

KHẢO SÁT QUY TRÌNH CHIẾT QUẢ THỂ NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO CHO HÀM LƯỢNG CORDYCEPIN TỐI ƯU

Nguyễn Thị Liên Thương⁽¹⁾, Lý Hà My⁽¹⁾, Nguyễn Minh Chánh⁽¹⁾, Nguyễn Đăng Khoa⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 14/12/2021; Ngày gửi phản biện 16/12/2021; Chấp nhận đăng 30/01/2022

Liên hệ Email: thuongntl@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2022.01.271>

Tóm tắt

Nấm đông trùng hạ thảo là một loại nấm dược liệu quý, có công dụng trong việc bồi bổ và hồi phục sức khỏe. Trong đó, cordycepin là dược chất chính của nấm đông trùng hạ thảo, có nhiều tác dụng trong việc ức chế sự phát triển của tế bào ung thư và kháng virus. Tuy nhiên, hiện nay chưa có nhiều nghiên cứu về khảo sát ảnh hưởng của điều kiện chiết đến hàm lượng cordycepin. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện: nhiệt độ, nồng độ dung môi, và thời gian chiết đến hiệu quả thu nhận cordycepin trên quả thể nấm đông trùng hạ thảo được nuôi trồng tại Viện Phát triển Ứng dụng, Trường Đại học Thủ Dầu Một. Hàm lượng cordycepin trong dịch chiết quả thể nấm được kiểm tra bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (UFLC). Kết quả khảo sát cho thấy hàm lượng cordycepin thu nhận cao nhất khoảng 1.10g/kg quả thể tươi ở nồng độ cồn 70°, nhiệt độ chiết 80°C, trong 120 phút, tương đương 6.97g/kg quả thể nấm khô. Kết quả này đóng vai trò cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm khai thác giá trị dược liệu từ dịch chiết của nấm đông trùng hạ thảo.

Từ khóa: nhiệt độ chiết, nồng độ cồn, quá trình chiết, thời gian tách chiết

Abstract

INVESTIGATING THE EXTRACTION CONDITION OF FRUITING BODY OF CORDYCEPS MILITARIS FOR THE OPTIMAL CONTENT OF CORDYCEPIN

Cordyceps militaris is a traditional medicinal mushroom that helps to revitalize and increase human health. Cordycepin is the main active compound of *Cordyceps militaris*, which plays an active role in the inhibition of cancer cell growth and in the prevention of virus infection. However, there has been little research on the effects of the extraction process on the level of cordycepin. In this study, we investigated the effects of temperature, the concentration of solvent, and time of extraction on the level of cordycepin in the extract of *Cordyceps militaris* fruiting bodies that are cultured at the Institute of Applied Technology, Thu Dau Mot University. The levels of cordycepin in the extract were evaluated by ultra-fast liquid chromatography (UFLC). The results

showed the highest level of cordycepin was obtained at 1.10g/kg fresh fruiting bodies using 70°EtOH, at 80°C for 2h. This level was equivalent to 6.97g/kg of cordycepin per dried fruiting bodies. These findings provide the basis for subsequent research on the pharmaceutical effects of fruiting body extract of Cordyceps militaris.

1. Đặt vấn đề

Đông trùng hạ thảo là một loại nấm dược liệu đã được sử dụng trong y học cổ truyền với nhiều công dụng như kháng viêm, điều hòa miễn dịch, chống oxy hóa, phục hồi da và hồi phục sức khỏe... (Das và cs., 2010; Nguyen và cs., 2021). Trong đó cordycepin, 3'-deoxyadenosine, là một gốc nucleoside có cấu trúc tương tự adenosine, và được xem là một trong những hoạt chất chính của nấm đông trùng hạ thảo. Cordycepin đã được nghiên cứu và chứng minh tác dụng kháng khuẩn (Ahn và cs., 2000), kháng nấm (Sugar và cs., 1998), kháng ung thư và đang được nghiên cứu lâm sàng (pha hai) để điều trị ung thư máu (Verma và cs., 2021). Ngoài ra, cordycepin cũng có khả năng kháng nhiều loại virus như virus cảm cúm, virus bại liệt (Poliovirus), và các RNA virus (Picornavirus) (Kaij-a-Kamb và cs., 1992). Đặc biệt, cordycepin có khả năng ức chế biểu hiện của gen của virus SARS-CoV-19, ức chế 65% gene E và gen 42% gene N, giúp ngăn chặn sự phát triển của SARS-CoV-19 trong tế bào (Verma và cs., 2021).

Nhiều quy trình tách chiết cordycepin đã được tiến hành dưới sự hỗ trợ của các công nghệ bao gồm sóng siêu âm, lò vi sóng, áp suất cao, chiết xuất Soxhlet và chiết xuất hồi lưu. Trong đó, các yếu tố như: dung môi, tỷ lệ mẫu : dung môi, nhiệt độ và thời gian chiết ảnh hưởng lớn đến hiệu quả thu nhận cordycepin (Yang và cs., 2008; Song và cs., 2007; Ni và cs., 2009). Hiện nay, trong nước chưa có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của điều kiện tách chiết đến hiệu quả thu nhận cordycepin từ quả thể nấm đông trùng hạ thảo. Gần đây, Đoàn Thị Phương Thùy và cộng sự nghiên cứu ảnh hưởng của các dung môi khác nhau, pH, nhiệt độ tách chiết đến hàm lượng cordycepin trong dung dịch. Kết quả cho thấy, hàm lượng cordycepin từ quả thể nấm đạt cao nhất trong dung môi ethanol: nước, 2:1 (v/v), pH 7 và nhiệt độ 55°C (Thùy và cs., 2018). Tuy nhiên, nghiên cứu khảo sát ở khoảng nhiệt độ thấp hơn 65°C, và chưa đánh giá ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng cordycepin.

Hiện nay, mô hình trồng nấm đông trùng hạ thảo ở Bình Dương đang phát triển mạnh, nghiên cứu quy trình tách chiết từ quả thể nấm đông trùng hạ thảo là rất cần thiết để khai thác thêm tiềm năng và phát triển đầu ra cho sản phẩm. Trong nghiên cứu này, nhóm chúng tôi sử dụng quả thể nấm đông trùng hạ thảo được nuôi cấy theo quy trình tối ưu của Viện Phát triển Ứng dụng, Trường Đại học Thủ Dầu Một, và đã được chuyển giao cho nhiều cơ sở nuôi trồng nấm dược liệu trên địa bàn tỉnh. Quả thể nấm được tách chiết với dung môi ethanol có sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Các điều kiện khảo sát bao gồm: nồng độ EtOH, nhiệt độ chiết và thời gian chiết đến hàm lượng cordycepin. Hàm lượng cordycepin trong dịch chiết được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (UFLC) và được quy đổi về đơn vị g/kg, cordycepin/quả thể tươi.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chung nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) được cung cấp bởi Viện Phát triển Ứng dụng Trường Đại học Thủ Dầu Một. Giống được nuôi trên môi trường rắn và cảm ứng ánh sáng. Quả thể được thu nhận ở giai đoạn già hóa (sau 65 ngày) nhằm đảm bảo hàm lượng được chất cao nhất.

2.2. Khảo sát độ ẩm của quả thể nấm đông trùng hạ thảo

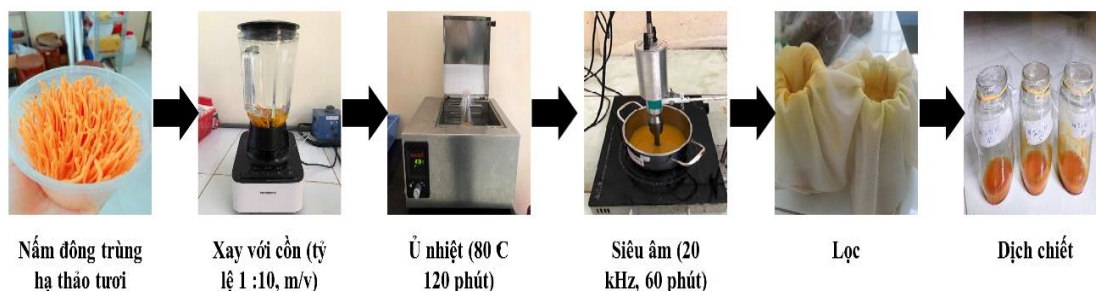
Quy trình khảo sát độ ẩm của quả thể nấm được thực hiện theo TCVN 3649-2000. Cân 2g đông trùng hạ thảo tươi và sấy ở nhiệt độ 70°C trong khoảng 2h. Mẫu được cho vào bình hút ẩm (5 phút) trước khi kiểm tra khối lượng. Quá trình sấy dừng lại khi khối lượng mẫu giữa hai lần cân liên tiếp không đổi. Độ ẩm của quả thể nấm được tính bằng công thức như sau:

$$\text{Độ ẩm (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \%$$

Trong đó m_1 là khối lượng nấm trước khi sấy, và m_2 là khối lượng quả thể nấm sau khi sấy.

2.3. Quy trình chiết

Quả thể nấm được chiết xuất theo phương pháp sau: Cân 20g đông trùng hạ thảo tươi, và xay nhuyễn với 200mL cồn 70°. Hỗn hợp được ủ ở điều kiện nhiệt độ 80°C trong 120 phút và đánh siêu âm với tần số 20kHz trong 60 phút. Hỗn hợp dịch chiết được ly tâm 5500rpm và được lọc qua giấy lọc để loại bỏ cặn, sau đó dịch lọc và cô cách thủy ở nhiệt độ 85°C.



Hình 1. Quy trình tách chiết quả thể tươi nấm đông trùng hạ thảo

2.4. Các thông số khảo sát

2.4.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cồn

Quá trình khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cồn từ 30° đến 70°, các thông số khác được giữ cố định như quy trình chiết cơ bản.

2.4.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Quá trình khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ từ 65°C đến 85°C, các thông số khác

được giữ cố định như quy trình chiết cơ bản.

2.4.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết

Quá trình khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết từ 30 phút đến 120 phút, các thông số khác được giữ cố định như quy trình chiết cơ bản.

2.5. Phương pháp phân tích cordycepin

Hàm cordycepin trong sản phẩm cao được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (ultra-fast liquid chromatography_UFLC). Hệ thống sắc ký lỏng cao áp (Shimadzu UFLC Prominence, Kyoto, Japan) bao gồm: bơm (LC-20A), cột sắc ký InertSustain C18 (5 μ m, 250 $\times$ 4.6mm), đầu dò UV (SPD-20A). Quá trình phân tách được thực hiện dưới những điều kiện sau: pha động bao gồm nước và methanol (tỷ lệ 80:20 v/v), quá trình giải hấp được thực hiện với tốc độ 1.0ml/min. Thể tích mẫu 20 μ l, bước sóng 257nm, nhiệt độ cột 40°C. Cordycepin chuẩn được mua từ Sigma-Aldrich, chất chuẩn được pha loãng và dựng đường chuẩn theo nồng độ từ 2-5 μ g/mL.

2.6. Phương pháp phân tích thống kê

Các phân tích được thực hiện ba lần, kết quả được tính trung bình. Các số liệu được thu thập và phân tích dữ liệu bằng phần mềm Statgraphics XV.I, phân tích ý nghĩa khác biệt bằng phương pháp phân tích phương sai (One-way ANOVA).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khảo sát độ ẩm của quả thể tươi nấm đông trùng hạ thảo

Độ ẩm của quả thể nấm được tiến hành khảo sát theo quy trình tiêu chuẩn. Kết quả được thể hiện ở bảng 1, cho thấy hàm lượng ẩm của nấm được khoảng 84.23%. Thực hiện quy đổi, cho kết quả 1kg nấm quả thể khô tương đương khoảng 6,34kg quả thể tươi.

Bảng 1. Độ ẩm của quả thể nấm

Khối lượng trước sấy (g)	Khối lượng sau sấy (g)	Độ ẩm (%)
2,000 $\pm$ 0.004	0,315 $\pm$ 0.000	84,23 $\pm$ 0.035

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện tách chiết trên quả thể tươi của nấm đông trùng hạ thảo, kết quả độ ẩm giúp chúng tôi có thể quy đổi hàm lượng cordycepin trên khối lượng quả thể khô, và so sánh với các quả đã công bố trước đó.

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

Sự gia tăng nhiệt độ thường sẽ ảnh hưởng đến độ hòa tan và hệ số khuếch tán của quá trình chiết (Mokrani và cs., 2016). Tuy nhiên, tùy vào cấu trúc của hợp chất tự nhiên, nhiệt độ chiết sẽ được điều chỉnh giúp thu nhận hàm lượng cao và giữ nguyên hoạt tính của hoạt chất. Trong các nghiên cứu trước đây, cordycepin thường được tách chiết ở nhiệt độ cao (60-80°C) (Ni và cs., 2009; Zhang và cs., 2012; Yu và cs., 2006), do đó chúng tôi chọn khoảng nhiệt độ khảo sát từ 65-80°C. Kết quả cho thấy, nhiệt độ cao giúp làm tăng hiệu quả thu nhận cordycepin (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng cordycepin

Nhiệt độ (°C)	Hàm lượng cordycepin (g/kg)
65	0,38 ± 0,027
70	0,56 ± 0,025
75	0,90 ± 0,017
80	1,15 ± 0,06
85	1,04 ± 0,09

Tại nhiệt độ 80°C hàm lượng cordycepin đạt được cao nhất với nồng độ 1,15g/kg, cao hơn khoảng 3 lần so với hàm lượng cordycepin được tách chiết ở nhiệt độ 65°C. Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Hong Zhang và cộng sự (2012), cho thấy hiệu quả tách chiết cordycepin cao ở nhiệt độ 85°C.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ cồn

Nhiều báo cáo trước đó cho thấy, hỗn hợp dung môi cồn và nước là dung môi phù hợp cho chiết xuất cordycepin ở quả thể nấm đông trùng hạ thảo (Song và cs., 2007; Ni và cs., 2009). Do đó chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cồn (30°-70°) đến hiệu quả thu nhận cordycepin.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ cồn đến hàm lượng cordycepin

Nồng độ cồn °	Hàm lượng cordycepin (g/kg)
30	0,88 ± 0,043
40	0,91 ± 0,065
50	0,97 ± 0,018
60	0,98 ± 0,046
70	1.10 ± 0,095

Kết quả cho thấy quả thể nấm chiết ở nồng độ cồn 70° có hàm lượng cordycepin cao nhất đạt khoảng 1.10g/kg, cao gấp 1.25 lần so với mẫu được chiết ở nồng độ cồn 30°. Ảnh hưởng của hỗn hợp dung môi làm thay đổi sự phân cực của cồn và nước riêng rẽ và giúp làm tăng tính tan của cordycepin, dẫn đến tăng hiệu quả tách chiết. Nghiên cứu trước đây cũng cho thấy việc sử dụng riêng rẽ dung môi cồn, hoặc nước cho hiệu quả tách chiết cordycepin thấp hơn hỗn hợp dung môi (Thùy và cs., 2018).

3.4. Ảnh hưởng của thời gian chiết

Quá trình chiết bao gồm nhiều quá trình: Sự hòa tan của dược chất trong dung môi chiết, sự khuếch tán của dược chất và sự dịch chuyển của các chất tan qua vách tế bào. Các quá trình này cần diễn ra trong điều kiện thích hợp, và trong khoảng thời gian phù hợp để đảm bảo hiệu quả chiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát thời gian chiết trong khoảng 30-120 phút. Kết quả cho thấy thời gian tách chiết tối ưu cho hàm lượng cordycepin là 120 phút và hàm lượng cordycepin đạt khoảng 1,05g/kg, cao hơn khoảng 2.1 lần so với hàm lượng cordycepin được tách chiết trong khoảng 30 phút (Bảng 4). Trong một nghiên cứu khác, Song và cộng sự (2007) cho thấy quy trình chiết sử dụng EtOH 20% với tỷ lệ 33mL:1g, EtOH: khối lượng quả thể, trong 102 phút có sự hỗ trợ sóng siêu âm cho hiệu quả thu nhận cordycepin tối ưu.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng cordycepin

Thời gian chiết (phút)	Hàm lượng cordycepin (g/kg)
30	0,49 ± 0,001
60	0,93 ± 0,048
120	1,05 ± 0,090

Hiệu quả của quá trình chiết đạt khoảng 1.10g/kg quả thể tươi, trong đó hàm lượng ẩm của quả thể được xác định khoảng 84,23%, tương đương hàm lượng cordycepin trên khối lượng quả thể khô có thể đạt khoảng 6,974g/kg. Kết quả này tương đương kết quả được khảo sát trên bột quả thể khô của giống nấm từ Nhật (khoảng 6.95g/kg) (Thùy và cs., 2018). Kết quả cho thấy quy trình khảo sát có thể tách chiết được hàm lượng cordycepin cao từ quả thể nấm đông trùng hạ thảo, giúp gia tăng khả năng ứng dụng của dịch chiết nấm đông trùng hạ thảo.

4. Kết luận

Kết quả khảo sát cho thấy nồng độ còn 70°, nhiệt độ chiết 80°C, thời gian chiết trong 120 phút phù hợp nhất cho việc tách chiết cordycepin từ quả thể nấm đông trùng hạ thảo. Hàm lượng cordycepin tách chiết tối ưu đạt khoảng 1.10g/kg quả thể nấm tươi và khoảng 6,974g/kg quả thể sấy khô. Kết quả có thể được ứng dụng để tách chiết các sản phẩm từ quả thể nấm đông trùng giàu hàm lượng cordycepin, và nâng cao hơn giá trị sử dụng của nấm đông trùng hạ thảo.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Thủ Dầu Một trong đề tài mã số DT.21.2-038.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ahn Y-J, Park S-J, Lee S-G, Shin S-C, Choi D-H. (2000). Cordycepin: Selective Growth Inhibitor Derived from Liquid Culture of Cordyceps militaris against Clostridium spp. *Journal of agricultural food chemistry*, 48(7), 2744-2748.
- [2] Das SK, Masuda M, Sakurai A, Sakakibara M. (2010). Medicinal uses of the mushroom Cordyceps militaris: current state and prospects. *Fitoterapia*, 81(8), 961-968.
- [3] Kaij-a-Kamb M, Amoros M, Girre L. (1992). Search for new antiviral agents of plant origin. *Pharmaceutica acta Helvetiae*, 67(5-6), 130-147.
- [4] Mokrani A, Madani K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and purification Technology*, 162, 68-76.
- [5] Nguyen L-TT, Vo T-H, Nguyen D-K, Nguyen M-C, Le U-CN (2021). Effects of Cordyceps militaris extract and its mixture with silica nanoparticles on burn wound healing on mouse model. *Journal of Drug Delivery Science Technology*, 102901.

- [6] Ni H, Zhou X-H, Li H-H, Huang W-F. (2009). Column chromatographic extraction and preparation of cordycepin from *Cordyceps militaris* waster medium. *Journal of Chromatography B*, 877(22), 2135-2141.
- [7] Song JF, Liu CQ, Li DJ, Jin BQ. (2007). Optimization of cordycepin extraction from cultured *Cordyceps militaris* by HPLC-DAD coupled with uniform design. *Journal of Chemical Technology Biotechnology: International Research in Process, Environmental Clean Technology*, 82(12), 1122-1126.
- [8] Sugar AM, McCaffrey RP. (1998). Antifungal activity of 3'-deoxyadenosine (cordycepin). *Antimicrobial agents Chemotherapy*, 42(6), 1424-1427.
- [9] Thùy ĐTP, Ánh TTN, Mai NTJKTVCN (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), 13(1), 93-102.
- [10] Verma AK, Aggarwal R. (2021). Repurposing potential of FDA-approved and investigational drugs for COVID-19 targeting SARS-CoV-2 spike and main protease and validation by machine learning algorithm. *Chemical biology drug design*, 97(4), 836-853.
- [11] Yang F, Li S. (2008). Effects of sample preparation methods on the quantification of nucleosides in natural and cultured *Cordyceps*. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 48(1), 231-235.
- [12] Yu HM, Wang B-S, Huang SC, Duh P-D. (2006). Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54(8), 3132-3138.
- [13] Zhang H, Wang JW, Dong SZ, Xu FX, Wang SH. (2012). The optimization of extraction of cordycepin from fruiting body of *Cordyceps militaris* (L.) Link. In: *Advanced Materials Research*, Trans Tech Publ, 1024-1028.