



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

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

(11)



1-0053318

(51)^{2020.01} C12N 1/14

(13) B

(21) 1-2022-02079

(22) 01/04/2022

(45) 25/11/2025 452

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

(54) CHỦNG VI NẤM PHYLLOSTICTA SP. THG2-27 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT
SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT HUPERZIN A VÀ
HUPERZIN B

(21) 1-2022-02079

- (57) Sáng chế đề cập đến chủng vi nấm *Phyllosticta* sp. THG2-27 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân của cây Thông đất râu (*Phlegmariurus phlegmaria*) phân bố tại xã Tùng Vài, Quận Bạ, Hà Giang, Việt Nam, trong đó chủng này có khả năng sinh tổng hợp đồng thời cả hoạt chất huperzin A và huperzin B với hàm lượng lần lượt là 1,366 và 0,582mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 600 bp được nêu trong SEQ ID NO:1. Huperzin A và huperzin B có tác dụng trong việc điều trị bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế 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 thuốc có khả năng sinh tổng hợp huperzin A và huperzin B với hàm lượng cao. Cụ thể, sáng chế đề xuất chủng vi nấm nội sinh *Phyllosticta* sp. THG2-27 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ thân cây Thông đất râu (*Phlegmariurus phlegmaria*) phân bố tại huyện 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 sáng chế

Cây Thông đất râu (*Phlegmariurus phlegmaria* (L.) T. Sen & U. Sen) là một loài cây dược liệu thuộc họ Thông đất (*Lycopodiaceae*) thường được sử dụng chữa đau họng, thủy thũng, đòn ngã tổn thương, đặc biệt là điều trị bệnh sa sút trí tuệ. Cây sống ở độ cao 700-2000m, ưa ẩm và bóng, thường sống bám trên cây gỗ hay các tảng đá ẩm có nhiều rêu và mùn trong rừng rậm thường xanh, phân bố nhiều ở Trung Quốc, Đài Loan, Malaysia, Nhật Bản, Australia. Ở Việt Nam cây phân bố rộng ở các vùng rừng núi thấp, trung bình và cao của vùng Bắc trung bộ đến Đà Nẵng, Khánh Hòa, Kiên Giang. Là cây thảo phụ sinh có thân thẳng, dài 30-100 cm, phân nhánh lưỡng phân 1-4 lần, đường kính thân khoảng 3 mm. Lá lưỡng hình dễ thấy. Lá sinh dưỡng hình xoan tam giác, rộng nhất ở đáy, 5-10 × 3-5 mm, lá có chất da dày, gần thẳng góc vào thân; gốc lá hình tim hoặc gần hình tim, cuống lá rất ngắn; mép nguyên, đỉnh lá nhọn. Cành mang túi bào tử ở ngọn nhánh, dài đến 16 cm; lá bào tử hình trứng, dài cỡ 1 mm, mép nguyên, đỉnh nhọn. Túi bào tử dạng thận, mở thành 2 mảnh bằng nhau.

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 cholinesteraza (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 cholinesteraza mạnh mẽ, có chọn lọc, có được tính độc đáo và ít độc tính, an toàn hơn so với các loại thuốc hóa dược khác như tacrine, donepezil, rivastigmin và galanthamin. Huperzin A được chiết xuất đầu tiên từ cây Thạch tùng răng cưa 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 và dạng sản phẩm ăn uống bổ sung ở Hoa Kỳ và nhiều nước trên thế giới. Huperzin B thể hiện hoạt tính ức chế cholinesteraza 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 acetylcholinesteraza, giúp hàm lượng acetylcholin 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, chủ yếu là huperzin A đã được phân lập từ hơn 50 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. 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. Tuy nhiên, 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 sinh tổng hợp huperzin A được 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: *Acremonium* sp. 2F09P03B sản sinh huperzin A với hàm lượng 8,32 µg/L (Li và cộng sự, 2007); 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 µg/L; Tiếp đó là các chủng *Colletotrichum gloeosporioides* ES026 sinh 1 µg/g nấm khô (Yang và cộng sự, 2011); *Cladosporium cladosporioides* LF70 sản sinh 56,84 µg/g nấm khô (Zhang và cộng sự, 2011); *Xylariales* sp. SY-02 sinh 26,4 µg/L (Su và cộng sự, 2011); *Podospora* sp. S29 sinh 50,6 µg/g nấm khô và *Trichoderma harzianum* L44 là 37,63 µg/g nấm khô (Dong và cộng sự, 2014); *Paecilomyces tenuis* YS-13 sản sinh 21 µg /L (Su và Yang, 2015); *Fusarium oxysporum* SNZ-12 sinh 11,1 mg/L (Han và cộng sự, 2016); *Fusarium oxysporum* NSG-1 sinh 1,01 mg/L (Zhang và cộng sự, 2018); *Alternaria brassicae* AGF041 với sản lượng huperzin A đạt 42,89 µg/g nấm khô (Zaki và cộng sự, 2019); Các chủng *Mucor racemosus* NSH-D, *Mucor fragilis* NSY-1, *Fusarium verticillioides* NSH-5, *Fusarium oxysporum* NSG-1, *Trichoderma harzianum* NSW-V sản sinh lần lượt là 107,0 mg/L, 181,7 mg/L, 117,1 mg/L, 111,1 mg/L và 319,8 mg/L (Han và cộng sự, 2020); *Colletotrichum boninense* HS7-1 sinh 3,7 µg/g nấm khô (Cui và cộng sự, 2021). 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 nghiên cứu về nấm nội sinh sinh huperzin từ các loài cây thuộc chi *Phlegmariurus* và nghiên cứu về chủng vi nấm nội sinh có khả năng sinh đồng thời cả huperzin A và huperzin B là chưa có nhiều công bố. Trong đó, Olga và cộng sự (2020) đã phân lập được chủng *Fusarium* sp. C17 từ cây *Phlegmariurus taxifolius* có khả năng sinh 3,2 µg µg huperzin A/g nấm khô; Zhang và cộng sự (2015) phân lập được chủng *Ceriporia renrata* MY311 sinh 40,53 µg huperzin A/L và *Hypoxylon investiens* NX9 sinh 27.48 µg huperzin A/L từ cây *Phlegmariurus plegmaria*. Chủng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* 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 µg/mL và 4,66 µg/mL) vào ngày thứ mười bốn (Liqin và cộng sự, 2018).

Theo các tài liệu đã công bố, hoạt tính huperzin A của các chủng nấm nội sinh khác nhau dao động từ 8,32 $\mu\text{g/L}$ đến 319,8 mg/L dịch lên men hoặc 3,2 đến 56,84 $\mu\text{g/g}$ sinh khối nấm khô. Tuy nhiên, nhiều chủng nấm phân lập có hoạt tính thấp đã được các nhà khoa học nghiên cứu thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy, điều kiện lên men nhằm tăng khả năng sản sinh huperzin. Đã có nhiều kết quả nghiên cứu khả quan về tối ưu điều kiện lên men được công bố, trong đó có chủng *C. gloeosporioides* ES026 sau khi được Zhao và cộng sự (2013) nghiên cứu tối ưu các điều kiện lên men thì hàm lượng huperzin A thu được đã tăng 25,58%. Nhằm tăng khả năng sinh tổng hợp huperzin A của chủng *Shiraia* sp. Slf14, Yan và cộng sự (2014) đã bổ sung vào môi trường lên men một số chất cảm ứng HSE (dịch chiết cây *Huperzia serrata* được tách chiết từ cây và lá Thạch tùng răng cưa), hàm lượng huperzin A đã tăng đạt 40mcg/g sinh khối khô. Đặc biệt, khi bổ sung 0,2 g/L L-lysin trong môi trường nuôi cấy, năng suất huperzin A cao hơn so với đối chứng không bổ sung L-lysin khoảng 40%. Hu Weixin và cộng sự (patent Trung Quốc số CN102168017B) đã nuôi chủng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* isolate YLJ-13 trong môi trường khoai tây cải tiến, môi trường khoai tây cải tiến được sử dụng như chất cảm ứng đã làm tăng hàm lượng huperzin A lên đến 199,6mg/L dịch lên men.

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, trong đó chủng *Fungal endophyte* Tsp25 có hàm lượng huperzin A cao nhất đạt 2,88 mg/L (Bảng độc quyền sáng chế số 26782 năm 2020), chủng *Penicillium* sp. LĐL4.4 đạt 1,38 mg/L (Bảng độc quyền sáng chế số 26781), chủng *Xylaria* sp. Tsp20 sản sinh 37,3 $\mu\text{g/L}$ (Bảng độc quyền giải pháp hữu ích số 2377), *Penicillium reticulisporum* Tsp41 sinh 34,1 $\mu\text{g/L}$ (Bảng độc quyền giải pháp hữu ích số 2376) và *Fusarium* sp. Rsp5.2 là 19,4 $\mu\text{g/L}$ (Bảng độc quyền giải pháp hữu ích số 2375) (Thanh và cộng sự, 2019, 2020). Tuy nhiên, các nghiên cứu về vi nấm nội sinh *Phyllosticta* sp. ở cây Thông đất râu (*Phlegmariurus phlegmaria*) có khả năng sinh đồng thời cả huperzin A và huperzin B với hàm lượng cao đến nay là chưa có 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 cung cấp cho ngành công nghiệp dược, 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 sáng chế

Sáng chế đề xuất chủng vi nấm *Phyllosticta* sp. THG2-27 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân cây Thông đất râu (*Phlegmariurus phlegmaria*) phân bố tại huyện Quản Bạ, Hà Giang, Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp đồng thời hoạt chất huperzin A và huperzin B với hàm lượng cao, hai chất này có tác dụng trong việc điều trị rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

Chủng vi nấm *Phyllosticta* sp. THG2-27 thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 600 bp được nêu trong SEQ ID NO:1 và có khả năng sinh tổng hợp đồng thời hoạt chất huperzin A và huperzin B cao với hàm lượng lần lượt là 1,366 và 0,582 mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng *Phyllosticta* sp. THG2-27 trên môi trường PDA-I sau 10 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc không cân đối; viền xê thùỳ bề mặt sần sùi; màu không đồng nhất tạo các viền màu đen, xám khác nhau; sợi sinh đường ngắn, có hạch nấm, màu đen, xanh đen, xám; sợi cơ chất màu đen.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái sợi khuẩn ty và bào tử của chủng *Phyllosticta* sp. THG2-27 chụp trên kính hiển vi quang học (độ phóng đại 100 lần). Sợi nấm có vách ngắn, phân nhánh, có bào tử, bào tử đơn bào, hình trứng, màu sáng.

Hình 3 là biểu đồ thể hiện sắc ký đồ HPLC (UV 310nm) của dịch chiết nấm *Phyllosticta* sp. THG2-27 trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao LC/MS-Trap Agilent series 1100.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi nấm *Phyllosticta* sp. THG2-27 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân cây Thông đất râu (*Phlegmariurus phlegmaria*) phân bố tại xã Tùng Vài, Quận Bạ, Hà Giang, Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B với hàm lượng cao.

Việc phân lập chủng thuần khiết về mặt sinh học từ thân của cây Thông đất râu 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 nấm thuần khiết về mặt sinh học.

Các chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học được phân loại bằng phương pháp truyền thống theo các khóa phân loại (Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự, 1982; Bùi Xuân Đồng, 1984; Ainsworth và cộng sự, 1973). 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.

Chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học sau khi định danh được đưa đi nuôi cấy và thử nghiệm khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B. Chủng nấm thử nghiệm 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; 0,5g Na₂HPO₄.2H₂O; 0,3g KCl; 0,3g NaCl và 1 lít nước cất) ở nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 10 ngày và tiến hành thu sinh khối bằng ly tâm ở 6000 vòng/phút, loại bỏ dịch. Sinh khối được sấy ở 45- 60°C và được tách chiết bằng dung môi hữu cơ thu được dịch chiết nấm, chính là dịch chiết alkaloid toàn phần. Dịch chiết nấm được xác định khả năng sinh tổng hợp huperzin A 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.

Thực hiện việc phân lập và xác định các đặc tính sinh trưởng và phát triển như nêu trên đã thu được chủng vi nấm thuộc chi *Phyllosticta* thuần khiết về mặt sinh học. Chủng vi nấm này có đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 600 bp và có độ tương đồng 99,29% và có độ dài đoạn so sánh 93% so với các chủng *Phyllosticta* được đối chiếu trên hàng dữ liệu gen NCBI và được định danh là *Phyllosticta* sp. HG2-27.

Chủng vi nấm *Phyllosticta* sp. THG2-27 thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B với hàm lượng lần lượt là 1,366 mg/L và 0,582 mg/L dịch lên men trong môi trường PDB-I.

Chủng vi nấm *Phyllosticta* sp. THG2-27 thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế là chủng tự nhiên được phân lập từ thân của cây dược liệu *Phlegmariurus phlegmaria* phân bố tại Việt Nam, có khả năng sinh đồng thời cả huperzin A và huperzuin B, hai chất này có tác dụng trong điều trị rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer. Đây là một trong các nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam và trên thế giới phân lập được chủng nấm nội sinh thuộc chi *Phyllosticta* từ cây *Phlegmariurus phlegmaria* có khả năng sinh đồng thời cả hai hoạt chất huperzin A và B. Chủng này trong tương lai có tiềm năng ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất hoạt chất huperzin A và B quy mô lớn đơn giản mà lại cho hiệu suất huperzin cao, phục vụ hỗ trợ điều trị các bệnh suy giảm về trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer, mở ra hướng đi mới có hiệu quả trong việc điều trị bệnh suy giảm về trí nhớ và Alzheimer 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 *Phyllosticta* sp. THG2-27 theo sáng chế hiện đang được lưu giữ tại Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen vi sinh vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học, trong môi trường PDA-I trong điều kiện lạnh sâu -20°C và -86°C , đồng thời bào tử của chủng được lưu giữ trong cát.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Mẫu thân của cây Thông đất râu (*Phlegmariurus phlegmaria*) tươi phân bố tại xã Tùng Vài, Quận Bạ, Hà Giang, Việt Nam được rửa sạch bằng nước, khử trùng lần lượt bằng etanol 70%, NaOCl 10% và HgCl_2 0,1% trong khoảng thời gian 2-3 phút; sau cùng, các mẫu được rửa lại bằng nước cất khử trùng 4-5 lần. Sau khi được xử lý, các mẫu thân cây được cắt thành từng lát nhỏ (0,2 - 1cm) và được đặt 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 nội sinh trong cây. Cây chuyển các sợi nấm của chủng phân lập từ các đĩa ban đầu sang đĩa thạch PDA-I mới, nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 3-10 ngày, theo dõi và cấy chuyển đến khi thu được chủng nấm thuần.

Kết quả đã phân lập được chủng nấm thuần, ký hiệu là THG2-27 có thời gian sinh trưởng 7-10 ngày nuôi cấy. Nuôi cấy chủng THG2-27 thuần trên môi trường thạch nghiêng đến khi khuẩn ty nấm phát triển phủ kín tối đa trên mặt thạch, sau đó bổ sung glycerol 15% vô trùng, giữ ở $4 - 10^{\circ}\text{C}$ 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 Nguyễn Lân Dũng và cộng sự (1982), Bùi Xuân Đồng (1984) và Ainsworth và cộng sự (1973) để sơ bộ nhận dạng, phân loại chủng THG2-27 đến chi.

Chủng THG2-27 được nuôi cấy phát triển trên môi trường PDA-I ở 28°C , quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc và kích thước khuẩn lạc. Hình thái khuẩn lạc của chủng THG2-27 trên môi trường PDA-I sau 10 ngày nuôi cấy được thể hiện ở hình 1. Khuẩn lạc không cân đối, viền xê thù, bề mặt sần sùi, màu không đồng nhất tạo các viền màu đen, xám khác nhau; sợi sinh dưỡng ngắn, có hạch nấm, màu đen/xanh đen/xám; sợi cơ chất màu đen. Chuẩn bị lam kính, lamen và các đĩa peptri 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 peptri. Nuôi ở 28°C trong khoảng thời gian 7-10 ngày cho đến khi sợi nấm mọc lan đều bề mặt lamen. Quan sát tiêu bản bằng kính hiển vi quang học, 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 THG2-27 được thể hiện trên hình 2, trong đó sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh, có bào tử, bào tử thoát ra thành dòng,

bào tử đơn bào, hình trứng, màu sáng.

Kết quả nhận dạng được chủng THG2-27 thuộc chi *Phyllosticta*.

ADN của chủng THG2-27 được tách chiết bằng kit tách chiết ADN (G-spinTMTotal DNA Extraction Kit). Kết quả kiểm tra trên máy đo quang phổ cho thấy ADN tổng số tách chiết được có độ tinh sạch cao ($A_{260}/A_{280}=1,87$) và được sử dụng làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR.

Vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng THG2-27 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 là 500-600 bp.

Phản ứng PCR được thực hiện theo phương pháp chuẩn được mô tả bởi White và cộng sự (1990). Thể tích phản ứng PCR (50 μ l) bao gồm 100ng ADN hệ gen, 25 μ l hỗn hợp chuẩn, 0,5 μ mol/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 600 bp. 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 THG2-27 được xác định trên máy giải trình 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 dữ liệu gen NCBI (bảng 1). Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng THG2-27 được thể hiện ở SEQ ID NO:1.

Bảng 1 - Mức độ tương đồng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm THG2-27 khi so sánh với trình tự các chủng trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI

Tên chủng	Chủng so sánh		Độ dài đoạn so sánh(%)	Mức độ tương đồng (%)
	Tên	Mã số		
THG2-27	<i>Phyllosticta capitalensis</i> CL08	MT085755.1	93	99,29
	<i>Phyllosticta elongata</i> LCM 886.01	MF495420.1	93	99,29
	<i>Phyllosticta fallopiae</i> B3194	MT043804.1	93	99,29
	<i>Phyllosticta</i> sp. Eef-1	MK120854.1	93	99,29
	<i>Phyllosticta elongata</i> DZ-20	MK429845.1	93	99,29

Kết quả cho thấy đã xác định được trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 tách từ chủng THG2-27 có kích thước 600 bp. Đoạn gen này có mức tương đồng với các trình

tự gen trên NCBI là 99,29% và có độ dài đoạn so sánh 93% so với các chủng *Phyllosticta* được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI như *Phyllosticta capitalensis* CL08 MT085755.1 (99,29%), *Phyllosticta elongata* LCM 886.01 (99,29%) MF495420.1 và *Phyllosticta fallopiae* B3194 MT043804.1 (99,29%). Với kết quả này, chủng THG2-27 thuộc chi *Phyllosticta* và chưa thể khẳng định chính xác được đến loài của chủng này. Kết quả này tương tự với kết quả phân loại bằng phương pháp truyền thống. Chủng THG2-27 được định danh là *Phyllosticta* sp. HG2-27.

Chủng vi nấm *Phyllosticta* sp. THG2-27 được nuôi lắc trong 1 lít môi trường PDB-I ở 150 vòng/phút, nhiệt độ 28°C trong 10 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. Phá vỡ tế bào sinh khối nấm khô bằng cách nghiền thành bột mịn với nitor lỏng.

Chiết huperzin A và huperzin B từ bột nấm khô theo các bước như sau: (1) bổ sung một lượng amoniac 10% với tỉ lệ 1ml/g 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 = 10 bằng NaOH 10%; (5) chiết 3 lần với clorofom (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 và B bằng phương pháp sắc ký màng mỏng (TLC) như sau: (1) hòa tan chất chuẩn huperzin A và 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 (chất chuẩn huperzin A, huperzin B 1µl nồng độ 10⁻⁶; mẫu dịch chiết nấm là 5µl), sấy nhẹ bản mỏng để bay hết dung môi; (3) dùng kẹp đưa bản mỏng đã chấm vào bình dung môi có thành phần clorofom:isopropanol:etyl axetat:amoniac (tỷ lệ 4:1,5:1:0,1), đậy nắp bình, khi vạch dung môi di chuyển đến cách mép trên tám 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 của chủng THG2-27 cho kết quả dương tính với huperzin A và B.

Xác định hàm lượng huperzin A và huperzin B có mặt trong dịch chiết chủng vi nấm *Phyllosticta* sp. THG2-27 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) 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 và B trong mẫu. Kết quả cho thấy pic chất huperzin A trong dịch chiết chủng THG2-27 được

phát hiện ở thời gian lưu Rt 6,363 phút tương đương với thời gian lưu Rt của chất chuẩn huperzin A, pic chất huperzin B trong dịch chiết chủng THG2-27 được phát hiện ở thời gian lưu Rt 3,868 trùng với thời gian lưu Rt của chất chuẩn huperzin B. Kết quả được thể hiện trên hình 3.

Kết quả định lượng huperzin A và huperzin B thu được từ 1ml dịch chiết của chủng THG2-27 có hàm lượng 1,366 và 0,582 mg/ml dịch chiết/1 lít dịch lên men. Như vậy, chủng THG2-27 có khả năng sinh tổng hợp huperzin A và huperzin B lần lượt là 1,366 và 0,582mg/L dịch lên men.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

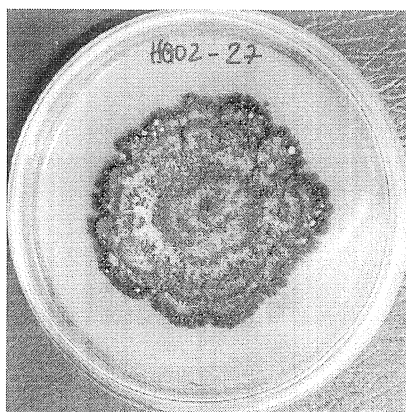
Chủng vi nấm *Phyllosticta* sp. THG2-27 là chủng được phân lập từ cây dược liệu tại Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp đồng thời cả hoạt chất huperzin A và huperzin B với hàm lượng cao, hai chất này có tác dụng trong điều trị các bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer - đây là căn bệnh gây tử vong thứ ba ở người cao tuổi sau bệnh tim mạch và ung thư.

Tính đến nay, đây là một trong các nghiên cứu mới ở Việt Nam và trên thế giới phân lập được chủng nấm nội sinh thuộc chi *Phyllosticta* từ cây *Phlegmariurus phlegmaria* có khả năng sinh đồng thời cả hai hoạt chất huperzin A và B. Chủng *Phyllosticta* sp. THG2-27 được phân lập từ thân cây *Phlegmariurus phlegmaria* phân bố tại xã Tùng Vài, Quận Bạ, Hà Giang, Việt Nam. Chủng này là một trong những chủng đầu tiên được nhóm nghiên cứu phân lập từ các cây thuộc họ Thông đất tại Việt Nam thuần khiết về mặt sinh học, có khả năng sinh tổng hợp đồng thời cả huperzin A và huperzin B với hàm lượng cao đạt lần lượt là 1,366 mg/L và 0,582 mg/L dịch lên men.

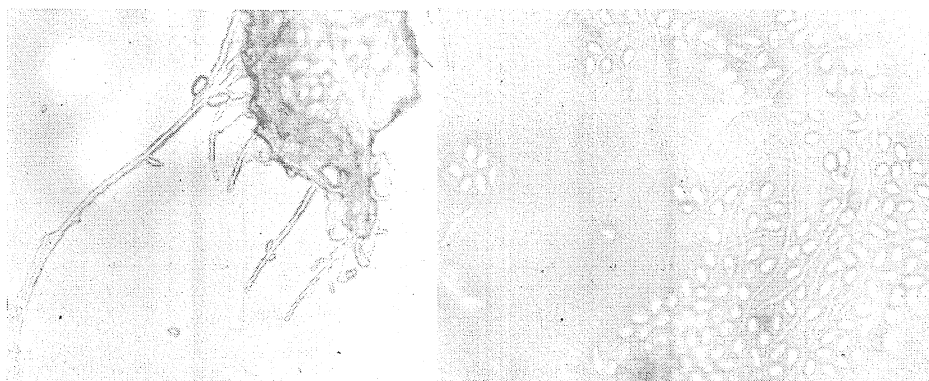
Bệnh Alzheimer là một trong những căn nguyên phổ biến gây chứng giảm trí nhớ ở người già. Tuy nhiên, ngày nay bệnh Alzheimer có xu hướng ngày càng bị trẻ hóa. Ở các nước phát triển số người già chiếm tỷ lệ đáng kể, vì vậy tỷ lệ người mắc bệnh Alzheimer ngày càng tăng và vấn đề được đặt ra là phải có các biện pháp giúp đỡ họ có cuộc sống hài hòa. Việt Nam là một trong những quốc gia có tốc độ già hóa dân số nhanh nhất thế giới với 10,1 triệu người cao tuổi, chiếm 11% tổng dân số, kéo theo các bệnh rối loạn về trí nhớ cũng phát triển, dẫn đến nhu cầu về chữa bệnh cũng tăng lên. Tác dụng tích cực từ huperzin A và B trong việc cải thiện trí nhớ của người bệnh Alzheimer đã mở ra hướng đi mới cho y học. Chính vậy, chủng *Phyllosticta* sp. THG2-27 sẽ được sử dụng làm chủng giống gốc để nghiên cứu nâng cao hoạt tính, xây dựng quy trình sản xuất huperzin quy mô lớn. Chủng chỉ cần lên men trong thời gian ngắn (15-25 ngày) với nguyên liệu đơn giản, rẻ tiền đã thu được lượng huperzin cao hơn, hiệu quả hơn có thể ứng dụng trong sản xuất huperzin quy mô lớn phục vụ hỗ trợ điều trị các bệnh suy giảm về trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer; mở ra hướng đi mới có hiệu quả trong việc 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

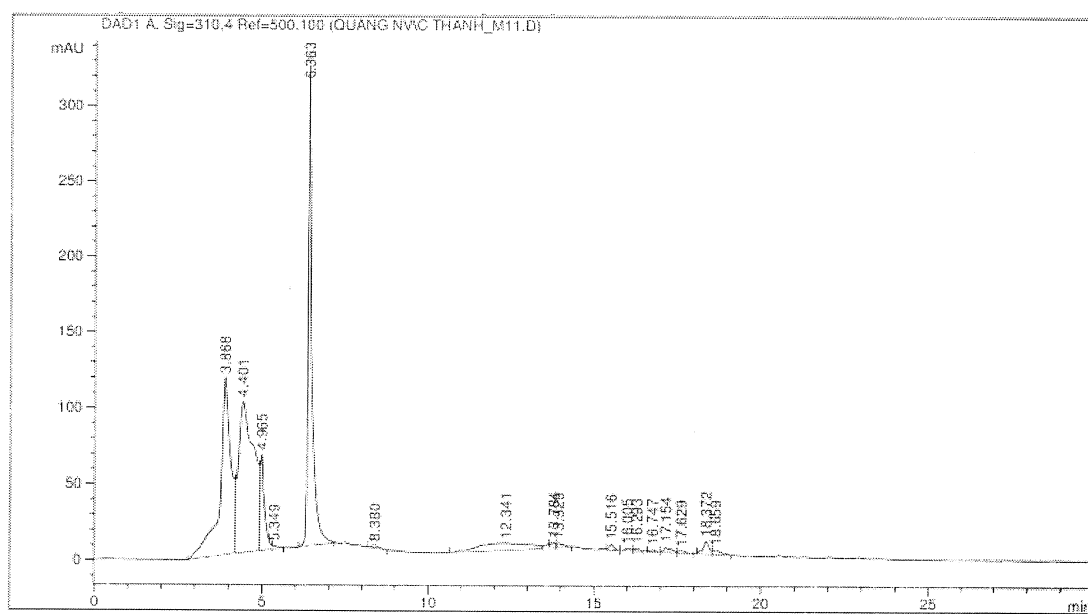
1. Chủng vi nấm *Phyllosticta* sp. THG2-27 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân của cây Thông đất râu (*Phlegmariurus phlegmaria*) phân bố tại huyện Quản Bạ, Hà Giang, Việt Nam, trong đó chủng này có khả năng sinh tổng hợp đồng thời cả hai hoạt chất huperzin A và huperzin B với hàm lượng 1,366 mg huperzin A và 0,582 mg huperzin B /L dịch lên men trong môi trường PDB-I, và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 600 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 *PHYLLOSTICTA* SP. THG2-27 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> 600

<212> ADN

<213> *Phyllosticta* sp. THG2-27

<400>

ccaccctagg tgtacctggg ggcattcatt agcggagggt ccggaaggag cttctcaccc	60
ttgtgtactc actatgttgc tttggcgggt cgacctggtt ccgaccagg cgcccgcg	120
ccccagcctt aactggccag gacgcccggc taagtgccg ccagtataca aaactcaaga	180
attcattttg tgaagtcctg atatatcatt taattgatta aaactttcaa caacggatct	240
cttggttctg gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat aagtaatgtg aattgcagaa	300
ttcagtgaat catcgaatct ttgaacgcac attgcgccct ctggtattcc ggagggcatg	360
cctgttcgag cgtcatttca accctcaagc tctgcttggg attgggcaac gtccgctgcc	420
ggacgtgcct tgaagacctc ggcgacggcg tcctagcctc gagcgtagta gtaaaatatc	480
tcgctttgga gtgctgggcg acggccggcg gacaatcgac cttcggtcta tttttccaag	540
gttgacctcg gatcaggtag ggataccgc tgaacttaag catatcaata aagcggagga	600