

## XÁC ĐỊNH THỜI GIAN THU HOẠCH ĐỂ NUÔI CÂY NẤM *Cordyceps militaris* CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA CAO NHẤT

LÂM KHẮC KỶ\*, NGUYỄN THÀNH LÝ, PHẠM THỊ THUỶ TIÊN, PHẠM VIỆT CHƯƠNG,  
LÊ ANH DŨNG, TRẦN TÀI

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

\* Tác giả liên hệ: lamkhacky@iuh.edu.vn

DOIs: <https://www.doi.org/10.46242/jstiuh.v79i1.5802>

**Tóm tắt.** *Cordyceps militaris* (Đông trùng hạ thảo) là một loài nấm dược liệu quý, được biết đến với hàm lượng cao các hợp chất chống oxy hóa như flavonoid, polyphenol và cordycepin. Thời điểm thu hoạch có vai trò quan trọng trong việc tối ưu hóa hàm lượng các hợp chất này nhằm nâng cao giá trị dược liệu của nấm, tuy nhiên quả thể nấm thường có giá thành khá cao. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định thời gian thích hợp để thu nhận để nuôi trồng *C. militaris* có hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất. Thí nghiệm thu nhận để nuôi trồng nấm ở những giai đoạn sinh trưởng khác nhau từ ngày 0 đến 10, 20, 30, 40, 50, 60 ứng với các giai đoạn sinh sợi nấm đến quả thể trưởng thành. Sau đó, thành phần hóa học của các giá thể được xác định bằng phương pháp GC/MS, khả năng kháng oxy hóa bằng đánh giá bằng cách xác định hàm lượng polyphenol tổng, năng lực khử và khả năng trung hòa gốc tự do DPPH. Kết quả cho thấy hoạt tính kháng oxy hóa tăng dần theo thời gian sinh trưởng và đạt mức cao nhất vào giai đoạn trưởng thành của quả thể vào ngày thứ 50. Những phát hiện này cung cấp cơ sở khoa học quan trọng cho việc tối ưu hóa quy trình thu hoạch phế phụ phẩm nuôi trồng nấm *C. militaris* trong nước, góp phần chủ động nâng cao chất lượng nguyên liệu cho ngành công nghiệp dược phẩm và thực phẩm chức năng từ nguồn phế phụ liệu nội địa theo hướng phát triển kinh tế sinh học tuần hoàn.

**Từ khóa.** Thời gian thu nhận, *Cordyceps militaris*, DPPH, polyphenol, năng lực khử.

### 1. GIỚI THIỆU

*Cordyceps militaris* (*C. militaris*) thuộc chi *Cordyceps* ký sinh trên ấu trùng thuộc chi *Thitarodes* (John & Matt, 2008 [1]) từ lâu đã được sử dụng trong y học phương Đông như nguồn dược liệu quan trọng với các chất có hoạt tính sinh học, tổng hàm lượng phenolic và hoạt tính chống oxy hóa của quả thể. Đa số các công trình nghiên cứu đã được công bố thường tập trung vào thành phần nuôi cấy trên để nuôi cấy y giá thể - môi trường rắn để nuôi cấy nấm *C. militaris* và phương pháp nuôi cấy để thu nhận các hoạt chất trên quả thể như cordycepin, Adenosine.. [2]. Các yếu tố được xác định là quan trọng để thu nhận quả thể có chất lượng cao trong sản xuất nhân tạo bao gồm thời gian nuôi cấy nhanh, thành phần nuôi cấy và phương thức đơn giản để dễ dàng mở rộng quy mô sản xuất và nhanh chóng thu được các hợp chất sinh học cụ thể [3].

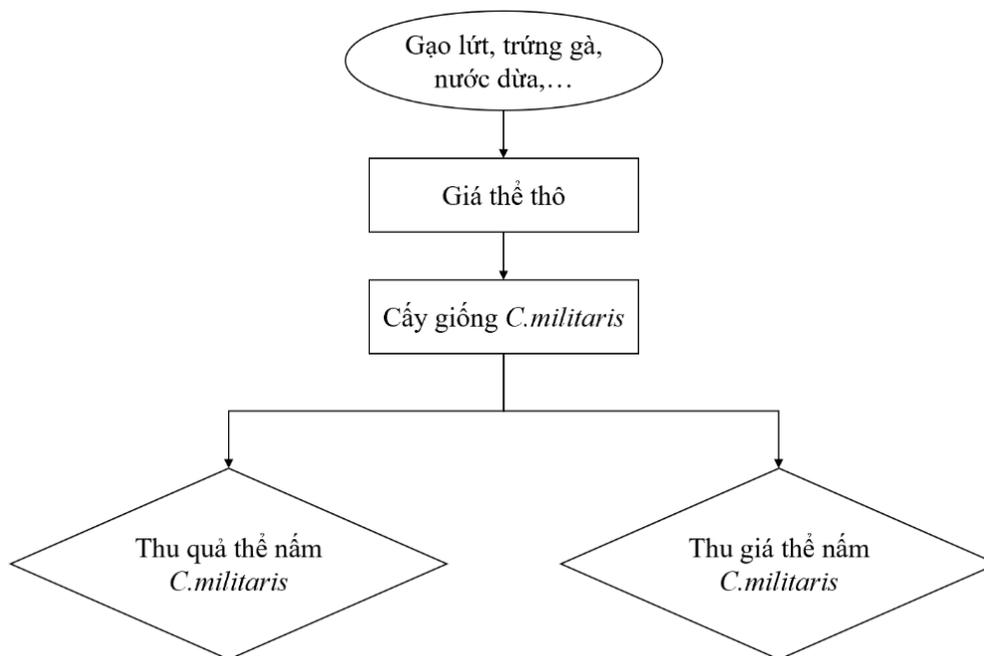
Tại Việt Nam trong những năm gần đây, các nhà khoa học trong nước cũng đã có nhiều nghiên cứu về thành phần của để nuôi cấy nấm nhằm tối ưu hóa việc thu nhận các hoạt chất sinh học sau nuôi cấy như công bố của Trinh Xuân Thi, 2016 về thành phần trong môi trường nuôi cấy tối ưu gồm gạo ST20 và có bổ sung thêm 3% glucose, 1% peptone, 1% yeast extract, 0,01% kitin [4] hay công bố của công ty TNHH Nấm Sinh học Việt Nam bao gồm: Gạo lứt, nước dừa, lòng trắng trứng gà, khoai tây, peptone, cao nấm men, saccharose,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Agar. Các thành phần này cung cấp dinh dưỡng để nuôi quả thể nấm, phần lớn dinh dưỡng sẽ được nấm hấp thụ, tuy nhiên sau khi thu hoạch quả thể nấm vẫn còn lượng dinh dưỡng chưa sử dụng hết nằm lại trong phần giá thể. Phần giá thể bị bỏ đi sau khi thu hoạch quả thể vẫn còn thành phần dinh dưỡng mà nấm chưa hấp thụ hết và đặc biệt có thể xuất hiện các hoạt chất được sinh tổng hợp trong quá trình nấm phát triển và trưởng thành. Các hoạt chất này tập trung ở phần gốc rễ của nấm và không được thu nhận vì nằm sâu trong lòng giá thể rất khó tách chiết. Đây là vấn đề ít được các nhà khoa học trong và ngoài nước chú ý nghiên cứu cũng như công bố, có thể do hoạt tính sinh học của chúng mang lại khá thấp so với sinh khối hệ sợi hay quả thể. Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích một số hoạt chất trong để nuôi cấy và hoạt tính chống oxy hóa của chúng theo các thời gian nuôi cấy khác nhau nhằm tìm ra mốc thời gian thích hợp để thu nhận để nuôi cấy nấm làm nguyên liệu

được và thực phẩm phục vụ cộng đồng theo hướng tận dụng nguồn phế phụ liệu nội địa đáp ứng kinh tế sinh học tuần hoàn.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Nguyên liệu

Giá thể nuôi trồng nấm trên môi trường bán rắn theo các mốc thời gian 0, 10, 20, 30, 40, 50 và 60 ngày được cung cấp bởi Công ty nấm sinh học Việt Nam theo qui trình thu nhận sau:



Hình 1. Quy trình thu nhận giá thể nấm *C.militaris* Công ty nấm sinh học Việt Nam

### 2.2. Hoá chất

Nguồn hóa chất cho các thử nghiệm gồm: Vitamin C, Acid gallic  $C_6H_2(OH)_3COOH$ , DPPH (2,2diphenyl-1-picrylhydrazyl), Sodium dihydrophosphate  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , Sodium hydrophosphate  $Na_2HPO_4$ , Thuốc thử Folin-Ciocalteu (Trung Quốc), Tricloroacetic acid (Trung Quốc), Potassium chloride (Trung Quốc), Potassium ferricyanide (Trung Quốc)  $K_3[Fe(CN)_6]$ , Clorua ferric (Trung Quốc)  $FeCl_3$ , Natri cacbonat (Trung Quốc)...

Các dung môi dùng để chiết xuất gồm các dung môi có khả năng hòa tan các chất ở các độ phân cực khác nhau như: Methanol 80%  $CH_3OH$ , Ethanol 96%, Acetone, Etyl acetate

### 2.3. Thiết bị

Chiết xuất cao toàn phần dùng Bình chiết ngấm kiệt và bình lắng 500 ml (ISOLAB) cho chiết cao phân đoạn. Làm khô dung dịch đến khối lượng không đổi với Máy cô quay (IKA HB10). Các thiết bị phân tích hỗ trợ gồm: Tủ sấy Memmert, Cân phân tích, Máy đo quang phổ, Bể ổn nhiệt, Máy vortex và Máy đo pH

### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.4.1. Xác định thành phần hóa học của các giá thể thu nhận được từ ngày 0 đến ngày 60.

Hợp chất có trong cao chiết nấm *C. militaris* được phân tích bằng phương pháp sắc kí lỏng khối phổ (GC-MS). Tín hiệu chất sẽ được phát hiện dựa trên sự trùng thời gian lưu  $R_t$  giữa hệ thống GC và hệ thống MS, theo đó hợp chất được phát hiện dựa trên sự trùng khớp về thời gian lưu  $R_t$  và số khối MS so với chất chuẩn.

Sử dụng các mẫu cao chiết của các mẫu giá thể 0, 10, 20, 30, 40, 50 và 60 ngày để thực hiện xác định thành phần hóa học. Mẫu được gửi tại Trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm TPHCM – Case

#### 2.4.2. Phương pháp phân tích tổng hàm lượng polyphenol (TPC)

TPC trong các mẫu được xác định bằng phương pháp so màu dựa trên quy trình được mô tả bởi Zhou và cs (2020) [6]. Thuốc thử Folin–Ciocalteu (FC) (2ml) được thêm vào 2ml dịch chiết đã pha loãng. Sau 3 phút, 750 $\mu$ l dung dịch natri cacbonat khan (7,5% trọng lượng) được thêm vào, và hỗn hợp này được định mức lên 10ml bằng nước cất. Sau 2h, độ hấp thụ được ghi lại ở bước sóng 765nm. Đường chuẩn được xây dựng với acid gallic làm chất chuẩn ở nồng độ từ 0 – 100  $\mu$ g/ml.

Tổng hàm lượng polyphenol được xác định theo công thức:

$$C = c \cdot V/m$$

Trong đó:

C : Tổng hàm lượng polyphenol của cao chiết (mgGAE/g)

c : nồng độ acid gallic từ đường chuẩn (mg/ml)

V : thể tích cao chiết (ml)

m : Khối lượng cao chiết (g).

#### 2.4.3 Phương pháp phân tích khả năng bắt gốc tự do DPPH

Phương pháp thực hiện dựa trên nghiên cứu của Brand-Williams và cộng sự (1995) [5].

**Nguyên tắc:** 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> (DPPH) có khả năng tạo ra các gốc tự do bền trong dung dịch methanol bão hòa vì phân tử không bị dinner hóa như một số gốc tự do khác. Những chất có khả năng làm trung hòa hoặc bao vây các gốc tự do sẽ làm giảm cường độ hấp thụ ánh sáng của các gốc tự do DPPH bằng cách nhận một nguyên tử hydro từ chất kháng oxy hóa với các hydrazine tương ứng. Hoạt tính kháng oxy hóa được đánh giá ở bước sóng 517nm thông qua giá trị hấp thụ ánh sáng của dung dịch thử nghiệm so với đối chứng khi đọc trên máy đo OD.

Khả năng bắt gốc tự do được biểu diễn thông qua phần trăm bắt gốc và được tính theo công thức: (2-1)

$$I\% = \left[ A_{control} - \frac{A_{sample} - A_{blank}}{A_{control}} \right] \times 100$$

Trong đó:

I% : Tỷ lệ bắt gốc DPPH (%)

A<sub>control</sub> : Độ hấp thụ của mẫu đối chứng

A<sub>sample</sub> : Độ hấp thụ của mẫu thí nghiệm sau khi ủ 30 phút

A<sub>blank</sub> : Độ hấp thụ của mẫu trắng

#### 2.4.4. Phương pháp xác định năng lực khử

Phương pháp được thực hiện dựa trên nghiên cứu của Nguyễn Thị Hằng và cộng sự (2017) [7].

**Nguyên tắc:** Chất kháng oxy hóa có trong mẫu thử sẽ thử ion Fe<sup>3+</sup> trong phân tử kali ferricyanid (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) thành ion Fe<sup>2+</sup> trong phân tử kali ferrocyanid (K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]). Khi bổ sung FeCl<sub>3</sub>, Fe<sup>3+</sup> phản ứng với ion ferrocyanid tạo thành phức hợp ferris ferrocyanid (K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) màu xanh dương.

**Tính giá trị IC<sub>50</sub>:** Với những mẫu có hoạt tính biến thiên tuyến tính với nồng độ, chúng ta vẽ đường thẳng y= ax + b đi qua tất cả các điểm (với y là phần trăm ức chế, x là nồng độ). Với những mẫu có hoạt tính không biến thiên tuyến tính với nồng độ, chúng ta chọn 2 nồng độ ức chế trên và dưới 50% và tiến hành vẽ đường thẳng y= ax + b, với hệ số a,b đã biết. Thay y = 50% vào phương trình sẽ tìm được giá trị x. Đó chính là nồng độ ức chế 50% hoạt tính.

#### 2.4.5. Phương pháp đánh giá cảm quan

Đánh giá cảm quan sản phẩm bột để nấm *C. Militaris* bằng phép thử cho điểm thị hiếu, sử dụng thang điểm Hedonic bởi 70 thành viên là sinh viên Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh và cho điểm mức độ yêu thích theo thang điểm Hedonic (7 điểm). [8][9]

Phân tích dữ liệu thu được bằng Excel. Số liệu được thu thập, xử lý bằng phần mềm Statgraphic. Kết quả được biểu thị dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD)

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả phân tích thành phần hóa học của giá thể nuôi trồng nấm *C. Militaris* ở ngày 0, 10, 20, 30, 40, 50 và 60

Theo qui trình thu nhận giá thể ở hình 1, chúng tôi thu được 7 loại giá thể từ ngày 0 đến ngày 60.



Hình 2. Các giá thể nấm *C. Militaris* thu được theo thời gian từ ngày 0 đến ngày 60.

Các mẫu giá thể thu được gửi đi phân tích thành phần hóa học bằng phương pháp GC/MS tại trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm TPHCM – Case có kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thành phần hóa học của giá thể *C. militaris* ở ngày 0, 20, 30, 40, 50 và 60

STT	Tên	Mẫu 0 (%)	Mẫu 20 (%)	Mẫu 30 (%)	Mẫu 40 (%)	Mẫu 50 (%)	Mẫu 60 (%)	Hoạt tính sinh học
1	3-Penten-2-one, 4-methyl-	3.56	-	0.67	-	-	-	-
2	2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl	15.41	-	7.38	-	15.82	-	-
3	Toluene, o-ethyl-	0.3	-	-	-	0.14	-	-
4	Toluene, p-ethyl-	0.08	-	-	-	0.32	-	-
5	Cumene	0.2	-	-	-	0.13	-	-
6	Mesitylene	0.16	-	-	-	1.55	-	-
7	Hemimellitene	0.76	-	-	-	4.24	-	-
8	2,4-Di-tert-butylphenol	0.17	-	-	-	-	-	Kháng oxi hoá (Kontham Kulangara Varsha et al., 2015) [10]
9	Myristic acid	0.17	-	0.08	-	-	-	-
10	14-Octadecenal	2.68	-	-	-	-	-	-
11	Palmitic acid,	0.68	1.52	3.61	1.97	5.15	2.88	Kháng oxi hoá

	methyl ester							(Ibrahim et al., 2022) [11]
12	9-Hexadecenoic acid	0.80	-	0.06	-	-	-	-
13	Hexadecenoic acid	16.21	-	13.01	-	15.24	-	Kháng viêm, kháng oxi hoá (Jigni Mishra et al., 2021) [12]
14	Palmitic acid, ethyl ester	0.92	-	4.16	-	2.26	-	-
15	Linoleic acid, methyl ester	1.17	-	4.56	-	4.18	-	Kháng oxi hoá (Ibrahim et al., 2022) [11]
16	Methyl 11-octadecenoate	1.12	-	-	-	-	-	-
17	Oleic Acid	50.12	-	-	-	-	-	Kháng oxi hoá, kháng viêm (H. Sales-Campos et al., 2013) [13]
18	Olein, 2-mono-	1.65	-	0.12	-	-	-	-
19	Squalene	0.56	-	0.73	-	-	-	Kháng viêm (Sánchez-Quesada et al., 2018) [14]
20	Cholesta-3-5-diene	1.03	-	-	-	-	-	-
21	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-e-ol,(3β,22E)-	0.31	-	0.67	-	0.87	-	-
22	Cholestanone, (5α)-	0.58	-	3.47	-	0.60	-	-
23	Cholest-4-en-3-one	1.37	-	-	-	1.24	-	-
24	Methyl 6-oxoheptanoate	-	-	0.05	-	-	-	-
25	6-Hydroxy-9-[tetrahydro-2H-pyran-2-yl]-9H-purine	-	-	0.11	-	-	-	-
26	Butylated Hydroxytoluene	-	0.44	0.04	0.67	-	2.64	-
27	Methyl tetradecanoate	-	-	0.03	-	-	-	-
28	Myristic acid, ethyl ester	-	-	0.04	-	-	-	-
29	Methyl 13-methyltetradecanoate	-	-	0.07	-	-	-	-
30	Pentadecanoic acid	-	-	0.17	-	-	-	-
31	Ethyl 13-methyltetradecanoate	-	-	0.13	-	-	-	-

XÁC ĐỊNH THỜI GIAN THU HOẠCH ĐỂ NUÔI CẤY NẤM *Cordyceps militaris* ...

32	Methyl palmitoleate	-	-	0.06	-	-	-	-
33	Oleic acid, methyl ester	-	-	5.55	-	7.85	-	-
34	Methyl stearate	-	-	0.87	-	-	-	Kháng oxy hoá (Adnan et al., 2019) [15]
35	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	-	-	30.98	-	-	-	Kháng viêm và kháng oxy hoá (Salisu et al., 2019) [16]
36	Linoleic acid ethyl ester	-	-	4.89	-	-	-	-
37	Ethyl Oleate	-	-	6.29	-	-	-	-
38	Stearic acid, ethyl ester	-	-	1.22	-	0.44	-	-
39	Methyl arachisate	-	-	2.42	-	0.38	-	-
40	Ethyl 14-methylhexadecanoate	-	-	0.39	-	-	-	-
41	Methyl tricosanoate	-	-	0.20	-	-	-	-
42	Ethyl nonadecanoate	-	-	0.18	-	-	-	-
43	Terephthalic acid, bis(2-ethylhexyl)ester	-	-	3.30	-	2.86	-	-
44	Cholesterone	-	-	0.97	-	-	-	-
45	Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one	-	-	2.30	-	-	-	-
46	Methylenecycloartan-3-one	-	-	1.24	-	-	-	-
47	n-Propylbenzene	-	-	-	-	0.18	-	-
48	Toluen, m-ethyl	-	-	-	-	0.63	-	-
49	Cetene	-	-	-	-	0.10	-	-
50	cis-13-Eicosenoic acid	-	-	-	-	0.26	-	Kháng viêm (Gazwi et al., 2022) [17]
51	Methyl isostearate	-	-	-	-	1.03	-	-
52	cis-13-Octadecenoic acid	-	-	-	-	29.33	-	-
53	Ethyl linoleate	-	-	-	-	1.58	-	-
54	9-Octadecenoic acid, ethyl ester, (E)-	-	-	-	-	2.75	-	-
55	Triacontane	-	-	-	-	0.35	-	-
56	Heneicosane	-	-	-	-	0.25	-	-
57	Pentacosane	-	-	-	-	0.26	-	-
58	1,3-Dioxolane, 2-ethyl-2,4,5-trimethyl-	-	0.96	-	0.48	-	2.17	-
59	3-Octanol, 3-methyl-	-	1.71	-	0.93	-	4.36	-

60	1-Tetradecene	-	0.11	-	0.12	-	0.23	-	
61	2,5-Cyclohexadien-1-one,2,6-di-tert-butyl-4-hydroxy-4-methyl-2H-Pyran-2-one,5,6-dihydro-6-pentyl-	-	0.06	-	0.05	-	0.15	-	
62	n - CEtyl alcohol	-	0.16	-	0.13	-	0.45	-	
63	Palmitoleic acid	-	0.18	-	-	-	-	-	
64	Palmitic acid	-	19.23	-	15.45	-	17.49	-	
65	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	-	1.72	-	-	-	-	-	
66	Trans-13-octadecenoic acid, methyl ester	-	3.26	-	3.93	-	3.49	-	
67	Linoelaidic acid	-	64.41	-	68.16	-	42.5	-	
68	Stearic acid	-	1.71	-	1.77	-	3.63	-	
69	Methyl 18-methylnonadecanoate	-	0.05	-	0.12	-	4.28	-	
70	Arachic acid	-	0.12	-	0.12	-	0.67	-	
71	Phthalic acid, di(2-propyl pentyl) ester	-	1.14	-	2.03	-	8.42	-	
72	Bis(2-ethylhexyl) isophthalate	-	0.79	-	0.23	-	1.04	-	
73	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, (3 $\beta$ ,22E)-	-	0.23	-	0.23	-	1.28	-	
74	Cholestane-3-one	-	0.22	-	0.29	-	0.39	-	
75	Cholest-4-en-3-one	-	1.91	-	1.31	-	1.76	-	
76	Linoleic acid, methyl ester	-	-	-	2	-	1.54	-	
77	1-Nonadecene	-	-	-	-	-	0.31	-	
78	TC	78	23	21	35	19	28	21	8

**Nhận xét:** Có 78 hợp chất tìm thấy trong giá thể *C. militaris* qua các thời gian nuôi trồng ngày 0, 20, 30, 40, 50 và ngày 60. Trong đó có:

+ Có 7 hợp chất có khả năng kháng oxy hoá lần lượt là: 2,4-Di-tert-butylphenol (Kontham Kulangara Varsha et al., 2015) [10], Palmitic acid, methyl ester (Ibrahim et al., 2022) [11], Hexadecenoic acid (Jigni Mishra et al., 2021) [12], Linoleic acid, methyl ester (Ibrahim et al., 2022) [11], Oleic Acid (H. Sales-Campos et al., 2013) [13], Methyl stearate (Adnan et al., 2019) [15], 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- (Adnan et al., 2019) [15].

+ Có 5 hợp chất có khả năng kháng viêm lần lượt là: Hexadecenoic acid (Jigni Mishra et al., 2021) [12], Oleic Acid (H. Sales-Campos et al., 2013) [13], Squalene (Sánchez-Quesada et al., 2018) [14], 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- (Salisu et al., 2019) [16], cis-13-Eicosenoic acid (Gazwi et al., 2022) [17].

+ Có 5 hợp chất chỉ xuất hiện ở ngày 0 lần lượt là: 2,4-Di-tert-butylphenol, 14-Octadecenal, Methyl 11-octadecenoate, Oleic Acid, Cholesta-3-5-diene.

+ Có 17 hợp chất chỉ xuất hiện ở ngày 30 lần lượt là: Methyl 6-oxoheptanoate, 6-Hydroxy-9-[tetrahydro-2H-pyran-2-yl]-9H-purine, Methyl tetradecanoate, Myristic acid, ethyl ester, Methyl 13-methyltetradecanoate, Pentadecanoic acid, Ethyl 13-methyltetradecanoate, Methyl palmitoleate, Methyl

stearate, 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, Ethyl Oleate, Ethyl 14-methyl-hexadecanoate, Methyl tricosanoate, Ethyl nonadecanoate, Cholesterol, Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one, 24-Methylenecycloartan-3-one.

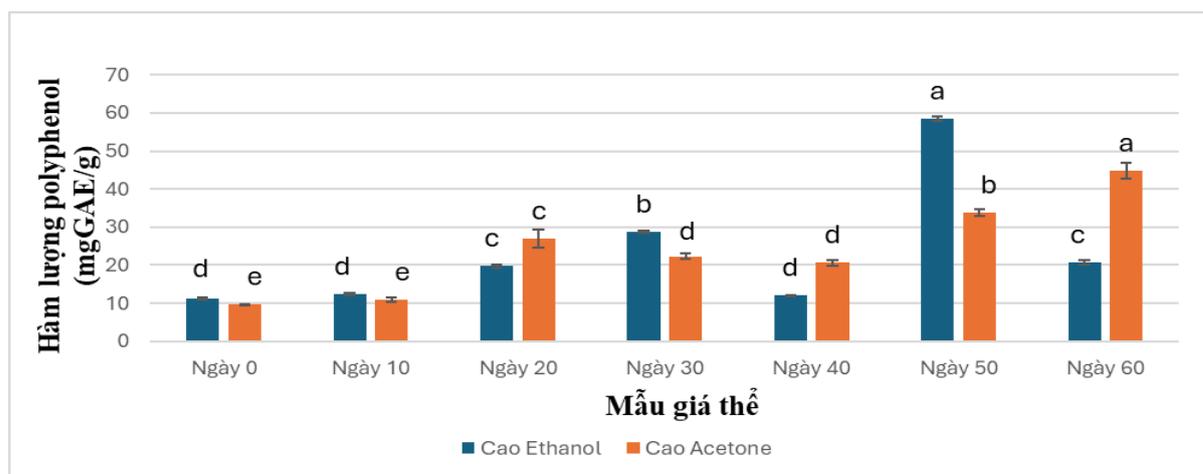
+ Có 11 hợp chất chỉ xuất hiện ở ngày 50 lần lượt là: n-Propylbenzene, Toluene, m-ethyl, Cetene, cis-13-Eicosenoic acid, Methyl isostearate, cis-13-Octadecenoic acid, Ethyl linoleate, 9-Octadecenoic acid, ethyl ester, (E)-, Triacontane, Heneicosane, Pentacosane

Có 1 hợp chất chỉ xuất hiện ở ngày 20: Palmitoleic acid

Hợp chất chỉ xuất hiện ở ngày 60 là 1-Nonadecene

Các hợp chất có nồng độ cao nhất ở các ngày gồm: ngày 0 hợp chất Oleic Acid, ngày 20 hợp chất Linoelaidic acid, ngày 30 hợp chất 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, ngày 40 hợp chất Linoelaidic acid, ngày 50 hợp chất cis-13-Octadecenoic acid, ngày 60 hợp chất Palmitic acid.

### 3.2. Kết quả phân tích hàm lượng Polyphenol tổng

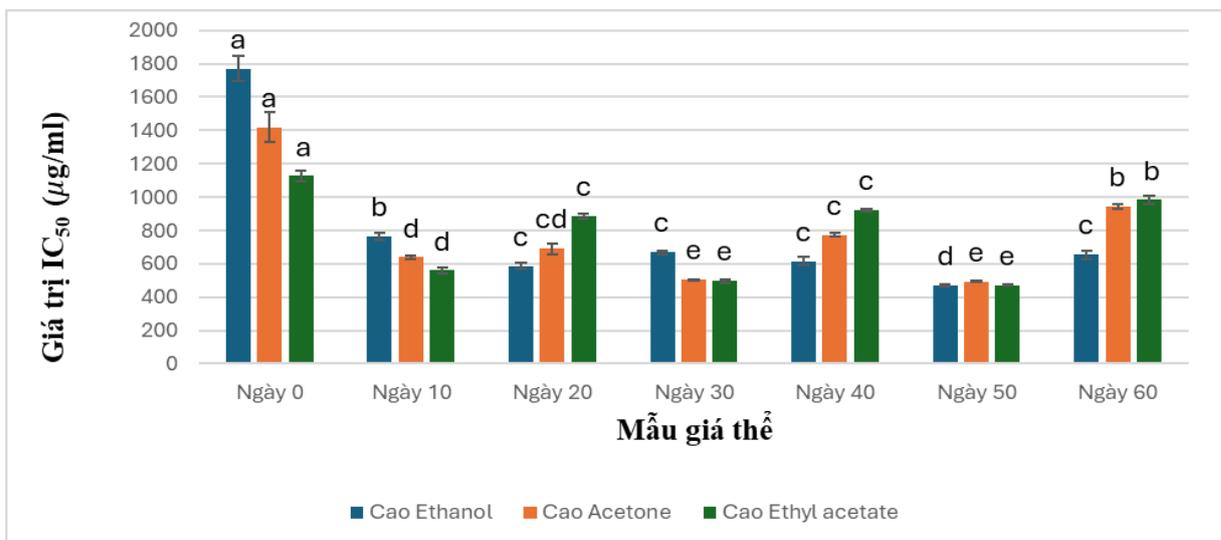


Hình 3. Biểu đồ hàm lượng Polyphenol tổng của các mẫu giá thể nuôi trồng *C. Militaris*

Giá trị tổng hàm lượng polyphenol (TPC) đạt 58,5 mg GAE/g trong chiết xuất ethanol từ giá thể nuôi cấy *Cordyceps militaris* ở ngày 50 là một kết quả đáng chú ý, phản ánh tiềm năng chống oxy hóa cao của mẫu chiết này. Để đánh giá ý nghĩa của kết quả này, chúng ta cần so sánh với các nghiên cứu tương tự đã được công bố. Trong nghiên cứu của Kim et al. (2021) [19], bã nuôi cấy của *C. militaris* được chiết xuất bằng ethanol 50% cho giá trị TPC dao động từ 40,68 đến 44,08 mg GAE/g, tùy thuộc vào loại bã và điều kiện chiết xuất [20]. Kết quả này cho thấy hiệu quả chiết xuất và hàm lượng polyphenol trong chiết xuất ethanol từ giá thể nuôi cấy *Cordyceps militaris* ở ngày 50 ở nghiên cứu này là vượt trội. So sánh với nghiên cứu khác sử dụng chiết xuất methanol từ quả thể *C. militaris* ghi nhận TPC là 39,52 mg GAE/g [20]. Điều này cho thấy mẫu chiết ngày 50 cũng có hàm lượng polyphenol cao hơn so với chiết xuất từ quả thể, mặc dù điều kiện chiết xuất và loại dung môi khác nhau.

Đối với cao chiết aceton, theo kết quả ở hình 3, TPC thu được ở ngày 50 cũng cao hơn các thời điểm trước đó và chỉ thấp hơn ngày 60. Điều này cho thấy với độ phân cực của aceton, tổng polyphenol thu được tăng dần theo thời gian khảo sát nhưng aceton lại có độ phân cực nhỏ hơn so với dung môi ethanol là dung môi tổng có độ phân cực đa cấp nên khả năng hòa tan các polyphenol lớn và rộng hơn. Như vậy, giá trị TPC 58,5 mg GAE/g trong chiết xuất ethanol từ giá thể nuôi cấy *C. militaris* ở ngày 50 là một kết quả cao so với các nghiên cứu trước đó, phản ánh hiệu quả chiết xuất và tiềm năng ứng dụng của mẫu chiết này trong các lĩnh vực như thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và dược phẩm.

### 3.3. Kết quả đánh giá khả năng bắt gốc tự do DPPH



Hình 4. Biểu đồ giá trị IC<sub>50</sub> của DPPH trong các mẫu giá thể nuôi trồng *C. militaris* theo thời gian

Thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH của các cao chiết từ các mẫu giá thể nuôi trồng *C. Militaris* từ ngày 0 đến ngày 60 từ đó có thể xác định được hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết. Giá trị IC<sub>50</sub> càng thấp thì mẫu có khả năng kháng oxy hóa càng cao và khả năng bắt gốc càng mạnh và ngược lại. Kết quả đánh giá khả năng bắt gốc DPPH của các cao chiết được thể hiện ở hình 4.

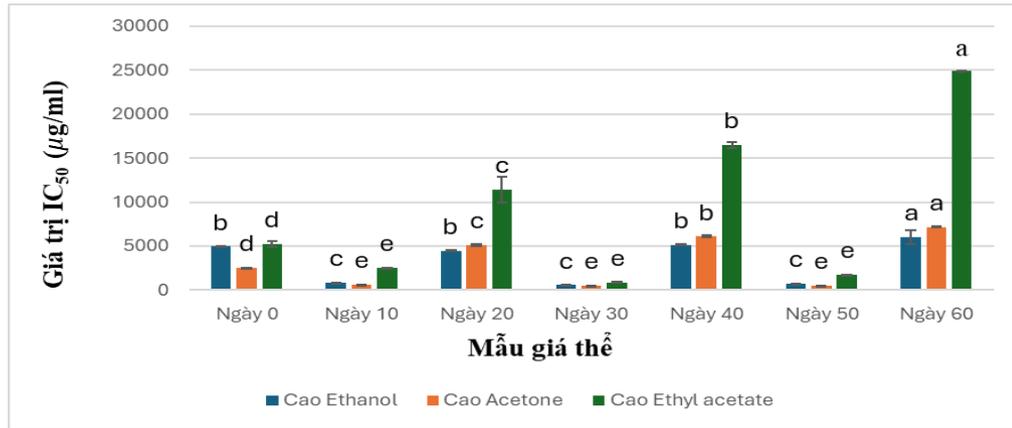
Với cao chiết Ethanol theo kết quả trên hình 4 có thể thấy được khả năng bắt gốc tự do DPPH của mẫu giá thể nuôi cấy *C. Militaris* không ổn định theo thời gian nuôi cấy từ ngày 0 đến ngày 60. Giá trị IC<sub>50</sub> = 472 µg/ml của mẫu giá thể nuôi cấy *C. Militaris* ở ngày 50 trong nghiên cứu này cao hơn kết quả nghiên cứu của Niketan Deshmukh và cộng sự năm 2023 trên chiết xuất giá thể nuôi cấy *Cordyceps militaris* bằng methanol có IC<sub>50</sub> = 2.920 µg/mL [18], và chiết xuất bằng nước của giá thể nuôi cấy *Cordyceps militaris* có IC<sub>50</sub> = 3.760 µg/mL [18]. Điều thú vị là giá trị IC<sub>50</sub> của ngày 50 trong nghiên cứu này cũng cho thấy giá trị cao nhất trong các thời điểm.

Với cao chiết Acetone thì mẫu ở ngày 50 có IC<sub>50</sub> = 494 µg/ml, thấp nhất so với các mẫu còn lại nên cũng có khả năng kháng oxy hóa mạnh nhất. Mẫu cao chiết Ethyl acetate với IC<sub>50</sub> = 473 µg/m ở ngày 50 cũng có khả năng bắt gốc tự do DPPH mạnh nhất so với các mẫu ở các thời điểm còn lại.

Trong tự nhiên, hầu hết các loài *Cordyceps* như *C. militaris* là một loài nấm ký sinh trên côn trùng và ấu trùng của côn trùng rồi nhân lên trong cơ thể ký chủ vào mùa đông. Bào tử nấm theo xâm nhiễm ký chủ, sau đó từ bào tử hình thành các ống nảy mầm có các thể bám. Chúng tiết ra các enzyme như lipase, chitinase, protease làm tan vỏ ngoài của ký chủ và xâm nhập vào bên trong cơ thể chủ và sinh trưởng. Đến cuối hè hoặc thu quả thể xuất hiện và tiếp tục phát tán bào tử vào không khí [21]. Các kết quả nghiên cứu khi nuôi trồng nhân tạo từ ngày 0 đến ngày 60, theo vòng đời sinh trưởng phức tạp từ lúc tạo hệ sợi cho đến khi hình thành quả thể, nấm *C. militaris* trao đổi chất với môi trường, tùy theo khả năng sinh trưởng cũng như chuyển hóa nội mô mà sẽ sinh tổng hợp các hoạt chất có tính kháng oxy hóa (trong đó có các hợp chất polyphenol) khác nhau. Trong thí nghiệm này cho thấy khả năng bắt gốc DPPH của cả 3 loại cao chiết đều yếu nhất vào ngày 0 và mạnh nhất vào ngày 50. Do đó, ngày 50 được chọn là thời điểm thích hợp nhất để thu nhận các hoạt chất có kháng oxy hóa trong giá thể là mạnh nhất.

### 3.4. Kết quả về đánh giá năng lực khử

Để có thêm dữ liệu tham khảo và so sánh các kết quả về hoạt tính kháng oxy hóa, chúng tôi tiếp tục đánh giá bằng phương pháp năng lực khử tránh bỏ sót những thông tin có giá trị về hoạt tính của những giá thể thu được ở các thời điểm còn lại.



Hình 5. Biểu đồ giá trị IC<sub>50</sub> của năng lực khử trong các mẫu giá thể nuôi trồng *C. militaris* theo thời gian. Theo kết quả ở hình 5, Giá trị IC<sub>50</sub> = 728 µg/mL trong phương pháp năng lực khử của chiết xuất ethanol từ giá thể nuôi cấy *Cordyceps militaris* thu nhận ở ngày 50 phản ánh mức độ hoạt tính chống oxy hóa trung bình và có khả năng khử thấp hơn ngày 30. tuy nhiên khi so sánh với các kết quả thu được từ việc phân tích các hoạt chất có trong các thời điểm cũng như hoạt tính kháng oxy hóa thể hiện qua khả năng bắt gốc DPPH và toognr polyphenol. Chúng tôi đề xuất giá thể nuôi cấy nấm *C. militaris* ở ngày 50 thích hợp để thu nhận làm nguyên liệu có giá thành thấp và có hoạt tính kháng oxy hóa tốt nhất trong các thời điểm nuôi cấy. Giá thể ngày 30 có giá trị tham khảo và cần những thí nghiệm tiếp theo để xác định hoạt tính kháng oxy hóa của chúng theo những phương thức khác.

### 3.5. Kết quả về đánh giá cảm quan

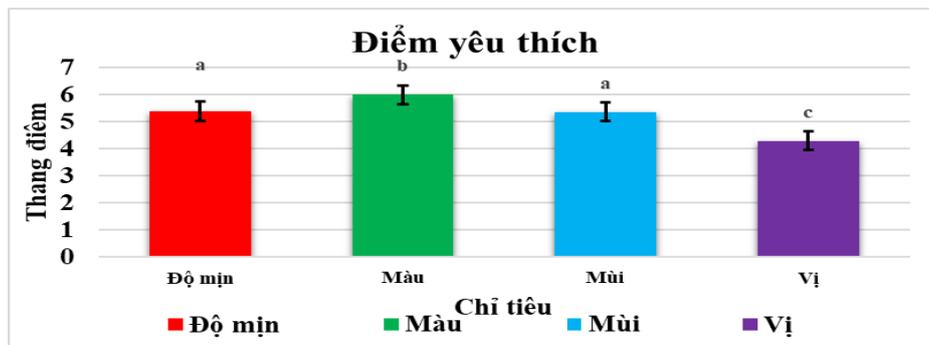
Bảng 2. Kết quả độ yêu thích - Khảo sát chỉ tiêu đánh giá độ mịn, màu, mùi, vị

Chỉ tiêu đánh giá	Điểm yêu thích
Độ mịn	5.39 <sup>a</sup> ± 1.37
Màu	6.00 <sup>b</sup> ± 1.15
Mùi	5.37 <sup>a</sup> ± 1.19
Vị	4.30 <sup>c</sup> ± 1.49

Với dữ liệu được khảo sát từ 70 người, độ yêu thích của người thử đối với chỉ tiêu của mẫu về màu cho kết quả điểm yêu thích cao nhất với 6.00 ± 1.15 điểm (khoảng rất thích), trong khi đó chỉ tiêu về độ mịn và mùi có số điểm yêu thích thấp hơn lần lượt là 5.39 ± 1.37 và 5.37 ± 1.19 (khoảng thích). Còn đối với chỉ tiêu về vị có điểm yêu thích thấp nhất là 4.30 ± 1.49 (khoảng bình thường). Có thể thấy về độ mịn, màu và mùi của sản phẩm được nhiều người yêu thích cho đến rất thích. Tuy nhiên với chỉ tiêu về vị thì độ yêu thích ở ngưỡng bình thường. Nguyên nhân vì bột có vị hơi đắng nhẹ ở hậu vị.

Hình 6. Biểu đồ thể hiện điểm yêu thích đối với các chỉ tiêu đánh giá

Có thể thấy về độ mịn, màu và mùi của sản phẩm được nhiều người yêu thích cho đến rất thích. Tuy nhiên với chỉ tiêu về vị thì độ yêu thích ở ngưỡng bình thường. Nguyên nhân vì bột có vị hơi đắng nhẹ ở hậu vị.



Để tối ưu hóa sản phẩm, cần nghiên cứu cải thiện thêm về vị nhằm cân bằng các đặc tính cảm quan, đặc biệt là vị của sản phẩm.

Do sản phẩm này là loại sản phẩm chủ yếu mang lại lợi ích cung cấp về mặt dinh dưỡng giành cho đối tượng trên 18 tuổi đặc biệt là người ăn kiêng, những người chú trọng đến sức khỏe và chế độ ăn uống, đồng thời do ảnh hưởng của điều kiện về quá trình khảo sát chỉ giới hạn ở đối tượng học sinh sinh viên, dẫn đến điểm đánh giá yêu thích thấp vì nhu cầu và chế độ ăn uống của mỗi sinh viên là khác, đối tượng khảo sát chưa đúng trọng tâm với đối tượng mà sản phẩm đặc biệt nhắm đến nên mức độ yêu thích đối với sản phẩm không được cao.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được thời điểm thu hoạch tối ưu của giá thể nuôi cấy *Cordyceps militaris* nhằm đạt được hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất. Cụ thể, ở ngày nuôi cấy thứ 50, mẫu giá thể cho thấy hiệu quả chống oxy hóa vượt trội với nhiều chỉ số nổi bật. Phân tích GC-MS cho thấy có 11 hợp chất chỉ xuất hiện tại thời điểm này, trong đó đáng chú ý là *cis-13-Octadecenoic acidate*, được xác định là hợp chất có hoạt lực sinh học cao nhất. Giá trị  $IC_{50}$  của hoạt tính quét gốc tự do DPPH tại ngày 50 đạt 472  $\mu\text{g/mL}$ , cho thấy khả năng kháng oxy hóa mạnh hơn so với các thời điểm thu hoạch khác. Đồng thời, tổng hàm lượng polyphenol (TPC) trong chiết xuất ethanol tại ngày này đạt 58,5 mg GAE/g – mức cao nhất trong toàn bộ thí nghiệm, phản ánh sự tích lũy đáng kể của các hợp chất chống oxy hóa tự nhiên. Mặc dù giá trị  $IC_{50}$  trong phép thử năng lực khử ở ngày 50 là 728  $\mu\text{g/mL}$  – chỉ đúng sau kết quả tại ngày 30 (550,37  $\mu\text{g/mL}$ ) – nhưng sự tổng hợp đồng thời các hợp chất hoạt tính cùng với giá trị TPC cao cho thấy ngày 50 là thời điểm thích hợp nhất để thu hoạch giá thể nhằm thu nhận chiết xuất giàu hoạt tính chống oxy hóa. Từ đó, có thể kết luận rằng ngày nuôi cấy ngày thứ 50 là thời điểm tối ưu để thu hoạch giá thể nuôi cấy *Cordyceps militaris* phục vụ cho mục tiêu tạo ra các sản phẩm giàu hoạt chất sinh học, đặc biệt là trong lĩnh vực thực phẩm chức năng và dược liệu tự nhiên.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] John H, Malt C., 2008. Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). International Journal Medicinal Mushroom 10(3): 219-234.
- [2] Karol Jędrejko, Katarzyna Kała, Katarzyna Sułkowska-Ziaja, Agata Krakowska, Piotr Zięba, Krystian Marzec, Agnieszka Szewczyk, Agnieszka Sękara, Jolanta Pytko-Polończyk, Bożena Muszyńska. *Cordyceps militaris* - Fruiting Bodies, Mycelium, and Supplements: Valuable Component of Daily Diet. Antioxidants (Basel). 2022 Sep 21;11(10):1861.
- [3] Yu-Chieh Chou, ing-Hsuan Sung, shi-Jing Hou, Darin Khumsupan, Shella Permatasari Santoso, Kuan-Chen Cheng and Shin-Ping Lin. Current Progress Regarding *Cordyceps militaris*, Its Metabolite Function, and Its Production. Appl. Sci. 2024, 14(11), 4610.
- [4] Xuân, T. T., & Tuấn, L. A. (2016). Nghiên cứu môi trường thích hợp cho sản xuất quả thể nấm dược liệu *Cordyceps militaris* (Clavicipitaceae: Hypocreales). Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, (CĐ Nông nghiệp), 88-92.
- [5] W. Brand- Williams, M.E. Cuvelier, M.E Cuvelier and C.Berset (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.
- [6] Jing Zhou và cs. Antioxidant activities of *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz leaf extracts and their major components, 2020.
- [7] Nguyễn Thị Minh Hằng và Bùi Văn Thắng (2017). Nghiên cứu nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) trên môi trường tổng hợp và nhộng tằm. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp, 4, 10-16.
- [8] Nguyễn Hoàng Dũng, Trương Cao Xuyên, Nguyễn Thị Minh Tú, Phan Thị Xuân Uyên. (2007). Đánh giá cảm quan thực phẩm nguyên lý và thực hành. Đại học quốc gia Tp.HCM.
- [9] Tu Viet Phu, Vu Thi Minh Hang. (2017). USING 7-POINT FACIAL HEDONIC SCALE TO COMPARE CHILDREN PREFERENCE TOWARDS PASTEURISED MILK AND UHT MILK: A CASE STUDY ON LOCAL COMMERCIAL PRODUCTS. School of Biotechnology and Food Technology, Hanoi University of Science and Technology, 1 Dai Co Viet, Ha Noi, Viet Nam.
- [10] Kontham Kulangara Varsha, Leena Devendra, Ganesan Shilpa, Sulochana Priya, Ashok Pandey, Kesavan Madhavan Nampoothiri. 2,4-Di-tert-butyl phenol as the antifungal, antioxidant bioactive purified from a newly isolated *Lactococcus sp.* International Journal of Food Microbiology, Volume 211, 15 October 2015, Pages 44-50.
- [11] Ibrahim, Muhammad, Rauf, Abdur, Muhammad, Naveed, Khalil, Anees Ahmed, Akram, Muhammad, Aziz, Qasim, Ullah, Zia, Al-Awthan, Yahya S., Bahattab, Omar and Al-Duais, Mohammed A.. "Chemical composition and in vitro and in vivo biological assortment of fixed oil extracted from *Ficus benghalensis* L." Open Chemistry, vol. 20, no. 1, 2022, pp. 583-592.
- [12] Jigni Mishra, Washim Khan, Sayeed Ahmad and Kshipra Misra. Supercritical Carbon Dioxide Extracts of *Cordyceps sinensis*: Chromatography-based Metabolite Profiling and Protective Efficacy Against Hypobaric

Hypoxia. ORIGINAL RESEARCH article Front. Pharmacol., 26 August 2021 Sec. Ethnopharmacology Volume 12 – 2021.

[13] H. Sales-Campos, P.R. Souza, B.C. Peghini, J.S. da Salva, C.R. Cardoso. Mini Rev., Med. Chem., 2013, 13, 201-210.

[14] Sánchez-Quesada, C.; López-Biedma, A.; Toledo, E.; Gaforio, J.J. Squalene Stimulates a Key Innate Immune Cell to Foster Wound Healing and Tissue Repair. Evid.-Based Complement. Altern. Med. 2018, 2018, 9473094.

[15] Adnan, M., Nazim Uddin Chy, M., Mostafa Kamal, A. T. M., Azad, M. O. K., Paul, A., Uddin, S. B., et al. (2019). Investigation of the Biological Activities and Characterization of Bioactive Constituents of *Ophiorrhiza rugosa* Var *Prostrata* (D. Don) & *Mondal* Leaves through In Vivo, In Vitro, and In Silico Approaches. *Molecules* 24, 1367.

[16] Salisu, T.F., Okpuzor, J. E. and Jaja, S. I. IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION AND QUANTIFICATION OF CHEMICAL COMPOUNDS IN SELECTED EDIBLE WILD LEAFY VEGETABLES. *Ife Journal of Science* vol. 21, no. 1 (2019).

[17] Gazwi, H.S.S.; Shoeib, N.A.; Mahmoud, M.E.; Soltan, O.I.A.; Hamed, M.M.; Ragab, A.E. Phytochemical Profile of the Ethanol Extract of *Malvaviscus arboreus* Red Flower and Investigation of the Antioxidant, Antimicrobial, and Cytotoxic Activities. *Antibiotics* 2022, 11, 1652.

[18] Niketan Deshmukh and Bhaskaran Lakshmi. Antioxidant Potential of *Cordyceps militaris* Mycelium: A Comparative Analysis of Methanol and Aqueous Extracts. *Biotech Res Asia* 2023;20(4).

[19] Hae Dong Jung, Jong Du Kim\*. (2021). Anti-oxidant and Anti-inflammatory Effects of *Cordyceps militaris* Extracts. *Journal of the Korean Society of Cosmetology* 2021;27(4):932-939.

[20] Punyawatt Pintathong, Putarak Chomnunti, Putarak Chomnunti, Sarita Sangthong, Areeya Jirarat and Phanuphong Chaiwut. The Feasibility of Utilizing Cultured *Cordyceps militaris* Residues in Cosmetics: Biological Activity Assessment of Their Crude Extracts. *J. Fungi* 2021, 7(11), 973

[21] Nguyễn Thị Liên Thương, Trịnh Diệp Phương Danh và Nguyễn Văn Hiệp, 2016. Nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*: Đặc điểm sinh học, giá trị dược liệu và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi trồng nấm. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 44b: 9-22.

## DETERMINATION OF THE OPTIMAL HARVEST TIME OF THE CULTURE MEDIUM OF VIETNAMESE-ISOLATED *Cordyceps militaris* WITH THE HIGHEST ANTIOXIDANT ACTIVITY

LAM KHAC KY\*, NGUYEN THANH LY, PHAM THI THUY TIEN, PHAM VIET CHUONG, LE ANH DUNG, TRAN TAI

*Institute of Biotechnology and Food technology, Industrial University of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Viet Nam*

*\*Corresponding author: lamkhacky@iuh.edu.vn*

**Abstract.** *Cordyceps militaris*, commonly known as a medicinal mushroom, is a valuable fungus renowned for its high content of antioxidant compounds such as flavonoids, polyphenols, and cordycepin. Harvest timing plays a crucial role in optimizing the concentration of these bioactive compounds, thereby enhancing the medicinal value of the fungus. However, the fruiting bodies are typically expensive. This study was conducted to determine the optimal harvest time for *C. militaris* CULTURE MEDIUM that yield the highest antioxidant activity. The experiment involved harvesting the CULTURE MEDIUM at various growth stages—days 0, 10, 20, 30, 40, 50, and 60—corresponding to developmental phases from mycelial growth to mature fruiting bodies. The chemical composition of the substrates was analyzed using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS), and antioxidant activity was evaluated by determining total polyphenol content, reducing power, and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging capacity. The results indicated that antioxidant activity increased progressively with growth duration, peaking at the mature fruiting body stage on day 50. These findings provide essential scientific evidence for optimizing the harvest process of *Cordyceps militaris* cultivation in Vietnam, contributing to the improvement of raw material quality for the domestic pharmaceutical and nutraceutical industries, while supporting the development of a circular bioeconomy.

**Keywords:** Harvest time, *Cordyceps militaris*, DPPH, polyphenol, reducing power.

*Ngày nhận bài: 05/5/2025*

*Ngày nhận đăng: 30/6/2025*