

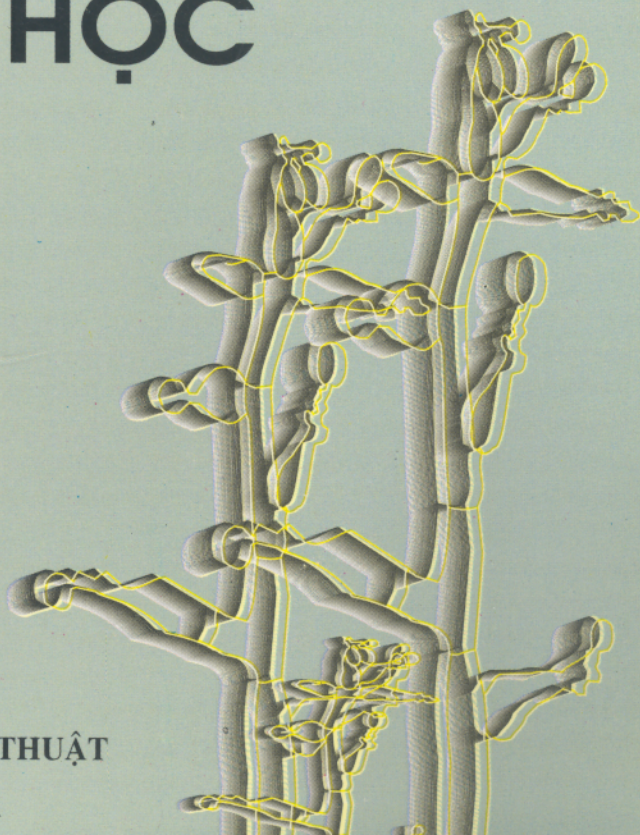
BÙI XUÂN ĐỒNG
NGUYỄN HUY VĂN

Vì nấm

DÙNG TRONG
CÔNG NGHỆ
SINH HỌC



NHÀ XUẤT BẢN
KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT



BÙI XUÂN ĐỒNG, NGUYỄN HUY VĂN

**VI NĂM
DÙNG TRONG
CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



**NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
HÀ NỘI - 2000**

Lời nói đầu

Hiện nay ở nước ta, tài liệu về sinh học và công nghệ sinh học quá thiếu thốn. Chúng tôi viết tập sách này nhằm góp phần nhỏ khắc phục tình hình trên.

Tập sách gồm 3 chương độc lập :

Chương 1 : Kỹ thuật lên men aflatoxin

(Thạc sĩ Nguyễn Huy Văn,

GS.TS. Bùi Xuân Đồng)

Chương 2 : Công nghệ biến đổi sinh học

(GS.TS. Bùi Xuân Đồng)

Chương 3 : Vi nấm dùng trong công nghệ sinh học

(GS.TS. Bùi Xuân Đồng)

Nội dung trên được viết nhằm phục vụ việc đào tạo trong và trên đại học ở các trường có chuyên ngành vi sinh vật, làm tài liệu tham khảo đối với các cán bộ giảng dạy, nghiên cứu sinh học, công nghệ sinh học, những người làm công tác chuyên môn có liên quan và các bạn đọc quan tâm đến các chuyên ngành này. Chúng tôi rất mong nhận được sự giúp đỡ, góp ý kiến của bạn đọc.

Bùi Xuân Đồng, Nguyễn Huy Văn

MỤC LỤC

Lời nói đầu

Chương I – Kỹ thuật lên men aflatoxin

1. Chọn lọc các chủng vi nấm có khả năng tạo thành các aflatoxin B1, B2, G1, G2
2. Lên men và chiết xuất aflatoxin

Tài liệu tham khảo chính

Chương II – Công nghệ biến đổi sinh học

1. Những vi sinh vật có hoạt tính biến đổi sinh học
2. Những phương pháp sử dụng trong công nghệ biến đổi sinh học
3. Cơ chất biến đổi sinh học
4. Phản ứng biến đổi steroid của các loài vi sinh vật

Tài liệu tham khảo chính

Chương III – Vi nấm dùng trong công nghệ sinh học

1. Nấm tiếp hợp dùng trong công nghệ sinh học
2. Nấm bất toàn dùng trong công nghệ sinh học

Tài liệu tham khảo chính

Chương I

KỸ THUẬT LÊN MEN AFLATOXIN

Từ năm 1960, loài vi nấm *Aspergillus flavus* được phát hiện là nguyên nhân gây chết khoảng 10 vạn gà tây con ở nước Anh với các tổn thương ở gan (gan bị hoại tử, chảy máu trong gan, tăng sinh ống mật, v.v.), và tiếp theo đó phát hiện mycotoxin do loài vi nấm này tạo thành trong thức ăn và trong môi trường nuôi cấy cũng gây cùng loại tổn thương gan ở súc vật thí nghiệm và gia cầm, súc vật chăn nuôi khác (vịt con, chuột, thỏ, khỉ, lợn, bò, cừu, v.v.). Mycotoxin đó được chiết xuất tinh khiết và được gọi là aflatoxin. Năm 1961, nghĩa là chỉ một năm sau khi phát hiện aflatoxin, mycotoxin này đã được xác định là ngoài bệnh cấp tính nói trên, còn có khả năng gây ung thư gan với liều lượng nhỏ ăn nhiều ngày ở các động vật thí nghiệm. Các điều tra dịch tễ học ở các vùng dân cư khác nhau trên thế giới cũng cho thấy ở các vùng mà khẩu phần thức ăn hàng ngày có chứa một hàm lượng aflatoxin tương đối cao, tỷ lệ người bị bệnh ung thư gan cao hơn ở các vùng khác. *Aspergillus flavus* Link ex Fries cùng với loài *A. parasiticus* Speare đã được xác định là hai loài vi nấm có tỷ lệ chủng tạo thành aflatoxin cao nhất trong môi trường nuôi cấy, cũng như trên nhiều loại thực phẩm, ngũ cốc (lạc, đỗ tương, ngô, gạo, lúa mì, v.v.) và cả trên một số vị thuốc nam, thuốc bắc nguồn gốc thực vật như ngưu tất (*radix Achyranthis bidentatae*), liên nhục (*semen Nelumbii*), nhân sâm (*radix Ginseng*), v.v. bị mốc (Cl. Moreau 1974, B.X. Đông và ct. 1998).

Vài thí dụ về kết quả nghiên cứu khả năng gây ung thư gan thực nghiệm trên súc vật và điều tra dịch tễ học (bảng 1.1 và bảng 1.2) :

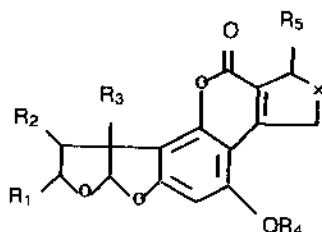
Bảng 1.1. Kết quả thực nghiệm trên chuột về khả năng gây ung thư gan của aflatoxin (Theo B.X.Đông, 1976)

Lượng aflatoxin trong thức ăn (mg aflatoxin/kg chuột)	Thời gian ăn (ngày)	Tỷ lệ chuột bị ung thư gan
5,0	370	14/15
3,5	340	11/15
1,0	294	5/9
1,0	223	8/15
0,2	360	2/10
0,1	361	1/10
0,005	384	0/10

Bảng 1.2. Tỷ lệ dân số bị ung thư gan và hàm lượng aflatoxin trung bình có trên thực phẩm (Theo Alain Reilly, 1993).

Tên nước hoặc vùng	Hàm lượng aflatoxin trong thực phẩm ($\mu\text{g/kg}$)	Số người mắc ung thư gan trên 100.000 người/năm
Vùng cao Kenya	0,1	12
Song Kha (Thái Lan)	0,2	2,0
Thảo nguyên vùng cao (Swaziland)	0,2	2,2
Vùng cao trung bình Kenya	0,2	2,5
Thảo nguyên cao trung bình (Swaziland)	0,3	3,8
Vùng thấp Kenya	0,3	4,0
Ratbari (Thái Lan)	16	4,0
Thảo nguyên vùng thấp (Swaziland)	1,5	9,2
Môzambic	7,8	13,0

Về hóa học, aflatoxin là nhóm các hợp chất có nhân difuranocumarin. Người ta đã phát hiện và xác định cấu trúc được 16 hợp chất này, kể cả các dẫn chất đã biến đổi trong cơ thể động vật (hình 1.1. và bảng 1.3).



Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của các aflatoxin

Bảng 1.3. Các nhóm hóa chức của các aflatoxin

Aflatoxin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X
B ₁	H	H	H	CH ₃	O	H ₂
G ₁	H	H	H	CH ₃	O	-OCH ₂ (lacton)
B ₂	H ₂	H ₂	H	CH ₃	O	H ₂
G ₂	H ₂	H ₂	H	CH ₃	O	-OCH ₂ (lacton)
B ₂ a	OH	H ₂	H	CH ₃	O	H ₂
G ₂ a	OH	H ₂	H	CH ₃	O	-OCH ₂ (lacton)
1-methoxy-B ₁	OCH ₃	H ₂	H	CH ₃	O	H ₂
2-methoxy-B ₁	H ₂	OCH ₃	H	CH ₃	O	H ₂
2-ethoxy-B ₁	H ₂	OCH ₂ CH ₃	H	CH ₃	O	H ₂
2-ethoxy-G ₁	H ₂	OCH ₂ CH ₃	H	CH ₃	O	-OCH ₂ (lacton)
Aflatoxinol (Ro)	H	H	H	CH ₃	OH	H ₂
P ₁	H	H	H	H	O	H ₂
M ₁	H	H	OH	CH ₃	O	H ₂
M ₂	H ₂	H ₂	OH	CH ₃	O	H ₂
BGM1	H	H	OH	CH ₃	O	-OCH ₂ (lacton)
Dihydro-aflatoxin	H ₂	H ₂	H	CH ₃	OH	H ₂

Trong 16 aflatoxin đã được phát hiện, người ta đặc biệt chú ý đến các aflatoxin B₁, G₁, B₂ và G₂ vì đó là 4 aflatoxin có độc tính cao nhất, đồng thời là các aflatoxin được sinh ra với số lượng nhiều nhất cả trong tự nhiên cũng như trong môi trường nuôi cấy.

Về cơ chế gây bệnh, các kết quả thí nghiệm in vivo và in vitro cho thấy aflatoxin liên kết với ADN trong nhân tế bào (một phân tử gam aflatoxin có mối liên kết với 600 phân tử gam ADN). Sự liên kết này gây ức chế enzym polymeraza của ARN. Mặt khác, tác dụng hạn chế trong tổng hợp ARN và tác dụng ức chế polymeraza t-ARN là các nguyên nhân làm giảm sút tổng hợp protit trong tế bào. Người ta cũng đã chứng minh rằng vòng α , β -lacton không bão hòa có trong phân tử aflatoxin làm cho hợp chất này có hoạt tính gây ung thư, và cũng chính vòng lacton này gây ức chế tổng hợp ADN nhân tế bào, do đó làm rối loạn sự tăng trưởng bình thường của tế bào (M.F. Nexterin và V.I.A. Vixxarionova, 1971).

Như chúng ta biết, cũng như các chất độc hại khác, aflatoxin qua đường tiêu hóa vào một số tế bào gan, tích tụ và bị chuyển hóa thành các dẫn chất giảm độc tính hay mất hẳn độc tính, đồng thời, với một hàm lượng aflatoxin nhất định, các tế bào này bị tổn thương như trên vừa nói, có nghĩa là gan đã bị tổn thương.

Ở Việt Nam, thông báo khoa học đầu tiên về phát hiện aflatoxin (từ một số chủng vi nấm dùng để lên men sản xuất nước chấm bằng đồ tương) vào năm 1970. Từ đó đến nay, nhiều công trình nghiên cứu về aflatoxin, các mycotoxin khác và các loài vi nấm tương ứng đã được thực hiện về điều tra phát hiện trên lương thực, thực phẩm, dược liệu, về lên men aflatoxin về thực nghiệm trên súc vật thí nghiệm, về dược lý học, về thú y v.v.

Hầu như tất cả các thí nghiệm, các công trình nghiên cứu nói trên đều cần có aflatoxin tinh khiết. Mặt khác, các phương pháp kiểm nghiệm aflatoxin hiện nay trên thế giới đều cần đến aflatoxin chuẩn. Giá loại hóa chất chuẩn này rất đắt (vài nghìn USD/lg), nước ta đang hoàn toàn phải nhập từ nước ngoài. Vì vậy, việc từng bước biểu biết và nắm vững công nghệ sản xuất loại hóa chất này là một trong các mục tiêu của công nghệ sinh học nước ta.

Cũng như đối với các sản phẩm lên men vi sinh vật khác (enzim, acid amin, acid hữu cơ, thuốc kháng sinh, v.v.), việc nghiên cứu sản xuất aflatoxin gồm các giai đoạn sau :

- Chọn lọc các chủng có khả năng tạo thành các aflatoxin B1, B2, G1, G2, trước hết là các aflatoxin B1, G1.
- Căn cứ vào các đặc điểm sinh học của loài *Aspergillus flavus* (hoặc *A. parasiticus*) như nhu cầu dinh dưỡng, nhu cầu oxy, pH môi trường, nhiệt độ, thời gian nuôi cấy, v.v., xác định các thông số lên men tối ưu.
- Lên men và chiết xuất aflatoxin.
- Kiểm tra sản phẩm

I. CHỌN LỌC CÁC CHỦNG VI NẤM CÓ KHẢ NĂNG TẠO THÀNH CÁC AFLATOXIN B1, B2, G1, G2

Như trên đã trình bày, các aflatoxin B1, G1, B2, G2 là các aflatoxin có độc tính cao nhất (giảm dần theo thứ tự), nghĩa là có khả năng gây bệnh lớn nhất, đặc biệt là các aflatoxin B1, G1. Vì vậy trừ các nghiên cứu riêng biệt, việc kiểm nghiệm aflatoxin đối với lương thực, thực phẩm, thức ăn gia súc, gia cầm thông thường chỉ tiến hành với các aflatoxin B1, G1, do đó nhu cầu chất chuẩn về aflatoxin chủ yếu là 2 aflatoxin này.

Chúng ta cũng biết rằng cho đến nay *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus* được xác định là 2 loài có khả năng tạo thành aflatoxin cao nhất. Hai loài vi nấm này, đặc biệt là loài *A. flavus* có tỷ lệ số chủng tạo thành aflatoxin lớn, đồng thời có một số chủng tạo thành nhiều

aflatoxin, nghĩa là có khả năng cho hiệu suất lên men cao. Vì lẽ đó, khi chọn các chủng vi nấm để lên men aflatoxin, đặc biệt là để lên men aflatoxin B₁, người ta phân lập và chọn lọc các chủng thuộc loài *A.flavus*. Các chủng thuộc loài *A.parasiticus* thường tạo thành đồng thời các aflatoxin B₁, G₁. Thí dụ các chủng *Aspergillus flavus* NRRL 3357 và *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 của một trung tâm nghiên cứu nông học ở Mỹ tạo thành các aflatoxin B₁, G₁ nuôi cấy trên lạc (bảng 1.4).

Bảng 1.4. Lượng aflatoxin được tạo thành bởi các chủng *Aspergillus flavus* NRRL 3357 và *A.parasiticus* NRRL 2999 (nhiệt độ nuôi cấy 25°C, theo Noris Kimura, 1988)

Các chủng vi nấm	Aflatoxin B ₁ (ppm)				Aflatoxin G ₁ (ppm)			
	Số ngày nuôi cấy				Số ngày nuôi cấy			
	3	5	7	9	3	5	7	9
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357	4,8	63,9	43,8	37,6				
<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999	3,1	67,4	38,7	30,0	8,7	110,3	90,6	50,7

Để có những chủng vi nấm thuộc các loài *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus*, chúng ta có thể mua các chủng đó ở các Bảo tàng giống vi sinh vật trên thế giới hoặc ở một số cơ sở giữ giống vi sinh vật trong nước.

Về các Bảo tàng giống vi sinh vật trên thế giới, cơ thể kể làm thí dụ một số cơ sở sau :

- ATTC (American Type Culture Collection) - Parklawn Drive Rockville, U. S.A.
- BCCM (British Commonwealth Collections of Microorganisms) - London, England
- CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) - Baarn, Netherlands
- CCF (Culture Collection of Fungi, Department of Sciences) - Prague, Czech.
- CMI (Commonwealth Mycological Institute) - Kew, Surrey, England.
- IFM (Institute for Food Microbiology) - Chibaken, Japan

- ITCC (Indian Type Culture Collection) - New Delhi, India
- ICP (Laboratoire de Cryptogamie, Museum national d'Histoire naturelle) - Paris, France.
- NRRL (Northern Regional Research Laboratory, U.S.Department of Agriculture) - Peorin, U.S.A.

Ở Việt Nam, các cơ sở sau có thể cung cấp các chủng thuộc 2 loài vi nấm nói trên :

- Bảo tàng giống vi sinh vật, Đại học quốc gia, Hà Nội.
- Bộ môn Thực vật, Đại học Dược, Hà Nội.

Chúng ta cần chú ý là các chủng vi nấm được giữ ở các bảo tàng hay các cơ sở giữ giống thường đã được cấy truyền nhiều lần, do đó đã giảm hoạt tính sinh học, hiệu suất lên men aflatoxin không cao bằng các chủng mới phân lập từ cơ chất tự nhiên hay từ các sản phẩm nông nghiệp.

Để chọn lọc các chủng của các loài *Aspergillus flavus* và *A.parasiticus* từ lạc nhân, có thể tiến hành theo sơ đồ các thí nghiệm ở bảng 1.5.

Bảng 1.5. Sơ đồ các thí nghiệm chọn lọc các chủng vi nấm thuộc các loài *Aspergillus flavus* và *A.parasiticus* để lên men aflatoxin

Thí nghiệm 1	Mục đích : Phân lập các chủng thuộc nhóm loài <i>Aspergillus flavus</i> Môi trường : Môi trường Czapek (+ kháng sinh) Phương pháp : Ulater
Thí nghiệm 2	Mục đích : Định loại để chọn các chủng thuộc các loài <i>A.flavus</i> và <i>A. parasiticus</i> Môi trường : Môi trường Czapek Phương pháp : Định loại hình thái
Thí nghiệm 3	Mục đích : Lên men các chủng thuộc các loài <i>A.flavus</i> và <i>A. parasiticus</i> Môi trường : Môi trường Czapek sửa đổi Phương pháp : Lên men lỏng trong bình nón
Thí nghiệm 4	Mục đích : Sơ bộ chọn các chủng tạo thành aflatoxin Phương pháp : Sắc ký cột nhỏ
Thí nghiệm 5	Mục đích : Chọn các chủng tạo thành aflatoxin cho hiệu suất cao Phương pháp : Chiết xuất aflatoxin bằng dung môi Định lượng aflatoxin bằng sắc ký bản mỏng
Thí nghiệm 6	Mục đích : Lên men kiểm tra chủng tạo thành aflatoxin cho hiệu suất cao nhất Phương pháp : Như ở thí nghiệm 5

1.1. Phân lập các chủng thuộc nhóm loài *Aspergillus flavus* (thí nghiệm 1).

Để các chủng thuộc nhóm loài này được thuần khiết (không bị lẫn vi khuẩn hoặc các loài vi nấm khác), chúng ta phải phân lập khuẩn lạc của các loài thuộc nhóm loài này từ trên mặt môi trường thạch trong hộp lồng đặt các hạt lạc, từ ngày thứ hai, và chậm nhất là ngày thứ năm kể từ khi đặt lạc vào môi trường. Thường từ cuối ngày thứ hai trở đi, khuẩn lạc của một số loài vi nấm tăng trưởng nhanh đã che phủ một phần khuẩn lạc của các loài vi nấm khác, gây khó khăn cho việc phân lập.

Khuẩn lạc các loài thuộc nhóm loài *Aspergillus flavus* ở các ngày tuổi từ thứ hai đến thứ năm là những khuẩn lạc non, chưa có những đặc điểm phân loại đặc trưng. Ở các khuẩn lạc này, các bộ máy sinh bào tử trần cũng chưa trưởng thành hoàn toàn, do đó cũng chưa có những đặc điểm phân loại đặc trưng cần thiết.

Vì hai lý do chính trên (phân lập khi khuẩn lạc còn non, khuẩn lạc non không có các đặc điểm phân loại đặc trưng), chúng ta không phân lập được các chủng của từng loài *Aspergillus flavus* hoặc *A. parasiticus* riêng biệt trên môi trường đặt lạc, mà phải phân lập tất cả các chủng của 2 loài vi nấm này cùng với các chủng của các loài có một số đặc điểm hình thái của khuẩn lạc giống với các đặc điểm cùng loại của 2 loài vi nấm nói trên, nói cách khác, chúng ta phân lập các chủng từ khuẩn lạc của tất cả các loài trong nhóm loài *Aspergillus flavus* (xem giải thích về nhóm loài trong phần định loại ở đoạn dưới).

Việc phân lập các chủng thuộc nhóm loài *Aspergillus flavus* được tiến hành cụ thể như sau :

Môi trường phân lập :

Môi trường Czapek (bổ sung kháng sinh) :

NaNO ₃	3,0g
K ₂ HPO ₄	1,0g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5g
KCl	0,5g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,01g
Saccharose	30,0g
Thạch	20,0g
(Tetracyclin)	0,5g)*

*(Có thể thay bằng : penicillin 0,25g + streptomycin 0,25g).

Ngâm thạch vào khoảng 400 ml nước cất để thạch trương nở. Nếu thạch ở dạng sợi, cắt sợi thành từng đoạn dài 1 - 2 cm. Hòa tan các thành phần khác của môi trường trong phần nước cất còn lại, đổ dung dịch này vào hỗn hợp nước thạch.

Dun sôi cho thạch tan hoàn toàn, rồi phân phối môi trường vào trong các bình nón có dung tích 100 - 200 ml, tiệt trùng trong nồi hấp ở 120°C trong 20 min. Trước khi phân phối môi trường vào trong các hộp lồng, bổ sung kháng sinh (tetracyclin 0,5g cho 1 lit môi trường) để ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Dùng phần môi trường không bổ sung kháng sinh để làm thạch nghiêng trong các ống thử có đường kính 12 - 15 mm.

Kỹ thuật phân lập :

Để phân lập các chủng vi nấm từ lạc, có thể dùng phương pháp Ulster áp dụng chung cho việc phân lập vi nấm từ các loại hạt. Tiến hành như sau :

Tách các hạt lạc làm 2 nửa, đặt các nửa hạt lạc này trên mặt môi trường thạch trong hộp lồng, lá mầm úp xuống môi trường. Mỗi hộp lồng, đặt 10 nửa hạt cách đều nhau.

Tiến hành trong điều kiện vô trùng (trong tủ cấy đã tiệt trùng).

Nuôi cấy ở tủ ẩm 28+1°C.

Phân lập từ ngày thứ hai đến ngày thứ năm vào các ống thạch nghiêng các khuẩn lạc màu lục, vàng lục trong tủ cấy.

Để tiếp các ống thạch nghiêng đã cấy nấm vào tủ ẩm ở nhiệt độ trên. Theo dõi nấm mọc trong các ống thạch nghiêng từ ngày thứ hai đến ngày thứ mười để kiểm tra độ thuần khiết của chủng vi nấm. Loại các chủng vi nấm bị nhiễm vi khuẩn hay các loài vi nấm không thuộc nhóm loài *Aspergillus flavus*. Ghi nhãn cho mỗi ống thạch nghiêng : ngày phân lập, môi trường phân lập, ký hiệu nguồn gốc chủng vi nấm (nơi thu nhận mẫu lạc).

Chúng ta gọi mỗi khuẩn lạc trong một ống thạch nghiêng là một chủng vi nấm, và cho mỗi chủng vi nấm đó một số hiệu để lưu trữ và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

1.2. Định loại để chọn các chủng thuộc các loài *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus* (thí nghiệm 2)

Môi trường định loại : môi trường Czapek

Cấy truyền các chủng thuộc nhóm loài *Aspergillus flavus* đã phân lập trong ống thạch nghiêng sang môi trường Czapek trong hộp lồng. Cấy một điểm ở trung tâm trên mặt môi trường, sao cho ở mỗi hộp lồng chỉ có 1 khuẩn lạc. Muốn vậy, cần chạm rất nhẹ đầu que cấy vào khuẩn lạc trong ống thạch nghiêng, chuyển nhanh và nhẹ tay đầu que cấy sang môi trường trong hộp lồng. Cũng cần chú ý thực hiện tốt các điều kiện vô trùng khi thực hiện thao tác này (trong phòng có trang bị lamine hoặc trong buồng cấy đã tiệt trùng, thao tác trên ngọn lửa đèn cồn, đầu kim loại của que cấy được đốt đỏ trên ngọn lửa đèn cồn và làm nguội trong môi trường ở mép khuẩn lạc trong ống thạch nghiêng, tiệt trùng tay kỹ bằng cồn 70°, v.v.). Mỗi chủng nấm trong ống thạch nghiêng được cấy sang 3 hộp lồng. Chọn một hộp lồng có khuẩn lạc đẹp nhất để làm tiêu bản vi học.

Vì việc phân lập các chủng thuộc nhóm loài *Aspergillus flavus* chỉ có thể căn cứ vào 1 - 2 đặc điểm của khuẩn lạc, nên thường phân lập cả các chủng của các nhóm loài khác của chi *Aspergillus*, và đôi khi cả các chủng của chi vi nấm khác, nên để định loại chắc chắn các chủng của các loài *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus* cần tiến hành lần lượt các bước sau (sau khi đã cấy truyền chủng vi nấm từ ống thạch nghiêng sang các hộp lồng) :

- Xác định các đặc điểm hình thái của khuẩn lạc.
- Xác định các đặc điểm của bào tử trần và bộ máy mang bào tử trần.
- Định loại chủng vi nấm đến chi *Aspergillus*.
- Định loại chủng vi nấm đến nhóm loài *Aspergillus flavus*
- Định loại chủng vi nấm đến loài *A. flavus* hoặc loài *A. parasiticus*.

Xác định các đặc điểm hình thái của khuẩn lạc :

Quan sát và ghi chép tất cả 3 hộp lồng của một chủng và xác định các đặc điểm sau ở khuẩn lạc 2, 5 và 12 ngày tuổi :

Đường kính trung bình của khuẩn lạc.

Chiều cao tối đa của khuẩn lạc

Dạng mặt của khuẩn lạc (dạng hạt, dạng sợi nấm nằm ngang hay dạng sợi thẳng đứng).

Màu sắc của mặt trên khuẩn lạc (màu sắc của các khối bào tử trần tạo thành ở trên mặt khuẩn lạc).

Màu sắc của mặt dưới (mặt sau) khuẩn lạc (màu sắc của hệ sợi nấm nén và màu sắc của sắc tố hòa tan nếu có).

Các đặc điểm khác trên mặt khuẩn lạc nếu có : giọt tiết (exudat), các sợi nấm thứ cấp, các bó sợi, các hạch nấm, v.v.

Xác định các đặc điểm của bào tử trần và bộ máy mang bào tử trần :

Các đặc điểm này được xác định trên tiêu bản vi học với thuốc nhuộm màu Xanh methyl hoặc Xanh Coton C4B 0,5% trong lactophenol.

Các đặc điểm cần xác định :

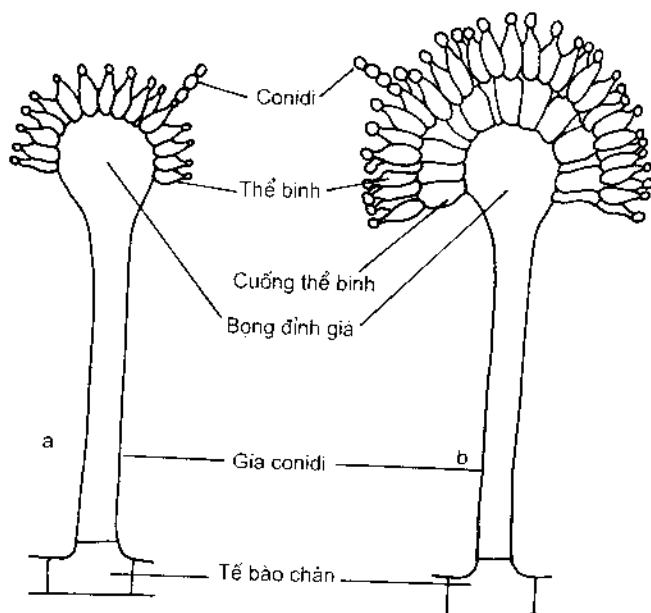
Sợi nấm : có hay không vách ngang, đường kính, màu sắc nếu có, nhẵn hoặc có gai, các dạng hình thái đặc biệt nếu có.

Bộ máy mang bào tử trần : các thành phần của bộ máy mang bào tử trần (tế bào chân, giá bào tử trần, bong dính giá, cuống thể bình, thể bình), hình dạng, kích thước, màu sắc, bề mặt có gai hay nhẵn của các thành phần này. Các thành phần phụ như bó giá, sợi cứng nếu có.

Bào tử trần : hình dạng, kích thước, màu sắc, mặt nhẵn hay có gai, kiểu phát sinh bào tử, dạng tập hợp của bào tử trần (chuỗi song song, chuỗi phân ly, khối cầu, tia tỏa tròn, khối chuỗi hình chùy, v.v.). Các loại bào tử khác nếu có (hình 1.2).

Định loại chủng nấm đến chi *Aspergillus* Mich. ex. Fr.

Trong hệ thống phân loại ngành Nấm (Mycota, Mycophyta) của Saccardo (1886), chi *Aspergillus* thuộc họ Moniliaceae, bộ Moniliales (bộ



Hình 1.2. Sơ đồ bộ máy mang bào tử trần (conidi) của chi *Aspergillus* Mich. ex Fr.

a - Bộ máy mang bào tử trần không có cuống thể bình.

b - Bộ máy mang bào tử trần có cuống thể bình

Hyphales), lớp Deuteromycetes (Fungi imperfecti). Theo hệ thống phân loại căn cứ vào đặc điểm hình thái kết hợp với đặc điểm phát sinh bào tử trần của Nấm bất toàn (Fungi imperfecti), chi *Aspergillus* thuộc tổ chi Phialoconidiaceae, lớp phụ Euphyphomycetidae, lớp Hyphomycetes, ngành phụ Nấm bất toàn (Deuteromycotina), ngành Nấm (Mycota).

So sánh các đặc điểm hình thái của khuẩn lạc và các đặc điểm vi học trong bảng 1.6 để định loại chi *Aspergillus*.

Bảng 1.6. Các nhóm phân loại (taxon) và các đặc điểm phân loại tương ứng để định loại các chủng vi nấm đến chi *Aspergillus*.

Các nhóm phân loại	Các đặc điểm phân loại tương ứng
Deuteromycotina	Sợi nấm ngăn vách
Hyphomycetes	Chỉ có bào tử vô tính là bào tử trần (không có bào tử hữu tính. Đôi khi có bào tử áo).
Euphyphomycetidae	Giá bào tử trần (conidiophore) tự do (không ở trong túi giá (pycnidium) hay trong đĩa giá (sporodochium)
Phialoconidiaceae	Bào tử trần thuộc tip cơ bản euconidi (bào tử trần chỉ được tạo thành bởi tế bào sinh bào tử trần).
<i>Aspergillus</i>	Bào tử trần thuộc tip phialoconidi (tế bào sinh bào tử trần là phialid). Bào tử trần không ngăn vách. Bộ máy mang bào tử trần hình hoa cúc, gồm : giá bào tử trần không phân nhánh, bong dính giá (vesicle), cuống thể bình (metulae) xếp trên mặt bong dính giá (một số loài không có cuống thể bình), thể bình (phialid) xếp thành cụm trên đỉnh cuống thể bình hoặc trực tiếp ở trên mặt bong dính giá (chủ yếu ở các loài không có cuống thể bình), khối bào tử trần khô (không có chất nhầy) gồm các chuỗi bào tử trần dài tụ hợp lại thành hình cột (in column), hình cầu, hình tia tỏa tròn. Bao giờ cũng có tế bào chân (foot-cell) ở gốc giá bào tử trần.

Nếu chủng vi nấm có các đặc điểm phân loại ở trong bảng 1.6, chủng đó thuộc chi *Aspergillus*.

Định loại chủng vi nấm đến nhóm loài *Aspergillus flavus*

Cho đến hiện nay, chuyên luận phân loại chi *Aspergillus* của Raper và Fennell (1966) vẫn được dùng làm tài liệu chính để định loại các loài của chi vi nấm này. Chi *Aspergillus* trong chuyên luận này có 133 loài và 18 thứ, được tập hợp trong 18 nhóm loài. Vì vậy trước khi định loại đến loài một chủng vi nấm đã được định loại là thuộc chi *Aspergillus*, cần xác định chủng đó thuộc nhóm loài nào trong 18 nhóm loài nói trên.

Nhóm loài *Aspergillus flavus* đặc trưng bởi các đặc điểm sau :

e. Bào tử trần ráp hoặc có gai rõ rệt g

g. Khuẩn lạc màu lục vàng, lục nâu, sau chuyển thành lục nâu, nâu. Giá bào tử trần dài 15 cm, có thể tới 4,5 cm . . .

. . . *A.oryzae* (Ahlburg) Cohn, *A. oryzae* (Ahlburg) Cohn var. *effusus* (Tiraboschi) Ohara

g. Khuẩn lạc màu vàng, lục vàng, xanh lục, sau không chuyển màu. Giá bào tử trần ngắn (dài dưới 10 cm) . . .

. . . *A.flavus* Link ex Fr. (Hình 1.3)

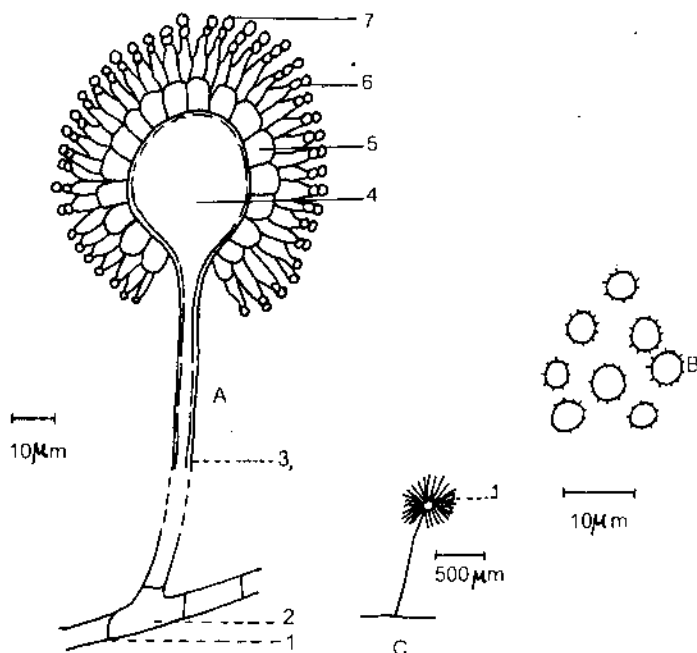
Sau khi đã định loại chủng vi nấm theo khóa phân loại nhóm loài *Aspergillus flavus*, cần kiểm tra lại tất cả các đặc điểm phân loại của 2 loài *A.flavus* và *A.parasiticus* ở bảng 1.8 để tránh sai sót.

Bảng 1.8. Các đặc điểm phân loại của các loài *Aspergillus flavus* Link ex Fr. và *A.parasiticus* Speare trên môi trường Czapek, nhiệt độ nuôi cấy $28 + 1^{\circ}\text{C}$, 10 ngày tuổi

Đặc điểm	<i>A.flavus</i>	<i>A.parasiticus</i>
Khuẩn lạc		
Dạng mặt	Dạng lén	Dạng lén, xốp nhẹ
Màu sắc	Lục vàng	Lục vàng, xanh lục
Màu mặt sau	Không màu, nâu hồng	Crem, nâu nhạt
Giọt tiết	Có hoặc không	Không
Sắc tố hòa tan quanh khuẩn lạc	Không	Không
Đường kính (cm)	6,0 - 8,0	3,0 - 5,5
Giá bào tử trần		
Bề mặt	Ráp hoặc nhẵn	Ráp hoặc nhẵn
Chiều dài (μm)	500-800 (100-150)	300 - 700
Đường kính (μm)	15-20 (5-10)	
Khối bào tử trần		
Hình dạng	Tia tỏa tròn, cột	Cầu, tia tỏa tròn
Đường kính, chiều dài (μm)	300 - 500 (50 - 300)	300 - 450
Bong đĩnh giá		
Hình dạng		hình bình
Đường kính (μm)	Cầu (chùy) 25 - 45 (10 - 20)	20 - 35
Cuống thể bình		
Có mặt	Có (không)	Không
Kích thước (μm)	5,0-10 x 3,5-5,5	
Thể bình		
Hình dạng	Hình bình	Hình bình
Kích thước (μm)	6,5-12,0 x 3,0 - 6,0	7,0-9,0.3,0-4,5
Bào tử trần		
Hình dạng	Cầu, hình trứng	Cầu
Bề mặt	Có gai	Ráp hoặc có gai
Đường kính, trục lớn (μm)	3,0 - 6,0	3,5 - 5,5

Chú thích - Trong ngoặc đơn : đặc điểm các thành phần của bộ máy mang bào tử trần chỉ có thể bình của loài *A.flavus*.

1.3. Sơ bộ chọn các chủng thuộc các loài *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus* tạo thành aflatoxin (thí nghiệm 3 và 4).



Hình 1.3. Bào tử trần và bộ máy mang bào tử trần của loài *Aspergillus flavus* Link ex Fries (loại bộ máy mang bào tử trần có cuống thể bình) :

A - Các thành phần của bộ máy mang bào tử trần.

1. Sợi nấm ; 2. Tế bào chân ; 3. Giá bào tử trần ; 4. Bọng dính giá ;
5. Cống thể bình ; 6. Thể bình ; 7. Bào tử trần.

B - Bào tử trần.

C - Bộ máy mang bào tử trần trưởng thành với khối bào tử trần hình tia tỏa tròn.

Vì không phải tất cả các chủng của các loài *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus* đều tạo thành aflatoxin, nên trước khi lên men để chiết xuất aflatoxin, cần chọn nhanh và loại bỏ các chủng không tạo thành các mycotoxin này. Ở Pháp chẳng hạn, 25% số chủng của loài *A. flavus* phân lập từ lương thực, thực phẩm và thức ăn gia súc tạo thành aflatoxin, ở một số nước châu Phi và một số vùng ở Tây Nam Á, số chủng này là 50%. Một thông báo ở Mỹ năm 1973 cho biết các chủng của loài *A. flavus* tạo thành aflatoxin trên lạc chiếm 96%, ở hạt bông chiếm 78%, ở lúa mạch chiếm 49% và ở gạo là 35%. Kết quả một khảo sát ở Hà Nội cho

biết các mẫu lạc lấy ở 10 địa điểm khác nhau có 60% số chủng của loài vi nấm nổi trên tạo thành aflatoxin (theo B.X.Đống, 1976).

Các số liệu trên chỉ có ý nghĩa hạn chế vì điều kiện nghiên cứu, khảo sát khác nhau (sản phẩm chưa mốc hay đã mốc, các phương pháp phân lập vi nấm, phương pháp phát hiện aflatoxin, v.v.), nhưng cho chúng ta thấy cần phải loại các chủng thuộc các loài *A.flavus* và *A.parasiticus* không tạo thành aflatoxin trong nghiên cứu lên men aflatoxin.

Các kết quả nghiên cứu ở Tổ bộ môn Vi nấm - Kháng sinh trường Đại học Dược Hà Nội cho thấy có thể dùng phương pháp phát hiện nhanh aflatoxin để chọn lọc các chủng thuộc các loài *A.flavus* và *A.parasiticus* tạo thành mycotoxin này.

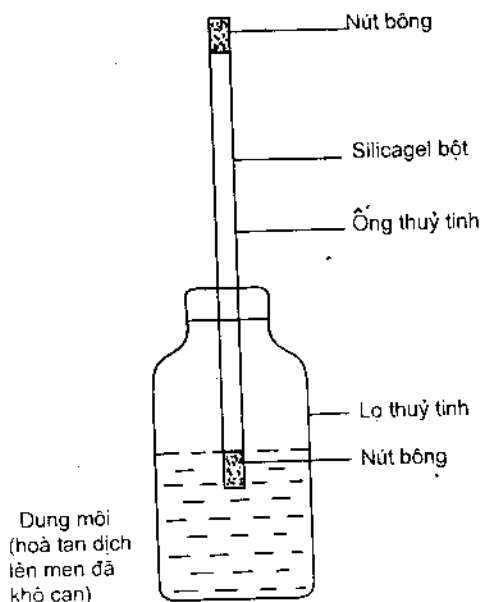
Môi trường lên men : môi trường Czapek không có thạch, trong đó natri nitrat được thay bằng amoni nitrat cùng lượng (theo kết quả nghiên cứu của D.Ba và ct., 1997), nước cất được thay bằng nước chiết ngô (60g ngô hạt, 500 ml nước cất, đun sôi trong 1h30 min, lọc qua gạc, bổ sung nước cất cho đủ 1000 ml). Tiệt trùng ở 120°C, 30 min.

Cấy mỗi chủng vi nấm vào 3 bình nón có dung tích 100 ml, mỗi bình chứa 20 ml môi trường (điều kiện vô trùng). Nhiệt độ nuôi cấy : 28±1°C. Thời gian nuôi cấy : 6 ngày. Lắc ngang : 120 lần/min.

Xác định nhanh aflatoxin bằng phương pháp sắc ký cột nhỏ (SKCN), tiến hành như sau :

Chuẩn bị sẵn nhiều bộ dụng cụ SKCN. Mỗi bộ SKCN gồm : 1 lọ thủy tinh có chiều cao 5 cm, đường kính trong miệng lọ khoảng 2 cm (có thể dùng lọ đựng bột penicilin tiêm), 1 ống thủy tinh có chiều dài 10 cm, đường kính trong 0,5 cm, nhồi silicagel vào ống ($1 \pm 0,1g$), nút 2 đầu ống bằng bông dày 0,5 cm (hình 1.4).

Cô ở ngọn lửa nhỏ dịch lên men trong các bình nón đến khi vừa cạn hết nước. Đổ vào mỗi bình nón 10 ml methanol hoặc chloroform, lắc 10 min để hòa tan aflatoxin nếu có trong dịch lên men. Đổ dung môi đã hòa tan cẩn vào lọ thủy tinh của bộ SKCN (khoảng 2 - 3 ml, trên nửa chiều cao của lọ). Lắp ống thủy tinh chứa silicagel bột vào nút đã khoan lỗ vừa khít với ống. Đẩy ống silicagel xuống cho đầu mút của ống ngập hết bông trong lớp dung môi. Khi dung môi đã chạy lên hết lớp bông ở đầu mút trên của ống, lấy ống ra khỏi lọ và sấy khô ống ở 60°C (thường trong 5 min). Phát hiện vết có huỳnh quang xanh hoặc lục trên cột silicagel ở đèn tử ngoại (UV) có $\lambda 365$ nm. Tiến hành song song với aflatoxin chuẩn hòa tan trong cùng loại dung môi (nồng độ dung dịch aflatoxin chuẩn : 2 $\mu g/ml$).



Hình 1.4. Bộ dụng cụ sắc ký cột nhỏ

Chủng vi nấm có dịch lên men có vết huỳnh quang xanh hay lục cùng màu và cùng vị trí trong cột silicagel với vết huỳnh quang của các aflatoxin chuẩn, chủng đó có khả năng tạo thành aflatoxin. Thường chỉ cần tiến hành với 2 loại aflatoxin chuẩn : aflatoxin B1 (có huỳnh quang xanh), aflatoxin G1 (có huỳnh quang lục).

Phương pháp trên cũng có thể dùng để phát hiện nhanh sự có mặt của aflatoxin trên các loại lương thực, thực phẩm, thức ăn gia súc.

Có thể dùng phương pháp sắc ký bản mỏng để phát hiện và chọn sơ bộ các chủng tạo thành aflatoxin của các loài vi nấm.

1.4. Chọn các chủng tạo thành aflatoxin cho hiệu suất cao (thí nghiệm 5 và 6)

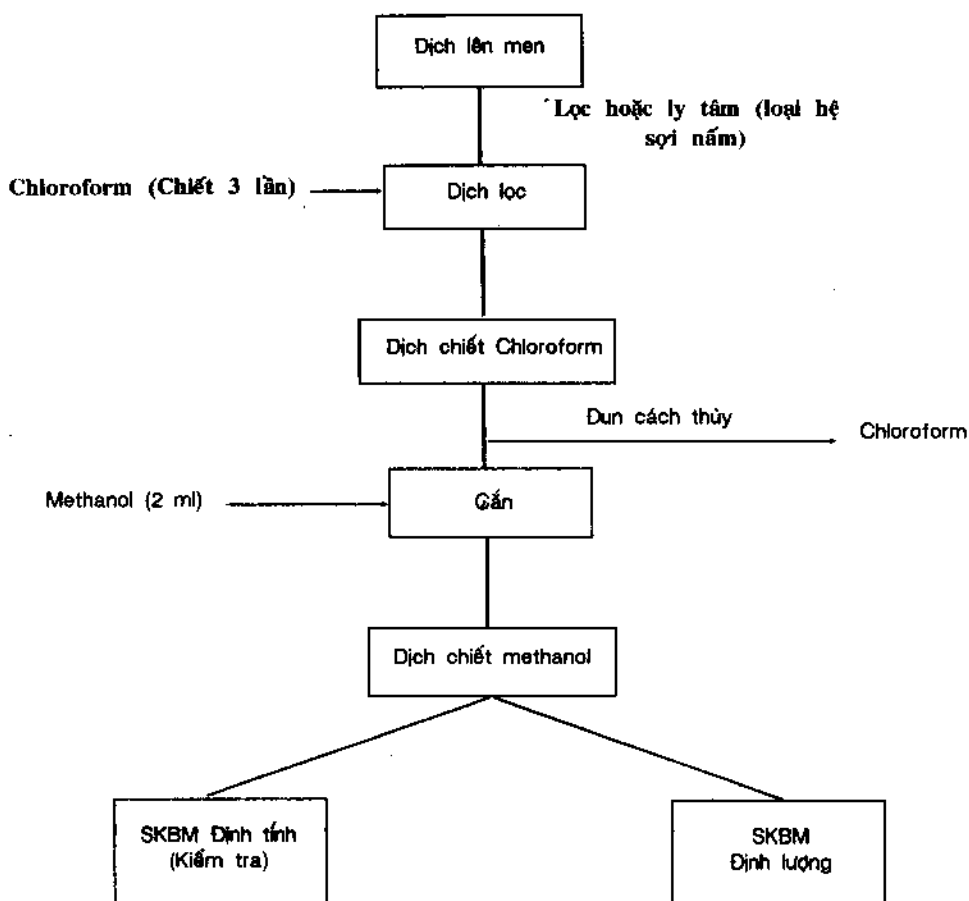
Môi trường lên men và phương pháp lên men aflatoxin tiến hành như ở 1.3.

Để chọn các chủng tạo thành aflatoxin cho hiệu suất cao, cần tiến hành định lượng aflatoxin của các dịch lên men nói trên. Việc định lượng này gồm 2 bước (hình 1.5).

- Chiết xuất aflatoxin của dịch lên men bằng dung môi.
- Định lượng aflatoxin bằng sắc ký bản mỏng (SKBM).

Để định lượng aflatoxin nên dùng các bản mỏng silicagel đúng tiêu chuẩn, thí dụ các bản mỏng silicagel Kieselgel 60 F₂₅₄ của hãng Merck, dày 0,2 mm, kích thước 15 x 15 hoặc 20 x 20 cm.

Aflatoxin chuẩn : các aflatoxin B1, G1, B2, G2 hoặc ít nhất các aflatoxin B1, G1 (thí dụ các aflatoxin chuẩn của hãng Fluka AG, Chem. Fabrik CH-9470 Buchs - CHLB Đức).



Hình 1.5. Sơ đồ qui trình định lượng aflatoxin để chọn các chủng thuộc các loài *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus* cho hiệu suất lên men aflatoxin cao (SKBM : sắc ký bán mỏng).

Có thể dùng một trong các hệ dung môi khai triển SKBM sau :

Chloroform - Methanol (97 : 3)

Chloroform - Methanol (95 : 5)

Aceton - Chloroform (1 : 9)

So sánh màu huỳnh quang và trị số R_f của dịch chiết methanol với aflatoxin chuẩn ở UV có λ : 365 nm.

Để khẳng định thêm các vết huỳnh quang trên sắc ký đồ là aflatoxin, phun acid nitric 50% lên sắc ký đồ, các vết aflatoxin đổi thành huỳnh quang màu vàng, hoặc phun acid sulfuric 25% lên sắc ký đồ, các vết aflatoxin đổi thành huỳnh quang màu đỏ gạch.

Để định lượng aflatoxin, cũng dùng SKBM như trên với dịch chiết methanol pha loãng, so sánh cường độ huỳnh quang của các dung dịch aflatoxin chuẩn đã biết trước nồng độ. Dịch chiết được chấm trên bản mỏng silicagel với các thể tích khác nhau, cùng trên bản mỏng chấm các dung dịch aflatoxin chuẩn.

Hàm lượng aflatoxin có trong dịch lên men được tính theo công thức :

$$A = \frac{S \cdot Y \cdot V}{W \cdot Z}$$

A : Lượng aflatoxin trong 1 lit dịch lên men (ng)

S : Thể tích dung dịch aflatoxin chuẩn được chấm trên bản mỏng (ml)

Y : Nồng độ của dung dịch chuẩn aflatoxin (ng/ml)

V : Thể tích dịch chiết (ml)

Z : Thể tích của dịch chiết chấm trên bản mỏng có cường độ huỳnh quang bằng cường độ huỳnh quang của S (ml)

W : Khối lượng dịch lên men dùng trong định lượng (g).

Ngoài phương pháp sắc ký cột nhỏ và SKBM, các phương pháp sắc ký lỏng cao áp, sắc khí khí, phương pháp ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) và phương pháp RIA/Radio Immunosorbent Assay cũng đã được dùng với mức độ khác nhau ở vài nước để xác định hàm lượng aflatoxin.

Sau khi đã chọn được chủng vi nấm tạo thành aflatoxin nhiều nhất trong môi trường lên men, cần lên men lại và định lượng nhiều lần để có số liệu trung bình về lượng aflatoxin này.

Các chủng vi nấm này cần được giữ giống trên thạch nghiêng, bằng phương pháp đông khô hoặc nitơ lỏng.

2. LÊN MEN VÀ CHIẾT XUẤT AFLATOXIN

Aflatoxin cũng như nhiều mycotoxin khác là các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp trong quá trình sinh trưởng, phát triển, quá trình trao đổi chất của một số loài vi nấm, chủ yếu là các loài *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus*. Cũng như nhiều sản phẩm trao đổi chất thứ cấp khác của vi sinh vật, của thực vật, người ta chưa biết rõ vai trò của các sản phẩm

này đối với đời sống của các sinh vật nói trên. Có thể sự tạo thành các sản phẩm trao đổi chất này gắn liền với sự kìm hãm dị hóa của một số enzym ở giai đoạn dinh dưỡng do sự dùng nhanh nguồn glucid trong môi trường của cơ thể vi sinh vật, và do đó khi giai đoạn này kết thúc, nhiều enzym mới có vai trò trong sự tạo thành các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp xuất hiện (J. Rivière, 1975). Và có thể cũng vì vậy mà aflatoxin được tạo thành khi bắt đầu hình thành bộ máy sinh bào tử trần, tăng dần đến giai đoạn sinh bào tử trần mạnh (ngày lên men thứ sáu), rồi giảm sút.

Mặc dù các mối liên hệ trao đổi chất giữa sự tạo thành bào tử trần và sự tạo thành aflatoxin chưa được rõ, nhưng các điều kiện nuôi dưỡng các loài vi nấm này liên quan rõ ràng đến kết quả tạo thành các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp của chúng, nói cách khác, đến kết quả lên men aflatoxin.

2.1. Lên men aflatoxin bởi các loài *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus*

A. flavus và *A. parasiticus* là những loài nấm hoại sinh, do đó chúng có khả năng phân giải các xác cơ thể hoặc các hợp chất hữu cơ bên ngoài cơ thể sống dùng làm chất dinh dưỡng. Để lên men tạo thành aflatoxin, chúng ta phải cung cấp cho các chủng nuôi cấy của 2 loài vi nấm này các chất dinh dưỡng thích hợp và nuôi cấy các chủng đó trong những điều kiện pH, nhiệt độ, thời gian thích hợp.

Nguồn dinh dưỡng cacbon. Như chúng ta biết, nấm có thể sử dụng các nguồn thức ăn cacbon rất khác nhau, hầu như không có loại hợp chất cacbon hữu cơ nào mà không có loài nấm này hay loài nấm khác không sử dụng được. Tuy nhiên mỗi loài nấm đồng hóa loại hợp chất này tốt hơn loại hợp chất khác. Mặt khác, để thực hiện các quá trình sinh trưởng, phát triển khác nhau, nấm thường lại có những nhu cầu không giống nhau về loại thức ăn này, thí dụ loại đường thích hợp với sự tạo thành hệ sợi nấm chưa chắc đã thích hợp với sự tạo thành các cơ quan sinh sản (như bộ máy sinh bào tử trần và bào tử trần), hoặc các sản phẩm trao đổi chất. Vì vậy sự thích hợp của một nguồn thức ăn cacbon được đánh giá bằng những chỉ tiêu khác nhau: mức độ sinh trưởng tối đa của hệ sợi nấm, mức độ tạo thành tối đa số lượng bào tử, mức độ tạo thành tối đa các sản phẩm trao đổi chất. Việc chọn chỉ tiêu nào phụ thuộc vào mục đích của quá trình lên men (lên men thu nhận sinh khối hay lên men thu nhận sản phẩm trao đổi chất).

Trừ một số ít các loài vi nấm có thể sử dụng nguồn thức ăn cacbon là các alcan như parafin, các hydrocarbua trong xăng dầu, các acid béo,

phần lớn các loài vi nấm có nguồn thức ăn cacbon thích hợp là hydrat cacbon. Mặc dù hai loài *A.flavus* và *A.parasiticus* có các enzym phân giải tinh bột, nhưng nguồn hydrat cacbon thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của 2 loài vi nấm này là saccharose và glucose. Môi trường Czapek và Czapek-Dox lần lượt có nguồn thức ăn này là saccharose và glucose là những môi trường tối ưu của *A.flavus* và *A.parasiticus*, và cũng là những môi trường chủ yếu để định loại các loài vi nấm này.

Nguồn dinh dưỡng nitơ - Các loài nấm khác nhau có nhu cầu khác nhau về nguồn dinh dưỡng nitơ, và thường có khả năng sử dụng cả các nguồn nitơ hữu cơ và các nguồn nitơ vô cơ.

Có những loài vi nấm sinh trưởng, phát triển tốt trong môi trường có muối amon, ngược lại một số loài vi nấm khác phát triển tốt hơn ở môi trường có nitrat. Nhiều loài trong đó có các loài *A.flavus* và *A.parasiticus* có khả năng đồng hóa các muối amon và nitrat. Đôi khi có những loài vi nấm không phát triển được trên các môi trường chứa muối amon, do khi cơ thể đồng hóa NH_4^+ , trong môi trường sẽ tích lũy các anion (SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , Cl^- , v.v.), làm hạ thấp pH của môi trường. Ngược lại, nitrat là những muối kiềm sinh lý. Khi cơ thể vi nấm đồng hóa NO_3^- , môi trường sẽ tích lũy các cation (K^+ , Na^+ , v.v.), do đó làm tăng pH của môi trường. Các loài *A.flavus* và *A.parasiticus* là các loài đồng hóa tốt cả các muối nitrat và amon, tuy nhiên trong lên men aflatoxin, một số thí nghiệm chứng tỏ rằng khi sử dụng muối amon làm nguồn dinh dưỡng nitơ, lượng aflatoxin tạo thành bởi các chủng của 2 loài vi nấm nhiều hơn (D.Ba và ct., 1977, T.D. Cardona, 1992).

Ngoài các nguồn nitơ vô cơ, nhiều loài vi nấm sử dụng tốt nhiều nguồn nitơ hữu cơ (protein, pepton, peptid, acid amin, v.v.). Nghiên cứu ảnh hưởng của các acid amin đến sự tạo thành aflatoxin của *A.flavus*, người ta thấy acid glutamic, prolin kích thích sự tạo thành các aflatoxin B, tryptophan kích thích sự tạo thành các aflatoxin G, alanin, asparagin, histidin, lysin, methionin không làm tăng hiệu suất lên men aflatoxin (M.F. Nexterin, V.I.A.Vixxarionova, 1966). Riêng với asparagin, một số người khác lại bổ sung acid amin này vào môi trường lên men aflatoxin, vì thu nhận được lượng aflatoxin từ môi trường lên men này lớn hơn lượng aflatoxin từ môi trường lên men có cùng thành phần nhưng không được bổ sung asparagin (D.Ba và ct., tài liệu đã dẫn).

Các nguyên tố khoáng - Các muối khoáng là những thành phần không thể thiếu trong các môi trường nuôi cấy, lên men các sản phẩm trao đổi chất của vi nấm, vì những thành phần này có những chức năng sinh lý và cấu trúc quan trọng ở tế bào vi nấm.

Các nguyên tố khoáng cần thiết đối với sự sinh trưởng, phát triển của vi nấm gồm các nguyên tố đa lượng (P, S, K, Mg, Ca) và các nguyên tố vi lượng (Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Ni, v.v.).

P thường chiếm tỷ lệ cao nhất trong thành phần khoáng của tế bào vi nấm, tham gia vào cấu tạo một số hợp chất hữu cơ của tế bào như nucleoprotein, photphoprotein, v.v., có mặt trong nhiều coenzim quan trọng như ADP, ATP, UDP, UTP, CoA, v.v. S tham gia vào quá trình trao đổi glucid của tế bào, tham gia hoạt hóa nhiều loại enzym như amylaza, invertaza, ATP-aza, v.v. Mg ngoài tính chất là một cofactor đối với nhiều enzym, cũng tham gia hoạt hóa nhiều enzym như esteraza, photphopheraza, carboxylaza, transacetylaza, v.v. Nồng độ Mg trong tế bào được xác định là có ảnh hưởng rõ rệt đến việc liên kết hay tách rời nhau các tiểu phần 60S và 40S của ribosom. Ca có vai trò cầu nối trung gian giữa nhiều thành phần quan trọng trong tế bào vi nấm (giữa các nucleotit, giữa protein và acid nucleic), ảnh hưởng đến sự hình thành các cấu trúc không gian ổn định của ribosom, nhân, v.v. Fe là nguyên tố vi lượng (cũng được coi là nguyên tố đa lượng) tham gia vào cấu trúc porphyrin sắt của hệ thống enzym chuyển vận electron như cytochrom, cytochromoxydaza, cũng tham gia vào hoạt hóa một số enzym như carboxylaza, arginaza, v.v. Các nguyên tố vi lượng khác chủ yếu tham gia vào hoạt hóa các enzym khác nhau.

Nhiều loài vi nấm có tính mẫn cảm rất cao đối với sự có mặt và nồng độ của các muối khoáng trong môi cấy, môi trường lên men (thay đổi một số đặc điểm hình thái, sinh trưởng, phát triển), do đó cần phải cho đủ (không thừa, không thiếu) các thành phần muối khoáng trong mỗi loại môi trường.

Trong lên men aflatoxin, các muối $ZnSO_4$, $FeSO_4$, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, $CaCl_2$ với nồng độ thích hợp có tác dụng tốt đối với sự tạo thành các mycotoxin này.

Nguồn dinh dưỡng của môi trường là yếu tố ảnh hưởng quyết định đến sự sinh trưởng, phát triển, đến sự tạo thành aflatoxin của các loài *A.flavus*, *A.parasiticus*. Ngoài ra pH của môi trường, nhiệt độ nuôi cấy cũng có ảnh hưởng như vậy đến hiệu suất lên men aflatoxin. pH ban đầu ít ảnh hưởng đến sự tạo thành aflatoxin, tuy nhiên pH tối ưu đối với sự sinh trưởng của *A. flavus* trong khoảng pH 4 và 5 (Dierner và Davis, 1969). Nhiệt độ tối ưu đối với sự sinh trưởng cũng như đối với sự tạo thành aflatoxin là nhiệt độ trong khoảng 24 - 28°C, trên 45°C và dưới 12°C, *A.flavus* không mọc hoặc mọc rất yếu (Schroeder và ct., 1967). *A.flavus* và *A.parasiticus* có thể sinh trưởng tốt và tạo thành aflatoxin ở

môi trường có hàm lượng nước khác nhau, do đó có thể lên men aflatoxin ở cả môi trường lỏng và môi trường rắn, tuy nhiên ở môi trường có hàm lượng nước quá nhỏ (dưới 8%), các loài vi nấm này không mọc hoặc mọc kém.

Trong công nghệ lên men aflatoxin, có thể dùng kỹ thuật lên men lỏng hay lên men rắn.

Lên men lỏng (liquid state fermentation) sử dụng môi trường nước, thường sử dụng môi trường Czapek không có thạch. Môi trường Czapek có thành phần muối khoáng thích hợp cho sự tăng trưởng và sự tạo thành aflatoxin của các loài vi nấm *A.flavus* và *A.parasiticus*, trừ trường hợp muối NaNO_3 . Như đã nói, NaNO_3 là nguồn đạm vô cơ của môi trường nuôi cấy vi nấm, sau khi cơ thể vi nấm đồng hóa ion NO_3^- , Na^+ tích lũy làm tăng pH của môi trường, do đó ảnh hưởng không tốt đến sự tăng trưởng và tạo thành aflatoxin. Vì vậy muối NaNO_3 trong môi trường Czapek thường được thay bằng muối amon nitrat. Asparagin thường cũng được bổ sung vào môi trường lên men aflatoxin để tăng hiệu suất lên men.

Kỹ thuật lên men rắn (solid state fermentation) cũng như kỹ thuật lên men lỏng là sự mô phỏng một dạng sinh thái của các hoạt động sống của vi sinh vật trong tự nhiên, xảy ra trong quá trình phân giải hiếu khí các loại cơ chất không tan. Kỹ thuật lên men rắn sử dụng môi trường là khối cơ chất sếp, làm từ các chất dinh dưỡng ở thể rắn hòa tan (các muối khoáng) hay không hòa tan trong nước (ngô, gạo, v.v.), và trong một số trường hợp bao gồm cả một số chất độn làm cho môi trường sếp, thoáng khí hơn như chấu, và nước với hàm lượng thích hợp.

Ở lên men lỏng cũng như ở lên men rắn aflatoxin bằng các chủng thuộc các loài *Aspergillus flavus* và *A.parasiticus*, sự tạo thành aflatoxin bắt đầu khi hệ sợi nấm bắt đầu tạo thành bộ máy sinh bào tử trần, tăng dần đến khi bào tử trần được sinh ra nhiều nhất vào ngày lên men thứ 6 (đối với trường hợp lên men lỏng), rồi giảm dần. Vì vậy để có hiệu suất lên men cao nhất, aflatoxin được chiết xuất từ môi trường lên men lên men lỏng ngay sau ngày lên men thứ 6. Nhiệt độ lên men ở cả lên men lỏng và lên men rắn thường ở 28°C , như chúng ta đã biết, là nhiệt độ thích hợp với cả sự sinh trưởng, phát triển, và sự tạo thành aflatoxin của 2 loài vi nấm này.

Lên men lỏng có những ưu điểm chủ yếu : dịch lọc thu được từ môi trường lên men sau khi quá trình lên men kết thúc có ít loại tạp chất, lượng tạp chất cũng ít, thuận lợi cho việc chiết xuất aflatoxin ; công nghiệp hóa thuận lợi, do đó có thể lên men với khối lượng lớn (hàng

chục, thậm chí hàng trăm m^3) ; tự động hóa, điện tử hóa dễ dàng, kể cả khâu phân tích theo dõi các thông số lên men, sự biến đổi của các chất dinh dưỡng trong môi trường, hiệu suất tạo thành aflatoxin trong quá trình lên men ; chất thải công nghiệp chủ yếu là chất lỏng, nên việc xử lý ít khó khăn. Vì những ưu điểm trên, nên cũng như công nghệ sản xuất các hợp chất có tác dụng sinh học khác (enzim, vitamin, acid amin, kháng sinh, một số acid hữu cơ, v.v.), công nghệ lên men aflatoxin ở các nước đều dùng kỹ thuật lên men lỏng. Lên men rắn aflatoxin chỉ thích hợp để sản xuất một lượng nhỏ sản phẩm, trong các điều kiện trang thiết bị thiếu thốn.

Dưới đây là kỹ thuật lên men lỏng và lên men rắn ở mức độ phòng thí nghiệm.

Kỹ thuật lên men lỏng

- Môi trường lên men : môi trường lên men sơ bộ chọn lọc các chủng (xem ở đoạn 1.3).

Cấy truyền nấm từ ống thạch nghiêng giữ giống (hay từ một ống giống đông khô) sang một ống thạch nghiêng (môi trường Czapek). Nuôi cấy nấm ở 28°C trong tủ ẩm, theo dõi hàng ngày để biết chắc chắn chủng nấm không bị nhiễm vi khuẩn hay các loài vi nấm khác. Sau ngày nuôi cấy thứ 6, dùng ngay các ống thạch nghiêng này để lên men aflatoxin.

Làm dịch treo bào tử trần trong nước cất tiệt trùng, khoảng 100 bào tử trong 1 ml. Cấy ngay dịch treo bào tử vào môi trường lên men, cấy 5 ml dịch treo trong 100 ml môi trường chứa sẵn trong bình nón có dung tích 500 ml. Lắc ngang, 120 - 150 lần/min. Nhiệt độ lên men 28°C . Cuối ngày lên men thứ 6, chiết xuất aflatoxin.

Để chiết xuất aflatoxin từ môi trường lên men, dùng các dung môi hòa tan aflatoxin (chloroform, methanol, ethanol, benzen, acetone) và các dung môi không hòa tan aflatoxin nhưng hòa tan lipid để loại lipid có trong môi trường.

Có thể chiết xuất aflatoxin theo 4 bước :

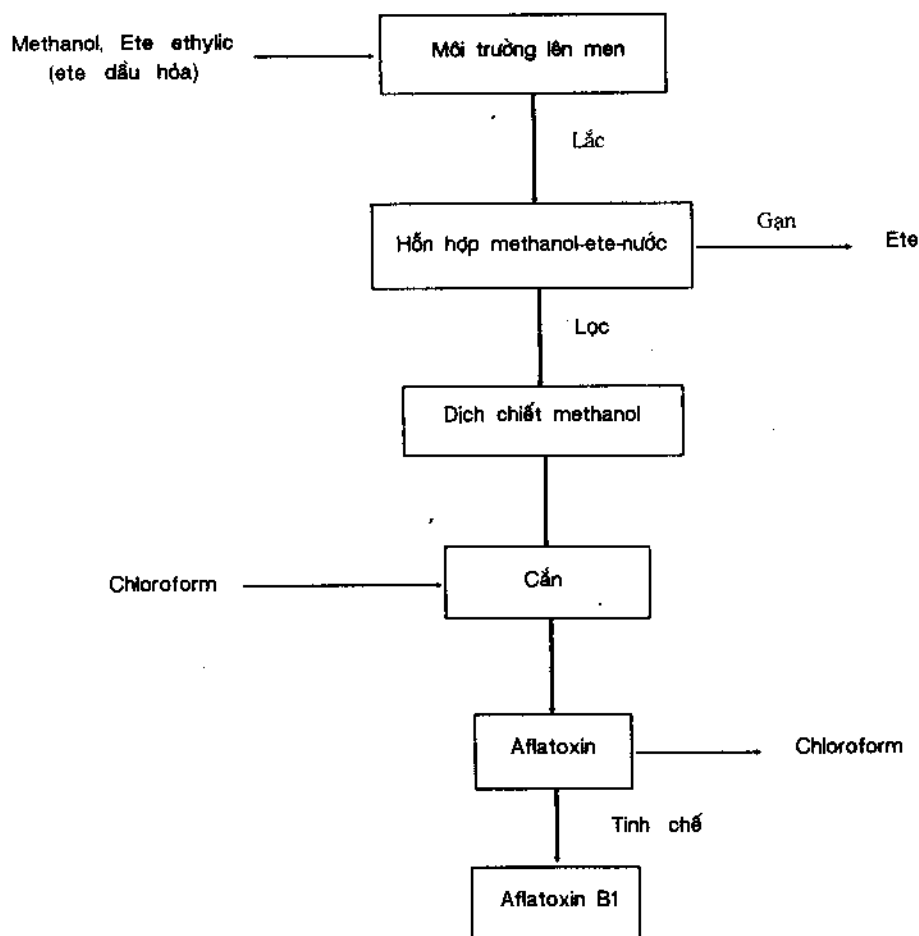
Bước 1 : Chiết xuất aflatoxin bằng methanol có trong môi trường lên men (chiết xuất với cả sinh khối để lấy được hết aflatoxin trong môi trường).

Bước 2 : Loại bỏ lipid có trong dịch chiết bằng ete dầu hỏa hay ete ethylic.

Bước 3 : Chiết xuất aflatoxin từ cặn sau khi đã loại bỏ lipid và chiết bằng methanol.

Bước 4 : Tinh chế aflatoxin B1 bằng cột sắc ký.

Thí dụ về chiết xuất aflatoxin B1 được trình bày trong hình 1.6.



Hình 1.6. Sơ đồ chiết xuất aflatoxin B1 từ môi trường lên men lỏng

Áp dụng kỹ thuật lên men và chiết xuất aflatoxin vừa nói có thay đổi, N.H.Văn (1993) đã lên men và chiết xuất aflatoxin từ một chủng thuộc loài *Aspergillus flavus* (chủng NHA-003, tổ bộ môn Vi nấm - Kháng sinh, trường Đại học Dược Hà Nội). Phát triển của chủng NHA-002 trên môi trường lên men, kết quả xác định aflatoxin có trong dịch chiết và kết quả chiết xuất aflatoxin B1 được trình bày trong các bảng 1.9 và 1.10

Bảng 1.9. Sự phát triển của chủng NHA-002 trên môi trường lỏng (Nhiệt độ nuôi cấy 28°C ; thời gian nuôi cấy 6 ngày) (N.H.Văn, 1993)

Đặc điểm Ngày nuôi cấy	Môi trường lên men		Sự phát triển của nấm	
	Màu sắc	Sự tạo nhầy	Hệ sợi nấm	Khối conidi (bào tử trần)
1	Không biến đổi		Chưa có	
2	Không màu	Ít chất nhầy	Hệ sợi nấm bắt đầu hình thành trên bề mặt môi trường	Chưa có
3	Màu vàng nhạt	Chất nhầy tăng dần và phân tán vào môi trường	Hệ sợi nấm lớn dần trên bề mặt môi trường	Bắt đầu xuất hiện conidi màu xanh lục trên bề mặt hệ sợi nấm
4	Màu vàng nâu	Chất nhầy tăng dần màu trắng đục	Hệ sợi nấm lớn dần chiếm gần hết mặt thoáng môi trường	Số lượng conidi tăng dần trên bề mặt hệ sợi nấm
5	Màu vàng nâu	Có nhiều đám nhầy lơ lửng trong môi trường	Hệ sợi nấm chiếm hết mặt thoáng môi trường	Conidi màu lục vàng chiếm gần hết bề mặt hệ sợi nấm
6	Màu nâu nhạt	Có nhiều chất nhầy trong môi trường	Hệ sợi nấm chiếm hết mặt thoáng môi trường	Conidi màu lục vàng chiếm hết bề mặt hệ sợi nấm

Bảng 1.10. Kết quả các định aflatoxin bằng SKBM của dịch chiết từ môi trường lỏng lên men của chủng NHA-003 (B : xanh ; G : lục) (N.H.Văn, 1993)

Dịch chiết	Số vết huỳnh quang	Màu huỳnh quang	Rf	Thay đổi màu huỳnh quang bởi HNO_3	Có mặt của aflatoxin
Hỗn hợp aflatoxin (B_1, B_2, G_1)	3	B B G	0,69 0,64 0,57	+ + +	B_1 B_2 G_1
Dịch chiết chloroform bình nuôi cấy số 1	1	B	0,69	+	B_1
Dịch chiết chloroform bình nuôi cấy số 2	1	B	0,69	+	B_1
Dịch chiết chloroform bình nuôi cấy số 3	1	B	0,69	+	B_1
Dịch chiết chloroform bình nuôi cấy số 4	1	B	0,69	+	B_1
Dịch chiết chloroform bình nuôi cấy số 5	1	B	0,69	+	B_1
Dịch chiết chloroform bình nuôi cấy số 6	1	B	0,69	+	B_1
Dịch chiết chloroform bình nuôi cấy số 7	1	B	0,69	+	B_1
Dịch chiết chloroform bình nuôi cấy số 8	1	B	0,69	+	B_1

Tiến hành lên men với 1 lit môi trường, N.H.Văn (tài liệu đã dẫn) đã chiết được $2382 \pm 135 \mu g$ aflatoxin B_1 .

Kỹ thuật lên men rắn

• Môi trường lên men : môi trường có thành phần dinh dưỡng chủ yếu là ngô hoặc lạc vì đó là những cơ chất thích hợp nhất cho sự tạo thành aflatoxin của các loài *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus*, được bổ sung thêm cám gạo để làm phong phú, đa dạng thêm nguồn dinh dưỡng bản (thức ăn nguồn cacbon, nguồn nitơ), đồng thời để bổ sung thêm nguồn vitamin B. Mùn của được cho vào môi trường nhằm làm tăng độ s

Ngoài ra để bào tử trần nảy sợi tốt, hệ sợi nấm tăng trưởng nhanh, nhất là trong giai đoạn lên men đầu, khi các enzym amylaza, proteaza ngoại bào do vi nấm sản sinh còn ít, đồng thời để làm ướt nguyên liệu, cho thêm vào các thành phần môi trường dung dịch Czapek (môi trường Czapek không có thạch).

Bốn môi trường sau đây đã được tiến hành thực nghiệm để lên men rắn (N.H.Văn, tài liệu đã dẫn) :

Môi trường I :

Ngô xay thành mảnh	800g
Cám gạo	200g
Dung dịch Czapek vừa đủ	

Môi trường II :

Ngô xay thành mảnh	700g
Cám gạo	200g
Mùn cưa	100g
Dung dịch Czapek vừa đủ	

Môi trường III :

Lạc nhân nghiền vụn	100g
Ngô xay thành mảnh	600g
Cám gạo	200g
Mùn cưa	100g
Dung dịch Czapek vừa đủ	

Môi trường IV (Môi trường kiểm tra) : thành phần như môi trường IV, nhưng không cấy nấm, để kiểm tra sự có mặt của aflatoxin trong các nguyên liệu.

Tiến hành làm môi trường và nuôi cấy vi nấm : trộn đều các thành phần rắn, phân phối vào các bình nón có dung tích 500 ml, mỗi bình 100g hỗn hợp nguyên liệu. Thêm dung dịch Czapek khoảng 40 - 50 ml, hấp tiệt trùng ở 120°C trong 50 min. Khi môi trường trong bình đã nguội, cấy vào mỗi bình 5 ml dịch treo bào tử trần lấy từ một ống thạch nghiêng có khuẩn lạc vi nấm 6 ngày tuổi. Nhiệt độ nuôi cấy : 28°C.

Về thời gian lên men, khác với trường hợp môi trường lỏng, kết quả thí nghiệm cho thấy thời gian lên men 8 ngày cho hàm lượng aflatoxin B1 cao nhất (bảng 1.11).

Bảng 1.11. Hàm lượng aflatoxin trong môi trường lên men III (Chủng nấm : *Aspergillus flavus* NHA-003, nhiệt độ lên men : 28°C)

Ngày lên men	Hàm lượng aflatoxin B1 ($\mu\text{g/kg}$)
4	372
5	6696
6	10.416
7	14.136
8	14.880
9	14.880

Kết quả theo dõi sự sinh trưởng, phát triển của chủng *Aspergillus flavus* NHA-003 trên 3 môi trường I, II, III cho thấy chủng vi nấm này tăng trưởng tốt trên cả 3 môi trường, nhưng có thể vì ở các môi trường II, III có mùn của nên môi trường sộp hơn, do đó hệ sợi nấm đâm sâu vào môi trường nhanh hơn là ở môi trường I, mặt khác, sự hình thành bào tử trần ở môi trường III (môi trường có lạc) sớm hơn 1 ngày so với ở các môi trường I và II (Các bảng 1.12, 1.13, 1.14).

Bảng 1.12. Sự phát triển của chủng NHA-003 trên môi trường số 1 (Nhiệt độ nuôi cấy 28°C)

Ngày nuôi cấy	Sự phát triển	
	Hệ sợi nấm	Bào tử trần (conidi)
1	Rất ít	Chưa có
2	Những sợi nấm màu trắng xen kẽ trên bề mặt môi trường	Chưa có
3	Hệ sợi nấm phát triển mạnh, các sợi nấm đâm sâu vào cơ chất, chỗ đâm sâu nhất 15 cm tính từ bề mặt môi trường	Có 1 số conidi màu vàng lục trên bề mặt hệ sợi nấm
4	Các sợi nấm đâm sâu vào cơ chất, chỗ đâm sâu nhất 2,5 cm tính từ bề mặt môi trường	Số lượng conidi tăng nhanh chiếm gần hết bề mặt hệ sợi nấm
5	Các sợi nấm đâm sâu tới đáy bình nuôi cấy (3,7 cm tính từ bề mặt môi trường)	Conidi chuyển dần sang màu xanh lục chiếm toàn bộ bề mặt hệ sợi nấm
6	Hệ sợi nấm chiếm toàn bộ môi trường	Số lượng conidi dày đặc, chiếm toàn bộ bề mặt hệ sợi nấm

Bảng 1.13. Sự phát triển của chủng NHA-003 trên môi trường số II
(Nhiệt độ nuôi cấy 28°C)

Ngày nuôi cấy	Sự phát triển	
	Hệ sợi nấm	Bào tử trần (conidi)
1	Rất ít	Chưa có
2	Xuất hiện những sợi nấm màu trắng trên bề mặt môi trường	Chưa có
3	Hệ sợi nấm phát triển mạnh, các sợi nấm đâm sâu và cơ chất, chỗ sâu nhất 2 cm tính từ bề mặt môi trường	Xuất hiện các đốm conidi màu vàng lục trên bề mặt hệ sợi nấm
4	Các sợi nấm đâm sâu tới đáy bình nuôi cấy (4 cm tính từ bề mặt môi trường)	Khối conidi tăng về số lượng, chiếm gần hết bề mặt hệ sợi nấm
5	Các sợi nấm màu trắng chiếm gần hết khối môi trường	Conidi chuyển dần sang màu xanh lục, chiếm toàn bộ bề mặt hệ sợi nấm
6	Các sợi nấm màu trắng chiếm toàn bộ khối môi trường	Khối conidi màu xanh lục dày đặc trên bề mặt hệ sợi nấm

Bảng 1.14. Sự phát triển của chủng NHA-003 trên môi trường số III
(Nhiệt độ nuôi cấy 28°C)

Ngày nuôi cấy	Sự phát triển	
	Hệ sợi nấm	Bào tử trần (conidi)
1	2	3
1	Rất ít	Chưa có
2	Xuất hiện những sợi nấm màu trắng trên bề mặt môi trường	Xuất hiện những conidi màu xanh lục trên bề mặt hệ sợi nấm
3	Hệ sợi nấm phát triển mạnh, các sợi nấm đâm sâu vào cơ chất 2 cm tính từ bề mặt môi trường	Số lượng conidi tăng nhanh trên bề mặt hệ sợi nấm

1	2	3
4	Hệ sợi nấm tiếp tục phát triển mạnh, các sợi nấm đâm sâu tới đáy bình nuôi cấy (4cm tính từ bề mặt môi trường)	Khối conidi màu vàng lục chiếm toàn bộ bề mặt hệ sợi nấm
5	Hệ sợi nấm màu trắng chiếm gần hết khối môi trường	Conidi chuyển dần sang màu xanh lục
6	Hệ sợi nấm màu trắng chiếm toàn bộ khối môi trường	Khối conidi màu xanh lục dày đặc trên bề mặt hệ sợi nấm

Hai phương pháp sau đây đã được sử dụng để chiết xuất aflatoxin từ môi trường lên men rắn đối với *Aspergillus flavus* :

• *Phương pháp 1 chiết xuất aflatoxin từ môi trường rắn :*

Dùng 400 ml chloroform cho 100g môi trường, chiết 3 lần (lần 1 dùng 200 ml chloroform, lần 2 và 3 mỗi lần dùng 100 ml chloroform), bằng cách ngâm và lắc môi trường trong chloroform 15 min, sau đó lọc bằng gạc để loại phần lớn sinh khối và một phần tạp chất (phần còn lại của môi trường mà nấm chưa phân giải và chưa hấp thu).

Các dịch lọc được gộp chung lại có màu xanh đen do bào tử trần đi qua vài gạc, do phần môi trường có kích thước nhỏ còn lại và do các sắc tố do nấm tạo thành trong quá trình lên men. Dịch lọc qua vài gạc được lọc lại qua giấy lọc Whatman. Một số tạp chất bị giữ lại trên giấy lọc nên dịch lọc có màu vàng sẫm. Dịch lọc được cất thu hồi hết chloroform, được cần màu vàng. Cần được hòa tan trong 100 ml hỗn hợp metanol và ete dầu hỏa (50 : 50 theo thể tích). Thêm vào hỗn hợp 100 ml nước cất. Cho hỗn hợp này vào bình gạc lắc để phân lớp. Lớp ete dầu hỏa ở trên có màu vàng sẫm do sắc tố và chất béo tan trong lớp này, lớp metanol ở dưới được tách riêng. Cạn thu được sau khi bốc hơi metanol được hòa trong 10 ml chloroform. Dịch chloroform dùng để phân tích bằng SKBM và sau đó để tinh chế (các hình 1.7 và 1.9). Kết quả xác định aflatoxin trong dịch chiết từ môi trường nuôi cấy được trình bày trong bảng 1.15.

Bảng 1.15. Kết quả xác định aflatoxin trong các dịch chiết từ môi trường rắn nuôi cấy chủng NHA-003 bằng phương pháp SKBM (B : xanh, G : lục)

Dịch chiết	Đặc điểm xác định				
	Số vết huỳnh quang	Màu huỳnh quang	Rf	Sự thay đổi màu huỳnh quang bởi HNO ₃	Aflatoxin có mặt
Hỗn hợp aflatoxin chuẩn (B ₁ , B ₂ , G ₁)	3	B B G	0,71 0,66 0,58	+ + +	B ₁ B ₂ G ₁
Dịch chiết môi trường số I	2	B G	0,71 0,58	+ +	B ₁ G ₁
Dịch chiết môi trường số II	2	B G	0,71 0,58	+ +	B ₁ G ₁
Dịch chiết môi trường số III	2	B G	0,71 0,58	+ +	B ₁ G ₁
Dịch chiết môi trường số IV	0	0	0	0	0

Trên sắc ký đồ của dịch chiết môi trường số IV (không cấy nấm) không có vết huỳnh quang chứng tỏ các nguyên liệu lạc, ngô, cám gạo, mùn cưa dùng làm môi trường không có aflatoxin. Sắc ký đồ của dịch chiết từ môi trường số I, II, III đều có 2 vết huỳnh quang, một vết có giá trị Rf 0,71, màu xanh (B) và thay đổi màu huỳnh quang từ xanh sang vàng khi phun acid nitric tương ứng với các đặc điểm của aflatoxin B₁ chuẩn. Vết còn lại có những đặc điểm : Rf = 0,58, màu lục, thay đổi màu huỳnh quang lục sang vàng khi phun acid nitric, tương ứng với aflatoxin G₁.

Trong phương pháp này dung môi chiết ban đầu là chloroform nên dịch chiết cuối cùng lẫn nhiều tạp chất (trên sắc ký đồ có nhiều vết bẩn không có huỳnh quang).

• *Phương pháp 2 chiết xuất aflatoxin từ môi trường rắn :*

Ngâm 100g môi trường lên men trong 500 ml hỗn hợp aceton nước (tỷ lệ 80/20 theo thể tích) trong 1 giờ (thỉnh thoảng lắc). Lọc hỗn hợp bằng vải gạc được dịch lọc màu nâu sẫm. Dịch lọc qua vải gạc được lọc lại qua giấy lọc Whatman, các tiểu phân nhỏ của môi trường, sinh khối, và một số chất màu được giữ lại trên giấy lọc. Vì aceton vừa tan trong

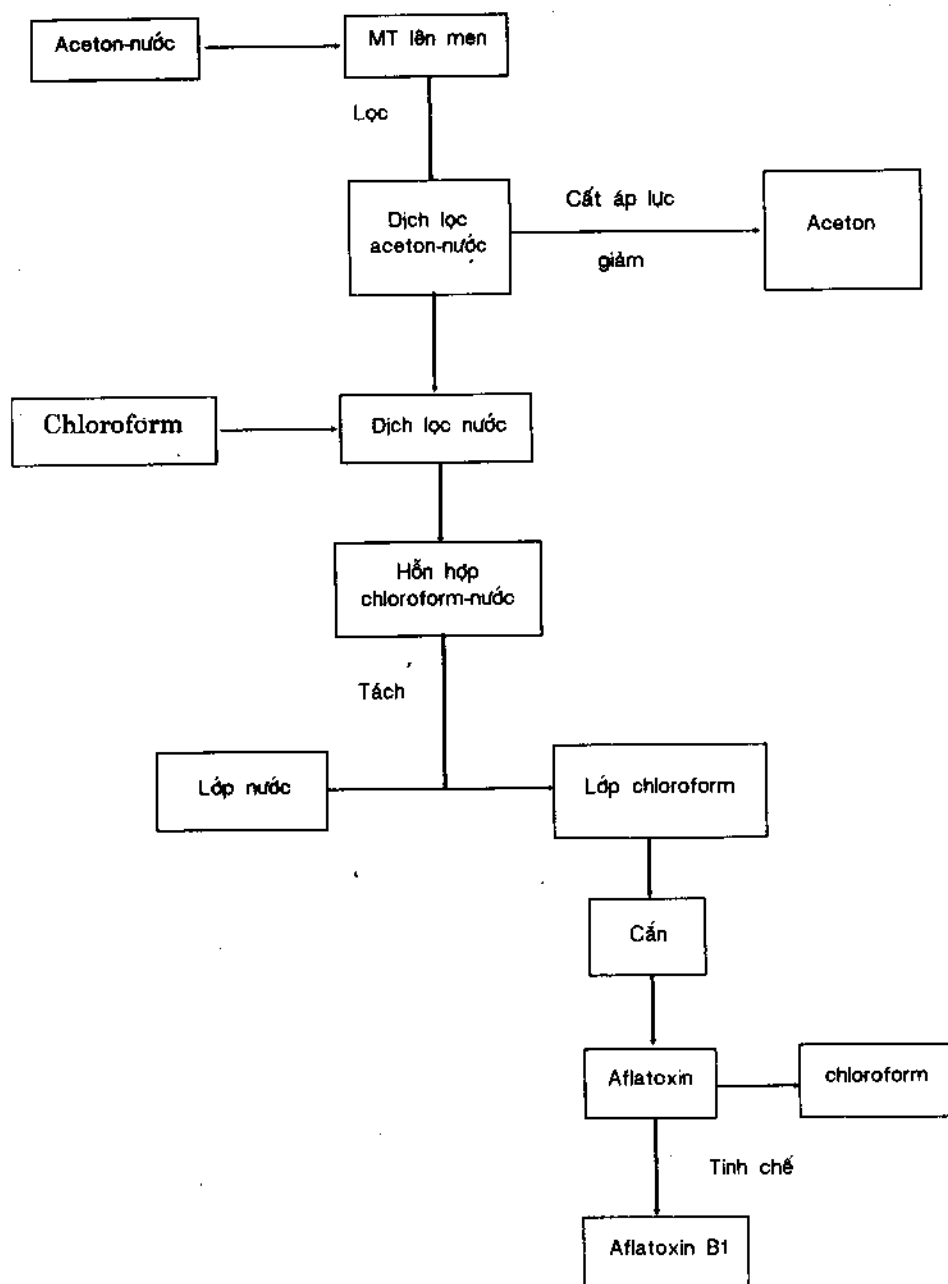
nước, vừa tan trong chloroform, nếu dùng chloroform chiết aflatoxin trong hỗn hợp aceton-nước này sẽ không thu được hết aflatoxin nên loại aceton trong hỗn hợp aceton-nước bằng máy cất quay áp lực giảm. Sau khi hết aceton, pha nước còn lại được chiết 3 lần liên tiếp bằng chloroform, mỗi lần dùng 50 ml. Gộp các dịch chiết chloroform và cô còn 10 ml. Dịch chloroform cuối cùng này được xác định aflatoxin bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng, và sau đó để tinh chế (xem các hình 1.8 và 1.9).

Kết quả xác định aflatoxin trong dịch chiết từ môi trường rắn nuôi cấy chủng *NHA-003* theo phương pháp chiết 2 cũng giống như kết quả xác định aflatoxin trong dịch chiết từ môi trường rắn nuôi cấy nấm theo phương pháp chiết 1. Trên sắc ký đồ có 2 vết huỳnh quang : một vết có giá trị R_f là 0,71 tương ứng với màu huỳnh quang và R_f của aflatoxin chuẩn B_1 ; 1 vết có giá trị R_f nhỏ hơn ($R_f = 0,58$) có màu huỳnh quang và giá trị R_f tương ứng với aflatoxin G_1 . Tuy nhiên vết huỳnh quang có giá trị $R_f = 0,58$ rất mờ (cường độ huỳnh quang yếu) chứng tỏ nồng độ của nó trong dịch chiết từ môi trường rắn rất thấp hay lượng aflatoxin G_1 được tạo ra trong môi trường nuôi cấy rất nhỏ.

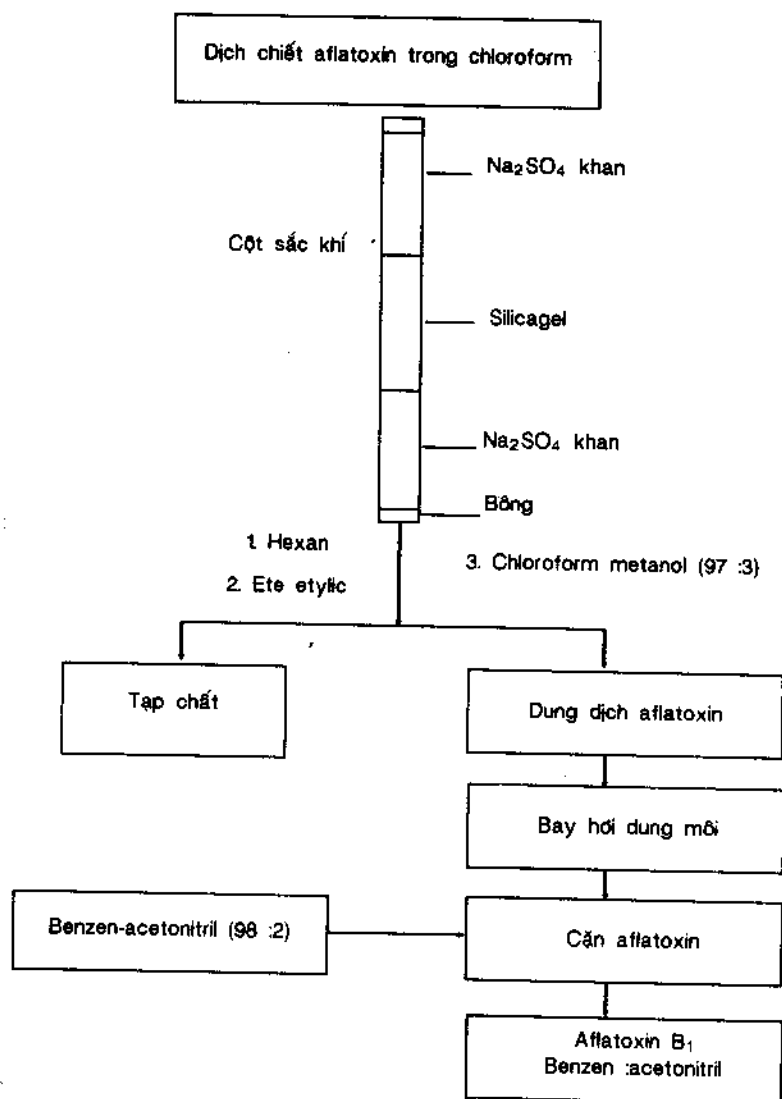
Sắc ký đồ của các dịch chiết theo phương pháp này có các vết tập ít hơn sắc ký đồ của các dịch chiết theo phương pháp 1, chứng tỏ dịch chiết theo phương pháp 2 còn lại ít tạp chất hơn.

Kết quả định lượng aflatoxin B_1 ở dịch chiết từ môi trường lên men chủng *Aspergillus flavus* *NHA-003* với các môi trường lên men rắn I, II, III cho thấy môi trường III có hiệu suất lên men cao nhất (bảng 1.16). Như chúng ta đã biết, môi trường III chỉ khác môi trường II là thành phần ngô xay được giảm đi 10%, thay bằng lạc nhân 10%. Như vậy, có thể việc giảm đi thành phần ngô không ảnh hưởng đến hiệu suất lên men aflatoxin và sự có mặt của lạc trong môi trường lên men là nguyên nhân tăng hiệu suất này. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của các nhà nghiên cứu trong và ngoài nước đều thấy rằng hàm lượng aflatoxin trên lạc bị nhiễm *A.flavus* cao nhất so với các loại lương thực, thực phẩm khác bị nhiễm loài vi nấm này (B.X.Đổng, 1976, 1999).

Tinh chế aflatoxin - Có thể tiến hành tinh chế aflatoxin bằng sắc ký cột (hình 1.8). Các dịch chiết aflatoxin được chạy qua cột silicagel. Khi lớp dịch chiết chloroform chạy tới lớp Na_2SO_4 khan ở phía dưới cột, loại tạp chất lẫn lộn bằng hexan và ete ethylic (với 50 ml dịch chiết, dùng 150 ml hexan và 150 ml ete ethylic). Phân hấp phụ bằng chloroform-methanol (97 : 3). Kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm bằng sắc ký bản mỏng với aflatoxin chuẩn. Nếu trên sắc ký đồ chỉ có một loại aflatoxin B_1 và không còn vết bản, kết tinh sản phẩm hoặc hòa tan sản phẩm trong benzen-acetonitril

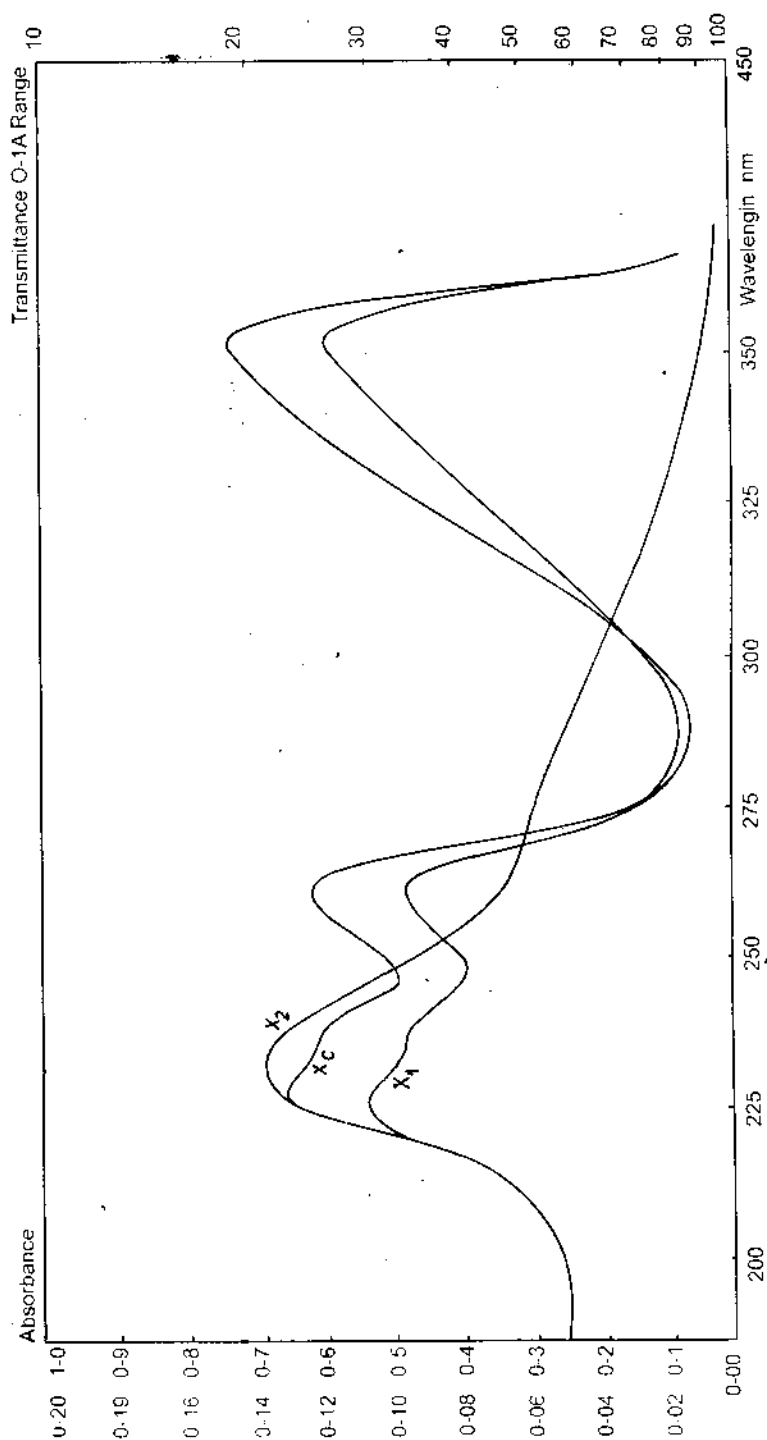


Hình 1.8. Quy trình chiết xuất aflatoxin từ môi trường rắn theo phương pháp 2 (MT : môi trường)



Hình 1.9. Quy trình tinh chế aflatoxin

Về phương pháp sinh học, phương pháp có độ nhạy cao, dễ thực hiện là phương pháp thử trên vịt con 2 ngày tuổi. Cho lô vịt con ăn thức ăn có hàm lượng aflatoxin B₁ 0,2 - 0,3 ppm cùng với lô đối chứng. Trong khoảng một tuần lễ, tất cả hoặc hầu hết các vịt con ăn thức ăn có aflatoxin sẽ chết, với các triệu chứng bệnh ở gan (sung huyết, chảy máu trong gan, hoại tử, thoái hóa mỡ, tăng sinh ống mật). Một số sinh vật (hay bộ phận cơ thể) cũng đã được thử nghiệm để kiểm tra aflatoxin (bảng 1.17).



Hình 1.10. Phổ hấp thụ tử ngoại của aflatoxin chuẩn B₁ và aflatoxin chiết từ môi trường nuôi cấy

(X_c : aflatoxin B₁ chuẩn ; X₁ : aflatoxin chiết xuất ; X₂ : dung môi)
(Do Phòng nghiên cứu Trung tâm, Đại học Dược Hà Nội thực hiện).

Bảng 1.17. Xác định aflatoxin bằng phương pháp sinh học
(Theo M.Polster, 1971)

Sinh vật (hay bộ phận cơ thể)	Độ nhạy
Vịt con 2 ngày tuổi	0,1 ppm
Phôi gà	0,025 - 0,048 ppm
Ảnh hưởng đến ấu trùng của loài <i>Heliothis virescens</i>	
Ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của <i>Artemia</i>	15 ppm
Ảnh hưởng đến sự nảy mầm và tạo thành diệp lục ở cây <i>Lepidum sativum</i>	1 - 10 ppm
Ức chế sự tăng trưởng của <i>Bacillus megaterium</i>	5 µg/ml môi trường

Phương pháp kiểm tra bằng sinh vật tuy có độ nhạy cao, nhưng ít được sử dụng vì hoặc tốn nhiều thời gian, hoặc ít chính xác vì phụ thuộc nhiều vào nguồn gốc, điều kiện nuôi dưỡng, v.v. Vì lẽ đó, phương pháp thường được sử dụng là các phương pháp hóa lý. Phương pháp này được thực hiện dựa vào các đặc điểm hóa lý của aflatoxin (bảng 1.18, hình 1.10).

Bảng 1.18. Tính chất lý hóa của một số aflatoxin

Aflatoxin	Công thức nguyên	Trọng lượng phân tử	Nhiệt độ nóng chảy			Huỳnh quang	Độ quay cực CHCl ₃ [α] _D	Hấp thụ tia UV		Hấp thụ tia IR CHCl ₃ ν _{max} (cm ⁻¹)
			*	**	***			λ (nm)	ε	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268 - 269	265 - 270	252 - 266,2	xanh lam	-558	223 265 362	25.600 13.400 21.800	1760 (mạnh) 1684 (yếu) 1632, 1589, 1562
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286 - 289	305 - 309	280 - 283	xanh lam	-492* (-430***)	222 265 362	69.600 9.200 (***11.00) 14.700 (**20.800)	
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244 - 246	247 - 250	246,7 - 247,3	xanh lục	-550	243 257 246 362	11.500 9.900 10.000 16.100	1760 1696 1630 1595

Bảng 1.18. Tính chất lý hóa của một số aflatoxin (tiếp)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	229-231	237-240		xanh lục	-473	221 245 265 365		
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299			xanh lam tím	-280	226 265 357		
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	320	293			tím		221 264 357		

* : Kết quả của Townsend,

** : Kết quả của Stubblefield và cộng sự

*** : Kết quả của Beljaars

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

Asao J. et al. 1965

The structure of aflatoxines B₁ et G₁. J.Am.Chem.Soc., 87 : 882-886.

Ba D. et al. 1997

Activité lipolytique et production d'aflatoxine chez *Aspergillus flavus*. Ann.Microbiol. /Inst. Pasteur, 128B : 87-93.

Bùi Xuân Đồng và cs. 1963

Một số nhận xét sơ bộ về nấm mốc trên dược liệu. Tạp chí Dược học, 3-1963 : 3-6.

Bùi Xuân Đồng, 1972

Contributions à l'étude taxonomique des Hyphomycètes /Deuteromycètes/. I. Esquisse d'une nouvelle classification. České Mykol., 26 : 155-166.

Bùi Xuân Đồng, 1976

Mầm mốc, độc và độc tố nấm mốc (Nấm mốc, bạn và thù, tập 2). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội (NXBKHKHT).

Bùi Xuân Đồng, 1997

Mycotoxin. Các phương pháp kiểm nghiệm. Giáo trình cao học, Đại học Dược Hà Nội.

Bùi Xuân Đồng, Hà Huy Kế, 1999

Nấm mốc và phương pháp phòng chống. NXBKHKHT.

Celia Sylos M. et al., 1989

Inexpensive rapid screening method for aflatoxin in peanut and peanut products. J.Sci.Food Agric., 49 : 167 - 172.

Lanford F. et Lanford J., 1971

Production d'aflatoxine par des souches d'*Aspergillus flavus* de différentes origines. Mycopath. et Mycol. appl., 43 : 323-328.

Lê Văn Bảy, 1993

Góp phần nghiên cứu một số thông số lên men aflatoxin, loại độc tố nấm mốc gây ung thư gan. Công trình tốt nghiệp Dược sĩ đại học, Đại học Dược Hà Nội.

Moreau Cl. (1974), 1980

Nấm mốc độc trong thực phẩm. Đặng Hồng Miên dịch, NXBKHKHT

Nesterin M.F., V.I.A.Vloxarionova (1966)

Aflatoxin, Kiều Hữu Ảnh dịch, trong Vi sinh vật học, tuyển tập, tập I, NXBKHK. 1971

Northolt M.D. et al., 1976

Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. J.Milk Food Technol., 39 : 170-174.

Nguyễn Huy Văn, 1994

Góp phần nghiên cứu phân loại *Aspergillus flavus* Link ex Fr. và các loài lân cận - Nghiên cứu lên men aflatoxin. Công trình tốt nghiệp Thạc sĩ Dược học, Đại học Dược Hà Nội.

Nguyễn Lâm Dũng, Bùi Xuân Đồng và Lê Đình Lương, 1982

Vi Nấm. NXBKHK.

Nguyễn Như Viên, 1990

Tình hình nhiễm aflatoxin B₁ trong thức ăn và độc hại của nó đối với gà công nghiệp. Luận án PTS. Nông nghiệp, Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

Nguyễn Thùy Châu, 1996

Nghiên cứu mức độ nhiễm nấm mốc sinh độc tố và độc tố nấm (mycotoxin) trên ngô, gạo Việt Nam và biện pháp phòng trừ. Luận án PTS. Sinh học, Đại học Khoa học tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội.

Raper K.B. et D.I.Fennell, 1965

The genus *Aspergillus*. Williams et Wilkins, Baltimore.

Schroecles H.W. et H.Hein., 1967

Aflatoxin production. Appl. Microbiol., 441 : 73-75.

Chương II

CÔNG NGHỆ BIẾN ĐỔI SINH HỌC

Biến đổi sinh học (biotransformation, microbial transformation) hay nói cho đầy đủ là biến đổi cấu trúc phân tử của các hợp chất hữu cơ ở một số vị trí trong phân tử của các hợp chất đó bằng phương pháp lên men vi sinh vật. Những công trình nghiên cứu đầu tiên thuộc lĩnh vực này là các công trình tạo thành testosterone của L.Mamoli, A.Vercellone (1937), của Koester và Cs. (1941). Năm 1949, Krámli và Horváth thông báo các loài *Proactinomyces roseus* và *Aerobacter* sp. có thể oxy hóa nguyên tử carbon ở vị trí 7 của phân tử cholesterol để có 7-hydroxycholesterol. Chúng ta nhớ lại cũng năm 1949, Hench và Cs. đã phát hiện thấy tác dụng đối với bệnh viêm thấp khớp của cortison. Tiếp theo đó, cortison và hydrocortison đã được chứng minh có tác dụng điều trị đối với các bệnh hen, xuyên, dị ứng, viêm ruột kết, v.v., công nghệ sản xuất các thuốc này được chú ý đặc biệt trong thời gian này. Người ta đồng thời cũng phát hiện các hợp chất steroid nói trên có tác dụng điều trị do sự có mặt của nguyên tử 11-Oxy trong phân tử của các hợp chất đó, và người ta đã nghiên cứu gắn nguyên tử oxy vào nguyên tử carbon ở vị trí 11 bằng phương pháp hóa học, nhưng phương pháp này vừa đắt tiền, vừa thực hiện khó khăn. Năm 1952, Peterson và Murray thông báo có thể oxy hóa hợp chất steroid ở các vị trí khác ngoài vị trí C₇ đã biết, bằng phương pháp biến đổi sinh học và đã tạo thành được 11 α -hydroprogesteron từ progesteron bằng một số chủng của loài *Rhizopus arrhizius*. Các thí nghiệm của các tác giả khác cho thấy có thể oxy hóa ở vị trí C₁₁ với nhiều hợp chất steroid khác ngoài progesteron, với vi nấm thuộc bộ Mucorales. Cũng năm 1952, những thí nghiệm được tiến hành với các loài thuộc chi *Aspergillus* của nhóm Nấm bất toàn (Fungi imperfecti) được phát hiện bởi Fried và Cs., với loài *Streptomyces fradiae* bởi Colingsworth và Cs. cũng cho những kết quả này.

Những nghiên cứu đầu tiên này và nhiều nghìn thông báo khoa học tiếp theo từ đó đến nay về biến đổi sinh học không những đối với các hợp chất steroid, mà cả với một số loài hợp chất khác như các cyclitol,

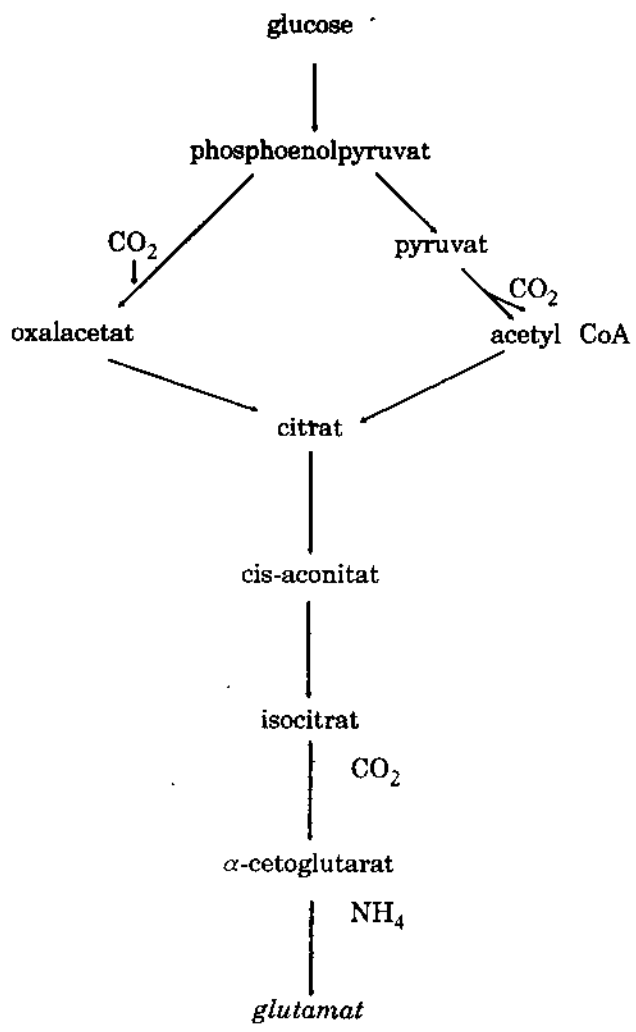
các aminoglycosid, v.v. bởi một loạt các loài vi khuẩn (bao gồm cả xạ khuẩn), nấm khác nhau, đã làm tăng hiểu biết về khả năng sinh học này, góp phần phát triển công nghiệp sản xuất các hormon sinh dục, các hợp chất corticoit làm thuốc, một số kháng sinh mới, một số vitamin, v.v., cũng đóng góp vào nghiên cứu phân loại học một số nhóm phân loại (taxon) vi nấm. Ở Việt Nam, từ những năm 1970, một số trường đại học và Viện nghiên cứu đã nghiên cứu thăm dò biến đổi sinh học hợp chất steroid với các loài thuộc chi *Rhizopus*, đặc biệt trước đó, từ những năm 1960, đã tiến hành điều tra cơ bản, nghiên cứu chiết xuất một số hợp chất steroid từ thực vật, động vật có ở nước ta, dùng làm nguyên liệu sản xuất thuốc, như neriolin từ cây trúc đào (*Nerium oleander* L.), các glycosid trợ tim từ cây đay (*Corchorus olitorius* L.), D-strophanthin từ cây sừng dê (*Strophanthus divaricatus* Hook. et Arn.), để xuất khẩu làm nguyên liệu biến đổi sinh học như hecogenin từ cây thùa (*Agave* sp.), diosgenin từ mía dò (*Costus speciosus* Smith), solasodin từ *Solanum aviculare* Forst. (cây di thực), cây lu lu dục (*Solanum nigrum* L.), một số hợp chất steroid từ nọc cóc, mật gấu, mật trâu, bò, lợn, rắn biển, v.v.

1. NHỮNG VI SINH VẬT CÓ HOẠT TÍNH BIẾN ĐỔI SINH HỌC

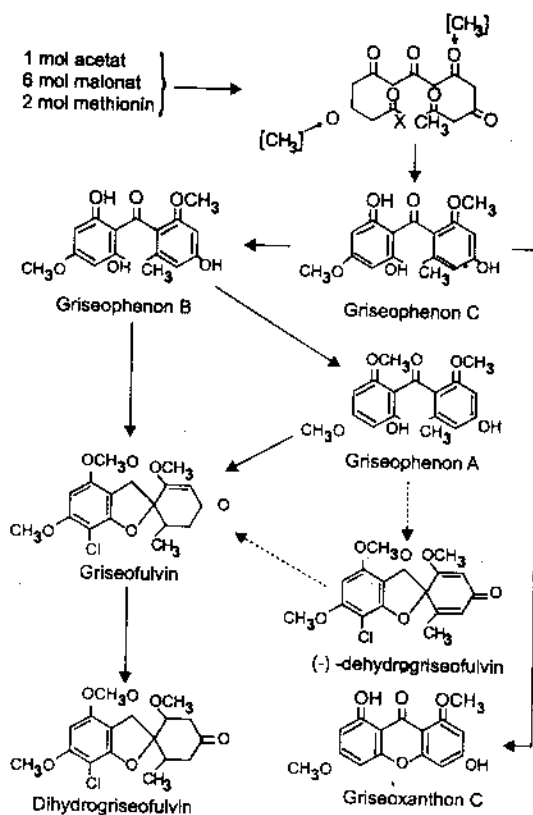
Những vi sinh vật có hoạt tính biến đổi sinh học được nghiên cứu cho đến nay gồm vi khuẩn (bao gồm cả xạ khuẩn) và nấm. Trong quá trình lên men ở những điều kiện nhất định (xem phần Phương pháp biến đổi sinh học), những vi sinh vật này thực hiện các phản ứng hóa học ở các vị trí nhất định trong phân tử các hợp chất. Các phản ứng hóa học này thường chỉ thực hiện đơn lẻ, mà không xảy ra liên tiếp nhiều phản ứng thuộc nhiều loại khác nhau để được sản phẩm lên men như trường hợp sinh tổng hợp các chất hữu cơ. Các hình 2.1, 2.2, 2.3 mô tả tóm tắt các phản ứng biến đổi sinh học của hợp chất 17α -hydroxy-cortison (17α -hydroxy-11-deoxycorticosterone, hay còn gọi là hợp chất S của Reichstein) bởi nhiều loài vi sinh vật khác nhau, và dãy phản ứng trong sinh tổng hợp acid glutamic bởi vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* và dãy phản ứng trong sinh tổng hợp griseofulvin (một kháng sinh chống nấm bệnh ở người) bởi một số loài thuộc chi *Penicillium* như *P.griseofulvum*, *P.urticae*, v.v., cho ta ý niệm về sự khác nhau này.

Một điều đáng chú ý nữa là các sản phẩm của sinh tổng hợp là các sản phẩm trao đổi chất sơ cấp, thứ cấp hoặc các sản phẩm trung gian, nên các sản phẩm này được tạo thành và tích lũy trong quá trình sinh trưởng, phát triển của cơ thể vi sinh vật, còn các sản phẩm của biến đổi sinh học chủ yếu được tạo thành trước khi bào tử nảy sợi nghĩa là

khi các bào tử được nuôi cấy chưa tạo thành các chồi nảy sợi (trường hợp xạ khuẩn và nấm), và cho đến nay, người ta cũng chưa xác định được rõ ràng các phản ứng biến đổi sinh học thuộc quá trình đồng hóa hay dị hóa của cơ thể vi sinh vật, và ý nghĩa của các phản ứng đó trong trao đổi chất của vi sinh vật.

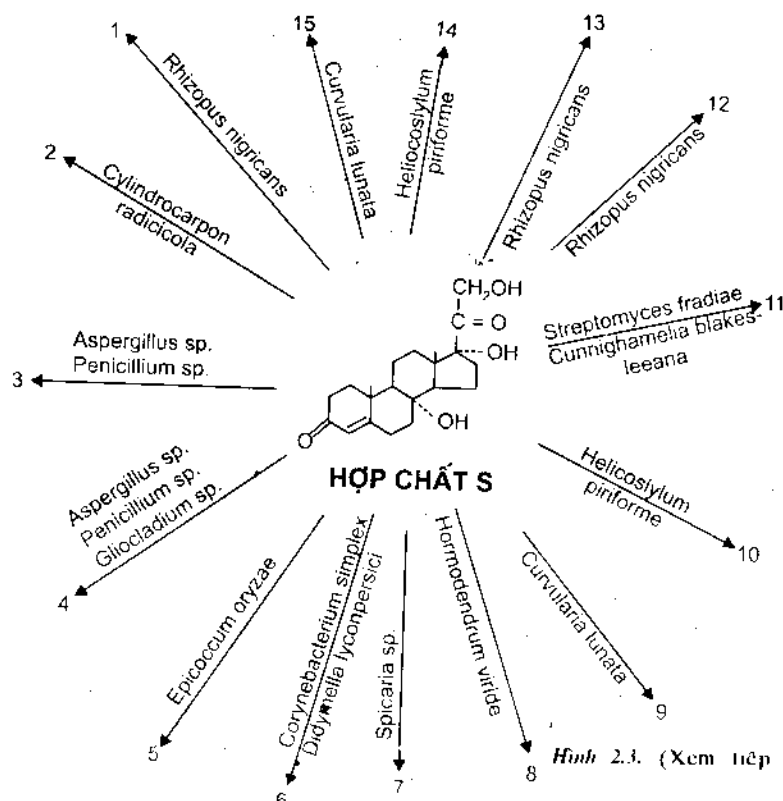


Hình 2.1. Những giai đoạn chính trong sinh tổng hợp acid glutamic (theo J.Rivière, 1975)

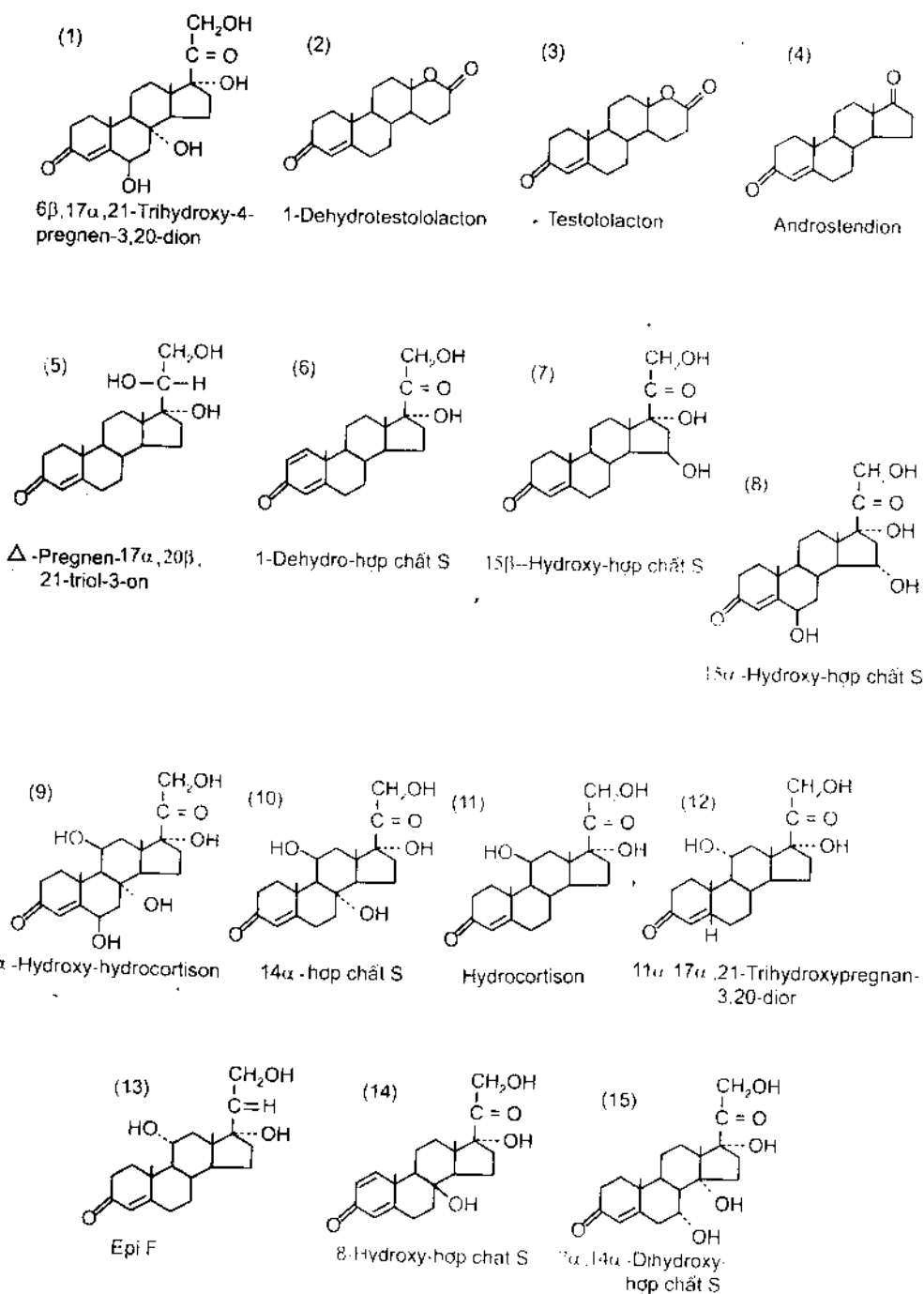


Hình 2.2. Những giai đoạn chính trong sinh tổng hợp griseofulvin và các sản phẩm trao đổi chất khác cùng tạo thành trong quá trình lên men

(theo W.B.Turner, 1975)



Hình 2.3. (Xem tiếp trang 49)



Hình 2.3. Các hợp chất steroid tạo thành từ hợp chất S (của Reichstein, 17α-hydroxy-11-deoxycorticosteron) bởi các vi sinh vật có hoạt tính biến đổi sinh học

Trong số các vi sinh vật đã được xác định là có hoạt tính biến đổi sinh học steroid, nấm có số chi và số loài lớn nhất (85 chi với khoảng 380 loài), tiếp theo là vi khuẩn (17 chi với 92 loài), xạ khuẩn (6 chi với 93 loài). Các vi sinh vật này có khả năng thực hiện 13 loại phản ứng hóa học, trong đó loại phản ứng được thực hiện nhiều nhất là phản ứng hydroxy hóa (78,8% tổng số chi), tiếp theo là các phản ứng oxy hóa, khử hydro, khử nhóm ceto lần lượt chiếm 30,2%, 22,8%, 20,1% tổng số chi (bảng 2.1).

Bảng 2.1 Các loại phản ứng hóa học thực hiện bởi vi sinh vật trong biến đổi sinh học các hợp chất steroid (tổng hợp theo dữ liệu của Capek và Cs., 1966)

Số thứ tự	Phản ứng hóa học (biến đổi sinh học)	Viết tắt	Số lượng chi	% chi so với tổng số chi
1	Hydroxy hóa	H x i	86	78,8%
2	Oxy hóa (alcol - ceton)	O	33	30,8%
3	Khử hydro (tạo dây nối kép)	D	25	22,8%
4	Khử nhóm-ceto	R	22	20,1%
5	Cắt nhánh ngang	Cl	11	10,0%
6	Vòng A - nhân thơm	Ar	5	4,5%
7	Loại dây nối kép (hydrogen hóa)	Hdg	5	4,5%
8	Epoxy hóa	Ep	5	4,5%
9	Sa phòng hóa este	S	4	3,6%
10	Cắt vòng B	Sp	4	3,6%
11	Cắt dây nối glucosid	Cl-Gl	4	3,6%
12	Este hóa	E	3	2,7%
13	Đồng phân hóa (chuyển dây nối kép 5 - 6 → 4 - 5)	I	1	0,9%

Trong nhóm vi khuẩn, chi *Bacillus* là chi có số loài có hoạt tính biến đổi sinh học lớn nhất và cũng là chi có khả năng tạo ra nhiều phản ứng hóa học nhất (bảng 2.2).

Bảng 2.2. Các chi vi khuẩn đã được xác định có hoạt tính biến đổi sinh học các hợp chất steroid

Số thứ tự	Các chi vi khuẩn	Số lượng loài có hoạt tính	Các phản ứng hóa học trong biến đổi sinh học ⁽¹⁾
1	<i>Acetobacter</i>	2	O
2	<i>Achromobacter</i>	2	Hxl
3	<i>Alcaligenes</i>	2	DR
4	<i>Arthrobacter</i>	1	D
5	<i>Azotobacter</i>	1	D.O
6	<i>Azotomonas</i>	1	D
7	<i>Bacillus</i>	11	Ar.D.Cl-Gl.Hdg.Hxl.O.R.S.Sp
8	<i>Bacterium</i>	3	D.Hdg.Hxl.O.R
9	<i>Catenobacterium</i>	1	R
10	<i>Clostridium</i>	3	Hdg.R
11	<i>Corynebacterium</i>	5	D. O.R
12	<i>Escherichia</i>	2	OR
13	<i>Flavobacterium</i>	6	Cl-Gl.O.R.S
14	<i>Micrococcus</i>	1	O
15	<i>Protaminobacter</i>	2	D
16	<i>Pseudomonas</i>	7	Ar.D.Hxl.O.R.Sp
17	<i>Serratia</i>	1	D

(1) Tên các loại phản ứng được viết tắt, xin xem ở bảng 2.1 có tên đầy đủ.

Trong nhóm xạ khuẩn, chi *Streptomyces* có số loài đã được xác định có hoạt tính biến đổi sinh học lớn nhất, và cùng với chi *Mycobacterium* là các chi tạo ra nhiều phản ứng hóa học nhất (bảng 2.3).

Bảng 2.3. Các chi xạ khuẩn đã được xác định có hoạt tính biến đổi sinh học các hợp chất steroid

Số thứ tự	Các chi xạ khuẩn	Số lượng loài có hoạt tính	Các phản ứng hóa học trong biến đổi sinh học ⁽¹⁾
1	<i>Actinomyces</i> Harz	14	l.Hxl. O
2	<i>Microthomonaspora</i> Orskov	1	D
3	<i>Mycobacterium</i> Lehmert Neum.	14	Ar.Cl.D.Hxl.O.R.Sp
4	<i>Nocardia</i> Trevisan	25	Ar.Cl.D.Hxl.Sp
5	<i>Proactinomyces</i>	1	Hxl. O
6	<i>Streptomyces</i> Waksman et Henrici	37	Cl.D.Hdg.Hxl.O.R

(1) Tên các loại phản ứng được viết tắt, xin xem ở bảng 1 có tên đầy đủ.

So với vi khuẩn (kể cả xạ khuẩn), trong tự nhiên, nấm (Fungi) có số lượng loài đã biết lớn hơn nhiều, 7579 chi với 71.360 loài (bao gồm cả số chi và loài của nấm bất toàn) (theo D.L.Hawksworth, 1995). Số chi và loài nấm đã được xác định hoạt tính sinh học cũng lớn hơn nhiều so với vi khuẩn, 85 chi với 380 loài, trong đó Nấm tiếp hợp (Zygomycotina) có 18 chi với 101 loài, Nấm túi (Ascomycotina) có 19 chi với 32 loài, Nấm đảm (Basidiomycotina) có 8 chi với 13 loài và Nấm bất toàn (Deuteromycotina) có 40 chi với 232 loài (Hệ thống phân loại ngành Nấm của Ainsworth, 1971). Trong các ngành phụ nấm trên, các chi của ngành phụ Nấm bất toàn tạo ra hầu hết các loại phản ứng hóa học trong biến đổi sinh học (11/13 loại phản ứng) (bảng 2.4).

Bảng 2.1 Các phản ứng biến đổi sinh học trên phân tử steroid ở các ngành phụ nấm

Số thứ tự	Các phản ứng hóa học ⁽¹⁾	<i>Zygomycotina</i>	<i>Ascomycotina</i>	<i>Basidiomycotina</i>	<i>Deuteromycotina</i>
1	Ar				+
2	Cl	+			+
3	Cl-Gl				+
4	D		+	+	+
5	E				+
6	Ep	+			+
7	Hdg		+		+
8	Hxl	+	+	+	+
9	O	+	+	+	+
10	R		+	+	+
11	S		+		+

(1) * Tên các loại phản ứng được viết tắt, xin xem tên đầy đủ ở bảng 1.

* Dấu + : tạo ra phản ứng biến đổi sinh học.

Trong các phản ứng tạo ra bởi nấm, phản ứng hydroxy hóa là loại phản ứng phổ biến nhất, tạo ra bởi nấm ở cả 4 ngành phụ. Hơn nữa, ở mỗi ngành phụ nấm, số chi (và cả số loài) có hoạt tính này cũng lớn nhất so với các hoạt tính biến đổi sinh học khác. Ở ngành phụ Nấm tiếp hợp, hoạt tính này có ở cả 18 chi, ở ngành phụ Nấm túi, có ở 84,2% tổng số chi, ở ngành phụ Nấm đảm, có ở 87,5% tổng số chi, ở ngành phụ Nấm bất toàn, có ở 87,8% tổng số chi. Hoạt tính biến đổi sinh học của các chi trong mỗi ngành phụ nấm được trình bày trong các bảng 2.5, 2.6, 2.7, 2.8.

Bảng 2.5. Các chi nấm thuộc ngành phụ Nấm tiếp hợp (Zygomycotina) đã được xác định có hoạt tính biến đổi sinh học các hợp chất steroid

Số thứ tự	Các chi nấm	Số lượng loài có hoạt tính	Các phản ứng hóa học trong biến đổi sinh học ⁽¹⁾
1	<i>Absidia</i> V.Tiegh.	16	Hxl, O
2	<i>Blakeslea</i> Thaxt.	1	Hxl, O
3	<i>Chaetocladium</i> Fres.	1	Hxl
4	<i>Choanephora</i> Currey	1	Hxl
5	<i>Circinella</i> v.Tiegh.	3	Hxl
6	<i>Cunninghamella</i> Matr.	9	Ep, Hxl, O
7	<i>Gongromella</i> Ribaldi	1	Hxl
8	<i>Helicostylum</i> Cda.	1	Epi, Hxl, O
9	<i>Mortierella</i> Coem.	8	Hxl
10	<i>Mucor</i> Michex Fr.	31	Cl, EpHxl, O
11	<i>Phycomyces</i> Kunze	3	Ep, Hxl
12	<i>Protoabsidia</i> Naumov	1	Hxl
13	<i>Rhizopus</i> Ehrenberg	17	ClHxl, O
14	<i>Syncephalastrum</i> Schroet.	2	Hxl
15	<i>Syncephalis</i> v.Tieghet Le Monn.	1	Hxl
16	<i>Szygites</i> Ehrenb. ex Fr. (Syn. của <i>Sporodinia</i> Link)	1	Hxl
17	<i>Thamnidium</i> Linke ex Wallr.	1	Hxl, O
18	<i>Zygothynchus</i> Vuill.	3	Hxl, O

) Tên các loài phản ứng được viết tắt, xin xem tên đầy đủ ở bảng 2.1.

Bảng 2.6. Các chi nấm thuộc ngành phụ Nấm túi (Ascomycotina) đã được xác định có hoạt tính biến đổi sinh học các hợp chất steroid

Số thứ tự	Các chi nấm	Số lượng loài có hoạt tính	Các phản ứng hóa học trong biến đổi sinh học ⁽¹⁾
1	2	3	4
1	<i>Calonectria</i> de Not.	1	D, Hxl, O
2	<i>Chaetomium</i> Kunze ex Fr.	3	Hxl
3	<i>Didymella</i> Sacc.	2	D, Hxl
4	<i>Eremothecium</i> Borzi	1	O
5	<i>Eurotium</i> Link ex Fr.	1	Hxl
6	<i>Gibberella</i> Sacc.	4	Hxl, O, S
7	<i>Glomerella</i> Schrenk. ex Spaulding	2	Hxl
8	<i>Leptosphaeria</i> Ceset de Not.	1	Hxl
9	<i>Lophotrichus</i> Benjamin	1	Hxl
10	<i>Metanospira</i> Cda.	1	Hxl
11	<i>Neurospora</i> Shear et Dodge	2	Hxl

Bảng 2.6 (tiếp)

1	2	3	4
12	<i>Ophiobolus</i> Riess	3	D, Hxl
13	<i>Peziza</i> Dillex Fr.	1	Hxl
14	<i>Phaeospora</i> Rabeng. ex Ceset de Not	1	Hxl
15	<i>Saccharomyces</i> Meyen ex Rees	3	E, HCl, R
16	<i>Sclerotinia</i> Fuckel	3	Hxl
17	<i>Sporormia</i> de Not.	1	Hxl
18	<i>Thielavia</i> Zopf	1	Hxl
19	<i>Xylaria</i> Hill ex Grev.	1	Hxl

(1) Tên các loài phản ứng được viết tắt, xin xem tên đầy đủ ở bảng 2.1.

Bảng 2.7. Các chi nấm thuộc ngành phụ Nấm đảm (Basidiomycotina) đã được xác định có hoạt tính sinh học các hợp chất steroid

Số thứ tự	Các chi nấm	Số lượng loài có hoạt tính	Các phản ứng hóa học trong biến đổi sinh học ⁽¹⁾
1	<i>Coriolus</i> Quéf.	1	Hxl
2	<i>Corichium</i> Pers.ex Gray	5	Hxl, O, R
3	<i>Cu. chibata</i> Gray ex Grev.	1	Hxl
4	<i>Epheloloma</i> (Fr.) Kummer	1	Hxl
5	<i>Lenzites</i> Fr.	1	Hxl
6	<i>Polyporus</i> (Mich.) Fr.ex Fr.	2	Hxl
7	<i>Poria</i> Pers.ex Gray	1	Hxl
8	<i>Merum</i> Pers.ex Gray	1	D, R

(1) Tên các loài phản ứng được viết tắt, xin xem tên đầy đủ ở bảng 2.1

Bảng 2.8. Các chi nấm thuộc ngành phụ Nấm bất toàn (Deuteromycotina) đã được xác định có hoạt tính sinh học các hợp chất steroid

Số thứ tự	Các chi nấm	Số lượng loài có hoạt tính	Các phản ứng hóa học trong biến đổi sinh học ⁽¹⁾
1	2	3	4
1	<i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.	2	D, Hdg, R
2	<i>Aspergillus</i> Mich.ex Fr	49	Cl, Cl-Gl, Hxl, O, S
3	<i>Beauveria</i> Vuill.	1	Hxl
4	<i>Botryodiplodia</i> Sacc.	1	Hxl
5	<i>Butyris</i> Pers.ex Fr.	2	Hxl, O
6	<i>Candida</i> Berkhout	1	R
7	<i>Cephalosporium</i> Cda.	3	Cl, Hxl

Bảng 2.8. (tiếp)

1	2	3	4
8	<i>Cercospora</i> Fres.	1	Hxl
9	<i>Cladobotryum</i> Nees	1	Hxl
10	<i>Cladosporium</i> Link ex Fr.	4	Cl. E, Hxl
11	<i>Colletotrichum</i> Cda.	5	D, Hxl
12	<i>Coniothyrium</i> Cda.	2	Hxl
13	<i>Coryneum</i> Nees ex Fr.	1	Hxl
14	<i>Curvularia</i> Boedijn	9	Ep. Hxl, O, R
15	<i>Cylindrocarpum</i> Wollenw.	2	Cl. D, Hxl
16	<i>Dactylium</i> Nees ex Fr.	1	Hxl
17	<i>Diplodia</i> Fr.	2	Hxl
18	<i>Dothichiza</i> Lib.	1	Hxl
19	<i>Epicoccum</i> Linke ex Wallr.	1	R
20	<i>Fusarium</i> Link ex Fr.	34	Cl. D, Hxl, O, S
21	<i>Gliocladium</i> Cda.	2	Cl. D, Hxl
22	<i>Gliocladium</i> Desmet Mont.	1	Hxl
23	<i>Haplosporella</i> Speg.	1	Hxl
24	<i>Helminthosporium</i> Link ex Fr.	3	D, Hxl
25	<i>Heterosporium</i> Sacc	5	D, Hxl
26	<i>Leptothecium</i> Tode ex Fr.	1	Hxl
27	<i>Nigrospora</i> Zimm.	3	Hxl, O
28	<i>Penicillium</i> Link ex Fr.	50	Cl, Cl-Gl, Hxl, O, R
29	<i>Pestalotia</i> de Not.	4	Hxl
30	<i>Phoma</i> sensu Sacc.	1	Hxl
31	<i>Rhizoctonia</i> DC. ex Fr.	3	Hxl
32	<i>Rhodotorula</i> Harrison	1	R
33	<i>Sclerotium</i> Tode ex Fr.	1	Hxl
34	<i>Septomyxa</i> Sacc.	5	Ar, Cl, D
35	<i>Spicaria</i> Harting	2	Hxl
36	<i>Stachylidium</i> Link ex Fr.	3	Hxl
37	<i>Sporotrichum</i> Link ex Fr.	2	Hxl, R
38	<i>Trichoderma</i> Pers. ex Fr.	9	L, Hxl
39	<i>Trichothecium</i> Link ex Fr.	5	Hxl, O, R
40	<i>Wolnowski</i> Sacc.	1	Hxl, O

(1) Tên các loại phản ứng được viết tắt, xin xem tên đầy đủ ở bảng 1.

Các bảng trên cho chúng ta biết các loại hoạt tính biến đổi sinh học của 108 chi vi sinh vật, bao gồm vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm, nhưng đó mới chỉ là dữ liệu của 593 thông báo của các tác giả khác nhau về biến đổi sinh học của steroid trong số hàng nghìn thông báo đã được công bố, chắc chắn còn một số chi các vi sinh vật cũng có hoạt tính biến đổi sinh học, mà chưa được nói đến. Và cũng vậy đối với một số loài, thí dụ loài

Acetobacter suboxydans biến đổi D-sorbitol thành L-sorbose, loài *Whetzelinia sclerotiorum* biến đổi olivomycin thành deisobutyrylolivomycin, v.v.

Mặt khác trong công nghệ biến đổi sinh học, chúng ta không phải chỉ chú ý tới loại phản ứng hóa học tạo ra bởi một loài vi sinh vật, mà còn chú ý tới vị trí biến đổi trong phân tử một hợp chất mà loài vi sinh vật đó có hoạt tính sinh học này. Chính loài mới mang đầy đủ tính đặc trưng này, đặc trưng về loại phản ứng hóa học và vị trí xảy ra phản ứng đó trong phân tử một hợp chất, thí dụ, cũng thuộc chi *Aspergillus*, nhưng loài *A. carbonarius* tạo ra phản ứng hydroxy hóa ở vị trí 15 β , loài *Aniger* tạo ra cùng loại phản ứng ở 5 β , và 11 α , v.v. (xem bảng ở cuối chương). tuy nhiên chúng ta cũng thấy phổ biến nhiều loài có vị trí phân loại rất xa nhau lại có hoạt tính biến đổi sinh học giống nhau, không những ở loại phản ứng mà ở cả vị trí trong phân tử hợp chất, thí dụ nhiều loài thuộc các chi *Mucor*, *Rhizopus* (thuộc ngành phụ Nấm tiếp hợp), *Aspergillus*, *Penicillium* (thuộc ngành phụ Nấm bất toàn), và cả một số loài thuộc chi *Pseudomonas*, *Streptomyces* (thuộc ngành Vi khuẩn, giới Procaryota) cũng có phản ứng hydroxy hóa ở vị trí 11 α . Như chúng ta biết, các hoạt động lên men vi sinh vật đều có sự tham gia của các enzym. Như vậy, trong biến đổi sinh học của vi sinh vật, các enzym tham gia vào một phản ứng hóa học nhất định trong những điều kiện nhất định của môi trường, đều được tế bào tạo thành ở các nhóm vi sinh vật ở các nhánh tiến hóa xa nhau. Tuy nhiên, cần nhấn mạnh rằng ở các loài vi sinh vật đã được xác định có hoạt tính biến đổi sinh học, mỗi loài chỉ có một hoặc một số hoạt tính nhất định (kể cả loại phản ứng hóa học và vị trí xảy ra phản ứng trong phân tử hợp chất), nghĩa là các hoạt tính này có đặc trưng loài và chi. Như chúng tôi sẽ nói ở đoạn sau, tính đặc trưng này đã được sử dụng trong phân loại học một số chi nấm.

Ảnh hưởng của cơ chất và sản phẩm biến đổi sinh học đến vi sinh vật

Trong quá trình lên men biến đổi sinh học, enzym của vi sinh vật làm biến đổi cơ chất, và như chúng ta đã biết, khả năng làm biến đổi cơ chất này của vi sinh vật có tính đặc trưng loài, ngược lại, cơ chất và các sản phẩm của quá trình lên men có ảnh hưởng tới vi sinh vật không? Nhiều nhà nghiên cứu đã chú ý đến vấn đề này, tuy cho đến nay những hiểu biết liên quan chưa nhiều, chưa giải thích được cơ chế ảnh hưởng, nhưng trong trường hợp cơ chất và sản phẩm biến đổi là steroid, hầu hết các hợp chất không phải là các hợp chất của các hoạt động sinh lý của vi sinh vật, trừ một số hợp chất sterol như ergosterol chẳng hạn là sản phẩm tổng hợp của tế bào vi sinh vật.

Một cách tổng quát, một số cơ chất và sản phẩm biến đổi không có ảnh hưởng, một số khác kích thích hoặc ức chế sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật.

Trước khi nói tới ảnh hưởng này (ảnh hưởng của cơ chất, sản phẩm biến đổi đến vi sinh vật), chúng ta nói tới một ảnh hưởng đặc biệt của một số loài vi sinh vật gây cản trở cho quá trình lên men biến đổi sinh học, đó là tác dụng gây kết dính steroid của các loài vi sinh vật đó. Tác dụng gây kết dính này có mối liên quan giữa cấu trúc của steroid và vi sinh vật liên quan, thí dụ như ở loài *Penicillium canescens*. Ở loài nấm bất toàn này, tác dụng gây kết dính rõ rệt nhất đối với các steroid có nhánh bên dài, có nhóm 3β -hydroxy và có dây nối kép ở vị trí 5 - 6 (bảng 2.9). Khả năng gây kết dính mạnh hay yếu cũng tùy từng loài, và khả năng này cao ở các loài nấm, yếu hơn ở vi khuẩn, xạ khuẩn (bảng 2.10).

Bảng 2.9. Tác dụng gây kết dính steroid của *Penicillium canescens* (theo Capek và Cs., 1966)

Steroid	% steroid bị kết dính
Cholesterol	69
β -sitosterol	65
Stigmasterol	49
Dehydroepiandrosteron	24
Δ^4 -androst-3, 17-dion	21
Δ^5 -pregn-3-ol-20-on	19
Testosteron	7
Cortisol	3

Bảng 2.10. Sự kết dính của β -sitosterol bởi các loài vi sinh vật (nuôi cấy 5 ngày, 200 mg steroid trong 1 ml môi trường) (theo Capek và Cs., 1966)

Vi sinh vật (Nấm)	% steroid bị kết dính	Vi sinh vật (Vi khuẩn, xạ khuẩn)	% steroid bị kết dính
<i>Gliocladium catenulatum</i>	84	<i>Microspora</i> sp.	23
<i>Penicillium canescens</i>	65	<i>Mycobacterium laticola</i>	
<i>Chaetomium funicola</i>	60	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
<i>Aspergillus flavus</i>	45	<i>Corynebacterium</i>	16
<i>Cladosporium</i> sp	35	<i>flaccumfaciens</i>	12
<i>Rhizopus nigricans</i>	35	<i>Staphylococcus aureus</i>	8
<i>Cylindrocepalum aureum</i>	17	<i>Bacillus cereus</i>	6
		<i>Streptomyces lavendulae</i>	3
		<i>Nocardia erythropolis</i>	0

Ảnh hưởng của các chất kháng sinh đến vi sinh vật - Về ảnh hưởng này, có 2 trường hợp. Ở trường hợp thứ nhất, vi sinh vật là tác nhân biến đổi sinh học có khả năng tạo thành chất kháng sinh, thí dụ các loài xạ khuẩn *Streptomyces griseus* tạo thành streptomycin, *Str. rimosus* sản sinh tetracyclin, *Str. fradiae* sản sinh neomycin, v.v. Các vi sinh vật sinh kháng sinh này không mẫn cảm với chính chất kháng sinh do chúng tạo thành, hay nói cách khác, có tính đối kháng với các chất kháng sinh đó. Như vậy, một chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* tạo thành kháng sinh streptomycin không chịu tác dụng của streptomycin, cũng như vậy đối với các chủng xạ khuẩn của các loài khác thuộc chi *Streptomyces*. Cơ chế đối kháng này với mỗi loài xạ khuẩn không giống nhau, thí dụ đối với loài *Str. griseus*, cơ chế đó bao gồm hoạt động của enzym (aminoglycosit photphotransferaza) làm kháng sinh mất hoạt tính, song song với quá trình "cải biến" của ribosom ; với loài *Str. fradiae*, cơ chế kháng neomycin của loài này chỉ do tế bào xạ khuẩn tạo thành enzym aminoglycosit photphotransferaza làm neomycin mất hoạt tính thông qua quá trình photphorin hóa, v.v. (Lê Thanh Bình, 1995). Nhưng chúng ta cần chú ý là với cùng một loài, thí dụ loài *Str. griseus*, một chủng của loài này không có khả năng tạo thành kháng sinh (ở đây là streptomycin), chủng đó mất tính đối kháng với kháng sinh và do đó vẫn bị kháng sinh này ức chế, như trường hợp các vi sinh vật mẫn cảm với một kháng sinh bị ức chế bởi kháng sinh đó. Vậy trong trường hợp mà vi sinh vật là tác nhân biến đổi sinh học mà có khả năng tạo thành một kháng sinh, nếu chính kháng sinh đó được dùng làm cơ chất, một số kết quả nghiên cứu cho thấy cơ chất này không ảnh hưởng đến vi sinh vật.

Trường hợp thứ hai thường gặp hơn : chất kháng sinh dùng làm cơ chất không phải là chất kháng sinh do vi sinh vật dùng làm tác nhân biến đổi sinh học tạo thành. Ở trường hợp này, chất kháng sinh dùng làm cơ chất sẽ ức chế sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật vốn là những vi sinh vật mẫn cảm với kháng sinh đó. Khi lên men biến đổi sinh học một kháng sinh, đương nhiên người ta không dùng tác nhân biến đổi là vi sinh vật mẫn cảm với kháng sinh, dù vi sinh vật này có hoạt tính biến đổi sinh học mong muốn, hoặc nếu dùng, phải nghiên cứu thăm dò nồng độ chất kháng sinh dùng làm cơ chất ít ảnh hưởng đến vi sinh vật.

Ảnh hưởng của các sterol đến vi sinh vật - Trong số các sterol, cholesterol và ergosterol đã được xác định là ức chế sinh trưởng của một số loài vi khuẩn và nấm, như *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium chrysogenum*, v.v. Khả năng ức chế này tùy thuộc vào

nồng độ cơ chất, và cũng tùy thuộc vào thành phần môi trường, và do tác dụng trực tiếp của sterol lên hệ thống enzym dehydro hóa của tế bào vi sinh vật, cũng do các hợp chất này làm thay đổi sức căng bề mặt của môi trường từ đó, ảnh hưởng đến tính thấm của màng tế bào đối với các hợp chất khác nhau (Capek và Cs., 1966).

Ảnh hưởng của các steroid khác đến vi sinh vật - Nhiều hormon steroid đã được xác định là có tác dụng ức chế vi sinh vật. Tác dụng này không giống nhau với mỗi hormon, và với một hormon, tác dụng cũng khác nhau với các loài vi sinh vật (các bảng 2.11 và 2.12).

Bảng 2.11. Tác dụng ức chế vi sinh vật bởi cortexone (80 - 250 $\mu\text{g/l}$ ml môi trường ; % tác dụng được tính bằng sự thay đổi lượng sinh khối)
(theo Capek và Cs., 1996)

Vi sinh vật	% ức chế
Vi khuẩn gram -	
<i>Acrobacter acrogenes</i>	5
<i>Escherichia coli</i>	5
<i>Proteus vulgaris</i>	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
<i>Ps.fluorescens</i>	5
<i>Serratia marcescens</i>	5
Vi khuẩn gram +	
<i>Bacillus megaterium</i>	49 - 100
<i>B.subtilis</i>	50 - 100
<i>Micrococcus aureus</i>	73 - 74
<i>Mycobacterium ranae</i>	97 - 100
<i>Sarcina lutea</i>	90 - 100
Nấm men	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65 - 94
<i>Torulopsis utilis</i>	25 - 33
Nấm sợi	
<i>Asporgillus niger</i>	56 - 76
<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	38 - 63
<i>Curvularia lunata</i>	60 - 100
<i>Neurospora crassa</i>	40 - 65
<i>Penicillium lilacinum</i>	71 - 86
<i>P. puberulum</i>	76 - 100

Bảng 2.12. Ảnh hưởng của các steroid đến sự sinh trưởng của *Neurospora crassa*) 250 μg steroid/1 ml môi trường ; % tác dụng ức chế được tính bằng sự thay đổi lượng sinh khối) (theo Iester và Cs., 1958)

Steroid	% ức chế
Cholesterol	4
Cholestenon	2
Ergosterol	7
Estradiol	2
Estriol	7
Androstenedion	18
Testosteron	26
Dihydrotestosteron	6
Pregnenolon	9
Progesteron	22
17-OH-progesteron	9
Cortexon	55
Δ^1 -dehydrocortexon	2
Cortexon acetat	5
Cortexon glucosid	8
5 β -dihydrocortexon	18
5 α -dihydrocortexon	39
7-hydrocortexon	7
11 α -hydrocortexon	5
11 β -hydrocortexon	4
14 β -hydrocortexon	10
15 α -hydrocortexon	0
17 α -hydrocortexon	3
11 β , 17 α -dihydroxy-11-ceto-cortexon	5
9 α -fluoro-11 β ,17 α -dihydrocortexon	3

Những hợp chất có các nhóm ceto, β -hydroxy, β -acetoxy, β -acetyl ở khung steroid cũng đã được xác định có tác dụng ức chế mạnh với một số vi sinh vật. Ngoài ra, một số thành phần môi trường có ảnh hưởng tới cường độ ức chế này, chẳng hạn thành phần đường, khả năng tiêu thụ các acid amin của vi sinh vật bị ức chế bởi cortexon, v.v. Một điều đáng chú ý nữa là hiện tượng trung hòa tác dụng ức chế vi sinh vật lẫn nhau của 2 hợp chất steroid, chẳng hạn tác dụng ức chế của cortexon bị giảm khi cùng có mặt của stigmasterol.

2. NHỮNG PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG TRONG CÔNG NGHỆ BIẾN ĐỔI SINH HỌC

Những phương pháp sử dụng trong công nghệ biến đổi sinh học về nguyên tắc không khác với các phương pháp lên men vi sinh vật khác,

tất nhiên với những sai khác nhất định. Mặt khác, công nghệ biến đổi sinh học mỗi hợp chất hữu cơ lại có qui trình cụ thể. Vì những lý do này, trong đoạn này, chúng tôi chỉ trình bày những phương pháp tổng quát liên quan đến công nghệ biến đổi sinh học.

2.1. Phương pháp dùng sinh khối và phương pháp dùng bào tử nấm

Như ở đoạn trên chúng ta đã biết, các vi sinh vật dùng trong công nghệ biến đổi sinh học bao gồm vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm. Với vi khuẩn, người ta dùng toàn bộ hỗn hợp sinh khối thu nhận được khi nuôi cấy để lên men biến đổi sinh học. Bào tử của xạ khuẩn đã được xác định có hoạt tính biến đổi sinh học, còn nội bào tử (endospore) của vi khuẩn không có hoạt tính sinh học này. Hầu hết nấm đã được nghiên cứu hoạt tính biến đổi sinh học là vi nấm thuộc các ngành phụ Nấm tiếp hợp, Nấm túi và Nấm bất toàn. Bào tử kín (còn gọi là bào tử nang, sporangiospore) của Nấm tiếp hợp, bào tử trần (conidi) của nấm túi và nấm bất toàn có hoạt tính sinh học này mạnh hơn hệ sợi nấm (mycelium), và đặc biệt các loại bào tử này khi chưa nảy sợi (chưa phồng to và chưa có chồi nảy sợi) đã được chứng minh là có hoạt tính mạnh nhất. Gehrig và Knight (1958) là những người đầu tiên nhận xét thấy bào tử nấm có hoạt tính biến đổi sinh học, và đã chứng minh conidi của loài *Penicillium roqueforti* có hoạt tính biến đổi acid octanoic thành 2-heptanon.

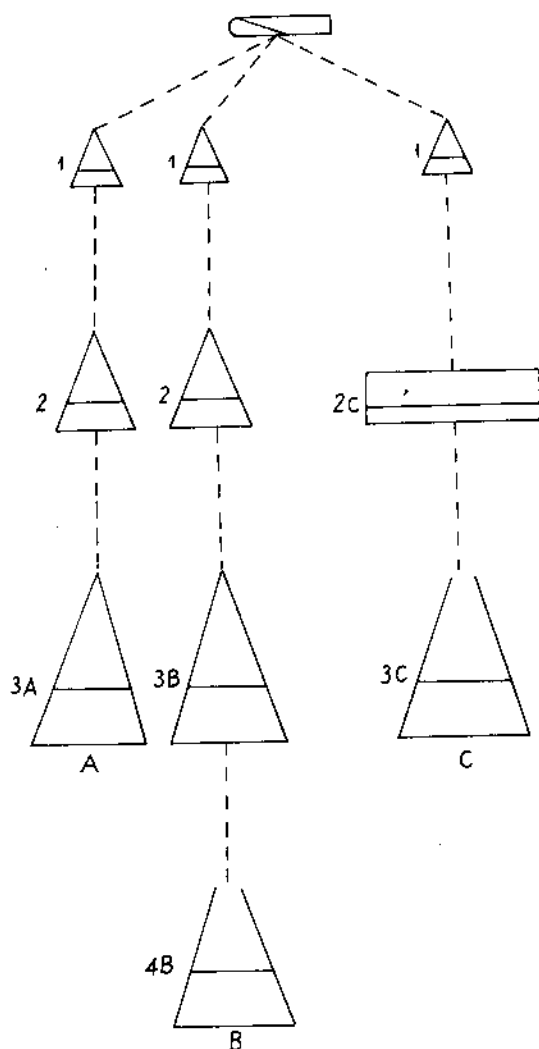
Hoạt tính này cũng đã được chứng minh là tăng tỷ lệ thuận với số lượng bào tử có mặt. Sở dĩ như vậy, theo giải thích của Knight (1966), bào tử nấm là giai đoạn nghỉ trong chu trình sống của nấm. Trong giai đoạn này, tế bào nấm không những có các enzym cần thiết cho các hoạt động trao đổi chất, mà còn có một nhóm enzym tham gia vào việc biến đổi một số cơ chất có trong môi trường xung quanh, không liên quan rõ ràng đến các quá trình đồng hóa, dị hóa của cơ thể nấm, tương ứng với lý thuyết cho rằng giai đoạn nghỉ (như bào tử nấm chẳng hạn) là sự ngắt quãng có tính thuận nghịch của sự phát triển phenotyp của một cơ thể sinh vật. Tương ứng với các nhóm vi sinh vật, có 2 cách dùng vi sinh vật trong biến đổi sinh học.

Phương pháp dùng sinh khối

Ở phương pháp này, vi sinh vật được bảo quản đông khô, trong cát hay trên thạch nghiêng được cấy lại trên thạch nghiêng, rồi được nuôi cấy nhân giống 1 - 2 lần. Để toàn bộ dịch nuôi cấy nhân giống cuối cùng vào bình hoặc nồi lên men biến đổi sinh học, cùng với cơ chất lên men. Môi trường lên men cũng là môi trường nuôi cấy nhân giống, hoặc có thành phần khác tùy thuộc vào thí nghiệm, vi sinh vật và cơ chất

ngiên cứu. Sau khi phản ứng biến đổi sinh học kết thúc, chiết xuất sản phẩm từ dịch lên men này (hình 2.4A).

Cần chú ý là quá trình nuôi cấy nhân giống và lên men trên phải được thực hiện vô trùng. Vì hầu hết vi sinh vật dùng trong biến đổi sinh học là các vi sinh vật hiếu khí, nên các bình nuôi cấy, các bình lên men phải được lắc liên tục hoặc có thiết bị thổi không khí vô trùng vào (trường hợp nổi lên men).



Hình 2.4. (Sơ đồ) : A, B - Phương pháp dùng sinh khối ; C- Phương pháp dùng bào tử

1 và 2 : nhân giống ; 3A : nhân giống + lên men ; 3B : nhân giống ; 4B : lên men trong dung dịch đậm ; 2C : nuôi cấy lấy bào tử trong môi trường rắn ; 3C : lên men trong dung dịch đậm.

Phương pháp dùng sinh khối có nhược điểm là dịch lên men không những có các sản phẩm biến đổi, phần cơ chất không biến đổi còn lại, mà còn có nhiều sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật cùng với các thành phần môi trường nuôi cấy, môi trường lên men chưa được vi sinh vật sử dụng hết. Vì vậy phương pháp này đã được cải tiến : bình lên men được dùng làm bình nuôi cấy nhân giống lần ba, sau đó sinh khối được tách riêng và rửa bằng nước cất hoặc một dung dịch đậm vô trùng. Đồ sinh khối này vào bình hay nồi lên men chứa dung dịch đậm để tạo thành một dịch treo, sau đó cho thêm cơ chất vào bình hay nồi lên men này, và cuối cùng chiết xuất sản phẩm sau khi phản ứng biến đổi sinh học kết thúc (hình 2.4B). Ở bình hay nồi lên men trong phương pháp dùng sinh khối cải tiến này, về nguyên tắc, không cần thực hiện vô trùng, vì dung dịch đậm không phải là dung dịch dinh dưỡng.

Trong một số trường hợp cần thiết, thí dụ như cần theo dõi phản ứng biến đổi sinh học nhiều ngày, người ta cho thêm các chất kháng sinh để tránh nhiễm khuẩn.

Sau đây là vài thí dụ về sử dụng phương pháp dùng sinh khối.

Như đã nói, phương pháp dùng sinh khối của nấm hiện nay ít được sử dụng, mà chủ yếu sử dụng trong trường hợp lên men biến đổi sinh học với vi khuẩn và xạ khuẩn. Thí dụ Argoudelis và Coast (1969) đã dùng phương pháp này để thực hiện phản ứng N-demethyl hóa clindamycin với một loài thuộc chi *Streptomyces*. Để thực hiện phản ứng biến đổi sinh học này, *Streptomyces punipalus* được nuôi cấy trong môi trường gồm glucose monohydrat 25g/lit, "Pharmamedia" (sản phẩm thủy phân của hạt bông) 25g/lit, ở nhiệt độ 28°C, trên máy lắc tròn (250 vòng/min, biên độ 6 cm) trong 72 h. Dịch nuôi cấy này được chuyển sang môi trường lên men với tỷ lệ 5%. Môi trường lên men gồm các thành phần : dextrin 30g/lit, một loại rỉ đường 20g/lit, bột cá 15g/lit, Pharmamedia 15g/lit. Môi trường lên men này cùng với 5% dịch nuôi cấy xạ khuẩn được nuôi cấy tiếp trong 48h trong cùng điều kiện trên (nhiệt độ, lắc). Sau cùng một lượng clindamycin được cho vào môi trường lên men. Sau 72h lên men, sản phẩm được chiết xuất và xác định hóa học. Clindamycin có hoạt tính kháng sinh mạnh gấp 4 lần lincomycin in vitro với vi khuẩn *Sarcina lutea*, l'-demethylclindamycin biến đổi sinh học từ clindamycin ở trên có hoạt tính này gấp đôi clindamycin, nghĩa là gấp 8 lần lincomycin.

Về phương pháp dùng sinh khối nấm, chúng ta có thể lấy thí dụ thí nghiệm của Peterson và Cs. (1952) ở thời kỳ đầu nghiên cứu biến đổi sinh học steroid. Ở thí nghiệm này, các loài nấm được dùng là *Rhizopus nigricans* và *Rh. arrhizus*. Môi trường nuôi cấy sau khi tiệt trùng và để nguội, được cấy vào bào tử hay sợi nấm. Bình nuôi cấy nấm được lắc 200 vòng/min. Nuôi cấy nấm ở nhiệt độ 28°C trong 24h hoặc lâu hơn. Các hợp chất steroid hòa tan trong aceton, ethanol hoặc một dung môi hữu cơ khác, được cho vào bình nuôi cấy và để lên men biến đổi sinh học 24 - 48h. Lượng steroid cho vào môi trường lên men (cũng là môi trường nuôi cấy nấm) từ 0,5 đến 1mg trong một lit môi trường. Sản phẩm biến đổi được chiết xuất bằng methylen clorua.

Phương pháp dùng bào tử

Hiện nay khi dùng nấm làm tác nhân biến đổi sinh học, người ta ít dùng toàn bộ sinh khối, mà dùng bào tử nấm được tách riêng khỏi môi trường nuôi cấy nấm, vì như đã nói ở trên, bào tử nấm chưa nảy sợi cho hiệu suất biến đổi sinh học (hình 2.4C).

Bào tử nấm là một phần của cơ thể nấm, thường có giới hạn rõ ràng với phần chính còn lại của cơ thể, làm nhiệm vụ phát tán, duy trì sự tồn tại, phát triển của loài. Tùy theo đặc điểm của quá trình tạo thành, bào tử nấm được phân biệt làm 2 loại : bào tử hữu tính được tạo thành kèm theo hiện tượng thụ tinh và sự phân chia giảm nhiễm của tế bào mang tính cái đã được thụ tinh bởi tế bào mang tính đực, bào tử vô tính được tạo thành trực tiếp từ một tế bào phân hóa của sợi nấm (tế bào sinh bào tử) và bằng sự phân bào gián phân của tế bào này. Do sự tạo thành bào tử hữu tính thường ít về số lượng và lại cần nhiều thời gian, nên chỉ có bào tử kén và conidi là những loại bào tử vô tính được dùng trong lên men biến đổi sinh học. Số lượng các loại bào tử vô tính này được tạo thành phụ thuộc vào đặc điểm di truyền và điều kiện của môi trường. Do cấu trúc di truyền thể hiện bằng các đặc điểm cấu tạo hình thái, một số loài nấm có các tế bào sinh bào tử chỉ phân bào một lần để tạo thành một bào tử, như trường hợp nấm bất toàn thuộc tổ chi *Aleurioconidia* (các loài thuộc các chi *Epicoccum*, *Humicola*, v.v.), một số loài khác có các tế bào sinh bào tử phân bào nhiều lần hoặc bản thân bào tử cũng phân bào để sinh bào tử, do đó loại tế bào sinh bào tử này tạo thành những chuỗi, những khối cầu gồm nhiều bào tử, như trường hợp nấm bất toàn thuộc các nhóm *Phialoconidiae*, *Blastoconidiae* (các loài thuộc các chi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, v.v.) (B.X. Đồng, 1972).

Chúng ta cũng cần chú ý khi chọn các chủng của một loài để nuôi cấy thu nhận bào tử, vì cùng một loài, do các đột biến tự nhiên hay nhân tạo, có chủng cho nhiều, có chủng cho ít bào tử.

Thành phần dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy, cũng như các điều kiện nuôi cấy khác như pH, nhiệt độ, độ ẩm, độ thông khí cũng ảnh hưởng, nhiều khi quyết định đến sự tạo thành nhiều hay ít bào tử của một chủng nấm. Có thể lấy thí dụ ảnh hưởng đến sự tạo thành này của các loại glucid đến một chủng nấm thuộc loài *Colletotrichum capsici* (bảng 2.13).

Về nuôi cấy nấm để thu nhận bào tử, có thể nuôi cấy trên môi trường thạch, trên môi trường rắn hay nuôi cấy chìm (trong môi trường lỏng).

Nuôi cấy trên môi trường thạch - Nuôi cấy nấm trên môi trường thạch thường được thực hiện trong phòng thí nghiệm để thu nhận một số lượng không lớn bào tử. Nấm được nuôi cấy trong hộp pectri hoặc trong bình Roux. Thành phần môi trường và các điều kiện nuôi cấy tùy thuộc

Bảng 2.13. Ảnh hưởng của các loại glucid đến sự tạo thành bào tử ở loài *Colletotrichum capsici* (theo V.I.Bilai, 1974)
(+++ : rất nhiều ; nhiều : ++ ; ít : +)

Glucid	Trọng lượng khô mg/25ml	Bào tử tạo thành	Glucid	Trọng lượng khô mg/25ml	Bào tử tạo thành
Maltose	102	+++	Lactose	60	+++
Xylose	91	+++	Sorbose	52	+++
Tinh bột	70	++	Arabinose	47	+
Dextrin	66	++	Fructose	46	++
Galactose	66	+++	Raffinose	42	+++
Glucose	64	++	Inulin	40	+
Rhamnose	64	++	Sorbit	23	+
Saccharose	62	+++	Mannit	16	+

vào từng loài. Đối với nhiều loài nấm tiếp hợp (nhiều loài thuộc chi *Mucor*, *Rhizopus*), nhiều loài nấm bất toàn (hầu hết các loài thuộc các chi *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, v.v.), nấm có thể mọc tốt và cho nhiều bào tử với các môi trường thạch Czapek, thạch khoai tây, thạch khoai tây - dextrose, nuôi cấy ở nhiệt độ 25 - 28°C. Về ảnh hưởng của thành phần môi trường đến số lượng bào tử được tạo thành, có thể kể thí dụ loài *Aspergillus ochraceus* cùng nuôi cấy 6 ngày, ở nhiệt độ 28°C, độ ẩm tương đối 55 - 60%, trên môi trường Sabouraud-dextrose trong một bình Roux cho 8.10^9 bào tử, trên cùng khối lượng môi trường thạch Difco W.L. trong một bình Roux cho $1,2.10^{11}$ bào tử (C.Vézina và Singh, 1975). Để thu nhận bào tử trên môi trường thạch, có thể dùng chổi sơn mềm đã tiệt trùng thu gom bào tử, cùng với dung dịch Tween 80 hoặc natrimonolauryl sulfat. Lọc dịch treo bào tử qua bông thủy tinh để loại các mảnh sợi nấm, sau đó có thể pha loãng dịch treo để có nồng độ bào tử theo ý muốn. Khi cần giữ bào tử để tiếp tục sử dụng, ly tâm dịch treo để được khối bột nhão, bảo quản trong tủ đá.

Nuôi cấy trên môi trường rắn - Để được số lượng bào tử nhiều hơn dùng trong nghiên cứu hay sản xuất thử, có thể nuôi cấy nấm trên môi trường rắn (còn gọi là môi trường xốp). Nguyên liệu để làm môi trường này thường là cám và các hạt ngũ cốc như gạo, lúa mì, lúa mạch, ngô, v.v. Cho nguyên liệu vào bình, bổ sung một lượng nước vừa đủ và hấp tiệt trùng. Để môi trường được xốp hơn, nghĩa là có độ thông khí trong môi trường tốt hơn, tăng cường khả năng tạo thành bào tử ở cả trong khối môi trường trong bình, đặc biệt trong trường hợp không có các bình det lớn như bình Fernbach, bổ sung một lượng chấu với tỷ lệ thích hợp vào môi trường trước khi tiệt trùng. Ngoài ra, với một số loài nấm có

nhu cầu dinh dưỡng đặc biệt, có thể bổ sung vào môi trường các muối khoáng, glucose, pepton, cao men bia, v.v. Ở các phòng thí nghiệm cần thường xuyên một lượng bào tử nấm để nghiên cứu, người ta thường dùng bình Roux hoặc bình Fernbach (một loại bình dẹt có dung tích lớn gấp 5 - 50 lần bình Roux). Các bình này có mặt thoáng lớn, nấm tạo thành bào tử chủ yếu ở trên mặt thoáng của môi trường. Khó khăn chính trong phương pháp này là xác định lượng nước bổ sung vào nguyên liệu trong bình để có môi trường không quá rắn, quá nhão, đồng thời độ ẩm tương đối trong bình thích hợp với sự tạo thành bào tử của mỗi loài nấm, vì như chúng ta biết có loài nấm ưa ẩm nhiều, có loài ưa ẩm ít. Lượng nước này nhiều khi ảnh hưởng quyết định đến số lượng bào tử tạo thành (bảng 2.11). Để thu gom bào tử tạo thành trong bình, cho nước hoặc một dung dịch đệm (dung dịch đẳng trương) vào trong bình, lắc rồi lọc qua bông thủy tinh, loại hạt và các sợi nấm, để được dung dịch treo bào tử. Có thể đếm bào tử bằng thiết bị đếm hồng cầu, pha loãng dịch treo bào tử để được dịch treo có số lượng bào tử mong muốn. Về hiệu suất thu nhận bào tử nấm, thí dụ với loài *Aspergillus ochraceus*, nuôi cấy với 200g lúa mạch hoặc 100g cám trong bình Fernbach, ở nhiệt độ 28°C, độ ẩm tương đối 98%, sau 6 ngày nuôi cấy thu nhận được 6g bào tử (30% trọng lượng khô). Ngoài ra, một phương pháp nuôi cấy nấm đơn giản để thu nhận bào tử đã được thử nghiệm có kết quả đối với nhiều loài *Aspergillus* và *Penicillium* : nuôi cấy nấm trên các miếng bánh mì (Sansing và Ciegler, 1973), tất nhiên ở nhiệt độ, với hàm lượng nước của bánh mì và độ ẩm tương đối thích hợp đối với từng loài.

Bảng 2.14. Ảnh hưởng của lượng nước cho vào nguyên liệu đến sự tạo thành bào tử nấm (theo J.Rivière, 1975)

(+ : tạo thành bào tử yếu, - : không tạo thành bào tử)

Lượng nước mỗi bình	<i>Aspergillus ochraceus</i> NRRL 405	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9142	<i>Mucor griseocyanus</i> ATCC 1207A	<i>Penicillium chrysogenum</i> WIS 53.414
40	10.10^{11}	+	-	-
60	$3.2.10^{11}$	$2.1.10^{11}$	-	18.10^{11}
80	$3.8.10^{11}$	$2.0.10^{11}$	-	$2.0.10^{11}$
100	$3.0.10^{11}$	+	-	10.10^{11}
120	+	-	$6.3.10^{11}$	+
140	-	-	$4.5.10^{11}$	-
160	-	-	-	-

Thí nghiệm được tiến hành trong bình Fernbach có dung tích 2,8 lít, với 200g hạt lúa mạch (tiệt trùng ở 121°C , 1h), nuôi cấy ở 28°C , 6 ngày với *Aspergillus ochraceus* và với 25°C , 14 ngày với các loài khác (RH 50 - 60%). Ở phạm vi công nghiệp, cần có một số lượng lớn bào tử, nấm được nuôi cấy trên môi trường cám trong các khay, các khay được đặt trên các giá ở trong một phòng kín vô trùng, có độ ẩm tương đối cao, được thông khí vô trùng. Để thu gom bào tử, trộn môi trường với nước, lắc mạnh ít phút, rồi cho vào nồi ly tâm có tốc độ quay nhỏ để tách bào tử khỏi sợi nấm và cám, lọc qua bông thủy tinh để được dịch treo bào tử. Mỗi khay có kích thước 762 x 457,2 x 44,5 mm cho 7.10^{12} bào tử của loài *Aspergillus ochraceus*.

Nuôi cấy trên môi trường lỏng (nuôi cấy chìm) - Khi cần nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo thành và số lượng bào tử, phương pháp nuôi cấy nấm trên môi trường lỏng có nhiều thuận lợi, vì với phương pháp này, các quá trình trao đổi chất và nhiều quá trình sinh học khác của cơ thể nấm thực hiện mạnh hơn. Với phương pháp này, người ta đã xác định được những thành phần môi trường ảnh hưởng đến số lượng bào tử của nhiều loài nấm (bảng 2.15).

Các môi trường có các thành phần dinh dưỡng khác nhau đã được sử dụng để thu nhận bào tử của một số loài nấm thuộc các ngành phụ Nấm tiếp hợp và Nấm bất toàn :

Môi trường A : Cao lúa mạch (Difco Lab. Inc.) 100g

Nước cất 1 lit

(pH 4,7)

Môi trường B : Nước ngô 5g

Rỉ đường 50g

Cereloz (glucose monohydrat) 25g

Natri clorua 25g

Nước cất 1 lit

(pH 6,0)

Môi trường C : Glucose 30g

NaNO_3 3g

K_2HPO_4 1g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g

KCl 0,5g

Nguyên tố vi lượng (B 10 μ g, Cu 100 μ g,
Fe 200 μ g, Mn 20 μ g, Mo 20 μ g, Zn 2000 μ g)
Nước cất 1 lit
(pH 5,5)

Môi trường D : Môi trường C với glucose được thay bằng saccharose

Môi trường E : Nước ngô 10g

Saccharose 30g

NaNO₃ 3g

K₂HPO₄ 1g

MgSO₄ . 7H₂O 0,5g

KCl 0,5g

FeSO₄ . 7H₂O 0,01g

Nước cất 1 lit

(pH 6,0)

Môi trường F : Nước ngô 10g

Edamin 10g

Cao lúa mạch 15g

Nước cất 1 lit

(pH 7,0)

Môi trường G : Glucose 10g

NaNO₃ 1g KCl 0,5g

KH₂PO₄ 1g

CaCl₂ 1g

MgSO₄ . 7H₂O 0,5g

Nguyên tố vi lượng (5 lần nồng độ môi trường C)

Nước ngô 10g

Nước cất 1 lit

(pH 4,0)

Bảng 2.15. Số lượng bào tử tạo thành của một số loài nấm ở các môi trường khác nhau với phương pháp nuôi cấy chìm (theo C. Vezina và K. Singh, 1975)

Số thứ tự loài	Nấm	Môi trường nuôi cấy (1 ml)	Số lượng bào tử (sau 5 ngày)
Nấm tiếp hợp			
1	<i>Conidiobolus</i> sp.	A	$6,5 \cdot 10^7$
2	<i>Cunninghamella blakesleeana</i> Lendn.	A	$17 \cdot 10^8$
3	<i>Mucor griseo-cyanus</i> Wagem	A	rất ít
Nấm bất hoàn			
4	<i>Aspergillus fumigatus</i> Thom et Rap.	B	$< 15 \cdot 10^7$
5	<i>Aspergillus ochraceus</i> Wilhelm	B	$20 \cdot 10^8$
6	<i>Coniothyrium</i> sp.	C	$30 \cdot 10^7$
7	<i>Curvularia lunata</i> (Walker) Boedijn	B	$< 10 \cdot 10^7$
8	<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn	C	0
9	<i>Fusarium conglomerans</i> (?)	B	0
		E	$90 \cdot 10^7$
		C	$35 \cdot 10^8$
10	<i>F. decemcellulare</i> Brick	D	$16 \cdot 10^7$
11	<i>F. equiseti</i> (Cda.) Sacc.	D	$64 \cdot 10^7$
12	<i>F. graminearum</i> Schwabe	D	$16 \cdot 10^8$
13	<i>F. merismoides</i> Cda.	D	$12 \cdot 10^8$
		C	$23 \cdot 10^8$
14	<i>F. moniliforme</i> Sheldon	D	$17 \cdot 10^8$
15	<i>F. oxysporum</i> Schlech.	D	$25 \cdot 10^8$
16	<i>Pestalotia lunera</i> Desmazière	C	$10 \cdot 10^7$
17	<i>Septomyxa affinis</i> (Sherb.) Wollenw.	B	$18 \cdot 10^8$
		C	$54 \cdot 10^8$
		E	$98 \cdot 10^8$
		F	$21 \cdot 10^9$
18	<i>Stachylidium theobromae</i> Turconi	B	$24 \cdot 10^8$
		C	$30 \cdot 10^8$
		E	$34 \cdot 10^8$
		G	$80 \cdot 10^8$
19	<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex Fr.	C	$50 \cdot 10^7$
20	<i>Trichothecium roseum</i> Link ex Fr.	B	$20 \cdot 10^7$

Chúng ta thấy chẳng hạn loài *Curvularia lunata* nuôi cấy trong môi trường C, ngoài glucose, có một loạt các muối vô cơ (NaNO_3 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , KCl), một loạt các nguyên tố vi lượng (B, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn), không tạo thành bào tử. Cùng loài nấm này được nuôi cấy ở môi trường B có nước ngô, rỉ đường, glucose monohydrat và muối vô cơ chỉ có NaCl với hàm lượng khá cao (25 g/lit) lại tạo thành $1,0 \cdot 10^7/1$ ml bào tử. Trường hợp *Aspergillus ochraceus* cũng như vậy, nếu môi trường nuôi cấy thiếu

NaCl và vài muối vô cơ khác, loài nấm này cũng không tạo thành bào tử. *Aspergillus niger* chỉ tạo thành bào tử nếu nguồn nitơ trong môi trường nuôi cấy là nitrat, còn nitơ ammonium lại ức chế sự sinh sản vô tính này.

Như đã nói, để tiến hành biến đổi sinh học bằng các loài nấm có hoạt tính sinh học này, hiện nay chủ yếu người ta dùng bào tử vô tính. Để thí dụ, có thể lấy thí nghiệm sâu của Capek và Cs. (1974) : nuôi cấy nấm (một số loài của các chi *Alternaria*, *Cladosporium*, *Stemphylium* trong môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C, 48h, lắc 80 vòng/(biên độ 8cm), lọc để loại hệ sợi nấm, dịch treo bào tử và progesteron hòa tan trong rượu ethylic (1mg/0,2ml) được cho vào một dung dịch sinh lý. Lên men 48h trong cùng điều kiện như nuôi cấy nấm.

Khi cất giữ bào tử nấm để dùng lâu dài, thường xuyên, cần chú ý là hoạt tính sinh học của bào tử mỗi loài nấm bền vững không giống nhau, thí dụ cùng giữ ở dạng bột nhão đông lạnh (-20°C), hoạt tính biến đổi sinh học của loài *Aspergillus ochraceus* bền vững đến 2 năm, trong khi đó hoạt tính của loài *Septomyxa affinis* chỉ bền vững ở giới hạn 2 tháng.

Cũng cần thực hiện vô trùng nghiêm ngặt khi nuôi cấy thu nhận bào tử dù bằng phương pháp nào, vì nấm bị nhiễm khi nuôi cấy, không còn riêng loại bào tử của loài nấm sử dụng mà lẫn bào tử của các loài khác, đương nhiên sẽ làm sai lệch kết quả biến đổi sinh học mong muốn. Cuối cùng cũng cần chú ý tìm hiểu khả năng gây bệnh, khả năng sinh độc tố nấm (mycotoxin) của mỗi loài nấm trước khi nuôi cấy, lên men, để phòng tránh bệnh. Chúng ta cần biết một số loài nấm có khả năng tạo thành các mycotoxin gây một số bệnh nguy hiểm như ung thư, v.v. nếu để các mycotoxin này lọt vào đường tiêu hóa thường xuyên với một lượng nhỏ (tính bằng μg cho 1 kg cơ thể), chẳng hạn các loài *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* tạo thành aflatoxin, *Penicillium islandicum* tạo thành islandotoxin, luteoskyrin, v.v. Các mycotoxin này có ở sợi nấm, bào tử và trong dịch nuôi cấy nấm của các loài có khả năng tạo thành các độc tố đó.

2.2. Phương pháp lên men biến đổi sinh học

Nếu tác nhân biến đổi là vi khuẩn, môi trường lên men cũng thường là môi trường nuôi cấy vi khuẩn, và thường được lên men chìm. Với nấm và với cả xạ khuẩn, thường dùng bào tử và có thể lên men bằng các phương pháp lên men chìm (lên men ở môi trường lỏng), hoặc lên men bề mặt (trên môi trường rắn) Cần chú ý để kết quả biến đổi sinh học

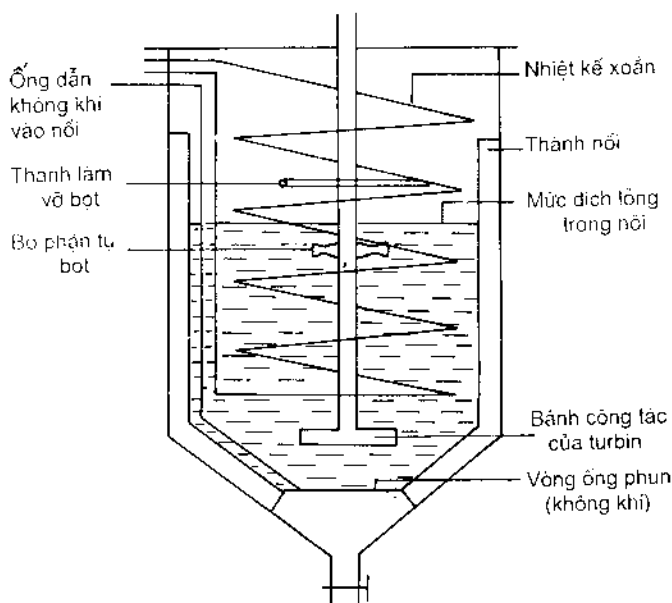
được chính xác, thường người ta rửa bào tử bằng nước hoặc bằng dung dịch đậm (phosphat, citrat hoặc acetat) để làm sạch môi trường nuôi cấy nấm, vừa để sạch tạp chất khi đưa bào tử vào lên men, vừa tránh bào tử nảy sợi.

Phương pháp lên men chìm

Biến đổi sinh học bằng phương pháp lên men chìm trong phòng thí nghiệm để nghiên cứu hay sản xuất thử, thường được tiến hành trong các bình nón trên máy lắc. Môi trường được lắc để vừa bảo đảm độ thông khí của môi trường, vừa tăng cường sự tiếp xúc của các hạt nhỏ của cơ chất (như các hợp chất steroid) với bào tử nấm. Trong trường hợp các nguyên liệu này không tan trong nước, thường ở dưới dạng hạt có kích thước 3 - 5 μm (phân tán bởi Tween 80). Số lượng bào tử nấm sử dụng ở trong khoảng 1.10^8 - 1.10^9 trong 1 ml môi trường. Hàm lượng steroid trong môi trường thay đổi theo hoạt tính biến đổi sinh học của bào tử đối với mỗi phản ứng biến đổi, thí dụ hàm lượng này là 5g/lit đối với trường hợp Δ -1-dehydro hóa (khử hydro) từ hợp chất S của Reichstein (17 α -hydroxy-11-deoxycorticosteron) A. D.Argoudelis và Cs. (1969, 1977, v.v.) thường dùng hàm lượng clindamycin là 50 mg trong 1 lit môi trường trong lên men biến đổi sinh học chất kháng sinh này. Môi trường lên men biến đổi sinh học bằng bào tử thường là nước hoặc một dung dịch đậm, và không bổ sung nguồn đạm để tránh bào tử nảy sợi. Tuy nhiên trong một số trường hợp lên men biến đổi sinh học, glucose có vai trò kích thích phản ứng, thí dụ phản ứng hydroxy hóa steroid bởi các loài *Aspergillus ochraceus* và *Mucor griseocyanus* cần có hàm lượng glucoza trong môi trường là 2 - 4g/lit. Về nguyên tắc khi lên men với bào tử nấm, không cần tiến hành trong điều kiện vô trùng. Trong trường hợp lên men kéo dài, có thể bổ sung vào môi trường một số chất kháng sinh như tetracyclin, neomycin để phòng môi trường bị nhiễm vi khuẩn. Bổ sung kháng sinh vào môi trường cũng cần thiết ở trường hợp lên men trong các nồi lên men lớn không có thiết bị thanh trùng không khí đưa vào nồi. Khác với lên men sinh tổng hợp, nhiệt độ và pH trong lên men biến đổi sinh học có giới hạn rộng. pH có giới hạn từ 4,0 đến 8,5, nhưng thường lên men ở pH 5 - 6 để hạn chế sự nhiễm khuẩn cho môi trường. Nhiệt độ lên men thường là 25 - 30°C. Nếu lên men trong bình, bình thường được lắc 200 - 300 vòng/min ở máy lắc tròn hoặc 100 - 200 vòng/min ở máy lắc ngang. Tỷ lệ dịch lên men với dung tích bình lên

men thường là 2/10. Một điều nữa cần chú ý khi lên men chìm là không hòa tan cơ chất là steroid trong nước, cần hòa tan cơ chất này trong các dung môi tan trong nước như aceton, ethanol, methanol, propylenglycol, v.v., để khi hòa vào nước, cơ chất sẽ thành những tiểu phần nhỏ.

Để lên men biến đổi sinh học với khối lượng lớn, người ta dùng các nồi lên men chuyên dùng. Các nồi này có cấu tạo đơn giản hơn loại nồi lên men sinh tổng hợp, vì không cần có các thiết bị giữ cho nồi lên men vô trùng (hình 2.5).



Hình 2.5. Sơ đồ kiểu nồi lên men biến đổi sinh học (Theo Vézina và Singh, 1975)

Phương pháp lên men trên môi trường rắn

Để nghiên cứu hoạt tính biến đổi sinh học, với mỗi bình môi trường lỏng, chỉ có thể xác định hoạt tính của một hợp chất steroid bởi một chủng vi sinh vật. Với môi trường thạch, có thể tiến hành xác định hoạt tính của một hợp chất steroid bởi nhiều chủng thuộc nhiều loài vi sinh vật đồng thời. Người ta trộn đều vào môi trường thạch đã tiệt trùng cơ chất (thí dụ một steroid) rồi đổ môi trường vào các hộp pectri. Cấy mỗi chủng nấm ở một điểm trên môi trường thạch. Thuốc thử tạo thành một vòng màu xung quanh khuẩn lạc của chủng có hoạt tính biến đổi sinh học đối với cơ chất (Vézina và Cs., 1969).

Một phương pháp khác phát hiện nhanh hoạt tính biến đổi sinh học của nấm được thực hiện như sau : trên bản mỏng sắc ký bằng silicagel G, cách đáy bản mỏng 0,5 cm, rỏ 1 μ l dung dịch hòa tan 30 μ g một cơ chất biến đổi, phủ lên trên vết cơ chất dịch treo bào tử của một chủng nấm ($2 \cdot 10^4$ bào tử/1 vết) ; làm đối chứng vết cơ chất và vết bào tử riêng biệt ; đặt bản mỏng sắc ký trong điều kiện nhiệt độ, độ ẩm thích hợp ; dùng các dung môi khác nhau để khai triển bản mỏng sắc ký, sấy khô và phun thuốc thử đặc trưng đối với các sản phẩm biến đổi (Hafer-Zedan và Plourde, 1971).

Ngoài ra phương pháp dùng cột trao đổi ion hay cột gel polyacrylamid cũng đã được dùng để nghiên cứu hoạt tính biến đổi sinh học của một số hợp chất như oxy hóa acid octanoic bởi bào tử của loài *Penicillium roqueforti* (Johnson và Ciegler, 1969), một số hợp chất steroid như phản ứng hydroxy hóa ở vị trí -11β bởi *Curvularia lunata* (Mosbach và Larsson, 1970). Về các phản ứng màu và huỳnh quang dùng để xác định một số sản phẩm biến đổi sinh học, xem ở đoạn sau.

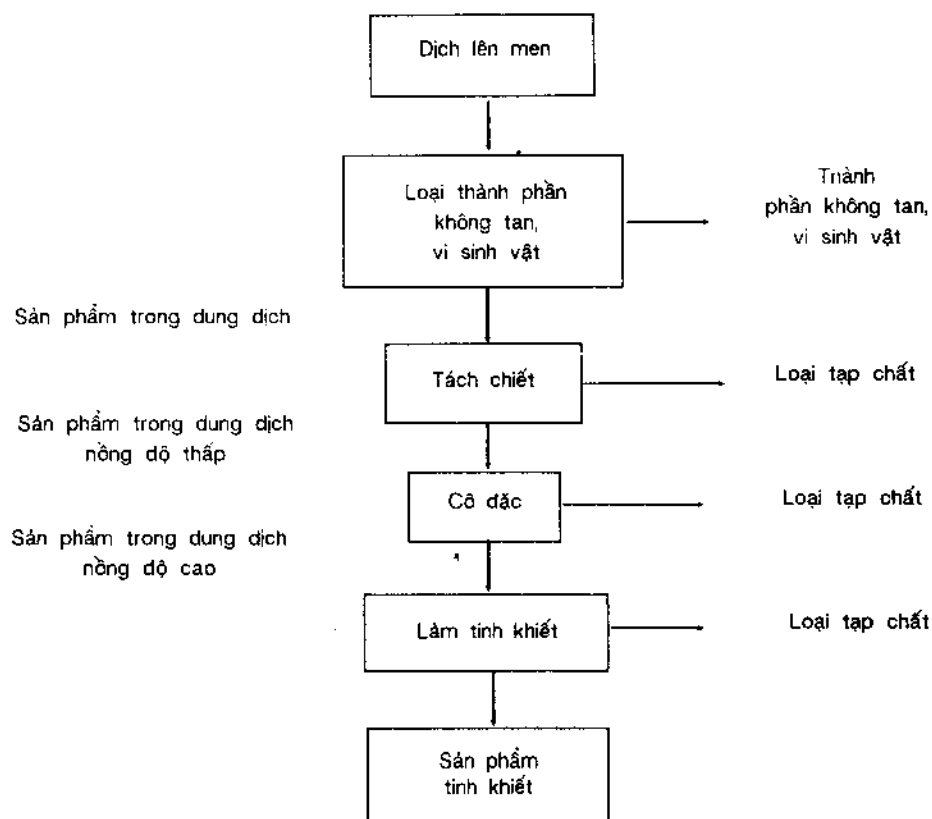
2.3. Các phương pháp tách chiết và xác định các sản phẩm biến đổi sinh học

Các sản phẩm biến đổi sinh học có nhiều loại (hydrat cacbon, kháng sinh, steroid, v.v.) và trong từng loại, lại có nhiều hợp chất có cấu trúc hóa học khác nhau, do đó, các phương pháp tách chiết và xác định các sản phẩm này không giống nhau. Trong phạm vi chương này, chúng tôi chỉ trình bày các nguyên tắc chung, và chỉ chọn vài trường hợp để làm thí dụ.

Như đã nói, dịch lên men biến đổi sinh học có thể đồng thời là dịch nuôi cấy, có thể là dịch treo bào tử trong nước hoặc một dung dịch đậm. Ở trường hợp thứ nhất, sau khi lên men kết thúc, dịch lên men ngoài sản phẩm biến đổi và phần nguyên liệu biến đổi cơ chất còn lại, còn một loạt hợp chất vô cơ, hữu cơ của các thành phần dinh dưỡng của dịch nuôi cấy mà vi sinh vật không sử dụng hết, và cả các sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật tạo thành trong quá trình nuôi cấy và lên men. Ở trường hợp thứ hai, dịch lên men khi đó có ít thành phần hơn, chủ yếu chỉ có sản phẩm biến đổi tạo thành, nguyên liệu biến đổi còn lại, và bào tử vi sinh vật (nấm hoặc xạ khuẩn).

Việc tách chiết sản phẩm biến đổi ở trường hợp thứ nhất đương nhiên phức tạp hơn ở trường hợp thứ hai, và phải qua nhiều giai đoạn hơn. Nói chung, việc tách chiết sản phẩm lên men phải qua những giai đoạn sau : loại những thành phần không tan bao gồm cả vi sinh vật,

tách chiết sản phẩm, cô đặc sản phẩm, làm tinh khiết sản phẩm (hình 2.6).



Hình 2.6. Sơ đồ các giai đoạn tách chiết sản phẩm lên men biến đổi sinh học

Với trường hợp lên men bằng bào tử, các giai đoạn chiết xuất và cô đặc thường được gộp làm một. Quy trình chiết xuất trên chỉ áp dụng đối với các sản phẩm biến đổi tan trong nước. Đối với các sản phẩm không tan trong nước, như trường hợp một số hợp chất steroid, sản phẩm cùng với bào tử nấm được tách riêng từ dịch lên men bằng ly tâm hay lọc, sau đó dùng dung môi để tách chiết steroid. Nếu sản phẩm ít tan trong nước, nghĩa là vừa ở dạng hòa tan, vừa ở dạng treo trong dịch lên men, hoặc trong trường hợp nghiên cứu các sản phẩm mới, cần phải tách chiết sản phẩm cả từ dịch lọc, cả từ cặn lọc.

Khi tiến hành tách chiết sản phẩm biến đổi sinh học, đặc biệt đối với steroid, điều cần chú ý đầu tiên là cần tiến hành tách chiết ngay sau khi lên men kết thúc, để tránh tác dụng của các enzym khác nhau của

vi sinh vật lên sản phẩm, như là phản ứng cắt mạch ngang của phân tử sản phẩm. Thông thường để làm việc này, chỉ cần tách sản phẩm với vi sinh vật (tế bào vi khuẩn, sợi nấm, bào tử nấm hoặc xạ khuẩn). Trường hợp các phản ứng biến đổi sinh học xảy ra nhanh, người ta đun dịch lọc ở nhiệt độ 60 - 80°C tùy từng loại vi sinh vật, hoặc bổ sung ngay vào dịch lên men một lượng acid hay một dung môi vô cơ. Thí dụ, phản ứng oxy hóa cortison thành prednison kết thúc sau 4 - 5h lên men biến đổi sinh học, nếu kéo dài thời gian lên men, sản phẩm sẽ biến đổi thành các dẫn chất 20 β -hydroxy. Để tránh hiện tượng này, người ta bổ sung vào dịch lên men acid chlorhydric đến pH 3,0 - 3,5 khi lên men kết thúc. Trong trường hợp sản phẩm không bị phân hủy ở nhiệt độ thấp, có thể để dịch lên men khi lên men kết thúc ở nhiệt độ 2 - 5°C. Ở nhiệt độ này, các enzym vi sinh vật trên thực tế không còn hoạt động được.

Trường hợp tách chiết sản phẩm biến đổi sinh học thuận lợi nhất khi sản phẩm hòa tan nhiều trong nước (thường sản phẩm có tính phân cực mạnh hơn cơ chất), đồng thời phản ứng biến đổi chỉ tạo thành một sản phẩm, có thể lên men biến đổi sinh học với nồng độ cao của cơ chất, và việc tách chiết sản phẩm lại đơn giản, thường chỉ cần loại bỏ vi sinh vật và tạp chất không tan bằng phương pháp lọc. Thí dụ, có thể biến đổi progesteron thành 11 α -hydroxy-progesteron bằng bào tử *Aspergillus ochraceus*, với nồng độ 20 - 50g cơ chất trong 1 lit, và hiệu suất biến đổi tới 90%, mà chỉ cần lọc lấy dung dịch sản phẩm (Weaver và Cs., 1960).

Để loại tạp chất khỏi dịch lên men khi lên men kết thúc, ngoài phương pháp lọc, có thể dùng các phương pháp khác nhau tùy trường hợp, như ly tâm, gầy vón tế bào vi sinh vật, v.v. Để chiết xuất sản phẩm từ dịch lên men đã loại tạp chất không tan, có thể dùng các phương pháp chiết xuất thông thường như dùng dung môi, hấp phụ, kết tinh, v.v. Để tách chiết phân biệt một steroid khỏi một dung dịch lên men biến đổi sinh học chứa nhiều steroid, có thể dùng dung môi có độ phân cực tăng dần, hoặc dùng một hệ dung môi, thí dụ để tách chiết phân biệt cortexelon với cortisol và epicortisol, hệ dung môi CCl₄ - CHCl₃ cho kết quả tốt (Mizsei và Szabo, 1961). Phương pháp kết tinh phân đoạn cũng đã được dùng trong trường hợp này, căn cứ vào độ phân cực và khả năng kết tinh của các hợp chất. Bằng phương pháp này, người ta tách các hợp chất như 11 α -hydroxy progesteron và 6 β -11 α -dihydroprogesteron (hợp chất sau được tách bằng kết tinh trong methanol), các hợp chất 6 β -hydroxy-17 α -methytestosteron và 11 α -hydroxy-17 α -methytestosteron (hợp chất thứ nhất được tách bằng kết tinh trong benzen), các hợp chất

prednison và dẫn chất 20β -hydroxy của steroid này bằng cloroform. Trong nghiên cứu biến đổi sinh học, hiện nay người ta còn dùng một số phương pháp tách chiết khác như sắc ký bản mỏng, sắc ký cột, cột trao đổi ion, phương pháp hóa học (như este hóa, xà phòng hóa, v.v.), sắc ký khí, sắc ký lỏng cao áp, v.v.

Xác định hóa học các sản phẩm biến đổi sinh học thường được tiến hành ở hai thời kỳ : thời kỳ lên men và khi đã thu được sản phẩm tinh khiết.

Sự tạo thành sản phẩm biến đổi sinh học trong quá trình lên men thường được theo dõi thường xuyên bằng các phản ứng màu, màu huỳnh quang trong UV trên sắc ký đồ của sắc ký bản mỏng, sắc ký giấy, so sánh với các mẫu hợp chất chuẩn. Với các chất kháng sinh, việc theo dõi này có thể thực hiện bằng sự kiểm tra hoạt tính kháng sinh trên sắc ký bản mỏng đã khai triển và được cấy vi sinh vật chỉ thị. Các phản ứng màu và màu huỳnh quang thường chỉ cho biết sự biến đổi của các nhóm hóa chức, ít khi có thể dùng để theo dõi sự hình thành toàn bộ sản phẩm (bảng 2.16).

Bảng 2.16. Một số thí dụ về phản ứng màu dùng để theo dõi sự tạo thành sản phẩm trong biến đổi sinh học các steroid

<i>Thuốc thử</i>	<i>Steroid hoặc nhóm hóa chức</i>	<i>Màu tạo thành</i>
SO_4H_2 đặc	Cortexolone Cortisol Cortison Testosteron	Xanh đậm Vàng đậm $\rightarrow$ nâu Vàng đậm $\rightarrow$ lục Xanh
$\text{SO}_4\text{H}_2 + \text{CH}_3\text{COOH}$ AgNO_3 trong NH_4OH (phản ứng Tollen)	α -diol	Nâu tối
m-dinitrobenzen/môi trường kiềm (phản ứng Zimmermann)	3-ceto	Xanh tím (không bền)
	20-ceto	Hồng tím (không bền)
	16ceto + 20ceto	Nâu-da cam
Hydrazid của acid isonicotinic	Δ^4 -3-ceto $\Delta^{1,4}$ -3-ceto	Vàng $\rightarrow$ nâu Vàng
Dung dịch FeCl_3 1% + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (phản ứng xanh Turnbull)	Phenolic	Xanh
Phenyl hydrazin/dung dịch kiềm	17 α -hydroxy 17-ceto	Huỳnh quang vàng (abs.max.410 nm)* Huỳnh quang tím (abs.max.520 nm)
m-dinitrobenzen		
Diphenylamin/dung dịch $\text{CH}_3\text{COOH}+\text{SO}_4\text{H}_2$ (phản ứng Dische)	11,20-diceto-20-01 11,17,21-triol-20-on	Huỳnh quang lục (abs max. 630-650 nm)

abs.max : Độ hấp thụ cực đại (absorption maximum)

Khi đã thu được các sản phẩm biến đổi sinh học tinh khiết, cũng như các sản phẩm lên men khác hoặc các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên hay tổng hợp hóa học, các sản phẩm này cần được xác định bằng các phương pháp vật lý, hóa học, để khẳng định hợp chất lên men và tách chiết được từ lên men biến đổi sinh học đã thực hiện, và nếu là sản phẩm mới, biết được cấu trúc hóa học của sản phẩm đó. Các phương pháp hóa học, vật lý thường dùng hiện nay là các phương pháp xác định điểm nóng chảy, độ quay cực, các phổ tử ngoại, cộng hưởng từ hạt nhân, cộng hưởng từ điện tử, khối phổ, phân tích nguyên tố, xác định cấu trúc tinh thể, các phản ứng hóa học, v.v.

3. CƠ CHẤT BIẾN ĐỔI SINH HỌC

Như chúng ta đã biết, từ những năm 1930 - 1940, đặc biệt từ năm 1949 sau khi biết được tác dụng điều trị của cortison và các hợp chất corticoid khác, nhiều hợp chất hữu cơ khác nhau đã được dùng làm cơ chất biến đổi sinh học, để tạo ra các sản phẩm có hoạt tính sinh học, tác dụng điều trị bệnh, v.v. cao hơn, thí dụ như chất kháng sinh l'-demethylclindamycin có tác dụng kháng khuẩn mạnh gấp 8 lần lincomycin do lên men biến đổi sinh học clindamycin bằng xạ khuẩn *Streptomyces punipalvus*, hoặc nhiều sản phẩm mới từ các hợp chất steroid, v.v. Một số phản ứng biến đổi sinh học còn giúp sử dụng các nguồn nguyên liệu tự nhiên, rẻ tiền, tạo thành các sản phẩm có giá trị kinh tế, giá trị phòng chống bệnh, như sử dụng các steroid chiết xuất từ thực vật như diosgenin, solasodin, v.v. Lên men biến đổi sinh học cũng đã được dùng để tạo ra các qui trình, công nghệ sản xuất mới có hiệu quả kinh tế cao, rút ngắn thời gian, nâng cao hiệu suất, như sản xuất một số hormon sinh dục, sản xuất vitamin C, một số thuốc kháng sinh, sản xuất glucose, v.v. Ngoài ra, các phản ứng biến đổi sinh học tạo một số chất còn được sử dụng để nghiên cứu cơ chế sinh tổng hợp, được dùng trong hóa phân loại một số nhóm phân loại vi sinh vật.

Nhiều hợp chất hữu cơ đã được nghiên cứu và trở thành cơ chất của lên men biến đổi sinh học.

3.1. Cơ chất kháng sinh và biến đổi sinh học một số hợp chất

Penicillin là thuốc kháng sinh đầu tiên được sử dụng để điều trị một số bệnh nhiễm trùng, được coi là mở đầu cho một giai đoạn y học (giai đoạn sử dụng kháng sinh), từ những năm đầu của thập kỷ 40, sản xuất bởi sinh tổng hợp chủ yếu với *Penicillium chrysogenum*. Việc dùng kháng sinh này rộng rãi tiếp sau đó đã tạo ra hiện tượng kháng penicillin của

vi khuẩn ngày càng tăng, do đó người ta đã nghiên cứu biến đổi một phần cấu trúc phân tử hợp chất này bằng hóa học hoặc bằng biến đổi sinh học, để thu nhận được những thuốc kháng sinh mới có tác dụng điều trị như penicillin, nhưng khác phục được hiện tượng kháng thuốc của vi khuẩn. Một phương pháp sản xuất kháng sinh mới loại này, như ampicillin, là dùng acid 6-aminopenicillanic (6-APA) làm nguyên liệu. Nguyên liệu này được sản xuất hoặc bằng phương pháp sinh tổng hợp, hoặc bằng phương pháp biến đổi sinh học penicillin. Penicillin V chẳng hạn đã biến đổi thành 6-APA bằng bào tử của các loài nấm *Fusarium conglomerans* và *F. moniliforme*, với hiệu suất 80% (thời gian lên men 48h, nồng độ bào tử 5.10^8 /ml, dung dịch đậm photphat 1%, pH 7,8) (Singh và Cs., 1967).

Với những mục tiêu khác nhau (tạo ra chất kháng sinh mới có hiệu lực điều trị cao hơn cơ chất, nghiên cứu cơ chế sinh tổng hợp một kháng sinh, v.v.), ngoài penicillin, nhiều chất kháng sinh khác đã được dùng làm cơ chất trong lên men biến đổi sinh học, dưới đây là tóm tắt một số thí dụ :

(1) Cơ chất : Chloramphenicol (hình 2.7)

Tác nhân biến đổi sinh học (TNBDSH) :

Dịch nuôi cấy *Streptomyces coelicolor*

Sản phẩm biến đổi sinh học (SPBDSH) :

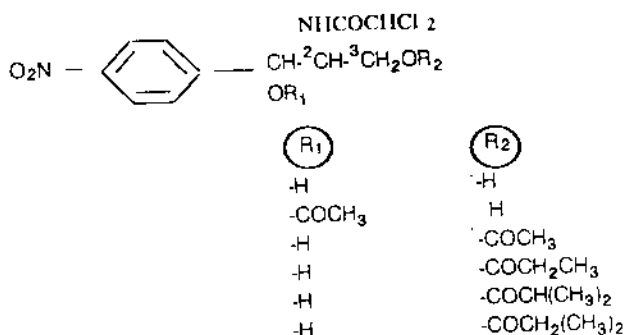
Chloramphenicol acetat

Chloramphenicol propionat

Chloramphenicol butyrat

Lên men biến đổi sinh học (LMBDSH) : môi trường nhiều thành phần, thời gian 24h

Chú thích : sản phẩm mất hoạt tính kháng sinh invitro. (Coats và Argoudelis, 1971).



Hình 2.7. Biến đổi sinh học chloramphenicol

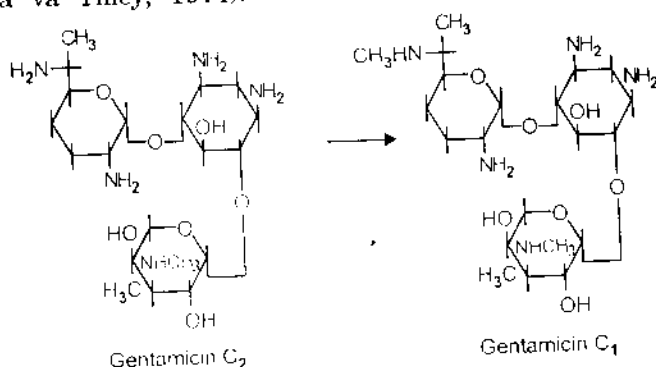
(2) Cơ chất : Gentamicin C₂ (hình 2.8)

TNBDSH : Dịch nuôi cấy của chủng đột biến của *Micromonospora purpurea* (chủng không tạo thành gentamicin).

SPBDSH : Gentamicin C₁ (6-N-methyl của gentamicin C₂)

LMBDSH : Môi trường (g/lit) : bột đậu nành 35, dextrose 5, dextrin 50, calci carbonat 7, cobalt chlorur, 7H₂O - 0,00024. Nhiệt độ 28°C. Thời gian 6 - 7 ngày. Lắc tròn 300 vòng/phần.

(Testa và Tilley, 1974).



Hình 2.8. Biến đổi sinh học gentamicin C₂

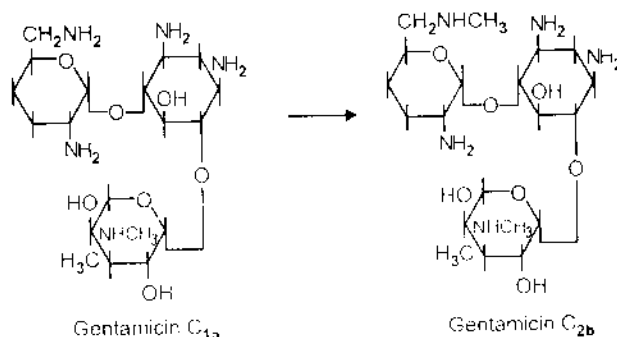
(3) Cơ chất : Gentamicin C_{1a} (hình 2.9)

TNBDSH : Dịch nuôi cấy của chủng đột biến của *Micromonospora purpurea* (chủng không tạo thành gentamicin).

SPBDSH : Gentamicin C_{2b} (6'-N-methyl của gentamicin C_{1a})

LMBDSH : Xem ở thí dụ (2)

(Testa và Tilley, 1976).



Hình 2.9. Biến đổi sinh học gentamicin C_{1a}

(4) Cơ chất : Kháng sinh JI.20A (hình 2.10)

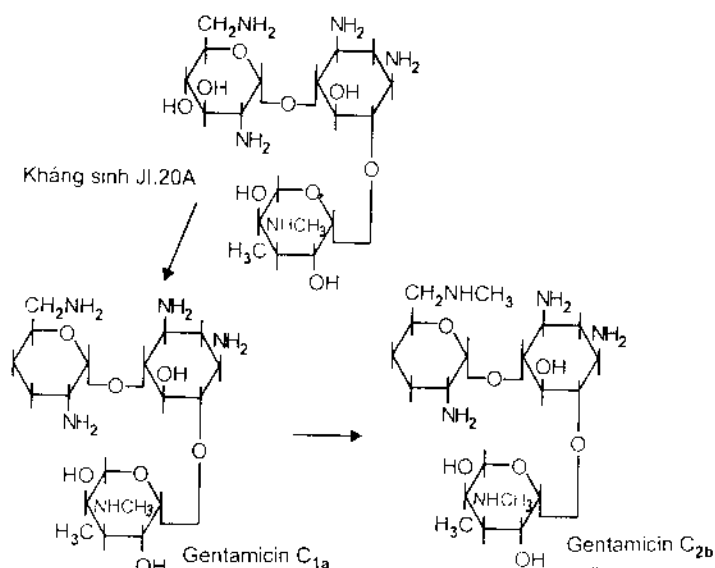
TNBDSH : Dịch nuôi cấy của chủng đột biến của *Micromonospora purpurea* (chủng không tạo thành gentamicin).

SPBDSH : Gentamicin C_{1a} (dẫn chất dehydroxy hóa của cơ chất)

Gentamicin C_{2b} (dẫn chất dehydroxy hóa và N-methyl hóa của cơ chất, dẫn chất N-methyl hóa của Gentamicin C_{1a})

LMBDSH : xem ở thí dụ (2)

(Testa và Tilley, 1976).



Hình 2.10. Biến đổi sinh học kháng sinh JI.20A và Gentamicin C_{1a}

(5) Cơ chất : Kháng sinh JI.20B (hình 2.11)

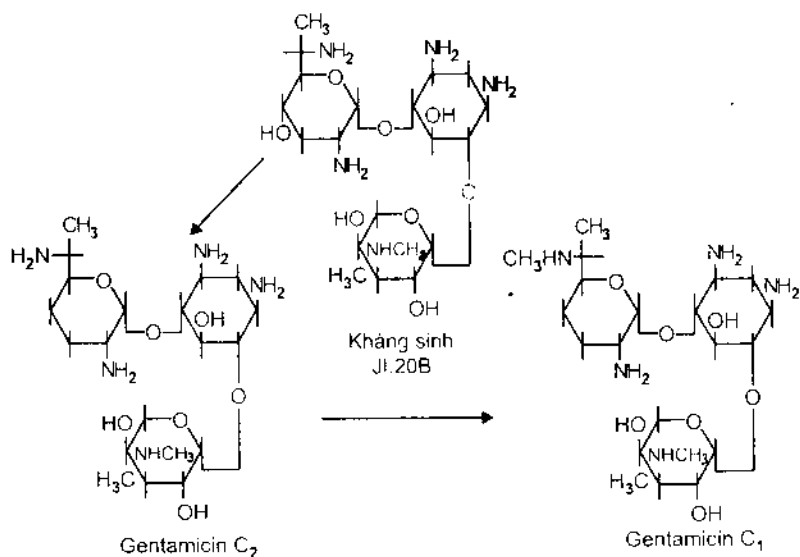
TNBDSH : Dịch nuôi cấy của chủng đột biến của *Micromonospora purpurea* (chủng không tạo thành gentamicin)

SPBDSH : Gentamicin C₂ (dẫn chất dehydroxy hóa của cơ chất)

Gentamycin C₁ (dẫn chất dehydroxy hóa và N-methyl hóa của cơ chất, dẫn chất N-methyl hóa của Gentamycin C₂).

LMBDSH : xem ở thí dụ (2)

(Testa và Tilley, 1976).



Hình 2.11. Biến đổi sinh học kháng sinh JI.20B và Gentamicin C₂

(6) Cơ chất : Kháng sinh G.418 (hình 2.12)

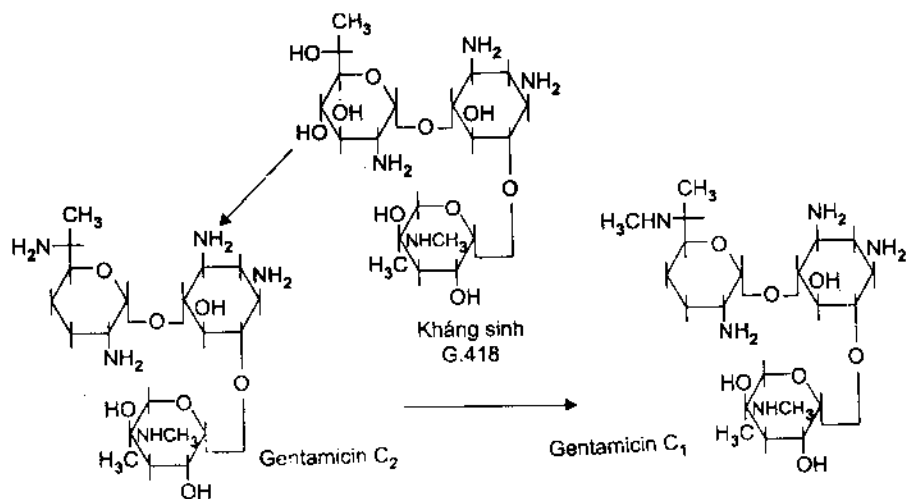
TNBDSH : Dịch nuôi cấy của chủng đột biến của *Micromonospora purpurea* (chủng không tạo thành gentamicin)

SPBDSH : Gentamicin C₂, (dẫn chất dehydroxy hóa và amin hóa của cơ chất)

Gentamicin C₁ (dẫn chất methyl hóa của gentamicin C₂).

LMBDSH : xem ở thí dụ (2)

(Testa và Tilley, 1976).



Hình 2.12. Biến đổi sinh học kháng sinh G.418

(7) Cơ chất : Gentamicin A, Gentamicin X₂ (hình 2.13)

TNBDSH : Dịch nuôi cấy của chủng đột biến của *Micromonospora purpurea* (chủng không tạo thành gentamicin).

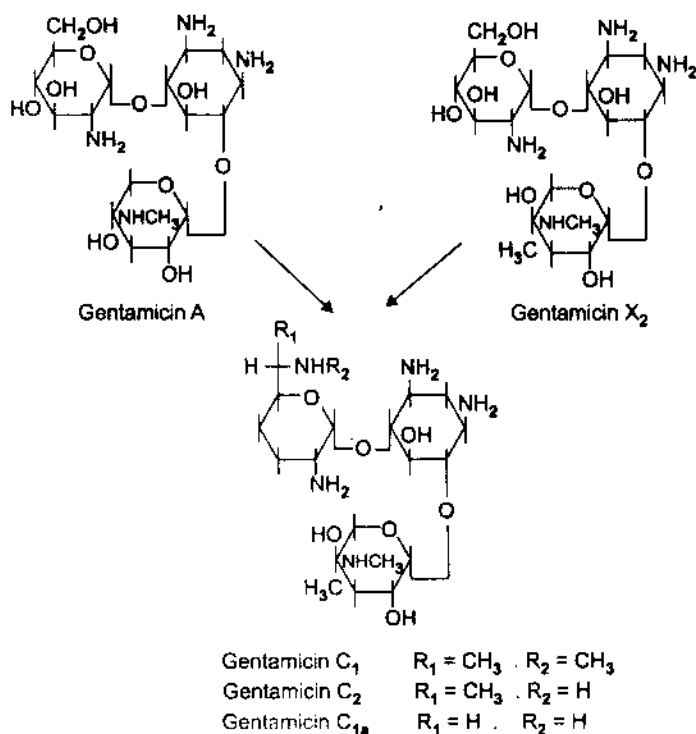
SPBDSH : Gentamicin C₁

Gentamicin C₂

Gentamicin C_{1a}

LMBDSH : xem ở thí dụ (2)

(Testa và Tilley, 1976)



Hình 2.13. Biến đổi sinh học gentamicin A₁ và gentamicin X₂

(8) Cơ chất : Lincomycin (hình 2.14)

TNBDSH : Dịch nuôi cấy của *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis*

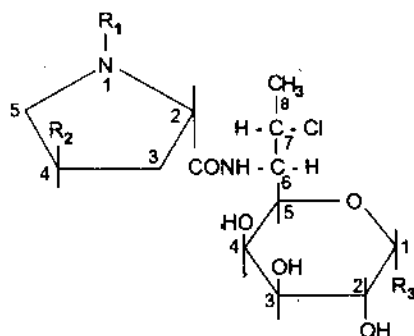
SPBDSH : Lincomycin sulfoxid
 1-demethylthio-1-hydroxylincomycin
 (Argoudelin và Cs., 1969)

(10) Cơ chất : Clindamycin (hình 2.16)

TNBDSH : *Streptomyces punipalus* SPBDSH : l'-demethylclindamycin

LMBDSH : Môi trường (g/lit) : dextrin 30, rỉ đường 20, bột cá 15, Pharmamedia (sản phẩm thủy phân của hạt bông) 15. Cơ chất 5% môi trường. Nhiệt độ 28°C. Dịch nuôi cấy xạ khuẩn cho vào bình lên men, sau 24h, cho cơ chất, lên men 72h. Lắc tròn 250 vòng/min.

Chú thích : sản phẩm còn 5% hoạt tính kháng sinh in vitro (Argoudelis và Cs., 1969).



Hình 2.16 và 2.17. Biến đổi sinh học clindamycin thành l'-demethylclindamycin và clindamycin sulfoxid.

Clindamycin
l'-demethylclindamycin
Clindamycin Sulfoxid

$R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$; $R_3 = \text{SCH}_3$

$R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$; $R_3 = \text{SCH}_3$

$R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$; $R_3 = \text{SCH}_3$

↓
O

(11) Cơ chất : Clindamycin (hình 5.17)

TNBDSH : *Streptomyces armentosus*

SPBDSH : Clindamycin sulfoxid

LMBDSH : Môi trường (g/lit) : tinh bột 30, rỉ đường 20, Pharmamedia (sản phẩm thủy ngân của hạt bông) 15, bột cá 15, mỡ lợn (mỡ nước) 5 ml/lit. Cơ chất 5% (v/v). Dịch nuôi cấy xạ khuẩn cho vào bình lên men, sau 48h cho cơ chất. Nhiệt độ 28°C. Lắc tròn 250 vòng/min. Thời gian lên men 120h.

Chú thích : Sản phẩm còn 1% hoạt tính kháng sinh in vitro (Argoudelis và Cs., 1969).

(12) Cơ chất : Clindamycin (hình 5.18)

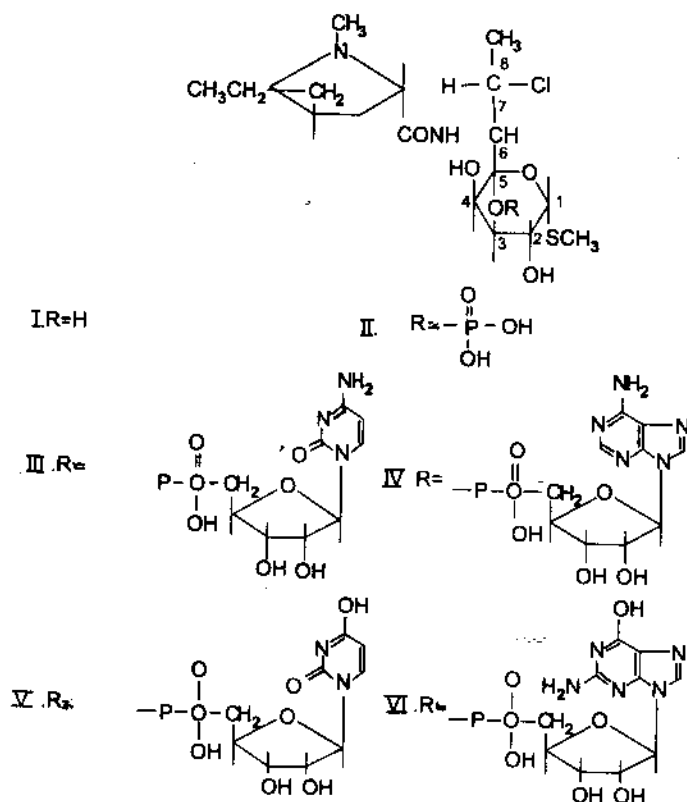
TNBDSH : *Szreptomycetes coelicolor* NRRL 3532

SPBDDSH : Clindamycin 3-ribonucleotid

Clindamycin 3-phốtphat

LMBDSH : Môi trường và điều kiện lên men : xem ở thí dụ (9)

Chú thích : sản phẩm mất hoạt tính kháng sinh in vitro (Argoudelin và Cs., 1977).



Hình 2.18. Biến đổi sinh học clindamycin thành clindamycin 3-nucleotid và clindamycin 3-phốtphat

- I. Clindamycin
- II. Clindamycin 3-Photphat
- III. Clindamycin 3-(5'-cytidylat)
- IV. Clindamycin 3-(5'-adenylat)
- V. Clindamycin 3-(5'-uridylat)
- VI. Clindamycin 3-(5'-guanylat)

(13) Cơ chất : Olivomycin A (hình 2.19)

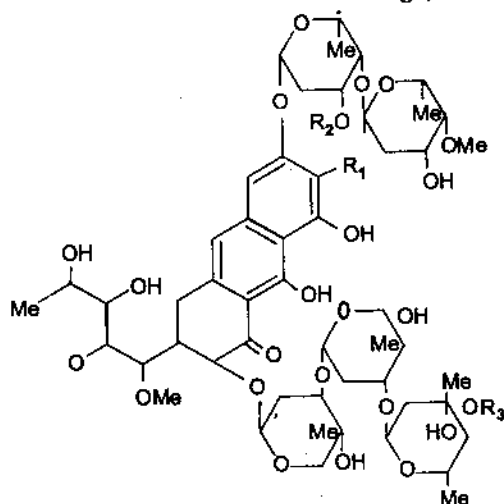
TNBDSH : *Whetzelinia sclerotiorum* ATCC-10939

SPBDSH : Deisobutyrylolivomycin A

IMBDSH : Môi trường (g/lít) : 37,5, Pharmamedia (sản phẩm thủy phân của hạt bông) 20,0, calci carbonat 5,0, calci sulfat 2,5,

natrisulfat 2,0. Cơ chất 1 mg/ml. Nhiệt độ 27°C. Dịch nuôi cấy nấm cho vào bình lên men, sau 48h, cho cơ chất, lên men 18 - 20h. Lắc tròn 250 vòng/min.

Chú thích : sản phẩm có hoạt tính kháng sinh giảm mạnh (vi khuẩn chỉ thị : các chủng khác nhau của *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *S.pyogenes*). (Schmitz và Claridge, 1977).



Hình 2.19. Biến đổi sinh học olivomycin A và chromomycin A₂ A₃

Olivomycin A : R₁=H, R₂=CH₃CO, R₃=COCH(CH₃)₂

Deisobutyrylolivomycin A : R₁=H, R₂=CH₃CO, R₃=H

Chromomycin A₂ : R₁=CH₃, R₂=CH₃CO, R₃=COCH(CH₃)₂

Chromomycin A₂ : R₁=CH₃, R₂=R₃=CH₃CO

Deisobutyrylchromomycin A₂ : R₁=CH₃, R₂=CH₂CO, R₃=H

(14) Cơ chất : Chromomycin A₂, A₃ (hình 2.19)

TNBDSH : *Whetzelinia sclerotiorum* ATCC-10939

SPBDSH : Deisobutyrylchromomycin A₂

IMBDSH : Môi trường và điều kiện lên men : xem ở thích dụ (13)

Chú thích : sản phẩm có hoạt tính kháng sinh tương tự như chromomycin A₂. (Schmitz và Claridge, 1977)

Ngoài kháng sinh, một số hợp chất khác cũng đã được sử dụng làm cơ chất cho lên men biến đổi sinh học. *Penicillium roqueforti* và nhiều loài thuộc các chi *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium* và *Scopulariopsis* biến đổi cơ chất là các acid béo thành các hợp chất - methylceto bằng phản ứng β -oxy hóa. Bào tử của loài *Aspergillus wentii* thủy phân tinh bột thành glucose không qua giai đoạn maltose. *Acetobacter suboxydans*,

Axylinum, *A. xylioides* biến đổi sorbit thành sorbose và thực hiện một số phản ứng biến đổi sinh học khác trong công nghệ sản xuất vitamin C hiện nay. Một số biến đổi sinh học khác cũng đã được biết như biến đổi methionin thành hợp chất - thiol bởi một số loài vi khuẩn thuộc các chi *Brevibacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* (Dias và Weimer, 1998), biến đổi độc tố nấm deoxynivalenol thành hợp chất 3-ceto-4-deoxynivalenol ít độc hơn cơ chất nhiều lần bởi một số vi sinh vật đất thuộc nhóm *Agrobacterium-Rhizobium*, (Shima và Cs., 1997), v.v. Nhưng trong tất cả các loại hợp chất đã được dùng làm cơ chất biến đổi sinh học đã được nghiên cứu nhiều nhất, đã được tổng kết có hệ thống nhất và cũng được dùng nhiều nhất trong công nghiệp dùng công nghệ biến đổi sinh học là các hợp chất steroid.

3.2. Cơ chất là steroid trong biến đổi sinh học

Trước khi nói tới các phản ứng biến đổi sinh học mà cơ chất là steroid, chúng ta cần chú ý thêm lại trong công nghệ biến đổi sinh học các điều kiện lên men thông thường khác như pH môi trường, nhiệt độ lên men, điều kiện thông khí, v.v., một số điều kiện khác cũng ảnh hưởng ở mức độ khác nhau tới hiệu suất biến đổi và loại phản ứng biến đổi thực hiện bởi vi sinh vật, như nồng độ bào tử (hoặc lượng sinh khối), cách đưa cơ chất vào môi trường lên men (hòa tan hoặc ở dạng dịch treo, kích thước của hạt cơ chất trong dịch treo). Một số kết quả nghiên cứu cũng cho thấy để thực hiện tối ưu phản ứng hydroxy hóa steroid, cần cho vào môi trường một lượng tối thiểu glucose (0,2 - 0,4%), hoặc với tác nhân biến đổi là *Aspergillus ochraceus*, nếu nồng độ progesteron là 5, 10 hoặc 15g trong một lít môi trường lên men, sản phẩm biến đổi sinh học thu được sẽ chỉ là dẫn chất 11 α -hydroxy của cơ chất, nếu nồng độ cơ chất thấp hơn, sản phẩm thu được ngoài dẫn chất 11 α -hydroxy trên, còn có thêm dẫn chất 6 β , 11 α -dihydroxy. (Vézina và Cs., 1975).

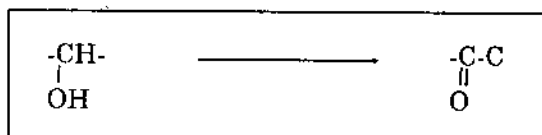
Khả năng biến đổi của vi sinh vật đối với các hợp chất steroid rất lớn như phần trình bày các phản ứng biến đổi sinh học dưới đây, nhưng chúng ta cần biết hiện nay trong công nghiệp dùng công nghệ biến đổi sinh học steroid mới chỉ có 6 loại phản ứng được dùng phổ biến : 11 α -hydroxy hóa (dùng bào tử của *Aspergillus ochraceus*), 11 β -hydroxy hóa (dùng bào tử của *Stachylidium theobromae*), 14 α -hydroxy hóa (dùng bào tử của *Mucor griseo-cyanus*), 16 α -dehydro hóa (dùng bào tử của *Streptomyces viridis*), 1-dehydroxy hóa và tạo thành nhân thơm A (dùng

bào tử của *Septomyxa affinis*) và phản ứng đồng phân hóa tạo thành nhóm chức 3-CO- Δ^4 (dùng *Septomyxa affinis* và vài loài khác).

CÁC LOẠI PHẢN ỨNG BIẾN ĐỔI SINH HỌC TRÊN CƠ CHẤT STEROID

● Phản ứng oxy hóa trong biến đổi sinh học

(1) Oxy hóa nhóm chức rượu bậc 2 thành nhóm chức ceto

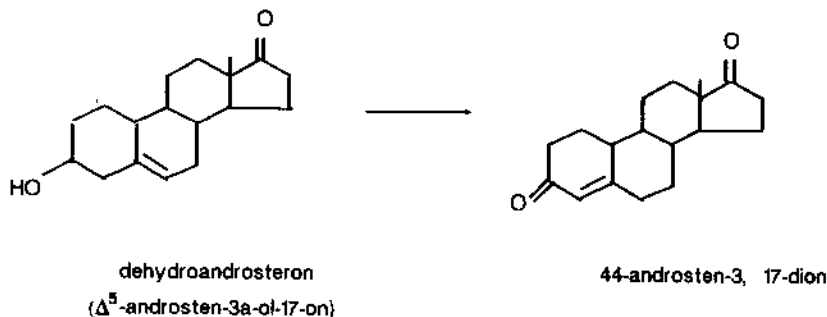


Phản ứng 1 (3-ceto hóa) :

Cơ chất : dehydroandrosteron

Tác nhân biến đổi sinh học (TNBDSH) : *Flavobacterium dehydrogenans*, *Proactinomyces erythropolis*

Sản phẩm biến đổi sinh học (SPBDSH) : Δ^4 -androsten-3,17-dion.



Hình 2.20. Biến đổi sinh học dehydroandrosteron

Phản ứng 2 (17-ceto hóa) :

Cơ chất : estradiol

TNBDSH : *Actinomyces albus*

SPBDSH : estron.



SPBDSH : Cholestenon

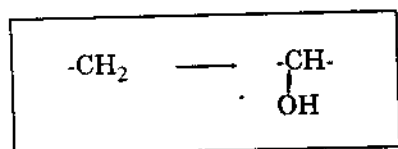


SPBDSH : Progesteron



(2) *Tạo thành nhóm chức rượu bậc 2 trên khung steroid*

(ở các vị trí 1α , 1β , 2β , 6β , 7α , 7β , 11α , 11β , 12β , 15α , 15β , 16α , 16β).

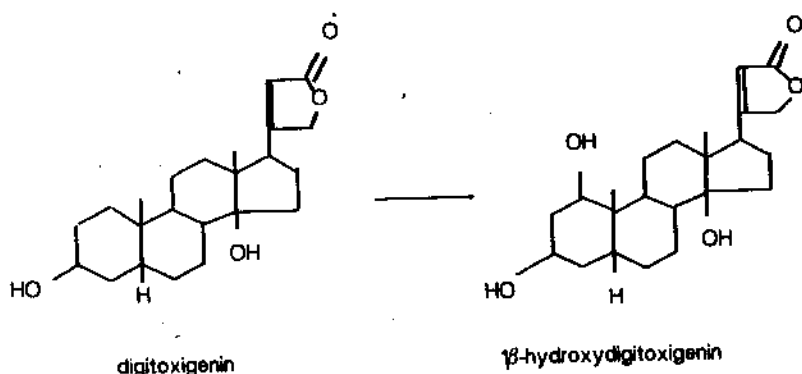


Phản ứng 5 (1 β - hydroxy hóa) :

Cơ chất : digitoxigenin

TNBDSH : *Absidia orchidis*

SPBDSH : 1β -hydroxydigitoxigenin



Hình 2.24. Biến đổi sinh học digitoxigenin

Phản ứng 6 (2 β -hydroxy hóa và 1 α -hydroxy hóa) :

Cơ chất : Δ^4 -androsten-3,17-dion

TNBDSH : *Penicillium* sp.

SPBDSH : Δ^4 -androsten-2 β -ol-3,17-dion

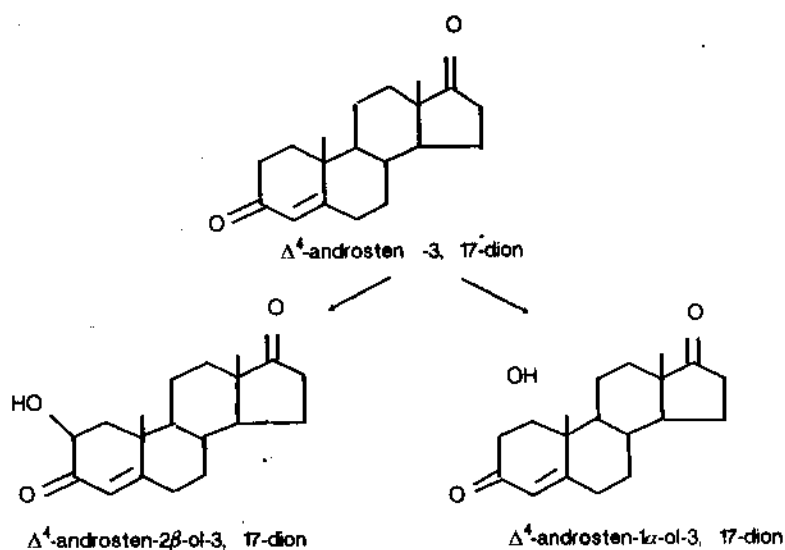
Δ^4 -androsten-1 α -ol-3,17-dion

Phản ứng 7 (6 β -hydroxy hóa) :

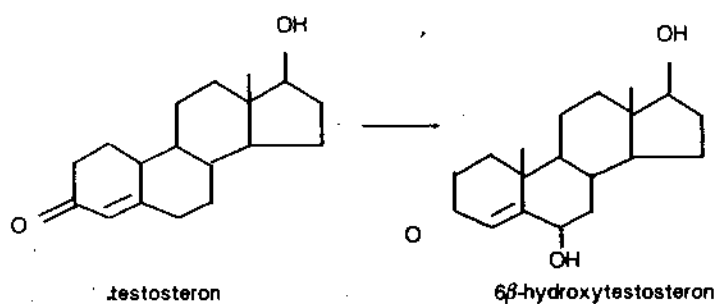
Cơ chất : Testosteron

TNBDSH : *Rhizopus reflexus*, *Rh. arrhizus*

SPBDSH : 6 β -hydroxy testosteron



Hình 2.25. Biến đổi sinh học Δ^4 -androsten-3,17-dion



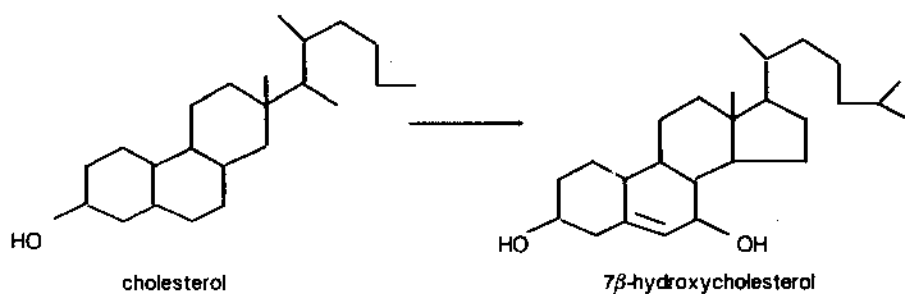
Hình 2.26. Biến đổi sinh học testosteron

Phản ứng 8 (7 β -hydroxy hóa) :

Cơ chất : Cholesterol

TNBDSH : *Proactinomyces roseus*

SPBDSH : 7 β -hydroxycholesterol



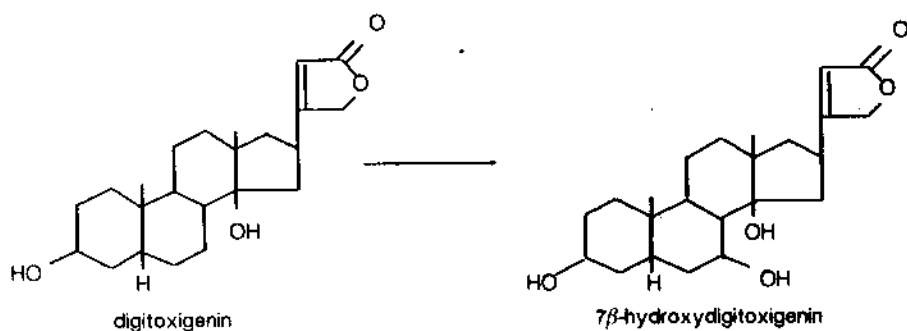
Hình 2.27. Biến đổi sinh học Cholesterol

Phản ứng 9 (7β -hydroxy hóa) :

Cơ chất : Digitoxigenin

TNBDSH : *Rhizopus nigricans*, *Rh. arrhizus*, *Absidia orchidis*

SPBDSH : 7β -hydroxydigitoxigenin



Hình 2.28. Biến đổi sinh học digitoxigenin

Phản ứng 10 (7β -hydroxy hóa, 7α -hydroxy hóa) :

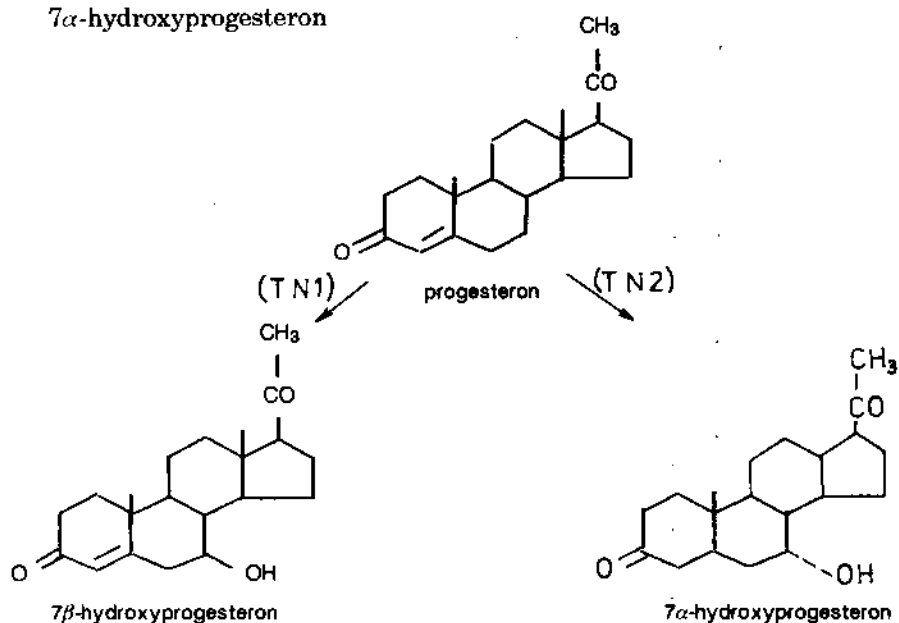
Cơ chất : Progesteron

TNBDSH : *Cladosporium* sp. (TN1)

Helminthosporium (TN2)

SPBDSH : 7β -hydroxyprogesteron

7α -hydroxyprogesteron



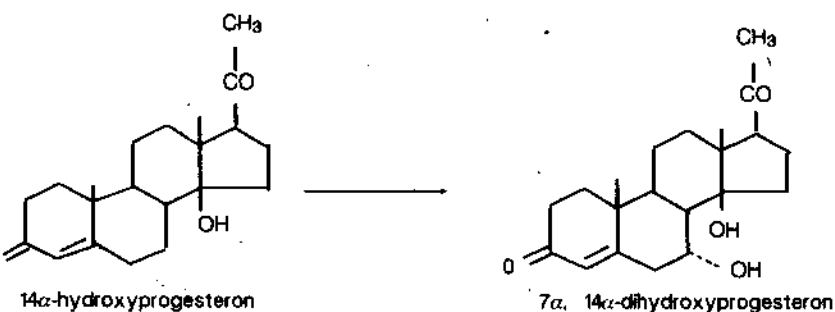
Hình 2.29. Biến đổi sinh học progesteron

Phản ứng 11 (7 α -hydroxy hóa) :

Cơ chất : 14 α -hydroxyprogesteron

TNBDSH : *Curvularia* sp.

SPBDSH : 7 α ,14 α -dihydroxyprogesteron



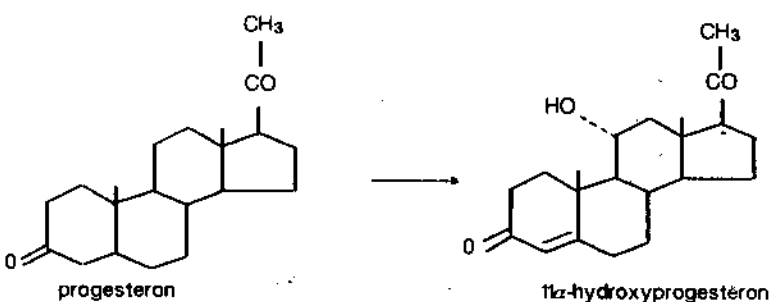
Hình 2.30. Biến đổi sinh học 14 α -hydroxyprogesteron

Phản ứng 12 (11 α -hydroxy hóa) :

Cơ chất : Progesteron

TNBDSH : *Rhizopus nigricans*, *Abaidia* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.

SPBDSH : 11 α -hydroxyprogesteron



Hình 2.31. Biến đổi sinh học progesteron

Phản ứng 13 (11 β -hydroxy hóa, 11 α -hydroxy hóa, 6 β -hydroxy hóa) :

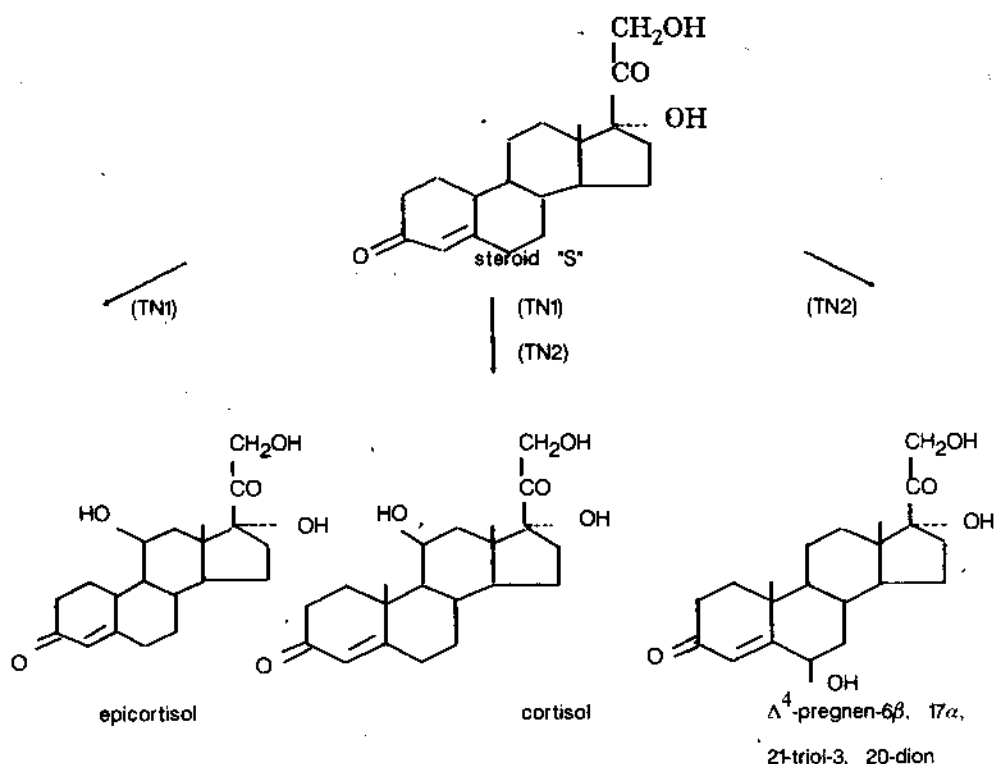
Cơ chất : Hợp chất S của Reichstein (Δ^4 -pregnen-17 α , 21-diol-3, 20-dion=deoxycortisol)

TNBDSH : *Absidia* sp. (TN1)

Cunninghamella sp. (TN2)

SPBDSH : Cortisol, epicortisol (với TN1)

Cortisol, Δ^4 -pregnen-6 β ,17 α ,21-triol-3,20-dion



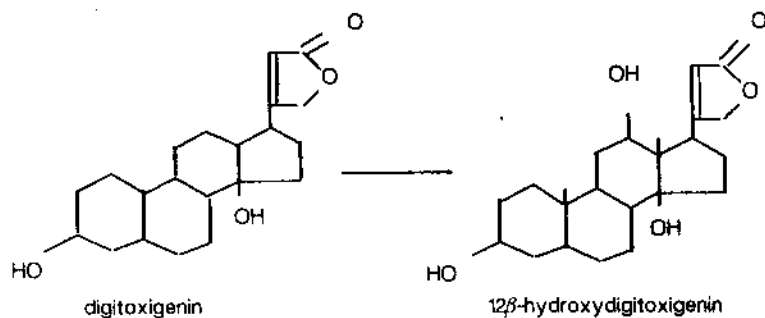
Hình 2.32. Biến đổi sinh học hợp chất S

Phản ứng 14 (12 β -hydroxy hóa) :

Cơ chất : Digitoxigenin

TNBDSH : *Fusarium lini*

SPBDSH : 12 β -hydroxydigitoxigenin



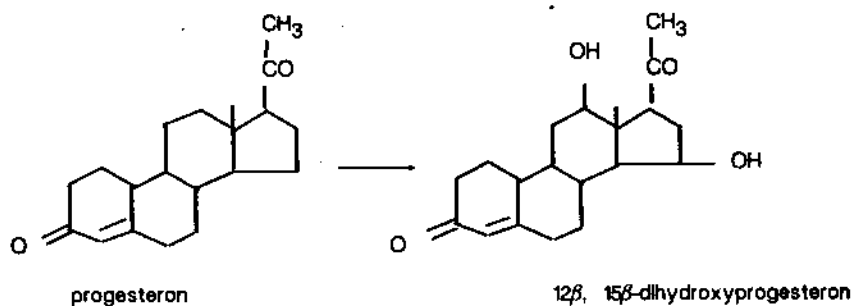
Hình 2.33. Biến đổi sinh học digitoxigenin

Phản ứng 15 ($12\beta,15\beta$ -hydroxy hóa) :

Cơ chất : Progesteron

TNBDSH : *Calonectria decora*

SPBDSH : $12\beta,15\beta$ -dihydroxyprogesteron



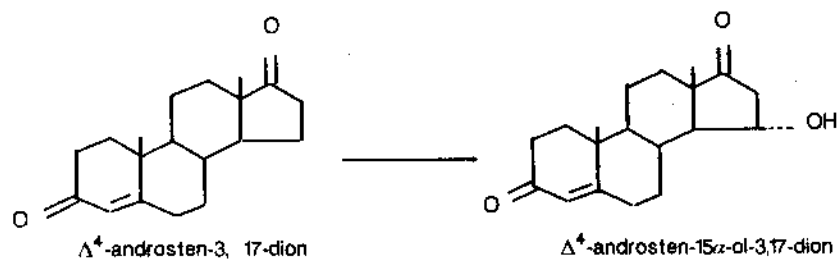
Hình 2.34. Biến đổi sinh học progesteron

Phản ứng 16 (15α -hydroxy hóa) :

Cơ chất : Δ^4 androsten-3,17-dion

TNBDSH : *Fusarium* sp.

SPBDSH : Δ^4 -androsten-15 α -ol-3,17-dion



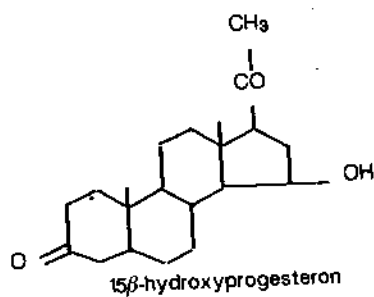
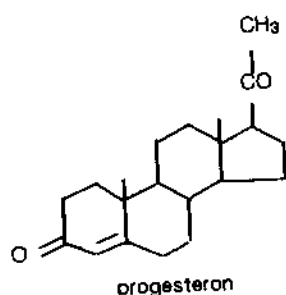
Hình 2.35. Biến đổi sinh học Δ^4 -androsten-3,17-dion

Phản ứng 17 (15β -hydroxy hóa) :

Cơ chất : Progesteron

TNBDSH : *Phycomyces blakesleanus*

SPBDSH : 15β -hydroxyprogesteron



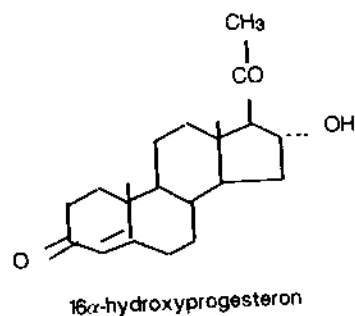
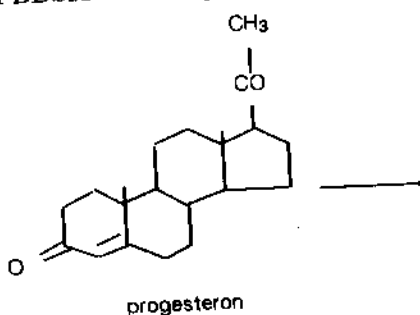
Hình 2.36. Biến đổi sinh học progesteron

Phản ứng 18 (16α-hydroxy hóa) :

Cơ chất : Progesteron

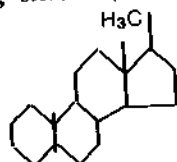
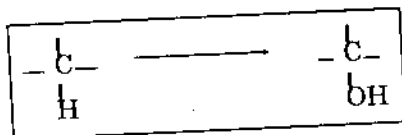
TNBDSH : *Actinomyces* sp.

SPBDSH : 16α-hydroxyprogesteron



Hình 2.37. Biến đổi sinh học progesteron

(3) Tạo thành nhóm chức rượu bậc 3 trên khung steroid (ở các vị trí 5β, 9α, 14α, 17α)

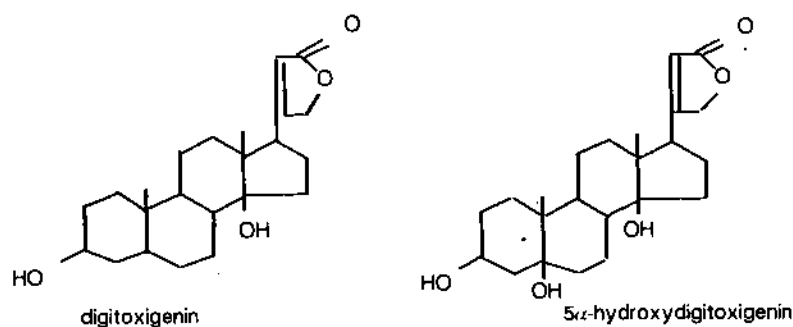


Phản ứng 19 (5β-hydroxy hóa) :

Cơ chất : Digitoxigenin

TNBDSH : *Mucor parasiticus*

SPBDSH : 5β-hydroxydigitoxigenin



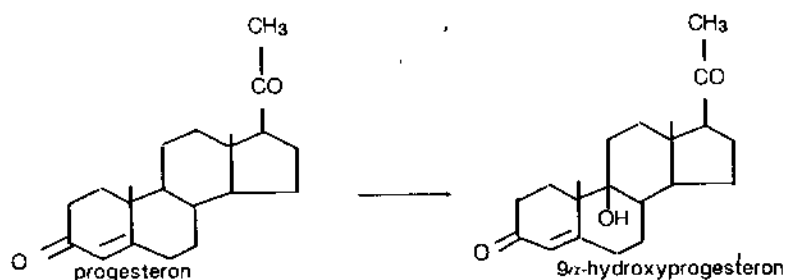
Hình 2.38. Biến đổi sinh học digitoxigenin

Phản ứng 20 (9 α -hydroxy hóa) :

Cơ chất : Progesteron

TNBDSH : *Circinella* sp.

SPBDSH : 9 α -hydroxyprogesteron



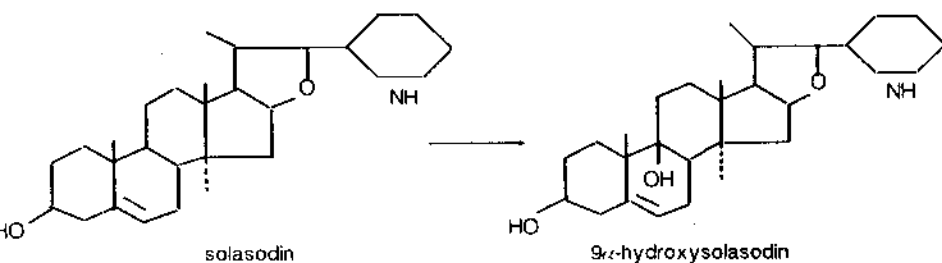
Hình 2.39. Biến đổi sinh học progesteron

Phản ứng 21 (9 α -hydroxy hóa) :

Cơ chất : Solasodin

TNBDSH : *Helicostylum piriforme*

SPBDSH : 9 α -hydroxysolasodin



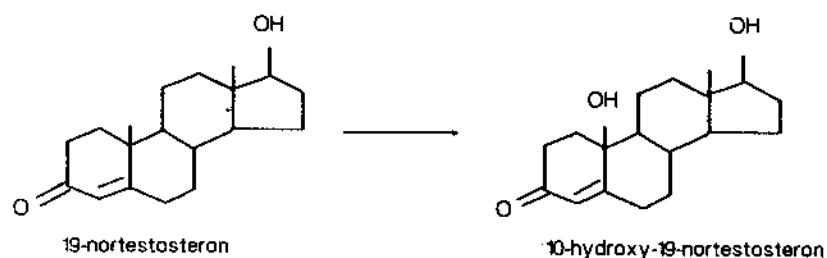
Hình 2.40. Biến đổi sinh học solasodin

Phản ứng 22 (10-hydroxy hóa) :

Cơ chất : 19-nortesteron

TNBDSH : *Botrytis cinerea*, *Curvularia lunata*

SPBDSH : 10-hydroxy-19-nortestosteron



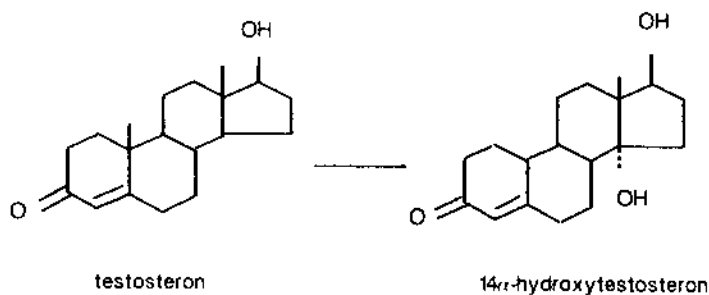
Hình 2.41. Biến đổi sinh học 19-nortestosteron

Phản ứng 23 (14 α -hydroxy hóa) :

Cơ chất : Testosteron

TNBDSH : *Mucor* sp.

SPBDSH : 14 α -hydroxyprogesteron



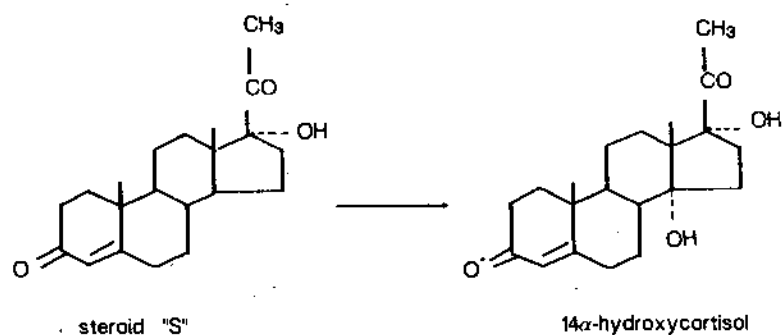
Hình 2.42. Biến đổi sinh học testosteron

Phản ứng 24 (11 β ,14 α -hydroxy hóa) :

Cơ chất : Hợp chất S của Rienchstein (deoxycortisol)

TNBDSH : *Curvularia lunata*

SPBDSH : 14 α -hydroxycortisol



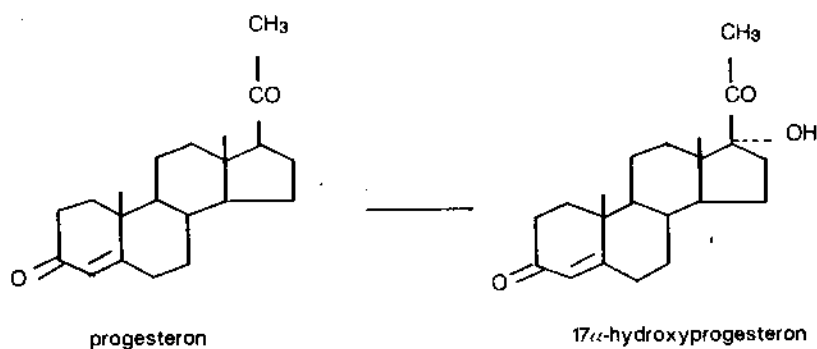
Hình 2.43. Biến đổi sinh học hợp chất S

Phản ứng 25 (17α-hydroxy hóa) :

Cơ chất : Progesteron

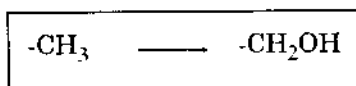
TNBDSH : *Cephalothecium roseum*

SPBDSH : 17α-hydroxyprogesteron



Hình 2.44. Biến đổi sinh học progesteron

(4) Tạo thành nhóm chức rượu bậc một ở nhánh ngưng của phân tử steroid :

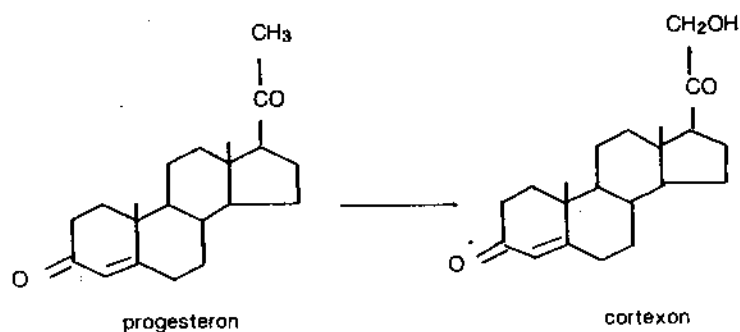


Phản ứng 26 (α-hydroxy hóa) :

Cơ chất : Progesteron

TNBDSH : *Aspergillus niger*

SPBDSH : Cortexon



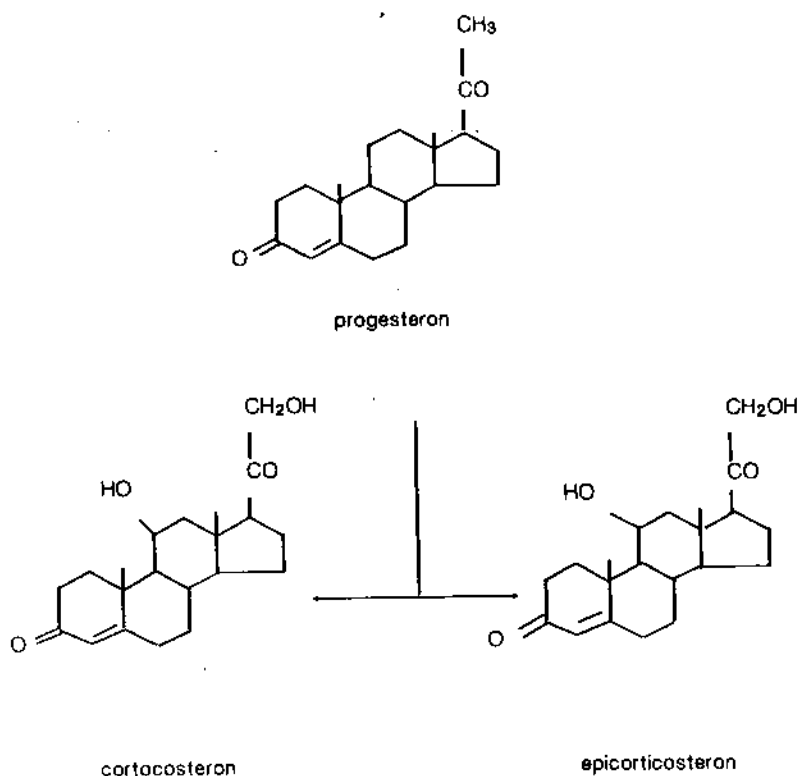
Hình 2.45. Biến đổi sinh học progesteron

Phản ứng 27 (11 α ,21-hydroxy hóa, 11 β ,21-dihydroxy hóa) :

Cơ chất : Progesteron

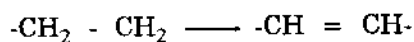
TNBDSH : *Aspergillus niger*, *Curvularia lunata*

SPBDSH : Corticosteron, epicorticosteron



Hình 2.46. Biến đổi sinh học progesteron

(5) Dehydro hóa vòng A của phân tử steroid ở các vị trí 1-2 và 4-5



Phản ứng 28 (tạo thành $\Delta^{1,4}$ cùng với các phản ứng khác) :

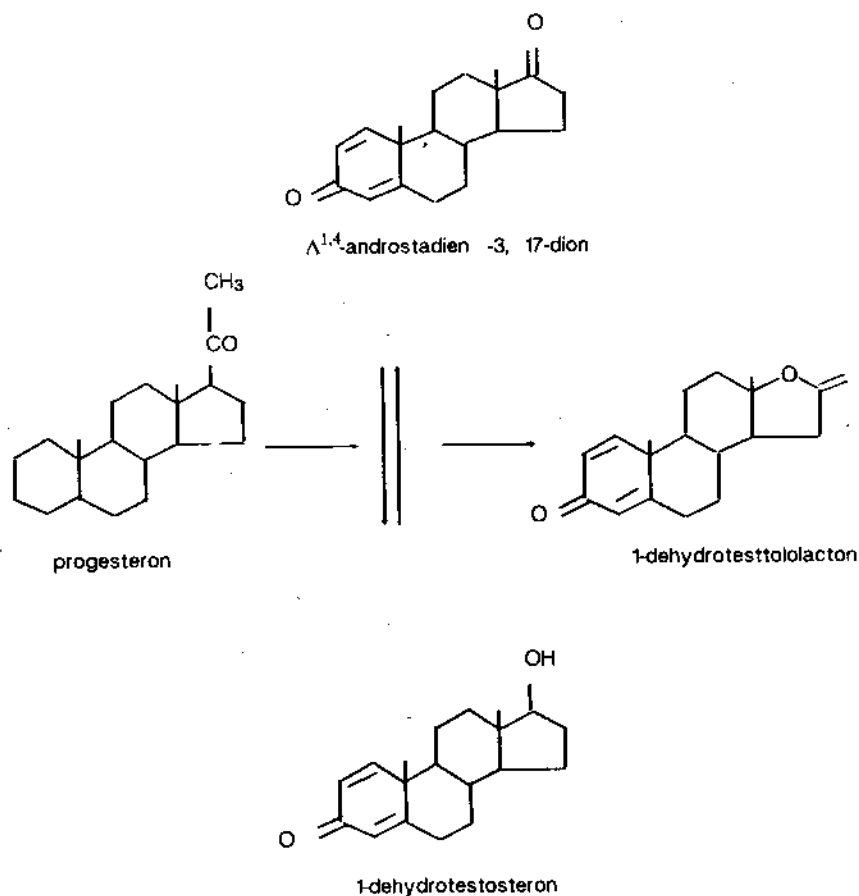
Cơ chất : Progesteron

TNBDSH : *Fusarium* sp.

SPBDSH : $\Delta^{1,4}$ -androstadien-3,17-dion

1-dehydrotestosteron

1-dehydrotestolacton



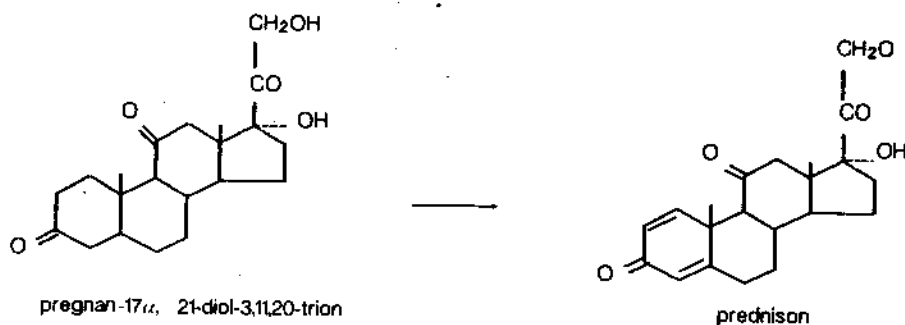
Hình 2.47. Biến đổi sinh học progesteron

Phản ứng 29 (tạo thành $\Delta^{1,4}$) :

Cơ chất : Pregnan-17 α ,21-diol-3,11,20-trion

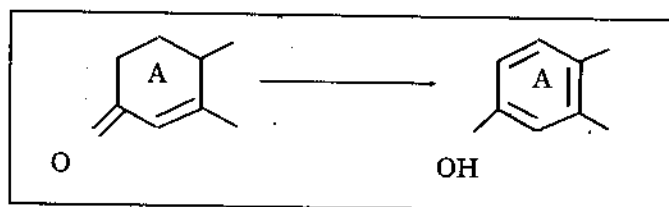
TNBDSH : *Nocardia blackwelli*

SPBDSH : Prednison



Hình 2.48. Biến đổi sinh học pregnan-17 α ,21-diol-3,11,20-trion

(6) **Biến đổi vòng A của phân tử steroid thành nhân thơm**

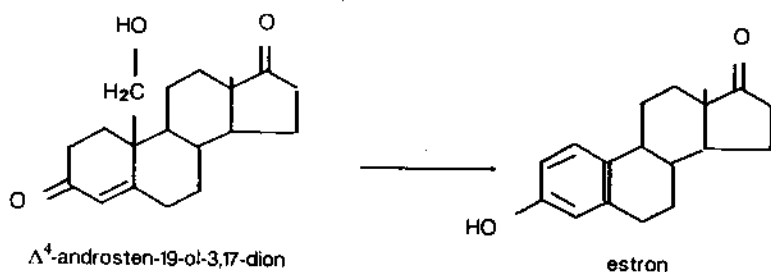


Phản ứng 30 (biến đổi vòng A thành nhân thơm) :

Cơ chất : Δ^4 -androst-19-ol-3,17-dion

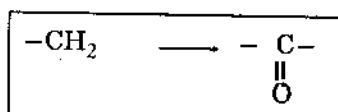
TNBDSH : vi sinh vật (R.M.Dodson et R.D.Muir-J.Am.Chem.Soc.,
80 : 5004, 1958)

SPBDSH : Estron



Hình 2.49. Biến đổi sinh học Δ^4 -androst-19-ol-3,17-dion

(7) Oxy hóa nhóm chức methylen thành nhóm chức ceto

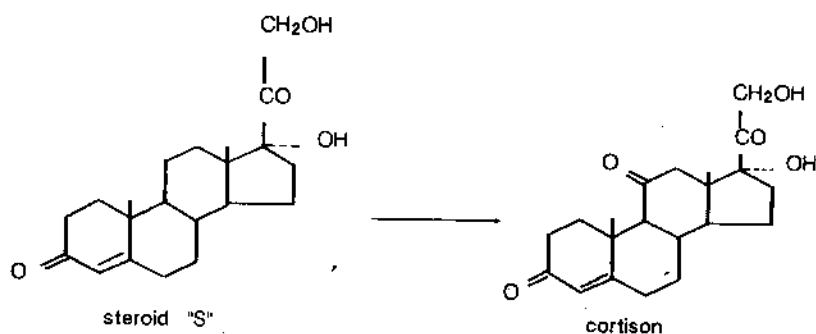


Phản ứng 31 (7-ceto hóa) :

Cơ chất : Hợp chất S của Reinschtein (deoxycortisol)

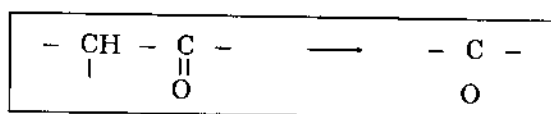
TNBDSH : *Cunninghamella blakeslcana*

SPBDSH : Cortison



Hình 2.50. Biến đổi sinh học hợp chất steroid S

(8) Cắt chuỗi ngang của steroid pregnan do tạo thành nhóm chức ceton

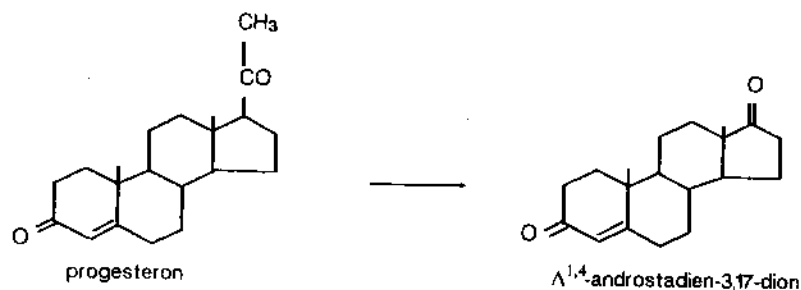


Phản ứng 32 (tạo thành 17-ceto) :

Cơ chất : Progesteron

TNBDSH : *Fusarium solani*, *F.laterium*, *Streptomyces lavendulae*

SPBDSH : $\Delta^{1,4}$ -androstadien-3,17-dion



Hình 2.51. Biến đổi sinh học progesteron

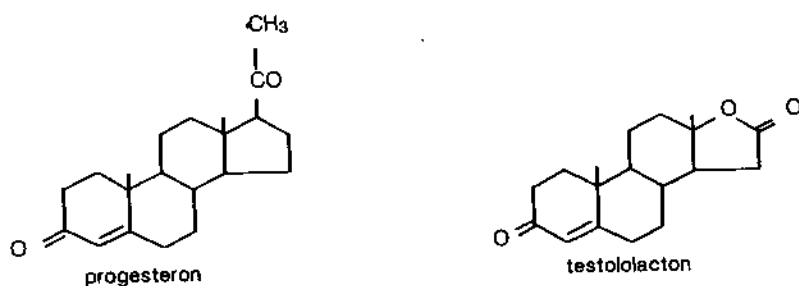
(9) *Cắt chuỗi ngang của steroid pregnan ở C-17 và mở vòng D do tạo thành nhóm chức lacton*

Phản ứng 32 (tạo thành vòng lacton) :

Cơ chất : Progesteron

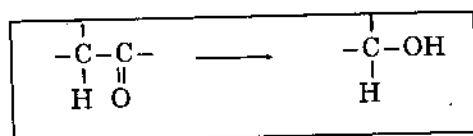
TNBDSH : *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.

SPBDSH : Testololacton



Hình 2.52. Biến đổi sinh học progesteron

(10) *Cắt chuỗi ngang của steroid pregnan ở C-17 do tạo thành nhóm chức rượu bậc 2*

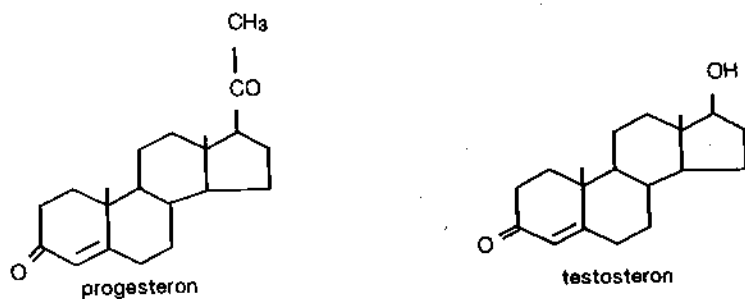


Phản ứng 34 (tạo thành 17-OH) :

Cơ chất : Progesteron

TNBDSH : *Penicillium* sp.

SPBDSH : Testosteron



Hình 2.53. Biến đổi sinh học progesteron

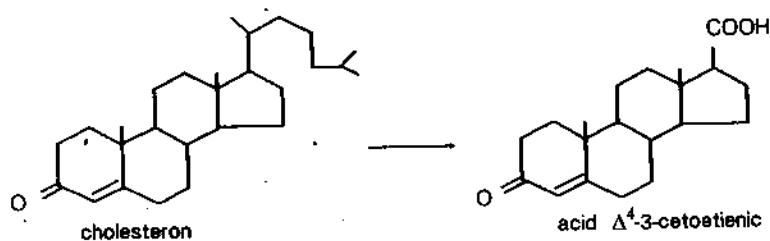
(11) *Cắt chuỗi ngang của steroid do tạo thành nhóm chức carboxyl*

Phản ứng 35 (tạo thành vòng 17-COOH) :

Cơ chất : Cholestenon

TNBDSH : *Proactinomyces erythropolis*

SPBDSH : Acid Δ^4 -3-cetoetienic



Hình 2.54. Biến đổi sinh học cholestenon

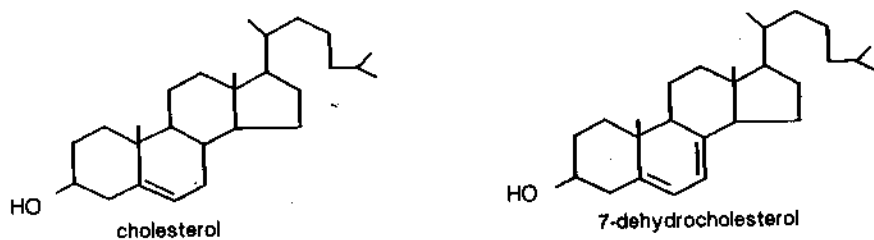
(12) *Dehydro hóa ở vòng B của phân tử steroid*

Phản ứng 36 (tạo thành Δ^7) :

Cơ chất : Cholesterol

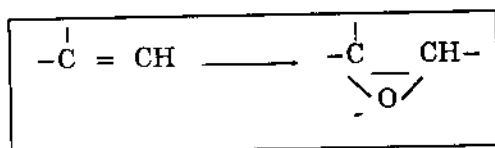
TNBDSH : *Azotobacter* sp.

SPBDSH : 7-dehydrocholesterol



Hình 2.55. Biến đổi sinh học cholesterol

(13) *Tạo thành epoxid*



Phản ứng 37 (tạo thành epoxid ở các vòng C, D) :

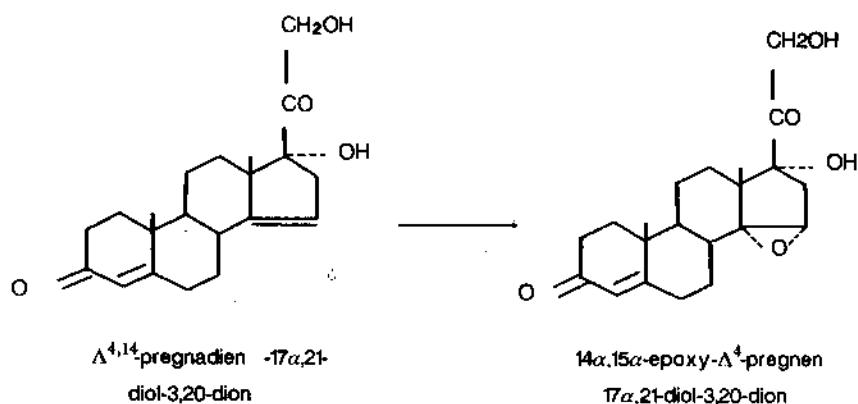
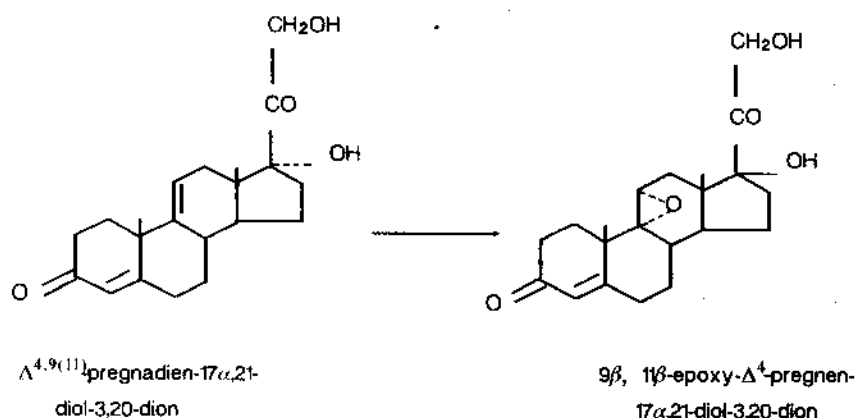
Cơ chất : $\Delta^{4,9(11)}$ -pregnadien-17 α ,21-diol-3,20-dion

$\Delta^{4,14}$ -pregnadien-17 α ,21-diol-3,20-dion

TNBDSH : *Curvularia lunata*, *Cunninghamella blakesleeana*

SPBDSH : 9 β ,11 β -epoxy- Δ^4 -pregnen-17 α ,21-diol-3,20-dion

14 α ,15 α -epoxy- Δ^4 -pregnen-17 α ,21-diol-3,20-dion



Hình 2.56. Biến đổi sinh học tạo thành epoxid

• Phản ứng khử trong biến đổi sinh học

(1) Khử nhóm chức ceton thành nhóm chức rượu bậc 2

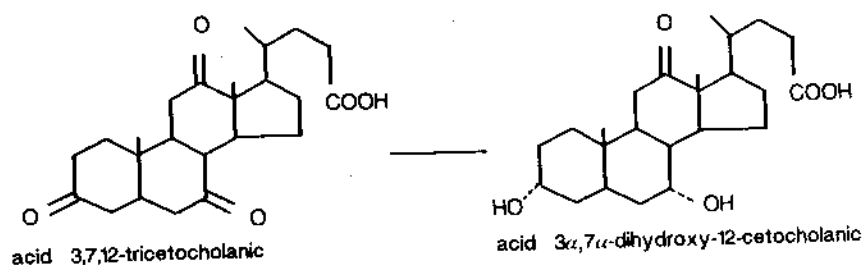


Phản ứng 38 (khử 3,7-ceto) :

Cơ chất : acid 3,7,12-tricetocholanic

TNBDSH : *Escherichia coli*

SPBDSH : acid 3 α ,7 α -dihydroxy-12-cetocholanic



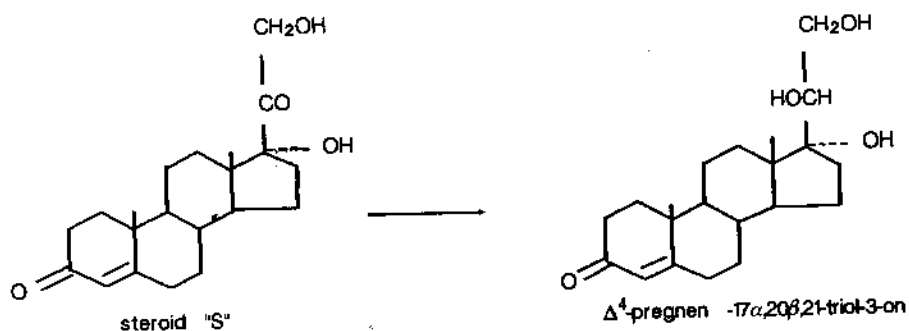
Hình 2.57. Biến đổi sinh học acid 3,7,12-tricetocholanic

Phản ứng 39 (khử 20-ceto) :

Cơ chất : hợp chất S của Rienschtein (deoxycortisol)

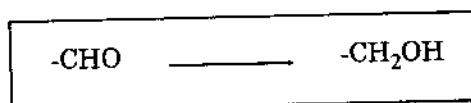
TNBDSH : *Fusarium* sp.

SPBDSH : Δ^4 -pregnen-17 α ,20 β -21,-triol-3-on



Hình 2.58. Biến đổi sinh học hợp chất S

(2) **Khử nhóm chức aldehyd của phân tử steroid thành nhóm chức rượu bậc 1**

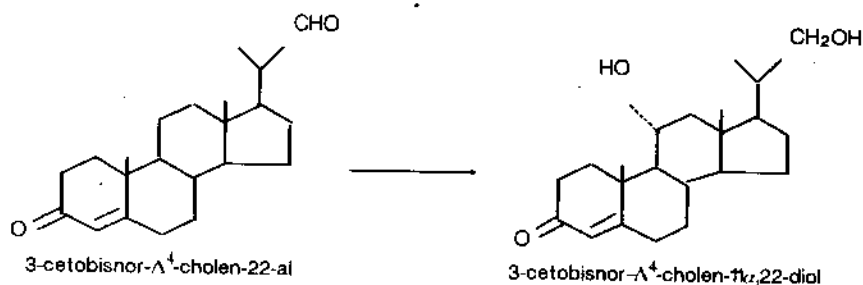


Phản ứng 40 (khử 22-al)

Cơ chất : 3-cetobisnor- Δ^4 -cholen-22-al

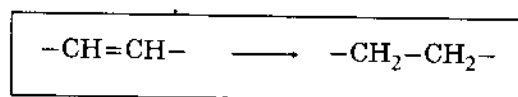
TNBDSH : *Rhizopus arrhizus*, *Penicillium lilacinum*

SPBDSH : 3-cetobisnor- Δ^4 -cholen-11 α ,22-diol



Hình 2.59. Biến đổi sinh học 3-cetobisnor- Δ^4 -cholen-22-al.

(3) Hydrogen hóa vòng A ở vị trí 1-2 của phân tử steroid

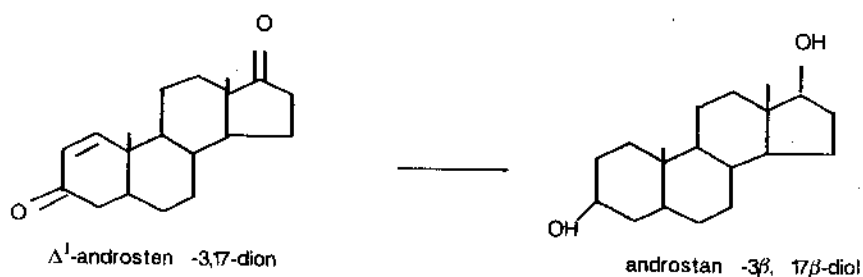


Phản ứng 41 (khử Δ^1 đồng thời khử 17-ceto)

Cơ chất : Δ^1 androsten-3,17-dion

TNBDSH : *Saccharomyces cerevisiae*

SPBDSH : androstan-3 β ,17 β -diol



Hình 2.60. Biến đổi sinh học Δ^1 -androsten-3,17-dion

(4) Hydrogen hóa vòng A ở vị trí 4-5 của phân tử steroid

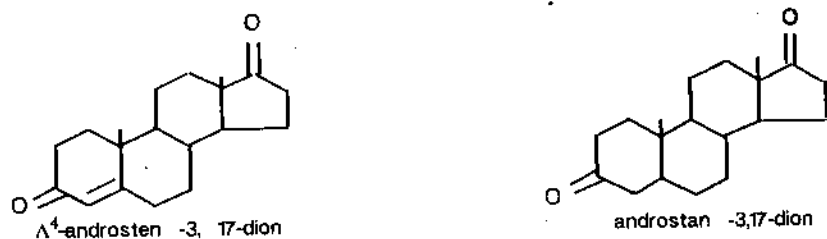


Phản ứng 42 (khử Δ^4)

Cơ chất : Δ^4 -androst-3,17-dion

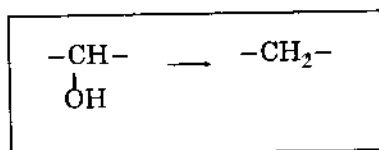
TNBDSH : *Clostridium lentoputrescens*

SPBDSH : androst-3,17-dion



Hình 2.61. Biến đổi sinh học Δ^4 -androst-3,17-dion

(5) Loại nhóm rượu bậc 2

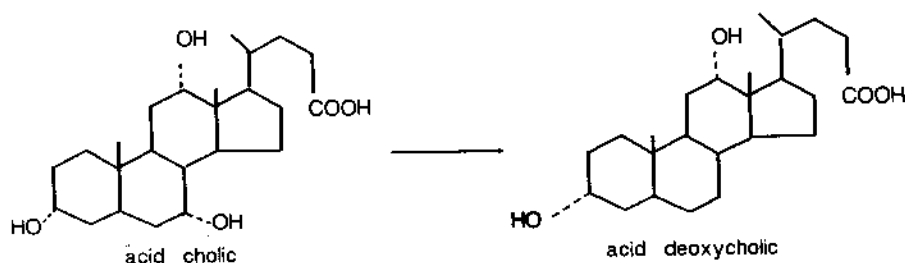


Phản ứng 43 (loại 7-OH)

Cơ chất : acid cholic

TNBDSH : vi sinh vật (không định loại)

SPBDSH : acid deoxycholic



Hình 2.62. Biến đổi sinh học acid cholic

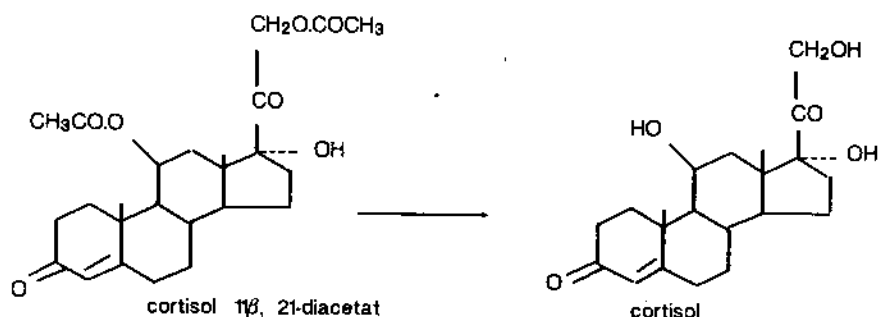
• Phản ứng thủy phân trong biến đổi sinh học

Phản ứng 44 (xà phòng hóa este) :

Cơ chất : cortisol 11 β ,21-diacetat

TNBDSH : *Flavobacterium dehydrogenans* var. *hydrolyticum*

SPBDSH : Cortisol



Hình 2.63. Biến đổi sinh học cortisol 11 β , 21-acetat

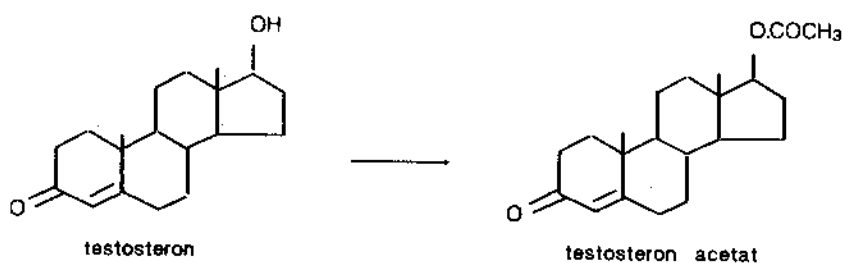
• Phản ứng este hóa trong biến đổi sinh học

Phản ứng 45 (acetyl hóa) :

Cơ chất : Testosteron

TNBDSH : *Saccharomyces fragilis*

SPBDSH : *Testosteron acetat*



Hình 2.64. Biến đổi sinh học testosteron

4. PHẢN ỨNG BIẾN ĐỔI STEROID CỦA CÁC LOÀI VI SINH VẬT

Một số chi nấm có các phản ứng biến đổi sinh học đặc trưng như các chi *Fusarium*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Cladosporium*, *Humicola* và *Gilmaniella* (Capek và Cs, 1960, 1974, 1975). Các chi lân cận *Humicola* và *Gilmaniella* phân cách nhau bởi khả năng biến đổi progesteron thành Δ^4 -androsten-3,17-dion và testosteron bởi chi *Humicola* và thành các dẫn chất monohydroxy ở các vị trí 6 β , 15 α bởi chi *Gilmaniella*. Ba chi lân cận *Alternaria*, *Stemphylium*, *Cladosporium* lần lượt phân cách nhau bởi

các phản ứng biến đổi progesteron thành các dẫn chất 1-dehydro, 14 α -hydroxy, 7 β -hydroxy của cơ chất này (bảng 2.17).

Bảng 2.17. Sản phẩm biến đổi sinh học đặc trưng của progesteron bởi các chi *Humicola*, *Gilmanella* và *Alternaria*, *Stemphylium*, *Cladosporium*

Chi nấm	Sản phẩm
Humicola Gilmanella	Δ^4 -androst-3,17-dion 6 β -hydroxy progesteron 15 α -hydroxyprogesteron
Alternaria Stemphylium Cladosporium	1-dehydroprogesteron 14 α -hydroxyprogesteron 7 β -hydroxyprogesteron

Đối với mỗi loài vi sinh vật, các phản ứng biến đổi sinh học cũng có tính đặc trưng : có thể một phản ứng được thực hiện bởi nhiều loài, nhưng mỗi loài chỉ thực hiện một hoặc một số phản ứng nhất định. Một điều đáng chú ý là trong các phản ứng này, có trường hợp là các phản ứng đơn độc, có trường hợp một phản ứng kèm theo một số phản ứng khác (bảng 2.1).

Bảng 2.18. Các phản ứng đơn độc và các phản ứng cũng xảy ra trong biến đổi các steroid bởi các loài vi sinh vật

Phản ứng đơn độc	Các phản ứng cũng xảy ra
Hydroxy hóa (mono,di-) Tạo thành - ceto Dehydro hóa : Oxy hóa -OH của vòng Tạo thành 1,4-dien-3-on Tạo dây nối kép ở vòng B Cắt dây nối C-C : Cắt một phần nhánh bên Tạo thành -ceto hoặc -OH ở nhánh bên Cắt vòng D tạo thành vòng lacton Cắt vòng A tạo thành một acid Khử dây nối kép Khử -ceto của vòng Khử ở nhánh bên	Hydroxy hóa, cùng với : khử dây nối kép của vòng Khử các nhóm carbonyl : Oxy hóa -OH Cắt nhánh bên Cắt dây nối C-C : Oxy hóa nhánh bên cùng với : hydroxy hóa ở vòng Oxy hóa -OH Tạo thành 1,4-dien-3-on Tạo thành lacton ở vòng D Tạo thành 17 β -OH, 17-CO Khử dây nối kép và -ceto của vòng Oxy hóa -OH và khử -ceto của vòng

Như đã nói, mỗi loài thực hiện một hoặc một số phản ứng biến đổi sinh học nhất định. Bảng 2.19 trình bày các loài và các phản ứng thực hiện bởi mỗi loài (Những loài có dấu (+) là những loài vi nấm có ở Việt Nam).

Bảng 2.19. Phản ứng biến đổi sinh học của các loài vi sinh vật (phản ứng được viết tắt, tên đầy đủ của phản ứng, xem bảng 2.1)

Số thứ tự	Loài vi sinh vật	Phản ứng biến đổi sinh học
1	2	3
1	<i>Absidia coerula</i>	Hxl: 11 α -OH, 11 β -OH O: 11-OH $\rightarrow$ 11-CO
2	<i>Absidia cylindrospora</i>	Hxl: 11 α -OH, 11 β -OH O: 11-OH $\rightarrow$ 11-CO
3	<i>Absidia glauca</i>	Hxl: 11 α -OH, 11 β -OH, 6 β -OH O: 11-OH $\rightarrow$ 11-CO
4	<i>Absidia hyalospora</i>	Hxl: 11 α -OH, 11 β -OH, 6 β -OH
5	<i>Absidia lichtheinii</i>	Hxl: 11 α -OH, 11 β -OH
6	<i>Absidia orchidis</i>	Hxl: 11 α -OH, 5 β -OH, 7 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH O: 11-OH $\rightarrow$ 11-CO
7	<i>Absidia ramosa</i>	Hxl: 11 α -OH, 11 β -OH, 6 β -OH O: 11-OH $\rightarrow$ 11-CO
8	<i>Absidia regnicri</i>	Hxl: 14 α -OH, 6 β -OH, 7 β -OH, 15 β -OH
9	<i>Absidia repens</i>	Hxl: 11 α -OH, 11 β -OH
10	<i>Absidia</i> sp.	Hxl: 7 α -OH, 11 α -OH
11	<i>Absidia spinosa</i>	Hxl: 11 α -OH, 11 β -OH
12	<i>Absidia tieghemii</i>	Hxl: 11 α -OH, 11 β -OH
13	<i>Absidia turkestamica</i>	Hxl: 11 α -OH, 11 β -OH, 6 β -OH O: 11-OH, 11-CO
14	<i>Actinomyces albidus</i>	Hxl: 16 α -OH
15	<i>Actinomyces albus</i>	O: 17 α -OH $\rightarrow$ 17-CO
16	<i>Actinomyces annulatus</i>	Hxl: 16 α -OH
17	<i>Actinomyces coerulus</i>	Hxl: 16 α -OH
18	<i>Actinomyces diastaticus</i>	Hxl: 16 α -OH
19	<i>Actinomyces flaveolus</i>	Hxl: 16 α -OH
20	<i>Actinomyces globisporus</i>	O: 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO I:
21	<i>Actinomyces globosus</i>	Hxl: 16 α -OH
22	<i>Actinomyces praecox</i>	Hxl: 16 α -OH
23	<i>Actinomyces ruber</i>	Hxl: 16 α -OH
24	<i>Actinomyces setonii</i>	Hxl: 16 α -OH
25	<i>Actinomyces</i> sp.	Hxl: 16 α -OH O: 3 β -OH, 12 α -OH $\rightarrow$ 3, 12-di-CO O: 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO I:
26	<i>Actinomyces viridochromogenes</i>	
27	<i>Actinomyces viridis</i>	Hxl: 16 α -OH
28	<i>Aerobacter aerogenes</i>	O: 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
29	<i>Achromobacter</i> sp.	Hxl: 6 β -OH, 14 α -OH
30	<i>Achromobacter kashiwasakienisis</i>	Hxl: 6 α -OH, 14 α -OH
31	<i>Alcaligenes faecalis</i>	O: 3 α -OH, 7 α -OH, 12 α -OH $\rightarrow$ 3,7, 12-tri-CO

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
32	<i>Alcaligenes</i> sp.	D : 1 - 2 R : 20-CO → 20β-OH
33	<i>Alternaria bataticola</i>	R : 3-CO → 3β-OH Hdg : 4 - 5
34	<i>Alternaria passiflorae</i>	D : 1 - 2, 4 - 5
35	<i>Arthrobacter simplex</i>	D : 1 - 2
36	<i>Aspergillus allicus</i>	O : 3β-OH → 3-CO Cl : 17 - 20
37	<i>Aspergillus amstelodami</i>	Hxl : 11α-OH, 15β-OH, 6β-OH O : 3β-OH → 3-CO
38	<i>Aspergillus atrorubescens</i>	Hxl : 15β-OH O : 3β-OH → 3-CO
39	<i>Aspergillus awamori</i>	Hxl : 11α O : 3β-OH → 3-CO GI-GI :
40	<i>Aspergillus caespitosus</i>	Hxl : 11β-OH
41	<i>Aspergillus candidus</i> (+)	Hxl : 11α-OH, 15β-OH O : 3β-OH → 3-CO
42	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Hxl : 15β-OH
43	<i>Aspergillus chevallieri</i> (+)	Hxl : 11α-OH Cl : 17 - 20 Cl-GI :
44	<i>Aspergillus cinnamomeus</i>	Hxl : 15β-OH O : 3β-OH → 3-CO Hxl : 11α-OH
45	<i>Aspergillus clavatus</i> (+)	Hxl : 15β-OH O : 3β-OH → 3-CO
46	<i>Aspergillus conicus</i>	Hxl : 11α-OH
47	<i>Aspergillus effusus</i>	Hxl : 11α-OH O : 3β-OH → 3-CO
48	<i>Aspergillus echinulatus</i>	Hxl : 11α-OH
49	<i>Aspergillus elegans</i>	Hxl : 15β-OH O : 3β-OH → 3-CO
50	<i>Aspergillus fischeri</i> (+)	Hxl : 11α-OH Cl : 17 - 20
51	<i>Aspergillus flavipes</i> (+)	Hxl : 11α-OH Cl : 17 - 20 O : 3β-OH → 3-CO
52	<i>Aspergillus flavus</i> (+)	Hxl : 11α-OH Cl : 17 - 20 O : 3β-OH → 3-CO Cl-GI :
53	<i>Aspergillus fumigatus</i> (+)	Hxl : 11α-OH, 11β-OH, 15β-OH O : 3β-OH → 3-CO
54	<i>Aspergillus giganteus</i> (+)	Hxl : 11α-OH, 15β-OH
55	<i>Aspergillus glaucus</i>	Cl-GI :

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
56	<i>Aspergillus gracilis</i> (+)	Hxl : 15 β -OH
57	<i>Aspergillus itaconicus</i>	Hxl : 11 α -OH
58	<i>Aspergillus luchuensis</i>	Hxl : 11 α -OH
59	<i>Aspergillus melles</i>	Hxl : 11 α -OH
60	<i>Aspergillus montevidensis</i>	Hxl : 11 α -OH
61	<i>Aspergillus nidulans</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
62	<i>Aspergillus niger</i> (+)	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO 11 α -OH $\rightarrow$ 11-CO GI-GI :
63	<i>Aspergillus niveo-glauca</i>	Hxl : 11 α -OH
64	<i>Aspergillus nivicus</i> (+)	Hxl : 11 α -OH
65	<i>Aspergillus ochraceus</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
66	<i>Aspergillus oryzae</i> (+)	Hxl : 11 α -OH Cl : 17 - 20 S : 16, 17, 20, 21
67	<i>Aspergillus ostianus</i>	Hxl : 15 α -OH
68	<i>Aspergillus parasiticus</i> (+)	Hxl : 15 α -OH
69	<i>Aspergillus penicilloides</i>	C : 17 - 20
70	<i>Aspergillus phoenixis</i> (+)	Cl-GI :
71	<i>Aspergillus rehmannii</i>	Hxl : 15 β -OH
72	<i>Aspergillus restrictus</i> (+)	Hxl : 15 β -OH
73	<i>Aspergillus ruber</i> (+)	Cl : 17 - 20
74	<i>Aspergillus saitoi</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
75	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	CL : 17 - 20
76	<i>Aspergillus</i> sp.	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 21-OH
77	<i>Aspergillus sydowii</i> (+)	Hxl : 11 α -OH
78	<i>Aspergillus tamaris</i> (+)	Hxl : 11 α -OH GI-GI :
79	<i>Aspergillus terreus</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH Cl : 17 - 20 Cl-GI :
80	<i>Aspergillus terricola</i> (+)	Cl : 17 - 20
81	<i>Aspergillus usamii</i>	Hxl : 11 α -OH
82	<i>Aspergillus ustus</i> (+)	Hxl : 11 α -OH
83	<i>Aspergillus varicolor</i>	Hxl : 11 α -OH
84	<i>Aspergillus versicolor</i> (+)	Hxl :
85	<i>Aspergillus wentii</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH Cl-GI :
86	<i>Azotobacter agilis</i>	D : 1 - 2
87	<i>Azotobacter indicus</i>	D : 1 - 2
88	<i>Azotobacter</i> sp.	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
89	<i>Azotomonas fluorescens</i>	D : 1 - 2
90	<i>Bacillus cereus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 14 α -OH
91	<i>Bacillus coli communis</i>	O : 3,12 α -di-OH $\rightarrow$ 3,12-di-CO
92	<i>Bacillus cyclo-oxydans</i>	D : 1 - 2 Ar : Sp : B
93	<i>Bacillus fusiformis</i>	D : 1 - 2
94	<i>Bacillus macerans</i>	Cl-Gl :
95	<i>Bacillus megatherium</i>	Hxl : 15 α -OH, 15 β -OH S : 21
96	<i>Bacillus pumilus</i>	D : 1 - 2
97	<i>Bacillus putrificus</i>	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO Hdg : 4 - 5 R : 3-CO $\rightarrow$ 3 α -OH
98	<i>Bacillus sp.</i>	D : 1 - 2 R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH
99	<i>Bacillus sphaericus</i>	D : 1 - 2 O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
100	<i>Bacillus subtilis</i>	D : 1 - 2
101	<i>Bacterium coli</i>	R : 7-CO $\rightarrow$ 7-OH
102	<i>Bacterium cyclo-oxydans</i>	D : 1 - 2 R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH O : 20 β -OH $\rightarrow$ 20-CO
103	<i>Bacterium sp.</i>	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO Hxl : 6 β -OH, 14 α -OH Hdg : 5 - 6
104	<i>Baauveria sp. (+)</i>	Hxl : 11 α -OH
105	<i>Blakeslea trispora (+)</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH O : 11 α -OH $\rightarrow$ 11-CO
106	<i>Botryodiplodia theobromae</i>	Hxl : 11 α -OH
107	<i>Botrytis cinerea (+)</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 β -OH 11 α -OH, 11 β -OH 15 β -OH O : 11 α -OH $\rightarrow$ 11-CO
108	<i>Botrytis piconiae</i>	Hxl : 11 α -OH
109	<i>Calonectria decora</i>	Hxl : 11 α -OH, 11 β -OH, 12 β -OH 15 α -OH, 15 β -OH D : 1 - 2 D : 4 - 5 O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
110	<i>Candida pulcherrima</i>	R : 22CO $\rightarrow$ 20 β -OH
111	<i>Catenabacterium catenatorum</i>	R : 3-CO $\rightarrow$ 3 β -OH
112	<i>Cephalosporium asperum</i>	Hxl : 7 α -OH
113	<i>Cephalosporium sp. (+)</i>	Hxl : 7 α -OH

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
114	<i>Cephalosporium subverticillatum</i>	Cl : 17 - 20
115	<i>Cercospora melonis</i>	Hxl : 8 β -OH
116	<i>Chaetochytrium bectedii</i>	Hxl : 6 β -OH
117	<i>Chaetomium cochliodes</i>	Hxl : 6 β -OH
118	<i>Chaetomium minutum</i>	Hxl : 6 β -OH
119	<i>Chaetomium succinum</i>	Hxl : 6 β -OH
120	<i>Choanephora cucurbitarium</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH
121	<i>Ciriella simplex</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH
122	<i>Circinella</i> sp.	Hxl : 9 β -OH, 14 α -OH
123	<i>Circinella spinosa</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
124	<i>Cladosporium resinae</i>	Cl : 17 - 20 E : 17 α -OH
125	<i>Cladosporium</i> sp. (+)	Hxl : 7 α -OH
126	<i>Clostridium lentoputrescens</i>	R : 17-CO $\rightarrow$ 17 β -OH
127	<i>Clostridium paraputriticum</i>	Hdg : 4 - 5 R : 3CO $\rightarrow$ 3 α -OH
128	<i>Clostridium terium</i>	Hdg : 15 α -OH R : 3CO $\rightarrow$ 3 α -OH
129	<i>Collectotrichum antirrhini</i>	Hxl : 15 α -OH
130	<i>Collectotrichum atramentarium</i>	D : 1 - 2
131	<i>Collectotrichum lindemuthianum</i>	D : 1 - 2
132	<i>Collectotrichum phomoides</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 β -OH, 12 α -OH
133	<i>Collectotrichum pisi</i>	Hxl : 11 β -OH
134	<i>Coniothyrium hellichorine</i>	Hxl : 6 β -OH, 7 α -OH, 11 β -OH
135	<i>Coniothyrium</i> sp.	Hxl : 11 α -OH, 11 β -OH
136	<i>Coriolus versicolor</i>	Hxl : 6 β -OH, 14 α -OH
137	<i>Corticium centrifugum</i>	R : 17-CO $\rightarrow$ 17 β -OH Hxl : 6 β -OH O : 16 β -OH $\rightarrow$ 16-CO
138	<i>Corticium microsclerotia</i>	Hxl : 11 β -OH
139	<i>Corticium praticola</i>	Hxl : 11 β -OH
140	<i>Corticium sasakii</i>	Hxl : 11 α -OH, 11 β -OH
141	<i>Corticium vagum</i>	Hxl : 11 α -OH, 11 β -OH
142	<i>Corynebacterium helvolum</i>	D : 1 - 2
143	<i>Corynebacterium hoagii</i>	D : 1 - 2
144	<i>Corynebacterium mediolanum</i>	D : 1 - 2 O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
145	<i>Corynebacterium simplex</i>	D : 1 - 2 R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO 20 β -OH $\rightarrow$ 20-CO

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
146	<i>Corynebacterium</i> sp.	D : 1 - 2
147	<i>Corynecum cardinale</i>	Hxl : 11 α -OH
148	<i>Cucurbitaria laburni</i>	Hxl : 17 α -OH
149	<i>Cunninghamella albida</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH
150	<i>Cunninghamella atricana</i>	Hxl : 11 α -OH, 11 β -OH O : 11-OH $\rightarrow$ 11-CO
151	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	Hxl : 9 α -OH
152	<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	Hxl : 6 β -OH, 9 α -OH 11 α -OH, 11 β -OH, 14 α -OH Ep : 9-11, 14 α , 15 α
153	<i>Cunninghamella echinulata</i>	Hxl : 6 β -OH, 9 α -OH 11 α -OH, 11 β -OH O : 11-OH $\rightarrow$ 11-CO
154	<i>Cunninghamella elegans</i>	Hxl : 6 β -OH, 9 α -OH 11 α -OH, 11 β -OH, 14 α -OH O : 11-OH $\rightarrow$ 11-CO
155	<i>Cunninghamella homothallica</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH O : 11-OH $\rightarrow$ 11-CO
156	<i>Cunninghamella ramosa</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH O : 11-OH $\rightarrow$ 11-CO
157	<i>Cunninghamella verticillata</i>	Hxl : 11 β -OH, 11 α -OH, 9 α -OH O : 11-OH $\rightarrow$ 11-CO
158	<i>Curvularia brachyspora</i> (+)	Hxl : 11 β -OH
159	<i>Curvularia falcata</i>	Hxl : 7 α -OH, 11 β -OH
160	<i>Curvularia fallax</i> (+)	Hxl : 7 α -OH
161	<i>Curvularia geniculata</i> (+)	Hxl : 11 β -OH
162	<i>Curvularia lunata</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 7 α -OH, 9 α -OH 10 β -OH 11 α -OH, 11 β -OH 14 α -OH, 15 β -OH 21-OH Ep : 11 β -9 α , 11 α -15 α R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH O : 11-OH $\rightarrow$ 11-CO Hxl : 11 β -OH
163	<i>Curvularia maculans</i>	Hxl : 11 β -OH
164	<i>Curvularia pallescens</i> (+)	Hxl : 7 α -OH, 8 β -OH 11 β -OH, 14 α -OH
165	<i>Curvularia</i> sp.	Hxl : 7 α -OH, 11 β -OH Ep : 9 α -11 α
166	<i>Curvularia tritolii</i>	Hxl : 11 β -OH
167	<i>Cylindrocarpon radiculicola</i>	D : 1 - 2 Cl : 17 - 20
168	<i>Dactylium dendroides</i>	Hxl : 11 α -OH, 17 α -OH
169	<i>Delacroixia coronata</i>	Hxl : 11 α -OH
170	<i>Didymella lycopersici</i>	D : 1 - 2

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
171	<i>Didymella volakii</i>	Hxl : 16 α -OH
172	<i>Didymocladium ternatum</i> *	Hxl : 11 α -OH
173	<i>Diplodia natalensis</i>	Hxl : 7 β -OH
174	<i>Diplodia tubericola</i>	Hxl : 7 β -OH
175	<i>Dothichia</i> sp.	Hxl : 11 β -OH
176	<i>Epicoecium oryzae</i>	R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH
177	<i>Eremothecium ashbyi</i>	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
178	<i>Escherichia coli</i>	R : 7-CO $\rightarrow$ 7 α -OH
179	<i>Escherichia freundii</i>	O : 3 α -OH $\rightarrow$ 3-CO
180	<i>Eurotium chevalieri</i> (+)	Hxl : 11 α -OH
181	<i>Flavobacterium androstendionicum</i>	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
182	<i>Flavobacterium carbonilicum</i>	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
183	<i>Flavobacterium dehydrogenans</i>	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO 17 β -OH $\rightarrow$ 17-CO R : 20-CO $\rightarrow$ 20 α -OH S : 11 β , 21
184	<i>Flavobacterium dehydrogenans</i> var. <i>hydrolyticum</i>	S : 3 β
185	<i>Flavobacterium maris</i>	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
186	<i>Flavobacterium</i> sp.	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO Cl-Gl :
187	<i>Fusarium avenaceum</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
188	<i>Fusarium avenaceum</i> var. <i>herbarum</i>	Hxl :
189	<i>Fusarium aquaeductum</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
190	<i>Fusarium aquaeductum</i> var. <i>dimerum</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
191	<i>Fusarium bulbigenum</i> (+)	D : 1 - 2 Hxl : 11 α -OH
192	<i>Fusarium buxicola</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
193	<i>Fusarium caucasicum</i>	D : 1 - 2 Cl : 17 - 20
194	<i>Fusarium cocophilum</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
195	<i>Fusarium culmorum</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 15 α -OH
196	<i>Fusarium dimerum</i> (+)	Hxl : 6 β -OH
197	<i>Fusarium discolor</i>	Hxl : 11 α -OH
198	<i>Fusarium equiseti</i> var. <i>bullatum</i>	Hxl : 11 α -OH
199	<i>Fusarium expansum</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
200	<i>Fusarium gibosum</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
201	<i>Fusarium gibosum</i> var. <i>acuminatum</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
202	<i>Fusarium gigas</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
203	<i>Fusarium graminearum</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
204	<i>Fusarium heterosporum</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH, 11 α -OH

* Chi *Didymocladium* đã trở thành tên đồng nghĩa (syn.) của chi *Cladobotryum* Nees (Ainsworth và C's. 1971)

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
205	<i>Fusarium javanicum</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH D : 1-2
206	<i>Fusarium javanicum</i> var. <i>ensiforme</i>	D : 1-2
207	<i>Fusarium lateritium</i> (+)	Cl : 17-20 D : 1-2
208	<i>Fusarium lini</i>	Hxl : 12 β -OH, 15 α -OH D : 1-2 S : 3 β
209	<i>Fusarium lycopersici</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
210	<i>Fusarium macroceras</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
211	<i>Fusarium merismoides</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
212	<i>Fusarium microcrea</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
213	<i>Fusarium moniliforme</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
214	<i>Fusarium moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
215	<i>Fusarium moniliforme</i> var. <i>lactis</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
216	<i>Fusarium nivale</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
217	<i>Fusarium oxysporum</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH, 11 α -OH D : 1-2
218	<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>orthoceras</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
219	<i>Fusarium redolens</i>	Hxl : 11 α -OH
220	<i>Fusarium reticulatum</i>	Hxl : 11 α -OH
221	<i>Fusarium sambucinum</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH, 11 α -OH
222	<i>Fusarium sarcochrourum</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
223	<i>Fusarium semitectum</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
224	<i>Fusarium solani</i> (+)	Hxl : 11 α -OH, 15 α -OH D : 1-2 Cl : 17-20 R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH
225	<i>Fusarium solani</i> var. <i>aduncisporum</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
226	<i>Fusarium solani</i> var. <i>argilaccum</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
227	<i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
228	<i>Fusarium solani</i> var. <i>redolens</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
229	<i>Fusarium</i> sp.	Hxl : 6 β -OH O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
230	<i>Fusarium sphacria</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
231	<i>Fusarium sporotrichiella</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
232	<i>Fusarium sporotrichiella</i> var. <i>poae</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH
233	<i>Fusarium zonatum</i>	D : 1-2
234	<i>Fusidium</i> sp.	Hxl : 7 α -OH
235	<i>Gibberella baecata</i>	Hxl : 15 α -OH
236	<i>Gibberella tulikuroi</i>	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
237	<i>Gibberella saubinetii</i>	Hxl : 6 β -OH, 12 β -OH, 15 α -OH

* Chi *Fusidium* Link ex Fr. đã trở thành syn. của chi *Cylindrocarpon* Wollenw. (Ainsworth v. s., 1971)

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
238	<i>Gibberella</i> sp.	S : 3 β
239	<i>Gliocladium catenulatum</i>	Hxl : 6 β -OH, 15 α -OH Hxl : 6 β -OH Cl : 17-20 D : 1-2
240	<i>Gliocladium roseum</i>	D : 1-2
241	<i>Gloesporium kaki</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
242	<i>Glomerella lagenarium</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
243	<i>Glomerella</i> sp.	Hxl : 11 α -OH
244	<i>Gongronella urceolifera</i>	Hxl : 11 α -OH
245	<i>Haplosporella</i> sp.	Hxl : 6 β -OH, 7 β -OH, 15 β -OH
246	<i>Helicostylum piriforme</i>	Hxl : 7 α -OH, 9 α -OH 11 α -OH, 14 α -OH Ep : 14 α , 15 α O : 11 β -OH $\rightarrow$ 11-CO, 7 β -OH $\rightarrow$ 7-CO
247	<i>Helmintosporium sativum</i>	Hxl : 7 α -OH, 7 β -OH 14 α -OH, 15 α -OH, 15 β -OH
248	<i>Helmintosporium</i> sp. (+)	Hxl : 7 α -OH, 7 β -OH 14 α -OH, 15 α -OH, 15 β -OH
249	<i>Helmintosporium turcicum</i>	D : 1-2
250	<i>Hendersonia aberrans</i>	Hxl : 21-OH
251	<i>Hendersonia acicola</i>	Hxl : 21-OH
252	<i>Hendersonia herpotricha</i>	Hxl : 21-OH
253	<i>Hendersonia phragmitis</i>	Hxl : 21-OH
254	<i>Hendersonia rubi</i>	Hxl : 21-OH
255	<i>Hormodendrum hordei</i> *	Hxl : 11 α -OH
256	<i>Hendersonia olivaceum</i>	Hxl : 15 α -OH
257	<i>Hendersonia pallidum</i>	Hxl : 11 α -OH
258	<i>Hendersonia viride</i>	Hxl : 15 α -OH
259	<i>Hypholoma</i> sp.	Hxl : 15 α -OH
260	<i>Lenzites abietina</i>	Hxl : 15 β -OH
261	<i>Leptosphaeria maculans</i>	Hxl : 17 α -OH
262	<i>Lichtheimia corymbifera</i> *	Hxl : 11 α -OH, 11 β -OH
263	<i>Lichtheimia ramosa</i>	Hxl : 11 α -OH, 11 β -OH
264	<i>Lophotrichus martinii</i>	Hxl : 17 α -OH
265	<i>Melanospora parasitica</i>	Hxl : 17 α -OH
266	<i>Microascus dehydrogenans</i>	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
267	<i>Micromonospora chalybea</i>	D : 1-2
268	<i>Mortierella alphina</i>	Hxl : 1-OH

* Chi *Lichtheimia* đã trở thành syn. của chi *Absidia* v.Tiegh. (Ainsworth và Cs., 1971).Chi *Hormodendrum* đã trở thành syn. của chi *Cladosporium* Link ex Fr. (Ainsworth và Cs., 1971).

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
269	<i>Mortierella bainieri</i>	Hxl : 1-OH
270	<i>Mortierella candelabrum</i>	Hxl : 1-OH
271	<i>Mortierella marburgensis</i>	Hxl : 1-OH
272	<i>Mortierella polycephala</i>	Hxl : 1-OH
273	<i>Mortierella pusilla</i> var. <i>isobellina</i>	Hxl : 1-OH
274	<i>Mortierella tuberosa</i>	Hxl : 1-OH
275	<i>Mortierella zonata</i>	Hxl : 1-OH
276	<i>Mucor adriaticus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
277	<i>Mucor adventitus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
278	<i>Mucor angulisporus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
280	<i>Mucor berolinensis</i>	Hxl : 6 β -OH
281	<i>Mucor buntingii</i>	Hxl : 6 β -OH
282	<i>Mucor circinelloides</i>	Hxl : 6 β -OH
283	<i>Mucor corymbifer</i>	Hxl : 6 β -OH, 14 α -OH
284	<i>Mucor dimorphosporus</i>	Hxl : 6 β -OH
285	<i>Mucor dubius</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
286	<i>Mucor erectus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
287	<i>Mucor genevensis</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH
288	<i>Mucor globosus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH
289	<i>Mucor griseo-cyanus</i>	Hxl : 9 α -OH, 14 α -OH Ep : 14 α -15 α Hxl : 7 α -OH, 14 α -OH
290	<i>Mucor guillemontii</i>	Hxl : 6 β -OH
291	<i>Mucor hiemalis</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
292	<i>Mucor humicola</i>	Hxl : 6 β -OH
293	<i>Mucor humilis</i>	Hxl : 6 β -OH
294	<i>Mucor hypochininus</i>	Hxl : 6 β -OH
295	<i>Mucor javanicus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
296	<i>Mucor mandshuricus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
297	<i>Mucor microsporus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
298	<i>Mucor mucedo</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 14 α -OH Cl : 17-20
299	<i>Mucor murorum</i>	Hxl : 6 β -OH
300	<i>Mucor parasiticus</i>	Hxl : 5 β -OH, 6 β -OH, 7 β -OH 9 α -OH, 11 α -OH, 14 α -OH Ep : 14 α , 15 α O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
301	<i>Mucor piriformis</i>	Hxl : 6 β -OH
302	<i>Mucor plumbens</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
303	<i>Mucor pusillus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH
304	<i>Mucor racemosus</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
305	<i>Mucor ramamianus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
306	<i>Mucor rouxianus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
307	<i>Mucor varians</i>	Hxl : 6 β -OH

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
308	<i>Mycobacterium berlinensis</i>	Hxl : 14 α -OH D : 1-2
309	<i>Mycobacterium buryicum</i>	Hxl : 14 α -OH D : 1-2
310	<i>Mycobacterium flavum</i>	D : 1-2 R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH Cl : 17-20
311	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	D : 1-2 Ar : Sp : B
312	<i>Mycobacterium friedmannii</i>	D : 1-2 Hxl : 14 α -OH
313	<i>Mycobacterium lacticola</i>	D : 1-2 Hxl : 14 α -OH R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH
314	<i>Mycobacterium phlei</i>	D : 1-2 Hxl : 14 α -OH D : 1-2
315	<i>Mycobacterium ranac</i>	Hxl : 14 α -OH D : 1-2 Hxl : 14 α -OH
316	<i>Mycobacterium rhodochrous</i>	D : 1-2 O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO, 20 β -OH $\rightarrow$ 20-CO Cl : 20-27 Ar : Sp : B
317	<i>Mycobacterium rubropertinctum</i>	D : 1-2
318	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	D : 1-2 Ar : Hxl : 14 α -OH Sp : B
319	<i>Mycobacterium</i> sp.	D : 1-2 Hxl : 14 α -OH O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH
320	<i>Mycobacterium thermophiles</i>	D : 1-2 Hxl : 14 α -OH
321	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	D : 1-2 Ar : Sp : B Hxl : 14 α -OH
322	<i>Mycocladus hyalinus</i> *	Hxl : 11 α -OH, 11 β -OH
323	<i>Mycobacterium roridum</i> (+)	Hxl : 11 α -OH
324	<i>Naematoloma sublaticum</i> *	Hxl : 6 β -OH, 14 α -OH

* Chi *Mycocladus* Beauv. đã trở thành syn. của chi *Absidia* v.Tiegh.

Chi *Nematoloma* Karst. đã trở thành syn. của chi *Hypholoma* Fr. (Kummer) (Ainsworth và C.s., 1971)

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
325	<i>Neurospora crassa</i>	Hxl : 9 α -OH
326	<i>Neurospora sitophila</i>	Hxl : 11 α -OH
327	<i>Nigrospora oryzae</i> (+)	Hxl : 11 α -OH, 15 β -OH
328	<i>Nigrospora</i> sp.	Hxl : 11 α -OH, 15 β -OH
329	<i>Nigrospora sphaerica</i> (+)	Hxl : 11 α -OH, 15 β -OH O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
330	<i>Nocardia asteroides</i>	D : 1-2
331	<i>Nocardia aurantia</i>	D : 1-2
332	<i>Nocardia blackwellii</i>	D : 1-2
333	<i>Nocardia brasiliensis</i>	D : 1-2
334	<i>Nocardia caviae</i>	D : 1-2
335	<i>Nocardia coccinea</i>	D : 1-2
336	<i>Nocardia convoluta</i>	D : 1-2
337	<i>Nocardia corallina</i>	D : 1-2 Hxl : 9 α -OH Cl : 17-20
338	<i>Nocardia cuniculi</i>	D : 1-2
339	<i>Nocardia erythropolis</i>	D : 1-2
340	<i>Nocardia farcinica</i>	D : 1-2
341	<i>Nocardia formica</i>	D : 1-2
342	<i>Nocardia gardneri</i>	D : 1-2
343	<i>Nocardia globetula</i>	D : 1-2
344	<i>Nocardia leishmanii</i>	D : 1-2
345	<i>Nocardia madurae</i>	D : 1-2
346	<i>Nocardia minima</i>	D : 1-2
347	<i>Nocardia opaca</i>	D : 1-2
348	<i>Nocardia polychromogenes</i>	D : 1-2
349	<i>Nocardia restrictus</i>	D : 1-2 Ar : Sp : B Hxl : 9 α -OH
350	<i>Nocardia rubra</i>	D : 1-2
351	<i>Nocardia salmonicolor</i>	D : 1-2
352	<i>Nocardia</i> sp.	D : 1-2 Ar : Sp : B Hxl : 9 α -OH Cl : 17-20 O : 3 α -OH $\rightarrow$ 3-CO
353	<i>Nocardia sylvodifera</i>	D : 1-2
354	<i>Nocardia transvalensis</i>	D : 1-2
355	<i>Ophiobolus herpotrichus</i>	Hxl : 21-OH D : 1-2
356	<i>Ophiobolus miyabeanus</i>	D : 1-2
357	<i>Ophiobolus</i> sp.	Hxl : 21-OH

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
358	<i>Penicillium adametzi</i>	Cl : 17-20
359	<i>Penicillium albidum</i>	Cl : 17-20
360	<i>Penicillium asperum</i>	Cl : 17-20
361	<i>Penicillium atramentosum</i>	Hxl : 11 α -OH
362	<i>Penicillium canescens</i> (+)	Cl : 17-20
363	<i>Penicillium citreo-viride</i> (+)	Cl : 17-20
364	<i>Penicillium citrinum</i> (+)	Cl : 17-20
365	<i>Penicillium commune</i>	Hxl : 11 α -OH
366	<i>Penicillium corylophilum</i> (+)	Cl : 17-20 Hxl : 11 α -OH
367	<i>Penicillium cyaneofulvum</i>	Cl : 17-20
368	<i>Penicillium cyclopium</i>	Cl-Gl :
369	<i>Penicillium daleae</i>	Cl : 17-20
370	<i>Penicillium decumbens</i> (+)	Cl : 17-20
371	<i>Penicillium diversum</i>	Hxl : 15 β -OH
372	<i>Penicillium egyptaceum</i>	Cl : 17-20
373	<i>Penicillium chrichii</i>	Hxl : 11 α -OH
374	<i>Penicillium frequentans</i> (+)	Cl : 17-20
375	<i>Penicillium fuscum</i>	Cl : 17-20
376	<i>Penicillium godlewskii</i>	Cl : 17-20
377	<i>Penicillium chrysogenum</i> (+)	Cl : 17-20 O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO Hxl : 11 α -OH Cl-Gl :
378	<i>Penicillium implicatum</i> (+)	Cl : 17-20
379	<i>Penicillium lanthiellum</i> (+)	Cl : 17-20
380	<i>Penicillium javanicum</i> (+)	Cl : 17-20
381	<i>Penicillium jensenii</i> (+)	Cl : 17-20
382	<i>Penicillium kapuscinskii</i>	Cl : 17-20
383	<i>Penicillium lilacinum</i> (+)	Cl : 17-20 R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH Hxl : 11 α -OH
384	<i>Penicillium lividum</i> (+)	Cl : 17-20
385	<i>Penicillium mclearginum</i>	Cl : 17-20
386	<i>Penicillium melinii</i>	Cl : 17-20
387	<i>Penicillium miczynskii</i> (+)	Cl : 17-20
388	<i>Penicillium multicolor</i> (+)	Cl : 17-20
389	<i>Penicillium nalgiovensis</i> (+)	Cl : 17-20
390	<i>Penicillium nigricans</i>	Cl : 17-20
391	<i>Penicillium notatum</i> (+)	Cl : 17-20 Hxl : 15 α -OH
392	<i>Penicillium ochro-chlorum</i>	Cl : 17-20
393	<i>Penicillium oxalicum</i> (+)	Hxl : 11 α -OH
394	<i>Penicillium parvum</i>	Cl : 17-20
395	<i>Penicillium piscarium</i>	Cl : 17-20

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
396	<i>Penicillium psitacinum</i>	Cl : 17-20
397	<i>Penicillium pulvillorum</i>	Cl : 17-20
398	<i>Penicillium purpurascens</i>	Cl : 17-20
399	<i>Penicillium pusillum</i>	Cl : 17-20
400	<i>Penicillium raciborskii</i>	Cl : 17-20
401	<i>Penicillium raistrickii</i> (+)	Cl : 17-20
402	<i>Penicillium restrictum</i>	Cl : 17-20
403	<i>Penicillium restrictulosum</i>	Cl : 17-20
404	<i>Penicillium rugulosum</i> (+)	Hxl : 15 β -OH
405	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	Cl : 17-20
406	<i>Penicillium simplicissimum</i> (+)	Cl : 17-20
407	<i>Penicillium soppi</i>	Cl : 17-20
408	<i>Penicillium</i> sp.	Cl : 17-20Hxl : 2 β -OH, 6 β -OH, 1 α -OH 12 β -OH, 15 α -OH, 15 β -OH
409	<i>Penicillium spinulosum</i> (+)	Cl : 17-20
410	<i>Penicillium steckii</i> (+)	Cl : 17-20
411	<i>Penicillium subalteritium</i>	Cl : 17-20
412	<i>Penicillium tardum</i> (+)	Hxl : 11 α -OH, 15 β -OH
413	<i>Penicillium terdikowski</i> (+)	Cl : 17-20 Cl : 17-20
414	<i>Penicillium thomii</i> (+)	Hxl : 19-OH
415	<i>Penicillium urticae</i>	Hxl : 15-OH
416	<i>Pestalotia foidans</i>	Hxl : 11 α -OH
417	<i>Pestalotia funera</i>	Hxl : 16 α -OH
418	<i>Pestalotia rosenae</i>	Hxl : 11 α -OH
419	<i>Pestalotia</i> sp.	Hxl : 11 α -OH
420	<i>Peziza species</i>	Hxl : 7 α -OH
421	<i>Phoma</i> sp.	Hxl : 11 β -OH
422	<i>Phycomyces blakesleanus</i>	Hxl : 6 β -OH, 7 α -OH, 7 β -OH 15 β -OH Ep : 14 α , 15 α
423	<i>Phycomyces blakesleanus - theobromatus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
424	<i>Phycomyces nitens</i>	Hxl : 6 β -OH
425	<i>Pleospora gacumannii</i>	Hxl : 14 α -OH
426	<i>Polyporus cinnabarinus</i>	Hxl : 6 β -OH, 14 α -OH, 15 β -OH
427	<i>Polyporus tulipiferus</i>	Hxl : 6 β -OH, 14 α -OH, 15 β -OH
428	<i>Poria cocos</i>	Hxl : 6 β -OH, 14 α -OH, 15 β -OH
429	<i>Protaminobacter albolavum</i>	D : 1-2
430	<i>Protaminobacter rubrum</i>	D : 1-2
431	<i>Proactinomyces erythropolis</i>	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO Hxl : 7 α -OH
432	<i>Proactinomyces rosus</i>	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
433	<i>Proactinomyces</i> sp.	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO Cl : 17-20
434	<i>Protoahsidia blakesleana</i>	Hxl : 11 α -OH
435	<i>Pseudodiphtheria bacilli</i>	O : 17 β -OH $\rightarrow$ 17-CO 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
436	<i>Pseudomonas borocupolis</i>	Hxl : 11 β -OH

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
437	<i>Pseudomonas dacumhae</i>	D : 1-2
438	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R : 20-CO → 20β-OH
439	<i>Pseudomonas marcescens</i>	DL 1-2
440	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	D : 1-2
		R : 20-CO → 20β-OH
441	<i>Pseudomonas</i> sp.	Hxl : 11β-OH
		R : 20-CO → 20β-OH
		D : 1-2
		O : 3β-OH → 3-CO
		17β-OH → 17-CO
442	<i>Pseudomonas testosteroni</i>	D : 1-2
		O : 3β-OH → 3-CO
		17β-OH → 17-CO
		Ar :
		Sp : B
443	<i>Pseudodothis</i> sp.	D : 1-2
		O : 3β-OH → 3-CO
444	<i>Pycnosporium</i> sp.	Hxl : 11α-OH
445	<i>Rhizoctonia ferruginea</i>	Hxl : 1-OH, 2β-OH
446	<i>Rhizoctonia solani</i>	Hxl : 1-OH, 6β-OH
447	<i>Rhizoctonia</i> sp. (+)	Hxl : 1-OH, 2β-OH, 6β-OH
448	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Hxl : 6β-OH, 7α-OH, 7β-OH
		11α-OH
		22-OH
449	<i>Rhizopus cambodlae</i>	Hxl : 6β-OH, 11α-OH
450	<i>Rhizopus cohni</i>	Hxl : 6β-OH, 11α-OH, 11β-OH
451	<i>Rhizopus delamar</i>	O : 11α-OH → 11-CO
452	<i>Rhizopus chinensis</i>	Hxl : 6β-OH, 11α-OH
453	<i>Rhizopus japonicus</i>	Hxl : 6β-OH, 11α-OH
454	<i>Rhizopus kazamensis</i>	Hxl : 6β-OH, 11α-OH
455	<i>Rhizopus nidulans</i>	Hxl : 6β-OH, 11α-OH
456	<i>Rhizopus nigricans</i> (+)	Hxl : 6β-OH
		7β-OH
		11α-OH
		11β-OH
457	<i>Rhizopus oryzae</i> (+)	Hxl : 6β-OH, 11α-OH
458	<i>Rhizopus pygmaeus</i>	Hxl : 6β-OH
459	<i>Rhizopus reflexus</i>	Hxl : 6β-OH, 11α-OH
460	<i>Rhizopus shanghaiensis</i>	Hxl : 6β-OH, 11α-OH
461	<i>Rhizopus</i> sp.	Hxl : 7α-OH, 7β-OH, 6β-OH
462	<i>Rhizopus stonius</i>	Cl : 17-20
463	<i>Rhizopus tonkinensis</i>	Hxl : 6β-OH, 11α-OH

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
464	<i>Rhizopus tritici</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH
465	<i>Rhodoseptoria</i> sp.	Hxl : 11 β -OH
466	<i>Rhodotorula glutinis</i>	R : 20-CO $\rightarrow$ 20 α -OH
467	<i>Rhodotorula longissima</i>	R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH
468	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (+)	R : 17-CO $\rightarrow$ 17 β -OH 3-CO $\rightarrow$ 3 α -OH 3-CO $\rightarrow$ 3 β -OH Hdg : 1-2 R : 17-CO $\rightarrow$ 17 β -OH E : 17 β -OH
469	<i>Saccharomyces fragilis</i>	Hxl : 11 β -OH D : 1-2 Hdg : 1-2
470	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 15 β -OH
471	<i>Sansevieria zeylanica</i>	Hxl : 21-OH D : 1-2 Hdg : 1-2
472	<i>Scenedesmus</i> sp.	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 15 β -OH
473	<i>Sclerotinia fruticola</i>	Hxl : 21-OH
474	<i>Sclerotinia libertiana</i>	Hxl : 2 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH, 15 β -OH Hxl : 2 β -OH
475	<i>Sclerotinia</i> sp.	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 15 β -OH
476	<i>Sclerotium hydrophilum</i>	D : 1-2 D : 1-2
477	<i>Septomyxa aesculi</i>	Ar : Cl : 17-20 D : 1-2
478	<i>Septomyxa affinis</i>	D : 1-2 D : 1-2 Hxl : 15 β -OH
479	<i>Septomyxa corni</i>	Hxl : 15 β -OH
480	<i>Septomyxa salicina</i>	Hxl : 15 β -OH
481	<i>Septomyxa tulasnei</i>	Hxl : 11 β -OH
482	<i>Serratia plymuthicum</i>	Hxl : 17 β -OH
483	<i>Spicaria simplicissima</i>	Hxl : 17 β -OH
484	<i>Spicaria</i> sp.	Hxl : 11 β -OH
485	<i>Spondylocadium</i> sp.	Hxl : 11 β -OH
486	<i>Sporodinia minima</i>	Hxl : 11 β -OH
487	<i>Sporormia minima</i>	Hxl : 11 β -OH
488	<i>Sporotrichum hambycinum</i>	Hxl : 11 β -OH
489	<i>Sporotrichum epigaeum</i>	D : 1-2 R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH Hxl : 11 β -OH
490	<i>Sporotrichum gougeroti</i>	Hxl : 11 α -OH, 11 β -OH, 14 α -OH
491	<i>Sporotrichum sulphurens</i>	Hxl : 11 α -OH, 11 β -OH
492	<i>Stachyidium bicolor</i>	Hxl : 11 α -OH, 11 β -OH
493	<i>Stachyidium theobromae</i>	D : 1-2 R : 2-CO $\rightarrow$ 20 β -OH
494	<i>Stercum lasciatum</i>	

* Chi *Sporodinia* Link đã trở thành syn. của *Syzygites* Ehr. ex Fr.

Chi *Stachyidium* Link ex Fr. đã trở thành syn. của *Spondylocadium* Mart. (Ainsworth và Cs., 1971)

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
495	<i>Streptomyces achromogenes</i>	Hxl : 16 α -OH
496	<i>Streptomyces albus</i>	O : 17 β -OH $\rightarrow$ 17-CO R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH 17-CO $\rightarrow$ 17 β -OH
497	<i>Streptomyces annulatus</i>	Hxl : 16 α -OH
498	<i>Streptomyces antibioticus</i>	D : 1-2
499	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Hxl : 6 β -OH, 9 α -OH O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO R : 3-CO $\rightarrow$ 3 β -OH
500	<i>Streptomyces aureus</i>	Hxl : 15 α -OH, 16 α -OH
501	<i>Streptomyces bobilliae</i>	D : 1-2
502	<i>Streptomyces coelicolor</i>	R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH
503	<i>Streptomyces diastaticus</i>	R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH Hxl : 16 α -OH
504	<i>Streptomyces diastochromogenes</i>	Hxl : 6 β -OH
505	<i>Streptomyces fimicarius</i>	Hxl : 16 α -OH
506	<i>Streptomyces flavocolus</i>	Hxl : 16 α -OH
507	<i>Streptomyces flavogriseus</i>	R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH
508	<i>Streptomyces fradiae</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO D : 7-8 O : 3 α -OH $\rightarrow$ 3-CO 12 α -OH $\rightarrow$ 12-CO
509	<i>Streptomyces gelaticus</i>	
510	<i>Streptomyces griseocanicus</i>	Hxl : 6 β -OH
511	<i>Streptomyces griseoluteus</i>	Hxl : 16 α -OH
512	<i>Streptomyces griseus</i>	Hxl : 16 α -OH O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH 3-CO $\rightarrow$ 3 β -OH Hdg : 4-5
513	<i>Streptomyces halstedii</i>	Hxl : 16 α -OH
514	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH
515	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	Hxl : 16 α -OH
516	<i>Streptomyces lavendulae</i>	D : 1-2 Cl : 17-20 R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH
517	<i>Streptomyces lipmanii</i>	Hxl : 16 α -OH
518	<i>Streptomyces mediodidicus</i>	Hxl : 16 α -OH
519	<i>Streptomyces microflavus</i>	Hxl : 16 α -OH
520	<i>Streptomyces olivaceus</i>	Hxl : 16 α -OH D : 1-2
521	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	D : 1-2
522	<i>Streptomyces parvus</i>	Hxl : 16 α -OH
523	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	Hxl : 16 α -OH
524	<i>Streptomyces purpeochromogenes</i>	Hxl : 16 α -OH
525	<i>Streptomyces rimosus</i>	Hxl : 6 β -OH O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO

Bảng 2.19. (tiếp)

1	2	3
526	<i>Streptomyces roseochromogenes</i>	Hxl : 2 β -OH 16 α -OH, 20 β -OH R : 20-CO $\rightarrow$ 20 β -OH
527	<i>Streptomyces rugosensis</i>	Hxl : 16 α -OH
528	<i>Streptomyces</i> sp.	Hxl : 2 β -OH, 6 β -OH
529	<i>Streptomyces sulphureus</i>	11 β -OH, 16 α -OH
530	<i>Streptomyces verme</i>	O : 3 β -OH $\rightarrow$ 3-CO
531	<i>Streptomyces viridis</i>	R : 3-CO $\rightarrow$ 3 β -OH
532	<i>Syncephalastrum cinereum</i>	Hdg : 4-5
533	<i>Syncephalastrum racemosum</i> (+)	Hxl : 16 α -OH Hxl : 16 α -OH
534	<i>Syncephalis nodosa</i>	Hxl : 16 α -OH
535	<i>Thamnidium elegans</i>	Hxl : 11 α -OH Hxl : 6 β -OH, 7 α -OH, 11 α -OH
536	<i>Thielavia terricola</i>	11 β -OH, 14 α -OH, 15 β -OH
537	<i>Tieghemella cylindrospora</i>	Hxl : 16 α -OH
538	<i>Tieghemella hyalospora</i>	Hxl : 17 α -OH
539	<i>Tieghemella</i> sp.	Hxl : 17 α -OH, 11 α -OH
540	<i>Tieghemella spinosa</i>	Hxl : 17 α -OH
541	<i>Trichoderma albanum</i>	Hxl : 17 α -OH
542	<i>Trichoderma glaucum</i>	Hxl : 17 α -OH E : 21
543	<i>Trichoderma konigii</i> (+)	Hxl : 17 α -OH
544	<i>Trichoderma lignorum</i>	Hxl : 17 α -OH
545	<i>Trichoderma narcesi</i>	Hxl : 17 α -OH
546	<i>Trichoderma nigrovirens</i>	Hxl : 17 α -OH
547	<i>Trichoderma numbergii</i>	Hxl : 17 α -OH
548	<i>Trichoderma</i> sp.	Hxl : 17 α -OH
549	<i>Trichoderma viride</i> (+)	Hxl : 17 α -OH, 11 α -OH
550	<i>Trichomonas gallinarum</i>	R : 17 α -OH
551	<i>Trichothecium arthenopum</i>	Hxl : 17 α -OH
552	<i>Trichothecium candidum</i>	Hxl : 17 α -OH
553	<i>Trichothecium plasmoparae</i>	Hxl : 17 α -OH
554	<i>Trichothecium polybrochum</i>	Hxl : 17 α -OH
555	<i>Trichothecium roseum</i> (+)	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH 14 α -OH, 17 α -OH O : 11-OH $\rightarrow$ 11-CO
556	<i>Wolnowia graminis</i>	Hxl : 6 β -OH, 16 α -OH O : 16 α -OH $\rightarrow$ 16-CO
557	<i>Xylaria species</i>	Hxl : 1 β -OH, 6 β -OH, 7 β -OH, 15 β -OH
558	<i>Zygothynchus heterosporus</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH O : 11 α -OH $\rightarrow$ 11-CO
559	<i>Zygothynchus modderi</i>	Hxl : 6 β -OH, 11 α -OH, 11 β -OH
560	<i>Zygothynchus vulniferus</i>	Hxl : 6 β -OH

Chi *Tieghemella* Berl. et de Toni đã trở thành syn. của chi *Absidia* V. Tiegh. (Aisworth và Cs., 1971)

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

Argoudelis A.D. et al., 1969, 1971

Microbial transformation of antibiotics

I. Production of lincomycin sulfoxide and 1-demethylthio 1-hydroxylincomycin by *S.linconensis*. *J.Antibiotics*, 22(6) : 289-291.

II. Phosphorylation of lincomycin by *Streptomyces* species. *J. Antibiotics*, 22(7) : 341-343, 1969.

III. Conversion of clindamycin to 1'-demethylclindamycin and clindamycin sulfoxide by *Streptomyces* species. *J.Antibiotics*, 22(7) : 309-314, 1969.

V. Clindamycin ribonucleotides. *J.Am.Chem.Soc.*, 93(2) : 534-535, 1971

VI. Acylation of chloramphenicol by *Streptomyces coelicolor*. *J. Antibiotics*, 24(3) : 206-209, 1971 Bayman P. et G.V.Radker, 1971

Bayman P. et G.V.Radker, 1997

Transformation and tolerance of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by fungi. *Intern. Biotransf. Biodegrad.*, 39(1) : 45-53.

Bui Xuan Dong, 1972

Contributions à l'étude taxonomique des *Hyphomycetes*. I. Esquisse d'une nouvelle classification. *Cesk.Mykol.*, 26 : 155-166.

Bùi Xuân Đồng, 1986

Hyphomycetes ở Việt Nam. tập 1 và 2. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội 1984, 1986.

Casida L., 1968

Industrial microbiology. John Wiley and Sons, New York.

Capek A. et al., 1966

Microbial transformation of steroids. Acad. Publ. House, Prague.

Capek A. et al., 1974

Progesterone transformation as a diagnostic feature in the genera *Alternaria* *Stemphylium* and *Cladosporium*. *Folia Mikrobiol.*, 19 : 378-380

Capek A. et al., 1975

Progesterone transformation as a diagnostic feature of the genera

- Humicola and Gilmaniella. Folia Mikrobiol., 20 : 166-167.
- Coasts J.H. et A.D.Argoudelis., 1971
- Microbial transformation of antibiotics. Phosphorylation of clindamycin by Streptomyces coelicolor Muller. J.Bacteriol., Oct. : 459-464.
- Dias B. et Bart Weimer., 1998
- Conversion of methionine to thiols by Lactococci, Lactobacilli and Brevibacteria. Appl. Env. Microbiol., 64(9) : 3320-3326
- Lê Thanh Bình, 1995.
- Nghiên cứu cơ chế kháng kháng sinh của một số chủng xạ khuẩn (Streptomyces) với kháng sinh do chúng tổng hợp ra và ứng dụng trong việc phân lập, tạo giống vi sinh vật Luận án PTS., Viện Công nghệ sinh học - TT. Khoa học tự nhiên và Công nghệ quốc gia, Hà Nội.
- Nguyễn Lâm Dũng, Bùi Xuân Đồng, Lê Đình Lương, 1982
- Vi nấm. NXB Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội.
- Phan Quốc Kinh, 1984
- Các chất steroid dùng làm thuốc. NXB Y học, Hà Nội.
- Rivière. J., 1975
- Les applications industrielles de la microbiologie. Masson et Cie., Paris.
- Schmitz H.et C.a.Claridge., 1977
- Biotransformation of antitumor agents by a strain of Whetzelinia sclerotiorum. J.Antibiotics. 30(8) : 335-338.
- Shima J. et at., 1997
- Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin Deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. Appl. Env. Microbiol., 63(10) : 8825-3830.
- Testa R.T et B.C.Tilley., 1976
- Biotransformation, a new approach to aminoglycoside biosynthesis. II. Gentamicin. J.Antibiotics, 29(2) : 140-146.
- Vézina C. et K.singh., 1975
- Transformation of organic compounds by fungal spores, in : The filamentous fungi, vol. I, eds. J.E.Smith et D.R.Berry, pp.158-192. Edward Arnold. London.

Chương III

VI NĂM DỪNG TRONG CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Công nghệ sinh học là một ngành khoa học mũi nhọn của thế giới ở cuối thế kỷ 20 và thế kỷ tiếp theo, và cũng đã được xác định là một trong vài ngành khoa học ưu tiên phát triển của nước ta trong những năm tới.

Công nghệ sinh học hiện nay tiếp thu và sử dụng kiến thức của nhiều ngành và chuyên ngành khoa học kỹ thuật khác nhau, trước hết các chuyên ngành của sinh học, và của cả hóa học, vật lý, toán, v.v. để khai thác, sử dụng năng lực của tế bào sinh vật, của phân tử các hợp chất mang thông tin di truyền (ADN, ARN), các hợp chất cấu trúc, sinh lý, sinh hóa của tế bào. Đương nhiên việc khai thác sử dụng này, kể cả đối với các hợp chất tách chiết khỏi tế bào, không tách rời các hoạt động sống của tế bào ở các cơ thể sinh vật. Vậy dù đối tượng khai thác sử dụng là đối tượng nào (phân tử các hợp chất, tế bào hay cơ thể sinh vật) thì cả quá trình khai thác sử dụng hay một giai đoạn của quá trình đó, ít nhất gắn liền với một sinh vật cụ thể, hay cũng có thể nói, với một loài nào đó trong sinh giới. Rõ ràng chúng ta phải biết chính xác các loài này để khai thác sử dụng năng lực nói trên có hiệu quả.

Cũng thế, việc khai thác sử dụng vi nấm trong một công nghệ sinh học cụ thể chỉ thực hiện được với các chủng của một hay một số loài vi nấm có các hoạt tính sinh học tương ứng. Công nghệ sinh học mà vi nấm được sử dụng bao gồm các công nghệ enzym, kháng sinh, acid hữu cơ, rượu cồn, acid amin, vitamin, chế biến thực phẩm, chế biến thức ăn gia súc, kích thích tố cây trồng, thuốc diệt côn trùng, biến đổi sinh học, xử lý chất thải, chất độc hại bảo vệ môi trường.

Ở Việt Nam do nhiều nguyên nhân, việc khai thác sử dụng vi sinh vật nói chung và vi nấm nói riêng trong công nghệ sinh học còn rất hạn chế, nhưng từ những năm 1960 đến nay, cũng đã có những nghiên cứu tiếp cận và ở vài lĩnh vực đã có những ứng dụng trong thực tế sản xuất, phục vụ đời sống. Trong phạm vi chương sách này, chúng tôi trình bày

các loài chủ yếu và các nhóm phân loại trên loài tương ứng dùng trong công nghệ sinh học, đặc biệt các nhóm phân loại (taxon) đã được sử dụng, nghiên cứu khai thác sử dụng ở nước ta, như trên đã nói, để có thể khai thác sử dụng các loài vi nấm này có hiệu quả hơn.

Vi nấm dùng trong công nghệ sinh học ở tài liệu này gồm :

Thuộc ngành phụ Nấm tiếp hợp (Zygomycotina), các chi :

Absidia van Tieghem

Mucor Mich. ex Fr.

Rhizopus Ehrenb. ex Corda

Thamnidium Link ex Wallroth

Thuộc ngành phụ Nấm bất toàn (Deuteromycotina), các chi :

Aspergillus Mich. ex Fr.

Beauveria Vuillemin

Cephalosporium Corda

Fusarium Link ex Fr.

Metarhizium Sorokin

Paecilomyces Bainier

Penicillium Link ex Fr.

1. NẤM TIẾP HỢP DÙNG TRONG CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Ngành phụ Nấm tiếp hợp (Zygomycotina) có khoảng 610 loài thuộc 115 chi, tất cả đều là vi nấm. Ngành phụ nấm này gồm 2 lớp khác biệt hẳn nhau về điều kiện sống : lớp Nấm tiếp hợp (Zygomycetes) gồm khoảng 510 loài, hầu hết sống hoại sinh trên cạn (bộ Mucorales), một số nhỏ ký sinh trên côn trùng, amip hoặc giun tròn (các bộ Entomophthorales và Zoopagales), lớp Nấm thích ty (Trichomycetes) gồm khoảng 100 loài sống ký sinh trên da và ống tiêu hóa của những động vật có vỏ kitin.

Các loài Nấm tiếp hợp được dùng trong công nghệ sinh học không nhiều, chủ yếu là một số loài thuộc các chi *Mucor*, *Rhizopus* được dùng làm nguồn amylaza thủy phân tinh bột trong lên men rượu, trong công nghiệp sản xuất đường glucose, một số loài khác có hoạt tính biến đổi sinh học được dùng trong công nghiệp sản xuất một số hợp chất steroid làm thuốc.

Chi *Absidia* van Tieghem

Chi *Absidia* gồm khoảng 20 loài Nấm tiếp hợp, đặc trưng bởi sự có mặt của các đoạn sợi nấm bò (stolon) và rễ giả (rhizoid). Đoạn sợi nấm bò là các đoạn sợi nấm khí sinh, không phân nhánh, thẳng hoặc hình

cung, phát sinh từ các sợi nấm nền, có các đầu mút chạm vào cơ chất và phát triển thành một số sợi rất ngắn bám vào cơ chất. Các sợi rất ngắn này gọi là rễ giả, nom giống như rễ cây ở các thân bò ở Thực vật hạt kín. Các nang bào tử kín (sporangium) mọc trên các đoạn sợi nấm bò, không mọc từ đầu mút của các đoạn sợi nấm này như trường hợp các loài thuộc chi *Rhizopus*. Các nang bào tử kín thường nhỏ, hình quả lê và có mấu nổi (apophysis) hình phễu ở phần gốc nang. Các bào tử tiếp hợp (zygosporum) nếu có được bao bởi sợi thô ráp, các sợi thô ráp này mọc từ một hay từ cả hai sợi treo của hợp tử.

Các loài thuộc chi *Absidia* phân bố rộng rãi ở đất, vài loài ưa nhiệt (nhiệt độ tăng trưởng tối ưu ở 37°C). Một số loài đã được xác định là có hoạt tính biến đổi sinh học, như biến đổi digitoxigenin thành 1 β -hydroxydigitoxigenin, 7 β -hydroxydigitoxigenin, progesteron thành 11 α -hydroxyprogesteron, v.v. (xem Chương 2).

Absidia spinosa Lendner - Khuẩn lạc xếp bông, trắng sau xám nâu. Nang bào tử kín thành cụm 2-4 chiếc, cuống nang không phân nhánh, thường có 1 vách ngang ở gần mấu nổi, trụ nang hình bán cầu. Bào tử kín hình trụ, dài 4 - 5 μ m. Bào tử tiếp hợp hình gần cầu, 50 - 80 μ m đường kính.

Absidia ramosa (Lindt) Lendner - Khuẩn lạc xếp bông, trắng sau xám. Cuống nang bào tử phân nhánh, không có vách ngang. Trụ nang màu xanh nhạt hoặc tím. Nang bào tử kín mọc vòng. Bào tử kín hình trái xoan hoặc hình trụ, hầu hết 4,8 - 2,8 μ m. Chưa thấy bào tử tiếp hợp. Nhiệt độ tăng trưởng tối ưu 37°C. Có khả năng gây bệnh trên động vật (G.Smith, 1971).

Chi *Mucor* Micheli ex Fries

Chi *Mucor* là chi tiêu biểu của họ Mucoraceae (bộ Mucorales), đặc trưng bởi hệ sợi nấm không có các đoạn sợi nấm bò và rễ giả, các nang bào tử kín với cuống nang phân nhánh hoặc không phân nhánh, đơn độc hay thành cụm, mọc từ các sợi nấm. Các đặc điểm hình thái (kích thước, hình dạng, màu sắc, v.v.) của khuẩn lạc, nang bào tử kín và các bộ phận của nang, bào tử kín và bào tử tiếp hợp (nếu có) đặc trưng cho mỗi loài của chi.

Số lượng loài của chi *Mucor* khác nhau tùy theo quan niệm phân loại học đối với chi vi nấm này của mỗi tác giả : Saccardo (1886) 150 loài, Lendner (1908) 51 loài, Zycha (1935) 42 loài, Naumov (1939) 88 loài. Các chuyên luận phân loại chi *Mucor* của Zycha và Naumov vẫn được sử dụng, tuy nhiên tùy theo quan niệm phân loại học của mỗi chuyên luận,

giới hạn phân cách các loài không giống nhau. Gần đây hơn, Hesseltine và Cs. từ năm 1952, và Schipper từ 1973 đã nghiên cứu phân loại lại chi *Mucor*, nhưng các đặc điểm phân loại dùng trong nghiên cứu vẫn chủ yếu là các đặc điểm của cơ quan sinh sản vô tính (nang bào tử kín), do đó phân loại học chi vi nấm này vẫn chưa có những đổi mới cơ bản. Có thể phân loại học chi *Mucor* căn cứ chủ yếu vào các đặc điểm phát sinh chủng loại và các đặc điểm hình thái của bào tử tiếp hợp (bào tử hữu tính) sẽ dẫn đến quan niệm về loài trong chi vi nấm này vững chắc hơn, và từ đó phương pháp định loại cũng được ổn định hơn (Schipper, 1973).

Nhiều loài thuộc chi *Mucor* phân bố rộng rãi trong đất, không khí, gây mốc các sản phẩm công nông nghiệp. Một số loài có hoạt tính biến đổi sinh học các hợp chất steroid (phần lớn hydroxy hóa ở các vị trí 6 β và 11 α). Các loài *M. racemosus*, *M. tonkinensis* được dùng để lên men rượu, thủy phân tinh bột.

Mucor mucedo L.ex Fr.

Khuẩn lạc trên cơ chất tự nhiên (phân súc vật) màu xám, có thể cao tới 15cm. Trên môi trường nuôi cấy (môi trường thạch - khoai tây, môi trường cao men bia), khuẩn lạc cao 2- 3 cm. Phần lớn nang bào tử kín hình cầu, gần cầu, 100 - 200 μ m đường kính, màu xám, xám nâu, có gai. Trụ nang hình trái xoan, hình elip, 160 x 125 μ m, hoặc hình trụ, hình gần elip, 85 x 53 μ m. Bào tử kín hình trụ, hình elip, dài 6 - 13 μ m. Cuống nang không phân nhánh, dài 2 - 3 cm, cuống nang phân nhánh ngắn hơn. Tạo thành bào tử tiếp hợp. Phân lập từ tài liệu giấy lưu trữ, vài sản phẩm khác ở Việt Nam.

Mucor racemosus Fres.

Khuẩn lạc trên môi trường cao men bia màu xám, xám nâu, xốp bông, cao dưới 1 cm. Cuống nang không phân nhánh, sau phân nhánh không đều. Nang bào tử kín hình cầu, phần lớn trong khoảng 20 - 70 μ m đường kính. Vỏ nang sần sùi, vỡ từng mảng. Trụ nang hình trái xoan, hình quả lê, elip, có phần phụ bao quanh gốc do vỏ nang khi vỡ còn sót lại. Bào tử kín phần lớn hình elip, 6-10 x 5-8 μ m. Bào tử áo có nhiều trên các sợi nấm khí sinh, trên cả cuống nang, hình cầu, hình trứng, v.v., phần lớn 10 - 20 μ m đường kính, không màu hoặc màu vàng, nhẵn. Tạo thành bào tử tiếp hợp (hiếm). Phân lập từ bánh men rượu cổ truyền và một số sản phẩm khác ở Việt Nam (hình 3.1).

Bảng 3.1. Khoa định loại loài *Mucor mucedo* và các loài lân cận (Các loài có nang bào tử kín lớn, $d > 100 \mu m$)
(Theo M.A.A.Schipper, 1974)

1. Khuẩn lạc thường chỉ cao 1 mm	
. . . . <i>M.aligarcensis</i> B.S.et B.R.Mehrotra	
1. Khuẩn lạc cao hơn 1 mm	2
2. Bào tử kín hình cầu, gần cầu khi nuôi cấy nấm ở $20^{\circ}C$, hình elip khi nuôi cấy ở $10^{\circ}C$	
. . . . <i>M.strictus</i> Hagem	
2. Hình dạng của bào tử kín không thay đổi với nhiệt độ nuôi cấy nấm . . .	3
3. Bào tử kín hình cầu, gần cầu, 4 - 5 μm đường kính	
. . . . <i>M.minutus</i> (Baijal et B.S.Mehrotra) Schipper.	
3. Bào tử kín lớn hơn, thường hình elip	4
4. Trụ nang hình trứng hay hình nón	5
4. Trụ nang hình trứng, elip hoặc hình quả lê	6
5. Nang bào tử kín tới 400 μm đường kính, chiều dài bào tử kín trung bình 25 μm	
. . . . <i>M.plasmatiscus</i> v.Tiegh.	
5. Nang bào tử kín tới 200 μm đường kính, bào tử kín thường dài 7.5 - 10.0 μm . Loài chịu lạnh	
. . . . <i>M.psychrophilus</i> Milko	
6. Loại cuống nang to không phân nhánh ở phần ngọn, trụ nang hình trứng, elip hoặc hình quả lê	7
6. Loại cuống nang to phân nhánh hợp trục, trụ nang hình trứng rõ rệt	8
7. Mọc nhanh trên môi trường thạch cao men bia, bào tử kín thường hình elip, dài tới 10 μm	
. . . . <i>M.piriformis</i> Fischer	
7. Mọc kém trên môi trường thạch cao men bia, nang bào tử kín hình trụ elip, dài tới 14 μm	
. . . . <i>M.mucedo</i> L. ex Fr.	

8. Nuôi cấy trong tối, khuẩn lạc màu xám gio, thường có nhiều cuống nang ngắn
M. saturninus Hagem
8. Nuôi cấy trong tối, khuẩn lạc màu nâu da bò, rất ít cuống nang ngắn
M. flavus Bainier

Bảng 3.2. Khóa định loại các loài *Mucor racemosus* và các loài lân cận
(Các loài có nang bào tử kín < 100 μ m đường kính)
(Theo M.A.A.Schipper, 1976)

1. Cuống nang phân nhánh hợp trục. Trụ nang hình elip, hình trứng hoặc cầu. Bào tử kín elip hay hình cầu 4 - 6 μ m đường kính, nhẵn. Hầu như không có bào tử áo ở cuống nang
M. bainieri Mehrotra et Baijal
M. ramississimus Samutsevitsh
M. zonatus Milko
M. circinelloides v.Tiegh. f.circinelloides
M. circinelloides flusitanicus (Bruderlein) Schipper
(= *M. lusitanicus* Bruderlein)
M. circinelloides f.griseo-cyanus (Hagem) Schipper (= *M. griseo-cyanus* Hagem)
M. circinelloides Janssenii (Lendner) Schipper (= *M. Janssenii* Lendener)
1. Cuống nang phân nhánh hợp trục, hợp trục không đều và đơn trục. Trụ nang elip với đáy cắt phẳng, hình trứng hay gần cầu. Bào tử kín elip rộng hoặc hình cầu 8 - 10 μ m đường kính, nhẵn hoặc có nốt sần. Bào tử áo có ít hoặc nhiều trên cuống nang 2
2. Cuống nang phân nhánh hợp trục nhiều lần. Các nhánh dài mọc cách nang bào tử kín tạo thành trước một quãng ngắn
M. fuscus Bainier
2. Cuống nang phân nhánh hợp trục không đều hoặc đơn trục 3
3. Bào tử kín hình cầu, gần cầu, màu nâu, mặt ngoài có nhiều chấm. Rất ít bào tử áo trên cuống nang
M. plumbeus Bon.
3. Bào tử kín hình gần cầu hoặc elip rộng, màu xám, nhẵn. Cuống nang có nhiều bào tử áo 4
4. Phần lớn bào tử kín hình cầu, gần cầu
M. racemosus Fres.*Isphaerosporus* (Hagem) Schipper.
(= *Msphaerosporus* Hagem)

5. Trụ nang cao tới 50 μm hoặc hơn. Các nhánh (đơn trục) ngắn . . .

. . . *M.racemosus racemosus* Fres.

(= *M.racemosus* Fres.)

5. Trụ nang cao tới 20 μm , hiếm khi cao tới 40 μm . Các nhánh (đơn trục) dài . . .

. . . *M.racemosus chibinensis* (Neophytova) Schipper

(= *M. chibinensis* Neophytova)

Chi *Rhizopus* Ehrenb. ex Cda.

Chi *Rhizopus* có khoảng 10 loài phân bố rộng rãi, đặc trưng bởi hệ sợi nấm có đoạn sợi nấm bò và rễ giả như trường hợp chi *Absidia*, nhưng các nang bào tử kín ở chi *Rhizopus* mọc ở đầu mút các đoạn sợi nấm bò, đối diện với rễ giả.

Một số loài của chi *Rhizopus* được dùng trong công nghệ biến đổi sinh học và trong công nghệ enzym. *Rh.arrhizus* biến đổi testosterone và digitoxigenin lần lượt thành 6 β -hydroxytestosterone và 7 β -hydroxytestosterone. *Rh.stolonifer* cũng thực hiện các phản ứng hydroxy hóa tương tự, biến đổi progesteron thành 11 α -hydroxytestosterone, v.v. Các loài *Rh.taiwanensis*, *Rh.japonicus* phân giải tinh bột. Nhiều loài khác thuộc chi nấm này có α -amylaza hoặc glucoamylaza, hoặc cả 2 loại enzym thủy phân tinh bột này. Một hướng nghiên cứu lên men rượu hiện nay là sử dụng chủng vi sinh vật vừa có gen mã hóa amylaza, vừa có các gen mã hóa lên men rượu ethylic. Gen mã hóa glucoamylaza của loài *Rh.oryzae* đã được dùng để chuyển vào tế bào loài nấm men bia (*Saccharomyces cerevisiae*) và tạo được các tế bào nấm men bia có thể chuyển hóa trực tiếp tinh bột sống thành rượu ethylic (A.Toshihito và Cs., 1989).

Ở Việt Nam, một số chủng của chi *Rhizopus* đã được tuyển chọn để sản xuất sinh khối phục vụ chăn nuôi (D. N. Bích và Ct., 1981). Một chủng (chung TH3.85) thuộc loài *Rh.chinensis* có hoạt tính phân giải cellulose đã được phân lập từ một chế phẩm vi sinh vật dùng để chế biến rác thành thức ăn chăn nuôi của nước ngoài, đã được nghiên cứu dùng để xử lý rác ở Hà Nội (N.B.Ngà và Cs., 1984). Các loài *Rh.artocarp*i, *Rh.stolonifer*, *Rh.oryzae* có ở nước ta (B.X.Dồng, 1998).

Rhizopus arrhizus Fischer - Rễ giả ngắn, nhỏ, màu nhạt. Nhiều cuống nang mọc từ các đoạn sợi nấm phồng to không có rễ giả. Nang bào tử kín hình cầu, 100 - 200 μm đường kính. Bào tử kín nhiều hình dạng, dài 5 - 7 μm .

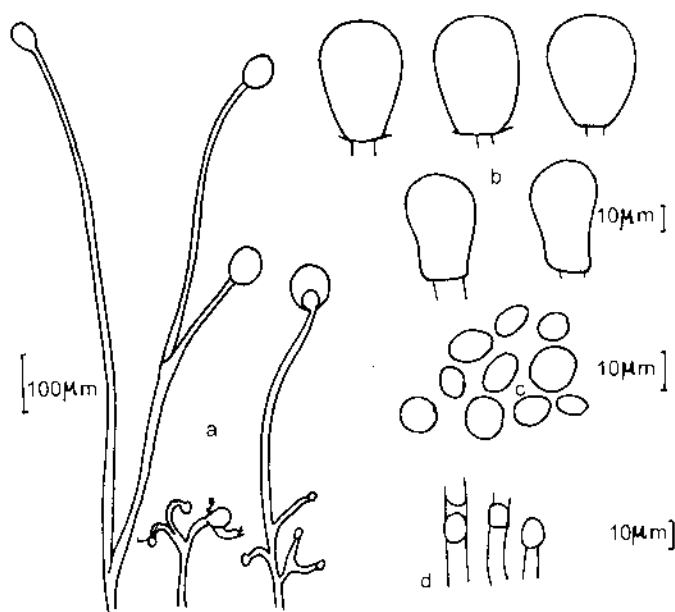
Rhizopus oryzae Went et P. Geerlings - Bào tử kín 7 - 9 μm trục lớn, nhỏ hơn bào tử kín của *Rh. stolonifer*, có khả năng sinh trưởng ở 37 - 40°C. Các đặc điểm khác giống như ở loài *Rh. stolonifer* dưới đây.

Rhizopus stolonifer (Ehrenb. ex Fr.) Lindner (Các tài liệu trước đây ở nước ta vẫn dùng tên đồng nghĩa của loài là *Rh. nigricans* Ehrenb.). Trên môi trường thạch khoai tây và nhiều môi trường khác, khuẩn lạc phát triển đầy hộp lồng sau vài ngày. Cuống nang thẳng, đơn độc hay thường thành cụm, dài 1 - 3 mm, rộng 15 - 25 μm . Rễ già màu nâu. Nang bào tử kín hình cầu, trắng sáng sau chuyển thành đen khi già, 120 - 200 μm đường kính. Bào tử kín có nhiều hình dạng (trứng, nhiều cạnh, gần cầu), 10 - 15 μm trục lớn, có các khía dọc ở mặt ngoài (hình 3.2).

Chi *Thamnidium* Link ex Wallroth

Chi *Thamnidium* đặc trưng bởi sự có mặt của 2 loại nang bào tử kín : nang bào tử kín (sporangium) có kích thước lớn và chứa nhiều bào tử kín, ở ngọn cuống ngang, các nang bào tử kín nhỏ (sporangiolum sporangiole) chỉ có 2 - 12 bào tử kín, ở ngọn các nhánh ngang thường ở phần gần gốc của cuống nang.

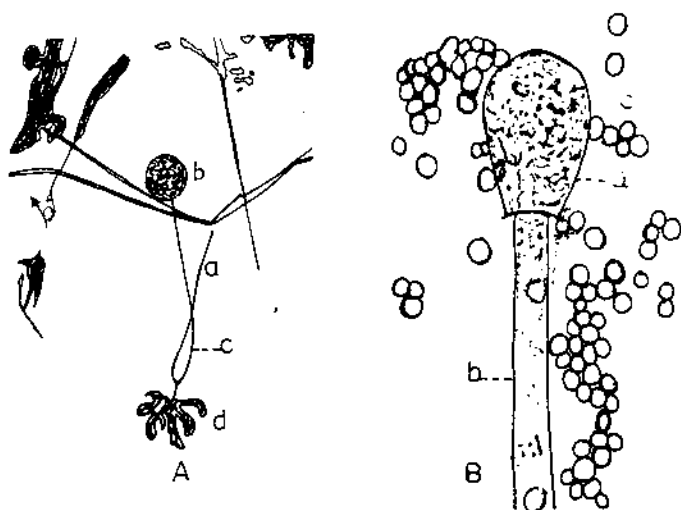
Loài *T. elegans* có hoạt tính hydroxy hóa ở các vị trí 11 α - và 11 β - của các hợp chất steroid.



Hình 3.1. *Mucor racemosus* f. *racemosus* Fres (= *M. racemosus* Fres.)

a. Nang bào tử kín, b. Trụ nang, c. Bào tử kín, d. Bào tử ảo.

Thamnidium elegans Link ex Fr. - Mọc tốt trên nhiều loại môi trường, khuẩn lạc có mặt dạng hạt, màu xám, cao 2 - 3 mm với chùm các nang bào tử kín nhỏ, sau cuống nang phát triển, dài 10 mm hoặc hơn, nang ở ngọn nang bào tử kín, màu nâu. Bào tử kín ở nang bào tử kín và nang bào tử kín nhỏ giống nhau, hình trứng, hình hạt đậu, 8 - 12 μ m trục lớn. Ít gặp, thường hay gặp nhất trên thịt bị nhiễm mốc trong kho lạnh.



Hình 3.2. *Rhizopus stolonifer* (Lhrenh. ex Fr.) Lindner

- A. Nang bào tử kín. a- Đoạn sợi nấm bò, b- Nang bào tử kín, c- Cuống nang, d- Rễ giả (x50)
 B. Trụ nang. a- Trụ nang, b- Cuống nang, c- Bào tử kín (x500)

2. NẤM BẮT TOÀN DÙNG TRONG CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Ngành phụ Nấm bắt toàn (Deuteromycotina) có khoảng 2600 chi với 15.000 loài (Hawksworth và ct., 1995), trong đó có một số loài được dùng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất những hợp chất sinh học.

Ở các loài Nấm bắt toàn, các đặc điểm phân loại bao gồm các đặc điểm phát sinh hoặc hình thái của bào tử trần, bộ máy mang bào tử trần và các đặc điểm hình thái của hệ sợi nấm. Như chúng ta biết, bào tử trần là loại bào tử vô tính, không phải là kết quả của các quá trình hữu tính, nên không mang đầy đủ các đặc điểm phát sinh chủng loại. Mặt khác, càng ngày người ta càng tìm thấy cơ quan sinh sản hữu tính (bào tử túi, bào tử đám và các cơ quan tương ứng) của nhiều loài Nấm

bất toàn, và khi đó các loài này với các đặc điểm của các cơ quan sinh sản hữu tính và cơ quan sinh sản vô tính được xếp vào các nhóm phân loại thích hợp trong ngành phụ Nấm túi (Ascomycotina) hay ngành phụ Nấm đảm (Basidiomycotina). Tuy nhiên cho đến nay Luật quốc tế về danh pháp vẫn công nhận tên loài của các loài Nấm bất toàn với các đặc điểm chỉ của cơ quan sinh sản vô tính, tức là của bào tử trần và cơ quan mang bào tử đó. Như vậy một loài nấm có thể có 2 tên và 2 vị trí phân loại khác nhau : một là tên loài Nấm túi hoặc Nấm đảm và đương nhiên có vị trí phân loại trong ngành phụ Nấm túi hoặc ngành phụ Nấm đảm và một là tên loài Nấm bất toàn và cũng có vị trí phân loại trong ngành phụ Nấm bất toàn.

Vì loài và chi Nấm bất toàn, như vừa nói, không phải là loài và chi thực sự (chỉ là một giai đoạn trong chu trình sống của loài : giai đoạn có bào tử trần), một số tác giả không coi nhóm phân loại Nấm bất toàn là một nhóm phân loại chính thức trong hệ thống phân loại hệ thống sinh sản của Nấm (Kendrick 1992, Hawkworth và Ct., 1995, v.v.). Có lẽ vì truyền thống và ý nghĩa thực tiễn, nhiều tác giả khác vẫn giữ nhóm phân loại Nấm bất toàn trong hệ thống phân loại Nấm (Bessey 1950, Ainsworth và ct, 1973, Moore 1994, v.v.).

Để định loại Nấm bất toàn, hiện nay có 2 hệ thống : hệ thống phân loại hình thái (Saccardo, 1880, 1886) và hệ thống phân loại trước hết căn cứ vào đặc điểm phát sinh của bào tử trần.

Trong hệ thống phân loại hình thái, các nhóm phân loại cùng bậc phân cách nhau hoàn toàn bởi các đặc điểm hình thái của bào tử trần, bộ máy bào tử trần, hệ sợi nấm. Lớp Nấm bất toàn (Deuteromycetes, Fungi imperfecti) trong hệ thống Saccardo gồm 4 bộ :

Bộ Nấm túi giả (bộ Túi khí khuẩn, Sphaeropsidales) gồm các Nấm bất toàn có túi giả (pycnidium) và có 1 họ (Sphaeropsidaceae) gồm các loài ký sinh trên thực vật.

Bộ Nấm đĩa giả (bộ Nấm đốm nâu, Melanconiales) gồm các Nấm bất toàn có đĩa giả (acervulus) và cũng có 1 họ (Melanconiaceae) gồm các loài ký sinh trên thực vật.

Bộ Nấm bông (Moniliales, Hyphomycetales) gồm các Nấm bất toàn không có túi giả hoặc đĩa giả, nghĩa là các giả bào tử trần (conidiophore) mọc từ các sợi nấm không phân hoá, các sợi nấm không tập hợp thành các bộ phận đặc biệt của hệ sợi nấm, gồm các loài vi nấm hoại sinh hoặc ký sinh.

Bộ Nấm bất thụ (*Mycetalia sterilia*, *Agonomycetales*) gồm các Nấm bất toàn không có một dạng bào tử thực nào kể cả bào tử trần.

Trong 4 bộ nấm trên, bộ Nấm bông có số loài đông nhất (khoảng 7500 loài) và được chia làm 4 họ. Họ Nấm bông (*Moniliaceae*) có sợi nấm, giá bào tử trần và bào tử trần không màu hoặc màu nhạt, giá bào tử trần rời nhau. Họ Nấm bông sẫm (*Dematiaceae*) cũng có giá bào tử trần rời nhau, nhưng sợi nấm hoặc giá bào tử trần hoặc bào tử trần hoặc cả 3 thành phần này có màu sẫm. Họ Nấm bó (*Stilbaceae*) có các giá bào tử trần dài, hợp lại thành bó giá (*synnema*, *coremium*). Họ Nấm đốm (*Tuberculariaceae*) có các giá bào tử trần ngắn, hợp lại thành đốm giá (*sporodochium*).

Dựa vào số lượng vách ngăn và hình dạng bào tử trần mỗi họ được chia làm các tổ chi (hoặc họ phụ) như : tổ chi *Amerosporae* có bào tử trần không ngăn vách, tổ chi *Didymosporae* có bào tử trần 1 vách ngang, tổ chi *Phragmosporae* có bào tử trần có 2 hoặc trên 2 vách ngang, tổ chi *Dictyosporae* có bào tử trần có vách ngang và vách dọc, tổ chi *Staurosporae* có bào tử trần hình sao, tổ chi *Helicosporae* có bào tử trần hình xoắn ốc. Mỗi tổ chi lại được chia làm 2 phân tổ : phân tổ *Micronemeae* có giá bào tử trần không khác sợi nấm về hình thái (kích thước, màu sắc, v.v.), phân tổ *Macronemeae* có giá bào tử trần phân biệt hẳn về hình thái với sợi nấm.

Trong từng tổ chi hay phân tổ, các chi Nấm bất toàn ngăn cách với nhau bởi một số đặc điểm hình thái của bào tử trần, giá bào tử trần và hệ sợi nấm, bởi cách sắp xếp của bào tử trần.

Hệ thống Saccardo trước đây và hiện nay giúp cho việc định loại Nấm bất toàn dễ dàng, nhanh chóng, tuy nhiên vì dùng một số dấu hiệu phân loại kém chính xác, nên thiếu độ tin cậy cần thiết ở một số nhóm phân loại.

Hệ thống phân loại phát sinh bào tử trần gọi tắt là hệ thống phát sinh hoàn chỉnh nhất từ hệ thống của Hughes (1953) đối với nhóm *Hyphomycetes* của Nấm bất toàn.

Trong hệ thống phân loại phát sinh, trừ loài và chi là những nhóm phân loại được thành lập với nghĩa là những giai đoạn vô tính (giai đoạn bào tử trần, *status conid.*) của các nhóm phân loại tương ứng ở Nấm túi và Nấm đảm, nhiều nhà nấm học không dùng các đơn vị phân loại chính thức trên chỉ cho các nhóm phân loại khác Nấm bất toàn.

(Deuteromycetes, Deuteromycotina, Deuteromycota, Deuteromycetia, Fungi imperfecti) được chia làm 3 nhóm tương đương với 3 lớp :

Nhóm Hyphomycetes gồm các Nấm bất toàn không có túi giá và đĩa giá.

Nhóm Coelomycetes gồm những Nấm bất toàn có túi giá hoặc đĩa giá.

Nhóm Agonomycetes gồm những Nấm bất toàn không có bào tử thực (bào tử trần).

Nấm Hyphomycetes chia thành các tổ chi (tương đương với họ) (Hughes 1953, Tubaki 1958, Barron 1969), hoặc thành họ (Subramanian 1962), hoặc thành nhóm phụ sau đó là các tổ chi (B.X.Đồng, 1972) (bảng 3.3).

Bảng 3.3. Giải thuyết tiến hóa các tip phát sinh của bào tử trần và các nhóm phân loại tương ứng của Hyphomycetes
(B.X.Đồng, 1972) (Mũi tên chỉ hướng tiến hóa)

Đặc điểm phát sinh bào tử trần	Bào tử trần tạo thành do sự cắt đoạn các sợi nấm (= những yếu tố có sẵn)	Bào tử trần do các sợi nấm và cả của bản thân các bào tử trần tạo thành. Về nguyên tắc, bào tử trần vừa có chức năng phát tán, vừa có chức năng của một tế bào sinh bào tử trần. Bào tử trần đơn độc hoặc thành chuỗi hướng ngọn (acropetal)*	Bào tử trần chỉ do sợi nấm (tế bào sinh bào tử trần phát sinh từ sợi nấm) tạo thành. Bào tử trần hoàn toàn phân hóa làm nhiệm vụ phát tán. Bào tử trần đơn độc hoặc thành chuỗi hướng gốc (basipetal)*
Tip cơ bản bào tử trần	Arthroconidi	Proconidi	Euconidi

* Chú thích : Chuỗi hướng ngọn : Các bào tử trần càng về phía ngọn chuỗi, càng non (chuỗi gốc già)

Chuỗi hướng gốc : Các bào tử trần càng về phía gốc chuỗi, càng non (chuỗi gốc non).

Bảng 3.3 (tiếp)

Tip bào tử trần và các tổ chi tương ứng	arthroconidi ARTHROCONIDIAE tổ chi VII, Hughes 1953)	blastoconidi BLASTOCONIDIAE (tổ chi IA, VIII, Hughes 1953 botryo-blastoconidi BOTRYO- BLASTOCONIDIAE (tổ chi IB, Hughes 1953) sympoduloconidi SYMPODULOCONIDIAE (tổ chi II, Hughes 1953) poroconidi POROCONIDIAE (tổ chi VI, Hughes 1953)	aleurioconidi ALEURIOCONIDIAE (tổ chi III, Hughes 1953) Meristem-aleurioconidi MERISTEM- ALEURIOCONIDIAE (tổ chi V, Hughes 1953) phialoconidi PHIALOCONIDIAE (tổ chi IV, Hughes 1953)
Các phân nhóm của nhóm Hyphomycetes	ARTHROHYPHOMYCETIDAE	BLASTOHYPHOYCETIDAE	EUHYPHOMYCETIDAE

Theo bảng 3.3, mức độ phân hóa của bào tử trần càng ngày càng cao từ tip cơ bản arthroconidi (bào tử trần được tạo thành từ yếu tố có sẵn, nghĩa là bằng cách phân đoạn các sợi nấm), đến tip cơ bản proconidi (bào tử trần là các yếu tố mới được tạo thành, từ các tế bào sinh bào tử trần của hệ sợi nấm, nhưng các bào tử trần này chưa phân hóa hoàn toàn, do đó vừa có chức năng phát tán, vừa có chức năng của tế bào sinh bào tử trần của sợi nấm), và cuối cùng là euconidi (tip cơ bản có mức độ phân hóa cao nhất, chỉ có chức năng duy nhất là chức năng phát tán của cơ thể nấm). Tương ứng với 3 tip cơ bản trên của bào tử trần của nhóm Hyphomycetes là 3 phân nhóm : Arthrohyphomycetidae, Blastohyphomycetidae và Euhyphomycetidae với các tổ chi trong từng phân nhóm. Các chi Nấm bất toàn thuộc nhóm Hyphomycetes được tập hợp trong các tổ chi và các phân nhóm này (các bảng 3.4, 3.5, 3.6).

**Bảng 3.4. Khóa định loại các chi Nấm bất toàn thuộc phân nhóm
Arthrohyphomycetidae (nhóm Hyphomycetes) có ở Việt Nam (B.X.Đông, 1984)**

1. Giá bào tử trần không phân hóa hình thái (không phân biệt với sợi nấm). Bào tử trần không màu, không ngăn vách, nhẵn, thuộc tip arthroconidi . . .
Geotrichum Link ex Pers.
2. Giá bào tử trần phân hóa hình thái rõ rệt. Bào tử trần không màu, màu vàng da cam khi tu lại thành khối, không ngăn vách, trong cùng một chuỗi ngắn cách nhau bởi các đoạn nối hình trụ . . .
Amblyosporium Fres.

**Bảng 3.5. Khóa định loại các chi Nấm bất toàn thuộc phân nhóm
Blastohyphomycetidae (nhóm Hyphomycetes) có ở Việt Nam (B.X.Đông, 1984)**

1. Bào tử trần không tạo thành qua các lỗ nhỏ trên vách của các tế bào sinh bào tử trần 2
1. Bào tử trần tạo thành qua lỗ nhỏ trên vách của các tế bào sinh bào tử trần (tổ chi Poroconidiace) 13
2. Bào tử trần đơn độc, tạo thành đồng thời trên các gai nhỏ ở vách ngoài của các tế bào sinh bào tử trần (tổ chi Botryoblastoconidiace) 3
2. Bào tử trần tạo thành chuỗi hướng ngọn (tổ chi Blastoconidiace) 5
3. Giá bào tử trần tiếp tục tăng trưởng qua đỉnh cũ. Nhiều bào tử trần đơn độc trên bông hình cầu ở đỉnh giá và ở một số đốt trên giá Bào tử trần không ngăn vách . . .
Gonatobotryum Sacc.
3. Giá bào tử trần ngừng tăng trưởng khi bào tử trần đã được tạo thành trên tế bào sinh bào tử trần ở đỉnh 4
4. Giá bào tử trần phân nhánh không đều nhiều lần. Tế bào sinh bào tử trần phồng thành bông hình cầu ở đỉnh các nhánh. Bào tử trần không ngăn vách . . .
Botrytis Mich. ex Fr.
4. Giá bào tử trần phân nhánh theo kiểu chia đôi nhiều lần ở phần ngọn. Tế bào sinh bào tử trần là các nhánh không phồng thành bông. Bào tử trần không ngăn vách . . .
Chromelosporium Cda.
5. Giá bào tử trần và tế bào sinh bào tử trần không phân hóa hình thái. Bào tử trần không ngăn vách, thành chuỗi ngắn . . .
Auricubasidium Viala et Boyer
5. Giá bào tử trần hay tế bào sinh bào tử trần phân hóa ít hay nhiều 6

6. Bào tử trần không màu hoặc màu nhạt 7
6. Bào tử trần màu sẫm 8
7. Giá bào tử trần màu sẫm, phân nhánh theo kiểu *Penicillium*. Bào tử trần không ngắn vách, nhầy, thành khối cầu . . .
Haplographium Berk. et Br.
7. Giá bào tử trần không màu, phân nhánh không đều. Bào tử trần không ngắn vách, thành chuỗi . . .
Monilia Pers. emend Sacc.
8. Bào tử trần không ngắn vách 9
8. Bào tử trần bao giờ cũng ngắn vách 11
9. Tế bào sinh bào tử trần không phồng to thành hình cầu, phân nhánh ở đỉnh hoặc không. Bào tử trần không ngắn vách hoặc có vách ngang . . .
Cladosporium Link. ex. Fr.
9. Tế bào sinh bào tử trần (ở đỉnh giá bào tử trần) hình cầu 10
10. Tế bào sinh bào tử trần là đỉnh giá phồng to, tạo thành 2 - 3 chuỗi bào tử trần ở phần đỉnh. Sợi cứng (seta) màu nâu . . .
Lacellinopsis Subramanian
10. Nhiều tế bào sinh bào tử trần trên đỉnh giá phồng to, mỗi tế bào tạo thành một chuỗi bào tử trần. Không có sợi cứng . . .
Periconia Tode ex Fr.
11. Bào tử trần thường chỉ có một vách ngang. Giá bào tử trần không phân nhánh . . .
Bispora Cda.
11. Bào tử trần thường có nhiều vách ngang 12
12. Bào tử trần có một hoặc nhiều vách ngang. Mỗi bào tử trần trong chuỗi có một phần phụ hình cầu ở gốc . . .
Balusandhika Subramanian.
12. Bào tử trần thường có 2 vách ngang trở lên. Các bào tử trần trong chuỗi liên nhau . . .
Septonema Cda.
13. Bào tử trần có vách ngang 14
13. Bào tử trần có vách ngang và vách dọc 21
14. Bào tử trần thường chỉ có một vách ngang. Giá bào tử trần thường phân nhánh . . .
Diphlococcum Grove
14. Bào tử trần có nhiều vách ngang 15
15. Bào tử trần thành chuỗi 16

15. Bào tử trần đơn độc hoặc thành chuỗi ngắn 18
16. Chuỗi bào tử trần gãy thành các phần không đều. Giá bào tử trần thường không phân nhánh . . .
. . . . *Torula* Pers.ex Fr.
16. Mỗi bào tử trần rời khỏi chuỗi riêng biệt. Giá bào tử trần thường phân nhánh 17
17. Giá bào tử trần ngừng tăng trưởng khi đã tạo thành bào tử trần ở đỉnh. Bào tử trần trưởng thành từ gần gốc đến gần đỉnh . . .
. . . . *Dendryphion* Wallroth
17. Giá bào tử trần tăng trưởng theo kiểu hợp trục. Bào tử trần trưởng thành đồng thời ở tất cả các ngăn . . .
. . . . *Dendryphiella* Bubak et Ranojevic
18. Giá bào tử trần ngừng tăng trưởng khi đã tạo thành bào tử trần ở đỉnh. Bào tử trần hình trụ hoặc gần chùy . . .
. . . . *Helminthosporium* Link ex Fr.
18. Giá bào tử trần tăng trưởng theo kiểu hợp trục 19
19. Bào tử trần hình trụ tròn đầu, thẳng hoặc hơi cong, vách dày, ngăn giữa thường lớn nhất . . .
. . . . *Drechslera* Ito
19. Bào tử trần hình thoi, hình gần chùy, hình gần cầu 20
20. Bào tử trần thường có một ngăn cong, gần đỉnh hoặc gần gốc hoặc cả hai có màu nhạt rõ rệt hơn các ngăn khác . . .
. . . . *Curvularia* Boedijn
20. Bào tử trần không như trên 21
21. Bào tử trần có sẹo lồi lên rõ rệt, màu nâu sẫm ở gốc . . .
. . . . *Exosporium* Link ex Schlechtendal
21. Bào tử trần không có sẹo lồi lên rõ rệt 22
22. Bào tử trần hình trứng hoặc hình chùy, có đỉnh kéo dài thành phần phụ hình trụ hẹp . . .
. . . . *Altemaria* Nees ex Wallroth
22. Bào tử trần hình gần cầu, đỉnh tròn 23
23. Giá bào tử trần tăng trưởng qua đỉnh cũ . . .
. . . . *Stemphylium* Wallroth
23. Giá bào tử trần tăng trưởng theo kiểu hợp trục . . .
. . . . *Ustiladium* Preuss

Bào tử trần hoàn toàn không ngăn vách, cong hình lưỡi liềm. Giá bào tử trần không ngăn vách	
. . . . <i>Idriella</i> Nelson et Wilhelm	
Bào tử trần đôi khi có vách ngang, hình elip thẳng. Giá bào tử trần ngăn vách	
. . . . <i>Veronaca</i> Cif. et Mont. (in part)	
1. Bào tử trần có một vách ngang	13
2. Bào tử trần có nhiều vách ngang	14
3. Bào tử trần cong, không màu. Có sợi cứng	
. . . . <i>Neta</i> Shearer et Crane	
4. Bào tử trần thẳng, màu sẫm. Không có sợi cứng	
. . . . <i>Cordana</i> Preuss	
5. Bào tử trần cong, không màu. Giá bào tử trần màu nâu	
. . . . <i>Pleurothecium</i> Hohnel	
6. Bào tử trần thẳng	15
7. Bào tử trần không màu, đơn độc dọc theo phần ngọn nhánh của giá bào tử trần	
. . . . <i>Veronaca</i> Cif. et Mont. (in part)	
8. Bào tử trần màu nâu nhạt, đơn độc, sát nhau ở phần đỉnh giá bào tử trần, trên các gai nhỏ	
. . . . <i>Pleuraphragmium</i> Costantin	
9. Bào tử trần đơn độc (tổ chi <i>Aleuroconidiace</i>)	17
10. Bào tử trần thành chuỗi hoặc khối hình cầu ở miệng tế bào sinh bào tử trần (tổ chi <i>Phialoconidiace</i> , tổ chi <i>Annelloconidiace</i>)	39
11. Bào tử trần hình xoắn ốc	
. . . . <i>Helicosporium</i> C.G.Nees	
12. Bào tử trần có hình dạng khác hình xoắn ốc	18
13. Giá bào tử trần và bào tử trần không màu (màu nhạt)	19
14. Giá bào tử trần hoặc bào tử trần hoặc cả hai có màu sẫm	23
15. Bào tử trần không ngăn vách	20
16. Bào tử trần ngăn vách	21
17. Giá bào tử trần không phân hóa hình thái, có thể có đồng thời bào tử trần thuộc tip <i>arthroconidi</i>	
. . . . <i>Chrysosporium</i> Cda.	
18. Giá bào tử trần phân hóa hình thái, chỉ có bào tử trần thuộc tip <i>aleurioconidi</i>	
. . . . <i>Sporotrichum</i> Link ex Fr.	

21. Bào tử trần hình gần trụ, có 0 - 2 vách ngang, không có ngăn nào hình cầu *Scolecobasidium* Abbott
21. Bào tử trần có 1 vách ngang, ngăn đỉnh hình cầu 22
22. Bào tử trần có ngăn đỉnh hình cầu, ngăn gốc hình nửa cầu
. *Mycogone* Link ex Chevalier
22. Bào tử trần có ngăn đỉnh hình gần cầu (vách ngang thẳng), ngăn gốc hình nón
. *Chlamydomyces* Bainier
23. Bào tử trần không ngăn vách 24
23. Bào tử trần ngăn vách 32
24. Bào tử trần hình cầu 25
24. Bào tử trần không có hình dạng trên 29
25. Giá bào tử trần có phần ngọn (tế bào sinh bào tử trần) phồng to hình trứng. Bào tử trần màu đen
. *Nigrospora* Zimmermann
25. Giá bào tử trần không như trên 26
26. Bào tử trần có vách dày đặc biệt và lỗ nảy sợi lớn
. *Gilmaniella* Barron
26. Bào tử trần không như trên 27
27. Giá bào tử trần phân nhánh không đều. Có sợi cứng
. *Botryotrichum* Sacc. et Marchal
27. Giá bào tử trần không phân nhánh 28
28. Bào tử trần bao giờ cũng màu sẫm và có nốt sần. Chịu nhiệt hoặc ưa nhiệt
. *Thermomyces* Tsiklinsky
28. Bào tử trần có gai hoặc nhẵn. Không chịu nhiệt hoặc ưa nhiệt
. *Humicola* Traaen
29. Giá bào tử trần tăng trưởng ở gốc, các vách ngang màu sẫm tối. Bào tử trần có rãnh nảy sợi màu nhạt
. *Arthrinium* Kunze ex Fr.
29. Giá bào tử trần không như trên 30
30. Phần ngọn giá bào tử trần (tế bào sinh bào tử trần) tăng trưởng qua đỉnh, có khuyết sẹo
. *Acrogenospora* MB Ellis
30. Tế bào sinh bào tử trần không như trên 31

31. Bào tử trần có phần gốc hình cầu, phần đỉnh thon nhỏ và ngắn, sát nhau thành cụm ở phần đỉnh của giá bào tử trần
Echinobotryum Cda.
31. Bào tử trần hình trứng với rãnh nảy sợi lớn, thành cụm ở phần đỉnh hoặc ở dọc thân giá bào tử trần
Mammaria Cesati
32. Bào tử trần có vách ngang 33
32. Bào tử trần có vách ngang và vách dọc 37
33. Bào tử trần cấu tạo bởi các nhánh ngắn vách ngang, các nhánh sát nhau thành cụm
Dictyosporium Cda.
33. Bào tử trần không nhu trên 34
34. Bào tử trần có vách rất dày, hình elip. Giá bào tử trần ngắn, không phân hóa hình thái
Murogenella Goos et Morris
34. Bào tử trần có vách dày bình thường 35
35. Bào tử trần có một vách ngang
Balanium Wallroth
35. Bào tử trần có nhiều vách ngang 36
36. Giá bào tử trần đơn độc, ngắn hoặc không có
Trichocladium Harz
36. Giá bào tử trần dài, tụ hợp thành bó giá
Nyctalospora Morris
37. Bào tử trần hình cầu. Bào tử trần ngắn, thành cụm
Epicoccum Link ex Schlechtendal
37. Bào tử trần khác hình cầu 38
38. Giá bào tử trần là các nhánh ngang, ngắn của sợi nấm
Pinthomyces Berk. et Br.
38. Giá bào tử trần dài, phân hình thái rõ rệt, tăng trưởng qua đỉnh
Acrodictys MBellis
39. Giá bào tử trần tụ hợp thành bó giá, thành cụm hoặc thành từng lớp rõ rệt 40
39. Giá bào tử trần phần lớn đơn độc 43
40. Giá bào tử trần thành bó giá 41
40. Giá bào tử trần thành cụm hoặc thành lớp 42
41. Bó giá không có lớp sợi bắt thụ bao bọc, phần ngọn giá phân nhánh theo

- kiểu *Penicillium*. Bào tử trần (không ngăn vách) màu sẫm
- *Doratomyces* Cda.
41. Bó giá (cả phần thân và phần ngọn) có các sợi bất thụ bao bọc, phần ngọn giá phân nhánh ở đỉnh nhiều lần. Bào tử trần (không ngăn vách) không màu hoặc màu nhạt
- *Heterocephalum* Thaxter.
42. Giá bào tử trần thành từng lớp, ngăn và không sát với nhau. Bào tử trần (không ngăn vách) không màu, thành chuỗi
- *Metarhizium* Sorokin
42. Giá bào tử trần thành cụm, dài, sát với nhau. Bào tử trần (không ngăn vách) màu nhạt hoặc sẫm, tụ họp thành khối cầu
- *Myrothecium* Tode ex Fr.
43. Tế bào sinh bào tử trần có các khuyết sẹo 44
43. Tế bào sinh bào tử trần không có khuyết sẹo 45
44. Giá bào tử trần màu sẫm. Bào tử trần (không ngăn vách) không màu, tụ họp thành khối nhày
- *Leptographium* Lagerberg et Melin
44. Giá bào tử trần và bào tử trần không màu. Bào tử trần (không ngăn vách) thành chuỗi
- *Scopulariopsis* Bainier
45. Giá bào tử trần và bào tử trần không màu (màu nhạt) 46
45. Giá bào tử trần hoặc bào tử trần hoặc cả hai màu sẫm 54
46. Bào tử trần không ngăn vách 47
46. Bào tử trần có vách ngang 53
47. Giá bào tử trần không phân nhánh. Tế bào sinh bào tử trần không thành cụm rõ rệt 48
47. Giá bào tử trần thường phân nhánh. Tế bào sinh bào tử trần thành cụm 50
48. Tế bào sinh bào tử trần phồng to ở phần giữa, thon nhỏ ở phần gốc và phần ngọn
- *Monocillium* Saksena
48. Tế bào sinh bào tử trần thon dần từ gốc đến đỉnh 49
49. Chuỗi bào tử trần không bền, không có mấu nối giữa các bào tử trần trong chuỗi
- *Acremonium* Link ex Fr.
49. Chuỗi bào tử trần bền, có mấu nối giữa các bào tử trần trong chuỗi
- *Sagenomiella* W.Gams
50. Thân giá bào tử trần không có nhánh, đỉnh giá phồng to 51

50. Thân giá bào tử trần có nhánh, đỉnh giá không phồng to 52
51. Bào tử trần khô, thành chuỗi dài. Giá bào tử trần phồng to thành bong ở đỉnh, trên mặt bong có các thể bình hoặc cuống thể bình mọc sát nhau
... Aspergillus Mich.ex Fr.
51. Bào tử trần tụ lại thành khối nhầy với các nhánh sợi bắt thụ bao bọc bên ngoài. Giá bào tử trần mang các nhánh cấp 1, cấp 2 và các thể bình ở đỉnh các nhánh cấp 2
... Glioccephalotrichum J.J.Ellis et Hesseltine
52. Thể bình có phần ngọn thon nhỏ, phần ngọn bao giờ cũng ngắn hơn phần gốc, xếp sát nhau thành cụm đặc trưng
... Penicillium Link ex Fr.
53. Bào tử trần cong hình lưỡi liềm. Có hoặc không bào tử trần nhỏ hình cầu, trứng elip
... Fusarium Link ex Fr.
53. Bào tử trần thẳng, hình trụ. Không có bào tử trần nhỏ
... Cyindrocapon Wollenweber
54. Bào tử trần không ngăn vách 55
54. Bào tử trần có vách ngang 62
55. Giá bào tử trần màu sẫm. Bào tử trần màu nhạt 56
55. Giá bào tử trần và bào tử trần màu sẫm 60
56. Ngọn giá bào tử trần biến đổi thành sợi cứng hoặc có sợi cứng riêng biệt 57
56. Hoàn toàn không có sợi cứng 58
57. Ngọn giá bào tử trần biến đổi thành sợi cứng. Tế bào sinh bào tử trần mọc thành cụm dọc thân giá. Bào tử trần thành khối nhỏ ở miệng thể bình
... Gonytrichum Nees et Nees ex Wallroth
57. Sợi cứng riêng biệt. Tế bào sinh bào tử trần đơn độc trên sợi nấm hoặc trên đỉnh giá bào tử trần. Bào tử trần 0 - 1 vách ngang, thành chuỗi
... Chaetochalara Sutton et Pirozynski
58. Giá bào tử trần tăng trưởng qua đỉnh cũ. Bào tử trần tụ hợp thành khối nhỏ ở miệng thể bình
... Chloridium Link ex Fr.
58. Giá bào tử trần ngừng tăng trưởng khi đã sinh bào tử trần 59
59. Bào tử trần ngoại sinh (hoặc nửa nội sinh), hình gần cầu. Thể bình ở đỉnh và dọc thân giá bào tử trần
... Angulimaya Subramanian et Lodha

59. Bào tử trần nội sinh rõ rệt, hình trụ. Thể bình đơn độc ở đỉnh giá bào tử trần

. *Chalara* (Cda.) Rabenh.

60. Bào tử trần nội sinh, hình nón cụt với đáy hình nhiều cạnh, thành chuỗi

. *Catenularia* Grove

60. Bào tử trần nửa nội sinh, hình trứng, tụ họp thành khối ở miệng thể bình 61

61. Thể bình thon đầu từ gốc đến đỉnh. Có bó sợi

. *Gliomastix* Guéguen

61. Thể bình phình to ở phần giữa, sau thon nhỏ đến đỉnh, có miệng gờ rõ rệt

. *Phialophora* Medlar

62. Giá bào tử trần không phân nhánh hoặc có ít nhánh dọc thân 63

62. Giá bào tử trần phân nhánh ở đỉnh 64

63. Thường có sợi cứng và thể bình kép. Bào tử trần (0-3 vách ngang, không màu), hình elip, cong

. *Codinaca* Maire

63. Không có sợi cứng. Thể bình đơn. Bào tử trần (0-3 vách ngang, không màu), hình trụ, thẳng

. *Cylindrotrichum* Bonorden

64. Giá bào tử trần phân nhánh không đều, mỗi nhánh có một thể bình ở đỉnh. Bào tử trần màu sẫm, cong, thành chuỗi gối lưng lên nhau

. *Fusariella* Sacc.

64. Giá bào tử trần phân nhánh theo kiểu *Penicillium*. Bào tử trần không màu, thẳng, thành chuỗi

. *Penicillifer* van Emden

Trong phạm vi chương này, chúng tôi chỉ trình bày các chi Nấm bất toàn dùng trong công nghệ sinh học đã có ứng dụng rộng rãi trong sản xuất.

Chi *ASPERGILLUS* Micheli ex Fries

Chi *Aspergillus* do Meicheli mô tả lần đầu tiên năm 1729, sau đó năm 1809, Link mô tả loài *Aspergillus glaucus* và loài Nấm túi *Eurotium herbariorum* phát hiện thấy trên cùng một tiêu bản mẫu cây khô. Fries (1832) chấp nhận chi nấm này của Micheli, như vậy theo Luật quốc tế về danh pháp thực vật (điều 13f), chỉ *Aspergillus* chính thức mang tên *Aspergillus* Micheli ex Fries. De Bary (1850) phát hiện giai đoạn bào tử trần của *Eurotium herbariorum* chính là *Aspergillus glaucus*. Cuối thế kỷ 19, một số công trình nghiên cứu cho biết một số sản phẩm lên men của một số loài thuộc chi *Aspergillus* là các acid hữu cơ như acid oxalic,

acid citric, v.v. và do đó chi *Aspergillus* được chú ý nghiên cứu cả về mặt hóa sinh, lên men vi sinh vật và cả về phân loại học. Wehmer ngoài các công trình nghiên cứu về hóa sinh, lên men các loài thuộc chi *Aspergillus*, đã có một chuyên luận về phân loại chi Nấm bất toàn này (1901). Nhiều loài thuộc chi *Aspergillus* được phát hiện thấy những đặc tính lên men mới, nhiều loài *Aspergillus* khác được tìm thấy trên những loại cơ chất khác nhau (được phẩm, lương thực, thực phẩm, v.v.) và cũng nhiều loài mới thuộc chi nấm này được mô tả. Thom và Church (1926) nghiên cứu phân loại học các loài đã được mô tả của chi *Aspergillus*, đề nghị chấp nhận 69 tên loài và thứ trong tổng số 350 loài và thứ đã mô tả. Hai nhà nấm học này đã sắp xếp 69 tên loài và thứ được chấp nhận đó vào 11 tập hợp dưới chi (nhóm loài, group). Chuyên luận tiếp theo về phân loại chi *Aspergillus* của Thom và Raper (1945) gồm 80 loài và 10 thứ được chấp nhận hoặc mô tả mới, các loài và thứ đó được tập hợp trong 14 nhóm loài. Chuyên luận về chi *Aspergillus* xuất bản gần đây nhất và vẫn đang được sử dụng rộng rãi để định loại các loài của chi nấm này là chuyên luận của Raper và Fennell (1965). Tiếp tục quan niệm phân loại học về chi *Aspergillus* từ Thom và Church (1926). Thom và Raper (1945), Raper và Fennell chấp nhận và mô tả mới 136 loài và 18 thứ tập hợp trong 18 nhóm loài.

Một điều đáng chú ý về phân loại học chi *Aspergillus* là từ Fischer (1897), Wehmer (1901), tiếp theo Thom và Church (1926), Thom và Raper (1945), Raper và Fennell (1965) đều giữ quan điểm : chỉ dùng một tên chi (tên *Aspergillus*) cho tất cả các loài tạo thành bộ máy mang bào tử trần có các đặc điểm của chi nấm này, dù các loài đó có hoặc không có giai đoạn tạo thành bào tử túi (giai đoạn hữu tính). Chi *Aspergillus* như vậy có 2 vị trí phân loại : vị trí phân loại trong Nấm bất toàn (họ Mucedinaceae, bộ "Hyphomycetes", lớp "Fungi imperfecti"), và vị trí phân loại trong lớp Nấm túi (họ Aspergillaceae, bộ "Plectascineae", lớp Ascomycetes) (Raper và Fennell 1965).

Một khuynh hướng khác không coi chi *Aspergillus* là một trường hợp ngoại lệ của Luật quốc tế về danh pháp thực vật và như vậy, tên *Aspergillus* chỉ dùng cho các loài Nấm bất toàn, dù các loài đó có hay không tạo thành bào tử túi. Mặt khác, những loài nấm có giai đoạn bào tử trần thuộc chi *Aspergillus* và tạo thành bào tử túi được tập hợp riêng trong các chi Nấm túi. Các chi Nấm túi này được thành lập căn cứ chủ yếu vào các đặc điểm phân loại của bộ máy sinh bào tử túi (thể quả túi, các túi bào tử và các bào tử túi - ascothecium, ascus, ascosporum). Như vậy một loài Nấm túi có giai đoạn bào tử trần thuộc chi *Aspergillus*, mang 2 tên : một tên loài thuộc chi *Aspergillus*, một tên loài thuộc chi Nấm túi (Benjamin 1955, Sarbhoy et Elphick 1968, Subramanian 1972, v.v.). Sau nhiều năm 2 quan điểm này cùng tồn tại, Fennell (1977) cũng đã chấp nhận điều 59 của Luật quốc tế về danh pháp thực vật đối với

chi *Aspergillus*. Đó cũng là quan điểm phân loại học của hầu hết các tài liệu phân loại về chi *Aspergillus* hiện nay.

Các loài Năm túi có giai đoạn bào tử trần thuộc chi *Aspergillus* (38 loài, 8 thứ) thuộc 11 chi Năm túi (Fennell 1977), 11 chi Năm túi này có giai đoạn bào tử trần thuộc 8 nhóm loài trong tổng số 18 nhóm loài của chi *Aspergillus* (bảng 3.7)

Bảng 3.7. Các chi Năm túi có giai đoạn bào tử trần thuộc chi *Aspergillus* Mich ex Fr. và các nhóm loài tương ứng thuộc chi Năm bát toàn này (Fennell 1977).

Nhóm loài của chi <i>Aspergillus</i>	Các chi Năm túi tương ứng
Nhóm loài <i>A. glaucus</i>	<i>Edvullia</i> Subramanian <i>Eurotium</i> Link ex Fr. <i>Marougiella</i> Subramanian <i>Hemisarmentales</i> Sarbhoy et Elphick
Nhóm loài <i>A. ornatus</i>	<i>Dichlaena</i> Montagne et Ducieu <i>Sclerosclista</i> Subramanian
Nhóm loài <i>A. fumigatus</i>	<i>Neosartorya</i> Malloch et Cain
Nhóm loài <i>A. ochraceus</i>	<i>Petromyces</i> Malloch et Cain
Nhóm loài <i>A. cremus</i>	<i>Chaetosartorya</i> Malloch et Cain
Nhóm loài <i>A. nidulans</i> (và loài <i>A. niveus</i> Blochw.)	<i>Emericella</i> Berk et Br.
Nhóm loài <i>A. flavipes</i>	<i>Fennellia</i> Wiley et Simmons

Một điều đáng chú ý là hầu như mỗi nhóm loài của chi *Aspergillus* có giai đoạn hữu tính (giai đoạn bào tử túi) tương ứng với một chi hoặc một số chi Năm túi, chứng tỏ các đặc điểm của bộ máy mang bào tử trần ở chi *Aspergillus* có khả năng phản ánh tính chất hệ thống sinh của các loài trong chi Năm bát toàn này, do đó cũng chứng tỏ các nhóm loài của Raper và Fennell (1965) thuộc chi *Aspergillus* có ý nghĩa hệ thống sinh. Tất nhiên ý nghĩa này còn hạn chế : còn 10 trong tổng số 18 nhóm loài thuộc chi *Aspergillus* không có hoặc chưa tìm thấy giai đoạn bào tử túi.

Chi *Aspergillus* Mich. ex Fr. đặc trưng bởi những đặc điểm sau (hình 1.2, chương một ; hình 3.3).

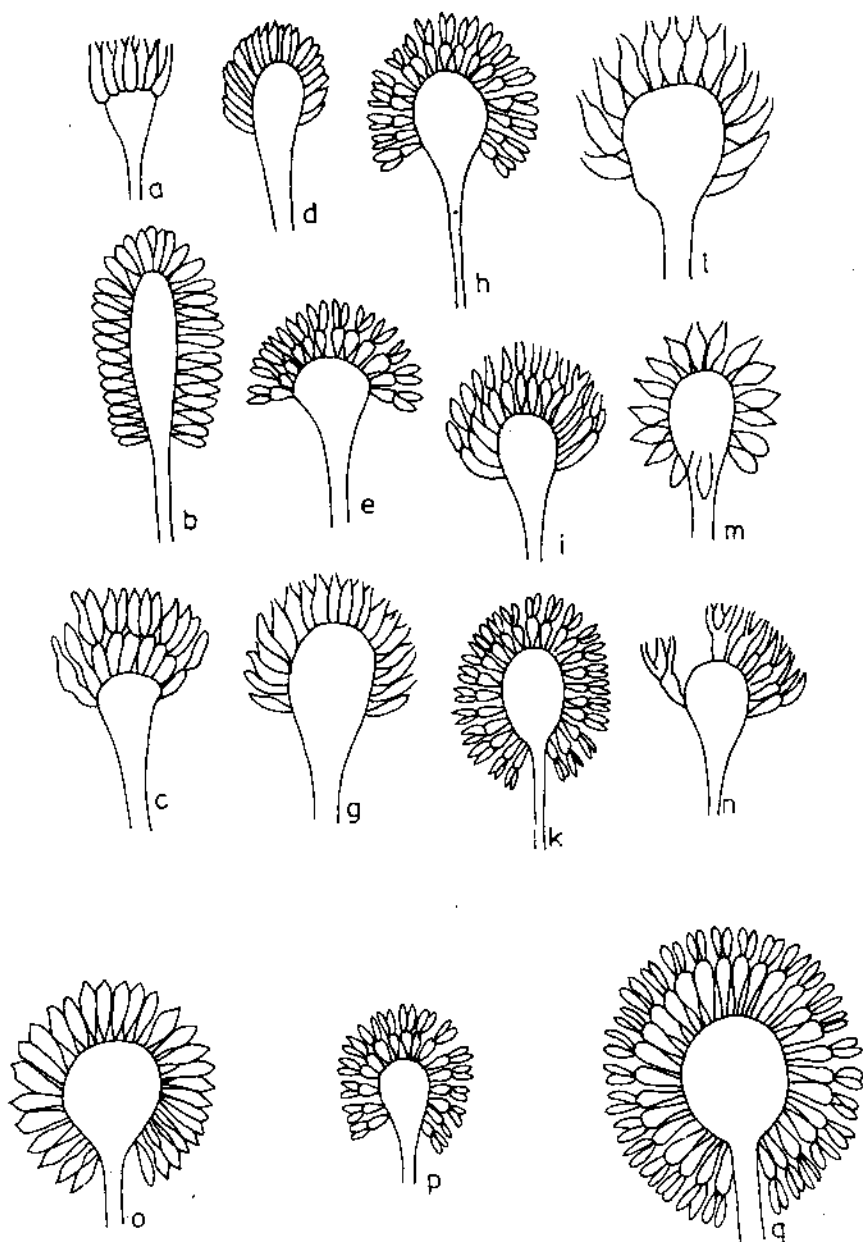
Hệ sợi nấm gồm các sợi ngăn vách, phân nhánh, không màu, màu nhạt hoặc trong một số trường hợp trở thành nâu hay màu sẫm khác ở các vùng nhất định của khuẩn lạc. Bộ máy mang bào tử trần phát triển

từ một tế bào có đường kính lớn hơn, màng dày hơn các đoạn lân cận của sợi nấm (tế bào chân - foot cell). Giá bào tử trần phát triển từ tế bào chân, như là một nhánh của sợi nấm, gần thẳng góc với trục của tế bào chân và thường ở trên mặt cơ chất. Giá bào tử trần không có nhánh, không có hoặc có ít vách ngang, có phần đỉnh to ra thành bong hình chùy, hình elip, hình nửa cầu hoặc hình cầu. Bong hữu thụ này (bong đỉnh giá) mang các thể bình. Các thể bình này hoặc song song và hợp thành cụm ở phần đỉnh bong, hoặc xếp thành hình tia sát nhau trên toàn bộ bề mặt bong. Thể bình hoặc chỉ có một tầng hoặc có 2 tầng. Trong trường hợp sau, mỗi thể bình cấp 1 (cũng gọi là *cuống thể bình*, metula) mang một cụm gồm 2 - 3 (hoặc nhiều hơn) thể bình cấp 2 (gọi là *thể bình*) ở phần đỉnh. Các bào tử trần được tạo thành nối tiếp nhau trong miệng thể bình, thành chuỗi hướng góc (bào tử ở ngay miệng thể bình là bào tử non nhất, càng xa miệng thể bình càng già), không phân nhánh. Bào tử trần không ngăn vách, thay đổi về hình dạng, kích thước, màu sắc, dấu vết ở mặt ngoài (nhẵn, có gai, có nốt sần) tùy từng loài. Tất cả các chuỗi bào tử trần tạo thành từ các thể bình của một bong đỉnh giá hợp thành khối bào tử trần đỉnh bong (conidial head). Khối bào tử trần đỉnh bong có thể có các dạng hình cột (các chuỗi bào tử trần song song, sát nhau), hình cầu hoặc hình tia tỏa tròn. Một số loài có bào tử túi (ascosporum) trong các thể quả kín (cleithothecium).

Như đã nói, các loài có bào tử túi này thuộc các chi Nấm túi khác nhau, trong số đó, chi *Eduvillia* không có thể quả thực sự, các túi bào tử (ascus) nằm ở giữa các sợi nấm sinh túi, chi *Eurotium* có thể quả có vách mỏng không nằm trong đệm nấm, ở các chi còn lại thể quả nằm trong đệm nấm. Các đệm nấm này có thể cứng dạng hạch nấm (sclerotium) hoặc mềm, có thể không có khoang, có 1 hoặc 2 - 3 khoang.

Về phân loại học chi *Aspergillus* như trên vừa trình bày, các đặc điểm phân loại ngăn cách chi nấm này với các chi nấm khác trong họ Mucedinaceae (Moniliaceae) trong hệ thống phân loại Saccardo, hay trong tổ chi Phialoconidiaceae (phân nhóm Euhyphomycetidae, nhóm Hyphomycetes) trong hệ thống phân loại phát sinh (B.X.Đông, 1972), cũng như các đặc điểm ngăn cách các loài trong chi vẫn chủ yếu căn cứ vào các đặc điểm hình thái (hình thái phát sinh hoặc hình thái cấu tạo). Từ giữa thế kỷ 20, một số nhà nấm học đã nghiên cứu các đặc điểm khác như các đặc điểm hóa sinh, hóa tế bào, v.v., dùng làm đặc điểm phân loại cho chi *Aspergillus*.

Về các đặc điểm hóa sinh, một số nhà nấm học Nhật Bản trên cơ sở nghiên cứu phân loại học nhóm loài *A.flavus* kết luận rằng có thể kết hợp các đặc điểm sinh lý - hóa sinh với các đặc điểm hình thái để ngăn cách các loài trong nhóm loài này (O'Hara 1951 - 1952, Murakami 1970 - 1973, v. v.). Nhưng cùng cùng nghiên cứu theo hướng đó với cùng nhóm loài, các kết quả lại cho kết luận ngược lại (Heseltine, Sorensen et Smith



Hình 3.3. Bong đỉnh giả mang (thể bình hoặc mang cả cuống thể bình và thể bình ở một số loài thuộc chi *Aspergillus* Mich. ex Fr.

a- *A.conicus* Blochw., b- *A.clavatus* Desm., c- *A.nidulans* (Eid) Wint., d- *A.fumigatus* Fres., e- *A.versicolor* (Vuill.) Tirab., g- *A.malignus* Lindt, h- *A.sydowi* (Bain et Sart.) Thom et Church, i- *A.niveus* Blochw., k- *A.varians* Wehm., l- *A.glaucus* Link, m- *A.citrisporus* Hohn., n- *A.terreus* Thom, o- *A.luchuensis* Inui, p- *A.austus* (Bain.) Thom et Church, q- *A.sulphureus* (Fres.) Thom et Church (M.A.Litimov 1967).

1970). Một loạt các nghiên cứu khác đối với các loài trong cùng một nhóm loài hay đối với một số loài trong các nhóm loài khác nhau thuộc chi *Aspergillus* về thành phần cấu tạo của tế bào, về các đặc điểm của diện di đồ các protein và các enzym, về các thành phần nhiệt phân với sắc ký khí, sắc ký lỏng, về các đặc điểm cấu tạo của acid nucleic, về các đặc điểm sinh tổng hợp các acid amin, về các đặc điểm trao đổi chất glucid, về các thành phần nguyên tố với kỹ thuật vi phân tích bằng tia X, nhằm tìm các đặc điểm phân loại mới, tin cậy hơn các đặc điểm hình thái với các loài thuộc chi nấm này, cho đến nay, vẫn chỉ có tính chất thăm dò, chưa có công trình nào cho kết quả có ý nghĩa phân loại học rõ rệt.

Vì những lẽ trên, hệ thống phân loại chi *Aspergillus* của Raper và Fennell (1965) gồm 18 nhóm loài đến nay vẫn ổn định và được sử dụng rộng rãi, không sửa đổi về cơ bản, mặc dù từ chuyên luận phân loại về chi *Aspergillus* của Raper và Fennell (1965) đến nay, một số loài mới thuộc chi nấm này đã được công bố ở một số nước.

Nhiều loài thuộc chi *Aspergillus* phân bố rộng rãi trên các cơ chất tự nhiên, trong các sản phẩm nông công nghiệp, ở nhiều vùng địa lý khác nhau trên thế giới. Một số loài, đặc biệt loài *A.oryzae* đã được dùng rộng rãi trong công nghệ lên men truyền thống để chế biến thực phẩm ở nhiều nước châu Á như Việt Nam (làm tương), Trung Quốc, Nhật Bản, Indonexia, Philipin, v.v. Hiện nay, công nghệ sinh học sử dụng một số loài thuộc chi *Aspergillus* chủ yếu là các loài *A.niger*, *A.oryzae* trong công nghiệp sản xuất enzym (α -amylaza, glucoamylaza, pectinaza, proteaza, cellulaza), trong công nghiệp chế biến thực phẩm, công nghiệp sản xuất một số acid hữu cơ như acid citric, acid gluconic, v.v. Một số loài khác có khả năng tạo thành các chất kháng sinh, như *A.fumigatus* tạo thành fumagilin có tác dụng trên *Entamoebae histolyca*, *A.humicola*, *A.nidulans* tạo thành lần lượt humicolin, nidulin có tác dụng ức chế đối với một số loài vi nấm, *A.candidus* tạo thành candidulin, *A.oryzae*, *A.tamarii* và một số loài khác tạo thành acid kojic có tác dụng ức chế đối với một số vi khuẩn, v.v., trong đó đã thực sự được dùng trong công nghiệp dược phẩm chỉ có loài *A.fumigatus* để sản xuất fumagilin làm thuốc chữa li amip. Nhiều loài thuộc chi nấm này có hoạt tính biến đổi sinh học (xem chương I), một số loài tạo thành các độc tố (mycotoxin), đặc biệt đáng chú ý là các loài tạo thành các độc tố gây ung thư gan như các loài *A.flavus*, *A.parasiticus* tạo thành aflatoxin, *A.versicolor* tạo thành sterigmatocystin.

Ở Việt Nam, một số chế phẩm enzym như các chế phẩm glucoamylaza từ *A.awamori* (L.V.Chứ và Đ.T.Thu, 1977), từ *A.niger* (Đ.V. Hợp, 1974); nghiên cứu chọn lọc các chủng thuộc các loài *A.awamori*, *A.niger*, *A.oryzae*

có hoạt tính α -amylaza và glucoamylaza cao để thủy phân tinh bột sắn (N.B.Ngà và N. L.Dũng, 1984) ; nghiên cứu thu nhận và sử dụng proteaza từ *A.oryzae* trong sản xuất nước chấm (Q.V.Thịnh, 1977), để khử lông da súc vật (L.V.Nhuong và Cs., 1977) ; thu nhận và sử dụng pectinaza, amylaza từ *A.niger* để xử lý dược liệu nguồn gốc thực vật (L.V.Nhuong và Cs., 1977) ; nghiên cứu sử dụng sinh khối của một số chủng thuộc loài *A.niger* để nâng cao chất lượng thức ăn chăn nuôi (N.L.Dũng và Cs., 1984) ; nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp acid citric của một số chủng lựa chọn của loài *A.niger* (N.T.Hương và N.L. Dũng, 1984) ; nghiên cứu chọn lọc được chủng *A.niger* TH3-19K của Nhật Bản có hoạt tính glucoamylaza cao dùng để thủy phân tinh bột sắn (D.V.Hợp và Cs., 1993), nghiên cứu hoạt tính phân giải phosphat khó tan và cellulose của *A.japonicus* (P.V.Ty và Đ.T.Lương, 1998), khả năng phân giải cellulose của một chủng ưa nhiệt thuộc loài *A.unilateralis* (P.V.Ty và Đ.T.Lương, 1998) ; nghiên cứu hệ vi nấm đối kháng đối với các vi khuẩn kháng kháng sinh ở Việt Nam, trong đó có 14 loài thuộc chi *Aspergillus* có hoạt tính này (B.X.Đồng và Cs., 1978), v.v.

Như vậy ở trên thế giới cũng như ở nước ta, các loài thuộc chi *Aspergillus* đã được sử dụng hay được nghiên cứu sử dụng vào công nghệ sinh học chủ yếu là một số loài trong các nhóm loài *A.fumigatus*, *A.flavus*, *A.niger*. Ngoài ra loài *A.flavus* trong nhóm loài cùng tên và loài *A.versicolor* trong nhóm loài cùng tên cũng cần chú ý vì khả năng tạo thành các mycotoxin gây ung thư gan của chúng.

Để định loại các loài trong các nhóm loài nói trên, đặc biệt các loài *A.fumigatus*, *A.flavus*, *A.oryzae*, *A.niger*, *A.awamori* và *A.versicolor*, chúng ta cần phải xác định các nhóm loài (khóa định loại các nhóm loài của chi *Aspergillus*, bảng 3.8), và định loại các loài trong mỗi nhóm loài tương ứng (khóa định loại các loài thuộc các nhóm loài *A.fumigatus*, *A.flavus*, *A. niger*, *A.versicolor*, các bảng 3.9, 3.10, 3.11, 3.12).

Bảng 3.8. Khóa định loại các nhóm loài của chi *Aspergillus* Mich.ex Fr.
(Raper và Fennell, 1965, có sửa đổi)

- | | |
|--|---|
| 1. Bọng dính giá chỉ mang thể bình (cụm nhóm loài Uniseriata) | 2 |
| 1. Chỉ có bọng dính giá mang cả cuống thể bình và thể bình, hoặc có loại bọng này đồng thời có cả bọng chỉ mang thể bình | 7 |
| 2. Khối bào tử trần dính bọng hình chùy, sau tách thành nhiều cột nhỏ, màu lục xanh. Bọng dính giá hình chùy Nhóm loài <i>A.clavatus</i> | |
| 2. Khối bào tử trần dính bọng hình tia tỏa tròn hoặc hình cột lớn. Bọng dính giá hình cầu, gân chùy, hình con quay | 3 |

3. Khối bảo tử trần đỉnh bong hình tia tỏa tròn (hoặc phần lớn hình tia tỏa tròn) 4
3. Khối bảo tử trần đỉnh bong hình cột 6
4. Khối bảo tử trần đỉnh bong chỉ có một loại hình tia tỏa tròn, màu lục xanh, lục nâu (một loài màu nâu). Thể quả túi màu vàng tươi có ở nhiều loài. Chịu được áp xuất thẩm thấu cao Nhóm loài *A. glaucus*
4. Khối bảo tử trần đỉnh bong phần lớn hình tia tỏa tròn, đôi khi hình cột 5
5. Khối bảo tử trần đỉnh bong hình tia tỏa tròn hoặc hình cột lớn, màu lục xanh, lục vàng, nâu lục. Thể quả nếu có màu tím hoặc lục nâu. Nhóm loài *A. ornatus*
5. Khối bảo tử trần đỉnh bong hình tia tỏa tròn (một loài hình cột), nhỏ, màu vàng, tím hồng. Không có thể quả Nhóm loài *A. cervinus*
6. Khối bảo tử trần đỉnh bong hình cột, màu lục. Bảo tử trần hình trụ khi non, sau hình elip, đôi khi hình cầu, gần cầu Nhóm loài *A. restrictus*
6. Khối bảo tử trần đỉnh bong hình cột, màu lục sẫm, xanh lục sẫm, xám lục. Bảo tử trần hình cầu. Thể quả nếu có màu vàng. Nhóm loài *A. fumigatus*
7. Phần lớn bong đỉnh giá mang thể bình trên cuống thể bình, một số nhỏ bong chỉ có thể bình. Có thể có bong mang thể bình trên cuống thể bình và cả thể bình trực tiếp trên bong . . . (cum nhóm loài *Biseriala I*) 8
7. Chỉ có bong đỉnh giá mang thể bình trên cuống thể bình (cum nhóm loài *Biseriala II*) 14
8. Khối bảo tử trần đỉnh bong thường hình cầu, sau tách thành nhiều cột nhỏ, đôi khi hình cột ngay khi còn non. Bong đỉnh giá hình cầu, gần cầu hoặc hình trứng ngắn. Giá bảo tử trần không thất lại ở phần dưới bong 9
8. Khối bảo tử trần đỉnh bong hình tia tỏa tròn, lớn. Bong đỉnh giá hình cầu. Giá bảo tử trần thất lại ở phần dưới bong 13
9. Khối bảo tử trần đỉnh bong hình cầu khi non, sau vẫn hình cầu hoặc tách thành nhiều cột nhỏ 10
9. Khối bảo tử trần đỉnh bong hình cầu khi non, sau hình tia tỏa tròn với các chuỗi bảo tử trần tách rời nhau, đôi khi hình cột 12
10. Khối bảo tử trần màu đen, nâu đen, lục đen Nhóm loài *A. niger*
10. Khối bảo tử trần không có màu đen 11
11. Khối bảo tử trần đỉnh bong màu vàng, vàng nâu, vàng đất. Giá bảo tử

trần thường ráp . . .

. . . Nhóm loài *A. ochraceus*

11. Khối bào tử trần dính bong màu trắng, trắng ngà. Giá bào tử trần nhẵn . . .

. . . Nhóm loài *A. candidus*

12. Khối bào tử trần dính bong màu lục vàng, lục nâu. Giá bào tử trần ráp . .

. . . Nhóm loài *A. flavus*

12. Khối bào tử trần dính bong màu vàng nâu nhạt hoặc sẫm. Giá bào tử trần nhẵn . . .

. . . Nhóm loài *A. wentii*

13. Khối bào tử trần dính bong màu nâu vàng, lục vàng nhạt hoặc lục xanh. Giá bào tử trần không màu, nhẵn . . .

. . . Nhóm loài *A. cremens*

13. Có 2 loại khối bào tử trần dính bong. Khối lớn màu xám nhạt, lục, nâu lục. Giá bào tử trần màu nâu. Khối nhỏ có kích thước giá bào tử trần và bong dính giá nhỏ hơn hẳn so với khối lớn . . .

. . . Nhóm loài *A. sparsus*

14. Khối bào tử trần dính bong màu lục. Tế bào Hulle nếu có, hình cầu, ít khi hình trứng

15

14. Khối bào tử trần dính bong không có màu lục. Tế bào Hulle nếu có thường dài, cong và xoắn

16

15. Khối bào tử trần dính bong hình tia tỏa tròn, sau thành hình cột ở vài loài. Giá bào tử trần không màu hoặc màu nâu nhạt, thường dài trên 100 μm . Không có hoặc có ít tế bào Hulle. Không có thể quả . . .

. . . Nhóm loài *A. versicolor*

15. Khối bào tử trần dính bong hình cột, thường màu lục vàng sẫm, đôi khi lục xanh sẫm hoặc nâu. Giá bào tử màu nâu, thường dài dưới 300 μm . Nhiều tế bào Hulle xếp thành cụm hoặc bao bọc các thể quả túi. Thể quả túi nếu có, màu tím . . .

. . . Nhóm loài *A. nidulans*

16. Khối bào tử trần dính bong tạo thành hình cột dài, các chuỗi xếp chặt vào nhau, màu da cam xám, nâu da cam, nâu da cam nhạt. Giá bào tử trần không màu. Bào tử trần nhỏ, đường kính hoặc trục lớn không quá 25 μm . . .

. . . Nhóm loài *A. terreus*

16. Khối bào tử trần dính bong hình tia tỏa tròn hoặc hình cột, các chuỗi không xếp sát nhau, ngắn hoặc không đều. Bào tử trần có đường kính trên 25 μm

17

17. Khối bào tử trần dính bong hình tia tỏa tròn hoặc hình cột rộng và ngắn, màu nâu xỉn. Giá bào tử trần màu nâu. . . .

... Nhóm loài *A.ustus*

17. Khối bào tử trần dính bong hình cột rộng và ngắn, màu trắng, xám da cam, xám tím. Giá bào tử trần không màu hoặc màu nâu ...

... Nhóm loài *A.flavipes*

Bảng 3.9. Khóa định loài các loài thuộc phân nhóm *Aspergillus fumigatus* của nhóm loài *A.fumigatus* (chi *Aspergillus* Mich ex. Fr.)

1. Có thể quá túi. Tạo thành ít bào tử trần ... Phân nhóm *A.fischeri*
(Các loài : *A.aureolus* Fenn. et Rap.
A.fischeri Wehmer
A.quadricinctus Vuill.
A.stramenius Novak et Raper)
1. Không có thể quá túi. Tạo thành nhiều bào tử trần (Môi trường Czapek, nhiệt độ nuôi cấy 28°C, 10 ngày tuổi) (Phân nhóm *A.fumigatus*) 2
2. Khối bào tử trần thẳng so với giá bào tử trần 3
2. Khối bào tử trần nghiêng so với giá bào tử trần 4
3. Bào tử trần hình cầu 2,0 - 3,5 μm đường kính, có gai ...
... *A.fumigatus* Fres.
3. Bào tử trần hình elip 2,3 - 3,0 x 3,5 - 5,5 μm ...
... *A.fumigatus* Fres.var.ellipticus Rap.et Fenn.
4. Bọng dính giá thẳng, nhưng thường có một ít thể bình ở phần gốc bọng, nên tạo ra hình ảnh giống như bọng dính giá lệch. Bào tử trần hình cầu 2,5 - 3,5 μm đường kính, có gai. Giá bào tử trần dài 5 - 30 μm ...
... *A.unilateralis* Tarower
4. Bọng dính giá (do đó khối bào tử trần) nghiêng thực sự so với giá bào tử trần 5
5. Chỉ có ít bọng dính giá nghiêng so với giá bào tử trần. Thể bình thường có vách ngang, tạo thành chuỗi bào tử trần rất ngắn (5 - 6 bào tử trần/1 chuỗi). Giá bào tử trần dài 130 - 250 μm ...
... *A.phialiseptus* Kwon-Chung
5. Hầu hết bọng dính giá nghiêng so với giá bào tử trần 6
6. Bào tử trần nhẵn, hơi ráp, đường kính dưới 2,8 μm . Khuẩn lạc 3,5 - 4,0 cm đường kính ...
... *A.viriditatus* Ducker et Throver
6. Bào tử trần có gai, đường kính tới 3,5 μm . Khuẩn lạc dưới 2 cm đường kính hoặc tạo thành ít bào tử trần 7
7. Khuẩn lạc 1,5 - 2,0 cm, tạo thành nhiều bào tử trần. Khối bào tử trần dính bong 45 x 75 μm ...

... *A. duricaulis* Rapet Fenn.

7. Khuẩn lạc thưa thớt bảo tử trần. Khối bảo tử trần đỉnh bong (môi trường thạch cao lúa mạch) hình cột dài tới 200 μm ...

... *A. brevipes* Smith

Bảng 3.10. Khóa định loại các loài thuộc nhóm loài *Aspergillus niger* (chi *Aspergillus* Mich. ex Fr.) (Môi trường Czapek, nhiệt độ nuôi cấy 28°C, 10 ngày tuổi)

- | | |
|---|---|
| 1. Bong đỉnh giả chỉ có thể bình | 2 |
| 1. Bong đỉnh giả hầu hết có cuống thể bình và thể bình | 3 |
| 2. Khối bảo tử trần đỉnh bong hình tia tỏa tròn, phần lớn dưới 300 μm đường kính, sau tách hình cột dài tới 600 - 700 μm . Bảo tử trần hình cầu, 4 μm đường kính ... | |
| ... <i>A. lapomicus</i> Saito | |
| 2. Khối bảo tử trần đỉnh bong hình cầu, sau tách thành nhiều cột nhỏ, dài 500 - 1000 μm . Bảo tử trần elip 4, x 5 μm ... | |
| ... <i>A. aculeatus</i> Iizula | |
| 3. Khối bảo tử trần có màu đen thực sự (đen than) | 4 |
| 3. Khối bảo tử trần màu đen nâu, đen đỏ nâu | 8 |
| 4. Bảo tử trần lớn, hình cầu, 6.5 - 10.0 μm đường kính ... | |
| ... <i>A. carbonarius</i> (Bain.) Thom | |
| 4. Bảo tử trần có đường kính dưới 5 μm | 5 |
| 5. Giả bào tử trần dài trên 5 mm, thường dài 7 - 8 mm. Bảo tử trần hình cầu, 3.5 - 5.0 μm đường kính nhẵn, hoặc sần sùi ... | |
| ... <i>A. pulverulentus</i> (McAlpine) Thom | |
| 5. Giả bào tử trần phần lớn dài dưới 4 mm | 6 |
| 6. Khuẩn lạc rộng, 5 - 6 cm đường kính. Cuống thể bình 6-8 x 20-40 μm ... | |
| ... <i>A. ficuum</i> (Reichardt) Rennings | |
| 6. Khuẩn lạc dưới 4.5 cm đường kính | 7 |
| 7. Khuẩn lạc 3.0 - 3.4 cm đường kính. Cuống thể bình 5.5-7.5 x 40-60 μm , có ít cuống thể bình có vách ngang và dài tới 100 - 110 μm ... | |
| ... <i>A. phoenicis</i> Cda. Thom | |
| 7. Khuẩn lạc 2.5 - 3.0 cm đường kính. Cuống thể bình phần lớn 5-6 x 20-30 μm đôi khi 8-10 x 60-70 μm | |
| ... <i>A. niger</i> v Tiegh. | |
| 8. Khuẩn lạc khi già màu nâu đen đỏ nâu đen | 9 |

8. Khuẩn lạc khi già màu xám nâu

10

9. Khuẩn lạc 4 - 5 cm đường kính. Khối bào tử trần đỉnh bong hình cầu, hình tia tỏa tròn, 200 - 300 μm đường kính. Giá bào tử trần 15 - 30 μm đường kính, dài 2 - 3 mm, đôi khi tới 5 - 6 mm . . .

. . . *A.tubingensis* (Schoer) Mossaray

9. Khuẩn lạc 5 - 7 cm đường kính. Khối bào tử trần đỉnh bong hình cầu, hình tia tỏa tròn, sau tách thành các cột, dài 200 - 300 μm . Giá bào tử trần 25 - 50 μm đường kính dài 2 - 3 mm . . .

. . . *A.awamori* Nakazawa

10. Bào tử trần hình elip, phần lớn 3,5-3,8 x 5,0-5,5 μm , đôi khi 2,5-3,0 x 7,5-9,0 μm , có gai . . .

. . . *A.ellipticus* Rap. et Fenn.

10. Bào tử trần hình cầu

11

11. Bào tử trần có gai, 3 - 5 μm đường kính. Khuẩn lạc màu lục nâu, nâu đen, môi trường xung quanh màu nâu lục sẫm . . .

. . . *A.heteromorphus* Batista et. Naia

11. Bào tử trần chỉ hơi ráp, 4,0 - 4,5 μm đường kính. Khuẩn lạc màu lục nâu đen, đen nâu . . .

. . . *A.toctidus* (Hakazawa) Thom et Rap.

(*A.toctidus* var. *pallidus* Nak., Simo et Wat.

A.toctidus var. *acidus* Nak., Simo et Wat.)

**Bảng 3.11. Khóa xác định các loài thuộc nhóm loài *A.flavus*
(chi *Aspergillus* Mich. ex Fr.)**

Xem bảng 1.7, chương 1

**Bảng 3.12. Khóa định loại các loài thuộc phân nhóm *Aspergillus versicolor* của
nhóm loài *A.versicolor* (chi *Aspergillus* Mich.ex Fr.) (Môi trường Czapek, nhiệt
độ nuôi cấy 28°C, 10 ngày tuổi)**

1. Các khối bào tử trần trên cùng một khuẩn lạc có 2 màu :

Phân nhóm *A.lanus*

(Các loài và thứ : *A.lanus* Rapet Thom

A.lanus var. *brevis* Rapet Thom

A.allahabadii Mehrotra et. Agnihotri

A.ambiguus Sappa

A.microcysticus Sappa)

1. Các khối bào tử trần trên cùng một khuẩn lạc thường cùng màu (Phân
nhóm *A.versicolor*)

2

2. Bọng dính giá thường hình cầu, hình cầu hơi thon dài. Cường thể bình gần kín hoặc hoàn toàn kín mặt bọng. Thường có tế bào Hülle và không có hạch nấm
2. Bọng dính giá thường hình con quay. Chỉ mang cường thể bình ở nửa phần trên mặt bọng. Thường không có tế bào Hülle và có hạch nấm
3. Bào tử trần thường có đường kính dưới $4\ \mu\text{m}$, hình cầu
3. Bào tử trần có đường kính hoặc trục lớn trên $4\ \mu\text{m}$, hình cầu hoặc elip
4. Giá bào tử trần không màu hoặc màu vàng nhạt
4. Giá bào tử trần màu nâu rõ rệt
5. Khuẩn lạc 2-3 cm đường kính. Chỉ có một loại khối bào tử trần dính bọng hình gần cầu, hình tia tỏa tròn, đường kính $100 - 125\ \mu\text{m}$. . .
A.versicolor (Vuill.) Tiraboschi
5. Khuẩn lạc 3 - 4 cm đường kính. Có 2 loại khối bào tử trần dính bọng, hình gần cầu, hình tia tỏa tròn, $100 - 150\ \mu\text{m}$ và $15 - 25\ \mu\text{m}$ đường kính . . .
A.sydowi (Bainet Sart.) Thom et Church
6. Giá bào tử trần ráp, phần lớn dài $700\ \mu\text{m}$. . .
A.pulvinus Kwon et Fennell
6. Giá bào tử trần nhẵn, phần lớn dài dưới $300\ \mu\text{m}$
7. Khối bào tử trần dính bọng hình tia tỏa tròn, $200 - 300\ \mu\text{m}$ đường kính. Bào tử trần ráp, $3,0 - 3,5\ \mu\text{m}$ đường kính . . .
A.silvaricus Fennel Rap.
7. Khối bào tử trần dính bọng gồm nhiều chuỗi tách rời nhau hoặc hình cột không chặt, dài $200 - 300\ \mu\text{m}$, và các khối bào tử trần nhỏ mang ít thể bình và ít bào tử trần . . .
A.speluncus Rapet Fenn.
8. Giá bào tử trần phần lớn dài $1,5 - 2,5\ \text{mm}$ (không màu khi quan sát trong giọt nước) . . .
A.varians (Wehmer) Rap et Fenn.
8. Giá bào tử trần màu nâu kể cả khi nhìn trong giọt nước
9. Tạo thành 1 loại bào tử trần, hình cầu và elip ở các khuẩn lạc non ($3,5-4,5 \times 4-6\ \mu\text{m}$), hình cầu và ráp rõ rệt ở các khuẩn lạc 2 tuần lễ tuổi . . .
A.asperescens Stolk
9. Tạo thành 2 loại bào tử trần, hình cầu
10. Khuẩn lạc 4 - 6 cm đường kính. Tế bào Hülle màu nâu, vàng nâu, tạo thành các vùng dạng hạt trên mặt khuẩn lạc . . .
A.granulosus Rapet Thom

10. Khuẩn lạc 3 - 4 cm đường kính. Tế bào Hülle màu tím đỏ, xếp thành các vòng đồng tâm hay thành cụm rải rác trên mặt khuẩn lạc

. *A. caespitosus* Rapet Thom

11. Khuẩn lạc 10 - 15 cm đường kính. Bào tử trần dưới $3,2 \mu\text{m}$ đường kính 12

11. Khuẩn lạc 2 - 3 cm đường kính. Bào tử trần trên $3,8 \mu\text{m}$ đường kính hoặc trực lớn 13

12. Cống thể bình mọc ở gần hết mặt bông. Khối bào tử trần hình tia tỏa tròn sau hình cột lỏng $40-60 \times 100-200 \mu\text{m}$

. *A. arcuarius* Rapet Fenn.

12. Cống thể bình 3 - 6 chiếc trên đỉnh bông. Khối bào tử trần nhỏ, với cống thể bình và thể bình có dạng chổi như ở chi *Penicillium*

. *A. pycnomeli* Sappa

13. Khuẩn lạc trên môi trường cao lúa mạch (nhiệt độ nuôi cấy $24 - 26^{\circ}\text{C}$, 10 ngày tuổi) 3 cm đường kính. Bào tử trần hình trứng, ellip, phần lớn $3,5 - 4,0 \mu\text{m}$ trực lớn

. *A. malodoratus* Kwon et Fenn.

13. Khuẩn lạc ở điều kiện nuôi cấy trên, $5,5 - 6,0$ cm đường kính. Bào tử trần $4 - 7 \mu\text{m}$ đường kính, có mặt các tinh thể hình kim của hợp chất pachybasin ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_3$) xếp thành dạng cành cây

. *A. crystallinus* Kwon et Fenn.

* * *

Sau khi xác định một chủng vi nấm thuộc các loài *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. awamori*, *A. niger* và *A. versicolor* ở các khóa định loại các nhóm loài và phân nhóm tương ứng thuộc chi *Aspergillus*, kiểm tra chi tiết các đặc điểm phân loại của chủng vi nấm cần xác định đó với các đặc điểm tương ứng của chủng mẫu của một Bào tàng giống theo tóm tắt mô tả dưới đây.

Aspergillus fumigatus Fres. - Khuẩn lạc trên môi trường Czapek, nuôi cấy ở nhiệt độ 27°C , 10 ngày tuổi, màu lục xám, xanh xám, xám, đường kính 4 - 5 cm, mượt nhưng, đôi khi xốp bông. Khối bào tử trần đỉnh bông hình cột, dài tới $400 \mu\text{m}$. Giá bào tử trần nhẵn, thường dài $500 \mu\text{m}$. Bông đỉnh giá hình bình, $20 - 30 \mu\text{m}$ đường kính, mang thể bình ở phần nửa bông trên. Thể bình $2-3 \times 6-8 \mu\text{m}$. Bào tử trần hình cầu, $2,0 - 3,5 \mu\text{m}$ đường kính, có gai, mọc thành chuỗi gốc non (hình 3.3).

Aspergillus oryzae (Ahlburg) Cohn - Khuẩn lạc trên môi trường Czapek (nhiệt độ nuôi cấy 27°C , 10 ngày tuổi) 5 - 6 cm đường kính, màu lục, vàng lục, lục nâu sau chuyển thành nâu lục, nâu. Khối bào tử

trần đỉnh bông hình tia tỏa tròn, phần lớn 150 - 300 đến 400 - 500 μm đường kính. Giá bào tử trần nhẵn hoặc ráp, thường dài 1,0 - 2,5 cm, có thể tới 4 - 5 cm. Bông đỉnh giá hình gần cầu, 40 - 50 μm đường kính, hoặc mang cuống thể bình và thể bình, hoặc chỉ mang thể bình. Cuống thể bình 4-5 x 8-12 μm . Thể bình mọc trực tiếp trên bông đỉnh giá 3-5 x 12-15 μm , thể bình mọc trên cuống thể bình 3,0-3,5 x 8-10 μm . Bào tử trần phần lớn hình cầu, đôi khi hình elip 4,5 - 7,0 μm đường kính hoặc 8 - 10 μm trục lớn, nhẵn hoặc ráp, có gai mịn.

Aspergillus flavus Link ex Fr. - Xem bảng 1.8, chương một (hình 1.3, chương một).

Aspergillus parasiticus Speare - Xem bảng 1.8, chương một

Aspergillus awamori Nakazawa - Khuẩn lạc trên môi trường Czapek (nhiệt độ nuôi cấy 27°C, 10 ngày tuổi) 5 - 7 cm đường kính, màu nâu đen. Khối bào tử trần đỉnh bông hình cầu, sau hình tia tỏa tròn và tách thành các cột, phần lớn 200 - 300 μm đường kính. Giá bào tử trần nhẵn, dài 200 - 300 μm đến 2 - 3 mm. Bông đỉnh giá hình cầu, phần lớn 25 - 50 μm đường kính, mang cuống thể bình và thể bình hoặc chỉ mang thể bình. Cuống thể bình 3,5 - 10 μm x 4,5-40 μm . Thể bình 3-4 x 5-10 μm . Bào tử trần hình cầu, 3,5 - 5,0 μm đường kính, nhẵn, có gai hoặc có các vết ráp dọc, thành chuỗi gốc non.

Aspergillus niger v.Tiegh. - Khuẩn lạc trên môi trường Czapek (nhiệt độ nuôi cấy 27°C, 10 ngày tuổi) 2,5 - 3,0 cm đường kính, màu đen. Khối bào tử trần đỉnh bông hình cầu, sau hình tia tỏa tròn hoặc tách thành các cột 700 - 800 μm đường kính, đôi khi có các khối bào tử trần nhỏ màu nâu đen. Giá bào tử trần nhẵn, dài 1,5 - 3,0 cm. Bông đỉnh giá hình cầu, 45 - 75 μm đường kính. Cuống thể bình phần lớn 5-6 x 20-30 μm , đôi khi 6-10 x 60-70 μm . Thể bình 3,0-3,5 x 8-10 μm . Bào tử trần hình cầu, phần lớn 4 - 5 μm đường kính, ráp hoặc có gai không đều, thành chuỗi gốc non.

Aspergillus versicolor (Vuill.) Tiraboschi - Khuẩn lạc trên môi trường Czapek (nhiệt độ nuôi cấy 27°C, 10 ngày tuổi), 2 - 3 cm đường kính, màu trắng, sau vàng, vàng da cam, lục vàng, lục tùy từng chủng. Khối bào tử trần thường chỉ có một loại, hình cầu, hình tia tỏa tròn, 100 - 125 μm đường kính. Giá bào tử trần nhẵn, 5-6 x 500-700 μm , sát bông tới 10 μm đường kính. Bông đỉnh giá hình cầu, hình cầu hơi thon dài, 12 - 16 μm đường kính, mang cuống thể bình và thể bình. Cuống thể bình phần lớn 3 x 8 μm . Thể bình 2,0-2,5 x 5,0-7,5 μm . Bào tử trần hình cầu, 2,9-3,5 μm đường kính, có gai. Đôi khi có tế bào Hülle (hình 3.3).

Chi *BEAUVERIA* Vuillemin

Chi *Beauveria* do Vuillemin thành lập năm 1912 từ loài *Botrytis bassiana* Balsamo. Chi *Beauveria* tách khỏi chi *Botrytis* Pers.ex Fr. và phân cách với chi này bởi các đặc điểm của tế bào sinh bào tử trần. Tế bào sinh bào tử trần của chi *Botrytis* là các tế bào ở đỉnh của giá bào tử trần hoặc ở đỉnh các nhánh của giá, phồng to, mang các gai nhỏ. Bào tử trần đơn độc được tạo thành trên các gai đó. Tế bào sinh bào tử trần của chi *Beauveria* tiếp tục mọc dài theo kiểu hợp trục, do đó ngoằn ngoèo hình chữ chi và có gai nhỏ ở đầu mút của các đoạn hình chữ chi đó. Bào tử trần được tạo thành trên các gai nhỏ này.

Chi *Beauveria* đặc trưng bởi các đặc điểm : giá bào tử trần phân hóa, thường là những tế bào lớn, không ngăn vách, không màu, ở đỉnh sợi nấm hoặc là các nhánh ngang của sợi nấm. Các tế bào sinh bào tử trần ở phần đỉnh của giá, đơn độc hoặc thành cụm dây đặc, hoặc thành vòng, không màu, không ngăn vách, gồm 2 phần. Phần gốc hình cầu hoặc hình thoi, phần ngọn có dạng cuống hẹp, ngoằn ngoèo thành hình chữ chi, có răng ngắn mang bào tử trần. Bào tử trần không ngăn vách, hình cầu hoặc elip, gốc tròn, nhẵn, vách mỏng, thuộc tip sympoduloconidi (tip cơ bản proconidi).

Chi *Beauveria* Vuill. ngăn cách với chi *Tritirachium* Limber lần cận bởi các đặc điểm sau của chi *Tritirachium* : sợi nấm thường có màu, tế bào sinh bào tử trần không có gai mà có sọc, giá bào tử trần mọc ra từ các sợi nấm thẳng đứng.

Các loài của chi *Beauveria* là các loài vi nấm diệt côn trùng, phân bố rộng rãi ở nhiều vùng địa lý, trên côn trùng, đất hoang, đất trồng trọt. Hoạt tính diệt côn trùng của loài *B.bassiana* là các enzym có khả năng phân giải biểu bì và prôtein của các loài động vật này (Shimizu và ct., 1993), và bởi độc tố bovericin ($C_{45}H_{57}O_9N_3$, cyclo (N-methyl-L-phenylalanin-D- α -hydroxyisovaleryl) $_3$). Người ta đã phát hiện 175 loài côn trùng ở Bắc Mỹ và 60 loài côn trùng ở Liên Xô (cũ) bị loài *B.bassiana* ký sinh. Ở Việt Nam, T.K.Chính (1996) đã phát hiện 111 mẫu trong tổng số 936 mẫu côn trùng thuộc bộ Cánh vảy (Lepidoptera) và bộ Cánh giống (Isoptera) bị ký sinh bởi các loài *B.bassiana* và *B.brongniati* và đã thử nghiệm chế phẩm B.75 từ *B.bassiana* dạng bột để phòng trừ sâu róm thông (*Dendrolimus punctatus* Walker) và cho biết sâu chết 80% sau một năm xử lý bằng chế phẩm này.

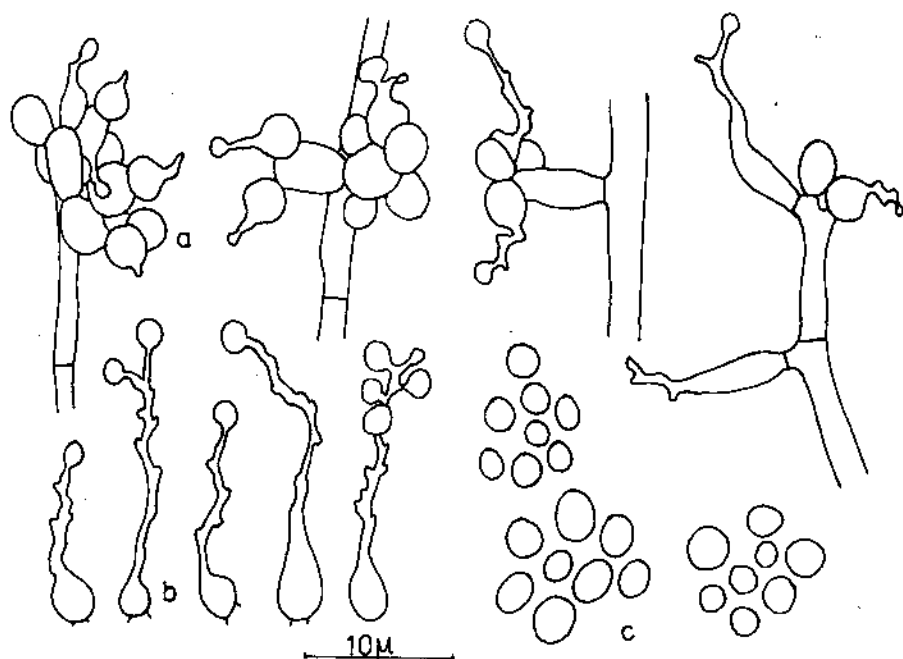
Các tác giả đã mô tả 14 loài thuộc chi *Beauveria*. De Hoog (1972) chấp nhận và mô tả 3 loài *B.alba* (Limber) Saccas, *B.bassiana* (Vuill.) Bals. và *B.brongniartii* (Sacc.) Petch (bảng 3.13) (hình 3.4 và 3.5).

Bảng 3.13. Khóa định loại các loài thuộc chi *Beauveria* Vuill.
(Theo De Hoog, 1972)

1. Tế bào sinh bào tử trần phần lớn mọc thành vòng dọc sợi nấm thẳng đứng, phần gốc 15-25 x 10-24 μm , đôi khi rộng tới 3,5 μm , phần ngọn dài tới 35 μm , rộng 1 μm , gai dài 1 μm . . .
 . . . *B.alba* (Limber) Saccas)
1. Tế bào sinh bào tử trần mọc rải rác, hoặc thành cụm trên giá bào tử trần phân hóa rõ rệt
 2. Bào tử trần hình cầu hoặc gần cầu, đôi khi hình elíp rộng, 2-2,5 x 2-3 μm .
 Tế bào sinh bào tử trần có phần gốc hình cầu, hình bình, thành cụm dày đặc . . .
 . . . *B.bassiana* (Vuill.) Bals.
2. Bào tử trần phần lớn hình elíp, đôi khi hình gần cầu, 2,0-2,5 x 2,5-4,5 μm .
 Tế bào sinh bào tử trần thon nhỏ, ít khi thành cụm . . .
 . . . *B.bronquiaritii* (Sacc.) Patch

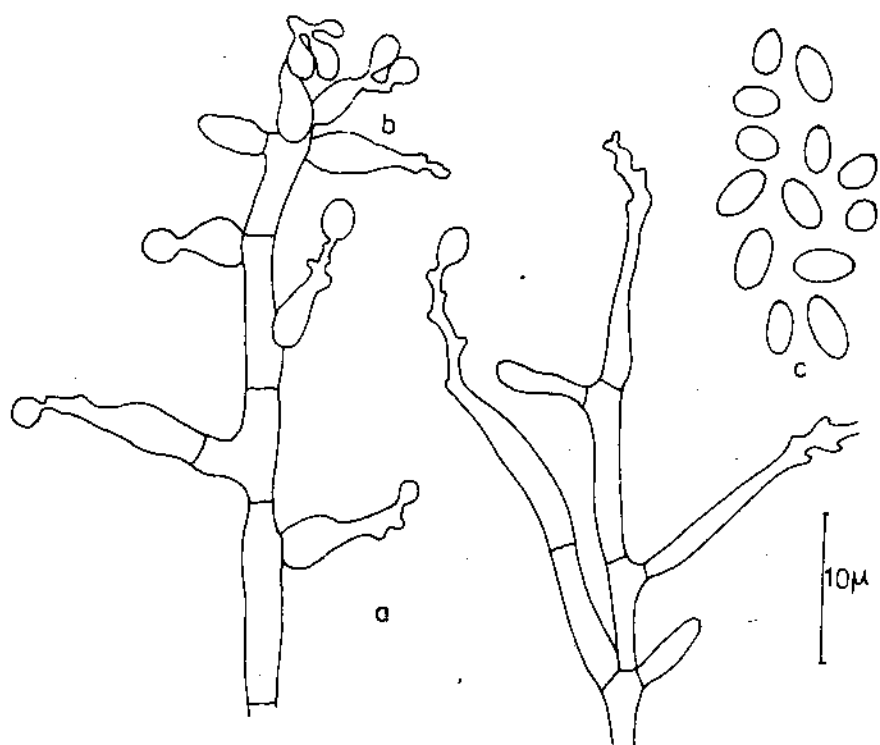
Sau đây là mô tả tóm tắt các loài đã thấy ở Việt Nam.

Beauveria bassiana (Vuill.) Bals. - Khuẩn lạc trên môi trường thạch



Hình 3.4. *Beauveria bassiana* (Vuill.) Bals.

- a- Bộ máy mang bào tử trần với giá bào tử trần và tế bào sinh bào tử trần,
 b- Các dạng tế bào sinh bào tử trần, c- Bào tử trần (De Hoog 1972).



Hình 3.5. *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch

a- Bộ máy mang bào tử trần, b- Tế bào sinh bào tử trần,
c- Bào tử trần (De Hoog, 1972).

- khoai tây (nhiệt độ nuôi cấy 25°C , 7 ngày tuổi) 1 - 2 cm đường kính, dạng bột, nhung, len hoặc xốp bông, màu trắng, trắng ngà vàng, đôi khi các sợi nấm tập hợp thành bó sợi. Các sợi nấm khi sinh mang các giá bào tử trần ngắn, phồng to, $3-5 \times 3-6 \mu\text{m}$. Các giá bào tử trần này hoặc tạo thành các nhánh ở phần ngọn, hoặc trực tiếp tạo thành các tế bào sinh bào tử trần.

Các tế bào sinh bào tử trần mọc thành cụm, đôi khi được tạo thành từ giá bào tử trần hoặc nhánh của giá. Phần gốc của tế bào sinh bào tử trần hình cầu, hình bình, $2,5-3,5 \times 3-6 \mu\text{m}$ hoặc $2,5 - 4,0 \mu\text{m}$ đường kính, phần ngọn dạng cuống hẹp, ngoằn ngoèo hình chữ chi hoặc ngoằn ngoèo không đều, có rãnh, $1 \times 5-20 \mu\text{m}$. Bào tử trần không ngăn vách, hình cầu đôi khi hình elip, đáy tròn đôi khi nhọn, nhẵn, $2,0-2,5 \times 2-3 \mu\text{m}$. Có bào tử áo.

Beauveria brongniartii (Sacc.) Petch.- Khuẩn lạc trên môi trường thạch - khoai tây (nhiệt độ nuôi cấy 25°C , 7 ngày tuổi) 1,0 - 1,5 cm, trắng sau vàng, hồng tím, đỏ tím hoặc tím dạng len, xốp bông, mượt nhung hay dạng bột, đôi khi có bó sợi. Giá bào trần $5 - 9 \mu\text{m}$ đường kính hoặc chiều dài. Tế bào sinh bào tử trần có phần gốc hình gần cầu, hình bình, $2,0-3,5 \times 4-25 \mu\text{m}$, phần ngọn $1,0-1,5 \times 25 \mu\text{m}$, ngoằn ngoèo hình chữ

chi, gai dài 1,0 - 1,5 μm . Bào tử trần không ngăn vách, không màu, nhẵn, hình elip, đôi khi gần cầu, 2,0-2,5 x 2,5-4,5 μm . Không có bào tử áo.

Chi CEPHALOSPORIUM Corda

Giá bào tử trần không có hoặc ngắn, nếu có, không phân nhánh hoặc phân nhánh ít. Tế bào sinh bào tử trần là các thể bình, ở đỉnh giá bào tử trần, nhưng phần lớn mọc trực tiếp, rải rác trên sợi nấm. Các thể bình thon dần từ gốc đến đỉnh. Bào tử trần thuộc tip phialoconidi (típ cơ bản euconidi), không ngăn vách, nhiều hình dạng (hình cầu, hình trứng, elip, hình trụ), không màu hoặc màu nhạt, thành khối cầu nhầy ở miệng thể bình.

Chi *Cephalosporium* được Corda mô tả năm 1839. Các loài của chi này được Gams (1971) chuyển sang các chi *Acremonium* Link ex Fr., *Monocillium* S. B.Saksena và *Verticillium* Nees ex Wallroth. Trong tài liệu này chúng tôi vẫn giữ *Cephalosporium* Cda. với loài *C. acremonium* Cda., vì các tài liệu về kháng sinh học hiện nay vẫn dùng tên loài vì nấm tạo thành kháng sinh cephalosporin này, để tiện việc tra cứu (hình 3.6).

Cephalosporium acremonium Cda.- Khuẩn lạc trên môi trường thạch - khoai tây (nhiệt độ nuôi cấy 27°C, 10 ngày tuổi) có đường kính 16 - 25 cm, sinh nhiều bào tử trần, dạng mặt thay đổi từ mượt đến xốp bông, với các vết nhầy, màu trắng, hồng hoặc da cam nhạt. Giá bào tử trần nếu có rất ngắn, gần thẳng góc với sợi nấm, không phân nhánh. Thể bình thẳng hoặc hơi cong, dài 20 - 40 μm , đường kính 1,4 - 2,5 μm ở gần đáy, giảm dần đến 0,5 - 1,0 μm ở phần đỉnh. Bào tử trần hầu hết hình trụ, đôi khi hình gần cầu hoặc hình quả lê, phần lớn 0,9-1,8 x 3,3-5,5 μm , tụ hợp thành khối cầu hơi nhầy ở đỉnh thể bình. Không có bào tử áo.

Theo W.Gams (1971) tên *Acremonium strictum* W.Gams là tên chính và tên, *Cephalosporium acremonium* sensu auct. plur. non Corda là tên đồng nghĩa *C. acremonium* cho kháng sinh tự nhiên là cephalosporin C, dễ dàng biến đổi thành acid 7-aminocephalosporamic (7-ACA). Cephalosporin C có tác dụng trên *Staphylococcus aureus* và *Salmonella typhi*, nhưng hoạt phổ hẹp và tác dụng yếu. Hiện nay người ta dùng 7-ACA để sản xuất các kháng sinh bán tổng hợp như cephalotin, cephaloridin, cephalacin, v.v.

Chi FUSARIUM LINK ex Fries

Chi *Fusarium* là một chi nấm có số lượng loài đã được mô tả đặc biệt lớn, trên một nghìn loài, nhưng cũng là một chi nấm mà số lượng loài đến nay còn được chấp nhận so với số lượng loài đã được mô tả nói

trên chiếm một tỉ lệ rất nhỏ : trên dưới 1% hoặc 3 - 4% tùy các tác giả khác nhau. Nguyên nhân cơ bản của tình hình trên là khả năng biến dị rất cao của các chủng của chi *Fusarium* trên các cơ chất tự nhiên. Nhiều đặc điểm hình thái hoặc nuôi cấy của các chủng thuộc cùng một loài thay đổi trong một giới hạn rất lớn. Nghiên cứu các đặc điểm này của 8 chủng có nguồn gốc khác nhau thuộc loài *Foxysporum* Schlecht lưu trữ ở Viện Nghiên cứu quốc gia nông nghiệp ở Dijon (Pháp), chúng tôi thấy chẳng hạn 4 trong số 8 chủng này không tạo thành đệm giá nhầy, 4 chủng còn lại tạo thành đệm giá nhầy điển hình, hoặc 2 chủng có màu trắng hồng nhạt, 2 chủng có màu trắng ánh bạc, 2 chủng có màu hồng da cam và 2 chủng còn lại màu trắng hoặc tím hồng nhạt (trên môi trường thạch - khoai tây), v.v. Sự có mặt của bào tử trần lớn (macroconidium) và bào tử trần nhỏ (microconidium) là các đặc điểm cơ bản của các loài thuộc chi nấm này, tính chất đó cũng phụ thuộc vào nguồn gốc các chủng, đặc biệt phụ thuộc vào số lượng lần đã cấy truyền các chủng đó. Tính chất đa dạng của các bào tử trần lớn và nhỏ của mỗi loài cũng là một trong những nguyên nhân tạo ra tình hình mô tả quá nhiều loài nói trên. Những nghiên cứu về phân loại học chi *Fusarium* từ đầu thế kỷ này, đặc biệt từ những năm 1950 trở lại đây, nhờ kỹ thuật nuôi cấy đơn bào tử, các kỹ thuật hiển vi khác được cải tiến, đã có những đổi mới, trước hết là các đặc điểm phân loại của mỗi loài đã được nghiên cứu có hệ thống và do đó đã có những giới hạn cho mỗi đặc điểm đó khá rõ rệt.

Hệ thống phân loại chi *Fusarium* theo hướng đó bắt đầu từ Wollenweber (1910) và tiếp đó là hệ thống của Wollenweber và Reinking (1935) gồm 142 loài và thứ, dạng (form) tập hợp trong 16 nhóm loài. Raillo (1950) chấp nhận hệ thống của 2 nhà nấm học này với những sửa đổi nhỏ. Tiếp tục theo hướng đó, Bilal (1955) đề nghị một hệ thống gồm 26 loài tập hợp trong 9 nhóm loài và sau đó (1977), bổ sung vào chi này 5 loài nữa. Booth (1971) bổ sung thêm các đặc điểm của bộ máy mang bào tử trần của nhiều loài và căn cứ vào các đặc điểm này cùng với các đặc điểm hình thái và nuôi cấy khác, đã đề nghị 12 nhóm loài với 44 loài và thứ được chấp nhận hoặc mô tả mới của chi *Fusarium*. Theo một quan điểm phân loại khác về chi *Fusarium*, Snyder và Hansen (1940), sau đó Toussoun và Nelson (1968), Messiaen và Cassini (1968), ngoài các đặc điểm khác, dùng đặc điểm của gót ngân gốc bào tử trần lớn là một trong các đặc điểm cơ bản, đã tập hợp các loài của Wollenweber và Reinking (1935) vào 9 loài và một số thứ. Loài của chi *Fusarium* theo quan điểm phân loại của các nhà nấm học đó có giới hạn rất rộng và do đó nhiều nhóm chủng của cùng một loài có những đặc

điểm hóa sinh trước hết là đặc điểm về sự có mặt của các mycotoxin khá xa nhau hoặc hoàn toàn khác nhau. Loài *F.tricinctum* (Cda.) Snyder et Hansen chẳng hạn trong hệ thống của Snyder và Hansen tương đương với 4 loài trong hệ thống của Booth, trong 4 loài này chỉ có loài *F.sporotrichoides* Sherb. có mycotoxin gây tăng bạch cầu. Vì các loài theo quan điểm phân loại của Snyder và Hansen quá rộng như vậy, nên hệ thống phân loại chi *Fusarium* của Booth (1971) và của Bilal (1977) hiện được sử dụng rộng rãi trong các cơ sở phân loại ở các nước.

Giai đoạn hữu tính (giai đoạn bào tử túi) của trên 10 loài và thứ thuộc chi *Fusarium* thuộc các loài của các chi Năm túi *Calonectria* de Not., *Giberella* Sacc., *Micronectriella* Speg. và *Nectria* Fr.

Về chi *Fusarium* ở 3 nước Đông Dương, Bugnicourt (1939) đã phát hiện và mô tả 29 loài và thứ ký sinh trên 112 loài cây Hạt kín (ngành Ngọc Lan) và 3 loài côn trùng. Các loài và thứ này đã được kiểm tra lại và được xác định là thuộc 11 loài và thứ còn giá trị, 18 nhóm phân loại khác đã trở thành các tên đồng nghĩa (B.X.Đồng 1986). Sau Bugnicourt, một số loài và thứ khác thuộc chi *Fusarium* đã được phát hiện và mô tả.

Công nghệ sinh học dùng loài *F.monoliforme* Sheldon để sản xuất chất kích thích sinh trưởng thực vật giberillin đã có những ứng dụng trong thực tiễn nông nghiệp ở nhiều nước. Ở nước ta, một số công trình nghiên cứu phân lập tuyển chọn các chủng nấm thuộc loài *F.monoliforme*, nghiên cứu nuôi cấy, chiết xuất giberillin và nghiên cứu ứng dụng kích thích tố sinh trưởng thực vật này đối với một số cây trồng đã được thực hiện trong hơn 30 năm qua (N.L.Dũng 1965, L.K.Bảng và Cs. 1975, 1988, L.V.Tri và Cs. 1988, v.v.). Một số loài thuộc chi *Fusarium* cũng đã được nghiên cứu về mycotoxin (N.T.Châu 1996).

Bảng 3.14. Khóa định loại các loài thuộc chi *Fusarium* Link ex Fr. có ở Việt Nam (B.X.Đồng, 1986). (Môi trường thạch - khoai tây, nhiệt độ nuôi cấy 27°C, 7 ngày tuổi)

1. Khuẩn lạc trên 2.5 cm đường kính	2
1. Khuẩn lạc dưới 2.5 cm đường kính	16
2. Có bào tử trần nhỏ	3
2. Không có bào tử trần nhỏ	9
3. Bào tử trần nhỏ xếp thành chuỗi	4
3. Bào tử trần nhỏ không xếp thành chuỗi	5
4. Khuẩn lạc màu đỏ carmin	

F.deccemcellulare Brick

4. Khuẩn lạc màu hồng, tím da cam, hồng tím . . .
... *F.moniliforme* Sheldon
5. Bào tử trần nhỏ được tạo thành trên các thể bình nhiều miệng 6
5. Bào tử trần nhỏ được tạo thành trên các thể bình một miệng 7
6. Khuẩn lạc có sắc tố màu đỏ. Bào tử trần nhỏ có loại thuộc tip blastoconidi . . .
... *F.sporotrichoides* Sherb.
6. Khuẩn lạc có sắc tố nâu nhạt, tím hồng. Không có bào tử trần thuộc tip blastoconidi . . . *F.moniliforme* Sheldon var. *subgluticans* Wollenw. et Reinking
7. Bào tử trần nhỏ hình gần cầu (tạo thành trên các thể bình ngắn, phồng to)
... *F.poae* (Peck) Wollenw.
7. Bào tử trần nhỏ hình elip, hình trứng 8
8. Giá bào tử trần phân hóa rõ rệt, có nhánh mang các thể bình dài . . .
... *F.solani* (Martius) Sacc.
8. Giá bào tử trần rất ngắn hoặc không có. Thể bình tạo thành các bào tử trần nhỏ ngắn, phồng to, phần lớn mọc từ sợi nấm . . .
... *F.oxysporum* Schlecht.
9. Bào tử trần lớn có nhiều hình dạng và kích thước 10
9. Bào tử trần lớn phần lớn có cùng hình dạng và kích thước 13
10. Bào tử trần lớn có loại thuộc tip blastoconidi 11
10. Bào tử trần lớn hoàn toàn thuộc tip phialoconidi 12
11. Bào tử trần lớn hình trứng, nhọn ở 2 đỉnh, 3-5 vách ngang . . .
... *F.camptoceras* Wollenw. et Reinking
11. Bào tử trần lớn hình thoi, 3 - 7 vách ngang . . .
... *F.semitectum* Berk. et Rav. var. *malus* Wollenw.
12. Bào tử trần lớn có ngắn gốc rộng hoặc hình nêm, cong . . .
... *F.tumidum* Sherb.
12. Bào tử trần lớn có ngắn gốc thon nhỏ thành hình cuống nhỏ ở phần cuối
... *F.equiseti* (Cda.) Sacc.
13. Phần lớn bào tử trần lớn thẳng 14
13. Phần lớn bào tử trần lớn có mặt lưng và mặt bụng 15
14. Khuẩn lạc màu đỏ carmin. Giá bào tử trần lớn phân nhánh ở đỉnh nhiều lần theo kiểu *Penicillium* . . .
... *F.stilboides* Wollenw.
14. Khuẩn lạc có màu sắc khác nhau, nhưng không có màu đỏ carmin. Giá bào tử trần lớn có 2 - 3 nhánh ở đỉnh . . .

15. Ngăn đỉnh của bào tử trần lớn nhọn hoặc cong hình mỏ ...

... *F.culmorum* (W.G.Smith) Sacc.

15. Ngăn đỉnh của bào tử trần lớn thon nhỏ dần ...

... *F.graminearum* Schwabe

16. Khuẩn lạc rất hẹp. 1 cm đường kính. (Giá bào tử trần lớn rất ngắn hoặc không có) ...

... *F.merismoides* Cda.

16. Khuẩn lạc 2.0 - 2.5 cm đường kính

17

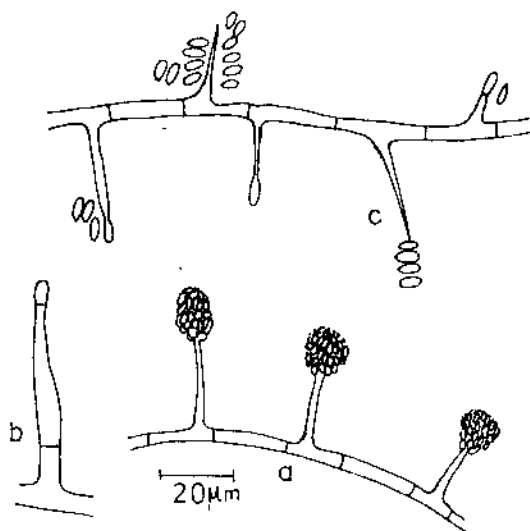
17. Bào tử trần lớn hầu hết có 1 vách ngang Có bào tử áo. Thể bình dài 10 - 18 μm ...

... *F.dimerum* Penzig

17. Bào tử trần lớn có 1 - 3 vách ngang Không có bào tử áo Thể bình dài 7 - 9 μm ...

... *F.univale* (Fr.) Cda.

Fusarium graminearum Schwabe (Perf.st. : *Gibberella zeae* (Schw.) Petch) - Khuẩn lạc trên môi trường thạch-khoai tây, nhiệt độ nuôi cấy 27°C, 7 ngày tuổi, 9 - 10 cm đường kính, màu nâu, hồng tím nâu, không có hoặc hiếm đệm giả (sporodochium). Giá bào tử trần lớn ngắn, mang nhánh ở phần đỉnh, nhánh dài 5 - 12 μm . Thể bình thường đơn độc ở



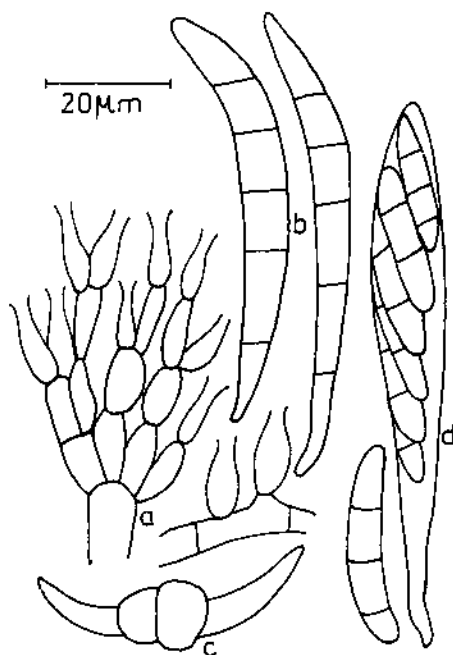
Hình 3.6. *Cephalosporium* sp.

- a. Thể bình mang khối bào tử trần hình cầu ở trên miệng.
b. Thể bình. c. Thể bình với các bào tử trần vừa được tạo thành.

đỉnh các nhánh và xen lẫn với các nhánh ở đỉnh giá, đôi khi tăng sinh tạo thành nhánh của giá ở miệng, có kích thước $3,5-4,5 \times 10-15 \mu\text{m}$. Bào tử lớn hầu hết 3 - 7 vách ngang, 3 vách ngang $2,5-4,0 \times 25-35 \mu\text{m}$, 4 vách ngang $2,5-4,0 \times 25-42 \mu\text{m}$, 5 - 7 vách ngang $2,5-5,0 \times 35-60 \mu\text{m}$. Không có bào tử trần nhỏ. Bào tử áo 10 - 12 μm đường kính. Thể quả túi 140 - 250 μm trục lớn, túi bào tử chứa 8 bào tử túi. Bào tử túi hình thoi, cong, phần lớn 3 vách ngang, $3-4 \times 19-24 \mu\text{m}$ (Hình 3.7).

Tạo thành các trichothecen (mycotoxin gây nôn mửa, ỉa chảy, tổn thương tế bào ở tủy xương, tuyến giáp trạng, giảm bạch cầu) và zearalenon (mycotoxin tác dụng xấu đến đông hóa ở động vật, gây phù nề bộ phận sinh dục của lợn cái, làm teo buồng trứng, gây sẩy thai).

Fusarium moniliforme Sheldon (Perf.st. : *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Ito et Kimura)- Khuẩn lạc trên môi trường thạch-khoai tây nhiệt độ nuôi cấy 27°C , 7 ngày tuổi, 4 - 5 cm đường kính, xốp bông, màu trắng ngà, hồng tím, vài vùng có dạng bột. Giá bào tử trần lớn, 10 - 20 μm dài, đơn hoặc có 2 - 3 nhánh ở phần đỉnh. Thể bình thành cụm 2 - 3 chiếc trên đỉnh giá hoặc đỉnh nhánh, $3,5-4,0 \times 20-25 \mu\text{m}$. Bào tử trần

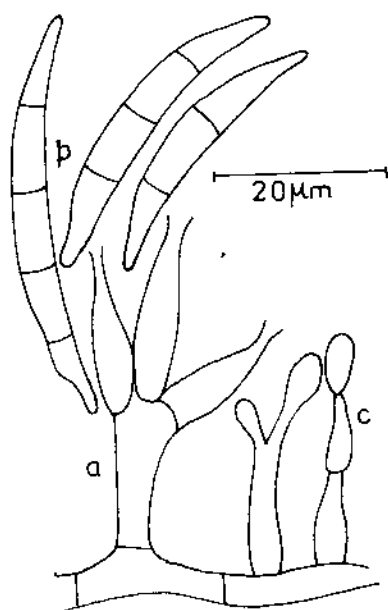


Hình 3.7. *Fusarium graminearum* Schwabe

- a- Giá bào tử trần, b- Bào tử trần lớn, c- Bào tử áo tạo thành trên bào tử trần lớn, d- Túi bào tử và bào tử túi (B.X.Đồng, 1986).

lớn có ngăn đỉnh dài, cong, ngắn gốc thon đột ngột thành cuống ngắn và hẹp, 3 - 7 vách ngang $2,5-4,0 \times 30-50 \mu\text{m}$, loại 7 vách ngang $3-4 \times 30-65 \mu\text{m}$. Thể bình tạo thành bào tử trần nhỏ ở trên sợi nấm, đơn độc $2-3 \times 20-30 \mu\text{m}$. Bào tử trần nhỏ hình thoi, 0-1 vách ngang, $1,5-2,5 \times 5-12 \mu\text{m}$, thành chuỗi. Không có bào tử áo. Hạch nấm hình cầu, màu xanh sẫm. Theo Booth (1971), thể quả túi ở trên lá cây đã rụng (Hình 3.8).

Tạo thành giberellin (kích thích tố sinh trưởng thực vật), fumonisin (mycotoxin gây viêm gan, tràn dịch phổi).

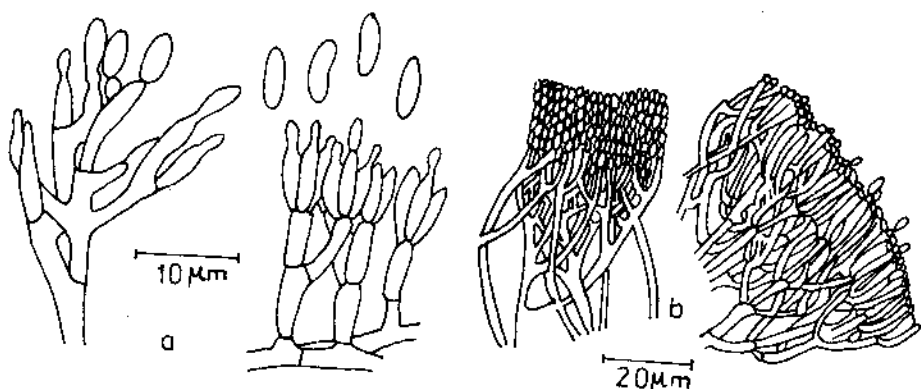


Hình 3.8. *Fusarium moniliforme* Sheldon

a- Giá bào tử trần, b- Bào tử trần lớn, c- Thể bình tạo thành các bào tử trần nhỏ (B.X.Đồng, 1986).

Chi METARHIZIUM Sorokin

Chi *Metarhizium* được mô tả bởi Sorokin năm 1883 với loài *M.anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Sau đó vài loài được mô tả mới (Petch 1931, 1935, Pope 1944, Borowska 1970, v.v.). Tulloch (1976) kiểm tra và chấp nhận các loài *M.anisopliae* (Metsch.) Sorokin với 2 thứ và loài *M.flavoviride* Gams et Rozsypal. Loài *M.anisopliae* với 2 thứ *M.anisopliae* var.*anisopliae* Sorokin và *M.anisopliae* var.*major* (Johnstom) Tulloch đã được phân lập từ một số mẫu côn trùng thuộc các bộ Cánh vẩy (Lepidoptera) và Cánh giồng (Isoptera) ở nước ta, và đã được dùng để



Hình 3.9. *Metarhizium* sp.

a- Giá bào tử trần mang thể bình và bào tử trần, b- Thể bình và chuỗi bào tử trần thành lớp (Litvinov, 1967).

nghiên cứu sản xuất các chế phẩm diệt một số côn trùng và mối hại cây trồng (*Odontotermes hainanensis* Light), hại công trình (*Coptotermes formosanus* Shir) (T.K.Chính 1996).

Chi *Metarhizium* đặc trưng bởi các giá bào tử trần mọc sát nhau trên sợi nấm, do đó tạo thành một lớp dày. Phần ngọn các giá đó mang các nhánh ngắn hoặc các thể bình. Thể bình đơn độc từng đôi hay thành vòng. Bào tử trần thuộc tip phialoconidi (tip cơ bản euconidi), không ngăn vách, hình trứng dài hoặc hình trụ, không màu hoặc màu nhạt, thành chuỗi gốc non, thường tụ lại thành dạng cột (hình 3.9).

Bảng 3.15. Khóa định loại các loài và thứ thuộc chi *Metarhizium* Sorokin (Theo M. Tulloch, 1976)

1. Bào tử trần hình trụ hoặc hình trứng, thường hơi hẹp lại ở giữa và vuông vắn ở 2 đỉnh. Khuẩn lạc có những màu lục khác nhau, màu xám da cam, xám vàng . . .
 . . . *M.flavoviride* Gams et Rozsypal
1. Bào tử trần hình elip với 2 hoặc 1 đỉnh tròn. Khuẩn lạc màu lục xám vàng. lục xám . . .
 . . . *M.anisopliae* (Metsch.) Sorokin
- Bào tử trần 3,5 - 9,0 μm dài (thường 5 - 8 μm) . . .
 . . . *M.anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin
- Bào tử trần 9 - 18 μm dài (thường 10 - 14 μm) . . .
 . . . *M.anisopliae* var. *varmator* (Johnston) Tulloch

Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin - Khuẩn lạc trên môi trường thạch-khoai tây (nhiệt độ nuôi cấy 27°C, 7 ngày tuổi) màu trắng sau chuyển thành màu lục xám nhạt, lục xám vàng. Giá bào tử trần ngắn vách, nhẵn, không phân nhánh hoặc có 1 - 2 nhánh ở phần ngọn, thường tập hợp thành một lớp dày gồm các thể bình ở đỉnh giá và đỉnh các nhánh. Thể bình mọc đối hoặc mọc vòng, ít khi đơn độc, 2,3-2,5 x 7-11 μ m, hình trụ hoặc hình bình. Bào tử trần không màu hoặc màu lục nhạt, lục xám nhạt, hình elip thẳng hoặc hơi cong, 3,5 - 9 μ m hoặc 9 - 18 μ m trục dài, thành chuỗi.

Chi PAECILOMYCES Bainier

Chi *Paecilomyces* do Bainier mô tả năm 1907, sau đó được nhiều tác giả chấp nhận chỉ mới này và bổ sung nhiều loài mới. Chuyên luận về chi nấm này của Samson (1974) chấp nhận 16 loài đã mô tả, đồng thời tổ hợp mới 9 loài và đề nghị 6 loài mới, tất cả tập hợp trong 2 nhóm loài. Nhóm loài thứ nhất là nhóm loài *Paecilomyces* có các giai đoạn bào tử túi thuộc các chi *Byssochlamys* Westling, *Talaromyces* C.R.Benjamin và *Thermoascus* Miehe, gồm các loài ưa nhiệt ôn hòa (mesophile), chịu nhiệt và ưa nhiệt, có khuẩn lạc màu nâu vàng hoặc các màu nâu khác. Nhóm loài thứ hai là nhóm loài *Isarioides* gồm các loài không có giai đoạn bào tử túi, ưa nhiệt ôn hòa và có khuẩn lạc màu tím hồng, màu lục và màu vàng. Nhiều loài trong nhóm loài thứ hai này ký sinh gây bệnh côn trùng.

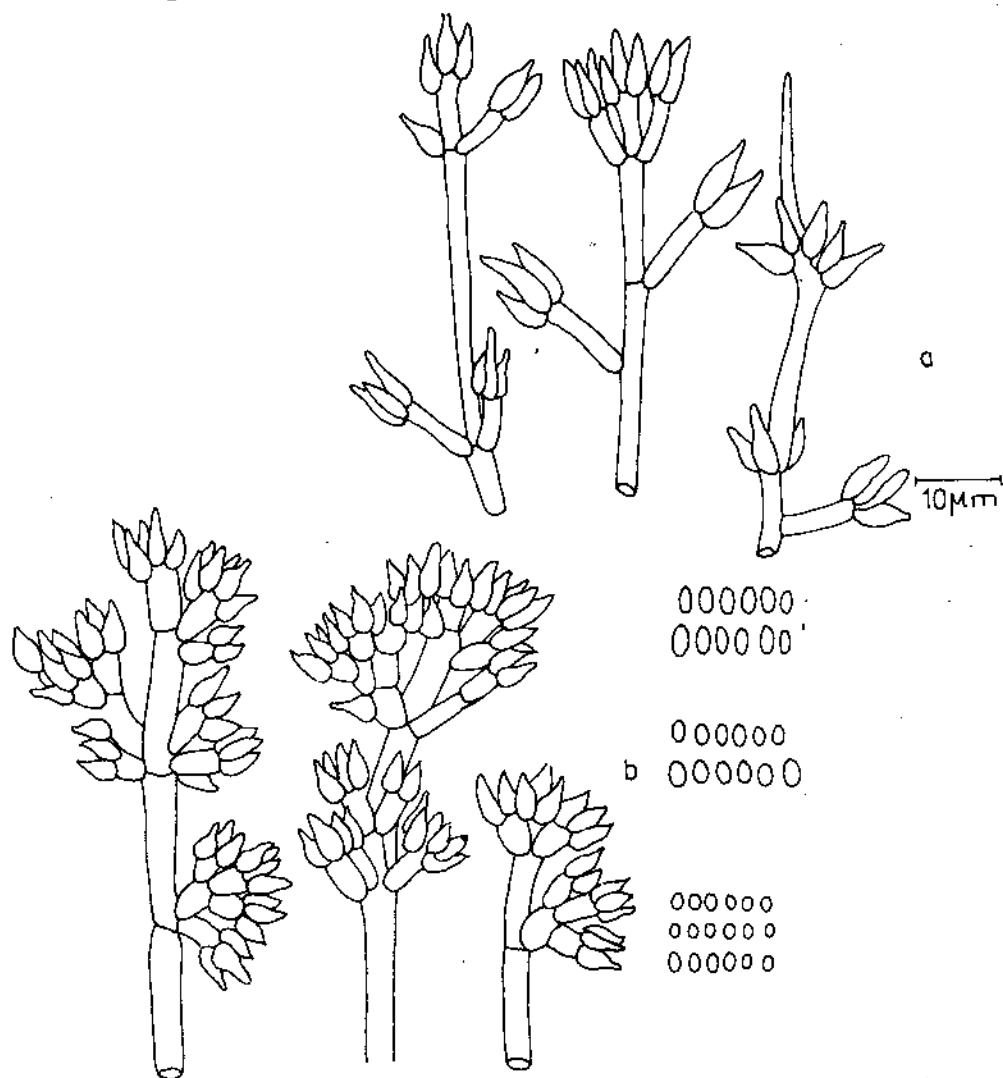
Chi *Paecilomyces* đặc trưng bởi những đặc điểm :

Khuẩn lạc màu trắng, lục, tím nhạt, vàng hoặc vàng nâu. Giá bào tử trần đơn độc hoặc thành bó giá, phân nhánh không đều hoặc thành vòng. Nhánh mang ở đỉnh thể bình mọc thành vòng. Thể bình đôi khi đơn độc trên các sợi nấm không phân hóa. Thể bình gồm phần gốc hình trụ hoặc hình gần trứng và phần ngọn thon nhỏ đột ngột thành một cổ dài. Bào tử trần thuộc tip phialoconidi (tip cơ bản euconidi), không ngắn vách, không màu hoặc màu nhạt, nhẵn hoặc có gai, thành chuỗi gốc non. Các chuỗi bào tử trần tách xa nhau, ít khi tụ hợp thành khối.

Chi *Acremonium* Link ex Fr. phân cách với chi *Paecilomyces* bởi các thể bình thường đơn độc trên sợi nấm không phân hóa hoặc trên các giá bào tử trần ngắn, và bởi các thể bình hình dùi. Chi *Penicillium* Link ex Fr. phân cách với chi *Paecilomyces* bởi các thể bình hình bình, cũng có phần ngọn hẹp nhưng không dài như ở *Paecilomyces* và sắp xếp thành dạng chổi. Ngoài ra 2 chi nấm này phân cách nhau bởi sự có mặt của bào tử áo ở nhiều loài của chi *Paecilomyces* và không có bào tử áo ở các loài thuộc chi *Penicillium*. Các chi lân cận với chi *Paecilomyces* về các đặc điểm phát sinh conidi và các đặc điểm hình thái còn có các chi :

Acrophialophora Edward, *Akanthomyces* Lebert, *Gabarnaudia* Samson et W.Gams, *Mariannaea* Arnaud, *Nalanthamala* Subram., *Nomuraea* Maublanc, *Phialocladus* Kreisel, *Phialotubus* Roy et Leelavathy, *Septofusidium* W.Gams, *Sesquicillium* W.Gams, *Tolypocladium* W.Gams và *Verticillium* Nees ex Wallr.

Loài *P.variotii* Bainier là loài thường gặp nhất ở không khí, đất và trên các sản phẩm công nông nghiệp ở nước ta (Đ.H.Miễn, 1980), tạo thành kháng sinh variotin (kháng sinh chống nấm), cũng tạo thành



Hình 3.10. *Paecilomyces farinosus* (Holm ex S.F.Gray) Brown et Smith

a- Các dạng khác nhau của giả bào tử trần, b- Bào tử trần ở các chùng khác nhau (Samson, 1974).

mycotoxin là acid byssochlamic và một số sản phẩm trao đổi chất khác. Thường sống hoại sinh, nhưng loài vi nấm này có khả năng gây bệnh trên người và súc vật.

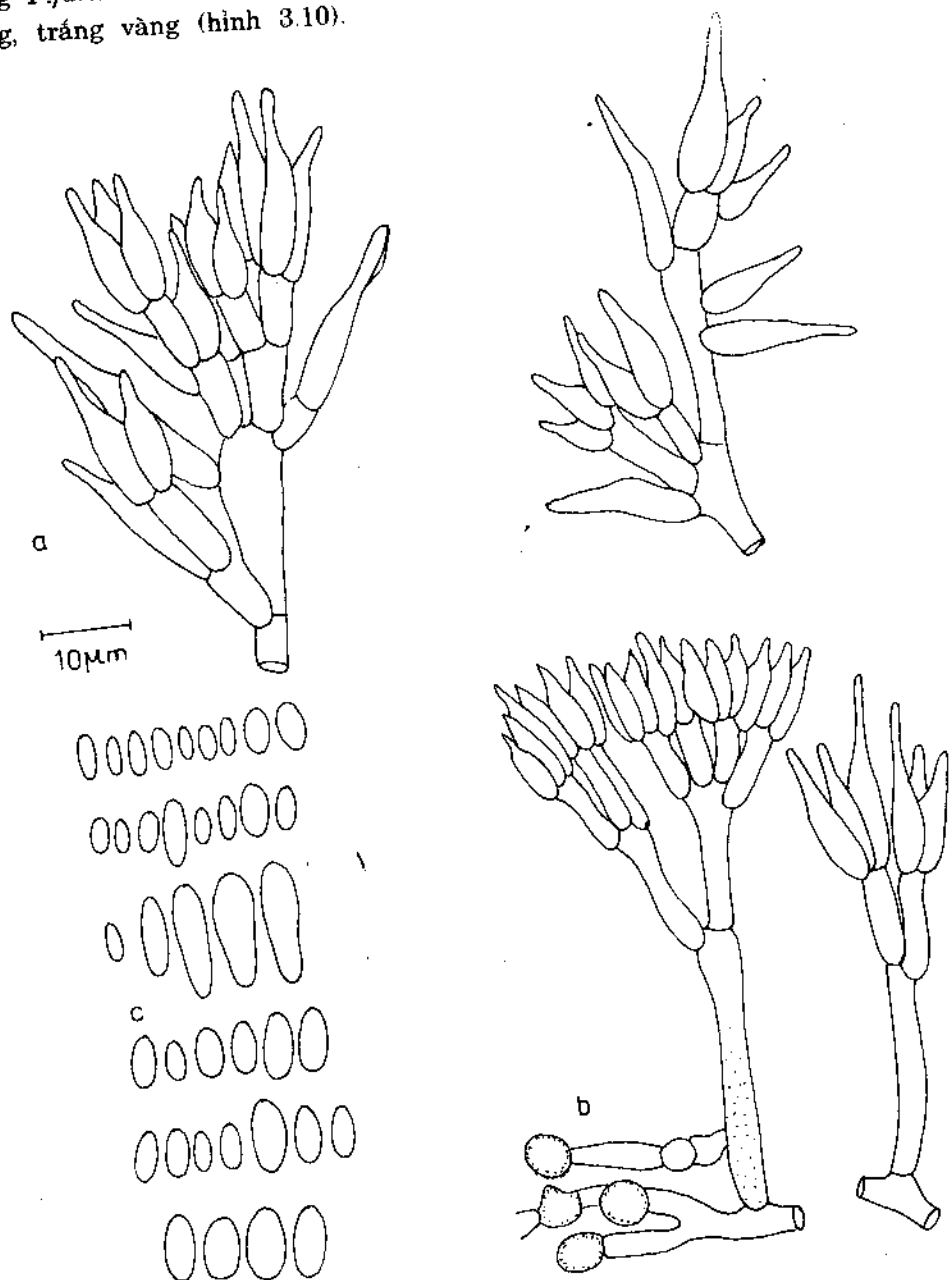
Loài *P.farinosus* (Holm ex S.F.Gray) Brown et Smith gây bệnh nhiều loài côn trùng, phân bố rộng rãi ở nhiều vùng trên thế giới, đã được phân lập từ một số loài côn trùng thuộc bộ cánh vảy (Lepidoptera) và bộ cánh giồng (Isoptera) ở nước ta (T.K.Chính, 1996).

Bảng 3.16. Khóa định loại các loài *Puccilomyces variotii* Bain. và *P.farinosus* (Holm ex S.F.Gray) Brown et Smith và các loài lân cận thuộc chi *Puccilomyces* Bain. (môi trường thạch-cao lúa mạch, nhiệt độ nuôi cấy 27°C, 10 ngày tuổi)

- | | |
|--|---|
| 1. Khuẩn lạc màu nâu vàng, nâu | 2 |
| 1. Khuẩn lạc màu trắng hoặc màu tười nhạt | 3 |
| 2. Khuẩn lạc dạng bột, đôi khi xốp bông nhẹ, 8 cm đường kính. Bào tử trần nhiều hình dạng, phần lớn 2-4 x 3,2-5,0 μm . . . | |
| . . . <i>P.variotii</i> Bain. | |
| 2. Khuẩn lạc dạng xốp bông, 6 cm đường kính. Bào tử trần phần lớn 1,7-4,3 x 7,0-11,5 μm . . . | |
| . . . <i>P.clavisporus</i> Hammill | |
| 3. Thể bình hầu hết đơn độc trên các sợi nấm không phân hóa hoặc trên các giá bào tử trần ngắn. (Bào tử trần hình hạt chanh, 2-3 x 3-4 μm) . . | |
| . . . <i>P.inflatus</i> (Burnside) Carmichael | |
| 3. Thể bình hầu hết mọc trên các giá bào tử trần | 4 |
| 4. Bào tử trần hình elip hay hình thoi, 10-18 x 2-3 μm . Khuẩn lạc màu trắng đến vàng nhạt. Bó giá trên cơ chất tự nhiên màu trắng đến vàng . . . | |
| . . . <i>P.farinosus</i> (Holm ex S.F.Gray) Brown et Smith | |
| 4. Bào tử trần hình gần cầu đến elip. Khuẩn lạc màu trắng đến đỏ. Bó giá trên cơ chất tự nhiên màu đỏ tối . . . | |
| . . . <i>P.amucroscus</i> (P.Henn.) Samson | |

Puccilomyces farinosus (Holm ex S.F.Gray) Brown et Smith - Khuẩn lạc trên môi trường thạch-cao lúa mạch (nhiệt độ nuôi cấy 27°C, 10 ngày tuổi) 4 - 5 cm đường kính, mặt dạng bột, đôi chỗ dạng xốp bông nhẹ, trắng sau màu vàng tươi nhạt với các bó giá màu vàng. Giá bào tử trần hầu hết mọc từ các sợi nấm nền, nhẵn, không màu, 1,0-2,5 x 100-300 μm , mang 1-5 nhánh ở đỉnh và phần ngọn giá. Thể bình ở đỉnh giá hoặc đỉnh các nhánh thành cụm, đôi khi mọc trực tiếp trên giá, 1,5-2,5 x 5-15 μm , gồm phần gốc hình gần cầu hoặc trứng và phần cổ hẹp 0,5 μm chiều

ngang. Bào tử trần hình elip, hình thoi, đôi khi hình hạt chanh, 1,0-1,8 x 2-3 μm , nhẵn, không màu, thành chuỗi. Không có bào tử áo. Trên côn trùng *P. farinosus* có dạng một lớp bột màu trắng với nhiều bố giá màu trắng, trắng vàng (hình 3.10).



Hình 3.11. *Paecilomyces variotii* Bainier

a- Các dạng của giá bào tử trần, b- Bào tử áo,
c- Bào tử trần của các chủng khác nhau (Samson, 1974).

Paecilomyces varioti Bainier - Khuẩn lạc trên môi trường thạch-cao lúa mạch (nhiệt độ nuôi cấy 27°C, 10 ngày tuổi) 6 - 8 cm đường kính, mặt dạng bột, đôi khi xốp bông hoặc có ít bó sợi, màu lục nâu, vàng lục. Giá bào tử trần nhẵn hoặc hơi xù xì, 4-7 x 30-12 μm , mang các nhánh xếp thành vòng hoặc không đều. Thể bình 2,5-5,0 x 15-25 μm mọc thành cụm 2 - 7 chiếc hoặc đơn độc, phần gốc hình trụ hoặc gần elip, phần cổ hình trụ dài, 1,0 - 1,5 μm . chiều ngang. Bào tử trần hình gần trụ, hình elip, 2,5-4,0 x 3,5-5,0 μm , nhẵn, không màu hoặc màu vàng nhạt thành chuỗi. Bào tử áo đơn độc hoặc thành chuỗi ngắn, hơi xù xì, màu nâu, hình cầu hoặc hình quả lê, 5,5 - 8,0 μm đường kính (hình 3.11).

Chi *PENICILLIUM* Link ex Fries

Chi *Penicillium* do Link mô tả đầu tiên năm 1809 với 3 loài *P.candidum*, *P.expansum* và *P.glaucum*, sau đó được S.F.Gray (1821), Fries (1932) chấp nhận nhưng loại bỏ loài *P.glaucum* vì giới hạn loài này quá rộng (tất cả các loài có bộ máy mang bào tử trần dạng chổi và mọc thành khuẩn lạc màu lục). Tên loài *P.glaucum* sau đó đều không được chấp nhận trong tất cả các chuyên luận phân loại của chi nấm này. Sau Fries, nhiều loài thuộc chi *Penicillium* đã được phát hiện và mô tả. Trong chuyên luận về chi *Penicillium* của Biourge (1923) đã mô tả mới và tập hợp các loài đã mô tả trước đó, đã có tới 128 loài. Biourge đề nghị 2 phân chi của chi *Penicillium* : phân chi *Eupenicillim* gồm các loài có giá bào tử trần mang các nhánh và các vòng thể bình và phân chi *Monoverticillium* chỉ có giá bào tử trần mang vòng thể bình. Chuyên luận của Thom (1930) mở đầu cho quan điểm phân loại học về chi *Penicillium* mà hiện nay vẫn được sử dụng rộng rãi. Thom đề nghị 4 nhóm loài (sectio) của chi nấm bất toàn này căn cứ vào cấu tạo của bộ máy mang bào tử trần : *Monoveticillata*, *Asymmetrica*, *Biverticillata-Symmetrica* và *Polyverticillata*. Nhóm loài *Asymmetrica* được chia làm 6 phân nhóm (subsectio, series) căn cứ vào dạng mặt khuẩn lạc và một phần vào đặc điểm hình thái của bộ máy mang bào tử trần. Chuyên luận về chi *Penicillium* của Raper và Thom (1949) hiện nay đang được dùng rộng rãi về cơ bản theo quan điểm phân loại học của Thom (1930) về chi nấm này với vài thay đổi nhỏ : Nhóm *Asymmetrica* còn 5 phân nhóm (*Divaricata*, *Velutina*, *Lanata*, *Funiculosa* và *Fasciculata*), quan niệm về nhóm loài *Polyverticillata* hẹp hơn trước, chỉ còn loài *P.albicans* Bain. Điều đáng chú ý là Thom (1930), Raper và Thom (1949) không (theo Luật quốc tế về danh pháp thực vật (điều 59), chỉ chấp nhận tên chi *Penicillium* cho cả các loài thuộc chi nấm này có hoặc không có giai đoạn hữu tính (giai đoạn bào tử túi). Đóng góp quan trọng của Thom và

sau đó của Raper và Thom là trên cơ sở nghiên cứu nhiều chủng khác nhau của hầu hết các loài thuộc chi *Penicillium* đã được công bố (cho đến 1949), đã xây dựng một quan niệm về loài đối với chi nấm này và đã kiểm tra, chọn lựa để mô tả mới và mô tả lại 141 loài và thứ được chấp nhận với các tên đồng nghĩa. Chuyên luận của Raper và Thom (1949) sau đó được tái bản nhiều lần, không có thay đổi và bổ sung. Từ Raper và Thom (1949) đến nay, chúng ta có thể thấy một số công trình nghiên cứu phân loại học về chi *Penicillium* đáng chú ý như Abe (1956), Pidoplitsko (1972), Fassatióvá (1975), Samson và ct. (1976) với một số thay đổi ở một số nhóm loài và quan trọng hơn là thay đổi về quan niệm loài (do đó về giới hạn các loài) ở các phân nhóm Fasciculata, Funiculosa và Lanata thuộc nhóm loài *Asymmetrica*⁽¹⁾. Tiếp sau đó, 2 chuyên luận phân loại về chi *Penicillium* đáng chú ý là chuyên luận của Pitt (1979) và chuyên luận của Ramirez (1982). Trong chuyên luận của Pitt, quan niệm về loài ở tất cả các nhóm loài thuộc chi *Penicillium* được xác định lại, các chi Nấm túi có giai đoạn bào tử trần được chấp nhận theo đúng Luật danh pháp quốc tế về thực vật. Do quan niệm mới đó, chỉ còn 67 loài mô tả trong chuyên luận của Raper và Thom (1949) được Pitt chấp nhận, đồng thời Pitt mô tả lại và mô tả mới (loài mới - sp.nov., tên mới - nom.nov., tổ hợp mới-comb.nov.) 37 loài thuộc chi *Eupenicillium* Ludwig, 16 loài thuộc chi *Talaromyces* C.R. Benjamin và 150 loài thuộc chi *Penicillium*, cùng với các nhóm loài và các phân nhóm mới trong các chi. Chuyên luận của Ramirez không thay đổi về quan điểm phân loại so với chuyên luận của Raper và Thom (1949), chỉ bổ sung các loài mới được mô tả sau 1949, với các tổ hợp mới (*Penicillium* series *atrosanguineum* ser.nov. gồm 2 loài *P.atro-sanguineum* B.X.Đông, 1973 và *P.griseo-purpureum* Smith, 1966, và một số tổ hợp mới khác).

Chi *Penicillium* thuộc họ Moniliaceae, bộ Moniliales, lớp Nấm bất toàn (*Deuteromyces*, *Fungi imperfecti*) trong hệ thống phân loại hình thái (Saccardo 1886), hoặc tổ chi VI (section VI), nhóm *Hyphomycetes* trong hệ thống phân loại nhóm *Hyphomycetes* của Hughes (1953), tổ chi *Phialoconidiaceae*, nhóm phụ *Euhyphomycetidae*, nhóm *Hyphomycetes* trong hệ thống phân loại nhóm Nấm bất toàn này của B.X.Đông (1972). Các loài có giai đoạn bào tử túi đã phát hiện được thuộc các chi Nấm túi *Eupenicillium* Ludwig, *Talaromyces* C.R.Benjamin, *Hamigera* Stolk et Samson, *Trichoskytale* Cda., *Dichiaena* Montagne et Durieux. Các chi Nấm túi này thuộc họ *Trichocomataceae* (bộ *Eurotiales*, lớp *Plectomycetes*, ngành phụ *Ascomycotina*, ngành Nấm - *Mycota*).

(1) Xem chi tiết ở "Nhóm nấm *Hyphomycetes* ở Việt Nam", tập II. NXB. Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội, 1986.

Chi *Penicillium* đặc trưng bởi các đặc điểm :

Sợi nấm ngăn vách, phân nhánh, không màu hoặc màu nhạt, đôi khi màu sẫm.

Khuẩn lạc màu lục, vàng lục, xanh lục, lục xám, xám, đôi khi có màu vàng, đỏ, tím hoặc trắng. Mặt trái khuẩn lạc không màu hoặc có màu sắc khác nhau, môi trường thạch nuôi cấy không màu hoặc có màu sắc do có mặt các sắc tố hòa tan tương ứng. Khuẩn lạc có hoặc không có vết khía xuyên tâm hay đồng tâm, có hoặc không các giọt tiết (exudat).

Bộ máy mang bào tử trần (còn gọi là "chổi", penicillus) hoặc chỉ gồm giá bào tử trần với một vòng thể bình ở đỉnh giá (cấu tạo 1 vòng, monoverticillate), hoặc gồm giá bào tử trần với 2 đến nhiều cuống thể bình (metulae) ở phần ngọn giá, trên đỉnh của mỗi cuống thể bình đó có các thể bình (cấu tạo 2 vòng, biverticillate). Trường hợp các giá bào tử trần mang 1 hoặc nhiều nhánh (branch) ở phần ngọn giá, sau đó các nhánh mang các cuống thể bình và các cuống thể bình lại mang các thể bình cũng được coi là cấu tạo 2 vòng. Khi các cuống thể bình xếp đều đặn và sát nhau trên ngọn giá, cấu tạo 2 vòng đó được gọi là cấu tạo 2 vòng đối xứng, trường hợp các cuống thể bình xếp không đều trên phần ngọn giá hoặc có nhánh, cấu tạo này được gọi là cấu tạo 2 vòng không đối xứng. Trường hợp giá bào tử trần mang nhiều nhánh và các nhánh này cùng với các cuống thể bình, các thể bình xếp đều đặn và sát nhau, bộ máy mang bào tử trần có cấu tạo nhiều vòng (polyverticillate).

Giá bào tử trần có thể phát triển từ các sợi nấm nằm sát cơ chất, sát mặt môi trường thạch nuôi cấy (các sợi nền), khi đó thường có chiều dài đều nhau, và khuẩn lạc có dạng mặt nhung (velutinate). Giá bào tử trần có thể là nhánh của các sợi nấm khí sinh, khuẩn lạc trong trường hợp này có mặt dạng len hoặc xốp bông (lanate, floccose). Trường hợp các giá bào tử trần là các nhánh của các bó sợi hoặc bản thân chúng tụ hợp lại với nhau thành các bó giá, khuẩn lạc đặc trưng bởi sự có mặt của các bó sợi (funiculose) hoặc của các bó giá (fasciculate).

Tế bào sinh bào tử trần của các loài thuộc chi *Penicillium* là các thể bình. Thể bình ở nhiều loài của chi nấm này có phần đỉnh ngắn và thon nhỏ dần, phần đỉnh này thường có đường kính vào khoảng 1/3 đường kính của phần thân. Một số loài thuộc nhóm loài Biverticillata-Symmetrica có thể bình hình mũi dáo (thể bình có phần đỉnh tương đối dài và thon nhỏ dần).

Bào tử trần của các loài thuộc chi *Penicillium* thuộc tip phialoconidi (tip cơ bản euconidi), không có vách ngăn, hình cầu, gần cầu, hình trứng, elip, đôi khi hình trụ. Khi riêng rẽ, các bào tử trần không màu hoặc màu

nhật, khi tụ hợp thành đám, thường có màu lục, vàng lục, lục xanh, lục xám, xám. Các bào tử trần này tạo thành chuỗi dài trên miệng thể bình.

Bào tử trần cũng như giá bào tử trần, các nhánh, các cuống thể bình, các thể bình tùy từng loại có mặt ngoài nhẵn, ráp, có gai hoặc sần sùi, gồ ghề (hình 3.12, 3.13).

Một số ít loài tạo thành hạch nấm (sclerotium). Hạch nấm cấu tạo bởi các tế bào có vách dày, có thể rất cứng hoặc mềm, hình cầu, gần cầu, không màu hoặc có màu sắc khác nhau, đơn độc hoặc thành cụm. Một số loài như đã nói, có bào tử túi (ascosporum). Thể quả túi là những thể quả kín (cleistothecium), có vỏ thể quả cứng hoặc mềm, có hoặc không có các sợi nấm bao quanh, thể sinh túi cuộn xoắn hoặc thẳng, túi bào tử (ascus) đơn độc hoặc thành chuỗi, bào tử túi không ngăn vách, có hoặc không có rãnh và gỡ quỹ đạo.

Nhiều loài thuộc chi *Penicillium* phân bố rộng rãi ở nhiều vùng địa lý trên trái đất, có mặt ở nhiều cơ chất tự nhiên, trên nhiều sản phẩm công nông nghiệp và gây mốc cho các sản phẩm này. Nhiều loài đã được phát hiện có ở Việt Nam trên các cơ chất tự nhiên và các sản phẩm nói trên (B.X.Đông 1977, 1986), D.H.Miền 1980, v.v.). *P.notatum* là loài vi nấm, cũng là loài vi sinh vật đầu tiên được dùng để lên men sản xuất chất kháng sinh đầu tiên (penicillin), tạo ra tiền bộ mới của y học hiện đại, với phát hiện của Fleming về khả năng ức chế vi khuẩn của một chủng thuộc loài vi nấm này. Tiếp đó loài *P.chrysogenum* được phát hiện cũng cho penicillin với nhiều chủng có hiệu suất lên men cao, đặc biệt sau khi đã xử lý đột biến. Trong công nghiệp sản xuất kháng sinh hiện nay, một số chủng đã xử lý đột biến của *P.chrysogenum* có thể cho tới 30g penicillin hoặc hơn trong 1 lit môi trường lên men. Các chủng nấm này dùng để sản xuất penicillin tự nhiên (penicillin G, penicillin V, v.v.) và acid 6-aminopenicillamic (dùng để sản xuất các penicillin bán tổng hợp như ampicillin, oxacillin, v.v.). Các penicillin tự nhiên và bán tổng hợp này dùng trong điều trị các bệnh có nguồn gốc vi khuẩn (gram + hoặc vừa gram + vừa gram - tùy loại kháng sinh). Một số loài *Penicillium* khác như *P.gniseofulvum*, *P.nigricans*, *P.urticae*, v.v. cho griseofulvin. Griseofulvin là một kháng sinh được dùng trong điều trị một số bệnh nấm ngoài da, tóc, gây ra bởi các nấm bệnh như *Microsporum* spp., *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton* spp. Nhiều loài thuộc chi nấm *Penicillium* cho các kháng sinh khác, nhưng không được dùng trong điều trị vì hoạt tính kháng sinh yếu hoặc vì độc tính cao.

Ngoài các loài được dùng trong công nghệ kháng sinh, một số loài khác thuộc chi *Penicillium* được dùng trong công nghệ chế biến thực phẩm như công nghệ sản xuất phomat (*P.roqueforti*). Nhiều loài cũng đã được

ngiên cứu khả năng tạo thành các acid hữu cơ, về các hoạt tính enzym và một số sản phẩm trao đổi chất khác. Chúng ta cũng cần chú ý trong chi *Penicillium*, một số loài có khả năng tạo thành mycotoxin, đặc biệt các mycotoxin có khả năng gây ung thư gan như các loài *P.islandicum* tạo thành islandotoxin và luteoskyrin, loài *P.urticae* tạo thành patulin, v.v.

Để định loại các loài thuộc chi *Penicillium* đã được dùng rộng rãi trong công nghệ sinh học (*P.griseofulvum*, *P.chrysogenum*, *P.notatum*, *P.roqueforti*) và các loài tạo thành độc tố nguy hiểm (*P.islandicum*, *P.urticae*), sau khi xác định các chủng nấm thuộc chi nấm này, cần xác định các chủng nấm đó lần lượt thuộc nhóm loài, phân nhóm, sau đó mới xác định được loài của các chủng nấm đó (các bảng 3.17, 3.18, 3.19).

**Bảng 3.17. Khóa định loại các nhóm loài (sectio) và các phân nhóm (subsection) của chi *Penicillium* Link ex Fr.
(Theo Pidoplitsko 1972, B.X.Đồng 1976)**

1. Chổi 1 vòng (Sectio MONOVERTICILLATA)	2
1. Chổi 2 vòng-nhiều vòng	6
2. Có thể quả túi hoặc hạch nấm	3
2. Không có thể quả túi hoặc hạch nấm	4
3. Có thể quả túi	
. . . . Subsectio <i>Monoverticillata-Ascogena</i>	
3. Có hạch nấm	
. . . . Subsectio <i>Monoverticillata-Sclerogena</i>	
4. Chổi 1 vòng nhưng có 1-2 nhánh	
. . . . Subsectio <i>Monoverticillata-Ramigena</i>	
4. Chổi 1 vòng, không có nhánh	5
5. Giá bào tử trần dài, phần lớn trên 100 μ m	
. . . . Subsectio <i>Monoverticillata-Longiphora</i>	
5. Giá bào tử trần ngắn, phần lớn dưới 100 μ m	
. . . . Subsectio <i>Monoverticillata-Breviphora</i>	
6. Chổi 2 vòng	7
6. Chổi 3-4 vòng . . . (Sectio POLYVERTICILLATA)	
7. Chổi 2 vòng không đối xứng	8
7. Chổi 2 vòng đối xứng (Sectio BIVERTICILLATA-SYMMETRICA)	15

8. Cuống thể bình 2-4 cái, tách xa nhau (Sectio DIVARICATA)	9
8. Cuống thể bình 3-6 cái, xếp gần nhau, thường có 2-3 nhánh (Sectio ASYMMETRICA)	12
9. Có thể quả túi hoặc hạch nấm	10
9. Không có thể quả túi hoặc hạch nấm	11
10. Có thể quả . . .	
	. . . Subsectio Divaricata-Ascogena
10. Có hạch nấm . . .	
	. . . Subsectio Divaricata-Sclerotigena
11. Khuẩn lạc có mặt dạng nhung . . .	
	. . . Subsectio Divaricata-Velutina
11. Khuẩn lạc mặt dạng len, dạng bông sốp . . .	
	. . . Subsectio Divaricata-Lanata
12. Có thể quả . . .	
	. . . Subsectio Asymmetrica-Ascogena
12. Không có thể quả	13
13. Khuẩn lạc mặt dạng nhung mượt . . .	
	. . . Subsectio Asymmetrica-Velutina
13. Khuẩn lạc không như trên	14
14. Khuẩn lạc mặt dạng len, xốp bông . . .	
	. . . Subsectio Asymmetrica-Lanata
14. Khuẩn lạc có bó giá . . .	
	. . . Subsectio Asymmetrica-Fasciculata
15. Khuẩn lạc có thể quả hoặc hạch nấm	16
15. Khuẩn lạc không có thể quả hoặc hạch nấm	17
16. Có thể quả . . .	
	. . . Subsectio Symetrica-Ascogena
16. Có hạch nấm . . .	
	. . . Subsectio Symetrica-Sclerotigena
17. Thể bình có phần đỉnh thon nhỏ đột ngột . . .	
	. . . Subsectio Symetrica-Cyathophora
17. Thể bình có phần đỉnh thon nhỏ dần . . .	
	. . . Subsectio Symetrica-Lanceofera

Bảng 3.18. Khóa định loại các loài *Penicillium chrysogenum* Thom, *P. notatum* Westling, *P. roqueforti* Thom và các loài lân cận trong phân nhóm *Asymmetrica-Velutina* (Theo Raper và Thom 1949, Samson, Stolk và Hadlok 1976, B.X.Đổng 1986) (Môi trường Czapek, nhiệt độ nuôi cấy 27°C, 10 ngày tuổi)

1. Giá bào tử trần hiếm khi có nhánh	2
1. Giá bào tử trần thường có nhánh	5
2. Bào tử trần hình trứng, hình elip, tạo thành các chuỗi song song hoặc chéo lên nhau	3
2. Bào tử trần hình cầu, gần cầu, xếp thành các chuỗi sát nhau (dạng cột)	4
3. Khuẩn lạc màu lục, mép màu xanh, mặt trái không màu. Bào tử trần hình trứng 3,0 - 3,2 μm trục lớn . . .	
. . . <i>P.coeruloviride</i> G.Smith	
3. Khuẩn lạc màu lục xanh, mặt trái màu nâu. Bào tử trần hình elip hoặc gần cầu, 2,5 - 3,2 μm trục lớn . . .	
. . . <i>P.corylophyllum</i> Dierckx	
4. Khuẩn lạc màu lục xanh tươi, mặt trái màu vàng, vàng da cam. Bào tử trần 2,2 - 3,2 μm đường kính . . .	
. . . <i>P.citrinum</i> Thom	
4. Khuẩn lạc màu xanh, lục vàng, mặt trái màu vàng, vàng nâu. Bào tử trần 2,0 - 2,5 μm đường kính . . .	
. . . <i>P.steckii</i> Zaleski	
5. Các thành phần của chổi có kích thước bình thường	6
5. Các thành phần của chổi ngắn và xếp sát nhau	20
6. Giá bào tử trần và bào tử trần nhẵn	7
6. Giá bào tử trần hoặc bào tử trần, hoặc cả hai ráp	15
7. Khuẩn lạc phát triển tốt trên môi trường Czapek, 4-5 cm đường kính, tạo thành nhiều bào tử trần	8
7. Khuẩn lạc mọc kém trên môi trường Czapek, 1 cm đường kính, tạo thành ít bào tử trần	14
8. Mặt trái khuẩn lạc màu vàng, vàng lục, vàng nâu. Giọt tiết màu vàng	9
8. Mặt trái khuẩn lạc, đỏ nâu, đỏ da cam hoặc vàng, tím. Không có giọt tiết hoặc nếu có, giọt tiết không màu	12
9. Bào tử trần phần lớn hình elip	10
9. Bào tử trần phần lớn hình cầu, gần cầu	11
10. Khuẩn lạc màu lục vàng, lục xám vàng. Bào tử trần 2,8-3,5 x 3-4 μm . . .	
. . . <i>P.chrysogenum</i> Thom	

10. Khuẩn lạc màu lục xanh. Bào tử trần 2,5-3,0 x 3,0-3,5 μm . . .
 . . . *P. meleagrinum* Biourge
11. Khuẩn lạc màu lục xanh. Giọt tiết màu vàng tươi. Bào tử trần 3,0 - 3,5 μm
 đường kính . . .
 . . . *P. notatum* Westling
11. Khuẩn lạc màu lục vàng, lục xám. Giọt tiết màu- vàng hoặc không màu. Bào
 tử trần 3,0 - 3,8 μm đường kính . . .
 . . . *P. cyaneo-fulvum* Biourge
12. Bào tử trần hình elip 2,8-3,5 x 3-4 μm . Mặt trái khuẩn lạc màu đỏ da
 cam sẫm . . .
 . . . *P. atramentosum* Thom
12. Bào tử trần hình elip, hình quả lê, trục lớn dài tới 6 - 7 μm 13
13. Khuẩn lạc màu lục, với các "khối bột" bào tử trần, mặt trái không màu,
 màu vàng hoặc tím. Bào tử trần hình elip, 3-4 x 4,5-6,6 μm . . .
 . . . *P. oxalicum* Currie et Thom
13. Khuẩn lạc màu lục xanh nhạt, mặt trái đỏ nâu. Bào tử trần hình trứng, đôi
 khi hình quả lê, 3-4 x 3,5-7,0 μm . . .
 . . . *P. japonicum* G.Smith
14. Khuẩn lạc màu lục vàng (môi trường cao lúa mạch). Bào tử trần elip, 3-
 5 μm , sau 6-8 μm (10-12 μm) trục lớn
 . . . *P. digitatum* Sacc.
14. Bào tử màu trắng, khuẩn lạc hoàn toàn không có màu lục . . .
 . . . *P. digitatum* Sacc. var. *californicum* Thom
15. Bào tử trần ráp, giá bào tử trần nhẵn 16
15. Bào tử trần nhẵn hoặc có gai, giá bào tử trần ráp 17
16. Bào tử trần hình cầu, ráp rõ rệt 3,0 - 3,6 μm đường kính, xếp thành nhiều
 cột . . .
 . . . *P. atrovenetum* G.Smith
16. Bào tử trần hình trụ hoặc elip, hơi ráp 12-2,3 x 3,5-5,0 μm , đôi khi 10 μm
 trục lớn, xếp thành các chuỗi tách xa nhau . . .
 . . . *P. rennelliae* Stolk
17. Bào tử trần hình cầu 18
17. Bào tử trần hình elip 19
18. Bào tử trần nhẵn 3,5-5,0 μm , đôi khi 7 - 8 μm đường kính . . .
 . . . *P. roqueforti* Thom
18. Bào tử trần có gai 3,5 - 4,5 μm đường kính . . . *P. haraonense* Baghdadi
19. Khuẩn lạc 2,0 - 2,5 cm đường kính, mặt trái màu vàng nâu, gần đen. Bào
 tử trần 3,0 - 3,5 μm trục lớn . . .
 . . . *P. casei* Staub

19. Khuẩn lạc 5,0 - 5,5 cm đường kính, mặt trái không màu hoặc màu vàng nhạt. Bào tử trần 3,1 - 4,1 μm trục lớn *P.pseudocasei* Abe
20. Giá bào tử trần thường không có nhánh. Bào tử trần hình elip, gần cầu 2,8 - 3,3 μm trục lớn. Khuẩn lạc màu lục xanh *P.paxilli* Bain.
20. Giá bào tử trần thường có nhánh
21. Nhánh và cuống thể bình có đường kính lớn, nhánh 4-7 x 10-17 μm , cuống thể bình 4-7 x 9-12 μm . Bào tử trần hình cầu, 3 - 4 μm đường kính *P.brevicompactum* Dierckx
21. Nhánh và cuống thể bình không như trên
22. Khuẩn lạc màu lục vàng 2,0 - 2,5 cm đường kính. Bào tử trần hình elip, sau hình cầu 2,5 - 3,5 μm đường kính *P.stoloniferum* Thom
22. Khuẩn lạc màu nâu nhạt, 4,5 cm đường kính. Bào tử trần hình elip, gần cầu, có gai 2,3 - 3,3 μm trục lớn *P.brunneostoloniferum* Abe
- (Theo G.Smith 1963, syn. của *P. ochraceum* Bain.)

Bảng 3.19. Khóa định loại loài *Penicillium griseofulvum* Dierckx và các loài lân cận trong phân nhóm Asymmetrica-Fasciculata.
(Theo Samson Stolk và Hadlok 1976, B.X.Đông 1986)
(Môi trường Czapek, nhiệt độ nuôi cấy 27°C, 10 ngày tuổi)

1. Giá bào tử trần hầu hết tụ hợp thành bó giá 2
1. Giá bào tử trần phần lớn riêng rẽ, một số tụ hợp thành bó giá, nhưng không tạo thành thân bó giá rõ rệt 5
2. Bó giá dài tới 15 cm, thân rộng 1 - 4 mm. Bào tử trần hình elip nhọn đầu, có gai mịn 2,0-2,5 x 3,0-3,8 μm *P.isariiiforme* Stolk et Meyer
2. Bó giá không dài quá 4 cm 3
3. Bó giá không phân hóa thành phần thân và phần đầu hữu thụ, dài 2 - 4 cm. Bào tử trần hình elip, nhọn 2,2-3,0 x 3-4 μm *P.clavigerum* Demelius
3. Bó giá có phần thân và phần đầu hữu thụ phân hóa rõ rệt 4
4. Bó giá cao 0,5 - 0,2 cm, thân bó màu tím hồng hoặc đỏ, phần đầu màu lục. Bào tử trần hình elip 3,0-3,5 x 4,0-4,5 μm *P.claviiforme* Bain.

4. Bó giá (chỉ tạo thành rõ rệt trên môi trường cao lúa mạch) cao tới 1 mm, thân bó màu trắng, phần đầu màu lục. Bào tử trần hình elip 2,0-2,5 x 3,2-3,7 μm . . .

. . . *P.concentricum* Samson, Stolk et Hadlok

5. Bào tử trần ráp hoặc có gai 6

5. Bào tử trần nhẵn 7

6. Bào tử trần 4,5 - 4,5 μm đường kính. Mặt trái khuẩn lạc không màu hoặc màu vàng . . .

. . . *P.echinulatum* Fassatióvá

. . . (= *P.cyclopium* Westling var. *echinulatum* Raper et Thorn)

6. Bào tử trần 2 - 3 μm đường kính. Mặt trái khuẩn lạc màu nâu vàng, nâu đỏ, giọt tiết màu da cam đỏ . . .

. . . *P.hordei* Stolk

7. Giá bào tử trần nhẵn 8

7. Giá bào tử trần ráp hoặc có gai 10

8. Thể bình ngắn, dài không quá 6,5 μm , phần đỉnh rất ngắn. Bào tử trần hình elip, nhẵn 2,2-2,5 x 2,5-3,5 μm . . .

. . . *P.griseofulvum* Dierckx

8. Thể bình dài trên 6,5 μm , phần đỉnh rõ rệt 9

9. Khuẩn lạc màu lục vàng, lục xanh 4 - 5 cm đường kính. Thể bình 2,0-3,5 x 8-12 μm . Bào tử trần nhẵn, 2,5-3,0 x 3,0-3,5 μm . . .

. . . *P.expansum* Link ex S.F.Gray

9. Khuẩn lạc màu lục xám 2,0 - 2,5 cm đường kính. Thể bình 2-5 x 8-15 μm . Bào tử trần hình trụ sau elip, nhẵn, 2,5-3,5 x 4-5 μm (Gây thối quả cam, chanh) . . .

. . . *P.italicum* Wehmer

(Khuẩn lạc màu lục nâu, nâu nhạt, có mặt các cuộn sợi nấm 200 - 500 μm đường kính . . .

. . . *P.italicum* Wehmer var. *avellaneum* Samson et Guttar)

10. Bào tử trần hình elip, nhẵn 2,0-2,5 x 3,0-3,5 μm . Giá bào tử trần ráp (ở các chủng mới phân lập, phần lớn giá bào tử trần tụ hợp thành bó giá)

. . . *P.granulatum* Bain.

10. Bào tử trần hình cầu, phần lớn 3 - 4 μm đường kính. Giá bào tử trần ráp, dài 100 - 400 μm . Thể bình dài 7 - 9 μm , phần đỉnh ngắn. Các đặc điểm khác biến thiên (theo các chủng) . . .

11

. . . *P.verrucosum* Dierckx

11. Vùng có bào tử trần trên khuẩn lạc màu trắng, màu vàng, nâu vàng, không có màu lục

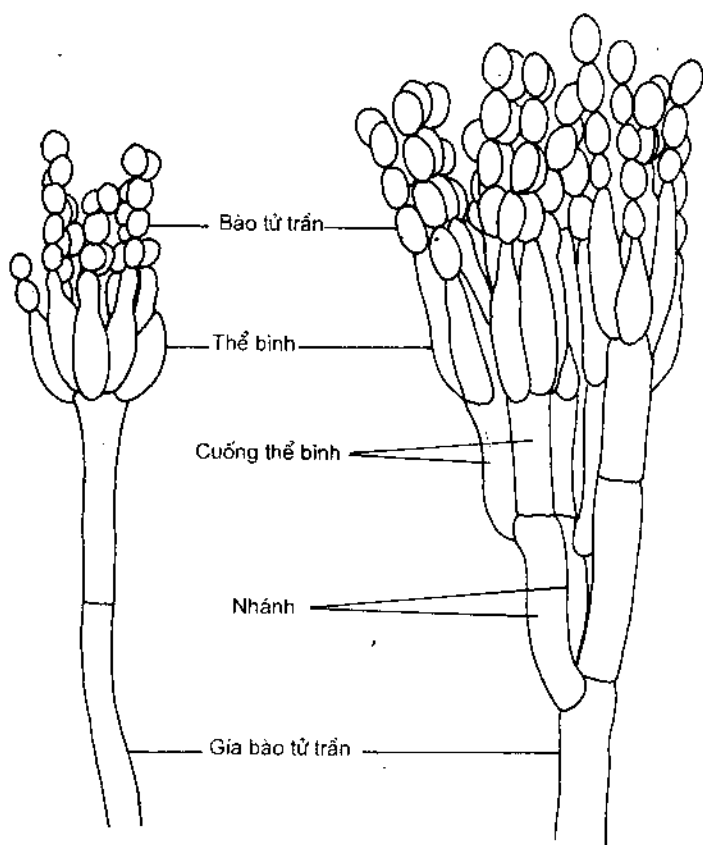
12

11. Vùng có bào tử trần trên khuẩn lạc có các màu lục
12. Vùng có bào tử trần trắng sau hồng tím nhạt hoặc trắng vàng nhạt.
Khuẩn lạc 4 cm đường kính . . .
. . . *P. verrucosum* var. *album* (G. Smith) Samson, Stolk et Hadlok
12. Vùng có bào tử trần màu nâu vàng, nâu lục nhạt. Khuẩn lạc 2,0 - 3,5 cm đường kính . . .
. . . *P. verrucosum* var. *ochraceum* (Thom) Samson, Stolk et Hadlok
(=*P. ochraceum* Thom, in Raper et Thom, 1949)
13. Khuẩn lạc không quá 3 cm đường kính, màu lục vàng tươi, mặt trái vàng nâu, nâu vàng . . .
. . . *P. verrucosum* var. *verrucosum* Dierckx
13. Khuẩn lạc phát triển nhanh hơn, trên 3 cm đường kính, không có màu lục vàng tươi
14. Phần lớn giá bào tử trần tụ hợp thành bó giá ở các chùng mới phân lập, hệ sợi nấm màu vàng, giọt tiết nâu da cam, vùng có bào tử trần màu lục xám, lục xanh . . .
. . . *P. verrucosum* var. *corymbiferum* (Westling) Samson, Stolk et Hadlok
(=*P. corymbiferum* Westling, in Raper et Thom, 1949)
14. Các đặc điểm của bó giá, hệ sợi nấm, giọt tiết không như trên
15. Vùng có bào tử trần trên khuẩn lạc màu lục sẫm. Phần lớn giá bào tử trần riêng rẽ. Khuẩn lạc 3 - 4 cm đường kính . . .
. . . *P. verrucosum* var. *melanochlorum* Samson, Stolk et Hadlok
(=*P. palitans* Westling sensu Raper et Thom 1949)
15. Vùng có bào tử trần trên khuẩn lạc màu lục xám, lục xanh. Khuẩn lạc có bó giá rõ rệt, thường 4,5 - 5,0 cm đường kính . . .
. . . *P. verrucosum* var. *cyclopium* (Westling) Samson, Stolk et Hadlok
(=*P. cyclopium* Westling, in Raper et Thom, 1949).

14

15

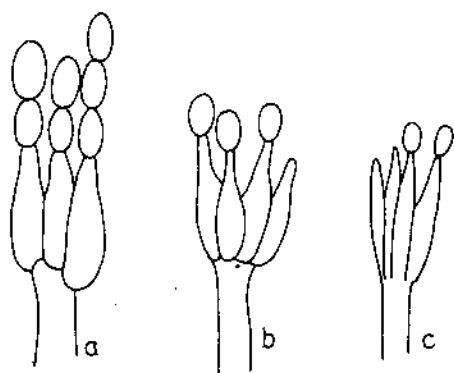
Penicillium chrysogenum Thom - Thuộc phân nhóm Asymmetrica-Velutina, nhóm loài Asymmetrica. Khuẩn lạc 5 - 6 cm đường kính, màu lục vàng, lục xanh, mặt dạng nhung, đôi khi có vài vùng xốp bông nhẹ, nhiều rãnh xuyên tâm. Mặt trái khuẩn lạc và môi trường xung quanh màu vàng, vàng nâu tươi. Giọt tiết màu vàng chanh. Giá bào tử trần nhẵn, phát triển từ hệ sợi nền, phần lớn 3,0-3,5 x 150-350 μ m, mang 1 - 2 nhánh. Nhánh cùng với các vòng cuống thể bình, các vòng thể bình tạo thành chồi-3 vòng. Nhánh nhẵn 3,0-3,5 x 15-25 μ m. Cuống thể bình 2-5 cái trên đỉnh một nhánh 2-3 x 12-15 μ m. Thể bình xếp thành từng vòng 4 - 6 cái trên đỉnh một cuống thể bình 2,0-2,5 x 8-10 μ m.



Hình 3.12. Chi *Penicillium* Link ex Fries. Các thành phần của chồi (bộ máy mang bào tử trần).

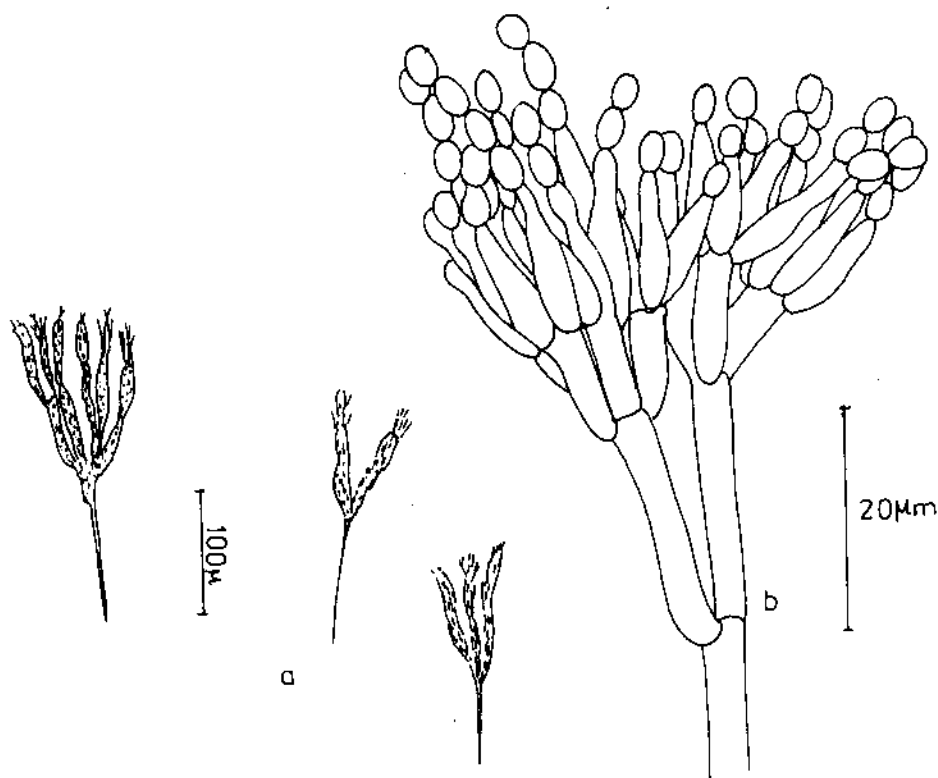
Bào tử trần hình elip, nhỏ, $2,5-3,5 \times 3-4 \mu\text{m}$, thành cột dài tới $200 \mu\text{m}$ (hình 3.14, 3.15).

Penicillium notatum Westling - Thuộc phân nhóm Asymmetrica-Velutina, nhóm loài Asymmetrica. Khuẩn lạc $3,0 - 4,5 \text{ cm}$ đường kính, màu lục xanh, lục xám xanh, mặt dạng nhung, nhiều rãnh xuyên tâm. Mặt trái khuẩn lạc màu vàng tươi, vàng nâu tươi. Giọt tiết rất nhiều, màu vàng tươi, vàng nâu nhạt. Giá bào tử trần nhỏ, phát triển hầu hết từ hệ sợi nên $2,5-3,0 \times 250-500 \mu\text{m}$, không có nhánh hoặc mang 1 - 2 nhánh. Nhánh nếu có nhỏ, $2,5-3,0 \times 10-20 \mu\text{m}$. Cuống thể bình thành vòng 3 - 6 cái trên đỉnh giá bào tử trần hoặc trên đỉnh mỗi nhánh $2,5-3,0 \times 10-15 \mu\text{m}$. Thể bình xếp thành vòng 3 - 6 cái $2,0-2,5 \times 8-10 \mu\text{m}$. Bào tử trần hình cầu, gần cầu, nhỏ $3,0 - 3,5 \mu\text{m}$ đường kính, xếp thành các chuỗi song song hay dạng cột, dài tới $100 \mu\text{m}$ (hình 3.16).



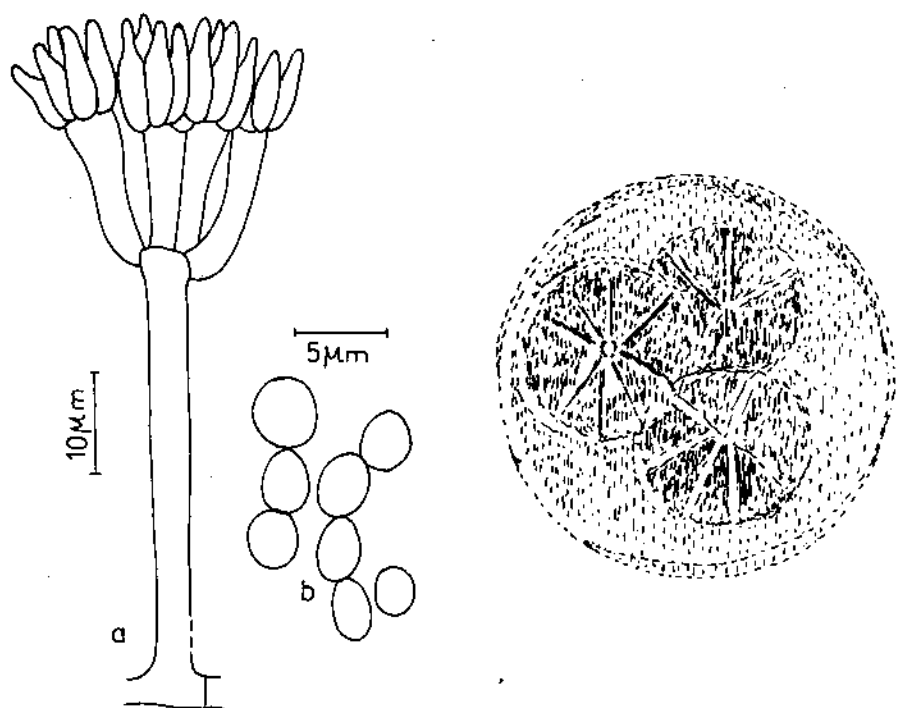
Hình 3.13. Chi *Penicillium* Link ex Fries. Các kiểu thể bình.

a- Thể bình có phần cổ rộng ở *P.expansum* Link và nhiều loài, b- Thể bình có phần cổ hẹp ở *P.janthinellum* Biourge và các loài lân cận, c- Thể bình hình móc ở *P.funiculosum* Thom và một số loài thuộc nhóm loài Biverticillata-Symmetrica (Raper và Thom, 1949)



Hình 3.14. *Penicillium chrysogenum* Thom.

a- Chổi (bộ máy mang bào tử trần) với các chuỗi bào tử trần tụ lại thành dạng cột. b- Chi tiết bộ máy mang bào tử trần.



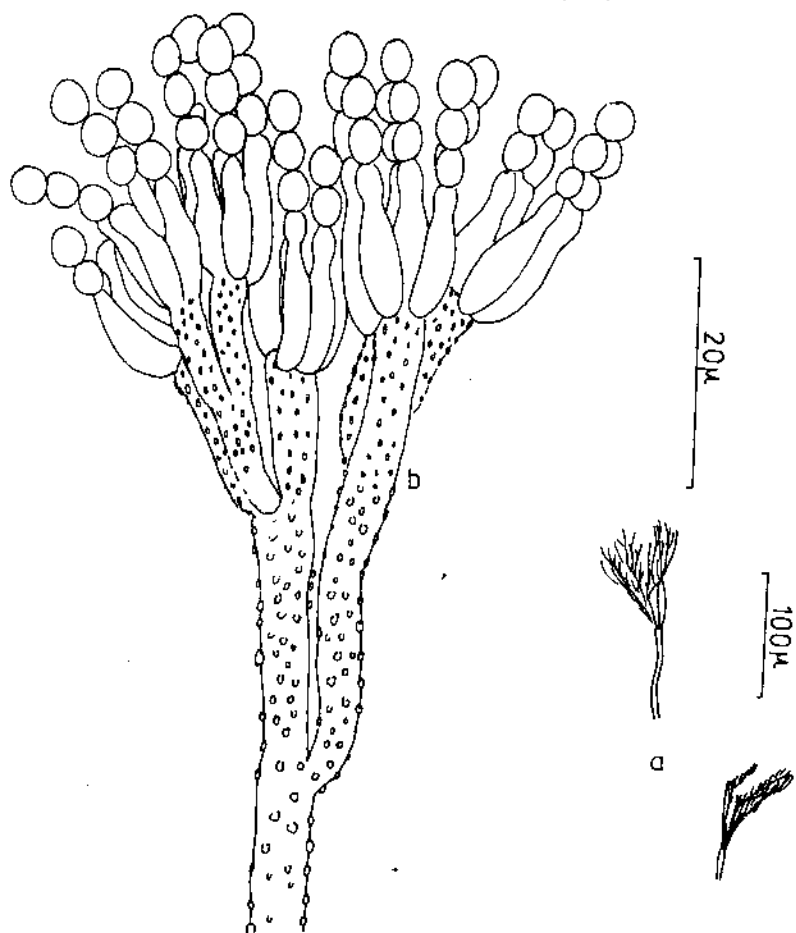
Hình 3.15. *Penicillium notatum* Westling.

a- Bộ máy mang bào tử trần (chổi), b- Bào tử trần, c- Khuẩn lạc của chủng nấm do Fleming phân lập (chủng NRRI 824) (Raper và Thom, 1949).

Penicillium roqueforti Thom - Thuộc phân nhóm Asymmetrica-Velutina nhóm loài Asymmetrica. Khuẩn lạc 5 - 6 cm đường kính, mặt dạng nhung, có các rãnh xuyên tâm không đều, màu lục xanh, lục xám, mặt trái màu lục xanh đến đen. Không có giọt tiết. Chổi đa dạng, một vòng, hai vòng, hoặc hai vòng với 1 - 2 nhánh mọc sát vào giá bào tử trần. Giá bào tử trần thường ngắn, 4-6 x 100-150 μm, có các nốt sần, hiếm khi nhẵn. Cuống thể bình 3-4 cái thành vòng trên đỉnh giá hoặc đỉnh mỗi nhánh 3,0-4,5 x 12-15 μm. Thể bình thành vòng 4 - 6 cái trên đỉnh giá, đỉnh nhánh, hoặc trên đỉnh mỗi cuống thể bình 3,0-3,5 x 8-12 μm. Bào tử trần hình cầu, gần cầu, thường 3,5 - 5,0 μm, đôi khi 7 - 8 μm đường kính, nhẵn, thành chuỗi song song (hình 3.17).

Penicillium griseofulvum Dierckx - Thuộc phân nhóm Asymmetrica-Fasciculata, nhóm loài Asymmetrica. Khuẩn lạc mọc chậm, 1,8 - 2,0 cm đường kính, màu lục xám, lục vàng, mặt trái màu vàng, vàng nâu, đỏ nâu. Bó giá chủ yếu có ở vùng mép khuẩn lạc, các giá bào tử trần còn lại riêng rẽ. Giá bào tử trần nhẵn, dài 400 - 500 μm không có nhánh, có 1 hoặc 2 vòng nhánh, các nhánh nếu có tách xa nhau. Thể

binh dài không quá $6,5\text{ }\mu\text{m}$, phần đỉnh rất ngắn, không phân biệt rõ rệt.
 Bào tử trần hình elip $2,2-2,5 \times 2,5-3,5\text{ }\mu\text{m}$, nhẵn.



Hình 3.16. *Penicillium roqueforti* Thom.

- a- Bộ máy mang bào tử trần (chổi) với các chuỗi bào tử trần song song,
 b- Chi tiết bộ máy mang bào tử trần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

Booth C., 1971

The genus *Fusarium*. CMI, Kew, Surrey

Bộ Đại học và Trung học chuyên nghiệp, 1977

Tóm tắt báo cáo Hội nghị sinh học các trường đại học Việt Nam lần I (TP. Hồ Chí Minh - 1977). Hà Nội

Bùi Xuân Đồng, 1972

Contributions à l'étude des Hyphomycètes, I. Esquisse d'une nouvelle classification. *Ceské Mykol.* 26/3 : 155-166.

Bùi Xuân Đồng, 1977

Một số vấn đề về nấm học. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội

Bùi Xuân Đồng, 1984, 1986

Nhóm nấm Hyphomycetes ở Việt Nam, tập 1 và 2. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội

Bùi Xuân Đồng, 1998

Các vi nấm dùng trong công nghệ kháng sinh - Phương pháp định loại. Giáo trình cao học. Trường Đại học Dược, Hà Nội.

De Hoog G.S., 1972

The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Studies in Mycol.*, N.I.

Lê Ngọc Tú và Cs., 1982

Enzim vi sinh vật, tập 2. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

Lê Văn Nhung và Nguyễn Lân Dũng, 1992

Công nghệ sinh học - Một cơ hội cho tất cả. NXB Nông nghiệp, Hà Nội

Nguyễn Lân Dũng, 1981

Sử dụng vi sinh vật để phòng sâu hại cây trồng. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội

Nguyễn Lân Dũng, 1983

Một số sản phẩm của vi nấm. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội

Phạm Hồ Trương, 1993

Chuyển hóa phế liệu ligno-xenuloza nhờ nấm sợi bằng phương pháp lên men rắn. Luận án PTS. Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội.

Pitt John I, 1979

The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press. London (...)

Quản Văn Thịnh, 1979

Sinh tổng hợp proteaza từ chủng nấm mốc *Asp.oryzae* VN1 và ứng dụng trong sản xuất nước chấm. Luận án PTS. Trường Đại học Bách khoa, Hà Nội

Ramírez L., 1982

Manual and Atlas of the *Penicillia*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, NY., Oxford

Raper K.B. et Ch.Thom, 1949

A manual of the *Penicillia*. The Williams et Wilkins Company, Baltimore

Raper K.B. et D.I.Fennell, 1965

The genus *Aspergillus*. The Williams et Wilkins Company, Baltimore

Samson R.A., 1974

Paecilomyces and some allied *Hyphomycetes*. Studies in Mycol., N.6.

Schipper A.A., 1974

Mucor mucedo, *Mucor flavus* and related species. Studies in Mycol., N.10

Schipper A.A., 1976

Mucor circinelloides, *Mucor racemosus* and related species. Studies in Mycol., N.12

Smith G., 1971

An introduction to industrial Mycology, 6 éd. E.Arnold Ltd., London

Tạ Kim Chính., 1996

Nghiên cứu tuyển chọn một số chủng vi nấm diệt côn trùng gây hại ở Việt Nam và khả năng ứng dụng. Luận án PTS. Viện Công nghệ sinh học - TT. Khoa học tự nhiên và Công nghệ quốc gia, Hà Nội

Trương Công Quyền, 1972

Sơ lược về kháng sinh. Phòng nghiên cứu kháng sinh, Trường Đại học Dược, Hà Nội

Tulloch M., 1976

The genus *Metarhizium*. Trans.Br. mycol.Soc., 66/3 : 407-411.

Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Việt Nam, 1978

Thu nhận và ứng dụng các chất hoạt động sinh học từ vi sinh vật.
Lê Văn Nhung và Cs. biên tập NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội

BÙI XUÂN ĐỒNG, NGUYỄN HUY VĂN

VI NĂM DÙNG TRONG CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Chịu trách nhiệm xuất bản :

PGS. TS TÔ ĐĂNG HẢI

Biên tập và sửa bài :

PHẠM THÁI

Trình bày bìa :

HƯƠNG LAN

**NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
70 TRẦN HUNG ĐẠO - HÀ NỘI**

In 1000 bản, khổ 16 x 24 cm, tại Nhà in 19 - 8

Giấy phép xuất bản số 84 - 82 - 1 ngày 24/1/2000.

In xong và nộp lưu chiểu tháng 4 năm 2000

Vì nắm đung trong công nghệ



1 001031 400738

22.500 VNĐ

Giá: 22.500 đ