



NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH TRÍCH LY POLYSACCHARIDES TỪ NẤM LIM XANH (*GANODERMA LUCIDIUM*)

Luu Hồng Sơn^{1*}, Tạ Thị Lương^{1,2}, Vi Đại Lâm¹, Nguyễn Thị Tình¹, Đinh Thị Kim Hoa¹, Trịnh Thị Chung¹,
Huỳnh Thị Thiệp¹

¹ Trường Đại học Nông Lâm - Đại học Thái Nguyên

² Đại học Queensland

Email: luuhongson@tuaf.edu.vn

Thông tin bài viết

Ngày nhận bài:

11/5/2020

Ngày duyệt đăng:

12/8/2020

Từ khóa:

nấm Lim xanh; quy trình;
trích ly; polysaccharide;
thông số.

Tóm tắt

Nấm Lim xanh (*Ganoderma lucidium*) thuộc họ nấm gỗ mọc trên thân của cây Lim xanh (*Erythrophleum fordii*) đã chết. Nấm *Lim xanh* được khẳng định là loại dược liệu có ích cho sức khỏe con người và được dùng làm thuốc từ lâu đời. Đa số các sản phẩm từ nấm Lim xanh thông dụng hiện nay trên thị trường Việt Nam chủ yếu là nấm quả thể khô hoặc tai nấm khô cắt lát, có rất ít sản phẩm chế biến tiện dụng. Trong nghiên cứu này nấm Lim xanh được nuôi cấy tại phòng nuôi cấy mô Khoa Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên - Đại học Thái Nguyên. Nghiên cứu đã xác định điều kiện để trích ly các polysaccharide từ nấm Lim xanh nuôi cấy là: thời gian xử lý sóng siêu âm 4 phút, hàm lượng polysaccharide đạt 4,26 mg/g; nồng độ ethanol 80 %, hàm lượng polysaccharide đạt 4,81 mg/g; tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 (g/ml), hàm lượng polysaccharide đạt 4,98 mg/g; thời gian trích ly là 90 phút, hàm lượng polysaccharide đạt 5,32 mg/g; nhiệt độ 80 °C, hàm lượng polysaccharide đạt 5,83 mg/g.

1. MỞ ĐẦU

Lim xanh thuộc nhóm nấm lớn và rất đa dạng về chủng loại. Từ khi xác lập thành một chi riêng, là *Ganoderma Karst* (1881), đến nay có hơn 200 loài được ghi nhận [1, 5]. Cho đến nay đã xác định được trên 90 nguyên tố hóa học trong nấm Lim xanh. Hai nhóm hợp chất hóa học được quan tâm nhất là polysaccharide và triterpenoide, trong đó polysaccharide chứa hàm lượng cao nhất, chiếm từ 50 - 60 %, là hợp chất quyết định chất lượng của nấm

Lim xanh. Nấm Lim xanh có hàm lượng polysaccharide càng cao thì được đánh giá là chất lượng càng tốt [2, 6]. Năm 1976 polysaccharide đã được tách chiết ở Nhật và được bằng sáng chế dùng để điều trị ung thư [7]. Năm 2018, Didem Sohretoglu and Shile Huang cho thấy polysaccharide trích ly từ nấm Lim xanh kháng tế bào ung thư [9]. Chính vì vậy việc nghiên cứu trích ly polysaccharide từ nấm Lim xanh góp phần nâng cao giá trị dược liệu, kinh tế từ loài nấm này.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu



Hình 1. Nấm Lim xanh (*Ganoderma lucidium*) nuôi trồng tại Khoa CNSH - CNTP, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

Đối tượng nghiên cứu là quả thể nấm Lim xanh được phân lập, nuôi cấy sau 3 tháng tại phòng nuôi cấy mô của Khoa CNSH - CNTP, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên.

2.2. Dung môi, hóa chất, thiết bị

Thiết bị: Máy đo quang phổ, tủ sấy, cân điện tử, máy soxlet, tủ cấy, tủ ẩm, bể ổn nhiệt, bể siêu âm Elmasonic S100/H, 9,5 lít - Đức. S 100 H - Đức.

Dung môi: C₂H₅OH tinh khiết - Việt Nam

2.3. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian xử lý bằng sóng siêu âm tới hiệu quả trích ly polysaccharide trong nấm Lim xanh.

Tiến hành khảo sát ở các mốc thời gian: 0, 2, 4 và 6 phút. Dựa trên cơ sở đó thí nghiệm được bố trí như sau:

Công thức	Thời gian xử lý bằng sóng siêu âm (phút), Cường độ sóng âm: 100 dB	Yếu tố cố định
CT1	0	<ul style="list-style-type: none"> - Khối lượng mẫu: 10g - Dung môi ethanol 70 % - Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi: 1/15 (g/ml) - Nhiệt độ: 70 °C - Thời gian: 60 phút
CT2	2	
CT3	4	
CT4	6	

Dịch trích ly đem lọc qua giấy lọc thô 2 lần và lọc qua giấy lọc tinh 1 lần. Mỗi công thức lặp lại 3 lần. Tiến hành xác định hàm lượng polysaccharide, từ đó lựa chọn được công thức tối ưu nhất.

Thí nghiệm 2: Nghiên cứu lựa chọn nồng độ dung môi trích ly polysaccharide từ nấm Lim xanh.

Việc lựa chọn nồng độ dung môi thích hợp sẽ nâng cao hiệu quả chiết xuất hợp chất. Tiến hành khảo sát ở nồng độ ethanol sau: 60, 70, 80, 90 và 96 % như sau:

Công thức	Yếu tố thay đổi Nồng độ dung môi ethanol (%)	Yếu tố cố định
CT1	60	<ul style="list-style-type: none"> - Khối lượng mẫu: 10g - Nhiệt độ: 70 °C - Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi: 1/15 (g/ml) - Thời gian: 60 phút - Thời gian xử lý sóng siêu âm được lựa chọn thí nghiệm 1
CT2	70	
CT3	80	
CT4	90	
CT5	96	

Dịch trích ly đem lọc qua giấy lọc thô 2 lần và lọc qua giấy lọc tinh 1 lần. Mỗi công thức lặp lại 3 lần. Tiến hành xác định hàm lượng polysaccharide, từ đó lựa chọn được công thức tối ưu nhất.

Thí nghiệm 3: Nghiên cứu lựa chọn tỉ lệ nguyên liệu nấm Lim xanh với dung môi trích ly

Tiến hành khảo sát tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml) theo 4 công thức: 1/10, 1/15, 1/20 và 1/25.

CT	Yếu tố thay đổi (Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi)	Yếu tố cố định
CT1	1/10	<ul style="list-style-type: none"> - Khối lượng mẫu: 10g - Nhiệt độ: 70 °C - Thời gian: 60 phút - Thời gian xử lý sóng siêu âm được lựa chọn ở thí nghiệm 1 - Nồng độ dung môi ethanol được lựa chọn ở thí nghiệm 2
CT2	1/15	
CT3	1/20	
CT4	1/25	

Dịch trích ly đem lọc qua giấy lọc thô 2 lần và lọc qua giấy lọc tinh 1 lần. Mỗi công thức lặp lại 3 lần. Tiến hành xác định hàm lượng polysaccharide, từ đó lựa chọn được công thức tối ưu nhất.

Thí nghiệm 4: Nghiên cứu lựa chọn thời gian trích ly polysaccharide từ nấm Lim xanh.

Thời gian trích ly có ảnh hưởng mạnh mẽ tới quá trình trích ly và cho phí năng lượng cũng như dung môi. Tiến hành khảo sát ở các mức thời gian sau: 30, 60, 90 và 120 phút ở cùng điều kiện sau:

Công thức	Yếu tố thay đổi Thời gian trích ly (phút)	Yếu tố cố định
CT1	30	<ul style="list-style-type: none"> - Khối lượng mẫu: 10g - Nhiệt độ: 70 °C - Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi được lựa chọn ở thí nghiệm 3 - Thời gian xử lý sóng siêu âm được lựa chọn ở thí nghiệm 1 - Nồng độ dung môi ethanol được lựa chọn ở thí nghiệm 2
CT2	60	
CT3	90	
CT4	120	

Dịch trích ly đem lọc qua giấy lọc thô 2 lần và lọc qua giấy lọc tinh 1 lần. Mỗi công thức lặp lại 3 lần. Tiến hành xác định hàm lượng polysaccharide, từ đó lựa chọn được công thức tối ưu nhất.

phản ứng được phát hiện trên máy quang phổ ở bước sóng 490 nm. Hàm lượng polysaccharide được định lượng dựa trên số đo OD thu được của mẫu thí nghiệm đối chiếu với đồ thị chuẩn glucose [4, 5, 8].

2.3. Phương pháp phân tích

Phương pháp định lượng polysaccharide tổng sau khi trích ly

Dịch chiết thu được sau thí nghiệm 1, 2, 3, 4 được xác định hàm lượng polysaccharide theo phương pháp phenol - sunlfuric acid (Dubois et al., 1956). Lấy 400 µl dịch mẫu chứa polysaccharide cho tác dụng với 200 µl dung dịch phenol 5%, nhỏ thêm từ từ 1ml H₂SO₄ đậm đặc và để 30 phút ở nhiệt độ phòng. Màu của

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian xử lý bằng sóng siêu âm tới hiệu quả trích ly polysaccharide trong nấm Lim xanh.

Sóng siêu âm có tác dụng bẻ gãy các liên kết hóa học, phá vỡ tế bào, hỗ trợ khả năng trích ly các chất có trong nguyên liệu. Polysaccharide là chất mang hoạt tính sinh học quan trọng của nấm Lim xanh vì vậy xử lý bằng sóng siêu âm sẽ nâng cao được hiệu quả trích ly các hợp chất trong nấm Lim xanh.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian xử lý sóng siêu âm đến hiệu quả trích ly polysaccharide trong nấm Lim xanh

Thời gian xử lý (phút)	0	2	4	6
Hàm lượng polysaccharides (mg/g)	2,90 ^c	4,00 ^{ab}	4,26 ^a	4,21 ^a

(Chú thích: a, b, c: sai khác giữa các công thức xử lý trong cùng một thời điểm có ý nghĩa ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$)

Qua bảng 1, cho thấy hàm lượng polysaccharide tăng khi thời gian xử lý bằng sóng siêu âm tăng. Hàm lượng polysaccharide cao nhất ở thời gian xử lý 4 phút là 4,26 mg/g, hàm lượng polysaccharide là 4,00 mg/g ở thời gian xử lý là 2 phút, hàm lượng polysaccharide rất thấp khi không được xử lý bằng sóng siêu âm 2,90 mg/g. Ta thấy hàm lượng polysaccharide ở thời gian 4 phút là cao nhất bởi vì cường độ sóng âm cao tác động vào nguyên liệu làm cho cấu trúc nguyên liệu bị phá vỡ, đồng thời nhiệt độ cũng tăng theo khi cường độ tăng tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình trích ly diễn ra nhanh hơn [10]. Ở thời gian trích ly 6 phút hàm lượng polysaccharide giảm nguyên nhân là do thời gian kéo dài, năng lượng lớn, nhiệt độ cao hoạt chất

polysaccharide bị phá hủy đồng thời các hợp chất không mong muốn cũng sẽ được trích ly cùng. Chính vì thế chúng tôi quyết định xử lý sóng siêu âm ở thời gian 4 phút trước khi trích ly cho những thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Nghiên cứu lựa chọn nồng độ dung môi trích ly polysaccharide từ nấm Lim xanh.

Ethanol là dung môi có khả năng hòa tan khá tốt. Sử dụng ethanol ở các nồng độ khác nhau sẽ có hiệu quả của quá trình trích ly khác nhau. Thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nồng độ dung môi ethanol đến hiệu quả trích ly polysaccharide được tiến hành trong phần thí nghiệm 2. Kết quả thu được như bảng 2:

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi ethanol đến hiệu quả trích ly polysaccharides trong nấm Lim xanh

Nồng độ ethanol (%)	60	70	80	90	96
Hàm lượng polysaccharides (mg/g)	4,18 ^b	4,25 ^b	4,81 ^a	4,82 ^a	4,82 ^a

(Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$).

Qua bảng 2 ta thấy: Các nồng độ dung môi khác nhau sẽ cho giá trị polysaccharide khác nhau. Hàm lượng polysaccharide tăng dần khi nồng độ tăng dần từ 4,18 mg/g ở nồng độ 60% lên 4,82 mg/g ở nồng độ 96%. Tuy nhiên hàm lượng polysaccharide từ nồng độ ethanol 80% lên nồng độ 96% tăng nhưng không có sự sai khác. Từ đó, chúng tôi lựa chọn nồng độ dung môi ethanol trích ly tối ưu nhất là ethanol 80% và sử dụng kết quả cho các nghiên cứu sau.

3.3. Nghiên cứu lựa chọn tỉ lệ nguyên liệu nấm Lim xanh/ dung môi trích ly.

Lượng dung môi nhiều hay ít đều ảnh hưởng đến quá trình trích ly các chất trong nguyên liệu. Nếu lượng dung môi quá ít thì chỉ đủ để thấm ướt nguyên liệu, vì vậy hiệu suất trích ly sẽ thấp. Ngược lại, nếu lượng dung môi sử dụng quá nhiều thì gây hao phí dung môi, nhiên liệu trong quá trình lọc cô và các chi phí khác. Vì vậy việc tìm ra tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là cần thiết cho quá trình trích ly, thu sản phẩm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi ethanol (g/ml) đến hiệu quả trích ly polysaccharide trong nấm Lim xanh

Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml)	1/10	1/15	1/20	1/25
Hàm lượng polysaccharides (mg/g)	3,30 ^c	4,81 ^b	4,98 ^a	4,99 ^a

(Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$).

Qua bảng 3, ta thấy hàm lượng polysaccharide tăng khi tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu tăng. Để đảm bảo hiệu suất trích ly cũng như để tối thiểu các chi phí sản xuất chúng tôi lựa chọn tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml) là 1/20 làm cơ sở cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.4. Nghiên cứu lựa chọn thời gian trích ly polysaccharides từ nấm *Lim xanh*.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu quả trích ly polysaccharides trong nấm *Lim xanh*

Thời gian (phút)	30	60	90	120
Hàm lượng polysaccharides (mg/g)	2,71 ^c	4,98 ^b	5,32 ^a	5,29 ^a

(Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$).

Qua bảng 4 chúng tôi nhận thấy: thời gian trích ly càng dài thì càng trích ly kiệt hoạt chất có trong nguyên liệu. Tuy nhiên, đến một thời gian trích ly nhất định thì lượng hoạt chất tăng lên rất chậm hoặc không tăng nữa. Khi trích ly ở thời gian 30 phút thì hàm lượng polysaccharide thu được thấp 2,71 mg/g. Hoạt chất tăng nhanh khi trích ly ở 60 phút, với hàm lượng polysaccharide là 4,98 mg/g, sau 90 phút trích ly, hàm lượng polysaccharide thu được cao nhất 5,32 mg/g nguyên liệu được trích ly gần hết. Ở thời gian lâu hơn 120 phút, hàm lượng polysaccharid thấp hơn do hàm lượng polysaccharid trích ly ít hơn polysaccharid phân

Thời gian trích ly có ảnh hưởng mạnh mẽ đến hiệu quả trích ly và chi phí năng lượng cũng như dung môi. Nếu thời gian trích ly ngắn, thì các hoạt chất giải phóng ra ít, nhưng khi tăng thời gian trích ly thì làm tổn hao năng lượng, quá trình sản xuất kéo dài. Do đó, chúng tôi tiến hành khảo sát các mức thời gian và kết quả được ghi ở bảng 4:

hủy. Vì vậy chúng tôi chọn thời gian trích ly ở 90 phút là thời gian trích ly trong nấm *Lim xanh*.

3.5. Nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ trích ly các hợp chất từ nấm *Lim xanh*.

Nhiệt độ là một trong yếu tố ảnh hưởng rất lớn tới quá trình trích ly. Khi nhiệt độ trích ly càng cao sẽ làm cho độ xốp của nguyên liệu tăng lên (do nguyên liệu trương nở), độ nhớt làm giảm và hoạt chất sẽ hòa tan dễ hơn vào dung môi. Tuy nhiên nhiệt độ là một yếu tố có giới hạn vì nhiệt độ quá cao có thể xảy ra các phản ứng không cần thiết như tăng độ tan của một số tạp chất, khó khăn cho quá trình lọc, thúc đẩy các biến đổi hóa học làm chất lượng dịch chiết biến đổi không có lợi và làm tăng chi phí sản xuất.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu quả trích ly polysaccharide trong nấm *Lim xanh*

Nhiệt độ (°C)	60	70	80	90
Hàm lượng polysaccharides (mg/g)	3,76 ^c	5,32 ^b	5,83 ^a	5,79 ^a

(Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$).

Theo bảng 5, khi nhiệt độ tăng thì giá trị polysaccharide tăng lên tỉ lệ với độ cao của nhiệt độ. Ở nhiệt độ 60 °C cho hàm lượng 3,76 mg/g, sau đó khi tăng lên 70 °C cho hàm lượng 5,32 mg/g. Ở nhiệt độ 80 °C và 90 °C thì hàm lượng lần lượt là 5,83 mg/g và 5,79 mg/g. Ở nhiệt độ 90 °C polysaccharide giảm có thể bắt đầu bị phân hủy. Vì vậy chúng tôi lựa chọn nhiệt độ 80 °C là nhiệt độ thích hợp cho trích ly các hoạt chất trong nấm *Lim xanh*.

4. Kết luận

Điều kiện trích ly thích hợp để thu được hàm lượng polysaccharide được xác định như sau: thời gian xử lý sóng siêu âm 4 phút, hàm lượng polysaccharide đạt 4,26 mg/g; nồng độ ethanol 80 %, hàm lượng polysaccharide đạt 4,81 mg/g, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 (g/ml), hàm lượng polysaccharide đạt 4,98 mg/g; thời gian trích ly là 90 phút, hàm lượng polysaccharide đạt 5,32 mg/g; nhiệt độ 80 °C, hàm lượng polysaccharide đạt 5,83 mg/g. Kết quả của chúng tôi đã tìm ra được điều kiện thích hợp để trích ly polysaccharide cho hàm lượng cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Le Xuan Tham. *Research on biological properties and mineral absorption ability in Ganoderma lucidum (Leyss.ex Fr). Karst*, Ph.D thesis of Biology, Hanoi University of Science. Vietnam National University, Hanoi, 1996.
2. Nguyen Duc Tien. *Research on technology to produce some supplements*. Ministry level project report, 2006.
3. Nguyen Thi Minh Tu. *Process to extract biological compounds from reishi mushroom (Ganoderma lucidum)*. Journal of Science and Technology, Vol 47 (2009). 45 - 53.
4. National Institute of Medicinal Materials, *Methods to investigate effects of medicine from herbs*. 2006.
5. Nguyen Lan Dung. *Technology for growing mushrooms*. Hanoi Agriculture, 2001.
6. Paterson RR, *Ganoderma - a therapeutic fungal biofactory*. Phytochemistry 67 (18): 1985 - 2001, 2006.
7. Kaibara et all, *Japanese Journal of Surgery*. 1976; 6: 54-59
8. Dubois et all, *Calorimetric method for determination of sugars and related substances*. Anal. Chem. 28: 350- 356.
9. Didem Sohretoglu and Shile Huang. *Ganoderma lucidum Polysaccharides as an anti-cancer agent*, Anticancer Agents Med Chem. 18(5): 2018. 667-674.
10. Tran Huu Danh, *Cleaning the super sound wave application*, Journal of Science Can Tho University Episode 52, Part A (2017): 46-53.

Research on the extraction of polysaccharides from mushroom ganoderma lucidum

Luu Hong Son, Ta Thi Luong, Vi Dai Lam, Nguyen Thi Tinh, Dinh Thi Kim Hoa, Trinh Thi Chung, Huynh Thi Thiep

Article info

Received:
11/5/2020

Accepted:
12/8/2020

Keywords:
Ganoderma lucidum,
process, *extraction*,
polysaccharides,
parameters

Abstract

Ganoderma lucidum belongs to wood mushroom which grows on logs of died *Erythrophleum fordii*. Reishi mushroom is useful for health and have been used for a long time. In the market, reishi mushroom products are sold as fruiting bodies or drying slides. These products are not handy for customers. In this research, *Ganoderma lucidum* was cultivated in laboratory of Faculty of Biotechnology and Food Technology, Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry. The factors to extract polysaccharides had been identified. The polysaccharides concentration in the extraction with ultrasonic waves was 4,26 mg/g in 4 minutes. The suitable concentration of ethanol for extraction was 80% with 4,81 mg/g polysaccharides. Ratio of material and solution was 1/20 (g/ml) with polysaccharides concentration as 4,98 mg/g; In extraction, polysaccharide concentration showed the result as 5,32 mg/g in 90 minutes and 5,83 mg/g at 80°C.
