



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

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

(11)



1-0042313

(51)^{2021.01} C12N 1/00

(13) B

(21) 1-2022-04719

(22) 27/07/2022

(45) 27/01/2025 442

(43) 25/10/2022 415

(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

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

(54) CHỦNG VI NẤM NỘI SINH FUSARIUM FOETENS AQF6 THUẦN KHIẾT VỀ
MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CÁC HOẠT CHẤT CHỐNG
OXY HÓA

(21) 1-2022-04719

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi nấm *Fusarium foetens* AQF6 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ rễ của cây dẻ tùng Vân Nam (*Amentotaxus yunnanensis* H.L.Li) phân bố tại Hà Giang, Việt Nam có hoạt tính chống oxy hóa cao loại bỏ gốc tự do DPPH, hydroxyl lần lượt với tỷ lệ phần trăm ức chế là 95,75%, 85,66% ở nồng độ 800µg/ml, có hoạt tính kháng 6/6 chủng vi sinh vật khiếm định thử nghiệm (*Escherichia coli* ATCC 11105, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus epidermidis* kháng methicillin ATCC 35984, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* kháng methicillin ATCC 33591, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 500bp đã được đăng ký trên ngân hàng GenBank NCBI (mã số OP020702). Cao chiết thô các chất có hoạt tính sinh học của chủng vi nấm nội sinh AQF6 được tách chiết, phân lập, tinh sạch và xác định được cấu trúc hóa học của 13 hợp chất sạch. Hoạt chất sinh học có tác dụng trong việc điều trị bệnh nhiễm khuẩn và hỗ trợ điều trị bệnh ung thư, rối loạn tim mạch và tiểu đường.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh vật học và công nghệ sinh học ứng dụng trong y dược liên quan đến chủng vi nấm nội sinh trên cây dẻ tùng Vân Nam có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất chống oxy cao. Cụ thể, sáng chế đề xuất chủng vi nấm nội sinh *Fusarium foetens* AQF6 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ rễ của cây dẻ tùng Vân Nam (*Amentotaxus yunnanensis* H.L.Li) phân bố tại Huyện Quản Bạ, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất chống oxy hóa và kháng khuẩn cao, các chất này có tác dụng trong điều trị bệnh nhiễm khuẩn và hỗ trợ điều trị bệnh ung thư, rối loạn tim mạch và tiểu đường.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ngày nay, xã hội phát triển kéo theo sự phát sinh nhiều yếu tố mới như: môi trường ô nhiễm, chất phụ gia trong thức ăn, các chất có hại trong mỹ phẩm, thuốc lá, rượu bia, thức ăn nhanh hay căng thẳng thần kinh (stress)... Đây là những tác nhân chính gây ra gốc tự do. Các gốc tự do hay nói chính xác hơn là các chất hoạt động chứa oxy (reactive oxygen species, ROS) và nitơ (reactive nitrogen species, RNS), là các dẫn xuất dạng khử của oxy và nitơ phân tử gây ra nhiều bệnh nguy hiểm như ung thư, bệnh tim mạch, đục thủy tinh thể, hen suyễn, viêm gan, tổn thương gan và các bệnh suy giảm miễn dịch (Lee và cs., 2004).

Áp lực oxy hóa được biết đến là sự mất cân bằng của các loại oxy phản ứng (ROS) và có thể được định nghĩa là trạng thái khi các loại oxy phản ứng quá mức, dẫn đến những thay đổi sinh lý bệnh tương tự như hội chứng thích ứng chung của các tác nhân gây căng thẳng tế bào (Sies, 2015; 2017). Nguyên nhân trực tiếp của áp lực oxy hóa là sự mất cân bằng giữa các gốc tự do và chất chống oxy hóa, trong đó ROS được tạo ra bởi một số quá trình nội sinh hoặc ngoại sinh và các tác động tiêu cực của chúng được vô hiệu hóa bởi các biện pháp phòng chống oxy hóa (Pizzino và cs., 2017). Các gốc tự do phổ biến được sử dụng trong một số lượng lớn các nghiên cứu là 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), gốc hydroxyl và superoxit. Như vậy, ROS bao gồm cả gốc tự do như hydro peroxit và oxy không gốc tự do như, anion superoxit, oxy đơn và gốc hydroxyl là các phân tử có phản ứng cao, có thể được giảm bớt thông qua bổ sung chất chống oxy hóa (Griffiths và cs., 2016). Chất chống oxy hóa là các hợp chất bảo vệ các tế bào do các gốc tự do gây ra. Các phản ứng qua trung gian gốc tự do có liên quan đến các bệnh như ung thư, bệnh tiểu đường, bệnh Alzheimer, v.v. (Maloney và cs., 2006). Do thực tế là chỉ có một số chất chống oxy hóa được chấp thuận cho các ứng dụng lâm sàng nên cần phải tìm kiếm các chất chống oxy hóa mới và hiệu quả. Cho đến nay, tác dụng của các chất chống oxy hóa hữu cơ có trong tự nhiên đối với hóa trị liệu đã được thử nghiệm thông qua một số nghiên cứu *in vitro* và *in vivo*. Quercetin, một trong những flavonoid dồi dào nhất có trong các loại rau như hành tây và bông cải xanh, đã được chứng minh là có khả năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư buồng trứng di căn ở

người (Teekaraman và cs., 2019). Một polyphenol tự nhiên được gọi là resveratrol đã được chứng minh để ngăn ngừa suy giảm nhận thức do hóa trị liệu thông qua các thí nghiệm trên chuột (Shi và cs., 2018). Theo báo cáo, ROS được tạo ra trong quá trình điều trị bằng thuốc chống ung thư không chỉ gây đột biến mà còn góp phần hình thành các khối u ác tính thứ cấp - một tác dụng phụ của hóa trị, trong khi một số chất chống oxy hóa tự nhiên như vitamin C và E có thể giảm thiểu nguy cơ này (Pedersen và cs., 1991; Guyton và Kensler, 1993; Conklin, 2009). Mặc dù, một số chất chống oxy hóa học tổng hợp đã được bổ sung rộng rãi trong thực phẩm cho con người do tính chất chống oxy hóa cao, chúng có thể tăng cường các tác dụng phụ liên quan đến sức khỏe như sinh ung thư do butylat hydroxylanisol (BHA) hoặc tổn thương phổi bởi butylat hydroxytoluen (BHT), khiến chúng ít thích hợp hơn trong việc điều trị bằng hóa chất điều trị ung thư và các phương pháp điều trị bệnh liên quan khác (Ito và cs., 1986; Hocman, 1988). Do đó, sự chú ý dần dần được chuyển hướng sang các chất chống oxy hóa tự nhiên từ các nguồn như vi sinh vật có thể khắc phục sự thất bại của hóa trị cũng như ngăn ngừa nguy cơ ung thư.

Vi nấm nội sinh đa dạng ở trong thực vật, đại diện cho nguồn tài nguyên sinh học dồi dào về hợp chất tự nhiên có tiềm năng khai thác trong lĩnh vực dược phẩm và nông nghiệp (Schulz và cs., 2002). Chúng cư trú bên trong vật chủ thực vật mà không gây ra các triệu chứng bệnh rõ ràng trong khi sự tương tác trao đổi chất liên tục giữa chúng và vật chủ (Petrini, 1991; Wilson, 1995). Sự tương tác của vi nấm nội sinh với cây chủ là một trong những cách tiếp cận môi trường tốt nhất trong việc sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học. Đặc biệt, có một số loài vi nấm nội sinh có thể tự sinh tổng hợp các chất trao đổi chất có nguồn gốc từ cây chủ. Theo báo cáo, vi nấm nội sinh *Penicillium griseofulvum* có thể tổng hợp huperzine A, một dược chất tiên phong trong việc giảm áp lực oxy hóa và điều trị bệnh Alzheimer, có nguồn gốc từ cây thuốc thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) (Wang và cs., 2011). Nhiều chất chống oxy hóa và chống ung thư khác cũng đã được chứng minh là do vi nấm nội sinh tạo ra (Zhao và cs., 2011). Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về đa dạng vi nấm nội sinh trên cây dược liệu (Huang và cs., 2008). Samanthi và cộng sự (2015) đã phân lập được hai hợp chất polyketit mới từ chủng vi nấm *P. citrinum* US/PA/06 gồm 5'-axetyl-3,5,7'-trimethoxy-3'H-spiro[cyclohexa [2,4] diene-1,1'-isobenzofuran] -3',6-dion và axit 4-axetyl-2'-hydroxy-3',5',6-trimethoxy biphenyl-2-carboxylic thể hiện hoạt tính chống oxy hóa với giá trị IC_{50} lần lượt là $159,7 \pm 22,3$ và $68,6 \pm 4,3 \mu\text{g/mL}$. Chủng vi nấm *Cladosporium cladosporioides* KT384175 được phân lập từ rong (*Sargassum wightii*) cũng thể hiện khả năng chống oxy hóa cao và đang được nghiên cứu phân tách các hoạt chất sinh học (Hulikere và cs., 2016). Hợp chất variecolortin A được thu nhận từ chủng vi nấm *Eurotium* sp. SCSIO F452 thể hiện hoạt tính bắt gốc tự do DPPH với trị IC_{50} $58,4 \mu\text{M}$ (Zhong và cs., 2018). Bên cạnh đó, một dẫn xuất chromon mới, arthon C từ chủng vi nấm biển sâu *Arthrinium* sp. UJNMF0008 cũng có khả năng bắt gốc tự do DPPH và ABTS với giá trị IC_{50} lần lượt $16,9$ và $18,0 \mu\text{M}$ (Bao và cs., 1982). Các báo cáo cũng cho thấy, nhiều hợp chất chống oxy hóa đã được thu nhận từ các chủng vi nấm biển nội sinh. Cụ thể, chủng vi nấm

A. wentii EN-48 nội sinh ở rong biển (*Sargassum* spp.) có khả năng sinh tổng hợp 8 hợp chất thể hiện khả năng bắt gốc tự do DPPH với giá trị IC_{50} từ 5,2 – 99,4 μ g/mL gồm một dẫn xuất anthraquinon mới (wentiquinon C), một dẫn xuất benzamit mới (methyl 4-(3,4-dihydroxybenzamit) butanoat) cùng với 6 hợp chất phenolic (Li và cs., 2014). Bên cạnh đó, các hợp chất kháng khuẩn, cụ thể là fusarithioamide A đã được xác định trong chiết xuất etyl axetate của vi nấm nội sinh *Fusarium chlamydosporium* (Ibrahim và cs., 2016). Nghiên cứu sâu hơn của chủng vi nấm *Fusarium tricinctum* đã phân lập được 3 hợp chất kháng khuẩn bao gồm fusarielin B, enniatin B và fusartricin (Zhang và cs., 2015).

Ở Việt Nam, dẻ tùng Vân Nam (*Amentotaxus yunnanensis* H.L.Li) thuộc chi Dẻ tùng (*Amentotaxus* Pilg.) thuộc họ Thông đỏ (Taxaceae) có 6 loài trên thế giới phân bố chủ yếu ở Bắc Ấn Độ đến Đài Loan và Trung Quốc (Võ Văn Chi, 2003). Cây dẻ tùng Vân Nam phân bố ở Lào Cai, Hà Giang, Yên Bái, Quảng Ninh. Theo Sách đỏ của IUCN về các loài bị đe dọa, dẻ tùng Vân Nam đã được phân loại là loài Sẽ nguy cấp (VU). Bên cạnh đó, loài hạt trần này cũng đã được liệt vào danh sách các loài thực vật có quần thể cực nhỏ (PSESE) cần được cứu hộ khẩn cấp bởi chính quyền địa phương Vân Nam (Ma và cs., 2013). Đã có một số công trình nghiên cứu trên thế giới về thành phần hóa học của loài dẻ tùng Vân Nam. Theo Li và cộng sự (2003) thì các hợp chất chính được phân lập từ loài này là amentoflavin biflavonoit và abietan diterpenoit torreyayunmin. Theo nghiên cứu của Trần Huy Thái và cộng sự (2020) hàm lượng tinh dầu từ lá loài dẻ tùng Vân Nam đạt 0,01% (theo nguyên liệu khô). Bằng phương pháp sắc ký khối phổ (GC/MS), 50 thành phần hóa học của tinh dầu từ lá loài dẻ tùng Vân Nam chiếm 88,96% tổng lượng tinh dầu đã được xác định. Thành phần chính của tinh dầu gồm: α -pinen (21,91%), kaur-16-en (13,03%), α -calacoren (9,42%), δ -cadinen (6,23%) và β -caryophyllen (4,9%). Đây là dẫn liệu mới về thành phần hóa học của tinh dầu loài dẻ tùng Vân Nam ở 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 dẻ tùng Vân Nam (*Amentotaxus yunnanensis* H.L.Li) có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất chống oxy hóa, kháng khuẩn đến nay chưa có công bố nào.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chủng vi nấm nội sinh *Fusarium foetens* AQF6 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ rễ của cây dẻ tùng Vân Nam (*Amentotaxus yunnanensis* H.L.Li) phân bố tại Huyện Quản Bạ, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam (23°8'16" N 105°0'44" E) có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất chống oxy hóa và kháng khuẩn cao, các chất này có tác dụng trong điều trị bệnh nhiễm khuẩn và hỗ trợ điều trị bệnh ung thư, rối loạn tim mạch và tiểu đường.

Chủng vi nấm nội sinh AQF6 thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 500bp và được đăng ký trên ngân hàng GenBank (mã số OP020702). Cao chiết thô các chất có hoạt tính sinh học thô của chủng AQF6 có hoạt tính chống oxy hóa cao loại bỏ gốc tự do DPPH, hydroxyl lần lượt với tỷ lệ phần trăm ức chế là 95,75%, 85,66% ở nồng độ 800 μ g/ml và có hoạt tính kháng 6/6 chủng vi sinh vật kiểm định

thử nghiệm (*Escherichia coli* ATCC 11105, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus epidermidis* kháng methicillin ATCC 35984, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* kháng methicillin ATCC 33591, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212). Cao chiết thô các chất có hoạt tính sinh học của chủng vi nấm nội sinh AQF6 được tách chiết, phân lập, tinh sạch và xác định được cấu trúc hóa học của 13 hợp chất sạch (cyclo-pro-val (1), axit 2-hydroxybenzeneaxetic (2), *p*-hydroxybenzaldehyt (3), 2- (4-hydroxyphenyl) etanol (4), axit *p*-hydroxybenzeneaxetic (5), axit phenylaxetic (6), axit salixylic (7), 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin (8), daidzein (9), 2-axetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinon (10), isoformononetin (11), β -2'-deoxyadenosin (12), β -adenosin (13)). Ở nồng độ 800 μ g/ml hoạt tính chống oxy hóa DPPH của hoạt chất cyclo-pro-val, 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin, 2-axetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinon đạt trên 50% và hoạt tính chống oxy hóa hydroxyl của hoạt chất axit *p*-hydroxybenzeneaxetic, 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin và β -adenosin đạt trên 90%. Hoạt động chống oxy hóa của hầu hết các hoạt chất đối với superoxit mạnh đạt trên 72%.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng vi nấm nội sinh AQF6 trên môi trường PDA sau 5 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc ban đầu có màu trắng hơi ngả hồng, dạng sợi bông xốp. Mặt sau khuẩn lạc có màu hồng nhạt, khuẩn lạc tròn.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái bào tử của chủng vi nấm nội sinh AQF6 chụp trên kính hiển vi quang học (độ phóng đại 400 lần). Cuống sinh bào tử đơn độc hoặc phân nhánh, phần đỉnh sinh ra nhiều bào tử dạng thể bình, bào tử trần hình bầu dục.

Hình 3 là sơ đồ phân lập các hợp chất từ phân đoạn D, E của cao chiết của chủng AQF6, các hợp chất sạch phân lập được định tên theo ký hiệu trên sơ đồ lần lượt là cyclo-pro-val (1), axit 2-hydroxybenzeneaxetic (2), *p*-hydroxybenzaldehyt (3), 2-(4-hydroxyphenyl) etanol (4), axit *p*-hydroxybenzeneaxetic (5), axit phenylaxetic (6), axit salixylic (7), 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin (8), daidzein (9), 2-axetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinon (10), isoformononetin (11), β -2'-deoxyadenosin (12) và β -adenosin (13).

Hình 3 là hình ảnh thể hiện phổ ^1H NMR (A) và ^{13}C NMR (B) của hợp chất cyclo-pro-val (1).

Hình 4 là hình ảnh thể hiện phổ ^1H NMR (A) và ^{13}C NMR (B) của hợp chất axit 2-hydroxybenzeneaxetic (2).

Hình 5 là hình ảnh thể hiện phổ ^1H NMR (A) và ^{13}C NMR (B) của hợp chất *p*-hydroxybenzaldehyt (3).

Hình 6 là hình ảnh thể hiện phổ ^1H NMR (A) và ^{13}C NMR (B) của hợp chất 2-(4-hydroxyphenyl) etanol (4).

Hình 7 là hình ảnh thể hiện phổ ^1H NMR (A) và ^{13}C NMR (B) của hợp chất axit *p*-hydroxybenzeneaxetic (5).

Hình 8 là hình ảnh thể hiện phổ ^1H NMR (A) và ^{13}C NMR (B) của hợp chất axit phenylaxetic (6).

Hình 9 là hình ảnh thể hiện phổ ^1H NMR (A) và ^{13}C NMR (B) của hợp chất axit salixylic (7).

Hình 10 là hình ảnh thể hiện phổ ^1H NMR (A) và ^{13}C NMR (B) của hợp chất 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin (8).

Hình 11 là hình ảnh thể hiện phổ ^1H NMR (A) và ^{13}C NMR (B) của hợp chất daidzein (9).

Hình 12 là hình ảnh thể hiện phổ ^1H NMR (A) và ^{13}C NMR (B) của hợp chất 2-acetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinon (10).

Hình 13 là hình ảnh thể hiện phổ ^1H NMR (A) và ^{13}C NMR (B) của hợp chất isoformononetin (11).

Hình 14 là hình ảnh thể hiện phổ ^1H NMR (A) và ^{13}C NMR (B) của hợp chất β -2'-deoxyadenosin (12).

Hình 15 là hình ảnh thể hiện phổ ^1H NMR (A) và ^{13}C NMR (B) của hợp chất β -adenosin (13).

Hình 16 là cấu trúc hóa học của hợp chất sạch 1-13 từ dịch lên men của chủng *F. foetens* AQF6.

Hình 17 là hình ảnh thể hiện hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết từ chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6. Khả năng khử gốc gốc hydroxyl tự do, DPPH và khả năng đánh bắt gốc superoxit.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ rễ của cây dẻ tùng Vân Nam (*Amentotaxus yunnanensis* H.L.Li) phân bố tại Huyện Quản Bạ, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất chống oxy hóa, kháng khuẩn cao, các chất này có tác dụng trong điều trị bệnh nhiễm khuẩn và hỗ trợ điều trị bệnh ung thư, rối loạn tim mạch và tiểu đường.

Việc phân lập chủng thuần khiết về mặt sinh học từ rễ của dẻ tùng Vân Nam (*Amentotaxus yunnanensis* H.L.Li) phân bố tại Huyện Quản Bạ, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam được thực hiện theo phương pháp của Kumar và cộng sự (2019) có cải tiến như mô tả sau đây. Mẫu rễ cây dẻ tùng Vân Nam (*Amentotaxus yunnanensis* H.L.Li) phân bố tại 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 rễ cây được cắt thành từng lát nhỏ (0,5x0,5x0,5cm), đặt các lát nhỏ lên đĩa Petri chứa môi trường PDA (Môi trường PDA có thành phần môi trường (g/l) như sau: dịch chiết khoai tây 200, dextroza 20, thạch 20 và 1 lít nước cất) có độ pH = 6,5-7,0, 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 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 (QIAamp ADN 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 được xác định trình tự nucleotit bằng máy giải trình tự 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 dịch lên men tiếp tục được tách chiết bằng dung môi hữu cơ, phân lập thu được các chất sạch và thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính kháng khuẩn của các hợp chất phân lập được. Chủng nấm thử nghiệm được nuôi cấy trong hệ thống lên men quy mô 70 lít môi trường RM (Môi trường RM có thành phần môi trường (g/l) như sau: dịch chiết khoai tây 200, NH₄SO₄ 3,0, MgSO₄ 0,5, KH₂PO₄ 2, glucoza 40, pepton 0,5, cao nấm men 0,8, phenylalanin 0,01 và 1 lít nước cất, giá trị pH 5,0) ở nhiệt độ 28°C, khuấy 200 vòng/phút trong 10 ngày. Dịch lên men mang đi ly tâm với tốc độ 4000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C trên máy ly tâm (Sorvall Evolution RC) thu được dịch lên men và sinh khối ướt. Các chất có hoạt tính sinh học từ dịch lên men và sinh khối ướt được tách chiết theo phương pháp của Miche'le và cộng sự (2020) có cải tiến như mô tả sau đây. Dịch lên men được tách chiết 3 lần bằng dung môi hữu cơ etyl axetat theo tỷ lệ 1:3 (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 tiếp tục cô quay ở 60°C bằng thiết bị cô quay (Buchi R124, Thụy Sĩ) để loại bỏ dung môi. Sinh khối ướt được sấy khô ở nhiệt độ 40 – 50°C sau đó được xay nhuyễn và chiết 2 lần với dung môi metanol theo tỷ lệ (3 thể tích dung môi : 1 khối lượng sinh khối khô). Dịch chiết sinh khối nấm tiếp tục cô quay ở 50°C bằng thiết bị cô quay (Buchi R124, Thụy Sĩ) để loại bỏ dung môi. Sau đó dịch chiết chất có hoạt tính sinh học toàn phần được làm khô và cân đến khối lượng không đổi (cao chiết). Cao chiết hoạt chất sinh học thô được bảo quản ở 4°C cho các thử nghiệm phân lập, tách chiết chất sạch có hoạt tính chống oxy hóa và xác định hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết.

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 *Fusarium* thuần khiết về mặt sinh học. Chủng vi nấm này có đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 500bp và có độ tương

đồng $\geq 99\%$ và có độ dài đoạn so sánh $\geq 98\%$ so với các chủng *Fusarium* được đối chiếu trên hàng dữ liệu gen NCBI và được định danh là *Fusarium foetens* AQF6 (mã số GenBank OP020702).

Chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6 thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất có hoạt tính chống oxy hóa cao loại bỏ gốc tự do DPPH, hydroxyl lần lượt với tỷ lệ phần trăm ức chế là 95,75%, 85,66% ở nồng độ 800 μ g/ml và có hoạt tính kháng 6/6 chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm. Cao chiết thô các chất có hoạt tính sinh học của chủng vi nấm nội sinh AQF6 được tách chiết, phân lập, tinh sạch và xác định được cấu trúc hóa học của 13 hợp chất sạch (cyclo-pro-val (1), axit 2-hydroxybenzeneacetic (2), *p*-hydroxybenzaldehyt (3), 2- (4-hydroxyphenyl) etanol (4), axit *p*-hydroxybenzenacetic (5), axit phenylacetic (6), axit salixylic (7), 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin (8), daidzein (9), 2-axetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinon (10), isoformononetin (11), β -2'-deoxyadenosin (12), β -adenosin (13)). Ở nồng độ 800 μ g/ml hoạt tính chống oxy hóa DPPH của hoạt chất cyclo-pro-val, 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin, 2-axetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinon đạt trên 50% và hoạt tính chống oxy hóa hydroxyl của hoạt chất axit *p*-hydroxybenzeneacetic, 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin và β -adenosin đạt trên 90%. Hoạt động chống oxy hóa của hầu hết các hoạt chất đối với superoxide rất mạnh đạt trên 72%. Tổng 13 hợp chất sạch có hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn cao, các chất này có tác dụng trong điều trị bệnh nhiễm khuẩn và hỗ trợ điều trị ung thư và giúp bảo vệ tế bào khỏi các gốc tự do tạo trong các quá trình oxy hóa nên ngăn cản hay là chậm quá trình này. 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 chống oxy hóa và chất kháng khuẩn quy mô lớn đơn giản mà lại cho hiệu suất chống oxy hóa và kháng khuẩn cao, phục vụ điều trị bệnh nhiễm khuẩn hỗ trợ điều trị các bệnh ung thư và làm sạch các gốc tự do có nguồn từ tự nhiên, mở ra hướng đi mới có hiệu quả trong việc điều trị bệnh nhiễm khuẩn và hỗ trợ điều trị bệnh ung thư, rối loạn tim mạch và tiểu đường 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 *F. foetens* AQF6 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 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

Ví dụ 1: Phân lập chủng vi nấm nội sinh có khả năng sinh tổng hợp chất các chất chống oxy hóa và kháng khuẩn

Mẫu rễ của cây dẻ tùng Vân Nam (*Amentotaxus yunnanensis* H.L.Li) phân bố tại Huyện Quản Bạ, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam được rửa sạch bằng nước, khử trùng lần lượt bằng etanol 70% trong 30 giây, sau đó khử trùng bề mặt bằng NaOCl 3,5% trong 2 phút và etanol 70%

trong khoảng thời gian 2-5 giây; 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 (0,5x0,5x0,5cm) và được đặt lên đĩa Petri chứa môi trường PDA 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 vi nấm nội sinh. Cây chuyển các sợi nấm của chủng phân lập từ các đĩa ban đầu sang đĩa thạch PDA-G mới, 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 AQF6 có thời gian sinh trưởng 5-7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA. Nuôi cấy chủng AQF6 thuần trên môi trường PDA 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 AQF6 đến chi.

Chủng vi nấm nội sinh AQF6 được nuôi cấy phát triển trên môi trường PDA 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 AQF6 trên môi trường PDA sau 5 ngày nuôi cấy được thể hiện trên hình 1. Khuẩn lạc của chủng vi nấm nội sinh AQF6 ban đầu có màu trắng hơi ngả hồng, dạng sợi bông xốp. Mặt sau khuẩn lạc có màu hồng nhạt, khuẩn lạc tròn. 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 dẩy 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 AQF6 được thể hiện trên hình 2, trong đó Cuống sinh bào tử đơn độc hoặc phân nhánh, phần đỉnh sinh ra nhiều bào tử dạng thể bình, bào tử trần hình bầu dục.

Kết quả nhận dạng được chủng vi nấm nội sinh AQF6 thuộc chi *Fusarium*.

ADN của chủng vi nấm nội sinh AQF6 được tách chiết bằng kit tách chiết ADN (QIAamp ADN mini kit (Qiagen, Mỹ)). Kết quả kiểm tra trên máy đo quang phổ cho thấy ADN tổng số tách chiết được có độ tinh sạch cao ($A_{260}/A_{280} = 1,96$) và được sử dụng làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR.

Vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm nội sinh AQF6 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-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 Roopa và cộng sự (2015). Thể tích phản ứng PCR (25µl) bao gồm 100ng ADN hệ gen, 25µl hỗn hợp chuẩn, 0,1µg ADN tổng số 0,4µM mỗi mồi, 0,2mM dNTPs, 1×Taq polymeraza đệm, 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 (QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Mỹ)).

Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm nội sinh AQF6 được xác định trên máy giải trình tự 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 1). Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm nội sinh AQF6 được thể hiện ở SEQ ID NO:1.

Bảng 1 - Mức độ tương đồng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm nội sinh AQF6 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		
AQF6	<i>Fusarium foetens</i> CBS 110286	NR_159865.1	99	99,39
	<i>Fusarium foetens</i> C54	OL602458.1	99	99,60
	<i>Fusarium foetens</i> hd-10	OK030710.1	99	99,60
	<i>F. circinatum</i> CBS 405.97	NR_120263	98	99,16
	<i>F. bactridioides</i> CBS 100057	NR_120262	98	98,95

Kết quả cho thấy đã xác định được trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 tách từ chủng vi nấm nội sinh AQF6 có kích thước 500bp. 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 *Fusarium* được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI như *Fusarium foetens* CBS 110286 (99,39%), *Fusarium foetens* C54 (99,60%), *Fusarium foetens* hd-10 (99,60%), *F. circinatum* CBS 405.97 (99,16%) và *F. bactridioides* CBS 100057 (98,95%). Với kết quả này cho thấy, chủng vi nấm nội sinh AQF6 thuộc loài *Fusarium foetens*. Kết quả này cho kết quả tương tự khi phân loại bằng phương pháp truyền thống. Chủng vi nấm nội sinh AQF6 được định danh là *Fusarium foetens* AQF6 (mã số GenBank OP020702).

Ví dụ 2: Nuôi cấy và tách chiết các chất chống oxy hóa và kháng khuẩn từ dịch lên men của chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6

Chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6 được lên men trong hệ thống lên men quy mô 70 lít với môi trường lên men trường RM ở nhiệt độ 28°C, khuấy 200 vòng/phút trong 10 ngày. Dịch lên men được ly tâm với tốc độ 4000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C trên máy li tâm (Sorvall Evolution RC) thu được dịch lên men và sinh khối ướt. Các chất có hoạt tính sinh học từ dịch lên men và sinh khối ướt được tách chiết theo phương pháp của Miche'le và cộng sự (2020) có cải tiến như mô tả sau đây: 1) dịch lên men được tách chiết 3 lần bằng dung môi hữu cơ etyl acetat theo tỷ lệ 1:3 (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; 2) dịch chiết nấm tiếp tục cô quay ở 60°C bằng thiết bị cô quay (Buchi R124, Thụy Sĩ) để loại bỏ dung môi; 3) sinh khối ướt được sấy khô ở nhiệt độ 40 – 50°C sau đó được xay nhuyễn và chiết 2 lần với dung môi metanol theo tỷ lệ (3 thể tích dung môi : 1 khối lượng sinh khối khô); 4) dịch chiết sinh khối nấm tiếp tục cô quay ở 50°C bằng thiết bị cô quay (Buchi R124, Thụy Sĩ) để loại bỏ dung môi; 5) Sau đó dịch chiết chất có hoạt tính sinh học toàn phần được làm khô và cân đến khối lượng không đổi (cao chiết). Cao chiết hoạt chất sinh học thô thu được 25g cặn (4g cặn etyl axetat và 21g cặn MeOH). Tổng 25g cặn chiết này sau đó được chiết phân lớp với các dung môi hữu cơ như n-hexan, diclometan, etyl axetat, và nước thu được cặn chiết n-hexan (phân đoạn H 6,2g), diclometan (phân đoạn D 1,4g), etyl axetat (phân đoạn E 943mg) và phần dịch nước. Phần dịch nước được sắc ký qua cột diaion HP-20, hệ rửa giải với dải nồng độ MeOH-H₂O 50/50 → MeOH:100% thu được 2 phân đoạn W1 4,6g và W2 811mg. Cặn chiết thô của chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6 được phân lân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất theo các phương pháp mô tả dưới đây: Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (Merck 105715), RP18 F254s (Merck); phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu. Sắc ký lớp mỏng điều chế (PTLC): thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn Silica gel 60G F₂₅₄ (Merck, 105875). Sắc ký cột (CC): được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel pha thường (0,040 - 0,063 mm, Merck), silica gel pha đảo ODS (30 - 50 µm, Fujisilisa Chemical Ltd.), Diaion HP-20, và Sephadex LH-20. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC): thực hiện trên hệ thống máy HPLC Agilent 1200 kết nối đầu dò DAD. Phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử thời gian bay (HRESITOFMS) được đo trên hệ thống Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy AVANCE NEO 600 FT-NMR spectrometer (Bruker, Germany), Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Dịch chiết thô thu được đưa vào cột Diaion HP-20 và HPLC, thu được các hợp chất 1 (2,1mg), 2 (9mg), 3 (5mg), 4 (1,7mg), 5 (5mg), 6 (5mg), 7 (12mg), 8 (1,7mg), 9 (2,1mg), 10 (2,7mg), 11 (1,9mg), 12 (1,7mg), 13 (3,1mg) (ký hiệu trên sơ đồ cặn chiết thô của chủng AQF6 là CEAE) (hình 3). Dựa trên kết quả phân tích phổ ¹H NMR, ¹³C NMR (hình 4-16) và khối phổ LC/MS đã xác định cấu trúc hóa học của 13 hợp chất sạch đã biết bao gồm cyclo-pro-val (1), axit 2-hydroxybenzeneaxetic (2), *p*-hydroxybenzaldehyt (3), 2- (4-

hydroxyphenyl) etanol (4), axit *p*-hydroxybenzenaxetic (5), axit phenylaxetic (6), axit salixylic (7), 6,8-dihydroxy-3-metylisocoumarin (8), daidzein (9), 2-axetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinon (10), isoformononetin (11), β -2'-deoxyadenosin (12), β -adenosin (13) (hình 17).

Cấu trúc hóa học của 13 hợp chất được phẩm được chia thành 6 nhóm chức năng: diketopiperazin (cyclo-pro-val), polyphenol (axit 2-hydroxybenzeneaxetic, *p*-hydroxybenzaldehyt, 2- (4-hydroxyphenyl) etanol, axit *p*-hydroxybenzeneaxetic), axit cacboxylic (axit phenylaxetic, axit salixylic), flavonoit (6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin, isoformononetin, daidzein), anthraquinon (2-axetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9, 10-anthraquinon) và nucleosit (β -2'-deoxyadenosin, β -adenosin). Chủng *F. foetens* được phát hiện là nguồn gây bệnh mầm bệnh trên cây thu hải đường và ngô được báo cáo là sinh ra một số độc tố như beauvericin, axit 10,11-dihydroxyfusaric, axit hydroxyfusaric, axit dehydrofusaric và axit fusaric không bão hòa hydroxyl hóa (Schroers và cs., 2004, González- Jartín và cs., 2019). Sự khác biệt có thể là do thành phần môi trường và kết quả của sự chuyển gen ngang giữa nấm nội sinh và vật chủ tương ứng của chúng. Trong số 13 hợp chất đã được xác định, 7 hợp chất bao gồm *p*-hydroxybenzaldehyt, 2- (4-hydroxyphenyl) etanol, axit phenylaxetic, daidzein, β -2'-deoxyadenosin, β -adenosin và axit salixylic đã được khai thác trước đây từ chi *Fusarium* (Sampedro và cs., 2007, Boonyaketguson và cs., 2015, Hoque và cs., 2022). Vì vậy, đây là báo cáo đầu tiên chúng minh tiềm năng được phẩm của chủng vi nấm nội sinh *F. foetens*.

Ví dụ 3: Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết hoạt chất sinh học thô từ dịch lên men và 13 hợp chất sạch tách chiết từ dịch lên men của chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6

Khả năng khử gốc hydroxyl tự do của cao chiết hoạt chất sinh học thô của chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6 và 13 hợp chất sạch được đánh giá theo phương pháp của Li và cộng sự (2014). Phản ứng gốc hydroxyl tự do bao gồm 0,5ml brilliant green với nồng độ 0,435mM, 1,0ml FeSO₄ 0,5mM, 0,75ml H₂O₂ (3%, w/v) và 1,5ml dung dịch đệm natri photphat 0,15M (độ pH 7,4). Phản ứng được bắt đầu bằng cách thêm 1,0ml dung dịch cao chiết hoạt chất sinh học thô, 13 hợp chất sạch (800 μ g/ml), sau đó ủ ở 37°C trong 30 phút. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 624nm và nước cất đã khử ion được sử dụng làm mẫu trắng. Khả năng khử gốc hydroxyl tự do (%) = $(A \text{ mẫu} - A \text{ trắng}) / (A_o - A \text{ trắng}) \times 100$, trong đó A mẫu là độ hấp thụ của mẫu, A_o là độ hấp thụ của mẫu đối chứng etanol 70% và A trắng là độ hấp thụ của mẫu trắng. Các cao chiết hoạt chất sinh học thô, 13 hợp chất sạch tạo ra có tác dụng ức chế trong việc loại bỏ các gốc hydroxyl. Tuy nhiên, khả năng khử gốc hydroxyl tự do của cao chiết hoạt chất sinh học thô tăng lên tương đối phụ thuộc vào sự gia tăng của nồng độ cao chiết hoạt chất sinh học thô, 13 hợp chất sạch 800 μ g/mL.

Phương pháp 2-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) được thực hiện dựa trên việc bắt giữ gốc DPPH đối với chất chống oxy hóa dẫn đến giảm độ hấp thụ ở bước sóng 517nm (Kadaikunnan và cs., 2015). Phản ứng bao gồm: 100 μ l 0,1mM DPPH hòa tan trong metanol được trộn với 100 μ l dung dịch cao chiết hoạt chất sinh học thô, 13 hợp chất sạch ở nồng độ

từ 800 μ g/ml. Hỗn hợp phản ứng ủ ở nhiệt độ phòng 30 phút trong tối. Khả năng khử gốc DPPH tự do (%) = $[1 - (A \text{ mẫu} - A_o) / A \text{ trắng}] \times 100$, trong đó A mẫu là độ hấp thụ của mẫu, và A trắng là độ hấp thụ của mẫu trắng. A_o là độ hấp thụ của mẫu trong điều kiện với ethanol 70% thay vì dung dịch gốc DPPH. DPPH được sử dụng rộng rãi để đánh giá khả năng loại bỏ gốc tự do của chất chống oxy hóa. Khả năng khử gốc DPPH tự do của cao chiết hoạt chất sinh học thô, 13 hợp chất sạch và axit ascorbic được đánh giá ở nồng độ 800 μ g/ml.

Khả năng đánh bắt gốc superoxit của cao chiết hoạt chất sinh học thô của chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6 được đánh giá và cải tiến theo phương pháp của Yang và cộng sự, 2015. Đánh giá khả năng phòng vệ loại bỏ các gốc tự do đã sinh ra của cao chiết hoạt chất sinh học thô qua việc ngăn chặn sự tạo thành superoxit. Phản ứng đánh bắt gốc 900 μ l Tris-HCl (độ pH 8,2) với nồng độ 0,05M, 200 μ l dung dịch cao chiết hoạt chất sinh học thô, 13 hợp chất sạch (800 μ g/ml) và 80 μ l pyrogallol với nồng độ 2,5mM, hỗn hợp phản ứng được ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 299nm và nước cất khử ion được sử dụng làm mẫu trắng. Hiệu quả đánh bắt gốc superoxit (%) = $(A \text{ trắng} - A \text{ mẫu}) / (A \text{ trắng}) \times 100$, trong đó A mẫu là độ hấp thụ của mẫu, A trắng là độ hấp thụ của mẫu đối chứng chứa ethanol 70% thay vì mẫu và axit ascorbic. Các cao chiết hoạt chất sinh học thô, 13 hợp chất sạch tạo ra có tác dụng ức chế trong việc đánh bắt gốc superoxit. Tuy nhiên, hiệu quả đánh bắt gốc superoxit của cao chiết hoạt chất sinh học thô tăng lên tương đối phụ thuộc vào sự gia tăng của nồng độ cao chiết hoạt chất sinh học thô, 13 hợp chất sạch ở nồng độ 800 μ g/ml.

Cặn chiết thô của chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6 có hoạt tính khử mạnh gốc DPPH với tỷ lệ cao là $95,75 \pm 1,1\%$ với nồng độ cao chiết 800 μ g/ml. Chúng có thể so sánh với tỷ lệ phần trăm ức chế axit ascorbic ($96,32 \pm 3,97\%$). Trong khi đó, cặn chiết thô này cũng cho thấy hoạt tính loại bỏ gốc hydroxyl của chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6 cho thấy hoạt tính chống oxy hóa cao với tỷ lệ phần trăm ức chế là $85,66 \pm 1,91\%$. Do đó, chủng nấm *F. foetens* AQF6 được chọn để tiếp tục lên men quy mô và phân tích các chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học.

Tổng số 13 hợp chất sạch từ dịch lên men của chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6 được xác định hoạt động chống oxy hóa chống lại các gốc tự do DPPH, superoxit và hydroxyl. Tất cả các hợp chất đều thể hiện hoạt tính chống oxy hóa yếu đối với gốc tự do tổng hợp được tạo ra bởi DPPH, nằm trong khoảng từ $18,04 \pm 1,26\%$ đến $56,53 \pm 1,34\%$ ở 800 μ g/ml (hình 18). Ở nồng độ 800 μ g/ml hoạt tính chống oxy hóa DPPH của hoạt chất cyclo-pro-val, 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin, 2-acetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinon đạt trên 50%. Ngược lại, tiềm năng thu hồi hydroxyl mạnh đã được quan sát thấy trong tất cả các hợp chất được thử nghiệm. Trong số đó, các hợp chất hydroxyl axit p-hydroxybenzeneaxetic, 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin và β -adenosin cho thấy hoạt

động trung hòa gốc hydroxyl với tỷ lệ phần trăm ức chế là $90,78 \pm 2,61\%$, $89,47 \pm 2,98\%$ và $95,75 \pm 1,03\%$, gần như tương đương với axit ascorbic ($99,19 \pm 0,23\%$). Về gốc tự do superoxit, 8 trong số 13 hợp chất cho thấy hoạt tính chống oxy hóa cao với tiềm năng trung hòa gốc superoxit hơn 72%, trong đó hợp chất cyclo-pro-val (1) và 8-dihydroxy-3-metylisocoumarin (8) cho thấy có hoạt tính chống oxy hóa mạnh với 3 gốc thử nghiệm DPPH, superoxit và hydroxyl.

Ví dụ 4. Thử hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết hoạt chất sinh học thô từ dịch lên men và 13 hợp chất sạch tách chiết từ dịch lên men của chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6

Hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá đối với các vi khuẩn sau: *Escherichia coli* ATCC 11105, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus epidermidis* kháng methicillin (MRSE) ATCC 35984, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA) ATCC 33591, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 sử dụng phương pháp khuếch tán lỗ thạch (Holder và Boyce 1994). Khoảng 100µl dịch huyền phù vi khuẩn mới chuẩn bị được trang đều trên đĩa thạch MPA (thành phần môi trường MPA (g/l): cao thịt 3, pepton 5, NaCl 10, thạch 20, bổ sung nước đủ 1000 ml, độ pH = 6,5). Khoảng 20µl của mỗi hợp chất tinh khiết (800µg/ml) được thêm vào các lỗ có đường kính 6mm tương ứng được tạo bởi một dụng cụ đục lỗ vô trùng. Kanamycin và ampicillin được sử dụng làm đối chứng dương, trong khi 10% (v/v) DMSO được sử dụng làm đối chứng âm. Sau đó, các đĩa được ủ ở 37°C và đường kính của các vùng ức chế sự phát triển của vi khuẩn được đo sau 16-24 giờ ủ. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng cách đo vùng ức chế (không bao gồm đường kính giếng). Thí nghiệm được thực hiện ba lần.

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng 6 chủng vi khuẩn kiểm định thử nghiệm của cao chiết hoạt chất sinh học thô của chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6 và 13 hợp chất sạch, với kanamycin và ampicillin làm đối chứng dương. Cao chiết hoạt chất sinh học thô AQF6 cho thấy có hoạt tính ức chế mạnh đối với tất cả các vi khuẩn được thử nghiệm với vùng ức chế nằm trong khoảng từ $11,8 \pm 0,8\text{mm}$ đến $24,2 \pm 0,8\text{mm}$ ở 800µg/ml (Bảng 2). Khi sử dụng ở 800µg/ml, trong số 13 hợp chất, chỉ có hợp chất daidzein và β -adenosin thể hiện hoạt tính kháng khuẩn vừa phải đối với tất cả các vi khuẩn được thử nghiệm. *Escherichia coli* ATCC 11105, MRSE ATCC 35984, MRSA ATCC 3359 khá nhạy cảm với các hợp chất hóa học do chủng AQF6 tạo ra. Đáng chú ý, hoạt tính kháng khuẩn cao nhất chống lại MRSA ATCC 3359 được tìm thấy trong hợp chất isoformononetin với vòng ức chế $24,2 \pm 0,8\text{mm}$, tương đương với kanamycin và chiết xuất thô.

Bảng 2 - Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của cao chiết hoạt chất sinh học thô và 13 hợp chất sạch của chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6

Hợp chất	Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định (mm)					
	1	2	3	4	5	6
Cyclo-pro-val	$5,5^{b \pm 0,5}$	0 ^a	$14,8^{e \pm 0,8}$	0 ^a	$10,2^{a \pm 1}$	0 ^a

Axit 2-hydroxybenzeneaxetic	10 ^{f,g,h} ±0,5	0 ^a	14,2 ^c ±1,3	0 ^a	11,8 ^b ±0,8	5 ^{b,c} ±0,5
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyt	0 ^a	0 ^a	11,5 ^b ±1,3	0 ^a	10,5 ^{a,b} ±1,8	0 ^a
2- (4-Hydroxyphenyl) ethanol	10,3 ^{g,h} ±1	0 ^a	10,2 ^b ±0,5	0 ^a	13,2 ^c ±0,8	0 ^a
Axit <i>p</i> -hydroxybenzeneaxetic	10,7 ^{g,h} ±0,8	0 ^a	9,3 ^b ±1	0 ^a	20,2 ^{c,f} ±1,3	0 ^a
Axit phenylaxetic	10,3 ^{g,h} ±0,8	0 ^a	11,8 ^{c,d} ±0,8	0 ^a	19 ^d ±0,8	0 ^a
Axit salixylic	10,7 ^h ±0,8	0 ^a	15,2 ^e ±1	0 ^a	19,3 ^{d,e} ±0,8	0 ^a
6,8-Dihydroxy-3-methylisocoumarin	8,8 ^{d,e,f} ±0,8	9,3 ^d ±1	14,2 ^c ±1	12 ^c ±0,5	19,7 ^{c,f} ±0,8	5,2 ^c ±1
Daidzein	6,8 ^{b,c} ±1	0 ^a	12,2 ^d ±0,8	0 ^a	20,3 ^{c,f} ±0,8	0 ^a
2-Axetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-Anthraquinon	7,5 ^{c,d} ±0,5	7,5 ^c ±0,5	15,2 ^e ±1	0 ^a	24,2 ^g ±0,8	0 ^a
Isoformononetin	11,2 ^h ±1	5,2 ^b ±1	15 ^e ±0,8	8 ^b ±0,5	19,2 ^{d,e} ±0,8	0 ^a
β-2'-Deoxyadenosin	9,2 ^{e,f,g} ±1	6,2 ^b ±1	10,3 ^{b,c} ±1	9,2 ^c ±0,8	14,8 ^c ±0,8	4,2 ^b ±0,8
β-Adenosin	16,8 ⁱ ±0,8	5,2 ^b ±1	9,3 ^a ±0,8	0 ^a	9,2 ^a ±1	5,2 ^c ±1
Cặn chiết thô AQF6	18,8 ^k ±0,8	28,8 ^e ±1,8	24,2 ^g ±0,8	14,2 ^d ±1,3	26,2 ^f ±1	15,5 ^f ±0,5
Ampicillin	24,7 ⁿ ±0,8	0 ^a	24,5 ^g ±0,5	28,2 ^f ±0,8	9,2 ^a ±1	12,2 ^e ±0,8
Kanamycin	20,3 ^l ±1	0 ^a	20,2 ^f ±0,8	20,8 ^e ±0,8	21,2 ^f ±1	4,5 ^{b,c} ±0,5

*Vi sinh vật kiểm định: (1) *Escherichia coli* ATCC 11105; (2) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; (3) *Staphylococcus epidermidis* kháng methicillin ATCC 35984; (4) *Bacillus cereus* ATCC 11778; (5) *Staphylococcus aureus* kháng methicillin ATCC 33591; (6) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

* Ampicillin và kanamycin được sử dụng làm đối chứng dương.

* Các chữ cái trên cùng một cột chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa thống kê theo đánh giá của Fisher ($p < 0,05$).

Các hợp chất hoạt tính sinh học có đặc tính chống oxy hóa và kháng khuẩn được sinh tổng hợp bởi vi nấm nội sinh gần đây được coi là một nguồn tiềm năng để khai thác các hoạt chất có hoạt tính chống oxy hóa và kháng vi khuẩn gây bệnh. Chiết xuất thô AQF6 cho thấy tác dụng ức chế mạnh chống lại các gốc tự do và vi khuẩn được thử nghiệm liên quan đến sự có mặt các hoạt chất polyphenol, flavonoid. Để hỗ trợ những kết quả này, 4 hợp chất polyphenol (axit 2-hydroxybenzeneaxetic, *p*-hydroxybenzaldehyt, 2- (4-hydroxyphenyl) ethanol, axit *p*-hydroxybenzeneaxetic) và 3 hợp chất flavonoid (6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin, isoformononetin, daidzein) có hoạt tính kháng khuẩn và chống oxy hóa đã được xác định trong nghiên cứu này. Daidzein được báo cáo là có hoạt tính kháng khuẩn, chống oxy hóa và chống ung thư (Alshehri và cs., 2021). *p*-hydroxybenzaldehyt chiết xuất từ nấm nội sinh *Epicoccum nigrum* đã được chứng minh cho hoạt tính chống oxy hóa loại bỏ gốc DPPH khá cao (Hoque và cs., 2022). Cả β-adenosin và β-2'-deoxyadenosin đã được chứng minh là chất chống oxy hóa tiềm năng chống lại các gốc anion hydroxyl và superoxit.

Tuy nhiên, hoạt động loại bỏ gốc DPPH ở mức thấp, trái ngược với hoạt động chống oxy hóa thu được từ adenosine và 2'-deoxyadenosin từ dịch lên men của chủng vi nấm *Penicillium* sp. YY-20 nội sinh trên cây bạch quả (*Ginkgo biloba*) (Yuan và cs., 2014). Ngoài ra, cả hai hợp chất này cũng có hoạt tính kháng *E. coli* ATCC 11105, *P. aeruginosa* ATCC 9027, MRSE ATCC 35984, MRSA ATCC 33591, *E. faecalis* ATCC 29212, làm nổi bật tiềm năng của các dẫn xuất adenosin tự nhiên được tạo ra bởi vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6. Tương tự như β -adenosin và β -2'-deoxyadenosin, cyclo-pro-val được biết đến như một diketopiperazin cũng có hoạt tính kháng khuẩn và chống oxy hóa vừa phải. Nó không phù hợp với nghiên cứu trước đây cho thấy hoạt chất cyclo-pro-pal không có khả năng ức chế vi khuẩn *B. cereus* (Kumar và cs., 2014). Những kết quả này đã chứng minh rằng cây dẻ tùng Vân Nam là nguồn phong phú, đa dạng phân lập vi nấm nội sinh sản xuất các chất chống oxy hóa và kháng khuẩn mạnh.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6 là chủng được phân lập từ cây dẻ tùng Vân Nam tại Việt Nam, có hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và sinh tổng hợp 13 hợp chất sạch (cyclo-pro-val (1), axit 2-hydroxybenzeneaxetic (2), *p*-hydroxybenzaldehyt (3), 2- (4-hydroxyphenyl) etanol (4), axit *p*-hydroxybenzenaxetic (5), axit phenylaxetic (6), axit salixylic (7), 6,8-dihydroxy-3-metylisocoumarin (8), daidzein (9), 2-axetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinon (10), isoformononetin (11), β -2'-deoxyadenosin (12), β -adenosin (13)) có hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn cao, các chất này có tác dụng trong việc điều trị bệnh nhiễm khuẩn và hỗ trợ điều trị bệnh ung thư, rối loạn tim mạch và tiểu đường - đây là căn bệnh gây tử vong hàng đầu ở Việt Nam và trên thế giới.

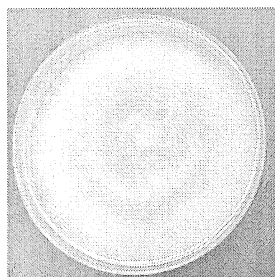
Tính đến nay, chưa có một công bố nào về vi nấm nội sinh trên cây dẻ tùng Vân Nam ở Việt Nam. Chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6 là một trong những chủng đầu tiên được nhóm nghiên cứu phân lập tại Việt Nam, chủng này được phân lập từ rễ của cây dẻ tùng Vân Nam (*Amentotaxus yunnanensis* H.L.Li) phân bố tại Huyện Quản Bạ, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam và là chủng gốc thuần khiết về mặt sinh học cao chiết thô các chất có hoạt tính sinh học thô của chủng AQF6 có hoạt tính chống oxy hóa cao loại bỏ gốc tự do DPPH, hydroxyl lần lượt với tỷ lệ phần trăm ức chế là 95,75%, 85,66% ở nồng độ 800 μ g/ml và có hoạt tính kháng 6/6 chủng vi sinh vật khiếm định thử nghiệm. Cao chiết thô các chất có hoạt tính sinh học của chủng vi nấm nội sinh AQF6 được tách chiết, phân lập, tinh sạch và xác định được cấu trúc hóa học của 13 hợp chất sạch (cyclo-pro-val (1), axit 2-hydroxybenzeneaxetic (2), *p*-hydroxybenzaldehyt (3), 2- (4-hydroxyphenyl) etanol (4), axit *p*-hydroxybenzenaxetic (5), axit phenylaxetic (6), axit salixylic (7), 6,8-dihydroxy-3-metylisocoumarin (8), daidzein (9), 2-axetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinone (10), isoformononetin (11), β -2'-deoxyadenosin (12), β -adenosin (13)). Ở nồng độ 800 μ g/ml hoạt tính chống oxy hóa DPPH của hoạt chất cyclo-pro-val, 6,8-dihydroxy-3-methyisocoumarin,

2-acetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinon đạt trên 50% và hoạt tính chống oxy hóa hydroxyl của hoạt chất axit p-hydroxybenzeneacetic, 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin và β -adenosin đạt trên 90%. Hoạt động chống oxy hóa của hầu hết các hoạt chất đối với superoxit mạnh đạt trên 72%.

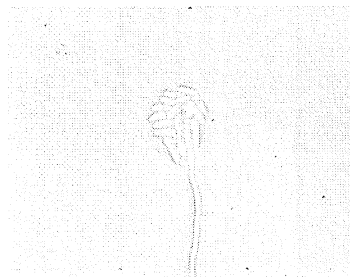
Sự thoái hóa của tế bào (sự oxy hóa tế bào) là nguyên nhân chính gây nên bệnh tật trong cơ thể con người do tạo ra quá nhiều phản ứng chứa oxy (Reactive Oxygen Species—ROS) (Hileman và cs., 2004). Cơ thể động vật và cả con người thường tạo ra các hợp chất có tính kháng oxy hóa. Khi hàm lượng các chất kháng oxy hóa trong cơ thể giảm xuống sẽ làm tăng nguy cơ hủy hoại các tế bào. Những ảnh hưởng bất lợi của ROS có thể được ngăn ngừa bằng cách bổ sung các chất kháng oxy hóa từ thực phẩm, dược liệu (Schramm và cs., 2003; Conforti và cs., 2008). Các hợp chất kháng oxy hóa là những hợp chất làm chậm hoặc ngăn chặn được sự phát triển của các gốc tự do bảo vệ tế bào và cơ thể. Sự phát triển khả năng kháng thuốc của các vi khuẩn và vi nấm gây bệnh hiện nay ngày càng nhiều đối với các loại thuốc trên thị trường là một vấn đề liên quan mà các dịch vụ y tế phải đối mặt và đã trở thành mối quan tâm nghiêm trọng trên toàn thế giới. Chính vì vậy, chủng vi nấm nội sinh *F. foetens* AQF6 sẽ là chủng gốc để tiến hành các nghiên cứu cao hoạt tính trong các điều kiện, môi trường nuôi cấy tối ưu để xây dựng được quy trình sản xuất chất chống oxy hóa và kháng khuẩn quy mô lớn cho hiệu suất thu hoạt chất sinh học cao. Chủng chỉ cần nuôi trong môi trường với các nguyên liệu đơn giản, rẻ tiền, quy trình lên men sản xuất hoạt chất sinh học 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 hoạt chất sinh học một cách nhanh hơn, đơn giản hơn, hiệu quả hơn có thể ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất hoạt chất sinh học mô lớn phục vụ điều trị các bệnh nhiễm khuẩn, hỗ trợ điều trị các bệnh ung thư, phòng ngừa và điều trị các bệnh khác liên quan đến gốc tự do như bệnh tim mạch, xơ vữa động mạch, tăng huyết áp, tiểu đường, viêm khớp, ung thư và lão hóa về trí nhớ mở ra hướng đi mới có hiệu quả trong việc điều trị bệnh 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

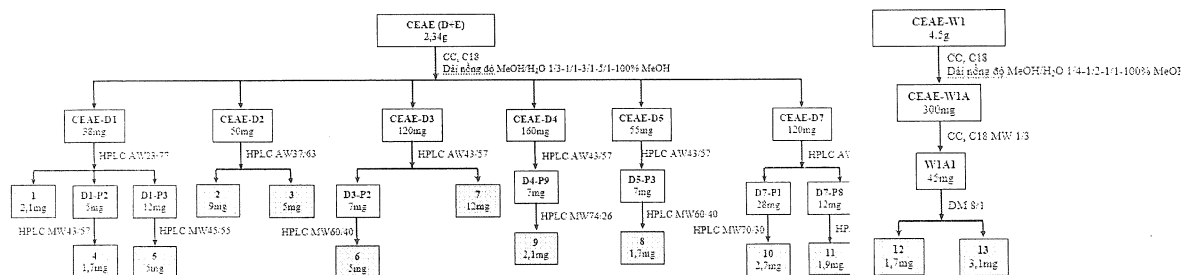
1. Chủng vi nấm nội sinh *Fusarium foetens* AQF6 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ rễ của cây dẻ rừng Vân Nam (*Amentotaxus yunnanensis* H.L.Li) phân bố tại Huyện Quản Bạ, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam, trong đó chủng AQF6 có khuẩn lạc ban đầu có màu trắng hơi ngả hồng, dạng sợi bông xốp; cuống sinh bào tử đơn độc hoặc phân nhánh, phần đỉnh sinh ra nhiều bào tử dạng thể bình, bào tử trần hình bầu dục; mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 500bp đã được đăng ký trên GenBank mã số OP020702 và có hoạt tính chống oxy hóa cao loại bỏ gốc tự do DPPH, hydroxyl lần lượt với tỷ lệ phần trăm ức chế là 95,75%, 85,66% ở nồng độ 800µg/ml; có hoạt tính kháng 6/6 chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm (*Escherichia coli* ATCC 11105, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus epidermidis* kháng methicillin ATCC 35984, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* kháng methicillin ATCC 33591, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212); có khả năng tổng hợp 13 hợp chất sạch (cyclo-pro-val, axit 2-hydroxybenzeneacetic, *p*-hydroxybenzaldehyt, 2-(4-hydroxyphenyl)etanol, axit *p*-hydroxybenzenaxetic, axit phenylaxetic, axit salixylic, 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin, daidzein, 2-axetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinon, isoformononetin, β -2'-deoxyadenosin, β -adenosin); ở nồng độ 800µg/ml hoạt tính chống oxy hóa DPPH của hoạt chất cyclo-pro-val, 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin, 2-axetyl-1,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinon đạt trên 50% và hoạt tính chống oxy hóa hydroxyl của hoạt chất axit *p*-hydroxybenzeneacetic, 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin và β -adenosin đạt trên 90%; các hợp chất hydroxyl axit *p*-hydroxybenzeneacetic, 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin và β -adenosin cho thấy hoạt động trung hòa gốc hydroxyl với tỷ lệ phần trăm ức chế là $90,78 \pm 2,61\%$, $89,47 \pm 2,98\%$ và $95,75 \pm 1,03\%$; hoạt động chống oxy hóa của 8 trong số 13 hợp chất đối với superoxit mạnh đạt trên 72%; 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin, β -2'-deoxyadenosin có hoạt tính kháng 6/6 chủng vi khuẩn kiểm định thử nghiệm; *Escherichia coli* ATCC 11105, MRSE ATCC 35984, MRSA ATCC 3359 khá nhạy cảm với các hợp chất hóa học do chủng AQF6 tạo ra và hoạt tính kháng khuẩn cao nhất chống lại MRSA ATCC 3359 được tìm thấy trong hợp chất isoformononetin với vòng ức chế $24,2 \pm 0,8\text{mm}$.



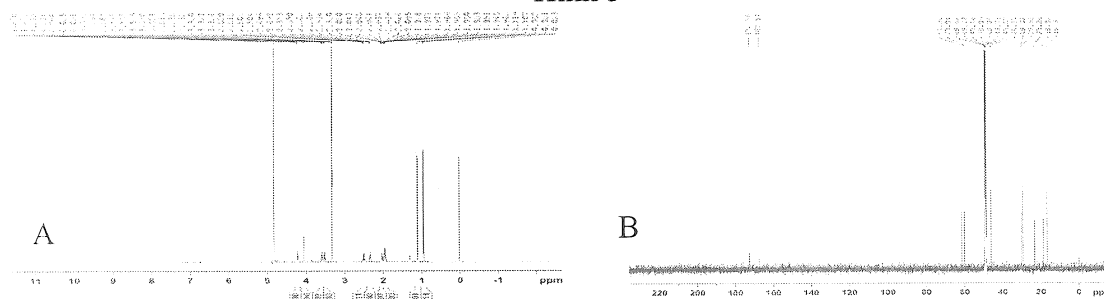
Hình 1



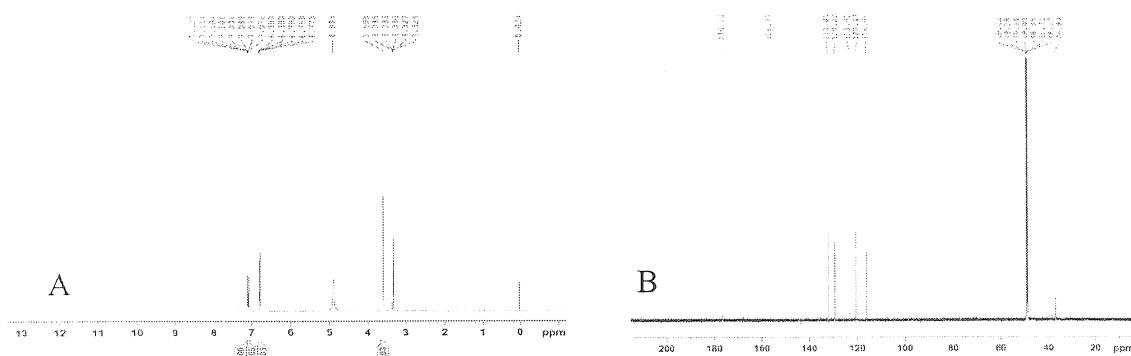
Hình 2



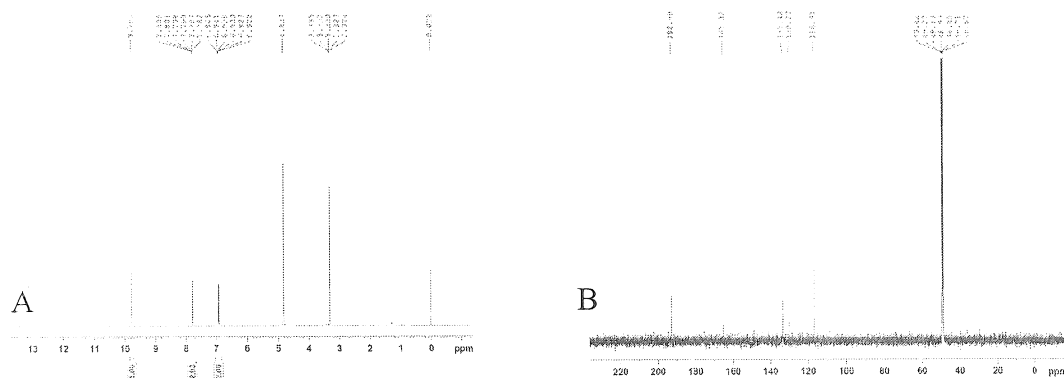
Hình 3



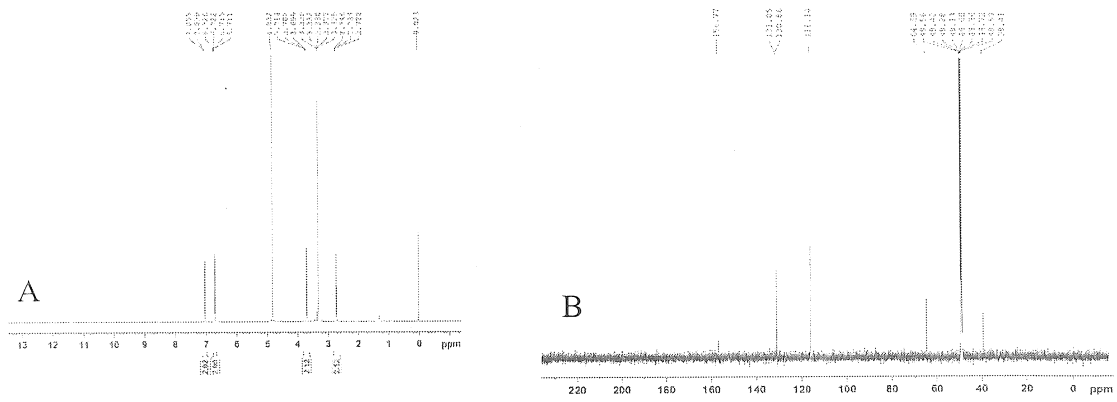
Hình 4



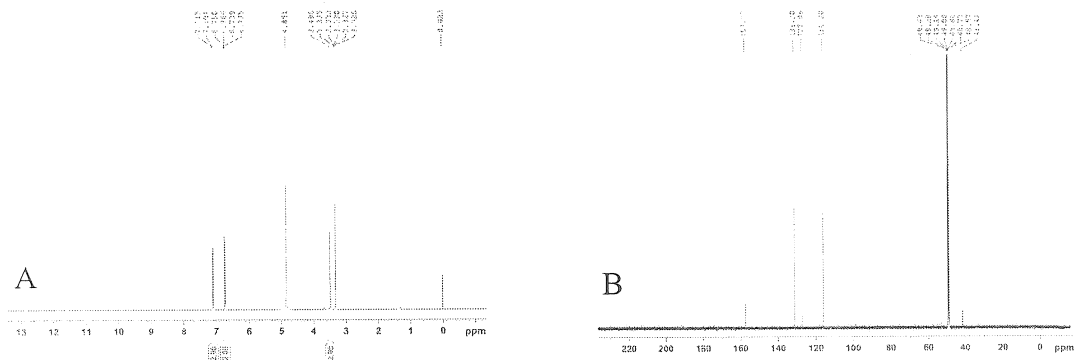
Hình 5



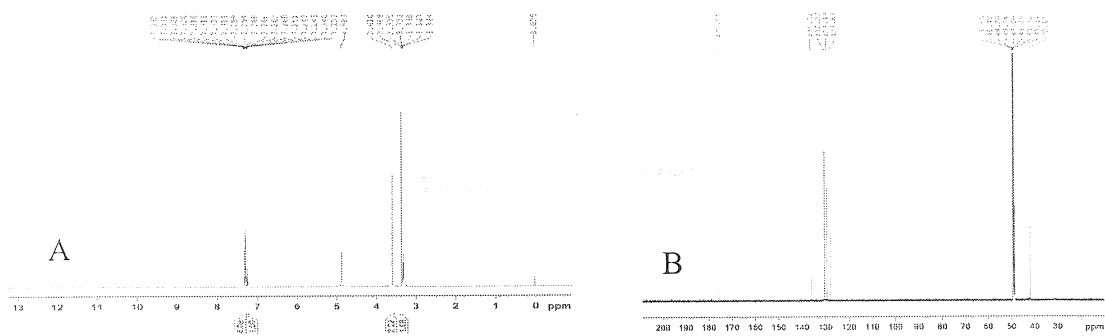
Hình 6



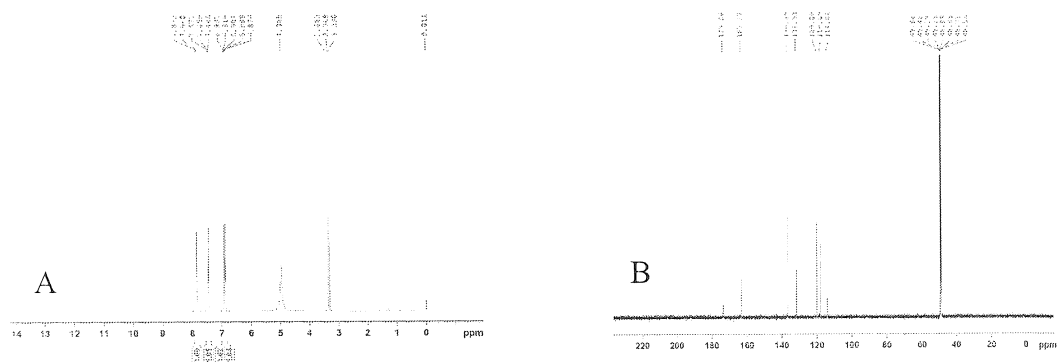
Hình 7



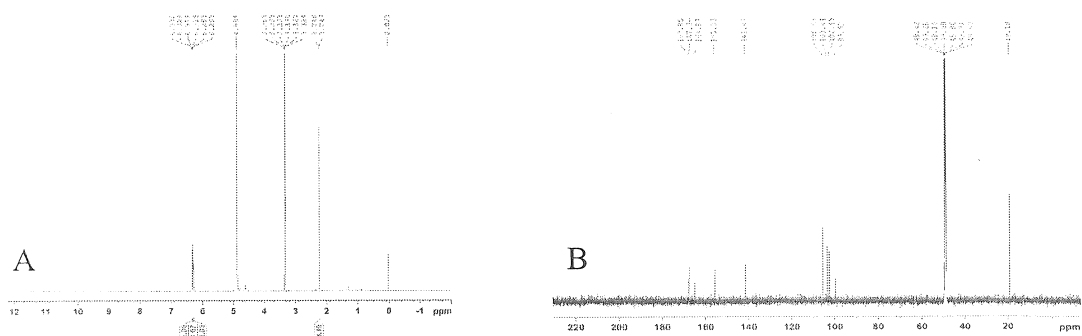
Hình 8



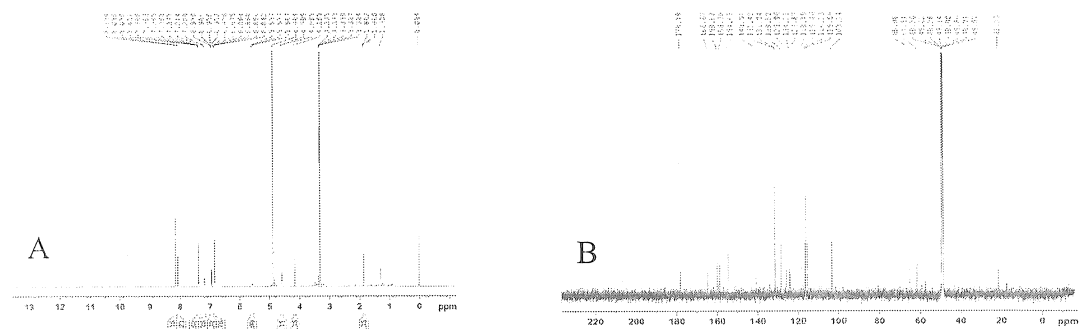
Hình 9



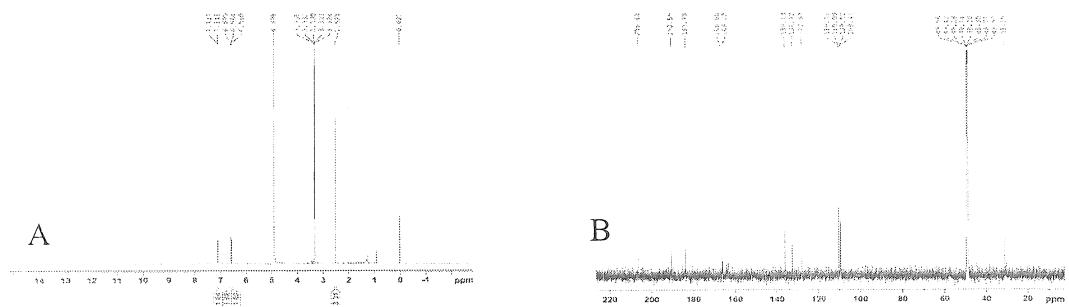
Hình 10



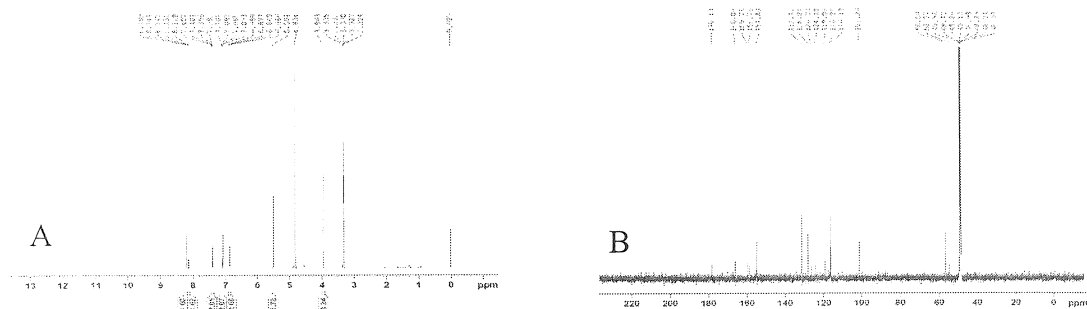
Hình 11



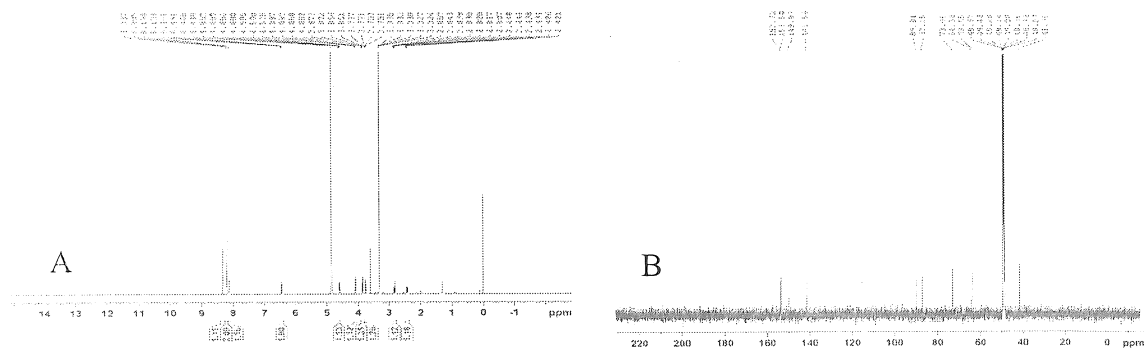
Hình 12



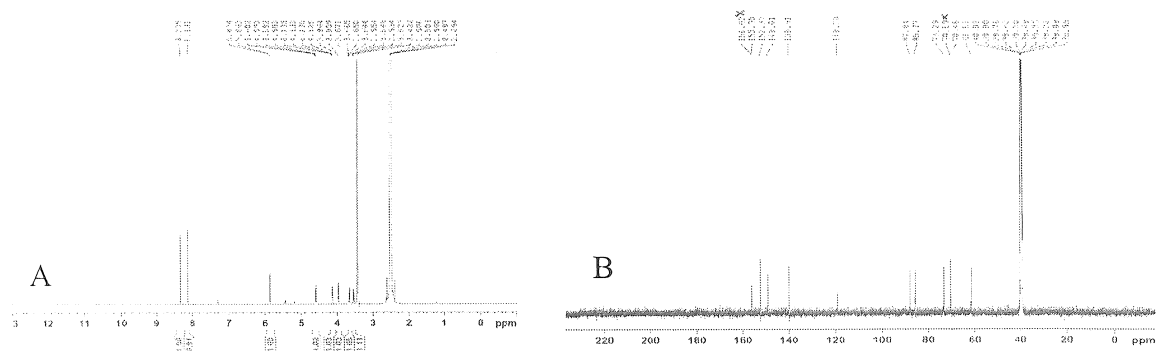
Hình 13



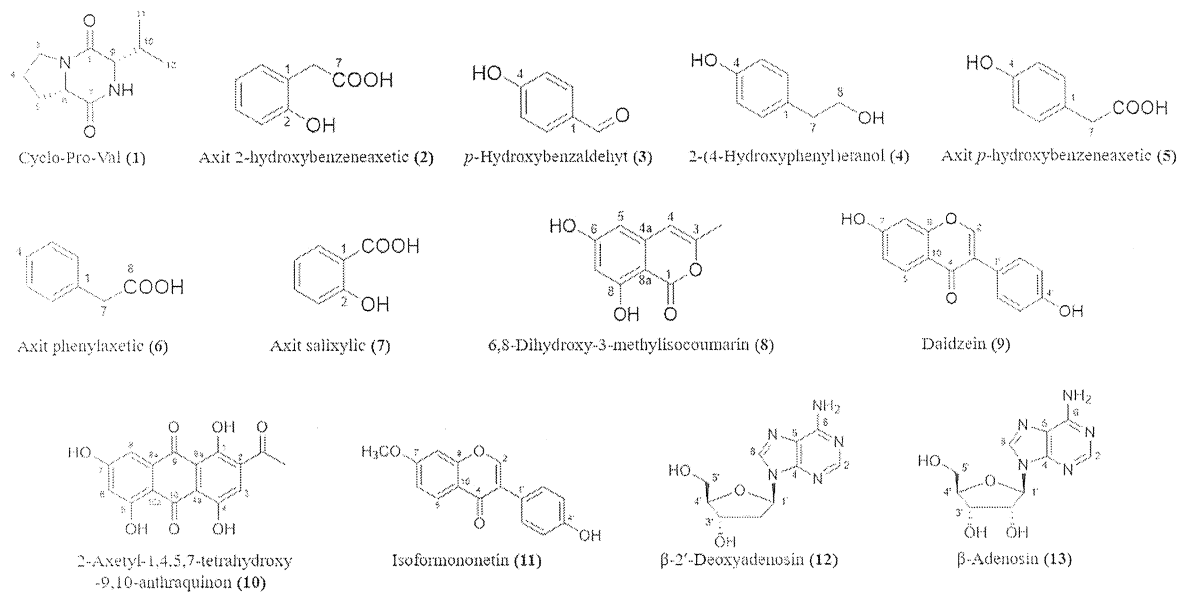
Hình 14



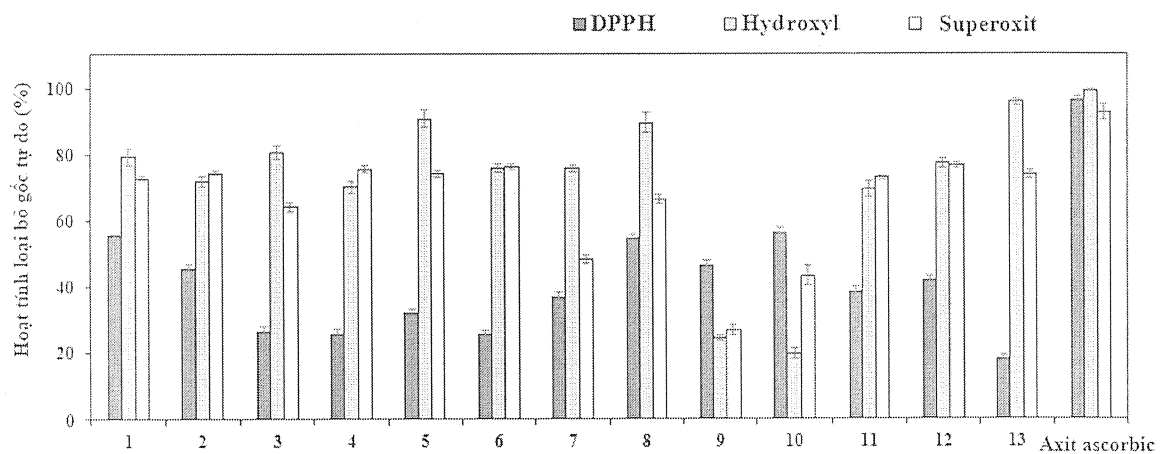
Hình 15



Hình 16



Hình 17



Hình 18

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> CHỦNG VI NẤM NỘI SINH *FUSARIUM FOETENS* AQF6 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CÁC HOẠT CHẤT CHỐNG OXY HÓA

<160> 1

<210> SEQ ID NO:1

<211> 500

<212> ADN

<213> *Fusarium foetens* AQF6

<400>

```
1  TCCAAACCCC TGTGGAACAT ACCACTTGGT TGCCTCGGCG GATCAGCCCG CTCCCGGTAA
61  AACGGGACGG CCCGCCAGAG GACCCCTAAA CTCTGTTTCT ATATGTAACT TCTGAGTAAA
121 ACCATAAATA AATCAAAACT TTCAACAACG GATCTCTTGG TTCTGGCATC GATGAAGAAC
181 GCAGCAAAAT GCGATAAGTA ATGTGAATTG CAGAATTCAG TGAATCATCG AATCTTTGAA
241 CGCACATTGC GCCCGCCAGT ATTCTGGCGG GCATGCCTGT TCGAGCGTCA TTTCAACCCT
301 CAAGCACAGC TTGGTGTTGG GACTCGCGTT AATTCGCGTT CCTCAAATTG ATTGGCGGTC
361 ACGTCGAGCT TCCATAGCGT AGTAGTAAAA CCCTCGTTAC TGGTAATCGT CGCGGCCACG
421 CCGTTAAACC CCAACTTCTG AATGTTGACC TCGGATCAGG TAGGAATACC CGCTGAACTT
481 AAGCATATCA ATAAGCGGAG
```