

NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ AN TOÀN VI SINH VÀ KIM LOẠI NẶNG CỦA BỘT SINH KHỐI NẤM THƯỢNG HOÀNG THU ĐƯỢC QUA LÊN MEN CHÌM

Nguyễn Thị Minh Huyền^{1,3*}, Trần Thị Hoa¹, Ninh Thị Tuyết Lan¹
Phạm Thị Lệ², Đỗ Thị Mến², Trần Thị Hiền²

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 10/01/2020; Ngày sửa bài sau phản biện: 20/02/2020; Ngày chấp nhận đăng: 22/03/2020)

Tóm tắt

Nấm Thượng Hoàng (*Phellinus linteus*) được biết đến là một loại nấm có nhiều công dụng tốt cho sức khỏe của con người. Nấm được sử dụng ở hầu hết các nước châu Á như Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc, Thái Lan và hiện tại ở Việt Nam. Do nấm sinh trưởng chậm và bị khai thác quá mức trong điều kiện tự nhiên nên hiện nay nấm được nuôi trồng nhân tạo ở các nước trên. So với trồng nấm trên giá thể là thân gỗ mục thì việc trồng nấm ở dạng sinh khối trong môi trường lỏng cũng có một số ưu thế như thời gian được rút ngắn và chủ động trong quy mô nhân giống. Trong nghiên cứu này, sinh khối nấm Thượng Hoàng được nuôi cấy trong môi trường lỏng đã tối ưu hóa, sấy thăng hoa, nghiền thành bột mịn và đánh giá độ an toàn về mặt vi sinh cũng như lượng tồn dư Arsenic và Chì, để đảm bảo thành phẩm sinh khối đạt tiêu chuẩn an toàn cho người sử dụng. Kết quả thu được như sau: tổng số vi sinh vật hiếu khí là $2,2 \times 10^4$ CFU/g, Coliforms $< 1,0 \times 10^1$ CFU/g, *Staphylococci* có phản ứng dương tính với *Coagulase* $< 1,0 \times 10^1$ CFU/g, tổng số nấm men - mốc $< 1,0 \times 10^1$ CFU/g, không có *E.coli*, *Clostridium perfringens* và *Salmonella* spp.. Ngoài ra không tìm thấy Arsenic và Chì trong mẫu xét nghiệm.

Từ khóa: Sinh khối, nấm Thượng Hoàng, nuôi cấy, môi trường lỏng, vi sinh, kim loại nặng, an toàn.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm Thượng Hoàng (*Phellinus linteus*) hay còn được biết tới với tên gọi là nấm Hoàng Sơn, có tác dụng trong hỗ trợ điều trị các bệnh ung thư, đái tháo đường, bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn,... [1-3]. Bột nấm sử dụng liên tục trong thời gian dài sẽ tăng cường hệ miễn dịch cho cơ thể, tốt cho tim mạch đặc biệt loại nấm này rất phù hợp cho những người cao tuổi, người chịu nhiều áp lực, người mắc bệnh béo phì, cao huyết áp. Hiện nay, có rất nhiều nghiên cứu chú trọng đến các chất có hoạt tính sinh học [4, 6] và xác định cũng như phân lập các thành phần có hoạt tính sinh học, chức năng kháng u và các cơ chế dược lý của nấm Thượng Hoàng [5, 7, 8]. Đây là các loài nấm mọc nhiều năm, lớp thụ tầng năm sau chòng lên lớp thụ tầng năm trước. Nấm Thượng Hoàng mọc ở những vùng rừng sâu, núi cao hiểm trở, các khu rừng nguyên sinh, tuổi nấm có khi đến vài chục năm. Do nguồn nguyên liệu tự nhiên đã cạn kiệt bởi sự khai thác quá mức của con người. Người ta đã đầu tư và thực hiện trồng hoặc sản xuất các loại nguyên liệu để chủ động phục vụ, nâng cao sức khỏe, giúp kéo dài cuộc sống của con người. Trước đây, nhân nuôi sinh khối nấm Thượng Hoàng cũng như các loại nấm sợi khác được tiến hành trên thân gỗ và các giá thể, thực chất là thực hiện lên men trên môi trường xộp (hay còn gọi là môi trường bán rắn). Việc nuôi trồng nấm sợi trên thân gỗ và các giá thể mất rất nhiều công sức và đặc biệt là thời gian. Hiện nay, với sự phát triển của công nghệ lên men, người ta có thể nuôi trồng nấm hoàn toàn ở môi trường lỏng do ưu thế rút ngắn về thời gian và chủ động được quy mô sản xuất. Sinh khối tạo ra cũng có một số hoạt chất hữu ích cho sức khỏe [9-11].

*Điện thoại: 0947479978 Email: ntminhhuyen@ibt.ac.vn

Ở Việt Nam các nghiên cứu về nấm Thượng Hoàng chưa nhiều. Với mục tiêu phát triển và tạo sinh khối nấm Thượng Hoàng để sử dụng nâng cao sức khỏe, nghiên cứu này trình bày kết quả nhân nuôi sinh khối trong môi trường lỏng và nghiên cứu đánh giá an toàn về mặt vi sinh và tồn dư Arsenic và Chì của bột sinh khối nấm Thượng Hoàng thu được.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng nấm Thượng Hoàng GC được cung cấp bởi Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nhân giống trong đĩa thạch

- Giống nấm được bảo quản trên môi trường PDA ở 4°C. Thành phần cho 1 lít môi trường PDA: dịch chiết khoai tây (200 g khoai tây thái nhỏ đun sôi 30 phút, thu dịch) bổ sung 20 g glucose, 15 g agar, 1g cao nấm men, thêm nước cho đủ 1 L môi trường. Khử trùng môi trường ở 121°C trong 15 phút và đổ đĩa petri.

- Trước các thí nghiệm, giống nấm cần được làm mới bằng cách cấy giống nấm kích thước $1 \times 0,7$ cm trên đĩa petri chứa 15 - 20 mL môi trường thạch PDA, ủ trong tủ ẩm ở nhiệt độ 28°C, nấm mọc kín đĩa trong vòng 10 - 15 ngày. Tiếp tục cấy chuyển sang môi trường lỏng để dùng trong các thí nghiệm và nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Phương pháp nhân giống và nhân sinh khối trên môi trường lỏng

- Môi trường lỏng phù hợp cho chủng nấm phát triển tốt nhất đã được nhóm nghiên cứu tối ưu thành phần (cho 1 lít môi trường) gồm có: glucose 30 g, cao nấm men 15g, K_2HPO_4 0,46 g, KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, $MnCl_2$ 0,0036 g, $ZnCl_2$ 0,03 g, $FeCl_2$ 0,01 g, $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,005 g. Môi trường được khử trùng ở điều kiện 121°C; 1 atm trong 15 phút.

- Nấm Thượng Hoàng được nuôi lắc trong bình tam giác dung tích 250 mL chứa 100 mL môi trường tối ưu. Thời gian nuôi cấy trong 15 ngày ở 27°C với tốc độ lắc 150 rpm (nấm được nuôi trong bình tam giác có thể cấy từ đĩa thạch sang hoặc chuyển từ lỏng sang lỏng).

- Sau 15 ngày nấm mọc đặc bình tam giác, cấy chuyển sang bình dung tích 5 L chứa 3,5 L môi trường tối ưu có hệ thống sục khí. Thời gian nuôi cấy khoảng 07 ngày có bổ sung chất kháng bọt dùng trong thực phẩm (SGA*720 Silicone antifoam emulsion) nồng độ cuối cùng là 50 ppm.

- Nấm phát triển tốt trong bình 5 L, mọc dày đặc sẽ được cấy chuyển sang nồi lên men dung tích 100 L chứa 65 L môi trường tối ưu. Thời gian nuôi cấy 15 ngày bổ sung chất kháng bọt nồng độ cuối là 50 ppm ở nhiệt độ 28°C tốc độ sục khí là 1 vvm. Sau 15 ngày lên men, thu sinh khối và bảo quản ở tủ lạnh -20°C. Sau đó sinh khối được sấy đông khô (sấy thăng hoa) và nghiền thành bột mịn để sử dụng cho các mục đích tiếp theo.

2.2.3. Phương pháp xét nghiệm vi sinh

Các xét nghiệm vi sinh cho bột sinh khối nấm Thượng Hoàng được thực hiện tại phòng thử nghiệm Vi sinh của Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn đo lường chất lượng 1, Tổng cục Tiêu chuẩn đo lường chất lượng.

- Tổng số vi sinh vật hiếu khí được đánh giá bằng phương pháp định lượng vi sinh vật theo tiêu chuẩn ISO 4833-1 : 2003 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms.

- Số lượng Coliforms trong bột sinh khối nấm Thượng Hoàng được đánh giá theo tiêu chuẩn ISO 4832:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of Coliforms.

- Số lượng *E.coli* trong bột sinh khối nấm Thượng Hoàng được đánh giá theo tiêu chuẩn ISO 16649-2:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*.

- *Staphylococci* có phản ứng dương tính với *Coagulase* được đánh giá theo tiêu chuẩn ISO 6888-1:1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive *staphylococci* (*Staphylococcus aureus* and other species).

- Tổng số nấm men mốc được đánh giá theo tiêu chuẩn ISO 21527-1, 2: 2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds.

- *Clostridium perfringens* được đánh giá theo tiêu chuẩn ISO 7937:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens*.

- *Salmonella* spp. được đánh giá theo tiêu chuẩn ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*.

2.2.4. Phương pháp xét nghiệm Arsenic và Chì

Các xét nghiệm tồn dư Arsenic và Chì trong bột sinh khối nấm Thượng Hoàng dưới đây được thực hiện tại phòng thử nghiệm Môi trường và Hóa chất thuộc Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn đo lường chất lượng 1, Tổng cục Tiêu chuẩn đo lường chất lượng.

- Hàm lượng Arsenic (As) trong bột sinh khối nấm Thượng Hoàng được đánh giá theo tiêu chuẩn AOAC 2015.01.

- Hàm lượng Chì (Pb) trong bột sinh khối nấm Thượng Hoàng được đánh giá theo tiêu chuẩn AOAC 2015.01.

2.3. Thời gian và địa điểm nhân giống

Quá trình nhân giống nấm Thượng Hoàng được thực hiện từ cuối năm 2018 đến nay tại phòng thí nghiệm Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

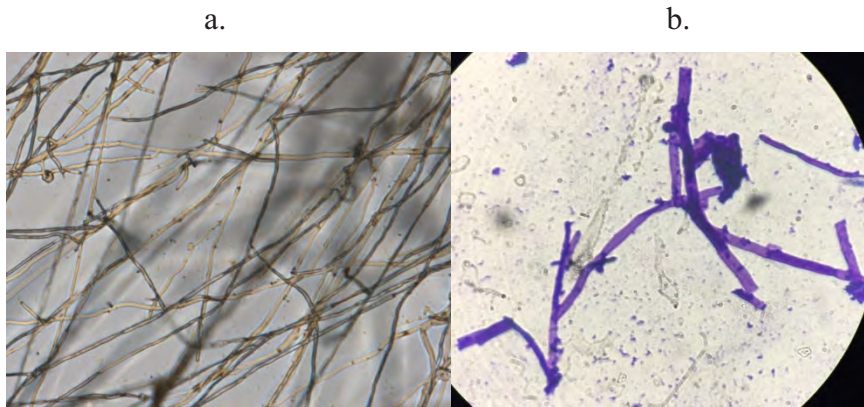
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nhân giống nấm Thượng Hoàng trong đĩa thạch và trong môi trường lỏng

Nấm Thượng Hoàng phát triển trên đĩa thạch ở dạng sợi màu vàng sáng, hình 1a dưới đây cho thấy sợi nấm phát triển trên đĩa thạch sau khi cấy sẽ lan đều tạo ra khuẩn lạc tròn, bề mặt sợi mịn và màu vàng sáng. Mặt sau của đĩa nấm sợi lan trên thạch và tạo màu vàng sẫm hơn (hình 1b). Ảnh chụp dưới kính hiển vi cho thấy sợi nấm phát triển lan đều, có vách ngăn, đa bào, nảy chồi mới bằng cách phân nhánh bên (hình 2). Vách ngăn có thể nhìn thấy rõ bởi màu sắc đậm hơn, ngăn trục sợi nấm thành các phần khác nhau, hình thành hai tế bào riêng biệt (hình 2).



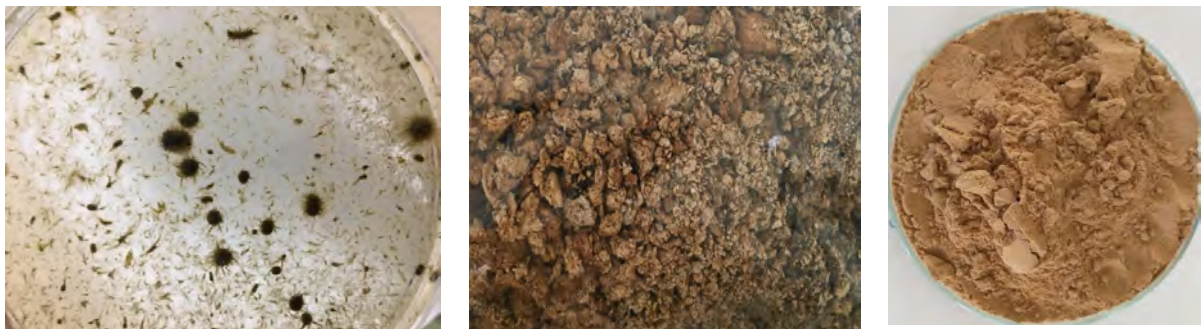
Hình 1. Nấm được nuôi cấy trên đĩa petri trong môi trường thạch khoai tây
a. Mặt trước của đĩa thạch, nấm mọc lan trên mặt thạch. b. Mặt sau của đĩa



Hình 2. Ảnh chụp sợi nấm dưới kính hiển vi

- a. Sợi nấm mọc trong môi trường thạch (ảnh chụp dưới kính hiển vi quang học, vật kính 40x)
- b. Sợi nấm được cố định trên lam kính và nhuộm với thuốc tím kết tinh

Trong môi trường lỏng, sợi nấm mọc thành các khối hình cầu hoặc hình trụ có tua dài và phát triển đều xung quanh khối nấm sợi này (hình 3a). Nghiên cứu trên thế giới cho thấy nấm nuôi theo mô hình lên men sinh khối đạt chất lượng tốt và cho các hoạt chất tương tự như với nấm trồng thông thường trên giá thể thân gỗ mục [9-11]. Ngoài ra ưu điểm của phương pháp nhân nuôi sinh khối là quá trình trồng nấm có thời gian ngắn hơn rất nhiều so với trồng nấm trên thân gỗ (thường là 4 đến 6 năm). Trong nghiên cứu của chúng tôi, nấm Thượng Hoàng được nuôi trong môi trường lỏng nhằm mục đích thu sinh khối, đánh giá chất lượng của sinh khối và hướng tới sử dụng như thực phẩm chức năng. Thời gian nhân giống lên men theo mẻ và mỗi mẻ kéo dài khoảng 15 đến 20 ngày, sinh khối thu được được sấy thăng hoa (đông khô, hình 3b) và nghiền thành bột (hình 3c). Lượng sinh khối thu được trung bình là khoảng 30g khô/lít môi trường. Phương pháp sấy thăng hoa có ưu điểm là việc làm khô được thực hiện ở nhiệt độ thấp vì thế chất lượng nấm thu được cao, không mất nhiều giá trị dinh dưỡng. Bột sinh khối nấm Thượng Hoàng thu được có màu vàng nâu, mùi thơm dịu, ngọt.



Hình 3. a. Nấm được cấy trong môi trường lỏng; b. Thu sinh khối và sấy thăng hoa; c. Và nghiền thành bột mịn

3.2. Mức độ an toàn vi sinh của bột sinh khối nấm Thượng Hoàng thu được thông qua nuôi cấy trên môi trường lỏng

Bột sinh khối nấm Thượng Hoàng được kiểm tra một số chỉ tiêu vi sinh nhằm mục đích đánh giá độ an toàn về mặt vi sinh của sản phẩm cho các mục đích sử dụng tiếp theo.

3.2.1. Tổng số vi sinh vật hiếu khí

Đây là chỉ số thể hiện số vi sinh vật chỉ sinh trưởng trong điều kiện có oxy, nó còn là chỉ

thị mức độ vệ sinh của thực phẩm; đánh giá chất lượng của mẫu về vi sinh vật, nguy cơ hư hỏng, thời hạn bảo quản của sản phẩm, mức độ vệ sinh trong quá trình chế biến, bảo quản sản phẩm. Qua đánh giá bằng tiêu chuẩn ISO 4833-1:2013 về vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm thu được kết quả là $2,2 \times 10^4$ CFU/g.

3.2.2. Coliforms

Đây là nhóm thường thấy có trong hệ tiêu hóa của người, có khả năng phân giải nhiều loại cơ chất khác nhau: carbohydrate, chất hữu cơ sinh năng lượng, các hợp chất chứa nitơ đơn giản,... gây hư hỏng thực phẩm. Qua đánh giá bằng tiêu chuẩn ISO 4832:2006 thu được kết quả nhỏ hơn $1,0 \times 10^1$ CFU/g.

3.2.3. E.coli

Đây là vi sinh vật ký sinh trong đường ruột của động vật, xuất hiện trong môi trường chỉ thị cho ô nhiễm phân. Phần lớn các chủng *E.coli* là vô hại, chỉ có một số ít gây tiêu chảy như *E. coli* O157:H7. Qua đánh giá bằng tiêu chuẩn ISO:16649-2:2001 thu được kết quả là không có *E.coli* trong mẫu.

3.2.4. Staphylococci có phản ứng dương tính với Coagulase

Đây là nhóm cầu khuẩn gram dương, nó sinh ra độc tố đường ruột enterotoxin bền nhiệt và khó bị phân hủy ở nhiệt độ cao, chúng lên men và phân giải đường nhưng không tạo mùi vị khó chịu cho sản phẩm. Một số loài trong nhóm này có khả năng gây bệnh như *Staphylococcus aureus*, có thể dẫn đến nhiều biến chứng có thể nguy hại đến sức khỏe của con người. Qua đánh giá bằng tiêu chuẩn ISO 6888-1:1999 thu được kết quả *Staphylococci* có phản ứng dương tính với *coagulase* nhỏ hơn $1,0 \times 10^1$ CFU/g.

3.2.5. Tổng số nấm men mốc

Nấm mốc là vi nấm có khả năng tạo sợi nấm, sinh sản bằng bào tử hay khuẩn ty. Nấm men là những tế bào đơn tính sinh sản chủ yếu dạng vô tính theo kiểu nảy chồi. Chúng có khả năng gây độc tố và gây bệnh khi vào cơ thể. Qua đánh giá bằng tiêu chuẩn ISO 21527-1,2:2008 thu được kết quả tổng số nấm men mốc nhỏ hơn $1,0 \times 10^1$ CFU/g.

3.2.6. Clostridium perfringens

Đây là nhóm vi khuẩn gram dương, kỵ khí, sinh nội bào tử gây bệnh. Đôi khi, chúng có thể gây ngộ độc thực phẩm khi có mặt trong thức ăn chưa được chế biến kỹ lưỡng. Qua đánh giá bằng tiêu chuẩn ISO 7937:2004, kết quả cho thấy không có *Clostridium perfringens* trong bột sinh khối nấm.

3.2.7. Salmonella spp.

Đây là nhóm trực khuẩn gram âm, chúng phát triển trong khoảng nhiệt độ tương đối rộng từ 6 - 45,6°C và trong pH từ 4,1 - 9,0. Khi xâm nhiễm vào cơ thể, chúng sẽ gây bệnh cho cả người và động vật, chúng cũng là tác nhân chủ yếu gây ngộ độc thực phẩm khi chưa đảm bảo an toàn trong chế biến thực phẩm. Qua đánh giá bằng tiêu chuẩn ISO 6579-1:2017 thì không phát hiện thấy *Salmonella* spp.

Hiện nay chưa có quy định về ngưỡng an toàn vi sinh cho sản phẩm bột sinh khối của nấm, do đó nhóm nghiên cứu tham khảo quy chuẩn quy định giới hạn tối đa cho phép vi sinh vật trong ngũ cốc và sản phẩm ngũ cốc gồm có: 1. Sản phẩm có xử lý nhiệt trước khi sử dụng; 2. Dùng trực tiếp, không qua xử lý nhiệt trước khi sử dụng; 3. Thức ăn dinh dưỡng cho trẻ em phải xử lý nhiệt trước khi sử dụng theo “Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm” được ban hành kèm theo Quyết định số

46/2007/QĐ-BYT ngày 19/12/2007 của Bộ trưởng Bộ Y tế, làm kết quả đối chứng. Kết quả các chỉ tiêu đánh giá chất lượng vi sinh của bột sinh khối nấm Thượng Hoàng được tổng hợp ở Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Kết quả thử nghiệm vi sinh bột sinh khối nấm Thượng Hoàng

STT	Tên chỉ tiêu	Phương pháp thử	Kết quả	Giới hạn tối đa cho phép theo QĐ 46/2007/QĐ-BYT		
				1*	2*	3*
1	Tổng số VSV hiếu khí (CFU/g)	ISO 4833-1:2013	$2,2 \times 10^4$	10^6	10^4	10^5
2	Coliforms (CFU/g)	ISO 4832:2006	$< 1,0 \times 10^1$	10^3	10	10^2
3	<i>E.coli</i> (CFU/g)	ISO 16649-2:2001	Không có	10^2	3	10
4	<i>Staphylococci</i> có phản ứng dương tính với Coagulase (CFU/g)	ISO 6888-1:1999	$< 1,0 \times 10^1$	10^2	10	10^2
5	Tổng số bào tử nấm men mốc (CFU/g)	ISO 21527-1,2:2008	$< 1,0 \times 10^1$	10^3	10^2	ND
6	<i>C.perfringens</i> (CFU/g)	ISO 7937:2004	Không có	10^2	10	10
7	<i>Salmonella spp</i> /25g	ISO 6579-1:2017	Không phát hiện	ND	ND	Không có

1*: Mục 6.5. Quy định giới hạn cho phép vi sinh vật trong ngũ cốc và sản phẩm ngũ cốc, Phần 1: Sản phẩm chế biến từ ngũ cốc, khoai, củ, đậu đỗ: bột, miến, mỳ sợi (có xử lý nhiệt trước khi sử dụng).

2*: Mục 6.5. Quy định giới hạn cho phép vi sinh vật trong ngũ cốc và sản phẩm ngũ cốc, Phần 2: Sản phẩm chế biến từ ngũ cốc, khoai, củ, đậu đỗ: bột, miến, mỳ sợi (dùng trực tiếp, không qua xử lý nhiệt trước khi sử dụng).

3*: Mục 6.9. Quy định giới hạn cho phép vi sinh vật trong thức ăn đặc biệt. Phần 1: Thức ăn khô và thức ăn dinh dưỡng cho trẻ em, thức ăn thay thế đặc biệt (phải xử lý nhiệt trước khi sử dụng).

ND: Không quy định

Như vậy so với cả 03 nhóm tham khảo, phần lớn các nội dung xét nghiệm của bột sinh khối nấm Thượng Hoàng đều có chỉ số nằm dưới ngưỡng giới hạn. Chỉ có chỉ tiêu tổng số sinh vật hiếu khí cao hơn so với giới hạn tối đa cho phép tại mục chỉ tiêu tham khảo 2*. Việc xuất hiện vi sinh vật hiếu khí chỉ có thể xảy ra sau khi lên men do quá trình thu mẫu và đông khô hay nghiền bột đều làm thủ công, không qua hệ thống tiệt trùng liên hoàn. Tuy nhiên, cách dùng thông thường của nấm Thượng Hoàng là sắc với nước nóng và uống do đó bột nấm Thượng Hoàng không phải là sản phẩm sử dụng trực tiếp không qua xử lý nhiệt. Việc này làm giảm nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe của các vi sinh vật hiếu khí có hại (nếu như có) trong sản phẩm bột nấm. Do đó, có thể cho rằng bột nấm sau các quá trình nghiền cứu của chúng tôi đạt sự an toàn về mặt vi sinh và có thể dùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Mức độ an toàn đối với Arsenic và Chì của bột sinh khối nấm Thượng Hoàng thu được thông qua nuôi cấy trên môi trường lỏng

Nguy cơ nhiễm Arsenic và Chì là khá phổ biến do chúng có mặt trong nhiều môi trường khác nhau và ở nồng độ cao có thể gây hại cho sức khỏe của con người. Sinh khối nấm Thượng Hoàng được nhân nuôi trong môi trường lỏng, với nước là nguồn nước máy của Thành phố và các hóa chất khác chưa hoàn toàn tinh khiết. Do đó, ngoài các chỉ tiêu vi sinh, các chỉ tiêu Arsenic, Chì cũng được kiểm tra để đánh giá độ an toàn của sản phẩm bột nấm. Kết quả đánh giá được đưa ra dưới đây.

3.3.1. Hàm lượng Arsenic (As)

Arsenic được tìm thấy trong tự nhiên ở nguồn nước ngầm trên toàn thế giới và có thể gây ra nhiều nguy hiểm đối với sức khỏe con người như gây độc cho hệ tuần hoàn và ung thư da... Nước được sử dụng để cấp cho hệ thống lên men nấm Thượng Hoàng là nước máy được lấy qua hệ thống cấp nước của Thành phố, do đó vẫn có khả năng tồn dư Arsenic. Qua đánh giá bằng tiêu chuẩn AOAC 2015.01 cho kết quả là không phát hiện Arsenic trong bột sinh khối nấm Thượng Hoàng (LOD = 0,01 mg/kg).

3.3.2. Hàm lượng chì (Pb)

Chì là kim loại rất độc, có khả năng gây sảy thai hoặc ảnh hưởng đến hệ thần kinh trung ương. Bằng mắt thường hoặc ngửi, qua cảm quan ta không thể phát hiện hàm lượng Chì có trong các loại thực phẩm. Qua đánh giá bằng tiêu chuẩn AOAC 2015.01, kết quả không phát hiện Chì trong bột sinh khối nấm Thượng Hoàng (LOD = 0,03 mg/kg).

Tương tự như các chỉ tiêu vi sinh, chưa có quy định cụ thể về hàm lượng Chì và Arsenic được phép có mặt trong sản phẩm bột sinh khối nấm. Do đó, chúng tôi tham khảo giới hạn tối đa cho phép kim loại trong thực phẩm đối với thực phẩm chức năng, ngũ cốc và thực phẩm đặc biệt theo “Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm” được ban hành kèm theo Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT ngày 19/12/2007 của Bộ trưởng Bộ Y tế. Kết quả tổng hợp trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm tồn dư Arsenic và Chì của bột sinh khối nấm Thượng Hoàng

STT	Tên chỉ tiêu	Phương pháp thử	Kết quả	Giới hạn tối đa cho phép theo QĐ 46/2007/QĐ-BYT		
				1*	2*	3*
1	Arsenic (mg/kg)	AOAC 2015.01	Không phát hiện (LOD = 0,01)	1	5	0,1
2	Chì (mg/kg)	AOAC 2015.01	Không phát hiện (LOD = 0,03)	0,2	10	0,02

1*: Phần 5.2. Arsenic, ngũ cốc; Phần 5.4 Chì, ngũ cốc, đậu đỗ

2*: Phần 5.2. Arsenic, thực phẩm chức năng; Phần 5.4 Chì, thực phẩm chức năng

3*: Phần 5.2. Arsenic, thực phẩm đặc biệt; Phần 5.4 Chì, thức ăn cho trẻ dưới 1 tuổi

Như vậy, so sánh với quy định giới hạn tối đa cho phép gần nhất thì hàm lượng Arsenic và Chì trong bột sinh khối nấm Thượng Hoàng nằm dưới ngưỡng giới hạn tối đa cho phép của nhóm thức ăn đặc biệt dành cho trẻ em là nhóm có ngưỡng giới hạn thấp nhất tương ứng là 0,1 mg/kg và 0,02 mg/kg (bảng 2). Kết quả cho thấy, bột sinh khối nấm Thượng Hoàng sản xuất theo quy trình lên men chìm là an toàn về chỉ tiêu Arsenic và Chì.

4. KẾT LUẬN

Nấm Thượng Hoàng có thể được nuôi trồng ở trong bình lên men sinh khối lỏng với thời gian lên men rút ngắn hơn rất nhiều so với nuôi trồng trên giá thể thân gỗ mục. Chất lượng bột sinh khối đạt ngưỡng an toàn về mặt vi sinh và không có Arsenic và Chì. Ngoài ra, để bột sinh khối nấm đạt chất lượng tốt, cần cải thiện quy trình nuôi trồng để các chất có hoạt tính sinh học cao hơn. Việc chủ động tạo ra sản phẩm nấm này có ý nghĩa rất lớn trong công nghiệp dược bởi giá trị của nấm rất cao và tốt cho sức khỏe.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này hoàn thành nhờ tài trợ kinh phí từ đề tài Bộ Công Thương mã số ĐT.04.18/CNSHCB. Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của Viện Công nghệ HAU, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội đã hỗ trợ nhân lực và hợp tác để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. G. Han, M. W. Hyun, C. S. Kim, J. W. Jo, J. H. Cho, K. H. Lee, W. S. Kong, S. K. Han, J. Oh and G. H. Sung, "Species identity of *Phellinus linteus* (sanghuang) extensively used as a medicinal mushroom in Korea", *Journal of Microbiology*, vol 54, no. 4, pp. 290-295, 2016.
- [2] J. J. Pei, Z. B. Wang, H. L. Ma, J. K. Yan, "Structural features and antitumor activity of a novel polysaccharide from alkaline extract of *Phellinus linteus* mycelia," *Carbohydrate Polymers*, vol. 115, pp. 472-477, 2015.
- [3] C. J. Lin, H. M. Lien, H. Y. Chang, C. L. Huang, J. J. Liu, Y. C. Chang, C. C. Chen and C. H. Lai, "Biological evaluation of *Phellinus linteus*-fermented broths as anti-inflammatory agents", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 118, no. 1, pp. 88-93, 2014.
- [4] I. K. Lee and B. S. Yun, "Highly oxygenated and unsaturated metabolites providing a diversity of hispidin class antioxidants in the medicinal mushrooms *Inonotus* and *Phellinus*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol 15, no. 10, pp. 3309-3314, 2007.
- [5] T. Zhu, S. H. Kim and C. Y. Chen, "A medicinal mushroom: *Phellinus linteus*", *Current Medicinal Chemistry*, vol 15, no 13, pp. 1330-1335, 2008.
- [6] J. E. Ramberg, E. D. Nelson, R. A. Sinnott, "Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature", *Nutrition Journal*, vol. 9, no. 54, 2010.
- [7] I. K. Lee and B. S. Yun, "Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance", *The Journal of Antibiotics (Japan)*, vol. 64, no. 5, pp. 349-359, 2011.
- [8] I. H. Park, S. Y. Jeon, H. J. Lee, S. I. Kim and K. S. Song, "A beta-secretase (BACE1) inhibitor hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*", *Planta Medica*, vol. 70, no. 2, pp. 143-146, 2004.
- [9] H. J. Hwang, S. W. Kima, J. W. Choi and J. W. Yun, "Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190", *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 33, no. 2-3, pp. 309-319, 2003.
- [10] W. S. Jo, Y. H. Rew, S. G. Choi, G. S. Se, J. M. Sung and J. Y. Uhm, "The culture conditions for the mycelial growth of *Phellinus* spp.", *Mycobiology*, vol. 34, no. 4, pp. 200-205, 2006.
- [11] J. W. Lee, S. J. Baek and Y. S. Kim, "Submerged culture of *Phellinus linteus* for mass production of polysaccharides", *Mycobiology*, vol. 36, no. 3, pp.178-182, 2008.

Summary

EVALUATION OF MICROBIOLOGICAL AND HEAVY METAL SAFETY ASSESSMENT OF PHELLINUS LINTEUS MASS POWDER FROM SUBMERGED FERMENTATION

Nguyen Thi Minh Huyen^{1,3}, Tran Thi Hoa¹, Ninh Thi Tuyet Lan¹
Pham Thi Le², Do Thi Men², Tran Thi Hien²

¹ Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

² Faculty of Biology, VNU University of Science, Vietnam National University, Hanoi

³ Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

Phellinus linteus is known to be a medicinal mushroom which is very good to human health. They are used as medicinal mushroom in many Asian countries such as Japan, Korea, China, Thailand and Vietnam. Because of long time growth and over-harvest by humans in natural conditions, they are artificially cultured in these countries. There were advances of liquid culture of mushroom such as time saving and scaleable in culture in comparison with culturing of mushroom in decaying wood. In this study, *Phellinus linteus* is cultured in optimum liquid medium, lyophilized, ground into fine powder and evaluated for microbiological and total of Arsenic and Lead to ensure the biomass product will meet safety standards for users. Results are as follows: Total of anaerobic bacteria $2,2 \times 10^4$ CFU/g, Coliforms $< 1,0 \times 10^1$ CFU/g, Coagulase positive with *Staphylococci* $< 1,0 \times 10^1$ CFU/g, total amount of yeast - mold $< 1,0 \times 10^1$ CFU/g, not detected of *E.coli*, *Clostridium perfringens* and *Salmonella* spp.. Furthermore, we did not find any Arsenic and Lead which are supposed to remain in our sample.

Keywords: biomass, *phellinus linteus*, culture, liquid medium, microbiology, heavy metals, safety.