DOI: 10.31276/VJST.65(8).05-10

Xác định hàm lượng polysaccharide, phenolic và hoạt tính chống ôxy hóa của cao chiết hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL3

Nguyễn Mạnh Tuấn*, Hoàng Văn Hưng, Đỗ Thị Hiền, Đỗ Bích Duệ, Phạm Thị Phương Lan

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

Ngày nhận bài 12/9/2022; ngày chuyển phản biện 15/9/2022; ngày nhận phản biện 7/10/2022; ngày chấp nhận đăng 11/10/2022

Tóm tắt:

Nấm Thượng Hoàng (*Tropicoporus* hay *Phellinus*) là một trong các loại nấm dược liệu quý và được chứng minh có vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ sức khỏe. Những nghiên cứu về nấm Thượng Hoàng mới chỉ được triển khai ở nước ta trong khoảng 10 năm trở lại đây nên nguồn dữ liệu khoa học về nguồn nấm này chưa thực sự phong phú. Nghiên cứu này được triển khai nhằm bổ sung dữ liệu về định danh phân tử chủng nấm NTH-PL3 được thu thập trong tự nhiên và xác định các hoạt chất sinh học, cũng như khả năng chống ôxy hóa của cao chiết tổng số từ hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng. Kết quả phân tích trình tự gen ITS của rDNA cho thấy, chủng nấm NTH-PL3 thuộc loài *Tropicoporus linteus* với độ tương đồng cao nhất về trình tự ITS là 99,87%. Hiệu suất thu cao chiết tổng số từ hệ sợi bằng methanol 75% đạt 29,75±3,84%. Trong cao chiết hệ sợi nấm chứa polysaccharide với hàm lượng 23,72±1,34 mg glucose/g và 18,54±1,87 mg axit gallic/g đối với phenolic. Giá trị EC_{50} đối với khả năng bắt gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) và tạo phức chất với sắt của cao chiết từ hệ sợi nấm Thượng Hoàng đạt lần lượt là 268,54±3,89 và 411,65±10,87 µg/ml.

Từ khóa: **hoạt tính chống ôxy hóa, nấm dược liệu, phenolic, polysaccharide, *Tropicoporus linteus*.**

Chỉ số phân loại: **1.6**

Đặt vấn đề

Nấm Thượng Hoàng (*Tropicoporus linteus*) hay được gọi với tên *Phellinus linteus*, *Inonotus linteus*, *Polyporus linteus*, *Sanghuangporus sanghuang* thuộc họ *Hymenochaetaceae* phân bố chủ yếu ở các khu vực nhiệt đới thuộc châu Mỹ và Đông Á [1, 2]. Giá trị dược liệu của nấm Thượng Hoàng nhận được nhiều sự quan tâm từ khi kết quả nghiên cứu của T. Ikekawa và cs (1968) [3] được công bố cho thấy khả năng ức chế tế bào ung thư Sarcoma-180 ở chuột của cao chiết nấm Thượng Hoàng đạt cao nhất (97,6%) so với nấm Hương (80,7%), nấm Vân Chi (75-77%), nấm Linh Chi (65-70%), nấm Mộc nhĩ (42,6%) ở liều lượng cao chiết thử nghiệm là 200 mg/kg chuột. Cho đến nay, có khoảng hơn 11.400 kết quả nghiên cứu về nấm Thượng Hoàng (các loài tiêu biểu như *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus hartigii* và *Phellinus gilvus*) được công bố trên dữ liệu Google Scholar. Các nghiên cứu cho thấy, trong nấm Thượng Hoàng bao gồm cả hệ sợi và quả thể chứa đựng đa dạng các hoạt chất sinh học tiềm năng như polysaccharide, phenolic, flavonoid, carotenoid… Các hoạt chất này được chứng minh có vai trò sinh học quan trọng như chống ôxy hóa [4], chống ung thư [5], chống viêm [6], điều hòa hệ thống miễn dịch [7], kháng khuẩn (bao gồm cả *Staphylococcus aureus* kháng methicillin) [8], chống đái tháo đường [9], bảo vệ gan [10] và bảo vệ thần kinh [11]. Chính vì vậy, nấm Thượng Hoàng được coi là một trong các loại nấm dược liệu quý và được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền.

Việt Nam thuộc vùng khí hậu nhiệt đới, thuận lợi cho các loại nấm sinh trưởng, trong đó có nấm Thượng Hoàng. Tuy nhiên, các nghiên cứu về nấm Thượng Hoàng chủ yếu được công bố trong khoảng 10 năm trở lại đây. Kết quả của các nghiên cứu đề cập đến đặc điểm nuôi cấy hệ sợi nấm Thượng Hoàng [12-15]. Một số hoạt chất sinh học tiềm năng có trong quả thể nấm Thượng Hoàng thu thập tại nước ta cũng được báo cáo như hàm lượng phenolic chiếm 4,6 mg axít gallic/g quả thể *Phellinus linteus* [16], 4 hoạt chất (meshimakobnol A, meshimakobnol B, ergosterol và ergosterol peroxide) có khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư được tìm thấy trong quả thể *Phellinus igniarius* [17]. Tuy nhiên, nghiên cứu về hoạt tính chống ôxy hóa của dịch tách chiết từ hệ sợi nấm Thượng Hoàng ở nước ta gần như chưa có công bố. Do vậy, kết quả nghiên cứu này sẽ bổ sung dữ liệu về hàm lượng polysaccharide và phenolic có trong hệ sợi, cũng như hoạt tính chống ôxy hóa của dịch tách từ hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL3 nhằm phục vụ cho phát triển các sản phẩm hỗ trợ sức khỏe con người.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Chủng nấm Thượng Hoàng NTH-PL3 ở dạng hệ sợi đã được phân lập và thuần khiết bởi Hoàng Văn Hưng và cs (2022) [18] (hình 1).

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenmanhtuan@tuaf.edu.vn

Determination of polysaccharide and phenolic contents and antioxidant activity of the crude extract from mycelial biomass of strain *Tropicoporus linteus* NTH-PL3

Manh Tuan Nguyen*, Van Hung Hoang, Thi Hien Do, Bich Due Do, Thi Phuong Lan Pham

Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

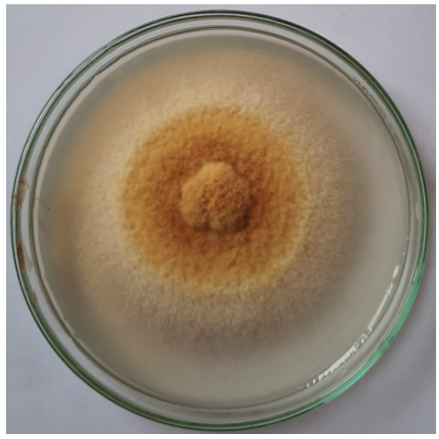
Received 12 September 2022; revised 7 October 2022; accepted 11 October 2022

Abstract:

***Tropicoporus* (synonym *Phellinus*) mushroom is one of the precious medicinal mushrooms and has been proven to play a significant role in supporting health. However, studies on the *Tropicoporus* mushroom have only been carried out in our country within the last ten years, so the scientific data on this mushroom source is not really rich. This study aimed to add research data on molecular identification of strain NTH-PL3 collected in nature and determination of bioactive compounds, as well as antioxidant activity of the total extract from mycelium of *Tropicoporus*. Results of rDNA ITS sequence analysis showed that strain NTH-PL3 belongs to *Tropicoporus linteus* species with the highest similarity in ITS sequence of 99.87%. The total yield of bioactive compounds extracted from the mycelium using 75% methanol was 29.75±3.84%. In the crude bioactive extract, total polysaccharide content was 23.72±1.34 mg glucose/g and 18.54±1.87 mg gallic acid/g for phenolic. EC_{50} values for 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging and ferrous ion chelating ability of total crude bioactive extract from mycelium of *Tropicoporus* were 268.54±3.89 and 411.65±10.87 µg/ml, respectively.**

Keywords: **antioxidant activity, medicinal mushroom, phenolic, polysaccharide, *Tropicoporus linteus*.**

Classification number: **1.6**



Hình 1. Hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng NTH-PL3 trên môi trường PDA ở 25°C, 7 ngày.

Phương pháp nghiên cứu

Nuôi cấy hệ sợi, tách chiết DNA và định danh phân tử: Hệ khuẩn ty của chủng NTH-PL3 được nuôi cấy trong môi trường potato dextrose broth (PDB) (g/l): dịch chiết từ khoai tây (200), dextrose (20), pH 6,5 ở 25°C, 3 ngày nuôi lắc 130 vòng/phút. Thu nhận sinh khối hệ sợi và tách chiết DNA tổng số theo phương pháp của H.W. Kang và cs (2002) [19]. Cặp mồi ITS5 xuôi (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') và ITS4 ngược (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') được sử dụng cho nhân trình tự vùng gen ITS1 + 5.8S rRNA + ITS2 + 28S rRNA [20]. Chu trình của phản ứng PCR được thực hiện như sau: biến tính trong 2 phút ở 95°C; 25 chu kỳ: biến tính trong 30 giây ở 95°C, gắn mồi 30 giây ở 60°C, kéo dài 1 phút ở 72°C; kéo dài ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR tinh sạch bằng kít QIAquick® PCR, được giải trình tự thông qua hệ thống Applied Biosystems 3730 xl DNA analyzer sử dụng Big Dye terminator cycle sequencing kit v.3.1 (Macrogen, Hàn Quốc). Nhận diện trình tự vùng gen ITS1 + 5.8S rRNA + ITS2 + 28S rRNA của chủng NTH-PL3 với dữ liệu công bố trên GenBank thông qua NCBI Blast. Quan hệ di truyền (Neighbor joining tree) của chủng phân lập được thiết lập bằng phần mềm MEGA 7 [21].

Lên men chìm và *thu nhận sinh khối hệ sợi:* Chủng NTH-PL3 được nuôi cấy trong bình tam giác dung tích 500 ml chứa 200 ml môi trường dịch thể PDB ở 25°C trong 3 ngày nuôi lắc (130 vòng/phút). Tiếp đến, 3% dịch nuôi được cấy chuyển sang bình lên men 20 l chứa 16 l môi trường PDB ở 25°C, sục khí ở tốc độ 1 VVM (tốc độ dòng khí/thể tích môi trường/phút), khuấy ở 150 vòng/phút trong 7 ngày. Sinh khối hệ sợi được thu nhận bằng giấy lọc Whatman No.1 và được rửa 3 lần bằng nước cất khử trùng. Sấy khô sinh khối hệ sợi ở 65°C đến trọng lượng không đổi, nghiền nhỏ và bảo quản trong lọ tối màu ở 4-6°C.

Tách chiết cao tổng số: Bột hệ sợi (30 g) được cho vào bình Duran tối màu dung tích 1 l, sau đó 5 phần dung môi methanol 75% được bổ sung vào mẫu, lắc qua đêm ở 100

vòng/phút. Thu nhận dịch chiết bằng giấy lọc Whatman No.1, cặn được tách lại bằng methanol 75% trong 1 giờ. Loại bỏ dung môi bằng máy cô quay chân không ở 40°C, hòa cặn trong nước cất khử trùng và đông khô. Bảo quản cao tổng số trong lọ tối màu ở 4-6°C.

Xác định hàm lượng polysaccharide tổng số: Hàm lượng polysaccharide tổng số được xác định bằng cách sử dụng phenol-sulfuric theo phương pháp của M. Dubois và cs (1956) [22]. Bột tách chiết (10 mg) được hòa tan trong 5 ml nước cất, sau đó 2 ml dung dịch ở nồng độ 50 µg/ml được cho vào ống thủy tinh. Tiếp đến, 0,05 ml phenol 80% được thêm vào mẫu và được trộn đều trước khi thêm 5 ml axít sulfuric 95%. Hỗn hợp dung dịch được trộn đều, đặt trong nồi cách thủy ở 30°C trong 20 phút. Hàm lượng polysaccharide tổng số trong mẫu được xác định thông qua hàm lượng glucose bằng máy quang phổ UV-VIS ở bước sóng 490 nm.

Xác định hàm lượng phenolic tổng số: Hàm lượng phenol tổng số có trong cao tổng số được xác định theo phương pháp cải tiến bằng cách sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu [23]. Hòa bột tách chiết tổng số trong nước cất có nồng độ cuối cùng 100 µg/ml. Sau đó, 0,2 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% được thêm vào 1,6 ml dịch chiết, trộn đều trong 3 phút trước khi thêm 0,2 ml natri cacbonat 10%. Hỗn dịch này được giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Hàm lượng phenolic tổng số được xác định thông qua axít gallic ở bước sóng 760 nm.

Khả năng khử gốc tự do DPPH: Khả năng khử gốc tự do của cao chiết hệ sợi nấm Thượng Hoàng được đo bằng cách sử dụng DPPH theo phương pháp của Q.D. Do và cs (2014) [23]. DPPH được hòa trong methanol ở nồng độ 0,1 mM. Trộn đều 2,5 ml dung dịch mẫu với 2,5 ml dung dịch DPPH, hỗn dịch được bao phủ bằng giấy bạc và để đứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Khả năng khử 50% gốc tự do (EC_{50}) của cao chiết được xác định ở bước sóng 517 nm. Axít gallic và axít citric được sử dụng là đối chứng.

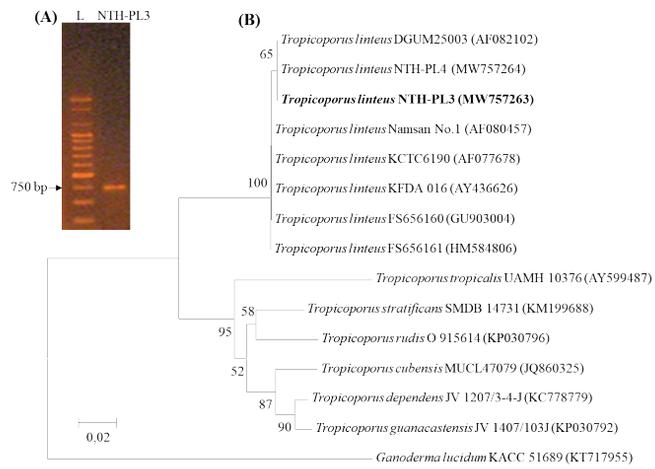
Khả năng tạo phức chất với sắt: Sử dụng phương pháp của A.A. Soares và cs (2009) [24] để xác định khả năng tạo phức chất với sắt của cao chiết. Mẫu (0,7 ml) được pha loãng trong 0,7 ml nước cất. Dung dịch pha loãng được trộn với 0,175 ml $FeCl_2$ 0,5 mM, đo hấp thu quang học lần 1 ở bước sóng 550 nm. Sau đó, 0,175 ml $C_{20}H_{12}N_4Na_2O_6S_2$ 0,5 mM được thêm vào dung dịch hỗn hợp, lắc trong 1 phút. Phản ứng được giữ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút trước khi đo hấp thu quang học lần 2 ở bước sóng 550 nm. Axít ethylenediaminetetraacetic (EDTA) và axít citric được sử dụng là đối chứng.

Xử lý số liệu: Kết quả của các thí nghiệm được xử lý bằng Student's t-test để xác định ý nghĩa thống kê. Giá trị $p<0,05$ là giới hạn sai khác có ý nghĩa thống kê.

Kết quả và bàn luận

Định danh chủng nấm NTH-PL3

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho nhân trình tự vùng gen ITS1 + 5.8S rRNA + ITS2 + 28S rRNA (ITS) bằng cặp mồi ITS5/ITS4 của chủng NTH-PL3 cho thấy xuất hiện một băng duy nhất có kích thước khoảng 750 bp (hình 2A). Báo cáo của A.M. Romanelli và cs (2014) [25] cho thấy trình tự vùng gen ITS của ngành Basidiomycota có kích thước khoảng 700~800 bp.



Hình 2. Định danh chủng nấm NTH-PL3 dựa trên trình tự vùng ITS. (A) Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng gen ITS. L: thang chuẩn 1 kb; **(B)** Sơ đồ phả hệ của chủng NTH-PL3 dựa trên trình tự vùng ITS. Hệ số bootstrap: 1000.

Kết quả giải trình tự cho thấy, trình tự vùng gen ITS của chủng nấm NTH-PL3 có chiều dài 766 bp, được công bố trên GenBank với mã số truy nhập là MW757263. Kết quả so sánh với dữ liệu công bố trên GenBank cho thấy, trình tự vùng gen ITS của chủng NTH-PL3 có sự tương đồng 99,87% với *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 (MW757264), 99,74% với các loài *Inonotus* (=*Tropicoporus*) *linteus* FS656161 (HM584806), *Inonotus* (=*Tropicoporus*) *linteus* PL0801 (FJ940906), *Phellinus* (=*Tropicoporus*) *linteus* DGUM25003 (AF082102). Báo cáo của M. Thines và cs (2018) [26] cho thấy, giới hạn về sự tương đồng khi so sánh trình tự vùng gen ITS lớn hơn 99% được coi là loài đã nhận diện. Bên cạnh đó, cây quan hệ di truyền (hình 2B) cho thấy chủng NTH-PL3 được sắp xếp vào một nhóm của chi *Tropicoporus*. Dựa vào kết quả nhận diện trình tự vùng gen ITS cho thấy chủng NTH-PL3 thuộc loài *Tropicoporus linteus*.

Việc phân loại nấm, đặc biệt là các chi có quan hệ gần về mặt di truyền gặp rất nhiều khó khăn. Dựa vào đặc điểm kiểu hình như hình thái, màu sắc quả thể nấm, hệ sợi nấm, hình dạng bào tử…, S.C. Teng (1963) [27] đã phân loại chủng nấm Thượng Hoàng thuộc chi *Phellinus* với danh pháp khoa học là *Phellinus linteus*. Đến năm 1992, chủng nấm Thượng Hoàng được phân loại lại do có các đặc

điểm kiểu hình tương đồng của chi *Inonotus* và được gọi tên là *Inonotus linteus* [28]. Gần đây, sử dụng kết hợp dữ liệu về đặc điểm kiểu hình và chỉ thị phân tử, chủng nấm Thượng Hoàng được phân loại lại, là một loài thuộc chi *Tropicoporus* [29]. Cho đến nay, danh pháp khoa học của nấm Thượng Hoàng là *Tropicoporus linteus* hay *Phellinus linteus* hoặc *Inonotus linteus* [2].

Hàm lượng polysaccharide và phenolic trong cao chiết hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng NTH-PL3

Các chất chống ôxy hóa tổng hợp được sử dụng rộng rãi trong cuộc sống, tuy nhiên các bằng chứng nghiên cứu cho thấy một số chất như butylated hydroxyanisole (BHA) và butylated hydroxytoluene (BHT) có khả năng gây ra ung thư dạ dày [30, 31]. Ngược lại, nấm được biết đến là nguồn thực phẩm an toàn, chứa đựng rất nhiều hoạt chất sinh học tiềm năng hỗ trợ sức khỏe con người. Polysaccharide và phenolic là những hoạt chất sinh học tự nhiên có hàm lượng dồi dào cả trong hệ sợi và quả thể, được chứng minh có khả năng chống ôxy hóa hiệu quả [1, 32, 33].

Theo báo cáo của Q.D. Do và cs (2014) [23] khi so sánh hàm lượng tách chiết của các hoạt chất chống ôxy hóa dưới tác động của các loại dung môi khác nhau bao gồm nước, methanol, ethanol và acetone cho thấy, methanol 75% cho hàm lượng tách chiết các chất chống ôxy hóa cao nhất so với các loại dung môi còn lại. Trong nghiên cứu này, methanol 75% được sử dụng để tách chiết hoạt chất có trong hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng, lượng cao chiết thu được là 8,93±1,15 g (chiếm 29,75±3,84%). Kết quả xác định hàm lượng polysaccharide và phenolic có trong cao chiết tổng số cho thấy có mặt đồng thời cả 2 hoạt chất này với hàm lượng lần lượt là 23,72±1,34 mg glucose/g và 18,54±1,87 mg axít gallic/g. Polysaccharide là một phân tử lớn, có khả năng chống ôxy hóa hiệu quả [34], được phân chia thành 2 nhóm là homopolysaccharide (chiếm đa số và có hoạt chất sinh học chính của nấm, chứa các phân tử glucose liên kết với nhau) và heteropolysaccharide (không chứa các phân tử glucose) [35]. Trong nấm cũng chứa dồi dào hoạt chất phenolic, trong đó axít gallic là một trong những chất chính. Bên cạnh đó, axít protocatechuic, catechol, axít gentisic… cũng được tìm thấy trong nấm [36]. Do vậy, xác định hàm lượng polysaccharide và phenolic thông qua glucose và axít gallic theo thứ tự thường cho kết quả thấp hơn so với hàm lượng polysaccharide và phenolic thực tế có trong nấm.

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng polysaccharide cao hơn khoảng 1,3 lần so với phenolic. Hàm lượng polysaccharide có trong hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng NTH-PL3 cao hơn so với *Phellinus* (=*Tropicoporus*) *nigricans* (15,33±0,21%) [34]. Báo cáo của R. Prasad và cs (2015) [37] tiến hành xác định hàm lượng phenolic có trong hệ sợi và quả thể nấm của 16 loài nấm đảm (Basidiomycota), bao gồm *Agaricus bisporus*, *Armillaria mellea*, *Auricularia auriculajudae*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Laetiporus sulphureus*, *Lentinus tigrinus*, *Lycoperdon pyriforme*, *Phellinus linteus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajorcaju*, *Polyporus arcularius*, *Russula brevipes*, *Schizophyllum commune*, *Sparassis crispa* và *Spongipellis unicolor* cho thấy, trong các hệ sợi và quả thể nấm có chứa hàm lượng phenolic trung bình lần lượt là 8,17±1,28 và 15,03±4,71 mg axít gallic/g; mặc dù hàm lượng phenolic trong hệ sợi thấp hơn khoảng 1,8 lần so với quả thể nhưng thời gian nuôi cấy của hệ sợi ngắn và dễ dàng kiểm soát điều kiện nuôi cấy hơn so với nuôi trồng quả thể nấm.

Khả năng chống ôxy hóa của cao chiết tổng số từ hệ sợi nấm chủng Thượng Hoàng NTH-PL3

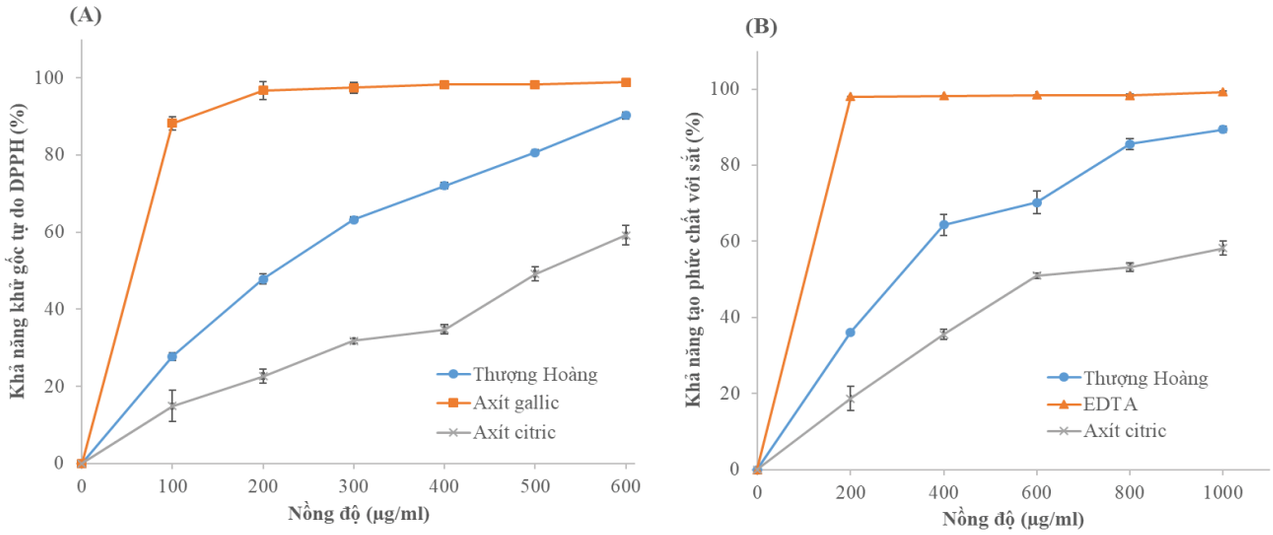
Cao chiết tổng số của hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng và các chất chuẩn được thử nghiệm đồng thời để xác định khả năng chống ôxy hóa. Kết quả được thể hiện ở bảng 1 và hình 3. Đối với khả năng khử gốc tự do DPPH, giá trị EC_{50} của cao chiết tổng số từ hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng, axít gallic và axít citric lần lượt là 268,54±3,89, 13,96±2,16 và 513,92±12,99 µg/ml. Tuy nhiên, hoạt tính khử gốc tự do DPPH của cao chiết tổng số của hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng (EC_{50}=268,54±3,89 µg/ml) trong nghiên cứu này yếu hơn so với cao chiết tổng số từ quả thể nấm (EC_{50}=50,9 µg/ml) của Nguyễn Xuân Duy và Đặng Quang Quốc (2016) [38].

Bảng 1. Hoạt tính chống ôxy hóa của cao chiết tổng số từ hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng NTH-PL3 và các chất chuẩn.

Thành phần	EC_{50} (µg/ml)	
	Khử gốc tự do DPPH	*Tạo phức chất với sắt*
Hệ sợi nấm chủng Thượng Hoàng	268,54±3,89[a]	411,65±10,87[b]
Axít gallic	13,96±2,16[a]	-
Axít citric	513,92±12,99[a]	737±13,62[b]
EDTA	-	49,06±0,61[b]

Ghi chú: chữ cái trong cùng một cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05); giá trị được biểu thị là trung bình ± độ lệch chuẩn (n=3); -: không đánh giá.

Kết quả bảng 1 cho thấy, hoạt tính khử gốc tự do DPPH của cao chiết tổng số của nấm hệ sợi nấm Thượng Hoàng yếu hơn so với axít gallic (p=0,0001), nhưng mạnh hơn so với axít citric (p=0,0013). Ở nồng độ 600 µg/ml, khả năng khử gốc tự do của cao chiết hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng đạt 90,21±0,86%, axít gallic đạt 98,87±0,21% và axít citric đạt 59,13±2,57% (hình 3A). Đối với khả năng tạo phức chất với sắt đạt cao nhất đối với chất chuẩn EDTA (giá trị EC_{50}=49,06±0,61 µg/ml). Cao chiết tổng số của hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng cần lượng cao hơn so với EDTA để liên kết với sắt tạo phức chất với giá trị EC_{50}=411,65±10,87 µg/ml, nhưng lại mạnh hơn có ý nghĩa (p<0,05) so với axít citric (EC_{50}=737±13,62 µg/ml). Ở nồng độ 1000 µg/ml, khả năng tạo phức chất với sắt của cao chiết tổng số của hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng, axít citric và



Hình 3. Khả năng khử gốc tự do DPPH (A) và tạo phức chất với sắt (B) của cao chiết tổng số từ hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng NTH-PL3.

EDTA lần lượt là 89,39±0,87, 58,20±1,83 và 99,20±0,35% (hình 3B).

Khả năng tạo phức chất với sắt của cao chiết tổng số của hệ sợi chủng nấm Thượng Hoàng NTH-PL3 (EC_{50}=411,65 µg/ml) yếu hơn so với kết quả đánh giá từ quả thể nấm Thượng Hoàng (EC_{50}=54,2 µg/ml) của Nguyễn Xuân Duy và Đặng Quang Quốc (2016) [38].

Theo báo cáo của C. Sánchez (2017) [33], các hoạt chất chống ôxy tiềm năng bao gồm polysaccharide, polyphenol, carotenoid… Những hoạt chất này có hàm lượng trong quả thể nấm nhiều hơn so với hệ sợi nấm [33, 34]. Do vậy, hoạt tính chống ôxy hóa của cao chiết tổng số từ quả thể thường tốt hơn so với tách chiết từ hệ sợi nấm.

Các gốc tự do được tạo ra trong quá trình trao đổi chất của tế bào trong trạng thái sinh lý bình thường. Cùng với đó, sắt cần thiết cho sự phát triển, sinh sản của tế bào, tổng hợp các phân tử sinh học, các phản ứng của enzyme và khả năng miễn dịch của cơ thể. Hàm lượng của các gốc tự do và sắt trong cơ thể được kiểm soát ở giới hạn an toàn trong điều kiện sinh lý bình thường. Tuy nhiên, dưới các tác nhân ngoại cảnh (tia cực tím, thuốc lá…) và nội sinh (rối loạn chuyển hóa, các enzyme hoạt động không bình thường…) dẫn đến hàm lượng các gốc tự do và sự tích tụ kim loại tăng cao, gây độc cho tế bào [39]. Các hoạt chất trong nấm Thượng Hoàng được chứng minh có hiệu quả tốt trong việc khử các gốc tự do, cũng như tạo phức chất với kim loại (cơ thể dễ dàng đào thải kim loại dưới dạng phức chất) [1, 34, 40].

Kết luận

Dựa vào kết quả phân tích trình tự vùng ITS, chủng nấm NTH-PL3 được định danh thuộc loài *Tropicoporus linteus*. Hiệu suất thu cao chiết tổng số từ hệ sợi bằng methanol 75% đạt 29,75±3,84%. Hàm lượng polysaccharide và phenolic có trong cao chiết hệ sợi nấm đạt tương ứng là 23,72±1,34 mg glucose/g và 18,54±1,87 mg axít gallic/g. Cao chiết tổng số của hệ sợi nấm có khả năng khử gốc tự do DPPH (giá trị EC_{50}=268,54±3,89 µg/ml) và tạo phức chất với sắt (EC_{50}=411,65±10,87 µg/ml).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được sự hỗ trợ về kinh phí bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo thuộc Chương trình "Nghiên cứu phát triển và ứng dụng công nghệ cao trong sản xuất cây trồng đặc trưng cho các tỉnh miền núi phía Bắc", mã số: CT2020.03.TNA-06. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] W. Chen, H. Tan, Q. Liu, et al. (2019), "A review: The bioactivities and pharmacological applications of *Phellinus linteus*", *Molecules*, **24(10)**, DOI: 10.3390/molecules24101888.

[2] G.J. Min, H.W. Kang (2021), "Artificial cultivation characteristics and bioactive effects of novel *Tropicoporus linteus* (Syn. *Phellinus linteus*) strains HN00K9 and HN6036 in Korea", *Mycobiology*, **49(2)**, pp.161-172, DOI: 10.1080/12298093.2021.1892568.

[3] T. Ikekawa, M. Nakanishi, N. Uehara, et al. (1968), "Antitumor action of some basidiomycetes, esspecially *Phellinus linteus*", *GANN Japanese Journal of Cancer Research*, **59(2)**, pp.155-157.

[4] Y. Lee, W.M. Lee, J.Y. Kim, et al. (2008), "Src kinase-targeted anti-inflammatory activity of davallialactone from Inonotus xeranticus in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells", *Br. J. Pharmacol.*, **154(4)**, pp.852-863, DOI: 10.1038/bjp.2008.136.

[5] S. Konno, K. Chu , N. Feuer, et al. (2015), "Potent anticancer effects of bioactive mushroom extracts (*Phellinus linteus*) on a variety of human cancer cells", *J. Clin. Med. Res.*, **7(2)**, pp.76-82, DOI: 10.14740/jocmr1996w.

[6] L.Y. Yang, S.C. Shen, K.T. Cheng, et al. (2014), "Hispolon inhibition of inflammatory apoptosis through reduction of iNOS/NO production via HO-1 induction in macrophages", *J. Ethnopharmacol.*, **156**, pp.61-72, DOI: 10.1016/j.jep.2014.07.054.

[7] P. Suabjakyong, K. Nishimura, T. Toida, L.J.L.D.V. Griensven (2015), "Structural characterization and immunomodulatory effects of polysaccharides from *Phellinus linteus* and *Phellinus igniarius* on the IL-6/IL-10 cytokine balance of the mouse macrophage cell lines (RAW 264.7)", *Food Funct.*, **6(8)**, pp.2834-2844, DOI: 10.1039/c5fo00491h.

[8] J.M. Hur, C.H. Yang, S.H. Han, et al. (2004), "Antibacterial effect of *Phellinus linteus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", *Fitoterapia*, **75(6)**, pp.603-605, DOI: 10.1016/j.fitote.2004.06.005.

[9] H. Feng, S. Zhang, J.M.F. Wan, et al. (2018), "Polysaccharides extracted from *Phellinus linteus* ameliorate high-fat high-fructose diet induced insulin resistance in mice", *Carbohydr. Polym.*, **200**, pp.144-153, DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.07.086.

[10] S.C. Huang, P.W. Wang, P.C. Kuo, et al. (2018), "Hepatoprotective principles and other chemical constituents from the mycelium of *Phellinus linteus*", *Molecules*, **23(7)**, DOI: 10.3390/molecules23071705.

[11] D.J. Choi, S. Cho, J.Y. Seo, et al. (2016), "Neuroprotective effects of the *Phellinus linteus* ethyl acetate extract against H_2O_2-induced apoptotic cell death of SKN-MC cells", *Nutr. Res.*, **36(1)**, pp.31-43, DOI: 10.1016/j.nutres.2015.11.005.

[12] Phạm Quang Thu (2016), "Đặc điểm sinh học của nấm Thượng Hoàng (*Phellinus linteus*) trong nuôi cấy thuần khiết", *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, **1**, tr.4231-4237.

[13] Trần Thị Lụa, Vũ Văn Hạnh (2017), "Nghiên cứu điều kiện nhân sinh khối nấm Thượng Hoàng (*Phellinus baumi*)", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, **8(81)**, tr.106-108.

[14] Trần Thị Hiền, Trần Văn Tuấn, Nguyễn Thị Lý và cs (2020), "Ảnh hưởng của một số điều kiện môi trường đến sự phát triển sinh khối nấm Thượng Hoàng (*Phellinus linteus*)", *Tạp chí Công Thương*, **42**, tr.20-23.

[15] Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Thị Bích Thùy, Vũ Thị Khánh Linh và cs (2021), "Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng hệ sợi của nấm *Phellinus linteus*", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **63(2)**, tr.39-43.

[16] Trần Thị Văn Thi, Lê Lâm Sơn, Lê Trung Hiếu, Trần Văn Khoa (2016), "Nghiên cứu hoạt tính kháng ôxy hóa của nấm Thượng Hoàng (*Phellinus linteus* (Berk. Et Curt.) Teng) trồng tại Việt Nam", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Huế*, **6(1)**, tr.107-116.

[17] N.T. Thanh, N.N. Tuan, P.C. Kuo, et al. (2018), "Chemical constituents from the fruiting bodies of *Phellinus igniarius*", *Nat. Prod. Res.*, **32(20)**, pp.2392-2397, DOI: 10.1080/14786419.2017.1413572.

[18] Hoàng Văn Hưng, Đỗ Bích Duệ, Đỗ Thị Hiền, Nguyễn Mạnh Tuấn (2022), "Đặc điểm hình thái và nuôi cấy nấm Thượng Hoàng (*Phellinus* spp.) thu thập tại các tỉnh miền núi phía Bắc, Việt Nam", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, **227(5)**, tr.171-177.

[19] H.W. Kang, D.S. Part, Y.J. Part, et al. (2002), "PCR based detection of *Phellinus linteus* using specific primers generated from universal rice primer (URP) derived PCR polymorphic band", *Mycobiology*, **30(4)**, pp.202-207.

[20] T. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor (1990), "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics", *PCR Protocols*, **18(1)**, pp.315-322, DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.

[21] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura (2016), "MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Mol. Biol. Evol.*, **33(7)**, pp.1870-1874, DOI: 10.1093/molbev/msw054.

[22] M. Dubois, K.A. Giles, J.K. Hamilton, et al. (1956), "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Anal. Chem.*, **28(3)**, pp.350-356, DOI: 10.1021/ac60111a017.

[23] Q.D. Do, A.E. Angkawijaya, P.L.T. Nguyen, et al. (2014), "Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*", *J. Food Drug Anal.*, **22(3)**, pp.296-302, DOI: 10.1016/j.jfda.2013.11.001.

[24] A.A. Soares, C.G.M.D. Souza, F.M. Daniel, et al. (2009), "Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity", *Food Chem.*, **112(4)**, pp.775-781, DOI: 10.1016/j.jfda.2013.11.001.

[25] A.M. Romanelli, J. Fu, M.L. Herrera, B.L. Wickes (2014), "A universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification", *Mycoses*, **57(10)**, pp.612-622, DOI: 10.1111/myc.12208.

[26] M. Thines, P.W. Crous, M.C. Aime, et al. (2018), "Ten reasons why a sequence-based nomenclature is not useful for fungi anytime soon", *IMA Fungus*, **9(1)**, pp.177-183, DOI: 10.5598/imafungus.2018.09.01.11.

[27] S.C. Teng (1963), *Fungi of China*, Science Press, 808pp.

[28] A.R. Teixeira (1992), "New combinations and new names in the *Polyporaceae*", *Revista Brasileira De Botanica*, **15(2)**, pp.125-127.

[29] L.W. Zhou, J. Vlasák, C. Decock, et al. (2016), "Global diversity and taxonomy of the Inonotus linteus complex (Hymenochaetales, Basidiomycota): *Sanghuangporus* gen. nov., *Tropicoporus excentrodendri* and *T. guanacastensis* gen. et spp. nov., and 17 new combinations", *Fungal Diversity*, **77**, pp.335-347, DOI: 10.1007/s13225-015-0335-8.

[30] A.A. Botterweck, H. Verhagen, R.A. Goldbohm, et al. (2000), "Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands Cohort Study", *Food Chem. Toxicol.*, **38(7)**, pp.599-605, DOI: 10.1016/s0278-6915(00)00042-9.

[31] S.P. Felter, X. Zhang, C. Thompson (2021), "Butylated hydroxyanisole: Carcinogenic food additive to be avoided or harmless antioxidant important to protect food supply?", *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **121**, DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.104887.

[32] M. Kozarski, A. Klaus, D. Jakovljevic, et al. (2015), "Antioxidants of edible mushrooms", *Molecules*, **20(10)**, pp.19489-19525, DOI: 10.3390/molecules201019489.

[33] C. Sánchez (2017), "Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms", *Synth. Syst. Biotechnol.*, **2(1)**, pp.13-22, DOI: 10.3390/molecules201019489.

[34] Z. Wang, C. Wang, Y. Quan (2014), "Extraction of polysaccharides from *Phellinus nigricans* mycelia and their antioxidant activities *in vitro*", *Carbohydr. Polym.*, **99**, pp.110-115, DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.08.073.

[35] M. Friedman (2016), "Mushroom polysaccharides: Chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans", *Foods*, **5(4)**, DOI: 10.3390/foods5040080.

[36] F. Bach, A.A. Ferreira Zielinski, C.V. Helm, et al. (2019), "Bio compounds of edible mushrooms: *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities", *LWT - Food Science and Technology*, **107**, pp.214-220, DOI: 10.1016/j.lwt.2019.03.017.

[37] R. Prasad, V.K. Varshney, N.S.K. Harsh, M. Kuma (2015), "Antioxidant capacity and total phenolics content of the fruiting bodies and submerged cultured mycelia of sixteen higher Basidiomycetes mushrooms from India", *Int. J. Med. Mushrooms*, **17(10)**, pp.933-941, DOI: 10.1615/intjmedmushrooms.v17.i10.30.

[38] Nguyễn Xuân Duy, Đặng Quang Quốc (2016), "Hoạt tính chống ôxy hóa và ức chế enzym tyrosinase của nấm Linh chi Thượng Hoàng (*Phellinus linteus*) ở Việt Nam", *Tạp chí Dược học*, **56(3)**, tr.38-41.

[39] H. Ye, Y. Shou, X. Liu, et al. (2019), "Recent advances on reactive oxygen species-responsive delivery and diagnosis system", *Biomacromolecules*, **20(7)**, pp.2441-2463, DOI: 10.1021/acs.biomac.9b00628.

[40] I. Gulcin, S.H. Alwasel (2022), "Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant method", *Processes*, **10(1)**, DOI: 10.3390/pr10010132.