

MỤC LỤC

MỤC LỤC	i
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC HÌNH	vii
DANH MỤC BẢNG.....	x
MỞ ĐẦU	11
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	13
1.1. Nấm Linh chi.....	13
1.1.1. Phân loại khoa học	13
1.1.2. Mô tả	14
1.1.3. Đặc điểm sinh thái.....	14
1.1.4. Điều kiện sinh trưởng và phát triển.....	15
1.1.5. Nuôi trồng nấm Linh chi	15
1.1.6. Thành phần hóa học	15
1.1.7. Công dụng	16
1.1.8. Tác dụng sinh học	16
1.1.9. Đa dạng sinh học loài nấm Linh chi.....	17
1.1.10. Chiết xuất dược liệu và điều chế cao thuốc.....	19
1.1.11. Công nghệ sấy phun	21
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	23
2.1. Đối tượng nghiên cứu, chất đối chiếu, dung môi hóa chất và thiết bị.....	23
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	23
2.1.2. Chất đối chiếu, dung môi, thuốc thử, trang thiết bị, dụng cụ	23
2.2. Phương pháp nghiên cứu	25
2.2.1. Mục tiêu 1: Điều tra đánh giá tiềm năng, nghiên cứu khả năng phát triển nguồn gen của một số loài nấm Linh chi (<i>Ganoderma</i> spp.) có giá trị của khu vực Tây Nguyên 25	
2.2.2. Mục tiêu 2: Nghiên cứu nhân giống, phát triển, ứng dụng tạo ra 4 sản phẩm từ các loài nấm Linh chi (<i>Ganoderma</i> spp.) ở khu vực Tây Nguyên	31

2.2.3.	Mục tiêu 3: Chuyển giao công nghệ, phục vụ khai thác, bảo tồn và phát triển một số loài nấm Linh chi (<i>Ganoderma</i> spp.) tại Tây Nguyên.....	34
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU		36
3.1.	Thu thập mẫu, điều tra vùng phân bố nấm Linh chi tại khu vực Tây Nguyên và các vùng lân cận như: Quảng Nam, Huế, Tây Nam Bộ.....	36
3.1.1.	Xây dựng kế hoạch thu mẫu nghiên cứu gồm các thông tin khu vực thu mẫu, số lượng thu mẫu, thời gian thu mẫu	36
3.1.2.	Thiết kế mẫu phiếu điều tra	45
3.1.3.	Tiến hành thu mẫu nghiên cứu theo kế hoạch, thu mẫu khô và cả mẫu tươi, thiết lập điều kiện bảo quản và lưu trữ mẫu nghiên cứu	46
3.1.4.	Phân loại mẫu thu được dựa trên hình thái quả thể, mã hóa mẫu theo khu vực thu mẫu, bảo quản và lưu trữ mẫu:	50
3.1.5.	Phân tích phiếu điều tra để xác định ít nhất 3 loài tiềm năng thuộc Linh chi <i>Ganoderma</i> spp	58
3.2.	Phân tích các đặc điểm sinh học, sinh thái, định danh và nghiên cứu dấu vân tay sinh học.....	58
3.2.1.	Định danh tên khoa học mẫu nấm Linh chi thu được dựa trên hình hình dạng bào tử và dựa vào khóa phân loại Nấm	58
3.2.2.	Phân tích đặc điểm hình thái, sinh thái mẫu và điều kiện tự nhiên, môi trường, sinh thái khu vực thu mẫu (nhiệt độ, độ ẩm, độ cao, độ che phủ dưới tán...)	71
3.2.3.	Mô hình hồi quy đa biến dự báo tần số xuất hiện (mật độ) của các loài nấm liên quan tới các nhân tố sinh thái (nhiệt độ, độ ẩm, độ cao và cường độ chiếu sáng).....	76
3.2.4.	Nghiên cứu dấu vân tay sinh học (DNA fingerprint) của các mẫu thuộc chi <i>Ganoderma</i>	77
3.2.5.	Xây dựng hồ sơ dược liệu bao gồm: tên khoa học, bộ ảnh, tiêu bản khô, đặc điểm hình thái, sinh thái, dấu vân tay sinh học	84
3.3.	Xác định thành phần hóa học trong một số phân đoạn chiết từ các mẫu nấm Linh chi <i>Ganoderma</i> spp.;.....	107
3.3.1.	Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hoá học các hợp chất đặc trưng trong các mẫu nấm Linh chi <i>Ganoderma</i> spp.	107
3.3.2.	Quy trình phân lập, tinh chế acid ganoderic A, B	116
	Thăm dò hệ dung môi cho sắc ký cột cô điển.....	118

Tiến hành sắc ký cột cổ điển.....	118
3.3.3. Thiết lập chất đối chiếu từ nấm Linh chi.....	125
3.4. Đánh giá tiềm năng, khả năng phát triển nguồn dược liệu nấm Linh chi tại Tây Nguyên	129
3.4.1. Khảo sát tác dụng sinh học (điều hòa đường huyết, điều hòa lipid, chống oxy hóa, bảo vệ gan) của một số mẫu nấm Linh chi Tây Nguyên.....	130
3.4.2. Khảo sát dấu vân tay sắc ký của 1 số mẫu nấm Linh chi Tây Nguyên và các vùng khác	142
3.4.3. Khảo sát, đánh giá ảnh hưởng môi trường, điều kiện sinh thái đến khả năng bảo tồn và phát triển nấm Linh chi Tây Nguyên.....	147
3.4.4. Phương án bảo tồn.....	152
3.5. Nghiên cứu xây dựng và ứng dụng quy trình nuôi trồng một số chủng nấm Linh chi Tây Nguyên.....	155
3.5.1. Thu bào tử nấm.....	155
3.5.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của hệ sợi nấm của 03 loài nấm thuộc chi <i>Ganoderma</i> : <i>Ganoderma applanatum</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Ganoderma fornicatum</i> và 2 loài <i>Ganoderma tropicum</i> , <i>Amauroderma subresinosum</i>	159
3.5.3. Quy trình nuôi trồng 04 loài nấm thuộc chi <i>Ganoderma</i> : <i>Ganoderma applanatum</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Ganoderma fornicatum</i> , <i>Ganoderma tropicum</i> và 1 loài <i>Amauroderma subresinosum</i>	164
3.6. Nghiên cứu quy trình sản xuất nấm Linh chi Tây Nguyên đóng gói chất lượng cao.....	182
3.6.1. Nghiên cứu quy trình sản xuất nấm Linh chi	182
3.6.2. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) Linh chi Tây Nguyên.....	188
3.6.3. Đóng gói và bảo quản sản phẩm nấm Linh chi Tây Nguyên	197
3.7. Nghiên cứu quy trình bào chế rượu Linh chi Tây Nguyên đạt chất lượng làm thực phẩm chức năng.	200
3.7.1. Xây dựng quy trình ngâm chiết và sản xuất rượu Linh chi.....	200
3.7.2. Xây dựng tiêu chuẩn, thẩm định tiêu chuẩn và công bố chất lượng rượu Linh chi.	204

3.8. Nghiên cứu quy trình bào chế cao Linh chi Tây Nguyên đạt TCCS cho 3 loại cao linh chi giàu hoạt chất (cao toàn phần, cao giàu polysaccharid và cao giàu triterpenoid).....	208
3.8.1. Nghiên cứu quy trình chiết xuất, bào chế 3 loại cao Linh chi giàu hoạt chất nêu trên	208
3.8.2. Thử độc tính và một số tác dụng dược lý của cao Linh chi Tây Nguyên.....	213
3.8.3. Theo dõi, đánh giá độ ổn định của chế phẩm	228
3.8.4. Bào chế và đóng gói cao Linh chi toàn phần giàu hoạt chất, 1.000 lọ x 100 g cao/lọ	233
3.9. Nghiên cứu quy trình bào chế nang mềm Linh chi bào chế từ cao Linh chi toàn phần giàu hoạt chất quy mô 10.000 nang/mẻ	233
3.9.1. Nghiên cứu xây dựng công thức nang mềm Linh chi	233
3.9.2. Xây dựng, thẩm định TCCS cho viên nang mềm Linh chi	240
3.9.3. Theo dõi, đánh giá độ ổn định của chế phẩm	245
3.10. Hợp tác với doanh nghiệp xây dựng cơ sở sản xuất các sản phẩm linh chi, đầu tư dây chuyền công nghệ bào chế; chuyển giao sản phẩm	248
3.10.1. Chuyển giao công nghệ nhân giống, nuôi trồng và bào chế các sản phẩm từ nấm Linh chi Tây Nguyên; Ký kết các hợp đồng chuyển giao công nghệ nhân giống, nuôi trồng và bào chế các sản phẩm từ nấm Linh chi Tây Nguyên.....	248
3.10.2. Đào tạo cán bộ chuyển giao công nghệ nhân giống, nuôi trồng và bào chế các sản phẩm từ nấm Linh chi Tây Nguyên.....	249
3.11. Đăng ký lưu hành sản phẩm	250
3.11.1. Thiết kế bao bì nhãn mác cho các sản phẩm	250
3.11.2. Đăng ký nhãn hiệu sản phẩm và xây dựng hồ sơ công bố thực phẩm chức năng (TPCN) hoặc hồ sơ đăng ký thuốc cho các sản phẩm đã nêu	253
3.12. Đăng ký bản quyền thương hiệu Nấm Linh chi của Tây Nguyên	254
3.12.1. Chuyển giao, hợp tác với doanh nghiệp tại Tây Nguyên phát triển các nhãn hiệu của sản phẩm từ Linh chi Tây Nguyên trong đó có 4 loại sản phẩm của đề tài (Linh chi, rượu Linh chi, cao Linh chi, nang mềm Linh chi), bảo hộ nhãn hiệu sản phẩm;..	254
3.12.2. Cùng doanh nghiệp xây dựng chiến lược truyền thông Marketing cho các sản phẩm nêu trên bao gồm: tổ chức hội thảo, xây dựng phim tài liệu, chương trình TVC quảng cáo truyền hình và các phương tiện truyền thông báo, đài, website.....	260

3.12.3. Đăng ký bảo hộ thương hiệu nấm Linh chi Tây Nguyên bao gồm chỉ dẫn địa lý	261
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN	263
CHƯƠNG 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	267
5.1. Kết luận:	267
5.2. Đề nghị	269
TÀI LIỆU THAM KHẢO	270

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Từ nguyên	Ý nghĩa
ĐDVN V		Dược điển Việt Nam V
HL		Hàm lượng
RSD	Relative standard deviation	Độ lệch chuẩn tương đối
R _s	Resolution	Độ phân giải
S/N	Signal/Noise	Tỉ lệ tín hiệu/nhiều
SKLM		Sắc ký lớp mỏng
HKCMMS	Hong Kong Chinese materia medica standards	Dược điển Hong Kong
S _{pic}		Diện tích pic
t _R	Retention time	Thời gian lưu
TP		Toàn phần
CHCl ₃	Cloroform	
ĐDVN		Dược điển Việt Nam
EtOAc	Ethyl acetat	
EtOH	Ethanol	
GA	Ganoderic acid	
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
IR	Infrared	(Phổ) hồng ngoại
IT-TOF	Ion Trap – Time of Flight	
MeOH	Methanol	
DCM	Dichloromethan	
MS	Mass Spectroscopy	Phổ khối
NLC		Nấm Linh Chi
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân
PCR	Polymerase Chain Reaction	Kỹ thuật khuếch đại gen
PDA	Photo Diode Array	Dãy diod quang
RAPD	RAPD	Kỹ thuật phân tích đa dạng DNA khuếch đại ngẫu nhiên
SKĐC		Sắc ký lỏng điều chế
TCKT		Tiêu chuẩn kỹ thuật
CC	Column chromatography	Sắc ký cột
KTCL		Kiểm tra chất lượng
SKĐ		Sắc ký đồ
Cf	Cloroform	

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Lục bảo Linh chi	14
Hình 1.2.	Quy trình điều chế cao thuốc và các yếu tố ảnh hưởng	20
Hình 3.1.	Bản đồ đa dạng nấm Linh chi Ganoderma ở khu vực Tây Nguyên	44
Hình 3.2.	- Đặc điểm mẫu lõi của bào tử họ Ganodermataceae Donk.	59
Hình 3.3.	Đa dạng về hình thái của bào tử nấm họ Ganodermataceae Donk	60
Hình 3.4.	Mặt cắt ngang của ống nấm	60
Hình 3.5.	Đặc trưng nhận diện bào tử chi Ganoderma,	60
Hình 3.6.	Đặc trưng nhận diện bào tử chi Amauroderma	61
Hình 3.7.	Phân bố các loài nấm họ Ganodermataceae Donk theo kiểu rừng	71
Hình 3.8.	Tỷ lệ % các loài nấm họ Ganodermataceae Donk theo kiểu rừng	71
Hình 3.9.	Phân bố các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae Donk theo độ cao	72
Hình 3.10.	Tỷ lệ % các loài nấm họ Ganodermataceae Donk theo độ cao	72
Hình 3.11.	Phân bố các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae theo nhiệt độ	73
Hình 3.12.	Tỷ lệ % các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae theo nhiệt độ	73
Hình 3.13.	Phân bố các loài nấm họ Ganodermataceae theo độ ẩm	74
Hình 3.14.	Tỷ lệ % các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae theo độ ẩm	74
Hình 3.15.	Phân bố các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae theo cường độ ánh sáng ..	75
Hình 3.16.	Tỷ lệ % các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae theo cường độ ánh sáng ..	75
Hình 3.17.	DNA tổng số của 43 mẫu của các loài nấm họ Ganodermataceae	78
Hình 3.18.	Phổ điện di sản phẩm PCR với cặp mồi ITS1/ITS5 trên 43 mẫu của các loài nấm họ Ganodermataceae	78
Hình 3.19.	Cây quan hệ phát sinh chủng loại giữa các mẫu nghiên cứu	82
Hình 3.20.	<i>Amauroderma coltricioides</i>	85
Hình 3.21.	<i>Amauroderma conjunctum</i>	85
Hình 3.22.	<i>Amauroderma exile</i>	86
Hình 3.23.	<i>Amauroderma niger</i>	86
Hình 3.24.	<i>Amauroderma rude</i>	87
Hình 3.25.	<i>Amauroderma rugosum</i>	87
Hình 3.26.	<i>Amauroderma subresinosum</i>	88
Hình 3.27.	<i>Amauroderma sp1</i>	88
Hình 3.28.	<i>Amauroderma sp2</i>	89

Hình 3.29.	<i>Amauroderma sp3</i>	89
Hình 3.30.	<i>Ganoderma adpersum</i>	90
Hình 3.31.	<i>Ganoderma applanatum</i>	90
Hình 3.32.	<i>Ganoderma amboinense</i>	91
Hình 3.33.	<i>Ganoderma australe</i>	91
Hình 3.34.	<i>Ganoderma balabacense</i>	92
Hình 3.35.	<i>Ganoderma capense</i>	92
Hình 3.36.	<i>Ganoderma cochlear</i>	93
Hình 3.37.	<i>Ganoderma croflavum</i>	93
Hình 3.38.	<i>Ganoderma flexipes</i>	94
Hình 3.39.	<i>Ganoderma fornicatum</i>	94
Hình 3.40.	<i>Ganoderma gibbosum</i>	95
Hình 3.41.	<i>Ganoderma lobatum</i>	95
Hình 3.42.	<i>Ganoderma lucidum</i>	96
Hình 3.43.	<i>Ganoderma mastoporum</i>	97
Hình 3.44.	<i>Ganoderma multiplicatum</i>	97
Hình 3.45.	<i>Ganoderma multipileum</i>	98
Hình 3.46.	<i>Ganoderma oroflavum</i>	98
Hình 3.47.	<i>Ganoderma philippii</i>	99
Hình 3.48.	<i>Ganoderma preifferi</i>	99
Hình 3.49.	<i>Ganoderma pseudoferreum</i>	100
Hình 3.50.	<i>Ganoderma sessiliforme</i>	100
Hình 3.51.	<i>Ganoderma steyaertanum</i>	101
Hình 3.52.	<i>Ganoderma subtornatum</i>	101
Hình 3.53.	<i>Ganoderma tornatum</i>	102
Hình 3.54.	<i>Ganoderma triangulatum</i>	102
Hình 3.55.	<i>Ganoderma tropicum</i>	103
Hình 3.56.	<i>Ganoderma sp1</i>	103
Hình 3.57.	<i>Ganoderma sp2</i>	104
Hình 3.58.	<i>Ganoderma sp3</i>	105
Hình 3.59.	<i>Ganoderma sp 4</i>	105
Hình 3.60.	<i>Ganoderma sp5</i>	105

Hình 3.61.	<i>Ganoderma sp.6</i>	106
Hình 3.62.	<i>Ganoderma sp.7</i>	106
Hình 3.63.	Sắc ký đồ xác định độ tinh khiết của các hợp chất A, B và C bằng HPLC ..	110
Hình 3.64.	Sơ đồ tách phân đoạn từ cao A bằng dung môi hữu cơ	117
Hình 3.65.	Sắc ký đồ SKLM các phân đoạn thu được từ SKC cô điển.....	118
Hình 3.66.	Hình SKLM bột thu được sau khi SKC cô điển	119
Hình 3.67.	Sắc ký đồ các chất trên sắc ký lỏng điều chế lần 2.....	121
Hình 3.68.	Sơ đồ kết quả sắc ký lỏng điều chế của GA,GB.....	121
Hình 3.69.	Tinh thể GA sau khi sắc ký lỏng điều chế	121
Hình 3.70.	Tinh thể GB sau khi sắc ký lỏng điều chế	121
Hình 3.71.	Hình ảnh tế bào quan sát dưới kính hiển vi soi ngược sau 48 giờ xử lý (x20)	142
Hình 3.72.	Giống cấp 1 sau khi được phân lập.....	167
Hình 3.73.	Quả thể Nấm nuôi trồng ở ngày thứ 50	172
Hình 3.74.	Quả thể Nấm nuôi trồng ở ngày thứ 65	172
Hình 3.75.	Quy trình nuôi trồng Nấm <i>Ganoderma lucidum</i>	173
Hình 3.76.	Môi trường lỏng mới được cấy giống.....	176
Hình 3.77.	Môi trường lỏng mới được cấy giống <i>Ganoderma fornicatum</i>	177

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1.	Danh mục chất đối chiếu, dung môi, thuốc thử	23
Bảng 2.2.	Danh mục trang thiết bị.....	24
Bảng 2.3.	Danh mục dụng cụ	24
Bảng 3.1.	Kế hoạch thu hoạch mẫu điều tra tại khu vực Tây Nguyên và các vùng lân cận	45
Bảng 3.2.	Kết quả thu nhận thực tế tại các khu vực nghiên cứu	46
Bảng 3.3.	Kết quả mô tả mẫu thu nhận theo từng khu vực thu hái	50
Bảng 3.4.	Hệ số tương đồng của từng cặp mẫu.....	80
Bảng 3.5.	Các phân đoạn thu được từ cao A sau khi chiết phân bố lỏng-lỏng	117
Bảng 3.6.	Bảng so sánh kết quả ^1H , ^{13}C của acid ganoderic A [1] và hợp chất GA	122
Bảng 3.7.	Bảng so sánh kết quả ^1H , ^{13}C của acid ganoderic B và hợp chất GB	124
Bảng 3.8.	Kết quả đánh giá liên phòng Acid ganoderic A.....	128
Bảng 3.9.	Kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm	129
Bảng 3.10.	Nồng độ insulin trong mẫu thử ($\mu\text{IU}/\text{mg}$ protein) ở 2 nồng độ glucose.	134
Bảng 3.11.	Bảng số lượng nấm thu được:	147
Bảng 3.12.	Chương trình pha động HPLC định lượng triterpen	195
Bảng 3.13.	Độ ổn định lão hóa cấp tốc của cao Linh chi giàu triterpenoid	228
Bảng 3.14.	Độ ổn định cao toàn phần Linh chi	229
Bảng 3.15.	Độ ổn định của cao Linh chi giàu polysaccharid	231
Bảng 3.16.	Báo cáo độ ổn định viên nang mềm Linh chi	245

MỞ ĐẦU

Linh chi (*Ganoderma lucidum*) là một loại dược liệu được trồng trọt từ lâu đời, là một loại dược liệu quý hiếm, được ghi trong sách “Thần Nông bản thảo” từ 2000 năm trước. Linh chi được coi là một sản vật quý hiếm của đất rừng Đại Nam, nổi bật với các tác dụng như: kiện não, bảo can, cường tâm, kiện vị, cường phế, giải độc, giải cảm và giúp con người sống lâu, tăng tuổi thọ.

Giá trị dược lý của Linh Chi càng được khẳng định khi Hội nghị Năm học thế giới thành lập Viện nghiên cứu Linh Chi Quốc tế tại New York.. Một trong hai nhóm hoạt chất chính được nghiên cứu nhiều nhất trong Linh chi được triterpen – nhóm chất có tiềm năng được trong việc phòng ngừa và hỗ trợ điều trị nhiều bệnh khác nhau, đặc biệt giúp ngăn chặn các gốc tự do, chống lại các tế bào khối u và sự phát triển của các tế bào ung thư. Với công dụng phong phú và đa dạng, các chế phẩm từ nấm Linh chi ra đời ngày càng nhiều nhằm phục vụ chăm sóc sức khỏe của người dân. Tuy nhiên, ĐĐVN V chỉ mới kiểm soát hàm lượng chất chiết được trong dược liệu chưa kiểm soát các nhóm hoạt chất như triterpenoid, Dược điển Mỹ cũng đã xây dựng chuyên luận kiểm soát chất lượng Linh Chi dựa trên 10 triterpenoid sử dụng chất chuẩn chính là acid ganoderic A và cao chuẩn nhưng các hoạt chất này có giá thành khá cao và khó khăn khi nhập khẩu, vì vậy cần có nghiên cứu về phân lập và điều chế các chất đối chiếu này.

Nằm trong khu vực nhiệt đới gió mùa, Việt Nam có lượng mưa lớn quanh năm với rừng xanh nhiệt đới, đây là điều kiện thuận lợi cho các loài nấm phát triển. Ganoderma là loại nấm bán ký sinh, trên các dạng thân gỗ mục, phân bố trên khắp dọc đất nước từ dãy Hoàng Liên Sơn đến dãy Trường Sơn, khu vực Tây Nguyên, kéo dài đến vùng Đông Nam Bộ, và các rừng mưa ở Phú Quốc. Vì vậy, sự đa dạng của Ganoderma đã được nhiều nhà khoa học công bố như Nấm lớn ở Việt Nam của GS.TSKH.Trịnh Tam Kiệt hay những công bố về nấm rừng Tây Nguyên của TS. Nguyễn Phương Đại Nguyên,... Tuy nhiên, chưa có điều tra tổng thể nào về các loài nấm Linh chi ở Tây Nguyên, đánh giá tiềm lực của nguồn dược liệu quý giá này và có phương án bảo tồn, phát triển trong tương lai.

Hiện nay, Linh chi đỏ được trồng và bán khá nhiều trên thị trường, tuy nhiên chủ yếu dưới dạng nông nghiệp hoặc 1 số dược liệu, cao dược liệu và thuốc đông dược. Cần phát triển đa dạng hơn nữa các dòng sản phẩm tinh từ Linh chi nhằm giải quyết các vấn đề về đầu ra cho người nuôi trồng. Đồng thời, phải hướng tới việc kiểm soát nuôi trồng, chất lượng Linh chi theo quy trình đạt chất lượng để đáp ứng nhu cầu làm thuốc, thực phẩm chức năng cho thị trường và hướng tới xuất khẩu.

Xuất phát từ các nhu cầu trên, đề tài “**Nghiên cứu, ứng dụng và chuyển giao công nghệ phục vụ khai thác, bảo tồn và phát triển một số chế phẩm từ một vài loài nấm Linh chi (*Ganoderma spp.*) tại khu vực Tây Nguyên**” với các mục tiêu:

1. Điều tra đánh giá tiềm năng, nghiên cứu khả năng phát triển nguồn gen của một số loài nấm Linh chi (*Ganoderma spp.*) có giá trị của khu vực Tây Nguyên
2. Nghiên cứu nhân giống, phát triển, ứng dụng, tạo ra 4 sản phẩm từ các loài nấm Linh chi (*Ganoderma spp.*) ở khu vực Tây Nguyên;
3. Chuyển giao công nghệ, phục vụ khai thác, bảo tồn và phát triển một số loài nấm Linh chi (*Ganoderma spp.*) tại Tây Nguyên

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Nấm Linh chi

1.1.1. Phân loại khoa học

- Giới: Fungi
- Ngành: Basidiomycota
- Lớp: Agaricomycetes
- Bộ: Polyporales
- Họ: Ganodermataceae.

Họ nấm Linh chi gồm 5 chi: *Ganoderma* Karst, *Amauroderma* Murr, *Humphreya* Stey và *Haddowia* Stey, *Tomophagus*. Tuy nhiên, phần lớn nấm Linh chi nằm trong 2 chi *Ganoderma* Karst và *Amauroderma* Murr, trong đó chủ yếu vẫn là chi *Ganoderma* Karst với khoảng 219 loài [99].

Họ Ganodermataceae trước đây được xếp trong nhóm nấm đa lỗ (polypore), cho đến năm 1993, vẫn duy trì trong họ Polyparaceae sensu lato. Cách đây khoảng gần 50 năm, họ Ganodermataceae Donk (1948) đã được thừa nhận tồn tại tự nhiên theo luật danh pháp [20].

Chi *Ganoderma* có thể quả thường bóng láng. Bản thân tên chi *Ganoderma* cũng thể hiện được hình thái thể quả bên ngoài (*derma* nghĩa là lớp vỏ, *gano* nghĩa là láng bóng). Các loài *Ganoderma* được tìm thấy trên khắp thế giới, và các đặc điểm khác nhau, như hình dạng và màu sắc thể quả (đỏ, đen, xanh, trắng, vàng và tím). Tuy nhiên đặc điểm hình thái có thể thay đổi do sự khác biệt về trồng trọt ở các vị trí địa lý khác nhau trong các điều kiện khí hậu khác nhau và sự phát triển di truyền tự nhiên của các cá thể loài (ví dụ, đột biến, tái kết hợp). Do đó, việc sử dụng các đặc điểm hình thái để phân loại dễ dẫn đến lẫn lộn, chồng chéo và không rõ ràng đối với loại nấm này. Karsten (1881), nhà nấm học người Phần Lan, đã tách và xây dựng chi nấm *Ganoderma* thành một chi độc lập dựa trên bào tử đảm có lớp vỏ kép, hình trứng cụt, bề mặt sần sùi có mụn cóc nhỏ. Đây là bước tiên quan trọng trong việc nghiên cứu và phân loại họ nấm Ganodermataceae.

1.1.2. Mô tả

Nấm linh chi còn có những tên khác như Tiên thảo, Nấm trường thọ, Vạn niên nhung, ... Trung quốc thường gọi linh chi dưới cái tên là Lingzhi; Nhật gọi là Reishi, Munnertake và Sachitake, trong khi Hàn gọi là Youngzhi. Nấm Linh chi thường được dùng để gọi chung cho các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae.

Từ thời xưa đã nhắc tới 6 loại linh chi hay gập (lục bảo linh chi), phân biệt theo màu sắc là xanh, đỏ, trắng, vàng, đen và tím, trong đó loại linh chi màu đỏ (có màu thay đổi từ nâu đến đỏ vàng và đỏ cam) có tác dụng phòng và điều trị bệnh tốt nhất.



Hình 1.1. Lục bảo Linh chi

1.1.3. Đặc điểm sinh thái

Môi trường sống của nấm thường ở rừng kín xanh ẩm, độ cao từ vài chục mét đến 1500m. Nấm Linh chi thường hoại sinh trên gỗ mục, thuộc đại diện của các họ Caesalpiniaceae (lim, lim xẹt, muồng đen, me,...) và Fabaceae (một số loài thuộc các chi *Quercus*, *Lythocapus*, *Castanopsis*...). Nấm phát triển tốt trong điều kiện bóng râm và có ánh sáng khuếch tán yếu. Nấm Linh chi sinh sản chủ yếu bằng bào tử nằm ở mặt dưới của thể quả. Phần có chức năng sinh dưỡng chính là hệ sợi của nấm mọc ẩn trong gỗ mục hoặc đất. Chỉ có 2 hoặc 3 trong số 10.000 cây gỗ mục mới có sự phát triển của nấm Linh chi, do đó, nấm tự nhiên cực kỳ hiếm. Tuy nhiên, ngày nay, người ta đã có thể nuôi trồng nấm Linh chi trong nhà.

1.1.4. Điều kiện sinh trưởng và phát triển

Nấm có khả năng sản xuất enzyme ngoại bào, những enzyme ngoại bào giúp cho nấm biến đổi những chất hữu cơ phức tạp thành dạng hòa tan dễ hấp thụ. Chính vì vậy, nấm linh chi có đời sống dị dưỡng, lấy thức ăn từ nguồn hữu cơ, thức ăn được hấp thụ qua màng tế bào hệ sợi nấm.

1.1.5. Nuôi trồng nấm Linh chi

Nấm linh chi bắt đầu được trồng từ năm 1621 ở Trung Quốc [47], nhưng mãi đến năm 1971, sau khi nhà khoa học Nhật Bản là Zenzaburo Kasai và Yukio Naoi (Đại học Kyoto) trồng thành công trong phòng thí nghiệm thì kỹ thuật trồng mới bắt đầu được phổ biến, lan sang Trung Quốc, Hàn Quốc, Thái Lan, . . . và Việt Nam. Đến năm 1997, trong hội nghị quốc tế về Linh chi tại Nhật Bản, sản lượng Linh Chi được thống kê trên thế giới khoảng 4.300 tấn/năm, riêng Trung Quốc đạt được khoảng 3.000 tấn, còn lại là các nước như Hàn Quốc, Nhật Bản, Đài Loan, Hoa Kỳ, Thái Lan, Malaysia, Việt Nam, Sri Lanka và Indonesia. Nhật Bản tuy đã tìm ra cách trồng nhưng chỉ đạt sản lượng 500 tấn mỗi năm. Đến năm 2005, theo báo cáo của hội nghị quốc tế về nấm và các sản phẩm nấm tổ chức tại Thượng Hải, riêng sản lượng Linh chi của Trung Quốc là hơn 49.000 tấn/năm.

1.1.6. Thành phần hóa học

Hầu hết, nấm Linh chi tươi chứa khoảng 90 % nước theo trọng lượng, 10 % còn lại bao gồm protein 10-40 %, 2-8 % chất béo, 3-28 % carbohydrat, 3-32 % chất xơ, 8-10 % tro, và một số vitamin và khoáng chất chính như: kali, canxi, photpho, magnesi, selen, sắt, kẽm, đồng, ...[43]. Trong thành phần không bay hơi của nấm Linh chi, có chứa 1,8 % tro, 26-28 % carbohydrat, 3-5 % chất béo thô, 59 % chất xơ thô, và 7-8 % protein thô [93].

Ngoài ra, nấm có chứa một loạt các chất có hoạt tính sinh học, chẳng hạn như terpenoid, steroid, phenol, nucleotid và các dẫn xuất của chúng, glycoprotein, và polysaccharides. Protein nấm có chứa tất cả các acid amin thiết yếu, rất giàu lysin và leucin. Tổng hàm lượng chất béo thấp và tỷ lệ cao các đa acid béo không bão hòa tương đối so với tổng số acid béo của nấm được coi là đóng góp đáng kể cho giá trị sức khỏe của nấm [43], [46], [109]. Các Polysaccharid, peptidoglycan, và triterpen là

ba nhóm hoạt chất sinh học chính trong nấm Linh chi [42]. Tuy nhiên, số lượng và tỷ lệ của từng thành phần này là khác nhau, có thể thay đổi trong các sản phẩm tự nhiên và thương mại. Sự khác biệt này có thể do các loài hay chủng nấm khác nhau hay phương pháp sản xuất khác nhau.

1.1.7. Công dụng

Nấm linh chi là một vị thuốc đã được ghi trong bản tập sách “Thần nông bản thảo” viết cách đây khoảng 2000 năm và sau này được đề cập trong “Bản thảo cương mục” của tác giả Lý Thời Trân năm 1595 [16]. Trong số 6 loại linh chi hay gập (lục bảo linh chi), phân biệt theo màu sắc là xanh, đỏ, trắng, vàng, đen và tím. Loại linh chi màu đỏ (có màu thay đổi từ nâu đến đỏ vàng và đỏ cam) có tác dụng phòng và điều trị bệnh tốt nhất. Bởi vậy, linh chi đỏ được dùng rộng rãi trên thế giới.

Theo Y học cổ truyền, nấm linh chi có vị nhạt, tính ấm, có tác dụng tư bổ cường tráng. Y học cổ truyền Trung Quốc, nấm Linh Chi xếp đứng đầu trong nhóm “thượng dược” với chức năng điều hòa các hoạt động chuyển hóa trong cơ thể, kéo dài tuổi thọ, tăng khả năng đề kháng của cơ thể đối với những tác động bất lợi của môi trường xung quanh. Ở Việt Nam, nấm Linh chi cũng được sử dụng làm dược liệu từ rất sớm. Từ thời Lê Quý Đôn (1726-1784), nấm Linh chi đã được đánh giá rất cao: nấm Linh chi là một sản vật quý hiếm của đất rừng Đại Nam, với nhiều tác dụng như: Kiện não, bảo can, cường tâm, kiện vị, cường phế, giải độc, giải cảm và giúp con người sống lâu, tăng tuổi thọ.

Linh chi được ứng dụng trong y học hiện đại để điều trị các bệnh tim mạch, xơ vữa động mạch, bệnh viêm gan, bệnh viêm khớp, viêm phổi, cao huyết áp, ung thư, viêm loét dạ dày tá tràng; tác dụng chống dị ứng, bảo vệ và khử độc gan, bệnh rối loạn đường huyết cũng đã được công bố.

1.1.8. Tác dụng sinh học

Nấm Linh chi đã được sử dụng từ rất lâu đời, được coi là một trong những “thượng dược” với rất nhiều công dụng, tác dụng. Ngày nay, đặc biệt quan tâm nhiều hơn đến các tác dụng chống lão hóa, tổn thương não gây bởi chứng thiếu máu cục bộ, bệnh viêm gan do virus, cải thiện rối loạn chức năng tinh dịch nam giới, hạ mỡ máu,

suy giảm miễn dịch và chống ung thư. Rất nhiều các nghiên cứu làm sáng tỏ các tác dụng này của nấm Linh chi.

1.1.9. Đa dạng sinh học loài nấm Linh chi

Ở Việt Nam, từ những năm 1980, trong nghiên cứu về nấm lớn ở Việt Nam, Trịnh Tam Kiệt [15] đã nêu những đặc trưng cơ bản để nhận biết và mô tả một số loài của 5 ngành, 21 lớp, 39 bộ, trong đó, họ Ganodermataceae được mô tả có 86 loài. Sau đó, các nghiên cứu về nấm Linh chi được tiến hành chuyên sâu hơn.

Năm 1996, Lê Xuân Thám và cs. đã chứng minh được mối liên hệ về cấu trúc bào tử đảm của chi *Ganoderma* Karst và *Haddowia* Stey khi nghiên cứu cấu trúc bào tử của loài *G. pseudoferrum*. Tiếp đến, Lê Bá Dũng [7] cho rằng thành phần loài của họ Ganodermataceae khá đa dạng về cấu trúc bào tử, bào tầng, hình dạng quả thể, tuy nhiên, cấu trúc bào tử được ổn định nhất, ít biến đổi so với các đặc điểm khác khi điều kiện môi trường thay đổi. Đây là đặc điểm quan trọng để làm căn cứ phân loại.

Năm 2007, nhóm nghiên cứu Ngô Anh đã liệt kê 36 loài thuộc 1 chi của họ Ganodermataceae khi nghiên cứu về nấm dược liệu ở Thừa Thiên Huế. Lê Xuân Thám [27] trong quá trình điều tra xây dựng bảo tàng nấm ở Vườn quốc gia Cát Tiên từ năm 2005 - 2010, đã nghiên cứu, chụp hình được trên 30 loài, thuộc đầy đủ 4 chi và 1 chi mới, trong đó có đến 12 loài là bổ sung mới (phát hiện đầu tiên tại Cát Tiên và Việt Nam): *Amauroderma subresinosum*, *Amauroderma schomburgkii*, *Amauroderma ramosii*, *Amauroderma spp.1 - 4*, *Humphreya endertii*, *Haddowia longipes*, *Ganoderma ochrolaccatum*, *Ganoderma cupreolaccatum*, *Ganoderma thanglongense*, *G. curtisii*, *G. resinaceum*, *G. microsporum*, *G. koningsbergii* và *G. weberianumi*, *Ganoderma spp.1 - 4* ...

Riêng tại khu vực Tây Nguyên, đến năm 2013, Nguyễn Phương Đại Nguyên [20] đã liệt kê và mô tả khá chi tiết được 26 loài thuộc chi *Ganoderma*.

Cùng với sự phát triển của khoa học, ứng dụng công nghệ sinh học trong việc giải mã gen cũng bước đầu góp phần phân loại, định danh nấm Linh chi ở Việt Nam. Nguyễn Hoài Giang [10] sử dụng kỹ thuật RAPD-PCR để phân loại một số loài thuộc chi *Ganoderma* ở Việt Nam.

Năm 2010, Lê Xuân Thám [26] cũng tập hợp các nghiên cứu, phân tích giải mã gen của họ Ganodermataceae cho thấy khả năng có thể ứng dụng rộng rãi để phân loại, định danh loài nấm Linh chi.

Gần đây nhất, năm 2016, nhóm nghiên cứu Phạm Thị Minh Tâm, Nguyễn Ngọc Vinh và cộng sự tại Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh cũng “**Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử vào nghiên cứu một số loài nấm linh chi tại Việt Nam**” [24] giúp cho việc định danh cũng như chỉ ra những điểm khác biệt về một số loài linh chi thông qua tiến hành thực nghiệm trên 7 mẫu thu thập được. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy trên trình tự β -tubulin thì ba mẫu nấm: Linh chi Hàn Quốc (L2- *G. lucidum*) và Linh chi Nhật bản (L6- *G. lucidum*) được xếp chung nhóm G2 (bootstrap 100). 5 mẫu còn lại mỗi mẫu một nhóm: Mẫu Linh chi Việt Nam (L1- *G. lucidum*) nằm trong nhóm G1 với các chủng *G. lucidum* strain ASI 7068, *G. lucidum* strain IUM 4310, *G. lucidum* isolate GL 128, *G. mereditae* strain ASI 7140, *G. mereditae* strain ATCC 64492 (bootstrap 100), mẫu Nấm lim xanh (L5- *G. lingzhi*) nằm trong nhóm G5 với các chủng *G. lingzhi* strain M9724 và *G. lucidum* isolate GL-GL33 (bootstrap 100), mẫu Linh chi OPC mẫu 2 (L4- *G. lucidum*) cùng chung nhóm G4 với *G. lucidum* IUM 3986 (bootstrap 100), mẫu nấm mít (L7- *G. applanatum*) nằm trong nhóm G6 với *Ganoderma* sp ASI 7150, *Ganoderma* sp G117, *G. applanatum* ATCC 44053, *G. tomatum* CBS strain 109679, *G. mirabile* CBS strain 218.36 (bootstrap 100), còn lại mẫu Linh chi OPC mẫu 1 (L3- *G. lucidum*) nằm trong một nhóm riêng (G30). Như vậy, sự sắp xếp nhóm của cây phát sinh loài trên 2 vùng gen cho kết quả khác nhau.

Một khảo sát sơ bộ từ tháng 5 – 8.2016 tiến hành bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh (Trần Việt Hùng), Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (Đương Minh Tâm) và Đại Học Tây Nguyên về đa dạng sinh học Nấm Linh chi thu tại 5 khu vực thuộc các tỉnh Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông và Lâm Đồng. Kết quả đã thu được nhiều loài Linh chi khác nhau nghiên cứu. Các loại Linh chi này đều được dân bản địa thu hái tự nhiên, buôn bán và đều được sử dụng như loại dược liệu quý. Bên cạnh đó, có nhiều loại dược thương lái Trung Quốc

sang đặt mua với số lượng rất lớn, đang gây tình trạng ảnh hưởng đến môi trường và suy kiệt nguồn dược liệu quý này.

1.1.10. Chiết xuất dược liệu và điều chế cao thuốc

1.1.10.1. Một số phương pháp chung về chiết xuất dược liệu

Chiết xuất là sự phương pháp sử dụng dung môi để tách các chất tan ra khỏi một hỗn hợp chất. Chiết xuất kiểu chiết rắn-lỏng dựa trên cơ sở chính là sự hòa tan của chất tan vào dung môi.

Trong quá trình chiết xuất có 3 quá trình quan trọng đồng thời xảy ra là sự hòa tan, sự khuếch tán và sự thâm thấu qua vách tế bào.

Có nhiều phương pháp chiết xuất dược liệu như: ngâm kiệt, ngâm (ngâm lạnh, ngâm nóng, chiết bằng dung môi ở nhiệt độ sôi, chiết Soxhlet...) và các phương pháp khác như siêu âm, chiết xuất sử dụng vi sóng, chiết dưới áp suất thấp.... Tùy vào bản chất dược liệu, dung môi chiết, quy mô sản xuất, thiết bị... mà sử dụng phương pháp thích hợp [1].

1.1.10.2. Phương pháp điều chế cao thuốc

Quá trình điều chế cao thuốc thường có 2 giai đoạn:

Giai đoạn I: Chiết xuất dược liệu bằng các dung môi thích hợp. Lựa chọn phương pháp thích hợp tùy theo bản chất dược liệu, dung môi, trang thiết bị và quy mô sản xuất.

Giai đoạn II: Cô đặc và làm khô dịch chiết để độ ẩm còn lại không quá quy định của từng loại cao thuốc. Quá trình cô đặc và làm khô thường được tiến hành trong các thiết bị cô dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 60 °C hoặc cô cách thủy và sấy ở nhiệt độ không quá 80 °C. Các phương pháp làm khô được áp dụng trong điều chế cao thuốc như phương pháp dùng không khí nóng (sử dụng tủ sấy, tủ sấy chân không, máy sấy tầng sôi, phun sấy...), phương pháp đông khô [2].

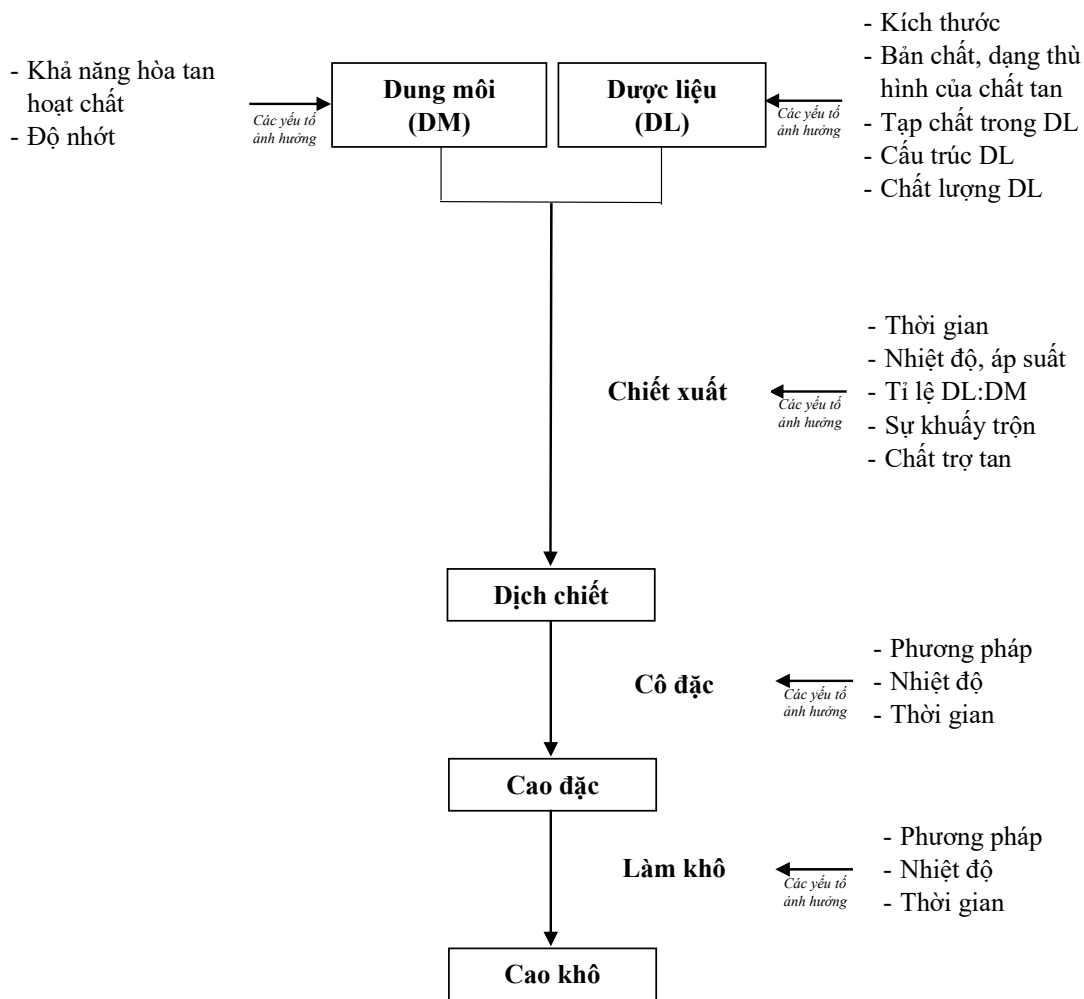
Trường hợp muốn thu được cao thuốc có tỷ lệ tạp chất thấp, phải tiến hành loại tạp chất.

Bảo quản

Theo DĐVN V, cao thuốc được đựng trong bao bì kín, để nơi khô, mát, tránh ánh sáng, nhiệt độ ít thay đổi.

1.1.10.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình điều chế cao thuốc

Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình điều chế cao thuốc bao gồm các yếu tố liên quan đến nguyên liệu, dung môi, phương pháp chiết và các kỹ thuật hỗ trợ khác, được trình bày trong Hình 1.2



Hình 1.2. Quy trình điều chế cao thuốc và các yếu tố ảnh hưởng

1.1.10.4. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng của cao thuốc

Cao thuốc phải đáp ứng yêu cầu theo quy định trong chuyên luận riêng và phải đạt các yêu cầu chung của Cao thuốc theo ĐĐVN V, bao gồm:

- *Độ trong, mùi vị, độ đồng nhất, màu sắc:* Cao thuốc phải đúng màu sắc đã mô tả trong chuyên luận riêng, có mùi và vị đặc trưng của dược liệu sử dụng. Cao lỏng phải đồng nhất, không có váng mốc, không có cặn bã dược liệu và vật lạ.
- *Mất khối lượng do làm khô:* Cao đặc không quá 20%, cao khô không quá 5%.

- *Hàm lượng cồn* (áp dụng cho cao lỏng và cao đặc): 90% - 110% lượng ethanol ghi trên nhãn.
- *Kim loại nặng*: Không được quá 20 phần triệu nếu không có chỉ dẫn khác.
- *Dung môi tồn dư*: Nếu điều chế với dung môi không phải là cồn, nước hay hỗn hợp cồn - nước, dư lượng dung môi sử dụng phải đáp ứng yêu cầu quy định trong Phụ lục 10.14. Xác định dung môi tồn dư.
- *Giới hạn nhiễm khuẩn*: Đáp ứng yêu cầu quy định trong phụ lục 13.6. Thử giới hạn nhiễm khuẩn.
- *Dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật*: Đáp ứng yêu cầu quy định trong Phụ lục 12.17. Dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật.

1.1.11. Công nghệ sấy phun

1.1.11.1. Tổng quan

Công nghệ sấy phun được sử dụng rộng rãi trong quá trình sản xuất bột khô từ thức ăn đến phân bón và dược phẩm. Đây là công nghệ chuyển dạng lỏng sang dạng bột với các thiết bị cũng như quy trình thích hợp. Ngoài ra, công nghệ này có khả năng tạo ra các hạt riêng lẻ nhanh chóng, nên cho phép tạo ra nhiều loại hạt với kích thước khác nhau tùy theo yêu cầu kỹ thuật trong quá trình sản xuất bột thuốc [3].

1.1.11.2. Quá trình sấy phun

Nguyên lý hoạt động:

Dịch được bơm thông qua bơm nhu động. Chùm chất lỏng chứa chất rắn được tạo ra và sau đó tiếp xúc với dòng khí phù hợp để thúc đẩy bay hơi nhanh chóng do sự bay hơi chất lỏng theo dòng khí. Khi bay hơi đủ lượng chất lỏng thì chất rắn còn lại trong giọt hình thành nên các hạt nhỏ, khi chúng được phân nhỏ trong dòng khí. Các hạt được tách riêng bằng khí sấy nhờ sử dụng cyclon [3].

Quá trình sấy phun bao gồm 4 giai đoạn:

- Giai đoạn 1: Tạo giọt phun.
- Giai đoạn 2: Phân tán giọt phun với khí sấy
- Giai đoạn 3: Bay hơi dung môi.
- Giai đoạn 4: Phân tách các tiểu phân bằng khí sấy.

1.1.11.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sấy phun

Sấy phun là một quá trình phức tạp cần phải hiểu rõ sự liên quan giữa các thông số quy trình cũng như công thức dịch phun để tạo thành sản phẩm mong muốn.

Các thông số ảnh hưởng trong quá trình sấy phun:

Nhiệt độ khí vào của dòng không khí nóng: là nhiệt độ sấy trung bình tại thời điểm đầu tiên cung cấp. Thay đổi nhiệt không khí sẽ ảnh hưởng đến khả năng làm khô, sự bốc hơi dung môi. Đây là thông số đầu tiên phải kiểm soát khi đưa vào buồng sấy.

Nhiệt độ khí ra: của dòng khí nóng chịu sự ảnh hưởng của nhiệt độ khí vào, lưu lượng khí, nhiệt bay hơi của dung môi và nồng độ chất rắn trong dòng chất lỏng. Nhiệt độ dòng khí ra là kết quả của sự trao đổi nhiệt của hệ thống cung cấp dòng khí nóng.

Lưu lượng dòng khí nóng: là lượng khí nóng được cung cấp trong một đơn vị thời gian. Tỷ lệ dòng khí nóng có thể được xác định thông qua mức độ làm khô của sản phẩm cũng như khả năng phân tách trong cyclon. Lưu lượng dòng không khí chậm thì quá trình di chuyển của sản phẩm cũng chậm, kéo dài thời gian tiếp xúc với nhiệt nóng. Vì vậy, nên điều chỉnh dòng khí nóng đạt giá trị cực đại để tối ưu hóa hiệu năng của cyclon.

Đặc tính vật lý của cao khô (kích thước hạt, tính hút ẩm) bị ảnh hưởng bởi lưu lượng của dòng chất lỏng, kích thước giọt chất lỏng, nhiệt độ phun, chất mang, loại dung môi, độ nhớt, sức căng bề mặt, lượng chất rắn trong dịch sấy phun [4].

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu, chất đối chiếu, dung môi hóa chất và thiết bị

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Linh chi được thu hái tại các vùng:

- + Tiên Phước, Quảng Nam.
- + K'bang, Gia Lai.
- + Buôn Đôn, Đắk Lắk.
- + Cát Tiên, Lâm Đồng
- + An Nhơn, Bình Định

Linh chi trồng tại ở Bình Dương, Đắk Lắk được cung cấp bởi Công ty phát triển dược liệu Tây Nguyên

Linh chi Hàn Quốc, Linh chi Nhật Bản, Linh chi Trung Quốc được cung cấp bởi Công ty Dược liệu Hà Ký

Linh chi được thu thập tại 1 số cơ sở nuôi trồng trên toàn quốc như: Bình Phước, Bình Dương, Sóc Trăng, Quảng Ngãi.

2.1.2. Chất đối chiếu, dung môi, thuốc thử, trang thiết bị, dụng cụ

Bảng 2.1. Danh mục chất đối chiếu, dung môi, thuốc thử

Phân loại	Tên	Nguồn gốc
Chất đối chiếu	Ganoderic acid B	Nature connecting Health
	Ganoderic acid A	USP
	<i>Gnoderma lucidum</i>	USP
	fruiting body dry extract	
Dung môi	Ethanol tuyệt đối	VWR, Pháp
	Nước cất	Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh
	Ethyl formate	Sigma-Aldrich
	Toluen	Merck, Đức
	Acid formic	Merck, Đức
	Acetonitril	J. T. Baker, Mỹ
	Methanol	J. T. Baker, Mỹ
	Cloroform	J. T. Baker, Mỹ
	Acid sulfuric 98%	Merck, Đức
Acid phosphoric 85%	Merck, Đức	
Thuốc thử	Acid sulfuric 10%/ ethanol	ĐDVN V

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Bảng 2.2. *Danh mục trang thiết bị*

Trang thiết bị, dụng cụ	Tên, nguồn gốc
Bộ rây dược liệu	Anh
Cân kỹ thuật	METTLER BD 202, Thụy Sĩ
Cân phân tích 4 chữ số	Mettler Toledo AT - 200, d = 0,1 mg, Thụy Sĩ
Cân phân tích 6 chữ số	Mettler Toledo XP86, d = 0,002 mg, Thụy Sĩ
Bể siêu âm gia nhiệt	Elma Sonic, Đức
Bếp cách thủy	Memmert WMB 40, Đức
Bể điều nhiệt	Thermostate Jeio Tech, Hàn Quốc
Lò nung	Carbolite, Anh
Tủ sấy	JSON-050, Hàn Quốc
Tủ sấy chân không	Heraeus VT 6025, Đức
Kính hiển vi quang học	Nikon Eclipse 80i, Nhật Bản
Cột sắc ký phân tích C18 150 mm x 2 mm x 3 μ m	Phenomenex, Mỹ
Máy sấy phun - tạo hạt tầng sôi	STS-2, Việt Nam
Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao	SHIMADZU-UFLC-SPD-M20A đầu dò PDA, Nhật Bản
Tủ sấy đối lưu cưỡng bức	Model: UF260, Đức
Tủ vi khí hậu	Model: KBF 720, Binder, Đức

Các thiết bị phân tích được đặt tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh (200 Cô Bắc, phường Cô Giang, quận 1, TP. Hồ Chí Minh) đang trong thời hạn hiệu chuẩn.

Bảng 2.3. *Danh mục dụng cụ*

Chén cân, chén nung	Bình triển khai sắc ký
Pipet chính xác	Cốc có mỏ (becher)
Pipet không chính xác	Bình nón (erlen)
Ống đong	Bình định mức
Bản mỏng GF ₂₅₄	Các dụng cụ khác

Các dụng cụ đều đạt tiêu chuẩn phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Mục tiêu 1: Điều tra đánh giá tiềm năng, nghiên cứu khả năng phát triển nguồn gen của một số loài nấm Linh chi (*Ganoderma* spp.) có giá trị của khu vực Tây Nguyên

2.2.1.1. Nội dung 1: Thu thập mẫu, điều tra vùng phân bố nấm Linh chi tại khu vực

Tây Nguyên và các vùng lân cận như: Quảng Nam, Huế, Tây Nam Bộ

a. *Xây dựng kế hoạch thu thập mẫu nghiên cứu, thiết kế mẫu phiếu điều tra, khu vực dự kiến điều tra, số lượng mẫu cần thu tại mỗi khu vực;*

Xây dựng kế hoạch thu mẫu nghiên cứu gồm các thông tin khu vực thu mẫu, số lượng thu mẫu, thời gian thu mẫu.

- Tìm hiểu tài liệu về vùng phân bố Linh chi ở Tây Nguyên
- Tìm hiểu tài liệu về vùng phân bố Linh chi ở các tỉnh lân cận (Khánh Hòa, Phú Yên, Quảng Nam, Đồng Nai...)
- Phân tích dữ liệu tìm được để đưa ra kế hoạch thu mẫu cụ thể

Thiết kế mẫu phiếu điều tra: 2 nội dung

+ Thông tin chung: mục tiêu khảo sát, địa điểm, ngày và người khảo sát

+ Thông tin khảo sát: thông tin người được hỏi và các thông tin về Linh chi như: vùng phân bố, điểm nhận biết, thời gian thu hái, cách sử dụng, công dụng, thông tin từ đâu.

b. *Phân tích mẫu và định danh:*

- Phân tích các đặc điểm sinh học, sinh thái: Phân tích đặc điểm hình thái ngoài; Phân tích đặc điểm hiển vi
- Định danh loài: Mẫu nấm được thu thập và định danh theo phương pháp hình thái giải phẫu.
- Tiến hành thu mẫu nghiên cứu theo kế hoạch, thu mẫu khô và cả mẫu tươi, thiết lập điều kiện bảo quản và lưu trữ mẫu nghiên cứu;

- Bước đầu phân loại mẫu thu được dựa trên hình thái quả thể, mã hóa mẫu theo khu vực thu mẫu, bảo quản và lưu trữ mẫu.

- Phân tích phiếu điều tra để xác định ít nhất 3 loài tiềm năng thuộc Linh chi *Ganoderma* spp.

Xây dựng tiêu bản mẫu đạt tiêu chuẩn theo quy định của BTTNVN, bao gồm: mẫu tiêu bản khô, bộ ảnh màu (có đầy đủ lý lịch mẫu), cùng các dữ liệu về sinh học, hóa học, ...

2.2.1.2. Nội dung 2: Phân tích các đặc điểm sinh học, sinh thái, định danh và nghiên cứu dấu vân tay sinh học

a. Định danh tên khoa học mẫu nấm Linh chi thu được dựa trên hình hình dạng bào tử và dựa vào khóa phân loại Nấm;

b. Phân tích đặc điểm hình thái, sinh thái mẫu và điều kiện tự nhiên, môi trường, sinh thái khu vực thu mẫu (nhiệt độ, độ ẩm, độ cao, độ che phủ dưới tán...);

Tiến hành ghi nhận điều kiện sinh thái của các loài nấm linh chi ở 4 kiểu rừng: rừng thường xanh, rừng bán thường xanh, rừng thông, rừng hỗn hợp lá rộng và lá kim tại 8 địa phương: Đắk Nông, Đắk Lắk, Lâm Đồng, Gia Lai, Kom Tum, Đồng Nai, Khánh Hòa, Bình Định.

Để xác định các yếu tố sinh thái tại địa điểm nấm mọc, chúng tôi sử dụng một số máy như: máy đo độ ẩm Tiger Direct HMAMT-110 (USA); máy đo cường độ chiếu sáng Tiger Direct LMLX1010B (USA); máy đo độ cao GPS Garmin Trex Vista HCx (USA) và máy đo nhiệt độ Extech 445703. Chi tiêu theo dõi: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, độ cao và tần số xuất hiện mẫu ngoài tự nhiên.

Sử dụng phần mềm Statgraphic Centurion XV để thiết lập các hàm hồi quy đa biến và phân tích mối quan hệ, tần số xuất hiện (mật độ) của các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae, Amauroderma với các nhân tố sinh thái.

c. *Nghiên cứu thiết lập bộ dấu vân tay sinh học (DNA fingerprint) của các mẫu thuộc chi Ganoderma.*

c.1. Tách chiết ADN tổng số

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn phương pháp sử dụng CTAB của P. Doyle and Doyle (1987) có một số cải tiến nhỏ để tiến hành tách chiết ADN từ các mẫu nghiên cứu.

Quy trình:

Chuẩn bị sẵn dung dịch đệm chiết CTAB ở 60°C.

Nghiền 0,3 gam mẫu lá bằng chày cối sứ vô trùng trong nitor lỏng đến khi thành dạng bột mịn (mẫu húng, chà, cối được giữ trước ở - 80°C).

Hoà tan mẫu đã nghiền nhỏ trong 800µl CTAB buffer và 60µl SDS 10%. Thành phần dung dịch đệm chiết: Tris-bazơ 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, CTAB 2%.

Ủ mẫu ở 65°C trong bể ổn nhiệt, thời gian 60 phút.

Bổ sung Chloroform, lắc nhẹ cho tới khi thành dạng nhũ sữa. Ly tâm 11000 vòng/phút trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Hút dung dịch phía trên chuyển sang ống mới.

Tiếp tục chiết lần 2 bằng Chloroform, thu được dịch chiết chứa ADN.

Tủa ADN bằng isopropanol đã làm lạnh. Để ở -20°C trong 1 giờ.

Ly tâm thu tủa 10500 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C.

Rửa tủa bằng ethanol 70%, ly tâm thu tủa, làm khô và hoà tan trong đệm TE.

Loại ARN: bổ sung RNase vào mẫu ADN và ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Các bước tiếp theo tương tự các bước 5-9.

c.2. Thành phần của một phản ứng PCR

- Mỗi phản ứng PCR bao gồm các thành phần:

STT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	Nước cất hai lần khử ion	9
2	Buffer Mg ⁺ 25 Mm	1,5
3	dNTPs 10 Mm	0,3
4	Taq ADN polymerase 5 U/µl	0,2
5	Mồi ITS4 10 µM	1,5
6	Mồi ITS5 10 µM	1,5
7	DNA	1
	Tổng thể tích của một phản ứng	15,0

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

c.3. Chương trình chạy PCR

Phản ứng PCR được tiến hành trong ống eppendorf 0,2 ml và thực hiện trên máy Mastercycler epgradient S theo chu trình sau:

Các bước	Nhiệt độ(°C)	Thời gian
1	94	5 phút
2	94	1 phút
3	56	45 giây
4	72	50 giây
5	Lặp lại từ bước 2,	35 lần
6	72	7 phút
7	4	∞

Sau khi hoàn thành chương trình chạy PCR, sản phẩm PCR được bổ sung 4 μ l loading dye rồi tiến hành điện di.

c.4. Phương pháp điện di trên gel agarose

Cân 0,4 g agarose cho vào 40 ml TAE 1X, đun đến sôi để agarose tan hoàn toàn. Để nguội 45-50°C bổ sung 2,5 μ l Ethidium Bromide, đổ vào khuôn gel đã được chuẩn bị sẵn. Sau 30-60 phút, khi gel đã nguội và đông cứng thì chuyển khay chứa bản gel vào máy điện di và cho đệm chạy TAE 1X vào buồng điện di sao cho đệm ngập bản gel khoảng 0,5-1 cm.

Tra mẫu: Sản phẩm PCR được trộn với 4 μ l loading dye và tra vào các giếng trên gel.

Chạy điện di: Sau khi tra mẫu điện di xong, máy điện di được kết nối với bộ nguồn. Đặt 130 V.

Quan sát: gel được soi dưới đèn tử ngoại, ADN sẽ được phát sáng nhờ liên kết với EtBr.

c.5. Phương pháp thôi gel theo kit Qiagen

1. Cắt lấy đoạn ADN mong muốn từ gel agarose, cho đoạn gel vừa cắt vào ống eppendorf 2ml.

2. Bổ sung buffer QG theo tỷ lệ 3 thể tích QG : 1 thể tích gel (100mg ~100 μ l).

3. Ủ ở nhiệt độ 50°C trong khoảng 10 phút cho đến khi gel tan hoàn toàn.
4. Sau khi gel tan hoàn toàn, kiểm tra màu của dung dịch phải là màu vàng, nếu màu của dung dịch là màu cam hoặc màu tím xanh thì phải bổ sung 10µl sodium acetate 3M, pH 5.
5. Cho dung dịch mẫu đã hoà tan ở trên vào cột QIAquick và ly tâm tốc độ 13 000 rpm trong 1 phút.
6. Bổ sung 500 µl buffer QG vào cột QIAquick và ly tâm tốc độ 13 000 rpm trong 1 phút để loại hết agarose dư thừa.
7. Bổ sung 750 µl buffer PE vào cột QIAquick, để cột thẳng đứng 5 phút sau đó ly tâm tốc độ 13 000 rpm trong 1 phút.
8. Chuyển cột QIAquick sang ống microcentrifuge 1.5ml sạch.
9. Để hoà tan ADN, bổ sung 30 µl nước (pH 7 – 8.5) vào giữa màng của cột QIAquick và ly tâm tốc độ 13 000 rpm trong 1 phút, thu lượng ADN tinh sạch.

c.6. Giải trình tự

Sản phẩm PCR ITS sau khi được tinh sạch, được giải trình tự tại công ty Macrogen (Hàn Quốc). Kết quả giải trình tự được so sánh với các trình tự tương đồng trên NCBI. Sau đó, các trình tự được tập hợp lại và phân tích bằng chương trình MEGA v5.1 để tạo cây phát sinh loài.

d. Xây dựng hồ sơ dược liệu bao gồm: tên khoa học, bộ ảnh, tiêu bản khô, đặc điểm hình thái, sinh thái, dấu vân tay sinh học ...

2.2.1.3. Nội dung 3: Nghiên cứu thành phần hoá học và dấu vân tay sắc ký của đối tượng nghiên cứu

a. Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hoá học các hợp chất đặc trưng trong các mẫu nấm Linh chi Ganoderma spp.;

a.1. Xác định thành phần hóa học trong một số phân đoạn chiết từ các mẫu nấm Linh chi *Ganoderma* spp.;

a.1.1. Khảo sát dung môi chiết xuất cho cao toàn phần giàu hoạt chất
+ Khảo sát ảnh hưởng của dung môi chiết đến hàm lượng triterpenoid trong cao toàn phần

Khảo sát điều kiện chiết xuất với các dung môi: ethanol tuyệt đối, ethanol 96%, ethanol 70%, ethanol 50%, ethanol 30% và nước.

Đánh giá kết quả bằng SKLM

Đánh giá bằng khối lượng cần

Yêu cầu: Chọn dung môi cho lượng cần lớn và số vết trên sắc ký đồ rõ và đậm nhất

a.1.2. Tiến hành chiết xuất cao Linh chi toàn phần

Dựa vào hiệu suất chiết xuất cao đã khảo sát, tiến hành chiết xuất với lượng lớn dược liệu, cô thu hồi dung môi thu được cao chiết toàn phần.

a.1.3. Đánh giá các cao phân đoạn Linh chi chiết xuất từ cao toàn phần

Định tính bằng sắc ký lớp mỏng

Định lượng hàm lượng triterpenoid trong các cao phân đoạn cao bằng HPLC

a.2. Chiết, phân lập và tinh chế của 5 đến 10 chất đặc trưng của Linh chi *Ganoderma* spp. kèm theo bộ phổ nhận dạng (phổ UV, IR, MS, NMR ...)

Từ điều kiện khảo sát tiến hành chiết cao toàn phần và cao phân đoạn giàu hoạt chất. Từ cao phân đoạn tiến hành bằng sắc ký cột cô điển với dung môi có độ phân cực tăng dần

Tiến hành tinh chất bằng sắc ký điều chế hoặc kết tinh phân đoạn

b. *Nghiên cứu dấu vân tay sắc ký: xây dựng sắc ký đồ dấu vân tay đặc trưng sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) ...*

- + Khảo sát điều kiện sắc ký
- + Phân tích, xây dựng dấu vân tay hóa học

c. *Nghiên cứu thiết lập ít nhất 3 chất chuẩn phân lập từ nấm Linh chi Tây Nguyên*

- + Nghiên cứu quy trình chiết xuất, phân lập một số chất đặc trưng từ nấm Linh chi *Ganoderma* spp;
- + Nghiên cứu quy trình tinh chế các chất này đạt tiêu chuẩn thiết lập chất chuẩn đối chiếu hóa học
- + Thiết lập ít nhất 3 chất chuẩn đối chiếu hóa học
- + Thiết lập ít nhất 3 chất chuẩn đối chiếu hóa học

2.2.1.4. Nội dung 4: Đánh giá tiềm năng, khả năng phát triển nguồn dược liệu nấm Linh chi tại Tây Nguyên

- Khảo sát tác dụng sinh học (điều hòa đường huyết, điều hòa lipid, chống oxy hóa, bảo vệ gan) của một số mẫu nấm Linh chi Tây Nguyên (khoảng 10 mẫu đại diện cho ít nhất 3 loài tiềm năng dựa trên kết quả điều tra sử dụng bản địa), tập trung vào mẫu Nấm Linh chi lim xanh đang lưu hành phổ biến ở Tây Nguyên;
- Khảo sát dấu vân tay hóa học của một số mẫu nấm Linh chi Tây Nguyên và các vùng khác (10 mẫu đại diện cho ít nhất 3 loài tiềm năng);
- Khảo sát, đánh giá ảnh hưởng môi trường, điều kiện sinh thái đến khả năng bảo tồn, phát triển nấm Linh chi Tây Nguyên (của ít nhất 3 loài tiềm năng);
- Nghiên cứu xây dựng mô hình, phương án bảo tồn một số nguồn gen nấm Linh chi tại Vườn Quốc gia Yok-Don, huyện Buôn Đôn, tỉnh Đắk Lắk (diện tích khoảng 10.000 m²);

2.2.2. Mục tiêu 2: Nghiên cứu nhân giống, phát triển, ứng dụng tạo ra 4 sản phẩm từ các loài nấm Linh chi (*Ganoderma* spp.) ở khu vực Tây Nguyên

2.2.2.1. Nội dung 5: Nghiên cứu xây dựng và ứng dụng quy trình nuôi trồng một số chủng nấm Linh chi Tây Nguyên

- Thu, bảo quản bào tử, giữ giống của một số loài nấm linh chi *Ganoderma* spp. ở Tây Nguyên, ít nhất 10 giống (của ít nhất 3 loài tiềm năng) để nhân giống;
- Xây dựng quy trình nhân giống, nuôi trồng nấm Linh chi trong phòng thí nghiệm;
- Khảo sát một số điều kiện nuôi trồng ảnh hưởng đến khả năng phát triển và chất lượng của một số chủng nấm Linh chi;
- Xây dựng quy trình nuôi trồng, nhân giống một số chủng nấm Linh chi Tây Nguyên (10 giống) quy mô 1 tấn/m²;
- Nuôi trồng, một số chủng của ít nhất 3 loài tiềm năng quy mô 1 tấn/m² (năm 2 m²);

-
- Xây dựng mô hình nuôi trồng nấm Linh chi Tây Nguyên quy mô tối thiểu 10 tấn/năm tại xã Krông Na, huyện Buôn Đôn, tỉnh Đắk Lắk trên diện tích khoảng 40.000 m², bao gồm nhà xưởng, trang thiết bị, nhân công.

2.2.2.2. Nội dung 6: Nghiên cứu quy trình sản xuất nấm Linh chi Tây Nguyên đóng gói chất lượng cao

- Nghiên cứu quy trình thu hoạch, sơ chế, chế biến Linh chi tươi và linh chi khô, quy đóng gói đóng gói
- Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) Linh chi Tây Nguyên, cao hơn tiêu chuẩn hiện tại trong dược điển Việt Nam xuất bản lần thứ 5 (2018) có tiêu chuẩn của một số hoạt chất chính (acid ganoderic, polysaccharid...)
 - + Nghiên cứu phương pháp định tính, định lượng một số hoạt chất trong chế phẩm;
 - + Xây dựng và thẩm định TCCS;
- Đóng gói và bảo quản sản phẩm nấm Linh chi Tây Nguyên
- Kiểm tra chất lượng nấm Linh chi Tây Nguyên trước và sau khi đóng gói

2.2.2.3. Nội dung 7: Nghiên cứu quy trình bào chế rượu Linh chi Tây Nguyên đạt chất lượng làm thực phẩm chức năng

- Khảo sát nồng độ rượu và tỷ lệ ngâm dược liệu
- Ngâm, chiết và sản xuất rượu quy mô tối thiểu 1.000 L/mẻ
- Xây dựng, thẩm định tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) và công bố chất lượng rượu Linh chi Tây Nguyên
 - + Nghiên cứu và thẩm định phương pháp định tính, định lượng một số hoạt chất trong chế phẩm;
 - + Xây dựng TCCS và công bố chất lượng;
- Đóng gói, bảo quản sản phẩm rượu Linh chi Tây Nguyên
- Kiểm tra chất lượng rượu Linh chi Tây Nguyên trước và sau khi đóng gói

2.2.2.4. Nội dung 8: Nghiên cứu quy trình bào chế cao Linh chi Tây Nguyên đạt TCCS cho 3 loại cao linh chi giàu hoạt chất (cao toàn phần, cao giàu polysaccharid và cao giàu triterpenoid) cho loài tiềm năng nhất hiện nay là Nấm Lim xanh Tây Nguyên;

- Nghiên cứu quy trình chiết xuất, bào chế 3 loại cao Linh chi giàu hoạt chất nêu trên
- Xây dựng, thẩm định TCCS cao Linh chi
 - + Nghiên cứu phương pháp định tính, định lượng một số hoạt chất trong chế phẩm
 - + Xây dựng TCCS
 - + Thẩm định TCCS
- Bào chế cao Linh chi Tây Nguyên đạt TCCS
- Kiểm tra đánh giá chất lượng cao Linh chi Tây Nguyên theo TCCS
- Thử độc tính và một số tác dụng dược lý của cao Linh chi Tây Nguyên
 - + Thử độc tính cấp và độc tính bán trường diễn
 - + Thử hoạt tính chống oxy hóa, bảo vệ gan, tác dụng trên đường huyết và lipid máu
 - + Thử tác dụng điều hòa miễn dịch (kích thích miễn dịch không đặc hiệu)
- Theo dõi, đánh giá độ ổn định của chế phẩm
 - + Đánh giá độ ổn định của chế phẩm bằng phương pháp lão hóa cấp tốc
 - + Theo dõi độ ổn định của chế phẩm ở điều kiện thường
- Bào chế và đóng gói cao Linh chi toàn phần giàu hoạt chất, 1.000 lọ x 100 g cao/lọ

2.2.2.5. Nội dung 9: Nghiên cứu quy trình bào chế nang mềm Linh chi bào chế từ cao Linh chi toàn phần giàu hoạt chất quy mô 10.000 nang/mẻ

- Nghiên cứu xây dựng công thức nang mềm Linh chi
- Nghiên cứu quy trình bào chế nang mềm Linh chi quy mô pilot
- Xây dựng, thẩm định TCCS cho viên nang mềm Linh chi
 - + Nghiên cứu phương pháp định tính, định lượng một số hoạt chất chính trong chế phẩm

- + Xây dựng TCCS
- + Thẩm định TCCS
- Bào chế nang mềm Linh chi ở quy mô 10.000 nang/mẻ, x 3 mẻ
- Theo dõi, đánh giá độ ổn định của chế phẩm
 - + Đánh giá độ ổn định của chế phẩm bằng phương pháp lão hóa cấp tốc
 - + Theo dõi độ ổn định của chế phẩm ở điều kiện thường

2.2.3. Mục tiêu 3: Chuyển giao công nghệ, phục vụ khai thác, bảo tồn và phát triển một số loài nấm Linh chi (*Ganoderma* spp.) tại Tây Nguyên

2.2.3.1. Nội dung 10: Hợp tác với doanh nghiệp xây dựng cơ sở sản xuất các sản phẩm linh chi, đầu tư dây chuyền công nghệ bào chế; chuyển giao sản phẩm

- Chuyển giao công nghệ nhân giống, nuôi trồng và bào chế các sản phẩm từ nấm Linh chi Tây Nguyên; Ký kết các hợp đồng chuyển giao công nghệ nhân giống, nuôi trồng và bào chế các sản phẩm từ nấm Linh chi Tây Nguyên
- Đào tạo cán bộ chuyển giao công nghệ nhân giống, nuôi trồng và bào chế các sản phẩm từ nấm Linh chi Tây Nguyên

2.2.3.2. Nội dung 11: Đăng ký lưu hành sản phẩm

- Thiết kế bao bì nhãn mác cho các sản phẩm
 - + Nấm Linh chi Tây Nguyên khô đạt TCCS
 - + Rượu Linh chi Tây Nguyên
 - + Cao Linh chi Tây Nguyên
 - + Viên nang mềm Linh chi
- Đăng ký nhãn hiệu sản phẩm và xây dựng hồ sơ công bố thực phẩm chức năng (TPCN) hoặc hồ sơ đăng ký thuốc cho các sản phẩm đã nêu

2.2.3.3. Nội dung 12: Đăng ký bản quyền thương hiệu Nấm Linh chi của Tây Nguyên

- Chuyển giao, hợp tác với doanh nghiệp tại Tây Nguyên phát triển các nhãn hiệu của sản phẩm từ Linh chi Tây Nguyên trong đó có 4 loại sản phẩm của

đề tài (Linh chi, rượu Linh chi, cao Linh chi, nang mềm Linh chi), bảo hộ nhãn hiệu sản phẩm;

- Cùng doanh nghiệp xây dựng chiến lược truyền thông Marketing cho các sản phẩm nêu trên bao gồm: tổ chức hội thảo, xây dựng phim tài liệu, chương trình TVC quảng cáo truyền hình và các phương tiện truyền thông báo, đài, website....

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Thu thập mẫu, điều tra vùng phân bố nấm Linh chi tại khu vực Tây Nguyên và các vùng lân cận như: Quảng Nam, Huế, Tây Nam Bộ

3.1.1. Xây dựng kế hoạch thu mẫu nghiên cứu gồm các thông tin khu vực thu mẫu, số lượng thu mẫu, thời gian thu mẫu

3.1.1.1. Tìm hiểu tài liệu về vùng phân bố Linh chi ở Tây Nguyên

- Tỉnh Kon Tum

Trong những năm gần đây, do các loài dược liệu là loại lâm sản phụ dưới tán rừng, nhu cầu tiêu thụ lớn nên tình trạng khai thác một cách triệt để khó kiểm soát, khai thác không gắn với bảo tồn, tái sinh.

Theo dõi hàng năm trên địa bàn các huyện, người dân thường thu hái trong tự nhiên được số lượng đáng kể các loài dược liệu tươi chủ yếu trên địa bàn các huyện Kon Plông, Tu Mơ Rông và Đăk Glei; nguồn dược liệu thu hái chủ yếu bán thô cho thương lái để tiêu thụ nội địa đối với các loài quý hiếm như Lan kim tuyến, Đảng sâm, Sâm Ngọc Linh, nấm linh chi... và các loài khác có số lượng lớn được bán sang Trung Quốc. Do vậy việc bảo tồn và phát triển cây dược liệu là một trong những nhiệm vụ chính mà tỉnh đã đề ra.

- Tỉnh Gia Lai

Trong những năm qua, nguồn cung cấp cây dược liệu của tỉnh Gia Lai chủ yếu dựa trên việc thu hái, khai thác từ tự nhiên mà chưa chú trọng đến việc gieo trồng, tái sinh, bảo tồn các nguồn gen quý hiếm. Ngoài ra, việc thu hái còn mang tính tự phát và không được quản lý chặt chẽ dẫn tới tình trạng khai thác tận diệt làm suy giảm rất nhanh số lượng và thành phần loài cây dược liệu quý ở Gia Lai.

Để đảm bảo nguồn cung cấp và phát triển diện tích cây dược liệu trên địa bàn, đảm bảo nâng cao thu nhập cho người dân, rất cần thiết phải có sự đầu tư bảo tồn và phát triển cây dược liệu tại địa phương; đầu tư công nghệ chế biến, xây dựng thương hiệu, thị trường tiêu thụ ổn định; tạo ra các sản phẩm đặc trưng vùng miền, góp phần ổn định đời sống, tạo công ăn, việc làm cho người dân, đồng thời phát huy thế mạnh của tỉnh và bảo tồn được những loài dược liệu quý, hiếm.

Trên cơ sở Quyết định số 1976/QĐ-TTg ngày 30/10/2013 của Thủ tướng Chính phủ về việc Phê duyệt Quy hoạch tổng thể phát triển dược liệu đến năm 2020 và định hướng đến năm 2030; Quyết định số 206/QĐ-BYT ngày 22 tháng 01 năm 2015 của Bộ Y tế về ban hành danh mục cây dược liệu ưu tiên phát triển giai đoạn 2015 - 2020; tỉnh Gia Lai đã giao cho các ngành liên quan xây dựng quy hoạch về phát triển cây dược liệu của tỉnh.

- **Tỉnh Đắk Lắk**

- **Tỉnh Đắk Nông**

Kết quả khảo sát chuyên cho thấy cây dược liệu ở Đắk Nông phân bố rải rác ở hầu hết các diện tích rừng trên địa bàn tỉnh. Đắk Nông có 4 vùng sinh thái có tập trung cây dược liệu với trữ lượng lớn. Khu Bảo tồn thiên nhiên Tà Đùng có các loại cây thuốc quý hiếm như: Hà thủ ô đỏ, thiên niên kiện, ỏ kiến, câu đằng, bình vôi, câu tích, nấm linh chi, nắp ấm, cốt toái bồ, ba gạc lá toa... Khu Bảo tồn thiên nhiên Nam Nung phổ biến các cây thuốc như: bò cu vể, chè dây, sa nhân, hoài sơn, thổ phục linh, màng tang, thạch xương bồ, dầu nóng lá nhỏ, bạc thau, câu đằng, dây gắm,... Các cây thuốc quý hiếm bao gồm: Hoàng đằng, vàng đắng, ỏ kiến, bình vôi, nấm linh chi, cốt toái bồ, nắp ấm, ba gạc lá to. Vùng rừng thuộc huyện Chư Jút có thể khai thác tốt các loại cây như kê huyết đằng, sơn thực gai, sâm cuốn chiếu, gỏi hạc, thảo quyết minh, sa nhân, hà thủ ô trắng. Một số loài cây quý cần được bảo vệ như hoàng cầm, sâm cau, một lá...

Là một tỉnh có tài nguyên rừng khá nhiều, độ che phủ chiếm gần 40% tổng diện tích đất, Đắk Nông có môi trường thuận lợi cho phát triển một số cây dược liệu yêu cầu sinh thái dưới tán rừng. Theo Hội Đông y tỉnh, khảo nghiệm bước đầu đối với một số cây trồng khi di thực từ rừng về trồng, chăm sóc trong điều kiện ở vườn nhà, rẫy cho thấy cây sinh trưởng phát triển tốt hơn khi trong rừng. Khả năng mở rộng về quy mô, sản xuất hàng hóa là rất lớn.

- **Tỉnh Lâm Đồng**

Lâm Đồng nằm ở Nam Tây Nguyên, diện tích tự nhiên chiếm 976.478 ha, trong đó có trên 212.000 ha đất đỏ bazan và phân bố chủ yếu ở độ cao từ hơn 800 m

– 1.600 m so với mực nước biển; nhiệt độ vùng này biến thiên từ 18°C – 21,5°C, lượng mưa trung bình hàng năm từ 1.800 – 2.600 mm là điều kiện thích hợp phát triển đa dạng cây trồng như rau, hoa, chè, cà phê, cây đặc sản, trong đó cây dược liệu là cây phù hợp cho phát triển tại Lâm Đồng cả về quy mô và chất lượng. Theo thống kê toàn tỉnh có trên 300 ha cây dược liệu, chủ yếu là Actisô, Diệp hạ châu, Đảng sâm, Đương quy... Theo kế hoạch của UBND tỉnh về phát triển nông nghiệp toàn diện, bền vững, hiện đại, xác định đến năm 2020 toàn tỉnh có khoảng 350 ha cây dược liệu và đến năm 2025 có khoảng 500 ha cây dược liệu và cây đặc sản.

b/ Tìm hiểu tài liệu về vùng phân bố Linh chi ở các tỉnh lân cận (Khánh Hòa, Phú Yên, Quảng Nam, Đồng Nai...)

- Tỉnh Khánh Hòa

Nấm linh chi chưa được trồng rộng rãi trên địa bàn các xã, thị trấn của huyện Vạn Ninh; song những năm gần đây một số hộ gia đình nông dân đã mạnh dạn tìm tòi, trồng thử nghiệm với loại cây trồng này, bước đầu cho tín hiệu khả quan. Tuy chỉ mới trồng qua hơn 1 năm, nhưng có thể nói mô hình trồng nấm linh chi đỏ của một số hộ ở xã Vạn Long, huyện Vạn Ninh chứa đầy hứa hẹn.

Ngành Trồng nấm đã trở thành ngành nghề quan trọng và là một trong những ngành định hướng mũi nhọn, đóng góp một phần lớn trong hiệu quả kinh tế mà sản xuất nông nghiệp mang lại.

- Tỉnh Phú Yên

Việc dựng giàn, làm lưới bao xung quanh và lắp đặt hệ thống phun sương mát tổng chi phí từ 8-10 triệu đồng. Ban đầu thì dùng phôi nấm làm thử nghiệm. Sau này, để duy trì mô hình thì kinh phí đầu tư làm phôi nấm cũng rất rẻ vì nguyên liệu là những sản phẩm phụ hàng ngày có sẵn trong sản xuất nông nghiệp như rơm rạ, mùn cưa, thân cây gỗ, lõi ngô, bã mía...



Quá trình chăm sóc, thu hoạch nấm không cần nhiều lao động, đặc biệt có thể tận dụng lao động nhàn rỗi tại gia đình, một người vừa ở nhà làm việc nhà vừa có thể trông coi nấm. Hàng ngày, người này chỉ cần để ý nhiệt độ, nếu ánh nắng chiếu trực tiếp thì mở máy phun sương và đóng màn phủ xung quanh, nếu nhiệt độ quá thấp thì bật hệ thống bóng điện. Đối với việc thu hái nấm, nấm bào ngư hàng ngày bỏ ra khoảng 10-15 phút, còn đối với nấm linh chi sau 5 tháng trồng thì có 3 đợt thu hoạch, nếu dùng máy sấy thì chỉ một ngày là sấy khô hết; phơi nắng cũng chỉ mất một công sáng mang ra tối cất vào.

Khí hậu ở Sông Hinh cũng hỗ trợ tốt cho quá trình sinh trưởng và phát triển của các loại nấm. Ở đây nhiệt độ trung bình khoảng 24,9°C, độ ẩm bình quân 82% rất phù hợp để trồng nấm.

Theo Phòng NN-PTNT huyện Sông Hinh, sau hơn 1 năm trồng nấm, hiệu quả kinh tế ước tính ban đầu: Nấm linh chi với 3.600 bịch, thu về 64,8kg (0,18kg/bịch phơi), giá bán 600.000 đồng/kg nấm tươi, doanh thu gần 39 triệu đồng. Vì vậy, Phòng NN-PTNT huyện đã triển khai mô hình để tạo thêm nghề mới cho lao động nông thôn. Đây là một trong những hướng phát triển kinh tế cho người dân địa phương.

- **Tỉnh Bình Định**

Và sau gần 2 năm được trồng thử nghiệm nấm linh chi ở 2 mô hình, Trung tâm Ứng dụng tiến bộ KHCN Bình Định đã kết luận: Cây nấm linh chi phù hợp với điều kiện trồng ở Bình Định, cho hiệu quả kinh tế cao và có thể nhân rộng.

Cụ thể như sau: Từ năm 2011, Trung tâm Ứng dụng tiến bộ KHCN Bình Định - đơn vị tổ chức thực hiện mô hình trồng nấm linh chi, đã triển khai 2 mô hình:

- Tại Trại nghiên cứu, thực nghiệm KHCN của Trung tâm (ở xã Phước An, huyện Tuy Phước). Theo thống kê của Trung tâm, qua 12 đợt trồng, tỉ lệ bịch phôi sống và phát triển thành nấm đạt cao, trên 90%. Sau khi trồng từ 75-90 ngày, nấm linh chi cho thu hoạch. Mô hình cho thu hoạch được trên 550 kg nấm tươi (184 kg nấm khô).
- Tại hộ ông Phạm Ngọc Dũng thôn Thạch Xuân, xã Hoài Hương (Hoài Nhơn) trồng 650 bịch phôi nấm linh chi trên diện tích 30m². Ông Dũng cho biết: Qua 4 đợt trồng tổng cộng 650 bịch phôi, thu hoạch được 47 kg nấm tươi. Nấm linh chi phát triển khá tốt, dễ chăm sóc, ít tốn diện tích. Hiện tại, sản phẩm nấm thu được đã được tiêu thụ tại địa phương, với giá bán 400 ngàn đồng/kg nấm khô thì lợi nhuận 1,5 triệu đồng/1.000 bịch phôi. Nếu người trồng nấm tự sản xuất bịch phôi thì lợi nhuận là 2,3 triệu đồng/ 1.000 bịch phôi. Sắp tới tôi sẽ tiếp tục trồng khoảng 2.000 bịch phôi nữa

Qua đó, mô hình trồng nấm đã được nhân rộng trong chương trình nông thôn miền núi giai đoạn từ 2011 đến nay do Sở KH&CN tiến hành đối với dự án “Xây dựng mô hình ứng dụng tiến bộ KH&CN sản xuất và chế biến nấm ăn, nấm dược liệu quy mô công nghiệp tại tỉnh Bình Định”, đã được Trung tâm Ứng dụng tiến bộ KH&CN Bình Định triển khai thực hiện từ năm 2014.

Trên cơ sở đó, Sở KH&CN đề nghị cơ quan chủ trì có kế hoạch đẩy mạnh công tác tuyên truyền, phổ biến, nhân rộng kết quả của dự án đến các hộ dân có nhu cầu sản xuất nấm trên các địa bàn đã triển khai và nhân rộng mô hình ra các địa phương khác, đặc biệt là vùng có tiềm năng lớn về nguồn nguyên liệu trồng nấm như huyện Hoài Nhơn, thị xã An Nhơn. Chuyển giao quy trình, kỹ thuật cho các tổ chức, cá nhân có nhu cầu để tăng cường các cơ sở sản xuất bịch phôi đạt yêu cầu, kịp thời cung ứng cho người dân. Tiếp tục nghiên cứu cải tiến công nghệ, quy trình sản xuất để nâng cao chất lượng giống nấm, bịch phôi nấm đạt tiêu chuẩn; đồng thời hạ giá thành các sản phẩm giống, góp phần tăng thu nhập cho người trồng nấm

- Tỉnh Quảng Nam

Những nghiên cứu về nấm lớn ở Trung bộ và Tây Nguyên đã được một số tác giả đề cập đến như: Patouillard, N. (1923, 1928), Joly P. (1968), Ngô Anh (2003),

Dörfelt, H., Trịnh Tam Kiệt, Berg, A. (2004), ...Tuy nhiên so với các khu vực khác, nghiên cứu nấm ở khu vực miền Trung vẫn còn ít, mặc dù khu hệ nấm ở đây được dự đoán là rất phong phú. Việc thu thập và định loại các loài nấm ở miền Trung, Tây Nguyên có ý nghĩa khoa học và thực tiễn rất đáng kể.

Bên cạnh núi Ngọc Linh, Tiên Phước là một huyện trung du phía tây của tỉnh Quảng Nam với khí hậu nhiệt đới gió mùa, đặc trưng với các trận mưa núi, mưa giông vào mùa hè, khí hậu lạnh ẩm kéo dài vào mùa đông. Chính đặc điểm khí hậu và thổ nhưỡng tại vùng núi Tiên Phước này mới đủ điều kiện để nấm lim xanh sinh trưởng và phát triển. Tại vùng núi Tiên Phước tỉnh Quảng Nam mới là vùng núi có các khu rừng già nguyên sinh rộng lớn, nhiều cây cổ thụ. Nấm lim xanh mọc trên gốc và rễ cây lim đã chết mới là loại nấm có giá trị cao vì thế số lượng nấm lim xanh không nhiều. Sau khi cây lim bị đốn thì phải đến 3 – 4 năm sau mới thấy sự xuất hiện của nấm lim xanh, chúng mọc ra từ gốc, rễ và thân của cây lim bị chặt đổ. Vòng đời của nấm lim xanh tự nhiên khá ngắn, toàn bộ quá trình hình thành, sinh trưởng và phát triển chỉ kéo dài 8 – 9 tháng, thường từ tháng 3 đến cuối tháng 10 âm lịch. Nếu trong khoảng thời gian này nấm không được thu hoạch thì chúng cũng sẽ tự chết đi. Vì lim là loài thực vật sống theo quần thể vì thế nấm lim xanh cũng tồn tại theo quần thể chứ không mọc đơn lẻ như các loài nấm khác.

Ở Tiên Phước, Quảng Nam, người dân địa phương thường thu hái những cây nấm linh chi mọc tự nhiên dưới gốc các cây lim xanh nên đặt tên là nấm Lim xanh. Thật ra, tên chính thức của họ nấm này là Linh chi (tiếng Hoa Lingzhi nghĩa là Trường thọ), các tên khác là Thần thảo, Tiên thảo, Trường thọ, Vạn niên, tên khoa học là *Ganoderma lucidum* (nấm Da sáng) thuộc họ nấm gỗ, Linh chi (Ganodermataceae). Người Trung Quốc đã sử dụng Linh chi làm thuốc trên 2000 năm. Họ xếp Linh chi vào loại thượng phẩm, là một vị thuốc quý trong “Thần nông bản thảo” và “Bản thảo cương mục”....

Hiện đã có 6 loại nấm linh chi được nghiên cứu, sử dụng rất rộng rãi và rất chi tiết là: Linh chi xanh (Thanh chi, Long chi); Linh chi đỏ (Xích chi, Hồng chi, Đơn chi); Linh chi vàng (Hoàng chi, Kim chi); Linh chi trắng (Bạch chi, Ngọc chi; Linh chi đen (Hắc chi, Huyền chi); và Linh chi tím (Tử chi, Mộc chi). Trong đó Linh chi

đỏ là loại nấm có dược tính mạnh nhất, được nuôi trồng và sử dụng phổ biến trên thế giới, nhiều nhất là ở Bắc Mỹ, Nhật, Hàn Quốc, Đài Loan, Trung Quốc, Thái Lan, Việt Nam...

- Tỉnh Đồng Nai

Với khí hậu và thổ nhưỡng thích hợp cho quá trình sinh trưởng của các loại nấm, đặc biệt là nấm thảo dược, mô hình trồng nấm linh chi đỏ ở xã Đông Hòa, huyện Trảng Bom (Đồng Nai) hiện đang được các hộ nông dân trong vùng đầu tư theo chuỗi khép kín từ phối giống đến nuôi trồng, chế biến. Trại nấm cũng phải tuyệt đối sạch sẽ, thông thoáng, đảm bảo nhiệt độ từ 22-28° C và độ ẩm từ 80-90%; nhà trồng nấm linh chi đỏ phải được trang bị hệ thống tưới tự động, nền nhà được tráng xi măng để duy trì độ ẩm cho nấm phát triển; bao lưới xung quanh nhằm ngăn chặn côn trùng xâm nhập gây hại cho nấm.

Mô hình trồng nấm linh chi đỏ ở xã Đông Hòa hiện có quá trình sản xuất thực hiện theo chuỗi khép kín từ phối giống đến nuôi trồng, chế biến. Ở trang trại nấm linh chi, nguồn phế thải sau khi thu hoạch linh chi còn được tận dụng làm nguyên liệu bịch phối để sản xuất các loại nấm ăn. Sau khoảng 5 tháng, nấm linh chi dược liệu cho thu hoạch một lần thành phẩm.

Trước hiệu quả kinh tế mang lại từ việc trồng nấm linh chi dược liệu, Trung tâm Khuyến nông tỉnh Đồng Nai và Trạm Khuyến nông huyện Trảng Bom đã tổ chức hội thảo để đánh giá mô hình trồng nấm linh chi dược liệu tại địa phương. Hội thảo thu hút sự tham gia của đông đảo cán bộ, hội viên nông dân 17 xã, thị trấn trên địa bàn huyện Trảng Bom. Nấm linh chi dược liệu được coi là loài thảo dược có nhiều công dụng tốt cho sức khỏe.

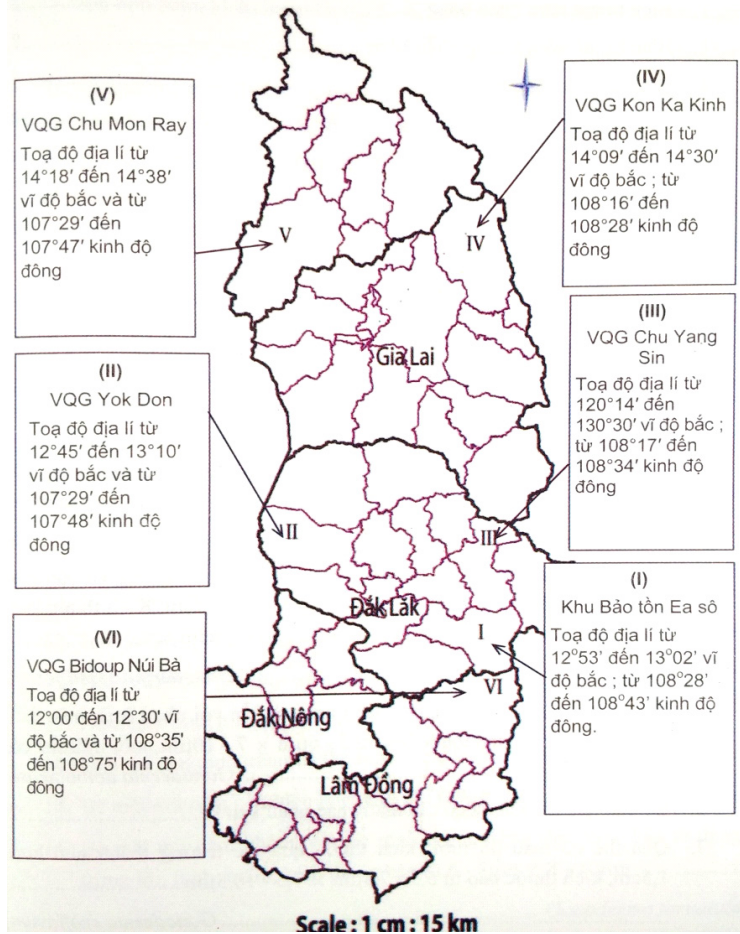
Với hiệu quả đã đạt được từ các mô hình, trạm Khuyến nông Trảng Bom sẽ tiếp tục mở các lớp tập huấn, hội thảo kỹ thuật trồng nấm trong thời gian tới tại các trại nấm làm ăn có hiệu quả, đạt năng suất, chất lượng tốt. Qua đó, bà con nông dân tham gia tập huấn, hội thảo sẽ có cơ hội được học hỏi kinh nghiệm lẫn nhau, để việc thực hiện mô hình trồng nấm linh chi dược liệu ngày càng hiệu quả, mang lại nguồn thu ổn định cho gia đình.

Khoảng 5 tháng nấm linh chi đỏ cho thu hoạch một lần. Nấm thành phẩm sau khi thu hoạch để đảm bảo đúng tiêu chuẩn vệ sinh phải phơi khô, hoặc sấy ở nhiệt độ từ 40-45⁰C. Nấm linh chi dược liệu có tác dụng kháng ung thư và điều tiết miễn dịch, ức chế sự phát tán các tế bào ung thư, ổn định huyết áp, hạ mỡ máu, giảm cholesterol trong máu, giải độc gan, làm mạnh gan và ức chế sự phóng thích histamine, cải thiện dị ứng...

Các nghiên cứu chung về Tây Nguyên:

Năm 2007, nhóm nghiên cứu Ngô Anh đã liệt kê 36 loài thuộc 1 chi của họ Ganodermataceae khi nghiên cứu về nấm dược liệu ở Thừa Thiên Huế. Lê Xuân Thám [27] trong quá trình điều tra xây dựng bảo tàng nấm ở Vườn quốc gia Cát Tiên từ năm 2005 - 2010, đã nghiên cứu, chụp hình được trên 30 loài, thuộc đầy đủ 4 chi và 1 chi mới, trong đó có đến 12 loài là bổ sung mới (phát hiện đầu tiên tại Cát Tiên và Việt Nam): *Amauroderma subresinosum*, *Amauroderma schomburgkii*, *Amauroderma ramosii*, *Amauroderma spp.1 - 4*, *Humphreya endertii*, *Haddowia longipes*, *Ganoderma ochrolaccatum*, *Ganoderma cupreolaccatum*, *Ganoderma thanglongense*, *G. curtisii*, *G. resinaceum*, *G. microsporum*, *G. koningsbergii* và *G. weberianumi*, *Ganoderma spp.1 - 4*,...

Riêng tại khu vực Tây Nguyên, đến năm 2013, Nguyễn Phương Đại Nguyên đã liệt kê và mô tả khá chi tiết được 26 loài thuộc chi *Ganoderma*.



Hình 3.1. Bản đồ đa dạng nấm Linh chi *Ganoderma* ở khu vực Tây Nguyên

Nhận xét: Vùng Tây Nguyên nằm ở cực nam của dãy núi Trường Sơn, gồm 5 tỉnh Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông và Lâm Đồng. Ngoài ra, địa hình của vùng Tây Nguyên bị phân cắt nhiều bởi các dãy núi khác nhau (Ngọc Linh, An Khê, Chư Dju, Chư Yang Sin...) và có nhiều khu bảo tồn, vườn quốc gia như Chư Yang Sin, Kon Ka Kinh, Yok Đôn và Chư Mom Ray. Có độ cao trung bình từ 400-2.200 m so với mặt nước biển. Khí hậu ở Tây Nguyên chia làm 2 mùa rõ rệt, mùa mưa từ tháng 5-11, mùa khô từ tháng 12 đến tháng 4 năm sau. Lượng mưa trung bình hàng năm khá lớn, từ 1.500-3.600 mm. Nhiệt độ trung bình hàng năm ở vùng có độ cao 450-800 m dao động trong khoảng 21- 23°C; ở các vùng có độ cao lớn hơn, nhiệt độ thấp hơn, dao động từ 18-21°C. Thực vật ở vùng Tây Nguyên rất phong phú và đa dạng, bao gồm rừng lá kim, rừng lá rộng, rừng hỗn giao lá kim lá rộng và rừng tre nứa. Với điều kiện tự nhiên này, tạo nên sự đa dạng về thành phần loài nấm lớn nói

chung và họ Ganodermataceae nói riêng. Dựa trên điều kiện tự nhiên của vùng, nhóm nghiên cứu đề xuất sẽ lấy mẫu ở 8 điểm: K’Bang – Gia Lai, Buôn Đôn – Đắk Lắk, Đức Trọng – Lâm Đồng, Đà Lạt – Lâm Đồng, Tiên Phước – Quảng Nam, Khánh Sơn – Khánh Hòa, Nam Cát Tiên – Đồng Nai, Kom Tum.

3.1.1.2. Kế hoạch thu mẫu nghiên cứu:

Mẫu nghiên cứu được thiết kế theo mẫu bên dưới

Bảng 3.1. Kế hoạch thu hoạch mẫu điều tra tại khu vực Tây Nguyên và các vùng lân cận

STT	Nơi lấy mẫu	Số lượng mẫu	Tên mã hóa	Yêu cầu mẫu lấy	Thời gian thu hoạch
01	K’Bang – Gia Lai	100 mẫu	GL-1 đến GL-100	Mẫu Linh chi phải là mẫu nấm dùng ăn hoặc uống được, còn đủ thể quả, mới được hoạch	Tháng 07 - 08/2018
22	Buôn Đôn – Đắk Lắk	100 mẫu	ĐL-1 đến ĐL -100		Tháng 07 - 08/2018
33	Đức Trọng – Lâm Đồng	100 mẫu	LĐ-1 đến LĐ-100		Tháng 07 - 08/2018
44	Đà Lạt – Lâm Đồng	100 mẫu	LĐ-101 đến LĐ-200		Tháng 08 - 09/2018
55	Tiên Phước – Quảng Nam	100 mẫu	QN-1 đến QN-100		Tháng 08 - 09/2018
66	Khánh Sơn – Khánh Hòa	100 mẫu	KH-1 đến KH-100		Tháng 08 - 09/2018
77	Nam Cát Tiên – Đồng Nai	100 mẫu	ĐN-1 đến ĐN-100		Tháng 08 - 09/2018
88	Kom Tum	100 mẫu	KT-1 đến KT-100		Tháng 08 - 09/2018

3.1.2. Thiết kế mẫu phiếu điều tra

Phiếu khảo sát có đầy đủ thông tin:

- Tiêu đề
- Thông tin chung: Mục tiêu khảo sát, địa điểm khảo sát, người khảo sát, ngày khảo sát
- Thông tin khảo sát: người được khảo sát, thông tin thu nhận về Linh chi

- Kênh thông tin để biết về Linh chi
- Vùng phân bố và điểm khác biệt
- Về vấn đề khai thác
- Về vấn đề buôn bán, thương mại Linh chi
- Cách sử dụng Linh chi
- Tác dụng của Linh chi
- Yếu tố quyết định chất lượng của Linh chi

3.1.3. Tiến hành thu mẫu nghiên cứu theo kế hoạch, thu mẫu khô và cả mẫu tươi, thiết lập điều kiện bảo quản và lưu trữ mẫu nghiên cứu

3.1.3.1. Tiến hành thu mẫu nghiên cứu theo kế hoạch tại các khu vực; thời gian thu mẫu trong vòng 3 ngày – 1 tuần.

Kế hoạch được tiến hành thực tế và kết quả thu nhận được trình bày ở Bảng 3.2. bên dưới:

Bảng 3.2. *Kết quả thu nhận thực tế tại các khu vực nghiên cứu*

STT	Nơi lấy mẫu	Kết quả thu được	Kết quả so với yêu cầu
1	K' Bang – Gia Lai	Mẫu thu được là 100 mẫu được đánh số từ GL-1 đến GL-100	100 %
2	Buôn Đôn – Đắk Lắk	Mẫu thu được là 140 mẫu được đánh số ĐL-1 đến ĐL-140	140 %
3	Đắk Nông	Mẫu thu được là 100 mẫu được đánh số ĐG-1 đến ĐG -100	100 %
4	Đà Lạt – Lâm Đồng	Mẫu thu được là 120 mẫu được đánh số LD-1 đến LD-120	120 %
5	Tiên Phước – Quảng Nam	Mẫu thu được là 150 mẫu được đánh số QN-1 đến QN-150	150 %
6	Khánh Sơn – Khánh Hòa	Mẫu thu được là 100 mẫu được đánh số KH-1 đến KH-100	100 %
7	Nam Cát Tiên – Đồng Nai	Mẫu thu được là 100 mẫu được đánh số ĐN-1 đến ĐN-100	100%
8	Kom Tum	Mẫu thu được là 110 mẫu được đánh số KT-1 đến KT-110	110 %
9	Vùng khác	Mẫu thu được là 140 mẫu được đánh số VK-1 đến VK-140	140 %

3.1.3.2. Thiết lập điều kiện bảo quản tại vùng thu mẫu:

Thu thập nấm:

Khi thu thập các mẫu nấm mọc trên mặt đất thì dùng dao xẻng hay thuổng để đào cả phần gốc của nấm. Phải đào cẩn thận và chú ý quan sát xem nấm có bao gốc, hay gốc kéo dài dạng rễ, có hạch nấm, hay rễ nấm có dạng sợi màu trắng; có tạo nên rễ nấm với thực vật bậc cao hay có quan hệ với kiến mối.... tạo thành vườn nấm hay không. Tuyệt đối không được dùng tay để nhổ nấm, vì như thế sẽ để lại các phần khác của nấm trong đất, dẫn đến những sai sót trong quá trình phân loại sau này. Để thu thập các loài nấm cục hay một số *Gastetomycetes* nằm trong đất, phải đào sâu trong đất ở những nơi có điều kiện sinh thái thích hợp, có sự phân bố của nhóm này.

Với những nấm sống có liên quan đến thực vật bậc cao, tổ kiến, tổ mối cần phải tiến hành khai quật cẩn thận theo chiều dọc của rễ nấm, và sợi nấm kéo dài để tìm mối liên quan trực tiếp giữa nấm và các sinh vật khác.

Đối với những loại nấm sống trên gỗ, trên cây thì phải dùng dao mà đục, dùng rìu để nạy, tách hay bở chúng ra khỏi giá thể (khi tách cần lấy cả phần nhỏ mẫu gỗ mà trên đó nấm đã sống bám vào, chú ý quan sát xem nấm có tạo nên thể hình rễ, hạch nấm dưới lớp vỏ hay trong gỗ không). Cần ghi chép cẩn thận xem nấm gây mục kiểu gì (trắng, nâu, hỗn hợp: mục vết thương, mục rễ, mục màng, mục thối, mục tạo nên những khoang trong nhỏ, xốp...) ở phần nào của gỗ hay cây mà trên đó nấm mọc.

Một số nấm có quả thể chất keo sống trên gỗ thường khô, teo khi trời khô, nắng và chỉ thấy rõ vào thời kỳ mưa ẩm khi mô trương phồng lên, vì vậy cần phải quan sát kỹ ở các khe để tránh bỏ sót.

Nếu gặp nhiều mẫu nấm cần thu thập ở các giai đoạn phát triển khác nhau thì phải quan sát lại và ghi chép cẩn thận sự hình thành quả thể của chúng, kể cả những dạng không điển hình về màu sắc và hình dạng.

Mẫu vừa thu xong phải ghi ký hiệu và nhãn hiệu ngay (Số hiệu, người lấy/ở mặt trước ; Ngày lấy, địa điểm lấy/ở mặt sau), ghi bằng loại mực không bị nhòe trong nước. Sau đó ghi chép những đặc điểm dễ biến mất của nấm vào phiếu điều tra đã in sẵn như: Màu sắc, mặt mũ nấm và các phần phụ (khô, nhầy dính, có vảy, lông, mụn, hydrophan, biến màu, có dịch sữa, vòng nấm một lớp hay hai lớp, dễ chuyển động

hay không,...). Nếu có điều kiện nên chụp ảnh lại, sau đó tiến hành gói nấm lại. Những nấm có quả thể dạng tán, dạng ô người ta dùng giấy báo gói lại thành dạng phễu, sau đó đặt phần cuống nấm xuống đáy phễu còn mũ nấm ở phía trên và gói lại. Mỗi mẫu nấm phải được gói riêng, để tránh lẫn lộn. Những nấm có kích thước nhỏ, dễ gãy vỡ nên để riêng trong các lọ nhỏ, hộp nhựa,....

Xử lý mẫu tạm thời trong phòng thí nghiệm:

Mẫu lấy về phải được xử lý ngay: mẫu để trên bàn, mở ra cho thoáng, nếu lớp giấy bao bị ướt, bản thì cần phải thay ngay. Sau đó tiến hành mô tả, ghi chép tiếp những đặc điểm của nấm vào phiếu điều tra như: kích thước, hình dạng, màu sắc, các đặc điểm của mặt mũ, mép mũ, bào thể, bụi bào tử, cuống nấm, thịt nấm,....

Để làm bách thảo khô: nấm được sấy bằng ánh nắng mặt trời, đốt củi, than, bếp điện hay tủ sấy điện. Nấm được xếp lên phen đan hay lưới thép mắt cáo, có gờ xung quanh, treo trên nguồn nhiệt. Để tránh nấm bị biến dạng và thay đổi màu sắc quá nhanh, cần sấy khô nấm ở độ nhiệt từ 60-80⁰C (khi sấy ở chỗ trống, có thể phủ lên trên một lớp sô mỏng để tránh ruồi, muỗi).

Đối với những nấm nạc có kích thước lớn có thể chế đôi hoặc bỏ thành nhiều lát mỏng để sấy cho mau khô

Đối với những nấm có thể mỏng, và những lát đã được bỏ mỏng có thể xếp giữa các lớp giấy bản, giấy báo, lót và phủ vải mịn rồi ép và sấy khô từ từ và thay giấy để hút bớt độ ẩm như ở thực vật bậc cao

Đối với nấm tán có thể xử lý mẫu như sau: dùng dao sắc bỏ qua quả thể ở chính giữa nấm thành 3-4 phiến, mỗi phiến dày 1,5-2 mm. Những lát cắt ở giữa được giữ nguyên để quan sát thịt của mũ, phiến, quan hệ giữa phiến và cuống cũng như cuống nấm. Lát phía ngoài gồm non nửa mũ và cuống, dùng dao hay thìa nhỏ nạo hết thịt nấm, phiến nấm và chỉ giữ lại biểu bì của mũ và cuống.

Hiện nay, một số phòng thí nghiệm làm mẫu khô theo phương pháp khô lạnh ở nhiệt và áp suất thấp trong tủ lạnh, phòng có nhiệt độ thấp, có bơm hút không khí ẩm. Mẫu nấm được xử lý theo phương pháp này rất ít bị biến dạng và gần như giữ được màu sắc

Trong điều kiện nhiệt đới, những mẫu nấm sau khi đã được xử lý như trên vẫn dễ bị ẩm trở lại, dễ bị các vi khuẩn, nấm mốc cũng như côn trùng phá hoại, vì vậy các mẫu nấm sau khi đã sấy khô, cần được bọc trong giấy bóng mờ hay cho vào túi polyethylen, có thể để silicagel, băng phiến hay xông hơi formalin, etc.....tốt nhất là tẩm trong dung dịch HgCl₂, trong cồn như ở thực vật bậc cao. Sau đó được xếp vào thùng carton, hộp gỗ, thùng kẽm và đậy kín

Để giữ cho nấm có hình dạng và màu sắc tốt hơn so với mẫu sấy khô, thông thường người ta cho nấm vào lọ thủy tinh có nút và ngâm trong cồn pha loãng 30-50%, hay dung dịch formalin 4% (nhưng vẫn có trường hợp nấm bị biến dạng). Gần đây, người ta ứng dụng phương pháp của Latz để chống lại hiện tượng trên (trộn lẫn 25g sulfat kẽm, 10ml formalin trong 1 lít nước cất rồi ngâm nấm vào), qua hơn 10 năm bảo quản, quan sát chưa thấy sự thay đổi đáng kể nào.

Cần có kiểm tra định kỳ, để khi phát hiện mẫu nấm nào bị côn trùng xâm nhập thì phải xử lý ngay, và cách ly với các mẫu nấm khác.

3.1.3.3. Thiết lập điều kiện bảo quản tại nơi nghiên cứu:

Nhóm nghiên cứu đã tiến hành lấy mẫu và thực hiện việc xử lý mẫu tại nơi thu hái, rồi tiến hành vận chuyển về nơi tiến hành nghiên cứu tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh đạt yêu cầu đề ra, đảm bảo lưu trữ được bào tử, quả thể, hình dạng của mẫu Nấm thu thập được, thuận lợi cho việc nghiên cứu tiếp theo với các bước bên dưới:

Bước 1: Phân loại nấm theo từng địa phương

Bước 2: Phân loại theo nhóm có hình thái giống nhau

Bước 3: Làm vệ sinh nấm

Bước 4: Phơi khô nấm dưới ánh nắng mặt trời

Bước 5: Xông cồn 90% để diệt nấm mốc và mối mọt

Bước 6: Phơi nấm sau khi xông cồn

Bước 7: Đóng gói, bảo quản

3.1.4. Phân loại mẫu thu được dựa trên hình thái quả thể, mã hóa mẫu theo khu vực thu mẫu, bảo quản và lưu trữ mẫu:

Từ 1060 mẫu nấm Linh chi tự nhiên tại các tỉnh Tây Nguyên và lân cận (huyện Tiên Phước, Quảng Nam; huyện K'bang, Gia Lai; huyện Buôn Đôn, Đắk Lắk; huyện Cát Tiên, Đồng Nai và huyện An Nhơn, Bình Định...) được phân loại bằng hình thái thành 85 nhóm mẫu

Kết quả mô tả mẫu thu nhận được trình bày theo Bảng 3.3 bên dưới:

Bảng 3.3. *Kết quả mô tả mẫu thu nhận theo từng khu vực thu hái*

STT	Nơi thu hái (Ký hiệu)	Ký hiệu mẫu	Mô tả
1	Đắk Lắk (ĐL)	ĐL-01	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên có vòng đồng tâm nổi rõ
2		ĐL-02	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu vàng. Mép tròn dày. Mặt trên vòng đồng tâm có khoảng cách không đều
3		ĐL-03	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu, dạng rẻ quạt. Mặt trên có vòng đồng tâm đi từ mép lên, có vân tán xạ
4		ĐL-04	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu vecni, dạng rẻ quạt. Mặt trên vòng đồng tâm đi từ mép, vân tán xạ mờ
5		ĐL-05	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu vecni bóng không đều. Mép gờ tròn nâu nhạt. Mặt trên có vòng đồng tâm
6		ĐL-06	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu vecni bóng. Mép gờ tròn màu nâu. Mặt trên có vòng đồng tâm, vân tán xạ
7		ĐL-07	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép gờ tròn nâu nhạt. Mặt trên có vòng đồng tâm, vân tán xạ không rõ
8		ĐL-08	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu, dạng rẻ quạt. Mép tròn. Mặt trên vòng đồng tâm ở giữa nấm, vân tán xạ rõ
9		ĐL-09	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu vecni bóng không đều. Mép tròn. Mặt trên có vòng đồng tâm
10		ĐL-10	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu, dạng rẻ quạt. Mép gờ tròn. Mặt trên có vân tán xạ
11		ĐL-11	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu vecni bóng. Mép gờ tròn nâu nhạt. Mặt trên có vòng đồng tâm
12	Khánh Hòa (KH)	KH-01	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu vecni bóng, đậm dần lên khi vào giữa nấm. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu nhạt. Mặt trên có vòng đồng tâm nổi rõ

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

STT	Nơi thu hái (Ký hiệu)	Ký hiệu mẫu	Mô tả
13		KH-02	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu vecni bóng, dạng rẻ quạt. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu nhạt. Mặt trên có vòng đồng tâm nổi, vân tán xạ
14		KH-03	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn. Mặt trên có vòng đồng tâm nổi rõ đi từ mép dần lên vào giữa nấm
15		KH-04	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu, dạng rẻ quạt. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu nhạt. Mặt trên có vòng đồng tâm nổi rõ, vân tán xạ mờ
16		KH-05	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu vecni bóng xen lẫn nâu vàng, dạng rẻ quạt. Mép tròn. Mặt trên có vòng đồng tâm nổi rõ, không đều, vân tán xạ
17		LĐ-01	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu, không láng, dạng rẻ quạt. Mép tròn. Mặt trên vòng đồng tâm không rõ, vân tán xạ mờ
18	Lâm Đồng (LĐ)	LĐ-02	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu, dạng rẻ quạt. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên có vòng đồng tâm nổi rõ, không đều
19		LĐ-03	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu, mọc nhiều tầng. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên có vòng đồng tâm nổi rõ, đi từ mép dần vào giữa nấm
20		LĐ-04	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu, mọc thành tầng. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên có vòng đồng tâm nổi rõ, không đều
21		LĐ-05	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu, dạng rẻ quạt. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu nhạt. Mặt trên có vòng đồng tâm và vân tán xạ không rõ
22		LĐ-06	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu, dạng rẻ quạt, mọc thành tầng. Mép tròn. Mặt trên có vòng đồng tâm, vân tán xạ mờ
23		LĐ-07	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu, dạng rẻ quạt, mọc thành tầng. Mép tròn. Mặt trên có vòng đồng tâm không rõ, vân tán xạ mờ
24		LĐ-08	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu có lốm đốm màu vecni, dạng rẻ quạt. Mép tròn. Mặt trên vòng đồng tâm nổi gờ lên, vân tán xạ mờ
25		Kontum (KT)	KT-01

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

STT	Nơi thu hái (Ký hiệu)	Ký hiệu mẫu	Mô tả
			từ mép rõ vào dần giữa nấm không rõ, vân tán xạ mờ
26		KT-02	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu vecni sậm màu, bóng láng, dạng vỏ sò. Mép tròn. Mặt trên vòng đồng tâm nổi lên, từ mép
27		KT-03	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu có lốm đốm màu vecni, dạng rẻ quạt. Mép tròn. Mặt trên vòng đồng tâm nổi rõ từ mép, vân tán xạ mờ
28		KT-04	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu có lốm đốm màu vecni, dạng rẻ quạt. Mép tròn, gờ mép nổi rõ. Mặt trên vòng đồng tâm nổi, vân tán xạ tạo thành những nếp nhăn trên bề mặt nấm
29		KT-05	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu có lốm đốm màu vecni, dạng rẻ quạt. Mép tròn. Mặt trên vòng đồng tâm nổi gờ lên, vân tán xạ mờ
30	Đăk Nông (ĐNo)	ĐNo-01	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt, màu nâu có lẫn màu nâu vecni. Mép tròn. Mặt trên vòng đồng tâm không đều, vân tán xạ
31		ĐNo-02	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng tròn, mọc thành tầng, màu nâu, vào giữa nấm có màu nâu vecni sậm. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu nhạt. Mặt trên sần sùi, vòng đồng tâm
32		ĐNo-03	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt, mọc đơn hoặc thành tầng, màu nâu vecni, bóng. Mép tròn, gờ mép tròn dày màu nâu nhạt. Mặt trên thể quả vòng đồng tâm nổi thành từng vòng to, lõm dần xuống khi vào giữa nấm, vân tán xạ
33		ĐNo-04	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng tròn, màu nâu nhạt đi dần vào giữa thể quả là màu nâu đỏ đến vecni nâu, bóng. Mép tròn, gờ mép màu nâu nhạt. Mặt trên thể quả vòng đồng tâm rõ, vân tán xạ mờ
34		ĐNo-05	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt, màu nâu vecni, bóng. Mép tròn, gờ mép màu nâu. Mặt trên thể quả vòng đồng tâm rõ, vân tán xạ dày làm cho mặt thể quả nhiều nếp nhăn, ở giữa thể quả nhô cao
35		ĐNo-06	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt, màu nâu vecni, bóng. Mép tròn, gờ mép màu nâu. Mặt trên thể quả vòng đồng tâm, vân tán xạ

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

STT	Nơi thu hái (Ký hiệu)	Ký hiệu mẫu	Mô tả	
36		ĐNo-07	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt, mọc thành tầng, màu nâu lẫn màu vecni. Mép tròn, gờ mép tròn dày màu nâu. Mặt trên vòng đồng tâm nổi thành vòng rõ, vân tán xạ	
37		ĐNo-08	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt, màu nâu lẫn màu vecni. Mép tròn, gờ mép tròn dày màu nâu. Mặt trên vòng đồng tâm đi từ mép lên, vân tán xạ nổi làm cho mặt thể quả có dạng rẻ quạt	
38		ĐNo-09	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt, màu nâu lẫn màu vecni. Mép tròn, gờ mép tròn dày màu nâu. Mặt trên vòng đồng tâm nổi thành vòng lớn, vân tán xạ nổi làm cho bề mặt có dạng rẻ quạt, ở giữa thể quả hơi lõm	
39		ĐNo-10	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng tròn, màu nâu. Mép tròn, gờ mép tròn dày. Mặt trên vòng đồng tâm nổi thành vòng lớn, vân tán xạ mờ, ở giữa thể quả hơi lõm	
40		ĐNo-11	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt, màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép tròn dày. Mặt trên vòng đồng tâm nổi thành vòng lớn đi từ mép dần lên, vân tán xạ mờ, ở giữa thể quả hơi lõm	
41		ĐNo-12	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng tròn, mọc thành tầng, màu nâu vecni sậm. Mép tròn, gờ mép tròn màu nâu nhạt. Mặt trên vòng đồng tâm nổi thành vòng lớn đi từ mép dần lên, vân tán xạ mờ, ở giữa thể quả nhô cao	
42		ĐNo-13	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt, mọc thành tầng, màu nâu nhạt. Mép tròn, gờ mép tròn. Mặt trên vòng đồng tâm đi từ mép dần lên, vân tán xạ không đều	
43		ĐNo-14	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt, màu nâu có lốm đốm màu vecni. Mép tròn. Mặt trên vòng đồng tâm đi từ mép lên, vân tán xạ	
44		Gia Lai (GL)	GL-01	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm nổi
45			GL-02	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm nổi gờ lên không đều

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

STT	Nơi thu hái (Ký hiệu)	Ký hiệu mẫu	Mô tả
46		GL-03	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi
47		GL-04	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, chải rộng, vòng đồng tâm nổi gồ lên từ mép và nhỏ dần khi vào giữa thể quả
48		GL-05	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mặt trên thể quả sần sùi, có nhiều lớp
49		GL-06	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt màu nâu. Mép tròn. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm có nhiều lớp đi từ mép lên cao dần
50		QN-01	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, bị nứt rạn, vòng đồng tâm nổi từng lớp (như bậc thang)
51		QN-02	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm nổi từng lớp
52	Quảng Nam (QN)	QN-03	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm nổi từng lớp dày từ mép lên, vân tán xạ không rõ
53		QN-04	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm nổi từng lớp dày từ mép lên (nổi lên thành từng cục u nần)
54		QN-05	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm nổi từng lớp dày từ mép lên (nổi lên thành từng cục u nần)
55		QN-06	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm nổi từng lớp dày từ mép lên
56		QN-07	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm nổi từng lớp dày từ mép lên, vân tán xạ làm cho bề mặt thể quả như hình quạt
57		QN-08	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, nứt rạn, vòng đồng tâm nổi từng lớp dày từ mép lên
58		QN-09	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

STT	Nơi thu hái (Ký hiệu)	Ký hiệu mẫu	Mô tả
			tâm nổi từng lớp dày từ mép lên, đi dần lên cao như bậc thang, có vân tán xạ
59		QN-10	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm nổi từng lớp dày từ mép lên
60		QN-11	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm nổi từng lớp dày từ mép lên (nổi lên thành từng cục u nần), giữa các vòng đồng tâm có rãnh
61		QN-12	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm nổi từng lớp dày từ mép lên (nổi lên thành từng vòng), giữa các vòng đồng tâm có rãnh , ở giữa thể quả hơi lõm
62		QN-13	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm từ mép lên, giữa các vòng đồng tâm có rãnh
63		QN-14	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng rẻ quạt màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm từ mép lên, giữa các vòng đồng tâm có rãnh
64		ĐN-01	Nấm lớn, hóa gỗ, dạng tròn, màu nâu vecni, bóng. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần, vòng đồng tâm nổi từng lớp (như bậc thang), giữa các vòng đồng tâm có rãnh
65	Đồng Nai (ĐN)	ĐN-02	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả vòng đồng tâm nổi từng lớp từ mép lên, vân tán xạ
66		ĐN-03	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả có vòng đồng tâm không rõ, vân tán xạ không rõ
67		ĐN-04	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm nổi từng lớp từ mép lên, vân tán xạ
68	Các vùng khác (VK)	VK-01	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, màu nâu vecni, bóng. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả vòng đồng tâm, vân tán xạ

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

STT	Nơi thu hái (Ký hiệu)	Ký hiệu mẫu	Mô tả
69		VK-02	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, màu nâu . Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm từ mép lên, giữa thể quả nhô cao
70		VK-03	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, mọc thành tầng, màu nâu đỏ xen lẫn màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm từ mép lên, giữa thể quả nhô cao, vân tán xạ tạo thành những nếp nhăn
71		VK-04	Nấm lớn, hóa gỗ, hình tròn, mọc thành tầng, màu nâu xen lẫn màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép dày. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm từ mép lên, vân tán xạ mờ
72		VK-05	Nấm lớn, hóa gỗ, hình tròn, mọc thành tầng, màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm từ mép lên, vân tán xạ mờ
73		VK-06	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, mọc đơn hoặc tầng, màu nâu xen lẫn màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm từ mép lên, vân tán xạ tạo thành nếp nhăn trên thể quả
74		VK-07	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, mọc đơn hoặc tầng, màu nâu xen lẫn màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu nhạt. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm, vân tán xạ tạo thành nếp nhăn trên thể quả
75		VK-08	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, màu nâu xen lẫn màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm tạo nếp lớn, vân tán xạ tạo thành nếp nhăn trên thể quả, ở giữa hơi lõm
76		VK-09	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, mọc đơn hoặc tầng, màu nâu xen lẫn màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm tạo nếp lớn, vân tán xạ tạo thành nếp nhăn trên thể quả
77		VK-10	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, mọc đơn hoặc tầng, màu nâu xen lẫn màu nâu vecni, bóng. Mép tròn,

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

STT	Nơi thu hái (Ký hiệu)	Ký hiệu mẫu	Mô tả
			gờ mép dày màu nâu. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm tạo nếp lớn, vân tán xạ tạo nếp nhăn trên thể quả
78		VK-11	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, màu nâu xen lẫn màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu. Mặt trên thể quả sần sùi, vòng đồng tâm không rõ
79		VK-12	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu. Mặt trên thể quả bóng, vòng đồng tâm từ mép lên tạo thành những vòng đồng tâm lớn, vân tán xạ tạo nên những nếp nhăn trên bề mặt
80		VK-13	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, màu nâu đỏ vào giữa nấm có màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu. Mặt trên thể quả bóng, hơi sần, vòng đồng tâm từ mép lên tạo thành những vòng đồng tâm lớn, vân tán xạ tạo nên những nếp nhăn trên bề mặt
81		VK-14	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, màu nâu đỏ có lốm đốm màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu. Mặt trên thể quả hơi sần, vòng đồng tâm từ mép lên tạo thành những vòng đồng tâm lớn, vân tán xạ tạo nên những nếp nhăn trên bề mặt
82		VK-15	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu lốm đốm màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu. Mặt trên thể quả hơi sần, vòng đồng tâm từ mép lên
83		VK-16	Nấm lớn, hóa gỗ, màu nâu lốm đốm màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu. Mặt trên thể quả hơi sần, vòng đồng tâm không rõ, vân tán xạ tạo thành nếp nhăn trên bề mặt thể quả
84		VK-17	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, màu nâu vecni. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu nhạt. Mặt trên thể quả hơi sần, vòng đồng tâm, vân tán xạ tạo thành nếp nhăn trên bề mặt thể quả
85		VK-18	Nấm lớn, hóa gỗ, hình rẻ quạt, màu nâu vecni, bóng. Mép tròn, gờ mép dày màu nâu. Mặt trên thể quả hơi sần, vòng đồng tâm từ mép (tạo thành những vòng lớn, có rãnh giữa các vòng), vân tán xạ tạo thành nếp nhăn trên bề mặt thể quả

3.1.5. Phân tích phiếu điều tra để xác định ít nhất 3 loài tiềm năng thuộc Linh chi *Ganoderma* spp

Kết quả khảo sát được thống kê được trình bày trong bảng ở phần Phụ lục

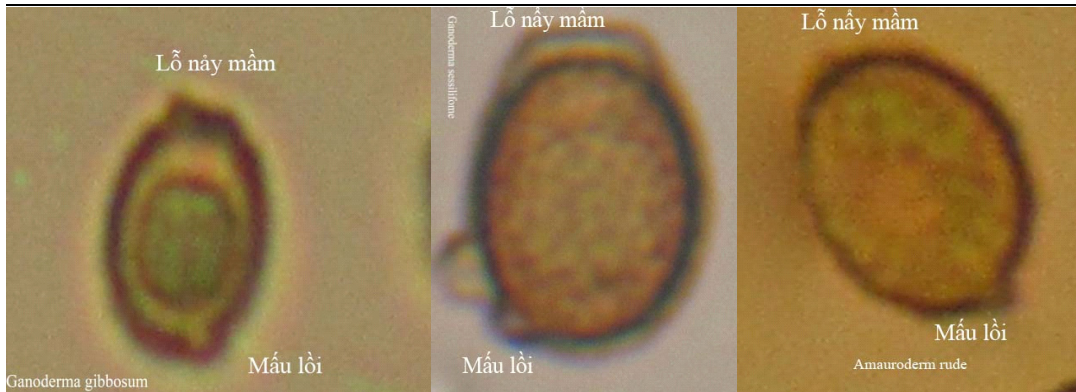
Qua phiếu khảo sát và thực tế khảo sát nhận thấy thông tin về tác dụng của Linh chi được biết nhiều trong khảo sát là từ sau năm 2000, về tác dụng và cách dùng cũng như giá tiền mua, bán Linh chi có rất nhiều thông tin nhưng tập trung vào một số vấn đề chính: Hàm lượng hoạt chất quyết định giá trị của nấm Linh chi, Linh chi có tác dụng bồi bổ sức khỏe và hỗ trợ điều trị một số bệnh. Về phần thu hái thì thông tin trải rộng theo biên độ khảo sát nhưng tập trung ở các vùng rừng núi thì sẽ có Linh chi. Qua khảo sát, nhận thấy Linh chi lim xanh, Linh chi vàng và Linh chi đỏ là ba loại linh chi được biết đến nhiều nhất và được sử dụng nhiều nhất.

3.2. Phân tích các đặc điểm sinh học, sinh thái, định danh và nghiên cứu cấu trúc vân tay sinh học

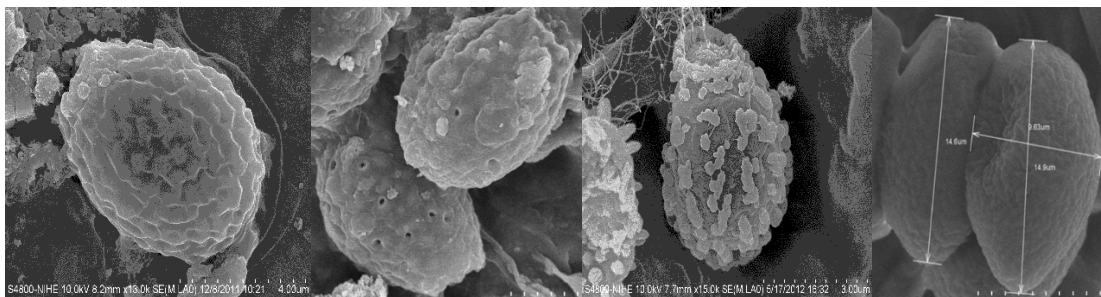
3.2.1. Định danh tên khoa học mẫu nấm Linh chi thu được dựa trên hình hình dạng bào tử và dựa vào khóa phân loại Nấm

Đánh giá chung

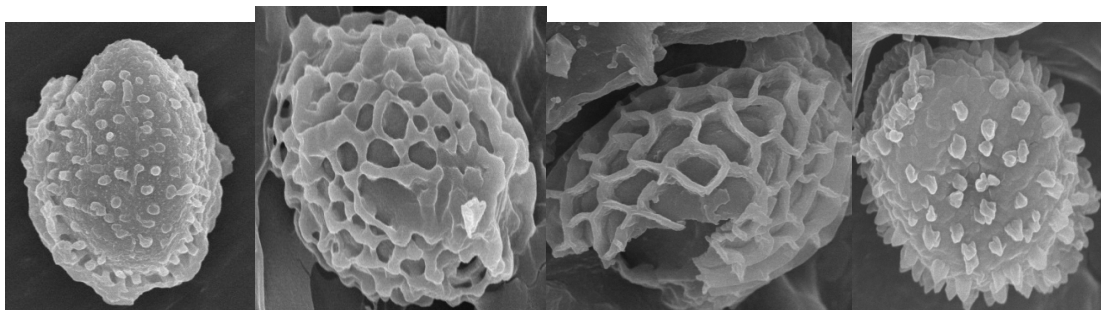
Họ Ganodermataceae Donk có cấu trúc bào tử khá đặc biệt so với các họ nấm khác, sự nhận dạng về hình thái cấu trúc bào tử rất rõ nét, đa số bào tử có hình trứng nhọn một đầu, bầu dục, hay gần tròn gồm 2 lớp, lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhỏ (trụ chống) có nhiều hình dạng khác nhau (hình bán nguyệt, hình trụ,..). Đặc điểm này chỉ có duy nhất ở họ Ganodermataceae Donk và hoàn toàn không có ở các họ nấm khác. Cấu trúc hình dạng bề mặt ngoài khá đa dạng như hình lưới, hình gai hay nhẵn. Bên cạnh đó bào tử của một số loài xuất hiện cấu trúc mấu lồi nhỏ như kiểu lỗ nảy mầm ở đáy bào tử đối diện với lỗ nảy mầm thường chệch sang 1 phía trái hay phải tùy loài. (*Ganoderma gibbosum*, *Ganoderma sessilifone*, *Amauroderma rude*)



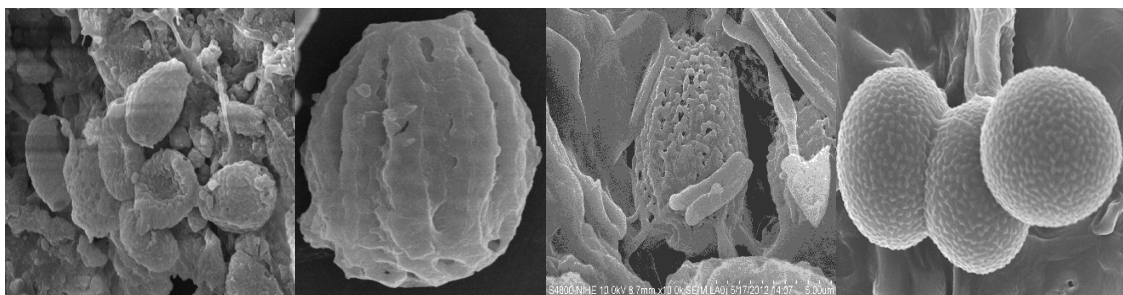
Hình 3.2. - Đặc điểm máu lồi của bào tử họ *Ganodermataceae* Donk.



G. multiplicatum *G. lucidum* *G. fornicatum* *A. subresinosum*

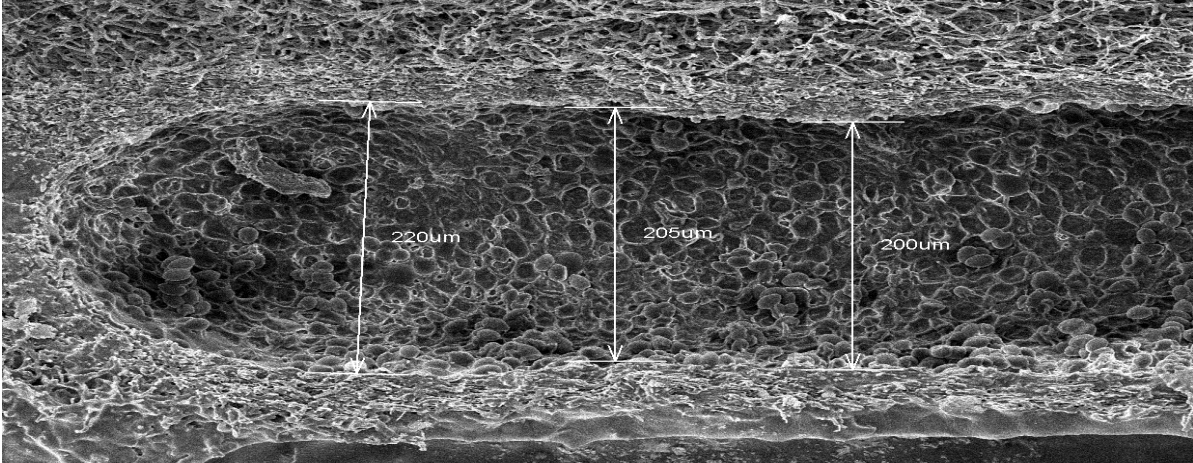


Ganoderma sp.



Ganoderma sp. *Amauroderma* sp.

Hình 3.3. Đa dạng về hình thái của bào tử nấm họ *Ganodermataceae* Donk

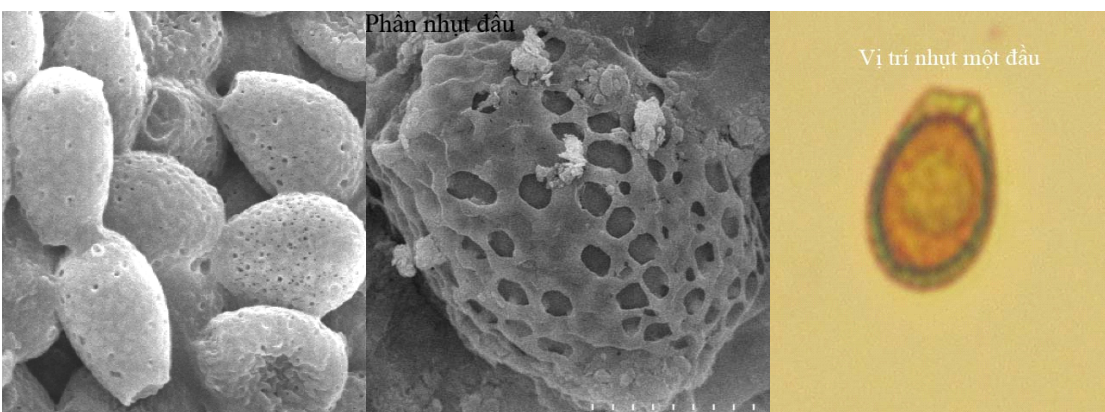


Hình 3.4. Mặt cắt ngang của ống nấm

Đặc điểm khác biệt của cấu trúc bào tử ở các chi trong họ *Ganodermataceae* Donk

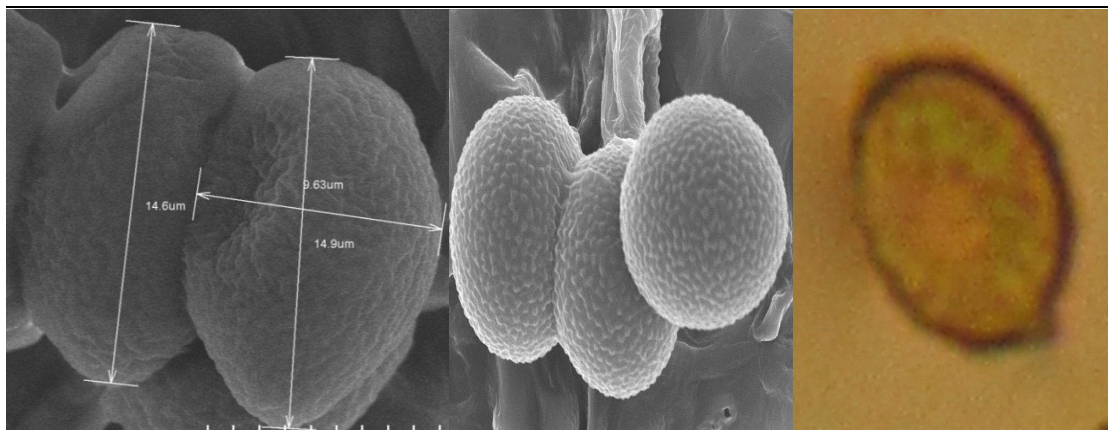
Đặc điểm cấu trúc bào tử của họ *Ganodermataceae* Donk có đặc trưng riêng là bào tử có dạng hình trứng, hình tròn hay bầu dục, gồm hai lớp màng (lớp màng ngoài thường nhẵn, lớp trong có gai nhỏ...).

Đối với chi *Ganoderma* thuộc họ *Ganodermataceae* Donk có đặc trưng riêng là dạng hình trứng nhọt một đầu (phần lõ nẩy mầm).



Hình 3.5. Đặc trưng nhận diện bào tử chi *Ganoderma*,

Đối với chi *Amauroderma* thuộc họ *Ganodermataceae* có đặc trưng là dạng hình trứng hay gần tròn không nhọt đầu.



Hình 3.6. Đặc trưng nhận diện bào tử chi *Amauroderma*.

Dựa vào khóa phân loại nấm của thầy Trịnh Tam Kiệt: Hình ảnh thể nấm, kích thước bào tử, kích thước sợi nấm

85 nhóm mẫu được phân loại thành 43 loài thuộc 2 chi: *Ganoderma* và *Amauroderma*

STT	Nhóm mẫu ký hiệu	Mô tả	Đề xuất tên khoa học
01	03 nhóm mẫu	Quả thể có màu xám đen. Quả thể khi non có dạng vò tròn màu trắng viền đen, sau phát triển thành hình tròn. Bào tử hình trứng hay hình bầu dục, có khi gần tròn, kích thước 6 - 8 × 8 - 10 (13) μm	<i>Amauroderma coltricioides</i>
02	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu xám nâu, cuống nấm ngắn hay không có. Mũ nấm hình tròn hay gần tròn, đường kính 5 – 20 cm, mặt trên mũ nấm xù xì, phủ lớp vỏ mỏng, màu nâu đen ở trung tâm viền ngoài nhạt hơn. Bào tử hình cầu hay gần tròn hoặc hình elip, có đường kính 4 – 6 μm × 7 – 9 μm ; bề mặt vỏ bào tử nhẵn, nội chất có màu nâu gỉ sắt.	<i>Amauroderma conjunctum</i> (Lloyd.)
03	05 nhóm mẫu	Quả thể có màu đen hay xám đen, kích thước quả thể 13 – 15 cm × 7 – 9 cm, dày khoảng 1 cm. Mũ nấm hình quả thận hay tròn, bề mặt mũ nấm màu xám đen, có các nếp nhăn, gồ ghề, không nhẵn bóng, có cấu trúc vòng đồng tâm rõ rệt và không có vân thớ phóng xạ. Bào tử hình trứng, kích thước bào tử khoảng 6 – 8 μm × 8 – 10 μm ; nội chất có màu vàng gỉ sắt.	<i>Amauroderma exile</i> (Berk.).

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

04	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu sẫm đến nâu đen, viền nấm khi khô có màu đen, cuống nấm hoàn chỉnh. Mũ nấm dạng tròn lượn sóng, đường kính 2 – 7 cm, dày 0,3 – 1 cm ; mặt trên mũ nấm có nhiều nếp nhăn. Bào tử hình cầu đến elip, đường kính 4 – 7 μm \times 8 – 10 μm ; màu gỉ sắt, nội chất màu nâu nhạt.	<i>Amauroderma niger.</i>
05	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đất hay nâu đen và cuống nấm hoàn chỉnh. Mũ nấm hình quả thận hay tròn, đường kính 5 – 15 cm, dày 0,9 - 2,1 cm; mặt trên mũ nấm xù xì, phủ lớp vỏ mỏng, màu nâu xám và có lớp lông mịn khó nhận thấy. Bào tử hình cầu, khá lớn, đường kính 9 – 12 μm \times 11 – 15 μm ; màu gỉ sắt, màng bào tử gồm hai lớp, nội chất có hạt rất mịn khó nhận thấy.	<i>Amauroderma rude (Berk.)</i>
06	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu xám, viền ngoài đen bóng, khi non có dạng cục tròn màu trắng viền đen, sau phát triển thành dạng quả thận hay hình quạt. Bào tử hình trứng, đường kính 4 - 6 μm \times 6 - 8 μm ; gồm 2 lớp màng có màu vàng sậm, nội chất màu nâu gỉ sắt.	<i>Amauroderma rugosum.</i>
07	03 nhóm mẫu	Quả thể có màu đen bóng. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm có nhiều nếp nhăn, cấu trúc vòng đồng tâm không vân thớ phóng xạ. Bào tử hình trứng kích thước 9 – 12 μm \times 14 – 16 μm , màng hai lớp, nội chất có màu vàng nhạt.	<i>Amauroderma subresinosum</i>
08	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu và cuống nấm hoàn chỉnh. Mũ nấm hình gân tròn, đường kính 5 - 15cm, dày 0,9 - 2,1cm ; mặt trên mũ nấm xù xì, phủ lớp vỏ mỏng, màu nâu xám và có lớp lông mịn. Bào tử hình trứng, khá lớn, đường kính 9 - 12,5 μm \times 12 - 16,5 μm ; màu nâu gỉ sắt. Bào tử gồm 2 lớp (lớp ngoài nhăn, lớp trong có gai nhẹ), nội chất có hạt rất mịn khó nhận thấy.	<i>Amauroderma sp1</i>
09	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu xám đen. Mũ nấm hình tròn, quả thể khi non có dạng vôi tròn màu trắng viền đen, sau phát triển thành hình tròn. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm rõ và không vân thớ phóng xạ. Bào tử hình trứng, đường kính 5 – 6 μm \times 7 – 10 μm ; nội chất có	<i>Amauroderma sp2.</i>

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

		màu vàng gỉ sắt, bào tử có 2 lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ.	
10	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đen nhiều tầng chia thùy sâu, mỗi thùy rộng khoảng 8 - 10cm. Mũ nấm gần tròn, mặt trên mũ nấm xù xì, có các rãnh nhăn nheo màu nâu đen và có các nhu nhon giống như gai, có cấu trúc vòng đồng tâm rất mờ, không vân thớ phóng xạ. Bào tử hình trứng hay elip có đường kính 5 – 7 µm × 8 – 10 µm ; bề mặt vỏ bào tử nhẵn, viền ngoài bào tử có màu xanh, nội chất có màu nâu gỉ sắt.	<i>Amauroderma</i> sp3.
11	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đen, dạng quạt, không cuống, có kích thước 2–5 cm x 3 – 6 cm, dày 11,5 cm. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm. Mép mũ tà, lượn sóng. Bề mặt mũ nấm gồ ghề, có màu nâu đen. Bào tử hình trứng nhut một đầu, kích thước 2 - 3 µm x 4 -6 µm, màng hai lớp: lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ, nội chất có màu nâu vàng.	<i>Ganoderma adspersum</i> (Schulzer)
12	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đất hay màu xám, không bóng láng. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn, sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và vân thớ phóng xạ. Bào tử hình trứng nhut một đầu, kích thước 4 - 6,5 µm × 7 - 9 (10) µm ; màng hai lớp (lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ), có màu nâu gỉ sắt.	<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat
13	03 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đen. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng, sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và không có vân thớ phóng xạ. Mép mũ hơi tà, không lượn sóng và không chia thùy. Bề mặt mũ nấm không bằng phẳng, có màu nâu xen lẫn màu đen, viền có màu đỏ đậm. Bào tử hình trứng nhut một đầu hay hình bầu dục, có khi gần tròn, kích thước 5-6 µm× 7-10 µm, màng hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ, nội chất có màu nâu gỉ sắt	<i>Ganoderma amboinense</i> (Lam.ex Fr.)
14	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đất. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng, sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và không có vân thớ phóng xạ. Mép mũ hơi tà, không lượn sóng và không chia thùy.	<i>Ganoderma austral</i> (Fr.) Pat

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

		Bào tử hình trứng nhọn một đầu hay hình bầu dục, có khi gần tròn, kích thước 5-7 μm × 7-11 μm , màng hai lớp: lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ, nội chất có màu nâu gỉ sắt.	
15	02 nhóm mẫu	Quả thể không cuống dạng móng ngựa, chất gỗ cứng, nấm mọc thành cụm, rời gốc trên cây lá rộng và gốc bám vào giá thể trên diện rộng. Mặt trên quả thể có dạng vành đai đồng tâm, màu nâu hồng; mép mũ tã; lớp da mặt quả thể dày tới 0,2 - 0,5mm dễ tách rời khỏi thịt nấm. Bào tử hình trứng nhọn một đầu, kích thước 5 - 7 μm × 8 - 10 μm ; màng hai lớp: lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ; nội chất màu nâu, chứa một vài hạt nhỏ.	<i>Ganoderma balabacense</i> Murrill
16	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu đỏ tươi, có viền màu trắng đục hay vàng nhạt. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng viền vàng, sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm không có cấu trúc vòng đồng tâm và vân thớ phóng xạ. Bào tử hình trứng nhọn một đầu, kích thước 5 - 7 μm × 9 - 11 (12) μm ; màng bào tử có hai lớp (lớp ngoài nhẵn mỏng, lớp trong dày hơn và có gai nhẹ), nội chất màu nâu gỉ sắt.	<i>Ganoderma capense</i>(Lloyd)
17	01 nhóm mẫu	Quả thể có mũ và cuống hoàn chỉnh. Mũ nấm dạng quạt hay hình quả thận hơi tròn, dẹt; mép mũ nấm tã; mặt trên mũ nấm có các vân thớ nhẵn, xếp phóng xạ toả ra từ cuống nấm tới mép mũ, có các vành đai đồng tâm, màu đen bóng, cuống nấm màu tím. Bào tử dạng trứng nhọn một đầu, kích thước 5,5 - 7,5 μm × 9,5 - 11,5 (13) μm ; màng dày hai lớp: lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ; nội chất màu gỉ sắt.	<i>Ganoderma cochlear</i>
18	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đất. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng, sau phát triển thành dạng quạt có khi tròn. Mặt trên mũ nấm không có cấu trúc vòng đồng tâm và vân thớ phóng xạ. Mép mũ tã, ít lượn sóng và không chia thùy. Bào tử hình trứng nhọn một đầu, kích thước 5 - 6,5 μm × 6 - 9 μm ; màng hai lớp (màng ngoài nhẵn, màng trong có gai nhẹ) và có màu nâu gỉ sắt, nội chất có màu xám xanh.	<i>Ganoderma croflavum</i>
19	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đỏ, bóng láng. Quả thể khi non có dạng hình trụ đầu đỉnh, sau phát triển	<i>Ganoderma flexipes</i> Pat

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

		thành dạng bán cầu. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm. Mép mũ nấm mỏng hay hơi tà, có lượn sóng và không chia thùy. Bề mặt mũ nấm màu vàng gỉ sắt, nâu, nâu đỏ, có lớp vỏ bóng láng như vecni. Bào tử hình trứng nhọn một đầu, kích thước 4 - 6,5 μ m \times 8,5 - 11,5 μ m ; màng hai lớp (lớp ngoài nhẵn, không màu ; lớp trong có gai nhẹ), có màu nâu gỉ sắt.	
20	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đen. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng, sau phát triển thành dạng tán hình bầu dục hay gần tròn. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và không có vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà, không lượn sóng và không chia thùy. Bề mặt mũ nấm không bằng phẳng, có màu đen. Bào tử hình trứng nhọn một đầu hay hình bầu dục có khi gần tròn, kích thước 4 - 6 μ m \times 9 - 12 μ m, màng hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ, nội chất có màu nâu gỉ sắt.	<i>Ganoderma fornicatum</i>
21	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đất. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn, sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm không có cấu trúc vòng đồng tâm và không vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà, lượn sóng và có chia thùy (mỗi thùy kích thước 4 - 5cm). Bề mặt mũ nấm gồ ghề, có màu nâu đất. Bào tử hình trứng, nhọn một đầu, kích thước 5 - 7 μ m \times 7 - 9 (10) μ m, màng hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ; nội chất viền ngoài có màu nâu gỉ sắt, bên trong có màu xanh lam	<i>Ganoderma gibbosum</i>
22	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đỏ bóng, viền ngoài khi non có màu vàng. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng viền vàng, sau phát triển thành dạng quạt hay dạng móng. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và không vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà, lượn sóng và chia thùy. Bào tử dạng trứng, nhọn một đầu, kích thước 4 - 6 μ m \times 7 - 9 μ m ; màng bào tử hai lớp (lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ), nội chất vàng gỉ sắt.	<i>Ganoderma lobatum</i>
23	03 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đỏ, bóng láng. Quả thể khi non có dạng cục tròn, sau phát triển thành dạng thận. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và vân thớ phóng xạ. Mép mũ nấm mỏng	<i>Ganoderma lucidum</i>

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

		hay hơi tà, có lượn sóng và chia thùy. Bề mặt mũ nấm màu vàng gỉ sắt, nâu, nâu đỏ, nâu hồng, có lớp vỏ bóng láng như vecni. Bào tử hình trứng nhọn một đầu, kích thước 5 - 6,5 μm \times 8,5 - 11,5 μm ; màng hai lớp (lớp ngoài nhẵn, không màu ; lớp trong có gai nhẹ), có màu nâu gỉ sắt.	
24	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đỏ bóng, viền ngoài khi non có màu trắng. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng viền vàng, sau phát triển thành dạng quạt hay dạng móng. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và không vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà. Bề mặt mũ nấm gồ ghề, có màu đỏ bóng. Bào tử dạng trứng, nhọn một đầu, kích thước 4 – 6 μm \times 8 – 10 μm ; màng bào tử hai lớp, nội chất vàng sậm.	<i>Ganoderma mastoporum</i>
25	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu xám xen lẫn màu nâu. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng, sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và không có vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà, không lượn sóng và chia thùy (mỗi thùy 5 – 6 cm). Bào tử hình trứng nhọn một đầu hay hình bầu dục, có khi gần tròn, kích thước 4-6 μm \times 6,5 - 9 (10) μm , màng hai lớp (lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ), nội chất có màu nâu gỉ sắt.	<i>Ganoderma multiplicatum</i>
26	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu đỏ đậm. Quả thể khi non có dạng trụ, sau phát triển thành dạng tán gần tròn (dạng phễu đặc). Mặt trên mũ nấm màu trắng có khe rãnh dạng san hô, không có cấu trúc vòng đồng tâm và không có vân thớ phóng xạ. Bề mặt mũ nấm có màu đỏ đậm, bề mặt bào tử có màu trắng đục đến vàng sậm. Bào tử hình trứng nhọn một đầu, màng hai lớp: lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ; nội chất có màu nâu gỉ sắt.	<i>Ganoderma multipileum</i>
27	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đỏ hay nâu đất. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng viền vàng, sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà, lượn sóng và chia thùy (mỗi thùy có kích thước 4 – 10 cm). Bào tử hình trứng, nhọn một đầu, kích thước 6 – 8 μm \times 10 - 12 (14) μm , màng hai lớp : lớp ngoài	<i>Ganoderma oroflavum</i> (Lloyd)

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

		nhẵn, lớp trong có gai nhẹ ; nội chất có màu nâu gỉ sắt.	
28	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu xám hơi vàng. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng xám, sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm không có cấu trúc vòng đồng tâm và không có vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà, lượn sóng và chia thùy (3 - 4 thùy, mỗi thùy có kích thước 4 – 5 cm). Bào tử hình trứng nhọn một đầu hay hình bầu dục có khi gần tròn kích thước 5-7(8) $\mu\text{m} \times 7 - 9 (10) \mu\text{m}$, màng hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ ; nội chất có màu nâu gỉ sắt.	<i>Ganoderma philippii</i>
29	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đỏ bóng, viền ngoài khi non có màu vàng. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng viền vàng, sau phát triển thành dạng quạt hay dạng móng. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và không vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà, không lượn sóng và không chia thùy. Bào tử dạng trứng, nhọn một đầu, kích thước 3 – 4 $\mu\text{m} \times 7 - 8 \mu\text{m}$; màng bào tử hai lớp.	<i>Ganoderma preifferi</i>
30	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đỏ hay nâu đất, khi non có viền trắng. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng, sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm sáng tối, không vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà, lượn sóng và chia thùy. Bào tử đơn bào, hình trứng nhọn đầu, kích thước 6,5 - 7,5 $\mu\text{m} \times 8,5 - 10,5 \mu\text{m}$; màng dày hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ ; nội chất màu nâu hay nâu xanh.	<i>Ganoderma pseudoferreum</i>
31	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu đỏ đậm, có dạng cánh hoa dâm bụi. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng viền màu nâu, sau phát triển thành dạng hình quạt. Mặt trên mũ nấm có khe rãnh, không có cấu trúc vòng đồng tâm rõ và không có vân thớ phóng xạ. Mép mũ mỏng, hơi lượn sóng và chia thùy (3 - 4 thùy, mỗi thùy có kích thước 2 – 3 cm). Bào tử hình trứng nhọn một đầu hay hình bầu dục, kích thước 6 -7 $\mu\text{m} \times 7 - 10 \mu\text{m}$, màng hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ ; nội chất có màu nâu gỉ sắt.	<i>Ganoderma sessiliforme</i>
32	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu vàng đất. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng, sau phát triển thành dạng quạt hay hình quả thận. Mặt trên mũ	<i>Ganoderma steyaertanum</i>

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

		nấm có cấu trúc vòng đồng tâm rõ và vân thớ phóng xạ. Mép mũ mỏng, lượn sóng không chia. Bề mặt mũ nấm gồ ghề, có màu vàng đất. Bào tử hình trứng nhọn một đầu hay hình bầu dục, có khi gần tròn, kích thước $6 - 7 \mu\text{m} \times 8 - 11 \mu\text{m}$, màng hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ ; nội chất có màu nâu gỉ sắt.	
33	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đen. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng đục, sau phát triển thành dạng móng hay hình quạt. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm rõ và không vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà, không lượn sóng và không chia thùy. Bề mặt mũ nấm gồ ghề, có các vân đồng tâm nổi, có màu nâu đen. Bào tử hình trứng nhọn một đầu, kích thước $5 - 7,5 \mu\text{m} \times 8 - 11 \mu\text{m}$; màng hai lớp (màng ngoài nhẵn, màng trong có gai nhẹ); có màu nâu gỉ sắt.	<i>Ganoderma subtornatum</i>
34	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu sáng hay nâu đất. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng viền vàng, sau phát triển thành dạng quạt hay gần tròn, mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và vân thớ phóng xạ. Mép mũ nấm có gờ nhỏ hơi cuộn xuống, lượn sóng không chia thùy. Bề mặt mũ nấm gồ ghề, có màu nâu đất. Bào tử hình elip hay hình trứng nhọn một đầu, kích thước $6 - 8 \mu\text{m} \times 8 - 10 \mu\text{m}$; màng dày gồm hai lớp (lớp ngoài mỏng và nhẵn bóng, lớp trong có gai nhẹ), nội chất màu nâu gỉ sắt.	<i>Ganoderma tornatum</i>
35	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đất. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng, sau phát triển thành dạng quạt gần tròn. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và không có vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà, không lượn sóng và không chia thùy. Bề mặt mũ nấm không bằng phẳng, có màu nâu đất. Viền ngoài dày gồm nhiều lớp. Bào tử hình trứng nhọn một đầu hay hình bầu dục có khi gần tròn, kích thước $5 - 7 \mu\text{m} \times 7 - 10 \mu\text{m}$, màng hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ; nội chất có màu nâu gỉ sắt.	<i>Ganoderma triangulatum.</i>
36	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu đỏ đậm, mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng viền màu đỏ, sau phát triển thành dạng quạt hay tròn. Mặt trên mũ nấm có màu đỏ tươi đến đỏ tím bóng láng, có cấu trúc vòng đồng tâm. Mép mũ nấm tà, hơi	<i>Ganoderma tropicum</i>

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

		lượn sóng và chia thùy, mỗi thùy kích thước 2 - 8 cm. Bào tử hình trứng nhọn một đầu hay hình bầu dục, kích thước 4 – 6 μm × 6 – 8 μm , màng hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ ; nội chất có màu nâu gỉ sắt.	
37	03 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đen. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng, sau phát triển thành dạng tán tròn. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và không có vân thớ phóng xạ. Mép mũ hơi tà, không lượn sóng và không chia thùy. Bề mặt mũ nấm không bằng phẳng, có màu nâu đất xen lẫn màu đen. Bào tử hình trứng nhọn một đầu hay hình bầu dục, có khi gần tròn, kích thước 3-4 μm × 5-7 μm , màng hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ ; nội chất có màu nâu gỉ sắt.	<i>Ganoderma</i> sp1
38	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đất. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng, sau phát triển thành dạng quạt hay gần tròn, tán nấm mới có thể sinh ra tiếp theo từ mặt dưới của bào tầng và phát triển tán nấm rộng ra tạo nên quả thể có nhiều tầng. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và không có vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà, lượn sóng và chia thùy. Bào tử hình trứng nhọn một đầu, tầng phủ bào tử bao kín không thấy tầng cột chống, kích thước 4 – 5 μm × 7 – 9 μm , màng hai lớp (lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ) ; nội chất có màu nâu gỉ sắt	<i>Ganoderma</i> sp2
39	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu trắng xám. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng, sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và không có vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà, không lượn sóng và chia thùy (3 thùy, mỗi thùy 4 - 5cm). Bề mặt mũ nấm không bằng phẳng, có màu trắng xám. Bào tử hình trứng nhọn một đầu hay hình bầu dục, có khi gần tròn, kích thước 5 – 6 μm × 7 – 10 μm , màng hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ; nội chất có màu nâu gỉ sắt.	<i>Ganoderma</i> sp3.
40	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu nâu đất. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng, sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng tâm và không có vân thớ phóng xạ. Mép	<i>Ganoderma</i> sp4.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

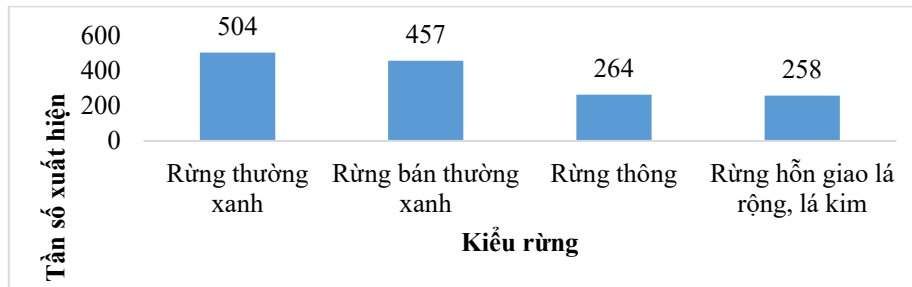
		mũ hơi tà, lượn sóng và chia thùy (2 - 3 thùy, mỗi thùy kích thước 4 – 10 cm). Bề mặt mũ nấm không bằng phẳng, có màu nâu đất. Bào tử hình trứng nhọn một đầu, kích thước 3 – 5 $\mu\text{m} \times 6 - 8,5 \mu\text{m}$, màng hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ ; nội chất có màu nâu gỉ sắt.	
41	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu xám hoặc nâu đất. Mũ nấm khi non có dạng cục tròn, sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm có nhiều khe rãnh có cấu trúc vòng đồng tâm và vân thớ phóng xạ mờ. Mép mũ tà, có lượn sóng và chia thùy. Bề mặt mũ nấm phần lớn là màu xám đậm, bề mặt mũ nấm sần sùi, gồ ghề. Bào tử hình trứng nhọn một đầu, kích thước 4 – 5 $\mu\text{m} \times 6 - 7\mu\text{m}$, màng hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ ; nội chất có màu nâu gỉ sắt.	Ganoderma sp.5.
42	02 nhóm mẫu	Quả thể có màu đen, Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng viền đen, sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng, không vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà, lượn sóng và chia thùy. Bề mặt mũ nấm gồ ghề, có màu đen. Bào tử đơn bào, hình trứng nhọn đầu, kích thước 4 - 6 $\mu\text{m} \times 8,5 - 10 \mu\text{m}$; màng dày hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ ; nội chất màu nâu hay nâu xanh.	Ganoderma sp.6
43	01 nhóm mẫu	Quả thể có màu đen có nhiều thùy, Mũ nấm khi non có dạng cục tròn màu trắng viền đen, sau phát triển thành dạng quạt. Mặt trên mũ nấm có cấu trúc vòng đồng, không vân thớ phóng xạ. Mép mũ tà, lượn sóng và chia thùy. Bề mặt mũ nấm gồ ghề, có màu đen. Bào tử đơn bào, hình trứng nhọn đầu, kích thước 3 – 5 $\mu\text{m} \times 5,5 - 8 \mu\text{m}$; màng dày hai lớp : lớp ngoài nhẵn, lớp trong có gai nhẹ ; nội chất màu nâu hay nâu xanh.	Ganoderma sp.7

3.2.2. Phân tích đặc điểm hình thái, sinh thái mẫu và điều kiện tự nhiên, môi trường, sinh thái khu vực thu mẫu (nhiệt độ, độ ẩm, độ cao, độ che phủ dưới tán...)

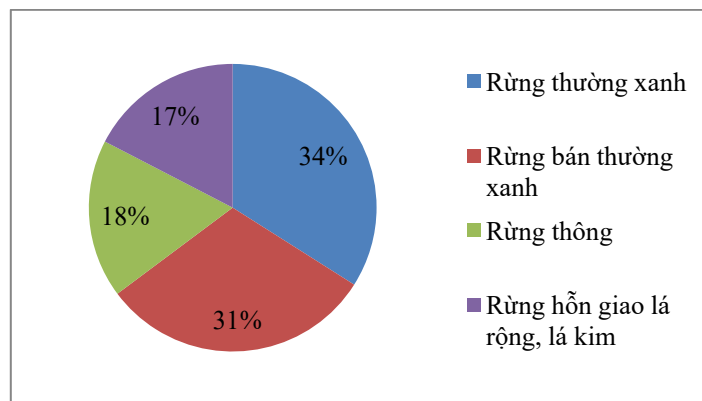
Tiến hành ghi nhận điều kiện sinh thái của các loài nấm linh chi ở 4 kiểu rừng: rừng thường xanh, rừng bán thường xanh, rừng thông, rừng hỗn hợp lá rộng và lá kim tại 8 địa phương: Đắk Nông, Đắk Lắk, Lâm Đồng, Gia Lai, Kom Tum, Đồng Nai, Khánh Hòa, Bình Định.

3.2.2.1. Ảnh hưởng của kiểu rừng đến sự phân bố các loài nấm thuộc họ *Ganodermataceae* Donk

Kết quả ảnh hưởng của kiểu rừng được thể hiện ở Hình 3.7 và Hình 3.8 bên dưới.



Hình 3.7. Phân bố các loài nấm họ *Ganodermataceae* Donk theo kiểu rừng

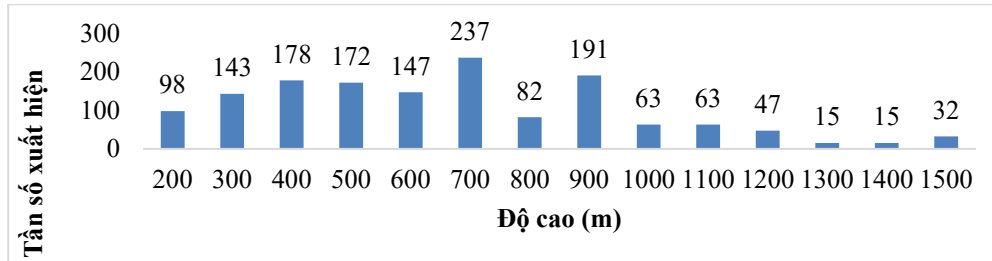


Hình 3.8. Tỷ lệ % các loài nấm họ *Ganodermataceae* Donk theo kiểu rừng

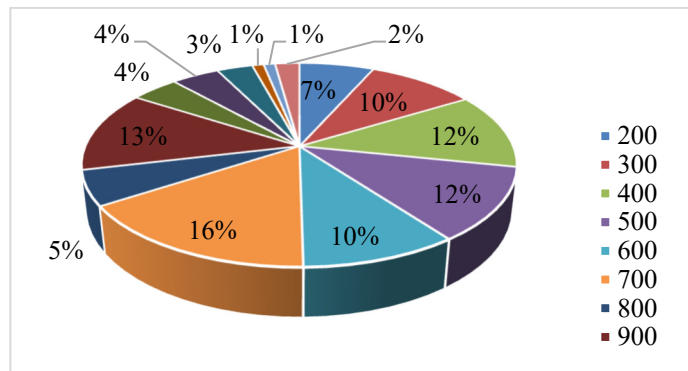
Từ những kết quả nghiên cứu thực địa ở Hình 3.7 và Hình 3.8 cho thấy rõ rằng sinh cảnh có ảnh hưởng đến sự xuất hiện quả thể của các loài nấm thuộc họ *Ganodermataceae*. Các loài nấm họ *Ganodermataceae* ở khu vực Tây Nguyên xuất

hiện chủ yếu ở các sinh cảnh rừng thường xanh và bán thường xanh là chủ yếu chiếm 65% so với 2 kiểu rừng còn lại. Ảnh hưởng của độ cao đến sự phân bố các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae Donk

Kết quả ảnh hưởng của độ cao được thể hiện ở Hình 3.9 và Hình 3.10 bên dưới.



Hình 3.9. Phân bố các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae Donk theo độ cao

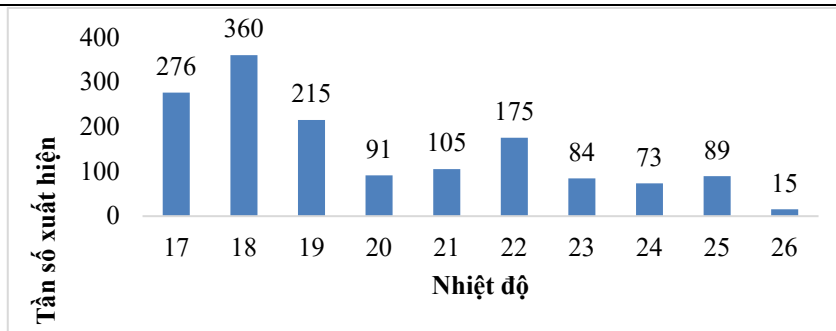


Hình 3.10. Tỷ lệ % các loài nấm họ Ganodermataceae Donk theo độ cao

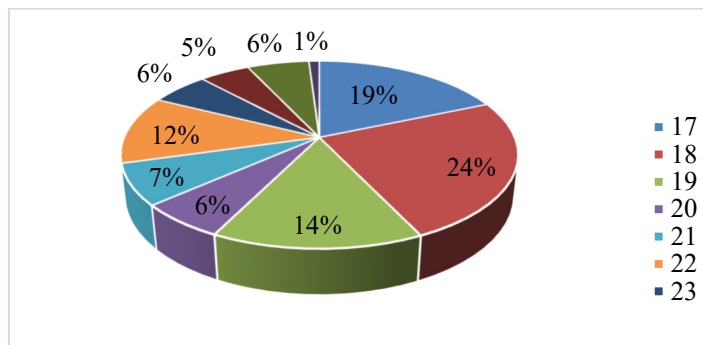
Từ kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của độ cao ở Hình 3.99 và Hình 3.1010 ta nhận thấy rằng, trong khoảng độ cao nghiên cứu từ 200 đến lớn hơn 1500 m so với mặt nước biển thì tần số xuất hiện của các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae có xu hướng tăng dần theo độ cao đến 200-900 m. Từ 1000 m đến 1500 m thì lại có xu hướng giảm dần. Nấm xuất hiện nhiều nhất ở độ cao từ 300 đến 700 m chiếm 50%. Từ kết quả trên chỉ ra rằng độ cao từ 300-700 m là độ cao phù hợp cho các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae sinh trưởng và phát triển.

3.2.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phân bố các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae Donk

Kết quả ảnh hưởng của nhiệt độ được thể hiện ở Hình 3.11 và Hình 3.12 bên dưới.



Hình 3.11. Phân bố các loài nấm thuộc họ *Ganodermataceae* theo nhiệt độ

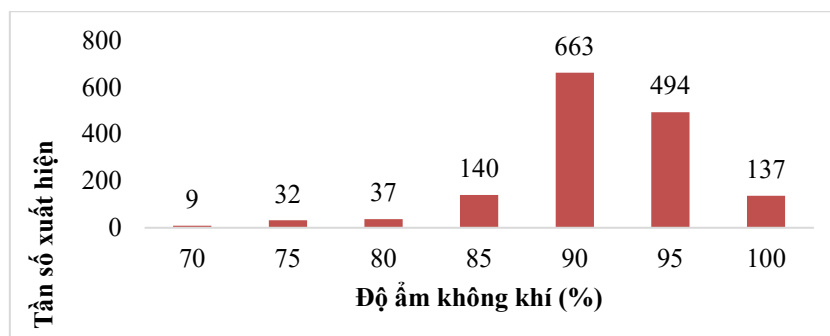


Hình 3.12. Tỷ lệ % các loài nấm thuộc họ *Ganodermataceae* theo nhiệt độ

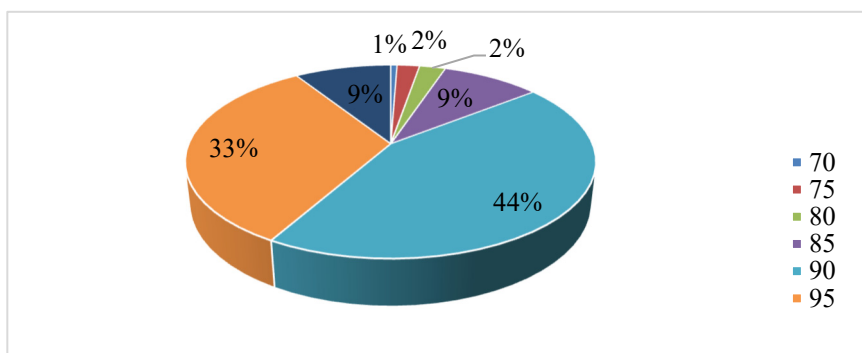
Từ kết quả ở Hình 3.11 và Hình 3.12, ta nhận thấy rằng nhiệt độ là nhân tố sinh thái ảnh hưởng rất rõ đến sự xuất hiện của các loài nấm thuộc họ *Ganodermataceae*. Ở ngưỡng nhiệt độ 17-19 °C có tần số xuất hiện của các loài nấm là chiếm ưu thế, chiếm 57% so với ngưỡng nhiệt độ còn lại.

3.2.2.3. Ảnh hưởng của độ ẩm đến sự phân bố các loài nấm thuộc họ *Ganodermataceae* Donk

Kết quả ảnh hưởng của độ ẩm được thể hiện ở Hình 3.13 và Hình 3.14 bên dưới.



Hình 3.13. Phân bố các loài nấm họ Ganodermataceae theo độ ẩm

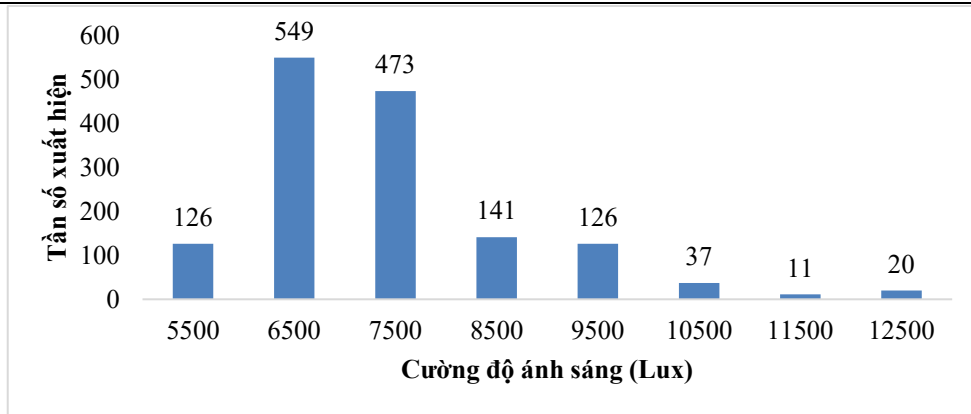


Hình 3.14. Tỷ lệ % các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae theo độ ẩm

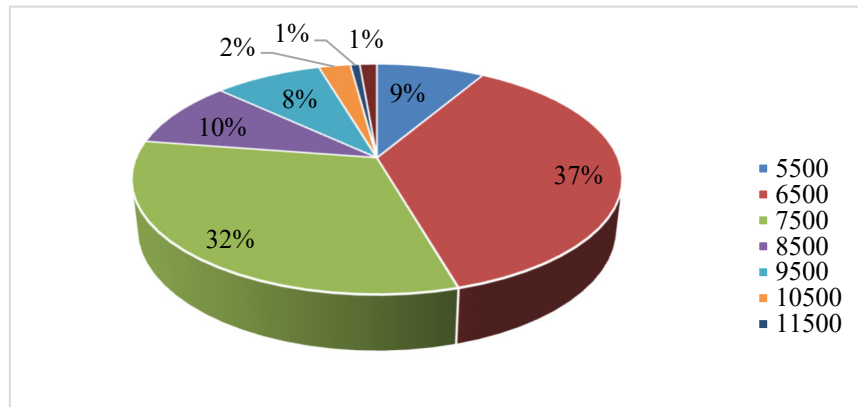
Qua kết quả ở Hình 3.133 và Hình 3.144, chúng tôi đã nhận định rằng vai trò của của độ ẩm tác động rất rõ nét đến sự xuất hiện của các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae cụ thể ở độ ẩm 90-95 % chiếm tỉ lệ 77 % số loài nấm xuất hiện, đây cũng là độ ẩm thích hợp nhất cho sự sinh trưởng phát triển của các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae trong ngưỡng độ ẩm nghiên cứu. Đối với độ ẩm quá cao lớn hơn 95% môi trường quá ẩm ướt, dẫn đến lượng nước trong cơ chất nhiều, đây là điều kiện không thuận lợi cho các phản ứng phân huỷ và sự sinh trưởng của hệ sợi nấm. Với hai khoảng độ ẩm nhỏ hơn 90% và lớn hơn 95% không thuận lợi cho các loài nấm họ Ganodermataceae dẫn đến tần suất bắt gặp ở môi trường này ít. Điều này có nghĩa là ở khu vực Tây Nguyên độ ẩm không khí từ 90-95% là độ ẩm thích hợp cho các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae

3.2.2.4. Ảnh hưởng của ánh sáng đến sự phân bố các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae Donk

Kết quả ảnh hưởng của cường độ ánh sáng được thể hiện ở Hình 3.15 và Hình 3.16 bên dưới.



Hình 3.15. Phân bố các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae theo cường độ ánh sáng



Hình 3.16. Tỷ lệ % các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae theo cường độ ánh sáng

Từ kết quả nghiên cứu ở Hình 3.15 và Hình 3.16, cho ta thấy rõ rằng ánh sáng ảnh hưởng rõ đến sự xuất hiện quả thể của các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae. Các loài nấm họ Ganodermataceae ở khu vực Tây Nguyên xuất hiện chủ yếu ở cường độ ánh sáng nhỏ hơn 6500 - 7500 lux chiếm tỉ lệ 69 % so với 9 % ở cường độ ánh sáng nhỏ hơn 6500 lux và 22 % khi ánh sáng lớn hơn 7500 lux trong ngưỡng ánh sáng nghiên cứu. Sự hình thành quả thể của các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae tốt nhất ở cường độ ánh sáng từ 6500 - 7500.

3.2.3. Mô hình hồi quy đa biến dự báo tần số xuất hiện (mật độ) của các loài nấm liên quan tới các nhân tố sinh thái (nhiệt độ, độ ẩm, độ cao và cường độ chiếu sáng)

Vấn đề đặt ra là nghiên cứu mối quan hệ giữa tần số xuất hiện của các loài Nấm với các nhân tố sinh thái, để tìm ra các tổ hợp sinh thái hoặc nhân tố sinh thái quan trọng, phục vụ cho việc xác định vùng phân bố, phát triển, bảo vệ và các kỹ thuật liên quan. Với số liệu điều tra 105 điểm tổng hợp dữ liệu trên Excel, sử dụng phần mềm Statgraphic Centurion XV để thiết lập các hàm hồi quy đa biến và phân tích mối quan hệ, tần số xuất hiện các loài Nấm với các nhân tố sinh thái. Với dung lượng mẫu 105 điểm cho các loài nấm, phân tích hồi quy với 05 nhân tố sinh thái quan trọng, các biến chưa thỏa mãn điều kiện về quan hệ với tần số xuất hiện các loài nấm được loại trừ ở mức $P > 0,1$. Việc dò tìm quan hệ từ hàm đơn giản đến phức tạp, từ biến đơn đến tổ hợp biến và đổi biến số. Kết quả xây dựng được hàm hồi quy đa biến cho các loài nấm được thể hiện như sau.

Tham số	Giá trị	Sai số	T	P-value
a	-5.61318	1.43981	-3.89855	0.0002
log(Doam+Kieurung+Nhietdo)	1.25556	0.205746	6.10249	0.0000
log(Anhsang)	0.120451	0.0651129	1.84988	0.0673
log(Docao)	0.195215	0.0198961	9.81176	0.0000
CONSTANT	-5.61318	1.43981	-3.89855	0.0002

Với 05 biến nhân tố sinh thái được dò tìm, thì cho thấy rằng có 04 nhân tố ảnh hưởng quan trọng đến tần số xuất hiện và phân bố của các loài nấm và thể qua phương trình sau:

$$\log(\text{Tansoxuathien}) = -5.61318 + 1.25556 * \log(\text{Doam+Kieurung+Nhietdo}) + 0.120451 * \log(\text{Anhsang}) + 0.195215 * \log(\text{Docao})$$

Với $n = 105$ và tất cả biến số được kiểm tra bằng tiêu chuẩn t với điều kiện $P < 0,1$; từ đây đã phát hiện 5 nhân tố là ánh sáng (anhsang), độ ẩm không khí (doam), độ cao so với mặt nước biển (docao), kiểu rừng (kieurung) và nhiệt độ không khí (nhietdo) có ảnh hưởng rõ rệt đến tần số xuất hiện của các loài nấm. Đồng thời với hệ số xác định $R^2 = 59.145\%$ với $P < 0,1$ cho thấy rằng quan hệ giữa, tần số xuất hiện của các loài nấm với 5 nhân tố sinh thái trên là rất chặt chẽ, và tác động qua lại lẫn nhau như sau: Tần số xuất hiện tỷ lệ thuận với độ ẩm, cường độ ánh sáng, nhiệt độ, kiểu rừng

và độ cao so với mặt nước biển, điều này có nghĩa là càng lên cao thì nhiệt độ không khí giảm, độ ẩm không khí tăng lên tần số xuất hiện của các loài nấm càng tăng .

Mô hình hồi quy giúp cho việc hiểu biết những yêu cầu sinh thái ban đầu của các loài nấm. Đây là cơ sở để giúp cho việc phát hiện khu vực phân bố của các loài, cũng như là cơ sở cho việc gây trồng và phát triển các loài nấm nói trên.

3.2.4. Nghiên cứu dấu vân tay sinh học (DNA fingerprint) của các mẫu thuộc chi Ganoderma

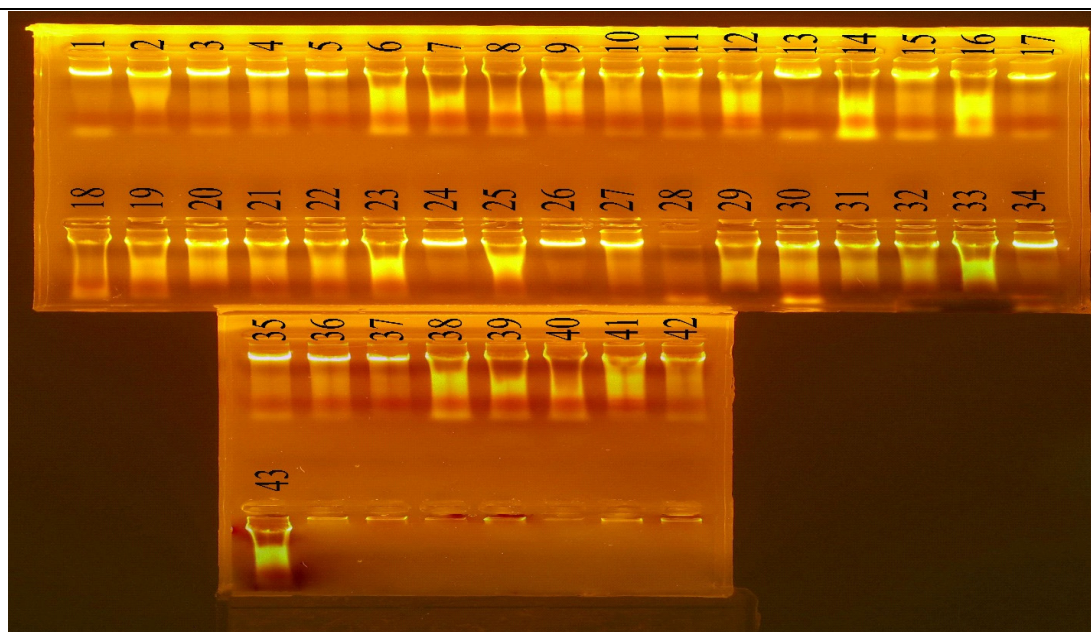
- Khảo sát đoạn môi và điều kiện tách chiết trên thể quả, thân nấm
- Thực hiện định danh PCR, vẽ cây sơ đồ loài, so sánh bộ gen giữa các loài nghiên cứu

3.2.4.1. Kết quả chiết DNA tổng số và chạy PCR và tinh sạch các sản phẩm khuếch đại

Tách chiết axit nucleic là công việc đầu tiên đóng vai trò quan trọng trong công nghệ DNA. Nhờ tiến bộ và sự đổi mới công nghệ mà tách chiết axit nucleic ngày nay đã trở nên đơn giản. Hiện nay có rất nhiều phương pháp tách chiết DNA tổng số của thực vật. Tuy nhiên đối với từng đối tượng nhất định cần có phương pháp riêng. Do vậy, việc lựa chọn và cải tiến phương pháp cho phù hợp với từng đối tượng là điều rất cần thiết và quan trọng.

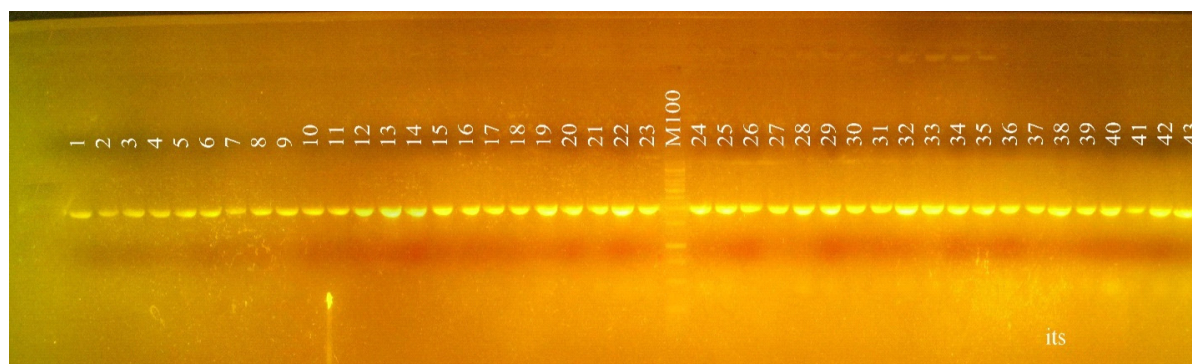
Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn phương pháp sử dụng CTAB của P.Doyle and Doyle (1987) có một số cải tiến nhỏ để tiến hành tách chiết DNA tổng số của 43 mẫu của các loài nấm họ Ganodermataceae nghiên cứu. Kết quả tách chiết DNA tổng số của 43 mẫu được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1%.

Qua kết quả điện di trên gel agarose 1% cho thấy các băng DNA thu được của các mẫu nấm họ Ganodermataceae khá gọn và đồng đều chứng tỏ chất lượng DNA của các mẫu là khá tốt. Đủ yêu cầu để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3.17. DNA tổng số của 43 mẫu của các loài nấm họ *Ganodermataceae*

Sau khi thực hiện phản ứng PCR, sản phẩm khuếch đại với cặp mồi ITS4/ITS5 và được điện di trên gel agarose 1,5% cho băng đơn hình với kích thước khoảng 600-700 bp.



Hình 3.18. Phổ điện di sản phẩm PCR với cặp mồi ITS1/ITS5 trên 43 mẫu của các loài nấm họ *Ganodermataceae*

Kết quả khuếch đại sản phẩm PCR của từng mẫu được tiến hành thổi gel, sử dụng cột Sigma GenElute™ Agarose Spin column (USA), nhằm thu được sản phẩm PCR đặc hiệu.

3.2.4.2. Kết quả giải trình tự vùng ITS-rDNA của các mẫu nấm họ Ganodermataceae nghiên cứu

Kết quả so sánh trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS2 ở các mẫu nghiên cứu

Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch, được giải trình tự tại công ty Macrogen (Hàn Quốc). Kết quả giải trình tự được vùng ITS1-5,8S-ITS2 của các mẫu nghiên cứu được tiến hành so sánh với nhau bằng công cụ căn trình tự ClustalW của phần mềm Mega 6.0 và CLC 8.0, kết quả được thể hiện trong hình ở phần Phụ lục

Từ kết quả so sánh trình tự các nucleotide của 43 mẫu nấm họ Ganodermataceae, có thể nhận thấy sự khác biệt giữa các trình tự chủ yếu là các vị trí đa hình đơn (SNP), trong đó 1 nucleotid bị thay thế bởi một nucleotid khác hoặc thêm bớt trong trình tự vùng ITS1 và ITS2 của các mẫu nấm họ Ganodermataceae khảo sát.

43 mẫu nấm họ Ganodermataceae được nghiên cứu có sự khác biệt rất nhiều về trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS2, sự biến động trình tự giữa các mẫu về sự sai các các nucleotid.

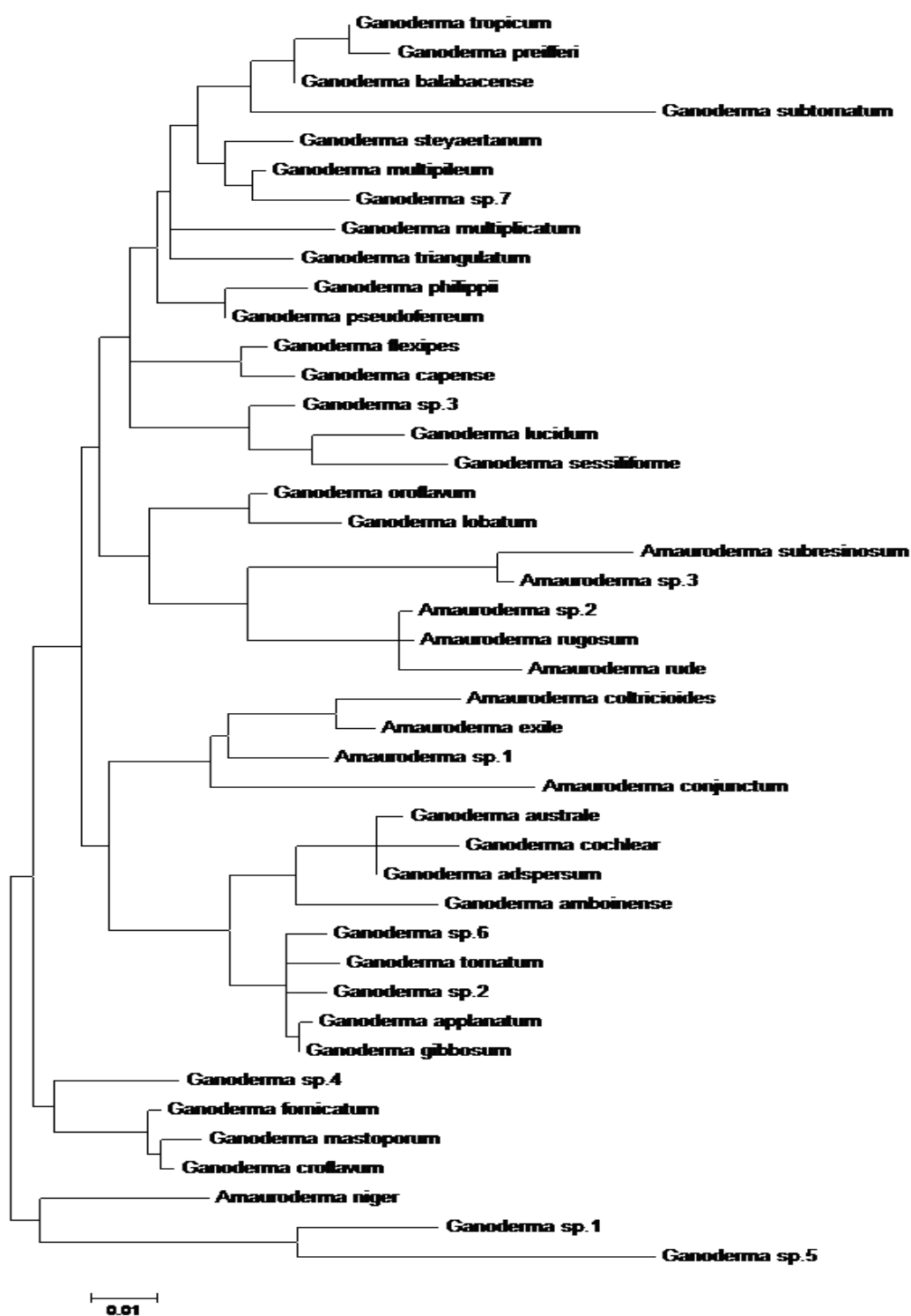
Dựa vào kết quả so sánh trình tự các nucleotide ở hình 3.3, cho thấy dựa vào trình tự ITS1-5,8S-ITS2 có thể phân biệt các mẫu nấm họ Ganodermataceae trong tập đoàn nghiên cứu như sau:

Khảo sát thành phần nucleotide thuộc các trình tự ITS1-5,8S-ITS2 của 43 mẫu nấm họ Ganodermataceae được trình bày trong bảng ở phần Phụ lục

Kết quả khảo sát thành phần bốn loại nucleotide của 43 mẫu nấm họ Ganodermataceae cho thấy thành phần Guanin, Cytosine, Adenine và Thymine của các mẫu nghiên cứu khác nhau, đây cũng là đặc điểm cho thấy sự khác nhau giữa các mẫu khảo sát dựa trên vùng ITS1-5,8S-ITS2. Nhìn chung, các mẫu nghiên cứu có tỷ lệ Guanin và Cytosine thấp hơn tỷ lệ Adenine và Thymine hay nói một cách khác là đều có thành phần % GC thấp hơn thành phần % AT. Mẫu *Ganoderma croflavum* có thành phần (G+C) thấp nhất (46.62 %) và có thành phần (A+T) cao nhất (53.38 %). Tỷ lệ thành phần % (G+C) trung bình ở cả 43 mẫu nghiên cứu là 48.36 % và tỷ lệ thành phần % (A+T) trung bình 51.64 %.

Kết quả xây dựng cây quan hệ phát sinh giữa các mẫu nghiên cứu dựa trên trình tự nucleotid vùng ITS1-rRNA-ITS2

Sau khi xác định được trình tự nucleotid vùng ITS1-rRNA-ITS2, tiến hành dựng cây quan hệ phát sinh bằng phần mềm Mega 6.0 theo phương pháp Maximum likelihood, kết quả thể hiện ở Hình 3.19



Hình 3.19. Cây quan hệ phát sinh chủng loại giữa các mẫu nghiên cứu

Dựa vào kết quả phân tích cây quan hệ phát sinh trên hình cho thấy 43 mẫu nấm họ Ganodermataceae nghiên cứu phân thành 2 nhánh chính:

* Nhóm I: gồm 3 taxon đó là: *Amauroderma niger*, *Ganoderma sp.1* và *Ganoderma sp.5*

* Nhóm II: gồm 40 taxon nghiên cứu còn lại và phân chia thành các nhóm phụ như sau:

Nhóm phụ II.1 gồm 4 taxon sau: *Ganoderma sp.4*, *Ganoderma fornicatum*, *Ganoderma mastoporium* và *Ganoderma croflavum*

Nhóm phụ II.2 bao gồm 36 taxon và lại được chia làm 2 nhóm dưới phụ sau

- Nhóm dưới phụ II.2.a bao gồm 13 taxon có tên trong bảng dưới đây:

TT	Ký hiệu	Tên loài
1	Am05	<i>Amauroderma conjunctum</i>
2	Am06	<i>Amauroderma exile</i>
3	Am07	<i>Amauroderma coltricioides</i>
4	Am08	<i>Amauroderma sp1.</i>
5	Ga12	<i>Ganoderma applanatum</i>
6	Ga17	<i>Ganoderma cochlear</i>
7	Ga18	<i>Ganoderma amboinense</i>
8	Ga25	<i>Ganoderma tornatum</i>
9	Ga26	<i>Ganoderma gibbosum</i>
10	Ga32	<i>Ganoderma adpersum</i>
11	Ga33	<i>Ganoderma australe</i>
12	Ga38	<i>Ganoderma sp.2</i>
13	Ga43	<i>Ganoderma sp.6</i>

- Nhóm dưới phụ II.2.b bao gồm 23 taxon còn lại có tên trong bảng dưới đây:

TT	Ký hiệu	Tên loài
1	Am02	<i>Amauroderma subresinosum</i>
2	Am03	<i>Amauroderma rugosum</i>
3	Am04	<i>Amauroderma rude</i>
4	Am09	<i>Amauroderma</i> sp2.
5	Am10	<i>Amauroderma</i> sp3.
6	Ga11	<i>Ganoderma lucidum</i>
7	Ga13	<i>Ganoderma multiplicatum</i>
8	Ga15	<i>Ganoderma oroflavum</i>
9	Ga16	<i>Ganoderma philippii</i>
10	Ga19	<i>Ganoderma balabacense</i>
11	Ga20	<i>Ganoderma capense</i>
12	Ga21	<i>Ganoderma pseudoferreum</i>
13	Ga23	<i>Ganoderma lobatum</i>
14	Ga24	<i>Ganoderma subtornatum</i>
15	Ga27	<i>Ganoderma triangulatum</i>
16	Ga28	<i>Ganoderma sessiliforme</i>
17	Ga29	<i>Ganoderma tropicum</i>
18	Ga30	<i>Ganoderma steyaertanum</i>
19	Ga31	<i>Ganoderma multipileum</i>
20	Ga34	<i>Ganoderma flexipes</i>
21	Ga36	<i>Ganoderma preifferi</i>
22	Ga39	<i>Ganoderma</i> sp.3
23	Ga43	<i>Ganoderma</i> sp.7

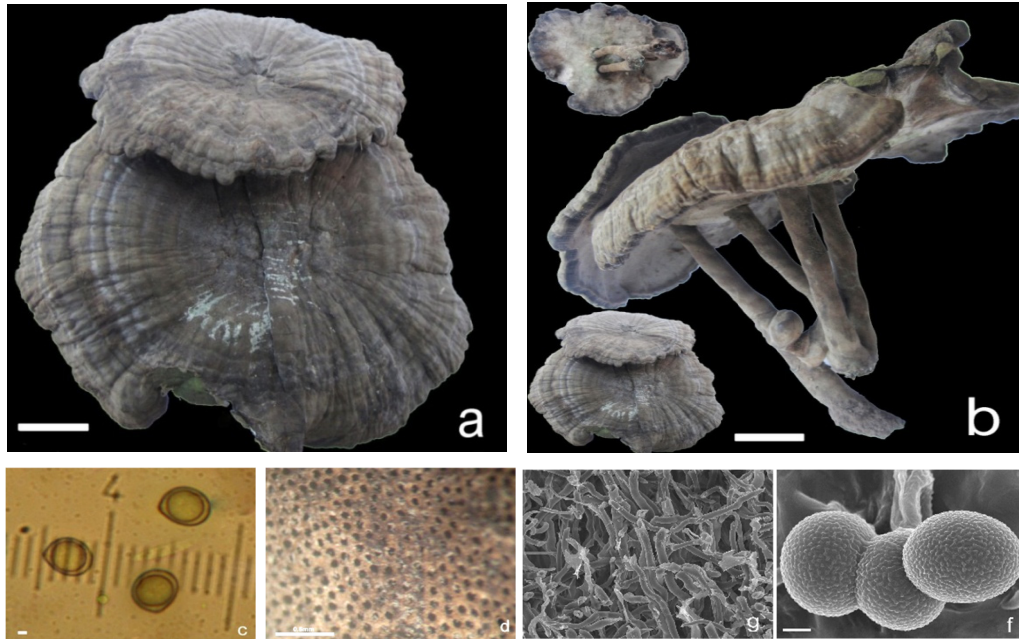
3.2.5. Xây dựng hồ sơ dược liệu bao gồm: tên khoa học, bộ ảnh, tiêu bản khô, đặc điểm hình thái, sinh thái, dấu vân tay sinh học

Xây dựng 43 bộ dữ liệu cho 43 loài linh chi trong đó có 33 loài *Ganoderma* spp. và 10 loài *Amauroderma* spp.

SST1

Tên khoa học: *Amauroderma coltricioides* T.W. Henkel, Aime & Ryvarden 2003

- Bộ ảnh:



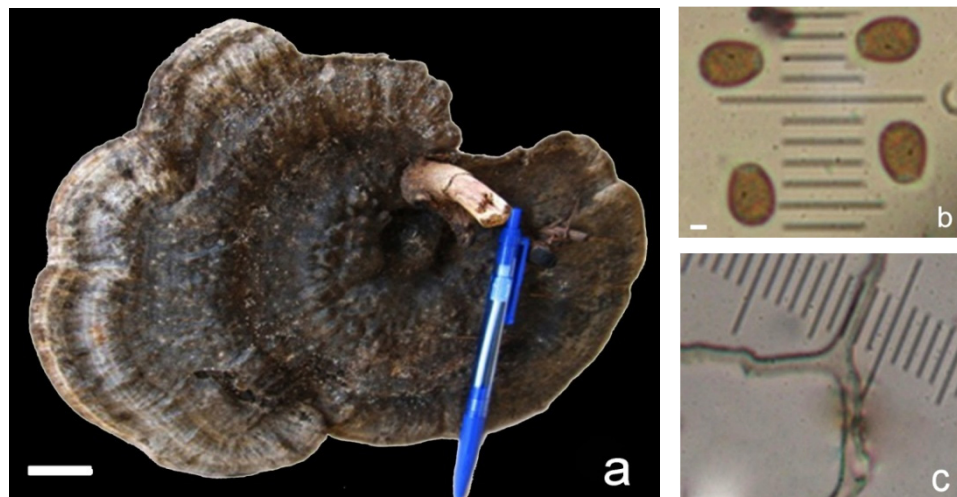
Hình 3.20. *Amauroderma coltricioides*

Ghi chú : a, b: Quả thể ; c: Bào tử ; d: Bào tầng ; e: Hệ sợi (kính SEM) ; g: Bào tử
Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT2

- Tên khoa học: *Amauroderma conjunctum* (Lloyd.) Torrend 1920

- Bộ ảnh:



Hình 3.21. *Amauroderma conjunctum*

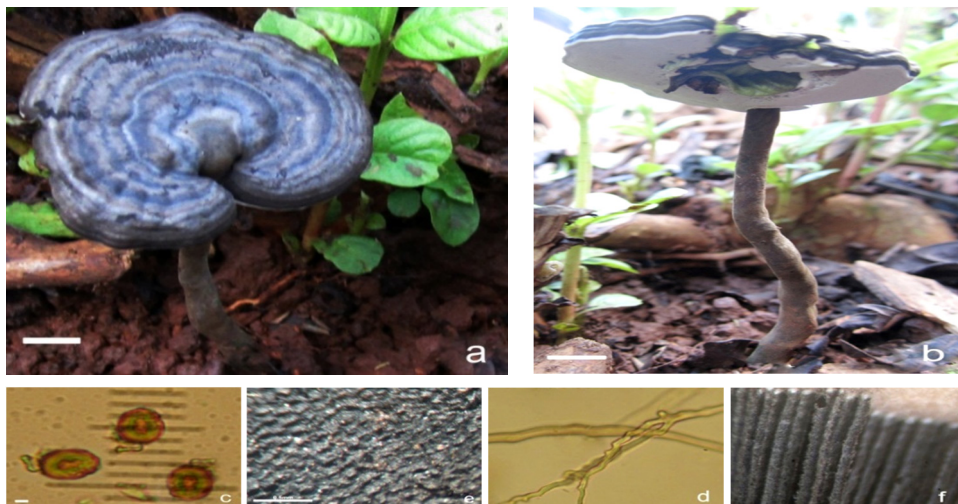
Ghi chú: a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Bào tầng

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT3

- Tên khoa học: *Amauroderma exile* (Berk.) Torrend 1920

- Bộ ảnh:



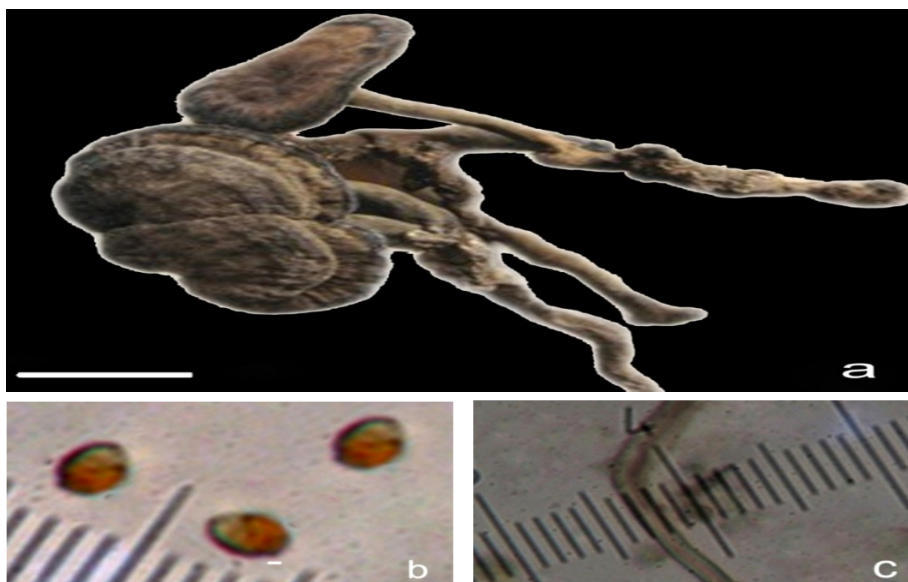
Hình 3.22. *Amauroderma exile*

Ghi chú : a, b: Quả thể ; c: Bào tử ; d: Bào tầng ; e: Hệ sợi ; g: Ống nấm
Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm

STT4

- Tên khoa học: *Amauroderma niger*.

- Bộ ảnh:



Hình 3.23. *Amauroderma niger*

Ghi chú : a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Bào tầng
Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT5

- Tên khoa học: *Amauroderma rude* (Berk.) Torrend 1920

- Bộ ảnh:



Hình 3.24. *Amauroderma rude*

Ghi chú : a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Bào tầng

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5mm.

STT6

- Tên khoa học: *Amauroderma rugosum* (Blume & T. Nees) Torrend 1920

- Bộ ảnh:



Hình 3.25. *Amauroderma rugosum*

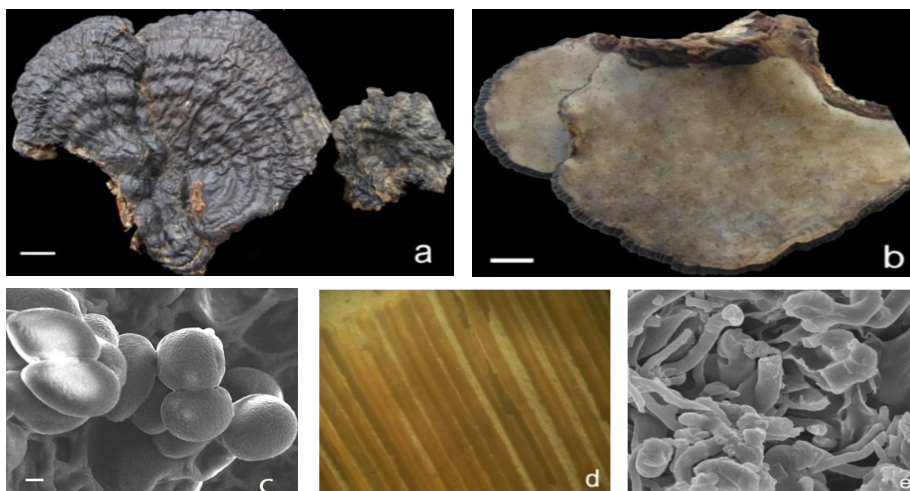
Ghi chú: a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Bào tầng ; d: Hệ sợi

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT7

- Tên khoa học: *Amauroderma subresinosum*

- Bộ ảnh:



Hình 3.26. *Amauroderma subresinosum*

Ghi chú : a, b : Quả thể ; c : Bào tử (SEM) ; d : Ống nấm ; e : Hệ sợi

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tử = 0,5 mm.

STT8

- Tên khoa học: *Amauroderma* sp1.

- Bộ ảnh:



Hình 3.27. *Amauroderma* sp1

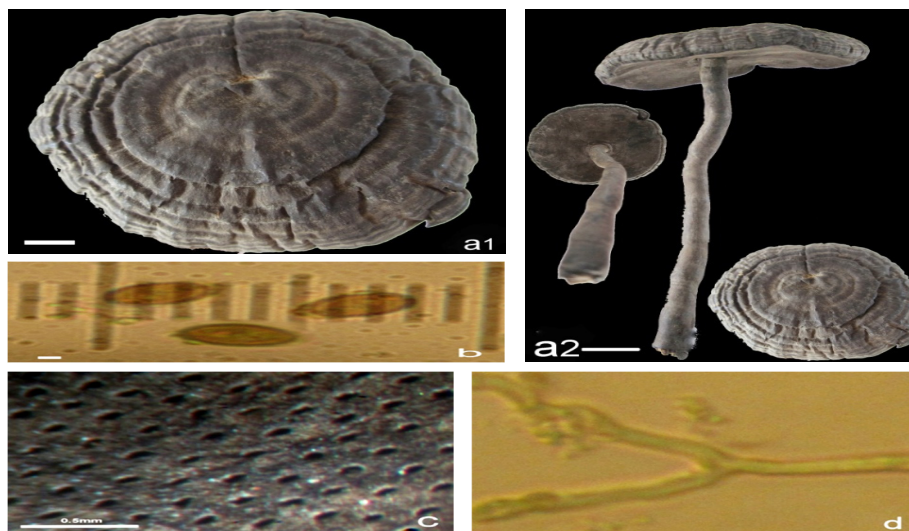
Ghi chú : a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Bào tầng

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT9

- Tên khoa học: *Amauroderma* sp2.

- Bộ ảnh:



Hình 3.28. *Amauroderma* sp2.

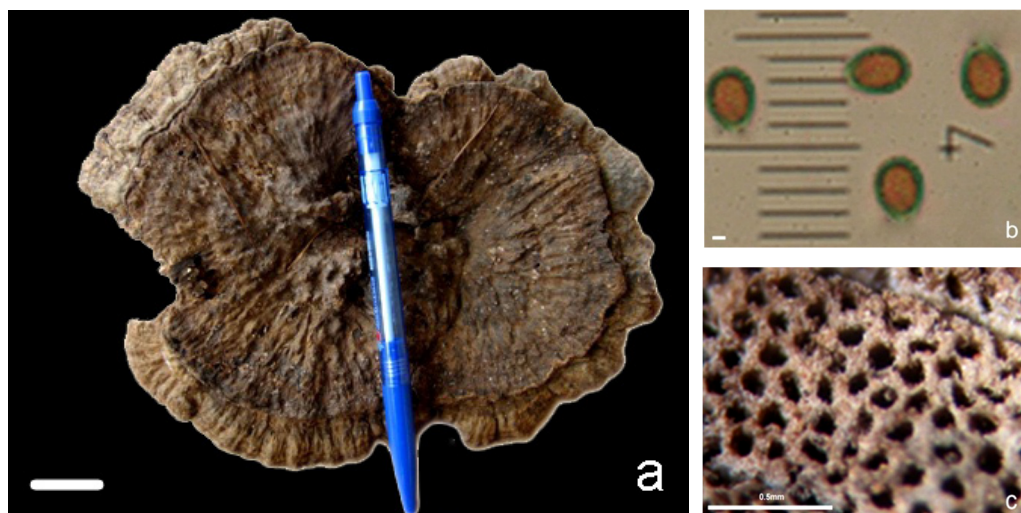
Ghi chú : a1, a2: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Bào tầng ; d: Hệ sợi

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT10

- Tên khoa học: *Amauroderma* sp3.

- Bộ ảnh:



Hình 3.29. *Amauroderma* sp3

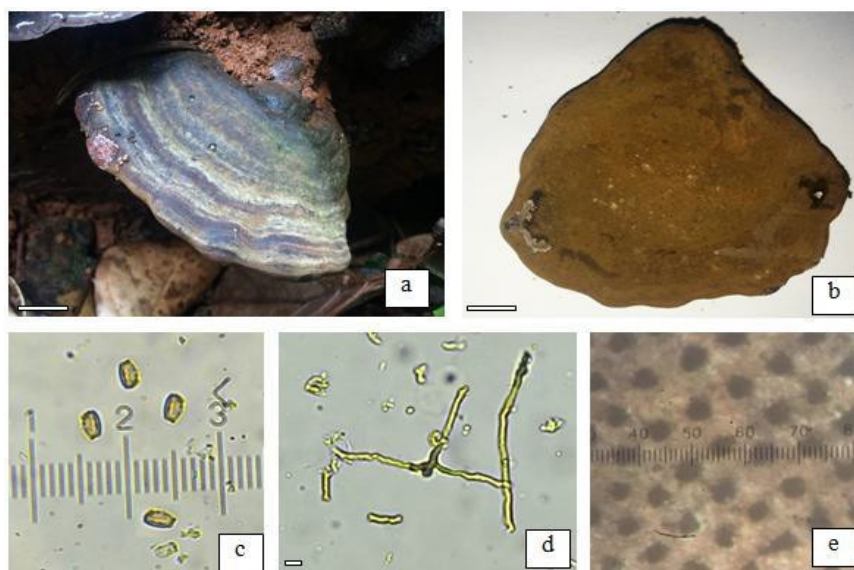
Ghi chú : a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Bào tầng

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT11

- Tên khoa học: *Ganoderma adpersum*

- Bộ ảnh:



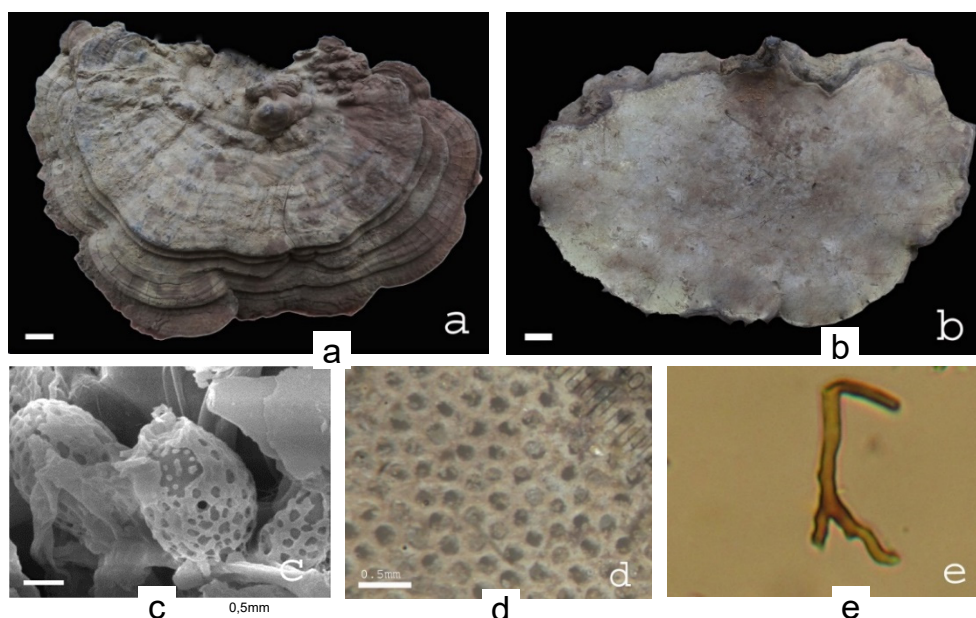
Hình 3.30. *Ganoderma adpersum*

Ghichú: a,b: Quả thể c: Bào tử d: Hệ sợi e: Bào tầng
a,b = 1cm d = 2 μ m

STT12

- Tên khoa học: *Ganoderma amboinense* (Lam.) Pat. 1887

- Bộ ảnh:



Hình 3.31. *Ganoderma applanatum*

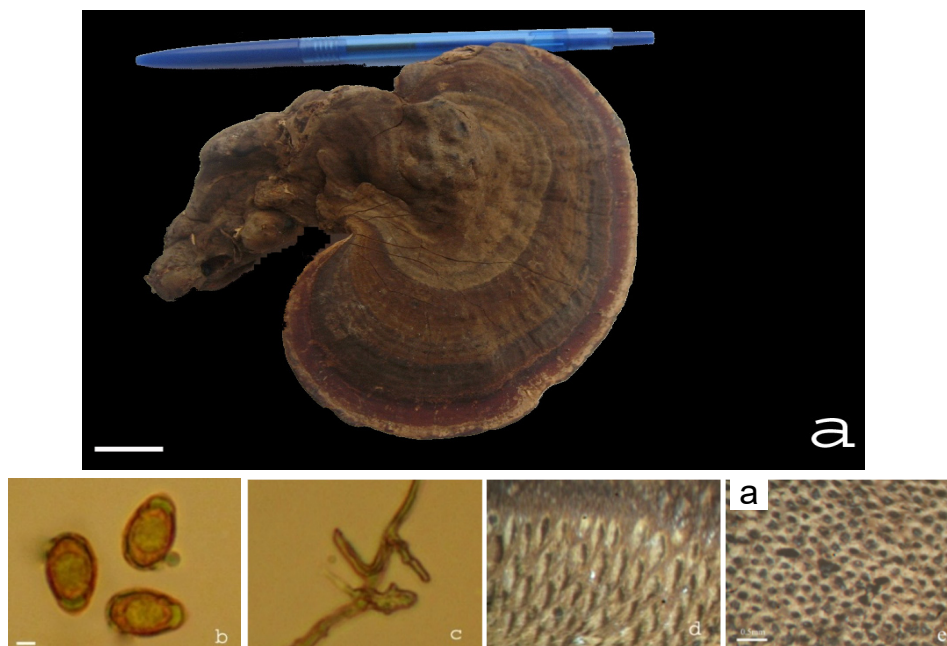
Ghi chú: a, b : Quả thể ; c : Bào tử (SEM) ; d : Bào tầng ; e : Hệ sợi

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT13

- Tên khoa học: *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. 1887

- Bộ ảnh:



Hình 3.32. *Ganoderma amboinense*

Ghi chú: a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Hệ sợi ; d: Ống nấm ; e: Bào tầng

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT14

- Tên khoa học: *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. 1889

- Bộ ảnh:



Hình 3.33. *Ganoderma australe*

Ghichú: a,b: Quả thể c:Bào tử d: Hệ sợi e: Bào tầng

a,b = 2 cm c,d = 2 μ m e = 0,5 mm

STT15

- Tên khoa học: *Ganoderma balabacense* Murrill 1908

- Bộ ảnh:



Hình 3.34. *Ganoderma balabacense*

Ghi chú: a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Hệ sợi ; d: Bào tầng

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT16

- Tên khoa học: *Ganoderma capense* (Lloyd) Teng 1963

- Bộ ảnh:



Hình 3.35. *Ganoderma capense*

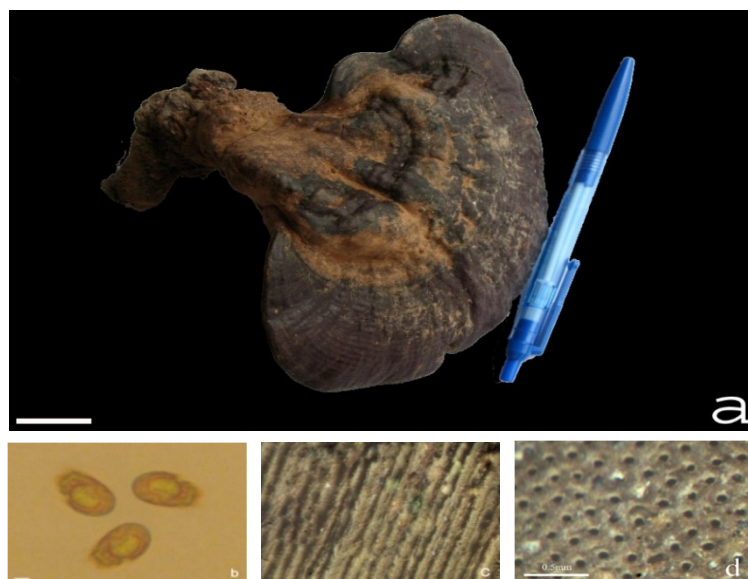
Ghi chú : a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Hệ sợi ; d: Bào tầng

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT17

- Tên khoa học: *Ganoderma cochlear* (Nees) Merr. 1917

- Bộ ảnh:



Hình 3.36. *Ganoderma cochlear*

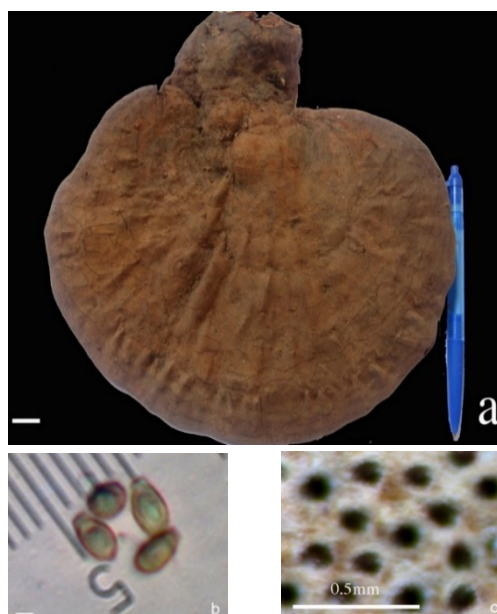
Ghi chú : a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Ống nấm ; d: Bào tầng

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT18

- Tên khoa học: *Ganoderma croflavum* Lloyd

- Bộ ảnh:



Hình 3.37. *Ganoderma croflavum*

Ghi chú: a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Bào tầng

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT19

- Tên khoa học: *Ganoderma flexipes* Pat. 1907

- Bộ ảnh:



Hình 3.38. *Ganoderma flexipes*

Ghi chú: a,b: Quả thể c: Bào tử d: Bào tầng e: Hệ sợi

a, b = 1 cm d = 1 mm c,e = 2 μ m

STT20

- Tên khoa học: *Ganoderma fornicatum* (Fr.) Pat. 1889

- Bộ ảnh:



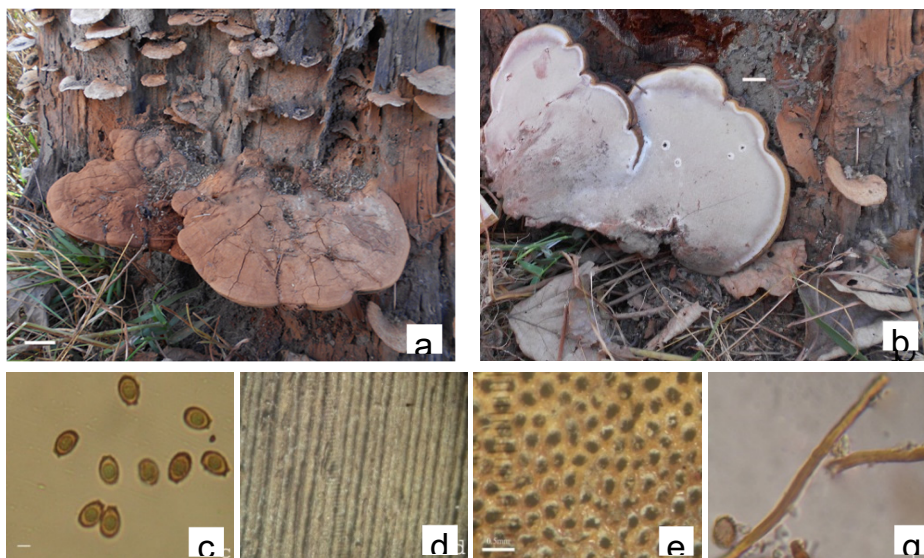
Hình 3.39. *Ganoderma fornicatum*

Ghi chú: a, b: Quả thể ; c: Bào tử ; d: Bào tầng ; e: Thịt nấm ; g: Bào tử (hình SEM)
Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT21

- Tên khoa học: *Ganoderma gibbosum* (Blume & T. Nees) Pat. 1897

- Bộ ảnh:



Hình 3.40. *Ganoderma gibbosum*

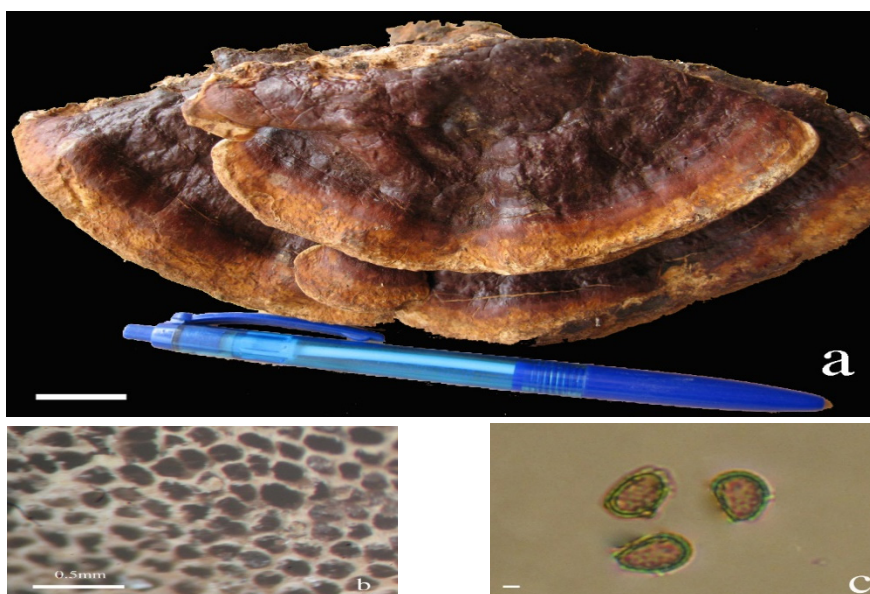
Ghi chú: a, b: Quả thể ; c: Bào tử ; d: Ống nấm ; e: Bào tầng ; g: Hệ sợi

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT22

- Tên khoa học: *Ganoderma lobatum* (Schwein.) G.F. Atk. 1908

- Bộ ảnh:



Hình 3.41. *Ganoderma lobatum*

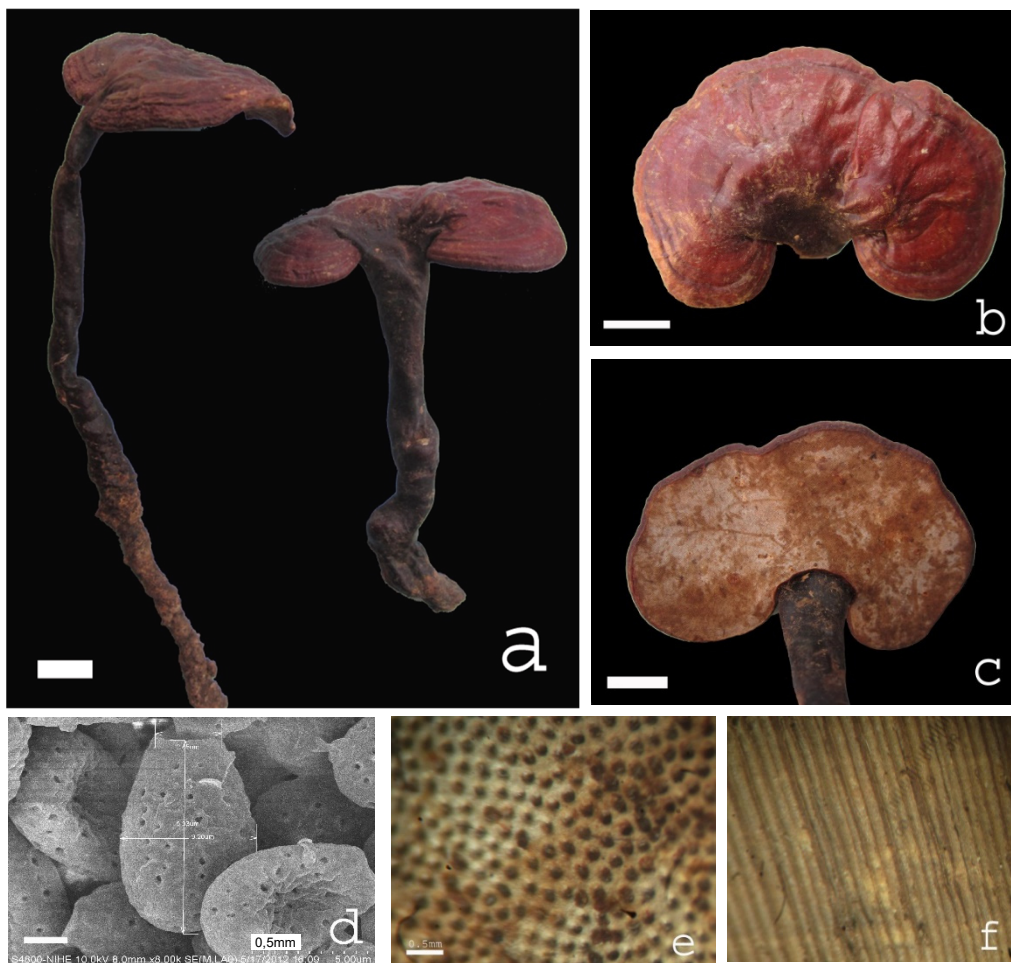
Ghi chú: a: Quả thể ; b: Bào tầng ; c: Bào tử

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT23

- Tên khoa học: *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. 1881

- Bộ ảnh:



Hình 3.42. *Ganoderma lucidum*

Ghi chú: a, b, c: Quả thể ; d: Bào tử (SEM) ; e: Bào tầng ; g: Ống nấm

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT24

- Tên khoa học: *Ganoderma mastoporum* (Lev.) Pat.1889

- Bộ ảnh:



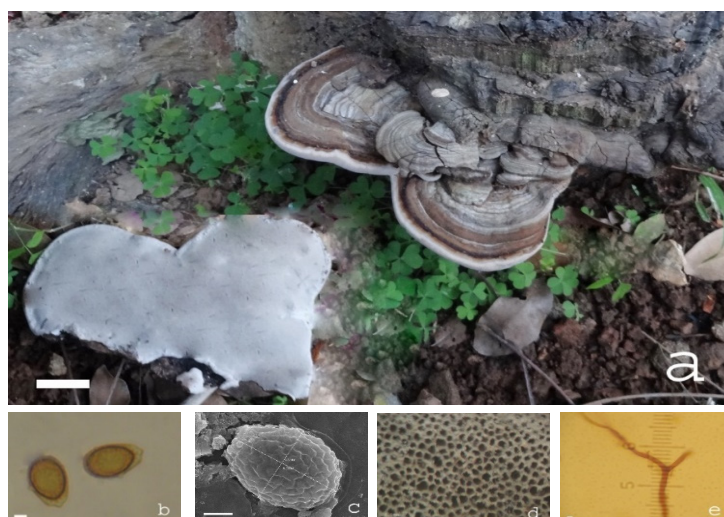
Hình 3.43. *Ganoderma mastoporum*

Ghi chú: a,b: Quả thể c: Bào tầng d: Hệ sợi e: Bào tử
a,b = 2 cm d = 2 µm

STT25

- Tên khoa học: *Ganoderma multiplicatum* (Mont.) Pat. 1889

- Bộ ảnh:



Hình 3.44. *Ganoderma multiplicatum*

Ghi chú: a, b: Quả thể ; c: Bào tử (SEM) ; d: Bào tầng ; e: Hệ sợi

STT26

- Tên khoa học: *Ganoderma multipileum* Ding Hou 1950.

- Bộ ảnh:



Hình 3.45. *Ganoderma multipileum*.

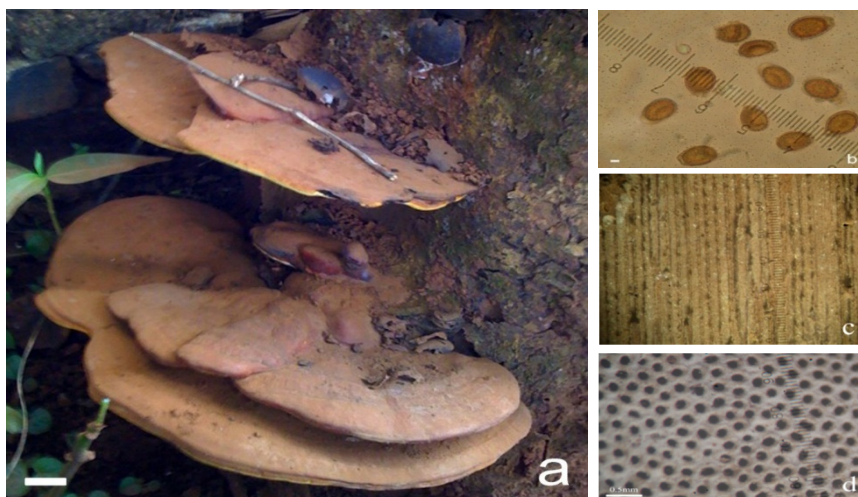
Ghi chú : a, b: Quả thể ; c: Bào tầng ; d: Hệ sợi

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT27

- Tên khoa học: *Ganoderma oroflavum* (Lloyd) C.J. Humphrey 1931

- Bộ ảnh:



Hình 3.46. *Ganoderma oroflavum*

Ghi chú: a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Ống nấm ; d: Bào tầng

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT28

- Tên khoa học: *Ganoderma philippii* (Bres. & Henn. ex Sacc.) Bres. 1932

- Bộ ảnh:



Hình 3.47. *Ganoderma philippii*

Ghi chú : a, b: Quả thể ; c: Bào tử ; d: Bào tăng ; e: Hệ sợi

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tăng = 0,5 mm.

STT29

- Tên khoa học: *Ganoderma preifferi* Bres.

- Bộ ảnh:



Hình 3.48. *Ganoderma preifferi*

Ghi chú: a,b: Quả thể c: Bào tử d: Bào tăng e: Hệ sợi

a,b = 2 cm c, e = 2 μ m d = 1 mm

STT30

- Tên khoa học: *Ganoderma pseudoferreum* (Wakef.) Overeem & B.A. Steinm. 1925

- Bộ ảnh:



Hình 3.49. *Ganoderma pseudoferreum*

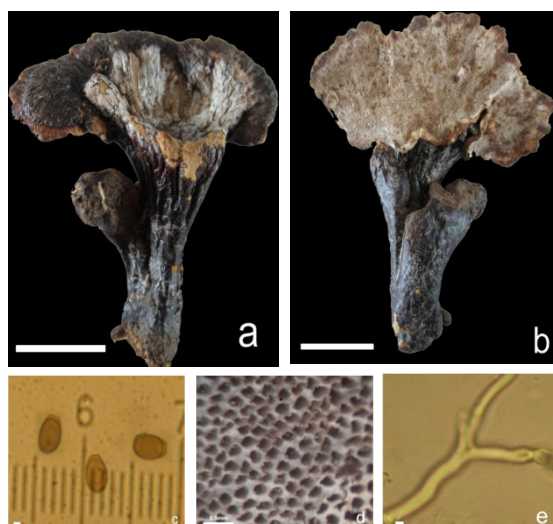
Ghi chú : a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Hệ sợi ; d: Bào tầng

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT31

- Tên khoa học: *Ganoderma sessiliforme* Murrill 1912

- Bộ ảnh:



Hình 3.50. *Ganoderma sessiliforme*

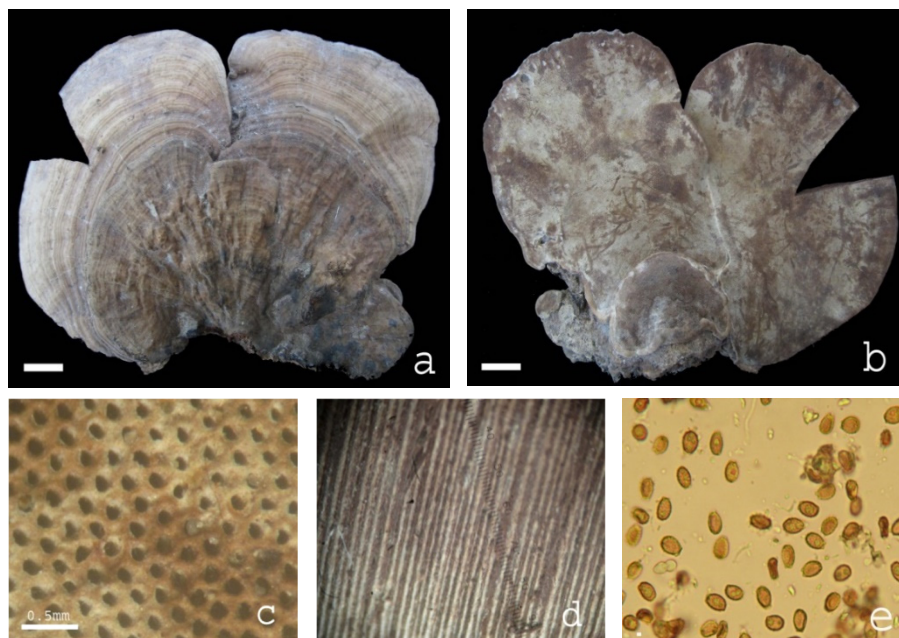
Ghi chú : a, b: Quả thể ; c: Bào tử ; d: Hệ sợi ; e: Ống nấm ; f: Bào tầng

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT 32

- Tên khoa học: *Ganoderma steyaertanum* B.J. Sm. & Sivasith. 2003

- Bộ ảnh:



Hình 3.51. *Ganoderma steyaertanum*

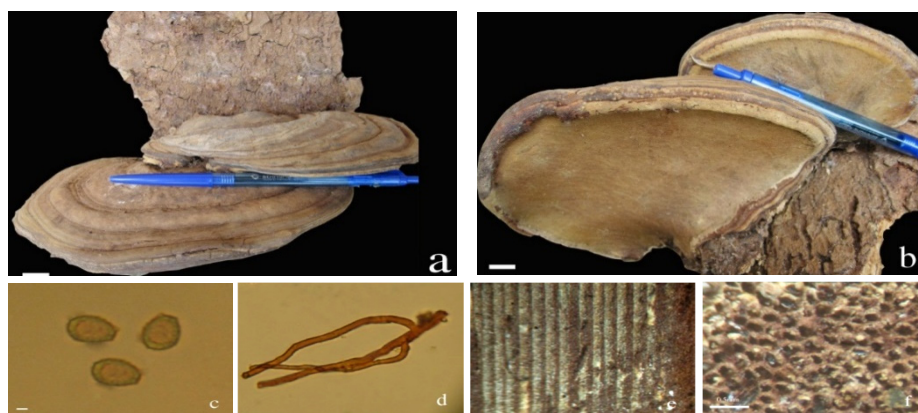
Ghi chú : a, b: Quả thể ; c: Bào tầng ; d: Ống nấm ; e: Bào tử

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT33

- Tên khoa học: *Ganoderma subtornatum* Murrill 1907

- Bộ ảnh:



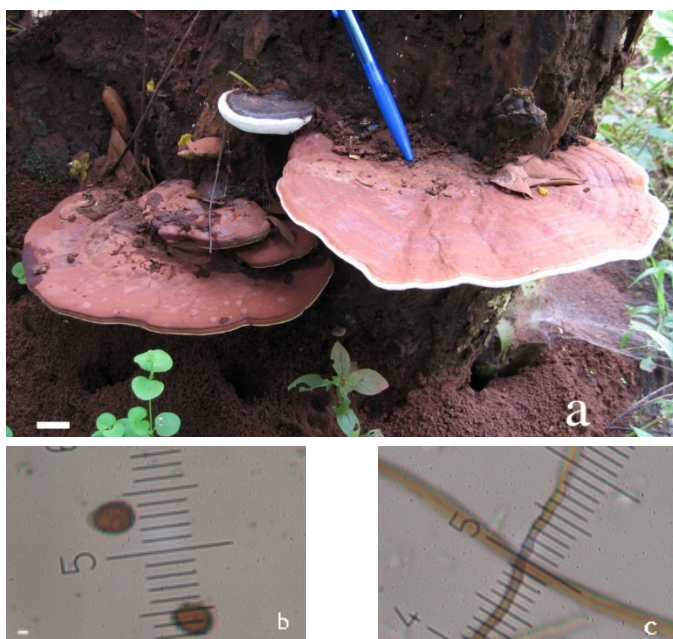
Hình 3.52. *Ganoderma subtornatum*

Ghi chú: a, b: Quả thể ; c: Bào tử ; d: Hệ sợi ; e: Ống nấm ; g: Bào tầng

STT34

- Tên khoa học: *Ganoderma tornatum* (Pers.) Bres. 1912

- Bộ ảnh:



Hình 3.53. *Ganoderma tornatum*

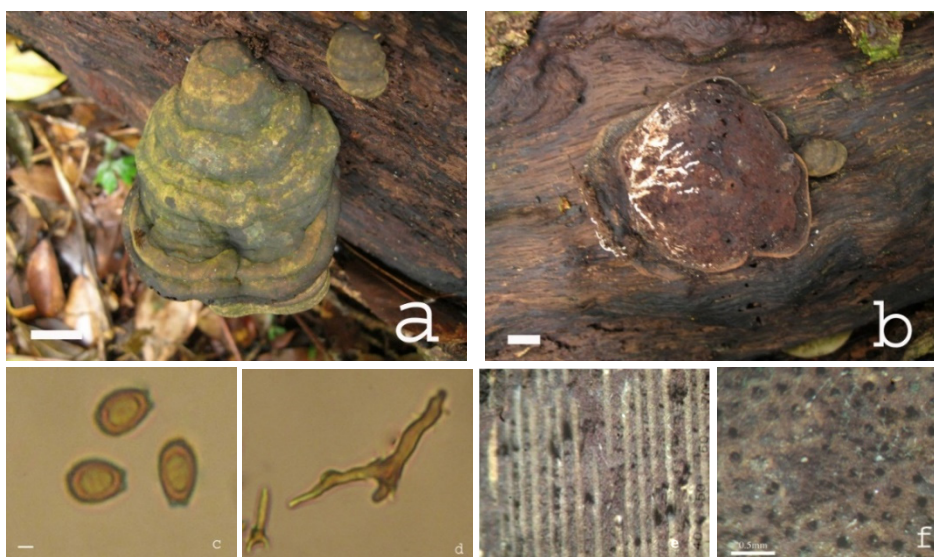
Ghi chú : a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Hệ sợi

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μm, thước đo bào tử = 0,5 mm.

STT35

- Tên khoa học: *Ganoderma triangulatum* Zhao et Xu, Acta Microbiol. Sin

- Bộ ảnh:



Hình 3.54. *Ganoderma triangulatum*

Ghi chú : a, b: Quả thể ; c: Bào tử ; d: Hệ sợi ; e: Ống nấm ; g: Bào tầng

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μm, thước đo bào tử = 0,5 mm.

STT36

- Tên khoa học: *Ganoderma tropicum* (Jungh.) Bres. 1910

- Bộ ảnh:



Hình 3.55. *Ganoderma tropicum*

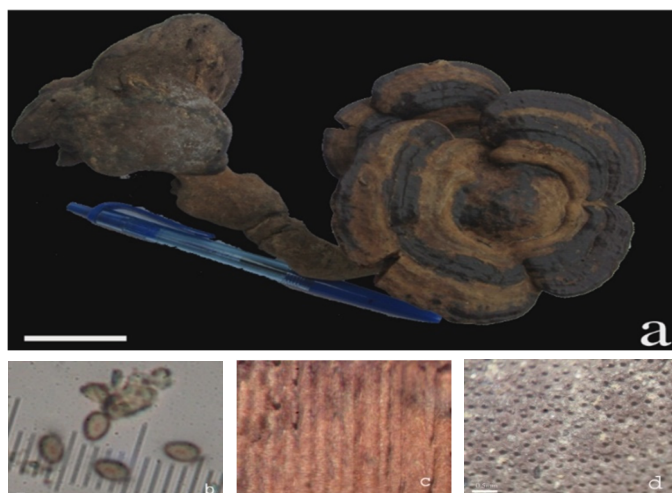
Ghi chú: a, b: Quả thể ; c: Bào tử ; d: Bào tầng ; e: Hệ sợi

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT37

- Tên khoa học: *Ganoderma sp.1*

- Bộ ảnh:



Hình 3.56. *Ganoderma sp.1*.

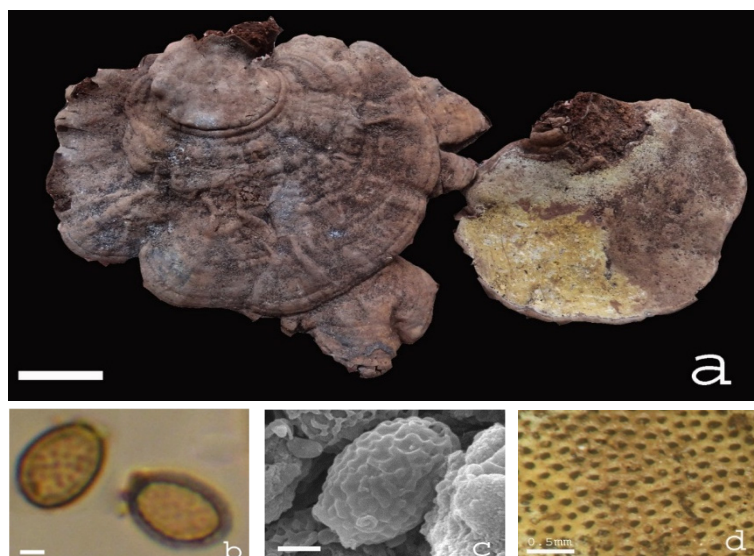
Ghi chú : a : Quả thể ; b : Bào tử ; c : Ống nấm ; d : Bào tầng ;

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT38

- Tên khoa học: *Ganoderma sp.2*

- Bộ ảnh:



Hình 3.57. *Ganoderma sp.2*.

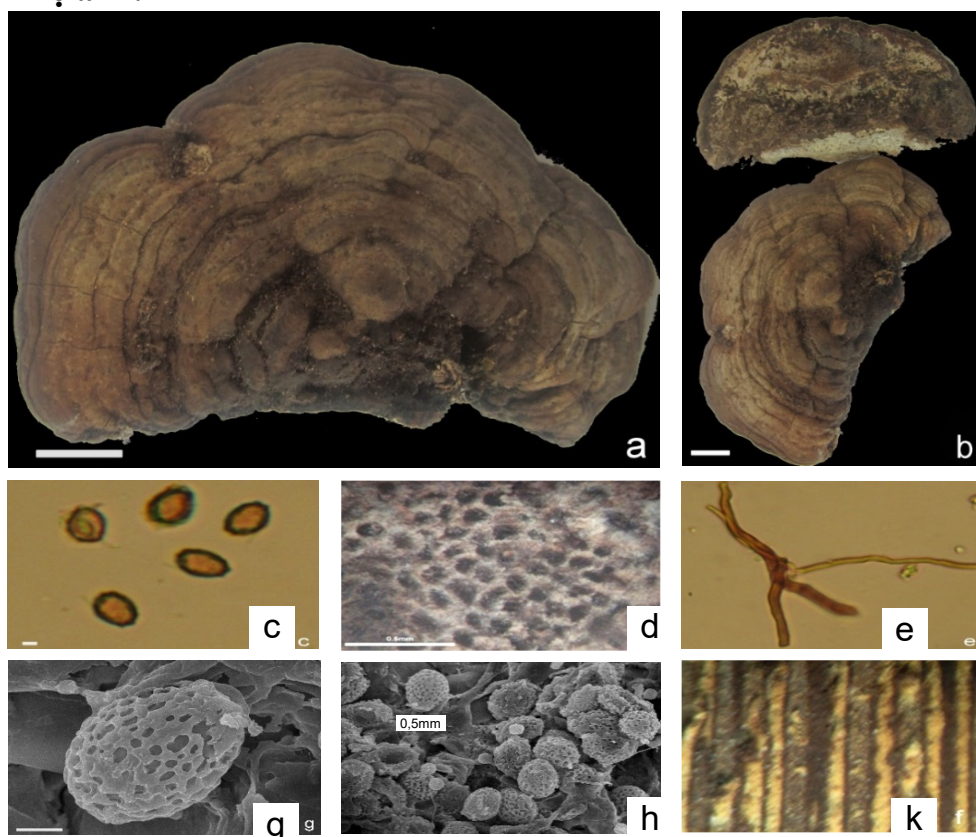
Ghi chú : a: Quả thể ; b: Bào tử ; c: Bào tử (SEM) ; d: Bào tầng

Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

STT39

- Tên khoa học: *Ganoderma sp.3*

- Bộ ảnh:



Hình 3.58. *Ganoderma sp3.*

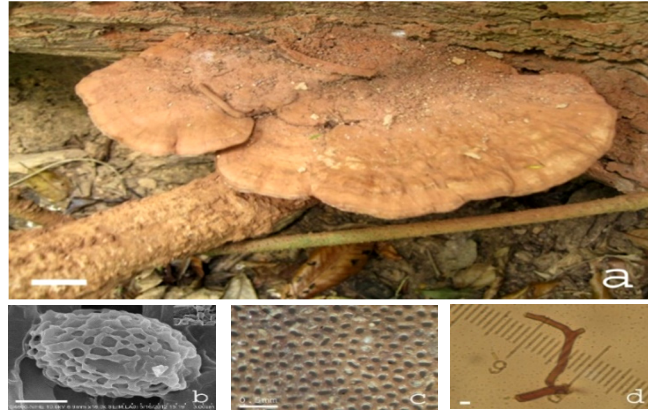
Ghi chú: a, b : Quả thể ; c : Bào tử ; d : Bào tầng ; e : Hệ sợi ; g, h : Bào tử (SEM); k : Ống nấm

Thước đo hình tự nhiên = 2cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5mm

STT40

- Tên khoa học: *Ganoderma sp.4*

- Bộ ảnh:



Hình 3.59. *Ganoderma sp 4.*

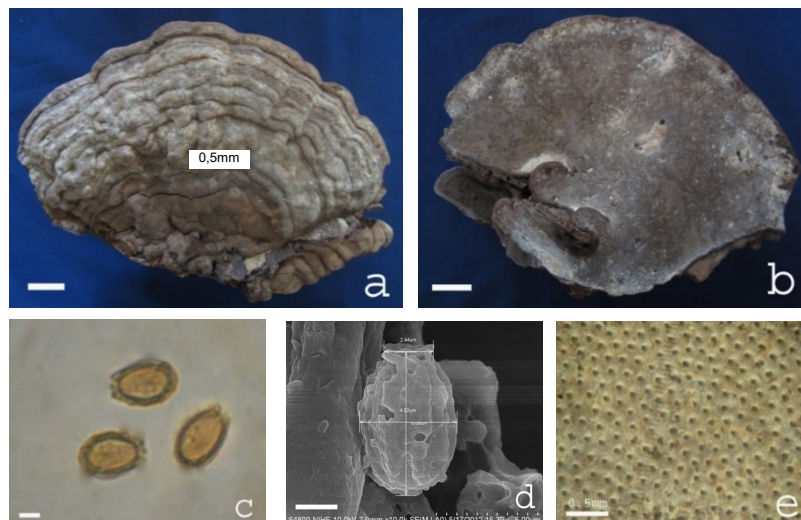
Ghi chú : a : Quả thể ; b : Bào tử (SEM) ; c : Bào tầng ; d : Hệ sợi

Thước đo hình tự nhiên = 2cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5mm.

STT41

- Tên khoa học: *Ganoderma sp.5*

- Bộ ảnh:



Hình 3.60. *Ganoderma sp5.*

Ghi chú: a, b : Quả thể ; c : Bào tử ; d : Bào tử (SEM) ; e : Bào tầng

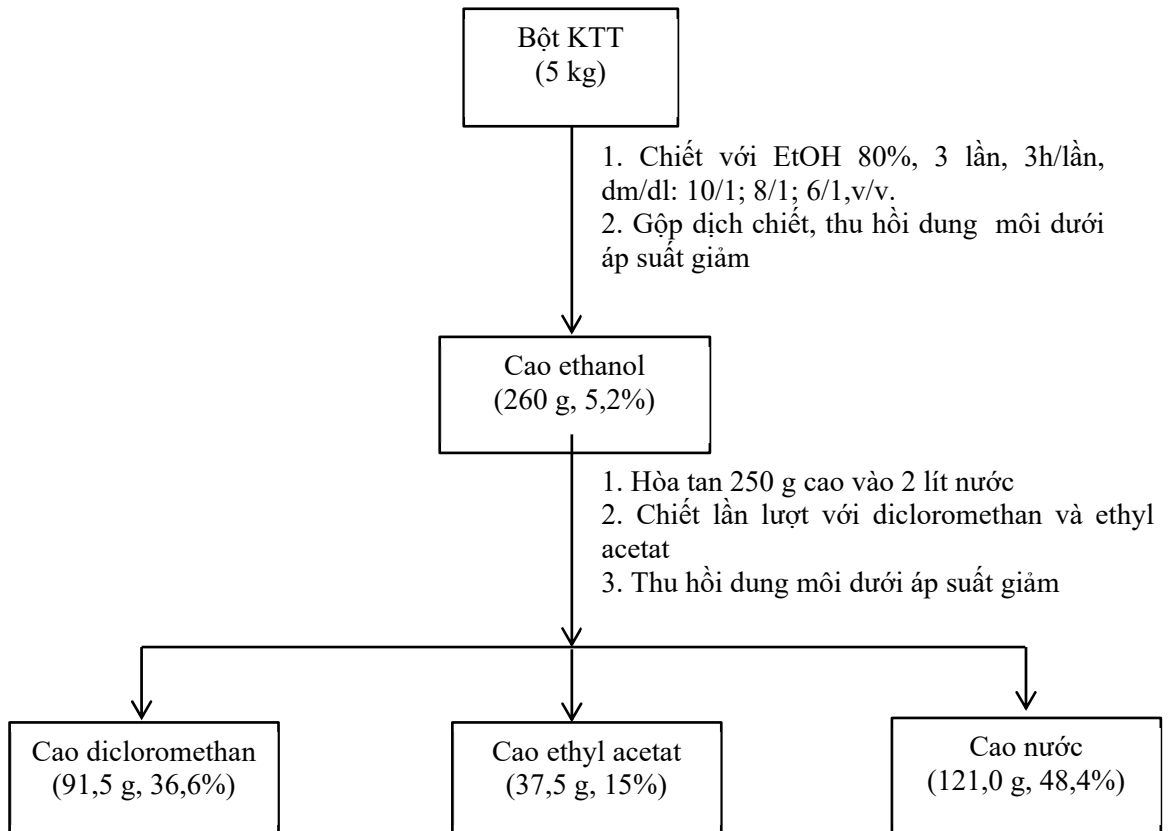
Thước đo hình tự nhiên = 2 cm, thước đo hình hiển vi = 2 μ m, thước đo bào tầng = 0,5 mm.

3.3. Xác định thành phần hóa học trong một số phân đoạn chiết từ các mẫu nấm Linh chi *Ganoderma* spp.;

3.3.1. Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hoá học các hợp chất đặc trưng trong các mẫu nấm Linh chi *Ganoderma* spp.

3.3.1.1. Phương pháp chiết xuất, phân lập

- Sơ đồ 1:



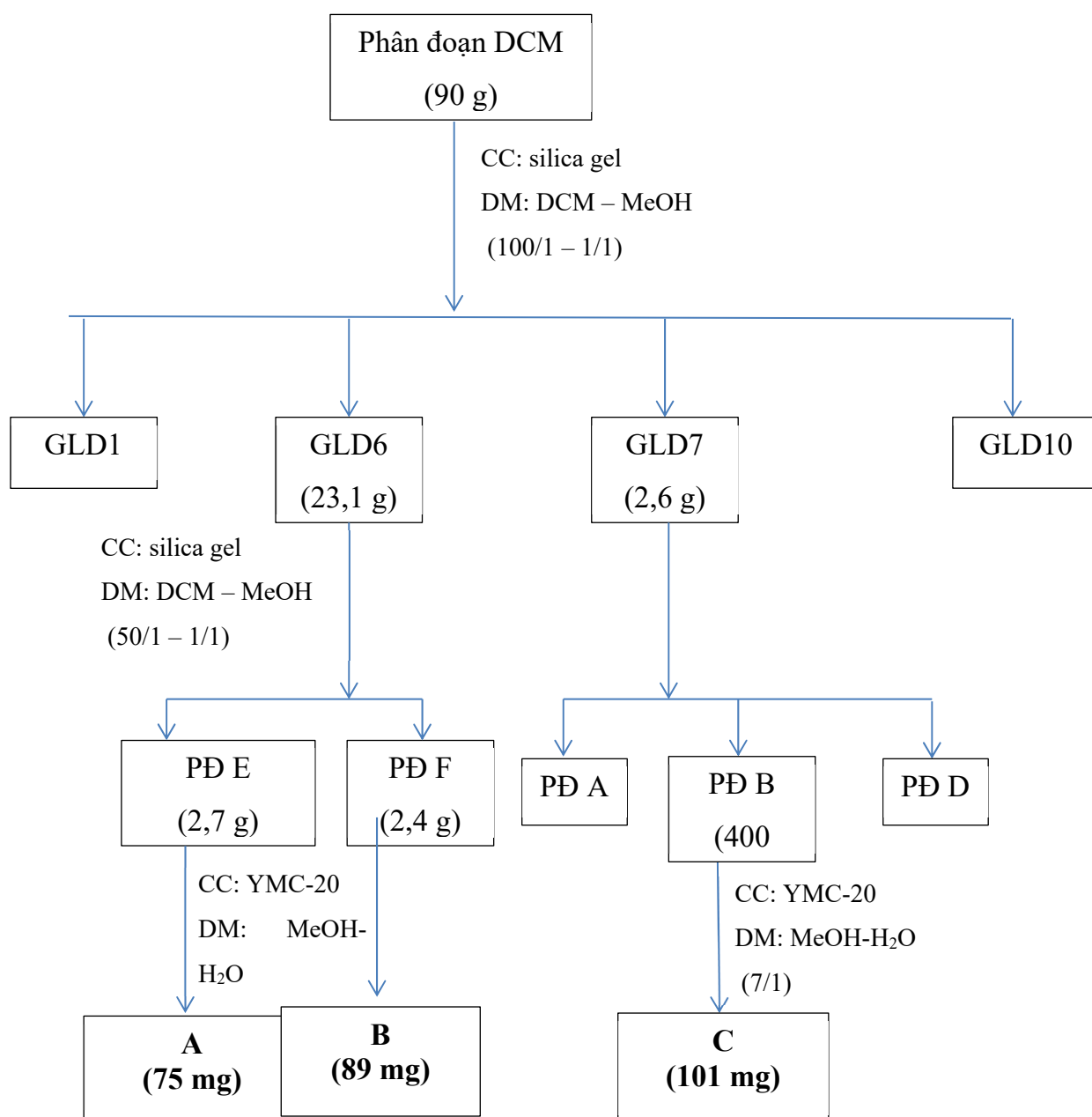
Sơ đồ chiết xuất Nấm linh chi

Kết quả chiết xuất phân đoạn trên cho thấy: Cao phân đoạn dicloromethan chiếm tỉ lệ cao gấp hơn 2 so với cao phân đoạn ethyl acetate và chỉ sau phân đoạn nước. Mặt khác các hợp chất lucidenic acid E2 và ganodermaontriol có độ phân cực thấp, nên hai chất này thường tập trung tại phân đoạn dicloromethan. Chính vì vậy, nhóm nghiên cứu tập trung phân lập và tinh chế hai hợp chất này từ cao phân đoạn DCM. Cao dicloromethan (91,5 g) được phân tách bằng sắc ký cột thường (CC) trên silica gel (Merck, 63-200 μm). Mẫu được đưa lên cột theo phương pháp tẩm mẫu trên silica

gel. Rửa giải bằng dichlometan và hệ dung môi gradient dichlometanol – methanol với các tỉ lệ 100:1 - 1:1 (v/v), thu được 8 phân đoạn là GLD1-GLD8.

Phân đoạn GLD6 (21,3 g) tiếp tục được phân tách trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi dichlometanol – methanol (50/1, v/v) thu được 2 phân đoạn (E và F). Phân đoạn E (2,7 g) được tinh chế trên cột sắc ký pha đảo bằng hệ dung môi methanol – nước (7/1) thu được 75 mg hợp chất A. Phân đoạn F (2,4 g) được tinh chế trên cột sắc ký pha đảo bằng hệ dung môi methanol – nước (6/1) thu được 89 mg hợp chất B

Phân đoạn GL7 (2,6 g) được phân tách trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi dichlometanol – methanol (20/1-1/1, v/v) thu được 4 phân đoạn nhỏ (A-D). Tinh chế phân đoạn B (400 mg) bằng sắc ký cột pha đảo với hệ dung môi rửa giải methanol - nước (2/1, v/v/) thu được 101 mg hợp chất C



Sơ đồ phân lập chất A, B, C từ phân đoạn dicloromethan

Nhận thấy: quy trình 2, 3 có thể tách được nhiều chất nên có thể dùng song song 2 quy trình này để tiến hành phân lập các chất trong Linh chi.

3.3.1.2. Xác định độ tinh khiết của hai chất A, B, C bằng phương pháp HPLC

Hai chất sau khi phân lập được ba chất A, B, C bằng sắc ký cột như trình bày ở phần 3.1, nhóm nghiên cứu đã tiến hành kiểm tra độ tinh sạch của các chất này sử dụng hệ

sắc ký HPLC-PDA có các thông số kỹ thuật sau: Hệ thống sắc ký HPLC-DAD Shimadzu, Cột Agilent C₁₈ (5 μ m, 4,5 x 250mm)

Điều kiện chạy cột là:

+ Nhiệt độ lò cột: 40°C

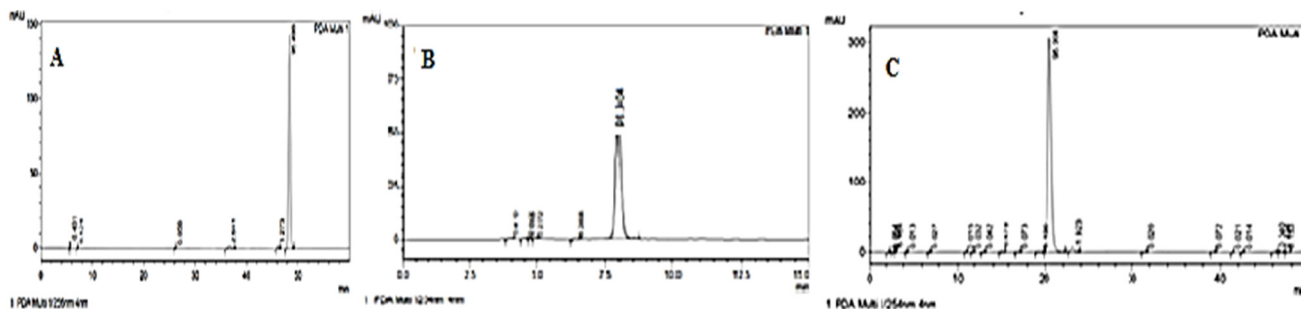
+ Thể tích tiêm: 20 μ l

+ Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

+ Bước sóng phát hiện: 254 nm

+ Pha động: Acetonitril/nước (40/60)

Kết quả sắc ký đồ kiểm tra độ tinh sạch của các chất xem hình 3.4 cho thấy: 03 hợp chất phân lập được cho sắc ký đồ gọn nét.



Hình 3.63. Sắc ký đồ xác định độ tinh khiết của các hợp chất A, B và C bằng HPLC

Kết quả kiểm tra độ tinh sạch trên 03 hợp chất A, B và C phân lập từ phân đoạn dicloromethan có độ tinh khiết đạt trên 95% và đủ điều kiện làm chất đối chiếu.

Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được (Biện luận cấu trúc hai chất A, B và C)

Hợp chất A. Phổ IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3.300 cm⁻¹ (nhóm –OH); 1.178 cm⁻¹ (liên kết C-O); 1688 cm⁻¹ (của nhóm C=O), 1726 cm⁻¹ (nhóm COOH). Phổ khối ESI – MS: m/z = 459,27 [M-H]⁻ (M = 460 ứng với công thức phân tử C₂₇H₄₀O₆). Phổ ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) và ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) của chất A được trình bày ở **bảng dưới**

Hợp chất B. Phổ IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3300 cm⁻¹ (OH), 1693 cm⁻¹ (C=O), 1.113 cm⁻¹ (C-O-C), 1738 cm⁻¹ (nhóm COOH). Phổ khối ESI – MS: m/z = 517,27 [M+H]⁺ (M =

516 ứng với công thức phân tử $C_{29}H_{40}O_8$). Phổ 1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) và ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) của hợp chất **B** được trình bày ở *bảng dưới*

Hợp chất C. Phổ IR ν_{max} (cm^{-1}): 3.300 cm^{-1} (OH), 1698 cm^{-1} (C=O), 1113 cm^{-1} (C-O-C). Phổ khối ESI – MS: $m/z = 507,32 [M+Cl]^-$ (M = 486 ứng với công thức phân tử $C_{30}H_{46}O_5$). Phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) và ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) của chất **C** được trình bày ở *bảng dưới*

Vị trí C	Hợp chất A		Acid Lucidenic N [3]	Hợp chất B		Acid lucidenic E2[3]	Hợp chất C		Ganoderma nontriol [3]
	1H -NMR	^{13}C -NMR ^[a]	^{13}C -NMR ^[b]	1H -NMR	^{13}C -NMR ^[a]	^{13}C -NMR ^[b]	1H -NMR	^{13}C -NMR ^[c]	^{13}C -NMR ^[c]
1		34,5	34,8		33	33,3		36,6	36,7
2		26,9	27,6		26,6	27,4		34,8	34,9
3	3,13 (1H, dd, 4,9;12,0 Hz)	77,5	78,3	3,24 (1H,d, 5,1;5,1 Hz)	76,7	77,5	-	216,9	216,9
4		38,3	38,6		40,4	40,5		47,5	47,5
5		48,9	49,1		51,3	51,4		50,7	50,7
6		26,6	26,6		36,2	36,7		23,7	23,7
7	4,85 (1H, dd, 9,5; 8,0 Hz)	66,6	66,9		199,8	198,8	5,51 (1H, d, 6,6 Hz)	119,9	119,4
8		157,4	156,8		151,8	151,6		142,8	142,7
9		142,7	142,7		145,8	146		144,5	144,3
10		38,5	38,8		38,8	39,2		37,2	37,2
11		199,1	198		194,2	194,1	5,41 (1H,d, 6,2Hz)	117,2	117,2
12		50,1	50,3	5,69 (1H, s)	79,4	79,4		37,8	37,7
13		45,3	45,3		50,7	48		43,7	43,8
14		59,1	59,4		58,4	58,5		50,3	50,3
15		218,8	217,5		207,4	206		27,9	27,8
16		40,4	41		37	37,6		31,4	31,5
17		45,7	46,1		45,1	45,5		51	50,9
18	0,99 (3H, s)	16,4	17,4	0,85 (3H, s)	11,2	12,1	0,61 (3H, s)	15,7	15,8
19	1,05 (3H, s)	17,5	18,4	1,76 (3H, s)	16,9	18	1,21 (3H, s)	22	22,1
20		35	35,1		32,6	33		36,5	36,5

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Vị trí C	Hợp chất A		Acid Lucidenic N [3]	Hợp chất B		Acid lucidenic E2[3]	Hợp chất C		Ganoderma nontriol [3]
	¹ H-NMR	¹³ C-NMR ^[a]	¹³ C-NMR ^[b]	¹ H-NMR	¹³ C-NMR ^[a]	¹³ C-NMR ^[b]	¹ H-NMR	¹³ C-NMR ^[c]	¹³ C-NMR ^[c]
21	1,02 (3H, d, 6,6 Hz)	17,07	18	1,05 (d, 6,6 Hz)	19,2	20,2	0,94 (3H, d, 6,4Hz)	18,6	18,7
22		30,5	30,4		29,7	30,2		33,5	33,5
23		30,3	30,7		31	31,8		28,9	29,8
24		176,2	178,2		175,2	176,9	3,47 (1H, dd, 1,4 & 10,5 Hz)	79,3	77,2
25	-	-	-	-	-	-		73,9	73,9
26	-	-	-	-	-	-	3,84 & 3,48 (2H, d, 11,2 Hz)	67,7	69,6
27	-	-	-	-	-	-	1,14 (3H, s)	22,5	20,3
28	1,23 (3H, s)	27,3	24,4	1,03 (3H, s)	26,9	27,9	1,12 (3H, s)	25,4	25,4
29	0,86 (3H, s)	14,8	28,1	0,91 (3H, s)	14,8	15,6	1,10 (3H, s)	20,9	22,5
30	1,40 (3H, s)	23,5	15,4	1,37 (3H, s)	20,2	21,4	0,90 (3H, s)	25,3	25,5
C O O C H ₃				2,22 (3H, s)	19,5	20,9			
C O O C H ₃				-	170,2	170,1			

^[c] = [CDCl₃, 100 MHz]; ^[a] = [CD₃OD, 100MHz], ^[b] = [CDCl₃, 75MHz]

Biện giải cấu trúc

Hợp chất A

Phổ 1D-NMR của A (¹H-, ¹³C-NMR và DEPT) cho tín hiệu đặc trưng của một lanostan-triterpen tương tự như cấu trúc của hợp chất A. Trên phổ ¹H—NMR cho tín hiệu của 6 nhóm methyl bao gồm 5 tín hiệu singlet của nhóm methyl liên kết với

carbon bậc 4 nội vòng lanostan tại δ_H 0,99 (3H, *s*, H-18), 1,05 (3H, *s*, H-19), 1,23 (3H, *s*, H-28), 0,86 (3H, *s*, H-29) và 1,40 (3H, *s*, H-30), 01 tín hiệu doublet của nhóm methyl nối với carbon bậc 3 tại δ_H 1,02 (3H, *d*, $J = 6,6$ Hz, H-21). Ngoài ra, hai tín hiệu proton dịch chuyển về trường thấp tại δ_H 4,85 (1H, *dd*, $J = 9,5$ & 8,0 Hz, H-7) và 3,13 (1H, *dd*, $J = 4,9$ & 12,0 Hz, H-3) đặc trưng cho nhóm hydroxymethin. Hằng số tương tác của proton 3 và 7 có tín hiệu *doublet doublet* với hằng số tương tác J tương ứng là 4,9 & 12,0 Hz và 9,5 và 8,0 Hz gợi ý về cấu trúc beta của nhóm hydroxy. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **A** cho tín hiệu tương ứng với tín hiệu proton trên phổ ^1H -NMR bao gồm 6 tín hiệu methyl tại δ_C 16,4 (C-18), 17,5 (C-19), 23,5 (C-28), 27,3 (C-29), 14,8 (C-30) và 17,7 (C-21); 2 tín hiệu nhóm hydroxymethin tại δ_C 77,5 (C-3) và 66,6 (C-7). Ngoài ra, trên phổ ^{13}C -NMR cho tín hiệu 2 nhóm keton (C=O) tại δ_C 218,8 (C-15) và 199,1 (C-11); tín hiệu 01 nhóm carbonyl tại δ_C 176,2; và tín hiệu một cặp olefin nội vòng tại δ_C 157,4 (C-8), 142,7 (C-9). Phổ DEPT cho tín hiệu 27 carbon với 6 nhóm methyl, 7 nhóm methylen, 5 nhóm metin và 9 carbon khác. Từ các phân tích phổ 1D-NMR và phổ khối cho thấy hợp chất **A** có cấu trúc là nor-25,26,27-lanostan-triterpen và hợp chất này có một số điểm là:

+ Hợp chất **A** chỉ có 2 nhóm keton.

+ Hợp chất **A** không bị acetyl hóa tại vị trí C-12 mà bị hydroxy hóa tại C-7.

Vị trí carbon khác được xác định dựa vào tương tác trực tiếp H→C trên phổ HSQC thực nghiệm và gán các vị trí tương ứng trong dữ liệu phổ trong tài liệu tham khảo.

Như vậy, từ kết quả phân tích phổ 1D-, 2D-NMR và phổ khối ESI-MS kết hợp với so sánh dữ liệu phổ tài liệu tham khảo có thể kết luận hợp chất **A** là acid lucidenic N.

Hợp chất B

Phổ 1D-NMR của **B** cho tín hiệu đặc trưng của một lanostan-triterpen: trên phổ ^1H -NMR của **B** xuất hiện tín hiệu proton của 7 nhóm methyl gồm: 5 tín hiệu singlet của 5 methyl nối với carbon bậc 4 nội vòng tại δ_H 0,85 (3H, *s*, H-18); 1,76 (3H, *s*, H-19); 1,03 (3H, *s*, H-28); 0,91 (3H, *s*, H-29) và 1,37 (3H, *s*, H-30)], 1 tín hiệu doublet của nhóm methyl liên kết với carbon bậc 3 tại δ_H 1,05 (3H, *d*, $J = 6,6$ Hz, H-21) và nhóm acetoxy methyl ester tại δ_H 2,22. Tín hiệu proton dịch chuyển về trường thấp tại δ_H 3,24 (1H, *dd*, $J = 11,5$; 5,1 Hz, H-3) và δ_H 5,69 (1H, *s*, H-12) gợi ý sự xuất hiện của

nhóm hydroxymethin. Hằng số tương tác của proton H-3 và H-12 lần lượt là: 11,5; 5,1 Hz và singlet gợi ý về cấu hình β -OH. Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của **B** cho tín hiệu của 29 carbon và hoàn toàn tương ứng với các tín hiệu trên phổ $^1\text{H-NMR}$ gồm: 6 nhóm methyl tại δ_{C} 11,2 (C-18); 16,9 (C-19); 19,2 (C-21); 26,9 (C-28); 14,8 (C-29), 20,2 (C-30); hai tín hiệu nhóm hydroxymethin tại δ_{C} 76,7 (C-3) và 79,4 (C12). Ngoài ra trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho tín hiệu của 2 nhóm carbonyl tại δ_{C} 175,2 (C24), 170,2 (COOCH₃); 3 tín hiệu keton tại δ_{C} 207,4 (C-15), 199,8 (C-7), 194,2 (C-11); và tín hiệu cặp olefin nội vòng tại δ_{C} 151,8 (C-8), 145,8 (C-9). Trên phổ DEPT của **B** cho tín hiệu của 6 nhóm methyl, 6 nhóm methylen, 5 nhóm methin và 11 tín hiệu carbon khác. Vị trí carbon được xác định nhờ tương tác trực tiếp H \rightarrow C trên phổ HSQC. Trên phổ HMBC thực nhiệm cho tương tác đặc trưng của khung lanostan-triterpen (xem bảng) gồm:

H18 (δ_{H} 0,85) \rightarrow C12 (δ_{C} 79,4), C13 (δ_{C} 50,7), C14 (δ_{C} 58,4) và C17 (δ_{C} 45,1);

H19 (δ_{H} 1,76) \rightarrow C9 (δ_{C} 145,8); C10 (δ_{C} 38,8) và C5 (δ_{C} 51,3);

H28 (δ_{H} 1,03) và H29 (δ_{H} 0,91) \rightarrow C3 (δ_{C} 76,7), C4 (δ_{C} 40,4) và C5 (δ_{C} 51,3);

H30 (δ_{H} 1,37) \rightarrow C8 (δ_{C} 151,8), C13 (δ_{C} 50,7), C14 (δ_{C} 58,4) và C15 (δ_{C} 207,4)

H21 (δ_{H} 1,05) \rightarrow C20 (δ_{C} 32,6), C17 (δ_{C} 45,1) và C22 (δ_{C} 29,7).

Từ phân tích phổ 1D, 2D-NMR và phổ khối MS kết hợp với so sánh dữ liệu phổ trong tài liệu tham khảo có thể xác định **B** là acid lucidenic E₂.

Hợp chất C

Phổ 1D-NMR ($^1\text{H-}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT) của hợp chất **C** đặc trưng cho cấu trúc lanostan-triterpen rất phổ biến trong chi *Ganoderma*. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của **C** cho tín hiệu của 7 nhóm methyl tại δ_{H} 0,61 (*s*, H-18), 1,21 (*s*, H-19), 0,94 (*d*, $J = 6,4$ Hz, H-21), 1,14 (*s*, H-27), 1,12 (*s*, H-28), 1,10 (*s*, H-29) và 0,90 (*s*, H-30); ba tín hiệu proton dịch chuyển về trường thấp đặc trưng cho các vị trí bị hydroxy hóa tại δ_{H} 3,47 (1H, *dd*, $J = 1,4$ & 10,5 Hz, H-24) và 3,84 & 3,48 (2H, *d*, $J = 11,2$ Hz, H-26); 2 tín hiệu nối đôi của hai cặp olefin tại δ_{H} 5,51 (1H, *d*, $J = 6,6$ Hz, H-7), 5,41 (1H, *d*, $J = 6,2$ Hz, H-11). Các tín hiệu carbon trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **C** hoàn toàn tương ứng với tín hiệu proton trên phổ $^1\text{H-NMR}$ bao gồm: 7 nhóm methyl tại δ_{C} 15,7 (C-18), 22,0 (C-19), 18,6 (C-21), 20,9 (C-27), 25,3 (C-28), 22,5 (C-29), 25,4 (C-30);

03 tín hiệu carbon bị hydroxy hóa tại δ_C 79,3 (C-24), 73,9 (C-25) và 67,7 (C-26); 2 cặp olefin tại δ_C (119,9; 142,8) và (144,5, 117,2). Ngoài ra, trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho tín hiệu 1 nhóm keton tại δ_C 216,9. Phổ DEPT cho tín hiệu 30 carbon với 7 nhóm methyl, 8 nhóm methylen, 6 nhóm methin và 9 carbon khác. Vị trí của carbon khác được xác định dựa trên dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$, phổ HMBC, HSQC và DEPT, kết hợp với so sánh dữ liệu phổ tài liệu [3] về hợp chất ganodermanontriol.

Như vậy, từ kết quả phân tích dữ liệu phổ 1D-NMR, MS kết hợp với so sánh dữ liệu phổ tài liệu tham khảo có thể kết luận hợp chất **C** là 24,25,26-trihydroxy-5-lanosta-7,9(11)-dien-3-one hay còn gọi là ganodermanontriol.

3.3.1.3. Hoàn thiện quy trình thực nghiệm phân lập A, B và C

Bằng phương pháp chiết xuất và sắc ký cột thông thường, nhóm nghiên cứu đã phân lập và xác định cấu trúc của hai hợp chất **A**, **B** và **C** là: acid lucidenic N, acid lucidenic E2 và ganodermanontriol. Các hợp chất này đã được kiểm tra độ tinh sạch bằng HPLC đều cho độ tinh sạch trên 95%. Để hoàn thiện quy trình chiết xuất và phân lập acid lucidenic E2 và ganodermanontriol cần khảo sát các điều kiện có liên quan đến hàm lượng của chất này như: dung môi chiết xuất, tỉ lệ dung môi chiết xuất, số lần chiết xuất, kích thước dược liệu. Thực nghiệm cho thấy, hiệu suất chiết cao tổng của Nấm linh chi đỏ (*Ganoderma lucidum*) rất thấp so với các dược liệu khác (chiếm 4 -7%, chính vì vậy điều kiện chiết xuất nên cân lựa chọn các điều kiện như: dược liệu nên được chiết nóng, tỉ lệ dược liệu/ dung môi: 1/10; 1/8 và 1/6,... và thời gian chiết 3 h/1 lần.

Khảo sát các điều kiện chiết xuất

a. Khảo sát dung môi chiết xuất

Phương pháp chiết xuất lựa chọn là pp chiết nóng, lựa chọn dung môi ethanol làm dung môi chiết xuất.

b. Khảo sát số lần chiết trên mẻ

Chọn 3 lần chiết là phù hợp đối với mỗi lô chiết xuất để đảm bảo thời gian chiết mỗi mẻ trong ngày và lợi ích kinh tế.

c. Khảo sát kích thước dược liệu chiết xuất

Kích thước nấm xay nhỏ (Loại 1) là phù hợp cho chiết xuất.

Như vậy, với việc khảo sát các điều kiện dung môi chiết xuất cao tổng, nồng độ dung môi chiết xuất, số lần chiết xuất, kích thước dược liệu ảnh hưởng đến cao chiết tổng cũng như hoạt chất, nhóm nghiên cứu đã lựa chọn được các điều kiện chiết là: sử dụng dung môi ethanol 70% để chiết xuất, số lần chiết là 3 lần, tỉ lệ dung môi/dược liệu 10/1, kích thước dược liệu loại 1 (dược liệu xay nhỏ).

Hoàn thiện quy trình phân lập hợp chất A, B và C thực nghiệm

Tiến hành khảo sát một số chỉ tiêu trong quá trình chiết xuất, phân lập:

- Dung môi chiết
- Số lần chiết

Xác định thành phần hóa học trong một số phân đoạn chiết từ các mẫu nấm Linh chi *Ganoderma* spp;

Hợp chất A, B và C được phân lập đảm bảo độ tinh khiết để làm chất đối chiếu phục vụ cho việc xây dựng quy trình thực nghiệm chiết xuất 3 chất này với khối lượng đủ lớn để thiết lập chuẩn. Để thực hiện mục tiêu này, nhóm nghiên cứu đã tiến hành các bước nghiên cứu sau:

Bước 1: Điều chế phân đoạn dicloromethan giàu hoạt chất.

Bước 2: Phân lập hợp chất sử dụng phương pháp sắc ký cột

Như vậy, bằng phương pháp sắc ký cột pha đảo và pha thường với các hệ dung môi khá thông dụng như: dicloromethan, methanol và nước nhóm nghiên cứu đã phân lập và tinh chế được 3 chất thu được 3,55 g chất acid Lucidenic E; 3,28 g chất Ganodermanotriol và 3,11 g chất acid Lucidenic N từ 20 kg dược liệu Nấm linh chi. Tiến hành sấy chân không, đóng lọ 20 mg và đánh giá chất đối chiếu acid Lucidenic E (167 lọ), Ganodermanotriol (155 lọ), acid Lucidenic N (149 lọ)

3.3.2. Quy trình phân lập, tinh chế acid ganoderic A, B

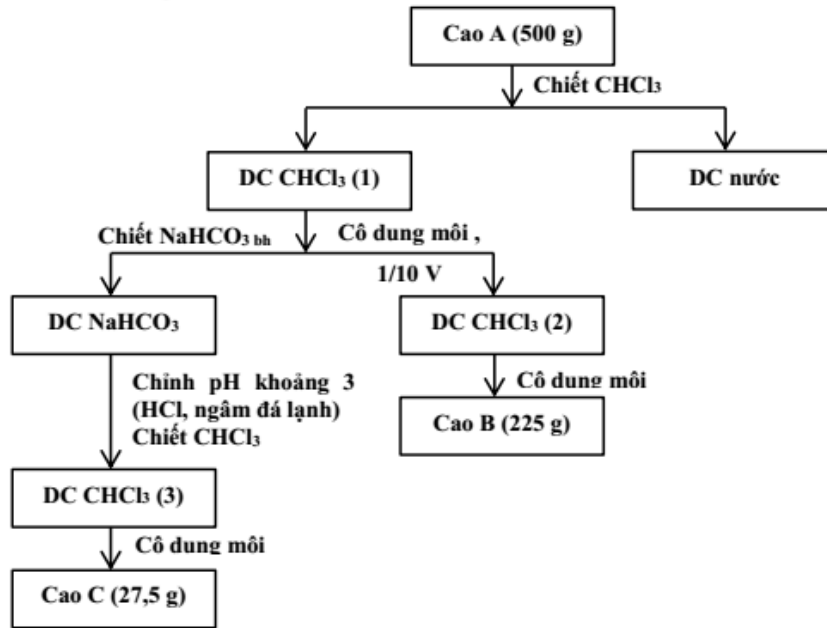
3.3.2.1. Chiết cao toàn phần

Nấm Linh chi (10,0 kg) chia làm 5 mẻ được làm ẩm mỗi mẻ với khoảng 2 lít ethanol 70% trong 4 giờ. Nạp từng mẻ vào bình ngâm kiệt, thêm khoảng 6 lít

ethanol 70%, ngâm trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Rút dịch chiết với tốc độ 3 mL/phút. Thu được 12 lít dịch chiết mỗi mẻ. Cô thu hồi dung môi của 5 mẻ thu được khoảng 520 g (cao A).

3.3.2.2. Phân lập, tinh chế acid ganoderic A, B

Dùng 500 g cao A tiến hành phân lập GA theo sơ đồ Hình 3.64 và Bảng 3.5



Hình 3.64. Sơ đồ tách phân đoạn từ cao A bằng dung môi hữu cơ

Bảng 3.5. Các phân đoạn thu được từ cao A sau khi chiết phân bố lỏng-lỏng

Cao	Khối lượng (g)	Hàm lượng (%)	Thể chất
Cao B	225 g	0,14	Cao đặc, màu nâu đen
Cao C	27,5	3,7	Cao đặc, màu vàng nâu

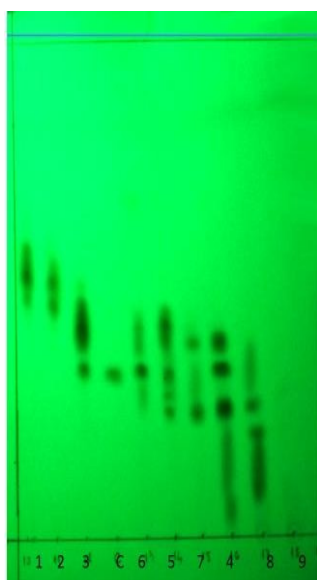
Nhận xét: Trên bản SKLM, cao C có ít vết và vết có Rf tương ứng với chuẩn là đậm nhất nên chứng tỏ cao C sạch nhất và chứa nhiều acid ganoderic A, tiếp tục sắc ký cột với cao C để phân lập acid ganoderic A.

Thăm dò hệ dung môi cho sắc ký cột cổ điển

Kết quả thăm dò hệ dung môi cho sắc ký cột cổ điển với giá trị R_f của GA. Chọn hệ cloroform-methanol tăng dần độ phân cực bằng methanol để khai triển cột cổ điển.

Tiến hành sắc ký cột cổ điển

Từ 27,5 g cao C sau khi qua sắc ký cột cổ điển thu được n phân đoạn. Phân đoạn 3, 4, 5, 6 có chất cần lấy so với chuẩn gộp chung để tiếp tục sắc ký điều chế.



Hình 3.65. Sắc ký đồ SKLM các phân đoạn thu được từ SKC cổ điển

Rửa lại hai phân đoạn bằng ether dầu hỏa thu được dạng bột màu vàng (20 g)



Hình 3.66. Hình SKLM bột thu được sau khi SKC cô điện

3.3.2.3. Tinh chế bằng sắc ký lỏng điều chế

Hòa tan bột thu được trong methanol để có nồng độ 1 g/mL. Lọc qua màng lọc nylon 0,45 μm ; tiêm vào hệ thống HPLC

Máy sắc ký điều chế Shimadzu đầu dò PDA

Tốc độ dòng: 6 mL/phút

Nồng độ thử: 1 g/mL

Nồng độ chuẩn: 2 mg/mL

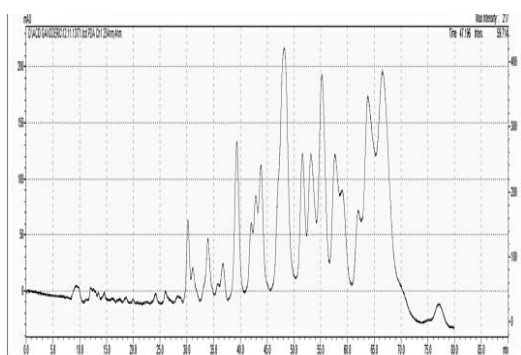
Pha động: Dung dịch acid acetic 2,0 % (v/v, A) và acetonitril (B)

Cột sắc ký điều chế Phenomenex (250 x 21 mm, 10 μm)

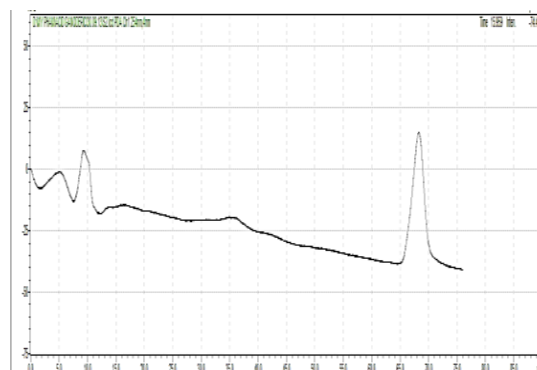
Thể tích tiêm: 1 mL

Pha động: 65% A : 35% B

Áp suất : 47 bar



Thử



Chuẩn

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Sắc ký đồ các chất trên sắc ký lỏng điều chế lần 1

Thu nhận phân đoạn bằng thủ công khoảng thời gian tương ứng với chuẩn (62 –70 phút). Cô thu hồi dung môi.

Tiếp tục tiến hành sắc lý lỏng điều chế lần 2 theo điều kiện

Máy sắc ký lỏng Shimadzu 20A: Tốc độ dòng: 4 mL/phút

Nồng độ thử: 0,1 g/mL.

Cột Gemini C18 (250x10 mm; 5 μ m)

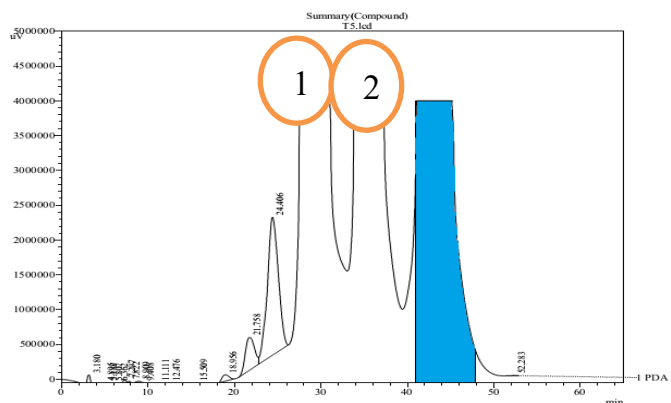
Thể tích tiêm: 70 μ l

Áp suất: 137 bar

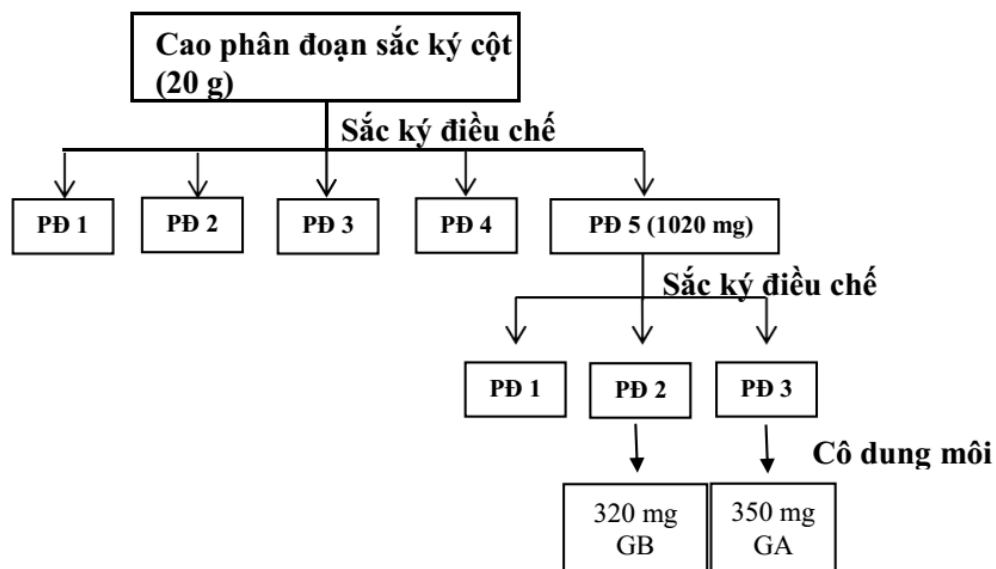
Pha động: Dung dịch acid acetic 2,0 % (A) và acetonitril (B)

<i>Thời gian (phút)</i>	<i>Dung dịch acid acetic 2% (A) (%)</i>	<i>Acetonitril (B) (%)</i>
0	50	50
5	65	35
8	75	25
67	75	25
75	50	50

Cô thu hồi dung môi phân đoạn 1, phân đoạn 2 thu được tinh thể không màu, khối lượng 320 mg và 350 mg.



Hình 3.67. Sắc ký đồ các chất trên sắc ký lỏng điều chế lần 2



Hình 3.68. Sơ đồ kết quả sắc ký lỏng điều chế của GA, GB



Hình 3.69. Tinh thể GA sau khi sắc ký lỏng điều chế



Hình 3.70. Tinh thể GB sau khi sắc ký lỏng điều chế

3.3.2.4. Đánh giá cấu trúc chất phân lập

Đánh giá chất GA

Bảng 3.6. Bảng so sánh kết quả ^1H , ^{13}C của acid ganoderic A [1] và hợp chất GA

Vị trí C/H	Hợp chất GA (400MHz, DMSO)		Acid ganoderic A[1]
	^1H -NMR	^{13}C -NMR ^{a,b}	^{13}C -NMR ^{c,d}
1	1,39 (1H, ddd, 16, 8, 8)	35,7	35,7
2	-	34,3	34,4
3	-	209,4	208,4
4	-	46,7	47,0
5	1,65 (1H, m)	48,2	49,2
6	1,72 (1H, dd, 9,2, 19) 1,90 (1H, dd, 12, 7,2)	29,4	29,2
7	4,5 (1H, dd, 8,8, 7,6)	67,7	69,1
8	-	161,6	159,6
9	2,26 (1H, d, 16)	139,5	140,6
10	2,15 (1H, dd, 9,8, 11) 2,32 (1H, dd, 15, 7,8)	46,4	46,8
11	-	199,7	200,0
12	-	52,1	51,9
13	-	37,7	38,2
14	-	54,1	54,2
15	4,7 (1H, dd, 3,7, 8,2)	71,2	72,6
16	1,85 (1H, m)	36,7	36,2
17	-	48,1	48,3
18	0,89 (3H, s)	17,6	17,4
19	1,13 (3H, s)	19,7	19,6
20	-	32,7	32,8
21	0,76 (3H, d, 6,0)	19,3	19,4
22	2,39 (1H, dd, 13,2, 3,8) 2,15 (1H, 16, 9,8)	49,5	49,8
23	-	216,9	217,3
24	2,63 (1H, dd, 8 5,5) 2,47 (1H, dd, 8,6, 3,1)	46,4	46,7

Vị trí C/H	Hợp chất GA (400MHz, DMSO)		Acid ganoderic A[1]
	¹ H-NMR	¹³ C-NMR ^{a,b}	¹³ C-NMR ^{c,d}
25	2,66 (1H, m)	34,7	34,8
26	1,05 (3H, d, 6,9)	27,2	27,4
27	-	177,2	180,1
30	0,98 (3H, s)	17,4	17,0
31	1,03 (3H, s)	20,9	20,8
32	1,16 (3H, s)	20,4	19,8
COOH	12,09 (1H, br.s)	-	-
OH	5,32 (1H, s), 4,62 (1H, s)	-	-

Kết luận: hợp chất GA có phổ ¹H và ¹³C trùng với acid ganoderic A.

Phổ IR

Phổ IR có đỉnh hấp thụ ở 1694 cm⁻¹ đây là vùng hấp thụ của nhóm –C=O; có các đỉnh phổ hấp thụ đặc trưng của -COOH ở 1738 cm⁻¹. Có band hấp thụ rộng ở 3300 – 3400 cm⁻¹ đây là đặc trưng vùng hấp thụ của nhóm –OH (nhóm chức rượu); có vùng hấp thụ 1115 cm⁻¹ là vùng hấp thụ đặc trưng của liên kết C-O.

Khối phổ (MS)

ESI-MS m/z: 515,3035 [M-H]⁻.

Pic ion	Lý thuyết	Chất D	Độ lệch ppm
[M-H] ⁻	515,3008	515,3035	5,24

Phổ ESI-MS tín hiệu tại m/z: 515,3035 [M-H]⁻, phù hợp với công thức phân tử C₃₀H₄₄O₇ (M = 516).

Đánh giá chất GB

Bảng 3.7. Bảng so sánh kết quả ^1H , ^{13}C của acid ganoderic B và hợp chất GB

Vị trí C/H	Hợp chất GB (400MHz, DMSO)		Acid ganoderic B[1]
	^1H -NMR	^{13}C -NMR ^{a,b}	^{13}C -NMR ^{c,d}
1	2,72 (1H, m)	34,8	34,8
2	1,46 (2H, m)	27,8	27,6
3	2,96 (1H, q)	76,7	78,3
4		38,7	38,8
5	0,82 (1H, d)	49,2	49,2
6	1,36 (1H, m) 1,76 (1H, m)	27,6	26,6
7	4,7 (1H, dd)	65,9	66,9
8	-	158,9	156,8
9	-	141,9	142,7
10	-	38,6	38,6
11	-	198,6	197,9
12	2,85(1H, d) 2,42 (1H, d)	50,8	50,3
13	-	45,3	45,4
14	-	58,34	59,4
15	-	215,7	217,5
16	2,59 (1H, dd) 2,04 (1H, m)	41,1	40,9
17	2,67 (1H, m) 2,43 (1H, m)	45,7	45,6
18	0,89 (3H, s)	17,9	17,4
19	1,09 (3H, s)	18,5	18,5
20	1,99 (1H, m)	31,7	32,0
21	0,85 (3H, d)	19,6	19,6
22	2,43 (1H, d) 2,21 (1H, dd)	48,9	49,0
23	-	209,1	207,6

Vị trí C/H	Hợp chất GB (400MHz, DMSO)		Acid ganoderic B[1]
	¹ H-NMR	¹³ C-NMR ^{a,b}	¹³ C-NMR ^{c,d}
24	2,73 (1H, d) 1,99 (1H, m)	46,5	46,6
25	-	34,7	34,6
26	-	177,2	180,3
27	1,06 (3H,d)	17,3	16,9
30	0,93 (3H, s)	28,6	28,2
31	0,71 (3H, s)	16,4	15,5
32	1,23 (3H, s)	25,1	24,4
COOH	12,11 (1H, br.s)	-	-

Kết luận: hợp chất GB có phổ ¹H và ¹³C trùng với acid ganoderic B.

Phổ IR

Phổ IR có đỉnh hấp thụ ở 1694 cm⁻¹ đây là vùng hấp thụ của nhóm –C=O; có các đỉnh phổ hấp thụ đặc trưng của -COOH ở 1737 cm⁻¹. Có band hấp thụ rộng ở 3300 – 3400 cm⁻¹ đây là đặc trưng vùng hấp thụ của nhóm –OH (nhóm chức rượu); có vùng hấp thụ 1120 cm⁻¹ là vùng hấp thụ đặc trưng của liên kết C-O.

Khối phổ (MS)

ESI-MS m/z: 515,3005 [M-H]⁻.

Pic ion	Lý thuyết	Chất E	Độ lệch ppm
[M-H] ⁻	515,3008	515,3005	0,58

Phổ ESI-MS có tín hiệu tại m/z: 515,3005 [M-H]⁻, phù hợp với công thức phân tử C₃₀H₄₄O₇ (M = 516).

3.3.3. Thiết lập chất đối chiếu từ nấm Linh chi

a. *Ganodermanontriol*

Đóng lọ

Khối lượng ban đầu: 3,28 g

Khối lượng đóng lọ: 20 mg.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Số lọ đóng được (N): 155 lọ

Đánh giá Z score của các kết quả:

STT	DL gốc (%)	xTB	s	Z-score	Final (%)
1	97,55	97,45	0,22	0,5	97,551
2	97,77	1,5	97,773		
3	97,20	1,1	97,204		
4	97,16	1,3	97,164		
5	97,36	0,4	97,359		
6	97,41	0,2	97,412		
7	97,41	0,2	97,4105		
8	97,34	0,5	97,335		
9	97,31	0,7	97,309		
10	97,76	1,4	97,757		
11	97,54	0,4	97,542		
12	97,78	1,5	97,775		
Trung bình	97,5				
Hàm ẩm	1,8%				
Giá trị ấn định	95,7%				

b. Acid Lucidenic E2

Đóng ống

Khối lượng ban đầu: 3,11 mg

Đóng ống 20 mg.

Số lượng ống đóng được: 167 lọ.

Đánh giá Z score của các kết quả:

STT	DL gốc (%)	XTB	s	Z-score	Final (%)
1	98,91	98,90	0,02	0,8	98,912
2	98,90			0,0	98,899
3	98,91			0,9	98,914
4	98,91			0,8	98,912
5	98,86			2,1	
6	98,90			0,2	98,896
7	98,88			1,1	98,881
8	98,88			0,9	98,884
9	98,89			0,7	98,887
10	98,92			1,2	98,919
11	98,91			0,5	98,907
12	98,90			0,1	98,900
Giá trị trung bình					98,9
Hàm âm					1,2
Giá trị ấn định					97,2

c. *Acid Lucidenic N*

Đóng ống

Khối lượng ban đầu: 3,11 g

Đóng ống 20 mg.

Số lượng ống đóng được: 149 lọ.

Đánh giá Z score của các kết quả:

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

STT	DL gốc (%)	X _{TB}	s	Z-score	Final (%)
1	99,73	99,74	0,01	0,8	99,728
2	99,73			0,7	99,729
3	99,74			0,2	99,737
4	99,73			0,1	99,734
5	99,73			1,0	99,726
6	99,74			0,0	99,735
7	99,73			0,4	99,731
8	99,72			1,3	99,723
9	99,75			1,5	99,749
10	99,75			1,4	99,748
11	99,74			0,9	99,743
12	99,74			0,4	99,739
Giá trị trung bình					99,7
Hàm âm					2,9
Giá trị ấn định					96,8

d. *Acid ganoderic A*

Đóng ống

Khối lượng ban đầu: 350 mg

Đóng ống 10 mg.

Số lượng ống đóng được: 35 lọ.

Bảng 3.8. Kết quả đánh giá liên phòng *Acid ganoderic A*

STT	So sánh liên phòng		
	1	2	3
1	98,75	98,58	98,77
2	99,21	99,30	99,18
3	99,25	99,23	98,82
4	99,00	99,01	99,56
5	99,26	98,58	98,95
6	98,75	99,07	99,04

Xác định giá trị ấn định theo hướng dẫn của ISO 13528, kỹ thuật phân tích robust:

Algorithm A. Hàm lượng GA là 99,02 %

e. *Acid ganoderic B*

Đóng ống

Khối lượng ban đầu: 320 mg

Đóng ống 10 mg.

Số lượng ống đóng được: 32 lọ.

Bảng 3.9. Kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm

STT	So sánh liên phòng		
	1	2	3
1	99,75	99,58	99,77
2	99,21	99,32	99,34
3	99,25	99,28	99,82
4	99,50	99,21	99,56
5	99,56	98,88	99,45
6	98,75	99,47	99,51

Xác định giá trị ấn định theo hướng dẫn của ISO 13528, kỹ thuật phân tích robust: Algorithm A. Hàm lượng GB là 99,50 %

Như vậy, đề tài đã tiến hành đánh giá chất đối chiếu cho 3 chất phân lập được với các giá trị ấn định: Acid Lucidenic E2 (97,2%), Acid Lucidenic N (96,8%), Ganodermanontriol (95,7%), Acid ganoderic A (99,02 %), Acid ganoderic A (99,50 %)



3.4. Đánh giá tiềm năng, khả năng phát triển nguồn dược liệu nấm Linh chi tại Tây Nguyên

Dựa vào thông tin hồi cứu và vào kết quả điều tra tri thức bản địa, chúng tôi lựa chọn

10 mẫu đại diện cho ít nhất 10 loài tiềm năng để nghiên cứu tác dụng sinh học.

Bảng. Thông tin 10 loài Linh chi đối tượng nghiên cứu

Mẫu	Phân loại, định danh
12	<i>Ganoderma amboinense</i> (Lam.) Pat. 1887
16	<i>Ganoderma capense</i> (Lloyd) Teng 1963
18	<i>Ganoderma croflavum</i> Lloyd
23	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst. 1881
27	<i>Ganoderma oroflavum</i> (Lloyd) C.J. Humphrey 1931
33	<i>Ganoderma subtornatum</i> Murrill 1907
34	<i>Ganoderma tornatum</i> (Pers.) Bres. 1912
39	<i>Ganoderma sp.3</i>
40	<i>Ganoderma sp.4</i>
42	<i>Ganoderma sp.6</i>

Mẫu nghiên cứu (500 g) được chiết siêu âm với ethanol 70% theo tỉ lệ 1:10, 3 lần, ở nhiệt độ thường trong thời gian 120 phút. Cát thu hồi dung môi, sau đó cô cách thủy tới gần tới cạn, phân tán phần cạn này trong vừa đủ 150 ml nước nóng. Để nguội, chuyển các mẫu cao vào các lọ, mã hóa, bảo quản mát ở nhiệt độ 5°C trong tủ lạnh trước khi thử nghiệm. Các cao này được gọi làm mẫu thử nghiệm (MTN)

3.4.1. Khảo sát tác dụng sinh học (điều hòa đường huyết, điều hòa lipid, chống oxy hóa, bảo vệ gan) của một số mẫu nấm Linh chi Tây Nguyên.

3.4.1.1. Khảo sát tác dụng điều hòa đường huyết của một số mẫu nấm Linh chi Tây Nguyên

a. Khảo sát hoạt tính ức chế enzym

Khảo sát hoạt tính ức chế enzym α -amylase *in vitro* của các cao Linh Chi

Khảo sát sơ bộ cho thấy hoạt tính ức chế enzym α -amylase *in vitro* của các cao Linh chi ở nồng độ 1000 μ g/ml yếu, nằm trong khoảng 0 - 12%. Do đó, đề tài không khảo sát hoạt tính này ở các nồng độ thấp hơn 1000 μ g/ml của các cao Linh Chi để xác định giá trị IC₅₀.

Khảo sát tác dụng ức chế enzym α -glucosidase *in vitro* của các cao Linh chi

Khảo sát sơ bộ cho thấy hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase *in vitro* của các cao Linh chi mẫu 16, 23, 33, 40 ở nồng độ 1000 μ g/ml ở mức độ yếu (< 50%).

Các mẫu còn lại có hoạt tính ở mức độ trung bình – mạnh (> 50%). Do đó, đề tài khảo sát hoạt tính ở các nồng độ thấp hơn 1000 µg/ml để xác định giá trị IC₅₀.

Xác định IC₅₀ của cao 12, 18, 23, 34, 39 và 42 lần lượt là 26,68 µg/ml; 390,25 µg/ml; 798,32 µg/ml; 689,05 µg/ml; 455,07 µg/ml và 624,39 µg/ml; so với mẫu đối chứng acarbose là 222,10 µg/ml.

Như vậy, các cao chiết từ nấm Linh chi có tác động ức chế enzym α-glucosidase *in vitro*. Trong đó, các cao Linh Chi mẫu 12, 18, 23, 34, 39 và 42 có hoạt tính trung bình mạnh theo thứ tự giảm dần mẫu 12 > 18 > 39 > 42 > 34 > 23. Thứ tự hoạt tính ức chế enzym α-glucosidase *in vitro* tương đồng với thứ tự hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* (mẫu 12 > mẫu 18 > mẫu 39 > mẫu 23 > mẫu 34).

b. *Khảo sát tác động lên sự tiết insulin*

Phân lập tiểu đảo Langerhan từ tụy chuột nhắt

Các tụy thu từ chuột nhắt được phân cắt bằng collagenase II 200U/ml pha trong dung dịch HBSS bơm vào trong tụy, thu tụy vào falcon 50 ml.

Falcon chứa tụy được ủ trong bể cách thủy ở 37 °C trong 30 phút. Sau đó, thêm 25 ml dung dịch HBSS/CaCl₂ 3 mM mỗi falcon. Tách mô bằng cách lắc mạnh bằng tay falcon 40 lần trong 10 giây, thu huyền dịch tế bào. Ly tâm 30 giây ở 290g và 4 °C. Thu cấy tế bào, phân tán tế bào trong 20 ml HBSS/CaCl₂ 3 mM. Rây huyền dịch tế bào qua rây 0,419 mm, thu tế bào vào falcon 50 ml mới; rửa falcon ban đầu với 5 ml HBSS/CaCl₂ 3 mM và đổ qua rây. Thu huyền dịch, ly tâm 30 giây ở 290g và 4 °C. Thu cấy tế bào, hòa trong 10 ml Ficoll 1077.

Thêm 10 ml môi trường RPMI không FBS theo thành falcon với tốc độ 1ml/10 giây tạo lớp phân cách (môi trường RPMI phía trên, Ficoll phía dưới).

Ly tâm falcon ở 900g, 20 °C trong 20 phút, thu đảo tụy ở lớp giữa Ficoll/ môi trường bằng pipet pasteur nhựa cho vào falcon mới, loại cấy các tế bào ngoại tiết.

Bổ sung vào falcon môi trường RPMI 1640 chứa 10% FBS, ly tâm 5 phút ở 290g, 4 °C

Thu cấy đảo tụy, hòa trong 5 ml môi trường nuôi cấy (RPMI 1640, 10% FBS, penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml). Lọc đảo tụy qua bộ lọc tế bào 0,07 mm, thu đảo tụy được giữ trên bộ lọc cho vào falcon mới, rửa bộ lọc với 4 ml môi

trường, cho mặt bộ lọc giữ tế bào tiếp xúc với môi trường nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 6 giếng (3ml môi trường/giếng). Rửa lưới lọc với môi trường nuôi cấy. Kiểm tra hiệu quả thu đảo tụy và hình thái đảo tụy trên kính hiển vi soi ngược, ủ đĩa nuôi cấy tiểu đảo tụy qua đêm ở 37°C, 5% CO₂.

Khảo sát khả năng tiết insulin trên đảo tụy:

Thu tiểu đảo và rửa với 2 ml dung dịch glucose thấp (2,8 mM).

Hút chuyển tiểu đảo qua đĩa nuôi cấy mới, ủ với 2 ml dung dịch glucose nồng độ thấp (2,8 mM) ở 37°C, 5% CO₂ trong 30 phút.

Chuyển 10 tiểu đảo vào mỗi giếng. Thêm 500 µl dung dịch KRBH chứa glucose nồng độ thấp (2,8 mM) có hoặc không bổ sung mẫu thử nồng độ 100 µg/ml (cao Linh chi) hoặc mẫu đối chứng glimepirid 5 µg/ml. Ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 1 giờ; trộn các tiểu đảo, ly tâm ở tốc độ 1000 rpm trong 1 phút.

Thu khoảng 500 µl dịch trong, bảo quản ở -20°C đến khi tiến hành định lượng insulin. Hòa cần tiểu đảo tụy với 500 µl dung dịch KRBH chứa glucose nồng độ cao (16,7 mM) có hoặc không bổ sung mẫu thử nồng độ 100 µg/ml (cao Linh chi) hoặc mẫu đối chứng glimepirid 5 µg/ml, ủ ở 37 °C, 5% CO₂ trong 1 giờ; trộn các tiểu đảo, ly tâm ở tốc độ 1000 rpm trong 1 phút.

Thu khoảng 500 µl dịch trong, bảo quản ở -20°C đến khi tiến hành định lượng insulin.

Định lượng insulin bằng bộ kit ELISA insulin chuột

- Chuẩn bị:

+ Dung dịch rửa: Pha loãng 20 lần dung dịch rửa 20X.

+ Dung dịch pha loãng B: Pha loãng 5 lần từ dung dịch B 5X ban đầu để pha loãng mẫu chuẩn, mẫu thử, biotyl và streptavidin.

+ Biotyl: Thêm 100 µl dung dịch B 1X vào 1 vial Biotyl, trộn lên xuống nhẹ nhàng bằng pipette, bảo quản ở -20°C trong 2 tháng hoặc 4°C trong 5 ngày.

Pha loãng Biotyl 80 lần bằng dung dịch B 1X.

+ Streptavidin 1X: Pha loãng 500 lần bằng dung dịch B 1X.

+ Mẫu chuẩn: Thêm 400 µl dd B 1X vào vial, trộn đều, thu dung dịch 1400 µIU/ml.

Từ đó, pha loãng bằng dd B 1X để có các nồng độ 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.38, 4.63 và 0 µIU/ml.

+ Mẫu thử: sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào để pha loãng ở tỷ lệ 1:2.

+ Quy trình:

- Lấy số lượng giếng tương ứng với mẫu chuẩn, mẫu trắng (mẫu chứng kiểm tra) và mẫu thử đặt vào dụng cụ giữ giếng (plate).
- Cho 100 μ l mẫu thử hoặc mẫu chuẩn hoặc mẫu trắng vào giếng tương ứng; lắc nhẹ để trộn đều; ủ 2,5h ở nhiệt độ phòng.
- Loại bỏ dung dịch ủ và rửa 4 lần bằng cách cho 300 μ l dung dịch rửa vào mỗi giếng; hút bỏ dịch rửa trong giếng; thấm khô giếng bằng cách úp giếng trên giấy thấm để loại bỏ dung dịch rửa còn bám vào giếng.
- Cho 100 μ l dung dịch biotyl vào mỗi giếng, lắc nhẹ để trộn đều; ủ 1 h ở nhiệt độ phòng.
- Loại bỏ dung dịch ủ và rửa 4 lần bằng cách cho 300 μ l dung dịch rửa vào mỗi giếng; hút bỏ dịch rửa trong giếng; thấm khô giếng bằng cách úp giếng trên giấy thấm để loại bỏ dung dịch rửa còn bám vào giếng.
- Cho 100 μ l dung dịch streptavidin 1X vào mỗi giếng; lắc nhẹ để trộn đều; ủ 45 phút ở nhiệt độ phòng.
- Loại bỏ dung dịch ủ và rửa 4 lần bằng cách cho 300 μ l dung dịch rửa vào mỗi giếng; hút bỏ dịch rửa trong giếng; thấm khô giếng bằng cách úp giếng trên giấy thấm để loại bỏ dung dịch rửa còn bám vào giếng.
- Cho 100 μ l dung dịch TMB vào mỗi giếng, lắc nhẹ để trộn đều; ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng trong tối.
- Cho 50 μ l dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng; lắc nhẹ để trộn đều.
- Đo OD ở bước sóng 450 nm bằng máy đọc plate reader trong vòng 30 phút.
- Tính kết quả: tính OD trung bình của mỗi mẫu. Thiết lập đường chuẩn bằng OD trung bình của các mẫu dung dịch insulin theo nồng độ. Lấy OD trung bình của mẫu thử, tính nồng độ insulin trong mẫu thử theo đường chuẩn (μ IU/ml).
- Định lượng protein toàn phần trong mẫu thử (mg protein/ml) dựa vào đường chuẩn của dung dịch albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin - BSA) bằng phương pháp Bradford sử dụng thuốc nhuộm Coomassie brilliant blue G250 kết hợp với protein trong mẫu thử tạo dung dịch màu xanh được đo OD ở bước sóng 590 nm

tỷ lệ với nồng độ protein.

- Kết quả được trình bày dưới dạng: nồng độ insulin trung bình trong mẫu thử ($\mu\text{IU}/\text{mg}$ protein) \pm SEM của 02 thí nghiệm độc lập cho mỗi nồng độ mẫu thử cao Linh chi 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hoặc đối chứng glimepirid 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Kết quả

Phân lập tiểu đảo Langerhan từ tụy chuột nhắt

Ở chuột *Swiss albino* đực, 7-8 tuần tuổi, trọng lượng trung bình khoảng 30 ± 3 g, nhóm nghiên cứu đã phân lập được trung bình tổng số 65 tiểu đảo tụy/chuột, dao động từ 56 đến 72 tiểu đảo trên mỗi tuyến tụy.

Sau khi phân lập, các tiểu đảo được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 bổ sung 10% (v/v) huyết thanh bò thai để tăng khả năng sống, penicilin 100 U/ml và streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ để giảm khả năng nhiễm khuẩn.

Ủ qua đêm từ 16 - 20 giờ trong tủ ẩm vô trùng ở 37 °C, 5% CO₂ giúp các tiểu đảo có thời gian phục hồi sau quá trình chịu ảnh hưởng của collagenase trước khi khảo sát chức năng của tiểu đảo. Hình ảnh quan sát các tiểu đảo bằng kính hiển vi soi ngược cho thấy các tiểu đảo có hình cầu, đường kính khoảng 50 - 250 μm , màu nâu vàng so với các tế bào của mô ngoại tiết tương đối trong suốt. Sau khi ủ qua đêm ở 37 °C, 5% CO₂, các tiểu đảo khỏe mạnh phục hồi có một ít tế bào riêng lẻ nhô ra khỏi bề mặt tròn tương đối nhẵn; các tế bào nhô ra khỏi bề mặt có thể là một dấu hiệu của sự thoái hóa tế bào. Ngoài ra, trên hình ảnh quan sát thấy một số tiểu đảo lớn xuất hiện một số vùng trung tâm có màu nâu đậm hơn (nâu đen) do các tế bào ở trung tâm thiếu oxy.

Dựa trên đường chuẩn của insulin và protein, tính kết quả nồng độ insulin

Bảng 3.10. Nồng độ insulin trong mẫu thử ($\mu\text{IU}/\text{mg}$ protein) ở 2 nồng độ glucose.

Mẫu thử nghiệm	Glucose thấp (2,8 mM)	Glucose cao (16,7 mM)
Chứng âm	4148,57 \pm 488,45	4886,91 \pm 495,88
Glimepirid	5851,12 \pm 2525,10	6796,80 \pm 2662,24
Mẫu 12	9700,76 \pm 69,09	19069,88 \pm 2183,36
Mẫu 16	6770,85 \pm 2755,84	6682,60 \pm 466,07

Mẫu thử nghiệm	Glucose thấp (2,8 mM)	Glucose cao (16,7 mM)
Mẫu 18	3085,94 ± 211,45	2255,60 ± 794,73
Mẫu 23	4479,22 ± 131,99	3951,60 ± 162,13
Mẫu 23A	4261,29 ± 1421,55	2785,75 ± 1846,48
Mẫu 23B	5069,24 ± 117,61	4573,81 ± 422,00
Mẫu 27	5159,78 ± 363,98	3886,50 ± 1469,97
Mẫu 33	4437,89 ± 586,66	4054,81 ± 926,98
Mẫu 34	5286,63 ± 217,42	3682,77 ± 207,20
Mẫu 39	4165,09 ± 278,00	4622,92 ± 587,73
Mẫu 40	5231,12 ± 567,26	6942,92 ± 2444,07
Mẫu 42	6427,32 ± 561,51	8546,42 ± 1534,30

Bảng 3.10 cho thấy tác động của cao chiết Linh chi 100 µg/ml và mẫu đối chứng glimepirid 5 µg/ml đối với sự bài tiết insulin từ tiểu đảo tụy phân lập từ chuột nhắt trắng khi có mặt glucose ở nồng độ thấp (2,8 mM) và nồng độ cao (16,7 mM).

So với đối chứng âm glucose 2,8 mM và DMSO 0,2%, cao chiết 12, 16, 23B, 27, 34, 40, 42 ở nồng độ 100 µg/ml làm tăng tiết insulin 22 - 134% so với đối chứng dương glimepirid 5 µg/ml tăng 41%, trong đó sự tăng tiết insulin theo thứ tự giảm dần là cao 12 (134%) > cao 16 và 42 (55-63%) > cao 23B, 27, 34, 40 (22-27%).

Khi tăng nồng độ glucose từ 2,8 mM lên 16,7 mM gây ra sự tiết insulin. Đối chứng dương glimepirid 5 µg/ml duy trì mức tăng khoảng 40%, cao 12, 16, 40 và 42 tăng tiết insulin lần lượt khoảng 290%, 37%, 42% và 75%.

Kết quả cho thấy trong các cao Linh chi, cao 12 có tiềm năng làm tăng tiết insulin từ tế bào tiểu đảo tụy trong cả tình trạng thiết và đủ glucose, đặc biệt khi nồng độ glucose tăng từ 2,8 mM lên 16,7 mM, tác động tăng tiết insulin tăng lên khoảng 2 lần.

Các cao còn lại thể hiện tác động tăng tiết insulin chưa rõ ràng.

Như vậy, một số cao Linh chi như cao 12, 14, 40 và 42 thể hiện tác động tiết insulin từ tiểu đảo tụy.

c. *Khảo sát tác dụng hạ lipid huyết của một số mẫu nấm Linh chi Tây Nguyên*

Mô hình gây rối loạn lipid huyết nội sinh bằng Tyloxapol

Trên mô hình gây rối loạn lipid huyết nội sinh bằng cách tiêm tĩnh mạch đuôi chuột tyloxapol liều 250 mg/kg, 10 lô chuột được điều trị với cao nấm linh chi T12, T16, T18, T23, T27, T33, T40, T42, T15B liều uống 0,20 g/kg đều thể hiện tác dụng điều hòa triglycerid, cholesterol toàn phần và LDL-cholesterol huyết. Trong đó, các lô T12, T18, T27, T33, T15B thể hiện tác dụng tốt hơn các lô còn lại.

Mô hình gây rối loạn lipid huyết ngoại sinh

Trên mô hình gây rối loạn lipid huyết ngoại sinh có duy trì chế độ ăn giàu cholesterol trong suốt quá trình điều trị, 10 lô chuột được điều trị với cao nấm linh chi T12, T16, T18, T23, T27, T33, T39, T40, T42, T15B liều uống 0,20 g/kg đều không thể hiện tác dụng hạ lipid huyết.

Trên mô hình gây rối loạn lipid huyết ngoại sinh không duy trì chế độ ăn giàu cholesterol trong suốt quá trình điều trị, ba lô chuột được điều trị với cao nấm linh chi T12, T18, T39 liều uống 0,20 g/kg đều thể hiện tác dụng hạ cholesterol toàn phần và LDL-cholesterol, tăng HDL-cholesterol huyết. Trong đó, lô T12 và T18 thể hiện tác dụng tốt hơn lô T39.

3.4.1.2. Khảo sát tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ gan của một số mẫu nấm Linh chi

Tây Nguyên

a. Phương pháp DPPH

Khảo sát sơ bộ cho thấy hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* bằng phương pháp DPPH của các cao Linh Chi ở nồng độ 1000 µg/ml cho thấy các mẫu 16, 27, 33, 40 và 42 có hoạt tính chống oxy hóa yếu (< 50%), cụ thể hoạt tính chống oxy hóa trung bình lần lượt là 35,88%, 28,99%, 43,47%, 26,43% và 40,86%. Các cao còn lại thể hiện hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* ở mức độ trung bình-mạnh, trên 50% ở nồng độ 1000 µg/ml nên được chọn tiếp tục khảo sát hoạt tính này ở các nồng độ thấp hơn để xác định giá trị EC₅₀ so sánh với chất đối chiếu quercetin.

Dựa vào giá trị EC₅₀ cho thấy hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của các cao Linh Chi có độ mạnh giảm dần theo thứ tự mẫu 12 > mẫu 18 > mẫu 39 > mẫu 23 > mẫu 34.

Như vậy, các cao chiết từ nấm Linh chi có tác động chống oxy hóa *in vitro*, tác động này làm trung hòa các gốc tự do. Trong đó, các cao Linh Chi mẫu 12, 18, 39, 23, 34 có hoạt tính trung bình mạnh theo thứ tự giảm dần.

b. Khả năng loại gốc tự do superoxyd

Các mẫu cao thử được sàng lọc khả năng loại gốc tự do superoxid ở nồng độ 1000 µg/mL. Kết quả cho thấy các mẫu thử ở nồng độ khảo sát 1000 µg/mL thể hiện hoạt tính loại bỏ gốc superoxid yếu, cụ thể đều thấp hơn 50%. Do đó không tiếp tục khảo sát tìm IC₅₀ của các mẫu thử. Chất đối chứng acid ascorbic thể hiện khả năng loại gốc superoxid trong phương pháp pyrogallol với giá trị IC₅₀ là 219,57 ± 9,46 µg/mL.

c. Khả năng loại gốc tự do hydroxyl

Các mẫu cao thử được sàng lọc khả năng loại gốc tự do hydroxyl ở nồng độ 1000 µg/mL. Kết quả sàng lọc ở nồng độ 1000 µg/mL của các mẫu thử cho hoạt tính loại bỏ gốc tự do hydroxyl thấp hơn 50%. Cụ thể, các mẫu 12, 16, 23A, 27, 33, 39 và 40 có hoạt tính đánh bắt gốc hydroxyl đạt 31% - 37%; các mẫu 18, 23, 42 cho kết quả khoảng 26% - 28%; mẫu 23B và 34 thể hiện hoạt tính loại bỏ gốc hydroxyl kém với kết quả lần lượt là 6% và 17%. Mẫu đối chứng DMSO thể hiện hoạt tính đánh bắt gốc tự do hydroxyl trong thử nghiệm deoxydribose với giá trị IC₅₀ là 0,53 µL/mL.

3.4.1.3. Khảo sát tác dụng điều hòa miễn dịch của một số mẫu nấm Linh chi Tây Nguyên.

a. Khảo sát khả năng kích thích miễn dịch trên mô hình chuột nhắt

Thí nghiệm 1: Khảo sát khả năng kích thích miễn dịch trên mô hình chuột nhắt gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamide của 10 cao chiết từ nấm Linh chi

Chuột đực, khỏe mạnh, được chia ngẫu nhiên thành 24 lô, 6 chuột/lô:

- Lô sinh lý trước thử nghiệm: lấy máu tim, gửi mẫu xác định công thức bạch cầu tại phòng khám Đa khoa Medlatec
- Lô 1 (sinh lý chuẩn): cho chuột uống nước cất
- Lô 2 (chứng bệnh): cho chuột uống nước cất
- Lô 3 (đối chiếu): chuột được tiêm phúc mạc filgrastim liều 50 µg/kg

- Lô 4 và 5 (cao thử 12): cho chuột uống cao thử 12 liều 180 mg/kg và 360 mg/kg
 - Lô 6 và 7 (cao thử 16): cho chuột uống cao thử 16 liều 180 mg/kg và 360 mg/kg
 - Lô 8 và 9 (cao thử 18): cho chuột uống cao thử 18 liều 180 mg/kg và 360 mg/kg
 - Lô 10 và 11 (cao thử 23): cho chuột uống cao thử 23 liều 180 mg/kg và 360 mg/kg
 - Lô 12 và 13 (cao thử 27): cho chuột uống cao thử 27 liều 180 mg/kg và 360 mg/kg
 - Lô 14 và 15 (cao thử 33): cho chuột uống cao thử 33 liều 180 mg/kg và 360 mg/kg
 - Lô 16 và 17 (cao thử 34): cho chuột uống cao thử 34 liều 180 mg/kg và 360 mg/kg
 - Lô 18 và 19 (cao thử 39): cho chuột uống cao thử 39 liều 180 mg/kg và 360 mg/kg
 - Lô 20 và 21 (cao thử 40): cho chuột uống cao thử 40 liều 180 mg/kg và 360 mg/kg
 - Lô 22 và 23 (cao thử 42): cho chuột uống cao thử 42 liều 180 mg/kg và 360 mg/kg
 Lô 1 (sinh lý chuẩn) được tiêm phúc mạc NaCl 0,9%, thể tích 0,1 ml/10 g. Chuột từ lô 2 đến lô 23 được tiêm phúc mạc CYP (pha trong NaCl 0,9%) liều duy nhất 150 mg/kg vào ngày 1, thể tích tiêm 10 ml/kg. Chuột ở lô 3 được tiêm phúc mạc filgrastim (pha trong glucose 5%), liều 50 µg/kg, hàng ngày từ ngày 2 đến ngày 4, liều đầu tiên cách 24 giờ sau khi tiêm CYP. Chuột ở các lô 4 đến lô 23 được cho uống cao thử tương ứng hàng ngày từ ngày 1 đến ngày 4. Chuột ở các lô thử nghiệm được ghi nhận trọng lượng hàng ngày trước khi uống thuốc. Vào ngày 4, sau khi tiêm filgrastim hoặc uống cao thử 1 giờ, gây mê chuột bằng đá CO₂, lấy máu tim để xác định công thức bạch cầu tại phòng khám Medlatec; tách lấy lách, tuyến ức, gan và tuyến thượng thận, rửa bằng NaCl 0,9% lạnh, thấm khô, cân và ghi nhận trọng lượng, xác định khối lượng tương đối của các cơ quan theo công thức:

$$g\% = \frac{P_{cq}}{P_{ct}} * 100$$

Trong đó: P_{cq}: trọng lượng cơ quan (g)

P_{ct}: trọng lượng cơ thể (g)

Kết quả

Thông số bạch cầu của chuột trước thử nghiệm

So với chỉ số ở chuột bình thường được tham khảo theo tài liệu của Suckow M.A., Danneman P., Brayton C. (2001), The laboratory mouse, CRC Press Inc., USA, tổng số lượng bạch cầu trong khoảng 3,0 - 14,2 (10⁹/L), chuột phù hợp sử dụng cho thử

nghiệm khảo sát khả năng kích thích miễn dịch trên mô hình chuột nhất gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid của các cao chiết từ nấm Linh chi.

Tác động trên trọng lượng cơ thể chuột

Tại cùng thời điểm khảo sát, trọng lượng cơ thể chuột giữa các lô cho uống cao thử khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ($p > 0,05$), trừ lô cao 34 liều 180 mg/kg ngày 5 tăng có ý nghĩa ($p < 0,05$). Như vậy, việc cho chuột uống cao Linh chi thể hiện tác động không rõ trên trọng lượng cơ thể chuột suy miễn dịch bằng cyclophosphamid.

Tác động lên trọng lượng tương đối của gan, lách, tuyến ức, tuyến thượng thận

Khi cho chuột uống cao Linh chi với liều 180 mg/kg và 360 mg/kg, đa số ở các lô có sự tăng trọng lượng tương đối của lách và tuyến ức, tuy nhiên sự tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh thể hiện ở lô cao 23 liều 180 mg/kg ($p < 0,05$) và lô cao 39 liều 360 mg/kg ($p < 0,01$). Tác động này thể hiện tốt hơn thuốc đối chiếu filgrastim 50 μ g/kg ($p < 0,01$). Tuy nhiên, trọng lượng tương đối của lách và tuyến ức ở tất cả các lô khảo sát chưa trở về mức sinh lý bình thường ($p < 0,05$).

Cao 23 và 39 thể hiện tác động tăng trọng lượng tương đối của tuyến ức với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa 2 liều thử nghiệm 180 mg/kg và 360 mg/kg (tương ứng lần lượt với liều 5 g và 10 g dược liệu khô/kg/ngày ở người lớn).

Tác động trên số lượng và công thức bạch cầu

Ở lô chứng bệnh tiêm cyclophosphamid, tổng số lượng bạch cầu giảm 2,4 lần so với lô sinh lý ($p < 0,01$) kèm theo sự giảm có ý nghĩa thống kê số lượng bạch cầu lympho, tỷ lệ bạch cầu lympho và bạch cầu đơn nhân ($p < 0,05$). Điều này chứng tỏ tiêm phúc mạc cyclophosphamid liều 150 mg/kg đã gây suy giảm miễn dịch trên chuột nhất thành công.

Khi tiêm phúc mạc filgrastim cho chuột với liều 50 μ g/kg giúp tăng tổng số lượng bạch cầu, số lượng và tỷ lệ bạch cầu đơn nhân so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$).

Khi cho chuột uống cao Linh chi, một số lô có tổng số lượng bạch cầu tăng so với lô chứng bệnh khoảng 6 - 25%; tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Trong đó, cao 16, 27 và 42 với liều cho chuột uống 180 mg/kg giúp làm tăng

tỷ lệ tế bào bạch cầu lympho có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$) ở cùng thời điểm ngày 5 sau khi tiêm cyclophosphamide.

Điều này gợi ý tác động kích thích miễn dịch của các cao Linh chi thể hiện chưa rõ rệt trên mô hình chuột nhất gây suy miễn dịch bằng cách tiêm phúc mạc cyclophosphamid liều 150 mg/kg.

Thí nghiệm 2: Khảo sát khả năng kích thích miễn dịch trên mô hình chuột nhất gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamide của 2 cao chiết từ nấm Linh chi (23A và 23B)

Thực hiện tương tự thí nghiệm 1 với 07 lô, 8 chuột/lô:

- Lô 1 (sinh lý chuẩn): cho chuột uống nước cất
- Lô 2 (chứng bệnh): cho chuột uống nước cất
- Lô 3 (đối chiếu): chuột được tiêm phúc mạc filgrastim liều 50 μ g/kg
- Lô 4 và 5 (cao thử 23A): cho chuột uống cao thử 12 liều 180 mg/kg và 360 mg/kg
- Lô 6 và 7 (cao thử 23B): cho chuột uống cao thử 16 liều 180 mg/kg và 360 mg/kg

Kết quả:

So với chỉ số ở chuột bình thường được tham khảo theo tài liệu của Suckow M.A., Danneman P., Brayton C. (2001), The laboratory mouse, CRC Press Inc., USA, tổng số lượng bạch cầu trong khoảng 3,0 - 14,2 ($10^9/L$), chuột phù hợp sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

Tác động trên trọng lượng cơ thể chuột

Tại cùng thời điểm khảo sát, so với lô chứng bệnh, trọng lượng cơ thể chuột giữa 2 lô cho uống cao 23A liều 180, 360 mg/kg khác biệt có ý nghĩa thống kê vào ngày 2 ($p < 0,05$) và lô cao 23B 180 mg/kg vào ngày 3 ($p < 0,05$). Như vậy, kết quả bước đầu cho thấy việc cho chuột uống cao Linh chi 23A, 23B thể hiện tác động phục hồi trọng lượng cơ thể chuột suy miễn dịch bằng cyclophosphamid.

Tác động lên trọng lượng tương đối của gan, lách, tuyến ức và tuyến thượng thận trên chuột thử nghiệm

So với chuột ở lô sinh lý, trọng lượng tương đối của lách và tuyến của chuột ở lô chứng bệnh thấp hơn lần lượt 2,27 lần và 5,27 lần ($p < 0,01$); trọng lượng tương đối của gan tăng 1,15 lần có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Điều này chứng tỏ

cyclophosphamid tiêm phúc mạc liều 150 mg/kg vào ngày 1 đã gây tổn thương các cơ quan miễn dịch chính của chuột thử nghiệm. Sau 5 ngày tiêm cyclophosphamid, trọng lượng tuyến thượng thận chưa bị ảnh hưởng ($p > 0,05$ so với lô sinh lý).

So với lô chứng bệnh, khi cho chuột uống cao chiết Linh chi 23A, 23B với liều 180 mg/kg và 360 mg/kg (tương ứng lần lượt với liều 5 g và 10 g dược liệu khô/kg/ngày ở người lớn) hoặc tiêm thuốc đối chứng dương filgrastim 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, đa số ở các lô có sự tăng trọng lượng tương đối của lách, tuy nhiên không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Đối với các cơ quan khác, sự thay đổi trọng lượng tương đối không đáng kể so với lô chứng bệnh.

Tác động trên số lượng và công thức bạch cầu

Khi cho chuột uống cao Linh chi 23A và 23B ở liều 180 mg/kg và 360 mg/kg liên tục trong 5 ngày giúp làm tăng tổng số lượng bạch cầu và số lượng bạch cầu lympho có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với lô chứng bệnh.

Kết quả thu được gợi ý cao Linh chi 23A thể hiện tác động kích thích miễn dịch trên mô hình chuột nhất gây suy miễn dịch bằng cách tiêm phúc mạc liều duy nhất cyclophosphamid 150 mg/kg.

b. Khảo sát tác động trên tế bào máu ngoại vi:

Sử dụng dòng tế bào: Tế bào đơn nhân máu ngoại vi người (hPBMC - Human Peripheral blood mononuclear cell) được cung cấp từ công ty Lonza, Lot: 3046717, lưu trữ, hoạt hóa và nuôi cấy tại Viện Pasteur TP. HCM.

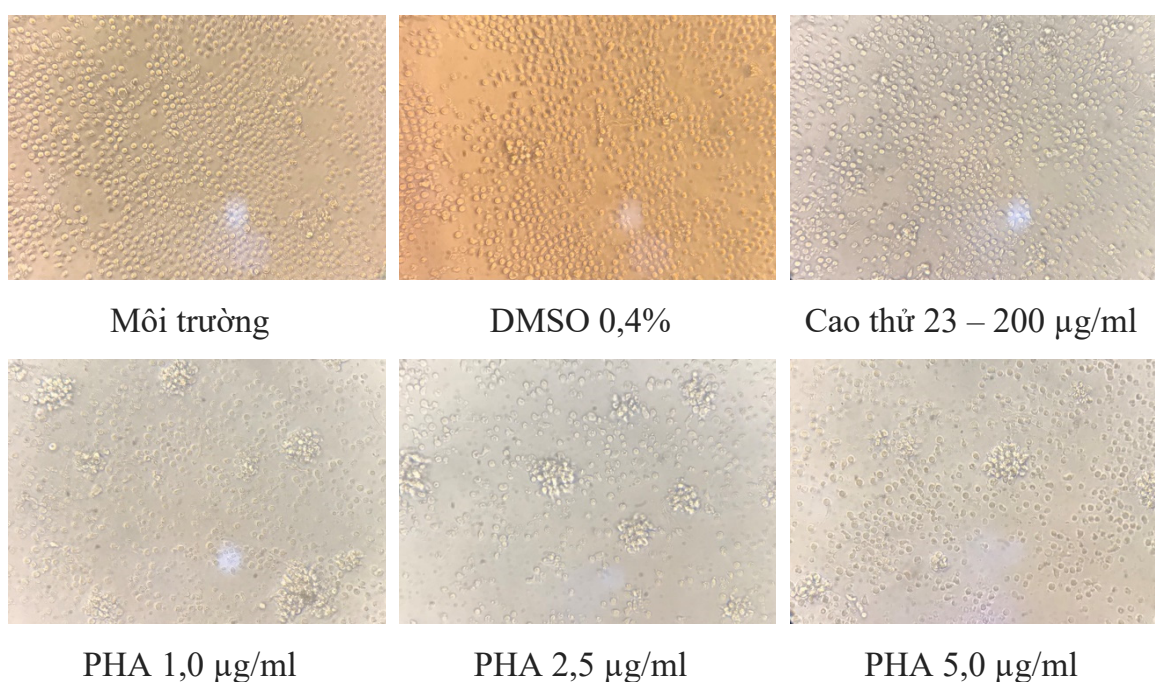
Xác định tỷ lệ sống của tế bào dựa trên hoạt tính của enzym succinat dehydrogenase (SDH) trong ty thể của tế bào sống. SDH chuyển MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid] có màu vàng thành tinh thể formazan có màu tím, được hòa tan trong dung môi isopropanol. Tỷ lệ tế bào sống được tính dựa trên OD của mẫu được đo ở bước sóng 570 nm.

Giá trị OD đo ở 570 nm của thử nghiệm được trình bày trong Bảng x so với giá trị OD nền của giếng không có tế bào trung bình khoảng 0,03.

Kết quả cho thấy ở nồng độ khảo sát 100 và 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ các mẫu cao thử thể hiện hoạt tính kích thích tăng trưởng của tế bào đơn nhân máu ngoại vi người sau thời gian xử lý 48 giờ yếu với mức độ tăng tỷ lệ tế bào sống so với mẫu đối chứng âm đa số khoảng

10-20%, mạnh nhất là mẫu cao 23 có mức độ tăng tỷ lệ tế bào sống khoảng 30% ở nồng độ 200 $\mu\text{g/ml}$. Đối với mẫu đối chứng dương, ở các nồng độ khảo sát từ 1,0 đến 10 $\mu\text{g/ml}$, tỷ lệ tế bào sống tăng từ 23% đến 42%, tỷ lệ nghịch với nồng độ mẫu PHA xử lý tế bào.

Hình ảnh tế bào quan sát dưới kính hiển vi soi ngược sau 48 giờ xử lý với cao thử 23 ở nồng độ 200 $\mu\text{g/ml}$ và đối chứng dương PHA nồng độ 1, 2.5 hoặc 5 $\mu\text{g/ml}$ được trình bày trong Hình 3.77.



Hình 3.71. Hình ảnh tế bào quan sát dưới kính hiển vi soi ngược sau 48 giờ xử lý (x20)

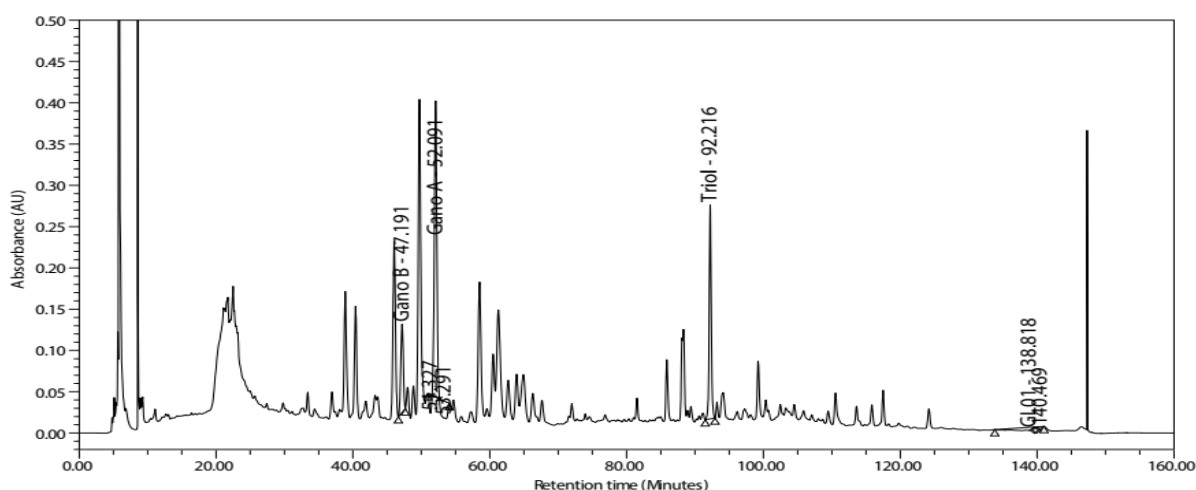
3.4.2. Khảo sát dấu vân tay sắc ký của 1 số mẫu nấm Linh chi Tây Nguyên và các vùng khác

3.4.2.1. Điều kiện khảo sát dấu vân tay sắc ký

- Hệ thống HPLC - PDA
- Cột C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm), nhiệt độ cột 40 $^{\circ}\text{C}$
- Bước sóng: 256 nm và 243 nm
- Pha động: Gradient

Thời gian	Acid phosphoric 0,1% (%)	ACN (%)
0	96	4
10	89	11
15	70	30
60	55	45
90	15	85
110	0	100
140	0	100
141	96	4
160	96	4

- Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút
- Thể tích tiêm: 50 µl



Sắc ký đồ điều kiện phân tích dấu vân tay

Với điều kiện sắc ký này, các pic marker tách tương đối tốt trên nền mẫu.

Thời gian lưu tương đối của các pic marker được thể hiện trong bảng

TT	Marker	Thời gian lưu tương đối
1	Acid lucidenic N	0.84
2	Acid ganoderic B	0.91
3	Acid ganoderic A	1.00
4	Acid lucidenic E2	1.38
5	Ganodermanontriol	1.77

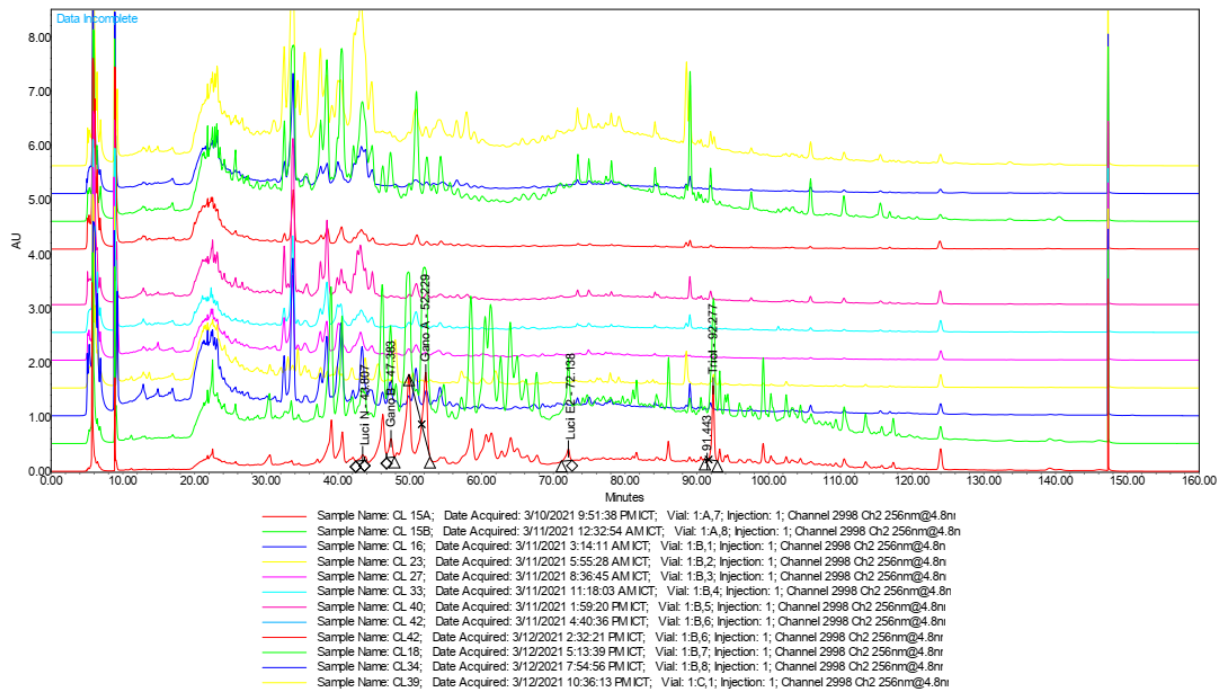
Như vậy, có thể lựa chọn điều kiện sắc ký này để xác định các marker có trong các mẫu dược liệu nấm linh chi, qua đó có thể bước đầu xây dựng dấu vân tay sắc ký của linh chi.

3.4.2.2. Xây dựng dấu vân tay sắc ký

Mẫu	Tên loài	Thời gian, địa điểm thu mẫu
CL12	<i>Ganoderma amboinense</i> (Lam.) Pat. 1887	Đắc Lắc
CL15	<i>Ganoderma balabacense</i> Murrill 1908	Đắc Lắc
CL16	<i>Ganoderma capense</i> (Lloyd) Teng 1963	Đắc Lắc
CL18	<i>Ganoderma croflavum</i> Lloyd	Đắc Lắc
CL23	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst. 1881	Đắc Lắc
CL27	<i>Ganoderma oroflavum</i> (Lloyd) C.J. Humphrey 1931	Đắc Lắc
CL33	<i>Ganoderma subtornatum</i> Murrill 1907	Đắc Lắc
CL34	<i>Ganoderma tornatum</i> (Pers.) Bres. 1912	Đắc Lắc
CL39	<i>Ganoderma</i> sp.3	Đắc Lắc
CL40	<i>Ganoderma</i> sp.4	Đắc Lắc
CL42	<i>Ganoderma</i> sp.6	Đắc Lắc

Bảng phân loại và mã hóa 10 loại nấm Linh chi được sử dụng nghiên cứu dấu vân tay sắc ký.

Từ điều kiện sắc ký đã lựa chọn, tiến hành khảo sát một số mẫu nấm linh chi thu thập được.

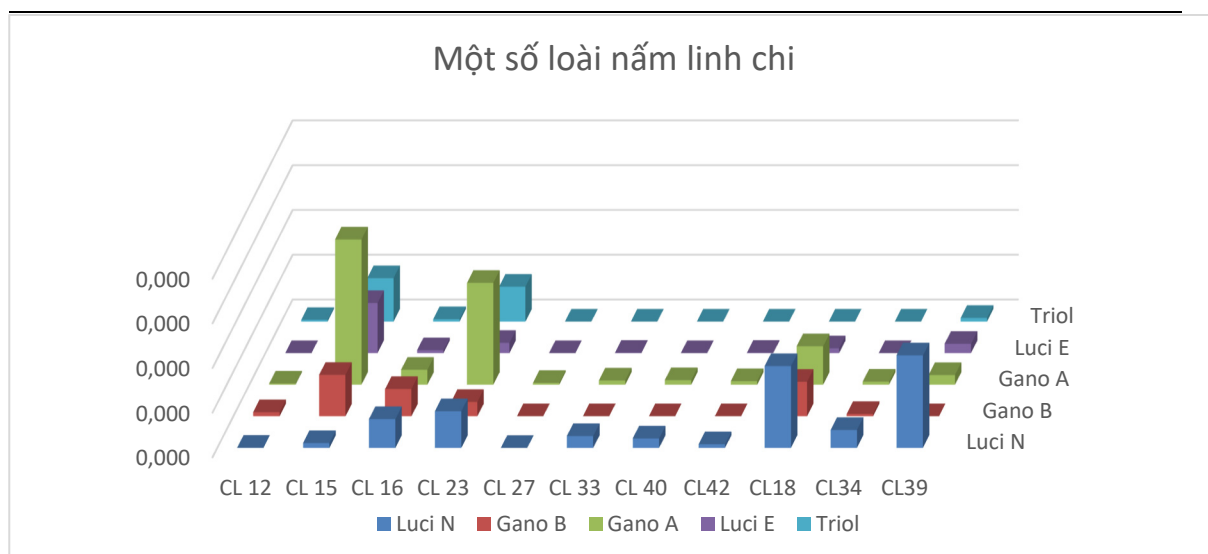


Hình 1. Sắc ký đồ một số loài nấm linh chi *Ganoderma* sp.

Hàm lượng các marker trong một số loài nấm linh chi *Ganoderma* spp. thu thập được thể hiện trong bảng:

Bảng hàm lượng marker trong một số loài nấm linh chi *Ganoderma* spp.

STT	Mẫu	Hàm lượng marker (mg/g)				
		Luci N	Gano B	Gano A	Luci E	Triol
1	CL 12	0,000	0,009	0,002	0,000	0,004
2	CL 15	0,011	0,093	0,325	0,112	0,097
3	CL 16	0,065	0,061	0,033	0,006	0,005
4	CL 23	0,082	0,032	0,228	0,023	0,078
5	CL 27	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000
6	CL 33	0,027	0,000	0,009	0,001	0,000
7	CL 40	0,021	0,000	0,010	0,000	0,000
8	CL42	0,008	0,000	0,008	0,001	0,000
9	CL18	0,183	0,077	0,086	0,011	0,000
10	CL34	0,040	0,005	0,007	0,000	0,000
11	CL39	0,207	0,000	0,022	0,021	0,008





Hình 2. Biểu đồ hàm lượng marker (mg/g) của một số loài nấm Linh chi

Từ kết quả khảo sát 5 marker trong một số loài nấm linh chi *Ganoderma* spp., nhận thấy hàm lượng các marker trong các loài khác nhau khá rõ rệt, trong đó loài *G. lucidum* (CL23) tương đối cao hơn so với các loài khác. Một số loài hầu như không phát hiện các marker này như *Ganoderma amboinense* (CL12), *Ganoderma oroflavum* (CL27). Hàm lượng acid lucidenic N trong 2 loài *Ganoderma croflavum* (CL18) và *Ganoderma* sp.3 (CL39) là cao nhất. Các marker khác lại được tìm thấy nhiều nhất trong loài *G. balabacense* (CL15).




3.4.3. Khảo sát, đánh giá ảnh hưởng môi trường, điều kiện sinh thái đến khả năng bảo tồn và phát triển nấm Linh chi Tây Nguyên

3.4.3.1. Tiến hành khảo sát trên địa bàn vườn quốc gia York-don, huyện Buôn Đôn, Đắk Lắk




Bảng 3.11. Bảng số lượng nấm thu được:



STT	Hình ảnh loài nấm	Số lượng điểm thu được	Thời điểm thu mẫu
1		25 điểm lấy mẫu có loại này	Quanh năm
2		3 điểm lấy mẫu có loại này	Mùa mưa

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

STT	Hình ảnh loài nấm	Số lượng điểm thu được	Thời điểm thu mẫu
3		11 điểm lấy mẫu có loài này	Mùa mưa
4		10 điểm lấy mẫu có loài này	Mùa mưa
5		23 điểm lấy mẫu có loài này	Quanh năm

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

STT	Hình ảnh loài nấm	Số lượng điểm thu được	Thời điểm thu mẫu
6		9 điểm lấy mẫu có loài này	Mùa mưa
7		3 điểm lấy mẫu có loài này	Mùa mưa
8		14 điểm lấy mẫu có loài này	Mùa mưa

STT	Hình ảnh loài nấm	Số lượng điểm thu được	Thời điểm thu mẫu
9		8 điểm lấy mẫu có loài này	Mùa mưa
10		9 điểm lấy mẫu có loài này	Mùa mưa

3.4.3.2. Phân tích mẫu và định danh:

Quả thể chất gỗ, ít khi chất bì dai, sống hoại sinh trên gỗ, ít khi kí sinh. Quả thể có mũ và cuống, cuống nấm thường lệch một bên hay không cuống, màu nâu hay nâu đen, phía ngoài quả thể thường có lớp vỏ dày, bóng láng. Bào tử hai lớp màng, lớp màng ngoài nhẵn, lớp màng trong có gai nhỏ.

1A. Quả thể thường có vỏ cứng và bóng láng, bào tử hai lớp, vỏ hình trứng nhọn đầuchi *Ganoderma*

1B. Quả thể thường có vỏ cứng không bóng láng, bào tử hai lớp vỏ, hình trứng không nhọn đầu chi.... *Amauroderma*

* Đặc điểm của chi *Ganoderma* Karst : Quả thể có cuống hoặc không cuống, mọc trên gỗ. Mũ nấm bóng láng thường dạng thận hay quạt có khi tròn. Thịt nấm màu nâu chất gỗ đến chất bì dai. Ông nấm đa số một tầng, một số ít hai tầng, bào tử có dạng

STT	Tên Khoa học	Nơi mọc	Tần số bắt gặp	Phương thức sống	Ý nghĩa
1	<i>Ganoderma lucidum</i> (Leyss ex Fr.) Karst	Rừng hỗn giao lá rộng và tre nứa	+++	Hoại sinh	Dược liệu
2	<i>Ganoderma amboinense</i> (Lam.ex Fr.) Pat.	Rừng lá rộng	+	Hoại sinh	Chưa rõ
3	<i>Ganoderma balabacense</i> Murr.	Rừng lá rộng	++	Hoại sinh	Không rõ
4	<i>Ganoderma capense</i> (Lloyd) Teng.	Rừng lá rộng	++	Hoại sinh	Không rõ
5	<i>Ganoderma applanatum</i> (Pres.) Pat.	Rừng lá rộng	+++++	Hoại sinh	Dược liệu
6	<i>Ganoderma multiplicatum</i> (Mont.) Pat.	Rừng lá rộng	++	Hoại sinh	Không rõ
7	<i>Amauroderma niger</i> (Lloyd)	Rừng lá rộng (Rừng Sao)	+	Hoại sinh	Dược liệu
8	<i>Amauroderma subresinosum</i> (Murrill) Corner	Rừng lá rộng (Rừng Sao)	+++	Hoại sinh	Dược liệu
9	<i>Amauroderma rugosum</i> (Blume & T. Nees) Torrend	Rừng khộp	++	Hoại sinh	Không rõ
10	<i>Amauroderma rude</i> (Berk.)	Rừng lá rộng	++	Hoại sinh	Không rõ

hình trứng nhọt một đầu, vỏ bào tử gồm hai lớp, lớp ngoài nhẵn lớp trong có gai nhẹ có màu vàng gỉ sắt.

* Đặc điểm của chi *Amauroderma* (Pat.) Murr. Quả thể có cuống, mọc trên gỗ hoặc trên đất, biểu bì của mũ có tầng vỏ, thường thường không láng bóng. Thịt nấm gần như màu trắng hoặc màu nâu, chất gỗ đến chất bì dai nhưng ở giữa luôn luôn rắn, ống nấm một tầng. Bào tử hình cầu hay gần hình cầu, thường màu nhạt, vỏ ngoài bóng nhẵn, vỏ trong sần sùi.

Định danh loài

Danh lục các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae Donk ở Vườn Quốc gia Yok Đôn

Ghi chú: TSBG: Tần suất bắt gặp (+ ít, ++ nhiều, +++ rất nhiều), PTS: Phương thức sống.

Nhận xét:

Họ *Ganodermataceae* ở khu Vườn Quốc gia Yok Đôn thuộc khu vực Tây Nguyên có 10 loài *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst, *Ganoderma amboinense* (Lam.ex Fr.) Pat., *Ganoderma balabacense* Murr., *Ganoderma capense* (Lloyd) Teng., *Ganoderma applanatum* (Pres.) Pat., *Ganoderma multiplicatum* (Mont.) Pat. 1889., *Amauroderma niger* (Lloyd), *Amauroderma subresinosum* (Murrill) Corner 1983., *Amauroderma rugosum* (Blume & T. Nees) Torrend 1920., *Amauroderma rude* (Berk.). Trong số 10 loài trong danh lục trên thì có 6 loài *Ganoderma balabacense*, *Ganoderma tornatum*, *Ganoderma multiplicatum*, *Amauroderma niger*, *Amauroderma subresinosum*, *Amauroderma rugosum* là loài mới cho khu hệ nấm lớn Tây Nguyên và có 2 loài *Ganoderma multiplicatum*, *Amauroderma rugosum* có thể là loài mới cho nấm lớn Việt Nam.

Có 4 loài được dùng làm dược liệu: *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst., *Ganoderma applanatum* (Pres.) Pat., *Amauroderma niger* (Lloyd), *Amauroderma subresinosum* (Murrill) Corner 1983. Có thể bảo tồn và phát triển các loại nấm này ở rừng quốc gia Yok-Đôn. Tuy nhiên, các loài nấm thuộc họ *Ganodermataceae* Donk đa số sống hoại sinh trên gỗ hay tàn dư thực vật dưới tán rừng từ tháng 5 đến tháng 12 trong năm. Đặc biệt, rừng quốc gia Yok- Đôn là rừng lá khộp, rụng lá vào mùa khô nên việc bảo tồn rất khó khăn.

3.4.4. Phương án bảo tồn

Bước 1. Đánh giá điều kiện môi trường

- Dưới tán rừng hoặc dưới tán cây lâu năm
- Chủ động được nguồn nước và có thể tạo môi trường ẩm đảm bảo sự phát triển của Linh chi



Bước 2. Lựa chọn giá thể có sẵn, không ảnh hưởng đến bảo tồn rừng tự nhiên
Thân gỗ mục như thân gỗ Lim xẹt, Lim xanh, gỗ thông, gỗ keo,...



Bước 3. Lựa chọn nguồn giống bảo tồn

Sử dụng giống được thu ở địa phương, trong khuôn khổ đề tài sử dụng giống *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst được tìm thấy tương đối nhiều ở vùng vườn quốc gia York-don.



Bước 4. Tiến hành chuẩn bị giá thể, giống cây

- Giá thể được hấp tiệt trùng ở 95°C trong 2h
- Giống được cấy chuyền tới túi meo
- Giá thể được đục lỗ hoặc khoét rãnh để cho meo giống vào
- Tiến hành ủ giống để sợi nấm phát triển



Bước 5. Đưa ra tự nhiên để nấm tự phát triển, kiểm soát độ ẩm xuyên suốt quá trình nuôi trồng và kiểm soát sâu bệnh.



Từ các bước đã nêu, đề tài đã tiến hành Xây dựng mô hình bảo tồn bán tự nhiên tại buôn Ea-Ma, xã Krong Na, huyện Buôn Đôn, tỉnh Đắk Lắk với diện tích 6 ha.



3.5. Nghiên cứu xây dựng và ứng dụng quy trình nuôi trồng một số chủng nấm Linh chi Tây Nguyên

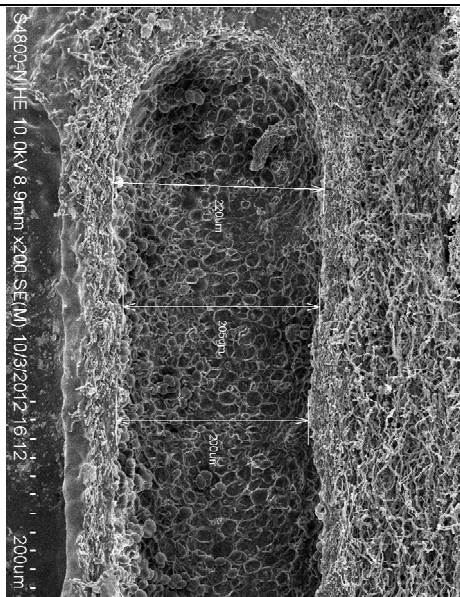
3.5.1. Thu bào tử nấm

3.5.1.1. Cách thu bào tử của nấm ngoài tự nhiên

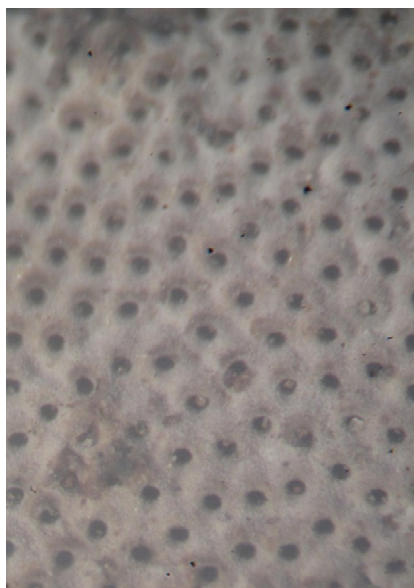
Mẫu nấm (quả thể) thu ngoài tự nhiên khi đã đủ tuổi trưởng thành (nấm trưởng thành có bề mặt bào tử bắt đầu chuyển màu, từ màu trắng đục sang màu vàng hạt cải hay từ màu trắng đục sang màu xám nâu...

Tùy theo từng loại cụ thể, từng trường hợp gặp phải khi thu mẫu sẽ có những hình thức thu bào tử khác nhau:

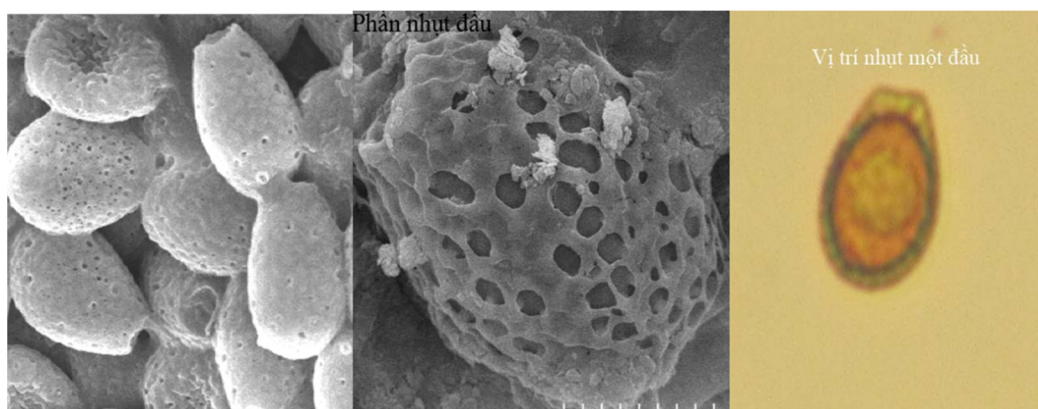
+ Đối với những mẫu nấm đi thu trên tụy thu mẫu không quay lại địa điểm thu thì sẽ tiến hành thu nấm tại chỗ và để riêng biệt trong túi giấy troky. Bào tử sẽ được thu trong phòng thí nghiệm bằng các dụng cụ giải phẫu. Xác định bào tử cắt dọc ống nấm dùng que nhọn mảnh tác động cơ học để đưa bào tử từ trong ống nấm ra ngoài. Lượng bào tử nhiều hay ít phụ thuộc giai đoạn sinh trưởng (tuổi nấm), nấm chưa trưởng thành không có bào tử.



Ống Nấm



Bào tầng



Bào tử

Đối với những mẫu Nấm bắt gặp trên tuyến thu mẫu mà trong quá trình đi thu mẫu còn quay trở lại địa điểm có mẫu thì sẽ sử dụng dụng cụ gồm túi nilon và bên trong là giấy đã được hấp khử trùng để bao bọc quả thể nấm và húng bào tử, sau khi quay lại sẽ tiến hành thu bào tử đã húng được trên dụng cụ và thu mẫu Nấm



Mẫu Nấm được bao bọc bởi dụng cụ hứng bào tử của Nhóm Nghiên cứu

3.5.1.2. Cách thu bào tử của nấm ở trang trại nuôi trồng

Nấm nuôi trồng trong trại sau 55 ngày sẽ bắt đầu phát tán bào tử. Tuy nhiên, ở giai đoạn này nấm vẫn còn non. Việc thu bào tử thích hợp là từ ngày 65 trở đi, khi này bề mặt bào tầng của Nấm chuyển từ màu trắng đục sang màu vàng nhạt. Khi đã xác định giai đoạn thu bào tử, chúng tôi ngừng tưới, sau đó sử dụng các khay giấy được thiết kế chuyên dụng trải dưới bề mặt bào tầng của Nấm, khi này bào tử sẽ được phóng thích ra từ các lỗ bào tầng. Khi nấm linh chi phóng thích bào tử, nếu ta nhìn xuyên qua ánh nắng sẽ thấy từng đợt bào tử bay qua như khói, bám vào bề mặt khay giấy đã được trải ở trên, tạo thành lớp bụi màu nâu đỏ rất mịn như đất đỏ bazan.



Bào tử nấm phóng thích từ bào tầng ra ngoài tạo thành một lớp màu nâu đỏ mịn



Bào tử Nấm thu được (có màu nâu đỏ rất mịn như đất đỏ bazan)

3.5.1.3. Bảo quản bào tử Nấm

Bào tử Nấm sau khi được thu sẽ được bảo quản dưới 2 hình thức:

- + Bào tử sẽ được ngâm trong dung dịch cồn 70 độ để sử dụng cho các mục đích nghiên cứu khác
- + Bào tử sẽ được bảo quản trong đĩa petri hoặc bình tam giác và được đặt trong điều kiện nhiệt độ 4⁰C để phục vụ cho công tác nuôi cấy, làm giống.

Nhận xét

Qua quá trình điều tra thành phần loài nấm thuộc chi *Ganoderma* tại khu vực Tây Nguyên. Chúng tôi đã xác định đặc điểm sinh học và phân loại, định danh đã xác định tên khoa học của 03 loài nấm thuộc chi *Ganoderma*: *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma fornicatum* bao gồm 09 chủng Nấm.

Các chủng nấm thuộc chi *Ganoderma* thu được mọc chủ yếu ở sinh cảnh rừng hỗn giao. Phân bố ở độ cao từ 350m đến 1200m, nhiệt độ từ 22⁰C đến 25⁰C, độ ẩm từ 76% đến 86%.

3.5.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của hệ sợi nấm của 03 loài nấm thuộc chi *Ganoderma*: *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma fornicatum* và 2 loài *Ganoderma tropicum*, *Amauroderma subresinosum*

3.5.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của pH

Số liệu thử nghiệm ảnh hưởng của pH đến tăng trưởng kích thước hệ sợi 03 loài nấm thuộc chi *Ganoderma*: *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma fornicatum*.

Sau 6 ngày theo dõi về sự gia tăng kích thước của hệ sợi (colonhi) có sự khác biệt rõ rệt ở các ngưỡng pH khác nhau và đối với các loài nấm khác nhau là khác nhau. Với cả 03 loài nấm, pH từ 6 đến 7 là khoảng nồng độ thích hợp cho sự phát triển của hệ sợi nấm. Tuy nhiên với loài *Ganoderma lucidum* thì nồng độ pH = 7 là tối ưu, còn đối với 2 loài còn lại thì pH = 6 là tối ưu. Trong 03 loài nấm nghiên cứu thì quan sát về hình thái cho thấy đối với hệ sợi loài *Ganoderma lucidum* phát triển dày với mật độ cao nhất, còn với loài *Ganoderma fornicatum* thì hệ sợi phát triển mỏng và yếu nhất.

Ảnh hưởng của pH lên sự tăng trưởng của hệ sợi nấm của loài *Ganoderma tropicum*

Số liệu thử nghiệm ảnh hưởng của pH tăng trưởng kích thước hệ sợi Nấm loài *Ganoderma tropicum*.

Sau 6 ngày theo dõi về sự gia tăng kích thước của hệ sợi (colonhi) có sự khác biệt rõ rệt ở các ngưỡng pH khác nhau, với độ pH = 6,0 là mạnh nhất trong dãy pH khảo sát từ 4 - 8. Tuy nhiên với nồng độ pH = 4 hệ sợi phát triển kém nhất, ở pH = 5 và pH = 7 thì kích thước hệ sợi không có sự khác biệt nhiều và phát triển mạnh hơn pH = 8; điều này cho thấy dải nồng độ pH từ 5 đến 7 phù hợp cho sinh trưởng của hệ sợi của

loài nấm *Ganoderma tropicum*, trong đó pH = 6 là pH tối ưu cho sự sinh trưởng của hệ sợi nấm của loài nấm nghiên cứu.

Ảnh hưởng của pH lên sự tăng trưởng của hệ sợi nấm của loài *Amauroderma subresinosum*

Số liệu thử nghiệm ảnh hưởng của pH tăng trưởng kích thước hệ sợi Nấm *Amauroderma subresinosum*.

Sau 6 ngày theo dõi về sự gia tăng kích thước của hệ sợi (colonhi) có sự khác biệt rõ rệt ở các ngưỡng pH khác nhau, với độ pH = 7 là mạnh nhất trong dãy pH khảo sát từ 4-8. Tuy nhiên với nồng độ pH = 4 và pH = 5 hệ sợi phát triển kém nhất và ít có sự khác biệt, ở pH = 6 và pH = 8 thì kích thước hệ sợi cũng không có sự khác biệt nhiều và phát triển mạnh hơn pH = 4 và 5; điều này cho thấy dải nồng độ nghiên cứu thì pH = 7 là pH tối ưu cho sự sinh trưởng của hệ sợi nấm của loài nấm *Amauroderma subresinosum*.

3.5.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của các loại đường lên sự tăng trưởng của hệ sợi

Số liệu thử nghiệm ảnh hưởng của các loại đường đến tăng trưởng kích thước hệ sợi 03 loài nấm thuộc chi *Ganoderma*: *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma fornicatum*.

Môi trường dinh dưỡng nhân tạo có chứa các loại đường khác nhau glucose, saccharose, mantose và lactose thì sự sinh trưởng hệ sợi của cùng 1 loài cũng khác nhau và của các loài khác nhau cũng khác nhau. Tuy nhiên trong 4 nguồn đường đã sử dụng trong nghiên cứu thì glucose có ảnh hưởng tốt nhất cho sự sinh trưởng của hệ sợi nấm. Đường lactose thì sự sinh trưởng hệ sợi thấp nhất.

Vậy glucose ở nồng độ 25 gam/lít là nguồn dinh dưỡng tốt nhất cho sự sinh trưởng của hệ sợi nấm của 3 loài đã được nghiên cứu: *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma fornicatum*

Glucose là nguồn dinh dưỡng tốt nhất cho sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma fornicatum*, có lẽ là vì chúng là đường đơn với cấu trúc phân tử đơn giản và là nguồn nguyên liệu cho chu trình di hoá glycolyza để tạo ra sản phẩm cho chu rình Krebs để giải phóng năng lượng nuôi tế bào và tạo ra sản phẩm trung gian cho quá trình sinh tổng hợp khác. Các loại đường khác

như saccharose, mantose và lactose là các đường đôi có trọng lượng phân tử lớn, cấu trúc phân tử phức tạp hơn phân tử glucose, do vậy nấm muốn sử dụng được chúng phải thực hiện quá trình cắt liên kết của đường đôi vì vậy chúng khó sử dụng hơn so với glucose.

Ảnh hưởng của đường saccharose lên sự sinh trưởng hệ sợi nấm của 02 loài Nấm: *Ganoderma tropicum*, *Amauroderma subresinosum*

Loài Ganoderma tropicum

Số liệu thử nghiệm ảnh hưởng của đường saccharose đến tăng trưởng hệ sợi nấm *Ganoderma tropicum*

Sau 6 ngày theo dõi nuôi cấy sự gia tăng về kích thước của hệ sợi có ý nghĩa thống kê. Ở nồng độ đường saccharose 35 g/l sau 6 ngày theo dõi của hệ sợi loài *Ganoderma tropicum* thì sự gia tăng về đường kính colonhi của hệ sợi là cao nhất so với các nồng độ khác. Điều này cho thấy đối với đường saccarose ở nồng độ đường 35 g/l là thích hợp cho sự tăng trưởng hệ sợi của loài *Ganoderma tropicum*.

Loài Amauroderma subresinosum

Số liệu thử nghiệm ảnh hưởng của đường saccharose đến tăng trưởng hệ sợi nấm *Amauroderma subresinosum*.

Ở nồng độ đường saccharose 35 g/l sau 6 ngày theo dõi của hệ sợi loài *Amauroderma subresinosum* thì sự gia tăng về đường kính colonhi của hệ sợi là cao nhất so với các nồng độ khác. Điều này cho thấy đối với đường saccarose ở nồng độ đường 35 g/l là thích hợp cho sự tăng trưởng hệ sợi của loài *Amauroderma subresinosum*.

Ảnh hưởng của đường mantose lên sự tăng trưởng hệ sợi của 02 loài Nấm: *Ganoderma tropicum*, *Amauroderma subresinosum*

Loài Ganoderma tropicum

Số liệu thử nghiệm ảnh hưởng của đường mantose đến tăng trưởng hệ sợi nấm *Ganoderma tropicum*

Ở các nồng độ đường mantose bổ sung khác nhau từ 15-40 g thì ở nồng độ đường 30g/l cho kích thước hệ sợi là cao nhất so với các nồng độ đường khác. Nồng độ bổ sung đường mantose 30g/l là thích hợp cho sự sinh trưởng của hệ sợi của loài *Ganoderma tropicum*.

Loài Amauroderma subresinosum

Số liệu thử nghiệm ảnh hưởng của nồng độ đường mantose đến tăng trưởng kích thước hệ sợi nấm *Amauroderma subresinosum*

Sau 6 ngày theo dõi ở các nồng độ đường mantose bổ sung khác nhau từ 15-40 g thì ở nồng độ đường 30 g/l cho kích thước hệ sợi là cao nhất so với các nồng độ đường khác. Nồng độ bổ sung đường mantose 30g/l là thích hợp cho sự sinh trưởng của hệ sợi của loài *Amauroderma subresinosum*.

Ảnh hưởng của đường lactose lên sự tăng trưởng hệ sợi của của 02 loài Nấm: *Ganoderma tropicum*, *Amauroderma subresinosum*

Loài Ganoderma tropicum

Số liệu thử nghiệm ảnh hưởng của đường lactose đến tăng trưởng hệ sợi nấm *Ganoderma tropicum*: ở các nồng độ đường khác nhau không có sự sai khác nhiều về kích thước của hệ sợi tuy nhiên sau 6 ngày theo dõi ở nồng độ từ 15g/l đến 40g/l cho thấy: Nồng độ 20 g/l ảnh hưởng rõ ràng và cao nhất đến tăng trưởng trung bình kích thước hệ sợi, tiếp đến là nhóm nồng độ 30 g/l và 25 g/l, tiếp đến là nhóm 25 g/l và 35 g/l, ảnh hưởng thấp nhất đến tăng trưởng kích thước hệ sợi là nhóm 35 g/l, 40 g/l và 15 g/l; kích thước hệ sợi dao động từ 2,9 đến 3,8 cm và thấp hơn nhiều so với các đường khác. Điều này cho thấy đối với đường lactose là không phù hợp trong nuôi cấy hệ sợi nấm loài *Ganoderma tropicum*

Loài Amauroderma subresinosum

Số liệu thử nghiệm ảnh hưởng của nồng độ đường lactose đến tăng trưởng kích thước hệ sợi nấm *Amauroderma subresinosum*

Ở các nồng độ đường lactose khác nhau ở thí nghiệm đến tăng trưởng kích thước hệ sợi nấm *Amauroderma subresinosum* như sau: Nồng độ 20 g/l ảnh hưởng rõ ràng và cao nhất đến tăng trưởng trung bình kích thước hệ sợi, tiếp đến là nhóm nồng độ (30 g/l, 15 g/l, 25 g/l và 35 g/l) và ảnh hưởng thấp nhất đến tăng trưởng kích thước hệ sợi là nồng độ 40 g/l.

Ảnh hưởng của đường glucose lên sự tăng trưởng hệ sợi của 02 loài Nấm: *Ganoderma tropicum*, *Amauroderma subresinosum*

Loài Ganoderma tropicum

Số liệu thử nghiệm ảnh hưởng của đường glucose đến tăng trưởng hệ sợi nấm *Ganoderma tropicum*

Ở các nồng độ đường glucose khác nhau ở thí nghiệm đến tăng trưởng kích thước hệ sợi nấm *Ganoderma tropicum* như sau: Nồng độ 30 g/l ảnh hưởng rõ ràng và cao nhất đến tăng trưởng trung bình kích thước hệ sợi, tiếp đến là nồng độ 25 g/l, tiếp đến là nhóm nồng độ (35 g/l và 40 g/l) và ảnh hưởng thấp nhất đến tăng trưởng kích thước hệ sợi là nhóm nồng độ (40 g/l, 20 g/l và 15 g/l).

Loài Amauroderma subresinosum

Số liệu thử nghiệm ảnh hưởng của nồng độ đường glucose đến tăng trưởng kích thước hệ sợi nấm *Amauroderma subresinosum*

Các nồng độ đường glucose khác nhau ở thí nghiệm đến tăng trưởng kích thước hệ sợi nấm *Amauroderma subresinosum* như sau: Nồng độ 25 g/l ảnh hưởng rõ ràng và cao nhất đến tăng trưởng trung bình kích thước hệ sợi, tiếp đến là nhóm nồng độ (20 g/l và 30 g/l), tiếp đến là nhóm nồng độ (30 g/l, 35 g/l và 40 g/l) và ảnh hưởng thấp nhất đến tăng trưởng kích thước hệ sợi là nồng độ nhóm nồng độ (35 g/l, 40 g/l và 15 g/l)

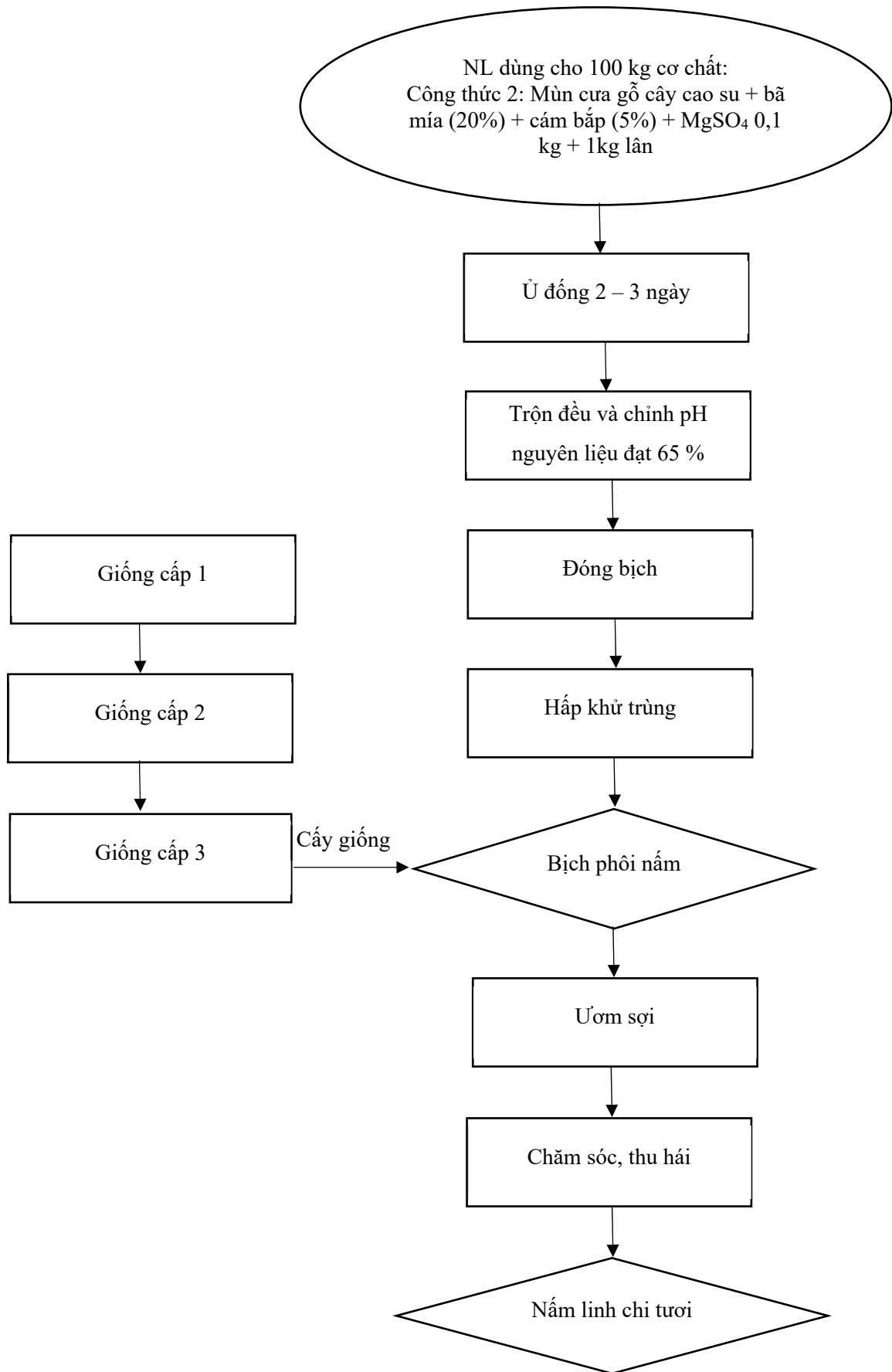
Trong môi trường dinh dưỡng nhân tạo có chứa các loại đường khác nhau glucose, saccharose, mantose và lactose thì sự sinh trưởng hệ sợi của cùng 1 loài cũng khác nhau và của các loài khác nhau cũng khác nhau. Tuy nhiên trong 4 nguồn đường đã sử dụng trong nghiên cứu thì glucose có ảnh hưởng tốt nhất cho sự sinh trưởng của hệ sợi nấm. Đường lactose thì sự sinh trưởng hệ sợi thấp nhất.

Vậy glucose ở nồng độ 30 gam/lít là nguồn dinh dưỡng tốt nhất cho sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Ganoderma tropicum*, glucose ở nồng độ 25 gam/lít là nguồn dinh dưỡng tốt nhất cho sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Amauroderma subresinosum*.

3.5.3. Quy trình nuôi trồng 04 loài nấm thuộc chi *Ganoderma*: *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma fornicatum*, *Ganoderma tropicum* và 1 loài *Amauroderma subresinosum*.

3.5.3.1. Quy trình nuôi trồng loài *Ganoderma lucidum*

Qua quá trình khảo sát ảnh hưởng của nồng độ pH, các loại đường và nồng độ các loại đường, chúng tôi thấy rằng: nồng độ pH thích hợp cho sự phát triển của hệ sợi Nấm *Ganoderma lucidum* là pH=7; Loại đường thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi là đường Glucose với nồng độ 25g/l. Từ đó chúng tôi đã khảo sát và xây dựng 3 quy trình nuôi trồng với lượng bã mía lần lượt là 10 %, 20 %, 30% theo sơ đồ dưới đây. Trong đó quy trình 2 với lượng bã mía là 20 % cho kết quả nấm tốt hơn cả.



❖ **Phân lập giống và tạo giống cấp 1.**

Phương pháp chuẩn bị môi trường thạch nghiêng (slope) để bảo phân lập mẫu Nấm

Sử dụng ống nghiệm có thể tích 15 hoặc 30 ml có nắp nhựa hoặc không có nắp nhựa. Đối với ống nghiệm không có nắp nhựa, dùng bông sạch để làm nút.

Bước 1: Hấp tiệt trùng ống nghiệm, nút bông, nắp nhựa ở 121⁰C trong 20 phút.

Chuẩn bị môi trường PDA:

Môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) bao gồm các thành phần sau:

Khoai tây (Potato)	200 gam
Glucose	25 gam
Agar	20 gam
Nước cất	1000 ml

Cách chuẩn bị:

1: Cân 20 gam Agar và 25 gam Glucose cùng với 100 ml nước cất cho vào cốc đong thủy tinh loại 1000 ml

2: Khoai tây rửa sạch, gọt vỏ, cân 200 gam.

3: Cắt thành miếng có kích thước 12 x 12 mm.

4: Cho vào nồi đun sôi cùng với 1000 ml nước.

5: Đun sôi cho đến khi khoai tây mềm ra (khoảng 15 - 20 phút).

6: Dùng 1 chiếc rây bột và 1 tấm gạc để lọc lấy phần nước dịch khoai tây.

7: Cho nước khoai tây vào cốc đong có chứa Agar và Glucose đủ thể tích 1000 ml, khuấy đều.

8: Cho toàn bộ hỗn hợp trên vào nồi đun sôi để hòa tan Agar.

9: Cho hỗn hợp cuối cùng vào bình tam giác thủy tinh loại 1000 ml.

10. Chuẩn độ pH = 7

Bước 2: Rót môi trường PDA (khi chưa bị đông đặc) vào các ống nghiệm với mức 5 ml (ống nghiệm 15 ml) và 10 ml (ống nghiệm 30 ml).

Bước 3: Đậy nút bông hoặc nắp nhựa (nắp nhựa không được vặn quá chặt), cho vào nồi hấp tiệt trùng ở 121⁰C trong 30 phút. (Chú ý để đứng ống nghiệm, tránh làm đổ môi trường ra ngoài).

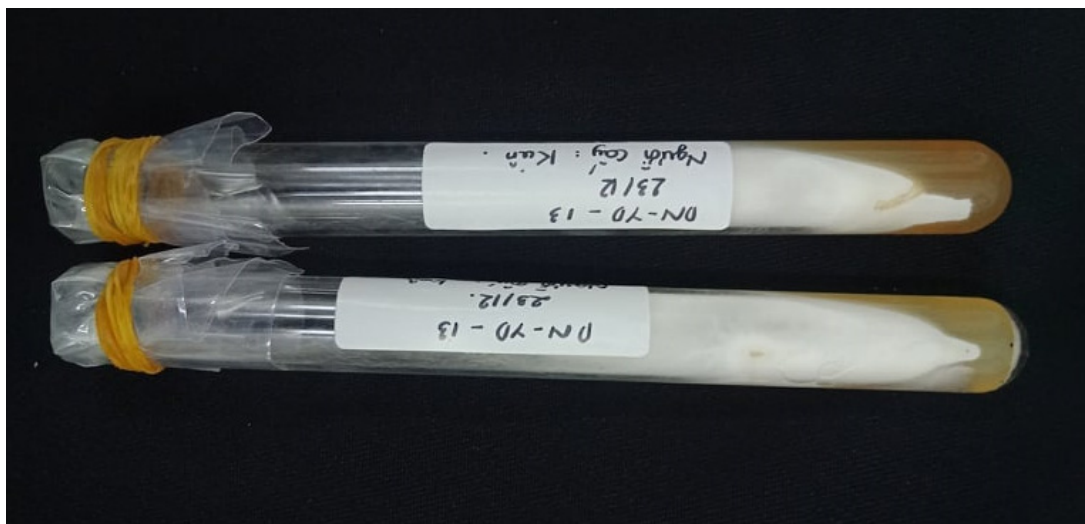
Bước 4: Sau khi kết thúc chế độ làm việc của nồi hấp tiệt trùng (ở nhiệt độ 70°C), lấy các ống nghiệm ra ngoài để nằm nghiêng khoảng 45°.

Vặn chặt nắp nhựa, chờ môi trường nguội và đông đặc lại, ta được môi trường thạch nghiêng (slope).

Bước 5: Tiến hành phân lập mẫu nấm vào các slope trong tủ cấy sinh học vô trùng.

1. Chuẩn bị mẫu nấm phân lập: yêu cầu mẫu còn tươi và non.
2. Chuẩn bị và khử trùng các dụng cụ cấy: Lưỡi lam, kẹp gắp, khay cấy, cây cấy...
3. Người cấy vệ sinh, khử trùng 2 tay, đốt đèn cồn trong tủ cấy.
4. Tiến hành phân lập: Dùng dao lam cắt bỏ 4 phía bên ngoài mẫu Nấm phân lập, cắt lấy một phần nhỏ mô bên trong rồi dùng kẹp gắp phần mô này chuyển sang giữa ống thạch nghiêng đã chuẩn bị. Lưu ý: Dao lam mỗi lần cắt yêu cầu phải hơ lại trên ngọn lửa đèn cồn, các thao tác thực hiện tiến hành gần ngọn lửa đèn cồn.

Bước 6: Để các slope đã cấy nấm trong các tủ nuôi ở nhiệt độ từ 22 đến 24°C, theo dõi 2 - 3 ngày để phát hiện và loại bỏ các slope bị nhiễm vi khuẩn và nấm khác. Các mẫu đạt yêu cầu tiếp tục cấy truyền để nhân giống và giữ giống.



Hình 3.72. Giống cấp 1 sau khi được phân lập

Cấy truyền từ môi trường PDA sang môi trường PDA

Chuẩn bị môi trường PDA trong đĩa Petri hoặc trong slope.

Dùng que cấy lấy 1 lượng rất nhỏ nấm từ ống gốc (một phần sợi nấm hoặc một miếng nhỏ thạch có sợi nấm) cấy chuyển sang đĩa petri hoặc slope có môi trường PDA.

Dùng nhãn dính ghi các thông tin bao gồm: tên nấm, ngày cấy, số thứ tự của đĩa hoặc slope, tên người cấy.

Dùng paraffin hoặc giấy bọc đĩa tiết trùng quần quanh miệng đĩa (đậy nắp slope).

Chuyển các đĩa hoặc slope đã cấy vào nuôi hoặc bảo quản ở nhiệt độ thích hợp ta được giống cấp 1.

Chú ý: Các thao tác tiến hành trên ngọn lửa đèn cồn trong tủ hốt vô trùng.

❖ **Làm giống cấp 2**

*** Nấu môi trường lúa**

Nguyên liệu : lúa.

Cách nấu môi trường :

- Lúa ngâm trong nước, vớt bỏ hạt lép.
- Cho lúa vào nồi nấu, đổ nước ngập lúa vừa đun vừa đảo để các hạt chín đều, nấu cho tới khi hạt vừa hé miệng thì ngưng.
- Vớt ra rổ để lên kệ cho ráo nước, đợi cho lúa nguội thì cho lúa vào bình tam giác, nút bông, bọc báo vào đầu miệng chai hay bình tam giác.
- Hấp bình tam giác (chai) đựng lúa ở 1,2atm trong 20 phút.
- Sau khi hấp xong lấy ra, để nguội, chuẩn bị cấy giống cấp 2.

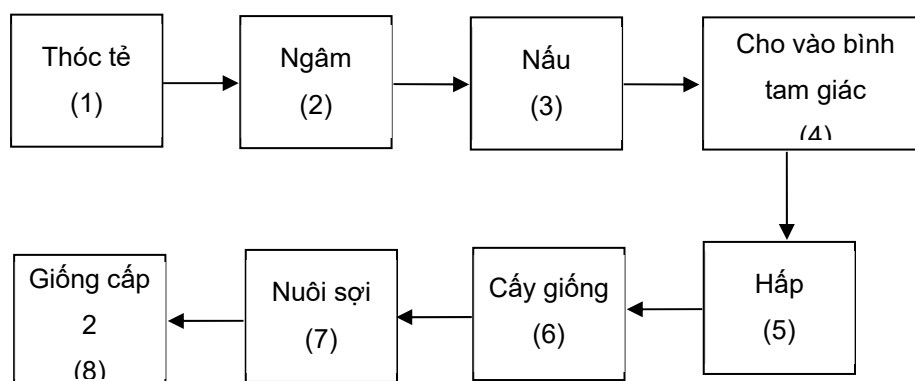
*** Tạo giống cấp 2**

- Chuyển giống cấp 1 từ ống nghiệm vào bình tam giác đựng lúa, thực hiện trong điều kiện vô trùng để giống cấp 2 không bị nhiễm khuẩn, nấm mốc.
- Sau khoảng 1 - 2 ngày, nấm bắt đầu lan tơ, khoảng 7 - 10 ngày thì nấm bắt đầu lan tơ kín bình tam giác.



Giống cấp 2 sau 10 ngày cấy giống (Kí hiệu G.L)

*** Tóm tắt quy trình sản xuất giống cấp 2**



❖ Quy trình tạo giống cấp 3

*** Nguyên liệu và dụng cụ**

– Que sắn, chai thủy tinh dung tích 600ml hoặc túi ni lông.

*** Tạo giống cấp 3**

– Sử dụng que sắn có kích thước như sau: dài 12 - 15cm, rộng 2cm, dày 4 - 5mm ; khô, không ẩm mốc.

– Ngâm nước vôi : hoà nước vôi 5% (5kg vôi cho 100 lít nước), ngâm que sắn chìm trong nước vôi khoảng 12 - 16 giờ. Ngâm nước vôi có tác dụng nâng pH lên để không chế nấm mốc, tẩy mốc phía ngoài của que sắn, tạo độ ẩm đạt được 65%. Sau khi vớt ra, rửa 2 - 3 lần bằng nước sạch, que sắn chuyển sang màu vàng sáng là được.

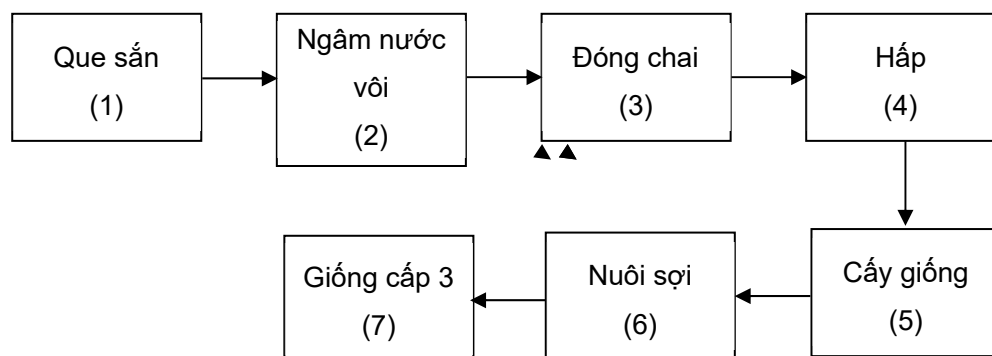
- Cho que sắn vào chai sạch hoặc túi ni lông chịu nhiệt.
- Hấp khử trùng chai thuỷ tinh hoặc túi ni lông đựng que sắn.
- Chuyển giống cấp 2 (khoảng 15 - 20 hạt lúa đã có tơ nấm lan đều) vào trong chai đựng que sắn đã qua hấp khử trùng.
- Nuôi sợi tơ nấm khoảng 2 tuần cho sợi tơ nấm lan kín que sắn trong chai.

Lưu ý : Quá trình sử dụng giống nấm linh chi trên thân que sắn không nên sử dụng nấm thân que sắn còn non, vì sợi tơ còn yếu sẽ khó sống khi chuyển sang môi trường mùn cưa nghèo chất dinh dưỡng hơn. Cũng không nên để quá già vì khi quá già các sợi nấm bám chặt vào nhau, trong quá trình ta chuyển sang mùn cưa các sợi nấm khó bám vào que nấm mà sẽ tuột lại trong chai gây hiệu quả thấp.



Giống cấp 3 (Kí hiệu G.L)

*** Tóm tắt quy trình sản xuất giống cấp 3**



❖ **Nguyên liệu và phương pháp nuôi trồng nấm linh chi**

*** Nguyên liệu dùng cho 100kg cơ chất**

- Mùn cưa gỗ cây cao su
- Cám bắp 5%.
- Bỏ sung 20% cơ chất bã mía trong cơ chất
- MgSO₄ 0,1kg, 1kg lân cho 100kg cơ chất.
- Vôi (bột nhẹ), điều chỉnh pH 5 - 5,5.
- Nước sạch (nước sinh hoạt, ăn, uống hằng ngày).

*** Các bước nuôi trồng nấm linh chi trên mùn cưa**

- + *Bước 1* : Trộn mùn cưa gỗ cao su và bã mía và các thành phần còn lại theo tỉ lệ đã nêu ở công thức trên (100kg cơ chất) và đảm bảo các yêu cầu đã nêu.
- + *Bước 2* : Ủ đồng khoảng 2 - 3 ngày.
- + *Bước 3* : Trộn và đảo đều, điều chỉnh độ ẩm khoảng 65%.
- + *Bước 4* : Đóng bịch có trọng lượng 1,2 - 1,4kg.
- + *Bước 5* : Hấp khử trùng ở nhiệt độ khoảng 100 - 105°C trong 10 giờ.
- + *Bước 6* : Để nguội và cấy giống, phòng cấy giống phải được vô trùng để đảm bảo bịch giống không bị nhiễm khuẩn, nấm.
- + *Bước 7* : Ươm sợi cho sợi ra kín bịch (trong điều kiện không sáng).
- + *Bước 8* : Để nấm ra ở cổ bịch, chăm sóc.
- + *Bước 9* : Thu hái, bảo quản.

❖ **Phương pháp chăm sóc, thu hái**

*** Chuẩn bị điều kiện trong nuôi trồng**

Nhà trồng nấm phải đảm bảo sạch sẽ, thông thoáng, có mái che chống mưa và chủ động được các điều kiện sinh thái (tốt nhất mái che có thể di chuyển để điều tiết ánh sáng).

Các điều kiện sinh thái nhà trại :

- Nhiệt độ : 22 – 30 °C
- Độ ẩm không khí :85 – 90 %
- Ánh sáng : 300-400 lux, chiếu đều từ mọi phía.

– Kín gió.

Sau khi tiến hành nuôi trồng loài *Ganoderma lucidum* theo quy trình như trên, chúng tôi nhận thấy rằng:

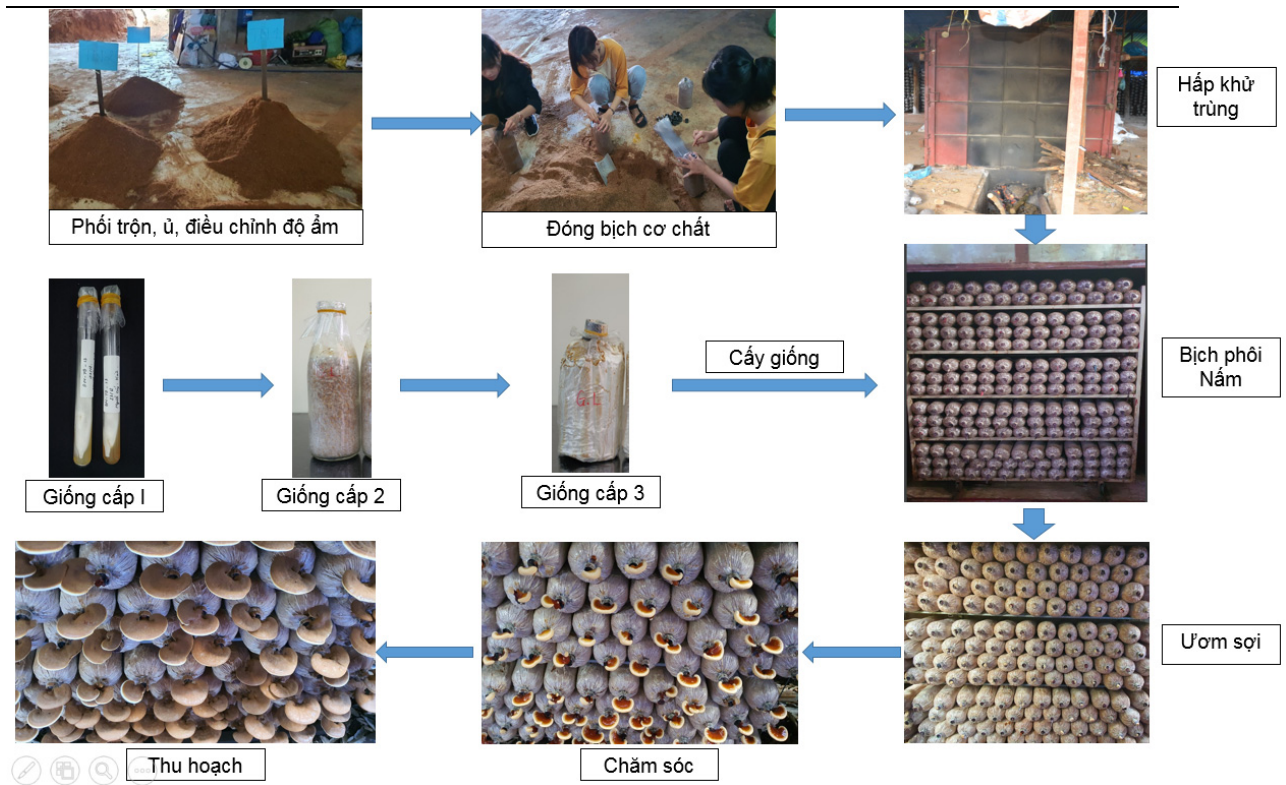
Thời gian hệ sợi lan kín bịch phôi nấm là 26 ngày. Tỷ lệ bịch phôi nấm bị nhiễm là 5%. Kích thước quả thể sau 40 ngày (kể từ ngày hình thành quả thể) là 6.7 x 6.0 cm



Hình 3.73. Quả thể Nấm nuôi trồng ở ngày thứ 50



Hình 3.74. Quả thể Nấm nuôi trồng ở ngày thứ 65

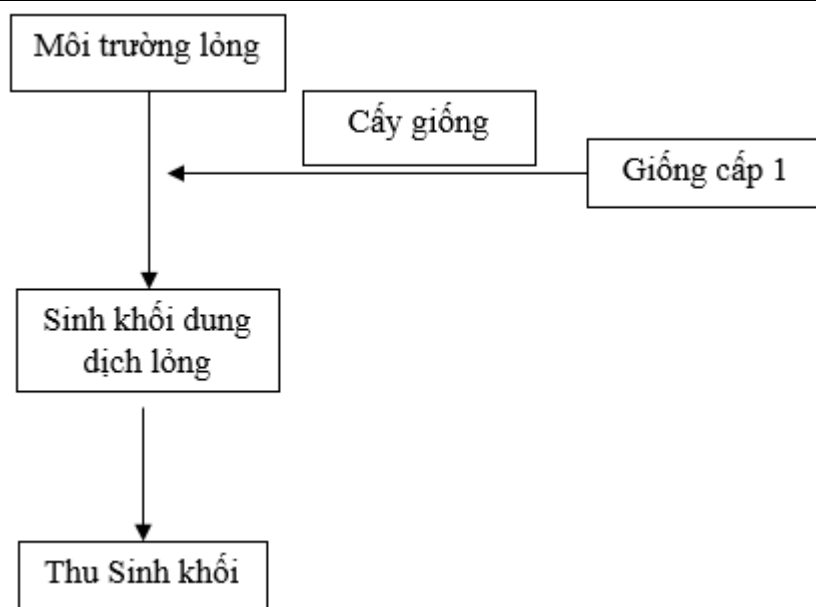


Hình 3.75. Quy trình nuôi trồng nấm *Ganoderma lucidum*

3.5.3.2. . Quy trình nuôi trồng loài *Ganoderma applanatum*

Qua quá trình khảo sát ảnh hưởng của nồng độ pH, các loại đường và nồng độ các loại đường, chúng tôi thấy rằng: nồng độ pH thích hợp cho sự phát triển của hệ sợi Nấm *Ganoderma applanatum* là pH = 6; Loại đường thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi là đường Glucose với nồng độ 25 g/l. Từ đó chúng tôi xây dựng 3 quy trình nuôi trồng với tỉ lệ bã mía tương ứng là 10%, 20 % và 30 % theo 3 sơ đồ của quy trình nuôi trồng *Ganoderma lucidum*.

Qua quá trình xây dựng quy trình nuôi trồng nấm *Ganoderma applanatum*, chúng tôi tiến hành các bước theo quy trình (1,2,3) trên, tuy nhiên giống sau khi được cấy vào bịch phơi nấm để tiến hành ươm sợi thì thấy rằng sợi nấm phát triển yếu và sau thời gian theo dõi thì không có hiện tượng hình thành quả thể. Do đó, chúng tôi tiến hành phương án thu sinh khối của hệ sợi Nấm trong môi trường dung dịch lỏng theo quy trình (4)



Chuẩn bị môi trường lỏng:

Sử dụng bình thủy tinh chịu nhiệt có thể tích 1lít có nắp nhựa hoặc không có nắp nhựa. Đối với bình thủy tinh không có nắp nhựa, dùng bông sạch để làm nút.

Bước 1: Hấp tiệt trùng bình thủy tinh, nút bông, nắp nhựa ở 121⁰C trong 20 phút. Chuẩn bị môi trường lỏng:

Thành phần bao gồm:

Khoai tây (Potato)	200 gam
Glucose	25 gam
Nước cất	1000 ml

Cách chuẩn bị:

1: Cân 25 gam Glucose cùng với 100 ml nước cất cho vào cốc đong thủy tinh loại 1000 ml

2: Khoai tây rửa sạch, gọt vỏ, cân 200 gam.

3: Cắt thành miếng có kích thước 12x12 mm.

4: Cho vào nồi đun sôi cùng với 1000 ml nước.

5: Đun sôi cho đến khi khoai tây mềm ra (khoảng 15 – 20 phút).

6: Dùng 1 chiếc rây bột và 1 tấm gạc để lọc lấy phần nước dịch khoai tây.

7: Cho nước khoai tây vào cốc đong có chứa Glucose đủ thể tích 1000 ml, khuấy đều.

8: Cho hỗn hợp cuối cùng vào bình tam giác thủy tinh loại 1000 ml.

9. Chuẩn độ pH = 6

Bước 2: Rót môi trường lỏng vào các bình thủy tinh đã chuẩn bị sẵn.

Bước 3: Đậy nút bông hoặc nắp nhựa (nắp nhựa không được vặn quá chặt), cho vào nồi hấp tiệt trùng ở 121⁰C trong 20 phút. (Chú ý tránh làm đổ môi trường ra ngoài).

Bước 4: Sau khi kết thúc chế độ là việc của nồi hấp tiệt trùng (ở nhiệt độ 70⁰C), lấy các bình thủy tinh ra ngoài để sẵn sàng vào tủ cấy.

Bước 5: Tiến hành cấy giống cấp 1 vào môi trường lỏng trong tủ cấy sinh học vô trùng.

1. Chuẩn bị giống cấp 1: yêu cầu giống sạch và sợi nấm đang trong giai đoạn sinh trưởng phát triển.

2. Chuẩn bị và khử trùng các dụng cụ cấy: Lưỡi lam, kẹp gấp, khay cấy, cây cấy...

3. Người cấy vệ sinh, khử trùng 2 tay, đốt đèn cồn trong tủ cấy.

4. Tiến hành cấy giống: Dùng que cấy lấy 1 lượng rất nhỏ nấm từ ống gốc giống cấp 1 (một phần sợi nấm hoặc một miếng nhỏ thạch có sợi nấm) cấy chuyển sang bình thủy tinh đựng môi trường lỏng.

Dùng nhãn dính ghi các thông tin bao gồm: tên nấm, ngày cấy, số thứ tự, tên người cấy.

Chú ý: Các thao tác tiến hành trên ngọn lửa đèn cồn trong tủ hốt vô trùng.

Bước 6: Để các bình giống lỏng đã cấy nấm trong các tủ nuôi ở nhiệt độ từ 22 đến 24⁰C, theo dõi 2 – 3 ngày để phát hiện và loại bỏ các bình bị nhiễm vi khuẩn và nấm khác.



Hình 3.76. Môi trường lỏng mới được cấy giống

Thu sinh khối: Sinh khối sợi Nấm sau khi được nuôi trong môi trường dinh dưỡng lỏng ở điều kiện không có ánh sáng, nhiệt độ 22°C, thời gian 30 ngày, bắt đầu tiến hành thu sinh khối.



Ganoderma applanatum (Kí hiệu G.A)

3.5.3.3. Quy trình nuôi trồng loài *Ganoderma fornicatum*

Qua quá trình khảo sát ảnh hưởng của nồng độ pH, các loại đường và nồng độ các loại đường, chúng tôi thấy rằng: nồng độ pH thích hợp cho sự phát triển của hệ sợi Nấm *Ganoderma fornicatum* là pH=6; Loại đường thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi là đường Glucose với nồng độ 25g/l. Đầu tiên chúng tôi cũng tiến hành xây dựng 3 quy trình nuôi trồng tương tự như *Ganoderma lucidum*. Tuy nhiên qua quá trình nuôi trồng nấm *Ganoderma fornicatum*, giống sau khi được cấy

vào bịch phôi nấm để tiến hành ươm sợi thì thấy rằng sợi nấm phát triển yếu và sau thời gian theo dõi thì không có hiện tượng hình thành quả thể. Do đó, chúng tôi tiến hành phương án thu sinh khối của hệ sợi Nấm trong môi trường dung dịch lỏng theo quy trình giống nấm *Ganoderma applanatum*.



Hình 3.77. Môi trường lỏng mới được cấy giống *Ganoderma fornicatum*

Thu sinh khối: Sinh khối sợi Nấm sau khi được nuôi trong môi trường dinh dưỡng lỏng ở điều kiện không có ánh sáng, nhiệt độ 22°C, thời gian 30 ngày, bắt đầu tiến hành thu sinh khối.

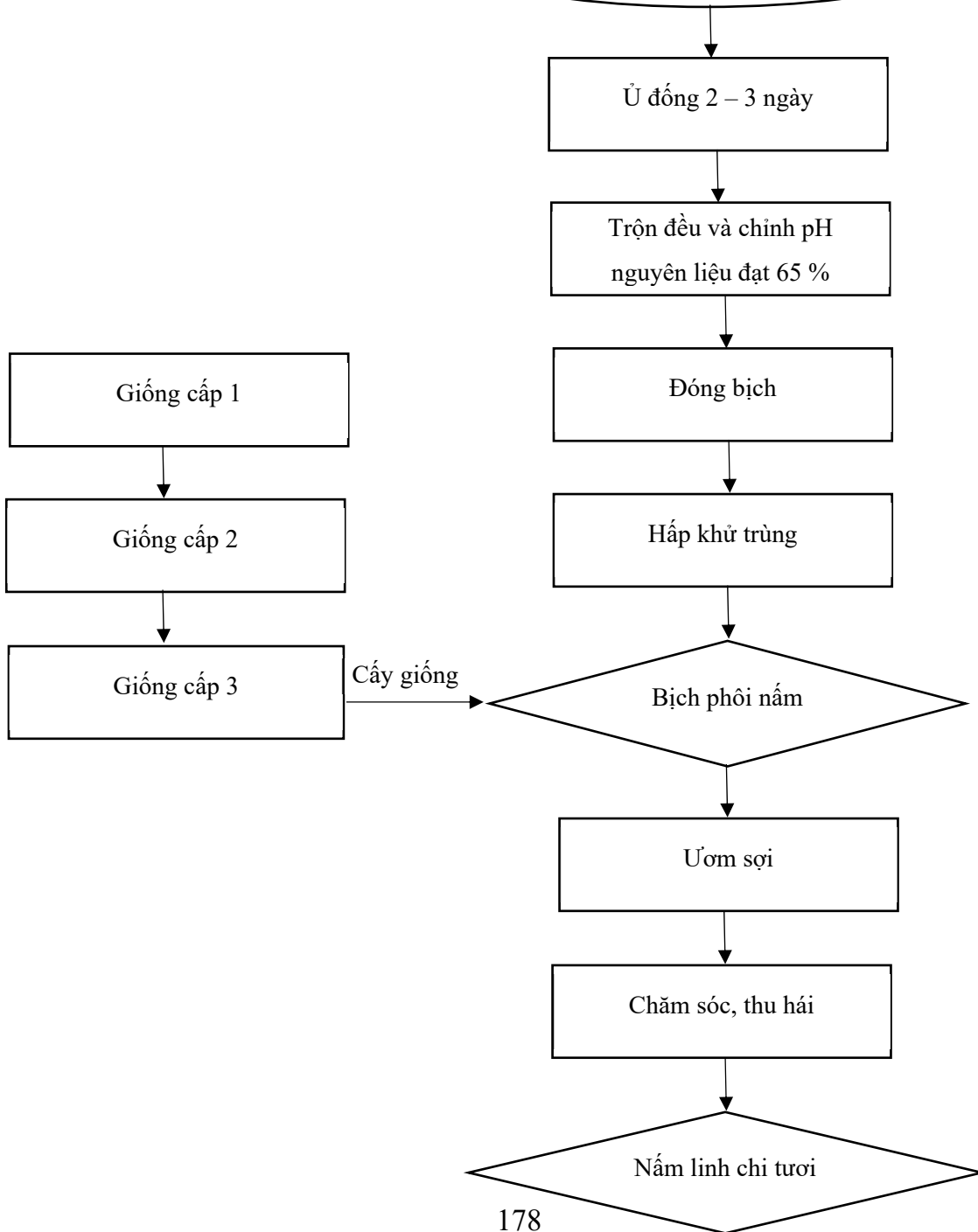


Ganoderma fornicatum (Kí hiệu G.F)

3.5.3.4. Quy trình nuôi trồng loài *Amauroderma subresinosum*

Qua quá trình khảo sát ảnh hưởng của nồng độ pH, các loại đường và nồng độ các loại đường, chúng tôi thấy rằng: nồng độ pH thích hợp cho sự phát triển của hệ sợi Nấm *Amauroderma subresinosum* là pH = 7; Loại đường thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi là đường Glucose với nồng độ 20 g/l. Từ đó chúng tôi xây dựng quy trình nuôi trồng theo sơ đồ dưới đây.

NL dùng cho 100 kg cơ chất:
 Công thức 2: Mùn cưa gỗ cây cao su + bã
 mía (20%) + cám bắp (5%) + MgSO₄ 0,1 kg
 + 1 kg lân



Các bước tiến hành phân lập và tạo giống tương tự như trên

❖ **Nguyên liệu và phương pháp nuôi trồng nấm linh chi**

*** Nguyên liệu dùng cho 100kg cơ chất**

- Mùn cưa gỗ cây cao su
- Cám bắp 5 %.
- Bổ sung 20 % cơ chất bã mía trong cơ chất
- MgSO₄ 0,1 kg, 1kg lân cho 100 kg cơ chất.
- Vôi (bột nhẹ), điều chỉnh pH 7
- Nước sạch (nước sinh hoạt, ăn, uống hằng ngày).

*** Các bước nuôi trồng nấm linh chi trên mùn cưa**

- + *Bước 1* : Trộn mùn cưa gỗ cao su và bã mía và các thành phần còn lại theo tỉ lệ đã nêu ở công thức trên (100 kg cơ chất) và đảm bảo các yêu cầu đã nêu.
- + *Bước 2* : Ủ đống khoảng 2-3 ngày.
- + *Bước 3* : Trộn và đảo đều, điều chỉnh độ ẩm khoảng 65 %.
- + *Bước 4*: Đóng bịch có trọng lượng 1,2-1,4 kg.
- + *Bước 5* : Hấp khử trùng ở nhiệt độ khoảng 100 – 105 °C trong 10 giờ.
- + *Bước 6* : Để nguội và cấy giống, phòng cấy giống phải được vô trùng để đảm bảo bịch giống không bị nhiễm khuẩn, nấm.
- + *Bước 7* : Ươm sợi cho sợi ra kín bịch (trong điều kiện không sáng).
- + *Bước 8* : Để nấm ra ở cổ bịch, chăm sóc.
- + *Bước 9* : Thu hái, bảo quản.

❖ **Phương pháp chăm sóc, thu hái**

❖ **Phương pháp chăm sóc**

Sau khi ủ bịch hệ sợi kéo trắng bịch 2/3 ta chuyển bịch phơi từ nhà ủ sang nhà nuôi trồng đảm bảo các điều kiện

- Nhiệt độ : 22-30 °C
- Độ ẩm không khí : 85-90 %
- Ánh sáng : 400-600 lux, chiếu đều từ mọi phía.
- Kín gió.

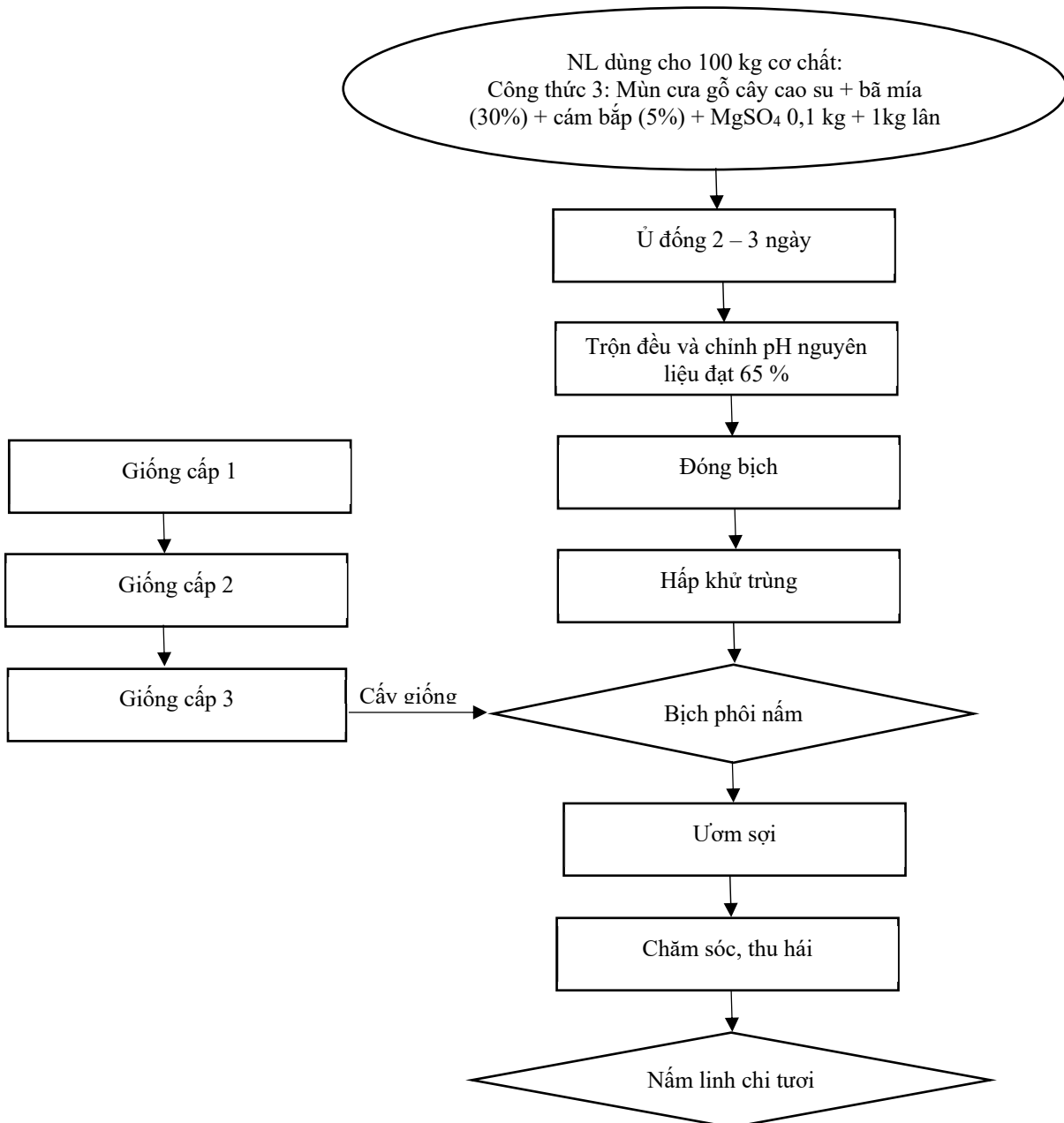
Chăm sóc duy trì các điều kiện trên cho đến khi nấm già (40 ngày).

Thu hái

Khi nấm già tiến hành thu hái và bảo quản.

3.5.3.5. Quy trình nuôi trồng loài *Ganoderma tropicum*

Qua quá trình khảo sát ảnh hưởng của nồng độ pH, các loại đường và nồng độ các loại đường, chúng tôi thấy rằng: nồng độ pH thích hợp cho sự phát triển của hệ sợi Nấm *Ganoderma tropicum* là pH = 5,5-6,0; Loại đường thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi là đường Glucose với nồng độ 30 g/l. Từ đó chúng tôi xây dựng quy trình nuôi trồng theo sơ đồ dưới đây.



Các bước chuẩn bị giống cấp và phương pháp nuôi trồng tương tự như các quy trình trên.

❖ **Phương pháp chăm sóc**

Sau khi ủ bịch hệ sợi kéo trắng bịch 2/3 ta chuyển bịch phôi từ nhà ủ sang nhà nuôi trồng đảm bảo các điều kiện

- Nhiệt độ : 22-30°C
- Độ ẩm không khí : 70-80%
- Ánh sáng : 400-600lux, chiếu đều từ mọi phía.
- Kín gió.

Chăm sóc duy trì các điều kiện trên cho đến khi nấm già (50 ngày).

Thu hái

Khi nấm già tiến hành thu hái và bảo quản.

Nhận xét: Qua quá trình thu thập và phân loại, chúng tôi tiến hành phân lập giống của 04 loài nấm thuộc chi *Ganoderma*: *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma fornicatum*, *Ganoderma tropicum* và 1 loài thuộc chi *Amauroderma subresinosum* để đưa vào nuôi trồng thử nghiệm. Ở giai đoạn đầu khi nghiên cứu môi trường phân lập giống cho thấy, hệ sợi cả 4 loài đều phát triển tốt trên môi trường đường glucose (25g/l), riêng hệ sợi nấm *Ganoderma tropicum* phát triển tốt nhất trên môi trường chứa glucose ở nồng độ 30 gam/lít. Tuy nhiên, khi khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường thì có sự khác nhau, trong đó loài *Ganoderma lucidum* và *Amauroderma subresinosum* thích hợp với môi trường pH = 7, còn 3 loài còn lại thích hợp phát triển ở pH = 6. Qua đó tiến hành xây dựng quy trình nuôi trồng nấm.

Trong quá trình tiến hành quy trình nuôi trồng nấm, kết quả cho thấy, loài *Ganoderma lucidum* có sự sinh trưởng và phát triển tốt để hình thành quả thể theo quy trình với công thức nuôi trồng gồm: Mùn cưa gỗ cây cao su + Bã mía (30 %) + Cám bắp (5 %) + MgSO₄ 0,1 kg + 1kg lân.

Đối với loài *Ganoderma tropicum* có sự sinh trưởng và phát triển tốt để hình thành quả thể theo quy trình với công thức nuôi trồng gồm : Mùn cưa gỗ cây cao su + Bã mía (30 %) + Cám bắp (5 %) + MgSO₄ 0,1 kg + 1kg lân

Đối với loài *Amauroderma subresinosum* có sự sinh trưởng và phát triển tốt để hình thành quả thể theo quy trình với công thức nuôi trồng gồm: Mùn cưa gỗ cây cao su + Bã mía (20%) + Cám bắp (5%) + MgSO₄ 0,1kg + 1kg lân

Đối với 2 loài *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma fornicatum*, sau khi bố trí nuôi trồng trên 3 công thức thì khi đến giai đoạn ươm sợi, hệ sợi nấm sinh trưởng phát triển yếu, sau thời gian dài vẫn không thể hình thành được quả thể. Từ đó chúng tôi tiến chuyển sang nuôi trồng theo quy trình thu sinh khối trên môi trường lỏng.

3.6. Nghiên cứu quy trình sản xuất nấm Linh chi Tây Nguyên đóng gói chất lượng cao

3.6.1. Nghiên cứu quy trình sản xuất nấm Linh chi

3.6.1.1. Nhận biết giai đoạn trưởng thành



Giai đoạn thu hoạch chia làm 2 giai đoạn cho một lần thu:

- Giai đoạn 1: Thu hoạch bào tử nấm Linh chi trước 20 ngày thu tại nấm
- Giai đoạn 2: Thu hoạch nấm Linh chi nguyên tại sau hơn 4 tháng

Thời điểm bào tử nấm Linh chi chuẩn bị phát tán cho đợt sinh sản, phần màu đỏ bên trong sẽ đổi sang màu nâu, lúc này nấm Linh chi đang trưởng thành. Tuy nhiên vẫn chưa phải là lúc để thu hoạch vì chúng còn phát triển thêm.

- Khi phần viền trắng ngoài của tai nấm cũng đổi sang màu nâu cùng phần giữa thì lúc này mới chuẩn bị bước vào giai đoạn cần thu hoạch, lúc này tạm gọi giai đoạn trung niên của Nấm Linh Chi.

-
- Có đôi lúc nó đã đổi màu luôn cả phần màu trắng hết như nấm trung niên, nhưng sau đó lại tiếp tục nhô thêm phần màu trắng cho thấy chúng còn muốn phát triển mạnh thêm nữa. Lúc này chưa phải thời điểm thu hoạch mà phải theo dõi thêm.
 - Trước khi tới giai đoạn trung niên để thu bào tử nấm Linh chi thì sẽ có một đợt vệ sinh tưới nước để làm sạch cũng như đảm bảo không có bụi.
 - Sau đó nấm linh chi sẽ bắt đầu quy trình thu hoạch bào tử trước vài ngày rồi mới thu hoạch tại nấm Linh Chi.
 - Tuy nhiên chỉ nên thu hoạch bào tử với một số lượng nhất định, thường 100kg tại nấm thu khoảng 1-2kg bào tử. Tỷ lệ này sẽ đảm bảo được chất lượng tốt nhất cho lượng bào tử còn trên tại nấm Linh Chi

3.6.1.2. Chuẩn bị thu hoạch bào tử

- Tùy theo điều kiện và số lượng bào tử cần thu hoạch mà có 3 cách thu khác nhau: Thứ nhất, sản lượng cao thường sẽ sử dụng “máy hút” đặt trên cao để khi Nấm Linh Chi phát tán bào tử sẽ thu hoạch hoàn toàn
- Thứ hai có thể sử dụng túi trùm trên tai nấm để trùm cả tai Nấm Linh Chi lại và thu tất cả Bào Tử bay ra vào một nơi và không bị bay ra ngoài. Tuy nhiên với quy trình này có thể làm cho tai nấm Linh Chi bị hầm và gây biến dị.
- Thứ ba, với quy trình đang được áp dụng tại nhà nuôi trồng của công ty CPPT Dược liệu Tây Nguyên thì đòi hỏi nhân công sẽ phải sử dụng trang phục và công cụ chuyên dụng. Quanh nhà trại nấm Linh Chi sẽ được phủ một lớp nilong cao cấp tiêu chuẩn sạch nhập trực tiếp từ Israel (đã được trải qua 1 quy trình khử trùng hoàn toàn). Lớp này sẽ bọc ở chung quanh nhà nấm như trần nhà, sàn, vách. Khi bào tử nấm Linh Chi phát tán vào không khí sẽ được gói gọn trong lớp nilông này hoàn toàn sạch và không thể bay ra ngoài được.

3.6.1.3. Thu hoạch tai nấm



- Công cụ sử dụng: kéo chuyên dụng và khay đựng kín. Kéo sẽ được khử trùng thật đảm bảo để cắt nấm thu hoạch. Nấm Linh chi là nấm thân gỗ nên loại kéo dùng phải thật bén để dễ thu hoạch. Còn khay kín là để không bị rơi bào tử xuống

Chú ý:

- Quá trình thu nấm, cũng phải đảm bảo vệ sinh, tránh nhiễm: nhân công nên sử dụng trang phục và công cụ chuyên dụng



- Sau khi thu hoạch, ở một vài nơi sẽ tiến hành quy trình rửa sạch tai nấm rồi mới phơi khô. Quá trình này sẽ làm cho tai nấm sạch sẽ nhưng mất đi lớp Bào Tử.
- Có 2 cách:
 - + Đảm bảo hệ thống kín, hệ thống tưới phun nước sạch. Thu hoạch Nấm Linh Chi nguyên tai còn nguyên Bào Tử, rồi tiến hành sấy, đóng gói.
 - + Tai nấm sau khi thu hoạch, dùng cọ chuyên dụng để thu bào tử, rồi tiến hành sấy, đóng gói.

Tuy nhiên để đảm bảo lượng bào tử vẫn còn trên tai nấm thì chúng tôi đã cho hệ thống tưới phun vệ sinh sạch trước khi thu hoạch bào tử. Sau đó bào tử sẽ vẫn phát tán để thu bào tử và lại phát tán liên tục cho tới khi thu tai nấm luôn.

Vậy nên, sau khi thu tai nấm có lại hàm lượng bào tử quý rất nhiều nên sẽ không vệ sinh thêm nữa. Giai đoạn này trong nhà nấm cần phải đảm bảo kín đáo nhưng vẫn đảm bảo nhiệt độ thích hợp. Do đó, nấm Linh chi nguyên tai mà còn nguyên bào tử thì dùng sẽ cực kỳ tốt cho sức khỏe, tăng dược tính.

3.6.1.4. Quá trình sấy khô tai nấm Linh chi

Sau khi thu hoạch tai nấm thì sẽ tới thẳng giai đoạn phơi khô, tai nấm Linh chi sẽ được đưa vào nhà sấy tự nhiên giống với quá trình phơi bào tử.

Nhiệt độ trong nhà sấy sẽ dao động 75-80°C tự nhiên, tai nấm sẽ phơi trong khoảng hơn 2-3 ngày tùy điều kiện lý tưởng. Việc này cũng là để tránh ẩm mốc và bảo quản nấm tự nhiên được lâu hơn.

Đặc điểm tuyệt vời là nhà sấy kín 98%, không gió, không vi khuẩn và luôn đảm bảo để vệ sinh trước khi đóng gói, cao gấp đôi hoặc 2,5 lần so với điều kiện phơi ngoài trời chỉ 30-35 độ C



Làm sạch Linh chi: loại bỏ đất, chất bẩn và chất hữu cơ bám vào dược liệu.

Quá trình làm sạch thông thường bao gồm: cọ rửa (ngâm, phun nước hoặc chà xát) Linh chi hoặc khử trùng nếu có nguy cơ nhiễm nấm và vi khuẩn

Bằng nước:

- Phải đảm bảo chất lượng nước theo đúng tiêu chuẩn quy định.
- Nước phải được thay thường xuyên để tránh tích tụ các chất hữu cơ và ngăn ngừa ô nhiễm vi sinh lây lan sang dược liệu.

Khử trùng bằng Ô zôn

-
- Mức độ đậm đặc của ô zôn có hiệu quả khử trùng đối với quả là 20 ppm
 - Cần phải điều khiển liều lượng ô zôn và thời gian tiếp xúc với Linh chi phụ thuộc vào khối lượng Linh chi cần xử lý.

Khử trùng bằng chiếu xạ

- Xử lý kháng khuẩn cho Linh chi (thô hay đã chế biến) bằng những phương pháp chiếu xạ, phải được khai báo và phải dán nhãn trên dược liệu theo yêu cầu, đặc biệt khi phát hiện Linh chi nhiễm aflatoxin

Kiểm tra và phân loại.

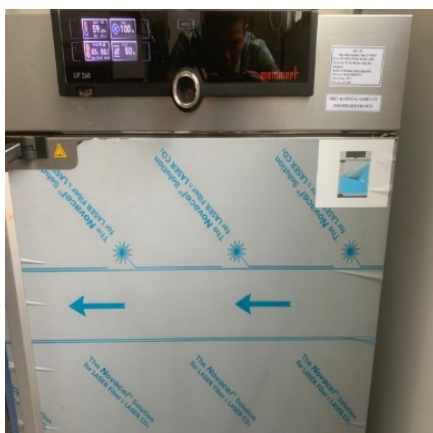
Linh chi cần được kiểm tra và phân loại trước khi sơ chế. Công tác kiểm tra có thể bao gồm:

- Kiểm tra bằng mắt để xem có bị nhiễm chéo hay không bởi các nấm khác hay những dược liệu khác và/hoặc những bộ phận giá thể không thuộc loại cần thu hái.
- Kiểm tra bằng mắt để loại tạp chất.
- Đánh giá theo cảm quan, như ngoại dạng, mức độ hư hỏng, kích cỡ, màu sắc, mùi, vị khả dĩ có.
- Trước khi sấy, cần phải bảo vệ Linh chi khỏi bị ảnh hưởng của mưa, hơi ẩm và bất cứ điều kiện nào có thể làm giảm phẩm chất của chúng, và nguy cơ nhiễm nấm mốc
- Linh chi sử dụng tươi thì cần được thu hái và chuyển càng nhanh càng tốt đến cơ sở chế biến để ngăn sự lên men do vi khuẩn và nấm. Những loại dược liệu này có thể được giữ đông lạnh, hoặc xông cồn trong bình kín hay những biện pháp bảo quản thích hợp khác, ngay sau khi thu hái và trong thời gian chuyển tiếp cho đến người sử dụng cuối cùng

Sơ chế

- Cần phải kiểm tra tất cả các Linh chi trong những công đoạn sơ chế khi sản xuất, và phải loại bỏ mọi sản phẩm kém phẩm chất, hay tạp chất bằng phương pháp cơ học hay thủ công
- Tất cả các Linh chi đã xử lý cần được bảo vệ khỏi bị nhiễm bẩn và phân huỷ, cũng như bọ, côn trùng, loài gặm nhấm và đặc biệt là nhiễm nấm và aflatoxin
- Sau khi thu hoạch tại nấm thì sẽ tới giai đoạn phơi khô:

- + Nấm Linh Chi sẽ được đưa vào nhà sấy tự nhiên
- + Tủ sấy gió



Nhà sấy tự nhiên:



- Nhiệt độ trong nhà sấy sẽ dao động 75-80 °C tự nhiên, tại nấm sẽ phơi trong khoảng hơn 1- 2 ngày tùy điều kiện.
- Điều kiện lý tưởng: nhà sấy kín 98 %, không gió, không vi khuẩn và luôn đảm bảo vệ sinh trước khi đóng gói, cao gấp đôi hoặc 2,5 lần so với điều kiện phơi ngoài trời chỉ 30-35 °C.

Tủ sấy gió:

- Nhiệt độ: 55 - 65 °C
- Tốc độ gió 100 %
- Thời gian: 4h
- Đảo cánh quạt: 50 %

Nấm Linh chi cần đạt độ ẩm theo yêu cầu quy định:

- + ĐDVN V: Không quá 17,0 %
- + USP: Không quá 17,0 %

+ HKCMMS: Không quá 14,0 %

+ CP (Chinese Pharmacopoeia): Không quá 17,0 %

Khuyến cáo:

Khi Linh chi được sấy để sử dụng dạng khô, thì cần giữ hàm ẩm của Linh chi càng thấp càng tốt, để giảm sự hư hỏng do nấm, mốc và ô nhiễm do các loại vi khuẩn khác. Nếu không thực hiện sấy gió và nhà sấy tự nhiên: tránh phơi Linh chi trực tiếp trên nền đất không che phủ. Nếu dùng một bề mặt bê tông hay xi măng để phơi thì phải đặt Linh chi trên một tấm vải nhựa hoặc một loại vải hay tấm trải khác thích hợp

3.6.2. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) Linh chi Tây Nguyên

3.6.2.1. Xây dựng hệ thống chỉ tiêu cho tiêu chuẩn cơ sở nấm Linh chi

Quan điểm thực phẩm:

Nấm Linh chi phải theo quy định trong tiêu chuẩn TCVN 10918:2015 về nấm khô
 Nấm Linh chi phải theo quy định trong tiêu chuẩn sơ chế và xử lý theo các quy định tương ứng của TCVN 5603:2008 (CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003) *Quy phạm thực hành về những nguyên tắc chung đối với vệ sinh thực phẩm* và các tiêu chuẩn quy phạm thực hành, quy phạm thực hành vệ sinh khác có liên quan

Quan điểm Dược liệu:

Linh chi đỏ (*Ganoderma lucidum*) phải đáp ứng 1 trong số tiêu chuẩn sau:

- Dược điển Việt Nam hiện hành (ĐĐVN V): chuyên luận Linh chi tr.1229
- Dược điển Mỹ (USP 41): chuyên luận *Ganoderma Lucidum Fruiting Body, Ganoderma Lucidum Fruiting Body Powder*
- HKCMMS chuyên luận Ganoderma
- Dược điển Trung quốc (CP 2015); chuyên luận Ganoderma (Lingzhi)

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Chỉ tiêu	ĐĐVN V	ĐĐTQ 2015	USP 41	HKCMMS
Mô tả	X	X	X	X
Soi bột	X	X	X	X
Định tính	X	X	X	X
Độ ẩm	X	X	X	X
Tro toàn phần	X	X	X	X
Tro không tan trong acid	X	O	O	X
Chất chiết được	X	X	X	X
Kim loại nặng	O	O	X	X
Dư lượng thuốc trừ sâu	O	O	X	X
Độc tố nấm mốc	O	O	O	X
Dư lượng lưu huỳnh Dioxid	O	O	O	X
Tạp chất	O	O	X	X
Định lượng	O	Polyscharid/ triterpenoid/ sterol	Polyscharid/triterpenoid	Polysacharid
Giới hạn nhiễm khuẩn	O	O	X	O

Ghi chú: X: có; O: không

ĐĐVN V : Dược điển Việt Nam V

ĐĐTQ 2015: Dược điển Trung Quốc 2015

USP 41: Dược điển Mỹ

HKCMMS: Dược điển Hong Kong Chinensis Materia Medical Standards

Quan điểm Dược liệu:

-
- Chỉ tiêu định danh (mô tả, bột): Hầu hết các Dược điển đều quy định
 - Chỉ tiêu tinh khiết (tro toàn phần, độ ẩm, tro acid): USP 41 và ĐDTQ 2015 không yêu cầu chỉ tiêu tro acid
 - Chỉ tiêu an toàn (Kim loại nặng, Dư lượng thuốc trừ sâu, Độc tố nấm mốc, Dư lượng lưu huỳnh Dioxit, Tạp chất, Vi sinh)
 - + ĐĐVN V và ĐDTQ 2015 hầu như không quy định cho các chỉ tiêu này
 - + USP 41 không kiểm soát Độc tố nấm mốc, Dư lượng lưu huỳnh Dioxit
 - + HKHCMMS: Kiểm soát toàn bộ các chỉ tiêu trên trừ chỉ tiêu Vi sinh
 - Chỉ tiêu chất lượng (Chất chiết được, định tính, định lượng)
 - + ĐĐVN V chỉ thực hiện định tính và chỉ tiêu chất chiết được, chưa dùng chất chuẩn để kiểm soát
 - + ĐDTQ 2015, USP41 đều kiểm soát chất lượng định tính, định lượng qua 2 nhóm hoạt chất chính polysacharid và triterpenoid
 - + HKCMMS kiểm soát định tính cả 2 nhóm nhưng định lượng chỉ kiểm soát polysaccharide

3.6.2.2. Tiêu chuẩn cơ sở của nấm Linh chi

a. Mô tả

Thể quả dạng hình thận, hình tròn hay hình quạt, hóa gỗ. cứng, đường kính 5 cm đến 18 cm, dày 1 cm đến 2 cm. Mặt trên màu nâu vàng đến nâu đỏ, bóng loáng như đánh vecni, có những vòng đồng tâm và nếp nhăn tỏa ra, mép mỏng, nhăn, hơi lượn sóng. Mặt dưới màu vàng nâu đến nâu nhạt với các lỗ nhỏ li ti. Phần trong xốp, màu trắng đến nâu nhạt. Cuống hình trụ, dính lệch, có khi phân nhánh, dài 6 cm đến 10 cm, đường kính 1 cm đến 3,5 cm, màu nâu đỏ đến nâu đen. Mùi thơm nhẹ, vị đắng.

b. Bột

Bột màu vàng nâu. Soi bột dưới kính hiển vi thấy: Sợi nấm rải rác hoặc tụ thành đám, không màu hoặc nâu nhạt, mảnh, hơi cong, phân nhánh, đường kính 2,5 µm đến 6 µm. Bào tử hình trứng, màu nâu, đứng riêng lẻ hay tụ thành từng đám, dài 8 µm đến 12 µm, rộng 5 µm đến 8 µm, đỉnh trơn nhẵn, lớp vỏ ngoài không màu, lớp vỏ trong có nhiều chỗ lồi ra.

c. *Định tính*

Phản ứng hóa học: Lấy 2 g bột dược liệu, thêm 20 ml ethanol 96 % (TT), đun sôi hồi lưu 1 giờ, lọc. Nhỏ vài giọt dịch lọc lên tờ giấy lọc, sấy nhẹ cho khô, phun hỗn hợp dung dịch sắt (III) clorid 0,9 % (TT) và dung dịch kalifericyanid 0,6 % (TT) theo tỷ lệ (1 : 1), sẽ có màu xanh lơ.

Phương pháp sắc ký lớp mỏng:

Cách 1: Theo ĐĐVN V

Bản mỏng: Silicagel G.

Dung môi khai triển: Ether dầu hòa - ether ethylic - acid formic (15:5:1).

Dung dịch thử: Lấy 2 g bột thô dược liệu, thêm 30 ml methanol (TT), đun hồi lưu trong 30 phút, lọc. Bốc hơi dịch lọc trên cách thủy đến cạn. Hòa cồn trong 2 ml methanol (TT).

Dung dịch đối chiếu: Lấy 2 g bột thô Linh chi (mẫu chuẩn) tiến hành chiết như mẫu thử.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 5 μ l mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được 10 cm đến 12 cm, lấy bản mỏng ra, để khô trong không khí, quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (có ít nhất 4 vết phát quang màu vàng ánh xanh, trong đó có vết thứ hai từ trên xuống có cường độ đậm hơn nhiều so với các vết khác).

Cách 2: Theo USP 40

Hệ dung môi: Toluene-ethyl format-acid formic (5:5:0,2)

Chuẩn bị mẫu thử: 1 g bột dược liệu thêm 50 ml methanol, siêu âm 15 phút, ly tâm, gạn dịch chiết để bay hơi đến khô. Hòa tan cồn với 2 ml methanol, ly tâm, gạn dịch trong.

Chuẩn bị mẫu đối chiếu: dung dịch acid ganoderic A trong methanol có nồng độ 1 mg/ml.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 5 μ l mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được 10 cm đến 12 cm, lấy bản mỏng ra, để khô trong không khí:

- Soi đèn UV bước sóng 254 nm
- Phun dung dịch acid sulfuric 10 % trong ethanol, sấy bản mỏng ở 100 0C đến hiện vết, đem soi đèn UV bước sóng 366 nm

d. Độ ẩm

Không quá 17,0 % (Phụ lục 9.6, ĐĐVN V, lượng mẫu thử 1 g; 100 °C; 5 h).

e. Tro toàn phần

Không quá 3,0 % (Phụ lục 9.8, ĐĐVN V).

f. Tro không tan trong acid

Không quá 0,5 % (Phụ lục 9.7, ĐĐVN V).

g. Chất chiết được trong dược liệu

Không ít hơn 3,0 % tính theo dược liệu khô kiệt. Tiến hành theo phương pháp chiết nóng (Phụ lục 12.10, ĐĐVN V). Dùng ethanol 95 % (TT) làm dung môi.

h. Định lượng polysaccharide:

Tiến hành theo Dược điển Hong Kong

Phương pháp phổ UV

Thuốc thử:

Dung dịch anthrone sulfuric acid: cân chính xác 0,1 g anthrone và hòa tan trong 100 mL acid sulfuric (98%, v/v).

Dung dịch chuẩn

Dung dịch gốc chuẩn glucose khan, Std-Stock (120 mg/L): cân chính xác 12,0 mg CRS glucose khan và hòa tan trong 100 mL nước.

Dung dịch chuẩn glucose khan để thử nghiệm, Std-AS: Hút chính xác thể tích của Std-Stock glucose khan, pha loãng với nước để tạo ra một dãy các dung dịch 12, 24, 36, 48, 60 (mg/L)

Dung dịch thử

Cân chính xác 2 g bột dược liệu và cho vào bình cầu đáy tròn dung tích 250 mL, sau đó thêm 100 mL nước. Để yên trong 1 h. Đun hồi lưu hỗn hợp trong 4 h. Làm nguội đến nhiệt độ phòng. Lọc và chuyển dịch lọc vào bình nón 500 mL. Rửa phần cặn và giấy lọc hai lần, mỗi lần bằng 10 mL nước nóng. Chuyển phần cặn và giấy lọc vào bình cầu đáy tròn dung tích 250 mL. Lặp lại quá trình chiết thêm một lần nữa trong 1 h. Gộp và chuyển phần dịch lọc sang đĩa bay hơi. Bay hơi dung môi đến khô trên bếp cách thủy, hòa tan cặn trong 5 mL nước. Chuyển dung dịch vào bình cầu đáy tròn dung tích 250 mL và thêm 75 mL ethanol. Để yên hỗn hợp ở 4°C trong 12 giờ. Chuyển hỗn hợp vào ống ly tâm 100 mL.

Ly tâm ở khoảng 4000 vòng/phút trong 10 phút. Loại bỏ phần dung dịch phía trên, hòa tan cặn trong nước nóng. Chuyển dung dịch vào bình định mức 50 mL và thêm nước đến vạch.

Hút chính xác 3 mL dung dịch trên cho vào bình định mức 50 mL và thêm nước đến vạch.

Sử dụng nước là mẫu blank

Hệ thống đo quang phổ tử ngoại / khả kiến: được đặt ở bước sóng 625 nm.

Phương pháp đo màu

Dùng pipet lấy 2 mL dung dịch chuẩn hoặc dung dịch thử cho vào ống nghiệm 10 mL, sau đó dùng pipet lấy 6 mL dung dịch acid anthron sulfuric. Để yên trong 15 phút. Làm nguội hỗn hợp trong nước đá trong 15 phút. Sử dụng dung dịch acid anthron sulfuric tương ứng làm mẫu trắng. Tiến hành phân tích UV / Visible ở bước sóng 625nm.

Yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống

Thực hiện ít nhất năm phép xác định lặp lại, mỗi lần sử dụng 2 mL glucose khan Std-AS (36 mg / L) bằng phương pháp đo màu. Yêu cầu của thông số về tính phù hợp của hệ thống như sau: RSD của độ hấp thụ của glucose khan không được lớn hơn 5,0%.

Đường tuyến tính

Xác định một dãy glucose khan Std-AS (mỗi loại 2 mL) trong hệ thống đo quang phổ tử ngoại / khả kiến và ghi lại độ hấp thụ bằng phương pháp đo màu. Vẽ đồ thị độ hấp

thụ của glucose khan với nồng độ tương ứng của glucose khan Std-AS. Xác định đường tuyến tính từ 5 điểm chuẩn.

Tính toán

Đo độ hấp thụ và tính nồng độ (tính bằng miligam trên lít) của glucose khan trong dung dịch thử nghiệm và tính hàm lượng phần trăm của polysacharid trong mẫu thử tính trên khô kiệt.

i. Định lượng triterpenoid toàn phần:

tiến hành theo USP 40

Chuẩn bị các dung dịch mẫu:

Dung dịch chuẩn: Dung dịch Acid ganoderic A 0,1 mg/ml trong ethanol.

Dung dịch cao Linh chi chuẩn: cân khoảng 40 mg cao Linh chi chuẩn, hòa trong 5 ml ethanol. Siêu âm trong vòng 30 phút. Ly tâm lấy dịch lọc, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Mẫu thử: Cân chính xác 2 g bột dược liệu vào bình tam giác 200 ml, thêm 75 ml ethanol, đun hồi lưu trong 45 phút. Để nguội, lọc, tráng bình 2 lần với 10 ml ethanol, lọc, kết hợp các dịch lọc lại. Làm khô cấn, hòa tan cấn trong 20 ml ethanol. Chuyển dung dịch vào bình định mức 25 ml, pha loãng đến thể tích với ethanol, trộn đều. Lọc qua đầu lọc 0,22 μm .

Điều kiện sắc ký:

Cột sắc kí: Gemini C18 (150 mm x 2 mm x 3 μm)

Nhiệt độ cột: 25 °C

Bước sóng phát hiện: 257 nm

Tốc độ dòng: 0,36 ml/phút

Thể tích tiêm: 5 μl

Pha động A: acid phosphoric 0,1%

Pha động B: CAN

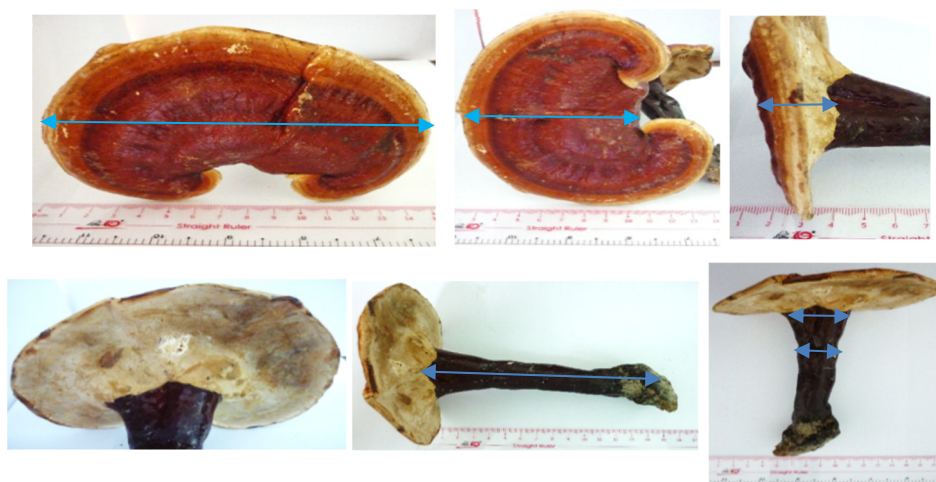
Bảng 3.12. Chương trình pha động HPLC định lượng triterpen

Thời gian (phút)	Pha động A (%)	Pha động B (%)
0	80,0	20,0
3	73,5	26,5
34	73,5	26,5
52	61,5	38,5
53	80,0	20,0
58	80,0	20,0
60	100,0	0
62	100,0	0
65	80,0	20,0
70	80,0	20,0

3.6.2.3. Kết quả Thẩm định TCCS

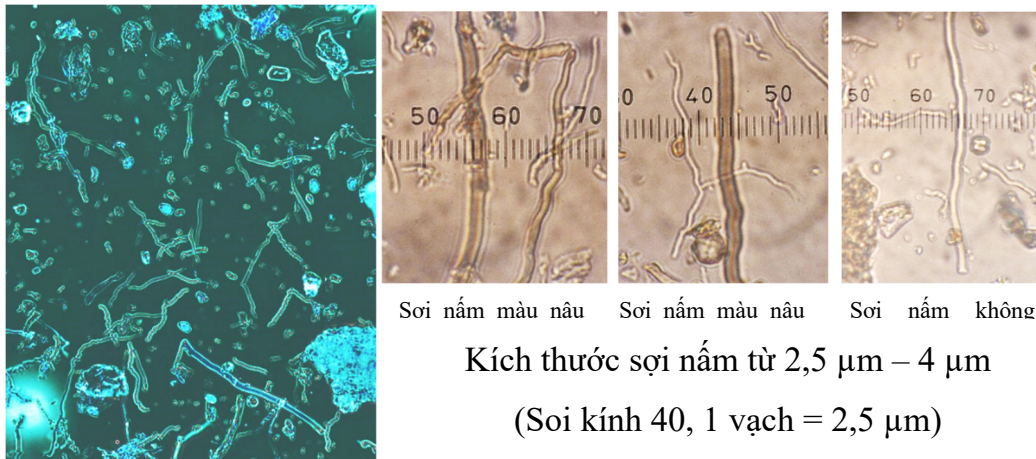
a. Mô tả

- Thể quả hình thận, hóa gỗ, cứng; dày 2 cm, đường kính ngang 15 cm, đường kính dài 11 cm (Hình 1,2,3)
- Mặt trên màu nâu vàng đến nâu đỏ, bóng loáng như đánh vecni. Có những vòng đồng tâm và nếp nhăn tỏa ra, mép mỏng hơi dợn sóng (Hình 1,2)
- Mặt dưới màu vàng nhạt với các lỗ nhỏ li ti (Hình 6)
- Phần trong xốp, màu trắng ngà
- Cuống hình trụ, màu nâu đen, đỉnh lệch, dài khoảng 15 cm, đường kính từ 2-5 cm (Hình 4,5)
- Mùi thơm nhẹ, vị đắng

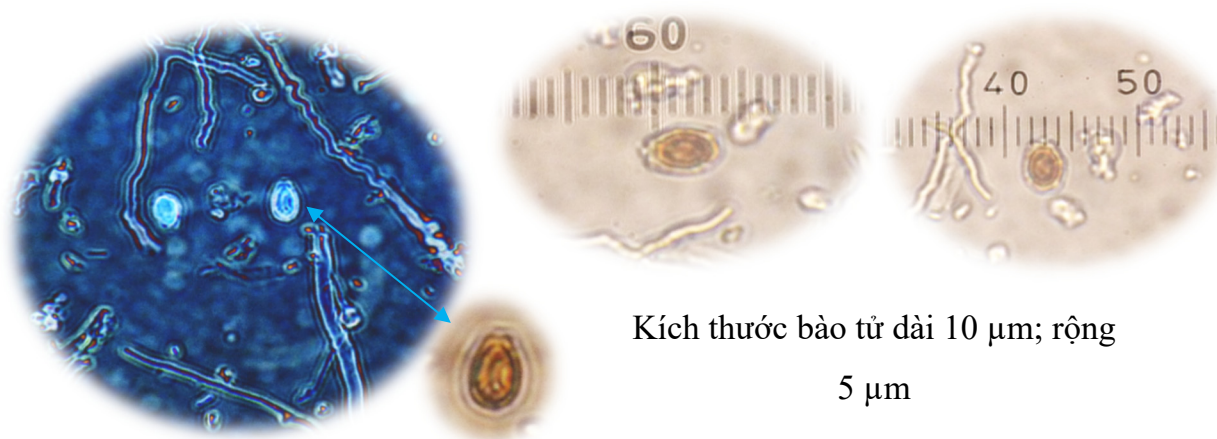


b. Bột

- Sợi nấm rải rác hoặc tụ thành từng đám không màu hoặc nâu nhạt, mảnh, hơi cong, phân nhánh



- Bào tử hình trứng, màu nâu, đứng riêng lẻ hay tụ thành từng đám, đỉnh tròn nhẵn, lớp vỏ ngoài không màu, lớp vỏ trong có nhiều chỗ lõm ra



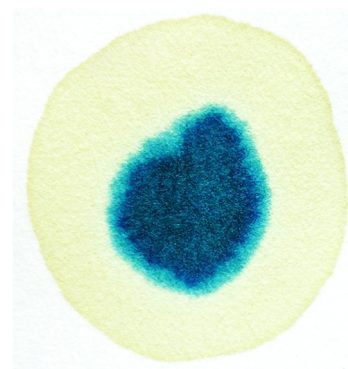
c. Định tính

Phản ứng hóa học (DĐVN V)

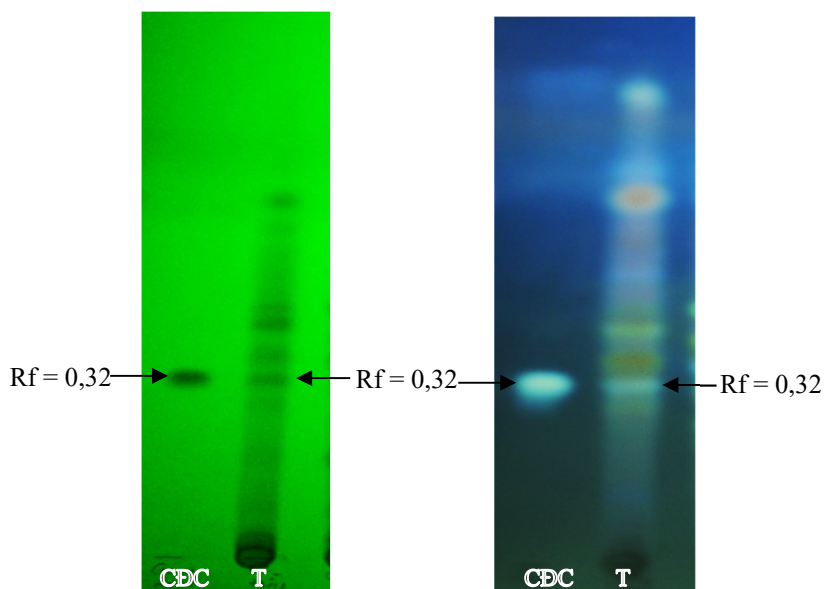
- Lấy 2 g bột dược liệu, thêm 20 ml ethanol 96 % (TT), đun sôi hồi lưu 1 giờ, lọc.

- Nhỏ vài giọt dịch lọc lên tờ giấy lọc, sấy khô

- Nhỏ tiếp lên vết mẫu thử hỗn hợp dung dịch sắt III clorid 0,9 % (TT) và dung dịch kali fericyanid 0,6 % (TT) theo tỉ lệ (1:1) → có màu xanh lơ



Sắc ký lớp mỏng (USP 40)



- d. Độ ẩm: 12,4 %
- e. Tro toàn phần: 1,4 %
- f. Tro không tan trong acid: 0,3 %
- g. Chất chiết được trong dược liệu: 4,8 %
- h. Định lượng polysaccharide theo glucose: 2,1%
- i. Định lượng acid ganoderic A: 1,14 %

3.6.3. Đóng gói và bảo quản sản phẩm nấm Linh chi Tây Nguyên

Quá trình đóng gói phụ thuộc vào nhu cầu phân phối thị trường

- Khối lượng
- Hình thức đóng gói
- Để nguyên hoặc xát lát

Tốt nhất nên thực hiện hút chân để đảm bảo tránh ẩm và tăng thời gian bảo quản



- Đóng gói cấp 2, ghi nhãn, số lô và hạn dùng.
- Kiểm tra chất lượng sản phẩm
- Đóng vào các túi nhựa dày



Đóng gói:

- Linh chi đã chế biến nên được đóng gói càng nhanh càng tốt để ngăn ngừa sản phẩm hư hỏng và bảo vệ chống sự tiếp xúc không cần thiết với công trùng ngấm ngấm tấn công và các nguồn ô nhiễm khác.
 - Nên thực hiện các biện pháp kiểm soát chất lượng liên tục trong quá trình để loại bỏ được liệu kém tiêu chuẩn, các chất gây ô nhiễm và vật lạ trước và trong các giai đoạn đóng gói sau cùng
 - Linh chi đã sấy cần được đóng gói trong các hộp, túi, bao hay các đồ đựng sạch. Linh chi để đóng gói phải đảm bảo không ô nhiễm, sạch, khô và trong tình trạng không hư hỏng và phải tuân theo các yêu cầu về chất lượng đối với nguyên liệu cây thuốc
 - Vật liệu bao bì dùng lại các túi đay vào bao lưới phải làm sạch kỹ (khử khuẩn) và sấy khô hoàn toàn trước khi dùng lại, như thế để tránh bị vật chứa

đựng trước có thể gây nhiễm chéo. Tất cả vật liệu đóng gói phải được bảo quản trong một chỗ sạch và không bị dịch bệnh và không tiếp xúc với thú vật, gia súc và các nguồn ô nhiễm khác.

- Nhãn gắn vào bao bì phải cho biết rõ ràng tên khoa học của Linh chi, phần sử dụng, nơi xuất xứ (địa điểm, hay thu hái), ngày trồng trọt hay thu hái và người chế biến và thông tin định lượng. Nhãn cũng phải gồm thông tin cho biết sự chấp thuận chất lượng và tuân theo các yêu cầu về của dán nhãn quốc gia và/hoặc vùng khác
- Nhãn phải có xác nhận số lô sản xuất. Có thể thêm các thông tin bổ sung về các thông số sản xuất và chất lượng của Linh chi trong một giấy chứng nhận riêng, giấy này phải gắn với bao bì mang cùng một số lô.
- Phải lưu hồ sơ về bao bì lô hàng, và phải đảm bảo gồm tên sản phẩm, nơi sản xuất, số lô, trọng lượng, số và ngày phân phối. Hồ sơ phải được lưu trong thời hạn ba năm hay theo nhà chức trách quốc gia và/hoặc vùng yêu cầu.
- Phương tiện vận chuyển để vận chuyển Linh chi chờ đóng gói từ nơi sản xuất đến bảo quản để chế biến phải làm sạch giữa hai lần bốc dỡ/vận chuyển, và khi tích hợp được thông gió tốt để làm mát hơi ẩm ở nguyên liệu cây thuốc và để ngăn ngừa sự ngưng tụ nước.

Bảo quản Linh chi trước sấy:

- Bảo quản dược liệu sau khi thu hoạch ở trong khu vực không có mối nguy ô nhiễm cho dược liệu tươi và các dụng cụ chứa đựng.
- Linh chi tươi sau khi thu hoạch phải được bảo quản/chứa đựng ở nơi chuyên biệt và cách xa nơi có mối nguy ô nhiễm.
- Nơi bảo quản phải cách xa nơi để dụng cụ, dầu, hóa chất, sản phẩm và các vật tư chứa đựng sản phẩm (túi nhựa, hộp...).

Bảo quản Linh chi sau sấy:

- Linh chi sau sấy phải để ở khu vực riêng, sạch sẽ
- Phải tránh tiếp xúc giữa dược liệu tươi vừa thu hoạch và dược liệu tươi đang bảo quản.

- Phải bảo quản sản phẩm xa nơi để dụng cụ, chất lỏng, hóa chất và các vật dụng đóng gói (túi đựng, hộp chứa...).
- Không để trực tiếp sản phẩm xuống sàn nhà.
- Để dược liệu tươi đảm bảo cách xa tường nhà sơ chế từ 8 đến 30 cm.

Bảo quản sau đóng gói

- Nhiệt độ dưới 30 °C, độ ẩm dưới 70 %
- Thông thoáng, kiểm soát sâu bọ, chuột,...

Thời hạn sử dụng đối với Linh chi đã sấy, ép chân không là 12 - 24 tháng.

3.7. Nghiên cứu quy trình bào chế rượu Linh chi Tây Nguyên đạt chất lượng làm thực phẩm chức năng.

Sử dụng rượu nếp cái hoa vàng để sản xuất các loại rượu linh chi

3.7.1. Xây dựng quy trình ngâm chiết và sản xuất rượu Linh chi

a. *Quy trình sản xuất rượu TỨ LINH:*

Nấm Lim xanh : Nấm được lựa chọn phải được kiểm tra hoạt chất triterpenoid và không bị nhiễm nấm mốc, thân nấm màu đỏ nâu, mũ nấm đều màu và không bị nhiễm mối mọt, nấm được rửa sạch dưới vòi nước, tách riêng phần thân và mũ nấm. Mũ nấm được xắt thành các lát mỏng có bề dày từ 1,0 cm – 1,5 cm. Phơi ráo từ 12- 24 h

Nấm Linh chi hàn quốc: Nấm phải màu vàng đều, mặt trên không bị xỉn màu, không bị nấm mốc và mối mọt. Tai nấm được rửa sạch, thái thành lát mỏng có bề dày từ 1,0 cm – 1,5 cm. Phơi ráo từ 12- 24 h

Nấm Hồng chi: Nấm được lựa chọn phải có đường kính từ 10 cm trở lên, không bị nấm mốc, mối mọt. Nấm được rửa sạch và chà bằng bàn chải để loại bỏ các chất bẩn trên bề mặt, thái thành lát mỏng có bề dày từ 1,0 cm – 1,5 cm. Phơi ráo từ 12- 24 h.

Nấm Thượng hoàng: Nấm màu vàng tươi, mùi thơm, còn nguyên tai. Tai nấm được rửa sạch, thái thành lát mỏng có bề dày từ 1,0 cm – 1,5 cm. Phơi ráo từ 12- 24 h

Nấm sau khi để ráo nước, khô nhẹ, thì tiến hành xếp vào bồn ngâm với tỉ lệ ngâm như sau (1:1:2:1)

Rượu khử độc tố: Đối với rượu Bảo Linh, ta sử dụng Rượu 30,5 % Vol. Tỉ lệ rượu và tổng lượng nấm (20:1). Rượu được rót vào bồn 2 lần

Lần 1: khoảng 50 % lượng rượu để rượu ngấm đều vào dược liệu

Lần 2: sau lần 1 khoảng 2 ngày, cho tiếp lượng rượu còn lại vào bồn

Đậy kín.

Bồn ngâm chiết: dạng bồn nằm ngang, hoặc bồn đứng, có vòi rút dịch và màng lọc cặn.

Định kỳ kiểm tra: Định kỳ kiểm tra màu sắc, hương, vị của rượu. nếu có sự bất thường phải xử lý ngay. Định kỳ hàng tuần kiểm tra 1 lần. Nên có sự khuấy đảo nhẹ trong giai đoạn đầu ngâm, càng về sau thì càng ổn định để giữ được hương, vị của sản phẩm. Thời gian ngâm tối thiểu 06 tháng

Chiết rót và đóng chai: Trước khi đóng chai toàn bộ, tiến hành đóng sơ bộ lượng sản phẩm vừa đủ, tiến hành kiểm tra chất lượng theo TCVN 7043:2013 tiêu chuẩn quốc gia về rượu trắng. Sau khi kết quả kiểm nghiệm đạt yêu cầu, ta đem đóng chai, can, dán nhãn mác đã được đăng ký sở hữu trí tuệ đầy đủ thì đóng thùng quy cách.



Tiến hành ngâm chiết với quy mô 4 bồn mỗi bồn 250 lít.

Nguyên liệu: 5 kg nấm Lim xanh, 5 kg nấm Linh chi Hàn quốc, 10 kg nấm Hồng Chi, 5 kg nấm thượng hoàng. Rượu nếp cái hoa vàng 1200 lít.

Thu được 1040 lít rượu Tú Linh. Đóng chai : 500 chai

b. Quy trình sản xuất rượu BẢO LINH

Nấm Lim xanh : Nấm được lựa chọn phải được kiểm tra hoạt chất triterpenoid và không bị nhiễm nấm mốc, thân nấm màu đỏ nâu, mũ nấm đều màu và không bị nhiễm mối mọt, nấm được rửa sạch dưới vòi nước, tách riêng phần thân và mũ nấm. Mũ nấm được xắt thành các lát mỏng có bề dày từ 1,0 cm – 1,5 cm. Phơi ráo từ 12- 24 h

Nấm Linh chi hàn quốc: Nấm phải màu vàng đều, mặt trên không bị xỉn màu, không bị nấm mốc và mối mọt. Tai nấm được rửa sạch, thái thành lát mỏng có bề dày từ 1,0 cm – 1,5 cm. Phơi ráo từ 12- 24 h

Nấm Hồng chi: Nấm được lựa chọn phải có đường kính từ 10 cm trở lên, không bị nấm mốc, mối mọt. Nấm được rửa sạch và chà bằng bàn chải để loại bỏ các chất bẩn trên bề mặt, thái thành lát mỏng có bề dày từ 1,0 cm – 1,5 cm. Phơi ráo từ 12- 24 h. Nấm sau khi để ráo nước, khô nhẹ, thì tiến hành xếp vào bồn ngâm với tỉ lệ ngâm như sau (1:1:3)

Rượu khử độc tố: Đối với rượu Bảo Linh, ta sử dụng Rượu 40,5 % Vol. Tỉ lệ rượu và tổng lượng nấm (20:1). Rượu được rót vào bồn 2 lần

Lần 1: khoảng 50 % lượng rượu để rượu ngấm đều vào dược liệu

Lần 2: sau lần 1 khoảng 2 ngày, cho tiếp lượng rượu còn lại vào bồn

Đậy kín.

Bồn ngâm chiết: dạng bồn nằm ngang, hoặc bồn đứng, có vòi rút dịch và màng lọc cặn.

Định kỳ kiểm tra: Định kỳ kiểm tra màu sắc, hương, vị của rượu. nếu có sự bất thường phải xử lý ngay. Định kỳ hàng tuần kiểm tra 1 lần. Nên có sự khuấy đảo nhẹ trong giai đoạn đầu ngâm, càng về sau thì càng ổn định để giữ được hương, vị của sản phẩm. Thời

Chiết rót và đóng chai: Trước khi đóng chai toàn bộ, tiến hành đóng sơ bộ lượng sản phẩm vừa đủ, tiến hành kiểm tra chất lượng theo TCVN rượu gạo. Sau khi kết quả kiểm nghiệm đạt yêu cầu, ta đem đóng chai, can, dán nhãn mác đã được đăng ký sở hữu trí tuệ đầy đủ thì đóng thùng quy cách



Tiến hành ngâm chiết với quy mô 4 bồn mỗi bồn 250 lít.

Nguyên liệu: 5 kg nấm Lim xanh, 5 kg nấm Linh chi Hàn quốc, 15 kg nấm Hồng Chi.

Rượu nếp cái hoa vàng 1200 lít.

Thu được 1080 lít rượu Bảo Linh. Đóng chai: 500 chai

c. *Quy trình sản xuất rượu LINH CHI*

Nấm Lim xanh : Nấm được lựa chọn phải được kiểm tra hoạt chất triterpenoid và không bị nhiễm nấm mốc, thân nấm màu đỏ nâu, mũ nấm đều màu và không bị nhiễm mối mọt, nấm được rửa sạch dưới vòi nước. Phơi ráo từ 12- 24 h

Nấm Hồng chi: Nấm được lựa chọn phải có đường kính từ 10 cm trở lên, không bị nấm mốc, mối mọt. Nấm được rửa sạch và chà bằng bàn chải để loại bỏ các chất bẩn trên bề mặt, thái thành lát mỏng có bề dày từ 1,0 cm – 1,5 cm. Phơi ráo từ 12- 24 h. Nấm sau khi để ráo nước, khô nhẹ, thì tiến hành xếp vào bồn ngâm với tỉ lệ ngâm như sau (1:2)

Rượu khử độc tố: Đối với rượu Linh chi, ta sử dụng Rượu 40,5 % Vol. Tỉ lệ rượu và tổng lượng nấm (20:1). Rượu được rót vào bồn 2 lần

Lần 1: khoảng 50 % lượng rượu để rượu ngấm đều vào dược liệu

Lần 2: sau lần 1 khoảng 2 ngày, cho tiếp lượng rượu còn lại vào bồn

Đậy kín.

Bồn ngâm chiết: dạng bồn nằm ngang, hoặc bồn đứng, có vòi rút dịch và màng lọc cặn.

Định kỳ kiểm tra: Định kỳ kiểm tra màu sắc, hương, vị của rượu. nếu có sự bất thường phải xử lý ngay. Định kỳ hàng tuần kiểm tra 1 lần. Nên có sự khuấy đảo nhẹ trong giai đoạn đầu ngâm, càng về sau thì càng ổn định để giữ được hương, vị của sản phẩm.

Chiết rót và đóng chai:

Trước khi đóng bình toàn bộ, tiến hành đóng sơ bộ lượng sản phẩm vừa đủ, tiến hành kiểm tra chất lượng theo TCVN rượu gạo. Sau khi kết quả kiểm nghiệm đạt yêu cầu, ta đem đóng chai, can, dán nhãn mác đã được đăng ký sở hữu trí tuệ đầy đủ thì đóng thùng quy cách.

Mỗi bình 10 lít, tiến hành cho 100 g nấm Lim xanh, rồi cho rượu Linh chi vào, đậy nắp, để ổn định 3-5 ngày.



Tiến hành ngâm chiết với quy mô 1 bồn mỗi bồn 250 lít.

Nguyên liệu: 3 kg nấm Lim xanh, 9 kg nấm Hồng Chi. Rượu nếp cái hoa vàng 270 lít.

Thu được 220 lít rượu Linh chi. Đóng chai: 22 bình.

3.7.2. Xây dựng tiêu chuẩn, thẩm định tiêu chuẩn và công bố chất lượng rượu Linh chi.

3.7.2.1. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng, thẩm định tiêu chuẩn:

Rượu Bảo Linh, Rượu Tứ Linh và Rượu Linh Chi nghiên cứu được áp dụng theo tiêu chuẩn rượu trắng theo TCVN 7043:2013 và kết hợp định tính Linh Chi với các chỉ tiêu đề xuất bao gồm:

- Chỉ tiêu cảm quan
 - + Trạng thái
 - + Màu sắc
 - + Mùi vị
- Chỉ tiêu hóa học
 - + Hàm lượng ethanol, (% thể tích) ở 20°C
 - + Hàm lượng methanol (mg/l) ethanol 100°
 - + Hàm lượng rượu bậc cao, tính theo methyl-2-propanol-1 (mg/l) ethanol 100°
 - + Hàm lượng aldehyd, tính theo acetaldehyd (mg/l) ethanol 100°
 - + Hàm lượng este, tính theo ethyl acetat (mg/l) ethanol 100°
- Kim loại nặng
- Định tính Linh chi bằng sắc ký lớp mỏng theo USP 43.

Sau khi khảo sát các thông số hàm lượng ethanol theo TCVN 8008:2009, hàm lượng rượu bậc cao theo TCVN 8011:2009, hàm lượng aldehyd theo TCVN 8009:2009, hàm lượng este TCVN 8011:2009.

Từ các kết quả khảo sát, đề xuất tiêu chuẩn và mức chất lượng như sau:

STT	Chỉ tiêu	Mức giới hạn đề xuất		
		Bảo Linh	Tứ Linh	Linh chi
1	Trạng thái	Dạng lỏng đồng nhất, không có tạp		
2	Màu sắc	Dung dịch màu vàng nâu, trong		
3	Mùi, vị	Mùi thơm dược liệu, vị đắng. Không có mùi, vị lạ		
4	Định tính	Phải có phản ứng đặc trưng của Linh chi (<i>Ganoderma lucidum</i>)		
5	Độ trong	Dung dịch trong, không có tạp chất lạ		
6	Thời gian oxy hóa	>10 ngày		
7	Hàm lượng ethanol (%)	< 35%	< 35%	< 40%
8	Hàm lượng rượu bậc cao (mg/L)	< 400 mg/L	< 400 mg/L	< 100 mg/L
9	Hàm lượng methanol (mg/L)	Không lớn hơn 100		
10	Hàm lượng aldehyd tính theo acetaldehyd (mg/L)	< 300 mg/L	< 300 mg/L	< 100 mg/L
11	Hàm lượng este tính theo ethyl acetat (mg/L)	< 150 mg/L	< 100 mg/L	< 100 mg/L
12	Kim loại nặng (Chì, Thiếc)	Không được có		

3.7.2.2. Công bố sản phẩm rượu

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

BẢN TỰ CÔNG BỐ SẢN PHẨM

Số: 05/NVT/2019

I. Thông tin về tổ chức, cá nhân tự công bố sản phẩm

Tên tổ chức, cá nhân: **NGUYỄN VĂN THIỆP.**

Địa chỉ: Đội 9, thôn Thượng Phúc, xã Tả Thanh Oai, huyện Thanh Trì, thành phố Hà Nội.

Điện thoại: 0973517458

Giấy chứng nhận đăng ký hộ kinh doanh số: 01L8000839

Số Giấy chứng nhận cơ sở đủ điều kiện ATTP:/...../GCNATTPNL ngày cấp/...../..... Nơi cấp

II. Thông tin về sản phẩm

1. Tên sản phẩm: **RƯỢU BẢO LINH**

2. Thành phần: Gạo nếp cái hoa vàng, nước sạch, nấm lim xanh, nấm Linh Chi (Hàn Quốc), nấm Linh Chi (Việt Nam), men truyền thống

3. Thời hạn sử dụng sản phẩm: Không hạn định.

4. Quy cách đóng gói và chất liệu bao bì:

Chất liệu bao bì: Đóng gói bằng chai thủy tinh, can nhựa, bình gốm sứ đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm theo quy định bộ Y tế

Thể tích thực: 300ml, 350ml, 500ml, 650ml, 700ml, 1.0L, 1.5L, 2.0L, 2.5L, 3L, 4L, 5L, 7L và 10L

5. Tên và địa chỉ cơ sở sản xuất sản phẩm

Tên cơ sở: Hộ kinh doanh: **NGUYỄN VĂN THIỆP.**

Địa chỉ: Đội 9, thôn Thượng Phúc, xã Tả Thanh Oai, huyện Thanh Trì, thành phố Hà Nội

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

BẢN TỰ CÔNG BỐ SẢN PHẨM

Số: 01/NVT/2019

I. Thông tin về tổ chức, cá nhân tự công bố sản phẩm

Tên tổ chức, cá nhân: **NGUYỄN VĂN THIỆP.**

Địa chỉ: Đội 9, thôn Thượng Phúc, xã Tả Thanh Oai, huyện Thanh Trì, thành phố Hà Nội.

Điện thoại: 0973517458

Giấy chứng nhận đăng ký hộ kinh doanh số: 01L8000839

Số Giấy chứng nhận cơ sở đủ điều kiện ATTP:/...../GCNATTPNL ngày cấp/...../..... . Nơi cấp

II. Thông tin về sản phẩm

1. Tên sản phẩm: **RƯỢU TỨ LINH**

2. Thành phần: Gạo nếp cái hoa vàng, nước sạch, nấm lim xanh, nấm Linh Chi (Hàn Quốc), nấm Linh Chi (Việt Nam), men truyền thống

3. Thời hạn sử dụng sản phẩm: Không hạn định.

4. Quy cách đóng gói và chất liệu bao bì:

Chất liệu bao bì: Đóng gói bằng chai thủy tinh, can nhựa, bình gốm sứ đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm theo quy định bộ Y tế

Thể tích thực: 300ml, 350ml, 500ml, 650ml, 700ml, 1.0L, 1.5L, 2.0L, 2.5L, 3L, 4L, 5L, 7L và 10L

5. Tên và địa chỉ cơ sở sản xuất sản phẩm

Tên cơ sở: Hộ kinh doanh: **NGUYỄN VĂN THIỆP.**

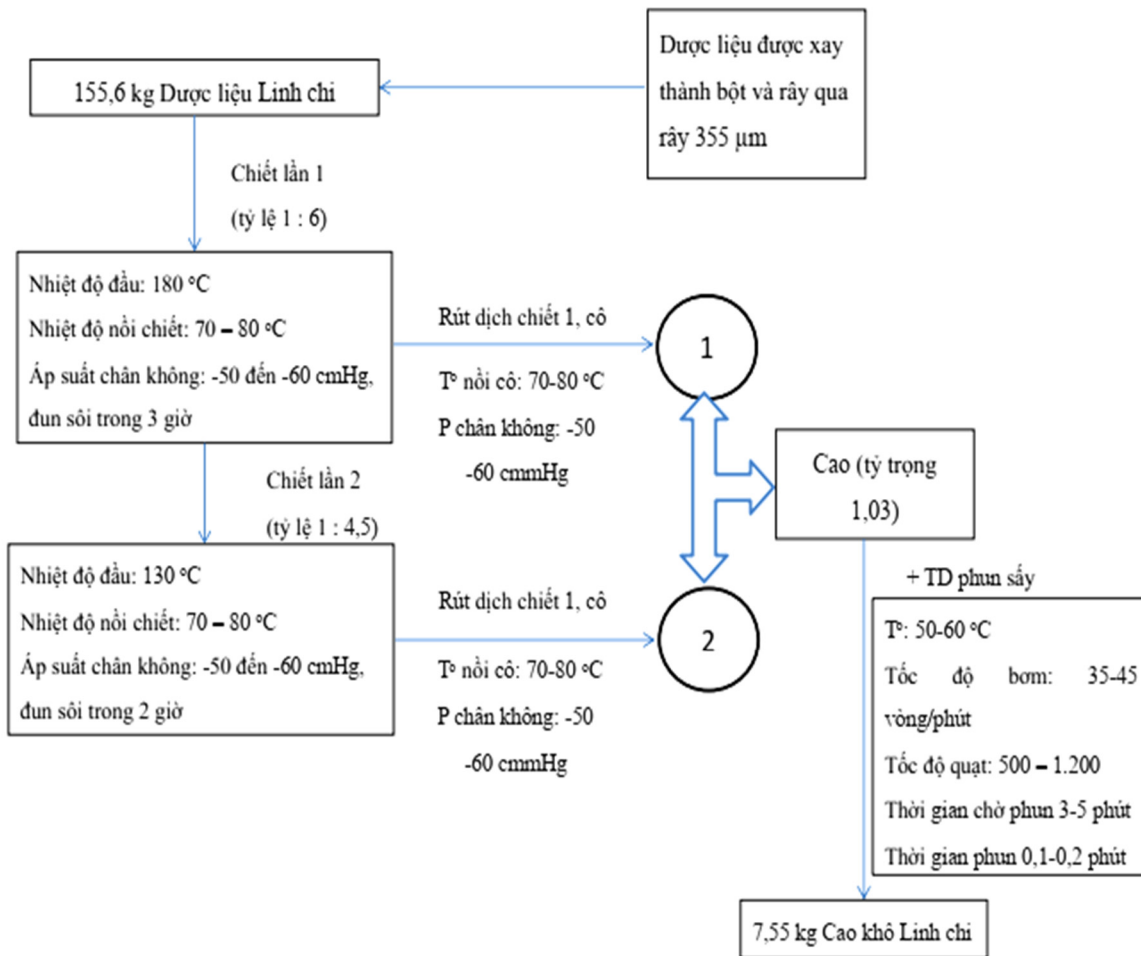
Địa chỉ: Đội 9, thôn Thượng Phúc, xã Tả Thanh Oai, huyện Thanh Trì, thành phố Hà Nội

3.8. Nghiên cứu quy trình bào chế cao Linh chi Tây Nguyên đạt TCCS cho 3 loại cao linh chi giàu hoạt chất (cao toàn phần, cao giàu polysaccharid và cao giàu triterpenoid)

3.8.1. Nghiên cứu quy trình chiết xuất, bào chế 3 loại cao Linh chi giàu hoạt chất nêu trên

3.8.1.1. Cao toàn phần:

a. Quy trình chiết xuất



Từ 155,6 kg dược liệu Linh chi, với quy trình được trình bày bên dưới, nhóm nghiên cứu thu được 7,55 kg cao khô Linh chi

b. Kết quả đánh giá sơ bộ cao Linh chi

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

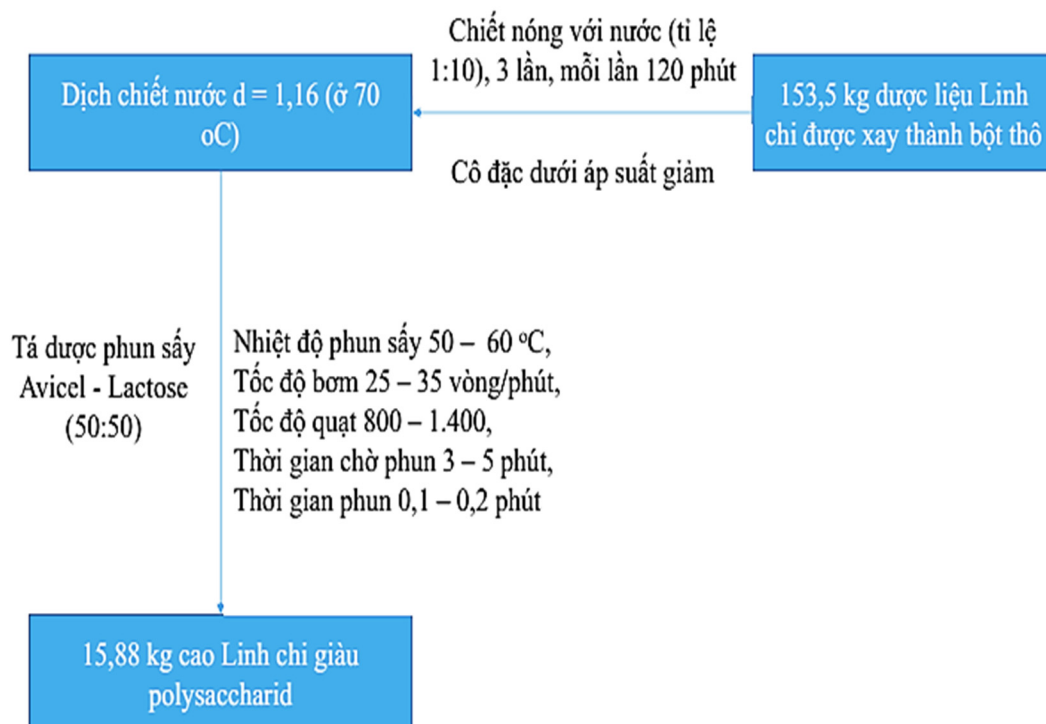
STT	Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
1	Cảm quan		Bột màu nâu khô tơi, kích thước đồng nhất, có mùi thơm dược liệu.
2	Hàm ẩm	Không quá 3,0 %	1,5 %
3	Tỷ trọng biểu kiến		1,25
4	Chỉ số nén		14,3
5	Hiệu suất thu hồi		76,4 %
6	Định tính bằng sắc ký lớp mỏng	Phải có phản ứng của Linh chi	Đúng
7	Định lượng triterpenoid tính theo acid ganoderic A	Không dưới 1,0 % tính trên chế phẩm khô	Đạt (1,20 %)



Cao khô toàn phần

3.8.1.2. Cao giàu polysaccharid

a. Quy trình bào chế cao giàu polysaccharid:



Từ 153,5 kg dược liệu Linh chi, với quy trình được trình bày bên dưới, nhóm nghiên cứu thu được 15,88 kg cao khô Linh chi giàu polysaccharid

b. Kết quả đánh giá chất lượng cao Linh chi giàu polysaccharid

STT	Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
1	Cảm quan		Bột màu nâu khô toi, kích thước đồng nhất, có mùi thơm dược liệu.
2	Hàm ẩm	Không quá 3,0 %	1,5 %
3	Tỷ trọng biểu kiến		1,25
4	Chỉ số nén		14,3
5	Hiệu suất thu hồi		76,4 %
6	Định tính bằng sắc ký lớp mỏng	Phải có phản ứng của polysaccharid	Đúng (D(+))Glucose, D(+))Mannose,

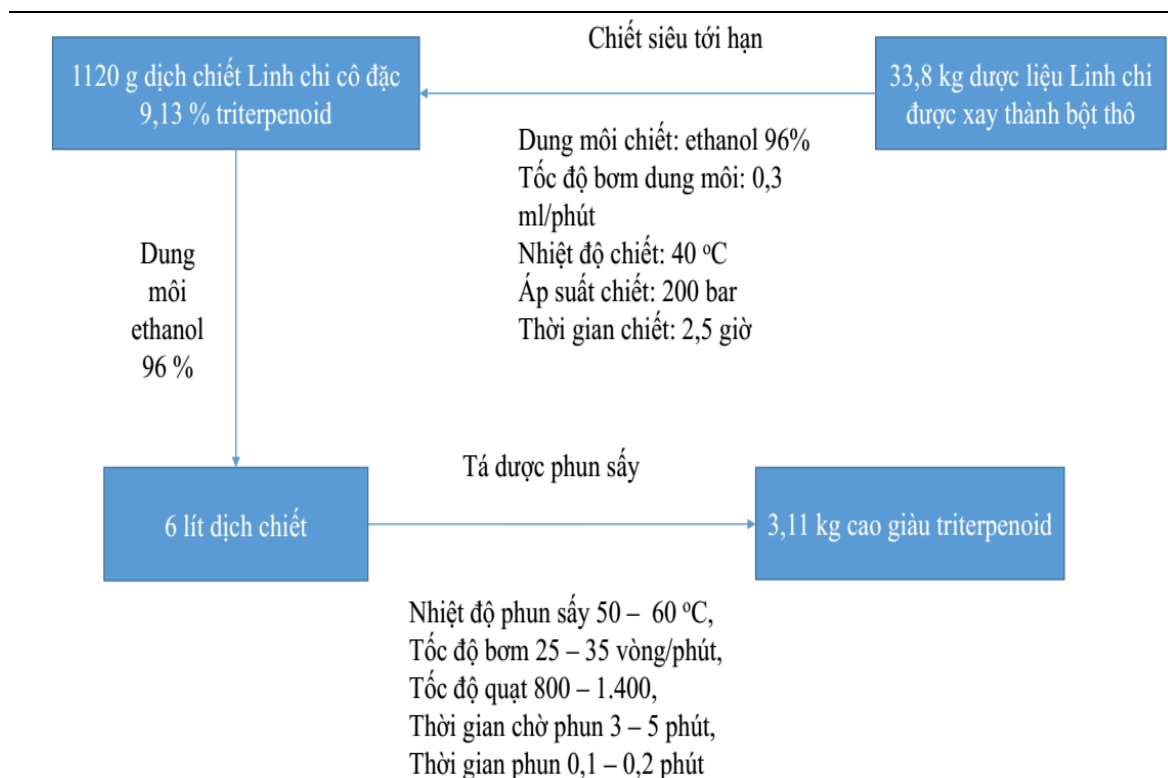
STT	Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
			D(+) <i>Galactose</i> , D(+) <i>Fucose</i>)
7	Định lượng polysaccharid tính theo glucose	Không dưới 2,0 % tính trên chế phẩm khô	Đạt (3,91 %)



Bột cao khô giàu polysaccharide

3.8.1.3. Cao Linh chi giàu triterpenoid

a. *Quy trình điều chế cao Linh chi giàu triterpenoid*



Từ 33,8 kg dược liệu Linh chi, với quy trình được trình bày bên dưới, nhóm nghiên cứu thu được 3,11 kg cao khô Linh chi giàu polysaccharid

b. Kết quả kiểm tra chất lượng cao Linh chi giàu triterpenoid



STT	Chỉ tiêu	Kết quả
1	Cảm quan	Bột màu nâu khô toi, kích thước đồng nhất, có mùi thơm dược liệu.
2	Hàm ẩm	6,7%
3	Chỉ số nén	13,5
4	Định tính bằng sắc ký lớp mỏng	Đúng
5	Định lượng triterpen tính theo acid ganoderic A	Đạt (2,26 %)

3.8.2. Thử độc tính và một số tác dụng dược lý của cao Linh chi Tây Nguyên

3.8.2.1. Thử độc tính cấp và độc tính bán trường diễn

a. Độc tính cấp:

Độc tính cấp đường uống của các cao TP, cao TRI và cao POL được khảo sát trên 10 chuột nhắt trắng (5 đực, 5 cái). Cao TP và cao POL được phân tán trong nước cất ở nồng độ cao nhất có thể qua được kim cho chuột uống lần lượt là 0,6 g/ml và 0,4 g/ml. Cao TRI khó phân tán đều trong nước, nhanh lắng nên sử dụng tween 80 để hỗ trợ phân tán đều cao TRI trong nước với tỷ lệ 6,7% (v/v), nồng độ cao nhất có thể qua kim cho uống của cao TRI là 0,4 g/ml. Sau khi cho chuột ở các nhóm uống cao TP hoặc cao POL hoặc cao TRI với thể tích cho uống tối đa 50 ml/kg, tương ứng với liều 30 g/kg, 20 g/kg và 20 g/kg, tất cả chuột giảm di chuyển sau đó hoạt động bình thường, khỏe mạnh, ăn cám, uống nước, tiêu tiểu, cử động bình thường, không có dấu hiệu bất thường nào. Trong thời gian 72 giờ quan sát, không có chuột nào bị chết. Tiếp tục theo dõi chuột trong 14 ngày ở điều kiện chăm sóc bình thường, không có chuột nào chết; chuột sống không có bất thường về hành vi, trạng thái lông, ăn uống, tiêu tiểu. Chuột sống đến cuối thử nghiệm được mổ, quan sát đại thể các cơ quan không thấy dấu hiệu bất thường.

Như vậy, không xác định được LD_{50} của cao TP, cao POL và cao TRI; các cao thử không thể hiện độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt với liều tối đa có thể cho uống qua kim (D_{max}) lần lượt là 30 g/kg, 20 g/kg và 20 g/kg.

*b. Độc tính bán trường diễn***Ảnh hưởng lên tình trạng chung và sự thay đổi cân nặng của chuột**

Trong thời gian thí nghiệm, chuột nhất ở các lô đều sống, hoạt động, ăn uống bình thường, lông mượt, không có hiện tượng rụng lông hoặc khô cứng lông, mắt sáng, phân khô, nước tiểu bình thường.

Trọng lượng cơ thể của chuột được cho uống các cao thử thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý ở cùng thời điểm khảo sát ($p > 0,05$), trừ thời điểm ngày 10 và ngày 14, lô cao TP liều 100 mg/kg, cao POL liều 70 và 140 mg/kg có trọng lượng cơ thể cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý ($p < 0,05$). Khi so sánh trong từng lô, tại hầu hết các thời điểm thử nghiệm, trọng lượng cơ thể của chuột ở 2 giới khác biệt không đáng kể ($p > 0,05$).

Nhìn chung, việc cho chuột uống cao TP liều 50 mg/kg và 100 mg/kg, cao TRI liều 45 mg/kg và 90 mg/kg, cao POL liều 70 mg/kg và 140 mg/kg trong 14 ngày hoặc 28 ngày liên tiếp không làm thay đổi thể trọng chuột thử nghiệm so với lô sinh lý.

Ảnh hưởng lên các thông số huyết học*** Cao TP**

Về số lượng bạch cầu, sau 14 ngày thử nghiệm, số lượng bạch cầu của lô uống cao TP 50 mg/kg tăng có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý ($p < 0,05$), lô uống cao TP 100 mg/kg có số lượng bạch cầu thay đổi không đáng kể. Sau 28 ngày, số lượng bạch cầu ở lô uống cao TP cả 2 liều 50 và 100 mg/kg thay đổi không có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý uống nước cất cùng thời điểm.

Sau 14 ngày, đa phần các thông số về hồng cầu thay đổi không đáng kể, trừ lô chuột cho uống cao TP liều 100 mg/kg có các thông số HGB, RBC, HCT giảm nhẹ so với lô sinh lý ($p < 0,05$). Sau 28 ngày cho uống cao TP liều 50 và 100 mg/kg, các thông số về hồng cầu khác biệt không có ý nghĩa so với lô sinh lý cho uống nước cất ($p > 0,05$).

Số lượng tiểu cầu ở 2 lô cho uống cao TP 50 và 100 mg/kg trong 14 ngày thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý ($p > 0,05$). Sau 28 ngày, lô uống cao TP liều 50 mg/kg

có số lượng tiểu cầu tăng so với lô sinh lý ($p < 0,01$), tuy nhiên, lô uống cao TP liều 100 mg/kg thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Khi so sánh giữa 2 giới trong cùng lô thử nghiệm, các thông số về chức năng tạo máu đa phần không khác biệt đáng kể ($p > 0,05$).

Nhìn chung, việc cho chuột uống cao TP liều 50 mg/kg và 100 mg/kg trong 14 hoặc 28 ngày liên tiếp không ảnh hưởng đến chức năng tạo máu của chuột thử nghiệm.

*** Cao TRI**

Sau 14 ngày cho chuột uống cao TRI liều 45 và 90 mg/kg, số lượng bạch cầu tăng có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý ($p < 0,05$). Tuy nhiên, sau 28 ngày thử nghiệm, số lượng bạch cầu ở 2 lô uống cao TRI liều 45 và 90 mg/kg khác biệt không đáng kể so với lô sinh lý uống nước cất cùng thời điểm ($p > 0,05$).

Về dòng hồng cầu, sau 14 ngày và 28 ngày cho chuột uống cao TRI liều 45 và 90 mg/kg, hầu hết các thông số về hồng cầu thay đổi không có ý nghĩa so với lô sinh lý cùng thời điểm.

Số lượng tiểu cầu ở lô cho uống cao TRI 90 mg/kg trong 14 ngày tăng so với lô sinh lý ($p < 0,01$). Tuy nhiên, sau 28 ngày, lô uống cao TRI ở cả 2 liều 45 và 90 mg/kg có số lượng tiểu cầu thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với lô sinh lý.

Khi so sánh giữa 2 giới trong cùng lô thử nghiệm, các thông số về chức năng tạo máu đa phần không khác biệt đáng kể ($p > 0,05$).

Nhìn chung, việc cho chuột uống cao TRI liều 45 mg/kg và 90 mg/kg trong 14 hoặc 28 ngày liên tiếp không ảnh hưởng đến chức năng tạo máu của chuột thử nghiệm.

*** Cao POL**

Về số lượng bạch cầu, sau 14 ngày và 28 ngày thử nghiệm, lô chuột được cho uống cao POL liều 70 và 140 mg/kg có số lượng bạch cầu khác biệt không đáng kể so với lô sinh lý cùng thời điểm ($p > 0,05$).

Về dòng hồng cầu, sau 14 ngày cho uống cao POL, đa phần các thông số thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý, trừ lô uống POL liều 140 mg/kg có RBC và MCHC giảm, MCV tăng so với lô sinh lý ($p < 0,05$). Tuy nhiên sau 28 ngày, cả 2 lô uống cao POL liều 70 và 140 mg/kg có các thông số về hồng cầu khác biệt không đáng kể so với lô sinh lý ($p > 0,05$).

Số lượng tiểu cầu ở lô cho uống cao POL 70 mg/kg trong 14 ngày và uống cao POL liều 70 và 140 mg/kg trong 28 ngày tăng có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý cùng thời điểm.

Khi so sánh giữa 2 giới trong cùng lô thử nghiệm, các thông số về chức năng tạo máu đa phần không khác biệt đáng kể ($p > 0,05$).

Nhìn chung, việc cho chuột uống cao POL liều 70 mg/kg và 140 mg/kg trong 14 hoặc 28 ngày liên tiếp không ảnh hưởng đến chức năng tạo máu của chuột thử nghiệm.

Ảnh hưởng lên chức năng gan

*** Cao TP**

Sau 14 ngày và 28 ngày liên tiếp cho chuột nhất uống cao TP liều 50 mg/kg và 100 mg/kg, các thông số chức năng gan (AST, ALT) thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý cùng thời điểm ($p > 0,05$). Không có sự khác biệt đáng kể về các thông số chức năng gan giữa 2 giới trong cùng lô thử nghiệm ($p > 0,05$).

Như vậy, việc cho chuột uống cao TP liều 50 mg/kg và 100 mg/kg trong 14 ngày và 28 ngày liên tiếp không làm ảnh hưởng đến chức năng gan chuột.

*** Cao TRI**

Sau 14 ngày, lô chuột nhất được cho uống cao TRI liều 45 mg/kg và 90 mg/kg có các thông số AST và ALT thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý ($p > 0,05$). Sau 28 ngày, lô chuột uống cao TRI liều 45 mg/kg có các thông số AST, ALT thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý, lô cao TRI liều 90 mg/kg có thông số ALT cao so với lô sinh lý nhưng vẫn trong giới hạn của chuột bình thường. Không có sự khác biệt đáng kể về các thông số chức năng gan giữa 2 giới trong cùng lô thử nghiệm ($p > 0,05$).

Như vậy, việc cho chuột nhất uống cao TRI liều 45 mg/kg trong 14 và 28 ngày liên tiếp không làm ảnh hưởng đến chức năng gan chuột. Tuy nhiên, cần thận trọng khi sử dụng cao TRI liều cao trong thời gian dài.

*** Cao POL**

Sau 14 ngày, lô cao POL liều 70 và 140 mg/kg có các thông số AST và ALT thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý ($p > 0,05$). Sau 28 ngày, chuột được cho uống cao POL liều 70 mg/kg có thông số ALT cao hơn so với lô sinh lý và trong giới hạn của

chuột bình thường, tuy nhiên, ở lô cao POL liều 140 mg/kg, các thông số chức năng gan thay đổi không đáng kể ($p > 0,05$). Không có sự khác biệt về thông số chức năng gan giữa 2 giới trong cùng lô ($p > 0,05$).

Như vậy, việc cho chuột uống cao POL liều 70 mg/kg và 140 mg/kg trong 14 ngày và 28 ngày liên tiếp không làm ảnh hưởng đến chức năng gan chuột.

Ảnh hưởng lên chức năng thận

*** Cao TP**

Sau 14 ngày thử nghiệm, lô uống cao TP liều 50 mg/kg có các thông số chức năng thận: ure và creatinin thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý ($p > 0,05$), lô uống cao TP liều 100 mg/kg có chỉ số ure tăng và creatinin thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý cùng thời điểm ($p < 0,05$). Tuy nhiên, sau 28 ngày, các thông số chức năng thận ở cả 2 lô uống cao TP liều 50 và 100 mg/kg thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý uống nước cất ($p > 0,05$).

Như vậy, việc cho chuột nhất uống cao TP với liều 50 mg/kg và 100 mg/kg trong 14 ngày hoặc 28 ngày liên tiếp không ảnh hưởng đến chức năng thận của chuột.

*** Cao TRI**

Sau 14 ngày và 28 ngày thử nghiệm, lô chuột được cho uống cao TRI liều 45 mg/kg và 90 mg/kg có các thông số chức năng thận: ure và creatinin thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý uống nước cất cùng thời điểm ($p > 0,05$).

Như vậy, việc cho chuột nhất uống cao TRI với liều 45 mg/kg và 90 mg/kg trong 14 ngày hoặc 28 ngày liên tiếp không ảnh hưởng đến chức năng thận của chuột.

*** Cao POL**

Sau 14 ngày và 28 ngày, lô chuột được cho uống cao POL liều 70 mg/kg và 140 mg/kg có các thông số chức năng thận: ure và creatinin thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý uống nước cất cùng thời điểm ($p > 0,05$).

Như vậy, việc cho chuột nhất uống cao POL với liều 70 mg/kg và 140 mg/kg trong 14 ngày hoặc 28 ngày liên tiếp không ảnh hưởng đến chức năng thận của chuột.

Ảnh hưởng lên đại thể các cơ quan

Quan sát đại thể cho thấy sau 28 ngày thử nghiệm, các cơ quan như tim, phổi, gan, thận, hệ thống tiêu hóa của chuột ở các lô không có hiện tượng bất thường. Tim: cơ tim bình thường. Gan: toàn bộ gan màu đỏ tươi, bề mặt láng mịn, không có hiện tượng phù nề hay sung huyết, dịch mật vàng trong, túi mật bình thường. Thận: tất cả chuột đều có thận bình thường, màu đỏ thẫm, mặt nhẵn, không xuất hiện sung huyết và tổn thương. Phổi: màu trắng hồng bình thường. Ruột: bình thường.

Ảnh hưởng lên hình thái vi thể gan, thận

Sau khi cố định mẫu gan, thận bằng dung dịch formol 10%, mẫu được phân tích vi thể gan, thận tại Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Quận 2, Tp. Hồ Chí Minh.

Cấu trúc vi thể gan

Lô sinh lý có 6/6 mẫu gan xuất hiện tình trạng viêm gan nhẹ, điều này có thể do cấu trúc tế bào gan chuột thay đổi theo thời gian. Ở các lô thử, khi cho uống cao TP hoặc TRI hoặc POL, tỷ lệ xuất hiện tình trạng viêm nhẹ trong cấu trúc vi thể gan chuột tương đương với lô sinh lý.

Như vậy, việc cho chuột nhắt uống cao TP hoặc TRI hoặc POL không ảnh hưởng đến cấu trúc vi thể tế bào gan của chuột thử nghiệm.

Cấu trúc vi thể thận

Sau 28 ngày thử nghiệm, 5/6 mẫu thận của chuột ở lô sinh lý có cấu trúc vi thể bình thường, 1/6 mẫu xuất hiện tình trạng viêm thận – bể thận mạn tính nhẹ.

Ở lô cao TP liều 50 mg/kg, 6/6 mẫu thận bình thường; tuy nhiên, lô chuột cho uống cao TP liều 100 mg/kg, 3/6 mẫu xuất hiện hiện tình trạng viêm thận – bể thận mạn tính nhẹ.

Ở lô cao TRI liều 45 mg/kg trong 28 ngày, 6/6 mẫu thận bình thường, ở lô chuột cho uống cao TRI liều 90 mg/kg, 3/6 mẫu xuất hiện hiện tình trạng viêm thận – bể thận mạn tính nhẹ.

Ở lô chuột cho uống cao POL liều 70 và 140 mg/kg, 5/6 mẫu thận của chuột ở lô sinh lý có cấu trúc vi thể bình thường, 1/6 mẫu xuất hiện tình trạng viêm thận – bể thận mạn tính nhẹ, tương đương với lô sinh lý.

Như vậy, việc cho chuột nhất uống cao TP liều 50 mg/kg; cao TRI liều 45 mg/kg; cao POL với liều 70 và 140 mg/kg không làm thay đổi cấu trúc vi thể tế bào thận của chuột thử nghiệm. Tuy nhiên, cho chuột uống cao TP liều 100 mg/kg và cao TRI 90 mg/kg có thể ảnh hưởng đến cấu trúc tế bào thận; do đó không nên sử dụng cao TP và TRI với liều cao trong thời gian dài.

3.8.2.2. Hoạt tính chống oxy hóa

a. Phương pháp DPPH

Cao TP, cao TRI và cao POL thể hiện hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* khảo sát bằng phương pháp DPPH với giá trị EC_{50} lần lượt là $395,56 \pm 17,25 \mu\text{g/ml}$; $462,39 \pm 30,31 \mu\text{g/ml}$ và $749,16 \pm 16,98 \mu\text{g/ml}$. Mẫu đối chứng quercetin là có giá trị EC_{50} là $3,79 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$. Dựa vào giá trị EC_{50} cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của các cao thử có độ mạnh giảm dần theo thứ tự cao TP, cao TRI và cao POL.

b. Khả năng loại gốc tự do superoxid

Các mẫu cao thử được sàng lọc khả năng loại gốc tự do superoxid ở nồng độ 1000 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả thu được cho thấy các mẫu thử ở nồng độ khảo sát 1000 $\mu\text{g/mL}$ thể hiện hoạt tính loại bỏ gốc superoxid yếu, thấp hơn 10%. Do đó, không tiếp tục khảo sát tìm IC_{50} của các mẫu cao thử. Chất đối chứng acid ascorbic thể hiện khả năng loại gốc superoxid khảo sát bằng phương pháp pyrogallol với giá trị IC_{50} là $154,31 \pm 4,86 \mu\text{g/mL}$.

c. Khả năng loại gốc tự do hydroxyl

Các mẫu cao thử được sàng lọc khả năng loại gốc tự do hydroxyl ở nồng độ 1000 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả cho thấy cả ba mẫu cao TP, cao TRI và cao POL không thể hiện hoạt tính loại bỏ gốc tự do hydroxyl ở nồng độ sàng lọc 1000 $\mu\text{g/mL}$, do đó không tiếp tục khảo sát tìm IC_{50} của các mẫu thử. Mẫu đối chứng DMSO thể hiện hoạt tính đánh bắt gốc tự do hydroxyl trong thử nghiệm deoxydribose với giá trị IC_{50} là 0,56 $\mu\text{L/mL}$.

3.8.2.3. Tác động hạ đường huyết *in vitro* của các cao thử**a. Hoạt tính ức chế enzym α -amylase *in vitro***

Kết quả khảo sát hoạt tính ức chế enzym amylase *in vitro* của các mẫu cao thử ở nồng độ Kết quả cho thấy ở nồng độ sàng lọc 1000 $\mu\text{g/mL}$, mẫu cao POL không thể hiện hoạt tính ức chế enzym α -amylase *in vitro*; cao TP và cao TRI có hoạt tính ức chế enzym α -amylase yếu, khoảng 14-18%. Do đó, không khảo sát các nồng độ khác để xác định EC_{50} của các cao thử. Mẫu đối chứng acarbose thể hiện hoạt tính ức chế enzym α -amylase với giá trị EC_{50} là $826,81 \pm 64,95 \mu\text{g/ml}$.

b. Hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase *in vitro*

Ở nồng độ khảo sát 1000 $\mu\text{g/ml}$, cao TP thể hiện hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase yếu với tỷ lệ ức chế là 35,85%; cao POL không thể hiện hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase

(-1,95%), do đó không tiếp tục khảo sát tìm EC_{50} của hai cao này. Cao TRI thể hiện hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase với EC_{50} là $162,99 \pm 16,55 \mu\text{g/ml}$, thấp hơn giá trị EC_{50} của mẫu đối chứng acarbose là $333,87 \pm 32,41 \mu\text{g/ml}$. Dựa vào giá trị EC_{50} cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của cao TRI mạnh hơn acarbose.

3.8.2.4. Tác động điều hòa rối loạn lipid máu nội sinh**a. Trên mô hình rối loạn lipid máu nội sinh cấp tính**

Kết quả cho thấy 24 giờ sau khi tiêm tĩnh mạch tyloxapol liều 250 mg/kg, lô chứng bệnh có nồng độ triglycerid, cholesterol toàn phần và LDL-C tăng lần lượt 2,9 lần, 1,8 lần và 1,7 lần ($p < 0,01$). Nồng độ HDL-C khác biệt không đáng kể so với lô sinh lý ($p > 0,05$). Như vậy việc tiêm tĩnh mạch tyloxapol liều 250 mg/kg đã gây được tình trạng rối loạn lipid huyết cấp trên chuột nhất.

Ở chuột được điều trị với đối chứng fenofibrat 50 mg/kg, nồng độ triglyceride và cholesterol toàn phần giảm lần lượt 48,3% và 24,0% có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ($p < 0,01$). Nồng độ LDL-C giảm nhẹ, khoảng 10% và nồng độ HDL-C thay đổi không có ý nghĩa so với lô chứng bệnh ($p > 0,05$). Như vậy, mô hình đáp ứng với đối chứng fenofibrat nên được sử dụng khảo sát tác động điều hòa rối loạn lipid huyết cấp của mẫu thử.

Nồng độ các chỉ số lipid huyết ở lô chuột được điều trị với cao TP liều 50 mg/kg và 100 mg/kg khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$); trong đó nồng độ triglyceride giảm khoảng 11 - 19%, nồng độ cholesterol toàn phần giảm khoảng 3 - 10%.

Cao TRI ở hai liều thử nghiệm 45 mg/kg và 90 mg/kg thể hiện tác động làm giảm nồng độ triglycerid, cholesterol toàn phần và LDC-C có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$ và $p < 0,01$). Cụ thể, hai lô này có nồng độ triglycerid giảm khoảng 50 - 55%, cholesterol toàn phần giảm khoảng 13 - 22% và LDL-C giảm khoảng 33 - 44% so với lô chứng bệnh. Nồng độ HDL-C tăng lần lượt 16,2% và 55,7% ở lô chuột uống cao TRI liều 45 và 90 mg/kg, nhưng chỉ lô cao TRI 90 mg/kg có ý nghĩa thống kê so với chuột chứng bệnh ($p < 0,05$). So với lô fenofibrat 50 mg/kg, hai lô cao TRI có nồng độ triglycerid và cholesterol toàn phần khác biệt không đáng kể ($p > 0,05$), tuy nhiên chỉ số LDL-C giảm đáng kể và chỉ số HDL-C ở lô TRI 90 mg/kg cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$ và $p < 0,01$). Bốn chỉ số lipid huyết giữa hai lô chuột uống cao TRI khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), trừ HDL-C ở lô TRI 90 mg/kg cao hơn đáng kể so với liều 45 mg/kg ($p < 0,05$).

Việc cho uống cao POL liều 70 mg/kg làm nồng độ triglycerid, cholesterol toàn phần và LDL-C lần lượt giảm 54,7%, 18,6% và 41,1% có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ($p < 0,01$); nồng độ HDL-C tăng 13,2%, tuy nhiên không có ý nghĩa thống kê so với chuột chứng bệnh ($p > 0,05$). Với liều 140 mg/kg, cao POL làm giảm 40,1% nồng độ triglycerid huyết, 17,8% nồng độ cholesterol toàn phần, 33,3% nồng độ LDL-C và làm tăng 41,2% nồng độ HDL-C của chuột thử nghiệm so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$). So sánh giữa liều 70 và 140 mg/kg của cao POL cho thấy tác dụng làm giảm nồng độ triglycerid huyết, cholesterol toàn phần, LDL-C và tăng HDL-C của hai liều khác nhau không có ý nghĩa ($p > 0,05$). So với lô fenofibrat 50 mg/kg, cao POL liều 70 mg/kg làm giảm LDL-C và cao POL liều 140 mg/kg làm tăng HDL-C có ý nghĩa ($p < 0,05$ và $p < 0,01$), các chỉ số còn lại khác biệt không đáng kể ($p > 0,05$).

Như vậy, cao TP liều 50 mg/kg và 100 mg/kg không thể hiện tác động điều hòa rối loạn lipid máu; cao TRI với liều cho uống 45, 90 mg/kg và cao POL với liều cho uống 70, 140 mg/kg thể hiện tác động điều hòa rối loạn lipid máu nội sinh cấp tính trên chuột nhắt. So với đối chứng fenofibrat 50 mg/kg, tác động của cao TRI và cao POL trên triglycerid và cholesterol toàn phần không khác biệt, tuy nhiên tác động trên LDL-C và HDL-C tốt hơn. Giữa hai liều khảo sát của cùng cao TRI hoặc cao POL, mức liều cao hơn thể hiện tác động điều hòa lipid máu tốt hơn.

b. Trên mô hình rối loạn lipid máu nội sinh bán cấp

Tác động hạ triglycerid huyết

Ở tất cả thời điểm khảo sát, nồng độ triglycerid huyết của chuột lô chứng bệnh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý, tăng gấp 4,0 – 12,0 lần ($p < 0,01$).

So với lô chứng bệnh, lô fenofibrat 50 mg/kg có nồng độ triglycerid giảm 85,1% từ sau 1 tuần điều trị ($p < 0,01$). Tác dụng này duy trì ổn định với nồng độ triglycerid giảm 85 - 92% trong các tuần tiếp theo ($p < 0,01$). Như vậy, mô hình gây tăng lipid huyết bán cấp bằng cách tiêm tyloxapol 3 lần/tuần đáp ứng với thuốc đối chứng fenofibrat 50 mg/kg. Do đó, mô hình được sử dụng để khảo sát tác động điều hòa rối loạn lipid huyết của các cao thử.

Trong 4 tuần điều trị, nồng độ triglycerid ở các lô chuột được cho uống cao TP, cao TRI hoặc cao POL ở các mức liều thử nghiệm giảm không đáng kể so với lô chứng bệnh ($p > 0,05$). Như vậy, các mẫu thử cao TP, cao TRI và cao POL không thể hiện tác dụng hạ triglycerid huyết trên mô hình chuột nhắt gây rối loạn lipid huyết nội sinh bán cấp.

Tác động hạ cholesterol huyết

Lô chứng bệnh có nồng độ cholesterol toàn phần tăng gấp 3,6 – 5,0 lần so với lô sinh lý, cao hơn có ý nghĩa thống kê ở tất cả các thời điểm khảo sát ($p < 0,01$).

Trong giai đoạn điều trị, lô fenofibrat 50 mg/kg có nồng độ cholesterol toàn phần giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh cùng thời điểm ($p < 0,01$): cholesterol toàn phần sau 1, 2, 3 và 4 tuần điều trị lần lượt giảm 72,9%, 54,2%, 67,4% và 61,4%.

Nồng độ cholesterol toàn phần ở các lô cao TP, cao TRI hoặc cao POL cao hơn chuột sinh lý ($p < 0,01$) và khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với chuột chứng bệnh trong suốt thời gian khảo sát ($p > 0,05$). Như vậy, các cao TP, cao TRI và cao POL không thể hiện tác dụng hạ cholesterol toàn phần trên mô hình chuột nhất gây rối loạn lipid huyết nội sinh bán cấp.

Tác động hạ LDL-C

Lô chứng bệnh có nồng độ LDL-C tăng cao có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý ở tất cả thời điểm khảo sát, tăng gấp 2,2 – 8,7 lần ($p < 0,01$).

Lô fenofibrat 50 mg/kg có nồng độ LDL-C giảm 75,5% có ý nghĩa so với lô chứng bệnh sau 1 tuần điều trị ($p < 0,01$). Tác động này duy trì trong các tuần tiếp theo với mức độ giảm LDL-C lần lượt là 56,8%, 78,5% và 69,5% ứng với thời điểm sau 2, 3 và 4 tuần điều trị ($p < 0,01$).

Việc cho chuột nhất uống cao TP liều 50 mg/kg sau 1 và 2 tuần làm giảm lần lượt 51,2% và 32,5% nồng độ LDL-C ($p < 0,01$). Trong hai tuần tiếp theo, nồng độ LDL-C ở lô uống cao TP 50 mg/kg giảm khoảng 9-22%, không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Với liều thử nghiệm 100 mg/kg, cao TP làm giảm khoảng 23 - 51% nồng độ LDL-C trong 3 tuần điều trị đầu, có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$). Tuy nhiên vào tuần điều trị cuối, nồng độ LDL-C ở lô cao TP 100 mg/kg hầu như không thay đổi so với chuột chứng bệnh ($p > 0,05$).

Cao TRI liều 45 và 90 mg/kg làm giảm đáng kể nồng độ LDL-C sau 1 tuần điều trị; cụ thể mức giảm lần lượt là 47,5% và 60,3% ($p < 0,01$). Tuy nhiên, mức độ giảm LDL-C giảm còn 2-20% trong 3 tuần tiếp theo, không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ($p > 0,05$).

So với lô chứng bệnh, sau một tuần điều trị với cao POL liều 70 mg/kg và 140 mg/kg, nồng độ LDL-C giảm khoảng 53% có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$); tác dụng này giảm còn khoảng 24 - 29% vào tuần điều trị thứ 2 và còn dưới 10% sau 3 và 4 tuần điều trị ($p > 0,05$).

So với lô fenofibrat 50 mg/kg, nồng độ LDL-C ở các lô uống cao TP, cao TRI hoặc cao POL đều cao hơn đáng kể trong suốt 4 tuần điều trị ($p < 0,05$ và $p < 0,01$). Giữa

hai lô chuột được điều trị với hai mức liều thử nghiệm của cùng một cao, nồng độ LDL-C khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy, cao TP liều 50 và 100 mg/kg thể hiện tác dụng giảm LDL-C trong hai tuần điều trị đầu; cao TRI liều 45, 90 mg/kg và cao POL liều 70, 140 mg/kg làm giảm LDL-C trong một tuần điều trị đầu trên mô hình chuột nhất gây rối loạn lipid huyết nội sinh bán cấp.

Tác động tăng HDL-C

Lô chứng bệnh có nồng độ HDL-C giảm so với lô sinh lý, trong đó sự giảm có ý nghĩa thống kê vào các tuần 3, 4, 5 và 6 ($p < 0,01$).

Nồng độ HDL-C ở chuột uống fenofibrat liều 50 mg/kg tăng đáng kể sau 1 tuần điều trị, tăng 55,0% so với lô chứng bệnh ($p < 0,01$). Trong ba tuần tiếp theo, nồng độ HDL-C tăng khoảng 15-25% nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Các mẫu cao thử TP, TRI và POL ở hai mức liều thử nghiệm không làm tăng nồng độ HDL-C so với lô chứng bệnh, ngoại trừ cao POL liều 70 mg/kg làm tăng 26,5% HDL-C vào cuối đợt điều trị ($p < 0,01$).

Như vậy, các mẫu thử cao TP, cao TRI và cao POL không thể hiện tác dụng tăng HDL-C trên mô hình chuột nhất gây rối loạn lipid huyết nội sinh bán cấp.

c. Tác động điều hòa rối loạn lipid máu bán cấp ngoại sinh

Tác động lên trọng lượng cơ thể chuột thử nghiệm

Sau 8 tuần gây bệnh, nhóm chuột được cho uống dung dịch giàu lipid có nồng độ cholesterol toàn phần gấp 1,9 lần, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với chuột sinh lý ($p < 0,01$); nồng độ triglycerid và HDL-C giảm có ý nghĩa thống kê so với chuột sinh lý ($p < 0,01$); nồng độ LDL-C tăng không đáng kể ($p > 0,05$). Như vậy, sau 8 tuần, mô hình gây được tình trạng tăng cholesterol toàn phần và giảm HDL-C trên chuột nhất; mô hình chưa gây được tình trạng tăng triglycerid và LDL-C ngoại sinh. Do đó, các chuột trong nhóm gây bệnh được chia thành 8 lô ($n = 6-8/lô$) theo chỉ số nồng độ cholesterol toàn phần sao cho giữa các lô không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Tác động lên nồng độ cholesterol toàn phần

Nồng độ cholesterol toàn phần ở lô chứng bệnh vẫn duy trì ở mức cao gấp 1,8 và 1,6 lần so với lô sinh lý trong 1 và 2 tuần tiếp theo ($p < 0,01$).

Lô atorvastatin 10 mg/kg có nồng độ cholesterol toàn phần giảm 32,2% sau 01 tuần điều trị, thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với chuột chứng bệnh ($p < 0,05$). Trong tuần điều trị tiếp theo, mức giảm cholesterol toàn phần còn 13,3% không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Nồng độ cholesterol toàn phần ở lô chuột uống cao TRI liều 45 mg/kg sau 01 và 02 tuần điều trị lần lượt giảm 34,7% và 40,5%, giảm có ý nghĩa thống kê so với chuột chứng bệnh (với $p < 0,05$ và $p < 0,01$) và về mức tương đương so với chuột sinh lý ($p > 0,05$). Ở liều 90 mg/kg, cao TRI làm giảm khoảng 3,4 - 15,1% nồng độ cholesterol toàn phần, khác biệt không đáng kể so với lô chứng bệnh ($p > 0,05$).

Cả hai cao TP và cao POL ở hai mức liều thử nghiệm đều không thể hiện tác động hạ cholesterol toàn phần, nồng độ cholesterol toàn phần ở các lô chuột cho uống cao TP liều 50, 100 mg/kg và cao POL liều 70, 140 mg/kg đều khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với chuột chứng bệnh cùng thời điểm ($p > 0,05$).

Như vậy, cao TRI thể hiện tác động hạ cholesterol toàn phần trên mô hình chuột nhất gây rối loạn lipid máu ngoại sinh. Cao TP và cao POL không thể hiện tác động này.

Tác động lên nồng độ triglycerid máu

Tình trạng tăng nồng độ LDL-C của lô chứng bệnh so với lô sinh lý ($p < 0,05$) duy trì trong tuần tiếp theo nhưng sau 02 tuần, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Sau 01 tuần điều trị, nồng độ LDL-C ở các lô điều trị bằng atorvastatin 10 mg/kg hoặc các cao thử không khác biệt so với lô chứng bệnh ($p > 0,05$). Sau 2 tuần điều trị, cao TP liều 50, 100 mg/kg và cao POL liều 140 mg/kg làm giảm khoảng 35 - 48% nồng độ LDL-C so với chuột chứng bệnh có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$).

Như vậy, cao TP liều 50 và 100 mg/kg và cao POL liều 140 mg/kg thể hiện tác động hạ nồng độ LDL-C máu sau 02 tuần điều trị trên mô hình chuột nhất gây rối loạn lipid ngoại sinh.

Tác động lên HDL-C

Nhóm chuột uống dung dịch giàu lipid trong 8 tuần có nồng độ HDL-C thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với chuột sinh lý ($p < 0,01$). Trong 01 và 02 tuần tiếp theo, nồng độ HDL-C ở lô chứng bệnh có sự hồi phục dần, thấp hơn không có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý cùng thời điểm ($p > 0,05$). Sau 01 tuần điều trị, các lô chuột được cho uống atorvastatin 10 mg/kg, cao TRI 45 mg/kg, cao POL 70 mg/kg hoặc cao POL 140 mg/kg có nồng độ HDL-C tăng cao có ý nghĩa thống kê so với chuột chứng bệnh ($p < 0,05$). Sau 2 tuần điều trị, nồng độ HDL-C giữa các lô chuột khác biệt nhau không đáng kể, ngoại trừ lô atorvastatin có HDL-C cao hơn có ý nghĩa thống kê so với chuột chứng bệnh lẫn chuột sinh lý ($p < 0,05$).

Như vậy, cao TRI liều 45 mg/kg, cao POL liều 70 và 140 mg/kg làm tăng HDL-C sau 01 tuần điều trị trên mô hình chuột nhất gây rối loạn lipid ngoại sinh. Cao TP không thể hiện tác động tăng HDL-C ở cả hai liều thử nghiệm.

3.8.2.5. Tác động kích thích miễn dịch***Thông số bạch cầu của chuột trước thử nghiệm***

So với chỉ số ở chuột bình thường được tham khảo theo tài liệu của Suckow M.A., Danneman P., Brayton C. (2001), The laboratory mouse, CRC Press Inc., USA, tổng số lượng bạch cầu trong khoảng 3,0-14,2 ($10^9/L$), chuột phù hợp sử dụng cho thử nghiệm khảo sát khả năng kích thích miễn dịch trên mô hình chuột nhất gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid.

Tác động lên trọng lượng cơ thể chuột

Tại cùng thời điểm khảo sát, trọng lượng cơ thể chuột giữa các lô cho uống cao thử khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ($p > 0,05$), trừ lô cao TRI liều 45 mg/kg ngày 4 thấp hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$). Như vậy, việc cho chuột uống cao thử thể hiện tác động không rõ trên trọng lượng cơ thể chuột suy miễn dịch bằng cyclophosphamid.

Tác động lên trọng lượng tương đối của gan, lách, tuyến ức, tuyến thượng thận

So với chuột ở lô sinh lý, trọng lượng tương đối của lách và tuyến ức của chuột ở lô chứng bệnh thấp hơn lần lượt 3,77 lần và 3,45 lần ($p < 0,01$). Điều này chứng tỏ cyclophosphamid tiêm phúc mạc liều 150 mg/kg vào ngày 1 đã gây tổn thương các cơ quan miễn dịch chính của chuột thử nghiệm. Sau 5 ngày tiêm cyclophosphamid, trọng lượng gan, tuyến thượng thận chưa bị ảnh hưởng ($p > 0,05$ so với lô sinh lý).

Khi cho chuột filgrastim 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, so với lô chứng bệnh, trọng lượng gan tăng 12,8% ($p < 0,01$) và trọng lượng lách tăng 68,6%, có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$); trọng lượng tuyến ức tăng 12,2% nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tuy nhiên, trọng lượng tương đối của lách và tuyến ức ở lô đối chiếu chưa trở về mức sinh lý bình thường ($p < 0,05$).

Ở các lô điều trị cho uống cao TP 50 mg/kg và 100 mg/kg, cao TRI 45 mg/kg và 90 mg/kg, cao POL 70 mg/kg và 140 mg/kg, trọng lượng các cơ quan miễn dịch chính của chuột thay đổi không đáng kể so với lô chứng bệnh ($p > 0,05$).

Như vậy, việc cho chuột uống các cao thử không thể hiện tác động trên trọng lượng tương đối của các cơ quan miễn dịch chuột gây suy miễn dịch bằng cyclophosphamid.

Tác động lên số lượng và công thức bạch cầu

Ở lô chứng bệnh, tổng số lượng bạch cầu giảm 11,2 lần so với lô sinh lý ($p < 0,01$) kèm theo sự giảm có ý nghĩa thống kê số lượng bạch cầu trung tính (7,1 lần), bạch cầu lympho (11,0 lần), bạch cầu đơn nhân (16,5 lần) ($p < 0,01$). Điều này chứng tỏ việc tiêm phúc mạc cyclophosphamid liều 150 mg/kg đã gây suy giảm miễn dịch trên chuột nhất thành công.

Khi tiêm phúc mạc filgrastim cho chuột nhất với liều 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ giúp tăng tổng số lượng bạch cầu, số lượng bạch cầu trung tính, bạch cầu lympho, bạch cầu đơn nhân so với lô chứng bệnh, với tỷ lệ tăng lần lượt là 154,0%; 158,1%; 112,0%; 445,7% ($p < 0,05$).

Khi cho chuột điều trị với các cao thử, lô uống cao TP liều 50 mg/kg làm tăng số lượng bạch cầu lympho 48,1%, và lô cao POL liều 140 mg/kg làm tăng tổng số lượng bạch cầu 229,0%, số lượng bạch cầu lympho 142,3%, số lượng bạch cầu đơn nhân

842,9%, có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$). Ở các lô điều trị còn lại, số lượng và tỷ lệ bạch cầu thay đổi không đáng kể so với lô chứng bệnh ($p > 0,05$).

Như vậy, việc cho chuột uống cao thử POL liều 140 mg/kg thể hiện tác động kích thích miễn dịch giúp làm tăng tổng số lượng bạch cầu, số lượng bạch cầu lympho, bạch cầu mono trên chuột nhất gây suy miễn dịch bằng cyclophosphamid; các cao thử còn lại không thể hiện tác động này.

3.8.3. Theo dõi, đánh giá độ ổn định của chế phẩm

Mẫu được bảo quản trong tủ vi khí hậu trong vòng 6 tháng, điều kiện nhiệt độ $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, độ ẩm $75\% \pm 5\%$.

3.8.3.1. Cao Linh chi giàu triterpenoid:

Bảng 3.13. Độ ổn định lão hóa cấp tốc của cao Linh chi giàu triterpenoid

Chỉ tiêu thử	Tiêu chuẩn chấp nhận	Thời điểm		
		T = 0	T = 3	T = 6
Cảm quan	Sản phẩm có màu vàng nâu. Dạng bột mịn, khô, không vón cục, không có tạp chất	Đạt	Đạt	Đạt
Định tính	Dương tính	Đúng		
Mất khối lượng do làm khô	Không quá 5,0%	Đạt (2,12%)	Đạt (2,14%)	Đạt (2,22%)
Tro tổng	Không quá 5%	Đạt (3,21%)		
Giới hạn kim loại nặng				
<i>Chì</i>	Không phát hiện	Đạt		
<i>Cadimi</i>	Không phát hiện	Đạt		
<i>Thủy ngân</i>	Không phát hiện	Đạt		
<i>Asen</i>	Không phát hiện	Đạt		

Chỉ tiêu thử	Tiêu chuẩn chấp nhận	Thời điểm		
		T = 0	T = 3	T = 6
Hàm lượng triterpenoid	Không ít 1,5 % tính trên chế phẩm khan	Đạt (2,22%)	Đạt (2,16%)	Đạt (2,06%)
Giới hạn nhiễm khuẩn				
<i>Tổng số vi sinh vật hiếu khí</i>	Không lớn hơn 10000 cfu/g hoặc ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Tổng số nấm men nấm mốc</i>	Không lớn hơn 100 cfu/g hoặc ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Enterobacteriaceae</i>	Không lớn hơn 500 cfu/g hoặc ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Không có trong 1 g hoặc 1 ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Staphylococcus aureus</i>	Không có trong 1 g hoặc 1 ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Định lượng Escherichia coli</i>	Không có trong 1 g hoặc 1 ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Salmonella spp.</i>	Không có trong 10 g hoặc 10 ml	Đạt	Đạt	Đạt

Nhận xét: Hàm lượng triterpen thay đổi không đáng kể trong quá trình đánh giá lão hóa cấp tốc, kết quả cho thấy cao tương đối ổn định với điều kiện khảo sát ở nhiệt độ $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $75\% \pm 5\%$.

3.8.3.2. Cao Linh chi toàn phần

Bảng 3.14. Độ ổn định cao toàn phần Linh chi

Chỉ tiêu thử	Tiêu chuẩn chấp nhận	Thời điểm		
		T = 0	T = 3	T = 6
Cảm quan	Sản phẩm có màu vàng nâu. Dạng bột	Đạt	Đạt	Đạt

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Chỉ tiêu thử	Tiêu chuẩn chấp nhận	Thời điểm		
		T = 0	T = 3	T = 6
	mịn, khô, không vón cục, không có tạp chất			
Định tính	Dương tính	Đúng		
Mất khối lượng do làm khô	Không quá 5,0 %	Đạt (3,53%)	Đạt (3,55%)	Đạt (3,60%)
Tro tổng	Không quá 5,0 %	Đạt (3,68%)		
Giới hạn kim loại nặng				
<i>Chì</i>	Không phát hiện	Đạt		
<i>Cadimi</i>	Không phát hiện	Đạt		
<i>Thủy ngân</i>	Không phát hiện	Đạt		
<i>Asen</i>	Không phát hiện	Đạt		
Hàm lượng triterpenoid	Không ít hơn 1,0 % tính trên chế phẩm khan	Đạt (2,12%)	Đạt (2,03%)	Đạt (2,01%)
Hàm lượng polysaccharid	Không ít hơn 1,0 % tính trên chế phẩm khan	Đạt (1,36%)	Đạt (1,20%)	Đạt (1,18%)
Giới hạn nhiễm khuẩn				
<i>Tổng số vi sinh vật hiếu khí</i>	Không lớn hơn 10000 cfu/g hoặc ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Tổng số nấm men nấm mốc</i>	Không lớn hơn 100 cfu/g hoặc ml	Đạt	Đạt	Đạt

Chỉ tiêu thử	Tiêu chuẩn chấp nhận	Thời điểm		
		T = 0	T = 3	T = 6
<i>Enterobacteriaceae</i>	Không lớn hơn 500 cfu/g hoặc ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Không có trong 1 g hoặc 1 ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Staphylococcus aureus</i>	Không có trong 1 g hoặc 1 ml	Đạt	Đạt	Đạt
Định lượng <i>Escherichia coli</i>	Không có trong 1 g hoặc 1 ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Salmonella spp.</i>	Không có trong 10 g hoặc 10 ml	Đạt	Đạt	Đạt

Nhận xét: Hàm lượng triterpen và polysaccharid thay đổi không đáng kể trong quá trình đánh giá lão hóa cấp tốc, kết quả cho thấy cao tương đối ổn định với điều kiện khảo sát ở nhiệt độ $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $75\% \pm 5\%$.

3.8.3.3. Cao Linh chi giàu polysaccharid

Bảng 3.15. Độ ổn định của cao Linh chi giàu polysaccharid

Chỉ tiêu thử	Tiêu chuẩn chấp nhận	Thời điểm		
		T = 0	T = 3	T = 6
Cảm quan	Sản phẩm có màu vàng nâu. Dạng bột mịn, khô, không vón cục, không có tạp chất	Đạt	Đạt	Đạt
Định tính	Dương tính	Đúng		
Mất khối lượng do làm khô	Không quá 5,0 %	Đạt (4,03%)	Đạt (4,13%)	Đạt (4,15%)

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Chỉ tiêu thử	Tiêu chuẩn chấp nhận	Thời điểm		
		T = 0	T = 3	T = 6
Tro tổng	Không quá 5,0 %	Đạt (3,36%)		
Giới hạn kim loại nặng				
<i>Chì</i>	Không phát hiện	Đạt		
<i>Cadimi</i>	Không phát hiện	Đạt		
<i>Thủy ngân</i>	Không phát hiện	Đạt		
<i>Asen</i>	Không phát hiện	Đạt		
Hàm lượng polysaccharid	Không ít hơn 2,0 % tính trên chế phẩm khan	Đạt (2,12%)	Đạt (2,10%)	Đạt (2,07%)
Giới hạn nhiễm khuẩn				
<i>Tổng số vi sinh vật hiếu khí</i>	Không lớn hơn 10000 cfu/g hoặc ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Tổng số nấm men nấm mốc</i>	Không lớn hơn 100 cfu/g hoặc ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Enterobacteriaceae</i>	Không lớn hơn 500 cfu/g hoặc ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Không có trong 1 g hoặc 1 ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Staphylococcus aureus</i>	Không có trong 1 g hoặc 1 ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Định lượng Escherichia coli</i>	Không có trong 1 g hoặc 1 ml	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Salmonella spp.</i>	Không có trong 10 g hoặc 10 ml	Đạt	Đạt	Đạt

Nhận xét: Hàm lượng polysaccharid thay đổi không đáng kể trong quá trình đánh giá lão hóa cấp tốc, kết quả cho thấy cao tương đối ổn định với điều kiện khảo sát ở nhiệt độ $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $75\% \pm 5\%$.

3.8.4. Bào chế và đóng gói cao Linh chi toàn phần giàu hoạt chất, 1.000 lọ x 100 g cao/lọ

Cao mềm Linh chi được đóng lọ từ quy trình điều chế cao toàn phần trước khi phun sấy. Từ 160 kg Linh chi thu được 125 lít cao lỏng toàn phần có tỉ trọng 1,03; cô đặc dưới áp suất giảm về tỉ trọng 1,18; thêm mật ong và chất bảo quản để có được 105 lít cao mềm có tỉ trọng 1,22.

Tiến hành đóng lọ 50 mg thu được 2100 lọ.



3.9. Nghiên cứu quy trình bào chế nang mềm Linh chi bào chế từ cao Linh chi toàn phần giàu hoạt chất quy mô 10.000 nang/mẻ

3.9.1. Nghiên cứu xây dựng công thức nang mềm Linh chi

Dựa trên thực tế phát triển công thức tại công ty Medisun, sử dụng cao khô giàu triterpenoid làm nguyên liệu sản xuất viên nang mềm Linh chi

Nhóm nghiên cứu đề xuất thành phần vỏ nang và dịch thuốc như sau:

Vỏ nang		Dịch nhân	
Thành phần	Thành phần	Thành phần	Khối lượng
Gelatin 200BL Grain	Cao khô Linh chi (1)		80 mg
Sorbitol liquid	White Beeswax (2)		16.8 mg
Glycerin	Palm Oil (3)		150 mg
Methyl Paraben (Nipagin)	Lecithin (4)		40 mg

Vỏ nang	Dịch nhân	
Thành phần	Thành phần	Khối lượng
Propyl Paraben (Nipazol)	Methyl Paraben (5)	0,2 mg
Vanilline	Sorbitan Oleate (PSS) (6)	8 mg
Titan Dioxide	Soybean oil (7)	135 mg
Black Iron Oxide		
Ponceau 4R		
Kali Sorbate (Potassium Sorbate)		
Red Iron Oxide		
Acid Citric		
Glycine		

Bào chế dịch nhân:

Quy trình tiến hành như sau:

B1: Tiến hành trộn thành phần (2) và (3), gia nhiệt đến khi tan hoàn toàn thu được dung dịch (A)

B2: Tiến hành trộn các thành phần (4), (5), (6) và 250 g thành phần (7), khuấy đều đến khi hỗn hợp phân tán đều (B)

B3: Cho (A) vào (B) khuấy đều. Tiếp tục cho cao khô Linh chi vào, khuấy đều thu được hỗn hợp (C)

B4: Xay hỗn hợp (C) với thành phần (7) còn lại.

Nhận xét: Thử chất tương đối đồng đều và ổn định, trong thời gian 24h, không có sự tách lớp. Dùng quy trình này để bào chế dịch nang mềm

Bào chế dịch vỏ nang:

- Hòa tan các paraben, glycerin và sorbitol trong nước nóng trên 80 °C.
- Ngâm trương nở gelatin trong dung dịch thu được trong thời gian thích hợp rồi đun cách thủy và khuấy hòa tan.
- Loại bọt khí trong dịch vỏ nang trong điều kiện hút chân không duy trì áp suất – 0,6 đến – 0,4 Mpa

- Ủ dịch dịch gelatin ở nhiệt độ thích hợp đến trong.

Bào chế vỏ nang: Nhúng khuôn ngậ dịch vỏ nang kết hợp xoay để vỏ nang bám đều lên bề mặt khuôn, nhấc khuôn ra. Làm đông đặc vỏ nang ở nhiệt độ thích hợp sau đó bóc vỏ nang ra khỏi khuôn.

Đóng thuốc vào nang: Dùng bơm tiêm hút và bơm dịch thuốc vào đầy vỏ nang rồi hàn kín viên nang bằng máy hàn nang thủ công.

Làm khô viên nang: Viên được làm khô ở nhiệt độ 21 - 24 °C, độ ẩm 25 - 30 % đến khi độ ẩm vỏ viên nang đạt 9 – 14 %.

Các thông số kỹ thuật trong quá trình bào chế viên nang mềm như thời gian ngâm trương nở, nhiệt độ và thời gian hòa tan gelatin, nhiệt độ và thời gian ủ dịch vỏ nang, nhiệt độ làm đông đặc và hàn kín vỏ nang, thời gian sấy khô nang được xác định thông qua nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của các thông số này đến đặc tính của dịch vỏ nang, màng vỏ nang và viên nang mềm bào chế được.

3.9.1.1. Ảnh hưởng của thời gian ngâm trong trương nở gelatin

Tiến hành ngâm trương nở gelatin trong các khoảng thời gian 15 phút, 30 phút và 45 phút. Cố định nhiệt độ hòa tan và ủ dịch vỏ nang sau hòa tan là 60°C. Kết quả đánh giá được trình bày theo bảng sau:

Tiêu chí	Mẫu dịch và màng vỏ tạo thành		
	15 phút	30 phút	45 phút
Thời gian hòa tan gelatin (h)	2,45	2,30	2,22
Thời gian ủ để dịch trong (h)	14	14	14
Độ nhớt (cP)	158,0 ± 1,2	151,0 ± 1,4	150 ± 1,1
Độ bền gel (g)	318,4 ± 0,1	321,3 ± 0,1	323,8 ± 0,1
Độ dày màng (mm)	0,34 ± 0,04	0,37 ± 0,03	0,37 ± 0,05
Thời gian hòa tan màng (phút)	38,1 ± 0,6	40,2 ± 0,4	39,1 ± 0,5
Lực kéo đứt (N)	6,5 ± 0,4	9,7 ± 0,3	9,9 ± 0,3

Kết quả nghiên cứu cho thấy thời gian ngâm trương nở gelatin có ảnh hưởng tới đặc tính dịch vỏ nang và màng vỏ nang. Khi tăng thời gian ngâm trương nở gelatin, độ bền gel của dịch vỏ nang và lực kéo đứt có xu hướng tăng trong khi độ nhớt dịch vỏ gelatin, thời gian hòa tan gelatin và thời gian để dịch hết bọt lại có xu hướng giảm. Đặc tính của các mẫu dịch và màng vỏ nang thời gian 30 phút và thời gian 45 phút khác nhau không đáng kể nhưng có thời gian để dịch trong ngắn hơn, lực kéo đứt lớn

hơn so với mẫu thời gian 30 phút. Trên cơ sở kết quả nghiên cứu thu được, thời gian ngâm trương nở gelatin trong khoảng 30 - 45 phút được lựa chọn.

3.9.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ hòa tan gelatin

Tiến hành ngâm trương nở gelatin trong 30 phút. Khảo sát nhiệt độ hòa tan gelatin là 60 °C, 70 °C, 80 °C. Cố định nhiệt độ ủ dịch vỏ nang sau hòa tan là 60 °C. Kết quả đánh giá một số đặc tính của dịch vỏ nang và màng vỏ nang được trình bày ở bảng dưới.

Kết quả nghiên cứu còn cho thấy khi tăng nhiệt độ hòa tan gelatin từ 60 °C lên 70 °C và 80 °C, thời gian cần thiết để hòa tan vỏ nang giảm tương ứng từ 2,5 giờ xuống 1,5 và 1,15 giờ; thời gian cần để ủ dịch vỏ nang đến trong cũng giảm tương ứng từ 14 giờ xuống 12 và 11 giờ.

Tiêu chí	Mẫu dịch và màng vỏ tạo thành		
	60 °C	70 °C	80 °C
Thời gian hòa tan màng (phút)	40,1 ± 0,3	39,4 ± 0,4	30,1 ± 0,3
Độ dày màng (mm)	0,37 ± 0,03	0,38 ± 0,05	0,37 ± 0,02
Lực kéo đứt (N)	9,8 ± 0,2	9,9 ± 0,3	7,9 ± 0,2

Kết quả thể hiện trong bảng cho thấy:

Khi tăng nhiệt độ hòa tan gelatin lên đến 80 °C, độ nhớt, độ bền gel của dịch vỏ nang giảm xuống. Ngoài ra, nhiệt độ hòa tan gelatin tăng lên không ảnh hưởng nhiều đến độ dày màng vỏ nang nhưng đều có xu hướng làm giảm thời gian hòa tan cũng như lực kéo đứt vỏ nang. Sự thay đổi đặc tính của dịch và màng vỏ nang có thể liên quan đến khả năng gelatin bị thủy phân một phần ở nhiệt độ cao. Từ kết quả nghiên cứu thu được, nhiệt độ hòa tan gelatin được chọn trong khoảng 60 - 70 °C với thời gian hòa tan tương ứng là 1,5 – 2 giờ.

3.9.1.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ ủ dịch gelatin

Tiến hành ngâm trương nở gelatin trong 30 phút. Nhiệt độ hòa tan gelatin 70 °C, thời gian hòa tan gelatin 1,5 giờ. Khảo sát nhiệt độ ủ dịch vỏ nang sau hòa tan là 55 °C, 60 °C và 65 °C. Kết quả đánh giá dịch vỏ nang và màng vỏ nang được trình bày trong bảng sau:

Tiêu chí	Mẫu dịch và màng vỏ tạo thành		
	55 °C	60 °C	65 °C
Thời gian ủ đến dịch trong (giờ)	16	12	9
Độ nhớt (cP)	181,3 ± 1,3	150,3 ± 1,4	140,1 ± 1,5
Độ bền gel (g)	325,3 ± 0,2	322,4 ± 0,2	315,2 ± 0,2
Độ dày màng (mm)	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,40 ± 0,04
Thời gian hòa tan (phút)	40,3 ± 1,2	39,0 ± 0,8	33,7 ± 2,6
Lực kéo đứt (N)	11,6 ± 0,4	11,2 ± 0,2	6,2 ± 0,4

Nhận thấy nhiệt độ ủ dịch vỏ gelatin có ảnh hưởng tới đặc tính của dịch vỏ nang và màng vỏ nang. Khi nhiệt độ ủ dịch vỏ tăng, các chỉ tiêu chất lượng của dịch và màng vỏ nang đều có xu hướng giảm. Mẫu ở nhiệt độ 65 °C có sự giảm mạnh chỉ tiêu lực kéo đứt và độ nhớt, đồng thời độ đồng đều bề dày màng giảm đi nhiều so với hai mẫu còn lại. Không có sự quá khác biệt về độ bền gel dịch vỏ, thời gian hòa tan và lực kéo đứt màng vỏ nang giữa hai mẫu ủ ở nhiệt độ 55 °C và 60 °C. Trên cơ sở phân tích trên, nhiệt độ ủ dịch vỏ nang thích hợp là 55 – 60 °C với thời gian ủ dịch gelatin tương ứng là 12 – 16 giờ.

3.9.1.4. Đánh giá tương tác giữa vỏ và dịch đóng nang.

Bào chế viên nang mềm với công thức vỏ nang và thông số kỹ thuật đã lựa chọn. Khảo sát nhiệt độ làm đông đặc vỏ nang ở nhiệt độ 18 - 20 °C và 2 - 8 °C. Đánh giá khả năng hàn kín vỏ nang ở các nhiệt độ 40, 41 và 42 °C. Kết quả được trình bày ở bảng dưới:

Nhiệt độ hàn vỏ	Nhiệt độ đông đặc vỏ nang		
	2 - 8 °C	18 - 20 °C	
	Ban đầu	Ban đầu	Sau 2 tuần
40 °C	-	+	Viên kín, không rò dịch
41 °C	-	+	Viên kín, không bị rò dịch
42 °C	±	-	

Ghi chú:

(+): Viên được hàn kín, không bị rò rỉ dịch khi bóp nhẹ viên và làm khô

(±): Vỏ nang hàn dính được nhưng bị rò rỉ dịch khi bóp nhẹ và làm khô.

(-): Không hàn dính được vỏ nang

Kết quả khảo sát cho thấy:

Mẫu vỏ nang làm đông đặc ở điều kiện 2 – 8 °C: Khi hàn kín vỏ nang ở nhiệt độ 40 – 41 °C vỏ nang không chảy lỏng nên không hàn được viên. Ở nhiệt độ hàn 42 °C, mép hàn kết dính được vỏ nang với nhau nhưng viên bị rò rỉ dịch khi bóp nhẹ và làm khô.

Mẫu vỏ nang làm đông đặc ở điều kiện 18 – 20 °C: Với nhiệt độ hàn vỏ nang 40 °C có thể hàn kín viên, đảm bảo viên không bị rò rỉ dịch sau làm khô hoặc bóp nhẹ nhưng khó cắt viên khỏi vị trí hàn. Ở nhiệt độ hàn 41 °C, có thể hàn được viên, viên không bị rò rỉ dịch sau làm khô, mép hàn vẫn kín khi bóp nhẹ viên. Ở nhiệt độ hàn 42 °C, vỏ nang chảy lỏng nhanh nên không hàn kín được.

Từ kết quả nghiên cứu thu được, nhiệt độ đông đặc và nhiệt độ hàn kín vỏ nang được chọn lần lượt là 18 – 20 °C và 40 – 41 °C.

Thời gian làm khô nang

Bào chế viên nang mềm theo theo các thông số kỹ thuật đã chọn ở trên. Khảo sát các khoảng thời gian làm khô 16 giờ, 20 giờ, 24 giờ và 28 giờ. Kết quả đánh giá độ ẩm của viên sau làm khô ở khoảng thời gian khác nhau thể hiện trong bảng sau:
Bảng: Độ ẩm của viên nang bào chế sau khi làm khô ở các khoảng thời gian khác nhau (n= 3, TB ± SD)

Thời gian làm khô nang (giờ)	Độ ẩm (%)
16 giờ	14,0 ± 0,4
20 giờ	9,0 ± 0,7
24 giờ	7,3 ± 0,6
28 giờ	5,8 ± 0,2

Kết quả nghiên cứu chứng tỏ để độ ẩm viên nang đạt yêu cầu 9 - 14 %, cần làm khô trong thời gian 16 – 20 giờ.

Tiến hành thực hiện trên lô 30.000 nang Linh chi /lô

Tiến hành trên 3 lô thực nghiệm



Tiến hành thực hiện 3 lô: 2020NC01 –2020 NC02 –2020NC03

3.9.2. Xây dựng, thẩm định TCCS cho viên nang mềm Linh chi

3.9.2.1. Nghiên cứu phương pháp định tính, định lượng một số hoạt chất chính trong chế phẩm

3.9.2.2. Xây dựng TCCS

Công ty Cổ phần Dược phẩm Medisun
Viên nang mềm Linstata

**TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG
VIÊN NANG MỀM LINSTATA**

I- YÊU CẦU KỸ THUẬT

1.1. Công thức điều chế cho 1 viên nang mềm:

STT		1 viên
I.	MEDICIN:	
1	Cao khô Linh chi	80 mg
2	White Beeswax	16.8 mg
3	Palm Oil	150 mg
4	Lecithin	40 mg
5	Methyl Paraben	0.2 mg
6	Sorbitan Oleate (PSS)	8 mg
7	Soybean oil	135 mg
	Tổng:	450 mg
II.	GELMASS:	
1	Gelatin 200BL GRAIN	
2	Sorbitol liquid	
3	Glycerin	
4	Methyl Paraben (Nipagin)	
5	Propyl Paraben (Nipazol)	
6	Vanilline	
7	Titan Dioxide	
8	Black Iron Oxide	
9	Ponceau 4R	
10	Kali Sorbate (Potassium Sorbate)	
11	Red Iron Oxide	
12	Acid Citric	
13	Glycine	

Công ty Cổ phần Dược phẩm Medisun
Viên nang mềm Linstata

1.2. Tiêu chuẩn nguyên liệu:

STT	Nguyên liệu	Tiêu chuẩn
1	Cao khô Linh chi	TCCS
2	White Beeswax	NSX
3	Palm Oil	NSX
4	Lecithin	NSX
5	Methyl Paraben	NSX
6	Sorbitan Oleate (PSS)	NSX
7	Soybean oil	NSX

II- YÊU CẦU KỸ THUẬT

2.1. Tính chất: Viên nang mềm màu nâu đỏ, không có mùi ôi mốc. Bên trong chứa dịch thuốc màu nâu

2.2. Khối lượng trung bình dịch thuốc trong nang : 450 mg ± 7,5 %

2.3. Kim loại nặng:

Chì: Không quá 3,0 ppm

Cadmi: Không quá 1,0 ppm

Thủy ngân: Không quá 0,1 ppm

2.4. Độ rã: Không quá 30 phút.

2.5. Định tính: Chế phẩm phải thể hiện các phép thử định tính của acid ganoderic A.

2.7. Định lượng: Hàm lượng Acid ganoderic A(C₁₈H₂₀O₅) trong mỗi đơn vị chế phẩm không ít hơn 0,18 mg.

2.8. Độ nhiễm khuẩn: Giới hạn độ nhiễm khuẩn:

Stt	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức tối đa
1	Tổng số VSVHK	CFU/g	10000
2	Coliforms	CFU/g	10
3	Cl.perfringens	CFU/g	10
4	Tổng số bào tử nấm men nấm mốc	CFU/g	100

Công ty Cổ phần Dược phẩm Medisun
Viên nang mềm Linstata

III- PHƯƠNG PHÁP THỬ

3.1. Tính chất: Thử bằng cảm quan chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu

3.2. Độ đồng đều khối lượng: Thử theo ĐĐVN V, phụ lục 11.3

3.3. Kim loại nặng: phương pháp AAS

3.3.1. Chì:

- Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 5,0 g mẫu thử cho vào một chén sứ. Nung ở nhiệt độ không quá 450 °C tới khi không còn carbon, làm nguội. Bằng cách này mà tro chưa loại được hết carbon thì dùng một ít nước nóng cho vào khối chất đã than hóa, dùng đũa thủy tinh khuấy đều, rửa đũa thủy tinh, đem bốc hơi đến khô rồi nung ở nhiệt độ không quá 450 °C đến khi tro hóa hoàn toàn. Để nguội. Hòa tan tro trong 2,5 ml dung dịch HNO₃, đun nóng, chuyển vào bình định mức 25 ml, rửa cốc bằng 5 ml nước nóng, 3 lần. Gộp các dịch rửa vào bình định mức, để về nhiệt độ phòng rồi thêm nước vừa đủ 25 ml. Lọc lấy dịch trong được dung dịch thử.
- Mẫu chuẩn: Từ dung dịch chì chuẩn gốc 1000 ppm, pha các dung dịch chuẩn có nồng độ tăng dần từ 0,1 ppm – 2 ppm (ít nhất 3 nồng độ) trong dung dịch HNO₃ 1 %.
- Mẫu trắng: Dung dịch HNO₃ 1 %.
- Tiến hành:
 - Theo phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử, dùng ngọn lửa acetylen - không khí, đèn cathod rỗng chì.
 - Đo độ hấp thụ của dung dịch thử, các dung dịch chuẩn và mẫu trắng ở cực đại 283,3 nm, dùng dung dịch mẫu trắng để hiệu chỉnh điểm 0 của máy.
 - Vẽ đường biểu diễn sự phụ thuộc giữa độ hấp thụ với nồng độ chì trong các dung dịch chuẩn và xác định hàm lượng của chì trong chế phẩm thử.

3.3.2. Cadmi:

- Mẫu thử: Dung dịch mẫu thử trong phần xác định chì.
- Mẫu chuẩn: Từ dung dịch chuẩn cadmi gốc 1000 ppm, pha các dung dịch chuẩn có nồng độ tăng dần từ 0,1 ppm – 0,8 ppm (ít nhất 3 nồng độ) trong dung dịch HNO₃ 1 %.
- Mẫu trắng: Dung dịch HNO₃ 1 %.
- Tiến hành:
 - Theo phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử, dùng ngọn lửa acetylen - không khí, đèn cathod rỗng cadmi.
 - Đo độ hấp thụ của dung dịch thử, các dung dịch chuẩn và mẫu trắng ở cực đại 228,8 nm, dùng dung dịch mẫu trắng để hiệu chỉnh điểm 0 của máy.
 - Vẽ đường biểu diễn sự phụ thuộc giữa độ hấp thụ với nồng độ cadmi trong các dung dịch chuẩn và xác định hàm lượng của chì trong chế phẩm thử.

Công ty Cổ phần Dược phẩm Medisun
Viên nang mềm Linstata

3.3.3. Thủy ngân:

- Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 5,0 g mẫu thử cho vào bình polytetraflouroethylen, thêm 6 ml HNO₃, 4 ml HCl, đậy kín. Sấy ở 70 °C trong 4h. Để nguội. Chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức 50 ml, tráng rửa bình phá mẫu bằng 10 ml nước, 3 lần. Gộp các dịch rửa vào bình định mức, thêm nước vừa đủ 50 ml. Lọc lấy dịch trong. Hút chính xác 25 ml dịch lọc tiến hành thực hiện phản ứng xác định hàm lượng thủy ngân.
- Mẫu chuẩn: Từ dung dịch thủy ngân chuẩn gốc 1000 ppm, pha dung dịch chuẩn có nồng độ 50 ppb, lấy chính xác 1 ml – 8 ml (tương ứng 50 ppb – 300 ppb) thực hiện phản ứng .
- Mẫu trắng: Xử lý như mẫu thử nhưng không có mẫu thử.
- Chuẩn bị các dung dịch:
 - Dung dịch H₂SO₄ 1,0 N
 - Dung dịch thiếc clorid: Hòa tan 10 g SnCl₂.2HCl trong 20 ml HCl, thêm nước vừa đủ 100 ml
- Tiến hành:
 - Theo phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử, dùng bộ hóa hơi lạnh đối với thủy ngân, đèn cathod rỗng thủy ngân.
 - Thực hiện phản ứng: Lấy chính xác 25 ml dung dịch mẫu trắng, thêm khoảng 200 ml dung dịch H₂SO₄ 1,0 N, thêm nhanh 7 ml dung dịch thiếc clorid, đậy kín bình phản ứng. Thực hiện tương tự với các mẫu chuẩn và thử.
 - Đo độ hấp thụ của dung dịch thử, các dung dịch chuẩn và mẫu trắng ở cực đại 253,7 nm, dùng dung dịch mẫu trắng để hiệu chỉnh điểm 0 của máy.
 - Vẽ đường biểu diễn sự phụ thuộc giữa độ hấp thụ với nồng độ thủy ngân trong các dung dịch chuẩn và xác định hàm lượng của thủy ngân trong chế phẩm thử.

3.4. Độ rã: Thử theo ĐVN V, phụ lục 11.6

3.5. Định tính

Trong phần định lượng, sắc ký đồ của dung dịch thử phải cho pic có cùng thời gian lưu với thời gian lưu của pic Acid ganoderic A trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

3.7. Định lượng

Phương pháp HPLC, phụ lục 5.3, ĐVN V.

Hóa chất và thuốc thử:

- Acetonitril dùng cho sắc ký lỏng.
- Methanol (TT).

Công ty Cổ phần Dược phẩm Medisun
Viên nang mềm Linstata

- Acid phosphoric (TT)

Điều kiện sắc ký:

- Cột Phenomenex Gemini C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), hoặc cột tương đương.
- Nhiệt độ cột: 30°C
- Pha động: Dung dịch acid phosphoric 0,078 % - acetonitril (60:40) (điều chỉnh tỷ lệ nếu cần).
- Tốc độ dòng: 0,8 ml/phút.
- Detector UV ở bước sóng 257 nm.
- Thể tích tiêm: 20 µl

Chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch chuẩn:

+ *Dung dịch thử*: Cân chính xác khoảng 1g chế phẩm cho vào định mức 50 ml, thêm 20 ml methanol, siêu âm 30 phút, lắc đều trong vòng 30 phút, để nguội, điền đến vạch. Lọc qua màng lọc Millipore 0,45 µm.

+ *Dung dịch đối chiếu acid ganoderic A*: cân 4,0 mg acid ganoderic A cho vào bình định mức 50 ml, hòa tan trong khoảng 20 ml methanol, sau đó thêm methanol vừa đến vạch, lắc đều. Hút 1,0 ml dung dịch vào bình định mức 10 ml, thêm methanol vừa đủ đến vạch. Lọc qua màng lọc Millipore 0,45 µm.

Tiến hành:

Tiêm riêng biệt 20 µl mỗi dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào máy sắc ký. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu, ghi lại thời gian lưu, diện tích của pic Acid ganoderic A.

Dựa vào diện tích pic trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn và dung dịch thử, lượng cân chất chuẩn và mẫu thử, hàm lượng chất chuẩn, nồng độ pha loãng, tính hàm lượng của Acid ganoderic A có trong chế phẩm.

7. Độ nhiễm khuẩn: Thử theo phụ lục 13.6, Dược điển Việt Nam V.

TP Hồ Chí Minh, ngày tháng năm 2019
TỔNG GIÁM ĐỐC

3.9.3. Theo dõi, đánh giá độ ổn định của chế phẩm

3.9.3.1. Đánh giá độ ổn định của chế phẩm bằng phương pháp lão hóa cấp tốc

Bảng 3.16. Báo cáo độ ổn định viên nang mềm Linh chi

Chỉ tiêu thử	Tiêu chuẩn chấp nhận	Thời điểm (tháng)		
		T = 0	T = 3	T = 6
Tính chất	Viên nang mềm màu nâu đỏ, không có mùi ôi mốc. Bên trong chứa dịch thuốc màu nâu	Đạt	Đạt	Đạt
Khối lượng trung bình dịch thuốc trong nang	450 mg ± 7,5%	Đạt (P = 450,2 mg)	Đạt (P = 451,8 mg)	Đạt (P = 451,1 mg)
Độ rã	Không quá 30 phút	Đạt (12 phút)	Đạt (P = 13 phút)	Đạt (13 phút)
Định tính HPLC	<i>Acid ganoderic A</i>	Đúng	Đúng	Đúng
Định lượng <i>Acid ganoderic A</i>	Không ít hơn 0,18 mg C ₁₈ H ₂₀ O ₅ tính theo KLTB dịch thuốc trong nang	Đạt (0,24 mg)	Đạt (0,22 mg)	Đạt (0,20 mg)
Giới hạn nhiễm khuẩn	Theo TCCS	Đạt	Đạt	Đạt
Tổng số vi sinh vật hiếu khí	Không quá 10000 cfu/g	Đạt (20 cfu/g)	Đạt (20 cfu/g)	Đạt (20 cfu/g)
Tổng số bào tử nấm men nấm mốc	Không quá 100 cfu/g	Đạt (< 10 cfu/g)	Đạt (< 10 cfu/g)	Đạt (< 10 cfu/g)

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Chỉ tiêu thử	Tiêu chuẩn chấp nhận	Thời điểm (tháng)		
		T = 0	T = 3	T = 6
<i>Coliforms</i>	Không quá 10 cfu/g	Đạt (10 cfu/g)	Đạt (10 cfu/g)	Đạt (10 cfu/g)
<i>Cl.perfringens</i>	Không quá 10 cfu/g	Đạt (Không phát hiện)	Đạt (Không phát hiện)	Đạt (Không phát hiện)
Kim loại nặng	Không quá 38,0%	Đạt (3,53%)		
<i>Chì</i>	Không quá 3,0 ppm	Đạt (Không phát hiện, LOD = 0,345 ppm)		
<i>Cadimi</i>	Không quá 1,0 ppm	Đạt (Không phát hiện, LOD = 0,017 ppm)		
<i>Thủy ngân</i>	Không quá 0,1 ppm	Đạt (Không phát hiện, LOD = 0,003 ppm)		

Kết luận: Viên nang mềm Linh chi ổn định trong vòng 6 tháng trong điều kiện lão hóa cấp tốc nhiệt độ $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $75\% \pm 5\%$.

3.9.3.2. Theo dõi độ ổn định của chế phẩm ở điều kiện thường

Chỉ tiêu thử	Tiêu chuẩn chấp nhận	Thời điểm		
		T = 0	T = 3	T = 6
Tính chất	Viên nang mềm màu nâu đỏ, không có mùi	Đạt	Đạt	Đạt

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Chỉ tiêu thử	Tiêu chuẩn chấp nhận	Thời điểm		
		T = 0	T = 3	T = 6
	ôi mốc. Bên trong chứa dịch thuốc màu nâu			
Khối lượng trung bình dịch thuốc trong nang	450 mg ± 7,5%	Đạt (P = 450,2 mg)	Đạt (P = 451,2 mg)	Đạt (P = 450,8 mg)
Độ rã	Không quá 30 phút	Đạt (12 phút)	Đạt (P = 14 phút)	Đạt (13 phút)
Định tính <i>HPLC</i>	<i>Acid ganoderic A</i>	Đúng	Đúng	Đúng
Định lượng <i>Acid ganoderic A</i>	Không ít hơn 0,18 mg C ₁₈ H ₂₀ O ₅ tính theo KLTB dịch thuốc trong nang	Đạt (0,24 mg)	Đạt (0,23 mg)	Đạt (0,23 mg)
Giới hạn nhiễm khuẩn	Theo TCCS	Đạt	Đạt	Đạt
<i>Tổng số vi sinh vật hiếu khí</i>	Không quá 10000 cfu/g	Đạt (20 cfu/g)	Đạt (20 cfu/g)	Đạt (20 cfu/g)
<i>Tổng số bào tử nấm men nấm mốc</i>	Không quá 100 cfu/g	Đạt (< 10 cfu/g)	Đạt (< 10 cfu/g)	Đạt (< 10 cfu/g)
<i>Coliforms</i>	Không quá 10 cfu/g	Đạt (10 cfu/g)	Đạt (10 cfu/g)	Đạt (10 cfu/g)
<i>Cl.perfringens</i>	Không quá 10 cfu/g	Đạt (Không phát hiện)	Đạt (Không phát hiện)	Đạt (Không phát hiện)

Chỉ tiêu thử	Tiêu chuẩn chấp nhận	Thời điểm		
		T = 0	T = 3	T = 6
Kim loại nặng	Không quá 38,0%	Đạt (3,53%)		
<i>Chi</i>	Không quá 3,0 ppm	Đạt (Không phát hiện, LOD = 0,345 ppm)		
<i>Cadimi</i>	Không quá 1,0 ppm	Đạt (Không phát hiện, LOD = 0,017 ppm)		
<i>Thủy ngân</i>	Không quá 0,1 ppm	Đạt (Không phát hiện, LOD = 0,003 ppm)		

Kết luận: Viên nang mềm Linh chi ổn định trong vòng 06 tháng trong điều kiện theo dõi ở nhiệt độ thường nhiệt độ $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $75\% \pm 5\%$.

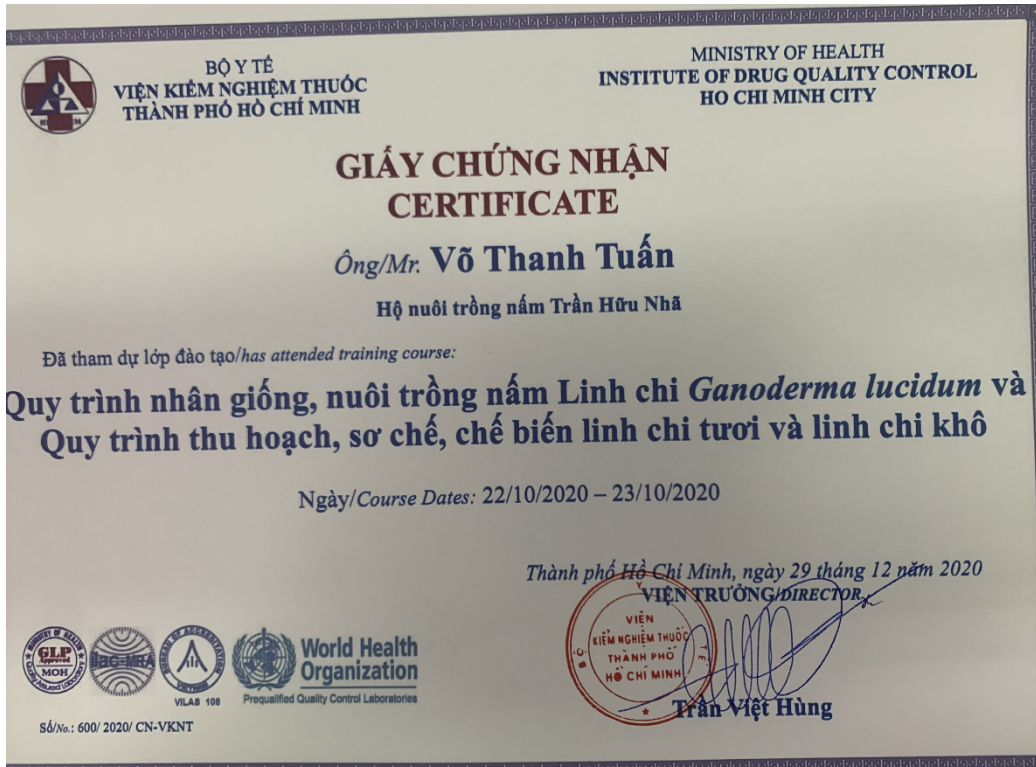
3.10. Hợp tác với doanh nghiệp xây dựng cơ sở sản xuất các sản phẩm linh chi, đầu tư dây chuyền công nghệ bào chế; chuyển giao sản phẩm

3.10.1. Chuyển giao công nghệ nhân giống, nuôi trồng và bào chế các sản phẩm từ nấm Linh chi Tây Nguyên; Ký kết các hợp đồng chuyển giao công nghệ nhân giống, nuôi trồng và bào chế các sản phẩm từ nấm Linh chi Tây Nguyên.

- Đã ký kết hợp đồng chuyển giao công nghệ nhân giống, nuôi trồng cho Hộ kinh doanh cá thể Trần Hữu Nhã – Phú Giáo, Bình Dương
- Đã ký kết hợp đồng chuyển giao công nghệ nuôi trồng cho Công ty cổ phần phát triển Dược liệu Gia Lai
- Đã ký kết phân phối sản phẩm nấm Linh chi trồng giàu polysaccharid, Linh chi trong giàu Triterpenoid cho công ty cổ phần Nam Dược

- Đã ký kết phân phối Cao mềm Linh chi, Viên nang mềm Linstata cho công ty Cổ phần Truyền thông Tinh Hoa Đất Việt
- Đã ký kết phân phối các sản phẩm rượu cho công ty rượu Tiêu Dao và công ty rượu bia nước giải khát Quang Minh

3.10.2. Đào tạo cán bộ chuyển giao công nghệ nhân giống, nuôi trồng và bảo chế các sản phẩm từ nấm Linh chi Tây Nguyên

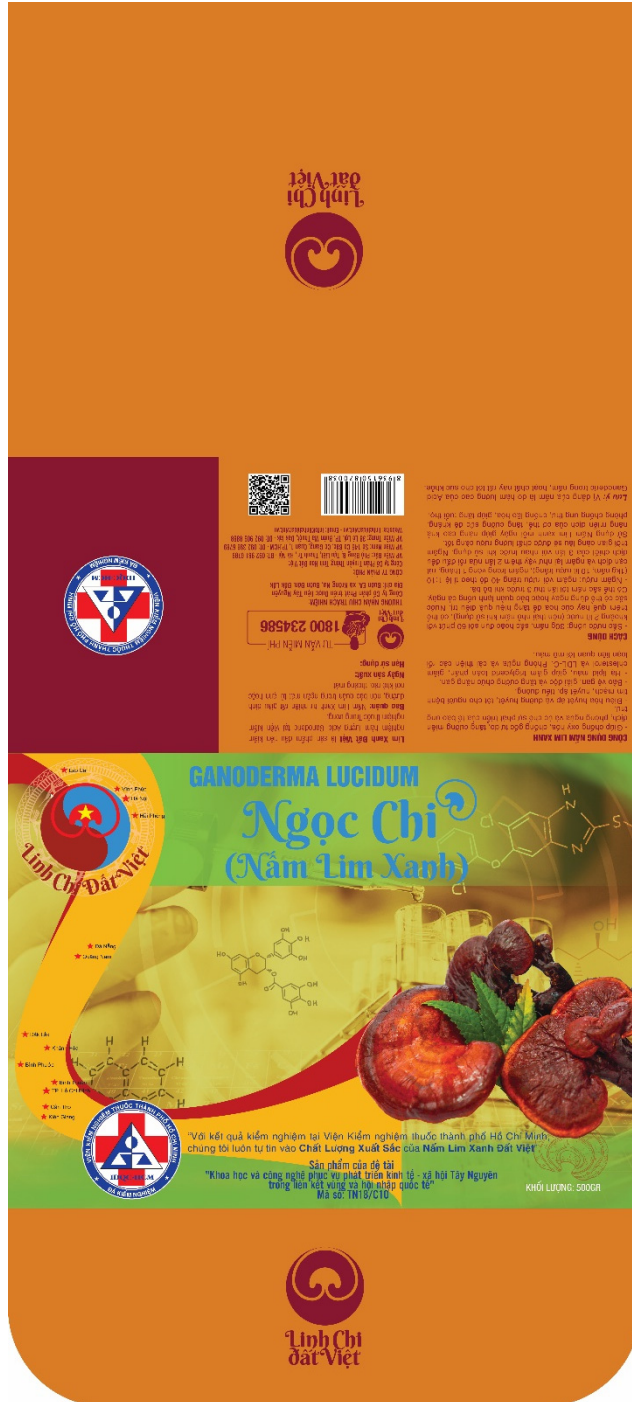


- Mở lớp đào tạo được hơn 30 lượt cán bộ về quy trình nhân giống, nuôi trồng nấm Linh chi *Ganoderma lucidum* và quy trình thu hoạch, sơ chế, chế biến Linh chi tươi và khô
- Đào tạo trực tiếp về quy trình nhân giống, nuôi trồng nấm Linh chi *Ganoderma lucidum* tại hộ nuôi trồng nấm Trần Hữu Nhã với 05 nhân sự
- Đào tạo trực tiếp về quy trình nhân giống, nuôi trồng nấm Linh chi *Ganoderma lucidum* tại Công ty Cổ phần phát triển Dược liệu Gia Lai với 10 nhân sự

3.11. Đăng ký lưu hành sản phẩm

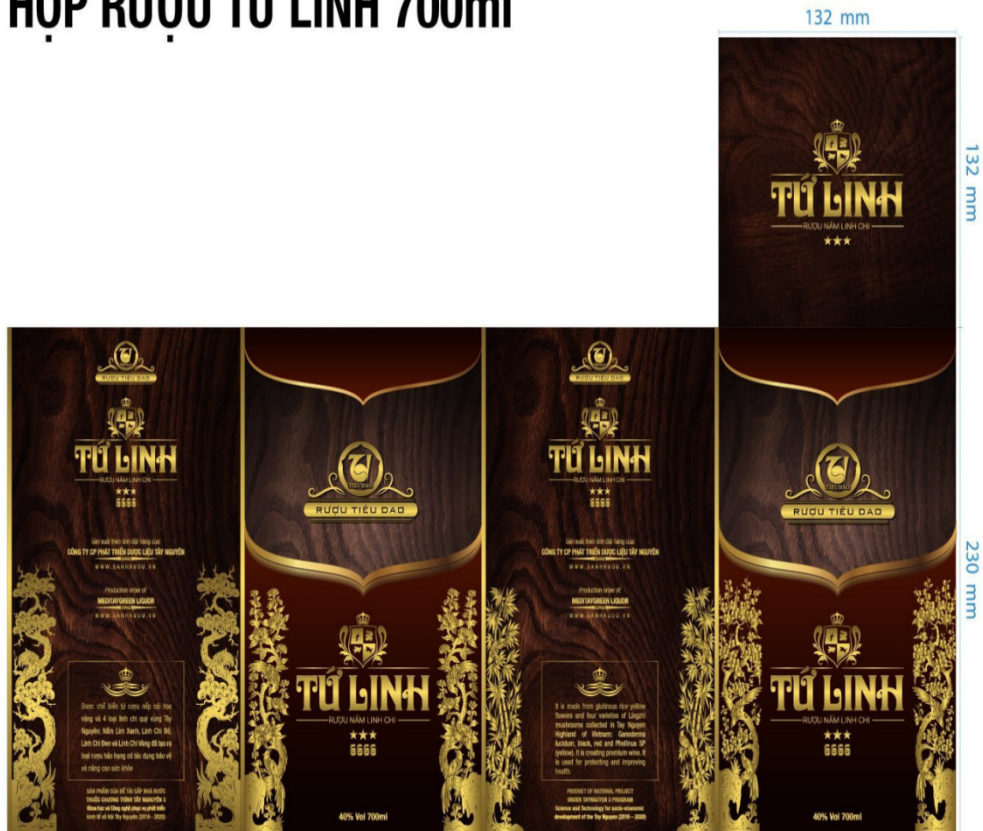
3.11.1. Thiết kế bao bì nhãn mác cho các sản phẩm

3.11.1.1. *Nấm Linh chi Tây Nguyên khô đạt TCCS*



3.11.1.2. Rượu Linh chi Tây Nguyên

HỘP RƯỢU TỬ LINH 700ml



CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU



3.11.1.3. Cao Linh chi Tây Nguyên



Linh Chi Đất Việt

- ☞ Bồi bổ sức khỏe, chống lão hóa
- ☞ Điều hòa đường huyết, ổn định đường huyết cho bệnh nhân tiểu đường tuýp 2
- ☞ Ổn định huyết áp
- ☞ Hỗ trợ điều trị bệnh ung thư

**CAO MỀM LINH CHI
LINSTATA**



Số lô:
NSX :
HD :

CÔNG DỤNG
Bồi bổ sức khỏe, chống lão hóa. Điều hòa đường huyết, ổn định đường huyết cho bệnh nhân tiểu đường tuýp II. Ổn định huyết áp. Hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

ĐỐI TƯỢNG
- Trẻ em từ 5 tuổi trở lên và người trưởng thành trong các trường hợp:
Người điều trị tiểu đường tuýp II.
Người bệnh cao huyết áp.
Người suy nhược cơ thể.
Người đang điều trị bệnh ung thư.

HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG
1 thìa cà phê pha loãng với 50 ml nước ấm. Ngày uống 2 - 3 lần.

BẢO QUẢN
Nơi khô, tránh ánh sáng, nhiệt độ dưới 30 độ C

Tiêu chuẩn chất lượng: TCCS
Số công bố:

3.11.1.4. Viên nang mềm Linh chi



Kích thước vỉ: 110x65mm



Kích thước hộp 2 vỉ (dài x rộng x cao): 115 x 70 x 25 mm

3.11.2. Đăng ký nhãn hiệu sản phẩm và xây dựng hồ sơ công bố thực phẩm chức năng (TPCN) hoặc hồ sơ đăng ký thuốc cho các sản phẩm đã nêu

Có hồ sơ đính kèm.

3.12. Đăng ký bản quyền thương hiệu Nấm Linh chi của Tây Nguyên

3.12.1. Chuyển giao, hợp tác với doanh nghiệp tại Tây Nguyên phát triển các nhãn hiệu của sản phẩm từ Linh chi Tây Nguyên trong đó có 4 loại sản phẩm của đề tài (Linh chi, rượu Linh chi, cao Linh chi, nang mềm Linh chi), bảo hộ nhãn hiệu sản phẩm;



Hanoi Head Office
3rd Fl., 97-99 Lang Ha Bldg., Lang Ha St.,
Dong Da Dist., Hanoi, Vietnam
Tel: (+84) 24 6666 6886

HCM Branch
Room 1401B, 14th Fl., Centec Tower, 72-74 Nguyen Thi
Minh Khai Str., Dist.3, Ho Chi Minh City, Vietnam
Tel: (+84) 28 2226 8068

Số hồ sơ: IP/IC2099

Ngày 05 tháng 03 năm 2021

CÔNG TY CỔ PHẦN TRUYỀN THÔNG TINH HOA ĐẤT VIỆT
Số 5, ngách 74/20, ngõ 155, đường Trường Chinh, Phường Phương Liệt,
Quận Thanh Xuân, Thành phố Hà Nội


GỬI EMAIL
Số trang: 09

V/v: Tư vấn đăng ký nhãn hiệu & quyền tác giả tại Việt Nam.

Kính gửi Anh Hùng,

Như đã trao đổi với Anh tại cuộc họp ngày 4/3/2021, chúng tôi đã tổng hợp để gửi lại Anh & Quý Công ty danh sách các đơn ĐKNH cần thực hiện như sau:

1. NHÃN HIỆU NỘP ĐƠN NGAY, KHÔNG TRA CỨU

STT	Nhãn hiệu	Nhóm sản phẩm/dịch vụ	Tài liệu cần bổ sung/Lưu ý	Chủ sở hữu
1.	 Tinh hoa đất Việt	<ul style="list-style-type: none"> - Nhóm thứ nhất: Mỹ phẩm; chế phẩm mỹ phẩm dùng để chăm sóc da; nước rửa tay (không dùng cho mục đích y tế); nước rửa bát; chất tẩy rửa (trừ loại dùng trong hoạt động sản xuất và dùng cho mục đích y tế) (05 sản phẩm) - Nhóm thứ hai: Dược phẩm; thuốc đông dược; nấm linh chi, dùng cho mục đích y tế; thực phẩm chức năng có mục đích y tế; thực phẩm chức năng làm từ nấm linh chi có mục đích y tế; chất bổ sung ăn kiêng dạng bột làm từ nấm linh chi; cao nấm linh chi; đồ uống được ngâm chiết từ nấm linh chi, dùng cho mục đích y tế; rượu thuốc dùng cho mục đích y tế; dung dịch sát khuẩn dùng cho mục đích y tế; nước rửa tay có mục đích y tế; trà có chứa nấm linh chi dùng cho mục đích y tế. (12 sản phẩm) - Nhóm thứ ba: Nấm linh chi, nấm mối đã cắt lát, sơ chế, bảo quản (không dùng cho mục đích y tế); nấm linh chi, nấm mối khô đã qua chế biến; nấm đông trùng hạ thảo. (03 sản phẩm) 	<ul style="list-style-type: none"> - File ảnh rõ nét dạng đen trắng (âm bản); - Bỏ phần chữ TIEUDAO trong phần logo đi vì sẽ bị coi là tương tự gây nhầm lẫn với nhãn hiệu "TIÊU DAO" đã được bảo hộ theo đăng ký số 249021 dưới tên Công ty TNHH Tiêu Dao. 	<p>Công ty Cổ phần Truyền thông Tinh Hoa Đất Việt Số 5, ngách 74/20, Ngõ 155, đường Trường Chinh, Phường Phương Liệt, Quận Thanh Xuân, Thành phố Hà Nội, Việt Nam.</p>

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU



Hanoi Head Office
3rd Flr., 97-99 Lang Ha Bldg., Lang Ha St.,
Dong Da Dist., Hanoi, Vietnam
Tel: (+84) 24 6666 6886

HCM Branch
Room 1401B, 14th Flr., Centec Tower, 72-74 Nguyen Thi
Minh Khai Str., Dist.3, Ho Chi Minh City, Vietnam
Tel: (+84) 28 2226 8068

		<ul style="list-style-type: none"> - Nhóm thứ tư: Trà; cà phê; ca cao; đồ uống trên cơ sở trà, cà phê, cacao. <i>(04 sản phẩm)</i> - Nhóm thứ năm: Rượu; rượu thuốc không có mục đích y tế; đồ uống có cồn. <i>(03 sản phẩm)</i> - Nhóm thứ sáu: Mua bán, xuất nhập khẩu, đại lý giới thiệu sản phẩm các sản phẩm mỹ phẩm, chế phẩm mỹ phẩm dùng để chăm sóc da, nước rửa tay, nước rửa bát, chất tẩy rửa (trừ loại dùng trong hoạt động sản xuất và dùng cho mục đích y tế), dược phẩm, thuốc đông dược, nấm linh chi, dùng cho mục đích y tế, thực phẩm chức năng có mục đích y tế, thực phẩm chức năng làm từ nấm linh chi có mục đích y tế, chất bổ sung ăn kiêng dạng bột làm từ nấm linh chi, cao nấm linh chi, đồ uống được ngâm chiết từ nấm linh chi, dùng cho mục đích y tế, rượu thuốc dùng cho mục đích y tế, dung dịch sát khuẩn dùng cho mục đích y tế, trà có chứa nấm linh chi dùng cho mục đích y tế, nấm linh chi, nấm mối đã cất lát, sơ chế, bảo quản (không dùng cho mục đích y tế), nấm linh chi, nấm mối khô đã qua chế biến, nấm đông trùng hạ thảo, trà, cà phê, ca cao, đồ uống trên cơ sở trà, cà phê, cacao, rượu, rượu thuốc không có mục đích y tế, đồ uống có cồn, quần áo, mũ nón, giày dép, phụ kiện quần áo, phụ kiện mũ nón, phụ kiện giày dép. <i>(03 dịch vụ)</i> 		<p>Công ty Cổ phần Truyền thông Tinh Hoa Đất Việt Số 5, ngách 74/20, Ngõ 155, đường Trường Chinh, Phường Phương Liệt, Quận Thanh Xuân, Thành phố Hà Nội, Việt Nam.</p>
2.			<p>File ảnh rõ nét dạng đen trắng (âm bản).</p>	<p>Trần Việt Hùng Số nhà 155/74/20 đường Trường Chinh, phường Phương Liệt, quận Thanh Xuân, Thành phố Hà Nội, Việt Nam.</p>
3		<ul style="list-style-type: none"> - Thêm chấm Hoàng Sa, Trường Sa; - Đăng ký nhãn hiệu màu. 		<p>Trần Việt Hùng Số nhà 155/74/20 đường Trường Chinh, phường Phương Liệt, quận Thanh Xuân, Thành phố Hà Nội, Việt Nam.</p>



Hanoi Head Office
3rd Fl., 97-99 Lang Ha Bldg., Lang Ha St.,
Dong Da Dist., Hanoi, Vietnam
Tel: (+84) 24 6666 6886

HCM Branch
Room 1401B, 14th Fl., Centec Tower, 72-74 Nguyen Thi
Minh Khai Str., Dist.3, Ho Chi Minh City, Vietnam
Tel: (+84) 28 2226 8068

		- Nhóm thứ tám: Dịch vụ chăm sóc sức khỏe; dịch vụ spa; dịch vụ mát-xa; dịch vụ thẩm mỹ. (04 dịch vụ)		
--	--	--	--	--

2. NHÃN HIỆU TRA CỨU TRƯỚC KHI NỘP ĐƠN



STT	Nhãn hiệu	Nhóm sản phẩm/dịch vụ	Tài liệu cần bổ sung	Chủ sở hữu
4.		<ul style="list-style-type: none"> - Nhóm thứ nhất: Mỹ phẩm; chế phẩm mỹ phẩm dùng để chăm sóc da; nước rửa tay; nước rửa bát; chất tẩy rửa (trừ loại dùng trong hoạt động sản xuất và dùng cho mục đích y tế) (05 sản phẩm) - Nhóm thứ hai: Dược phẩm; thuốc đông dược; nấm linh chi, dùng cho mục đích y tế; thực phẩm chức năng có mục đích y tế; thực phẩm chức năng làm từ nấm linh chi có mục đích y tế; chất bổ sung ăn kiêng dạng bột làm từ nấm linh chi; cao nấm linh chi; đồ uống được ngâm chiết từ nấm linh chi, dùng cho mục đích y tế; rượu thuốc dùng cho mục đích y tế; dung dịch sát khuẩn dùng cho mục đích y tế; nước rửa tay có mục đích y tế; trà có chứa nấm linh chi dùng cho mục đích y tế. (12 sản phẩm) - Nhóm thứ ba: Nấm linh chi, nấm mối đã cắt lát, sơ chế, bảo quản (không dùng cho mục đích y tế); nấm linh chi, nấm mối khô đã qua chế biến; nấm đông trùng hạ thảo. (03 sản phẩm) - Nhóm thứ tư: Trà; cà phê; ca cao; đồ uống trên cơ sở trà, cà phê, cacao. (04 sản phẩm) - Nhóm thứ năm: Rượu; rượu thuốc không có mục đích y tế; đồ uống có cồn. (03 sản phẩm) - Nhóm thứ sáu: Mua bán, xuất nhập khẩu, đại lý giới thiệu sản phẩm các sản phẩm mỹ phẩm, chế phẩm mỹ phẩm dùng để chăm sóc 	<ul style="list-style-type: none"> - File ảnh rõ nét dạng đen trắng (âm bản). 	<p>Công ty Cổ phần Truyền thông Tinh Hoa Đất Việt. Số 5, ngách 74/20, Ngõ 155, đường Trường Chinh, Phường Phương Liệt, Quận Thanh Xuân, Thành phố Hà Nội, Việt Nam.</p>



LAW FIRM & IP AGENT
VIETTHINK
ALWAYS THINK FOR YOU

Hanoi Head Office
3rd Fl., 97-99 Lang Ha Bldg., Lang Ha St.,
Dong Da Dist., Hanoi, Vietnam
Tel: (+84) 24 6666 6886

HCM Branch
Room 1401B, 14th Fl., Centec Tower, 72-74 Nguyen Thi
Minh Khai Str., Dist.3, Ho Chi Minh City, Vietnam
Tel: (+84) 28 2226 8068

		<p>da, nước rửa tay, nước rửa bát, chất tẩy rửa (trừ loại dùng trong hoạt động sản xuất và dùng cho mục đích y tế), dược phẩm, thuốc đông dược, nấm linh chi, dùng cho mục đích y tế, thực phẩm chức năng có mục đích y tế, thực phẩm chức năng làm từ nấm linh chi có mục đích y tế, chất bổ sung ăn kiêng dạng bột làm từ nấm linh chi, cao nấm linh chi, đồ uống được ngâm chiết từ nấm linh chi, dùng cho mục đích y tế, rượu thuốc dùng cho mục đích y tế, dung dịch sát khuẩn dùng cho mục đích y tế, nước rửa tay có mục đích y tế, trà có chứa nấm linh chi dùng cho mục đích y tế, nấm linh chi, nấm mối đã cắt lát, sơ chế, bảo quản (không dùng cho mục đích y tế), nấm linh chi, nấm mối khô đã qua chế biến, nấm đông trùng hạ thảo, trà, cà phê, ca cao, đồ uống trên cơ sở trà, cà phê, cacao, rượu, rượu thuốc không có mục đích y tế, đồ uống có cồn. (03 dịch vụ)</p> <p>- Nhóm thứ bảy: Dịch vụ cung cấp thực phẩm và đồ uống (do nhà hàng thực hiện); dịch vụ quán cà phê; quán giải khát; dịch vụ nhà hàng ăn uống do nhà hàng thực hiện (04 dịch vụ)</p> <p>- Nhóm thứ tám: Dịch vụ chăm sóc sức khỏe; dịch vụ spa; dịch vụ mát-xa; dịch vụ thẩm mỹ. (04 dịch vụ)</p>		
5.		<p>- Nhóm thứ nhất: Dược phẩm; đông dược; đồ uống y tế; đồ uống được ngâm chiết từ nấm linh chi, dùng cho mục đích y tế; đồ uống được ngâm chiết từ lá cây hoặc thảo mộc, dùng cho mục đích y tế; thực phẩm chức năng làm từ nấm linh chi có mục đích y tế. (06 sản phẩm)</p>	Sửa lại nhãn hiệu: - Chính lại màu nền là màu đơn sắc. - Thiết kế logo Linh chi đất Việt to hơn để nhìn rõ hơn;	<p>Trần Việt Hùng Số nhà 155/74/20 đường Trường Chinh, phường Phương Liệt, quận Thanh Xuân, Thành</p>
6.				


7.		- Nhóm thứ hai: Đồ uống tăng lực; đồ uống không cồn có hương vị chiết xuất nấm linh chi, không dùng cho mục đích y tế; đồ uống không cồn giải khát; nước giải khát. (04 sản phẩm)	- Xem lại thiết kế tượng Phật.	phố Hà Nội, Việt Nam.
8.		- Nhóm thứ nhất: Dược phẩm; trà có chứa nấm linh chi dùng cho mục đích y tế; đồ uống y tế; đồ uống được ngâm chiết từ lá cây hoặc thảo mộc, dùng cho mục đích y tế; đồ uống được ngâm chiết từ nấm linh chi, dùng cho mục đích y tế; thực phẩm chức năng làm từ nấm linh chi có mục đích y tế (06 sản phẩm).	Bỏ phần logo “Linh Chi Đất Việt” ra khỏi mẫu nhãn hiệu vì chủ sở hữu nhãn hiệu này là “Công ty CP truyền thông Tinh hoa Đất Việt”.	Công ty Cổ phần Truyền thông Tinh Hoa Đất Việt. Số 5, ngách 74/20, Ngõ 155, đường Trường Chinh, Phường Phương Liệt, Quận Thanh Xuân, Thành phố Hà Nội, Việt Nam
9.		- Nhóm thứ hai: Trà có thành phần là nấm linh chi, không dùng cho mục đích y tế; trà linh chi túi lọc (không dùng cho mục đích y tế); trà linh chi hòa tan (không dùng cho mục đích y tế); đồ uống được ngâm chiết từ lá cây hoặc thảo mộc, không dùng cho mục đích y tế. (04 sản phẩm).	Thực hiện chuyển nhượng nhãn hiệu “LINSTATA” theo đăng ký số 281589 từ “Công ty CP KHCN ANVY” sang Công ty CP Truyền thông Tinh hoa đất Việt vì nhãn Công ty CP truyền thông Tinh hoa đất Việt đã nộp đơn đăng ký nhãn hiệu LINSTATA theo đơn số 4-2019-26283.	Công ty Cổ phần Truyền thông Tinh Hoa Đất Việt. Số 5, ngách 74/20, Ngõ 155, đường Trường Chinh, Phường Phương Liệt, Quận Thanh Xuân, Thành phố Hà Nội, Việt Nam
10.		- Nhóm thứ nhất: Rượu thuốc dùng cho mục đích y tế; rượu thảo dược (thực phẩm chức năng); đồ uống y tế; đồ uống được ngâm chiết từ lá cây hoặc thảo mộc, dùng cho mục đích y tế; đồ uống được ngâm chiết từ nấm linh chi,	- Chuyển lại thiết kế thành chữ & hình đen trên nền trắng;	Trần Việt Hùng Số nhà 155/74/20 đường Trường Chinh, phường Phương Liệt, quận Thanh
11.			- Thêm thiết kế HOÀNG BẢO LINH.	

3.12.2. Cùng doanh nghiệp xây dựng chiến lược truyền thông Marketing cho các sản phẩm nêu trên bao gồm: tổ chức hội thảo, xây dựng phim tài liệu, chương trình TVC quảng cáo truyền hình và các phương tiện truyền thông báo, đài, website....


- Nấm linh chi - Món quà của thiên nhiên Lần 1: 21h ngày 03/03/2021 Phát lại lần 2: 6h.15 ngày 8/03/2021 Trên kênh VTV2 - Đài Truyền hình Việt Nam và xem trên các ứng dụng Truyền hình số: vtv.vn; vtvgo, onme, svtv và trang fanpage VTV2 chất lượng cuộc sống, kênh Youtube VTV2 của đài Truyền hình Việt Nam.
- Nấm linh chi - tập 2 Lần 1: 21h ngày 31/03/2021 Phát lại lần 2: 6h.15 ngày 05/4/2021 Trên kênh VTV2 - Đài Truyền hình Việt Nam và xem trên các ứng dụng Truyền hình số: vtv.vn; vtvgo, onme, svtv và trang fanpage VTV2 chất lượng cuộc sống, kênh Youtube VTV2 của đài Truyền hình Việt Nam.

3.12.3. Đăng ký bảo hộ thương hiệu nấm Linh chi Tây Nguyên bao gồm chỉ dẫn địa lý

CÔNG BÁO SỞ HỮU CÔNG NGHIỆP SỐ 398 TẬP A - QUYỂN 3 (05.2021)


(210) 4-2021-09746	(220) 19.03.2021
(540)	(441) 25.05.2021
	(531) A11.1.6; 26.1.1; 5.3.20; 8.7.3 (591) Trắng, đỏ, cam đậm, cam nhạt. (731) MAI TIẾN PHƯƠNG (VN) 26 tổ 13 Finom, xã Hiệp Thạnh, huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng

(511) Nhóm 43: Dịch vụ quán ăn tự phục vụ; dịch vụ quán cà phê; dịch vụ cung cấp thức ăn, đồ uống do nhà hàng thực hiện; dịch vụ nhà hàng ăn uống; dịch vụ căng tin.

(210) 4-2021-09747	(220) 19.03.2021
(540)	(441) 25.05.2021
	(591) Trắng, xanh nước biển. (731) CÔNG TY TNHH SẢN XUẤT THƯƠNG MẠI PHÁT TRIỂN HÂN THỊNH (VN) 403/28/33 đường Tân Chánh Hiệp 10, phường Tân Chánh Hiệp, quận 12, thành phố Hồ Chí Minh

(511) Nhóm 03: Mặt nạ làm đẹp; mỹ phẩm; bộ mỹ phẩm; đồ trang điểm (mỹ phẩm); khăn giấy được tẩm, thấm ướt nước thơm mỹ phẩm; giấy tẩm chế phẩm tẩy trang.

Nhóm 16: Khăn giấy dùng để tẩy trang; giấy vệ sinh; khăn lau bằng giấy.

(210) 4-2021-09749	(220) 19.03.2021
(540)	(441) 25.05.2021
	(531) 26.1.1; A5.11.5 (731) TRẦN VIỆT HÙNG (VN) Số nhà 155/74/20 đường Trường Chinh, phường Phương Liệt, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội (740) Công ty Luật TNHH VIETTHINK (VIETTHINK LAW FIRM)

(511) Nhóm 03: Mỹ phẩm; chế phẩm mỹ phẩm dùng để chăm sóc da; nước rửa tay (không dùng cho mục đích y tế); nước rửa bát; chất tẩy rửa (trừ loại dùng trong hoạt động sản xuất và dùng cho mục đích y tế).

Nhóm 05: Dược phẩm; thuốc đông dược; nấm linh chi dùng cho mục đích y tế; thực phẩm chức năng có mục đích y tế; thực phẩm chức năng làm từ nấm linh chi có mục đích y tế;

CÔNG BÁO SỞ HỮU CÔNG NGHIỆP SỐ 398 TẬP A - QUYỂN 3 (05.2021)

chất bổ sung ăn kiêng dạng bột làm từ nấm linh chi; cao nấm linh chi [dùng cho mục đích y tế]; đồ uống được ngâm chiết từ nấm linh chi, dùng cho mục đích y tế; rượu thuốc dùng cho mục đích y tế; dung dịch sát khuẩn dùng cho mục đích y tế; nước rửa tay có mục đích y tế; trà có chứa nấm linh chi dùng cho mục đích y tế.

Nhóm 29: Nấm linh chi, nấm mối đã cất lát, sơ chế, bảo quản (không dùng cho mục đích y tế); nấm linh chi, nấm mối khô đã qua chế biến (không dùng cho mục đích y tế); nấm đông trùng hạ thảo (không dùng cho mục đích y tế).

Nhóm 30: Trà; cà phê; ca cao; đồ uống trên cơ sở trà, cà phê, cacao.

Nhóm 33: Rượu; rượu thuốc không có mục đích y tế; đồ uống có cồn.

Nhóm 35: Mua bán, xuất nhập khẩu, đại lý giới thiệu sản phẩm các sản phẩm mỹ phẩm, chế phẩm mỹ phẩm dùng để chăm sóc da, nước rửa tay, nước rửa bát, chất tẩy rửa (trừ loại dùng trong hoạt động sản xuất và dùng cho mục đích y tế), dược phẩm, thuốc đông dược, nấm linh chi, dùng cho mục đích y tế, thực phẩm chức năng có mục đích y tế, thực phẩm chức năng làm từ nấm linh chi có mục đích y tế, chất bổ sung ăn kiêng dạng bột làm từ nấm linh chi, cao nấm linh chi, đồ uống được ngâm chiết từ nấm linh chi, dùng cho mục đích y tế, rượu thuốc dùng cho mục đích y tế, dung dịch sát khuẩn dùng cho mục đích y tế, nước rửa tay có mục đích y tế, trà có chứa nấm linh chi dùng cho mục đích y tế, nấm linh chi, nấm mối đã cất lát, sơ chế, bảo quản (không dùng cho mục đích y tế), nấm linh chi, nấm mối khô đã qua chế biến, nấm đông trùng hạ thảo, trà, cà phê, ca cao, đồ uống trên cơ sở trà, cà phê, cacao, rượu, rượu thuốc không có mục đích y tế, đồ uống có cồn, quần áo, mũ nón, giày dép, phụ kiện quần áo, phụ kiện mũ nón, phụ kiện giày dép.

Nhóm 43: Dịch vụ cung cấp thực phẩm và đồ uống (do nhà hàng thực hiện); dịch vụ quán cà phê; quán giải khát; dịch vụ nhà hàng ăn uống do nhà hàng thực hiện.

Nhóm 44: Dịch vụ chăm sóc sức khỏe; dịch vụ spa; dịch vụ mát-xa; dịch vụ thẩm mỹ.

(210) **4-2021-09750**

(540)



(220) 19.03.2021

(441) 25.05.2021

(531) A1.1.10; A1.1.2; A26.11.12

(731) TRƯƠNG BÌNH MINH ĐỒNG (VN)
120 Lê Lư, phường Phú Thọ Hòa, quận Tân Phú, thành phố Hồ Chí Minh

(511) Nhóm 25: Quần áo, đồ đi chân, đồ đội đầu, quần áo thời trang.

(210) **4-2021-09751**

(540)

COREPEL

(220) 19.03.2021

(441) 25.05.2021

(731) NGUYỄN THỊ THU THẢO (VN)

Đại Đồng, xã Đại Mạch, huyện Đông Anh, thành phố Hà Nội

(511) Nhóm 19: Vật liệu lát sàn bằng gỗ tự nhiên, gỗ công nghiệp, gỗ ghép kỹ thuật, phào ốp chân tường bằng mdf và bằng gỗ tự nhiên.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Đề tài đã tiến hành thu mẫu, điều tra vùng phân bố nấm Linh chi tại khu vực Tây Nguyên và các vùng lân cận như: Quảng Nam, Huế, Tây Nam Bộ. Tiến hành phân loại được hơn 84 mẫu nấm khác nhau. Qua phiếu khảo sát và thực tế khảo sát nhận thấy thông tin về tác dụng của Linh chi được biết nhiều trong khảo sát là từ sau năm 2000, về tác dụng và cách dùng cũng như giá tiền mua nấm, bán Linh chi có rất nhiều thông tin nhưng tập trung vào một số vấn đề chính: Hàm lượng hoạt chất quyết định giá trị của nấm Linh chi, Linh chi có tác dụng bồi bổ sức khỏe và hỗ trợ điều trị một số bệnh. Về phần thu hái thì thông tin trải rộng theo biên độ khảo sát nhưng tập trung ở các vùng rừng núi thì sẽ có Linh chi. Qua khảo sát, nhận thấy Linh chi lim xanh, Linh chi vàng và Linh chi đỏ là ba loại linh chi được biết đến nhiều nhất và được sử dụng nhiều nhất. Qua thông tin thu được cho thấy, sự nhận biết về Linh chi của người thu hái, người bán và người sử dụng chưa đầy đủ nên có những thông tin khác nhau. Vì vậy, việc thực hiện đề tài sẽ có thông tin đầy đủ và cụ thể hơn giúp người nuôi trồng, người phân phối và người sử dụng nhìn nhận rõ ràng hơn.

4.2. Các mẫu nấm linh chi được định danh tên khoa học dựa trên hình dạng bào tử và dựa vào khóa phân loại Nấm; định danh gen dựa trên việc tách chiết DNA tổng số, chạy PCR và tinh sạch các sản phẩm khuếch đại nhận thấy có tổng cộng 43 loài trong đó có 11 loài thuộc chi *Amauroderma* và 32 loài thuộc chi *Ganoderma*. Kết quả phân tích dựa vào đoạn trình tự ITS1-5,8S-ITS2 cho thấy 43 mẫu nấm họ Ganodermataceae thu thập tại khu vực Tây Nguyên khá đa dạng về mặt di truyền, có sự tương đồng di truyền cao của một số mẫu trong 43 trình tự, hệ số tương đồng cao nhất là 98.86%, còn hệ số thấp nhất là 70.62%; khoảng cách di truyền gần nhất là 0.01 và xa nhất là 0.19. Một số nấm họ Ganodermataceae có chung nguồn gốc, tiến hóa, quan hệ phát sinh. Qua đó cho thấy sự tương đồng về mặt di truyền, nguồn gốc phát sinh của các nấm họ Ganodermataceae nghiên cứu. Những biến động di truyền trong vùng ITS1-5,8S-ITS2 thể hiện sự đa dạng của các mẫu nghiên cứu. Từ đó, xác định được những nguồn gen có năng suất, chất lượng cao phục vụ công tác nhân giống, phát triển và bảo tồn nguồn gen nấm họ Ganodermataceae quý của Việt Nam.

4.3. Nấm linh chi là vị thuốc quý, được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền cũng như y học hiện đại để điều trị và phòng ngừa nhiều chứng bệnh như suy nhược thần kinh, mất ngủ, chán ăn, chóng mặt, viêm gan mạn tính, tăng cholesterol máu, ngộ độc nấm, bệnh tim mạch, tăng huyết áp và ung thư. Nhiều nghiên cứu cho thấy các hoạt chất trong nấm linh chi là polysaccharid, triterpenoid, lectin, steroid và protein. Trong đó, nhóm hợp chất triterpenoid, gồm chủ yếu là các dẫn chất lanostan đã được chứng minh là thành phần chính, mang lại nhiều tác dụng cho dược liệu này như ganoderiol F, ganodermanontriol, acid ganoderic A, B, H, và C1 kháng HIV-1, acid ganoderic A, B, và C hạ cholesterol, ganodermanontriol và ergosterol bảo vệ gan, acid ganoderic C2 và D kháng histamin, lucialdehyd C, acid ganoderic T ức chế khối u, ganoderiol F, ganodermanondiol và ganodermanontriol kháng bổ v.v... Các hợp chất lanostan triterpenoid cũng được sử dụng để làm chất đánh dấu trong xây dựng dấu vân tay hóa học và đánh giá chất lượng của nấm linh chi. Trong đó các hợp chất có hàm lượng lớn là ganodermanontriol, acid ganoderic A, acid ganoderic C2, acid lucidenic E2. Hiện nay trên thị trường có rất nhiều chế phẩm và thực phẩm chức năng với nhiều công dụng khác nhau được bào chế dưới dạng trà tan, viên nén, viên nang, bột, cao chiết được sản xuất từ nấm linh chi. Tuy nhiên, dược liệu thô cũng như các chế phẩm từ nấm linh chi trên thị trường chưa được kiểm soát về hàm lượng nhóm chất hay chất cụ thể nên chất lượng rất khác nhau. Do đó, việc kiểm soát chất lượng của dược liệu cũng như các chế phẩm này bằng các chất đánh dấu là cần thiết. Theo các tài liệu đã công bố, các hợp chất chính mang hoạt tính và được sử dụng làm chất đánh dấu để xây dựng dấu vân tay hóa học và đánh giá chất lượng của nấm linh chi trong nhiều nghiên cứu là các lanostan triterpenoid. Kết quả thu được 3 hợp chất chính là acid lucidenic E2, acid lucidenic N và ganodermanontriol, đều là các lanostan triterpenoid. Trong nghiên cứu đánh giá chất lượng của nấm linh chi và một số loài cùng chi *Ganoderma* tại Việt Nam, PGS. TS. Đỗ Hà và cộng sự thấy rằng đây cũng là các hợp chất có hàm lượng lớn hơn cả trong nấm linh chi, cao nhất là acid lucidenic E2 với hàm lượng trong các mẫu nấm linh chi hoang dại và các mẫu nấm được nuôi trồng tương ứng là 319,47 – 1766,75 $\mu\text{g/g}$ và 258,06 – 481,31 $\mu\text{g/g}$. Hàm lượng tương ứng của acid lucidenic N và ganodermanontriol lần lượt là 275,80 – 884,05 $\mu\text{g/g}$ và 129,31

– 394,10 µg/g; 52,53 – 139,08 µg/g và 50,85 – 208,34 µg/g [23]. Bên cạnh đó, đây còn là các hợp chất mang lại hoạt tính cho dược liệu này. Ganoderatriol được chứng minh là có tác dụng bảo vệ gan và kháng bổ thể, acid lucidenic N có tác dụng kháng ung thư. Như vậy, các hợp chất acid lucidenic E2, acid lucidenic N và ganodermanontriol đều có thể được sử dụng làm chất đánh dấu cho dược liệu nấm linh chi. Hiện nay ở nước ta, tiêu chuẩn đánh giá chất lượng dược liệu nấm linh chi là chuyên luận Linh chi trong Dược điển Việt Nam V chưa đưa xác định chất chuẩn đối chiếu cho dược liệu này. Đề tài đã nghiên cứu, thiết lập chất đối chiếu cho 3 chất trên, góp phần nâng cấp tiêu chuẩn kiểm soát chất lượng dược liệu cũng như các chế phẩm từ nấm linh chi.

4.4. Từ kết quả thực nghiệm cứu tác dụng điều hòa đường huyết, điều hòa lipid, chống oxy hóa, bảo vệ gan nhận thấy loài *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. 1887, loài *Ganoderma capense* (Lloyd) Teng, *Ganoderma croflavum* (Lloyd), *Ganoderma lucidum* (Curtis) P.Karst. 1981, *Ganoderma oroflavum* (Lloyd) C.J.Humphery, *Ganoderma subtornatum* Murrill 1907, *Ganoderma tornatum* (Pers.) Bres. 1912, *Ganoderma* sp3, *Ganoderma* sp4, *Ganoderma* sp6 là những loài tiềm năng và đặc trưng có thể phát triển và bảo tồn ở Tây Nguyên. Dựa trên việc thông dụng và được công bố, công nhận trong Dược điển, nhóm nghiên cứu sẽ tập trung cho dòng *Ganoderma lucidum*.

4.5. Đã xây dựng được quy trình thu giữ bào tử và giống của 10 loài nấm linh chi tiềm năng ở Tây Nguyên. Đồng thời nhóm nghiên cứu đã xây dựng được 10 quy trình nhân giống, tập trung trên 4 loài: ***Ganoderma applanatum***, ***Ganoderma lucidum***, ***Ganoderma tropicum***, ***Ganoderma fonicatum***. Trong đó, quy trình nuôi trồng thực tế và có thể nhân rộng vì bản chất ký sinh nên chỉ tập trung trên loài ***Ganoderma lucidum*** với 2 quy trình nuôi trồng *Ganoderma lucidum* giàu triterpenoid và *Ganoderma lucidum* giàu polysachharid. Đã xây dựng mô hình nuôi trồng tại Buôn Ea- Ma, Xã Krông – Na, huyện Buôn Đôn, tỉnh Đắk Lắk với nhà kính, theo công nghệ tưới hiện đại, tiết kiệm năng lượng.

4.6. Nghiên cứu quy trình thu giữ bào tử, thu nấm Linh chi với công nghệ sấy gió đảo chiều và công nghệ năng lượng mặt trời. Đã đưa ra các tiêu chuẩn cơ sở cho nấm

Linh chi giàu polysaccharid và Linh chi giàu Triterpenoid, với mức chất lượng tập trung vào định lượng polysaccharid tính trên glucose và triterpenoid tính theo acid ganoderic A. Đây là cơ sở để nâng cao chuyên luận này trong Dược điển Việt Nam. Đồng thời với việc kiểm soát các chỉ tiêu an toàn như kim loại nặng,.. sẽ là tiền đề để xuất khẩu các dược liệu này trong tương lai.

4.7. Đã nghiên cứu 3 loại rượu Linh chi trong đó có sự kết hợp giữa nấm Linh chi trồng và nấm Linh chi thu hái tự nhiên. Đồng thời có sử dụng thêm nấm Linh chi Hàn Quốc và nấm thượng hoàng để giảm vị đắng cho nấm Linh chi thu hái tự nhiên. Với việc sử dụng rượu nếp cái hoa vàng tự chưng cất và kiểm soát chất lượng, Rượu Linh chi nghiên cứu được đã đảm bảo độ an toàn cho người sử dụng và hướng đến kiểm soát chất lượng thông qua tiêu chuẩn cơ sở.

4.8. Đã nghiên cứu bào chế cao Linh chi với các phương pháp hiện đại như chiết lỏng siêu tới hạn để thu được cao giàu Triterpenoid. Đây là một nghiên cứu quan trọng trong việc chọn lọc nhóm hoạt chất có dược tính sinh học cao nhằm phát triển các công nghệ bào chế hiện đại sau này.

CHƯƠNG 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

5.1. Kết luận:

Trong khuôn khổ thực hiện đề tài, nhóm nghiên cứu đã đáp ứng được các mục tiêu đề ra.

Mục tiêu 1: Điều tra đánh giá tiềm năng, nghiên cứu khả năng phát triển nguồn gen của một số loài nấm Linh chi (*Ganoderma* spp.) có giá trị của khu vực Tây Nguyên

- Đã thu được mẫu ở 8 vùng Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông, Lâm Đồng, Kon Tum, Quảng Nam, Khánh Hòa, Đồng Nai với tỉ lệ thu mẫu đạt 100% - 140% theo kế hoạch đặt ra. Mẫu thu thập về được phân loại và đánh số thứ tự, bảo quản ở điều kiện phù hợp.
- Đã tiến hành khảo sát 400 phiếu điều tra ở 8 địa phương tiến hành thu mẫu và 1 số vùng lân cận. Qua khảo sát, các thông tin có độ lặp không cao, tùy thuộc vào từng địa phương, từng nội dung khảo sát, Nhóm nghiên cứu đã tổng hợp thông tin theo 4 nhóm chính như: Đặc điểm của nấm Linh chi, điểm khác biệt với nấm rừng khác; về vấn đề khai thác linh chi; về giá cả và nguồn gốc Linh chi; về chất lượng và tác dụng Linh chi
- Tiến hành định danh loài bằng phương pháp vi học và phương pháp định danh gen thu được 43 mẫu nấm thuộc họ Ganodermataceae trong đó có 11 loài thuộc chi *Amauroderma* và 32 loài thuộc chi *Ganoderma*. Đồng thời xây dựng bộ dữ liệu về thông tin sinh thái, hình thái học, bộ ảnh màu của 43 loài nấm Linh chi trên.
- Từ 43 loài định danh, nhóm nghiên cứu khảo sát trên 10 loài được công bố có tác dụng sinh học tốt để tiến hành khảo sát thành phần hóa học, dấu vân tay sắc ký lớp mỏng, sắc ký lỏng và tiến hành đánh giá tác dụng sinh học trên tác dụng bảo vệ gan, hạ đường huyết, hạ lipid huyết và hỗ trợ tăng miễn dịch. Trong đó, các loài Linh Chi mẫu *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma croflavum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma tornatum*, *Ganoderma* sp3 và *Ganoderma* sp6 có hoạt tính trung bình mạnh trong ức chế enzym α -glucosidase *in vitro* và hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase *in vitro*. Trong

khi đó tác động lên sự tiết insulin nội sinh thì *Ganoderma applanatum* có tác dụng vượt trội. Về tác dụng điều hòa miễn dịch thì mẫu *Ganoderma lucidum* thể hiện tác động kích thích miễn dịch trên mô hình chuột nhất gây suy miễn dịch bằng cách tiêm phúc mạc liều duy nhất cyclophosphamid 150 mg/kg và tăng tỷ lệ tế bào sống khoảng 30% ở nồng độ 200 µg/ml khi khảo sát tác động trên tế bào máu ngoại vi. Qua tác dụng sinh học có thể bảo tồn và nhân giống một số loài như *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*.

- Đề tài đã thực hiện được mô hình bảo tồn với diện tích 60.000 m² ở khu vực Buôn Ea-Ma, xã Krông-Na, huyện Buôn Đôn, Đắk Lắk với mô hình dưới tán rừng, có kiểm soát độ ẩm để kích thích sự phát triển của nấm Linh chi

Mục tiêu 2: Nghiên cứu nhân giống, phát triển, ứng dụng tạo ra 4 sản phẩm từ các loài nấm Linh chi (*Ganoderma* spp.) ở khu vực Tây Nguyên

- Qua quá trình điều tra thành phần loài nấm thuộc chi *Ganoderma* tại khu vực Tây Nguyên. Chúng tôi đã xác định đặc điểm sinh học và phân loại, định danh đã xác định tên khoa học của 03 loài nấm thuộc chi *Ganoderma*: *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma fornicatum* bao gồm 09 chủng nấm. Các chủng nấm thuộc chi *Ganoderma* thu được mọc chủ yếu ở sinh cảnh rừng hỗn giao. Phân bố ở độ cao từ 350m đến 1200m, nhiệt độ từ 22 °C đến 25 °C, độ ẩm từ 76 % đến 86 %.
- Đã xây dựng được quy trình nuôi trồng 04 loài nấm thuộc chi *Ganoderma*: *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma fornicatum*, *Ganoderma tropicum* và 1 loài *Amauroderma subresinosum*.
- Xây dựng mô hình nuôi trồng nấm Linh chi Tây Nguyên quy mô tối thiểu 10 tấn/năm tại xã Krông Na, huyện Buôn Đôn, tỉnh Đắk Lắk trên diện tích khoảng 60.000 m², bao gồm nhà xưởng, trang thiết bị, nhân công. Nuôi trồng trên diện tích 4 nhà nuôi trồng với công suất mỗi nhà nuôi trồng từ 280 kg/ nhà trên diện tích 60 m². Tiến hành nuôi 3 đợt trên năm và định hướng nuôi trồng 12 nhà nuôi trồng trên diện tích khoảng 60.000 m² với 2 quy trình trồng Linh chi giàu polysaccharid và Linh chi giàu triterpenoid. Đã đăng ký và đạt chứng chỉ Viet-Gap cho vùng nuôi trồng

-
- Đã xây dựng quy trình điều chế và đăng ký lưu hành 3 sản phẩm rượu theo tiêu chuẩn an toàn thực phẩm là Bảo Linh, Tứ Linh và rượu Linh chi. Đã xây dựng quy trình điều chế và đăng ký lưu hành 01 sản phẩm trà Linh Chi, 01 viên nang mềm và 03 quy trình bào chế cao gồm cao toàn phần, cao giàu triterpenoid và cao giàu polysachharid.

Mục tiêu 3: Chuyển giao công nghệ, phục vụ khai thác, bảo tồn và phát triển một số loài nấm Linh chi (*Ganoderma* spp.) tại Tây Nguyên

- Đã tiến hành ký kết chuyển giao công nghệ nuôi trồng với 2 đơn vị và tiến hành chuyển giao sản phẩm cho 3 đơn vị gồm 1 đơn vị truyền thông, 2 đơn vị sản xuất kinh doanh dược phẩm. Đồng thời tiến hành đào tạo hơn 30 lượt cán bộ về công nghệ nhân giống, giữ giống, nuôi trồng và thu hái bảo quản Linh chi
- Đã tiến hành đăng ký 3 sản phẩm thực phẩm, 01 sản phẩm thực phẩm chức năng, đánh giá Viet-Gap cho 1 mô hình nuôi trồng và tiến hành bảo hộ thương hiệu cho rượu Bảo Linh, rượu Tứ Linh; thương hiệu Linh chi đất việt;
- Đã thực hiện quảng bá sản phẩm và công nghệ nuôi trồng Linh chi trên kênh HTV7, HTV9 và chương trình Chất Việt trên đài truyền hình Việt Nam

5.2. Đề nghị

- Cần tiến hành nghiên cứu phân lập thêm các hoạt chất trên loài *Ganoderma applanatum*
- Cần đa dạng hơn nữa các sản phẩm từ Linh chi nhằm nâng cao giá trị cho Linh chi Việt Nam
- Cần đánh giá sâu rộng hơn về việc trồng trọt Linh chi ở Việt Nam để có thể xây dựng Linh chi đất Việt thành thương hiệu quốc gia và vươn ra quốc tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO**Tiếng việt**

1. Nguyễn Thị Mai Anh, Đào Văn Phan, Phạm Thị Vân Anh (2005) "Bước đầu nghiên cứu tác dụng của nấm linh chi Việt Nam (*Ganoderma lucidum*) qua một số chỉ số lipid máu ở chuột cống". *Tạp chí Nghiên cứu y học*, 38 (5), 42-45.
2. Nguyễn Tuấn Anh, Trần Thu Hương, Hồ Đức Cường, Nguyễn Thị Phương Hà (2007) Khảo sát thành phần các hợp chất có hoạt tính sinh học và sản phẩm bào chế từ nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum* Karst.). *Hội nghị khoa học và công nghệ hoá học hữu cơ toàn quốc lần thứ IV*. Hội Hoá học Việt Nam.
3. Nguyễn Tuấn Anh, Trần Thu Hương, Nguyễn Thị Phương Hà (2007) Khảo sát điều kiện chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học trong nấm Linh Chi (*Ganoderma lucidum* Karst.). *Tuyển tập các công trình Hội nghị khoa học và công nghệ hoá học hữu cơ toàn quốc lần thứ IV*. Hội Hoá học Việt Nam.
4. Nguyễn Thị Chính, cs. (2005) *Báo cáo kết quả đề tài: "Phát triển công nghệ sản xuất nấm dược liệu phục vụ tăng cường sức khỏe"*, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,
5. Nguyễn Hải Đăng (2015) *Báo cáo kết quả đề tài: "Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học một số loài nấm lớn và địa y ở khu vực Tây Nguyên và đề xuất bảo tồn, phát triển một số loài có triển vọng"*, Viện Hóa Sinh biển, Viện Hàn lâm KHCN Việt Nam,
6. Nguyễn Thượng Dong, cs. (2006) *Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài cấp Bộ Y tế: "Nghiên cứu một số tác dụng sinh học của 3 loài nấm Linh chi *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., *G. lobatum* (Schw.) Atk. và *G. lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. theo hướng làm thuốc hỗ trợ điều trị ung và thuốc chống lão hóa"*, Viện Dược Liệu,
7. Lê Bá Dũng (2003) *Nấm lớn Tây Nguyên*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội,
8. Nguyễn Thị Kim Dung, Nguyễn Bá Đức, Trần Lưu Vân Hiến (2002) "Bước đầu nghiên cứu tác dụng điều trị hỗ trợ của viên Linh chi - Tam thất trên bệnh nhân ung thư vòm họng trong quá trình xạ trị". *Tạp chí Dược liệu*, 7, 152-154.

9. Trần Đình Duy, Hà Đức Cường, Nguyễn Đăng Thoại, Trần Mạnh Hùng (2013) "Nghiên cứu tác dụng dự phòng và điều trị suy giảm bạch cầu của cao Linh chi (*G. lucidum*) và chế phẩm Linh chi trên mô hình gây suy giảm bạch cầu bằng paclitaxel và carboplatin.". *Tạp chí Dược học*, 53 (450), 15-19.
10. Nguyễn Hoài Giang, Nguyễn Xuân Hùng, Trịnh Tam Kiệt, Lê Đình Lương (2005) "Nghiên cứu khả năng phân loại chi *Ganoderma* bằng kỹ thuật phân tử RAPD-PCR và môi đặc hiệu *laccase*". *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng*, 1/2005
11. Đỗ Thị Hà, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Minh Khởi (2014) "Các dẫn chất của acid nucleic và acid benzoic từ nấm Linh chi thu hái tại Quảng Nam". *Tạp chí Dược liệu*, 19, 216-219.
12. Trần Việt Hùng, Dương Minh Tân, Nguyễn Ngọc Vinh, Phạm Thị Hiền, Nguyễn Thị Ngân, Đỗ Thị Hà, Nguyễn Thu Hằng (2017) "Khảo sát hàm lượng acid ganoderic A trong một số mẫu nấm linh chi Việt Nam (*Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao". *Tạp chí Dược học*, 497 (9), 73-76, 80.
13. Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Ngọc Hằng (2010) "Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa theo hướng bảo vệ gan của nấm Linh chi đỏ *Ganoderma lucidum*". *Tạp chí Y học TP.HCM*, 14 (2), 129-134.
14. Nguyễn Minh Khởi, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thị Duyên, Đỗ Thị Hà (2015) "Lanostan triterpen của nấm Linh chi thu hái tại Quảng Nam". *Tạp chí Dược liệu*, 20, 38-44.
15. Trịnh Tam Kiệt (2012) *Nấm lớn ở Việt Nam*, Nxb Nông Nghiệp,
16. Đỗ Tất Lợi (2006) *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học,
17. Viện Hàn lâm KHCN Việt Nam (2016) *Báo cáo Tổng kết Chương trình Tây Nguyên 3, giai đoạn 2011-2016*,
18. Nguyễn Thị Kim Ngân, Trịnh Xuân Hậu, Đoàn Suy Nghĩ (2000) Tác dụng bảo vệ phóng xạ của nấm Linh Chi (*Ganoderma lucidium*) trên chuột nhắt trắng Swiss. *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học*. Báo cáo khoa học hội nghị sinh học quốc gia.

-
19. Ngô Xuân Nghiễn, Lê Hồng Vinh, Đinh Xuân Linh, Nguyễn Thị Sơn, Nguyễn Bích Thủy, Đặng Thị Mỹ, Nguyễn Huỳnh Minh Quyên, Nguyễn Văn Dũng, Lương Quyết Thắng, Thân Đức Nhã, Nguyễn Hữu Toàn, Nguyễn Công Thành, Nguyễn Hữu Đông, Lê Văn Tam, Trần Công Hạnh (2002) "Kết quả nghiên cứu công nghệ nuôi trồng nấm Linh chi trên bã mía". *Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, 7, 577-580.
20. Nguyễn Phương Đại Nguyên (2013) *Nấm Linh chi ở Tây Nguyên*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam,
21. Đặng Ngọc Quang, Bùi Thị Thu Hương, Lê Xuân Thám, Andrea Porzel (2011) "Nghiên cứu thành phần hóa học và khả năng kháng tế bào ung thư của nấm Linh chi đỏ *Ganoderma tropicum*". *Tạp chí Hóa học*, 49 (6), 693-696.
22. Nguyễn Huỳnh Minh Quyên, Khuất Hữu Trung, Nguyễn Công Thành, Nguyễn Hữu Toàn, Lê Thị Phương, Nguyễn Thị Sơn, Đinh Xuân Linh, Ngô Xuân Nghiễn, Nguyễn Thị Phương Đoài, Nguyễn Thị Bích Thủy, Nguyễn Hữu Đông, Bùi Mạnh Cường (2002) "Bước đầu nghiên cứu một số thành phần hóa học, hoạt tính sinh học và marker phân tử của một số chủng nấm Linh chi.". *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, tháng 7/2002
23. Nguyễn Huỳnh Minh Quyên, Khuất Hữu Trung, Nguyễn Hữu Toàn, Trần Thị Nguyệt Lan, Nguyễn Hữu Đông, Lê Xuân Thám, Ngô Anh (2003) Nghiên cứu sự đa dạng về hình thái quả thể và so sánh thành phần hóa sinh cơ bản của một số chủng linh chi. *NCCB trong sinh học, nông nghiệp, y học*. Báo cáo khoa học Hội nghị toàn quốc lần II. Huế.
24. Phạm Thị Minh Tâm, Lê Thị Thu Cúc, Trần Thị Quỳnh Chi, Trần Việt Hùng, Nguyễn Ngọc Vinh (2016) "Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử vào nghiên cứu một số loài nấm linh chi tại Việt Nam". *Tạp chí Dược học*, 56 (9), 16-21.
25. Lê Xuân Thám (2005) *Nấm Linh Chi Ganodermataceae Donk.*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật,
26. Lê Xuân Thám (2010) *Nấm trong công nghệ & chuyển hoá môi trường. Linh chi - Ganodermataceae Donk.* Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội,

-
27. Lê Xuân Thám, cs. (2013) *Báo cáo tổng kết đề tài "Phát triển sản xuất nấm trên cơ sở điều tra xây dựng bảo tàng nấm ở Vườn quốc gia Cát Tiên"*, Vườn Quốc gia Cát Tiên, Đồng Nai,
28. Trần Thị Văn Thi, Nguyễn Thị Hoài, Lê Trung Hiếu (2012) "Chiết xuất, xác định hàm lượng và khảo sát tác dụng dược lý của phân đoạn polysaccharid từ nấm linh chi nuôi trồng tại Thừa Thiên Huế". *Tạp chí Dược học*, 433, 18-22.
29. Tạ Bích Thuận (2008) *Báo cáo đề tài: "Nghiên cứu khả năng chống oxy hóa và chống viêm của dịch chiết nấm Linh chi Ganoderma lucidum"*, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,
30. Phạm Bảo Trương, Nguyễn Minh Thủy (2015) "Tối ưu hoá quá trình trích ly polysaccharide và tannin trong nấm Linh chi đỏ (*Ganoderma lucidum*)". *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 36, 21-28.
31. Nguyễn Thị Minh Tú (2009) "Quy trình chiết tách các hoạt chất sinh học từ nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*)". *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 47(1), 45-53.
32. Dương Nguyễn Duy Tuyền, Nguyễn Thị Thu Hương, Trần Minh Thông (2013) "Khảo sát tác dụng của polysaccharid chiết từ nấm Linh chi đỏ và nấm Linh chi vàng trên vi thể tế bào gan, lách và tuyến ức của chuột bị gây suy giảm miễn dịch". *Tạp chí Dược liệu*, 18 (1), 38-43.
33. Nguyễn Ngọc Vinh, cs. (2014) *Báo cáo đề tài: "Chiết xuất, phân lập acid ganoderic A từ nấm Linh chi đỏ (Ganoderma lucidum) làm chất đối chiếu"*, Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh - Đề tài cấp Viện,
34. Nguyễn Ngọc Vinh, Lê Thị Thu Cúc, Phan Như Trúc, Trần Việt Hùng (2016) "Xây dựng quy trình định tính, định lượng acid ganoderic A bằng phương pháp HPLC trong nấm Linh chi - *Ganoderma lucidum* (Leyss ex. Fr.) Karst". *Tạp chí Dược học*, 56, 48-51.
35. Phạm Thị Bạch Yến, Đào Văn Phan (2007) "Nghiên cứu tác dụng hạ lipid máu của nấm hồng chi Đà Lạt (*Ganoderma lucidum*) trên thực nghiệm". *Tạp chí Nghiên cứu y học*, 52 (5), 30-34.

36. Trần Phi Hoàng Yến, Nguyễn Thảo Đoan Trang, Nguyễn Ngọc Vinh (2014) "Tác dụng của NL197 và cao chiết nấm Linh chi đỏ (*Ganoderma lucidum*) trên thoái hoá tế bào thần kinh do trimethyltin ở chuột nhắt trắng.". *Tạp chí Dược học*, 462

Tiếng Anh

37. Amaral A.E., Carbonero E.R., Simão C.G., Kadowaki M.K., Sasaki G.L., Osaku C.A., et al. (2008) "An unusual water-soluble β -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*". *Carbohydrate Polymers*, 72 (3), 473–478.

38. Bao X., Liu C., Fang J., Li X. (2001) "Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. ". *Carbohydr Res.*, 332, 67-74.

39. Bao X., Wang X., Dong Q., Fang J., Li X. (2002) "Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*". *Phytochemistry.*, 59 (175-181)

40. Bao X.F., Wang X.S., Dong Q., Fang J.N., Li X.Y. (2002) "Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*". *Phytochemistry*, 59 (2), 175-181.

41. Bhosle S., Ranadive K., Bapat G., Garad S., Deshpande G., Vaidya J. (2010) "Taxonomy and Diversity of *Ganoderma* from the Western parts of Maharashtra (India)". *Mycosphere*, 1 (3), 249-262.

42. Boh B., Berovic M., Zhang J., Zhi-Bin L. (2007) "*Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds.". *Biotechnol Annu Rev.*, 13, 265-301.

43. Borchers A. T, Stern J. S, Hackman R. M, Keen C. L, Gershwin M. E. (1999) "Mushrooms, tumors, and immunity". *Proc Soc Exp Biol Med.*, 221, 281-293.

44. Cao Q. Z., Lin Z. B. (2004) "Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide". *Acta Pharmacologica Sinica* 25 (6), 833-838.

-
45. Cao Q. Z., Lin Z. B. (2006) "*Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide inhibits the growth of vascular endothelial cell and the induction of VEGF in human lung cancer cell". *Life Sciences*, 78, 1457-1463.
46. Chang S. T., Buswell J. A. (1996) "Mushroom nutraceuticals.". *World J Microbiol Biotechnol.*, 12, 473-476.
47. Chang S. T., Miles P. G. (2004) *MUSHROOMS: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*, CRC press,
48. Chang YH., Yang JS., Yang JL., Wu CL., Chang SJ., Lu KW., Kuo CL., Hsia TC., Chung JG. (2009) "*Ganoderma lucidum* extract promotes immune responses in normal BALB/c mice in vivo". *In Vivo: International Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research*, 23 (5), 755-759.
49. Chen D. H., Shiou W. Y., Wang K. C., editors. et al. (1999) "Chemotaxonomy of triterpenoid pattern of HPLC of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*". *J Chin Chem Soc.*, 46, 47-51.
50. Chen J.H., Zhou J.P., Zhang L.N. (1998) "Chemical structure of the water-insoluble polysaccharide isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*". *Polymer Journal*, 30 (10), 838-842.
51. Chen Y., Bicker W, Wu J., Xie M. Y., Lindner W. (2010) "Ganoderma species discrimination by dual-mode chromatographic fingerprinting: A study on stationary phase effects in hydrophilic interaction chromatography and reduction of sample misclassification rate by additional use of reversed-phase chromatography.". *J Chromatogr.*, 1217 (8), 1255-1265.
52. Cheng C.R., Yue Q.X., Wu Z.Y., Song X.Y., Tao S.J., Wu X.H., Xu P.P., Liu X., Guan S.H., Guo D.A. (2010) "Cytotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum*". *Phytochemistry*, 71, 1579-1585.
53. Chung WT., Lee SH., Kim JD., Park YS., Hwang B., Lee SY., Lee HY. (2001) "Effect of mycelial culture broth of *Ganoderma lucidum* on the growth characteristics of human cell lines". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (6), 550-555.

-
54. Cole R.J., Jarvis B.B., Schweikert M.A. (2003) *Handbook of Fungal Secondary Metabolites*, Academic Press, California,
55. Do Thi Ha Le Thi Loan, Tran Manh Hung, Le Vu Ngoc Han, Nguyen Minh Khoi, Le Viet Dung, Byung Sun Min, Nguyen Phuong Dai Nguyen (2015) "An Improved HPLC-DAD Method for Quantitative Comparisons of Triterpenes in *Ganoderma lucidum* and Its Five Related Species Originating from Vietnam". *Molecules*, 20, 1059-1077.
56. Dong Q., Wang Y., Shi L., Yao J., Li J., Ma F.L., et al. (2012) "A novel water-soluble β -D-glucan isolated from the spores of *Ganoderma lucidum*". *Carbohydrate Research*, 353, 100–105.
57. El-Mekawy S, Meselhy M. R, Nakamura N, et al. (1998) "Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*". *Phytochemistry*, 49, 1651–1657.
58. Evans S., Dizeyi N., Abrahamsson PA., Persson J. (2009) "The effect of a novel botanical agent TBS-101 on invasive prostate cancer in animal models". *Anticancer Research*, 29 (10), 3917-3924.
59. Falandysz J. (2008) "Selenium in edible mushrooms.". *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.*, 26 (3), 256-299.
60. Gao Y. H., Zhou S. F., Chen G. L., Dai X. H., Ye J. X. (2002) "A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curr.: Fr.) P. Karst. Extract (Ganopoly) in patients with advanced cancer". *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4, 207-214.
61. Gao Y. H., Zhou S. F., Jiang W. Q., Huang M., Sai X. H. (2003) "Effects of Ganopoly (a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract) on immune functions in advanced-stage cancer patients". *Immunological Investigations*, 32 (3), 201-215.
62. Gao Y. H., Sai X. H., Chen G. L., Ye J. X., Zhou S. F. (2003) "A randomized, placebo-controlled, multi-center study of *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllphoromycetidae) polysaccharides (Ganopoly) in patients with

-
- advanced lung cancer". *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5 (4), 368-381.
63. Gao JJ., Min BS., Ahn EM., Nakamura N., Lee HK., Hattori M. (2002) "New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50 (6), 837-840.
64. Gao Y, Tang W, Gao H, Chan E, Lan J, Zhou S. (2004) "Ganoderma lucidum polysaccharide fractions accelerate healing of acetic acid-induced ulcers in rats.". *J Med Food.*, 7 (4), 417-421.
65. Gao Y., Lan J., Dai X., Ye J., Zhou S. (2004) "A phase I/II study of Lingzhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetidae) extract in patients with type II diabetes mellitus". *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 6 (1), 33-40.
66. Gonzalez A. G, Leon F., Rivera A., Munoz C. M., Bermejo J. (1999) "Lanostanoid triterpenes from *Ganoderma lucidum*". *J Nat Prod.*, 62, 1700–1701.
67. Hien B. T. T., Thu N. T., Tuyen N. Q., Tham L. X., Quang D. N. (2014) "Cytotoxic steroids found in Vietnamese Lingzhi *Ganoderma neo-japonicum*". *Journal of Science of HNUE*, 59 (9), 25-29.
68. Hikino H, Ishiyama M, Suzuki Y, Konno C. (1989) "Mechanisms of hypoglycemic activity of ganoderan B: A glycan of *Ganoderma lucidum* fruit body". *Planta Med.*, 55, 423–428.
69. Hikino H., Konno C., Mirin Y., Hayashi T. (1985) "Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies.". *Planata Med.*, 4, 339-340.
70. Hong K. J., Dunn D. M., Shen C. L., Pence B. C. (2004) "Effects of *Ganoderma lucidum* on apoptotic and anti-inflammatory function in HT-29 human colonic carcinoma cells". *Phytotherapy Research*, 18, 768-770.
71. Hsiao W. L., Li Y. Q., Lee T. L., Li N., You M. M., Chang S. T. (2004) "Medicinal mushroom extracts inhibit ras-induced cell transformation and the

inhibitory effect requires the presence of normal cells". *Carcinogenesis*, 25 (7), 1177-1183.

72. Ji Z., Tang Q., Zhang J., Yang Y., Jia W., Pan Y. (2007) "Immunomodulation of RAW264.7 macrophages by GLIS, a proteopolysaccharide from *Ganoderma lucidum*". *J Ethnopharmacol.*, 112, 445-450.

73. Jia J, Zhang X, Hu Y. S, et al. (2009) "Evaluation of in vivo antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats". *Food Chem.*, 115, 32-36.

74. Jiang J, Slivova V, Valachovicova T, Harvey K, Sliva D. (2004) "*Ganoderma lucidum* inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostate cancer cells PC-3". *Int J Oncol.*, 24 (5), 1093-1099.

75. Jiang J., Grieb B., Thyagarajan A., Sliva D. (2008) "*Ganoderic acids* suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF-kappaB signaling". *International Journal of Molecular Medicine*, 21 (5), 577-584.

76. Jiang J., Slivova V., Sliva D. (2006) "*Ganoderma lucidum* inhibits proliferation of human breast cancer cells by down-regulation of estrogen receptor and NF-kappaB signaling". *International Journal of Oncology*, 29 (3), 695-703.

77. JIANGUO WANG J., ZHANG L., YU Y., Cheung P. C. K. (2009) "Enhancement of Antitumor Activities in Sulfated and Carboxymethylated Polysaccharides of *Ganoderma lucidum*". *J. Agric. Food Chem.*, 57, 10565-10572.

78. Kao C. HJ., Jesuthasan A. C., Bishop K. S., Glucina M. P., Ferguson L. R. (2013) "Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: active ingredients and pathways". *Functional Foods in Health and Disease*, 3 (2), 48-65.

79. Keypour S, Riahi H, Moradali M. F, Rafati H. (2008) "Investigation of the antibacterial activity of a chloroform extract of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae)". *Int J Med Mushrooms.*, 10 (4), 345-349.

-
80. Kim KC, Kim JS, Son JK, Kim IG. (2007) "Enhanced induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia HL-60 cells by the *Ganoderma lucidum* and *Duchesnea chrysantha* extracts". *Cancer Lett.*, 246 (1-2), 210-217.
81. Kimura Y., Taniguchi M., Baba K. (2002) "Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: Mechanism of action and isolation of an active substance.". *Anticancer Research*, 22 (6A), 3309-3318.
82. Kirti M. Kulkarni, Leena S. Patil, Mrs. Vineeta V. Khanvilkar, Dr. Vilasrao J. Kadam (2014) "Fingerprinting techniques in herbal standardization". *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 4 (2), 1049-1062.
83. Kubota T., Asaka Y., Miura I., Mori H. (1982) "Structures of *ganoderic acids A* and *B*, two new lanostane type bitter *triterpenes* from *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.". *Helvetica Chimica Acta*, 65, 611-619.
84. Lakshmi B, Ajith T. A, Jose N, Janardhanan K. K. (2006) "Antimutagenic activity of methanolic extract of *Ganoderma lucidum* and its effect on hepatic damage caused by benzo[a]pyrene". *J Ethnopharmacol.*, 107 (2), 297-303.
85. Li P., Deng YP., Wei XX., Xu JH. (2013) "Triterpenoids from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxic activities". *Natural Product Research*, 27 (1), 17-22.
86. Li Y. Q, Wang S. F (2006) "Anti-hepatitis B activities of ganoderic acid from *Ganoderma lucidum*". *Biotechnol Lett.*, 28 (11), 837-841.
87. Li Z., Liu J., Zhao Y. (2005) "Possible mechanism underlying the antiherpetic activity of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro.". *J Biochem Mol Biol.*, 38 (1), 34-40.
88. Lin SB., Li CH., Lee SS., Kan LS. (2003) "Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest". *Life Sciences*, 72 (21), 2381-2390.

-
89. Liu X., Yuan JP., Chung CK., Chen XJ. (2002) "Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*". *Cancer Letters*, 182 (2), 155-161.
90. Liu YW., Gao JL., Guan J., Qian ZM., Feng K., Li SP. (2009) "Evaluation of Antiproliferative Activities and Action Mechanisms of Extracts from Two Species of *Ganoderma* on Tumor Cell Lines". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (8), 3087-3093.
91. Ma C., Guan S. H., Yang M., Liu X., Guo D. A. (2008) "Differential protein expression in mouse splenic mononuclear cells treated with polysaccharides from spores of *Ganoderma lucidum*". *Phytomedicine*, 15 (4), 268-276.
92. Ma J., Ye Q., Hua Y., editors. et al. (2002) "New lanostanoids from the mushroom *Ganoderma lucidum*". *J Nat Prod.*, 65, 72–75.
93. Mau J. L, Lin H. C, Chen C. C (2001) "Non-volatile components of several medicinal mushrooms". *Food Res Int.*, 34, 521-526.
94. Min BS., Gao JJ., Nakamura N., Hattori M. (2000) "Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against meth-A and LLC tumor cells". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48 (7), 1026-1033.
95. Min B. S, Nakamura N, Miyashiro H, Bae K. W, Hattori M. (1998) "Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease". *Chem Pharm Bull.*, 46, 1607–1612.
96. Miyazaki T, Nishijima M (1981) "Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*". *Chem Pharm Bull.*, 29 (12), 3611-3616.
97. Miyazaki T., Nishijima M. (1981) "Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, anti-tumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (12), 3611-3616.
98. Moncalvo J.M., Wang HH., Hseu RS. (1995) "Phylogenetic Relationships in *Ganoderma* Inferred from the Internal Transcribed Spacers and 25S Ribosomal DNA Sequences". *Mycologia*, 87 (2), 223-238.

-
99. Moncalvo J. M. (2000) Systematics of *Ganoderma*. *Ganoderma Diseases of Perennial Crops*. CAB International, Wallingford, UK, 23-45.
100. Müller CI., Kumagai T., O'Kelly J., Seeram NP., Heber D., Koeffler HP. (2006) "*Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells". *Leukemia Research*, 30 (7), 841-848.
101. Nishitoba T., Sato H., Kasai T., Kawagishi H., Sakamura S. (1984) "New bitter C27 and C30 terpenoids from fungus *Ganoderma lucidum* (Reishi)". *Agricultural and Biological Chemistry journal*, 48, 2905–2907.
102. Ohno N., Miura N. N., Sugawara N., Tokunaka K., Kirigaya N., Yadomae T., . Pharm Pharmacol Lett. 1998;4:174–7. (1998) "Immunomodulation by hot water and ethanol extracts of *Ganoderma lucidum*". *Pharmaceutical and pharmacological letters*, 8 (4), 174-177.
103. Park E. J, Ko G, Kim J, Dong H. S. (1997) "Antifibrotic effects of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*, Glycyrrhizin, and Pentoxifylline in rats with cirrhosis induced by biliary obstruction". *Biol Pharm Bull.*, 20, 417-420.
104. Paterson R. (2006) "*Ganoderma*: A therapeutic fungal biofactory". *Phytochemistry.*, 67, 1985-2001.
105. Peng Y.F., Zhang L.N., Zeng F.B., Xu Y.X. (2003) "Structure and antitumor activity of extracellular polysaccharides from mycelium". *Carbohydrate Polymers*, 54 (3), 297-303.
106. RUEY-SHYANG HSEU, HSI-HUA WANG, HUEI-FANG WANG, JEAN-MARC MONCALVO (1996) "Differentiation and Grouping of Isolates of the *Ganoderma lucidum* Complex by Random Amplified Polymorphic DNA-PCR Compared with Grouping on the Basis of Internal Transcribed Spacer Sequences". *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 62 (4), 1354-1363.
107. Ryvarden L. (1991) *Genera of polypores : nomenclature and taxonomy* Fungiflora, Oslo,

-
108. Sadava D., Still DW., Mudry RR., Kane SE. (2009) "Effect of *Ganoderma* on drug-sensitive and multidrug-resistant small-cell lung carcinoma cells". *Cancer Letters*, 277 (2), 182-189.
109. Sanodiya B. S, Thakur G. S, Baghel R. K, Prasad G. B, Bisen P. S. (2009) "*Ganoderma lucidum*: A potent pharmacological macrofungus.". *Curr Pharm Biotechnol.*, 10 (8), 717-742.
110. Sato H., Nishitoba T., Shirasu S., Oda K., Sakamura S. (1986) "*Ganoderiol A and B*, new triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* (Reishi)". *Agricultural and Biological Chemistry journal*, 50, 2887–2890.
111. Shang D., Zhang J., Wen L., Li Y., Cui Q. (2009) "Preparation, characterization, and antiproliferative activities of the Se-containing polysaccharide SeGLP-2B-1 from Se-enriched *Ganoderma lucidum*". *journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (17), 7737-7742.
112. Sheikh I.A., Vyas D., Dehariya K., Singh V., Ganaie M.A. (2014) "HPLC determination of phenolics and free radical scavenging activity of ethanolic extracts of two polypore mushrooms". *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (2), 679-684.
113. Shi Y. L, James A. E, Benzie I. F, Buswell J. A. (2002) "Mushroom-derived preparations in the prevention of H₂O₂-induced oxidative damage to cellular DNA.". *Teratog Carcinog Mutagen.*, 22, 103–111.
114. Shi X.M., Zhang J.S, Tang Q.J., Yang Y., Hao R.H., Pan Y.J (2008) "Fingerprint analysis of Lingzhi (*Ganoderma*) strains by high-performance liquid chromatography coupled with chemometric methods". *World J Microbiol Biotechnol.*, 24, 2443–2450.
115. Shi Y, Sun J, He H, Guo H, Zhang S (2008) "Hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum* peptides against D-galactosamine-induced liver injury in mice.". *J Ethnopharmacol.*, 117, 415-419.
116. Sliva D. (2004) "Cellular and physiological effects of *Ganoderma lucidum* (Reishi)". *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 4 (8), 873-879.

-
117. Sone Y., Okuda R., Wada N., Kishida E., Misaki A. (1985) "Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*". *Agricultural and Biological Chemistry*, 49 (9), 2641-2653.
118. Song Y. S., Kim S. H., Sa J. H., Jin C., Lim C. J., Park E. H. (2004) "Anti-angiogenic and inhibitory activity on inducible nitric oxide production of the mushroom *Ganoderma lucidum*". *Journal of Ethnopharmacology*, 90 (1), 17-20.
119. SONIAMOL JOSEPH, BABY SABULAL, VARUGHESE GEORGE, KUTTIKKADAN RONY ANTONY, KAINOOR KRISHNANKUTTY JANARDHANAN (2011) "Antitumor and anti-inflammatory activities of polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*". *Acta Pharm.*, 61, 335–342.
120. Su C. H., Yang Y. Z., Ho H., Hu C.H., Sheu M. T. (2001) "High-performance liquid chromatographic analysis for the characterization of triterpenoids from *Ganoderma*". *Journal of Chromatographic Science*, 39, 93–100.
121. Tang W., Liu JW., Zhao WM., Wei DZ., Zhong JJ. (2006) "Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells". *Life Sciences*, 80 (3), 205-211.
122. Teng SC. (1996) *Fungi of China*, Mycotaxon, Ithaca, New York,
123. Thi TT., Hoài NT., Phương NT., Hiếu LT., Sơn LL. (2012) "Khảo sát một số tác dụng dược lý của phân đoạn triterpenoid từ nấm Linh chi trồng tại Thừa Thiên Huế". *Tạp chí Dược liệu*, 17, 154-158.
124. Tomasi S, Lohézic-Le Dévéhat F, Sauleau P, Bézivin C, Boustie J. (2004) "Cytotoxic activity of methanol extracts from Basidiomycete mushrooms on murine cancer cell lines". *Pharmazie.*, 59 (4), 290-293.
125. Ukai S., Yokoyama S., Hara C., Kiho T. (1982) "Structure of an alkali-soluble polysaccharide from the fruit body of *Ganoderma japonicum* Lloyd.". *CarbohydrateResearch*, 105 (2), 237-245.

-
126. Van Der Hem L, Van Der Vliet A, Bocken C. F. M, Kino K, Hoitsma A. J, Tax W. J. M. (1995) "Lingzhi-8: Studies of a new immunomodulating agent." *Transplantation.* , 60, 438-443.
127. Wachtel-Galor S, Choi S. W, Benzie I. F. F. (2005) "Effect of *Ganoderma lucidum* on human DNA is dose dependent and mediated by hydrogen peroxide". *Redox Rep.*, 10 (3), 145–149.
128. Wang G., Zhang J., Mizuno T., Zhuang C., Ito H., Mayuzumi H., et al. (1993) "Antitumor active polysaccharides from the Chinese mushroom Songshan lingzhi, the fruiting body of *Ganoderma tsugae*." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 57 (6), 894-900.
129. Wang G., Zhao J., Liu J., Huang Y., Zhong J. J., Tang W. (2007) "Enhancement of IL-2 and IFN-gamma expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid Me in vivo." *International Immunopharmacology*, 7 (6), 864-870.
130. Wang H, Ng T. B. (2006) "Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*." *Peptides.*, 27, 27-30.
131. Wang S. Y., Hsu M. L., Hsu H. C., et al. (1997) "The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes". *International journal of cancer* 70 (6), 699-705.
132. Wang YY, Khoo KH, Chen ST, Lin CC, Wong CH, Lin CH (2002) "Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities". *Bioorganic & medicinal chemistry*, 10 (4), 1057-1062.
133. Weng CJ., Chau CF., Yen GC., Liao JW., Chen DH., Chen KD. (2009) "Inhibitory effects of *ganoderma lucidum* on tumorigenesis and metastasis of human hepatoma cells in cells and animal models ". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (11), 5049-5057.

-
134. Wu QP., Xie YZ., Li SZ., La Pierre D.P., Deng Z., Chen Q., Li C., Zhang Z., Guo J., Wong CK. A., Lee D.Y., Yee A., Yang B.B. (2006) "Tumour cell adhesion and integrin expression affected by *Ganoderma lucidum*". *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (1), 32-41.
135. Wu TS, Shi LS., Kuo SC. (2001) "Cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* Triterpenes". *Journal of Natural Products*, 64 (8), 1121-1122.
136. Xia Q., Zhang H., Sun X., Zhao H., Wu L., Zhu D., Yang G., Shao Y., Zhang X., Mao X., Zhang L., She G. (2014) "A Comprehensive Review of the Structure Elucidation and Biological Activity of Triterpenoids from *Ganoderma* spp.". *Molecules*, 19 (11), 17478-17535.
137. Xie YZ., Li SZ., Yee A., La Pierre D.P., Deng Z., Lee D.Y., Wu QP., Chen Q., Li C., Zhang Z., Guo J., Jiang Z., Yang B.B. (2006) "*Ganoderma lucidum* inhibits tumour cell proliferation and induces tumour cell death". *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (1), 177-185.
138. Xu Z., Chen X., Zhong Z., Chen L., Wang Y. (2011) "Ganoderma lucidum polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities.". *Am J Chin Med.*, 39 (1), 15-27.
139. Yi Chen, Yan Yan, Ming-Yong Xie, Shao-Ping Nie, Wei Liu, Xiao-Feng Gong, Yuan-Xing Wang (2008) "Development of a chromatographic fingerprint for the chloroform extracts of *Ganoderma lucidum* by HPLC and LC-MS". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47 (3), 469-477.
140. Yuen J. W, Gohel M. D. (2005) "Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: A review of scientific evidence.". *Nutr Cancer.*, 53, 11-17.
141. Yuen J. W., Gohel M. D. (2008) "The dual roles of *Ganoderma* antioxidants on urothelial cell DNA under carcinogenic attack". *Journal of Ethnopharmacology*, 118 (324-330)
142. Yun T. K. (1999) "Update from Asia: Asian studies on cancer chemoprevention". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 889, 157-192.

-
143. Zaidman B. Z, Yassin M, Mahajna J, Wasser S. P. (2005) "Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics.". *Appl Microbiol Biotechnol.*, 67, 453-468.
144. Zhang H., Li W.J., Nie S.P., Chen Y., Wang Y.X., Xie M.Y. (2012) "Structural characterisation of a novel bioactive polysaccharide from *Ganoderma atrum*". *Carbohydrate Polymers*, 88 (3), 1047-1054.
145. Zhang R, Xu S, Cai Y, Zhou M, Zuo X, and Chan P (2011) "Ganoderma lucidum Protects Dopaminergic Neuron Degeneration through Inhibition of Microglial Activation". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011
146. Zhu X. L, Chen A. F, Lin Z. B. (2007) "Ganoderma lucidum polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice.". *J Ethnopharmacol.*, 111, 219–226.
147. Zhu X., Lin Z. (2006) "Modulation of cytokines production, granzyme B and perforin in murine CIK cells by *Ganoderma lucidum* polysaccharides.". *Carbohydrate Polymers*, 63 (2), 188-197.
148. Do Thi Ha, Pham Thi Thuy, Nguyen Minh Khoi (2013) "Ergostane and lanostane steroids from fruiting body of *Ganoderma lucidum* collected in Quang Nam - Da Nang". *Tạp chí Dược liệu*, 18, 394-399.
149. USP (2017) USP 40. *The United States Pharmacopeia*. The United States Pharmacopeial Convention.