

BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ NUÔI TRỒNG THÀNH CÔNG NẤM PHÁT QUANG *OMPHALOTUS SP* NHẪM CUNG CẤP NGUYÊN LIỆU CHO NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH MỘT SỐ HOẠT CHẤT KHÁNG UNG THƯ HỮU HIỆU

Đào Thị Vân⁽¹⁾, Nguyễn Hoàng Vũ⁽¹⁾, Lê Duy Thắng⁽¹⁾, Daniel Maguire⁽²⁾, Anthony Rayner⁽²⁾

(1) Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG -HCM

(2) Đại học Queensland, Australia

TÓM TẮT: Bước đầu khảo sát đặc điểm sinh lý biến dưỡng, định danh và nuôi trồng thành công chủng nấm phát quang mới *Omphalotus sp* – một loài nấm dược liệu quý – phân lập từ rừng cao su miền Đông nam bộ, Việt Nam.

1. MỞ ĐẦU

Trên thế giới, vấn đề tìm kiếm các loại dược liệu cho điều trị ung thư đang ngày một phổ biến. Ngoài các dược liệu chiết tách từ thực vật và lên men từ vi sinh vật, các nhà khoa học ngày càng quan tâm đặc biệt đến nấm lớn vì giống như chúng ta nấm lớn là loài nhân thật và sự trao đổi chất của chúng ta liên quan nhiều đến trao đổi chất của chúng hơn là ở vi khuẩn nhân giả[2]. Các kết quả nghiên cứu gần đây của các nhà khoa học trên thế giới cho thấy nấm phát quang đang được chú ý đến không chỉ riêng đặc tính phát quang mà còn liên quan đến y học, đặc biệt trong lĩnh vực ung thư. Những sản phẩm trao đổi chất của chúng có hoạt tính sinh học cao trong tính kháng nấm, kháng khuẩn, và kháng vi rút, đặc biệt chúng gây ức chế khả năng phân bào của tế bào ung thư [2]. Những hợp chất trao đổi chất của nấm phát quang vẫn đang tiếp tục được quan tâm trong toàn thể hóa học nấm bởi vì nhóm nhân thật này là những nguồn nguyên liệu lớn nhất thế giới chưa được khai thác về sự đa dạng sinh học cũng như đa dạng hóa học của chúng [2,3]. Chúng tôi lần đầu tiên khảo sát đặc điểm sinh biến dưỡng và hoàn thiện qui trình nuôi trồng loài nấm phát quang mới *Omphalotus sp* thu thập được từ vùng rừng cao su miền Đông nam bộ, Việt Nam nhằm cung cấp những thông số và đặc điểm sinh lý biến dưỡng của loài nấm mới này cho nuôi trồng ở qui mô công nghiệp góp phần cung cấp cho y học một sản phẩm dược liệu có nguồn gốc tự nhiên, đáp ứng cho nhu cầu điều trị các căn bệnh về ung thư và cho những nghiên cứu tiếp theo với ứng dụng trong phân loại học, hóa học và sinh thái học.

2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu: Chủng nấm phát sáng dưới các gốc cây mục; Thu thập các tai nấm non làm nghiên liệu nghiên cứu; Giải phẫu hình thái để định danh; Phân lập và để có giống gốc cho các thí nghiệm.

Phương pháp phân loại định danh: Dựa trên các đặc điểm mũ, phiến, và bào tử nấm, nhờ: hình dáng, kích thước, màu sắc, cấu tạo... để định danh. Tai nấm được thu nhận, quan sát hình thái bên ngoài; Quan sát hình thái cắt dọc để xem cách gắn mũ nấm và phiến vào thân, cấu trúc của thân; Quan sát hình thái giải phẫu phiến (phiến cắt ngang) dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 100 lần(X10) và 400 lần (X40); Quan sát hình dạng, kích thước bào tử bằng kính hiển vi ở độ phóng đại 400 (X40). Khảo sát khả năng phát sáng của tơ nấm. Dựa vào chìa khóa phân loại của Jean Marie Polese (2000) [1] để định danh.

Môi trường sử dụng: Khảo sát tơ nấm trên 5 loại môi trường dinh dưỡng khác nhau (Khoai tây – glucose, Khoai tây – dextrose, Hamada, Pepton, Yeast-malt, Malt) so sánh tốc độ lan tơ khác nhau và sinh khối tích lũy. Khảo sát khả năng sử dụng đạm và khoáng: Nấm sử dụng cả hai nguồn đạm: hữu cơ (pepton, bắp, đậu nành) và vô cơ (NaNO₃, KNO₃, (NH₄)₂SO₄, urea);

khoáng _ sử dụng nguồn khoáng: K (KCl, K₂CO₃), P(P₂O₅) và Mg (MgSO₄) so sánh sinh khối tích lũy để xác định loại đạm khoáng và nồng độ thích hợp mà nấm hấp thu để phát triển tốt nhất.

Khảo sát khả năng phân hủy tinh bột, cellulose, casein, lignin của tơ nấm (phương pháp định tính): Cắt một mẫu thạch nhỏ có tơ nấm, cấy lên môi trường có nguồn carbon khác nhau là tinh bột, cellulose, lignin. Theo dõi sự lan tơ theo thời gian để đánh giá khả năng phân hủy các nguồn carbon này. Làm tương tự trên môi trường có nguồn protein là casein để đánh giá khả năng phân hủy protein.

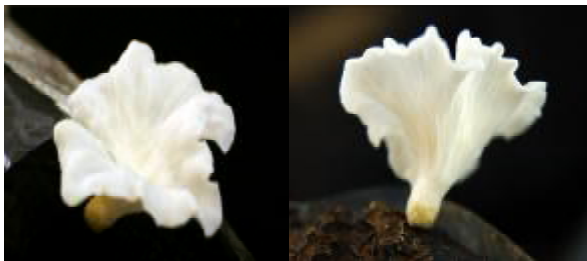
Khảo sát đặc điểm sinh lý phát triển của tơ nấm: Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, ánh sáng, độ ẩm lên sự phát triển của nấm.

Đo độ phát sáng của tơ nấm theo thời gian tiếp xúc với Oxy không khí : Cắt miếng thạch có tơ nấm cho vào dụng cụ đo là máy Luminestor.

Khảo sát đặc điểm sinh lý và điều kiện thúc đẩy sự tạo quả thể nấm : Đo độ chiếu sáng, độ ẩm, nhiệt độ thích hợp cho sự hình thành quả thể nấm.

3.KẾT QUẢ – THẢO LUẬN

3.1.Phân loại _Định danh



Hình 1. Tai nấm trưởng thành sau 4 ngày



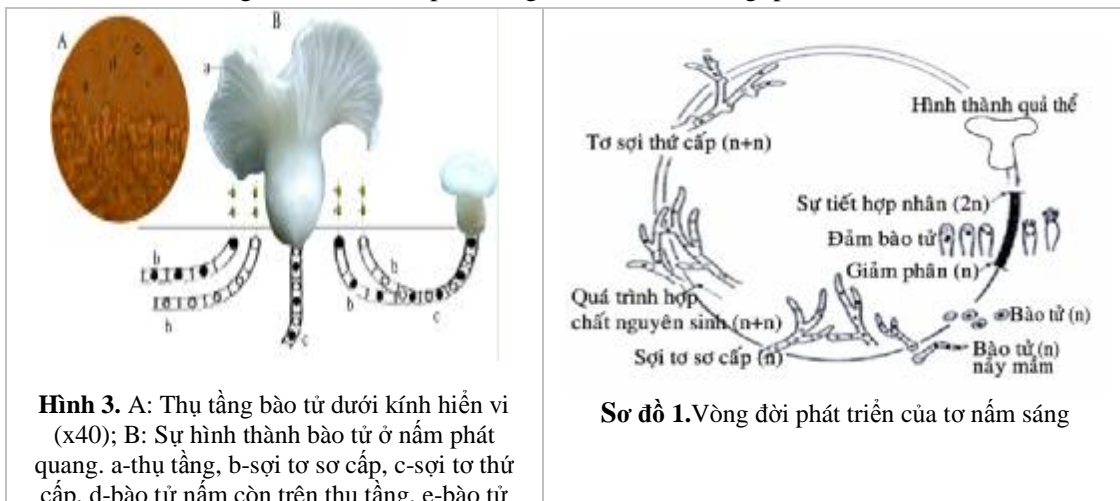
Hình 2. Giải phẫu cắt dọc tai nấm

Mũ gắn vào thân dạng hình chữ Y, đỉnh lõm.

Cuống tròn, ngắn, không có vòng cổ, dài trung bình 5-9cm.

Phiến to và kéo dài xuống đến cuống, bề ngang rộng 0,20- 0,25cm. Mỗi cm có 40- 50 phiến.

Bào tử hình trứng, màu trắng, đường kính trung bình 1,8- 2 x 1,2- 1,3 μm, bào tử không bắt màu với iode. Trong túi nấm có thể phát sáng ở cả tơ, mũ, cuống, phiến và bào tử.



Hình 3. A: Thụ tầng bào tử dưới kính hiển vi (x40); B: Sự hình thành bào tử ở nấm phát quang. a-thụ tầng, b-sợi tơ sơ cấp, c-sợi tơ thứ cấp, d-bào tử nấm còn trên thụ tầng, e-bào tử

Sơ đồ 1. Vòng đời phát triển của tơ nấm sáng

nấm đã được phóng thích	
-------------------------	--

Với các đặc điểm về hình dạng và cấu tạo như trên, dựa theo khóa phân loại của Jean Marie Polese (2000)[1], nấm thu được là loài *Omphalotus* sp, thuộc họ Paxillaceae, bộ Boletales, lớp Basidiomycetes, ngành Basidiomycotina. Đây là loài nấm phát quang chưa từng được đề cập trong các tài liệu phân loại nấm ở Việt Nam.

3.2.Đặc điểm sinh lý – biến dưỡng của nấm phát quang *Omphalotus* *af. illudent*

Bảng 1. Khả năng phát triển tơ nấm trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau

Môi trường	Tốc độ lan tơ	Sinh khối tích lũy
Potato	++	++
Potato-dextrose	++	++
Hamada	+	+
Pepton	++++	+++
Yeast-malt	+++++	++++
Malt	+++	+++++

So sánh chất lượng tơ nấm khi nuôi cấy trên PGA (tối thiểu) và Malt (thích hợp):

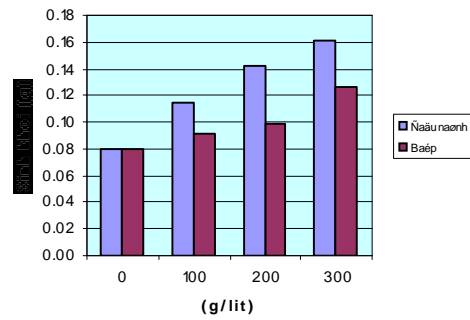
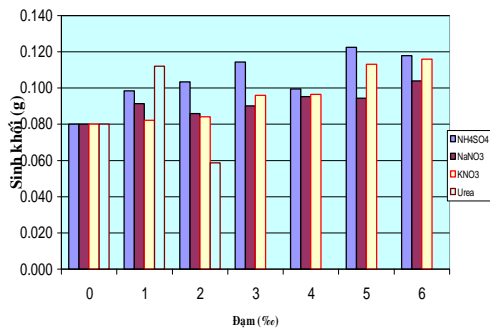


Bảng kết quả trên cho thấy: trên môi trường tối thiểu PGA (potato – glucose agar), tơ nấm lan nhanh nhưng chất lượng tơ nấm không tốt, tơ nấm rời rạc và xơ xác. Trên môi trường thích hợp Malt lại cho sinh khối tích lũy cao hơn, chất lượng tơ tốt hơn so với các loại môi trường khác. Như vậy, có thể sử dụng môi trường có malt để nuôi cấy và nhân giống nấm phát quang.

Bảng 2. Khả năng sử dụng các nguồn đạm, khoáng khác nhau của tơ nấm.

Nồng độ đạm thích hợp cho nấm phát triển	Nồng độ khoáng thích hợp
--	--------------------------

Đạm hữu cơ		Đạm vô cơ		cho nấm phát triển	
Bắp	30%	NaNO ₃	6‰	KCl	6‰
Đậu nành	30%	KNO ₃	5‰	K ₂ CO ₃	1‰
		(NH ₄) ₂ SO ₄	5‰	P ₂ O ₅	0,5‰
		Urê	1‰	MgSO ₄	1,5-2‰

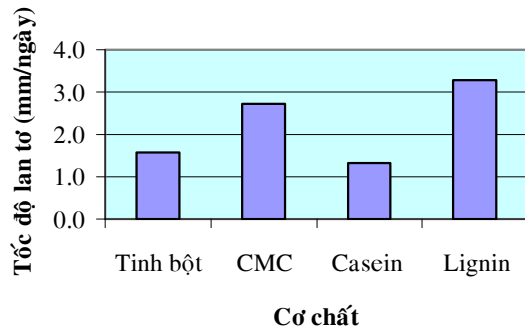


Biểu đồ 1: Khả năng sử dụng nguồn đạm vô cơ

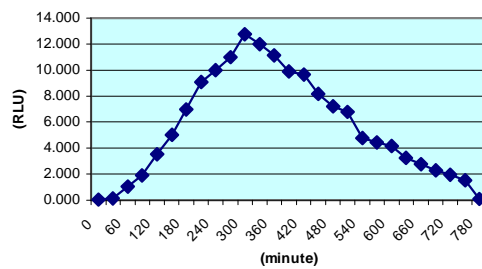
Biểu đồ 2: Khả năng sử dụng đạm hữu cơ

Bảng 3. Điều kiện sinh lý thích hợp cho sự phát triển tơ nấm:

Nhiệt độ thích hợp		pH thích hợp	Độ ẩm thích hợp		Ánh sáng thích hợp
Tơ nấm	Quả thể		Tơ nấm	Quả thể	
28±2°C	25±2°C	4.5-5.0	70%	90%	100-200lux



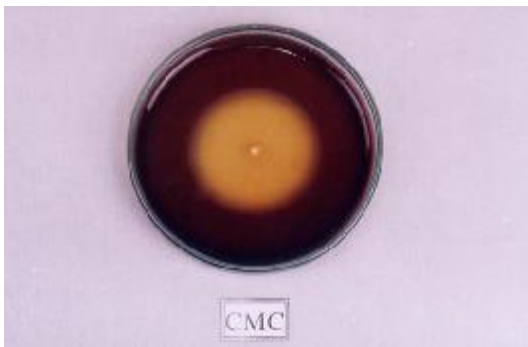
Biểu đồ 3. Khả năng sử dụng các nguồn cơ chất khác nhau



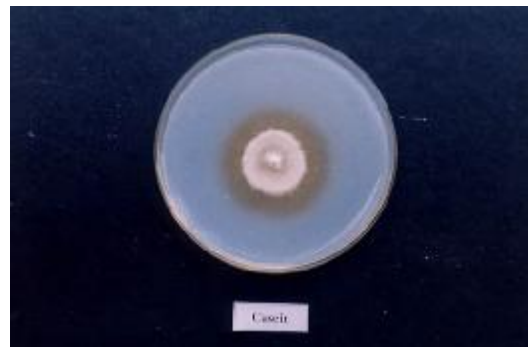
Biểu đồ 4. Cường độ phát sáng của tở theo thời gian

Qua khảo sát cho thấy, nấm phát quang có khả năng sử dụng các nguồn cơ chất tinh bột, cellulose, lignin. Trong đó, khả năng sử dụng lignin là cao nhất.

Sau hơn 5 giờ tiếp xúc với không khí, tở phát sáng tối đa, sau đó giảm dần cho đến giờ thứ 13 thì gần như tắt hẳn.



Hình 4. ồng phân giải Cellulose trên môi trường chứa 1g CMC /lít. CMC (Carboxyl Methyl Cellulose).



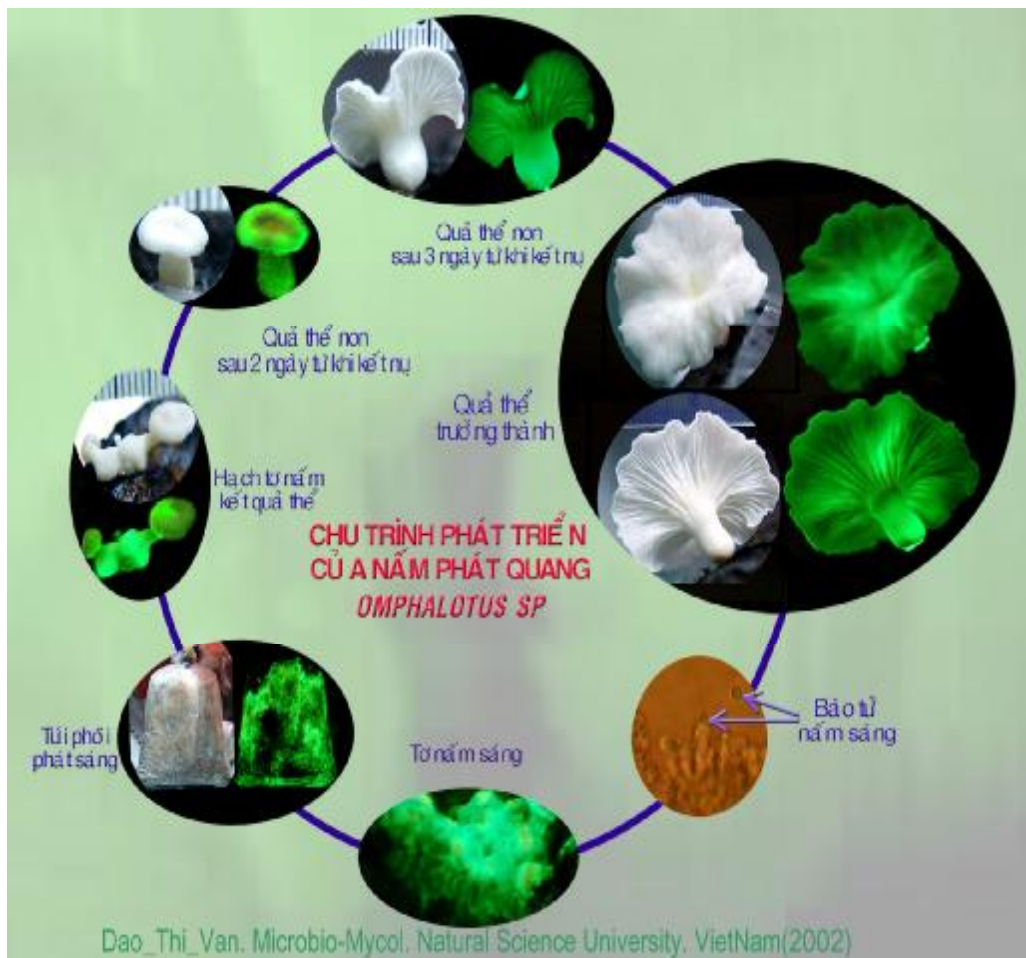
Hình 5. ồng phân giải Casein trên môi trường chứa 1g Casein/lít



Hình 6. Vòng phân giải tinh bột trên môi trường chứa 1g tinh bột tan /lít



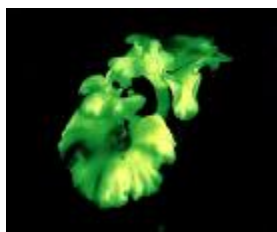
Hình 7. Vòng phân giải lignin trên môi trường chứa 1g lignin/lít



Một số loài nấm phát quang đang được nghiên cứu nuôi trồng trên thế giới

**Omphalotus nidiformis**

(Berk.) O.K.Mill. Mycol. Helv. 6: 93 (1994)

**Omphalotus olearius**

Jack-O-Lantern mushroom

**Omphalotus illudens****Omphalotus olivascens** *Mycena lampadis*. [Maguire 1988][pending]

4. KẾT QUẢ - ĐỀ NGHỊ

Với các đặc điểm về hình dạng và cấu tạo như trên, dựa theo khóa phân loại của Jean Marie Polese (2000)[1], nấm thu được là loài *Omphalotus* sp, thuộc họ Paxilaceae, bộ Boletales, lớp Basidiomycetes, ngành Basidiomycotina. Đây là nấm nhiệt đới, dễ nuôi trồng cho quả thể trong điều kiện nhân tạo. Nấm có khả năng phát sáng liên tục bởi hệ sợi tơ và quả thể, ánh sáng phát ra có màu xanh lục. Loài nấm phát quang này chưa từng được đề cập trong các tài liệu phân loại nấm ở Việt Nam.

Tiếp tục tách chiết các hợp chất trao đổi thứ cấp của nấm phát quang, khảo sát hoạt tính sinh học của chúng và so sánh với các chủng nấm phát quang khác của các nước trên thế giới (*Omphalotus nidiformis*, *Omphalotus olearius* và *Omphalotus illudens*), ứng dụng sản xuất các sản phẩm dược liệu có nguồn gốc tự nhiên gần gũi với trao đổi chất của con người và cho hiệu quả điều trị ung thư cao; Tiếp tục nghiên cứu hợp chất quan trọng được tạo ra trong quá trình phát sáng, ứng dụng trong y dược, phân loại, hóa học, và trong sinh thái học.

RESEACH ON BIOLOGY AND THE SUCCESSFUL CULTIVATION OF A NEW LUMINESCENT MUSHROOM *OMPHALOTUS* AF. *ILLUDENT* FOR EXAMINATION THE EFFECTIVE ANTICANCER PROPERTY OF SOME EXTRACTS

Dao Thi Van⁽¹⁾, Nguyen Hoang Vu⁽¹⁾, Le Duy Thang⁽¹⁾, Daniel Maguire⁽²⁾
Anthony Rayner⁽²⁾

(1)University of Natural Sciences, VNU-HCM

(2) University of Queensland, Australia

ABSTRACT: Bioluminescence has a great popular appeal for its potential applications. Bioluminescence of fungi was recently researched in the world. In this study, we collected bioluminescent fungi in the tropical forest in the Southeast of Vietnam and identified it taxonomically in the name *Omphalotus* sp whose characteristics are very different from those of others. In this connection, the purpose of this research is to cultivate to isolate metabolites from

this mushroom and examine its anticancer property. Special attention was paid to the different activities of metabolites and the attempts made to use them in medicinal chemistry. Fungi are of special interest because like us, they are eucaryotes and our metabolism is more related to theirs than to that of the procaryotic bacteria. Therefore, a number of metabolites were isolated from fungi which found their way into medical applications as natural products, starting material for pharmaceuticals or as lead structures for the development of pharmaceutical products.

Key word: *Bioluminescence; new luminous fungi; Omphalotus; cultivation.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

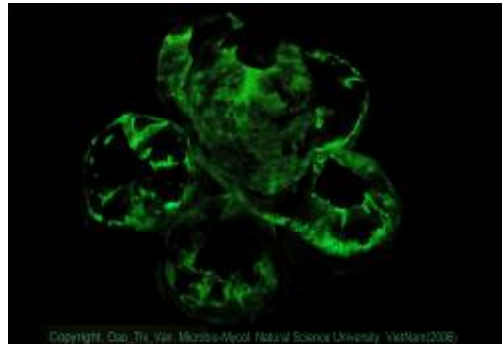
- [1]. Le Mini Guide Des Champignons by Jean Marie Polese, NXB Konemann, (2000).
- [2]. Wolf-Rainer Abraham, *Current Medical Chemistry* (2001), 8, 583-606
- [3]. Trevor C. McMorrisa, A. Kashinathama, Ricardo Liraa, Henrik Rundgrena, Peter K. Gantzela, Michael J. Kelnerb, Robin Dawec, *Phytochemistry* 61 (2002) 395-398
- [4]. Hedda J Weitz, The effect of culture conditions on the mycelial growth and luminescence of naturally bioluminescent fungi. Department of plant and Soil Science, University of Aberdeen. www.fems-microbiology.org
- [5]. Lê Duy Thắng, *Kỹ thuật nuôi trồng nấm ăn*, Nhà xuất bản nông nghiệp, (1994).
- [6]. Shimomura O. *Bioluminescence, Chemical principles and Methods*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd,(2006).
- [7]. Weitz H.J. Development of a novel, bioluminescence-based, fungal bioassay for toxicity testing. *Environ. Microbiol.* 4: 422-429, (2002).

PHỤ LỤC

Qua nuôi cấy cho thấy tơ nấm phát sáng rất rõ (ảnh: 3a, 3b, 4a, 4b)



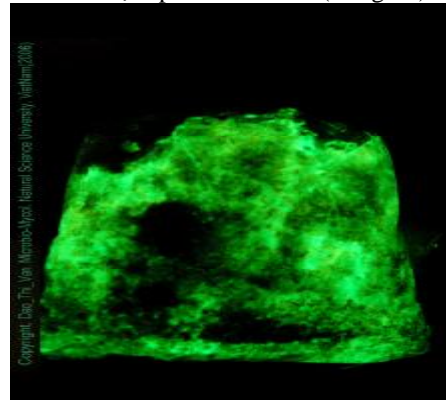
Ảnh 3a. Bịch phôi có tơ nấm (ngoài sáng)



Ảnh 3b. Bịch phôi có tơ nấm (trong tối)



Ảnh 4a. Bịch phôi có tơ nấm (ngoài sáng)



Ảnh 4b. Bịch phôi có tơ nấm (trong tối)

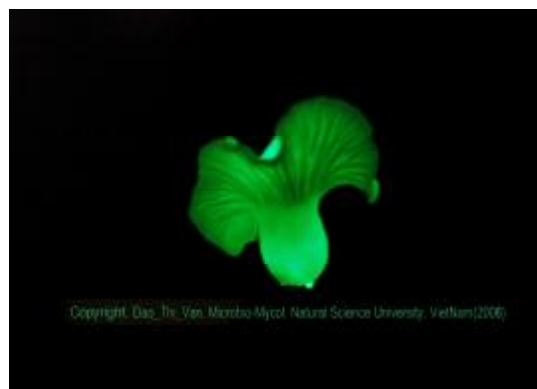
Đối với quả thể

Sau 4 ngày quả thể xuất hiện, nấm bắt đầu phát sáng và đến khi quả thể chuyển sang vàng thì nấm ngừng phát sáng.

Nấm có thể phát sáng suốt các giai đoạn phát triển của quả thể (ảnh : 5a, 5b, 6a, 6b)



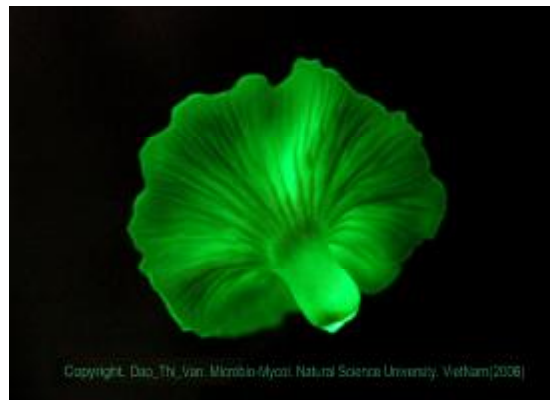
Ảnh 5a. Tai nấm còn non (ngoài sáng)



Ảnh 5b. Tai nấm còn non (trong tối)



Ảnh 6a. Tai nấm trưởng thành (ngoài sáng)



Ảnh 6b. Tai nấm trưởng thành (trong tối)