



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003111

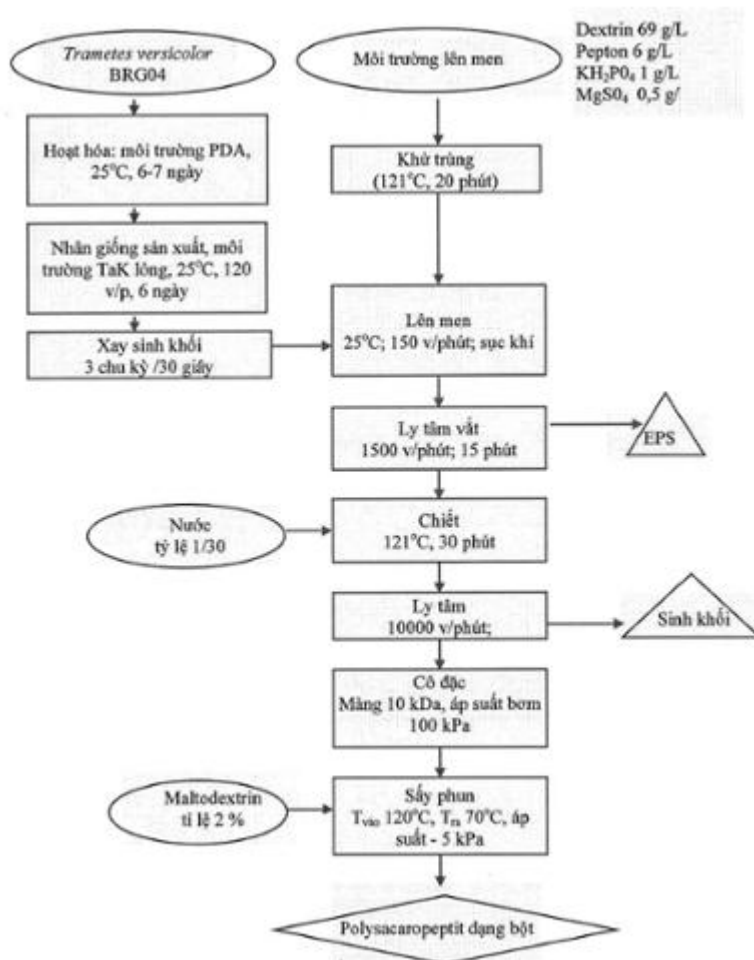
(51) **A61K 36/07**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00635 (22) 11/12/2020
(45) 27/03/2023 420 (43) 25/02/2021 395
(73) Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội (VN)
Số 1, phố Đại Cồ Việt, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội
(72) Phạm Tuấn Anh (VN); Tô Kim Anh (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT POLYSACAROPEPTIT TỪ NẤM VÂN CHI

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất polysacaropectit từ nấm Vân chi (*Trametes versicolor*) bằng kỹ thuật lên men lỏng. Quá trình lên men lỏng giúp rút ngắn thời gian lên men cho phép thu được polysacaropectit từ nấm. Sản phẩm thu được thể hiện hoạt tính ức chế các dòng tế bào ung thư như dòng tế bào ung thư vú (MCF-7), dòng tế bào ung thư phổi (A549), dòng tế bào ung thư cổ tử cung (Hela) thích hợp để phát triển được phẩm để điều trị bệnh ung thư.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học và công nghệ vi sinh. Cụ thể giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất polysacaropectit từ nấm Vân chi (*Trametes versicolor*). Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép thu nhận bột polysacaropectit có hoạt tính chống oxy hoá và kháng các tế bào ung thư thích hợp để phát triển thực phẩm chức năng hoặc dược phẩm hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Nấm Vân chi có tên khoa học là *Trametes versicolor* hoặc *Coriolus versicolor* là một loại dược liệu quý đã được sử dụng lâu trong dược truyền thống nhiều nước trên thế giới. Các hoạt chất của nấm Vân chi chủ yếu bao gồm polysacaropectit (PSP), polysacarit krestin (PSK) với tên gọi chung là polysacaropectit.

Polysacaropectit (PSP) và polysacarit krestin (PSK) được xếp vào nhóm các hoạt chất có khả năng gây đáp ứng sinh học qua đó tăng cường hệ miễn dịch và ức chế các tế bào ung thư. Tác dụng của PSP và PSK được biết đến thông qua ba cơ chế chính: (i) cải thiện khả năng miễn dịch của vật chủ bằng cách ức chế sản xuất hoặc vô hiệu hoá các chất ức chế miễn dịch; (ii) kích hoạt các tế bào miễn dịch như tế bào lympho, tác động trực tiếp hoặc điều hoà việc tạo ra các cytokinase khác nhau; (iii) và tác động trực tiếp lên tế bào ung thư. Ngoài ra các polysacaropectit từ nấm Vân chi còn thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và chống oxy hoá.

Đã có nhiều nghiên cứu phát triển nấm Vân chi, trong đó các kỹ thuật nuôi trồng chủ yếu là thu sinh khối dạng quả thể trên cơ chất rắn hoặc sinh khối dạng sợi trên môi trường cơ chất rắn. Với hai kỹ thuật này thường mất nhiều thời gian để thu được hệ sợi và quả thể nấm. Để giải quyết vấn đề này, việc nuôi trồng trên môi trường lỏng đã được phát triển, tuy nhiên kỹ thuật này vẫn còn nhiều vấn đề và chưa được tối ưu nên khó phát triển để thu được sản phẩm.

Kỹ thuật nuôi trồng nấm Vân chi để thu quả thể là kỹ thuật truyền thống được áp dụng rộng rãi đối với nấm lớn nói chung. Theo kỹ thuật này, nấm Vân chi được nhân từ dạng sợi và trồng vào các môi trường chứa các cơ chất rắn, thường sử dụng như mùn cưa, trấu, rơm, cám, có bổ sung thêm các thành phần dinh dưỡng. Thời gian nuôi trồng

kéo dài, thường từ 3 đến 4 tháng, trong đó thời gian phát triển hệ sợi là từ 21 đến 30 ngày, và thời gian phát triển quả thể từ 2 đến 3 tháng. Nấm Vân chi dạng quả thể có thành tế bào được gỗ hoá nên tương đối cứng, gây khó khăn so với quá trình nghiền và trích ly, do vậy hiệu suất trích ly hoạt chất từ sinh khối quả thể thường thấp.

Kỹ thuật nuôi nấm Vân chi thu hệ sợi sinh khối trên các nguồn cơ chất rắn như gạo hạt đã được phát triển thay vì thu quả thể. Sau khi hệ sợi mọc phủ kín cơ chất, toàn bộ hệ sợi và cơ chất được sấy khô, nghiền mịn và sử dụng trực tiếp. Một số công trình nghiên cứu sử dụng các bột này để trích ly polysacarit tổng số. Không có thông tin về hàm lượng polysacarit chính xác từ sợi nấm và thành phần hoạt tính của chúng, chỉ có hàm lượng polysacarit tổng của sợi nấm và hạt gạo, trong khi hàm lượng polysacarit từ nấm rất lớn bao gồm dạng hoạt tính và không hoạt tính, và polysacarit từ gạo cơ không có hoạt tính sinh học. Thời gian thu sản phẩm theo kỹ thuật nuôi hệ sợi trên giá thể rắn dao động từ 20 đến 25 ngày, tương đối rút ngắn so với kỹ thuật nuôi trồng thu quả thể.

Mặc dù vậy, thời gian nuôi trồng nấm Vân chi trên giá thể rắn vẫn rất dài, thường mất 1 tháng và hiệu suất thu nhận sinh khối nấm thấp. Cần có một quy trình nuôi trồng nấm Vân chi để thu polysacaropectit hiệu quả, rút ngắn thời gian, giảm chi phí và tăng hiệu suất tổng hợp polysacaropectit.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, theo đó giải pháp hữu ích đề cập tới quy trình sản xuất polysacaropectit từ nấm Vân chi bằng kỹ thuật lên men chìm nhằm giảm thời gian lên men và thu hồi đơn giản polysacaropectit từ sinh khối sợi nấm. Quy trình sản xuất polysacaropectit từ nấm Vân chi theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

a) Hoạt hóa chủng giống gốc bằng cách thu nhận chủng giống gốc nấm Vân chi *Trametes versicolor* BRG04 được lưu giữ tại Viện Công nghệ Sinh học – Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, số 01 Đại Cồ Việt, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội với số lưu giữ BRG04, sau đó cấy lên môi trường PDA và nuôi cấy ở 25°C trong thời gian từ 6 đến 7 ngày để hoạt hóa chủng giống gốc;

b) Nhân giống sản xuất bằng cách chuyển chủng giống gốc vào môi trường lên men lỏng TaK, nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 25°C, tốc độ khuấy 120 vòng/phút

trong thời gian 6 ngày, sau khi thu sinh khối, tiến hành xay nhỏ sinh khối với 3 chu kỳ, mỗi chu kỳ 30 giây, thu được giống sản xuất;

c) Lên men tổng hợp sinh khối chứa polysacaropectit bằng cách chuyển giống sản xuất vào môi trường lên men đã được khử trùng chứa 69 g/l dextrin, 6 g/l pepton 6 g/l 1g/l KH_2PO_4 và 0,5 g/l MgSO_4 . Tiếp đó lên men 7 ngày ở nhiệt độ 25°C , tốc độ khuấy từ 100-150 vòng/phút trong điều kiện sục khí;

d) Thu hồi polysacaropectit bằng cách thu sinh khối sợi nấm, sau đó tiến hành chiết với nước theo tỷ lệ sinh khối/nước 1/30 (trọng lượng/thể tích) trong thiết bị chiết kín ở nhiệt độ 121°C , thời gian chiết 30 phút. Ly tâm tách sinh khối ở tốc độ ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút, thu phần dịch và cô đặc bằng màng kích cỡ 10kDa với áp suất bơm khoảng 100 kPa rồi phối trộn với 2% maltodextrin (khối lượng/thể tích), sau khi sấy phun ở nhiệt độ đầu phun 120°C , nhiệt độ ra 70°C , áp suất -5kPa thu được sản phẩm polysacaropectit ở dạng bột.

Theo một phương án cụ thể, trong đó lượng không khí được sục trong quá trình lên men là từ 0,2 đến 1 theo thể tích môi trường lên men.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1: Sơ đồ thể hiện quy trình sản xuất bột polysacaropectit từ nấm Vân chi sử dụng phương pháp lên men lỏng.

Hình 2 là ảnh chụp chủng nấm Vân chi *Trametes versicolor* BRG04 phát triển trên môi trường PDA cho thấy khuẩn lạc nấm sợi màu trắng.

Hình 3: Biểu đồ thể hiện động thái quá trình lên men (sự thay đổi của pO_2 , hàm lượng sinh khối nấm, hàm lượng PSP và PSK qua các ngày) trong thiết bị lên men.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích sẽ mô tả chi tiết các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Chủng nấm Vân chi *Trametes versicolor* BRG04 được sử dụng theo giải pháp hữu ích được cung cấp bởi Viện Công nghệ Sinh học – Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội. Chủng giống gốc được lưu giữ tại Viện Công nghệ Sinh học –

Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, số 01 Đại Cồ Việt, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội trên môi trường hạt thóc với số lưu giữ BRG04.

Quy trình sản xuất polysacaropectit từ nấm Vân chi theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước: a) hoạt hóa chủng giống gốc; b) nhân giống sản xuất; c) lên men tổng hợp sinh khối và polysacaropectit; và d) thu hồi polysacaropectit.

Trong bước hoạt hóa chủng giống gốc, chủng giống gốc nấm Vân chi *Trametes versicolor* BRG04 được sử dụng là chủng giống gốc nấm Vân chi được lưu giữ tại Viện Công nghệ Sinh học – Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, số 01 Đại Cồ Việt, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội với số lưu giữ BRG04. Chủng này được lưu giữ ở nhiệt độ 4°C trên môi trường giá thể là hạt thóc. Chủng nấm Vân chi *Trametes versicolor* BRG04 theo giải pháp hữu ích có trình tự ITS được nêu trong SEQ ID NO.1 và cho thấy có hiệu suất sinh tổng hợp PSP tới 38 mg/g sinh khối khô và PSK 13 mg/g sinh khối khô. Chủng nấm Vân chi *Trametes versicolor* BRG04 theo giải pháp hữu ích được phân lập từ chủng nấm mọc trên thân gỗ lấy tại xã Trục Thanh, huyện Trục Ninh, tỉnh Nam Định. Chủng giống gốc được cấy lên môi trường PDA và nuôi cấy ở 25°C trong thời gian từ 6 đến 7 ngày để hoạt hóa chủng.

Môi trường PDA là môi trường nuôi cấy chuẩn, bao gồm dịch chiết khoai tây 200 ml/L, đường dextrose 20 g/L và agar 20 g/L.

Trong bước nhân giống sản xuất, tiến hành chuyển chủng giống gốc đã được hoạt hóa vào môi trường lên men lỏng TaK và nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 25°C. Trong quá trình lên men, tiến hành khuấy với tốc độ khuấy 120 vòng/phút trong thời gian 6 ngày. Sau khi thu sinh khối, tiến hành xay nhỏ sinh khối với 3 chu kỳ, mỗi chu kỳ 30 giây, thu được giống sản xuất.

Môi trường TaK bao gồm glucose 10 g/L, dịch chiết malt 10 g/L, dịch chiết nấm men 2 g/L, pepton 2 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, MgSO₄ 1 g/L, asparagin 1 g/L, biotin 0,1 mg/L.

Trong bước lên men tổng hợp polysacaropectit, tiến hành chuyển giống sản xuất vào môi trường lên men đã được khử trùng. Môi trường lên men lỏng nấm Vân chi *Trametes versicolor* BRG04 được sử dụng chứa 69 g/l dextrin, 6 g/l pepton 6 g/l 1g/l KH₂PO₄ và 0,5 g/l MgSO₄. Tiếp đó, lên men 7 ngày ở nhiệt độ 25°C, tốc độ khuấy từ 100 đến 150 vòng/phút trong điều kiện sục khí.

Theo một phương án cụ thể, trong đó lượng không khí được sục trong quá trình lên men là từ 0,2 đến 1 theo thể tích môi trường lên men.

Trong bước thu hồi polysacaropectit, tiến hành lọc thu sinh khối sợi nấm, sau đó tiến hành chiết với nước theo tỷ lệ sinh khối/nước khoảng 1/30 (trọng lượng/thể tích) trong thiết bị chiết kín ở nhiệt độ 121°C. Thời gian chiết 30 phút để chiết kiệt các thành phần polysacaropectit có trong hệ sợi. Sau đó ly tâm tách sinh khối ở tốc độ ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút. Phần bã được bỏ để thu phần dịch. Tiến hành cô đặc bằng màng kích cỡ 10kDa với áp suất bơm khoảng 100 kPa. Tiếp đó rồi phối trộn với 2% maltodextrin (khối lượng/thể tích) rồi sấy phun. Điều kiện sấy phun được thực hiện ở nhiệt độ đầu phun 120°C, nhiệt độ ra 70°C, áp suất -5kPa. Sau khi sấy, thu được sản phẩm polysacaropectit ở dạng bột.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Lên men sinh tổng hợp polysacaropectit từ nấm Vân chi

Để thử nghiệm, chủng giống Vân chi *Trametes versicolor* BRG04 được cung cấp bởi Viện Công nghệ Sinh học – Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, số 01 Đại Cồ Việt, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội với số lưu giữ BRG04 trên giá thể hạt thóc.

Chuẩn bị môi trường PDA bao gồm dịch chiết khoai tây 200 ml/L, đường dextrose 20 g/L và agar 20 g/L, sau khi thanh trùng bằng nồi hấp, để nguội, thu được môi trường nhân giống. Cây chủng giống gốc và nuôi cấy ở 25°C trong thời gian 6 ngày để hoạt hóa chủng giống gốc. Sau khi hoạt hóa, hệ sợi của chủng giống gốc mọc kín bề mặt môi trường nuôi cấy, như thể hiện trên Hình 2.

Chuẩn bị bình tam giác 250 mL chứa 100 mL môi trường TaK bao gồm glucose 10 g/L, dịch chiết malt 10 g/L, dịch chiết nấm men 2 g/L, pepton 2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 1 g/L, asparagin 1 g/L, biotin 0,1 mg/L. Môi trường được tiệt trùng và để nguội trước khi nhân giống.

Cây chủng giống sau khi đã hoạt hóa chuyển vào môi trường TaK và nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 25°C. Trong quá trình nuôi, tiến hành lắc với tốc độ 120 vòng/phút trong thời gian 6 ngày. Sau khi thu sinh khối, tiến hành xay nhỏ sinh khối với 3 chu kỳ, mỗi chu kỳ 30 giây, thu được giống sản xuất.

Lấy 1 lít môi trường lên men gồm dextrin 69 g/L, pepton 6 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, MgSO_4 0,5 g/L đã được tiệt trùng và đưa vào thiết bị lên men 2L, pH của dịch được chỉnh về 7 bằng NaOH hoặc HCl 1N. Cây 2g sinh khối nấm Vân chi đã được xay ở trên vào môi trường lên men. Tiến hành lên men trong 7 ngày với tốc độ khuấy 100 vòng/phút, sục khí 1 lít/phút, sử dụng chất phá bọt gián đoạn khi xuất hiện bọt.

Sau khi lên men lọc thu sinh khối sợi nấm, sau đó tiến hành chiết với nước theo tỷ lệ sinh khối/nước khoảng 1/30 (trọng lượng/thể tích) trong thiết bị chiết kín ở nhiệt độ 121°C . Thời gian chiết 30 phút để chiết kiệt các thành phần polysacaropectit có trong hệ sợi. Sau đó ly tâm tách sinh khối ở tốc độ ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút. Phần bã được bỏ để thu phần dịch. Tiến hành cô đặc bằng màng kích cỡ 10kDa với áp suất bơm khoảng 100 kPa. Tiếp đó rồi phối trộn với 2% maltodextrin (khối lượng/thể tích) rồi sấy phun. Điều kiện sấy phun được thực hiện ở nhiệt độ đầu phun 120°C , nhiệt độ ra 70°C , áp suất -5kPa. Sau khi sấy, thu được sản phẩm polysacaropectit ở dạng bột.

Ví dụ 2. Xác định hàm lượng polysacaropectit

Để xác định hàm lượng PSP thu được từ sinh khối nấm, trong quá trình nuôi cấy từ Ví dụ 1, tiến hành thu hồi sinh khối lên men theo thời gian xác định, sấy khô và chiết sản phẩm, kết tủa sản phẩm với cồn 96° , tỉ lệ dịch chiết/cồn là $\frac{1}{4}$. Kết tủa được thu hồi bằng ly tâm (8.000 g, 30 phút, 4°C), hoà tan trong nước cất để xác định hàm lượng PSP.

Để xác định hàm lượng PSK thu được từ sinh khối nấm, trong quá trình nuôi cấy từ Ví dụ 1, tiến hành thu hồi sinh khối lên men theo thời gian xác định, sấy khô và chiết, kết tủa với amoni sulfat nồng độ 70% bão hoà. Kết tủa được thu hồi bằng ly tâm (8.000 g, 30 phút, 4°C), hoà tan trong nước cất. Loại muối dịch bằng màng 30 kDa.

Hàm lượng polysaccarit trong PSP, PSK được xác định trực tiếp bằng phương pháp xác định hàm lượng carbohydrate Phenol-Sulfuric. Quá trình được thực hiện như sau: Hút 50 μl mẫu vào ống eppendoff, tiếp đó bổ sung 150 μl axit H_2SO_4 98% và 30 μl phenol 5% rồi đảo trộn mạnh trong 30 giây. Để phản ứng xảy ra ở nhiệt độ từ 95 đến 100°C trong 5 phút và đo màu ở bước sóng 490 nm để xác định hàm lượng polysaccarit.

Hàm lượng protein trong dịch mẫu được định lượng trực tiếp bằng phương pháp Bradford. Quá trình được thực hiện như sau: Hút vào mỗi ống eppendoff 160 μl dịch cần phân tích và bổ sung 40 μl thuốc thử Bradford rồi để phản ứng trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Tiến hành đo màu ở bước sóng 595 nm để xác định hàm lượng protein.

Kết quả phân tích được thể hiện trên Hình 3.

Ví dụ 3: Thử nghiệm khả năng kháng tế bào ung thư

Để đánh giá khả năng kháng dòng tế bào khối u của sản phẩm polysacaropectit thu được từ Ví dụ 1, tiến hành thử nghiệm hoạt tính kháng tế bào ung thư đối với các dòng tế bào MCF-7 (TB ung thư vú), A549 (tế bào ung thư phổi), Hela (tế bào ung thư cổ tử cung) theo phương pháp MTT.

Tế bào được nuôi cấy ở 37°C, 48 giờ, 5% CO₂ trong môi trường DMEM (Dullbecco's Modified Eagle Medium), EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Sigma-Aldrich, USA) hoặc RPMI 1640 (Thermofisher, Waltham, CHLB Đức) có bổ sung L-glutamine 2mM, kháng sinh (Penicillin + Streptomycin sulfate) và huyết thanh bê 5-10%.

Dịch 100µl tế bào được nhỏ lên phiên vi lượng 96 giếng (1,5 x 10⁵ tế bào/giếng) được ủ (37°C, 72 giờ) với 50 µl chất chuẩn Paclitaxel (5µM) (mẫu đối chứng dương) và mẫu thí nghiệm 50 µl mẫu thử (pha bằng RPMI 1640) ở nồng độ 100mg/ml, mỗi mẫu lặp lại 3 lần. Tế bào sau đó được nhuộm với 0.15mg (30 µl của 5g/l) chất nhuộm tetrazolium (MTT, Sigma-Aldrich) ủ 4 giờ, 37°C. Khi thấy sản phẩm chuyển dạng tinh thể formazan được hòa tan với 100 µl dimetyl sulfoxit (DMSO, Sigma-Aldrich) trong 10 phút. Đo mật độ quang ở bước sóng 540nm. Mẫu đối chứng không sử dụng chế phẩm theo giải pháp hữu ích.

Theo phương pháp MTT, enzym oxidoreductaza phụ thuộc NAD (P)H của tế bào có thể phản ánh tương quan số lượng các tế bào đang phát triển. Enzym này xúc tác phản ứng khử thuốc nhuộm tetrazolium MTT 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromit thành dạng formazan không hòa tan, có màu tím.

Khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư ở nồng độ nhất định của chất thử tính theo % so với đối chứng âm theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ ức chế tế bào (\%)} = [1 - (\text{OD mẫu} / \text{OD đối chứng (-)})] \times 100\%$$

Các mẫu có biểu hiện hoạt tính (% ức chế $\geq$ 50%) được xác định IC₅₀ (µg/ml) là nồng độ của mẫu thử mà tại đó ức chế 50% tế bào ung thư, sử dụng dụng phần mềm TableCurve AISN Software (Jandel Scientific, USA). Kết quả được thể hiện trong bảng bên dưới.

Bảng 1. Kết quả thử nghiệm khả năng kháng tế bào ung thư

Dòng tế bào	MCF7	A549	Hela
IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	22,27	27,17	43,59

Kết quả cho thấy, mẫu sản phẩm polysacaropectit thu được từ Ví dụ 1 cho thấy hoạt tính kháng khối u vượt trội, thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của khối u với các dòng tế bào MCF7, A549 và Hela thử nghiệm.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép sản xuất polysacaropectit từ nấm Vân chi *Trametes versicolor* BRG04 bằng kỹ thuật lên men lỏng thu hệ sợi. Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép rút ngắn thời gian lên men, nhưng vẫn đảm bảo được hiệu suất và khả năng tích tụ polysacarit hoạt tính từ nấm Vân chi.

Bằng cách sử dụng nấm Vân chi *Trametes versicolor* BRG04 có khả năng sinh tổng hợp polysacaropectit kết hợp lên men lỏng cho hiệu suất thu hồi sinh khối và polysacarit đủ để có khả năng phát triển được nguồn dược chất phục vụ cho phát triển ngành dược phẩm, mở ra khả năng tiếp cận thuốc hỗ trợ điều trị bệnh ung thư trên cơ sở hoạt chất sinh học.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất polysacaropectit từ nấm Vân chi, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) hoạt hóa chủng giống gốc bằng cách thu nhận chủng giống gốc nấm Vân chi *Trametes versicolor* BRG04 được lưu giữ tại Viện Công nghệ Sinh học – Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, số 01 Đại Cồ Việt, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội với số lưu giữ BRG04, sau đó cấy lên môi trường PDA và nuôi cấy ở 25°C trong thời gian từ 6 đến 7 ngày để hoạt hóa chủng giống gốc;

b) nhân giống sản xuất bằng cách chuyển chủng giống gốc vào môi trường lên men lỏng TaK, nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 25°C, tốc độ khuấy 120 vòng/phút trong thời gian 6 ngày, sau khi thu sinh khối, tiến hành xay nhỏ sinh khối với 3 chu kỳ, mỗi chu kỳ 30 giây, thu được giống sản xuất;

c) lên men tổng hợp polysacaropectit bằng cách chuyển giống sản xuất vào môi trường lên men đã được khử trùng chứa 69 g/l dextrin, 6 g/l pepton 6 g/l 1g/l KH_2PO_4 và 0,5 g/l MgSO_4 , tiếp đó lên men 7 ngày ở nhiệt độ 25°C, tốc độ khuấy từ 100-150 vòng/phút trong điều kiện sục khí; và

d) thu hồi polysacaropectit bằng cách lọc thu sinh khối sợi nấm, sau đó tiến hành chiết với nước theo tỷ lệ sinh khối/nước khoảng 1/30 (trọng lượng/thể tích) trong thiết bị chiết kín ở nhiệt độ 121°C, thời gian chiết 30 phút, sau đó ly tâm tách sinh khối ở tốc độ ly tâm 1000 vòng/phút trong 15 phút, thu phần dịch và cô đặc bằng màng kích cỡ 10kDa với áp suất bơm khoảng 100 kPa rồi phối trộn với 2% maltodextrin (khối lượng/thể tích), sau khi sấy phun ở nhiệt độ đầu phun 120°C, nhiệt độ ra 70°C, áp suất 5 kPa thu được sản phẩm polysacaropectit ở dạng bột.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó lượng không khí được sục trong quá trình lên men là từ 0,2 đến 1 theo thể tích môi trường lên men.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội

<120> QUY TRÌNH SẢN XUẤT POLYSACAROEPTIT TỪ NẤM VÂN CHI

<130>

<160> 1

<170>

<210> 1

<211> 583

<212> ADN

<213> *Trametes versicolor* BRG04

<220>

<223> ITS

<220>

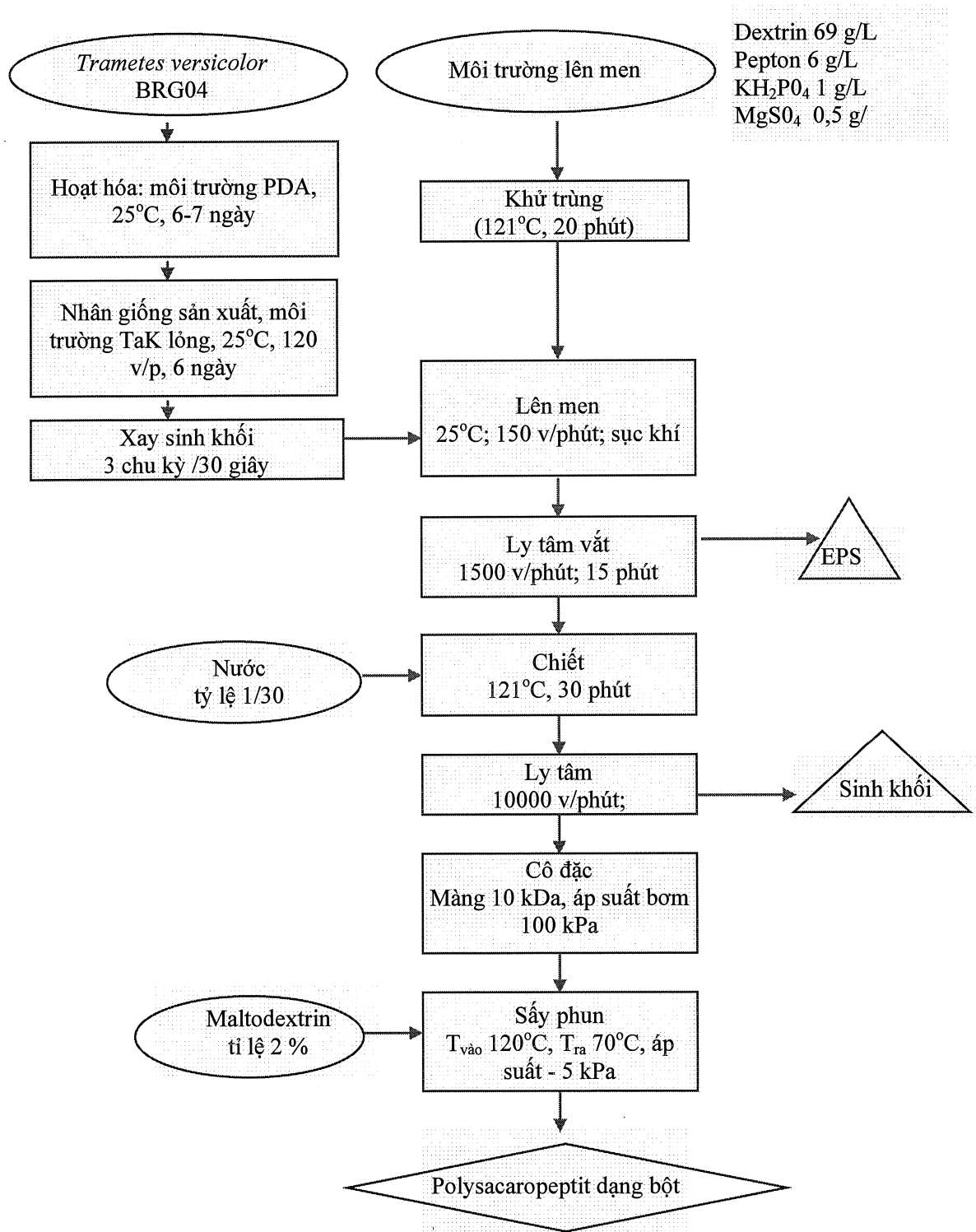
<400> 1

```

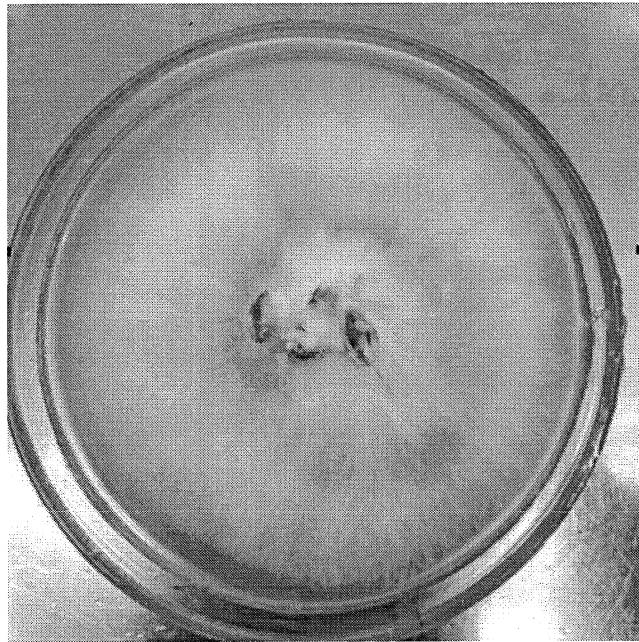
ACGAGTTGTA GCTGGCCTTT CGAGGCATGT GCACGCTCTG CTCATCCACT CTACCCCTGT 60
GCACTTACTG TAGGTTGGCG TGGGCTCCTT AACGGGAGCA TTCTGCCGGC CTATGTATAC 120
TACAAACACT TTAAAGTATC AGAATGTAAA CGCGTCTAAC GCATCTATAA TACAACTTTT 180
AGCAACGGAT CTCTTGGCTC TCGCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAATGCG ATAAGTAATG 240
TGAATTGCAG AATTCAGTGA ATCATCGAAT CTTTGAACGC ACCTTGCGCT CCTTGGTATT 300
CCGAGGAGCA TGCCTGTTTG AGTGTCTATG AATTCTCAAC TTATAAATCC TTGTGATCTA 360
TAAGCTTGGA CTTGGAGGCT TGCTGGCCCT TGTCGGCCGG NNCCCCTGGA AGGCTTTACC 420
TNNATTCCGA ACGGATCGGT TCTCATGGGG ATAATGGCCT ACCCTNTGAC CNTGAATGGT 480
TTGGCCAAGC TCCTAACCGC CCATTAGAAC AACTTTTTAC CATCNACCT CAAATCAGGA 540
AGANCNCCCC NNTAAATTTA ACCNNATCAT AACCCGAAGA AAA 583

```

HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3

