

NGHIÊN CỨU SƠ CHẾ, CHIẾT XUẤT POLYSACCHARIDE VÀ TRITERPENOID THÔ TỪ QUẢ THỂ NẤM LINH CHI

PRELIMINARY PROCESSING, EXTRACTION OF TOTAL POLYSACCHARIDES AND TRITERPENOID FROM *GANODERMA LUCIDUM* FRUITING BODY

Phạm Châu Huỳnh^{1*}, Lê Văn Tình¹, Lê Thị Thảo Tiên², Phan Tiến Dũng¹, Nguyễn Bá Ngọc³, Đặng Quang Hải⁴, Mạc Thị Hà Thanh⁴, Huỳnh Thị Kim Cúc³

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học Đà Nẵng

²Trường Cao đẳng Lương thực - Thực phẩm

³Viện Phát triển Công nghệ Xanh

⁴Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng

*Tác giả liên hệ: huynhpc@danang.gov.vn

(Nhận bài: 21/9/2020; Chấp nhận đăng: 06/3/2021)

Tóm tắt - Nghiên cứu này nhằm làm rõ ảnh hưởng của kỹ thuật sơ chế nguyên liệu, chiết xuất đến kết quả khai thác polysaccharide và triterpenoid từ nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*). Thử nghiệm cho thấy, hiệu suất thu nhận các hoạt chất có thể được cải thiện nếu xử lý quả thể nấm bằng phương pháp ủ - sấy hoặc lạnh đông sâu - nghiền, giảm kích thước bột xay, tăng tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu, tăng thời gian ngâm, và tăng số lần chiết lặp. Hiệu suất thu nhận, thành phần chất chiết còn phụ thuộc thành phần dung môi (trong chiết xuất đơn) và thứ tự sử dụng các dung môi (trong chiết xuất kép). Chiết bằng nước có thể thu được ~100w% polysaccharide và ~16–20w% triterpenoid có trong nguyên liệu, và nếu chiết tiếp bằng EtOH có thể thu kiệt phần triterpenoid còn lại trong bã. Ngược lại, nếu chiết bằng EtOH, có thể thu được ~100w% triterpenoid trong nguyên liệu và dịch chiết không chứa polysaccharide, nhưng nếu sau đó tiếp tục chiết bã bằng nước, chỉ thu được ~78,5w% lượng polysaccharide có trong nguyên liệu.

Từ khóa - Linh chi (*Ganoderma lucidum*); polysaccharide; triterpenoid; chiết xuất; hiệu quả chiết xuất.

1. Giới thiệu

Cùng với sự phát triển của khoa học và công nghệ về hợp chất thiên nhiên, nấm dược liệu ngày càng được quan tâm bởi giàu hoạt chất có khả năng chữa bệnh. Nấm hương, nấm Khiêu vũ (Maitake), nấm Thái Dương (Agaricus) và Linh chi (*Ganoderma lucidum*) là các nấm dược liệu điển hình. Trong cộng đồng người Việt Nam, Linh chi là một trong những Đông dược quý, được sử dụng để tăng khả năng kháng bệnh và tuổi thọ.

Khoa học thực chứng đã cho thấy, quả thể, sợi nấm, và bào tử Linh chi giàu thành phần có hoạt tính sinh học, trong đó quan trọng nhất là các polysaccharide tan trong nước (GI-PS; chủ yếu là β -1,3-glucan) và triterpenoids (GI-TP) [1]. Cả GI-PS [2], [3], GI-TP [4], [5] và hỗn hợp chiết thô từ Linh chi [6] được chứng minh có hoạt tính kháng các dạng khối u. Hoạt chất trong Linh chi cũng thể hiện hiệu quả trong điều trị hơn 20 loại bệnh, như tăng huyết áp, hen suyễn, viêm phế quản, bệnh tim mạch... [1].

Abstract - This study was aimed to clarify the effects of raw material preliminary processing, extraction technique on the extraction of polysaccharides and triterpenoids from *Ganoderma lucidum* fruiting body. It was shown that the extraction efficiency of the active substances could be improved with the mushroom processed by annealing - drying or deep freezing - crushing, or by reducing the size of the raw material, increasing the ratio of solvent/raw materials, the immersion time, and the number of repetitions. The extraction efficiency and the extract composition were shown depended on the solvent content (in single extraction) and the order in which the solvents were used (in double extraction). Extraction with water as the solvent was able to collect ~100w% polysaccharide and ~16–20w% triterpenoids in the materials, and further extraction with EtOH could harvest the remaining triterpenoid in the residues. In contrary, in the extraction with EtOH, ~100w% triterpenoid was obtained from the raw material, the resulted extract contained no polysaccharide, and in further extraction of the residue with water, only ~78.5w% of the polysaccharide in the raw material was obtained.

Key words - Lingzhi (*Ganoderma lucidum*); polysaccharide; triterpenoid; extraction; extraction efficiency.

Linh chi thường được sử dụng dưới hình thức ngâm rượu, bột mịn để pha vào đồ uống, hoặc thái lát/xay nhỏ và sắc uống như trà. Một hướng chế biến mới là chiết hoạt chất, sau đó cô đặc thành cao, hoặc sấy khô và đóng viên nang. Dù vậy, chưa thấy có công bố một cách hệ thống về kỹ thuật sơ chế nguyên liệu và chiết xuất hoạt chất từ Linh chi.

Mục đích chính của nghiên cứu này là khảo sát điều kiện kỹ thuật của các công đoạn xử lý và chiết xuất quả thể nấm nhằm thu nhận GI-PS và GI-TP phục vụ hướng phát triển sản phẩm giá trị gia tăng từ chất chiết Linh chi.

2. Vật liệu và Phương pháp

2.1. Vật liệu

Nấm Linh chi (tươi) được thu nhận từ Hợp tác xã Nấm An Hải Đông (TP. Đà Nẵng). Chloroform ($\geq 99\%$, khan), n-butanol (99,5w%, AR), methanol (MeOH; $\geq 99,8w\%$), vanillin (99w%), acetonitrile (99,8w%, khan), dichloromethane ($\geq 99,9w\%$), phenol ($\geq 99,5w\%$),

¹ Danang Centre for Biotechnology (Pham Chau Huynh, Le Van Tinh, Phan Tien Dung)

² College of Food Industry (Le Thi Thao Tien)

³ Institute of Green Technology Development (Nguyen Ba Ngoc, Huynh Thi Kim Cuc)

⁴ The University of Danang - University of Science and Technology (Hai Quang Dang, Thanh Ha Thi Mac)

perchloric acid (ACS reagent, 60w%), thuốc thử Folin – Ciocalteu, oleanolic acid (chuẩn phân tích), lovastatin (chuẩn phân tích), và petroleum ether (ACS reagent) từ Sigma – Aldrich. D-glucose (chuẩn phân tích) từ Supelco. Ethanol (EtOH; $\geq 99,9\text{w}\%$) từ Xilong Scientific.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thu nhận và xử lý mẫu nấm

Quả thể nấm Linh chi tươi được thu nhận theo Codex Methods of Sampling (năm 2004), loại bỏ dị vật, trộn đều để đồng nhất mẫu, và đưa vào thử nghiệm ngay, hoặc sấy bằng hồng ngoại đến độ ẩm $\sim 7\text{w}\%$ và bảo quản ở $\sim 5^\circ\text{C}$, từ đó triển khai cho các thí nghiệm.

2.2.2. Thử nghiệm về sơ chế nguyên liệu

a. Phương pháp sơ chế nguyên liệu

Mẫu quả thể Linh chi tươi được cắt thành mảnh ($\sim 2 \times 2$ cm), trộn đều, và xử lý bằng các phương pháp: (1) Xử lý bằng vi sóng trong 5 phút, sau đó sấy trong không khí đối lưu ở 55°C trong 10 giờ đến $\sim 9\text{w}\%$ ẩm (M-IRD, microwave treatment - infrared drying); (2) Sấy bằng bức xạ hồng ngoại ($\lambda \sim 940\text{nm}$) ở $\sim 50^\circ\text{C}$ trong 10 giờ đến $\sim 7\text{w}\%$ ẩm (IR-D, infrared drying); (3) Làm dập, ủ ở 45°C trong 12 giờ, sau đó sấy bằng bức xạ hồng ngoại ($\lambda \sim 940\text{nm}$) ở $\sim 50^\circ\text{C}$ trong 10 giờ đến $\sim 7\text{w}\%$ ẩm (F-IRD, fermentation – infrared drying); và (4) Lạnh đông sâu đến -70°C , sau đó nghiền vụn (ULT-G, ultra-low temperature freezing - grinding). Mẫu chứng là quả thể nấm tươi (FR, fresh sample). Các mẫu sau xử lý và mẫu chứng được phân tích hàm lượng GI-PS và GI-TP theo phương pháp trình bày ở Mục 2.2.5.

b. Mức độ làm nhỏ nguyên liệu

Quả thể nấm Linh chi khô được xay thành 4 nhóm bột theo kích thước: $d \leq 2\text{mm}$, $d \leq 3\text{mm}$, $d \leq 5\text{mm}$, và $d \leq 10\text{mm}$ (sử dụng máy nghiền búa, tốc độ 4500 vòng/phút, và bộ sàng với các kích thước lỗ khác nhau). Các mẫu bột theo kích thước được chiết xuất GI-PS và GI-TP một cách độc lập, theo quy trình được tham khảo từ [7] và [9], có điều chỉnh, với dung môi tương ứng là nước và EtOH (được chọn theo đặc tính tan của các hoạt chất). Để chiết GI-PS, 5 g mẫu được ngâm 2 giờ trong 100mL nước 80°C , thu lấy dịch chiết và lọc trong qua giấy lọc (Whatman No. 4, $\text{Ø} 20\text{--}25\mu\text{m}$). Quá trình được lặp 3 lần, dịch chiết được phối trộn và định lượng hoạt chất.

Đối với GI-TP, thực hiện tương tự trên, với dung môi là EtOH ($> 99,5\text{w}\%$).

2.2.3. Nghiên cứu điều kiện chiết xuất

Chiết GI-PS bằng nước 80°C và GI-TP bằng EtOH $99,5\text{w}\%$ 80°C độc lập nhau, sử dụng bột Linh chi khô, độ ẩm ban đầu $\sim 7\text{w}\%$, kích thước $d \leq 3\text{mm}$. Về cơ bản, quy trình chiết mỗi hoạt chất gồm 3 công đoạn: (1) Phân tán 5 g bột nấm vào dung môi (nước; EtOH) 80°C ; (2) Ngâm nguyên liệu trong dung môi ở 80°C kết hợp khuấy đảo trong 90 phút; (3) Lọc chân không qua giấy lọc (Whatman No. 4) để thu nước chiết. Các thí nghiệm cụ thể như sau:

- Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu: Chiết GI-PS với 4 mức tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (nước): 20/1, 30/1, và 60/1 (L/kg). Lặp lại quy trình chiết 3 lần. Thực hiện tương tự cho GI-TP; dùng dung môi là EtOH ($> 99,5\text{V}\%$).

- Thời gian ngâm: Chiết GI-PS với 4 mức thời gian ngâm mẫu: 30, 60, 90 và 120 phút. Tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi là 1/20. Lặp lại quy trình chiết 3 lần. Thực hiện tương tự với GI-TP; dùng dung môi là EtOH ($> 99,5\text{V}\%$).

- Thử nghiệm số lượt chiết xuất

Chiết GI-PS nhiều lần: Đối với mỗi 5 g Linh chi, tiến hành chiết GI-PS lặp 8 lần với dung môi là nước. Dịch chiết sau mỗi lần được định lượng GI-PS.

Chiết GI-TP nhiều lần: Đối với mỗi 5 g Linh chi, tiến hành chiết GI-TP lặp 8 lần với dung môi là EtOH ($> 99,5\text{V}\%$). Dịch chiết từ mỗi lần được định lượng GI-TP.

2.2.4. Khảo sát mô thức chiết xuất

a. Chiết xuất đơn (single extraction)

Chiết bột nấm ($d \leq 3\text{mm}$) bằng hỗn hợp dung môi EtOH ($> 99,5\text{w}\%$) – nước ở 80°C , với nồng độ EtOH: 0, 25, 50, 75, và $100\text{V}\%$. Ứng với mỗi nồng độ của EtOH, 5 g mẫu được ngâm 2 giờ trong 100mL dung môi 80°C , lọc hỗn hợp qua giấy lọc (Whatman No. 4) thu dịch chiết trong. Quá trình được lặp 3 lần. Dịch chiết được trộn và định lượng hoạt chất. Hiệu quả chiết (E_{ef}) được xác định theo công thức:

$$E_{ef} = \frac{AS_s}{AS_0} * 100\%$$

Trong đó, AS_s (mg) là khối lượng hoạt chất đã chiết được, và AS_0 (mg) là khối lượng hoạt chất có trong nguyên liệu ban đầu (xác định như ở Mục 2.2.4).

b. Chiết xuất kép (double/dual extraction)

Phương án 1 (PA 1): Chiết xuất GI-PS từ bột nấm Linh chi bằng nước, sau đó chiết GI-TP bằng EtOH ($> 99,5\text{w}\%$). Trong mỗi thực nghiệm, 5 g bột Linh chi ($d \leq 3\text{mm}$) được ngâm 2 giờ trong 100mL dung môi 80°C , thu lấy dịch chiết và lọc trong qua giấy lọc (Whatman No. 4). Quá trình được lặp 3 lần, dịch chiết được phối trộn và định lượng hoạt chất.

Phương án 2 (PA 2): Chiết xuất GI-TP từ bột nấm Linh chi bằng EtOH, sau đó sử dụng bã làm nguyên liệu để chiết GI-PS bằng nước. Cách thực hiện cụ thể như ở PA 1.

2.2.5. Phân tích định lượng hoạt chất

a. Phân tích định lượng GI-PS

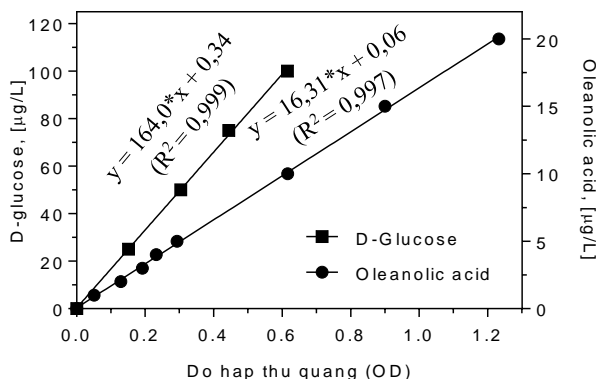
GI-PS được chiết từ mẫu nấm theo phương pháp ở [7], có điều chỉnh. Hai gram mẫu được ngâm trong 50 mL nước 85°C trong 2 giờ, sau đó lọc chân không qua giấy lọc (Whatman No. 4) thu nước chiết. Quá trình được lặp 6 lần. Nước chiết được trộn chung và cô đặc đến ~ 100 mL, bổ sung 200 mL EtOH tuyệt đối, để yên ở 4°C trong 12 giờ. Hỗn hợp sau đó được ly tâm (5000 vòng/phút, 10 phút), loại bỏ phần lỏng; Phần rắn được rửa bằng EtOH tuyệt đối và làm khô, thu được GI-PS thô.

GI-PS được định lượng dựa trên phản ứng màu giữa polysaccharide và các đơn phân của nó (D-glucose) với phenol và H_2SO_4 đặc [8]. Cụ thể, GI-PS thô được hòa tan và định mức bằng nước cất đến 25 mL. Một mL của dung dịch này được trộn với 1 mL phenol $5\text{w}\%$ và 5 mL H_2SO_4 đặc. Hỗn hợp được lắc 30 phút, sau đó đo độ hấp thụ (OD) tại bước sóng hấp thụ cực đại ($\lambda_{\text{max}} \sim 490$ nm; Spectrophotometer Cary 60). Hàm lượng đường được tính toán dựa trên đường chuẩn của glucose (Hình 1).

b. Phân tích định lượng GI-TP

GI-TP được chiết và định lượng theo phương pháp ở [9], có điều chỉnh. Hai gram bột mẫu được cho vào 50mL EtOH 95V%, ngâm ở 70°C trong 2 giờ, sau đó lọc chân không qua giấy lọc (Whatman No. 4) thu lấy dịch chiết. Quy trình trên được lặp 4 lần. Nước chiết hỗn hợp được cô đặc ở áp suất thấp thành sệt và sấy khô ở 80°C. Chất chiết khô được rửa bằng ~25 mL nước cất trong 10 phút và sấy khô ở 80°C. Thêm 5 mL ether dầu vào chất chiết khô, siêu âm 2 phút, để yên 10 phút và ly tâm thu phần lắng. Chất lắng được rửa bằng 5 mL chloroform (2 lần), và chung ở áp suất thấp để loại chloroform, thu được GI-TP tinh.

Hòa tan GI-TP tinh và định mức đến 25 mL bằng ethylacetate. Lấy 1 mL dung dịch GI-TP ở trên chung ở áp suất thấp để loại ethylacetate, thu được GI-TP rắn. Cho vào ống nghiệm đựng chất rắn 1 mL hỗn hợp dung dịch 5w% vanillin trong acetic acid băng và 4 mL perchloric acid. Lắc (vortex) đến tan hoàn toàn chất rắn, để yên dung dịch ở 70°C trong 30 phút, sau đó làm lạnh trong bể nước đá (~3 phút). Lấy 1 mL dịch định mức thành 10mL với acetic acid băng. Hàm lượng GI-TP được xác định qua độ hấp thụ tại $\lambda_{\max} = 550\text{nm}$ (Agilent Spectrophotometer Cary 60) với oleanolic acid (Sigma Aldrich) là chất chuẩn và EtOH tuyệt đối làm mẫu trắng (Hình 1).



Hình 1. Đường chuẩn của D-glucose và oleanolic acid

2.2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm GraphPad 2017 (GraphPad Software, Inc., USA). Kết quả định lượng được biểu diễn ở dạng mean \pm SD. Sự sai khác giữa các kết quả thí nghiệm được xác định bằng phân tích phương sai, với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

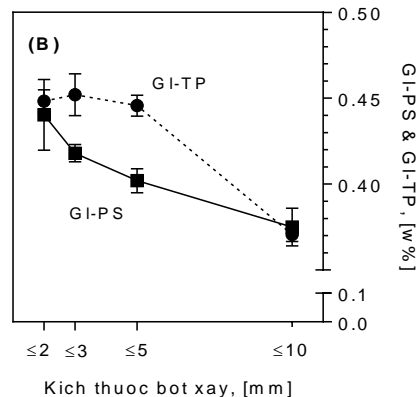
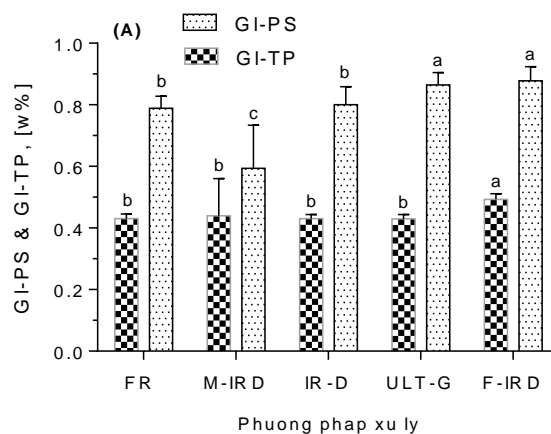
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phương pháp xử lý nguyên liệu nấm

Hình 2A biểu diễn kết quả xác định và so sánh lượng GI-PS và GI-TP chiết được (theo w% chất khô mẫu) từ các mẫu nấm khác nhau về biện pháp sơ chế. Lượng GI-TP trong các mẫu M-ID, IR-D, ULT-G, và FR (mẫu chứng) tương đương nhau, nhưng thấp hơn so với mẫu F-IRD. Trong khi đó, lượng GI-PS khai thác được từ ULT-G tương đương với từ F-IRD, FR tương đương IR-D, và theo phân cấp: ULT-G & F-IRD > FR & IR-D > M-ID. Hiệu quả thu nhận GI-PS từ các mẫu ULT-G và F-IRD gấp ~1,1 lần so với từ các mẫu FR và IR-D.

Hình 2B biểu diễn biến đổi của lượng GI-PS và GI-TP

chiết được theo kích thước bột xay. Lượng GI-TP thu được từ các bột nhóm $d \leq 2\text{mm}$, $d \leq 3\text{mm}$, và $d \leq 5\text{mm}$ tương đương nhau, và bằng ~1,20 lần so với lượng thu được từ nhóm bột $d \leq 10\text{mm}$. Trong khi đó, với các kích thước bột đã khảo sát, hiệu quả chiết GI-PS càng cao khi bột càng được xay mịn. So với chiết từ bột $d \leq 10\text{mm}$, hiệu quả chiết GI-PS lần lượt đạt 1,05, 1,10, và 1,70 lần tương ứng với bột kích thước $d \leq 3\text{mm}$, $d \leq 5\text{mm}$, và $d \leq 10\text{mm}$.



Hình 2. Phụ thuộc của tổng lượng GI-PS và GI-TP chiết được vào điều kiện sơ chế nguyên liệu (tính theo w% chất khô bột nấm). (A) Ảnh hưởng bởi phương pháp chế biến nấm tươi; (B) Ảnh hưởng bởi khác biệt về kích thước nguyên liệu. Các chữ cái biểu thị có hay không sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa các giá trị trung bình

Như vậy, một số phương pháp sơ chế nấm tươi có thể giúp tăng hiệu quả chiết GI-PS và GI-TP. Sự gia tăng hiệu quả thu nhận GI-PS bởi ULT-G và F-IRD có thể được giải thích bằng sự phá vỡ sâu sắc cấu trúc màng tế bào quả thể nấm, nhờ đó giải phóng triệt để β -1,3-glucan, là hợp chất vốn liên kết chặt với các thành phần khác tạo nên cấu trúc bảo vệ tế bào. Trong trường hợp xử lý nấm tươi bằng lạnh đông đến -72°C (ULT-G), nước trong tế bào và mô nấm kết tinh thành những tinh thể lớn, dẫn đến sự phá vỡ các cấu trúc tế bào. Mặt khác, nhờ nhiệt độ âm sâu, tinh thể nước đá có thể tồn tại được trong quá trình xay sinh khối nấm đông và gây ma sát giúp phá vỡ cấu trúc tế bào. Đối với trường hợp nấm tươi được làm dập và ủ ở 45°C trước khi sấy băng hồng ngoại (mẫu F-IRD), sự gia tăng lượng GI-PS khai thác có thể cũng nhờ sự phá hủy sâu sắc màng tế bào quả thể nấm, tuy nhiên cơ chế khác với ở mẫu ULT-G. Làm dập và ủ nấm tươi có thể đã kích hoạt và tạo điều

kiện hoạt động cho nhiều enzyme thủy phân nội bào làm phân rã các cấu trúc tế bào và giải phóng β -1,3-glucan khỏi các phức khó tan. Một khả năng khác là dưới tác dụng của enzyme, diễn ra sự phân cắt polysaccharide mạch dài thành các oligosaccharide tan được trong nước, tuy nhiên vì không có sự vượt trội về kết quả chiết GI-PS từ F-IRD so với từ ULT-G nên khả năng này chưa được khẳng định.

Qua số liệu ở Hình 2A, GI-TP trong nguyên liệu cho thấy có thể được khai thác kiệt ngay cả với nguyên liệu tươi hoặc sấy mà không cần qua các phương pháp xử lý đặc biệt. Trong khi đó, lượng GI-TP chiết được từ F-IRD cao hơn so với các mẫu khác dường như không phải bởi hiệu quả phá hủy cấu trúc tế bào và mô quả thể nấm, mà có thể bằng một số quá trình sinh hoá chưa được xác định.

Về ảnh hưởng của kích thước nguyên liệu lên hiệu suất chiết hoạt chất, dù đã có công bố về ảnh hưởng cụ thể của kích thước bột xay trong chiết đối với nhiều thảo dược, nhưng vẫn chưa thấy có dữ liệu như vậy về chiết xuất GI-PS và GI-TP từ Linh chi. Các tài liệu liên quan khẳng định thảo dược được xay nhỏ giúp quá trình chiết được triệt để, và thường giải thích bởi sự gia tăng diện tích bề mặt tiếp xúc dung môi – nguyên liệu [10]. Tuy nhiên, theo nhóm tác giả, ngoài yếu tố tổng diện tích tiếp xúc, còn có thể có hiệu quả tích cực từ việc rút ngắn quãng đường khuếch tán hoạt chất từ bên trong nguyên liệu vào dung môi, và tăng mức độ phá hỏng vi cấu trúc của tế bào và mô nấm, nhờ các cản trở đối với sự khuếch tán của hoạt chất được giảm thiểu.

Như vậy, xay nhỏ nguyên liệu sẽ tạo thuận lợi để giải phóng hoạt chất vào dung môi. Tuy nhiên, nguyên liệu quá mịn có xu hướng gây tăng trở lực lọc, do đó làm giảm hiệu suất thu hồi chất chiết. Vì vậy, trong sản xuất thực, cần xét điều kiện kỹ thuật cụ thể để chọn kích thước bột xay.

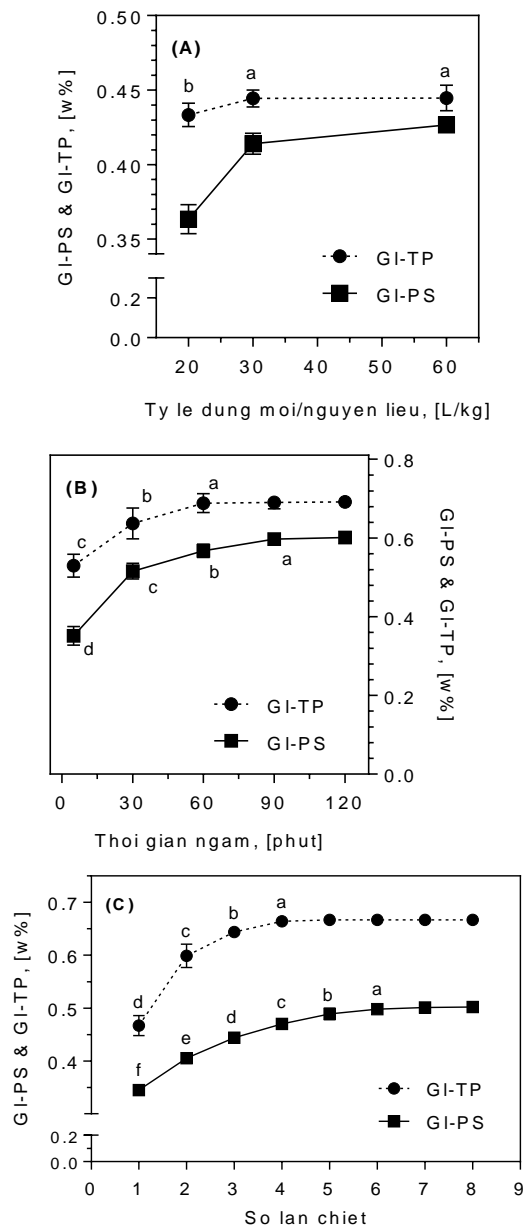
3.2. Điều kiện chiết xuất

Hình 3A biểu diễn kết quả khảo sát lượng hoạt chất GI-PS và GI-TP chiết được (so với w% chất khô nấm Linh chi) theo tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu. Tương ứng mỗi hoạt chất, tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi dẫn đến tăng hiệu quả chiết. Hình 3B thể hiện kết quả thí nghiệm xác định ảnh hưởng thời gian ngâm nguyên liệu đến hiệu quả chiết GI-PS và GI-TP nấm Linh chi. Hình 3C biểu diễn lượng hoạt chất tổng sau các lần chiết xuất lặp lại.

Hiệu quả khai thác GI-PS và GI-TP tăng khi tăng tỷ lệ dung môi/nguyên liệu tương ứng từ 20 L/kg lên 60 L/kg (1,18 lần; GI-PS) và 30 L/kg (1,03 lần; GI-TP) (Hình 3A) có thể được giải thích bằng sự giảm tương ứng về nồng độ hoạt chất trong hệ dung môi – nguyên liệu, do đó giảm lượng chất tan lưu lại trong sinh khối và phần chất lỏng tồn lưu trong đó sau khi hỗn hợp chiết được lọc chân không. Mặc khác, nồng độ chất tan thấp hơn tạo ra động lực khuếch tán lớn hơn, do vậy chất tan càng dễ thắng các trở lực để chuyển vào dung môi.

Kết quả trên Hình 3B thể hiện vai trò của thời gian trong quá trình khuếch tán của các hoạt chất và cho phép xác định được thời gian mà tại đó quá trình khuếch tán từng chất tan đạt đến trạng thái cân bằng; đó cũng là thời gian hiệu suất chiết đạt giá trị cao nhất. Với các điều kiện thí nghiệm đã tiến hành, thời gian sớm nhất để hiệu quả chiết GI-TP và GI-PS đạt mức cao nhất tương ứng là 60 và 90 phút, tăng

1,16 lần (GI-PS) và 1,08 lần (GI-TP) so với ngâm 30 phút. Việc tiếp tục tăng thời gian ngâm vượt các giá trị trên không đem lại hiệu quả gia tăng đáng kể.



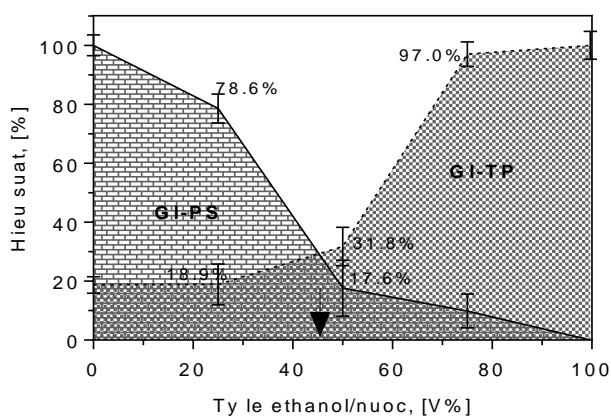
Hình 3. Kết quả thực nghiệm về các yếu tố kỹ thuật của công đoạn chiết GI-PS và GI-TP từ Linh chi. Ảnh hưởng của: (A) tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, (B) thời gian mỗi lần ngâm, và (C) số lượt chiết xuất. (Các chữ cái biểu thị có hay không sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa các giá trị trung bình)

Theo Hình 3C, chiết nhiều lần là cần thiết để có hiệu suất khai thác cao đối với GI-TP và GI-PS từ Linh chi. Với GI-PS, chiết lần 1, 2, và 3 thu được tương ứng ~67,6w%, ~80,5%, và ~88,3% lượng hoạt chất có trong nguyên liệu. Hiệu quả chiết tăng với mức ý nghĩa khi chiết đến lần thứ 6, đạt ~99,4% (gấp 1,47 lần so với chiết 1 lần). Với GI-TP, sau lần chiết 1, 2, 3, và 4 khai thác được tương ứng 70,0%, 89,8%, 96,9% lượng hoạt chất có trong nguyên liệu. Hiệu quả chiết tăng với mức ý nghĩa khi chiết đến lần thứ 4, đạt 99,6% (gấp 1,42 lần so với chiết không lặp). Hiệu quả thu nhận hoạt chất tăng khi chiết nhiều lần là nhờ tận thu chất

tan trong dung môi tồn lưu trong nguyên liệu sau mỗi đợt chiết bởi tái khuếch tán chất tan, và sự tiếp tục chuyển khối chất tan vào dung môi do động lực khuếch tán tăng khi nguyên liệu tiếp xúc dung môi mới. Kết quả này cùng với phát hiện ở Mục 3.1. cho thấy, đường như GI-PS khó được chiết kiệt khỏi nấm Linh chi. Nhược điểm của chiết lặp nhiều lần là tiêu tốn nhiều dung môi, thời gian, và làm loãng dịch chiết hỗn hợp. Vì vậy, đối với chiết GI-PS theo phương pháp chiết gián đoạn (như ở báo cáo này), thì số lần chiết GI-PS là 3 (hiệu suất ~88,3%) và GI-TP là 2 (hiệu suất ~89,8%) là có thể chấp nhận được.

3.3. Mô thức chiết xuất

Hình 4 biểu diễn kết quả thực nghiệm chiết xuất GI-PS và GI-TP bằng dung môi hỗn hợp EtOH – nước (mô thức chiết xuất đơn) và bằng EtOH và nước riêng lẻ (mô thức chiết xuất kép). Kết quả chứng tỏ, có thể chiết GI-PS và GI-TP từ Linh chi một cách đồng thời hoặc riêng lẻ bằng cách sử dụng dung môi hỗn hợp (EtOH – nước) hoặc sử dụng từng dung môi đơn (EtOH, nước).

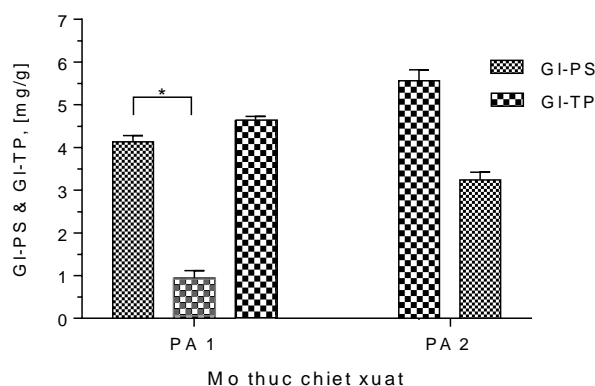


Hình 4. Hiệu suất chiết xuất GI-PS và GI-TP từ nấm Linh chi theo tỷ lệ EtOH/nước trong dung môi hỗn hợp

Trong trường hợp chiết xuất đơn, khi tăng tỷ lệ EtOH/nước thì hiệu quả chiết GI-PS giảm và GI-TP tăng. Từ đồ thị biểu diễn kết quả ở Hình 4, cho phép dự đoán thành phần chất chiết tương ứng từng nồng độ EtOH của dung môi, và nhận thấy tại tỷ lệ EtOH/nước ~45V%, lượng GI-PS và GI-TP được khai thác từ nguyên liệu sau 3 lần chiết lặp lại tương đương nhau (~25% tổng lượng hoạt chất tương ứng ban đầu trong mẫu chiết). Sau khi loại bỏ dung môi, chất chiết trên chỉ có thể tạo với nước hoặc EtOH các huyền phù đục do chứa đồng thời các hợp phần chỉ tan trong nước hoặc trong cồn. Ở khía cạnh khác, kết quả trên cho thấy việc sử dụng Linh chi theo cách ngâm rượu, chiết và bổ sung rượu nhiều lần như cách trong dân gian có thể khai thác triệt để cả hai hoạt chất quý trong Linh chi là polysaccharide và triterpenoid.

Trong trường hợp chiết xuất kép, kết quả thực nghiệm so sánh cho thấy, thứ tự sử dụng dung môi ảnh hưởng rõ rệt đến thành phần chất chiết (Hình 5). Nếu theo PA 1 (chiết trước bằng nước), dịch chiết có vị đắng, chứa ~100% GI-PS và ~16–20w% GI-TP có trong nguyên liệu ban đầu. Tuy nhiên, trong quá trình chiết tiếp sau đó bằng EtOH, chất chiết thu được chỉ chứa ~80–84% lượng GI-TP có trong nguyên liệu và không phát hiện có GI-PS. Ngược lại, nếu theo PA 2, dịch chiết chứa toàn bộ GI-TP

trong nguyên liệu đầu và không lẫn GI-PS, nhưng trong quá trình chiết tiếp theo đó bằng nước, dịch chiết thu được không có vị đắng, và chỉ chứa ~78,5w% lượng GI-PS có trong nguyên liệu.



Hình 5. Hiệu quả thu nhận GI-PS và GI-TP trong 2 phương án chiết xuất kép. (*) Phần chất chiết được bởi nước trong PA 1

Phần GI-TP được chiết cùng với GI-PS trong PA 1 thể hiện khả năng tan được trong nước và có vị đắng. Cho đến nay, đã có hơn 300 triterpenoid đã được xác định từ chi nấm *Ganoderma*, với phân tử chứa từ 24 đến 51 carbon [11], [12], [13], [14] trong đó ở Linh chi (*G. lucidum*) chủ yếu là dạng lanostane. Nhiều hợp chất terpenoid từ Linh chi, với phân tử chứa từ 17C đến 30C được xác định là có thể cho vị đắng [15]. Mặt khác, chất chiết Linh chi bằng nước cũng có thể đã hòa tan các terpenoid có phân tử đơn giản và có hoạt tính sinh học quý. Một nghiên cứu gần đây phát hiện một hợp phân tử chất chiết Linh chi tan được trong nước có độc tính đối với dòng tế bào ung thư phổi kháng EGFR-TKI A549 và tế bào ung thư tuyến tiền liệt ở người PC3 [4], từ đó, đã xác định được các sesquiterpenoid dạng gymnomitrane.

Từ kết quả thí nghiệm, đã phát hiện một hiện tượng đáng chú ý là tồn thất về lượng GI-PS (~21,5%) khi chiết xuất các hợp chất theo PA 2. Có thể rằng khi ngâm vào nguyên liệu để chiết GI-TP, EtOH đã có tác động dẫn đến các gốc -OH trên β -1,3-glucan tạo các liên kết nội phân tử hoặc liên phân tử, từ đó biến tính một phần các β -1,3-glucan và chuyển chúng sang dạng kém hoặc không tan trong nước, hoặc phát sinh liên kết bền vững với các hợp phần không tan trong sinh khối nguyên liệu.

4. Kết luận

- Sơ chế nấm nguyên liệu bằng phương pháp ủ – sấy, hoặc lạnh đông sâu – nghiền có thể giúp tăng hiệu quả thu nhận polysaccharide và triterpenoid đến 110–120%.

- Hiệu suất chiết polysaccharide và triterpenoid tăng khi giảm kích thước bột xay từ $\leq 10\text{mm}$ đến $\leq 2\text{mm}$ (tăng tương ứng 170% và 120%) và tăng số lần chiết lặp từ 1 đến 6 lần trong chiết polysaccharide (tăng ~150%) và 4 lần trong chiết triterpenoid (tăng 140%). Ngoài ra, hiệu suất thu nhận hoạt chất cũng tăng đáng kể khi tăng thời gian ngâm nguyên liệu trong dung môi, và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu.

- Hiệu suất thu nhận và thành phần chất chiết còn phụ thuộc thành phần dung môi (trong chiết xuất đơn) và thứ tự sử dụng các dung môi (trong chiết xuất kép). Chiết bằng nước có thể thu được ~100w% polysaccharide và ~16–

20w% triterpenoid có trong nguyên liệu, và nếu chiết tiếp bằng EtOH có thể thu kiệt phần triterpenoid còn lại trong bã. Ngược lại, nếu chiết bằng EtOH, có thể thu được ~100w% triterpenoid trong nguyên liệu và dịch chiết không chứa polysaccharide, nhưng nếu sau đó tiếp tục chiết bã bằng nước, chỉ thu được ~78,5w% lượng polysaccharide có trong nguyên liệu.

Lời cảm ơn: Tác giả chân thành cảm ơn UBND TP. Đà Nẵng đã tài trợ cho nghiên cứu này.

TAI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R. R. M. Paterson, "Ganoderma - A therapeutic fungal biofactory", *Phytochemistry*, 2006, doi: 10.1016/j.phytochem.2006.07.004.
- [2] L. F. Li *et al.*, "Comprehensive comparison of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and *G. sinense*: Chemical, antitumor, immunomodulating and gut-microbiota modulatory properties", *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-22885-7.
- [3] C. J. Weng and G. C. Yen, "The in vitro and in vivo experimental evidences disclose the chemopreventive effects of *Ganoderma lucidum* on cancer invasion and metastasis", *Clinical and Experimental Metastasis*, 2010, doi: 10.1007/s10585-010-9334-z.
- [4] P. T. Binh, D. Descoutures, N. H. Dang, N. P. Dai Nguyen, and N. T. Dat, "A new cytotoxic gymnomitrane sesquiterpene from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies", *Nat. Prod. Commun.*, vol. 10, no. 11, pp. 1911–1912, 2015, doi: 10.1177/1934578x1501001125.
- [5] K. Xu, X. Liang, F. Gao, J. Zhong, and J. Liu, "Antimetastatic effect of ganoderic acid T in vitro through inhibition of cancer cell invasion", *Process Biochem.*, 2010, doi: 10.1016/j.procbio.2010.04.013.
- [6] R. Zhao, Q. Chen, and Y. min He, "The effect of *Ganoderma lucidum* extract on immunological function and identify its anti-tumor immunostimulatory activity based on the biological network", *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-30881-0.
- [7] T. G. Pillai, C. K. K. Nair, and K. K. Janardhanan, "Polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum* occurring in Southern parts of India, protects radiation induced damages both in vitro and in vivo", *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 26, no. 1, pp. 80–85, 2008, doi: 10.1016/j.etap.2008.02.004.
- [8] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", *Anal. Chem.*, 1956, doi: 10.1021/ac60111a017.
- [9] C. Liang *et al.*, "The extract optimization and identification study of bioactive total triterpenoids from the rare traditional Chinese medicine *Qinling Polyporus umbellatus*", *J. Chem. Pharm. Res.*, vol. 6, no. 6, pp. 1283–1289, 2014.
- [10] "A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation", *Med. Aromat. Plants*, 2015, doi: 10.4172/2167-0412.1000196.
- [11] Z. Lin and B. Yang, *Ganoderma and Health - Biology, Chemistry and Industry*. Springer Singapore, 2019.
- [12] H. T. Ma, J. F. Hsieh, and S. T. Chen, "Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*", *Phytochemistry*, 2015, doi: 10.1016/j.phytochem.2015.02.017.
- [13] Y. M. Yan *et al.*, "Lingzhiols, unprecedented rotary door-shaped meroterpenoids as potent and selective inhibitors of p-Smad3 from *ganoderma lucidum*", *Org. Lett.*, 2013, doi: 10.1021/ol4026364.
- [14] H. W. Seo *et al.*, "Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity", *Arch. Pharm. Res.*, 2009, doi: 10.1007/s12272-009-2109-x.
- [15] T. Nishitoba, H. Sato, and S. Sakamura, "New Terpenoids from *Ganoderma Lucidum* and Their Bitterness", *Agric. Biol. Chem.*, vol. 49, no. 5, pp. 1547–1549, 1985, doi: 10.1080/00021369.1985.10866944.