

ẢNH HƯỞNG CỦA pH VÀ NHIỆT ĐỘ LÊN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA HỆ SỢI NẤM LINH CHI TRONG ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY HUYỀN PHÙ

Nguyễn Bá Tu⁽¹⁾, Nguyễn Thanh Thuận⁽²⁾, Tăng Công Trường⁽³⁾

(1), (2) Trường Đại học Thủ Dầu Một, (3) Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Bình Dương

TÓM TẮT

Trong bài báo này, chúng tôi công bố kết quả nghiên cứu sự ảnh hưởng của điều kiện pH và nhiệt độ môi trường lên sự sinh trưởng của hệ sợi nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) trong điều kiện nuôi cấy huyền phù. Nhiệt độ tối ưu được xác định trong khoảng 25-30 °C với pH lần lượt là 5.0 sau 7 ngày và 4.0 sau 14 ngày nuôi cấy. Hàm lượng sinh khối thu được tối đa sau 7 ngày là 450 mg/100ml và sau 14 ngày là 630 mg/100ml. Sự thay đổi pH môi trường đáp ứng với sự sinh trưởng của hệ sợi nấm. Khi sợi nấm sinh trưởng thì pH của môi trường giảm xuống và ngược lại.

Từ khóa: nấm linh chi, sự sinh trưởng, sinh khối

*

1. Giới thiệu

Linh chi (*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst) đã được sử dụng để điều trị nhiều loại bệnh khác nhau ở người (như bệnh viêm gan mãn tính, cao huyết áp, cholesterol hoá mạch máu, tiểu đường, tắc nghẽn động mạch vành, hen suyễn, viêm loét dạ dày....) ở các nước phương Đông từ hơn 2000 năm trước (Stamets, 1993) (Hobbs, 1995) [18]. Hiện nay, việc nuôi trồng nấm linh chi để thu nhận sinh khối và chiết suất các sản phẩm thứ cấp đang là hướng nghiên cứu mũi nhọn trong lĩnh vực y - sinh học [1], [2], [3].

Về thành phần hoá học và các hoạt chất, đến nay, các nghiên cứu đã xác định được trong nấm linh chi có khoảng 119 loại triterpens và nhiều loại polysaccharide có giá trị như 1,3-β Dglucan (đang được xem là yếu tố mới có tác dụng chống ung thư). Các

nghiên cứu của Kremer và cs (1999), Zhang và cs (2001), Qin và cs (2008) cho thấy các hoạt chất triterpens, polysacchrides và protein có nguồn gốc từ thể quả nấm linh chi đều có mối tương quan dương tính với các đáp ứng miễn dịch cơ thể. Chẳng hạn, Tang và cs (2006) đã chứng minh axit ganoderic T (AG-T, một loại lanostane triterpenoid) với hàm lượng 50 μ g ml⁻¹ đã có thể gây ức chế dòng tế bào ung thư phổi 95 D thông qua cơ chế apoptosis và gây nên sự nghỉ hoá chu kì tế bào chỉ sau 4-8 giờ, trong nghiên cứu này tác giả còn công bố AG-T có khả năng điều chỉnh mức biểu hiện của p53 và Bax (hai protein quan trọng tham gia kiểm soát các điểm giới hạn trong chu kì tế bào). Ngoài ra, đáng kể đến là Lz-8- một loại protein chống dị ứng phổ rộng và điều hoà miễn dịch đang được giới khoa học hết sức chú ý trong việc nghiên cứu sử dụng điều trị các bệnh hiểm

nghèo. Qin và cs (2008) đã chứng minh với hàm lượng $5\mu\text{g ml}^{-1}$ protein LZ-8 đã có thể làm tế bào lách chuột tăng sinh tới 149% còn với hàm lượng $10\mu\text{g ml}^{-1}$ thì protein này đã chống được phản ứng ngưng kết máu ở người [8], [9], [10], [15], [16].

Về LZ-8, các phương pháp tách chiết truyền thống gặp những hạn chế nhất định do chủ yếu sử dụng thể quả làm nguyên liệu, chẳng hạn Kino và cs (1990) sử dụng 340 gram thể quả chỉ thu được 10 mg LZ-8, do vậy hiệu suất thu nhận chưa đáp ứng được nhu cầu thực tiễn và giá thành cao [11].

Các nghiên cứu của Zhou (2002) và Koshisuke K. (2004) phát hiện thấy LZ-8 có cả trong giai đoạn hệ sợi và thể quả, điều này chỉ ra nếu tiến hành nuôi cấy và tách chiết LZ-8 ngay trong giai đoạn huyền phù tế bào thì sẽ khắc phục được những hạn chế trong phương pháp truyền thống, rút ngắn được thời gian và qui trình sản xuất [11].

Như vậy, LZ-8 là một protein có vai trò quan trọng trong việc điều hòa hệ thống miễn dịch và những kĩ thuật liên quan đến qui trình li trích vẫn còn đang trong giai đoạn chưa hoàn thiện; đặc biệt là ứng dụng kĩ thuật nuôi cấy huyền phù thu nhận LZ-8 còn rất ít thông tin đề cập. Nghiên cứu này nhằm xác định điều kiện pH và nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng của hệ sợi nấm linh chi thông qua việc khảo sát sự ảnh hưởng của chúng trong môi trường huyền phù. Kết quả thu được sẽ góp phần tìm ra môi trường nuôi cấy phù hợp cho sự phát triển của hệ sợi hướng tới thu nhận các hoạt chất như LZ-8.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu và môi trường

Chủng nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) được lưu trữ tại Phòng Thí nghiệm

Bộ môn Sinh học Khoa Khoa học Tự Nhiên Trường Đại học Thủ Dầu Một. Qui trình nuôi cấy được tiến hành trên môi trường PDA có thay đổi.

1. Sợi nấm được nuôi trên môi trường thạch nghiêng chứa 200g/L dịch chiết khoai tây, 20g/L glucose, 1,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5g/L KH_2PO_4 , 10mg/L vitamin B₁, 20g/L agar.

2. Chuyển sợi nấm sang đĩa petri cùng môi trường PDA nuôi trong 5 ngày ở 28^oC.

3. Chuyển sợi nấm sang bình tam giác (loại 250ml) chứa 50ml bao gồm 35g/L sucrose, 5g/L peptone, 2,5g/L dịch chiết nấm men, 0,5g/L MgSO_4 , 1g/L KH_2PO_4 , và 0,05g/L vitamin B₁. Hiệu chỉnh độ pH ở các mức 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 thông qua việc bổ sung HCl 1M hoặc NaOH 1M. Các bình tam giác được lắc trong máy lắc ổn nhiệt ở các mức 25^oC, 30^oC, 35^oC, sau đó theo dõi sinh khối hệ sợi ở các ngày 7 và 14.

4. Ghi nhận sự tăng trưởng theo phương pháp sấy khô của Yang và cs (1998)[17].

2.2. Xử lí số liệu

Các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần, sau đó thu kết quả và xử lí bằng phần mềm phân tích ANOVA

3. Kết quả và thảo luận

Qua quá trình nghiên cứu chúng tôi đã thu được một số kết quả như sau:

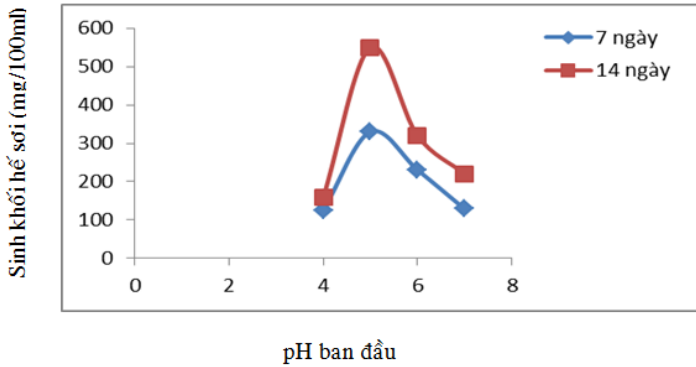
3.1. Ảnh hưởng của pH ban đầu

Hệ sợi của các loài nấm sợi nói chung có thể sinh trưởng trong một dải pH khá rộng. Các nghiên cứu đối với nấm lớn cho thấy dải pH phù hợp tương đối trong khoảng 5-7. Tuy nhiên, pH sẽ thay đổi rất lớn trong quá trình sinh trưởng của hệ sợi, đặc biệt trong trường hợp nuôi cấy huyền phù. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định pH tối ưu cho sự sinh trưởng của hệ sợi nấm

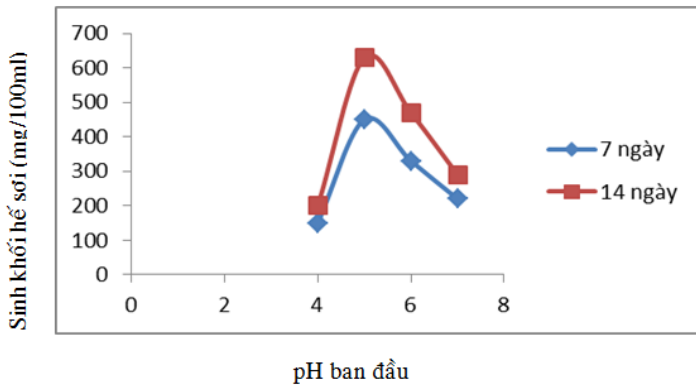
Linh chi trong môi trường PDA thông qua việc khảo sát dải pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 để thu sinh khối sau 7 ngày và 14 ngày.

Một dải hẹp về nhiệt độ đã được chúng tôi thử nghiệm trên khả năng sinh trưởng của dịch huyền phù tại pH 5.0: Với nhiệt độ 25°C: sinh khối linh chi thu được lớn nhất

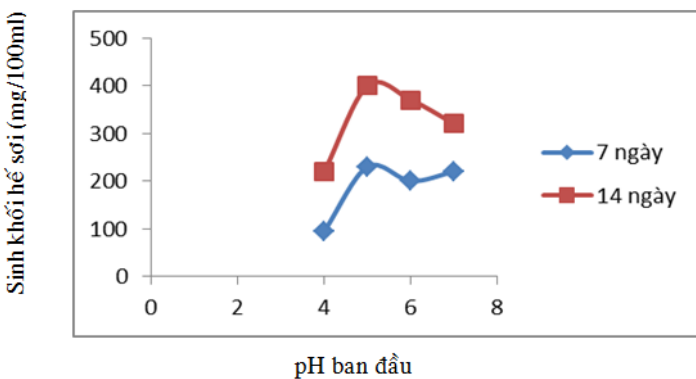
lần lượt là 330mg/100ml và 550mg/100ml (hình 1). Với nhiệt độ 30°C: sinh khối linh chi thu được lớn nhất lần lượt là 450mg/100ml và 630mg/100ml (hình 2). Với nhiệt độ 35°C: sinh khối linh chi thu được lớn nhất lần lượt là 230mg/100ml và 400mg/100ml (hình 3).



Hình 1: Ảnh hưởng của pH môi trường lên sự sinh trưởng của hệ sợi nấm linh chi trong môi trường lỏng tại nhiệt độ 25°C.



Hình 2: Ảnh hưởng của pH môi trường lên sự sinh trưởng của hệ sợi nấm linh chi trong môi trường lỏng tại nhiệt độ 30°C.



Hình 3: Ảnh hưởng của pH môi trường lên sự sinh trưởng của hệ sợi nấm linh chi trong môi trường lỏng tại nhiệt độ 35°C.

Như vậy, tại mỗi nhiệt độ khác nhau, pH ban đầu sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến sự tăng trưởng sinh khối hệ sợi nấm trong dịch huyền phù tế bào. pH ban đầu thấp thì sinh

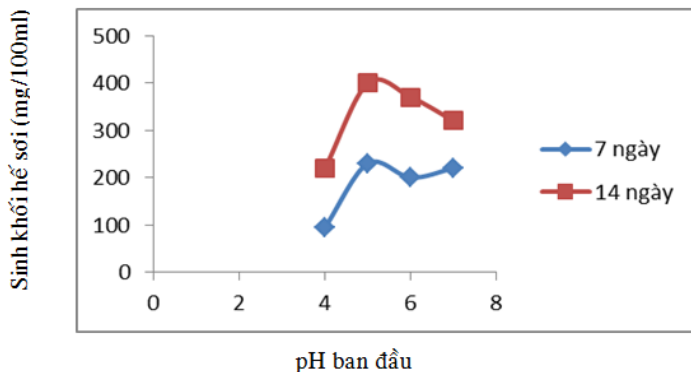
khối thu được ít, khi pH môi trường tăng lên thì sinh khối hệ sợi đạt cực đại tại pH 5.0.

Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Yang và cs (1998), pH tối ưu để thu sinh khối hệ

sợi nấm linh chi là 4.0 trong môi trường Glucose-NH₄Cl [17]. Còn theo nghiên cứu của Hsieh và cs (2005) trong môi trường tổng hợp cho thấy sinh khối linh chi tối ưu thu được tại pH bằng 4.5 và 5.0. Một nghiên cứu khác của Jelena Vukojevic (2006) [18] cho thấy pH tối ưu thu nhận sinh khối Linh chi ở 4.5-5.0, nhiệt độ 22^o C trong môi trường tổng hợp (Ko và cs, 2001). Điều này cho thấy pH tối ưu cho việc thu sinh khối hệ sợi nấm Linh chi phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy.

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và sự biến thiên pH

Nhiệt độ khác nhau có sự ảnh hưởng khác nhau lên khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm. Kết quả được chỉ ra trong hình 4



Hình 4: Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường lên sự sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi trong môi trường lỏng tại pH 5.0.

Sự ảnh hưởng của dải nhiệt độ lên sinh khối linh chi tại pH 6.0

Tại pH 6.0 kết quả cũng thu được tương tự khi khảo sát tại pH 5.0. Ngoài pH môi trường và sự tăng trưởng sinh khối có mối tương quan nghịch, kết quả chỉ ra trên hình 5 còn cho thấy sinh khối của hệ sợi tăng dần khi nhiệt độ môi trường tăng từ 25^oC (đạt 320mg/100ml) đến 30^oC (cao nhất 470 mg/100ml) sau đó giảm nhanh ở 35^oC (đạt 370 mg/100 ml) (hình 5).

Từ kết quả trên cho thấy nhiệt độ khác nhau có sự ảnh hưởng khác nhau lên khả

và 5 cho thấy tại cùng một pH nhưng nhiệt độ môi trường khác nhau sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng tăng trưởng của hệ sợi.

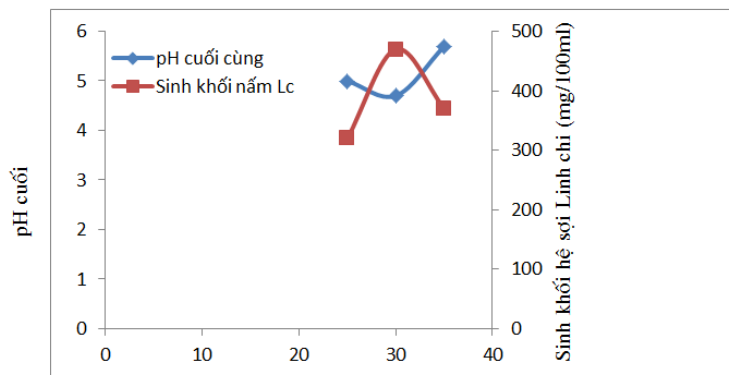
Sự ảnh hưởng của dải nhiệt độ lên sinh khối linh chi tại pH 5.0

Kết quả chỉ ra trên hình 4 cho thấy pH ban đầu đều giảm từ 5.0 xuống 4.3; 3.8 và 4.7 khi sinh khối môi trường tăng lên. Sự sinh trưởng của hệ sợi tăng dần khi nhiệt độ môi trường tăng lên từ 25^oC lên 30^oC với sinh khối thu được lần lượt 550 mg/100ml và 630 mg/100ml sau 14 ngày nuôi cấy, khi nhiệt độ vượt quá 30^oC thì Linh chi tăng trưởng chậm và đạt sinh khối thấp nhất tại 35^oC là 400 mg/100ml.

năng sinh trưởng của hệ sợi nấm.

Tại cùng một pH nhưng nhiệt độ môi trường khác nhau sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng tăng trưởng của hệ sợi. Nhiệt độ thuận lợi cho hệ sợi phát triển trong khoảng 30^oC, ra ngoài ngưỡng này tốc độ sinh trưởng hệ sợi giảm nhanh chóng. pH môi trường đã có biến động khá mạnh trong quá trình sinh trưởng của hệ sợi nấm.

Như vậy, sự sinh trưởng của hệ sợi nấm linh chi phụ thuộc vào nhiều yếu tố: chủng nấm, thành phần môi trường, các điều kiện lí, hoá khác. Để thu được những kết quả phổ



Hình 5: Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường lên sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Linh chi* trong môi trường lỏng tại pH 6.0

quát hơn, cần tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố khác (như độ thoáng bề mặt, tốc độ lắc...) lên sinh trưởng của hệ sợi nấm *linh chi* trong các môi trường lỏng khác nhau. Trên cơ sở đó tiến hành khảo sát mối tương quan các hoạt chất được li trích (polysacchride, protein, triterpenoid...) với các yếu tố môi trường nhằm tiến tới xây dựng quy trình nuôi cấy cho từng chất riêng biệt.

4. Kết luận

Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện pH và nhiệt độ lên sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Linh chi* trong điều kiện nuôi cấy huyền phù là cơ sở cho việc xác định các điều kiện lí hoá tối ưu thu nhận sinh khối hệ sợi nấm trong môi trường lỏng đồng thời cũng là cơ sở cho việc thực hiện các nghiên cứu thu nhận protein LZ-8.

Khảo sát sự ảnh hưởng của pH và

nhiệt độ lên khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm *linh chi* trong dịch huyền phù cho các kết quả:

- *Linh chi* có khả năng sinh trưởng trong dải pH từ 4-7, nhiệt độ từ 25-35 °C. Trong kết quả này, pH và nhiệt độ phù hợp cho phép thu được sinh khối hệ sợi nấm cao nhất lần lượt là 5.0 và 30°C với khối lượng 450mg/100ml và 630mg/100ml tại pH 5.0 sau 7 ngày và 14 ngày nuôi cấy.

- pH môi trường có biến động khá mạnh trong quá trình sinh trưởng hệ sợi, sinh khối càng tăng thì pH càng giảm và ngược lại, tuy nhiên tại pH thấp thì khả năng sinh trưởng lại chậm lại. Tại các pH khảo sát đều cho thấy sinh khối hệ sợi nấm tăng lên khi nhiệt độ tăng từ 25°C lên 30°C nhưng khi nhiệt độ vượt quá ngưỡng này thì sinh khối giảm nhanh chóng.

*

EFFECT OF TEMPERATURE AND pH ON THE MYCELIAL GROWTH OF *GANODERMA LUCIDUM* IN SUBMERGED FLASK CULTURES

Nguyen Ba Tu⁽¹⁾, Nguyen Thanh Thuan⁽²⁾, Tang Cong Truong⁽³⁾

(1), (2) Thu Dau Mot University, (3) Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Bình Dương

ABSTRACT

*In this paper the effects of environmental condition on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* were investigated in shake flask cultures. The optimal temperature and pH were found to be around 25-30 °C with pH suitable were 5.0 after 7 days and 4.0 after 14 days cultured. The maximum mycelial concentration reached to around 450 mg/100ml and 630 mg/100ml after 7 days and 14 days cultured, respectively. The pH of medium*

changed correspondingly with the changes in the growth of mycelium. As mycelial growth incereased, the pH of medium decreased and reverse.

Key words: *lingzhi (ganoderma), growth, biomass*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ngô Anh (2007), *Giáo trình Nấm học*, NXB Đại học Huế.
- [2] Nguyễn Thị Chính (1999), *Nghiên cứu công nghệ sản xuất sinh khối và một số hoạt tính sinh học của linh chi (Ganoderma lucidum)*, Tạp chí Sinh học, số 21, tr 132-136.
- [3] Phan Huy Dục (1992), *Nấm linh chi - nguồn dược liệu quý hiếm cần được bảo vệ và nuôi trồng*, Tạp chí Dược học, số 2.
- [4] Nguyễn Anh Dũng (1995), *Góp phần vào nghiên cứu các thành tố hóa học của Ganoderma lucidum*, Tạp chí Dược học, 2, tr 14-16.
- [5] Ngô Kiến Đức và cs (2009), *Nghiên cứu tác dụng phòng ngừa loạn sản tế bào gan và chống suy tủy của linh chi*, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Y dược TP. Hồ Chí Minh.
- [6] Tạ Bích Thuận và cs (2007), *Tìm hiểu các enzym bảo vệ ôxi hoá của nấm linh chi (Ganoderma lucidum)*, Tạp chí khoa học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.
- [7] Chang M., et al. (2005), *Optimization of the medium composition for the submerged culture of Ganoderma lucidum by Taguchi array design and steepest ascent method*, National Taiwan Ocean University, Science Direct.
- [8] Gao Y at al. (2002), *The immunomodulating effects of Ganoderma lucidum (Curt. Fr.) P. Karst (Ling Zhi, reishi mushroom) (Aphyllophoromycetidae)*, Int. J. Med. Mushrooms.
- [9] Liang, et al. (2009), *Ganoderma lucidum immunomodulatory protein (Lz-8) expressed in Pichia pastoris and the identification of immunocompetence*, Department of Cytobiology, Institute of Frontier Medical Science, Jilin University, Changchun, China.
- [10] Habijani J., at al. (2001), *Immunostimulatory Effects of Fungal Polysaccharides from Ganoderma lucidum Submerged Biomass Cultivation*, University of Ljubljana, Slovenia.
- [11] Koshisuke K, et al. (2004), *Isolation and Characterization of a New Immunomodulatory Protein, Ling Zhi-8 (LZ- 8), from Ganoderma lucidum*, The journal of biological chemistry, Odawara, Japan.
- [12] Lee, et al. (2006), *Factors influencing the production of endopolysacchride from Ganoderma applanatum*, The journal of Divition of Biotechnology, Korea Forest Research Institute.
- [13] Lee et al. (2006), *Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from Ganodermaapplanatum*, Korea Forest Research Institute, The journal of Science Direct.
- [14] Naszeen Z. et al. (2005), *Study of different growth parameters in Ganoderma lucidum*, Biotechnology and food research Center, PCSIR labs, USA.
- [15] Qin et al. (2008), *Functional expression of LZ-8, a fungal immunomodulatory protein from Ganoderma lucidum in Pichia pastoris*, J. Gen. Appl. Microbiol.
- [16] Tang et al. (2006), *Ganoderic acid T from Ganoderma lucidum mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells*, The journal of ScienceDirect: life Science.
- [17] Yang et al., 1998. *Effect of cultivating condititons on the mycelial growth of Ganoderma lucidum in submerged flask cultures*. The journal of Bioprocess Engineering.
- [18] Vukojevic et al. (2006), *Effect of medium pH and cultivation period on mycelial biomass, polysaccharide, and ligninolytic enzyme production by Ganoderma lucidum from montenegro*, The journal of BioScience.