

QUY TRÌNH CHIẾT TÁCH CÁC HOẠT CHẤT SINH HỌC TỪ NẤM LINH CHI (*GANODERMA LUCIDUM*)

NGUYỄN THỊ MINH TÚ

1. MỞ ĐẦU

Linh chi *Ganoderma lucidum* là một loại nấm thuộc họ đa khổng (Polyporaceae), từ xưa đã được xếp vào hàng “thượng dược” với nhiều tên gọi khác nhau như: thần tiên thảo, bất lão thảo, nấm trường thọ, nấm gỗ, vạn niên nhung, nấm Lim [3, 10]. Linh chi được dùng làm thuốc phòng, trị được nhiều bệnh, làm tăng thể lực, kéo dài tuổi thọ, được xem như vật an lành, tượng trưng cho sự trường thọ. Từ thập niên 70 thế kỉ XX trở đi, nhiều nhà y học ở các nước bắt đầu tiến hành nghiên cứu thành phần hữu hiệu, tác dụng dược lí và hiệu quả trị liệu của linh chi.

Trên thế giới và Việt Nam đã có rất nhiều nghiên cứu về tách chiết và sử dụng các hợp chất sinh học trong linh chi. Nhóm nghiên cứu Viện Công nghiệp thực phẩm của Trương Thị Hòa [2] đã tiến hành chiết linh chi (*Ganoderma lucidum*) chủng Nhật Bản trên các dung môi cồn và nước 80°C, 90°C, 100°C; với tỉ lệ 1/10 (nguyên liệu/dung môi), chiết 3 lần, kết quả hiệu suất trích ly cao nhất có thể đạt 8,4 - 8,8%. Tác giả Nguyễn Anh Dũng (XNDPTU 24 Mekophar) tiến hành chiết với cồn tinh khiết (Merck) đạt hiệu suất 4 - 6% [2].

Những nghiên cứu về nấm linh chi tại Việt Nam tập trung chủ yếu vào điều tra, sưu tập, nêu đặc điểm phân loại, điều kiện sinh thái, quy trình nuôi trồng và các hoạt chất chính có trong nấm linh chi. Tuy đã có sản phẩm sản xuất ở quy mô công nghiệp song giá thành còn quá cao.

Phạm vi của bài báo cáo này đề cập đến quy trình chiết tách các hợp chất có hoạt tính trong nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) trong dung môi nước với điều kiện ôn hòa.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu linh chi mà chúng tôi nghiên cứu trong đề tài này có vị trí phân loại như sau [5]:

- | | |
|-----------------|---------------------------------------|
| • Giới nấm | Mycetalia; |
| • Ngành nấm đảm | Basidiomycota; |
| • Lớp nấm đảm | Basidiomycetes; |
| • Bộ nấm lỗ | Aphyllphorales; |
| • Họ linh chi | <i>Ganoderma lucidum</i> taceae Donk; |
| • Chi linh chi | <i>Ganoderma lucidum</i> ; |
| • Loài linh chi | <i>Ganoderma lucidum</i> . |

Nguyên liệu linh chi (*Ganoderma lucidum*) được thu nhận từ dự án Sản xuất thực phẩm chức năng của Viện Nghiên cứu rừng bền vững và Chứng chỉ rừng thuộc Viện Khoa học và công nghệ Việt nam với đối tác Canada, bắt đầu năm 2006. Dự án nhằm phát động phong trào trồng linh chi (*Ganoderma lucidum* chủng Canada) "xoá đói giảm nghèo" tại xã Tiên Xuân, tỉnh

Hoà Bình. Dự án đang trong giai đoạn nghiên cứu và nuôi trồng thử nghiệm nên sản lượng tương đối thấp. Giá thành sự kiện ban đầu khoảng 300.000 đồng/kg.

Nguyên liệu được thu hái ngoài tự nhiên ở tuổi năm vừa thành thực, đã được phơi khô ở cơ sở nuôi trồng, được bảo quản trong túi nilon kín.

2.2. Hóa chất thiết bị thí nghiệm

Hoá chất sử dụng trong nghiên cứu có nguồn gốc Trung Quốc đã được kiểm định, đảm bảo tiêu chuẩn sử dụng trong phòng thí nghiệm, bao gồm: ethanol 96%, n-hexane, chloroform, acetic acid đặc, nitric acid đặc và nước cất.

Thiết bị thí nghiệm: Cân điện tử, cân đĩa; thiết bị cô quay chân không Fisher; thiết bị sấy chân không Fisher; bộ cất đậm Kjeldahl; máy so màu, bình ôn nhiệt, thiết bị gia nhiệt, tủ sấy...

3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Khảo sát nguyên liệu

3.1.1. Xác định độ ẩm nguyên liệu [4]

Xác định theo phương pháp sấy đến khối lượng không đổi.

3.1.2. Xác định hàm lượng Cellulose [4]

Cellulose có ảnh hưởng tới khả năng trích ly các hoạt chất ra khỏi nguyên liệu nấm linh chi. Phương pháp định lượng cellulose dựa vào tính chất bền đối với tác dụng của axit mạnh và kiềm mạnh, không bị phân hủy dưới tác dụng của axit yếu như các chất khác thường đi kèm theo với cellulose như hemiluloza, lignin... Cellulose xác định được gọi là cellulose (gồm cellulose và một lượng nhỏ hemicellulose, chủ yếu là các pentose và lignin...).

3.1.3. Xác định hàm lượng Protein thô trong nguyên liệu bằng phương pháp Kjeldahl [1]

Trên cơ sở định lượng nitơ tổng số, tính ra lượng Protein thô bằng cách nhân với hệ số tương ứng. Các bước bao gồm: Vô cơ hóa mẫu: Cất đậm và Chuẩn độ.

3.1.4. Xác định hàm lượng Carbohydrate [1]

Xác định theo phương pháp phân tích chất lượng lương thực thực phẩm.

3.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình chiết

Do điều kiện thí nghiệm, khi khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình chiết: dung môi, nhiệt độ, thời gian chiết, tác động của đảo trộn, chúng tôi tiến hành đối với nguyên liệu ở dạng xay vỡ.

3.2.1. Khảo sát dung môi

Việc lựa chọn dung môi chiết tách ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng tách chất ra khỏi nguyên liệu [7]. Tiến hành nghiên cứu thăm dò từ dung môi ít phân cực đến dung môi phân cực

mạnh: n- hexan, chloroform, ethanol 96%, ethanol 70%, ethanol 45%, nước. Do tính chất của dung môi mà đối với mỗi loại dung môi, dịch chiết thu được sẽ có các thành phần khác nhau.

Để xác định được dung môi thích hợp nhất cho quá trình chiết, các mẫu được chiết trong cùng điều kiện: lượng nguyên liệu chiết là 10g; tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/30; nguyên liệu ở dạng xay vỡ kích thước 1x1 mm; số lần chiết là 1; thời gian chiết 8 giờ/lần; chiết ở nhiệt độ phòng. Tiến hành lặp lại 2 lần đối với mỗi mẫu.

3.2.2. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng trong chiết xuất hoạt chất từ nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) trong dung môi nước

Việc đảo trộn là cần thiết để tạo ra chênh lệch nồng độ ở màng tế bào, tăng cường tốc độ khuếch tán. Trong các thí nghiệm tiếp theo các mẫu đều được đảo trộn trong quá trình chiết.

- Khảo sát nhiệt độ

Để xác định ảnh hưởng của nhiệt độ chiết, tiến hành chiết nguyên liệu xay vỡ ở cùng điều kiện tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi là 1/30, lượng nguyên liệu là 10 g, thời gian chiết 8 tiếng/lần, có đảo trộn, số lần chiết là 1.

- Khảo sát thời gian

Thời gian chiết ảnh hưởng tới khả năng tách chất chiết cùng với tạp chất. Về nguyên tắc, thời gian chiết càng lớn thì hàm lượng chất chiết thu hồi càng cao. Tuy nhiên, trong quá trình chiết xuất, lúc đầu các chất có phân tử lượng thấp tan trước (thường là hoạt chất), sau mới đến các chất có phân tử lượng cao (thường là tạp như nhựa, keo...). Để tìm được thời gian chiết thích hợp, tiến hành khảo sát hàm lượng thu hồi chất chiết theo thời gian. Nguyên liệu chiết ở dạng xay vỡ, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/30 (w/v), chiết ở nhiệt độ 50°C, có đảo trộn, số lần chiết là 1.

- Khảo sát tỉ lệ nguyên liệu/dung môi

Về nguyên tắc, trong một giới hạn cho phép, lượng dung môi càng nhiều càng rút được nhiều chất tan. Tuy nhiên, nếu sử dụng một lượng dung môi quá lớn cho quá trình chiết tách sẽ làm ảnh hưởng đến quá trình xử lý dịch chiết sau này về các mặt: thời gian, năng lượng, thể tích thiết bị. Nguyên liệu chiết ở dạng xay vỡ, thời gian chiết 8 tiếng/lần, chiết ở nhiệt độ 50°C, có đảo trộn, số lần chiết là 1.

3.3. Thử hoạt tính chống oxy hóa của sản phẩm

Sử dụng phương pháp Reducing power để kiểm tra hoạt tính chống oxy hóa [8, 10]: Lần lượt lấy (50 – 500 µg) bột chiết pha trong 1 ml nước cất, 2 ml dung dịch ethanol 96%, 2 ml dung dịch đệm phosphate (0,2 M, pH 6,6) và 2ml kali ferricyanide (1%) vào các ống nghiệm và ủ ở 30°C trong 30 phút. Tiếp đó, thêm vào hỗn hợp 2 ml trichloroacetic acid 10% rồi đem li tâm ở tốc độ 3000 vòng/ phút trong 10 phút. Cuối cùng lấy 3 ml phần dung dịch trên bề mặt pha với 2 ml ethanol 96% và 0,5 ml ferric chloride 0,1%. Đo độ hấp thụ của dung dịch trên với thiết bị UV-Vis ở bước sóng 700 nm. Thực hiện tương tự với mẫu kiểm chứng. Thí nghiệm được tiến hành 3 lần.

$$AAI = \frac{R_{sample}}{R_{control}}$$

AAI: Chỉ số chống oxi hóa; R_{sample}: Mật độ quang của mẫu; R_{control}: Mật độ quang mẫu kiểm chứng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát nguyên liệu

Bảng 1. Thành phần linh chi nguyên liệu (*Ganoderma lucidum*)

Thành phần	Hàm lượng (%)
Nước	13,51
Cellulose	54,42
Hợp chất nitơ tổng số	2,10
Protein	13,5
Carbonhydrate	22,60

Nhận xét

- Nguyên liệu có độ ẩm 13.51%. Độ ẩm vượt ngoài độ ẩm trung bình đã khảo sát [9]. Nguyên nhân có thể do quá trình thu hái và xử lý nguyên liệu không đảm bảo độ ẩm cần thiết hoặc trong quá trình bảo quản, nguyên liệu bị ẩm không khí xâm nhập. Do đó, trong quá trình thực hiện thí nghiệm, cần thiết phải đưa nguyên liệu về độ ẩm cho phép bằng phương pháp sấy.
- Hàm lượng cellulose trong nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) chủng Canada trồng tại Việt nam ở mức trung bình so với các khảo sát trước đó [8]. Do thuộc loại nấm gỗ, hàm lượng cellulose của linh chi cao nên dung môi chiết rất khó thấm vào trong tế bào. Quá trình chiết đòi hỏi nhiều thời gian, hiệu suất thu được không cao. có thể các chất hòa tan bị giữ lại trong hệ thống lưới cellulose khá phức tạp của chúng. Vì vậy nguyên liệu cần được xử lý cắt lát mỏng hoặc nghiền trước khi tiến hành tách chiết. Tuy nhiên, cần chú ý vì nếu nghiền quá nhỏ, bột sẽ dính kết với nhau khi hòa trong dung môi hoặc dễ vón cục gây cản trở quá trình chiết.
- Hàm lượng nitơ tổng số trong nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) chủng Canada trồng tại Việt nam là 2.1%, nằm trong giới hạn đã khảo sát [8].

3.2. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết

Bảng 2. Khảo sát lượng chất chiết thu hồi với từng loại dung môi

Dung môi	n-hexane	chloroform	ethanol 96%	ethanol 70%	ethanol 45%	H ₂ O
Lượng chất chiết thu hồi (%)	1,06	2,52	3,68	4,48	4,03	4,72

Nhận xét: Hàm lượng chất chiết thu hồi tăng dần tương ứng với các dung môi n-hexane, chloroform, ethanol 96%, ethanol 45%, ethanol 70%, nước. Như vậy khả năng thu hồi chất chiết của nước và ethanol 70% là lớn nhất. Nước và ethanol là những dung môi rẻ tiền, dễ kiếm, thân thiện với môi trường. Mặt khác, giá thành của những dung môi này lại rẻ hơn và hoàn toàn không độc so với n-hexane và chloroform. Với kết quả như vậy, các khảo sát tiếp theo được thực hiện trên dung môi nước.

3.3. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết

Bảng 3. Khảo sát nhiệt độ chiết với dung môi nước

Nhiệt độ chiết (°C)	30	40	50	60	70	80	90	100
Lượng chất chiết thu hồi (%)	4,89	5,14	6,05	6,34	6,59	7,14	7,40	7,46

Bảng 4. Khảo sát thời gian chiết với dung môi nước

Thời gian chiết (giờ)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Lượng chất chiết thu hồi (%)	3,03	3,67	4,45	5,34	5,77	5,92	6,05	6,09	6,14	6,17	6,22

Bảng 5. Khảo sát tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi nước

Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml)	1/40	1/35	1/30	1/25	1/20	1/15	1/10
Lượng chất chiết thu hồi (%)	6,13	6,09	6,05	5,95	5,88	5,53	4,32

3.4. Xác định vùng hoạt động tối ưu của quá trình chiết

Với các thông số nhiệt độ, thời gian chiết, tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi có khoảng biến thiên là $Z_1 = 50 \div 90$ (°C), $Z_2 = 6 \div 11$ (h), $Z_3 = 1/35 \div 1/15$ (g/ml), lập một quy hoạch trực giao cấp một, hai mức tối ưu [6] được phương trình hồi quy mô tả đúng thực nghiệm là:

$$y = 6,59 + 0,65 x_1 + 0,07 x_2 - 0,16 x_3.$$

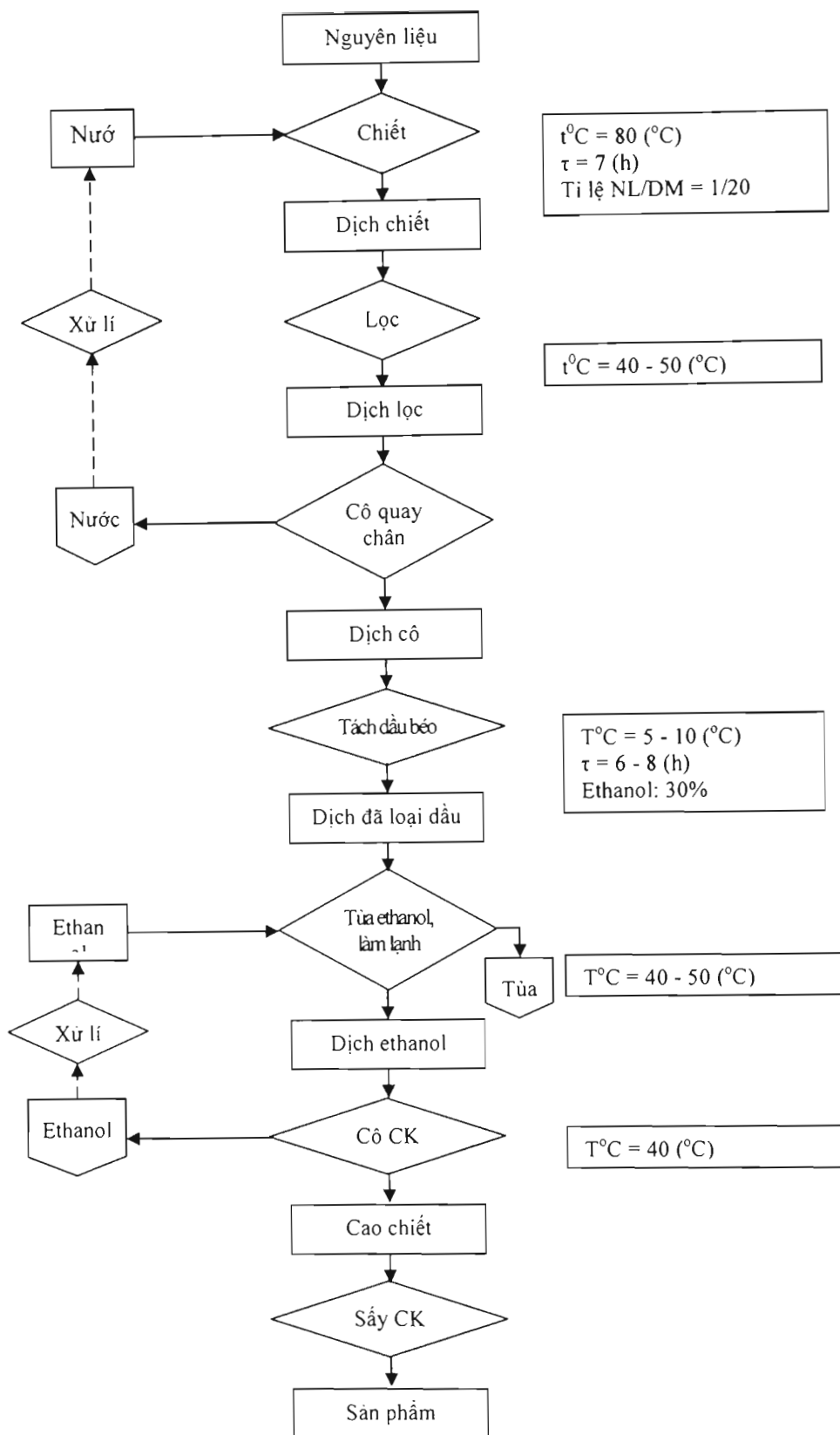
Hàm mục tiêu đạt giá trị cực đại tại các điều kiện nhiệt độ chiết 90°C, thời gian chiết 11 giờ/loại và tỉ lệ chiết 1/35g/ml tuy nhiên với mục đích lựa chọn được thông số quá trình chiết với mục đích hàm lượng chất chiết thu hồi cao với điều kiện không ảnh hưởng tới chất lượng hợp chất thiên nhiên thu được, dựa trên sự trợ giúp của phần mềm NemrodW thời gian chiết ngắn, tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi phù hợp từ phương trình thu được :

- Nhiệt độ chiết: 80°C.
- Thời gian chiết: 7 (h).
- Tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi: 1/20 (m/v)
- Hàm lượng chất chiết thu hồi: $6,91 \pm 0,03\%$.

3.5. Sơ đồ quy trình chiết nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*)

Thuyết minh quy trình (hình 1).

Nguyên liệu linh chi trong nghiên cứu này được thu hái ngoài tự nhiên ở tuổi nấm vừa thành thực, đã được phơi khô ở dạng quả thể, kích thước tán 6 - 8 cm, nguyên liệu có màu nâu đỏ sẫm, bóng. Để thuận lợi cho quá trình chiết, cần thiết phải xử lí để kích thước nguyên liệu đồng đều và nhỏ nên nguyên liệu linh chi được xay vỡ, bảo quản trong bao bì PE tại nơi khô mát (Độ ẩm nguyên liệu được duy trì < 13%, tránh ẩm mốc phát triển).



Hình 1. Quy trình chiết hoạt chất từ nấm linh chi *Ganoderma lucidum* trên dung môi nước

Nguyên liệu được đưa vào túi vải lọc đặt trong nồi chiết (sử dụng túi vải lọc có tác dụng giảm lượng bã nguyên liệu xâm nhập vào dịch chiết, giảm tải việc xử lý tách bã chiết). Nước khử khoáng được đưa vào trộn đều với nguyên liệu đảm bảo tính thấm ướt cho toàn khối và tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi đạt 1/20 (m/v). Nâng nhiệt khối dịch tới nhiệt độ yêu cầu (80°C) và duy trì trong thời gian 7 giờ. Trong thời gian chiết, thường xuyên đảo trộn dịch tránh nhiệt cục bộ và tăng khả năng chuyển chất ra ngoài khối dịch. Tiến hành rửa bã bằng nước nóng từ từ đến khi dịch có màu hơi vàng đục nhằm rút kiệt chất chiết khỏi nguyên liệu.

Dịch chiết thu được có màu nâu đỏ, đục, mùi đặc trưng thảo mộc. Dịch lọc có màu nâu đỏ, trong, óng ánh, đưa đi cô loại nước trong thiết bị cô quay chân không.

Lựa chọn nồng độ ethanol 30% trong quá trình tua để giảm thiểu lượng dung môi cần sử dụng. Lượng Ethanol thu được sau khi cô quay chân không ở nhiệt độ 50°C với thể tích bằng 0,5 lượng Ethanol sử dụng để tua tạp chất cho nồng độ 40 - 50% khi đo bằng cồn kế. Ethanol này được thu hồi với mục đích tái sử dụng sau khi có những biện pháp xử lý thích hợp.

Tiếp tục làm lạnh dịch ở nhiệt độ 2 – 5°C để lắng cặn mịn trong thời gian 6 - 8 giờ. Sau đó lắng gạn, loại cặn mịn, đưa dịch đi cô đặc. Quá trình cô đặc dừng khi dịch cao sệt có thể tích tương đương tỉ lệ 0,5 : 1 so với khối lượng nguyên liệu ban đầu. Dịch cao sệt được sấy chân không ở nhiệt độ 40°C tới dạng bột mịn, xốp, màu nâu sáng, vị đắng đặc trưng.

3.6. Đánh giá một số tính chất của hoạt chất thu được

3.6.1. Thành phần hóa học

Bảng 6. Định tính thành phần hóa học trong cao chiết dung môi nước

Hợp chất	Phương pháp thử	Quan sát	Kết quả
Hợp chất phenol	Phản ứng với FeCl_3	Tủa xanh đen	+
Alkaloid	Phản ứng với H_2SO_4 , thuốc thử Drangendroff	Không có tủa vàng	-
Triterpenoid	Sắc kí bản mỏng	Hiện màu	+

3.6.2 Hoạt tính chống oxy hóa

Bảng 7. Mật độ quang và chỉ số chống oxy hóa của sản phẩm

Lượng dịch chiết (μg)	0	50	60	70	80	90	100
Mật độ quang	0,066	0,221	0,238	0,256	0,273	0,291	0,308
AAI	1,00	3,35	3,61	3,88	4,14	4,41	4,67

Mật độ quang của dung dịch thí nghiệm tăng dần theo lượng dịch mẫu. Mật độ quang của mẫu thí nghiệm cao hơn mật độ quang của mẫu kiểm chứng chứng tỏ dịch linh chi có khả năng khử ion Fe^{+3} thành Fe^{+2} . Nồng độ dịch chiết càng cao thì mật độ quang của dung dịch càng cao.

4. KẾT LUẬN

So với nghiên cứu trước đây [2], quy trình chiết nấm linh chi *Ganoderma lucidum* trên dung môi nước có điều kiện nhiệt độ thấp hơn, số lần chiết ít. Mặc dù thời gian dài hơn, qui trình này đơn giản và thành phần chiết ra được chứng minh có hoạt tính chống oxy hóa.

Lời cảm ơn. Bài báo là kết quả của một phần nghiên cứu trong Đề tài nghiên cứu khoa học và công nghệ (Bộ Giáo dục và Đào tạo) năm 2006-2007 (B2006-01-52) do Trường Đại Học Bách Khoa chủ trì.

Các hóa chất dùng trong thí nghiệm khảo sát hoạt tính sinh học được GS. Sawamura Masayoshi trường Đại học Kochi Nhật bản cung cấp.

Tác giả xin chân thành cảm ơn Bùi Thị Quỳnh Chi, sinh viên K48 ngành Công nghệ Thực phẩm đã đóng góp tích cực cho bài báo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Đạt, Ngô Văn Tâm - Phân tích lương thực thực phẩm, Bộ Lương thực và Thực phẩm, 1974.
2. Trương Thị Hoà, Trương Hương Lan, Nguyễn Thu Hà, Nguyễn Thị Thi, Lại Quốc Phong - Nghiên cứu trích ly các hợp chất sinh học từ nấm linh chi, Viện Công nghiệp Thực phẩm, 2001.
3. Đỗ Tất Lợi, Lê Duy Thắng, Trần Văn Luyến - Nấm linh chi nuôi trồng và sử dụng, NXB Nông nghiệp, Hà Nội, 1994.
4. Nguyễn Văn Mùi - Thực hành hoá sinh học, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, 2001.
5. Lê Xuân Thám - Nấm linh chi cây thuốc quý, NXB Khoa học và Kỹ thuật, 1998.
6. Nguyễn Minh Tuyền - Quy hoạch thực nghiệm, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2005.
7. Viện Dược liệu - Nghiên cứu thuốc từ thảo dược (Giáo trình sau Đại học), Bộ GD&ĐT, Bộ Y tế, (TS. Nguyễn Duy Thuần, PIII, Chiết xuất dược liệu), NXB Khoa học và Kỹ thuật, 2006.
8. Viện Dược liệu - Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lí của thuốc từ dược thảo, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2006.
9. Vũ Thiên Hà - Nghiên cứu góp phần xây dựng hoàn thiện quy trình chiết xuất một số hợp chất có hoạt tính sinh học từ nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*), Đại học Bách Khoa, Hà Nội, 2007.
10. <http://dictionary.bachkhoatoanthu.gov.vn>

SUMMARY

STUDY ON ISOLATION OF ACTIVE COMPOUNDS FROM LINGZHI (*GANODERMA LUCIDUM*)

Lingzhi (*Ganoderma lucidum*) has been well known for its activities in disease's treatment. There have been many studies including international and Vietnamese on lingzhi and its properties. However, the aims of this study were to investigate as gentle as possible the condition of extraction. Moreover solvent was also a technologically concerned problem recently, therefore the purpose was to eliminate this factor. The results have showed that extraction in hot water (80°C), then scattering in ethanol (30%) will produce compounds with relatively high anti oxidant activities.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 12 tháng 8 năm 2008

Viện Công nghệ sinh học - Công nghệ thực phẩm,
Đại học Bách khoa Hà Nội.