

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

-----***-----

HOÀNG THỊ NHUNG

**NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC VÀ CÁC ĐẶC TÍNH SINH
HỌC CỦA MỘT SỐ NẤM ĐẢM TRONG SINH TỔNG
HỢP EPS, KHÁNG VI SINH VẬT, TẠO LACCASE
TỪ CÁC VÙNG SINH THÁI KHÁC NHAU**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội, 2015

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

-----***-----

HOÀNG THỊ NHUNG

**NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC VÀ CÁC ĐẶC TÍNH SINH
HỌC CỦA MỘT SỐ NẤM ĐẢM TRONG SINH TỔNG
HỢP EPS, KHÁNG VI SINH VẬT, TẠO LACCASE
TỪ CÁC VÙNG SINH THÁI KHÁC NHAU**

Chuyên ngành: Vi Sinh Vật

Mã số: 60420103

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

PGS. TS. Đặng Thị Cẩm Hà

Hà Nội, 2015

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc tới PGS. TS. Đặng Thị Cẩm Hà đã kiên trì chỉ bảo, quan tâm hướng dẫn và dìu dắt tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn, giúp tôi có thêm nhiều kiến thức và kinh nghiệm quý báu trong nghiên cứu khoa học.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến Ban Lãnh đạo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Ban giám hiệu Trường Đại học Thái Nguyên, cùng các Thầy cô giáo đã tham gia giảng dạy trong suốt khóa học.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới TS. Đinh Thị Thu Hằng cùng tập thể cán bộ của phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường và các nghiên cứu sinh đã tận tình giúp đỡ tôi lấy mẫu và trong suốt quá trình thực hiện luận văn.

Tôi cũng xin cảm ơn đến PGS. TS Thành Thị Thu Thủy đã giúp đỡ tôi bổ trợ thêm những kiến thức mới. Cảm ơn GS. Bram Brouwer và công ty BioDetection Systems B.V- BDS, Hà Lan đã thực hiện các phân tích sử dụng công nghệ DR-CALUX để có kết quả mới trong luận văn này.

Cuối cùng, tôi xin dành lời cảm ơn tới chồng và con trai - là chỗ dựa tinh thần và những người thân trong gia đình là chỗ dựa vững chắc, động viên, giúp đỡ trong suốt thời gian qua.

Một lần nữa, xin chân thành cảm ơn tất cả những sự giúp đỡ quý báu đó !

Hà Nội, tháng 12 năm 2015

Học viên cao học

Hoàng Thị Nhung

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi.

Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận văn

Hoàng Thị Nhung

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN.....	i
LỜI CAM ĐOAN	ii
MỤC LỤC	iii
BẢNG CHỮ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG	viii
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	ix
MỞ ĐẦU	1
PHẦN 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Tổng quan về nấm ăn và nấm dược liệu (MMS).....	3
1.2. Lịch sử nghiên cứu và sử dụng nấm.....	5
1.2.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	5
1.2.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam	7
1.3. Polysaccharide từ nấm- nguồn carbohydrate có hoạt tính sinh học tự nhiên....	8
1.4. Tách chiết và xác định các đặc tính của polysaccharide từ nấm.....	9
1.5. Đặc điểm cấu trúc của polysaccharide phân lập từ nấm	11
1.6. Phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) trong nghiên cứu cấu trúc của polysaccharide	12
1.7. Tính chất vật lý của polysaccharide	15
1.7.1. Khối lượng phân tử của polysaccharide	15
1.7.2. Độ hòa tan của polysaccharide từ nấm	15
1.8. Vai trò của polysaccharide từ nấm đối với sức khỏe	16
1.8.1. Tính kháng u, điều trị ung thư và miễn dịch của polysaccharide	16
1.8.2. Hạ lipid máu và hạn chế đường huyết	20
1.8.3. Tính chống oxy hóa của polysaccharide từ nấm.....	21
1.8.4. Prebiotic từ nấm	22
1.8.5. Tính kháng virus của polysaccharide từ nấm	23
1.8.6. Hoạt tính kháng khuẩn của polysaccharide từ nấm	24
1.9. Laccase và ảnh hưởng của nó đến sức khỏe con người	26

1.9.1. Tổng quan về laccase	26
1.9.2. Ứng dụng của laccase trong lĩnh vực bảo vệ sức khỏe.....	27
1.10. Phương pháp phân tích sàng lọc DR-Calux.....	28
PHẦN 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	35
2.1. Vật liệu	35
2.1.1. Vi sinh vật	35
2.1.2. Hóa chất và thiết bị	35
2.2. Phương pháp nghiên cứu	36
2.2.1. Phương pháp phân lập các chủng nấm.....	36
2.2.2. Phương pháp phân loại nấm dựa vào trình tự xác định trình tự ITS	36
2.2.3. Chuẩn bị giống	37
2.2.4. Phương pháp xác định sinh khối và hàm lượng exopolysaccharide	37
2.2.5. Phương pháp xác định hoạt tính enzyme laccase.....	37
2.2.6. Đánh giá ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp polysaccharide và enzyme laccase	38
2.2.6.1. Đánh giá ảnh hưởng của pH	38
2.2.6.2. Đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy	38
2.2.6.3. Đánh giá ảnh hưởng của nguồn nitơ.....	39
2.2.6.4. Đánh giá ảnh hưởng của nguồn carbon	39
2.2.7. Xác định hàm lượng protein, carbohydrate tổng số của EPS thô	39
2.2.8. Đánh giá khả năng kháng vi sinh vật kiểm định	40
2.2.9. Xác định thành phần của polysaccharide	41
2.2.10. Xác định hoạt tính của EPS và sinh khối nấm lên một số chức năng của tế bào	41
PHẦN 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	44
3.1. Phân lập và phân loại các chủng nấm nghiên cứu	44
3.2. Khả năng sinh trưởng, sinh tổng hợp EPS và hoạt tính laccase của các chủng nấm.....	48
3.3. Khả năng kháng vi sinh vật kiểm định của dịch nuôi cấy một số chủng nấm...54	54

3.4. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sự tạo sinh khối, sinh tổng hợp EPS và laccase của 2 chủng nấm <i>Earliella</i> sp. FPT31 và <i>Ganoderma</i> sp. FMD12..	56
3.4.1. Ảnh hưởng của pH môi trường	56
3.4.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy	59
3.4.3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ.....	61
3.4.4. Ảnh hưởng của nguồn carbon	63
3.4.5. Ảnh hưởng của nồng độ glucose.....	65
3.4.6. Khả năng sinh trưởng, sinh tổng hợp EPS và laccase của FPT31 khi kết hợp các yếu tố môi trường	67
3.5. Hàm lượng carbohydrate và protein của EPS thô thu được từ FPT31 và FMD12.....	70
.....	
3.6. Thành phần và cấu trúc EPS của FMD12 và FPT31	72
3.7. Hoạt tính <i>in vitro</i> của EPS từ 2 chủng nấm FMD12 và FPT31.....	75
PHẦN 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	77
4.1. Kết luận.....	77
4.2. Kiến nghị	78
TÀI LIỆU THAM KHẢO	79

BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
AR	Androgen Receptor
CALUX	Chemical Activated Luciferase Gene Expression
COSY	Corelated Spectrscopy
CVD	Cardiovascular Disease
D ₂ O	Deuterium oxide
dce	Dried crude exopolysaccharide
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNS	3,5-dinitrosalicylic acid
đtg	Đồng tác giả
EPS	Exopolysaccharide
ER	Estrogen Receptor
FCS	Fetal calf serum
GC	Gas Chromatography
GR	Glucocorticoid Receptor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High- Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Concentration Inhibiting 50% Of Groth
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPS	Intracelular Polysaccharide
ITS	Internal transcribed spacer
IZD	Internal Zone Diameter

NEAA	Non-Essential Amino Acid
MAE	Microwave- Assisted Extraction
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MMs	Medicinal Mushrooms
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
MRSE	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis</i>
MS	Mass Spectrometry
MW	Molecular Weight
NK	Natural killer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Nrf2	Nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDA	Potato Dextro Aga
PDB	Potato Dextro Broth
PGM	Potato Glucose Malt
PLE	Pressurized Liquid Extraction
PR	Progesterone Receptor
PSK	Polysaccharit–K
PSP	Polysaccharopeptide
ROESY	Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
SEC	Size-Exclusion Chromatography
SFE	Supercritical Fluid Extraction
TNF	Tumor Necrosis Factor
TSB	Tryptone Soya Broth
UAE	Ultrasonic- Assited Extraction
VREF	Vancomycinresistant <i>Enterococcus faecium</i>

DANH MỤC CÁC BẢNG

	Trang	
Bảng 1.1	Một số phương pháp tách chiết polysaccharide từ nấm	10
Bảng 1.2	Độ chuyển dịch hoá học δ (ppm) từ cơ sở dữ liệu SUGABASE của dạng glucose và galactose	14
Bảng 1.3	Một số polysaccharide có hoạt tính kháng ung thư từ các nấm điển hình	19
Bảng 1.4	Một số DR- Calux thông dụng	30
Bảng 2.1	Thành phần thí nghiệm đánh giá khả năng ức chế sự sinh trưởng của vi sinh vật	36
Bảng 2.2	Sơ đồ hút mẫu cho phân tích sàng lọc CALUX	38
Bảng 3.1	Độ tương đồng giữa các nấm thuộc <i>Ganoderma</i> từ các vùng	40
Bảng 3.2	Hình thái các chủng nấm và khả năng sinh trưởng, sinh tổng hợp polysaccharide và enzyme laccase của chúng	44
Bảng 3.3	Khả năng ức chế sự sinh trưởng 2 chủng vi khuẩn <i>B. cereus</i> và <i>M. luteus</i> của dịch nuôi cấy chủng FMD12	50
Bảng 3.4	Sự sinh trưởng và khả năng tổng hợp EPS theo thời gian của FPT31 và FMD12	55
Bảng 3.5	Khả năng sinh trưởng, sinh tổng hợp EPS và laccase của FPT31 trên môi trường chứa đường và cao nấm men ở nồng độ khác nhau	62
Bảng 3.6	Điều kiện nuôi cấy của 2 chủng nấm FPT31 và FMD12 với một số nghiên cứu quốc tế	64
Bảng 3.7	Hàm lượng đường và protein trong EPS thô của FPT31 và FMD12	66
Bảng 3.8	Kết quả sàng lọc hoạt tính in vitro của EPS từ 2 chủng nấm FPT31 và FMD12 bằng Calux	71