Nghiên cứu khả năng hấp thu selenium của nấm *Ophiocordyceps sinensis* trong nuôi cấy lỏng

- **Trần Minh Trang**
- **Phạm Tiến Dũng**

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG - HCM

- **Lê Quốc Phong**

Viện Sinh học nhiệt đới TP.HCM

- **Đinh Minh Hiệp**

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

(Bài nhận ngày 19 tháng 09 năm 2016, nhận đăng ngày 21 tháng 11 năm 2016)

TÓM TẮT

Ophiocordyceps sinensis (Đông trùng hạ thảo) là một loài nấm dược liệu có giá trị cao trong y học cổ truyền và hiện đại. Bên cạnh đó, selenium (Se) là một nguyên tố vi lượng thiết yếu trong cơ thể con người. Do vậy, nghiên cứu khả năng hấp thu Se của nấm O. sinensis, từ đó nâng cao dược tính của nó cũng như khả dụng sinh học của Se là vô cùng cấp thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nuôi cấy O. sinensis trên môi trường có bổ sung Se vô cơ 4^+ và 6^+ từ 0–30 mg/L, sau đó cô lập 3 hợp chất chứa Se bao gồm: selenium-exopolysaccharide (Se-EPS), selenium-polysaccharide (Se-PS) và selenium-protein (Se-Pr). Kết quả cho thấy, nấm O. sinensis phát triển và tích lũy Se tốt trên môi trường Se^{6+} 25 mg/L với sinh khối và hàm lượng Se đạt lần lượt là 14,52 ± 0,82 g/L và 1644,83 ± 116,45µg/g. Trong đó, thành phần Se có trong các hợp chất hữu cơ Se-EPS, Se-PS và Se-Pr tương ứng là 568,84 ± 12,86 µg/g, 429,68 ± 22,17µg/g và 443,19 ± 18,48µg/g. Hơn thế nữa, kết quả phân tích phổ hồng ngoại FT-IR của chúng xác định có sự hiện diện của các dao động giãn Se=O và C-O-Se ở những đỉnh hấp thu đặc trưng. Do vậy, những kết quả này chứng tỏ O. sinensis có khả năng chuyển hóa Se vô cơ thành dạng Se hữu cơ trong quá trình phát triển của chúng, tạo tiền đề cơ sở khoa học cho những nghiên cứu sâu hơn về những hoạt chất giàu Se có trong nấm O. sinensis.

***Từ khóa**: Ophiocordyceps sinensis, phổ hồng ngoại FT-IR, selenium-exopolysaccharide, selenium-polysaccharide, selenium-protein*

MỞ ĐẦU

Selenium (Se) là một trong những nguyên tố vi lượng thiết yếu cho con người, có ý nghĩa sinh học to lớn. Se là thành viên nhóm VIA trong bảng hệ thống tuần hoàn và như vậy có tính chất hóa học gần giống như lưu huỳnh (S). Vì vậy, thực vật và nấm có thể thay thế Se cho S trong sinh tổng hợp methionine tạo thành selenomethionine (SeMet). SeMet có thể được chuyển hóa thành selenocysteine (SeCys) và các chất chuyển hóa của nó. Ở người, Se là thành phần của selenoprotein và một số enzyme như glutathione perxosidase (GSH-Px), dehydrogenase, thioredoxin reductase và iodothyronine deiodinase… chúng có chức năng sinh lý quan trọng như kháng oxy hóa, kháng ung thư, tăng cường miễn dịch, ức chế HIV và chống

lão hóa… [1] Sự thiếu hụt Se có liên quan đến một số bệnh như Kashin-Beck, Keshan và ung thư.

Gần đây, hợp chất Se thu hút được sự chú ý rộng rãi bởi hoạt tính sinh học quan trọng của chúng. Độc tố và dược tính của một số hợp chất Se đã được nghiên cứu nhiều và kết quả cho thấy hình thức tồn tại của Se là rất quan trọng. Các hợp chất Se hữu cơ (như SeMet và methylselenocysteine) tốt hơn và an toàn hơn so với Se vô cơ (như selenate hoặc selenite) và có thể được sử dụng để bổ sung thích hợp trong khẩu phần ăn của con người nhằm nâng cao sức khỏe hay điều trị một số bệnh liên quan. Do vậy, việc bổ sung Se trong nuôi cấy vi sinh vật đã thu hút nhiều sự chú ý của các nhà khoa học trên thế giới nhằm chuyển hóa Se vô cơ thành Se hữu cơ.

Nhiều báo cáo về nuôi trồng nấm men và nấm lớn như *C. militaris*, *G. lucidum*… trên môi trường dinh dưỡng giàu Se như selenite (Na_2SO_3), để chuyển hóa thành dạng Se hữu cơ dưới dạng Se-PS hay Se-Pr đã được công bố. Kết quả nghiên cứu của Zhao và cộng sự (2004) cho thấy, *G. lucidum* có thể chuyển hóa selenite vô cơ trong cơ chất thành Se hữu cơ dưới dạng protein (56–61%) và polysaccharide (11–18 %) và các thành phần khác [16]. Dong và cộng sự (2012) đã chứng minh Se có thể nâng cao chất lượng của protein, chất béo, carbohydrate, khoáng chất, polysaccharide, mannitol, amino acid, cordycepin và adenosine của *C. militaris*, tuy nhiên cơ chế tác động của Se vẫn chưa được hiểu rõ [1].

Ophiocordyceps sinensis (tên thường gọi là Đông trùng hạ thảo) là một loài nấm dược liệu quý hiếm, được biết đến trong y học cổ truyền Trung Quốc cách đây hơn 700 năm. Nghiên cứu hiện đại đã chứng minh, *O. sinensis* có nhiều hoạt tính sinh học đáng quý như kháng oxy hóa, tăng cường và điều hòa hệ thống miễn dịch, giảm cholesterol trong máu, giảm đường huyết, kháng ung thư và chống di căn… Những tác dụng có lợi đó là do có sự đa dạng về thành phần các hợp chất có hoạt tính sinh học như adenosine, cordycepin, polysaccharide, amino acid và các nguyên tố vi lượng… Tuy nhiên, hoạt động khai thác quá mức và phá hủy môi trường sống của con người cũng như do sự biến đổi khí hậu đã làm cho nguồn *O. sinensis* trở nên khan hiếm và có nguy cơ tuyệt chủng [7]. Do vậy, giải pháp khả thi và bền vững để sản xuất nấm dược liệu quý hiếm này là công nghệ nuôi cấy sợi nấm *O. sinensis* trên môi trưởng lỏng.

Chính vì lẽ đó, các nhà khoa học muốn biết: liệu rằng *O. sinensis* có thể được sử dụng như một đối tượng tích lũy hiệu quả Se trong nuôi cấy nhân tạo hay không? Nếu loài nấm dược liệu quý này có thể chuyển hóa Se từ dạng vô cơ trong môi trường thành dạng hữu cơ tích lũy trong cơ thể nấm, thì *O. sinensis* giàu Se sẽ trở thành một nguồn bổ sung Se trong khẩu phần ăn khi nó sở hữu những tác dụng đáng quý cho cơ thể con người. Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định khả năng hấp thu Se của nấm *O. sinensis* và thu nhận các hợp chất Se hữu cơ bao gồm: polysaccharide ngoại bào chứa Se (Se-exopolysaccharide), polysaccharide nội bào chứa Se (Se-polysaccharide) và protein chứa Se (Se-protein) có trong nấm *O. sinensis* giàu Se.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

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

Nuôi cấy *O. sinensis* trên môi trường giàu Se

Chủng nấm *O. sinensis* được hoạt hóa trên môi trường PGA (khoai tây 200 g/L, glucose 20 g/L và agar 15 g/L) trong 10-15 ngày ở 25 ^{0}C, sau đó chuyển 2 khoanh giống (Ø = 1 cm) vào 200 mL môi trường PG (khoai tây 200 g/L, glucose 20 g/L) ủ ở 25 ^{0}C trong 7 ngày. Tiếp theo, giống được chuyển sang môi trường lỏng (khoai tây 200 g/L, saccharose 50 g/L, KH_2PO_4 5 g/L, $MgCl_2.3H_2O$ 1 g/L và $Na_2SeO_3.5H_2O$/$Na_2SeO_4.12H_2O$ với nồng độ Se^{4+}/Se^{6+} từ 0–30 mg/L) theo tỷ lệ 1:12,5 (v/v), ủ ở 25 ^{0}C trong 40 ngày.

Xác định đường kính sợi nấm

Nhỏ 1 giọt nước lên lame kính, sau đó tách sợi nấm đặt lên trên và tiến hành đo đường kính sợi nấm bằng phương pháp quan sát trắc vi thị kính (vật kính 100 X).

Thu nhận sinh khối nấm

Sinh khối nấm được tách ra khỏi dịch nuôi cấy bằng cách cho qua rây nhựa và rửa sạch dưới vòi nước nhằm loại bỏ Se còn lại trong môi trường bám vào. Sau đó, nấm được sấy khô ở 60 ^{0}C đến trọng lượng không đổi và xác định khối lượng khô của sinh khối nấm.

Phân tích hàm lượng Se

Hàm lượng Se có trong sinh khối được xác định bằng phương pháp phổ hấp thu nguyên tử với bộ hydride hóa HG-AAS [4].

Thu nhận các hợp chất selenium hữu cơ

Thu nhận Se-exopolysaccharide (Se-EPS). Dịch nuôi cấy nấm được thu nhận bằng cách lọc qua giấy lọc Whatman, cô đặc và tủa với ethanol theo tỷ lệ 1:4 (v/v) ở 4 ^{0}C trong 24 h. Rửa tủa với ethanol, acetone và ether, sau đó đông khô. Sử dụng HG-ASS để xác định hàm lượng Se có trong tủa và nhóm chức đặc trưng bằng phổ hồng ngoại FTIR [13].

Thu nhận Se-polysaccharide (Se-PS)

20 g bột nấm được chiết với 2 lần nước ở 60 ^{0}C theo tỷ lệ 1:30 (w/v) trong 3 h. Thu nhận dịch chiết, cô đặc và loại protein bằng TCA. Dịch nổi được tủa với ethanol theo tỷ lệ 1:4 (v/v). Ly tâm và rửa tủa nhiều lần với ethanol, acetone, và ether, đông khô tủa. Xác định hàm lượng Se bằng HG-AAS và nhóm chức đặc trưng bằng phổ hồng ngoại FTIR [9].

Thu nhận Se-protein (Se-Pr)

10 g bột nấm được chiết 2 lần với NaOH 0,25M ở 50 ^{0}C theo tỷ lệ 1:10 (w/v) trong 4 h. Dịch chiết được thu nhận và tủa với $(NH_4)_2SO_4$ (95 % bão hòa) ở 4 ^{0}C trong 12 h. Tủa được thu nhận bằng ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó, hòa tủa với 5 mL đệm Tris-HCL (pH 8,0), và thực hiện thẩm tách với Tris-HCl (pH 8,0) trong 24 h. Hàm lượng Se được xác định bằng HG-AAS và nhóm chức đặc trưng bằng phổ hồng ngoại FTIR. [9].

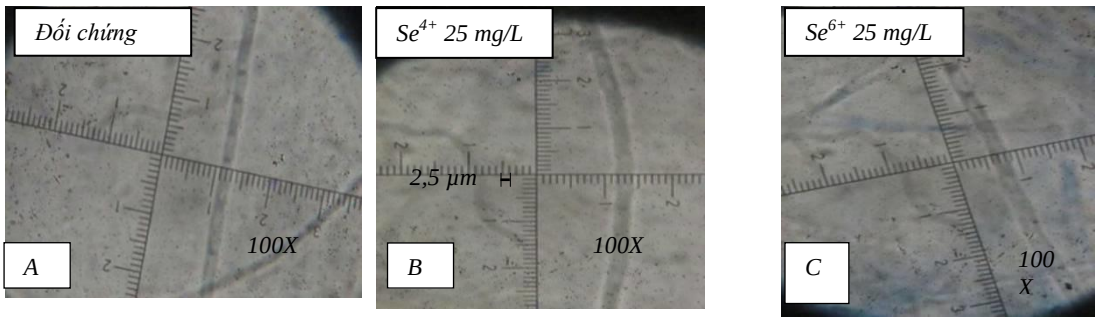
Phân tích dữ liệu

Tất cả các dữ liệu được phân tích ANOVA đơn yếu tố (one-way) bằng phần mềm thống kê SPSS. 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.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

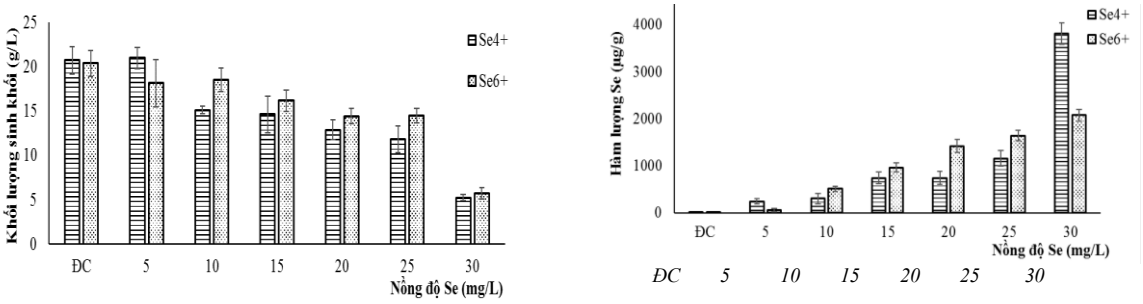
Hình thái và đường kính sợi nấm

Khi quan sát sợi nấm dưới kính hiển vi, chúng tôi nhận thấy hình thái và đường kính sợi nấm ở các nghiệm thức chứa Se không có sự khác biệt so với mẫu đối chứng (Hình 1). Tất cả các sợi nấm không có vách ngăn, không phân nhánh, thuôn đều, và đặc biệt không đứt gãy hay phình to bất thường. Đường kính các sợi nấm khoảng 5-7,5 µm. Kết quả này chứng minh, Se không ảnh hưởng đến đường kính và hình thái sợi nấm trong quá trình sinh trưởng và phát triển của nấm *O. sinensis.*



Hình 1. Hình thái và đường kính sợi nấm dưới kính hiển vi trắc vi thị kính (vật kính 100X)

A. Đối chứng B. Se^{4+} 25 mg/L C. Se^{6+} 25 mg/L



Hình 2. Tác động của Se đến sự phát triển của nấm *O. sinensis*

Sự ảnh hưởng của Se đến sự phát triển của nấm *O. sinensis*

Se là một nguyên tố vi lượng cần thiết cho cơ thể nấm, tuy nhiên, nó sẽ trở thành một yếu tố gây độc cho nấm khi ở nồng độ cao trong môi trường. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát hai loại Se vô cơ ($Na_2SeO_3.5H_2O$ và $Na_2SeO_4.12H_2O$) với nồng độ từ 0 – 30 mg/L.

Kết quả cho thấy, Se có ảnh hưởng đáng kể đến sự sản xuất sinh khối của nấm *O. sinensis* khi nồng độ càng tăng ($p < 0,05$), đặc biệt ở nồng độ Se 30 mg/L hiệu suất thu nhận sinh khối giảm khoảng 80 % so với đối chứng (Hình 2). Hơn thế nữa, khi tăng nồng độ Se lớn hơn 40 mg/L, *nấm O. sinensis* bị ức chế hoàn toàn.

So sánh mức độ gây độc của hai loại Se vô cơ đối với nấm *O. sinensis*, thông qua kết quả hiệu suất thu nhận sinh khối và hàm lượng Se có trong nấm đã chứng minh Se^{4+} có độc tính cao hơn so với Se^{6+}. Cụ thể, ở nồng độ 25 mg/L, nghiệm thức Se^{6+} cho sinh khối và hàm lượng Se tương ứng là 14,52 ± 0,82 g/L và 1644,83 ± 116,45 µg/g, trong khi đó, nghiệm thức Se^{4+} chỉ đạt lần lượt là 11,85 ± 1,52 g/L và 1159,65 ± 169,58 µg/g. Sự khác biệt này là do con đường chuyển hóa của hai loại Se này trong cơ thể nấm là không giống nhau. Mapelli và cộng sự (2012) chứng minh Se hấp thu vào cơ thể vi sinh vật nhờ vào hệ thống sulfate permease [10]. Do đó, con đường vận chuyển selenate (SeO_4^{2-}) tương tự như sulfate (SO_4^{2-}) bằng kênh vận chuyển chủ động sulfate-proton; trong khi, selenite (Se^{4+}) được vận chuyển vào trong cơ thể theo cách tự phát dựa vào GSH (glutathione) [8, 12]. Tuy nhiên, khả năng chuyển hóa thành các dạng Se hữu cơ của hai loại Se này trong nấm *O. sinensis* vẫn chưa được sáng tỏ. Như vậy, qua thí nghiệm này chúng tôi kết luận, nấm *O. sinensis* có khả năng thích nghi trên môi trường giàu Se, đặc biệt ở nồng độ 25 mg/L là thích hợp nhất cho nấm phát triển và tích lũy Se.

Thu nhận các hợp chất Se hữu cơ

Để đánh giá mức độ chuyển hóa Se của nấm *O. sinensis* từ hai loại Se vô cơ trên, chúng tôi tiến hành cô lập ba hợp chất hữu cơ chính có chứa Se bao gồm: Se-EPS, Se-PS và Se-Pr. Bảng 1 cho thấy, hàm lượng ba hợp chất hữu cơ thu được từ hai nghiệm thức chứa Se 25 mg/L đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (với $p<0,05$). Trong đó, nghiệm thức Se^{6+} cho hiệu suất thu nhận Se-EPS và Se-PS đạt cao nhất lần lượt là 1,46 g/L và 8,96 (g/100g). Điều này chứng tỏ Se đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa và kích thích sinh tổng hợp các hợp chất hữu cơ như: polysaccharide, protein và amino acid … ở nấm *O. sinensis*, đặc biệt là dạng Se^{6+} [1]. Đây được xem là một trong những cơ chế giúp nấm *O. sinensis* thích nghi tốt trên môi trường giàu Se vô cơ.

Bảng 1. Hàm lượng các hợp chất Se hữu cơ trong nấm *O. sinensis*

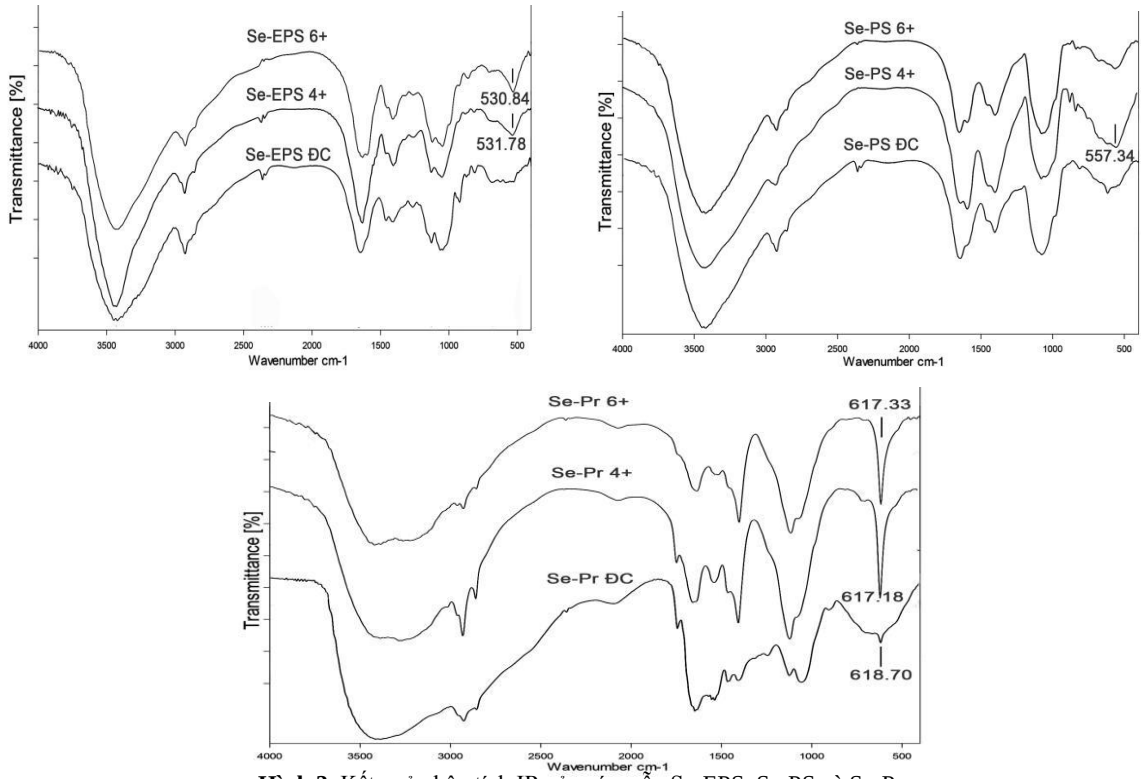
Lô	Hợp chất Se hữu cơ					
	Se-EPS		Se-PS		Se-Pr	
	Hiệu suất (g/L)	Hàm lượng Se (µg/g)	Hiệu suất (g/100g)	Hàm lượng Se (µg/g)	Hiệu suất (g/100g)	Hàm lượng Se (µg/g)
Đc	1,28 ± 0,17	0,84 ± 0,04	7,67 ± 1,59	0,33 ± 0,01	11,67 ± 1,45	0,48 ± 0,03
Se^{4+} (25 mg/L)	1,32 ± 0,67	448,03 ± 27,69	7,70 ± 0,86	381,05 ± 19,55	8,34 ± 2,03	576,26 ± 39,76
Se^{6+} (25 mg/L)	1,46 ± 0,41	568,84 ± 12,86	8,96 ± 1,35	429,68 ± 22,17	9,16 ± 1,27	443,19 ± 18,48

Đồng thời, hàm lượng Se có trong các hợp chất hữu cơ ở hai lô có bổ sung Se 25 mg/L cũng cao hơn so với đối chứng. Đáng chú ý, hàm lượng Se có trong Se-EPS và Se-PS ở lô Se^{6+} đều cao hơn lô Se^{4+} lần lượt là khoảng 1,3 lần và 1,1 lần, ngoại trừ Se-Pr. Kết quả này chứng minh, nấm *O. sinensis* có khả năng chuyển hóa Se vô cơ 6+ tốt hơn so với Se vô cơ 4+ để tạo thành các dạng hợp chất hữu cơ chứa Se có khả dụng sinh học cao hơn.

Phân tích FT-IR

Quang phổ FT-IR của các mẫu Se-EPS, Se-PS và Se-Pr trong khoảng độ dài sóng 4000 – 400 cm^{-1} được thể hiện ở Hình 3.

Nhìn chung, các mẫu đều có khoảng độ dài sóng 3500–3200 cm^{-1} và 3000–2800 cm^{-1} lần lượt là dao động giãn O-H và C-H. Dải sóng từ 1300–400 cm^{-1} thường được xác định là của các nhóm chức hóa học chính của polysaccharide hay protein:[2, 11].



Hình 3. Kết quả phân tích IR của các mẫu Se-EPS, Se-PS và Se-Pr

Đối với các mẫu Se-EPS và Se-PS ở Hình 3A - 3B, phổ hồng ngoại FT-IR cho thấy các polysaccharide có đặc điểm cấu trúc gần tương đồng nhau. Cụ thể, dải 1200–900 cm^{-1} đặc trưng dao động dãn đối xứng và bất đối xứng của liên kết glycosidic C-O-C và vùng 1100-1000 cm^{-1} là đặc điểm cho sự hiện diện của β-glucane. Ngoài ra, dải 1650-1620 cm^{-1} được đề nghị có sự hiện hiện của protein và nhóm chức thơm C=C cũng như vùng 1410–1400 cm^{-1} có sự xuất hiện nhóm OH của hợp chất phenolic [5, 6, 11]. Đáng chú ý, mẫu Se-PS 4+ và 6+ có đỉnh hấp thu tại 836 và 838 cm^{-1} đánh dấu sự hiện diện của dao động giãn Se=O mà mẫu Se-PS đối chứng không xuất hiện. Điều này chứng minh, một phần Se vô cơ được tích lũy ở dạng hợp chất hữu cơ chứa trong polysaccharide nhưng Se vẫn không làm ảnh hưởng đến cấu trúc chính của các phân tử polysaccharide có trong nấm *O. sinensis*.

Tương tự đối với mẫu Se-Pr (Hình 3C) cũng xuất hiện những vùng đặc trưng ở 1650–1620 cm^{-1} và 1410–1400 cm^{-1}. Đặc biệt, mẫu Se-Pr 4+ và 6+ có sự xuất hiện hai đỉnh sóng ở khoảng 1115cm^{-1} và 617 cm^{-1} lần lượt đặc trưng cho dao động giãn Se=O và C-O-Se [3, 14], trong khi đó mẫu Se-Pr đối chứng hấp thu yếu ở hai đỉnh sóng này. Kết quả này chứng tỏ, nấm *O. sinensis* có khả năng chuyển hóa Se vô cơ thành dạng Se hữu cơ dưới dạng Se-protein.

KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu này chứng minh, chủng nấm *O. sinensis* có khả năng chuyển hóa Se vô cơ thành dạng Se hữu cơ tích lũy chủ yếu dưới dạng polysaccharide và protein, trong đó Se^{6+} nồng độ 25 mg/L là thích hợp nhất. Tại nồng độ này, hàm lượng Se trong sinh khối đạt 1644,83 ± 116,45 µg/g cao hơn 1,3 lần so với nghiên cứu của Zheng khi nuôi cấy *C. sinensis* SU-1 trên môi trường chứa 20 mg/L Na_2SeO_3 [16]. Thành phần Se có trong polysaccharide và protein đạt khoảng 400–600 µg/g. Do vậy, dựa vào khuyến cáo sử dụng Se của RDI (Reference Daily Intake) là 55 µg/ngày/người, tương ứng khoảng 90–140 mg Se-EPS, Se-PS hay Se-Pr từ *O. sinensis* là đủ để đáp ứng nhu cầu. Chúng có thể được sử dụng như một nguồn bổ sung Se trong khẩu phần ăn hằng ngày, góp phần nâng cao sức khỏe của con người. Ngoài ra, sự hiện diện của Se sẽ làm tăng đáng kể dược tính vốn có của nấm *O. sinensis* như hoạt tính kháng oxy hóa, kích thích miễn dịch và đặc biệt là kháng ung thư… Từ đó, định hướng phát triển những dòng sản phẩm có giá trị cao trong y học.

Study on the selenium absorptive ability of *Ophiocordyceps sinensis* fungus in liquid cultures

- **Tran Minh Trang**
- **Pham Tien Dung**

University of Science, VNU-HCM

- **Le Quoc Phong**

Institute of Tropical Biology, HCMC, Vietnam

- **Dinh Minh Hiep**

Agricultural Hi-Tech Park of HCMC, Vietnam

ABSTRACT

Ophiocordyceps sinensis is a medicinal mushroom which is highly valued in traditional and modern medicine. Besides, selenium (Se) is an essential trace element in the human body. Therefore, the study on selenium accumulation ability of O. sinensis fungus to improve its bioactivities as well as selenium bioavailability is extremely imperative. In this research, O. sinensis cultured on liquid medium with sodium selenite (Se^{+4}) or sodium selenate (Se^{+6}) at 0–30 mg/L concentrations, then isolated three selenium-containing compounds including selenium-exopolysaccharide (Se-EPS), selenium-polysaccharide (Se-PS) and selenium-protein (Se-Pr). The results showed that the growth and selenium cumulation of O. sinensis at 25 mg/L Se^{6+} were the best with the biomass and selenium levels reached 14.52 ± 0.82 g/L and 1644.83 ± 116.45 µg/g, respectively. Of those, the selenium composition in organic compounds was 568.84 ± 12.86 µg/g in Se-EPS, 429.68 ± 22.17µg/g in Se-PS and 443.19 ± 18.48 µg/g in Se-Pr. Moreover,

the FT-IR analysis of the aforementioned compounds determined the presence of Se=O and C-O-Se stretching vibration at the featured absorption peaks. Consequently, these results have demonstrated that O. sinensis is capable to transform inorganic Se into organic Se forms during its development process. Finally, this study will create premises and scientific basis for the further study on the Se-enriched substances in O. sinensis mushroom.

Keywords*: FT-IR, Ophiocordyceps sinensis, selenium-exopolysaccharide, selenium-polysaccharide, selenium-protein.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. J.Z. Dong, C. Lei, X.R. Ai, Y. Wang, Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* link and analysis on its main active components. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 5, 1215– 1224 (2012).

[2]. G.B. Ding, R.H. Nie, H.L. Lv, G.Q. Wei, L.Q Zhao, Preparation and biological evaluation of a novel selenium-containing exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613. *Carbohydrate Polymers*, 109, 28–34 (2014).

[3]. H. Feng, J. Fan, H. Bo, X. Tian, H. Bao, X. Wang, Selenylation modification can enhance immune-enhancing activity of *Chuanminshen violaceum* polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 153, 302–311 (2016).

[4]. J.L. Ji, L. Juan, L. Haijuan, W. Yueling, Effects of fermented mushroom of *Cordyceps sinensis*, rich in selenium, on uterine cervix cancer. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 1, 1-8 (2014).

[5]. M. Jin, Z. Lu, M. Huang, Y. Wang, Y. Wang, Effects of Se-enriched polysaccharides produced by *Enterobacter cloacae* Z0206 on alloxan-induced diabetic mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 348–352 (2012).

[6]. M. Kozarski, A. Klaus, M. Niks, M.M. Vrvic, N. Todorovic, D. Jakovljevic, V. Griensven, Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26, 144–153 (2012).

[7]. H.C. Lo, H. Chienyan, F.Y. Lin, T.H. Hsu, A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* in DongChongXiaCao and related bioactive ingredients. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 3, 1, 16-32 (2013).

[8]. R. Marco, J. Petru, B. Carlo, Selenium biochemistry and its role for hyman health. *Metallomics*, 1, 6, 25–54 (2014).

[9]. G. Mao, W. Feng, H. Xiao, T. Zhao, F. Li, Y. Zou, Y. Ren, Y. Zhu, L. Yang, X. Wu, Purification, characterization, and antioxidant activities of selenium-containing proteins and polysaccharides in Royal Sun mushroom, *Agaricus brasiliensis* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 16, 5, 463–475 (2014).

[10]. V. Mapelli, P.R. Hillestrøm, K. Patil, E.H. Larsen, L. Olsson, The interplay between sulphur and selenium metabolism influences the intracellular redox balance in *Saccharomyces cerevisiae. FEMS Yeast Research*, 12, 20–32 (2012).

[11]. W.L Shi, H. Han, G.Z. Chen, X. Chen, Y.K. Hong, L.K. Chen, D. Chen and Z. Lu, Extraction, characterization of the polysaccharide extracts from Se-enriched G. lucidum (Se-GLP) and its inhibition against oxidative damage in ischemic reperfusion mice. *Carbohydrate Polymers*, 80, 774–778 (2010).

[12]. A Tazre, M. Dauplais, I. Grigoras, M. Lazard, N.T. Ha Duong, F. Barbier, S. Blanquet, P. Plateau, Extracellular production of hydrogen selenide accounts for thiol-assisted toxicity of selenite against *Saccharomyces*

cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 12, 8759– 8767 (2007).

[13]. T.M. Trang, H. Thu, L.T.T. Hang, D.M. Hiep, Extraction of exo-polysaccharide from the culture fluid *Cordyceps sinensis* and its effects on proliferation of the PBMCs. *Journal of Science and Technology*, 53, 6B, 72–81 (2015).

[14]. J. Wang, B. Zhao, X. Wang, J. Yao, J. Zhang, Synthesis of selenium-containing polysaccharides and evaluation of antioxidant activity in *vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 987–991 (2012).

[15]. S. Yang, H. Zhang, Production of intracellular selenium-enriched polysaccharides from thin stillage by *Cordyceps sinensis* and its bioactivities. *Food and Nutrition Research*, 30153: 30160 vol (2016).

[16]. L. Zheng, L. Hao, H. Ma, C. Tian, T. Li, X. Sun, M. Jia, L. Jia, Production and *in vivo* antioxidant activity of Zn, Ge, Se-enriched mycelia by *Cordyceps sinensis SU-01*. *Current microbiology*, 69, 3, 270–276 (2014).