



(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)



2-0004120

(51) **C12N 1/14**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00134

(22) 01/04/2022

(45) 25/06/2025 447

(43) 25/10/2023 427A

(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) LÊ THỊ MINH THÀNH (VN); CHU HOÀNG HÀ (VN); PHẠM THANH HÀ (VN);
TRỊNH THỊ THU HÀ (VN); TRẦN THỊ HOA (VN).

(54) CHỨNG VI NẤM SCHIZOPHYLLUM COMMUNE TLC-12 THUẦN KHIẾT VỀ
MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT HUPERZIN A
VÀ HUPERZIN B

(21) 2-2022-00134

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng *Schizophyllum commune* TLC-12 phân lập từ thân cây Thạch tùng javanica (*Huperzia javanica*) phân bố tại huyện Quán Bạ, tỉnh Hà Giang, Việt Nam, chủng này có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B với hàm lượng lần lượt là 0,710 và 0,426 mg/L dịch lên men và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 556 bp được nêu trong SEQ ID NO:1. Huperzin A và huperzin B có tác dụng trong việc điều trị bệnh suy giảm trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

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 huperzin A và huperzin B. Cụ thể là đề cập đến chủng vi nấm nội sinh *Schizophyllum commune* TLC-12 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ thân cây Thạch tùng javanica (*Huperzia javanica*) phân bố tại Quản Bạ, Hà Giang, Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B, hai chất này có tác dụng trong việc điều trị bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cây Thạch tùng javanica (*Huperzia javanica*) là một loài cây dược liệu thuộc họ Thông đất (Lycopodiaceae). Là loại cây ưa ẩm và bóng, mọc trên đất ẩm có tầng dày và nhiều mùn, thường mọc thành đám nhỏ trên đất trên rừng rậm thường xanh, ở độ cao 1000-1500m và được tìm thấy nhiều ở Trung Quốc, Ấn Độ, Nhật Bản. Thạch tùng javanica được biết đến như một loại thảo dược quý, đặc biệt được sử dụng trong điều trị bệnh Alzheimer (Tang 1996; Wang và cộng sự, 1998; Yang và cộng sự, 2008). Ở Việt Nam cây Thạch tùng javanica được tìm thấy ở các tỉnh Hà Giang, Vĩnh Phúc. Đây là cây cỏ nhiều năm, cao khoảng 10-40 cm. Thân mọc đứng hay nằm trên mặt đất ngọn hướng lên trên, cành phân nhánh lưỡng phân 1-2 lần, đường kính khoảng 2-5 mm, hình trụ. Lá sinh dưỡng hình mác, hình elip tới elip hẹp, kích thước khoảng 11-19 × 2-5 mm, chóp lá rất nhọn, mép có răng cưa không đều, 10-25 răng. Lá bào tử có hình mác tuyến tính, hình mác hoặc hình trứng, 7-14 mm × 1,5 - 4 mm, mép có răng cưa không đều. Túi bào tử hình thận, 0,6-1,1 × 1,2-1,6 mm, mọc ở nách lá bào tử, không cuống, hơi vàng.

Suy giảm trí nhớ là thuật ngữ chung chỉ sự suy giảm khả năng trí tuệ nghiêm trọng đến nỗi ảnh hưởng đến cuộc sống hàng ngày. Bệnh Alzheimer (bệnh sa sút trí tuệ hay mất trí nhớ) chiếm 60-80% trong những bệnh làm suy giảm trí nhớ. Bệnh Alzheimer thường gặp ở người già, ngày nay bệnh có xu hướng trẻ hóa trên toàn cầu. Bệnh có tác động xấu đến ngôn ngữ, tư duy và ảnh hưởng tiêu cực đến hoạt động sinh hoạt hàng ngày của người bệnh. Bệnh Alzheimer trầm trọng hơn theo thời gian và cuối cùng gây tử vong. Bệnh Alzheimer được coi là nguyên nhân lớn thứ ba gây tử vong ở các nước phát triển sau bệnh tim mạch và ung thư (Wimo và cộng sự, 2007). Hiện nay, trên toàn thế giới có khoảng 50 triệu người mắc bệnh Alzheimer, trong đó bao gồm hơn 5 triệu người Mỹ. Số người mắc bệnh ngày càng tăng do số người già ở các nước phát triển chiếm tỷ lệ đáng kể, điều này làm ảnh hưởng lớn tới ổn định xã hội. Ở Việt Nam, số người cao tuổi chiếm 11% tổng dân số, kéo theo số người mắc bệnh Alzheimer tăng, vì vậy nhu cầu chữa bệnh tăng cao. Alzheimer là một căn bệnh rất phức tạp và không thể

điều trị khỏi hoàn toàn bằng việc dùng thuốc hoặc biện pháp can thiệp nào khác. Hiện nay, các chuyên gia y tế cũng chỉ có thể đưa ra những biện pháp để ngăn chặn tình trạng bệnh phát triển nhanh hơn. Việc sử dụng các chất ức chế cholinesterase (AChEI) là một biện pháp chính trong điều trị Alzheimer, trong đó huperzin A là hoạt chất chính và được sử dụng nhiều nhất. Hiện nay nguồn cung cấp huperzin A chính chủ yếu là từ cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*).

Huperzin A và huperzin B là hai alcaloit có tác dụng ức chế cholinesterase mạnh mẽ, có chọn lọc, có được tính độc đáo. Huperzin A được chiết xuất đầu tiên ở Trung Quốc vào năm 1948 và được phê duyệt để điều trị Alzheimer vào những năm 1990, ngày nay đã có sẵn dưới dạng thuốc hỗ trợ điều trị ở Hoa Kỳ. Huperzin B thể hiện hoạt tính ức chế cholinesterase thấp hơn huperzin A nhưng có thời gian tác dụng lâu hơn và thể hiện chỉ số điều trị cao hơn. Huperzin B cho thấy khả năng duy trì và phục hồi trí nhớ ở cả chuột trưởng thành và chuột già được điều trị bằng huperzin B trong các thử nghiệm *in vivo*. Huperzin A và huperzin B có khả năng tác động trực tiếp lên não bộ với liều lượng thấp, chỉ tính bằng microgram nhờ khả năng xuyên qua hàng rào mạch máu não. Sau khi vào được não, các huperzin ức chế việc sản sinh ra acetylcholinesterase, giúp hàm lượng acetylcholine trong não tăng lên, làm cải thiện nhận thức và trí nhớ cho bệnh nhân Alzheimer. Ngày nay, các huperzin còn được chứng minh không chỉ hỗ trợ não bộ của người Alzheimer, người già có biểu hiện suy giảm trí nhớ mà còn hiệu quả trong việc cải thiện trí nhớ ở người lớn khỏe mạnh.

Huperzin A đã được phân lập từ các loài thực vật họ Lycopodiaceae khác nhau của Úc, Pháp, Panama, Mexico, Malaysia, Ba Lan, và đặc biệt là ở Trung Quốc, nơi họ Lycopodiaceae phân bố rộng rãi. Huperzin A đã được xác định ở hơn 50 loài thuộc họ Lycopodiaceae nhưng chưa có công bố nào chứng minh cây Thạch tùng javanica có khả năng sinh huperzin A. Tuy nhiên, hàm lượng huperzin trong các loài cây rất thấp và việc khai thác quá mức đã làm giảm quần thể cây dược liệu trong tự nhiên. Thêm vào đó, cây chậm phát triển, năng suất thấp nên khó đáp ứng được nhu cầu thị trường. Đã có nhiều kết quả khả quan công bố về nuôi cấy *in vitro* với một số loài cây (*Huperzia serrata*) và tổng hợp hóa học huperzin A, huperzin B. Mặc dù vậy, các phương pháp này vẫn chưa đem lại hiệu quả cao do đòi hỏi kỹ thuật phức tạp, chi phí cao, thời gian tương đối dài, thời gian nhân được giống cây để thu làm nguyên liệu sản xuất thuốc cũng kéo dài hàng năm (Szypula và cộng sự, 2005; Ma & Gang, 2008). Việc tổng hợp hóa học huperzin A mặc dù đã được nghiên cứu và thành công vào năm 1989 (Kosiba và cộng sự, 1989) và có thể sản xuất một lượng huperzin A khá lớn, tuy nhiên đây không phải là một phương pháp khả thi bởi kỹ thuật phức tạp, chi phí sản xuất cao và tạo nhiều chất dẫn xuất phụ khác nên tính khả dụng không cao và có thể gây nhiều tác dụng phụ khi sử dụng so với huperzin A tự nhiên (Tun và cộng sự, 2011; White và cộng sự, 2013). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh nấm nội sinh phân lập từ một số cây dược liệu thuộc họ Thông đất có khả năng sản sinh các huperzin. Do đó, việc nghiên cứu phân lập các chủng nấm nội sinh trong các cây họ Thông đất có khả năng sản sinh hoạt chất huperzin A, huperzin B

đã được các nhà khoa học quan tâm nhằm thay thế, tăng cường lượng huperzin cho ngành công nghiệp dược.

Hợp chất huperzin A và huperzin B được tìm thấy sinh tổng hợp bởi các loài nấm nội sinh trong một số cây thuộc họ Thông đất, trong đó chủ yếu là các chủng sinh huperzin A phân lập được từ cây Thạch tùng răng cưa, bao gồm các chi chủ yếu như *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Coniochaeta*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Plectosphaerella*, *Paecilomyces*, *Podospora*, *Penicillium*, *Cyphellophora*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces*, *Schizophyllum* và *Botrytis*. Các chủng công bố phân lập từ cây Thạch tùng răng cưa bằng kỹ thuật phân tích sắc ký màng lỏng (TLC) và sắc ký màng lỏng hiệu năng cao (HPLC) bao gồm: Li và cộng sự (2007) đã phân lập được chủng *Acremonium* sp. 2F09P03B sản sinh huperzin A với hàm lượng 8,32 $\mu\text{g/L}$; Wang và cộng sự (2011) đã xác định được 39 chủng có khả năng sản sinh huperzin A thuộc các chi *Aspergillus*, *Podospora*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces*, *Shiraia* và *Botrytis*, trong đó chủng *Shiraia* sp. Slf14 cho sản lượng huperzin A cao nhất là 327,8 $\mu\text{g/L}$; Yang và cộng sự (2011) đã phân lập được chủng *Colletotrichum gloeosporioides* ES026 có khả năng sinh 30 μg huperzin A/g nấm khô; Chủng *Cladosporium cladosporioides* LF70 sản sinh 56,84 $\mu\text{g/g}$ nấm khô (Zhang và cộng sự, 2011). Chủng *Xylariales* sp. SY-02 sinh 26,4 $\mu\text{g/L}$ (Su và cộng sự, 2011). Hu Weixin và cộng sự (patent Trung Quốc số CN102168017B) đã nghiên cứu nâng cao sản lượng của chủng *Colletotrichum gloeosporioides* YLJ-13 có khả năng sản sinh huperzin A lên tới 199,6 mg/L rất có triển vọng cho sản xuất huperzin A quy mô lớn; Dong và cộng sự (2014) đã phân lập được chủng *Podospora* sp. S29 sinh 50,6 $\mu\text{g/g}$ nấm khô và *Trichoderma harzianum* L44 là 37,63 $\mu\text{g/g}$ nấm khô; Su và Yang (2015) đã phân lập được chủng *Paecilomyces tenuis* YS-13 có khả năng sản sinh được 21 μg huperzin A/L. Han và cộng sự (2016) phân lập được chủng *Fusarium oxysporum* SNZ-12 sinh 11,1 mg/L . Zaki và cộng sự (2019) phân lập chủng *Alternaria brassicae* AGF041 với sản lượng huperzin A đạt 42,89 $\mu\text{g/g}$ nấm khô. Han và cộng sự (2020) đã phân lập được 5 chủng *Mucor racemosus* NSH-D, *Mucor fragilis* NSY-1, *Fusarium verticillioides* NSH-5, *Fusarium oxysporum* NSG-1, *Trichoderma harzianum* NSW-V sản sinh huperzin A cao lần lượt là 107,0 mg/L , 181,7 mg/L , 117,1 mg/L , 111,1 mg/L và 319,8 mg/L . Cui và cộng sự (2021) phân lập được chủng *Colletotrichum boninense* HS7-1 sinh 3,7 $\mu\text{g/g}$ nấm khô. Một số trong các chủng này đã được đăng ký bản quyền tại Trung Quốc hoặc đã xác định được các điều kiện lên men thích hợp và là chủng giống gốc làm nguyên liệu cho sản xuất huperzin A quy mô công nghiệp. Các chủng phân lập từ cây *Phlegmariurus plegmaria* có khả năng tạo ra huperzin A là *Ceriporia renrata* MY311 sinh 40,53 $\mu\text{g/L}$ và *Hypoxylon investiens* NX9 sinh 27.48 $\mu\text{g/L}$ (Zhang và cộng sự, 2015). Olga và cộng sự (2020) đã phân lập được chủng *Fusarium* sp. C17 từ cây *Phlegmariurus taxifolius* có khả năng sinh 3,2 μg huperzin A/g nấm khô. Các nghiên cứu về nấm nội sinh sinh huperzin thuộc loài cây Thạch tùng javanica là chưa có công bố và các công bố về chủng vi nấm nội sinh có khả năng sinh đồng thời cả huperzin A và huperzin B là

chưa có nhiều, trong đó chủng *Schizophyllum commune* MT39 được phân lập từ cây *Phlegmariurus phlegmaria* được chứng minh có khả năng sinh huperzin A (patent CN 103834577A) và chủng nấm *Colletotrichum gloesporioides* phân lập từ cây *Huperzia serrate* sinh cả huperzin A và huperzin B đã được tối ưu hóa điều kiện lên men cho kết quả hàm lượng tích lũy của huperzin A và huperzin B được đo đạt mức cao nhất (lần lượt là 12,417 $\mu\text{g/mL}$ và 4,66 $\mu\text{g/mL}$) vào ngày thứ mười bốn (Liqin và cộng sự, 2018).

Ở Việt Nam, trước đây đã có nhiều nghiên cứu về vi nấm nội sinh trong cây dược liệu. Gần đây, nhóm nghiên cứu đã công bố 5 chủng vi nấm nội sinh phân lập được từ cây Thạch tùng răng cưa phân bố tại Sa Pa (tỉnh Lào Cai) và Đà Lạt (tỉnh Lâm Đồng) có khả năng sinh tổng hợp huperzin A và đã được cấp bằng độc quyền sang chế và giải pháp hữu ích, bao gồm các chủng: *Fungal endophyte* Tsp25, *Penicillium* sp. LĐL4.4, *Xylaria* sp. Tsp20, *Penicillium reticulisporum* Tsp41 và *Fusarium* sp. Rsp5.2 với hàm lượng huperzin A lần lượt là 2,88 mg/, 1,38 mg/L, 37,3 $\mu\text{g/L}$, 34,1 $\mu\text{g/L}$ và 19,4 $\mu\text{g/L}$ (Thanh và cộng sự, 2019, 2020). Tuy nhiên, cho đến hiện nay chưa có nghiên cứu nào về chủng vi nấm nội sinh *Schizophyllum commune* ở cây Thạch tùng javanica (*Huperzia javanica*) có khả năng sinh đồng thời cả huperzin A và huperzin B được công bố. Các kết quả này là tiền đề và cơ sở khoa học để các nhà khoa học thực hiện các nghiên cứu tiếp theo về tạo nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu sản xuất huperzin A và huperzin B nhằm phục vụ hỗ trợ điều trị bệnh suy giảm trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer ở Việt Nam.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng vi nấm *Schizophyllum commune* TLC-12 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ thân cây Thạch tùng javanica (*Huperzia javanica*) phân bố tại huyện Quản Bạ, tỉnh Hà Giang, Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp đồng thời cả huperzin A và huperzin B, các chất này có tác dụng trong việc điều trị rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

Chủng vi nấm *Schizophyllum commune* TLC-12 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 556 bp và có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B với hàm lượng lần lượt là 0,710 và 0,426 mg/L dịch lên men.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng *Schizophyllum commune* TLC-12 trên môi trường PDA-I sau 4 ngày nuôi cấy trên đĩa thạch. Khuẩn lạc tròn, viền liền; sợi sinh dưỡng bông xốp, màu trắng sữa; sợi cơ chất màu trắng xen vàng.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái sợi khuẩn ty của chủng *Schizophyllum commune* TLC-12 chụp trên kính hiển vi quang học (độ phóng đại 400 lần). Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh, bào tử mầm nảy mầm tạo thành sợi nấm đơn vô tính, trong mỗi ngăn sợi nấm chứa một nhân.

Hình 3 là biểu đồ thể hiện sắc ký đồ HPLC (UV 310nm) của dịch chiết chủng nấm *Schizophyllum commune* TLC-12 trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao LC/MS-Trap Agilent series 1100.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng *Schizophyllum commune* TLC-12 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân cây Thạch tùng javanica (*Huperzia javanica*) phân bố tại vùng Hà Giang, Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A, huperzin B và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 556 bp được nêu trong SEQ ID NO:1.

Việc phân lập chủng thuần khiết về mặt sinh học từ thân cây Thạch tùng javanica được thực hiện theo phương pháp của Dobranic và cộng sự (1995) và Shen và cộng sự (2000) có cải tiến như mô tả sau đây: Mẫu cây được rửa sạch với nước, khử trùng lần lượt bằng etanol 70%, NaOCl 10% và HgCl₂ 0,1% trong khoảng thời gian 3-5 phút. Sau đó, các mẫu cây được rửa lại bằng nước cất khử trùng 4-5 lần. Sau khi được xử lý, các mẫu cây được cắt thành từng phần nhỏ (0,2-1cm), đặt các phần nhỏ lên đĩa peptri chứa môi trường PDA-I (Môi trường PDA-I cải tiến có thành phần môi trường (g/l) như sau: 150g khoai tây; 10g đường glucoza; 10g cao nấm men; 5g pepton; 5g tryton; 2g NaNO₃; 0,5g MgSO₄; 1g KH₂PO₄; 0,5g K₂HPO₄; 0,5 Na₂HPO₄.2H₂O; 0,3g KCl; 0,3g NaCl, 16g agar và 1 lít nước cất) 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 3-10 ngày, hàng ngày theo dõi sự phát triển của các khuẩn lạc nấm nội sinh trong cây. Cấy chuyển các sợi nấm của các loài nấm khác nhau từ các đĩa ban đầu sang đĩa thạch PDA-I mới và nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 3-10 ngày, theo dõi và cấy chuyển đến khi thu được các chủng thuần.

Chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học được phân loại theo phương pháp truyền thống dựa vào các khóa phân loại của Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự, 1982; Bùi Xuân Đồng, 1984; Ainsworth và cộng sự, 2001; Wösten và Wessels, 2006. Sau đó, tách chiết hệ gen của các chủng nấm thu được bằng kit tách chiết ADN (G-spinTMTotal ADN Extraction Kit) và khuếch đại đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 bằng cặp mồi đặc hiệu ITS1 (5' – CCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') và ITS4 (5' – CCTCCGCTTATTGATATGC – 3'). Tiếp theo, đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 thu được được xác định trình tự nucleotit bằng máy giải trình tự AEI PRISM @ 3700 Genetic Analyzer. Trình tự nucleotit được phân tích bằng phần mềm PCGENE và trình tự vùng được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI (GenBank) với phần mềm Bioedit, Blast và định danh.

Sau khi phân lập và xác định các đặc tính sinh trưởng phát triển thu được chủng vi nấm nội sinh thuộc chi *Schizophyllum*. Chủng vi nấm này có đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 556 bp và có độ tương đồng $\geq 99,10\%$, độ dài đoạn so sánh $\geq 99\%$ so với các chủng *Schizophyllum commune* được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu

GenBank mang các mã số MN526594.1, MH539647.1, MF061788.1, MT859910.1 và được định danh là *Schizophyllum commune* TLC-12.

Sau khi định danh, chủng nấm *Schizophyllum commune* TLC-12 thuần khiết về mặt sinh học được nuôi cấy và xác định khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A, huperzin B. Chủng nấm được nuôi cấy trong 1 lít môi trường PDB-I (Môi trường PDB-I cải tiến có thành phần môi trường (g/l) như sau: 150g khoai tây; 10g đường glucoza; 10g cao nấm men; 5g pepton; 5g tryton; 2g NaNO₃; 0,5g MgSO₄; 1g KH₂PO₄; 0,5g K₂HPO₄; 0,5 Na₂HPO₄.2H₂O; 0,3g KCl; 0,3g NaCl và 1 lít nước cất) ở nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 4 ngày và tiến hành thu sinh khối bằng ly tâm ở 6000 vòng/phút, loại bỏ dịch. Sinh khối tươi được sấy ở 45 - 60°C và được tách chiết bằng dung môi hữu cơ thu được dịch chiết nấm, dịch chiết này chính là alkaloid toàn phần. Dịch chiết nấm được xác định khả năng sinh tổng hợp huperzin A, huperzin B bằng phương pháp sắc ký màng mỏng (TLC) và bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao LC/MS-Trap Agilent series 1100.

Chủng vi nấm *Schizophyllum commune* TLC-12 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B với hàm lượng lần lượt là 0,710 và 0,426 mg/L dịch lên men. Chủng *Schizophyllum commune* TLC-12 thuần khiết về mặt sinh học trong giải pháp hữu ích là chủng được phân lập từ thân cây Thạch tùng javanica phân bố tại Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B, hai chất này có tác dụng trong điều trị rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer. Hợp chất huperzin A được tìm thấy sinh tổng hợp bởi các loài nấm nội sinh trong các cây dược liệu họ Thông đất bao gồm các chi chủ yếu như *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Coniochaeta*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Plectosphaerella*, *Podospora*, *Penicillium*, *Cyphellophora*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces*, *Botrytis* và *Schizophyllum*. Kết quả tìm ra chủng vi nấm nội sinh trong cây dược liệu thuộc chi *Schizophyllum*, loài *commune* có khả năng sinh tổng hợp cả huperzin A và huperzin B là một công bố đầu tiên ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Điều này mở ra hướng đi mới có hiệu quả trong việc điều trị bệnh Alzheimer tại Việt Nam.

Chủng *Schizophyllum commune* TLC-12 theo giải pháp hữu ích 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 ở điều kiện lạnh sâu -20°C và -86°C, trong dung dịch 15% glycerol.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Mẫu thân cây Thạch tùng javanica (*Huperzia javanica*) tươi phân bố tại Quản Bạ, Hà Giang, Việt Nam được rửa sạch và được khử trùng lần lượt bằng etanol 70%, NaOCl 10% và HgCl₂ 0,1% trong khoảng thời gian 3-5 phút rồi được rửa lại bằng nước cất khử trùng 4-5 lần. Sau khi được xử lý, các mẫu cây được cắt thành từng phần nhỏ (0,2-1cm), đặt các phần nhỏ lên đĩa peptri chứa môi trường PDA-I với khoảng cách đồng đều và được đánh số kí hiệu, thứ tự riêng tương ứng. Các đĩa được nuôi ở nhiệt độ 28°C trong

thời gian 3-10 ngày, theo dõi các đĩa hàng ngày để kiểm tra sự phát triển của các khuẩn lạc nấm. Các sợi nấm của các loài nấm khác nhau được cấy chuyển từ các đĩa ban đầu sang đĩa thạch PDA-I mới và nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 3-10 ngày, theo dõi và cấy chuyển đến khi thu được các chủng nấm thuần.

Kết quả đã phân lập được chủng TLC-12 thuần khiết về mặt sinh học có thời gian sinh trưởng 3-5 ngày nuôi cấy. Nuôi cấy chủng TLC-12 thuần trên môi trường thạch nghiêng đến khi khuẩn ty nấm phát triển phủ kín mặt thạch (4-5 ngày), sau đó bổ sung glycerol 15% vô trùng, giữ ở 4-10°C, -20°C và -86°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 và vi hình thái của chủng nấm như hình thái khuẩn lạc, hệ sợi; vách ngăn sợi nấm, bào tử và cuống bào tử theo các khóa phân loại của Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự (1982); Bùi Xuân Đồng (1984); Ainsworth và cộng sự (2001); Wösten và Wessels (2006) để sơ bộ nhận dạng, phân loại chủng TLC-12 đến chi.

Chủng TLC-12 được nuôi cấy phát triển trên môi trường PDA-I ở 28°C trong 3 - 5 ngày, quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc và kích thước khuẩn lạc. Chủng TLC-12 được nuôi cấy trên đĩa môi trường PDA-I sau 4 ngày nuôi cấy hình thái khuẩn lạc được thể hiện trên hình 1. Khuẩn lạc tròn, viền liền; sợi sinh dưỡng bông xốp, màu trắng sữa; sợi cơ chất màu trắng xen vàng. 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 0,5 x 0,5 cm đặt lên lam kính rồi lấy lamén đặt lên bề mặt miếng thạch, nuôi trong đĩa petri ở 28°C trong khoảng thời gian 3 - 7 ngày cho đến khi sợi nấm mọc lan đều bề mặt lamén. Đặt lam kính và lamén lên soi dưới kính hiển vi quang học, quan sát đặc điểm hệ sợi, bào tử, cuống bào tử, vách ngăn của chủng nấm. Hình thái của sợi khuẩn ty của chủng TLC-12 được thể hiện trên hình 2. Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh; bào tử mầm nảy mầm tạo thành sợi nấm đơn vô tính, trong mỗi ngăn sợi nấm chứa một nhân. Chủng vi nấm được nhận dạng sơ bộ qua màu sắc, hình thái khuẩn lạc cùng đặc điểm vi hình thái theo các khóa phân loại.

Kết quả nhận dạng được chủng TLC-12 thuộc chi *Schizophyllum*.

ADN của chủng TLC-12 được tách chiết bằng kit tách chiết ADN (G-spinTMTotal DNA Extraction Kit). Vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng TLC-12 được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') và ITS4 (5'- CCTCCGCTTATTGATATGC - 3'). Cặp mồi ITS1 và ITS4 khuếch đại đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của các chủng nấm có kích thước tính toán theo lý thuyết 500-600bp.

Phản ứng PCR được thực hiện theo phương pháp chuẩn được mô tả bởi White và cộng sự (1990). Thể tích phản ứng PCR (50µl) bao gồm 100 ng ADN hệ gen, 25 µl hỗn hợp chuẩn, 0,5 µmol/L mỗi mồi và nước khử ion. Chu trình nhiệt bao gồm: 94°C trong

5 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ nhiệt: 94°C trong 1 phút 30 giây, 53°C trong 1 phút 30 giây, 72°C trong 2 phút; kết thúc ở 72°C trong 10 phút. Sau khuếch đại, sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di gel agarosa 1%. Kết quả thu được một phân đoạn gen có kích thước khoảng hơn 500bp. 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 TLC-12 được xác định trên máy giải trình tự tự động AEI PRISM@ 3700 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific, Mỹ). Xử lý dữ liệu trình tự đoạn ADN bằng phần mềm Bioedit, Blast và so sánh, đối chiếu dữ liệu nguồn gen trên ngân hàng gen NCBI (bảng 1). Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng TLC-12 được thể hiện ở SEQ ID NO:1.

Kết quả đã xác định được trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 tách từ chủng TLC-12 có kích thước 556 bp. Trình tự đoạn gen này có độ tương đồng $\geq 99,10\%$ và độ dài đoạn so sánh $\geq 99\%$ so với các chủng thuộc chi *Schizophyllum*, loài *commune* được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI, kết quả so sánh này đã khẳng định được chủng TLC-12 thuộc chi *Schizophyllum*, loài *commune*.

Bảng 1- Mức độ tương đồng đoạn gen vùng ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm TLC-12 khi so sánh trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI

Tên chủng	Chủng so sánh		Độ dài đoạn so sánh %	Mức độ tương đồng %
	Tên	Mã số		
TLC-12	<i>Schizophyllum commune</i> TF38	MN526594.1	100	99,28
	<i>Schizophyllum commune</i> ENN1	MH539647.1	100	99,28
	<i>Schizophyllum commune</i> strain SCAU12	MF061788.1	100	99,28
	<i>Schizophyllum commune</i> strain LZ12-16	MT859910.1	99	99,10

Chủng *Schizophyllum commune* TLC-12 được nuôi cấy trong 1 lít môi trường PDB-I ở 180 vòng/phút, nhiệt độ 28°C trong 4 ngày. Thu sinh khối nấm tươi bằng ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút. Sấy khô sinh khối nấm tươi thu được ở nhiệt độ 45-60°C, nghiền thành bột mịn bằng nitor lỏng.

Chiết xuất huperzin A, huperzin B từ bột nấm khô theo các bước như sau: (1) bổ sung một lượng ammoni 10% với tỉ lệ 1ml/1g bột nấm trong 1-2 giờ ở nhiệt độ phòng; (2) bổ sung 30ml dung môi HCl 5% tỉ lệ 1:30ml, lắc ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ; (3) ly tâm thu dịch chiết ở 6000 vòng/phút trong 10 phút; (4) chỉnh dung dịch thu được về độ pH là 10 bằng NaOH 10%/NH₄OH 25%; (5) chiết 3 lần với cloroform (tỷ lệ 1:1), thu pha dưới; (6) cô quay loại bỏ dung môi, thu được cặn alkaloid toàn phần; và (7) hòa tan cặn alkaloid thu được trong 1ml metanol.

Dịch alkaloid toàn phần thu được được xác định hoạt chất huperzin A, huperzin B bằng phương pháp sắc ký màng mỏng (TLC) như sau: (1) hòa tan chất chuẩn huperzin A, huperzin B trong metanol 1mg/ml, pha loãng đến các nồng độ chuẩn; (2) hoạt hóa bản mỏng silicagel bằng cách sấy 1 giờ ở 110°C, mẫu được chấm lên bản mỏng bằng pipet, sấy nhẹ bản mỏng để bay hết dung môi; (3) dùng kẹp đưa bản mỏng đã chấm mẫu vào bình dung môi có thành phần cloroform:isopropanol:etyl axetat:amoni (tỷ lệ 4:1,5:1:0,1), đẩy nắp bình, theo dõi vạch dung môi di chuyển đến khi cách mép trên tấm bản mỏng 1cm thì lấy bản mỏng ra khỏi bình, sấy nhẹ bản mỏng; (4) sử dụng thuốc nhuộm KMnO₄ 0,5% và Iod 0,5% xịt đều lên bản mỏng, sấy nhẹ bản mỏng, quan sát vết. Kết quả xác định được alkaloid toàn phần thu được từ chủng TLC-12 cho kết quả dương tính với huperzin A và huperzin B.

Xác định hàm lượng huperzin A, huperzin B có mặt trong dịch chiết chủng TLC-12 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên hệ thống LC/MS-Trap Agilent series 1100 với cột phân tích Zorbax SB -C18 RP (4.6 x 150 mm), detector DAD và MS. Trên hệ thống HPLC, pic tín hiệu được lựa chọn của huperzin A chuẩn được phát hiện một cách ổn định tại thời gian lưu Rt 6,3-6,4 phút, pic tín hiệu được lựa chọn của huperzin B chuẩn được phát hiện ổn định tại thời gian lưu Rt 3,5-3,8 phút. Từ các kết quả giá trị cường độ pic ion phân tử, giá trị tích phân cường độ hấp thụ tử ngoại của pic, sử dụng phương pháp phân tích phương sai hồi qui tuyến tính một lớp (ANOVA) để xây dựng đường chuẩn phục vụ cho việc định lượng huperzin A, huperzin B trong mẫu. Kết quả cho thấy, pic chất huperzin A trong dịch chiết chủng TLC-12 được phát hiện ở thời gian lưu Rt 6,351 phút tương đương với thời gian lưu Rt của chất chuẩn huperzin A, pic chất huperzin B trong dịch chiết chủng TLC-12 được phát hiện ở thời gian lưu Rt 3,545 phút tương đương với thời gian lưu Rt của chất chuẩn huperzin B. Kết quả được thể hiện trên hình 3.

Kết quả xác định dịch chiết của chủng TLC-12 có hàm lượng huperzin A đạt 0,710 mg/L dịch lên men và hàm lượng huperzin B đạt 0,426 mg/L dịch lên men.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

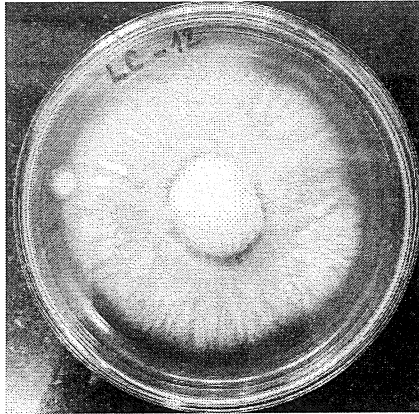
Chủng vi nấm *Schizophyllum commune* TLC-12 là chủng thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân cây Thạch tùng javanica phân bố tại Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hai hoạt chất huperzin A và huperzin B, hai chất này có tác dụng trong điều trị các bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer – chứng bệnh gây sa sút trí tuệ ở người cao tuổi.

Cho đến nay, kết quả nghiên cứu về vi nấm nội sinh cây Thạch tùng javanica có khả năng sinh tổng hợp huperzin và nghiên cứu về chủng vi nấm sinh tổng hợp đồng thời cả huperzin A và huperzin B thuộc chi *Schizophyllum*, loài *commune* của nhóm nghiên cứu là kết quả đầu tiên được công bố. Chủng *Schizophyllum commune* TLC-12 là một trong những chủng đầu tiên được nhóm nghiên cứu phân lập từ các cây thuộc họ Thông đất tại Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp cả hai hoạt chất huperzin A và

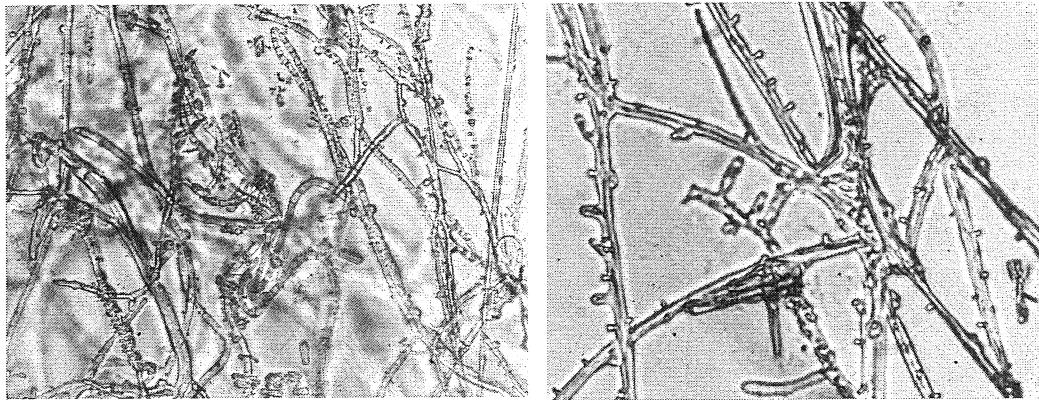
huperzin B. Chúng này sẽ được thực hiện các nghiên cứu tiếp theo để nâng cao hoạt tính sinh tổng hợp cả 2 hoạt chất huperzin A và huperzin B để sử dụng làm chủng giống gốc ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất hoạt chất huperzin A và huperzin B quy mô công nghiệp, đơn giản, hiệu quả, phục vụ hỗ trợ điều trị các bệnh suy giảm về trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer. Kết quả này mở ra hướng đi mới có hiệu quả trong việc phòng và điều trị bệnh Alzheimer tại Việt Nam, góp phần giảm giá thành sản phẩm, nâng cao sức khỏe cộng đồng và tăng hiệu quả kinh tế, xã hội.

YÊU CẦU BẢO HỘ

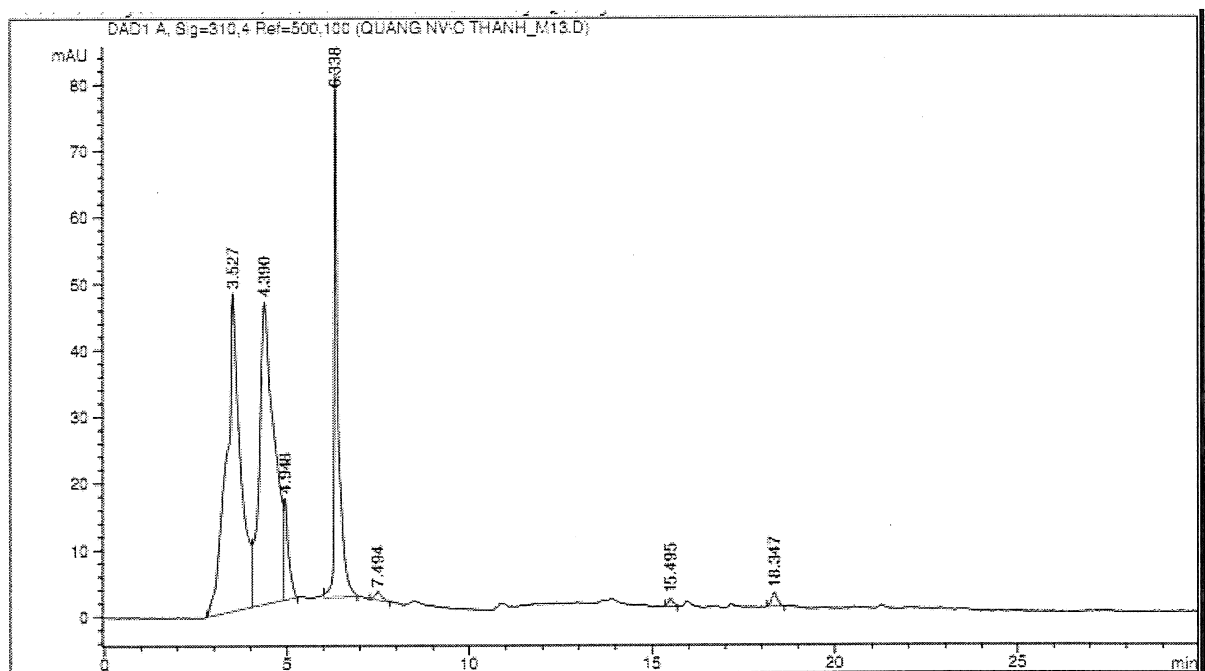
1. Chủng vi nấm *Schizophyllum commune* TLC-12 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân cây Thạch tùng javanica (*Huperzia javanica*) phân bố tại huyện Quản Bạ, tỉnh Hà Giang, Việt Nam, chủng này có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B với hàm lượng lần lượt là 0,710 và 0,426 mg/L dịch lên men và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 556 bp được nêu trong SEQ ID NO:1.



Hình 1



Hình 2



Hình 3

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> CHỦNG VI NẤM *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* TLC-12 THUẦN KHIẾT
VỀ MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT
HUPERZIN A VÀ HUPERZIN B

<160> 1

<210> SEQ ID NO:1

<211> 556

<212> ADN

<213> *Schizophyllum commune* TLC-12

<400>

```

cccaaagcct tcacgggcg cggttgacta cgtcwacctc acaccttaaa gtatgttaac 60
gaatgtaatc atggtcttga cagaccctaa aaagttaata caactttcga caacggatct 120
cttggtcttc gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat aagtaatgtg aattgcagaa 180
ttcagtgaat catcgaatct ttgaacgcac cttgcgccct ttggtattcc gaggggcatg 240
cctgtttgag tgtcattaaa taccatcaaa ccctcttttg acttcggtct cgagagtggc 300
ttggaagtgg aggtctgctg gagcctaacg gagccagctc ctcttaaag tattagcgga 360
tttcccttgc gggatcgct ctccgatgtg ataatttcta cgtcgtgrc catctcgggg 420
ctgacctagt cagtttcaat aggagtctgc ttctaaccgt ctcttgactg agactagcga 480
cttgtgcgct aacttttgac ttgacctcaa atcaggtagg actaccgct gaacttaagc 540
atatcaataa gcggag                                     556

```