

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***

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2023

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- PGS. TS. Nguyễn Tiến Thắng
- TS. Đinh Minh Hiệp

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2023

LỜI CẢM ƠN

“Luận án Tiến sĩ này sẽ không thể trở thành hiện thực nếu không có sự ủng hộ cả về mặt tri thức lẫn tinh thần của rất nhiều người quan trọng trong cuộc đời tôi.”

Khi mới bắt đầu chương trình Nghiên cứu sinh và Luận án Tiến sĩ, quả thật tôi chưa bao giờ nghĩ sẽ phải đối mặt với quá nhiều khó khăn và thử thách đến vậy. Quá trình thực hiện luận án là cả một cuộc hành trình với đủ mọi cung bậc cảm xúc cá nhân, lẫn thử thách về tri thức và nội lực con người.

Để hoàn thành chương trình Luận án Tiến sĩ, tôi đã nhận được sự quan tâm, chia sẻ, hỗ trợ của rất nhiều thầy cô, anh chị, các bạn bè cùng khoá, đồng nghiệp tại các đơn vị. Chính vì thế, tôi muốn bày tỏ sự biết ơn sâu sắc nhất đến tất cả những người đã luôn ở bên cạnh tôi ngay từ những ngày đầu bắt tay vào làm Luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Tiến Thắng, người thầy đáng kính đã luôn nhiệt tình động viên, hướng dẫn, thẳng thắn góp ý để tôi hoàn thiện Luận án.

Tôi cũng muốn thể hiện sự cảm kích chân thành của mình đến TS. Đinh Minh Hiệp, người Thầy đã gieo mầm và dẫn dắt cho tôi từ những bước đầu tiên trên con đường nghiên cứu, đã hỗ trợ, định hướng, giúp đỡ và chia sẻ cùng tôi trong suốt quá trình thực hiện Luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn các Thầy Cô ở Học Viện Khoa học và Công nghệ đã luôn hỗ trợ tôi trong suốt chương trình nghiên cứu sinh. Trân trọng cảm ơn các Thầy Cô giáo của Viện Sinh học Nhiệt đới đã tận tình truyền đạt kiến thức, góp ý cho tôi trong cả quá trình học tập và thực hiện đề tài.

Xin trân trọng cảm ơn các Thầy Cô Khoa Sinh và Khoa Hóa, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên- Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh đã nhiệt tình góp ý và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài.

Tôi thật sự cảm kích sự giúp đỡ nhiệt tình và vô tư của các bạn trong nhóm nghiên cứu: em Trần Minh Trang, em Nguyễn Tài Hoàng, em Huỳnh Thu và rất rất nhiều thành viên khác. Các em đã dành nhiều tâm huyết, thời gian để hỗ trợ tôi. Chính các em đã mang đến cho tôi những năng lượng tích cực và niềm vui trong quá trình hoàn thành Luận án.

Trân trọng cảm ơn Trường ĐH Công Nghiệp Thực Phẩm TP HCM, nơi tôi đang công tác trong suốt thời gian thực hiện Luận án, đặc biệt Khoa Công Nghệ Thực Phẩm và các Thầy Cô trong Bộ Môn Khoa Học Thực Phẩm đã chia sẻ, tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành chương trình học tập và nghiên cứu.

Và cuối cùng, tôi xin dành tình cảm, sự biết ơn đối với gia đình, những người luôn mong mỏi, âm thầm quan tâm, động viên, khích lệ để tôi hoàn thành Luận án.

Một lần nữa, bằng cả tấm lòng, tôi chân thành cảm ơn tất cả mọi người đã không ngại khó khăn và đồng hành cùng tôi trên chặng đường dài của nghiên cứu sinh.

Trân trọng!

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan công trình nghiên cứu này là của chính tôi. Các số liệu, kết quả trình bày trong Luận án này là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Lê Thị Thúy Hằng

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT	i
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	ii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	iiv
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Giới thiệu về nấm <i>C. sinensis</i>	3
1.1.1. Nguồn gốc và vòng đời phát triển	3
1.1.2. Thành phần hoạt chất có hoạt tính sinh học.....	5
1.1.3. Nghiên cứu nuôi cấy nhân tạo nấm <i>C. sinensis</i>	6
1.2. Tổng quan về polysaccharide ngoại bào – EPS ở nấm <i>C. sinensis</i>	8
1.2.1. Giới thiệu chung về polysaccharide	8
1.2.2. Con đường sinh tổng hợp EPS	9
1.2.3. Các phương pháp thu nhận EPS.....	11
1.2.4. Hoạt tính sinh học của EPS.....	12
1.3. Mối liên hệ giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học của EPS	14
1.3.1. Phương pháp xác định thành phần đơn phân của EPS từ nấm <i>C. sinensis</i> ...15	
1.3.2. Phương pháp xác định cấu trúc của EPS	17
1.3.3. Mối liên hệ giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học của EPS có nguồn gốc từ nấm <i>C. sinensis</i>	20
1.4. Các phương pháp cải thiện hoạt tính sinh học của EPS	21
1.4.1. Phương pháp tinh sạch EPS	21
1.4.2. Phương pháp cải biến cấu trúc hóa học của EPS	22
1.4.3. Phương pháp kích thích tăng sinh tổng hợp EPS.....	26
1.5. Tối ưu hoá môi trường nuôi cấy	26
1.5.1. Giới thiệu	26
1.5.2. Thiết kế thí nghiệm	26

CHƯƠNG II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	30
2.1. Vật liệu nghiên cứu	30
2.1.1. Chủng nấm sử dụng.....	30
2.1.2. Hóa chất và thiết bị.....	30
2.1.2.1. Hóa chất	30
2.1.2.2 Thiết bị và dụng cụ	31
2.1.3. Môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm <i>C. sinensis</i>	32
2.2. Quy trình thực nghiệm.....	33
2.3. Phương pháp nghiên cứu	33
2.3.1. Chuẩn bị giống cấp 1	33
2.3.2. Chuẩn bị giống cấp 2	34
2.3.3. Khảo sát nguồn nitơ thích hợp trong nuôi cấy nấm <i>C. sinensis</i> để thu nhận EPS có hoạt tính sinh học	34
2.3.4. Thu nhận EPS.....	35
2.3.5. Định lượng đường tổng	35
2.3.6. Định lượng protein	36
2.3.7. Khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do ABTS ⁺	37
2.3.8. Thu nhận và tinh sạch EPS	38
2.3.8.1. Thu nhận phân đoạn EPS bằng sắc ký lọc gel.....	38
2.3.8.2. Thu nhận phân đoạn EPS bằng kỹ thuật lọc membrane theo phương pháp lọc tiếp tuyến	38
2.3.9. Cải biến sulfate hóa EPS	39
2.3.9.1. Tạo dẫn xuất EPS sulfate hóa	39
2.3.9.2. Xác định độ thay thế (DS).....	39
2.3.10. Nuôi cấy kích thích tăng sinh tổng hợp EPS bằng dầu thực vật	41

2.3.10.1. Khảo sát ảnh hưởng của dầu thực vật lên phát triển và tạo EPS trong nuôi cấy lỏng-tĩnh <i>C. sinensis</i>	41
2.3.10.2. Tách chiết EPS từ nuôi cấy <i>C. sinensis</i> bổ sung dầu	42
2.3.11. Khảo sát loại protein khởi phức với EPS	44
2.3.12. Đánh giá hoạt tính kháng phân bào của các phân đoạn EPS	45
2.3.13. Thử nghiệm apoptosis tế bào của các phân đoạn EPS.....	46
2.3.14. Khảo sát soạt tính ức chế Tyrosinase của các phân đoạn EPS.....	47
2.3.15. Xác định thành phần đường đơn của EPS.....	48
2.3.16. Xác định và dự đoán cấu trúc và liên kết của EPS	49
2.3.17. Xác định cấu trúc tổng thể của EPS.....	50
2.3.18. Phương pháp xử lý số liệu.....	50

CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khảo sát điều kiện nuôi cấy lỏng-tĩnh <i>C. sinensis</i>	51
3.1.1. Ảnh hưởng của nguồn N đến tạo sinh khối và phức EPS-protein.....	51
3.1.2. Ảnh hưởng của nguồn N đến hàm lượng EPS trong phức EPS-protein	52
3.1.3. Ảnh hưởng của nguồn N đến hoạt tính kháng oxy hóa <i>in vitro</i> phức EPS-protein	54
3.2. Khảo sát nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm <i>C. sinensis</i> kích thích tăng sinh tổng hợp và hoạt tính sinh học của EPS bằng dầu thực vật.....	57
3.2.1. Sự thay đổi hàm lượng sinh khối và EPS của nấm <i>C. sinensis</i> trong môi trường nuôi cấy có bổ sung dầu thực vật.....	57
3.2.1.1. Kết quả khảo sát trên môi trường bổ sung dầu dừa.....	58
3.2.1.2. Kết quả khảo sát trên môi trường bổ sung dầu hướng dương.....	59
3.2.1.3. Kết quả khảo sát trên môi trường bổ sung dầu ô liu.....	60
3.2.2. Khảo sát hàm lượng polysaccharide và protein trong tủa EPS thu từ các môi trường bổ sung dầu.....	61

3.2.3. Khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do ABTS ⁺ của tủa phức protein-EPS thu được từ 3 môi trường bổ sung dầu.....	63
3.2.4. Khảo sát thời gian thích hợp thu nhận sinh khối và EPS trong dịch nuôi cấy bổ sung dầu ô liu.....	66
3.3. Tối ưu hoá khả năng tổng hợp EPS trong môi trường bổ sung dầu ô liu	68
3.3.1. Kết quả sàng lọc yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng sinh khối và EPS..	68
3.3.2. Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy bằng đáp ứng bề mặt Box-Behnken..	70
3.3.3. Hàm lượng polysaccharide và protein của EPS của 15 nghiệm thức bổ sung dầu.....	73
3.3.4. Hoạt tính bắt gốc tự do ABTS ⁺ của 15 nghiệm thức bổ sung dầu.....	74
3.4. Xây dựng quy trình tách chiết EPS từ môi trường bổ sung dầu ô liu.....	76
3.4.1. Kết quả xác định dung môi loại dầu.....	76
3.4.2. Khảo sát hàm lượng polysaccharide và lipid trong dịch nuôi cấy nấm sau khi loại dầu.....	78
3.4.3. Khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do ABTS ⁺ của các mẫu loại dầu	80
3.4.4. Khảo sát thu nhận phức EPS-protein.....	81
3.5. Thu nhận, tinh sạch và cải biến sulfate hóa nâng cao hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS	83
3.5.1. Thu nhận và tinh sạch EPS.....	83
3.5.1.1. Khảo sát nồng độ TCA dùng để loại protein khỏi phức EPS.....	83
3.5.1.2. Khảo sát loại protein khỏi phức EPS bằng phương pháp Sevag	84
3.5.1.3. Khảo sát nồng độ enzyme Alcalase để loại protein khỏi phức EPS	85
3.5.2. Thu nhận và khảo sát hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS	86

3.5.2.1. Thu nhận các phân đoạn EPS bằng lọc gel.....	86
3.5.2.2. Thu nhận các phân đoạn EPS bằng lọc gel sau khi loại protein bằng Alcalase 20 UI/ml.....	87
3.5.2.3. Hoạt tính bắt gốc tự do ABTS ⁺ , hàm lượng polysaccharide và protein của phân đoạn EPS I và EPS II	88
3.5.2.4. Khảo sát hoạt tính kháng phân bào của phân đoạn EPS I và EPS II ...	89
3.5.3. Khảo sát thu nhận và tinh sạch phân đoạn EPS từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm <i>C. sinensis</i> bằng lọc tiếp tuyến	91
3.6. Kết quả cải biến sulfate hóa của các phân đoạn EPS sau lọc tiếp tuyến.....	92
3.6.1. Kết quả sulfate hóa phân đoạn < 100 kDa.....	93
3.6.2. Kết quả sulfate hóa phân đoạn 100 -750 kDa.....	93
3.6.3. Kết quả sulfate hóa phân đoạn > 750 kDa.....	95
3.6.4. Kết quả khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do ABTS ⁺ của 3 phân đoạn EPS sau khi được sulfate hóa.....	97
3.6.5. Khảo sát hoạt tính kháng Tyrosinase của 3 phân đoạn EPS sau khi được sulfate hóa.....	98
3.7. Xác định thành phần cấu tạo và cấu trúc hóa học của EPS từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh <i>C. sinensis</i>	100
3.7.1. Khảo sát đơn vị thành phần đường đơn của EPS	101
3.7.2. Xác định các dạng liên kết glycoside trong EPS	102
3.7.3. Khảo sát cấu trúc của EPS bằng NMR	105
3.8. Bàn luận kết quả nghiên cứu của luận án và đề xuất quy trình công nghệ nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm <i>C. sinensis</i> tạo EPS có hoạt tính sinh học	109
CHƯƠNG IV: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	119
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	120
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	121
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	122
PHỤ LỤC	130

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ABTS ⁺	2,2 – azinobis – (3 – ethylbenzothiazoline – 6 – sulphonic acid)
TCA	Trichloroacetic acid
CP	Cordyceps polysaccharide
EPS	Exopolysaccharide
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
IL	Interleukin
IPS	Intracellular polysaccharide
GPC	Gel Permeation Chromatography
LDL	Low – density lipoprotein
MEA	Malt extract agar
MDA	Malodialdehyd
MW	Molecular Weight: Trọng lượng phân tử
NK	Natural killer
OD	Optical density: mật độ quang học
<i>C. sinensis</i>	<i>Cordyceps sinensis</i>
CBB	Coomassine Brilliant Blue
PDA	Potato dextrose agar
PDYA	Potato dextrose yeast extract agar
PE	Petroleum ether
PSP	Phức polysaccharide-protein
TCA	Trichloroacetic acid
Tw	Tween 80
YEA	Yeast extract agar
UDP	Uridine-diphosphate
SKK	Sinh khối khô

DANH MỤC BẢNG

<i>Bảng 1.1.</i> Các hoạt chất chính và dược tính của chúng trong <i>C. sinensis</i>	5
<i>Bảng 1.2.</i> Nghiên cứu nuôi cấy lỏng sợi nấm của <i>C. sinensis</i>	7
<i>Bảng 1.3.</i> Phản ứng tạo dẫn xuất glucose với PMP	16
<i>Bảng 1.4.</i> Exopolysaccharide (EPS) từ nấm <i>C. sinensis</i> : nguồn, cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học của chúng	21
<i>Bảng 1.5.</i> Các phương pháp cải biến polysaccharide	23
<i>Bảng 2.1.</i> Thành phần 3 môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh <i>C. sinensis</i>	34
<i>Bảng 2.2.</i> Bố trí thí nghiệm xác định hoạt tính bắt gốc ABTS ⁺	37
<i>Bảng 2.3.</i> Bố trí thí nghiệm	39
<i>Bảng 2.4.</i> Bố trí thí nghiệm xác định hàm lượng SO ₃ ²⁻ trong mẫu	40
<i>Bảng 2.5.</i> Bố trí thí nghiệm loại dầu	43
<i>Bảng 2.6.</i> Bố trí thí nghiệm xác định tỷ lệ tua.....	43
<i>Bảng 3.1.</i> Hàm lượng polysaccharide, protein trong EPS	62
<i>Bảng 3.2.</i> Các biến trong ma trận Plackett-Burman	69
<i>Bảng 3.3.</i> Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman	70
<i>Bảng 3.4.</i> Thiết kế Box – Behnken	71
<i>Bảng 3.5.</i> Mối liên hệ giữa các thành phần môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh <i>C. sinensis</i>	71
<i>Bảng 3.6.</i> Hàm lượng polysaccharide và protein của EPS	74
<i>Bảng 3.7.</i> Phần trăm bắt gốc tự do của các mẫu EPS	75
<i>Bảng 3.8.</i> Kết quả nuôi cấy nấm <i>C. sinensis</i> trên môi trường dự đoán tối ưu.....	76
<i>Bảng 3.9.</i> Giá trị % bắt gốc tự do ABTS ⁺ của các mẫu loại dầu	80
<i>Bảng 3.10.</i> Khối lượng polysaccharide và protein trong mẫu EPS-protein thô	82
<i>Bảng 3.11.</i> So sánh khả năng loại protein của TCA 10 %, Sevag 4:1 và Alcalase 20 UI/mL.....	86
<i>Bảng 3.12.</i> % bắt gốc tự do, hàm lượng polysaccharide và hàm lượng protein trong EPS thô và phân đoạn EPS I, EPS II.....	88

<i>Bảng 3.13.</i> Thành phần hóa lý của 3 phân đoạn EPS lọc tiếp tuyến.....	91
<i>Bảng 3.14.</i> Kết quả sulfate hóa 3 phân đoạn EPS thu được sau lọc tiếp tuyến.....	96
<i>Bảng 3.15.</i> Khả năng kháng oxy hóa của 3 phân đoạn EPS sulfate hóa.....	97
<i>Bảng 3.16.</i> Hoạt tính ức chế Tyrosinase của 3 phân đoạn EPS sau khi sulfate hóa	99
<i>Bảng 3.17.</i> Thành phần đường đơn của 5 nghiệm thức môi trường (%)	101
<i>Bảng 3.18.</i> Các dạng liên kết glycoside trong EPS của 5 nghiệm thức môi trường.	103

DANH MỤC HÌNH

<i>Hình 1.1.</i> Vòng đời phát triển và quả thể nấm <i>C. sinensis</i>	4
<i>Hình 1.2.</i> Con đường sinh tổng hợp EPS ở vi khuẩn <i>Bifidobacterium</i> IPLA-R1	11
<i>Hình 1.3.</i> Phản ứng tạo dẫn xuất glucose với PMP.....	16
<i>Hình 1.4.</i> Cấu trúc hóa học của fucoidan	25
<i>Hình 1.5.</i> Cấu trúc đơn vị disaccharide của ulvan	25
<i>Hình 2.1.</i> Sơ đồ nghiên cứu tổng quát của luận án	33
<i>Hình 2.2.</i> Sơ đồ tách chiết EPS từ dịch nuôi cấy <i>C. sinensis</i> bổ sung dầu.....	42
<i>Hình 2.3.</i> Tách dầu ra khỏi dịch nuôi cấy bằng dung môi hữu cơ.....	42
<i>Hình 2.4.</i> Quá trình oxy hóa phenol do Tyrosinase xúc tác	47
<i>Hình 2.5.</i> Phản ứng thủy phân disaccharide	49
<i>Hình 2.6.</i> Các đường đơn sau khi bị acetyl hoá.....	49
<i>Hình 3.1.</i> Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến tạo sinh khối (A) và phức EPS (B) theo thời gian bởi nấm <i>C. sinensis</i> nuôi cấy lỏng-tĩnh.....	52
<i>Hình 3.2.</i> 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.....	54
<i>Hình 3.3.</i> Hoạt tính bắt gốc tự do ABTS ⁺ của phức EPS thu nhận từ các môi trường nuôi cấy khác nhau ở ngày thứ 40.....	55
<i>Hình 3.4.</i> Ảnh hưởng của dầu dừa đến tạo sinh khối và tổng hợp EPS của <i>C. sinensis</i> nuôi cấy lỏng-tĩnh.....	58
<i>Hình 3.5.</i> Sự thay đổi về hàm lượng sinh khối khô và EPS khi bổ sung dầu hướng dương	59
<i>Hình 3.6.</i> Sự thay đổi năng suất sinh khối khô và EPS khi bổ sung dầu ô liu	60
<i>Hình 3.7.</i> Kết quả kháng oxy hoá của EPS từ môi trường bổ sung dầu dừa.....	63
<i>Hình 3.8.</i> Kết quả kháng oxy hoá của EPS từ môi trường bổ sung dầu hướng dương	64
<i>Hình 3.9.</i> Kết quả kháng oxy hoá của EPS thu từ môi trường bổ sung dầu ô liu.....	65
<i>Hình 3.10.</i> Hàm lượng sinh khối khô và EPS của <i>C. sinensis</i> nuôi cấy lỏng tĩnh theo thời gian	66

<i>Hình 3.11.</i> Mặt đáp ứng hàm lượng EPS theo hai yếu tố.....	72
<i>Hình 3.12.</i> Giá trị IC ₅₀ của EPS từ thí nghiệm Box – Behnken.....	75
<i>Hình 3.13.</i> Sự tách lớp của các dung môi khảo sát theo thời gian.....	77
<i>Hình 3.14.</i> Hàm lượng polysaccharide của dịch nuôi cấy trước và sau khi loại dầu	79
<i>Hình 3.15.</i> Hàm lượng lipid của mẫu EPS trước và sau khi loại dầu	79
<i>Hình 3.16.</i> Khối lượng phức EPS-protein thu được theo tỷ lệ tua khác nhau.....	80
<i>Hình 3.17.</i> Kết quả khảo sát nồng độ TCA loại protein.....	83
<i>Hình 3.18.</i> Kết quả loại protein bằng phương pháp Sevag	84
<i>Hình 3.19.</i> Kết quả khảo sát loại protein bằng Alcalase	85
<i>Hình 3.20.</i> Tách phân đoạn EPS bằng sắc ký lọc gel Sephadex G-100	87
<i>Hình 3.21.</i> Phân đoạn lọc gel EPS sau khi loại protein bằng Alcalase 20 UI/ml.....	88
<i>Hình 3.22.</i> Hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan Hep-G2 của 2 phân đoạn EPS ...	89
<i>Hình 3.23.</i> Giá trị IC ₅₀ của 2 phân đoạn trên dòng tế bào ung thư gan Hep-G2	90
<i>Hình 3.24.</i> Phổ FT-IR phân đoạn 100 kDa trước và sau sulfate hóa.	93
<i>Hình 3.25.</i> Phổ FT-IR phân đoạn 100 – 750 kDa trước và sau khi sulfate hóa.	94
<i>Hình 3.26.</i> Phổ FT-IR phân đoạn EPS trên 750 kDa trước và sau khi sulfate hóa...	95
<i>Hình 3.27.</i> Tỷ lệ thành phần đường đơn của EPS từ dịch nuôi cấy nấm <i>C. sinensis</i> trên 5 nguồn cơ chất khác nhau.....	101
<i>Hình 3.28.</i> Phổ ¹ H NMR của EPS ở 5 nghiệm thức môi trường chứa glucose, fructose, sucrose, peptone, hỗn hợp của chúng và nghiệm thức đối chứng.	108
<i>Hình 3.29.</i> Đề xuất quy trình công nghệ nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm <i>C. sinensis</i> tạo EPS có hoạt tính sinh học.....	118

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cordyceps sinensis – tên thường gọi là Đông trùng hạ thảo (tên đồng danh *Ophiocordyceps sinensis*), là một loài nấm thuộc lớp nấm túi Ascomycetes ký sinh trên loài sâu bướm thuộc bộ cánh vẩy Lepidoptera. Đây là nấm dược liệu quý hiếm được ghi nhận trong Y học cổ truyền Trung Hoa. Nghiên cứu hiện đại đã chứng minh *C. sinensis* có tác dụng tốt cho sức khỏe, tăng cường miễn dịch, chống suy giảm trí nhớ, làm chậm quá trình lão hóa, bảo vệ não và tim trong điều kiện oxy khí quyển.... Những tác dụng quý này được cho là do nấm có sự đa dạng về thành phần các hợp chất có hoạt tính sinh học như cordycepin, adenosine, polysaccharide, ergosterol, protein, acid amin và các nguyên tố vi lượng.

Hiện nay, có rất nhiều sản phẩm dược và thực phẩm chức năng được phát triển từ Đông trùng hạ thảo. Đa số những sản phẩm này có nguồn gốc từ quả thể tự nhiên của nấm *C. sinensis*. Trong bối cảnh sự khan hiếm nguồn nấm tự nhiên do biến đổi khí hậu cũng như do nhu cầu sử dụng gia tăng, công nghệ nuôi cấy lỏng nhân tạo nuôi sinh khối nấm được xem là giải pháp thay thế hiệu quả hiện nay. Bằng chứng, trong những năm gần đây một vài dòng sản phẩm có nguồn gốc từ sinh khối nấm *C. sinensis* đã có mặt trên thị trường cả trong và ngoài nước. 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. Ngoài ra, hoạt chất này có những tác dụng quan trọng khác như kháng viêm, giảm mệt mỏi, bảo vệ thận và bảo vệ khỏi tia phóng xạ.

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 hãy 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. Luận án sẽ thực hiện 4 nội dung nghiên cứu sau:

- 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 sulfate 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 công nghệ nuôi cấy lỏng-tĩnh *C. sinensis* tạo EPS có hoạt tính sinh học.

CHƯƠNG 1 – TỔNG QUAN TÀI LIỆU

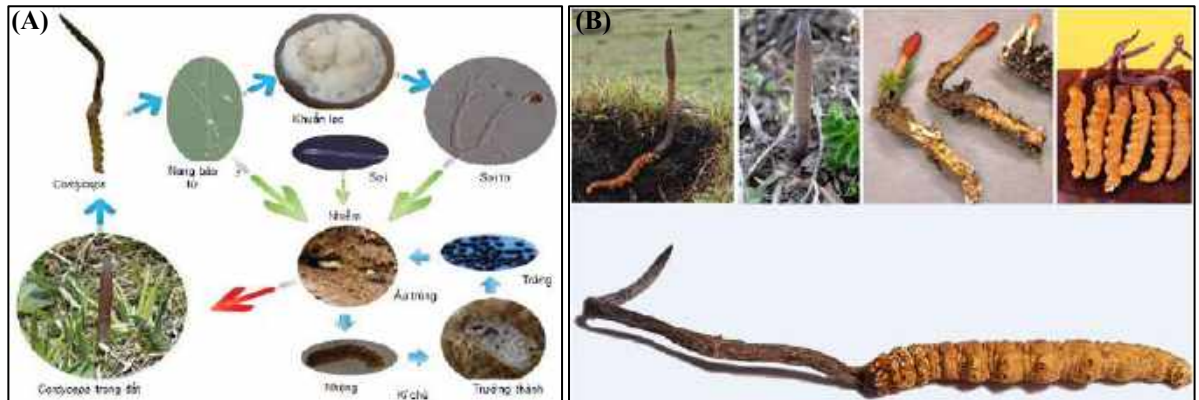
1.1. Giới thiệu về nấm *Cordyceps sinensis*

1.1.1. Nguồn gốc và vòng đời phát triển

Đầu thế kỉ XIV, học giả người Italia, Pier Andrea Saccarado đặt tên cho một loài nấm tìm thấy ở Tây Tạng, Trung Quốc là “*Cordyceps sinensis*”. Tên *Cordyceps* có nguồn gốc từ tiếng Latin bao gồm hai từ là “cord” và “ceps” có nghĩa tương ứng là “thân” và “đầu”. Các từ Latin kết hợp với nhau mô tả chính xác quá trình xâm nhập của nấm *Cordyceps*. *Cordyceps* là loài nấm nội ký sinh trên ấu trùng và các cá thể trưởng thành của nhiều loài côn trùng khác nhau [1].

Năm 1878, các nhà khoa học đã phát hiện ra nấm này ký sinh trên ấu trùng của một loài côn trùng thuộc chi *Thitarodes*. Thường dễ gặp nhất ở sâu non loài *T. baimaensis* hoặc *T. armoricanus*. Ngoài ra, hơn 50 loài khác thuộc họ Hepialidae (Lepidoptera) cũng bị nấm thuộc chi *Cordyceps* ký sinh. Vào cuối mùa thu, các chất trên biểu bì của sâu non họ ngài đêm tương tác với các bào tử nấm và hình thành các sợi nấm, các sợi nấm đâm sâu vào ấu trùng. Đến đầu mùa hè năm sau, nấm phát triển mạnh và gây chết vật chủ, sau đó hình thành quả thể, phát triển và chui ra khỏi mặt đất, nhưng gốc vẫn dính vào đầu vật chủ. Do đó nhiều người gọi là nấm “Đông trùng hạ thảo” bởi vì mùa đông nấm sống trong cơ thể côn trùng, mùa hè phát triển ra ngoài cơ thể giống như cây cỏ [2]. Tại Trung Quốc *C. sinensis* có tên gọi là “DongChongXiaCao”, tại Nhật Bản *C. sinensis* có tên gọi là “Tockukaso” đều có nghĩa là Đông trùng hạ thảo [3] (hình 1.1A).

Năm 2007 Sung và cộng sự đề nghị đổi tên *C. sinensis* thành *Ophiocordyceps sinensis* [4]. Dẫu vậy, danh pháp *C. sinensis* vẫn thường được các nhà nấm học sử dụng trong các báo cáo khoa học như tên đồng danh của *O. sinensis*. Hiện nay đã ghi nhận hơn 750 loài *Cordyceps* trên thế giới như *C. sinensis*, *C. militaris*, *C. martialis*, *C. hawkesii*, *C. liangshanensis*, *C. barnesii*, *C. cicadicola*, *C. gracilis*, *C. ramosa*, *C. ophioglossoides* và *C. gunnii*... [5]. Tuy nhiên, cho đến nay người ta mới chỉ nghiên cứu nhiều nhất về 2 loài Đông trùng hạ thảo *C. sinensis* và Nhung trùng hạ thảo *C. militaris*.



Hình 1.1. (A) Vòng đời phát triển và (B) quả thể nấm *C. sinensis* [6]

Năm 2010, một nhóm các nhà nấm học của Mỹ, Thái Lan và Hàn Quốc nghiên cứu và sắp xếp lại hệ thống của nhóm nấm *Cordyceps*. Theo kết quả nghiên cứu này, toàn bộ các loài thuộc nhóm nấm *Cordyceps* được phân chia lại thuộc về 3 họ: họ Clavicipitaceae với các chi *Metacordyceps*, *Hypocrella*, *Regiocrella* và *Torrubiella*; họ Cordycipitaceae với chi *Cordyceps*; họ Ophiocordycipitaceae với 2 chi *Cordyceps* và *Elaphocordyceps* [7] (hình 1.1 B).

Phân loại

Giới: Fungi

Ngành: Ascomycota

Lớp: Sordariomycetes

Bộ: Hypocreales

Họ: Ophiocordycipitaceae

Chi: *Cordyceps*

Loài: *Cordyceps sinensis* (tên đồng danh *Ophiocordyceps sinensis*)

Phức hợp ký sinh của nấm và vật chủ thường được tìm thấy ở thảo nguyên với độ cao 3000 – 5000 m so với mực nước biển. Chúng phân bố chủ yếu ở Tây Tạng, Thanh Hải, Tứ Xuyên, Vân Nam, Cam Túc (Trung Quốc), Himalaya và Ấn Độ... đặc biệt phong phú và đa dạng trong rừng ôn đới và nhiệt đới ẩm [8].

1.1.2. Thành phần hoạt chất có hoạt tính sinh học

Năm 1964, y học cổ truyền Trung Quốc đã sử dụng *C. sinensis* như một loại dược liệu dùng để điều trị các rối loạn về hô hấp, thận, gan, các bệnh về tim mạch, yếu sinh lý và cao huyết áp. Bên cạnh đó, nghiên cứu hiện đại cũng đã chứng minh *C. sinensis* có các hoạt tính như điều hòa miễn dịch, kháng oxy hóa, ức chế hình thành khối u, kháng khuẩn, kháng nấm và kháng di căn. Những tác dụng có lợi đó là do sự đa dạng về thành phần các hợp chất có hoạt tính sinh học như polysaccharide, cordycepin, nucleoside, adenosine, hydroxyethyl - adenosine, acid cordycepic, sterol, acid amin, vitamin và nguyên tố vi lượng... (Bảng 1.1) [9]. Trong đó, nhóm hoạt chất polysaccharide được nghiên cứu nhiều bởi chúng có hoạt tính sinh học cao như kháng ung thư, kháng di căn, kháng oxy hóa, điều hòa hệ thống miễn dịch, giảm đường huyết, giảm cholesterol trong máu [10].

Bảng 1.1. Các hoạt chất chính và dược tính của chúng trong *C. sinensis*

Nhóm chất	Hoạt tính
Nucleoside	Kháng ung thư; làm suy giảm các kích thích của tế bào thần kinh hệ thần kinh trung ương; ức chế phóng thích các chất dẫn truyền thần kinh khác nhau; chống co giật; kích thích sự phát triển của sợi thần kinh <i>in vitro</i> và trong hệ thống thần kinh trung ương người
Polysaccharide	Kháng oxy hóa, kháng ung thư; tăng miễn dịch, hạ đường huyết; kháng viêm và điều hòa miễn dịch.
Ergosterol	Gây độc tế bào, kháng virus và tác dụng kháng loạn nhịp tim; giảm globulin A trong bệnh lý thận, tiền chất của vitamin D
Mannitol	Lợi tiểu, kháng ho và kháng oxy hóa
Peptide	Kháng ung thư và tiềm năng miễn dịch
Cordycepin	Kháng phân bào, kháng ung thư

1.1.3. Nghiên cứu nuôi cấy nhân tạo nấm *C. sinensis*

Hiện nay, *C. sinensis* khan hiếm do nhu cầu sử dụng ngày càng tăng của con người, do đó đã có nhiều nỗ lực tìm ra phương pháp nuôi cấy nhân tạo *C. sinensis* thay thế nguồn nấm tự nhiên bởi vì loài nấm này rất khó thu nhận do kích thước nhỏ, thời điểm tăng trưởng chậm và tùy thuộc rất nhiều vào điều kiện khí hậu. Nghiên cứu cho thấy nấm *C. sinensis* có thể phân lập từ tự nhiên, sau đó được nuôi cấy quy mô lớn bằng công nghệ lên men - những giá trị sinh học của sợi nấm nuôi cấy nhân tạo tương tự như những loài *Cordyceps* tìm thấy trong tự nhiên.

Nhu cầu dinh dưỡng cho sự tăng trưởng sợi nấm phụ thuộc vào chủng và điều kiện nuôi cấy, do đó, kiểm soát được những yếu tố nuôi cấy sẽ kiểm soát được chất lượng sản phẩm. Nguồn carbon là thành phần dinh dưỡng ảnh hưởng nhất đến quá trình sinh sống của nấm, cần cho nấm tổng hợp bộ khung tế bào, biến dưỡng và tạo năng lượng. Các loài nấm khác nhau có nhu cầu sử dụng các nguồn carbon khác nhau. Trong khi đó, nguồn nitơ là một trong những thành phần chính có vai trò quan trọng trong điều hòa sinh học, chi phối sự phát triển của tế bào, hình thành các sản phẩm và enzyme tế bào. Nấm có thể sử dụng các nguồn nitơ khác nhau để sinh trưởng như ammonium, nitrate, peptide và các acid amin. Ngoài ra nấm cũng sử dụng một số khoáng chất và vitamin để tăng trưởng [11].

Hiện nay, hai phương pháp nuôi cấy nấm được sử dụng chủ yếu là nuôi cấy lỏng và nuôi cấy bán rắn:

Phương pháp nuôi cấy lỏng: một số nghiên cứu đã được báo cáo trong vòng 10 năm qua nuôi cấy lỏng sợi nấm của *C. sinensis* là một trong những chiến lược hiệu quả để tăng tổng hợp các hợp chất sinh học mong muốn vì dễ dàng theo dõi các điều kiện nuôi cấy và tối ưu hóa các yếu tố lý hóa môi trường (Bảng 1.2) [2], [12]. Phương pháp nuôi cấy chủ yếu sử dụng tại Trung Quốc là nuôi cấy lỏng, trong đó một lượng mô nhỏ *Cordyceps* được cấy vào môi trường lỏng vô trùng. Các sợi nấm *Cordyceps* được thu hoạch bằng cách lọc dịch nuôi cấy, sau đó sấy khô và nghiền thành bột mịn. Sau khi sấy khô, bột có thể sử dụng trực tiếp, hoặc tiếp tục xử lý bằng nước nóng hay một số dung môi khác, các cao chiết ở dạng lỏng hoặc được sấy khô. Phương pháp này tạo ra sản phẩm chất lượng tốt, quy mô lớn và dễ kiểm soát các thông số tăng trưởng, tạo ra sản phẩm đồng nhất có chất lượng ít biến đổi [13].

Bảng 1.2. Nghiên cứu nuôi cấy lỏng sợi nấm của *C. sinensis*

Giống	Thành phần môi trường	Nhiệt độ (°C)	pH	Phương pháp	Thời gian (ngày)	Sinh khối (g/L)	EPS (g/L)	Tham khảo
<i>C. sinensis</i>	Saccharose 20, bột bắp 25, CaCl ₂ 0,78, MgSO ₄ .7H ₂ O 1,73 (g/L)	20	4,0	BỂ khuấy 150 rpm	16	20,9	4,1	Kim và Yun (2005)
<i>C. sinensis</i> 16	Saccharose 2 %, cao nấm men 0,9 %, K ₂ HPO ₄ 0,3 %, CaCl ₂ 0,4 % (w/v)	25	-	BỂ khuấy 150 rpm	5	54,0	28,4	Cha và cộng sự (2007)
<i>C. sinensis</i> Cs-HK1	Glucose 40, peptone 5, cao nấm men 5, KH ₂ PO ₄ 1, MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5 (g/L), NH ₄ Cl 10 mmol/l	22 - 25	4,4	BỂ khuấy 150 rpm	7	23,2	3,4	Leung và cộng sự (2007)
<i>C. sinensis</i>	Saccharose 20, cao nấm men 2, KH ₂ PO ₄ 4 (g/L)	26	7,0	BỂ khuấy 130 rpm	4	12,3	24,5	Wu, Chen và Hao (2009)
<i>C. sinensis</i>	Glucose 30, peptone 15, KH ₂ PO ₄ 3, MgSO ₄ .7H ₂ O 1,5, khoai tây 200 (g/L)	-	-	BỂ khuấy		25,0	2,8	Yin và cộng sự (2013)

Phương pháp nuôi cấy bán rắn: gần đây quả thể nấm *C. sinensis* đã được nuôi cấy thành công bởi các nhà khoa học Nhật Bản và Mỹ. Nấm được đưa vào môi trường bán rắn đã khử trùng, thường là hạt ngũ cốc hoặc hỗn hợp ngũ cốc, ấu trùng

côn trùng (phần còn lại của con tằm), với độ ẩm tương đối 45 – 50 %. Mặc dù nuôi cấy nấm *C. sinensis* trên môi trường bán rắn giải quyết được những vấn đề thường gặp so với nuôi cấy trên môi trường lỏng như sự thất thoát một số hợp chất sinh học vào môi trường nuôi cấy, tuy nhiên, thời điểm phát triển của sợi nấm *C. sinensis* trên môi trường bán rắn là rất chậm và hiệu quả kinh tế kém [14].

Nuôi cấy lỏng thuận lợi hơn cho sợi nấm phát triển mạnh vì nuôi cấy trong không gian nhỏ gọn, thời điểm ngắn hơn và giảm tỷ lệ nhiễm [5]. Vì vậy, nuôi cấy nhân tạo sợi nấm *C. sinensis* trong môi trường lỏng là phương pháp có tiềm năng để nhân sinh khối nấm được liệu này.

1.2. Tổng quan về polysaccharide ngoại bào – exopolysaccharide của nấm *C. sinensis*

1.2.1. Giới thiệu chung về polysaccharide

Polysaccharide là những cấu trúc carbohydrate cao phân tử, được tạo thành từ những đơn vị đường đơn lặp đi lặp lại, liên kết với nhau bằng các cầu nối glucoside. Những cấu trúc này thường có dạng mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Chúng được tổng hợp ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình sống của sinh vật [15]. Polysaccharide thường có màu nâu, không mùi, đa số tan tốt trong nước nóng, không tan trong các dung môi hữu cơ như methanol, benzen, pyridin, chloroform và hexan. Các polysaccharide có độ hòa tan khác nhau, một số dễ hòa tan trong nước lạnh, số khác hòa tan tốt trong nước nóng, tuy nhiên có những polysaccharide không hòa tan trong nước.

Polysaccharide của vi sinh vật được chia thành 3 nhóm chính dựa vào vị trí của chúng trong tế bào: polysaccharide nội bào cung cấp nguồn carbon và năng lượng cho tế bào; polysaccharide vách tế bào chứa peptidoglycan, acid teichoic và lipopolysaccharide. EPS là những polysaccharide được tổng hợp trong tế bào rồi tiết ra môi trường xung quanh, được công bố đầu tiên vào năm 1861 bởi Pasteur, mô tả như là các chất chuyển hóa thứ cấp được tổng hợp chủ yếu từ cuối giai đoạn tăng trưởng đến ổn định của vi sinh vật. Trong đó, EPS có một số ưu điểm vượt trội hơn hai nhóm còn lại bao gồm tổng hợp số lượng lớn trong thời điểm ngắn, dễ phân lập và thu nhận [16].

EPS có thành phần và cấu trúc rất đa dạng, chia thành hai nhóm: homopolysaccharide (polysaccharide đồng hình) và heteropolysaccharide (polysaccharide dị hình). Homopolysaccharide chỉ chứa các đường đơn cùng loại hay khác loại. Nói cách khác là chỉ có carbohydrate trong thành phần. Heteropolysaccharide trong thành phần ngoài carbohydrate còn có các thành phần phi carbohydrate như các gốc acetate, phosphate, sulfate, protein và amin ... [15].

Polysaccharide trong quả thể hoặc sợi nấm *C. sinensis* chiếm khoảng 3 – 8 % trọng lượng khô. Polysaccharide ở *Cordyceps* là một phức hợp có hoạt tính sinh học, gồm các loại đường đơn giản ở các tỷ lệ khác nhau, bao gồm mannose, glucose và fructose [17], [18]. Polysaccharide được sử dụng như tiêu chuẩn để kiểm soát chất lượng sinh khối nấm *C. sinensis* bởi sự phức tạp về cấu trúc và khối lượng phân tử [1]. Polysaccharide từ tự nhiên và nuôi cấy *C. sinensis* được chứng minh có đặc điểm hóa học tương tự nhau thông qua phương pháp “Bản đồ saccharide”. Chúng chứa chủ yếu 1,4- β -D- glucoside, 1,4- α - glucoside, 1,6- α - glucoside và các liên kết 1,4- β -D-mannoside [19].

1.2.2. Con đường sinh tổng hợp exopolysaccharide

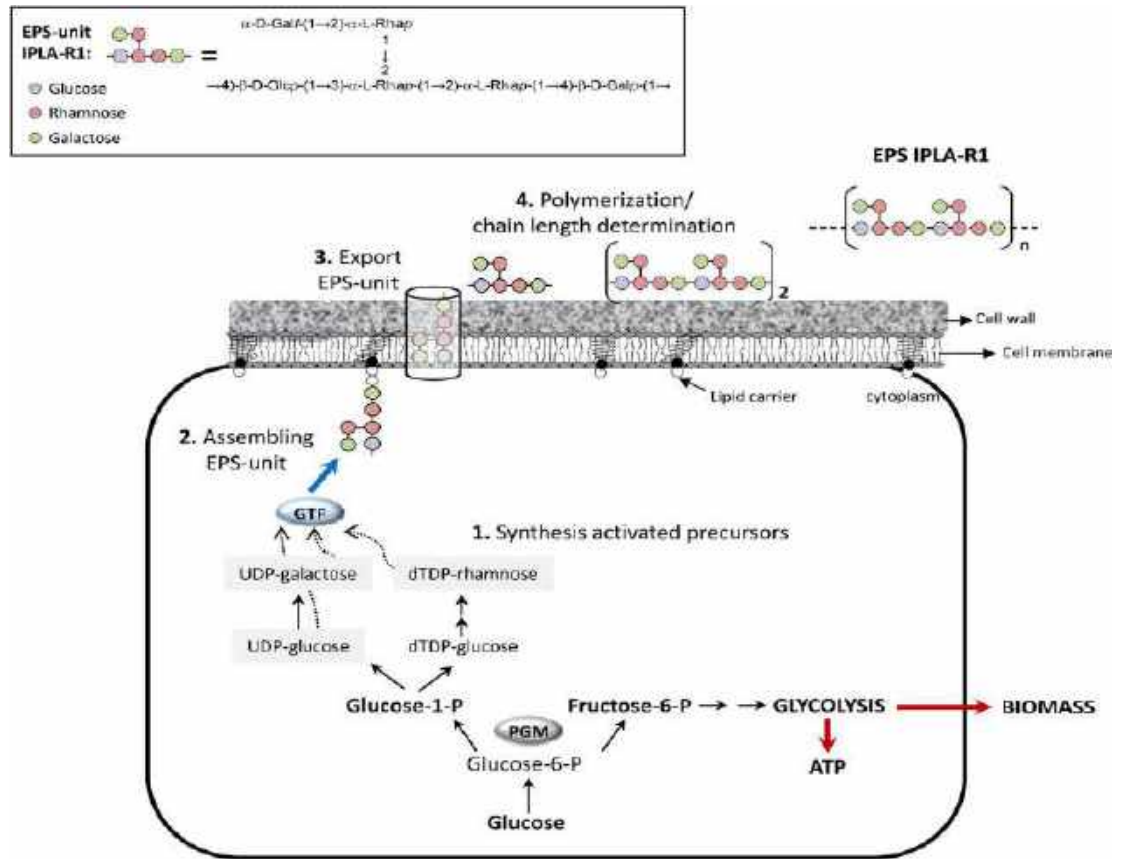
Vi sinh vật sử dụng nguồn carbon chủ yếu là glucose để tích tụ sinh khối và tổng hợp EPS, ngoài ra vi sinh vật còn sử dụng các nguồn carbon khác như saccharose, maltose, lactose, fructose, galactose, xylose, cellobiose, sorbitol, mannitol. Trong quá trình chuyển hóa, tế bào nấm chuyển đường đơn thành uridine-diphosphate (UDP) - đường đơn để tổng hợp EPS. Còn các đường đơn như galactose, mannose được chuyển thành UDP-galactose và UDP-mannose, hoặc UDP-glucose rồi mới được hấp thụ [9]. Trong hầu hết các trường hợp, sự khác nhau về trọng lượng phân tử và thành phần đường của EPS phụ thuộc vào thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy khác nhau. Một số yếu tố ảnh hưởng lên sinh tổng hợp EPS của nấm *C. sinensis* bao gồm [20]:

- *Điều kiện nuôi cấy tạo EPS của nấm C. sinensis*: phụ thuộc vào nhiệt độ, pH, oxy, thời gian nuôi cấy... Sandfoxd (1979) cho rằng hầu hết các nấm tạo được EPS đều là hiếu khí hoặc kỵ khí tùy ý nên giới hạn mức oxy cung cấp sẽ gây bất lợi cho sinh tổng hợp EPS. Điều kiện pH từ 3,0 - 6,5 và nhiệt độ từ 22 – 30 °C là thích hợp để tổng hợp EPS. Không giống như EPS từ vi khuẩn, EPS từ nấm cần thời điểm ủ lâu hơn (4 - 15 ngày).

- *Thành phần môi trường*: Từng loại nấm trong họ *Cordyceps* tạo EPS sử dụng nguồn carbon và nguồn nitơ khác nhau. Trong đó *C. sinensis* sử dụng chủ yếu nguồn carbon là saccharose (20 mg/L) và nguồn nitơ từ bột ngô (25 mg/L). Ngoài ra vi lượng, dầu thực vật, NH_4^+ và vitamin cũng ảnh hưởng đáng kể lên nuôi cấy nấm *C. sinensis*.
- *Phương pháp nuôi cấy*: Sinh tổng hợp EPS của nấm *C. sinensis* xảy ra ở các mức độ khác nhau trong nuôi cấy lỏng, nuôi cấy lỏng tĩnh, nuôi cấy bán rắn và nuôi cấy rắn.

EPS được tổng hợp nội bào, sau đó tiết ra môi trường xung quanh, tuy nhiên có rất ít thông tin về con đường sinh tổng hợp EPS từ nấm. Hiện vẫn chưa có công bố chính thức nào về con đường sinh tổng hợp EPS tiết ra từ nấm *C. sinensis* vì sự phức tạp trong cấu trúc EPS và phức tạp trong xử lý các enzyme liên quan. Cho đến nay, nghiên cứu về EPS đều dựa vào con đường sinh tổng hợp EPS của vi khuẩn để dự đoán con đường sinh tổng hợp EPS của nấm nhờ vào sự tương đồng nguồn carbon sử dụng và hệ enzyme xúc tác.

Con đường sinh tổng hợp EPS của *Bifidobacterium* IPLA-R1 gồm bốn giai đoạn (Hình 1.2). Thông thường, bốn giai đoạn riêng biệt xảy ra trong khoang tế bào khác nhau: (1) sự hoạt hóa để tổng hợp các tiền chất, bao gồm sự phosphoryl hóa glucose thành glucose-6-phosphate (Glucose-6-P) bởi hexokinase. Một phần Glucose-6-P sẽ tham gia vào tạo sinh khối thông qua con đường đường phân. Phần khác sẽ chuyển hóa thành Glucose-1-P, là đầu vào con đường tổng hợp EPS. Uridine-5'-diphosphate pyrophosphorylase sẽ xúc tác chuyển Glucose-1-P thành UDP-Glucose, là đơn phân để tổng hợp EPS. (2) Sự lắp ráp các đơn vị EPS xảy ra nhờ enzyme glycosyltransferases (GTF) ở bên trong tế bào vi khuẩn. (3) Sự tiết các đơn vị EPS ra ngoài. (4) Tổng hợp EPS trên bề mặt tế bào [21].



Hình 1.2. Con đường sinh tổng hợp EPS ở vi khuẩn *Bifidobacterium* IPLA-R1

1.2.3. Các phương pháp thu nhận exopolysaccharide

Do EPS tủa trong dung môi hữu cơ, đặc biệt tủa trong ethanol nên hầu hết các nghiên cứu đều sử dụng ethanol để thu nhận EPS từ dịch nuôi cấy. Phân đoạn tủa EPS thô được tinh sạch bằng cách loại bỏ protein, loại màu và tinh sạch tách phân đoạn qua cột sắc ký như trao đổi ion, lọc gel và sắc ký ái lực. Các phân đoạn EPS sẽ được thổi ra khỏi cột sắc ký nhờ dung dịch đệm rửa giải thích hợp. Các phân đoạn EPS thu được sẽ được cô đặc, thẩm tách và đông khô [3,14,22,23,24,25].

Như vậy, thu nhận EPS từ nuôi cấy dịch nuôi cấy lỏng tĩnh nấm *C. sinensis* vẫn là một lĩnh vực nghiên cứu mới mẻ chưa được nghiên cứu nhiều. Do đó, vẫn cần phải đầu tư nghiên cứu nuôi cấy nấm *C. sinensis*. Ngoài việc nâng cao sản lượng EPS, cũng cần phải nghiên cứu cải thiện nâng cấp chất lượng của nó thông qua các biến đổi cấu trúc hóa học bằng phương pháp sinh học, hóa học hay sử dụng enzyme... để có thể chủ động tạo nguồn dược liệu có giá trị sử dụng trong dược phẩm và thực phẩm chức năng. Sau giai đoạn nuôi cấy tĩnh EPS tiết ra từ nấm *C. sinensis* sẽ được thu nhận và tinh sạch.

Theo Xiao và cộng sự (2003), Kim và Yun (2005), Lee và cộng sự (2009) dịch nuôi cấy nấm *Cordyceps* được thu nhận và ly tâm 8500 vòng/phút trong 20 phút. Dịch nổi sẽ được cô đặc còn 1/3 tổng thể tích ban đầu. Sau đó, bổ sung ethanol tuyệt đối với tỷ lệ 1:2, giữ ở 4 °C, trong 1 giờ và ly tâm trong khoảng 8.000-12.000 vòng/phút trong 20 phút. Loại tủa và dịch nổi được lọc qua màng lọc (Milipore 0,45 µm). Dịch sau khi lọc sẽ tủa với ethanol tuyệt đối theo tỷ lệ 1:4, lắc mạnh. Dung dịch tủa EPS được giữ 4 °C trong 24 giờ và tủa sẽ được thu nhận bằng cách ly tâm trong 20 phút. Tủa EPS nhận được sẽ được đông khô và xác định khối lượng [18].

Theo Belwal và cộng sự (2019), dịch nuôi cấy nấm được thu nhận theo các thời điểm khác nhau, sau đó lọc bằng giấy lọc Whatman 1. Dịch lọc sẽ được cô nước xuống còn ¼ thể tích ban đầu bằng máy cô quay ở nhiệt độ dưới 50 °C. Dịch sau khi cô được thẩm tách qua màng thẩm tách 12 – 14 kDa và tủa với ethanol tuyệt đối theo tỷ lệ 1:4, lắc mạnh và để qua đêm ở 4 °C. Tủa EPS được thu nhận bằng cách ly tâm 10,000 vòng/phút trong 10 phút, gạn bỏ dịch nổi. Tiến hành đông khô mẫu EPS thu được và xác định khối lượng của EPS.

Theo Negi và cộng sự (2009), sinh khối nấm được tách ra từ dịch môi trường lỏng bằng cách ly tâm 4000 vòng/phút trong 15 phút và dịch nổi lọc qua giấy lọc Whatman 1. Dịch sau khi lọc được tủa với ethanol 95 % theo tỷ lệ 1:5 (v/v), giữ lạnh ở 4 °C qua đêm. Tủa EPS sẽ được thu nhận bằng cách ly tâm như trên. Hàm lượng EPS được xác định bằng phương pháp phenol–acid sulfuric hấp thụ ở bước sóng 490 nm, lấy glucose làm chuẩn.

1.2.4. Hoạt tính sinh học của exopolysaccharide

Vai trò chính của EPS là bảo vệ tế bào trong môi trường sống. EPS được tổng hợp và tiết ra môi trường khi tế bào gặp phải điều kiện sống không thuận lợi bao gồm cạnh tranh với sinh vật khác, ảnh hưởng của nhiệt độ, cường độ ánh sáng hay pH.. Tuy nhiên, EPS không đóng vai trò dự trữ năng lượng [27]. Nghiên cứu cho thấy EPS có MW từ 5-200 kDa thu từ môi trường nuôi cấy *C. sinensis* có khả năng kháng oxy hóa và điều hòa miễn dịch [9].

Dong và Yao (2008) đã tiến hành khảo sát và đánh giá khả năng kháng oxy hóa của EPS thu từ dịch nuôi *C. sinensis* thông qua 6 thí nghiệm trên mô hình *in vitro*, bao gồm ức chế peroxide hóa acid linoleic, khả năng bắt gốc tự do DPPH, superoxide

anion, hydroxyl, đánh giá hoạt tính khử và khả năng tạo phức với ion Fe. Kết quả EPS thu được có hoạt tính ức chế quá trình peroxide hóa acid linoleic, khả năng bắt gốc tự do superoxide anion và hydroxyl tốt hơn so với butylated hydroxytoluen, ức chế hơn 80 % gốc tự do DPPH và giảm hoạt tính tạo phức với ion Fe [29].

IPS và EPS thu từ *C. sinensis* tự nhiên hay nuôi cấy nhân tạo có hoạt tính điều hòa miễn dịch, kháng khối u, kháng oxy hóa và giảm lượng đường huyết trong máu. Ngoài ra, chúng còn có những hoạt tính sinh học quan trọng khác như kháng viêm, giảm mệt mỏi, bảo vệ thận, tăng lượng testosterone huyết tương và bảo vệ khỏi tia phóng xạ [12].

Hoạt động điều hòa miễn dịch là chức năng sinh học quan trọng nhất của polysaccharide. EPS từ *C. sinensis* nuôi cấy cảm ứng tạo ra TNF- α (nhân tố hoại tử khối u), interleukin IL6 và IL10 phụ thuộc vào nồng độ và kích thích thực bào trong bạch cầu đơn nhân. Cheung và cộng sự (2009) đã thu nhận EPS có MW 82 kDa, có khả năng kích thích tiết IL2, IL6, IL8 [31].

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. EPS chiết từ một chủng *C. sinensis* vô tính thuộc *Tolypocladium sinensis* có thể ức chế sự di căn của những tế bào u melanine B16 trong phổi và gan. Ngoài ra, EPS này cũng ngăn chặn sự phát triển khối u H22 và tăng hoạt tính miễn dịch trong chuột mang khối u H22 [52].

Li và cộng sự (2003) đã dùng sắc ký cột tinh sạch một phân đoạn giàu polysaccharide từ *C. sinensis* nuôi cấy có hoạt động kháng oxy hóa mạnh. Trong đó, phân đoạn CSP-1 MW 210 kDa có khả năng kháng oxy hóa mạnh trong tế bào pheochromocytoma PC12 ở chuột, bảo vệ tế bào không bị phá hủy bởi H₂O₂, ức chế sự peroxid hóa lipid và hoạt hóa những enzyme kháng oxy hóa chính như glutathion peroxidase và superoxid dismutase trong tế bào. Gần đây, một EPS từ *Tolypocladium sinensis*, một chủng *C. sinensis* vô tính khác, có thể bảo vệ tế bào PC12 khỏi bị phá hủy bởi H₂O₂ bằng cách tăng hoạt động của glutathion peroxidase, catalase và

superoxid dismutase, cũng như giảm hoạt động của lactate dehydrogenase và hàm lượng malondialdehyde [12].

Lin R và cộng sự (2012) đã nghiên cứu hoạt tính của EPS từ *C. militaris* SU5 – 08 cho thấy EPS có khả năng bắt gốc tự do hydroxyl, superoxid anion và 1,1 – diphenyl – 2 – picrylhydrazyl (DPPH). Từ đó có thể kết luận EPS của *C. militaris* SU5 – 08 có hoạt tính kháng oxy hóa và tăng cường miễn dịch [24].

Kết quả nghiên cứu về hoạt động kháng oxy hóa của IPS và EPS từ nấm *C. gracilic* bởi Sharmi Stha Sinha và cộng sự (2015) cho thấy cả 2 hợp chất này đều có khả năng kháng oxy hóa trên mô hình *in vitro* như khả năng bắt gốc tự do DPPH⁺, ABTS⁺, năng lực khử và khả năng bắt Fe [32].

Leung (2009) khi so sánh hàm lượng polysaccharide và protein trong phức hợp EPS tương ứng theo thời gian nuôi cấy nhận thấy hàm lượng polysaccharide tăng đáng kể từ ngày 4 (46 %) đến ngày 6 (70 %) trong khi hàm lượng protein giảm nhẹ từ 29,3 % (ngày 4) xuống 27,9 % (ngày 5). Kết quả phân tích MW cho thấy khi MW của EPS tăng lên thì lượng protein giảm xuống trong suốt quá trình phát triển sợi nấm. Đặc tính này được duy trì đến phase cân bằng. Tác giả cho rằng có sự kết hợp giữa polysaccharide với protein tạo thành phức hợp polysaccharide-protein (PSP) có MW từ 5- 200 kDa [33].

Chen và cộng sự (2010) đã sử dụng gel Superdex-G75 tách được 5 phân đoạn từ EPS đặt tên là OF-I, II, III, IV, V với hàm lượng protein kèm theo trong các phân đoạn lần lượt là 3,4; 4,3; 6,1; 30,1; 50,5 µg/ml với khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ gia tăng khi hàm lượng protein gia tăng [34]. Các thử nghiệm trên nuôi cấy tế bào cũng cho kết quả tương tự. Kết luận này tương đồng với các công bố của Leung và cộng sự (2009) [33].

Nhiều nghiên cứu cho thấy hoạt tính kháng oxy hóa, kháng viêm, điều hòa miễn dịch... của EPS là do các EPS liên kết với protein, tuy nhiên hiện vẫn chưa rõ cơ chế protein liên kết với polysaccharide tạo hoạt tính sinh học nói trên [14].

1.3. Liên quan giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học của exopolysaccharide

Đặc điểm cấu trúc và tính chất lý hóa của polysaccharide phụ thuộc vào thành phần và trình tự đơn phân, MW, loại và kiểu liên kết glycosidic, số lượng và vị trí gắn các nhóm phi carbohydrate và cấu hình chuỗi phân tử. Cấu trúc hóa học của

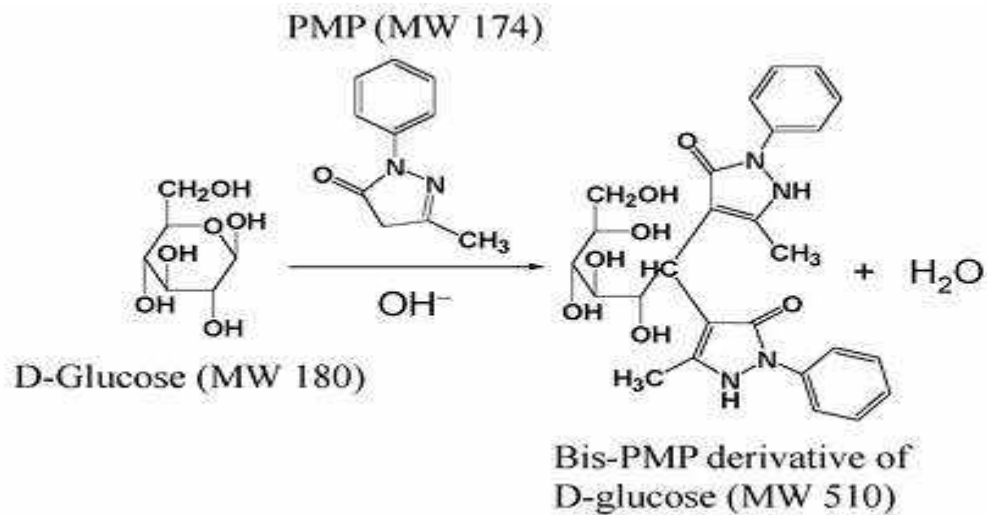
polysaccharide nội bào (IPS) và ngoại bào (EPS) của *C. sinensis* tinh sạch thường tiến hành bằng phân tích phổ hồng ngoại IR, phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR, sắc ký khí GC, sắc kí khí ghép khối phổ GC-MS, sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC, acid hóa, methyl hóa, và thủy phân Smith.

1.3.1. Xác định thành phần đơn phân của exopolysaccharide từ nấm *C. sinensis*

Để xác định thành phần đường đơn, cần phải tách đường đơn từ các phức hợp glycoprotein, lipopolysaccharide hay glycopeptide bằng thủy phân acid, dung phân (solvolysis) hay thủy phân bằng methanol (methanolysis). Các phân tử đường đơn tách ra sẽ được biến đổi về dẫn xuất phù hợp để phân tích. Thông thường, chúng được biến đổi thành các dẫn xuất bay hơi để phân tích sắc ký khí-lỏng hay sắc ký khí-lỏng kết hợp khối phổ [34].

Thủy phân bằng acid là một trong những phương pháp phổ dụng nhất trong phân tích thành phần đường đơn, vì liên kết glycosidic kém bền trong môi trường acid và dễ dàng bị phá vỡ [35]. Tuy nhiên, mức độ kém bền của mỗi liên kết là khác nhau, phụ thuộc vào vị trí, cấu hình anomer và bản chất của đơn phân mang liên kết. Vì vậy, để thủy phân hiệu quả, cần dựa vào thành phần đường đơn của EPS để xác định điều kiện thủy phân phù hợp, bao gồm loại acid sử dụng, nồng độ acid, nhiệt độ phản ứng, thời gian phản ứng và một số yếu tố khác [35][34]. Acid hydrochloric, acid sulfuric và acid trifluoroacetic (TFA) là những acid thường xuyên được sử dụng trong phân tích thành phần đường đơn [36].

Quy trình phân tích thành phần đường đơn gồm các bước cắt liên kết glycoside bằng acid tạo dẫn xuất. Tiến hành định tính và định lượng dẫn xuất hình thành. Sắc ký trao đổi ion với đầu dò đo cường độ xung (pulsed amperometric) là phương pháp phân tích thành phần đường đơn không cần tạo dẫn xuất. Gần đây, các nhà nghiên cứu còn dùng phương pháp tạo dẫn xuất 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) để phân tích thành phần đường đơn của polysaccharide từ *C. sinensis* (hình 1.3).



Hình 1.3. Phản ứng tạo dẫn xuất glucose với PMP

Cấu trúc của polysaccharide từ *C. sinensis* tự nhiên được nghiên cứu lần đầu tiên bởi Miyazaki và cộng sự (1977). Phân đoạn polysaccharide CS – I hòa tan trong nước được ly trích và tinh sạch bằng cất phân đoạn với ethanol và lọc gel. Tỷ lệ mol giữa D–galactose và D–mannose là 1: 1 được xác định sau khi thủy phân CS – I.

Theo các kết quả nghiên cứu trước đây đường đơn thường có trong IPS và EPS là mannose, glucose và galactose với tỷ lệ mol khác nhau. Năm 2011, polysaccharide CBHP được Nie và cộng sự thu nhận từ dịch nuôi cấy *C. sinensis* có thành phần đường đơn gồm 95,19 % glucose, 0,91 % mannose, 0,61 % galactose [10]. Yan và cộng sự (2010) thu nhận polysaccharide EPS-1A từ dịch nuôi cấy *Tolyocladium* sp. chứa 15,2 glucose : 3,6 mannose : 1 galactose theo tỷ lệ mol [25]. Năm 2009, Kim và cộng sự thu được polysaccharide PS-A có thành phần gồm 2 glucose: 1 mannose: 1 galactose [37]. Chen và cộng sự (2009) đã thu nhận được polysaccharide CS-Pp có thành phần gồm glucose, mannose, galactose theo tỷ lệ mol 21: 2: 1 [38]. Cùng năm, Wang và cộng sự (2009) đã thu nhận phân đoạn polysaccharide CPS1 từ dịch nuôi cấy *C. sinensis* có thành phần gồm 2,8 glucose: 2,9 mannose: 1 galactose [39]. Wang và cộng sự (2010) đã phân tích một phân đoạn polysaccharide với MW khoảng $7,7 \times 10^3$ Da từ sinh khối nấm *Cordyceps* có tỷ lệ mannose : galactose là 1:9. Phân tích IR và NMR cho thấy có một khung sườn α - D- glucan với các liên kết (1-4) và (1-3); và các mạch nhánh của α - D- (1-6)- mannose được gắn vào khung sườn qua vị trí O-6 của gốc α -(1-3)-galactose. Nghiên cứu này cũng cho thấy các phân đoạn có MW

trong khoảng 10 – 1000 kDa có xu hướng tan trong nước tốt hơn và vì thế có hoạt tính kháng khối u hiệu quả hơn [40].

Trong khoảng 30 năm trở lại đây, các nghiên cứu thành phần đường đơn của các polysaccharide được tách từ *C. sinensis* tự nhiên cũng như nuôi cấy nhân tạo cho thấy, polysaccharide trong *C. sinensis* thường được tạo thành từ các đơn phân gồm glucose, mannose và galactose. Mạch chính polysaccharide của *C. sinensis* trong tự nhiên là mannose. Còn ở *C. sinensis* nuôi cấy nhân tạo thì mạch chính polysaccharide có thể là mannose hoặc glucose. Đây là một kết quả thú vị chứng tỏ thành phần, cấu trúc của polysaccharide tạo ở *C. sinensis* phụ thuộc nhiều vào điều kiện nuôi cấy.

1.3.2. Xác định cấu trúc của exopolysaccharide

Các EPS sau khi tinh sạch được sử dụng cho các nghiên cứu sâu hơn về hoạt tính sinh học và cấu trúc hóa học. Cấu trúc sơ cấp của phức hợp carbohydrate đã được làm sáng tỏ trong các nghiên cứu về: 1) thành phần đường đơn; 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 và 7) sự phân bố kích thước phân tử. Cụ thể nhờ các phương pháp hoá học cơ bản và phương pháp phân tích cấu trúc hiện đại.

Phương pháp hoá học cơ bản

- *Phương pháp thủy phân* thông qua việc cắt đứt các liên kết glycosidic. Một trong những phương pháp hóa học xuất hiện sớm nhất là sử dụng các acid thủy phân từng phần phức hợp carbohydrate thành các đoạn oligosaccharide. Các loại acid thường được sử dụng như trifluoroacetic acid (TFA), sulfuric acid (H₂SO₄), hydrofluoric acid (HF). Nên loại bỏ TFA sau khi thủy phân vì nó gây khó khăn cho việc xác định liên kết β -(1→4)-cellulose [41]. Để thủy phân hiệu quả một polysaccharide, cần dựa vào thành phần đường đơn của nó để chọn điều kiện thủy phân phù hợp, bao gồm loại acid, nồng độ acid, nhiệt độ phản ứng, thời gian phản ứng và một số yếu tố khác [41, 25]. HCl, H₂SO₄ và TFA là những acid thường xuyên được sử dụng trong phân tích thành phần đường đơn. Trong đó, TFA thường được lựa chọn vì một số ưu điểm như hiệu quả thủy phân liên kết glycosidic cao, ít gây tổn hại cho phân tử đường đơn vừa được tạo ra, dễ dàng loại bỏ sau phản ứng do tính dễ bay hơi. Mặc dù đơn giản, dễ thiết lập và tùy chỉnh, phương pháp này cũng có một số khuyết điểm là lượng đơn phân đường thu được thường thấp. Yang và cộng sự (2009) đã tiến hành phân tích thành phần của carrageenan bằng TFA loãng. Kết quả

thu nhận được đã giúp các nhà nghiên cứu hiểu sâu hơn về cơ chế tác động của phản ứng thủy phân carrageenan, đồng thời cung cấp thêm thông tin về đặc điểm cấu trúc của nhóm chất này [4]. Võ Thị Phương Trang (2019) đã sử dụng TFA để phân tích mẫu EPS thu từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* tại phòng thí nghiệm Sinh hoá, Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP.HCM. Tác giả tạo dẫn xuất từ dịch nuôi cấy sau thủy phân bằng PMP và phát hiện bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Ngoài ra, kết hợp nhiều phương pháp khác nhau sẽ tăng hiệu suất của phản ứng thủy phân [42]. Chen và cộng sự (2019) đã tách EPS từ chủng nấm *Antrodia cinnamomea* và thủy phân với TFA 4M ở 95 °C trong 4 giờ. Kết quả phân tích cho thấy thành phần đường đơn gồm 33,32 % galactose, 26,78 % glucose, 17,89 % arabinose và một lượng nhỏ mannose, xylose, fucose và rhamnose [43].

- **Methyl hóa:** Thường kết hợp cùng với acid sẽ cho kết quả thủy phân tốt hơn. Methyl hóa kết hợp với acid HF thủy phân giải phóng các đơn vị acid đường rất tốt từ pectin. Kim và cộng sự (2006) xác định cấu trúc của polysaccharide bằng cách tối ưu phương pháp methyl hoá bổ sung thêm một quy trình tiền hoà tan với glycerol. Mẫu thô được hoà tan với glycerol và 100 μ L dimethyl sulfoxide, thêm NaOH làm chất xúc tác. Methyl iodine được thêm vào sau đó rồi lặp lại quy trình xác định thành phần đường đơn. Cấu trúc của polysaccharide được phân tích GC-MS [44].

- **Oxi hóa H_2O_2 và thoái hoá Smith:** Sử dụng periodate ion (IO_4^-) để oxy hóa nhóm glycol của acid polysaccharides như heparin và polygalacturonate. Sự kết hợp của 3 phương pháp oxi hóa H_2O_2 , khử và thủy phân nhẹ bằng acid gọi là thoái hoá Smith tạo ra các đuôi glycerol và glucan không khử. Đặc điểm của các đường đơn hay oligosaccharides có thể cung cấp thông tin về cấu trúc gốc của polysaccharide.

- **Các kỹ thuật phân tích hiện đại:**

- **Phổ UV-Vis và FTIR:** Thành phần uronic acids trong polysaccharide được xác định bằng phương pháp đo phổ UV-Vis. Khối phổ đầu dò FTIR cho phép xác định chuyển động phân tử và các liên kết giữa các nguyên tử, loại đường đơn, liên kết glycosidic giữa chúng và nhóm chức trong cấu trúc của polysaccharide [45]. Ren và cộng sự (2019) sử dụng phổ hồng ngoại (FT-IR) để dự đoán các nhóm chức chính và khung sườn hoá học của polysaccharide chiết xuất từ *C. militaris* nhận thấy các peak hấp thụ của polysaccharide xuất hiện ở 3600-3200 cm^{-1} , 3000-2800 cm^{-1} ,

1640 cm^{-1} và 1500-1300 cm^{-1} . Vùng peak trong khoảng 3600-3200 cm^{-1} tương ứng với độ rung kéo dài của O-H và liên kết hydro liên phân tử. Các peak trong vùng 3000-2800 cm^{-1} tương ứng với sự rung động của C-H, vùng 1640 cm^{-1} đáp ứng với gốc -CHO. Bên cạnh đó, ba peak ở 1154 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} và 1023 cm^{-1} tương ứng với sự hấp thụ của C-O-C trong nhóm pyranose và hydroxyl. Rung động kéo dài đối xứng của vòng pyranoid xuất hiện ở tín hiệu 761 cm^{-1} . Đỉnh hấp thụ ở 850 cm^{-1} là dấu hiệu của liên kết α -glycosidic. Do đó, các tác giả kết luận polysaccharide từ *C. militaris* có cấu trúc tương đồng với α -pyranose [46].

- *Sắc kí và khối phổ*: Phương pháp GC và HPLC được sử dụng để phân tích polysaccharide thủy phân bằng TFA hoặc sau khi methyl hóa, oxi hóa với periodic acid, thoái hoá Smith [45]. Chen và cộng sự (2016) đã sử dụng HPLC để xác định dẫn xuất PMP-EPS bằng cách xử lý EPS với 450 μL dung dịch PMP (phenyl methyl pyrazolone) và 450 μL NaOH 0,3 M ở 70 $^{\circ}\text{C}$ trong 30 phút. Dừng phản ứng bằng cách trung hoà với 450 μL HCl 0,3 M. Sau đó chiết xuất với chloroform. Dịch chiết xuất được phân tích bằng HPLC với đầu dò UV, cột ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5 μm , 4,6 mm x 150 mm) [36]. Thành phần đơn phân của các phân đoạn EPS cũng được Trang và cộng sự (2018) phân tích bằng phương pháp HPLC. EPS được thủy phân với 5 mL TFA 2 M ở 120 $^{\circ}\text{C}$ trong 6 giờ. Thêm 100 μL NaOH 0,3 M và 200 μL PMP 0,5 M trong MeOH ở 70 $^{\circ}\text{C}$ trong 1 giờ, làm nguội đến nhiệt độ phòng, điều chỉnh về pH 7 bằng HCl 0,3 M. Mẫu sau đó được phân tích bằng HPLC với cột Lichrosob RP18 (25 cm x 4,6 mm).

- *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)* cũng thường được sử dụng để xác định cấu trúc tổng thể của polysaccharide [45]. Yuan và cộng sự (2016) đã sử dụng phổ NMR 1D và 2D (bao gồm HMBC, COSY, HSQC, HSQC-TOCSY, 1D-TOCSY và NOESY) để dự đoán cấu trúc tổng quan của polysaccharide chiết xuất từ *L. barbarium*. Kết quả cho thấy tín hiệu ở 4,53 ppm trong phổ proton là của β -D-Galp. Phổ HSQC cho thấy C anomeric có sự thay đổi tín hiệu hoá học (103,7 ppm). H-2/C-2 được ghi nhận bằng phổ COSY và HSQC có tín hiệu lần lượt là 3,67/70,6 ppm. Phổ 1D TOCSY cho thấy có sự dịch chuyển hoá học của H-3 và H-4 tương ứng là 3,73 và 4,14 ppm, tín hiệu H-5/C-5 (3,95/77,1 ppm) và H-6a, -b/C-6 (3,90, 4,04/70,0 ppm) [47]. Ren và cộng sự (2020) cho biết các tín hiệu của polysaccharide tập hợp trong phạm vi hẹp từ δ 3,5 đến δ 5,5 ppm. Tín hiệu từ phổ ^1H NMR của cấu trúc α -pyranose

thường được giới hạn từ δ 4,8 đến δ 5,3 ppm. Trong khi cấu trúc β -pyranose từ δ 4,4 đến δ 4,8 ppm [46]. 3 tín hiệu chính của H anomeric nằm trong vùng δ 5,16 – 5,41 ppm cho thấy có 3 gốc đường khác nhau. Sự thay đổi hoá học ở mức δ 5,41 ppm được cho là tín hiệu do H anomeric của α -glucose [48]. Peak ở tín hiệu δ 5,16 ppm, δ 4,44 ppm thuộc về H anomeric tương ứng với α -mannose và β -galactose [49].

1.3.3. Mối liên quan giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học của exopolysaccharide có nguồn gốc từ nấm C. sinensis

Nguồn gốc, tính chất phân tử, cấu trúc hóa học, thành phần đơn phân và hoạt tính sinh học của EPS tách chiết từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* được tổng hợp ở bảng 1.4. Dữ liệu cho thấy đặc điểm cấu trúc và thành phần hóa học của polysaccharide quyết định hoạt tính sinh học của chúng. Tùy thuộc vào điều kiện, môi trường nuôi cấy và chủng giống *C. sinensis* mà các EPS có cấu trúc và thể hiện hoạt tính sinh học khác nhau.

Điển hình là EPS-1A tách chiết từ dịch nuôi cấy nấm Cs-HK1 (*Tolyocladium* sp. phân lập từ *C. sinensis* tự nhiên) [50] có MW 40 kDa với thành phần đơn phân glucose:mannose:galactose theo tỷ lệ 15,2:3,6:1,0 M. Kết quả phân tích cho thấy, EPS-1A là một polysaccharide phân nhánh nhẹ với bộ khung gồm (1 \rightarrow 6)- α -D-glucose (~77 %) và (1 \rightarrow 6)- α -D-mannose (~23 %). Phân nhánh ở vị trí O-3 của (1 \rightarrow 6)- α -D-mannose của khung (1 \rightarrow 6)- α -D-mannose và kết thúc với đuôi β -D-galactose. Trong khi đó, cũng phân lập được galactomannan dạng liên kế α -1,6 từ *C. sinensis* tự nhiên có thành phần chính là galactose (~68,65 %) và glucose chỉ có 6,65 %, mannose 24,02 % [39] rất khác với EPS-1A tách chiết từ *C. sinensis* nuôi cấy nhân tạo.

Như vậy, hoạt tính sinh học của EPS phụ thuộc chủ yếu vào cấu trúc phân tử, thành phần đơn phân, liên kết glycosidic của bộ khung, dạng và độ polymer hóa của mạch nhánh, cấu trúc không gian và tính linh động của chuỗi [33]. Trong đó thành phần đơn phân, loại liên kết glycosidic, cách thức liên kết và cấu trúc không gian là quan trọng nhất.

Bảng 1.3. Exopolysaccharide (EPS) từ nấm *C. sinensis*: nguồn, cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học của chúng

Nguồn	Thành phần polysaccharide và protein (%)	Thành phần đơn phân	TLPT (kDa)	Hoạt tính sinh học	Tham khảo
EPSF	87,7 và 7,5	-	-	Điều hòa miễn dịch và kháng khối u	[12]
EPS-III	73,9 và 8,6	-	0,1 - 250	Kháng oxy hóa	[51]
EPS-1	90 và không đáng kể	-	38	Kháng oxy hóa	[52]
EPS	-	Mannose, glucose và galactose = 23:1:2,6	104	Tăng cường miễn dịch	[3]
AEPS-1	-	Glucopyranose và pyrano-glucuronic acid = 8:1	36	Tăng cường miễn dịch	[25]
EPS	-	MannoseNH ₂ :GalactoseNH ₂ :Galactose = 1,0: 1,1:0,3		Kháng oxy hóa	[53]
EPS	27,6 – 36,5 và 27,8 – 31,1	Glucose, galactose và mannose	-	-	[14]

1.4. Phương pháp cải biến nâng cấp hoạt tính sinh học của exopolysaccharide

1.4.1. Phương pháp tinh sạch exopolysaccharide

Nhằm tìm hiểu hoạt tính của EPS là do thành phần nào, đã tiến hành tinh sạch, loại bỏ các thành phần liên kết với EPS. Sự có mặt của protein, đường đơn và các oligosaccharide trong dịch EPS ảnh hưởng đến phân tích.

Có một số phương pháp loại protein được sử dụng như phương pháp Sevag, phương pháp TCA (trichloroacetic acid), phương pháp NaCl, phương pháp CaCl₂

hoặc sử dụng enzyme cắt và kết hợp các phương pháp này với nhau. Hiện phương pháp Sevag được sử dụng nhiều nhất do tính phổ biến, hiệu suất và hiệu quả kinh tế. Huang và cộng sự (2010) loại protein ra khỏi oligosaccharide bằng cách bổ sung dịch Sevag vào dịch EPS theo tỷ lệ 5:1. Lắc đều 5 phút, ly tâm ở 2000 vòng/phút trong vòng 10 phút. Thu dịch nổi, lặp lại thí nghiệm 3-5 lần. Tủa dịch nổi thu được với ethanol tuyệt đối tỷ lệ 1:4.

Chen và cộng sự (2013) đã nghiên cứu loại protein ra khỏi phức hợp PSP của nấm linh chi. Dịch mẫu được bổ sung dịch Sevag 4:1 lắc mạnh cho dịch đồng nhất trong vòng 5 phút, sau đó để yên trong vòng 15 phút. Dịch sẽ tách làm 2 pha, thu dịch nổi ở pha ở trên, lặp lại thí nghiệm 3 lần, tủa dịch nổi thu được với ethanol tuyệt đối tỷ lệ 1:4, ly tâm thu tủa, rửa tủa bằng ethanol tuyệt đối, sấy khô và bảo quản ở 4 °C [55].

Huang và cộng sự (2011) đã loại protein ra khỏi phức với EPS. Dịch EPS được chỉnh về pH 3 bằng TCA 10 %. Ủ hỗn hợp dung dịch trong vòng 24h sau đó ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút. Thu dịch nổi. Lặp lại thí nghiệm 1-2 lần. Tủa dịch nổi thu được với ethenol tuyệt đối tỷ lệ 1:4 [54].

Sau khi loại bỏ protein EPS sẽ được làm sạch bằng phương pháp tách và khử màu. Sau đó tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion, sắc ký lọc gel và sắc ký ái lực. Quá trình rửa giải được tiến hành với đệm, tiếp theo là cô đặc, lọc và đông khô. Ngoài ra, dựa trên độ tan khác nhau của chúng trong ethanol, isopropanol và các dung môi khác, sẽ thu được các phân đoạn EPS khác nhau. Huang, Siu, Wang, Cheung và Wu (2013) đã tách các phân đoạn EPS từ môi trường lên men của *C. sinensis* bằng ethanol [50].

Kim và Yun (2005) đã tinh sạch EPS thô bằng sắc ký cột Sepharose CL-6B (2.4x100 cm), rửa giải với NaCl 0,2 M ở tốc độ dòng 0,6 ml/phút. Sắc ký lọc gel Sepharose CL-6B thu được 3 phân đoạn EPS từ môi trường nấm nuôi cấy trong môi trường thường và 2 phân đoạn thu từ môi trường nuôi cấy tối ưu. Phân tích sắc ký chứng minh tất cả các phân đoạn EPS thu được đều không chứa protein [58].

1.4.2. Phương pháp cải biến cấu trúc hóa học của expolysaccharide

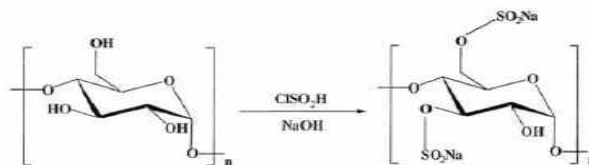
Cấu trúc hóa học của polysaccharide quyết định hoạt tính sinh học. Do vậy, nhiều nghiên cứu tập trung vào cải biến cấu trúc hóa học polysaccharide để tạo ra

những dẫn xuất có tác dụng dược lý mới tốt hơn so với polysaccharide tự nhiên [33, 56]. Có 3 cách tiếp cận được áp dụng để cải biến polysaccharide hiện nay là cải biến bằng hóa học, sinh học và vật lý (Bảng 1.5) [56].

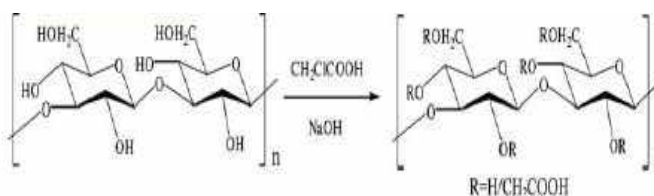
Bảng 1.5 Các phương pháp cải biến polysaccharide [56]

▪ **Phương pháp hoá học**

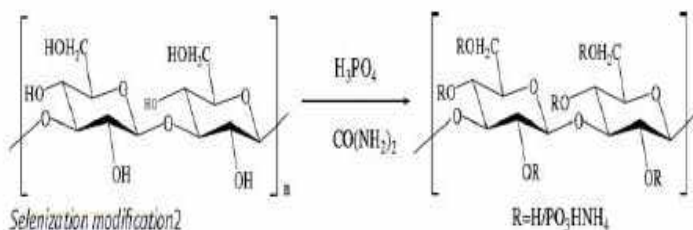
Sulfate hóa: gắn nhóm sulfate (SO_4^{2-}) vào vị trí -OH, -COOH hay gốc amine của nhân đường.



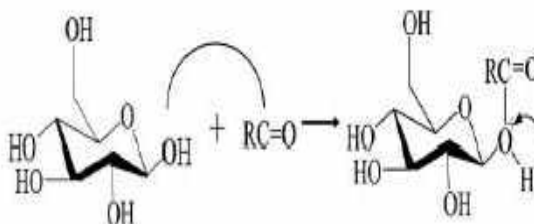
Carboxymethyl hóa: gắn nhóm carboxymethyl (CH_2COOH) vào chuỗi polysaccharide làm gia tăng độ hòa tan trong nước của cellulose và chitin, cũng như hoạt tính sinh học của chúng.



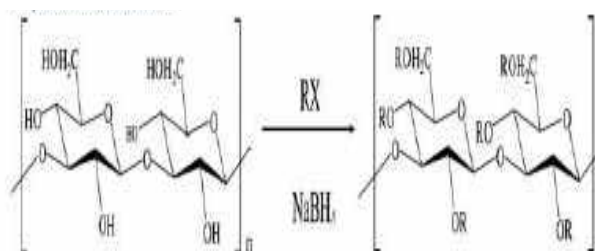
Phosphoryl hóa: gắn nhóm phosphate vào chuỗi polysaccharide, kích hoạt hoạt tính của polysaccharide tự nhiên.



Acetyl hóa: gắn nhóm acetyl ($\text{RC}=\text{O}$) vào chuỗi polysaccharide, làm tăng độ hòa tan trong nước, cũng như hoạt tính sinh học.



Alkyl hóa: gắn nhóm alkyl vào đầu cuối của mạch chính, làm giảm độ nhớt, tăng độ hòa tan và hoạt tính sinh học của polysaccharide, chủ yếu áp dụng với chitosan.



- **Phương pháp sinh học**

Thường sử dụng các enzyme phân giải cắt các liên kết của polysaccharide, làm giảm MW và độ nhớt của chúng. Phương pháp này có độ đặc hiệu và hiệu quả cao hơn so với phương pháp hóa học, không ảnh hưởng đến mạch chính của polysaccharide

- **Phương pháp vật lý**

Sóng siêu âm: cắt một vài liên kết hóa học của dextran pyran, làm giảm MW và tăng độ hòa tan, nâng cao hoạt tính.

Lò vi sóng: phân rã polysaccharide, tăng độ hòa tan và hoạt tính

Bức xạ: sử dụng tia Gamma Co-60 bẻ gãy cấu trúc, tăng độ hòa tan và hoạt tính kháng oxy hóa của polysaccharide.

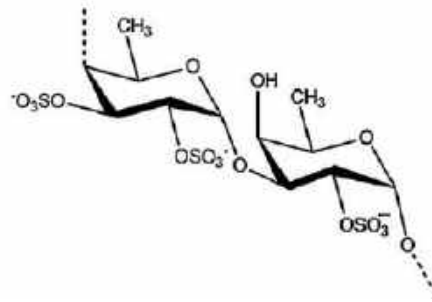
Nghiên cứu trong luận án này tập trung vào cải biến hóa học EPS tách chiết từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* bằng cải biến sulfate hóa. Các dữ liệu khoa học cho thấy nhóm SO_4^{2-} có vai trò quan trọng trong việc cải thiện hoạt tính sinh học của polysaccharide [29, 33, 41, 57, 58, 59, 60]. Hầu hết các polysaccharide sulfate bị mất hoạt tính được cho là có liên quan đến sự loại bỏ nhóm SO_4^{2-} [56].

Có nhiều phương pháp sulfate hóa polysaccharide được sử dụng như phương pháp oleum-dimethylformamide (DMF), phương pháp SO_3 -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].

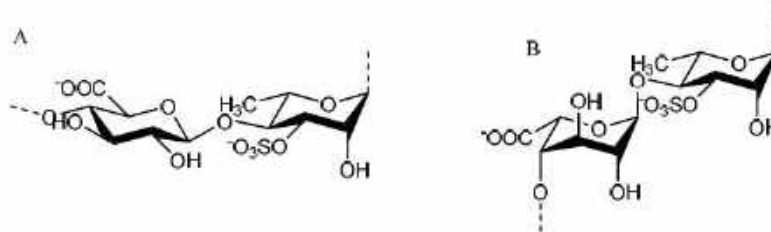
Hiện nay, nguồn polysaccharide sulfate tự nhiên được tìm thấy nhiều từ các sinh vật biển, đặc biệt là từ rong biển (macroalgae) với hàm lượng sulfate rất cao, ví dụ carrageenan, agaran, fucoidan và ulcan... [62]. Ngoài tính chất lưu biến tạo gel và đông tụ (gelling and thickening), các polysaccharide này còn thể hiện nhiều hoạt tính sinh học quan trọng như kháng đông máu, kháng virus, kháng viêm và tăng cường miễn dịch. Chúng còn được ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và dược phẩm [63]. Sau đây là một số polysaccharide sulfate được nghiên cứu và ứng dụng hiện nay.

Fucoidan là một loại polysaccharide sulfate, có mặt chủ yếu ở thành tế bào các loài rong biển nâu (chủ yếu từ *Fucus vesiculosus*), chứa chủ yếu L-fucose ($C_6H_{12}O_5$) và các nhóm ester sulfate (Hình 1.4). Nhóm sulfate thường ở vị trí C-2, C-3 hoặc C-4 [35, 63].



Hình 1.4. Cấu trúc hóa học của fucoidan [30]

Ulván là polysaccharide sulfate hòa tan được chiết xuất ở rong xanh thuộc bộ Ulvales, với thành phần chính gồm rhamnose, xylose, acid iduronic và acid glucuronic gắn nhóm sulfate. Cấu trúc hóa học gồm các đơn vị đường đôi loại 3-sulfate acid ulvanobiouronic lặp lại có hoặc không kèm theo acid glucuronic và iduronic (Hình 1.5). Trong phân tử, nhóm sulfate thường xuất hiện vị trí C-3 của đơn phân rhamnose và ở vị trí C-2 của đơn phân xylose (Hình 1.5) [63].



Hình 1.5. Cấu trúc đơn vị disaccharide của ulvan. A. $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3S-(1}\rightarrow]_n$; $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Idop-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3S-(1}\rightarrow]_n$. Glcp: acid glucuronic; Idop: acid iduronic; Rhap3S: 3-sulfate rhamose [19]

Tóm lại, polysaccharide sulfate là nguồn hoạt chất có hoạt tính sinh học giá trị cao. Những dữ liệu trên là cơ sở khoa học cho nghiên cứu của luận án này tập trung nghiên cứu tạo các dẫn xuất sulfate EPS tách chiết từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*.

1.4.3. Phương pháp kích thích tăng sinh tổng hợp expolysaccharide

Những điều kiện sinh trưởng và yếu tố dinh dưỡng khác nhau cũng được nghiên cứu để thu được nhiều polysaccharide, cordycepin hoặc các hợp chất sinh học khác ở một số loài nấm. Các nghiên cứu cho biết, bổ sung vào môi trường nuôi cấy nấm nguồn nitơ hữu cơ như: peptone, bột đậu tương, bột bắp... hoặc nguồn nitơ vô cơ như: amonium chloride, amonium sulfate, sodium nitrate, potassium nitrate, urea và ammonium oxalate sẽ kích thích tổng hợp EPS ở một số loài nấm.

Leung và Wu (2007) đã nghiên cứu ảnh hưởng của ammonium đến quá trình sản xuất cordycepin và EPS trong nuôi cấy sợi nấm *C. sinensis*. Nấm *C. sinensis* Cs-HK1 được nuôi trên môi trường lỏng chứa glucose, cao nấm men, pepton và những muối vô cơ. NH_4Cl được thêm vào môi trường ở những nồng độ khác nhau từ 5 - 40 mmol/l ở ngày thứ 3. Nồng độ 10 mmol/l, NH_4Cl kích thích tạo cordycepin cao nhất, tăng gần 4 lần từ 28,5 lên đến 117 $\mu\text{g/g}$ và tăng lượng EPS lên 40 % (từ 2,6 lên đến 3,7 g/L). Việc bổ sung ammonium ảnh hưởng tốt trong khoảng từ 5 – 10 mmol/l, nhưng gây ra bất lợi cho sự phát triển của nấm ở nồng độ cao hơn [48]. Chen và cộng sự (2007) nghiên cứu ảnh hưởng của vi lượng lên quá trình tổng hợp sinh khối và EPS bằng cách bổ sung thêm 0,4 % CaCl_2 vào môi trường nuôi cấy. Kết quả cho thấy sự nhân sinh khối sợi nấm và EPS của *C. sinensis* được cải thiện tương ứng là 54,0 g/L và 28,4 g/L [64].

Bổ sung muối khác như KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 và NaCl cũng cần thiết cho nấm tổng hợp EPS. Wang và cộng sự (2019) đã bổ sung 30 mM Mg^{2+} và 5 mM K^+ vào môi trường nuôi cấy *C. sinensis*, thu được tối đa 5,86 mg/L EPS, cao hơn 130,7 % so với môi trường nuôi cấy cơ bản [65].

Đáng chú ý, nhiều nghiên cứu đã chứng minh dầu thực vật và acid béo có khả năng kích thích sự phát triển của sợi nấm và thúc đẩy quá trình tổng hợp các chất biến dưỡng trong nấm. Yang và cộng sự (2005) nghiên cứu bổ sung 0,1 % dầu đậu nành vào môi trường nuôi cấy nấm *C. sinensis*, sau 5 ngày nuôi cấy kết quả cho thấy hàm

lượng EPS tăng từ 0,334 – 0,537 g/L [66]. Ngoài ra, khi bổ sung 0,1 g/100 mL palmitic acid vào môi trường nuôi cấy nấm *Ganoderma lucidum*, kết quả sau 7 ngày nuôi cấy lắc, hàm lượng EPS tăng 40 % [67].

Stasinopoulos và Seviour (1990) nghiên cứu trên nấm đã chứng minh được việc thêm vào môi trường nuôi cấy nấm *Acremonium persicinum* dầu ô liu, dầu hướng dương, các loại acid béo và chất hoạt động bề mặt có tác dụng kích thích lượng EPS tăng đáng kể. Trong đó, dầu ô liu và dầu hướng dương ở nồng độ thấp nhất (0,4 kg/m³) cũng làm tăng EPS từ 12 - 14 kg/m³ đến 22 - 24 kg/m³ và tăng lên đến 28 kg/m³ ở nồng độ cao hơn. Dầu đậu phộng và dầu hoa hồng cũng có tác dụng kích thích tương tự nhưng chỉ ở nồng độ thấp (0,4 – 1,2 kg/m³), nhưng làm giảm lượng sinh khối và EPS ở nồng độ cao hơn. Oleic acid và palmitic acid làm tăng lượng sinh khối và polysaccharide. Linoleic acid chỉ kích thích ở nồng độ thấp. Trong khi stearic acid ức chế sự phát triển và tổng hợp EPS của nấm *A. persicinum* [68].

Yang và cộng sự (2000) cho biết oleic acid và palmitic acid có khả năng làm tăng đáng kể lượng sinh khối sợi nấm *G. lucidum* và EPS. Ở nồng độ 0,15 g/100 mL, dầu ô liu giúp tăng lượng sinh khối từ 0,2 đến 0,46 g/mL. Ngược lại, linoleic acid (0,1 g/100 mL) ức chế sự phát triển sợi nấm và khả năng tổng hợp EPS [69].

Năm 2002, Park và cộng sự cho biết dầu hướng dương ở nồng độ 2 % làm tăng lượng EPS của *C. militaris* nuôi cấy lỏng từ 2,3 lên đến 7,5 g/L. Dầu ô liu ở nồng độ 4 % tăng sinh khối nấm từ 5,88 lên đến 19,0 g/L. Kết quả nghiên cứu cho thấy các acid béo như acid oleic và acid palmitic có tác dụng kích thích đáng kể sự phát triển sợi nấm và tổng hợp EPS, trong khi acid linoleic lại kìm hãm [58].

Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có nghiên cứu về ảnh hưởng của dầu thực vật đến sự phát triển của nấm *C. sinensis* được công bố. Dầu thực vật đã được chứng minh có thể kích thích sự phát triển ở một số loài nấm [70], nguyên nhân có thể do lipid là thành phần của màng tế bào, nên khi tăng số lượng tế bào (đồng nghĩa với tăng sinh khối tế bào khi nuôi cấy nấm), xuất hiện nhu cầu tăng khả năng hấp thụ dầu từ môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu còn cho thấy ảnh hưởng của dầu thực vật và acid béo lên sự hình thành EPS. Nguyên nhân có thể do dầu thực vật và acid béo có khả năng làm thay đổi thành phần của màng sinh học và làm tăng tính thấm của màng hoặc ảnh hưởng trực tiếp lên sinh tổng hợp các enzyme có liên quan đến quá trình hình thành polysaccharide như glucan synthetase [23].

Từ những lập luận trên, luận án này đề ra nhiệm vụ khảo sát sự ảnh hưởng của 3 loại dầu: dầu hướng dương, dầu ô liu và dầu dừa lên sự tổng hợp EPS của nấm *C. sinensis* nuôi cấy lỏng-tĩnh. Đây là một đóng góp mới của luận án. 4 nội dung nghiên cứu của luận án được trình bày trong sơ đồ nghiên cứu tổng quát (Hình 2.1).

1.5. Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy

1.5.1. Giới thiệu

Trong quy hoạch thực nghiệm, các biến được thay đổi đồng thời theo kế hoạch đã định trước. Dữ liệu thu nhận được phân tích một cách khoa học theo các phương pháp phân tích thống kê.

1.5.2. Thiết kế thí nghiệm

Các nguyên tắc trong Design Of Expert để giảm hoặc thậm chí khử bỏ các sai số của thí nghiệm. Bởi sự sai số thí nghiệm gây ra sự sai lệch trong việc xác định sự ảnh hưởng của các thông số quan trọng. Ba nguyên tắc cơ bản nhất trong thiết kế thí nghiệm [53]:

Nguyên tắc ngẫu nhiên: Nguyên tắc này áp dụng để hạn chế ảnh hưởng của các yếu tố gây nhiễu. Thứ tự thay đổi giá trị các thông số thí nghiệm; cách bố trí thí nghiệm; thứ tự tiến hành từng thí nghiệm. Các phần mềm thiết kế thí nghiệm thường tạo các kế hoạch thí nghiệm với thứ tự ngẫu nhiên.

Nguyên tắc lặp lại: Mỗi thí nghiệm phải được tiến hành lặp lại ít nhất nhiều hơn một lần. Chúng ta cần phân biệt hành động lặp lại với việc đo lại một vài thông số nào đó nhiều lần.

Nguyên tắc tạo khối: Nguyên tắc này được sử dụng khi số lượng thí nghiệm nhiều. Trong mỗi khối các thí nghiệm được thiết kế tuân thủ theo nguyên tắc ngẫu nhiên, lặp lại.

1.5.2.1. Sàng lọc yếu tố có ý nghĩa theo Plackett - Burman

Thiết kế Plackett - Burman (PB) đã được Plackett và Burman đưa ra vào năm 1946. Thiết kế này cho phép sử dụng N thí nghiệm để đánh giá N-1 ảnh hưởng chính. Cơ sở của thiết kế PB dựa trên ma trận Hadamard, trong đó số lượng thí nghiệm là bội số của 4, tức là $N = 4, 8, 12, 16, \dots$ (N là số các thử nghiệm). Thiết kế thích hợp cho việc nghiên cứu lên đến $k = (N-1)/(L-1)$ nhân tố, trong đó: L là số lượng các mức (cấp). k là số nhân tố.

Thí nghiệm PB là dạng đặc biệt của thí nghiệm hai mức riêng phần. Mục đích thực nghiệm sàng lọc được thiết kế để giảm bớt số thí nghiệm cần tiến hành bằng cách chỉ ra các biến có ảnh hưởng mạnh nhất đến hàm mục tiêu. Thiết kế PB sử dụng hai cấp độ cho mỗi yếu tố, mức độ cao hơn được kí hiệu là “ + ” và thấp “ - ”, mỗi mức độ được sắp xếp thử nghiệm theo tính chu kì [92].

1.5.2.2. Thí nghiệm đáp ứng bề mặt – Box Behnken

Thiết kế BB được phát triển dựa trên sự kết hợp của một thiết kế thí nghiệm toàn phần 2 mức và một thiết kế thí nghiệm khối không đầy đủ.

Thực nghiệm tối ưu hóa giúp chúng ta tìm giá trị cực trị hay tìm vùng tối ưu cho quá trình hay các điều kiện tối ưu để vận hành một hệ thống. Các bài toán tối ưu thường được biết đến với tên gọi “phương pháp bề mặt đáp ứng”. Một chuỗi thí nghiệm được thiết kế với các mục đích sau: chỉ ra tập giá trị các biến thí nghiệm; tìm kiếm các giá trị biến đầu vào nhằm đạt các yêu cầu cụ thể của hàm mục tiêu nghiên cứu; xác định các thông số kỹ thuật mới, cải thiện quy trình và mô hình hóa quan hệ vào – ra làm cơ sở dự đoán hay điều khiển quá trình [92].

1.6. Mục tiêu nghiên cứu

Xây dựng quy trình nuôi cấy lỏng tĩnh nấm *C. sinensis* và thu nhận, cải biến nâng cấp hoạt tính sinh học của EPS từ dịch nuôi cấy.

Từ những lập luận trên, luận án này đề ra nhiệm vụ khảo sát 4 nội dung nghiên cứu chính bao gồm:

- 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 sulfate 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 công nghệ nuôi cấy lỏng-tĩnh *C. sinensis* tạo EPS có hoạt tính sinh học.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. *Chủng nấm sử dụng*

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. Tuy nhiên nghiên cứu hoàn thiện quy trình công nghệ nuôi cấy lỏng-tĩnh, thu nhận và tinh sạch EPS. Nghiên cứu thành phần đơn phân cấu tạo của EPS vẫn chưa được thực hiện.

2.1.2. *Hóa chất và thiết bị*

2.1.2.1 *Hóa chất*

Hoá chất sử dụng để tinh sạch EPS

2,2,2-Trichloroethanoic acid (Prolabo)

Chloroform (Merck)

n-butanol (Merck)

Alcalase (Đức)

Hoá chất xác định hàm lượng protein

Dung dịch albumin 0,01 % (Trung Quốc)

Thuốc thử Bradford (Coomassine Brilliant Blue) (Merck)

Hoá chất xác định hàm lượng polysaccharide

Acid sulfuric đậm đặc (Trung Quốc)

Phenol 5 % (Trung Quốc)

Glucose (Merck)

Hoá chất nuôi cấy *C. sinensis*

D-glucose (Merck)

Sucrose (Merck)

Peptone (Merck)

D-fructose (Merck)

Cao nấm men

KH_2PO_4 (Merck)

K_2HPO_4 (Merck)

MgSO_4 (Merck)

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)

Hoá chất sulfate hoá

Sulfur trioxide pyridine complex ($\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$) (Thụy Sĩ)

L-Tyrosine (Đức)

Kojic acid (Đức)

Sodium rhodizonat (Hàn Quốc)

Hoá chất xác định cấu trúc – liên kết của EPS

Acid hydroclorid (Merck)

Acid trifluoroacetic (Fisher)

Acetonitril (Prolabo)

Kali dihydrophosphate (Merck)

Methanol (Prolabo)

Natri hydroxyt (Merck)

Triethylamin (Merck)

Dimethyl sulfoxide (Merck)

Methyl iodide (Trung Quốc)

Pyridine (Merck)

4-Dimethylaminopyridine (Trung Quốc)

Sodium borohydride (Trung Quốc)

2.1.2.2. Thiết bị và dụng cụ

Thiết bị

+ Bếp cách thủy Memmert WBN 29, Đức

+ Cân kỹ thuật OHAUS SPS 202F, Trung Quốc

+ Cân phân tích Mettler Toledo XS205, Thụy Sĩ

+ Máy cô quay RE300, Anh

+ Máy đo pH Mettler Toledo Seven Easy, Thụy Sĩ

+ Máy ly tâm Hettich EBA 20, Anh

+ Máy khuấy từ AGE – Velp Y

+ Máy quang phổ tử ngoại- khả kiến Shimadzu UV-1700, Nhật

- + Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1260
- + Tủ sấy Memmert, Đức
- + Bể ổn nhiệt MEMMERT
- + Tủ sấy dụng cụ MEMMERT
- + Hệ thống cô quay chân không EYELA OSB-2100, N-1200A, N-1200B
- + Hệ thống máy lọc tiếp tuyến
- + Máy Microplate Reader
- + Bình khí trơ Argon
- + Tủ hút Ascent MAX - ESCO

Dụng cụ

- + Pipetman 10 – 100 μL , 100 – 1000 μL , 1000 – 5000 μL
- + Đĩa petri
- + Ống nghiệm
- + Erlen 250 mL
- + Pipet 1 – 25 mL
- + Becher 25 – 1000 mL
- + Bình định mức 10 – 1000 mL
- + Cuvette thủy tinh

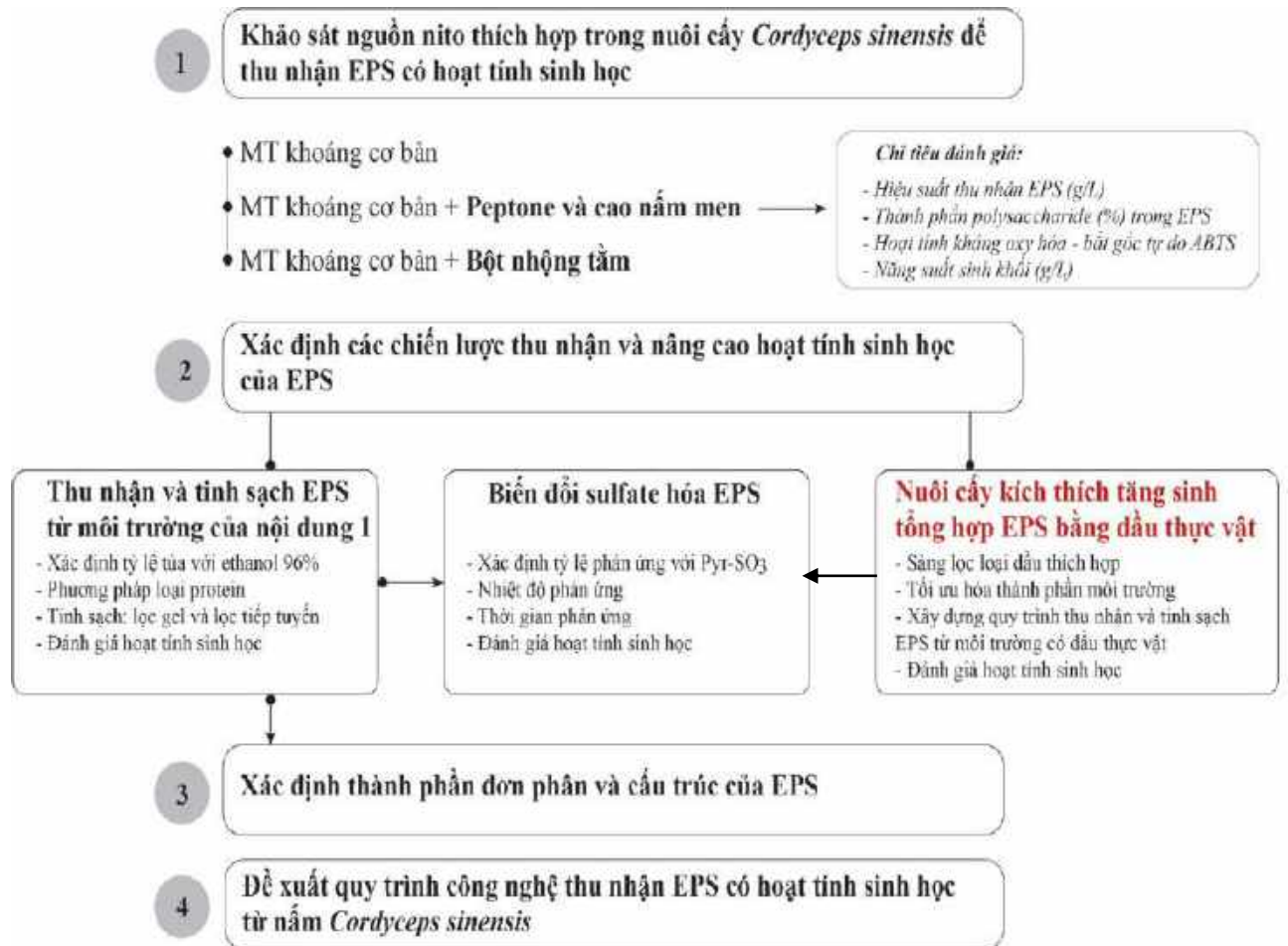
2.1.3. Môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C.sinensis*

- Khoai tây: 200 g/L
- Saccharose: 50 g/L
- K_2HPO_4 : 0,5 g/L
- KH_2PO_4 : 0,5 g/L
- MgSO_4 : 0,2 g/L

2.2. Quy trình thực nghiệm

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-

protein 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

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Nội dung 1: Khảo sát nguồn nito thích hợp trong nuôi cấy nấm *C. sinensis* để thu nhận EPS có hoạt tính sinh học và tăng sinh tổng hợp EPS bằng cách bổ sung dầu thực vật.

2.3.1. Chuẩn bị giống cấp 1

Nguyên tắc:

Hoạt hóa nhằm khôi phục hoạt tính giống nấm *C. sinensis* sau thời gian giữ giống bằng cách cấy chuyển từ ống giống sang môi trường PGA, trước khi thực hiện nuôi trồng trên các môi trường khác.

Tiến hành:

- Chuẩn bị môi trường PGA: khoai tây (200 g/L), glucose (20 g/L), agar (15 g/L). pH 6-7. Hấp khử trùng 15 phút ở 121 °C.
- Đổ 10-15 mL môi trường PGA vào đĩa petri
- Dùng que cấy vòng lấy một miếng thạch nhỏ có giống từ ống giống gốc sang đĩa petri
- Ủ nhiệt độ 20 ± 2 °C trong 7 ngày
- Thao tác thực hiện trong tủ cấy vô trùng

2.3.2. Chuẩn bị giống cấp 2**Nguyên tắc:**

Thực hiện bằng cách chuyển giống cấp 1 từ môi trường thạch sang môi trường lỏng giàu dinh dưỡng hơn để nhân nhanh hệ sợi nấm *C. sinensis* trước khi cấy giống vào môi trường nuôi cấy.

Tiến hành:

- Chuẩn bị môi trường lỏng PG: khoai tây (200 g/L), glucose (20 g/L) pH 6-7.
- Cho 200 mL PG vào erlen 250 mL, hấp 20 phút ở 121 °C.
- Cấy 2 khoanh giống cấp 1 vào erlen.
- Ủ 20 – 25 °C, từ 10 -12 ngày.

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

Nuôi cấy nấm *C. sinensis* trong môi trường lỏng tĩnh và thu EPS do nấm tiết ra môi trường trong quá trình phát triển. Thời gian nuôi cấy 30 – 40 ngày.

*Bảng 2.1. Thành phần 3 môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis**

Môi trường cơ bản	Môi trường peptone và cao nấm men	Môi trường bột nhộng
<ul style="list-style-type: none"> - Khoai tây: 200 g/L - Saccharose: 50 g/L - K₂HPO₄: 0,5 g/L - KH₂PO₄: 0,5 g/L - MgSO₄: 0,2 g/L 	<ul style="list-style-type: none"> - Khoai tây: 200 g/L - Saccharose: 50 g/L - K₂HPO₄: 0,5 g/L - KH₂PO₄: 0,5 g/L -MgSO₄: 0,2 g/L - Peptone: 6 g/L - Cao nấm men: 4 g/L 	<ul style="list-style-type: none"> - Khoai tây: 200 g/L - Saccharose: 50 g/L - K₂HPO₄: 0,5 g/L - KH₂PO₄: 0,5 g/L -MgSO₄: 0,2 g/L - Bột nhộng: 10 g/L

- Chuẩn bị 3 nồi môi trường 10 lít tương ứng theo bảng 2.1. Môi trường được hấp khử trùng ở 121 °C trong 45 phút. Để qua đêm trong phòng cấy cho nguội.

- Cấy giống vào nồi chứa môi trường nuôi cấy bằng cách đổ 2 erlen chứa giống vào mỗi nồi.

- Đổ 200 mL môi trường chứa giống vào hộp nhựa 500 mL.

- Theo dõi sự phát triển của nấm *C. sinensis* trong từng hộp 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, 40 ngày.

2.3.4. Thu nhận EPS

EPS là sản phẩm của nấm *C. sinensis* được tiết ra ngoài môi trường trong quá trình nuôi cấy lỏng-tĩnh. Bổ sung ethanol vào dịch chiết làm hàng số điện môi giảm và phá vỡ vỏ hydrat hóa của các phân tử EPS và các ion tích điện. Kết quả, các EPS bị tủa và được thu nhận bằng cách ly tâm.

Tiến hành:

Quy trình tách chiết EPS được thực hiện dựa theo nghiên cứu của Kim và Yun (2005) nhưng có một số điều chỉnh cho phù hợp với điều kiện thí nghiệm [55]:

+ Dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* (đã được tách sinh khối) được thu nhận bằng cách ly tâm 4.000 vòng/phút trong 10 phút.

+ Cô đặc dịch nổi còn 1/10 thể tích ban đầu bằng cô quay chân không ở 60 °C.

+ Tủa với ethanol lạnh 96 % theo tỷ lệ 1 dịch : 5 ethanol (v/v) trong 24h ở 4 °C.

+ Ly tâm 8.000 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ dịch nổi, thu tủa và rửa tủa với ethanol 96 %.

+ Đông khô tủa EPS và bảo quản ở 4 °C cho các phân tích tiếp theo.

2.3.5. Định lượng đường tổng

Nguyên tắc:

Hàm lượng đường của EPS được xác định dựa trên phản ứng màu đặc trưng của các sản phẩm đường bị phân hủy bởi acid sulfuric với phenol. Cường độ màu càng đậm, thông qua đo OD, ở bước sóng 490 nm càng cao, càng chứng tỏ hàm lượng đường càng cao. Saccharose được sử dụng làm chất chuẩn.

Tiến hành:

Trộn hỗn hợp phản ứng gồm 1 mL mẫu + 1 mL phenol 5 % + 5 mL H₂SO₄ đậm đặc, để yên trong 10 phút. Sau đó lắc đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Cuối cùng đo OD ở bước sóng 490 nm. Sử dụng saccharose (0 – 70 µg/mL) làm đường chuẩn. Thành phần đường (%) trong mẫu được xác định theo công thức 1 như sau:

$$\text{Thành phần polysaccharide (\%)} = \frac{C \times n \times V}{m \times 10^6} \quad (\text{Công thức 1})$$

Trong đó, C (µg/mL) là nồng độ đường suy ra từ đường chuẩn saccharose, n là độ pha loãng của mẫu, V (mL) là thể tích pha mẫu ban đầu, m (g) là khối lượng mẫu ban đầu.

2.3.6. Định lượng protein

Theo phương pháp Brafford dựa vào sự liên kết của thuốc nhuộm Coomassie Blue G250 với protein trong môi trường acid. Hàm lượng protein được xác định bằng cách đo OD của dung dịch ở bước sóng 595 nm.

Tiến hành:

Dung dịch thuốc thử Brafford: 0,01 g Coomassie Blue G250, hòa tan trong 50 mL ethanol tuyệt đối và 100 mL acid phosphoric 85 %, sau đó định mức với nước cất đến 1000 mL. Lắc đều và giữ lạnh ở 4 °C. Trộn 0,5 mL mẫu + 2,5 mL thuốc thử Brafford, lắc đều, để yên trong 10 phút ở nhiệt độ phòng và đo độ OD ở bước sóng 595 nm. Albumin (0 – 70 µg/mL) được sử dụng làm đường chuẩn. Hàm lượng protein (%) trong mẫu được xác định theo công thức 2 như sau:

$$\text{Thành phần protein (\%)} = \frac{C \times n \times V}{m \times 10^6} \quad (\text{Công thức 2})$$

Trong đó, C (µg/mL) là nồng độ protein suy ra từ đường chuẩn albumin, n là độ pha loãng của mẫu, V (mL) là thể tích pha mẫu ban đầu, m (g) là khối lượng mẫu ban đầu.

2.3.7. Khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺

Nguyên tắc:

Cation ABTS⁺ [2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] là một gốc tự do bền phát quang màu xanh, đặc trưng ở bước sóng 734 nm. Các chất kháng oxy hóa sẽ khử ion này thành dạng không màu ABTS - R⁺. Đo độ giảm OD của dung dịch ở bước sóng 734 nm sẽ xác định được hoạt tính của chất kháng oxy hóa so sánh với chất kháng oxy hóa chuẩn là vitamin C. Trong dịch kali persulfate, gốc ABTS⁺ bền 2 ngày ở nhiệt độ phòng trong tối.

Tiến hành:

Khảo sát khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ được thực hiện theo quy trình của Sudha năm 2011 với một số thay đổi phù hợp, gồm 3 giai đoạn cơ bản sau [22]:

- Tạo gốc tự do ABTS⁺: Hòa dung dịch ABTS⁺ 7 mM với dung dịch K₂S₂O₈ 2.45 mM theo tỷ lệ thể tích 1:1, ủ trong tối 12 – 16 giờ ở nhiệt độ phòng.

- Pha loãng dung dịch ABTS⁺: Pha loãng trong đệm PBS pH 7,4 cho đến khi dung dịch sau pha loãng (dung dịch A) có OD_{734 nm} = 0,70 ± 0,02.

- Tạo hỗn hợp phản ứng: Cho 3.000 µl dung dịch A vào 100 µl dung dịch mẫu cần phân tích, ủ tối trong 30 phút, đo OD 734 nm, mỗi nồng độ mẫu được lặp lại tối thiểu 3 lần.

Bảng 2.2. Bố trí thí nghiệm xác định hoạt tính bắt gốc ABTS⁺

Nồng độ (µg/ml)	0	1000	2000	3000	4000	5000	6000
V _{stock} (µl)	0	45	90	135	180	225	270
C _{stock} = 4000 (µg/ml)							
V _{H₂O} (µl)	450	405	360	315	270	225	180
V _{mẫu} (µl)	100	100	100	100	100	100	100
V _{ABTS⁺} (ml)	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Ủ tối trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, đo OD 734 nm.							

Tính toán:

$$\text{Khả năng bắt gốc tự do ABTS (\%)} = \frac{C \times n \times V}{m \times 10^6} \quad (\text{Công thức 3})$$

Với A_{blank} : giá trị OD_{734 nm} mẫu trắng (nước + dung dịch A)

$A_{\text{mẫu}}$: giá trị OD_{734 nm} mẫu phân tích (mẫu phân tích + dung dịch A)

2.3.8. Thu nhận và tinh sạch EPS

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

Sắc ký lọc gel GPC (Gel Permeation Chromatography) được sử dụng để phân tách các phân đoạn polymer dựa trên sự khác biệt MW và hình dạng của chúng. Các phân tử polymer bị phân tách thành các phân đoạn khác nhau theo MW. Phổ phân đoạn của polymer trong mẫu phân tích sẽ được ghi nhận và xác định MW theo thang chuẩn [71].

Tiến hành:

- Nạp mẫu EPS (10 g/l) thu được ở trên vào cột gel Sephadex-G100 có h=70 cm, d=2,4 cm.
- Ly giải cột bằng NaCl 0,2 M với tốc độ 0,5 ml/phút.
- Thu dung dịch ra khỏi cột 1,5 ml/ống.
- Xác định hàm lượng polysaccharide và protein của từng ống.
- Phân đoạn EPS được thẩm tách với nước cất qua màng thẩm tách 12 – 14 kDa.
- Thu nhận phân đoạn chứa EPS, đông khô, bảo quản lạnh ở -4 °C.

2.3.8.2. Thu nhận phân đoạn EPS bằng kỹ thuật lọc membrane theo phương pháp lọc tiếp tuyến

Nguyên tắc:

Lọc tiếp tuyến là kỹ thuật lọc bằng cách bơm dịch lọc tuần hoàn dọc theo bề mặt của màng lọc. Khi đó các thành phần có kích thước nhỏ hơn kích thước lỗ màng sẽ chui qua màng lọc. Còn lại dịch cô đặc chứa các chất có kích thước lớn hơn lỗ

màng được giữ lại và chảy ngược trở lại bể chứa. Dịch bơm vào được gọi là dịch feed. Dịch cô đặc trở lại bể chứa là retentate - được tiếp tục cô đặc tiếp bằng cách bơm qua màng. Dịch lọc gọi là permeate. [72].

Tiến hành:

- Hòa tan tủa EPS thu được với nước cất, để yên trong 2 giờ, ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch nổi.
- Cho dịch nổi qua hệ thống lọc tiếp tuyến, màng lọc có kích thước lỗ tách 750 kDa và 30 kDa; và màng lọc có kích thước lỗ tách 100 kDa và 750 kDa.
- Thu nhận phần dịch đặc retentate và dịch sau khi lọc permeate.
- Tủa dịch thu nhận với ethanol 96 % nhiệt độ 4 °C trong 24h. Sau tủa ly tâm thu cặn, sấy khô và bảo quản ở - 4 °C.

2.3.9. Cải biến sulfate hóa EPS

2.3.9.1. Tạo dẫn xuất EPS sulfate hóa

Trong phản ứng CSA-Pyr, hỗn hợp EPS và phức CSA-Pyr ở tỷ lệ EPS/SO₃.Py, nhiệt độ, môi trường và thời gian phản ứng phù hợp, nhóm sulfate –SO₃²⁻ từ phức hợp pyridine sulfur trioxide (SO₃.Py) sẽ gắn vào vị trí –OH các nhân đường của EPS và tạo ra các dẫn xuất sulfate EPS (S-EPS) [56].

Bảng 2.3. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm	Ký hiệu mẫu	Tỷ lệ EPS/SO ₃ .Py (w/w)	Thời gian (h)
1	S-EPS ₁	1:5	1
2	S-EPS ₂	1:5	2
3	S-EPS ₃	1:5	3
4	S-EPS ₄	1:7	1
5	S-EPS ₅	1:7	2
6	S-EPS ₆	1:7	3

Hòa tan 200 mg EPS với DMSO, khuấy từ trong 2h. Sau đó thêm SO₃.Py theo tỷ lệ ở bảng 2.3. Tiến hành phản ứng ở 90 °C trong hệ kín.

2.3.9.2 Xác định độ thay thế (DS)

Độ thay thế (DS) được định nghĩa là số nhóm SO_3^{2-} được gắn trên một đơn vị đường của chuỗi EPS và được xác định dựa trên hàm lượng SO_3^{2-} có trong mẫu. Ion SO_3^{2-} sẽ phản ứng với Ba^{2+} trong dung dịch mẫu làm giảm OD cường độ màu hồng của Ba^{2+} và thuốc thử natri rhodizonat ở bước sóng 529 nm. Dựa vào đường chuẩn Na_2SO_4 xác định hàm lượng SO_3^{2-} [69].

Bảng 2.4. Bố trí thí nghiệm xác định hàm lượng SO_3^{2-} trong mẫu

Thành phần phản ứng	Thử không	Thử thật
Nước cất (mL)	0,5	0
Mẫu/ Na_2SO_4 (mL)	0	0,5
Ethanol 96 %	2	2
BaCl_2 (mL)	1	1
Natri rhodizonat (mL)	1,5	1,5
Lắc đều, để trong tối ở nhiệt độ phòng trong 20 phút Đo độ hấp thu màu ở bước sóng 520 nm		

Thí nghiệm được thực hiện theo thứ tự ở bảng. Thành phần sulfate SO_3^{2-} của dẫn xuất được xác định dựa trên đường chuẩn Na_2SO_4 . Dựa trên hàm lượng SO_3^{2-} , độ thay thế DS được tính theo công thức như sau:

$$DS = \frac{1,62 \times S\%}{32 - 1,02 \times S\%} \quad (\text{Công thức 4})$$

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

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

$$\text{HS (\%)} = \frac{\text{Khối lượng dẫn xuất (g)}}{\text{Khối lượng EPS đầu vào (g)}} \quad (\text{Công thức 5})$$

Thực hiện đo phổ bằng máy đo FT-IR tại Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ.

2.3.10. Nuôi cấy kích thích tăng sinh tổng hợp EPS bằng dầu thực vật

2.3.10.1. Khảo sát ảnh hưởng của dầu thực vật lên phát triển và tạo EPS trong nuôi cấy lỏng-tĩnh *C. sinensis*

Sợi nấm *C. sinensis* phát triển trong môi trường lỏng tĩnh bổ sung dầu thực vật kích thích tạo sinh khối nấm và tiết EPS ra môi trường.

- 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. Cho dầu ô liu và Tween 80 vào erlen 250 ml, dùng máy khuấy từ khuấy đều hỗn hợp thành dung dịch đồng nhất. Bổ sung lượng nước thích hợp. Dùng máy khuấy từ khuấy đều. Hấp khử trùng 15 phút ở 121 °C. Thực hiện tương tự với dầu dừa và dầu hướng dương.
- Môi trường được rót vào nồi inox, hấp khử trùng 30 phút, 121 °C.
- Để nguội qua đêm trong tủ cấy, bổ sung 1 bình giống cấp 2 và dầu thực vật.
- Khuấy đều bằng máy khuấy từ trong 5 phút. Đổ 200 ml môi trường vào hộp nhựa.
- Nuôi lỏng-tĩnh ở nhiệt độ 20 – 25 °C, trong 40 ngày.
- Dịch thu được hấp khử trùng để thu nhận EPS.

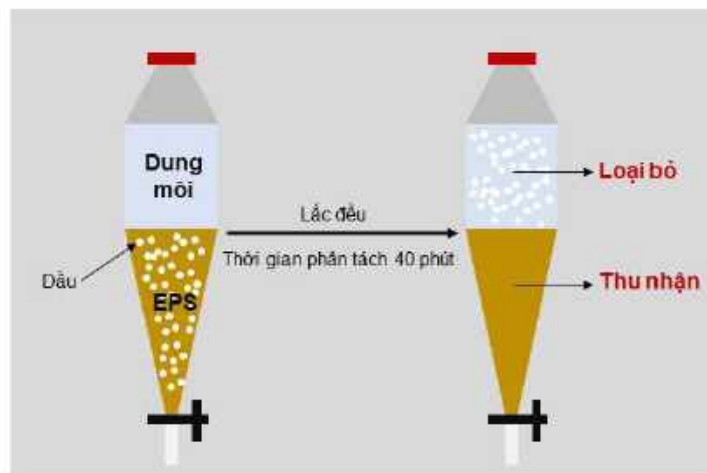
Quy trình tách chiết EPS từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* dựa trên phương pháp của Kim và Yun (2003) [73]; Sharma Sapan Kumar và cộng sự (2015) có chỉnh sửa liên quan đến bổ sung và loại dầu ra khỏi dịch nuôi cấy (Hình 2.2).

2.3.10.2. Tách chiết EPS từ dịch nuôi cấy *C. sinensis* bổ sung dầu



Hình 2.2. Sơ đồ tách chiết EPS từ dịch nuôi cấy *C. sinensis* bổ sung dầu

❖ Khảo sát loại dầu ra khỏi dịch bằng chiết lỏng-lỏng



Hình 2.3. Tách dầu ra khỏi dịch nuôi cấy sử dụng dung môi hữu cơ

Trong chiết lỏng-lỏng sử dụng các loại dung môi hữu cơ có tính phân cực khác nhau để loại dầu ra khỏi dịch: Dung môi hữu cơ không phân cực sẽ hòa tan dầu không

phân cực vào phase dịch lỏng phía trên. EPS mục tiêu sẽ nằm lại ở phase dịch lỏng phía dưới.

Ba loại dung môi được chọn để khảo sát là petroleum ether, hexan, diethyl ether. Dịch nuôi cấy được lọc vải, hấp khử trùng ở 121 °C trong vòng 15 phút. Cô quay giảm thể tích còn 1/4. Cho mẫu dịch đã cô quay vào 3 bình lỏng. 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 EPS 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.

Bảng 2.5. Bố trí thí nghiệm loại dầu

Tên dung môi	PE	Hexan	Diethyl ether
Thể tích mẫu (ml)	100	100	100
Thể tích dung môi (ml)	100	100	100

❖ ***Khảo sát tỷ lệ rửa ethanol 96⁰ để thu nhận exopolysaccharide***

EPS ở dịch thu được ở phase bên dưới sẽ được rửa bằng ethanol. Do ethanol có hằng số điện môi nhỏ hơn, sẽ ngăn cản sự phân tán của EPS trong dịch làm độ hòa tan của EPS giảm và rơi vào rửa.

Dịch nuôi cấy sau khi loại dầu được rửa với ethanol 96⁰ theo các tỷ lệ 1:3, 1:4, 1:5. Để lạnh 4 °C trong 24h. Ly tâm 4000 vòng/ phút trong vòng 10 phút, bỏ dịch. Thu rửa và rửa rửa 3-4 lần với ethanol 96⁰. Sấy khô ở 60 °C trong vòng 4h. Xác định hàm lượng EPS và protein có trong từng lô thí nghiệm (Bảng 2.6).

Bảng 2.6. Bố trí thí nghiệm xác định tỷ lệ rửa

Tỷ lệ	1:3	1:4	1:5
Thể tích mẫu (ml)	10	10	10
Thể tích ethanol 96 ⁰ (ml)	30	40	50

2.2.11. Khảo sát loại protein khỏi phức với EPS

Để khảo sát riêng EPS nhiệm vụ tiếp theo là phải tách protein ra khỏi phức EPS-protein thu được ở trên. Có một số phương pháp loại protein khỏi phức với EPS.

Loại protein bằng phương pháp Sevag

Sử dụng dung môi có hằng số điện môi thấp ngăn cản sự phân tán của protein trong môi trường làm cho độ hòa tan của protein giảm và rơi vào tủa. 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 bằng thuốc thử Sevag (Chloroform: Buthanol) với 3 tỷ lệ khảo sát 3:1; 4:1 và 5:1 [50]. Hòa tan tủa EPS thô bằng nước, lắc mạnh với thuốc thử Sevag. Ly tâm 4.000 vòng/ phút 10 phút. Thu dịch EPS, bỏ lớp dung môi và tủa. Lặp lại quá trình từ 3-5 lần cho đến khi không còn kết tủa. Dịch EPS thu được sau đó được sấy khô ở 60 °C, bảo quản EPS ở 4 °C. Xác định hàm lượng protein và EPS 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.

Loại protein bằng TCA

Thông qua việc các cation protein sẽ gắn với TCA tạo muối không tan kết tủa, do pI của protein thấp hơn pI của TCA. 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 [70]. Hòa tan EPS thô bằng nước, ủ với TCA 10 %, 20 %, 30 %, 40 % điều chỉnh hỗn hợp đến pH 3,0. Giữ lạnh 4 °C trong 24h, sau đó ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Thu dịch, lặp lại quá trình 3 lần. Xác định hàm lượng protein và EPS trước và sau khi loại protein. Xác định khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ của mẫu EPS trước và sau khi loại protein.

Loại protein ra khỏi phức với EPS bằng protease Alcalase

Sử dụng enzyme endoprotease Alcalase có 3 hoạt tính xúc tác khác nhau là peptidase, amidase và esterase cắt các liên kết peptide trong phân tử protein trong phức với EPS thành các đoạn peptide nhỏ, tách ra khỏi phức với EPS và tan vào dịch.

Hòa tan mẫu EPS thô vào nước, trộn với enzyme Alcalase 10U, 20U, 30U, 40U, 50U theo tỷ lệ 3:1 v/v. Ủ ở 60 °C trong 2 giờ. Xác định hàm lượng protein và EPS trước và sau khi loại protein. Xác định khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ của mẫu EPS trước và sau khi loại protein.

2.3.12. **Đánh giá hoạt tính kháng phân bào của các phân đoạn EPS**

Nguyên tắc:

Sử dụng quy trình cải tiến của Viện Ung Thư Quốc Gia Hoa Kỳ (NCI) (*In Vitro* Cancer Cell Line Screen – Manual of Operations (08/2005)). Thử nghiệm SRB là phương pháp so màu đơn giản và nhạy để xác định độc tính tế bào của chất nghiên cứu. SRB là thuốc nhuộm tích điện âm sẽ liên kết tĩnh điện với các phần tích điện dương của protein. Lượng thuốc nhuộm liên kết sẽ phản ánh lượng protein tổng của tế bào. Trong thử nghiệm, tế bào được cố định, rửa và nhuộm với SRB. Sau đó SRB liên kết với protein tế bào được hòa tan tạo dung dịch trong suốt có màu hồng. OD đo được của dung dịch tương quan với lượng protein tổng hay số lượng tế bào. Sự thay đổi lượng tế bào so với mẫu chứng phản ánh độc tính tế bào của chất nghiên cứu.

Tiến hành:

Các dòng tế bào ung thư gan Hep-G2 (từ thế hệ 4 đến 20) được nuôi trong môi trường E'MEM có bổ sung 10 % FBS (Fetal Bovine Serum) ở 37 °C và 5 % CO₂ đạt độ phủ khoảng 70-80 %.

- Tách tế bào bằng trypsin/EDTA, loại môi trường; rửa lớp đơn tế bào bằng 2 ml PBS (NaCl 10 g, KCl 0,25 g, Na₂HPO₄ 1,44 g, KH₂PO₄ 0,25 g, nước cất đủ 1 L); loại PBS và thêm 1 mL trypsin/EDTA vào bình cho ngập lớp đơn tế bào trong 1-2 phút; loại trypsin/EDTA và thêm 1 mL môi trường vào bình; nhẹ nhàng huyền phù tế bào bằng pipette và chuyển 1 mL dịch huyền phù tế bào vào eppendorf 1,5 mL.
- Đếm tế bào trong buồng đếm hồng cầu bằng phương pháp Trypan blue. Xác định tổng số tế bào trong 1 mL.
- Tạo dịch tế bào đồng nhất có mật độ mong muốn bằng cách trộn dịch huyền phù tế bào ban đầu với môi trường theo tính toán ở trên.
- Đưa 100 µL dịch tế bào đồng nhất vào mỗi giếng. Kiểm tra đĩa dưới kính hiển vi để xem mức độ trải đều của dịch tế bào trong giếng và ủ các đĩa thí nghiệm trong tủ ấm 24 giờ.
- Pha loãng phân đoạn ESP trong tủ vô trùng.
- Ủ trong tủ ấm 48 giờ
- Cố định tế bào: lấy đĩa khỏi tủ ấm và thêm 50 µl TCA 50 % lạnh vào mỗi giếng; đặt đĩa trong tủ lạnh từ 1-3 giờ; lấy đĩa khỏi tủ lạnh và loại dịch trong các giếng

bằng cách lật ngược đĩa; rửa đĩa 5 lần bằng nước (200 μ L/giếng), thấm đĩa trên giấy sau khi rửa. Đặt đĩa trên khay, để khô ở nhiệt độ phòng trong 12-24 giờ.

- Nhuộm protein với SRB: thêm 100 μ L SRB vào mỗi giếng, để ở nhiệt độ phòng trong 20 phút; rửa đĩa 4 lần với acetic acid 1 % (200 μ L/giếng); thấm đĩa trên giấy sau khi rửa để loại acetic acid còn lại; đặt đĩa trên khay, để khô 12-24 giờ.
- Đọc kết quả: thêm 200 μ L Tris 10 mM vào mỗi giếng; lắc đĩa trên máy lắc đến khi SRB cố định được hòa tan hết (10 phút); ghi nhận giá trị OD tại bước sóng 492 và 620 nm bằng máy đọc ELISA reader.
- Tính toán tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào theo công thức:

$$I(\%) = \frac{OD(492-620)C - OD(492-620)TN}{OD(492-620)C} \times 100 \quad (\text{Công thức 6})$$

- Tính toán thống kê bằng phần mềm SPSS 16.0.

(*) Một số mẫu bị nhiễm khuẩn và tạo tủa trong môi trường nuôi cấy nên sau khi mẫu hòa tan trong DMSO và pha loãng đến nồng độ yêu cầu, cần lọc vô khuẩn bằng màng lọc 0,22 μ m.

2.2.13. Thử nghiệm apoptosis tế bào của các phân đoạn EPS

Nguyên lý của phương pháp là sử dụng kính hiển vi huỳnh quang để phát hiện hiện tượng apoptosis dựa trên tính thấm vào màng tế bào của acridine orange và ethidium bromide phát huỳnh quang. Acridine orange thấm cả vào tế bào sống và chết còn ethidium bromide chỉ thấm vào tế bào chết. Như vậy, tế bào sống sẽ phát huỳnh quang màu xanh của acridine orange, còn tế bào chết sẽ phát huỳnh quang màu đỏ cam, là sự kết hợp giữa màu huỳnh quang của acridine orange và ethidium bromide [14].

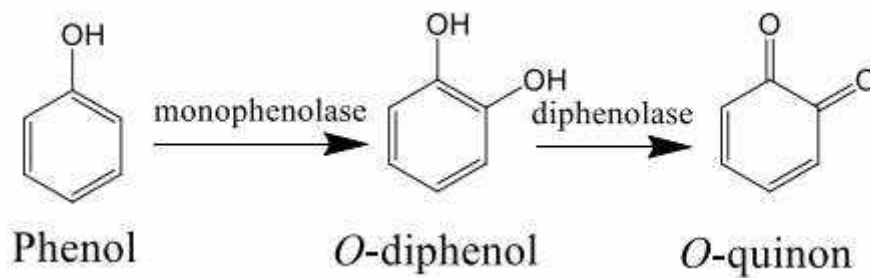
- Tế bào được cho vào các đĩa nhựa nuôi cấy đường kính 35 mm đạt mật độ 2×10^5 tế bào/đĩa.
- Ủ tế bào ở 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂, 24 giờ.
- Cảm ứng tế bào với mẫu thử ở nồng độ IC₅₀.
- Sau các khoảng thời gian cảm ứng, hút hết dịch nổi trong đĩa. Sau đó thêm 25 μ L dung dịch nhuộm acridine orange/ ethidium bromide (100 μ g/ml acridine

orange: 100 µg/ml ethidium bromide) và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang.

2.3.14. Khảo sát soạt tính ức chế Tyrosinase của các phân đoạn EPS

Nguyên tắc:

Tyrosinase hay còn gọi là enzyme polyphenol oxidase, là một enzyme monooxygenase chứa Cu tham gia vào hai phản ứng riêng biệt của quá trình chuyển hóa melanin: Hydroxyl hóa monophenol thành O-diphenol và oxy hóa O-diphenol thành O-quinol. O-quinol tạo thành sẽ tham gia một loạt các phản ứng để tạo melanin [74].



Hình 2.4. Quá trình oxy hóa phenol do Tyrosinase xúc tác

Acid kojic (5-hydroxyl-2-(hydroxymethyl)- γ -pyron) ức chế sự hình thành sắc tố từ L-DOPA, norepinephrine và dopamine dưới sự xúc tác của Tyrosinase. Điều này có nghĩa rằng acid kojic có thể giảm chuyển hóa O-diphenol thành O-quinon ngăn cản tạo thành sắc tố.

Tiến hành:

70 µL dung dịch S-EPS pha loãng trong DMSO 5 %, thành dãy nồng độ khác nhau được nạp lên đĩa 96 giếng. Mẫu chứng âm không chứa chất thử nghiệm. Thêm 30 µL dung dịch Tyrosinase nồng độ 333 U/mL và ủ ở nhiệt độ phòng 10 phút. Thêm 110 µL – Tyrosinase 2 mM và tiếp tục ủ trong 30 phút. Đo OD ở bước sóng 490 nm. Kojic acid được dùng làm chứng dương. Các mẫu đi kèm với mẫu trắng không chứa Tyrosinase.

% ức chế Tyrosinase được xác định bằng công thức:

$$IC (\%) = \frac{(A \text{ chứng âm} - A \text{ blank}) - (A \text{ thử nghiệm} - A \text{ blank})}{A \text{ chứng âm} - A \text{ blank}} \times 100 \quad (\text{Công thức 7})$$

2.3.15. Xác định thành phần đường đơn của EPS

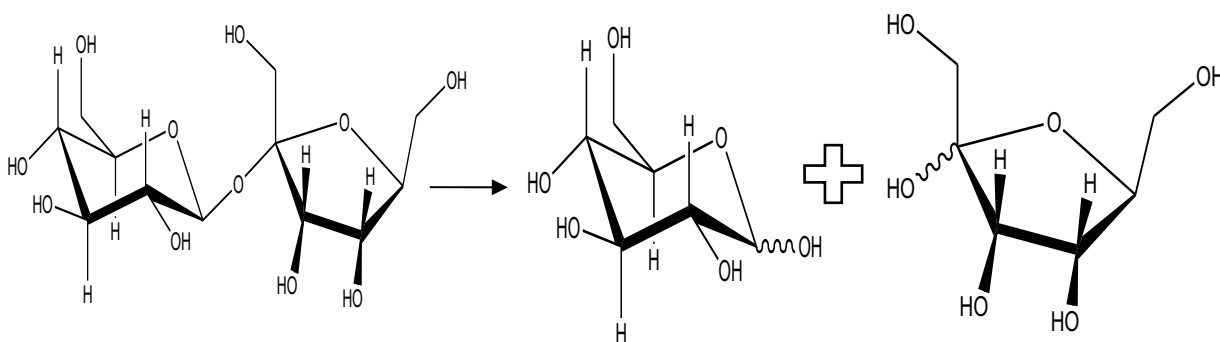
Nguyên tắc:

Phương pháp GC-MS được sử dụng để xác định thành phần đường đơn 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 EPS dưới tác động của acid bị thủy phân thành các đường đơn, làm xuất hiện các nhóm OH tự do. Sau đó, các đường đơn này được acetyl hoá với tác nhân anhydride acetic (Ac_2O), gắn các gốc acetyl này với nhóm -OH, chuyển thành các cấu trúc dễ bay hơi dễ dàng được phân tích trong hệ thống GC-MS.

Tiến hành:

Thủy phân: Tham khảo quy trình của Yu và cộng sự (2007) [22], có sửa đổi để phù hợp với điều kiện thí nghiệm liên quan đến thời gian, nhiệt độ và nồng độ acid sử dụng.

Dưới tác dụng của acid HCl, EPS bị thủy phân thành các phân tử đường đơn do liên kết glycosidic giữa các phân tử này bị phá vỡ.

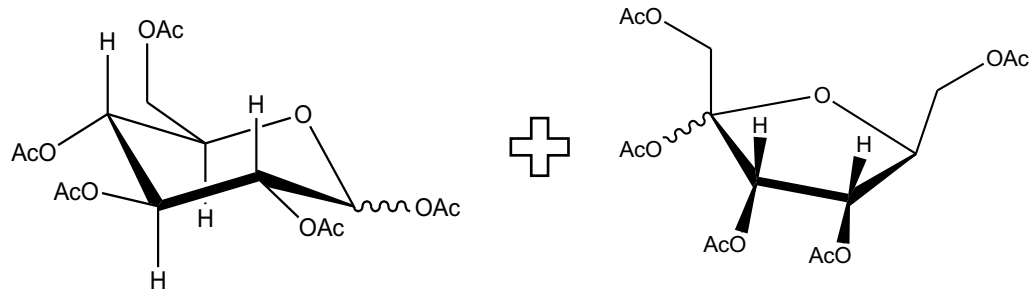


Hình 2.5. Mô tả phản ứng thủy phân của disaccharide

Thủy phân EPS bằng acid hydrochloric (HCl): Cân 35 mg EPS đã tinh sạch vào bình cầu cổ nhám 10 mL, thêm 2,5 mL HCl 10%. Sử dụng hệ hoàn nguyên ở nhiệt độ $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 3 giờ. Sau phản ứng, để nguội về nhiệt độ phòng và trung hòa về pH 7 bằng NaOH 1 M. Cô quay dịch trung hoà để loại bớt nước. Kiểm tra sản phẩm thủy phân thu được bằng sắc ký bản mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao.

❖ *Acetyl hóa EPS:* Mẫu EPS sau khi được thủy phân hoà tan với 3 mL Ac_2O trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Thêm 4 mL hỗn hợp DMAP/pyridine (0,025 M). Cho hỗn hợp vào bình cầu phản ứng ở nhiệt độ $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ. Sau phản ứng, hỗn hợp

được chiết với ethyl acetate và HCl 10 %, thu pha dịch dung môi hữu cơ. Lặp lại 3 lần để loại bỏ hết pyridine trong hỗn hợp, sau đó sấy khô.



Hình 2.6. Các đường đơn sau khi bị acetyl hoá

❖ Phân tích GC-MS

Mẫu sấy khô được hoà vào dung môi thích hợp để chạy GC-MS sử dụng cột Thermo-Electron capillary GC (15 m x 0.25 id x 0.25 pm, 5 % diphenyl). Tốc độ dòng khí Helium là 1 mL/phút. Nhiệt độ buồng 190 °C trong 4 phút, sau đó tăng theo nhịp độ 4 °C/phút tới 230 °C, duy trì trong 8 phút. Nhiệt độ cổng tiêm và đầu dò tương ứng với 250 °C và 300 °C. Thể tích tiêm mẫu 1 µL.

2.3.16. Xác định và dự đoán cấu trúc và liên kết của EPS

Nguyên tắc: Tham khảo quy trình của Wang và cộng sự (2019) [65].

Sử dụng GC-MS tương tự như trong mục trên, khác biệt duy nhất là quá trình chuyển đổi hoá học EPS thành cấu trúc dễ bay hơi được thực hiện theo quy trình: methyl hoá → thủy phân → hoàn nguyên → acetyl hoá. EPS chuyển hóa thành alditol acetate bị methyl hoá thành PMAAs dễ bay hơi. Quá trình này cũng cho phép xác định thành phần đường đơn liên kết trong EPS. Các EPS có các nhóm -OH tự do bên ngoài được methyl hoá với tác nhân là CH₃I. Gốc methyl gắn nhóm -OH, làm cho cấu trúc của EPS ít phân cực hơn. Sau methyl hóa. Các EPS sẽ bị thủy phân acid thành các đường đơn, làm xuất hiện các nhóm -OH tự do. Các nhóm -OH tự do sẽ được acetyl hoá với tác nhân là anhydride acetic (Ac₂O). Các gốc acetyl sẽ chiếm lấy O trong nhóm -OH và chuyển thành các cấu trúc dễ bay hơi và được phân tích trong hệ thống GC-MS.

2.3.17. Xác định cấu trúc tổng thể của EPS

Sử dụng phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) nghiên cứu cấu trúc phân tử của các hợp chất hữu cơ thông qua xác định cộng hưởng tương tác bức xạ điện từ của các hạt nhân trong từ trường mạnh [4].

Tiến hành:

Trong phân tích NMR, EPS được trao đổi với deuterium bằng cách hoà mẫu trong deuterium oxide (D₂O). Hoà tan 20 mg EPS sau tinh sạch trong 1 mL D₂O, đánh siêu âm trong 1 giờ, để qua đêm ở nhiệt độ phòng để quá trình trao đổi xảy ra. Lặp lại 3 lần các bước trên trước khi xác định cấu trúc tổng thể EPS với phổ NMR.

2.3.18. 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 – BIỆN LUẬN

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

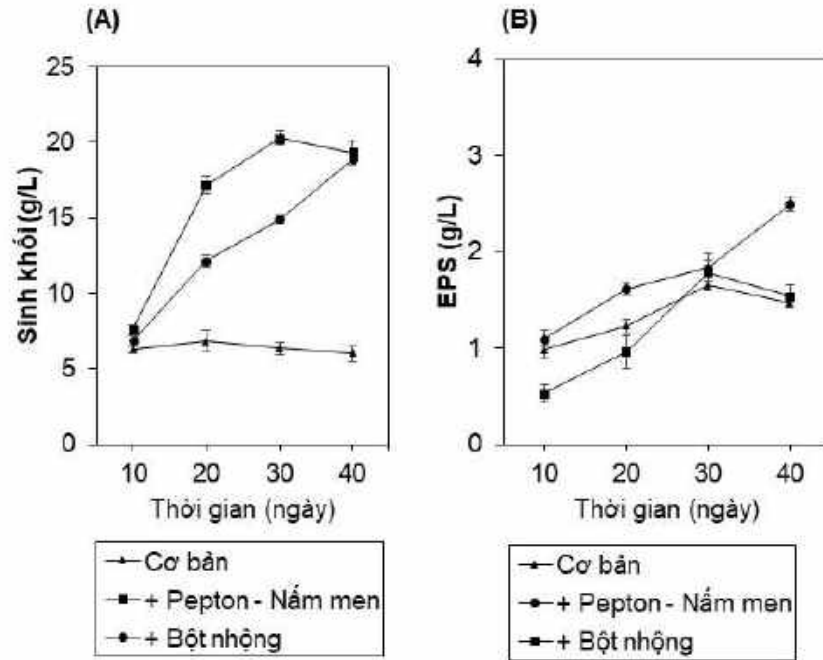
3.1.1. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến tạo sinh khối và phức EPS-protein

Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitơ khác nhau như peptone, cao nấm men và nhộng tằm 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.

Kết quả 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 bột nhộng tằm cũng tốt hơn so với trên môi trường cơ bản. Ở ngày thứ 30, sinh khối nấm trên môi trường bổ sung bột 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 bột 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 (Hình 3.1A).

Phức EPS trong quá trình sinh trưởng của nấm *C. sinensis*, thường được tiết nhiều trong pha ổn định. Ở môi trường cơ bản không bổ sung nitơ, thời gian sinh trưởng của nấm ngắn, vào phase ổn định từ ngày 20 đến 30. Phức EPS tiết ra từ nấm đạt cao nhất ở ngày thứ 30 là 1,65 g phức EPS/L (Hình 3.1B). Trên môi trường bổ sung peptone và cao nấm men, phức EPS được tạo ra tăng dần từ 1,1 g ở ngày thứ 10 đến 2,5 g ở ngày thứ 40. Do vậy, thời điểm thu nhận phức EPS tốt nhất từ *C. sinensis* nuôi cấy lỏng-tĩnh trên môi trường peptone và cao nấm men là ngày thứ 40 (Hình 3.1B). Vào thời điểm, nấm đang ở cuối phase ổn định và đầu phase suy vong. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Hồ Thị Phương Thảo (2015) với năng suất là 2,75 g phức EPS/L và nghiên cứu của Lo và cộng sự (2013) với năng suất trong khoảng từ 0,43 đến 3,21 g phức EPS/L [13]. Trong khi đó, trên môi trường bổ sung

bột nhộng tằm, năng suất tạo phức EPS do nấm *C. sinensis* được ghi nhận tăng từ 0,5 đến 1,8 g sau 10-30 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, sự tiết phức EPS giảm dần sau đó. Ở thời điểm ngày thứ 40, phức EPS thu được nhỏ hơn so với thời điểm 30 ngày (Hình 3.1B).



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].

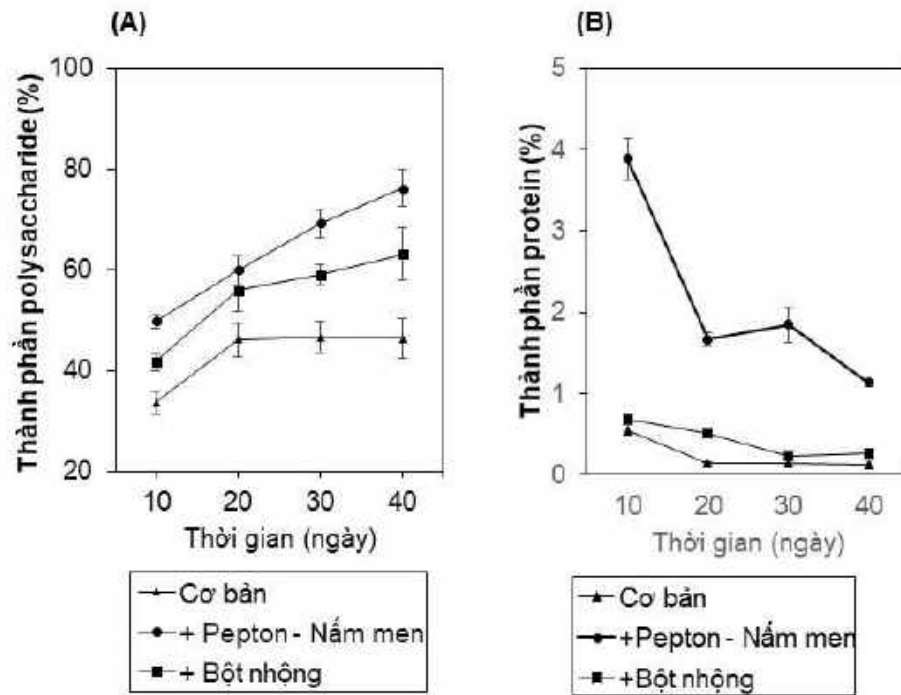
3.1.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến thành phần EPS trong phức EPS-protein

Polysaccharide là cấu phần quan trọng và quyết định đến hoạt tính sinh học của phức EPS-protein. Do đó, tiếp theo phải tìm hiểu ảnh hưởng của nguồn nitơ đến thành phần polysaccharide trong phức EPS-protein do nấm *C. sinensis* tạo ra trong nuôi cấy lỏng-tĩnh (Hình 3.2).

Kết quả cho thấy phức EPS-protein thu nhận từ môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh bổ sung peptone và cao nấm men có thành phần polysaccharide cao hơn đáng kể so

với 2 môi trường còn lại ở tất cả các thời điểm khảo sát. Điểm thú vị là trên môi trường peptone và cao nấm men, nấm sản xuất phức EPS-protein với thành phần polysaccharide tăng dần đều trong thời gian sinh trưởng trong khoảng từ 10-40 ngày. Ở thời điểm ngày thứ 10, thành phần polysaccharide trong phức EPS-protein là 50 % và tăng dần liên tục đến ngày thứ 40 (Hình 3.2A). Xu thế này cũng được ghi nhận khi nấm *C. sinensis* nuôi cấy trên môi trường bổ sung nhộng tằm. Mặc dù thành phần polysaccharide của phức EPS-protein trên môi trường này là thấp hơn so với thành phần polysaccharide của phức EPS-protein trên môi trường peptone và cao nấm men. Ở ngày thứ 40, thành phần polysaccharide của phức EPS-protein thu nhận từ 2 môi trường này tương ứng là 63 % và 76 % ($p < 0.05$). Trong khi đó, trên môi trường cơ bản, thành phần polysaccharide của phức EPS-protein là thấp nhất ở tất cả các thời điểm khảo sát. Hơn nữa, kể từ sau ngày thứ 20 ngày, thành phần polysaccharide của phức EPS-protein tạo ra trên môi trường này dường như không thay đổi ở giá trị khoảng 46 %.

Kết quả phân tích còn cho thấy các phức EPS-protein này còn chứa một lượng nhỏ protein dao động từ 0,1 – 3,9 % (Hình 3.2B). Trong đó, phức EPS-protein từ môi trường peptone và cao nấm men có thành phần protein cao hơn so với 2 môi trường còn lại. Kết quả này gợi ý về sự tồn tại của phức polysaccharide-protein. Các nghiên cứu trước đã xác nhận EPS tạo bởi nấm *C. sinensis* có thể tồn tại ở dạng phức với protein. Leung và cộng sự (2009) đã ly trích EPS tạo bởi nấm *C. sinensis* Cs-HK1 từ môi trường bổ sung peptone và cao nấm men có thành phần polysaccharide khoảng 65-70 % và chứa khoảng 25 % protein [77]. Hoạt tính sinh học của phức EPS-protein đã được chứng minh là phụ thuộc đáng kể vào thành phần protein trong phức bởi Huang và cộng sự (2013). Như vậy có thể gợi ý rằng, thành phần protein cao hơn trong phức EPS-protein từ môi trường nuôi cấy bổ sung peptone và cao nấm men có thể đóng vai trò quan trọng trong thể hiện hoạt tính sinh học của phức EPS-protein [50].

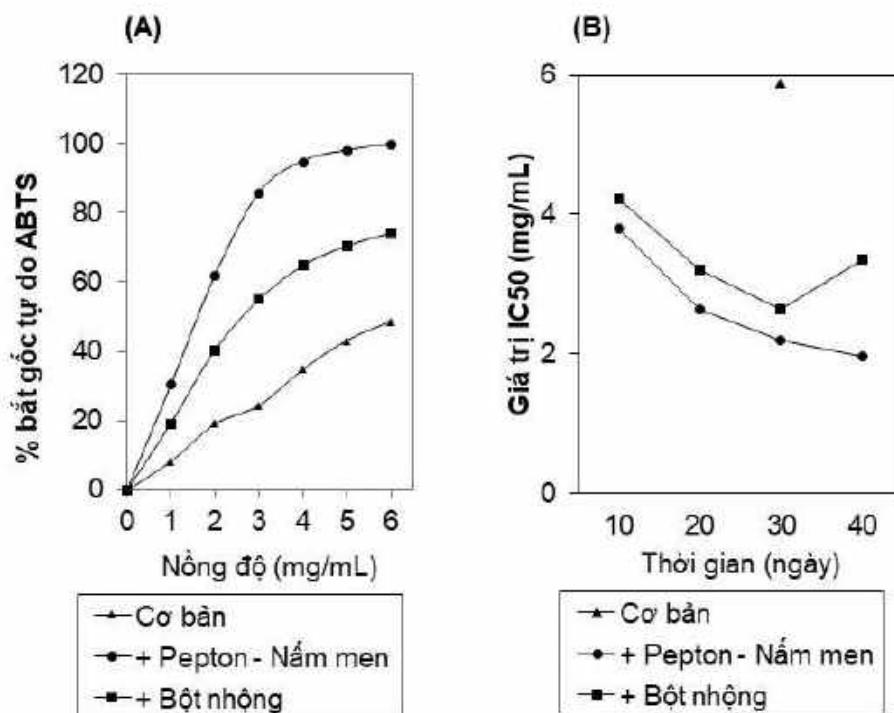


Hình 3.2. Sự thay đổi về hàm lượng polysaccharide (A) và protein (B) trong EPS tách chiết từ 3 môi trường khác nhau theo thời gian nuôi cấy từ 10 – 40 ngày

Kết luận, kết quả khảo sát cho thấy nguồn nitơ đóng vai trò rất quan trọng trong sinh tổng hợp phức EPS-protein của nấm *C. sinensis*. Sự hiện diện đồng thời của polysaccharide và protein trong phức EPS-protein 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.

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

Kết quả khảo sát cho thấy hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ của phức EPS-protein thay đổi đáng kể phụ thuộc vào nguồn nitơ sử dụng trong nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*. Phức EPS-protein 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-protein từ môi trường cơ bản (Hình 3.3A).



Hình 3.3. (A) Hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ của phức EPS-protein 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-protein theo thời gian nuôi cấy thể hiện qua IC₅₀ (mg/mL).

Giá trị IC₅₀ thấp thể hiện hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ của phức EPS-protein từ môi trường peptone và cao nấm men cao hơn so với 2 môi trường còn lại (Hình 3.3B). IC₅₀ là nồng độ tại đó hơn 50 % các gốc tự do ABTS⁺ bị bắt bởi EPS. Do đó EPS có giá trị IC₅₀ càng thấp càng thể hiện hoạt tính bắt ABTS⁺ càng cao. Phức EPS-protein từ môi trường peptone và cao nấm men có IC₅₀ là thấp hơn so với từ 2 môi trường còn lại.

Điểm thú vị là trên môi trường bổ sung peptone và cao nấm men, hoạt tính bắt ABTS⁺ của phức EPS-protein tăng dần theo thời gian nuôi cấy. Bằng chứng là giá trị IC₅₀ của EPS thu nhận ở ngày thứ 40 thấp hơn đáng kể, khoảng 2 lần, so với IC₅₀ của phức EPS-protein thu nhận ở ngày thứ 10. Điều này có thể liên quan đến sự gia tăng của thành phần polysaccharide trong phức EPS-protein theo thời gian (Hình 3.2A). Xu thế này cũng quan sát thấy ở phức EPS-protein từ môi trường bổ sung nhộng tằm trong khoảng thời gian từ 10-30 ngày nuôi cấy. Hơn nữa, thành phần protein của phức

EPS-protein từ môi trường peptone và cao nấm men có thể tham gia vào việc cải thiện hoạt tính bắt gốc tự do của chúng.

Kết luận: Nguồn nitơ trong môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* ảnh hưởng đáng kể đến sinh tổng hợp phức EPS-protein có hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺. 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-protein. 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 ABTS⁺

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. Còn lại đa số đạt năng suất thấp hơn trong khoảng 20-25 g/L sinh khối và 2,8-4,1 g/L EPS (Kim và Yun, 2005; Leung và cộng sự 2007; Wu, Chen và Hao 2009 và Yin và cộng sự 2013). 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 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 bột nhộng tằm cũng tốt hơn so với trên môi trường cơ bản. Ở ngày thứ 30, sinh khối nấm trên môi trường bổ sung bột 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 bột 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.

Thành phần N trong môi trường nuôi cấy lỏng tĩnh nấm *C. sinensis* ảnh hưởng đáng kể tới thành phần EPS trong phức EPS-protein. Môi trường nuôi cấy bổ sung peptone và cao nấm men cũng kích thích tăng tạo EPS so với trong môi trường lỏng cơ bản và bổ sung nhộng tằm giống như trong nuôi cấy nấm *C. sinensis* lỏng-khuấy [Leung và cộng sự 2007; Wu, Chen và Hao 2009 và Yin và cộng sự 2013]. Liên quan đến hoạt tính kháng oxy hóa bắt gốc tự do ABTS⁺ của EPS thu nhận từ môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* cũng cao hơn so với môi trường lỏng cơ bản và bổ sung nhộng tằm.

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

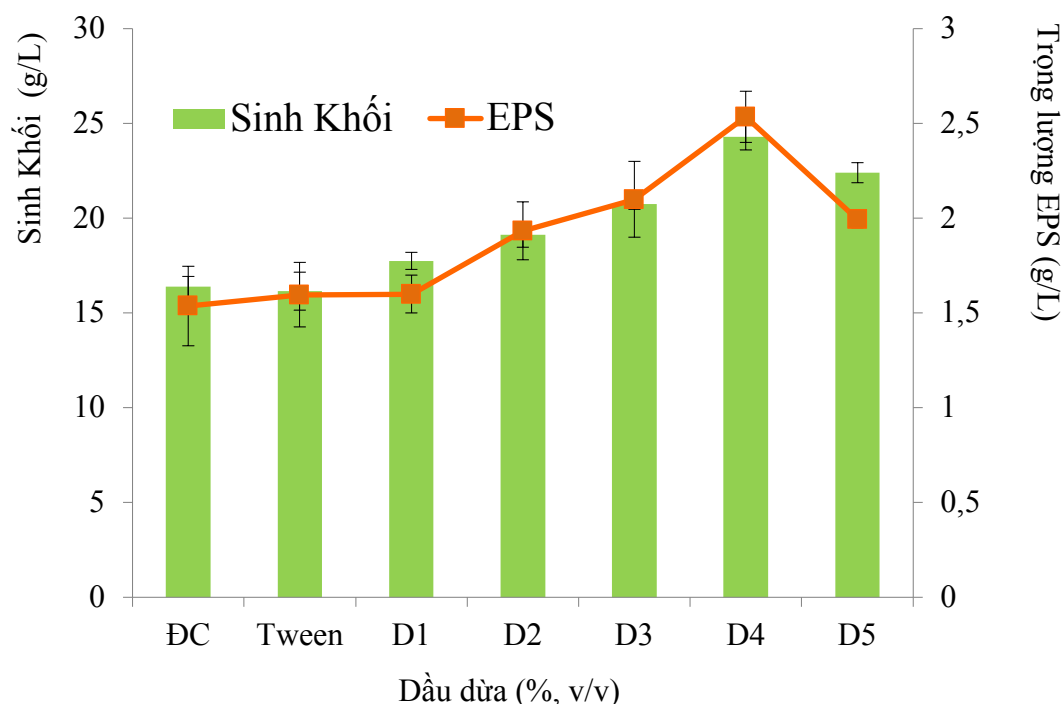
3.2.1. Sự thay đổi hàm lượng sinh khối và EPS của nấm *C. sinensis* trong môi trường nuôi cấy có bổ sung dầu thực vật

Theo tài liệu tham khảo, các tác giả đã bổ sung một số dầu thực vật nồng độ từ 1-5% vào môi trường nuôi cấy lỏng *C. sinensis* [78, 80]. 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 %, dầu hướng dương từ 1 – 5 % và 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 được mô tả trong hình 3.4.



Hình 3.4. Ảnh hưởng của dầu dừa đến tạo sinh khối và tổng hợp EPS của *C. sinensis* nuôi cấy lỏng-tĩnh

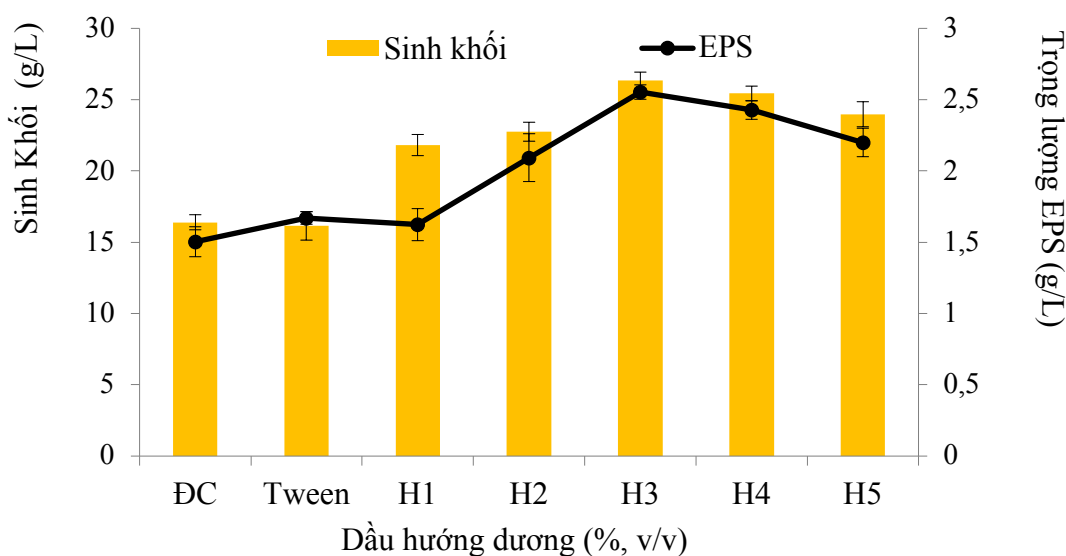
Về sinh khối, biểu đồ 3.4 cho thấy bổ sung dầu dừa vào môi trường nuôi cấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ năng suất tạo sinh khối khô giữa các lô thí nghiệm so với đối chứng (ĐC). Cụ thể, các lô thí nghiệm bổ sung dầu dừa (D) đều tăng tạo sinh khối cao hơn so với lô ĐC. Trong đó lô D4 cho năng suất cao nhất là $24,30 \pm 0,07$ g/L. Lô D1 thấp nhất đạt $17,75 \pm 0,45$ g/L (D1) vẫn cao hơn so với năng suất tạo sinh khối của lô ĐC và lô bổ sung Tween khoảng $16,4 \pm 0,05$ g/L. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Hsieh và cộng sự (2008) [80]. Lý do là dầu dừa chứa

không nhiều acid béo không no acid oleic, chủ yếu chứa acid béo bão hoà nên phần nào hạn chế kích thích tạo gia tăng sinh khối.

Về 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. Kết quả khảo nghiệm thể hiện ở hình 3.5.



Hình 3.5. Sự thay đổi về hàm lượng sinh khối khô và EPS khi bổ sung dầu hướng dương

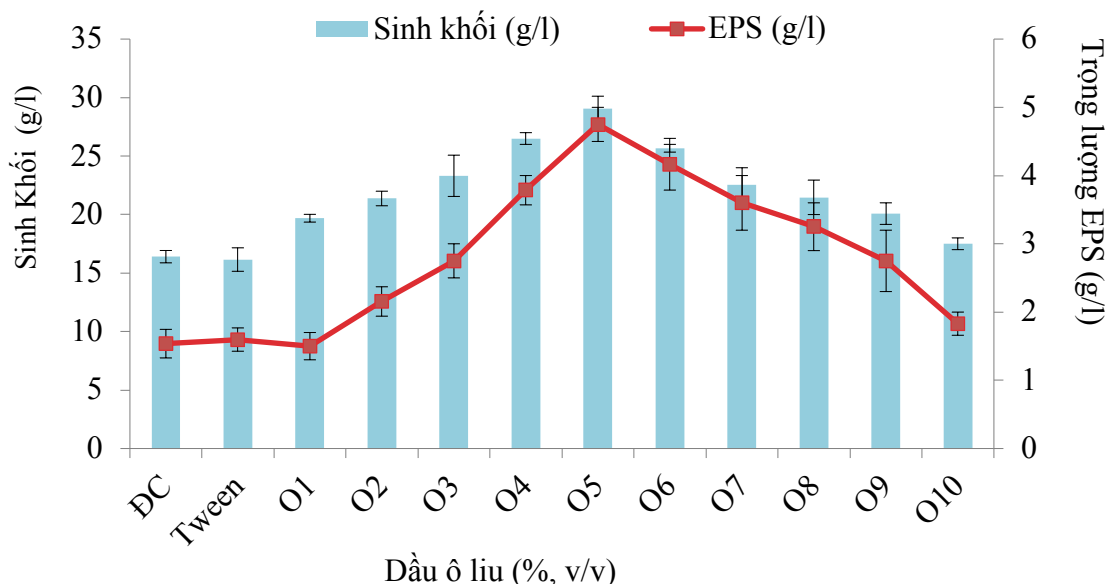
Đối với sinh khối khô, bổ sung dầu hướng dương cũng làm tăng năng suất tạo sinh khối khô với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các lô thí nghiệm và lô ĐC ($p < 0,05$). Năng suất tạo sinh khối cao nhất $26,37 \pm 0,56$ g/L ở lô bổ sung 3 % dầu hướng dương (H3), cao hơn nhiều so với lô ĐC $16,38 \pm 0,05$ g/L. Tính chung bổ sung dầu hướng dương từ 1 – 5 % làm tăng năng suất tạo sinh khối của nấm *C. sinensis*

từ 35,34 % – 43,67 % so với ĐC. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Park và cộng sự (2002) về ảnh hưởng dầu hướng dương đến khả năng kích thích nấm phát triển và tăng sinh khối nấm của *C. militaris* [78]. Có sự gia tăng đáng kể như trong khảo sát có thể là do trong dầu hướng dương, thành phần acid linoleic, một acid béo không no chứa 2 nối đôi phổ biến chiếm tới 65 – 70 % cao hơn nhiều so với trong dầu dừa [1, 80].

Đối với tổng hợp 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* thu được kết quả thể hiện trong hình 3.6.



Hình 3.6. Sự thay đổi năng suất sinh khối khô và EPS khi bổ sung dầu ô liu

Đối với sinh khối, so sánh năng suất tạo sinh khối khô giữa các lô O1 – O10 (bổ sung từ 1 – 10 % dầu ô liu) so với lô ĐC thấy có sự tăng từ $19,48 \pm 0,6$ g/L ở lô

O1 tới $29,06 \pm 1,06$ g/L ở lô O5 so với ở lô ĐC là $16,47 \pm 0,06$ g/L có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Tuy nhiên sau đó năng suất tạo sinh khối ở các lô từ O6 – O10 lại giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Kết quả khảo sát cho thấy bổ sung dầu ô liu ở các nồng độ khác nhau sẽ ảnh hưởng đến khả năng phát triển của nấm *C. sinensis* trong môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh. Sinh khối tăng mạnh khi bổ sung dầu ô liu tới 5 %, tăng khoảng 76 % so với ĐC. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Park và cộng sự khi nghiên cứu trên nấm *C. militaris* [78]. Nguyên nhân có thể là do trong dầu ô liu, acid oleic, một loại acid béo không no chiếm hơn 70 % có khả năng kích thích sự phát triển của sinh khối nấm trong môi trường lỏng [61].

Về EPS, bổ sung dầu ô liu vào môi trường nuôi cấy cũng 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 đến 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].

Do EPS thu được từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* là phức hợp của EPS và protein nên cần thiết phải khảo sát hàm lượng polysaccharide và protein trong tủa EPS thu từ các môi trường bổ sung dầu.

3.2.2 Khảo sát hàm lượng polysaccharide và protein trong tủa EPS thu từ các môi trường bổ sung dầu

Sau khi khảo sát ảnh hưởng của dầu thực vật đến sự phát triển và tổng hợp EPS của nấm *C. sinensis* ở 40 ngày nuôi cấy, đã tiến hành xác định hàm lượng polysaccharide và protein có trong tủa EPS thu từ các môi trường khảo sát bổ sung dầu. Kết quả được trình bày ở bảng 3.1.

Nhìn chung các môi trường khảo sát đều có hàm lượng polysaccharide cao, phù hợp với quy trình tách chiết polysaccharide đã sử dụng. Trong đó năng suất tạo phức EPS-protein và hàm lượng polysaccharide trong phức này thu được từ môi trường bổ sung dầu ô liu cao hơn đáng kể so với từ môi trường bổ sung dầu dừa và dầu hướng dương và cao hơn so với đối chứng. Kết quả khảo sát cũng cho thấy hàm lượng protein trong phức EPS-protein thu từ các môi trường bổ sung dầu và môi

trường ĐC không khác nhau nhiều, dao động từ 1,6 - 2 % và chiếm tỷ lệ thấp. Điều này chứng tỏ bổ sung dầu thực vật, đặc biệt là dầu ô liu, kích thích tăng chủ yếu đối tượng mà đề tài quan tâm là hàm lượng EPS trong phức protein-EPS thu nhận từ dịch môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*. Do vậy môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* bổ sung dầu ô liu là phù hợp và được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

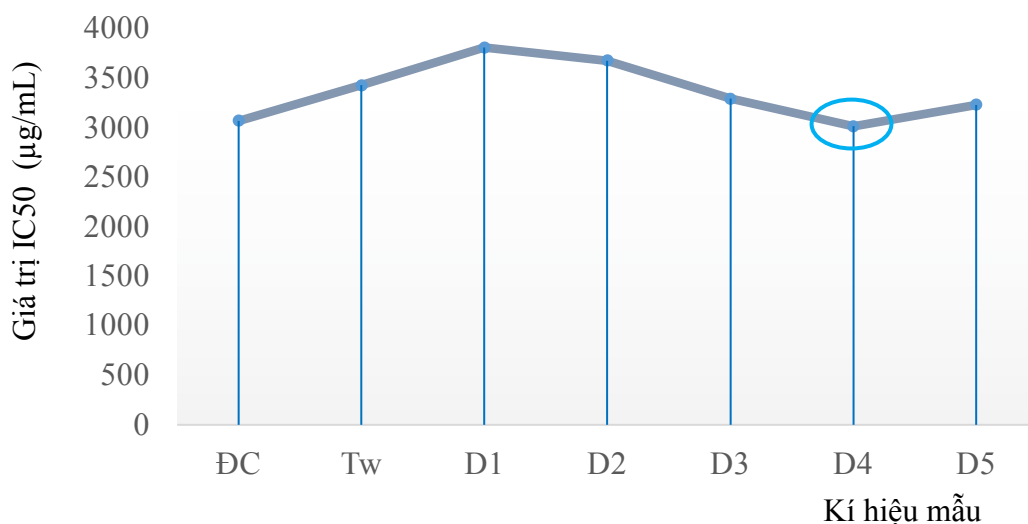
Bảng 3.1. Hàm lượng polysaccharide, protein trong EPS

Mẫu	Hàm lượng polysaccharide (%)	Hàm lượng protein (%)	Mẫu	Hàm lượng polysaccharide (%)	Hàm lượng protein (%)
ĐC	55,09 ± 0,38	1,79 ± 0,57			
Tw	48,97 ± 0,40	0,91 ± 0,11			
D1	45,32 ± 0,71	1,11 ± 0,52	O1	51,65 ± 1,05	1,66 ± 0,42
D2	48,69 ± 0,54	0,98 ± 0,13	O2	57,98 ± 0,62	1,98 ± 0,99
D3	56,85 ± 0,49	1,21 ± 0,36	O3	60,53 ± 0,16	1,81 ± 1,12
D4	55,97 ± 0,98	1,32 ± 0,43	O4	62,21 ± 0,55	1,70 ± 0,98
D5	53,61 ± 0,72	0,82 ± 0,87	O5	64,31 ± 0,95	1,63 ± 0,07
H1	55,70 ± 1,54	1,890 ± 0,73	O6	69,65 ± 1,32	2,11 ± 0,56
H2	59,44 ± 1,27	2,64 ± 0,06	O7	61,98 ± 0,65	1,98 ± 0,19
H3	65,43 ± 0,50	1,37 ± 0,06	O8	60,53 ± 0,17	1,21 ± 0,31
H4	66,76 ± 0,72	2,48 ± 0,45	O9	63,21 ± 0,59	1,32 ± 0,42
H5	61,05 ± 0,53	2,85 ± 0,14	O10	60,78 ± 0,23	1,82 ± 0,86

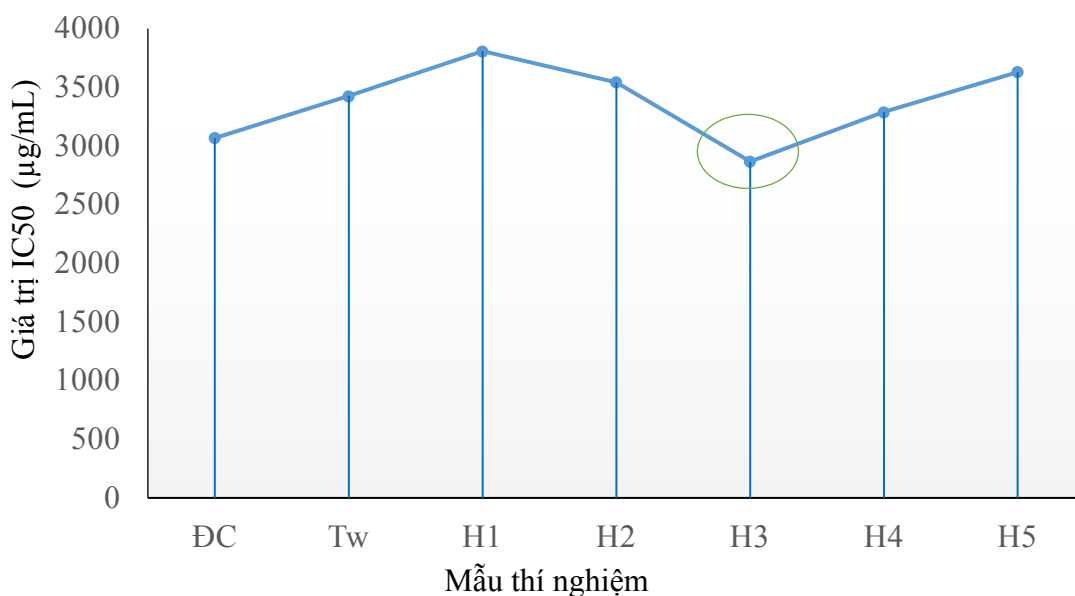
Ngoài năng suất tạo sinh khối và khối lượng phức protein-EPS thu được. Mục đích nghiên cứu của luận án là tìm hiểu hoạt tính sinh học nói chung, trong đó có hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ của phức protein-EPS. Do vậy, khảo sát tiếp theo liên quan đến phân tích hàm lượng polysaccharide trong phức, hoạt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

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

Kết quả khảo sát khả năng bắt gốc tự do $ABTS^+$ của tủa phức protein-EPS thu được từ 3 môi trường bổ sung dầu dựa trên giá trị IC_{50} được thể hiện qua các Hình 3.7, 3.8 và 3.9.



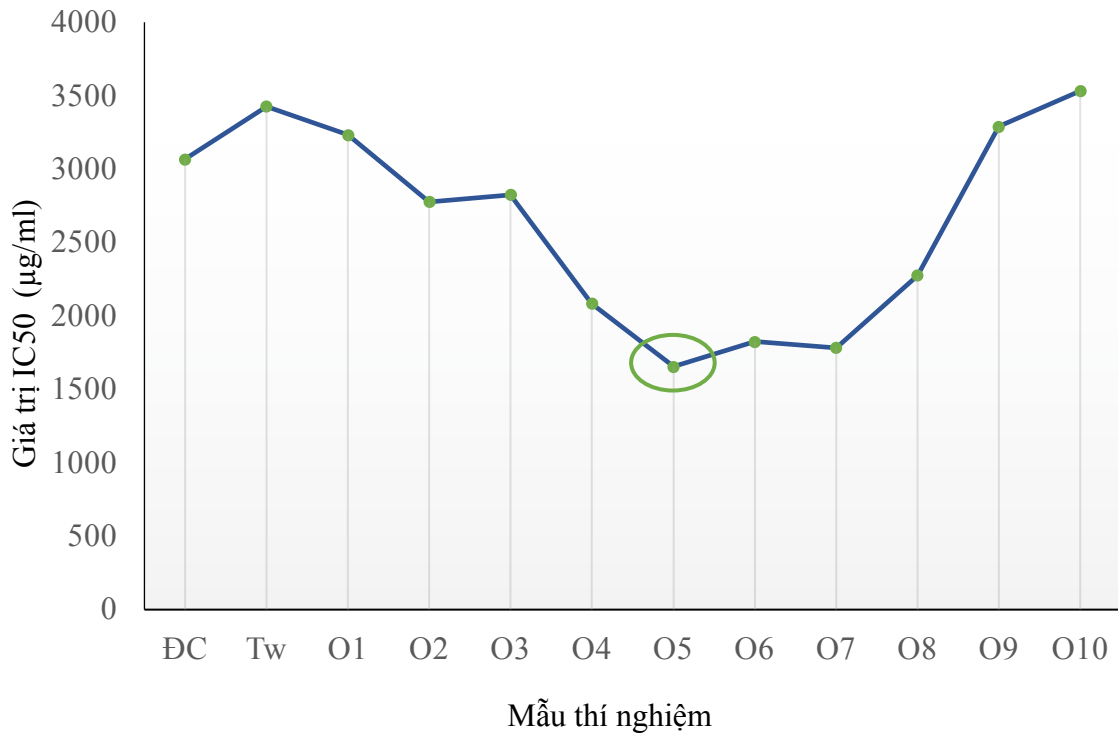
Hình 3.7. Kết quả kháng oxy hoá của EPS thu từ môi trường bổ sung dầu dừa. ĐC: đối chứng; Tw: bổ sung Tween 80; O1-O10: dầu dừa từ 1 - 10 %.



Hình 3.8. Kết quả kháng oxy hoá của EPS thu từ môi trường bổ sung dầu hướng dương. ĐC: đối chứng; Tw: bổ sung Tween 80; H1-H10: dầu hướng dương từ 1 - 10 %.

Kết quả cho thấy EPS thu từ môi trường dầu hướng dương 3 % (Hình 3.10) có hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ với IC₅₀ = 2866,03 µg/mL và cao hơn một chút so với đối chứng với IC₅₀ = 3067,71 µg/mL. Kết quả tương tự với việc bổ sung dầu dừa 4 % với IC₅₀ = 3012,23 µg/mL (Hình 3.11). Nhìn chung kết quả khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ của phức EPS-protein thu được từ môi trường bổ sung dầu hướng dương và dầu dừa không khác biệt so với ĐC.

Kết quả khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ của phức EPS-protein thu được từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* bổ sung dầu ô liu khá triển vọng. Theo kết quả ghi nhận được, trong khoảng nồng độ khảo sát từ 0 - 6000 µg/mL, các mẫu EPS đều có khả năng bắt gốc ABTS⁺ với tỉ lệ khác nhau. Trong đó EPS của môi trường có nồng độ dầu ô liu 5 - 7 % bắt được gần hết gốc tự do trong khoảng nồng độ khảo sát.



Hình 3.9. Kết quả kháng oxy hoá của EPS thu từ môi trường bổ sung dầu ô liu. ĐC: đối chứng; Tw: bổ sung Tween 80; O1-O10: dầu ô liu từ 1-10 %.

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 (IC₅₀ = 3067,48 µg/ml). Trong đó cao nhất là môi trường ô liu 5 % với IC₅₀ = 1713,02 µg/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,

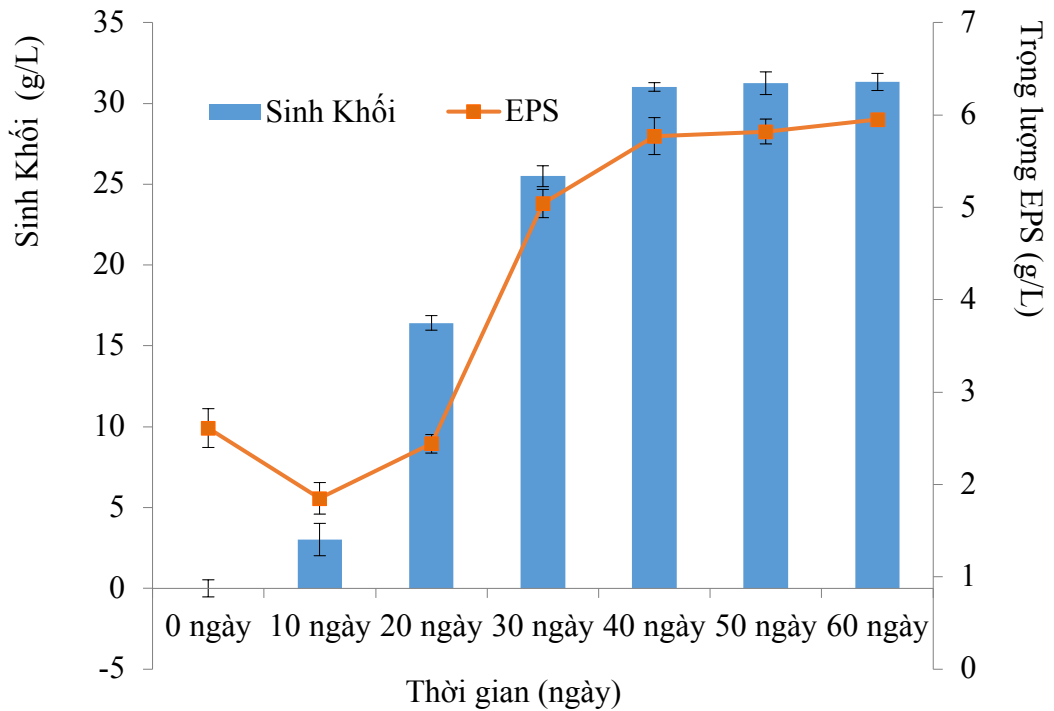
điều hòa hệ thống miễn dịch, kháng khối u, chống lão hóa... Nghiên cứu của Yan và cộng sự (năm 2014) cũng cho thấy phân đoạn EPS thu từ sinh khối nấm và dịch nuôi cấy có khả năng bắt gốc hydroxyl và ABTS⁺ cao [79].

Nhìn chung kết quả khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ của phức EPS-protein 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.

3.2.4 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. Kết quả được thể hiện Hình 3.10.

Đối với sinh khối, sự khác biệt về năng suất sinh khối khô có ý nghĩa thống kê giữa 0 ngày và 10 ngày ($p < 0,01$), 10 ngày và 20 ngày ($p < 0,05$), 20 ngày và 30 ngày ($p < 0,01$), 30 ngày và 40 ngày ($p < 0,01$). Năng suất sinh khối khô thu ở ngày thứ 40, 50 và 60 ngày cao hơn so với thời điểm 0 ngày, 10 ngày, 20 ngày, 30 ngày và khác biệt giữa chúng không có ý nghĩa thống kê. Năng suất sinh khối khô thu ở ngày thứ 40 ngày đạt $31,01 \pm 0,03$ g/L cao hơn so với các ngày trước đó. Cụ thể, tương ứng là sau 30 ngày nuôi cấy, năng suất sinh khối đạt $25,49 \pm 0,32$ g/L, 20 ngày $16,42 \pm 0,85$ g/L, 10 ngày $3,02 \pm 0,00$ g/L. Điều này chứng tỏ thời điểm thích hợp thu hoạch sinh khối nấm từ môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* bổ sung dầu ô liu là ngày thứ 40.



Hình 3.10. Hàm lượng sinh khối khô và EPS theo thời gian của *C. sinensis* nuôi cấy lỏng-tĩnh

Về hàm lượng EPS, kết quả khảo sát cho thấy sự khác biệt về hàm lượng EPS giữa các thời điểm 0 ngày và 10 ngày, 10 ngày và 20 ngày không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$), khi so sánh hàm lượng EPS tại thời điểm 20 ngày và 30 ngày, 30 ngày và 40 ngày ($p < 0,05$). Tương ứng với hàm lượng EPS thu tại thời điểm 20, 30 và 40 ngày lần lượt là $2,44 \pm 0,02$ g/L, $5,04 \pm 0,03$ g/L, $5,77 \pm 0,02$ g/L. Điều này cho thấy hàm lượng EPS thu được ở ngày thứ 40 cao hơn 1,14 lần so với ở ngày thứ 30 ngày. Trong khi, sự khác biệt về hàm lượng EPS thu được tại thời điểm ngày thứ 40, 50 và 60 không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Vậy, thời điểm thích hợp thu nhận EPS tại thời điểm ngày thứ 40.

Tóm lại, 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.

Từ kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi chọn thời điểm thu hoạch nấm *C. sinensis* khi bổ sung 5 % dầu ô liu vào môi trường nuôi cấy là 40 ngày. Đây là thời điểm thích hợp để nấm phát triển mạnh và tổng hợp EPS cao.

Các khảo sát trình bày trong mục 3.1.2 cho thấy cả 3 loại dầu bổ sung vào môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* đều ảnh hưởng lên sự phát triển, năng suất tạo sinh khối và tổng hợp EPS.

Về hình thái, sinh khối nấm phát triển dày, phủ tơ trắng đều, mịn ở các lô dầu dừa (D3, D4), hướng dương (H2, H3) và ô liu (O5, O6). Trong khi ở những nồng độ còn lại sinh khối nấm không phủ tơ trắng đều ở bề mặt. Điều này chứng tỏ nồng độ từng loại dầu khác nhau ảnh hưởng đến hình thái nấm trong quá trình phát triển (Hình ảnh minh hoạ ở phần Phụ Lục).

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy dầu dừa không thích hợp cho sự phát triển và tổng hợp EPS của nấm *C. sinensis* bởi thành phần chủ yếu của dầu dừa là acid béo bão hòa và 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.

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

3.3.1 Kết quả sàng lọc yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng sinh khối và EPS

Trong nghiên cứu này đã tiến hành sàng lọc 9 yếu tố tham gia thành phần môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* gồm dịch chiết khoai tây, saccharose, peptone, cao nấm men, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 và dầu ô liu với hai mức thấp và cao theo ma trận Plackett – Burman. Kết quả xử lý bằng phần mềm Minitab 17 cho thấy, các yếu tố saccharose, peptone, cao nấm men và dầu ô liu ảnh hưởng tới hàm lượng sinh khối với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Căn cứ vào hệ số ảnh hưởng, thấy dầu ô liu có tác động mạnh nhất đến hàm lượng sinh khối (7,302), tiếp đến là saccharose (6,599), peptone (5,969) và cuối cùng là cao nấm men (3,988). Trong khi KH_2PO_4 lại tác động ngược đến hàm lượng sinh khối với độ tin cậy $p < 0,05$.

Trong khi đó, 5 yếu tố có giá trị ảnh hưởng lớn tới hàm lượng EPS (Bảng 3.2) gồm dịch chiết khoai tây, saccharose, peptone, MgSO_4 và dầu ô liu với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Dựa trên hệ số ảnh hưởng, dầu ô liu tác động mạnh nhất đến hàm lượng EPS (1,466), tiếp theo là các yếu tố saccharose (1,296), dịch chiết khoai tây (1,151), MgSO_4 (0,899) và cuối cùng là peptone (0,811). KH_2PO_4 và K_2HPO_4 ảnh hưởng không đáng kể đến hàm lượng EPS ở độ tin cậy $p < 0,05$. Bên cạnh đó, hàm lượng sinh khối khô và EPS giữa thực nghiệm và mô hình có sự chênh lệch không đáng kể. Theo kết quả nghiên cứu sàng lọc yếu tố của Dong và cộng sự (2008), glucose và peptone có ảnh hưởng lên hàm lượng tổng hợp EPS của *C. militaris* [29]. Trong nghiên cứu này saccharose, peptone và dầu ô liu được chọn là những yếu tố ảnh hưởng mạnh nhất đến hàm lượng EPS cho thiết kế thí nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt Box – Behnken (bảng 3.3, bảng 3.4).

Bảng 3.2. Các biến trong ma trận Plackett-Burman

Yếu tố	Đơn vị	Kí hiệu	Mức		Mức độ ảnh hưởng đến hàm lượng sinh khối		Mức độ ảnh hưởng đến hàm lượng EPS	
			Thấp (-)	Cao (+)	Ảnh hưởng	Prob > F	Ảnh hưởng	Prob > F
Dịch chiết khoai tây	g/L	X1	150	250	3,119	0,075	1,151	0,017
Saccharose	g/L	X2	20	60	6,599	0,007	1,296	0,011
Peptone	g/L	X3	2	10	5,969	0,010	0,811	0,049
Cao nấm men	g/L	X4	2	6	3,988	0,038	0,228	0,476
KH ₂ PO ₄	g/L	X5	0,2	0,8	-5,893	0,011	-1,253	0,012
K ₂ HPO ₄	g/L	X6	0,2	0,8	0,312	0,832	-0,859	0,041
CaCl ₂	g/L	X7	0,2	0,8	1,729	0,256	0,514	0,151
MgSO ₄	g/L	X8	0,1	0,3	0,848	0,552	0,899	0,036
Ô liu	v/v	X9	2	8	7,302	0,005	1,466	0,007

Bảng 3.3. Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman

NT	Các biến									Sinh khối (g/L)		EPS (g/L)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	Thực nghiệm	Mô hình	Thực nghiệm	Mô hình
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	30,46	28,66	5,76	5,4
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	29,76	31,55	5,25	5,60
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	23,99	23,68	2,69	2,88
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	23,40	23,08	1,70	1,89
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	21,03	19,24	2,85	2,50
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	20,34	20,65	2,80	2,61
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	35,28	35,60	4,21	4,02

8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	14,55	16,34	1,41	1,76
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	18,06	16,25	1,40	1,04
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	14,48	16,27	1,23	1,58
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	19,50	19,18	2,22	2,41
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	9,38	9,696	0,75	0,56
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31,11	31,28	5,61	5,65
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30,83	31,28	5,54	5,65
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31,90	31,28	5,81	5,65

3.3.2 Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy bằng đáp ứng bề mặt Box – Behnken

Các nghiệm thức nuôi cấy lỏng tĩnh 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.

Kết quả phân tích ANOVA ở phụ lục cho thấy, mô hình có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), hệ số hồi quy $R^2 = 0,9788 > 0,75$ chứng tỏ mô hình tương thích với thực nghiệm.

Phương trình hồi quy nhận được như sau:

$$\text{Hàm lượng EPS (g/L)} = 5,757 + 0,384Y_1 + 0,342Y_2 + 1,021Y_3 - 0,992Y_1^2 - 1,360Y_2^2 - 1,037Y_3^2 + 0,080Y_1Y_2 - 0,532Y_1Y_3 + 0,425Y_2Y_3 \quad (1)$$

Bảng 3.4. Thiết kế Box - Behnken

Nghiem thức	Các biến			Hàm lượng SK (g/L)		Hàm lượng EPS (g/L)	
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Thực nghiệm	Mô hình	Thực nghiệm	Mô hình
1	-1	-1	0	24,44	24,60	2,59	2,76
2	1	-1	0	25,11	24,81	3,46	3,37
3	-1	1	0	24,36	24,66	3,19	3,28
4	1	1	0	29,35	29,19	4,38	4,21
5	-1	0	-1	20,12	20,61	1,70	1,79
6	1	0	-1	24,67	25,61	3,27	3,62
7	-1	0	1	29,09	28,15	5,25	4,90
8	1	0	1	28,48	27,89	4,69	4,60
9	0	-1	-1	23,12	22,47	2,68	2,42
10	0	1	-1	24,73	23,95	2,44	2,26
11	0	-1	1	25,85	26,64	3,43	3,61
12	0	1	1	28,95	29,60	4,89	5,15
13	0	0	0	31,15	31,15	5,75	5,76
14	0	0	0	31,15	31,15	5,76	5,76
15	0	0	0	31,15	31,15	5,76	5,76

Để xác định mức độ tối ưu của mỗi biến cho hàm lượng EPS tối ưu, đồ thị bề mặt ba chiều tương tác được xây dựng với trục Z là hàm lượng EPS và 2 biến độc lập bất kỳ, trong khi duy trì biến còn lại ở mức tối ưu (Bảng 3.5)

Bảng 3.5. Mối liên hệ giữa các thành phần môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh

A: Mối liên hệ giữa dầu ô liu – peptone đến hàm lượng EPS

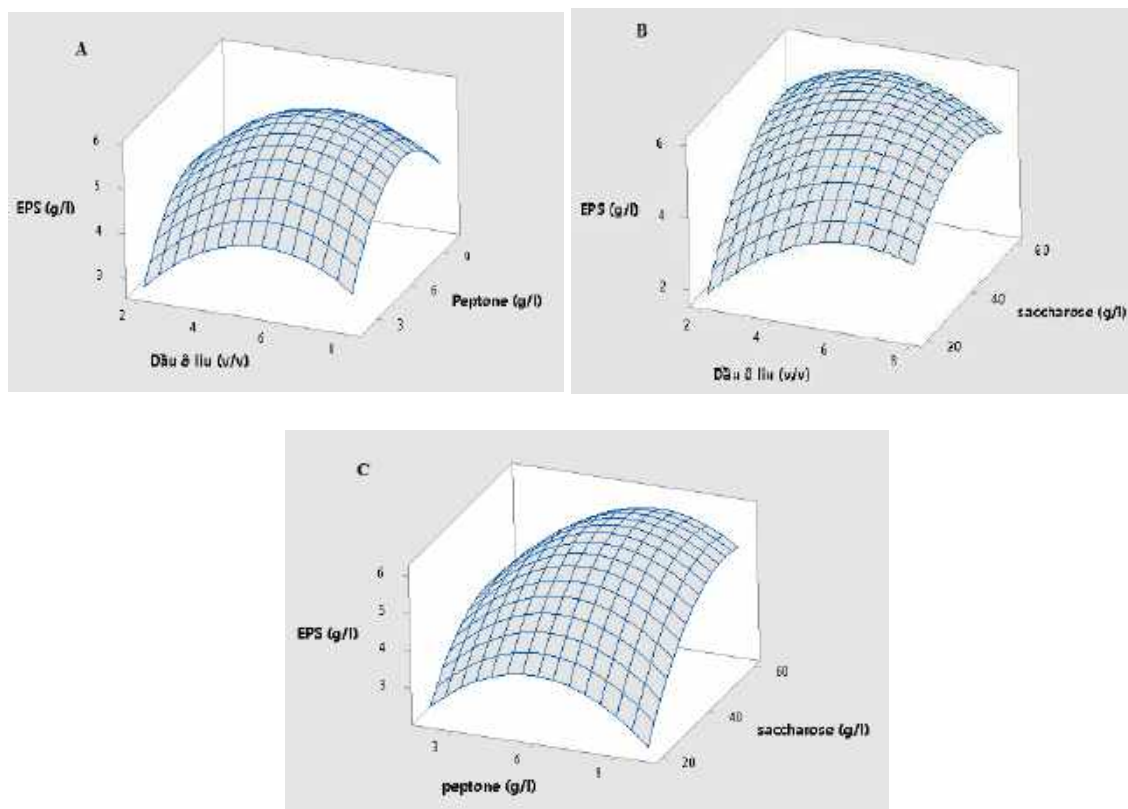
Quy luật	Biến độc lập	Hàm lượng EPS
1	Nếu lượng dầu ô liu tăng từ 3,91 đến 7,25 % và lượng peptone tăng từ 4,60 đến 8,44 g/L	Đạt giá trị lớn nhất
2	Nếu lượng dầu ô liu giảm từ 2,28 đến 2 % và lượng peptone giảm từ 2,27 đến 2,00g/L	Đạt giá trị nhỏ nhất

B: Mối liên hệ giữa dầu ô liu – saccharose đến hàm lượng EPS

Quy luật	Biến độc lập	Hàm lượng EPS
1	Nếu lượng dầu ô liu tăng từ 4,87 – 5,51 % và lượng saccharose tăng từ 47,45 – 51,63 g/L	Đạt giá trị lớn nhất
2	Nếu lượng dầu ô liu giảm từ 2,18 – 2,01 % và lượng saccharose giảm từ 21,28 – 20,56 g/L	Đạt giá trị nhỏ nhất

C: Mối liên hệ giữa peptone – saccharose đến hàm lượng EPS

Quy luật	Biến độc lập	Hàm lượng EPS
1	Nếu lượng peptone tăng từ 5,98 – 7,70 g/L và lượng saccharose tăng từ 45,88 – 55,19 g/L	Đạt giá trị lớn nhất
2	Nếu lượng peptone giảm từ 3,00 – 2,00 g/L hoặc từ 10,00 – 8,78 g/L và lượng saccharose giảm từ 24,64 – 20,76 g/L	Đạt giá trị nhỏ nhất



Hình 3.11. Mặt đáp ứng hàm lượng EPS theo hai yếu tố. A. Dầu ô liu (Y1) – Peptone (Y2) với saccharose ở nồng độ 40 g/L; B. Dầu ô liu (Y1) – Saccharose (Y3) với peptone ở nồng độ 6 g/L; C. Peptone (Y2) - Saccharose (Y3) với dầu ô liu ở nồng độ 5 v/v.

Kết quả trên cho thấy cả 3 thành phần dinh dưỡng là dầu ô liu, peptone và saccharose đều có ảnh hưởng đến hàm lượng EPS của nấm *C. sinensis*. Cụ thể, khi tăng dầu ô liu, peptone và saccharose thì hàm lượng EPS tăng và đạt tối đa khi bổ sung dầu ô liu 7,25 %, peptone 8 g/L và saccharose 55 g/L.

Qua nhận xét của từng nghiệm thức và dựa vào kết quả phân tích biểu đồ 3 chiều cùng kết quả biện luận, có những nhận xét sau:

Tất cả những nghiệm thức có nồng độ dầu ô liu thấp đều cho hàm lượng EPS thấp (<3,00 g/L). Nghiệm thức bổ sung peptone trung bình và saccharose ở mức cao (5,25 g/L) cho hàm lượng EPS đáng kể. Nghiệm thức có nồng độ dầu ô liu cao đều cho EPS cao (>3,00 g/L). Những nghiệm thức có lượng peptone cao (10 g/L) có ảnh hưởng đến hình thái nấm, cụ thể là bề mặt sinh khối.

Ảnh hưởng của 3 yếu tố trên đối với sự tạo sinh khối và hàm lượng EPS, cho thấy rằng 2 giá trị này có xu hướng biến thiên cùng nhau. Dầu ô liu khi bổ sung vào môi trường được sử dụng như nguồn carbon cho nấm phát triển, đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho việc tạo EPS có thể thông qua thay đổi tính thấm của màng cho phép các chất dinh dưỡng hấp thu vào nấm dễ dàng.

Do vậy, phần mềm Minitab 17 tiếp tục được sử dụng để dự đoán các thông số để chọn ra công thức môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* tối ưu nhằm tạo năng suất sinh khối nấm hợp lý với hàm lượng EPS cao. Tính toán lý thuyết cho kết quả môi trường có bổ sung 5,27 % dầu ô liu, 6,77 g/L peptone và 48,69 g/L saccharose dự kiến sẽ cho hàm lượng EPS trung bình là 6,06 g/L và sinh khối khô trung bình là 31,87 g/L. Tuy nhiên dẫn liệu trên cần được kiểm chứng bằng thực nghiệm

3.3.3 Hàm lượng polysaccharide và protein của EPS của 15 nghiệm thức bổ sung dầu

Khảo sát 15 nghiệm thức liên quan đến bổ sung 5,27 % dầu ô liu, 6,77 g/L peptone và 48,69 g/L saccharose vào môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*. Mẫu EPS của 15 nghiệm thức sau khi thu nhận được định lượng polysaccharide và protein. Kết quả được tổng hợp ở bảng 3.6.

Kết quả cho thấy hàm lượng polysaccharide và protein trong EPS thu từ 15 nghiệm thức có giá trị khác nhau. Nhìn chung EPS ở các nghiệm thức đều có hàm

lượng polysaccharide và protein cao hơn ở mẫu đối chứng (ĐC: môi trường không bổ sung dầu).

Bảng 3.6. Hàm lượng polysaccharide và protein của EPS

Mẫu	Hàm lượng EPS (g/L)	Hàm lượng polysaccharide (%)	Hàm lượng protein (%)
ĐC	1,71	31,09 ± 0,98	1,79 ± 0,57
NT1	2,59	33,65 ± 0,35	1,00 ± 0,69
NT2	3,46	37,08 ± 9,78	2,47 ± 0,00
NT3	3,19	61,27 ± 0,23	3,68 ± 0,05
NT4	4,38	75,67 ± 0,22	5,67 ± 0,00
NT5	1,70	27,93 ± 5,29	3,22 ± 0,01
NT6	3,27	51,73 ± 0,86	4,12 ± 0,21
NT7	5,25	64,60 ± 12,47	0,82 ± 0,01
NT8	4,69	16,80 ± 0,81	1,72 ± 0,06
NT9	2,68	26,12 ± 0,01	2,61 ± 0,36
NT10	2,44	19,73 ± 1,27	1,39 ± 0,00
NT11	3,43	33,95 ± 2,07	4,33 ± 0,00
NT12	4,89	44,23 ± 0,33	2,50 ± 0,02
NT13	5,75	53,01 ± 0,00	5,02 ± 0,01
NT14	5,25	51,78 ± 0,00	5,36 ± 0,02
NT15	5,73	52,97 ± 0,00	5,78 ± 0,01

Cụ thể, nghiệm thức 4 có hàm lượng polysaccharide cao nhất (75,67 %) với hàm lượng protein tương đối cao (5,78 %). Các nghiệm thức 3, 4, 6, 7, 13, 14 và 15 đều có hàm lượng polysaccharide lớn hơn 50 %. Hàm lượng protein của 15 nghiệm thức thay đổi đáng kể chủ yếu trong khoảng từ 1,00 – 5,67 %, thấp nhất là ở nghiệm thức 7 (0,82 %).

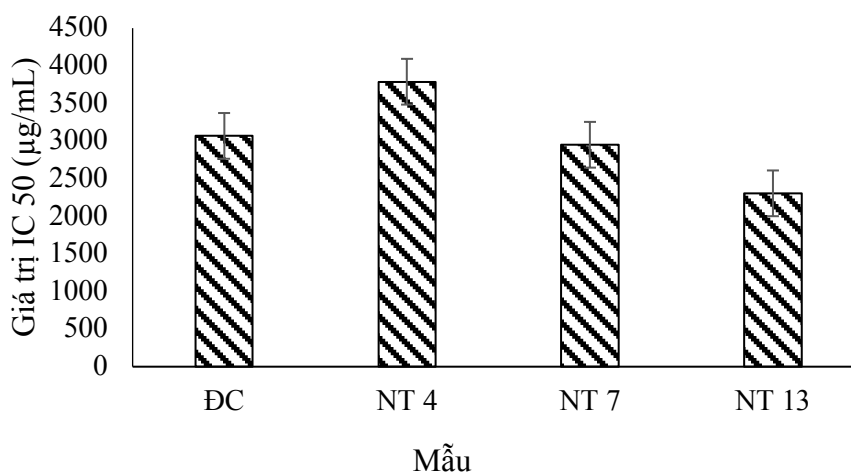
3.3.4 Hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ của 15 nghiệm thức bổ sung dầu

EPS thu được từ 15 nghiệm thức theo thiết kế Box – Behnken được khảo sát khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺. Kết quả khảo sát thể hiện trong bảng 3.7.

Bảng 3.7. Phần trăm bắt gốc tự do của các mẫu EPS

Mẫu	% bắt gốc tự do	Mẫu	% bắt gốc tự do	Mẫu	% bắt gốc tự do
NT1	28,75 ± 23,03	NT6	15,11 ± 2,72	NT11	34,08 ± 0,92
NT2	35,00 ± 23,16	NT7	69,01 ± 9,30	NT12	48,00 ± 0,68
NT3	38,15 ± 5,14	NT8	17,47 ± 2,08	NT13	81,74 ± 0,04
NT4	50,11 ± 17,08	NT9	20,32 ± 13,73	NT14	83,40 ± 16,73
NT5	48,34 ± 11,17	NT10	38,90 ± 18,14	NT15	83,36 ± 0,13

Kết quả cho thấy trong 15 mẫu phân tích, ở nồng độ 4.000 µg/mL chỉ 3 nghiệm thức 4, 7 và 13 có tỷ lệ bắt gốc tự do ABTS⁺ > 50 %. Trong đó, mẫu EPS nghiệm thức 5 bắt gốc tự do cao nhất, đạt 56 % tại nồng độ khảo sát. Kế đến là mẫu EPS nghiệm thức 4 (53 %) và nghiệm thức 7 (51 %).



Hình 3.12. Giá trị IC₅₀ của EPS từ thí nghiệm Box – Behnken

Hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺ của EPS ở mẫu nghiệm thức 7 và 13 cao hơn so với hoạt tính bắt gốc của mẫu đối chứng (IC₅₀ = 3067,48 µg/mL). Nghiệm thức 4 có hoạt tính thấp nhất, thấp hơn cả đối chứng. Trong các mẫu thử nghiệm, EPS hoạt tính bắt gốc ABTS⁺ cao nhất ở nghiệm thức 13 với giá trị IC₅₀ = 2304,34 µg/mL, kế đến giá trị IC₅₀ = 2949,88 µg/mL của mẫu EPS ở nghiệm thức 7.

Từ những phân tích trên, 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 %), 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.

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 ($\mu\text{g/mL}$)	Hàm lượng EPS (g/L)	Hàm lượng polysaccharide (%)	Hàm lượng protein (%)
Mẫu ĐC	3067,48	1,71	31,09 \pm 0,98	1,79 \pm 0,57
Kết quả dự đoán	2304,34	5,75	53,01 \pm 0,00	5,02 \pm 0,01
Kết quả thực nghiệm	2216,76	5,28	51,67 \pm 3,82	4,45 \pm 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 IC₅₀ 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*.

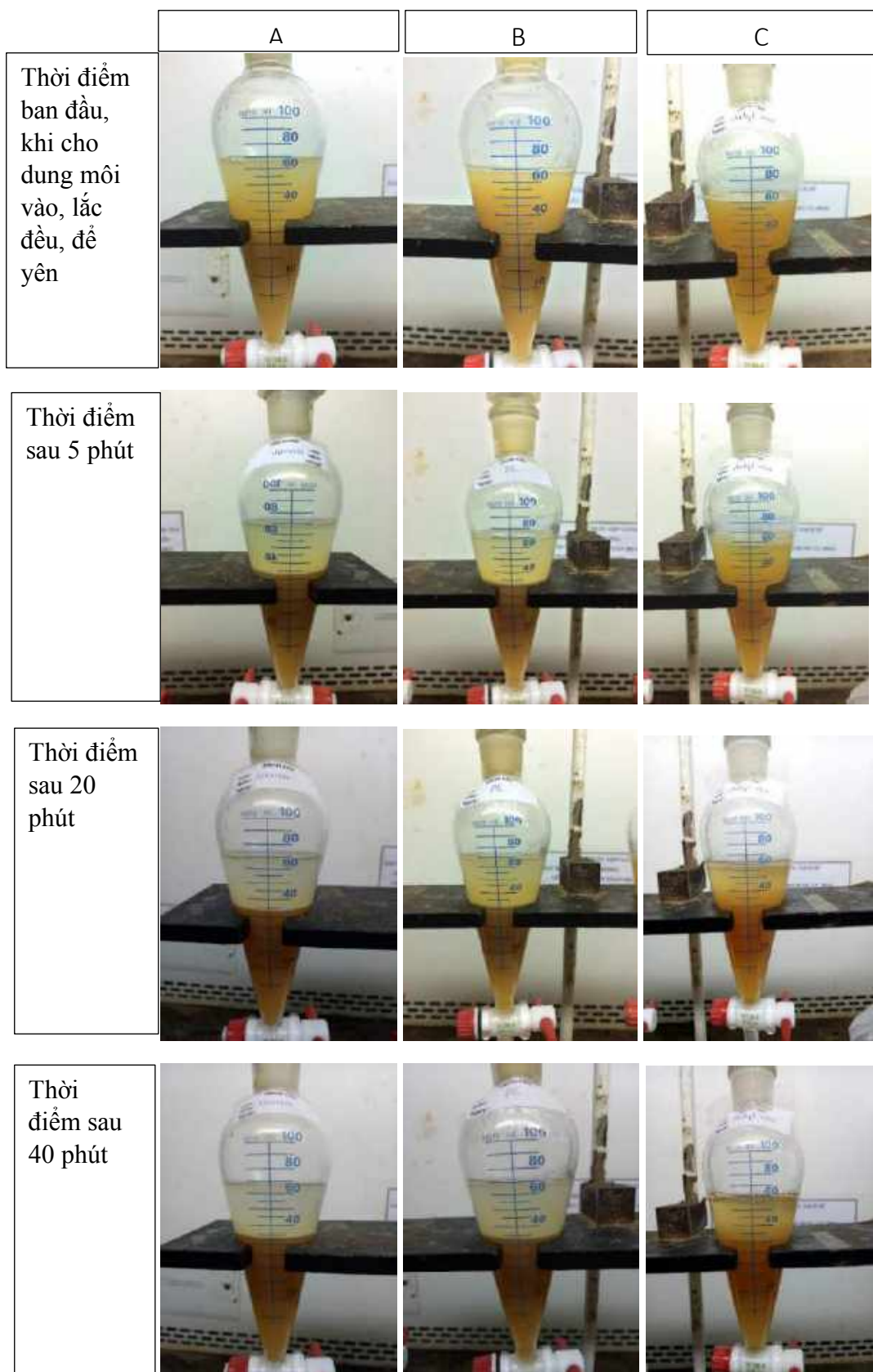
3.4 Xây dựng quy trình tách chiết EPS từ môi trường bổ sung dầu ô liu

3.4.1 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.

Ba dung môi được sử dụng có tính không phân cực, có tác dụng lôi kéo dầu ô liu ra khỏi dịch nuôi cấy nấm. Do hỗn hợp xử lý có tỷ trọng khác nhau nên phân tách

thành 3 lớp: Dung môi hữu cơ có tỷ trọng nhẹ nổi lên trên cùng. Nằm ở mặt phân cách giữa lớp dịch nấm và lớp dung môi là lớp nhũ tương. Lớp dưới cùng là dịch nấm cần thu nhận. Kết quả khảo sát tách lớp thể hiện ở hình 3.13.



Hình 3.13. Sự tách lớp của các dung môi khảo sát theo thời gian

A: Dịch loại dầu bằng dung môi hexan; B: Dịch loại dầu bằng dung môi PE;
C: Dịch loại dầu bằng dung môi DE

Tiến hành khảo sát như sau: Bổ sung 3 dung môi vào dịch nấm, lắc đều cho đồng nhất được với dịch nuôi cấy. Để yên 5 phút, bắt đầu có sự tách lớp ở lô thí nghiệm A và B. Trong khi dịch ở lô thí nghiệm C vẫn chưa tách lớp. Sau 20 phút, ở hai lô A và B phân lớp rõ rệt. Lớp dung môi phía trên của lô thí nghiệm A trong hơn so với lô thí nghiệm B. Dịch ở lô thí nghiệm C bắt đầu có sự tách lớp. Sau 40 phút để yên, sự tách lớp ở lô A không thay đổi nhiều so với thời điểm 20 phút. Ở lô B đã có sự phân lớp rõ rệt, trong hơn so với thời điểm 20 phút. Trong khi ở lô C tuy có sự phân lớp rõ tại thời điểm 40 phút, nhưng màu lớp dung môi phía trên vẫn còn đậm.

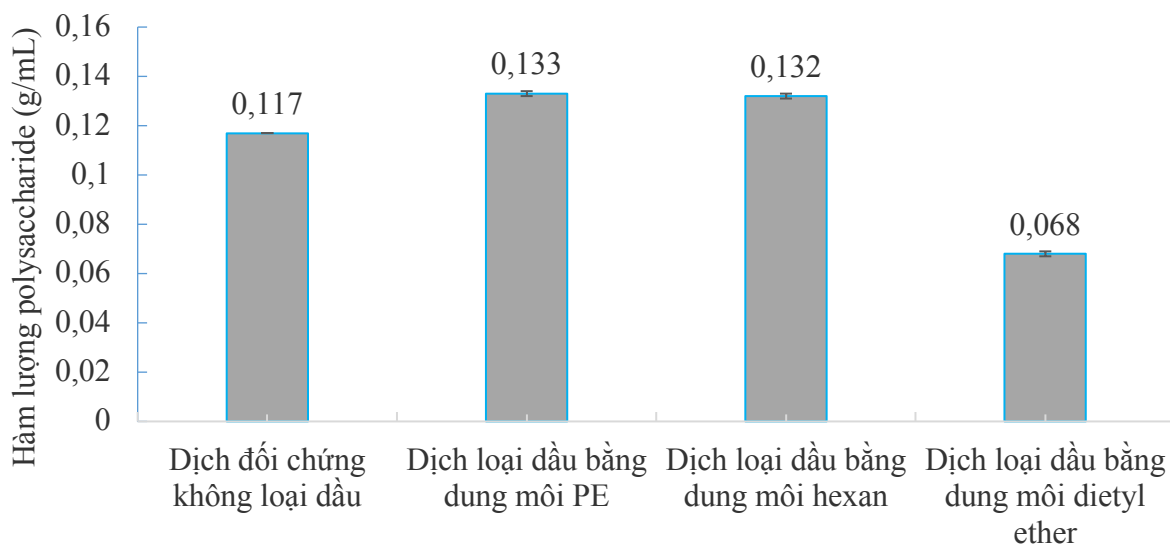
Quá trình tách lớp cho thấy, dịch nuôi cấy sử dụng hexan và PE để loại dầu có thời gian tách lớp nhanh hơn so với DE với lớp dung môi phía trên trong. Trong khi lớp phía trên của dung môi DE có màu vàng gần với màu của dịch nuôi cấy nấm. Nguyên nhân có thể là dung môi hexan và PE tách triệt để dầu từ dịch nấm, còn dung môi DE có thể còn lôi kéo thêm các thành phần khác có trong dịch nấm như đường, protein, ...nên lớp dung môi thu được có màu vàng sậm giống với màu của dịch nấm.

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.

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

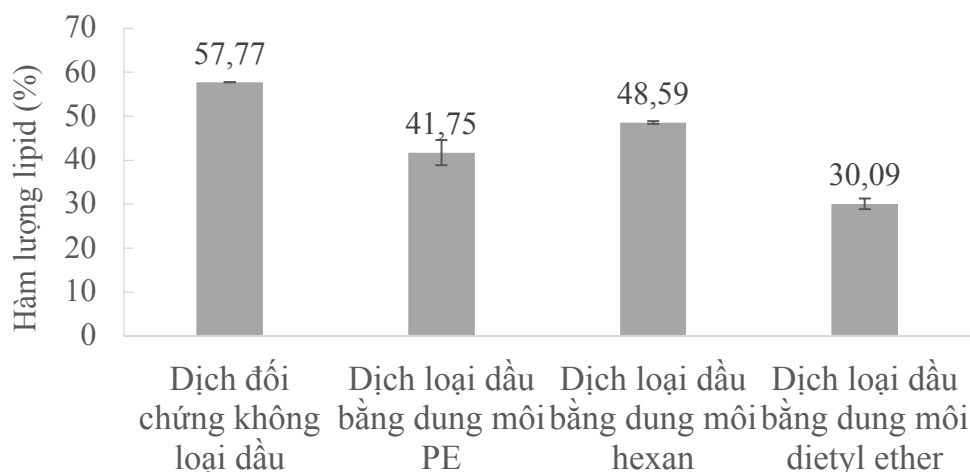
Dịch nấm sau khi được loại dầu đã được xác định hàm lượng polysaccharide và lipid. Kết quả thể hiện ở hình 3.14 và 3.15.

Sau khi loại dầu hàm lượng polysaccharide trong dịch thu được tăng lên và hàm lượng lipid giảm đi. Điều này chứng tỏ dung môi hữu cơ đã tách được một phần dầu ô liu ra khỏi dịch nuôi cấy nấm.



Hình 3.14. Hàm lượng polysaccharide của dịch nuôi cấy trước và sau khi loại dầu (g/mL)

Hàm lượng lipid trước và sau khi loại dầu của thể hiện trong hình 3.15.



Hình 3.15. Hàm lượng lipid của dịch nuôi cấy nấm trước và sau khi loại dầu (%)

Hàm lượng polysaccharide của dịch sau khi loại dầu bằng dung môi hexan và dung môi PE tăng lên tương ứng là 0,132 g/mL và 0,133 g/mL so với hàm lượng polysaccharide ban đầu của dịch nuôi cấy là 0,117 g/mL. Phân tích xử lý thống kê ANOVA cho thấy giữa 2 giá trị này không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Trong khi dung môi DE làm giảm hàm lượng polysaccharide khoảng một nửa so với ban đầu chỉ còn 0,068 g/mL.

Kết quả khảo sát trên cho thấy khả năng loại dầu ô liu ra khỏi dịch nuôi cấy nấm của dung môi DE là cao nhất với hàm lượng lipid chỉ còn chiếm 30,09 % trong

mẫu. Tiếp theo là dung môi PE còn 41,75 %. Dung môi hexan loại dầu ra khỏi dịch nuôi cấy nấm thấp nhất với hàm lượng lipid vẫn còn tới 48,59 %.

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.

3.4.3 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 được thể hiện ở bảng 3.9.

Bảng 3.9. Giá trị % bắt gốc tự do ABTS⁺ của các mẫu loại dầu

Tên mẫu thí nghiệm	% bắt gốc tự do
Đối chứng không loại dầu	33,88
Loại dầu bằng PE	58,69
Loại dầu bằng hexan	37,96
Loại dầu bằng DE	66,99

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.

Kết quả thu được trong khảo sát này cho thấy, khả năng lôi kéo dầu và hoạt tính của mẫu sau khi loại 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.

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

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.

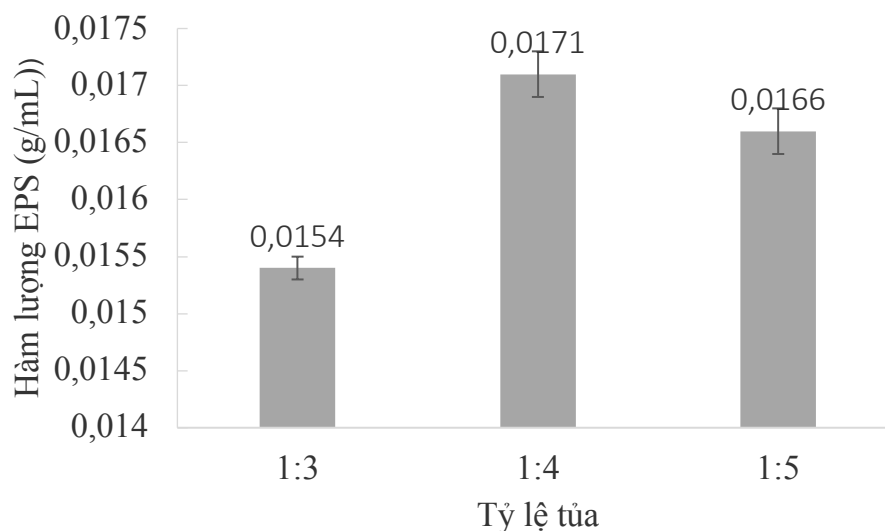
Các nghiệm thức nuôi cấy lỏng tĩnh thu nhận EPS được thực hiện trên 3 yếu tố ở 3 mức gồm 15 công thức trong đó 3 lần lặp lại của các điểm trung tâm. Bảng 3.4 thể hiện kết quả thực nghiệm so với kết quả mô hình dự đoán bằng phần mềm Minitab 17. Nhìn chung, kết quả thu được từ thực nghiệm và mô hình không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

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.

Kết quả thu được trong khảo sát này cho thấy, khả năng lôi kéo dầu và hoạt tính của mẫu sau khi loại 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.

3.4.4 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 96⁰ được khảo sát theo tỷ lệ giữa dịch nuôi nấm và ethanol là: 1:3; 1:4 và 1:5. Khối lượng tủa EPS-protein thu được thể hiện trong hình 3.16.



Hình 3.16. Khối lượng phức EPS-protein thu được theo tỷ lệ tủa khác nhau

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 thể hiện trong bảng 3.10.

Bảng 3.10. Khối lượng polysaccharide và protein trong mẫu EPS-protein thô

Tỷ lệ	Hàm lượng polysaccharide (%)	Hàm lượng protein (%)
1:3	44,33±2,51	3,61±0,07
1:4	53,35±2,92	3,94±0,54
1:5	41,73±1,42	3,54±0,02

Kết quả cho thấy, ở tỷ lệ tủa giữa giữa dịch nuôi nấm và ethanol 96⁰ 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*. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác: 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 dịch nuôi cấy/ethanol được chọn trong các nghiên cứu này khá giống nhau nằm trong khoảng 1:3 đến 1:5. Sự khác nhau về tỷ lệ tủa để thu nhận phức EPS-protein phụ thuộc vào nấm nuôi cấy, thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy [57].

⇒ Kết luận chung: Tỷ lệ tủa 1:4 (v/v) giữa dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh và ethanol 96⁰ 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.

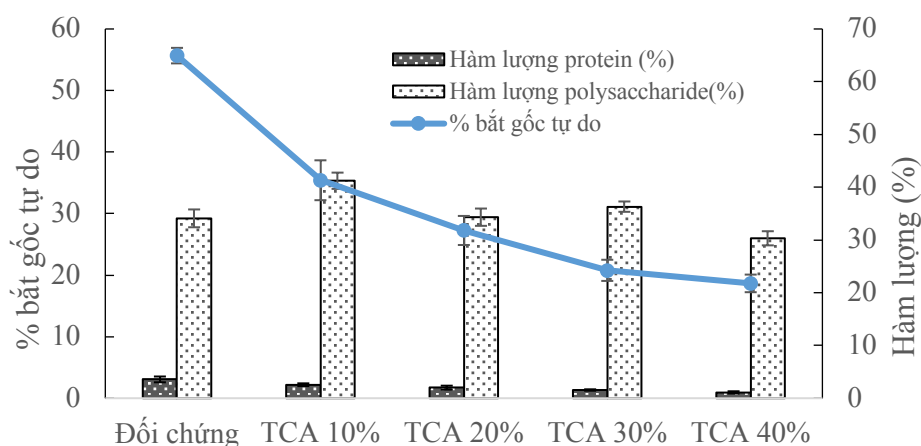
Sau khi đã xác định được điều kiện tối ưu để loại dầu ô liu ra khỏi dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* và thu tủa EPS-protein, việc tiếp theo là phải khảo sát tinh sạch loại bỏ protein ra khỏi phức EPS-protein, thu nhận các phân đoạn EPS sau khi loại protein và nghiên cứu cải biến bằng cách sulfate hóa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

3.5.1.1. Khảo sát nồng độ TCA dùng để loại bỏ protein

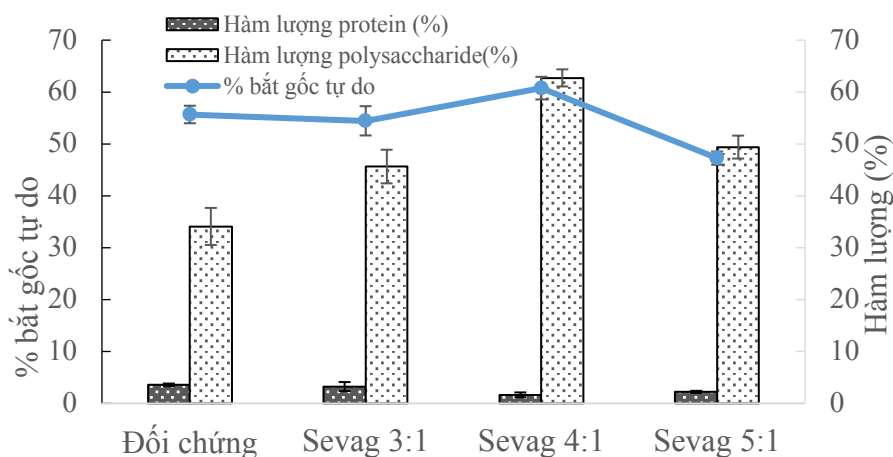


Hình 3.17. Kết quả khảo sát nồng độ TCA thích hợp loại protein

TCA khảo sát ở các nồng độ 10, 20, 30, 40 % đều loại bỏ được protein trong phức EPS-protein thô với hàm lượng protein giảm từ 3,57 % đến 1,11 % . Sau khi loại protein ra khỏi phức với EPS, hàm lượng polysaccharide trong mẫu có sự thay đổi so với đối chứng, tăng giảm phụ thuộc vào nồng độ TCA. Trong đó loại protein bằng TCA 10 % tăng hàm lượng polysaccharide tới 41,23 % so với hàm lượng ban đầu là 34,10 % (hình 3.17). Tuy nhiên tỷ lệ % bắt gốc tự do của mẫu sau khi loại

protein bằng TCA là 35,42 %, thấp hơn nhiều so với mẫu đối chứng là 55,62 %. Lý do là TCA hoạt động dựa trên sự gắn với cation của protein phá vỡ phức hợp EPS-protein. Đồng thời cũng phá hủy một phần cấu trúc của chuỗi EPS. Do đó làm mất hoạt tính bắt gốc tự do của EPS. Điều này cho thấy phương pháp loại bỏ protein ra khỏi phức EPS-protein không hiệu quả vì ảnh hưởng đến hoạt tính của EPS sau khi loại protein.

3.5.1.2. Khảo sát loại protein bằng phương pháp Sevag

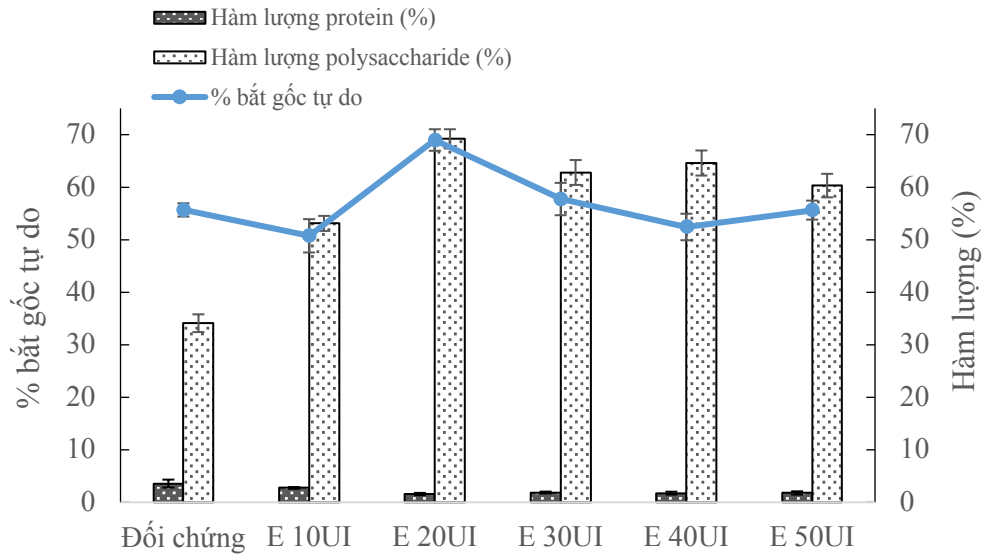


Hình 3.18. Kết quả loại protein bằng phương pháp Sevag

Kết quả khảo sát cho thấy hàm lượng polysaccharide có trong mẫu khi loại protein bằng Sevag theo tỷ lệ 3:1 là 45,64 %, 5:1 là 49,39 %, đều nhỏ hơn khi loại protein bằng Sevag tỷ lệ 4:1 là 62,72 %.

Các mẫu thí nghiệm đều cho % hàm lượng protein giảm. Chứng tỏ protein đã bị loại ở tất cả các mẫu. So sánh với % hàm lượng polysaccharide có trong mẫu sau khi loại protein, hàm lượng protein trong mẫu càng thấp thì hàm lượng polysaccharide trong mẫu càng cao. Hàm lượng protein trong mẫu khi loại bằng Sevag 4:1 là thấp nhất 1,65 % so với trong mẫu ban đầu là 3,57 %. Phương pháp loại protein bằng Sevag 4:1 cho hiệu quả loại được nhiều protein ra khỏi mẫu nhất (hình 3.18). Đồng thời khảo sát hoạt tính bắt gốc ABTS⁺ cũng cho kết quả là phương pháp loại protein bằng Sevag tỷ lệ 4:1 cho kết quả tỷ lệ bắt gốc ABTS⁺ >50 % cao nhất.

3.5.1.3. Khảo sát nồng độ enzyme Alcalase để loại bỏ protein



Hình 3.19. Kết quả khảo sát loại protein bằng Alcalase

Tất cả các nghiệm thức sử dụng Enzyme làm tác nhân loại protein đều cho thấy hàm lượng protein giảm đi so với trong phức EPS-protein thô ban đầu. Enzyme Alcalase ở hoạt độ 20 UI/mL cho hiệu quả loại protein cao nhất với hàm lượng protein trong phức giảm còn 1,57 % so với đối chứng là 3,57 % và với hàm lượng EPS cao 69,2 %, gấp đôi so với đối chứng. Khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ của các mẫu EPS sau khi loại protein bằng Alcalase đều > 50 %, cao nhất ở hoạt độ enzyme 20 UI/mL là 68,98 % (hình 3.19).

Dựa trên khả năng loại protein, hàm lượng EPS và khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ của các mẫu EPS sau khi loại protein của các nghiệm thức xử lý với hoạt độ Alcalase trong khoảng từ 10-50 UI/mL lần lượt là 2,74; 1,57; 1,86; 1,75 và 1,78, đã lựa chọn Alcalase hoạt độ 20 UI/mL để xử lý loại protein trong mẫu EPS thô cho các thử nghiệm tiếp theo.

Tiếp theo là so sánh khả năng loại protein từ phức EPS-protein bằng xử lý TCA 10 %, Sevag 4:1 và enzyme Alcalase 20 UI/mL.

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. 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 9,8 % với 12,2 % mannan oligosaccharide thất thoát [50]. Tuy nhiên so với với phương pháp sử dụng Alcalase thì vẫn kém hơn.

Kết luận, thu nhận EPS thô từ dịch môi trường sau nuôi cấy nấm *C. sinensis* bổ sung dầu ô liu và sử dụng Alcalase để loại protein từ EPS thô.

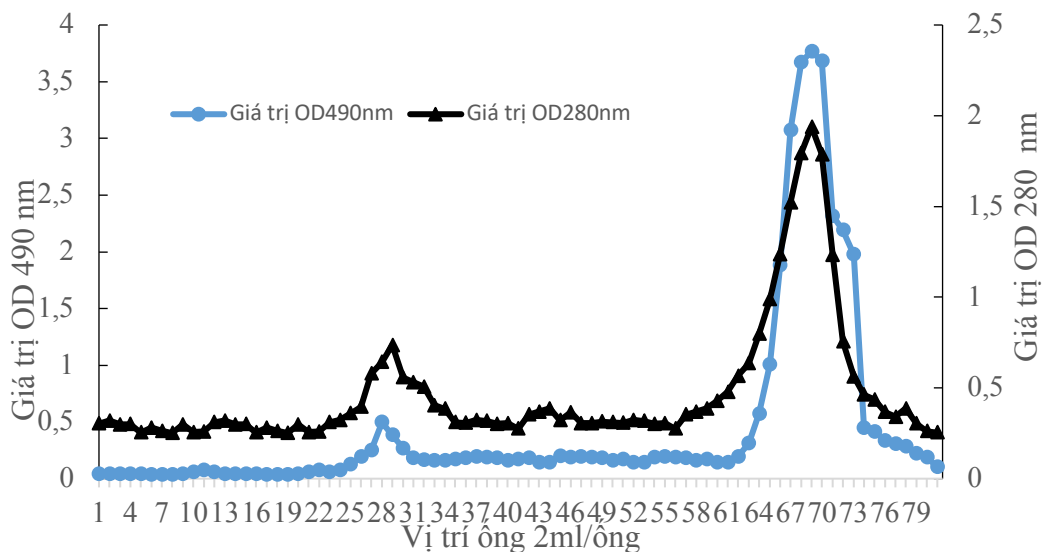
Sau khi loại đáng kể protein từ phức EPS-protein trong dịch, hàm lượng EPS gia tăng đáng kể. Do EPS là đối tượng nghiên cứu của luận án, nên việc tiếp theo là nghiên cứu thu nhận và khảo sát hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS thu được bằng lọc gel và lọc tiếp tuyến.

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 để tinh sạch EPS thô. Kết quả thu được thể hiện trong hình 3.20 với 2 phân đoạn EPS I và EPS II với giá trị OD 490 nm

và OD 280nm tương ứng với độ hấp thụ của EPS và protein.



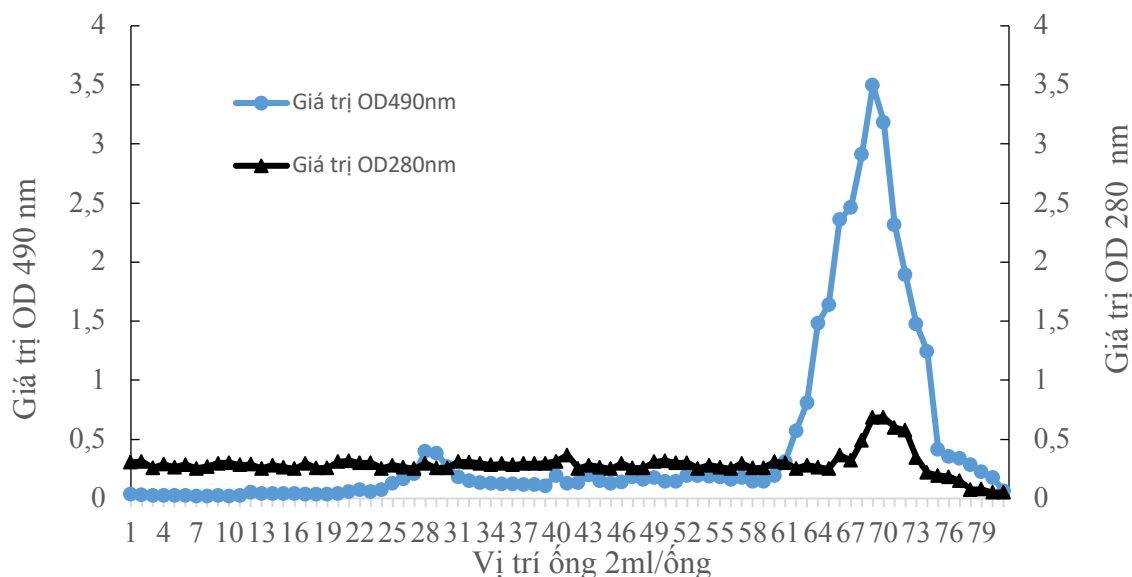
Hình 3.20. Tách phân đoạn EPS bằng sắc ký lọc gel Sephadex G-100

Sử dụng sắc ký lọc gel Sephadex G-100 thu được 2 phân đoạn EPS: EPS I (từ ống 25 đến ống 35) và EPS II (từ ống 55 đến ống 76) với thể tích 2 mL/1 ống. 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 biểu diễn hàm lượng EPS và protein đều có chung đỉnh ở các ống có vị trí cùng nhau.

Nhiều nghiên cứu trước đó đã chỉ ra rằng phân đoạn EPS từ dịch nuôi cấy họ nấm *Cordyceps* có thể chứa protein hoặc không. Năm 2005, Kim và cộng sự thực hiện tách phân đoạn EPS bằng sắc ký lọc gel Sepharose CL-6B thu được 5 phân đoạn EPS từ *C. militaris* NG1 và 3 phân đoạn EPS từ *C. sinensis* [81]. Sự khác biệt này có thể là do nguồn gốc chủng nấm, thành phần và điều kiện môi trường nuôi cấy khác nhau hay do kỹ thuật tách phân đoạn EPS bằng sắc ký lọc gel khác 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.



Hình 3.21. Phân đoạn lọc gel EPS sau khi loại protein bằng Alcalase 20 UI/ml

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 thụ của cả EPS I và EPS II đều giảm mạnh. Tương tự đỉnh hấp thụ của polysaccharide cũng thấp hơn so với trước khi xử lý (Hình 3.21). 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.

3.5.2.3. Hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺, hàm lượng polysaccharide và protein của phân đoạn EPS I và EPS II

Bảng 3.12. % bắt gốc tự do, hàm lượng polysaccharide và hàm lượng protein trong EPS thô và phân đoạn EPS I, EPS II

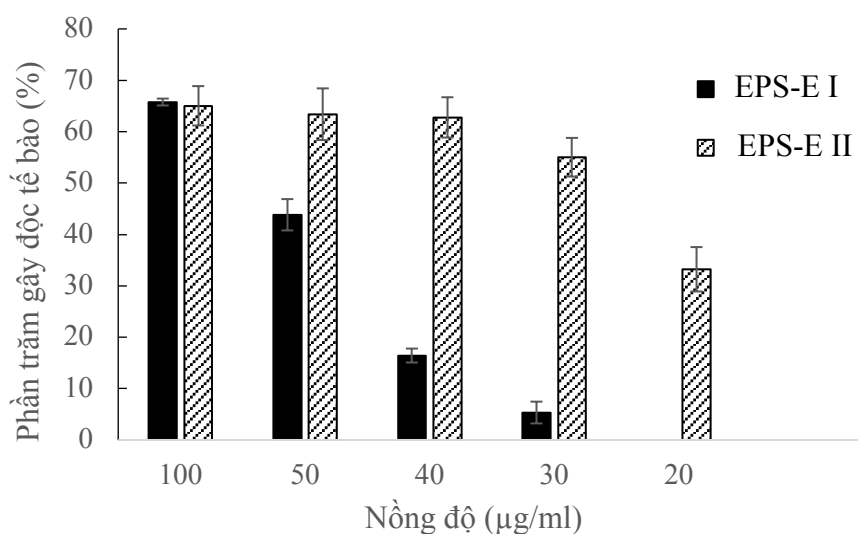
Mẫu	% bắt gốc tự do	HL polysaccharide (%)	HL protein (%)
EPS thô	55,67 ± 1,26	34,1 ± 2,69	3,57 ± 0,25
EPS I	60,23 ± 2,01	62,83 ± 0,42	2,31 ± 0,17
EPS II	62,46 ± 1,87	65,09 ± 0,53	3,57 ± 0,25
EPS-E	68,98 ± 2,05	69,2 ± 1,83	1,57 ± 0,22
EPS-E I	78,62 ± 2,94	82,33 ± 3,76	0,002 ± 0,0
EPS-E II	79,83 ± 2,66	78,98 ± 4,01	0,067 ± 0,0

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: Ở EPS I hàm lượng polysaccharide tăng từ 34,1 % lên 82,33 %, gấp 2,4 lần và 78,98 % đối với EPS II, gấp 2,3 lần so với phức EPS thô. Trong khi, hàm lượng protein giảm đáng kể khi xử

lý Alcalase, giảm từ 3,57 % còn 0,002 % và 0,0067 % tương ứng EPS-E I và EPS-E II. Cả 2 phân đoạn sau xử lý Alcalase đều có hoạt tính bắt gốc tự do tăng đáng kể so với EPS thô.

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

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

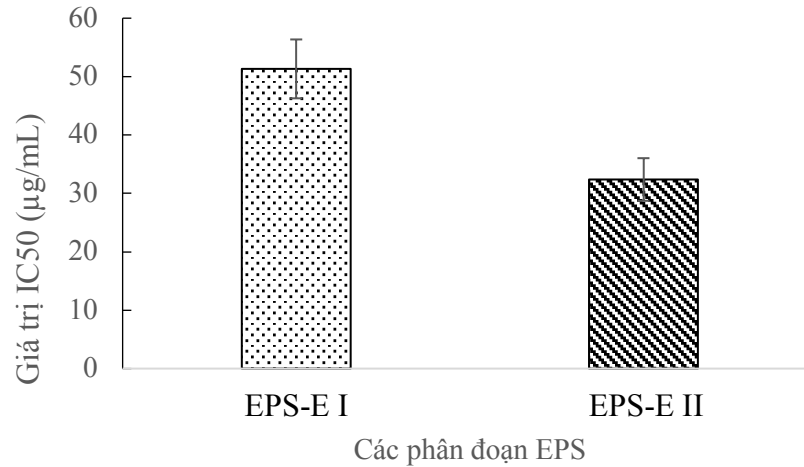


Hình 3.22. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan Hep-G2 của 2 phân đoạn EPS

Kết quả trên hình 3.22 cho thấy các phân đoạn ở nồng độ 100 µg/mL đều có khả năng gây độc cao và tương đồng nhau sau 48 giờ cảm ứng. Khi giảm nồng độ, phân đoạn EPS-E II cho kết quả gây độc tế bào tốt hơn phân đoạn EPS-E I. Ở nồng độ 50 µg/mL, 40 µg/mL, khả năng gây độc tế bào của EPS-E II vẫn trên 60 %. Trong khi khả năng gây độc tế bào của EPS-E I đã giảm mạnh. Khả năng gây độc tế bào của EPS-E II khi giảm nồng độ từ 100 µg/mL xuống 50 µg/mL vẫn còn > 60 %.

Kết quả sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào sau 48 giờ xử lý ở các nồng độ khác nhau cho thấy EPS-E II có hoạt tính gây độc tế bào cao hơn. Tiếp theo là xác định giá trị IC₅₀, giá trị ức chế 50 % sự tăng trưởng tế bào của 2 phân đoạn để so sánh nồng độ gây độc ở 2 phân đoạn,...

Để xác định IC_{50} , đã tiến hành xác định % gây độc tế bào trên một dãy gồm 5 nồng độ và dựa vào phương pháp nội suy để xác định nồng độ gây độc tế bào 50 %. Kết quả được thể hiện ở hình 3.23.



Hình 3.23. Giá trị IC_{50} của 2 phân đoạn trên dòng tế bào ung thư gan Hep-G2

Giá trị IC_{50} càng nhỏ, thì hoạt tính gây độc tế bào ung thư càng cao. Kết quả cho thấy EPS-E II có hoạt tính gây độc tế bào cao hơn so với EPS-E I. Theo chương trình tầm soát hoạt tính kháng ung thư của các hợp chất tự nhiên của Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ, những cao chiết có $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ có hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* được coi là tốt, có triển vọng. Còn ở mức $IC_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$ thì khả năng gây độc tế bào thấp, không có triển vọng. Như vậy, giá trị IC_{50} ở nồng độ $32,38 \pm 3,65 \mu\text{g/mL}$ của phân đoạn EPS-E 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 kỹ thuật lọc membrane theo phương pháp lọc tiếp tuyến với màng lọc 100 kDa, từ 100 – 750 kDa và > 750 kDa. Kết quả thu được thể hiện trong bảng 3.13.

Bảng 3.13. Thành phần hóa lý của 3 phân đoạn EPS lọc tiếp tuyến

Phân đoạn	Khối lượng (g)	Polysaccharide (%)	Đường khử (%)	Protein (%)
EPS thô	10,0	67,96	2,94	5,13
< 100 kDa	0,8	78,04	3,79	3,65
100 – 750 kDa	0,7	82,03	3,33	3,71
> 750 kDa	1,06	76,39	3,22	4,72

Trong 10 g EPS hòa tan thu được tổng cộng 2,56 g EPS các phân đoạn, xấp xỉ 25 % với khối lượng EPS ban đầu. Phân đoạn EPS lớn hơn 750 kDa là phân đoạn lớn nhất (1,06 g). Phân đoạn EPS nhỏ hơn 100 kDa và từ 100 – 750 kDa thu nhận được lần lượt là 0,8 và 0,7 g. Kết quả này cho thấy EPS có các phân đoạn polysaccharide kích thước trải dài từ dưới 100 kDa đến trên 750 kDa. Nghiên cứu trước đây về exopolysaccharide của chủng *Cs-HK1* cũng cho thấy hàm lượng EPS có khối lượng phân tử trải dài từ 5 kDa đến hơn 200 kDa [36].

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 kỹ thuật lọc membrane theo phương pháp lọc tiếp tuyến là phù hợp để thu nhận và tinh sạch các phân đoạn mẫu EPS.

Hàm lượng đường khử trong các phân đoạn EPS cao hơn so với EPS thô. Phân đoạn EPS nhỏ hơn 100 kDa có hàm lượng đường khử lớn nhất (3,79 %) cho thấy mẫu EPS đang nghiên cứu có hàm lượng đường khử không cao và tập trung nhiều ở phân đoạn nhỏ. Loại protein bằng Alcalase làm hàm lượng đường khử tăng lên cho thấy mẫu EPS đã được tinh sạch.

Hàm lượng protein trong các phân đoạn tăng dần từ thấp đến cao. 2 phân đoạn EPS nhỏ hơn 100 kDa và trong khoảng 100 – 750 kDa có hàm lượng protein thấp hơn mẫu EPS thô. Trong mẫu nhỏ hơn 100 kDa hàm lượng protein giảm 28,85 % Trong mẫu từ 100 – 750 kDa hàm lượng protein giảm 27,68 %. Trong khi hàm lượng protein trong phân đoạn EPS lớn hơn 750 kDa giảm không đáng kể, 7,99 % so với mẫu EPS thô. Điều này phù hợp với nhận định của nghiên cứu trước đây cho thấy EPS thu nhận từ *C. sinensis* là một phức hợp của polysaccharide và protein [82].

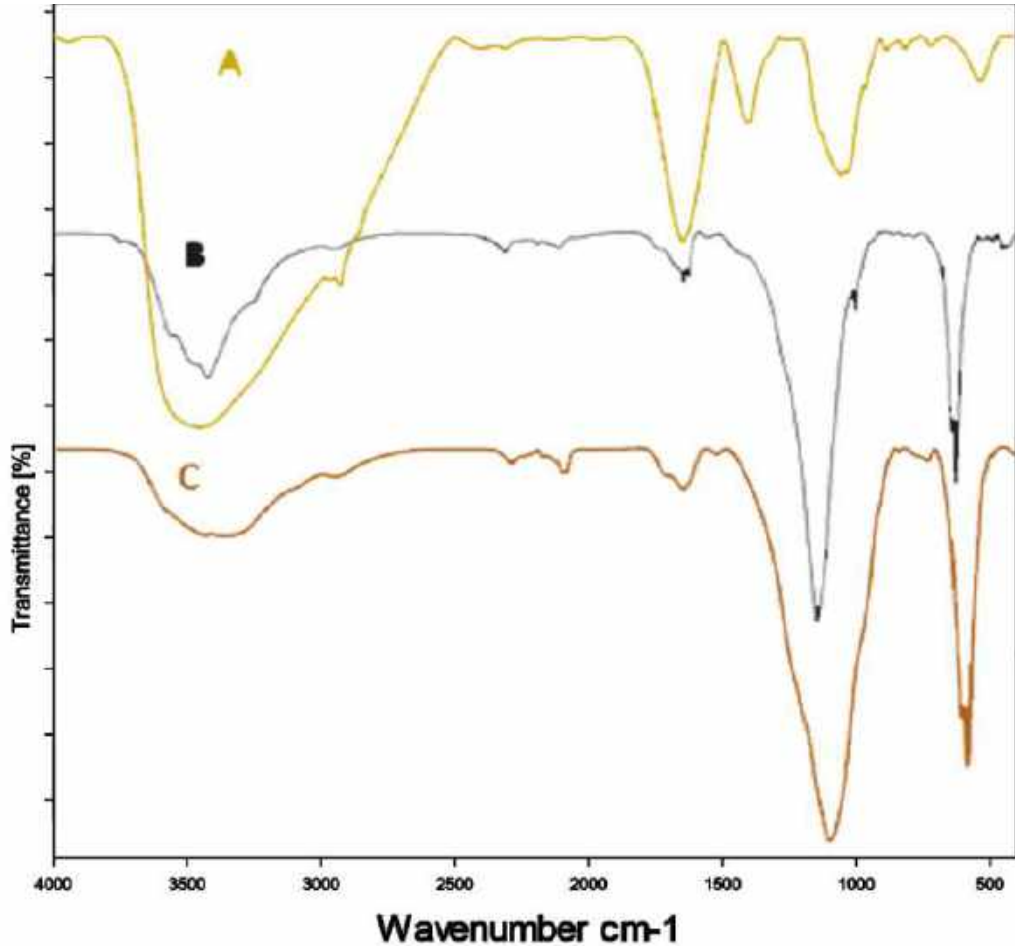
Tóm lại, thành phần hóa học của EPS bao gồm: polysaccharide, đường khử, protein thay đổi tùy thuộc vào phân đoạn EPS thu được bằng lọc tiếp tuyến. Đây được xem là kết quả quan trọng giúp chủ động kiểm soát EPS nguyên liệu đầu vào cho quá trình sulfate hóa trong các nghiên cứu tiếp theo. Bên cạnh đó, cần có những nghiên cứu cấu trúc chuỗi mạch polysaccharide, các loại liên kết glycosidic có trong phức và thành phần đơn phân của EPS làm cơ sở cho việc cải biến cấu trúc theo định hướng nâng cao hoạt tính sinh học của EPS từ nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*.

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 của chúng.

3.6 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/Py 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.

3.6.1 Kết quả sulfate hóa phân đoạn <100 kDa

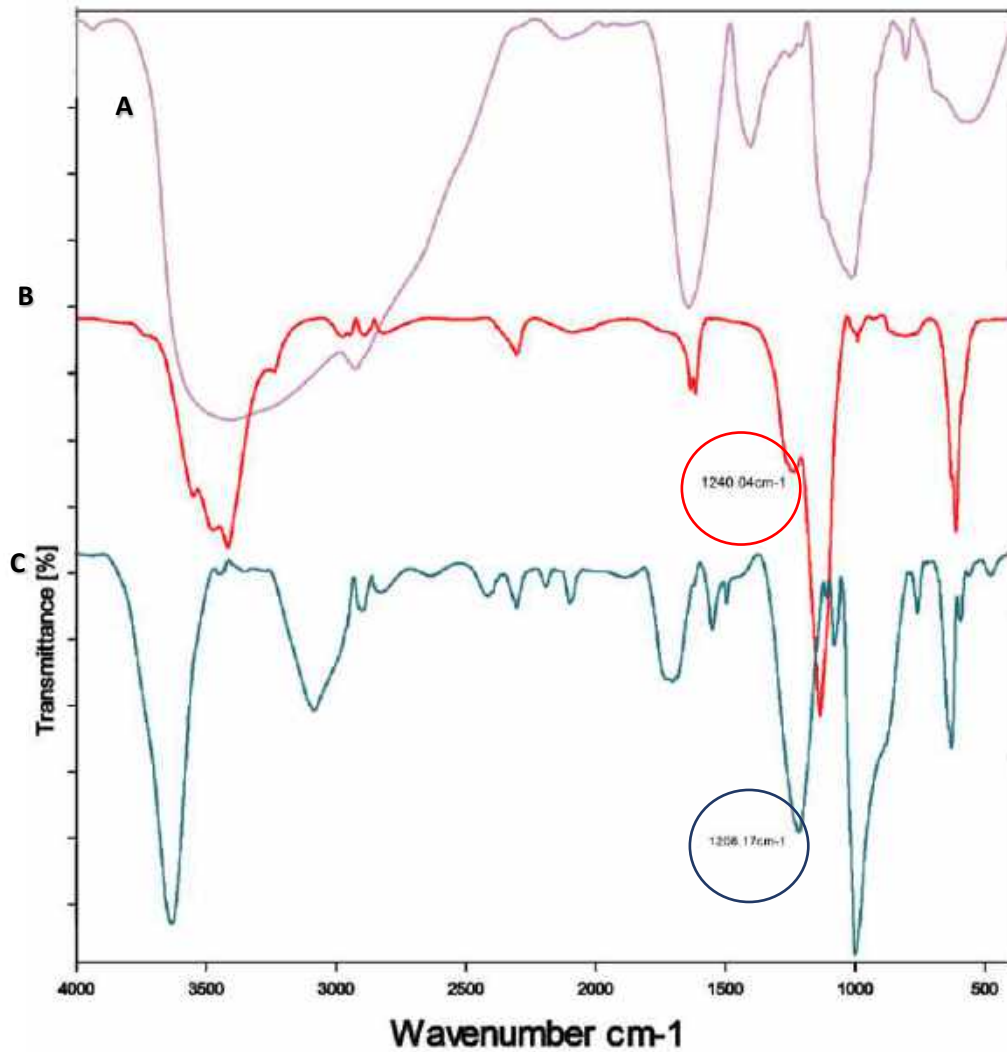


Hình 3.24. Phổ FT-IR phân đoạn 100 kDa trước và sau sulfate hóa. A: trước sulfate hóa; B: sulfate hóa tỷ lệ EPS/SO₃.Py 1:5; C: sulfate hóa tỷ lệ EPS/SO₃.Py 1:7

Sự khác biệt trước và sau sulfate hóa được thể hiện rõ ràng trong khoảng peak 1000-1500 cm⁻¹. Hình B, C có sự tương đồng khi lần lượt xuất hiện 3 đỉnh lớn: 1139,86 cm⁻¹; 1127,61 cm⁻¹. Các đỉnh này có khoảng chân mở rộng và sườn có những điểm gờ nhẹ. Trong khi đó phản ứng sulfate hóa thành công thể hiện khi trên hình phổ FT-IR xuất hiện đỉnh trong khoảng 1200 cm⁻¹. Có thể dự đoán rằng trong khoảng peak (1100-1400 cm⁻¹) được thể hiện trong các hình B, C có ghi nhận sự dao động của liên kết S=O nhưng những liên kết này quá ít để phổ FT-IR có thể ghi nhận được rõ ràng (Hình 3.24).

Phân đoạn EPS <100 kDa có MW nhỏ, nên quá trình khuấy nhiệt ở 90 °C trong môi trường khí trơ có thể làm polysaccharide bị đứt gãy, làm giảm hiệu quả gốc SO_3^{2-} thay thế H trong polysaccharide.

3.6.2 Kết quả sulfate hóa phân đoạn 100-750 kDa



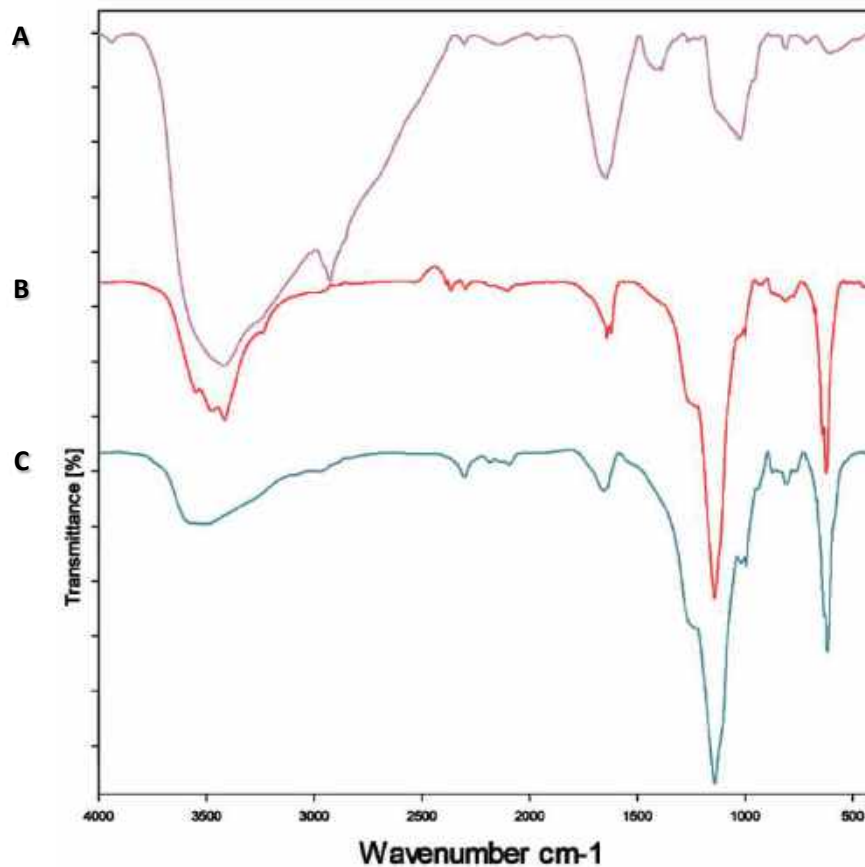
Hình 3.25. Phổ FT-IR phân đoạn 100 – 750 kDa trước và sau khi sulfate hóa. A: trước khi sulfate hóa; B: sulfate hóa tỷ lệ EPS/ $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ 1:5 (w/w); C: sulfate hóa (tỷ lệ EPS/ $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ 1:7 (w/w)

Trong khoảng bước sóng 1200 cm^{-1} của phổ FT-IR phân đoạn EPS 100 – 750 kDa trước khi sulfate hóa (hình A) không có đỉnh nào được ghi nhận, chứng tỏ trong mẫu không có sự xuất hiện của liên kết S=O. Trong khi đó có sự khác biệt so với hình A: hình B xuất hiện đỉnh 1240 cm^{-1} và hình C xuất hiện đỉnh 1208 cm^{-1} (Hình 3.25).

Độ thay thế (DS) hiển thị trung bình số nhóm SO_3^{2-} gắn trên gốc đường của S-EPS ở tỷ lệ 1:5 2h (Hình 3. 25B) đạt 2,32 và hiệu suất sulfate hóa đạt 90,37 %, cao hơn mẫu S-EPS 1:7 2h (Hình 3. 25C) với DS chỉ đạt 1,64 và hiệu suất sulfate hóa 55,35 %. Điều này cho thấy mẫu EPS từ 100-750 kDa đạt hiệu quả sulfate hóa cao nhất, khi phản ứng với SO_3Py tỷ lệ 1:5 trong 2h (Hình 3.25).

Nghiên cứu của luận án này là kế thừa và phát triển từ nghiên cứu của tác giả Trần Minh Trang nhằm hoàn thiện phản ứng sulfate hóa để cải thiện hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS. Trần Minh Trang và cộng sự (2017) đã thực hiện sulfate hóa phân đoạn S-EPS₁₁ EPS chiết xuất từ *C. sinensis* đạt kết quả tốt nhất với DS là 1,59; dao động S=O tại $1129,40\text{ cm}^{-1}$; hiệu suất sulfate hóa 13,78 % [83].

3.6.3 Kết quả sulfate hóa phân đoạn > 750 kDa



Hình 3.26. Phổ FT-IR phân đoạn EPS >750 kDa trước và sau khi sulfate hóa.

A: trước khi sulfate hóa; B: sulfate hóa (tỷ lệ EPS/ SO_3Py 1:5 (w/w)); C: sulfate hóa (tỷ lệ EPS/ SO_3Py 1:7 (w/w))

Phổ FT-IR của phân đoạn EPS >750 kDa trước và sau sulfate hóa có sự khác biệt trong khoảng peak 1000-1500 cm^{-1} . Hình A thể hiện phân đoạn EPS >750 kDa khi chưa sulfate hóa: không thấy xuất hiện đỉnh trong khoảng 1200 cm^{-1} , chứng tỏ trong mẫu EPS không chứa liên kết sulfate S=O. Trong hình B và C lần lượt xuất hiện 2 đỉnh lớn là 1138 cm^{-1} và 1142 cm^{-1} có phần chân rộng và trên sườn có gờ nổi rõ trong khoảng 1200 cm^{-1} . Tuy đỉnh trong khoảng 1200 cm^{-1} không xuất hiện rõ ràng, nhưng 2 điểm nhô ra trên sườn đỉnh của hình B và C thể hiện có sự dao động của liên kết S=O. Có thể phán đoán rằng phản ứng sulfate hóa đã xảy ra, nhưng số lượng liên kết S=O trong mẫu chưa đủ nhiều để phổ nhận biết rõ ràng (Hình 3.26).

Kết quả sulfate hóa 3 phân đoạn EPS thu được từ phức EPS-protein 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	S=O (1200 cm^{-1})
1:5	2		(ở 1240 cm^{-1})	
1:5	3		DS=2,32; 90,375 % tại t=2h	
1:7	1		S=O	S=O (1200 cm^{-1})
1:7	2		(ở 1208 cm^{-1})	
1:7	3		DS=1,64; 55,348 % tại t=2h	

Độ thay thế (DS) là thông số quan trọng để đánh giá chất lượng của các dẫn xuất sulfate. Kết quả cho thấy, giá trị DS ở các phân đoạn có sự khác biệt rõ rệt (Bảng 3.14). Cụ thể, phân đoạn 100-750 kDa 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 < 100 kDa không xảy ra phản ứng sulfate hoá và phân đoạn > 750 kDa cho giá trị DS < 1. Nghiên cứu trước đã chứng minh DS càng cao thì hoạt tính của các dẫn xuất càng mạnh. Đáng chú ý, dẫn xuất S-EPS 100 - 750 kDa của chúng tôi có giá trị DS cao hơn các dẫn xuất sulfate khác của các nghiên cứu như S-EPS-1D (DS = 1,38) từ *C. sinensis* của Yan và cộng sự (2010) ở một điều kiện tỷ lệ CSA/Pyr

= 1:1 (v/v), 60 °C và 3h [51]; S-ASP (DS = 0,82) từ *Artemisia sphaerocephala* của Wang và cộng sự (2010) (CSA/Pyr = 1:1, 60 °C, 3h) [85]; nghiên cứu của Li và cộng sự (2012) đã tạo DHPD22 (DS = 0,94) từ *Dendrobium huoshanense* (CSA/Pyr = 1:2, 60 °C, 1h) [22]; dẫn xuất sulfate polysaccharide (DS = 0,23) từ *C. militaris* (CSA/Pyr = 1:2, 70 °C, 2h) của tác giả Jing và cộng sự (2015) [90]; cùng năm 2016 Xie và cộng sự tạo dẫn xuất S-CP1-1 (DS = 0,55) từ *Cyclocarya paliurus* (CSA/Pyr = 1:1, 60 °C, 4h) [69]; và nghiên cứu của Xu cũng tạo S-SGP (DS = 0,99) từ *Sphallerocarpus gracilis* (CSA/Pyr = 1,29:1, 64,74 °C, 3,41 h) [41]. Tuy nhiên, dẫn xuất của chúng tôi thấp hơn dẫn xuất S-PSG-3 (DS= 3,43) từ *Ganoderma atrum* của Chen và cộng sự (2015) (CSA/Pyr = 3:1, 45 °C, 6h) [18]. Như vậy, phản ứng sulfate hóa polysaccharide tùy thuộc vào cấu trúc chuỗi polysaccharide, điều kiện phản ứng cũng như kỹ thuật sulfate hóa khác nhau giữa các nhóm nghiên cứu. 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*.

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.

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

Kết quả khảo sát khả năng bắt gốc ABTS⁺ tự do của 3 phân đoạn EPS sau khi được sulfate hóa dựa trên giá trị IC₅₀ được thể hiện trong bảng 3.16.

Bảng 3.15. Khả năng kháng oxy hóa của 3 phân đoạn EPS sulfate hóa

Mẫu	Nồng độ (µg/mL) giá trị IC ₅₀		
	Chưa sulfate	EPS/SO ₃ .Py tỷ lệ 1:5	EPS/SO ₃ .Py tỷ lệ 1:7
EPS thô	>4000		
EPS phân đoạn < 100 kDa	3026,2	>4000	>4000

EPS phân đoạn 100-750 kDa	3346,4	2205,7	2765,8
EPS phân đoạn > 750 kDa	3679,3	3223,5	3304,2

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 <100 kDa 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].

Hoạt tính bắt gốc tự do $ABTS^+$ của phân đoạn EPS 100-750 kDa sau khi được sulfate hóa được cải thiện đáng kể tăng từ 60,94 % ở EPS tự nhiên đến 98,62 %, tăng hơn 38 %. Và cũng chính phân đoạn này cho kết quả tạo dẫn xuất sulfate hóa tốt nhất so với 2 phân đoạn còn lại. Kết quả nghiên cứu trong luận án này tốt hơn so với dẫn xuất sulfate hóa SEPS-1D tạo bởi Yan và cộng sự (2012), chỉ đạt 60 % tại cùng nồng độ khảo sát. Kết quả DS của S-EPS 100-750 kDa của nghiên cứu này cao hơn so với SEPS-1D, lần lượt là 2,32 và 1,38 [61]. Điều này cũng phù hợp với nhận định của Wang và cộng sự (2010) cho rằng dẫn xuất sulfate polysaccharide có giá trị DS càng cao thì hoạt tính kháng oxy hóa càng mạnh [85]. Helbert và cộng sự (2017) cũng cho rằng hoạt tính kháng oxy hóa của dẫn xuất sulfate polysaccharide tăng cùng với sự gia tăng thành phần sulfate của sản phẩm [57]. Một số nghiên cứu trước đây cũng chứng minh dẫn xuất sulfate hóa polysaccharide có hoạt tính kháng oxy hóa cao hơn so với polysaccharide tự nhiên. Như vậy, các gốc sulfate (SO_3^{2-}) được gắn vào phân đoạn EPS đóng một vai trò quan trọng trong biểu hiện hoạt tính sinh học của dẫn xuất sulfate polysaccharide. Nguyên nhân có thể là nhóm SO_3^{2-} tương tác với điện tử trong EPS, giúp nâng cao khả năng kháng oxy hóa.

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

Ngoài hoạt tính bắt gốc tự do ABTS⁺, cũng cần khảo sát hoạt tính kháng Tyrosinase của 3 phân đoạn sau khi được nâng cấp sulfate hoá. Lý do trong cơ thể người Tyrosinase xúc tác phản ứng oxy hoá khử liên quan đến loại bỏ các gốc tự do.

Các mẫu EPS được sulfate hóa (S-EPS) trong nghiên cứu ức chế Tyrosinase được thực hiện phản ứng lần lượt ở các nồng độ từ 0 đến 4000 µg/mL (bảng 3.17).

Bảng 3.16. Hoạt tính ức chế Tyrosinase của 3 phân đoạn S-EPS

Mẫu	IC ₅₀ (µg/mL)
Acid Kojic (chứng dương)	258,5
EPS 100 kDa chưa sulfate	>4000
EPS 100-750 kDa chưa sulfate	>4000
EPS 750 kDa chưa sulfate	>4000
S-EPS 100-750 kDa tỷ lệ 1:5	852,7
S-EPS 100-750 kDa tỷ lệ 1:7	927,4
S-EPS 750 kDa tỷ lệ 1:5	>4000
S-EPS 750 kDa tỷ lệ 1:7	>4000

Trong bảng 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 µg/mL. Các mẫu S-EPS còn lại cho kết quả đều trên 4000 µg/mL, không biểu hiện kháng Tyrosinase. Mẫu S-EPS tỷ lệ 1:5 cho kết quả kháng Tyrosinase tốt nhất là 852,7 µg/mL.

Oludemi và cộng sự (2016) đã tổng hợp những nghiên cứu về hoạt tính kháng Tyrosinase trên một số loại nấm. Kết quả nhận được là phù hợp với những nghiên cứu trước đây: Chiết xuất metanol của nấm *Pleurotus Ostreatus* ở liều lượng 1,125-1 mg/mL ức chế tới 11,36-59,56 % hoạt tính Tyrosinase. Chiết xuất metanol từ nấm *Lentinula Edodes* ở liều lượng 1,125-1 mg/mL ức chế tới 15,12 – 54,61 % hoạt tính Tyrosinase [86]. Trong nghiên cứu này, phân đoạn S-EPS 100 – 750 kDa tỷ lệ 1:5 2h

ở liều lượng 1 mg/mL ức chế Tyrosinase tới 63,50 %, cao hơn các kết quả trong các nghiên cứu trước [82].

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 SO_3^{2-} ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính sinh học của các dẫn xuất sulfate hóa của EPS. Đã tổng hợp thành công dẫn xuất sulfate hóa S-EPS ở điều kiện tối ưu với tỷ lệ $EPS/SO_3.Py = 1:5$, 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 $EPS/SO_3.Py$ để cải biến sulfate hóa nâng cấp hoạt tính sinh học của EPS thu nhận từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis*.

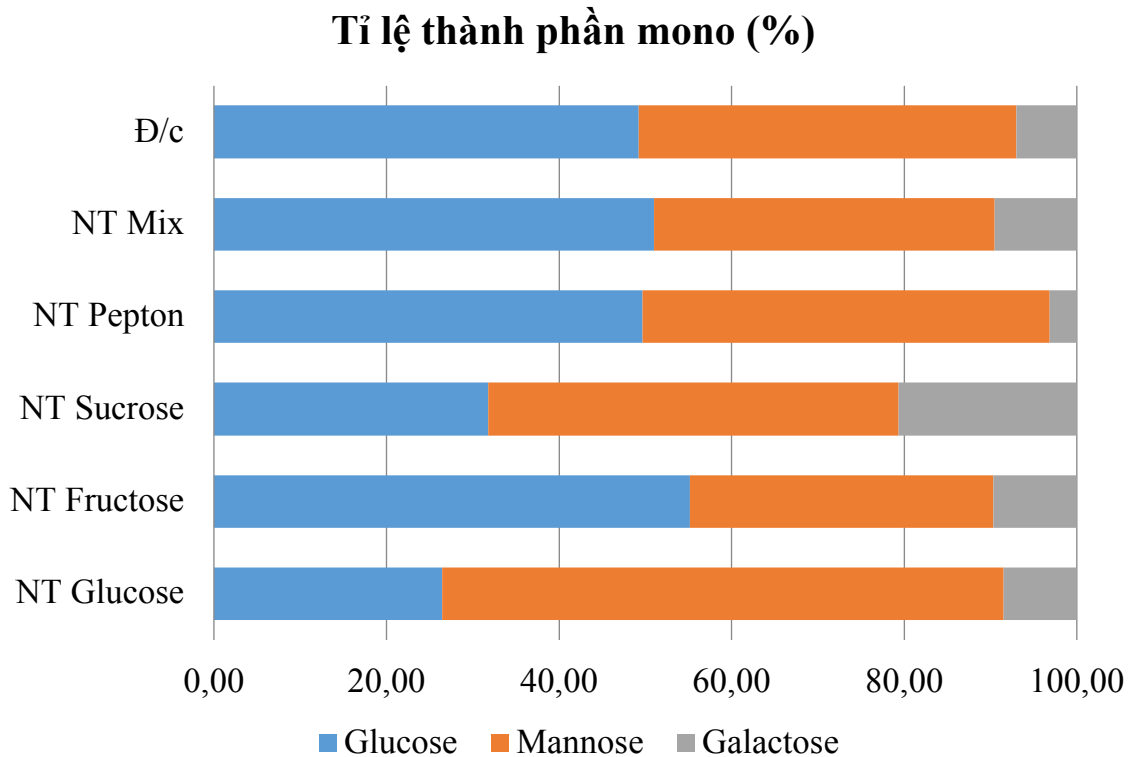
Cấu trúc hóa học, thành phần cấu tạo và các kiểu liên kết trong EPS quyết định hoạt tính sinh học của chúng. Do vậy nhiệm vụ tiếp theo là tìm hiểu về cấu trúc hóa học, thành phần cấu tạo và các kiểu liên kết trong EPS thu được từ dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* và khảo sát mối liên quan của chúng với hoạt tính sinh học của các phân đoạn EPS.

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

3.7.1. 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 %.

Sau 40 ngày nuôi cấy nấm *C. sinensis* thu nhận EPS từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* trên các môi trường nghiên cứu nói trên. Tiến hành xác định thành phần đường đơn của EPS bằng phương pháp thủy phân HCl 10 %.



Hình 3.27. Tỉ lệ thành phần đường đơn của EPS từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* trên 5 nguồn cơ chất khác nhau

Bảng 3.17. Thành phần đường đơn của các nghiệm thức (%)

	NT glucose	NT fructose	NT sucrose	NT peptone	NT mix
Glucose	26,44	55,19	31,82	49,64	51,01
Mannose	65,10	35,10	47,55	47,23	39,50
Galactose	8,46	9,71	20,63	3,13	9,49

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. Ở NT glucose, thành phần mannose chiếm chủ yếu là 65,1 %. Trong khi ở NT fructose và NT mix, glucose lại chiếm chủ yếu lần lượt là 55,19 % và 51,01 %. Đặc biệt, NT bổ sung sucrose có thành phần galactose cao nhất so với các nghiệm thức còn lại là 20,63 %. Sự khác

biệt này có thể liên quan đến nguồn cơ chất là sucrose, thay vì là đường đơn như các nghiệm thức còn lại (hình 3.30, bảng 3.20).

Li và cộng sự (2006) cũng đã thông báo thành phần đường đơn phân đoạn CSP-1 thu được từ nấm *C. sinensis* gồm glucose, mannose và galactose với tỉ lệ tương ứng giữa chúng là 1:0,6:0,75 trong khoảng 210 kDa [91]. 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]. Li và cộng sự (2021) đã phân tích thành phần đường đơn của EPS từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis* với 3 nhóm kích thước phân tử [84]. Kết quả nghiên cứu cho thấy: Phân đoạn EPS-HM có MW 6250 kDa chứa 4 thành phần đường đơn là mannose : glucose : galactose : 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. Tuy nhiên, có điểm đặc biệt là giữa hai phân đoạn EPS có MW khác nhau nói trên lại có sự khác biệt khá lớn giữa tương quan tỉ lệ galactose so với các đường đơn còn lại. Ở phân đoạn EPS-HM, galactose chiếm tỷ lệ cao so với các đường đơn còn lại còn lại. Còn ở EPS-LM, galactose lại chiếm tỷ lệ khá thấp so với mannose và glucose. Kết quả cho thấy đường đôi trong môi trường nuôi cấy *C. sinensis* tạo EPS chứa galactose nhiều hơn. Các polysaccharide trong *C. sinensis* chủ yếu là thành phần cấu trúc xương của thành tế bào, hỗ trợ tế bào ổn định cơ học và cấu trúc. Trong các giai đoạn sinh trưởng khác nhau, ví dụ ở sợi nấm hay quả thể, thành phần và cấu trúc của polysaccharide do đó sẽ khác nhau tùy thuộc vào điều kiện của môi trường nuôi cấy và quá trình sinh trưởng.

3.7.2. 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 thông qua quá trình sau: Trước tiên, tiến hành methyl hóa EPS, sau đó thủy phân và acetyl hóa các dẫn xuất methyl hóa tạo dẫn xuất PMAAs của EPS để phân tích GC-MS. 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 →3)- α -D-Glcp. Riêng ở nghiệm thức môi trường bổ sung peptone có sự xuất hiện mạch nhánh →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 của việc xác định tỉ lệ thành phần đường đơn và liên kết có sự khác biệt. Tỉ lệ mạch chính →3)- β -D-Manp-(1→ chiếm hơn 50 %, trong khi thành phần glucose và mannose tương đối bằng nhau. Nguyên nhân có thể là do trong phản ứng methyl hoá glucose bị biến đổi thành mannose, hoặc ngược lại. Hiện tượng này cũng xuất hiện trong nhiều các nghiên cứu trước đây. Hai polysaccharide với tên gọi là CPS1 và CPS2 của Chen và cộng sự (2016) được phân lập từ nuôi cấy hệ sợi của *C. sinensis* có tỉ lệ thành phần monosaccharide tương ứng là Glu:Man:Gal:Ara = 46:36:18:1 và Glu:Man:Gal:GlaUA:Xyl:Ara:Rha = 30:25:14:4:3:3:1. Cả hai cấu trúc đều có liên kết α -glycosidic với CPS1 có mạch khung là các gốc glucose liên kết với 1,6-man ở các vị trí C2, C3 và C4; mạch khung của CPS2 là 1,6-glu, 1,6-man và 1,6-gal với các nhánh là các gốc monosaccharide khác nhau tại vị trí C3 [11].

Bên cạnh đó, Sheng và cộng sự (2011) đã phân lập được EPS từ *C. sinensis* có β -D-glucan là mạch khung chính. EPS thu được chứa các thành phần monosaccharide gồm mannose, glucose và galactose với tỉ lệ là 23:1:2,6 [14]. Yan và cộng sự (2010) phân lập được EPS-1A với trọng lượng phân tử trung bình khoảng 40 kDa được tinh sạch từ môi trường lên men nuôi cấy *C. sinensis*. EPS-1A chứa thành phần monosaccharide là glucose, mannose và galactose với tỉ lệ tương ứng 15,2:3,6:1. Cấu trúc mạch khung gồm 2 gốc (1→6)- α -D-glucose (77 %) và (1→6)- α -D-mannose (23 %) với các nhánh ở vị trí O-3 [14]. Nghiên cứu của Zhang và cộng sự (2012) đã thu nhận polysaccharide với trọng lượng phân tử là 12 kDa bằng sắc ký lọc gel. Polysaccharide này chứa phần đường đơn gồm mannose, rhamnose, arabinose, xylose, glucose và galactose tương ứng với tỉ lệ 38,3 %; 2,51 %; 2,21 %; 5,22 %; 27,44 % và 24,25 % [70]. Wang và cộng sự (2017) đã xác định được một β -D-glucan tan trong nước từ *O. sinensis* tự nhiên. Các đặc điểm cấu trúc được xác định bằng phương pháp sắc ký trao đổi anion hiệu năng cao kết hợp với đầu dò ampe kế xung

(HPAEC-PAD), GC-MS và phổ NMR. Kết quả chỉ ra β -D-Glucan có cấu trúc với mỗi bảy khung sườn $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}$ thì sẽ có 2 nhánh $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}$ [4].

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 $\rightarrow3\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow$. Trong khi mạch chính ở 5 nghiệm thức trong nghiên cứu này là $\rightarrow3\text{-}\beta\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow$. 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.

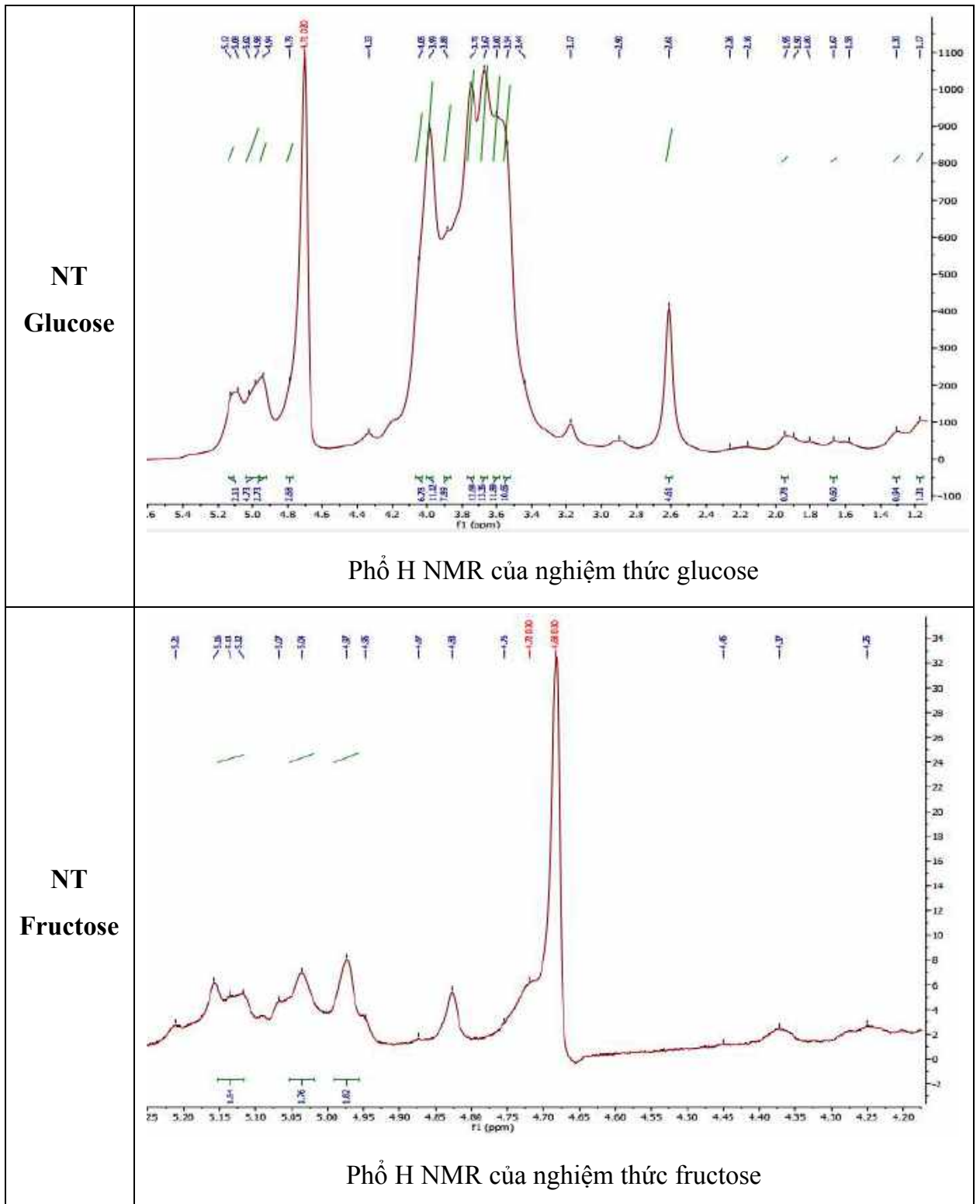
Nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* trên các nguồn cơ chất khác nhau cho sinh khối và EPS khác nhau. Trong đó, peptone là nguồn cơ chất nấm sử dụng kém hiệu quả nhất. Đối với nguồn cơ chất là glucose, EPS sinh ra từ nấm có cấu trúc phức tạp, có nhiều liên kết giữa các thành phần đường đơn. Việc có nhiều liên kết giữa các đường đơn có thể giúp EPS có hoạt tính sinh học tốt hơn do có chứa nhiều gốc glucan tự do, dễ bị phân cắt. Nguồn cơ chất đường đôi sucrose *C. sinensis* hấp thụ kém hơn so với đường đơn khi bổ sung ở cùng nồng độ.

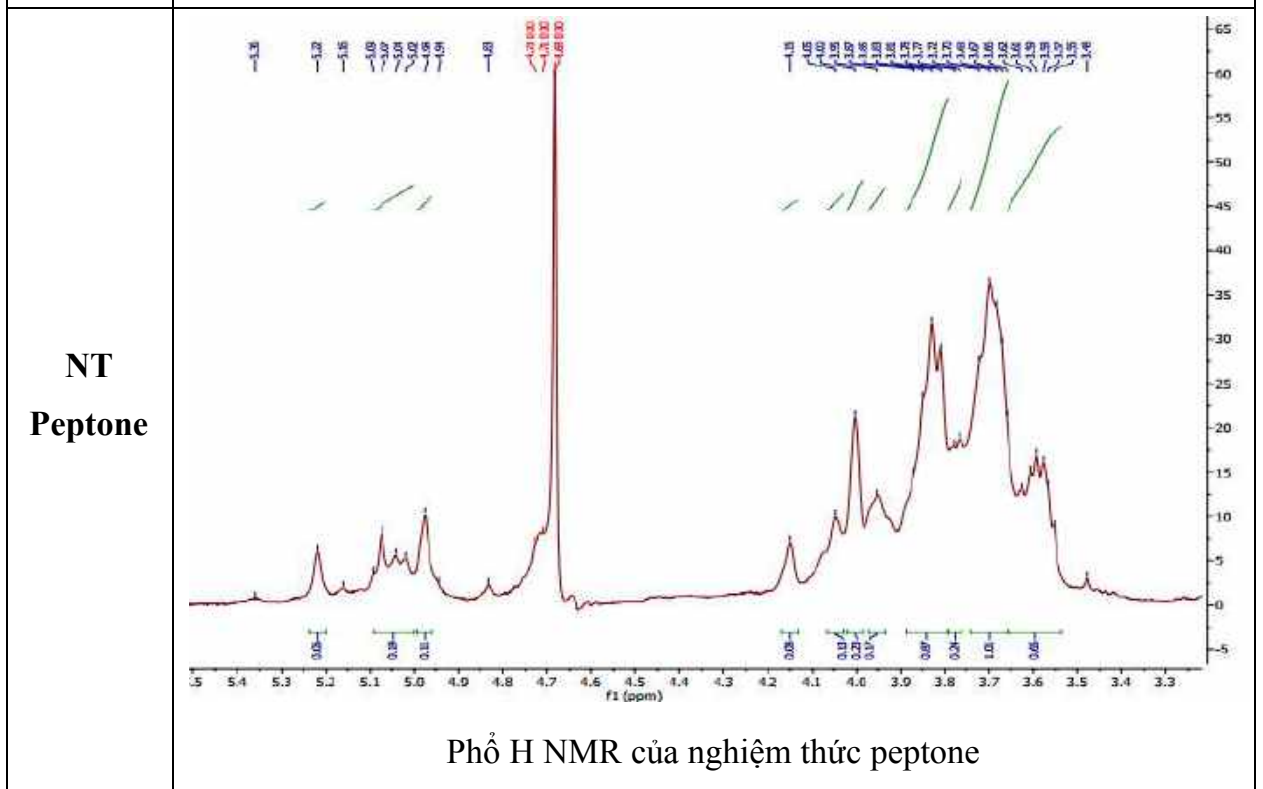
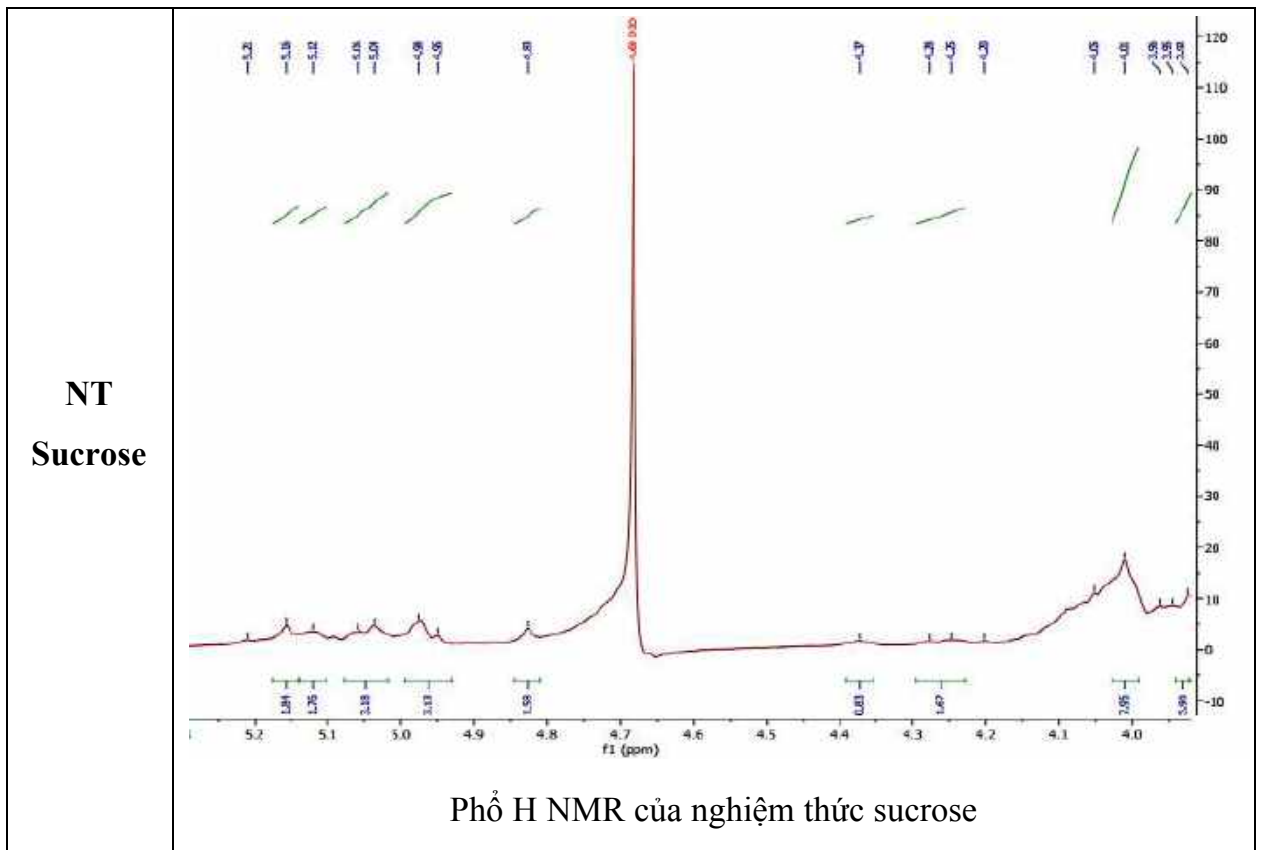
3.7.3. Khảo sát cấu trúc của EPS bằng NMR

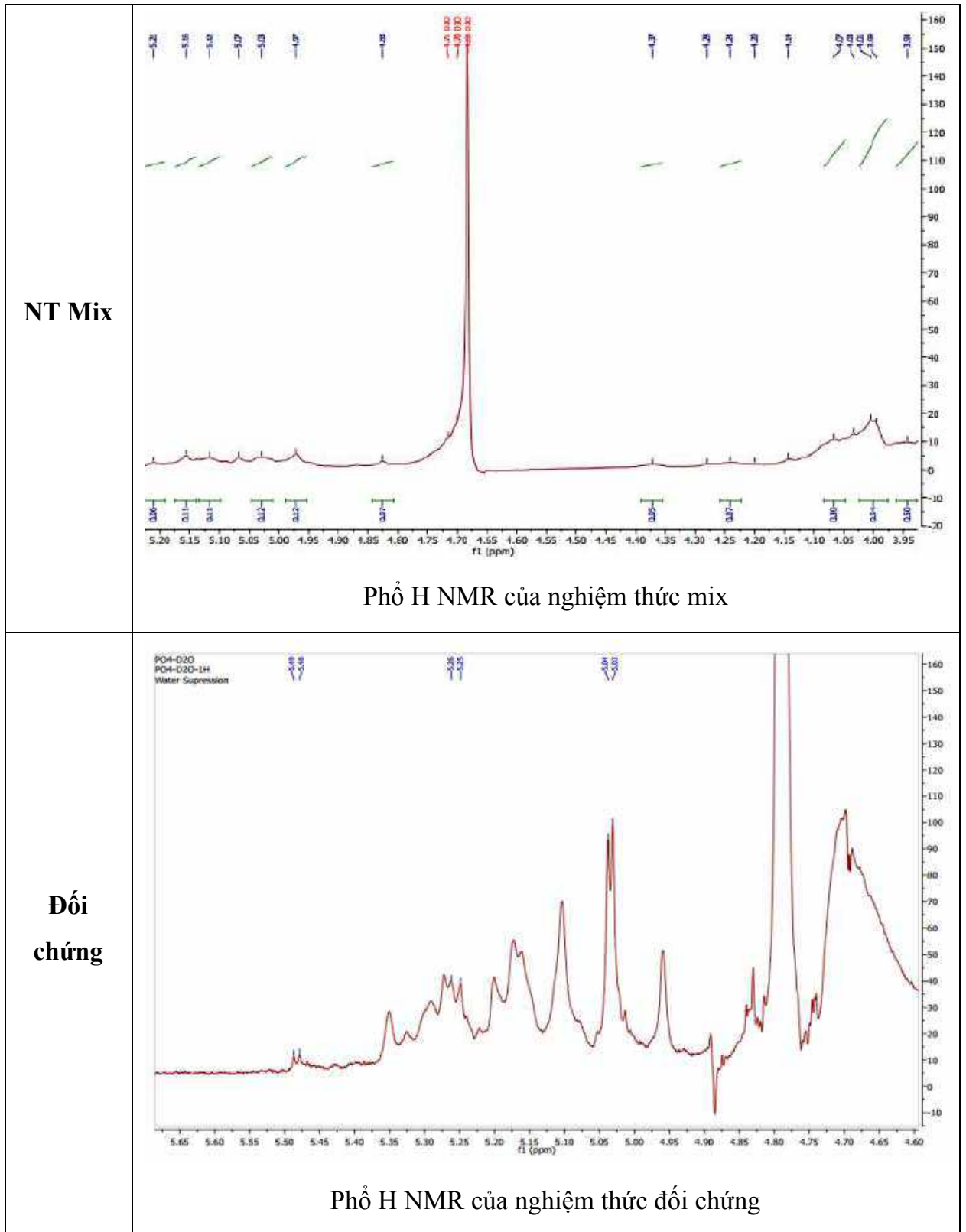
Cấu hình của liên kết glycosidic trong polysaccharide được phân tích bằng ^1H NMR (hình 3.28). So với các phổ đồ khác của các sản phẩm tự nhiên, các tín hiệu của polysaccharide thu thập trong một phạm vi hẹp δ 4,3 – δ 5,9 ppm tương ứng với tín hiệu của 3 loại đường [89]. EPS thu nhận từ tất cả 5 nghiệm 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 $\alpha\text{-D-mannose}$ và $\beta\text{-D-galactose}$.

Tuy nhiên các tín hiệu này chưa được tách rõ ràng, có thể do cấu trúc của EPS bị kết tụ lại với nhau do nhiều liên kết chèn giữa các peak. Ngoài ra, phổ ^{13}C NMR

không có tín hiệu ở vùng 160 đến 180 ppm cho thấy không có sự tồn tại của uronic acid. Các tín hiệu của C anomeric trong nghiên cứu của Wang và cộng sự (2017) hiện diện ở cả 5 nghiệm thức [4]. Tín hiệu ở 105 ppm, 102 ppm và 99 ppm tương ứng với C anomeric của Manp, Galp và Glcp. So sánh kết quả của ^1H NMR và ^{13}C NMR, phù hợp với kết luận là thành phần đường đơn của EPS trong 5 nghiệm thức thử nghiệm trên đều có mặt 3 loại đường đơn là mannose, glucose và galactose.







Hình 3.28. Phổ ^1H NMR của EPS ở 5 nghiệm thức môi trường chứa glucose, fructose, sucrose, peptone, hỗn hợp của chúng và nghiệm thức đối chứng.

Phổ ^1H NMR ở nghiệm thức bổ sung glucose cho tín hiệu từ δ 4,8 – δ 5,2 ppm, các tín hiệu này chưa phân tách rõ ràng. Tín hiệu tại δ 5,16 ppm thuộc về H anomeri-

của α -mannose. Ngoài ra có tín hiệu nhỏ ở khoảng δ 4,3 ppm thuộc về H anomeric của β -galactose.

Ở NT fructose, các tín hiệu phân tách rõ ràng hơn. Trong khoảng từ δ 4,9 – δ 5,2 ppm xuất hiện nhiều tín hiệu, cho thấy có sự hiện diện của α -mannose. Tuy nhiên không xuất hiện tín hiệu ở δ 4,2 - δ 4,3 ppm. Phổ NMR ở nghiệm thức sucrose lại không cho tín hiệu mạnh ở δ 4,2 – δ 4,3 ppm mặc dù thành phần mono là galactose chiếm tỉ lệ cao.

Các tín hiệu từ δ 5,03 – δ 5,19 ở nghiệm thức sucrose cũng không quá mạnh. Điều này có thể do EPS ở nghiệm thức này không tan trong D₂O. Đối với nghiệm thức peptone, tín hiệu phân tách rõ ràng hơn: tín hiệu mạnh ở δ 4,15 ppm có thể là của β -galactose, tín hiệu từ δ 5 – δ 5,2 ppm là các tín hiệu của mannose. Phổ NMR ở nghiệm thức mix cũng cho các tín hiệu không mạnh (hình 3.28).

Kết luận: 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.

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

Hiện thông tin về nhóm hoạt chất EPS do nấm *C. sinensis* tiết ra môi trường nuôi cấy nói chung trong đó có môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nói riêng, 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*..

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. 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. Còn lại đa số đạt năng suất thấp hơn trong khoảng 20 - 25 g/L sinh khối và 2,8-4,1 g/L EPS (Kim và Yun, 2005; Leung và cộng sự 2007; Wu, Chen và Hao 2009 và Yin và cộng sự 2013). 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 bột nhộng tằm cũng tốt hơn so với trên môi trường cơ bản. Ở ngày thứ 30, sinh khối nấm trên môi trường bổ sung bột 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 bột 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.

Thành phần N trong môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* ảnh hưởng đáng kể tới thành phần EPS trong phức EPS-protein. Môi trường nuôi cấy bổ sung peptone và cao nấm men cũng kích thích tăng tạo EPS so với trong môi trường lỏng cơ bản và môi trường bổ sung nhộng tằm giống như trong nuôi cấy nấm *C. sinensis* lỏng-khuấy [Leung và cộng sự 2007; Wu, Chen và Hao 2009 và Yin và cộng sự 2013]. Liên quan đến hoạt tính kháng oxy hóa bắt gốc tự do ABTS⁺ của EPS thu nhận từ môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* cũng cao hơn so với môi trường lỏng cơ bản và bổ sung nhộng tằm.

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.

Các khảo sát trình bày trong mục 3.1.2 cho thấy cả 3 loại dầu bổ sung vào môi trường nuôi cấy lỏng-tĩnh nấm *C. sinensis* đều ảnh hưởng lên sự phát triển, năng suất tạo sinh khối và tổng hợp EPS.

Về hình thái, sinh khối nấm phát triển dày, phủ tơ trắng đều, mịn ở các lô dầu dừa (D3, D4), hướng dương (H2, H3) và ô liu (O5, O6). Trong khi ở những nồng độ còn lại sinh khối nấm không phủ tơ trắng đều ở bề mặt. Điều này chứng tỏ nồng độ từng loại dầu khác nhau ảnh hưởng đến hình thái nấm trong quá trình phát triển.

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.

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 cấy thực nghiệm đều thấp hơn mẫu đối chứng. Như vậy, kết quả tối ưu hóa phù hợp với thực nghiệm.

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 96⁰ 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 dịch nuôi cấy/ethanol được chọn trong các nghiên cứu này khá giống nhau nằm trong khoảng 1:3 đến 1:5. Sự khác nhau về tỷ lệ tủa để thu nhận phức EPS-protein phụ thuộc vào chủng nấm nuôi cấy, thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy [57]. Tỷ lệ tủa 1:4 (v/v) giữa dịch nuôi cấy lỏng-tĩnh và ethanol 96⁰ 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 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: Ở EPS I hàm lượng polysaccharide tăng từ 34,1 % lên 82,33 %, gấp 2,4 lần và 78,98 % đối với EPS II, gấp 2,3 lần so với phức EPS thô. Trong khi, hàm lượng protein giảm đáng kể khi xử lý Alcalase, giảm từ 3,57 % còn 0,002 % và 0,0067 % tương ứng EPS I và EPS II. Cả 2 phân đoạn sau xử lý Alcalase đều có hoạt tính bắt gốc tự do tăng đáng kể so với EPS thô.

Liên quan đến khảo sát hoạt tính kháng phân bào của các phân đoạn EPS đã được tinh sạch.

Giá trị IC_{50} càng nhỏ, thì hoạt tính gây độc tế bào ung thư càng cao. Kết quả cho thấy EPS II có hoạt tính gây độc tế bào cao hơn so với EPS I. Theo chương trình tầm soát hoạt tính kháng ung thư của các hợp chất tự nhiên của Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ, những cao chiết có $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ có hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* được coi là tốt, có triển vọng. Còn ở mức $IC_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$ thì khả năng gây độc tế bào thấp, không có triển vọng. 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 1 và EPS 2 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.

Độ thay thế (DS) là thông số quan trọng để đánh giá chất lượng của các dẫn xuất sulfate tạo thành sau khi được sulfate hóa. 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. Các nghiên cứu trước đây cho biết DS càng cao thì hoạt tính của các dẫn xuất càng mạnh. Đáng chú ý, dẫn xuất S-EPS100-750kDa trong nghiên cứu này có giá trị DS cao hơn so với các dẫn xuất sulfate của các nghiên cứu khác như S-EPS-1D (DS = 1,38) từ *C. sinensis* của Yan và cộng sự (2010) ở một điều kiện tỷ lệ CSA/Py = 1:1 (v/v), 60 °C và 3h [51]; S-ASP (DS = 0,82); từ *Artemisia sphaerocephala* của Wang và cộng sự (2010) (CSA/Py = 1:1, 60 °C, 3h) [85]; nghiên cứu của Li và cộng sự (2012) đã tạo DHPD22 (DS = 0,94) từ *Dendrobium huoshanense* (CSA/Py = 1:2, 60 °C, 1h) [22]; dẫn xuất sulfate polysaccharide (DS = 0,23) từ *C. militaris* (CSA/Py = 1:2, 70 °C, 2h) của tác giả Jing và cộng sự (2015) [90]; cùng năm 2016 Xie và cộng sự tạo dẫn xuất S-CP1-1 (DS = 0,55) từ *Cyclocarya paliurus* (CSA/Py = 1:1, 60 °C, 4h) [69]; và nghiên cứu của Xu cũng tạo S-SGP (DS = 0,99) từ *Sphallerocarpus gracilis* (CSA/Py = 1,29:1, 64,74 °C, 3,41 h) [41]. Tuy nhiên, dẫn xuất sulfate trong nghiên cứu này thấp hơn dẫn xuất S-PSG-3 (DS= 3,43) từ *Ganoderma atrum* của Chen và cộng sự (2015) (CSA/Py = 3:1, 45 °C, 6h) [18]. Điều này chứng tỏ, phản ứng sulfate hóa polysaccharide còn tùy thuộc vào cấu trúc chuỗi polysaccharide, điều kiện phản ứng cũng như kỹ thuật sulfate hóa khác nhau giữa các nhóm nghiên cứu. 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*.

Khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do của các dẫn xuất sulfate hóa cho thấy 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 <100 kDa có hoạt tính kháng oxy hóa tốt nhất 66,51 % với IC₅₀ 3026 µg/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.

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 SO_3^{2-} 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/ $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ = 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/ $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ 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 $\rightarrow 3\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$. Trong khi mạch chính ở 5 nghiệm thức trong nghiên cứu này là $\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow$. 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. Trong đó, peptone là nguồn cơ chất nấm

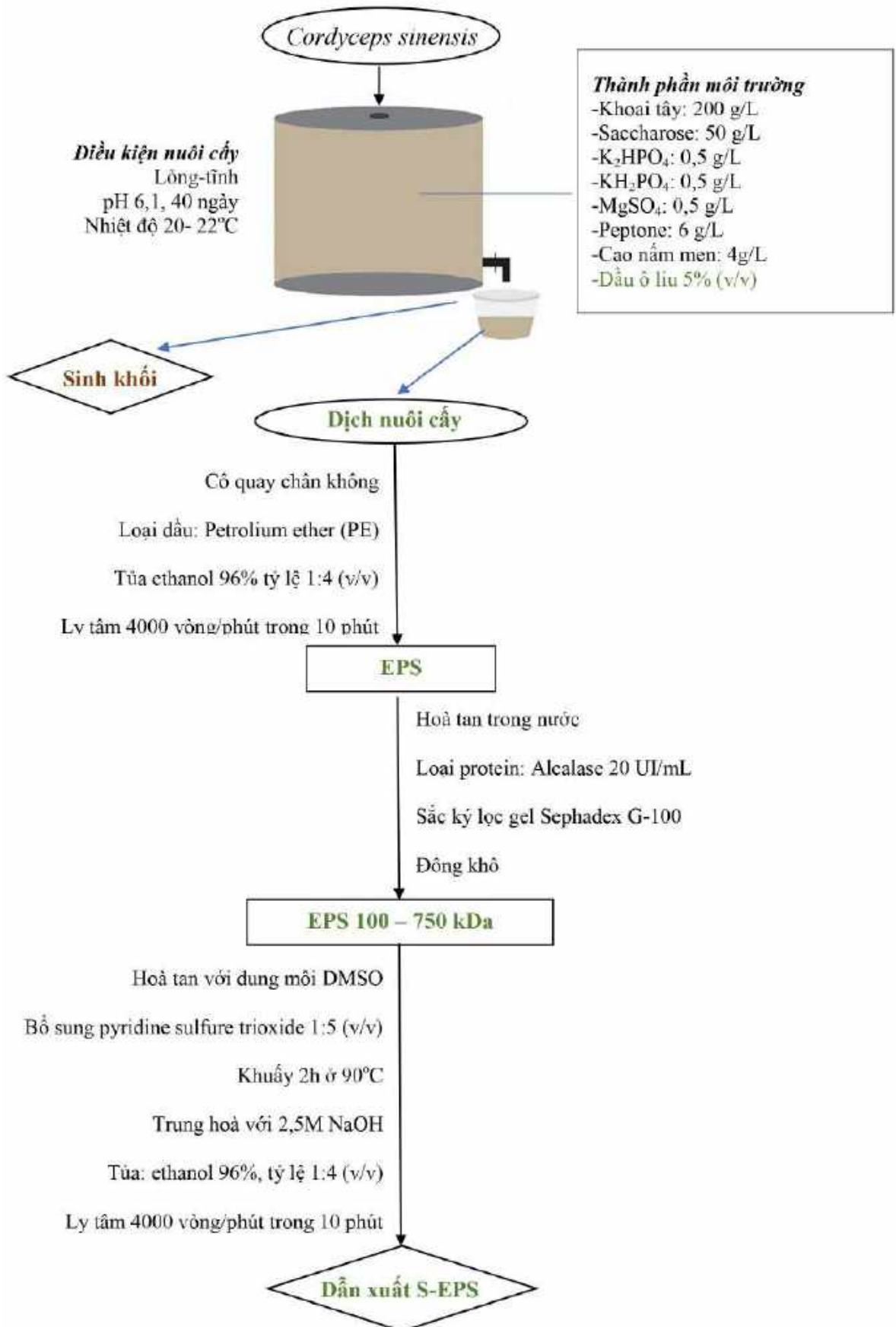
sử dụng kém hiệu quả nhất. Đối với nguồn cơ chất là glucose, EPS sinh ra từ nấm có cấu trúc phức tạp, có nhiều liên kết giữa các thành phần đường đơn. Việc có nhiều liên kết giữa các đường đơn có thể giúp EPS có hoạt tính sinh học tốt hơn do có chứa nhiều gốc glucan tự do, dễ bị phân cắt. Đối với nguồn cơ chất đường đôi sucrose *C. sinensis* hấp thụ kém hơn so với đường đơn khi bổ sung ở cùng nồng độ.

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

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. 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*.

4.2. 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 các 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 xuất sulfate có hoạt tính sinh học ở quy mô pilot, làm tiền đề cho việc sản xuất dẫn xuất 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 $\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow$. 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 Thu, Nguyễn Tiên Thắng, Đinh Minh Hiệp, *Tối ưu hóa thành phần dầu ô liu trong môi trường nuôi cấy nấm Cordyceps sinensis thu nhận exopolysaccharide*, Tạp chí Khoa học - Đại học Quốc Gia Hà Nội, 33(1S) 2017.
2. Trần Minh Trang, Huỳnh Thu, **Lê Thị Thúy Hằng**, Đinh Minh Hiệp, *Extraction of exo-polysaccharide 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. **Hang Le Thi Thuy**, Tuyet 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 Cordyceps sinensis*, Tạp Chí Khoa Học Công Nghệ và Thực Phẩm, 13(1), 3-10, 2017.
4. **Hang Le Thi Thuy**, 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 Cordyceps sinensis olive oil – stimulated culture*, International Journal of Agricultural Technology 14(7), 2151-2162, 2018.
5. **Le Thi Thuy Hang**, Ha Bao Chau, Vo Thi Trieu, Vo Thi Phuong Trang, Tran Minh Trang, Dinh Minh Hiep, Nguyen Tien Thang, *Exopolysaccharide extraction from Cordyceps sinensis culture broth supplemented with olive oil*, Vietnam Academy of Science and Technology Journal of Biology 40, (2SE), 2018
6. **Le Thi Thuy Hang**, 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 Cordyceps sinensis cultured in olive oil-supplemented broth*, Viet Nam Journal of Chemistry, 58(4) 482-487, 2020.
7. **Hang, 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 đường đơn composition of exopolysaccharide from Cordyceps sinensis*, International Journal of Agricultural Technology, 16(3), 619-628, 2020.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yan, J.K., Li, L., Wang, Z.M., Leung, P.H., Wang, W.Q., and Wu, J.Y., (2009). Acidic degradation and enhanced antioxidant activities of exopolysaccharides from *Cordyceps sinensis* mycelial culture. *Food Chemistry*. 117(4), 641-646
2. Jin, M., Lu, Z., Huang, M., Wang, Y., and Wang, Y., (2011). Sulfated modification and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Enterobacter cloacae* Z0206. *International journal of biological macromolecules*. 48(4), 607-612)
3. Choi, D., Lee, J.H., Kim, Y.S., Na, M.S., Choi, O.Y., Lee, H.D., Lee, M.K. and Cha, W.S. (2011), "A study of mycelial growth and exopolysaccharide production from a submerged culture of *Mycoleptodonoides aitchisonii* in an air-lift bioreactor", *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28(6),1427-1432
4. Wang, J., Nie, S., Chen, S., Phillips, A.O., Phillips, G.O., Li, Y., Xie, M., and Cui, S.W., (2017). Structural characterization of an α -1, 6-linked galactomannan from natural *Cordyceps sinensis*. *Food Hydrocolloids*, 78, 77-91
5. Shashidhar, G., Giridhar, P. and Manohar, B. (2015), Functional polysaccharides from medicinal mushroom *Cordyceps sinensis* as a potent food supplement: extraction, characterization and therapeutic potentials—a systematic review, *Royal Society of Chemistry Advances*, 5(21), 16050-16066
6. Hwang HJ, Kim SW, Xu CP, Choi JW and Yun JW. (2003). Production and molecular characteristics of four groups of exopolysaccharids from submerged culture of *Phellinus gilvus*. *Journal of Applied Microbiology*, 94(4), 708-19
7. Wang, X.-L. and Y.-J. Yao, (2011). Host insect species of *Cordyceps sinensis*: a review. *ZooKeys*, (127): p. 43-59.
8. Winkler, D., (2009). Caterpillar Fungus (*Cordyceps sinensis*) Production and Sustainability on the Tibetan Plateau and in the Himalayas. *Asian Medicine*, 5: p. 291-316.
9. Chen, X., Ding, Z.Y., Wang, W.Q., Siu, K.C. and Wu, J.Y. (2014), An antioxidative galactomannan–protein complex isolated from fermentation broth of a medicinal fungus Cs-HK1, *Carbohydrate Polymers*, 112, 469-474
10. Nie, S., S.W. Cui, and M. Xie, (2018). Chapter 2 - Methodologies for Studying Bioactive Polysaccharides, in *Bioactive Polysaccharides*, *Academic Press*. p. 51-97.
11. Chen, X., Wu, J.-y., and Gui, X., (2016). Production and characterization of exopolysaccharides in mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1 with different carbon sources. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 24(1), 158-162

12. Li, Rui Zhao, Hong Li Zhou, De Heng Wu. (2012), Deproteinization of Polysaccharide from the Stigma Maydis by Sevag Method, *Advanced Materials Research*, 340, pp. 416–420
13. Lo, H.C., Hsieh, C., Lin, F.Y. and Hsu, T.H. (2013), A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Cordyceps sinensis* in Dong-ChongXiaCao (冬蟲夏草 Dōng Chóng Xià Cǎo) and related bioactive ingredients, *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 3(1), 16-32
14. Sheng, L., Chen, J., Li, J., and Zhang, W., (2011). An exopolysaccharide from cultivated *Cordyceps sinensis* and its effects on cytokine expressions of immunocytes. *Applied biochemistry and biotechnology*. 163(5), 669-678
15. Lee SH, Hwang HS, and Yun JW. (2009). Production of polysaccharids by submerged mycelial culture of entomopathogenic fungus *Cordyceps takaomontana* and their apoptotic effects on human neuroblastoma cells. *Korean journal of chemical engineering*, 26(4), 1075 – 1083
16. Hidalgo Cantabrana, C., Sánchez, B., Milani, C., Ventura, M., Margolles, A. and Ruas Madiedo, P. (2014), Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp, *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1), 9-18
17. Paek, K.Y., Hosakatte, N.M. and Zhong, J.J. (2014), Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology, *Springer*.
18. Chen, Y., Zhang, H., Wang, Y., Nie, S., Li, C., and Xie, M., (2015). Sulfated modification of the polysaccharides from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. *Food Chemistry*. 186(Supplement C), 231-238
19. Mahapatra, S. and Banerjee, D. (2013). Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications, *Microbiology Insights*, 6, 1-16
20. Luis Lillo, Julio Alarcon, Gerardo Cabello, Sergio Aguila, and Joel B. Alderete. (2007). Structural studies of native *Paecilomyces* sp. exopolysaccharide. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(9-10), 623-626
21. Chen, P.X., Wang, S., Nie, S. and Marcone, M. (2013), Properties of *Cordyceps sinensis*: A review, *Journal of Functional Foods*, 5(2), 550-569
22. Yu, R., Yang, W., Song, L., Yan, C., Zhang, Z. and Zhao, Y. (2007). "Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*", *Carbohydrate Polymers*, 70(4), 430-436
23. Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M. (1993), Principles of biochemistry, *New York: Worth*, 38
24. Liu, X.-C., et al., (2016). Structural properties of polysaccharides from cultivated fruit bodies and mycelium of *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate Polymers*. 142: p. 63-72.

25. Yan, J.-K., Li, L., Wang, Z.-M., and Wu, J.-Y., (2010). Structural elucidation of an exopolysaccharide from mycelial fermentation of a *Tolypocladium* sp. fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis*. *Carbohydrate Polymers*. 79(1), 125-130.
26. Negi, P.S., Singh, R., Koranga, P.R., Ahmed, Z., (2009). Biodiversity of *Cordyceps* in Himalayan hills of Uttarakhand, India. Proc. Abstr. 5th Int. Med. Mushroom Conf. Nantong, Jiangsu, China.
27. Ale, M.T. and Meyer, A.S., (2013). Fucoidans from brown seaweeds: An update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *RSC Advances*, 3(22), 8131-8141
28. Belwal, T., et al., (2019). Chapter 5.4 - *Ophiocordyceps sinensis*, in Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements, S.M. Nabavi and A.S. Silva, Editors, *Academic Press*. p. 527-537.
29. Dong, C.H. and Yao, Y.J. (2008), "*In vitro* evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts from natural and cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*", *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie-Food Science and Technology*, 41(4), pp. 669-677
30. Yu, Y., Shen, M., Wang, Z., Wang, Y., Xie, M., and Xie, J., (2017). Sulfated polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* enhances the immunomodulatory activity of macrophages. *Carbohydrate Polymers*. 174, 669-676
31. Wang, Z.-M., Peng, X., Lee, K.-L.D., Tang, J.C.-O., Cheung, P.C.-K., and Wu, J.-Y., (2011). Structural characterisation and immunomodulatory property of an acidic polysaccharide from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1. *Food chemistry*. 125(2), 637-643
32. Sharmistha Sinha (1997), *Anionic polysaccharides from plants : structural features, chemical modification and biological activities* P.A. Riley. *Melanin* , 29(11), 0–1239.
33. Mao, X.B., Eksriwong, T., Chauvatcharin, S. and Zhong, J.J. (2005). Optimization of carbon source and carbon/nitro ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*, *Process Biochemistry*, 40(5), 1667-1672
34. Paterson, R.R.M. (2008), *Cordyceps*—A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory, *Phytochemistry*, 69(7), 1469-1495
35. Zhang, W., Yang, J., Chen, J., Hou, Y., and Han, X., (2005). Immunomodulatory and antitumour effects of an exopolysaccharide fraction from cultivated *Cordyceps sinensis* (Chinese caterpillar fungus) on tumour-bearing mice. *Biotechnology and applied biochemistry*. 42(1), 9-15
36. Chen, X., Wu, J.-y., and Gui, X., (2016). Production and characterization of exopolysaccharides in mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1 with different carbon sources. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 24(1), 158-162

37. Kim, S.W., et al., (2003). Production and Characterization of Exopolysaccharides from an Entomopathogenic Fungus *Cordyceps militaris* NG3. *Biotechnology Progress*, **19**(2): p. 428-435.
38. Chen Y, Xie MY, Wang YX, Nie SP and Li C. (2009). Analysis of the đư ờng đ ờn composition of purified polysaccharids in *Ganoderma atrum* by capillary gas chromatography. *Phytochemical Analysis*, **20**, 503-510
39. Wang, L., Li, X., and Chen, Z., (2009). Sulfated modification of the polysaccharides obtained from defatted rice bran and their antitumor activities. *International Journal of Biological Macromolecules*. **44**(2), 211-214
40. Wang, Y., Yin, H., Lv, X., Wang, Y., Gao, H. and Wang, M. (2010), *Protection of Chronic Renal Failure by a Polysaccharide from Cordyceps sinensis*, *Fitoterapia*. **81**(5), pp. 397-402.
41. Xu, Y., Song, S., Wei, Y., Wang, F., Zhao, M., Guo, J., and Zhang, J., (2016). Sulfated modification of the polysaccharide from *Sphallerocarpus gracilis* and its antioxidant activities. *International journal of biological macromolecules*. **87**, 180-190
42. Trang, V.T.P., (2018). Nghiên cứu thu nhận các phân đoạn exopolysaccharide từ dịch nuôi cấy nấm *O. sinensis*.
43. Chen, L., et al., (2019). Production, structure and morphology of exopolysaccharides yielded by submerged fermentation of *Antrodia cinnamomea*. *Carbohydrate Polymers*, **205**: p. 271-278.
44. Kim, J.S., et al., (2006). Addition of glycerol for improved methylation linkage analysis of polysaccharides. *Carbohydrate Research*, **341**(8): p. 1061-1064.
45. Wijesinghe, W. and Jeon, Y.-J., (2012). Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*. **88**(1), 13-20
46. Ren, Y.-Y., et al., (2020). Carboxymethylation and acetylation of the polysaccharide from *Cordyceps militaris* and their α -glucosidase inhibitory activities. *Natural Product Research*, **34**(3): p. 369-377.
47. Yuan, Y., et al., (2016). Structure identification of a polysaccharide purified from *Lycium barbarum* fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, **82**: p. 696-701.
48. Leung PH, Wu JY, (2007). Effects of ammonium feeding on the production of bioactive metabolites (cordycepin and exopolysaccharides) in mycelial culture of a *Cordyceps sinensis* fungus. *Journal of Applied Microbiology*, **103**(5), 1942-1949.
49. Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., and Ewart, H.S., (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine drugs*. **9**(2), 196-223

50. Huang, Q.-L., Siu, K.-C., Wang, W.-Q., Cheung, Y.-C., and Wu, J.-Y., (2013). Fractionation, characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides from fermentation broth of a *Cordyceps sinensis* fungus. *Process Biochemistry*, 48(2), 380-386
51. Yan, J.-K., Li, L., Wang, Z.-M., and Wu, J.-Y., (2010). Structural elucidation of an exopolysaccharide from mycelial fermentation of a *Tolypocladium* sp. fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis*. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 125-130.
52. Xiao JH, Liang ZQ and Liu AY. (2003). The technical route and condition of polysaccharids extraction and isolation from *Paecilom Paecilomyces*. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 22, 140-145
53. Oh, J.Y., Cho, E.J., Nam, S.H., Choi, J.W. and Yun, J.W. (2007), Production of polysaccharide-peptide complexes by submerged mycelial culture of an entomopathogenic fungus *Cordyceps sphecocephala*, *Process Biochemistry*, 42(3), 352-362
54. Huang, J., Song, D., Yang, A., Yin, H., & Zhang, W. (2011). Differentiation and maturation of human dendritic cells modulated by an exopolysaccharide from an anamorph of *Cordyceps sinensis*. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 1, 126–131
55. Chen, S., Siu, K.C., Wang, W.Q., Liu, X.X. and Wu, J.Y. (2013), *Structure and Antioxidant Activity of a Novel poly-N-acetylhexosamine Produced by a Medicinal Fungus*, *Carbohydrate Polymers*, 94(1), pp. 332-338.
56. Li, S., Xiong, Q., Lai, X., Li, X., Wan, M., Zhang, J., Yan, Y., Cao, M., Lu, L., and Guan, J., (2016). Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 237-250
57. Helbert, W., (2017). Marine Polysaccharide sulfatases. *Frontiers in Marine Science*, 4, 6
58. Kim and Yun. (2005). A comparative study on the production of exopolysaccharids between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *C. sinensis* in submerged mycelial cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 728–738
59. Wu F et al. (2011). Structural characterization and antioxidant activity of purified polysaccharid from cultured *Cordyceps militaris*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(18), 2743 – 275
60. Hon and D.N.S., Cellulose: Chemistry and Technology. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, Elsevier, Oxford, 2001: p. 1039-1045.
61. Yang, F.C., Ke, Y.-F. and Kuo, S.-S. (2000), Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures, *Enzyme and microbial technology*, 27(3), 295-301
62. Holliday, J. and Cleaver, M. (2004), On the trail of the yak ancient *Cordyceps* in the modern world, *Online posting June*

63. Chen, Y., Mao, W., Tao, H., Zhu, W., Qi, X., Chen, Y., Li, H., Zhao, C., Yang, Y., Hou, Y. and Wang, C., (2011). Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus sp.* Y16. *Bioresource Technology*, 102(17), 8179 – 8184
64. Chen, et al., (2013). Properties of *Cordyceps sinensis*: A review. *Journal of Functional Foods*, 5: p. 550-569.
65. Wang, C.-C., et al., (2019). Enhanced exopolysaccharide production by *Cordyceps militaris* using repeated batch cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(4): p. 499-505.
66. Yang, J., Zhang, W., Shi, P., Chen, J., Han, X., & Wang, Y. (2005). *Effects of exopolysaccharide fraction (EPSF) from a cultivated Cordyceps sinensis fungus on c-Myc, c-Fos, and VEGF expression in B16 melanoma-bearing mice. Pathology-Research and Practice*, 201(11), 745-750.
67. Yang, F.C., Ke, Y.-F. and Kuo, S.-S. (2000), Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures, *Enzyme and microbial technology*, 27(3), 295-301
68. Stasinopoulos, S.S., R., (1990) Stimulation of exopolysaccharide production in the fungus *Acremonium persicinum* with fatty acids. *Biotechnology and Bioengineering*, 36: p. 778-782.
69. Xie, Jian-Hua; Wang, Zhi-Jun; Shen, Ming-Yue; Nie, Shao-Ping; Gong, Bin; Li, Hai-Shan; Zhao, Qiang; Li, Wen-Juan; Xie, Ming-Yong (2015). Sulfated modification, characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*. *Food Hydrocolloids*
70. Zhang, Y., Li, E., Wang, C., Li, Y. and Liu, X. (2012), *Cordyceps sinensis*, the flagship fungus of China: terminology, life strategy and ecology, *Mycology*, 3(1), 2-10
71. Yan, J.-K., Wang, W.-Q., Ma, H.-L., and Wu, J.-Y., (2012). Sulfation and enhanced antioxidant capacity of an exopolysaccharide produced by the medicinal fungus *Cordyceps sinensis*. *Molecules*. 18(1), 167-177
72. Sung, G.H., Hywel Jones, N.L., Sung, J.M., Luangsa-ard, J.J., Shrestha, B. and Spatafora, J.W. (2007), Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi, *Studies in Mycology*, 57, 5-59.
73. Kim, S.W., et al., Production and Characterization of Exopolysaccharides from an Entomopathogenic Fungus *Cordyceps militaris* NG3. *Biotechnology Progress*, 2003. 19(2): p. 428-435.
74. N Baurin; E Arnoult; T Scior; Q.T Do; P Bernard (2002). *Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity.* , 82(2-3)

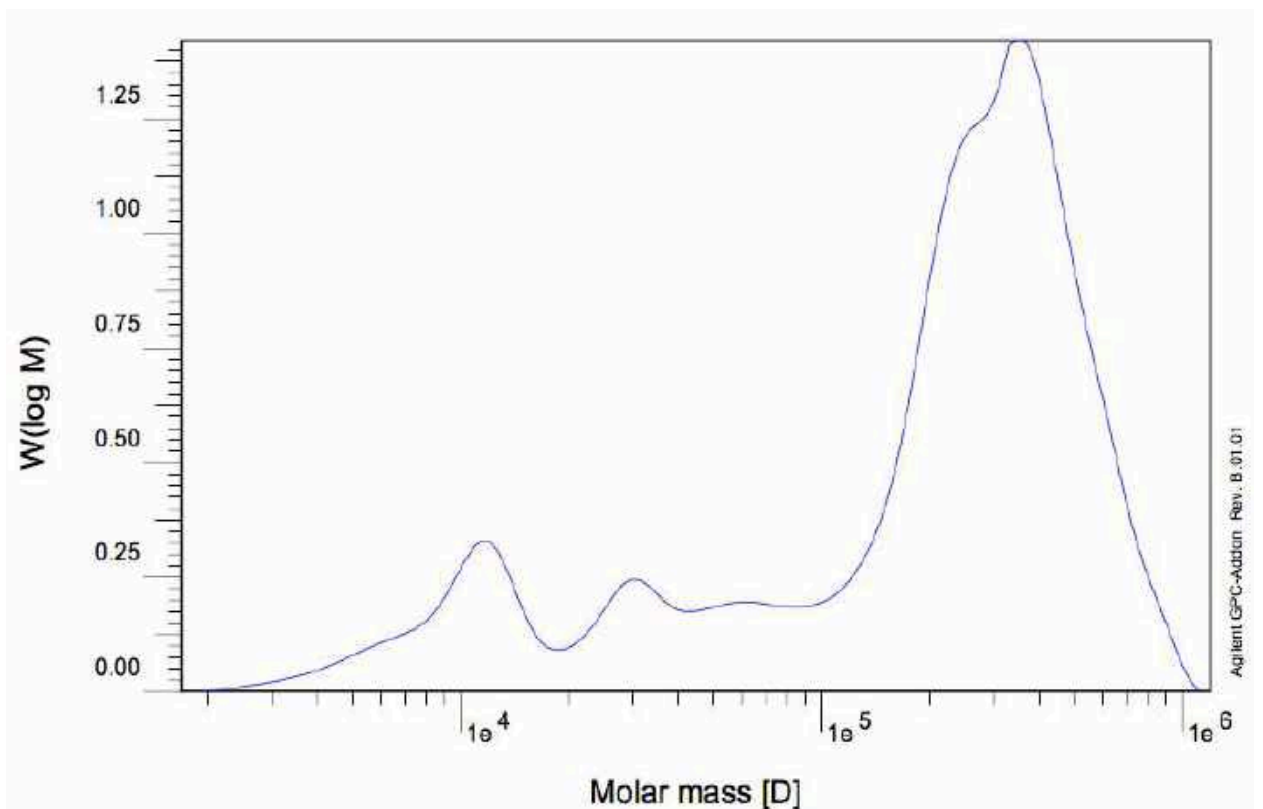
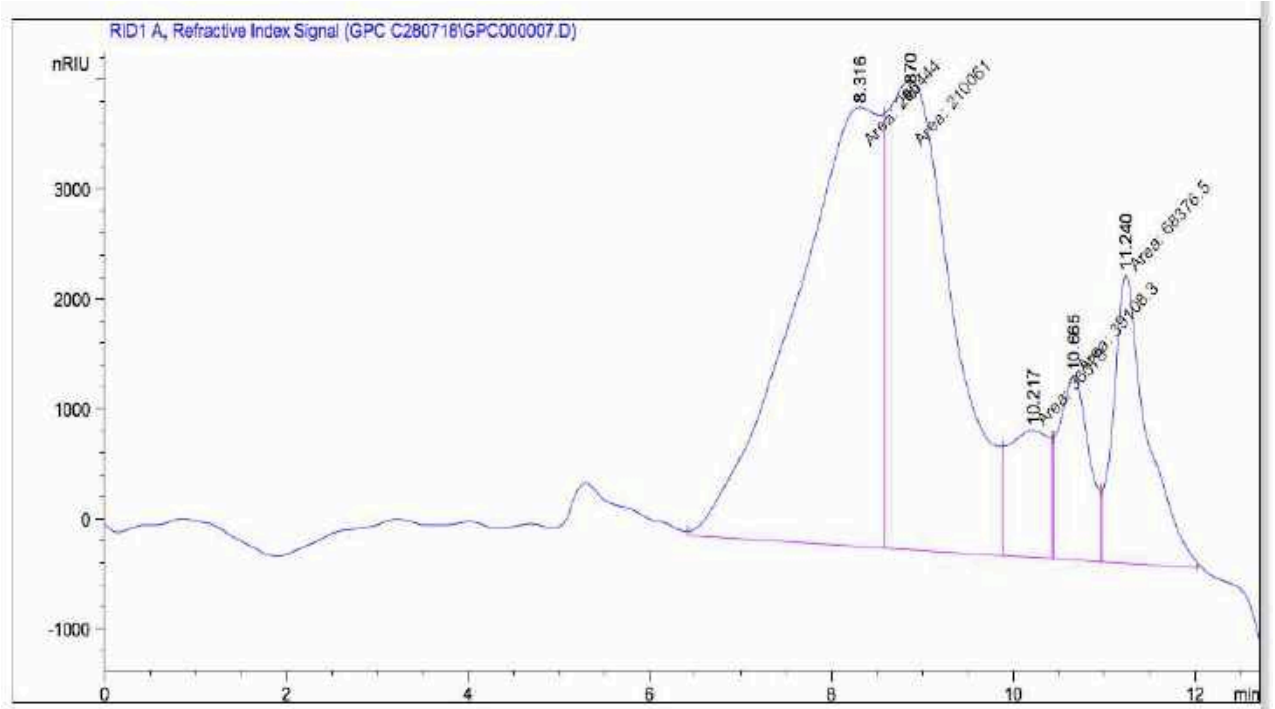
75. Wang, J., Kan, L., Nie, S., Chen, H., Cui, S.W., Phillips, A.O., Phillips, G.O., Li, Y. and Xie, M., A Comparison of Chemical Composition, Bioactive Components and Antioxidant Activity of Natural and Cultured *Cordyceps sinensis*. *LWT-Food Science and Technology*, 2015. **63**: p. 2-7.
76. Dong, C.H. and Yao, Y.J. (2008), "In vitro evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts from natural and cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*", *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie-Food Science and Technology*, 41(4), pp. 669-677
77. Leung, P.H., Zhao, S., Ho, K.P. and Wu, J.Y. (2009), Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1, *Food Chemistry*, 114(4), 1251-1256
78. Park, J.P., Kim, S.W., Hwang, H.J., Cho, Y.J. and Yun, J.W. (2002), Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*, *Enzyme and Microbial Technology*, 31(3), 250-255
79. Yan, J.K., Wang, W.Q. and Wu, J.Y. (2014), Recent advances in *Cordyceps sinensis* polysaccharides: Mycelial fermentation, isolation, structure, and bioactivities: A review, *Journal of Functional Foods*, 6, 33-47
80. Hsieh, C., Wang, H.L., Chen, C.C., Hsu, T.H. and Tseng, M.H. (2008), Effect of plant oil and surfactant on the production of mycelial biomass and polysaccharides in submerged culture of *Grifola frondosa*, *Biochemical Engineering Journal*, 38(2), 198-205
81. Kim and Yun. (2005). A comparative study on the production of exopolysaccharids between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *C. sinensis* in submerged mycelial cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 728-738
82. Fan, W.-Q., Yin, H.-P., Zhou, C.-L., (2008). Separation, purification and activity of pharmacodynamic action of polysaccharide from *Cordyceps*. *Chin. J. Bioproc. Eng.* 1, 016.
83. Trang Minh Tran, Phuong Thi Xuan Nguyen, Lai Thi Nguyen, Hang Thi Thuy Le, Thu Huynh, Hiep Minh Dinh, (2018). "Preparation of a sulfated exopolysaccharide (S-EPS) from *Cordyceps sinensis* fungus and its antioxidant effects", *Science And Technology Development Journal - Natural Sciences*, 2(4).
84. Li, L.-Q., et al., (2021). Isolation and Assessment of a Highly-Active Anti-Inflammatory Exopolysaccharide from Mycelial Fermentation of a Medicinal Fungus Cs-HK1. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**: p. 2450.
85. Wang, J., Guo, H., Zhang, J., Wang, X., Zhao, B., Yao, J., and Wang, Y., (2010). Sulfated modification, characterization and structure-antioxidant relationships of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 81(4), 897-905.
86. Oludemi Taofiq, Sandrina A. Heleno, Ricardo C. Calhelha, Maria José Alves, Lillian Barros, Maria Filomena Barreiro, Ana M. González-Paramás and Isabel C. F. R. Ferreira (2016). Development of Mushroom-Based Cosmeceutical

Formulations with Anti Inflammatory, Anti-Tyrosinase, Antioxidant, and Antibacterial Properties. *Bioactive Compounds* 21(10), 1372

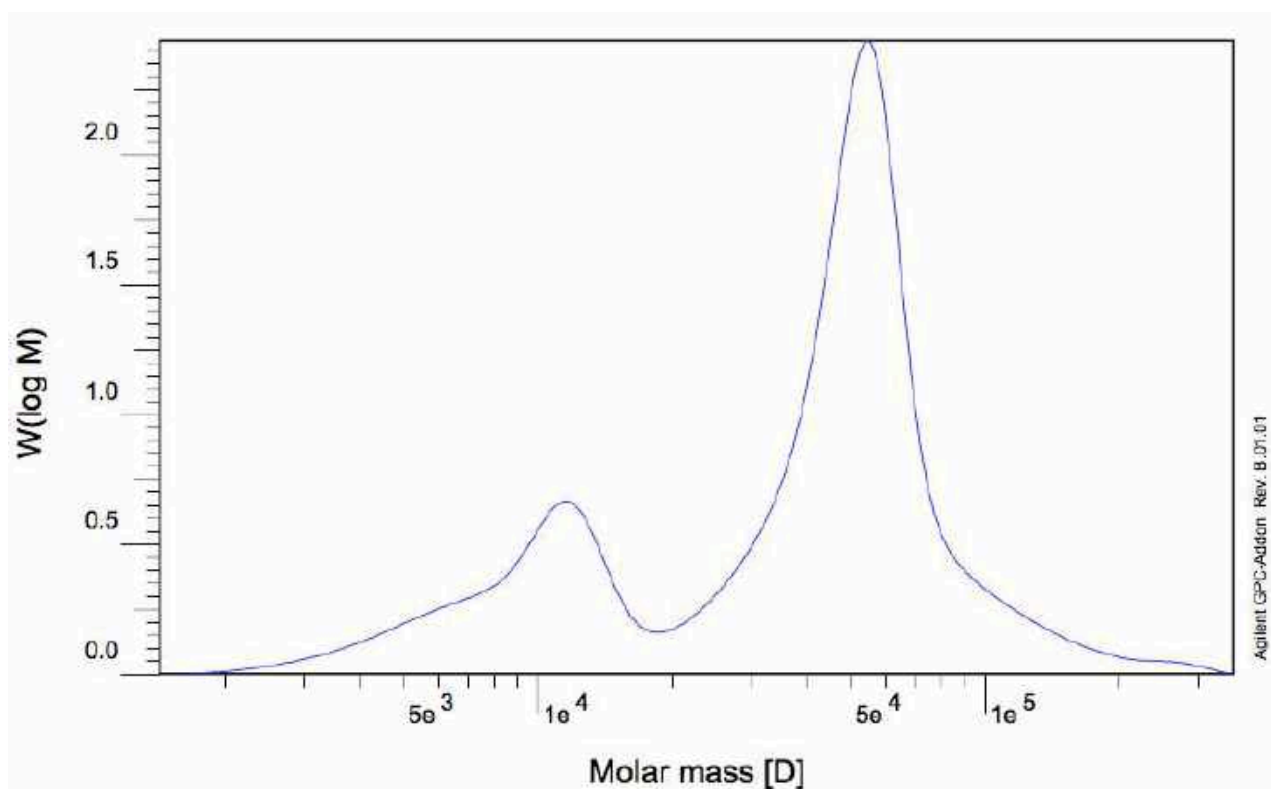
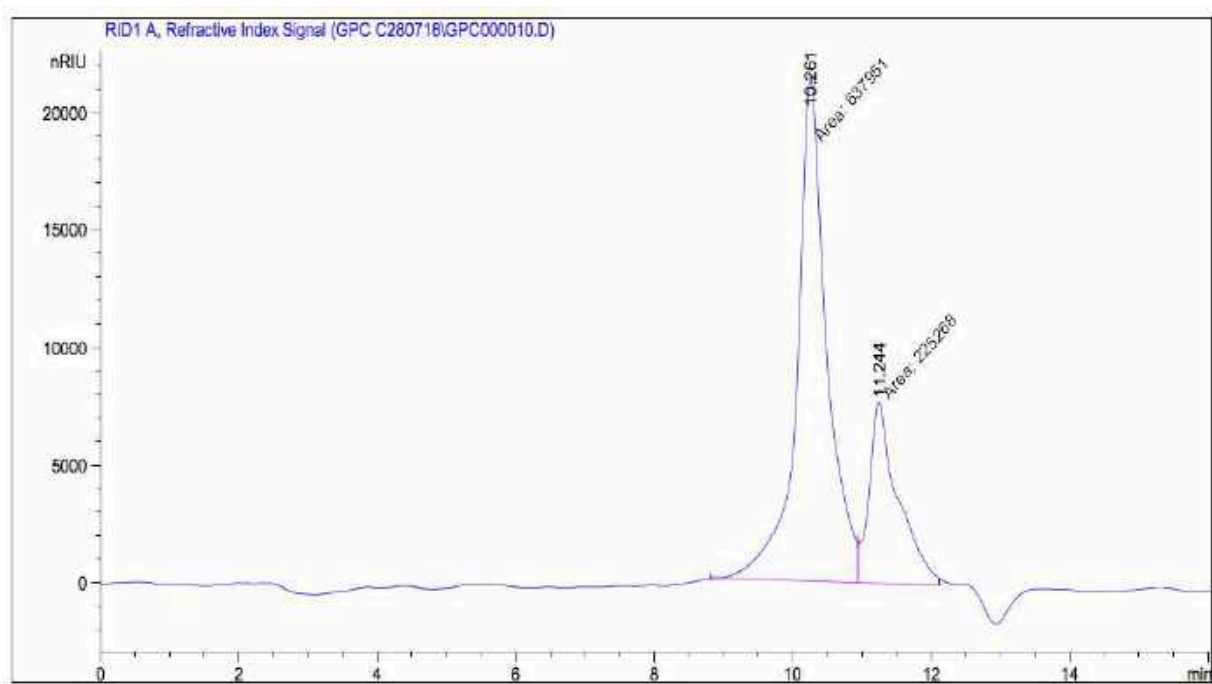
87. Wang, M. Wang, and Y. Ling, (2009). Structural determination and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. *Am. J. Chin. Med*, **37**: p. 977-989.
88. Merkle, R.K., and Poppe, (1994). Carbohydrate Composition Analysis of Glycoconjugates by Gas-liquid Chromatography/mass Spectrometry, *Methods in Enzymology*: p. 1-15.
89. Liu, X.-C., et al., (2016). Structural properties of polysaccharides from cultivated fruit bodies and mycelium of *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate Polymers*, 142: p. 63-72.
90. Jing, Y., Zhu, J., Liu, T., Bi, S., Hu, X., Chen, Z., Song, L., Lv, W., and Yu, R., (2015). Structural characterization and biological activities of a novel polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris* and its sulfated derivative. *Journal of agricultural and food chemistry*. 63(13), 3464-3471.
91. Li, S.P., et al., (2006). Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps mycelia*. *Phytomedicine*, **13**(6): p. 428-33.
92. No, A. and Committee, A.M. (2013). Experimental design and optimisation (4): Plackett–Burman designs", *Analytical Methods*, 5(8), pp. 1901-1903.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Trọng lượng phân tử 2 phân đoạn lọc gel LG I và II trong môi trường bổ sung dầu ô liu 5 %

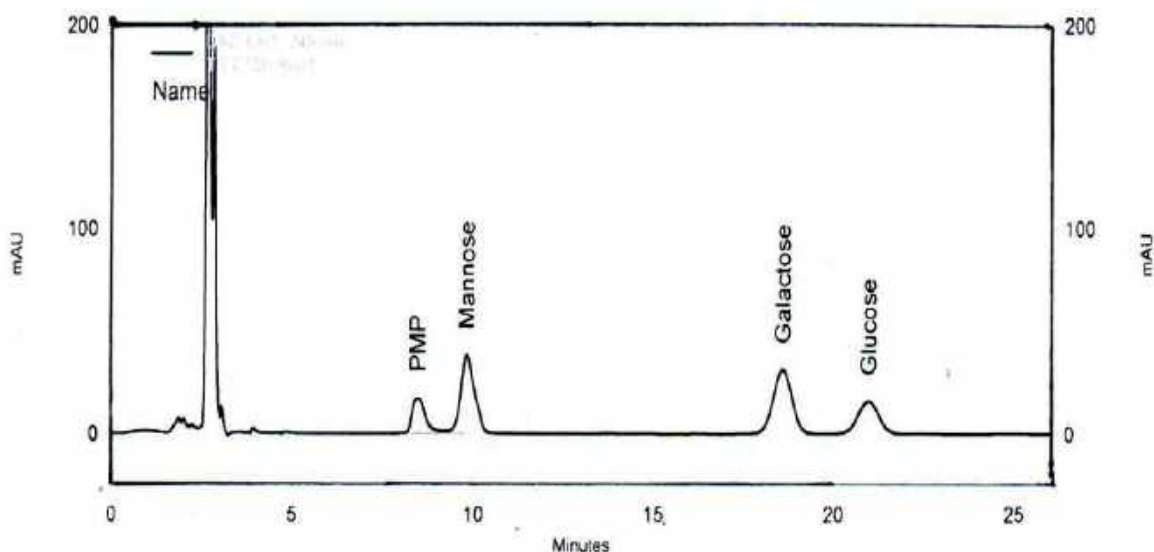


PL1: Phân đoạn lọc gel LG I



PL1: Phân đoạn lọc gel LG II

Phụ lục 2. Sắc ký đồ thành phần đường đơn của E_G







Phụ lục 3. Bảng các phân đoạn EPS thu được bằng kỹ thuật lọc membrane theo phương pháp lọc tiếp tuyến

STT	Trọng lượng phân tử	Phân đoạn	Khối lượng (g)
1	< 30 kDa	E _{<30}	0,1608
2	30 – 750 kDa	E ₃₀₋₇₅₀	0,2823
3	> 750 kDa	E _{>750}	0,1251

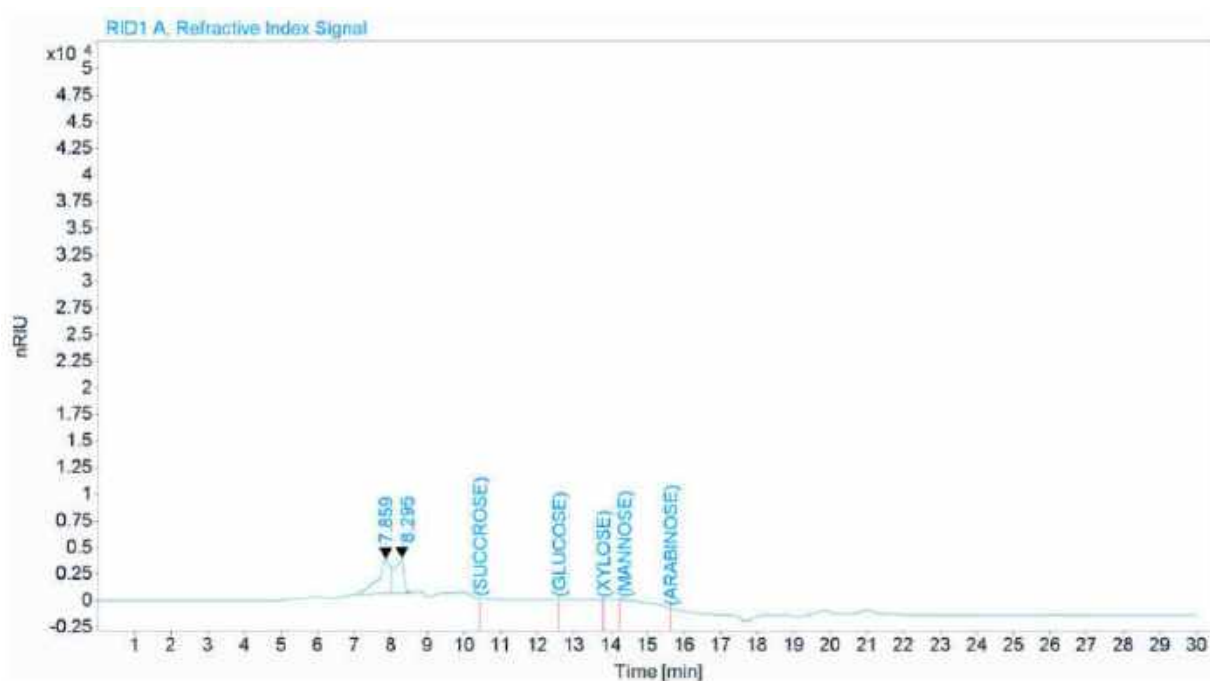
Phụ lục 4. Thành phần hóa học của phân đoạn EPS thu được bằng phương pháp lọc tiếp tuyến

STT	Phân đoạn	Hàm lượng polysaccharide (%) (mg/mg)	Hàm lượng protein (%) (mg/mg)	Thành phần đường đơn
1	E _{<30}	31,25 ± 0,52	1,37 ± 0,08	2,73 Glucose : 3,66 Mannose : 1,0 Galactose
2	E ₃₀₋₇₅₀	62,65 ± 1,03	1,03 ± 0,04	3,15 Glucose : 11,79 Mannose : 1,0 Galactose
3	E _{>750}	30,90 ± 0,38	0,65 ± 0,02	16,93 Glucose : 13,30 Mannose : 1,0 Galactose

Phụ lục 5. Sắc ký bản mỏng dịch EPS thủy phân bằng các acid

			
HCl	H ₂ SO ₄	TFA	acid triflic
1. EPS trước thủy phân	2. EPS sau thủy phân	3. Tinh bột sau thủy phân	4. Tinh bột trước thủy phân

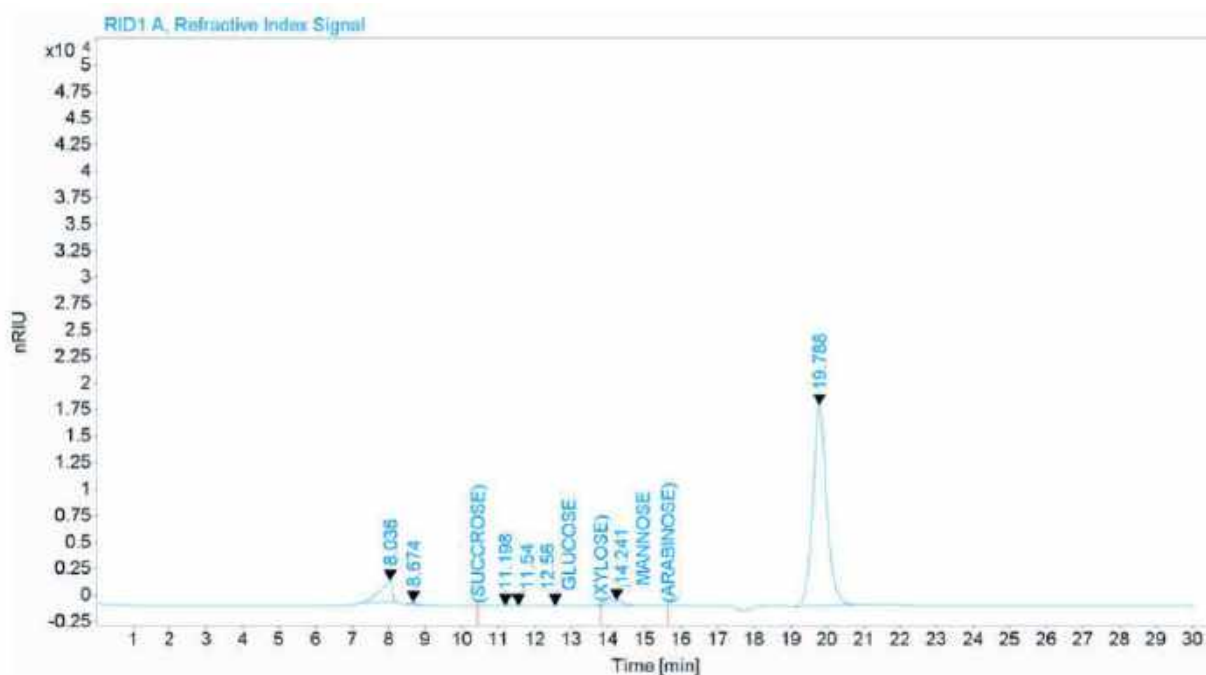
Phụ lục 6. Sắc ký đồ HPLC dịch EPS thủy phân bằng HCl



Các đỉnh tín hiệu HPLC dịch EPS thủy phân bằng HCl

RT (phút)	Tên hợp chất	Diện tích đỉnh	Phần trăm (%)
7,859		77317,883	59,14
8,295		53408,898	40,86
Tổng		130726,781	100

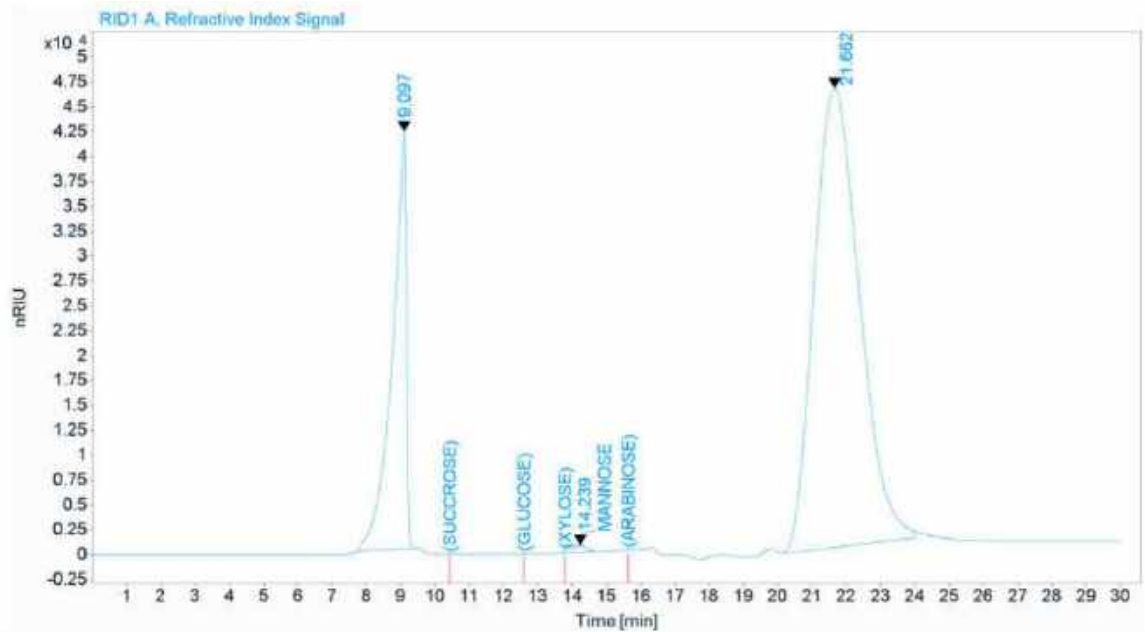
Phụ lục 7. Sắc ký đồ HPLC dịch EPS thủy phân bằng H₂SO₄



Các đỉnh tín hiệu HPLC dịch EPS thủy phân bằng H₂SO₄

RT (phút)	Tên hợp chất	Diện tích đỉnh	Phần trăm (%)
8,036		46803,773	8,15
8,674		3146,032	0,55
11,198		127,132	0,02
11,540		81,015	0,01
12,560	Glucose	663,907	0,12
14,241	Mannose	15272,775	2,66
19,788		508384,438	88,49
Tổng		574479,072	100

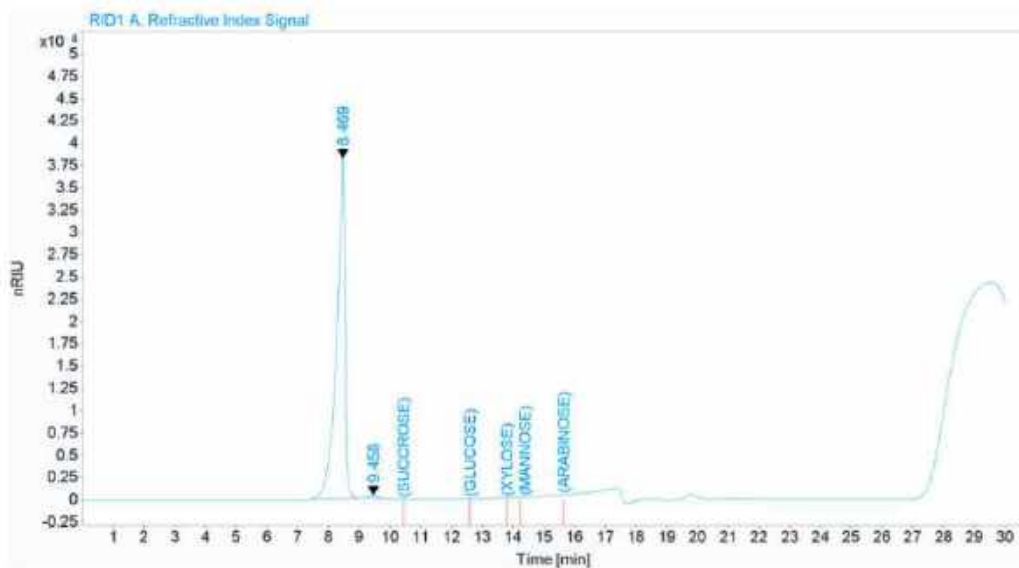
Phụ lục 8. Sắc ký đồ HPLC dịch EPS thủy phân bằng TFA



Các đỉnh tín hiệu HPLC dịch EPS thủy phân bằng TFA

RT (phút)	Tên hợp chất	Diện tích đỉnh	Phần trăm (%)
9,097		1172197,500	21,56
14,239	Mannose	21612,229	0,40
21,662		4242157,000	78,04
Tổng		5435966,729	100





Phụ lục 9. Sắc ký đồ HPLC dịch EPS thủy phân bằng acid triflic



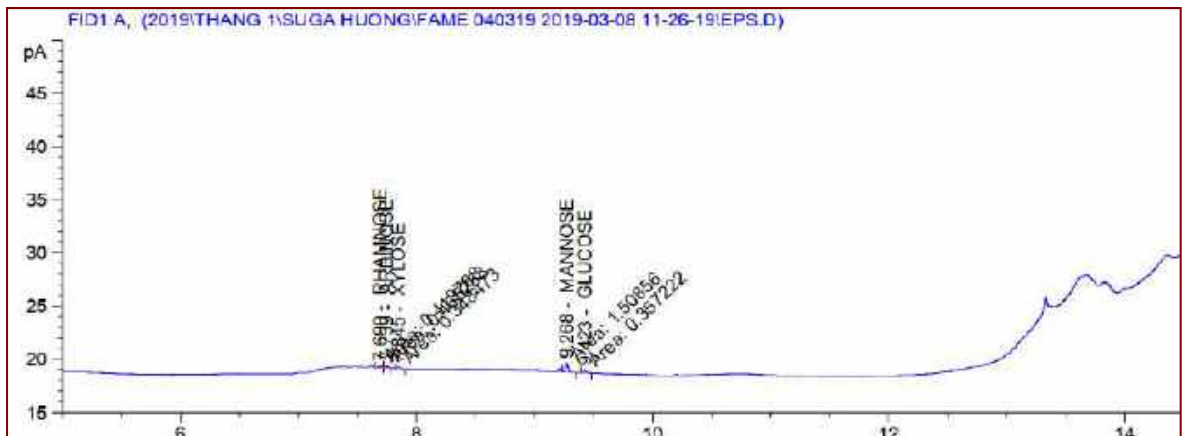
Các đỉnh tín hiệu HPLC dịch EPS thủy phân bằng acid triflic

RT (phút)	Diện tích đỉnh	Phần trăm (%)
8,469	725724,875	99,16
9,458	6145,822	0,84
Tổng	731870,697	100

Phụ lục 10. Sắc ký bản mỏng dẫn xuất acetyl hoá

			
HCl	H ₂ SO ₄	TFA	acid triflic
1. Tinh bột sau thủy phân	2. Tinh bột sau acetyl hoá	3. EPS sau thủy phân	4. EPS sau acetyl hoá

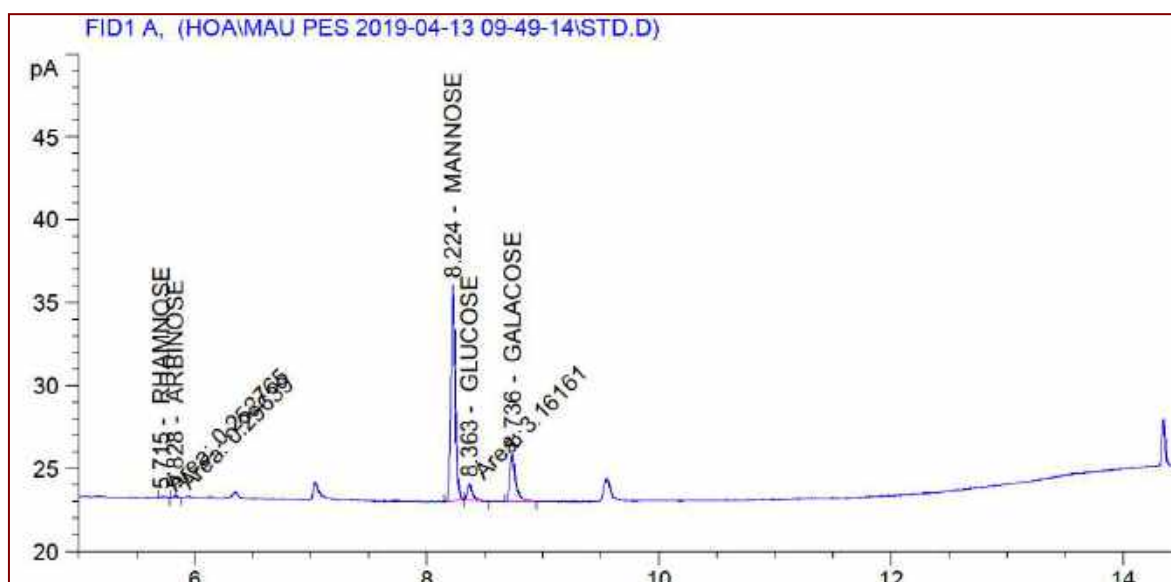
Phụ lục 11. Sắc ký đồ GC dẫn xuất acetyl hoá HCl



Các Đường đơn trong dẫn xuất từ quy trình HCl

STT	Loại đường đơn	Kết quả (mg/g)	Tỷ lệ
01	Rhamnose	17,2	1,04
02	Arabinose	23,7	1,45
03	Xylose	16,3	1
04	Mannose	18,7	1,15
05	Glucose	65,7	4,03
06	Galactose	20,8	1,28

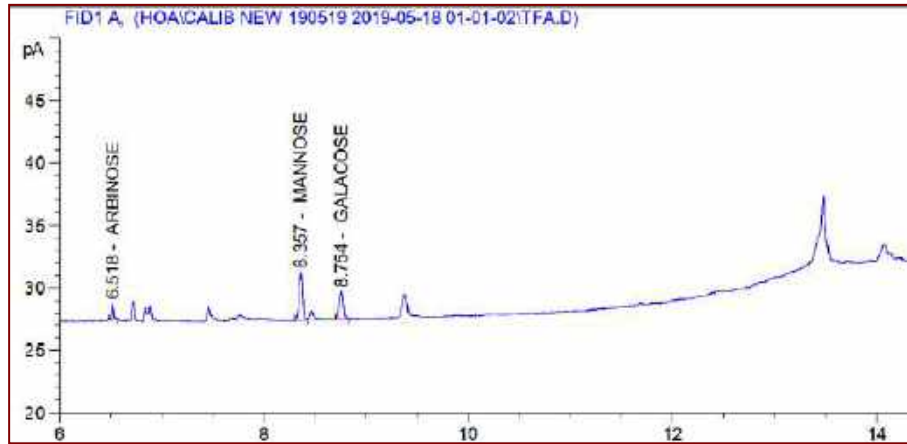
Phụ lục 12. Sắc ký đồ GC dẫn xuất acetyl hoá từ quy trình H₂SO₄



Đường đơn phát hiện trong dẫn xuất từ quy trình H₂SO₄

STT	Loại đường đơn	Kết quả (mg/g)	Tỷ lệ
01	Rhamnose	0,17	1
02	Arabinose	0,19	1,12
03	Mannose	22,10	130
04	Glucose	1,69	9,94
05	Galactose	7,90	46,5

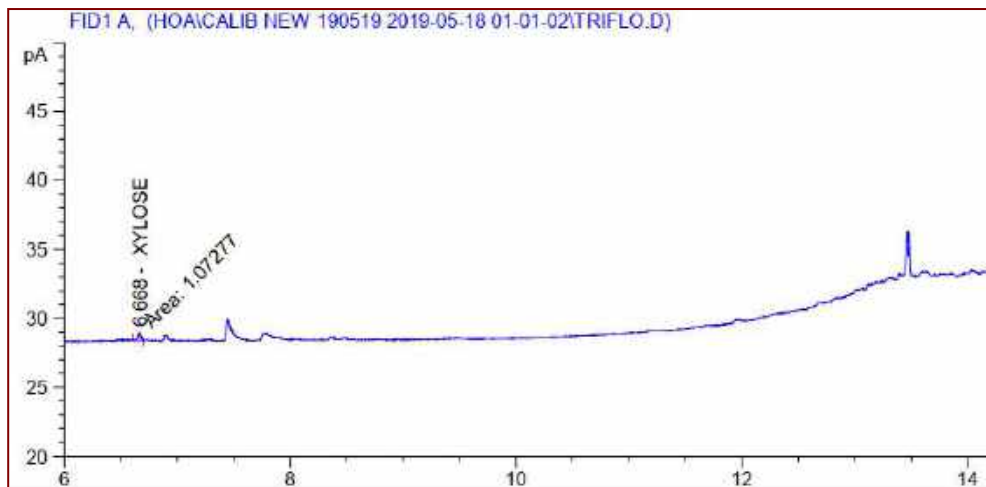
Phụ lục 13. Sắc ký đồ GC dẫn xuất acetyl hoá từ quy trình TFA



Đường đơn phát hiện trong dẫn xuất từ quy trình TFA

STT	Loại đường đơn	Kết quả (mg/g)	Tỷ lệ
01	Arabinose	0,55	1
02	Mannose	2,83	5,15
03	Galactose	2,09	3,80

Phụ lục 14. Sắc ký đồ GC dẫn xuất acetyl hoá

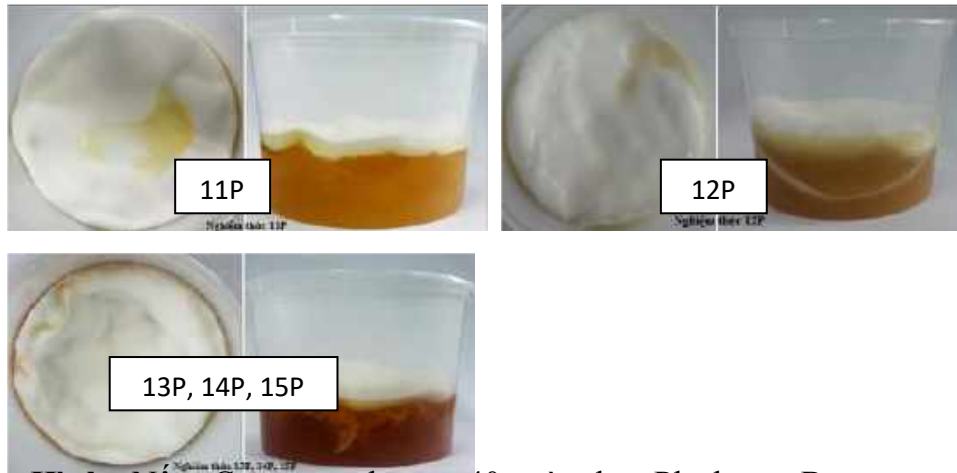


Đường đơn phát hiện trong dẫn xuất từ quy trình

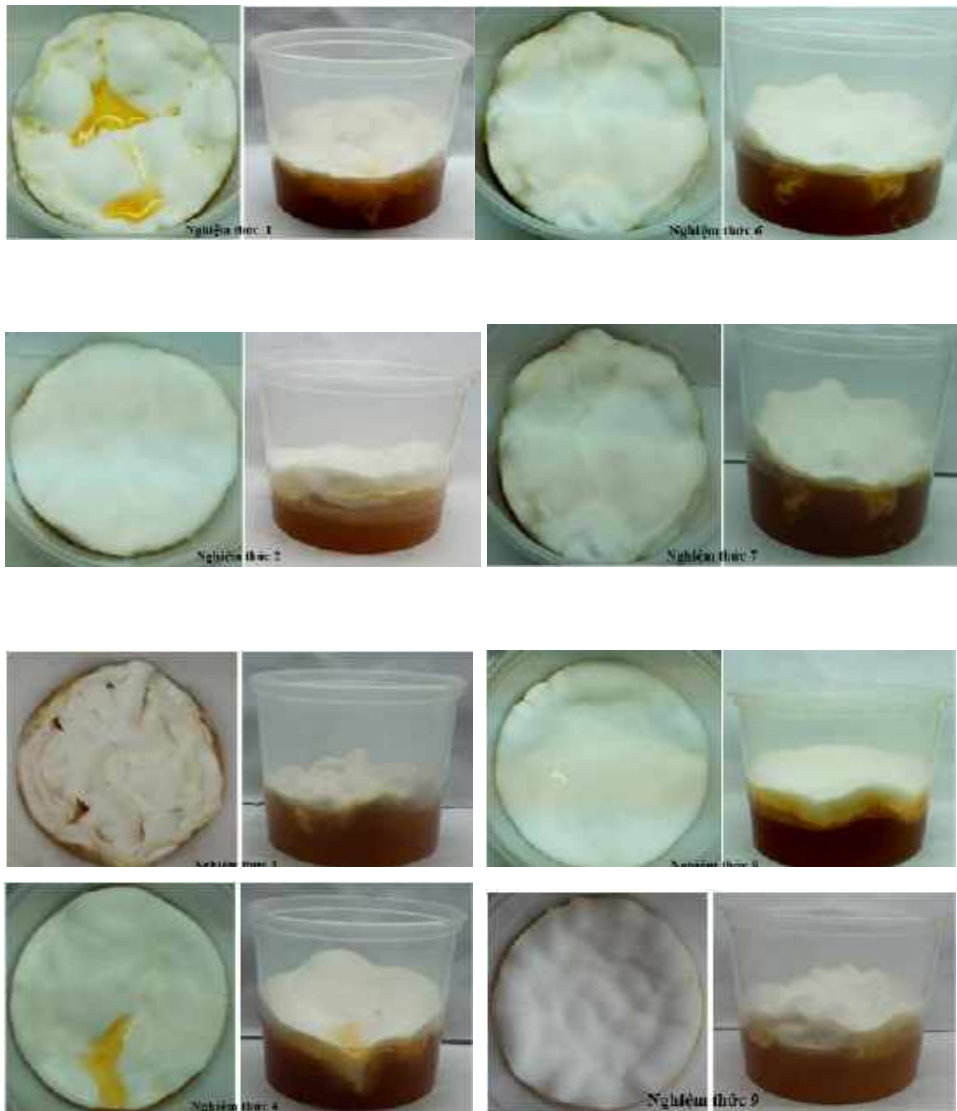
STT	Loại đường đơn	Kết quả (mg/g)
01	Xylose	0,04

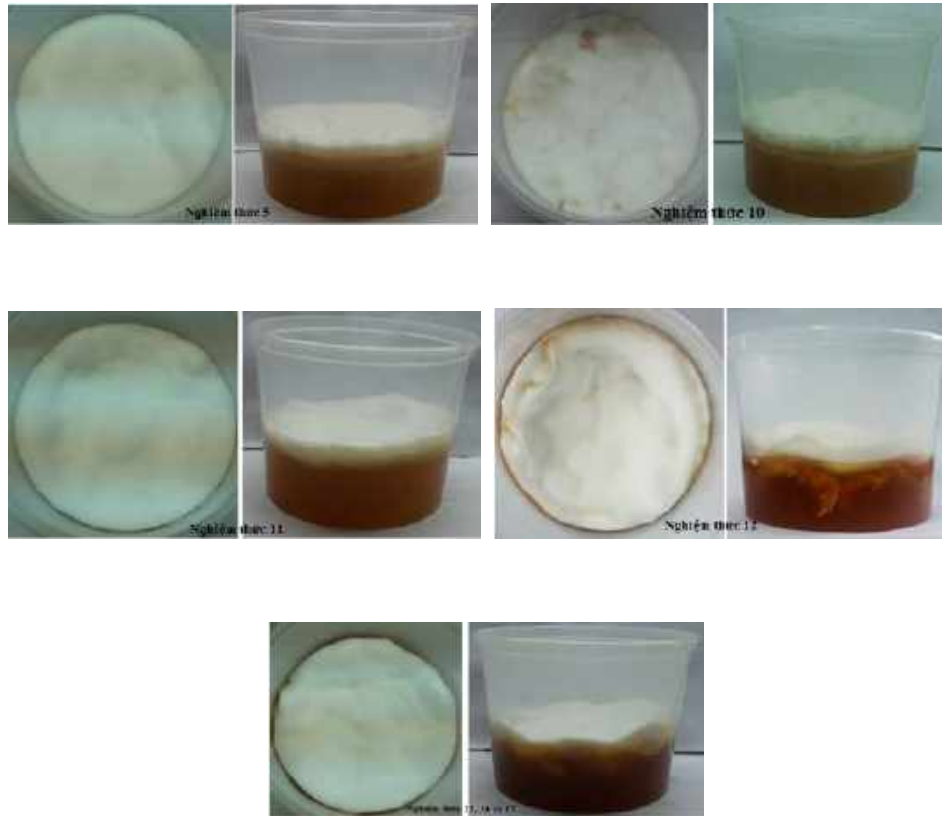
Phụ lục 15





Hình . Nấm *C.sinensis* thu sau 40 ngày theo Plackett – Burman





Hình. Nấm *C. sinensis* thu sau 40 ngày theo thí nghiệm Box – Behnken