

Khảo sát khả năng phân giải bào tử nấm Linh Chi đỏ (*Ganoderma lucidum*) bằng các vi khuẩn phân lập từ các chế phẩm men tiêu hóa

Nguyễn Trung Hiếu^{1,*}, Lê Thị Thùy Trang²

¹Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Nguyễn Tất Thành

²Chi cục Thủy Sản TP. HCM

*nthieu@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Chúng tôi tiến hành phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn từ sữa chua và men vi sinh có khả năng làm yếu cấu trúc và tăng phóng thích triterpenoid từ bào tử nấm Linh Chi đỏ (*Ganoderma lucidum*). Kết quả cho thấy có 4 chủng *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* và *B. subtilis* đều có khả năng làm yếu cấu trúc và tăng phóng thích triterpenoid từ bào tử nấm sống sau 3 – 7 ngày lên men và hiệu quả đạt được cao hơn khi lên men với bào tử nấm đã hấp trong cùng điều kiện. Đặc biệt, chủng *L. casei* và *L. acidophilus* cho hiệu quả phóng thích triterpenoid cao hơn khi lên men bào tử nấm sống. Chủng *B. subtilis* lại cho hiệu quả phóng thích cao nhất khi lên men với bào tử nấm đã hấp. Khi đánh giá sự ảnh hưởng một số điều kiện nuôi cấy và chiết xuất lên độ bền cấu trúc triterpenoid và polysaccharide, kết quả cho thấy polysaccharide bền trong 4 loại dung môi nước, acid (HCl 0,01M), base (NaOH 0,01M), và dịch men sống *B. subtilis* và *L. plantarum* ở nhiệt độ ủ 30 – 90°C và 120°C (môi trường nước) trong 0 – 60 phút; kém ổn định trong môi trường acid và base ở nhiệt độ 120°C. Triterpenoid ổn định ở nhiệt độ 30 – 90°C (thời gian ủ 0 – 60 phút) trong dịch men sống vi *B. subtilis* và *L. plantarum*, và nhiệt độ 30°C (thời gian ủ 0 – 60 phút), 60°C (thời gian ủ 0 – 40 phút) trong cồn 96°; kém ổn định trong cồn 96° ở nhiệt độ 60°C (thời gian ủ 60 phút) và 90°C.

Nhận 09.11.2019
Được duyệt 18.04.2019
Công bố 26.06.2019

Từ khóa
bào tử nấm Linh Chi,
Ganoderma lucidum,
L. plantarum, *L. casei*,
L. acidophilus, *B. subtilis*, polysaccharide,
triterpenoid.

© 2019 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Mở đầu

Nhiều nghiên cứu cho thấy nấm Linh Chi có nhiều công dụng quý như: kiện não, bảo vệ gan, giải độc, giải cảm, hoạt hóa hệ thống miễn dịch, ức chế tế bào ung thư và trẻ hóa da[1-4] nhờ sự hiện diện của nhiều chất có hoạt tính sinh học; đặc biệt là polysaccharide (giàu β - glucan), triterpenoid, tannin, steroid, saponin... Các hoạt chất này chủ yếu có trong quả thể nấm, khi hình thành bào tử hoạt chất được đóng gói và tích lũy trong bào tử cao hơn quả thể nấm[5]. Các nghiên cứu cho thấy, trong bào tử có hầu hết các chất có hoạt tính giống trong quả thể nấm và hoạt tính của chúng cao hơn nhiều lần so với quả thể nấm[6]. Để thu được lượng hoạt chất tối đa trong bào tử các nghiên cứu thường tập trung vào việc làm tăng hiệu quả chiết hoạt chất bằng các phương pháp nghiền cơ học với máy nghiền li tâm tốc độ cao[6], chiết hoạt chất kết hợp dùng sóng siêu âm, phá bào tử bằng CO₂ siêu tới hạn[7]. Tuy nhiên, các phương pháp này thường tốn nhiều dung môi, sử dụng các thiết bị đặc biệt. Nhiệt sinh ra từ phương pháp nghiền đôi khi làm ảnh hưởng đến các chất có hoạt tính, dùng sóng siêu âm và áp suất cao thì lượng

bào tử bị phá vỡ không nhiều, giá thành cao[7]. Một nghiên cứu về lên men bào tử nấm Linh Chi bằng *Lactobacillus plantarum* cho thấy chủng này có khả năng phân giải vỏ bào tử nấm hiệu quả, không tốn nhiều chi phí và trang thiết bị. Nghiên cứu cho thấy chỉ sau 3 ngày đã có hiện tượng vỡ bào tử khi kết hợp với phương pháp sấy, sau 5 ngày lên men với *L. plantarum* và sấy thì hầu hết các bào tử đều bị hủy khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử[8]. Kết quả này cho thấy triển vọng có thể sử dụng chủng vi khuẩn có lợi để làm tăng hiệu quả phóng thích hoạt chất từ bào tử, có thể sử dụng bào tử đã làm yếu cấu trúc mà không cần phải tách vi khuẩn sau lên men.

2 Vật liệu - phương pháp

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Bào tử nấm Linh Chi đỏ (*Ganoderma lucidum*) được cung cấp từ trại nấm Đất Thép, được sấy ở 50°C trong 30 phút và xác định độ ẩm trước khi dùng cho lên men.

Chủng mua *Lactobacillus plantarum* (ATCC10241), chủng *Lactobacillus casei* phân lập từ sữa chua Yakult và các chủng

được phân lập từ men vi sinh *Lactobacillus acidophilus* (L – Bio), *Bacillus subtilis* (Biosubtyl DL).

2.2 Phân lập và nhân sinh khối vi khuẩn

Các chủng được phân lập trong môi trường MRS (DeMan – Rogosa – Sharpe), được ủ 37°C trong 2 – 3 ngày. Chọn các khuẩn lạc thuần nhất, nhân sinh khối lần 1 và 2 trong môi trường Woo[9] ở điều kiện 37°C trong 2 – 3 ngày. Các chủng sau khi nhân sinh khối lần 2, được xác định nồng độ trước khi cho lên men bào tử nấm.

2.3 Lên men bào tử nấm

Ủ 0,4g bào tử nấm đã hấp vô trùng với 20ml hỗn hợp acid acetic 0,01M và acid lactic 0,01M (hoặc NaOH 0,01M), đem ủ 37°C trong 3, 5 và 7 ngày. Sau 3, 5 và 7 ngày, tiến hành lấy mẫu định lượng triterpenoid phóng thích ra môi trường ủ và còn lại trong bào tử nấm.

Cấy 5.10^7 CFU dịch vi khuẩn (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* hoặc *B. subtilis*) vào chai nuôi cấy chứa 20ml môi trường Woo lỏng đã hấp vô trùng với 0,4g bào tử nấm được xử lý vô trùng (hoặc 0,4g bào tử nấm đã hấp vô trùng), đem ủ 37°C trong 3, 5 và 7 ngày. Sau 3, 5 và 7 ngày, tiến hành lấy mẫu định lượng triterpenoid còn lại trong bào tử nấm.

2.4 Chiết xuất triterpenoid từ bào tử nấm

Thu 0,4g bào tử sau lên men (ủ với hỗn hợp acid hoặc base) đem phá bào tử với hạt thủy tinh (tỉ lệ 2:3) trên máy phá mini – beadbeater ở 4800 vòng/phút trong 6 phút. Thu toàn bộ dịch phá (hoặc 0,4g bào tử sau lên men không phá bào tử) đem chiết với 10ml cồn 96° trên bể ủ nhiệt ở 80°C trong 30 phút. Thu toàn bộ dịch chiết đem cô cạn ở 80°C trên bể ủ nhiệt. Sau cô cạn, hòa tan căn với 2ml methanol, dung dịch này dùng để định lượng triterpenoid tổng số.

2.5 Định lượng triterpenoid

Lượng triterpenoid tổng số từ bào tử nấm được xác định dựa vào phương pháp chuyển màu triterpenoid bằng hỗn hợp vanillin – acid acetic glacial – HClO₄. Đường chuẩn định lượng triterpenoid được xây dựng bằng cách pha chất chuẩn oleanolic acid thành dãy nồng độ 2 – 14µg/ml và đo độ hấp thụ ở bước

sóng 544nm. Phương trình hồi qui tuyến tính có dạng $Y = 0,098X + 0,014$ ($R = 0,9947$, $n = 7$), với X là nồng độ oleanolic acid (µg/ml) và Y là giá trị hấp thụ ở bước sóng 544nm.

Hút 0,125ml dung dịch triterpenoid đã hòa tan trong methanol vào effendof 1,5ml đem cô cạn ở 80°C trên block nhiệt. Thêm tiếp 0,15ml hỗn hợp vanillin – acid acetic glacial và 0,5ml HClO₄ vào effendorf. Ủ nóng ở 70°C trong 25 phút và ủ mát 4 – 8°C trong 3 phút. Sau 3 phút, chuyển toàn bộ dịch ủ sang bình định mức 5ml, thêm tiếp acid acetic glacial cho đủ 5ml. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 544nm.

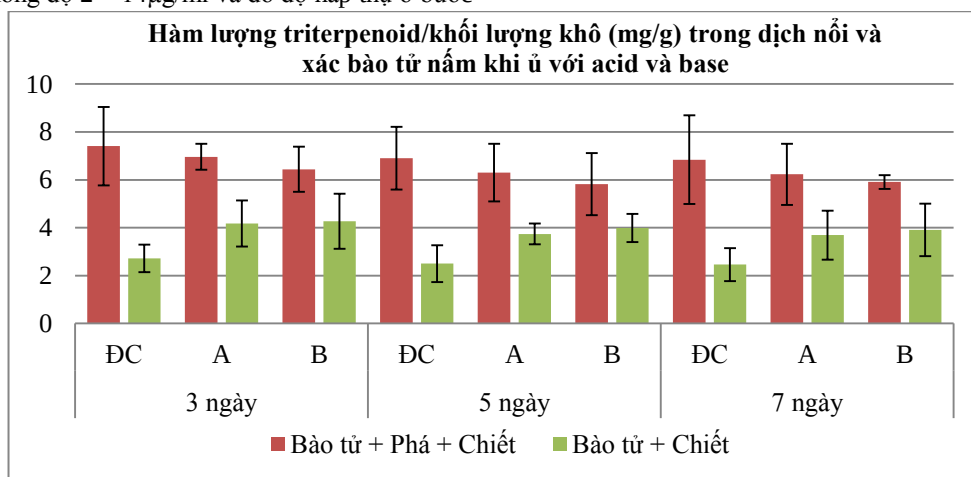
2.6 Xử lý thống kê

Các kết quả được xử lý bằng phần mềm Excel và SAS 9.1 để xây dựng đường chuẩn và xác định giá trị trung bình cùng khoảng tin cậy của các kết quả thí nghiệm.

3 Kết quả - thảo luận

3.1 Kết quả ủ bào tử nấm đã hấp trong hỗn hợp acid hữu cơ và base mạnh

Khi lên men bào tử nấm với vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus*, môi trường sau lên men thường hơi chuyển dịch về tính acid do sinh ra acid acetic và acid lactic trong suốt quá trình lên men. Tuy nhiên, lượng acid sinh ra trong điều kiện lên men thường thấp nên các kết quả thí nghiệm khảo sát của Chaiyavat và cộng tác viên (2010) về sự ảnh hưởng của hai loại acid này không thấy có sự tác động lên cấu trúc bào tử nấm[8]. Do đó, để đánh giá chính xác hơn về vai trò của hai acid này lên cấu trúc bào tử nấm chúng tôi tiến hành ủ bào tử với hỗn hợp acid đậm đặc hơn (acid acetic 0,01M và acid lactic 0,01M) so với điều kiện nuôi cấy để đánh giá sự ảnh hưởng của acid. Đồng thời, vi khuẩn *B. subtilis* khi lên men cũng tạo ra NH₃ làm kiềm hóa môi trường lên men nên cũng có thể làm ảnh hưởng lên cấu trúc bào tử. Do đó, để đánh giá khách quan về sự ảnh hưởng này, thí nghiệm được khảo sát trên môi trường base mạnh (NaOH 0,01M) để đánh giá mức độ tác động lên cấu trúc.



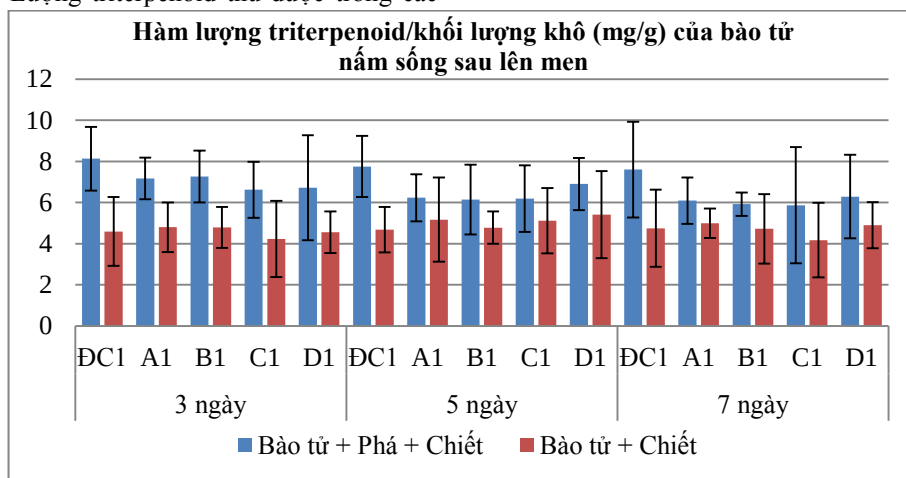
Hình 1 Đồ thị có khoảng tin cậy thể hiện hàm lượng triterpenoid/khối lượng khô (mg/g) của bào tử nấm đã hấp sau 3, 5 và 7 ngày ủ với hỗn hợp acid và base ĐC: Nước cất; A: Acid acetic 0,01M và acid lactic 0,01M; B: NaOH 0,01M

Kết quả cho thấy hàm lượng triterpenoid phóng thích ra môi trường ù trong cả 3 nghiệm thức có xu hướng tăng dần khi tăng thời gian ù. ù càng lâu thì lượng hoạt chất phóng thích ra càng nhiều (Hình 1). Trong tất cả các thời điểm lượng triterpenoid thu được trong dịch nổi của mẫu A và B đều cao hơn ĐC; đặc biệt, khi ù trong môi trường NaOH 0,01M thì lượng triterpenoid phóng thích ra môi trường là cao nhất. Lượng triterpenoid còn lại trong bào tử cũng có sự khác biệt có ý nghĩa trong các mẫu thí nghiệm; lượng triterpenoid còn lại trong bào tử của mẫu ĐC là cao nhất và thấp nhất khi ù trong môi trường NaOH (mẫu B). Sự khác biệt này có thể do acid và base đã ảnh hưởng lên các liên kết trên cấu trúc bào tử nên làm yếu cấu trúc bào tử, sự tác động của NaOH có xu hướng mạnh hơn so với hỗn hợp acid. Ngoài ra, lượng triterpenoid còn lại trong tất cả các nghiệm thức cũng tương quan với lượng triterpenoid phóng thích ra ngoài môi trường. Lượng triterpenoid phóng thích ra môi trường càng nhiều thì lượng triterpenoid còn lại trong bào tử càng ít. Sự tác động của hỗn hợp acid và base gần như không ảnh hưởng đến cấu trúc triterpenoid (tổng lượng triterpenoid trong môi trường ù và xác bào tử trong các nghiệm thức gần tương đương nhau). Bào tử sau ù trong 3 môi trường cũng được đem chiết mà không phá bào tử. Lượng triterpenoid thu được trong các

nghiệm thức A và B tại các thời điểm chiếm khoảng một nửa lượng triterpenoid còn lại trong xác bào tử, và lượng triterpenoid chiết được này cũng cao hơn nhiều so với nghiệm thức ĐC. Điều này chứng tỏ các thành phần acid và base trong môi trường ù có tác động làm yếu cấu trúc bào tử, nên làm tăng hiệu quả chiết. Khi cấu trúc bào tử đã yếu thì lượng triterpenoid rò rỉ ra ngoài môi trường phụ thuộc rất nhiều vào tổng nồng độ chất tan và loại dung môi có trong môi trường ù.

3.2 Kết quả thí nghiệm lên men bào tử nấm sống với các vi khuẩn

Để đánh giá quá trình lên men ảnh hưởng lên cấu trúc bào tử nấm sống, chúng tôi tiến hành lên men bào tử đã xử lý vô trùng với các vi khuẩn phân lập. Kết quả cho thấy nếu chỉ ù bào tử trong môi trường nuôi cấy (ĐC1), đem phá và chiết thì lượng triterpenoid còn lại trong bào tử cao hơn so với khi lên men với vi khuẩn (A1, B1, C1 và D1). Khi lên men bào tử với vi khuẩn, các chất sinh ra trong suốt quá trình lên men đã tác động lên cấu trúc và làm tăng phóng thích hoạt chất ra khỏi bào tử nên lượng chất còn lại trong bào tử thấp hơn nhiều so với bào tử chỉ ù trong môi trường nuôi cấy. Thời gian lên men càng dài thì sự tác động càng tăng.



Hình 2 Đồ thị có khoảng tin cậy thể hiện hàm lượng triterpenoid/khối lượng khô (mg/g) của bào tử nấm sống sau lên men 3, 5 và 7 ngày với các vi khuẩn

ĐC1: Môi trường nuôi cấy; A1: Lên men *L. plantarum*; B1: Lên men *L. casei*; C1: Lên men *L. acidophilus*; D1: Lên men *B. subtilis*

Các chủng dùng trong thí nghiệm đều làm tăng phóng thích hoạt chất từ bào tử nấm sống sau 3 ngày lên men và mạnh nhất sau 7 ngày lên men. Trong đó, chủng *L. plantarum* và *B. subtilis* (A1 và D1) cho hiệu quả phóng thích hoạt chất yếu hơn *L. casei* và *L. acidophilus* (B1 và C1) nên lượng triterpenoid còn lại trong bào tử của nghiệm thức A1 và D1 cao hơn so với hai nghiệm thức B1 và C1 (Hình 2). Sau 3 – 7 ngày lên men có sự tăng phóng thích hoạt chất mạnh có thể do lượng dinh dưỡng đã cạn sau 3 ngày lên men, để tồn tại vi khuẩn tăng cường sản sinh nhiều chất có khả năng làm yếu hoặc phân giải bào tử để tận dụng nguồn dinh dưỡng. Khi

cấu trúc bào tử bị yếu dần thì sự phóng thích hoạt chất ra ngoài môi trường sẽ phụ thuộc rất nhiều vào tổng lượng chất hòa tan trong môi trường và khả năng hòa tan của môi trường đối với triterpenoid. Thực tế cho thấy triterpenoid kém tan trong môi trường nước nên khi cấu trúc bào tử đã yếu, lượng triterpenoid khuếch tán ra ngoài môi trường nuôi cấy không nhiều. Để đánh giá chính xác hơn, chúng tôi tiến hành chiết bào tử sau khi lên men với ethanol 96° và không phá bào tử. Lượng triterpenoid thu được trong phương pháp này cao gần bằng phương pháp phá và chiết bào tử. Kết quả này một phần chứng minh sự suy yếu trong cấu trúc bào tử khi lên men,

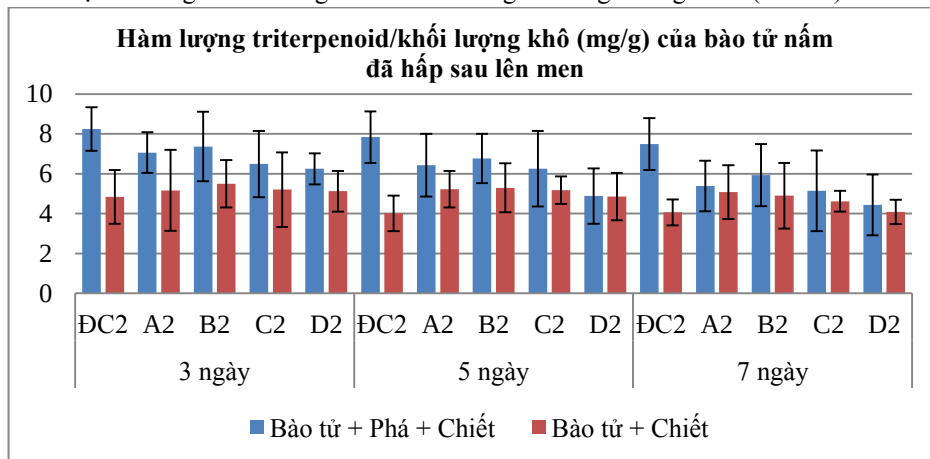
đồng thời cũng cho thấy cấu trúc bào tử là rào cản chính ngăn chặn sự phóng thích triterpenoid ra ngoài môi trường, để thu được lượng triterpenoid hoàn toàn từ bào tử nấm, ngoài việc phá vỡ bào tử cần kết hợp dung môi chiết thích hợp để chiết kiệt hoạt chất từ bào tử.

Trong nghiệm thức đối chứng, lượng triterpenoid còn lại trong bào tử nấm sống khi ủ trong môi trường nuôi cấy (mẫu ĐC1) cũng cao hơn so với bào tử đã hấp khi ủ trong môi trường nước (mẫu ĐC) (Hình 1 và 2). Nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt là do bào tử nấm sống hạn chế phóng thích hoạt chất ra ngoài môi trường nhiều hơn so với nấm chết. Đồng thời, bào tử nấm chết được ủ trong môi trường nước có ít

chất hòa tan hơn nên khả năng rò rỉ triterpenoid ra môi trường cũng cao hơn so với môi trường nuôi cấy.

3.3 Kết quả thí nghiệm lên men bào tử nấm đã hấp với các vi khuẩn

Kết quả thí nghiệm cho thấy lượng triterpenoid còn lại trong tất cả các nghiệm thức đều thấp hơn so với mẫu ĐC2 và có xu hướng giảm dần khi tăng thời gian lên men. Trong 4 chủng thí nghiệm, *B. subtilis* cho hiệu quả lên men phóng thích hoạt chất từ bào tử hấp là cao nhất (lượng triterpenoid còn lại thấp nhất 4,44 mg/g) (mẫu D2), 3 chủng *L. plantarum*, *L. casei*, và *L. acidophilus* cho hiệu quả phân giải gần tương đương nhau (Hình 3).



Hình 3 Đồ thị có khoảng tin cậy thể hiện hàm lượng triterpenoid/khối lượng khô (mg/g) của bào tử nấm đã hấp sau lên men 3, 5 và 7 ngày với các vi khuẩn

ĐC2: Môi trường nuôi cấy; A2: Lên men *L. plantarum*; B2: Lên men *L. casei*; C2: Lên men *L. acidophilus*; D2: Lên men *B. subtilis*

Sau thời gian ủ 3 ngày, lượng triterpenoid chiết được từ bào tử nấm không phá trong mẫu ĐC2 chỉ bằng một nửa so với lượng triterpenoid còn lại trong bào tử được phá và chiết, khi tăng thời gian ủ thì tỉ lệ này tăng rất ít. Trong khi, hiệu quả chiết lại rất cao ở các nghiệm thức lên men với vi khuẩn, khi tăng thời gian lên men thì tỉ lệ chiết được cũng tăng. Sau 7 ngày lên men, lượng triterpenoid còn lại trong bào tử của các nghiệm thức lên men (A2, C2 và D2) cũng thấp hơn các nghiệm thức lên men bào tử nấm sống (A1, C1 và D1) (Hình 2). Đặc biệt, khi lên men bào tử nấm đã hấp với *B. subtilis* thì lượng triterpenoid còn lại trong bào tử là thấp nhất sau 7 ngày lên men. Điều này cho thấy, bào tử nấm hấp thích hợp cho lên men với các vi khuẩn này hơn so với bào tử nấm sống.

Các kết quả thí nghiệm lên men vi khuẩn với bào tử nấm sống (Hình 2) và nấm đã hấp (Hình 3) có thể nhận định, khi bước sang giai đoạn cạnh tranh dinh dưỡng các vi khuẩn trong lên men sẽ làm tăng khả năng làm yếu hoặc phân hủy cấu trúc bào tử để tìm kiếm nguồn dinh dưỡng từ bào tử nên làm tăng phóng thích hoạt chất từ bào tử ra môi trường nuôi cấy, thời gian lên men càng tăng thì sự tổn thương bào tử càng nhiều. Tuy nhiên, sự phá hủy này là không hoàn toàn vì cấu trúc

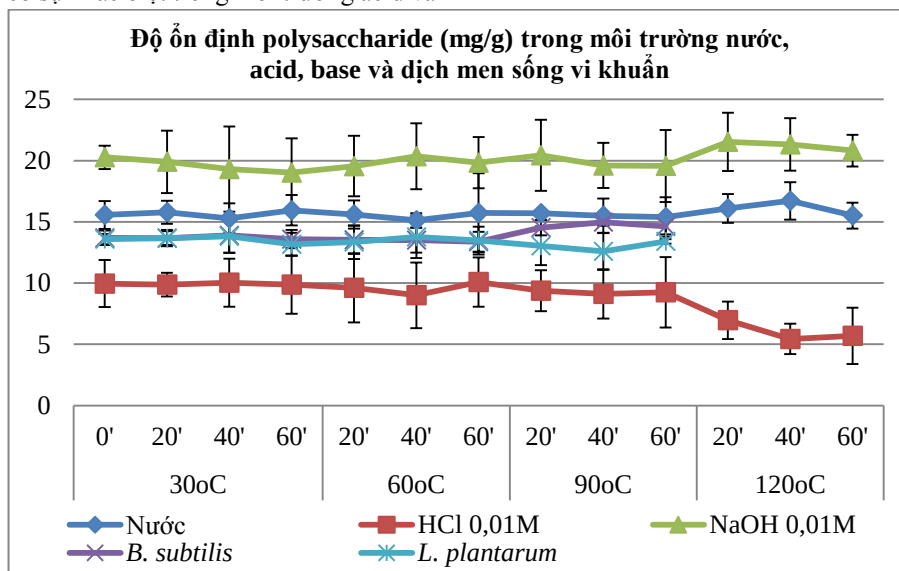
bào tử được cấu tạo bởi lớp vỏ kép khá phức tạp, thành phần vỏ đa dạng SiO_2 (19.01%), Ca (19.01%) và chitin (52.08 – 57.64%) [6]. Đặc tính này giúp bào tử có khả năng đề kháng rất cao với các điều kiện khắc nghiệt ngoài tự nhiên; nếu lên men bào tử với vi khuẩn thì chỉ có thể phá hủy một phần mà không thể phá hủy hoàn toàn cấu trúc bào tử. Muốn thu được toàn bộ hoạt chất trong bào tử, có thể phải phối hợp thêm các tác nhân cơ học khác hoặc dùng dung môi chiết thích hợp sau giai đoạn lên men. Ngoài ra, khả năng làm yếu nhẹ cấu trúc bào tử có thể cũng có sự tham gia ảnh hưởng một phần của các thành phần acid (acid lactic và acid acetic được tạo ra khi lên men với *L. plantarum*, *L. casei*, và *L. acidophilus*) hoặc các thành phần kiềm (*B. subtilis*) được tạo ra trong suốt quá trình lên men.

3.4 Kết quả khảo sát độ ổn định của polysaccharide trong môi trường nước, acid, base và dịch men sống

Để đánh giá sự ảnh hưởng của một số điều kiện lên men và chiết xuất lên độ ổn định của cấu trúc polysaccharide, trong thí nghiệm này, bào tử được tiến hành phá vỡ và thu polysaccharide. Ủ polysaccharide trong các môi trường nước, acid, base và dịch lên men vi khuẩn ở nhiệt độ 30 – 120°C, thời gian ủ 0 – 60 phút. Kết quả trên Hình 4 cho thấy

tại các thời điểm từ 0 – 60 phút ở các nhiệt độ 30°C, 60°C, 90°C và 120°C (môi trường nước). Trong các môi trường nước, acid và base thì lượng polysaccharide đo được không thay đổi và không có sự khác biệt đáng kể. Tuy nhiên, tại thời điểm 120°C lại có sự khác biệt trong môi trường acid và

base. Lượng polysaccharide đo được giảm mạnh trong môi trường acid và tăng nhẹ trong môi trường base. Các kết quả này cho thấy cấu trúc polysaccharide đã bị ảnh hưởng nên làm thay đổi độ hấp thụ của các polysaccharide ở bước sóng 488nm.



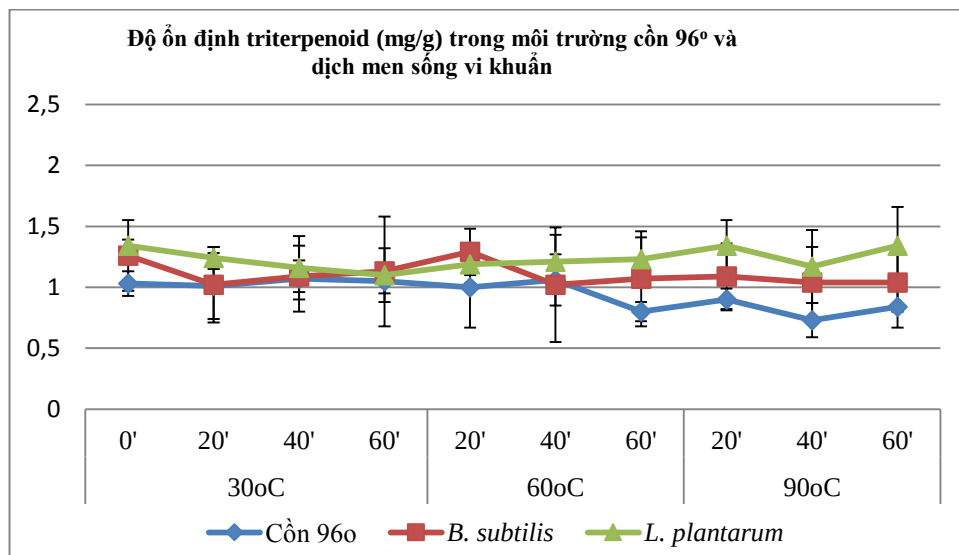
Hình 4 Đồ thị có khoảng tin cậy thể hiện độ ổn định hàm lượng polysaccharide (mg/g) khi ủ trong các môi trường nước, acid, base, dịch men sống *B. subtilis* và *L. plantarum*

Lượng polysaccharide ổn định ở 30 – 60°C (thời gian ủ 0 – 60 phút) trong môi trường dịch men sống *B. subtilis* và *L. plantarum*. Trong khi, tại nhiệt độ 90°C có hiện tượng tăng nhẹ độ hấp thụ của polysaccharide trong môi trường dịch men sống *B. subtilis* và không thay đổi độ hấp thụ trong môi trường dịch men sống *L. plantarum*. Thông thường, các men hoạt động tốt ở nhiệt độ thấp hơn 90°C, nhiệt độ cao men dễ bị biến tính và mất tác dụng. Nếu men của *B. subtilis* tiết ra có ảnh hưởng lên cấu trúc polysaccharide thì sẽ tác động mạnh tại thời điểm 30 – 60°C. Tuy nhiên, tại nhiệt độ 90°C, độ hấp thụ đo được lại tăng nhẹ. Sự khác biệt này có thể do ở 90°C các protein có trong dịch nuôi cấy bị biến tính nên làm thay đổi độ hấp thụ của dịch ủ trong môi trường dịch men sống *B. subtilis*. Ngoài ra, để đánh giá chính xác hơn về sự hình thành các loại đường đơn, trong nghiên cứu này có khảo sát sự hình thành đường khử sau các thời điểm ủ bằng thuốc thử Fehling. Kết quả thu được đều âm tính. Điều này chứng tỏ không có sự xuất hiện các loại đường khử trong dung dịch. Để nhận định chính xác hơn vấn đề này cần phải

có thêm nhiều bằng chứng thực nghiệm khác để đánh giá. Tuy nhiên, các kết quả thu được tạm thời có thể khẳng định cấu trúc polysaccharide bền trong điều kiện ủ với dịch lên men ở 30 – 90°C (Hình 4).

3.5 Kết quả khảo sát độ ổn định triterpenoid trong môi trường cồn 96° và dịch men sống

Để đánh giá độ ổn định cấu trúc triterpenoid, trong nghiên cứu này, triterpenoid được ủ trong cồn 96° và môi trường dịch men sống của vi khuẩn. Kết quả trên Hình 5 cho thấy tại các khoảng nhiệt độ 30 – 90°C (thời gian ủ 0 – 60 phút) trong môi trường dịch men sống *B. subtilis* và *L. Plantarum*, nhiệt độ 30°C và 60°C (0 – 40 phút) trong môi trường cồn 96° thì lượng triterpenoid đo được không có sự khác biệt đáng kể. Tuy nhiên, tại thời điểm 60 phút (60°C) và các thời điểm khác ở 90°C lại có sự khác biệt đáng kể lượng triterpenoid đo được và có xu hướng giảm dần khi tăng thời gian ủ. Điều này cho thấy trong môi trường cồn 96° ở nhiệt độ 90°C cấu trúc triterpenoid có thể đã bị ảnh hưởng nên làm giảm độ hấp thụ của triterpenoid ở bước sóng 544nm.



Hình 5: Đồ thị có khoảng tin cậy thể hiện độ ổn định hàm lượng triterpenoid (mg/g) khi ủ trong môi trường còn 96°, dịch men sống *B. subtilis* và *L. plantarum*

4 Kết luận

Hỗn hợp acid (acid acetic 0,01M và acid lactic 0,01M) và NaOH 0,01M có ảnh hưởng làm tăng phóng thích nhẹ hoạt chất triterpenoid ra môi trường trong thời gian ủ 3 – 7 ngày, môi trường NaOH 0,01M làm tăng phóng thích hoạt chất mạnh nhất. Thời gian ủ càng lâu thì lượng hoạt chất phóng thích ra môi trường sẽ càng nhiều.

Các chủng *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* và *B. subtilis* đều có khả năng làm yếu cấu trúc bào tử nấm sống và đã hấp trong 3 – 7 ngày lên men, nấm đã hấp cho hiệu quả lên men cao hơn nấm sống. Đặc biệt, chủng *L. casei* và *L. acidophilus* cho hiệu quả phóng thích hoạt chất nhiều hơn khi lên men với bào tử nấm sống, chủng *B. subtilis* cho hiệu quả phóng thích hoạt chất mạnh nhất khi lên men với bào tử

đã hấp. Thời gian lên men càng lâu thì hiệu quả làm yếu và tăng phóng thích hoạt chất ra môi trường càng hiệu quả.

Cấu trúc polysaccharide ổn định ở nhiệt độ 30 – 90°C và 120°C (môi trường nước) trong thời gian ủ 0 – 60 phút của 4 môi trường nước, acid (HCl 0,01M), base (NaOH 0,01M) và dịch men sống của *B. subtilis* và *L. plantarum*, kém ổn định ở nhiệt độ 120°C trong môi trường acid và base. Triterpenoid ổn định ở nhiệt độ 30 – 90°C (thời gian ủ 0 – 60 phút) trong dịch men sống *B. subtilis* và *L. plantarum*, và nhiệt độ 30°C (thời gian ủ 0 – 60 phút), 60°C (thời gian ủ 0 – 40 phút) trong còn 96°; kém ổn định trong còn 96° ở nhiệt độ 60°C (thời gian ủ 60 phút) và 90°C.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ NTTU trong đề tài mã số 2017.01.52

Tài liệu tham khảo

1. Sakai T and Chihara G. 1995. "Health foods and medicinal usages of mushrooms". Food Reviews International, 11, pp. 69-81.
2. Xie YZ, Li SZ, Yee A, La Pierre DP, Deng Z, Lee DY, Wu QP, Chen Q, Li C, Zhang Z, Guo J, Jiang Z, Yang BB (2006). "Ganoderma lucidum inhibits tumor cell proliferation and induces tumour cell death". Enzyme Microb. Technol. 40: 177-185.
3. Mohammed A, Adelaiye AB, Abubakar MS, Abdurahman EM, 2007. "Effects of aqueous extract of Ganoderma lucidum on blood glucose levels of normoglycemic and alloxan-induced diabetic wistar rats". Med. Plant Res. 1(2): 34-37
4. Sheng-Quan Huang, Jin-Wei Li, Zhou Wang, Hua-Xin Pan, Jiang-Xu Chen and Zheng-Xiang Ning, 2010. "Optimization of Alkaline Extraction of Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and Their Effect on Immune Function in Mice". Molecules, 15, 3694-3708
5. Min BS, Nakamura N, Miyashiro H, Bae KW, Hattori M, 1998. "Triterpenes from the spores of Ganoderma lucidum and their inhibitory activity against HIV-1 protease", Chem. Pharm. Bull. 46 (1998) 1607-1612.
6. Jungjing MA, Zhengyi FU, Peiyan MA, Yanli SU, Qingjie Z, 2007. "Breaking and characteristics of *Ganoderma lucidum* spores by high speed centrifugal shearing pulverizer". J. Wuhan Univ. Tech-Mater. Sci. Ed. 22: 617-621
7. Yu-Jie Fu, Wei Liu, Yuan-Gang Zu, Xiao-Guang Shi, Zhi-Guo Liu, Günter Schwarz, Thomas Efferth, 2009. "Breaking the spores of the fungus Ganoderma lucidum by supercritical CO₂". Food Chemistry 112, 71-76.
8. Chaiyavat Chaiyasut*, Chakrapong Kruatama and Sasithorn Sirilun, 2010. "Breaking the spores of *Ganoderma lucidum* by fermentation with Lactobacillus plantarum". African Journal of Biotechnology Vol. 9(43), pp. 7379-7382
9. Woo, Cheol Joo, Un-Jung Yun, Heui-Dong Park, 1996. "Isolation of Chitin-utilizing Bacterium and Production of Its Extracellular Chitinase". Journal of Microbiology and Biotechnology, 6(6): 439 - 444.

Evaluating the capability to break the spores of *Ganoderma lucidum* by some bacteria isolated from probiotics

Nguyễn Trung Hiếu^{1,*}, Lê Thị Thùy Trang²

¹Nguyen Tat Thanh University

²Department of Fisheries TP. HCM

*nthieu@ntt.edu.vn

Abstract We screened bacteria isolated from yogurt and probiotics. They can weaken the structure of spores and increase the release of triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. The results showed that four strains of *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* and *B. subtilis* are able to weaken the structure of spores and increase the release of triterpenoid from live fungal spores after 3-7 days of fermentation. Higher yields are obtained when fermented with steamed fungal spores under the same conditions. In particular, strains of *L. casei* and *L. acidophilus* give higher triterpenoid release when fermented with live fungus spores, while *B. subtilis* give the highest release efficiency when fermented with steamed fungus spores. When evaluating the effect of some culturing and extraction conditions on triterpenoid and polysaccharide stability, the results showed that polysaccharide is stable in 4 solvents, water, acid (HCl 0.01M), base (NaOH 0.01 M), and live enzymes of *B. subtilis* and *L. plantarum* at incubation temperatures of 30-90°C and 120°C (water) for 0-60 minutes; while unstable in acid and base environment at 120°C. Triterpenoid is stable at 30-90°C (incubation time 0-60 minutes) in *B. subtilis* and *L. plantarum*, and 30°C (incubation time 0-60 minutes), 60°C (incubation time 0 - 40 minutes) in 96° alcohol; unstable in 96° alcohol at 60°C (incubation time 60 minutes) and 90°C.

Keywords *Ganoderma lucidum*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *B. subtilis*, polysaccharide, triterpenoid.