



(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)



2-0004194

(51) **C12N 1/14; C12N 15/01**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00492

(22) 31/08/2023

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/01/2024 430A

(73) **TRUNG TÂM SINH HỌC THỰC NGHIỆM - VIỆN ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ
(VN)**

C6 Thanh Xuân Bắc, Thanh Xuân, Hà Nội

(72) **Vũ Xuân Tạo (VN); Trần Bảo Trâm (VN); Nguyễn Thị Thanh Mai (VN); Đào Ngọc
Ánh (VN); Đỗ Thị Kim Trang (VN); Trương Thị Chiên (VN).**

(54) **CHŨNG NẤM CORDYCEPS MILITARIS SHBTQ THUẦN KHIẾT VỀ MẶT
SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG HÌNH THÀNH QUẢ THỂ MÀU TRẮNG CHỨA
HOẠT CHẤT PENTOSTATIN**

(21) 2-2023-00492

(57) Sáng chế đề cập đến chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ thuần khiết về mặt sinh học có khả năng hình thành quả thể màu trắng chứa hoạt chất pentostatin. Chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ theo sáng chế được phân lập tại Việt Nam, và có thể áp dụng trong sản xuất công nghiệp góp phần phát triển và mở rộng ngành trồng nấm *Cordyceps militaris* tại Việt Nam.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực vi sinh, cụ thể sáng chế đề cập đến chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ thuần khiết về mặt sinh học có khả năng hình thành quả thể màu trắng chứa hoạt chất pentostatin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cordyceps militaris là một loài nấm dược liệu quan trọng, được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền. Các hoạt chất chính trong nấm *Cordyceps militaris* như cordycepin, adenosin, polysacarit,... đã được chứng minh có khả năng điều hòa miễn dịch, chống ung thư, chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, kháng virus. Do vậy, nấm *Cordyceps militaris* được coi là loài nấm có giá trị kinh tế cao và đang được nuôi trồng với quy mô lớn tại nhiều nước trên thế giới như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Việt Nam,... Việc tìm kiếm các chủng nấm *Cordyceps militaris* mới với năng suất, hàm lượng hoạt chất cao và đặc biệt có những đặc điểm độc đáo được coi là chìa khóa then chốt nắm giữ thành công của các doanh nghiệp và đơn vị nuôi trồng thương mại loài nấm này.

Trong tự nhiên hay nuôi trồng, quả thể nấm *Cordyceps militaris* có màu vàng tới vàng cam do trong quả thể nấm chứa carotenoid (bao gồm lutein, zeaxanthin và bốn cordyxanthin). Hiện nay, tại tất cả các cơ sở nuôi trồng nấm *Cordyceps militaris* của Việt Nam đều đang nuôi trồng chủng nấm *Cordyceps militaris* cho quả thể màu vàng cam chứa hoạt chất cordycepin và adenosin. Tuy nhiên, dưới tác động của các yếu tố di truyền hay các yếu tố bên ngoài có thể tạo ra các chủng nấm đột biến có những đặc tính độc đáo. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về nấm *Cordyceps militaris* hiện nay tập trung vào nghiên cứu đa dạng và các yếu tố ảnh hưởng tới nuôi trồng và hàm lượng hoạt chất cordycepin trong quả thể nấm. Một số ít các nghiên cứu sâu hơn đã đề cập tới đặc điểm về gen và biểu hiện gen ở nấm

Cordyceps militaris. Tuy nhiên, tất cả các nghiên cứu đều tiến hành trên các chủng nấm *Cordyceps militaris* thông thường với quả thể màu vàng cam.

Pentostatin là hoạt chất quan trọng trong sản xuất các loại thuốc hóa trị sử dụng trong điều trị ung thư. Hoạt chất này lần đầu tiên được tìm thấy trong sản phẩm lên men xạ khuẩn *Streptomyces*. Hiện nay, pentostatin chủ yếu được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hóa học. Việc ứng dụng công nghệ vi sinh trong sản xuất các hoạt chất một cách nhanh chóng và hiệu quả đã được ứng dụng nhiều trong thực tế, do đó cũng có nhu cầu tìm kiếm nguồn vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp pentostatin để có thể ứng dụng vào các quy trình sản xuất mang lại hiệu quả cao và đơn giản trong vận hành.

Như vậy, vẫn có nhu cầu rất lớn với một chủng nấm *Cordyceps militaris* có năng suất, hàm lượng hoạt chất cao, có các đặc tính hữu ích tốt hơn, đặc biệt là có khả năng sinh tổng hợp pentostatin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ thuần khiết về mặt sinh học có khả năng hình thành quả thể màu trắng chứa hoạt chất pentostatin.

Thông thường, các chủng nấm đột biến có màu trắng của các loài nấm có quả thể có màu như *Cordyceps militaris* do có hệ sắc tố tiết ít, thì sẽ tăng cường khả năng tiết các hoạt chất khác. Do đó, để tìm kiếm các chủng *Cordyceps militaris* với năng suất, hàm lượng hoạt chất cao, có các đặc tính hữu ích tốt hơn, cũng cần hướng tới các chủng đột biến màu trắng của *Cordyceps militaris*.

Chủng nấm theo sáng chế là chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ được phân lập từ mẫu quả thể đột biến màu trắng phát sinh trong quá trình nuôi trồng nấm *Cordyceps militaris* tại Việt Nam. Chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ theo sáng chế có trình tự vùng ITS (khuếch đại bởi cặp mồi ITS1 và ITS4) có kích thước 531 bp, tương đồng trên 99% với trình tự ITS của các chủng nấm *Cordyceps militaris* trên Ngân hàng gen quốc tế (NCBI). Sau 60 ngày nuôi trồng, chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ hình thành quả thể màu trắng, có chiều dài từ 3-5 cm

và quả thể chứa hoạt chất pentostatin với hàm lượng trung bình 1,5 mg/g quả thể khô.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh mẫu quả thể đột biến màu trắng thu thập tại Việt Nam.

Hình 2 là hình ảnh khuẩn lạc thu được khi nuôi cấy mẫu quả thể đột biến màu trắng thu thập được.

Hình 3 là hình ảnh quả thể màu trắng của chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ.

Hình 4 là Sắc ký đồ chạy HPLC phân tích pentostatin trong quả thể chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế mô tả chi tiết các phương án và ví dụ thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết sáng chế chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Các quy trình, kỹ thuật pha chế môi trường, khử trùng môi trường, ... là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ: phương pháp cấy để tránh vi sinh vật ngoại lai lây nhiễm vào môi trường nuôi cấy, phương pháp khử trùng môi trường nuôi cấy.

Các thành phần, hóa chất hoặc thiết bị sử dụng trong quy trình theo sáng chế có thể tìm thấy, hoặc mua được trên thị trường. Các thiết bị hoặc hóa chất có thể mua được, ví dụ, từ công ty Merck (Đức), Sigma (Mỹ) v.v..

Sáng chế đề cập đến chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ thuần khiết về mặt sinh học phân lập tại Việt Nam có khả năng hình thành quả thể màu trắng chứa hoạt chất pentostatin sẽ được bộc lộ rõ ràng ở đây thông qua các phương án thực hiện sáng chế.

Thực hiện việc theo dõi, quan sát các quả thể nấm thu được tại các đơn vị sản xuất các sản phẩm liên quan *Cordyceps militaris* để sàng lọc, tìm kiếm các quả thể nấm đột biến có màu trắng. Các tác giả sáng chế đã thu được mẫu quả thể đột biến

màu trắng phát sinh trong quá trình nuôi trồng nấm *Cordyceps militaris* tại một đơn vị sản xuất nấm tại Bắc Ninh. Mẫu quả thể đột biến màu trắng thu được được thể hiện trên Hình 1.

Thực hiện phân lập chủng nấm đột biến màu trắng bằng cách cắt mẫu quả thể màu trắng thành các lát nhỏ và đặt lên bề mặt môi trường PDA (potatose dextrose agar) chứa kháng sinh chloramphenicol với nồng độ 100 µg/ml (có tác dụng ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn), đĩa được ủ ở 22 - 25°C trong tối 5 ngày. Hệ sợi nấm màu trắng xuất hiện từ các lát quả thể được cấy chuyển sang đĩa môi trường PDA mới để thu khuẩn lạc thuần khiết (Hình 2).

Chủng nấm thuần khiết được phân loại tới loài dựa trên trình tự ITS khuếch đại bởi cặp mồi ITS1 và ITS4 (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'/ ITS4: 5'-TCCTCCGCTTA TTGATATGC-3') và sau đó thực hiện so sánh với các trình tự ITS đã biết bằng chương trình BLAST trên ngân hàng gen NCBI. Chủng nấm thuần khiết sau khi phân lập được nuôi trong môi trường PDB (lắc 200 vòng/phút ở 22 - 25°C trong tối), sau 3 - 4 ngày tiến hành thu hệ sợi nấm sử dụng cho việc tách chiết ADN tổng số. ADN tổng số của chủng nấm được tách bằng kit tách chiết ADN của hãng NanoHelix - Hàn Quốc. Mẫu ADN tổng số được sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS sử dụng cặp mồi đặc hiệu ITS1/ITS4. Sản phẩm PCR được tinh sạch sử dụng bộ kit tinh sạch ADN của hãng Promega. Sản phẩm sau tinh sạch được giải trình tự bằng phương pháp giải trình tự thế hệ mới. Trình tự ITS thu được có độ dài 531 bp được thể hiện trên SEQ ID NO: 1, tương đồng trên 99% với trình tự ITS của các chủng nấm *Cordyceps militaris* trên NCBI, xác định được chủng thu được là *Cordyceps militaris*. Chủng nấm *Cordyceps militaris* thu được được định danh là *Cordyceps militaris* SHBTQ.

Chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ thu được được lưu giữ dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học tại Trung tâm Sinh học thực nghiệm - Viện Ứng dụng công nghệ - Bộ Khoa học và Công nghệ trong dung dịch glycerol 20% ở điều kiện lạnh 4 - 5°C.

Chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ được thực hiện nuôi trồng thu quả thể và xác định khả năng sinh tổng hợp pentostatin. Chọn đĩa thạch giống nấm

Cordyceps militaris SHBTQ có hệ sợi nấm màu trắng mọc một lớp dày trên bề mặt môi trường và không bị tạp nhiễm. Chuẩn bị chai nuôi giống dịch thể là các chai thủy tinh trung tính, thể tích 1 lít chứa 500 mL môi trường PDB (potatose dextrose broth) có bổ sung 0,1% pepton được khử trùng ở 121°C trong thời gian 30 phút. Môi trường sau khử trùng được để nguội hoàn toàn qua đêm. Dùng que cấy vô trùng cắt và chuyển 2 - 3 cm² hệ sợi nấm từ đĩa giống nấm sang chai chứa môi trường lỏng. Chai giống được nuôi trong tối với điều kiện lắc 130 vòng/phút ở 22 - 25°C trong 3 - 4 ngày để thu giống nấm sản xuất dạng dịch thể.

Giống nấm dạng dịch thể được sử dụng để cấy lên môi trường dinh dưỡng chứa trong hộp nhựa trong hình trụ thể tích 650 mL đã khử trùng và để nguội. Mỗi hộp môi trường được cấy 5 mL giống nấm dạng dịch thể. Môi trường dinh dưỡng (dùng cho 1 hộp nuôi hình trụ, thể tích 650 mL) bao gồm: 30 g gạo lứt huyết rồng và 60 ml dịch dinh dưỡng. Thành phần 1 lít dịch dinh dưỡng gồm: dịch chiết 200 g khoai tây, 15 g glucoza, 15 g sucroza, 1 g MgSO₄, 1 g KH₂PO₄, 1 g pepton, 100 g nhộng tằm và nước. Giá thể sau khi cấy giống được đặt trong tối 5 - 7 ngày, ở 22 - 25°C để hệ sợi nấm phát triển toàn bộ bề mặt giá thể. Sau đó, hộp nuôi nấm được chuyển ra nuôi ở điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày (500 - 700 lux) ở 22 - 25°C, độ ẩm trên 85%. Sau 60 ngày nuôi, quả thể nấm hình thành có màu trắng đồng nhất, chiều dài quả thể đạt 3 - 5 cm, khối lượng quả thể tươi đạt 30 g/hộp nuôi.

Xác định hoạt chất pentostatin trong quả thể chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ: Mẫu quả thể tươi sau khi nuôi cấy 60 ngày được thu và sấy khô bằng máy sấy thăng hoa ở nhiệt độ -40°C tới khi độ ẩm đạt 5 - 7%. Hàm lượng pentostatin được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC. Sử dụng hệ thống thống HPLC (Shimadzu, Nhật Bản), gồm: bơm LC-20AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL-20AHT, detector DAD, lò cột CTO-10AS VP, cột Agilent C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), kết nối với máy tính có cài đặt phần mềm Labsolution để truy xuất kết quả. Detector được đặt quan sát tại bước sóng 280 nm. Kết quả phân tích cho thấy, quả thể chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ chứa hoạt chất pentostatin.

Chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ trong sáng chế khác biệt ở chỗ: Chủng này là chủng nấm *Cordyceps militaris* đột biến được phân lập tại Việt Nam có khả năng hình thành quả thể màu trắng với năng suất quả thể cao và quả thể nấm chứa hoạt chất pentostatin. Tính đến nay, chưa có một công bố nào về chủng nấm *Cordyceps militaris* đột biến được phân lập tại Việt Nam có khả năng hình thành quả thể màu trắng chứa hoạt chất pentostatin. Kết quả này mở ra một hướng mới là ứng dụng chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ vào nuôi trồng sản xuất ở Việt Nam nhằm tạo ra một sản phẩm nấm dược liệu độc đáo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nuôi trồng và xác định hoạt chất pentostatin trong quả thể chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ.

Chọn đĩa thạch giống nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ có hệ sợi nấm màu trắng mọc một lớp dày trên bề mặt môi trường và không bị tạp nhiễm. Chuẩn bị chai nuôi giống dịch thể là các chai thủy tinh trung tính, thể tích 1 lít chứa 500 mL môi trường PDB có bổ sung 0,1% pepton được khử trùng ở 121°C trong thời gian 30 phút. Môi trường sau khử trùng được để nguội hoàn toàn qua đêm. Dùng que cấy vô trùng cắt và chuyển 2 - 3 cm² hệ sợi nấm từ đĩa giống nấm sang chai chứa môi trường lỏng. Chai giống được nuôi trong tối với điều kiện lắc 130 vòng/phút ở 22 - 25°C trong 3 - 4 ngày để thu giống nấm sản xuất dạng dịch thể.

Giống nấm dạng dịch thể được sử dụng để cấy lên môi trường dinh dưỡng chứa trong hộp nhựa trong hình trụ thể tích 650 mL đã khử trùng và để nguội. Mỗi hộp môi trường được cấy 5 mL giống nấm dạng dịch thể. Môi trường dinh dưỡng dùng cho 1 hộp nuôi hình trụ, thể tích 650 mL bao gồm: 30 g gạo lứt huyết rồng và 60 ml dịch dinh dưỡng. Thành phần 1 lít dịch dinh dưỡng gồm: dịch chiết 200 g khoai tây, 15 g glucoza, 15 g sucroza, 1 g MgSO₄, 1 g KH₂PO₄, 1 g pepton, 100 g nhộng tằm và bổ sung nước cho đủ 1 lít. Giá thể sau khi cấy giống được đặt trong tối 5 - 7 ngày, ở 22 - 25°C để hệ sợi nấm phát triển toàn bộ bề mặt giá thể một lớp mỏng. Loại bỏ các hộp nhiễm nấm mốc. Sau đó, hộp nuôi nấm được chuyển ra nuôi ở điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 500 - 700 lux ở 22 - 25°C,

độ ẩm trên 85%. Sau 60 ngày nuôi, quả thể nấm hình thành có màu trắng đồng nhất, chiều dài quả thể đạt 3 - 5 cm, khối lượng quả thể tươi đạt 30 g/hộp nuôi (Hình 3).

Xác định hoạt chất pentostatin trong quả thể chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ: Mẫu quả thể tươi sau khi nuôi cấy 60 ngày được thu và sấy khô bằng thiết bị sấy thăng hoa ở nhiệt độ -40°C tới khi độ ẩm đạt 5 - 7%. Hàm lượng pentostatin được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC. Cân chính xác 0,2 g bột quả thể đã nghiền (qua rây số 180 và đã xác định độ ẩm) vào bình tam giác dung tích 50 ml. Thêm 10ml nước, tiến hành chiết siêu âm trong 60 phút (công suất 250w, tần số 50kHz, nhiệt độ phòng), sau đó để yên 10 phút, lọc qua giấy lọc vào bình định mức 25 ml. Thêm tiếp 10 ml nước vào phần bã được liệu, siêu âm trong 60 phút, sau đó để yên 10 phút và lọc tiếp dịch chiết vào bình định mức 25 ml, bổ sung đến vạch mức bằng nước, lắc đều, thu được dung dịch mẫu thử. Dung dịch mẫu thử được lọc qua màng lọc 0,22 μm trước khi tiêm vào hệ thống phân tích HPLC. Sử dụng hệ thống thống HPLC (Shimadzu, Nhật Bản), gồm: bơm LC-20AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL-20AHT, detector DAD, lò cột CTO-10AS VP, cột Agilent C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm), kết nối với máy tính có cài đặt phần mềm Labsolution để truy xuất kết quả. Detector được đặt quan sát tại bước sóng 280 nm. Kết quả phân tích cho thấy, quả thể chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ chứa hoạt chất pentostatin với hàm lượng trung bình 1,5 mg/g quả thể khô (Hình 4).

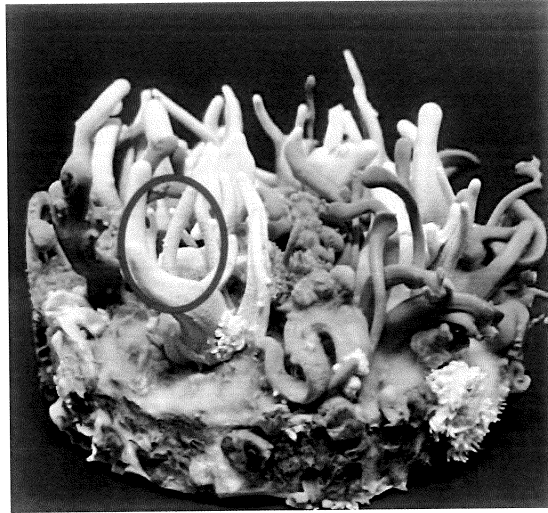
Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ là chủng nấm đột biến được phân lập tại Việt Nam có khả năng hình thành quả thể màu trắng với năng suất quả thể cao và quả thể nấm chứa hoạt chất pentostatin. Tính đến nay, chưa có một công bố nào về chủng nấm *Cordyceps militaris* đột biến được phân lập tại Việt Nam có khả năng hình thành quả thể màu trắng chứa hoạt chất pentostatin. Chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ là chủng đầu tiên phân lập tại Việt Nam có khả năng hình thành quả thể màu trắng chứa hoạt chất pentostatin. Kết quả này mở ra một hướng mới là ứng dụng chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ vào nuôi trồng sản xuất ở Việt Nam nhằm tạo ra một sản phẩm nấm dược liệu độc đáo.

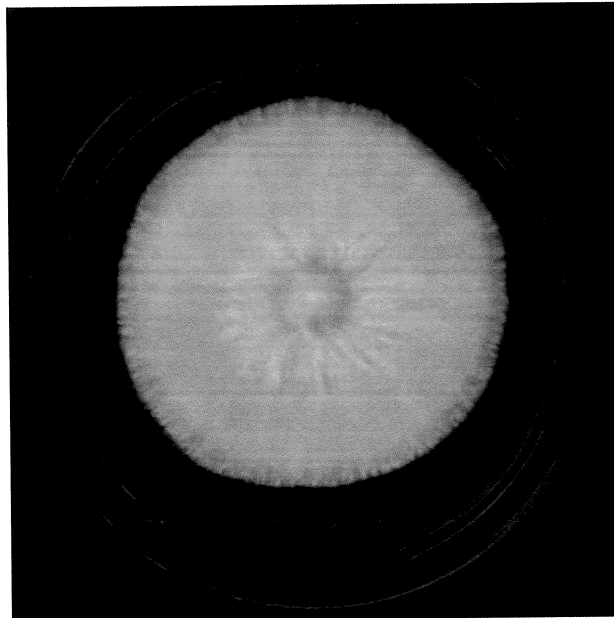
Chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ có khả năng áp dụng trên qui mô công nghiệp, giúp tạo ra sản phẩm mới độc đáo là quả thể nấm *Cordyceps militaris* màu trắng chứa hoạt chất pentostatin, góp phần thúc đẩy mở rộng ngành nuôi trồng nấm *Cordyceps militaris* ở Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

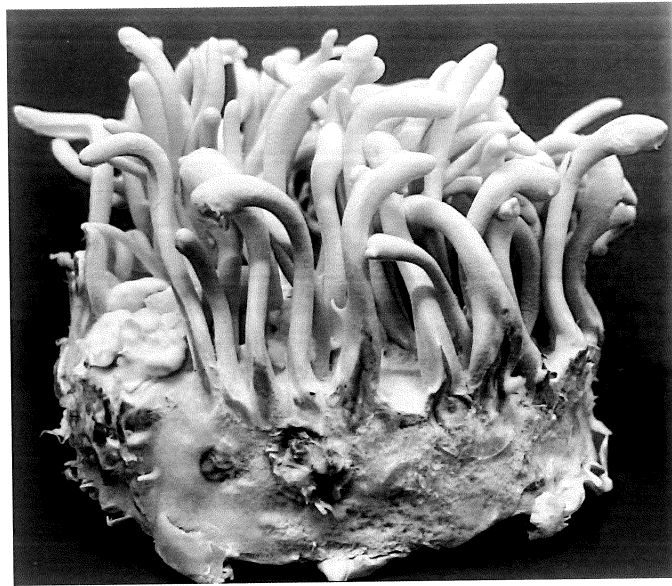
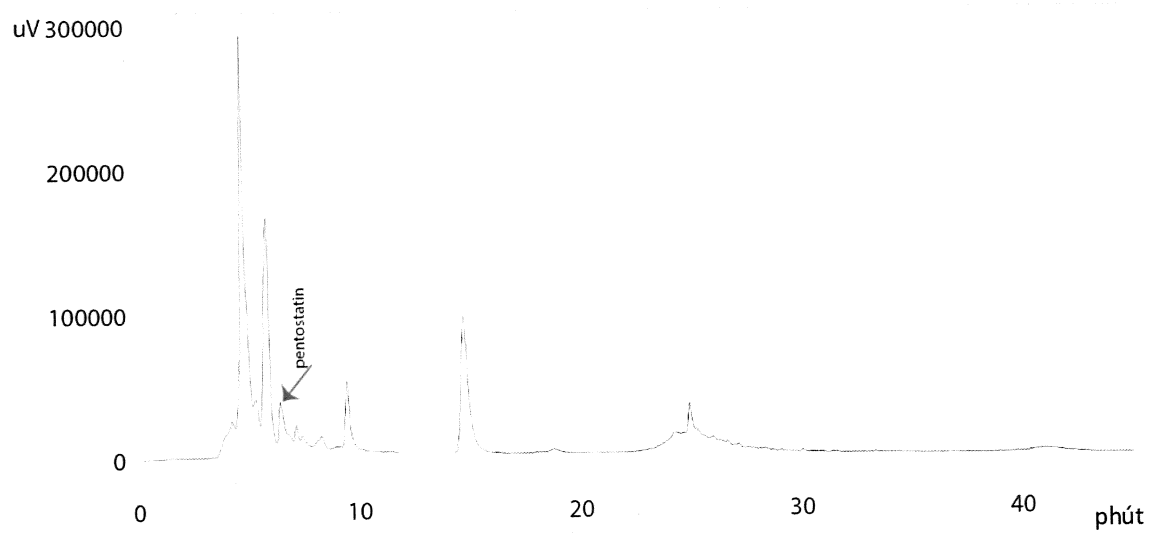
1. Chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ thuần khiết về mặt sinh học có khả năng hình thành quả thể màu trắng chứa hoạt chất pentostatin, trong đó chủng nấm này được phân lập tại Việt Nam và có trình tự ITS có độ dài 531 bp được thể hiện trên SEQ ID NO: 1.



Hình 1



Hình 2

**Hình 3****Hình 4**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> TRUNG TÂM SINH HỌC THỰC NGHIỆM - VIỆN ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ

<120> Chủng nấm *Cordyceps militaris* SHBTQ thuần khiết về mặt sinh học có khả năng hình thành quả thể màu trắng chứa hoạt chất pentostatin

<160> 1

<210> 1

<211> 531

<212> ITS

<213> *Cordyceps militaris*

<400> 1

```

tttcaactcc caccctttgt gaacatacct atcgttgctt cggcggactc gccagcgcc 60
tggacgcggg cctgggcggc ggccgtcggg ggccccaac actgtatcta ccagtttttc 120
tgaatccgcc gcaaggcaaa acaaatgaat caaaactttc aacaacggat ctcttggtc 180
tggcatcgat gaagaacgca gcgaaatgcg ataagtaatg tgaattgcag aattcagtga 240
atcatcgaat ctttgaacgc acattgcgcc cgccagcatt ctggcgggca tgcctgttcg 300
agcgtcatth caaccctcga cgtcccctgg gggatgtcgg cgttggggac cggcagcaca 360
ccgccgcccc cgaaatgaag tggcggcccg tccgcggcga cctctgcgta gtactccaac 420
tcgcaccggg aaccgcacgt ggccacgccg taaaacgcc aactctgaac gttgacctcg 480
gatcaggtag gaataccgcg tgaacttaag catatcaata agccggagga a 531

```