

## Khảo sát sự ảnh hưởng của loại và nồng độ đường lên sự gia tăng sinh khối và sinh tổng hợp polysaccharide trong nuôi cấy chìm *Ganoderma lucidum*

Researching the Influence of the Kinds and Content of Carbohydrate on the Mycelial Growth and Polysaccharides Production of *Ganoderma lucidum* in Submerged Culture

Nguyễn Phan Khánh Hòa<sup>1\*</sup>, Lê Thị Thủy Tiên<sup>2</sup>, Nguyễn Đức Lượng<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp. Hồ Chí Minh, 140 Lê Trọng Tấn, Tây Thạnh, Tân Phú, HCM

<sup>2</sup> Trường Đại học Bách Khoa Tp. Hồ Chí Minh, 268 Lý Thường Kiệt, phường 14, quận 10, HCM

Đến Tòa soạn: 02-7-2017; chấp nhận đăng: 25-01-2018

### Tóm tắt

Khảo sát xác định vai trò của đường trong nuôi cấy chìm *Ganoderma lucidum* ĐL và *Ganoderma lucidum* TP (phân lập tại Việt Nam). Kết quả cho thấy, đối với chủng ĐL, sinh khối, EPS và IPS cao nhất khi sử dụng lactose 60 g/l; còn sucrose 60 g/l lại thích hợp đối với chủng TP. Khi sử dụng loại đường với nồng độ thích hợp, sinh khối của chủng TP đạt được cao hơn so với ĐL ( $14.091 \pm 1.174$ ,  $13.470 \pm 0.073$  g khối lượng khô /l, tương ứng của chủng TP và ĐL), tuy nhiên lượng PS thu được ở chủng ĐL lại cao hơn so với chủng TP. Hàm lượng IPS và EPS thu được ở chủng ĐL là  $10.23 \pm 0.10$  mg/100 mg khối lượng khô,  $1347.83 \pm 38.54$  mg/l, ở chủng TP là  $12.64 \pm 0.33$  mg/100 mg khối lượng khô và  $12.64 \pm 0.33$  mg/l.

Từ khóa: đường, *Ganoderma lucidum*, nuôi cấy chìm, polysaccharide, sinh khối.

### Abstract

This investigation was conducted to determine the role of carbohydrate in submerged *Ganoderma lucidum* DL and *Ganoderma lucidum* TP (isolated in Vietnam). The results showed that for DL strain, biomass, EPS and IPS were highest when using lactose 60 g/l; whereas, 60 g/l sucrose is suitable for biomass, IPS, EPS of TP strain. Under the conditions of submerged fermentation with suitable carbohydrates, the biomass of TP strain was higher than the DL strain ( $14.091 \pm 1.174$ ,  $13.470 \pm 0.073$  g dry weight/l, corresponding to TP and DL strain), but the amount of PS obtained in DL strain was higher than in TP. The IPS and EPS content obtained in DL strain was  $10.23 \pm 0.10$  mg/100 mg dry weight and  $1347.83 \pm 38.54$  mg/l, TP strain was  $12.64 \pm 0.33$  mg/100 mg dry weight và  $12.64 \pm 0.33$  mg/l.

Keywords: carbohydrate, biomass, *Ganoderma lucidum*, polysaccharides, submerged culture.

### 1. Đặt vấn đề

Nấm linh chi *Ganoderma lucidum* là một dược thảo quý, có điều hòa miễn dịch, kháng tế bào ung thư, điều hòa lượng đường trong máu, có tác dụng tốt trên những trường hợp viêm gan, nhất là viêm gan do virus [1-4]. Những hoạt tính này của *G. lucidum* chủ yếu do các hợp chất polysaccharide (bao gồm polysaccharide nội bào – IPS và polysaccharide ngoại bào – EPS) chiếm tỷ lệ lớn nhất trong tất cả các hợp chất có hoạt sinh học có trong quả thể nấm.

Có trên 200 loại polysaccharide (PS) được ly trích và thu nhận từ *G. lucidum*, trong đó  $\beta$ -glucan đóng vai trò quan trọng nhất vì có khả năng tăng cường hệ thống miễn dịch ở người. Đặc biệt khi 1,3- $\beta$ -glucan tạo phức với protein sẽ có tác dụng chống ung thư rõ rệt [4]. Qua kết quả nghiên cứu tại trường Đại học Harvard (Mỹ) vào năm 1980,  $\beta$ -glucan với cấu trúc không gian và hình dạng như một chìa khóa

liên kết vừa khớp với thụ thể trên bề mặt các tế bào miễn dịch quan trọng trong cơ thể như đại thực bào, lympho bào (tế bào NK, tế bào T, tế bào B), bạch cầu trung tính [5, 6]. Sự liên kết này sẽ kích thích các tế bào trên tăng cường sản xuất một số chất “độc” để giết chết những tế bào bất thường trong cơ thể (như nhân tố hoại tử khối u INF- $\alpha$ , Interleukin-6 truyền tín hiệu giữa các tế bào bạch cầu hay Interferon tăng hoạt tính thực bào của đại thực bào) [6]. PS từ *G. lucidum* còn có khả năng ức chế hình thành các ống mạch dẫn chất nuôi dưỡng các tế bào ung thư, kích thích tiết insulin bằng cách tạo điều kiện hấp thu calcium vào tế bào  $\beta$  trong tụy tạng... [8]. PS có nguồn gốc từ Linh chi đỏ dùng điều trị ung thư đã được công nhận sáng chế (patent) ở Nhật do khả năng tăng cường hoạt động của các tế bào của hệ miễn dịch trong cơ thể [9].

Hiện nay, nấm Linh chi đỏ được nuôi trồng chủ yếu bằng phương pháp truyền thống thu quả thể. Phương pháp này có nhiều nhược điểm như thời gian kéo dài, chất lượng không đồng đều, khó kiểm soát chất lượng, cần diện tích nuôi trồng khá lớn, quy trình

\* Địa chỉ liên hệ: Tel: (+84) 9386619947

Email: hoanpk@cntp.edu.vn

ly trích hợp chất khó khăn... Điều cần thiết là tìm ra một phương pháp thay thế có thể khắc phục các hạn chế trên và nâng cao hàm lượng các hợp chất chuyển hóa. Theo nhiều khảo sát, PS chiết xuất từ quả thể, từ bào tử và từ hệ sợi tơ nấm thu nhận trong nuôi cấy trên môi trường lỏng hoặc rắn đều có hoạt tính sinh học tương tự nhau [1, 3, 4]. Điều này mở ra một hướng mới đó là ứng dụng công nghệ nuôi cấy tế bào trong nuôi cấy và thu nhận PS từ hệ sợi nấm *Linh chi*.

Nghiên cứu này bước đầu khảo sát sự gia tăng sinh khối và hình thành PS theo thời gian của 2 chủng *G. lucidum* phân lập tại Việt Nam, ký hiệu ĐL và TP. Đồng thời, khảo sát sự ảnh hưởng của loại và nồng độ đường đến quá trình gia tăng sinh khối và sinh tổng hợp PS (bao gồm IPS và EPS) thu được từ 2 chủng này.

## 2. Vật liệu – phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Giống

2 Chủng *Ganordema lucidum* ĐL và TP có nguồn gốc Việt Nam, đã được phân lập và định danh tại Phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ Sinh học trường Đại học Nông lâm thành phố Hồ Chí Minh; và được cung cấp bởi công ty TNHH TM DV KT Việt Doanh.

Giống được cấy chuyển trên môi trường PGA (potato glucose agar). Lưu trữ điều kiện 4°C, sau 2 tuần cấy chuyển một lần để duy trì giống.

Trước khi đưa vào giai đoạn nuôi cấy chính, giống trải qua 2 giai đoạn hoạt hóa trên môi trường có thành phần: sucrose 35g/l, cao nấm men 7.5g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g/l, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.5g/l, vitamin B<sub>1</sub> 0.05g/l, pH 5.5.

**Hoạt hóa lần 1:** Dùng dao cắt mảnh tơ mọc trên đĩa thạch thành từng miếng nhỏ có kích thước 5x5mm. Chuyển 5 miếng thạch có tơ vào ống nghiệm có 10ml nước cất đã hấp khử trùng, lắc mạnh và chuyển vào bình tam giác 250ml có 40ml môi trường. Nuôi trên máy lắc tròn tốc độ 120 vòng/phút trong 7 ngày, điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm (29 – 31°C).

**Hoạt hóa lần 2:** Chuyển 5ml dịch có sinh khối sau hoạt hóa lần 1 sang bình tam giác 250ml có 45ml môi trường. Nuôi trên máy lắc tròn tốc độ 120 vòng/phút trong 4 ngày, điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm (29 – 31°C) [10].

### 2.2. Thí nghiệm 1: Khảo sát sự gia tăng sinh khối và hình thành PS theo thời gian

Chuyển 5ml dịch có sinh khối sau hoạt hóa lần 2 sang bình tam giác 250ml có chứa 45ml môi trường nuôi cấy có thành phần sucrose 50g/l, cao nấm men 5g/l, peptone 5g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/l, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.5g/l,

vitamin B<sub>1</sub> 0.05g/l; pH 5.5. Nuôi trên máy lắc tròn tốc độ 120 vòng/phút trong 12 ngày, điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm (29 – 31°C).

Vẽ đường cong sinh trưởng của chủng căn cứ trên khối lượng sinh khối thu được sau mỗi ngày. Đồng thời trong giai đoạn nuôi cấy gần đi vào giai đoạn cân bằng xác định hàm lượng EPS và IPS.

### 2.3. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của loại đường và nồng độ đường lên sự gia tăng sinh khối và tổng hợp PS ở *Ganoderma lucidum*

Chuyển 5ml dịch có sinh khối sau hoạt hóa lần 2 sang bình tam giác 250ml có 45ml môi trường nuôi cấy.

Thay đổi loại và nồng độ đường trong thành phần môi trường nuôi cấy. Sử dụng 4 loại đường: glucose, sucrose, lactose, manitol với các nồng độ 40, 50, 60, 70 g/l. Bố trí thí nghiệm và đặt tên các nghiệm thức theo bảng 1.

Các thành phần môi trường còn lại cố định: cao nấm men 5g/l, peptone 5g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/l, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.5g/l, vitamin B<sub>1</sub> 0.05g/l; pH 5.5. Nuôi cấy trên máy lắc tròn tốc độ 120 vòng/phút, điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm (29 – 31°C).

Thu sinh khối và đo hàm lượng PS tại thời điểm xác định từ thí nghiệm 1.

**Bảng 1.** Bố trí thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của loại và nồng độ đường lên sự gia tăng sinh khối và tổng hợp PS ở *Ganoderma lucidum*

Loại đường	Nồng độ đường (g/l)			
	40	50	60	70
Glucose	G4	G5	G6	G7
Sucrose	S4	S5	S6	S7
Lactose	L4	L5	L6	L7
Manitol	M4	M5	M6	M7

### 2.4. Xác định khối lượng sinh khối

Sinh khối sau thời gian nuôi cấy được lọc bằng giấy lọc, rửa bằng nước cất 3 lần và sấy ở 50°C đến khối lượng không đổi. Đặt trong bình hút ẩm từ 1–2 giờ. Cân sinh khối bằng cân phân tích.

### 2.5. Xác định hàm lượng EPS

Dịch môi trường sau nuôi cấy được tua bằng ethanol tuyệt đối (tỉ lệ 1:4) trong 12h. Sau đó đem ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 20 phút. Thu tủa, hòa tan với nước cất và xác định hàm lượng PS bằng phương pháp phenol – acid sulfuric.

Phương pháp phenol – acid sulfuric: Hút 1ml dịch hòa tan cho vào ống nghiệm, thêm vào 1ml dung dịch phenol 5%, 5ml dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc, để yên 10 phút, lắc đều và để yên trong 20 phút ở

điều kiện 28 – 30°C, đo mật độ quang ở bước sóng 490nm. Sử dụng chuẩn là glucose [11].

**2.6. Xác định hàm lượng IPS**

Lấy 100mg sinh khối đã sấy khô đem ly trích với NaOH 1M giữ ở 60°C trong 1h. Lọc lấy phần dịch trong, tiến hành xác định hàm lượng IPS bằng phương pháp phenol – acid sulfuric, tương tự trường hợp EPS.

**2.7. Xử lý số liệu**

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, thực hiện theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên. Các phép đo được lặp lại 3 lần trên 1 mẫu. Kết quả được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS với độ tin cậy 95%, đồ thị được vẽ bằng phần mềm Excel 2016.

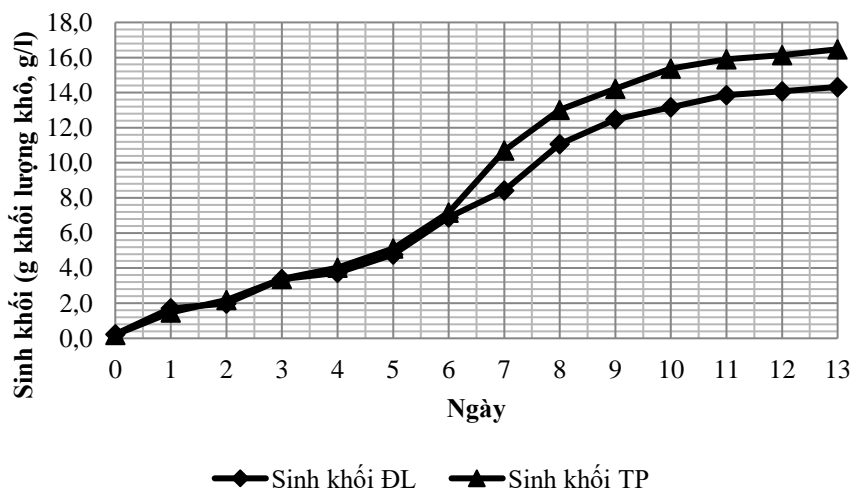
**3. Kết quả và bàn luận**

**3.1. Sự gia tăng sinh khối và tích lũy PS theo thời gian**

Hàm lượng PS thu nhận trong nuôi cấy *G. lucidum* có sự liên quan chặt chẽ đến khối lượng sinh khối [12]. Kết quả theo dõi về sự gia tăng sinh khối theo thời gian của 2 chủng TP và ĐL được thể hiện ở hình 1.

Với lượng giống bổ sung ban đầu tương đương nhau ( $0.236 \pm 0.006$  g khối lượng khô/1 đối với ĐL và  $0.202 \pm 0.016$  g khối lượng khô /1 đối với TP), trong 6 ngày nuôi cấy đầu tiên, sinh khối của 2 chủng thu được không có sự chênh lệch. Nhưng bắt đầu từ ngày nuôi cấy thứ 7 cho đến khi kết thúc thời gian khảo sát, sinh khối chủng TP tăng mạnh hơn và cao hơn so với sinh khối chủng ĐL. Sự tăng sinh khối ở chủng ĐL chậm lại từ ngày nuôi cấy thứ 10, và từ ngày thứ 12 trong nuôi cấy chủng TP (Hình 1).

Kết quả hàm lượng EPS và IPS đo được của mỗi chủng khi đi vào giai đoạn cân bằng (từ ngày nuôi cấy thứ 8 đến thứ 13) đã cho thấy, lượng EPS của ĐL và TP đạt cao nhất ở ngày nuôi cấy thứ 10 (Bảng 2). Qua ngày nuôi cấy 11, EPS có xu hướng giảm, trong khi IPS vẫn tiếp tục tăng. Điều này có thể do thời gian nuôi kéo dài, nguồn dinh dưỡng trong môi trường bắt đầu cạn kiệt, tế bào có thể sử dụng những hợp chất đường do chính chúng tiết ra ngoài môi trường để tăng sinh và tích lũy chất dự trữ trong tế bào [12]. Ngoài ra, những tác động cơ học (như khuấy, lắc...) trong nuôi cấy có thể làm EPS bị đứt gãy hoặc EPS cũng có thể bị biến đổi dưới sự thay đổi của pH môi trường [13, 14].



**Hình 1.** Sự gia tăng sinh khối của chủng ĐL và TP

**Bảng 2.** Sự tích lũy EPS và IPS của chủng ĐL theo thời gian

Ngày	Chủng ĐL		Chủng TP	
	IPS (mg/100mg khối lượng khô)	EPS (mg/l)	IPS (mg/100mg khối lượng khô)	EPS (mg/l)
8	8.80±0.65 <sup>a</sup>	1142.18±55.18 <sup>a</sup>	7.42 ± 0.36 <sup>a</sup>	848.85 ± 50.32 <sup>a</sup>
9	9.42±0.43 <sup>ab</sup>	1358.09±80.42 <sup>b</sup>	8.25 ± 0.39 <sup>a</sup>	870.81 ± 57.51 <sup>a</sup>
<b>10</b>	<b>10.12±0.37<sup>bc</sup></b>	<b>1409.16±84.35<sup>b</sup></b>	<b>9.39 ± 0.46<sup>b</sup></b>	<b>911.95 ± 67.72<sup>b</sup></b>
11	10.71±0.42 <sup>bc</sup>	1254.84±86.94 <sup>ab</sup>	9.29 ± 0.34 <sup>b</sup>	895.07 ± 80.09 <sup>b</sup>
12	11.51±0.85 <sup>d</sup>	1003.00±77.15 <sup>a</sup>	9.41 ± 0.35 <sup>b</sup>	867.29 ± 68.02 <sup>b</sup>
13	11.02±0.32 <sup>cd</sup>	975.66±47.25 <sup>a</sup>	9.52 ± 0.32 <sup>b</sup>	899.04 ± 37.56 <sup>b</sup>

Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%

Kết quả này tương tự kết quả trong khảo sát được thực hiện trên chủng *G. lucidum* CCGMC 5616 (Trung Quốc). Thông qua việc đo tỷ lệ hấp thu oxygen trên 1 đơn vị sinh khối (special oxygen uptake rate – SOUR), các tác giả nhận thấy, SOUR ổn định trong 4 ngày nuôi cấy đầu tiên, sau đó SOUR tăng nhanh, đạt giá trị cao nhất tại ngày thứ 10, qua ngày nuôi thứ 11 SOUR bắt đầu giảm, hàm lượng EPS thu được sau thời điểm này ngày càng ít hơn, trong khi sinh khối và IPS vẫn có xu hướng tăng nhẹ [10].

Dựa vào kết quả phân tích số liệu, ngày thứ 10 là thời điểm thích hợp để dừng việc nuôi cấy đối với cả 2 chủng ĐL và TP.

### 3.2. Sự ảnh hưởng của loại đường và nồng độ đường ban đầu đến sự gia tăng sinh khối và tích lũy PS

Đường là nguồn cung cấp carbon để tế bào sinh tổng hợp carbohydrate, lipid, acid amin... và là nguồn cung cấp năng lượng cho các hoạt động tế bào [12]. Kết quả ở bảng 3 và 4 cho thấy các nghiệm thức có bổ sung đường vào môi trường nuôi cấy đều cho sinh khối, IPS và EPS cao hơn so với mẫu đối chứng (môi trường không bổ sung đường). Điều này, khẳng định tầm quan trọng của đường trong nuôi cấy *G. lucidum*.

\* Đối với chủng ĐL:

Theo số liệu bảng 3, ở đa số các nồng độ sử dụng, lactose phù hợp cho sự gia tăng sinh khối của chủng ĐL. Tuy nhiên, chỉ ở các nồng độ thấp (40 và

50 g/l), sử dụng lactose mới cho lượng IPS cao, còn ở các nồng độ cao (60 và 70 g/l), sucrose lại thích hợp cho tích lũy IPS trong tế bào. Hàm lượng EPS cũng khác nhau khi sử dụng sucrose và lactose ở các nồng độ khác nhau. Ở các nồng độ 40 và 50 g/l, sự chênh lệch về hàm lượng EPS ở các nghiệm thức sử dụng lactose và sucrose không đáng kể ( $912.23 \pm 67.68$  và  $889.18 \pm 29.76$  mg/l, tương ứng với L4 và S4;  $1117.35 \pm 37.92$  và  $1245.18 \pm 112.16$  mg/l, tương ứng với L5 và S5). Trong khi đó, ở nồng độ 60 và 70 g/l, nghiệm thức sử dụng lactose cho kết quả về hàm lượng EPS cao hơn sử dụng sucrose ( $1347.83 \pm 38.54$  và  $1074.36 \pm 19.27$  mg/l, tương ứng với L6 và S6;  $1186.16 \pm 32.66$  và  $734.29 \pm 11.16$  mg/l, tương ứng với L7 và S7).

Kết quả này tương tự với kết quả khảo sát trên chủng *G. lucidum* CCGMC 5.616 (Trung Quốc), trong 4 nguồn đường sử dụng là glucose, maltose, sucrose và lactose ở cùng nồng độ 50 g/l thì lactose cho sinh khối *G. lucidum* và IPS cao nhất ( $12.32 \pm 0.65$  g/l và  $12.25 \pm 0.38$  mg/100mg khối lượng khô, tương ứng) và sucrose là nguồn đường cho hàm lượng EPS cao nhất (750 mg/l) [44]. Một khảo sát khác trên *Lyophyllum decaster* cũng cho kết quả sinh khối đạt cao nhất khi sử dụng lactose (nồng độ 30 g/l). Tuy nhiên ở loài nấm này, IPS và EPS thu được cao nhất khi môi trường sử dụng glucose [15]. Điều này do mỗi loài có một hệ enzyme tham gia vào các con đường biến dưỡng khác nhau và cũng tùy vào nguồn gốc phân lập của mỗi chủng trong cùng một loài, mỗi đối tượng có nguồn cơ chất thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường đến sự gia tăng sinh khối, hàm lượng EPS, IPS của chủng ĐL

Loại đường	Nồng độ, (g/l)	Nghiệm thức	Sinh khối (g khối lượng khô /l)	IPS (mg/100mg khối lượng khô)	EPS (mg/l)
Đối chứng	0	ĐC	$0.882 \pm 0.107$	$1.04 \pm 0.03$	$98.83 \pm 3.55$
Glucose	40	G4	$5.171 \pm 0.288^a$	$3.82 \pm 0.11^a$	$212.54 \pm 10.74^a$
Manitol		M4	$2.546 \pm 0.061^b$	$3.09 \pm 0.28^b$	$130.47 \pm 11.33^b$
Sucrose		S4	<b><math>7.674 \pm 0.195^c</math></b>	$8.05 \pm 0.11^c$	<b><math>889.18 \pm 29.76^c</math></b>
Lactose		L4	<b><math>7.346 \pm 0.211^c</math></b>	<b><math>8.23 \pm 0.26^d</math></b>	<b><math>912.23 \pm 67.68^c</math></b>
Glucose	50	G5	$6.871 \pm 0.311^a$	$4.79 \pm 0.35^a$	$640.93 \pm 14.08^a$
Manitol		M5	$2.986 \pm 0.159^b$	$4.69 \pm 0.16^b$	$387.38 \pm 16.22^b$
Sucrose		S5	<b><math>10.740 \pm 0.121^c</math></b>	$10.05 \pm 0.24^c$	<b><math>1245.18 \pm 112.16^c</math></b>
Lactose		L5	$10.156 \pm 0.080^d$	<b><math>13.05 \pm 0.40^d</math></b>	<b><math>1117.35 \pm 37.92^c</math></b>
Glucose	60	G6	$6.401 \pm 0.037^a$	$6.53 \pm 0.13^a$	$301.40 \pm 33.31^a$
Manitol		M6	$4.001 \pm 0.195^b$	$5.36 \pm 0.13^b$	$513.17 \pm 33.91^b$
Sucrose		S6	$12.153 \pm 0.232^c$	<b><math>12.57 \pm 0.39^c</math></b>	$1074.36 \pm 19.27^c$
Lactose		L6	<b><math>13.470 \pm 0.073^d</math></b>	$10.23 \pm 0.10^d$	<b><math>1347.83 \pm 38.54^d</math></b>
Glucose	70	G7	$4.755 \pm 0.125^a$	$3.08 \pm 0.16^a$	$141.39 \pm 7.37^a$
Manitol		M7	$2.233 \pm 0.214^b$	$4.31 \pm 0.25^b$	$365.29 \pm 11.91^b$
Sucrose		S7	<b><math>9.184 \pm 0.649^c</math></b>	<b><math>10.13 \pm 0.18^c</math></b>	$734.29 \pm 11.16^c$
Lactose		L7	<b><math>8.327 \pm 0.079^c</math></b>	$7.88 \pm 0.15^d$	<b><math>1186.16 \pm 32.66^d</math></b>

Trong cùng 1 nồng độ, các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường đến sự gia tăng sinh khối và hàm lượng EPS, IPS của chủng TP

Loại đường	Nồng độ (g/l)	Nghiệm thức	Sinh khối (g khối lượng khô /l)	IPS (mg/100mg khối lượng khô)	EPS (mg/l)
Đối chứng	0	ĐC	1.920 ± 0.068	0.95 ± 0.07	96.09 ± 3.18
Glucose	40	G4	3.244 ± 0.391 <sup>a</sup>	4.36 ± 0.19 <sup>a</sup>	181.07 ± 20.21 <sup>a</sup>
Manitol		M4	2.241 ± 0.153 <sup>b</sup>	2.15 ± 0.46 <sup>b</sup>	125.71 ± 2.69 <sup>ab</sup>
Sucrose		S4	<b>8.993 ± 0.534<sup>c</sup></b>	<b>6.71 ± 0.09<sup>c</sup></b>	<b>456.87 ± 54.25<sup>b</sup></b>
Lactose		L4	<b>8.680 ± 0.422<sup>c</sup></b>	<b>6.86 ± 0.21<sup>c</sup></b>	<b>523.39 ± 75.57<sup>b</sup></b>
Glucose	50	G5	8.651 ± 0.464 <sup>a</sup>	8.89 ± 0.59 <sup>a</sup>	249.13 ± 15.58 <sup>a</sup>
Manitol		M5	3.006 ± 0.142 <sup>b</sup>	3.82 ± 0.27 <sup>b</sup>	152.43 ± 12.84 <sup>b</sup>
Sucrose		S5	<b>12.109 ± 0.213<sup>c</sup></b>	9.04 ± 0.20 <sup>c</sup>	<b>906.51 ± 62.79<sup>c</sup></b>
Lactose		L5	9.899 ± 0.139 <sup>d</sup>	<b>11.87 ± 0.33<sup>d</sup></b>	<b>907.53 ± 90.39<sup>c</sup></b>
Glucose	60	G6	5.883 ± 0.287 <sup>a</sup>	5.98 ± 0.22 <sup>a</sup>	559.14 ± 48.50 <sup>a</sup>
Manitol		M6	3.788 ± 0.150 <sup>b</sup>	4.93 ± 0.22 <sup>b</sup>	132.15 ± 1.62 <sup>b</sup>
Sucrose		S6	<b>14.091 ± 1.174<sup>c</sup></b>	<b>12.64 ± 0.33<sup>c</sup></b>	<b>1200.03 ± 98.46<sup>c</sup></b>
Lactose		L6	11.904 ± 0.143 <sup>d</sup>	9.19 ± 0.08 <sup>d</sup>	<b>1172.24 ± 20.78<sup>c</sup></b>
Glucose	70	G7	4.450 ± 0.077 <sup>a</sup>	3.13 ± 0.26 <sup>a</sup>	383.82 ± 15.21 <sup>a</sup>
Manitol		M7	2.868 ± 0.567 <sup>b</sup>	3.18 ± 0.42 <sup>b</sup>	121.15 ± 3.85 <sup>b</sup>
Sucrose		S7	<b>10.903 ± 0.254<sup>c</sup></b>	<b>8.61 ± 0.15<sup>c</sup></b>	<b>898.66 ± 56.32<sup>c</sup></b>
Lactose		L7	<b>10.528 ± 0.143<sup>c</sup></b>	6.45 ± 0.26 <sup>d</sup>	<b>999.06 ± 67.32<sup>c</sup></b>

Trong cùng 1 nồng độ, các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%

Xét về ảnh hưởng của nồng độ đường ban đầu đến sinh khối và PS, trong dãy nồng độ khảo sát, 40, 50, 60 và 70 g/l, sinh khối thu được tăng khi nồng độ đường sử dụng tăng. Các trường hợp đều cho sinh khối cao nhất ở nồng độ 60 g/l. Ở nồng độ 70 g/l, sinh khối giảm đáng kể.

Đường cần thiết cho các hoạt động biến dưỡng của tế bào, nhưng cũng có thể làm tăng áp suất thẩm thấu dung dịch dẫn đến ức chế, kim hãm các hoạt động và làm tế bào chết đi [12]. Đây có thể là nguyên nhân dẫn đến khi sử dụng đường ở nồng độ 70 g/l, sinh khối của cả hai chủng đều giảm đáng kể (Bảng 3, 4).

Trong khảo sát ảnh hưởng nồng độ đường trên đối tượng *G. lucidum* CCGMC 5.616 (Trung Quốc), tác giả cũng đã nhận thấy khi sử dụng đường có nồng độ lớn hơn 65 g/l trong môi trường nuôi cấy, tế bào có hiện tượng co lại, kích thước cụm tế bào giảm hẳn [9]. Hiện tượng này cũng xảy ra tương tự trong nuôi cấy tế bào *Panax notoginseng* [16].

Bên cạnh đó, nồng độ đường cao còn kích thích, tăng cường hoạt động hô hấp tế bào, sinh ra nhiều khí CO<sub>2</sub>. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng khi nồng độ CO<sub>2</sub> trong môi trường tăng cao sẽ có tác động ức chế sinh trưởng cũng như các hoạt động chuyển hóa trong nuôi cấy tế bào chìm [17].

Kết quả ở bảng 3 cho thấy IPS của chủng ĐL ở đa số các trường hợp đạt cao nhất khi sử dụng nồng độ đường 60 g/l (6.53 ± 0.13, 5.36 ± 0.13 và 12.57 ± 0.39 mg/100 mg khối lượng khô, tương ứng với G6,

M6 và L6), chỉ có trường hợp sử dụng lactose, IPS cao nhất ở nồng độ 50 g/l (13.05 ± 0.40 mg/100 mg khối lượng khô).

Khi sử dụng glucose và sucrose, hàm lượng EPS của chủng ĐL đạt cao nhất ở nồng độ 50 g/l (640.93 ± 14.08 và 1245.18 ± 112.16 mg/l, tương ứng với G5 và S5), nhưng khi thức sử dụng manitol và lactose, nồng độ 60 g/l cho lượng EPS trội hơn hẳn những nồng độ khác (513.17 ± 33.91 và 1347.83 ± 38.54 mg/l, tương ứng với M6 và L6).

\* Đối với chủng TP

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, cũng như chủng ĐL, tế bào chủng TP phát triển trong môi trường sử dụng sucrose và lactose tốt hơn trong môi trường sử dụng glucose và manitol. Tế bào hấp thu manitol yếu nhất trong cả 4 loại đường sử dụng trong thí nghiệm.

Khi khảo sát sự ảnh hưởng của các loại đường ở nồng độ khác nhau, sinh khối chủng TP đạt cao nhất khi sử dụng glucose 50 g/l (8.651 ± 0.464 g khối lượng khô /l).

IPS thu được ở các nghiệm thức sử dụng glucose và lactose đạt cao nhất ở nồng độ 50 g/l (8.89 ± 0.59 và 11.87 ± 0.33 mg/100 mg khối lượng khô, tương ứng với G5 và L5). Khi sử dụng manitol và sucrose, IPS cao nhất ở nồng độ 60 g/l (3.788 ± 0.150 và 11.904 ± 0.143 mg/100 mg khối lượng khô, tương ứng với M6 và S6). Như vậy, xu hướng ảnh hưởng của nồng độ đường ban đầu đến sinh khối và IPS giữa 2 chủng ĐL và TP có sự khác nhau trong trường hợp sử dụng glucose. Nghiệm thức G5 cho sinh khối và

IPS của chủng TP cao nhất, trong khi ở nghiệm thức G6, sinh khối và IPS của chủng ĐL cao nhất.

EPS từ chủng TP đều đạt tối đa ở nồng độ 60 g/l đối với tất cả các loại đường sử dụng. Riêng với manitol, EPS thu được ở nồng độ 50 g/l và 60 g/l xấp xỉ bằng nhau ( $152.43 \pm 12.84$  và  $132.15 \pm 1.62$  mg/l, trong ứng nghiệm thức M5 và M6).

IPS của chủng TP cũng có xu hướng thay đổi theo sự thay đổi của sinh khối. Với EPS, ngoại trừ nghiệm thức S6 (sử dụng sucrose), sinh khối, IPS và EPS đồng thời cao nhất ở nồng độ 60 g/l, ở các nghiệm thức còn lại sinh khối tăng nhưng không gia tăng EPS. Nghiệm thức sử dụng glucose cho sinh khối và IPS cao nhất ở nồng độ 50 g/l (G5), trong khi EPS cao nhất ở nồng độ 60 g/l (G6). Nghiệm thức sử dụng manitol cho sinh khối và IPS cao nhất ở nồng độ 60 g/l (M6), trong khi EPS cao nhất ở nồng độ 50 g/l (M5).

Qua kết quả phân tích số liệu, sucrose 60 g/l phù hợp nhất cho sự gia tăng sinh khối và tổng hợp IPS, EPS ở chủng TP. Sinh khối, hàm lượng IPS, EPS thu được trong nghiệm thức S6 này lần lượt là  $14.091 \pm 1.174$  g khối lượng khô /l,  $12.64 \pm 0.33$  mg/100 mg khối lượng khô và  $12.64 \pm 0.33$  mg/l.

#### 4. Kết luận và kiến nghị

##### 4.1. Kết luận

Từ những kết quả ghi nhận được trong phạm vi nghiên cứu của đề tài, chúng tôi rút ra được một số kết luận và kiến nghị như sau:

- Có thể ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào chìm đối với nấm Linh chi đỏ *Ganoderma lucidum* Việt Nam.

- Thời gian tối ưu cho sự gia tăng sinh khối của chủng ĐL là 10 ngày và của chủng TP là 12 ngày. Tuy nhiên, hàm lượng EPS và IPS của 2 chủng đều cao nhất ở ngày nuôi cấy thứ 10.

- Loại đường thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và tổng hợp PS của chủng ĐL là lactose 60 g/l, của chủng TP là sucrose 60 g/l.

##### 4.2. Kiến nghị

Nhằm xác định được chủng *G. lucidum* thích hợp cho nuôi cấy chìm thu nhận PS, chúng tôi có một số kiến nghị sau:

- Khảo sát sự ảnh hưởng của yếu tố dinh dưỡng khác (nguồn nitơ, khoáng, vitamin...)

- Khảo sát sự ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy (tốc độ lắc, nhiệt độ nuôi cấy, pH môi trường, ánh sáng...)

#### Tài liệu tham khảo

- [1] Chen Hung Sen, Tsai Yow Fu, Lin Steven, Lin Chia Ching, Khoo Kay Hooi, Lin Chun Hung, Wong Chi Huey, Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12 (2004) 5595–5601.
- [2] Hikino H., Konno C., Mirin Y., Hayashi T. (1985), Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies, *Planta Medica*, 4 (1985) 339 – 34028.
- [3] Miyazaki Toshio, Nishijima Motogiro, Studies on fungal polysaccharides XXVII: Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (1981) 3611–3616.
- [4] Sone Y., Okuda R., Wada N., Kishida E., Misaki A., Structures and antitumor activities of the polysaccharide isolated from fruiting body and the growing fermentation of mycelium of *Ganoderma lucidum*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 49 (1985) 2641 – 2653, 45.
- [5] Vento S., T-lymphocytes sensitization to hepatocyte antigens in autoimmune chronic active hepatitis, *Gastroenterology*, 91 (1986) 810–817
- [6] Georges M. Halpern, *Healing mushrooms*, 188, Square One, United States of America, 2007.
- [7] Wang Sheng Yuan, Hsu MingLing, Hsu Hui Chi, Tzeng Cheng Hwai, Lee Shuih Sheng, Shiao Ming Shi, Ho Chi Kuan, The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes, *International Journal of Cancer*, 70 (1997) 699–705.
- [8] Fang Qing Hua, Tang Ya Jie, Zhong Jian Jiang, Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*, *Process Biochemist*, 37 (2002) 1375–1379.
- [9] Bhagwan S. Sanodiya, Gulab S. Thakur, Rakesh K. Baghel, G.B.K.S. Prasad, P.S. Bisen, *Ganoderma lucidum*: A potent pharmacological macrofungus, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10 (2009) 717-742.
- [10] Fang Qing Hua, Zhong Jian Jiang, Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites - ganoderic acid and polysaccharide, *Biochemical Engineering Journal*, 10 (2002) 61–65.
- [11] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28 (1956) 350 – 356.
- [12] Nguyễn Đức Lượng, *Vi sinh học công nghiệp - Tập 2*, Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh, 2003.
- [13] Lee Hwan Young, Song Min Kyung, Yu Young Seob, Hwang Seokhwan, “Production of *Ganoderma lucidum* mycelium using cheese whey as an alternative substrate: response surface analysis and biokinetics”, *Biochemical Engineering Journal*, 15 (2003) 93–99,
- [14] Yang F. C., Huang H. C., Yang M. J., The influence of environmental conditions on the mycelial growth of *Antrodia cinnamomea* in submerged cultures,

- Enzyme and Microbial Technology, 33 (2003) 395–402.
- [15] Chandra P. Pokhrel, Shoji Ohga, Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*, Food Chemistry, 105 (2007) 641–646.
- [16] Zhang Y. H., Zhong J. J., Hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation of *Panax notoginseng* cells, Enzyme Microbiological Technology, 21 (1997) 59–63.
- [17] Lê Xuân Thám, Năm Linh chi – dược liệu quý ở Việt Nam, Nhà xuất bản Mũi Cà Mau, 1996