

## NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN NHÂN SINH KHỐI NẤM THƯỢNG HOÀNG VÀNG (*Phellinus baumii*)

Trần Thị Lua<sup>1</sup>, Vũ Văn Hạnh<sup>2</sup>

### TÓM TẮT

Nhân nuôi sợi nấm trong môi trường lỏng cho năng suất cao, tốn ít thời gian và không gian hơn khi nuôi cấy sợi nấm trên môi trường rắn. Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu và lựa chọn thành phần môi trường nuôi cấy để thu sinh khối sợi nấm có hiệu quả nhất. Môi trường PGB cải tiến (thành phần (g/l): Khoai tây 200; Glucose 20; Yeast extract 10;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5). Các điều kiện nuôi cấy được xác định như sau: nhiệt độ 28 °C; pH ban đầu 6,0; và tốc độ lắc 150 rpm. Với thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy này, sinh khối tế bào tối đa đạt được là 17,9 g /l.

**Từ khóa:** Nấm thượng hoàng vàng, *Phellinus baumii*, sinh khối sợi nấm

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm thượng hoàng vàng (*Phellinus*) họ Hymenochaetaceae, thuộc chi *Phellinus* gồm có một số loài *P. linteus*, *P. ribis*, *P. igniarius* và *P. Baumii*. Trên thế giới hiện chỉ có 4 nước trồng thành công loài nấm này là Hàn Quốc, Trung Quốc, Nhật Bản và Thái Lan. Chúng được sử dụng nhiều trong hỗ trợ điều trị các bệnh ung thư, đái tháo đường, bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn, virus, bệnh tim, tiểu đường, cao huyết áp cũng như các bệnh viêm loét (Lee, 2007). Dịch chiết từ nấm có tác dụng an thần, giảm hưng phấn của thần kinh trung ương, chữa trị chứng bí tiểu, bổ thận khí, chữa trị đau nhức khớp xương, gân cốt, loét dạ dày, rối loạn tiêu hoá kéo dài (Kim, 2010).

Ở Việt Nam, nghiên cứu về nấm thượng hoàng chưa nhiều, nghiên cứu của Phạm Quang Thu (2016) xác định môi trường nuôi cấy thích hợp cho nấm *P. linteus* thu được từ tự nhiên là PDA, nhiệt độ thích hợp là 25°C và độ ẩm là 95%. Nấm thượng hoàng là nấm dược liệu quý, trong tự nhiên không đủ để khai thác. Với mục tiêu phát triển và nhân giống nấm thượng hoàng thương mại hiện nay, nhằm nhân nhanh số lượng nấm đáp ứng nhu cầu của thực tế. Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố dinh dưỡng, pH, nhiệt độ... đến khả năng nhân sinh khối của nấm thượng hoàng.

### II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng nấm thượng hoàng (*P. baumii*) được phòng Các chất chức năng sinh học - Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp, ký hiệu là Pb.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Giống nấm được bảo quản trên môi trường PGA (200 g khoai tây + 20 g glucose + 12 g thạch + 1000 ml nước cất) ở 4°C. Trước các thí nghiệm, giống nấm cần được làm mới bằng cách cấy giống nấm trên đĩa petri chứa 15 - 20 ml môi trường PGA, đậy nắp kín đĩa để dùng trong các nghiên cứu.

- Chuẩn bị môi trường PGB: Khoai tây gọt vỏ, rửa sạch, thái nhỏ, đun sôi 20 phút, lọc lấy nước trong, lên thể tích 1000 ml rồi bổ sung 20 g glucose. Môi trường được rót 100 ml vào bình tam giác 250 ml, hấp khử trùng ở 121°C trong thời gian 15 phút. Sau khi khử trùng, đậy môi trường nguội rồi cấy giống nấm thượng hoàng, mỗi bình cấy một miếng thạch có chứa sợi nấm đã chuẩn bị trong các đĩa petri. Các thí nghiệm được thực hiện từ tháng 4 - 10 năm 2016 tại phòng các hoạt chất chức năng, Viện Công nghệ sinh học.

- Nấm thượng hoàng được nuôi cấy lắc trong bình tam giác dung tích 250 ml chứa 100 ml môi trường PGB cải tiến, lần lượt thay thế glucose bằng sucrose, maltose, lactose với lượng 2%, pH 6,5, thời gian nuôi cấy 15 ngày, đánh giá sinh khối sợi nấm đối với các nguồn cacbon khác nhau.

- Bổ sung vào môi trường PGB các nguồn nitơ lần lượt là pepton, cao nấm men, cao man với nồng độ 1% và  $NaNO_3$ ,  $NH_4Cl$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $NH_4NO_3$ ,  $KNO_3$  với nồng độ 0,05%. Đánh giá sinh khối sợi nấm đối với các nguồn nitơ khác nhau sau 15 ngày nuôi cấy.

- Bổ sung vào môi trường PGB các loại muối khoáng là  $KH_2PO_4$ ,  $FeSO_4$  với nồng độ 0,1% và  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KCl$ ,  $CaCl_2$  nồng độ 0,05%. Đánh giá sinh khối của sợi nấm sau 15 ngày nuôi cấy.

- Nấm thượng hoàng được nuôi cấy trên môi trường có pH là 5; 6; 6,5; 7, sử dụng NaOH hoặc  $H_2SO_4$  1 N để chỉnh pH môi trường. Đánh giá sinh

<sup>1</sup> Viện Thổ nhưỡng Nông hóa, Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội - Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam

<sup>2</sup> Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ CN Việt Nam

khối của sợi nấm ở các pH khác nhau sau 15 ngày nuôi cấy.

- Nấm thượng hoàng được nuôi cấy trong môi trường dịch thể trên máy lắc tốc độ lần lượt là 100, 130, 150, 180, 200 vòng/phút trong thời gian 15 ngày. Đánh giá sinh khối của sợi nấm với các chế độ lắc khác nhau.

- Nấm thượng hoàng được nuôi cấy ở 28°C trong tất cả các thí nghiệm nhân sinh khối.

- Xác định sinh khối sợi nấm khô: Thu 100 ml dịch nuôi cấy nấm, ly tâm 4.000 vòng/phút trong thời gian 30 phút, loại bỏ nước. Sinh khối sợi nấm được sấy ở 50°C tới khối lượng không đổi.

- Xử lý số liệu: Các số liệu được xử lý thống kê sinh học trên máy tính theo chương trình Excel.

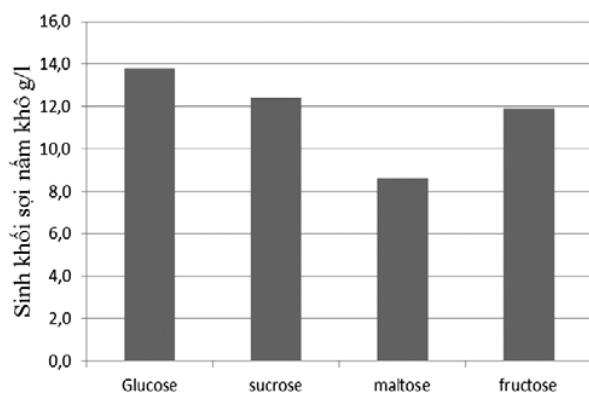
### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm được thực hiện tại Bộ môn Các chất chức năng sinh học, Viện Công nghệ sinh học và Bộ môn Vi sinh, Viện Thổ nhưỡng Nông hóa.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng carbon đến sinh trưởng sợi nấm trong môi trường dịch thể

Ảnh hưởng của 4 nguồn carbon khác nhau là glucose, sucrose, fructose, maltose đến sinh trưởng của sợi nấm trong môi trường dịch thể cho thấy, đường glucose cho sinh khối cao nhất, đạt 13,5 g/l, tiếp đến là đường sucrose 12,4 g/l và thấp nhất là đường mantose đạt 8,6 g/l. Kết quả được thể hiện trong hình 1.

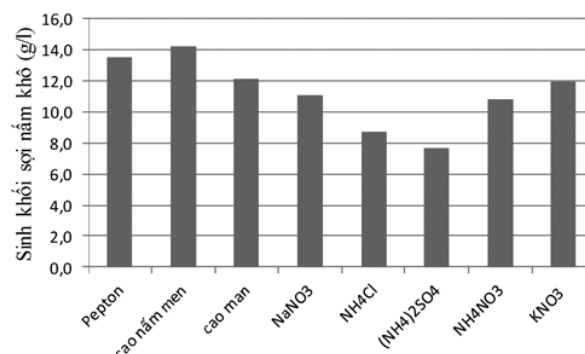


Hình 1. Ảnh hưởng của các nguồn carbon đến sinh khối sợi nấm thượng hoàng

### 3.2. Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng nitơ đến sinh trưởng sợi nấm trong môi trường dịch thể

Ảnh hưởng của 8 nguồn nitơ đến sinh trưởng của sợi nấm trong môi trường dịch thể cho thấy, sinh khối sợi nấm đạt cao nhất khi sử dụng cao nấm

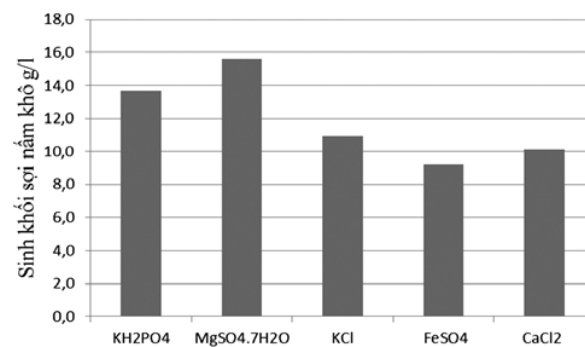
men. Trong môi trường nuôi cấy có nguồn nitơ hữu cơ thì sinh khối sợi nấm tăng cao hơn khi sử dụng môi trường nuôi cấy có nguồn nitơ vô cơ. Sinh khối sợi nấm đạt cao nhất 14,2 g/l. Nhiều nghiên cứu về nhân sinh khối lỏng nấm *Phellinus*. sp này (Hur H. 2008) cũng cho thấy nguồn đạm hữu cơ có tác dụng tăng sinh khối sợi nấm nhanh hơn so với nguồn đạm vô cơ (Hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ đến sinh khối sợi nấm thượng hoàng

### 3.3. Ảnh hưởng của các loại muối khoáng đến sinh trưởng của sợi nấm trong môi trường dịch thể

Khi bổ sung một số muối khoáng vào môi trường nuôi cấy nấm thượng hoàng cho thấy sinh khối của nấm đạt cao nhất trong môi trường có muối MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, đạt 15,6 g/l, tiếp đến là muối KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> và sinh khối sợi nấm thấp nhất khi nuôi cấy trên môi trường có muối FeSO<sub>4</sub> đạt 9,2 g/l (Woo-Sik Jo, 2006) (Hình 3).



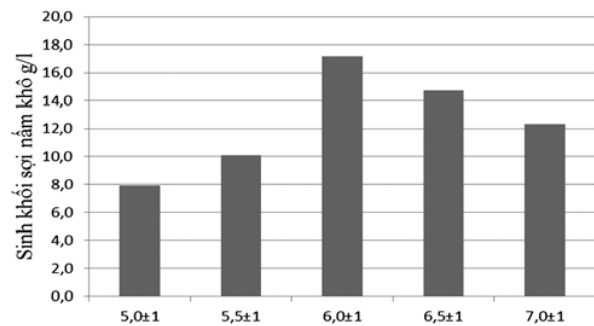
Hình 3. Ảnh hưởng của các muối khoáng đến sinh khối sợi nấm thượng hoàng

Từ các kết quả nghiên cứu trên, môi trường PGB được bổ sung thêm 1% cao nấm men, 0,05% MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (môi trường PGB cải tiến) dùng cho nghiên cứu tiếp theo.

### 3.4. Ảnh hưởng của pH môi trường dịch thể đến sinh trưởng của sợi nấm

Khi nuôi cấy nấm thượng hoàng trên môi trường

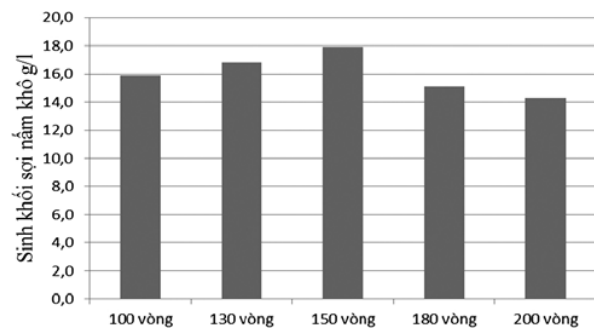
PGB cải tiến trong 15 ngày ở 5 mức pH khác nhau, sinh khối sợi nấm khô đạt 17,6 g/l cao nhất ở pH bằng  $6,0 \pm 1$  và thấp nhất là 7,9 g/l ở pH bằng  $5,0 \pm 1$  (Hình 4).



Hình 4. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến sinh khối sợi nấm.

### 3.5. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng sợi nấm trong môi trường dịch thể

Khi nuôi cấy nấm thượng hoàng trên môi trường PGB cải tiến với 6 tốc độ lắc khác nhau cho thấy, tốc độ lắc có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh khối sợi nấm. Sinh khối sợi nấm tăng dần, ở tốc độ lắc 100 vòng/phút sinh khối sợi nấm khô đạt 15,9 g/l và cao nhất ở tốc độ lắc 150 vòng/phút sinh khối sợi nấm khô đạt 17,9 g/l. Ở tốc độ lắc 200 vòng/phút sinh khối sợi nấm khô giảm chỉ còn 14,3 g/l (Hình 5).



Hình 5. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh khối nấm thượng hoàng

## IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Môi trường PGB cải tiến (thành phần (g/l): Khoai tây 200; Glucose 20; cao nấm men 10;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5); nhiệt độ, 28 °C; pH ban đầu,  $6,0 \pm 1$ ; tốc độ lắc 150 vòng/phút, sinh khối tế bào tối đa đạt được là 17,9 g/l.

### 4.2. Kiến nghị

Tiếp tục nghiên cứu điều kiện tối ưu đa biến để tìm ra thời gian nhân sinh khối tốt nhất cho nấm thượng hoàng và đánh giá khả năng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy nấm thượng hoàng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Phạm Quang Thu, 2016. Đặc điểm sinh học của nấm thượng hoàng (*Phellinus linteus*) trong nuôi cấy thuần khiết. *Tạp chí Khoa học lâm nghiệp* 1/2016, 4231 - 4237.
- Chihara G, Hanuram J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka F., 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk) Sing (an edible mushroom) *Cancer Res.* 1970b; 30: 2776-2781.
- Hyun Hur, 2008. Cultural characteristics and log-mediated cultivation of the medicinal mushroom *Phellinus linteus*. *Mycobiology* 2008;36: 81-87.
- Kim HM, Kang JS, Kim JY, Park SK, Kim HS, Lee YJ, Yun J, Hong JT, Kim Y, Han SB, 2010. Evaluation of antidiabetic activity of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* in non-obese diabetic mouse. *Int Immunopharmacol* 2010, 10: 72-78.
- Lee IK YB., 2007. Highly oxygenated and unsaturated metabolites providing a diversity of hispidin class antioxidants in the medicinal mushrooms *Inonotus* and *Phellinus*. *Bioorg Med Chem* 2007, 15: 3309-3314.
- Woo-Sik Jo, Young-Hyun Rew, Sung-Guk Choi, Geon-Sik Seo, Jae-Mo Sung, and Jae-Youl Uhm, 2006. The Culture Conditions for the Mycelial Growth of *Phellinus* spp. *Mycobiology* 2008, 34(4): 200-205.

## Submerged culture conditions for the production of *Phellinus baumi* mycelial biomass

Tran Thi Lua, Vu Van Hanh

### Abstract

Submerged cultures have the potential for a higher mycelial production in a shorter period of time within a reduced space in comparison with cultivation in solid artificial media. The research and selection showed the most effective medium composition for production of *Phellinus baumi* as follows: Glucose, 20 g/l; yeast extract, 10 g/l;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5 g/l. The culture conditions were determined to be as follows: temperature at 28°C; initial pH 6.0; and agitation of 150 rpm. The maximum mycelial biomass achieved was 17.9 g/l under above composition and conditions.

**Key words:** Sang Hwang, *Phellinus baumii*, mycelial biomass

Ngày nhận bài: 15/5/2017

Ngày phản biện: 28/5/2017

Người phản biện: TS. Nguyễn Duy Trinh

Ngày duyệt đăng: 25/6/2017

# THU NHẬN N-ACETYL-GLUCOSAMINE TỪ CHITIN SỬ DỤNG ENZYME ENDOCHITINASE VÀ $\beta$ -HEXOSAMINIDASE TÁI TỔ HỢP

Nguyễn Hoàng Anh<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Giang<sup>2</sup>, Lê Thanh Hà<sup>3</sup>

## TÓM TẮT

Chủng *E.coli* tái tổ hợp chứa gene mã hóa cho endochitinase từ *Bacillus licheniformis* DSM13 và chủng *E.coli* tái tổ hợp chứa gene mã hóa cho  $\beta$ -hexosaminidase từ *Lactococcus lactis ssp. lactis* IL1403 được sử dụng để nuôi cấy, thu nhận và tinh sạch enzyme tái tổ hợp. Endochitinase và  $\beta$ -hexosaminidase tái tổ hợp được xác định đặc tính bằng cách sử dụng cơ chất tương ứng là chitin huyền phù 2% và pNp-GlcNAc 10 mM. Kết quả chỉ ra rằng: Endochitinase rất bền nhiệt, với chu kỳ bán hủy ( $t_{50}$ ) ở 37 và 50°C là 15 và 7 ngày ủ tương ứng,  $\beta$ -hexosaminidase có chu kỳ bán hủy ở 30°C và 37°C là 35 và 17 giờ. Thêm vào đó, endochitinase và  $\beta$ -hexosaminidase đều bền ở pH 6. Sản phẩm chính thủy phân chitin huyền phù 2% sử dụng endochitinase ở 50°C và  $\beta$ -hexosaminidase ở 30°C tại pH6 là GlcNAc.

**Từ khóa:** Chitin, chitinase,  $\beta$ -hexosaminidase, *E.coli*, N-acetyl-Glucosamine

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine (GlcNAc) được biết đến là một hoạt chất sinh học quý, có tác dụng chữa các loại bệnh về khớp, viêm ruột và đã được ứng dụng để sản xuất thực phẩm chức năng, mỹ phẩm (Lord, 1985). GlcNAc có thể được tổng hợp từ chitin, một polysaccharide cấu tạo từ nhiều đơn phân GlcNAc liên kết với nhau bằng liên kết  $\beta$  (1-4) glycoside. Chitin rất dồi dào trong tự nhiên, chỉ đứng sau cellulose, dễ dàng tìm thấy trong vỏ của các loài giáp xác như tôm, cua... Hàng năm, ngành công nghiệp chế biến thủy sản xuất khẩu của Việt Nam sản sinh ra khoảng 70.000 tấn phế phụ phẩm từ chế biến thủy sản xuất khẩu (Đào Tố Quyên và *ctv.*, 2006). Vì vậy, việc nghiên cứu, sản xuất GlcNAc từ nguồn cơ chất chitin này sẽ góp phần làm tăng giá trị kinh tế ngành chế biến thủy sản và làm giảm ô nhiễm môi trường của Việt Nam.

Ngày nay, GlcNAc có thể được sản xuất từ chitin bằng phương pháp hóa học hoặc sinh học sử dụng phức hệ enzyme endochitinase và  $\beta$ -hexosaminidase. Trong đó, phương pháp sử dụng enzyme đang được quan tâm nghiên cứu nhiều hơn do phương pháp này cho hiệu suất thu hồi và sản phẩm có độ tinh khiết cao, không gây ăn mòn thiết bị, thân thiện với môi trường (Haupt *et al.*, 1999). Việc nghiên cứu tạo các chủng vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất, ứng dụng enzyme đang rất được quan tâm, bởi chúng hạn chế các nhược điểm của các chủng tự nhiên đang gặp phải như mức độ biểu hiện protein (enzyme) thấp, hoạt độ của enzyme không cao. Mục đích của nghiên cứu này là xác định khả năng thu nhận GlcNAc từ chitin sử dụng kết hợp enzyme endochitinase và  $\beta$ -hexosaminidase tái tổ hợp mà ở Việt Nam chưa có một nghiên cứu tương tự nào.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng *E.coli* tái tổ hợp mang gene mã hóa cho enzyme endochitinase từ *Bacillus licheniformis* DSM13 và *E.coli* tái tổ hợp mang gene mã hóa cho  $\beta$ -hexosaminidase từ *Lactococcus lactis ssp. lactis* IL1403 được sử dụng để nuôi cấy, thu nhận enzyme tái tổ hợp.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Nuôi cấy thu sinh khối tế bào

Nuôi cấy thu sinh khối tế bào được tiến hành theo phương pháp của Nguyen và cộng tác viên (2011). 1% dịch vi khuẩn đã hoạt hóa được đưa vào các bình tam giác có thể tích 1000 mL có chứa 250 mL LB (Ampicillin 100  $\mu$ g/mL), vi khuẩn được nuôi ở 37°C, lắc 150 vòng/phút. Khi giá trị OD đạt khoảng 0,4 - 0,5, bổ sung chất cảm ứng IPTG vào môi trường nuôi cấy với nồng độ cuối cùng là 0,4 mM. Tiếp theo, vi khuẩn tiếp tục được nuôi cấy 16 giờ, lắc 150 vòng/phút ở 18°C đối với chủng sinh endochitinase và 25°C đối với chủng sinh  $\beta$ -hexosaminidase. Sau đó, sinh khối tế bào được thu bằng cách ly tâm dịch nuôi với tốc độ 6.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút, được rửa 2 lần bằng đệm 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6 và được bảo quản ở -20°C cho các lần sử dụng tiếp theo.

#### 2.2.2. Phương pháp điện di protein SDS-PAGE và xác định trọng lượng phân tử

Phương pháp điện di protein SDS-PAGE để xác định, mức độ biểu hiện gene, độ sạch của chế phẩm và trọng lượng phân tử của enzyme được tiến hành theo phương pháp của Laemmli và cộng tác viên (1970).

<sup>1</sup> Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup> Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>3</sup> Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách Khoa Hà Nội