LĐL4.4 có thời gian sinh trưởng 5-7 ngày nuôi cấy. Nuôi cấy chủng LĐL4.4 thuần trên môi trường thạch nghiêng đến khi khuẩn ty nấm phát triển phủ kín mặt thạch, sau đó bổ sung glycerol 15% vô trùng, giữ ở 4 - 10°C để lưu giữ và bảo quản chủng giống.

Sử dụng phương pháp phân loại truyền thống vi nấm dựa trên đặc điểm hình thái của chủng. Đặc tính hình thái của vi nấm được xác định dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc; hệ sợi, hình thái, vách ngăn sợi nấm; bào tử và cuống bào tử theo các khóa phân loại của Nguyễn Lân Dũng và cộng sự (1982), Bùi Xuân Đồng (1984) và Ainsworth và cộng sự (1973) để sơ bộ nhận dạng, phân loại chủng LĐL4.4 đến chi.

Chủng LĐL4.4 được nuôi cấy phát triển trên môi trường PDA-I ở 28°C, quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc và kích thước khuẩn lạc. Hình thái khuẩn lạc của chủng LĐL4.4 trên môi trường PDA-I sau 5 ngày nuôi cấy được thể hiện trên hình 1. Khuẩn lạc của chủng LĐL4.4 có màu xanh lục, viền trắng, khuẩn lạc tròn, có các khía đồng tâm và có giọt tiết. Chuẩn bị lam kính, lamén và các đĩa peptri đã được khử trùng. Dùng que cấy lấy một miếng thạch có sợi nấm phát triển kích thước khoảng 0,5x0,5cm đặt lên lam kính rồi lấy lamén đập lên bề mặt miếng thạch. Sau đó đặt lam kính chứa lamén đó vào trong đĩa peptri. Nuôi ở 28°C trong khoảng thời gian 5-7 ngày cho đến khi sợi nấm mọc lan đều bề mặt lamén. Quan sát tiêu bản bằng kính hiển vi quang học, quan sát đặc điểm hệ sợi, bào tử, cuống bào tử và vách ngăn của chủng

nấm. Nhận dạng sơ bộ chủng vi nấm qua màu sắc, hình thái khuẩn lạc cùng đặc điểm vi hình thái theo các khóa phân loại. Hình thái của sợi khuẩn ty và bào tử của chủng LĐL4.4 được thể hiện trên hình 2, trong đó sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh, tận cùng là các bào tử trần đỉnh dạng cầu.

Kết quả nhận dạng được chủng LĐL4.4 thuộc chi *Penicillium*.

ADN của chủng LĐL4.4 được tách chiết bằng kit tách chiết ADN (G-spinTMTotal DNA Extraction Kit). Kết quả kiểm tra trên máy đo quang phổ cho thấy ADN tổng số tách chiết được có độ tinh sạch cao ($A_{260}/A_{280} = 1,85$) và được sử dụng làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR.

Vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng LĐL4.4 được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi ITS1 (5'- CCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') và ITS4 (5'- CCTCCGCTTATTGATATGC - 3'). Cặp mồi ITS1 và ITS4 khuếch đại đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của các chủng nấm có kích thước tính toán theo lý thuyết là 500-600bp.

Phản ứng PCR được thực hiện theo phương pháp chuẩn được mô tả bởi White và cộng sự (1990). Thể tích phản ứng PCR (50 μ l) bao gồm 100ng ADN hệ gen, 25 μ l hỗn hợp chuẩn, 0,5 μ mol/L mỗi mồi và nước khử ion. Chu trình nhiệt bao gồm: 94°C trong 5 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ nhiệt: 94°C trong 1 phút 30 giây, 53°C trong 1 phút 30 giây, 72°C trong 2 phút; kết thúc ở 72°C trong 10 phút. Sau khuếch đại, sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di gel agarosa 1%. Kết quả thu được một phân đoạn gen có kích thước khoảng 550bp. Tinh sạch đoạn gen này bằng kit tinh sạch ADN (GeneJET PCR Purification Kit #K0701, Thermo Scientific).

Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng LĐL4.4 được xác định trên máy giải trình tự động AEI PRISM@ 3700 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific, Mỹ). Xử lý dữ liệu trình tự đoạn ADN bằng phần mềm Bioedit, Blast và so sánh, đối chiếu dữ liệu nguồn gen trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI (bảng 1). Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng LĐL4.4 được thể hiện ở SEQ ID NO:1.

Kết quả cho thấy đã xác định được trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 tách từ chủng LĐL4.4 có kích thước 531bp. Đoạn gen này có mức tương đồng với các trình tự gen trên NCBI $\leq 99\%$ và có độ dài đoạn so sánh $\leq 88\%$ so với các chủng *Penicillium* được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI như *Penicillium citrinum* NRRL184 (99%), *Penicillium hetheringtonii* CBS122392 (98%), và *Penicillium tropicum* CBS112584 (96%). Với kết quả này cho thấy, chủng LĐL4.4 thuộc chi *Penicillium* và chưa thể khẳng định chính xác được đến loài của chủng này. Kết quả này cho kết quả

tương tự khi phân loại bằng phương pháp truyền thống. Chủng LĐL4.4 được định danh là *Penicillium* sp. LĐL4.4.

Bảng 1 - Mức độ tương đồng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm LĐL4.4 khi so sánh với trình tự các chủng trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI

Tên chủng	Chủng so sánh		Độ dài đoạn so sánh(%)	Mức độ tương đồng (%)
	Tên	Mã số		
LĐL4.4	<i>Penicillium citrinum</i> NRRL 184	NR 121224.1	88	99
	<i>Penicillium hetheringtonii</i> CBS 122392	NR 111482.1	84	98
	<i>Penicillium tropicum</i> CBS 112584	NR 111485.1	82	96
	<i>Penicillium sizovae</i> CSS 423.69	NR 111487.1	82	96
	<i>Penicillium malacaense</i> NRRL 35754	NR 121344.1	88	94

Chủng vi nấm *Penicillium* sp. LĐL4.4 được nuôi lắc trong 3 lít môi trường PDB-I ở 150 vòng/phút, nhiệt độ 28°C trong 5 ngày. Thu sinh khối nấm tươi bằng ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút. Sấy khô sinh khối nấm tươi thu được ở nhiệt độ 45-60°C. Phá vỡ tế bào từ sinh khối nấm khô bằng cách nghiền thành bột mịn bằng nitor lỏng.

Chiết huperzin A từ bột nấm khô theo các bước như sau: (1) bổ sung một lượng amoniac 10% với tỉ lệ 1ml/g bột nấm trong 1-2 giờ ở nhiệt độ phòng; (2) bổ sung 30ml dung môi HCl 5% tỉ lệ 1:30ml, lắc ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ; (3) ly tâm thu dịch chiết ở 6000 vòng/phút trong 10 phút; (4) chỉnh dung dịch thu được về độ pH = 10 bằng NaOH 10%; (5) chiết 3 lần với clorofom (tỷ lệ 1:1), thu pha dưới; (6) cô quay loại bỏ dung môi, thu được cặn alkaloid toàn phần; và (7) hòa tan cặn alkaloid thu được trong 1ml metanol.

Dịch alkaloid toàn phần thu được được xác định hoạt chất huperzin A bằng phương pháp sắc ký màng mỏng (TLC) như sau: (1) hòa tan chất chuẩn huperzin A trong metanol 1mg/ml, pha loãng đến các nồng độ chuẩn; (2) hoạt hóa bản mỏng silicagel bằng cách sấy 1 giờ ở 110°C, mẫu được chấm lên bản mỏng bằng pipet (chất chuẩn huperzin A 1µl nồng độ 10⁻⁶; mẫu dịch chiết nấm là 5µl), sấy nhẹ bản mỏng để bay hết dung môi; (3) dùng kẹp đưa bản mỏng đã chấm vào bình dung môi có thành phần clorofom:isopropanol:etyl axetat:amoniac (tỷ lệ 4:1,5:1:0,1), đậy nắp bình, theo dõi vạch dung môi di chuyển đến khi cách mép trên tấm bản mỏng 1cm thì lấy bản mỏng ra khỏi bình, sấy nhẹ bản mỏng; (4) sử dụng thuốc nhuộm KMnO₄ 0,5% và Iod

0,5% xịt đều lên bản mỏng. Sấy nhẹ bản mỏng, quan sát vết. Kết quả xác định được alkaloid toàn phần thu được của chủng LĐL4.4 cho kết quả dương tính với huperzin A. Kết quả sắc ký bản mỏng được thể hiện trên hình 3.

Xác định hàm lượng huperzin A có mặt trong dịch chiết chủng vi nấm *Penicillium* sp. LĐL4.4 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent series 1100. Trên hệ thống HPLC, pic tín hiệu được lựa chọn của huperzin A chuẩn được phát hiện một cách ổn định tại thời gian lưu Rt 10,262 – 10,663 phút đối với các mẫu chất chỉ thị dùng trong thang định lượng, đồng thời hệ thống MS phát hiện được pic ion phân tử của huperzin A tại thời điểm 10,3 – 10,7 phút với pic ion phân tử 243,0 [M+H⁺]. Đường chuẩn được tính toán xây dựng bằng phần mềm Chemstation dựa trên diện tích pic UV 310nm tại thời gian lưu Rt 10,3 – 10,7 phút. Kết quả cho thấy pic chất huperzin A trong dịch chiết chủng LĐL4.4 được phát hiện ở thời gian lưu Rt 10,622 phút sự trùng với thời gian lưu Rt, phổ UV và số khối MS so với chất chỉ thị huperzin A. Kết quả được thể hiện trên hình 4.

Kết quả định lượng huperzin A thu được từ 1ml dịch chiết của chủng LĐL4.4 có hàm lượng 4,14mg/ml dịch chiết/3 lít dịch lên men. Như vậy, chủng LĐL4.4 có khả năng sinh tổng hợp huperzin A là 1,38mg huperzin A/L dịch lên men.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng vi nấm *Penicillium* sp. LĐL4.4 là chủng được phân lập từ cây dược liệu tại Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A, chất này có tác dụng trong điều trị các bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer - đây là căn bệnh gây tử vong hàng đầu ở người cao tuổi sau bệnh tim và ung thư.

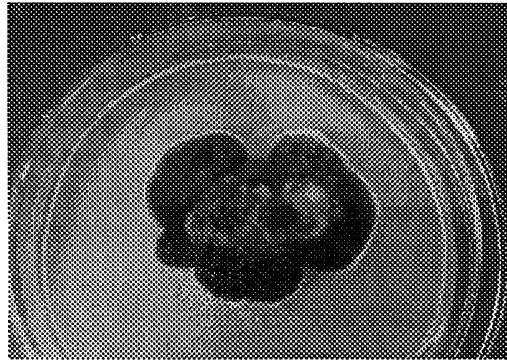
Tính đến nay, chưa có một công bố nào về vi nấm nội sinh cây Thạch tùng răng cưa ở Việt Nam. Chủng *Penicillium* sp. LĐL4.4 là một trong những chủng đầu tiên được nhóm nghiên cứu phân lập tại Việt Nam, chủng này được phân lập từ lá cây Thạch tùng răng cưa phân bố tại Langbiang, Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam và là chủng gốc thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A cao, đạt 1,38mg/L dịch lên men.

Bệnh suy giảm trí nhớ ngày càng trẻ hóa trên toàn cầu. Tác dụng tích cực từ huperzin A đã mở ra hướng rẽ mới cho y học, nó không chỉ hỗ trợ điều trị hiệu quả cho não bộ của người bệnh Alzheimer, người già có biểu hiện suy giảm trí nhớ mà còn có hiệu quả trong việc cải thiện trí nhớ ở người lớn khỏe mạnh. Đối với Việt Nam chúng ta, hiện nay tỷ lệ người lớn tuổi ngày càng gia tăng, và các bệnh suy giảm về trí nhớ cũng phát triển, dẫn đến nhu cầu về chữa bệnh cũng tăng lên. Tỷ lệ người già của

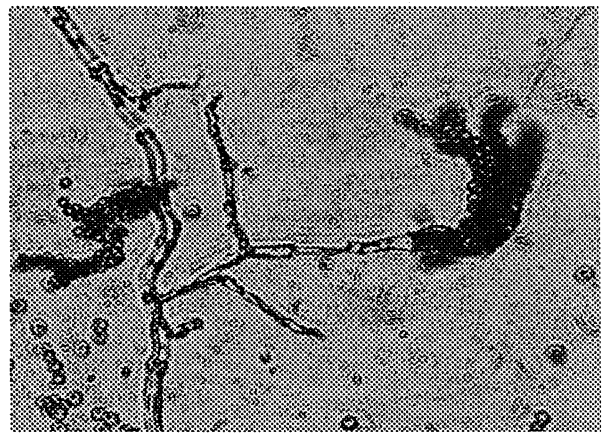
các nước phát triển cũng chiếm tỷ lệ đáng kể và vấn đề được đặt ra là phải có những biện pháp giúp đỡ họ có cuộc sống hài hòa cao hơn. Chính vì vậy, chủng *Penicillium* sp. LĐL4.4 sẽ là chủng giống gốc để tiến hành các nghiên cứu nâng cao hoạt tính trong các điều kiện, môi trường nuôi cấy tối ưu để xây dựng được quy trình sản xuất huperzin A quy mô lớn cho hiệu suất huperzin A cao. Chủng chỉ cần nuôi trong môi trường với các nguyên liệu đơn giản, rẻ tiền, quy trình lên men sản xuất huperzin A đơn giản, không cần máy móc thiết bị phức tạp và chỉ trong một thời gian ngắn (từ 12-15 ngày) đã thu được hàm lượng huperzin A một cách nhanh hơn, đơn giản hơn, hiệu quả hơn có thể ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất hoạt chất huperzin A quy mô lớn phục vụ hỗ trợ điều trị các bệnh suy giảm về trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer; mở ra hướng đi mới có hiệu quả trong việc điều trị bệnh Alzheimer tại Việt Nam; góp phần giảm giá thành sản phẩm, nâng cao sức khỏe cộng đồng và tăng hiệu quả kinh tế và xã hội.

YÊU CẦU BẢO HỘ

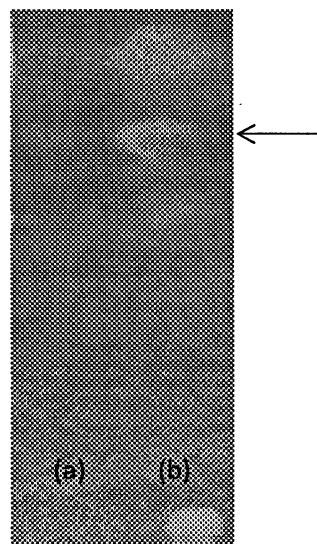
1. Chủng vi nấm *Penicillium* sp. LĐL4.4 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ lá của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) phân bố tại Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam, trong đó chủng này có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A với hàm lượng đạt 1,38mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 531bp được nêu trong SEQ ID NO:1.



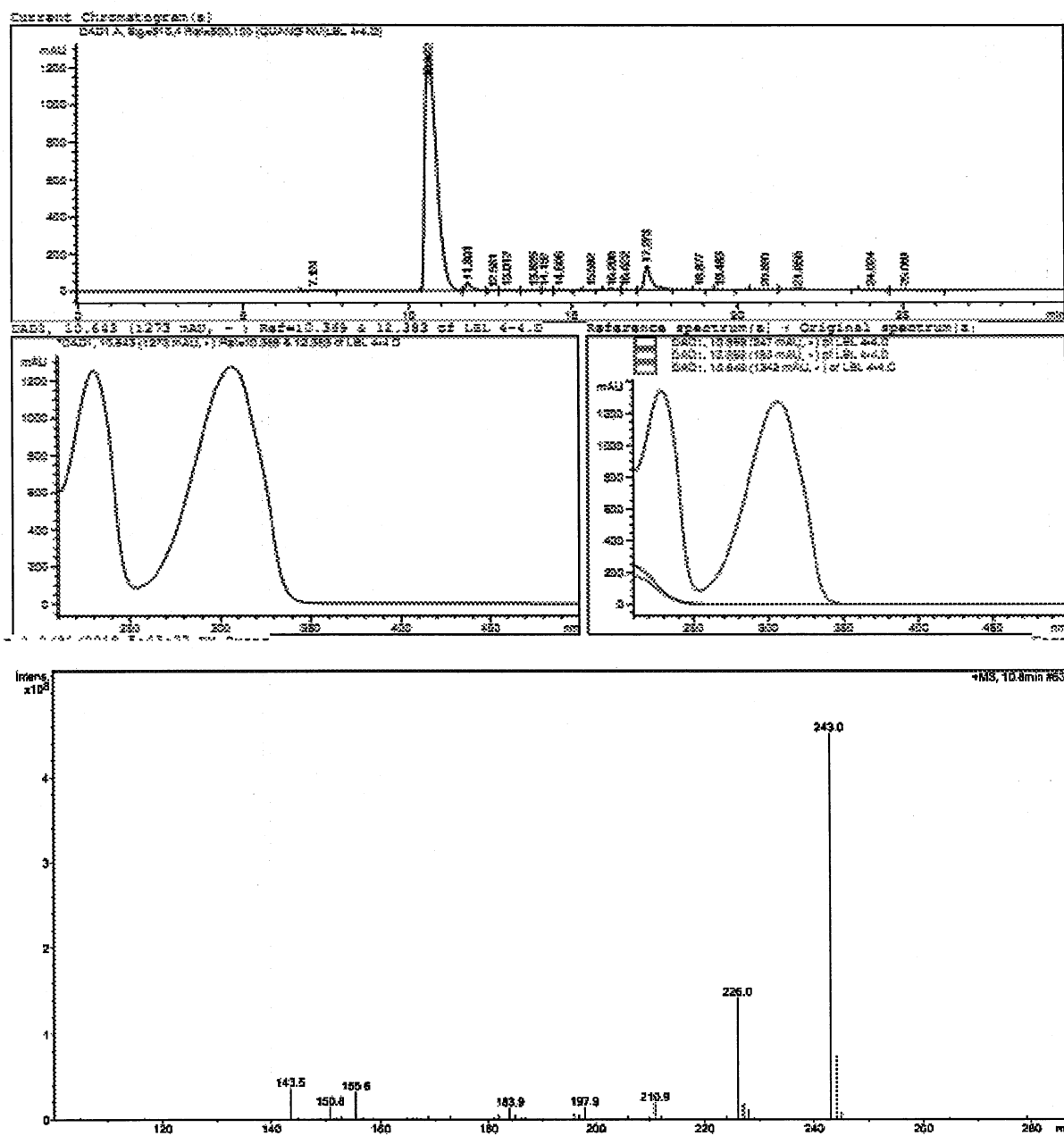
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> CHỦNG VI NẤM *PENICILLIUM* SP. LĐL4.4 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT HUPERZIN A

<160> 1

<210> SEQ ID NO:1

<211> 531

<212> ADN

<213> *Penicillium* sp. LĐL4.4

<400>

cattagtccg ttgcggagct cgcagggtgac ctgctaacca atcgtaaccg aaggaatcct	60
gcgtcggcgg gccccccctc cgccgacggc cccccagaac gctgtctgaa gttgcagtct	120
gagacctata acgaaattag ttaaaacttt caacaacgga tctcttggtt ccggcatcga	180
tgaagaacgc agcgaaatgc gataactaat gtgaattgca gaattcagtg aatcatcgag	240
tctttgaacg cacattgcgc cctctggtat tccggagggc atgcctgtcc gagcgtcatt	300
gctgccctca agcccggctt gtgtgttggg ccccgctccc cccgccgggg ggacggggccc	360
gaaaggcagc ggcggcaccg cgtccggtcc tcgagcgtat ggggcttcgt caccgcgtct	420
agtaggcccc gccggcgcca gccgaccccc aacctttaat tatctcaggt tgacctcgga	480
tcaggtaggg ataccgctg aacttaagca tatcaataag cggaggaacg g	531