

KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY *CORDYCEPS SINENSIS* THU NHẬN POLYSACCHARIDE NGOẠI BÀO (EPS) CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA

THE EFFECT OF CULTURE MEDIUM COMPONENTS ON PRODUCTION OF EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE (EPS) WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY IN *CORDYCEPS SINENSIS* FUNGUS

Lê Thị Thúy Hằng^{1,4}, Trần Đặng Mỹ Ngân², Nguyễn Thị Kim Hậu¹, Nguyễn Thành Sơn¹, Đinh Minh Hiệp³,
Nguyễn Tiến Thắng⁴, Nguyễn Thị Kim Oanh¹

¹Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. HCM; hanglitt@cntp.edu.vn

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. HCM

³Ban Quản lý Khu Nông nghiệp – Công nghệ cao TP.HCM; dinhminhhiiep@gmail.com

⁴Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; thangnt1949@gmail.com

Tóm tắt - *Cordyceps sinensis* (Đồng trùng hạ thảo) đang được giới khoa học quan tâm bởi chúng có chứa nhiều hợp chất sinh học như cordycepin, nucleoside, ergosterol, polysaccharide, ... Tại Việt Nam, *C. sinensis* được nuôi cấy nhân tạo trên môi trường lỏng tĩnh, sử dụng hệ sợi để sản xuất và nghiên cứu, còn dịch môi trường sau nuôi cấy có chứa lượng exopolysaccharide (EPS) có hoạt tính kháng oxy hóa cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát khả năng tạo EPS của *C. sinensis* trong môi trường bổ sung peptone, cao nấm men hoặc nhộng so với môi trường cơ bản (đối chứng). Sau đó, chúng tôi đánh giá khả năng kháng oxy hóa của EPS thu từ dịch nuôi cấy bằng phương pháp bắt gốc tự do ABTS. Kết quả cho thấy, *C. sinensis* có khả năng thích nghi và phát triển tốt được trên các môi trường này và kích thích tăng tổng hợp EPS. Trong đó, môi trường có chứa peptone và cao nấm men thu sinh khối và EPS cao nhất là 19,3 g/l và 2,5 g/l. Hoạt tính bắt gốc tự do ABTS của EPS cũng tăng lên đáng kể ở 40 ngày.

Từ khóa - *Cordyceps sinensis*; exopolysaccharide; nuôi cấy lỏng tĩnh; hoạt tính kháng oxy hóa; ABTS (2,2'- azino - bis (3 - ethylbenzothiazoline - 6 - sulphonic acid))

1. Giới thiệu

Cordyceps sinensis có tên gọi thông thường là Đồng trùng hạ thảo, là một loài nấm sống ký sinh trên ấu trùng của các loài sâu bướm thuộc bộ Lepidoptera, chi *Hepialus* và *Thitarodes*. Sau khi xâm nhiễm vào vật chủ, chúng sẽ phát triển bên trong vật chủ dưới dạng sợi nấm, qua mùa đông, nấm giết chết vật chủ và hình thành quả thể mọc lên khỏi mặt đất [2]. *C. sinensis* là một loại dược liệu quý hiếm được sử dụng làm thuốc chữa bệnh và thuốc bổ cách đây hàng trăm năm trong y học cổ truyền Trung Hoa. Các nghiên cứu hiện đại đã chứng minh những tác dụng dược học của nấm như hoạt tính kích thích hệ miễn dịch, giảm cholesterol, kháng khối u, kháng oxy hóa và giảm đường huyết... Trong những năm gần đây, *C. sinensis* có nguy cơ bị tuyệt chủng do tình trạng khai thác quá mức, cũng như do ảnh hưởng của biến đổi khí hậu toàn cầu [3]. Do vậy, giải pháp khả thi và bền vững để duy trì nguồn nấm dược liệu quý này là công nghệ lên men sợi nấm *C. sinensis*. Các nghiên cứu đã chứng minh tác dụng dược lý của *C. sinensis* nuôi cấy nhân tạo tương tự như *C. sinensis* ngoài tự nhiên.

Hiện nay, việc nghiên cứu thành phần môi trường nuôi cấy nấm ăn hay nấm dược liệu đang được quan tâm, bởi

Abstract - Currently, *Cordyceps sinensis* (Dong trung hạ thảo) receives much interest from scientific community because of many bioactive compounds such as: cordycepin, nucleoside, ergosterol, polysaccharide... *C. sinensis* was successfully artificially cultured in liquid medium in Vietnam. However, after incubation, only mycelial biomass, rather than culture fluid, was produced and studied. Many studies indicate that the culture fluid of *C. sinensis* contains bioactive EPS. In this study, we investigate the EPS of *C. sinensis* in the liquid of static culture by supplementing with peptone, yeast or silkworms compared to the control culture. Then, we assess the antioxidant activity of EPS from the culture fluid by ABTS free radical method. Results indicate that *C. sinensis* has the ability to adapt to and develop well in these media as well as stimulate the EPS production. Particularly, the medium within peptone and yeast gives the highest biomass and EPS of 19.3 g/l and 2.5 g/l. ABTS activity of EPS from it also increases significantly in 40 cultured days.

Key words - *Cordyceps sinensis*; exopolysaccharide; surface liquid cultures; antioxidant activity; ABTS (2,2'- azino - bis (3 - ethylbenzothiazoline - 6 - sulphonic acid))

chúng có tác dụng kích thích sự phát triển của sợi nấm và sản xuất exopolysaccharid trong quá trình lên men. Tuy nhiên, trên thế giới cũng như ở Việt Nam chưa có công bố khoa học nào về việc nghiên cứu so sánh giữa môi trường nuôi cấy lỏng tĩnh có bổ sung nhộng tằm và môi trường có peptone, cao nấm men. Do vậy, trong nghiên cứu sau này chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của thành phần môi trường trong nuôi cấy sợi nấm đến sự phát triển và tổng hợp exopolysaccharide của nấm *Cordyceps sinensis*, và khả năng kháng oxy hóa của chúng trong điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Giống *C. sinensis* được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Nguyên Long (Lạc Dương, Lâm Đồng). Giống được giữ trong ống thạch nghiêng chứa môi trường PGA ở nhiệt độ 4°C.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Khảo sát sự ảnh hưởng của thành phần môi trường lên sự phát triển và sinh tổng hợp EPS của *C. sinensis*

Chuẩn bị 10 lít mỗi loại môi trường có thành phần:

- MT1: 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;
- MT2: 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, peptone 6 g/l, yeast extract 4 g/l;
- MT3: 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, nhộng 10 g/l.

Sau đó, hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút. Bỏ sung 2 erlen giống (đã được nhân giống 10 ngày từ ống thạch nghiêng) vào môi trường và rót 200 ml môi trường vào mỗi hộp nhựa (dung tích 500 ml) và nuôi cấy ở nhiệt độ 20 – 25°C. Theo dõi sự phát triển của từng thí nghiệm qua việc ghi nhận hình thái sinh khối, nhận xét tốc độ tăng trưởng, thời gian thu sinh khối và EPS sau 10, 20, 30, 40 ngày.

2.2.2. Thu nhận sinh khối

Sinh khối được sấy khô ở 60°C đến khối lượng không đổi. Sau đó, xác định trọng lượng khô (g/l) của sinh khối nấm.

2.2.3. Thu nhận exopolysaccharid (EPS)

Dịch nuôi cấy được thu nhận cô quay chân không giảm thể tích. Sau đó, EPS được thu nhận bằng cách thu tủa với ethanol 96° (tỷ lệ 1:4 v/v) trong 24h ở 4°C. Ly tâm thu tủa và đông khô mẫu, bảo quản ở 4°C. Định lượng polysaccharid trong EPS bằng phương pháp phenol – acid sulfuric và định lượng protein trong EPS bằng phương pháp Bradford.

2.2.4. Khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do ABTS (2,2'- azino - bis (3 – ethylbenzothiazoline – 6 - sulphonic acid)) của EPS

Khảo sát khả năng bắt gốc tự do ABTS của EPS được thực hiện theo quy trình của Roberto và cộng sự (1999) [6] với một số thay đổi phù hợp, gồm 3 giai đoạn. Giai đoạn 1, tạo gốc tự do ABTS^{•+}: hòa dung dịch ABTS 7 mM với dung dịch $K_2S_2O_8$ 2,45 mM theo tỉ lệ thể tích 1:1, ủ trong tối 12 – 16 giờ ở nhiệt độ phòng. Giai đoạn 2, 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. Giai đoạn 3, 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 mật độ quang ở bước sóng 734 nm. Đối chứng dương là vitamin C.

Khả năng bắt gốc tự do ABTS^{•+} của mẫu phân tích được tính theo công thức:

$$S\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

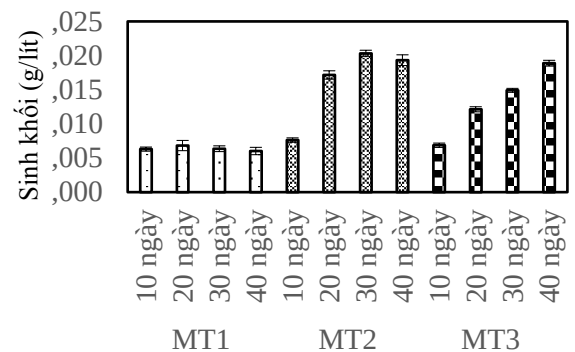
A_0 : Giá trị OD_{730nm} của mẫu trắng (dung dịch (A) không chứa mẫu phân tích);

A_1 : Giá trị OD_{730nm} của mẫu phân tích (dung dịch (A) chứa mẫu phân tích).

3. Kết quả và biện luận

3.1. Sự ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sự phát triển của sinh khối nấm *C. sinensis* trong môi trường lỏng tĩnh

Nghiệm thức này nhằm khảo sát ảnh hưởng peptone và cao nấm men, nhộng đến sự phát triển sinh khối của nấm *C. sinensis* theo các mốc thời gian 10 ngày, 20 ngày, 30 ngày và 40 ngày.



Hình 1. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sự phát triển của sinh khối nấm *C. sinensis* trong môi trường lỏng tĩnh

Nhìn chung, cả 3 môi trường đều tạo sinh khối theo thời gian phù hợp với sự sinh trưởng của nấm. MT1 là môi trường đối chứng, môi trường dinh dưỡng nghèo nàn không phù hợp để sản xuất sinh khối. Thời điểm thu sinh khối cao nhất của môi trường này là 20 ngày (6,83 g/L). Môi trường 1, nấm sớm bước vào giai đoạn suy vong khi từ 20 ngày trở đi, sinh khối nấm đã giảm (6,83 xuống 6,36 g/L), điều này là do môi trường không có bổ sung nguồn Nitơ, mà chỉ hấp thu dinh dưỡng từ nguồn Carbon.

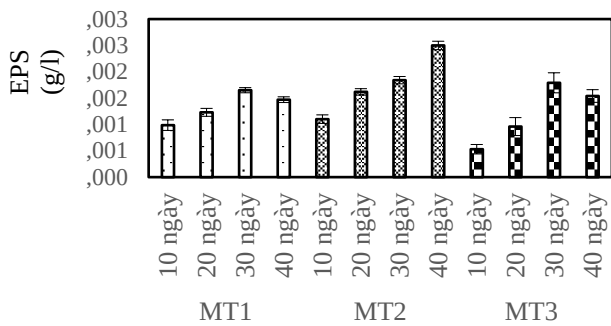
MT2 bổ sung thêm peptone và cao nấm men so với MT1, đây là môi trường giàu dinh dưỡng phù hợp để nuôi cấy thu sinh khối. Thời điểm thu tốt nhất là 30 ngày (20,32 g/L, gấp khoảng 3 lần MT1 là 6,36 g/L). MT2, sinh khối nấm tăng dần đến 30 ngày sau đó giảm dần (20,32 xuống 19,33 g/L), thời gian bước vào giai đoạn suy vong kéo dài một phần là do môi trường này có bổ sung thêm peptone và cao nấm, nguồn dinh dưỡng cho nấm dễ phát triển, đây cũng là môi trường phù hợp với nghiên cứu của Dong Yao và cộng sự (2005), môi trường có chứa peptone (5,58 g/L) và cao nấm men là (2,97 g/L) sau 15 ngày nuôi, với việc nuôi cấy lắc 150 vòng/phút [3].

MT3 bổ sung dịch chiết nhộng tằm, đây cũng là môi trường dinh dưỡng cho nấm phát triển tốt. Tuy nhiên, đây chưa phải là môi trường tối ưu nhất cho việc thu sinh khối. Thời điểm thu tốt nhất trong khảo sát là 40 ngày (11,84 g/L gấp khoảng 2 lần MT1 là 6,03 g/L).

Qua kết quả này cho thấy MT2 là môi trường dinh dưỡng phù hợp cho việc nuôi cấy và thời điểm thu sinh khối nấm *C. sinensis* tốt nhất là 30 ngày.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sự sinh tổng hợp EPS của *C. sinensis*

EPS là một polysaccharide ngoại bào được nấm tổng hợp và tiết ra ngoài môi trường nuôi cấy, nó là một hợp chất thứ cấp, và thường được tiết nhiều trong pha ổn định. Kết quả trọng lượng tủa EPS thu được biểu diễn trên Hình 2 như sau:



Hình 2. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sự sinh tổng hợp EPS của *C. sinensis*

Ở MT1, qua kết quả thu nhận sinh khối ở trên cho thấy thời gian sinh trưởng của nấm ngắn, sớm vào pha ổn định từ 20 đến 30 ngày, nên nấm tổng hợp một lượng EPS ở thời điểm 30 ngày cao hơn các thời gian khác (1,65 g/l).

MT2 là môi trường có peptone và cao nấm men, giàu dinh dưỡng. Theo bảng biểu đồ Hình 2 cho thấy, hàm lượng thu được tăng dần đến 40 ngày (1,1 g/l - 2,5 g/l). Vì vậy, thời điểm thu EPS tốt nhất cho MT2 là 40 ngày. Ở 40 ngày của MT2 lượng EPS là nhiều nhất (2,50 g/l) như đã trình bày ở phần kết quả sinh khối, sinh khối 30 đến 40 ngày giảm, nấm ở cuối pha ổn định, đầu pha suy vong, trong điều kiện không thuận lợi, nấm sẽ tiết ra EPS như một "hàng rào chắn" bảo vệ cho mình. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Hồ Thị Phương Thắm (2015) với hiệu suất thu EPS là 2,75 g/l [4] và nghiên cứu của Lo và cộng sự (2013) với hiệu suất thu EPS từ 0,43 - 3,21 g/l [8].

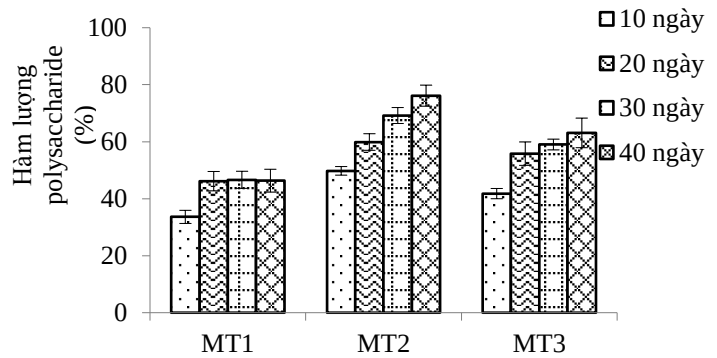
MT3 là môi trường có dịch chiết nhộng, môi trường dinh dưỡng này cũng tạo ra lượng EPS đáng kể nhưng không cao bằng MT2. Từ 10 - 30 ngày, EPS tăng mạnh (0,53 - 1,79 g/l). Đến 40 ngày, lượng sinh khối giảm xuống, vì vậy thời điểm thu EPS tốt nhất ở MT3 là 30 ngày.

Qua kết quả khảo sát 3.1 và 3.2 chúng tôi nhận thấy thành phần môi trường ảnh hưởng đến sự phát triển sinh khối và tổng hợp EPS của nấm *C. sinensis*. Dựa trên mối tương quan giữa sinh khối và EPS, chúng tôi nhận thấy MT2 (môi trường bổ sung peptone và cao nấm men) phù hợp thu cả sinh khối và EPS ở thời điểm 40 ngày nuôi cấy, mặc dù sinh khối 40 ngày (19,33 g/l) ít hơn 30 ngày (20,32), nhưng bù lại ta thu được lượng EPS 40 ngày đáng kể (2,4 g/l) so với 30 ngày (1,84 g/l).

3.3. Hàm lượng polysaccharide và protein trong tủa EPS thu từ các môi trường

Sau khi khảo sát ảnh hưởng của môi trường và thời gian nuôi cấy để thu nhận sinh khối và EPS, chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng polysaccharide có trong tủa EPS thu từ các môi trường khảo sát. Kết quả được trình bày ở các biểu đồ sau:

Với phương trình đường chuẩn: $y = 0,0108x$ ($R^2 = 0,9948$) làm chuẩn để xác định hàm lượng polysaccharide trong mẫu khảo sát.



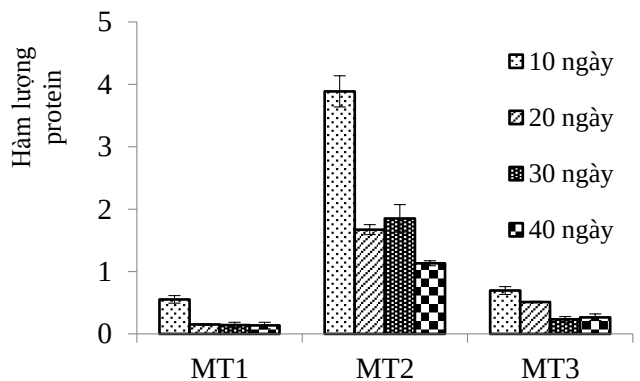
Hình 3. Biểu đồ kết quả định lượng polysaccharide của EPS thu từ các môi trường

Nhìn chung cả 3 MT đều có hàm lượng polysaccharide cao, phù hợp với quy trình tách chiết polysaccharide mà nhóm đã sử dụng. Trong đó hàm lượng polysaccharide trong MT1 là thấp nhất, chỉ khoảng 46%; ở MT2 và MT3 (50-60%), hàm lượng polysaccharide cao hơn đáng kể, phù hợp với kết quả 3.2, lượng tủa EPS thu được cao hơn so với MT1. Và lượng polysaccharide cao nhất là MT2 (76%), ở thời gian 40 ngày.

3.3.1. Định lượng protein

Bên cạnh việc xác định hàm lượng polysaccharide, chúng tôi xác định lượng protein có trong tủa EPS thu được từ các môi trường khảo sát.

Với phương trình đường chuẩn: $y = 0,0012x$ ($R^2 = 0,9953$) làm chuẩn để xác định hàm lượng protein trong mẫu EPS.



Hình 4. Biểu đồ kết quả định lượng protein của EPS thu từ các môi trường khảo sát

Nhìn chung, hàm lượng protein trong tủa EPS thu từ các môi trường rất thấp, chỉ vào khoảng 0,1 - 3%.

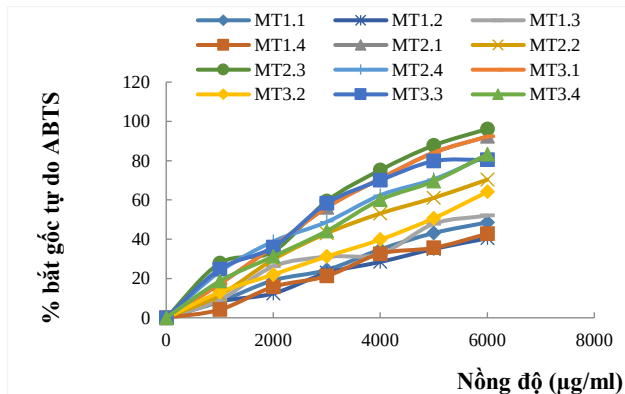
Ở MT2, trong khi hàm lượng polysaccharide cao nhất, thì hàm lượng protein lại cao hơn so với môi trường đối chứng, vì MT2 là môi trường có peptone và cao nấm men, hàm lượng protein cao nên ở thời điểm 10 ngày, nấm chưa sử dụng nhiều còn tồn đọng lại lượng protein cao hơn so với MT1.

Ở MT3, có sự chênh lệch nhiều giữa các thời điểm thu. Nhiều nhất là ở 10 ngày, sau đó thì giảm mạnh (0,695 - 0,111%), ở 20 ngày lượng protein cũng thấp hơn đối chứng (0,04%), nhưng không chênh lệch nhiều.

3.4. Hoạt tính bắt gốc tự do ABTS+ của EPS

Hoạt tính bắt gốc tự do ABTS+ là một trong các khảo sát hoạt tính kháng oxy hoá hiệu quả và đơn giản. Tiềm năng kháng oxy hóa của mẫu được đánh giá thông qua giá trị IC₅₀. IC₅₀ là giá trị thể hiện nồng độ của mẫu chứa chất kháng oxy hóa mà tại nồng độ đó làm giảm 50% nồng độ gốc tự do ban đầu. Giá trị IC₅₀ càng thấp, hiệu quả bắt gốc tự do càng cao.

Kết quả khảo sát khả năng bắt gốc tự do ABTS+ dựa trên giá trị IC₅₀ được thể hiện qua các biểu đồ sau.



Hình 5. Khả năng bắt gốc tự do ABTS+ của EPS từ dịch nuôi cấy nấm *C. sinensis*

Trong đó kí hiệu:

- MT1.1, MT1.2, MT1.3 và MT1.4: MT1 sau thời gian 10, 20, 30 và 40 ngày nuôi cấy.
- MT2.1, MT2.2, MT2.3 và MT2.4: MT2 sau thời gian 10, 20, 30 và 40 ngày nuôi cấy.
- MT3.1, MT3.2, MT3.3 và MT3.4: MT3 sau thời gian 10, 20, 30 và 40 ngày nuôi cấy.

Tất cả các cao chiết trong khoảng nồng độ khảo sát (0 – 6000 µg/ml) đều cho thấy có khả năng bắt gốc ABTS+ với tỉ lệ khác nhau, được thể hiện ở Hình 5. Nồng độ mẫu càng tăng thì khả năng bắt gốc tự do càng cao.

Các cao EPS hầu như đều bắt được các gốc tự do trong khoảng nồng độ khảo sát, chỉ trừ cao MT1. Nhìn chung các cao EPS có khả năng bắt được 50% gốc tự do ở khoảng nồng độ 2.000 – 3.000 µg/ml. Tuy nhiên, cũng có cao EPS cần dùng đến nồng độ hơn 4.000 µg/ml mới bắt được 50% gốc tự do.

Bảng 1. Giá trị IC₅₀ (µg/ml) của các mẫu khảo sát

	MT1	MT2	MT3
10 ngày	—	3794,32	4216,14
20 ngày	—	2643,89	3210,67
30 ngày	5882,35**	2186,13	2631,57
40 ngày	—	1964,56*	3355,70

*: giá trị IC₅₀ cao nhất

**: giá trị IC₅₀ thấp nhất

—: không tìm được giá trị IC₅₀

Qua kết quả giá trị IC₅₀ của EPS thu từ các môi trường khảo sát ở các thời điểm khác nhau, chúng tôi nhận thấy: MT1 thời gian 10, 20 và 40 ngày không xác định được giá

trị IC₅₀ vì trọng lượng EPS ở thời gian này tương đối ít, gây khó khăn cho việc xác định hoạt tính; còn ở 30 ngày, giá trị IC₅₀ cao hơn so với MT2, MT3 nên hoạt tính kháng oxy hoá ở MT1 thấp. Trong khi đó, giá trị IC₅₀ của MT2 ở 40 ngày là 1964,56, thấp nhất so với các khảo sát khác, nên khả năng kháng oxy hoá của EPS thu từ MT2 40 ngày là cao nhất.

Từ các thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy MT2 ở thời điểm 40 ngày cho khối lượng sinh khối, EPS và khả năng bắt gốc tự do ABTS+ tốt nhất. Đây là thời điểm tốt nhất cho nấm phát triển, vừa thu nhiều sinh khối, vừa thu được EPS từ dịch nuôi. Có thể tận dụng hai nguồn chứa nhiều polysaccharide có hoạt tính sinh học, điển hình là khả năng kháng oxy hóa bắt gốc tự do ABTS+. Một vài nghiên cứu của Yang và cộng sự (2005) [16], Sharma và cộng sự (2015) [7] đã cho rằng EPS là những polysaccharide được tiết ra môi trường bên ngoài của nhiều loài vi sinh vật. Và EPS trong *C. sinensis* đã được chứng minh là có chứa nhiều hoạt tính sinh học giá trị như kháng oxy hóa, điều hòa hệ thống miễn dịch, kháng khối u, chống lão hóa... Nghiên cứu của Yan và cộng sự (năm 2013) cho thấy phân đoạn exopolysaccharide thu từ sinh khối nấm và dịch nuôi cấy có khả năng bắt gốc hydroxyl và ABTS cao [16].

4. Kết luận

Trong thành phần môi trường nuôi cấy bổ sung peptone/cao nấm men và môi trường bổ sung nhộng tằm, *C. sinensis* có khả năng phát triển tốt và tăng tổng hợp EPS so với môi trường cơ bản làm đối chứng. Khối lượng EPS thu được và hàm lượng polysaccharide có trong EPS có mối tương quan cao với hoạt tính bắt gốc tự do ABTS+. Môi trường 2 (peptone và cao nấm men) nấm phát triển tốt, cho lượng sinh khối cao (20,32 g/l) và EPS nhiều (2,50 g/l), có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh với thời gian thu nhận 40 ngày.

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, ĐHQG TP.HCM đã hỗ trợ chúng tôi trong suốt thời gian làm nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Angelis Sandra de, *Exopolysaccharide production and antioxidant activity by submerged co-culture of macromycetes and microalgae*, 2009.
- [2] Buenz EJ, Bauer BA, Osmundson TW, Motley TJ, “The traditional Chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects on apoptotic homeostasis”, *Journal of Ethnopharmacology* (96 1-2) (2005) 19.
- [3] Dong CH, Yao YJ, “Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture”, *Journal of Applied Microbiology* (99 3) (2005) 483.
- [4] El-Shamy AR, Nehad EA, *Optimization of polysaccharid production by *Alternaria alternata**, 2010.
- [5] Hsieh C, Wang HL, Chen CC, Hsu TH, Teng MH, “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) (2008) 198.

- [6] Lê Tấn Hưng, Võ Thị Hạnh, Lê Thị Bích Phượng, Trần Thanh Phong, Trương Thị Hồng Vân, Sivichai S., “Nấm côn trùng tại Vườn Quốc gia Cát Tiên: Nguồn tài nguyên quý cho các ứng dụng sinh học”, *Tuyển tập Hội nghị khoa học kỷ niệm 35 năm thành lập Viện Khoa học & Công nghệ Việt Nam*, 2010.
- [7] Lin R, Liu H, Wu S, Pang L, Jia M, Fan K, Jia S, Jia L., “Production and in vitro antioxidant activity of exopolysaccharide by a mutant, *Cordyceps militaris* SU5-08”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 2012, p. 153-157.
- [8] Lo HC, Hsieh C, Lin FY, Hsu TH., “A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* in dong-chongxiacao (dong chong xia cao) and related bioactive ingredients”, *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 3, 2013, p. 16-32.
- [9] Mani Abin, “Evaluation of Mycelial and Exo-polysaccharide production from *Cordyceps militaris*”, *Journal of Applied Sciences and Engineering Research*, 2015, p. 609 - 619, DOI: 10.6088/ijaser.04063
- [10] Phạm Quang Thu, “Phát hiện nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps gunnii* (Berk.) tại Vườn Quốc gia Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 2009.
- [11] Shashidhar, M.G, “Bioactive principles from *Cordyceps sinensis*: A potent food supplement – A review”, *Journal of Functional Foods*, 2013.
- [12] Sharma S K, Gautam N and Atri N S ., *Optimization, composition and antioxidant activities of exo- and intracellular polysaccharides in submerged culture of Cordyceps gracilis (Grev.)*, Durieu & Mont, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015 (8).
- [13] Lương Bảo Uyên, Trần Quốc Tuấn, Trình Mai Duy Lưu và Ngô Đại Nghiệp, *Thực tập chuyên ngành Sinh Hóa*, 2015, NXB ĐHQG TP Hồ Chí Minh, TP Hồ Chí Minh.
- [14] Yan J, Wang WQ, Ma H and Wu J., *Sulfation and enhanced antioxidant capacity of an exopolysaccharide produced by the medicinal fungus Cordyceps sinensis*, *Molecules*, 2013 (18 1) 167-177.
- [15] Yang FC, Ke YF, Kuo SS., *Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by Garnoderma lucidum in shake flask cultures*, *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, (27 3-5) 295.
- [16] Yang J, Zhang W, P. Shi P, Chen J, Han X and Wang Y., *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*, 2005 (201 11) 745-750.
- [17] Zhong S, Pan H, Fan L, Lv G, Wu Y, Parmeswaran B, Pandey A, Soccol CR., *Advances in research of polysaccharides in Cordyceps species*, *Food Technology and Biotechnology*, 2005, 47, p. 304–312.

(BBT nhận bài: 27/03/2017, hoàn tất thủ tục phản biện: 26/05/2017)