

**NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA
CỦA NẤM THƯỢNG HOÀNG (*Phellinus linteus* (Berk. Et Curt.) Teng)
TRỒNG TẠI VIỆT NAM**

Trần Thị Văn Thi*, Lê Lâm Sơn, Lê Trung Hiếu, Trần Văn Khoa

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học - Đại học Huế

**Email: tranthivanthi@gmail.com*

TÓM TẮT

*Hoạt tính kháng oxy hóa của nấm Thượng hoàng (*Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) Teng) và polysaccharide - thành phần hóa học quan trọng nấm Thượng hoàng đã được khảo sát. Mẫu nấm sử dụng ở dạng quả thể khô, được xay ra thành bột, chiết bằng ethanol 96° để thu được cao ethanol (PI-E). Mẫu được tiếp tục chiết bằng nước nóng ở 100°C trong 4 giờ để thu được cao nước (PI-W). Tiếp tục tinh chế PS-W để loại protein và phân đoạn theo độ phân cực khác nhau theo tỷ lệ thể tích của hỗn hợp dung môi ethanol- nước, thu được các phân đoạn PS-E32, PS-E48, PS-E68. Lực kháng oxy hóa tổng của PI-E, PI-W, PS-E32, PS-E48, PS-E68 được xác định theo phương pháp phospho molybdenum của Prieto (1999). Kết quả thu được cho thấy khả năng kháng oxy hóa của nấm Thượng hoàng trồng tại Việt Nam và các phân đoạn polysaccharide từ mẫu nấm này cao hơn nhiều so với một số mẫu Linh chi đối chứng.*

Từ khóa: *Phellinus linteus, hoạt tính kháng oxy hóa, polysaccharide.*

1. MỞ ĐẦU

Nấm Thượng hoàng (*Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) Teng), là loài nấm gỗ, phát triển tự nhiên, hiện đang nhận được sự quan tâm đặc biệt do có nhiều hoạt tính sinh học quý, hứa hẹn vượt trội hơn cả các loài Linh chi: kháng khối u, ức chế tế bào ung thư, tăng cường kháng thể, kháng oxy hóa [1-8]. Người ta đã phân lập giống, thuần dưỡng và nuôi trồng. Hiện nay, nấm được trồng tại Hàn Quốc, Nhật Bản, Trung Quốc và bước đầu đã được trồng ở Việt Nam. Với giống và điều kiện nuôi trồng khác nhau, nấm có thể có hoạt tính sinh học khác nhau. Điều này làm cho một loài nấm có hoạt tính sinh học quý, khi phát triển ở nơi khác nhau đều cần được nghiên cứu. Trong nấm Thượng hoàng, polysaccharide (PS) là thành phần hóa học quan trọng. PS là các polymer thiên nhiên có cấu trúc đa dạng, phức tạp và đã được nghiên cứu rộng rãi trong y học do các hoạt tính sinh học đa dạng của chúng [9]. Trong bài báo này, chúng tôi thông báo những kết quả khảo sát đầu tiên về hoạt tính kháng oxy hóa của mẫu nấm và các phân đoạn

cao polysaccharide chiết từ mẫu nấm Thượng hoàng (*Phellinus linteus*(Berk. et Curt.) Teng) trồng tại miền Nam Việt Nam.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

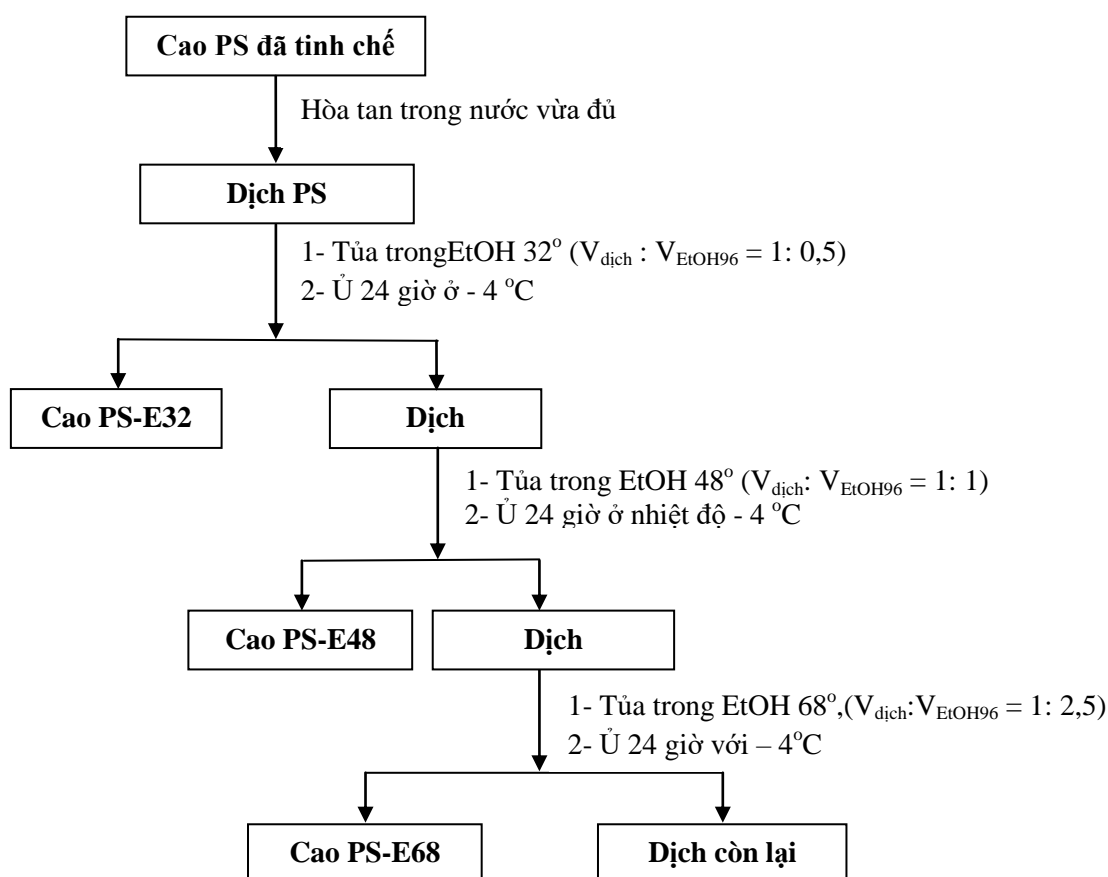
Nấm Thượng hoàng được mua từ nhà sản xuất tại thành phố Hồ Chí Minh, ở dạng quả thể đã sấy khô và đóng gói theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất. Tên loài đã được nhà cung cấp giống và nhà sản xuất xác nhận là *Phellinus linteus*(Berk. et Curt.) Teng.

2.2. Chiết xuất, tinh chế PS và phân đoạn

- Chiết xuất cao ethanol và cao nước: Mẫu nấm Thượng hoàng (*Phellinus linteus*) được xay nhỏ và xác định độ ẩm tương ứng. Mẫu được ngâm chiết với ethanol (EtOH) 96° trong hai tuần để tách loại các hợp chất tan trong ethanol, cô đuổi dung môi, thu được cao ethanol (PI-E). Sau đó, mẫu tiếp tục được chiết bằng nước ở 100 °C trong 4 giờ. Quá trình chiết được lặp đi lặp lại cho đến khi dịch chiết cuối không còn polysaccharide (định tính bằng phenol-acid sulfuric [10]). Cô loại dung môi, thu được cao nước (PI-W).

- Tách chiết và tinh chế cao polysaccharide (PS): Hòa tan lại với nước cất vừa đủ, kết tủa với ethanol 96° theo tỷ lệ 1:5 (v/v), để qua đêm ở -4°C rồi tiến hành ly tâm. Phần tủa polysaccharide sau ly tâm được hòa tan trở lại trong nước cất và lắc với thuốc thử Sevage (CHCl₃:BuOH = 4:1, v/v) trong 30 phút để loại protein tự do. Dịch nước sau tinh chế cho kết tủa lại với ethanol 96°, ủ ở -4°C trong 24 giờ và ly tâm. Quá trình tinh chế loại protein này được lặp lại năm lần đến khi khối lượng cao thu được gần như không đổi. Sau khi ly tâm, phần tủa lần lượt được rửa sạch với ethanol tuyệt đối và acetone trước khi sấy khô, thu được cao PS đã tinh chế.

- Phân đoạn polysaccharide theo độ phân cực khác nhau theo tỷ lệ thể tích của hỗn hợp dung môi ethanol- nước, theo sơ đồ hình 1, thu được các cao phân đoạn PS-32, PS-48 và PS-68. Xác định hàm lượng PS có trong mỗi phân đoạn tương ứng bằng phương pháp phenol-acid sulfuric [10].



Hình 1. Sơ đồ phân đoạn PS bằng hỗn hợp dung môi ethanol – nước

2.3. Xác định lực kháng oxy hoá tổng (total antioxydant capacity) theo mô hình phospho molybdenum

Lực kháng oxy hoá tổng của các mẫu khảo sát PI-E, PI-W, PS-E32, PS-E48, PS-E68 được đánh giá theo phương pháp phospho molybdenum của Prieto [11]. Phương pháp này dựa trên sự khử Mo (VI) về Mo (V) bởi các hợp chất có khả năng kháng oxy hóa trong môi trường acid, tạo thành phức phosphate/Mo (V) có màu xanh lá cây. Lấy 0,3 mL dịch mẫu khảo sát, thêm vào 3 mL dung dịch thuốc thử (0,6 M acid sulfuric, 28 mM natrium phosphate và 4 mM ammoni molybdate), đậy kín và ủ ở 95°C trong 90 phút. Sau đó, mẫu được làm lạnh về nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng được đo ở bước sóng 695 nm trên máy quét phổ tử ngoại - khả kiến UV-Vis DR Jacos V630, Nhật Bản. Trong mẫu trắng, dung dịch cần phân tích được thay bằng nước cất. Lực kháng oxy hoá tổng được biểu diễn theo độ hấp thụ của mẫu, độ hấp thụ càng lớn thì lực kháng oxy hóa tổng càng cao.

2.4. Phân tích số liệu thống kê Anova hai nhân tố

Sử dụng kỹ thuật thống kê Anova kết hợp với phần mềm Excel phân tích phương sai hai nhân tố không lặp và so sánh với chuẩn Fischer để xác định yếu tố có ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm để kiểm soát các giá trị thực nghiệm thu được là khác nhau đáng tin cậy.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng kháng oxy hóa của mẫu nấm Thượng hoàng

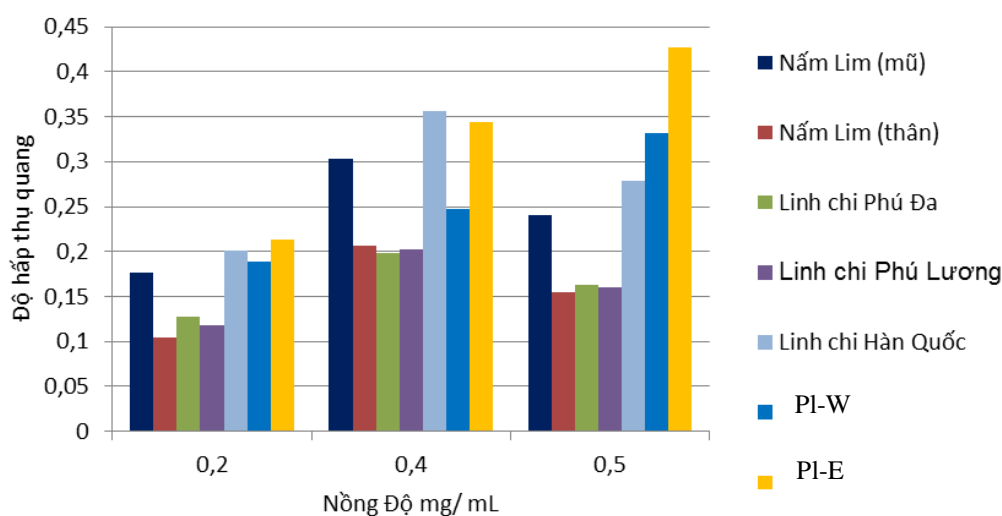
3.1.1. Lực kháng oxy hóa tổng

Kết quả xác định lực kháng oxi hoá tổng của cao ethanol (PI-E) và cao nước (PI-W) được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Độ hấp thụ quang của cao ethanol và cao nước ở các nồng độ khác nhau trong dung dịch

Nồng độ (mg/mL)	Độ hấp thụ quang	
	Cao EtOH (PI-E)	Cao nước (PI-W)
0,1	0,0964	0,0960
0,2	0,2130	0,1881
0,3	0,2749	0,2429
0,4	0,3445	0,2765
0,5	0,4276	0,3314

Ở nồng độ thấp, lực kháng oxi hóa tổng của cao PL-E và lực kháng oxi hóa tổng của cao PI-W là xấp xỉ nhau. Tuy nhiên, ở nồng độ cao hơn, từ 0,4 đến 0,5 mg/ mL, lực kháng oxy hóa của PI-E tăng nhanh hơn rõ rệt. So sánh với lực kháng oxy hóa tổng của các mẫu nấm Linh chi được nghiên cứu trước đây trong cùng điều kiện phòng thí nghiệm [12], nhận được kết quả trên hình 2.



Hình 2. Lực kháng oxy hoá tổng của cao ethanol và cao nước của mẫu nấm Thượng hoàng (*Phellinus lintues*) so với một số mẫu Linh chi (*Ganoderma lucidum*)

Ở tất cả các nồng độ, tổng lực kháng oxy hóa của cao PI-E và PI-W của mẫu nấm Thượng hoàng đều tương đương hay vượt trội so với các mẫu nấm còn lại, trong số đó có mẫu nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*) Hàn Quốc và mẫu nấm Lim xanh thiên nhiên (*Ganoderma lucidum*) thu hái tại Quảng Bình. Đây là một tín hiệu rất đáng phấn khởi đối với loại nấm Thượng hoàng (*Phellinus lintues*) đang bắt đầu được trồng tại miền Nam Việt Nam.

3.1.2. Hàm lượng các hợp chất phenolic

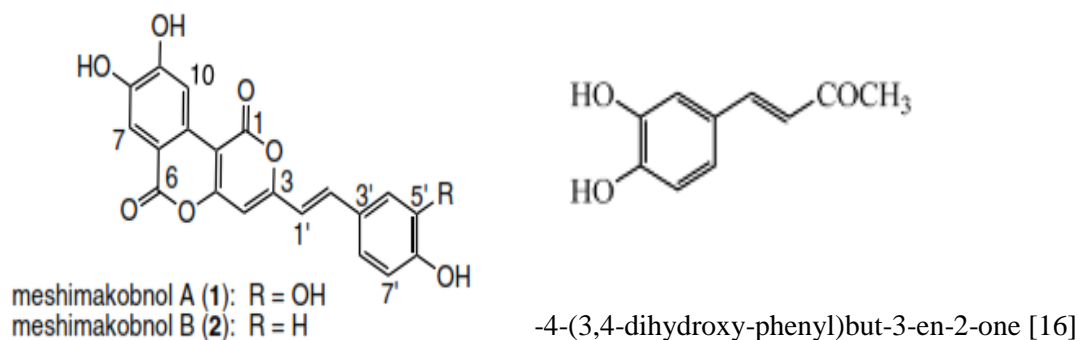
Đường chuẩn được xây dựng với chất chuẩn acid gallic trong dung môi methanol tương ứng với 5 nồng độ khác nhau trong khoảng $0,05 \div 0,3$ (mg/mL). Kết quả, thu được phương trình hồi quy tuyến tính: $y = 10,5530x + 0,0652$ với hệ số tương quan $R = 0,9993$. Hàm lượng tổng các hợp chất phenolic của nấm Thượng hoàng so sánh với các loại nấm dược liệu khác [14], [15] được thể hiện trên bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng tổng phenolic của mẫu nấm Thượng hoàng so với các mẫu nấm dược liệu khác

Mẫu	Xuất xứ	Hàm lượng tổng phenolic, (mg acid gallic/ gam mẫu) (P = 0,95; n=3)	TLTK
Thượng hoàng (<i>P. linteus</i>)	Việt Nam	4,60 ± 0,08	Nghiên cứu này
Linh chi (<i>G. Lucidum</i>)	Hàn Quốc	0,132 ± 0,005	[14]
Lim (mũ nấm) (<i>G. Lucidum</i>)	Quảng Bình	0,106 ± 0,002	[15]
Linh chi (<i>G. Lucidum</i>)	Phú Lương - Huế	0,053 ± 0,002	[14]

Hàm lượng tổng các hợp chất phenolic của nấm Thượng hoàng là $4,60 \pm 0,08$ mg acid gallic/gam mẫu, cao gấp 40-50 lần so với các mẫu Linh chi đang trồng tại Việt Nam ở cùng điều kiện khảo sát. Kết quả này cho thấy các hợp chất phenolic đóng góp đáng kể trong hoạt tính kháng oxy hóa của nấm Thượng hoàng.

Chúng tôi chưa tìm thấy công trình nào đánh giá hàm lượng tổng phenolic từ nấm Thượng hoàng, tuy nhiên kết quả trên cũng phù hợp với công bố về việc tách chiết được các hợp chất phenolic riêng lẻ từ loài nấm này. Akito Nagastu và cộng sự đã phân lập ra hợp chất phenolic gọi là meshimakobnol, đây là tên xuất phát từ tên nấm bằng tiếng Nhật (nấm Meshimkobu). Sorasak samchai và cộng sự phân lập được hợp chất dẫn xuất phenolic 4-(3,4-dihydroxy-phenyl)but-3-en-2-one [16] từ nấm Thượng hoàng thu hái tại Cambodia vào tháng 10 năm 2007, có công thức cấu tạo thể hiện trên hình 3.



Hình 3. Một số hợp chất phenolic đã được tách chiết từ nấm Thượng hoàng.

Các hợp chất phenolic trong thực vật có khả năng dập tắt các gốc tự do và ức chế hoạt động của lipid peroxide. Tác giả [17] cho rằng: có tính hiệu cao tuyến tính giữa hoạt động bắt gốc tự do của dịch chiết PS (không phải dịch chiết EtOH) và tổng phenolic, do đó hoạt động kháng oxy hóa của nấm Thượng hoàng có thể là do thành phần phức hợp polysaccharide-phenolic.

3.1.3. Hàm lượng tổng flavonoid

Đường chuẩn được xây dựng với dung dịch chuẩn quercetin trong methanol tương ứng với 5 nồng độ khác nhau trong khoảng từ $0,05 \div 0,3$ (mg/mL). Kết quả thiết lập được phương trình hồi quy tuyến tính: $y = 8,4214x - 0,0384$ với hệ số tương quan $R = 0,9965$.

Hàm lượng tổng flavonoid trong nấm Thượng hoàng được chỉ ra ở bảng 3. Flavonoid là nhóm hợp chất chứa nhiều polyphenol có khả năng kháng oxy hóa rất cao. Hàm lượng flavonoid trong nấm Thượng hoàng là $2,30 \pm 0,08$ mg quercetin/g mẫu ($P = 0,95$; $n=3$).

Bảng 3. Hàm lượng flavonoid của các mẫu nấm Thượng hoàng so với một số mẫu nấm dược liệu khác

Mẫu	Xuất xứ	Hàm lượng tổng flavonoid (P = 0,95; n=3) (mg quercetin)/ g mẫu	TLTK
Thượng hoàng (<i>P.linteus</i>)	Việt Nam	2,30 ± 0,08	Nghiên cứu này
Linh chi (<i>G. lucidum</i>)	Hàn Quốc	0,058 ± 0,001	[14]
Lim (mũ nấm) (<i>G. lucidum</i>)	Quảng Bình	0,085 ± 0,001	[15]
Linh chi (<i>G. lucidum</i>)	Phú Lương Huế	0,044 ± 0,002	[14]

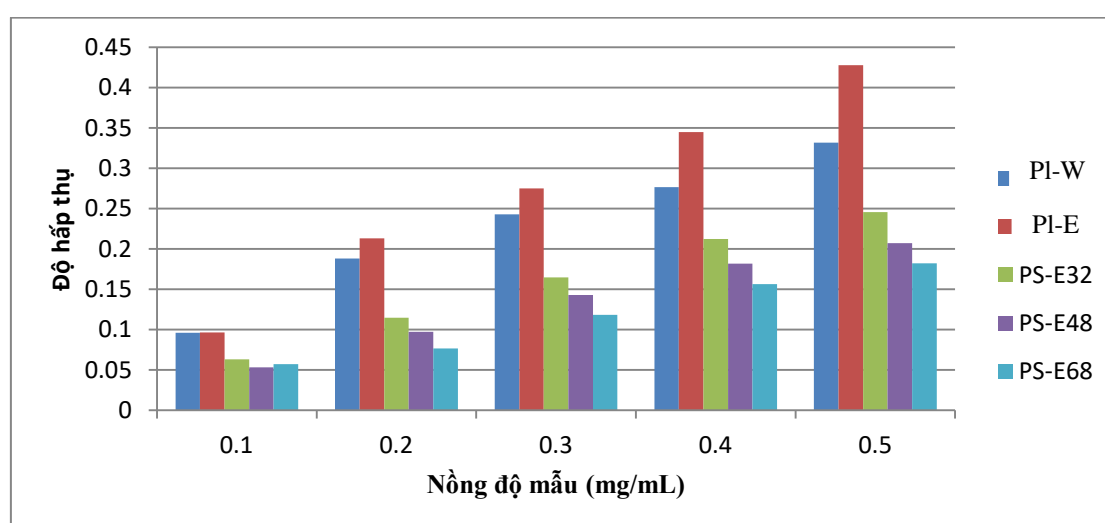
Hàm lượng flavonoid của nấm Thượng hoàng cao hơn flavonoid trong các loài nấm Linh chi dược liệu ($p=0,95$, $n=5$) đã được nghiên cứu trong cùng điều kiện.

3.2. Khả năng kháng oxy hóa của polysaccharide từ mẫu nấm Thượng hoàng

Kết quả xác định lực kháng oxy hoá tổng của các cao phân đoạn polysaccharide được thể hiện trên bảng 4.

Bảng 4. Độ hấp thụ quang của các cao phân đoạn polysaccharide tại các nồng độ khác nhau

Nồng độ (mg/mL)	Độ hấp thụ quang		
	PS-E32	PS-E48	PS-E68
0,1	0,0629	0,0521	0,0570
0,2	0,1147	0,0971	0,0764
0,3	0,1645	0,1427	0,1182
0,4	0,2123	0,1815	0,1562
0,5	0,2457	0,2069	0,1821

**Hình 4.** Lực kháng oxy hóa tổng của các phân đoạn cao PS so với PI-E và PI-W tại các nồng độ khác nhau.

Các kết quả ở bảng 4 và hình 4 cho thấy rằng, hoạt tính kháng oxy hóa của các mẫu đều tăng theo nồng độ. Hoạt tính kháng oxy hóa của cao ethanol và cao nước luôn luôn cao hơn các cao phân đoạn PS, trong đó lực kháng oxy hóa mạnh nhất là cao EtOH (PI-E) và sau đó là cao nước (PI-W). Polysaccharide đóng góp một phần trong hoạt tính kháng oxy hóa tổng này bên cạnh sự đóng góp của các hợp chất phenolic. Kết quả này cho thấy việc ngâm trong rượu hay sắc nấm Thượng hoàng trong nước đều thu được các chất có hoạt tính kháng oxy hóa cao trong chữa bệnh so với nhiều loài nấm Linh chi *Ganoderma lucidum* khác hiện đang được trồng tại Việt Nam.

Cho đến nay, chúng tôi chỉ tìm được công bố [17] sử dụng phương pháp DPPH để xác định khả năng bắt gốc tự do của polysaccharide trong nấm Thượng hoàng với EC₅₀ là 7,11 mg/mL, trong khi chất chuẩn acid ascorbic cho tín hiệu hoạt động tốt tại EC₅₀ có giá trị nồng độ 1,64 mg/mL. Như vậy, kết quả khảo sát của chúng tôi theo mô hình phospho molybdenum và kết quả khảo sát theo mô hình DPPH của công trình [17] đều cho kết quả đáng khích lệ về khả năng hoạt động kháng oxy hóa của polysaccharide từ nấm Thượng hoàng.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, khả năng kháng oxy hóa của cao ethanol, cao nước và các cao polysaccharide được chiết xuất từ nấm Thượng hoàng (*Phellinus linteus* (Berk. Et Curt.) Teng) trồng tại Việt Nam đã được khảo sát. Hoạt tính kháng oxy hóa của mẫu nấm Thượng hoàng, thể hiện qua lực kháng oxy hóa tổng, hàm lượng các hợp chất phenolic, flavonoid đều vượt trội so với các loài nấm Linh chi khác trồng tại Việt Nam. Trong đó, các hợp chất polysaccharide cũng đóng góp phần quan trọng vào hoạt tính kháng oxy hóa này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Maja Kozarski, Antita Klaus, Miomir Niksic, Dragaica Jakovevic, Johannes P.F.G.Helsper, Leo J.I.D Van Griensven (2011). Antioxydant and immunomodulating activities of polysaccharide extract of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry*, 129, 1667-1675.
- [2]. Samchai, P.seephokai, A. Sangdee, A.Puntumchai, U.Klinhom (2009). Antioxydant, Cytotoxyc and Antimalarial activitive from crude extracts of Mushroom *Phellinus Linteus*, *Journal of Biological Sciences* 9(7): 778-783.
- [3]. Sorasak Samchai, Prapairat Seephonkai, Chattai Kaewtong (2011). Two Indole Devatives and Phenolic Compound Isolate from Mushroom *Phellinus linteus*. *Chinese jurnal of Natural Medicines*, 9(3): 0173-0175.
- [4]. Soon-kew Park, et all (2003). Acidic polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* induce phenotypic and functional maturation of murine dornitic cells. *Biochemical and Biophysical*

- Research Communications*. 312,449-458.
- [5]. S.P. Wasser (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharide, *Appl Microbiol Biotechnol*, 60:258-274.
- [6]. S.Samchai, P.Seephonkai, A. Sangdee, A. puntumchai, U. Klinhom (2009). Antioxydant, Cytotoxyc Antimalarial Actiivites from crude extracts of Mushroom *Phellinus linteus*. *Journal of Biological Sciences* 9(7): 778-783.
- [7]. Takuma Sasaki, Yoshiko Aria, Tetsuro Ikekawa, Gora Chihara and Fumiko Fukuoka (1971). Antitumor Polysaccharides from some polyporaceae, *Ganoderma applanatum* (pers.) Pat and *Phellinus linteus* (Berk. Et Curt) Aoshima. National Cancer research institute. *Chem.Pharm.Bull.* 19(4), 821-826.
- [8]. Tongbo Zhu, Sung –Hoon Kim, Chang-Yan Chen (2008). A Medicinal Mushroom: *Phellinus Lintues*. *Current Medicinal Chemistry*, 15, 1330-1335.
- [9]. Chen, G. T., Ma, X. M., Liu, S. T., Liao, Y. L., & Zhao, G. Q (2012). Isolation, purification and antioxydant activities of polysaccharides from *Grifola frondosa*, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 89, pp. 61–66.
- [10]. Dubois M, Gilles KA, Hamiton JK, Rebers P, Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal Chem*, 28:350-6
- [11]. Prieto, P., Pineda, M., Anguilar, M (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxydant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific application to the determination of Vitamin E. *Anal,Biochem.*, Vol. 269, pp. 337-341 .
- [12]. Hui-Yu-Huang, Shih-Yung Chiech, Tim K.Tso, Ting-Yi Chien, Hsin-Tang lin, Ying-Chieh Tsai (2011). Orally administerd mycelia culture of *Phillinus Linteus* exhibit antitumor effect in heptatoma cell-bearing mice, *Journal of Ethnopharmacology* 133, 460-466.
- [13]. Fang Liu., Fung. M.C, V.E. Ooi and Chang S.T. (1996). Induction in the mouse of gene expression of immunomodulating cytokines by mushroom polysaccharide- protein complexes, *Life Science*, 58, 21, 1795-1803.
- [14]. Lê Trung Hiếu, Trương Thị Như Tâm, Nguyễn Thị Ánh Huyền, Lê Thị Thùy Trang (2014). Bước đầu nghiên cứu đánh giá khả năng kháng oxy hóa của một số loài thực vật Việt Nam, *Tạp chí khoa học và công nghệ*, Trường Đại học Khoa học Huế.1,1, 1-30.
- [15]. Lê Thùy Trang (2014). *Nghiên cứu thành phần hoạt chất polysaccharide, triterpenoid và hoạt tính sinh học của nấm Lim - Ganoderma SP. thiên nhiên thu hái tại tỉnh Quảng Bình*, Luận văn Thạc sĩ khoa học Hóa học, Đại học Khoa học.
- [16]. Soon-kew Park, Gi-Young Kim, Jong-Young Kwak, Yoe-Sik Bae, Jae-Dong Lee, Yang-Hyo Oh, SoonCheol Ahn, and Yeong-min Park (2003). Acidic polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* induce phenotypic and functional maturation of murine dermnic cells, *Biochemical and*

Nghiên cứu hoạt tính kháng oxy hóa của nấm Thượng hoàng (*Phellinus linteus*(Berk. Et Curt.) Teng) ...

Biophysical Research Communications. 312,449-458.

- [17]. Maja Kozarski, Antita Klaus, Miomir Niksic, Dragaica Jakovevic, Johannes P.F.G.Helsper, Leo J.I.D Van Griensven (2011). Antioxidant and immunomodulating activities of polysaccharide extract of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*, *Food Chemistry* 129, 1667-1675.

THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF *PELLINUS LINTEUS* MUSHROOMS

(*Phellinus linteus* (Berk . Et Curt .) Teng) PLANT IN VIETNAM

Tran Thi Van Thi*, Le Lam Son, Tran Van Khoa

Department of Chemistry, Hue University College of Sciences

*Email: tranthivanthi@gmail.com

ABSTRACT

Antioxidant activities of Thuong hoang mushroom (*Phellinus linteus* (Berk. Et Curt.) Teng) and polysaccharide - an important chemical component in Thuong hoang mushroom were surveyed. The dry fruiting body of Thuong hoang mushroom was pulverized. The dried powder was extracted by 96° ethanol to obtain ethanol extract (PS-E). Then, the residue was extracted by distilled water at 100°C for 4 hours to obtain water extract (PS-W). The PS-W was purified to remove free protein and fractioned by different polar solvent mixtures those were composed by ethanol and water. The PS-W was resolved in water and precipitated by 32%, 48% và 68% ethanol solutions, yield PS-E32, PS-E48, PS-E-68 fractions, respectively. The total antioxidant capacity of Pl-E, Pl-W, PS-E32, PS-E48, PS-E68 were assessed by phosphorus molybdenum method (Prieto, 1999). Assessment results showed that the total antioxidant capacity of Thuong hoang cultivated in Vietnam and its polysaccharide fractions were much more than some different *Ganoderma lucidum* samples.

Keywords: antioxidant capacity, polysaccharide, *Phellinus linteus*.