

Tối ưu hóa thành phần dầu ô liu trong môi trường nuôi cấy nấm *Ophiocordyceps sinensis* để thu nhận exopolysaccharide

Lê Thị Thúy Hằng^{1,4,*}, Bạch Thị Bích Phượng², Nguyễn Thị Thu Tuyết²,
Trần Minh Trang², Huỳnh Thu³, Nguyễn Tiến Thắng⁴, Đinh Minh Hiệp⁵

¹Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP.HCM

³Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG TP.HCM

⁴Học Viện Khoa Học và Công Nghệ, Viện Hàn Lâm Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam

⁵Ban Quản lý Khu Nông nghiệp - Công nghệ cao TP.HCM

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 09 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: *Ophiocordyceps sinensis* (*Cordyceps sinensis*) là loài nấm dược liệu quý hiếm có giá trị cao trong nền y học cổ truyền và hiện đại. Đây là loại nấm nổi tiếng chứa nhiều hợp chất sinh học có ý nghĩa như: kháng oxy hóa, kháng ung thư, giảm huyết áp, điều hòa miễn dịch và giảm cholesterol trong máu,... Tại Việt Nam, nấm đã được nuôi cấy nhân tạo lỏng tinh thành công và chỉ sử dụng sinh khối nấm từ năm 2013. Tuy nhiên nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy nấm *O. sinensis* tiết ra nhiều exopolysaccharide (EPS) mang nhiều hoạt tính sinh học trong môi trường nuôi cấy. Do đó, nuôi cấy nấm *O. sinensis* nhằm tăng tổng hợp EPS là vô cùng cần thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nuôi cấy *O. sinensis* trên môi trường có bổ sung dầu ô liu từ 1 - 10% (v/v) để chọn ra nồng độ dầu thích hợp cho sự phát triển của nấm và tăng quá trình sinh tổng hợp EPS, kết quả EPS thu được $5,03 \pm 0,38$ g/L (tăng 2,94 lần) so với đối chứng khi bổ sung 5% (v/v) dầu ô liu vào môi trường nuôi cấy. Thời gian thích hợp thu nhận EPS trong môi trường bổ sung dầu ô liu là 40 ngày. Sau đó, chúng tôi sử dụng thiết kế Plackett-Burman để kiểm tra mức độ ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng khác nhau lên quá trình tạo EPS. Trong đó, dầu ô liu, saccharose và peptone là ba yếu tố có tác động mạnh nhất. Thiết kế thí nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken đã thực hiện và tìm ra giá trị tối ưu của ba yếu tố gồm dầu ô liu (5,27%), saccharose (48,69 g/L) và peptone (6,77 g/L) cho khả năng tổng hợp EPS đạt 6,06 g/L.

Từ khóa: *Ophiocordyceps sinensis*, exopolysaccharide (EPS), Plackett-Burman, Box-Behnken.

1. Mở đầu

Ophiocordyceps sinensis là loài nấm ký sinh trên một loại ấu trùng bướm đặc biệt có tên *Hepialus armoricanus*. Nấm *O. sinensis* thường

niễm vào ấu trùng vào mùa hè, nấm sinh trưởng và phát triển một cách tự nhiên trên vật chủ vào mùa thu, đến mùa đông nấm sẽ giết chết hoàn toàn cơ thể vật chủ, hình thành cấu trúc bào tử sinh sản stroma, phát triển lên mặt đất vào mùa hè sau đó, vì vậy nấm *O. sinensis* còn có tên gọi là Đông Trùng Hạ Thảo. *O. sinensis* là một loại nấm dược liệu quý có nhiều lợi ích cho sức khỏe con người trong điều

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-905417404.

Email: hanglth@cntp.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4609>

trị các bệnh nan y và tăng cường sức khỏe, bởi trong nấm có chứa nhiều hợp chất quý như polysaccharide, cordycepin, adenosine, ergosterol và nhiều loại vitamin khác nhau [1]. Trong những năm gần đây, nấm *O. sinensis* tự nhiên trở nên cạn kiệt nên không thể đáp ứng nhu cầu thị trường. Để giải quyết vấn đề trên, năm 1980 các nhà khoa học đã phân lập thành công chủng *O. sinensis* và sử dụng công nghệ lên men tạo nên sinh khối sợi nấm lớn và đồng nhất. Nhân sinh khối trong môi trường lỏng là phương pháp hiệu quả do dễ dàng kiểm soát hoặc tạo điều kiện tối ưu cho quá trình lên men như thành phần môi trường, nhiệt độ, pH và độ ẩm [2].

Bên cạnh đó, polysaccharide là hợp chất được tổng hợp từ những loài vi sinh vật khác nhau, được tìm thấy trong tế bào và trong môi trường nuôi cấy. Trong quá trình tăng trưởng, polysaccharide ngoại bào (exopolysaccharide - EPS) được tổng hợp bên trong tế bào và tiết ra môi trường xung quanh. Sự tiết EPS giúp vi sinh vật tồn tại trong những điều kiện môi trường khắc nghiệt gây bất lợi cho quá trình sinh trưởng, do đó, EPS có lợi thế hơn so với polysaccharide trong tế bào do có khả năng sản xuất nhiều trong thời gian ngắn, dễ dàng tách chiết và tinh sạch [3].

Trong những năm gần đây, EPS từ nấm *Cordyceps* đã thu hút sự quan tâm trên toàn thế giới do hoạt tính sinh học cao như kháng oxy hóa, kháng ung thư, giảm cao huyết áp, điều hòa miễn dịch và giảm cholesterol trong máu ... [3]. Từ các kết quả nghiên cứu hoạt tính sinh học của EPS đã công bố nên có rất nhiều nỗ lực tìm kiếm và mở rộng nghiên cứu EPS từ *Cordyceps* được thực hiện. Sự thay đổi thành phần môi trường khi nhân sinh khối trong môi trường lỏng và điều kiện nuôi cấy sẽ quyết định hoạt tính EPS. Điều này khiến các nhà khoa học tập trung vào điều kiện, thành phần nuôi cấy để tối ưu hóa năng suất thu nhận EPS, đồng thời chủ động tăng cường, cải thiện hoạt tính của EPS. Leung và Wu (2007) nghiên cứu ảnh hưởng của ammonium đến quá trình sinh tổng hợp EPS trong nuôi cấy sợi nấm *C. sinensis* HK1, khi bổ sung ammonium 5 - 40 mmol/L

vào ngày thứ ba nuôi cấy thì lượng EPS tăng 40% ở ammonium 10 mmol/L [4]. Cui và Jia (2010) nghiên cứu tối ưu hóa môi trường nuôi cấy *C. militaris* gồm 0,78-1,96 g /L, peptone 12,56 g /L, KH₂PO₄ 1 g /L, YE extract 10 g /L, và 0,5 g /L MgSO₄.7H₂O thì hàm lượng EPS tăng gấp 2,5 lần [5]. Trong những nghiên cứu gần đây, dầu thực vật được chứng minh có ảnh hưởng đến sinh tổng hợp sinh khối và EPS ở một số loài nấm như *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps militaris*, *Grifola frondosa*,... do có thành phần chủ yếu là acid béo và được sử dụng rộng rãi như nguồn carbon vì chứa acid oleic, acid linoleic và acid linolenic [6-8]. Do đó, sự kích thích quá trình sinh tổng hợp EPS trong nuôi cấy nhân tạo của dầu thực vật được các nhà nghiên cứu quan tâm bởi tăng hợp chất có hoạt tính sinh học.

Qua những nghiên cứu và thực tế trên, đồng thời kế thừa thành công của nhóm chúng tôi về nghiên cứu chứng minh dầu thực vật gồm dầu dừa, dầu hướng dương và dầu ô liu có ảnh hưởng đến sự phát triển và tổng hợp EPS của nấm *O. sinensis*. Trong đó dầu ô liu là thành phần thích hợp nhất trong quá trình kích thích tổng hợp EPS của nấm *O. sinensis*. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi tối ưu hóa thành phần môi trường nuôi cấy bổ sung dầu ô liu theo thiết kế Plackett-Burman và đáp ứng bề mặt Box-Behnken để thu nhận hàm lượng EPS trong dịch nuôi cấy nấm *O. sinensis* cao nhất.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng nấm *O. sinensis* được cung cấp bởi Tiến sĩ Trương Bình Nguyên (Đại học Đà Lạt - Việt Nam).

2.2. Khảo sát nồng độ dầu ô liu

Chủng nấm *O. sinensis* được hoạt hóa trên môi trường PGA trong 10-15 ngày ở 25°C trong 7 ngày, tiếp theo, giống được chuyển sang môi trường lỏng tĩnh. Bổ sung dầu ô liu (nồng độ từ

1-10% v/v) vào môi trường nuôi cấy lỏng tĩnh để xác định sự ảnh hưởng đến khả năng phát triển và tổng hợp EPS của nấm *O. sinensis* (sử

dụng Tween 80 làm chất nhũ hóa). Sau 30 ngày nuôi cấy, tiến hành xác định trọng lượng sinh khối khô và EPS.

Bảng 1. 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
DCKT	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
CNM	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

2.3. Xác định thời gian thích hợp thu nhận sinh khối và EPS

Môi trường nuôi cấy nấm *O. sinensis* bổ sung dầu ô liu (5% v/v), ủ ở 25 °C, thu nhận tại thời điểm 10 ngày, 20 ngày, 30 ngày, 40 ngày, 50 ngày và 60 ngày để theo dõi trọng lượng sinh khối khô và EPS.

2.4. Tối ưu hóa và thiết kế thí nghiệm

Sàng lọc yếu tố có ý nghĩa bằng thiết kế Plackerr-Burman

Để xác định được các yếu tố và mức ảnh hưởng đến sự phát triển và tổng hợp EPS ở nấm *O. sinensis*, 9 yếu tố được chọn là dịch chiết khoai tây, saccharose, cao nấm men, peptone, KH₂PO₄, K₂HPO₄, CaCl₂, MgSO₄, dầu ô liu để làm thí nghiệm. Thí nghiệm được thiết kế theo ma trận Plackett-Burman (Bảng 1) với 9 yếu tố trong 15 nghiệm thức (Bảng 2) để sàng lọc yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự phát triển và tổng hợp EPS (g/L).

Tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken

Phương pháp đáp ứng bề mặt là một kỹ thuật mô hình thực nghiệm được sử dụng để đánh giá mối quan hệ giữa một tập hợp các yếu tố thử nghiệm kiểm soát. Trong nghiên cứu này, ba yếu tố chính được xác định giá trị tối ưu và được nghiên cứu ở 3 mức thấp, trung bình và cao (-1, 0, +1) (Bảng 3) trong 15 nghiệm thức (Bảng 4). Hàm đáp ứng được chọn là hàm lượng EPS (Y g/L). Mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc 2:

$$Y \text{ (g/L)} = B_0 + B_1Y_1 + B_2Y_2 + B_3Y_3 + B_4Y_1Y_2 + B_5Y_1Y_3 + B_6Y_2Y_3 + B_7Y_1^2 + B_8Y_2^2 + B_9Y_3^2 \text{ (phương trình 1)}$$

Trong đó, Y: Hàm lượng EPS. B₀: hằng số, B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇, B₈, B₉: hệ số tuyến tính

2.5. Thu nhận sinh khối nấm

Sinh khối nấm được thu nhận và rửa sạch dưới vòi nước, sau đó được sấy khô ở 55 °C đến khối lượng không đổi và xác định khối lượng khô của sinh khối nấm.

Bảng 2. 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	TN	MH	TN	MH
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

2.6. Thu nhận EPS

Quy trình tách chiết EPS từ dịch nuôi cấy nấm *O. sinensis* dựa trên phương pháp của Kim và cộng sự (2005) có điều chỉnh một số bước cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [9].

Dịch nuôi cấy được lọc với vải lọc, hấp khử trùng. Cô quay ở 50°C giảm thể tích còn 1/5 thể tích ban đầu. Loại dầu trong dịch nuôi cấy bằng hexan theo tỷ lệ 5:1. Tủa với ethanol 96° theo tỷ lệ 1:4, để 24 giờ ở 4°C. Ly tâm lạnh 4000 vòng/phút trong 10 phút, bỏ dịch. Thu tủa và rửa tủa 3 - 4 lần với cồn 96°. Sấy khô 55°C, nghiền tủa thành dạng bột, đo độ ẩm.

2.7. Định lượng polysaccharide

Hàm lượng đường tổng số hòa tan được xác định dựa trên phản ứng màu đặc trưng bởi

đường và nhiều chất hữu cơ với sự hiện diện của sulfuric acid [10].

Hòa tan tủa EPS trong nước, pha loãng k lần. Cho 1 mL dung dịch phenol 5% vào 1 mL mẫu. Thêm từ từ 5 mL H₂SO₄ đậm đặc, lắc đều, để yên 10 - 20 phút ở nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thụ màu ở bước sóng 490 nm. Sử dụng đường chuẩn saccharose 0,1%.

Bảng 3. Nồng độ các yếu tố sử dụng trong Box-Behnken

Yếu tố	Đơn vị	Ký hiệu	Mức		
			-1	0	+1
Dầu thực vật	v/v	Y1	2	5	8
Peptone	g/L	Y2	2	6	10
Saccharose	g/L	Y3	20	40	60

Bảng 4. Thiết kế Box-Behnken

NT	Các biến			Hàm lượng SK (g/L)		Hàm lượng EPS (g/L)	
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	TN	MH	TN	MH
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

2.9. Phân tích dữ liệu

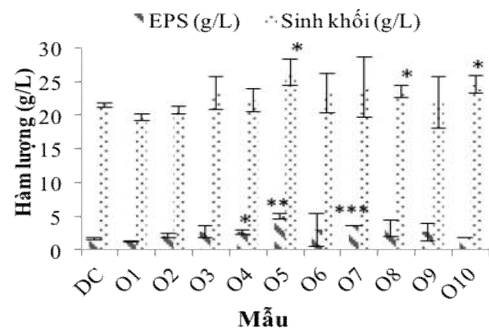
Tất cả các dữ liệu được phân tích thống kê dựa trên phần mềm Minitab 17 và Excel (với phép so sánh F-test và t-test). Dữ liệu thể hiện giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Mức ý nghĩa 5% ($p < 0,05$) được sử dụng như xác suất chấp nhận tối thiểu cho sự khác biệt giữa các giá trị trung bình.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của dầu ô liu lên sự phát triển và tổng hợp EPS

Sau 30 ngày nuôi cấy bằng phương pháp lỏng tĩnh, chúng tôi thu nhận sinh khối và EPS từ dịch nuôi cấy nấm *O. sinensis* có bổ sung dầu ô liu có nồng độ từ 1 - 10 % (v/v) (Biểu đồ 1).

Đối với sinh khối, hàm lượng sinh khối khô giữa các lô O1, O5, O8 và O10 tăng từ 9,35 - 20,45% so với ĐC ($21,59 \pm 0,06$ g/L), sinh khối khô TB đạt cao nhất $26,01 \pm 1,99$ g/L (O5), riêng lô O1 ($19,69 \pm 0,11$ g/L) thu lượng EPS thấp hơn 8,8% so với ĐC đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Do đó, bổ sung nồng độ 5, 8 và 10% dầu ô liu sẽ làm tăng khả năng phát triển của nấm. Tuy nhiên, sự khác biệt về hàm lượng sinh khối của các lô O2, O3, O4, O6, O7 và O9 so với lô ĐC không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), cho nên khi bổ sung dầu ô liu ở các nồng độ trên không ảnh hưởng đến quá trình phát triển của nấm.



Chú thích: khác biệt có ý nghĩa so với lô ĐC: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)
 Biểu đồ 1. Sự thay đổi hàm lượng sinh khối khô và EPS khi bổ sung dầu ô liu.

Về lượng EPS, bổ sung 1% ô liu làm giảm lượng EPS, nhưng 4, 5 và 7% ô liu làm tăng lượng EPS của nấm. Chi tiết, EPS đạt $5,03 \pm 0,38$ g/L, tăng 2,94 lần so với ĐC ($1,71 \pm 0,00$ g/L) khi bổ sung 5% dầu ô liu O5, trong khi đó, O7 đạt $3,69 \pm 0,00$ g/L, tăng 2,15 lần so với ĐC. Tuy nhiên, sự khác biệt về hàm lượng EPS TB của các lô O2, O3, O6 và từ O8 - O10 so với lô ĐC không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), nên bổ sung các nồng độ trên không ảnh hưởng đến khả năng tiết EPS.

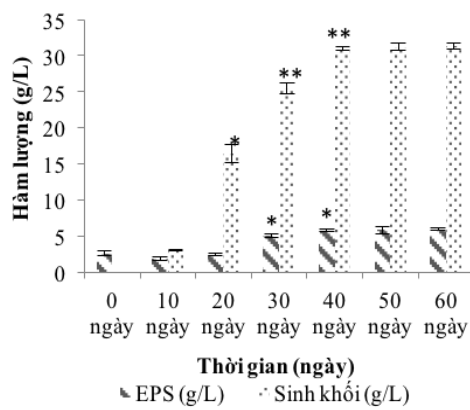
Tóm lại, trọng lượng sinh khối ($25,49 \pm 0,32$ g/L) tăng 1,2 lần và EPS ($5,03 \pm 0,38$ g/L) tăng 2,94 lần so với đối chứng khi bổ sung 5% dầu ô liu. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Park và cộng sự (2002), bổ sung 4% dầu ô liu vào môi trường nuôi cấy *C. militaris* thì thu được sinh khối cao nhất (19 g/L) [6]. Điều này hợp lý do dầu ô liu có thành phần chủ yếu là oleic acid (chiếm hơn 72%) - một dạng acid béo

không bão hòa đơn, nấm dễ dàng sử dụng cho sự phát triển và tổng hợp EPS.

Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, khi bổ sung 5% dầu ô liu sẽ kích thích nấm phát triển mạnh, đồng thời tổng hợp EPS cao rõ rệt so với ĐC, vì vậy chúng tôi chọn dầu ô liu 5% để tiếp tục thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Thời gian thích hợp thu nhận sinh khối và EPS

Sinh khối nấm và dịch nuôi cấy thu nhận cách nhau 10 ngày (Biểu đồ 2).



Biểu đồ 2. Hàm lượng sinh khối khô và EPS theo thời gian.

Chú thích: khác biệt so với ĐC * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

Quá trình phát triển của nấm tăng theo thời gian, bằng chứng 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, đạt lần lượt $3,02 \pm 0,00$ g/L và $16,42 \pm 0,85$ g/L (tăng 5,44 lần), đến 30 ngày, sinh khối nấm ($25,49 \pm 0,32$ g/L) tăng thêm 1,55 lần so với 20 ngày và tăng 1,22 lần khi thu ở 40 ngày ($31,01 \pm 0,03$ g/L), nhưng tăng không đáng kể sau 40 ngày nuôi cấy.

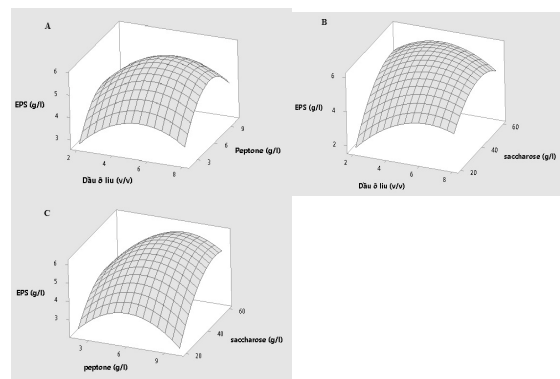
Kết quả cho thấy hàm lượng EPS TB thu tại thời điểm 20, 30 và 40 ngày lần lượt là $2,44 \pm 0,02$ g/L, $5,03 \pm 0,38$ g/L, $5,77 \pm 0,02$ g/L. Điều này cho thấy tại sau 40 ngày nuôi cấy cho hàm lượng EPS cao hơn 1,14 lần so với 30 ngày nuôi cấy. Trong khi đó, sự khác biệt nhau về hàm lượng EPS TB tại thời điểm 40 ngày và 50 ngày, 50 ngày và 60 ngày không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Vậy chúng tôi chọn thời điểm thu hoạch nấm *O. sinensis* khi bổ sung 5% dầu ô liu vào môi trường nuôi cấy là 40 ngày.

3.3. Tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy, mô hình có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), hệ số hồi quy $R^2 = 0,9788 > 0,75$ chứng tỏ hàm lượng EPS thu từ mô hình (MH) tương thích với thực nghiệm (TN). Hơn nữa, giá trị R^2 dự đoán là 0,6601 phù hợp với R^2 điều chỉnh là 0,9405.

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 hai biến độc lập bất kỳ, trong khi duy trì biến còn lại ở mức tối ưu của chúng (Biểu đồ 3). Từ đó dự đoán các thông số tối ưu và đưa ra công thức môi trường tối ưu cho hàm lượng EPS tạo ra cao đồng thời sinh khối tạo ra không thấp.



Biểu đồ 3. 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 5% dầu ô (v/v).

Phương trình hồi quy nhận được như sau:

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

Kết quả ghi nhận được là 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 được lượng EPS trung bình là 6,06 g/L và sinh khối khô trung bình là 31,87 g/L. Tuy nhiên, đây chỉ là kết quả dự đoán lý thuyết, cần được kiểm chứng bằng thực nghiệm.

3.4. Hàm lượng polysaccharide có trong EPS

Mẫu EPS của 15 nghiệm thức sau khi thu nhận được định lượng polysaccharide (Bảng 6)

Bảng 6. Hàm lượng polysaccharide trong EPS

Mẫu	Hàm lượng EPS (g/L)	Hàm lượng polysaccharide (%)	Mẫu	Hàm lượng EPS (g/L)	Hàm lượng polysaccharide (%)
ĐC	1,71	31,09 ± 0,98	NT8	4,69	36,68 ± 0,01
NT1	2,59	33,65 ± 0,35	NT9	2,68	38,42 ± 0,01
NT2	3,46	37,08 ± 9,78	NT10	2,44	39,59 ± 0,07
NT3	3,19	61,27 ± 0,23	NT11	3,43	33,95 ± 2,07
NT4	4,38	75,67 ± 0,22	NT12	4,89	44,23 ± 0,33
NT5	1,70	35,13 ± 0,01	NT13	5,75	53,01 ± 0,00
NT6	3,27	51,73 ± 0,86	NT14	5,75	53,01 ± 0,00
NT7	5,25	64,60 ± 12,47	NT15	5,75	53,01 ± 0,00

4. Kết luận

Việc bổ sung Dầu ô liu vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ 5% (v/v) làm tăng sự phát triển sợi nấm $26,01 \pm 1,99$ g/L (tăng 1,2 lần) và kích thích quá trình tổng hợp EPS đạt $5,03 \pm 0,38$ g/L (tăng 2,94 lần) so với đối chứng với thời gian thu nhận thích hợp là 40 ngày nuôi cấy. Sử dụng thiết kế Plackett-Burman để sàng lọc chín yếu tố ban đầu (15 nghiệm thức), chọn ra được ba yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển và tổng hợp EPS ở nấm *O. sinensis* là dầu ô liu, peptone và saccharose. Kết hợp với phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken tối ưu hóa thành phần môi trường nuôi cấy cho hàm lượng EPS dự kiến đạt cao nhất 6,06 g/L với dầu ô liu 5,27 %, peptone 6,77 g/L và saccharose 48,69 g/L. Kết quả làm tiền đề cho nghiên cứu thu nhận EPS với quy mô công nghiệp. Nhìn chung hàm lượng polysaccharide trong EPS của 15 nghiệm thức đều cao hơn so với đối chứng, cụ thể polysaccharide có trong mẫu EPS của nghiệm thức 4 chiếm cao nhất đạt 75,67%.

cho thấy hàm lượng polysaccharide chiếm trong EPS thu từ 15 nghiệm thức có giá trị khác nhau. Nhìn chung EPS các nghiệm thức có hàm lượng polysaccharide đều cao hơn mẫu đối chứng.

Kết quả cho thấy nghiệm thức 4 có polysaccharide chiếm cao nhất (75,67%). Các nghiệm thức 3, 6, 7 và 13 đều có lượng polysaccharide lớn hơn 50%.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến Trung Tâm Thí Nghiệm Thực Hành và Trung Tâm Việt Đức thuộc Trường ĐH Công nghiệp Thực Phẩm Tp. HCM; Viện Sinh Học Nhiệt Đới - Học Viện Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam; Phòng Thí Nghiệm Sinh Hóa - Trường ĐH Khoa học Tự nhiên TP.HCM đã hỗ trợ chúng tôi trong suốt thời gian làm nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] Wang, L.Y., Cheong, K.L., Wu, D.T., Meng, L.Z., Zhao, J. and Li, S.P, (2015), "Fermentation optimization for the production of bioactive polysaccharides from *Cordyceps sinensis* fungus UM01", *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, pp.180-185.
- [2] Yan, J.K., Wang, W.Q., Ma, H.L. and Wu, J.Y. (2013), "Sulfation and enhanced antioxidant capacity of an exopolysaccharide produced by the medicinal fungus *Cordyceps sinensis*", *Molecules*, 18, pp. 167-177.
- [3] Mahapatra, S. and Banerjee, D. (2013), "Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications", *Microbiology Insights*, 6, pp. 1-16.

- [4] Leung, P.H. and Wu, J.Y. (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), pp. 1942-1949.
- [5] Cui, J.D. and Jia, S.R. (2010), "Optimization of medium on exopolysaccharides production in submerged culture of *Cordyceps militaris*", *Food Science and Biotechnology*, 19(6), pp. 1567-1571.
- [6] 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), pp. 198-205.
- [7] 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), pp. 250-255.
- [8] 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), pp. 295-301.
- [9] Kim, H. and Yun, J. (2005), "A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures", *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), pp. 728-738.
- [10] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P. and Smith, F. (1956), "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Analytical Chemistry*, 28(3), pp. 350-356.

Optimization of Exopolysaccharide Production in Liquid Culture of *Ophiocordyceps sinensis* Fungus with Addition of Olive Oil

Le Thi Thuy Hang^{1,4}, Bach Thi Bich Phuong², Nguyen Thi Thu Tuyet², Tran Minh Trang², Huynh Thu³, Nguyen Tien Thang⁴, Dinh Minh Hiep⁵

¹University of Food Industry, Ho Chi Minh City

²University of Science, Ho Chi Minh City

³University of Technology, Ho Chi Minh City

⁴Vietnam Academy of Science and Technology

⁵Agricultural Hi-Tech Park of Ho Chi Minh City

Abstract: *Ophiocordyceps sinensis* (syn. *Cordyceps sinensis*) is a medicinal mushroom which is highly valued in traditional and modern medicine. It is a well-known entomopathogenic fungus with many significant bioactivities such as antioxidants, immunomodulatory and antitumor, etc. In Vietnam, its mycelial biomass has been cultured artificially in a liquid medium and has studied application since 2013. However, many previous researches demonstrated that it secreted numerous bioactive exopolysaccharides (EPS) in culture medium. Therefore, *O. sinensis* cultured to improve EPS synthesis is essential. In this research, *O. sinensis* cultured in liquid medium with olive oil from 1 to 10% (v/v) to choose the oil concentration for the growth and EPS synthesis of *O. sinensis*. The results showed that *O. sinensis* could synthesize EPS up to 2,94 times compared to control (total EPS was 5,03 ± 0,38 g/L) when added 5% olive oil to the culture medium. The suitable time to receive EPS is 40 days. Then, we used the Plackett - Burman experimental design, and saccharose (48,69 g/L), peptone (6,77 g/L) and olive oil (5,27%) were found to be the most significant parameters. The optimum conditions including saccharose, peptone and olive oil were determined by Box - Behnken method and the results showed maximum of EPS value is 6,06 g/L.

Keywords: *Ophiocordyceps sinensis*, exopolysaccharide (EPS), Plackett-Burman, Box-Behnken.