

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

NGUYỄN THỊ BÍCH HẰNG

THU NHẬN, ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH PREBIOTIC CỦA
POLYSACCHARIDE TỪ SỢI NẤM (*Cordyceps militaris*,
Trametes versicolor) VÀ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG SINH KHỐI
TRONG CHẾ BIẾN THỰC PHẨM BỔ SUNG

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT

Đà Nẵng, 2026

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT
NGUYỄN THỊ BÍCH HẰNG

THU NHẬN, ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH PREBIOTIC CỦA
POLYSACCHARIDE TỪ SỢI NẤM (*Cordyceps militaris*,
Trametes versicolor) VÀ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG SINH KHỐI
TRONG CHẾ BIẾN THỰC PHẨM BỔ SUNG

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm

Mã số: 9540101

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Đặng Minh Nhật

TS. Nguyễn Hoàng Dũng

Đà Nẵng, 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi cam đoan luận án này được hoàn thành là công trình nghiên cứu của bản thân. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án chưa từng được công bố trong bất kỳ luận án cùng cấp nào trước đây.

Đà Nẵng, ngày....tháng....năm 2026

Nghiên cứu sinh thực hiện

LỜI CẢM ƠN

Sau hơn 3 năm học tập và nghiên cứu, luận án tiến sĩ của tôi đã được hoàn thành. Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS.TS. Đặng Minh Nhật và TS. Nguyễn Hoàng Dũng – những người thầy đã tận tâm hướng dẫn, dìu dắt tôi từ những ngày đầu nhận đề tài.

Đặc biệt, tôi xin gửi lời tri ân sâu sắc đến PGS.TS. Đặng Minh Nhật. Thầy đã dành nhiều thời gian và tâm huyết không chỉ để truyền đạt kiến thức chuyên môn, kỹ năng nghiên cứu, mà còn truyền cảm hứng về tinh thần trách nhiệm và đạo đức trong công bố khoa học. Nhờ sự định hướng của Thầy, tôi không chỉ hoàn thiện được luận án này mà còn trưởng thành hơn rất nhiều trên con đường nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô thuộc Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Khoa Hóa, Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng đã luôn hỗ trợ nhiệt tình về mặt chuyên môn, tinh thần cũng như tạo điều kiện tốt nhất về cơ sở vật chất trong suốt quá trình tôi thực hiện các thực nghiệm.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám hiệu Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng, cùng Ban Chủ nhiệm Khoa Sinh – Nông nghiệp – Môi trường đã luôn quan tâm, tạo điều kiện thuận lợi nhất để tôi yên tâm công tác, học tập và nghiên cứu. Cùng với đó, xin gửi lời cảm ơn chân thành đến các thành viên trong nhóm nghiên cứu Công nghệ sinh học nấm của Khoa đã luôn sát cánh, đồng hành và hỗ trợ tôi gặt hái được những kết quả nghiên cứu giá trị.

Tôi cũng xin dành tình cảm tri ân sâu sắc đến gia đình, những người thân yêu, bạn bè và đồng nghiệp – những người đã luôn là điểm tựa tinh thần vững chắc, động viên và khích lệ tôi vượt qua mọi khó khăn trong suốt chặng đường vừa qua.

Cuối cùng, tôi xin trân trọng cảm ơn Quý thầy cô trong Hội đồng đánh giá luận án đã dành thời gian quý báu để đọc, phản biện và đóng góp những ý kiến vô cùng giá trị, giúp luận án của tôi được hoàn thiện ở mức tốt nhất.

Xin trân trọng cảm ơn!

Đà Nẵng, ngày tháng năm 2026
Nghiên cứu sinh thực hiện

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	vii
DANH MỤC BẢNG	viii
DANH MỤC HÌNH ẢNH.....	x
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	3
2.1. Mục tiêu tổng quát.....	3
2.2. Mục tiêu cụ thể	3
3. Đối tượng, phạm vi nghiên cứu.....	3
3.1. Đối tượng nghiên cứu.....	3
3.2. Phạm vi nghiên cứu	3
4. Phương pháp nghiên cứu	4
4.1. Phương pháp nghiên cứu lý thuyết.....	4
4.2. Phương pháp nghiên cứu thực nghiệm.....	4
5. Ý nghĩa	4
5.1. Ý nghĩa khoa học.....	4
5.2. Ý nghĩa thực tiễn	5
6. Bố cục của luận án.....	5
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	7
1.1. Giới thiệu về nấm <i>Cordyceps militaris</i> và <i>Trametes versicolor</i>	7
1.1.1. Đặc điểm phân loại và giá trị truyền thống	7
1.1.2. Các hợp chất hoạt tính sinh học chính của <i>Cordyceps militaris</i>	8
1.1.3. Các hợp chất hoạt tính sinh học chính của <i>Trametes versicolor</i>	10
1.2. Tổng quan về hoạt tính prebiotic.....	12
1.2.1. Lịch sử và định nghĩa của prebiotic	12
1.2.2. Tiêu chí phân loại và cơ chế hoạt động của prebiotic	13

1.2.3. Tiềm năng prebiotic của <i>Cordyceps militaris</i> và <i>Trametes versicolor</i>	15
1.2.4. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính prebiotic	15
1.2.4.1. Tại Việt Nam	16
1.2.4.2. Trên thế giới	17
1.3. Tổng quan về polysaccharide trong nấm và các phương pháp chiết xuất.....	20
1.3.1. Polysaccharide trong quả thể và hệ sợi nấm	20
1.3.2. Các phương pháp chiết xuất polysaccharide từ nấm	24
1.4. Phương pháp nuôi cấy dịch thể	30
1.4.1. Giới thiệu về nuôi cấy dịch thể.....	30
1.4.2. Ưu điểm của nuôi cấy dịch thể	31
1.4.3. Các yếu tố ảnh hưởng trong quá trình nuôi cấy dịch thể.....	33
1.4.3.1. Thành phần môi trường nuôi cấy	33
1.4.3.2. Các điều kiện vật lý	35
1.4.3.3. Hình thái hệ sợi và khả năng trao đổi chất	38
1.4.3.4. Các yếu tố sinh học và điều kiện nuôi cấy	38
1.5. Tổng quan về khả năng kháng oxi hóa.....	39
1.5.1. Khái niệm và cơ chế	39
1.5.2. Khả năng kháng oxi hóa của một số hợp chất có trong <i>Cordyceps militaris</i> và <i>Trametes versicolor</i>	40
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	44
2.1. Đối tượng.....	44
2.2. Hóa chất, thiết bị và dụng cụ	45
2.2.1. Hóa chất.....	45
2.2.2. Thiết bị và dụng cụ	45
2.3. Phạm vi.....	45
2.4. Sơ đồ nghiên cứu	46
2.5. Phương pháp thực hiện các nội dung nghiên cứu.....	48
2.5.1. Nội dung 1: Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể nhằm thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm	48
2.5.2. Nội dung 2: Chiết xuất tuần tự và đánh giá hình thái, hoạt tính kháng oxi hoá, prebiotic của các chiết xuất PS.....	53
2.5.3. Nội dung 3: Ứng dụng hệ sợi nấm chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung	61
2.6. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu	65

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	66
3.1. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể nhằm thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm	66
3.1.1. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy đối với hệ sợi nấm <i>C. militaris</i>	66
3.1.1.1. Ảnh hưởng của các yếu tố đơn biến đến năng suất sinh khối và hàm lượng PS hệ sợi nấm <i>C. militaris</i>	66
3.1.1.2. Xác định điều kiện tối ưu nhằm thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm <i>C. militaris</i>	69
3.1.1.3. Thực nghiệm kiểm tra các điều kiện tối ưu sợi nấm <i>C. militaris</i>	74
3.1.2. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy đối với hệ sợi nấm <i>T. versicolor</i>	74
3.1.2.1. Ảnh hưởng của các yếu tố đơn biến đến năng suất sinh khối và hàm lượng PS hệ sợi nấm <i>T. versicolor</i>	74
3.1.2.2. Xác định điều kiện tối ưu nhằm thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm <i>T. versicolor</i>	77
3.1.2.3. Thực nghiệm kiểm tra các điều kiện tối ưu sợi nấm <i>T. versicolor</i>	81
3.2. Chiết xuất tuần tự và đánh giá hình thái, hoạt tính kháng oxi hoá, prebiotic của các chiết xuất PS	81
3.2.1. Phân tích cấu trúc bề mặt PS bằng kính hiển vi điện tử quét	81
3.2.2. Hàm lượng polysaccharide tách chiết tuần tự từ hệ sợi nấm	85
3.2.3. Khả năng kháng oxi hóa của các chiết xuất PS từ hệ sợi nấm	87
3.2.4. Hoạt tính prebiotic của PS chiết xuất từ hệ sợi nấm	90
3.2.4.1. Khả năng kích thích sự sinh trưởng probiotic	91
3.2.4.2. Chỉ số prebiotic của các chiết xuất PS sợi nấm	95
3.2.4.3. Ảnh hưởng của các chiết xuất PS đến hàm lượng acid béo chuỗi ngắn tạo thành	98
3.2.4.4. Khả năng bị phân giải bởi α -amylase của các chiết xuất PS sợi nấm	105
3.2.4.5. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy	106
3.3. Ứng dụng hệ sợi nấm chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung	112
3.3.1. Đánh giá an toàn bột sợi nấm	112
3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng bột sợi nấm bổ sung đến chất lượng nước lên men từ nấm Bào ngư	113
3.3.2.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ bổ sung sinh khối sợi nấm đến hoạt tính kháng oxi hóa của đồ uống lên men	113
3.3.2.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ bổ sung sinh khối sợi nấm đến khả năng sinh trưởng của lợi khuẩn	115

3.3.2.3. Ảnh hưởng đến khả năng kháng khuẩn	117
3.3.2.4. Ảnh hưởng đến chất lượng cảm quan sản phẩm	120
3.3.2.5. Ảnh hưởng đến sự thay đổi pH và hàm lượng acid tổng số (TAN)	122
3.3.2.6. Đánh giá an toàn sản phẩm nước nấm lên men có bổ sung sợi nấm.....	124
3.3.3. Xây dựng quy trình chế biến nước uống lên men	125
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	129
A. KẾT LUẬN	129
B. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	130
C. KIẾN NGHỊ VÀ HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO	131
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC.....	133
TÀI LIỆU THAM KHẢO	134

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
BBD	Box-Behnken Design	Mô hình quy hoạch thực nghiệm Box-Behnken
CNM	Yeast extract	Cao nấm men
Cs	Collaborator	Cộng sự
CT	Formula	Công thức
FOS	Fructo-oligosaccharides	Fructo-oligosaccharide
GOS	Galacto-oligosaccharide	Galacto-oligosaccharide
ISAPP	International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics	Hiệp hội Khoa học Quốc tế về Probiotic và Prebiotic
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccarit
OD	Optical density	Mật độ quang
PI	Prebiotic index	Chỉ số prebiotic
PS	Polysaccharides	Polysaccharide
PSK	Polysaccharide Krestin	Polysaccharide Krestin
PSP	Polysaccharide peptide	Peptide polysaccharide
RS	Resistant starch	Tinh bột kháng tiêu hóa
RSM	Response Surface Methodology	Phương pháp bề mặt đáp ứng
SCFA	Short-chain fatty acid	Acid béo mạch ngắn
SEM	Scanning electron microscopy	Kính hiển vi điện tử quét
SmF	Submerged fermentation	Lên men chìm
TAN	Total acid number	Hàm lượng acid tổng số
TLTK	Reference	Tài liệu tham khảo
TPCN	Functional food	Thực phẩm chức năng
UV-VIS	Ultraviolet-visible spectroscopy	Phổ tử ngoại - khả kiến
VSV	Microorganism	Vi sinh vật

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các hợp chất chính của nấm <i>C. militaris</i>	8
Bảng 1.2. Các hợp chất chính của nấm <i>T. versicolor</i>	10
Bảng 1.3. Cấu trúc của glucan phân lập từ một số loại nấm	22
Bảng 2.1. Ưu nhược điểm của các phương pháp chiết xuất	26
Bảng 2.2. Tóm tắt bố trí thí nghiệm OFAT nấm <i>T. versicolor</i>	49
Bảng 2.3. Tóm tắt bố trí thí nghiệm OFAT nấm <i>C. militaris</i>	50
Bảng 2.4. Xây dựng đường chuẩn D-glucose bằng thuốc thử DNS	60
Bảng 3.1. Thực nghiệm khảo sát tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy nấm <i>C. militaris</i>	69
Bảng 3.2. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với năng suất sinh khối hệ sợi nấm <i>C. militaris</i>	70
Bảng 3.3. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với hàm lượng polysaccharide từ hệ sợi nấm <i>C. militaris</i>	70
Bảng 3.4. Thực nghiệm khảo sát tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy thu sinh khối sợi nấm <i>T. versicolor</i>	77
Bảng 3.5. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với năng suất sinh khối hệ sợi nấm <i>T. versicolor</i>	78
Bảng 3.6. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với hàm lượng PS hệ sợi nấm <i>T. versicolor</i>	79
Bảng 3.7. Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS từ <i>C. militaris</i>	88
Bảng 3.8. Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS của PS từ <i>T. versicolor</i>	88
Bảng 3.9. Đường kính vòng vô khuẩn của <i>E. coli</i> và <i>S. aureus</i> (mm)	107
Bảng 3.10. Đường kính vòng vô khuẩn của <i>E. coli</i> và <i>S. aureus</i> (mm)	109
Bảng 3.11. Kết quả thử nghiệm các chỉ tiêu an toàn sinh học hệ sợi nấm	112
Bảng 3.12. Khả năng trung hoà gốc tự do ABTS ⁺ của dịch chiết nấm Bào ngư bổ sung hệ sợi nấm <i>T. versicolor</i> lên men (%)	114
Bảng 3.13. Mật độ vi khuẩn <i>L. plantarum</i> trong nước nấm bào ngư lên men (logCFU/mL)	115
Bảng 3.14. Đường kính vùng ức chế (mm) của đồ uống lên men đối với <i>E. coli</i> và <i>S. aureus</i> ở các thời gian lên men khác nhau	120

Bảng 3.15. Sự thay đổi pH của dịch chiết nấm Bào ngư được bổ sung hệ sợi nấm <i>T. versicolor</i> theo thời gian lên men	122
Bảng 3.16. Sự thay đổi hàm lượng acid tổng số (tính theo acid lactic) của dịch chiết nấm Bào ngư được bổ sung hệ sợi nấm <i>T. versicolor</i> theo thời gian lên men	123
Bảng 3.17. Kết quả đánh giá an toàn vi sinh và hoá học sản phẩm nước lên men	124

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Quả thể nấm <i>C. militaris</i>	7
Hình 1.2. Quả thể nấm <i>T. Versicolor</i>	8
Hình 1.3. Sơ đồ biểu diễn sinh lý hệ sợi nấm.....	20
Hình 2.1. Sơ đồ tổng quát các nội dung nghiên cứu	47
Hình 2.2. Quy trình tách polysaccharide thô từ sinh khối nấm.....	52
Hình 2.3. Sơ đồ quy trình chiết xuất tuần tự các phân đoạn polysaccharide (PS) từ sinh khối hệ sợi nấm.....	54
Hình 3.1. Ảnh hưởng điều kiện nuôi: pH, hàm lượng glucose và cao nấm men trong môi trường dịch thể đến sinh khối hệ sợi nấm <i>C. militaris</i> . A: Ảnh hưởng của pH, B: Ảnh hưởng của glucose, C: Ảnh hưởng của cao nấm men	67
Hình 3.2. Ảnh hưởng tương tác của các điều kiện nuôi cấy đến năng suất sinh khối (hàng trên) và hàm lượng polysaccharide (hàng dưới) của nấm <i>C. militaris</i>	71
Hình 3.3. Phân tích vùng tối ưu đa mục tiêu	73
Hình 3.4. Biểu đồ tối ưu hóa đa mục tiêu điều kiện nuôi cấy thu nhận sinh khối và polysaccharide	73
Hình 3.5. Ảnh hưởng điều kiện nuôi: pH, hàm lượng glucose và cao nấm men trong môi trường dịch thể đến sinh khối hệ sợi nấm <i>T. versicolor</i> . A: Ảnh hưởng của pH, B: Ảnh hưởng của glucose, C: Ảnh hưởng của cao nấm men	75
Hình 3.6. Ảnh hưởng tương tác của các điều kiện nuôi cấy đến năng suất sinh khối (hàng trên) và hàm lượng polysaccharide (hàng dưới) của nấm <i>T. versicolor</i>	79
Hình 3.7. Phân tích vùng tối ưu đa mục tiêu	80
Hình 3.8. Biểu đồ tối ưu hóa đa mục tiêu điều kiện nuôi cấy thu nhận sinh khối và polysaccharide	80
Hình 3.9. Ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của các PS chiết xuất từ hệ sợi nấm <i>C. militaris</i> (1000×) (A), (3000×) (B) (5000×) (C) và (10.000×) (D)	82
Hình 3.10. Ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của các PS chiết xuất từ hệ sợi nấm <i>T. versicolor</i> (1000×) (A), (3000×) (B) (5000×) (C) và (10.000×) (D)	83
Hình 3.11. Hàm lượng PS chiết xuất từ hệ sợi nấm <i>C. militaris</i> và <i>T. versicolor</i>	86
Hình 3.12. Hình thái các phân đoạn Polysaccharide tách chiết từ sợi nấm	87

<i>C. militaris</i> và <i>T. versicolor</i>	87
Hình 3.13. Khả năng sinh trưởng của probiotic trên môi trường bổ sung PS chiết xuất từ sợi nấm <i>C. militaris</i>	91
Hình 3.14. Khả năng sinh trưởng của các chủng probiotic trên môi trường bổ sung chiết xuất PS nấm <i>T. versicolor</i>	92
Hình 3.15. Chỉ số prebiotic (PI) của các phân đoạn polysaccharide đối với các chủng probiotic khảo sát. (A) Các phân đoạn từ hệ sợi nấm <i>C. militaris</i> ; (B) Các phân đoạn từ hệ sợi nấm <i>T. versicolor</i>	96
Hình 3.16. Ảnh hưởng của PS đến hàm lượng SCFAs. A: <i>Butyric acid</i> ; B: <i>Propionic acid</i> ; C: <i>Acetic acid</i>	100
Hình 3.17. Ảnh hưởng của PS đến hàm lượng SCFAs. A: <i>Acetic acid</i> , B: <i>Propionic acid</i> ; C: <i>Butyric acid</i>	103
Hình 3.18. Phần trăm PS bị phân giải bởi α -amylase.....	105
Hình 3.19. Khả năng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy <i>L. plantarum</i> đối với <i>E. coli</i> ATCC 85922 và <i>S. aureus</i> ATCC 25023	108
Hình 3.20. Khả năng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy <i>L. plantarum</i> đối với <i>E. coli</i> ATCC 85922 và <i>S. aureus</i> ATCC 25023	110
Hình 3.21. Khả năng kháng khuẩn của đồ uống lên men đối với <i>E. coli</i> ATCC 85922 (A) và <i>S. aureus</i> ATCC 25023 (B).....	118
Hình 3.22. Đánh giá cảm quan của đồ uống lên men 24 giờ từ các công thức thí nghiệm	121
Hình 3.23. Sơ đồ quy trình chế biến nước uống nấm bào ngư bổ sung hệ sợi nấm Vân chi lên men lactic	126
Hình 3.24. Sản phẩm nước uống nấm bào ngư lên men lactic.....	128

1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, với sự gia tăng nhanh chóng các bệnh mạn tính không lây nhiễm liên quan đến hội chứng chuyển hóa điển hình như đái tháo đường, béo phì, gout và các bệnh đường tiêu hóa thì vai trò của hệ vi sinh vật đường ruột đối với sức khỏe con người ngày càng được quan tâm. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng sự mất cân bằng hệ vi sinh có liên quan mật thiết đến các rối loạn đáp ứng miễn dịch, viêm mạn tính và sự suy giảm chức năng chuyển hóa. Do đó, việc tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên có khả năng điều hòa hệ vi sinh đường ruột, đặc biệt là các hoạt chất prebiotic đang trở thành xu hướng nghiên cứu và ứng dụng quan trọng trong lĩnh vực công nghệ thực phẩm và dược liệu.

Prebiotic đóng vai trò là nguồn cơ chất chọn lọc cho các lợi khuẩn (probiotic) sinh trưởng từ đó thiết lập và duy trì sự cân bằng của hệ vi sinh vật đường ruột. Bên cạnh đó, prebiotic đóng vai trò như một cái bẫy đối với vi khuẩn gây hại. Từ đó làm chậm sự hấp thụ của đường glucose và giảm đề kháng insulin cải thiện đường huyết, cải tiến chất béo, làm giảm nguy cơ tim mạch, cải thiện viêm mạn tính, giúp điều hòa hệ thống miễn dịch, ngăn cản nhiễm trùng, hen suyễn, bệnh chàm và các bệnh tự miễn nghiêm trọng. Đặc biệt, quá trình lên men prebiotic bởi probiotic còn sản sinh ra các acid béo chuỗi ngắn (SCFAs) giúp nuôi dưỡng đại tràng, tăng cường hấp thụ khoáng chất, điều hòa pH, giảm ung thư đại trực tràng, viêm ruột và các rối loạn bất thường của ruột [1].

Trong lĩnh vực nghiên cứu và ứng dụng prebiotic, các hợp chất có nguồn gốc thực vật như Fructo-oligosaccharides (FOS/inulin) và Galacto-oligosaccharides (GOS) hiện đang chiếm ưu thế chủ đạo. Xuất phát từ những lợi ích sức khỏe thiết yếu mà prebiotic mang lại, các nỗ lực nghiên cứu hiện nay đang tập trung khai phá những nguồn nguyên liệu mới có hiệu suất cao và tính an toàn sinh học vượt trội. Trong bối cảnh đó, nấm nổi lên như một đối tượng tiềm năng nhờ thành phần cấu tạo giàu carbohydrate không tiêu hóa được như chitin, hemicellulose, β - và α -glucans, mannan, xylan và galactan [2]. Các polysaccharide này, cùng với các đường chuỗi ngắn (glucose, galactose, fructose và N-acetylglucosamine), đóng vai trò là chất nền đặc hiệu kích thích sự tăng trưởng của hệ vi sinh vật có lợi, đặc biệt là *Bifidobacteria* và *Lactobacillus* [3]. Về mặt hoạt tính, bên cạnh các tác dụng dược lý kinh điển, các nghiên cứu gần đây bắt đầu hé lộ tiềm năng to lớn của nấm dược liệu trong vai trò là prebiotic – nguồn thức ăn chọn lọc cho hệ vi sinh vật đường ruột [1]. Polysaccharide từ nấm ăn và nấm dược liệu như *Cordyceps militaris*

và *Trametes versicolor* sở hữu cấu trúc bền vững, không bị tiêu hóa ở dạ dày và có khả năng kích thích chọn lọc các lợi khuẩn như *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* rất hiệu quả [4,5]. *C. militaris* từ lâu đã nổi tiếng trong y học cổ truyền với khả năng tăng cường sinh lực, hỗ trợ chức năng phổi và điều hòa miễn dịch [6,7]. Trong khi đó, *T. versicolor* được biết đến như một nguồn của β -glucan và các phức hợp polysaccharide-peptide (như PSP, PSK), đã được ứng dụng rộng rãi trong hỗ trợ điều trị ung thư và kích thích miễn dịch [8,9]. Tuy nhiên, thực tế cho thấy việc khai thác và sử dụng hai loài nấm này hiện nay chủ yếu vẫn tập trung vào quả thể. Phương pháp nuôi trồng quả thể truyền thống trên cơ chất rắn thường tốn nhiều thời gian, phụ thuộc vào yếu tố thời tiết, khó kiểm soát chất lượng đồng nhất và chi phí sản xuất cao, gây trở ngại cho việc ứng dụng đại trà trong công nghiệp [10,11]. Để giải quyết bài toán này, hướng đi tập trung vào sinh khối hệ sợi nấm thông qua công nghệ nuôi cấy dịch thể (SmF) đang nổi lên như một giải pháp mới để sản xuất sinh khối hữu cơ. So với nuôi trồng quả thể hay lên men rắn (SSF), SmF cho phép rút ngắn đáng kể thời gian sinh trưởng, dễ dàng kiểm soát các thông số môi trường như pH, nhiệt độ, oxy hòa tan và thuận lợi cho việc mở rộng quy mô công nghiệp để thu nhận sinh khối hữu cơ sợi nấm. Quan trọng hơn, nhiều nghiên cứu đã chứng minh hệ sợi nấm nuôi cấy dịch thể không chỉ có năng suất sinh khối cao mà còn tích lũy các polysaccharide với hoạt tính sinh học đặc trưng. Cụ thể, Kim và cs. (2003) đã chứng minh việc tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy lỏng giúp *C. militaris* đạt năng suất sinh khối và exo-polysaccharide rất cao [12]. Tiếp nối hướng đi này Shih và cs. (2007) đã làm rõ vai trò của việc kiểm soát các thông số vận hành trong hệ thống bioreactor, cho thấy sự tương tác giữa nguồn nitrogen và tốc độ khuấy trộn là chìa khóa để duy trì sự ổn định của hàm lượng cordycepin trong sản xuất quy mô lớn [13]. Đặc biệt, nghiên cứu của Kang và cộng sự (2024) còn chỉ ra rằng việc kết hợp công nghệ chiếu sáng LED xanh trong hệ thống SmF không chỉ kích thích sự phát triển của hệ sợi mà còn làm giàu đáng kể các hoạt chất sinh học có tính kháng viêm mạnh [14].

Tuy nhiên, đa số các nghiên cứu hiện nay mới chỉ dừng lại ở việc tách chiết hoạt chất từ quả thể và một số hoạt trong khi tiềm năng prebiotic của sinh khối hệ sợi nấm nuôi cấy dịch thể vẫn là một hướng nghiên cứu lớn chưa được khai phá tương xứng. Xuất phát từ thực tiễn và các luận điểm khoa học nêu trên, đề tài **“Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (*Cordyceps militaris*, *Trametes versicolor*) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung”** được thực hiện. Đề tài không chỉ hướng đến việc làm chủ công nghệ sản xuất sinh khối nấm chất lượng cao bằng phương pháp lên men dịch thể, mà còn cung cấp những dẫn

liệu khoa học mới về hoạt tính prebiotic của hệ sợi nấm, tạo tiền đề phát triển các sản phẩm thực phẩm chức năng thể hệ mới chủ động nguồn nguyên liệu, hiệu quả cao và bền vững.

2. Mục tiêu nghiên cứu

2.1. Mục tiêu tổng quát

Xác lập cơ sở khoa học về điều kiện nuôi cấy, đặc điểm hình thái và hoạt tính sinh học (kháng oxi hóa, prebiotic) của các phân đoạn polysaccharide từ hệ sợi nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*; từ đó đánh giá khả năng ứng dụng sinh khối nấm trong chế biến sản phẩm thực phẩm định hướng chức năng dạng nước uống lên men giàu hoạt tính sinh học.

2.2. Mục tiêu cụ thể

- Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể sợi nấm nhằm thu nhận tối đa hiệu suất sinh khối và hàm lượng polysaccharide cao nhất từ hai chủng nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*.

- Đánh giá, so sánh hiệu suất thu nhận, đặc điểm hình thái và các hoạt tính sinh học invitro (prebiotic và kháng oxi hóa) của các phân đoạn polysaccharide được chiết xuất tuần tự bằng nước nóng (HWE), kiềm (AE) và acid (AEc).

- Khảo sát khả năng ứng dụng sinh khối sợi nấm trong chế biến nước nấm bào ngư lên men lactic giàu probiotic và có các hoạt tính sinh học hỗ trợ sức khỏe như kháng oxi hóa và kháng khuẩn.

3. Đối tượng, phạm vi nghiên cứu

3.1. Đối tượng nghiên cứu

Sợi nấm: bao gồm 2 chủng *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*

3.2. Phạm vi nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu của luận án được giới hạn trong các phạm vi sau:

- Đối tượng chính sử dụng trong nghiên cứu là 2 chủng nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*, phạm vi của đề tài tập trung vào đánh giá hoạt tính của PS sợi nấm và tiềm năng ứng dụng của sinh khối sợi nấm.

- Chiết xuất và đánh giá tiềm năng prebiotic của 3 loại PS khác nhau chiết bằng nước nóng (HWE), chiết kiềm (AE) và chiết acid (AEc) từ 2 chủng nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*

- Các hệ vi sinh vật sử dụng đánh giá hoạt tính prebiotic bao gồm: Các chủng lợi khuẩn *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1, *Lactiplantibacillus casei* – 01, *Bifidobacteria animalis* YC381, *Lactiplantibacillus pentosus* NH1, *Pediococci acidilactici* NBD8 và Các chủng hại khuẩn *Escherichia coli* ATCC 85922 và *Staphylococcus aureus* ATCC 25023.

- Quả thể nấm Bào ngư tím (*Pleurotus ostreatus*) thu mua tại trại nấm Quỳnh Tâm-Hòa Phong – Hòa Vang – Thành phố Đà Nẵng để chế biến nước nấm bào ngư lên men.

- Các thí nghiệm được tiến hành tại các phòng thí nghiệm của Khoa Sinh – Nông nghiệp – Môi trường, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng và Khoa Hóa, Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng.

- Thời gian thực hiện: từ năm 2021 đến năm 2025.

4. Phương pháp nghiên cứu

4.1. Phương pháp nghiên cứu lý thuyết

Tìm kiếm và thu thập các tài liệu, tư liệu, sách báo, cùng các công trình nghiên cứu liên quan đến nuôi cấy, tối ưu điều kiện nuôi cấy hệ sợi nấm, nghiên cứu tách chiết phân đoạn PS nói chung từ các nguồn thực vật cũng như từ sợi nấm, các nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng oxi hoá và prebiotic của PS, các loại prebiotic khác và các nghiên cứu chế biến sản phẩm lên men... từ nguồn tài liệu trong nước và quốc tế.

4.2. Phương pháp nghiên cứu thực nghiệm

- Tối ưu điều kiện thu sinh khối từ sợi nấm giàu Polysaccharide
- + *Xác định ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến sự phát triển sợi nấm trong môi trường dịch thể*
- + *Xác định điều kiện tối ưu nuôi cấy sinh khối và polysaccharide hệ sợi nấm*
- Tách chiết tuần tự và đánh giá hình thái, hoạt tính kháng oxi hóa, prebiotic của các chiết xuất PS
- Ứng dụng hệ sợi nấm chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung
- Thu thập và xử lý số liệu

5. Ý nghĩa

5.1. Ý nghĩa khoa học

- Luận án cung cấp bộ dữ liệu khoa học đầy đủ và có hệ thống về ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng (C, N) và môi trường (pH) đến sinh khối và sự tích lũy

polysaccharide của hệ sợi nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor* trong điều kiện nuôi cấy chìm (SmF).

- Chứng minh mối liên hệ giữa phương pháp chiết và hoạt tính sinh học: Luận án đi sâu phân tích so sánh các polysaccharide chiết xuất tuần tự (nước, kiềm, acid). Kết quả cho thấy mỗi phân đoạn PS khác nhau có hoạt tính kháng oxi hóa khác nhau, hoạt tính prebiotic khác nhau đối với mỗi chủng probiotic khác nhau, đóng góp một góc nhìn mới về việc lựa chọn phương pháp chiết tách để định hướng chức năng cho sản phẩm đích, thay vì chỉ tập trung vào chiết nước nóng truyền thống.

- Kết quả nghiên cứu cung cấp các bằng chứng định lượng cụ thể về khả năng kháng tiêu hóa (kháng α -amylase), chỉ số prebiotic (PI) và đặc biệt là lượng acid béo chuỗi ngắn (SCFAs - Acetate, Propionate, Butyrate) được sản sinh từ PS nấm do các chủng lợi khuẩn đặc hiệu (*L. plantarum*, *L. casei*, *B. animalis*, *L. pentosus*, *P. acidilactici*) lên men. Điều này góp phần củng cố cơ sở lý luận cho việc sử dụng sợi nấm được liệu như một nguồn prebiotic.

- Cung cấp nền tảng khoa học cho các nghiên cứu sâu hơn về đặc tính phân tử, cấu trúc hóa học và tương tác sinh học của PS đối với hệ sinh thái đường ruột cũng như việc tìm kiếm phát hiện các phân tử PS mới từ sợi nấm.

5.2. Ý nghĩa thực tiễn

- Thiết lập được các điều kiện tối ưu cho quy trình nuôi cấy dịch thể nấm *C. militaris* và *T. versicolor* để đạt hiệu suất sinh khối và hàm lượng polysaccharide cao. Đây là giải pháp công nghệ khả thi để tạo ra nguồn sinh khối hữu cơ, giúp chủ động nguồn nguyên liệu ổn định cho công nghiệp thực phẩm và dược phẩm, đồng thời nuôi cấy dịch thể cũng là phương thức nhân giống nhanh, nâng cao năng suất hiệu quả nuôi trồng nấm, hiện đại hóa công nghệ nuôi trồng nấm.

- Đa dạng hóa sản phẩm thực phẩm hỗ trợ sức khỏe từ nấm: Kết quả nghiên cứu ứng dụng đã tạo ra sản phẩm "Nước nấm Bào ngư lên men bổ sung hệ sợi nấm *Trametes versicolor*" với chất lượng cảm quan tốt, đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm và sở hữu hoạt tính sinh học (kháng khuẩn, prebiotic) đã được kiểm chứng. Đây là mô hình sản phẩm thực tế, có tiềm năng thương mại hóa, đáp ứng xu hướng tiêu dùng thực phẩm xanh và hỗ trợ sức khỏe đường ruột.

6. Bố cục của luận án

Luận án gồm 133 trang (không kể phần phụ lục và TLTK), kết cấu bao gồm: Mở đầu có 5 trang trình bày tính cấp thiết, mục tiêu, nội dung, phương pháp nghiên cứu, ý nghĩa

khoa học, ý nghĩa thực tiễn của luận án.

Nội dung chính gồm 3 chương:

Chương 1: Tổng quan vấn đề nghiên cứu gồm 38 trang;

Chương 2: Vật liệu và phương pháp nghiên cứu, gồm có 22 trang;

Chương 3: Kết quả nghiên cứu và thảo luận gồm có 63 trang;

Phần kết luận và kiến nghị gồm 3 trang; Danh mục các công trình nghiên cứu đã công bố 1 trang. Ngoài ra, phần tài liệu tham khảo gồm 23 trang. Trong luận án tổng cộng có 24 bảng, 30 hình vẽ và đồ thị. Có 223 tài liệu tham khảo gồm tiếng Anh và tiếng Việt là các bài báo được công bố trong tạp chí khoa học và sách.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Giới thiệu về nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*

1.1.1. Đặc điểm phân loại và giá trị truyền thống

C. militaris là một loài nấm ký sinh côn trùng thuộc ngành Ascomycota, lớp Sordariomycetes, họ Cordycipitaceae. Từ lâu, nấm đã được sử dụng trong y học cổ truyền Trung Hoa (dưới tên gọi “đông trùng hạ thảo”) để hỗ trợ điều trị các bệnh về thận, phổi, gan, sinh lý nam và nhiều loại ung thư khác nhau, cũng như tăng cường năng lượng và sức khỏe tổng thể [15]. So với loài họ hàng là *Cordyceps sinensis*, *C. militaris* được ưa chuộng hơn trong sản xuất công nghiệp do khả năng nuôi trồng dễ dàng, thời gian phát triển ngắn và khả năng tổng hợp cordycepin với năng suất cao hơn [16,17].



Hình 1.1. Quả thể nấm *C. militaris*

(Ảnh: Nguyễn Thị Bích Hằng, 2022)

Ngược lại, *T. versicolor* là một loài nấm mục gỗ thuộc ngành Basidiomycota, họ Polyporaceae, thường mọc trên thân cây gỗ mục. Trong y học phương Đông, nó được biết đến với tên gọi “Vân chi”, dùng trong trà hoặc chiết xuất làm thuốc bổ, đặc biệt trong điều trị ung thư tại Trung Quốc và Nhật Bản [18,19]. Với hình dạng giống đuôi gà tây đặc trưng, *T. versicolor* cũng dễ nhận diện và khai thác trong tự nhiên.



Hình 1.2. Quả thể nấm *T. versicolor*

(Ảnh: Nguyễn Thị Bích Hằng, 2022)

1.1.2. Các hợp chất hoạt tính sinh học chính của *Cordyceps militaris*

Trong những thập kỷ gần đây *C. militaris* đã thu hút sự chú ý đáng kể trong giới khoa học và ngành công nghiệp dược phẩm nhờ chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học phong phú với tiềm năng ứng dụng trong y học cổ truyền và hiện đại. Nấm này nổi bật không chỉ nhờ khả năng tăng cường hệ miễn dịch, kháng oxy hóa và chống ung thư mà còn nhờ khả năng hỗ trợ điều hòa chuyển hóa năng lượng và hệ vi sinh vật đường ruột [20].

Bảng 1.1. Các hợp chất chính của nấm *C. militaris*

Hợp chất	Đặc điểm cấu tạo	Hoạt tính sinh học nổi bật	Cơ chế tác động chính	TL TK
Cordycepin (3'-deoxyadenosine)	Tương tự adenosine nhưng thiếu nhóm -OH ở vị trí 3'.	<ul style="list-style-type: none"> - Chống ung thư - Kháng viêm - Kháng virus và vi khuẩn 	<ul style="list-style-type: none"> - Can thiệp vào quá trình tổng hợp RNA. - Điều hòa các con đường tín hiệu PI3K/Akt và MAPK. - Ức chế nhân tố phiên mã NF-κB. 	[21] [22]
Polysaccharide (PS)	Bao gồm cả homopolysaccharide (β-glucan) và	<ul style="list-style-type: none"> - Tăng cường miễn dịch - Prebiotic - Kháng oxy 	<ul style="list-style-type: none"> - Kích thích đại thực bào, tế bào NK, sản xuất cytokine. 	[20] [20] [23]

Hợp chất	Đặc điểm cấu tạo	Hoạt tính sinh học nổi bật	Cơ chế tác động chính	TL TK
	heteropolysaccharide.	hóa - Điều hòa đường huyết và lipid máu	- Hỗ trợ sự phát triển của lợi khuẩn đường ruột. - Quét gốc tự do, tăng hoạt tính enzyme kháng oxy hóa nội sinh (SOD, CAT).	
Adenosine và Nucleoside	Adenosine, uridine, guanosine, inosine.	- Điều hòa tim mạch (nhịp tim, giãn mạch) - Chống viêm, chống mệt mỏi - Cải thiện giấc ngủ và nhận thức	- Tác động lên các thụ thể purinergic trong cơ thể. - Hiệp đồng tác dụng với cordycepin.	[20]
Sterol và Ergosterol	Ergosterol và các dẫn xuất oxy hóa của nó (ví dụ: ergosterol peroxide).	- Kháng oxy hóa và chống viêm - Chống ung thư - Là tiền chất của vitamin D2	- Tạo ra các loại oxy phản ứng (ROS) để cảm ứng quá trình apoptosis (chết tế bào theo chương trình). - Ức chế sự hấp thu cholesterol tại ruột non.	[21]
Hợp chất phenolic và flavonoid	Các acid phenolic (caffeic, ferulic) và flavonoid.	- Kháng oxy hóa mạnh - Chống viêm và chống lão hóa - Bảo vệ gan	- Bảo vệ tế bào khỏi tổn thương do gốc tự do gây ra. - Điều hòa các enzyme chuyển hóa xenobiotic.	[24] [23]

Tóm lại, nấm *Cordyceps militaris* là nguồn dược liệu quý với phổ hợp chất hoạt tính sinh học đa dạng và nhiều tiềm năng ứng dụng trong y học hiện đại và thực phẩm chức năng. Các nhóm hợp chất chính gồm cordycepin, polysaccharide, adenosine, sterol

và polyphenol đều đã được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học nổi bật như chống ung thư, tăng cường miễn dịch, Kháng oxi hóa, điều hòa chuyển hóa và hỗ trợ sức khỏe đường ruột. Tuy nhiên, để ứng dụng rộng rãi, cần có thêm các nghiên cứu lâm sàng và tối ưu quy trình chiết tách, nuôi cấy nhằm đảm bảo hiệu quả và độ an toàn cho người sử dụng.

1.1.3. Các hợp chất hoạt tính sinh học chính của *Trametes versicolor*

T. versicolor nổi bật với hai hợp chất polysaccharide gắn protein có hoạt tính mạnh là PSK (polysaccharide-K, hay còn gọi là Krestin) và PSP (polysaccharide peptide). Cả hai đều có khả năng kích hoạt miễn dịch mạnh mẽ, tăng sản xuất cytokine (IL-2, TNF- α , IFN- γ), thúc đẩy hoạt động của tế bào T, tế bào sát tự nhiên (NK) và đại thực bào. Tại Nhật Bản, PSK đã được cấp phép sử dụng như một tác nhân hỗ trợ điều trị ung thư đường tiêu hóa, vú, phổi và gan trong liệu pháp kết hợp với hóa trị [8,18].

Bảng 1.2. Các hợp chất chính của nấm *T. versicolor*

Hợp chất	Đặc điểm cấu tạo	Hoạt tính sinh học nổi bật	Cơ chế tác động và ứng dụng chính	TL TK
PSK (Polysaccharide-K)	Glycoprotein (Polysaccharide liên kết protein)	- Hỗ trợ điều trị ung thư (Đã được cấp phép lâm sàng) - Điều hòa miễn dịch	- Kích hoạt tế bào T, tế bào NK; tăng sản xuất IL-2, IFN- γ . - Ứng dụng: Kết hợp với hóa trị, kéo dài thời gian sống cho bệnh nhân ung thư dạ dày, đại tràng, phổi, gan.	[18] [25]
PSP (Polysaccharide Peptide)	Polysaccharide liên kết peptide (hàm lượng peptide cao)	- Điều hòa miễn dịch - Kháng oxi hóa - Kháng virus, kháng khuẩn - Chống viêm	- Ức chế NF- κ B, giảm các cytokine tiền viêm TNF- α , IL-6. - Ức chế virus viêm gan B và vi khuẩn <i>Staphylococcus aureus</i> . - Cải thiện thời gian sống của bệnh nhân ung thư.	[26] [27] [28]

Hợp chất	Đặc điểm cấu tạo	Hoạt tính sinh học nổi bật	Cơ chế tác động và ứng dụng chính	TL TK
Polysaccharide (β -glucan)	β -glucan (các liên kết β -1 \rightarrow 3 và β -1 \rightarrow 6)	<ul style="list-style-type: none"> - Tăng cường miễn dịch - Prebiotic 	<ul style="list-style-type: none"> - Hoạt hóa đại thực bào và tế bào lympho. - Hỗ trợ hệ vi sinh đường ruột, làm tăng các acid béo chuỗi ngắn (SCFAs) như acetate, propionate, butyrate. 	[29]
Hợp chất phenolic & flavonoid	Gallic acid, caffeic acid, ferulic acid, quercetin, kaempferol	<ul style="list-style-type: none"> - Kháng oxi hóa mạnh - Chống viêm - Bảo vệ gan, giảm lipid máu 	<ul style="list-style-type: none"> - Quét gốc tự do, chelat hóa ion kim loại. - Ức chế các enzyme gây viêm COX-2 và 5-LOX, giảm PGE2 và LTB4. 	[30] [31]
Terpenoid & Sterol	Triterpenoid (Trametenolic acid), Ergosterol, Ergosterol peroxide	<ul style="list-style-type: none"> - Chống ung thư - Kháng khuẩn, kháng virus - Điều hòa miễn dịch 	<ul style="list-style-type: none"> - Cảm ứng quá trình apoptosis (tự chết tế bào) qua con đường ty thể, ức chế proteasome. - Điều hòa các gen liên quan đến apoptosis như Bax và Bcl-2. 	[32] [33]
Enzyme (Laccase, Peroxidase)	Laccase, Manganese Peroxidase (MnP), Lignin Peroxidase (LiP)	<ul style="list-style-type: none"> - Phân hủy sinh học - Khử độc - Hỗ trợ chiết xuất 	<ul style="list-style-type: none"> - Phân hủy lignin, thuốc trừ sâu, chất màu công nghiệp. - Phá vỡ cấu trúc môi trường nuôi cấy, tạo điều kiện thuận lợi cho việc chiết xuất polysaccharide. 	[34]

Hợp chất	Đặc điểm cấu tạo	Hoạt tính sinh học nổi bật	Cơ chế tác động và ứng dụng chính	TL TK
Các hợp chất nhỏ khác	Quinone, Aldehyde, Acid hữu cơ	- Kháng oxi hóa, kháng viêm - Hiệp đồng bảo vệ tế bào	- Cảm ứng các gen chống ung thư (Nrf2, HO-1). - Hỗ trợ sửa chữa DNA và tăng cường hoạt tính của các enzyme giải độc.	[35]

Có thể nói rằng nấm *T. versicolor* là một kho tàng hợp chất hoạt tính sinh học có giá trị cao với các ứng dụng tiềm năng trong y học, thực phẩm chức năng và công nghệ sinh học. Các nhóm hợp chất chính bao gồm PS (PSK, PSP), phenolic, flavonoid, terpenoid, sterol và enzyme oxi hóa đã được chứng minh có hoạt tính chống ung thư, điều hòa miễn dịch, kháng oxi hóa, kháng khuẩn và hỗ trợ hệ vi sinh đường ruột.

Nhìn chung, *C. militaris* và *T. versicolor* đều là những loài nấm dược liệu quan trọng, thể hiện tiềm năng dược lý đa dạng thông qua các hợp chất hoạt tính sinh học phong phú. *C. militaris* nổi bật với cordycepin và polysaccharide có hoạt tính chống ung thư, kháng viêm và hỗ trợ chuyển hóa, trong khi *T. versicolor* được chứng minh hiệu quả lâm sàng rõ rệt thông qua PSK và PSP. Cả hai loài đều là ứng cử viên sáng giá cho nghiên cứu ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm chức năng và tiền sinh học. Việc tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chìm nhằm nâng cao hiệu suất sinh khối và hoạt tính sinh học của hệ sợi hai loài này là một hướng nghiên cứu mang tính thực tiễn và triển vọng.

1.2. Tổng quan về hoạt tính prebiotic

1.2.1. Lịch sử và định nghĩa của prebiotic

Khái niệm “prebiotic” lần đầu tiên được giới thiệu vào năm 1999 bởi Gibson và Roberfroid, nhằm phân biệt các hợp chất có khả năng điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột mà không phải là vi khuẩn sống, tức khác với probiotic. Trong công bố này, các tác giả định nghĩa prebiotic là “một chất không tiêu hóa được, có ảnh hưởng có lợi đối với vật chủ thông qua việc kích thích chọn lọc sự phát triển và/hoặc hoạt động của một hoặc một số vi sinh vật có lợi trong đại tràng”. Khái niệm này đã tạo tiền đề cho một lĩnh vực nghiên cứu mới về các hợp chất chức năng trong thực phẩm, đặc biệt là các carbohydrate không tiêu hóa được, như fructooligosaccharide (FOS), inulin, galactooligosaccharide (GOS), và gần đây là PS có nguồn gốc từ nấm và thực vật [36].

Theo thời gian, khái niệm prebiotic đã được mở rộng và làm rõ hơn nhờ vào sự tiến bộ trong khoa học vi sinh vật, sinh học phân tử và công nghệ “multi-omics” (metagenomics, metabolomics, transcriptomics). Năm 2010, Tổ chức Khoa học Quốc tế về Probiotic và Prebiotic (ISAPP) đã đề xuất một định nghĩa điều chỉnh, theo đó prebiotic là “một thành phần thực phẩm không tiêu hóa, được lên men chọn lọc, dẫn đến sự thay đổi có lợi trong thành phần và/hoặc hoạt động của hệ vi sinh vật đường ruột”. Tuy nhiên, định nghĩa này vẫn mang tính đặc thù cho hệ vi sinh vật ruột và thiếu sự bao hàm cho các tiềm năng prebiotic ngoài hệ tiêu hóa [37].

Vào năm 2017, một nhóm chuyên gia của ISAPP tiếp tục cập nhật định nghĩa chính thức của prebiotic để phản ánh những phát hiện mới nhất, đồng thời mở rộng phạm vi khái niệm. Theo đó, prebiotic được định nghĩa là “một chất nền được sử dụng chọn lọc bởi các vi sinh vật của vật chủ, đem lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ” [38].

Nhìn chung, khái niệm prebiotic đã trải qua quá trình phát triển từ một định nghĩa ban đầu tập trung vào hệ vi sinh vật đường ruột, đến một định nghĩa toàn diện hơn mang tính liên ngành và liên hệ thống. Sự phát triển này phản ánh mối liên kết ngày càng rõ rệt giữa vi sinh vật và sức khỏe vật chủ, cũng như tiềm năng ứng dụng to lớn của prebiotic trong các lĩnh vực y học, thực phẩm chức năng, và công nghệ sinh học hiện đại.

1.2.2. Tiêu chí phân loại và cơ chế hoạt động của prebiotic

Trong những năm gần đây, khái niệm prebiotic không chỉ dừng lại ở các hợp chất oligosaccharide truyền thống mà đã mở rộng để bao hàm nhiều loại chất nền khác như PS có trọng lượng phân tử cao, polyphenol, acid béo không tiêu hóa và thậm chí là peptide. Tuy nhiên, bất chấp sự đa dạng về cấu trúc và nguồn gốc, để một hợp chất được công nhận là prebiotic, nó phải đáp ứng ba tiêu chí cơ bản, được xây dựng trên cơ sở nghiên cứu vi sinh vật học, sinh hóa và sinh lý học đường tiêu hóa [38].

Tiêu chí thứ nhất là không bị tiêu hóa hay hấp thu tại ruột non. Điều này có nghĩa là hợp chất phải vượt qua quá trình tiêu hóa enzyme tuyến tụy và enzyme ruột một cách nguyên vẹn. Khác với các carbohydrate thông thường như tinh bột hay đường đơn, prebiotic không bị phân giải bởi α -amylase, maltase, sucrase hay lactase. Tính kháng tiêu hóa này cho phép các hợp chất prebiotic di chuyển đến đại tràng – nơi sinh sống của quần thể vi sinh vật cộng sinh – mà không bị biến đổi đáng kể. Đây là điều kiện tiên quyết để prebiotic có thể tương tác với microbiota ruột và phát huy tác dụng sinh học đặc hiệu.

Tiêu chí thứ hai là được lên men chọn lọc bởi một số nhóm vi sinh vật có lợi trong hệ vi sinh đường ruột. Các vi khuẩn như *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Akkermansia muciniphila* và *Faecalibacterium prausnitzii* có khả năng sử dụng prebiotic như một nguồn carbon chính để phát triển, tạo ra lợi ích sinh học đa dạng. Quá trình lên men này không chỉ giúp tăng sinh số lượng vi khuẩn có lợi mà còn ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây hại như *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, và *Salmonella spp.*, nhờ vào sự cạnh tranh dinh dưỡng và thay đổi môi trường vi mô. Việc tác động chọn lọc là yếu tố phân biệt prebiotic với các chất xơ thông thường, bởi không phải tất cả các chất xơ đều có tính đặc hiệu đối với microbiota.

Tiêu chí thứ ba, đồng thời là mục tiêu cuối cùng của prebiotic, là mang lại lợi ích sinh lý rõ rệt cho vật chủ. Lợi ích này có thể biểu hiện ở nhiều cấp độ khác nhau, từ cải thiện tiêu hóa, hấp thu dinh dưỡng, tăng cường miễn dịch niêm mạc, đến tác dụng kháng viêm và kháng oxy hóa. Một trong những cơ chế sinh lý học quan trọng của prebiotic là sự sản sinh các acid béo chuỗi ngắn (short-chain fatty acids – SCFAs) trong quá trình lên men. Các SCFAs chính như acetate, propionate và butyrate đóng vai trò là nguồn năng lượng cho tế bào biểu mô ruột (đặc biệt là butyrate), điều hòa pH đường ruột, và hoạt hóa các thụ thể miễn dịch như GPR41, GPR43 – từ đó ảnh hưởng đến các con đường tín hiệu liên quan đến viêm, chuyển hóa lipid và insulin. Butyrate còn được chứng minh là có khả năng làm giảm biểu hiện của các cytokine tiền viêm (như TNF- α , IL-6), hỗ trợ điều trị các bệnh lý viêm ruột mạn tính như viêm loét đại tràng và Crohn.

Bên cạnh đó, một số prebiotic còn thể hiện tính chất synbiotic khi được kết hợp cùng probiotic, giúp nâng cao khả năng định cư và sinh trưởng của vi khuẩn có lợi. Trong hệ sinh thái đường ruột, prebiotic không chỉ đóng vai trò là “nguồn thức ăn” mà còn là yếu tố điều tiết hoạt động gen của microbiota, ảnh hưởng đến biểu hiện enzym chuyển hóa, tạo enzyme thủy phân PS, và tương tác với hệ thống miễn dịch ruột thông qua các receptor như TLR (Toll-like receptors) hay NOD-like receptors [39].

Như vậy, prebiotic là các hợp chất đặc biệt với ba đặc điểm cốt lõi: không bị tiêu hóa, lên men chọn lọc bởi vi sinh vật có lợi, và mang lại lợi ích sinh lý đáng kể. Cơ chế hoạt động của prebiotic, đặc biệt là thông qua quá trình sản sinh SCFAs và điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột, đã mở ra nhiều hướng nghiên cứu và ứng dụng tiềm năng trong y học, dinh dưỡng và công nghệ thực phẩm.

1.2.3. Tiềm năng prebiotic của *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*

Trong số hàng trăm loài nấm dược liệu đã được nghiên cứu, nấm *C. militaris* và nấm *T. versicolor* nổi bật như hai đại diện tiêu biểu nhờ sự đa dạng cấu trúc PS, khả năng sinh tổng hợp hợp chất sinh học có giá trị, và tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực thực phẩm chức năng và dược phẩm hiện đại. Việc lựa chọn hai loài nấm này làm đối tượng nghiên cứu không chỉ dựa trên giá trị truyền thống mà còn dựa vào những bằng chứng khoa học đương đại về hoạt tính sinh học, đặc biệt là tiềm năng prebiotic của PS được chiết xuất từ hệ sợi và quả thể của chúng.

C. militaris là một loài nấm ký sinh thuộc lớp Ascomycetes, có khả năng sinh trưởng tốt trong điều kiện nuôi cấy nhân tạo, khác với loài *C. sinensis* vốn đòi hỏi điều kiện tự nhiên phức tạp. Nấm này đã được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền để tăng cường sinh lực, cải thiện chức năng phổi, gan và thận. Thành phần hóa học chính của nấm *C. militaris* gồm có cordycepin (3'-deoxyadenosine), adenosine, D-mannitol, và đặc biệt là PS hòa tan trong nước có trọng lượng phân tử từ vài chục đến hàng trăm kilodalton. Các PS từ *C. militaris* (CMPs) được chứng minh có cấu trúc đa dạng như glucan, galactomannan và heteropolysaccharide, chứa các monosaccharide như glucose, mannose, galactose, fucose, xylose và arabinose. Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy CMPs có khả năng điều biến miễn dịch, kháng oxy hóa, kháng viêm, đồng thời có tác dụng điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột, làm tăng các vi khuẩn có lợi như *Lactobacillus* và *Akkermansia muciniphila*. Đặc biệt, CMPs thúc đẩy sản xuất SCFAs mà đặc biệt là butyrate, từ đó cải thiện hàng rào biểu mô ruột và làm giảm viêm đại tràng trên mô hình chuột, gợi mở tiềm năng lớn trong ứng dụng prebiotic.

Ngược lại, *T. versicolor*, hay còn gọi là “nấm đuôi gà tây”, là một loài nấm mục gỗ phổ biến thuộc lớp Basidiomycetes, nổi tiếng với khả năng sản sinh các hợp chất polysaccharide-protein như PSK (Polysaccharide-K) và PSP (Polysaccharide-Peptide). Tại Nhật Bản, PSK đã được công nhận như một dược phẩm bổ trợ điều trị ung thư từ những năm 1970. Cấu trúc của PSK và PSP chứa nhiều phân tử β -glucan phức hợp với protein, tạo nên hoạt tính sinh học mạnh mẽ trong việc kích hoạt miễn dịch bẩm sinh và thích ứng, thông qua việc tăng biểu hiện cytokine, tăng hoạt động tế bào NK và đại thực bào. Gần đây, các nghiên cứu bắt đầu chú ý đến khả năng điều biến hệ vi sinh vật ruột của PSP, cho thấy nó có thể làm tăng tỷ lệ vi khuẩn sinh SCFAs như *Roseburia*, *Bacteroides*, và *Faecalibacterium*, đồng thời làm giảm *Clostridium* và *Enterococcus* – hai nhóm vi khuẩn liên quan đến viêm đường ruột. Điều này cho thấy *T. versicolor*

không chỉ có giá trị dược lý mà còn là nguồn prebiotic tiềm năng, đặc biệt trong phòng ngừa bệnh viêm đường ruột và rối loạn chuyển hóa.

Việc lựa chọn *C. militaris* và *T. versicolor* làm mô hình nghiên cứu về hoạt tính prebiotic là hợp lý vì cả hai đều có thể nuôi trồng nhân tạo ổn định, chiết xuất PS dễ dàng, và được chứng minh có tác dụng điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột thông qua nhiều cơ chế khác nhau. Hơn nữa, chúng đại diện cho hai nhóm nấm có hệ sinh học và sinh hóa khác biệt: *C. militaris* thuộc Ascomycetes với hệ sợi tơ nhỏ mảnh, còn *T. versicolor* thuộc Basidiomycetes với quả thể lớn và chứa nhiều β -glucan. Sự khác biệt này cho phép so sánh trực tiếp hiệu quả prebiotic của PS theo nguồn gốc phân loại và cấu trúc phân tử, từ đó xác định được các đặc tính hóa học liên quan đến hoạt tính sinh học.

1.2.4. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính prebiotic

1.2.4.1. Tại Việt Nam

Ở Việt Nam, các nghiên cứu tập trung vào nghiên cứu nuôi trồng và đánh giá chất lượng và hoạt tính quả thể và một số ít hệ sợi nấm. Các công trình nghiên cứu và công bố về prebiotic còn hạn chế. Hiện nay, trên thị trường chủ yếu các sản phẩm có chức năng cải thiện đường ruột được bổ sung prebiotic là từ thực vật như FOS, GOS. Prebiotic vẫn còn khá mới ở nước ta vì vậy cần nhiều hơn các nghiên cứu về nó.

Liều Mỹ Đông và Nguyễn Thúy Hương đã khảo sát ảnh hưởng của Whey Protein và Prebiotic lên tỉ lệ sống sót của *Bifidobacterium bifidum* vi gói trong sữa chua Synbiotic. Kết quả khảo sát cho thấy, pH của mẫu chứa *B. bifidum* tự do có giá trị pH thấp nhất và lượng tế bào sống sót cũng đạt thấp nhất so với mẫu chứa sản phẩm vi gói. Khi canxi-anginat được bao phủ bởi whey protein đã cải thiện hơn 3 log (CFU/g) so với khi không bao phủ. Prebiotic FOS được bổ sung vào sữa chua cũng đã giúp nâng cao sự sống sót của *B. bifidum* trong quá trình bảo quản. Kết quả cũng cho thấy rằng, chế phẩm vi gói canxi-anginat 2%, FOS 2% bao phủ bởi whey protein 10% cho hiệu quả bảo vệ tốt nhất và đạt tỉ lệ sống sót 97% sau 9 tuần bảo quản và 54% sau khi ủ 5h trong môi trường dạ dày và muối mật [40].

Năm 2017, Vũ Thị Kim Hoa và các cộng sự đã nghiên cứu hiệu quả của việc bổ sung các sản phẩm dinh dưỡng có Probiotic và Prebiotic đến chỉ số miễn dịch, tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp của trẻ 25 – 36 tháng tuổi. Sau 5 tháng nghiên cứu, kết quả chỉ ra rằng: đối với các trẻ được sử dụng sản phẩm Synbiotic thì tình trạng miễn dịch được cải thiện rõ rệt: nồng độ IgA trong máu tăng cao hơn (3,64 mg/mL) và IgA trong phân

(48 mg/mL) so với đối chứng. Nhóm Synbiotic giảm số lần cũng như số ngày mắc bệnh tiêu chảy; số ngày mắc nhiễm khuẩn hô hấp ở nhóm dùng Synbiotic cũng giảm đáng kể. Như vậy, sản phẩm có chứa probiotic và prebiotic đã giúp điều hòa miễn dịch và ổn định hệ vi sinh đường ruột của trẻ em [41].

Theo tác giả Trần Hữu Dũng và Nguyễn Hải Thúy đã thực hiện đề tài “Tổng quan về vai trò tinh bột kháng trong kiểm soát đường huyết sau ăn trên bệnh nhân đái tháo đường type 2”. Qua nghiên cứu đã cho thấy với sự hạn chế giải phóng glucose trong ruột non, RS đã tham gia rất hiệu quả trong sự làm giảm đường huyết sau ăn, góp phần hạn chế sự hấp thu cholesterol trong huyết tương và nồng độ thấp hơn, cải thiện độ nhạy cảm insulin thụ thể, tăng cảm giác no, giảm lưu trữ chất béo. Sự lên men và chuyển hóa thành các acid béo mạch ngắn tạo ra nguồn năng lượng thấp trong ruột già đã cho thấy RS có bản chất không phải là các sợi cellulose thông thường. Nghiên cứu về RS ứng dụng trong lĩnh vực khoa học và công nghệ ở nước ta đang vẫn là một tiềm năng rất lớn nhưng cũng đầy thách thức, đặc biệt là các loại RS sử dụng như một nguyên liệu trong chế biến các loại thực phẩm chức năng [42].

1.2.4.2. Trên thế giới

Với những lợi ích sức khỏe thiết thực mà prebiotic mang lại đã có rất nhiều nghiên cứu về phương thức sản xuất, công dụng, khả năng kích thích sinh trưởng của probiotic, cũng như các nguồn nguyên liệu để sản xuất prebiotic. Nhưng những nghiên cứu về nguồn nguyên liệu sản xuất prebiotic chủ yếu là về thực vật, chưa có nhiều nghiên cứu về nấm. Hiện nay, nấm đang được quan tâm như nguồn nguyên liệu sản xuất prebiotic mới, an toàn, hiệu quả.

Polysaccharide chiếm 3-8% trong toàn bộ trọng lượng khô và được xem là thành phần chính góp phần tạo nên hoạt tính sinh học của *Cordyceps*, được chia làm hai loại dựa vào vị trí của chúng trong nấm: PS nội bào và PS ngoại bào hay còn gọi là exopolysaccharide – EPS. PS tham gia tích cực trong việc ngăn chặn sự hình thành và lây lan các khối u, gây ức chế hoạt động của các gốc tự do, kích thích và điều hòa miễn dịch, tham gia phản ứng viêm, kháng oxy hóa v.v... Trong đó hoạt tính kháng oxy hóa đang được quan tâm và nghiên cứu nhiều nhất. PS hiện diện ở thành tế bào và tham gia vào cấu trúc thành phần trong tế bào chất của *Cordyceps* [43]. Các nghiên cứu trên thế giới đã khẳng định PS chính là thành phần quyết định hoạt tính kháng oxy hóa của *C. militaris*. Đặc biệt, một số nghiên cứu đã cho thấy rằng dịch nuôi cấy *C. militaris* cũng chứa một lượng lớn exopolysaccharide có hoạt tính sinh học.

Lin và cộng sự (2012) đã nghiên cứu hoạt tính của exopolysaccharide từ *Cordyceps militaris* SU5 – 08, kết quả cho thấy rằng PS có khả năng bắt gốc tự do hydroxyl, superoxide anion và DPPH. Từ đó có thể kết luận rằng PS của *C. militaris* SU5 – 08 là một chất kháng oxi hóa và tăng cường phản ứng miễn dịch tiềm năng [44]. Wei-Ting Chou và cộng sự đã nghiên cứu ứng dụng phân gốc và phân thân nấm như là một nguồn prebiotic. Từ những kết quả nghiên cứu cho thấy các phần thải của nấm như gốc nấm hoặc thân nấm rẻ hơn các nguồn khác và là nguồn mới để khai thác prebiotic [45].

Thornthan Sawangwan và cộng sự đã nghiên cứu đặc tính của prebiotic chiết xuất từ 7 loại nấm ăn khác nhau cho thấy tổng số cacbohydrate và tổng lượng đường khử của nấm *Pleurotus ostreatus* đạt cao nhất lần lượt là $6,7325 \pm 0,0261$ mg/mL và $2,6737 \pm 0,0027$ mg/mL. Các đặc tính của prebiotic xác định dựa trên sự kích thích tăng trưởng của probiotic với nhóm vi khuẩn có lợi trong đường ruột, ức chế gây bệnh đối với vi khuẩn có hại và dung nạp đường tiêu hóa. Sự ức chế gây bệnh thể hiện qua đường kính vòng và vùng ức chế rộng nhất của *Salmonella typhi* trong môi trường có bổ sung dịch chiết từ nấm *P. Ostreatus* [46]. Mặt khác, Imrankhan và cộng sự đã nghiên cứu PS từ nấm *Ganoderma lucidum* và *Poria cocos* đã cho thấy được khả năng prebiotic thông qua sự ảnh hưởng của PS đến thành phần của hệ vi sinh đường ruột trong chuột [47].

Ganoderma lucidum (nấm Linh chi) và *Poria cocos* (nấm Phục linh) là các loại nấm được liệu được sử dụng phổ biến trong Y học cổ truyền Trung Quốc và được tiêu thụ như các loại thực phẩm chức năng. Các polysaccharide (PS) chiết xuất từ thể quả và hệ sợi nấm được cấp cho chuột C57BL/6J (6 tuần tuổi) qua đường uống mỗi ngày với liều lượng 750 mg/kg trong vòng 15 ngày. Sau đó, hệ vi sinh vật đường ruột (Gut microbiota - GM) của chuột được phân tích thông qua kỹ thuật ERIC-PCR và giải trình tự amplicon rRNA 16S. Tổng cộng có 2,59 triệu đoạn đọc (reads) chất lượng cao (> 200 bp) đã được xử lý để lập hồ sơ cấu trúc hệ vi sinh vật. Kết quả cho thấy việc bổ sung PS làm giảm đáng kể ($p < 0,01$) số lượng đơn vị phân loại hoạt động (OTU) và mức độ đa dạng sinh học của hệ vi sinh vật đường ruột. Đáng chú ý, sự phong phú của các chủng vi khuẩn liên quan đến khả năng chống béo phì, sinh tổng hợp SCFA, phân giải polysaccharide/xylan và sản sinh acid lactic đã tăng lên một cách có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở nhóm chuột được điều trị bằng PS. Nghiên cứu này kết luận rằng các PS từ hai loại nấm trên đóng vai trò như các prebiotic, giúp điều hòa cấu trúc hệ vi sinh vật đường ruột, từ đó góp phần tạo nên các đặc tính nâng cao sức khỏe của *G. lucidum* và *P. cocos* [48]. Gần đây, Mitsou và cs. (2020) đã nghiên cứu về tác động của β -glucan trong nấm ăn tới hệ vi sinh vật đường ruột lão hóa. Kết quả thấy rằng β -glucan có thể

phát huy tác dụng có lợi trong việc khôi phục hệ vi sinh vật đường ruột và SCFAs ở người cao tuổi [49].

Polysaccharide là một trong những thành phần hoạt tính sinh học chủ yếu làm nên dược tính của nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*). Nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá khả năng hệ vi sinh vật đường ruột ở người lên men PS chiết xuất từ *G. lucidum* (GLP), đồng thời khảo sát tiềm năng prebiotic của hợp chất này thông qua hệ thống Mô phỏng Hệ sinh thái vi sinh vật đường ruột người (SHIME). Hợp chất GLP được chiết xuất từ thể quả của *G. lucidum* có trọng lượng phân tử trung bình đạt 133,1 kDa. Quá trình lên men GLP in vitro mô phỏng môi trường ruột kết trong thời gian ngắn cho thấy sự sụt giảm liên tục của hàm lượng carbohydrate tổng số, đường khử cũng như giá trị pH. Phân tích bằng sắc ký khí (GC) chỉ ra rằng GLP thúc đẩy quá trình sinh tổng hợp các acid béo chuỗi ngắn (SCFA), cụ thể là acid axetic, acid propionic và acid butyric. Bên cạnh đó, phân tích giải trình tự amplicon 16S rDNA cho thấy GLP giúp cải thiện mức độ đa dạng của quần xã vi sinh vật, làm gia tăng tỷ lệ ngành Bacteroidetes so với Firmicutes, đồng thời làm tăng đáng kể sự phong phú của các chủng *Bacteroides ovatus* và *Bacteroides uniformis*. Tóm lại, GLP có khả năng được hệ vi sinh vật đường ruột ở người sử dụng làm cơ chất, từ đó điều biến cấu trúc quần thể và chức năng trao đổi chất của hệ vi sinh vật này. Do đó, GLP mang tiềm năng lớn để được ứng dụng như một prebiotic mới nhằm nâng cao sức khỏe con người [50].

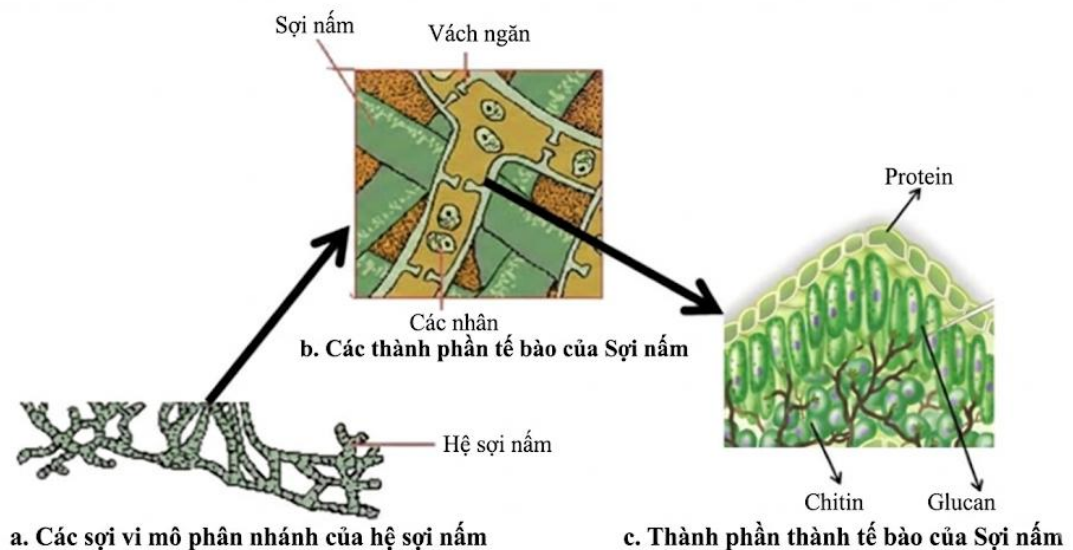
Hiện nay, các nhà khoa học trong và ngoài nước đang tập trung nghiên cứu điều kiện nuôi cấy nhằm thu sinh khối sợi nấm với hiệu suất cao. Bên cạnh đó, việc phân tích, đánh giá tầm quan trọng của các hợp chất trong hệ sợi và quả thể nấm thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học. Chính vì vậy, đã có nhiều công bố có tính khoa học và thực tiễn để tiến tới sản xuất công nghiệp tạo ra nguồn sinh khối hữu cơ đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng cũng như nhu cầu sức khỏe của con người. Hiện nay, các sản phẩm bổ sung nhằm cải thiện sức khỏe đường ruột chủ yếu chiết xuất từ thực vật. Nhiều nghiên cứu trên thế giới cho thấy PS chiết xuất từ nấm có khả năng kích thích probiotic và ức chế vi sinh vật gây bệnh, đặc biệt là β -glucan từ sợi nấm. Vì vậy, việc đa dạng nguồn cơ chất sản xuất, tạo ra sản phẩm có hoạt tính sinh học cao cải thiện sức khỏe sinh vật chủ là vấn đề hết sức cấp thiết. Kết quả nghiên cứu đánh giá hoạt tính prebiotic từ sợi nấm là một trong những giải pháp hữu ích làm đa dạng nguồn prebiotic cung cấp cho công nghệ dược phẩm, thực phẩm và ứng dụng trong chăn nuôi. Tăng sự đa dạng và nâng cao hoạt tính các loại prebiotic, đồng thời giảm thời gian nuôi trồng và chi phí sản xuất là mục tiêu mà các nhà khoa học đang hướng đến.

1.3. Tổng quan về polysaccharide trong nấm và các phương pháp chiết xuất

1.3.1. Polysaccharide trong quả thể và hệ sợi nấm

Trong giới tự nhiên, nấm được liệu là kho tàng sinh học phong phú với nhiều hoạt chất, trong đó PS đóng vai trò nổi bật. Đặc biệt, các PS có nguồn gốc từ *Trametes versicolor* (nấm Vân chi) và *Cordyceps militaris* (Đông trùng hạ thảo) đã được nghiên cứu rộng rãi nhờ các đặc tính sinh học đa dạng như tăng cường miễn dịch, chống viêm, Kháng oxi hóa, chống ung thư và điều hòa chuyển hóa. Trên thế giới, nghiên cứu về PS nấm đã phát triển thành một hệ thống toàn diện, bao phủ từ tách chiết, xác định cấu trúc phân tử phức tạp bằng các kỹ thuật cao cấp (NMR, HPSEC), đến đánh giá cơ chế tác động lên tế bào thông qua các thụ thể miễn dịch như Dectin-1 và TLR2/4 [51,52]. Với tiềm năng ứng dụng trong thực phẩm chức năng và dược phẩm, hai loài nấm này đã trở thành trọng tâm của nhiều công trình khoa học trên toàn thế giới. Tại Việt Nam, nghiên cứu về PS từ nấm trong những năm gần đây đã có nhiều khởi sắc, tập trung vào các loài có giá trị như *Ganoderma lucidum* (linh chi) và *Cordyceps militaris*.

Hệ sợi nấm là một dạng vật liệu sinh học tự nhiên, được cấu thành chủ yếu từ mạng lưới các polymer sinh học như chitin, glucan và protein [53]. Sinh lý sợi nấm ở các giai đoạn khác nhau được thể hiện ở hình sau:



Hình 1.3. Sơ đồ biểu diễn sinh lý hệ sợi nấm

(Nguồn: Rathore et. al., (2019) [53])

Trong *T. versicolor*, các PS chủ yếu tồn tại dưới dạng phức hợp protein-polysaccharide, nổi bật nhất là PSK (Polysaccharide-Krestin) và PSP (Polysaccharide Peptide). PSK là một β -glucan liên kết với protein, có cấu trúc mạch chính β -(1 \rightarrow 4)

glucopyranose và nhánh β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 6). PSP có cấu trúc tương tự và được biết đến như một chất kích thích miễn dịch mạnh mẽ, đây là minh chứng rõ ràng cho mối quan hệ giữa cấu trúc (liên kết với protein, độ phân nhánh) và chức năng sinh học, một hướng nghiên cứu then chốt trên thế giới [52,54]. PSK đã được phê duyệt như một liệu pháp hỗ trợ trong điều trị ung thư tại Nhật Bản từ những năm 1970, được sử dụng kết hợp với hóa trị cho bệnh nhân ung thư đường tiêu hóa và phổi. Nhiều nghiên cứu lâm sàng đã cho thấy PSK có khả năng kéo dài thời gian sống và giảm tái phát ung thư thông qua việc kích hoạt các tế bào miễn dịch như tế bào T, tế bào NK và đại thực bào, đồng thời điều hòa sản xuất cytokine [55].

Bên cạnh đó, PSP cũng thể hiện tác dụng sinh học ấn tượng. Nó đã được chứng minh có khả năng bảo vệ tế bào khỏi tổn thương do stress oxy hóa, đồng thời làm giảm các chỉ số viêm trong mô hình chuột thí nghiệm. Một polysaccharide khác từ nấm *T. versicolor* có tên Tramesan được chiết xuất từ dịch nuôi cấy và cho thấy khả năng kháng oxy hóa mạnh, thông qua việc trung hòa các gốc tự do và làm tăng hoạt động của enzyme kháng oxy hóa nội sinh [56]. Ngoài ra, các nghiên cứu gần đây còn ghi nhận khả năng của PS từ nấm vân chi trong việc giảm lipid máu, cải thiện chuyển hóa lipid thông qua ức chế biểu hiện các gene như SREBP-1c và FAS trong mô hình chuột tăng lipid máu [57].

Ngược lại, *C. militaris* cũng sở hữu hệ PS phong phú không kém, mặc dù có cấu trúc khác biệt. Các PS của loài nấm này chủ yếu là β -(1 \rightarrow 3)-glucan và α -(1 \rightarrow 4)-glucan, với nhiều phân tử có trọng lượng phân tử cao và cấu trúc phân nhánh phức tạp. Một trong những PS được nghiên cứu nhiều là CM1, được phân lập từ quả thể và sợi nấm, thể hiện hoạt tính chống viêm và điều hòa chuyển hóa lipid. CM1 đã được chứng minh có khả năng giảm cholesterol và triglyceride máu trong mô hình chuột mắc hội chứng chuyển hóa, đồng thời làm giảm biểu hiện các yếu tố phiên mã liên quan đến tích lũy mỡ như PPAR γ và C/EBP α [58]. Các nghiên cứu quốc tế đã chứng minh PS từ nấm *C. militaris* có khả năng kích hoạt mạnh mẽ đại thực bào RAW 264.7 thông qua các con đường NF- κ B và MAPK [8,59]. Tại Việt Nam, các nghiên cứu cũng đã khảo sát điều kiện nuôi cấy chìm tối ưu để sản xuất PS từ *C. militaris* và *T. versicolor*, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong nước [60].

Ngoài ra, polysaccharide CP2-S được chiết xuất từ bào tử của *C. militaris* cho thấy khả năng kích hoạt miễn dịch rất mạnh mẽ. Trong các thí nghiệm in vitro, CP2-S làm tăng sản xuất nitric oxide (NO), TNF- α và IL-6 từ đại thực bào RAW264.7, chứng tỏ tác động rõ rệt đến hệ miễn dịch bẩm sinh [61]. Đặc biệt, CP2-S còn được đánh giá có

khả năng kháng oxi hóa thông qua việc ức chế các con đường tín hiệu viêm như NF- κ B và MAPK, giúp làm giảm tổn thương mô do viêm mãn tính gây ra. Cũng giống như *T. versicolor*, các PS từ *C. militaris* thể hiện khả năng ức chế mạnh các cytokine viêm như IL-1 β , IL-6 và TNF- α trong mô hình gây viêm bằng LPS, từ đó cho thấy triển vọng trong việc hỗ trợ điều trị các bệnh viêm mãn tính như viêm đại tràng, viêm khớp và xơ vữa động mạch [61].

Không chỉ dừng lại ở các đặc tính dược lý, PS từ hai loài nấm trên còn đang được khai thác trong lĩnh vực công nghệ thực phẩm và mỹ phẩm. Trong một nghiên cứu gần đây, chiết xuất PS từ *C. militaris* đã được ứng dụng vào sản phẩm kem dưỡng da và thử nghiệm trên người tình nguyện. Kết quả cho thấy chiết xuất có tính ổn định, không gây kích ứng da và giúp cải thiện độ ẩm cũng như độ đàn hồi của da. Trong khi đó, PS từ *T. versicolor* đang được nghiên cứu như một thành phần có thể tích hợp vào thực phẩm chức năng dạng bột hoặc viên nang nhằm tăng cường miễn dịch và chống lão hóa [62].

Một điểm chung đáng lưu ý là cả hai loài đều cho thấy hoạt tính sinh học phụ thuộc rất lớn vào cấu trúc phân tử của PS. Trọng lượng phân tử, mức độ phân nhánh, loại liên kết glycosidic và tỷ lệ kết hợp với protein đều ảnh hưởng mạnh đến hiệu quả sinh học. Ví dụ, các PS có nhánh β -(1 \rightarrow 6) thường hoạt hóa miễn dịch mạnh hơn so với dạng chuỗi β -(1 \rightarrow 3) đơn thuần. Bên cạnh đó, việc tối ưu hóa quy trình chiết tách như chiết nước nóng, chiết kiềm, hoặc chiết xuất có hỗ trợ của enzyme đóng vai trò thiết yếu để thu nhận sản phẩm có hoạt tính cao và độ tinh sạch phù hợp cho ứng dụng công nghiệp [57]. Tuy nhiên, trong khi nghiên cứu quốc tế đã đi sâu vào phân tích các mối quan hệ cấu trúc-chức năng này, thì phần lớn nghiên cứu trong nước vẫn còn thiếu các phân tích cấu trúc chi tiết (thành phần monosaccharide, liên kết glycosidic, NMR) và mới dừng lại ở đánh giá hoạt tính sơ bộ [62,63].

Bảng 1.3. Cấu trúc của glucan phân lập từ một số loại nấm

Tên loài nấm	Đơn vị lặp lại của glucan	Tài liệu tham khảo
<i>Pleurotus florida</i>	$\begin{array}{c} \rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 6)-\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow \\ 6 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-Glcp} \end{array}$	[64]

<i>Lentinus squarrosulus</i>	$\begin{array}{c} \rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 6)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow \\ 6 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glcp} \end{array}$	[65]
<i>Calocybe indica</i>	$\begin{array}{c} \rightarrow [6)-\beta\text{-D-Glcp}-(1)_2\rightarrow 4)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow [4]-\alpha\text{-D-Glcp}-(1)_2\rightarrow \\ 6 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glcp} \end{array}$	[66]
<i>Russula albonigra</i>	$\begin{array}{c} \rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow \\ 6 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-Glcp}-(3\rightarrow 1)-\alpha\text{-D-Glsp} \end{array}$	[67]
<i>Ramaria botrytis</i>	$\begin{array}{c} \rightarrow 6)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 6)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 6)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow \\ 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glsp} \end{array}$	[68]
<i>Tricholoma crassum</i>	$\begin{array}{c} \rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 6)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow 6)-\beta\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow \\ 6 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta\text{-D-Glsp} \end{array}$	[69]

Từ những nghiên cứu về polyssacharide trong nấm, có thể nhận thấy rằng hoạt tính của nấm phần lớn do các PS đảm nhận. Quả thể nấm và sợi nấm như một nguồn nguyên liệu đầy hứa hẹn để sản xuất các sản phẩm bảo vệ sức khỏe với những công dụng đã được chứng minh: Kháng oxi hóa, kháng khuẩn, hạ đường huyết, giảm cholesterol, chống ung thư, kháng viêm...

Polysaccharide từ *T. versicolor* và *C. militaris* là những hợp chất tự nhiên đầy tiềm năng, không chỉ trong lĩnh vực y học cổ truyền mà còn trong công nghệ thực phẩm hiện đại. Các nghiên cứu hiện tại đã làm rõ nhiều khía cạnh về cấu trúc và cơ chế tác dụng

của các hợp chất này, nhưng vẫn còn nhiều khoảng trống trong việc đánh giá lâm sàng, độc tính lâu dài và hiệu quả phối hợp với các liệu pháp điều trị khác. Với sự hỗ trợ của công nghệ sinh học và phân tích hiện đại, tương lai của các PS nằm trong lĩnh vực chăm sóc sức khỏe và phòng bệnh hứa hẹn sẽ ngày càng mở rộng.

1.3.2. Các phương pháp chiết xuất polysaccharide từ nấm

Hiện nay, các kỹ thuật chiết xuất rất đa dạng, từ các phương pháp truyền thống như chiết nước nóng (HWE), chiết kiềm (AE), chiết acid (AEc) đến các phương pháp hiện đại hỗ trợ bởi công nghệ như enzyme (EAE), siêu âm (UAE) và vi sóng (MAE). Sự lựa chọn phương pháp phụ thuộc vào đặc tính cấu trúc của polysaccharide mục tiêu (độ tan, liên kết), quy mô sản xuất và yêu cầu về độ tinh khiết cũng như hoạt tính sinh học của sản phẩm cuối cùng. Mỗi phương pháp đều hoạt động dựa trên nguyên lý riêng biệt nhằm phá vỡ tế bào nấm, tuy nhiên, quy trình tổng thể thường tuân theo một trình tự logic chung để đảm bảo thu hồi tối đa lượng polysaccharide thô.

Các nghiên cứu trên thế giới thường áp dụng linh hoạt và so sánh nhiều phương pháp để tìm ra giải pháp tối ưu cho từng loại nấm. Trong khi đó, nghiên cứu tại Việt Nam đã bắt đầu tiếp cận các phương pháp hiện đại. Ví dụ, Do và cộng sự (2021) đã kết hợp siêu âm và enzyme (UAEE) để chiết PS từ *G. lucidum*, cho hiệu suất cao hơn 42% so với HWE truyền thống [51]. Tương tự, nghiên cứu của Suong và cộng sự (2015) cũng tối ưu hóa chiết xuất PS từ linh chi bằng EAE [70]. Tuy nhiên, dù sử dụng tác nhân phá vỡ tế bào khác nhau, quy trình chiết tách polysaccharide từ sợi nấm đều tuân theo các bước cơ bản sau [71–74].

Bước 1: Chuẩn bị và xử lý nguyên liệu

Quả thể hoặc hệ sợi nấm được làm sạch, sấy khô (thường sấy ở 40–60°C hoặc sấy thăng hoa) để loại bỏ nước.

Nghiền nguyên liệu thành bột mịn (kích thước < 1 mm) nhằm gia tăng diện tích tiếp xúc bề mặt giữa bột nấm và dung môi. Các nghiên cứu trong nước như của Phạm Châu Huỳnh và cộng sự (2021) đã chỉ ra tầm quan trọng của việc tối ưu kích thước bột (≤ 2 mm) và tỷ lệ dung môi để tăng hiệu suất [75].

Tùy chọn: Loại bỏ chất béo và sắc tố bằng cách ngâm với ethanol hoặc ether trước khi chiết (nếu cần sản phẩm có độ tinh khiết cao).

Bước 2: Quá trình chiết xuất: Tại giai đoạn này, sinh khối bột nấm được xử lý bằng hệ dung môi và các tác nhân xúc tác phù hợp nhằm phá vỡ cấu trúc vách tế bào, qua đó giải phóng và thu hồi tối đa hàm lượng polysaccharide.

HWE: Đun với nước nóng (90–100°C)

AE/AEc: Ngâm trong dung dịch kiềm hoặc acid (kèm gia nhiệt).

EAE: Ủ với enzyme đặc hiệu (Cellulase, Protease...) ở nhiệt độ và pH thích hợp.

UAE/MAE: Xử lý bằng sóng siêu âm hoặc vi sóng trong dung môi nước.

Bước 3: Tách cặn và xử lý dịch chiết

Ly tâm (4000–8000 rpm) hoặc lọc để loại bỏ phần bã rắn (chitin, tế bào chưa vỡ).
Thu lấy phần dịch trong.

Lưu ý: Đối với chiết kiềm/acid, cần trung hòa dịch chiết về pH 7,0. Đối với chiết enzyme, cần gia nhiệt nhanh (100°C) để bất hoạt enzyme.

Bước 4: Cô đặc và kết tủa

Cô quay chân không dịch chiết ở nhiệt độ thấp (40–60°C) để giảm thể tích (còn 1/3 hoặc 1/4 thể tích ban đầu).

Thêm Ethanol 96% (hoặc Methanol) lạnh vào dịch cô đặc với tỷ lệ 3–5 lần thể tích dịch (đạt nồng độ cồn cuối khoảng 80%).

Ủ lạnh ở 4°C qua đêm (8–12 giờ) để polysaccharide kết tủa hoàn toàn.

Bước 5: Thu hồi Polysaccharide thô

Ly tâm hoặc lọc lấy phần kết tủa.

Rửa tủa 2–3 lần bằng ethanol, acetone để loại bỏ nước, muối dư và các tạp chất phân tử lượng thấp.

Sấy khô (ưu tiên sấy đông khô) để thu được chế phẩm polysaccharide thô dạng bột, sẵn sàng cho các bước tinh sạch hoặc phân tích tiếp theo.

Bước 6: Tinh sạch (Tùy chọn)

Loại protein (phương pháp Sevag), loại muối (thẩm tích), hoặc tách phân đoạn (sắc ký).

- Ưu nhược điểm của các phương pháp chiết xuất

Bảng 2.1. Ưu nhược điểm của các phương pháp chiết xuất

Phương pháp	Nguyên lý hoạt động	Ưu điểm	Nhược điểm
Chiết nước nóng (HWE)	Phá vỡ tế bào bằng nhiệt, hòa tan PS tan trong nước.	<ul style="list-style-type: none"> - Thiết bị đơn giản, chi phí thấp. - An toàn, không độc hại. - Dễ triển khai quy mô công nghiệp. 	<ul style="list-style-type: none"> - Thời gian chiết dài, tiêu tốn năng lượng. - Hiệu suất thấp với các PS liên kết chặt. - Độ chọn lọc thấp.
Chiết Kiềm (AE)	Dùng OH^- phá vỡ liên kết hydro/ester trong thành tế bào.	<ul style="list-style-type: none"> - Hiệu suất cao, thu hồi tốt các β-glucan không tan trong nước. - Phù hợp chiết kiệt sau bước HWE. 	<ul style="list-style-type: none"> - Dễ gây đứt gãy mạch, giảm khối lượng phân tử. - Cần trung hòa (gây nhiễm muối). - Hóa chất gây ăn mòn, xử lý thải phức tạp.
Chiết Acid (AEc)	Dùng H^+ thủy phân một phần thành tế bào.	<ul style="list-style-type: none"> - Thu hồi tốt các PS acid hoặc sulfat hóa. - Hỗ trợ thủy phân tạo oligosaccharide cho nghiên cứu cấu trúc. 	<ul style="list-style-type: none"> - Nguy cơ thủy phân quá mức làm mất hoạt tính. - Kém chọn lọc, lẫn nhiều tạp chất. - Ít được dùng làm phương pháp chính.
Hỗ trợ enzyme (EAE)	Enzyme thủy phân đặc hiệu thành phần vách tế bào.	<ul style="list-style-type: none"> - Điều kiện êm dịu, bảo toàn cấu trúc tự nhiên. - Tính chọn lọc cao, ít tạp chất. - Thân thiện môi trường. 	<ul style="list-style-type: none"> - Chi phí enzyme cao. - Quy trình phức tạp (cần kiểm soát pH, nhiệt độ chặt chẽ). - Khó áp dụng đại trà quy mô lớn.
Hỗ trợ siêu âm (UAE)	Hiệu ứng xâm thực (cavitation) phá vỡ cơ học tế bào.	<ul style="list-style-type: none"> - Rút ngắn thời gian đáng kể. 	<ul style="list-style-type: none"> - Sóng siêu âm mạnh có thể cắt mạch polymer.

Phương pháp	Nguyên lý hoạt động	Ưu điểm	Nhược điểm
		<ul style="list-style-type: none"> - Nhiệt độ thấp, bảo vệ hoạt chất. - Tiết kiệm dung môi. 	<ul style="list-style-type: none"> - Khó đồng nhất năng lượng khi mở rộng quy mô lớn. - Chi phí thiết bị cao hơn HWE.
Hỗ trợ vi sóng (MAE)	Gia nhiệt nội tại nhanh chóng do ma sát phân tử.	<ul style="list-style-type: none"> - Thời gian cực nhanh (tính bằng phút). - Hiệu suất cao, gia nhiệt đồng đều từ bên trong. - Tiết kiệm năng lượng. 	<ul style="list-style-type: none"> - Nguy cơ quá nhiệt cục bộ gây phân hủy PS. - Thiết bị chuyên dụng đắt tiền. - Chưa phù hợp cho quy mô sản xuất lớn.

- Cơ sở khoa học sử dụng chiết xuất nước nóng, chiết kiềm và chiết acid trong nghiên cứu chiết tách polysaccharide từ nấm

+ Tính kế thừa và độ tin cậy từ các nghiên cứu nền tảng

Ba phương pháp chiết truyền thống – chiết bằng nước nóng (HWE), chiết kiềm (AE) và chiết acid (AEc) – đã được áp dụng phổ biến trong nhiều thập kỷ trong lĩnh vực hóa sinh và công nghệ dược liệu. Chúng là những phương pháp kinh điển được trích dẫn rộng rãi trong các công bố quốc tế về chiết tách polysaccharide từ nấm (*Ganoderma*, *Pleurotus*, *Cordyceps*, *Tremella*...). Việc lựa chọn các phương pháp này đảm bảo tính khả lặp và độ tin cậy, giúp kết quả nghiên cứu dễ dàng được so sánh, đối chiếu với các công trình trước, đồng thời tăng giá trị khoa học khi công bố. Trong khi đó, các phương pháp hiện đại như EAE, UAE hay MAE dù có tiềm năng nhưng còn tương đối mới, dữ liệu so sánh và chuẩn hóa chưa nhiều, khiến kết quả nghiên cứu khó đặt trong hệ quy chiếu rộng [74].

Đây là các phương pháp kinh điển được sử dụng và trích dẫn rộng rãi trong các công bố quốc tế về PS nấm [50]. Việc áp dụng chúng đảm bảo tính khả lặp, giúp kết quả dễ dàng được so sánh, đối chiếu với các công trình trước đó. Điều này đặc biệt quan trọng trong bối cảnh nghiên cứu tại Việt Nam đang cần xây dựng và chuẩn hóa các quy trình cơ bản, tạo nền tảng cho các nghiên cứu chuyên sâu hơn.

+ Khả năng thu hồi phổ rộng các loại polysaccharide

Điểm nổi bật của HWE, AE và AEc là khả năng chiết tách toàn diện các loại polysaccharide.

HWE thu hồi hiệu quả các polysaccharide tan trong nước, thường là β -glucan và heteropolysaccharide – nhóm có hoạt tính sinh học chính.

AE giúp giải phóng các β -glucan gắn chặt trong thành tế bào, vốn không thể chiết ra bằng nước nóng. Các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ rõ *T. versicolor* và *C. militaris* có chứa cả PS tan trong nước (như β -glucan hoạt tính miễn dịch) và các PS liên kết chặt trong thành tế bào cần kiềm để giải phóng [57,61].

AEc đặc biệt phù hợp để tách các polysaccharide mang tính acid (chứa nhóm uronic acid hoặc sulfate), vốn ít tan trong dung môi trung tính hoặc kiềm.

Sự kết hợp ba phương pháp này cho phép khai thác hầu như toàn bộ phổ polysaccharide (water-soluble, alkali-soluble, acid-soluble) của nấm. Ngược lại, EAE, UAE và MAE thường chỉ ưu tiên tăng hiệu suất thu hồi ở một dạng nhất định, nhưng chưa đủ sức bao quát toàn bộ các phân đoạn quan trọng này.

+ Tính khả thi và kinh tế kỹ thuật trong bối cảnh Việt Nam

So với các phương pháp hiện đại (EAE, UAE, MAE) đòi hỏi chi phí cao cho enzyme, thiết bị chuyên dụng và quy trình tối ưu phức tạp [70], ba phương pháp truyền thống có ưu thế rõ rệt về tính ứng dụng thực tế. Chúng chỉ yêu cầu hóa chất phổ thông và thiết bị cơ bản, phù hợp với điều kiện trang thiết bị và nguồn lực tại nhiều phòng thí nghiệm, viện nghiên cứu và có tiềm năng mở rộng sản xuất tại Việt Nam. Nghiên cứu của Vũ Thị Lan Anh và cs., (2024) về chiết β -glucan từ phụ phẩm *C. militaris* cũng sử dụng kết hợp siêu âm với chiết kiềm, cho thấy AE vẫn là phương pháp chủ lực ngay cả khi có hỗ trợ công nghệ [76].

+ Tính ổn định và giảm nguy cơ biến đổi cấu trúc

Một lý do quan trọng để lựa chọn HWE, AE và AEc là chúng cho phép kiểm soát tốt quá trình chiết, hạn chế nguy cơ phân mảnh polysaccharide. Các phương pháp hiện đại như UAE và MAE, do sử dụng cavitation hoặc vi sóng công suất cao, dễ gây cắt mạch polysaccharide, làm giảm khối lượng phân tử và thay đổi đặc tính sinh học. Trong khi đó, EAE có thể gây thủy phân quá mức nếu không tối ưu hóa điều kiện, làm biến đổi hoạt tính tự nhiên của polysaccharide. Với HWE, AE và AEc, mặc dù vẫn có nguy

cơ biến tính khi đun lâu, nhưng quá trình thủy phân có thể kiểm soát tốt bằng điều chỉnh nhiệt độ, nồng độ dung môi và thời gian.

+ Khía cạnh kinh tế và nguồn lực nghiên cứu

Một ưu điểm khác của HWE, AE và AEc là chi phí thấp và không phụ thuộc vào nguồn cung đặc biệt. Chúng chỉ cần hóa chất rẻ tiền và thiết bị cơ bản, phù hợp với điều kiện nghiên cứu tại nhiều phòng thí nghiệm trong nước. Ngược lại, EAE phụ thuộc vào enzyme nhập khẩu, giá thành cao và có thời hạn bảo quản ngắn. UAE và MAE cần thiết bị chuyên dụng, chi phí đầu tư và vận hành lớn. Như vậy, ba phương pháp truyền thống có lợi thế rõ rệt về tính khả thi và hiệu quả chi phí, đặc biệt trong bối cảnh nghiên cứu gắn liền ứng dụng thực tiễn.

* Tóm lại, việc áp dụng hệ thống chiết xuất tuần tự bằng nước nóng (HWE), dung dịch kiềm (AE) và dung dịch acid (AEc) là một hướng tiếp cận toàn diện và bám sát mục tiêu của luận án. Các phương pháp truyền thống này không chỉ đảm bảo độ tin cậy và tính khả lặp cao mà còn cho phép phân lập triệt để các phân đoạn polysaccharide có bản chất liên kết khác nhau trong màng tế bào. Khác với các kỹ thuật chiết xuất hiện đại như hỗ trợ bằng vi sóng (MAE), siêu âm (UAE) hay enzyme (EAE) – vốn đòi hỏi thiết bị chuyên dụng đắt tiền và gặp nhiều rào cản kỹ thuật khi mở rộng năng suất – ba phương pháp HWE, AE và AEc thể hiện ưu điểm về tính kinh tế và tính khả thi. Do đó, việc lựa chọn hệ dung môi này đóng vai trò then chốt trong việc xây dựng một quy trình thu nhận polysaccharide chuẩn hóa, tạo tiền đề vững chắc cho các ứng dụng thực tiễn ở quy mô công nghiệp.

Polysacchride từ nấm dược liệu đã thu hút sự quan tâm sâu rộng của cộng đồng khoa học toàn cầu nhờ vào tiềm năng dược lý đa dạng như kháng oxy hóa, kháng viêm, tăng cường miễn dịch và hỗ trợ điều trị ung thư. Tuy nhiên, khi so sánh tình hình nghiên cứu về PS từ nấm tại Việt Nam với các nước phát triển, có thể thấy rõ những khoảng cách nhất định về chiều sâu khoa học, kỹ thuật phân tích và khả năng thương mại hóa. Ở cấp độ quốc tế, các nghiên cứu đã phát triển một hệ thống nghiên cứu toàn diện, bao phủ toàn bộ chuỗi giá trị từ tách chiết, tinh chế, xác định cấu trúc phân tử, đánh giá cơ chế sinh học đến ứng dụng lâm sàng và công nghiệp hóa. Các nghiên cứu không chỉ chiết xuất PS từ *C. militaris* và *G. lucidum* mà còn đi sâu vào phân tích cấu trúc bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), sắc ký phân tử cao áp (HPSEC), và xác định cơ chế tác động lên tế bào miễn dịch thông qua các thụ thể như TLR4 hoặc Dectin-1. Nhiều nghiên cứu quốc tế còn tiến hành thử nghiệm *in vivo*, *in vitro*, đánh giá độc tính và tiềm

năng điều trị trên mô hình động vật và người. Hơn thế nữa, các sản phẩm PS đã được ứng dụng thành công trong dược phẩm, thực phẩm chức năng và mỹ phẩm tại thị trường châu Á, châu Âu và Bắc Mỹ.

Ngược lại, tại Việt Nam, phần lớn các nghiên cứu vẫn tập trung ở mức cơ bản hoặc trung gian, chủ yếu xoay quanh việc tối ưu hóa điều kiện chiết xuất (như nhiệt độ, pH, thời gian, tỷ lệ dung môi), sử dụng một số kỹ thuật mới như hỗ trợ enzyme, siêu âm, hoặc kết hợp cả hai. Các hoạt tính sinh học được kiểm định chủ yếu là khả năng kháng oxi hóa (DPPH, ABTS), kháng khuẩn và chống viêm sơ cấp. Tuy nhiên, các phân tích chuyên sâu về cấu trúc phân tử như xác định liên kết glycosidic, khối lượng phân tử, hoặc chuỗi phân tử vẫn còn hiếm hoi. Các công bố chủ yếu xuất hiện tại hội nghị khoa học hoặc tạp chí trong nước, ít được quốc tế hóa, điều này làm hạn chế khả năng lan tỏa và đối thoại khoa học toàn cầu. Một điểm yếu khác là sự thiếu vắng mối liên kết giữa nghiên cứu và doanh nghiệp trong nước, dẫn đến kết quả nghiên cứu khó được ứng dụng vào quy trình sản xuất thực tế. Trong khi đó, ở nhiều nước phát triển, các công trình khoa học thường gắn với dự án R&D của các công ty dược phẩm, mỹ phẩm hoặc thực phẩm chức năng, từ đó rút ngắn thời gian thương mại hóa sản phẩm và tạo ra chuỗi giá trị rõ ràng. Bên cạnh đó, sự đa dạng sinh học cũng là một yếu tố cần được quan tâm. Trong khi các nghiên cứu quốc tế đã mở rộng đến hàng chục loài nấm như *Grifola frondosa*, *Tremella fuciformis*, *Hericium erinaceus*, *Agaricus blazei*, thì nghiên cứu tại Việt Nam vẫn còn tập trung vào một số ít loài phổ biến như *G. lucidum*, *C. militaris* và gần đây là *T. versicolor*. Việc khai thác các loài nấm bản địa ít được chú trọng, dẫn đến sự giới hạn về nguồn nguyên liệu và khả năng phát triển sản phẩm mới.

1.4. Phương pháp nuôi cấy dịch thể

1.4.1. Giới thiệu về nuôi cấy dịch thể

Kỹ thuật nuôi cấy dịch thể (SmF) hay còn gọi là lên men dịch thể là một phương pháp nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường lỏng dinh dưỡng, được khuấy trộn và sục khí nhằm tối ưu hóa sự phát triển của tế bào và/hoặc sự tạo thành các hợp chất chuyển hóa. Đây là kỹ thuật phổ biến và được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất các sản phẩm sinh học như enzyme, acid hữu cơ, kháng sinh, PS, các hợp chất hoạt tính sinh học và sinh khối vi sinh vật, đặc biệt là nấm dược liệu [77].

Khác với phương pháp lên men thể rắn (SSF), nuôi cấy dịch thể cho phép kiểm soát tốt hơn các yếu tố môi trường như pH, nhiệt độ, oxy hòa tan, tốc độ khuấy trộn và thông khí. Sự kiểm soát chính xác này giúp tối ưu hóa sự sinh trưởng của vi sinh vật

cũng như năng suất sản phẩm [78]. Ngoài ra, quá trình lên men dịch thể thường có thời gian nuôi cấy ngắn hơn, hiệu suất thu hồi sinh khối cao hơn, và dễ dàng mở rộng quy mô công nghiệp nhờ vào hệ thống bioreactor hiện đại [79]. Trong lĩnh vực nghiên cứu và ứng dụng dược liệu, kỹ thuật nuôi cấy dịch thể đã được áp dụng để sản xuất sinh khối và các hợp chất thứ cấp từ nấm dược liệu như *G. lucidum*, *C. militaris* và *T. versicolor* [80]. Quá trình này không chỉ tạo ra sinh khối nấm giàu hoạt chất mà còn có thể điều chỉnh điều kiện nuôi cấy để tăng cường sản sinh PS, triterpenoid hay các hợp chất kháng oxi hóa.

Một trong những lợi ích quan trọng của nuôi cấy dịch thể là tính khả thi trong việc tự động hóa và kiểm soát quá trình. Việc ứng dụng các công nghệ cảm biến, hệ thống điều khiển tự động và phân tích theo thời gian thực đã giúp cải thiện hiệu suất sản xuất và giảm thiểu sai sót trong quy trình. Bên cạnh đó, SmF còn thuận lợi trong việc thu hoạch sinh khối và chiết tách các hợp chất sinh học nhờ môi trường lỏng đồng nhất, giảm chi phí sản xuất và nâng cao độ tinh khiết của sản phẩm [81]. Tuy nhiên, kỹ thuật này cũng có một số hạn chế như chi phí đầu tư ban đầu cao, yêu cầu thiết bị phức tạp và cần kiểm soát nghiêm ngặt các điều kiện môi trường. Ngoài ra, một số loài vi sinh vật hoặc chủng nấm đặc thù có thể không thích nghi tốt với điều kiện nuôi cấy lỏng, làm ảnh hưởng đến hiệu suất sản xuất. Do đó, việc lựa chọn chủng giống, thiết kế môi trường nuôi cấy và tối ưu hóa các thông số kỹ thuật là những yếu tố then chốt trong thành công của SmF.

Có thể nói rằng kỹ thuật nuôi cấy dịch thể là một công cụ mạnh mẽ trong sinh học công nghiệp và công nghệ sinh học, với tiềm năng lớn trong việc sản xuất quy mô lớn các sản phẩm sinh học có giá trị cao. Trong bối cảnh phát triển công nghệ và nhu cầu sản phẩm tự nhiên ngày càng tăng, việc tiếp tục nghiên cứu, cải tiến và tối ưu hóa kỹ thuật SmF là rất cần thiết.

1.4.2. Ưu điểm của nuôi cấy dịch thể

Trong những năm gần đây, nhu cầu sử dụng các loại nấm dược liệu như *C. militaris*, *G. lucidum*, *T. versicolor* và *L. edodes* ngày càng tăng mạnh do tiềm năng sinh học đa dạng như kháng oxi hóa, tăng cường miễn dịch, chống ung thư, và điều hòa chuyển hóa. Tuy nhiên, việc sản xuất quả thể tự nhiên hoặc trên cơ chất rắn gặp nhiều thách thức về thời gian, năng suất, và kiểm soát chất lượng. Trong bối cảnh đó, kỹ thuật nuôi cấy dịch thể đã nổi lên như một giải pháp ưu việt, đặc biệt trong việc sản xuất sinh khối hệ sợi và hợp chất hoạt tính từ nấm dược liệu ở quy mô công nghiệp.

Một trong những ưu điểm lớn nhất của nuôi cấy dịch thể là khả năng kiểm soát chính xác các điều kiện môi trường như pH, nhiệt độ, nồng độ oxy hòa tan, tốc độ khuấy và sục khí. Điều này giúp tối ưu hóa sự sinh trưởng và chuyển hóa của nấm dược liệu. Theo Papagianni (2004), sự kiểm soát này không chỉ đảm bảo sự ổn định của quá trình lên men mà còn ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất sinh khối và chất lượng của các hợp chất thứ cấp như polysaccharide, triterpenoid, và sterol [81].

So với nuôi cấy trên cơ chất rắn, SmF cho hiệu suất sinh khối cao hơn trong thời gian ngắn hơn. Trong một nghiên cứu của Zhou et al. (2014), nuôi cấy dịch thể *C. militaris* cho thấy sinh khối tăng trưởng nhanh và PS hòa tan trong nước đạt nồng độ cao hơn so với nuôi cấy bề mặt [80]. Tương tự, Wang et al. (2013) báo cáo rằng SmF giúp tăng hiệu suất sản xuất ganoderic acid từ *G. lucidum* nhờ điều chỉnh điều kiện nuôi cấy phù hợp. Điều này đặc biệt quan trọng khi cần sản xuất nhanh và ổn định các hợp chất dược liệu trong quy mô thương mại [82].

Một lợi thế nổi bật khác của nuôi cấy dịch thể là khả năng thu sinh khối và chiết tách hoạt chất dễ dàng hơn. Trong môi trường lỏng, hệ sợi phát triển phân tán, không bị kết khối như trong nuôi cấy rắn, giúp quá trình lọc, ly tâm và chiết xuất diễn ra hiệu quả hơn. Ngoài ra, môi trường lỏng sạch hơn về vi sinh và ít chứa tạp chất từ cơ chất, giúp nâng cao độ tinh khiết của sản phẩm thu được [83].

Khả năng nhân rộng là yếu tố then chốt để đưa nghiên cứu vào ứng dụng thương mại. SmF cho phép dễ dàng mở rộng quy mô thông qua hệ thống bioreactor với thể tích từ vài lít đến hàng nghìn lít, đồng thời duy trì được độ lặp lại và ổn định của sản phẩm. Theo Palladino et al. (2024), sự phát triển của công nghệ bioreactor và cảm biến sinh học đã giúp giám sát quá trình lên men theo thời gian thực, từ đó tối ưu hóa quy trình sản xuất tự động và tiết kiệm chi phí nhân công [79].

Trong nghiên cứu công nghệ sinh học hiện đại, việc tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy bằng công cụ thiết kế thí nghiệm (Design of Experiment – DoE) như mô hình đáp ứng bề mặt (RSM) hay thuật toán di truyền (genetic algorithm) ngày càng phổ biến. Nuôi cấy dịch thể là nền tảng lý tưởng cho các nghiên cứu tối ưu hóa này nhờ tính linh hoạt và khả năng phản ứng nhanh của hệ thống [84]. Nhờ đó, các nhà nghiên cứu có thể điều chỉnh nồng độ chất cảm ứng, glucose, nitơ, hoặc oxy để định hướng sinh tổng hợp các hợp chất mục tiêu từ nấm.

SmF không chỉ giới hạn ở một vài loài mà đã được chứng minh hiệu quả trên nhiều chủng nấm dược liệu khác nhau như *Cordyceps militaris*, *Ganoderma lucidum*,

Schizophyllum commune, *Phellinus linteus*, và *Hericium erinaceus*. Điều này mở ra triển vọng ứng dụng rộng rãi cho ngành công nghiệp thực phẩm chức năng và dược phẩm từ nấm [85].

Nhìn chung, nuôi cấy dịch thể là một chiến lược nuôi cấy tiên tiến, đem lại nhiều lợi thế so với các phương pháp truyền thống trong sản xuất sinh khối và hợp chất hoạt tính từ nấm dược liệu. Từ khả năng kiểm soát môi trường, hiệu suất cao, dễ thu hồi sản phẩm, đến khả năng mở rộng và tối ưu hóa quy trình, SmF đã và đang đóng vai trò trung tâm trong xu hướng công nghiệp hóa sản phẩm nấm dược liệu. Việc tiếp tục nghiên cứu, tối ưu và ứng dụng SmF hứa hẹn sẽ góp phần quan trọng vào phát triển công nghệ sinh học xanh, bền vững và hiệu quả.

1.4.3. Các yếu tố ảnh hưởng trong quá trình nuôi cấy dịch thể

Lên men dịch thể là một phương pháp nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường lỏng, được áp dụng rộng rãi trong công nghiệp sinh học nhằm sản xuất sinh khối, enzyme, PS, và các hợp chất có hoạt tính sinh học. Trong nuôi cấy nấm dược liệu, đặc biệt là các loài nấm như *C. militaris*, *T. versicolor*, hệ sợi nấm không chỉ là nguồn sinh khối mà còn là “nhà máy” tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp có giá trị cao như polysaccharide, triterpenoid, và các alkaloid. Tuy nhiên, hiệu quả của quá trình này phụ thuộc vào nhiều yếu tố sinh học và môi trường. Bài viết này sẽ phân tích các yếu tố chính ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm và khả năng tổng hợp các hoạt chất sinh học trong nuôi cấy dịch thể.

1.4.3.1. Thành phần môi trường nuôi cấy

a. Nguồn carbon

Carbon là nguồn năng lượng và vật liệu xây dựng cho tế bào. Loại và nồng độ carbon có ảnh hưởng đáng kể đến tốc độ sinh trưởng và quá trình tổng hợp hoạt chất. Glucose là nguồn carbon phổ biến trong nuôi cấy dịch thể vì khả năng hấp thu nhanh và hiệu quả chuyển hóa cao. Tuy nhiên, nồng độ glucose quá cao có thể gây ra hiện tượng ức chế do áp suất thẩm thấu hoặc hiệu ứng catabolite repression [86]. Các nguồn carbon thay thế như lactose, maltose, hoặc sucrose cũng được sử dụng để điều chỉnh quá trình chuyển hóa. Chẳng hạn, trong nuôi cấy *G. lucidum*, nguồn carbon ảnh hưởng đến hàm lượng PS tổng hợp, với glucose và maltose cho kết quả tốt nhất [87].

Nghiên cứu Cui và cs. (2015) đã tập trung đánh giá ảnh hưởng của nguồn carbon thay thế đến sinh trưởng và tổng hợp triterpenoid trong quá trình nuôi cấy dịch thể *G. lucidum* [88]. Bakratsas và cs. (2021) đã phân tích sâu ảnh hưởng của loại và tỷ lệ

nguồn carbon đến quá trình nuôi cấy dịch thể nấm dược liệu. Tác giả nhấn mạnh rằng nguồn carbon không chỉ cung cấp năng lượng mà còn đóng vai trò điều tiết quá trình sinh trưởng và tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp như polysaccharide, triterpenoid, và alkaloid. Các loại đường đơn (glucose, fructose), đường đôi (sucrose, lactose), và carbon phức (molasses, malt extract) đều ảnh hưởng khác nhau đến tốc độ tăng sinh khối, hình thái hệ sợi và năng suất hoạt chất. Ngoài ra, nồng độ carbon cao có thể gây ức chế sinh trưởng hoặc tích tụ sản phẩm phụ không mong muốn, trong khi nồng độ thấp kéo dài thời gian pha lag [89]. Kachrimanidou và cs. (2023) đã đánh giá hiệu quả của việc sử dụng nguồn carbon hỗn hợp (glucose và xylose) trong nuôi cấy dịch thể nấm *P. ostreatus*. Kết quả cho thấy sự kết hợp này không chỉ giúp tăng tốc độ tiêu thụ đường mà còn cải thiện rõ rệt năng suất sinh khối, PS ngoại bào (EPS) và enzyme laccase so với khi dùng từng loại đường đơn lẻ. Sử dụng tỷ lệ glucose:xylose là 2:1 mang lại hiệu quả cao nhất, với hàm lượng EPS tăng 28% và hoạt tính laccase tăng 35% [90]. Trong khi đó, Wang và cs. (2025) đã nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn carbon đến quá trình tổng hợp PS và biểu hiện gene liên quan trong nuôi cấy dịch thể nấm *I. obliquus*. Kết quả cho thấy các loại carbon khác nhau (glucose, fructose, sucrose) không chỉ ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng mà còn điều tiết rõ rệt hoạt tính enzyme và biểu hiện các gene tổng hợp PS như PGI, UGP, và UGE. Đặc biệt, glucose thúc đẩy mạnh biểu hiện gene UGE, làm tăng hàm lượng PS tan trong nước [91].

Như vậy, những công bố trên minh chứng rằng nguồn carbon là một đầu mối quan trọng có thể điều chỉnh để tối ưu hóa cả sinh khối và sản lượng hoạt chất trong quá trình lên men dịch thể nấm dược liệu.

b. Nguồn nitrogen

Nitrogen là thành phần thiết yếu trong tổng hợp protein, acid nucleic và enzyme. Nguồn nitrogen có thể ở dạng vô cơ (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) hoặc hữu cơ (peptone, yeast extract). Hàm lượng và loại nitrogen ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ sinh khối và sự tích lũy hoạt chất. Ví dụ, *C. militaris* khi được nuôi cấy trong môi trường có yeast extract cho hàm lượng cordycepin cao hơn so với ammonium sulfate [92]. Sự cân đối giữa carbon và nitrogen (tỷ lệ C/N) cũng quan trọng. Tỷ lệ C/N cao thường thúc đẩy sinh trưởng hệ sợi, trong khi tỷ lệ thấp có thể kích thích sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp.

Nghiên cứu của Zhang và cs. (2014) đã tập trung khảo sát ảnh hưởng của các loại nguồn nitơ đến quá trình tổng hợp ganoderic acids trong nuôi cấy dịch thể. Kết quả cho thấy nguồn nitơ khác nhau (ammonium sulfate, nitrate, peptone, yeast extract) không

chỉ ảnh hưởng đến sinh khối mà còn điều tiết mạnh mẽ biểu hiện các gene liên quan đến sinh tổng hợp triterpenoid, như *hmgr*, *sqs* và *ls*. Nghiên cứu khẳng định rằng điều tiết nguồn nitơ là công cụ sinh học quan trọng để tối ưu hóa quá trình sản xuất hoạt chất từ *G. lucidum* [93]. Nghiên cứu của Serody và cs. (2024) đã cung cấp bằng chứng rõ ràng về ảnh hưởng của nguồn và hàm lượng nitơ đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp PS trong nuôi cấy dịch thể nấm dược liệu. Kết quả cho thấy, khi tăng gấp đôi hàm lượng nitơ trong môi trường (so với mức chuẩn), *G. tsugae* không chỉ tăng sinh khối mà còn kích hoạt một pha sinh trưởng thứ hai sau pha log, giúp tăng đáng kể năng suất exopolysaccharide (EPS). Trong các nguồn nitơ khảo sát, peptone và ammonium sulfate mang lại hiệu quả tốt nhất. Nghiên cứu này có thể mở rộng ứng dụng cho các loài nấm dược liệu khác như *T. versicolor* và *P. ostreatus*, nhấn mạnh rằng tối ưu hóa nguồn nitơ không chỉ cải thiện sinh trưởng mà còn là yếu tố điều tiết mạnh mẽ quá trình tổng hợp hoạt chất sinh học trong nuôi cấy dịch thể [94].

c. Vi chất và khoáng

Các ion kim loại như Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} đóng vai trò là đồng yếu tố của enzyme, ảnh hưởng đến hoạt động sinh hóa nội bào. Thiếu hụt hoặc dư thừa vi chất đều có thể ức chế sinh trưởng hoặc làm thay đổi lộ trình chuyển hóa [95]. Một số nghiên cứu ghi nhận rằng bổ sung Mg^{2+} và Zn^{2+} có thể tăng tổng hợp PS trong *G. lucidum* [96].

Khi đánh giá ảnh hưởng của ion sắt Fe^{2+} (dưới dạng ferrous sulfate – $FeSO_4$) đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp cordycepin trong nuôi cấy dịch thể *C. militaris*. Fan và cs. (2012) cho rằng việc bổ sung $FeSO_4$ ở nồng độ tối ưu (0.3 g/L) giúp tăng sinh khối hệ sợi lên 26% và tăng hàm lượng cordycepin đến 42% so với lô đối chứng. Nghiên cứu khẳng định sắt là vi khoáng quan trọng, có thể ứng dụng như một chất bổ sung đơn giản nhưng hiệu quả để nâng cao hiệu suất nuôi cấy dịch thể *C. militaris* [97].

1.4.3.2. Các điều kiện vật lý

a. pH môi trường

pH là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến cấu trúc, ổn định và hoạt tính của nhiều enzyme, cũng như ảnh hưởng đến tính thấm của màng tế bào tế bào vi sinh. Trong quá trình lên men dịch thể (hay còn gọi là lên men dịch thể) mỗi loài nấm có khoảng pH tối ưu riêng. Ví dụ như trong nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện lên men dịch thể nhằm nâng cao hiệu suất sinh khối và PS có hoạt tính sinh học từ *C. militaris*. Yang và cs. (2007) đã bố trí thí nghiệm sử dụng thiết kế Box–Behnken để đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố như nhiệt độ, pH và thời gian lên men. Kết quả cho thấy pH ban đầu của môi

trường có ảnh hưởng đáng kể đến sinh trưởng hệ sợi và năng suất PS, với giá trị pH tối ưu được xác định là 6,0 [98]. Trong nghiên cứu của Showkat và cs. (2022), các tác giả đã tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể để nâng cao năng suất cordycepin – một hoạt chất sinh học chủ lực của *C. militaris*. Thí nghiệm sử dụng phương pháp một yếu tố thay đổi và thiết kế phản hồi bề mặt (RSM) để khảo sát ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, thời gian nuôi và nồng độ nguồn carbon. Kết quả cho thấy giá trị pH ban đầu lý tưởng để sản xuất cordycepin là khoảng 6,5, giúp tối ưu hóa cả sinh khối hệ sợi và hàm lượng cordycepin trong môi trường lỏng [99].

Nghiên cứu của Fang và cs. (2002) nhằm đánh giá ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng sinh trưởng và sản xuất hợp chất hoạt tính sinh học của *G. lucidum* trong điều kiện nuôi cấy dịch thể. Kết quả cho thấy pH ban đầu là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sinh khối hệ sợi, hàm lượng ganoderic acid và PS [100]. Trong nghiên cứu của Cui và cs. (2015), các tác giả đã khảo sát quá trình sản xuất và đặc trưng hóa triterpenoid nội bào từ *G. lucidum* trong điều kiện nuôi cấy dịch thể với mục tiêu là tối ưu hóa các điều kiện lên men nhằm nâng cao sinh khối hệ sợi và hàm lượng triterpenoid. Kết quả cho thấy giá trị pH ban đầu có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất sinh học, trong đó pH 5.5 là tối ưu cho cả sự phát triển mycelium và tích lũy triterpenoid [88]. Trong nghiên cứu tổng quan của Zhou và cs. (2021), các tác giả đã trình bày các tiến bộ trong công nghệ sinh học hiện đại nhằm tối ưu hóa nuôi cấy *Ganoderma* phục vụ sản xuất dược liệu. Tài liệu nhấn mạnh rằng pH ban đầu của môi trường nuôi cấy là yếu tố quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến tốc độ sinh trưởng và khả năng tích lũy các hợp chất hoạt tính của nấm [101].

b. Nhiệt độ

Trong quá trình nuôi cấy dịch thể hệ sợi nấm dược liệu, nhiệt độ ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng và hoạt tính enzyme. Đa số các loài nấm dược liệu phát triển tốt trong khoảng 25–28°C. Sự sai lệch khỏi nhiệt độ tối ưu có thể làm giảm sinh khối hoặc chuyển dịch quá trình chuyển hóa sang con đường phụ, ảnh hưởng đến chất lượng hoạt chất thu nhận được.

Nghiên cứu của Liu và cs. (2019) tập trung vào việc cải tiến điều kiện nuôi cấy dịch thể nhằm nâng cao sản xuất exopolysaccharide (EPS) từ *G. lucidum*. Nhóm nghiên cứu sử dụng phương pháp nuôi cấy với hạt giống dạng bột mịn và áp dụng thiết kế thí nghiệm đáp ứng bề mặt (RSM) để tối ưu hóa các yếu tố môi trường, bao gồm nhiệt độ, pH, tỷ lệ giống và thời gian nuôi. Kết quả cho thấy nhiệt độ tối ưu để đạt được sản lượng

EPS cao nhất là 28°C. Nhiệt độ cao hơn hoặc thấp hơn mức này đều dẫn đến giảm hiệu suất sinh tổng hợp EPS và làm chậm sự phát triển của hệ sợi nấm. Nghiên cứu khẳng định rằng kiểm soát nhiệt độ chính xác là một yếu tố then chốt để nâng cao hiệu quả và độ ổn định trong nuôi cấy dịch thể *G. lucidum* [102]. Trong nghiên cứu tổng quan của Camilleri và cs. (2025), các tác giả đã trình bày toàn diện về các ứng dụng và kỹ thuật nuôi cấy hệ sợi nấm để sản xuất vật liệu sinh học và các sản phẩm có giá trị cao. Nghiên cứu nhấn mạnh rằng nhiệt độ là yếu tố then chốt ảnh hưởng trực tiếp đến tốc độ sinh trưởng của hệ sợi, cấu trúc tế bào và hoạt tính enzyme. Do đó, kiểm soát nhiệt độ chính xác là điều kiện bắt buộc trong các hệ thống lên men dịch thể quy mô phòng thí nghiệm lẫn công nghiệp [103].

c. Oxi hòa tan và sự thông khí

Oxi là yếu tố giới hạn trong nuôi cấy dịch thể, đặc biệt là khi sinh khối tăng cao khiến độ nhớt tăng, cản trở sự khuếch tán oxi. Sự thông khí không đủ có thể gây ra quá trình lên men kỵ khí, dẫn đến giảm tổng hợp hoạt chất và làm thay đổi hình thái hệ sợi. Nghiên cứu của Fazenda và cs. (2010) đã phân tích ảnh hưởng của mức oxi hòa tan đến hình thái hệ sợi và hiệu quả lên men trong nuôi cấy dịch thể *G. lucidum*. Thí nghiệm được thực hiện trong chế độ fed-batch với hai phương pháp điều khiển DO: không kiểm soát (DO giảm tự nhiên) và kiểm soát tự động bằng hệ thống cascade (tăng tốc độ khuấy và cấp khí khi DO giảm). Kết quả cho thấy khi DO được duy trì ở mức $\geq 30\%$ thông qua cascade, hệ sợi phát triển ở dạng phân tán đều và sinh khối đạt mức cao hơn đáng kể. Ngược lại, ở điều kiện DO không kiểm soát, hệ sợi hình thành các cụm lớn, làm tăng độ nhớt môi trường và giảm tốc độ truyền oxi, dẫn đến hiệu suất nuôi cấy thấp. Nghiên cứu khẳng định kiểm soát DO hiệu quả là yếu tố then chốt để tối ưu hóa hình thái và năng suất trong lên men dịch thể *G. lucidum* [104]. Trong nghiên cứu tổng quan của Thakur và cs. (2023) đã cung cấp cái nhìn toàn diện về vai trò của các yếu tố môi trường trong nuôi cấy dịch thể vi sinh vật, đặc biệt là nấm hiếu khí. Trong đó, DO được xác định là một yếu tố giới hạn quan trọng, đặc biệt khi sinh khối tăng cao trong môi trường lỏng. Đối với các loài nấm hiếu khí như *Aspergillus*, *Trichoderma* hay *Ganoderma*, mức DO ảnh hưởng trực tiếp đến sự tổng hợp enzyme ngoại bào, bao gồm cellulase, xylanase và protease. Khi DO thấp hơn mức tối ưu ($<20\text{--}30\%$), hoạt tính enzyme giảm mạnh do quá trình chuyển hóa chuyển hướng hoặc enzyme bị ức chế tổng hợp. Ngược lại, duy trì DO ổn định bằng cách điều chỉnh tốc độ khuấy và thông khí giúp tối đa hóa năng suất enzyme, đồng thời cải thiện hình thái hệ sợi và độ ổn định của quá trình lên men [105].

1.4.3.3. Hình thái hệ sợi và khả năng trao đổi chất

Hình thái hệ sợi nấm trong môi trường nuôi cấy dịch thể có thể thay đổi từ dạng sợi rời, cụm hạt (pellet) đến dạng màng. Hình thái này ảnh hưởng đến sự khuếch tán chất dinh dưỡng, oxi và thải sản phẩm. Trong nghiên cứu tổng quan của Lu và cs. (2024) đã trình bày toàn diện về các dạng hình thái (morphology) của nấm sợi trong nuôi cấy dịch thể và ảnh hưởng của chúng đến quá trình lên men. Theo nghiên cứu, hệ sợi nấm trong môi trường lỏng có thể tồn tại dưới ba dạng chính: sợi phân tán (dispersed hyphae), cụm sợi hoặc pellet (clump/aggregate), và màng bề mặt (biofilm hoặc mat formation). Mỗi dạng morphology ảnh hưởng khác nhau đến khả năng khuếch tán oxi, dinh dưỡng, và sự thải sản phẩm trao đổi chất. Việc điều chỉnh hình thái thông qua tốc độ khuấy, bọt khí, pH và thành phần môi trường là chiến lược hiệu quả để tối ưu hóa năng suất lên men [106]. Nghiên cứu của Veiter và cs. (2018) cũng chỉ ra rằng có mối liên hệ giữa hình thái hệ sợi nấm (đặc biệt là dạng pellet) và năng suất sinh học trong quá trình nuôi cấy dịch thể. Tác giả nhấn mạnh rằng hình thái là yếu tố quyết định đến hiệu quả khuếch tán oxi, chất dinh dưỡng và khả năng loại bỏ sản phẩm thải, từ đó ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất enzyme và chất chuyển hóa thứ cấp. Pellet có kích thước vừa phải (~0.5–1.0 mm) thường cho kết quả tốt nhất, vì tối ưu hóa tỷ lệ bề mặt/khối lượng, giúp tăng cường trao đổi chất mà không làm tăng độ nhớt môi trường. Pellet quá lớn làm hạn chế khuếch tán vào vùng trung tâm, gây thiếu oxi cục bộ, trong khi dạng sợi rời làm tăng độ nhớt và giảm hiệu quả trộn. Nghiên cứu kết luận rằng việc kiểm soát hình thái sợi nấm là một công cụ quan trọng để tối ưu hóa quá trình lên men công nghiệp [107].

1.4.3.4. Các yếu tố sinh học và điều kiện nuôi cấy

a. Chủng nấm

Mỗi loài và mỗi chủng nấm có tiềm năng sinh trưởng và tổng hợp hoạt chất khác nhau. Việc chọn lọc giống và cải biến di truyền có thể nâng cao năng suất đáng kể.

b. Tuổi cấy và tỷ lệ cấy

Tuổi và tỷ lệ của giống cấy ảnh hưởng đến khả năng thích nghi và tốc độ sinh trưởng ban đầu. Nếu tuổi giống quá già hoặc quá non sẽ kéo dài giai đoạn pha lag làm giảm năng suất. Tỷ lệ cấy quá thấp sẽ kéo dài pha lag, trong khi tỷ lệ cao có thể gây cạnh tranh chất dinh dưỡng và oxi [98].

Tóm lại, nuôi cấy dịch thể là công nghệ hiệu quả trong sản xuất sinh khối và hoạt chất sinh học từ nấm dược liệu. Tuy nhiên, hiệu quả của quá trình phụ thuộc vào nhiều yếu tố như thành phần môi trường, điều kiện vật lý, hình thái hệ sợi, giai đoạn phát triển,

và đặc điểm chủng nấm. Việc hiểu rõ và tối ưu hóa các yếu tố này sẽ giúp nâng cao năng suất và chất lượng sản phẩm. Trong bối cảnh công nghiệp hóa sản xuất dược liệu, sự kết hợp giữa công nghệ nuôi cấy và kỹ thuật sinh học phân tử hứa hẹn mở ra hướng đi mới cho việc khai thác tiềm năng của nấm dược liệu. Tuy vậy, với xu hướng sử dụng nguyên liệu tái chế, kết hợp lên men dịch thể và công nghệ sinh học enzyme, SmF hứa hẹn sẽ trở thành nền tảng bền vững để sản xuất sinh khối và hợp chất chức năng từ *C. militaris* và *T. versicolor*. Xu hướng toàn cầu hiện nay cho thấy nuôi cấy dịch thể không còn chỉ là giải pháp thay thế cho nuôi cấy truyền thống, mà đã trở thành một công nghệ chiến lược trong sản xuất dược liệu, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và prebiotic từ nấm. Việc chủ động kiểm soát môi trường nuôi, tối ưu hóa sinh khối và hoạt chất, kết hợp với khả năng mở rộng quy mô dễ dàng, đã giúp nuôi cấy dịch thể trở thành hướng đi có tiềm năng kinh tế – khoa học – công nghệ rất lớn. Những thành tựu quốc tế trong lĩnh vực này có thể trở thành hình mẫu cho các quốc gia như Việt Nam trong việc phát triển chuỗi giá trị nấm dược liệu công nghệ cao.

1.5. Tổng quan về khả năng kháng oxy hóa

1.5.1. Khái niệm và cơ chế

Khả năng kháng oxy hóa là thuật ngữ dùng để mô tả năng lực của một chất hoặc hệ thống sinh học trong việc vô hiệu hóa các gốc tự do (free radicals) và các loại oxy phản ứng (ROS), từ đó bảo vệ tế bào khỏi tổn thương oxy hóa. Gốc tự do là những phân tử hoặc nguyên tử có electron độc thân, rất dễ phản ứng và có khả năng gây tổn thương DNA, lipid, protein và các thành phần thiết yếu khác trong tế bào, dẫn đến lão hóa sớm và góp phần vào sự phát triển của nhiều bệnh lý như ung thư, tim mạch, thoái hóa thần kinh và tiểu đường [108].

Cơ chế kháng oxy hóa có thể được chia thành hai nhóm chính: Kháng oxy hóa enzyme (enzymatic antioxidants) và kháng oxy hóa không enzyme (non-enzymatic antioxidants). Các enzyme nội sinh như superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) và glutathione peroxidase (GPx) tham gia loại bỏ ROS sinh ra trong quá trình chuyển hóa tế bào.

Trong khi đó, các chất kháng oxy hóa không enzyme thường là các hợp chất có nguồn gốc ngoại sinh như polyphenol, flavonoid, vitamin C, vitamin E, carotenoid hoặc cordycepin chủ yếu hoạt động thông qua cơ chế quét gốc tự do trực tiếp. Cơ chế này bao gồm việc các phân tử kháng oxy hóa hiến tặng electron hoặc nguyên tử hydro để trung hòa các gốc tự do, qua đó ngăn chặn phản ứng dây chuyền gây tổn thương oxy hóa. Ví

dụ, acid ascorbic (vitamin C) và các flavonoid có cấu trúc vòng thơm mang nhóm hydroxyl dễ bị oxi hóa, cho phép chúng loại bỏ các gốc như DPPH•, O₂•⁻, OH• hoặc H₂O₂ một cách hiệu quả [109,110]. Đây là cơ chế cốt lõi làm nền tảng cho các phương pháp đánh giá hoạt tính kháng oxi hóa in vitro như DPPH, ABTS, và FRAP.

Ngoài việc trung hòa gốc tự do theo cách vật lý – hóa học, một cơ chế điều hòa di truyền quan trọng là con đường tín hiệu Nrf2–Keap1–ARE. Trong điều kiện bình thường, yếu tố phiên mã Nrf2 bị giữ lại trong bào tương bởi protein Keap1. Khi xuất hiện stress oxi hóa, Nrf2 tách khỏi Keap1, di chuyển vào nhân và gắn vào vùng ARE (antioxidant response element), từ đó kích hoạt biểu hiện các gen mã hóa enzyme bảo vệ như HO-1, NQO1 và GST [111]. Vì vậy, các chất kháng oxi hóa không chỉ có vai trò trực tiếp quét gốc tự do mà còn có khả năng kích hoạt hệ thống bảo vệ nội sinh của cơ thể ở cấp độ phân tử.

1.5.2. Khả năng kháng oxi hóa của một số hợp chất có trong *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*

Nấm dược liệu từ lâu đã được sử dụng trong y học cổ truyền và ngày càng được chú ý như những nguồn chất kháng oxi hóa tự nhiên phong phú. Trong số đó, *C. militaris* và *T. versicolor* nổi bật nhờ đa dạng các hợp chất hoạt tính sinh học có khả năng chống lại stress oxi hóa thông qua nhiều cơ chế hỗ trợ nhau.

C. militaris chứa nhiều hợp chất hoạt tính như cordycepin (3'-deoxyadenosine), nucleotid, polysaccharide, sterol như ergosterol và lovastatin, cùng với ergothioneine [112]. Cordycepin – một phân tử nhỏ có cấu trúc tương tự adenosine là một chất kháng oxi hóa và kháng viêm chủ lực. Trong các mô hình in vitro, nó làm giảm sự hình thành ROS và MDA, đồng thời làm tăng hoạt tính của enzyme kháng oxi hóa như SOD và GPx trong các tế bào thần kinh được xử lý bằng 6-hydroxydopamine; chiết xuất n-hexane ở nồng độ thấp (5 µM) cũng ghi nhận hiệu quả tương tự (GPx tăng +25,6%, SOD tăng +20,5%) [113]. Ngoài ra, cordycepin còn bảo vệ thần kinh và chống mệt mỏi: ở mô hình chuột chạy trên máy, liều 10 mg/kg làm tăng biểu hiện BDNF, Nrf2 và HO1 ở hồi hải mã, ức chế Keap1 và cải thiện trí nhớ, gợi ý rõ vai trò điều hòa kháng oxi hóa [114].

Các PS chiết xuất từ *C. militaris* bao gồm nội bào, ngoại bào và từ chất nền nuôi trồng còn lại cũng cho thấy tiềm năng kháng oxi hóa mạnh. Một chiết xuất bằng enzyme (EPCMa) kích hoạt con đường Nrf2/HO-1, tăng cường các enzyme kháng oxi hóa nội sinh và ức chế ROS cũng như peroxid hóa lipid [23]. Nhiều nghiên cứu độc lập khác xác nhận hoạt tính quét gốc tự do phụ thuộc liều của các PS này, đặc biệt là khả năng

giảm đáng kể gốc hydroxyl. Do đó, các phân tử nhỏ và đại phân tử hoạt động cùng nhau để loại bỏ ROS và điều hòa biểu hiện gen kháng oxi hóa. Bổ sung vào đó là các hợp chất phenolic và ergothioneine là một loại thiol tự nhiên có đặc tính ổn định sinh học – đóng vai trò bảo vệ thần kinh và trung hòa peroxide. Các nhóm chất này không chỉ có khả năng quét gốc tự do mà còn điều hòa biểu hiện gen liên quan đến cân bằng oxi hóa tế bào. Đáng chú ý, cơ chế kháng oxi hóa của cordycepin có thể góp phần vào lợi ích tim mạch thông qua việc làm giảm viêm mãn tính và tổn thương oxi hóa tế bào. Tuy nhiên, các thử nghiệm lâm sàng giai đoạn III quy mô lớn vẫn còn thiếu.

Trametes versicolor là một loài nấm mục sống hoại sinh có hoạt tính kháng oxi hóa mạnh mẽ. Thành phần hoạt chất gồm β -glucan gắn protein (như PSK, ~100 kDa) và polysaccharopeptide (PSP), cùng với các hợp chất phenolic, flavonoid, terpenoid và acid p-hydroxybenzoic, tất cả đều có khả năng trung hòa gốc tự do.

Trong các phân tích in vitro sử dụng phương pháp DPPH, ABTS, và FRAP, chiết xuất methanol của *T. versicolor* có IC₅₀ khoảng 5,6 μ g/mL, trong khi chiết xuất acetone đạt mức ức chế gốc tự do 50,9% ở 500 μ g/mL [115]. Phân tích LC-MS cho thấy có tới 28 hợp chất phenolic khác nhau. Chiết xuất methanol và nước có hàm lượng phenol và flavonoid cao, tương quan mạnh với hoạt tính kháng oxi hóa tổng thể [116]. Trong số đó, acid p-hydroxybenzoic được xác định là hợp chất chính có khả năng quét gốc mạnh. Về khả năng điều hòa miễn dịch, PSK – một β -glucan được phê duyệt tại Nhật Bản như thuốc hỗ trợ điều trị ung thư – đã cho thấy hiệu quả trong việc kéo dài sống sót và kích thích các cơ chế bảo vệ kháng oxi hóa ở gan và tế bào miễn dịch [8]. Dù vậy, dữ liệu lâm sàng trực tiếp đánh giá chỉ dấu stress oxi hóa ở người còn hạn chế.

Các tổng quan gần đây xác nhận vai trò của các polyphenol, terpenoid và các hợp chất kháng oxi hóa trong *T. versicolor* [31]. Healthline nhấn mạnh rằng nấm này chứa hơn 35 loại hợp chất phenolic, bao gồm quercetin và baicalein, có khả năng ức chế hoạt động của COX và LOX, từ đó làm giảm stress oxi hóa do viêm. *C. militaris* và *T. versicolor* đều chứa tổ hợp đa hợp chất kháng oxi hóa, bao gồm phân tử nhỏ như cordycepin, phenol, ergothioneine và PS lớn như PSK, PSP có khả năng quét ROS, tăng cường enzyme nội sinh và điều hòa miễn dịch. Kết quả tiền lâm sàng rất hứa hẹn; để chuyển sang ứng dụng lâm sàng cần có dữ liệu từ thử nghiệm người, nghiên cứu cơ chế sâu hơn và chuẩn hóa chiết xuất.

*Phân tích tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước có thể thấy rằng việc nghiên cứu các điều kiện nhằm thu sinh khối sợi nấm trong môi trường dịch thể, cũng như việc

phân tích, đánh giá tầm quan trọng của các hợp chất trong quả thể nấm và hệ sợi nấm đang thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học và đã có nhiều công bố có tính khoa học và thực tiễn cao để tiến tới sản xuất công nghiệp tạo ra nguồn sinh khối hữu cơ đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng cũng như nhu cầu sức khỏe của con người hiện nay. Tuy nhiên, các sản phẩm prebiotic hiện nay bổ sung và thực phẩm nhằm cải thiện sức khỏe đường ruột chủ yếu chiết xuất từ thực vật. Nhiều nghiên cứu trên thế giới cho thấy PS kháng tiêu hoá chiết xuất từ nấm có khả năng kích thích probiotic và ức chế vi sinh vật gây bệnh, đặc biệt là beta glucan từ sợi nấm. Vì vậy, việc đa dạng nguồn cơ chất sản xuất prebiotic, tạo ra sản phẩm có hoạt tính sinh học cao cải thiện sức khỏe sinh vật chủ là vấn đề hết sức cấp thiết. Hơn tất cả, nấm và sợi nấm là nguồn cơ chất tiềm năng cho vấn đề này, trong đó việc lên men sinh khối sợi giúp rút ngắn thời gian nuôi cấy, chủ động điều khiển công nghệ tiến tới hiện đại hóa công nghiệp hóa sản xuất nguyên liệu cho thực phẩm và dược phẩm là vấn đề đang được quan tâm. Kết quả nghiên cứu đánh giá hoạt tính prebiotic từ sợi nấm là một trong những giải pháp hữu ích làm đa dạng nguồn prebiotic cung cấp cho công nghệ dược phẩm, thực phẩm và ứng dụng trong chăn nuôi nhằm tăng cường sự đa dạng và nâng cao hoạt tính các loại prebiotic, đồng thời giảm thời gian nuôi trồng và chi phí sản xuất.

Kết luận tổng quan

Cordyceps militaris và *Trametes versicolor* là hai loài nấm dược liệu sở hữu hệ polysaccharide phong phú với hoạt tính sinh học đa dạng. Tuy nhiên, phần lớn các nghiên cứu trong nước hiện nay vẫn tập trung vào việc nuôi trồng và khai thác quả thể. Trong khi đó, tài liệu quốc tế đã khẳng định tiềm năng to lớn của công nghệ nuôi cấy dịch thể (SmF) trong việc thu nhận sinh khối hệ sợi chất lượng cao, giúp rút ngắn thời gian, kiểm soát tốt quy trình và dễ dàng mở rộng quy mô công nghiệp – một hướng đi phù hợp với xu thế hiện đại hóa ngành dược liệu. Mặc dù hoạt tính kháng oxy hóa của hai loài nấm này đã được chứng minh rộng rãi, nhưng tiềm năng prebiotic của polysaccharide từ hệ sợi nấm vẫn là một khoảng trống lớn trong bức tranh nghiên cứu tại Việt Nam. Trong bối cảnh nhu cầu tìm kiếm các nguồn prebiotic mới, an toàn và hiệu quả để thay thế nguồn gốc thực vật ngày càng tăng, việc đánh giá khả năng hỗ trợ hệ vi sinh vật đường ruột của nấm là một hướng đi mới mẻ và cấp thiết. Các phương pháp chiết xuất truyền thống đơn lẻ thường bỏ sót các nhóm polysaccharide liên kết chặt trong thành tế bào (như β -glucan không tan). Việc áp dụng quy trình chiết xuất phân đoạn kết hợp (nước nóng, kiềm, acid) là cần thiết để tận thu tối đa các hợp chất có hoạt tính sinh học cao.

Khác biệt với các nghiên cứu trước đây thường tập trung vào quả thể hoặc các hoạt tính dược lý cổ điển, đề tài này tập trung vào các điểm mới chính:

- Khai thác sinh khối hệ sợi thông qua nuôi cấy dịch thể thay vì quả thể, hướng tới quy trình sản xuất bền vững.

- Tập trung đánh giá chuyên sâu hoạt tính prebiotic của polysaccharide nấm – một hướng ứng dụng mới tại Việt Nam, bên cạnh hoạt tính kháng oxi hóa.

- So sánh song song tiềm năng sinh học giữa hai đại diện tiêu biểu của ngành Nấm túi (*C. militaris*) và Nấm đảm (*T. versicolor*) trên cùng một hệ điều kiện nuôi cấy và chiết xuất, từ đó cung cấp cơ sở khoa học tin cậy cho việc phát triển các sản phẩm thực phẩm chức năng thể hệ mới hỗ trợ sức khỏe đường ruột.

- Ứng dụng sinh khối hệ sợi nấm vào quy trình chế biến thực phẩm thực tế “Nước nấm Bào ngư lên men bổ sung hệ sợi nấm *Trametes versicolor*”. Đây là mô hình sản phẩm mới, kết hợp lợi ích của nấm dược liệu và công nghệ lên men lactic, tạo ra sản phẩm đồ uống định hướng chức năng giàu hoạt tính sinh học (kháng khuẩn, prebiotic, kháng oxi hóa).

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

- Chủng nấm *C. militaris* và *T. versicolor* được lưu trữ tại bộ sưu tập giống của phòng thí nghiệm Công nghệ Nấm, thuộc Khoa Sinh – Nông nghiệp – Môi trường, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng. Danh pháp các chủng đã được kiểm chứng thông qua phân tích trình tự một chiều (gen ITS), với độ tương đồng 100% so với chủng chuẩn trên GenBank.

- Chủng *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1 (trước đây là *Lactobacillus plantarum* WCFS1) sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi Đại học Khoa học Đời sống Na Uy (NMBU), Ås, Na Uy. Chủng được phân lập từ nước bọt người theo phương pháp mô tả trong nghiên cứu gốc của Kleerebezem (2003) [117].

- Chủng *Lactiplantibacillus casei* - 01 và *Bifidobacteria animalis* YC381 dạng bột sấy phun của Công ty Chr. Hansen (Đan Mạch), được cung cấp bởi chi nhánh công ty Chr. Hansen Malaysia Sdn. Bhd. Tại Việt Nam (địa chỉ: tầng 16 tòa nhà Bitexco, số 02 đường Hải Triều, Phường Bến Nghé, Quận 1, Thành phố Hồ Chí Minh). Mật số vi khuẩn ban đầu là 10^{11} CFU/g được bảo quản ở nhiệt độ -18°C theo quy định của nhà sản xuất.

- Chủng *Lactiplantibacillus pentosus* NH1 và *Pediococci acidilactici* NBD8 được cung cấp từ trường Đại học Bách Khoa – Đại học Đà Nẵng. Chủng này đã được định danh bằng giải trình tự gene 16S rRNA (Genbank: PP064920 và PP064833) và lưu giữ trong bộ sưu tập giống vi sinh vật của phòng thí nghiệm.

- Chủng hại khuẩn *Escherichia coli* ATCC 85922 và *Staphylococcus aureus* ATCC 25023 hãng sản xuất: MicroBiologics - Mỹ, được cung cấp bởi viện Công nghệ sinh học – Đại học Huế.

- Prebiotic thương mại FOS được cung cấp bởi công ty CP Dược phẩm Novaco (Số 6P, đường Đặng Văn Ngữ, Nam Đồng, Đống Đa, Hà Nội).

- Quả thể nấm bào ngư tím (*Pleurotus ostreatus*) thu mua tại trại nấm Quỳnh Tâm-Hòa Phong – Hòa Vang – Thành phố Đà Nẵng.

2.2. Hóa chất, thiết bị và dụng cụ

2.2.1. Hóa chất

- Enzyme α -amylase mua tại Công ty TNHH Công nghệ sinh học Aoboxing (Bắc Kinh, Trung Quốc), hoạt độ ≥ 3700 U/g; ABTS mua tại công ty Roche (Đức); DNS được sản xuất tại công ty hoá chất Zhongyu (Thượng Hải, Trung Quốc); Pepton và cao nấm men được sản xuất bởi HiMedia (Ấn Độ), Cồn 99,7% (Vietnam) và tất cả các hoá chất khác (K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Na_2HPO_4 , CH_3COONa , $K_2S_2O_8$...) được mua từ Guangdong Guanghua Sci-Tech Co.,Ltd (Quảng Đông, Trung Quốc).

- Các acid béo mạch ngắn chuẩn: acid propionic 99,2% (CAS No. 79-09-4, CPChem Ltd, Bulgaria); acid acetic 99,9% (CAS No. 64-19-7, CPChem Ltd, Bulgaria), acid butyric 98,8% (CAS No. 107-92-6, CPChem Ltd, Bulgaria).

2.2.2. Thiết bị và dụng cụ

- Máy ly tâm lạnh Hermle: Model Z 446 K (Đức)
- Máy lắc ổn nhiệt: Model: 1083, Nhà sản xuất: GFL (Đức)
- Máy khuấy từ gia nhiệt
- Máy quang phổ UV-VIS: Jasco 760
- Nồi hấp tiệt trùng: Model ALP MC-105L (Nhật Bản).
- Tủ ẩm CO_2 : Model ICO50med, Memmert (Đức).
- Sắc ký lỏng cao áp (HPCL) Ultimate 3000 - Dionex (Mỹ).
- Một số thiết bị cơ bản khác trang bị trong phòng thí nghiệm.

2.3. Phạm vi

- Về nội dung:

+ Đề tài tập trung tối ưu hóa quy trình nuôi cấy dịch thể để thu sinh khối hệ sợi nấm, không nghiên cứu nuôi trồng quả thể hay lên men trên cơ chất rắn.

+ Sử dụng phương pháp chiết xuất tuần tự phân đoạn bằng các dung môi theo trình tự: nước nóng (HWE), kiềm (AE) và acid (AEc) để thu nhận các phân đoạn polysaccharide (PS) đa dạng về cấu trúc và độ tan.

+ Đánh giá hoạt tính sinh học:

Hoạt tính kháng oxi hóa được đánh giá in vitro thông qua khả năng trung hòa gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$.

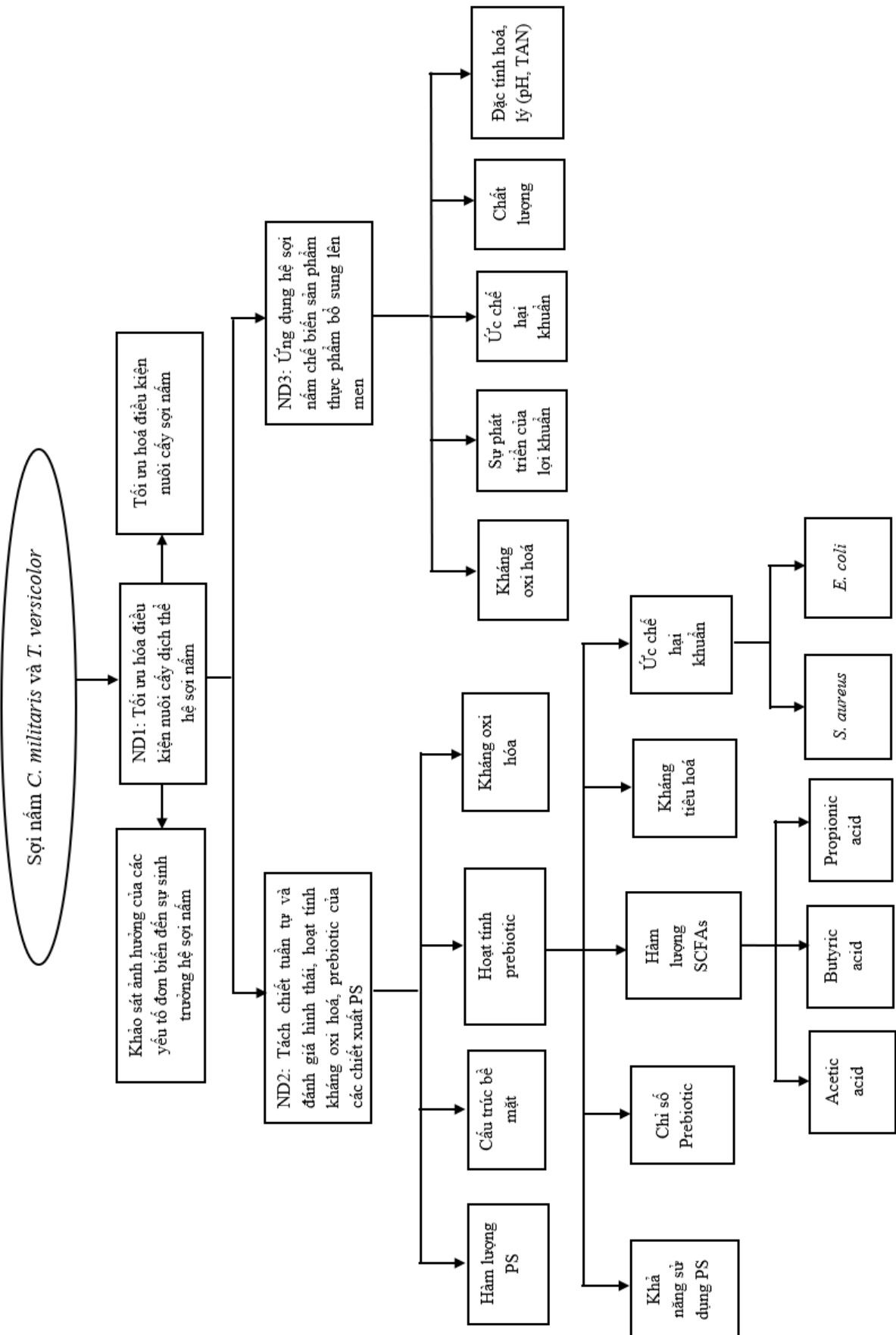
Tiềm năng prebiotic được đánh giá thông qua chỉ số prebiotic (PI), khả năng kháng enzyme tiêu hóa (α -amylase), khả năng sinh acid béo chuỗi ngắn (SCFAs) và khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh trong điều kiện nuôi cấy in vitro.

+ Ứng dụng sinh khối sợi nấm vào quy trình chế biến sản phẩm nước nấm Bào ngư lên men lactic, đánh giá các chỉ tiêu chất lượng cảm quan, hoá lý và vi sinh của sản phẩm.

- Về không gian: Nghiên cứu được thực hiện tại các phòng thí nghiệm Sinh học tại Khoa Sinh – Nông nghiệp – Môi trường, Trường Đại học Sư Phạm – Đại học Đà Nẵng và Khoa Hóa, Trường Đại học Bách Khoa – Đại học Đà Nẵng; các chỉ tiêu đánh giá an toàn thực phẩm (kim loại nặng và vi sinh) được gửi phân tích tại Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 2 (QUATEST 2).

- Về thời gian: Nghiên cứu được thực hiện trong khoảng thời gian 4 năm từ 2021 đến 2025.

2.4. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ tổng quát các nội dung nghiên cứu

2.5. Phương pháp thực hiện các nội dung nghiên cứu

2.5.1. Nội dung 1: Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể nhằm thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm

Mục đích: Xác định điều kiện pH, glucose và cao nấm men phù hợp cho sự phát triển của sợi nấm nhằm thu nhận PS với hàm lượng cao nhất, qua đó nâng cao hiệu suất sản xuất.

a. Phương pháp nuôi cấy hệ sợi nấm

Nấm *C. militaris* và *T. versicolor* được nhân giống cấp 1 trong các đĩa petri thủy tinh (90 mm × 15mm) với thành phần môi trường gồm: khoai tây (200 g/L), glucose (20 g/L) và agar (15 g/L), ủ ở 23 - 25°C trong 10 ngày. Sau đó, từ các đĩa tiến hành nuôi cấy hệ sợi nấm cấp 2 trên môi trường dịch thể bằng 2 phương pháp nuôi cấy lắc và tĩnh. Môi trường nuôi trồng dịch thể với các thành phần tương ứng với từng điều kiện cụ thể như sau: Khoai tây 200g/L, glucose 20 – 40 g/L, cao nấm men: 2 – 5 g/L, pepton 2 – 3 g/L, pH: 5 – 6. Cho 150mL môi trường trên vào các bình tam giác (250mL). Hấp khử trùng bằng hơi nước nóng ở 121°C trong vòng 20 phút, để nguội tự nhiên cho nhiệt độ hạ xuống dưới 30°C. Dùng que cấy chia nhỏ hệ sợi nấm trong đĩa thành phần bằng nhau 0,5 × 0,5 cm, sau đó nhanh chóng cấy vào bình đựng môi trường dung dịch (gạt bỏ lớp thạch phía dưới hệ sợi); 1 đĩa gốc/cấp 1 có thể cấy được 25-30 bình dịch. Giống sau khi cấy giống xong, được để tĩnh trong thời gian 24 giờ. Tiến hành nuôi hệ sợi nấm bằng hai phương pháp là nuôi tĩnh và nuôi lắc. Điều kiện nuôi lắc: cường độ 150 vòng/phút, nhiệt độ 22°C đối với nấm *C. militaris* và 27°C đối với nấm *T. versicolor*, tối hoàn toàn và độ ẩm không khí 65 – 70%. Giống cấp 2 dịch thể phải được kiểm tra hàng ngày. Loại bỏ các trường hợp bị nhiễm khuẩn, nhiễm mốc, giữ lại các bình giống có hệ sợi sinh trưởng khỏe, khuẩn lạc cầu phát triển đồng đều. Sau 10 ngày nuôi lắc và 20 ngày nuôi tĩnh thì hệ sợi nấm sinh trưởng và phát triển tốt, tiến hành thu hoạch và sấy khô ở 50°C [118].

b. Đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố đơn biến đến năng suất sinh khối và hàm lượng PS nấm *C. militaris*

- Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của pH. Hệ sợi nấm được nuôi trong môi trường PDB⁺ với pH ở các giá trị: 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0. Điều chỉnh pH dung dịch bằng HCl 0,1 N và dung dịch NaOH 0,1 N. Các bước thí nghiệm tiến hành như phương pháp nuôi cấy dịch thể và thu sinh khối hệ sợi nấm. Kết thúc quá trình nuôi cấy, tiến hành thu

hoạch, sấy khô sinh khối ở 50°C đến khối lượng không đổi. Chỉ tiêu đánh giá bao gồm: Trọng lượng sinh khối khô (g/L) và hàm lượng PS (%).

- Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng glucose. Hệ sợi nấm được nuôi trong môi trường PDB⁺ với pH tối ưu (tương ứng lượng sinh khối thu được lớn nhất) được điều chỉnh từ thí nghiệm 1, sau đó bổ sung glucose với hàm lượng lần lượt là 30, 35, 40, 45 và 50 g/L. Các bước thí nghiệm tiếp theo tiến hành như thí nghiệm 1

- Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng cao nấm men với sự điều chỉnh pH tối ưu từ thí nghiệm 1 và bổ sung thêm glucose tối ưu được xác định từ thí nghiệm 2, sau đó bổ sung cao nấm men với hàm lượng lần lượt là 2, 3, 4, 5 và 6 g/L. Các bước thí nghiệm tiếp theo tiến hành như thí nghiệm 1 và 2.

Bảng 2.2. Tóm tắt bố trí thí nghiệm OFAT nấm *T. versicolor*

Yếu tố khảo sát	Yếu tố cố định
pH ở các giá trị: 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0	Môi trường PDB ⁺ (glucose 20g/L, CNM 4g/L)
glucose với hàm lượng lần lượt là 30, 35, 40, 45 và 50 g/L	Môi trường PDB ⁺ (CNM 4g/L), pH đã chọn
cao nấm men với hàm lượng lần lượt là 2, 3, 4, 5 và 6 g/L	Môi trường PDB ⁺ , pH đã chọn và glucose đã chọn

c. Đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố đơn biến đến năng suất sinh khối và hàm lượng PS nấm *T. versicolor*

- Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của pH Hệ sợi nấm được nuôi trong môi trường PDB⁺ với pH ở các giá trị: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0. Điều chỉnh pH dung dịch bằng HCl 0,1 N và dung dịch NaOH 0,1 N. Các bước thí nghiệm tiến hành như phương pháp nuôi cấy dịch thể và thu sinh khối hệ sợi nấm

- Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng glucose Hệ sợi nấm được nuôi trong môi trường PDB⁺ với pH tối ưu (tương ứng lượng sinh khối thu được lớn nhất) được điều chỉnh từ thí nghiệm 1, sau đó bổ sung glucose với hàm lượng lần lượt là 10, 15, 20 và 25 g/L. Các bước thí nghiệm tiếp theo tiến hành như thí nghiệm 1

- Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng cao nấm men Hệ sợi nấm được nuôi trong môi trường PDB⁺ với sự điều chỉnh pH tối ưu từ thí nghiệm 1 và bổ sung thêm glucose tối ưu được xác định từ thí nghiệm 2, sau đó bổ sung cao nấm men với

hàm lượng lần lượt là 1; 1,5; 2 và 2,5 g/L. Các bước thí nghiệm tiếp theo tiến hành như thí nghiệm 1 và 2.

Bảng 2.3. Tóm tắt bố trí thí nghiệm OFAT nấm *C. militaris*

Yếu tố khảo sát	Yếu tố cố định
pH ở các giá trị: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5	Môi trường PDB ⁺ (glucose 20g/L, CNM 2g/L)
glucose với hàm lượng lần lượt là 10, 15, 20 và 25 và 30 g/L	Môi trường PDB ⁺ (CNM 2g/L), pH đã chọn
cao nấm men với hàm lượng lần lượt 1; 1,5; 2; 2,5 và 3 g/L	Môi trường PDB ⁺ , pH đã chọn và glucose đã chọn

d. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm

Dựa trên các khoảng giá trị tiềm năng thu được từ kết quả khảo sát đơn yếu tố, ba biến độc lập bao gồm pH, nồng độ glucose và hàm lượng cao nấm men được lựa chọn để tiến hành tối ưu hóa. Thiết kế Box-Behnken (BBD) thuộc mô hình bề mặt đáp ứng (RSM) được áp dụng với cấu trúc 3 mức mã hóa (-1, 0, +1) cho mỗi biến độc lập (**Bảng 2.4**). Mỗi liên hệ toán học biểu diễn sự phụ thuộc của các biến đáp ứng (năng suất sinh khối sợi nấm và hàm lượng PS) vào các biến độc lập được mô tả thông qua phương trình hồi quy đa thức bậc hai tổng quát có dạng:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

Trong đó:

Y: Giá trị dự đoán biến đáp ứng (năng suất sinh khối sợi nấm hoặc hàm lượng PS dự đoán thu được).

b_0 là hệ số tự do

X_i, X_j là nhân tố độc lập ảnh hưởng đến hàm mục tiêu Y

b_i là hệ số hồi quy bậc 1 mô tả ảnh hưởng của yếu tố X_i với Y (tuyến tính)

b_{ii} là hệ số hồi quy tương tác mô tả ảnh hưởng của yếu tố X_i với Y (phi tuyến)

b_{ij} là hệ số hồi quy tương tác mô tả ảnh hưởng đồng thời X_i và X_j với Y

Bảng 2.4. Bố trí thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy

Thí nghiệm thứ	Các yếu tố độc lập		
	pH môi trường	Glucose (g/L)	Cao nấm men (g/L)
1	0	-1	-1
2	-1	1	0
3	0	-1	1
4	0	0	0
5	0	0	0
6	-1	0	1
7	1	-1	0
8	0	1	1
9	0	0	0
10	0	1	-1
11	-1	-1	0
12	-1	0	-1
13	1	0	1
14	1	1	0
15	1	0	-1

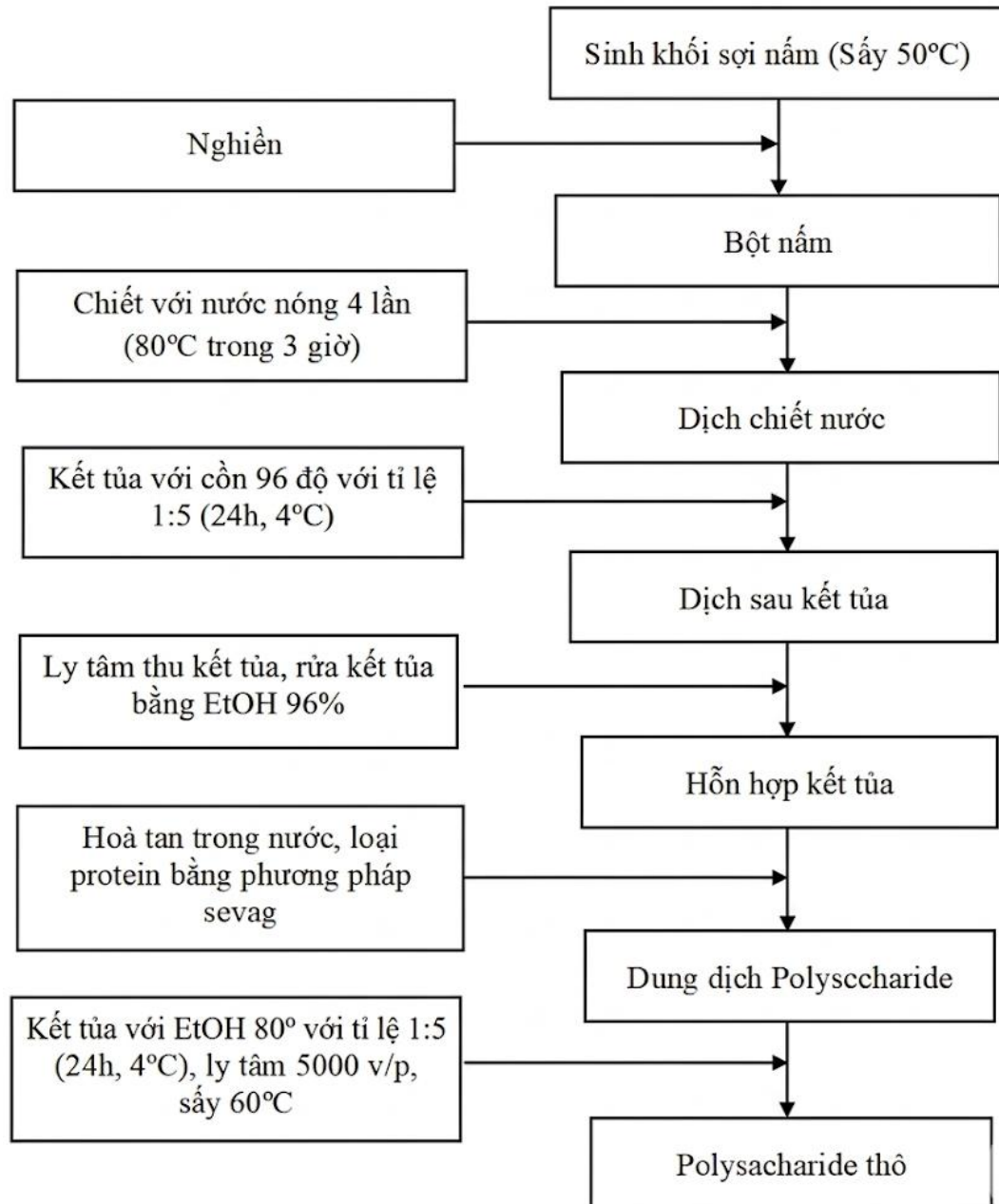
- Phương pháp thu nhận và xác định năng suất sinh khối hệ sợi nấm

Kết thúc thời gian nuôi cấy tĩnh (20 ngày), tiến hành thu nhận sinh khối hệ sợi nấm bằng phương pháp lọc. Sinh khối thu được đem rửa nhiều lần bằng nước cất để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy dư thừa. Sau đó, mẫu được sấy khô ở 50°C cho đến khi đạt khối lượng không đổi (độ ẩm $\cong 13\%$). Khối lượng sinh khối khô được xác định bằng cân phân tích và năng suất sinh khối được biểu diễn dưới dạng g/L (gam sinh khối khô/lít môi trường). Sợi nấm thành phẩm được bảo quản kín trong túi nilon hoặc lọ thủy tinh ở điều kiện tránh ánh sáng trực tiếp để phục vụ cho các phân tích tiếp theo.

- Phương pháp xác định hàm lượng PS hệ sợi nấm

Quy trình chiết PS để định lượng được thực hiện theo phương pháp của Sun và cs. (2005) và có một số sửa đổi. Sinh khối sợi nấm được sấy khô ở 50°C đến khối lượng không đổi, sau đó nghiền thành bột mịn và ngâm với nước nóng 80°C với tỉ lệ 1:20

trong 3h (lặp lại 4 lần). Lọc hỗn hợp thu dịch lọc và rửa với ethanol 96% theo tỉ lệ 1:5 ở 4°C trong 24h. Tiến hành ly tâm hỗn hợp 5000 vòng/phút thu rửa và rửa rửa 2 lần với cồn 96%. Sau đó kết tủa được hòa tan trong nước cất và loại bỏ protein bằng phương pháp Sevag (sử dụng hệ dung môi chloroform:n-butanol với tỷ lệ 4:1, v/v), rửa lại trong ethanol 80% (v/v). Sau khi ly tâm, kết tủa được rửa bằng etanol, sấy ở 60°C đến khối lượng không đổi thu được PS thô. Xác định hàm lượng PS bằng phương pháp phenol – sulfuric [119].



Hình 2.2. Quy trình tách polysaccharide thô từ sinh khối nấm

- PS được xác định bằng phương pháp phenol –sulfuric [120].

Nguyên tắc: Trong môi trường acid mạnh và nóng, thành phần oligosaccharide và PS bị thủy phân, giải phóng monosaccharide. Tiếp đó, chúng bị khử nước và tạo các dẫn xuất furan. Kết quả thu được sản phẩm có màu vàng cam với phenol và độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 490nm.

Các bước tiến hành

+ Lập đường chuẩn D-Glucose: 10-500 µg/mL

Dùng pipet chuyên 1ml mẫu (trong suốt) vào ống nghiệm, một mẫu trắng (nước cất) cũng được chuẩn bị. Thêm 1mL phenol 5% vào hỗn hợp mẫu. Thêm nhanh 5mL acid sulfuric đậm đặc (khi thêm acid H₂SO₄ vào nước sinh ra lượng nhiệt lớn). Sản phẩm phản ứng có màu vàng cam. Lắc đều mẫu và đợi phản ứng trong vòng 20 phút. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 490 nm.

+ Làm mẫu định lượng tương tự đường chuẩn

+ Xây dựng đường chuẩn D-Glucose (**Phụ lục 5.9**).

+ Tham chiếu đường chuẩn đã lập tính toán được hàm lượng PS tổng. Hàm lượng PS được tính theo phương trình:

$$\text{Hàm lượng \% PS} = \frac{OD + 0,0356}{0,00912} \times V \times \frac{100}{m \times (1 - w)} \times \frac{162}{180}$$

Trong đó:

% PS tính theo khối lượng khô sợi nấm

V: thể tích dung dịch sau khi hòa tan (mL)

m: khối lượng mẫu ban đầu (g)

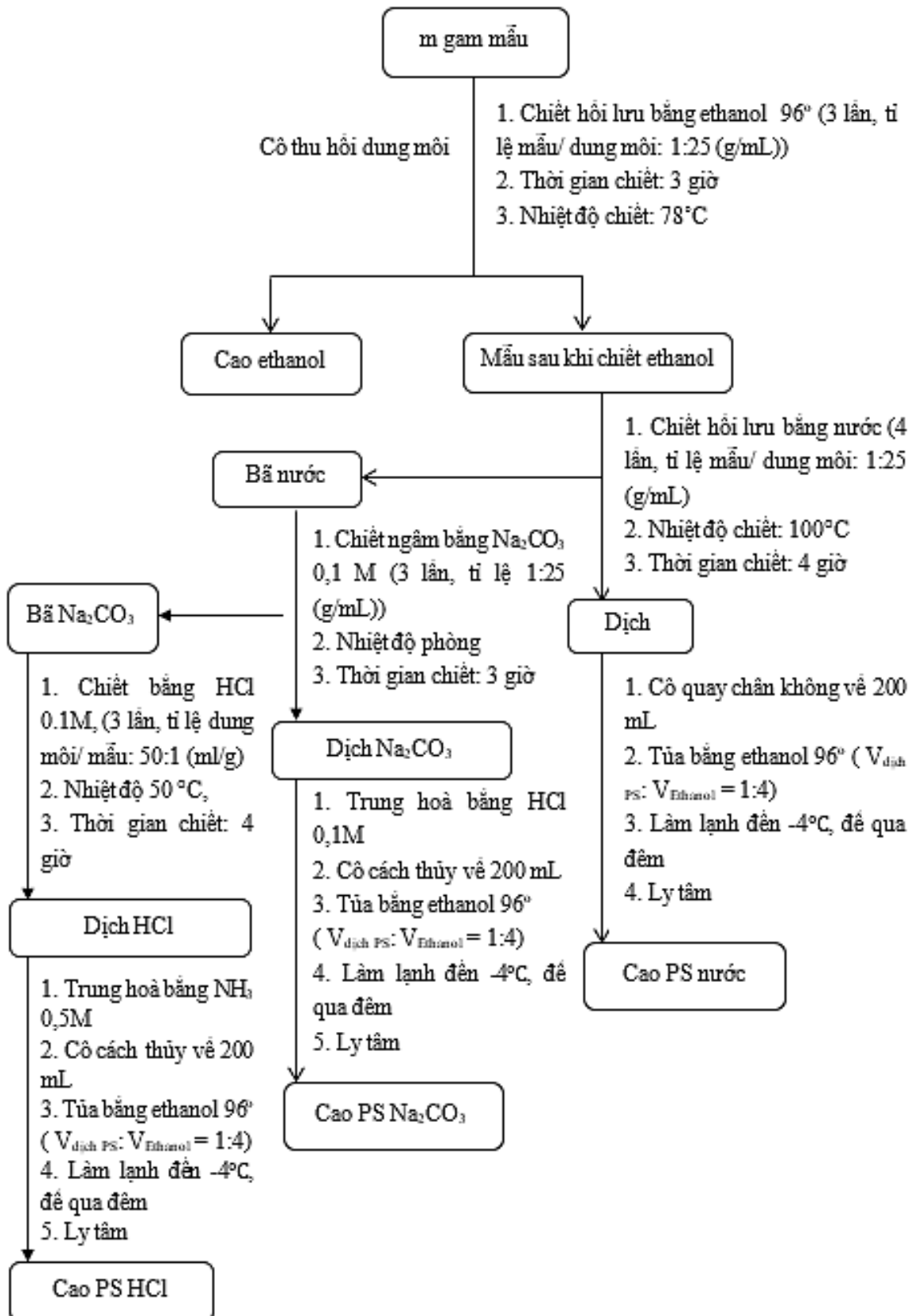
w: độ ẩm của mẫu (%)

2.5.2. Nội dung 2: Chiết xuất tuần tự và đánh giá hình thái, hoạt tính kháng oxi hoá, prebiotic của các chiết xuất PS

a. Chiết xuất tuần tự và định lượng các phân đoạn polysaccharide hệ sợi nấm

Trong nghiên cứu này, một quy trình tách chiết PS tuần tự với 3 loại dung môi (H₂O, Na₂CO₃, HCL) khác nhau đã được thực hiện dựa trên các nghiên cứu trước của Peng và cs. (2023) Tian và cs. 2024 và Yu và cs. 2024 [121–123], và có một số điều chỉnh. Mục đích của quy trình này là nhằm xác định hàm lượng PS thu được ở từng giai

đoạn dung môi, từ đó làm cơ sở để đánh giá toàn diện hơn về hoạt tính sinh học của các phân đoạn PS chiết xuất từ hệ sợi nấm.



Hình 2.3. Sơ đồ quy trình chiết xuất tuần tự các phân đoạn polysaccharide (PS) từ sinh khối hệ sợi nấm

20 g mẫu bột sợi nấm *C. militaris* ban đầu được chiết hồi lưu bằng ethanol 96% ở 78°C với tỉ lệ mẫu và ethanol là 1:25 (g/mL) trong 3 giờ, lặp lại quá trình chiết 3 lần để thu hết các hợp chất tan trong dung môi, sau đó ly tâm và lọc để loại bỏ phần dịch ethanol.

Mẫu còn lại sau khi loại bỏ ethanol tiếp tục được chiết hồi lưu bằng nước cất ở 100°C với tỉ lệ mẫu (được tính theo khối lượng ban đầu) và nước là 1:25 (g/mL) trong 4 giờ, lặp lại quá trình chiết 3 lần để cho PS hòa tan hết vào trong nước.

Ly tâm và lọc để tách thành 2 phần: dịch chiết nước và bã chiết nước

- Dịch nước được cô quay chân không ở 55°C đến khi về ~200ml, tua với ethanol 96° theo tỷ lệ $V_{\text{dịch PS}} : V_{\text{Ethanol}} = 1:4$, làm lạnh đến -4°C và để qua đêm, sau đó ly tâm, sấy khô ở 55°C rồi thu PS nước. Cân bằng cân phân tích để xác định hàm lượng PS chiết bằng nước.

Cho thêm dung dịch Na_2CO_3 0,1 M vào bã chiết nước theo tỷ lệ 25:1 (ml/g) (tính theo khối lượng mẫu ban đầu) ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ, lặp lại quá trình chiết 3 lần để thu hết PS tan trong dung dịch Na_2CO_3 0,1 M.

Ly tâm và lọc để tách thành 2 phần: dịch chiết Na_2CO_3 và bã chiết Na_2CO_3

- Dịch chiết Na_2CO_3 được trung hòa bằng HCl 0,1M (sao cho phản ứng xảy ra vừa đủ), cô quay chân không ở 55°C đến khi về ~200mL, tua với ethanol 96° theo tỷ lệ $V_{\text{dịch PS}} : V_{\text{Ethanol}} = 1:4$, làm lạnh đến -4°C và để qua đêm. Sau đó ly tâm, sấy khô ở 55°C rồi thu được PS Na_2CO_3 . Cân bằng cân phân tích để xác định hàm lượng PS chiết bằng Na_2CO_3 .

Cho thêm dung dịch HCl 0,1M vào bã chiết Na_2CO_3 theo tỷ lệ 25:1 (ml/g) (tính theo khối lượng mẫu ban đầu) ủ ở 50 °C trong 4 giờ, lặp lại quá trình chiết 3 lần để thu hết PS tan trong dung dịch HCl 0,1M.

Ly tâm và lọc để thu phần dịch chiết HCl, trung hòa dịch chiết HCl bằng dung dịch NH_3 0.5M (sao cho phản ứng xảy ra vừa đủ). Cô quay chân không ở 55°C đến khi về ~200ml, tua với ethanol 96° theo tỷ lệ $V_{\text{dịch PS}} : V_{\text{Ethanol}} = 1:4$, làm lạnh đến -4°C và để qua đêm. Sau đó ly tâm, sấy khô ở 55°C thu được PS Na_2CO_3 . Cân bằng cân phân tích để xác định hàm lượng PS chiết bằng HCl.

Các PS chiết xuất tuần từ nấm *C. militaris* bằng dung môi H_2O , Na_2CO_3 và HCl được ký hiệu lần lượt là: W-PSC; S-PSC và A-PSC. Các PS chiết xuất tuần từ sợi nấm

T. versicolor bằng dung môi H₂O, Na₂CO₃ và HCl được ký hiệu lần lượt là: W-PST; S-PST và A-PST

b. Phân tích hình thái bề mặt các phân đoạn polysaccharide

Bề mặt các phân đoạn polysaccharide chiết được bằng 3 loại dung môi được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) sử dụng thiết bị FEI-Quanta FEG 250 USA với EDAX Element ở điện áp tăng tốc 5,00 kV. Lượng mẫu thích hợp được chuẩn bị bằng cách dán chúng trên một tấm nhôm phẳng bằng chất kết dính dẫn điện và sau đó phủ chúng bằng bột vàng. Mức độ phóng đại của hình ảnh là 1000 lần, 3000 lần, 5000 lần và 10.000 lần [122].

c. Đánh giá khả năng kháng oxi hóa bằng phương pháp ABTS

Hoạt động loại bỏ gốc tự do được xác định bằng phương pháp khử màu ABTS^{•+} mô tả bởi Nenadis và cs. (2004) [124]. Dung dịch ABTS^{•+} được chuẩn bị bằng cách cho 2mL dung dịch ABTS 7 mM và 2 mL dung dịch K₂S₂O₈ 2.45 mM. Ủ dung dịch trong bóng tối 16 giờ, sau đó pha loãng bằng ethanol (khoảng 50 lần), điều chỉnh độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 734 nm có mật độ quang là $0,7 \pm 0,05$. Tiến hành khảo sát hoạt động trung hòa gốc tự do ABTS^{•+} bằng cách cho 990 μ L dung dịch ABTS^{•+} vào 10 μ L PS nấm. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong thời gian 6 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm. Chất đối chứng dương được sử dụng là vitamin C.

Khả năng bắt gốc tự do ABTS^{•+} được tính theo công thức:

$$I(\%) = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%$$

Trong đó: A₀: giá trị mật độ quang của mẫu trắng.

A₁: giá trị mật độ quang của mẫu thử.

d. Đánh giá hoạt tính prebiotic

- Khả năng kích thích vi sinh vật có lợi

Chuẩn bị mẫu

Các mẫu đánh giá là các chiết xuất PS chiết xuất từ nấm *C. militaris* bao gồm: W-PSC, S-PSC, A-PSC; các chiết xuất PS chiết xuất từ nấm *T. versicolor* bao gồm: W-PST, S-PST, A-PST và FOS.

Chuẩn bị vi sinh vật

Lactiplantibacillus plantarum WCFS1, *Lactiplantibacillus pentosus* NH1, *Pediococci acidilactici* NBD8, *Lactiplantibacillus casei* 01 và *Bifidobacteria animalis* YC381 được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy MRS ở 37°C trong 24 giờ. Các khuẩn

lạc thu được đưa vào 10 mL môi trường MRS dạng lỏng, nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ để vi khuẩn tăng trưởng.

Chuẩn bị môi trường

Các công thức nghiên cứu được chuẩn bị như sau:

- Môi trường GF: môi trường MRS đã loại bỏ glucose.
- Môi trường PS: môi trường GF bổ sung 1 g/L PS (W-PSC, W-PST, S-PSC, S-PST, A-PSC, A-PST).
- Môi trường FOS: môi trường GF bổ sung 1g/L prebiotic thương mại (FOS)
- Môi trường Glu: môi trường GF bổ sung 1 g/L glucose.

Cấy 1% (v/v) các chủng lợi khuẩn vào các môi trường ở trên ($\sim 10^8$ CFU/mL) rồi nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, xác định mật độ tế bào ở các công thức thí nghiệm thông qua mật độ quang đo ở bước sóng 600 nm ở thời điểm 0 giờ và 24 giờ [125]. Thí nghiệm này nhằm mục tiêu nghiên cứu khả năng vi khuẩn sử dụng các chiết xuất PS từ sợi nấm và FOS làm carbon do đó số lượng tế bào vi khuẩn được biểu thị bằng sự tích lũy tế bào thay vì đơn vị hình thành khuẩn lạc.

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 15 ống.

- Chỉ số prebiotic

Hoạt tính prebiotic của PS được đánh giá tương tự nghiên cứu của Huebner và cs. (2008) và Phirom-on & Apiraksakorn, (2021) và có một số sửa đổi nhỏ [125,126]. Các chủng lợi khuẩn được nuôi trong các môi trường như thí nghiệm trên. Chủng vi khuẩn gây bệnh *E. coli* ATCC 85922 được nuôi cấy trong M9 lỏng đã loại bỏ glucose (E_{GF}), bổ sung 1 g/L Glucose (E_G), môi trường E_{GF} bổ sung 1 g/L PS của từng chiết xuất và bổ sung 1 g/L prebiotic thương mại (FOS) (E_P). Các chủng vi khuẩn được nuôi ở 37°C trong 24 giờ. Đo mật độ quang của các mẫu tại bước sóng 600 nm (OD_{600}) để xác định khả năng tích lũy sinh khối. Các mẫu được thu thập ở thời điểm 0 và 24 nuôi cấy để đo sự phát triển của tế bào bằng OD_{600} . Chỉ số Prebiotic (PI) được xác định bằng công thức [127]:

$$PI = \left[\frac{(P_P^{24} - P_P^0) - ((P_{GF}^{24} - P_{GF}^0))}{(P_G^{24} - P_G^0) - ((P_{GF}^{24} - P_{GF}^0))} \right] - \left[\frac{(E_P^{24} - E_P^0) - ((E_{GF}^{24} - E_{GF}^0))}{(E_G^{24} - E_G^0) - ((E_{GF}^{24} - E_{GF}^0))} \right]$$

Trong đó:

P_p^0, P_p^{24} – Giá trị OD₆₀₀ của Probiotic ở môi trường chứa 1 g/L prebiotic tại 0 giờ và 24 giờ.

P_{GF}^0, P_{GF}^{24} – Giá trị OD₆₀₀ của Probiotic ở môi trường không bổ sung glucose tại 0 giờ và 24 giờ.

P_G^0, P_G^{24} – Giá trị OD₆₀₀ của Probiotic ở môi trường chứa 1 g/L glucose tại 0 giờ và 24 giờ.

E_p^0, E_p^{24} – Giá trị OD₆₀₀ của *E. coli* ở môi trường chứa 1g/L prebiotic tại 0 giờ và 24 giờ.

E_G^0, E_G^{24} – Giá trị OD₆₀₀ của *E. coli* ở môi trường chứa 1g/L glucose tại 0 giờ và 24 giờ.

E_{GF}^0, E_{GF}^{24} – Giá trị OD₆₀₀ của *E. coli* ở môi trường không bổ sung glucose tại 0 giờ và 24 giờ

- Khả năng kháng tiêu hóa bởi α -amylase

+ **Chuẩn bị môi trường đệm mô phỏng khoang miệng:** Chuẩn bị dung dịch thuốc thử bằng cách hòa tan lần lượt: 0,764 g Sodium chloride (NaCl); 1,491 g Potassium chloride (KCl); 0,133 g Calcium chloride (CaCl₂) vào nước cất với tổng thể tích dung dịch là 1.000 mL. Điều chỉnh pH của dung dịch này về mức 6,9 bằng cách sử dụng dung dịch Sodium bicarbonate 1 M

+ **Chuẩn bị dung dịch enzyme α -amylase:** Cân chính xác 0,345 g α -amylase và hòa tan vào 400 mL dung dịch thuốc thử tiêu hóa mô phỏng đã chuẩn bị ở trên, khuấy đều dung dịch này trong vòng 20 phút để đảm bảo enzyme α -Amylase được hòa tan hoàn toàn.

+ **Ủ mẫu thử và mô phỏng quá trình tiêu hóa:** Lấy mẫu thử lọc, sau đó thêm vào 400 mL dung dịch enzyme α -amylase đã chuẩn bị. Mẫu thử sẽ được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 (tức là 1 mg mẫu thử hòa với 1 mL dung dịch thuốc thử enzyme). Dung dịch mẫu sau đó được đặt vào bể ổn nhiệt ở 37°C để mô phỏng môi trường tiêu hóa trong miệng (tương tự điều kiện trong khoang miệng).

+ **Thu thập mẫu phân tích:** Mẫu phân tích được thu thập tại 0 giờ (trước khi tiêu hóa bắt đầu) và tại các khoảng thời gian 0,5 giờ sau khi bắt đầu. Sau đó, mỗi mẫu sẽ được đun sôi trong 5 phút để làm mất hoạt tính của enzyme α -amylase, tránh việc enzyme tiếp tục thủy phân khi thí nghiệm dừng lại. Sử dụng phương pháp DNS và Phenol – sulfuric acid để xác định lượng đường khử và đường tổng số.

Mức độ thủy phân (%) được tính theo công thức:

$$\text{Mức độ thủy phân} = \frac{\text{Đường khử thủy phân}}{\text{Đường tổng số} - \text{Đường khử không thủy phân}} \times 100$$

Đường khử thủy phân: Là lượng đường khử được tạo ra sau quá trình thủy phân (sau 0,5 giờ).

Đường tổng số: Được xác định từ tổng hàm lượng các loại đường có trong mẫu thử

Đường khử không thủy phân: Lượng đường khử có sẵn trong mẫu trước khi enzyme hoạt động (tại thời điểm 0 giờ).

- Xác định đường tổng số

Đường tổng số được xác định bằng phương pháp phenol-sulfuric acid [120].

Nguyên tắc: Trong môi trường acid mạnh và nóng, thành phần oligosaccharide và PS bị thủy phân, giải phóng monosaccharide (glucose). Tiếp đó, chúng bị khử nước và tạo các dẫn xuất furan. Kết quả thu được sản phẩm có màu vàng cam với phenol và độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 490nm.

Các bước tiến hành

+ Lập đường chuẩn D-Glucose: 10-500 µg/mL

Dùng pipet chuyển 1ml mẫu (trong suốt) vào ống nghiệm, một mẫu trắng (nước cất) cũng được chuẩn bị. Thêm 1mL phenol 5% vào hỗn hợp mẫu. Thêm nhanh 5mL acid sulfuric đậm đặc (khi thêm acid H₂SO₄ vào nước sinh ra lượng nhiệt lớn). Sản phẩm phản ứng có màu vàng cam. Lắc đều mẫu và đợi phản ứng trong vòng 20 phút. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 490 nm.

+ Làm mẫu định lượng tương tự đường chuẩn.

+ Tham chiếu đường chuẩn đã lập (**Phụ lục 5.3**) tính toán được hàm lượng carbohydrate tổng.

- Xác định đường khử

Đường khử được xác định bằng phương pháp DNS [128], các bước tiến hành như sau:

Bước 1. Hòa tan 300g muối Kali natri tartrate trong 500 mL nước cất (còn gọi là dung dịch muối Rochelle). Cho muối vào nước từ từ đến hết.

Bước 2. Chuẩn bị 200 mL dung dịch Sodium hydroxit 2N. Dùng thìa thủy tinh khuấy đến hòa tan hoàn toàn.

Bước 3. Hòa tan 10g DNS trong 200 mL natri hydroxit đã chuẩn bị ở bước 2 (sử dụng máy khuấy từ có gia nhiệt nhẹ).

Bước 4. Trộn dung dịch ở bước 1 và bước 3.

Bước 5. Định mức đến thể tích 1 L.

Bước 6. Bảo quản thuốc thử trong chai thủy tinh sẫm màu (Chuẩn 3 mL thuốc thử DNS bằng HCl 0,1 N với chỉ thị phenolphthalein. Nếu hết 5-6 mL là đạt. Nếu cần, bổ sung thêm NaOH).

Bước 7. Xây dựng đường chuẩn (dung dịch chuẩn glucose) theo **Bảng 2.4.**

Bảng 2.4. Xây dựng đường chuẩn D-glucose bằng thuốc thử DNS

STT	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Dung dịch chuẩn (mL)	Nước cất (mL)	Thuốc thử DNS (mL)
1	10	0,3	2,7	1
2	20	0,6	2,4	1
3	30	0,9	2,1	1
4	40	1,2	1,8	1
5	50	1,5	1,5	1
6	60	1,8	1,2	1
7	70	2,1	0,9	1

Bước 8: Đặt các ống vào nồi cách thủy sôi trong 5 phút và làm nguội đến nhiệt độ phòng (màu đỏ cam hình thành).

Bước 9: Đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 540 nm so với mẫu trắng.

Bước 10: Thiết lập đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc của hàm lượng chất chuẩn và độ hấp thụ quang.

Bước 11: Định lượng mẫu thử

Dùng pipet chuyên 3 mL mẫu xác định đường khử vào ống nghiệm có nắp vặn. Thêm 1 mL thuốc thử DNS vào dung dịch mẫu (Mẫu Blank được chuẩn bị bằng cách thêm 1 mL thuốc thử DNS vào 3 mL nước cất). Đặt các ống vào nồi cách thủy sôi trong

5 phút. Làm nguội mẫu nhanh đến nhiệt độ phòng và đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm. Tham chiếu đường chuẩn đã lập (**phụ lục 5.10**). Tính toán được hàm lượng đường khử của mẫu đo.

- Khả năng ức chế hại khuẩn của dịch nuôi cấy *L. plantarum* bổ sung PS

Chủng *L. Plantarum* WCFS1 được nuôi cấy tĩnh ở 37°C trong các môi trường (Bảng 3). Sau 24 giờ và 48 giờ lên men tiến hành ly tâm (5000 vòng/phút ở 4°C, trong 10 phút) rồi thu lấy phần dịch nổi để xác định sự ức chế sinh trưởng đối với *E. coli* và *S. aureus*. Lấy 50 µL dịch vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus* mật độ 10^8 CFU/mL (0,5 MCFarland) cấy vào các đĩa môi trường NA bằng kỹ thuật cấy trải đĩa. Tiến hành đục lỗ thạch có đường kính 7 mm trên các đĩa petri chứa 2 vi khuẩn ở trên. Cho vào các lỗ thạch 300 µL phần chất nổi thu từ quá trình ly tâm ở trên và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Khả năng ức chế được xác định bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn trên các đĩa thạch) [129].

Bảng 2.5. Bố trí môi trường nuôi cấy đánh giá khả năng ức chế *E. coli* và *S. aureus*

TT	Công thức	Môi trường
1	CT1	MRS + 0,1% W-PS
2	CT2	MRS + 0,1% S-PS
3	CT3	MRS + 0,1% A-PS
4	CT4	MRS + 0,1% FOS
5	CT5 (Control)	MRS

- Định lượng SCFAs

Acid lactic, acetic, propionic và butyric có thể được phát hiện trong môi trường tăng trưởng và được định lượng bằng HPLC. Môi trường lên men được ly tâm và phần nổi phía trên được thu hoạch để phân tích acid hữu cơ bằng HPLC sau khi lọc sử dụng màng acetate cellulose 0,20 µm. Hệ thống HPLC dòng Agilent 1200 với máy dò RI (Agilent, Đức) và cột Aminex HPX87H (BioRad, Hercules, CA, Mỹ) được sử dụng để thực hiện phân tích SCFAs. Các điều kiện phân tích như sau: pha động, 3 mM H₂SO₄ ở 0,6 mL min⁻¹, 50°C.

2.5.3. Nội dung 3: Ứng dụng hệ sợi nấm chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung

a. Đánh giá an toàn bột sợi nấm

Sinh khối hệ sợi nấm sau khi sấy khô được đóng gói kín trong bao bì PE

(polyethylene). Sau đó, các mẫu này được gửi đến Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 2 (QUATEST 2) để tiến hành đánh giá các chỉ tiêu an toàn, bao gồm: dư lượng kim loại nặng, vi sinh vật gây bệnh và độc tố nấm mốc (mycotoxins)

b. Quy trình sản xuất nước nấm bào ngư lên men bổ sung hệ sợi nấm *Trametes versicolor*

Quả thể nấm bào ngư sau khi thu mua ở chợ dân sinh được tiến hành rửa sạch và được sấy khô đến khối lượng không đổi ở 50°C, nghiền mịn rồi đun sôi trong 20 phút, thu lấy dịch chiết bằng giấy lọc Whatman 42; bổ sung 50 g/L glucose vào dịch chiết. Hệ sợi nấm *T. versicolor* được nuôi trong môi trường PDB⁺, sau 20 ngày thu hệ sợi, sấy khô ở 50°C đến khối lượng không đổi, nghiền nhỏ thành bột mịn. Sau đó, bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* 0% (w/v, CT1, control); 0,2% (w/v, CT2); 0,4% (w/v, CT3); 0,6% (w/v, CT4); 0,8% (w/v, CT5) và 1% (w/v, CT6) vào dịch chiết nấm Bào ngư ở trên rồi điều chỉnh pH của môi trường về 6,5 bằng dung dịch NaOH 1 N hoặc HCl 1 N. Tiếp theo, hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút (Hirayama HV-50, Manufacturing Corporation, Japan), để nguội ở nhiệt độ phòng. Sau đó bổ sung 1% (v/v) dịch vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (mật độ 10⁸ CFU/mL) vào các công thức thí nghiệm, lắc đều, ủ ở 37°C trong 12, 24 và 48 giờ [130].

c. Các phương pháp đánh giá chất lượng sản phẩm đồ uống lên men

- Xác định hàm lượng acid tổng số

Hàm lượng acid tổng số (tính theo acid lactic) được xác định theo phương pháp chuẩn độ Therner bằng dung dịch NaOH. Nhỏ 1 – 2 giọt phenolphthalein 0,1% vào mỗi bình Erlenmeyer chứa 2 mL dung dịch lên men từ nấm bào ngư được bổ sung hệ sợi nấm Vân Chi. Tiến hành chuẩn độ bằng cách cho từ từ dung dịch NaOH 0,1N vào trong bình tam giác đến khi dung dịch chuyển sang màu hồng nhạt và bền màu trong 30 giây thì dừng lại [131]. Hàm lượng acid tổng số (TAN) được tính theo công thức sau:

$$TAN = \frac{V \times K \times 100}{V_1}$$

Trong đó, TAN (mg/100 mL) là hàm lượng acid tổng số tính theo acid lactic; V (mL) là thể tích dung dịch NaOH 0,1N đã sử dụng; V₁ (mL) là thể tích dung dịch lên men từ nấm bào ngư có bổ sung hệ sợi nấm Vân chi; K là hệ số khi tính theo acid lactic (K = 0,009).

- Đánh giá khả năng trung hoà gốc tự do ABTS^{•+} của dịch chiết nấm bào ngư bổ sung sợi nấm *T. versicolor*

Hoạt động khử gốc tự do được xác định bằng phương pháp khử màu ABTS^{•+} được mô tả bởi Nenadis và cs., (2004) [124]. Dung dịch ABTS^{•+} được chuẩn bị bằng cách cho 2 mL dung dịch ABTS 7 mM vào 2 mL dung dịch K₂S₂O₈ 2,45 mM. Ủ dung dịch trong điều kiện tối 16 giờ, sau đó pha loãng bằng ethanol đến khi đạt độ hấp thụ quang ở bước sóng 734 nm là $0,70 \pm 0,05$. Để đánh giá hoạt tính kháng oxi hóa, hỗn hợp phản ứng được thiết lập bao gồm 990 μ L dung dịch ABTS^{•+} vào 10 μ L nước uống lên men từ dịch chiết nấm bào ngư có bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor*. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong thời gian 6 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm.

Khả năng bắt gốc tự do của ABTS^{•+} được tính theo công thức sau [132].

$$SA (\%) = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

A_0 – độ hấp thụ của dung dịch gốc ABTS^{•+} trước khi tương tác với hợp chất nghiên cứu; A_1 – độ hấp thụ của dung dịch gốc ABTS^{•+} sau khi phản ứng với hợp chất nghiên cứu.

- Xác định mật độ tế bào vi khuẩn *L. plantarum*

Dịch chiết bào ngư có bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* được lên men bởi chủng vi sinh vật *L. plantarum* WCFS1 ở 37°C. Tại các mốc thời gian 0, 12, 24 và 48 giờ, mẫu dịch lên men được thu nhận, tiến hành pha loãng thập phân, cấy trải đĩa và đếm khuẩn lạc để xác định mật độ tế bào trong các công thức thí nghiệm. Mật độ tế bào (D) được tính theo công thức sau:

$$D = \frac{\sum C}{V \times (n_1 + 0.1n_2) \times d}$$

Trong đó: $\sum C$ là tổng số khuẩn lạc trên hai đĩa petri có độ pha loãng liên tiếp; n_1 , n_2 là số đĩa petri ở hai độ pha loãng liên tiếp đã chọn; V (mL) là thể tích mẫu được đưa vào mỗi đĩa petri; d là độ pha loãng tương ứng với n_1 (độ pha loãng nhỏ hơn).

- Đánh giá khả năng ức chế sinh trưởng vi sinh vật có hại

Mẫu nước lên men từ dịch chiết nấm bào ngư có bổ sung hệ sợi nấm Vân chi ở các công thức thí nghiệm được li tâm (5000 vòng/20 phút ở 4°C) rồi thu lấy phần nổi để xác định khả năng ức chế sinh trưởng đối với *E. coli* và *S. aureus*. Lấy 50 μ L dung dịch vi khuẩn đã pha loãng ở 10^8 CFU/mL cấy vào các đĩa môi trường MH bằng kỹ thuật cấy

trái đĩa. Tiến hành đục lỗ thạch có đường kính 6 mm trên các đĩa petri chứa 2 vi khuẩn ở trên. Cho vào các lỗ thạch phần chất nổi thu từ quá trình ly tâm ở trên và ủ ở 37 °C trong 24h. Khả năng ức chế được xác định bằng cách đo đường kính (mm) vùng ức chế trên các đĩa thạch. Đối với thí nghiệm kháng khuẩn này, đối chứng là công thức chỉ chứa dịch chiết nấm bào ngư (không bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* và chủng lợi khuẩn *L. plantarum*) [129].

- Đánh giá cảm quan

Phương pháp đánh giá cảm quan sản phẩm nước nấm bào ngư lên men lactic được thực hiện bằng thang đo 9 điểm Hedonic theo mô tả của Adriana Gámbaro nhằm xác định mức độ ưa thích của người tiêu dùng đối với sản phẩm. Các chỉ tiêu cảm quan được đánh giá bao gồm màu sắc, mùi, vị, trạng thái và mức độ chấp nhận tổng thể của sản phẩm [133]. Hội đồng đánh giá bao gồm 82 thành viên (độ tuổi từ 18 – 40 tuổi) thử chưa qua đào tạo chuyên sâu về đánh giá cảm quan. Các thành viên này được lựa chọn ngẫu nhiên, bao gồm sinh viên và giảng viên đang công tác và học tập tại Khoa Sinh - Nông nghiệp - Môi trường, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng. Người được mời tham gia đánh giá có sức khỏe bình thường, không dị ứng với nấm hoặc các sản phẩm lên men và được hướng dẫn ngắn gọn về cách sử dụng thang điểm Hedonic trước khi tiến hành đánh giá nhưng không được cung cấp thông tin chi tiết về công thức mẫu nhằm tránh ảnh hưởng đến kết quả cảm quan.

Mẫu nước nấm bào ngư lên men lactic được mã hóa bằng các ký hiệu ngẫu nhiên và trình bày theo thứ tự ngẫu nhiên cho người tham gia đánh giá nhằm hạn chế sai số cảm quan. Người thử được yêu cầu nếm từng mẫu độc lập và cho điểm theo thang Hedonic từ 1 đến 9, trong đó: 1 = cực kỳ không thích, 5 = không thích cũng không ghét và 9 = cực kỳ thích.

Quá trình đánh giá được tiến hành trong điều kiện đủ ánh sáng, không có mùi lạ ảnh hưởng đến cảm nhận. Người tham gia được cung cấp nước lọc để súc miệng giữa các lần thử mẫu nhằm giảm ảnh hưởng chéo giữa các mẫu. Kết quả cảm quan được tổng hợp và xử lý thống kê để xác định mức độ chấp nhận của người tiêu dùng đối với sản phẩm nước nấm bào ngư lên men lactic.

- Đánh giá an toàn chất lượng sản phẩm

Mẫu sản phẩm nước lên men được gửi đến Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 2 (QUATEST 2) để tiến hành đánh giá các chỉ tiêu an toàn, bao gồm:

- Tổng số vi sinh vật hiếu khí (CFU/mL) được thực hiện theo ISO 4833-1:2013

- Tổng số bào tử nấm men (CFU/mL) được thực hiện theo ISO 21527-1:2008
- Mật độ vi khuẩn *E. coli* (CFU/mL) được đếm theo ISO 16649-2: 2001
- Mật độ *S. aureus* (CFU/mL) được xác định theo ISO 6888-1:2021
- Hàm lượng Cd và Pb (mg/L) được xác định theo AOAC 999.11
- Hàm lượng Hg (mg/L) được xác định theo AOAC 971.21
- Vi khuẩn *Cl. perfringens* được định lượng theo ISO 7937: 2004

2.6. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Thí nghiệm so sánh, thống kê và phân tích sử dụng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) trên phần mềm Minitab 19.0, sai khác có ý nghĩa thống kê được xác định với $P < 0,05$.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

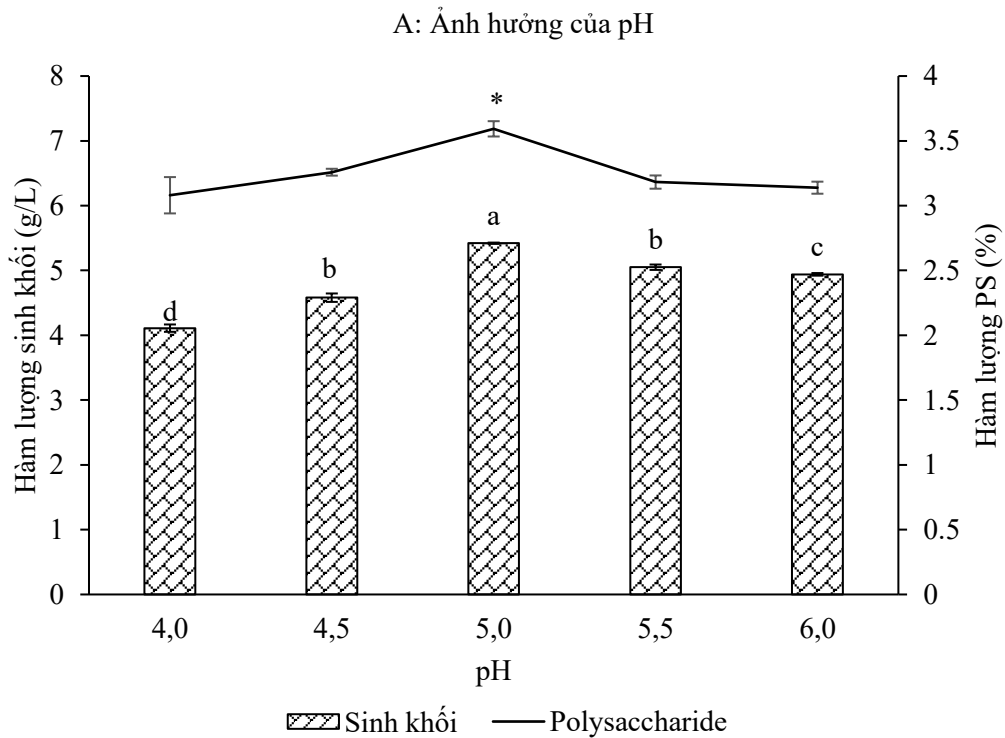
3.1. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể nhằm thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm

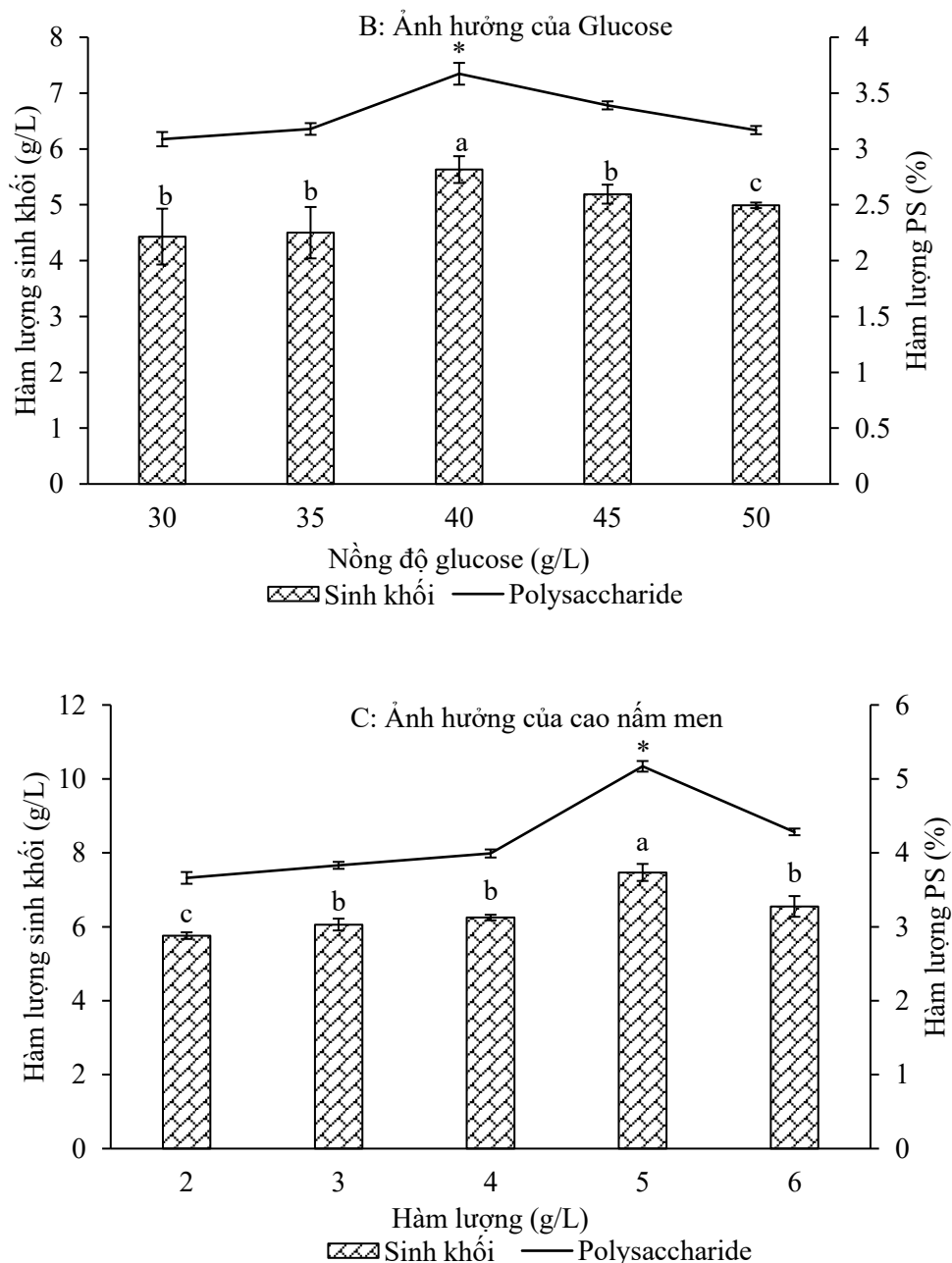
3.1.1. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy đối với hệ sợi nấm *C. militaris*

3.1.1.1. Ảnh hưởng của các yếu tố đơn biến đến năng suất sinh khối và hàm lượng PS hệ sợi nấm *C. militaris*

Glucose, cao nấm men, pH là những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng và phát triển của nấm; đây những yếu tố dinh dưỡng và môi trường cơ bản cần được tối ưu hóa để đạt được sinh trưởng hệ sợi nấm hiệu quả nhất. Việc tìm ra tỷ lệ và giá trị tối ưu của từng yếu tố cho từng loài nấm cụ thể là chìa khóa để thành công trong nuôi cấy hệ sợi nấm.

Năng suất sinh khối và hàm lượng PS của hệ sợi nấm *C. militaris* khi được nuôi cấy trong môi trường dịch thể ở các giá trị khác nhau về pH, hàm lượng glucose và cao nấm men được thể hiện **Hình 3.1**.





Hình 3.1. Ảnh hưởng điều kiện nuôi: pH, hàm lượng glucose và cao nấm men trong môi trường dịch thể đến sinh khối hệ sợi nấm *C. militaris*. A: Ảnh hưởng của pH, B: Ảnh hưởng của glucose, C: Ảnh hưởng của cao nấm men

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 3$). Các chữ cái khác nhau trong một điều kiện chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $p < 0,05$).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tại pH 5, hệ sợi nấm *C. militaris* sinh trưởng tốt nhất, đạt hàm lượng sinh khối khô và hàm lượng polysaccharide (PS) cao nhất, tương ứng là 5,42 g/L và 3,59%. Trong phạm vi khảo sát, khi tăng dần pH của môi trường nuôi cấy,

sinh khối hệ sợi nấm tăng dần, đạt cực đại tại pH 5 và sau đó có xu hướng giảm. Điều này chứng tỏ nấm *C. militaris* phát triển tối ưu trong môi trường có tính acid nhẹ. Mức pH tối ưu này giúp đảm bảo hoạt động hiệu quả của các enzyme nội bào và tối ưu hóa quá trình hấp thu dinh dưỡng. Ngược lại, nếu môi trường quá acid hoặc quá kiềm, hoạt tính enzyme sẽ bị ức chế, làm giảm đáng kể khả năng sinh trưởng, thậm chí gây chết hệ sợi.

Đáng chú ý, lượng sinh khối thu được trong nghiên cứu này cao hơn so với kết quả công bố của Trần Thu Hà và cs. (2016) (đạt 4,86 g/L) khi nuôi cấy *C. militaris* trong môi trường dịch thể ở cùng điều kiện pH 5 [134]. Sự khác biệt này có thể xuất phát từ sự không đồng nhất về chủng giống hoặc thành phần dinh dưỡng trong môi trường (như tỷ lệ C/N, nguồn khoáng chất và các vi lượng kích thích sinh tổng hợp) – những yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình trao đổi chất của nấm. Ngoài ra, các thông số vật lý trong quá trình lên men như kiểu bình nuôi cấy, tốc độ khuấy hay cấu trúc hệ sợi nấm cũng là những yếu tố then chốt tác động đến hiệu suất tổng hợp sinh khối và PS.

Khi tăng hàm lượng glucose sinh khối khô hệ sợi nấm có xu hướng tăng lên và đạt cực đại tại mức hàm lượng glucose là 40 g/L. Ở giai đoạn này hệ sợi nấm sinh trưởng khỏe và khối lượng sinh khối khô và PS đạt được thu được cao nhất tương ứng với 5,63 g/L và PS đạt 3,673%. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng lượng glucose thì lượng sinh khối của hệ sợi nấm thu được có xu hướng giảm, ở hàm lượng glucose 45 và 50 g/L với khối lượng sinh khối dao động trong khoảng 4,99 - 5,19 g/L. Nồng độ glucose trong môi trường thấp sẽ không đủ nguồn cacbon dẫn đến sợi nấm sinh trưởng chậm, hệ sợi yếu, và sinh khối thấp; mặt khác, nồng độ glucose quá cao trong môi trường lỏng, có thể tạo áp suất thẩm thấu cao gây ức chế sinh trưởng của tế bào nấm. Nghiên cứu của Trần Thị Thu Hà và cs. (2016) cho rằng, hệ sợi nấm *C. militaris* sinh trưởng tốt trên môi trường bổ sung đồng thời sucrose và glucose với hàm lượng là 20 g/L [134].

Cao nấm men là nguồn cung cấp nitơ hữu cơ và vitamin nhóm B, giúp nấm phát triển mạnh mẽ và tạo ra sinh khối lớn hơn. Nghiên cứu này cho thấy khi tăng hàm lượng cao nấm men đến mức 6g/L sinh khối và PS hệ sợi nấm có xu hướng tăng lên, lượng sinh khối khô và PS thu được cao nhất (7,47 g/L và 5,17%) khi được nuôi cấy trên môi trường với hàm lượng cao nấm men là 5 g/L. Tuy nhiên, tiếp tục tăng lượng cao nấm men lên qua 6 g/L sinh khối lại giảm còn $6,55 \pm 0,28$ g/L và PS giảm còn 4,28%. Kết quả nghiên cứu này thấp hơn so với nghiên cứu của Trần Thu Hà và cs. (2016), (10, 85 g/L) [134]. Nghiên cứu của Deshmukh và Bhaskaran (2024) cho thấy trong điều kiện tối ưu, nhiệt độ 20°C, glucose 2,5% (w/v) và chiết xuất nấm men 0,8% (w/v), năng suất sinh khối sợi nấm tối đa đạt $547 \pm 2,09$ mg/100 mL [135]. Dựa trên các kết quả khảo sát, các thông số môi trường dịch thể gồm pH 5, nồng độ glucose 40 g/L và cao nấm

men 5 g/L được lựa chọn làm giá trị tâm cho các thí nghiệm tối ưu hóa tiếp theo.

3.1.1.2. Xác định điều kiện tối ưu nhằm thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm *C. militaris*

Để đánh giá ảnh hưởng của các biến độc lập (X_1 : pH; X_2 : nồng độ glucose; X_3 : nồng độ cao nấm men) cũng như sự tương tác giữa chúng đến các hàm mục tiêu (Y_1 : sinh khối; Y_2 : hàm lượng PS), thí nghiệm được thiết kế theo mô hình Box-Behnken. Các nghiệm thức và kết quả thực nghiệm tương ứng về sinh khối và PS được trình bày chi tiết tại **Bảng 3.1**. Tiếp theo, kết quả phân tích phương sai (ANOVA) ở **Bảng 3.2** được sử dụng để đánh giá mức độ ý nghĩa của các biến đơn lẻ và các tương tác hiệp đồng đối với hai hàm mục tiêu nêu trên.

Bảng 3.1. Thực nghiệm khảo sát tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy nấm *C. militaris*

TT	Các yếu tố ảnh hưởng			Hàm mục tiêu	
	pH (X_1)	Glucose (g/L) (X_2)	Cao nấm men (g/L) (X_3)	Sinh khối (g/L) (Y_1)	PS (%) (Y_2)
1	4	40	4	5,20	3,86
2	4	30	5	3,78	3,54
3	6	40	6	5,23	4,13
4	5	30	6	6,82	4,15
5	5	30	4	4,93	3,66
6	5	40	5	8,97	5,29
7	6	50	5	5,37	3,18
8	5	40	5	9,17	5,37
9	4	40	6	4,07	3,89
10	6	30	5	5,43	3,31
11	6	40	4	5,70	3,50
12	5	50	6	5,43	4,20
13	5	40	5	8,76	5,19
14	5	50	4	5,18	4,38
15	4	50	5	3,85	3,32

Bảng 3.2 trình bày kết quả xác định hệ số của phương trình hồi quy và mức ý nghĩa (giá trị $P < 0,05$ thể hiện ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê) định vị các hàm mục tiêu lần

lượng của sinh khối và PS

Bảng 3.2. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với năng suất sinh khối hệ sợi nấm *C. militaris*

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	41,2573	6,8762	17,93	0,000
Linear	3	38,8168	12,9389	33,74	0,000
X ₁	1	23,1543	23,1543	60,37	0,000
X ₂	1	13,1216	13,1216	34,21	0,000
X ₃	1	7,9835	7,9835	20,82	0,002
Square	3	38,1452	12,7151	33,15	0,000
X ₁ ²	1	22,1555	22,1555	57,77	0,000
X ₂ ²	1	13,4640	13,4640	35,10	0,000
X ₃ ²	1	7,9471	7,9471	20,72	0,002
Error	8	3,0684	0,3835		
Lack-of-Fit	6	2,9843	0,4974	11,83	0,080
Pure Error	2	0,0841	0,0420		
Total	14	44,3257			

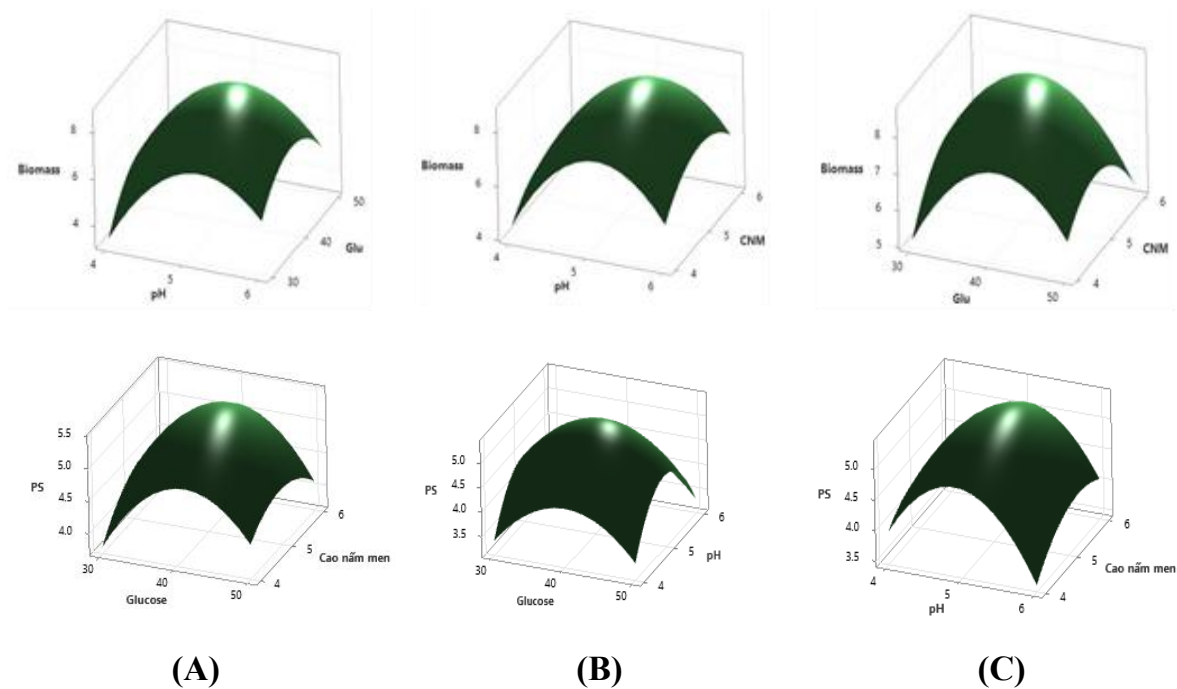
Bảng 3.3. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với hàm lượng polysaccharide từ hệ sợi nấm *C. militaris*

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	6,93753	1,15626	23,10	0,000
Linear	3	6,74332	2,24777	44,91	0,000
X ₁	1	4,39108	4,39108	87,72	0,000
X ₂	1	2,66875	2,66875	53,32	0,000
X ₃	1	0,45356	0,45356	9,06	0,017
Square	3	6,76786	2,25595	45,07	0,000
X ₁ ²	1	4,46093	4,46093	89,12	0,000
X ₂ ²	1	2,64681	2,64681	52,88	0,000
X ₃ ²	1	0,42474	0,42474	8,49	0,019
Error	8	0,40044	0,05006		
Lack-of-Fit	6	0,38417	0,06403	7,87	0,117
Pure Error	2	0,01627	0,00813		
Total	14	7,33797			

Phân tích phương sai (ANOVA) cho thấy cả hai mô hình hồi quy bậc hai mô tả năng suất sinh khối và hàm lượng polysaccharide đều có ý nghĩa thống kê rất cao (giá

trị P của mô hình = $0,000 < 0,01$). Đối với biến đáp ứng năng suất sinh khối, sự thay đổi của các yếu tố tuyến tính bậc nhất (X_1, X_2, X_3) và các tác động bậc hai (X_1^2, X_2^2, X_3^2) đều thể hiện mức độ ảnh hưởng cực kỳ rõ rệt đến hàm mục tiêu ($p = 0,000$). Trong khi đó, tác động tương tác kép giữa các biến độc lập đã được chứng minh là không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) và được tinh giản để tối ưu hóa mô hình.

Đặc biệt, chỉ số Lack-of-Fit (độ thiếu thích hợp) của mô hình sinh khối đạt giá trị $p = 0,080 > 0,05$ khẳng định sự sai lệch của mô hình dự đoán so với dữ liệu thực nghiệm là không có ý nghĩa, chứng tỏ mô hình toán học phản ánh rất trung thực kết quả thực tế. Sự phù hợp và khả năng giải thích dữ liệu của các phương trình hồi quy được minh chứng rõ nét qua hệ số xác định R^2 đạt mức rất cao, lần lượt là 0,9308 đối với mô hình sinh khối và 0,9454 đối với mô hình hàm lượng PS. Dựa trên độ tin cậy này, mô hình đáp ứng được yêu cầu để tiến hành trích xuất các thông số vận hành tối ưu cho quá trình nuôi cấy hệ sợi nấm. Liu và cs (2012) đã nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy nấm *C. militaris* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. Kết quả cho thấy, hàm lượng glucose thích hợp với sự sinh trưởng của hệ sợi nấm trong môi trường dịch thể là 4,62%, tương đương 46,2 g/L trong môi trường nuôi cấy [136]. Điều này cho thấy, sự sinh trưởng sợi nấm *C. militaris* cần hàm lượng glucose từ 39,9 - 46,2 g/L như một nguồn dinh dưỡng carbon thiết yếu [136]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao nấm men là nguồn cung cấp thêm nitơ cho sự sinh trưởng của sợi nấm.



Hình 3.2. Ảnh hưởng tương tác của các điều kiện nuôi cấy đến năng suất sinh khối (hàng trên) và hàm lượng polysaccharide (hàng dưới) của nấm *C. militaris*

Ghi chú: (A) pH và glucose; (B) pH và cao nấm men; (C) glucose và cao nấm men

Từ các đồ thị bề mặt đáp ứng (**Hình 3.2**), có thể thấy dạng mặt cong paraboloid lồi hướng lên trên, minh chứng rõ nét cho việc tồn tại một điểm cực đại thực sự cho hàm mục tiêu. Tác động bậc hai của các yếu tố độc lập (pH, nồng độ glucose và cao nấm men) thể hiện sự ảnh hưởng mạnh mẽ nhất đến năng suất sinh khối. Theo mô hình dự đoán, năng suất sinh khối đạt cực đại là 9,02 g/L tại điều kiện tối ưu: pH 5,15; nồng độ glucose 39,9 g/L và cao nấm men 5,03 g/L. Để kiểm chứng độ tin cậy của mô hình, thí nghiệm thực tế đã được tiến hành lặp lại 3 lần tại bộ thông số tối ưu này. Kết quả thực nghiệm cho thấy năng suất sinh khối khô đạt $8,90 \pm 0,25$ g/L, rất tương đồng với giá trị dự đoán lý thuyết. Điều này khẳng định phương trình hồi quy mô tả sự tương quan là phù hợp và có độ tin cậy cao.

Trong nghiên cứu của Suganendran Supramani và cs. (2019), đã tìm ra điều kiện tối ưu thu sinh khối sợi nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*) bằng thiết kế phức hợp trung tâm (CCD) với điều kiện pH đầu vào 4,01; 32,09 g/L glucose và tốc độ lắc 102 vòng/phút cho sinh khối đạt 5,12 g/L [137]. Điều này cho thấy, lượng sinh khối sợi nấm *C. militaris* trong nghiên cứu này thu được cao hơn so với các nấm Linh chi. Vì vậy, việc làm chủ và tối ưu hóa hệ thống nuôi cấy dịch thể này mở ra triển vọng lớn trong việc sản xuất sinh khối nấm quy mô lớn, cung cấp nguồn nguyên liệu chất lượng cao phục vụ cho ngành công nghiệp thực phẩm định hướng chức năng. Nghiên cứu của Deshmukh & Bhaskaran, (2024) đã cho thấy trong điều kiện tối ưu, nhiệt độ 20°C, glucose 2,5% (w/v) và chiết xuất nấm men 0,8% (w/v), năng suất sinh khối sợi nấm tối đa đạt $547 \pm 2,09$ mg/100 mL, cao hơn 1,95 lần so với năng suất trong môi trường cơ bản. Những phát hiện này cho thấy việc tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy và dinh dưỡng có thể tăng cường sản xuất sinh khối sợi nấm của *Cordyceps militaris*, cung cấp nguồn nấm có giá trị này bền vững và tiết kiệm chi phí [135].

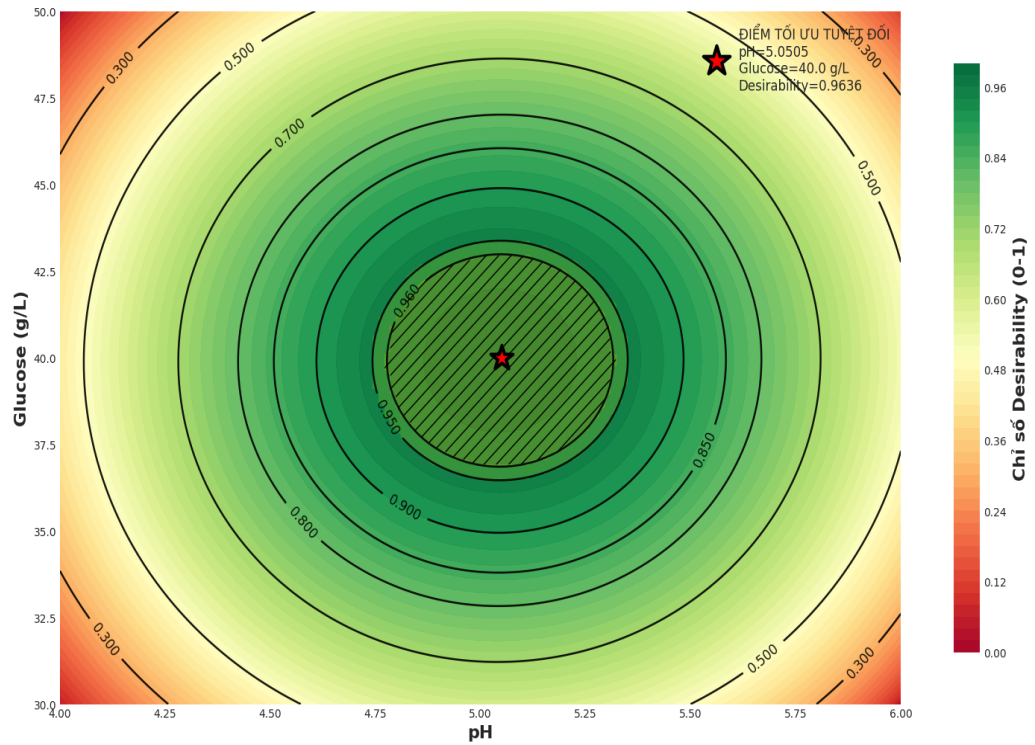
Mô hình toán học mô tả mối quan hệ giữa khối lượng sinh khối và hàm lượng PS với các yếu tố ảnh hưởng như sau:

$$Y1 = -122,3 + 25,10 X_1 + 1.514 X_2 + 14,74 X_3 - 2,450 X_1^2 - 0,01910 X_2^2 - 1,467 X_3^2$$

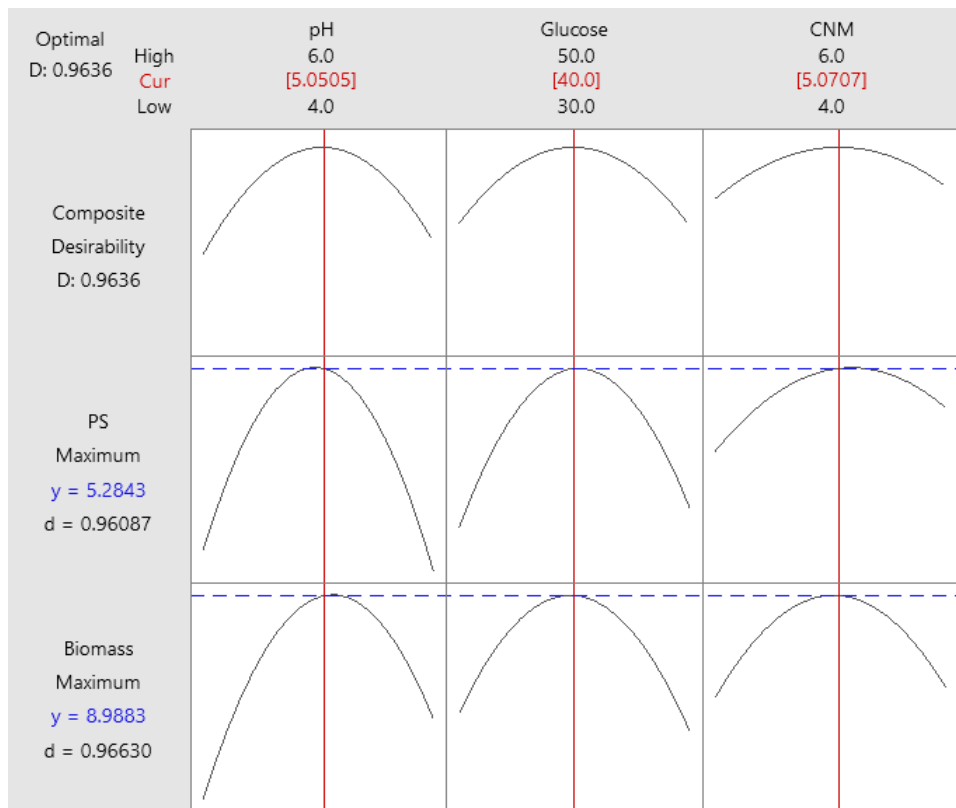
$$Y2 = -44,73 + 10,93 X_1 + 0,6826 X_2 + 3,51 X_3 - 1,099 X_1^2 - 0,00847 X_2^2 - 0,339 X_3^2$$

Trong đó: X_1 , X_2 , X_3 lần lượt là: pH, Glucose và cao nấm men

VÙNG TỐI ƯU ĐA MỤC TIÊU: BIOMASS & PS
(Cao nấm men = 5.0707 g/L)



Hình 3.3. Phân tích vùng tối ưu đa mục tiêu



Hình 3.4. Biểu đồ tối ưu hóa đa mục tiêu điều kiện nuôi cấy thu nhận sinh khối và polysaccharide

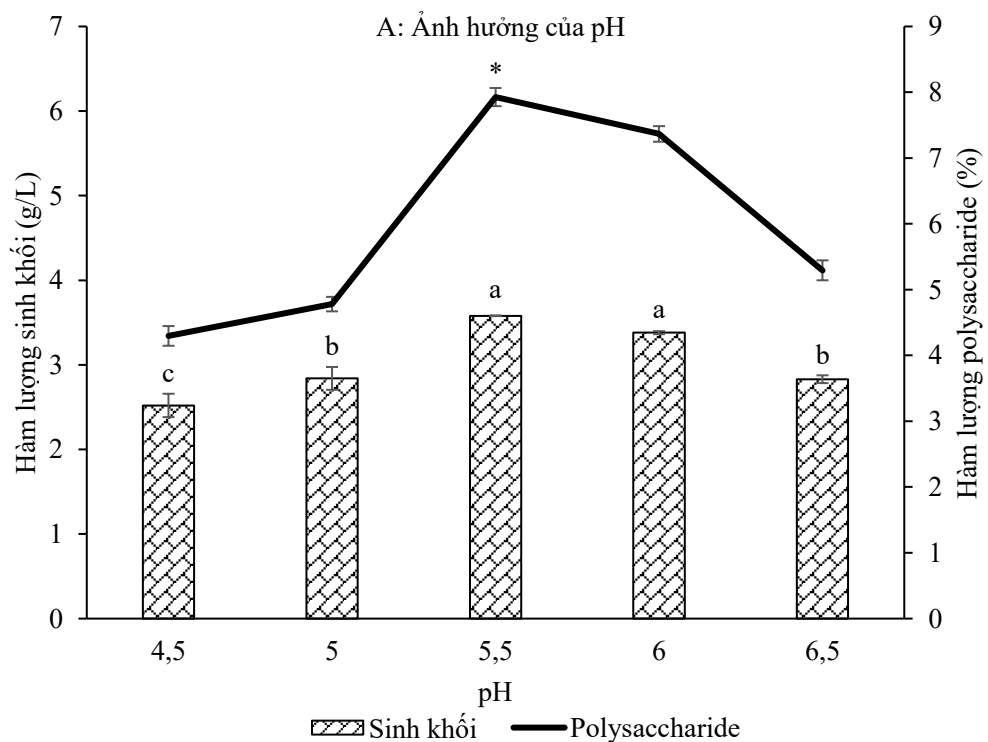
3.1.1.3. Thực nghiệm kiểm tra các điều kiện tối ưu sợi nấm *C. militaris*

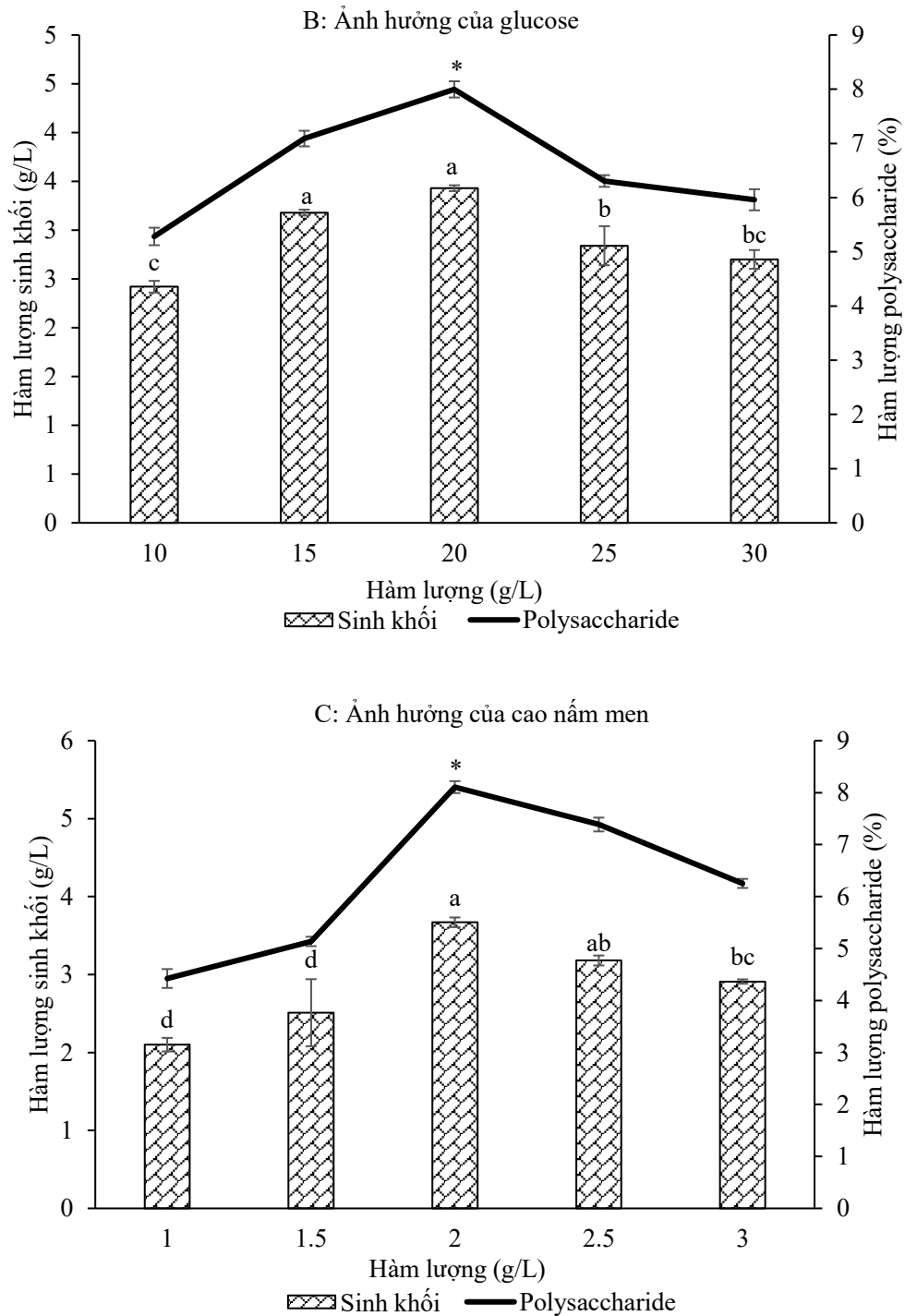
Mô hình dự đoán tại giá trị pH = 5,05, hàm lượng glucose 40 g/L và hàm lượng cao nấm men 5,07 g/L thì khối lượng sinh khối nấm đạt được cao nhất; tương ứng với sinh khối dự đoán đạt được là 8,98 g/L. Thực nghiệm để kiểm tra các điều kiện tối ưu, kết quả thực nghiệm cho thấy khối lượng sinh khối khô thu được tại điều kiện tối ưu là $8,90 \pm 0,25$ g/L; PS đạt 5,28% tương đương với giá trị dự đoán; như vậy phương trình mô hình tối ưu hóa là phù hợp và tin cậy.

3.1.2. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy đối với hệ sợi nấm *T. versicolor*

3.1.2.1. Ảnh hưởng của các yếu tố đơn biến đến năng suất sinh khối và hàm lượng PS hệ sợi nấm *T. versicolor*

Sinh khối và hàm lượng PS hệ sợi nấm *T. versicolor* khi được nuôi cấy trong môi trường dịch thể ở các giá trị khác nhau về pH, hàm lượng glucose và cao nấm men được thể hiện ở **Hình 3.5**.





Hình 3.5. Ảnh hưởng điều kiện nuôi: pH, hàm lượng glucose và cao nấm men trong môi trường dịch thể đến sinh khối hệ sợi nấm *T. versicolor*. A: Ảnh hưởng của pH, B: Ảnh hưởng của glucose, C: Ảnh hưởng của cao nấm men

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 3$). Các chữ cái khác nhau trong cùng một điều kiện chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $p < 0,05$).

pH, hàm lượng glucose và cao nấm men ảnh hưởng đến sự sinh trưởng nấm Vân chi nuôi cấy dịch thể. Khi pH tăng từ 4,5 đến 5,5 sinh khối sợi nấm và hàm lượng PS tăng dần, ở pH 5,5 sợi nấm sinh trưởng tốt nhất khối lượng sinh khối khô và PS là $3,58 \pm 0,004$ g/L và 7,93% , tiếp tục tăng pH sinh khối và cả PS lại có xu hướng giảm dần. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Yadav và Tripathi (1991) chỉ ra rằng điều kiện pH tối ưu để lên men sợi nấm Vân chi là pH = 5.5 [138]. Hoàng Thị Yến Dung và cs. (2023) đã khảo sát và cho thấy pH 6 là điều kiện tối ưu cho sinh khối sợi cao nhất (4,76 g/L) [139]. Veena & Pandey (2012) ghi nhận pH tối ưu cho tăng trưởng sợi là 4,5–6,0 [140].

Tại hàm lượng glucose 20 g/L sinh khối khô sợi nấm đạt giá tốt nhất $3,43 \pm 0,03$ g/L và hàm lượng PS cũng đạt cao nhất là $7,99 \pm 0,15\%$. Tuy nhiên, tiếp tục tăng hoặc giảm hàm lượng glucose, sinh khối sợi có xu hướng giảm dao động từ 2,42–3,18 g/L. Điều này có thể là do hàm lượng glucose quá cao gây chênh lệch áp suất thẩm thấu, dẫn đến tế bào hấp thụ nước kém, còn hàm lượng glucose thấp thì không đủ nguồn dinh dưỡng cho nấm phát triển.

Bên cạnh nguồn Carbon và pH nguồn Nitơ hữu cơ bổ sung cũng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm. Khi tăng lượng cao nấm men thì lượng sinh khối và cả PS có xu hướng tăng, hàm lượng cao nấm men tốt nhất trong nghiên cứu này là 2 g/L với hàm lượng sinh khối là $3,67 \pm 0,062$ g/L và PS là $8,10 \pm 0,115\%$. Tuy nhiên tiếp tục tăng lượng cao nấm men lên thì sinh khối nấm và cả PS có xu hướng giảm. Điều này là do nồng độ Nitơ cao gây ức chế hoạt tính của một số loại enzyme làm ảnh hưởng đến quá trình chuyển hoá các chất trong tế bào làm nấm sinh trưởng kém. Nghiên cứu của Adebayo-Tayo và Ugwu (2011) cho thấy cao nấm men cho sinh khối cao nhất của *T. versicolor* (khoảng 1,0 – 1,6 g/L khô) so với các nguồn nitrogen khác [141].

Như vậy sợi nấm phát triển tốt ở khoảng pH 5,5–6; nồng độ glucose từ 15–20 g/L; cao nấm men từ 2–2,5 g/L và pH 5,5; glucose 20 g/L; CNM 2 g/L thì sinh khối sợi nấm Vân chi đạt lượng sinh khối cao nhất.

Phân tích môi trường quan tuyến tính giữa năng suất sinh khối và hàm lượng PS của nấm *T. versicolor* khi nuôi cấy ở các khoảng pH, glucose và cao nấm men cho thấy có sự tương quan tuyến tính thuận rất chặt chẽ. Khi sinh khối tăng, hàm lượng PS cũng tăng. Giá trị p-value đều rất thấp ($p < 0,05$) cho thấy mối quan hệ này có ý nghĩa thống kê cao và ít khả năng xảy ra do sai số ngẫu nhiên. Dựa vào kết quả phân tích tương quan có thể thấy trong quá trình nuôi cấy, thay vì phải đo hàm lượng qua đó có thể ước tính

nhánh một cách tương đối chính xác thông qua việc đo sinh khối. Điều này giúp tối ưu hóa quy trình theo dõi và thu hoạch.

3.1.2.2. Xác định điều kiện tối ưu nhằm thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm *T. versicolor*

Thực hiện quy hoạch thực nghiệm theo mô hình Box-Behnken. Bố trí các nghiệm thức theo Bảng 3.4, trên bảng cũng thể hiện kết quả định lượng sinh khối và PS sợi nấm từ các nghiệm thức. Bảng 3.5 trình bày kết quả phân tích phương sai để đánh giá mức ý nghĩa của các biến và sự tương tác của chúng đối với các hàm mục tiêu lần lượt là Y_1 và Y_2 .

Bảng 3.4. Thực nghiệm khảo sát tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy thu sinh khối sợi nấm *T. versicolor*

TT	Các yếu tố ảnh hưởng			Hàm mục tiêu	
	pH (X_1)	Glucose (g/L) (X_2)	Cao nấm men (g/L) (X_3)	Sinh khối (g/L) (Y_1)	PS (%) (Y_2)
1	5,5	20	2	3,67	8,21
2	5	15	2	2,12	4,42
3	6	20	2,5	2,33	6,55
4	6	25	2	2,48	6,52
5	5,5	25	1,5	2,41	6,67
6	5,5	15	1,5	2,30	5,53
7	5,5	20	2	3,68	8,34
8	5	25	2	2,30	5,34
9	6	20	1,5	2,32	5,94
10	6	15	2	2,21	5,47
11	5	20	2,5	2,20	5,53
12	5	20	1,5	2,32	4,93
13	5,5	20	2	3,59	8,15
14	5,5	15	2,5	2,77	5,46
15	5,5	25	2,5	2,41	7,28

Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) từ Bảng 3.5 và Bảng 3.6 cho thấy cả hai mô hình hồi quy bậc hai mô tả năng suất sinh khối và hàm lượng polysaccharide (PS) của nấm *T. versicolor* đều đạt mức ý nghĩa thống kê cực kỳ cao ($p = 0,000 < 0,01$). Phân

tích chi tiết chỉ ra rằng, tất cả các yếu tố tuyến tính bậc nhất (X_1, X_2, X_3) và tác động bậc hai (X_1^2, X_2^2, X_3^2) đều có ảnh hưởng rất rõ rệt đến hai hàm mục tiêu ($p = 0,000$). Trong đó, dựa trên giá trị kiểm định F, yếu tố X_1 (pH) là nhân tố có tác động phân giải tuyến tính mạnh mẽ nhất đến cả quá trình sinh trưởng ($F = 103,49$) và tích lũy PS ($F = 255,59$). Đáng chú ý, các tương tác hai chiều giữa các yếu tố độc lập không thể hiện ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) và đã được chủ động loại bỏ để tinh giản mô hình, cho thấy các thông số này tác động một cách độc lập lên hàm mục tiêu.

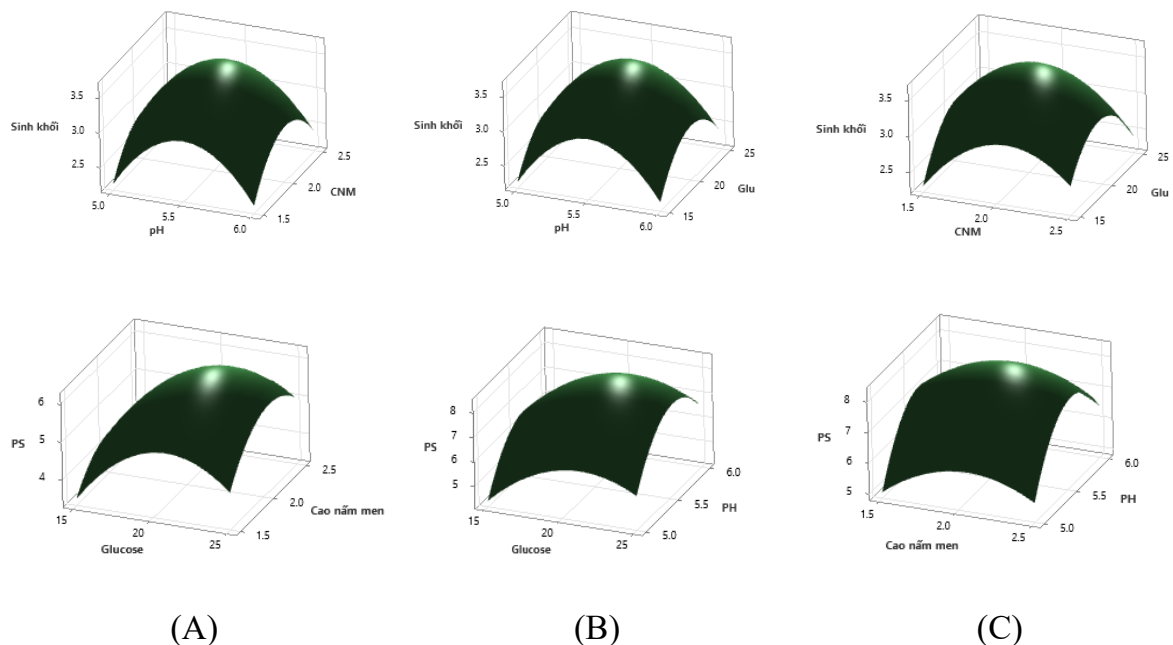
Giá trị R^2 lên tới 0,96 chỉ ra rằng các yếu tố đầu vào (X_1, X_2, X_3) và sự tương tác của chúng giải thích được hơn 96% sự biến thiên của sinh khối nấm *T. versicolor* trong quá trình lên men chìm. Khoảng cách giữa R^2 và R^2_{adj} khá nhỏ (khoảng 0,03, nằm trong ngưỡng an toàn dưới 0,2), chứng tỏ mô hình không chứa các biến nhiễu hoặc biến thừa gây sai lệch. Sự phù hợp của mô hình toán học với dữ liệu thực nghiệm được khẳng định chắc chắn thông qua kiểm định độ thiếu thích hợp (Lack-of-Fit). Cụ thể, giá trị p của Lack-of-Fit đối với mô hình sinh khối và hàm lượng PS lần lượt là 0,082 và 0,166 (đều lớn hơn ngưỡng 0,05). Điều này minh chứng rằng sự sai lệch giữa giá trị dự báo từ mô hình và giá trị thực tế là không có ý nghĩa thống kê, đồng thời mức độ nhiễu (Pure Error) là cực kỳ thấp. Do đó, các phương trình hồi quy đa thức thu được đảm bảo độ tin cậy để biểu diễn không gian bề mặt đáp ứng và trích xuất bộ thông số vận hành tối ưu.

Bảng 3.5. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với năng suất sinh khối hệ sợi nấm *T. versicolor*

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	4,18620	0,69770	32,43	0,000
Linear	3	4,17382	1,39127	64,68	0,000
X_1	1	2,22620	2,22620	103,49	0,000
X_2	1	1,30965	1,30965	60,88	0,000
X_3	1	1,25545	1,25545	58,36	0,000
Square	3	4,14500	1,38167	64,23	0,000
X_1^2	1	2,21531	2,21531	102,98	0,000
X_2^2	1	1,30534	1,30534	60,68	0,000
X_3^2	1	1,24031	1,24031	57,66	0,000
Error	8	0,17209	0,02151		
Lack-of-Fit	6	0,16722	0,02787	11,45	0,082
Pure Error	2	0,00487	0,00243		
Total	14	4,35829			

Bảng 3.6. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với hàm lượng PS hệ sợi nấm *T. versicolor*

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	21,1592	3,5265	87,52	0,000
Linear	3	16,4073	5,4691	135,73	0,000
X1	1	10,2984	10,2984	255,59	0,000
X2	1	5,5119	5,5119	136,80	0,000
X3	1	2,8164	2,8164	69,90	0,000
Square	3	15,4698	5,1566	127,98	0,000
X_1^2	1	10,0117	10,0117	248,48	0,000
X_2^2	1	4,8760	4,8760	121,01	0,000
X_3^2	1	2,6625	2,6625	66,08	0,000
Error	8	0,3223	0,0403		
Lack-of-Fit	6	0,3035	0,0506	5,36	0,166
Pure Error	2	0,0189	0,0094		
Total	14	21,4815			



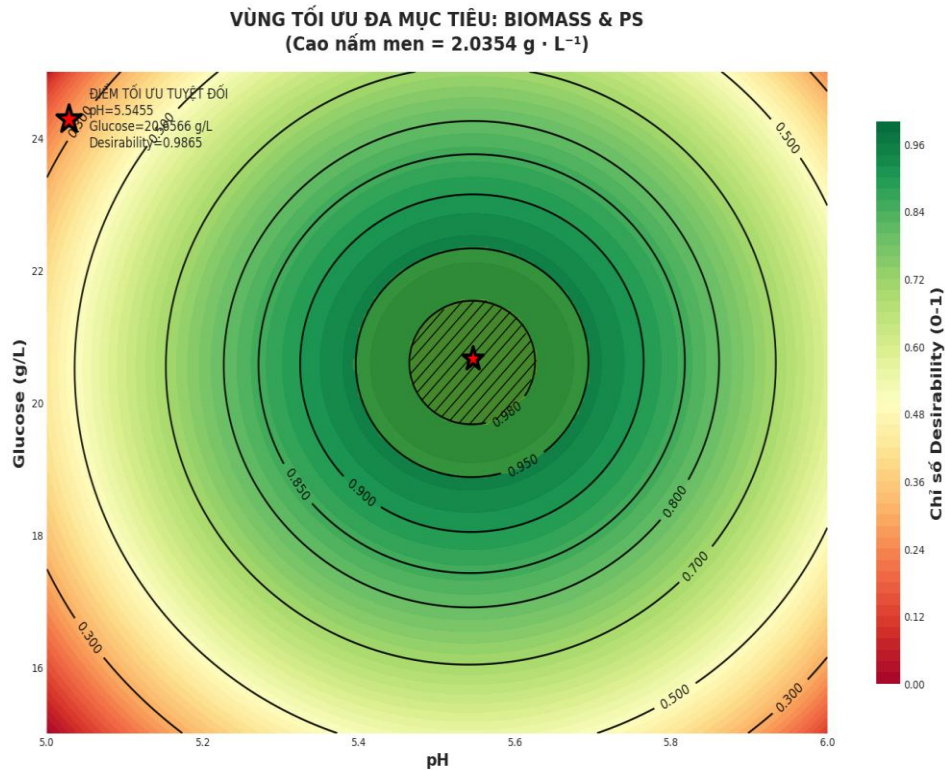
Hình 3.6. Ảnh hưởng tương tác của các điều kiện nuôi cấy đến năng suất sinh khối (hàng trên) và hàm lượng polysaccharide (hàng dưới) của nấm *T. versicolor*

Ghi chú: (A) Cao nấm men và pH; (B) pH và glucose; (C) Glucose và cao nấm men

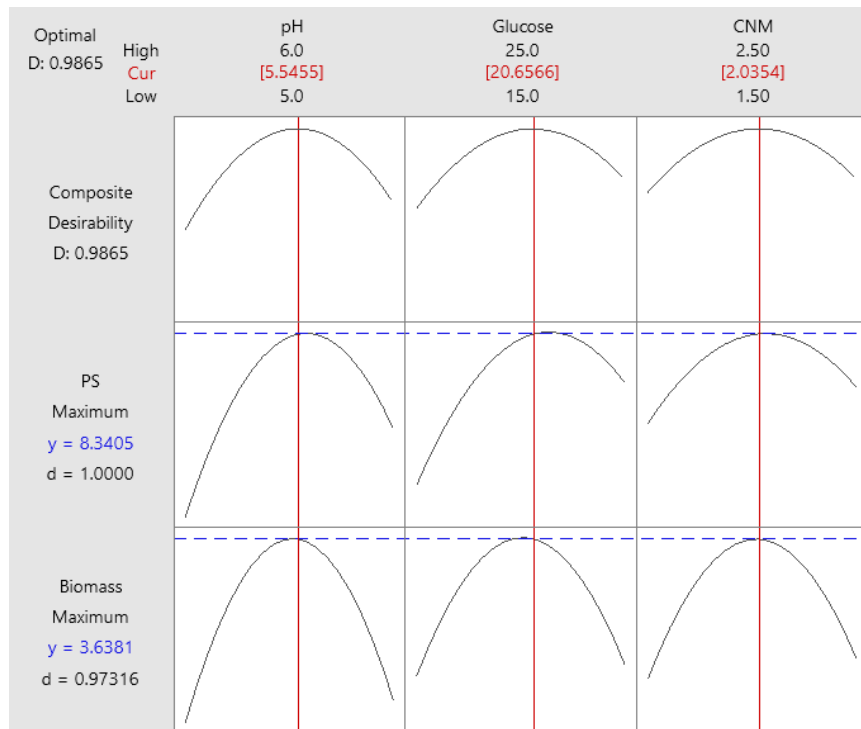
Mô hình toán học mô tả mối quan hệ giữa năng suất sinh khối và hàm lượng PS với các yếu tố ảnh hưởng như sau:

$$Y_1 \text{ (g/L)} = -109,69 + 34,18 X_1 + 0,956 X_2 + 9,36 X_3 - 3,098 X_1^2 - 0,02378 X_2^2 - 2,318 X_3^2$$

$$Y_2 \text{ (%) } = -232,2 + 73,52 X_1 + 1,962 X_2 + 14,02 X_3 - 6,587 X_1^2 - 0,04597 X_2^2 - 3,397 X_3^2$$



Hình 3.7. Phân tích vùng tối ưu đa mục tiêu



Hình 3.8. Biểu đồ tối ưu hóa đa mục tiêu điều kiện nuôi cấy thu nhận sinh khối và polysaccharide

3.1.2.3. Thực nghiệm kiểm tra các điều kiện tối ưu sợi nấm *T. versicolor*

Theo dự đoán của mô hình bề mặt đáp ứng, năng suất sinh khối và hàm lượng PS có thể đạt giá trị cực đại lần lượt là 3,638 g/L và 8,34% tại bộ thông số nuôi cấy lý tưởng: pH 5,55; nồng độ glucose 20,65 g/L và cao nấm men 2,0354 g/L. Nhằm đánh giá độ chính xác và khả năng ứng dụng thực tiễn của mô hình, một thí nghiệm kiểm chứng đã được tiến hành lặp lại 3 lần với các điều kiện tối ưu nêu trên.

Kết quả thực nghiệm cho thấy, năng suất sinh khối khô thu được đạt $3,59 \pm 0,12$ g/L và hàm lượng PS đạt $8,23 \pm 0,27\%$. Các giá trị thực tế này tương đồng và nằm trong vùng sai số cho phép so với giá trị dự báo lý thuyết. Điều này khẳng định rằng các phương trình hồi quy đã xây dựng là phù hợp, có độ tin cậy cao và quy trình tối ưu hóa đã diễn ra thành công.

Qua nghiên cứu tối ưu điều kiện nuôi cấy nhằm thu sinh khối giàu PS đã xác định thành công điều kiện tối ưu để sản xuất sinh khối sợi nấm bằng phương pháp nuôi cấy dịch thể, đạt $8,9 \pm 0,25$ g/L cho *C. militaris* và $3,59 \pm 0,12$ g/L cho *T. versicolor*. Các mô hình tối ưu hóa cho thấy độ tin cậy cao, khẳng định tính khả thi của việc sản xuất quy mô lớn.

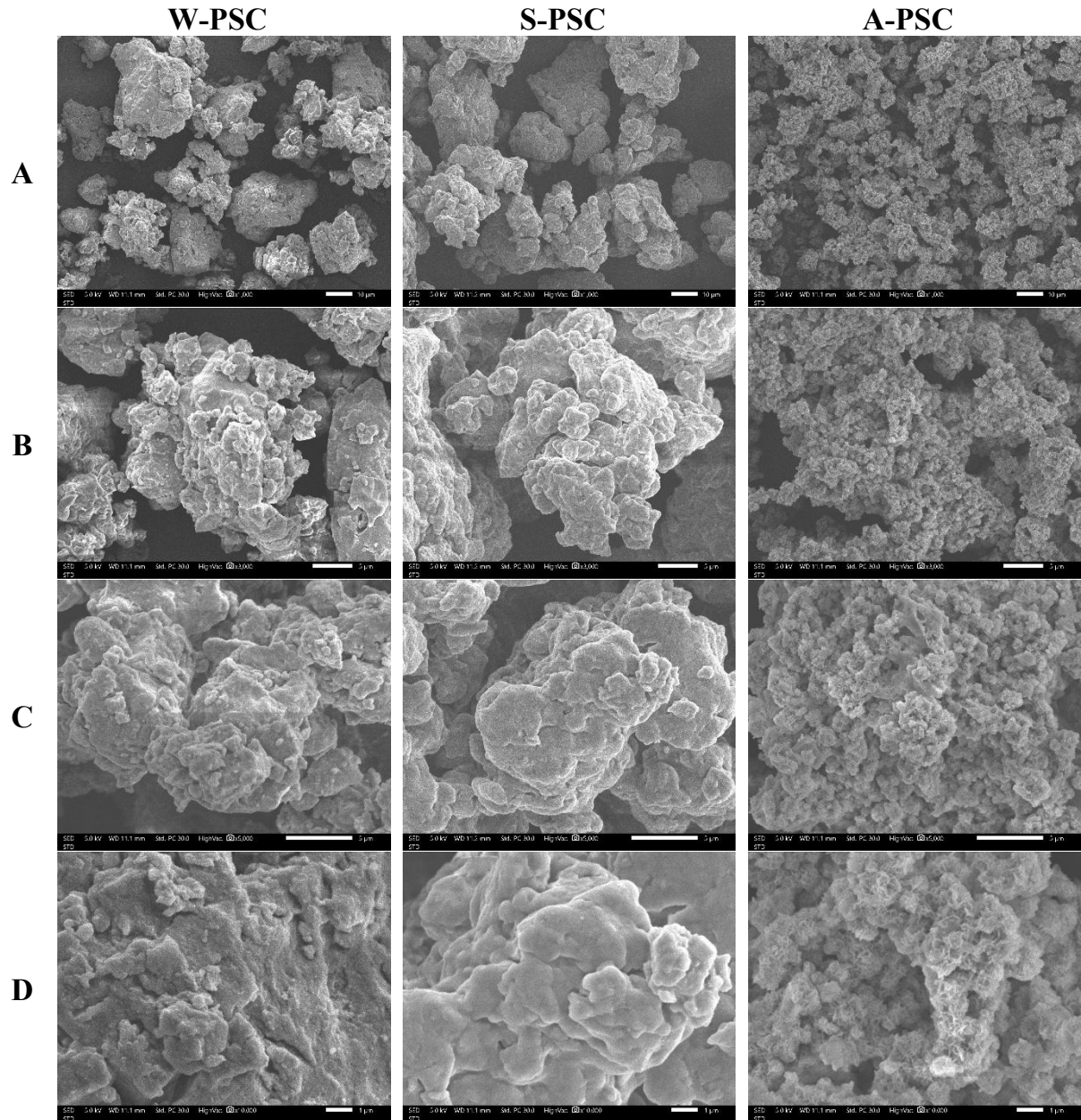
Dữ liệu thu được từ quá trình tối ưu hóa đã khẳng định tiềm năng to lớn của hệ thống nuôi cấy dịch thể trong việc thu nhận sinh khối nấm giàu polysaccharide (PS). Tuy nhiên, sinh khối hệ sợi nấm là một ma trận phức tạp, trong đó các phân đoạn PS thường liên kết chặt chẽ với vách tế bào và thể hiện các đặc tính hóa lý, sinh học khác biệt tùy thuộc vào dung môi hòa tan. Do đó, để khai thác triệt để và làm rõ bản chất của nguồn nguyên liệu này, nghiên cứu tiếp tục tiến hành phương pháp chiết xuất tuần tự (sử dụng lần lượt dung môi nước nóng, kiềm và acid). Định hướng tiếp cận này không chỉ nhằm nâng cao hiệu suất thu hồi các loại PS trong tế bào, mà còn đóng vai trò cốt lõi trong việc đánh giá sự ảnh hưởng của phương pháp phân lập đến đặc điểm hình thái, hoạt tính kháng oxy hóa và khả năng thể hiện hoạt tính prebiotic của từng phân đoạn PS chuyên biệt.

3.2. Chiết xuất tuần tự và đánh giá hình thái, hoạt tính kháng oxy hoá, prebiotic của các chiết xuất PS

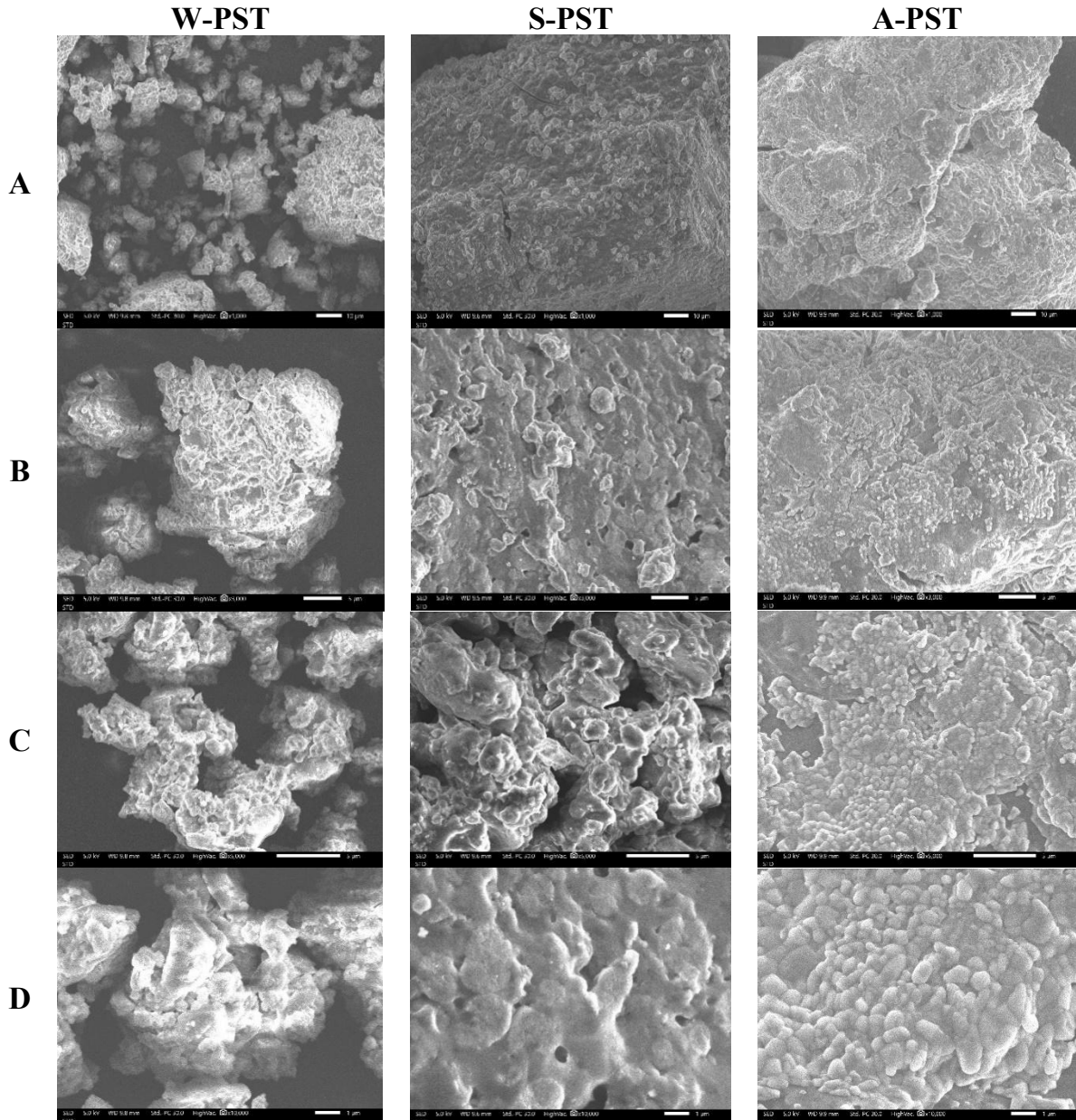
3.2.1. Phân tích cấu trúc bề mặt PS bằng kính hiển vi điện tử quét

Hiển vi điện tử quét (SEM – Scanning Electron Microscopy) là một công cụ quan trọng trong nghiên cứu cấu trúc vi mô của PS chiết xuất từ hệ sợi nấm. Việc sử dụng SEM cho phép quan sát trực tiếp hình thái bề mặt của PS sau khi chiết tách, cung cấp

thông tin chi tiết về hình dạng, độ xốp, kích thước hạt và mức độ kết tụ. Những đặc điểm này có mối liên hệ chặt chẽ với tính chất vật lý – hóa học, khả năng hòa tan, tính nhớt, và hoạt tính sinh học. Đặc biệt, việc so sánh hình thái học giữa các PS được chiết bằng những điều kiện khác nhau (nhiệt độ, pH, loại dung môi...) sẽ giúp đánh giá ảnh hưởng của quy trình chiết xuất đến cấu trúc sản phẩm cuối cùng.



Hình 3.9. Ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của các PS chiết xuất từ hệ sợi nấm *C. militaris* (1000×) (A), (3000×) (B) (5000×) (C) và (10.000×) (D)



Hình 3.10. Ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của các PS chiết xuất từ hệ sợi nấm *T. versicolor* (1000×) (A), (3000×) (B) (5000×) (C) và (10.000×) (D)

Hình 3.9. và **Hình 3.10.** Hiện thị hình ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM) của các chiết xuất PS từ 2 loại nấm ở độ phóng đại 1000×, 3000×, 5000x và 10.000×. Nhìn chung, các chiết xuất PS cho thấy hình dạng dày đặc và từng khối nhỏ dính nhau, có thể có lực tương tác mạnh do cấu hình phân nhánh cao hoặc tương tác tĩnh điện giữa các PS [142]. Sự khác biệt về cấu trúc vi mô thể hiện ở độ phân mảnh, độ mịn và sợi. A-PSC có hình dạng như tổ ong, cho thấy mức độ phân nhánh cao hơn, nhiều khối nhỏ liên kết lại, kết cấu xốp. Ở 2 phân đoạn W-PSC và S-PSC có sự tương đồng cao về hình dạng, tuy nhiên cấu trúc bề mặt có một số điểm khác biệt, W-PSC bề mặt nhiều khối nhỏ hơn.

Mẫu W-PST có cấu trúc dạng hạt và kết tụ, trong khi mẫu A-PST có một mức độ kết nối và nén chặt cao, làm giảm đáng kể độ xốp, mặc khác mẫu S-PST cấu trúc hạt cực kỳ nhỏ, đều đặn và được sắp xếp chặt chẽ. Bề mặt rất mịn và đồng nhất, gần như là một lớp vật liệu liên tục với các hạt nano hoặc tinh thể nhỏ. Điều này chứng tỏ dung môi chiết xuất ảnh hưởng đáng kể đến hình thái bề mặt của PS. Acid HCl có thể đã thủy phân một số thành phần, dẫn đến bề mặt mịn hơn, trong khi môi trường kiềm của natri cacbonat có khả năng phá vỡ các liên kết chéo trong mạng lưới polymer, dẫn đến sự trương nở và hình thành cấu trúc xốp. Khi độ phóng đại tăng lên, chi tiết bề mặt trở nên rõ ràng hơn, cho thấy sự khác biệt về cấu trúc giữa các mẫu. Những khác biệt này có thể ảnh hưởng đến tính chất hóa lý và hoạt tính sinh học của PS.

Các nghiên cứu trước đây cũng đã chỉ ra rằng dung môi chiết xuất có ảnh hưởng lớn đến cấu trúc và tính chất của PS [143]. Đã có nhiều báo cáo rằng chất xơ hòa tan trong cám kiều mạch tự nhiên có cấu trúc mịn, phẳng và đặc, ngược lại, chất xơ hòa tan được chiết xuất bằng phương pháp xử lý trước bằng hơi nước nóng có cấu trúc lỏng lẻo và bề mặt xốp [144].

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tùy thuộc vào đặc điểm cấu trúc các polysaccharide thể hiện các tính chất sinh học khác nhau [145,146]. Sự phụ thuộc này chủ yếu liên quan đến khối lượng phân tử (MW), thành phần hóa học, liên kết glycosidic, cấu trúc ba chiều, cấu hình phân nhánh và độ hòa tan thu được [146,147]. Các điều kiện chiết xuất cũng đóng vai trò quan trọng trong một số thông số, chẳng hạn như hiệu suất và chất lượng chiết xuất, cấu trúc hóa học và các đặc tính sinh học thu được [148]. Chẳng hạn nghiên cứu của Chen và cs. (2020) đã so sánh các polysaccharid được chiết xuất bằng nước nóng (HW), áp suất cao (HP), vi sóng (MA) và hỗ trợ siêu âm (UA) từ nấm *Schizophyllum commune* cho thấy pháp chiết đã ảnh hưởng đến hiệu suất polysaccharid, khối lượng phân tử (MW), thành phần monosaccharid và hoạt tính sinh học. Chiết xuất bằng sóng siêu âm mang lại khả năng chống oxy hóa và hạ đường huyết tốt nhất, mặc dù sản lượng thu được ít hơn và kích thước phân tử nhỏ hơn so với các phương pháp như dùng nước nóng, áp suất cao hay lò vi sóng. Các phương pháp chiết xuất này không làm thay đổi các liên kết hóa học cơ bản (theo phân tích quang phổ hồng ngoại), nhưng lại làm thay đổi rõ rệt tỷ lệ thành phần các loại đường đơn và cấu trúc vi mô bề mặt của polysaccharide. Song song đó, kính hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy sự khác biệt về cấu trúc vi mô của các chất chiết xuất polysaccharide [149].

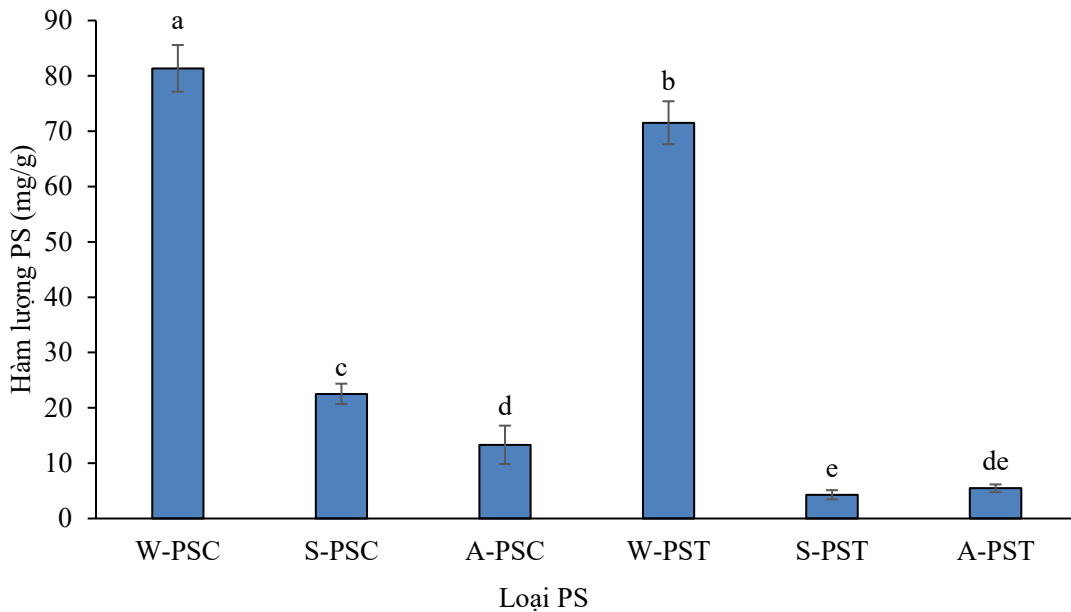
Tương tự, Shang et al. (2018) đã đánh giá tác động của các phương pháp chiết xuất khác nhau đến hiệu suất, khối lượng phân tử (MW) và thành phần monosaccharide của

polysaccharide. Nghiên cứu đã so sánh bốn phương pháp khác nhau: HW, UA, hỗ trợ enzyme và hỗ trợ enzyme-siêu âm và cho thấy phương pháp hỗ trợ enzyme tạo ra polysaccharide có tính chất chống oxy hóa cao hơn. Mặc dù trong nghiên cứu này đã chứng minh được cấu trúc xoắn ba của polysaccharide được chiết xuất, nhưng nghiên cứu này cũng thiếu phân tích về các loại liên kết và mức độ phân nhánh cũng như cách các phương pháp chiết xuất có thể ảnh hưởng đến các thông số này [150].

Tóm lại sự khác nhau cấu trúc trên bề mặt của PS sau khi chiết xuất bằng các dung môi khác nhau có thể ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng bộc lộ các vị trí phản ứng trên mạch polymer, do đó tác động đáng kể đến tương tác của chúng với các gốc tự do hay khả năng sử dụng của các chủng probiotic.

3.2.2. Hàm lượng polysaccharide tách chiết tuần tự từ hệ sợi nấm

Polysaccharide (PS) là một trong những thành phần cấu trúc chủ yếu của tế bào nấm, đồng thời là nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học trọng tâm đã được chứng minh mang lại nhiều lợi ích như: hạ đường huyết, kháng oxy hóa, điều hòa miễn dịch, kháng khối u, kháng khuẩn và chống viêm [151]. Thông thường, PS được phân lập bằng các dung môi phân cực, trong đó nước là dung môi phổ biến và lý tưởng nhất. Việc ứng dụng nhiệt độ cao trong quá trình chiết xuất bằng nước giúp đẩy nhanh tốc độ phá vỡ thành tế bào, từ đó gia tăng khả năng giải phóng và hòa tan PS [152]. Mặc dù chiết xuất bằng nước nóng là phương pháp truyền thống mang lại hiệu quả cao, một lượng lớn các phân đoạn PS không tan trong nước vẫn bị lưu giữ lại trong phần bã. Để khắc phục hạn chế này và khai thác toàn diện các dạng liên kết của PS, trong nghiên cứu này, quá trình chiết xuất tuần tự sinh khối hệ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor* đã được tiến hành bằng ba dung môi lần lượt là: nước nóng (H_2O), dung dịch kiềm (Na_2CO_3) và dung dịch acid (HCl). Kết quả về hiệu suất thu hồi của các phân đoạn PS được trình bày chi tiết tại **Hình 3.11**.



Hình 3.11. Hàm lượng PS chiết xuất từ hệ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor*

*Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 3$). Các chữ cái khác nhau chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $P < 0,05$). W-PS(C/T), S-PS(C/T), và A-PS(C/T) lần lượt là PS chiết xuất bằng H_2O , Na_2CO_3 và HCl từ hệ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor*.*

Kết quả chiết xuất tuần tự các phân đoạn PS từ sinh khối hệ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor* được trình bày tại **Hình 3.11**. Dữ liệu cho thấy hiệu suất chiết bằng nước (H_2O) cao hơn đáng kể so với hai tác nhân Na_2CO_3 và HCl . Điều này có thể giải thích do đặc tính của polysaccharide nấm phần lớn là các hợp chất dễ tan trong nước nóng; do đó, đa số các PS đã được giải phóng ngay từ giai đoạn đầu. Hệ quả là lượng PS còn lại trong bã nấm để chiết xuất bằng các dung môi tiếp theo đạt giá trị thấp.

Phương pháp xử lý bằng acid và kiềm giúp phá tế bào, gây ra sự phân hủy cấu trúc sợi thô và các liên kết thủy phân giữa glucan và protein thành tế bào (chẳng hạn như những loại có chuỗi bên liên kết O). Điều này giúp giải phóng PS nội bào và cho phép chiết xuất các thành phần hòa tan trong acid và kiềm cũng như chuyển đổi các thành phần không hòa tan trong nước thành các thành phần hòa tan trong nước. Chiết xuất nước nóng thường được sử dụng như một bước sơ bộ trước khi chiết xuất acid hoặc kiềm tiếp theo để tối đa hóa quá trình thu hồi PS [153]. Điều này là do một số PS có tính chất không hòa tan trong nước nóng. Do đó, dung dịch kiềm (Na_2CO_3) được sử dụng để tăng khả năng hòa tan PS và acid (HCl) được sử dụng để phá vỡ các liên kết glycosid của PS nhằm thu được các PS còn lại trong sợi nấm sau quá trình chiết suất bằng nước

nóng [154].



Hình 3.12. Hình thái các phân đoạn Polysaccharide tách chiết từ sợi nấm

C. militaris* và *T. versicolor

3.2.3. Khả năng kháng oxi hóa của các chiết xuất PS từ hệ sợi nấm

Đặc tính chống oxi hóa của các PS từ thực vật và nấm đã được nghiên cứu khá phổ biến và được sử dụng như các chất chống oxi hóa tự nhiên. Hoạt động chống oxi hóa của một loại hợp chất bất kỳ phụ thuộc vào khá nhiều yếu tố như hàm lượng lipid, nồng độ chất chống oxi hóa.

ABTS^{•+} là một gốc tự do dạng cation tương đối ổn định. Khi tương tác với các chất kháng oxi hóa gốc tự do sẽ nhận điện tử hoặc hydrogen để bị khử thành phân tử trung hòa bền vững và nhạt màu. Trong nghiên cứu này các phân đoạn PS khác nhau được pha loãng nồng độ từ 100-5000 $\mu\text{g/mL}$ với ascorbic acid được sử dụng làm đối chứng dương.

Bảng 3.7. Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS từ *C. militaris*

Nồng độ cao chiết ($\mu\text{g/mL}$)	khả năng trung hòa gốc tự do ABTS (%)		
	W-PSC	S-PSC	A-PSC
100	11,84 \pm 0,34 ^a	7,49 \pm 0,74 ^b	13,88 \pm 0,13 ^a
200	18,58 \pm 0,81 ^a	8,83 \pm 0,44 ^b	16,99 \pm 0,13 ^a
400	21,58 \pm 0,54 ^a	13,73 \pm 0,44 ^b	22,88 \pm 0,47 ^b
600	22,25 \pm 0,47 ^b	17,82 \pm 0,65 ^c	26,94 \pm 0,59 ^a
800	26,14 \pm 0,29 ^b	21,19 \pm 0,67 ^c	30,36 \pm 0,42 ^a
1000	31,37 \pm 0,91 ^a	24,54 \pm 0,34 ^b	32,59 \pm 0,37 ^a
2000	44,88 \pm 0,31 ^a	36,70 \pm 0,18 ^b	46,91 \pm 0,27 ^a
5000	86,15\pm0,79^a	69,64 \pm 0,51 ^b	81,51\pm0,56^a
IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	2446,51 \pm 24,34 ^c	3273,33 \pm 18,5 ^a	2474,24 \pm 2,78 ^b

Bảng 3.8. Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS của PS từ *T. versicolor*

Nồng độ cao chiết ($\mu\text{g/mL}$)	Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS (%)		
	W-PST	S-PST	A-PST
100	6,86 \pm 1,3 ^b	10,14 \pm 1,7 ^{ab}	11,45 \pm 1,1 ^a
200	9,61 \pm 0,3 ^c	14,27 \pm 1,3 ^b	17,93 \pm 1,0 ^a
400	20,38 \pm 1,9 ^b	21,36 \pm 3,3 ^b	29,09 \pm 2,2 ^a
600	27,13 \pm 2,2 ^b	28,73 \pm 1,7 ^b	36,72 \pm 1,4 ^a
800	37,83 \pm 2,9 ^b	34,81 \pm 0,5 ^b	43,43 \pm 0,3 ^a
1000	44,21 \pm 1,7 ^b	43,86 \pm 0,5 ^b	49,63 \pm 0,4 ^a
2000	84,64\pm3,1^a	71,78 \pm 1,6 ^c	79,08 \pm 0,5 ^b
IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	1142,5 \pm 21,72 ^b	1279,1 \pm 18,04 ^a	1070,6 \pm 18,25 ^c

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 3$). Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $P < 0,05$).

Kết quả cho thấy, khi nồng độ tăng lên khả năng bắt gốc tự do của các chiết xuất PS cũng tăng dần. Chiết xuất PS từ nấm *T. versicolor* cho hiệu quả bắt gốc tự do tốt hơn so với nấm *C. militaris*. Giá trị IC50 của 3 chiết xuất PS (W-PSC, S-PSC, A-PSC) nấm *C. militaris* được xác định lần lượt trong phương pháp này là 2446,51 \pm 24,34 $\mu\text{g/mL}$, 3273,33 \pm 18,54 $\mu\text{g/mL}$ và 2474,24,24 \pm 2,78 $\mu\text{g/mL}$ còn ở nấm *T. versicolor* là 1142,50 \pm 21,72 $\mu\text{g/mL}$; 1279,10 \pm 18 $\mu\text{g/mL}$; 1070,60 \pm 18,30 $\mu\text{g/mL}$. IC50 của các chiết xuất PS của 2 loại nấm này đều cao hơn so với IC50 của acid ascorbic với IC50 là: 83,89 \pm

0,39 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự nghiên cứu của Hằng và cộng sự năm 2017, exopolysaccharide (EPS) chiết xuất từ *Cordyceps sinensis* được nuôi cấy ở môi trường M2 trong 20 ngày và được đánh giá khả năng bắt gốc tự do ABTS \bullet^+ và xác định giá trị IC₅₀ đạt 2643,89 $\mu\text{g/mL}$, khả năng kháng oxi hoá thấp hơn so với cao chiết xuất PS trong nghiên cứu hiện tại. Điều này cho thấy sự tiềm năng của các PS được chiết xuất từ sợi nấm *C. militaris*. Tuy nhiên, đây là đặc điểm phổ biến ở các PS có nguồn gốc tự nhiên, do cấu trúc của chúng thường không chứa các nhóm chức có khả năng oxi hóa khử mạnh như phenol hoặc flavonoid, những thành phần chính trong các chất kháng oxi hóa chuẩn. So với một số các nghiên cứu khác về hoạt tính kháng oxi hóa của PS cho thấy khá có sự tương đồng, nghiên cứu của Petraglia (2023) hoạt tính kháng oxi hóa của PS tách chiết từ nấm *Pleurotus eryngii* là $1,15 \pm 0,09 \text{ mg/mL}$ [155]; nghiên cứu của Nesrine Teka và cs. (2022) cho thấy hoạt động kháng oxi hóa của các phân đoạn PS WPL, CPL và BPL chiết xuất từ lá *Allium roseum* lần lượt là 55,33%, 54,97% và 53,15%, ở nồng độ 3 mg/mL [156]. Cấu trúc xốp và lỏng lẻo, chẳng hạn như dạng tổ ong của mẫu A-PS (C/T) đã tạo điều kiện gia tăng đáng kể diện tích bề mặt tiếp xúc. Sự phân cắt không gian này giúp bộc lộ nhiều hơn các nhóm chức phân cực đang bị che khuất trong mạng lưới polymer (như các nhóm hydroxyl -OH tự do). Khi diện tích tiếp xúc tăng lên, các nhóm chức này dễ dàng tiếp cận và nhường hydrogen hoặc điện tử để trung hòa các gốc tự do, từ đó làm tăng mạnh khả năng chống oxy hóa của dịch chiết.

Hoạt tính bắt gốc tự do được cho là nhờ khả năng cho đi electron hoặc nguyên tử hydro, trung hòa các gốc tự do và giảm stress oxi hóa. Cả exopolysaccharide (EPS) và intracellular polysaccharide (IPS) chiết xuất từ *C. cicadae* đều thể hiện hoạt tính khử gốc tự do ABTS \bullet^+ đáng kể. Tỷ lệ ức chế tăng theo nồng độ, đạt mức ức chế tối đa ở 8.0 mg/mL [157]. Đối với *C. gracilis*, cả hai loại PS đều cho thấy hoạt tính khử gốc tự do ABTS \bullet^+ đáng kể, với hiệu ứng phụ thuộc vào nồng độ [158]. Ở *C. militaris*, các PS từ môi trường rắn được tách thành bốn thành phần bằng phương pháp kết tủa phân đoạn ethanol cho thấy hoạt tính kháng oxi hóa mạnh hơn *in vitro* [159].

Theo Chen và cs. (2013), PS tinh khiết chủ yếu bao gồm Glc (47,5%), Man (34,3%), Gal (10,8%) và Ara (4,85%) trong liên kết glycosid loại α có thể loại bỏ các gốc tự do, hydroxyl và superoxide trong ống nghiệm [160]. Nghiên cứu này cũng chứng minh rằng Glc và cấu hình β có thể tăng cường hoạt động kháng oxi hóa. Thứ hai, các ion chứa trong PSs có thể góp phần vào hoạt động kháng oxi hóa.

Hoạt tính khử gốc tự do ABTS \bullet^+ của PS chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như khối lượng phân tử, thành phần monosaccharide, nhóm chức, phương pháp chiết xuất và đặc

điểm cấu trúc. Các PS có khối lượng phân tử thấp hơn thường thể hiện hoạt tính kháng oxi hóa mạnh hơn [161]. Loại và tỷ lệ monosaccharide trong PS ảnh hưởng đáng kể đến đặc tính kháng oxi hóa của chúng. Nghiên cứu trên *Panax ginseng* cho thấy các PS acid có hàm lượng acid uronic cao hơn thể hiện hoạt tính khử gốc tự do ABTS^{•+} mạnh hơn so với PS trung tính [162]. Sự hiện diện của các nhóm chức đặc biệt, như acid uronic và sulfate, ảnh hưởng đến hoạt tính kháng oxi hóa. Một nghiên cứu về PS từ *Cordyceps* nổi bật tác động của các nhóm chức lên hoạt tính khử gốc tự do ABTS. Quá trình sulfat hóa một exopolysaccharide (EPS-1) từ *Cordyceps sinensis* làm tăng đáng kể hoạt tính kháng oxi hóa, tăng TEAC từ 21,0 lên 66,5 $\mu\text{mol Trolox/g}$. Sự cải thiện này được cho là nhờ các nhóm sulfate, giúp tăng mật độ electron và khả năng khử gốc tự do [163]. Kỹ thuật chiết xuất PS cũng ảnh hưởng đến khả năng kháng oxi hóa của chúng. PS chiết xuất từ hạt và thịt chà là Ajwa bằng phương pháp siêu âm hỗ trợ thể hiện hoạt tính khử gốc tự do ABTS^{•+} cao hơn so với chiết xuất bằng nước nóng [164]. Cấu trúc tổng thể, bao gồm kiểu phân nhánh và liên kết glycosidic, đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính kháng oxi hóa. Ví dụ, PS từ *Astragalus* có khối lượng phân tử trung bình cho thấy khả năng khử gốc tự do ABTS^{•+} mạnh nhất, gợi ý rằng cả khối lượng phân tử và cấu hình cấu trúc đều là yếu tố quan trọng [163]. Những phát hiện này nhấn mạnh rằng hoạt tính kháng oxi hóa của PS, được đo bằng xét nghiệm khử gốc tự do ABTS^{•+}, là đa diện và chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố nội sinh và ngoại sinh.

Trong nghiên cứu này, PS chiết xuất tuần tự từ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor* đã thấy được mối quan hệ giữa nồng độ PS và hoạt động kháng oxi hóa. Tuy khả năng kháng oxi hóa của PS không cao như Ascorbic acid trong các thử nghiệm trực tiếp, nhưng giá trị ứng dụng thực tiễn của PS còn được quyết định bởi nhiều cơ chế sinh học phức tạp khác. Ascorbic acid hoạt động như một chất kháng oxi hóa trực tiếp, nhanh chóng trung hòa các gốc tự do, còn điểm mạnh của PS là tính đa năng, độ an toàn cao và khả năng tương tác phức tạp với các hệ thống sinh học trong cơ thể. PS có khả năng góp phần duy trì cân bằng nội môi oxi hóa - khử một cách bền vững và toàn diện thông qua nhiều cơ chế khác nhau như: kích hoạt hệ thống enzyme nội sinh (Tăng sản xuất SOD, catalase, glutathione peroxidase); điều hòa con đường tín hiệu (Tác động lên Nrf2/ARE, NF- κ B để kiểm soát biểu hiện gene liên quan đến stress oxi hóa); bảo vệ cấu trúc tế bào (Ổn định màng tế bào, giảm rò rỉ electron từ ty thể); chelate ion Fe²⁺ [165].

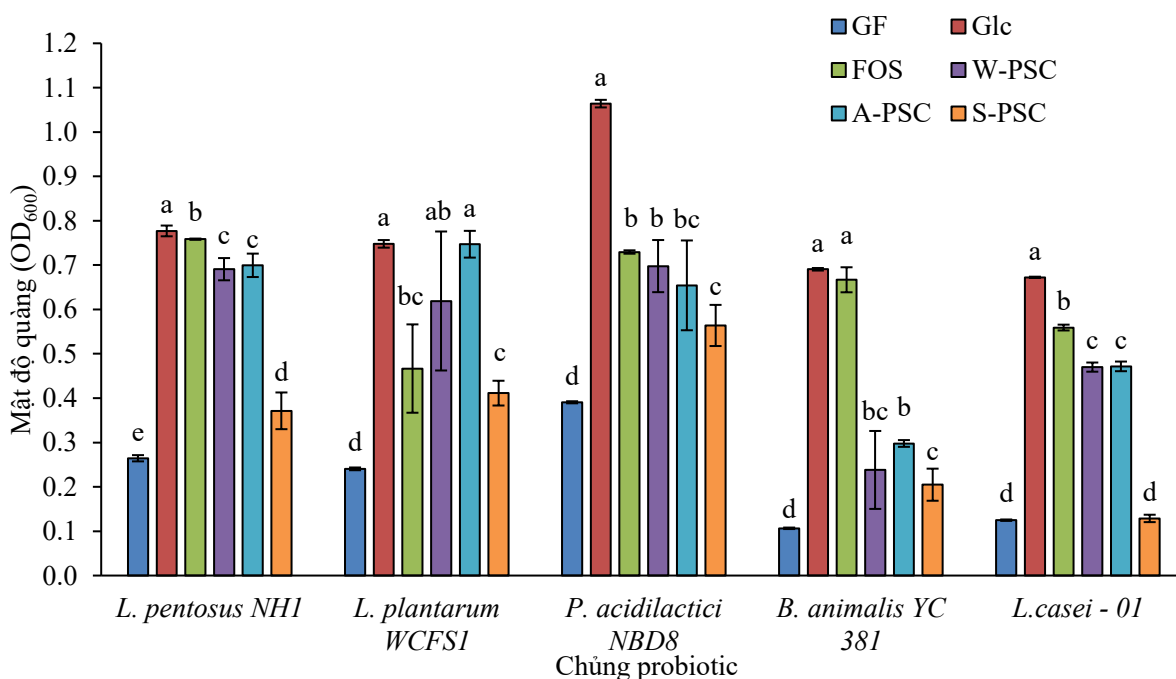
3.2.4. Hoạt tính prebiotic của PS chiết xuất từ hệ sợi nấm

Prebiotic, theo định nghĩa của ISAPP, là thành phần thực phẩm không tiêu hóa được sử dụng chọn lọc làm thức ăn cho vi sinh vật [166]. Hoạt tính prebiotic của

polysaccharide là do khả năng chuyển hóa có chọn lọc của các probiotic, do đó kích thích sự phát triển của chúng [167]. Trong nghiên cứu này đã đánh giá hoạt tính prebiotic của các PS chiết xuất từ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor* thông qua đánh giá khả năng các chủng probiotic sử dụng PS làm nguồn dinh dưỡng và đánh giá thông qua chỉ số hoạt động prebiotic.

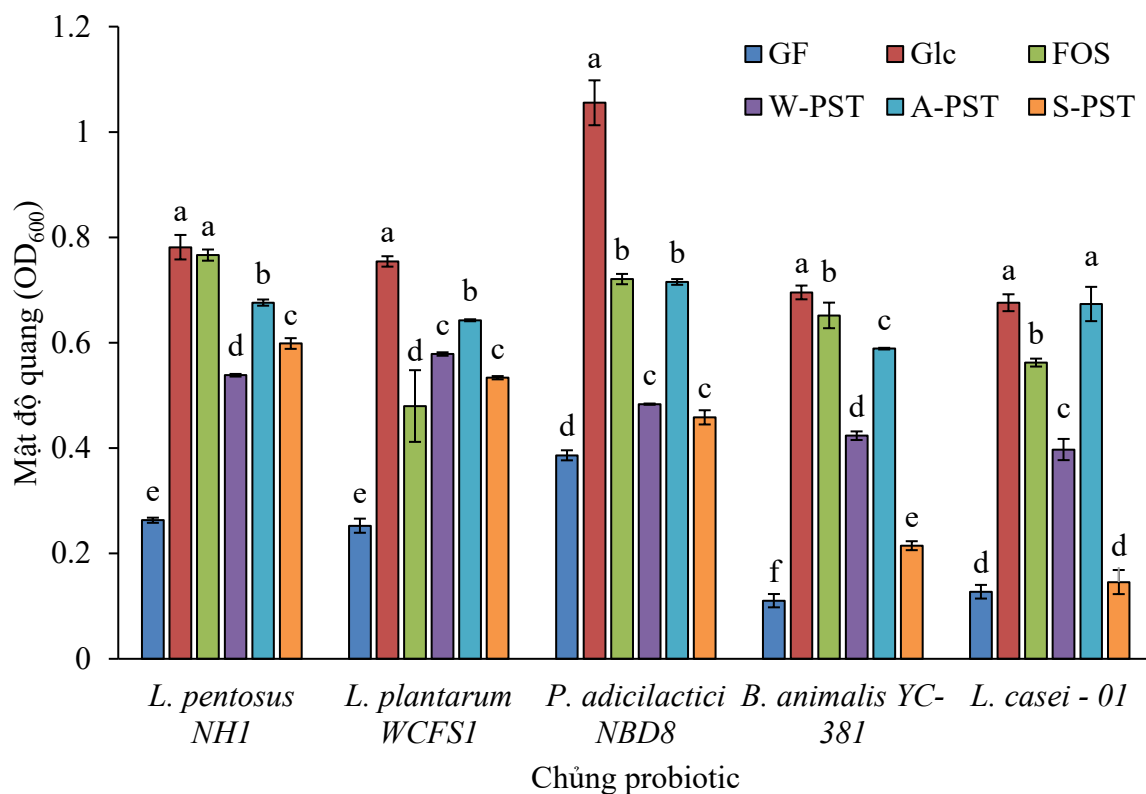
3.2.4.1. Khả năng kích thích sự sinh trưởng probiotic

Để đánh giá một loại carbohydrate nhất định có hoạt tính prebiotic, đầu tiên, carbohydrate đó cũng phải được chuyển hóa bởi các chủng probiotic tương tự như quá trình chuyển hóa glucose. Trong nghiên cứu này đã sử dụng 5 chủng vi khuẩn *P. acidilactici* NBD8, *L. pentosus* NH1 và *L. plantarum* WCFS1, *B. animalis* YC381 và *L. casei* – 01 để đánh giá khả năng sử dụng PS làm nguồn carbon. Đánh giá thông qua các môi trường không chứa glucose, môi trường kiểm soát glucose (1g/L), môi trường bổ sung 1g/L PS, và môi trường bổ sung 1g/L prebiotic thương mại (FOS). Kết quả được trình bày trong **Hình 3.13** và **Hình 3.14**.



Hình 3.13. Khả năng sinh trưởng của probiotic trên môi trường bổ sung PS chiết xuất từ sợi nấm *C. militaris*

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 15$). Các chữ cái khác nhau trong cùng một chủng probiotic thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $p < 0,05$) GF: không chứa glucose, Glc: bổ sung glucose 1g/L; W-PSC: bổ sung chiết xuất PS từ nước 1g/L; A-PSC: bổ sung chiết xuất từ HCl 1g/L; S-PSC: bổ sung chiết xuất từ Na_2CO_3 1g/L, FOS: bổ sung FOS 1g/L.



Hình 3.14. Khả năng sinh trưởng của các chủng probiotic trên môi trường bổ sung chiết xuất PS nấm *T. versicolor*

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 15$). Các chữ cái khác nhau trong cùng một chủng probiotic thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $P < 0,05$). GF: không chứa glucose; Glc: bổ sung glucose 1g/L; W-PST: bổ sung chiết xuất PS từ nước 1g/L; A-PST: bổ sung chiết xuất từ HCL 1g/L; S-PST: bổ sung chiết xuất từ Na_2CO_3 1g/L; FOS: bổ sung FOS 1g/L.

Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các chủng probiotic đều sinh trưởng trên các môi trường nghiên cứu. Tuy nhiên ở các môi trường khác nhau các chủng probiotic có sự sinh trưởng khác nhau đáng kể. Trên môi trường GF, khả năng sinh trưởng của các chủng probiotic rất thấp do thiếu nguồn carbon cần thiết cho quá trình trao đổi chất. Còn trên môi trường sử dụng glucose là nguồn carbon các chủng probiotic có đều tốc độ tăng trưởng cao điều này là do glucose dễ dàng được hấp thụ và chuyển hóa ngay lập tức thông qua các con đường trao đổi chất cơ bản. Trên các môi trường bổ sung phân đoạn PS, tất cả các chủng vi khuẩn đều có khả năng sinh trưởng, tuy nhiên ở một số phân đoạn PS sự sinh trưởng này khá thấp. Việc sử dụng PS sinh trưởng không đồng đều ở các chủng, một số chủng có thể sử dụng chiết PS này phát triển tốt tuy nhiên lại sử dụng kém chiết xuất PS khác. Chủng *B. animalis* và *L. casei* sinh trưởng kém trên môi trường bổ sung S-PSC và S-PST, chủng *P. acidilactici* sinh trưởng kém trên cả môi trường S-

PST và W-PST, nhưng cả 3 chủng này lại sinh trưởng tốt trên A-PST. Nguyên nhân là do PS là nguồn carbon phức tạp hơn glucose, để sử dụng PS vi khuẩn cần tiết ra các enzyme ngoại bào. Tuy nhiên, không phải tất cả các chủng đều có khả năng sản xuất đủ lượng enzyme cần thiết để phân hủy PS. Chỉ những chủng có bộ gene mã hóa cho các enzyme phù hợp mới có thể sử dụng PS hiệu quả.

Hình thái vi mô cũng là yếu tố then chốt quyết định khả năng lên men của các chủng vi khuẩn probiotic. A-PS có cấu trúc xốp, có mức độ phân nhánh cao và kích thước hạt nhỏ nên có thể tạo ra nhiều không gian vi lỗ cho phép các enzyme ngoại bào của vi khuẩn đường ruột dễ dàng khuếch tán, thâm nhập và bám dính vào mạch polysaccharide để thực hiện quá trình cắt đứt liên kết glycosidic điều này giải thích nguyên nhân ở phân đoạn A-PS các chủng đều phát triển tốt. Các phân đoạn PS có kết cấu lỏng lẻo sẽ bị thủy phân nhanh hơn thành các oligosaccharide và đường đơn, cung cấp nguồn carbon tức thời cho sự sinh trưởng của vi khuẩn có lợi. Trong khi đó, các cấu trúc hạt lớn, đóng cục rắn chắc có thể làm chậm quá trình lên men.

Phần lớn các chủng có thể phát triển trên môi trường chiết xuất PS cho thấy các chiết xuất PS từ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor* có thể là nguồn dinh dưỡng cho các probiotic. Kết quả này cũng tương tự nghiên cứu Phirom-on & Apiraksakorn (2021), *L. plantarum* SKKL1, *L. plantarum* TISTR 2075 và *L. casei* TISTR 1463 có thể sử dụng nguồn cellodextrin chiết xuất từ vỏ chuối làm nguồn carbon [125]. Nghiên cứu của HongSong và cs 2022 cũng cho thấy các ASP được tách chiết bằng các phương pháp khác nhau đều có hoạt tính prebiotic và điều này được giải thích là do chúng đều được cấu tạo từ glucose và galactose [168]. Synytsya và cs. (2009) đã nghiên cứu và cho thấy α -(1 3)- Glucan được phân lập từ thành tế bào của hai loài *P. ostreatus* và *P. eryngii* kích thích sự phát triển của vi khuẩn *bifidobacteria* và *lactobacillus*. Các đặc tính prebiotic của nhiều PS đã được nghiên cứu rộng rãi và được biết đến rộng rãi, trong khi ở nhóm α -(1 3)-glucan, hoạt tính prebiotic của chỉ một số loại α -(1 3)-glucan nhất định đã được chứng minh [169]. Một nghiên cứu khác của Cor và Cs. (2018) đã tổng quan về các PS từ nấm dược liệu và chỉ ra rằng beta-glucans, một loại PS phổ biến trong nấm, có thể có tác dụng prebiotic bằng cách kích thích sự phát triển của vi khuẩn đường ruột có lợi [170]. Tương tự, một nghiên cứu của Jayachandran và cs. (2017) đã xem xét các đặc tính prebiotic của PS từ nấm *Ganoderma lucidum* (Linh chi) và cho thấy nó có khả năng tăng cường sự phát triển của *lactobacillus* và *bifidobacteria* trong các nghiên cứu in vitro [171].

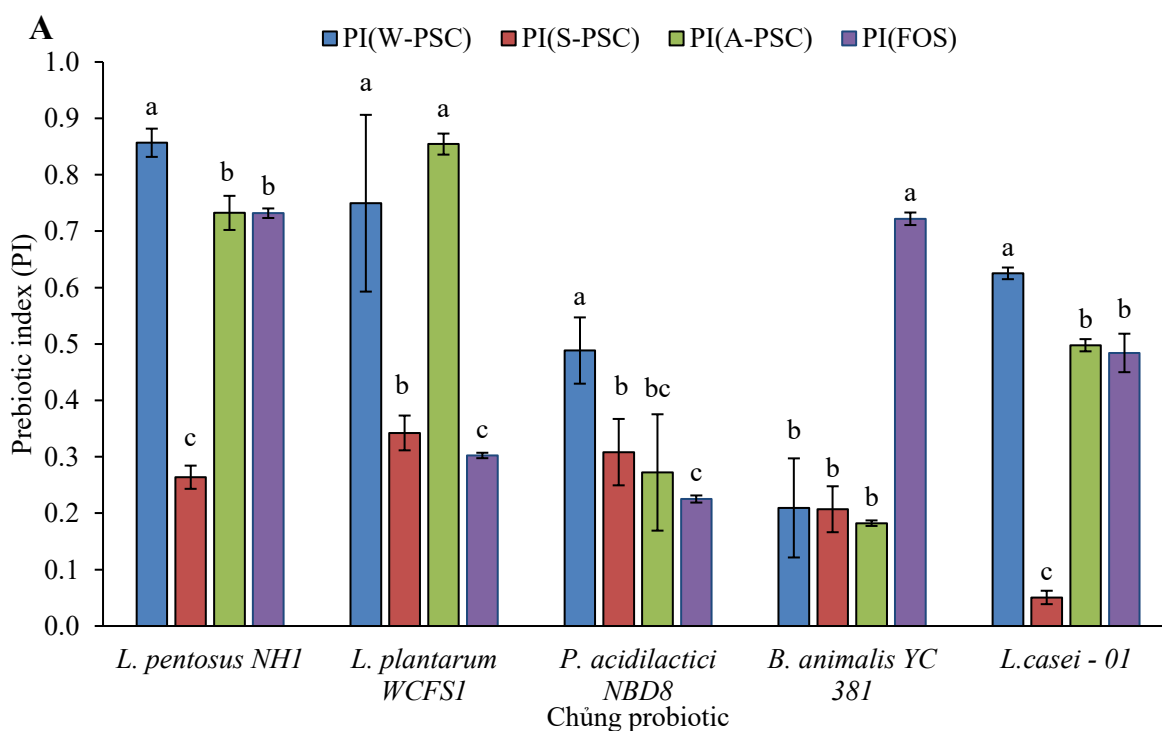
Ở tất cả 5 chủng nuôi cấy trên môi trường bổ sung A-PSC và A-PST đều thấy có sự sinh trưởng khá tốt, có chủng cao hơn và có chủng gần tương đương như FOS. Trong quá trình tách chiết acid đã phá vỡ cấu trúc của PS thành các phân tử nhỏ hơn (oligosaccharide, đường đơn) nên các chủng có thể dễ dàng sử dụng hơn so với 2 chiết xuất còn lại. FOS là một prebiotic, có khả năng kích thích sự phát triển của các chủng probiotic, đặc biệt là các chủng *Bifidobacterium* và *Lactobacillus*. FOS là các oligosaccharide, có cấu trúc đơn giản hơn so với PS nên dễ dàng bị phân hủy bởi các enzyme của vi khuẩn. Nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng FOS là nguồn cacbon tốt nhất cho sự phát triển của vi khuẩn probiotic [172]. Hơn nữa, FOS giàu ketone làm giảm viêm da dị ứng bằng cách điều chỉnh hệ vi khuẩn đường ruột và nó đóng vai trò thiết yếu trong việc điều chỉnh sự phát triển của các vi sinh vật này. PS chiết xuất từ sợi nấm là PS thô chưa qua tinh sạch và còn một số không tan trong nước như S-PST nên khả năng sử dụng có thể kém hơn prebiotic thương mại, Prebiotic thương mại đã được tinh sạch và được nghiên cứu chứng minh có thể kích thích sinh trưởng một cách chọn lọc sự phát triển của các loài vi khuẩn có lợi.

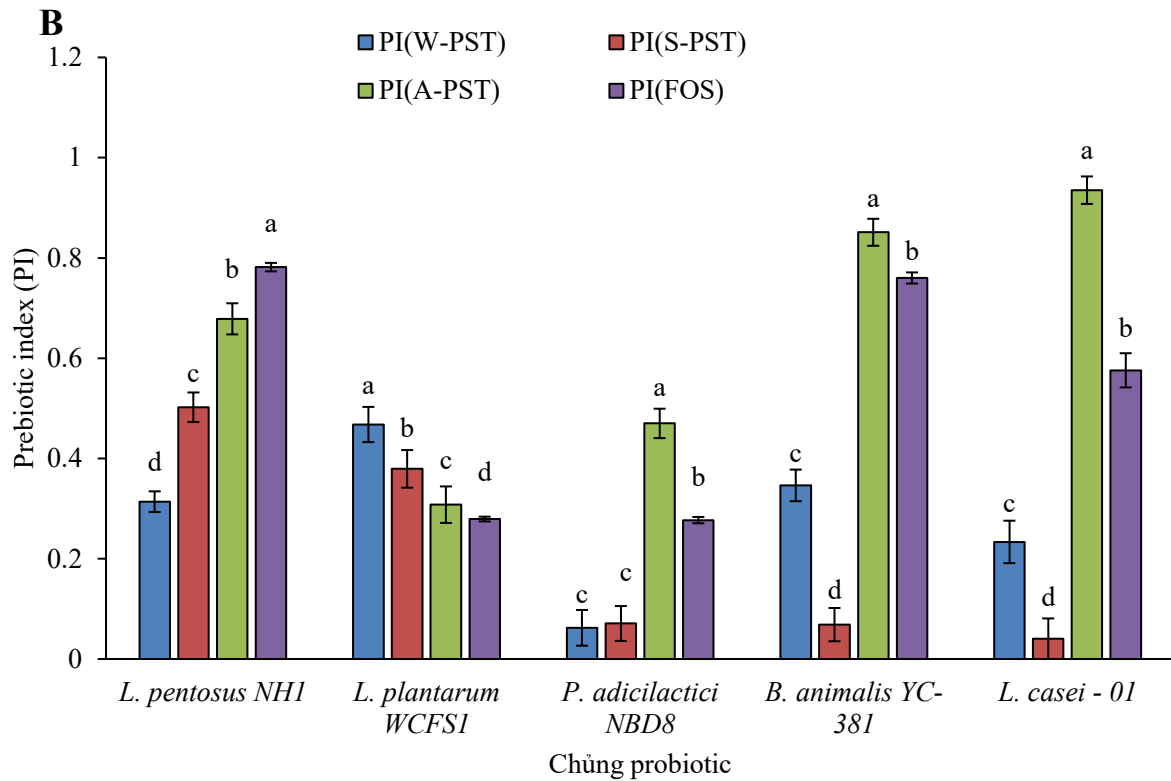
Yu và cs. (2013) nhận thấy rằng chiết xuất PS peptide (PSP) từ nấm Vân chi làm tăng đáng kể nồng độ *Bifidobacterium* và *Lactobacillus* trong môi trường nuôi cấy hệ vi sinh vật phân người, tương tự như tác dụng của fructooligosaccharides (FOS), một prebiotic đã biết. Nghiên cứu cũng cho thấy sự giảm số lượng *Clostridium*, *Staphylococcus* và *Enterococcus* spp., giảm độ pH và tăng sản xuất acid hữu cơ (lactate và SCFAs) [173]. Trong những năm gần đây rất nhiều nghiên cứu đã cho thấy polysaccharide từ nấm có khả năng kích thích sự sinh trưởng của probiotic và ức chế mầm bệnh. Nghiên cứu của Zhou và cs. (2022) cho thấy polysaccharid từ nấm *Ramaria flava*, được phát hiện có hoạt tính prebiotic bằng cách kích thích sự phát triển của *Lactobacillus rhamnosus* và tăng cường sản xuất SCFA. Quả thể nấm *P. ostreatus* đã được chứng minh là có hoạt tính prebiotic bằng cách kích thích sự phát triển của các chủng vi khuẩn probiotic (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*) mạnh hơn các probiotic thương mại như inulin và fructo-oligosaccharide [174]. Các nghiên cứu lên men in vitro đã chỉ ra rằng polysaccharid nấm có thể đóng vai trò là chất nền có thể lên men cho vi sinh vật đường ruột, dẫn đến những thay đổi chọn lọc trong quần thể vi khuẩn [175]. Đặc biệt, một số nghiên cứu đã báo cáo sự gia tăng các chi vi khuẩn thường liên quan đến sức khỏe đường ruột, bao gồm *Bifidobacterium* và *Lactobacillus*, đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì chức năng hàng rào ruột, sản xuất các chất chuyển hóa có lợi và ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây bệnh [176].

Các thử nghiệm trên mô hình động vật đã củng cố thêm những nhận định này. Cụ thể, việc bổ sung chiết xuất nấm hoặc polysaccharid vào khẩu phần đã được chứng minh là có thể thay đổi thành phần vi khuẩn đường ruột và tăng tỷ lệ các chủng vi khuẩn có lợi [176]. Bên cạnh *Bifidobacterium* và *Lactobacillus*, một số nghiên cứu còn ghi nhận sự gia tăng *Akkermansia*, một loại vi khuẩn phân hủy mucin có vai trò quan trọng trong việc tăng cường hàng rào bảo vệ niêm mạc ruột và cải thiện sức khỏe trao đổi chất. Đồng thời, việc sử dụng nấm cũng giúp điều chỉnh tỷ lệ *Firmicutes/Bacteroidetes*, một chỉ số vi sinh quan trọng có mối liên hệ mật thiết với các hội chứng rối loạn chuyển hóa và tình trạng viêm nhiễm [177].

3.2.4.2. Chỉ số prebiotic của các chiết xuất PS sợi nấm

Hoạt động của prebiotic được định nghĩa là khả năng của một chất nền cụ thể, thường là một chất prebiotic, trong việc hỗ trợ sự phát triển của các vi khuẩn có lợi trong đường ruột so với các vi khuẩn khác. Để đánh giá hoạt động của prebiotic, nó thường được so sánh với sự phát triển trên một chất nền không phải prebiotic, thường là glucose. Do đó, carbohydrate có điểm hoạt động prebiotic tích cực nếu chúng được chuyển hóa cũng như glucose bởi các chủng probiotic; và được chuyển hóa có chọn lọc bởi probiotic chứ không phải bởi các vi khuẩn đường ruột khác [127].





Hình 3.15. Chỉ số prebiotic (PI) của các phân đoạn polysaccharide đối với các chủng probiotic khảo sát. (A) Các phân đoạn từ hệ sợi nấm *C. militaris*; (B) Các phân đoạn từ hệ sợi nấm *T. versicolor*.

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 15$). Các chữ cái khác nhau ở cùng thời điểm lên men chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $p < 0,05$).

Kết quả nghiên cứu cho thấy chỉ số PI của tất cả các PS đều lớn hơn 0, tuy nhiên có sự khác nhau khá lớn giữa các chiết xuất PS và giữa các chủng. Các chủng probiotic có khả năng sử dụng các chiết xuất PS khác nhau. PS chiết xuất ở loài nấm khác nhau cũng cho thấy chỉ số PI khác nhau. Ở nấm *C. militaris* chỉ số PI của S-PSC ở tất cả các chủng nghiên cứu đều rất thấp. Mặc khác, W-PSC và A-PSC chỉ số khá cao ở hầu hết các chủng trừ *B. animalis*. Còn ở nấm *T. versicolor* chỉ số PI của S-PST và W-PST ở chủng *P. acidilactici* và S-PST ở chủng *B. animalis* và *L. casei* rất thấp. Nguyên nhân là do ở các PS này các chủng sử dụng dễ sinh trưởng rất kém so với Glucose. Tuy các chủng một số chủng sinh trưởng rất kém trên một số nguồn PS nhưng chỉ số PI không bị âm vì *E. coli* không hoặc sử dụng rất ít các PS này để sinh trưởng. Chỉ số hoạt động prebiotic của A-PST cao nhất đạt 0,935 ở chủng *L. casei* cao hơn khá lớn so với cả FOS. Trên các chủng *B. animalis* và *P. acidilactici* chỉ số PI của A-PST cũng đều cao hơn so với FOS; song song với đó W-PST cũng cho chỉ số PI cao hơn so với FOS, nguyên nhân

là do A-PST và W-PST đã kích thích mạnh sự phát triển của chủng này hơn cả FOS. A-PST đều cho chỉ số PI khá cao ở tất cả các chủng nên đây có thể là nguồn prebiotic tiềm năng trong tương lai. Đối với phân đoạn A-PST là phân đoạn chiết cuối cùng bằng acid nên đây là các đoạn PS nằm sâu bên trong tế bào, theo hình ảnh SEM thì cấu trúc các PS mịn hơn, có độ phân nhánh, nhiều khối nhỏ nên các probiotic dễ dàng sử dụng làm thức ăn cho sự sinh trưởng và phát triển, dẫn đến chỉ số PI cao đối với *B. animalis* và *L. casei*.

Cùng một loại PS nhưng ở các chủng khác nhau và trong cùng một chủng giữa các loại PS khác nhau có chỉ số hoạt động prebiotic khác nhau khá lớn. Chỉ số PI ở các chiết xuất PS và FOS nuôi trên 2 chủng *L. pentosus* và *L. plantarum* WCFS1 có biên độ dao động nhỏ hơn so với các chủng còn lại. Nguyên nhân do 2 chủng này đều có thể sử dụng các nguồn PS này ở mức cao và vừa phải; ở các chủng còn lại có loại chiết xuất PS được sử dụng rất tốt còn có loại được sử dụng khá kém. Lý giải cho điều này là do các chủng vi sinh vật khác nhau có khả năng trao đổi chất khác nhau gây ra sự khác biệt về điểm hoạt động prebiotic. Các chủng probiotic cần có hệ thống enzyme thủy phân cụ thể để sử dụng prebiotic. Do đó, các gen mã hóa cho các hệ thống trao đổi chất này có thể có hoặc không có ở các chủng khác nhau, dẫn đến chỉ số hoạt động prebiotic khác nhau. Mỗi chủng probiotic có thể có sự biến đổi gen và sự hoán vị trong các hệ thống này, điều này có thể tạo ra sự đa dạng trong khả năng chúng sử dụng và chuyển hóa prebiotic. Do đó, các chủng khác nhau có sự hoán vị và sự kết hợp khác giữa các đoạn gen trong hệ thống vận chuyển mã hóa gen phân giải PS gây ra sự khác biệt về điểm hoạt động prebiotic [178].

FOS là một prebiotic phổ biến, tuy nhiên hiệu quả của nó cũng thay đổi đáng kể giữa các chủng được thử nghiệm, chỉ số PI đều khá tốt nhưng có sự biến động tương đối giữa các chủng. Điều này củng cố thêm tính đặc hiệu trong tương tác prebiotic-probiotic.

Chỉ số PI của PS chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như cấu trúc phân tử và mức độ trùng hợp, khả năng hoà tan trong nước, tốc độ lên men và sản xuất SCFAs, tính chọn lọc của vi sinh vật, quá trình chế biến và biến đổi. Các oligosaccharide chuỗi ngắn (FOS, GOS) có PI cao hơn do dễ lên men, trong khi PS chuỗi dài (cellulose, tinh bột kháng) có PI thấp do lên men chậm. Chất xơ hòa tan (inulin, pectin, β -glucan) có PI cao hơn do thúc đẩy lên men và sản xuất acid béo chuỗi ngắn (SCFAs), trong khi chất xơ không hòa tan (cellulose) có khả năng lên men thấp và PI thấp [179]. Sản xuất nhiều butyrate, acetate và propionate tương quan với PI tốt hơn. Inulin, FOS và XOS thúc đẩy vi khuẩn sản xuất butyrate, cải thiện sức khỏe đường ruột [180]. Prebiotic tốt sẽ kích thích chọn

lợi khuẩn (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) trong khi hạn chế vi khuẩn gây bệnh. Arabinoxylan, pectin và β -glucan có thể hỗ trợ một số chủng *Bacteroides* [181]. Thủy phân bằng enzyme có thể làm tăng PI bằng cách phá vỡ PS thành oligosaccharide dễ lên men hơn. Trong khi đó, xử lý nhiệt (ép đùn, hấp khử trùng) có thể làm giảm hoạt tính prebiotic ở một số chất xơ [179]. Nhiều nghiên cứu cho thấy việc bổ sung polysaccharid có nguồn gốc từ sợi nấm làm giảm đáng kể các triệu chứng bệnh lý viêm loét dạ dày, cải thiện tình trạng dinh dưỡng, giảm tỷ lệ tiêu chảy và giảm viêm. Quan trọng hơn, việc sử dụng polysaccharid giúp tăng cường chức năng ruột và định hình lại hệ vi sinh vật đường ruột [182]. Nghiên cứu của Larypoor và cs., (2025) đã đánh giá tiềm năng prebiotic và hoạt tính chống oxy hóa của polysaccharide (PS) chiết xuất từ sinh khối nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*) và nấm Hương (*Lentinula edodes*) cho thấy PS từ nấm có cấu trúc carbohydrate phức tạp, khả năng kháng enzyme tiêu hóa ưu việt hơn inulin và thể hiện hoạt tính dọn gốc tự do (DPPH) đáng kể. Khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy không đường ở điều kiện tối ưu (pH 5.0, 37°C), PS của cả hai loại nấm đã kích thích hiệu quả sự sinh trưởng của các chủng probiotic theo một động học lên men đặc thù [183].

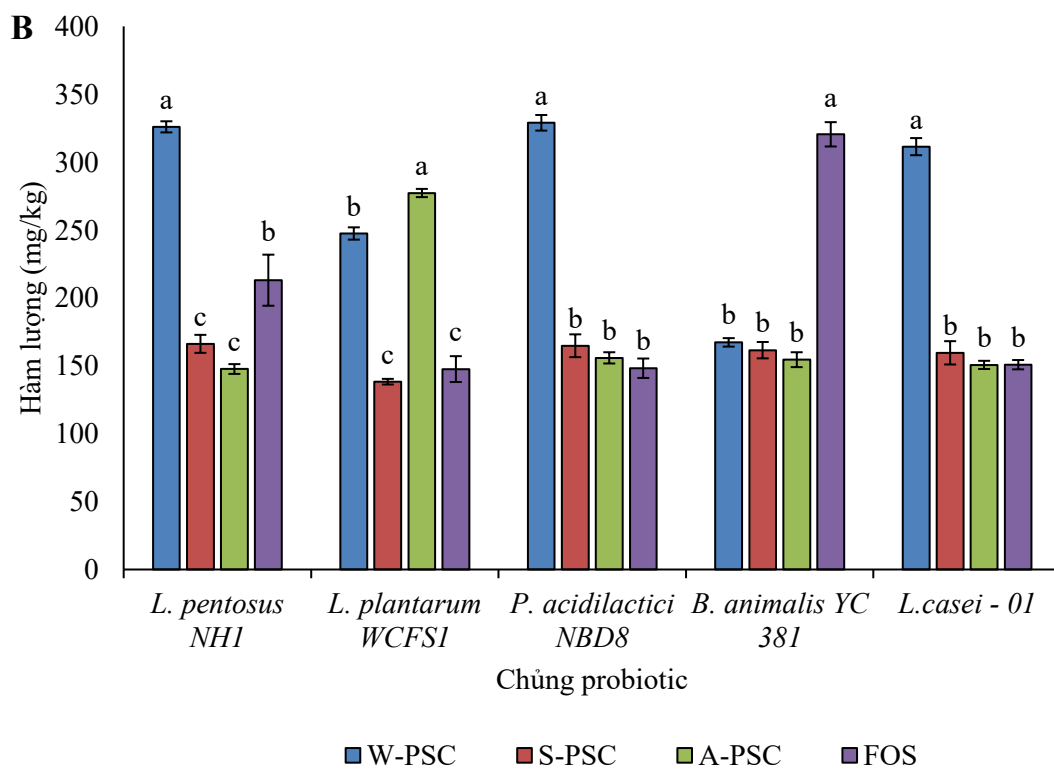
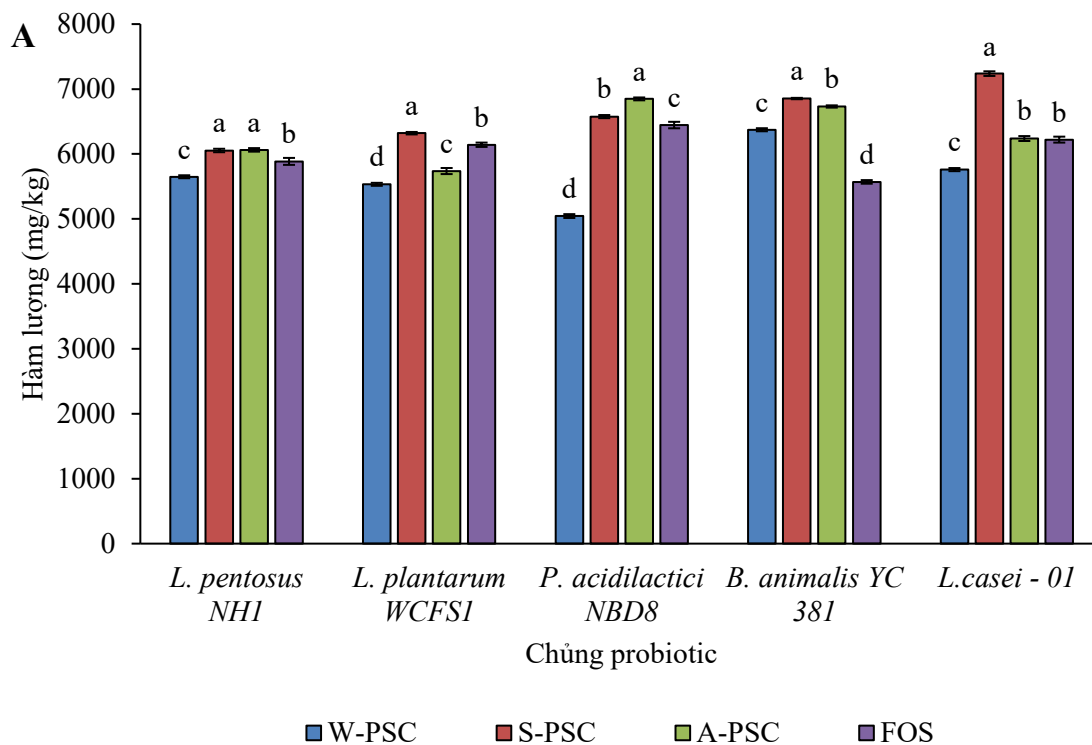
Thông qua chỉ số PI trong nghiên cứu này đã cho thấy được PS tách chiết tuần tự từ các dung môi khác nhau là ứng viên tiềm năng cho việc phát triển các thành phần prebiotic mới, có thể được ứng dụng trong các sản phẩm synbiotic để tăng cường hiệu quả của các chủng probiotic cụ thể.

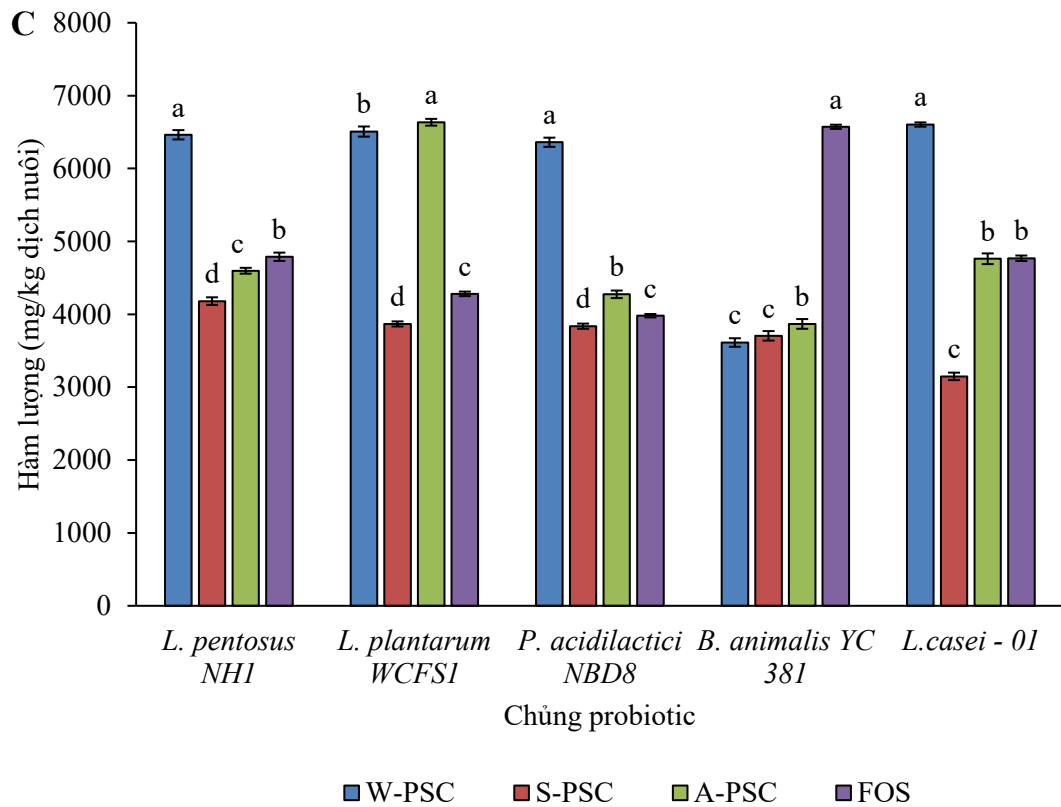
3.2.4.3. Ảnh hưởng của các chiết xuất PS đến hàm lượng acid béo chuỗi ngắn tạo thành

Acid béo chuỗi ngắn (SCFAs) đang nổi lên như một số hợp chất được nghiên cứu nhiều nhất trong thập kỷ qua, do tác động có lợi đã được chứng minh của chúng đối với sức khỏe con người [184]. SCFAs, bao gồm acetate, propionate và butyrate, là các phân tử năng lượng và tín hiệu quan trọng, do đó ảnh hưởng đến nhiều quá trình sinh lý khác nhau [185]. Ngoài ra, có thể làm giảm nguy cơ mắc bệnh đường tiêu hóa, ung thư và bệnh tim mạch. SCFAs có thể được phát hiện trong môi trường tăng trưởng của 5 chủng *L. plantarum* WCFS1, *L. pentosus* NH1, *P. acidilactici* NBD8, *B. animalis* YC381, *L. casei*-01 sau 24 giờ nuôi cấy bằng hệ thống HPLC dòng Agilent 1200 với máy dò RI (Agilent, Đức) và cột Aminex HPX87H (BioRad, Hercules, CA, Mỹ) được sử dụng để thực hiện phân tích SCFAs. Các điều kiện phân tích như sau: pha động 3 mM H₂SO₄ ở 0,6 mL min⁻¹, 50°C.

a. Hàm lượng SCFAs trong môi trường bổ sung PS chiết xuất nấm *C. militaris*

Kết quả định lượng các acetic acid, propionic acid và butyric acid được sinh ra trong quá trình sinh trưởng phát triển của các chủng probiotic ở các nghiệm thức bổ sung các PS chiết xuất khác nhau của sợi nấm *C. militaris* được thể hiện ở hình 3.16.





Hình 3.16. Ảnh hưởng của PS đến hàm lượng SCFAs. A: *Butyric acid*; B: *Propionic acid*; C: *Acetic acid*

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 3$). Các chữ cái khác nhau trong một nhóm cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $P < 0,05$).

Acetic acid là SCFA cao nhất thu được, dao động từ 5044,35 - 7237,35 mg/kg, tiếp theo là acid butyric 3147,95 - 6634,99 mg/kg và thấp nhất là acid propionic 138,31-328,97 mg/kg. Hàm lượng acetic acid được sản xuất trong môi trường nuôi cấy probiotic được bổ sung các chiết xuất PS khác nhau không khác biệt đáng kể (**Hình 3.16A**). Trong khi đó, lượng propionic acid và butyric acid thu được cao hơn đáng kể khi probiotic (trừ chủng *B. animalis* YC381) được bổ sung chiết xuất W-PSC so với môi trường nuôi cấy được bổ sung chiết xuất A-PSC, S-PSC và FOS (**Hình 3.16B** và **Hình 3.16C**). *B. animalis* YC381 khi được nuôi cấy trong môi trường bổ sung FOS có hàm lượng butyric acid và propionic acid cao hơn nhiều so với môi trường bổ sung chiết xuất PS từ sợi nấm *C. militaris*.

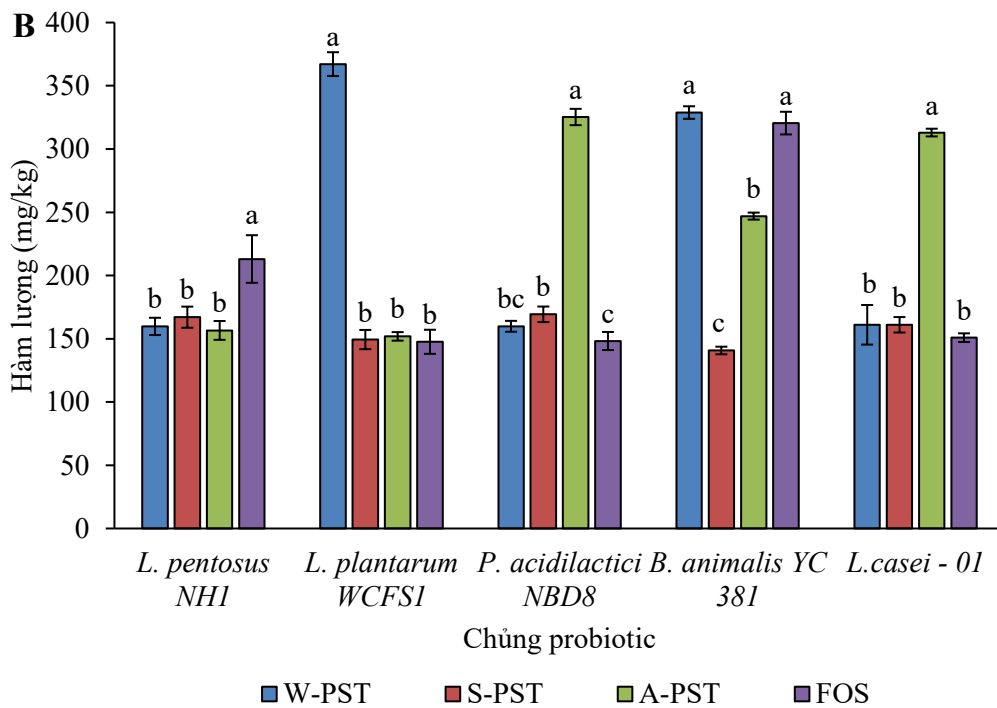
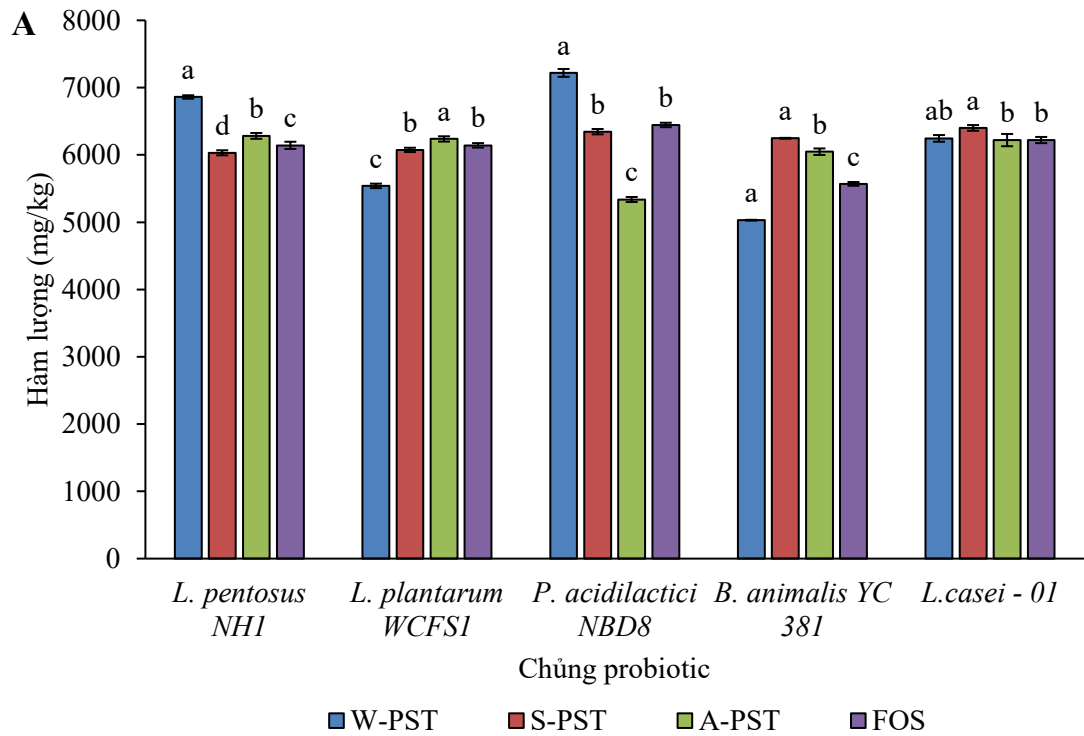
Loại và cấu trúc của PS có thể ảnh hưởng đến hiệu quả lên men. Ví dụ, các PS có cấu trúc phân nhánh cao có thể cần các enzyme vi khuẩn chuyên biệt hơn để lên men và có thể dẫn đến năng suất SCFAs thấp hơn [186]. FOS là một prebiotic thương mại bao

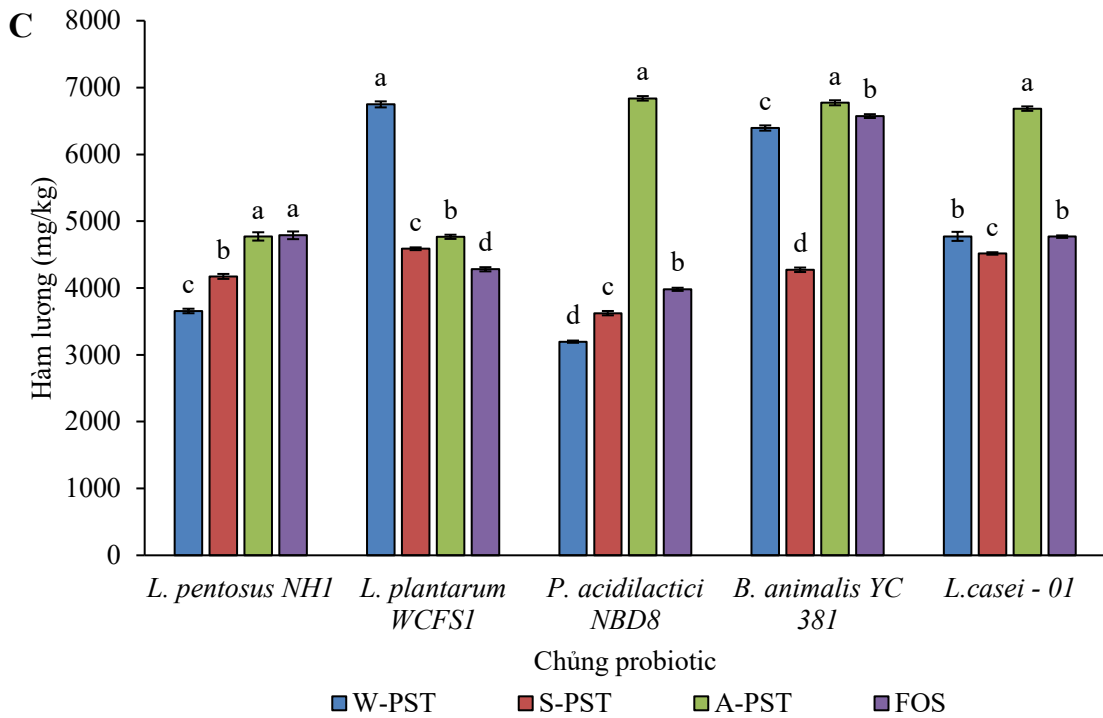
gồm các oligosaccharide, có cấu trúc đơn giản hơn PS, do đó dễ dàng bị phân hủy bởi các enzyme của vi khuẩn để sản xuất một lượng lớn SCFAs. Không phải tất cả các probiotic đều có hiệu quả như nhau trong việc sản xuất SCFAs. Các chủng cụ thể như *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum* và *Bifidobacterium breve* đã được nghiên cứu về khả năng lên men PS và sản xuất một lượng đáng kể SCFAs. Chỉ những chủng có gen mã hóa các enzyme phù hợp mới có thể sử dụng PS một cách hiệu quả. Điều này giải thích tại sao các chủng khác nhau sản xuất lượng SCFAs khác nhau từ cùng một nguồn PS; hoặc tại sao cùng một chủng lại sản xuất lượng SCFA khác nhau khi được bổ sung các nguồn PS khác nhau. Sự đa dạng và thành phần của hệ vi sinh vật đường ruột ảnh hưởng đáng kể đến việc sản xuất SCFAs. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng các chủng vi khuẩn cụ thể, chẳng hạn như *Lactobacillus faecis*, có thể ảnh hưởng đến hàm lượng SCFAs bằng cách điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột và giảm rối loạn chuyển hóa lipid [187].

Việc nuôi cấy probiotic được bổ sung PS có ý nghĩa sâu sắc đối với việc sản xuất acid béo chuỗi ngắn (SCFA), vốn rất cần thiết để duy trì sức khỏe đường ruột, chức năng miễn dịch và các quá trình trao đổi chất. Sự tương tác giữa các chủng probiotic cụ thể và các PS như inulin, tinh bột kháng và pectin giúp tăng cường sản xuất SCFAs, với butyrate, acetate và propionate là các sản phẩm cuối cùng chính. Các SCFAs này hỗ trợ tính toàn vẹn của ruột, điều hòa các phản ứng miễn dịch và mang lại lợi ích trao đổi chất. Bằng cách tối ưu hóa việc lựa chọn probiotic và các chất bổ sung PS, có thể khai thác những lợi ích này để có kết quả sức khỏe tốt hơn. Nghiên cứu sâu hơn về các tương tác cụ thể theo chủng và ảnh hưởng của chúng đối với việc sản xuất SCFAs sẽ tiếp tục mở ra những con đường mới cho các liệu pháp dựa trên probiotic.

b. Hàm lượng SCFAs trong môi trường bổ sung PS chiết xuất nấm *T. versicolor*

Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng tổng SCFAs và từng loại SCFA có sự khác nhau đáng kể trong các nghiệm thức khi bổ sung chiết xuất PS nuôi cấy 5 chủng probiotic khác nhau. Kết quả được thể hiện ở hình 3.17.





Hình 3.17. Ảnh hưởng của PS đến hàm lượng SCFAs. A: Acetic acid, B: Propionic acid; C: Butyric acid

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 3$). Các chữ cái khác nhau trong một nhóm cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $P < 0,05$).

Nhìn chung, acetic acid là loại SCFA có hàm lượng cao và khá đồng đều so với các nghiệm thức nghiêm cứu, hàm lượng dao động trong khoảng 5800 – 7200 mg/kg, tiếp theo là butyric acid với mức từ 3200 – 7000 mg/kg, trong khi propionic acid có giá trị thấp nhất, chỉ khoảng 100 – 360 mg/kg. Điều này phản ánh quy luật sinh học phổ biến trong quá trình lên men chất xơ và PS bởi vi khuẩn ruột, trong đó acetic acid thường là sản phẩm chính do vai trò trung gian trong nhiều con đường chuyển hóa carbon [188].

Hàm lượng giữa 3 SCFAs trong từng nghiệm thức bổ sung có mức độ dao động không đồng đều. Khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung chiết xuất A-PST cho thấy khả năng tạo butyric acid cao so với các nghiệm thức khác, đặc biệt trên các chủng như *P. acidilactici*, *B. animalis*, *L. casei*. Kết quả này tương đồng với kết quả đánh giá chỉ số PI đây là loại PS có chỉ số PI cao ở hầu hết các chủng, các chủng probiotic đã sử dụng PS này sinh trưởng và tăng cường sản xuất butyric acid. Bên cạnh đó, chiết xuất W-PST cũng cho kết quả tăng sản xuất hàm lượng Butyric khá cao, đặc biệt ở một số chủng như *B. animalis*, *L. plantarum*, W-PST cho thấy độ hòa tan tốt giúp quá trình lên men hiệu

quả. Ngược lại, chiết xuất S-PST có xu hướng tạo butyric acid thấp hơn đáng kể, có thể do cấu trúc bị thay đổi bởi môi trường kiềm và khả năng hoà tan tương đối thấp làm giảm khả năng lên men. FOS, mặc dù là prebiotic phổ biến, nhưng hàm lượng butyric acid tạo ra từ FOS có xu hướng trung bình và không ổn định giữa các chủng.

Hàm lượng Propionic acid thay đổi giữa các nghiệm thức nghiên cứu có sự tương đồng với Butyric acid. Chiết xuất A-PST cũng cho thấy hiệu quả tốt trong việc kích thích tạo propionic acid, đặc biệt là cũng là chủng *L. casei*, *P. acidilactici*, *B. animalis*. Chiết xuất W-PST hàm lượng propionic acid cao nhất chủng *L. plantarum* và có sự khác biệt ($P < 0,05$) so với FOS và 2 chiết xuất còn lại. Chủng *B. animalis* cũng cho hàm lượng SCFA này cao nhất tuy nhiên không có sự khác biệt so với FOS ($P > 0,05$). Trong khi đó, nuôi cấy probiotic trên môi trường bổ chiết xuất S-PST lại tạo propionic acid với hàm lượng trung bình và thấp nhất, điều này cho thấy là Na_2CO_3 không phải là dung môi chiết lý tưởng cho mục tiêu tạo nguồn prebiotic.

Trong các chủng vi khuẩn được khảo sát, *B. animalis* cho thấy khả năng lên men PS để tạo SCFAs (đặc biệt là acetic acid và butyric acid) cao hơn rõ rệt so với các chủng còn lại. Điều này phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy *Bifidobacterium* có khả năng thủy phân tốt các loại PS có cấu trúc mạch ngắn đến trung bình, và tạo ra lượng lớn acetic acid như sản phẩm chuyển hóa chính [189]. Ngoài ra, *L. plantarum* và *L. pentosus* cũng thể hiện hoạt tính lên men khá cao, đặc biệt với PS chiết bằng nước, cho thấy chúng có thể sử dụng tốt PS tự nhiên chưa bị biến đổi mạnh – phù hợp với tính chất sinh lý của vi khuẩn acid lactic [190].

Miao et al. (2015) đã xác định nồng độ SCFAs trong các môi trường lên men theo mẻ so với 5 loại carbohydrate được thử nghiệm (α -D-glucan, dextran, FOS 95, GOS 55 và insulin) và phát hiện ra rằng chúng có thể tạo ra các thành phần và tỷ lệ SCFA khác nhau. Do đó, các thành phần khác nhau của chất xơ trong chế độ ăn uống bao gồm cả PS không tiêu hóa có thể dẫn đến các tỷ lệ khác nhau trong các thành phần SCFA [191]. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng quá trình lên men polysaccharide *invitro* có thể làm tăng đáng kể sản xuất tổng SCFAs [192].

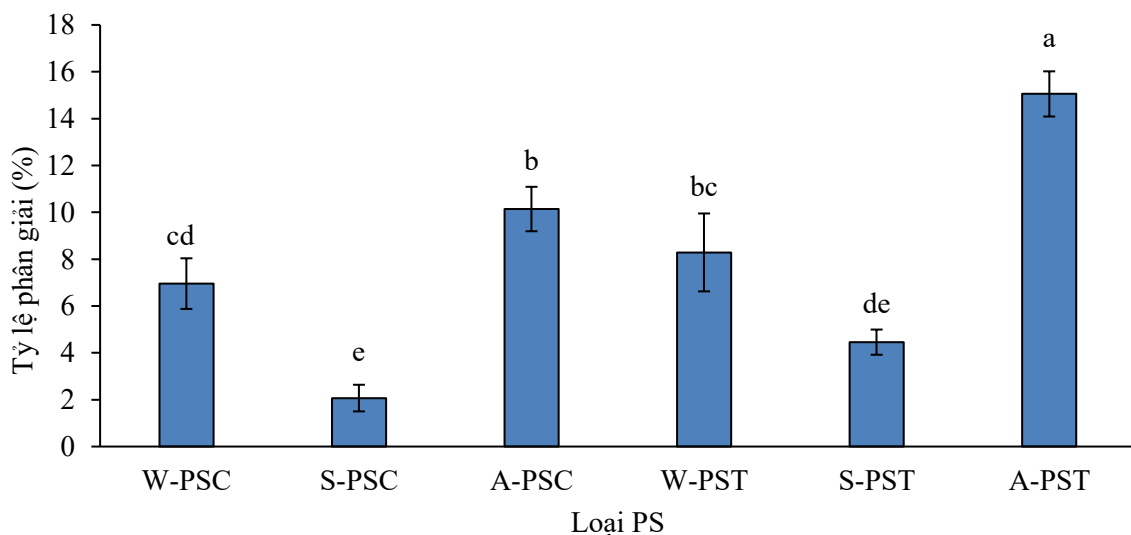
SCFAs có tác động có liên quan đến cả khả năng miễn dịch bẩm sinh và thích ứng. Về khả năng miễn dịch bẩm sinh, SCFAs có thể tác động trực tiếp lên bạch cầu trung tính, làm giảm sản xuất các loài oxi phản ứng (ROS) và myeloperoxidase (MPO) của chúng, và thậm chí có thể tăng cường quá trình apoptosis của chúng [193]. Điều trị bằng SCFAs và đặc biệt là bằng butyrate, có thể làm giảm viêm ruột, làm giảm con đường

truyền tín hiệu NF- κ B và tăng cường biểu hiện của các cytokine chống viêm như IL-10 [194].

Nội dung nghiên cứu đã chứng minh rằng các phân đoạn PS chiết xuất từ sợi nấm có hoạt tính kháng oxi khá tương đồng với các nghiên cứu của các nấm khác trước đây. Mặc khác, Các chiết xuất PS thể hiện hoạt tính prebiotic rõ rệt (thể hiện qua khả năng kích thích lợi khuẩn, kháng tiêu hóa, ức chế hại khuẩn và đặc biệt là sản sinh các acid béo mạch ngắn (SCFAs)). Tuy nhiên, hoạt tính này không đồng đều giữa các phân đoạn, phân đoạn A-PST (chiết bằng acid từ *T. versicolor*) cho thấy chỉ số PI cao và khả năng kích thích sinh Butyric acid vượt trội. Nghiên cứu này đã cung cấp cơ sở khoa học vững chắc để khẳng định rằng sợi nấm (*C. militaris* và *T. versicolor*) là nguồn nguyên liệu prebiotic đầy tiềm năng.

3.2.4.4. Khả năng bị phân giải bởi α -amylase của các chiết xuất PS sợi nấm

Nghiên cứu về khả năng kháng tiêu hóa PS được thực hiện dựa trên các xét nghiệm mô phỏng đường tiêu hóa của con người. Khả năng kháng tiêu hóa được khảo sát bằng phương pháp mô phỏng nước bọt. Tỷ lệ kháng tiêu hóa được xác định dựa trên mức độ thủy phân. Sự khác biệt tối thiểu giữa các phân đoạn PS về mức độ thủy phân được thể hiện trong **Hình 3.18**, hầu hết các mẫu PS có mức độ kháng tiêu hóa ở mức độ cao.



Hình 3.18. Phần trăm PS bị phân giải bởi α -amylase

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 5$). Các chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $P < 0,05$).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các chiết xuất PS bị phân giải bởi α -amylase khá thấp khoảng (2,07%-15,05%). Ở cả 2 chủng nấm S-PS đều ít bị tiêu hóa hơn so với 2

chiết xuất khác. Quá trình chiết kiềm đã chọn lọc hiệu quả phân đoạn β -glucan và loại bỏ phần lớn tạp chất glucan dạng α (glycogen/tinh bột), khiến S-PS trở nên trơ với enzyme tiêu hóa, bên cạnh đó S-PS cũng tan kém trong nước so với 2 PS khác. Chiết xuất A-PS cho thấy tỷ lệ bị phân giải cao nhất tức là khả năng kháng tiêu hóa bởi enzyme α -amylase thấp nhất so với các mẫu khác. Điều này có thể là do quá trình thủy phân acid làm thay đổi cấu trúc PS, PS bị phân cắt thành các đoạn ngắn khiến nó dễ bị enzyme amylase tác động hơn.

PS trong nấm chủ yếu là β -glucan với liên kết β -(1 \rightarrow 3) ở mạch chính và một số nhánh β -(1 \rightarrow 6) trong khi đó amylase chủ yếu tác động lên các liên kết α (1 \rightarrow 4) glycoside. Đặc tính không bị amylase phân hủy giúp PS nấm trở thành nguồn prebiotic, kích thích lợi khuẩn đường ruột. Điều này phù hợp với các nghiên cứu khác cho thấy PS từ các nguồn tự nhiên có thể có khả năng kháng tiêu hóa khác nhau tùy thuộc vào phương pháp chế biến và chiết xuất [195]. Trong nghiên cứu của Yongjin Sun và cs. (2021) PS thô tan trong nước của vỏ *Passiflora edulis* (WPEP), xylan (XY) và pectin cam quýt (CP) có mức độ thủy phân bởi α -amylase khoảng từ 2-10% [196].

Từ những kết quả trên ta có thể thấy rằng S-PS và W-PS có khả năng bị tiêu hoá thấp và trung bình, có tiềm năng cao để ứng dụng trong lĩnh vực sản phẩm prebiotic thông thường như sữa lên men, bột dinh dưỡng đặc biệt là làm thực phẩm prebiotic, hỗ trợ hệ vi sinh vật đường ruột mà không bị phân giải ở ruột non. Còn đối với A-PS với khả năng bị tiêu hóa mạnh nhất thì sẽ phù hợp với các sản phẩm prebiotic chọn lọc tác động chủ yếu ở đại tràng, đồng thời có thể ứng dụng làm chất mang thuốc hướng đích ruột già hoặc thành phần thực phẩm chức năng cho người tiểu đường.

3.2.4.5. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy

Escherichia coli và *Staphylococcus aureus* là những tác nhân hàng đầu gây ra nhiều loại nhiễm trùng ở người và động vật. Bổ sung prebiotic vào môi trường nuôi cấy probiotic sẽ giúp kích thích sự sinh trưởng và sản sinh ra các acid béo mạch ngắn góp phần tăng cường khả năng chống lại các các mầm bệnh này. Trong phạm vi nghiên cứu của đề tài sử dụng dịch nuôi cấy chủng *L. plantarum* được bổ sung 0,1% các chiết xuất PS khác nhau từ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor*.

a. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi cấy probiotic được bổ sung phân đoạn PS chiết xuất từ sợi nấm *C. militaris*

Nhiều nghiên cứu đã cho thấy PS chiết xuất từ nấm đặc biệt là nấm *C. militaris* đã cho thấy có khả năng kích thích sự tăng trưởng các chủng probiotic đồng thời tăng cường

sinh tổng hợp các acid béo chuỗi ngắn (SCFAs). Nghiên cứu này đã bổ sung 0,1% các chiết xuất PS khác từ nấm *C. militaris* vào môi trường nuôi cấy *L. plantarum* ở 5 CT (CT1: bổ sung W-PSC, CT2: bổ sung S-PSC, CT3: bổ sung A-PSC, CT4: bổ sung FOS và CT5: Môi trường MRS không bổ sung PS) và đánh giá hiệu quả ức chế *E. coli* và *S. aureus* sau 24 và 48 giờ. Kết quả được trình bày ở **Bảng 3.9** và **Hình 3.19**.

Bảng 3.9. Đường kính vòng vô khuẩn của *E. coli* và *S. aureus* (mm)

Công thức	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	24h	48h	24h	48h
CT1	27,06±1,21 ^a	27,68±0,62 ^{ab}	26,93±0,50 ^a	25,01±0,35 ^b
CT2	25,67±0,67 ^a	27,21±0,40 ^{ab}	26,47±0,30 ^a	23,80±0,47 ^c
CT3	27,00±0,38 ^a	27,11±0,39 ^b	24,88±0,40 ^b	24,63±0,42 ^{bc}
CT4	26,49±0,92 ^a	28,66±0,82 ^a	27,22±0,66 ^a	26,27±0,38 ^a
CT5	22,47±0,54 ^b	25,56±0,48 ^c	23,42±0,38 ^c	22,35±0,49 ^d

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05). CT1, CT2, CT3, CT4, CT5 là các nghiệm thức lần lượt bổ sung 0,1% W-PSC, 0,1% S-PSC; 0,1% A-PSC; 0,1% FOS và không bổ sung PS.

Kết quả nghiên cứu cho thấy ở tất cả các công thức nghiên cứu đều cho thấy hiệu quả ức chế tốt 2 chủng vi khuẩn gây hại *E. coli* và *S. aureus*. Ở thời điểm 24 và 48 giờ dịch lên men bổ sung 3 loại PS và FOS đều tạo ra vòng kháng khuẩn có đường kính lớn hơn đáng kể so với CT không bổ sung, cho thấy việc bổ sung PS từ *C. militaris* (bằng các phương pháp chiết khác nhau) và FOS vào môi trường nuôi cấy đã kích thích *L. plantarum* tăng cường sản xuất các hợp chất có khả năng kháng khuẩn. Các PS và FOS đóng vai trò như các nguồn thức ăn ưu tiên cho *L. plantarum*, thúc đẩy sinh trưởng và hoạt động trao đổi chất của chúng.

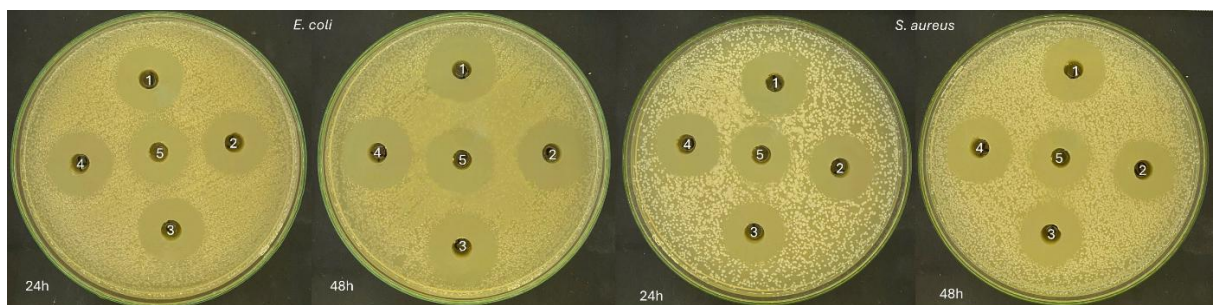
Ở chủng *E. coli* tại 24 giờ hiệu quả ức chế ở các CT bổ sung các chiết xuất PS và FOS không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Tại 48 giờ hiệu quả ức chế *E. coli* hầu hết có sự tăng lên hiệu quả tốt nhất ở CT bổ sung W-PSC, S-PSC và FOS với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là: 27,68±0,62 mm; 27,21±0,40 mm và 28,66±0,82 mm. CT bổ sung PS-HCL hiệu quả ức chế đạt 27,11±0,39 mm thấp hơn FOS, tuy nhiên không có sự khác biệt so với bổ sung W-PSC và S-PSC.

Khác với *E. coli*, ở chủng *S. aureus* tại 24 giờ CT bổ sung A-PSC cho hiệu quả ức

chế thấp hơn so với bổ sung W-PSC, S-PSC và FOS. Tại 48 giờ hoạt tính kháng khuẩn chống *S. aureus* của tất cả các công thức lại có xu hướng giảm nhẹ và có sự khác biệt giữa các CT bổ sung các nguồn PS khác nhau. Điều này có thể là do các hợp chất kháng khuẩn nhạy cảm với *S. aureus* đã bị suy giảm sau 48h lên men.

Sự khác biệt về hiệu quả giữa các CT bổ sung PS khác nhau cho thấy phương pháp chiết (H_2O , Na_2CO_3 , HCl) ảnh hưởng đến loại và cấu trúc của PS thu được. Các loại PS khác nhau này có thể được *L. plantarum* lên men với hiệu quả khác nhau, dẫn đến việc sản xuất lượng và loại chất kháng khuẩn cũng khác nhau. Hiệu quả kháng khuẩn ở *S. aureus* (Gram dương) và *E. coli* (Gram âm) khác nhau vì chúng có cấu trúc thành tế bào khác nhau. Malanovic và Lohner đã báo cáo rằng hoạt động kháng khuẩn của *Lactiplantibacillus* spp. rõ ràng hơn ở vi khuẩn Gram âm so với vi khuẩn Gram dương. Vi khuẩn Gram âm bao gồm màng ngoài có tính chọn lọc đối với chất kháng khuẩn [197]. Nghiên cứu này cho thấy *S. aureus* nhạy cảm hơn với các chất kháng khuẩn do *L. plantarum* tạo ra ở giai đoạn 24 giờ, mặc khác *E. coli* thể hiện sự nhạy cảm rõ rệt ở 48 giờ. Điều này, phản ánh phổ tác dụng khác nhau của các chất kháng khuẩn do *L. plantarum* sinh ra. Nghiên cứu của Madhavi Joshi đã cho thấy chiết xuất của nấm *C. militaris* bằng dung môi nước ở nồng độ 100% cao chiết cho đường kính vòng ức chế *E. coli* và *S. aureus* lần lượt là $17,64 \pm 0,01$ mm và $15,52 \pm 0,3$ mm [198].

Kết quả nghiên cứu đã chứng minh rằng việc bổ sung PS từ nấm *C. militaris* và FOS có khả năng cải thiện đáng kể hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi cấy *L. plantarum* chống lại *E. coli* và *S. aureus* so với nuôi cấy không bổ sung. Các phương pháp chiết PS khác nhau cho thấy hiệu quả khác nhau trên từng loại vi khuẩn.



Hình 3.19. Khả năng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy *L. plantarum* đối với *E. coli* ATCC 85922 và *S. aureus* ATCC 25023

Ghi chú: 1, 2, 3, 4, 5 là CT1, CT2, CT3, CT4 và CT5 (Bổ sung 0,1% W-PSC, bổ sung 0,1% S-PSC, bổ sung 0,1% A-PSC, bổ sung 0,1% FOS và môi trường MRS không bổ sung PS)

b. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi cấy probiotic được bổ sung phân đoạn PS chiết xuất từ sợi nấm *T. versicolor*

Nghiên cứu này đã bổ sung 0,1% các chiết xuất PS khác từ nấm *T. versicolor* vào môi trường nuôi cấy *L. plantarum* ở 5 CT (CT1: bổ sung W-PST, CT2: bổ sung S-PST, CT3: bổ sung A-PST, CT4: bổ sung FOS và CT5: môi trường MRS) và đánh giá hiệu quả ức chế *E. coli* và *S. aureus* sau 24 và 48 giờ. Kết quả được trình bày ở **Bảng 3.10** và **Hình 3.20**.

Bảng 3.10. Đường kính vòng vô khuẩn của *E. coli* và *S. aureus* (mm)

Công thức	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	24h	48h	24h	48h
CT1	28,28±0,30 ^a	27,88±0,76 ^a	28,47±0,81 ^a	27,04±0,25 ^b
CT2	28,47±0,85 ^a	26,91±0,39 ^a	27,35±0,68 ^{ab}	26,05±0,35 ^c
CT3	28,48±0,62 ^a	27,74±0,29 ^a	26,60±0,56 ^b	27,49±0,50 ^{ab}
CT4	28,86±0,34 ^a	27,65±0,92 ^a	27,53±0,25 ^{ab}	28,19±0,15 ^a
CT5	23,86±0,74 ^b	24,33±0,34 ^b	23,57±0,50 ^c	24,21±0,20 ^d

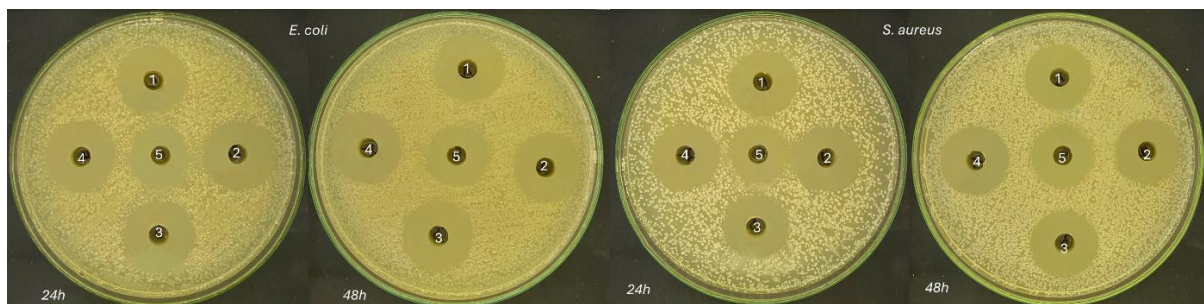
Ghi chú: dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05). CT1, CT2, CT3, CT4, CT5 là các nghiệm thức lần lượt bổ sung 0,1% W-PST, 0,1% S-PST; 0,1% A-PST; 0,1% FOS và không bổ sung PS.

Ở cả hai chủng vi khuẩn thử nghiệm tại cả hai thời điểm 24h và 48h, tất cả các công thức bổ sung chiết xuất PS và FOS đều cho thấy hoạt tính kháng khuẩn cao hơn so với công thức đối chứng không bổ sung ($p < 0,05$). Nguyên nhân là do bổ sung PS và FOS đã đóng vai trò là nguồn prebiotic kích thích *L. plantarum* sinh trưởng và trao đổi chất tích cực hơn, dẫn đến việc sản xuất ra lượng lớn hơn các hợp chất kháng khuẩn hơn so với không bổ sung.

Chủng *E. coli* tại cả 2 thời điểm ở các công thức bổ sung chiết xuất PS và FOS hiệu quả kháng khuẩn đều không có sự sai khác nhau. Mặc khác, ở chủng *S. aureus* tại 24 giờ CT bổ sung PS-H₂O cho hiệu quả kháng khuẩn cao nhất là: 28,47±0,81mm tuy nhiên không có sự sai khác so với CT bổ sung PS (Na₂CO₃) và FOS; tại 48 giờ hiệu quả kháng khuẩn giữa các công thức có sự khác biệt đáng kể với nhau ($p < 0,05$). Hiệu quả kháng khuẩn ở CT1 và CT2 có xu hướng giảm, ngược lại ở 3 CT còn lại có sự tăng nhẹ. Sự khác biệt về hiệu quả giữa các công thức cho thấy rằng cấu trúc và tính chất của PS

ảnh hưởng đến cách *L. plantarum* sử dụng chúng làm prebiotic. Các loại PS khác nhau có thể được lên men với tốc độ khác nhau, hoặc kích thích *L. plantarum* sản xuất các loại hợp chất kháng khuẩn với tỷ lệ khác nhau, hoặc ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen liên quan đến sản xuất bacteriocin. các bacteriocin hoặc các peptit kháng khuẩn khác có thể có phổ tác dụng hẹp hơn hoặc cơ chế khác nhau. Động học thay đổi theo thời gian có thể do sự thay đổi tỷ lệ các chất kháng khuẩn được sản xuất bởi *L. plantarum* theo giai đoạn phát triển của nó.

Nghiên cứu cho thấy, dịch nuôi cấy probiotic được bổ sung PS thể hiện tiềm năng đáng kể như các tác nhân kháng khuẩn hiệu quả và an toàn chống lại cả *E. coli* và *S. aureus*. Các chiết xuất PS từ nấm *C. militaris* và *T. versicolor* đóng vai trò là một chất tăng cường sinh học quan trọng, không chỉ thúc đẩy sự tăng sinh của vi khuẩn có lợi mà còn khuếch đại hoạt động trao đổi chất của chúng, dẫn đến sản lượng hợp chất kháng khuẩn cao hơn trong dịch nuôi cấy. Hiệu ứng hiệp đồng này biến đổi dịch nuôi cấy probiotic từ một hỗn dịch vi sinh đơn giản thành một nhà máy sinh học mạnh mẽ hơn để sản xuất các chất kháng khuẩn tự nhiên, mang lại một cách hiệu quả về chi phí và bền vững để tăng cường tiềm năng điều trị của chúng.



Hình 3.20. Khả năng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy *L. plantarum* đối với *E. coli* ATCC 85922 và *S. aureus* ATCC 25023

Ghi chú: 1, 2, 3, 4, 5 là CT1, CT2, CT3, CT4 và CT5 (Bổ sung 0,1% W-PST, bổ sung 0,1% S-PST, bổ sung 0,1% A-PST, bổ sung 0,1% FOS và môi trường MRS không bổ sung PS)

* **Tiêu kết:** Việc ứng dụng phương pháp chiết tuần tự với các dung môi khác nhau không chỉ giúp phân lập thêm các phân đoạn PS không tan trong nước mà còn tối ưu hóa hiệu suất thu hồi PS từ sinh khối hệ sợi nấm. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy sự ảnh hưởng của dung môi chiết đến cấu trúc bề mặt, hoạt tính kháng oxy hóa, hoạt tính prebiotic của mỗi phân đoạn PS. Hơn thế nữa mỗi PS tác động khác nhau đến mỗi loại probiotic khác nhau, dựa trên nghiên cứu này có thể khai thác sâu hơn tiềm năng kích

thích mỗi loại probiotic đặc hiệu của từng chiết xuất PS. Kết quả cũng cho thấy không có sự tương quan thuận chiều chặt chẽ giữa hoạt tính kháng oxi hóa và hoạt tính prebiotic của các mẫu khảo sát. PS từ sợi nấm *T. versicolor* thể hiện hoạt tính kháng oxi hóa cao hơn từ nấm *C. militaris*. Đối với hoạt tính prebiotic thì mỗi loại chiết xuất PS từ mỗi loại nấm sẽ có hiệu quả khác nhau đối với mỗi chủng probiotic khác nhau.

Mặc dù các kết quả đánh giá *in vitro* trong nghiên cứu này cho thấy các chiết xuất PS từ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor* có tiềm năng đáng kể trong việc kích thích tăng sinh các chủng probiotic, thúc đẩy sản sinh axit béo chuỗi ngắn (SCFA), tuy nhiên những phát hiện này vẫn chỉ mang tính chất định hướng ban đầu. Mô hình *in vitro* là không thể mô phỏng hoàn toàn các điều kiện sinh lý và môi trường phức tạp bên trong hệ tiêu hóa của cơ thể sống. Cụ thể, các phép thử này chưa tính đến các yếu tố biến thiên như: sự phân hủy cấu trúc qua các rào cản tiêu hóa (dạ dày, ruột non), tỷ lệ hấp thu và sinh khả dụng thực tế của các hợp chất có hoạt tính sinh học, cũng như mạng lưới tương tác cạnh tranh của toàn bộ hệ vi sinh vật đường ruột. Do đó, các kết quả thu được ở giai đoạn này chưa đủ cơ sở để khẳng định chắc chắn về những lợi ích sức khỏe hay hiệu quả sinh lý trên cơ thể người. Để xác minh tiềm năng ứng dụng thực tế và làm rõ cơ chế tác động ở cấp độ tế bào và mô, các nghiên cứu tiếp theo cần bắt buộc mở rộng đánh giá trên các mô hình *in vivo* và tiến tới các thử nghiệm lâm sàng.

Tuy nhiên, quy trình chiết xuất tinh sạch PS phức tạp và tốn kém nên khó phù hợp cho ứng dụng thực phẩm đại trà. Một sản phẩm thực phẩm chức năng cần cân bằng giữa hiệu quả, chi phí và tính thực tiễn. Bột sinh khối thô là dạng nguyên liệu dễ sản xuất, giá thành hợp lý, và quan trọng hơn trong sợi nấm chứa đựng toàn bộ PS mà chúng ta đã khảo sát. Do đó, để đảm bảo tính kinh tế và tính khả thi trong sản xuất tạo ra sản phẩm ứng dụng chúng tôi đã tập trung vào việc sử dụng toàn bộ sinh khối sợi nấm thô để phát triển một sản phẩm thực phẩm chức năng hoàn chỉnh nhằm chứng minh rằng những phát hiện khoa học có thể được hiện thực hóa thành một giải pháp hỗ trợ sức khỏe thiết thực.

Trên cơ sở đó, để chọn 1 loại sinh khối sợi nấm cho nghiên cứu ứng dụng chế biến thực phẩm vừa tạo ra sản phẩm có hoạt tính kháng oxi hóa vừa có hoạt tính prebiotic, vừa đảm bảo giá trị cảm quan nên chúng tôi đã chọn sinh khối sợi nấm Vân chi cho nghiên cứu ứng dụng chế biến thực phẩm.

3.3. Ứng dụng hệ sợi nấm chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung

Kết quả thực nghiệm cho thấy sinh khối sợi nấm *T. versicolor* và *C. militaris* đều là các nguyên liệu có tiềm năng ứng dụng chế biến các sản phẩm thực phẩm giàu hoạt tính prebiotic hoặc synbiotic. Sinh khối sợi nấm cả 2 chủng có thể ứng dụng làm bột dinh dưỡng sử dụng trực tiếp hoặc bổ sung vào các sản phẩm lên men nhằm kích thích sự sinh trưởng của lợi khuẩn, hoặc bổ sung vào các sản phẩm bánh kẹo, bột ngũ cốc để tăng hoạt tính prebiotic của sản phẩm. Trong phạm vi nghiên cứu của đề tài chúng tôi chọn sinh khối *T. versicolor* để ứng dụng chế biến nước nấm lên men vì trước hết, về mặt sản xuất, các chủng *C. militaris* thường có nhược điểm dễ bị thoái hóa giống qua các chu kỳ nuôi cấy, gây khó khăn cho việc duy trì chất lượng đồng đều [199,200]. Bên cạnh đó, *T. versicolor* có tính ổn định cao và khả năng sinh trưởng ở dải nhiệt độ thuận lợi hơn, giúp tối ưu hóa chi phí, giảm thiểu rủi ro nhiễm chéo và dễ dàng kiểm soát khi mở rộng quy mô lên men công nghiệp. Về mặt giá trị sinh học, phân đoạn PS thu nhận từ *T. versicolor* thể hiện năng lực chống oxy hóa mạnh mẽ hơn so với *C. militaris* trong cùng hệ điều kiện. Vì vậy, sợi nấm *T. versicolor* được chọn làm nghiên cứu ứng dụng bổ sung vào quy trình chế biến nước nấm bào ngư lên men trong nghiên cứu này.

3.3.1. Đánh giá an toàn bột sợi nấm

Sinh khối sợi nấm khô được bảo quản trong túi PE và gửi mẫu phân tích an toàn kim loại nặng, vi sinh vật, độc tố nấm tại Quatest 2, kết quả được thể hiện ở **Bảng 3.11**.

Bảng 3.11. Kết quả thử nghiệm các chỉ tiêu an toàn sinh học hệ sợi nấm

TT	Tên tiêu chí	Đơn vị tính	Phương pháp thử	Kết quả thử nghiệm	Giới hạn tối đa cho phép
1	Pb	mg/kg	AOAC 999.11	0,13	5
2	Cd	mg/kg	AOAC 999.11	0,11	3
3	Hg	mg/kg	AOAC971.21	KPH (MDL=0,01)	0,1
4	As	mg/kg	AOAC986.15	KPH (MDL=0,01)	2
5	Aflatoxin tổng (B1, B2, G1, G2)	µg/kg	AOAC991.31	KPH (MDL=1,0)	10
6	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	CFU/g	TCVN4884-1:2015	KPH (<10)	10
7	Colifoms	CFU/g	TCVN 6848:2007	KPH (<10)	10
8	Tổng số bào tử nấm men nấm mốc	CFU/g	TCVN8275-2:2020	KPH (<10)	10

9	<i>Salmonella</i>	CFU/g	TCVN 10780-1:2017	Âm tính/25g	Không phát hiện
---	-------------------	-------	-------------------	-------------	-----------------

Kết quả phân tích an toàn vi sinh và kim loại nặng bột nấm cho thấy kim loại nặng, Coliform, nấm men, nấm mốc, *Salmonella*, độc tố aflatoxin tổng số, đều thấp hơn giới hạn cho phép theo quy định của QCVN 8-3: 2012/BYT, QCVN 8-2:2011/BYT, QCVN 8-1:2011/BYT về giới hạn ô nhiễm vi sinh vật, kim loại nặng, độc tố vi nấm trong thực phẩm. Như vậy, sản phẩm sợi nấm đảm bảo tiêu chuẩn về an toàn vi sinh, hóa học để làm thực phẩm hoặc bổ sung vào chế biến các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng bột sợi nấm bổ sung đến chất lượng nước lên men từ nấm Bào ngư

Phát triển đồ uống lên men lactic từ nấm Bào ngư là một hướng tiếp cận tiềm năng nhằm đa dạng hóa chuỗi giá trị của các loại nấm quả thể thương mại tại Việt Nam. Đồng thời, hướng đi này cũng góp phần tạo ra các dòng sản phẩm thực phẩm định hướng chức năng mới, đáp ứng nhu cầu ngày càng cao của người tiêu dùng trong việc bảo vệ và nâng cao sức khỏe. Trong phạm vi đề tài, nghiên cứu đã tiến hành thử nghiệm sử dụng chủng *L. plantarum* lên men lactic dịch chiết quả thể nấm Bào ngư tím và bổ sung sinh khối sợi nấm *T. versicolor* như một nguyên liệu làm tăng hoạt tính prebiotic và hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn của sản phẩm, bên cạnh đó chủng *L. plantarum* cũng là chủng lợi khuẩn phổ biến, thương mại rộng rãi, khả năng ứng dụng trong thực phẩm và các nguồn nguyên liệu rất đa dạng như thực vật, sữa nên cũng được chọn làm chủng probiotic ứng dụng trong nghiên cứu chế biến.

3.3.2.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ bổ sung sinh khối sợi nấm đến hoạt tính kháng oxy hóa của đồ uống lên men

Hoạt tính kháng oxy hóa là một chỉ tiêu đánh giá không thể thiếu đối với các sản phẩm đồ uống định hướng chức năng. Các hợp chất Kháng oxy hóa đóng vai trò phòng chống và ngăn chặn sự tổn hại của tế bào thông qua việc kiểm soát quá trình oxy hóa. Chúng có khả năng kìm hãm, trung hòa hoặc loại bỏ các gốc tự do như superoxide, hydroxyl, hydrogen peroxide và alkoxy trong cơ thể [201,202]. Xuất phát từ mục tiêu phát triển các dòng sản phẩm mang lại lợi ích bảo vệ sức khỏe, việc đánh giá hoạt tính oxy hóa trong thực phẩm có ý nghĩa quan trọng. Trong nghiên cứu này, khả năng trung hòa gốc tự do ABTS^{•+} của dịch chiết nấm bào ngư lên men được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* được trình bày tại **Bảng 3.12**.

Bảng 3.12. Khả năng trung hoà gốc tự do ABTS⁺ của dịch chiết nấm Bào ngư bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* lên men (%)

Công thức	Thời gian lên men			
	Ban đầu	12 giờ	24 giờ	48 giờ
CT1	25,98 ± 0,51 ^f	26,05 ± 0,31 ^f	25,63 ± 0,53 ^f	25,46 ± 0,51 ^f
CT2	35,52 ± 0,88 ^e	34,44 ± 0,86 ^e	33,48 ± 0,59 ^e	32,45 ± 0,71 ^e
CT3	40,34 ± 0,89 ^d	39,39 ± 0,89 ^d	37,83 ± 0,46 ^d	37,66 ± 0,47 ^d
CT4	46,49 ± 0,81 ^c	48,6 ± 0,86 ^c	44,43 ± 1,25 ^c	43,27 ± 0,42 ^c
CT5	54,43 ± 1,38 ^b	54,83 ± 1,07 ^b	47,07 ± 0,56 ^b	46,90 ± 0,38 ^b
CT6	59,69 ± 0,38 ^a	58,13 ± 2,42 ^a	49,63 ± 1,01 ^a	48,44 ± 0,21 ^a

*Ghi chú: dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 15). Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05). CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, và CT6 là các nghiệm thức lần lượt bổ sung 0%, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0% (v/v) hệ sợi nấm *T. versicolor*.*

Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở tất cả các công thức thí nghiệm, khả năng kháng oxi hoá tăng tỉ lệ thuận với tỉ lệ hệ sợi nấm *T. versicolor* được bổ sung vào dịch chiết nấm Bào ngư, lần lượt tăng lên từ 25,84% ở CT1 lên 59,79% ở CT6 khi vừa mới bổ sung hệ sợi nấm; từ 25,917% đến 57,79% ở CT6 sau 12 giờ; từ 25,85% đến 49,57% sau 24 giờ; và từ 25,51% đến 48,35% sau 48 giờ lên men. Tuy nhiên, khả năng kháng oxi hóa lại có xu hướng giảm dần theo thời gian lên men, từ 35,05 - 32,56% ở CT2; 40,17 - 37,55% ở CT3; 46,68 - 43,25% ở CT4; 54,54 - 46,72% ở CT5; và 59,79 - 48,35% ở CT6. Sự suy giảm khả năng kháng oxi hoá ở các nghiệm thức khi kéo dài thời gian lên men có thể được giải thích là do sự phân hủy của một số hợp chất hữu cơ có hoạt tính sinh học theo thời gian hoặc sự bay hơi của một lượng nhỏ acid hữu cơ hoặc có thể là do vi khuẩn đã sử dụng các nguồn PS hoà tan trong dịch chiết làm nguồn dinh dưỡng cho quá trình sinh trưởng và phát triển của chúng.

Huaiqian-Dou đã báo cáo rằng, polysaccharopeptide (PSP) được xác định là thành phần hoạt tính sinh học chính, có thể thu được từ sợi nấm hoặc dịch lên men của *Trametes versicolor*. Trong đó hàm lượng polysaccharide và peptide lần lượt chiếm khoảng 60% và 10 – 30%. Các monosaccharide chủ yếu được tìm thấy trong PSP bao gồm glucose, mannose và một lượng nhỏ galactose, xylose và fucose. Trong đó β-glucan là một trong những thành phần được xác định có chức năng điều hòa miễn dịch [203]. Bên cạnh đó, nấm bào ngư cũng được chứng minh là nguồn thực phẩm rất giàu PS có hoạt tính sinh học [204]. Quá trình sử dụng PSs của hệ vi khuẩn đường ruột đã sản xuất

ra các acid béo chuỗi ngắn (SCFA) có tác dụng ức chế stress oxy hóa và kháng viêm và tăng cường hệ miễn dịch [205,206]. Vì vậy, điều này giải thích cho khả năng kháng oxy hoá cao của dịch chiết nấm bào ngư khi được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* trong nghiên cứu này.

3.3.2.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ bổ sung sinh khối sợi nấm đến khả năng sinh trưởng của lợi khuẩn

Lợi khuẩn, hay còn được gọi là probiotic là các vi sinh vật sống khi bổ sung thức ăn có tác dụng có lợi cho vật chủ bằng cách cải thiện sự cân bằng vi khuẩn đường ruột [207]. Prebiotic là thành phần thực phẩm không tiêu hóa và có lợi cho vật chủ bằng cách kích thích chọn lọc sự phát triển và hoạt động của một số lượng giới hạn các loài vi khuẩn cư trú trong ruột già và có tác dụng cải thiện sức khỏe của vật chủ [208]. Ở ruột già, số lượng *Lactobacillus* chỉ bằng khoảng 1% so với *Bifidobacterium*, và ảnh hưởng đến môi trường ruột cũng ít hơn so với *Bifidobacterium* [209]. Trong nghiên cứu này, hệ sợi nấm *T. versicolor* (tỷ lệ từ 0,2% đến 1%) như nguồn prebiotic để bổ sung vào dịch chiết nấm Bào ngư nhằm đánh giá sự kích thích tăng trưởng đối với lợi khuẩn *L. plantarum* sau 12 giờ, 24 giờ và 48 giờ lên men. Kết quả nghiên cứu được trình bày tại **Bảng 3.13**.

Bảng 3.13. Mật độ vi khuẩn *L. plantarum* trong nước nấm bào ngư lên men (logCFU/mL)

Công thức	Thời gian lên men			
	Ban đầu	12 giờ	24 giờ	48 giờ
CT1	8,38 ± 0,04 ^a	10,90 ± 0,04 ^d	10,99 ± 0,12 ^b	10,97 ± 0,09 ^c
CT2	8,38 ± 0,06 ^a	11,19 ± 0,13 ^c	11,40 ± 0,15 ^a	11,21 ± 0,24 ^b
CT3	8,39 ± 0,01 ^a	11,21 ± 0,12 ^c	11,51 ± 0,18 ^a	11,50 ± 0,12 ^a
CT4	8,38 ± 0,03 ^a	11,50 ± 0,16 ^a	11,55 ± 0,17 ^a	11,51 ± 0,16 ^a
CT5	8,36 ± 0,02 ^a	11,41 ± 0,23 ^{ab}	11,52 ± 0,19 ^a	11,38 ± 0,15 ^a
CT6	8,36 ± 0,05 ^a	11,28 ± 0,26 ^{bc}	11,56 ± 0,12 ^a	11,46 ± 0,17 ^a

*Ghi chú: dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 15). Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05). CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, và CT6 là các nghiệm thức lần lượt bổ sung 0%, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0% (v/v) hệ sợi nấm *T. versicolor*.*

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 12 giờ lên men, mật độ vi khuẩn ở tất cả các công thức thí nghiệm đều tăng nhanh so với ban đầu và mật độ vi khuẩn lớn nhất được ghi nhận ở CT4, 11,50 logCFU/mL. Sau 24 giờ nuôi cấy, mật độ vi khuẩn vẫn tiếp tục

tăng nhưng tốc độ tăng trưởng chậm dần, mật độ vi khuẩn lớn nhất ghi nhận được ở CT6, 11,56 logCFU/mL. Tương tự kết quả sau 12 giờ, sự khác biệt này cũng không có ý nghĩa thống kê so với CT2 bổ sung ít nhất hệ sợi nấm *T. versicolor* (0,2%). Sau 48 giờ lên men, mật độ vi khuẩn bắt đầu giảm xuống so với sau 12 và 24 giờ, mật độ vi khuẩn lớn nhất ghi nhận được ở CT3 bổ sung 0,4% hệ sợi nấm. Sự tăng trưởng chậm lại sau 24 giờ lên men có thể do nguyên nhân do sự giảm xuống về hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường và vi khuẩn đã bước vào pha cân bằng, và sau 48 giờ lên men, lúc này sự sinh trưởng của vi khuẩn đang ở pha suy thoái, nồng độ các chất dinh dưỡng cạn dần dẫn đến sự suy giảm về mật độ vi khuẩn.

Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, việc bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* ở tất cả các công thức thí nghiệm đã làm tăng mật độ lợi khuẩn *L. plantarum* so với công thức thí nghiệm không bổ sung. Sau 12 giờ lên men, mật độ tế bào đạt 10,90 logCFU/mL ở công thức thí nghiệm không bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* (CT1), và khi bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* từ 0,2 – 1% thì mật độ vi khuẩn tăng lên từ 11,19 – 11,50 logCFU/mL. Tương tự, sau 24 giờ lên men, mật độ vi khuẩn từ 10,99 logCFU/mL ở CT1 tăng lên từ 11,40– 11,56 logCFU/mL. Sau 48 giờ lên men, mật độ vi khuẩn từ 10,97 logCFU/mL ở CT1 tăng lên từ 11,21 – 11,51 logCFU/mL ở các công thức thí nghiệm được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor*. Điều này có thể do hệ sợi nấm *T. versicolor* và dịch chiết nấm Bào ngư có chứa hàm lượng PS hoà tan cao nên đã góp phần kích thích sự sinh trưởng của vi khuẩn *L. plantarum* thông qua sự sử dụng PS làm nguồn thức ăn trong quá trình lên men, cũng như các hoạt tính sinh học của sợi nấm tạo ra môi trường thuận lợi, ức chế hại khuẩn, giúp các lợi khuẩn sinh trưởng, phát triển nhanh hơn.

Điều này được báo cáo trong nghiên cứu của Robert-Hutkins, đó là việc bổ sung prebiotic góp phần làm tăng cường sự tồn tại của vi khuẩn *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*, đồng thời là tác nhân làm giảm sự đa dạng của hệ vi khuẩn trong ruột già [210].

Chủng lợi khuẩn khác nhau thì nhu cầu và hiệu quả sử dụng nguồn prebiotic cũng không giống nhau. Điều này được nghiên cứu của Nieves-Corzo báo cáo rằng, việc bổ sung prebiotic lactulose đã dẫn đến sự gia tăng đáng kể quần thể *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, và hàm lượng lactulose giảm khoảng 40% được quan sát thấy trong suốt quá trình lên men. Tuy nhiên, sự phát triển của *S. thermophilus* không bị ảnh hưởng khi có sự bổ sung của lactulose. Trong khi đó, sự bổ sung các prebiotic như GOS hoặc FOS vào quá trình lên men không có tác động đáng kể đến quần thể *S. thermophilus* và *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, hai chủng vi khuẩn thường kích thích sự phát triển của

nhau thông qua trao đổi chất chuyển hóa thông qua một quá trình được gọi là hợp tác nguyên thủy. Đồng thời, fructooligosaccharide (FOS) and galactooligosaccharide (GOS) không được chuyển hóa bởi vi khuẩn acid lactic trong sữa chua [211].

Polysaccharide chiết xuất từ nấm *T. versicolor* và *Pleurotus* spp. đã được chứng minh là có hoạt tính prebiotic bằng cách kích thích sự phát triển của các chủng vi khuẩn lactic như *L. acidophilus* và *L. plantarum* tương tự các chế phẩm sinh học thương mại như inulin và fructo-oligosaccharit. Trong nghiên cứu này, mật độ vi khuẩn ở các mẫu bổ sung 0,8% và 1% sinh khối sợi nấm thấp hơn so với mẫu bổ sung 0,6%. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Mustafa Yamaç (2022), đó là mật độ vi khuẩn ghi nhận lớn nhất khi bổ sung 0,25% polysaccharide chiết xuất từ một số loại nấm ăn và được liệu; khi tiếp tục tăng tỉ lệ polysaccharide thì mật độ vi khuẩn bắt đầu có sự suy giảm [212].

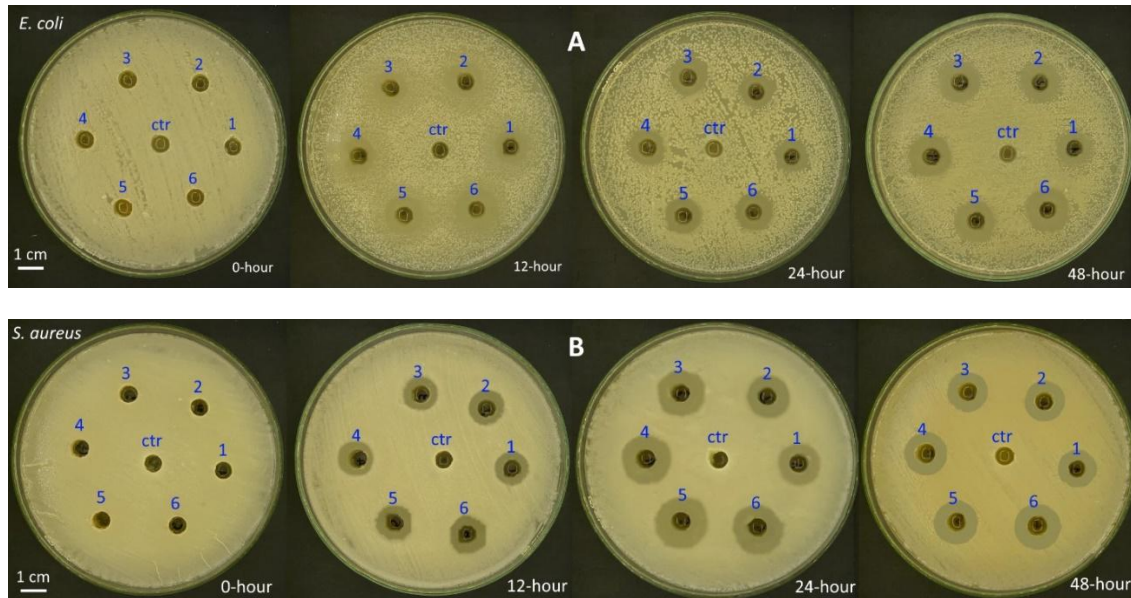
3.3.2.3. Ảnh hưởng đến khả năng kháng khuẩn

Các chủng vi khuẩn *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* là những chủng vi sinh vật gây bệnh đường ruột, chúng thường gây ngộ độc, đau bụng, nôn mửa, tiêu chảy. Việc sử dụng các sản phẩm nước uống lên men không những mang lại những lợi ích tốt cho sức khỏe mà còn giúp ức chế sự phát triển của các chủng vi khuẩn gây bệnh này [213].

Đối với vi khuẩn *E. coli*, kết quả nghiên cứu cho thấy, khả năng ức chế sự sinh trưởng tăng lên khi tăng tỉ lệ bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor*. Đường kính vùng ức chế tăng lên từ 6,55 mm ở CT1 (không bổ sung hệ sợi nấm) đến 9,88 mm ở CT6 (bổ sung 1% hệ sợi nấm) sau 12 giờ; tăng từ 6,71 mm ở CT1 đến 11,02 mm ở CT6 sau 24 giờ; và tăng từ 6,96 mm ở CT1 đến 11,32 mm ở CT6 sau 48 giờ lên men. Tuy nhiên, khả năng ức chế này không phải lúc nào cũng tỉ lệ thuận với thời gian lên men, đường kính vùng ức chế giảm xuống ở CT2, CT3 và CT4 khi kéo dài thời gian từ 12 giờ lên 24 giờ lên men, và sau đó là sự tăng trở lại khi tiếp tục kéo dài thời gian lên men đến 48 giờ (**Hình 3.21A**). Ở các công thức thí nghiệm không bổ sung hệ sợi nấm thì đường kính vùng ức chế hầu như không có sự thay đổi đáng kể, lần lượt là 6,55; 6,71; và 6,96 sau 12, 24, và 48 giờ lên men.

Đối với vi khuẩn *S. aureus*, nhìn chung, vùng ức chế sự sinh trưởng cũng tăng lên cùng với tỉ lệ tăng của hệ sợi nấm *T. versicolor* được bổ sung vào. Tuy nhiên, đường kính vùng ức chế sinh trưởng không giống nhau ở các thời gian lên men. Trong đó, dịch chiết nấm bào ngư được bổ sung hệ sợi nấm sau 24 giờ lên men ghi nhận có khả năng

ức chế sinh trưởng đáng kể đến vi khuẩn *S. aureus*, tăng lên từ 7,6 mm ở CT1 sau 12 giờ lên đến 11,67 mm sau 24 giờ; từ 8,25 – 11,81 mm ở CT2; từ 7,74 – 13,59 mm ở CT3; từ 7,94 – 15,28 mm ở CT4; từ 8,5 – 16,18 mm ở CT5; và từ 9,32 – 16,53 mm ở CT6 (**Hình 3.21B**).



Hình 3.21. Khả năng kháng khuẩn của đồ uống lên men đối với *E. coli* ATCC 85922 (A) và *S. aureus* ATCC 25023 (B)

Trong đó, *ctr* là mẫu đối chứng (không bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* và chủng *L. plantarum*), các mẫu 1, 2, 3, 4, 5 và 6 lần lượt được bổ sung 0%; 0,2%; 0,4%; 0,6%; 0,8% và 1,0% (v/v) hệ sợi nấm *T. versicolor*.

Nguyễn Thị Thơ (2024) đã báo cáo rằng, hàm lượng polysaccharids trong quả thể nấm *T. versicolor* khô (thu hoạch chính vụ) chiếm đến 13,4%. Dịch chiết từ quả thể nấm *T. versicolor* có khả năng kháng 4 chủng vi khuẩn *S. aureus*, *Samonella* sp., *Shigella* sp. và *E. coli* ở mức trung bình (đường kính vùng ức chế trong khoảng 7,5 – 15 mm). Trong đó, đường kính vùng ức chế đối với *E. coli* và *S. aureus* lần lượt là 13 mm và 11,3 mm khi chiết bằng dung môi ethanol; và 12,43 mm và 6,67 mm khi chiết bằng dung môi metanol [214].

Nghiên cứu của Şule-İnci (2022) đã chỉ ra rằng, chiết xuất methanol của *Trametes versicolor* đã ức chế sự phát triển của *E. coli* và *S. aureus* với vùng ức chế là 15,66 mm, còn đối với các vi khuẩn như *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *B. megaterium*, *C. albicans*, và *Tricophyton* sp. thì vùng ức chế nằm trong khoảng 11,66 – 26,76 mm. Trong khi đó, chiết xuất ethanol của *T. versicolor* đã ức chế sự phát triển của *E. coli* và *S. aureus* với vùng ức chế lần lượt là 12,33 mm và 10,23 mm, còn đối với các vi khuẩn còn lại thì

vùng ức chế nằm trong khoảng 10,23 – 24,74 mm [215].

Nghiên cứu của Raushan-Blieva (2022) về đánh giá tiềm năng kháng oxi hóa và kháng khuẩn của dịch chiết nước hệ sợi nấm *Trametes versicolor* bằng phương pháp nuôi cấy chìm cho thấy, vùng ức chế sinh trưởng đối với vi khuẩn gram âm *E. coli* ATCC 25922 là 7 mm, và đối với các chủng vi khuẩn gram dương như *S. aureus* FDA209P, *S. aureus* INA 00761 và *S. aureus* INA 00762 lần lượt là 15, 12, và 6 mm sau 21 ngày nuôi cấy. Còn đối với các chủng vi khuẩn khác như *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 13808, *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, và *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 thì vùng ức chế nằm trong khoảng 5 – 26 mm [216].

Nghiên cứu của Prince-Chawla (2020) báo cáo rằng, đường kính vùng ức chế sinh trưởng đối với các hại khuẩn của chiết xuất metanol quả thể nấm *T. versicolor* nằm trong khoảng 24,14 - 30,18 mm. Trong đó, vùng ức chế cao hơn đáng kể được ghi nhận đối với *S. aureus* (29,14 mm), trong khi đối với *E. coli*, *K. pneumonia* và *P. aeruginosa* (Chawla & Bains, 2020) 24,35 mm [217].

Trong nghiên cứu này, khả năng ức chế của dịch nấm bào ngư được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* ở cùng thời gian lên men đối với *S. aureus* cao hơn so với *E. coli*. Hiện tượng này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Prince-Chawla (2020) và Silva (2010), khả năng nhạy cảm của dịch chiết hệ sợi nấm *T. versicolor* đối với vi khuẩn gram dương như *S. aureus* cao hơn đáng kể do chúng không có periplasm liên kết màng trong màng tế bào bao gồm peptidoglycan như acid teichoic hoặc teichuronic. Ngoài ra, thành tế bào bên ngoài của *S. aureus* tạo thành một cấu trúc xếp ky nước dày có thể liên kết với một số lượng lớn protein và lipid làm tăng tính thấm của các tác nhân hóa trị liệu và peptidoglycan có nguồn gốc từ nấm [218]. Ngược lại, màng ngoài của các vi khuẩn gram âm như *E. coli* có chứa lipopolysaccharide hoạt động như một rào cản thẩm hiệu quả đối với các thành phần hoạt tính sinh học có nguồn gốc nấm; do đó, chúng ít nhạy cảm hơn đối với các vi khuẩn gram âm này [217].

Như vậy, khi so sánh kết quả thu được với các nghiên cứu trước đây cho thấy có sự khác biệt. Sự khác nhau này có thể tùy thuộc vào loài hại khuẩn được thử nghiệm, nguồn vật liệu nấm *T. versicolor* ban đầu (quả thể hoặc là hệ sợi nấm), thời gian thí nghiệm, và quan trọng nhất là dung môi và nồng độ của chúng được dùng để chiết PS (phương pháp tách chiết).

Bảng 3.14. Đường kính vùng ức chế (mm) của đồ uống lên men đối với *E. coli* và *S. aureus* ở các thời gian lên men khác nhau

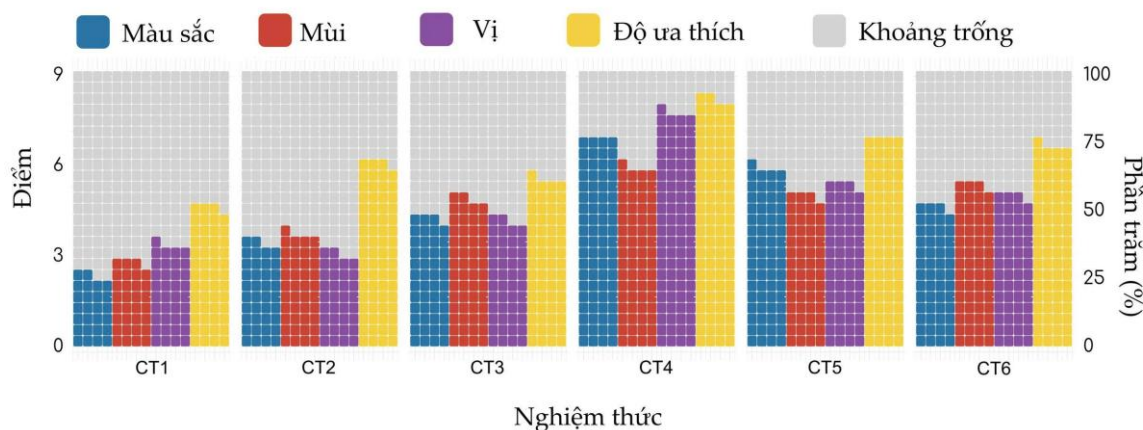
Công thức	12 giờ	24 giờ	48 giờ
	Đường kính vùng ức chế (mm)		
<i>E. coli</i>			
CT1	6,53 ± 0,44 ^d	8,80 ± 0,64 ^c	6,95 ± 0,77 ^c
CT2	7,95 ± 0,45 ^c	8,98 ± 0,29 ^c	9,18 ± 0,61 ^d
CT3	7,78 ± 0,37 ^c	10,54 ± 0,64 ^a	11,07 ± 0,37 ^c
CT4	8,07 ± 0,35 ^c	9,58 ± 0,38 ^b	12,26 ± 0,36 ^b
CT5	10,39 ± 0,70 ^b	10,45 ± 0,28 ^a	11,88 ± 0,52 ^b
CT6	11,71 ± 0,40 ^a	10,97 ± 0,56 ^a	13,42 ± 0,47 ^a
<i>S. aureus</i>			
CT1	7,55 ± 0,40 ^d	11,77 ± 0,72 ^d	9,74 ± 0,53 ^d
CT2	8,31 ± 0,94 ^{bc}	11,76 ± 0,62 ^d	11,08 ± 1,26 ^c
CT3	7,81 ± 0,44 ^{cd}	13,97 ± 0,86 ^c	11,35 ± 0,50 ^c
CT4	8,02 ± 0,52 ^{bcd}	15,31 ± 0,88 ^b	12,38 ± 0,59 ^b
CT5	8,62 ± 0,50 ^b	16,13 ± 1,21 ^{ab}	12,55 ± 0,70 ^b
CT6	9,41 ± 0,67 ^a	16,65 ± 0,74 ^a	13,58 ± 0,91 ^a

*Ghi chú: Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 15 mẫu). Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Kiểm định Tukey's HSD, mức ý nghĩa P < 0,05). Các công thức CT1, CT2, CT3, CT4, CT5 và CT6 tương ứng được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* (Nấm *T. versicolor*) với nồng độ lần lượt là 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% và 1,0% theo tỷ lệ thể tích/ thể tích (v/v).*

3.3.2.4. Ảnh hưởng đến chất lượng cảm quan sản phẩm

Các thử nghiệm sàng lọc cho thấy thời gian lên men ngắn hơn (12 giờ) hoặc thời gian lên men dài hơn (48 giờ) dẫn đến điểm số cảm quan thấp hơn về mùi thơm, hương vị và mức độ yêu thích chung so với 24 giờ lên men. Điều này có thể là do quá trình lên men chưa hoàn tất trong vòng 12 giờ nên đồ uống trong tất cả các phương pháp xử lý thử nghiệm đều không đạt được độ acid và hương thơm cần thiết của sản phẩm lên men có nguồn gốc từ nấm. Mặt khác, việc kéo dài thời gian lên men lên 48 giờ dẫn đến tăng tổng hàm lượng acid tích lũy và giảm hàm lượng đường. Điều này khiến sản phẩm có vị quá chua, do đó làm thay đổi hương thơm của đồ uống lên men. Hiện tượng này đã

được Shenxi-Chen (2021) báo cáo, thời gian lên men cực dài dẫn đến sự gia tăng LAB và sự giảm của nấm men, nguyên nhân là do sự thay đổi của các yếu tố môi trường, bao gồm hạn chế chất dinh dưỡng, nồng độ ethanol cao và giá trị pH thấp [219]. Do đó, phương pháp lên men trong 24 giờ đã được lựa chọn để đánh giá cảm quan và phân tích chất lượng.



Hình 3.22. Đánh giá cảm quan của đồ uống lên men 24 giờ từ các công thức thí nghiệm

*Ghi chú: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5 và CT6 lần lượt là các công thức được bổ sung 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% và 1,0% (v/v) hệ sợi nấm *T. versicolor**

Kết quả cho thấy đồ uống lên men trong nghiệm thức bổ sung 0,6% sợi nấm (CT4, 0,6%) đạt điểm cảm quan cao nhất về hình thức, hương thơm, hương vị và độ hài lòng chung, lần lượt là 6,87; 5,86; 7,61 và 8,09. Trên thang đo Hedonic chín điểm, nghiệm thức không bổ sung sợi nấm (CT1, 0%) đạt điểm cảm quan thấp nhất ở cả ba tiêu chí đánh giá. Sản phẩm đồ uống lên men từ CT4 có màu vàng nhạt đồng nhất với hương thơm đặc trưng của *P. ostreatus*. Trong tất cả các phương pháp xử lý, mặc dù lượng *P. ostreatus* được thêm vào là như nhau, nhưng hàm lượng của sợi nấm *T. versicolor* lại khác nhau. Các công thức CT5 và CT6, sự tích tụ cao của tổng hàm lượng acid có thể dẫn đến mùi chua trong sản phẩm lên men lẫn át mùi thơm đặc trưng của *P. ostreatus*. Trong khi đó, trong các phương pháp xử lý CT2 và CT3, lượng sợi nấm *T. versicolor* được thêm vào thấp hơn (0,2% và 0,4%), do đó mùi thơm của *P. ostreatus* vẫn mạnh, nhưng mùi thơm tổng thể thiếu hài hòa và cân bằng. CT4 cho thấy lượng sợi nấm *T. versicolor* được thêm vào đã tạo ra một quá trình lên men cân bằng. Các hợp chất được tạo ra trong quá trình lên men chiết xuất *P. ostreatus* có thêm sợi nấm *T. versicolor* có thể đã tương tác và kết hợp để tạo ra mùi thơm dễ chịu và hài hòa.

3.3.2.5. Ảnh hưởng đến sự thay đổi pH và hàm lượng acid tổng số (TAN)

Sự thay đổi pH là một trong những thông số quan trọng trong việc theo dõi và đánh giá hiệu quả của quá trình lên men. pH là chỉ số quan trọng để đánh giá các đặc tính của thực phẩm lên men bằng vi khuẩn lactic. Sự bổ sung các prebiotic được chứng minh là có tác dụng là tăng nồng độ acid amin và gia tăng đáng kể đến quần xã hệ vi khuẩn trong quá trình lên men, đặc biệt là số lượng vi khuẩn *Lactobacilli* [220]. Các prebiotic như GOS và FOS có tác dụng duy trì sự sinh trưởng của các lợi khuẩn như *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, làm tăng cường hiệu quả của quá trình lên men [211].

Bảng 3.15. Sự thay đổi pH của dịch chiết nấm Bào ngư được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* theo thời gian lên men

Công thức	Thời gian lên men			
	Ban đầu	12 giờ	24 giờ	48 giờ
CT1	5,62 ± 0,17	3,40 ± 0,14 ^a	3,19 ± 0,03 ^a	3,06 ± 0,02 ^b
CT2	5,28 ± 0,27	3,35 ± 0,05 ^b	3,15 ± 0,06 ^b	3,05 ± 0,01 ^c
CT3	5,10 ± 0,12	3,34 ± 0,02 ^b	3,14 ± 0,03 ^c	3,04 ± 0,05 ^c
CT4	4,89 ± 0,13	3,32 ± 0,02 ^c	3,14 ± 0,05 ^c	3,05 ± 0,04 ^b
CT5	4,90 ± 0,07	3,33 ± 0,02 ^b ^c	3,15 ± 0,03 ^b	3,07 ± 0,03 ^a
CT6	4,72 ± 0,09	3,33 ± 0,03 ^{bc}	3,16 ± 0,05 ^b	3,07 ± 0,02 ^a

Ghi chú: dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 15). Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $P < 0,05$). CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, và CT6 là các nghiệm thức lần lượt bổ sung 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1,0% (v/v) hệ sợi nấm *T. versicolor*.

Việc duy trì pH thấp (pH < 4,6) trong quá trình lên men thực phẩm là điều cần thiết và quan trọng để tạo điều kiện cho sự phát triển vi khuẩn lactic, ngăn ngừa sự phát triển của các vi sinh vật không mong muốn như vi khuẩn gây bệnh, nấm mốc và nấm men, đảm bảo an toàn thực phẩm về vi sinh vật [221].

Trong nghiên cứu này, sau 48h lên men, pH đo được ở công thức đối chứng thấp hơn có ý nghĩa (CT1; 3,057) so với công thức bổ sung 0,8% (CT5; 3,071) và 1% (CT6; 3,073) hệ sợi nấm ($P < 0,05$). Xiqing-Yue cho rằng, việc bổ sung prebiotic vào quá trình lên men lactic có thể làm giảm pH, gây ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây hại và giảm sự tích lũy quá trình tạo ra các hợp chất nitrit, một trong những tác nhân gây ung thư dạ dày [222]. Tuy nhiên, Nieves-Corzo cho rằng, việc bổ sung prebiotic vào quá

trình sản xuất các sản phẩm lên men không có tác động đáng kể đến sự tạo thành các acid lactic. Thay vào đó, pH của sản phẩm được kiểm soát bởi nhiều loại acid hữu cơ được tạo ra trong quá trình lên men [211]. Sự sinh trưởng của vi sinh vật trong quá trình lên men trải qua 4 giai đoạn, sự tạo thành các acid hữu cơ có tác dụng điều khiển đến độ acid của môi trường nuôi cấy cũng vì vậy sẽ biến động theo sự phát triển của hệ vi sinh vật. Theo thời gian lên men, pH đo được dần dần sẽ ổn định ít thay đổi hơn khi vi sinh vật bước vào giai đoạn suy thoái do sự cạn kiệt về nguồn chất dinh dưỡng (chủ yếu là đường) có trong môi trường nuôi cấy [223].

Các carbohydrate như chitin, cellulose, α - và β -glucans, mannans, xylans và galactans có trong nấm là một nguồn prebiotic có khả năng kích thích sự phát triển và hoạt động của vi khuẩn lactic trong quá trình lên men. Ảnh hưởng của tỉ lệ hệ sợi nấm *T. versicolor* được bổ sung vào dịch chiết nấm Bào ngư đến tổng hàm lượng acid (tính theo acid lactic) thu nhận được trong quá trình lên men thể hiện ở **Bảng 3.16**. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng acid tổng số tăng lên tỉ lệ thuận với tỉ lệ hệ sợi nấm được bổ sung và thời gian lên men.

Bảng 3.16. Sự thay đổi hàm lượng acid tổng số (tính theo acid lactic) của dịch chiết nấm Bào ngư được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* theo thời gian lên men

Thí nghiệm	Thời gian lên men			
	Ban đầu	12 giờ	24 giờ	48 giờ
CT1	1,362 \pm 0,074 ^f	3,702 \pm 0,118 ^f	6,611 \pm 0,101 ^f	8,026 \pm 0,059 ^f
CT2	1,437 \pm 0,026 ^e	4,244 \pm 0,128 ^e	7,218 \pm 0,100 ^e	9,158 \pm 0,132 ^e
CT3	1,606 \pm 0,030 ^d	5,466 \pm 0,049 ^d	7,435 \pm 0,041 ^d	9,442 \pm 0,099 ^d
CT4	1,744 \pm 0,028 ^c	5,782 \pm 0,034 ^c	7,825 \pm 0,071 ^c	9,769 \pm 0,045 ^c
CT5	1,875 \pm 0,043 ^b	6,017 \pm 0,089 ^b	8,16 \pm 0,059 ^b	10,362 \pm 0,106 ^b
CT6	2,021 \pm 0,036 ^a	6,617 \pm 0,027 ^a	8,643 \pm 0,033 ^a	10,678 \pm 0,027 ^a

*Ghi chú: dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn ($n = 15$). Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $P < 0,05$). CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, và CT6 là các thí nghiệm lần lượt bổ sung 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1,0% (v/v) hệ sợi nấm *T. versicolor*.*

Sau 12h lên men, so với công thức đối chứng (CT1, không bổ sung hệ sợi nấm), ngoại trừ CT2 (bổ sung 0,2% hệ sợi nấm), hàm lượng acid tổng số tăng lên ở các công thức còn lại đều hơn 1 g/L. Sau 24 giờ, ngoại trừ CT2 và CT3, xu hướng này lặp lại ở CT4, CT5 và CT6, và sau 48 giờ xu hướng này xảy ra ở tất cả các công thức thí nghiệm.

Hàm lượng acid tổng số lớn nhất ghi nhận được đều ở CT6 (bổ sung 1,0% hệ sợi nấm), lần lượt là 6,615; 8,640; và 10,680 g/L sau 12; 24; và 48 giờ lên men.

Tuy nhiên, sau 48 giờ lên men, hàm lượng acid tổng số thu nhận được CT6 (1% hệ sợi nấm *T. versicolor*) không khác nhau có ý nghĩa thống kê so với CT5 (0,8% hệ sợi nấm *T. versicolor*). Kết quả này cho thấy, tỉ lệ hệ sợi nấm được bổ sung càng cao và thời gian lên men càng lâu thì càng tạo điều kiện thuận lợi cho sự sinh trưởng của vi khuẩn lên men lactic, dẫn đến tăng hàm lượng acid tổng số trong các công thức thí nghiệm.

Nieves-Corzo cho rằng, quá trình trao đổi chất của vi khuẩn acid lactic trong quá trình lên men tạo ra chủ yếu là acid lactic, bên cạnh đó là acid acetic và một số acid hữu cơ khác với hàm lượng rất nhỏ. Sự gia tăng đáng kể về hàm lượng acid lactic đi kèm với sự giảm của độ pH. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng, các prebiotic như GOS và FOS hầu như không được vi khuẩn acid lactic chuyển hóa trong quá trình lên men, thay vào đó là đường lactose được chúng sử dụng hiệu quả như một nguồn cung cấp carbon. Tuy nhiên, việc bổ sung prebiotic như lactulose (với nồng độ 2% và 4%) lại làm tăng tốc độ của quá trình lên men [211].

3.3.2.6. Đánh giá an toàn sản phẩm nước nấm lên men có bổ sung sợi nấm

Sản phẩm nước nấm bào ngư lên men bổ sung 0,6% bột sợi nấm vân chi được đóng vào chai thủy tinh 110ml, gửi mẫu phân tích chất lượng an toàn tại Quatest 2. Kết quả phân tích được thể hiện ở **Bảng 3.17**.

Bảng 3.17. Kết quả đánh giá an toàn vi sinh và hoá học sản phẩm nước lên men

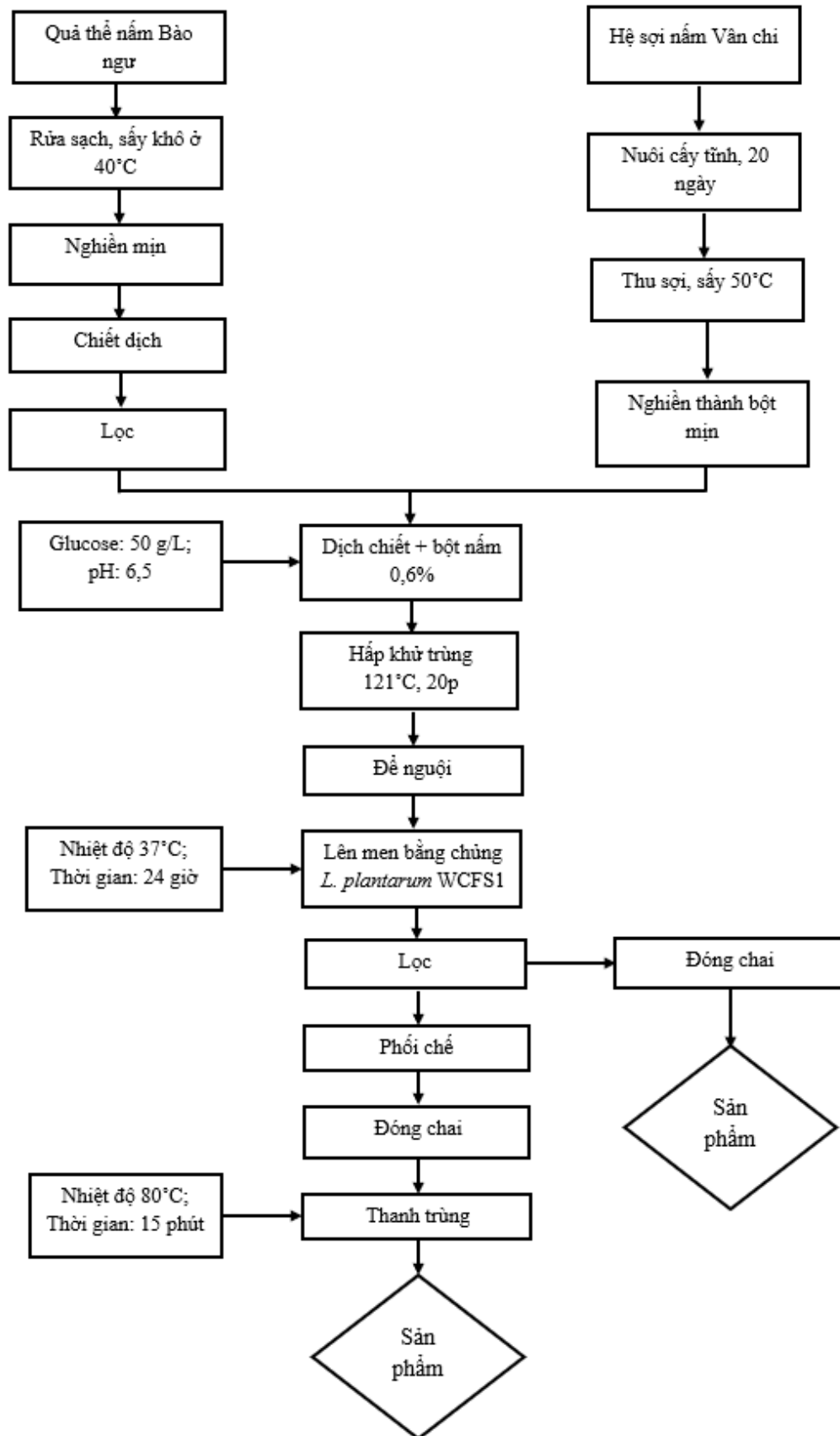
TT	Tên chỉ tiêu	Giới hạn cho phép (TCVN 13368:2021)	Hàm lượng trong sản phẩm	phương pháp thử
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	100 (CFU/ml)	KPH (<1)	TCVN 4884-1:2015
2	Tổng số bào tử nấm men, nấm mốc	10 (CFU/ml)	KPH (<1)	TCVN 8275-1:2010
3	<i>Coliforms</i>	10 (CFU/ml)	KPH (<1)	TCVN 6848:2007
4	<i>E. coli</i>	không được có	KPH (<1)	TCVN 7924-2:2008

5	Staphylococci có phản ứng dương tính với Coagulase (<i>S. aureus</i> và các loài khác)	không được có	KPH (<1)	ISO 6888-1:2021
6	<i>Cl. perfringens</i>	không được có	KPH (<1)	TCVN 4991:2005
7	Cadmi (Cd)	1 (mg/kg)	<0,05	AOAC 999.11
8	Chì (Pb)	0,05 (mg/kg)	<0,05	AOAC 999.11
9	Thủy Ngân (Hg)	0,05 (mg/kg)	<0,05	AOAC 971.21

Kết quả phân tích chất lượng vi sinh và hoá học của sản phẩm nước uống lên men có bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* cho thấy, không phát hiện tổng số vi sinh vật hiếu khí, bào tử nấm men, nấm mốc, *Coliform*, *E. coli*, Staphylococci có phản ứng dương tính với Coagulase, *Cl. perfringens*. Hàm lượng các kim loại nặng như Cd, Pb, Hg đều nằm thấp hơn giới hạn cho phép được quy định trong Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 20-1: 2024/BYT đối với giới hạn các chất ô nhiễm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Như vậy, sản phẩm nước nấm lên men bằng chủng vi khuẩn *L. plantarum* đảm bảo được an toàn chất lượng về mặt vi sinh và hóa học.

Bổ sung sinh khối sợi nấm vào hỗ trợ lên men lactic dịch nấm bào ngư bằng chủng *L. plantarum* cho thấy sản phẩm nước nấm thành phẩm tăng hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn và tăng mật độ lợi khuẩn mà cũng đảm bảo giá trị cảm quan so với các nghiệm thức khác. Ở nồng độ 0,6% sợi nấm bổ sung cho kết quả tốt nhất khi kết hợp các yêu cầu đặt ra và được đánh giá an toàn chất lượng, đảm bảo tiêu chuẩn của thực phẩm hỗ trợ sức khỏe. Điều này cho thấy sự hỗ trợ mạnh mẽ của sinh khối sợi nấm trong quá trình lên men lactic nước nấm bào ngư để nâng cao chất lượng sản phẩm. Kết quả nghiên cứu cũng góp phần tạo ra sản phẩm lên men mới từ nấm, giàu hoạt tính sinh học, đáp ứng nhu cầu ngày càng cao của người tiêu dùng cũng như đóng góp vào sự đa dạng các sản phẩm sau thu hoạch ngành nấm trong nước.

3.3.3. Xây dựng quy trình chế biến nước uống lên men



Hình 3.23. Sơ đồ quy trình chế biến nước uống nấm bào ngư bổ sung hệ sợi nấm Vân chi lên men lactic

Thuyết minh quy trình:

1. Giai đoạn chuẩn bị nguyên liệu

- Chuẩn bị nguyên liệu dịch chiết nấm Bào ngư

Bước 1: Quả thể nấm Bào ngư tươi được đem đi rửa sạch để loại bỏ tạp chất.

Bước 2: sấy khô ở nhiệt độ 40°C nhằm làm giảm độ ẩm mà vẫn hạn chế tối đa sự biến đổi của các hoạt chất sinh học nhạy cảm với nhiệt.

Bước 3: Nghiền mịn để phá vỡ cấu trúc tế bào, tăng diện tích tiếp xúc dung môi.

Bước 4: Tiến hành chiết dịch từ bột nấm

Bước 5: Lọc để thu hồi phần dịch chiết trong, loại bỏ bã rắn.

- Chuẩn bị nguyên liệu hệ sợi nấm Vân chi

Bước 1: Hệ sợi nấm Vân chi (*Trametes versicolor*) được tiến hành nuôi cấy tĩnh trong thời gian 20 ngày để hệ sợi phát triển và tích lũy tối đa các hợp chất.

Bước 2: Thu sợi và sấy ở 50°C.

Bước 3: Nghiền thành bột mịn để chuẩn bị cho quá trình phối trộn.

2. Giai đoạn phối trộn và chuẩn bị môi trường

Bước 1: Phối trộn Dịch chiết nấm bào ngư + bột nấm Vân chi (Dịch chiết + 0,6% bột nấm)

Bước 2: Bổ sung Glucose nồng độ 50 g/L và điều chỉnh pH về mức 6,5.

Bước 3: Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút để tiêu diệt hoàn toàn vi sinh vật tạp nhiễm, đảm bảo môi trường vô khuẩn trước khi cấy giống.

3. Giai đoạn lên men lactic

- Môi trường sau khi hấp khử trùng được để nguội xuống nhiệt độ thích hợp.

- Tiến hành cấy giống và lên men bằng chủng *Lactobacillus plantarum* WCFS1 ở 37°C trong 24 giờ. Quá trình lên men này giúp chuyển hóa lượng đường có sẵn thành acid lactic, sinh ra các hợp chất kháng khuẩn, hợp chất tạo hương vị và có thể giúp biến đổi các hợp chất có trong nấm thành các dạng sinh khả dụng cao hơn.

4. Giai đoạn thu hồi và hoàn thiện sản phẩm

Sau khi quá trình lên men kết thúc, dịch lên men được đem đi **lọc** để tách bỏ cặn bã và sinh khối. Từ bước này, quy trình rẽ nhánh để tạo ra hai dòng sản phẩm khác nhau:

- Dòng sản phẩm 1: Dịch lọc được đưa ngay vào khâu đóng chai để tạo ra Sản phẩm. Đây có thể là dạng sản phẩm lên men thô, giữ lại lượng lợi khuẩn sống (probiotic).

- Dòng sản phẩm 2: Dịch lọc tiếp tục trải qua bước phối chế (bổ sung thêm đường, chất điều vị, nước, hoặc hương liệu để hoàn thiện vị). Sau khi đóng chai, sản phẩm được đem đi thanh trùng ở nhiệt độ 80°C trong 15 phút. Quá trình thanh trùng này giúp tiêu diệt phần lớn vi sinh vật bất hoạt enzyme, giúp kéo dài thời gian bảo quản của Sản phẩm cuối cùng.



Hình 3.24. Sản phẩm nước uống nấm bào ngư lên men lactic

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

A. KẾT LUẬN

Luận án đã hoàn thành các mục tiêu nghiên cứu đề ra, tập trung vào việc đánh giá hoạt tính sinh học in vitro của polysaccharide thu nhận từ sinh khối hệ sợi nấm nuôi cấy dịch thể, bao gồm hoạt tính prebiotic, khả năng kháng oxi hóa, và định hướng ứng dụng vào sản phẩm thực phẩm. Từ các kết quả đạt được, có thể rút ra những kết luận chính như sau:

- **Xác định được một số điều kiện tối ưu quan trọng cho nuôi cấy dịch thể nhằm thu sinh khối với hiệu suất cao và giàu polysaccharide.**

- Đối với *Cordyceps militaris*: Điều kiện tối ưu là pH 5,05; nồng độ glucose 40 g/L và cao nấm men 5,07 g/L. Tại điều kiện này, năng suất sinh khối khô đạt $8,90 \pm 0,25$ g/L và hàm lượng PS đạt 5,28%.

- Đối với *Trametes versicolor*: Điều kiện tối ưu là pH 5,545; nồng độ glucose 20,65 g/L và cao nấm men 2,025 g/L. Tại điều kiện này, năng suất sinh khối khô đạt $3,59 \pm 0,12$ g/L và hàm lượng PS đạt $8,23 \pm 0,27\%$.

- **Đánh giá hiệu quả chiết và đặc điểm cấu trúc bề mặt của polysaccharide**

Phương pháp chiết tuần tự lần lượt với nước nóng, kiềm và acid đã chứng minh hiệu quả trong việc phân tách các phân đoạn PS với đặc tính khác biệt.

- Về hiệu suất: Dung môi nước đã chứng minh cho hiệu suất thu hồi polysaccharide cao ở cả hai chủng (81,35 mg/g với *C. militaris* và 71,53 mg/g với *T. versicolor*), việc chiết trình tự tiếp tục thu được các PS trong kiềm và acid với các hoạt tính kháng oxi hóa và hoạt tính prebiotic đặc trưng.

- Về hình thái: Điều kiện chiết có ảnh hưởng lớn đến cấu trúc bề mặt. Trong khi phân đoạn chiết nước và kiềm có dạng khối kết tụ, phân đoạn chiết acid (A-PST) và kiềm (S-PST) của nấm *T. versicolor* thể hiện cấu trúc nén chặt hoặc hạt mịn đặc thù.

- **Chứng minh hoạt tính sinh học của các chiết xuất Polysaccharide**

- Hoạt tính chống oxi hóa: Các phân đoạn PS đều thể hiện khả năng trung hòa gốc tự do ABTS. PS từ *T. versicolor* cho hoạt tính mạnh hơn (IC_{50} từ 1070 – 1279 $\mu\text{g/mL}$) so với *C. militaris* (IC_{50} từ 2446 – 3273 $\mu\text{g/mL}$).

- Hoạt tính Prebiotic: Các phân đoạn PS thể hiện tiềm năng prebiotic rõ rệt thông qua chỉ số PI dương và khả năng kháng tiêu hóa bởi alpha-amylase cao (mức độ thủy phân chỉ từ 2,07 – 15,05%). Nổi bật nhất là phân đoạn W-PSC (trên chủng *L. pentosus* NHI, $PI = 0,857$) và A-PST (trên chủng *L. casei* 01, $PI = 0,935$).

- Cơ chế tác động: Việc bổ sung PS không chỉ thúc đẩy sinh trưởng của lợi khuẩn mà còn tăng cường sinh tổng hợp các acid béo chuỗi ngắn (SCFAs) và nâng cao hiệu quả ức chế các vi khuẩn gây bệnh (*E. coli*, *S. aureus*).

- Ứng dụng thực tiễn vào sản phẩm nước uống lên men

Đã phát triển thành công công thức chế biến nước uống từ nấm Bào ngư lên men lactic bổ sung sinh khối sợi nấm *T. versicolor*:

- Công thức tối ưu: Bổ sung 0,6% sinh khối sợi nấm, thời gian lên men 24 giờ.

- Chất lượng sản phẩm: Sản phẩm đạt giá trị cảm quan cao về màu sắc, mùi vị; đồng thời sở hữu hoạt tính sinh học tốt. Các chỉ tiêu an toàn thực phẩm (vi sinh, kim loại nặng) đều nằm trong giới hạn cho phép theo QCVN 20-1:2024/BYT.

B. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Các kết quả nghiên cứu của luận án đã được xác định có những đóng góp mới cho học thuật và thực tiễn như sau:

* Về mặt học thuật:

- Hệ thống hóa cơ sở dữ liệu về công nghệ nuôi cấy dịch thể: đã xác lập được một số điều kiện công nghệ tối ưu cho quy trình nuôi cấy dịch thể hai chủng nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor* nhằm định hướng sinh tổng hợp sinh khối giàu polysaccharide. Đây là cơ sở khoa học quan trọng để giải thích ảnh hưởng của điều kiện môi trường (pH, nguồn C, N) đến sự tích lũy sinh khối và polysaccharide trong tế bào nấm.

- Làm sáng tỏ hiệu quả của phương pháp chiết tuần tự: Chứng minh được tính ưu việt của phương pháp chiết tuần tự trong việc phân tách các nhóm polysaccharide dựa trên đặc tính cấu trúc và độ tan. Đóng góp mới nằm ở việc phát hiện ra rằng phân đoạn polysaccharide chiết bằng acid (A-PS) – vốn ít được quan tâm trong các nghiên cứu trước đây – lại thể hiện hoạt tính prebiotic tiềm năng (chỉ số PI cao nhất với một số probiotic) so với các phân đoạn khác. Điều này mở ra hướng tiếp cận mới trong việc khai thác các polysaccharide liên kết chặt trong vách tế bào nấm.

- Kết quả nghiên cứu của luận án là cơ sở để tiếp tục tinh sạch, tách chiết và phát

hiện ra các polysaccharide mới từ sinh khối sợi nấm với các hoạt tính kháng oxy hóa và prebiotic đặc trưng.

- Cung cấp dữ liệu về tiềm năng prebiotic của hệ sợi nấm: Cung cấp bằng chứng thực nghiệm tin cậy chứng minh hoạt tính prebiotic invitro của PS sợi nấm: kháng tiêu, có khả năng kích thích chọn lọc các chủng lợi khuẩn (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*...) và ức chế hại khuẩn (*E. coli*, *S. aureus*) thông qua cơ chế sinh acid béo chuỗi ngắn (acid acetic, propionic, butyric).

* Về mặt thực tiễn:

- Đề xuất giải pháp công nghệ chủ động nguồn nguyên liệu: Luận án đã chứng minh tính khả thi của việc nuôi cấy dịch thể để thu sinh khối sợi nấm, đây là phương thức tiềm năng để tạo ra nguồn nguyên liệu hữu cơ có giá trị cho thực phẩm, dược phẩm bởi tính ổn định, năng suất cao, thời gian ngắn và dễ thực hiện trong quy mô công nghiệp, dễ kiểm soát các điều kiện nuôi cấy và tự động hóa. Đây là tiền đề quan trọng để đa dạng hóa mô hình sản xuất nguyên liệu bên cạnh canh tác truyền thống thu quả thể.

- Đa dạng hóa nguồn nguyên liệu sản xuất prebiotic trên thị trường: hiện nay nguồn prebiotic trên thị trường chủ yếu được sản xuất từ thực vật (FOS, inulin), rong biển (fucoidan, carrageenan), kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng sinh khối sợi nấm cũng là nguồn prebiotic tiềm năng mà có thể chủ động điều kiện nuôi cấy để thu sản phẩm ở quy mô công nghiệp.

- Phát triển thành công dòng sản phẩm nước uống lên men giàu probiotic, giàu hoạt tính kháng oxy hóa: Xây dựng thành công quy trình công nghệ sản xuất nước uống lên men từ nấm Bào ngư bổ sung sinh khối sợi nấm *Trametes versicolor*. Sản phẩm không chỉ đạt các tiêu chuẩn an toàn thực phẩm mà còn minh chứng cho việc ứng dụng thành công mô hình kết hợp Prebiotic (sợi nấm) và Probiotic (vi khuẩn lên men) để tạo ra thực phẩm bổ sung có giá trị gia tăng cao, sẵn sàng cho việc chuyển giao và thương mại hóa.

C. KIẾN NGHỊ VÀ HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

- Tiếp tục nghiên cứu quy trình thu sinh khối sợi nấm quy mô lớn, tạo sinh khối hữu cơ giàu các hợp chất sơ cấp đặc biệt là các PS giàu hoạt tính sinh học

- Phân tích cấu trúc phân tử, khối lượng phân tử từng phân đoạn PS để tìm kiếm ra các PS mới tan trong các dung môi khác nhau

- Khảo sát và làm sáng tỏ thêm các hoạt tính sinh học của PS: khả năng kháng tiêu đường, kháng viêm, kháng ung thư, tăng cường miễn dịch...

- Nghiên cứu ứng dụng sinh khối sợi nấm vào các sản phẩm mới để đa dạng hóa sản phẩm cũng như chức năng sản phẩm: sữa bột, nước yến, bánh quy, bánh mì, bột ngũ cốc, nước hoa quả lên men

- Sử dụng sinh khối sợi nấm như một loại bột dinh dưỡng giàu hoạt tính prebiotic

- Sử dụng bột PS tinh khiết từ chiết xuất nước như một nguyên liệu cho ngành dược để bào chế các dược phẩm cải thiện sức khỏe đường ruột.

- Nghiên cứu đánh giá *in vivo* hoạt tính prebiotic của PS sợi nấm nhằm làm sáng tỏ cơ chế tác động và khẳng định hiệu quả prebiotic của sợi nấm đối với hệ vi sinh vật đường ruột cũng như sức khỏe vật chủ.

Các đề tài nghiên cứu khoa học:

1. Chủ nhiệm đề tài cấp cơ sở thành phố: Nghiên cứu nuôi trồng nấm Vân chi (*Trametes versicolor*) trên cơ chất gỗ keo lá tràm và chế biến một số sản phẩm bảo vệ sức khỏe từ nấm vân chi tại thành phố Đà Nẵng – Đã nghiệm thu năm 2021
2. Thành viên thư kí đề tài cơ sở cấp trường Murata: Khảo sát hoạt tính prebiotic của polysaccharide chiết xuất từ sợi nấm *Cordyceps militaris*- Đã nghiệm thu năm 2023
3. Thành viên chính đề tài cấp thành phố: Áp dụng công nghệ lai bào tử đơn để chọn tạo chủng giống nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) cho năng suất và chất lượng cao – Đã nghiệm thu năm 2024
4. Chủ nhiệm đề tài cấp trường: Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và prebiotic của hệ sợi nấm Vân chi (*Trametes versicolor*) nuôi cấy dịch thể và ứng dụng chế biến nước uống nấm lên men – Đã nghiệm thu năm 2026

Các bài báo trong và ngoài nước:

1. Nguyen Thi Bich Hang, Doan Chi Cuong, Truong Cong Phat, Bui Duc Thang, Do Phu Huy, Dang Minh Nhat (2024), Developing a health-suppotting fermented lactic beverage from oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*). The New Diverse Facets of Sensory Evaluation (SPISE), 127-138.
2. Nguyen Thi Bich Hang, Dang Minh Nhat, Bui Duc Thang, Vo Van Minh, Nguyen Sy Toan, Munehiro Tanaka, Doan Chi Cuong (2025), Optimization of Lactic Fermented Beverages: Integrating *Trametes versicolor* Mycelium and *Pleurotus ostreatus* Extract for Enhanced Functional Properties, Mycobiology, Volume 53, Issue 4, 1-14
3. Hang Thi-bich Nguyen, Cuong Chi Doan, Thang Duc Bui, Nhat Minh Dang (2026), Prebiotic Properties of Polysaccharide Extracts from *Cordyceps militaris* Mycelium: Potentials for Functional Food and Drink Applications, Journal of Applied Biology & Biotechnology. Vol. 14(1), pp. 46-55, January-February, 2026.
4. Nguyen Thi Bich Hang, Dang Minh Nhat, Doan Chi Cuong, Bui Duc Thang (2023), Prebiotic properties of polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* mycelia, Vietnam Trade and Industry Review, 4, 413-420

- [1] Friedman M. Mushroom polysaccharides: Chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. *Foods*. 2016;5(4):1–40.
- [2] Aida F, Shuhaimi M, Yazid M, et al. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends Food Sci Technol*. 2009;20(11–12):567–575.
- [3] Fuentes-Zaragoza E, Sánchez-Zapata E, Sendra E, et al. Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch/Staerke*. 2011;63(7):406–415.
- [4] Zhao H, Li M, Liu L, et al. *Cordyceps militaris* polysaccharide alleviates diabetic symptoms by regulating gut microbiota against TLR4/NF- κ B pathway. *Int J Biol Macromol*. 2023;230:123241.
- [5] Pallav K, Dowd SE, Villafuerte J, et al. Effects of polysaccharopeptide from *Trametes versicolor* and amoxicillin on the gut microbiome of healthy volunteers: a randomized clinical trial. *Gut Microbes*. 2014;5(4):458–467.
- [6] Chen L, Liu X, Zheng K, et al. Cordyceps Polysaccharides: A Review of Their Immunomodulatory Effects. *Molecules*. 2024.
- [7] Phull A-R, Ahmed M, Park H-J. *Cordyceps militaris* as a Bio Functional Food Source: Pharmacological Potential, Anti-Inflammatory Actions and Related Molecular Mechanisms. *Microorganisms*. 2022;10(2).
- [8] Habtemariam S. *Trametes versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) polysaccharides in cancer therapy: Targets and efficacy. *Biomedicines*. 2020.
- [9] Bai M, Huang Z, Zheng X, et al. Polysaccharides from *Trametes versicolor* as a Potential Prebiotic to Improve the Gut Microbiota in High-Fat Diet Mice. *Microorganisms*. 2024.
- [10] Dudekula UT, Doriya K, Devarai SK. A critical review on submerged production of mushroom and their bioactive metabolites. *3 Biotech*. 2020 [cited 2025 Jul 16];10(8).
- [11] Doriya K, Jose N, Gowda M, et al. Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-Asparaginase. *Adv Food Nutr Res* . 2016 [cited 2025 Jul 18];78:115–135.

- [12] Cui J-D, Jia S-R. Optimization of medium on exopolysaccharides production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. Food Sci Biotechnol. 2010;19(6):1567–1571.
- [13] Shih IL, Tsai KL, Hsieh C. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. Biochem Eng J . 2007 [cited 2026 Mar 12];33(3):193–201.
- [14] Wu CY, Liang CH, Liang ZC. Effect of LED light on the production of fruiting bodies and nucleoside compounds of *Cordyceps militaris* at different growth stages of solid-state fermentation. J Taiwan Inst Chem Eng. 2023 [cited 2026 Mar 13];153.
- [15] Das SK, Masuda M, Sakurai A, et al. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. Fitoterapia. 2010;81(8):961–968.
- [16] Qin P, Li X, Yang H, et al. Therapeutic Potential and Biological Applications of Cordycepin and Metabolic Mechanisms in Cordycepin-Producing Fungi. Molecules. 2019.
- [17] Chamyuang S, Owatworakit A, Honda Y. New insights into cordycepin production in *Cordyceps militaris* and applications. Ann. Transl. Med. China; 2019. p. S78.
- [18] He Z, Lin J, He Y, et al. Polysaccharide-Peptide from *Trametes versicolor*: The Potential Medicine for Colorectal Cancer Treatment. Biomedicines. 2022.
- [19] Dou H, Chang Y, Zhang L. Chapter Fifteen - Coriolus versicolor polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China. In: Zhang LBT-P in MB and TS, editor. Glycans and Glycosaminoglycans as Clinical Biomarkers and Therapeutics - Part B. Academic Press; 2019. p. 361–381.
- [20] Zhang J, Wen C, Duan Y, et al. Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) Link polysaccharides: isolation, structure, and bioactivities: a review. Int J Biol Macromol. 2019;132:906–914.
- [21] Tuli HS, Sandhu SS, Sharma AK. Pharmacological and therapeutic potential of *Cordyceps* with special reference to Cordycepin. 3 Biotech. 2014;4(1):1–12.
- [22] Yu G, Peng J, Li L, et al. The role and mechanisms of cordycepin in inhibiting cancer cells. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2024 [cited 2025 Jul 21];57.

- [23] Zhao H, Deng B, Li D, et al. Enzymatic-extractable polysaccharides from *Cordyceps militaris* alleviate carbon tetrachloride-induced liver injury via Nrf2/ROS/NF- κ B signaling pathway. *J Funct Foods*. 2022;95:105152.
- [24] Chen X, Wu G, Huang Z. Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris*. *Int J Biol Macromol*. 2013;58:18–22.
- [25] Sakamoto J, Morita S, Oba K, et al. Efficacy of adjuvant immunochemotherapy with polysaccharide K for patients with curatively resected colorectal cancer: a meta-analysis of centrally randomized controlled clinical trials. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55(4):404–411.
- [26] Zuo K, Tang K, Liang Y, et al. Purification and antioxidant and anti-Inflammatory activity of extracellular polysaccharopeptide from sanghuang mushroom, *Sanghuangporus lonicericola*. *J Sci Food Agric*. 2021;101(3):1009–1020.
- [27] Knežević A, Stajić M, Sofrenić I, et al. Antioxidative, antifungal, cytotoxic and antineurodegenerative activity of selected *Trametes* species from Serbia. *PLoS One*. 2018;13(8):e0203064.
- [28] Ajibola OO, Nolasco-Hipolito C, Carvajal-Zarrabal O, et al. Turkey tail mushroom (*Trametes versicolor*): an edible macrofungi with immense medicinal properties. *Curr Opin Food Sci*. 2024;58:101191.
- [29] Mitsou EK, Saxami G, Stamoulou E, et al. Effects of Rich in B-Glucans Edible Mushrooms on Aging Gut Microbiota Characteristics: An In Vitro Study. *Molecules*. 2020;25(12).
- [30] Kamiyama M, Shibamoto T, Horiuchi M, et al. Antioxidant/Anti-Inflammatory Activities and Chemical Composition of Extracts from the Mushroom *Trametes versicolor*. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 2013;2(2):85–91.
- [31] Camilleri E, Blundell R, Baral B, et al. A comprehensive review on the health benefits, phytochemicals, and enzymatic constituents for potential therapeutic and industrial applications of Turkey tail mushrooms. *Discover Applied Sciences*. 2024;6(5):257.

- [32] Hsieh T-C, Wu JM. Regulation of cell cycle transition and induction of apoptosis in HL-60 leukemia cells by the combination of *Coriolus versicolor* and *Ganoderma lucidum*. *Int J Mol Med*. 2013;32(1):251–257.
- [33] Borlagdan M, De Castro ME, Altena I, et al. Sterols from *Trametes versicolor*. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. 2017;
- [34] Kumar A, Arora PK. Biotechnological Applications of Manganese Peroxidases for Sustainable Management. *Front Environ Sci*. 2022;Volume 10.
- [35] Jhan M-H, Yeh C-H, Tsai C-C, et al. Enhancing the antioxidant ability of *Trametes versicolor* polysaccharopeptides by an enzymatic hydrolysis process. *Molecules*. 2016;21(9):1215.
- [36] Gibson GR, Rastall RA, Roberfroid MB. Prebiotics. In: Gibson GR, Roberfroid MB, editors. *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1999. p. 101–124.
- [37] Gibson G, Scott K, Rastall R, et al. Dietary prebiotics: Current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. 2010;7:1–19.
- [38] Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(8):491–502.
- [39] Macfarlane S. Chapter 10 - Prebiotics in the Gastrointestinal Tract. In: Watson RR, Preedy VRBT-BF in PH, editors. *Bioactive Foods in Promoting Health*. Boston: Academic Press; 2010. p. 145–156.
- [40] Liều Mỹ Đông NTH. Khảo sát ảnh hưởng của Whey Protein và Prebiotic lên tỉ lệ sống sót của *Bifidobacterium Bifidum* vi gói trong sữa chua Synbiotic. 2015;c:49–55.
- [41] Vũ Thị Kim Hoa; Nguyễn Xuân Ninh; Nguyễn Đỗ Huy. Hiệu quả của bổ sung sản phẩm dinh dưỡng có probiotic và prebiotic đến chỉ số miễn dịch, tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp của nhóm trẻ 25 - 36 tháng tuổi. 2017. p. 57–61.
- [42] Hữu Dũng Trần, Hải Thúy Nguyễn. Tổng quan về vai trò tinh bột đề kháng trong kiểm soát đường huyết sau ăn trên bệnh nhân đái tháo đường típ 2. 2013;1–8.

- [43] Zhou X, Gong Z, Su Y, et al. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009;61(3):279–291.
- [44] Lin R, Liu H, Wu S, et al. Production and in vitro antioxidant activity of exopolysaccharide by a mutant, *Cordyceps militaris* SU5-08. *Int J Biol Macromol*. 2012;51(1–2):153–157.
- [45] Chou WT, Sheih IC, Fang TJ. The applications of polysaccharides from various mushroom wastes as prebiotics in different systems. *J Food Sci*. 2013;78(7).
- [46] Sawangwan T, Wansanit W, Pattani L, et al. Study of prebiotic properties from edible mushroom extraction. *Agriculture and Natural Resources*. 2018;52(6):519–524.
- [47] Khan I, Huang G, Li X, et al. Mushroom polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and *Poria cocos* reveal prebiotic functions. *J Funct Foods*. 2018;41:191–201.
- [48] Khan I, Huang G, Li X, et al. Mushroom polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and *Poria cocos* reveal prebiotic functions. *J Funct Foods*. 2018;41:191–201.
- [49] Mitsou EK, Saxami G, Stamoulou E, et al. Effects of rich in b-glucans edible mushrooms on aging gut microbiota characteristics: An in vitro study. *Molecules*. 2020;25(12):1–25.
- [50] Chou WT, Sheih IC, Fang TJ. The applications of polysaccharides from various mushroom wastes as prebiotics in different systems. *J Food Sci*. 2013;78(7).
- [51] Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002;60(3):258–274.
- [52] Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci Technol*. 2007;18(1):4–19.
- [53] Rathore H, Prasad S, Kapri M, et al. Medicinal importance of mushroom mycelium: Mechanisms and applications. *J Funct Foods*. 2019;56:182–193.

- [54] Wang W, Tan J, Nima L, et al. Polysaccharides from fungi: A review on their extraction, purification, structural features, and biological activities. *Food Chem X*. 2022;15:100414.
- [55] Fisher M, Yang L-X. Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy. *Anticancer Res*. 2002;22(3):1737–1754.
- [56] Scarpari M, Reverberi M, Parroni A, et al. Tramesan, a novel polysaccharide from *Trametes versicolor*. Structural characterization and biological effects. *PLoS One*. 2017;12(8):e0171412.
- [57] Liu J, Wang Y, Wu J, et al. Isolation, Structural Properties, and Bioactivities of Polysaccharides from Mushrooms *Termitomyces*: A Review. *J Agric Food Chem*. 2022;70:21–33.
- [58] Yu W-Q, Yin F, Shen N, et al. Polysaccharide CM1 from *Cordyceps militaris* hinders adipocyte differentiation and alleviates hyperlipidemia in LDLR(+/-) hamsters. *Lipids Health Dis*. 2021;20(1):178.
- [59] Saleh MH, Rashedi I, Keating A. Immunomodulatory Properties of *Coriolus versicolor*: The Role of Polysaccharopeptide. *Front Immunol*. 2017;Volume 8-.
- [60] Thuy DTT, Hieu N V. Khảo sát yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất polysaccharide từ *Cordyceps militaris*, *Trametes versicolor* tại Việt Nam. Hội nghị Năm học toàn quốc. 2020. p. 242–248.
- [61] Kaewkod T, Ngamsaoad P, Mayer K, et al. Antioxidant, Antibacteria, and Anti-Inflammatory Effects of *Cordyceps militaris* Extracts and Their Bioactive Compounds. *J Food Biochem*. 2024;2024(1):1862818.
- [62] Kanlayavattanakul M, Lourith N. *Cordyceps militaris* polysaccharides: preparation and topical product application. *Fungal Biol Biotechnol*. 2023;10(1):3.
- [63] Như Ngọc N, Thị Hồng Nhung N, Trà My K, et al. Nghiên cứu chiết xuất polysaccharide tổng số từ một số loại nấm Linh chi *Ganoderma lucidum* và đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*. 2024;13(5 SE-):11–19.
- [64] Roy SK, Das D, Mondal S, et al. Structural studies of an immunoenhancing water-soluble glucan isolated from hot water extract of an edible mushroom, *Pleurotus*

- florida, cultivar Assam Florida. Carbohydr Res. 2009 [cited 2025 Jul 7];344(18):2596–2601.
- [65] Bhunia SK, Dey B, Maity KK, et al. Structural characterization of an immunoenhancing heteroglycan isolated from an aqueous extract of an edible mushroom, *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer. Carbohydr Res. 2010 [cited 2025 Jul 7];345(17):2542–2549.
- [66] Mandal EK, Maity K, Maity S, et al. Chemical analysis of an immunostimulating (1→4)-, (1→6)-branched glucan from an edible mushroom, *Calocybe indica*. Carbohydr Res. 2012 [cited 2025 Jul 7];347(1):172–177.
- [67] Nandi AK, Sen IK, Samanta S, et al. Glucan from hot aqueous extract of an ectomycorrhizal edible mushroom, *Russula albonigra* (Krombh.) Fr.: structural characterization and study of immunoenhancing properties. Carbohydr Res. 2012 [cited 2025 Jul 7];363:43–50.
- [68] Bhanja SK, Rout D, Patra P, et al. Structural studies of an immunoenhancing glucan of an ectomycorrhizal fungus *Ramaria botrytis*. Carbohydr Res. 2013 [cited 2025 Jul 7];374:59–66.
- [69] Samanta S, Maity K, Nandi AK, et al. A glucan from an ectomycorrhizal edible mushroom *Tricholoma crassum* (Berk.) Sacc.: isolation, characterization, and biological studies. Carbohydr Res. 2013 [cited 2025 Jul 7];367:33–40.
- [70] Suong N, Trung Au V, Mai D. Optimizing the Polysaccharide Extraction from the Vietnamese Lingzhi (*Ganoderma lucidum*) Via Enzymatic Method. Journal of Food and Nutrition Sciences. 2015;3:111.
- [71] Zhu ZY, Dong F, Liu X, et al. Effects of extraction methods on the yield, chemical structure and anti-tumor activity of polysaccharides from *Cordyceps gunnii* mycelia. Carbohydr Polym. 2016 [cited 2026 Jan 15];140:461–471.
- [72] Sangthong S, Pintathong P, Pongsua P, et al. Polysaccharides from *Volvariella volvacea* Mushroom: Extraction, Biological Activities and Cosmetic Efficacy. Journal of Fungi 2022, Vol 8, Page 572. 2022 [cited 2026 Jan 15];8(6):572.
- [73] Sun Y, He H, Wang Q, et al. A Review of Development and Utilization for Edible Fungal Polysaccharides: Extraction, Chemical Characteristics, and Bioactivities. Polymers (Basel). 2022 [cited 2026 Jan 15];14(20).

- [74] Song W, Li M, Yue X, et al. Effect of extraction and purification on the structure and activity of *Flammulina velutipes* polysaccharides: a review. *Int J Food Sci Technol*. 2024;59(12):9571–9591.
- [75] Huỳnh PC, Tình LV, Tiên LTT, et al. Nghiên cứu sơ chế, chiết xuất polysaccharide và triterpenoid thô từ quả thể nấm linh chi. *Tạp Chí Khoa học Và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng*. 2021;19(3):41–46.
- [76] Anh VTL, Thanh VTK, Thanh NTL. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng tới quá trình chiết β glucan từ đế nấm *Cordyceps militaris*. *Hội nghị Khoa học Toàn quốc về Công nghệ Sinh học*. 2024. p. 223–228.
- [77] Bhargava S, bibhu_panda31@rediffmail.com, Sanjrani M, et al. Solid-State Fermentation: An Overview. *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly (cabeq@pbf.hr)*; Vol22 No1. 2008;22.
- [78] Singhanian RR, Patel AK, Sukumaran RK, et al. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresour Technol*. 2013;127:500–507.
- [79] Palladino F, Marcelino PR, Schlogl AE, et al. Bioreactors: Applications and Innovations for a Sustainable and Healthy Future—A Critical Review. *Applied Sciences*. 2024.
- [80] Zhou X, Gong Z, Su Y, et al. *Cordyceps* fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *J Pharm Pharmacol*. 2009;61(3):279–291.
- [81] Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv*. 2004;22(3):189–259.
- [82] Wang H, Ma J-X, Zhou M, et al. Current advances and potential trends of the polysaccharides derived from medicinal mushrooms sanghuang. *Front Microbiol*. 2022;13:965934.
- [83] Rahmatnejad V, Wei Y, Rao G. Recent Developments in Bioprocess Monitoring Systems BT - Biopharmaceutical Manufacturing: Progress, Trends and Challenges. In: Pörtner R, editor. Cham: Springer International Publishing; 2023. p. 39–66. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-031-45669-5_2.
- [84] Luo S, Luo Y, Yuan Y, et al. Optimization of Submerged Fermentation Conditions for Polysaccharide Production in Species of the Genus *Ganoderma*

- (Agaricomycetes) and Comparative Analysis of the Antioxidant Activities of Different Strains. *Int J Med Mushrooms*. 2025;27(1):13–27.
- [85] Berovic M, Podgornik BB, Gregori A. Cultivation Technologies for Production of Medicinal Mushroom Biomass: Review. *Int J Med Mushrooms*. 2022;24(2):1–22.
- [86] Papinutti VL, Diorio LA, Forchiassin F. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2003;30(3):157–160.
- [87] Boh B, Berovic M, Zhang J, et al. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. In: El-Gewely MRBT-BAR, editor. Elsevier; 2007. p. 265–301. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387265607130106>.
- [88] Cui M, Yang H, He G. Submerged fermentation production and characterization of intracellular triterpenoids from *Ganoderma lucidum* using HPLC-ESI-MS. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2015;16(12):998–1010.
- [89] Bakratsas G, Polydera A, Katapodis P, et al. Recent trends in submerged cultivation of mushrooms and their application as a source of nutraceuticals and food additives. *Future Foods*. 2021;4:100086.
- [90] Kachrimanidou V, Papadaki A, Papapostolou H, et al. *Ganoderma lucidum* Mycelia Mass and Bioactive Compounds Production through Grape Pomace and Cheese Whey Valorization. *Molecules*. 2023.
- [91] Wang Y, Gu J, Wu J, et al. Natural Products and Health Care Functions of *Inonotus obliquus*. *Curr. Issues Mol. Biol*. 2025.
- [92] Das SK, Masuda M, Hatashita M, et al. Optimization of culture medium for cordycepin production using *Cordyceps militaris* mutant obtained by ion beam irradiation. *Process Biochemistry*. 2010;45(1):129–132.
- [93] Zhang J, Zhong J-J, Geng A. Improvement of ganoderic acid production by fermentation of *Ganoderma lucidum* with cellulase as an elicitor. *Process Biochemistry*. 2014;49(10):1580–1586.
- [94] Serody J, Matthew B, Hewlett J. Submerged Fermentation of *Ganoderma tsugae* for the Optimized Production of Exopolysaccharides. *Journal of Advanced Technological Education*. 2024;3(3):69–80.

- [95] Li H, Dai J, Shi Y, et al. Molecular Regulatory Mechanism of the Iron-Ion-Promoted Asexual Sporulation of *Antrodia cinnamomea* in Submerged Fermentation Revealed by Comparative Transcriptomics. *Journal of Fungi*. 2023.
- [96] Zhang B, Zhou J, Li Q, et al. Manganese affects the growth and metabolism of *Ganoderma lucidum* based on LC-MS analysis. *PeerJ*. 2019;7:e6846.
- [97] Fan D, Wang W, Zhong J-J. Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrous sulfate. *Biochem Eng J*. 2012;60:30–35.
- [98] Yang S, Jin L, Ren X, et al. Optimization of fermentation process of *Cordyceps militaris* and antitumor activities of polysaccharides in vitro. *J Food Drug Anal*. 2014;22(4):468–476.
- [99] Showkat M, Narayanappa N, Umashankar N, et al. Optimization of Fermentation Conditions of *Cordyceps militaris* and In Silico Analysis of Antifungal Property of Cordycepin Against Plant Pathogens. *J Basic Microbiol*. 2024;64(10):e2400409.
- [100] Fang Q, Zhong J-J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*. 2002;37:769–774.
- [101] Zhou X-W, Su K-Q, Zhang Y-M. Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(3):941–963.
- [102] Liu S-R, Zhang W-R. Optimization of submerged culture conditions involving a developed fine powder solid seed for exopolysaccharide production by the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Food Sci Biotechnol*. 2019;28(4):1135–1145.
- [103] Camilleri E, Narayan S, Lingam D, et al. Mycelium-based composites: An updated comprehensive overview. *Biotechnol Adv*. 2025;79:108517.
- [104] Fazenda M, Harvey L, Mcneil B. Effects of Dissolved Oxygen on Fungal Morphology and Process Rheology During Fed-Batch Processing of *Ganoderma lucidum*. *J Microbiol Biotechnol*. 2010;20:844–851.
- [105] Thakur N, Sheetal, Bhalla TC. Chapter 18 - Enzymes and their significance in the industrial bioprocesses. In: Bhatt AK, Bhatia RK, Bhalla TCBT-BB for B and B,

- editors. Academic Press; 2023. p. 273–284. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128161098000180>.
- [106] Lu Z, Chen Z, Liu Y, et al. Morphological Engineering of Filamentous Fungi: Research Progress and Perspectives. *J Microbiol Biotechnol*. 2024;34(6):1197–1205.
- [107] Veiter L, Rajamanickam V, Herwig C. The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102.
- [108] Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008;4(2):89–96.
- [109] Lobo V, Patil A, Phatak A, et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010;4(8):118–126.
- [110] Jomova K, Valko M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *Eur J Med Chem*. 2013;70:102–110.
- [111] Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53 (Volume 53, 2013):401–426.
- [112] Ontawong A, Pengnet S, Thim-Uam A, et al. A randomized controlled clinical trial examining the effects of *Cordyceps militaris* beverage on the immune response in healthy adults. *Sci Rep*. 2024;14(1):7994.
- [113] Chou Y-C, Sung T-H, Hou S-J, et al. Current Progress Regarding *Cordyceps militaris*, Its Metabolite Function, and Its Production. *Applied Sciences*. 2024.
- [114] Cheng C, Zhang S, Chen C, et al. Cordycepin combined with antioxidant effects improves fatigue caused by excessive exercise. *Sci Rep*. 2025;15(1):8141.
- [115] Rašeta M, Popović M, Knežević P, et al. Bioactive Phenolic Compounds of Two Medicinal Mushroom Species *Trametes versicolor* and *Stereum subtomentosum* as Antioxidant and Antiproliferative Agents. *Chem Biodivers*. 2020;17(12):e2000683.
- [116] K D, S P S, B V, et al. Medicinal potential of Turkey tail mushroom (*Trametes versicolor*): A comprehensive review. *South African Journal of Botany*. 2024;172:254–266.

- [117] Kleerebezem M, Boekhorst J, Van Kranenburg R, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(4):1990–1995.
- [118] Stamets, P. (2000) Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. 3rd Edition, Ten Speed Press, Berkeley. - References - Scientific Research Publishing. [cited 2026 Mar 1]. Available from: <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1504404>.
- [119] Sun Y, Tang J, Gu X, et al. Water-soluble polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: Preparation, characterization and bioactivity. Int J Biol Macromol. 2005;36(5):283–289.
- [120] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal Chem. 1956;28(3):350–356.
- [121] Peng Z, Tian S, Li H, et al. Extraction, characterization, and antioxidant properties of cell wall polysaccharides from the pericarp of *Citrus Reticulata* cv. Chachiensis. Food Hydrocoll. 2023;136:108237.
- [122] Tian S, Peng Z, Zhang J, et al. Structural analysis and biological activity of cell wall polysaccharides and enzyme-extracted polysaccharides from pomelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.). Int J Biol Macromol. 2024;279:135249.
- [123] Yu D, Wang W, Hou S, et al. The effect of sequential extraction on the physicochemical and rheological properties of *Naematelia aurantialba* polysaccharides. Int J Biol Macromol. 2024;265:130777.
- [124] Nenadis N, Wang LF, Tsimidou M, et al. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS .+ assay. J Agric Food Chem. 2004 [cited 2025 Jul 19];52(15):4669–4674.
- [125] Phirom-on K, Apiraksakorn J. Development of cellulose-based prebiotic fiber from banana peel by enzymatic hydrolysis. Food Biosci. 2021;41.
- [126] Huebner J, Wehling RL, Parkhurst A, et al. Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. Int Dairy J. 2008;18(3):287–293.
- [127] Huebner J, Wehling RL, Hutkins RW. Functional activity of commercial prebiotics. Int Dairy J. 2007;17(7):770–775.

- [128] Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem.* 1959;31(3):426–428.
- [129] İnci Ş, Akyüz M, Kirbağ S. Antioxidant and Antimicrobial Effects of *Trametes versicolor* (L.) Lloyd Extracts in Different Solvents. *Turkish Journal of Science & Technology Research Paper.* 2022 [cited 2026 Jan 26];17(2):261–265.
- [130] Thi-Bich Hang N, Van Minh V, Munehiro T, et al. Optimization of Lactic Fermented Beverages: Integrating *Trametes versicolor* Mycelium and *Pleurotus ostreatus* Extract for Enhanced Functional Properties. *Mycobiology.* 2025 [cited 2025 Aug 8];53(4):379–392.
- [131] Tat TQ, Khanh ND. Isolation, identification and investigation some biochemical properties of lactic acid bacteria from “Mam sac chua” and “Com me” in Tien Giang province. *Ho Chi Minh City Open University Journal of Science.* 2021;11(1):11–21.
- [132] Kosanić M, Ranković B, Dašić M. Mushrooms as possible antioxidant and antimicrobial agents. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 2012;11(4):1095–1102.
- [133] Gámbaro A, McSweeney MB. Chapter Eight - Sensory methods applied to the development of probiotic and prebiotic foods. In: da Cruz AG, Prudencio ES, Esmerino EA, et al., editors. *Probiotic and Prebiotics in Foods: Challenges, Innovations and Advances.* Academic Press; 2020. p. 295–337. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104345262030036X>.
- [134] Hà TT, Lê Văn Vê NNG, Thu PT, et al. Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sự sinh trưởng của nấm Đông trùng hạ thảo trong môi trường nhân giống dịch thể. *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam.* 2016;58(8).
- [135] Deshmukh N, Bhaskaran L. Optimization of cultural and nutritional conditions to enhance mycelial biomass of *Cordyceps militaris* using statistical approach. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2023 [cited 2025 Nov 24];55(1):235.
- [136] Liu XY, Meng FX, Zhang YB, et al. Enhanced production of mycelia by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* using plackett-burman design and response surface methodology. *Applied Mechanics and Materials.* 2012;138:1209–1214.

- [137] Supramani S, Ahmad R, Ilham Z, et al. Optimisation of biomass, exopolysaccharide and intracellular polysaccharide production from the mycelium of an identified *Ganoderma lucidum* strain qrs 5120 using response surface methodology. *AIMS Microbiol.* 2019;5(1):19–38.
- [138] Yadav JS, Tripathi JP. Optimization of cultivation and nutrition conditions and substrate pretreatment for solid-substrate fermentation of wheat straw by *Coriolus versicolor*. *Folia Microbiol (Praha)*. 1991;36:294–301.
- [139] Dung HTY, Nam VH, Hằng NT. Tối ưu điều kiện lên men và thu hồi sản phẩm từ chủng nấm Vân chi bản địa (*Trametes versicolor*) phân lập tại miền núi phía Bắc Việt Nam. *TNU Journal of Science and Technology*. 2023;228(13):139–147.
- [140] Veena SS, Pandey M. Physiological and cultivation requirements of *Trametes versicolor*, a medicinal mushroom to diversify Indian mushroom industry. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 2012;82(8):672.
- [141] Adebayo-Tayo BC, Ugwu EE. Influence of different nutrient sources on exopolysaccharide production and biomass yield by submerged culture of *Trametes versicolor* and *Coprinus sp.* *AU Journal of Technology*. 2011;15(2).
- [142] Zheng Y, Zhang S, Wang Q, et al. Characterization and hypoglycemic activity of a β -pyran polysaccharides from bamboo shoot (*Leleba oldhami* Nakal) shells. *Carbohydr Polym.* 2016;144:438–446.
- [143] Yan J-K, Ding Z-C, Gao X, et al. Comparative study of physicochemical properties and bioactivity of *Hericium erinaceus* polysaccharides at different solvent extractions. *Carbohydr Polym.* 2018;193:373–382.
- [144] Ma Q, Yu Y, Zhou Z, et al. Effects of different treatments on composition, physicochemical and biological properties of soluble dietary fiber in buckwheat bran. *Food Biosci.* 2023;53:102517.
- [145] Maity P, Sen IK, Chakraborty I, et al. Biologically active polysaccharide from edible mushrooms: A review. *Int J Biol Macromol.* 2021 [cited 2026 May 26];172:408–417.
- [146] Wang T, Han J, Dai H, et al. Polysaccharides from *Lyophyllum decastes* reduce obesity by altering gut microbiota and increasing energy expenditure. *Carbohydr Polym.* 2022 [cited 2026 May 26];295:119862.

- [147] Du B, Meenu M, Liu H, et al. A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of β -Glucan. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol 20, Page 4032. 2019 [cited 2026 May 26];20(16):4032.
- [148] Gong P, Wang S, Liu M, et al. Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini-review. *Carbohydr Res.* 2020 [cited 2026 May 26];494:108037.
- [149] Chen Z, Yin C, Fan X, et al. Characterization of physicochemical and biological properties of *Schizophyllum commune* polysaccharide extracted with different methods. *Int J Biol Macromol.* 2020 [cited 2026 May 26];156:1425–1434.
- [150] Shang H, Chen S, Li R, et al. Influences of extraction methods on physicochemical characteristics and activities of *Astragalus cicer* L. polysaccharides. *Process Biochemistry.* 2018 [cited 2026 May 26];73:220–227.
- [151] Wu N, Ge X, Yin X, et al. A review on polysaccharide biosynthesis in *Cordyceps militaris*. *Int J Biol Macromol.* 2024;260:129336.
- [152] Jin M, Zhao K, Huang Q, et al. Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: A review. *Carbohydr. Polym.* 2012. p. 713–722.
- [153] Flores GA, Cusumano G, Venanzoni R, et al. The Glucans Mushrooms: Molecules of Significant Biological and Medicinal Value. *Polysaccharides.* 2024. p. 212–224.
- [154] Chen Y, Yao F, Ming K, et al. Polysaccharides from traditional Chinese medicines: extraction, purification, modification, and biological activity. *Molecules.* 2016;21(12):1705.
- [155] Petraglia T, Latronico T, Fanigliulo A, et al. Antioxidant Activity of Polysaccharides from the Edible Mushroom *Pleurotus eryngii*. *Molecules.* 2023.
- [156] Teka N, Alminderej FM, Souid G, et al. Characterization of polysaccharides sequentially extracted from *allium roseum* leaves and their hepatoprotective effects against cadmium induced toxicity in mouse liver. *Antioxidants.* 2022;11(10):1866.
- [157] Sharma SK, Gautam N, Atri NS. Retracted article: Optimized extraction, composition, antioxidant and antimicrobial activities of exo and intracellular

- polysaccharides from submerged culture of *Cordyceps cicadae*. *BMC Complement Altern Med*. 2016;15:1–10.
- [158] Sharma SK, Gautam N, Atri NS. [Retracted] Optimization, Composition, and Antioxidant Activities of Exo-and Intracellular Polysaccharides in Submerged Culture of *Cordyceps gracilis* (Grev.) Durieu & Mont. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015;2015(1):462864.
- [159] Wang X, Zhang J, Zhang K, et al. Ultrasound-Assisted Enzyme Extraction, Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Cordyceps militaris* Solid Medium. *Molecules*. 2024;29(19):4560.
- [160] Chen R, Jin C, Li H, et al. Ultrahigh pressure extraction of polysaccharides from *Cordyceps militaris* and evaluation of antioxidant activity. *Sep Purif Technol*. 2014;134:90–99.
- [161] Bai L, Xu D, Zhou Y-M, et al. Antioxidant Activities of Natural Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical and Medicinal Applications. *Antioxidants*. 2022.
- [162] Kim HM, Song Y, Hyun GH, et al. Characterization and antioxidant activity determination of neutral and acidic polysaccharides from *Panax ginseng* CA Meyer. *Molecules*. 2020;25(4):791.
- [163] Yan J-K, Wang W-Q, Ma H-L, et al. Sulfation and enhanced antioxidant capacity of an exopolysaccharide produced by the medicinal fungus *Cordyceps sinensis*. *Molecules*. 2012;18(1):167–177.
- [164] Dhahri M, Sioud S, Alsuhaymi S, et al. Extraction, characterization, and antioxidant activity of polysaccharides from ajwa seed and flesh. *Separations*. 2023;10(2):103.
- [165] Zeng F-S, Yao Y-F, Wang L-F, et al. Polysaccharides as antioxidants and prooxidants in managing the double-edged sword of reactive oxygen species. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;159:114221.
- [166] Swanson KS, Gibson GR, Hutkins R, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(11):687–701.

- [167] de Figueiredo FC, de Barros Ranke FF, de Oliva-Neto P. Evaluation of xylooligosaccharides and fructooligosaccharides on digestive enzymes hydrolysis and as a nutrient for different probiotics and *Salmonella typhimurium*. *Lwt*. 2020;118:108761.
- [168] Song H, Han L, Zhang Z, et al. Structural properties and bioactivities of pectic polysaccharides isolated from soybean hulls. *Lwt*. 2022;170:114079.
- [169] Synytsya A, Mičková K, Synytsya A, et al. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydr Polym*. 2009;76(4):548–556.
- [170] Cör D, Knez Ž, Hrnčič MK. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma Lucidum* terpenoids and polysaccharides: A review. *Molecules*. 2018;23(3):1–21.
- [171] Jayachandran M, Xiao J, Xu B. A Critical Review on Health Promoting Benefits of Edible Mushrooms through Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci*. 2017.
- [172] He S, Wang X, Zhang Y, et al. Isolation and prebiotic activity of water-soluble polysaccharides fractions from the bamboo shoots (*Phyllostachys praecox*). *Carbohydr Polym*. 2016;151:295–304.
- [173] Yu ZT, Liu B, Mukherjee P, et al. *Trametes versicolor* Extract Modifies Human Fecal Microbiota Composition In vitro. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2013 [cited 2025 Jul 19];68(2):107–112.
- [174] Uthan ET, Yamaç M, Yıldız Z. In vitro Prebiotic Activity of Polysaccharides Extracted from Edible / Medicinal Macrofungi Species. *The Journal of Fungus*. 2022 [cited 2026 May 26];13(1):15–29.
- [175] Duan H, Yu Q, Ni Y, et al. Effect of *Agaricus bisporus* Polysaccharides on Human Gut Microbiota during In Vitro Fermentation: An Integrative Analysis of Microbiome and Metabolome. *Foods*. 2023.
- [176] Ma G, Du H, Hu Q, et al. Health benefits of edible mushroom polysaccharides and associated gut microbiota regulation. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022 [cited 2026 May 28];62(24):6646–6663.
- [177] Barcan AS, Barcan RA, Vamanu E. Therapeutic Potential of Fungal Polysaccharides in Gut Microbiota Regulation: Implications for Diabetes,

Neurodegeneration, and Oncology. *J Fungi (Basel)*. 2024 [cited 2026 May 28];10(6).

- [178] Barrangou R, Altermann E, Hutkins R, et al. Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(15):8957–8962.
- [179] Rattanakiat S, Pulbutr P, Khunawattanakul W, et al. Prebiotic activity of polysaccharides extracted from Jerusalem artichoke tuber and development of prebiotic granules. *Pharmacognosy Journal*. 2020;12(6).
- [180] Sargautiene V, Nakurte I, Nikolajeva V. Broad prebiotic potential of non-starch polysaccharides from oats (*Avena sativa* L.): an in vitro study. *Pol J Microbiol*. 2018;67(3):307.
- [181] Islamova ZI, Ogai DK, Abramenko OI, et al. Comparative assessment of the prebiotic activity of some pectin polysaccharides. *Pharm Chem J*. 2017;51:288–291.
- [182] Ren Z, Xu Z, Amakye WK, et al. *Hericium erinaceus* mycelium-Derived Polysaccharide Alleviates Ulcerative Colitis and Modulates Gut Microbiota in Cynomolgus Monkeys. *Mol Nutr Food Res*. 2023 [cited 2026 May 28];67(3).
- [183] Larypoor M, Jameyi N, Dadgostar H, et al. Evaluation of the Prebiotic Properties of *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes* Polysaccharides in Enhancing Dairy Yeast and Bacterial Isolates. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 2025 [cited 2026 May 28];21(4):431–450.
- [184] Annunziata G, Arnone A, Ciampaglia R, et al. Fermentation of Foods and Beverages as a Tool for Increasing Availability of Bioactive Compounds. Focus on Short-Chain Fatty Acids. *Foods*. 2020.
- [185] Duan H, Yu Q, Ni Y, et al. Effect of *Agaricus bisporus* Polysaccharides on Human Gut Microbiota during In Vitro Fermentation: An Integrative Analysis of Microbiome and Metabolome. *Foods*. 2023.
- [186] Deleu S, Machiels K, Raes J, et al. Short chain fatty acids and its producing organisms: An overlooked therapy for IBD? *EBioMedicine*. 2021;66.

- [187] Yang M, Meng F, Gu W, et al. Influence of Polysaccharides From *Polygonatum kingianum* on Short-Chain Fatty Acid Production and Quorum Sensing in *Lactobacillus faecis*. *Front Microbiol*. 2021 [cited 2025 Jul 19];12.
- [188] Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol*. 2017;19(1):29–41.
- [189] Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, et al. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front Microbiol*. 2016;7:185.
- [190] Zhao G, Nyman M, Åke Jönsson J. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomedical Chromatography*. 2006;20(8):674–682.
- [191] Miao M, Ma Y, Jiang B, et al. Structural elucidation and in vitro fermentation of extracellular α -D-glucan from *Lactobacillus reuteri* SK24. 003. Bioactive carbohydrates and dietary fibre. 2015;6(2):109–116.
- [192] Fernández J, Redondo-Blanco S, Gutiérrez-del-Río I, et al. Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. *J Funct Foods*. 2016;25:511–522.
- [193] Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282–1286.
- [194] Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 [cited 2025 Jul 21];11:508738.
- [195] Wang W, Tan J, Nima L, et al. Polysaccharides from fungi: A review on their extraction, purification, structural features, and biological activities. *Food Chem X*. 2022;15:100414.
- [196] Sun Y, Guan Y, Khoo HE, et al. In vitro assessment of chemical and pre-biotic properties of carboxymethylated polysaccharides from *Passiflora edulis* peel, xylan, and citrus pectin. *Front Nutr*. 2021;8:778563.

- [197] Malanovic N, Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2016;1858(5):936–946.
- [198] Joshi M, Pathania P, Sagar A. FTIR studies and antimicrobial potential of *Cordyceps militaris* (a highly medicinal fungus) against Hospital Pathogens Madhavi Joshi Pooja Pathania Anand Sagar Microbiology. 2015;(2277):4–6.
- [199] Wang X, Li X, Qiu W, et al. Effects of mating-type ratio imbalance on the degeneration of *Cordyceps militaris* subculture and preventative measures. *PeerJ*. 2024 [cited 2026 May 29];12(7):e17648.
- [200] Yin J, Xin X, Weng Y, et al. Transcriptome-wide analysis reveals the progress of *Cordyceps militaris* subculture degeneration. *PLoS One*. 2017 [cited 2026 May 29];12(10).
- [201] Laitonjam WS. Chapter 9 - Natural antioxidants (NAO) of plants Acting as scavengers of free radicals. In: Atta-ur-Rahman BT-S in NPC, editor. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier; 2012. p. 259–275. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444595140000092>.
- [202] Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol*. 2020;94(3):651–715.
- [203] Dou H, Chang Y, Zhang L. Chapter Fifteen - *Coriolus versicolor* polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China. In: Zhang LBT-P in MB and TS, editor. *Glycans and Glycosaminoglycans as Clinical Biomarkers and Therapeutics - Part B*. Academic Press; 2019. p. 361–381. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877117319300353>.
- [204] Sołowiej BG, Nastaj M, Waraczewski R, et al. Effect of polysaccharide fraction from oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on physicochemical and antioxidative properties of acid casein model processed cheese. *Int Dairy J*. 2023;137:105516.
- [205] Huang Heng-Li; Deng, Xian; Zhu, Ting-Ting; Xiong, Jian-Feng; Xu, You-Hua; Xu, Yong WG. Short-Chain Fatty Acids Inhibit Oxidative Stress and Inflammation in Mesangial Cells Induced by High Glucose and Lipopolysaccharide. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2017/01/03. 2017;125(02):98–105.

- [206] Fontinha F, Martins N, Campos G, et al. The Effects of Short-Chain Fatty Acids in Gut Immune and Oxidative Responses of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*): An Ex Vivo Approach. *Animals*. 2024.
- [207] Butt UD, Lin N, Akhter N, et al. Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. *Fish Shellfish Immunol*. 2021;114:263–281.
- [208] Ferreira VC, Barroso TLCT, Castro LEN, et al. An overview of prebiotics and their applications in the food industry. *European Food Research and Technology*. 2023;249(11):2957–2976.
- [209] Matera M. Bifidobacteria, Lactobacilli: when, how and why to use them. *Global Pediatrics*. 2024;8:100139.
- [210] Hutkins R, Christensen CM, Kok CR, et al. Prebiotics enhance persistence of fermented-food associated bacteria in in-vitro cultivated fecal microbial communities. *Front Microbiol*. 2022;13.
- [211] Corzo N, Delgado-Fernández P, Olano A, et al. Effect of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria and physicochemical properties of yoghurts. *Int Dairy J*. 2019;89:77–85.
- [212] Yamaç M, Türsen Utham E, Yıldız Z. In vitro prebiotic activity of polysaccharides extracted from edible/medicinal macrofungi species. *Mantar Dergisi*. 2022;13(1):15–29.
- [213] Carvalho FM, Mergulhão FJM, Gomes LC. Using Lactobacilli to fight *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* biofilms on urinary tract devices. *Antibiotics*. 2021.
- [214] Thơ NT, Ninh KTH, Tuấn NT, et al. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of cultivated *Trametes versicolor* extract. *Journal of Forestry Science and Technology*. 2024;13(3):22–30.
- [215] İnci Ş, Akyüz M, Kırbağ S. Antioxidant and antimicrobial effects of *Trametes versicolor* (L.) Lloyd extracts in different solvents. *Turkish Journal of Science and Technology*. 2022;17(2):261–265.
- [216] Blieva R, Mustafin K, Bisko N, et al. Antioxidant and antimicrobial potential of *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor*. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2022;47(4):483–489.

- [217] Chawla P, Bains A. In vitro bioactivity, antimicrobial and anti-inflammatory efficacy of modified solvent evaporation assisted *Trametes versicolor* extract. 3 Biotech. 2020;10(9):404.
- [218] da Silva RF, Barros AC de A, Pletsch M, et al. Study on the scavenging and anti-*Staphylococcus aureus* activities of the extracts, fractions and subfractions of two *Volvarelliella volvacea* strains. World J Microbiol Biotechnol. 2010;26(10):1761–1767.
- [219] Tang J, Liu Y, Lin B, et al. Effects of ultra-long fermentation time on the microbial community and flavor components of light-flavor Xiaoqu Baijiu based on fermentation tanks. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2021 38:1. 2021 [cited 2025 Nov 23];38(1):3-.
- [220] Liang H, Zhao M, Cao X, et al. Effects of prebiotics on the fermentation of traditional suancai of Northeast China. Food Science and Human Wellness. 2024;13(3):1358–1367.
- [221] Clifford A. Hall III, Julie Garden-Robinson, Anuradha Vegi, et al. The effect of fermentation on the physicochemical characteristics of dry-salted vegetables. J Food Res. 2017;6(5):32–40.
- [222] Yue X, Wu R, Yu M, et al. Changes in flavour and microbial diversity during natural fermentation of suan-cai, a traditional food made in Northeast China. Int J Food Microbiol. 2015;211:23–31.
- [223] Zhou X, Li YBT-A of OM, editors. Chapter 1 - Basic biology of oral microbes. Atlas of oral microbiology: From healthy microflora to disease. Oxford: Academic Press; 2015. p. 1–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012802234400001X>.