

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT



NGUYỄN THỊ HẬU

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG TỚI
SỰ SINH TRƯỞNG CỦA NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO
CORDYCEPS MILITARIS

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

Hà Nội, Tháng 12 - 2014

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu - ĐHTN

<http://www.lrc-tnu.edu.vn/>

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Nấm đông trùng hạ thảo là tên chung chỉ một nhóm các loài nấm ký sinh trên sâu non, sâu trưởng thành hoặc nhộng của một số loại côn trùng. Nấm được đặt tên đông trùng hạ thảo dựa vào quá trình phát sinh, phát triển và vòng đời của chúng. Sâu non, nhộng, sâu trưởng thành của một số loài côn trùng nằm dưới đất hoặc ở trên mặt đất bị nấm ký sinh. Các loài nấm này sử dụng các chất hữu cơ trong cơ thể côn trùng làm thức ăn, làm cho côn trùng bị chết. Mùa đông, nhiệt độ và ẩm độ không khí thấp, nấm ký sinh ở dạng hệ sợi. Đến mùa hè, nhiệt độ và ẩm độ không khí cao, nấm chuyển sang giai đoạn sinh sản hữu tính, hình thành thể quả. Như vậy, mùa đông nấm ký sinh trên sâu, tồn tại ở giai đoạn hệ sợi, mùa hạ mọc thành cây nấm nên có tên là đông trùng hạ thảo. Một số loài đáng chú ý là *Cordyceps sinensis* và *Cordyceps militaris*.

Chi nấm *Cordyceps* đã được thu mẫu và định loại trên 400 loài khác nhau và theo hệ thống phân loại truyền thống, các loài này được xếp vào họ Clavicipitaceae [33].

Đông trùng hạ thảo không chỉ được các nhà khoa học nghiên cứu, mà còn được cả xã hội quan tâm đến, vì nấm là loại dược liệu quý, rất tốt cho sức khỏe con người, phù hợp với mọi lứa tuổi, từ trẻ con, phụ nữ mang thai, thanh thiếu niên, cho đến người già. Theo các tài liệu ghi chép về đông dược cổ, đông trùng hạ thảo là một vị thuốc bồi bổ hết sức quý giá, có tác dụng tích cực với các bệnh như rối loạn tinh dục, thận hư, liệt dương, di tinh, đau lưng, mỏi gối, ho hen, và có tác dụng tốt đối với trẻ em còi xương chậm lớn. Một số nghiên cứu hiện đại gần đây đã chỉ ra rằng nấm đông trùng hạ thảo có tác dụng làm tăng cường công năng của tuyến thượng thận, cải thiện được chức năng thận, nâng cao năng lực miễn dịch, kháng khuẩn, kháng virus, chống ung thư và chất phóng xạ.

Ở Việt Nam, những nghiên cứu về đông trùng hạ thảo nhìn chung chưa nhiều. Phần lớn những gì mà các nhà nghiên cứu Việt Nam có được về nguồn

được liệu quý hiếm này đều chỉ dừng lại ở việc phát hiện các chủng của đông trùng hạ thảo sẵn có trong tự nhiên. Một số ít tiến hành những nghiên cứu sâu hơn về đặc tính sinh lý của đông trùng hạ thảo cũng chỉ dừng lại ở mức độ thử nghiệm. Nhìn chung các nghiên cứu về đông trùng hạ thảo ở Việt Nam còn gặp nhiều khó khăn.

Từ những cơ sở lý luận về khoa học và thực tiễn nói trên, chúng tôi tiến hành đề tài: **“Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng tới sự sinh trưởng của nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*”**.

2. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài:

- Xác định được sự ảnh hưởng của thành phần dinh dưỡng, nhiệt độ, độ ẩm không khí, pH môi trường đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Cordyceps militaris* trong giai đoạn nhân giống.

- Xác định được sự ảnh hưởng của thành phần dinh dưỡng và phương thức cấy giống đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Cordyceps militaris* trong giai đoạn ươm sợi.

- Xác định được sự ảnh hưởng của nhiệt độ, độ ẩm không khí và cường độ chiếu sáng đến sự hình thành phát triển quả thể nấm *Cordyceps militaris*.

3. Nội dung nghiên cứu:

- Nghiên cứu sự ảnh hưởng của thành phần dinh dưỡng, nhiệt độ, độ ẩm không khí, pH môi trường đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Cordyceps militaris* trong giai đoạn nhân giống.

- Nghiên cứu sự ảnh hưởng của thành phần dinh dưỡng và phương thức cấy giống đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Cordyceps militaris* trong giai đoạn ươm sợi.

- Nghiên cứu sự ảnh hưởng của nhiệt độ, độ ẩm không khí và cường độ chiếu sáng đến sự hình thành phát triển quả thể nấm *Cordyceps militaris*.

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Kết quả nghiên cứu sự ảnh hưởng của một số yếu tố cơ bản tới sự sinh trưởng của hệ sợi, sự hình thành, phát triển của quả thể nấm *Cordyceps militaris* sẽ là căn cứ khoa học cho việc hoàn thiện và đưa quy trình sản xuất quả thể nấm đông trùng hạ thảo vào thực tế phục vụ đời sống con người. Ngoài ra kết quả của đề tài cũng cung cấp thông tin khoa học cho các nhà khoa học nghiên cứu chuyên sâu loài nấm quý hiếm *Cordyceps militaris*.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Đại cương về nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps*

1.1.1. Lịch sử nghiên cứu về *Cordyceps*

Nấm đông trùng hạ thảo được xem là rất quý, hiếm. Những câu truyện mang tính thần thoại và truyền thuyết liên quan đến loài nấm này được lưu truyền trong nhiều thiên niên kỷ. Hiện nay, các ghi nhận về thời gian phát hiện đầu tiên loài nấm này chưa được thống nhất. Theo Das (2009) thì nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps* được biết đến từ những năm 2000 trước công nguyên [15]. Nhưng theo Holliday và cộng sự (cs) (2004) tổng hợp từ nhiều nguồn tài liệu ghi nhận đầu tiên về nấm đông trùng hạ thảo được thực hiện tại Trung Quốc vào năm 620 sau công nguyên, vào triều đại nhà Đường (618-907 sau công nguyên). Sự ghi nhận này đã làm rõ bản chất sinh học từ những câu truyện huyền thoại và truyền thuyết về đông trùng hạ thảo. Đông trùng hạ thảo là một sinh vật tồn tại hàng năm được chuyển một cách thần bí từ động vật sang thực vật vào mùa hè và sau đó lại từ thực vật chuyển sang động vật vào mùa đông. Tiếp sau đó có nhiều công trình được xuất bản với nội dung về loài nấm đông trùng hạ thảo này của các học giả xứ Tây Tạng từ thế kỷ 15 đến thế kỷ 18, trong đó có công trình đầu tiên được cho là có cơ sở khoa học tin cậy nhất mô tả về nấm đông trùng hạ thảo của Wu-Yiluo năm 1757, trong cuốn sách *Dược điển*, dưới triều đại Thanh. Theo sau các học giả xứ Tây Tạng, việc phát hiện ra giá trị của đông trùng hạ thảo thuộc về những người chăn bò trên núi Hymalaya ở Tây Tạng cũ và Nepal, họ thấy rằng những chú bò gặm cỏ ăn phải cây nấm đông trùng hạ thảo vào mùa xuân đã trở nên cuồng nhiệt, bò đực luôn tìm và theo sát bò cái [18].

1.1.2. Phân loại học

Chi nấm *Cordyceps* đã được thu mẫu và định loại trên 400 loài khác nhau. Theo hệ thống phân loại truyền thống, chi *Cordyceps* thuộc giới Nấm, ngành Ascomycota, lớp Sordariomycetes, bộ Hypocreales, họ Clavicipitaceae [33].



Hình 1.1. Hình ảnh đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*

(www.jscr.jp)

Phân loại nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*:

Giới	: Fungi
Ngành	: Ascomycota
Phân ngành	: Ascomycotina
Lớp	: Sordariomycetes
Bộ	: Hypocreales
Họ	: Clavicipitaceae
Chi	: <i>Cordyceps</i>
Loài	: <i>Cordyceps militaris</i>

1.1.3. Đặc điểm và phân bố của *Cordyceps*

Nấm đông trùng hạ thảo là tên chung chỉ một nhóm các loài nấm ký sinh trên sâu non hoặc sâu trưởng thành của một số loại côn trùng. Nấm được đặt tên đông trùng hạ thảo dựa vào quá trình phát sinh, phát triển và vòng đời của chúng. Sâu non, nhộng, sâu trưởng thành của một số loài côn trùng nằm dưới đất hoặc ở trên mặt đất bị nấm ký sinh. Các loài nấm này sử dụng các chất hữu cơ

trong cơ thể côn trùng làm thức ăn, làm cho côn trùng bị chết. Mùa đông, nhiệt độ và ẩm độ không khí thấp, nấm ký sinh ở dạng hệ sợi. Đến mùa hè, nhiệt độ và ẩm độ không khí cao, nấm chuyển sang giai đoạn sinh sản hữu tính, hình thành thể quả [7].

Nấm đông trùng hạ thảo thường phát hiện vào mùa hè ở một số cao nguyên có độ cao từ 3500 m đến 5000 m so với mặt biển; đó là các vùng Tây Tạng, Tứ Xuyên, Cam Túc, Vân Nam... Đây chính là nguồn đông trùng hạ thảo tự nhiên [11]. Ngoài ra còn phát hiện tại các vùng núi cao thuộc Ấn Độ, Nepal, Bhutan. Hiện nay, khoảng hơn 400 loài đã được tìm thấy, trong đó có khoảng 90 loài được phát hiện ở Trung Quốc [44].

Tại Việt Nam, đông trùng hạ thảo cũng đã được phát hiện tại nhiều địa điểm khác nhau. Năm 2009, Phạm Quang Thu và cs đã phát hiện 3 chủng là *Cordyceps nutans* Pat. tại khu bảo tồn thiên nhiên Tây Yên Tử - Sơn Động - Bắc Giang [3], *Cordyceps gunni* Berk. tại vườn quốc gia Tam Đảo tỉnh Vĩnh Phúc [4], *Cordyceps militaris* Link. tại vườn quốc gia Hoàng Liên tỉnh Lào Cai [5]. Năm 2009, Đái Duy Ban và cộng sự cũng công bố phát hiện mới của mình về loài đông trùng hạ thảo lần đầu tiên được tìm thấy ở Việt Nam đó là loài đông trùng hạ thảo có tên là *Isaria cerambycidae*. Loài Đông trùng hạ thảo này được tìm thấy trên ấu trùng xén tóc [1]. Năm 2010, Phạm Thị Thùy Viện phát hiện được 2 giống là *Cordyceps nutans* ở Vườn quốc gia Cúc Phương (Ninh Bình) và *Cordyceps militaris* ở Vũ Quang (Hà Tĩnh) [8].

1.2. Các hoạt chất chính trong nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps*

1.2.1. Cordycepin

Cordycepin có cấu trúc 3'-deoxyadenosin là một purin alkaloid có dạng của nucleosid adenosin bị mất một oxy ở vị trí 3' phân đường ribose. Cordycepin được phân lập lần đầu vào năm 1950 từ *Cordyceps militaris*. Bằng phân tích phổ NMR (nuclear magnetic resonance) và IR (infrared), cordycepin được xem như là một hợp chất có hoạt tính sinh học được ly trích từ quả thể và

sợi nấm. Cordycepin có công thức $C_{10}H_{13}N_5O_3$ và có phân tử lượng 251, điểm nóng chảy tại 230-231⁰C, độ hấp thụ cực đại tại 259 nm. Có thể hoà tan trong dung dịch đậm muối, methanol hay ethanol, nhưng không hoà tan trong benzen, ether hay chloroform, do vậy nhiều nghiên cứu đã sử dụng dung dịch muối khử trùng và đậm phosphat làm dung môi [44].

Vì cordycepin có cấu trúc tương tự adenosin nên RNA polymerase không thể phân biệt. Khi tham gia tổng hợp nên phân tử RNA, cordycepin ngăn chặn quá trình kéo dài thêm các RNA và tạo ra các phân tử RNA kết thúc sớm. Do đó, cordycepin được xem như chất kháng ung thư hiệu quả [20]. Năm 2003, Sun và cs đã chứng minh hàm lượng cordycepin với hoạt tính kháng khối u ở *Cordyceps kyushuensis* cao hơn *Cordyceps sinensis* và *Cordyceps militaris*, ở *Cordyceps* nuôi cấy cao hơn tự nhiên, và trong sợi nấm cao hơn ấu trùng chủ [32]. Tác giả cũng khẳng định rằng đây là hợp chất có tiềm năng dược học cao. Năm 2007, Noriko Yoshikawa và cs chứng minh cordycepin có hoạt tính kháng ung thư hiệu quả thông qua việc ức chế quá trình methyl hóa acidnucleic và polyadenin hóa [40]. Đồng dạng của cordycepin là 2',5'- oligoadenin có tác dụng kháng virus thông qua việc ức chế reverse transcriptase. Tác giả cũng chứng minh rằng tiền chất của cordycepin là adenosin cũng có hoạt tính kháng ung thư.

1.2.2. Acid cordyceptic

Acid cordyceptic, một isomer của acid quinic, được nghiên cứu đầu tiên ở *Cordyceps sinensis* năm 1957. Cấu trúc tinh thể của acid cordyceptic được xác định là D-mannitol. Mannitol là hợp chất sinh học chính có nhiều hoạt tính quan trọng như kháng gốc tự do, lợi tiểu, trị ho. Chất này tồn tại trong tự nhiên chủ yếu ở rễ, thân và lá cây; được tìm thấy nhiều trong nấm ăn, cà rốt và rêu. Hàm lượng acid cordyceptic trong *Cordyceps* khoảng 7-29%. Mannitol có cấu tạo gồm một alcohol và một đường, hoặc một polyol; tương tự như xylitol hay sorbitol. Tuy nhiên, mannitol có xu hướng loại bỏ ion hydrogen trong nước làm

dung dịch trở nên acid. Công thức hóa học của mannitol là $C_6H_{14}O_6$, trọng lượng phân tử 182, nhiệt độ nóng chảy $166^{\circ}C$, tỷ trọng 1,489 ($20^{\circ}C$) và nhiệt độ sôi $290-295^{\circ}C$ (467 kPa). Mannitol có nhiều đặc tính quan trọng đã được sử dụng trong y học và thực phẩm, hàm lượng mannitol có trong quả thể nấm *Cordyceps* vào khoảng 29-85 mg/g, sợi nấm có hàm lượng acid cordyceptic cao hơn so với trong quả thể [44].

1.2.3. Polysaccharid

Cordyceps chứa một lượng lớn polysaccharid, khoảng 3-8% khối lượng, đây là một trong những hợp chất sinh học chính. Từ năm 1977, nhiều nghiên cứu khoa học tại Trung Quốc và Nhật Bản đã chứng minh được những ích lợi từ polysaccharid trong việc kháng ung thư, kháng oxy hóa, kháng viêm cũng như tác động điều hòa miễn dịch.

Các hợp chất polysaccharid ở *Cordyceps* là một galactomannan nhiều nhánh. Các hợp chất này bao gồm D-mannose và D-galactose với tỷ lệ 3:5, thường chứa một tỷ lệ nhỏ protein. Nó là một cấu trúc phân nhánh gồm các liên kết (1-6) và (1-2) liên kết các gốc α -D-mannopyranosyl ở mạch chính, có các liên kết đa dạng giữa các monosaccharid kế cận tạo thành các cấu trúc xoắn và vòng nhỏ. Tuy nhiên, một mannoglucan với trọng lượng phân tử xấp xỉ 7700 g/mol được phân tách gần đây chỉ chứa các đơn vị mannose và galactose với tỷ lệ 1:9. Các phân tích cho thấy nó có một khung sườn α -D-glucan với các liên kết (1-4) và (1-3); và các mạch nhánh của α -D-(1-6)-mannopyranose (Manp) được gắn vào khung sườn qua vị trí O-6 của gốc α -(1-3)-glucopyranosyl (GlcP). Nghiên cứu này cũng cho thấy dược tính của polysaccharid là từ các đặc tính của nó như trọng lượng phân tử, ví dụ như các polyglucan có trọng lượng phân tử lớn hơn (10-1000 kDa) có xu hướng tan trong nước tốt hơn và vì thế có hoạt tính kháng khối u hiệu quả hơn. Tuy nhiên, hoạt tính kháng ung thư là do sự tăng cường miễn dịch cho cơ thể hơn là hiệu ứng gây chết tế bào trực tiếp [34].

1.2.4. Ergosterol

Ergosterol là tiền chất quan trọng cho vitamin D. Hàm lượng ergosterol ở *Cordyceps militaris* nuôi cấy rất cao, chỉ đứng sau *Cordyceps sinensis* tự nhiên phân lập ở Tây Tạng. Các ergosterol và các chất đồng dạng của nó có hoạt tính kháng virus, điều hoà tim mạch, điều trị bệnh thận do giảm immunoglobulin A [44].

1.2.5. Nucleotid

Nucleotid là chất có nhiều trong *Cordyceps*, có tác dụng kháng khối u, phóng thích các tín hiệu dẫn truyền thần kinh, chống co giật... Trong đó, hàm lượng guanosin thường cao nhất. Hàm lượng nucleotid trong *Cordyceps* nuôi cấy cao hơn hẳn *Cordyceps* tự nhiên, điều này có thể liên quan đến hoạt động biến dưỡng nhanh trong quá trình nuôi cấy. Hàm lượng các nucleotid trong tự nhiên thấp có thể do sự thoái biến các nucleotid trong quá trình ủ đông [42]. Khí hậu ẩm và ẩm ướt là điều kiện làm tăng nucleotid trong *Cordyceps*. Năm 2003, Sun và cs nghiên cứu thấy có ít nhất 8 loại nucleosid hoặc nitrogen base có trong *Cordyceps kyushuensis* [32]. Năm 2010, Xie Jian Wei và cs đã tách và xác định được các loại thymin, adenosin, adenin và cordycepin có trong *Cordyceps sinensis*, nghiên cứu cho thấy hàm lượng các nucleotid khác nhau tùy theo vị trí phân lập [38].

1.2.6. Protein và acid amin

Hàm lượng protein trong *Cordyceps* vào khoảng 29,1 – 33% bao gồm 18 acid amin: acid aspartic, threonin, serin, glutamat, prolin, glycin, valin, methionin, isoleucin, leucin, tyrosin, phenylalanin, lysin, histidin, cystin, cystein và tryptophan. Các acid amin có hàm lượng cao nhất là glutamat, arginin và acid aspartic và có dược tính cao nhất là arginin, glutamat, tryptophan và tyrosin. Năm 2011, Zheng và cs đã nghiên cứu họ protein trong *Cordyceps militaris* [43]. Kết quả cho thấy bộ gen *Cordyceps militaris* chứa 61 họ protease nhưng hầu hết là serin protease và metallopeptidase, 12 gen mã hóa trypsin, 167 gen mã hóa protein kinase, 105 gen mã hóa glycosid hydrolase. Hơn nữa, *Cordyceps*