

KHẢO SÁT MỘT SỐ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC CAO CHIẾT THU ĐƯỢC TỪ SINH KHỐI *Cordyceps militaris* CMT01

Võ Thị Xuyên^{1*}, Phạm Ngọc Châu¹, Hồ Ngọc Gia Hân¹,
 Hồ Văn Thảo², Nguyễn Hoàng Đăng Khoa³, Đinh Minh Hiệp⁴

¹Khoa Công nghệ Ứng Dụng, Trường Đại học Văn Lang, Thành phố Hồ Chí Minh

²Văn phòng Ủy ban nhân dân tỉnh Sóc Trăng - Phòng Nông nghiệp - Tài nguyên

³Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

⁴Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Cordyceps militaris là loài nấm ký sinh côn trùng, phân bố rộng khắp nơi. Nhiều nghiên cứu cho thấy đây là loài nấm có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học cao, được sử dụng tốt cho mục đích thương mại và ứng dụng. Tuy nhiên, ở nước ta hiện chưa có nhiều nghiên cứu đi sâu tìm hiểu về thành phần hoạt chất, hoạt tính sinh học (HTSH) của cao chiết thu được từ sinh khối sợi nấm *C. militaris*. Do vậy, nghiên cứu này tập trung khảo sát một số HTSH của các cao chiết thu được từ sinh khối *C. militaris* CMT01 nhằm tạo cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn, hướng tới ứng dụng cao chiết của nấm này trong việc chăm sóc sức khỏe. Cao chiết ngâm kiệt bằng ethanol 96% (EtOH) từ sinh khối sợi nấm được chiết lỏng - lỏng để thu được cao phân đoạn ether dầu hòa (PE), ethyl acetat (EtOAc), n-butanol (Bu) và nước; Cao polysaccharide (PS) thu được từ bã nguyên liệu sau khi chiết ngâm kiệt bằng ethanol 96%. Kết quả khảo sát cho thấy, cao chiết EtOAc thể hiện khả năng bắt gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) và ABTS⁺ (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) đạt cao nhất với IC₅₀ lần lượt là 728 ± 39,15 µg/mL và 1.244 ± 13,99 µg/mL, cao EtOH có khả năng kháng viêm cao nhất với IC₅₀ đạt 526,09 ± 1,51 µg/mL và cao PS thể hiện khả năng ức chế XO cao nhất với IC₅₀ đạt 22,69 ± 0,72 µg/mL.

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, kháng oxy hóa, kháng viêm, sinh khối sợi nấm, ức chế xanthine oxydase (XO).

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cordyceps là nấm ký sinh trên côn trùng, được sử dụng trong y học Cổ truyền Trung Quốc từ rất lâu. Có nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học (HTSH) được tìm thấy từ *Cordyceps* như adenosine, cordycepin, polysaccharide, sterol, acid amin, vitamin,... Nhiều nghiên cứu cho thấy cao chiết từ sinh khối nấm *Cordyceps* thể hiện đa dạng các HTSH bao gồm: Hoạt tính kháng oxy hóa, kháng tế bào ung thư, điều hòa miễn dịch, kháng khuẩn, kháng viêm,... (Yue *et al.*, 2013). Trong số các loài nấm ký sinh trên côn trùng thì *Ophiocordyceps sinensis* (*Cordyceps sinensis* - Đông trùng hạ thảo) và *Cordyceps militaris* (Nhộng trùng thảo) được nghiên cứu và ứng dụng nhiều nhất. Mặc dù *C. sinensis* là loài được sử dụng như loại dược liệu quý nhưng phân bố rất hạn chế trong tự nhiên và không dễ dàng nuôi cấy trong điều kiện nhân tạo. Trong khi *C. militaris*, phân bố rộng rãi khắp nơi, có hàm lượng các hoạt chất có HTSH tương đương, thậm chí còn cao hơn của loài *C. sinensis*; hơn nữa dễ dàng nuôi trồng trong môi trường nhân tạo (Dong *et al.*, 2012). Do vậy, từ lâu *C. militaris* được sử dụng hiệu quả như là chủng thay thế cho *C. sinensis* trong việc ngăn ngừa và điều trị nhiều loại bệnh (Guo *et al.*, 2016).

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về nuôi cấy thu quả thể và sinh khối sợi nấm từ *C. militaris*; đồng thời, cũng có nhiều nghiên cứu tiến hành xác định các thành phần hoạt chất, HTSH của cao chiết thu được từ quả thể hoặc sinh khối nấm *C. militaris*; từ đó, tạo ra nhiều sản phẩm hỗ trợ sức khỏe. Ở nước ta, đã có các nghiên cứu về nuôi trồng tạo quả thể *C. militaris* (Lê Văn Vê *et al.*, 2015; Nguyễn Minh Đức *et al.*, 2017); về khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ sấy và chế độ ngâm chiết tới sự biến đổi thành phần hóa học và cảm quan của giá thể sau thu hoạch từ *C. militaris* của Nguyễn Thị Thanh Thủy và đồng tác giả (2017). Bên cạnh đó, có một số báo cáo về xây dựng quy trình chiết xuất cordycepin và adenosine từ *C. militaris* (Lê Thị Huyền Trang *et al.*, 2017; Đoàn Thị Phương Thủy *et al.*, 2018). Tuy nhiên, vẫn chưa có nhiều nghiên cứu đi sâu tìm hiểu về thành phần hoạt chất, hoạt tính sinh học của cao chiết thu được từ sinh khối sợi nấm *C. militaris*. Do đó, nghiên cứu này tập trung khảo sát một số HTSH của các cao chiết từ sinh khối *C. militaris*, tạo cơ sở cho những nghiên cứu sâu hơn hướng tới ứng dụng cao chiết từ loài nấm này trong chăm sóc sức khỏe.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng nấm *Cordyceps militaris* CMT01 do Công ty TNHH Nấm sinh học Việt Nam cung cấp.

Môi trường nuôi cấy: Khoai tây 200 g/L, sucrose ($\geq 99,5\%$, Trung Quốc) 60 g/L, pepton ($\geq 98\%$, Trung Quốc) 10 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ($\geq 99\%$, Trung Quốc) 0,655 g/L và pH 6 (Trần Nguyễn Phúc Nhân *et al.*, 2020). Môi trường (Potato Glucose Agar) PGA dùng để cấy truyền và bảo quản giống.

Hóa chất: Ethanol (96%, Việt Nam), PE (petroleum ether, 60-90%, Trung Quốc), EtOAc (ethylacetate, 99,5%, Trung Quốc), BuOH (n-Butanol, 99%, Đức), H_2SO_4 (98%, Trung Quốc), phenol (99%, Trung Quốc), saccharose ($\geq 99,5\%$ Trung Quốc), ABTS⁺ ($\geq 98\%$, Đức), vitamin C ($\geq 98\%$, Việt Nam), DMSO ($\geq 99,9\%$, Trung Quốc), DPPH ($>95\%$, Đức), methanol (99,5%, Trung Quốc), diclofenac (99,8%, Việt Nam), albumin huyết thanh bò ($\geq 98\%$, Đức), K_2HPO_4 (98,5%, Trung Quốc), KH_2PO_4 (99,5%, Trung Quốc), xanthine oxidase ($\geq 99,5\%$, Đức), allopurinol ($>99,5\%$, Đức),...

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị giống

Nuôi cấy *C. militaris* CMT01 trên môi trường PGA và ủ ở nhiệt độ $20 \pm 2^\circ C$. Sau 7 ngày, dùng dụng cụ vô trùng lấy khối thạch (5 mm) có hệ sợi nấm chuyển vào bình tam giác 250 mL có chứa 100 mL môi trường Potato Glucose (PG - khoai tây 200 g, glucose 20 g/l lít nước cất) vô trùng, nuôi cấy ở $20 - 25^\circ C$ trong 7 ngày. Tiến hành đồng nhất dịch nuôi cấy bằng que vô trùng trước khi đưa vào môi trường nuôi cấy.

Nuôi cấy và thu sinh khối sợi nấm

Sử dụng phương pháp nuôi cấy bề mặt trong điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh. Giống sau khi được chuẩn bị, tiến hành chuyển 6% dịch giống vào các hộp 500 mL có chứa 200 mL môi trường nuôi cấy (Trần Nguyễn Phúc Nhân *et al.*, 2020) đã được vô trùng. Ủ nuôi trong tối, ở $25^\circ C$. Sau 42 ngày, thu sinh khối sợi nấm bằng cách lọc qua giấy lọc Whatman No.1, rửa với nước cất, đem sấy ở $60 - 70^\circ C$ đến trọng lượng không đổi. Thí nghiệm bố trí 10 lít (50 hộp), lặp lại ít nhất 3 lần.

Thu nhận cao chiết từ sinh khối nấm

Chiết phân đoạn để thu nhận cao chiết được thực hiện theo Nguyễn Kim Phi Phụng (2007). Bột sinh khối *C. militaris* CMT01 được chiết ngâm kiệt với EtOH 96%, sau đó cô cạn dịch chiết bằng thiết bị cô quay Eyela SB1000 ở $55^\circ C$; khi đã bay hơi hầu hết dung môi, tiếp tục đem sấy trong tủ Memmert ở $55^\circ C$ cho đến khi bay hơi hết dung môi, thu được cao EtOH (cao tổng). Cao EtOH tiếp tục được chiết phân đoạn bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng với các dung môi PE, EtOAc, BU và nước; cô quay để thu được cao PE, cao EtOAc, cao BU và cao nước. Bã nguyên liệu lại được chiết kiệt với nước nóng ở nhiệt độ $65^\circ C$, rửa dịch chiết với cồn 96% theo tỷ lệ 1:4 thu được cao PS.

Định lượng một số hợp chất

Định lượng polysaccharide dựa trên phản ứng màu đặc trưng bởi đường với sự hiện diện của phenol và acid sulfuric đậm đặc. Đo độ hấp thụ màu của dung dịch ở bước sóng 490 nm (Nielsen, 2009). Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Định lượng adenosine và cordycepin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) tại Trung tâm Kiểm nghiệm TSL - Công ty TNHH Khoa học TSL.

Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa (KOH)

Khả năng bắt gốc tự do DPPH: Các chất KOH có khả năng trung hòa DPPH tự do tạo thành sản phẩm khử DPPH-H, dung dịch chuyển từ màu tím sang màu vàng cam, đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 517 nm. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần (Zheng *et al.*, 2008).

Khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺: Các hợp chất có tính KOH tác dụng với dung dịch chứa ABTS⁺, ABTS⁺ sẽ bị khử thành dạng không màu ABTS - R⁺ làm giảm giá trị hấp thụ tại bước sóng 734 nm. Dựa vào tính chất này để xác định khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ của mẫu phân tích. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần (Mamta *et al.*, 2015).

Khảo sát khả năng kháng viêm

Hoạt tính kháng viêm được thực hiện dựa trên khảo sát ức chế biến tính albumin trong *in vitro* của Trần Quốc Tuấn và đồng tác giả (2014) với diclofenac là chứng dương. Cao chiết được xác định khả năng kháng viêm thông qua hoạt động ức chế sự biến tính protein khi giữ hỗn hợp phản ứng ở $67^\circ C$ trong 3 phút. Mẫu được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 660 nm. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Khảo sát hoạt tính ức chế XO

XO xúc tác quá trình oxy hóa hypoxanthine thành xanthine và oxy hóa xanthine thành uric acid, đồng thời hình thành gốc tự do $O_2^{\cdot -}$. Uric acid có bước sóng hấp thụ cực đại tại 290 nm. Nếu mẫu thử có khả năng kháng XO càng cao sẽ hạn chế sự hình thành uric acid, do đó sẽ giảm giá trị mật độ quang. Mẫu có chất thử được so sánh với mẫu không có chất thử để đánh giá tác dụng ức chế XO của chất thử. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần (Huỳnh Thu *et al.*, 2017).

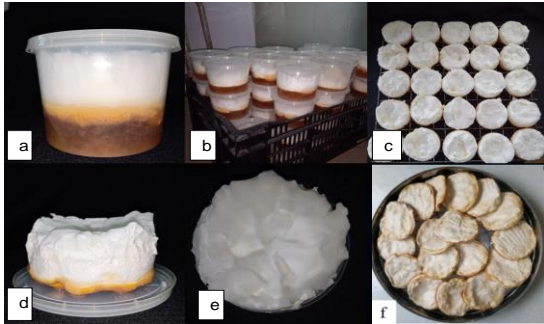
Xử lý số liệu

Các kết quả được lặp lại và tính giá trị trung bình. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2016 và SPSS 20.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu nhận sinh khối sợi nấm

Nấm *C. militaris* CMT01 được nuôi cấy trong môi trường lỏng tĩnh. Sau 42 ngày, tiến hành thu nhận sinh khối sợi nấm. Lượng sinh khối khô thu được từ 1 lít và 54 lít môi trường nuôi cấy là 23,75 g và 1.260 g. Lượng sinh khối nấm này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo về chiết cao để thử nghiệm các hoạt tính sinh học.



Hình 1. Sinh khối của *C. militaris* CMT01 sau 42 ngày nuôi cấy

a, b: *C. militaris* CMT01 trong môi trường lỏng sau 42 ngày nuôi cấy;
c, d: sinh khối tươi sau thu hoạch;
e: mặt trên của sinh khối tươi; f: sinh khối khô sợi nấm

Trích ly và thu nhận cao chiết

Sử dụng ethanol 96% để chiết xuất và thu cao tổng từ sinh khối sợi nấm *C. militaris* CMT01. Kết quả cho thấy hàm lượng cao EtOH thu được đạt $13,36 \pm 0,58\%$ (Bảng 1). Từ cao EtOH, tiếp tục chiết phân đoạn bằng các loại dung môi có độ phân cực tăng dần như PE, EtOAc, BU và nước để thu được các cao tương ứng. Kết quả cho thấy, hàm lượng cao PE đạt $7,98 \pm 0,29\%$, hàm lượng cao nước đạt $3,46 \pm 0,15\%$, hàm lượng cao Bu đạt $2,16 \pm 0,10\%$ và thấp nhất là hàm lượng cao EtOAc chỉ với $0,31 \pm 0,01\%$. Điều này chứng tỏ, sinh khối nấm *C. militaris* CMT01 có chứa nhiều hợp chất không phân cực, chứa ít hợp chất có độ phân cực trung bình. Hàm lượng cao PS thu được sau trích ly đạt $15,36 \pm 0,71\%$, cao này chứa các hợp chất có khả năng hòa tan tốt trong nước.

Bảng 1. Hàm lượng cao chiết thu được từ sinh khối *C. militaris* CMT01

STT	Loại cao	Hàm lượng cao (%)	Độ ẩm (%)
1	EtOH	$13,36 \pm 0,58$	1,03
2	PE	$7,98 \pm 0,29$	1,06
3	Cao phân đoạn	EtOAc	$0,31 \pm 0,01$
4		Bu	$2,16 \pm 0,10$
5		Nước	$3,46 \pm 0,15$
6	Cao PS	$15,36 \pm 0,71$	2,08

Ghi chú: Hàm lượng cao EtOH, cao PS tính theo nguyên liệu và các cao phân đoạn tính theo cao EtOH từ *C. militaris* CMT01

Định lượng một số hợp chất

Tiến hành xác định các hợp chất chính có HTSH như adenosine, cordycepin và polysaccharide từ sinh khối *C. militaris* CMT01 và các mẫu cao chiết. Kết quả định lượng được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2 cho thấy, hàm lượng polysaccharide từ sinh khối khô đạt $72,91 \pm 3,52$ mg/g. Trong số các cao chiết, hàm lượng polysaccharide đạt cao nhất là cao BU ($866,28 \pm 41,16$ mg/g), kế đến là cao PS ($810,47 \pm 38,52$ mg/g); cao PE có hàm lượng polysaccharide đạt mức thấp nhất. Bảng trên cũng cho thấy, sinh khối sợi nấm và cao EtOH có chứa adenosine và cordycepin. Trong đó, hàm lượng adenosine của cao EtOH đạt 684 ± 33 mg/kg, gấp khoảng 2,5 lần so với sinh khối sợi nấm (267 ± 12 mg/kg). Tương tự, hàm lượng cordycepin của cao EtOH ($43,712 \pm 1,01$ mg/kg) gấp khoảng 4,1 lần so với sinh khối khô ($10,460 \pm 140$ mg/kg). Khi so với nghiên cứu của Huang và đồng tác giả (2015) về hàm lượng cordycepin (50 mg/kg) và adenosine (2,560 mg/kg) từ *C. militaris* cho thấy mẫu sinh khối nấm này có hàm lượng adenosine cao hơn nhiều lần nhưng hàm lượng cordycepin lại thấp hơn rất nhiều so với mẫu sinh khối *C. militaris* CMT01. Trong công bố khác, Chiang và đồng tác giả (2017) đã chỉ ra hàm lượng cordycepin và adenosine của sinh khối *C. militaris* đạt lần lượt là 3,970 mg/kg và 950 mg/kg; qua đó cho thấy, hàm lượng cordycepin thu được từ sinh khối *C. militaris* CMT01 là cao hơn nhưng hàm lượng adenosine lại có phần thấp hơn. Sự khác biệt này có thể do chủng sử dụng trong nuôi cấy, thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy...

Bảng 2. Hàm lượng polysaccharid, adenosin và cordycepin trong các mẫu khảo sát

Mẫu khảo sát	Polysaccharide (mg/g)	Adenosine (mg/kg)	Cordycepin (mg/kg)
Sinh khối khô	72,91 ± 3,52 ^a	267 ± 12 ^a	10.460 ± 140 ^a
Cao EtOH	736,32 ± 35,62 ^e	684 ± 33 ^b	43.712 ± 1.01 ^b
Cao PE	485,55 ± 21,28 ^b	-	-
Cao EtOAc	675,15 ± 32,15 ^d	-	-
Cao Bu	866,28 ± 41,16^g	-	-
Cao nước	590,29 ± 27,51 ^c	-	-
Cao PS	810,47 ± 38,52 ^f	-	-

Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị TB ± ĐLC để đánh giá sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$; (-) không thực hiện khảo sát.

Khả năng bắt gốc tự do DPPH và ABTS⁺

Khả năng bắt gốc tự do DPPH, ABTS⁺ được dựa trên độ hấp thụ cực đại tại bước sóng 517 nm và 734 nm với chứng dương là vitamin C, cao PS không tan trong MeOH nên không tiến hành khảo sát khả năng bắt gốc tự do DPPH. Kết quả được thể hiện bằng giá trị IC₅₀ (Bảng 3).

Bảng 3. Khả năng bắt gốc tự do DPPH và ABTS⁺ của các cao chiết từ sinh khối *C. militaris* CMT01

Mẫu cao chiết	Giá trị IC ₅₀ DPPH (µg/mL)	Giá trị IC ₅₀ ABTS ⁺ (µg/mL)
Cao EtOH	911 ± 7,07 ^b	3,356 ± 81,66 ^e
Cao PE	3,703 ± 27,56 ^d	5,838 ± 113,47 ^f
Cao EtOAc	728 ± 39,15 ^a	1,244 ± 13,99 ^a
Cao Bu	700 ± 14,60 ^a	1,518 ± 6,53 ^b
Cao nước	1,030 ± 12,15 ^c	2,965 ± 47,68 ^d
Cao PS	-	1,795 ± 34,83 ^c
Vitamin C (chứng dương)	4,67 ± 0,04	99,51 ± 0,18
DMSO 5% (chứng âm) có phần trăm ức chế I(%)	0,72 ± 0,003%	0,32 ± 0,002%

Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị TB ± ĐLC để đánh giá sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$; (-) không thực hiện khảo sát.

Kết quả từ Bảng 3 cho thấy, tất cả các mẫu cao đều có khả năng bắt gốc tự do DPPH. Trong đó, cao Bu và cao EtOAc có khả năng bắt gốc tự do DPPH mạnh nhất với giá trị IC₅₀ nhỏ nhất lần lượt là 700 ± 14,60 µg/mL và 728 ± 39,15 µg/mL. Trong khi cao PE có giá trị IC₅₀ lớn nhất (3.703 ± 27,56 µg/mL), nghĩa là khả năng bắt gốc tự do DPPH kém nhất. Kết quả cũng cho thấy cao EtOH và cao nước có thể hiện khả năng bắt gốc tự do DPPH nhưng ở mức không cao. Tương tự, khi khảo sát khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺, nhận thấy cao EtOAc có khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ mạnh nhất với IC₅₀ là 1.244 ± 13,99 µg/mL, kế đến là cao Bu (1.518 ± 6,53 µg/mL) và thấp nhất là cao PE (5.838 ± 113,47 µg/mL).

Nhìn chung, các cao chiết từ sinh khối nấm *C. militaris* CMT01 đều có khả năng KOH ở cả hai phương pháp thử nghiệm tuy mức độ khác nhau. Trong đó cao EtOAc và cao Bu có giá trị IC₅₀ nhỏ hơn so với các cao chiết còn lại, tức là khả năng KOH mạnh hơn; chứng tỏ hai phân đoạn này có chứa các hợp chất có khả năng KOH cao.

Kết quả đạt được có phần tương đồng với một số công bố; trong đó, cao chiết nước từ hệ sợi của *C. militaris* (Kim *et al.*, 2015), cao chiết nước và các cao EtOH từ *C. sinensis* (Mamta *et al.*, 2015) thể hiện được khả năng bắt gốc tự do DPPH và ABTS⁺. Hơn nữa, khi so sánh với nghiên cứu của Won và Park (2005) về khả năng bắt gốc tự do DPPH, thì mẫu cao EtOH 70% từ sợi nấm *C. militaris* (IC₅₀ là 26 mg/mL) thấp hơn nhiều so với mẫu cao EtOH từ *C. militaris* CMT01. Tuy nhiên, cao nước từ *C. militaris* CMT01 lại có hoạt tính bắt gốc tự do DPPH (IC₅₀ là 1.030 ± 12,15 µg/mL) thấp hơn so với cao nước từ hệ sợi của *C. militaris* (IC₅₀ là 318 ± 0,021 µg/mL) (Kim *et al.*, 2015) và cao nước từ *C. pseudomilitaris* DL0015 (IC₅₀ là 362,71 ± 4,70 µg/mL) (Xuyến *et al.*, 2018).

Khả năng kháng viêm

Các mẫu cao chiết được khảo sát khả năng ức chế biến tính albumin dưới tác dụng của nhiệt độ. Kết quả khảo sát được thể hiện qua Bảng 4.

CÔNG NGHỆ HÓA SINH VÀ PROTEIN

Bảng 4. Khả năng kháng viêm của các cao chiết từ sinh khối *C. militaris* CMT01

Mẫu cao chiết	IC ₅₀ (µg/mL)
Cao EtOH	526,09 ± 1,51 ^a
Cao PE	949,96 ± 18,86 ^b
Cao EtOAc	1.283,67 ± 31,52 ^d
Cao Bu	3.121,27 ± 37,28 ^e
Cao nước	Không có hoạt tính
Cao PS	1.035,43 ± 22,88 ^c
Diclofenac (chứng dương)	48,05 ± 2,07
DMSO 5% (chứng âm) có phần trăm ức chế I(%) = 0,63 ± 0,02	

Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị TB ± ĐLC để đánh giá sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với p<0,05.

Kết quả cho thấy, cao EtOH có khả năng kháng viêm cao nhất với giá trị IC₅₀ là 526,09 ± 1,51 µg/mL, kế đến là cao PE (949,96 ± 18,86 µg/mL) và thấp nhất là cao Bu (IC₅₀ là 3.121,27 ± 37,28 µg/mL), trong khi cao nước không thể hiện hoạt tính kháng viêm. Như vậy, có thể thấy cao EtOH và cao PE có chứa các hợp chất tạo được liên kết với protein và tạo nên cấu trúc ổn định để bảo vệ protein khỏi sự biến tính bởi nhiệt. Kết quả thu được tương đồng với nghiên cứu của Lâm Khắc Kỳ và đồng tác giả (2021) khi cũng chỉ ra cao EtOH và cao PE có khả năng chứa những hợp chất ức chế sự biến tính protein. Hơn nữa, Lê Quốc Phong và đồng tác giả (2020) cũng nhận định rằng các hoạt chất có độ phân cực thấp có khả năng kháng viêm cao.

Khả năng ức chế xanthine oxidase (XO)

Tiến hành khảo sát khả năng ức chế enzym XO của các mẫu cao chiết ở các nồng độ khác nhau. Kết quả khảo sát dựa trên giá trị IC₅₀ và được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Khả năng ức chế XO của các cao chiết từ sinh khối *C. militaris* CMT01

Mẫu cao chiết	IC ₅₀ (µg/mL)
Cao EtOH	363,93 ± 5,56 ^e
Cao PE	200,64 ± 5,97 ^c
Cao EtOAc	420,20 ± 17,10 ^f
Cao Bu	280,51 ± 1,49 ^d
Cao nước	169,67 ± 5,04 ^b
Cao PS	22,69 ± 0,72 ^a
Allopurinol (chứng dương)	99,42 ± 0,75
DMSO 5% (chứng âm) có phần trăm ức chế I(%) = 0,59 ± 0,02	

Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị TB ± ĐLC để đánh giá sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với p<0,05.

Bảng 5 cho thấy, cao PS có giá trị IC₅₀ thấp nhất (22,69 ± 0,72 µg/mL), nghĩa là khả năng ức chế XO cao nhất. Tiếp đó là cao nước, cao PE, cao Bu và cao EtOH có giá trị IC₅₀ lần lượt là 169,67 ± 5,04 µg/mL, 200,64 ± 5,97 µg/mL, 280,51 ± 1,49 µg/mL và 363,93 ± 5,56 µg/mL. Khả năng ức chế XO của cao EtOAc kém nhất với giá trị IC₅₀ là 420,20 ± 17,10 µg/mL. Qua đó, cho thấy khả năng ức chế hoạt động của XO chủ yếu từ các mẫu cao có độ phân cực mạnh (cao nước) và độ phân cực yếu (cao PE). Nghiên cứu của Huỳnh Thư và đồng tác giả (2017) cho thấy, cao PE của *O. sinensis* thể hiện hoạt tính ức chế XO cao nhất đạt 26,21 ± 0,52% tại nồng độ 250 µg/mL, tuy nhiên nhóm tác giả không đưa ra giá trị IC₅₀. Bên cạnh đó, Yin và đồng tác giả (2018) cho thấy các polysaccharide từ *C. militaris* có hoạt tính ức chế XO, trong khi cao chiết EtOH không thể hiện hoạt tính ức chế XO ở nồng độ 0,5 - 3,0 mg/mL và cao nước có hoạt tính ức chế XO rất thấp (<10%).

KẾT LUẬN

Từ kết quả khảo sát cho thấy, mẫu cao EtOAc thể hiện khả năng bắt gốc tự do DPPH và ABTS⁺ đạt cao nhất với giá trị IC₅₀ lần lượt là 728 ± 39,15 µg/mL và 1.244 ± 13,99 µg/mL. Trong khi đó, cao EtOH có khả năng ức chế kháng viêm cao nhất với IC₅₀ đạt 526,09 ± 1,51 µg/mL. Thêm vào đó, mẫu cao PS thể hiện khả năng ức chế hoạt động của XO cao nhất với IC₅₀ đạt 22,69 ± 0,72 µg/mL. Kết quả thu được là cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn, hướng tới ứng dụng cao chiết từ sinh khối sợi nấm *C. militaris* CMT01 trong chăm sóc sức khỏe.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chiang SS, Liang ZC, Wang YC, Liang CH (2017). Effect of Light-Emitting Diodes on The Production of Cordycepin, Mannitol and Adenosine in Solid-State Fermented Rice by *Cordyceps militari*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 60: 51-56.
- Dong JZ, Lei C, Ai XR (2012). Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* Link and analysis on its main active components. *Appl Biochem Biotechnol*, 166: 1215-1224.
- Đoàn Thị Phương Thúy, Trần Thị Ngọc Ánh, Nguyễn Thị Mai (2018). Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện tách chiết đến hiệu quả thu nhận hoạt chất cordycepin từ nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris* Linn. Link). *Tạp chí khoa học Đại học mở TP HCM*, Tập 61, Số 4: 13-20.
- Guo M, Guo S, Huaijun Y, Bu N, Dong C, (2016). Comparison of major bioactive compounds of the caterpillar medicinal mushroom, *Cordyceps militaris* (Ascomycetes), Fruiting bodies cultured on wheat substrate and pupae. *Int J Med Mushrooms*, 18(4): 327-336.
- Huỳnh Thư, Vũ Anh Tùng, Nguyễn Trọng Hiếu, Đặng Ngọc Hồng Cẩm, Đinh Minh Hiệp (2017). Nghiên cứu hoạt tính ức chế xanthine oxidase của một số cao chiết từ nấm dược liệu. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên Và Công nghệ*, Tập 33, Số 2S: 192-198.
- Huang SJ, Lin CP, Mau JL, Li YS, Tsai SY (2015). Effect of UV-B Irradiation on Physiologically Active Substance Content and Antioxidant Properties of the Medicinal Caterpillar Fungus *Cordyceps militaris* (Ascomycetes). *Int J Med Mushrooms*, 17(3): 241-253.
- Kim YS, Kim EK, Hwang JW, Han YK, Kim SE, Jeong JH, Moon SH, Jeon BT, Park PJ (2015). Radical scavenging activities of *Undaria pinnatifida* extracts fermented with *Cordyceps militaris* mycelia. *J Microbiol Biotechnol*, 25(6): 820-827.
- Lê Thị Huyền Trang, Lê Minh Hoàng, Nguyễn Duy Bắc, Ngô Xuân Trinh, Phạm Văn Hiền, Nguyễn Thị Thu Hằng, Vũ Bình Dương (2017). Nghiên cứu xây dựng quy trình chiết xuất adenosin và cordycepin từ đông trùng hạ thảo nuôi cấy (*Cordyceps militaris*). *Tạp chí Dược học*, Tập 57, Số 492: 24-28.
- Lê Văn Vê, Trần Thu Hà, Nguyễn Thị Bích Thùy và Ngô Xuân Nghiễn (2015). Bước đầu nghiên cứu công nghệ nuôi trồng nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris* L. ex Fr) ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, Tập 13, Số 3: 445-454.
- Lâm Khắc Kỳ, Lê Thị Kim Cương, Văn Thị Xuân Thương, Đinh Minh Hiệp, Ngô Đại Hùng (2021). Hoạt tính kháng oxy hóa và kháng viêm in vitro của cao chiết nấm *Cordyceps takaomontana* DL0038A phân lập tại Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Đại học Thủ Dầu Một*, Tập 2, Số 51.
- Lê Quốc Phong, Nguyễn Hoàng Đăng Khoa, Đặng Tú Quyên, Nguyễn Tài Hoàng, Đinh Minh Hiệp, Ngô Kế Sương (2020). Đánh giá hoạt tính kháng viêm, kháng khuẩn và ức chế enzyme α -glucosidase in vitro của nấm *Ophiocordyceps sinensis* giàu selen. *Tạp chí Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam*, Tập 62, Số 8.
- Mamta P, Mehrotra S, Amitabh, Kirar V, Vats P, Nandi SP, Negi PS, Misra K (2015). Phytochemical and antimicrobial activities of Himalayan *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. *Indian J Exp Biol*, 53(1): 36-43.
- Nielsen S S (2009). Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. *Food Analysis Laboratory Manual*, pp. 47 – 53.
- Nguyễn Kim Phi Phụng (2007). *Phương pháp cô lập các hợp chất hữu cơ*. NXB Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Thị Thanh Thủy, Phí Quyết Tiến (2017). Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy và chế độ ngâm chiết tới sự biến đổi thành phần hóa học và cảm quan của giá thể sau thu hoạch đông trùng hạ thảo. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, Tập 7, Số 80: 52-56.
- Trần Quốc Tuấn, Lê Thị Oanh, Đinh Minh Hiệp và Ngô Đại Nghiệp (2014). Chuẩn hóa mô hình sàng lọc In vitro các hợp chất kháng viêm dựa trên khả năng ức chế biến tính albumin bò do nhiệt. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, Tập 52: 532-538.
- Võ Thị Xuyên, Phan Thị Loan, Vương Lợi, Đinh Minh Hiệp, Trương Bình Nguyên, Ngô Kế Sương (2018). Khảo sát khả năng kháng oxy hóa của cao chiết từ sinh khối hệ sợi *Cordyceps pseudomilitaris* DL0015. *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, 457-462.
- Won SY, Park EH (2005). Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *J Ethnopharmacol*, 96(3): 555-561.
- Yin C, Fan X, Fan Z, Shi D, Gao H (2018). Effects of Various Treatments on Extraction of The Main Bioactive Components and Determination of Biological Activity of Extracts from The Caterpillar Medicinal Mushroom *Cordyceps militaris* (Ascomycetes). *Int J Med Mushrooms*, 20(9): 873-885.
- Yue K, Ye M, Zhou Z, Sun W, Lin X (2013). The genus *Cordyceps*: a chemical and pharmacological review. *J Pharm Pharmacol* 65 (4): 474-493.
- Zheng LP, Gao LW, Zhou JQ, Sima YH, Wang JW (2008). Antioxidant activity of aqueous extract of a *Tolyposcladium* sp. fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis*. *Afr J Biotechnol*, 7(17): 3004-3010.

STUDY ON BIOLOGICAL ACTIVITIES OF BIOMASS EXTRACTS FROM *Cordyceps militaris* CMT01

Vo Thi Xuyen^{1*}, Pham Ngoc Chau¹, Ho Ngoc Gia Han¹,
Ho Van Thao², Nguyen Hoang Dang Khoa³, Dinh Minh Hiep⁴

¹Faculty of Applied Technology, Van Lang University, Ho Chi Minh City

²Office of the People's Committee of Soc Trang province - Department of Agriculture - Natural Resources

³University of Natural Sciences - Vietnam National University, Ho Chi Minh City

⁴Department of Agriculture and Rural Development of Ho Chi Minh City

SUMMARY

Cordyceps militaris is a species of insect-parasitic fungus with a wide distribution. Many studies have shown that this species can produce many compounds with high biological activity, which can be used for commercial and application purposes. However, in Vietnam, there have been few in-depth investigations to learn about the active ingredients and biological activities of extracts obtained from *C. militaris* mycelium biomass. Therefore, this study focuses on investigating some biological activities of extracts obtained from *C. militaris* CMT01 biomass to create a basis for further research, aiming to apply extracts of this species in health care. The exhausted extraction with ethanol 96% (EtOH) from mycelium biomass by liquid-liquid extraction method to obtain petroleum ether extract (PE), ethyl acetate extract (EtOAc), n-butanol extract (Bu) and water extract. Polysaccharide extract (PS) was obtained from raw material residue after exhausted extraction with 96% ethanol. The results showed that EtOAc extract showed the highest ability to scavenge DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS⁺ (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) free radicals with IC₅₀ values of 728 ± 39.15 µg/mL and 1.244 ± 13.99 µg/mL, respectively, EtOH extract has the highest ability to anti-inflammatory with an IC₅₀ value of 526.09 ± 1.51 µg/mL, and the PS extract showed the highest ability to inhibit the activity of the enzyme XO (Xanthine oxidase) with IC₅₀ value of 22.69 ± 0.72 µg/mL.

Keywords: *Cordyceps militaris*, anti-oxidant, anti-inflammatory, mycelial biomass, inhibits xanthine oxidase (XO).

* Author for correspondence: Tel: 0933757447; Email: xuyen.vt@vlu.edu.vn