



(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)



2-0004471

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

(13) **Y**

(21) 2-2022-00056

(22) 27/01/2022

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/08/2023 425A

(73) Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

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

(54) CHŨNG VI NẤM EPICOCUM SORGHINUM THG01-18 THUẦN KHIẾT VỀ
MẶT SINH HỌC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT HUPERZIN A
VÀ HUPERZIN B

(21) 2-2020-00056

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng *Epicoccum sorghinum* THG01-18 phân lập từ thân cây Thông đất nhám (*Phlegmariurus squarrosus*) phân bố tại huyện Quán Bạ, tỉnh Hà Giang, Việt Nam (tọa độ: 23°05'32"N 104°56'40"E, trên núi cao 1032m so với mặt nước biển), chủng này có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B với hàm lượng lần lượt là 0,758 và 0,548 mg/L dịch lên men và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 488bp được nêu trong SEQ ID NO:1. Huperzin A và huperzin B có tác dụng trong việc điều trị bệnh suy giảm trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh vật học và công nghệ sinh học liên quan đến các chủng vi nấm sống nội sinh trong cây dược liệu có khả năng sinh tổng hợp huperzin A và huperzin B. Cụ thể là đề cập đến chủng vi nấm nội sinh *Epicoccum sorghinum* THG01-18 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ thân cây Thông đất nhám (*Phlegmariurus squarrosus*) phân bố tại huyện Quán Bạ, tỉnh Hà Giang, Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B, hai chất này có tác dụng trong việc điều trị bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cây Thông đất nhám (*Phlegmariurus squarrosus*) là một loài cây dược liệu thuộc họ Thông đất (Lycopodiaceae). Đây là loài cây ưa ẩm và ưa bóng, thường sống bám trên cây gỗ, đôi khi trên các tảng đá ẩm có nhiều rêu, mùn trong rừng thường xanh, ở độ cao từ 800-1800m. Trước đây, ở Trung Quốc cây Thông đất nhám được sử dụng để điều trị các bệnh có liên quan đến tim mạch, hệ thần kinh. Ngày nay, các alcaloit phân lập từ cây Thông đất nhám đã được các nhà khoa học trên thế giới chứng minh có tác dụng hiệu quả và an toàn trên các triệu chứng bệnh Alzheimer, là bệnh chưa có thuốc điều trị hiệu quả. Ở Việt Nam hiện nay, cây Thông đất nhám được tìm thấy ở Hà Giang, Khánh Hòa. Đây là cây họ thảo phụ sinh, sống nhiều năm, thân thường mập, hình trụ, mọc đứng ở phần gốc, sau gập thông xuống dài 30-70 cm, 1-2 lần lưỡng phân. Lá hẹp, nhọn, xếp xoắn ốc hình dải - ngọn giáo, tỏa rộng ra, không cuống, mép nguyên, lá ở đỉnh thì ngắn hơn lá ở gốc. Chùy dài ở dưới chót nhánh. Bào tử diệp không khác lá thường, chỉ hơi nhỏ hơn; bào tử nang hình thận, nở thành 2 mảnh không bằng nhau. Bộ phận sinh sản ở ngọn thân thành bông không phân nhánh, dài khoảng 10 cm, lá bào tử giống lá thật, nhưng ngắn hơn 2 lần, thẳng, nhọn, hơi phình ở gốc. Túi bào tử hình thận, có 2 mảnh vỏ bằng nhau.

Bệnh Alzheimer là một trong những căn nguyên phổ biến gây chứng giảm trí nhớ ở người già, bệnh đặc trưng bởi sự mất dần các noron thần kinh và synap trong vỏ não và một số vùng dưới vỏ. Bệnh có xu hướng nặng dần gây ảnh hưởng xấu tới các hoạt động sinh hoạt hàng ngày, tới trí nhớ, hoạt động ngôn ngữ và tư duy của người bệnh. Bệnh thường xuất hiện ở người trên 65 tuổi. Tuy nhiên, ngày nay bệnh Alzheimer có xu hướng ngày càng bị trẻ hóa cũng như tỷ lệ người già mắc bệnh ngày

càng tăng làm ảnh hưởng không nhỏ tới ổn định của xã hội. 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 et al., 2007). Số người già ở các nước phát triển 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 những biện pháp giúp đỡ họ có cuộc sống hài hòa. Nước Pháp coi đây là một trong những chiến lược của ngành y tế quốc gia. Việt Nam cũng 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. Alzheimer là một căn bệnh rất phức tạp và không thể điều trị khỏi hoàn toàn bằng việc dùng thuốc hoặc biện pháp can thiệp nào khác. Hiện nay, các chuyên gia y tế cũng chỉ có thể đưa ra những biện pháp để ngăn chặn tình trạng bệnh phát triển nhanh hơn. Việc sử dụng các chất ức chế cholinesterase (AChEI) là một trong hầu hết các chiến lược được chấp nhận trong điều trị Alzheimer.

Huperzin A và huperzin B là các alcaloit, có tác dụng ức chế cholinesterase mạnh mẽ, có chọn lọc, có dược tính độc đáo. Trong các loại huperzin, huperzin A và huperzin B được chứng minh là một trong các hoạt chất có hoạt tính ức chế cholinesterase mạnh nhất và là các hoạt chất đang được sử dụng trong điều trị Alzheimer và phục hồi trí nhớ. Huperzin A và huperzin B có khả năng xuyên qua hàng rào mạch máu não và tác động trực tiếp lên não bộ với liều lượng rất thấp tính bằng microgram. Huperzin B thể hiện hoạt tính ức chế cholinesterase thấp hơn huperzin A nhưng có thời gian tác dụng lâu hơn và thể hiện chỉ số điều trị cao hơn. Ở Trung Quốc, hupein A lần đầu tiên được chiết xuất vào năm 1948 và được phê duyệt để điều trị Alzheimer vào những năm 1990, và ngày nay đã có sẵn dưới dạng thuốc hỗ trợ điều trị ở Hoa Kỳ. 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*.

Nguồn thu nhận huperzin A và huperzin B chính là thực vật thuộc họ Thông đất (Lycopodiaceae). Nhưng hàm lượng huperzin trong cây rất thấp, kèm theo cây có thời gian sinh trưởng dài, độ phân bố rất hẹp, cây thường sống ở độ cao trên 500m, cây sinh sản chủ yếu bằng bào tử, khối lượng cây xanh rất thấp, thời gian sinh trưởng dài, rất khó khăn khi đưa ra sản xuất lớn, chính vì vậy các nhà khoa học đã nghiên cứu nhằm tìm kiếm khả năng cung cấp nguyên liệu bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* với một số loài cây (Thạch tùng răng cưa - *Huperzia serrata*), tuy nhiên hiệu quả đem lại vẫn không được cao do điều kiện nuôi cấy khắc khe, thời gian nuôi cấy dài và khối lượng cây thu được ít. Việc tổng hợp hóa học huperzin A và huperzin B đòi hỏi kỹ thuật phức tạp, chi phí sản xuất cao và tạo nhiều 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 và

huperzin B tự nhiên (Tun et al. 2011; White et al. 2013). Bên cạnh đó, kỹ thuật nuôi cấy tế bào thực vật cũng gặp nhiều khó khăn như đòi hỏi kỹ thuật khắt khe, chi phí cao và thời gian dài. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng nấm nội sinh phân lập từ một số loài thuộc họ Thông đất có khả năng sản sinh các huperzin. Do đó, việc nghiên cứu phân lập các chủng nấm nội sinh trong cây thuộc họ Thông đất có khả năng sinh huperzin đã được chú trọng.

Đã có nhiều kết quả nghiên cứu khả quan về vi nấm nội sinh sinh huperzin, đặc biệt là ở Trung Quốc, nơi có các cây họ Thông đất phân bố nhiều. 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 (*Huperzia serrata*), bao gồm các chi chủ yếu như *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Coniochaeta*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Plectosphaerella*, *Paecilomyces*, *Podospora*, *Penicillium*, *Cyphellophora*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces* và *Botrytis*. Bằng kỹ thuật phân tích sắc ký màng lỏng (TLC) và sắc ký màng lỏng hiệu năng cao (HPLC), Li và cộng sự (2007) đã phân lập được chủng *Acremonium* sp. 2F09P03B sản sinh huperzin A với hàm lượng 8,32 μ g/L; Wang và cộng sự (2011) đã xác định được 39 chủng có khả năng sản sinh huperzin A thuộc các chi *Aspergillus*, *Podospora*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces*, *Shiraia* và *Botrytis*, trong đó chủng *Shiraia* sp. Slf14 cho sản lượng huperzin A cao nhất là 327,8 μ g/L. Trình tự hệ gen của chủng *Shiraia* sp. Slf14 đã được Zhang và cộng sự công bố vào năm 2014. Yang và cộng sự (2011) cũng đã phân lập và xác định được chủng *Colletotrichum gloeosporioides* ES026 có khả năng sản sinh 30 μ g huperzin A/g CDW; Hu Weixin và cộng sự (patent Trung Quốc số CN102168017B) đã nghiên cứu nâng cao sản lượng của chủng *Colletotrichum gloeosporioides* YLJ-13 có khả năng sản sinh huperzin A lên tới 199,6mg/L rất có triển vọng cho sản xuất huperzin A quy mô lớn. Su và Yang (2015) đã phân lập được chủng *Paecilomyces tenuis* YS-13 có khả năng sản sinh được 21 μ g huperzin A/L. Amira và cộng sự (2019) phân lập được chủng *Alternaria brassicae* với sản lượng huperzin A đạt 42,89 μ g/g CDW. Xiao và cộng sự (2020) phân lập được các chủng nấm nội sinh thuộc các chi *Aspergillus*, *Colletotrichum* và *Fusarium* có khả năng sinh huperzin A. Các nghiên cứu về nấm nội sinh sinh huperzin trên các loài cây thuộc chi *Phlegmariurus* và các chủng vi nấm có khả năng sinh đồng thời cả huperzin A và huperzin B là chưa có nhiều công bố, trong đó chủng *Ceriporia renrata* MY311 phân lập từ cây *Phlegmariurus plegmaria* đã được Zhang và cộng sự (2015) chứng minh là có khả năng tạo ra 40,53 μ g HupA/L và chủng *Colletotrichum gloeosporioides* từ cây *Huperzia serrata* có chứa cả huperzin A và huperzin B đã được công bố bởi Liqin và cộng sự (2018). Hầu hết, các chủng này đều đã được đăng ký bản quyền tại Trung Quốc, một số trong chúng 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.

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, bao gồm các chủng: *Penicillium* sp. LDL4.4, *Xylaria* sp. Tsp20, *Fungal endophyte* Tsp25, *Penicillium reticulisporum* Tsp41 và *Fusarium* sp. Rsp5.2 (Thanh và cộng sự, 2019, 2020). Tuy nhiên, các nghiên cứu về vi nấm nội sinh *Epicoccum sorghinum* ở cây Thông đất nhám (*Phlegmariurus squarrosus*) có khả năng sinh đồng thời cả huperzin A và huperzin B 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 nhằm phục vụ hỗ trợ điều trị bệnh suy giảm trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer ở Việt Nam.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng vi nấm *Epicoccum sorghinum* THG01-18 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ thân cây Thông đất nhám (*Phlegmariurus squarrosus*) phân bố tại huyện Quản Bạ, tỉnh Hà Giang, Việt Nam (tọa độ: 23°05'32"N 104°56'40"E, trên núi cao 1032m so với mặt nước biển) có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất huperzin A và huperzin B, các chất này có tác dụng trong việc điều trị rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer.

Chủng vi nấm *Epicoccum sorghinum* THG01-18 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 488bp và có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B với hàm lượng lần lượt là 0,758 và 0,548 mg/L dịch lên men.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng *Epicoccum sorghinum* THG01-18 trên môi trường PDA-I sau 5 ngày nuôi cấy trên đĩa thạch. Khuẩn lạc cân đối, không xê thùy, sợi khuẩn ty bông nhẹ có màu hồng phấn.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái sợi khuẩn ty của chủng *Epicoccum sorghinum* THG01-18 chụp trên kính hiển vi quang học (độ phóng đại 100 lần). Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh; không sinh bào tử.

Hình 3 là biểu đồ thể hiện sắc kí đồ HPLC (UV 310nm) của dịch chiết nấm *Epicoccum sorghinum* THG01-18 trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao LC/MS-Trap Agilent series 1100.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng *Epicoccum sorghinum* THG01-18 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân cây Thông đất nhám (*Phlegmariurus squarrosus*) phân bố tại vùng Hà Giang, Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A, huperzin B và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 488 bp được nêu trong SEQ ID NO:1.

Việc phân lập chủng thuần khiết về mặt sinh học từ thân cây Thông đất nhám 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 5-7 ngày, hàng ngày theo dõi sự phát triển của các khuẩn lạc nấm nội sinh trong cây. Cây 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 5-7 ngày, theo dõi và cấy chuyển đến khi thu được các chủng thuần.

Chủng nấm thuần khiết về mặt sinh học được phân loại theo phương pháp truyền thống dựa vào các khóa phân loại của Nguyễn Lân 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.

Sau khi phân lập và xác định các đặc tính sinh trưởng phát triển, tác giả giải pháp hữu ích thu được chủng vi nấm nội sinh thuộc chi *Epicoccum*, loài *sorghinum*. Chủng vi nấm này có đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước 488 bp và có độ tương đồng 99,18%, độ dài đoạn so sánh 99% so với các chủng *Epicoccum sorghinum* được

đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu GenBank mang các mã số MN006431.1, OK485136.1, MZ227319.1, MK429873.1 và được định danh là *Epicoccum sorghinum* THG01-18.

Sau khi định danh, chủng nấm *Epicoccum sorghinum* THG01-18 thuần khiết về mặt sinh học được nuôi cấy và xác định khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A, huperzin B. Chủng nấm được nuôi cấy trong 1 lít môi trường PDB-I (Môi trường PDB-I cải tiến có thành phần môi trường (g/l) như sau: 150g khoai tây; 10g đường glucoza; 10g cao nấm men; 5g pepton; 5g tryton; 2g NaNO₃; 0,5g MgSO₄; 1g KH₂PO₄; 0,5g K₂HPO₄; 0,5 Na₂HPO₄.2H₂O; 0,3g KCl; 0,3g NaCl và 1 lít nước cất) ở nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 5 ngày và tiến hành thu sinh khối bằng ly tâm ở 6000 vòng/phút, loại bỏ dịch. Sinh khối tươi được sấy ở 45 - 60°C và được tách chiết bằng dung môi hữu cơ thu được dịch chiết nấm, dịch chiết này chính là alkaloid toàn phần. Dịch chiết nấm được xác định khả năng sinh tổng hợp huperzin A, huperzin B bằng phương pháp sắc ký màng mỏng (TLC) và bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao LC/MS-Trap Agilent series 1100.

Chủng vi nấm *Epicoccum sorghinum* THG01-18 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B với hàm lượng lần lượt là 0,758 và 0,548 mg/L dịch lên men. Chủng *Epicoccum sorghinum* THG01-18 thuần khiết về mặt sinh học trong giải pháp hữu ích là chủng được phân lập từ thân cây Thông đất nhám phân bố tại Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B, hai chất này có tác dụng trong điều trị rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer. Hợp chất huperzin A được tìm thấy sinh tổng hợp bởi các loài nấm nội sinh trong các cây dược liệu họ Thông đất bao gồm các chi chủ yếu như *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Coniochaeta*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Plectosphaerella*, *Podospora*, *Penicillium*, *Cyphellophora*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Blastomyces*, *Botrytis*. Kết quả tìm ra chủng vi nấm nội sinh trong cây dược liệu thuộc chi *Epicoccum*, loài *sorghinum* có khả năng sinh tổng hợp cả huperzin A và huperzin B là một công bố đầu tiên ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Điều này mở ra hướng đi mới có hiệu quả trong việc điều trị bệnh Alzheimer tại Việt Nam.

Chủng *Epicoccum sorghinum* THG01-18 theo giải pháp hữu ích hiện đang được lưu giữ tại Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen vi sinh vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam ở điều kiện lạnh sâu - 20°C và -86°C, trong dung dịch 15% glycerol.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Mẫu thân cây Thông đất nhám (*Phlegmariurus squarrosus*) tươi phân bố tại Quán Bạ, Hà Giang, Việt Nam được rửa sạch và được khử trùng lần lượt bằng etanol 70%, NaOCl 10% và HgCl₂ 0,1% trong khoảng thời gian 3-5 phút rồi được rửa lại bằng nước cất khử trùng 4-5 lần. Sau khi được xử lý, các mẫu cây được cắt thành từng phần nhỏ (0,2-1cm), đặt các phần nhỏ lên đĩa peptri chứa môi trường PDA-I với khoảng cách đồng đều và được đánh số kí hiệu, thứ tự riêng tương ứng. Các đĩa được nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 5-7 ngày, theo dõi các đĩa hàng ngày để kiểm tra sự phát triển của các khuẩn lạc nấm. Các sợi nấm của các loài nấm khác nhau được cấy chuyển từ các đĩa ban đầu sang đĩa thạch PDA-I mới và nuôi ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 5-7 ngày, theo dõi và cấy chuyển đến khi thu được các chủng nấm thuần.

Kết quả đã phân lập được chủng THG01-18 thuần khiết về mặt sinh học có thời gian sinh trưởng 3-5 ngày nuôi cấy. Nuôi cấy chủng THG01-18 thuần trên môi trường thạch nghiêng đến khi khuẩn ty nấm phát triển phủ kín mặt thạch (3-5 ngày), sau đó bổ sung glycerol 15% vô trùng, giữ ở 4-10°C, -20°C và -86°C để lưu giữ và bảo quản chủng giống.

Sử dụng phương pháp phân loại truyền thống vi nấm dựa trên đặc điểm hình thái và vi hình thái của chủng nấm như hình thái khuẩn lạc, hệ sợi; vách ngăn sợi nấm, bào tử và cuống bào tử theo các khóa phân loại của Nguyễn Lân Dũng và cộng sự (1982); Bùi Xuân Đồng (1984); Ainsworth và cộng sự (1973) để sơ bộ nhận dạng, phân loại chủng THG01-18 đến chi.

Chủng THG01-18 được nuôi cấy phát triển trên môi trường PDA-I ở 28°C trong 5-7 ngày, quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc và kích thước khuẩn lạc. Chủng THG01-18 được nuôi cấy trên đĩa môi trường PDA-I sau 5 ngày nuôi cấy hình thái khuẩn lạc được thể hiện trên hình 1. Khuẩn lạc cân đối, không xê thùy, sợi khuẩn ty bông có màu hồng phấn. 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 0,5 x 0,5 cm đặt lên lam kính rồi lấy lamen đẩy lên bề mặt miếng thạch, nuôi trong đĩa peptri ở 28°C trong khoảng thời gian 5 - 7 ngày cho đến khi sợi nấm mọc lan đều bề mặt lamen. Đặt lam kính và lamen lên soi dưới kính hiển vi quang học, quan sát đặc điểm hệ sợi, bào tử, cuống bào tử, vách ngăn của chủng nấm. Hình thái của sợi khuẩn ty của chủng THG01-18 được thể hiện trên hình 2. Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh; không sinh bào tử. Chủng vi nấm được nhận dạng sơ bộ qua màu sắc, hình thái khuẩn lạc cùng đặc điểm vi hình thái theo các khóa phân loại.

Kết quả nhận dạng được chủng THG01-18 thuộc chi *Epicoccum*, loài *sorghinum*.

ADN của chủng THG01-18 được tách chiết bằng kit tách chiết ADN (G-spinTMTotal DNA Extraction Kit). Vùng gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng THG01-18 được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') và ITS4 (5'- CCTCCGCTTATTGATATGC - 3'). Cặp mồi ITS1 và ITS4 khuếch đại đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của các chủng nấm có kích thước tính toán theo lý thuyết 500-600bp.

Phản ứng PCR được thực hiện theo phương pháp chuẩn được mô tả bởi White và cộng sự (1990). Thể tích phản ứng PCR (50µl) bao gồm 100 ng ADN hệ gen, 25 µl hỗn hợp chuẩn, 0,5 µmol/L mỗi mồi và nước khử ion. Chu trình nhiệt bao gồm: 94°C trong 5 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ nhiệt: 94°C trong 1 phút 30 giây, 53°C trong 1 phút 30 giây, 72°C trong 2 phút; kết thúc ở 72°C trong 10 phút. Sau khuếch đại, sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di gel agarosa 1%. Kết quả thu được một phân đoạn gen có kích thước khoảng 500bp. Tinh sạch đoạn gen này bằng kit tinh sạch ADN (GeneJET PCR Purification Kit #K0701, Thermo Scientific).

Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng THG01-18 được xác định trên máy giải trình tự tự động AEI PRISM@ 3700 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific, Mỹ). Xử lý dữ liệu trình tự đoạn ADN bằng phần mềm Bioedit, Blast và so sánh, đối chiếu dữ liệu nguồn gen trên ngân hàng gen NCBI (bảng 1). Trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của chủng THG01-18 được thể hiện ở SEQ ID NO:1.

Kết quả đã xác định được trình tự đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 tách từ chủng THG01-18 có kích thước 488bp. Trình tự đoạn gen này có độ tương đồng 99,18% và độ dài đoạn so sánh 99% so với các chủng thuộc chi *Epicoccum*, loài *sorghinum* được đối chiếu trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI, kết quả so sánh này đã khẳng định được chủng THG01-18 thuộc chi *Epicoccum*, loài *sorghinum*.

Chủng *Epicoccum sorghinum* THG01-18 được nuôi cấy trong 1 lít môi trường PDB-I ở 180 vòng/phút, nhiệt độ 28°C trong 5 ngày. Thu sinh khối nấm tươi bằng ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút. Sấy khô sinh khối nấm tươi thu được ở nhiệt độ 45-60°C, nghiền thành bột mịn bằng nito lỏng.

Bảng 1- Mức độ tương đồng đoạn gen vùng ITS1-5,8S-ITS2 của chủng vi nấm THG01-18 khi so sánh trên Ngân hàng dữ liệu gen NCBI

Tên chủng	Chủng so sánh		Độ dài đoạn so sánh %	Mức độ tương đồng %
	Tên	Mã số		
THG01-	<i>Epicoccum sorghinum</i> AB231	MN006431.1	99	99,18

18	<i>Epicoccum sorghinum</i> AF21-1-2	OK485136.1	99	99,18
	<i>Epicoccum sorghinum</i> INF44	MZ227319.1	99	99,18
	<i>Epicoccum sorghinum</i> GJ-15	MK429873.1	99	99,18

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

Dịch alkaloid toàn phần thu được được xác định hoạt chất huperzin A, huperzin B bằng phương pháp sắc ký màng mỏng (TLC) như sau: (1) hòa tan chất chuẩn huperzin A, huperzin B trong metanol 1mg/ml, pha loãng đến các nồng độ chuẩn; (2) hoạt hóa bản mỏng silicagel bằng cách sấy 1 giờ ở 110°C, mẫu được chấm lên bản mỏng bằng pipet, sấy nhẹ bản mỏng để bay hết dung môi; (3) dùng kẹp đưa bản mỏng đã chấm mẫu vào bình dung môi có thành phần cloroform:isopropanol:etyl axetat:amoni (tỷ lệ 4:1,5:1:0,1), đậy nắp bình, theo dõi vạch dung môi di chuyển đến khi cách mép trên tấm bản mỏng 1cm thì lấy bản mỏng ra khỏi bình, sấy nhẹ bản mỏng; (4) sử dụng thuốc nhuộm KMnO₄ 0,5% và Iod 0,5% xịt đều lên bản mỏng, sấy nhẹ bản mỏng, quan sát vết. Kết quả xác định được alkaloid toàn phần thu được từ chủng THG01-18 cho kết quả dương tính với huperzin A.

Xác định hàm lượng huperzin A, huperzin B có mặt trong dịch chiết chủng THG01-18 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên hệ thống LC/MS-Trap Agilent series 1100 với cột phân tích Zorbax SB -C18 RP (4.6 x 150 mm), detector DAD và MS. Trên hệ thống HPLC, pic tín hiệu được lựa chọn của huperzin A chuẩn được phát hiện một cách ổn định tại thời gian lưu Rt 6,3-6,4 phút, pic tín hiệu được lựa chọn của huperzin B chuẩn được phát hiện ổn định tại thời gian lưu Rt 3,5-3,8 phút. Từ các kết quả giá trị cường độ pic ion phân tử, giá trị tích phân cường độ hấp thụ tử ngoại của pic, sử dụng phương pháp phân tích phương sai hồi qui tuyến tính một lớp (ANOVA) để xây dựng đường chuẩn phục vụ cho việc định lượng hup A, hup B trong mẫu. Kết quả cho thấy, pic chất huperzin A trong dịch chiết chủng THG01-18 được phát hiện ở thời gian lưu Rt 6,36 phút tương đương với thời gian lưu Rt của chất chuẩn huperzin A, pic chất huperzin B trong dịch chiết chủng THG01-18

được phát hiện ở thời gian lưu Rt 3,55 phút tương đương với thời gian lưu Rt của chất chuẩn huperzin B. Kết quả được thể hiện trên hình 3.

Kết quả xác định dịch chiết của chủng THG01-18 có hàm lượng huperzin A đạt 0,758 mg/L dịch lên men và hàm lượng huperzin B đạt 0,548 mg/L dịch lên men.

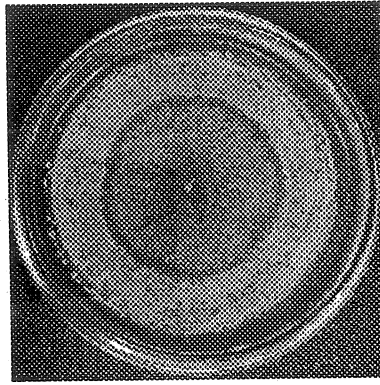
Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng vi nấm *Epicoccum sorghinum* THG01-18 là chủng thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ cây Thông đất nhám phân bố tại Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp hai hoạt chất huperzin A và huperzin B, hai chất này có tác dụng trong điều trị các bệnh rối loạn trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer – chứng bệnh gây sa sút trí tuệ ở người cao tuổi.

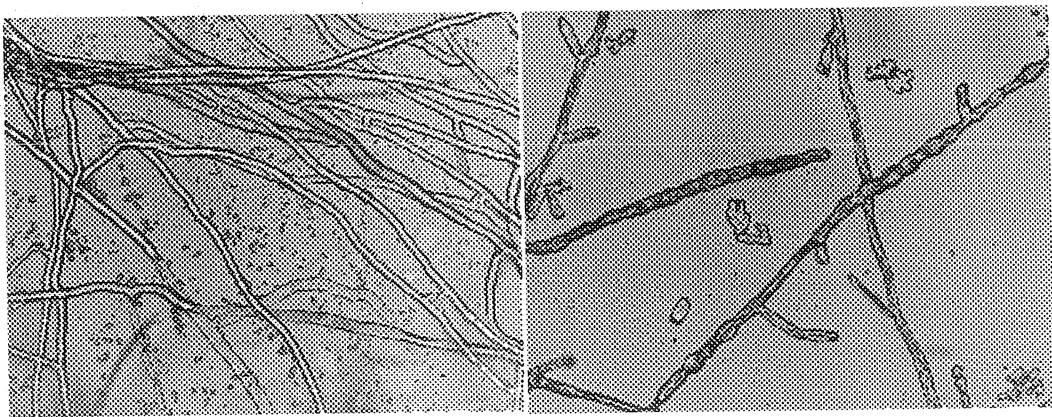
Hiện nay, Việt Nam chưa có công trình nào nghiên cứu về vi nấm nội sinh cây Thông đất nhám. Cho đến nay, kết quả nghiên cứu về chủng vi nấm sinh tổng hợp đồng thời cả huperzin A và huperzin B thuộc chi *Epicoccum*, loài *sorghinum* của nhóm nghiên cứu là kết quả đầu tiên được công bố. Chủng *Epicoccum sorghinum* THG01-18 là một trong những chủng đầu tiên được nhóm nghiên cứu phân lập tại Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp cả hai hoạt chất huperzin A và huperzin B. Chủng này sẽ được thực hiện các nghiên cứu tiếp theo để nâng cao hoạt tính sinh tổng hợp cả 2 hoạt chất huperzin A và huperzin B để sử dụng làm chủng giống gốc ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất hoạt chất huperzin A và huperzin B quy mô công nghiệp, đơn giản, hiệu quả, phục vụ hỗ trợ điều trị các bệnh suy giảm về trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer. Kết quả này mở ra hướng đi mới có hiệu quả trong việc phòng và điều trị bệnh Alzheimer tại Việt Nam, góp phần giảm giá thành sản phẩm, nâng cao sức khỏe cộng đồng và tăng hiệu quả kinh tế, xã hội.

YÊU CẦU BẢO HỘ

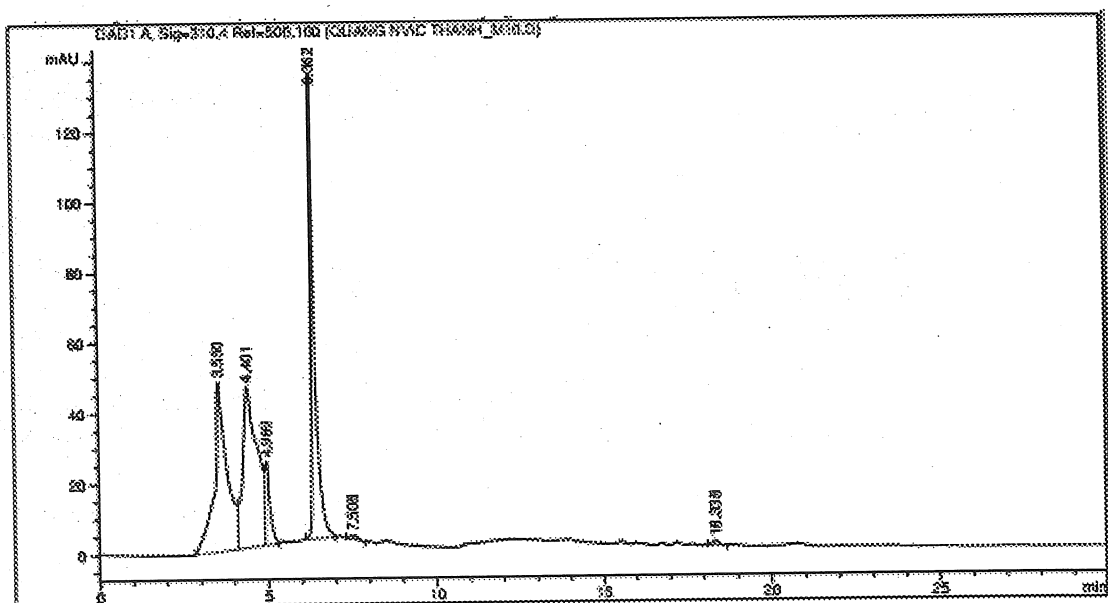
1. Chủng vi nấm *Epicoccum sorghinum* THG01-18 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ thân cây Thông đất nhám (*Phlegmariurus squarrosus*) phân bố tại huyện Quán Bạ, tỉnh Hà Giang, Việt Nam, chủng này có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất huperzin A và huperzin B với hàm lượng lần lượt là 0,758 và 0,548 mg/L dịch lên men và mang trình tự ADN vùng ITS1-5,8S-ITS2 có độ dài 488bp được nêu trong SEQ ID NO:1.



Hình 1



Hình 2



Hình 3

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> CHŨNG VI NẤM EPICOCUM SORGHINUM THG01-18 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> 488

<212> ADN

<213> *Epicoccum sorghinum* THG01-18

<400>

tgctgctat ctcttaccca tgtcttttga gtaccttacg tttcctcggg gggttcgccc	60
accgattgga caaatttaaa ccctttgcag ttgaaatcag cgtctgaaaa aacttaatag	120
ttacaacttt caacaacgga tctcttggtt ctggcatcga tgaagaacgc agcgaaatgc	180
gataagtagt gtgaattgca gaattcagtg aatcatcgaa tctttgaacg cacattgcgc	240
cccttggtat tccatggggc atgcctgttc gagcgtcatt tgtaccttca agctctgctt	300
gggtgtgggt gtttgtctcc tgtagactcg ccttaaaaca attggcagcc ggcgtattga	360
tttcggagcg cagtacatct cgcgctttgc actcataacg acgacatcca aaagtacatt	420
tttacctct tgacctcgga tcaggtaggg ataccgctg aacttaagca tatccaaaac	480
ccggaggg	488