**Exopolysaccharide từ *Ganoderma applanatum* như một hợp chất hoạt tính sinh học đầy hứa hẹn với đặc tính kìm tế bào và kháng khuẩn**

## **trừu tượng**

Một chế phẩm exopolysaccharide mới được phân lập từ môi trường nuôi cấy tĩnh tại nấm thối trắng Ganoderma applanatum (GpEPS) đã được thử nghiệm về các đặc tính hoạt tính sinh học của nó bao gồm tác dụng kích thích miễn dịch và gây độc tế bào. Kết quả chỉ ra rằng GpEPS được thử nghiệm (ở nồng độ trên 22,85  µ g / mL và 228,5  µ g / mL) có thể biểu hiện hoạt động chọn lọc chống lại các tế bào khối u (dòng tế bào SiHa) và kích thích sản xuất các đại thực bào có nguồn gốc TNF- α THP-1 tại mức 752,17 pg / mL. GpEPS cho thấy đặc tính kháng khuẩn chống lại Staphyloccoccus aureus và tác dụng độc đối với Vibrio fischeritế bào (82,8% tổn thương tế bào). Khả năng liên kết với cholesterol cao và khả năng liên kết với chất béo trung tính (tương ứng là 57,9% và 41,6% sau 24 giờ ủ với các chất được thử nghiệm) đối với các mẫu khảo sát của GpEPS.

## **1. Giới thiệu**

Nhiều chế phẩm từ nấm được sử dụng trong y học cổ truyền phương Đông để phòng và điều trị các bệnh như đau nửa đầu, cao huyết áp, viêm khớp, viêm phế quản, hen suyễn, tiểu đường, tăng cholesterol máu và viêm gan. Trong số nhiều loài, chi Linh chi có vẻ được quan tâm nhất chủ yếu do tác dụng chữa bệnh rộng rãi của nó. Theo nghiên cứu hiện có, các hoạt chất sinh học thu được từ G. applanatum có thể được sử dụng trong điều trị ung thư; hơn nữa, chúng cho thấy tác dụng điều trị chống lại HIV.

Sự bùng nổ gần đây của mối quan tâm trong việc phân lập và xác định đặc tính của các hợp chất hoạt tính sinh học với các đặc tính độc đáo từ họ Nấm linh chi có thể được quan sát thấy. Trong số đó, polysaccharid, đặc biệt là glucans, đáng được quan tâm đặc biệt. Polysaccharide bao gồm một nhóm lớn và đa dạng các chất đóng vai trò quan trọng trong cấu trúc và chức năng của thành tế bào nấm, là nguồn polysaccharide chính. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng, tùy thuộc vào điều kiện nuôi cấy, một số loài nấm cũng tạo ra các phân đoạn polysaccharid ngoại bào một cách hiệu quả.

## **2. Vật liệu và phương pháp**

### **2.1. Điều kiện nuôi cấy và vi sinh vật**

Chủng G. applanatum được lấy từ Bộ sưu tập nấm (FCL) của Khoa Hóa sinh, Đại học Maria Curie-Sklodovska, Lublin, Ba Lan. Các mẫu cấy được duy trì trên đĩa khoai tây-dextrose-agar (PDA), được cấy và ủ ở 25 ° C trong 7 ngày và bảo quản ở 4 ° C. Chất cấy thí nghiệm được chuẩn bị trong bình Elenmeyer 100 mL chứa 25 mL môi trường PDA ở 25 ° C trong 7 ngày. Sau khi cấy 4% (v / v) chất đồng nhất, các mẫu cấy lắc quay được ủ trong các bình Erlenmeyer 250 mL chứa 100 mL môi trường. Môi trường bao gồm các thành phần sau: 30 g / L glucose, 1 g / L (NH 4 ) 2 SO 4 , 0,5 g / L KH 2 PO 4 , 0,5 g / L MgSO 4× 7H 2 O, 0,01 g / L FeSO 4 z7H 2 O, và 1 g / L chiết xuất nấm men. Các thí nghiệm được thực hiện ở 25 ° C trong máy lắc quay (120 vòng / phút) trong 12 ngày. Sau thời gian này, chất lỏng nuôi cấy được tách khỏi sợi nấm bằng cách ly tâm trong 15 phút ở 4 ° C với tốc độ 10.000 vòng / phút.

### **2.2. Sự cô lập DNA bộ gen và Khuếch đại trình tự ITS**

Môi trường nuôi cấy nấm Ganoderma applanatum được nuôi cấy cố định trong môi trường Lindeberg và Holm ở nhiệt độ phòng (25 ° C) trong 7 ngày. Sợi nấm được thu hoạch qua Miracloth (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), rửa hai lần bằng đệm TE, và đông lạnh trong nitơ lỏng. DNA được phân lập theo Borges et al. Độ tinh khiết và số lượng của các mẫu DNA được đánh giá bằng máy quang phổ ND-1000 (Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, USA).

### **2.3. Chiết xuất Exopolysaccharides**

Các exopolysaccharid thô trong chất lỏng nuôi cấy được kết tủa với ethanol 96% lạnh theo tỷ lệ 1: 4 (v / v) và giữ qua đêm ở 4 ° C. Chế phẩm thu được được ly tâm (10 000 vòng / phút, 10 phút), rửa ba lần bằng etanol, hòa tan trong nước cất và đông khô.

### **2.4. Tính chất chung của Exopolysaccharid thô**

#### **2.4.1. Phân tích quang phổ FT-IR**

Thủy phân hoàn toàn bằng axit của exopolysaccharide được thực hiện bằng axit trifluoroacetic 4,95N (TFA) ở 80 ° C trong một khối gia nhiệt trong 4 giờ, và tiếp theo, hỗn hợp được làm lạnh, làm bay hơi, và sau đó phân tích bằng quang phổ hồng ngoại. Phổ FT-IR của các exopolysaccharide được ghi lại trên máy quang phổ Thermo-Nicolet Model 8700 A với mô-đun FT Ramana Nicolet NXR (Thermo Scientific, Hoa Kỳ). Quang phổ được ghi lại trong dải bước sóng 4000–400 cm -1 bằng kỹ thuật đĩa KBr.

#### **2.4.2. Xác định tổng lượng cacbohydrat và đường khử**

Tổng hàm lượng carbohydrate của các exopolysaccharide được xác định theo Dubois et al.  sử dụng xét nghiệm axit phenol-sulfuric với D-glucose làm chất chuẩn. Nồng độ đường khử được đo bằng phương pháp Somogyi-Nelson dựa trên quy trình được mô tả bởi Hope and Burns với một số sửa đổi. Tổng lượng đường khử được tính toán với D-glucose làm tiêu chuẩn. Tổng giá trị cuối cùng của polysaccharid thu được bằng cách trừ lượng đường khử khỏi tổng số cacbohydrat.

## **3. Kết quả và thảo luận**

Các loài nấm thuộc chi Linh chi được biết đến với khả năng tạo ra một số chất có đặc tính y sinh học đầy hứa hẹn. Quả thể của G. applanatum rất thường được sử dụng trong các liệu pháp y học cổ truyền Trung Quốc. Chúng được biết đến như là các yếu tố chống ung thư, kích thích miễn dịch và kháng vi rút rất hiệu quả. Cho đến nay, nhiều bài báo đã được xuất bản chỉ ra rằng sợi nấm G. applanatum chứa một lượng nhất định saponin, flavonoid, glycosid thân, steroid và polysaccharid. Một nhóm hợp chất đặc biệt thú vị và vẫn còn kém được nghiên cứu là polysaccharid ngoại bào được chiết xuất từG. applanatum .

### **3.1. Khuếch đại PCR của Vùng ITS**

Chủng của G. applanatum được sử dụng trong nghiên cứu này đã được xác định về mặt di truyền bằng cách xác định trình tự ITS. Một sản phẩm 654 bp thu được từ PCR với mồi ITS1-ITS4 và sau đó được giải trình tự trực tiếp.

### **3.2. Các tính chất chung của việc chuẩn bị GpEPS thô**

Trong nghiên cứu này, các mẫu cấy nuôi cấy lắc quay 12 ngày tuổi của G. applanatum đã được sử dụng để lấy dịch nuôi cấy để chiết xuất exopolysaccharid. Tương tự, trong nghiên cứu của họ, Lee et al. cho thấy sản lượng exopolysaccharid cao nhất thu được từ nuôi cấy G. applanatum 12 ngày tuổi. Hiện nay, một số polysaccharid của nấm thu được từ quả thể bằng các quy trình phân lập và phân đoạn tốn nhiều thời gian, bao gồm kết tủa bằng đường etanol, chiết lặp lại bằng nước sôi và dung dịch amoni oxalat của NaOH. Các polysaccharid chiết xuất sau đó được tinh chế bằng nhiều bước của kỹ thuật sắc ký. Trong công trình này, việc điều chế polysaccharid ngoại bào thu được bằng quy trình kết tủa etanol đơn giản từ chất lỏng nuôi cấy của G. applanatum .

### **3.3. Tính chất sinh học của chế phẩm GpEPS thô**

#### **3.3.1. Thuộc tính độc, kháng khuẩn và chống oxy hóa**

Được biết, một số chất được phân lập từ nấm có thể thể hiện hoạt tính kháng khuẩn. Zhu và cộng sự.  cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của polysaccharid từ chất nền nấm dành cho vi khuẩn E. coli và S. lutea . Kết quả từ các thử nghiệm độc tính sơ bộ của chúng tôi thu được bằng cách sử dụng hệ thống phát hiện Microtox cho thấy sự tiếp xúc của vi khuẩn biển biến đổi gen Vibrio fischeri với các exopolysaccharide đã thử nghiệm gây ra 82,8% tổn thương tế bào. Hoạt tính kháng khuẩn của GpEPS được phân tích bằng cách sử dụng các chủng E. coli và S. aureus .

Các exopolysaccharid thô chiết xuất từ G. applanatum đã được thử nghiệm độc tính tế bào in vitro chống lại các dòng tế bào ung thư biểu mô (SiHa và Ca Ski) và dòng nguyên bào sợi da người (HSF). Sau 24 giờ ủ, quan sát thấy những thay đổi nhỏ về khả năng sống của tế bào (HSF, SiHa, Ca Ski), nhưng chúng không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Ngược lại, kết quả thu được sau 48 giờ ủ thì đa dạng hơn.

## **4.Kết luận**

Các bằng chứng cho thấy rằng các exopolysaccharid được phân lập từ nấm thối trắng Ganoderma applanatum được đặc trưng bởi rất nhiều đặc tính y sinh quan trọng. Các thí nghiệm được tiến hành đã cho thấy rõ ràng tác dụng chống ung thư, điều hòa miễn dịch và kháng khuẩn. Các kết quả thử nghiệm của chúng tôi đã chứng minh rằng chế phẩm GpEPS thô có hoạt tính kháng u chống lại các tế bào ung thư biểu mô (dòng SiHa) và kích thích sản xuất Il-6 và TNF- α bởi dòng đại thực bào THP-1. Đồng thời, các thử nghiệm kháng khuẩn cũng chỉ ra đặc tính khử trùng tốt của các exopolysaccharid được nghiên cứu chống lại S. aureus và V. fischericác chủng. Các đặc tính sinh học được mô tả cũng như tác dụng hạ cholesterol máu của các chất được thử nghiệm gợi ý rằng các nghiên cứu hiện tại nên được tiếp tục dựa trên các ứng dụng dược lý trong tương lai. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng cần có các nghiên cứu sâu hơn bao gồm các hoạt động phòng ngừa và điều trị đối với phần GpEPS. Để quảng bá chế phẩm được mô tả như một sản phẩm có hoạt tính sinh học đầy hứa hẹn, cách sản xuất và phân lập đơn giản và tiết kiệm cũng như khả năng tiêu chuẩn hóa và kiểm soát các điều kiện sản xuất cần được nhấn mạnh.