



(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)



2-0004212

(51) **C12N 1/00**
2024.01

(13) **Y**

(21) 2-2025-00062

(22) 24/02/2022

(67) 1-2022-01149

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/07/2022 412A

(73) Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Số 18, đường Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

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

(54) **CHỦNG VI NẤM NỘI SINH ASPERGILLUS FUMIGATUS SDF8 THUẦN
KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ VÀ
SINH TỔNG HỢP CHẤT CHỐNG OXY HÓA**

(21) 2-2025-00062

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi nấm *Aspergillus fumigatus* SDF8 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân cây thiết sam núi đá (*Tsuga chinensis* (Franch.) Pritz.) phân bố tại Hà Giang, Việt Nam có hoạt tính gây độc tế bào ung thư A549, MCF7 (IC₅₀ 36,18µg/ml; 50,56µg/ml), có khả năng sinh tổng hợp chất chống oxy hóa polyphenol, flavonoid hàm lượng lần lượt đạt 99,09mg GAE/g, 96,25mg QE/g cao chiết từ dịch lên men, có hoạt tính chống oxy hóa cao loại bỏ gốc tự do hydroxyl với tỷ lệ phần trăm ức chế là 68,38% ở nồng độ 600µg/ml cao chiết hoạt chất sinh học thô, DPPH, superoxit lần lượt với tỷ lệ phần trăm ức chế là 70,80%, 75,96%, và năng lượng khử sắt là 0,73 ở nồng độ 800µg/ml cao chiết hoạt chất sinh học thô và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 525bp đã được đăng ký trên ngân hàng GenBank NCBI (mã số OM721777). Hoạt chất sinh học có tác dụng trong việc điều trị bệnh ung thư, phòng ngừa và điều trị các bệnh liên quan đến gốc tự do như bệnh tim mạch, xơ vữa động mạch, tăng huyết áp, tiểu đường, viêm khớp và lão hóa.

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 ứng dụng trong y dược liên quan đến chủng vi nấm nội sinh trên cây thiết sam núi đá có hoạt tính gây độc tế bào ung thư và sinh tổng hợp các chất chống oxy cao. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề xuất chủng vi nấm nội sinh *Aspergillus fumigatus* SDF8 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ thân của cây thiết sam núi đá (*Tsuga chinensis* (Franch.) Pritz.) phân bố tại Huyện Đồng Văn, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam có hoạt tính gây độc tế bào ung thư cao và sinh tổng hợp polyphenol, flavonoid có hoạt tính chống oxy hóa cao.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Ung thư đã và đang là mối quan tâm ngày càng tăng của nhân loại nhất là khi xã hội đang ở giai đoạn phát triển vượt bậc về y học, khoa học và công nghệ. Theo ước tính của Đài quan sát Ung thư Toàn cầu, sẽ có khoảng 29,5 triệu trường hợp ung thư mới, trong đó việc thực hiện các chiến lược phòng chống ung thư sẽ cứu sống gần 15 triệu người (Eniu và cs., 2019). Áp lực oxy hóa được biết đến là sự mất cân bằng của các loại oxy phản ứng (ROS) và các chất chống oxy hóa trong cơ thể, có thể dẫn đến tổn thương tế bào và mô, cản trở sự phát triển của ung thư (Griffiths và cs., 2016, Liu và cs., 2018). Thật 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). Trong nhiều thập kỷ, một số chất chống oxy hóa phenolic tổng hợp bao gồm butylat hydroxycanisole, butylat hydroxytoluen và propyl gallat đã được sử dụng để điều trị các bệnh liên quan đến ROS đã được báo cáo là gây ra tác dụng phụ nghiêm trọng (Saad cs., 2007). Tiếp cận với một số ít các liệu pháp hóa trị ung thư, các tác dụng phụ có hại của chúng và giá thành cao của hầu hết các loại thuốc này, khiến việc điều trị bệnh trở nên khó khăn. Hơn nữa, nhiều liệu pháp hiện tại không điều trị hiệu quả một số bệnh ung thư và các khối u đa kháng thuốc càng làm gây khó khăn trong việc điều trị. Việc phát hiện ra các tác nhân trị liệu hóa học mới là mục tiêu chính của các nhà hóa học dược liệu và sản phẩm tự nhiên. Trong phân tích dữ liệu được công bố trong Báo cáo hàng năm về Hóa dược, Newman và cộng sự phát hiện ra rằng từ năm 1989–1995, hơn 60% các loại thuốc được phê duyệt và các ứng cử viên thuốc được phát triển làm chất chống nhiễm trùng hoặc thuốc chống ung thư có nguồn gốc tự nhiên, được sản xuất trong một vật chủ thay thế nhưng bao gồm các sản phẩm tự nhiên ban đầu, các dẫn xuất của các sản phẩm tự nhiên và các sản phẩm tổng hợp được mô phỏng theo các hợp chất tự nhiên. Trong một phân tích chi tiết về các tác nhân thuốc mới trong giai đoạn 1981–2002, Newman và cộng sự.

Giải mã các nguồn hợp chất của các loại thuốc mới và được phê duyệt cho các bệnh khác nhau, từ thuốc giảm đau đến các vết thương. Trong số 79 chất chống ung thư mới, 12 chất là sinh học, 9 chất là sản phẩm tự nhiên, 21 chất dẫn xuất từ sản phẩm tự nhiên, 10 chất có nguồn gốc từ tổng hợp toàn phần với được chất sản phẩm tự nhiên và 25 chất từ tổng hợp toàn phần. Vì vậy, cần phải tìm kiếm các chất chống ung thư và chống oxy hóa thay thế từ các nguồn tự nhiên như vi sinh vật có thể khắc phục sự thất bại của hóa trị cũng như ngăn ngừa nguy cơ ung thư.

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). Tuy nhiên, quan sát thấy rằng hầu hết sự đa dạng nấm nội sinh vẫn chưa được khai thác nhiều (Huang và cs., 2008). Nhiều hợp chất được sản xuất bởi các loại nấm này có hoạt tính sinh học và bao gồm các alcaloit, flavonoit, steroid, terpenoit, peptit, polyketon, quinol và phenol cũng như một số hợp chất chứa clo. Cho đến năm 2003, khoảng 4.000 chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học đã được báo cáo từ nấm (Dreyfuss và Chapela, 1994). Rất nhiều thông tin về sự phân lập các hợp chất hoạt tính sinh học khác nhau từ nấm nội sinh đã được báo cáo trong ba thập kỷ qua. Hầu hết các chất chuyển hóa này được sản xuất bởi các loài *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium* và *Penicillium*. Schulz và cộng sự (2002) đã phân lập khoảng 6.500 chủng nấm nội sinh và thử nghiệm tiềm năng sinh học của chúng. Họ đã phân tích 135 chất chuyển hóa thứ cấp và thấy rằng 51% (38% đối với phân lập đất) các hợp chất có hoạt tính sinh học được phân lập từ nấm nội sinh là sản phẩm tự nhiên mới.

Nấm nội sinh đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp. Sự kết hợp của các yếu tố cảm ứng, bao gồm cả thực vật và nấm nội sinh làm tăng tích lũy các chất chuyển hóa thứ cấp trong thực vật và nấm (Li và cs., 2009). Nghiên cứu con đường sinh tổng hợp thể hiện rằng thực vật và nấm nội sinh có con đường trao đổi chất tương tự để sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp (Jennewein và cs., 2001). Sản xuất độc lập taxol bởi nấm nội sinh do gen 10-deacetylbaaccatin-III-10-O-acetyl transferaza từ nấm nội sinh *Cladosporium cladosporioides* MD2 phân lập từ môi trường *Taxus* (Zhang và cs., 2009). Gen này có liên quan đến con đường sinh tổng hợp taxol và giống 99% với *T. media* và giống 97% với *Taxus wallichiana* var. *marirei*. Hơn 20 loại thuốc có nguồn gốc từ sản phẩm tự nhiên đã được tung ra thị trường trên toàn thế giới từ 2001 đến 2005 và khoảng 140 loại đã trải qua các giai đoạn thử nghiệm lâm sàng khác nhau (Lam, 2007). Các chất chuyển hóa chức năng có nguồn gốc từ vi nấm nội sinh đã được thể hiện tiềm năng to lớn, tác động đến lĩnh vực dược phẩm (Strobel và Daisy, 2003; Gunatilaka, 2006).

Cuộc tìm kiếm các sản phẩm tự nhiên như các chất chống ung thư tiềm năng đã có trước năm 1550 trước Công nguyên, nhưng kỷ nguyên khoa học của sự tìm kiếm chất chống ung thư chỉ mới xuất hiện vào những năm 1950 với sự khám phá và phát triển của các alcaloit vinca, vinblastin và vincristin và sự phân lập độc tố gây độc tế bào (Verekar và cs., 2014). Các hợp chất có nguồn gốc thực vật đã đóng một phần quan

trọng trong việc phát triển một số loại thuốc chống ung thư hữu ích trên thử nghiệm lâm sàng, ví dụ: vinblastin, vincristin, selerotiorin, các dẫn xuất camptothecin (CPT), topotecan và irinotecan, etoposid có nguồn gốc từ epipodophyllotoxin, với paclitaxel (Taxol) là ví dụ có tác động nhiều nhất.

CPT là một alkaloit quinoline pentacyclic, một chất chống ung thư mạnh. CPT đầu tiên được phân lập bởi từ gỗ của *C. acuminata* Decaisne (Nyssaceae), một loại cây có nguồn gốc từ Trung Quốc. Alkaloit này đã được công bố từ một số loài thực vật ví dụ như các loài *Ervatamia heyneana*, *Merrilliodendron megacarpum* và *Ophiorrhiza*, với năng suất rất cao, được tìm thấy ở *Nothapodytes nimmonia* (Govindachari và Viswanathan, 1972). CPT ức chế sự nhân lên của virus gây suy giảm miễn dịch ở người trong ống nghiệm và cũng được biết là có hiệu quả hoàn toàn với ung thư tử cung, ung thư phổi, ung thư cổ tử cung và ung thư vú (Kusari và cs., 2009). Puri và cộng sự (2005) lần đầu tiên báo cáo một loại nấm nội sinh *Entrophospora infrequens* thu được từ *Nothapodytes foetida* có khả năng sản xuất CPT. Amna và cộng sự (2006) đã tiến hành các nghiên cứu động học về sự tăng trưởng và tích lũy CPT của *E. infrequens* nội sinh trong nuôi cấy huyền phù và đã xác định rằng loại nấm nội sinh này sẽ là nguồn vi sinh tiềm năng thay thế để tạo ra CPT.

Vinblastin và vincristin là hai alkaloit bisindole tự nhiên từ cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* hoặc *Vinca rosea*) được sử dụng làm thuốc chính trong tương ứng điều trị ung thư hạch và bệnh bạch cầu (Barnett và cs., 1978). Cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (Apocynaceae)) được tìm thấy có chứa một lượng lớn các alkaloit, khoảng 100 trong số đó đã được phân lập cho đến nay (Hughes và Shanks, 2002; Samuelsson và Bohlin, 2017). Nghiên cứu của Kharwar và cộng sự (2008) trên các vi sinh vật nội sinh trên cây dừa cạn (từ hai hệ sinh thái khác nhau ở Bắc Ấn Độ) đã chỉ ra rằng, chủng *Alternaria* và *Fusarium oxysporum* phân lập từ thực vật có khả năng sản xuất các alkaloit vinca.

Podophyllotoxin là một loại thuốc tự nhiên có hoạt tính dược học thuộc nhóm hóa chất của lignan. Nó hoạt động như một chất ức chế nguyên phân bằng cách liên kết thuận nghịch với tubulin và ức chế sự tập hợp vi ống (Cragg và Suffness, 1988). Vì vậy, podophyllotoxin được sử dụng làm tiền chất để tổng hợp các loại thuốc chống ung thư quan trọng này như etoposid (VP-16-213) và teniposid (VM-26) được sử dụng trong điều trị ung thư phổi, ung thư tinh hoàn, nhiều loại bệnh bạch cầu và bệnh bạch cầu, khối u rắn khác (Majumder và Jha, 2009). Một số báo cáo cho thấy sản xuất podophyllotoxin từ vi sinh vật nội sinh của *Podophyllum hexvårn*, *P. peltatum*, *Juniperus recurva* và *J. Communis* L. Horstmann (Kusari và cs., 2009; Nadeem và cs., 2012).

So với các thuốc chống ung thư khác như camptothecin, vinca alkaloit, podophyllotoxin và colchicin, động lực liên kết của taxol với tubulin rất đặc biệt. Các chất trên tăng cường tháo gỡ vi ống trong khi paclitaxel thúc đẩy lắp ráp và ổn định (Roberts và Hyams, 1979). Do khả năng độc nhất của nó liên kết đặc biệt với β -tubulin và độc tính tế bào của nó ở nồng độ thấp hơn, paclitaxel đang được sử dụng để điều trị

một số khối u thông thường. Paclitaxel đã được sử dụng thành công trong điều trị lâm sàng ung thư buồng trứng nhờn thuốc và phát triển mạnh hơn (Markman, 1991; Einzig và cs., 1992) và ung thư vú (Holmes và cs., 1991). Hiện nay, nó cũng được dùng để điều trị ung thư phổi (Ettinger, 1993), đầu và cổ (Forastiere và cs., 1993), thận, tuyến tiền liệt, ruột kết, cổ tử cung, dạ dày và tuyến tụy (Einzig và cs., 1992; Arbuck và cs., 1993; Brown và cs., 1993; Roth và cs., 1993).

Bên cạnh đó khả năng sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa của vi nấm đã được thể hiện qua một số công bố khoa học. 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'-acetyl-3,5,7'-trimethoxy-3'H-spiro[cyclohexa [2,4] diene-1,1'-isobenzofuran] -3',6-dion và axit 4-acetyl-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 cộng sự, 2016). Hợp chất varicolortin 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 $5,2 - 99,4 \mu\text{g/mL}$ 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).

Hiện nay, việc khai thác cây dược liệu ở dạng thô (sử dụng toàn bộ hay một số bộ phận cơ thể thực vật để làm thuốc, xuất khẩu nguyên liệu thô, tách chiết tinh dầu, tách chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học...) đã làm cho tài nguyên di truyền thực vật ở Việt Nam đã trải qua những thay đổi lớn, do nhiều nguyên nhân khác nhau mà nguồn gen nhiều loài cây bị suy thoái nghiêm trọng, một số loài có nguy cơ tuyệt chủng, dẫn đến nguy cơ suy giảm đa dạng sinh học nguồn tài nguyên thực vật. Nghiên cứu này không những mở ra hướng nghiên cứu mới về vi sinh vật học ứng dụng ở Việt Nam mà còn góp phần quan trọng trong việc xác định được mức độ đa dạng sinh học nguồn tài nguyên vi nấm nội sinh trên một số cây dược liệu của Việt Nam, phát hiện được các nguồn gen nấm mới, tiềm năng nhằm ứng dụng và phát triển các sản phẩm chuyển hóa thứ cấp trong lĩnh vực y dược ứng dụng trong điều trị bệnh ung thư và thực phẩm một cách bền vững, không dẫn đến việc hủy hoại cây chủ, bảo vệ sự đa dạng tài nguyên thực vật cũng như vi sinh vật của Việt Nam. Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên quan tâm tới mối tương quan giữa khả năng sinh hợp chất có hoạt tính sinh học của các vi nấm nội sinh và các sản phẩm chuyển hóa của cây thiết sam núi đá.

Ở Việt Nam, thiết sam núi đá thuộc họ Thông Pinaceae, bộ Thông Pinales được phát hiện tại Hà Giang (Đồng Văn: Tài Phìn Tùng, Hồ Quảng Phìn, Tà Xá; Mèo Vạc: Sung Chang, Lu Lu Phìn; Yên Minh: Lao Và Chải), Cao Bằng ở độ cao 1000m đến 1.500m. Thế giới: Phân bố từ Đài Loan và miền trung Trung Quốc xuống đến miền nam, trong đó có 3 tỉnh giáp với Việt Nam là Vân Nam, Quảng Tây và Quảng Đông. Đây là loài cây dược liệu quý hiếm, thuộc danh sách "đỏ" trong Chương trình Nghiên cứu bảo tồn và phát triển nguồn gen quý hiếm về cây thuốc, nhưng chưa được quan tâm nghiên cứu và khai thác ứng dụng trong điều trị bệnh tại Việt Nam. Ở Việt Nam và trên Thế giới trước đây đã có nhiều đề tài nghiên cứu về vi nấm nội sinh; tuy nhiên, các nghiên cứu về vi nấm nội sinh ở cây thiết sam núi đá (*Tsuga chinensis* (Franch.) Pritz.) có hoạt tính gây độc tế bào ung thư và chống oxy hóa đến nay chưa có công bố.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng vi nấm nội sinh *Aspergillus fumigatus* SDF8 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân của cây thiết sam núi đá (*Tsuga chinensis* (Franch.) Pritz.) phân bố tại Huyện Đồng Văn, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam (23°15'30" N 105°17'24" E) có hoạt tính gây độc tế bào ung thư cao và sinh tổng hợp polyphenol, flavonoid có hoạt tính chống oxy hóa cao.

Chủng vi nấm nội sinh SDF8 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 525bp và được đăng ký trên ngân hàng GenBank (mã số OM721777) và có hoạt tính gây độc dòng tế bào ung thư phổi (A549) ở người (IC₅₀ 36,18µg/ml) và ung thư vú (MCF7) ở người (IC₅₀ 50,56µg/ml), có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất chống oxy hóa cao polyphenol, flavonoid với hàm lượng đạt 99,09mg GAE/g, 96,25mg QE/g cao chiết từ dịch lên men, tương ứng

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng vi nấm nội sinh SDF8 trên môi trường PDA sau 5 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc màu xanh xám, dạng nhung mịn, mặt sau khuẩn lạc màu trắng vàng, khuẩn lạc tròn.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái bào tử của chủng vi nấm nội sinh SDF8 chụp trên kính hiển vi quang học (độ phóng đại 400 lần). Bào tử hình cầu, có kích thước 2-2,5µm, mọc dạng tỏa tròn. Bọng hình cầu, có chiều rộng 25-35µm. Cuống sinh bào tử trong suốt.

Hình 3 là hình ảnh thể hiện hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết từ chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8. Khả năng khử gốc gốc hydroxyl tự do (A), DPPH (B), năng lượng khử sắt (C) và khả năng đánh bắt gốc superoxit (D).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ thân của cây thiết sam núi đá (*Tsuga chinensis* (Franch.) Pritz.) phân bố tại Huyện Đồng Văn, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam có hoạt tính gây độc tế bào ung thư cao và sinh tổng hợp polyphenol, flavonoid có hoạt tính chống oxy hóa cao.

Việc phân lập chủng thuần khiết về mặt sinh học từ thân của cây thiết sam núi đá (*Tsuga chinensis* (Franch.) Pritz.) được thực hiện theo phương pháp của Kumar và cộng sự (2019) có cải tiến như mô tả sau đây. Mẫu thân cây thiết sam núi đá (*Tsuga chinensis* (Franch.) Pritz.) phân bố tại Huyện Đồng Văn, 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 ethanol 70% (v/v) trong 30 giây, NaOCl 3,5% (v/v) trong 2 phút và rửa tiếp với ethanol 70% (v/v) trong 2-5 giây. Sau đó, rửa lại bằng nước cất khử trùng 4 lần. Các mẫu thân cây được cắt thành từng lát nhỏ (0,5x0,5x0,5cm), đặt các lát nhỏ lên đĩa Petri chứa môi trường PDA-G (Môi trường PDA cải tiến có thành phần môi trường (g/l) như sau: 150g khoai tây; 10g đường glucoza; 10g sacaroza; 16g thạch và 1 lít nước cất) có độ pH = 7, có bổ sung streptomycin sulphat (100mg/L) với khoảng cách đồng đều và được đánh số kí hiệu, thứ tự riêng tương ứng. Các đĩa được nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 5-7 ngày, theo dõi các đĩa hàng ngày để kiểm tra sự phát triển của các khuẩn lạc nấm. Cây 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 ADN của chủng nấm thu được bằng kit tách chiết ADN (Dneasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Đức) và khuếch đại các vùng ITS cùng với gen 5,8S rARN bằng cặp mồi đặc hiệu ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') và ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'). Tiếp theo, các vùng ITS cùng với gen 5,8S rARN thu được 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 thử nghiệm khả năng sinh tổng hợp hoạt chất gây độc tế bào ung

thư và các chất chồn oxy hóa. Chủng nấm thử nghiệm được nuôi cấy trong 3 lít môi trường PDB-S (Môi trường PDB-S cải tiến có thành phần môi trường (g/l) như sau: 150g khoai tây; 10g đường glucoza; 10g sacaroza; 1g bột đậu tương và 1 lít nước cất, giá trị pH 7,0) ở nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 7 ngày. Dịch lên men được xay nhỏ bằng máy xay sinh tố, xay nhuyễn sinh khối và 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 và sinh khối đã xay nhuyễn) 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 (IKA, RV10, Đức) để loại bỏ dung môi. Sau đó cặn kháng sinh, kháng ung thư thô 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 hoạt tính gây độc tế bào ung thư, xác định hàm lượng polyphenol, flavonoid tổng và xác định hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết.

Thực hiện việc phân lập và xác định các đặc tính sinh trưởng và phát triển như nêu trên, tác giả giải pháp hữu ích đã thu được chủng vi nấm thuộc chi *Aspergillus* thuần khiết về mặt sinh học. Chủng vi nấm này có đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 525bp và có độ tương đồng $\geq 99\%$ và có độ dài đoạn so sánh $\geq 98\%$ so với các chủng *Aspergillus* được đối chiếu trên hàng dữ liệu gen NCBI và được định danh là *Aspergillus fumigatus* SDF8 (mã số GenBank OM721777).

Chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích có hoạt tính gây độc dòng tế bào ung thư phổi ở người (IC₅₀ 36,18µg/ml) và ung thư vú ở người (IC₅₀ 50,56µg/ml), có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất chống oxy hóa cao polyphenol, flavonoid với hàm lượng đạt 99,09mg GAE/g, 96,25mg QE/g cao chiết từ dịch lên men, tương ứng

Chủng vi nấm *A. fumigatus* SDF8 thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế là chủng tự nhiên được phân lập từ thân cây thiết sam núi đá (*Tsuga chinensis* (Franch.) Pritz.) phân bố tại Huyện Đồng Văn, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất gây độc tế bào ung thư và sinh tổng hợp polyphenol, flavonoid có hoạt tính chống oxy hóa cao, các chất này có tác dụng trong 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 kháng ung thư và chất chống oxy hóa quy mô lớn đơn giản mà lại cho hiệu suất kháng ung thư và chống oxy hóa cao, phục vụ 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 ung thư tại Việt Nam, góp phần giảm giá thành sản phẩm, nâng cao sức khỏe cộng đồng và tăng hiệu quả kinh tế và xã hội.

Chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 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 dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học, trong môi trường PDA-G trong điều kiện lạnh sâu -20°C và -86°C, đồng thời bào tử của chủng được lưu giữ trong cát.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập chủng vi nấm nội sinh có khả năng sinh tổng hợp chất gây độc tế bào ung thư và các chất chống oxy hóa

Mẫu thân cây thiết sam núi đá (*Tsuga chinensis* (Franch.) Pritz.) phân bố tại Huyện Đồng Văn, 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-G 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. Cấy 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 SDF8 có thời gian sinh trưởng 5-7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA-G. Nuôi cấy chủng SDF8 thuần trên môi trường PDA-G 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 SDF8 đến chi.

Chủng vi nấm nội sinh SDF8 được nuôi cấy phát triển trên môi trường PDA-G ở 28°C, quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc và kích thước khuẩn lạc. Hình thái khuẩn lạc của chủng vi nấm nội sinh SDF8 trên môi trường PDA-G sau 5 ngày nuôi cấy được thể hiện trên hình 1. Khuẩn lạc của chủng vi nấm nội sinh SDF8 có màu xanh xám, viền kem, khuẩn lạc tròn, dạng nhung mịn và mặt sau khuẩn lạc màu trắng vàng. Chuẩn bị

lam kính, lamen 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 lamen đẩy lên bề mặt miếng thạch. Sau đó đặt lam kính chứa lamen 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 lamen. 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 SDF8 được thể hiện trên hình 2, trong đó bào tử hình cầu, có kích thước 2-2,5µm, mọc dạng tỏa tròn. Bọng hình cầu, có chiều rộng 25-35µm. Cuống sinh bào tử trong suốt.

Kết quả nhận dạng được chủng vi nấm nội sinh SDF8 thuộc chi *Aspergillus*.

ADN của chủng vi nấm nội sinh SDF8 được tách chiết bằng kit tách chiết ADN (Dneasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Đức). Kết quả kiểm tra trên máy đo quang phổ cho thấy ADN tổng số tách chiết được có độ tinh sạch cao ($A_{260}/A_{280} = 1,98$) và được sử dụng làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR.

Vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm nội sinh SDF8 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, 0,1 µg ADN tổng số 0,4µM mỗi mồi, 0,2mM dNTPs, 1×Taq polymeraza đệm, và 1U Taq ADN polymeraza và nước khử ion. Chu trình nhiệt bao gồm: 95°C trong 10 phút; 35 chu trình: 95°C trong 30 giây, 65°C trong 60 giây, 72°C trong 90 giây; 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C. Sau khuếch đại, sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di gel agarosa 1%. Kết quả thu được một phân đoạn gen có kích thước khoảng 570bp. Tinh sạch đoạn gen này bằng kit tinh sạch ADN (GeneJET PCR Purification Kit #K0701, Thermo Scientific).

Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm nội sinh SDF8 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 SDF8 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 SDF8 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		
SDF8	<i>Aspergillus fumigatus</i> LF5	JF815069.1	98	99,22
	<i>Aspergillus fumigatus</i> DBB5	OM218663.1	98	99,22
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ZC-2	MK630344.1	98	99,22
	<i>Aspergillus fumigatus</i> AFUM-1	KY019228.1	98	99,22
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ZHLB-3	MT487765.1	99	98,85

Kết quả cho thấy đã xác định được trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 tách từ chủng vi nấm nội sinh SDF8 có kích thước 525bp. Đoạn gen này có mức tương đồng với các trình tự gen trên NCBI $\geq 99\%$ và có độ dài đoạn so sánh $\geq 98\%$ so với các chủng *Aspergillus* được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI như *Aspergillus fumigatus* LF5 (99,22%), *Aspergillus fumigatus* DBB5 (99,22%), *Aspergillus fumigatus* ZC-2 (99,22%), *Aspergillus fumigatus* AFUM-1 (99,22%) và *Aspergillus fumigatus* ZHLB-3 (98,85%). Với kết quả này cho thấy, chủng vi nấm nội sinh SDF8 thuộc loài *Aspergillus fumigatus*. Kết quả này cho kết quả tương tự khi phân loại bằng phương pháp truyền thống. Chủng vi nấm nội sinh SDF8 được định danh là *Aspergillus fumigatus* SDF8 (mã số GenBank OM721777).

Ví dụ 2: Nuôi cấy và tách chiết chất gây độc tế bào ung thư và các chất chống oxy hóa từ dịch lên men của chủng vi nấm nội sinh SDF8

Chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 được nuôi lắc trong 3 lít môi trường PDB-S ở 150 vòng/phút, nhiệt độ 28°C trong 7 ngày. Chất kháng ung thư và các chất chống oxy hóa thô theo các bước như sau: (1) dịch lên men được xay nhỏ bằng máy xay sinh tố, xay nhuyễn sinh khối và thu được hỗn hợp dịch lên men, sinh khối; (2) hỗn hợp trên được tách chiết 3 lần bằng dung môi hữu cơ etyl acetat theo tỷ lệ 1:3 (thể tích dung môi : thể tích hỗn hợp dịch lên men và sinh khối đã xay nhuyễn) thu được dịch chiết nấm, thu pha trên, chính là dịch chiết chất có hoạt tính sinh học toàn phần; (3) dịch chiết nấm tiếp tục cô quay ở 60°C bằng thiết bị cô quay (IKA, RV10, Đức) để loại bỏ dung môi; (4) sau khi cô quay thu cặn chất kháng ung thư và các chất chống oxy hóa thô được làm khô và cân đến khối lượng không đổi (cao chiết); (5) cao chiết hoạt chất sinh học thô được bảo quản ở 4°C cho các thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư, xác định hàm lượng polyphenol, flavonoid tổng và xác định hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết.

Ví dụ 3: Thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư của cao chiết hoạt chất sinh học thô từ dịch lên men của chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8

Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute – NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro*. Phép thử này được thực hiện theo phương đã được công bố trước đây (Skehan và cs., 1990). Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamin B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau: (1) trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm; (2) chất thử đã pha ở nồng độ 100µg/mL được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng. Giếng không có chất thử nhưng có tế bào ung thư (190µL) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng Axit Trichloroacetic – TCA 20%; (3) ủ trong tủ ấm 72 giờ. Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37°C, rửa 3 lần bằng axit acetic rồi để khô ở nhiệt độ phòng; (4) 10 mM đệm Tris base để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút rồi đọc kết quả OD ở bước sóng 540nm trên máy ELISA Plate Reader (Biotek); (5) phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau: $\% \text{ức chế} = 100\% - \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{ngày 0})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{ngày 0})}$; (6) phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticin ở các nồng độ 10µg/mL; 2µg/mL; 0,4µg/mL; 0,08µg/mL được sử dụng như là chất đối chứng tham khảo; (7) DMSO 1% luôn được sử dụng như đối chứng âm (nồng độ cuối cùng trong giếng thử là 0,05%). Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4; (8) theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), căn chiết được coi có hoạt tính tốt với IC₅₀ ≤ 20µg/mL, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt khi IC₅₀ ≤ 5µM (Hughes và cs., 2011).

Bảng 2 - Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8

Nồng độ (µg/mL)	Hoạt tính gây độc tế bào ung thư SDF8		Nồng độ (µg/mL)	Hoạt tính gây độc tế bào ung thư <i>Ellipticin</i>	
	A549	MCF7		A549	MCF7
100	61,61± 1,53	60,13± 2,67	100	90,9± 0,69	93,97± 2,26
IC ₅₀	36,81±2,82	50,56±1,82	IC ₅₀	0,43±0,03	0,47±0,05

Ghi chú: Ellipticine được sử dụng làm đối chứng dương.

Kết quả gây độc tế bào hai dòng tế bào ung thư phổi A549 và vú MCF7 ở người của cao chiết hoạt chất sinh học thô từ chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 được thể hiện trong bảng 2. Cao chiết hoạt chất sinh học thô từ chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 có hoạt tính gây độc cả 2 dòng tế bào ung thư khi ở nồng độ 100µg/mL đều có khả năng gây độc tế bào ung thư trên 60%. Cao chiết hoạt chất sinh học thô từ chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 có hoạt tính gây độc dòng tế bào ung thư phổi ở người (IC₅₀ 36,18µg/mL) và ung thư vú ở người (IC₅₀ 50,56µg/mL). Sự ức chế mạnh các dòng tế bào ung thư có thể do sự tương tác của các hợp chất có hoạt tính sinh học trong cao chiết với protein p53, một protein quan trọng nằm trong điều hòa chu kỳ tế bào – gọi là gen áp chế khối u p53 (Quách Ngọc Tùng và cs., 2021). Khi có tổn thương ở ADN, p53 làm ngừng chu kỳ tế bào cho đến khi ADN bị tổn thương được sửa chữa hoặc p53 có thể làm cho tế bào chết theo lập trình (apoptosis) nếu không còn khả năng sửa chữa ADN. Các chất có hoạt tính ức chế tế bào ung thư bám vào đầu N của p53 và giúp protein này không bị phân huỷ.

Ví dụ 4: Xác định chất chống oxy hóa và hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết hoạt chất sinh học thô từ dịch lên men của chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8

Xác định polyphenol: hàm lượng phenol được đo quang phổ ước tính bằng phương pháp thuốc thử FolinCiocalteu (FCR) như được mô tả bởi da Silva và cộng sự (2020) với một số sửa đổi trước tiên cần xây dựng đường chuẩn axit gallic với dải nồng độ từ 0,02 đến 0,1mg/mL) và xác định hàm lượng polyphenol được thực hiện trong các bước sau; (1) phản ứng thực hiện xây dựng đường chuẩn bao gồm 20µL dung dịch chuẩn axit gallic hoặc mẫu dịch cao chiết hoạt chất sinh học thô (1mg/mL) ở các nồng độ khác nhau, mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần ống thí nghiệm; (2) tiếp đó bổ sung 100µL thuốc thử FCR 10% (v/v) đã được thêm vào và hỗn hợp được lắc đều, để yên ở nhiệt độ phòng trong khoảng 5 phút; (3) sau đó thêm 80µL Na₂CO₃ khan 4% (w/v) vào dung dịch, lắc hỗn hợp và ủ ở 40°C trong 30 phút; (4) trong ống đối chứng, thể tích dịch chiết được thay thế bằng metanol; (5) sau khi ủ, độ hấp thụ được đo ở bước sóng 765nm bằng máy quang phổ UV-3000 PC; (6) kết quả đo OD thu được ở các nồng độ và hàm lượng polyphenol được tính từ phương trình đường chuẩn axit gallic $y=0,0043*x-0,0377$, $R^2=0,9983$ và được tính theo công thức sau: $C=c*V/m$, trong đó C là tổng hàm lượng của các hợp chất polyphenol tính bằng mg GAE/g cao chiết; c là nồng độ của axit gallic được thiết lập từ đường chuẩn, tính bằng mg/mL; V là thể tích dịch chiết tính bằng mL; và m là khối lượng của dịch cao chiết hoạt chất sinh học thô được sử dụng trong phép thử, tính bằng gam (g).

Xác định flavonoid: thử nghiệm so màu AlCl₃ được sử dụng để xác định hàm lượng flavonoid của cao chiết hoạt chất sinh học thô theo phương pháp được mô tả bởi

Tang và cộng sự (2020) với một số sửa đổi. Phương pháp này dựa trên sự thay đổi màu vàng cam tạo ra do tương tác của flavonoid với AlCl_3 theo các bước sau: (1) chuẩn bị 30 μL (1mg/mL) dịch cao chiết hoạt chất sinh học thô hòa tan trong metanol và chất chuẩn quercetin ở các nồng độ khác nhau (0,2 đến 1mg/mL) hút vào các ống nghiệm khác nhau; (2) tiếp đó bổ sung 10 μL NaNO_2 5% được thêm vào các ống nghiệm và để hỗn hợp này trong 6 phút; (3) sau đó bổ sung 10 μL AlCl_3 10% (w/v) được thêm vào hỗn hợp, để yên thêm 5 phút; (4) tiếp theo là thêm 60 μL NaOH 1M và 120 μL nước cất; (5) hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút độ hấp thụ được đo bằng máy đo phổ ở bước sóng 510nm; (6) mẫu đối chứng chứa 0,5mL nước cất thay vì dịch chiết/chất chuẩn dùng làm mẫu trắng; (7) hàm lượng flavonoid được tính toán bằng cách sử dụng đường cong chuẩn của quercetin, phương trình đường chuẩn quercetin $y=0,0016 \cdot x - 0,032$, $R^2=0,9974$ và được biểu thị bằng mg quercetin QE/g sử dụng công thức $C=c \cdot V/m$, như đã mô tả trước đó cho polyphenol.

Kết quả thu được từ cao chiết hoạt chất sinh học thô của chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất chống oxy hóa cao polyphenol, flavonoid với hàm lượng đạt 99,09mg GAE/g, 96,25mg QE/g cao chiết từ dịch lên men trong môi trường PDB-S, tương ứng.

Khả năng khử gốc hydroxyl tự do của cao chiết hoạt chất sinh học thô của chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 được đánh giá theo phương pháp của Arias và cộng sự (2021). Phản ứng gốc hydroxyl tự do bao gồm 0,5mL brilliant green với nồng độ 0,435mM, 1,0mL FeSO_4 0,5mM, 0,75mL H_2O_2 (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 (100; 200; 400; 600 $\mu\text{g/mL}$), 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 (%) = $(A \text{ mẫu} - A \text{ trắng}) / (A_0 - A \text{ trắng}) \times 100$, trong đó A mẫu là độ hấp thụ của mẫu, A_0 là độ hấp thụ của mẫu đối chứng và A trắng là độ hấp thụ của mẫu trắng. Các cao chiết hoạt chất sinh học thô 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 dải từ 100; 200; 400; 600 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 3A). Hoạt động thấp nhất được quan sát ở 100 $\mu\text{g/mL}$ cao chiết hoạt chất sinh học thô. Ở nồng độ 600 $\mu\text{g/mL}$, khả năng khử gốc hydroxyl tự do của cao chiết hoạt chất sinh học thô và axit ascorbic lần lượt là $68,38 \pm 2,67\%$ và $105,98 \pm 3,22\%$. Theo các kết quả này, khả năng khử gốc hydroxyl tự do của cao chiết hoạt chất sinh học thô của chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 tăng lên khi nồng độ tăng lên.

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 (Xu và cộng sự, 2017). Phản ứng bao gồm: 100 μ L 0,1mM DPPH hòa tan trong methanol được trộn với 100 μ L dung dịch cao chiết hoạt chất sinh học thô dải nồng độ từ 100; 200; 400; 600; 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 nước 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. Hoạt động loại bỏ gốc tự do của các chất chống oxy hóa phải cho một nguyên tử hydro cho gốc DPPH cải tiến theo phương pháp của Muhammad và cộng sự (2018). Khả năng khử gốc DPPH tự do của cao chiết hoạt chất sinh học thô và axit ascorbic được đánh giá ở nồng độ từ; 200; 400; 600; 800 μ g/mL (Hình 3B). Kết quả cho thấy rằng cao chiết hoạt chất sinh học thô của chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 tạo ra có hoạt động khử gốc DPPH mạnh mẽ phụ thuộc vào nồng độ. Ở nồng độ thấp nhất (100 μ g/mL), khả năng khử của cao chiết hoạt chất sinh học thô là $12,39 \pm 2,97\%$ so với axit ascorbic ($91,30 \pm 2,92\%$). Tăng nồng độ cao chiết hoạt chất sinh học thô lên 800 μ g/mL dẫn đến khả năng khử gốc DPPH cao nhất là $70,80 \pm 0,80\%$. Các hoạt chất polyphenol và flavonoid có trong cao chiết hoạt chất sinh học thô có thể đóng góp chủ yếu vào hoạt động thu gom gốc tự do.

Năng lượng khử sắt của cao chiết hoạt chất sinh học thô của chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 được đánh giá và cải tiến theo phương pháp của Rajoka và cộng sự, 2019. Phản ứng năng lượng khử sắt bao gồm 300 μ L dung dịch cao chiết hoạt chất sinh học thô (100; 200; 400; 600; 800 μ g/mL), 300 μ L dung dịch đệm natri photphat 0,2M (độ pH 7,3) và 1,5mL $K_3Fe(CN)_6$ (1%, w/v) và hỗn hợp phản ứng được ủ ở 50°C trong 25 phút trong tối, sau đó bổ sung 300 μ L axit trichloroacetic (12%, w/v) vào hỗn hợp phản ứng, ly tâm 6000 vòng/phút trong 20 phút. Tiếp đó lấy 1mL dịch nổi trên được phản ứng với 0,5mL $FeCl_3$ (0,2%, w/v). Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 700nm và nước cất khử ion được sử dụng làm mẫu trắng. Năng lượng khử sắt = A mẫu – A, trong đó A mẫu là độ hấp thụ của mẫu, A là độ hấp thụ của mẫu đối chứng chứa nước khử ion thay vì $FeCl_3$ (0,2%, w/v). Các cao chiết hoạt chất sinh học thô tạo ra có tác dụng ức chế trong việc loại bỏ các gốc hydroxyl. Tuy nhiên, năng lượng khử sắt 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 dải từ 100; 200; 400; 600; 800 μ g/mL (Hình 3C). Hoạt động thấp nhất được quan sát ở 100 μ g/mL cao chiết hoạt chất sinh học thô. Ở nồng độ 800 μ g/mL, cho nồng độ năng lượng khử sắt của cao chiết hoạt chất sinh học thô và axit ascorbic lần lượt là $0,73 \pm 0,02$ và $3,28 \pm 0,02$. Theo các kết quả này, năng lượng khử của cao chiết

hoạt chất sinh học thô của chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 tăng lên khi nồng độ tăng lên.

Khả năng đánh bắt gốc superoxit của cao chiết hoạt chất sinh học thô của chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 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 (pH 8,2) với nồng độ 0,05M, 200 μ L dung dịch cao chiết hoạt chất sinh học thô (100; 200; 400; 600 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 (%) = $(A \text{ trắng} - A \text{ mẫu}) / (A \text{ trắng}) * 100$, trong đó A mẫu là độ hấp thụ của mẫu, A trắng là độ hấp thụ của mẫu đối chứng chứa nước khử ion thay vì mẫu và axit ascorbic. Các cao chiết hoạt chất sinh học thô 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 dải từ 100; 200; 400; 600; 800 μ g/mL (Hình 3D). Hoạt động thấp nhất được quan sát ở 100 μ g/mL cao chiết hoạt chất sinh học thô. Ở nồng độ 800 μ g/mL, cho hiệu quả đánh bắt gốc superoxit của cao chiết hoạt chất sinh học thô và axit ascorbic rất thấp lần lượt là $75,96 \pm 0,22\%$ và $95,36 \pm 1,22\%$. Theo các kết quả này, hiệu quả đánh bắt gốc superoxit của cao chiết hoạt chất sinh học thô của chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 tăng lên khi nồng độ tăng lên. Như vậy, các hoạt chất polyphenol và flavonoid có trong cao chiết hoạt chất sinh học thô có thể đóng góp chủ yếu vào hoạt động chống oxy hóa của các gốc tự do thử nghiệm và năng lượng khử sắt đạt hiệu quả cao.

Chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 cũng được công nhận là nguồn cung cấp chất chống oxy hóa tốt để thay thế cho các chất chiết xuất từ thực vật và chất chống oxy hóa tổng hợp. Có rất nhiều báo cáo chứng minh đặc tính chống oxy hóa của nấm liên quan đến các chất chuyển hóa thứ cấp như polyphenol và flavonoid là các hợp chất có nguồn gốc thực vật với nhiều hoạt tính được lý đáng kể (Kumar và Pandey 2013, Dhayanithy và cs., 2019, Rahaman và cs., Năm 2020). Ở đây, dịch chiết thô hoạt chất sinh học của chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 có các hoạt tính chống oxy khác nhau, gốc hydroxyl, DPPH, năng lượng khử và gốc superoxit cho thấy các hoạt động chống oxy hóa tiềm năng. Các phát hiện tương tự cũng được chỉ ra ở vi nấm nội sinh trên một số cây thuốc bao gồm cây dừa cạn (*Catharanthus roseus*), cây đại kích (*Euphorbia hirta*), cỏ tai hùm (*Conyza Blini*) (Dhayanithy và cs., 2019, Tang và cs., 2020, Gautam và cs., 2022). Ngoài ra, hàm lượng polyphenol và flavonoid cao đã cung cấp bằng chứng vững chắc để hỗ trợ giả thuyết rằng các hợp chất polyphenol và flavonoid

có khả năng chịu trách nhiệm không chỉ cho tổng khả năng chống oxy hóa mà còn cả khả năng gây độc tế bào ung thư.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 là chủng được phân lập từ cây dược liệu tại Việt Nam, có hoạt tính gây độc tế bào ung thư cao và sinh tổng hợp chất polyphenol, flavonoid có hoạt tính chống oxy hóa cao, các chất này có tác dụng trong điều trị bệnh ung thư, bệnh tim mạch, xơ vữa động mạch, tiểu đường - đây là căn bệnh gây tử vong hàng đầu ở Việt Nam và trên thế giới.

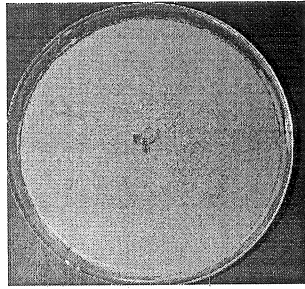
Tính đến nay, chưa có một công bố nào về vi nấm nội sinh cây thiết sam núi đá ở Việt Nam. Chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 là một trong những chủng đầu tiên được nhóm nghiên cứu phân lập tại Việt Nam, chủng này được phân lập từ thân của cây thiết sam núi đá phân bố tại Huyện Đồng Văn, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam và là chủng gốc thuần khiết về mặt sinh học có hoạt tính gây độc dòng tế bào ung thư phổi ở người (IC₅₀ 36,18µg/ml) và ung thư vú ở người (IC₅₀ 50,56µg/ml), có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất chống oxy hóa cao polyphenol, flavonoid với hàm lượng đạt 99,09mg GAE/g, 96,25mg QE/g cao chiết từ dịch lên men trong môi trường PDB-S, tương ứng.

Năm 2018 đã phát hiện 18,1 triệu ca mắc ung thư mới và 9,6 triệu ca tử vong do ung thư. Với 36 loại khác nhau, ung thư chủ yếu ảnh hưởng đến nam giới ở dạng ung thư đại trực tràng, gan, phổi, tuyến tiền liệt và dạ dày và nữ giới ở dạng vú, cổ tử cung, ung thư đại trực tràng, phổi và tuyến giáp (Khan và cs., 2019). Điều trị ung thư đã trở thành một lĩnh vực nghiên cứu hoàn toàn mới. Có những kỹ thuật thông thường cũng như rất hiện đại được áp dụng để chống lại bệnh ung thư. Nhiều kỹ thuật khác nhau, như hóa trị, xạ trị hoặc phẫu thuật được sử dụng để điều trị ung thư. Tuy nhiên, tất cả chúng đều có một số nhược điểm. Việc sử dụng các hóa chất thông thường có tác dụng phụ và độc tính với tế bào lành (Khan và cs., 2019). Nhưng khi vấn đề vẫn còn, các phương pháp tiếp cận mới là cần thiết để kiểm soát bệnh tật, đặc biệt, vì sự thất bại của các phương pháp trị liệu hóa học thông thường. Vì vậy, cần có những chiến lược mới trong phòng và chữa bệnh ung thư để kiểm soát tỷ lệ tử vong vì căn bệnh này. Vì vậy, việc nghiên cứu, lựa chọn các tác nhân kháng ung thư mới từ tự nhiên là ưu tiên hàng đầu của các nhà khoa học và các công ty dược phẩm trên thế giới. Từ những năm 30 của thế kỷ trước, vi sinh vật đã được khai thác mạnh để sản xuất nhiều loại thuốc kháng ung thư và các sản phẩm thuốc khác có khả năng chữa bệnh cao (Fenical và Jensen, 2006). Trong số đó, vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm trong đất đã được biết đến như là nguồn cung cấp các chất có hoạt tính sinh học và dược học có giá trị cao. Cho đến nay, hơn 120 thuốc quan trọng nhất được sử dụng (như penicillin, cyclosporin A, adriamycin, v.v....) có nguồn gốc từ các vi sinh vật đất (Alphonse và cs., 2002). Từ đầu những năm 1960, do nhu cầu

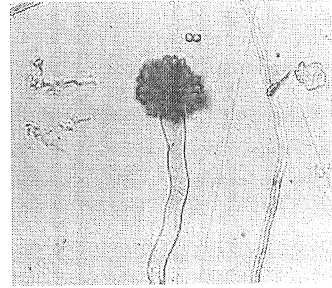
về các loại thuốc nhằm chế ngự các bệnh mới hoặc các chủng vi sinh vật kháng thuốc đã thúc đẩy các nhà nghiên cứu tìm kiếm các hoạt chất sinh học tự nhiên có nguồn gốc mới. Hệ sinh vật trên cạn (terrestrial ecosystem) trong đó nổi bật là các vi sinh vật cộng sinh trên thực vật, động vật... là đối tượng tiềm năng mà các nhà khoa học hướng tới trong hai thập kỷ gần đây. Ngoài ra, các nghiên cứu đã chứng minh rằng chính sự tồn tại của các gốc tự do ở nồng độ cao trong cơ thể người đã gây nên các tổn thương cấu trúc màng sinh học, tế bào, mô và các cơ quan đồng thời dẫn đến nhiều căn bệnh khác nhau (Martinez, 1995). Vì vậy, các hợp chất chống oxy hóa được xem là liệu pháp hứa hẹn cho 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 (Cozma, 2004). Chính vì vậy chủng vi nấm nội sinh *A. fumigatus* SDF8 sẽ là chủng giống gốc để tiến hành các nghiên cứu nâng cao hoạt tính trong các điều kiện, môi trường nuôi cấy tối ưu để xây dựng được quy trình sản xuất chất gây độc tế bào ung thư và chất chống oxy hóa 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 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

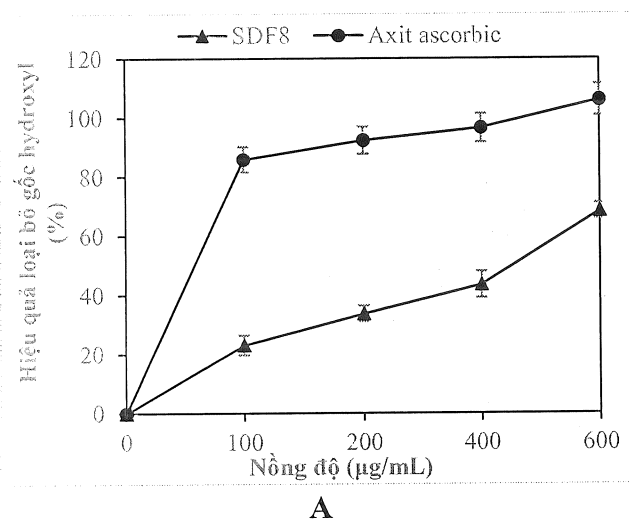
1. Chúng vi nấm nội sinh *Aspergillus fumigatus* SDF8 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân cây thiết sam núi đá (*Tsuga chinensis* (Franch.) Pritz.) phân bố tại Huyện Đồng Văn, Tỉnh Hà Giang, Việt Nam, trong đó chủng SDF8 có khuẩn lạc màu xanh xám, dạng nhung mịn, mặt sau khuẩn lạc màu trắng vàng, khuẩn lạc tròn; hình thái bào tử hình cầu, có kích thước 2-2,5 μ m, mọc dạng tỏa tròn, bong hình cầu, có chiều rộng 25-35 μ m, cuống sinh bào tử trong suốt; mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 525bp đã được đăng ký trên ngân hàng GenBank NCBI mã số OM721777 và có hoạt tính gây độc tế bào ung thư A549 và MCF7 (IC₅₀ 36,18 μ g/ml; 50,56 μ g/ml); có khả năng sinh tổng hợp chất chống oxy hóa polyphenol, flavonoid hàm lượng lần lượt đạt 99,09mg GAE/g, 96,25mg QE/g cao chiết từ dịch lên men; có hoạt tính chống oxy hóa cao loại bỏ gốc tự do hydroxyl với tỷ lệ phần trăm ức chế là 68,38% ở nồng độ 600 μ g/ml cao chiết hoạt chất sinh học thô, DPPH, superoxit lần lượt với tỷ lệ phần trăm ức chế là 70,80%, 75,96%, và năng lượng khử sắt là 0,73 ở nồng độ 800 μ g/ml cao chiết hoạt chất sinh học thô.



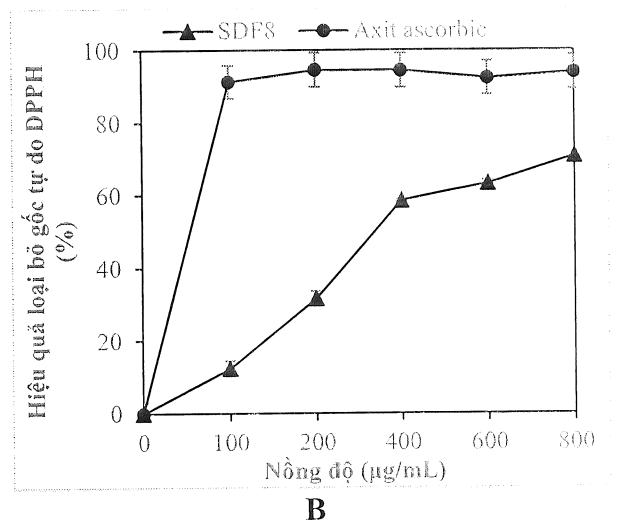
Hình 1



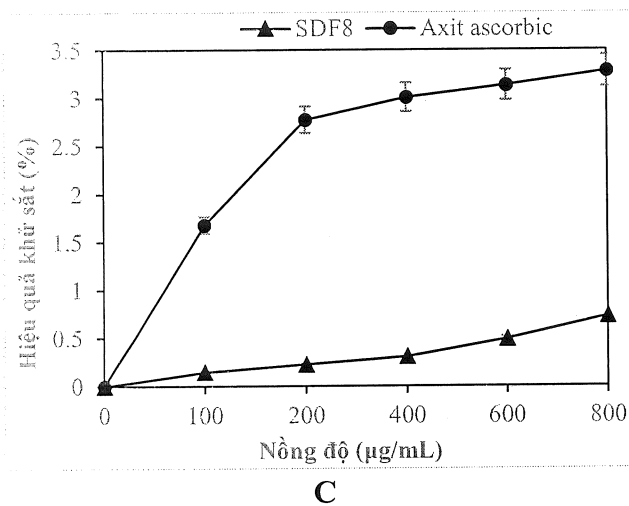
Hình 2



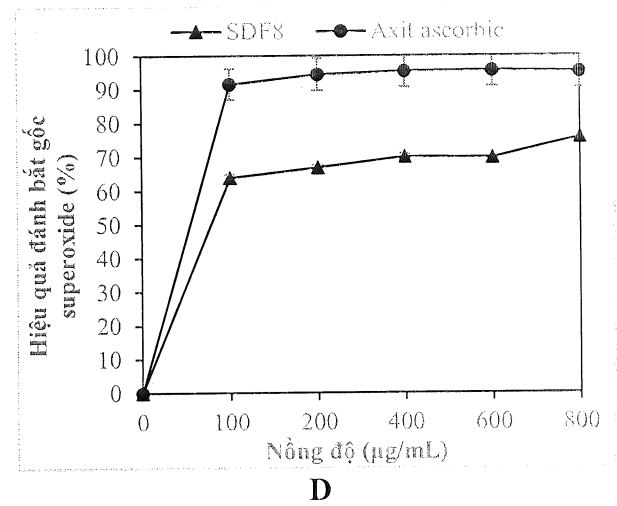
A



B



C



D

Hình 3

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> CHỦNG VI NẤM NỘI SINH *ASPERGILLUS FUMIGATUS* SDF8 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CÓ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ VÀ SINH TỔNG HỢP CHẤT CHỐNG OXY HÓA

<160> 1

<210> SEQ ID NO:1

<211> 525

<212> ADN

<213> *Aspergillus fumigatus* SDF8

<400>

```

1  AAGATGAAGG CCTCTGGGTC CAACCTCCCA CCCGTGTCTA TCGTACCTTG TTGCTTCGGC
61  GGGCCCGCCG TTTCGACGGC CGCCGGGGAG GCCTTGCGCC CCCGGGCCCC CGCCCGCCGA
121 AGACCCCAAC ATGAACGCTG TTCTGAAAGT ATGCAGTCTG AGTTGATTAT CGTAATCAGT
181 TAAAACTTTC AACAACGGAT CTCTTGGTTC CGGCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAATGCG
241 ATAAGTAATG TGAATTGCAG AATTCAGTGA ATCATCGAGT CTTGAACGC ACATTGCGCC
301 CCCTGGTATT CCGGGGGGCA TGCCTGTCCG AGCGTCATTG CTGCCCTCAA GCACGGCTTG
361 TGTGTTGGGC CCCCGTCCCC CTCTCCCGGG GGACGGGCCC GAAAGGCAGC GCGCGCACCG
421 CGTCCGGTCC TCGAGCGTAT GGGGCTTTGG CACCTGCTCT GTAGGCCCCG CCGGCACCAG
481 CCGACACCCA ACTTTATTTT TCTAAGGTTG ACCTCAGATG AGG

```