

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

====\*\*====



Cồ Thị Thùy Vân

**NGHIÊN CỨU QUI TRÌNH PHÂN LẬP, NHÂN GIỐNG DẠNG  
DỊCH THỂ ĐỂ NUÔI TRỒNG NẤM ĐÀU KHỈ (*HERICCIUM  
ERINACEUS* (BULL.: FR.) PERS.) VÀ TÁCH CHIẾT MỘT SỐ  
POLYSACCHARIDE CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

Hà Nội - 2015

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

====\*\*====



**Cô Thị Thùy Vân**

**NGHIÊN CỨU QUI TRÌNH PHÂN LẬP, NHÂN  
GIỐNG DẠNG DỊCH THỂ ĐỂ NUÔI TRỒNG NẤM  
ĐẦU KHỈ (*HERICIUM ERINACEUS* (BULL.: FR.)  
PERS.) VÀ TÁCH CHIẾT MỘT SỐ  
POLYSACCHARIDE  
CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 62420201

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. PGS.TS. Lê Mai Hương

2. PGS.TS. Trần Liên Hà

**Hà Nội - 2015**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi; các số liệu, kết quả, hình ảnh nêu trong Luận án là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình của tác giả nào khác.

*Hà Nội, ngày tháng năm 2015.*

**TM tập thể Giáo viên hướng dẫn**  
**Giáo viên HD 1**

**Nghiên cứu sinh**

**PGS.TS. Lê Mai Hương**

**Cồ Thị Thùy Vân**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Lê Mai Hương, Phòng Sinh học thực nghiệm - Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên – Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam và PGS.TS. Trần Liên Hà, Bộ môn Vi sinh – Hóa sinh – Sinh học phân tử - Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Đại học Bách khoa Hà Nội, đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình nghiên cứu để tôi hoàn thành Luận án này;

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo trong Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Đại học Bách khoa Hà Nội đã truyền đạt cho tôi những kiến thức quý báu cũng như giúp đỡ và động viên tôi trong suốt thời gian học tập tại trường; Đồng thời xin được gửi lời cảm ơn tới sự giúp đỡ, cộng tác của các cán bộ phòng Nghiên cứu – Trung tâm công nghệ sinh học thực vật – Viện di truyền nông nghiệp; các cán bộ phòng Sinh học thực nghiệm - Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên – Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam;

Tôi xin cảm ơn GS.TSKH. Trịnh Tam Kiệt đã cho tôi những lời khuyên và chỉ dẫn cho tôi rất nhiều kiến thức về nấm lớn.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám đốc cùng toàn thể cán bộ công nhân viên Trung tâm công nghệ sinh học thực vật – Viện di truyền nông nghiệp đã tạo điều kiện thuận lợi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu để tôi hoàn thành nhiệm vụ học tập được giao.

Hà Nội, ngày      tháng      năm 2015

**Cô Thị Thùy Vân**

## MỤC LỤC

|   | <b>TRANG</b> |
|---|--------------|
| <b>MỞ ĐẦU</b>   | 1            |
| <b>Chương 1: TỔNG QUAN</b>  | 5            |
| <b>1.1. Tình hình nghiên cứu và sản xuất và sử dụng nấm dược liệu</b>                                     | 5            |
| 1.1.1. Tình hình nghiên cứu và sản xuất nấm dược liệu   | 5            |
| 1.1.2. Tình hình nghiên cứu và sử dụng nấm dược liệu trong chăm sóc sức khỏe cộng đồng                    | 10           |
| 1.1.2.1. Tình hình nghiên cứu tách chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học trong nấm dược liệu           | 15           |
| 1.1.2.2. Tình hình nghiên cứu tách chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học trong nấm dược liệu ở nước ta | 16           |
| <b>1.2. Nấm Đầu khỉ <i>Hericium erinaceus</i> (Bull.: Fr.) Pers.</b>                                      | 17           |
| 1.2.1. Giới thiệu về nấm Đầu khỉ <i>Hericium erinaceus</i> (Bull.: Fr.) Pers.                             | 17           |
| 1.2.2. Vị trí nấm Đầu khỉ trong phân loại nấm học   | 18           |
| 1.2.3. Đặc điểm hình thái quả thể và một số đặc tính sinh học của nấm Đầu khỉ                             | 18           |
| 1.2.4. Thành phần hóa học của nấm Đầu khỉ <i>H. erinaceus</i>   | 19           |
| 1.2.4.1. Một số thành phần dinh dưỡng trong nấm Đầu khỉ   | 19           |
| 1.2.4.2. Một số thành phần hóa học mang lại giá trị dược liệu cho nấm Đầu khỉ                             | 20           |
| 1.2.5. Tình hình nuôi trồng nấm Đầu khỉ trên thế giới và trong nước                                       | 25           |
| 1.2.6. Một số phương pháp được sử dụng để tách polysaccharide từ quả thể và hệ sợi nấm dược liệu          | 30           |
| 1.2.6.1. Phương pháp tách chiết trong cồn   | 30           |
| 1.2.6.2. Phương pháp tách chiết trong nước nóng   | 30           |
| 1.2.6.3. Phương pháp tách chiết trong kiềm nóng kết hợp với sự hỗ trợ của lò vi sóng và siêu âm           | 31           |
| 1.2.6.4. Phương pháp tách chiết trong nước nóng kết hợp với sự hỗ trợ của lò vi sóng và siêu âm           | 32           |
| <b>Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b>   | 34           |
| <b>2.1. Vật liệu</b>  | 34           |
| <b>2.2. Các loại môi trường</b>   | 36           |
| <b>2.3. Phương pháp nghiên cứu</b>  | 39           |
| 2.3.1. Phương pháp nghiên cứu tuyển chọn, xây dựng QTCN phân lập giống nấm Đầu khỉ                        | 39           |

|   |    |
|---|----|
| 2.3.1.1. Khảo nghiệm, tuyển chọn giống nấm Đầu khi  | 39 |
| 2.3.1.2. Phân lập giống nấm Đầu khi   | 40 |
| 2.3.1.3. Nghiên cứu độ tuổi của quả thể nấm thích hợp để phân lập giống gốc   | 41 |
| 2.3.1.4. Nghiên cứu các điều kiện nhân giống gốc nấm Đầu khi  | 41 |
| 2.3.2. Phương pháp nghiên cứu xây dựng QTCN nhân giống nấm Đầu khi dạng dịch thể các cấp.                                       | 42 |
| 2.3.2.1. Nhân giống Đầu khi dạng dịch thể trung gian cấp 1 (dung tích 200 ml)   | 42 |
| 2.3.2.2. Nhân giống Đầu khi dạng dịch thể trung gian cấp 2 (dung tích 2000 - 5000 ml)   | 43 |
| 2.3.2.3. Nhân giống Đầu khi dạng dịch thể sử dụng trong nuôi trồng nấm Đầu khi trên nguồn cơ chất tổng hợp (dung tích 120 lít)  | 44 |
| 2.3.2.4. Phương pháp kiểm tra chất lượng giống nấm dạng dịch thể  | 45 |
| 2.3.3. Phương pháp nghiên cứu xây dựng QTCN nuôi trồng nấm Đầu khi trên nguồn cơ chất tổng hợp sử dụng giống nấm dạng dịch thể. | 46 |
| 2.3.3.1. Phương pháp xử lý nguyên liệu nuôi trồng nấm Đầu Khi   | 46 |
| 2.3.3.2. Nghiên cứu điều kiện thích hợp để nuôi trồng nấm Đầu khi trên nguồn cơ chất tổng hợp, sử dụng giống nấm dạng dịch thể. | 47 |
| 2.3.3.3. Phương pháp bố trí thí nghiệm  | 47 |
| 2.3.4. Phương pháp xác định một số thành phần dinh dưỡng, vitamin, axit amin trong nấm Đầu khi                                  | 49 |
| 2.3.5. Phương pháp nghiên cứu một số điều kiện tách chiết thu nhận polysaccharide trong quả thể nấm Đầu khi                     | 49 |
| 2.3.5.1. Phương pháp thu nhận polysaccharide trong mẫu quả thể nấm Đầu khi  | 49 |
| 2.3.5.2. Lựa chọn hóa chất kiểm thích hợp   | 50 |
| 2.3.5.3. Nghiên cứu nồng độ dung dịch NaOH thích hợp  | 50 |
| 2.3.5.4. Phương pháp xác định hàm lượng polysaccharide trong mẫu nấm  | 50 |
| 2.3.5.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định   | 50 |
| 2.3.5.6. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư người nuôi cấy invitro                      | 51 |
| 2.3.5.7. Phương pháp kiểm tra hoạt tính ức chế hình thành khối u 3 chiều trên thạch mềm (anti-tumor promoting assay) in vivo    | 52 |
| 2.3.5.8. Phương pháp nghiên cứu trên động vật thực nghiệm   | 53 |
| 2.3.6. Phương pháp xử lý số liệu  | 54 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN</b>   | <b>55</b> |
| <b>3.1. Kết quả tuyển chọn, phân lập lại giống nấm <i>H. erinaceus</i></b>                                     | <b>50</b> |
| 3.1.1. Kết quả so sánh, đánh giá và khảo nghiệm 4 giống nấm <i>H. erinaceus</i> trên diện hẹp                  | 51        |
| 3.1.1.1. Một số đặc trưng hình thái của 4 giống nấm <i>H. erinaceus</i> nghiên cứu tuyển chọn                  | 51        |
| 3.1.1.2. Thời gian sinh trưởng của 4 giống nấm <i>H. erinaceus</i> khảo nghiệm                                 | 52        |
| 3.1.1.3. Đánh giá khả năng chống chịu đối với các loại sâu bệnh hại của 4 giống <i>H. erinaceus</i> nghiên cứu | 57        |
| 3.1.1.4. Kết quả phân tích một số thành phần dinh dưỡng trong nấm <i>H. erinaceus</i> He1                      | 59        |
| 3.1.2. Kết quả phân lập lại giống nấm <i>H. erinaceus</i>  | 61        |
| 3.1.2.1. Ảnh hưởng của phương pháp phân lập đến sự mọc của hệ sợi nấm <i>H. erinaceus</i>                      | 61        |
| 3.1.2.2. Xác định thời điểm phân lập   | 63        |
| 3.1.2.3. Kết quả nghiên cứu môi trường dinh dưỡng phân lập giống nấm <i>H. erinaceus</i>                       | 65        |
| a. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sự sinh trưởng của hệ sợi giống gốc  | 65        |
| b. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sự sinh trưởng của hệ sợi  | 66        |
| c. Ảnh hưởng của thành phần môi trường dinh dưỡng đến sự sinh trưởng của sợi nấm                               | 68        |
| 3.1.2.4. Xác định nhiệt độ thích hợp nuôi giống gốc nấm <i>H. erinaceus</i>                                    | 70        |
| <b>3.2. Kết quả nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ nhân giống nấm <i>H. erinaceus</i> dạng dịch thể</b>   | <b>73</b> |
| 3.2.1. Nhân giống nấm <i>H. erinaceus</i> trung gian cấp 1 dạng dịch thể (dung tích 200ml)                     | 73        |
| 3.2.1.1. Kết quả nghiên cứu chế độ khử trùng môi trường dinh dưỡng   | 73        |
| 3.2.1.2. Kết quả nghiên cứu môi trường nhân giống nấm <i>H. erinaceus</i> dạng dịch thể trung gian cấp 1       | 74        |
| 3.2.1.3. Ảnh hưởng của pH môi trường dinh dưỡng dạng dịch thể đến  | 76        |

|  |    |
|--|----|
| sự sinh trưởng của hệ sợi nấm Đầu khi trung gian cấp 1 dạng dịch thể   |    |
| 3.2.1.4. Kết quả xác định tỷ lệ giống cấy thích hợp khi cấy chuyển sang môi trường dịch thể                                    | 76 |
| 3.2.1.5. Kết quả nghiên cứu nhiệt độ nuôi giống nấm Đầu khi trung gian cấp 1 dạng dịch thể                                     | 77 |
| 3.2.1.6. Chế độ nuôi giống   | 77 |
| a. Nghiên cứu chế độ nuôi giống trung gian cấp 1 trên máy lắc  | 80 |
| b. Nghiên cứu các chế độ nuôi giống trên máy khuấy từ  | 81 |
| 3.2.1.7. Kết quả nghiên cứu đường cong sinh trưởng của giống nấm Đầu khi trung gian cấp 1 dạng dịch thể                        | 82 |
| 3.2.2. Nhân giống nấm Đầu khi trung gian cấp 2 dạng dịch thể (dung tích 2000ml – 5000ml)                                       | 85 |
| 3.2.2.1. Kết quả nghiên cứu chế độ khử trùng môi trường dinh dưỡng   | 85 |
| 3.2.2.2. Kết quả nghiên cứu thành phần môi trường nhân giống trung gian cấp 2 nấm Đầu khi dạng dịch thể                        | 86 |
| 3.2.2.3. Kết quả nghiên cứu tuổi giống trung gian cấp 1 dạng dịch thể cấy chuyển sang giống trung gian cấp 2                   | 87 |
| 3.2.2.4. Kết quả xác định tỷ lệ giống cấy thích hợp khi cấy chuyển sang môi trường dịch thể                                    | 88 |
| 3.2.2.5. Kết quả nghiên cứu chế độ sục khí cho bình lên men dung tích 2-5 lít  | 89 |
| 3.2.2.6. Kết quả nghiên cứu chế độ sục khí cho bình lên men dung tích 2-5 lít  | 90 |
| 3.2.2.7. Kết quả xây dựng đường cong sinh trưởng của giống trung gian cấp 2 dạng dịch thể                                      | 92 |
| 3.2.3. Lên men nhân giống nấm Đầu khi dạng dịch thể qui mô 120 lít   | 95 |
| 3.2.3.1. Kết quả nghiên cứu thành phần môi trường nhân giống thể tích 120 lít  | 95 |
| 3.2.3.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện khử trùng môi trường dinh dưỡng đến chất lượng môi trường dinh dưỡng       | 95 |
| 3.2.3.3. Kết quả nghiên cứu tuổi giống trung gian cấp 2 dạng dịch thể cấy chuyển sang bình lên men nhân giống thể tích 120 lít | 96 |



|  |            |
|--|------------|
| 3.2.3.4. Kết quả nghiên cứu tỷ lệ giống cấy chuyển sang nồi lên men thể tích 120 lít   | 97         |
| 3.2.3.5. Kết quả xây dựng đường cong sinh trưởng của nuôi trồng dạng dịch thể, thể tích 120lit (nghiên cứu thời gian lên men)                                  | 98         |
| <b>3.3. Kết quả nghiên cứu xây dựng qui trình công nghệ nuôi trồng nấm Đầu khỉ sử dụng giống dạng dịch thể.</b>  | <b>104</b> |
| 3.3.1. Ảnh hưởng của độ ẩm cơ chất phối trộn đến khả năng nhiễm bệnh trong môi trường nuôi cấy và sự sinh trưởng, phát triển của hệ sợi nấm Đầu khỉ            | 104        |
| 3.3.2. Ảnh hưởng của thành phần dinh dưỡng phối trộn và phương pháp khử trùng đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm Đầu khỉ trong quá trình nuôi trồng thu quả thể | 107        |
| 3.3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống cấy vào bịch nguyên liệu đến sự sinh trưởng, phát triển của hệ sợi nấm Đầu khỉ  | 111        |
| 3.3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm Đầu khỉ trong nuôi trồng   | 113        |
| 3.3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự hình thành và phát triển quả thể  | 114        |
| 3.3.6. Hiệu quả kinh tế mang lại khi áp dụng qui trình công nghệ nuôi trồng nấm Đầu khỉ sử dụng giống dạng dịch thể  | 116        |
| <b>3.4. Kết quả tách chiết và thử hoạt tính sinh học của polysaccharide từ nấm Đầu khỉ <i>H. erinaceus</i></b>   | <b>120</b> |
| 3.4.1. Nghiên cứu quy trình tách chiết   | 120        |
| 3.4.1.1. Lựa chọn hóa chất kiềm thích hợp  | 120        |
| 3.4.1.2. Nghiên cứu tối ưu hóa nồng độ dung dịch NaOH  | 120        |
| 3.4.2. Xác định hàm lượng polysaccharide trong quả thể nấm Đầu khỉ He1 trong từng thời điểm nuôi   | 122        |
| 3.4.3. Kết quả kiểm tra hàm lượng polysaccharide trong quả thể nấm Đầu khỉ khô mới thu hái và sau thời gian bảo quản 6 tháng                                   | 124        |
| 3.4.4. Kết quả thử hoạt tính của polysaccharide thu nhận được  | 125        |
| 3.4.4.1. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định (Antimicrobial assay)   | 125        |
| 3.4.4.2. Hoạt tính gây độc tế bào (Cytotoxicity assay)   | 126        |

|   |     |
|---|-----|
| 3.4.4.3. Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế hình thành khối u trên thạch mềm của các phân đoạn polisaccarid                | 127 |
| 3.4.4.4. Kết quả thử nghiệm in vivo tính an toàn và hiệu lực của chế phẩm polysaccharide tổng HT1 trên động vật thực nghiệm | 128 |
| a. Kết quả nghiên cứu an toàn của chế phẩm HT1  | 128 |
| a1. Tác dụng của HT1 đối với trọng lượng cơ thể thỏ   | 129 |
| a2. Tác dụng của HT1 trên điện tim của thỏ khi dùng chế phẩm HT1 6 tuần   | 129 |
| a3. Tác dụng của HT1 đến một số chỉ số huyết học trên thỏ khi dùng HT1 6 tuần   | 131 |
| a4. Tác dụng của HT1 đối với hoạt độ enzym SGOT, SGPT của thỏ   | 133 |
| a5. Tác dụng HT1 đối với hàm lượng Creatinin của thỏ  | 134 |
| b. Kết quả nghiên cứu tác dụng bảo vệ phóng xạ của chế phẩm HT1   | 134 |
| c. Tác dụng của HT1 đối với quá trình tạo máu   | 135 |
| <b>Chương 4. KẾT LUẬN</b>   | 138 |
| <b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ TRONG PHẠM VI LUẬN ÁN</b>   | 141 |
| <b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>   | 142 |
| <b>Phụ lục</b>  | 149 |