

NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CAO CHIẾT GIÀU POLYSACCHARIDES TỪ NẤM LINH CHI BẰNG PHƯƠNG PHÁP ENZYME CÓ HỖ TRỢ SIÊU ÂM QUY MÔ PILOT

Hoàng Hương Ngọc¹, Bùi Thị Ánh Nguyệt², Bùi Thị Hương Quỳnh¹, Hoàng Ngọc Dũng²,
Trần Thị Ngọc Anh², Lê Thị Trang³, Lê Thị Vân Thanh³, Nguyễn Thị Hương Trà³,
Nguyễn Thị Thu Huyền³, Vũ Thu Diễm³, Nguyễn Đức Tiến³, Phạm Cao Thăng³, Bùi Thị Hương^{2,3,*}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Công ty TNHH Công nghệ Sinh học xanh Nhật Lan

³Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch

* Email: bthuong75@yahoo.com

TÓM TẮT

Kế thừa các kết quả nghiên cứu ở quy mô thí nghiệm, đã nghiên cứu và lựa chọn được các yếu tố công nghệ cho sản xuất cao chiết giàu polysaccharides từ nấm linh chi, quy mô 300 lít nguyên liệu/mẻ. Điều kiện thích hợp cho chiết xuất nấm linh chi là: Nấm được nghiền nhỏ với kích thước 1 - 2 cm x 0,5 - 1 cm, tỷ lệ nguyên liệu nấm/dung môi là 1 : 20, bổ sung 0,5% enzym celluclast, tiến hành siêu âm ở cường độ 600 W trong thời gian 35 phút ở nhiệt độ 50°C, tiếp tục ủ ở 50°C trong 115 phút. Thu hồi cao chiết giàu polysaccharides từ nấm linh chi bằng phương pháp cô chân không dịch chiết đến hàm lượng chất rắn hòa tan đạt 1,6°Brix, nhiệt độ cô đặc 60°C, áp suất 700 mm Hg, thời gian cô đặc khoảng 4,5 giờ. Tạo sản phẩm cao chiết dạng bột từ nấm linh chi bằng phương pháp sấy thăng hoa với tỷ lệ chất mang thích hợp là maltodextrin 3%, chiều dày vật liệu sấy là 1 cm. Nguyên liệu được cấp đông ở nhiệt độ -30°C trong 6 giờ, sấy thăng hoa với áp suất 30 - 60 Pa, nhiệt độ giàn ngưng -60°C, thời gian sấy 40 giờ. Sản phẩm cao chiết khô được nghiền bột mịn, có độ ẩm 4,5%, phù hợp với yêu cầu chất lượng của bột cao khô trong Dược điển Việt Nam V (< 5%); hàm lượng polysaccharides đạt 4,105 g/100 g (4,1%), chỉ tiêu an toàn thực phẩm đạt theo quy định trong Dược điển Việt Nam V và Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT ngày 19/12/2007 của Bộ Y tế. Sản phẩm có dạng bột khô, tơi, màu nâu xám, mùi thơm đặc trưng của nấm linh chi.

Từ khóa: Nấm linh chi, polysaccharides, siêu âm, enzym Celluclast[®] 1,5 L.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) là nấm dược liệu quý, có nhiều công dụng chữa bệnh và bồi bổ sức khỏe. Khoa học đã chứng minh quả thể, sợi nấm và bào tử linh chi giàu thành phần có hoạt tính sinh học, trong đó quan trọng nhất là polysaccharides (chủ yếu là β -1,3-glucan). Cả polysaccharides và hỗn hợp chiết thô từ linh chi được chứng minh có hoạt tính kháng tế bào ung thư và các dạng khối u ác tính và điều trị nhiều loại bệnh như: Tăng huyết áp, đái tháo đường, tim mạch, hen suyễn, viêm phế quản... [1, 2]. Hiện nay, các sản phẩm linh chi thương mại của Việt Nam chủ yếu vẫn là dạng nấm thô. Một hướng mới

là sản xuất cao chiết giàu hoạt chất cho đóng viên nang đang thu hút sự quan tâm của nhiều nhà khoa học.

Nhiều công trình nghiên cứu về chiết xuất và thu hồi polysaccharides từ nấm linh chi đã được công bố với nhiều phương pháp như: Sử dụng nước nóng, hóa chất (axit, kiềm), siêu âm, vi sóng, enzym..., trong đó phương pháp chiết xuất polysaccharides có hỗ trợ của siêu âm và enzym đã thể hiện tính ưu việt hơn so với các phương pháp khác là vừa nâng cao hiệu quả chiết xuất và rút ngắn thời gian chiết xuất [3, 4]. Tuy nhiên, điểm chung của các nghiên cứu này là đều chỉ dừng lại ở quy mô phòng thí nghiệm. Do đó, việc

nghiên cứu công nghệ sử dụng enzym sinh học kết hợp với sự hỗ trợ của sóng siêu âm cho chiết xuất nấm linh chi ở quy mô pilot sẽ là hướng đi tiềm năng, an toàn và hiệu quả.

Ở quy mô phòng thí nghiệm, đã nghiên cứu và lựa chọn được loại enzym và các thông số cho hiệu quả chiết xuất polysaccharides từ nấm linh chi đạt cao nhất bao gồm: Enzyme Celluclast® 1,5 L là 0,5%; tỉ lệ nguyên liệu : dung môi là 1 : 20; cường độ siêu âm 480 W trong 35 phút, thời gian chiết là 150 phút. Dịch chiết cô đặc được bổ sung maltodextrin với tỷ lệ 3% (w/w) và được sấy thăng hoa, cho cao khô đạt hàm lượng polysaccharides cao nhất.

Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sử dụng enzym sinh học với sự hỗ trợ của siêu âm, cho sản xuất cao chiết giàu hoạt chất polysaccharides từ nấm linh chi ở quy mô 300 lít nguyên liệu/mẻ và đánh giá chất lượng cao chiết sau khi sản xuất. Hướng nghiên cứu này sẽ góp phần giải quyết một số vấn đề như: (1) Ứng dụng công nghệ sinh học tiên tiến, an toàn, hiệu quả cho sản xuất, chế biến tinh, chế biến sâu các sản phẩm có giá trị gia tăng cao từ nấm dược liệu thô của Việt Nam, ở quy mô sản xuất lớn; (2) Gia tăng giá trị và ứng dụng của nấm linh chi cho làm thực phẩm chức năng, hỗ trợ, phòng chống một số bệnh y hiện nay, giúp bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nấm linh chi được nuôi trồng tại Việt Nam. Nấm có màu nâu sáng đặc trưng, độ ẩm $\leq 10,7\%$, tro 2,1%; polysaccharides 0,95% và đạt các chỉ tiêu an toàn thực phẩm theo quy định [5, 6].

2.2. Hoá chất

- Chế phẩm enzym Celluclast® 1,5 L (Novozymes, Đan Mạch) được sản xuất từ nấm *Trichoderma reesi*. Chế phẩm có hoạt tính cellulases, 700 EGU/g (EGU - Beta-glucanase Units). Enzym hoạt động ở pH 4,5 - 6, nhiệt độ 50 – 60°C.

- Các khoáng chất khác đạt mức độ phân tích.

2.3. Thiết bị

Thiết bị chính cho nghiên cứu quy mô pilot:

Hệ thống thiết bị siêu âm chiết xuất UTS-CB, dung tích 135 lít, công suất 1.800 W, 3 bồn thiết bị, tổng thể tích cho chiết xuất là 405 lít.

Thiết bị cô đặc chân không: Nồi cô đặc có thể tích là 1.500 lít, cho cô đặc tối đa 500 - 600 lít dịch/1 lần cô đặc, có cánh khuấy, áp suất cô đặc tối đa là 760 mm Hg.

Máy sấy thăng hoa, quy mô sấy 30 - 300 kg nguyên liệu/mẻ.

Các thiết bị phục vụ nuôi cấy và phân tích mẫu trong phòng thí nghiệm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Nghiên cứu lựa chọn cường độ siêu âm và thời gian cho chiết xuất polysaccharides từ nấm linh chi quy mô 300 lít nguyên liệu/mẻ

Nấm linh chi được nghiền nhỏ thành các mảnh kích thước 1 – 2 x 0,5 - 1 cm. Cân 15 kg nấm cho vào thiết bị chiết, bổ sung 300 lít dung dịch đệm phốt phát citrat pH 6 (tỷ lệ nguyên liệu : đệm là 1 : 20). Enzym celluclast được bổ sung vào hỗn hợp nguyên liệu với nồng độ 0,5%, trộn đều, siêu âm tại cường độ 480, 600, 720 W trong thời gian 35 phút ở nhiệt độ 50°C, rồi tiếp tục ủ ở 50°C trong 100, 115, 130, 145 phút (tổng thời gian chiết tương ứng là 135, 150, 165, 180 phút). Hỗn dịch được bắt hoạt enzym ở nhiệt độ 80°C trong 2 phút. Dịch chiết được lọc qua túi vải với đường kính lỗ 1 mm, thu dịch lọc. Lựa chọn cường độ siêu âm và thời gian chiết dựa vào kết quả phân tích hàm lượng polysaccharides. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, lấy kết quả trung bình của 3 lần thí nghiệm.

2.4.2. Nghiên cứu sự thay đổi hàm lượng chất khô hòa tan trong quá trình cô đặc dịch chiết và tạo sản phẩm cao chiết dạng bột

Dịch chiết nấm linh chi được cô đặc chân không ở nhiệt độ 60°C, áp suất 700 mmHg. Theo dõi sự thay đổi hàm lượng chất khô hòa tan và trạng thái sản phẩm trong quá trình cô đặc.

2.4.2.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ chất mang bổ sung đến chất lượng sản phẩm

Maltodextrin được bổ sung vào dịch chiết cô đặc nấm linh chi với các tỷ lệ 1, 2, 3, 4%. Trộn đều. Mẫu được đông lạnh ở nhiệt độ -30°C trong 6 giờ và sấy trên máy sấy thăng hoa ở áp suất 30 - 60 Pa, nhiệt độ giàn ngưng là -60°C trong 40 giờ. Lựa

chọn tỷ lệ chất mang bổ sung qua hàm lượng polysaccharides, độ ẩm và trạng thái sản phẩm.

2.4.2.2. Ảnh hưởng của chiều dày vật liệu sấy đến thời gian sấy và độ ẩm sản phẩm

Dịch chiết cô đặc được bổ sung maltodextrin với tỷ lệ thích hợp (là kết quả của thí nghiệm mục 2.4.2.1). Mẫu được trộn đều và rót vào các khay vô trùng có kích thước 50 x 30 x 7 cm, chiều dày vật liệu sấy 0,5; 1; 1,5; 2 cm (tương ứng với thể tích 0,75; 1,5; 2,25; 3 lít dịch/khay). Mẫu được đông lạnh ở nhiệt độ -30°C trong 6 giờ và sấy trên máy sấy thăng hoa ở áp suất 30 - 60 Pa, nhiệt độ giàn ngưng là -60°C. Mẫu được lấy sau các khoảng thời gian sấy 32 - 44 giờ (bước nhảy 4 giờ). Lựa chọn chiều dày vật liệu sấy qua độ ẩm sản phẩm.

2.5. Phương pháp phân tích

2.5.1. Xác định hàm lượng polysaccharides

Tiến hành theo phương pháp của Pawar và D'Mello (2011) [7], lượng polysaccharides được xác định gián tiếp bằng hàm lượng glucose có trong mẫu. Glucose được xác định theo phương pháp phenol - axit sulphuric. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 488 nm dựa vào cường độ màu vàng cam tạo ra khi glucose phản ứng với phenol và axit sulphuric. Hàm lượng glucose trong mẫu được tính toán dựa trên đường chuẩn glucose.

Từ dung dịch glucose 100 µg/ml, tiến hành pha ra các dung dịch đường glucose có nồng độ 60; 70; 80; 90; 100 µg/ml, mỗi nồng độ 5 ml. Hút 1 ml glucose ở các nồng độ pha loãng trên cho vào bình tam giác 20 ml, bổ sung 1 ml dung dịch phenol 5%. Ngay lập tức cho 5 ml axit sulphuric đặc vào ống nghiệm trên. Để ổn định trong 10 phút. Mẫu blank thay đường glucose bằng nước cất.

Cao thô được làm sạch theo phương pháp của Staub (1965) [8]. Cao thô được bổ sung dung dịch Savage (n-butanol/chloroform tỷ lệ 1 : 4), hỗn hợp được lắc nhẹ, sau đó để tĩnh cho tách pha. Dịch nổi được thu nhận và kết tủa bằng cồn 96% với tỉ lệ 1 : 4 ở nhiệt độ 4°C trong 24 giờ và ly tâm 12.000 vòng/phút trong 20 phút. Phần tủa được thu và sấy ở nhiệt độ 60°C đến khối lượng không đổi. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần để loại protein.

Hàm lượng polysaccharides được tính theo công thức:

$$Y = \frac{C \times V \times n \times 10^{-3} \times 100}{m}$$

Trong đó: Y là hàm lượng polysaccharides (mg/100 g); C là nồng độ polysaccharides thu được từ phương trình hồi quy đã hiệu chuẩn; V là thể tích của dung dịch chứa polysaccharides (ml); N là hệ số pha loãng; 10⁻³ là hệ số quy đổi (µg thành mg); 100 là hệ số quy đổi (g mẫu → 100 g); m là khối lượng mẫu (g). Hàm lượng polysaccharides sau đó được quy đổi về g/100 g.

2.5.2. Xác định hàm lượng chất khô hoà tan

Theo TCVN 4414:1987 [9].

2.5.3. Xác định độ ẩm

Theo phương pháp sấy đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ xác định.

2.5.4. Phân tích các chỉ tiêu an toàn thực phẩm

- Tổng số vi sinh vật hiếu khí, tổng số nấm men và nấm mốc, vi khuẩn gram âm dung nạp mật, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*. Tiến hành theo Dược điển Việt Nam V, phụ lục 13 [5].

-Xác định *Coliform* theo TCVN 4882:2007 [10].

- Xác định *Bacillus cereus* theo AOAC 980.31-1981 [11].

- Xác định chì và cadimi theo AOAC 999.11 [12].

- Xác định thủy ngân theo AOAC 971.21-1976 [13].

- Xác định aflatoxin tổng số theo AOAC 2008.02-2008 [14].

2.5.5. Phương pháp xử lý số liệu

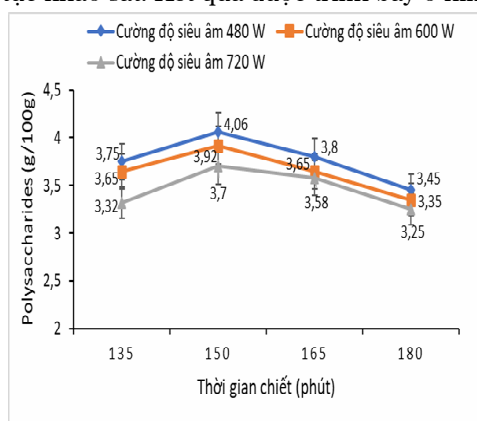
Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2010 và phần mềm SPSS 20.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu lựa chọn cường độ siêu âm và thời gian chiết cho chiết xuất polysaccharides từ nấm linh chi quy mô 300 lít nguyên liệu/mẻ

Ở quy mô thí nghiệm, đã lựa chọn chiết xuất polysaccharides từ nấm linh chi bằng phương pháp enzym có hỗ trợ siêu âm với các thông số như: Tỷ lệ enzym celluclast bổ sung là 0,5% trong đệm phosphate citrate pH 6, tỉ lệ linh chi: dung môi là 1 : 20; nhiệt độ chiết 50°C, siêu âm 480 W trong 35 phút, tiếp tục ủ ở 50°C trong 115 phút,

tổng thời gian chiết 150 phút. Khi sản xuất ở quy mô 300 lít nguyên liệu/mẻ, với thể tích dịch chiết lớn thì bên cạnh khảo sát về cường độ siêu âm thì thời gian xử lý enzyme cũng là các yếu tố cần phải tiếp tục khảo sát. Kết quả được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của cường độ siêu âm đến hiệu quả hỗ trợ enzyme cho chiết xuất polysaccharides từ nấm linh chi, quy mô 300 lít nguyên liệu/mẻ

Tương tự như kết quả chiết xuất ở quy mô phòng thí nghiệm, hiệu quả chiết xuất của 3 mẻ với 3 cường độ siêu âm khác nhau là 480, 600 và 720 W đều cho khả năng chiết xuất cao nhất tại thời điểm 150 phút và hàm lượng polysaccharides lần lượt đạt là 3,7 g/100 g, 4,06 g/100 g, 3,92 g/100 g. Kết quả ở hình 1 cho thấy, khi tăng cường độ siêu âm từ 480 - 600 W đã làm tăng hiệu quả chiết xuất polysaccharides bằng enzyme. Tuy nhiên, khi tăng cường độ siêu âm lên 720 W thì hiệu quả chiết xuất polysaccharides lại giảm. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Do và cs (2021) [15], khi nghiên cứu ảnh hưởng của cường độ siêu âm đến hiệu quả chiết polysaccharides từ nấm linh chi bằng enzyme. Đã nghiên cứu cường độ siêu âm từ 120 – 600 W (bước nhảy 80 W) và đã lựa chọn cường độ siêu âm 480 W. Trong nghiên cứu khác của Hoa và cs (2018) [3], cũng trên đối tượng nấm linh chi, khi cường độ siêu âm tăng từ 120 - 240 W, hàm lượng polysaccharides tăng và đạt cao nhất ở 240 W là 3,7%, khi cường độ siêu âm trên 240 W thì hàm lượng polysaccharides giảm. Điều này có thể giải thích, khi tăng cường độ siêu âm thì tăng sự tạo bọt khí, từ đó tạo nên lực cắt xén cao làm tăng tốc độ truyền khối của chất chiết và sự vỡ bọt cũng tạo nên sự khuấy trộn mạnh, giúp cho việc khuếch

tán polysaccharides vào dung môi và cải thiện hoạt động của enzyme [15, 16]. Tuy nhiên, nếu sóng siêu âm với năng lượng quá mạnh (ở cường độ quá cao), trong một khối dung tích nhất định thì bên cạnh sự phá vỡ tế bào còn làm thay đổi cấu trúc và phá hủy một phần các hợp chất có hoạt tính sinh học (kể cả enzyme, polysaccharides...), do đó hàm lượng hoạt chất sau khi tách chiết cũng sẽ bị giảm.

Khác với quy mô phòng thí nghiệm với cường độ siêu âm 480 W là thích hợp nhất, thì ở quy mô chiết xuất 300 lít/mẻ, cường độ siêu âm 600 W là thích hợp nhất. Điều này có thể giải thích, trong chiết xuất kết hợp giữa enzyme và siêu âm, ở quy mô dung tích lớn, sự khuếch tán trong dung dịch sẽ chậm và khó hơn so với ở quy mô dung tích nhỏ. Vì thế cường độ siêu âm lớn hơn sẽ đóng vai trò quan trọng trong hỗ trợ sự khuếch tán trong khối dung dịch lớn, làm tăng hiệu quả chiết của enzyme, do đó sẽ đảm bảo cho quá trình chiết xuất đạt hiệu quả tốt hơn.

Kết quả trên cũng chỉ ra sự ảnh hưởng của thời gian chiết xuất bằng enzyme. Hàm lượng polysaccharides tăng lên khi thời gian chiết tăng 135 - 150 phút và đạt cao nhất tại thời điểm 150 phút. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng thời gian chiết xuất lên 165 - 180 phút, hiệu quả chiết xuất giảm dần và giảm mạnh ở thời điểm chiết xuất 180 phút. Kết quả khảo sát ở quy mô lớn một lần nữa khẳng định lại kết quả chiết xuất tại phòng thí nghiệm, tổng thời gian chiết xuất là 150 phút. Với thời gian chiết ngắn dưới 150 phút là chưa đủ để chiết xuất polysaccharides trong tế bào nên cho hàm lượng hoạt chất chưa cao. Nhưng khi thời gian chiết xuất kéo dài trên 150 phút sẽ làm thúc đẩy quá trình oxy hóa và phân hủy polysaccharides trong dịch chiết xuất, dẫn đến làm giảm hàm lượng polysaccharides [17, 18].

Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Hoa và cs (2018) [3], Do và cs (2021) [15], theo đó đã lựa chọn cường độ siêu âm 600 W trong 35 phút, thời gian chiết xuất là 150 phút cho các nghiên cứu tiếp theo. Dịch chiết xuất nấm linh chi sau đó được tiến hành cô đặc và sấy khô cho thu hồi và sản xuất bột cao chiết giàu hoạt chất sinh học polysaccharides.

3.2. Khảo sát sự thay đổi hàm lượng chất khô hòa tan trong quá trình cô đặc dịch chiết từ nấm linh chi

Ở quy mô phòng thí nghiệm, đã lựa chọn thu hồi cao chiết giàu hoạt chất sinh học polysaccharides từ nấm linh chi bằng phương pháp cô đặc chân không đến hàm lượng chất khô

hòa tan tổng số đạt khoảng 1,6° Brix, nhiệt độ cô đặc 60°C. Khi nghiền cứu sản xuất ở quy mô 300 lít nguyên liệu/mẻ, dịch chiết từ nấm linh chi tiếp tục được cô đặc chân không ở nhiệt độ 60°C, áp suất 700 mm Hg. Tiến hành theo dõi sự thay đổi hàm lượng chất khô hòa tan tổng số và trạng thái sản phẩm, kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Sự thay đổi hàm lượng chất khô hòa tan trong quá trình cô đặc chân không dịch chiết từ nấm linh chi

Thời gian cô đặc (giờ)	Hàm lượng chất khô hòa tan của dịch cô đặc (%)	Trạng thái sản phẩm
0	0,2	Dịch loãng, màu nâu đen, thơm
1	0,5	Dịch màu nâu đen, thơm
2	0,9	Dịch màu nâu đen, thơm
3	1,2	Dịch bắt đầu đậm đặc, màu nâu đen, thơm
4	1,5	Dịch đặc, sánh, màu nâu đen, thơm
4,5	1,6	Dịch đặc, sánh, màu nâu đen, mùi thơm đặc trưng của linh chi
5	1,9	Dịch đặc, sánh, màu nâu sẫm, bắt đầu có mùi khét
5,5	2,2	Dịch đặc, sánh, màu nâu sẫm, mùi hơi khét

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, hàm lượng chất khô hòa tan trong dịch chiết nấm linh chi thấp 0,2° Brix do thành phần chủ yếu của nấm linh chi là cellulose. Hàm lượng chất khô hòa tan tăng dần theo thời gian cô đặc. Điều này được lý giải, là do khi cô đặc, nước trong sản phẩm bốc hơi làm tăng nồng độ chất khô hòa tan và hàm lượng hoạt chất (tăng từ 0,2 - 2,2° Brix). Kết quả cũng cho thấy, về trạng thái sản phẩm, ở thời điểm cô đặc 4,5 giờ cho dịch cô đặc có hàm lượng chất khô hòa tan đạt 1,6° Brix, dịch cô đặc, sánh, màu nâu đen, mùi thơm đặc trưng của linh chi. Tuy nhiên, khi tăng thời gian cô đặc lên 5 - 5,5 giờ thì dịch cô ở dạng đặc, sánh, màu nâu sẫm, bắt đầu có mùi khét, hàm lượng chất khô hòa tan đạt 1,9 và 2,2° Brix, theo thứ tự. Do vậy, đã lựa chọn thời điểm cô đặc chân

không là 4,5 giờ, cho hàm lượng chất khô hòa tan đạt khoảng 1,6° Brix.

3.3. Nghiên cứu tạo sản phẩm cao chiết dạng bột

3.3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ chất mang bổ sung đến chất lượng sản phẩm

Ở quy mô phòng thí nghiệm, kết quả cho thấy, khi sử dụng chất mang maltodextrin với tỷ lệ 3% cho hiệu quả sấy dịch cô đặc nấm linh chi là tốt nhất. Tuy nhiên, ở quy mô sản xuất 300 lít nguyên liệu/mẻ, nhằm tìm được tỷ lệ chất mang thích hợp, đã tiến hành khảo sát tỷ lệ bổ sung chất mang vào dịch cô đặc khác nhau 0, 1, 2, 3, 4%. Tiến hành cho sấy thăng hoa với bề dày vật liệu sấy là khoảng 1 cm, sấy trong 40 giờ. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ maltodextrin đến chất lượng của sản phẩm cao khô linh chi

Chất mang (%)	Hàm lượng polysaccharides (g/100 g)	Độ ẩm cao sau sấy (%)	Trạng thái sản phẩm
0	3,776 ± 93 ^c	4,3 ± 0,12	Cao màu nâu xám, quánh, vón cục, hơi khó nghiền nhỏ, ít mùi thơm
1	3,837 ± 82 ^b	4,4 ± 0,17	Cao màu nâu, xốp, ít vón cục, thơm
2	3,902 ± 80 ^b	4,5 ± 0,15	Cao màu nâu xám, xốp, dễ nghiền nhỏ, thơm
3	4,105 ± 87 ^a	4,5 ± 0,11	Cao màu nâu xám, xốp, dễ nghiền bột mịn, thơm
4	3,950 ± 88 ^a	4,6 ± 0,19	Cao màu nâu xám, xốp, dễ nghiền bột mịn, thơm

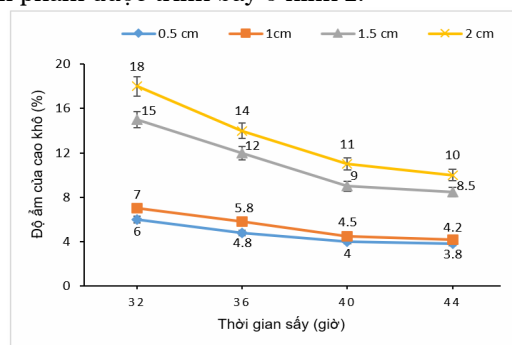
Ghi chú: Các chữ cái a, b, c... trong cùng cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, khi tăng tỷ lệ chất mang maltodextrin từ 0 - 3%, tỷ lệ hàm lượng hoạt chất polysaccharides tăng từ 3,776 g/100 g lên 4,105 g/100 g. Khi cho tỷ lệ chất mang lên 4% thì tỷ lệ polysaccharide trong cao chiết bắt đầu giảm nhẹ về còn 3,950 g/100 g, kết quả này có thể hiểu là do tỷ lệ chất độn tăng lên, làm giảm tỷ lệ hàm lượng hoạt chất trong cao chiết. Như vậy, ở tỷ lệ chất mang 1 - 3% đã góp phần giúp bảo vệ, tránh bị phân huỷ cấu trúc của một số thành phần polysaccharides trong tổng số các loại polysaccharides đã có trong cao chiết, trong suốt quá trình sấy. Do đó, hàm lượng hoạt chất đã tăng dần khi tăng tỷ lệ chất mang từ 0 - 3% và đạt cao nhất ở tỷ lệ chất mang 3%. Bên cạnh đó, khi tăng dần tỷ lệ chất mang còn giúp cho quá trình sấy và thu hồi cao chiết được dễ dàng hơn, tránh cho cao sấy bị kết dính, vón cục và hao hụt, làm giảm hiệu suất thu hồi trong quá trình sấy và thu cao khô. Ngoài ra, ở cao chiết có bổ sung chất mang sẽ cho cao khô xốp, dễ nghiền và giữ mùi thơm đặc trưng của linh chi tốt hơn so với cao chiết không bổ sung chất mang. Điều này cho thấy vai trò của maltodextrin trong quá trình sấy bột cao khô, đó là cải thiện tính chất cơ lý của sản phẩm, khắc phục hiện tượng kết dính, đóng bánh, khó nghiền, giúp cho thu hồi sản phẩm bột cao khô xốp, tơi, mịn. Do vậy, để sấy cao chiết linh chi cho hàm lượng polysaccharides đạt cao nhất và thuận tiện cho quá trình thu hồi cao sau sấy, đã chọn mức bổ sung 3% chất mang maltodextrin cho sấy thăng hoa dịch cô đặc.

3.3.2. Ảnh hưởng của chiều dày vật liệu sấy đến độ ẩm của sản phẩm

Dịch cô đặc được bổ sung maltodextrin với tỷ lệ là 3% (w/v). Mẫu được rót vào các khay có kích thước 50 x 30 x 7 cm, chiều dày vật liệu sấy 0,5, 1,

1,5, 2 cm (tương ứng với thể tích 0,75; 1,5; 2,25; 3 lít dịch/khay). Tiến hành sấy trên máy sấy thăng hoa ở áp suất 30 - 60 Pa, nhiệt độ giàn ngưng là - 60°C, thời gian 32 - 44 giờ. Kết quả phân tích độ ẩm sản phẩm được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Ảnh hưởng của chiều dày vật liệu sấy đến độ ẩm của sản phẩm

Hình 2 cho thấy, chiều dày vật liệu sấy ảnh hưởng đến độ ẩm của sản phẩm. Với chiều dày vật liệu sấy 0,5 và 1 cm, độ ẩm sản phẩm đạt dưới 5% sau 36 và 40 giờ sấy. Sản phẩm cao tơi, xốp, thơm, giòn, dễ nghiền, bột mịn. Khi tăng chiều dày vật liệu sấy lên 1,5 cm đã thấy rõ sự khác biệt về trạng thái độ ẩm của sản phẩm. Với chiều dày vật liệu sấy 1,5 và 2 cm, độ ẩm sản phẩm đạt 8,5 và 10%, theo thứ tự, sau 44 giờ sấy, kết quả này chưa đảm bảo chất lượng hàm ẩm của cao khô theo quy định. Kết quả thí nghiệm trên cho thấy, với lựa chọn chiều dày vật liệu sấy 1 cm, thời gian sấy là 40 giờ, cho cao khô đạt độ ẩm 4,5% sẽ cho hiệu quả kinh tế, tiết kiệm chi phí ở điều kiện sấy với vật liệu sấy 0,5 cm và thời gian sấy là 36 giờ cho cao sấy đạt hàm ẩm là 4,8%. Do vậy, đã chọn điều kiện sấy với chiều dày vật liệu sấy là 1 cm, thời gian sấy là 40 giờ.

3.4. Đánh giá chất lượng sản phẩm cao chiết dạng bột từ nấm linh chi

Bảng 3. Kết quả phân tích chỉ tiêu chất lượng và an toàn thực phẩm của sản phẩm cao chiết giàu polysaccharides từ nấm linh chi

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả	Quy định (*)
1	Hàm lượng polysaccharides	g/100 g	4,105	
2	Độ ẩm	%	4,5	
3	Kim loại nặng			
	Chì	mg/kg	KPH	≤ 10
	Thủy ngân	mg/kg	KPH	≤ 0,5
	Cadimi	mg/kg	KPH	≤ 0,3
4	Vi sinh vật			
	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	CFU/g	1,8 x 10 ²	≤ 10 ⁴

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

	Tổng số nấm men, nấm mốc	CFU/g	KPH	$\leq 10^2$
	Vi khuẩn gram âm dung nạp mật	CFU/g	KPH	$\leq 10^2$
	<i>Coliforms</i>	CFU/g	KPH	≤ 10
	<i>E. coli</i>	CFU/g	KPH	Âm tính
	<i>S. aureus</i>	CFU/g	KPH	≤ 10
	<i>C. perfringens</i>	CFU/g	KPH	≤ 10
	<i>B. cereus</i>	CFU/g	KPH	≤ 10
5	Độc tố nấm			
	Aflatoxin	$\mu\text{g/kg}$	KPH	≤ 4

*Ghi chú: KPH: Không phát hiện (dưới ngưỡng phát hiện của phương pháp). *Quy định trong Dược điển Việt Nam V phụ lục 13.6.6 vi sinh vật trong thuốc uống có nguồn gốc tự nhiên (động, thực vật, khoáng chất); cao thuốc, cồn thuốc dùng để sản xuất thuốc uống từ dược liệu và Quy định giới hạn tối đa nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm theo Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT ngày 19/12/2007 của Bộ trưởng Bộ Y tế.*

Sản phẩm cao chiết dạng bột từ nấm linh chi sản xuất quy mô 300 lít nguyên liệu/mẻ đã được phân tích: (1) Chỉ tiêu chất lượng chủ yếu (hàm lượng polysaccharides, độ ẩm); (2) Các chỉ tiêu an toàn thực phẩm (theo Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT ngày 19/12/2007 của Bộ trưởng Bộ Y tế về quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm và Dược điển Việt Nam V [6, 5]); (3) Đánh giá cảm quan (màu sắc, trạng thái, mùi vị). Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, sản phẩm cao chiết khô từ nấm linh chi có độ ẩm trung bình đạt 4,5%,

phù hợp với yêu cầu chất lượng của bột cao khô trong Dược điển Việt nam V ($< 5\%$) [5]. Hàm lượng polysaccharides đạt 4,105 g/100 g đáp ứng yêu cầu đề tài nghiên cứu. Chế phẩm dạng bột khô, tơi, màu nâu xám, mùi thơm đặc trưng của nấm linh chi. Các chỉ tiêu an toàn thực phẩm đạt theo Quy định trong Dược điển Việt Nam V (phụ lục 13.6.6 vi sinh vật) và Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm theo Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT ngày 19/12/2007 Bộ trưởng Bộ Y tế [5, 6].

		
Nguyên liệu nấm linh chi trước khi được nghiền cho chiết xuất	Hệ thống thiết bị cho chiết xuất và cô đặc	Cô đặc dịch chiết xuất của nấm linh chi
		
Dịch chiết xuất nấm linh chi sau khi được cô đặc	Hệ thống thiết bị cho sấy thăng hoa dịch cô đặc nấm linh chi	Sản phẩm bột cao chiết giàu polysaccharides từ nấm linh chi

Hình 3. Sản xuất cao chiết giàu polysaccharides từ nấm linh chi quy mô 300 lít nguyên liệu/mẻ

4. KẾT LUẬN

Nấm linh chi được nghiền nhỏ với kích thước 1 – 2 x 0,5 – 1 cm, trộn tỷ lệ nguyên liệu nấm/dung môi của dung dịch đệm phosphat citrat pH 6 là 1 : 20.

Điều kiện thích hợp cho chiết xuất nấm linh chi: Bổ sung 0,5% enzym celluclast, tiến hành siêu âm ở cường độ 600 W trong thời gian 35 phút ở nhiệt độ 50°C, tiếp tục ủ ở 50°C trong 115 phút, tổng thời gian chiết xuất với enzym là 150 phút (đã bao gồm cả thời gian siêu âm). Kết quả cho hàm lượng polysaccharides đạt cao nhất là 4,06 g/100 g.

Thu hồi cao chiết giàu polysaccharides từ nấm linh chi bằng phương pháp cô chân không dịch chiết đến hàm lượng chất khô hòa tan đạt 1,6° Brix, nhiệt độ cô đặc 60°C, áp suất 70 mm Hg, thời gian cô đặc khoảng 4,5 giờ.

Tạo sản phẩm cao chiết dạng bột từ nấm linh chi bằng phương pháp sấy thăng hoa với tỷ lệ chất mang thích hợp là maltodextrin 3%, chiều dày vật liệu sấy là 1 cm. Sấy thăng hoa ở điều kiện: Cấp đông nguyên liệu ở nhiệt độ -30°C trong thời gian 6 giờ, sấy ở áp suất 30 - 60 Pa, nhiệt độ giàn ngưng 60°C, thời gian sấy 40 giờ.

Sản phẩm cao chiết khô có độ ẩm đạt 4,5%, phù hợp với yêu cầu chất lượng của bột cao khô trong Dược điển Việt nam V (< 5%); hàm lượng polysaccharides đạt 4,105 g/100 g (4,1%); chỉ tiêu an toàn thực phẩm đạt theo quy định trong Dược điển Việt Nam V và theo Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT ngày 19/12/2007 của Bộ trưởng Bộ Y tế. Sản phẩm có dạng bột khô, tơi, màu nâu xám, mùi thơm đặc trưng của nấm linh chi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Paterson, R. R. M (2006). *Ganoderma* - A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.07.004.
2. Li-Feng, F., Hong-Bing, L., Quan-Wei, Z., Zhi-Peng, L. Tin-Long, W., Hau-Yee, F., Ji-Xia, Z., Su-Ping, B, Ai-Ping, L. and Quan-Bin, H (2018). Comprehensive comparison of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and *G. sinense*: Chemical, antitumor, immunomodulating and gut-microbiota modulatory properties". *Scientific Reports*, 8(1), 1 - 12, doi: 10.1038/s41598-018-22885-7.
3. Hoa, T. Q, Mai, T. T.P., Nam, H. M., Hieu, N, H. (2018). Extraction of polysaccharides from lingzhi by ultrasonic-assisted enzymatic method. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 56(4A), 171 - 181.
4. Nguyen Thi Kim Ngan, Tran Do Dat, Dang Hoang Lam, Phan Le Thao My, Ngo Thi Thuy Linh, Vuong Hoai Thanh, Nguyen Duc Viet, Ngo Hong Thao, Huynh Thi Thanh Tu, Nguyen Huynh Bach Son Long, Hoang Minh Nam, Mai Thanh Phong, Nguyen Huu Hieu (2020). Application of ultrasonic-assisted enzymatic extraction for polysaccharides from Vietnamese red *Ganoderma lucidum* and examination of antioxidant activity of the extract. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 58(6A), 110 - 122.
5. Dược điển Việt Nam (2017). *Bản lần thứ 5*. Nxb Y học.
6. Bộ Y tế (2007). Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT ngày 19/12/2007 của Bộ trưởng Bộ Y tế về Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm.
7. Pawar, H. A. & D'Mello, P. M (2011). Spectrophotometric estimation of total polysaccharides in *Cassia tora* gum. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(3), 93.
8. Staub, A. M (1965). Removal of protein-sevag method. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5, 5 - 6.
9. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4414:1987. Đồ hộp - Xác định hàm lượng chất khô hòa tan bằng khúc xạ kế.
10. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4882:2007 (ISO 4831:2006). Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp phát hiện và định lượng *Coliform* - Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất.
11. AOAC 980.31-1981. *Bacillus cereus* in foods. Enumeration and conf.
12. AOAC 999.11. Determination of lead, cadmium, copper, iron and zinc in foods. Atomic absorption spectrophotometry after dry ashing.
13. AOAC 971.21-1976. Mercury in food. Flameless atomic absorption.
14. AOAC 2008.02-2008. Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 and ochratoxin A.

15. Do, D. T., Lam, D. H., Nguyen, T., Phuong Mai, T. T., Phan, L. T. M., Vuong, H. T., Nguyen, H. H (2021). Utilization of response surface methodology in optimization of polysaccharides extraction from Vietnamese red *Ganoderma lucidum* by ultrasound-assisted enzymatic method and examination of bioactivities of the extract. *The Scientific World Journal*, <https://doi.org/10.1155/2021/7594092>.

16. Vuong Hoai, T., Nguyen Cao, P., Phan Le Thao, M., Do, T. D., Hoang Minh, N., Ha, H. K. P., Nguyen Huu, H (2020). Ultrasound-Assisted Enzymatic Extraction of Adenosine from Vietnamese *Cordyceps militaris* and Bioactivity

Analysis of the Extract. *Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1155/2020/1487654>.

17. Dam, S. M. and Vo, T. A (2014). Optimising polysaccharide extraction from the spore of Vietnamese lingzhi (*Ganoderma lucidum*) via enzymatic method. In *III Asia Pacific Symposium on Postharvest Research, Education and Extension: APS2014 1213*, 387 - 392.

18. Liu, Y., Gong, G., Zhang, J., Jia, S., Li, F., Wang, Y., Wu, S (2014). Response surface optimization of ultrasound-assisted enzymatic extraction polysaccharides from *Lycium barbarum*. *Carbohydrate polymers*, 110, 278 - 284.

STUDY OF PRODUCTION TECHNOLOGY OF POLYSACCHARIDES-RICH EXTRACT FROM *Ganoderma lucidum* BY ULTRASONIC-ASSISTED ENZYMATIC METHOD ON A PILOT SCALE

Hoang Huong Ngoc¹, Bui Thi Anh Nguyet², Bui Thi Huong Quynh¹, Hoang Ngoc Dung², Tran Thi Ngoc Anh², Le Thi Trang³, Le Thi Van Thanh³, Nguyen Thi Huong Tra³, Nguyen Thi Thu Huyen³, Vu Thu Diem³, Nguyen Duc Tien³, Pham Cao Thang³, Bui Thi Huong^{2,3}

¹University of Science - Vietnam National University, Hanoi

²Nhat Lan Green Biotechnology, Company, Vietnam

³Vietnam Institute of Agricultural Engineering and Post - Harvest Technology

Summary

Based on the results of laboratory-scale research, we selected the technological parameters for producing polysaccharides-rich extract powder from *Ganoderma lucidum* on a scale of 300 liters per batch. *G. lucidum* is crushed to a size of 1 - 2 cm x 0.5 - 1 cm, then mixed with a ratio of mushroom material/solvent of 1 : 20, added with 0.5% celluclast enzyme. The suitable extraction conditions were carried out by ultrasonication at a power of 600 W for 35 minutes at 50°C, then continuing in incubation and extraction at 50°C for 115 minutes. The polysaccharides-rich extract solution was concentrated by using vacuum evaporation until the dissolved solids content reached 1.6°Brix, under the pressure of 700 mm Hg, concentration temperature of 60°C and the estimated time of 4.5 hours. The extract powder was produced using the freeze-drying method, adding maltodextrin as the carrier at a ratio of 3% and the material thickness of 1 cm. The raw material was frozen at -30°C for 6 hours and freeze-dried under a pressure of 30 - 60 Pa, with a condenser temperature of -60°C, for 40 hours. The dry extract powder had a moisture content of 4.5%, meeting the quality requirements for dry extract powder as per the Vietnamese Pharmacopoeia V (< 5%). The polysaccharides content was 4.105 g/100 g (4.1%) and the food safety criteria complied with the regulations in the Vietnamese Pharmacopoeia V and Decision 46/2007/QĐ-BYT on 19th December, 2007, by the Ministry of Health in Vietnam. The product was a loose, dry powder with a gray-brown color and the characteristic fragrance of *G. lucidum*.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, polysaccharides, ultrasonic, Celluclast® 1.5 L enzym.

Ngày nhận bài: 6/8/2024

Ngày chuyển phản biện: 7/10/2024

Ngày thông qua phản biện: 4/11/2024

Ngày duyệt đăng: 28/3/2025