ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CẤP CỦA CHẾ PHẨM BỘT SINH KHỐI NẤM THƯỢNG HOÀNG SAU KHI LÊN MEN CHÌM

Bạch Thị Như Quỳnh[1], Nguyễn Thị Liên[2], Phạm Đức Cường[3], Ninh Thị Tuyết Lan[4], Nguyễn Thị Minh Huyền[4]

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá độc tính cấp của chế phẩm bột sinh khối Nấm Thượng hoàng (*Phellinus linteus*) thu được theo phương pháp lên men chìm tại Viện Công nghệ sinh học, Viện HLKH&CN Việt Nam. **Phương pháp**: Phương pháp xác định độc tính của thuốc của Nhà xuất bản Y học và OECD guidelines for testing of chemicals. **Kết quả và kết luận**: Liều không gây triệu chứng bất thường quan sát được trong thử nghiệm là 18,0 g mẫu thử/kg chuột. Liều gây chết 50% động vật thí nghiệm (LD50) lớn hơn 18,0 g mẫu thử/kg chuột. Bột sinh khối nấm Thượng hoàng có độc tính thấp dưới ngưỡng phân loại GHS và không gây ngộ độc cho động vật thử nghiệm.

Từ khóa: Nấm Thượng hoàng, *Phellinus linteus*, độc tính cấp, lên men chìm, chuột, sinh khối.

ABSTRACT:

ACUTE TOXICITY STUDY OF SUBMERGED-FERMENTATION OF *PHELLINUS LINTEUS* BIOMASS POWDER

Objective: Evaluation of acute toxicity of *Phellinus linteus* biomass powder which obtained from submerged-fermentation in Institute of Biotechnology, VAST. **Methods**: Method for evaluation of drug toxicity, Medicinal Publishing House and OECD guidelines for testing of chemicals. **Results and conclusions**: The dose that did not cause abnormal symptoms observed in the trial was 18.0 g of sample / kg of mice. Lethal dose of 50% of experimental animals (LD50) was greater than 18.0 g of test sample / kg of mice. The results showed that mushroom biomass had low toxicity below the GHS classification threshold and did not cause toxicity to test animals.

Keywords: *Phellinus linteus*, acute toxicity, submerged fermentation, mouse, biomass.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm Thượng hoàng được sử dụng theo cách truyền thống ở các nước châu Á do có nhiều đặc tính quý. Các nghiên cứu trên nấm cho thấy nấm có các tác động điều hòa miễn dịch (1, 2); kháng viêm (3, 4), kháng ung thư (5, 6) và kháng oxy hóa (7). Dịch chiết nấm được trồng trên gạo đỏ có tác dụng kìm hãm hoạt động dị ứng được điều hòa bởi IgE ở cả *in vitro* và *in vivo* (8). Dịch chiết từ nấm cũng đã được thử nghiệm lâm sàng để cải thiện chức năng miễn dịch ở các liều 1000 mg và 2000 mg trong 8 đến 10 tuần trên người tình nguyện (9). Hay ở các liều 1000 mg và 1500 mg trong 8 tuần cho nghiên cứu trên khớp gối và sụn khớp (10). Dịch chiết nấm tự nhiên có độc tính thấp và có thể được sử dụng để kháng khối u (11).

Hiện nay, nấm tự nhiên không có nhiều để khai thác với số lượng lớn do nấm mọc rất chậm, thích nghi chủ yếu trên cây dâu tằm và các điều kiện cho nấm phát triển rất khó thực hiện như trong tự nhiên, vì vậy nấm tự nhiên rất đắt (7). Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu sinh khối nấm Thượng Hoàng bằng cách lên men chìm. Phương pháp này cho hiệu quả cao hơn do chủ động trong các khâu nhân giống và môi trường, khí hậu được điều chỉnh thích hợp nhất với sự phát triển của nấm. Sau khi lên men chìm, sinh khối nấm được đông khô, nghiền thành bột và được thử nghiệm trên chuột theo quy trình chuẩn dùng trong xác định độc tính cấp của một sản phẩm. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá độ an toàn của sản phẩm bột sinh khối nấm Thượng Hoàng nhằm tiến tới sử dụng

1. Trường Đại học Y Dược Hải Phòng
2. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương
3. Viện Công nghệ HaUI, Đại học Công nghiệp Hà Nội
4. Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Minh Huyền, Email: ntminhhuyen@ibt.ac.vn; SĐT: 0947479978

Ngày nhận bài: 16/12/2020 | Ngày phản biện: 02/01/2021 | Ngày duyệt đăng: 30/01/2021

như một nguồn nguyên liệu thay thế nấm tự nhiên làm thực phẩm bảo vệ sức khoẻ.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Bột sinh khối nấm Thượng Hoàng: Được cung cấp bởi Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Nấm Thượng Hoàng được nhân giống trong môi trường thạch PDA (200 g khoai tây đun lấy dịch chiết, bổ sung 1 g cao nấm men, 20 g glucose và 15 g agar, khử trùng ở 121^{o}C, 15 phút). Sinh khối nấm Thượng Hoàng được lên men chìm trong môi trường đã tối ưu hóa ở nhiệt độ 28^{o}C trong vòng 15 ngày. Sinh khối thu được sau khi lên men được sấy đông khô, nghiền thành bột mịn. Bột nấm được ngâm trong nước nóng trong 15 phút và thu hỗn dịch thử với hàm lượng 0,3 g mẫu thử/ml.

Động vật thí nghiệm: 50 chuột nhắt trắng giống Swiss, cân nặng 18-22g được cung cấp bởi Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. Chuột được nuôi 6 - 8 con một chuồng trong phòng nuôi có kiểm soát nhiệt độ và độ ẩm thích hợp với thức ăn và nước uống theo nhu cầu. Tất cả các thao tác trên động vật thí nghiệm đều được tuân theo các qui trình về chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của Khoa Dược lý - Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thử độc tính cấp được tiến hành dựa trên tài liệu tham khảo chuẩn (13, 14). Chuột được nhịn ăn 3 - 4 giờ trước khi thử nghiệm, nước uống theo nhu cầu. Kiểm tra cân nặng trước khi thử nghiệm. Chuột đạt các yêu cầu về cân nặng được đưa vào thử nghiệm. Cách cho chuột uống: Lấy thể tích mẫu thử theo quy định đưa thẳng vào dạ dày chuột bằng kim cong đầu tù.

Cách xử lý và chuẩn bị mẫu thử: Cân một lượng mẫu thử, ngâm với nước sôi trong khoảng 15 phút để thu được hỗn dịch thử có chứa 0,3 g mẫu thử/ml.

Thử sơ bộ: Được tiến hành để thăm dò ở mức liều không làm chết chuột thí nghiệm (mức liều tối đa có thể cho uống): Dùng 10 chuột, cho mỗi chuột uống 0,4 ml mẫu thử x 3 lần (mỗi lần cách nhau 2 giờ) tương đương mức liều 18,0 g mẫu thử/kg chuột. Sau 24 giờ theo dõi, không có chuột thí nghiệm bị chết.

Thử nghiệm chính thức

Mẫu chứng: Nước.

Các mức liều thử nghiệm: Mức liều 1: 6,0g mẫu thử/kg chuột; mức liều 2: 12,0g mẫu thử/kg chuột; mức liều 3: 18,0g mẫu thử/kg chuột.

Tiến hành thử nghiệm chính thức trên 40 chuột, chia thành 4 nhóm gồm: 1 nhóm chứng uống nước và 3 nhóm thử theo mức liều đã dự tính. Các nhóm thử được dùng mẫu thử ở các mức liều theo Bảng 1.

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm thử độc tính cấp

Nhóm chuột	Thể tích cho uống/ngày (ml hỗn dịch thử/20 g chuột)	Liều dùng (g mẫu thử/kg chuột)	Số chuột thí nghiệm
Chứng (C)	0,4 ml nước x 3 lần	----	10
Mức 1 (T1)	0,4 ml hỗn dịch thử x 1 lần	6,0 g mẫu thử/kg chuột	10
Mức 2 (T2)	0,4 ml hỗn dịch thử x 2 lần	12,0 g mẫu thử/kg chuột	10
Mức 3 (T3)	0,4 ml hỗn dịch thử x 3 lần	18,0 g mẫu thử/kg chuột	10

** Lượng mẫu thử được cho uống từ 1- 3 lần, mỗi lần không quá 0,4 ml, cách nhau 2 giờ*

Theo dõi biểu hiện ngộ độc: sau khi uống hỗn dịch thử theo dõi các dấu hiệu bất thường (về thể trạng, hành vi, vận động, tình trạng ăn, uống, phân, nước tiểu) với tần suất khoảng 15 phút 1 lần trong vòng 1 giờ đầu và giãn dần tần suất trong vòng 24 giờ đầu. Tiếp tục theo dõi hoạt động của động vật thí nghiệm mỗi ngày 1 lần trong thời gian 7 ngày sau khi uống.

- Theo dõi mức độ tiêu thụ thức ăn, nước uống trong thời gian thử nghiệm.
- Theo dõi số chuột chết trong các nhóm thử và nhóm chứng.
- Theo dõi khối lượng chuột tại các thời điểm ngay trước khi uống, 1 ngày, 4 ngày và 7 ngày sau khi uống mẫu thử so với nhóm chứng (với các nhóm thử không có chuột thí nghiệm bị chết).

Trình bày và xử lý số liệu

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình cộng trừ độ lệch chuẩn (mean ± SD) và được xử lý thống kê bằng phép phân tích biến 1 chiều (one-way ANOVA) với hậu kiểm (post-hoc) Newman-Keuls test hoặc được xử lý thống kê bằng trắc nghiệm Student sử dụng phần mềm Prism phiên bản 6.0 (Graph Pad Software). Giá trị P < 0,05 được coi là có ý nghĩa thống kê.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Quan sát dấu hiệu ngộ độc, khả năng tiêu thụ thức ăn và nước uống của chuột

Đối với các dấu hiệu ngộ độc, trên tất cả các nhóm chuột kể cả nhóm đối chứng và các nhóm liều khác, không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc trong thời gian theo dõi. Chuột khỏe mạnh, nhanh nhẹn, lông mượt, ăn uống, vận động bình thường. Không có chuột chết trong quá trình thử nghiệm.

Đối với khả năng tiêu thụ thức ăn: Ở nhóm chứng, chuột ăn uống bình thường; ở các nhóm thử, sau khi uống mẫu thử và trong 7 ngày theo dõi nhóm thử, không nhận thấy có biểu hiện gì khác thường. Mức độ tiêu thụ thức ăn nước uống tương đương với nhóm chứng

Ảnh hưởng của mẫu thử lên khối lượng cơ thể chuột

Bảng 2, 3 và 4 là kết quả theo dõi khối lượng của chuột ở nhóm chứng và các nhóm thử. Giá trị trung bình của khối lượng nhóm chứng trước khi thử nghiệm là 19,9 ± 1,0 (g), và tương ứng ở các nhóm thử T1 là 19,6 ± 0,8 (g); T2 là 20,1 ± 1,0 (g) và T3 là 20,5 ± 0,8 (g). Như vậy trước khi thử nghiệm, khối lượng trung bình của chuột ở các nhóm thử và nhóm chứng không có sự khác biệt có ý nghĩa thông kê ($P_{ANOVA\ trước} > 0,05$; $P_{(T-C)\ trước} > 0,05$; $P_{(T-T)\ trước} > 0,05$).

Bảng 2. Kết quả theo dõi khối lượng chuột của nhóm chứng

Số TT	Khối lượng chuột (g)			
	Trước thử nghiệm	Sau 1 ngày	Sau 4 ngày	Sau 7 ngày
1	19,5	21,8	28,8	30,1
2	20,4	22,5	29,2	32,2
3	21,3	24,1	27,6	31,5
4	20,4	23,0	28,9	34,8
5	19,6	22,6	30,1	35,0
6	19,0	21,4	28,9	31,4
7	18,8	20,7	28,5	34,5
8	18,5	21,3	29,6	33,0
9	21,3	24,6	27,4	31,2
10	20,2	22,8	27,9	30,4
X tb	**19,9**	**22,5**	**28,7**	**32,4**
± SD	**1,0**	**1,2**	**0,9**	**1,8**

Bảng 3. Kết quả theo dõi khối lượng chuột của các nhóm thử với mức liều khác nhau

6,0g mẫu thử/kg chuột					12,0g mẫu thử/kg chuột				18,0g mẫu thử/kg chuột			
SỐ TT	**Trước thử nghiệm (g)**	**San 1 ngày (g)**	**Sau 4 ngày (g)**	**Sau 7 ngày (g)**	**Trước thử nghiệm (g)**	**Sau 1 ngày (g)**	**Sau 4 ngày (g)**	**Sau 7 ngày (g)**	**Trước thử nghiệm (g)**	**Sau 1 ngày (g)**	**Sau 4 ngày (g)**	**Sau 7 ngày (g)**
1	19,2	23,4	29,6	33,4	19,2	22,8	27,8	31,5	20,5	24,1	30,8	32,6
2	18,8	21,1	27,2	32,1	20,4	24,5	29,2	34,7	21,0	24,4	30,5	34,8
3	18,5	20,3	26,4	29,3	21,5	23,6	27,6	32,0	21,3	24,8	31,2	36,1
4	20,4	21,4	25,7	28,7	20,8	23,5	28,4	30,1	21,3	25,3	31,5	36,4
5	21,0	23,8	27,6	31,6	20,1	22,9	26,3	35,8	20,7	23,7	29,4	30,5
6	20,2	24,1	29,2	33,8	19,5	23,1	27,1	34,1	19,8	23,1	28,8	30,1
7	20,0	22,4	26,8	30,4	18,8	20,0	25,5	30,0	19,5	22,6	29,4	33,2
8	19,4	22,2	25,5	31,9	18,5	20,4	24,6	28,6	20,2	24,0	30,2	36,7
9	19,5	21,4	26,9	32,0	20,6	23,8	28,7	31,5	21,3	23,8	29,4	35,4
10	19,3	20,9	27,5	34,6	21,3	24,7	27,9	33,4	19,0	22,1	28,1	30,2
xtb	**19,6**	**22,1**	**27,2**	**31,8**	**20,1**	**22,9**	**273**	**323**	**20,5**	**23,8**	**29,9**	**33,6**
± SD	**0,8**	**1,3**	1,3	**1,9**	**1,0**	**1,6**	**1,5**	**23**	**0,8**	**1,0**	**1,1**	**2,6**

Kết quả so sánh khối lượng của chuột thí nghiệm giữa các nhóm thử và nhóm chứng được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Bảng so sánh khối lượng giữa các nhóm thí nghiệm

Nhóm (n=10)	**Khối lượng (g)**		**P (Anova)**	
	Trước thử nghiệm (m_0)	**Sau thử nghiệm (m_1)**	**Trước**	**Sau**
Chứng (C)	19,9 ± 1,0	32,4 ± 1,8	$P_{ANOVA} > 0,05$	$P_{ANOVA} > 0,05$
Tăng lên (%)		163,3	$P_{trước-sau} < 0,001$	
T1	19,6 ± 0,8	31,8 ± 1,9	$P_{T1-C} > 0,05$ $P_{T1-T2} > 0,05$ $P_{T1-T3} > 0,05$	$P_{T1-C} > 0,05$ $P_{T1-T2} > 0,05$ $P_{T1-T3} > 0,05$
Tăng lên (%)		162,1	$P_{trước-sau} < 0,001$	
T2	20,1 ± 1,0	32,2 ± 2,3	$P_{T2-C} > 0,05$ $P_{T2-T3} > 0,05$	$P_{T2-C} > 0,05$ $P_{T2-T3} > 0,05$
Tăng lên (%)		160,5	$P_{trước-sau} < 0,001$	
T3	20,5 ± 0,8	33,6 ± 2,6	$P_{T3-C} > 0,05$	$P_{T3-C} > 0,05$
Tăng lên (%)		164,2	$P_{trước-sau} < 0,001$	

Trong thời gian thử nghiệm, khối lượng của chuột ở nhóm chứng và các nhóm thử tăng dần đều theo thời gian từ 1 đến 7 ngày. Sau 7 ngày, khối lượng trung bình của nhóm chứng đạt 32,4 ± 1,8 (g); nhóm thử T1 là 31,8 ± 1,9 (g), nhóm T2 là 32,2 ± 2,3 (g) và nhóm T3 là 33,6 ± 2,6 (g). Như vậy, kết quả đo khối lượng của chuột trước và sau khi thử nghiệm 7 ngày có sự khác biệt đáng kể ($P_{trước\text{-}sau} < 0,001$) ở tất cả các nhóm thử nghiệm cũng như nhóm chứng; khối lượng của chuột tăng trung bình là hơn 160 % ở tất cả các nhóm. Tuy nhiên, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về cân nặng trung bình sau thử nghiệm giữa các nhóm thử với nhau và so với nhóm chứng ($P_{ANOVA\ sau} > 0,05$; $P_{(T\text{-}C)\ sau} > 0,05$; $P_{(T\text{-}T)\ sau} > 0,05$). Qua kết quả trên, ta có thể thấy rằng ở các mức liều của bột sinh khối nấm Thượng Hoàng 6,0; 12,0; 18,0 mg/kg cân nặng, chuột không có dấu hiệu bị ngộ độc trong thời gian thực hiện thí nghiệm; chuột vẫn tăng cân tốt, phát triển tốt. Không có biểu hiện khác thường so với nhóm chứng và giữa các nhóm thử nghiệm. Tất cả chuột đều ăn uống, hoạt động bình thường. Như vậy, có thể xác định được liều không gây triệu chứng bất thường quan sát được trong thử nghiệm này là 18,0 g mẫu thử/kg chuột. Đây cũng là liều tối đa có thể cho uống. Liều gây chết 50% động vật thí nghiệm (LD50) trong thử nghiệm này lớn hơn 18,0 g mẫu thử/kg chuột. Theo phân loại độc tính của GHS (12), những chất có giá trị độc tính cấp LD50 lớn hơn 5000mg/kg chuột theo đường uống được coi là độc tính thấp và không phân loại (unclassified). Kết quả thu được của thử nghiệm này cho thấy mẫu thử bột sinh khối nấm Thượng hoàng có độc tính thấp dưới ngưỡng phân loại của GHS.

IV. KẾT LUẬN

Liều không gây triệu chứng bất thường quan sát được của bột sinh khối nấm Thượng Hoàng trong thử nghiệm này là 18,0 g mẫu thử/kg chuột. Liều gây chết 50% của động vật thí nghiệm (LD50) của bột sinh khối nấm Thượng Hoàng lớn hơn 18,0 g mẫu thử/kg chuột. Bột sinh khối nấm Thượng Hoàng có độc tính thấp dưới ngưỡng phân loại của GHS. Như vậy sử dụng bột sinh khối nấm Thượng Hoàng không gây ngộ độc đối với động vật thí nghiệm.

Lời cảm ơn: Để hoàn thành nghiên cứu này, chúng tôi trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của Bộ Công thương trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu cấp nhà nước với mã số ĐT.04.18/CNSHCB. Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của Viện Công nghệ HAUI, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội đã hỗ trợ nhân lực và hợp tác để thực hiện các phần công việc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phương pháp xác định độc tính của thuốc – Nhà xuất bản Y học 2014

2. H. M. Kim, S. B. Han, G. T. Oh et al., "Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom Phellinus linteus", International Journal of Immunopharmacology, vol. 18, no. 5, pp. 295–303, 1996

3. G. T. Oh, S. B. Han, H. M. Kim, M. W. Han, and I. D. Yoo, "Immunostimulating activity of Phellinus linteus extracts to B-lymphocyte", Archives of Pharmacal Research, vol. 15, no. 4, pp. 379–381, 1992

4. M. Song and H.-J. Park, "Anti-inflammatory effect of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice on dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and LPS-activated macrophages", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 154, no. 2, pp. 311–318, 2014

5. H.-J. Park, E. S. Han, D. K. Park, C. Lee, and K. W. Lee, "An extract of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice inhibits inflammation markers in RAW264.7 macrophages by suppressing inflammatory cytokines, chemokines, and mediators and up-regulating antioxidant activity", *Journal of Medicinal Food*, vol. 13, no. 6, pp. 1468–1477, 2010

6. H. J. Park, S. Y. Choi, S. m. Hong, S. G. Hwang, and D. K. Park, "The ethyl acetate extract of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT29 cells", *Phytotherapy Research*, vol. 24, no. 7, pp. 1019–1026, 2010

7. T.-I. Jeon, C.-H. Jung, J.-Y. Cho, D. K. Park, and J.-H. Moon, "Identification of an anticancer compound against HT-29 cells from *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 3, no. 10, pp. 785–789, 2013

8. T. I. Jeon, S.-G. Hwang, B. O. Lim, and D. K. Park, "Extracts of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice suppress liver damage induced by carbon tetrachloride in rats", *Biotechnology Letters*, vol. 25, no. 24, pp. 2093–2096, 2003

9. Ha-Kyoung Kwon and Hye-Jin Park, "*Phellinus linteus* Grown on Germinated Brown Rice Inhibits IgE-Mediated Allergic Activity through the Suppression of FcεRI-Dependent Signaling Pathway *In Vitro* and *In Vivo",* Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2019, Article ID 1485015, 15 pages, 2019

10. Ga Hyeon Jung, Jae Hui Kang, "Efficacy of *Phellinus linteus* (sanghuang) extract for improving immune functions. Study protocol for a randomized, double-blinded, placebo-controlled pilot trial", Medicine, vol. 99:3, pp. 1-4, 2020

11. Yong Ho Ku, Hyun Lee, Hwa Yeon Ryu, Jae Hui Kang, "A clinical pilot study to evaluate the efficacy of oral intake of *Phellinus linteus* (sanghuang) extract on knee joint and articular cartilage. Study protocol clinical trial (SPIRIT Compliant)", Medicine, vol. 99:8, pp.1-5, 2020

12. Jong-Myeung Kim, Jun-Duck Park, Dong-Chan Park and Byung-Oh Kim, "*In vivo* Antitumor Activity and Acute, Subacute Toxicity of Keumsa (*Phellinus linteus*) Extracts", Journal of Life Science, vol. 23. no. 11. 1388~1396, 2013

13. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, 2017

14. OECD guidelines for testing of chemicals. Repeated dose 28 - days Oral Toxicity study in Rodents OECD 407, 2008