

Effect of Nitrogen Sources and Illumination Conditions on *Ganoderma Lucidum* Submerged Culture

Nguyen Phan Khanh Hoa^{1*}, Pham Thi Cam Hoa¹, Le Thi Thuy Tien²

¹Ho Chi Minh City University of Food Industry, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Viet Nam National University - Ho Chi Minh City University of Technology, Ho Chi Minh City, Vietnam

*Corresponding author email: hoanpk@hufi.edu.vn

Abstract

The research was conducted to select the nitrogen sources and suitable light condition during *Ganoderma lucidum* submerged culture (isolated in Vietnam). The results showed that organic nitrogen is more suitable than inorganic nitrogen for the growth and synthesis of fungal polysaccharides. The amounts of incellular polysaccharide and exopolysaccharide in this strain was highest when combined 7.5 g/L yeast extract and 2.5 g/L peptone. The light affected on the size, shape and the color of the DL cells in submerged culture. Under optimum condition for nitrogen and light sources, the biomass, IPS and EPS content of DL strain were 13.90 ± 0.27 g DW/L, 15.33 ± 0.97 mg/100mg DW and 2349.76 ± 46.94 mg/L, respectively.

Keywords: Light, *Ganoderma lucidum*, nitrogen, submerged culture, polysaccharides.

1. Đặt vấn đề

Nấm Linh chi đỏ *Ganoderma lucidum* (*G. lucidum*) là một loại dược thảo được xếp vào loại “thượng dược” [1-4]. Những hoạt tính của *G. lucidum* chủ yếu do các hợp chất polysaccharide (bao gồm polysaccharide nội bào và polysaccharide ngoại bào), hợp chất chiếm tỷ lệ lớn nhất trong tất cả các hợp chất có hoạt tính sinh học được thu nhận từ quả thể nấm, mà trong đó β -glucan là chủ yếu và đóng vai trò quan trọng bởi khả năng tăng cường hệ thống miễn dịch ở người [5].

Kỹ thuật nuôi trồng nấm Linh chi đỏ trên môi trường nhân tạo ngày càng phát triển mạnh và ở một số quốc gia như Nhật Bản, Trung Quốc, Mỹ, Việt Nam, nuôi trồng nấm Linh chi đỏ thu quả thể đã đạt đến quy mô công nghiệp. Tuy nhiên, phương pháp này gặp phải những khó khăn như thời gian nuôi trồng kéo dài từ 4 - 6 tháng, quá trình nuôi trồng phụ thuộc nhiều vào nguồn nguyên liệu, thành phần dinh dưỡng bổ sung, điều kiện nhiệt độ, độ ẩm và kể cả mức độ ô nhiễm của môi trường xung quanh. Những nhược điểm này dẫn đến chất lượng quả thể không đồng đều, khó kiểm soát. Quy trình trích ly các hợp chất cũng là một vấn đề gây khó khăn cho các nhà nghiên cứu. Do đó, hàm lượng polysaccharide (PS) thu nhận thường thấp và độ tinh sạch không cao [6, 7].

Theo nhiều nghiên cứu, PS chiết xuất từ quả thể, từ bào tử và từ sinh khối sợi nấm thu nhận trong nuôi cấy trên môi trường lỏng hoặc rắn đều có hoạt tính sinh học tương tự nhau [1, 3, 4]. Chính điều này làm nảy sinh ra việc ứng dụng phương pháp nuôi cấy tế bào - vốn đã thành công với nhiều đối tượng sinh vật - trong

thu nhận các sản phẩm chuyển hóa ở sinh khối sợi *G. lucidum*.

Môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy là các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy tế bào sinh vật nói chung và nuôi cấy sinh khối sợi *G. lucidum* nói riêng. Quá trình gia tăng sinh khối và sinh tổng hợp PS từ *G. lucidum* chịu ảnh hưởng bởi nguồn đường, nitơ, chất khoáng, hàm lượng oxy cũng như điều kiện về nhiệt độ, ánh sáng, pH... [8, 9].

Một công bố trước đây của nhóm tác giả đã xác định được loại đường thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và tổng hợp PS của chủng *G. lucidum* (ĐL) là lactose 60 g/L, thời gian tối ưu cho sự gia tăng sinh khối của chủng là 10 ngày, hàm lượng PS ngoại bào (EPS-exopolysaccharide) và PS nội bào (IPS-incellular polysaccharide) đều cao nhất ở ngày nuôi cấy thứ 10 [10]. Nghiên cứu này tiếp tục khảo sát sự ảnh hưởng của nguồn nitơ và điều kiện ánh sáng đến sự gia tăng sinh khối và hình thành PS (bao gồm EPS và IPS) của chủng này.

2. Vật liệu - phương pháp nghiên cứu

2.1. Giống

Chủng *Ganoderma lucidum* 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, ký hiệu ĐL và được cung cấp bởi công ty TNHH TM DV KT Việt Doanh.

Giống được cấy chuyền trên môi trường PGA (potato glucose agar). Lưu trữ điều kiện 4 °C, sau 2 tuần cấy chuyền 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 lỏng có thành phần: lactose 35 g/L, cao nấm men 7,5 g/L, KH₂PO₄ 1,0 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,5 g/L, vitamin B₁ 0,05 g/L, pH 5,5.

Hoạt hóa lần 1: Dùng dao cắt mảnh sinh khối sợi mọc trên đĩa thạch thành từng miếng nhỏ có kích thước 5 x 5 mm. Chuyển 5 miếng thạch có sinh khối sợi vào ống nghiệm có 10 mL nước cất đã hấp khử trùng, lắc mạnh và chuyển vào bình thủy tinh 250 mL có 40 mL 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 5 mL dịch có sinh khối sau hoạt hóa lần 1 sang bình thủy tinh 250 mL có 45 mL 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) [8].

2.2. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sự gia tăng sinh khối và tổng hợp PS ở *Ganoderma lucidum*

Chuyển 5 ml dịch có sinh khối sau hoạt hóa lần 2 sang bình thủy tinh 250 mL có chứa 45 mL môi trường nuôi cấy có thành phần lactose 60 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,5 g/L, vitamin B₁ 0,05 g/L, pH 5,5 [10]. Thay đổi nguồn cung cấp nitơ trong thành phần môi trường nuôi cấy với nồng độ và đặt tên các nghiệm thức theo Bảng 1. Nuôi trên máy lắc tròn tốc độ 120 vòng/phút trong 10 ngày, điều kiện ánh sáng mặt trời tự nhiên cường độ 900 - 1100 lux (12 h) xen kẽ tối hoàn toàn (12 h) và nhiệt độ phòng thí nghiệm (29 - 31 °C), sau đó dùng thu nhận sinh khối, đo hàm lượng PS (EPS và IPS).

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ

Nghiệm thức	Nguồn cung cấp nitơ	Nồng độ (g/L)
NT1	NH ₄ Cl	10,0
NT2	KNO ₃	10,0
NT3	Cao nấm men	10,0
NT4	Peptone	10,0
NT5	Cao nấm men : peptone	7,5 : 2,5
NT6	Cao nấm men : peptone	5,0 : 5,0
NT7	Cao nấm men : peptone	2,5 : 7,5

2.3. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của ánh sáng đến sự gia tăng sinh khối và tổng hợp PS ở *Ganoderma lucidum*

Chuyển 5 ml dịch có sinh khối sau hoạt hóa lần 2 sang bình thủy tinh 250 mL có 45mL môi trường nuôi cấy có thành phần: lactose 60 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,5 g/L, vitamin B₁ 0,05 g/L, pH 5,5 [10], nguồn nitơ thích hợp đã được xác định từ thí nghiệm 1.

Bảng 2. Khảo sát ảnh hưởng của ánh sáng đến sự gia tăng sinh khối và tổng hợp PS

Nghiệm thức	Điều kiện ánh sáng
As1	Ánh sáng mặt trời tự nhiên cường độ 900 - 1100 lux (12 giờ) xen kẽ tối hoàn toàn (12 giờ)
As2	Tối hoàn toàn

Thay đổi điều kiện ánh sáng và đặt tên nghiệm thức theo Bảng 2. Nuôi trên máy lắc tròn 120 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (29-31 °C). Nuôi cấy trong 10 ngày, sau đó dùng thu nhận sinh khối, đo hàm lượng PS (EPS và IPS).

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 [8]. 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 tủa bằng ethanol tuyệt đối (tỉ lệ 1:4) trong 12 giờ. 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 [8].

Phương pháp phenol - acid sulfuric: Hút 1 ml dịch hòa tan tủa cho vào ống nghiệm, thêm vào 1 ml dung dịch phenol 5%, 5 ml dung dịch H₂SO₄ đậm đặc, để yên 10 phút, lắc đều và để yên trong 20 phút ở điều kiện 29 - 31 °C, đo mật độ quang ở bước sóng 490 nm. Sử dụng chuẩn là glucose [11].

2.6. Xác định hàm lượng IPS

Lấy 100 mg sinh khối đã sấy khô đem trích ly với NaOH 1M giữ ở 60 °C trong 1 h giờ. Lọc lấy phần dịch trong, tiến hành xác định hàm lượng IPS bằng phương pháp phenol - acid sulfuric, tương tự trường hợp EPS [8].

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%.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sự gia tăng sinh khối và tổng hợp PS của *Ganoderma lucidum*

Hệ sợi nấm sử dụng nguồn đạm để tổng hợp các chất hữu cơ như purin, pyrimidin, protein, tổng hợp chitin cho vách tế bào [12]. Nguồn đạm sử dụng trong các môi trường nuôi cấy thường ở dạng muối vô cơ (như muối nitrate, muối amonium) hoặc ở dạng các hợp chất hữu cơ (amino acid, protein) [9].

Bảng 3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sự gia tăng sinh khối và tổng hợp PS

Nguồn nitơ	Nồng độ (g/l)	Nghiệm thức	Sinh khối (g DW/L)	IPS (mg/100mg DW)	EPS (mg/L)
Đối chứng	0	ĐC	1,50 ± 0,06 ^a	1,04 ± 0,03 ^a	88,66 ± 2,50 ^a
KNO ₃	10	NT1	9,18 ± 0,39 ^b	7,30 ± 0,31 ^b	546,47 ± 11,90 ^b
NH ₄ Cl	10	NT2	8,78 ± 0,17 ^b	8,14 ± 0,57 ^c	675,33 ± 11,77 ^b
Cao nấm men	10	NT3	11,88 ± 0,12 ^c	8,26 ± 0,53 ^d	1047,01 ± 45,45 ^b
Peptone	10	NT4	12,29 ± 0,32 ^{cd}	10,68 ± 0,58 ^e	1171,26 ± 27,87 ^c
Cao nấm men: peptone	7,5 : 2,5	NT5	14,23 ± 0,42^{de}	12,77 ± 0,36 ^e	1179,37 ± 36,25 ^c
Cao nấm men: peptone	5,0 : 5,0	NT6	13,27 ± 0,56^e	15,07 ± 0,46 ^f	1422,83 ± 31,98 ^d
Cao nấm men: peptone	2,5 : 7,5	NT7	14,66 ± 0,84^e	15,99 ± 0,34^g	1539,00 ± 26,73^d

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

Kết quả ở Bảng 3 về ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sự gia tăng sinh khối và tổng hợp PS ở chủng *ĐL* cho thấy các nghiệm thức có sự bổ sung nitơ trong môi trường nuôi cấy đều thu được sinh khối, hàm lượng IPS và EPS cao hơn so với mẫu đối chứng (môi trường không bổ sung nitơ). Các nguồn nitơ vô cơ không phải là nguồn thích hợp cho sự sinh trưởng và tổng hợp PS ở *G. lucidum*. Nghiệm thức sử dụng NH₄Cl (NT1) và nghiệm thức sử dụng KNO₃ (NT2) đều cho các giá trị về sinh khối, IPS và EPS thấp hơn hẳn các giá trị thu được ở nghiệm thức sử dụng nguồn nitơ hữu cơ bao gồm cao nấm men (NT3), peptone (NT4). Điều này có thể do trong quá trình biến dưỡng, tế bào chỉ sử dụng thành phần nitơ, còn các ion khác như Cl⁻ và K⁺ không được tế bào sử dụng, chúng làm tăng tính acid (Cl⁻) hoặc tăng tính kiềm (K⁺) của môi trường nuôi cấy, ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của tế bào [13]. Các khảo sát của Fang và Zhong (2002) cũng khẳng định, nitơ vô cơ không phải là nguồn nitơ thích hợp cho nuôi cấy chìm tế bào *G. lucidum*. Các tác giả cho rằng *G. lucidum* tổng hợp trực tiếp các protein từ các acid amin có sẵn trong các nguồn cung cấp chất dinh dưỡng [8].

Khi sử dụng các nguồn nitơ hữu cơ riêng lẻ bao gồm peptone hoặc cao nấm men, các kết quả về hàm lượng EPS và IPS của chủng *ĐL* ở nghiệm thức sử dụng peptone (NT4) lần lượt là 10,68±0,58 mg/100 mg DW và 1171,26±27,87 mg/L cao hơn ở nghiệm thức sử dụng cao nấm men (NT3) lần lượt là 8,14±0,57 mg/100 mg DW và 1047,01±45,45 mg/L, mặc dù sự chênh lệch về sinh khối giữa 2 nghiệm thức không đáng kể (11,88±0,13 và 12,29±0,32 g DW/L, tương ứng nghiệm thức NT3 và NT4). Như vậy, đối với chủng *ĐL*, peptone thích hợp hơn cao nấm men trong quá trình sinh tổng hợp PS. Kết quả này tương tự với kết quả của Fang và Zhong (2002) [8].

Để tìm ra nguồn nitơ phù hợp hơn cho *ĐL*, chúng tôi đã thử kết hợp cao nấm men và peptone theo các tỷ lệ khác nhau. Kết quả cho thấy khi có sự phối hợp, sinh khối của chủng *ĐL* cao hơn so với khi sử dụng 1 nguồn riêng lẻ, sinh khối tăng đồng thời với sự tích lũy IPS (tính trên mỗi đơn vị sinh khối khô). Tuy nhiên, EPS chỉ tăng đáng kể khi kết hợp lượng peptone bằng hoặc cao hơn lượng cao nấm men (nghiệm thức NT6 và NT7). Ở tỷ lệ kết hợp 7,5 g/L cao nấm men và 2,5 g/L peptone (nghiệm thức NT5), EPS thu được tương đương với nghiệm thức NT4 chỉ sử dụng peptone 10 g/L. Các số liệu ghi nhận được trong các nghiệm thức có sự thay đổi về tỷ lệ kết hợp cao nấm men và peptone càng khẳng định peptone là nguồn nitơ thích hợp nhất cho tổng hợp PS ở chủng *ĐL*. Mặc dù sinh khối gần như bằng nhau ở các tỷ lệ kết hợp, nhưng lượng IPS và EPS thu được có sự khác biệt rõ rệt trong các trường hợp. Hàm lượng IPS và EPS đạt cao nhất ở nghiệm thức NT7 (kết hợp 2,5 g cao nấm men và 7,5 g peptone) lần lượt là 15,99±0,34 mg/100 mg DW và 1539,00±26,73 mg/L. Nghiệm thức có sự kết hợp 7,5 g cao nấm men và 2,5 g peptone cho lượng IPS và EPS thấp nhất trong tất cả các trường hợp, hàm lượng IPS và EPS lần lượt là 12,77±0,36 mg/100 mg DW và 1179,37±36,25 mg/L. Dựa vào kết quả phân tích số liệu (Bảng 3), NT7 (2,5 g cao nấm men và 7,5 g peptone) là tốt nhất cho sự tăng sinh và hình thành PS ở chủng *ĐL*.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của ánh sáng đến sự gia tăng sinh khối và tổng hợp PS của *Ganoderma lucidum*

Ánh sáng là yếu tố ít được quan tâm trong nuôi cấy chìm các loài nấm lớn nói chung và *G. lucidum* nói riêng. Hầu như chưa tìm thấy nghiên cứu nào khảo sát ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng đến tăng trưởng và tổng hợp PS ở *G. lucidum*. Tuy nhiên, trong nuôi trồng truyền thống thu nhận quả thể, cường độ ánh sáng

manh có thể kiểm chế sự sinh trưởng của sợi nấm, có trường hợp giết chết sợi nấm. Ánh sáng có thể phá vỡ một số vitamin và enzyme, ảnh hưởng đến sự sinh trưởng bình thường của sợi nấm [9]. Do đó, việc tìm hiểu sự khác nhau trong quá trình sinh trưởng của hệ sợi nấm trong nuôi cấy chìm là cần thiết.

Kết quả ghi nhận trên chủng ĐL khi thực hiện thí nghiệm với 2 chế độ ánh sáng (điều kiện ánh sáng phòng thí nghiệm - nghiệm thức As 1 và điều kiện tối hoàn toàn - nghiệm thức As 2) được trình bày ở Bảng 4. Số liệu thu được cho thấy, sự khác nhau giữa 2 điều kiện ánh sáng này không dẫn đến sự chênh lệch về sinh khối và IPS, tuy nhiên, EPS trong điều kiện tối (nghiệm thức As 2) được hình thành nhiều hơn trong điều kiện ánh sáng phòng thí nghiệm (nghiệm thức As 1).

EPS của chủng ĐL trong điều kiện tối hoàn toàn là 2349,76±46,94 mg/L, cao hơn so với khi nuôi cấy trong điều kiện ánh sáng phòng thí nghiệm (1629,36±330,86 mg/L). Sự chênh lệch này là khá lớn và đáng quan tâm, khi hầu hết các PS có hoạt tính sinh học quan trọng đều tồn tại ở dạng ngoại bào [6-7].

Ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng còn thể hiện rõ thông qua sự khác biệt về kích thước và hình dạng tế bào trong các bình nuôi cấy. Khi được nuôi trong

điều kiện tối hoàn toàn (As 2), các tế bào có xu hướng lắng xuống đáy bình khi đưa về trạng thái tĩnh (Hình 3). Điều này có thể do sự khác nhau về tỷ trọng của tế bào trong 2 điều kiện nuôi cấy khác nhau. Các cụm tế bào của chủng ĐL trong điều kiện tối có màu ngả vàng hơn so với trong điều kiện ánh sáng phòng thí nghiệm (As 1) (Hình 4).

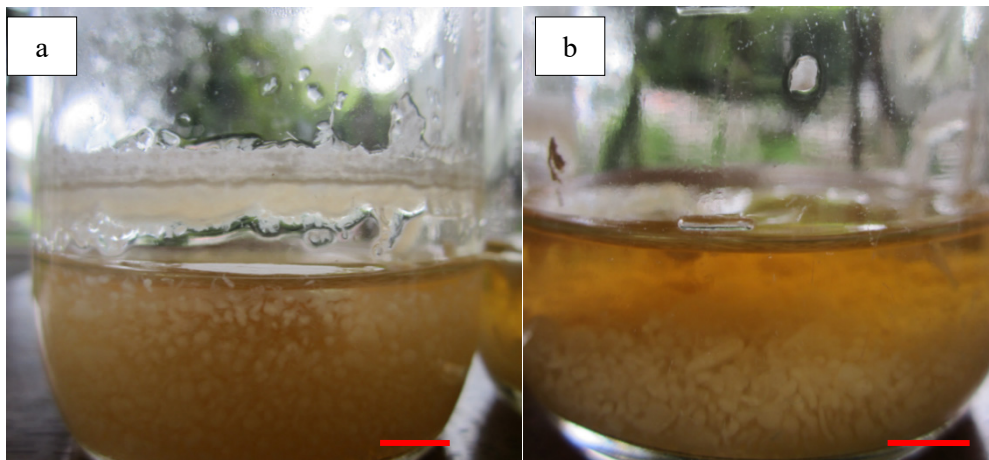
Hình dạng cụm tế bào cũng có sự thay đổi khi nuôi cấy trong 2 điều kiện ánh sáng khác nhau. Chủng ĐL khi nuôi cấy trong điều kiện tối cho các cụm tế bào có dạng hình que rõ rệt, trong khi ở điều kiện ánh sáng phòng thí nghiệm đa số các tế bào có dạng hình cầu hoặc hình bầu dục (Hình 5). Đường kính cụm tế bào hình cầu thu được trong điều kiện ánh sáng phòng thí nghiệm từ 1,5 - 3,0 mm, chiều dài của các cụm tế bào hình que thu được trong điều kiện tối từ 3,0 - 5,0 mm.

Những số liệu thu được cho thấy, nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn không những thu được lượng EPS lại cao hơn mà vẫn có thể thu được sinh khối và IPS tương đương với điều kiện ánh sáng thường. Đây là một ưu điểm khi mở rộng quy mô nuôi cấy các tế bào *G. lucidum* vì nuôi cấy ở mức công nghiệp thường sử dụng các fermentor bằng thép không rỉ, ánh sáng không thể xuyên qua [13].

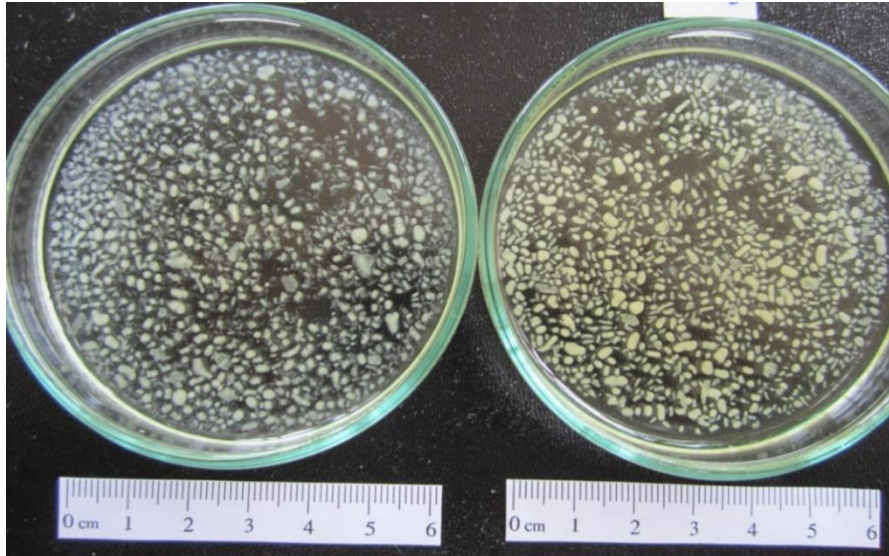
Bảng 4. Ảnh hưởng của ánh sáng đến sự gia tăng sinh khối và tổng hợp PS

Nghiệm thức	Sinh khối (g/l)	IPS (mg/100mgDW)	EPS (mg/l)
As 1	15,25 ± 0,86 ^a	15,58 ± 0,71 ^a	1629,36 ± 30,86 ^a
As 2	13,90 ± 0,27 ^b	15,33 ± 0,97 ^a	2349,76 ± 46,94^b

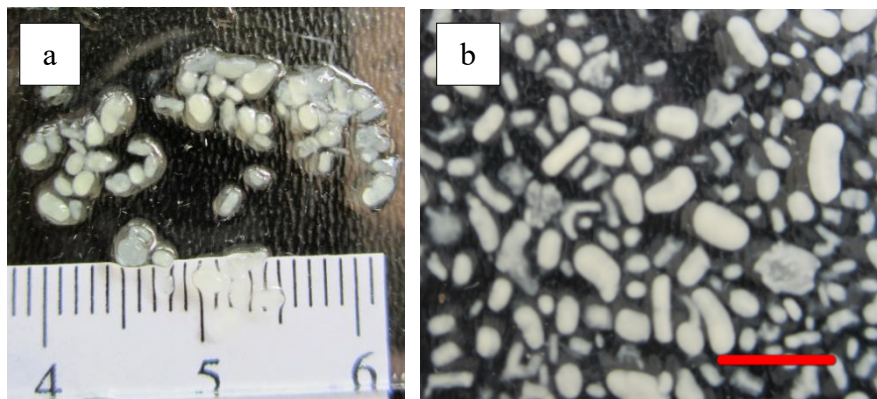
* Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%



Hình 3. Sinh khối của chủng ĐL ở các điều kiện ánh sáng khác nhau, thang đo 1 cm
 (a) Ánh sáng phòng thí nghiệm; (b) Tối hoàn toàn



Hình 4. Màu sắc các cụm tế bào của chủng ĐL ở các điều kiện ánh sáng khác nhau
(a) Ánh sáng phòng thí nghiệm; (b) Tối hoàn toàn



Hình 5. Hình dạng tế bào của chủng ĐL ở các điều kiện ánh sáng khác nhau, thang đo 1 cm
(a) Ánh sáng phòng thí nghiệm; (b) Tối hoàn toàn

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 như sau:

- Nitơ hữu cơ thích hợp cho các hoạt động sinh trưởng và chuyển hóa của các chủng *G. lucidum* Việt Nam. Hàm lượng EPS và IPS của chủng ĐL cao nhất khi kết hợp cao nấm men và peptone với tỷ lệ 1:3 bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

- Ánh sáng ảnh hưởng đến kích thước, hình dạng, màu sắc của các cụm tế bào và hàm lượng EPS thu được trong nuôi cấy chìm *G. lucidum*. Hàm lượng EPS của chủng ĐL khi được nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn có sự gia tăng đáng kể mặc dù về sinh khối và IPS không có sự chênh lệch.

4.2. Kiến nghị

Do những hạn chế trong quá trình thực hiện đề tài, chúng tôi có một số kiến nghị như sau:

- Khảo sát trên các chủng *G. lucidum* khác có nguồn gốc Việt Nam.

- Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitơ hữu cơ khác (như dịch chiết từ vi tảo, dịch chiết từ nấm men, nấm mốc...).

- Khảo sát thêm ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng khác như các vitamin (như vitamin B₁, vitamin A...), các khoáng vi lượng (KH₂PO₄, MgSO₄...).

- Khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy như nhiệt độ, pH môi trường, chế độ lắc nhằm tối ưu chế độ nuôi cấy.

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.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.08.003>
- [2] Hikino H., Konno C., Mirin Y., Hayashi T., Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies, *Planta Medica*, 4 (1985) 339 - 34028.
<https://doi.org/10.1055/s-2007-969507>
- [3] Miyazaki Toshio, Nishijima Motogiro, Studies on fungal polysaccharides XXVII: Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharides of *Ganoderma lucidum*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (1981) 3611 - 3616.
<https://doi.org/10.1248/cpb.29.3611>
- [4] Sone Y., Okuda R., Wada N., Kishida E., Misaki A., Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing fermentation of mycelium of *Ganoderma lucidum*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 49 (1985) 2641 - 2653, 45.
<https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10867134>
- [5] Georges M. Halpern, *Healing mushrooms*, 188, Square One, United States of America, 2007.
- [6] S. Jong, J. M. Birmingham, Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*, *Advances in Applied Microbiology*, 37 (1992) 101 - 134.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70253-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70253-3)
- [7] Mizuno T., The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan, *International Journal of Medicinal Mushroom*, 1 (1999) 9 - 29.
<https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v1.i1.20>
- [8] Fang Qing Hua, Zhong Jian Jiang, Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites - ganoderic acid and polysaccharides, *Biochemical Engineering Journal*, 10 (2002) 61-65.
[https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00158-9)
- [9] Yang F. C., Haung 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.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00136-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00136-4)
- [10] Nguyễn Phan Khánh Hòa, Lê Thị Thủy Tiên, Nguyễn Đức Lượng, 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*, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 125 (2018) 95-101.
- [11] Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K. , Rebers P. A., Smith F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry* 28 (1956) 350 - 356.
<https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- [12] Lê Xuân Thám, *Nấm linh chi - dược liệu quý ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Mũi Cà Mau, 1996.
- [13] Nguyễn Đức Lượng, *Vì sinh học công nghiệp - Tập 2*, Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia TP Hồ Chí Minh, 2003.