

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Lê Thị Thúy Hằng

**NGHIÊN CỨU THU NHẬN POLYSACCHARIDE NGOẠI BÀO CÓ HOẠT
TÍNH SINH HỌC TỪ NẤM *Cordyceps sinensis***

Chuyên ngành: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9 42 02 01

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2023

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học 1: PGS. TS. Nguyễn Tiến Thắng

Người hướng dẫn khoa học 2: TS. Đinh Minh Hiệp

Phản biện 1: ...

Phản biện 2: ...

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ ..', ngày ... tháng ... năm 201....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Hiện nay, có rất nhiều sản phẩm dược và thực phẩm chức năng được phát triển từ Đông trùng hạ thảo. Mặc dù công nghệ nuôi cấy sản xuất sinh khối nấm *C. sinensis* mang lại giá trị kinh tế lớn, nhưng một nguồn lợi khác từ dịch nuôi cấy dường như bị lãng quên. Rõ ràng, việc thải bỏ dịch nuôi cấy không những gia tăng chi phí xử lý môi trường mà còn làm thất thoát nguồn hoạt chất sinh học đáng quý – polysaccharide ngoại bào exopolysaccharide (EPS). Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng EPS sở hữu nhiều hoạt tính sinh học như điều hòa miễn dịch, kháng khối u, kháng oxy hóa và giảm đường huyết trong máu. Các nghiên cứu thu nhận EPS từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* chưa nhiều. Thông tin về hoạt chất có hoạt tính sinh học, trong đó có EPS hầu như còn khiêm tốn. Hơn nữa hoạt chất do nấm *C. sinensis* tạo ra phụ thuộc rất nhiều vào môi trường, điều kiện và cách thức nuôi cấy. Hiện thông tin về nhóm hoạt chất EPS do nấm *C. sinensis* tiết ra môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh còn ít, đặc biệt là ở Việt Nam còn rất khiêm tốn. Do vậy rất cần có các nghiên cứu tổng thể về môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* cơ bản kết hợp bổ sung các yếu tố kích thích tạo sinh khối nấm và EPS. Hoạt tính sinh học của EPS nói chung và các phân đoạn EPS nói riêng phụ thuộc vào thành phần cấu trúc đơn phân, cấu trúc hóa học và kích thước của chúng. Hiện những thông tin trên còn rất khiêm tốn, đặc biệt thông tin về cấu trúc khung cũng như mạch nhánh của các phân đoạn EPS. Do vậy rất cần những khảo sát liên quan đến thu nhận, tinh sạch, đánh giá hoạt tính sinh học và cấu trúc khung của các phân đoạn EPS thu nhận từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*.

Chính vì những lý do nêu trên, luận án này tập trung nghiên cứu môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* làm cơ sở đề xuất quy trình công nghệ sản xuất loài nấm dược liệu này tại Việt Nam. Nghiên cứu thu nhận EPS và các phân đoạn EPS có hoạt tính sinh học từ dịch nuôi cấy nấm và nghiên cứu nâng cấp hoạt tính sinh học của chúng.

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Xây dựng quy trình thu nhận polysaccharide ngoại bào của nấm *Cordyceps sinensis* có hoạt tính sinh học

3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

- Nội dung 1 Khảo sát nguồn nitơ thích hợp trong nuôi cấy nấm *C. sinensis* để thu nhận EPS có hoạt tính sinh học và nuôi cấy tăng sinh tổng hợp EPS bằng cách bổ sung dầu thực vật.
- Nội dung 2 khảo sát thu nhận, tinh sạch và cải biến sulfat hóa nâng cao hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS.
- Nội dung 3 khảo sát thành phần cấu tạo và cấu trúc hóa học của EPS thu nhận từ dịch nuôi cấy lỏng tĩnh *C. sinensis*.
- Nội dung 4 nghiên cứu đề xuất quy trình nuôi cấy lỏng-tĩnh *C. sinensis* tạo EPS có hoạt tính sinh học.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về exopolysaccharide

EPS thu từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* làm giảm đáng kể sự biểu hiện c-Myc, c-Fos và nhân tố phát triển màng trong mạch máu trong chuột bị u melanine B16. Do đó, EPS có thể ngăn chặn khối u phát triển trong phổi và gan chuột và có thể là một giải pháp tiềm năng trong liệu pháp ung thư. EPS biểu hiện hoạt tính kháng khối u chủ yếu thông qua sự tăng cường và hoạt hóa sự đáp ứng miễn dịch của cơ thể vật chủ. Một EPS chiết từ một chủng *C. sinensis* vô tính thuộc *Tolyocladium sinensis* có thể ức chế sự di căn của những tế bào u melanine B16 trong phổi và gan. Ngoài ra, EPS này có thể ngăn chặn sự phát triển khối u H22 và tăng hoạt tính miễn dịch trong chuột mang khối u H22, cho thấy EPS ngăn chặn khối u bằng cách hoạt hóa hệ miễn dịch của cơ thể.

1.2. Cải thiện hoạt tính sinh học của polysaccharide

Có nhiều phương pháp sulfate hóa polysaccharide được sử dụng như phương pháp oleum-dimethylformamide (DMF), phương pháp SO₃-pyridine, phương pháp acid chlorosulfonic (CSA)-pyridine (Pyr) và phương pháp acid aminosulfonic (ASA)-pyridine (Pyr) [23]. Trong đó, phương pháp CSA-Pyr thường được áp dụng: Hỗn hợp polysaccharide hòa tan và phức hợp CSA-Pyr được phản ứng dưới điều kiện nhiệt độ thích hợp trong một khoảng thời gian nhất định với một tỷ lệ CSA/Pyr được kiểm soát. Đối với polysaccharide hòa tan kém thì nên được phân tán trong dung dịch ion trước khi phản ứng với phức CSA-Pyr. Nhược điểm của phương pháp này là CSA có tính oxy hóa mạnh và thời gian phản ứng lâu có thể phá vỡ cấu trúc của polysaccharide [56].

Gần đây, một số dẫn xuất polysaccharide sulfate từ nấm dược liệu/thực vật đã được tổng hợp bằng phương pháp CSA/Pyr. Các kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt tính sinh học của các dẫn xuất sulfate đều cao vượt trội hơn so với polysaccharide tự nhiên. Trên đối tượng nấm *C. sinensis*, Yan và cộng sự đã thu được dẫn xuất S-EPS-1D bằng phương pháp CSA/Pyr có hoạt tính bắt gốc tự do ABTS+ và hydroxyl cao hơn so với EPS tự nhiên [61].

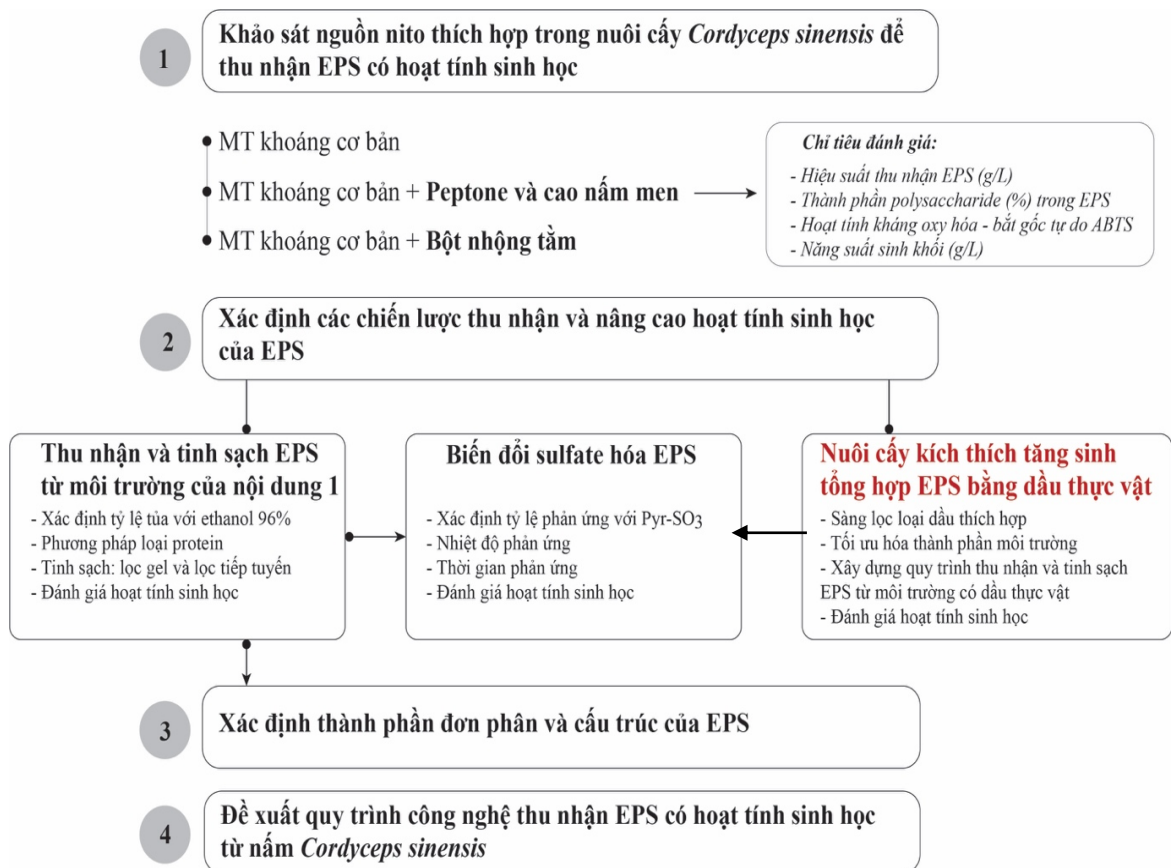
1.3. Xác định các phân đoạn và phân tích thành phần EPS thu được

Hwang và cộng sự (2003), EPS thu được sau khi rửa với ethanol được hòa trong dung dịch NaCl 0,2M để tạo dung dịch EPS có nồng độ 10 g/l, và được nạp vào cột Sepharose CL-4B (2,4 x 100 cm; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Su và cộng sự (2013), mẫu EPS thu được sau khi rửa với ethanol được nạp vào cột Sephacryl S – 300 HR (2,6 x 100 cm, Pharmacia Co.) và được giải ly bằng dung dịch NaCl 10 mM với tốc độ dòng 1 ml/phút. Các phân đoạn EPS được thu nhận và đông khô, giữ ở -20 °C để nghiên cứu thêm. Thủy phân khoảng 2 mg polysaccharide thu được bằng acid trifluoroacetic (TFA) trong 10 giờ ở 110 °C. Lượng acid dư sẽ được loại bỏ bằng methanol, và dịch thủy phân này được phân tích với hệ thống HPLC/ELSD. Kết quả được so sánh với các monosaccharide chuẩn: D-glucose, L-rhamnose, D-xylose, D-mannose và L-arabinose.

1.4. Xác định liên kết, cấu trúc exopolysaccharide

Các EPS sau khi tinh sạch được sử dụng cho các nghiên cứu sâu hơn về hoạt tính và cấu trúc. Hiện nay, để hiểu rõ về EPS, các nhà nghiên cứu đã tiến hành thực hiện phân tích cấu trúc của phân tử này. Cấu trúc sơ cấp của phức hợp carbohydrate đã được làm sáng tỏ trong các nghiên cứu về: 1) thành phần monosaccharide, 2) các liên kết trong cấu trúc, 3) kích thước vòng, 4) cấu hình lập thể, 5) trình tự gốc mono và các đơn vị lặp lại, 6) nhóm chuyển hóa, 7) sự phân bố kích thước phân tử.

Từ mục tiêu nghiên cứu của luận án trình bày ở trên, luận án đề xuất quy trình nghiên cứu gồm 4 nội dung được mô hình hóa trong sơ đồ nghiên cứu tổng quát. Sơ đồ nghiên cứu này sẽ làm cơ sở lý luận và thực nghiệm để đề xuất quy trình công nghệ nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* trong môi trường cải tiến có bổ sung dầu thực vật nhằm tạo năng suất sinh khối và EPS cao. Nghiên cứu thu nhận phức EPS và các phân đoạn EPS. Nghiên cứu thành phần đường đơn, cấu trúc hóa học và cải biến nâng cấp hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS.



Hình 2.1.

Sơ đồ nghiên cứu tổng quát của luận án

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống nấm *Cordyceps sinensis* CS-YK2007 được cung cấp bởi TS. Trương Bình Nguyên, Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Nông nghiệp Công nghệ cao, Trường Đại học Đà Lạt, Lâm Đồng. Nấm *C. sinensis* được nuôi cấy tại phòng thí nghiệm Sinh Hoá trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP HCM. Trong tiến trình thực hiện nghiên cứu có sử dụng dịch lỏng nuôi cấy lỏng-tĩnh do TS. Trương Bình Nguyên cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát nguồn nitơ thích hợp trong nuôi cấy nấm *C. sinensis* để thu nhận EPS có hoạt tính sinh học

Thời gian nuôi cấy *C. sinensis* thường kéo dài từ 30 – 40 ngày ở các môi trường khác nhau: MT1 (cơ bản gồm khoai tây và saccharose), MT2 (MT1 + peptone và cao nấm men) và MT3 (MT1 + nhộng). Theo dõi sự phát triển của từng thí nghiệm qua việc ghi nhận hình thái sinh khối, nhận xét tốc độ tăng trưởng, thời gian thu sinh khối và EPS sau 10, 20, 30 và 40 ngày.

2.2.2. Phương pháp nuôi cấy lỏng tĩnh trong môi trường bổ sung dầu ô liu

Chuẩn bị môi trường: khoai tây (200 g/l), saccharose (50 g/l), cao nấm men (4 g/l), peptone (6 g/l), KH_2PO_4 (0,5 g/l), K_2HPO_4 (0,5 g/l), CaCl_2 (0,5 g/l), MgSO_4 (0,2 g/l). pH 6-7. Pha hỗn hợp dầu ô liu và Tween 80: tỉ lệ 1 ml: 0,3 ml. Nuôi ở nhiệt độ 20 – 25 °C, trong 40 ngày. Dịch thu được hấp khử trùng để tiến hành thu nhận EPS.

2.2.3. Tách chiết EPS từ dịch nuôi cấy *Cordyceps sinensis* bổ sung dầu

2.2.3.1. Tách chiết exopolysaccharide từ dịch nuôi cấy *Cordyceps sinensis* bổ sung dầu ô liu

Quy trình tách chiết exopolysaccharide (EPS) từ dịch nuôi cấy nấm *Cordyceps sinensis* dựa trên phương pháp của Kim và Yun (2003); [Sharma](#) Sapan Kumar và cộng sự (2015) có chỉnh sửa liên quan đến bổ sung và loại dầu ra khỏi dịch nuôi cấy.

2.2.3.2. Khảo sát dung môi hữu cơ loại dầu ra khỏi dịch bằng kỹ thuật chiết lỏng-lỏng

Khảo sát 3 dung môi hữu cơ là petroleum ether, hexan, diethyl ether. Cho vào mỗi bình lỏng 3 dung môi petroleum ether, hexan, diethyl ether với tỷ lệ 1:1. Lắc đều các bình lỏng cho dịch mẫu và dung môi đồng nhất. Để yên bình lỏng, quan sát sự tách lớp. Thu phần dịch phía dưới sau 40 phút. Lặp lại quá trình 4 lần. Xác định hàm lượng polysaccharide và lipid trước và sau khi loại dầu. Xác định hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ của mẫu EPS trước và sau khi loại dầu.

2.2.3.3. Khảo sát tỷ lệ tủa ethanol 96⁰ để thu nhận exopolysaccharide từ môi trường bổ sung dầu

Dịch nuôi cấy sau khi loại dầu được tủa với ethanol 96⁰ theo các tỷ lệ 1:3; 1:4; 1:5. Xác định hàm lượng polysaccharide và protein có trong từng lô thí nghiệm.

2.2.3.4. Phương pháp loại protein

❖ Loại protein bằng phương pháp sevag

Loại protein được tiến hành theo phương pháp của Huang và cộng sự (2010) có điều chỉnh một số bước cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [14]. Thuốc thử sevag (Chloroform: Buthanol) với 3 tỷ lệ khảo sát 3:1; 4:1 và 5:1

Xác định hàm lượng protein và polysaccharide trước và sau khi loại protein với Sevag. Xác định khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ của mẫu EPS trước và sau khi loại protein

❖ Sử dụng TCA để loại protein ra khỏi mẫu EPS

Quy trình loại protein được tiến hành theo phương pháp của Huang và cộng sự (2010) có điều chỉnh một số bước cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Hòa tan EPS thô bằng nước, ủ với TCA 10 %, 20 %, 30 %, 40 % điều chỉnh hỗn hợp đến pH 3,0

Xác định hàm lượng protein và polysaccharide trước và sau khi loại protein. Xác định khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ của mẫu EPS trước và sau khi loại protein.

❖ Sử dụng enzyme protease để loại protein ra khỏi mẫu EPS

Hòa tan mẫu EPS thô vào nước, trộn với enzyme Alcalase 10U, 20U, 30U, 40U, 50U theo tỷ lệ 3:1 v/v. Xác định hàm lượng protein và polysaccharide trước và sau khi loại protein. Xác định khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ của mẫu EPS trước và sau khi loại protein.

2.2.4. Thu nhận phân đoạn EPS

2.2.4.1. Thu nhận phân đoạn EPS bằng phương pháp lọc tiếp tuyến

Cho dịch nổi qua hệ thống lọc tiếp tuyến, màng lọc có kích thước lỗ NMWC 750 kDa và 30 kDa; và màng lọc có kích thước lỗ NMWC 100 kDa và 750 kDa.

2.2.4.2. Thu nhận phân đoạn EPS bằng sắc ký lọc gel

Nạp mẫu EPS (10 g/l) vào cột gel sắc ký có h = 70 cm, d = 2,4 cm, gel Sephadex- G100. Xác định hàm lượng polysaccharide và protein của từng ống.

2.2.5. Cải biến sulfate hóa EPS

2.2.5.1. Tạo dẫn xuất EPS sulfate hóa

Thực hiện phản ứng sulfate hóa theo các thông số sau: Ba thông số bao gồm tỷ lệ EPS/SO₃.Py (1:5, 1:7, w/w), thời gian (1,5h, 2h)

2.2.5.2. Phương pháp xác định độ thay thế (DS)

Dựa trên hàm lượng sulfur, độ thay thế DS được tính theo công thức như sau:

$$DS = \frac{1,62 \times S\%}{32 - 1,02 \times S\%}$$

Trong đó, S% là thành phần sulfur của các dẫn xuất sulfate.

Hiệu suất thu nhận của các dẫn xuất sulfur được tính theo công thức như sau:

$$HS\% = \frac{\text{khối lượng dẫn xuất (g)}}{\text{khối lượng EPS ban đầu (g)}} \times 100$$

Đo phổ tại Viện Hàn Lâm khoa học và công nghệ. Thực hiện đo phổ bằng máy đo FT-IR.

2.2.6. Phương pháp xác định thành phần monosaccharide của EPS

Phương pháp GC-MS được sử dụng để xác định thành phần monosaccharide thủy phân từ ESP, được chuyển đổi hoá học thành cấu trúc dễ bay hơi theo quy trình: thủy phân, hoàn nguyên và acetyl hoá. Các cấu trúc này được phân tích trong hệ thống GC-MS.

2.2.7. Phương pháp xác định và dự đoán cấu trúc - liên kết của EPS

EPS chuyển hóa thành alditol acetate bị methyl hoá (PMAAs) dễ bay hơi. Quá trình này cũng cho phép xác định thành phần monosaccharide liên kết trong EPS (Tham khảo quy trình của Wang và cộng sự 2019). Cuối cùng các cấu trúc này được phân tích trong hệ thống GC-MS.

2.2.8. Phương pháp xác định cấu trúc tổng thể của EPS

Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Hóa phân tích, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG, TP.HCM bằng phương pháp NMR.

2.2.9. Phương pháp xác định hoạt tính sinh học của EPS

2.2.9.1. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của EPS bằng khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺

Mẫu EPS được tiến hành phản ứng với dung dịch ABTS trong đệm PBS pH 7,4, trong tối 30 phút, Sau đó tiến hành đo OD 734 nm và đánh giá khả năng bắt gốc tự do.

2.2.9.2. Phương pháp xác định khả năng kháng phân bào

Thử nghiệm độc tính SRB (Sulforhodamin B assay) được thực hiện theo quy trình của Nguyen, TMN và cộng sự (2017). Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Di truyền – SHPT, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, TP.HCM.

2.2.9.3. Phương pháp khảo sát soạt tính ức chế Tyrosinase

Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Sinh hóa, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG, TP.HCM.

2.2.10. Phương pháp xử lý số liệu

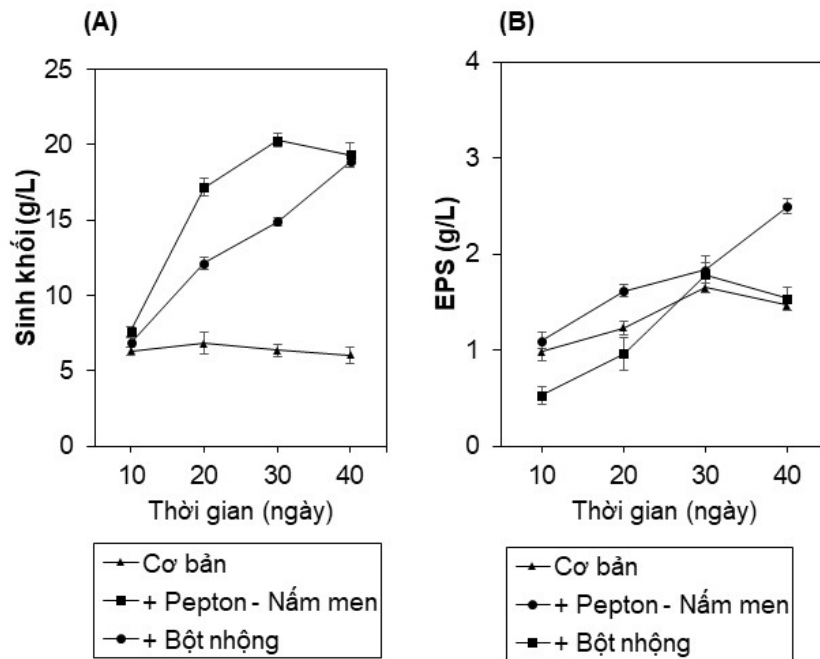
Số liệu được biểu diễn bằng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (mean \pm SD). Phần mềm Microsoft Excel 2013 được sử dụng để tính toán số liệu và vẽ đồ thị. Các thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần. Giá trị p-value $< 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. Khảo sát điều kiện nuôi cấy lỏng-tĩnh *C. sinensis*

3.1.1. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến tạo sinh khối và phức EPS

Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitơ khác nhau như peptone, cao nấm men và bột nhộng đến sản xuất sinh khối, sinh tổng hợp EPS và khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ của EPS bởi nấm *C. sinensis* nuôi cấy lỏng-tĩnh ở các thời điểm khác nhau 10, 20, 30 và 40 ngày.

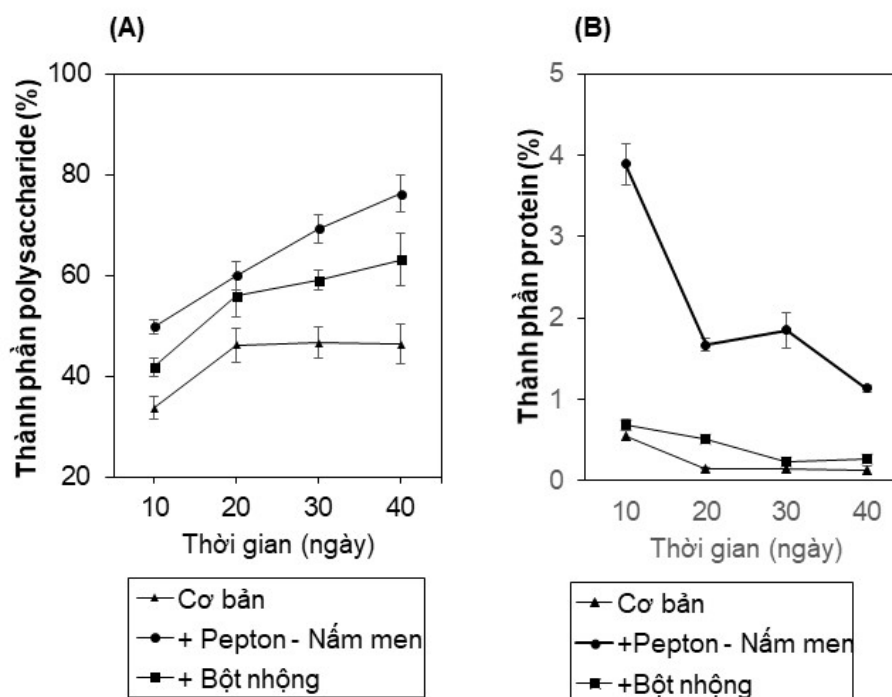


Hình 3.1. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến tạo sinh khối (A) và phức EPS (B) theo thời gian bởi nấm *C. sinensis* nuôi cấy lỏng-tĩnh

Tóm lại, nguồn nitơ thích hợp trong nuôi cấy lỏng-tĩnh thu nhận sinh khối nấm *C. sinensis* và phức EPS là peptone và cao nấm men. Thời điểm thu nhận phức EPS cao nhất ở ngày thứ 40 (2,5 g phức EPS/l) tương ứng với năng suất sinh khối là 19,3 g SKK/l. Dong Yao và cộng sự (2005) cũng cho rằng peptone và cao nấm men là nguồn nitơ quan trọng và thích hợp trong nuôi cấy nấm *C. sinensis* [76].

3.1.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến thành phần EPS trong phức EPS

Kết quả khảo sát cho thấy nguồn nitơ đóng vai trò rất quan trọng trong sinh tổng hợp phức EPS của nấm *C. sinensis*. Sự hiện diện đồng thời của polysaccharide và protein trong phức EPS có thể liên quan đến sự tồn tại của các phân đoạn phức hợp polysaccharide-protein có hoạt tính sinh học. Đây là gợi ý thú vị cho những nghiên cứu tiếp theo liên quan đến khảo sát các phân đoạn EPS sau khi tách protein.

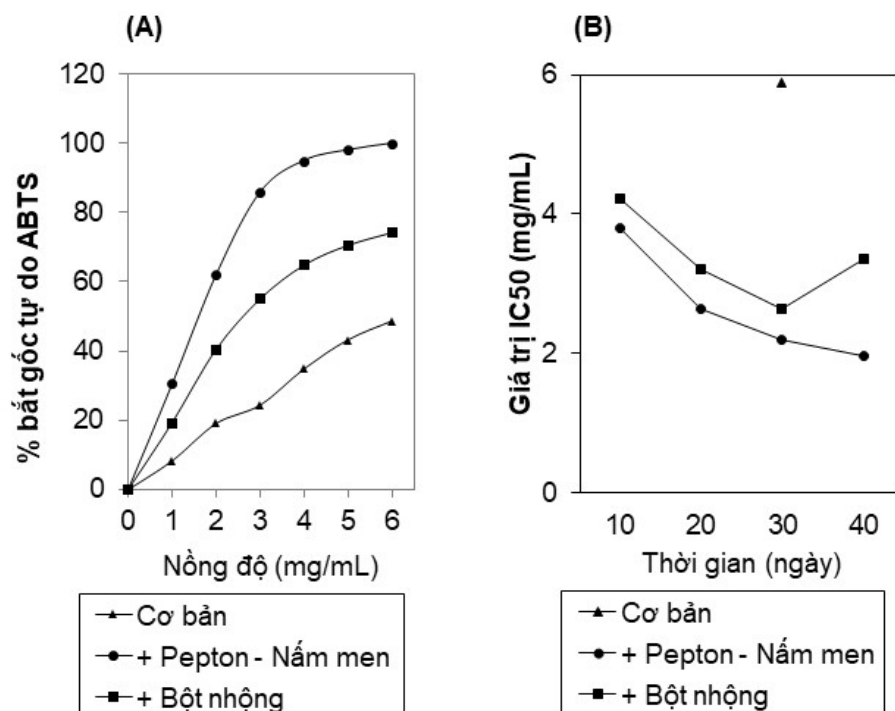


Hình 3.2. Sự thay đổi về thành phần polysaccharide (A) và protein (B) trong EPS tách chiết từ 3 môi trường khác nhau theo thời gian nuôi cấy từ 10 – 40 ngày

3.1.3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro* của phức EPS

Kết quả khảo sát cho thấy hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ của phức EPS thay đổi đáng kể phụ thuộc vào nguồn nitơ sử dụng trong nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*. Phức EPS thu nhận vào ngày thứ 40 từ môi trường bổ sung pepton và cao nấm men ở nồng độ khảo sát 0-6 mg/mL thể hiện hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ cao nhất, kể đến là phức EPS từ môi trường bổ sung nhộng tằm. Thấp nhất là phức EPS từ môi trường cơ bản (Hình 3.3A).

Thay đổi nguồn nitơ khác nhau trong môi trường nuôi cấy có thể làm thay đổi thành phần polysaccharide và hoạt tính sinh học của phức EPS. Trong nghiên cứu này, peptone và cao nấm men là nguồn nitơ thích hợp bổ sung vào môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* tạo EPS có hoạt tính bắt gốc tự do.



Hình 3.3. (A) Hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ của phức EPS thu nhận từ các môi trường nuôi cấy khác nhau ở ngày thứ 40. (B) Sự thay đổi khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ của các phức EPS theo thời gian nuôi cấy thể hiện qua IC₅₀ (mg/mL).

Ngoài môi trường cơ bản nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* theo kết quả nghiên cứu của một số tác giả dầu thực vật bổ sung vào môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* sẽ kích thích tăng sinh tổng hợp và hoạt tính sinh học của EPS. Do vậy, nhiệm vụ tiếp theo là khảo sát nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* kích thích tăng sinh tổng hợp và hoạt tính sinh học của EPS bằng dầu thực vật.

3.2. Khảo sát nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* kích thích tăng sinh tổng hợp và hoạt tính sinh học của EPS bằng dầu thực vật

3.2.1. Sự thay đổi hàm lượng sinh khối và EPS của nấm *C. sinensis* trong môi trường nuôi cấy có bổ sung dầu thực vật

Theo tài liệu tham khảo, các tác giả đã bổ sung một số dầu thực vật vào môi trường nuôi cấy lỏng *C. sinensis*. Trong nghiên cứu này, dầu dừa và dầu hướng dương được bổ sung trong khoảng 1 – 5 %. Riêng dầu ô liu cho kết quả cực đại ở 5 %. Do vậy, tiến hành khảo sát bổ sung dầu ô liu trong khoảng 1 - 10 %.

Sau 40 ngày nuôi cấy bằng phương pháp lỏng tĩnh, thu nhận sinh khối và EPS từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* bổ sung dầu dừa nồng độ từ 1 – 5 % và dầu hướng dương từ 1 – 5 %, dầu ô liu 1 – 10 %.

3.2.1.1 Kết quả khảo sát trên môi trường bổ sung dầu dừa

Trên môi trường nuôi cấy bổ sung dầu dừa nồng độ từ 1 – 5 % sự phát triển của nấm *C. sinensis* và tạo EPS có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê hàm lượng EPS tạo thành giữa các lô ĐC và các lô thí nghiệm. Kết quả cho thấy bổ sung dầu dừa ở các nồng độ 1 – 5 % làm tăng tổng hợp EPS ở nấm. Cụ thể, hàm lượng EPS khô đạt cao nhất $2,54 \pm 0,13$ g/l ở D4, thấp nhất $1,60 \pm 0,01$ g/l ở lô D1. Như vậy, việc bổ sung dầu dừa vào môi trường nuôi cấy đã kích thích gia tăng tổng hợp EPS của nấm *C. sinensis* từ 1,5 g/l lên 2,54 g/l. Tăng 1,66 lần so với ĐC ở lô D4 bổ sung 4 % dầu dừa vào môi trường nuôi cấy. Sự gia tăng này tương đồng với với sự gia tăng sinh khối nấm (Hình 3.4).

3.2.1.2 Kết quả khảo sát trên môi trường bổ sung dầu hướng dương

Môi trường nuôi cấy nấm *C. sinensis* bổ sung dầu hướng dương nồng độ từ 1 – 5% cũng làm nâng suất sinh khối khô và EPS. Ở môi trường bổ sung dầu hướng dương, lượng EPS thu được tăng dần khi nồng độ dầu tăng trong khoảng từ 1 – 3 %. Sau nồng độ dầu 3 %, lượng EPS tạo thành bắt đầu giảm. EPS thu ở môi trường bổ sung dầu hướng dương 3% cao nhất đạt $2,56 \pm 0,07$ g/l, tăng hơn 1,5 lần so với ĐC ($1,52 \pm 0,22$ g/l) ($p > 0,05$). Kết quả nhận được tương tự với kết quả nghiên cứu của Hsieh và cộng sự trong khảo sát bổ sung dầu hướng dương vào môi trường nuôi cấy nấm *G. frondosa* [80].

3.2.1.3 Kết quả khảo sát trên môi trường bổ sung dầu ô liu

Bổ sung dầu ô liu từ 1 – 10 % vào môi trường nuôi cấy nấm *C. sinensis* kích thích quá trình sinh tổng hợp EPS tăng lên đáng kể so với môi trường ĐC (hình 3.6). Khối lượng EPS tăng mạnh từ 2 – 4 lần so với đối chứng. Trong đó cao nhất là ở môi trường bổ sung dầu ô liu 5 % với $5,3 \pm 0,38$ g/l, tăng gấp 4 lần so với môi trường ĐC tương ứng là $1,54 \pm 0,03$ g/l ($p < 0,05$). Kết quả khảo sát này phù hợp với kết quả của Hsieh và cộng sự cho rằng dầu ô liu có khả năng kích thích nấm *Grifola frondosa* tăng sản xuất EPS [69].

Ngoài năng suất tạo sinh khối và khối lượng phức protein-EPS thu được. Mục đích nghiên cứu của luận án là tìm hiểu hoạt tính sinh học nói chung, trong đó có hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ của phức protein-EPS. Do vậy, khảo sát tiếp theo liên quan đến phân tích hàm lượng polysaccharide trong phức, hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ của phức protein-EPS thu được từ môi trường bổ sung dầu dừa, dầu hướng dương và dầu ô liu.

3.2.2 Khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ của tủa phức protein-EPS thu được từ 3 môi trường bổ sung dầu

Hoạt tính bắt ABTS⁺ của EPS thu từ môi trường có nồng độ ô liu 2 % trở lên đều cao hơn so với hoạt tính của EPS trong môi trường đối chứng ($IC_{50} = 3067,48$ μ g/ml). Trong đó cao nhất là môi trường ô liu 5 % với $IC_{50} = 1713,02$ μ g/ml, cao gần gấp 2 lần so với đối chứng. Nghiên cứu của Yang và cộng sự (2005) [65], Sharma và cộng sự (2015) [5] cho biết EPS thu nhận từ *C. sinensis* có hoạt tính kháng oxy hóa, điều hòa hệ thống miễn dịch, kháng khối u, chống lão hóa... Nghiên cứu của

Yan và cộng sự (năm 2014) cũng cho thấy phân đoạn EPS thu từ sinh khối nấm và dịch nuôi cấy có khả năng bắt gốc hydroxyl và ABTS⁺ cao [79].

Nhìn chung kết quả khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ của phức EPS thu được từ môi trường bổ sung dầu hướng dương và dầu dừa không khác biệt so với ĐC và không tốt bằng bổ sung dầu ô liu. Do vậy môi trường bổ sung dầu ô liu được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo liên quan đến khảo sát thời gian thích hợp thu nhận sinh khối và EPS trong dịch nuôi cấy bổ sung dầu ô liu.

3.2.3 **Khảo sát thời gian thích hợp thu nhận sinh khối và EPS trong dịch nuôi cấy bổ sung dầu ô liu**

Trong nghiên cứu này, các mẫu được lấy ở các thời điểm 10, 20, 30, 40, 50 và 60 ngày nuôi cấy từ môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* bổ sung dầu ô liu để thu nhận sinh khối và tủa EPS.

Quá trình phát triển của nấm tăng theo thời gian nuôi cấy. Bằng chứng là hàm lượng sinh khối nấm tăng từ 0 ngày đến 40 ngày nuôi cấy. Cụ thể, sự phát triển tăng mạnh nhất từ 10 ngày đến 20 ngày (tăng 5,44 lần), đến 30 ngày, sinh khối nấm tăng thêm 1,55 lần so với 20 ngày và tăng 1,22 lần khi thu ở 40 ngày nhưng quá trình này không tăng nhiều sau 40 ngày nuôi cấy.

Tuy nhiên theo đánh giá chung bổ sung 5% dầu ô liu sẽ kích thích nấm phát triển mạnh sinh khối đạt $29,06 \pm 1,06$ g/l, đồng thời tổng hợp EPS cũng cao $5,3 \pm 0,38$ g/l so với ĐC $1,52 \pm 0,22$ g/l và tốt hơn so với bổ sung dầu dừa và dầu hướng dương. Vì vậy, môi trường nuôi cấy bổ sung dầu ô liu 5 % được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo liên quan đến tối ưu hoá khả năng tổng hợp EPS trong môi trường bổ sung dầu ô liu.

3.3 **Tối ưu hoá khả năng tổng hợp EPS trong môi trường bổ sung dầu ô liu**

Từ những kết quả thu được, có thể dự đoán môi trường tối ưu để nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* có thành phần sau: dịch chiết khoai tây (200 g/l), saccharose (48,69 g/l), cao nấm men (4 g/l), peptone (6,77 g/l), dầu ô liu (5,27 %), KH₂PO₄ (0,5 g/l), K₂HPO₄ (0,5 g/l), CaCl₂ (0,5 g/l), MgSO₄ (0,2 g/l), pH 6 - 7. Kiểm tra nuôi cấy thực nghiệm trên môi trường dự đoán tối ưu thu được kết quả thể hiện ở bảng 3.8.

Bảng 3.8. Kết quả nuôi cấy nấm *C. sinensis* trên môi trường dự đoán tối ưu

Mẫu	IC ₅₀ (µg/ml)	Hàm lượng EPS (g/l)	Hàm lượng polysaccharide (%)	Hàm lượng protein (%)
Mẫu đối chứng	3067,48	1,71	31,09 ± 0,98	1,79 ± 0,57
Kết quả dự đoán	2304,34	5,75	53,01 ± 0,00	5,02 ± 0,01
Kết quả thực nghiệm	2216,76	5,28	51,67 ± 3,82	4,45 ± 0,27

Kết quả cho thấy, không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa kết quả thực nghiệm và kết quả dự đoán. Và đều tốt hơn so với đối chứng, liên quan đến hàm lượng EPS, % thành phần polysaccharide và hàm lượng protein. Giá trị IC_{50} của EPS thu được từ môi trường dự đoán tối ưu và nuôi thực nghiệm đều thấp hơn mẫu đối chứng. Như vậy, kết quả tối ưu hóa phù hợp với thực nghiệm.

Do đối tượng khảo sát của luận án là EPS thu từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*, nên tiếp theo phải tiến hành nghiên cứu loại bỏ dầu ô liu ra khỏi dịch nấm bằng dung môi hữu cơ nhằm tăng hiệu quả tách chiết EPS cũng như giúp đánh giá ảnh hưởng của dầu ô liu đến hoạt tính sinh học của EPS tạo thành trong môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*.

3.3 Xây dựng quy trình tách chiết EPS từ môi trường bổ sung dầu ô liu

3.3.1 Kết quả xác định dung môi loại dầu

Ba dung môi được sử dụng để tiến hành khảo sát là petroleum ether (PE), hexan và diethyl ether (DE). Hiệu quả của dung môi loại dầu được đánh giá dựa vào thời gian tách lớp, hàm lượng polysaccharide thu được, hàm lượng lipid trong mẫu trước và sau khi loại dầu và hoạt tính sinh học của EPS sau khi được loại dầu. Dung môi PE và hexan lôi kéo dầu ô liu ra khỏi dịch nuôi cấy nấm nhanh và hiệu quả hơn. Còn dung môi DE loại dầu ra khỏi dịch nuôi cấy nấm lâu hơn.

3.3.2 Khảo sát hàm lượng polysaccharide và lipid trong dịch nuôi cấy nấm sau khi loại dầu

Dịch nấm sau khi được loại dầu đã được xác định hàm lượng polysaccharide và lipid. Khả năng loại dầu ô liu ra khỏi dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* giảm dần theo thứ tự $DE > PE > hexan$. Tuy nhiên hàm lượng polysaccharide còn lại trong mẫu lại có xu thế ngược lại với $DE < PE = hexan$. Do vậy phải tiến hành kiểm tra hoạt tính kháng oxi hóa của các mẫu sau khi loại dầu để đánh giá dung môi sử dụng cũng như hàm lượng lipid trong mẫu ảnh hưởng như thế nào đến hoạt tính kháng oxi hóa của dịch thu được sau khi loại dầu để quyết định lựa chọn dung môi loại dầu phù hợp.

3.3.3 Khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do $ABTS^+$ của các mẫu loại dầu

Các mẫu sau khi được loại dầu đã được khảo sát khả năng bắt gốc tự do $ABTS^+$. Kết quả cho thấy các mẫu loại dầu đều có % bắt gốc tự do cao hơn so với dịch mẫu không được loại dầu. Mẫu được loại dầu bằng dung môi PE và DE bắt được $> 50\%$ gốc tự do. Mẫu được loại dầu bằng dung môi PE có hàm lượng lipid 41,75 % thấp hơn so với mẫu hexan là 48,59 % với % bắt gốc tự do 58,69 % cao gần gấp đôi so với mẫu được loại bằng dung môi hexan (37,98 %). Kết quả cho thấy, dịch nuôi cấy được loại dầu càng lớn thì khả năng bắt gốc tự do càng cao. Dung môi DE tuy loại được dầu ra khỏi dịch nuôi cấy nhiều nhất, nhưng do hàm lượng polysaccharide trong mẫu bị thất thoát nhiều, nên hoạt tính bắt gốc tự do chỉ tương đương với dịch nuôi cấy được loại bằng PE. Do vậy, chọn dung môi PE để loại dầu để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Sau khi loại dầu, khảo sát tiếp theo liên quan đến thu nhận phức EPS-protein bằng cách tủa với ethanol.

3.3.4 Khảo sát thu nhận phức EPS-protein

Phức EPS-protein được thu nhận bằng xử lý dịch nuôi cấy nấm sau loại dầu với ethanol 96^o được khảo sát theo tỷ lệ giữa dịch nuôi nấm và ethanol là: 1:3; 1:4 và 1:5 .

Sau khi thu được phức EPS-protein đã tiến hành xác định hàm lượng polysaccharide và protein có trong mẫu EPS-protein thô thu được. Kết quả cho thấy, ở tỷ lệ tủa giữa giữa dịch nuôi nấm và ethanol 96 ^oC 1:3 (v/v) khối lượng tủa EPS-protein là thấp nhất 0,0154 g/ml. Ở tỷ lệ 1:4 là cao nhất 0,0171 g/ml. Đến tỷ lệ 1:5, khối lượng tủa thu được lại giảm chỉ còn 0,0166 g/ml. Do vậy đã chọn tỷ lệ tủa 1:4 cho quá trình tách chiết EPS từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*.

Sau khi đã xác định được điều kiện tối ưu để loại dầu ô liu ra khỏi dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* và thu tủa EPS-protein, việc tiếp theo là phải khảo sát tinh sạch loại bỏ protein ra khỏi phức EPS-protein, thu nhận các phân đoạn EPS sau khi loại protein và nghiên cứu cải biến bằng cách sulfate hóa nhằm nâng cao hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS.

3.5. Thu nhận, tinh sạch và cải biến sulfate hóa nâng cao hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS

Trước tiên là khảo sát việc tinh sạch EPS bằng cách loại bỏ protein từ phức EPS-protein. Trong khuôn khổ nghiên cứu của luận án đã khảo sát phương pháp Sevag, TCA và enzyme Alcalase để loại bỏ protein nhằm xác định phương pháp xử lý nào là hiệu quả nhất dựa vào hoạt tính bắt gốc tự do của EPS sau khi loại protein.

3.5.1. Thu nhận và tinh sạch EPS

Bảng 3.11. So sánh khả năng loại protein của TCA 10 %, Sevag 4:1 và enzyme Alcalase 20 UI/ml

Phương pháp loại protein trong EPS thô	Hàm lượng polysaccharide (%)	Hàm lượng protein (%)	% bắt gốc tự do
TCA 10%	41,23 ± 1,54	2,56 ± 0,26	35,42 ± 3,24
Sevag 4:1	62,72 ± 0,18	1,65 ± 0,46	60,76 ± 2,18
Alcalase 20UI/ml	69,2 ± 1,83	1,57 ± 0,22	68,98 ± 2,05

Kết quả loại protein từ EPS thô bằng 3 phương pháp TCA, Sevag và Alcalase được thể hiện ở bảng 3.11. Trong đó, sử dụng Alcalase là phương pháp tốt nhất để loại protein từ phức EPS-protein thô.

Sau khi loại đáng kể protein từ phức EPS-protein trong dịch, hàm lượng EPS gia tăng đáng kể. Do EPS là đối tượng nghiên cứu của luận án, nên việc tiếp theo là nghiên cứu thu nhận và khảo sát hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS thu được bằng lọc gel và lọc tiếp tuyến.

3.5.2. Thu nhận và khảo sát hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS

3.5.2.1. Thu nhận các phân đoạn EPS bằng lọc gel

Sử dụng sắc ký lọc gel Sephadex G-100 thu được 2 phân đoạn EPS: EPS I (ống 35) và EPS II. Ở EPS I lượng protein cao hơn polysaccharide. Ngược lại ở phân đoạn EPS II lượng polysaccharide cao hơn protein, cả hai đều cao hơn so với EPS I. Ở cả 2 phân đoạn đường biên diễn hàm lượng EPS và protein đều có chung đỉnh ở các ống có vị trí cùng nhau.

3.5.2.2. Thu nhận phân đoạn EPS lọc gel sau khi loại bỏ protein bằng Alcalase 20 UI/ml

Sau khi sử dụng Alcalase 20 UI/mL để loại bỏ protein ra khỏi phức EPS, đã tiến hành tách các phân đoạn EPS bằng sắc ký lọc gel Sephadex G-100.

Kết quả sau sắc ký nhận được 2 phân đoạn EPS. EPS I (ống thứ 25-31) và EPS II (ống thứ 61-76). OD 280 nm tương ứng hàm lượng protein ở 2 đỉnh hấp thu của cả EPS I và EPS II đều giảm mạnh. Tương tự đỉnh hấp thu của polysaccharide cũng thấp hơn so với trước khi xử lý. Điều này chứng tỏ polysaccharide và protein gắn với nhau ở dạng phức protein-polysaccharide, xử lý Alcalase chưa thủy phân hết protein trong phức.

3.5.2.4. Khảo sát hoạt tính kháng phân bào của phân đoạn EPS I và EPS II

Khảo sát hoạt tính kháng phân bào của phân đoạn EPS I và EPS II thông qua khả năng gây độc tế bào bằng thử nghiệm SRB trên dòng tế bào ung thư gan Hep-G2.

Kết quả thu được EPS II có hoạt tính gây độc tế bào cao hơn so với EPS I. Giá trị IC_{50} ở nồng độ $32,38 \pm 3,65 \mu\text{g/ml}$ của phân đoạn EPS II có thể được coi là có khả năng gây độc tế bào. Tuy nhiên hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS có thể được cải thiện thông qua cải biến cấu trúc hóa học của chúng. Một trong những cách tiếp cận là cải biến sulfate hóa, gắn thêm các nhóm sulfate vào cấu trúc EPS nhằm tăng hoạt tính sinh học của chúng. Do vậy tiếp theo là nghiên cứu cải biến sulfate hóa EPS.

Lọc gel để thu nhận các phân đoạn EPS như trình bày ở trên là cách tiếp cận ở mức độ phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, trong thực tế sản xuất ở mức độ pilot, hay hơn nữa, ở mức độ sản xuất công nghiệp, thì lọc tiếp tuyến thường được sử dụng. Do vậy tiếp theo là nghiên cứu thu nhận phân đoạn EPS từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* bằng lọc tiếp tuyến.

3.5.3. Khảo sát thu nhận và tinh sạch phân đoạn EPS từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* bằng lọc tiếp tuyến

Trong thí nghiệm này sau khi nuôi cấy thu tủa EPS với ethanol 96% tỷ lệ 1:4 (v/v) trong 24h ở 4°C, với hiệu suất là 2,383 g/l. Hòa tan 10 g EPS thô và tiến hành thu nhận các phân đoạn EPS bằng phương pháp lọc tiếp tuyến với màng lọc 100 kDa, từ 100 – 750 kDa và > 750 kDa. Kết quả phân tích hàm lượng polysaccharide tổng hòa tan cho thấy hàm lượng polysaccharide của các phân đoạn EPS cao hơn so với mẫu EPS thô. Sau khi loại protein bằng Alcalase, hàm lượng

polysaccharide đều tăng ở tất cả các phân đoạn EPS. Kết quả trên cho thấy EPS đang nghiên cứu có chứa một lượng khá lớn polysaccharide có MW từ 100 - 750 kDa. Điều này chứng tỏ phương pháp lọc tiếp tuyến là phù hợp để thu nhận và tinh sạch các phân đoạn mẫu EPS.

Do giá trị IC_{50} gây độc tế bào ung thư gan Hep-G2 của 2 phân đoạn EPS I và EPS II mới đạt tốt nhất là $32,38 \pm 3,65 \mu\text{g/ml}$, chưa vượt qua ngưỡng yêu cầu $30 \mu\text{g/ml}$. Nên việc cải biến nâng cấp hoạt tính sinh học của chúng là cần thiết. Tiếp theo là khảo sát cải biến sulfate hóa các phân đoạn EPS thu được sau lọc tiếp tuyến nhằm nâng cao hoạt tính sinh học của chúng.

3.5.4. Kết quả sulfate hóa của các phân đoạn EPS sau lọc trực tuyến

Thực hiện phản ứng sulfate hóa 3 phân đoạn EPS thu được sau lọc tiếp tuyến và loại protein nhờ Alcalase từ phức EPS-protein bằng phương pháp CSA/Pyr theo tỷ lệ EPS/SO₃.Py lần lượt là 1:5 và 1:7 (w/w) trong môi trường khí Argon ở 90°C, tương ứng với thời gian 1h, 2h và 3h. Kết quả sulfate hóa 3 phân đoạn EPS thu được từ phức EPS sau lọc tiếp tuyến thể hiện trong bảng 3.14.

Bảng 3.14. Kết quả sulfate hóa 3 phân đoạn EPS thu được sau lọc tiếp tuyến

Tỷ lệ EPS/SO ₃ .Py (w/w)	Thời gian (h)	<100 kDa	100-750 kDa	>750 kDa
1:5	1	Không đạt	S=O (ở 1240 cm^{-1}) DS=2,32; 90,375 % tại t=2h	S=O (1200 cm^{-1})
1:5	2			
1:5	3			
1:7	1		S=O (ở 1208 cm^{-1}) DS=1,64; 55,348 % tại t=2h	S=O (1200 cm^{-1})
1:7	2			
1:7	3			

Phân đoạn 100-750kDa có giá trị DS cao hơn 2 phân đoạn còn lại, đặc biệt DS cao nhất ở tỷ lệ EPS/SO₃.Py 1:5 (DS = 2,32; 90,375 % tại t = 2h); trong đó phân đoạn < 100kDa không xảy ra phản ứng sulfate hoá và phân đoạn > 750 kDa cho giá trị DS < 1.

Mục đích nghiên cứu của luận án là nghiên cứu thu nhận EPS có hoạt tính sinh học. Do vậy, tiếp theo là khảo sát hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS sau khi được nâng cấp sulfate hóa.

3.5.4.1. Kết quả khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ của 3 phân đoạn EPS sau khi được sulfate hóa

EPS chưa sulfate hóa cho kết quả kháng oxy hóa ở những phân đoạn có MW nhỏ tốt hơn so với ở EPS có MW lớn. Phân đoạn EPS <100kDa có hoạt tính kháng oxy hóa tốt nhất 66,51% với IC_{50} 3026 $\mu\text{g/mL}$. Phân đoạn EPS có MW thấp có hoạt tính kháng oxy hóa cao hơn so với các phân đoạn EPS có MW cao hơn có thể do mức độ linh hoạt và độ hòa tan tốt hơn. Kết quả này cũng tương tự kết quả công bố của Li và cộng sự (2021) cho biết các phân tử polysaccharide phân lập từ nấm

Cordyceps có MW thấp có hoạt tính bắt gốc tự do anion superoxide cao hơn so với các phân tử có MW cao [84].

3.5.4. 2. Khảo sát hoạt tính kháng Tyrosinase của 3 phân đoạn EPS sau khi được nâng cấp sulfate hóa

Kết quả ghi nhận 2 thí nghiệm cho kết quả kháng Tyrosinase của mẫu S-EPS 100-750 kDa ở 2 tỷ lệ 1:5 và tỷ lệ 1:7, tương ứng là 852,7 và 927,4 $\mu\text{g/mL}$. Các mẫu S-EPS còn lại cho kết quả đều trên 4000 $\mu\text{g/mL}$, không biểu hiện kháng Tyrosinase. Mẫu S-EPS tỷ lệ 1:5 cho kết quả kháng Tyrosinase tốt nhất là 852,7 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả khảo sát hoạt tính ức chế Tyrosinase cho thấy mẫu S-EPS 100-750 kDa có kết quả tốt nhất với hiệu suất DS=2,32. Mẫu S-EPS 100-750 kDa là mẫu sulfate hóa rõ ràng nhất. Trên phổ FT-IR thấy có dao động C-O-S xấp xỉ 815 và S=O tại 1240 cm^{-1} . Bên cạnh đó hoạt tính kháng oxy hóa bắt gốc tự do ABTS⁺ của S-EPS 100-750 kDa được cải thiện đáng kể tăng từ 60,94% của EPS tự nhiên đến 98,62%, tăng hơn 38%.

3.6. Xác định thành phần cấu tạo và cấu trúc hóa học của EPS từ dịch nuôi nấm *C. sinensis*

3.6.1. Khảo sát đơn vị thành phần đường đơn của EPS

Để xác định thành phần đường đơn chính xác không bị cản trở bởi nấm men và peptone, trong nghiên cứu này ngoài môi trường cơ bản nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* chứa peptone và cao nấm men đã tiến hành nuôi cấy trên môi trường không chứa peptone và cao nấm men mà bổ sung 5 nguồn cơ chất khác là glucose 4 %, fructose 4 %, sucrose 4 %, peptone 4% và hỗn hợp (mix) của chúng với lượng bổ sung mỗi loại 1 %.

Kết quả cho thấy tất cả các nghiệm thức (NT) đều chứa 3 thành phần đường đơn là glucose, mannose và galactose theo các tỉ lệ khác nhau. Wang và cộng sự (2009) cũng thu nhận được polysaccharide từ sinh khối *C. sinensis* có thành phần đường đơn là glucose, mannose và galactose có tỷ lệ lần lượt là 2,8: 2,9: 1, MW trong khoảng 8,1 kDa [87]. Kết quả nghiên cứu cho thấy: phân đoạn EPS-HM có MW 6250 kDa chứa 4 thành phần đường đơn là mannose: glucose: galatose: ribose với tỉ lệ lần lượt là 1,71: 0,94: 1: 0,09. Trong khi ở các phân đoạn EPS-LM có MW thấp trong khoảng 40 – 360 kDa chỉ chứa 3 thành phần đường đơn là mannose, glucose và galactose theo tỷ lệ lần lượt là 7,76: 13,87: 1.

3.6.2. Xác định các dạng liên kết glycoside trong EPS

Sau khi xác định thành phần đường đơn của EPS từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis*, đã tiến hành xác định các dạng liên kết glycoside nối các đường đơn trong EPS. Kết quả được tóm tắt trong bảng 3.18.

Bảng 3.18. Các liên kết glycoside trong EPS của 5 nghiệm thức môi trường

Thứ tự	Các loại liên kết	Tỷ lệ (%)					
		Glucose	Fructose	Sucrose	Peptone	Mix	Đ/c
1	→2)-α-D-Manp	1,31			16,98		
2	→3)-α-D-Glcp	11,48	0,63			0,36	14,01
3	→3)-α-D-Manp-(2→	8,98	15,99	19,28	5,27	17,67	12,83
4	→3)-β-D-Manp-(1→	54,19	55,33	68,16	29,17	55,58	46,44
5	→4)-α-D-Manp	0,20					
6	→4)-α-D-Manp-(3→	0,65					
7	→6)-α-D-Manp	0,29					19,84
8	→6)-α-D-Manp-(2→	2,98					
9	→6)-α-D-Manp-(3→	0,92					
10	α-D-Manp-(2,3,6→	1,71	5,71	4,74	6,26	7,19	
11	α-D-Galp-(2,3,4→			0,28			
12	α-D-Manp-(2,3,4,6→		1,20			0,71	0,65
13	→4)-α-D-Glcp-(2→			0,77			

EPS thu được từ tất cả các nghiệm thức môi trường nuôi cấy nấm *C. sinensis* đều có mạch chính là →3)-β-D-Manp-(1→, trong đó ở 4 nghiệm thức glucose, fructose, sucrose, mix và đối chứng đều chiếm tỷ lệ cao, tương ứng là 54,19 %; 55,33 %; 68,16 %; 55,58 % và 46,44 %. Trong khi tỉ lệ mạch nhánh ở các nghiệm thức khác nhau là khác nhau. Có 2 mạch nhánh xuất hiện ở trong cả 5 nghiệm thức là →3)-α-D-Manp-(2→ và α-D-Manp-(2,3,6→ ở các tỉ lệ khác nhau. EPS thu được ở

nghiệm thức môi trường chứa glucose có nhiều mạch nhánh xuất hiện nhất. Ở nghiệm thức môi trường chứa sucrose và peptone không có sự xuất hiện mạch nhánh $\rightarrow 3$)- α -D-Glcp. Riêng ở nghiệm thức môi trường bổ sung peptone có sự xuất hiện mạch nhánh $\rightarrow 2$)- α -D-Manp (16,98 %). Điều này chứng tỏ bổ sung vào môi trường peptone, *C. sinensis* tạo rất ít EPS. Liên kết của EPS ở nghiệm thức bổ sung peptone cũng rất khác so với các nghiệm thức còn lại.

Kết quả nghiên cứu của các nghiên cứu khác cho thấy thành phần đường đơn của EPS cũng đều là glucose, mannose và galactose theo các tỉ lệ khác nhau. Trong đó glucose không hoàn toàn chiếm tỷ lệ cao nhất. Các EPS này đều có mạch chính là $\rightarrow 3$)-D-Glcp-(1 \rightarrow . Trong khi mạch chính ở 5 nghiệm thức trong nghiên cứu này là $\rightarrow 3$)- β -D-Manp-(1 \rightarrow . Đây là kết quả mới được ghi nhận trong cấu trúc EPS thu nhận trong dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh chủng nấm *C. sinensis* được cung cấp bởi tiến sĩ Trương Bình Nguyên. Ngoài ra, sự xuất hiện nhiều mạch nhánh trong cấu trúc EPS trong nghiên cứu này cũng cho thấy sự khác biệt rõ rệt. Trong khi EPS thu được ở các nghiên cứu khác ở chỉ thấy sự hiện diện 1 đến 2 mạch nhánh, thì EPS thu được ở cả 5 nghiệm thức trong nghiên cứu này đều có nhiều hơn 2 mạch nhánh. Điều này nói lên cấu trúc EPS thay đổi phụ thuộc vào mỗi cá thể nấm cũng như môi trường nuôi cấy chúng.

3.6.3. Khảo sát cấu trúc của EPS bằng NMR

Cấu hình của liên kết glycosidic trong polysaccharide được phân tích bằng ¹H NMR. So với các phổ đồ khác của các sản phẩm tự nhiên, các tín hiệu của polysaccharide thu thập trong một phạm vi hẹp δ 4,3 – δ 5,9 ppm tương ứng với tín hiệu của 3 loại đường. EPS thu nhận từ tất cả 5 nghiệm thức trên đều có tín hiệu peak tại δ 5,16 ppm và trong khoảng δ 4,2 – δ 4,3 ppm. Kết quả ghi nhận tín hiệu mạnh trong khoảng δ 5,03 ppm là tín hiệu của ¹H anomeric của α -D-mannose và β -D-galactose.

Tất cả các nghiệm thức đều có mạch chính là $\rightarrow 3$)- β -D-Manp-(1 \rightarrow , trong đó 4 nghiệm thức glucose, fructose, sucrose và mix có tỷ lệ cao. Phổ ¹H NMR cho tín hiệu tại δ 5,16 ppm, δ 4,2 – 4,3 ppm.

3.7. Bàn luận kết quả nghiên cứu của luận án và đề xuất quy trình nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* tạo EPS có hoạt tính sinh học

Luận án này tập trung nghiên cứu môi trường nuôi cấy lỏng tĩnh nấm *C. sinensis* làm cơ sở đề tối ưu quy trình công nghệ sản xuất loài nấm được liệu này tại Việt Nam. Nghiên cứu thu nhận EPS và các phân đoạn EPS có hoạt tính sinh học từ dịch nuôi cấy nấm và nghiên cứu nâng cấp hoạt tính sinh học của chúng. Một số vấn đề sau đã được làm sáng tỏ trong khuôn khổ thực hiện luận án.

Vấn đề thứ nhất liên quan đến nghiên cứu sàng lọc môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*. Trong phần tổng quan đã đề cập đến ưu thế của nuôi cấy lỏng nấm *C. sinensis* so với nuôi cấy bán rắn. Tuy nhiên đa số các nghiên cứu nuôi cấy lỏng nấm *C. sinensis* cho đến nay chủ yếu tập trung vào nghiên cứu nuôi cấy lỏng kết hợp khuấy với tốc độ trong khoảng 100-150 v/phút. Chưa

thấy đề cập nhiều đến nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*. Về thành phần môi trường nuôi cấy nấm *C. sinensis* về cơ bản khá giống nhau. Nguồn C thường là saccharose và glucose hay bột bắp. Nguồn N là cao nấm men và peptone cùng một số muối vô cơ cung cấp khoáng vi lượng. pH môi trường nuôi cấy thường có tính acid trong khoảng 4,0 - 4,5. Cũng có nghiên cứu tiến hành ở pH 7,0 (Wu, Chen và Hao, 2009).

Năng suất tạo sinh khối và EPS cũng khác nhau. Cao nhất là ở nghiên cứu của Cha và cộng sự (2007) đạt năng suất tương ứng của sinh khối và EPS là 54,0 g/l và 28,4 g/l. Nghiên cứu của Wu, Chen và Hao 2009 nuôi cấy lỏng nấm *C. sinensis* khuấy 150 v/phút, pH 7,0 cho năng suất sinh khối tương đối thấp 12,3 g/l, nhưng năng suất tạo EPS lại khá cao tới 24,5 g/l. Điều này chứng tỏ nuôi cấy lỏng nhân tạo nấm *C. sinensis* còn phải nghiên cứu tiếp tục liên quan đến sàng lọc thành phần môi trường nuôi cấy, hình thức nuôi cấy lỏng-khuấy, lỏng-tĩnh hay bán rắn.

Kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy sản xuất sinh khối của nấm *C. sinensis* nuôi cấy lỏng-tĩnh thấp nhất trên môi trường cơ bản không bổ sung nitơ. Thời điểm thu sinh khối cao nhất là vào ngày thứ 20 với 6,8 g sinh khối khô (SKK)/l. Trước khi nấm vào giai đoạn cân bằng và suy vong (hình 3.1A). Trong khi đó, trên môi trường bổ sung peptone và cao nấm men, thời điểm sinh khối nấm đạt cao nhất 20,3 g SKK/l vào ngày nuôi cấy thứ 30 gấp khoảng 3 lần so sinh khối tạo ra trên môi trường cơ bản (6,8 g SKK/l). Sinh khối của nấm *C. sinensis* tạo ra trên môi trường bổ sung dịch chiết nhộng tằm cũng tốt hơn so với trên môi trường cơ bản. Ở ngày thứ 30, sinh khối nấm trên môi trường bổ sung dịch chiết nhộng tằm đạt 14,9 g SKK/l cao hơn đáng kể so với môi trường cơ bản (6,4 g SKK/l), nhưng thấp hơn so với 20,3 g SKK/l trên môi trường bổ sung peptone và cao nấm men. Có điều thú vị là trên môi trường dịch chiết nhộng tằm, sau ngày thứ 30 sinh khối nấm tiếp tục được tạo ra cho đến ngày thứ 40 đạt 18,9 g SKK/l.

Vấn đề thứ 2 liên quan đến bổ sung dầu ô liu vào môi trường nuôi cấy lỏng- tĩnh nấm *C. sinensis* kích thích tạo sinh khối và EPS.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy dầu dừa không thích hợp cho sự phát triển và tổng hợp EPS của nấm *C. sinensis* nuôi cấy lỏng-tĩnh bởi thành phần chủ yếu của dầu dừa là acid béo bão hòa, chỉ chứa lượng nhỏ 6,2 % acid béo chưa bão hòa oleic acid. Do đó, dầu dừa không phù hợp cho nấm sử dụng để phát triển [78]. Trong khi dầu hướng dương và dầu ô liu do chứa nhiều acid béo chưa bão hòa, nên phù hợp hơn để bổ sung vào môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm kích thích *C. sinensis* phát triển và tổng hợp EPS. Kết quả khảo sát này tương tự như nghiên cứu của Hsieh và cộng sự (2008) khi bổ sung từ 0,1 – 1 % dầu hướng dương và dầu ô liu vào môi trường nuôi cấy nấm *G. frondosa* [80]. Điều này hợp lý do dầu hướng dương và dầu ô liu có hàm lượng acid béo chưa bão hòa oleic acid khá cao từ 55 – 75 % giúp nấm dễ dàng phát triển tăng sinh khối và tổng hợp EPS [61]. Kết quả khảo sát khá thú vị. Bổ sung dầu hướng dương cho kết quả năng suất tạo sinh khối nấm cao hơn so

với bổ sung dầu ô liu. Ngược lại, bổ sung dầu ô liu cho hàm lượng EPS cao hơn so với bổ sung dầu hướng dương.

Tuy nhiên theo đánh giá chung bổ sung 5 % dầu ô liu sẽ kích thích nấm phát triển mạnh sinh khối đạt $29,06 \pm 1,06$ g/l, đồng thời tổng hợp EPS cũng cao $5,3 \pm 0,38$ g/l so với ĐC $1,52 \pm 0,22$ g/l) và tốt hơn so với bổ sung dầu dừa và dầu hướng dương. Vì vậy, môi trường nuôi cấy bổ sung dầu ô liu 5 % được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo liên quan đến tối ưu hoá khả năng tổng hợp EPS trong môi trường bổ sung dầu ô liu.

Vấn đề thứ 3 liên quan đến tối ưu hóa thành phần môi trường môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* có bổ sung dầu ô liu nhằm kích thích tạo sinh khối và EPS.

Trong nghiên cứu của luận án, các nghiệm thức nuôi cấy lỏng-tĩnh nhằm thu nhận EPS được thực hiện trên 3 yếu tố ở 3 mức gồm 15 công thức trong đó 3 lần lặp lại của các điểm trung tâm. Bảng 3.4 thể hiện kết quả thực nghiệm so với kết quả mô hình dự đoán bằng phần mềm Minitab 17. Nhìn chung, kết quả thu được từ thực nghiệm và mô hình không có sự chênh lệch đáng kể.

Khảo sát thu nhận phức EPS-protein từ môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* bổ sung dầu ô liu cho thấy khả năng lôi kéo dầu và hoạt tính của mẫu thử nghiệm sau khi loại dầu bằng dung môi PE và DE tốt hơn so với dung môi hexan. Khả năng lôi kéo dầu ra khỏi dịch của dung môi DE là tốt nhất. Tuy nhiên lại làm thất thoát một lượng lớn polysaccharide. Hoạt tính bắt gốc tự do của mẫu loại bằng dung môi PE và dung môi DE gần như nhau. Do vậy, chọn dung môi PE để loại dầu để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Vấn đề thứ 4 liên quan đến thu nhận phức EPS-protein từ dịch môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* bổ sung dầu ô liu, sau khi loại dầu.

Kết quả cho thấy, ở tỷ lệ tủa giữa giữa dịch nuôi cấy nấm và ethanol 96 °C 1:3 (v/v) khối lượng tủa EPS-protein thu được là thấp nhất 0,0154 g/ml. Ở tỷ lệ 1:4 là cao nhất 0,0171 g/ml. Ở tỷ lệ 1:5, khối lượng tủa thu được lại giảm chỉ còn 0,0166 g/ml. Do vậy đã chọn tỷ lệ tủa 1:4 cho quá trình tách chiết EPS từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự kết quả nghiên cứu của Kim và Yun (2005) trên nấm *C. militaris* và *C. sinensis*; Angelis và Sandra (2009) trên nấm Macromycetes; Trần Minh Trang (2013) trên nấm *C. sinensis*. Tỷ lệ tủa 1:4 (v/v) giữa dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh và ethanol 96 để thu nhận phức EPS-protein từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* bổ sung dầu ô liu là tối ưu, và được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Vấn đề thứ 5 liên quan đến tinh sạch các phân đoạn EPS từ dịch tủa phức EPS-protein thu được từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* bổ sung dầu ô liu

Kết quả loại protein từ EPS thô bằng 3 phương pháp TCA, Sevag và Alcalase được thể hiện ở bảng 3.11. Trong đó, sử dụng Alcalase là phương pháp tốt nhất để loại protein từ phức EPS-protein thô. Cụ thể, tỷ lệ loại protein có sự khác biệt giữa 3 phương pháp khảo sát. Phương pháp sử dụng Alcalase có khả năng loại protein cao nhất, giảm chỉ còn 1,57 % với hàm lượng polysaccharide thu

được cao nhất (69,2%) ($p < 0,05$), với hoạt tính bắt gốc tự do của EPS là cao nhất 68,98% cao hơn 2 phương pháp còn lại. Phương pháp TCA gây thất thoát polysaccharide lớn hơn và làm hoạt tính bắt gốc tự do giảm so với đối chứng. Phương pháp Sevag cũng cho kết quả loại protein tương đối cao phù hợp với kết quả nghiên cứu của Huang và cộng sự (2009) sử dụng phương pháp Sevage loại protein ở mannan oligosaccharide, với tỷ lệ loại protein là 89,8 % với 12,2 % mannan oligosaccharide thất thoát [50]. Tuy nhiên so với với phương pháp sử dụng Alcalase thì vẫn kém hơn. Do vậy đã chọn phương pháp loại protein từ phức EPS bằng Alcalase.

Vấn đề thứ 6 liên quan đến khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do của các phân đoạn EPS đã được tinh sạch.

Kết quả bảng 3.12 cho thấy sau khi loại bỏ protein từ phức với EPS. Bằng sắc ký lọc gel G-100, thu được 2 phân đoạn EPS I và II. Kết quả cho thấy EPS II có hoạt tính gây độc tế bào cao hơn so với EPS I. Như vậy, giá trị IC_{50} ở nồng độ $32,38 \pm 3,65 \mu\text{g/ml}$ của phân đoạn EPS II có thể được coi là có khả năng gây độc tế bào. Tuy nhiên hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS có thể được cải thiện nhờ cải biến cấu trúc hóa học của chúng. Một trong những cách tiếp cận là cải biến sulfate hóa, gắn thêm các nhóm sulfate vào cấu trúc EPS nhằm tăng hoạt tính sinh học của chúng. Do vậy tiếp theo là nghiên cứu cải biến sulfate hóa EPS.

Vấn đề thứ 7 liên quan đến cải biến nâng cấp hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS đã được tinh sạch bằng cách sulfate hóa. Do trong khảo sát giá trị IC_{50} gây độc tế bào ung thư gan Hep-G2 của 2 phân đoạn EPS I và EPS II mới đạt $32,38 \pm 3,65 \mu\text{g/ml}$ chưa vượt qua ngưỡng yêu cầu là $30 \mu\text{g/ml}$. Nên việc cải biến nâng cấp hoạt tính sinh học của 2 phân đoạn này là cần thiết.

Kết quả sulfate hóa các phân đoạn cho thấy, giá trị DS ở các phân đoạn có sự khác biệt rõ rệt (Mục 3.3.4). Cụ thể, phân đoạn 100-750 kDa có giá trị DS cao hơn 2 phân đoạn còn lại, ở tỷ lệ EPS/SO₃.Py 1:5 (DS=2,32; 90,375% tại t=2h). Trong khi ở phân đoạn < 100 kDa không xảy ra phản ứng sulfate hoá. Còn phân đoạn > 750 kDa lại cho giá trị DS < 1. Từ những dữ liệu trên, có thể kết luận điều kiện phản ứng sulfate hóa thích hợp cho 3 phân đoạn EPS từ tủa EPS thu được từ dịch môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* là tỷ lệ EPS/SO₃.Py (1:5 và 1:7) trong 2h, ở nhiệt độ 90 °C. Đây cũng là điểm mới nổi bật của luận án đã tạo thành công dẫn xuất sulfate từ EPS thu được môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*.

Kết quả khảo sát hoạt tính ức chế Tyrosinase cho thấy mẫu S-EPS 100-750 kDa có kết quả tốt nhất với hiệu suất DS = 2,32. Mẫu S-EPS 100-750 kDa là mẫu sulfate hóa rõ ràng nhất. Trên phổ FT-IR thấy có dao động C-O-S xấp xỉ 815 và S=O tại 1240 cm⁻¹. Bên cạnh đó hoạt tính kháng oxy hóa bắt gốc tự do ABTS⁺ của S-EPS 100-750 kDa được cải thiện đáng kể tăng từ 60,94 % của EPS tự nhiên đến 98,62 %, tăng hơn 38 %.

Tóm lại, cải biến sulfate hóa làm thay đổi các tính chất lý hóa của EPS và cải thiện hoạt tính sinh học của chúng. Nhóm sulfate SO₃²⁻ ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính sinh học của các dẫn xuất

sulfate hóa của EPS. Trong nghiên cứu của luận án đã tổng hợp thành công dẫn xuất sulfate hóa S-EPS ở điều kiện tối ưu với tỷ lệ EPS/SO₃.Py = 1:5, 90 °C và 2h, đạt DS = 2,32 với hiệu suất 90,375 %. Giá trị DS thu được trong nghiên cứu này cao hơn so với các nghiên cứu trước đó, là rất triển vọng. Đây là điểm mới mở ra hướng ứng dụng sử dụng phương pháp EPS/SO₃.Py để cải biến sulfate hóa nâng cấp hoạt tính sinh học của EPS thu nhận từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*.

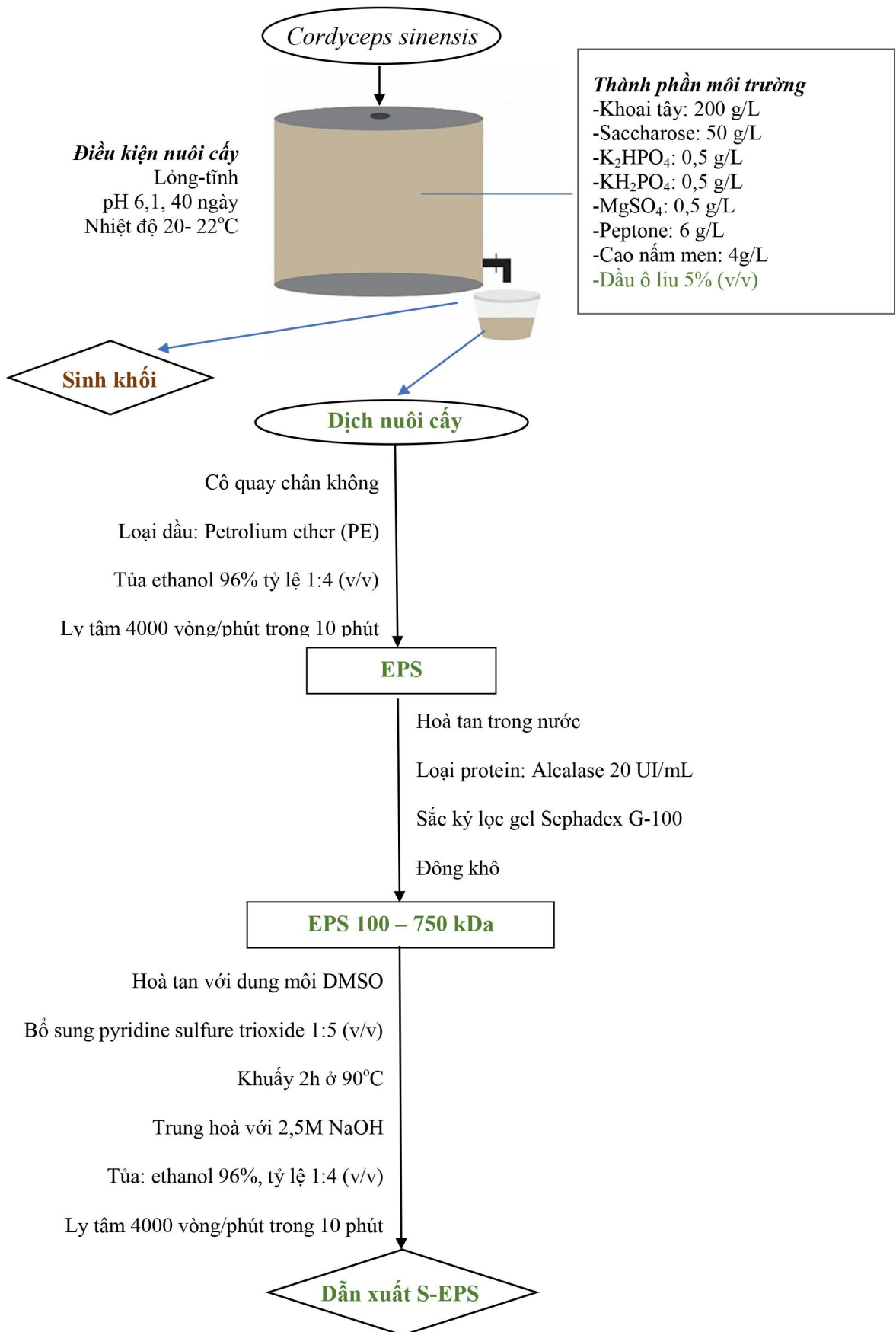
Vấn đề thứ 8 liên quan đến nghiên cứu thành phần và cấu trúc hóa học của EPS. Kết quả nghiên cứu của các nghiên cứu khác cho thấy thành phần đường đơn của EPS cũng đều là glucose, mannose và galactose theo các tỉ lệ khác nhau. Trong đó glucose không hoàn toàn chiếm tỷ lệ cao nhất. Các EPS này đều có mạch chính là $\rightarrow 3$ -D-Glcp-(1 \rightarrow). Trong khi mạch chính ở 5 nghiệm thức trong nghiên cứu này là $\rightarrow 3$ - β -D-Manp-(1 \rightarrow). Đây là kết quả mới được ghi nhận trong cấu trúc EPS thu nhận trong dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh chủng nấm *C. sinensis* được cung cấp bởi tiến sĩ Trương Bình Nguyên. Ngoài ra, sự xuất hiện nhiều mạch nhánh trong cấu trúc EPS trong nghiên cứu này cũng cho thấy sự khác biệt rõ rệt. Trong khi EPS thu được ở các nghiên cứu khác ở bảng 3.22 chỉ thấy sự hiện diện 1 đến 2 mạch nhánh. Trong khi EPS thu được trong cả 5 nghiệm thức trong nghiên cứu này đều có nhiều hơn 2 mạch nhánh. Điều này nói lên cấu trúc EPS thay đổi phụ thuộc vào mỗi cá thể nấm cũng như môi trường nuôi cấy chúng.

Kết luận chung: nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* trên các nguồn cơ chất khác nhau cho sinh khối và EPS khác nhau. Thành phần đường đơn của EPS ở tất cả các nghiệm thức đều chứa glucose, mannose và galactose theo các tỉ lệ khác nhau. Trong đó, EPS của nghiệm thức glucose và sucrose có thành phần mannose cao nhất là 65,10 % và 47,55 %. EPS của 3 nghiệm thức còn lại đều có thành phần glucose cao nhất.

Tất cả các nghiệm thức đều có mạch chính là $\rightarrow 3$ - β -D-Manp-(1 \rightarrow), trong đó 4 nghiệm thức glucose, fructose, sucrose và mix có tỷ lệ cao. Phổ ¹H NMR cho tín hiệu tại δ 5,16 ppm, δ 4,2 – 4,3 ppm.

Cấu trúc của EPS ít mạch nhánh với nguồn cơ chất là peptone. Trong khi ở nguồn cơ chất là glucose, thì EPS có nhiều mạch nhánh. EPS có trọng lượng phân tử lớn và thành phần galactose có hàm lượng cao ở nguồn cơ chất là sucrose.

Kết quả nghiên cứu của 4 nội dung chính của luận án, cho phép đề xuất quy trình nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* nhằm thu nhận EPS có hoạt tính sinh học.



Hình 3.29. Đề xuất quy trình nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* tạo EPS có hoạt tính sinh học

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

❖ Kết luận:

Kết quả nghiên cứu của luận án cho phép một số kết luận sau:

- Peptone và cao nấm men là nguồn nitơ thích hợp trong nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* để thu nhận EPS có hoạt tính kháng oxy hóa tốt hơn so với bột nhộng tằm.
- Đã xác định bổ sung dầu ô liu 5 % vào môi trường nuôi cấy cơ bản sẽ kích thích tăng sinh tổng hợp EPS bởi nấm *C. sinensis* nuôi cấy lỏng-tĩnh.
- Tinh sạch EPS thu được từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* bằng cách loại bỏ protein sử dụng Alcalase. Thu nhận phân đoạn EPS I và EPS II bằng sắc ký lọc gel và thu nhận phân đoạn EPS 100-750 kDa bằng lọc tiếp tuyến.
- Cải biến nâng cấp hoạt tính của phân đoạn EPS 100-750 kDa bằng sulfate hóa đã cải thiện đáng kể hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro* và hoạt tính ức chế tyrosinase, là đóng góp mới của luận án.
- Đã xác định được 3 đơn vị đường đơn chính trong mạch EPS thu nhận từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* là glucose, mannose, galactose, với mạch chính 1,3- β -D-Manp, 2 mạch nhánh 2,3)- α -D-Manp và α -D-Manp-(2,3,6 trong cấu trúc của EPS. Việc thay thế nguồn C khác nhau trong nuôi cấy có thể ảnh hưởng đến cấu trúc mạch nhánh, nhưng không làm thay đổi cấu trúc mạch chính của EPS tạo ra bởi nấm *C. sinensis*.
- Đã đề xuất quy trình công nghệ nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* tạo sinh khối nấm và hoạt chất EPS cao có hoạt tính sinh học từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*. Đây là nghiên cứu lần đầu tiên xây dựng quy trình thu nhận và tinh sạch EPS từ môi trường nuôi cấy *C. sinensis*.

❖ Kiến nghị

Với mục đích hoàn thiện tiếp các nội dung nghiên cứu nhằm thu nhận hoạt chất EPS từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* luận án có một số kiến nghị sau:

- Khảo sát hoạt tính kháng phân bào của 3 phân đoạn EPS sau khi được nâng cấp sulfate hóa.
- Hoàn thiện quy trình thu nhận phân đoạn EPS từ dịch nuôi cấy và tạo dẫn suất sulfate có hoạt tính sinh học ở quy mô pilot, làm tiền đề cho việc sản xuất dẫn suất EPS có hoạt tính sinh học.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Lần đầu tiên xây dựng được quy trình thu nhận EPS từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *Cordyceps sinensis* tại Việt Nam giúp chủ động tạo nguồn EPS có hoạt tính sinh học.
2. Đã xác định thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy tối ưu nấm *Cordyceps sinensis* chứa peptone và cao nấm men kết hợp bổ sung dầu ô liu 5% với thời gian nuôi cấy 40 ngày kích thích nấm phát triển và tổng hợp EPS.
3. Đã xác định 3 đơn vị thành phần chủ yếu của EPS từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *Cordyceps sinensis* là glucose, mannose và galactose theo các tỉ lệ khác nhau trong các phân đoạn EPS.
4. Đã tạo được dẫn suất sulfate-EPS bằng phương pháp EPS/SO₃.Py với tỷ lệ EPS/SO₃.Py = 1:5, 90 °C và 2h, đạt DS =2,32 với hiệu suất 90,375% cao hơn so với các nghiên cứu công bố trước đây. Các phân đoạn EPS thu được từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *Cordyceps sinensis* sau khi được cải biến sulfate hóa đều cải thiện hoạt tính sinh học đáng kể. Đặc biệt là phân đoạn S-EPS 100-750 kDa.
5. Luận án góp phần làm rõ cấu trúc EPS thu được từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *Cordyceps sinensis* có mạch chính là $\rightarrow 3$)- β -D-Manp-(1 \rightarrow . Phổ ¹H NMR cho biết vị trí của các C anomeric của Manp, Galp và Glcp.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. **Lê Thị Thúy Hằng**, Bạch Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Thu Tuyết, Trần Minh Trang, Huỳnh Thư, Nguyễn Tiến Thắng, Đinh Minh Hiệp, *Tối ưu hóa thành phần dầu ô liu trong môi trường nuôi cấy nấm Ophiocordyceps sinensis thu nhận exopolysaccharide*, Tạp chí Khoa học - Đại học Quốc Gia Hà Nội, 33(1S) 2017.
2. Trần Minh Trang, Huỳnh Thư, **Lê Thị Thúy Hằng**, Đinh Minh Hiệp, *Extraction of exopolysaccharide from the culture fluid Cordyceps sinensis and its effects on proliferation of the PBMCs*, Vietnam Journal of Science and Technology, 53(6B), 72-80, 2016.
3. **Hàng Lê Thị Thuý**, Tuyen Nguyen Thi Thu, Phuong Bach Thi Bich, Thu Huynh, Hiep Dinh Minh, Thang Nguyen Tien, *The effect of plant oils on mycelial biomass production, biosynthesis and antioxidants of exopolysaccharide by Ophiocordyceps sinensis*, Tạp Chí Khoa Học Công Nghệ và Thực Phẩm, 13(1), 3-10, 2017.
4. **Hàng Lê Thị Thuý**, Chau Ha Bao, Trang Vo Thi Phuong, Duy Bui Lap, Nam Tran Van Hai, Hiep Dinh Minh, Thang Nguyen Tien, *Deproteinization in purification of exopolysaccharide from Ophiocordyceps sinensis olive oil – stimulated culture*, International Journal of Agricultural Technology 14(7), 2151-2162, 2018.
5. **Lê Thị Thuý Hằng**, Ha Bao Chau, Vo Thi Trieu, Vo Thi Phuong Trang, Tran Minh Trang, Dinh Minh Hiep, Nguyen Tien Thang, *Exopolysaccharide extraction from Ophiocordyceps sinensis culture broth supplemented with olive oil*, Vietnam Academy of Science and Technology Journal of Biology 40, (2SE), 2018
6. **Lê Thị Thuý Hằng**, Bui Lap Duy, Ha Bao Chau, Dinh Minh Hiep, Nguyen Tien Thang, *Study of antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of exopolysaccharide and extracts from caterpillar fungus Ophiocordyceps sinensis cultured in olive oil-supplemented broth*, Viet Nam Journal of Chemistry, 58(4) 482-487, 2020.
7. **Hàng, L. T. T.**, Chau, H. B., Nam, T. V. H., Phu, D. H., Hiep, D. M. and Thang, N. T. *A survey on acid hydrolysis in analyzing the monosaccharide composition of exopolysaccharide from Ophiocordyceps sinensis*, International Journal of Agricultural Technology, 16(3), 619-628, 2020.