



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

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

(11)



2-0003666

(51) **C12N 1/00**
2023.01

(13) **Y**

(21) 2-2024-00161

(22) 24/02/2022

(67) 1-2022-01148

(45) 25/09/2024 438

(43) 25/07/2022 412

(73) Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Hà Nội

(72) Vũ Thị Hạnh Nguyên (VN); Phí Quyết Tiến (VN); Quách Ngọc Tùng (VN); Nguyễn Văn Thế (VN); Chu Hoàng Hà (VN).

(54) **CHỦNG VI NẤM NỘI SINH *PENICILLIUM CRUSTOSUM* WQF11 THUẦN
KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT
PACLITAXEL**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi nấm nội sinh *Penicillium crustosum* WQF11 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân của cây bạch tùng (*Cephalotaxus mannii* Hook.f.) phân bố tại Huyện Quản Bạ, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam, trong đó chủng này có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất paclitaxel với hàm lượng đạt 86,9mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-S và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 551bp đã được đăng ký trên GenBank với mã số OM758096. Chủng WQF11 có khuẩn lạc màu trắng đến xanh xám viền trắng, sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh, tận cùng là các bào tử trần dính dạng cầu, bào tử nhẵn, có hình elip, kích thước 2-3 x 1,5-2,5µm, khi già có hình cầu, cuống sinh bào tử nhẵn, có vách ngăn, phân nhánh điển hình kích thước đạt đến 100µm. Paclitaxel có tác dụng trong việc điều trị bệnh ung thư, đặc biệt là bệnh ung thư vú và ung thư phổi ở người.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích 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 dược liệu có khả năng sinh tổng hợp paclitaxel cao. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề xuất chủng vi nấm nội sinh *Penicillium crustosum* WQF11 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ thân của cây bạch tùng (*Cephalotaxus mannii* Hook.f.) phân bố tại Huyện Quản Bạ, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất paclitaxel, chất này có tác dụng trong việc điều trị bệnh ung thư, đặc biệt là bệnh ung thư vú và ung thư phổi ở người.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Paclitaxel (taxol) thuộc một nhóm diterpenoit phức tạp được gọi là taxan phân lập từ các nguồn tự nhiên (thực vật và vi nấm) đã được chứng minh có hiệu quả đối với các bệnh ung thư và được coi là thuốc điều trị hóa trị liệu thông thường, được xếp hạng là thuốc chống ung thư có giá trị trên 1 tỷ USD đầu tiên trên thế giới (Schiff và cs., 1978). So với các thuốc chống ung thư khác như camptothecin, vinca alkaloid, podophyllotoxin và colchicin, động lực liên kết của paclitaxel với tubulin rất đặc biệt. Các chất trên tăng cường tháo gỡ vi ống trong khi đó paclitaxel thúc đẩy lắp ráp và ổn định (Roberts và Hyams, 1979). Do khả năng độc nhất của liên kết với β -tubulin và độc tính tế bào của paclitaxel ở nồng độ thấp hơn, paclitaxel đang được sử dụng để điều trị một số khối u thông thường. Paclitaxel được Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) cấp phép sử dụng điều trị ung thư buồng trứng vào năm 1992 do hiệu quả cao và ít tác dụng phụ hơn các loại thuốc khác. Hiện nay, paclitaxel cũng được dùng để điều trị ung thư phổi (Ettinger, 1993), ung thư buồng trứng nhón thuốc (McGuire và cs., 1989; Einzig và cs., 1991; Markman 1991), đầu và cổ (Forastiere và cs., 1993), thận, tuyến tiền liệt, ruột kết, cổ tử cung, dạ dày, tuyến tụy (Einzig và cs., 1992; Arbuck và cs., 1993; Brown và cs., 1993; Roth và cs., 1993) và ung thư vú (Holmes và cs., 1991). Theo ước tính, paclitaxel là loại thuốc trị ung thư bán chạy nhất từng được sản xuất (Gordon, 2011) với quy mô thị trường là 1,6 tỷ đô la vào năm 2005 và dẫn xuất bán tổng hợp (semisynthetic analog) của paclitaxel là docetaxel đã đạt doanh số 3 tỷ đô la trong năm 2009 (Uzma và cs., 2018).

Năm 1962, các nhà nghiên cứu từ Viện Ung thư Quốc gia Mỹ đã tách chiết paclitaxel hiệu suất cao từ cây thủy tùng Thái Bình Dương (*Taxus brevifolia*), tuy nhiên, hàm lượng paclitaxel thu được thấp và giá thành cao vẫn là thách thức. Trung bình, 20 kg vỏ cây thông đỏ chiết xuất được 1mg paclitaxel (Schiff và Horwitz, 1980) và có giá 4,87-20 USD/mg paclitaxel. Do đó, việc cung cấp chất chống ung thư mạnh này đã sớm

trở thành vấn đề khan hiếm, vì ngay cả những ước tính ban đầu nhu cầu sử dụng paclitaxel trong điều trị ung thư có thể vượt quá 300kg, tương đương với 750 000 cây thủy tùng mỗi năm (Stierle và cs., 1995; Sohn và Okos, 1998) tức là 1kg paclitaxel được sản xuất sau khi chiết xuất từ 10 000kg vỏ *Taxus* (Schippmann, 2001) và một bệnh nhân ung thư cần khoảng 2,5-3,3mg paclitaxel để điều trị (Bedi và cs., 1996). Tuy vậy, dù có những tiến bộ vượt bậc trong quá trình lựa chọn sản xuất khác nhau trong hai thập kỷ qua, paclitaxel vẫn là một hợp chất đắt tiền.

Trong 40 năm qua, nhiều phương pháp tiếp cận như khai thác paclitaxel từ vỏ cây thủy tùng, nuôi cấy tế bào và mô thực vật, tổng hợp hóa học đã được phát triển và cải tiến (Bảng 1) (Fett-Neto và cs., 1992; Holton và cs., 1995; Wang và Zhong, 2002; Croteau và cs., 2006; Zhou và Wu, 2006). Tuy nhiên, những cách tiếp cận này là chưa phù hợp vì mất nhiều thời, hiệu suất thấp làm cho các phương pháp này trở nên không thực tế.

Bảng 1 - Các cách tiếp cận khác nhau để sản xuất paclitaxel từ vỏ cây thủy tùng và các bộ phận khác của cây.

Loài cây thuộc họ thông	Loại nuôi cấy	Năng suất paclitaxel	Tài liệu tham khảo
<i>Taxus cuspidata</i>	Callus	0,020% khối lượng khô	(Fett-Neto và cs., 1992)
<i>Taxus brevifolia</i>	<i>In vivo</i>	0,01% khối lượng khô của vỏ	(Banerjee và cs., 1996)
<i>Taxus media</i>	Huyền phù tế bào	115,2mg/L	(Yukimune và cs., 1996)
<i>Taxus chinensis</i>	Elicitor (<i>Aspergillus niger</i>)	Gấp 2 lần với đối chiếu	(Wang và cs., 2001)
<i>Taxus x media</i>	Nuôi cấy rễ tơ	Gấp 2 lần so với ở vỏ cây <i>T. brevifolia</i>	(Furmanowa và Syklowska-Baranek, 2000)
<i>Taxus chinensis</i>	Nuôi cấy tế bào ở bioreactor	612mg/L	(Wang và Zhong, 2002)

Khi những nghiên cứu đầu tiên phát hiện nấm nội sinh *Taxomyces andreanae* từ cây thủy tùng *Taxus* spp. sinh tổng hợp paclitaxel đã mở phương án mới cho sản xuất paclitaxel công nghiệp hiệu quả, chi phí giảm, khả thi trong thực tiễn sản xuất. Tiếp đó, một số nhóm nghiên cứu đã phân lập được vi nấm từ một số loài *Taxus* như *Taxus baccata*, *T. chinensis*, *T. cuspidata*, *T. media*, *T. floridana*, *T. canadensis*, *T. yunnanensis*, *T. mairei*, *T. sumatrana* và *T. wallichiana*, đã được báo cáo hàm lượng taxane trong và giữa các loài khác nhau (Tabata, 2006). Ngoài ra, gần đây các nghiên cứu đã phát hiện một số cây được liệu khác có thể phân lập nấm sinh paclitaxel như

Cardiospermum halicacabum, *Citrus medica*, *Cupressus* sp., *Ginkgo biloba*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Taxodium distichum*, *Podocarpus* spp., *Torreya grandifolia*, *Terminalia arjuna* (Flores-Bustamante và cs., 2010). Cho đến nay, ít nhất 19 chi nấm nội sinh (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Botryodiplodia*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Ectostroma*, *Fusarium*, *Metarhizium*, *Monochaetia*, *Mucor*, *Ozonium*, *Pap Formulapora*, *Periconia*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Pithomyces*, *Taxomyces*, *Tubercularia*) đã được sàng lọc và có khả năng sản xuất paclitaxel và các dẫn xuất (baccatin III, 10-deacetyl baccatin III) (Stierle và cs., 1993; Zhou và Wu, 2006; Gangadevi và cs., 2008; Zhao và cs., 2008; Zhao và cs., 2009). Các nghiên cứu trên đã bổ sung nguồn phân lập nấm sinh paclitaxel và thúc đẩy các nhà nghiên cứu phân lập thêm các chủng nấm nội sinh mới trên cây dược liệu phục vụ sản xuất. Để cải thiện hàm lượng paclitaxel thấp, các nghiên cứu hiện tại cần tập trung vào phân lập và xác định các dòng tế bào sản xuất paclitaxel cao, sản lượng paclitaxel ổn định và tối ưu hóa các điều kiện lên men. Cải thiện và tối ưu hóa các môi trường nuôi cấy của nấm sản xuất paclitaxel từ *Fusarium mairei* đã được thảo luận bởi Xu và cộng sự (2006). Mặc dù lượng paclitaxel được tìm thấy trong hầu hết các loại nấm nội sinh liên quan đến *Taxus* đều thấp so với của cây, tuy nhiên, thời gian thế hệ ngắn và tốc độ phát triển nhanh của nấm làm cho nó đáng để nghiên cứu để ứng dụng trong sản xuất paclitaxel (Liu và cs., 2009).

Nghiên cứu về các vi sinh vật (VSV) sản xuất paclitaxel có tiềm năng quan trọng cho các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng. Cho đến nay, hướng nghiên cứu bộ gen hoàn chỉnh liên quan đến tổng hợp sinh học paclitaxel còn bỏ ngõ. Việc giải trình tự và phân tích bộ gen những VSV này sẽ góp phần đáng kể vào việc mở rộng số lượng gen tổng hợp paclitaxel làm cơ sở cho sản xuất nhiều dị bản hơn. Ngoài ra, có hơn 400 loại taxan tự nhiên đã được biết đến, nhưng chỉ có một số gen liên quan đến tổng hợp sinh học taxane đã được phân lập. Trên các mẫu cây thông đỏ (*T. brevifolia*) đã phân lập được 150 chủng vi nấm và khoảng 10% chủng nấm nội sinh có sinh tổng hợp paclitaxel (Caruso và cs., 2000). Cho đến nay, khoảng 200 loài nấm nội sinh thuộc hơn 40 chi nấm thuộc họ *Ascomycota* và *Deuteromycota*, và một số ít từ *Basidiomycota* và *Zygomycota* được công bố có khả năng sinh tổng hợp paclitaxel (Kusari và cs., 2014). Một số nghiên cứu xác định sự có mặt của các gen mã hóa cho các enzym taxadien synthaza, 10-deacetyl baccatin III-10-O-acetyltransferaza và baccatin III 13-O- (3-amino-3-phenylpropanoyl) giúp sàng lọc bước đầu các loài vi nấm sinh tổng hợp xuất paclitaxel (Zhang và cs., 2008). Trên cơ sở phân tích hệ gen của vi nấm, các tác giả đã xác định được các gen 10-deacetyl baccatin III-10-O-acetyltransferaza và gen acyltransferaza chuỗi C-13 phenylpropanoit liên quan đến sinh tổng hợp paclitaxel (Roopa và cs., 2015). Gần đây, chủng nấm *Cladosporium oxysporum* phân lập từ cây chùm ngây (*Moringa oleifera*) có thể sinh paclitaxel đạt >250 µg/l. Gần đây, nghiên cứu đa dạng nấm trên cây *T. wallichiana* var. *Mairei* đã phân lập được 528 chủng nấm nội sinh từ vỏ cây, trong đó chỉ 01 chủng nấm *Phoma hazaginis* sinh tổng hợp paclitaxel (Zaiyou và cs., 2017).

Bên cạnh paclitaxel, một số chất chuyển hóa thứ cấp khác đã được phân lập, xác định cấu trúc trong nhiều nghiên cứu khác (Dreyfuss và Chapela, 1994; Strobel và cs., 2004; Padhi và cs., 2013). Nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học thuộc các nhóm ankaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, peptid, polyketon, quinol và phenol cũng như một số hợp chất chứa clo. Trong nghiên cứu của Schulz và cs. (2002) đã phân lập khoảng 6500 nấm nội sinh và phân tích 135 hợp chất chuyển hóa thứ cấp và cho thấy 51% các hợp chất mới có hoạt tính sinh học được phân lập từ nấm nội sinh. Vì thế, việc nghiên cứu các chủng VSV sản xuất taxan chỉ đang trong những bước đầu tiên.

Ở Việt Nam, cây bạch tùng được phát hiện chủ yếu tại Hà Giang, Cao Bằng và các tỉnh Tây Nguyên ở độ cao 600-1200m, nơi có ít ánh sáng và ẩm. Mọc rải rác ở phần dưới sườn núi đất hoặc đá vôi, ít khi lên gần đỉnh, trong rừng rậm thường xanh cây lá rộng. Thế giới: cây bạch tùng phân bố ở các nước như Ấn Độ, Trung Quốc, Mianma, Thái Lan. 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. Ở Việt Nam và trên Thế giới trước đây đã có nhiều đề tài nghiên cứu về vi nấm nội sinh; tuy nhiên, các nghiên cứu về vi nấm nội sinh ở cây bạch tùng (*Cephalotaxus mannii* Hook.f.) sinh paclitaxel có hàm lượng cao ứng dụng trong điều trị ung thư đến nay chưa có công bố.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng vi nấm nội sinh *Penicillium crustosum* WQF11 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ thân của cây bạch tùng (*Cephalotaxus mannii* Hook.f.) phân bố tại xã Bát Đại Sơn, Huyện Quản Bạ, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam (23°8'16" N 105°0'44" E), có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất chất paclitaxel, chất này có tác dụng trong việc điều trị bệnh ung thư, đặc biệt là bệnh ung thư vú và ung thư phổi ở người.

Chủng vi nấm nội sinh *Penicillium crustosum* WQF11 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 551bp và được đăng ký trên ngân hàng GenBank (mã số OM758096) và có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất paclitaxel cao với hàm lượng đạt 86,9mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-S. Chủng WQF11 có khuẩn lạc màu trắng đến xanh xám viền trắng, sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh, tận cùng là các bào tử trần đỉnh dạng cầu, bào tử nhẵn, có hình elip, kích thước 2-3 x 1,5-2,5µm, khi già có hình cầu, cuống sinh bào tử nhẵn, có vách ngăn, phân nhánh điển hình kích thước đạt đến 100µm.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng *Penicillium crustosum* WQF11 trên môi trường PDA-G sau 7 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc màu trắng đến xanh xám với viền trắng.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái sợi khuẩn ty và bào tử của chủng *Penicillium crustosum* WQF11 chụp trên kính hiển vi quang học (độ phóng đại 400 lần). Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh, tận cùng là các bào tử trần đỉnh dạng cầu, bào tử nhẵn, có hình elip, kích thước 2-3 x 1,5-2,5µm, khi già có hình cầu. Cuống sinh bào tử nhẵn, có vách ngăn, phân nhánh điển hình kích thước đạt đến 100µm.

Hình 3 là hình ảnh thể hiện kết quả sắc kí lớp mỏng (TLC) của chất chuẩn paclitaxel (A) và dịch cao chiết paclitaxel thô của chủng *Penicillium crustosum* WQF11 (B).

Hình 4 là biểu đồ thể hiện sắc kí đồ HPLC của chất chuẩn paclitaxel (A), cao chiết paclitaxel thô của chủng *Penicillium crustosum* WQF11 (B) trên máy AGILENT 1200 (Đức) kết nối đầu dò DAD; phổ UV của chất chuẩn paclitaxel (C), cao chiết paclitaxel thô của chủng *Penicillium crustosum* WQF11 của pic $R_t = 35,851$ (D); phổ LC-MS của chất chuẩn paclitaxel (E), cao chiết paclitaxel thô của chủng *Penicillium crustosum* WQF11 (F) trên máy AGILENT 1200 LC-MSD.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi nấm nội sinh *Penicillium crustosum* WQF11 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ thân của cây bạch tùng (*Cephalotaxus mannii* Hook.f.) phân bố tại xã Bát Đại Sơn, huyện Quản Bạ, tỉnh Hà Giang, Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất paclitaxel cao.

Việc phân lập chủng thuần khiết về mặt sinh học từ thân của cây bạch tùng (*Cephalotaxus mannii* Hook.f.) được thực hiện theo phương pháp của Kumar và cộng sự, năm 2019 có cải tiến như mô tả sau đây. Mẫu thân cây bạch tùng (*Cephalotaxus mannii* Hook.f.) phân bố tại xã Bát Đại Sơn, huyện Quản Bạ, tỉnh Hà Giang, Việt Nam được cắt thành từng khúc nhỏ dài 2-3cm rửa sạch bằng nước sạch rồi khử trùng lần lượt bằng etanol 70% (v/v) trong 30 giây, NaOCl 3,5% (v/v) trong 2 phút và rửa tiếp với etanol 70% (v/v) trong 2-5 giây. Sau đó, rửa lại bằng nước cất khử trùng 4 lần. Các mẫu thân cây được cắt thành từng lát nhỏ (0,5x0,5x0,5cm), đặt các lát nhỏ lên đĩa Petri chứa môi trường PDA-G (Môi trường PDA cải tiến có thành phần môi trường (g/L) như sau: 150g khoai tây; 10g đường glucoza; 10g sacaroza; 16g thạch và 1 lít nước cất) có độ pH = 7, có bổ sung streptomycin sulphat (100mg/L) 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-G có bổ sung streptomycin sulphat (100mg/L) 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 hình thái và đối chiếu với các đặc điểm được mô tả theo sách định tên loài vi nấm nội sinh của Raper và Thom (1949), Samson và cộng sự (2011), Stolk và Samson (1972), Crous và Groenewald (2015). Sau đó, tách chiết hệ gen của các chủng nấm thu được bằng kit tách chiết ADN (Dneasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Đức) và khuếch đại các vùng ITS cùng với gen 5,8S rARN bằng cặp mồi đặc hiệu ITS1 (5'–TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') và ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'). Tiếp theo, các vùng ITS cùng với gen 5,8S rARN thu được và được xác định trình tự nucleotit bằng máy giải trình tự tự động Sanger (First BASE Laboratories Sdn. Bhd., Malaysia). Trình tự nucleotit được phân tích bằng phần mềm ClustalX v.1.81 và trình tự vùng được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI (GenBank) bằng công cụ BLAST và định danh.

Chủng vi nấm nội sinh thuần khiết về mặt sinh học sau khi định danh được tiếp tục được nuôi cấy và thử nghiệm khả năng sinh tổng hợp hoạt chất paclitaxel. Chủng nấm thử nghiệm được nuôi cấy trong 3 lít môi trường PDB-S (Môi trường PDB-S cải tiến có thành phần môi trường (g/L) như sau: 150g khoai tây; 10g đường glucoza; 10g sacaroza; 1g bột đậu tương và 1 lít nước cất, giá trị pH 7,0) ở nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 15 ngày và tiến hành thu dịch lên men và sinh khối bằng ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 15 phút. Bổ sung 0,025% (w/v) Na₂CO₃ vào dịch lên men lắc 150 vòng/phút trong 60 phút để loại bỏ axit béo trong dịch lên men, sau đó, được chiết 3 lần với diclometan theo tỷ lệ 1:1 (thể tích dung môi : thể tích dịch lên men) thu được dịch chiết nấm, chính là dịch chiết chất có hoạt tính sinh học toàn phần. Dịch chiết nấm được thu lại và cô quay ở 35°C bằng thiết bị cô quay (IKA, RV10, Đức). Thu được cặn khô chính là paclitaxel thô có trong dịch lên men. Sinh khối được sấy ở 45- 60°C, sau đó sinh khối nấm khô được nghiền mịn và tách chiết 3 lần với metanol theo tỷ lệ 1:3 (khối lượng sinh khối khô : thể tích dung môi). Dịch chiết nấm được thu lại và cô quay ở 60°C bằng thiết bị cô quay (IKA, RV10, Đức). Thu được cặn khô chính là paclitaxel thô có trong sinh khối. Hòa tan phần cặn khô trong metanol tuyệt đối và sử dụng để phân tích, xác định paclitaxel. Dịch chiết nấm được xác định khả năng sinh tổng hợp paclitaxel bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC), bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên máy AGILENT 1200 (Đức) kết nối đầu dò DAD, quang phổ tử ngoại (UV) và bằng khối phổ LC-MS trên máy AGILENT 1200 LC-MSD.

Thực hiện việc phân lập và xác định các đặc tính sinh trưởng và phát triển như nêu trên, tác giả giải pháp hữu ích 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 551bp và có độ tương đồng $\geq 99\%$ và có độ dài đoạn so sánh $\geq 99\%$ so với các chủng *Penicillium* được đối chiếu trên hàng dữ liệu gen NCBI và được định danh là *Penicillium crustosum* WQF11 (mã số GenBank OM758096).

Chủng vi nấm nội sinh *P. crustosum* WQF11 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất paclitaxel với hàm lượng 86,9mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-S.

Chủng vi nấm nội sinh *P. crustosum* WQF11 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích là chủng tự nhiên được phân lập từ thân của cây bạch tùng (*Cephalotaxus mannii* Hook.f.) phân bố tại xã Bát Đại Sơn, huyện Quản Bạ, tỉnh Hà Giang, Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất paclitaxel, hoạt chất này có tác dụng trong điều trị bệnh ung thư, đặc biệt là bệnh ung thư vú và ung thư phổi ở người. 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 paclitaxel quy mô lớn đơn giản mà lại cho hiệu suất paclitaxel cao, phục vụ hỗ trợ điều trị các bệnh ung thư, đặc biệt là bệnh ung thư vú và ung thư phổi ở người, mở ra hướng đi mới có hiệu quả trong việc điều trị bệnh ung thư 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 nội sinh *P. crustosum* WQF11 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-G 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 giải pháp hữu ích

Mẫu thân của cây bạch tùng (*Cephalotaxus mannii* Hook.f.) phân bố tại xã Bát Đại Sơn, huyện Quản Bạ, tỉnh Hà Giang, Việt Nam được cắt thành từng khúc nhỏ dài 2-3cm rửa sạch bằng nước sạch rồi khử trùng lần lượt bằng etanol 70% (v/v) trong 30 giây, NaOCl 3,5% (v/v) trong 2 phút và rửa tiếp với etanol 70% (v/v) trong 2-5 giây. Sau đó, rửa lại bằng nước cất khử trùng 4 lần. Các mẫu thân cây được cắt thành từng lát nhỏ (0,5x0,5x0,5cm), đặt các lát nhỏ lên đĩa Petri chứa môi trường PDA-G (Môi trường PDA cải tiến có thành phần môi trường (g/L) như sau: 150g khoai tây; 10g đường glucoza; 10g sacaroza; 16g thạch và 1 lít nước cất) có độ pH = 7, có bổ sung streptomycin sulphat (100mg/L) 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

đổi các đĩa hàng ngày để kiểm tra sự phát triển của các khuẩn lạc vi nấm nội sinh. Cấy chuyển các sợi nấm của các chủng nấm phân lập được từ các đĩa ban đầu sang đĩa thạch PDA có bổ sung streptomycin sulphat (100mg/L) 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.

Kết quả đã phân lập được chủng được ký hiệu là WQF11 có thời gian sinh trưởng 5-7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA-G. Nuôi cấy chủng WQF11 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 Raper và Thom (1949), Samson và cộng sự (2011), Stolk và Samson (1972), Crous và Groenewald (2015) để sơ bộ nhận dạng, phân loại chủng vi nấm nội sinh WQF11 đến chi.

Chủng vi nấm nội sinh WQF11 được nuôi cấy phát triển trên môi trường PDA-G ở 28°C, quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc và kích thước khuẩn lạc. Hình thái khuẩn lạc của chủng vi nấm nội sinh WQF11 trên môi trường PDA-G sau 5 ngày nuôi cấy được thể hiện trên hình 1. Khuẩn lạc của chủng vi nấm nội sinh WQF11 màu trắng đến xanh xám với viền trắng. Chuẩn bị lam kính, lamén và các đĩa Petri 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 Petri. 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 (độ phóng đại 400 lần), 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 vi nấm nội sinh WQF11 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, bào tử nhẵn, có hình elip, kích thước 2-3 x 1,5-2,5µm, khi già có hình cầu. Cuống sinh bào tử nhẵn, có vách ngăn, phân nhánh điển hình kích thước đạt đến 100µm.

Kết quả nhận dạng được chủng vi nấm nội sinh WQF11 thuộc chi *Penicillium*.

ADN của chủng vi nấm nội sinh WQF11 được tách chiết bằng kit tách chiết ADN (Dneasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Đức). Kết quả kiểm tra trên máy đo quang phổ cho thấy ADN tổng số tách chiết được có độ tinh sạch cao ($A_{260}/A_{280} = 1,86$) và được sử dụng làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR.

Vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm nội sinh WQF11 được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') và ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'). Cặp mồi ITS1 và ITS4 khuếch đại đoạn gen ITS1-5,8S-ITS4 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 Roopa và cộng sự (2015). Thể tích phản ứng PCR (25µl) bao gồm 100ng ADN hệ gen, 25µl hỗn hợp chuẩn, 0,1 µg ADN tổng số 0,4µM mỗi mồi, 0,2mM dNTPs, 1×Taq polymeraza đậm, and 1U Taq ADN polymeraza và nước khử ion. Chu trình nhiệt bao gồm: 95°C trong 10 phút; 35 chu trình: 95°C trong 30 giây, 65°C trong 60 giây, 72°C trong 90 giây; 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C. 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 570bp. 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 vi nấm nội sinh WQF11 được xác định trên máy giải trình tự động Sanger (First BASE Laboratories Sdn. Bhd., Malaysia). Xử lý dữ liệu trình tự đoạn ADN bằng phần mềm ClustalX v.1.81, so sánh với các gen tương ứng đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) (bảng 2). Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS4 của chủng vi nấm nội sinh WQF11 được thể hiện ở SEQ ID NO:1.

Bảng 2 - Mức độ tương đồng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm WQF11 khi so sánh với trình tự các chủng trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI

Ký hiệu chủng	Chủng so sánh		Độ dài đoạn so sánh (%)	Mức độ tương đồng (%)
	Tên chủng	Mã số GenBank		
WQF11	<i>Penicillium crustosum</i> AIR-DRBC-II-11	KF815589.1	100	99,64
	<i>Penicillium crustosum</i> RT25	MG975627.1	99	99,82
	<i>Penicillium crustosum</i> FRR 1669	NR_077153.1	99	99,64
	<i>Penicillium crustosum</i> DUCC5730	MT582770.1	99	99,64
	<i>Penicillium crustosum</i> DTO 403-D6	MT316358.1	99	99,64

Kết quả cho thấy đã xác định được trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 tách từ chủng vi nấm nội sinh WQF11 có kích thước 551bp. Đoạn gen này có mức tương đồng với các trình tự gen trên NCBI $\geq 99\%$ và có độ dài đoạn so sánh $\geq 99\%$ so với các chủng *Penicillium* được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI như *Penicillium crustosum*

AIR-DRBC-II-11 (99,64%), *Penicillium crustosum* RT25 (99,82%), *Penicillium crustosum* FRR 1669 (99,64%), *Penicillium crustosum* DUCC5730 (99,64%) và *Penicillium crustosum* DTO 403-D6 (99,64%). Với kết quả này cho thấy, chủng vi nấm nội sinh WQF11 thuộc loài *Penicillium crustosum*. Kết quả này cho kết quả tương tự khi phân loại bằng đặc điểm hình thái khuẩn lạc, bào tử và cuống sinh bào tử. Chủng vi nấm nội sinh WQF11 được định danh là *Penicillium crustosum* WQF11 (mã số GenBank OM758096).

Chủng vi nấm nội sinh *P. crustosum* WQF11 được nuôi lắc trong 3 lít môi trường PDB-S ở 150 vòng/phút, nhiệt độ 28°C trong 15 ngày. Tiến hành thu dịch lên men và sinh khối bằng ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 15 phút. Thu paclitaxel thô từ dịch lên men và sinh khối nấm theo các bước sau: (1) bổ sung 0,025% (w/v) Na₂CO₃ vào dịch lên men lắc 150 vòng/phút trong 60 phút để loại bỏ axit béo trong dịch lên men; (2) sau đó, được chiết 3 lần với diclomethan theo tỷ lệ 1:1 (thể tích dung môi : thể tích dịch lên men) thu được dịch chiết nấm có hoạt chất paclitaxel, thu pha dưới; (3) dịch chiết nấm được thu lại và cô quay ở 35°C bằng thiết bị cô quay (IKA, RV10, Đức), thu được cặn khô chính là paclitaxel thô có trong dịch lên men; (4) sinh khối nấm tươi được sấy khô ở 45- 60°C, sau khi sinh khối nấm được sấy khô và được nghiền thành bột mịn; (5) bột sinh khối nấm khô được tách chiết 3 lần với metanol theo tỷ lệ 1:3 (khối lượng sinh khối khô : thể tích dung môi) thu được dịch chiết nấm có hoạt chất paclitaxel; (6) dịch chiết nấm tiếp tục cô quay ở 60°C bằng thiết bị cô quay (IKA, RV10, Đức) để loại bỏ dung môi thu được cặn chiết khô chính là paclitaxel thô có trong sinh khối; (7) hòa tan phần cặn khô paclitaxel thô thu từ dịch lên men và sinh khối nấm trong metanol tuyệt đối và sử dụng để phân tích, xác định hàm lượng paclitaxel.

Dịch paclitaxel thô thu được và được xác định hoạt chất paclitaxel bằng phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC) (Kumar và cs., 2019) như sau: (1) hòa tan chất chuẩn paclitaxel trong metanol 1mg/ml, pha loãng đến các nồng độ chuẩn; (2) hoạt hóa bản mỏng silicagel 60 F254, độ dày 0,25mm pha thường bằng cách sấy 1 giờ ở 110°C; (3) mẫu được chấm lên bản mỏng bằng pipet (chất chuẩn paclitaxel 1µl nồng độ 10⁻⁶; mẫu dịch paclitaxel thô là 5µl), sấy nhẹ bản mỏng để bay hết dung môi; (4) dùng kẹp đưa bản mỏng đã chấm vào bình dung môi có thành phần cloroform:metanol ở 7:1 (v/v), đẩy nắp bình, theo dõi vạch dung môi di chuyển đến khi cách mép trên tám bản mỏng 1cm thì lấy bản mỏng ra khỏi bình, sấy nhẹ bản mỏng; (5) sử dụng thuốc nhuộm vanilin 1% (w/v) trong axit sulfuric sau khi đun nóng nhẹ xít đều lên bản mỏng, sấy nhẹ bản mỏng, quan sát vết; (6) giá trị hệ số lưu giữ (R_f) của mẫu được tính toán theo phương trình sau từ sắc ký đồ và so sánh với phân loại tiêu chuẩn. Kết quả cho thấy sự hiện diện của paclitaxel trong mẫu cao chiết của chủng vi nấm nội sinh *P. crustosum* WQF11 khi so sánh với chất chuẩn paclitaxel. Giá trị R_f của mẫu cao chiết và chuẩn paclitaxel được

tìm thấy là 0,49. Kết quả sắc ký bản mỏng được thể hiện trên hình 3. Một kết quả tương tự xác định paclitaxel bằng TLC cũng được báo cáo về sinh tổng hợp paclitaxel từ vi nấm *Pestalotiopsis malicola* và *P. pauciseta* VM1 (Bi và cs., 2011) và chủng vi nấm nội sinh *Colletotrichum gloeosporioides* JGC-9 trên cây thanh táo (*Justicia gendarussa*) (Gangadevi và Johnpaul, 2008).

Xác định hàm lượng paclitaxel có mặt trong cao chiết của chủng vi nấm nội sinh *P. crustosum* WQF11 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên máy AGILENT 1200 (Đức) kết nối đầu dò DAD. Trên hệ thống HPLC, pic tín hiệu được lựa chọn của paclitaxel chuẩn (Hình 4A) được phát hiện một cách ổn định tại thời gian lưu Rt 35,873 phút đối với các mẫu chất chỉ thị dùng trong thang định lượng và xác nhận sự có mặt của paclitaxel trong mẫu cao chiết thử nghiệm của chủng vi nấm nội sinh *P. crustosum* WQF11 cũng cho thời gian lưu Rt 35,851 phút trùng với thời gian lưu của chất chuẩn (Hình 4B). Hàm lượng paclitaxel được xác định thông qua đường chuẩn được xây dựng bằng cách sử dụng HPLC bằng cách tiêm các nồng độ đã biết khác nhau của paclitaxel chuẩn. Diện tích dưới đỉnh của nồng độ đã biết được sử dụng để định lượng. Giá trị trung bình của bốn thí nghiệm độc lập được sử dụng để ước tính nồng độ sản xuất paclitaxel trong một lít từ các mẫu được chiết xuất. Kết quả xác định hàm lượng paclitaxel có trong cao chiết thô của chủng vi nấm nội sinh *P. crustosum* WQF11 so với paclitaxel chuẩn bằng sắc ký HPLC là 86,9mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-S.

Xác định paclitaxel có trong mẫu cao chiết bằng phân tích phổ cực tím UV theo các bước sau: (1) cạo vệt có chứa paclitaxel giả định trên bản mỏng silicagel 60 F254 ở Rf 0,49 của mẫu cao chiết thô; (2) sau đó hòa tan cặn trong metanol; (3) phổ của paclitaxel thô được vẽ trên máy quang phổ Beckman DU- 40 (Mỹ) và được định lượng bằng cách so sánh với phổ của paclitaxel chuẩn. Kết quả phân tích quang phổ cực tím (UV) cho thấy λ_{max} đối với paclitaxel mẫu cao chiết thô (Hình 4D) ở dải 230nm tương đương với λ_{max} đối với paclitaxel chuẩn (Hình 4C) được quan sát ở dải 230nm với sự thay đổi nhỏ về độ hấp thụ. Điều này khẳng định sự tồn tại của phân tử paclitaxel trong hỗn hợp mẫu cao chiết thô (Hình 4D). λ_{max} tương ứng với sự tồn tại của nhóm benzoyl. Hợp chất nấm được phân lập từ *Tubercularia* sp. TF5 cho thấy phổ hấp thụ UV tương tự như phổ hấp thụ của paclitaxel chuẩn ở bước sóng 228nm (Li và cs., 2008). Tương tự xác định paclitaxel có trong mẫu cao chiết bằng phân tích khối phổ (MS). Paclitaxel thô được hòa tan trong methanol : nước : axit axetic (50:50:1; v/v), 2mL mẫu được bơm bằng phương pháp tiêm vòng. Phổ khối lượng phun mù điện tử (ESI-MS: Electron Spray Ionization mass spectra) dựa vào sự phân mảnh ion dưới tác dụng của chùm ion bắn phá với năng lượng khác nhau, phổ biến là 70eV được đo trên máy AGILENT 1200 LC-MSD Trap để xác định sự có mặt của paclitaxel trong cao chiết thô. Kết quả phân tích

khối phổ của cao chiết thô cho thấy, khối phổ có độ phân giải cao thể hiện cấu trúc phức tạp của paclitaxel thô được tạo ra từ vi nấm nội sinh *P. crustosum* WQF11 với công thức thực nghiệm $C_{47}H_{51}NO_{14}$ và trọng lượng phân tử là 853,9. Phân tích sắc ký đồ của paclitaxel chuẩn cho ra 2 pic $(M + H)^+$ và $(M + Na)^+$ ở 851,18m/z và 876,48m/z, tương ứng (Hình 4E). Mẫu paclitaxel thô cũng tạo ra 2 pic $(M + H)^+$ và $(M + Na)^+$ ở 851,39m/z và 876,39m/z, tương ứng (Hình 4F), với các biến thể nhỏ và xác nhận sự hiện diện của paclitaxel trong mẫu cao chiết thô thử nghiệm. Những kết quả này cho thấy rằng chủng vi nấm nội sinh *P. crustosum* WQF11 đã sinh tổng hợp paclitaxel với hàm lượng cao.

Hiệu quả đạt được của Giải pháp hữu ích

Chủng vi nấm nội sinh *P. crustosum* WQF11 là chủng được phân lập từ cây được liệu tại Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất paclitaxel, chất này có tác dụng trong việc điều trị bệnh ung thư, đặc biệt là bệnh ung thư vú và ung thư phổi ở người - đây là căn bệnh ung thư gây tử vong hàng đầu ở mọi lứa tuổi từ người già tới trẻ nhỏ.

Tính đến nay, chưa có một công bố nào về vi nấm nội sinh trên cây bạch tùng phân bố tại Việt Nam. Chủng vi nấm nội sinh *P. crustosum* WQF11 là một trong những chủng đầu tiên được nhóm nghiên cứu phân lập tại Việt Nam, chủng này được phân lập từ thân cây bạch tùng (*Cephalotaxus mannii* Hook.f.) phân bố tại Huyện Quản Bạ, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam và là chủng gốc thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất paclitaxel cao, đạt 86,9mg/L dịch lên men.

Ung thư là một nhóm bệnh có thể ảnh hưởng đến các cơ quan khác nhau của cơ thể, và được đặc trưng bởi sự phát triển không kiểm soát của các tế bào bất thường và xâm lấn vào mô bình thường. Tế bào ung thư cũng có thể lây lan sang các bộ phận khác của cơ thể và tạo ra các khối u mới. Nếu sự lây lan của các tế bào trở nên mất kiểm soát, nó có thể dẫn đến tử vong. Năm 2007, người ta ước tính rằng bệnh ung thư đã giết chết 7,6 triệu người trên thế giới. Số người chết hàng năm do ung thư dự kiến sẽ tăng lên 17,5 triệu người vào năm 2050, chỉ đơn giản là do sự gia tăng và già hóa dân số được dự báo, cũng như những ảnh hưởng của lối sống và môi trường, bao gồm hút thuốc và tiếp xúc với các tác nhân gây ung thư (Revindra và cs., 2011). Do vậy, việc sản xuất một loại thuốc tự nhiên điều trị ung thư nguồn gốc thực vật không ngừng đạt đến mức mong muốn. Hơn nữa, nó được tạo ra ở giai đoạn phát triển cụ thể hoặc trong điều kiện môi trường cụ thể, khan hiếm hoặc có sẵn chất dinh dưỡng. Ngoài ra, các cây có thể phát triển rất chậm trong vài năm để có được giai đoạn tăng trưởng phù hợp để tích lũy và khai thác sản phẩm. Trường hợp tương tự với paclitaxel, nguồn cung từ vỏ cây bị hạn chế (0,01-0,05%) (Wheeler và cs., 1992) vì loại cây này không được tìm thấy nhiều trong tự nhiên (Cragg và cs., 1993), phát triển chậm trong vài thập kỷ mới tăng một vài inch đường kính (Flores và Sgrignoli, 1991), và chứa một lượng paclitaxel (0,01% trọng

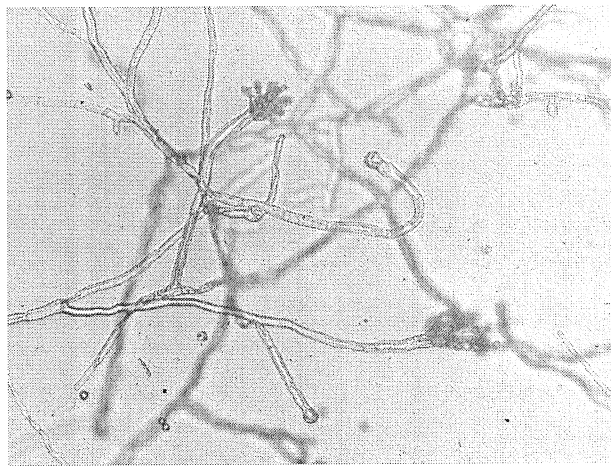
lượng khô ở vỏ cây) (Banerjee và cs., 1996). Do đó, việc cung cấp chất chống ung thư mạnh này đã sớm trở thành vấn đề khan hiếm. Nguồn cung hạn chế, cũng như các tác động sinh thái dẫn đến nguy cơ tuyệt chủng của thực vật, đã thúc đẩy việc tìm kiếm để phát triển của nguồn thay thế và chiến lược tiềm năng để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của thị trường và làm cho thuốc trở nên phổ biến rộng rãi hơn. Khi những nghiên cứu đầu tiên phát hiện vi nấm nội sinh *Taxomyces andreanae* từ cây thủy tùng *Taxus* spp. sinh tổng hợp paclitaxel đã mở phương án mới cho sản xuất paclitaxel công nghiệp hiệu quả, chi phí giảm, khả thi trong thực tiễn sản xuất. Chính vì vậy, chủng vi nấm nội sinh *P. crustosum* WQF11 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 paclitaxel quy mô lớn cho hiệu suất paclitaxel cao. Chủng chỉ cần nuôi trong môi trường với các nguyên liệu đơn giản, rẻ tiền, quy trình lên men sản xuất paclitaxel đơn giản, không cần máy móc thiết bị phức tạp và chỉ trong một thời gian ngắn (từ 15-20 ngày) đã thu được hàm lượng paclitaxel một cách nhanh hơn, đơn giản hơn, hiệu quả hơn có thể ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất hoạt chất paclitaxel quy mô lớn phục vụ hỗ trợ điều trị các bệnh ung thư, đặc biệt là bệnh ung thư vú và ung thư phổi ở người 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

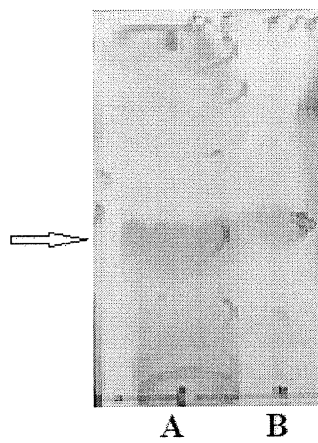
1. Chủng vi nấm nội sinh *Penicillium crustosum* WQF11 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân của cây bạch tùng (*Cephalotaxus mannii* Hook.f.) phân bố tại Huyện Quản Bạ, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam, trong đó chủng WQF11 có khuẩn lạc màu trắng đến xanh xám viền trắng, sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh, tận cùng là các bào tử trần đỉnh dạng cầu, bào tử nhẵn, có hình elip, kích thước 2-3 x 1,5-2,5µm, khi già có hình cầu, cuống sinh bào tử nhẵn, có vách ngăn, phân nhánh điển hình kích thước đạt đến 100µm, mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 551bp đã được đăng ký trên GenBank mã số OM758096 và có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất paclitaxel với hàm lượng đạt 86,9mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-S.



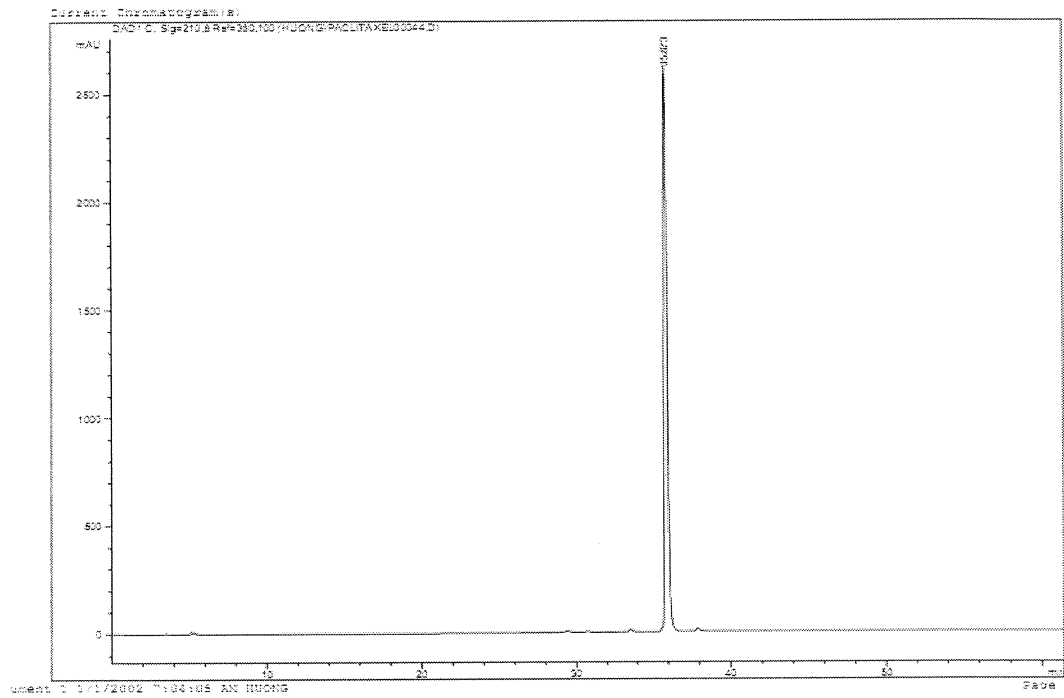
Hình 1



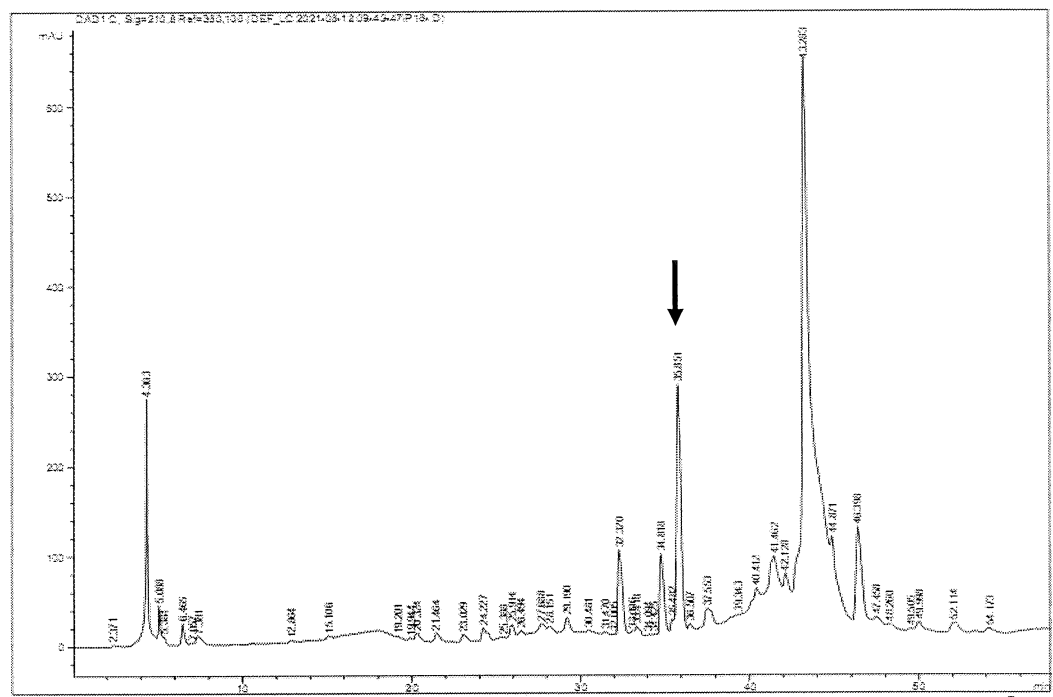
Hình 2



Hình 3

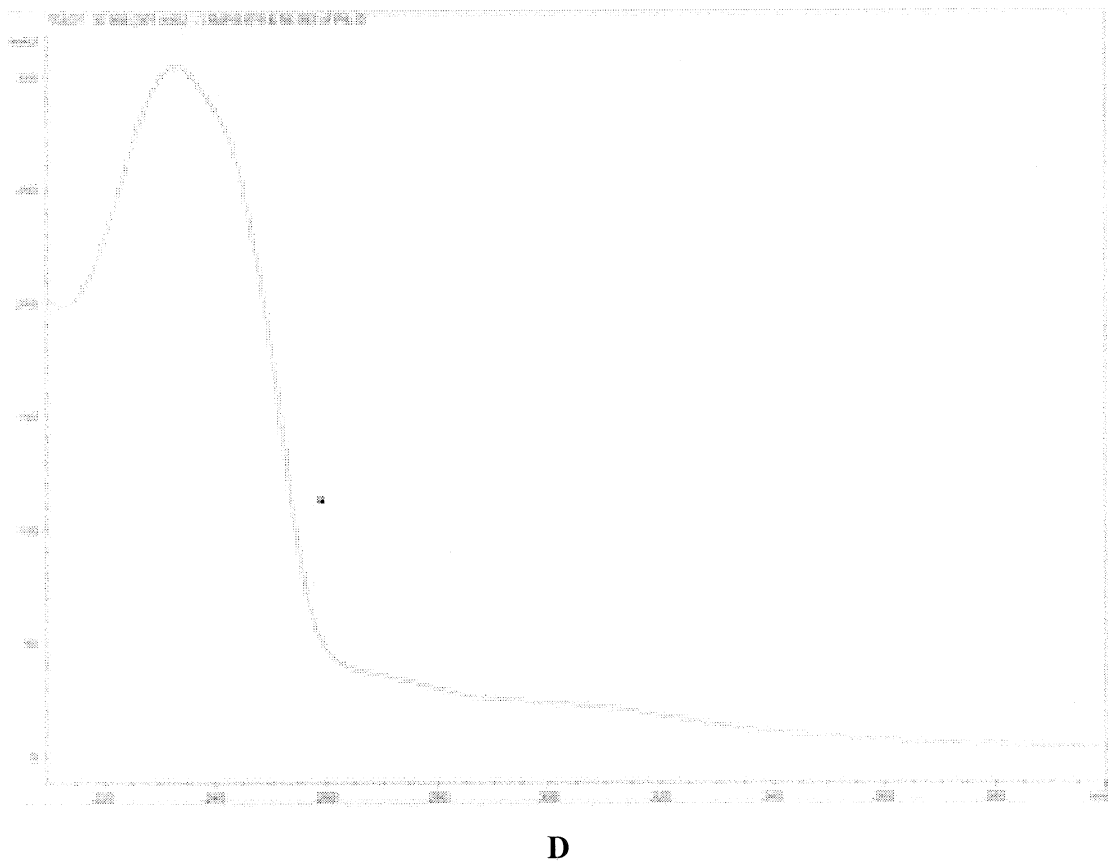
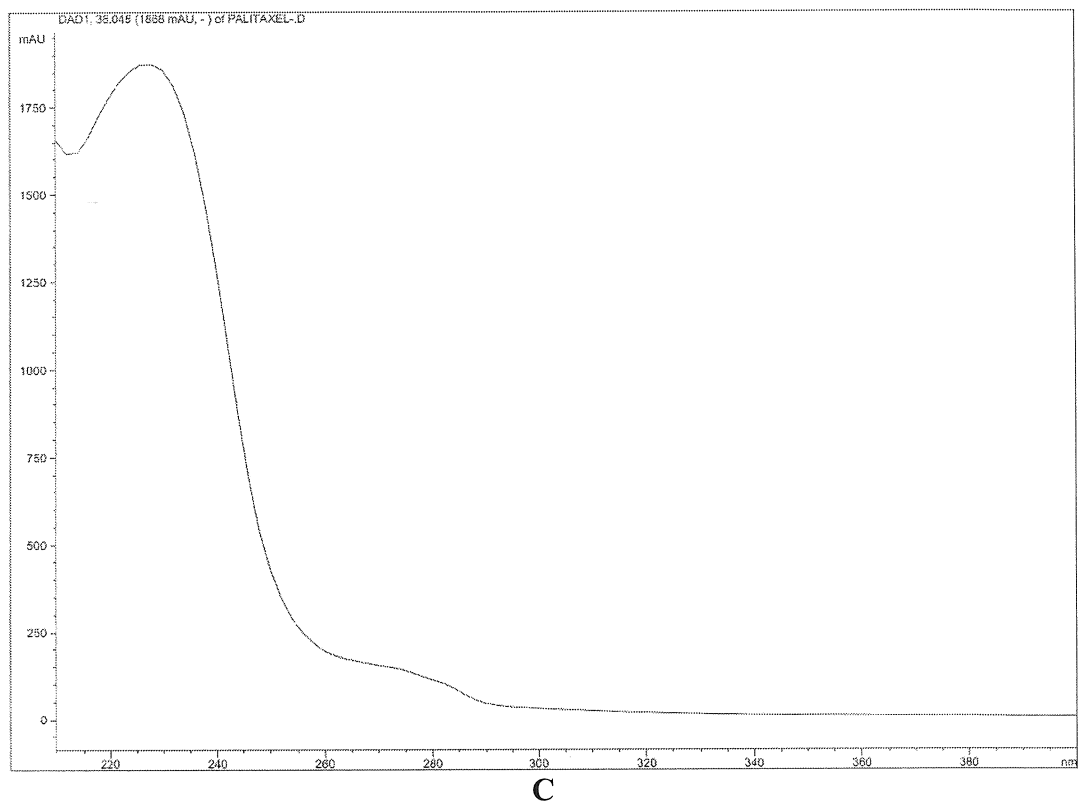


A

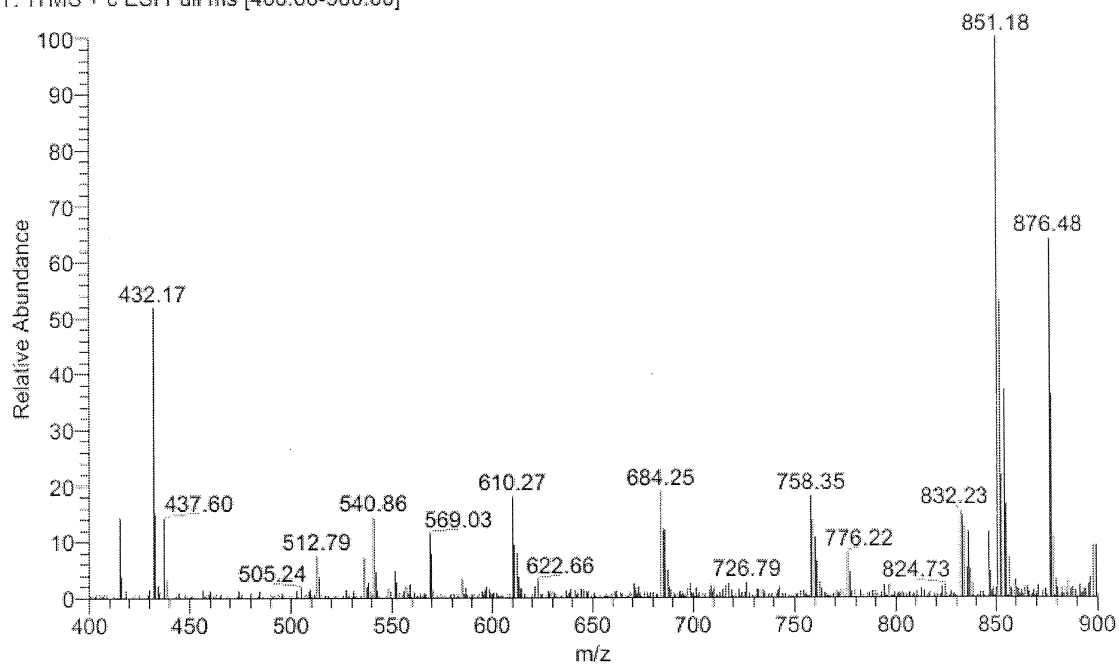


B

3666

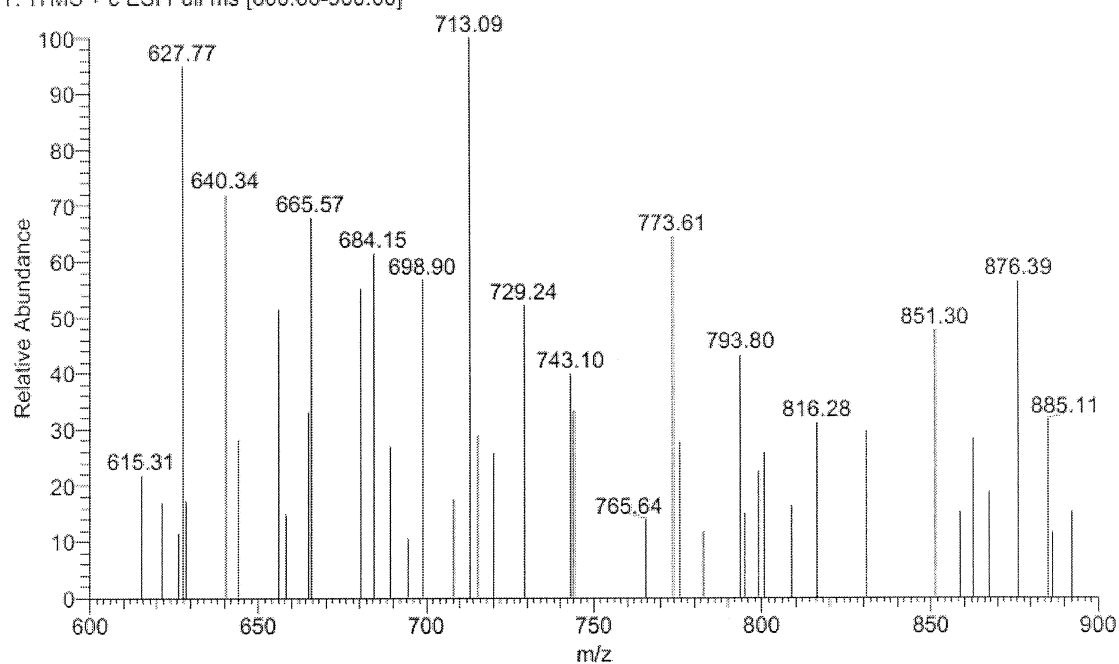


Pa_201126231506 #344-445 RT: 0.78-1.01 AV: 102 NL: 3.24E2
T: ITMS + c ESI Full ms [400.00-900.00]



E

Linh_210524194553 #831 RT: 1.64 AV: 1 NL: 2.60E2
T: ITMS + c ESI Full ms [600.00-900.00]



F

Hình 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> CHỦNG VI NẤM NỘI SINH *PENICILLIUM CRUSTOSUM* WQF11 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT PACLITAXEL

<160> 1

<210> SEQ ID NO:1

<211> 551

<212> ADN

<213> *Penicillium crustosum* WQF11

<400>

```

1  AATGAGGCCT  CTGGGTCCAA  CCTCCCACCC  GTGTTTATTT  TACCTTGTTG  CTCGGCGGGG
61  CCCGCCCTAA  CTGGCCGCCG  GGGGGCTTAC  GCCCCCGGGC  CCGCGCCCGC  CGAAGACACC
121 CTCGAACTCT  GTCTGAAGAT  TGAAGTCTGA  GTGAAAATAT  AAATTATTTA  AAACTTTCAA
181 CAACGGATCT  CTTGGTTCCG  GCATCGATGA  AGAACGCAGC  GAAATGCGAT  ACGTAATGTG
241 AATTGCAAA  TCAGTGAATC  ATCGAGTCTT  TGAACGCACA  TTGCGCCCCC  TGGTATTCCG
301 GGGGGCATGC  CTGTCCGAGC  GTCATTGCTG  CCCTCAAGCC  CGGCTTGTGT  GTGGGGCCCC
361 GTCCCCCGAT  CTCCGGGGGA  CGGGCCCGAA  AGGCAGCGGC  GGCACCGCGT  CCGGTCCTCG
421 AGCGTATGGG  GCTTTGTCAC  CCGCTCTGTA  GGCCGGGCCG  GCGCTTGCCG  ATCAACCCAA
481 ATTTTATCC  AGGTTGACCT  CGGATCAGGT  AGGGATACCC  GCTGAACTTA  AGCATATCAA
541 TAAGCGGAGG  A

```