

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN SINH TRƯỞNG HỆ SỢI NẤM MỠ *Agaricus blazei* Murill Ab-1

Trần Thu Hà¹, Trần Thùy Linh², Nguyễn Duy Trình¹, Nguyễn Văn Giang^{2*}

¹Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển nấm, Viện Di truyền Nông nghiệp

²Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: nvgiang@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 29.02.2022

Ngày chấp nhận đăng: 27.05.2022

TÓM TẮT

Nấm mỡ blazei (*Agaricus blazei* Murill) là loại nấm dược liệu có hoạt tính điều hòa miễn dịch và hỗ trợ chống ung thư mạnh mẽ. Dinh dưỡng và điều kiện môi trường ngoại cảnh là hai yếu tố tác động chính đến khả năng sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích xác định một số điều kiện thích hợp cho nhân giống nấm mỡ blazei trên môi trường thạch. Các nguồn dinh dưỡng carbon (glucose, fructose, maltose, sucrose và lactose), các nguồn nitơ (NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4HPO_4 , peptone và cao nấm men) với các giá trị pH ban đầu của môi trường nhân giống (-4, 5, 6, 7, 8, 9) và các ngưỡng nhiệt độ nuôi (15°C, 20°C, 25°C, 30°C và 35°C) đã được thử nghiệm đối với chủng nấm mỡ blazei Ab-1. Các thông số về đường kính hệ sợi, tốc độ sinh trưởng hệ sợi, mật độ hệ sợi đã được đánh giá với $P < 0,05$. Kết quả nghiên cứu cho thấy glucose và cao nấm men là nguồn dinh dưỡng carbon, nitơ thích hợp nhất đối với sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm Ab-1. Môi trường pH 6,0 và nhiệt độ 25°C là điều kiện tối ưu để hệ sợi nấm Ab-1 sinh trưởng. Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm trên đĩa thạch nhanh nhất đạt $8,14 \pm 0,16$ mm/ngày, đường kính khuẩn lạc là $78,44 \pm 2,34$ mm sau 10 ngày nuôi.

Từ khóa: Nấm mỡ blazei, hệ sợi, dinh dưỡng, carbon, nitơ.

Effect of Culture Conditions on Mycelial Growth of *Agaricus blazei* Murill Strain Ab-1

ABSTRACT

Agaricus blazei Murill is a medicinal mushroom with potent immunomodulatory and antitumor activities. Nutrition and environmental conditions are two main factors affecting the mycelial growth of mushrooms. Therefore, the study was carried out to optimize the culture of *Agaricus blazei* on a pure cultural medium. The carbon sources (glucose, fructose, maltose, sucrose, and lactose), nitrogen sources (NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4HPO_4 , peptone, and yeast extract) with initial pH values of 4, 5, 6, 7, 8, 9 and incubation temperatures of 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, and 35°C were tested for mycelial growth of *Agaricus blazei* mushroom strain Ab-1. The mycelial colony diameter, growth rate, and mycelial density were evaluated with $P < 0.05$. Results indicated that glucose and yeast extracts were the most suitable carbon and nitrogen sources for the mycelial growth of strain Ab-1. pH6 and temperature of 25°C were also optimal conditions for the growth of Ab-1 mycelia. The mycelial colony's growth rate and diameter reached 8.14 mm/day and 78.44 mm after 10 days.

Keywords: *Agaricus blazei*, mycelium, nutrient, carbon source, nitrogen source.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm mỡ blazei (*Agaricus blazei* Murill) là một loại nấm dược liệu có giá trị cao. Trong y học cổ truyền, nấm blazei đã được sử dụng để phòng ngừa nhiều loại bệnh, bao gồm cả ung thư, xơ cứng động mạch, tiểu đường và viêm gan

(Grinde & cs., 2006; Ali & cs., 2021). Một số nghiên cứu gần đây đã báo cáo về khả năng điều hòa miễn dịch mạnh mẽ của nấm mỡ blazei (Hetland & cs., 2008; Ali & cs., 2021), đặc tính chống khối u (Ellertsen & cs., 2006; Shimizu & cs., 2016; Misgiati & cs., 2021) và các hoạt động chống virus của loài nấm này (Sorimachi & cs.,

2001; Grinde & cs., 2006; Wang & cs., 2013). Sản lượng nấm mỡ *blazei* của Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc cao nhất thế giới, chiếm tới 90% tổng sản lượng của thế giới (Gregori & cs., 2008; Win & Ohga, 2018).

Trong những năm gần đây, một số nhà khoa học đã nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy khác nhau tới sinh trưởng hệ sợi và khả năng chuyển hóa của một số loại nấm được liệu (Cui & cs., 1998; Park & cs., 1999; Cho & cs., 2002; Hwang & cs., 2004). Theo Hamedí & cs. (2012) các đặc tính khác nhau của nấm có thể bị ảnh hưởng do thay đổi điều kiện nhân nuôi như pH, nhiệt độ, thành phần nuôi cấy, khối lượng giống cấy. Khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm mỡ *blazei* có sự thay đổi từ 7,36 đến 9,08 mm/ngày khi nhân nuôi trên các môi trường nhân giống khác nhau (Rózsa & cs., 2016). Đường kính hệ sợi nấm mỡ *A. blasiliensis* nhân nuôi ở các điều kiện nhiệt độ, pH khác nhau có sự sai khác thống kê, đạt từ 20mm đến 80mm sau 21 ngày nuôi sợi (Colauto & cs., 2008). Tuy nhiên chưa có báo cáo về tác động của điều kiện nuôi cấy đến hình thái hệ sợi của nấm *blazei*, cũng như mối quan hệ giữa hình thái học và khả năng tạo sinh khối của nấm mỡ *blazei*. Nguyễn Thị Chính & cs. (2007) khi nghiên cứu về đặc điểm sinh học và công nghệ nuôi trồng giống nấm mỡ *Agaricus blazei* nhập ngoại đã khẳng định Việt Nam có đủ các điều kiện cần thiết để phát triển giống nấm mỡ *blazei*. Một vài nghiên cứu về hoạt tính sinh học cũng như giá trị dược liệu của loài nấm này cũng đã được một số nhà khoa học ở nước ta công bố như công trình nghiên cứu của Nguyễn Thị Chính & cs. (2006), Lê Xuân Thám & Trương Bình Nguyễn (2003).

Để làm phong phú thêm cơ sở dữ liệu về đặc tính sinh học cũng như yêu cầu về điều kiện nhân giống hoặc nuôi trồng của loài nấm mỡ *blazei* ở nước ta, hướng tới mục tiêu phát triển thêm một loài nấm dược liệu mới có giá trị cao vào cơ cấu sản xuất, chúng tôi thực hiện nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng hệ sợi chủng giống nấm mỡ *blazei* (*Agaricus blazei* Murill) Ab-1 mới nhập nội.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Giống nấm và môi trường nhân giống

Chủng nấm mỡ *blazei* (*Agaricus blazei*) Ab-1 nhập nội năm 2019 đang lưu giữ tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển nấm - Viện Di truyền Nông nghiệp trên môi trường PGA ở nhiệt độ 4-8°C.

Môi trường nền sử dụng để nhân giống nấm mỡ Ab-1 là môi trường PA gồm dịch chiết 200g khoai tây + 20g agar được chuẩn bị theo phương pháp của Bích Thuy Thi Nguyễn & cs. (2019). Các nguồn carbon gồm: glucose, fructose, maltose, sucrose và lactose; các nguồn nitơ gồm: NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4HPO_4 , peptone và cao nấm men. Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này được sản xuất bởi Công ty Merck KgaA.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị môi trường nhân giống

Môi trường PA dùng để nhân giống nấm mỡ Ab-1 được chuẩn bị theo phương pháp của Bích Thuy Thi Nguyễn & cs. (2019); khoai tây gọt sạch vỏ (200g), cắt miếng có kích thước $1,0 \times 1,0\text{cm}$, đun sôi với 500ml nước cất trong 15 phút, lọc lấy phần dịch chiết. Bổ sung thêm 20g agar và các nguồn dinh dưỡng carbon, nitơ tuyển chọn và bổ sung vào dịch chiết, thêm nước cất cho đủ 1.000ml. Sử dụng dung dịch NaOH 1N hoặc HCl 1N và dung dịch đệm phosphate để hiệu chỉnh và pH môi trường nhân giống (Nguyễn Thị Chính & cs., 2007), hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút, sau đó chia vào các đĩa petri vô trùng ($\varnothing = 9,0\text{cm}$), mỗi đĩa petri chứa 20ml môi trường (Nguyễn Văn Giang & cs., 2021a). Mỗi công thức thí nghiệm được bố trí 30 đĩa petri cho 03 lần nhắc lại.

2.2.2. Nuôi sợi nấm mỡ *blazei*

Hệ sợi giống nấm mỡ *blazei* Ab-1 được nuôi trong tủ bảo ôn Memmert IF110 ở nhiệt độ $26^\circ\text{C} \pm 1$ (Eguchi & cs., 1994) và độ ẩm không khí 65%. Định kỳ quan sát đặc điểm sinh trưởng hệ sợi chủng nấm sau 2, 4, 6, 8, 10 ngày nuôi (Nguyễn Thị Chính & cs., 2007).

2.2.3. Ảnh hưởng của nguồn carbon

Nhân nuôi chủng nấm mốc *blazei* Ab-1 trên môi trường PA bổ sung thêm các nguồn carbon khác nhau (glucose, fructose, maltose, sucrose và lactose) với nồng độ 20 g/l để đánh giá ảnh hưởng của các nguồn dinh dưỡng carbon đến khả năng sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm (Danielle, 2010; Nguyễn Thị Chính & cs., 2007; Rózsa & cs., 2016).

2.2.4. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Nhân nuôi chủng nấm mốc *blazei* Ab-1 trên môi trường PA bổ sung 20 g/l glucose và 1,0 g/l nguồn nitơ. Các nguồn nitơ sử dụng gồm NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4HPO_4 , peptone và cao nấm men (Nguyễn Thị Chính & cs., 2007; Dias & cs., 2011).

2.2.5. Ảnh hưởng của hàm lượng carbon

Nhân nuôi chủng nấm mốc *blazei* Ab-1 trên môi trường PA bổ sung 1,0 g/l cao nấm men và glucose với các nồng độ 15, 20, 25, 30 và 35 g/l để khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng carbon đến sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm (Nguyễn Thị Chính & cs., 2007).

2.2.6. Ảnh hưởng của pH

Nhân nuôi chủng nấm mốc *blazei* Ab-1 trên môi trường PA bổ sung 20 g/l glucose và 1,0 g/l cao nấm men. Sử dụng dung dịch NaOH 1N và dung dịch HCl 1N để điều chỉnh pH ban đầu của môi trường nhân giống là 4, 5, 6, 7, 8, 9 (Nguyễn Thị Chính & cs., 2007, Hamedi & cs., 2012).

2.2.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Môi trường nhân giống sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng hệ sợi nấm mốc *blazei* Ab-1 là PA được bổ sung 20 g/l glucose và 1,0 g/l cao nấm men. Sau khi cấy giống, hệ sợi nấm Ab-1 sẽ được nuôi sợi trong tủ bảo ôn Memmert IF110 với các ngưỡng nhiệt độ $15 \pm 1^\circ\text{C}$; $20 \pm 1^\circ\text{C}$; $25 \pm 1^\circ\text{C}$; $30 \pm 1^\circ\text{C}$ và $35 \pm 1^\circ\text{C}$ (Nguyễn Thị Chính & cs., 2007). Quan sát đánh giá đặc điểm sinh trưởng hệ sợi để lựa chọn ra ngưỡng nhiệt độ thích hợp nhất cho sinh trưởng của hệ sợi nấm Ab-1 (Danielle, 2010; Nguyễn Thị Chính & cs., 2007).

2.2.8. Chỉ tiêu theo dõi

Đặc điểm sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm mốc *blazei* Ab-1 đánh giá theo phương pháp của Nguyễn Thị Chính & cs. (2007) và Bích Thuy Thi Nguyen & cs. (2019), gồm các chỉ tiêu: đường kính hệ sợi (mm), tốc độ sinh trưởng hệ sợi (mm/ngày) và mật độ hệ sợi. Tốc độ sinh trưởng hệ sợi được tính theo công thức $V = D/T$, trong đó V là tốc độ sinh trưởng hệ sợi (mm/ngày), D là đường kính hệ sợi (mm), T là thời gian nuôi sợi (ngày). Mật độ hệ sợi nấm được quan sát và đánh giá theo các mức: (-) Hệ sợi không phát triển, (+) Hệ sợi mỏng, (++) Hệ sợi trung bình, (+++) Hệ sợi dày.

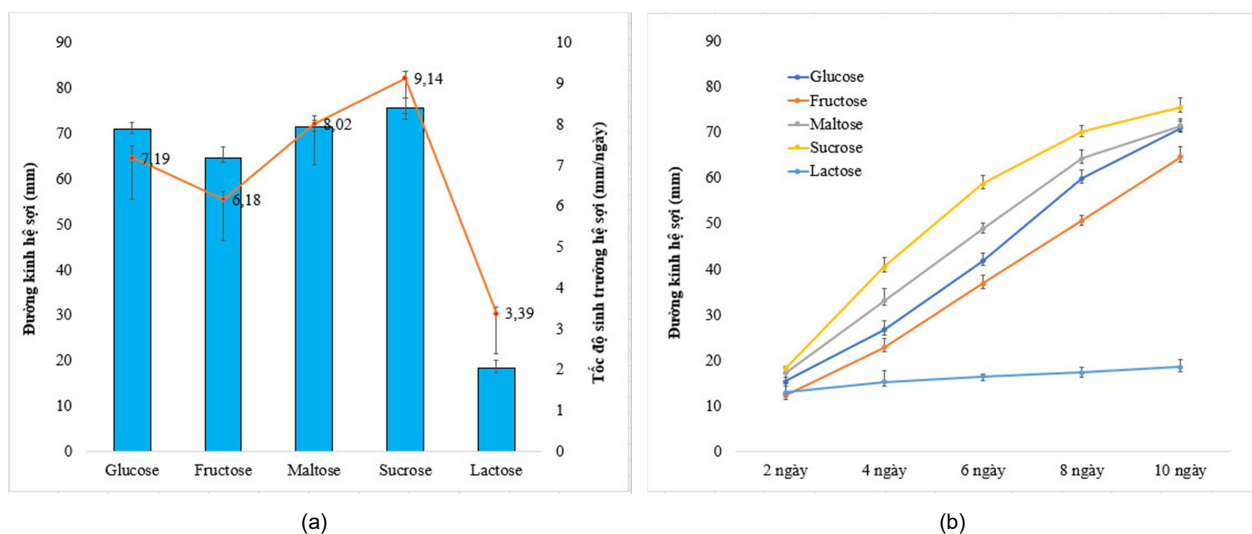
2.2.9. Xử lý số liệu

Kết quả nghiên cứu được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel 2019. Các giá trị trung bình của các công thức thí nghiệm được so sánh bằng phương pháp phân tích phương sai ANOVA cho thí nghiệm một nhân tố và kiểm định Duncan (Duncan's Multiple-Comparison Test) trên phần mềm IRRISTAT 5.0 với mức ý nghĩa $P < 0,05$.

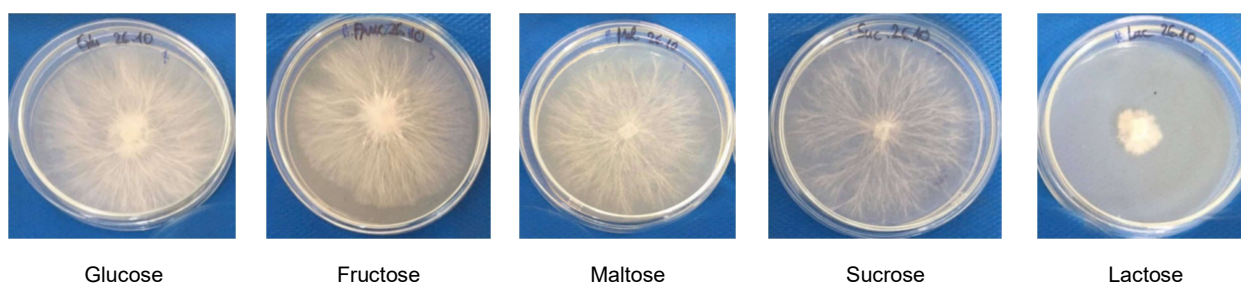
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nguồn carbon

Tốc độ sinh trưởng hệ sợi nấm mốc *blazei* Ab-1 trên các môi trường có bổ sung các nguồn carbon khác nhau (Hình 1a) đạt trung bình từ 3,39 đến 9,14 mm/ngày ($P < 0,05$). Tốc độ sinh trưởng hệ sợi của nấm Ab-1 nhanh nhất trên môi trường có bổ sung sucrose ($9,14 \pm 0,18$ mm/ngày) và maltose ($8,02 \pm 0,21$ mm/ngày), đường kính hệ sợi nấm sau 10 ngày nuôi đạt lần lượt $75,59 \pm 2,21$ mm và $71,49 \pm 1,49$ mm (Hình 1b). Tuy nhiên mật độ hệ sợi nấm Ab-1 mỏng và phân bố không đều trên cả hai loại môi trường này. Môi trường nhân giống bổ sung glucose, tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm mốc *blazei* Ab-1 đạt $7,19 \pm 0,3$ mm/ngày, đường kính hệ sợi đạt $71,02 \pm 1,58$ mm sau 10 ngày nuôi, mật độ sợi dày và đồng nhất. Môi trường bổ sung lactose, sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm Ab-1 được ghi nhận là chậm nhất, với tốc độ sinh trưởng hệ sợi trung bình 3,39 mm/ngày, đường kính hệ sợi sau 10 ngày nuôi cấy đạt $18,51 \pm 1,59$ mm và không có khả năng phát triển kín bề mặt môi trường nhân giống (Hình 2).



Hình 1. (a) Ảnh hưởng của nguồn carbon đến đường kính hệ sợi nấm *blazei* Ab-1 sau 10 ngày nuôi sợi; (b) tốc độ sinh trưởng hệ sợi của nấm *blazei* Ab-1 sau 2, 4, 6, 8, 10 ngày ở 26 ± 1°C, pH 7,5



Hình 2. Hệ sợi nấm *blazei* Ab-1 trên môi trường bổ sung các nguồn carbon sau 10 ngày ở 26 ± 1°C, pH = 7,5

Nguyễn Thị Huyền Trang & cs. (2021) đã báo cáo rằng glucose là nguồn carbon tối ưu cho phần lớn các loài nấm lớn sinh trưởng phát triển hệ sợi, do nấm dễ dàng chuyển hóa glucose để tạo năng lượng tế bào. Danielle (2010) khẳng định, mỗi loài nấm khác nhau có các điều kiện nuôi cấy tối ưu cụ thể. Các loài nấm mỡ *A. blazei* được thu thập từ các nguồn khác nhau có các đặc điểm sinh trưởng khác nhau, cuộc điều tra phân loại các chủng nấm *A. blazei* của Wasser & cs. (2002) đã một lần nữa khẳng định và làm nổi bật những khác biệt này. Nghiên cứu của Eguchi & cs. (1994) đã ghi nhận glucose và sucrose là hai nguồn carbon hiệu quả nhất đối với sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm mỡ *blazei* CJ-01 trên môi trường thạch. Trên môi trường nuôi cấy có glucose chủng nấm mỡ *blazei* CJ-10

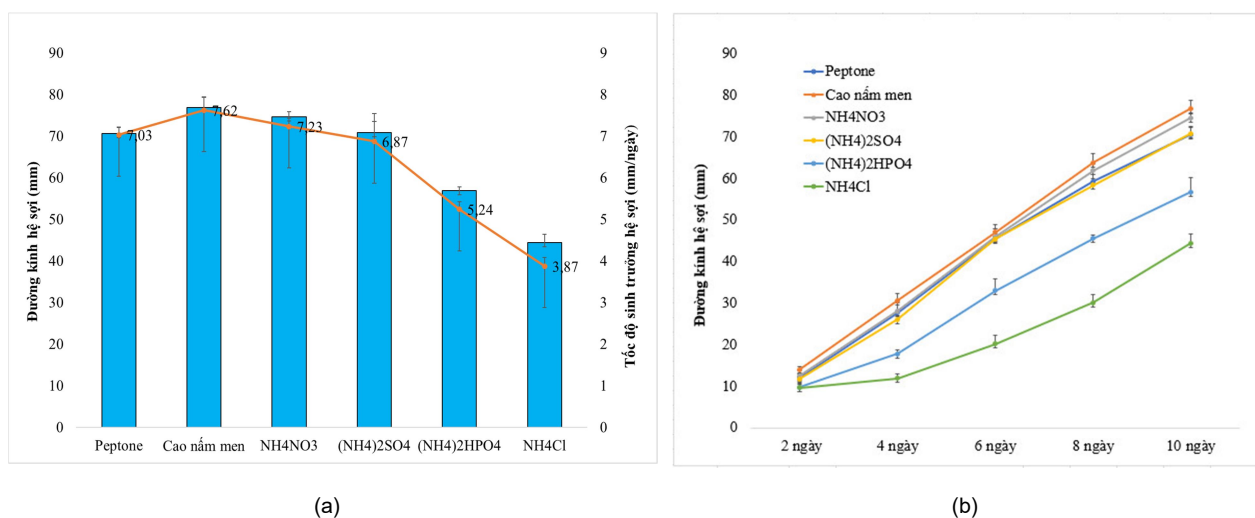
tạo ra nhiều sợi nấm nhất và nguồn sucrose thuận lợi nhất cho tổng hợp polysaccharide ngoại bào (exopolysaccharide/EPS) của sợi nấm mỡ *blazei* (Eguchi & cs., 1994). Kết quả khảo sát của Hamed & cs. (2012) trên chủng nấm *A. blazei* DPPH 131 lại khẳng định rằng tinh bột là nguồn carbon tốt nhất cho khả năng tạo sinh khối và tổng hợp polysaccharide ngoại bào. Như vậy, nguồn dinh dưỡng carbon tối ưu phụ thuộc vào đặc tính của từng chủng giống. Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy glucose là nguồn carbon tối ưu nhất cho sự sinh trưởng và phát triển hệ sợi chủng nấm mỡ *blazei* Ab-1.

3.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

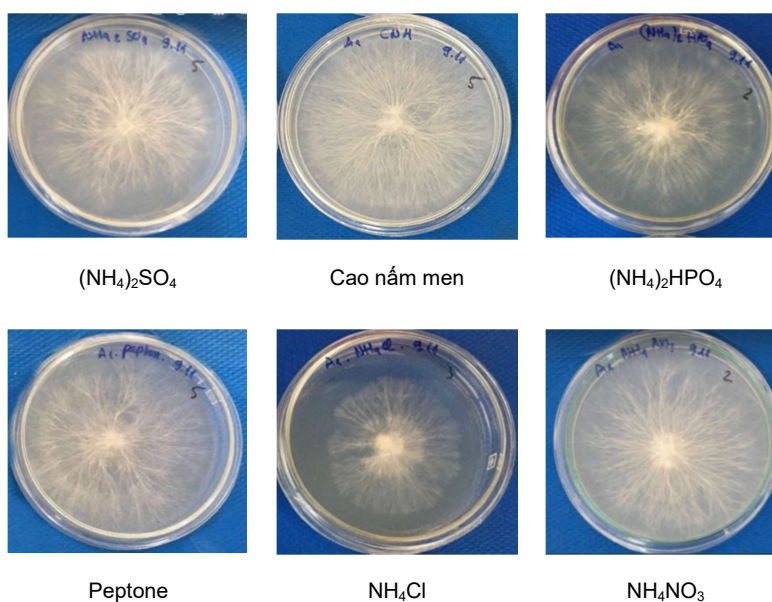
Kết quả thí nghiệm (Hình 3) cho thấy dinh dưỡng nitơ có ảnh hưởng tới khả năng sinh

trưởng hệ sợi nấm của chủng nấm Ab-1, tốc độ sinh trưởng hệ sợi trung bình của chủng nấm Ab-1 đạt từ 3,87 đến 7,62 mm/ngày. Kết quả có sự sai khác thống kê ở mức ý nghĩa $P < 0,05$. Cao nấm men là nguồn dinh dưỡng cung cấp nitơ tối ưu cho sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm Ab-1 với tốc độ sinh trưởng nhanh nhất $7,62 \pm 0,32$ mm/ngày, đường kính hệ sợi đạt $76,87 \pm 2,37$ mm sau 10 ngày nuôi, mật độ hệ sợi nấm dày, phân bố đều (Hình 4). Các nguồn nitơ

như peptone, NH_4NO_3 và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cũng được ghi nhận là các nguồn dinh dưỡng phù hợp cho nhân nuôi nấm Ab-1. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ và NH_4Cl là hai nguồn nitơ không thuận lợi cho sinh trưởng hệ sợi của nấm Ab-1, hệ sợi nấm sinh trưởng chậm, tốc độ sinh trưởng đạt $5,25 \pm 0,18$ mm/ngày đối với môi trường có bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ và $3,87 \pm 0,21$ mm/ngày đối với môi trường có bổ sung NH_4Cl ; mật độ hệ sợi mỏng, phân bố không đều (Hình 4).



Hình 3. (a) Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến đường kính hệ sợi nấm mỡ blazei Ab-1 sau 10 ngày nuôi sợi; (b) tốc độ sinh trưởng hệ sợi của nấm mỡ blazei Ab-1 sau 2, 4, 6, 8, 10 ngày ở $26 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7,5



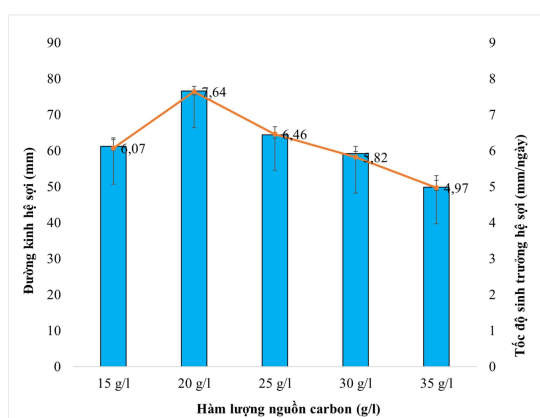
Hình 4. Hệ sợi nấm mỡ blazei Ab-1 trên môi trường bổ sung các nguồn nitơ sau 10 ngày ở $26 \pm 1^\circ\text{C}$, pH = 7,5

Hamed & cs. (2012) phân tích sự sai khác về khả năng tạo sinh khối và tổng hợp polysaccharide ngoại bào của nấm mỡ *blazei* bằng phương pháp kiểm nghiệm Kruskal - Wallis H và Mann - Whitney U đã nhận thấy polysaccharide ngoại bào và sinh khối của nấm mỡ *blazei* khi nhân nuôi trong môi trường có chứa các hợp chất nitơ hữu cơ (chiết xuất nấm men, phyto peptone) cao hơn đáng kể so với môi trường có chứa các nguồn nitơ vô cơ như urê và amoni clorua (NH_4Cl). Hamed & cs. (2007) đã lựa chọn cao nấm men là nguồn dinh dưỡng nitơ hiệu quả nhất cho quá trình tăng sinh khối cũng như tổng hợp các hoạt chất ngoại bào của nấm mỡ *A. blazei*. Tương tự, nhiều nghiên cứu khác cũng đã báo cáo các nguồn nitơ hữu cơ sẽ phù hợp cho quá trình sản xuất sinh khối và EPS ở nhiều loại nấm khác nhau (Chen & cs., 2008, Hamed & cs., 2007; Lee & cs., 2004, Bích Thuy Thi Nguyen & cs., 2021). Nguyên nhân là do hầu hết các loài nấm thiếu hệ thống chuyển hóa nitơ vô cơ thành các nguyên liệu đơn giản hơn trong quá trình tổng hợp amino acid (Petre & cs., 2016). Ngoài ra, Bảo tàng Giống chuẩn của Mỹ (American Type Culture Collection/ATCC) cũng đã khuyến cáo sử dụng cao nấm men trong quá trình nhân nuôi để nấm mỡ *A. blazei* để có được khả năng sinh trưởng phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 24°C . Lin & Yang (2006) cũng khẳng định môi trường gồm 5,0% chiết xuất mạch nha,

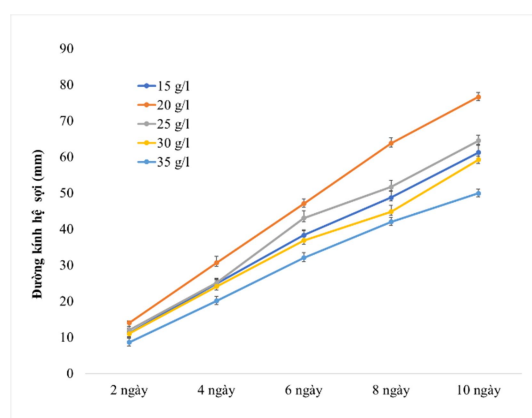
0,1% cao nấm men và 0,5% peptone là thích hợp cho nhân nấm mỡ *blazei* dạng dịch thể. Như vậy, cao nấm men là dinh dưỡng nitơ thích hợp nhất cho sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm Ab-1 và kết quả nghiên cứu này là phù hợp với các nghiên cứu trước đó.

3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng carbon

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng carbon đến khả năng sinh trưởng hệ sợi nấm mỡ Ab-1 được trình bày tại hình 5. Tốc độ sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm Ab-1 trên các môi trường với hàm lượng nguồn carbon khác nhau có sự sai khác thống kê ($P < 0,05$). Môi trường được bổ sung 20 g/l glucose, hệ sợi nấm Ab-1 sinh trưởng với tốc độ nhanh nhất $7,64 \pm 0,14$ mm/ngày, đường kính hệ sợi đạt $76,53 \pm 1,27$ mm sau 10 ngày nuôi. Trên môi trường bổ sung 35 g/l glucose, tốc độ sinh trưởng hệ sợi của chủng nấm mỡ Ab-1 chậm nhất ($4,97 \pm 0,2$ mm/ngày), đường kính hệ sợi sau 10 ngày nuôi là $49,88 \pm 3,18$ mm, mật độ hệ sợi mỏng (Hình 6). Hàm lượng glucose là 15, 25 và 30 g/l cũng được ghi nhận là không phù hợp cho hệ sợi nấm mỡ Ab-1 sinh trưởng; tốc độ sinh trưởng hệ sợi của nấm Ab-1 chậm, lần lượt là $6,07 \pm 0,29$, $6,46 \pm 0,2$ và $5,82 \pm 0,16$ mm/ngày; mật độ hệ sợi nấm trung bình (Hình 6). Rószka & cs. (2016) cũng khẳng định glucose với hàm lượng 20 g/l có tác động tốt nhất tới sinh trưởng của hệ sợi nấm mỡ *blazei*.

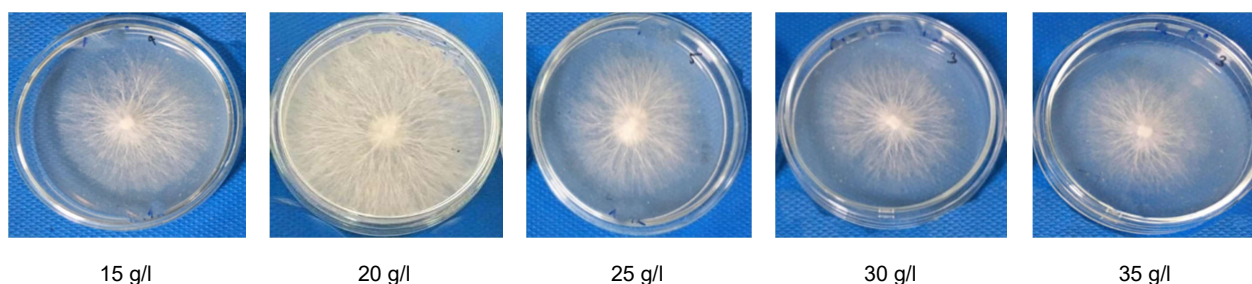


(a)

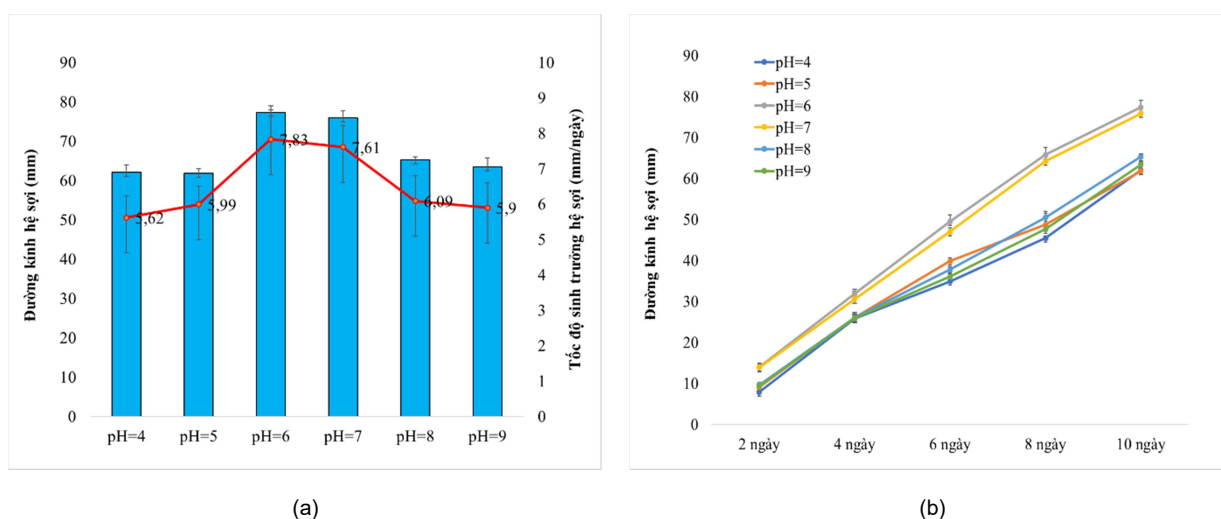


(b)

Hình 5. (a) Ảnh hưởng của hàm lượng nguồn carbon đến đường kính hệ sợi nấm mỡ *blazei* Ab-1 sau 10 ngày nuôi sợi; (b) tốc độ sinh trưởng hệ sợi của nấm mỡ *blazei* Ab-1 sau 2, 4, 6, 8, 10 ngày ở $26 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7,5



Hình 6. Hệ sợi nấm mốc blazei Ab-1 trên môi trường bổ sung hàm lượng glucose khác nhau sau 10 ngày ở $26 \pm 1^\circ\text{C}$, pH = 7,5



Hình 7. (a) Ảnh hưởng của pH đến đường kính hệ sợi nấm mốc blazei Ab-1 sau 10 ngày nuôi sợi; (b) tốc độ sinh trưởng hệ sợi của nấm mốc blazei Ab-1 sau 2, 4, 6, 8, 10 ngày ở $26 \pm 1^\circ\text{C}$

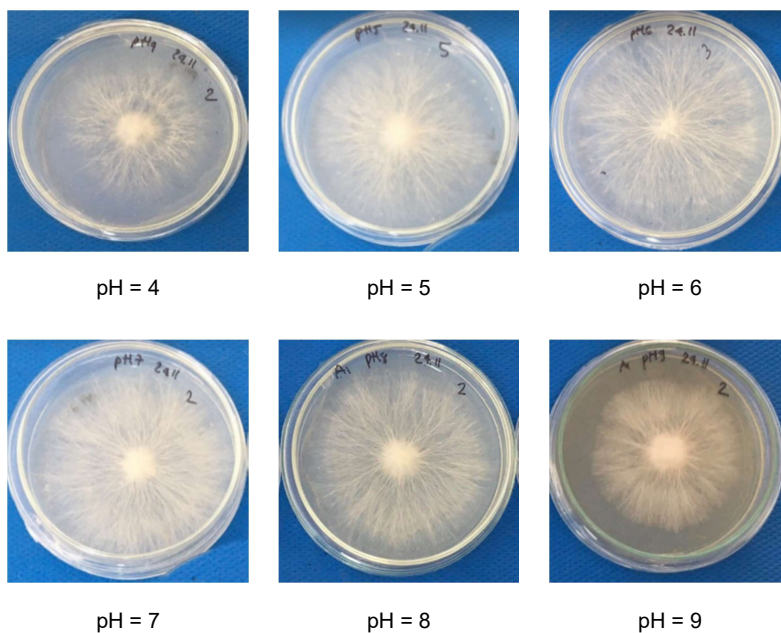
Nguyễn Thị Chính & cs. (2007) đã khẳng định việc sử dụng hàm lượng glucose phù hợp trong môi trường nuôi sợi là điều kiện cần thiết để duy trì và thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của nấm mốc blazei, hàm lượng glucose từ 10 đến 30 g/l thích hợp cho hệ sợi nấm *A. blazei* sinh trưởng. Hàm lượng glucose trong chất nền cao, vượt quá khả năng hấp thụ của sợi nấm sẽ kìm hãm sự sinh trưởng của sợi nấm (Elisashvili, 2012). Hơn nữa sự tồn tại của glucose trong môi trường nhân giống với nồng độ cao sẽ tạo ra áp suất thẩm thấu, gây bất lợi cho sinh tổng hợp và chuyển hóa các chất của sợi nấm. Ngược lại, khi hàm lượng glucose thấp, một số các sản phẩm được tạo ra từ quá trình chuyển hóa nitơ dư thừa cũng sẽ gây ức chế sự tăng sinh hệ sợi của nấm (Ha Thi Hoa & Wang, 2015; Nguyễn Văn

Giang & cs., 2021b). Như vậy hàm lượng glucose tối ưu để bổ sung vào môi trường nhân nuôi nấm mốc blazei Ab-1 là 20 g/l. Kết quả nghiên cứu phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Chính & cs. (2007).

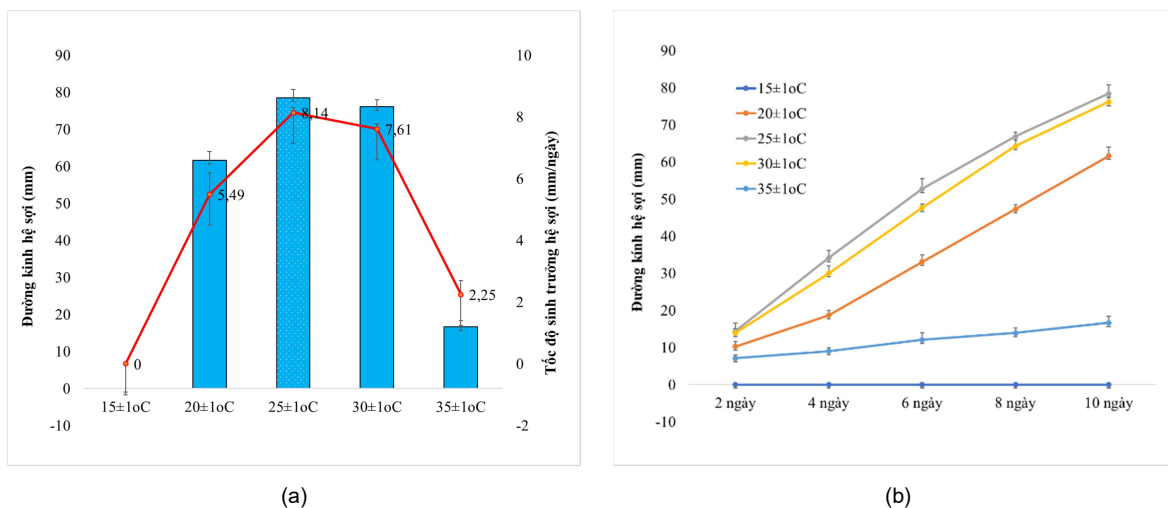
3.4. Ảnh hưởng của pH

Kết quả đánh giá đặc điểm sinh trưởng hệ sợi (Hình 7) chỉ ra rằng sợi nấm *A. blazei* Ab-1 sinh trưởng tốt trên môi trường PA được bổ sung 20 g/l glucose, 1,0 g/l cao nấm men trong phạm vi pH 4-9, với pH tối ưu là 6-7. Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm Ab-1 tại giá trị pH 6-7 đạt $7,61 \pm 0,61$ đến $7,83 \pm 0,83$ mm/ngày, đường kính hệ sợi đạt từ $75,9 \pm 1,86$ đến $77,4 \pm 1,63$ mm sau 10 ngày nuôi; mật độ sợi dày (Hình 8).

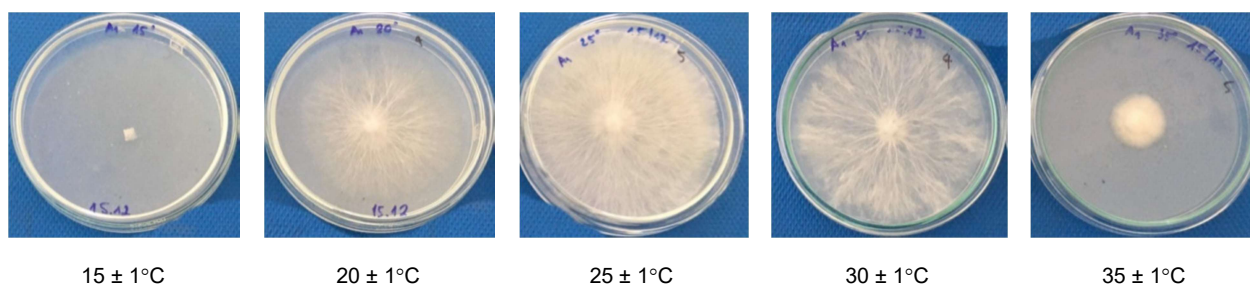
Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng hệ sợi nấm mỡ *Agaricus blazei* Murill Ab-1



Hình 8. Hệ sợi nấm mỡ blazei Ab-1 trên môi trường có pH khác nhau sau 10 ngày ở $26 \pm 1^\circ\text{C}$



Hình 9. (a) Ảnh hưởng của nhiệt độ đến đường kính hệ sợi nấm mỡ blazei Ab-1 sau 10 ngày nuôi cấy; (b) tốc độ sinh trưởng hệ sợi của nấm mỡ blazei Ab-1 sau 2, 4, 6, 8, 10 ngày ở pH 6,0



Hình 10. Hệ sợi mỡ blazei Ab-1 sau 10 ngày nuôi ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau (pH6)

Giá trị pH môi trường nhân nuôi liên quan đến khả năng tiết các enzyme ngoại bào của sợi nấm vào chất nền, các enzyme này thường hoạt động trong phạm vi pH hẹp. Hầu hết các loại nấm sinh trưởng và phát triển hệ sợi thuận lợi ở giá trị pH 6,5-6,8 (Miles & Chang, 1977). Eguchi & cs. (1994) báo cáo mức pH thích hợp cho sinh trưởng của chủng nấm mốc *A. blazei* CJ-01 trên môi trường thạch là 6,0. Phạm vi pH tối ưu là 5-6 cũng được Wasser & cs. (2002) và Danielle (2010) quan sát khi nghiên cứu các đặc điểm nuôi cấy của chủng nấm mốc *A. blazei* ATCC 76739 được thu thập từ Mỹ. Nguyễn Thị Chính & cs. (2007) ghi nhận giá trị pH 7,5 là tối ưu đối với chủng nấm *A. balzei* A15 có nguồn gốc từ Brazil. Danielle (2010) cho rằng, mỗi một chủng nấm *A. balzei* sẽ có những đặc điểm sinh trưởng riêng trong một điều kiện nghiên cứu cụ thể, đây là nguyên nhân dẫn đến sự sai khác về giá trị pH tối ưu giữa các chủng giống. Colauto & cs. (2008) báo cáo rằng giá trị pH 4,5 được coi là lý tưởng cho sự phát triển của sợi nấm trong nhân giống dịch thể (Kawagoe & cs., 2004) và pH từ 6,5 đến 6,8 là lý tưởng khi nuôi trồng trên giá thể compost (Iwade & Mizuno, 1997) đối với nấm mốc *A. brasiliensis*. Như vậy có thể thấy giá trị pH thích hợp của môi trường cũng phụ thuộc vào từng chủng giống. Chủng nấm mốc *blazei* Ab-1 có khả năng thích nghi với pH tương đối rộng (pH 4-9).

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả khảo sát sinh trưởng hệ sợi nấm Ab-1 tại các ngưỡng nhiệt độ nuôi cấy khác nhau (Hình 9) cho thấy hệ sợi nấm mốc *blazei* Ab-1 có khả năng sinh trưởng phát triển tốt ở nhiệt độ 20-30°C, tối ưu ở nhiệt độ 25°C $\pm$ 1 với tốc độ sinh trưởng hệ sợi nhanh nhất (8,14 $\pm$ 0,16 mm/ngày), đường kính hệ sợi sau 10 ngày nuôi đạt 78,44 $\pm$ 2,34mm, mật độ sợi nấm dày. Ở nhiệt độ 35°C $\pm$ 1 hệ sợi nấm mốc Ab-1 sinh trưởng chậm, tốc độ sinh trưởng hệ sợi chỉ đạt 2,25 $\pm$ 0,45 mm/ngày, hệ sợi mỏng. Ở nhiệt độ 15°C $\pm$ 1, hệ sợi nấm mốc Ab-1 không phát triển (Hình 10).

Nhiệt độ nuôi cấy có ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme, thúc đẩy hoặc ức chế các quá

trình trao đổi chất và ảnh hưởng tới tăng trưởng của nấm (Miles & Chang, 1997). Mỗi chủng nấm sẽ phát triển và biểu hiện các đặc điểm sinh học tốt nhất tại ngưỡng nhiệt độ thích hợp (Nguyễn Văn Giang & cs., 2021). Danielle (2010) báo cáo nhiệt độ tối ưu cho sợi nấm *A. blazei* phát triển là 28-29°C, nhiệt độ trên 37°C sẽ ức chế sự phát triển của sợi nấm *A. blazei* và có rất ít hoặc không có sự tăng trưởng hệ sợi của loài nấm này ở nhiệt độ 10°C và 45°C. Nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của *A. blazei* được xác định trong nghiên cứu của Danielle (2010) cao hơn so với báo cáo trước đây của Eguchi & cs. (1994) (26°C) hay của Nguyễn Thị Chính & cs. (2007) (20-25°C). Như vậy, có thể thấy hệ sợi của chủng nấm mốc *blazei* Ab-1 sinh trưởng thuận lợi ở khoảng nhiệt độ khá rộng (25-30°C), nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng là 25°C.

4. KẾT LUẬN

Môi trường nhân giống PA bổ sung 20 g/l glucose và 1 g/l cao nấm nem là môi trường thích hợp cho tăng trưởng hệ sợi nấm mốc *A. blazei* Ab-1, tốc độ sinh trưởng hệ sợi đạt 7,64 $\pm$ 0,14 mm/ngày. Chủng nấm Ab-1 có khả năng sinh trưởng trong phạm vi pH rộng (pH 4-9), trong đó nhân nuôi hệ sợi nấm Ab-1 trong điều kiện pH 6, ở nhiệt độ 25°C $\pm$ 1 hệ sợi nấm đạt tốc độ sinh trưởng nhanh nhất 8,14 $\pm$ 0,16 mm/ngày, đường kính khuẩn lạc 78,44 $\pm$ 2,34mm sau 10 ngày nuôi. Các kết quả của nghiên cứu này góp phần xây dựng quy trình nuôi trồng chủng nấm mốc *blazei* Ab-1 ở quy mô trang trại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ali M.M., Baig M.T, Jabeen A., Aslam M. & Shahid U. (2021). Therapeutic Value of Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murill. Pakistan Journal of Medicine and Dentistry. 10(01): 83-89.
- Bich Thuy Thi Nguyen, Nghien Xuan Ngo, Ve Van Le, Luyen Thi Nguyen, Ry Kana & Huy Duc Nguyen (2019). Optimal culture conditions for mycelial growth and fruiting body formation of Lung Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* strain GA3. Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering. 61(1): 62-67.

- Bich Thuy Thi Nguyen, Ve Van Le, Huyen Trang Thi Nguyen, Luyen Thi Nguyen, Thuy Trang Thi Tran & Nghien Xuan Ngo (2021). Nutritional requirements for the enhanced mycelial growth and yield performance of *Trametes versicolor*. Journal of Applied Biology & Biotechnology. 9(1): 1-7.
- Bilay V.T., Solomko E.F. & Buchalo A.S. (2000). Growth of Edible and Medicinal Mushrooms on Commercial Agar Media. Science And Cultivation Of Edible Fungi. Proceedings Of The 15th International Congress On The Science And Cultivation Of Edible Fungi, Maastricht, Netherlands, A.A. Balkema.
- Chen W.C., Zhao Z., Chen S.F. & Li Y.Q. (2008). Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. Bioresource Technology. 99: 3187-319.
- Cho Y.J., Hwang H.J., Kim W.S., Song C.H. & Yun J.W. (2002). Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. Journal Biotechnology. 95: 13-23.
- Colauto N.B., Aizono P.M., Carvalho L.R.M., Paccola-Meirelles L.D. & Linde G.A. (2008). Temperature and pH conditions for mycelial growth of *Agaricus brasiliensis* on axenic cultivation. Semina: Ciências Agrárias, Londrina. 29(2): 307-312.
- Cui Y.Q., Okkerse W.J., Van der Lans R.G.J.M. & Luyben K.Ch.A.M. (1998). Modeling and measurements of fungal growth and morphology in submerged fermentations. Biotechnology and Bioengineering. 60: 216-229.
- Danielle R.T. (2010). Growth and Therapeutic Properties of *Agaricus blazei*. Environment and Biotechnology Centre Faculty of Life and Social Sciences Swinburne University of Technology. 235p.
- Dias E.S., Gaspar Júnior P.J., Tomizawa M.M., Schwan R.F. & Rinker D.L. (2011). Nutritional Requirements for Growth of *Agaricus brasiliensis*. Acta Scientiarum. Biological Sciences. 33(1): 93-97.
- Eguchi F., Yoshimoto H., Yoshimoto T. & Higaki M. (1994). Physiological factors affecting mycelial growth of *Agaricus blazei*. Mokuzai Gakkaishi. 40(6): 666-671.
- Elisashvili V.I. (2012). Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocesses and Products (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms. 14(3): 211-239.
- Ellertsen L.K., Hetland G., Johnson E. & Grinde B. (2006). Effects of medicinal extract from *Agaricus blazei* Murrill on gene expression a human monocyte cell line as examined by micro arrays and immunoassays. International Immunopharmacol. 6: 133-143.
- Gregori A., Pahor B., Glaser R. & Pohleven F. (2008). Influence of carbon dioxide, inoculum rate, amount and mixing of casing soil on *Agaricus blazei* fruiting bodies yield. Acta Agriculturae Slovenica. 91(2): 371-378.
- Grinde B., Hetland G. & Johnson E. (2006). Effects on gene expression and viral load of a medicinal extract from *Agaricus blazei* in patients with chronic hepatitis C infection. International Immunopharmacology. 6: 1311-1314
- Ha Thi Hoa & Wang C.L. (2015). The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). Mycobiology. 43: 14-23.
- Hamed A., Ghanati F. & Vahid H. (2012). Study on the effects of different culture conditions on the morphology of *Agaricus blazei* and the relationship between morphology and biomass or EPS production. Annals of Microbiology. 62: 699-707.
- Hamed A., Vahidi H. & Ghanati F. (2007). Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exopolysaccharide by *Agaricus blazei* Murrill DPPH 131 using response surface methodology. Biotechnology. 6: 456-464.
- Hwang H.J., Kim S.W., Xu C.P., Choi J.W. & Yun J.W. (2004). Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. Journal of Applied Microbiology. 96: 1296-1305.
- Iwade I. & Mizuno T. (1997). Cultivation of kawariharatake (*Agaricus blazei* Murrill). Food Reviews International. 13(3): 383-390.
- Kawagoe M., Nagaoka Y., Araki M., Yamagami K., Naoe K. & Noda H. (2004). Submerged culture of *Agaricus blazei* mycelium in a bubble column fermentor. Journal of Chemical Engineering of Japan, Tokyo. 37(8): 1056-1061.
- Lê Xuân Thám & Trương Bình Nguyên (2003). Bổ sung vào nhóm nấm chống ung thư ở Việt Nam một loài nấm hiếm: nấm Búp (*Agaricus blazei* Murrill). Tạp chí Dược học Việt Nam. 5: 12-14.
- Lee B.C., Bae J.T. Pyo H.B., Chao T.B., Kim S.W., Hwang G.H. & Yun J.W. (2004). Submerged culture conditions for the mycelial biomass and EPS by the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. Enzyme and Microbial Technology. 35: 369-376.
- Lin J.H. & Yang S.S. (2006). Mycelium and polysaccharide production of *Agaricus blazei* Murrill by submerged fermentation. Journal of microbiology, immunology, and infection. 39(2): 98-108.

- Miles P.G. & Chang S.T. (1997). Mushroom Biology: Concise Basics and Current Developments. World Scientific.
- Misgiati M., Widyawaruyanti A., Raharjo S.J. & Sukardiman S. (2021). Ergosterol Isolated from *Agaricus blazei* Murill N-Hexane Extracts as Potential Anticancer MCF-7 Activity. Pharmacognosy Journal. 13(2): 418-426,
- Nguyễn Thị Chính, Lý Lan Phương, Lý Ngọc Oanh, Phạm Thị Thùy Linh, Nguyễn Hồng Anh & Nguyễn Anh Hoàng (2007). Nghiên cứu đặc điểm sinh học và công nghệ nuôi trồng nấm búp *Agaricus blazei* nhập ngoại có khả năng chống u. Đề tài NCKH Trường Đại học Quốc gia Hà Nội. Mã số QG0526. 127tr.
- Nguyễn Thị Chính, Phạm Thùy Linh, Đinh Hồng Duyên, Bùi Thị Hoa & Nguyễn Thị Khoa (2006). Một số thành phần và hoạt tính sinh học của nấm búp *Agaricus blazei* nuôi trồng ở Việt Nam. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. 85: 43-45.
- Nguyễn Thị Huyền Trang, Lê Văn Vè, Nguyễn Thu Nhường, Ngô Xuân Nghiễn, Nguyễn Thị Luyện, Trần Đông Anh & Nguyễn Thị Bích Thùy (2021). Nâng cao năng suất và sinh trưởng hệ sợi nấm đầu khi (*Hericium erinaceus* (Bull.: fr.) Pers) thông qua tối ưu điều kiện dinh dưỡng. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 19(3): 311-321.
- Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Thị Bích Thuỳ, Vũ Thị Khánh Linh, Nguyễn Duy Trinh & Trần Thu Hà (2021). Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng hệ sợi của nấm *Phellinus linteus*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 63(2): 39-43.
- Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Thị Phương Thảo, Trần Thu Hà & Nguyễn Duy Trinh (2021b). Ảnh hưởng của một số nguồn carbon, nitơ và muối khoáng đến sinh trưởng hệ sợi nấm ngân nhĩ *Tremella fuciformis* Tre-1. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 19(11): 1522-1530.
- Park E.Y., Koike Y., Higashiyama K., Fujikawa S. & Okabe M. (1999). Effect of nitrogen source on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 88: 61- 67.
- Petre M. (2016). Mushroom biotechnology developments and applications. Elsevier/Academic Press. Amsterdam, Boston.
- Rózsa S., Măniuțiu D.N., Marta G.T., Stela D. & Suzana B.B.F. (2016). Research on the biology of the *Agaricus blazei* Murrill mushroom mycelium. Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology. 20(1): 123-126.
- Sorimachi K., Ikehara Y., Maezato G., Okubo A., Yamazaki S., Akimoto K. & Niwa A. (2001). Inhibition by *Agaricus blazei* Murill fractions of cythopathic effect induced by Western Equine Encephalitis (WEE) virus on VERO cells in vitro. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 65:1645-11647.
- Wang H., Fu Z. & Han C. (2013). The Medicinal Values of Culinary - Medicinal Royal Sun Mushroom (*Agaricus blazei* Murrill). Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine. pp. 1-6.
- Wasser S.P., Didukh M.Y., de A. Amazonas M.A., Nevo E., Stamets P. & da Eira A.F. (2002). Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun *Agaricus* (the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill. International Journal of Medicinal Mushrooms. 4(4): 267-290.
- Win T.T. & Ohga S. (2018). Study on the Cultivation of *Agaricus blazei* (Almond Mushroom) Grown on Compost Mixed with Selected Agro-Residues. Advances in Microbiology. 8: 778-789.