

KHẢO SÁT YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH TRÍCH LY TRITERPENOID TỪ NẤM LINH CHI (*Ganoderma lucidum*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP ENZYME CÓ HỖ TRỢ SIÊU ÂM

Nguyễn Minh Anh^{1,2,3}, Phan Nguyễn Cẩm Chương^{1,2,3}, Nguyễn Đức Việt^{1,2,3},
Trần Đỗ Đạt^{1,2,3}, Lữ Thị Mộng Thy^{1,4}, Huỳnh Ngọc Oanh^{2,3},
Hoàng Minh Nam^{1,2,3}, Mai Thanh Phong^{1,2,3}, Nguyễn Hữu Hiếu^{1,2,3*}

¹Phòng thí nghiệm Trọng điểm ĐHQG – HCM Công nghệ Hóa học và Dầu khí
(Key CEPP Lab), Trường Đại học Bách Khoa TP.HCM

²Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa TP.HCM

³Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

⁴Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: nhhieubk@hcmut.edu.vn

Ngày nhận bài: 09/8/2021; Ngày chấp nhận đăng: 08/11/2021

TÓM TẮT

Triterpenoid trong nấm linh chi được biết đến với những hoạt tính sinh học nổi bật như kháng oxy hóa, kháng khuẩn, ức chế tế bào ung thư và kháng tiểu đường. Mục đích của nghiên cứu này là đưa ra điều kiện phù hợp để thu nhận được cao nấm linh chi giàu triterpenoid bằng phương pháp enzyme có hỗ trợ siêu âm (ultrasound-assisted enzyme extraction - UAEE). Vì vậy, nghiên cứu tiến hành khảo sát các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình trích ly như nồng độ enzyme (%), tỷ lệ dung môi: nguyên liệu (mL/g), nhiệt độ (°C), thời gian siêu âm (giờ) và công suất siêu âm (W) bằng phương pháp luân phiên từng biến. Kết quả cho thấy hàm lượng triterpenoid thu được là 11,33 mg/g chất khô (CK) tại nồng độ enzyme 2,5%, tỷ lệ dung môi: nguyên liệu là 20:1 mL/g, nhiệt độ 60 °C, thời gian 60 phút và công suất siêu âm 480 W. Khả năng bắt gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl của cao chiết có giá trị IC₅₀ bằng 379,8 µg/mL. Phương pháp trích ly bằng enzyme có sự hỗ trợ siêu âm được xem như một giải pháp tiếp cận xanh trong trích ly cao nấm giàu triterpenoid phù hợp ứng dụng trong công nghệ dược phẩm, thực phẩm chức năng.

Từ khóa: Kháng oxy hóa, nấm linh chi, triterpenoid, trích ly enzyme hỗ trợ siêu âm.

1. GIỚI THIỆU

Nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) hay còn được gọi là Lingzi trong tiếng Trung Quốc hoặc Reishi trong tiếng Nhật là một loài nấm lớn, sẫm màu, thuộc họ Ganodermataceae. Loài nấm này được biết đến như một loại thảo dược được sử dụng để tăng cường sức khỏe, kéo dài tuổi thọ và được sử dụng phổ biến ở các nước châu Á như Trung Quốc, Nhật Bản, Việt Nam và Hàn Quốc [1]. Trong dân gian, quả thể và bào tử nấm linh chi được dùng để hỗ trợ điều trị viêm gan, viêm phế quản, tăng huyết áp và một số bệnh ung thư [2, 3]. Các hợp chất có hoạt tính sinh học của nấm linh chi rất đa dạng như polysaccharide, steroid, germanium hữu cơ và triterpenoid [4]. Trong đó, triterpenoid là hợp chất đóng vai trò quan trọng vì có khả năng kháng oxy hoá, kháng khuẩn, kháng viêm, ức chế enzyme α -glucosidase và ngăn ngừa ung thư [5]. Triterpenoid là hợp chất có cấu tạo từ 6 đơn vị isopren, các triterpenoid có bộ khung chứa 27-30 nguyên tử cacbon [6]. Triterpenoid có khả năng tan tốt trong ethanol, methanol, ít

tan trong nước ngoài trừ kết hợp với đường để tạo thành glycosid. Ngoài ra, các triterpenoid khi tác dụng với HClO_4 , H_2SO_4 và thuốc thử vanillin có gia nhiệt sẽ có màu tím. Đây là phản ứng đặc trưng để định lượng triterpenoid có trong nấm [7, 8].

Trích ly là bước thiết yếu ảnh hưởng đến thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của mẫu cao chiết. Do đó, việc tìm ra phương pháp trích ly, điều kiện trích ly phù hợp nhằm thu nhận hàm lượng cao nấm giàu triterpenoid là vấn đề hết sức cần thiết. Phương pháp trích ly bằng enzyme có hỗ trợ siêu âm (ultrasound-assisted enzymatic extraction - UAEE) là sự kết hợp giữa hai quá trình trích bằng siêu âm và enzyme, mang lại nhiều ưu điểm vượt trội so với phương pháp trích ly truyền thống [9]. Quá trình trích ly bằng siêu âm tạo ra các bọt khí làm tăng quá trình truyền khối giữa dung môi và nguyên liệu, đồng thời các bọt khí va chạm và làm phá vỡ thành tế bào giúp dung môi dễ dàng xâm nhập vào bên trong để hoà tan triterpenoid [10]. Bên cạnh đó, việc kết hợp enzyme Viscozyme cassava PL (cellulase và chitinase) liên kết với cơ chất làm phá vỡ cấu trúc của thành tế bào, giải phóng các thành phần nội bào vào dung môi [11]. Việc sử dụng enzyme và siêu âm để hỗ trợ trích ly giúp đẩy nhanh thời gian trích ly bằng cách tăng khả năng phá vỡ thành tế bào, từ đó tăng khả năng khuếch tán của các hoạt chất vào dung môi. UAEE ít tiêu tốn năng lượng, hàm lượng hợp chất trích ly cao và bảo toàn tốt các hoạt tính sinh học do các phân tử sinh học được trích ly ở nhiệt độ không quá cao. Đây được xem như một phương pháp trích ly xanh và thân thiện với môi trường [9]. Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã sử dụng sóng siêu âm để trích ly các hoạt chất có hoạt tính sinh học từ các loài thực vật khác nhau như phenolic từ mướp đắng, phlorotannin và polysaccharide từ tảo nâu [12, 13].

Vì vậy, trong nghiên cứu này cao chiết giàu triterpenoid được trích ly bằng phương pháp enzyme hỗ trợ siêu âm và tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng của các yếu tố trích ly đến hàm lượng triterpenoid thu được bằng phương pháp luân phiên từng biến. Thông qua khảo sát các yếu tố để tìm ra nồng độ enzyme, tỷ lệ dung môi: nguyên liệu, nhiệt độ, thời gian siêu âm và công suất siêu âm phù hợp để thu được cao chiết chứa hàm lượng triterpenoid cao nhất. Đồng thời đánh giá hoạt tính kháng oxy hoá thông qua khả năng bắt gốc tự do với đối chứng là axit ascorbic. Kết quả thu được sẽ tạo tiền đề cho các nghiên cứu khác sâu hơn để có thể ứng dụng cao chiết nấm linh chi trong thực phẩm và được phẩm qua đó nâng cao sức khoẻ của con người.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Nấm linh chi được mua từ trại Nấm Linh chi Ngọc Anh (ấp 2, xã An Nhơn Tây, huyện Củ Chi, Tp. Hồ Chí Minh). Nấm linh chi được sấy ở nhiệt độ $60\text{ }^\circ\text{C}$ (độ ẩm 12,38%) và bảo quản trong bình hút ẩm. Các hóa chất được sử dụng trong thí nghiệm bao gồm ethyl acetate, ethanol, methanol được cung cấp bởi ChemSol, Việt Nam. Axit perchloric (HClO_4), axit axetic (CH_3COOH), axit ascorbic và vanillin của hãng Xilong, Trung Quốc. Axit ursolic (99%) và 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) được cung cấp bởi Sigma. Viscozyme cassava PL được cung cấp bởi Novozyme, Đan Mạch. Tất cả các hóa chất được sử dụng mà không cần tinh chế. Nước cất được sử dụng trong tất cả thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Quy trình trích ly triterpenoid bằng phương pháp enzyme hỗ trợ siêu âm

Cân 2 g mẫu linh chi đã xay nhuyễn cho vào 100 mL nước cất. Tiếp theo, thêm 2 mL dung dịch enzyme Viscozyme cassava PL để thu được nồng độ 2 % (v/v) ở $60\text{ }^\circ\text{C}$ trong 60 phút. Sau đó, enzyme sẽ bị bất hoạt ở $80\text{--}85\text{ }^\circ\text{C}$ trong vòng 2 phút [14]. Tiến hành lọc thu dịch chiết, phần bã thêm ethanol và được siêu âm ở điều kiện nhiệt độ, công suất siêu âm và thời

gian siêu âm được thay đổi. Dịch chiết ở cả hai giai đoạn sẽ tiến hành cô quay chân không ở 50 °C cho đến khi thu được khối lượng không đổi và xác định hàm lượng triterpenoid trong cao chiết. Các yếu tố ảnh hưởng như nồng độ enzyme, tỷ lệ dung môi: nguyên liệu, thời gian siêu âm, nhiệt độ và công suất siêu âm lên hàm lượng triterpenoid sẽ được khảo sát.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đến hàm lượng triterpenoid

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của các yếu tố trích ly bao gồm nồng độ enzyme (2; 2,5; 3; 3,5 và 4%), tỷ lệ dung môi: nguyên liệu (8:1, 12:1, 16:1, 20:1 và 24:1 mL/g), nhiệt độ trích ly (30, 40, 50, 60 và 70 °C), thời gian siêu âm (30, 45, 60, 75 và 90 phút) và công suất siêu âm (120, 240, 360, 480 và 600 W) lên hàm lượng triterpenoid sẽ được tiến hành theo phương pháp luân phiên từng biến. Trong các thí nghiệm, một biến được thay đổi trong khi các biến khác cố định.

2.2.2.1. Khảo sát nồng độ enzyme

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme ở các giá trị 2; 2,5; 3; 3,5 và 4%; các thông số cố định là tỷ lệ dung môi: nguyên liệu 16:1 mL/g, nhiệt độ 50 °C, thời gian 60 phút và công suất siêu âm 360 W.

2.2.2.2. Khảo sát tỷ lệ dung môi: nguyên liệu

Các tỷ lệ dung môi: nguyên liệu được lựa chọn để tiến hành thí nghiệm khảo sát là 8:1, 12:1, 16:1, 20:1 và 24:1 mL/g với nồng độ enzyme phù hợp chọn được ở mục 2.2.2.1, cố định các điều kiện nhiệt độ 50 °C, thời gian 60 phút và công suất siêu âm 360 W.

2.2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ được chọn để khảo sát trong khoảng từ 30-70 °C với bước nhảy là 10 °C, với nồng độ enzyme và tỷ lệ dung môi: nguyên liệu phù hợp ở mục 2.2.2.1 và 2.2.2.2; cố định thời gian trích ly trong 60 phút và công suất siêu âm 360 W.

2.2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian

Thời gian được chọn trong khoảng 30-90 phút với bước nhảy là 15 phút, các yếu tố nồng độ enzyme, tỷ lệ dung môi: nguyên liệu, nhiệt độ được chọn từ các mục 2.2.2.1, 2.2.2.2 và 2.2.2.3, công suất siêu âm cố định ở 360 W.

2.2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của công suất siêu âm

Công suất siêu âm khảo sát với 5 mức là 120, 240, 360, 480 và 600 W, các điều kiện nồng độ enzyme, tỷ lệ dung môi: nguyên liệu, nhiệt độ và thời gian tìm được ở mục 2.2.2.1, 2.2.2.2, 2.2.2.3 và 2.2.2.4.

2.2.3. Xác định hàm lượng triterpenoid

Xây dựng đường chuẩn với chất chuẩn là axit ursolic: Hàm lượng triterpenoid được xác định bằng phương pháp đo phổ hấp thụ phân tử ngoại khả kiến (UV-Vis) theo mô tả của Chen và cộng sự (2007) và có sự điều chỉnh [15]. Dung dịch axit ursolic được hòa tan trong dung dịch ethyl acetate có nồng độ lần lượt là 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 và 0,06 mg/mL và làm bay hơi ethyl acetate ở 60 °C. Sau đó 0,2 mL vanillin-axit axetic (5 %), 1,2 mL axit perchloric được bổ sung và đun cách thủy và ủ ở 70 °C trong 15 phút. Sau đó, các hỗn hợp được làm lạnh nhanh trong 2 phút, rồi định mức bằng ethyl acetate đến 5 mL (V_{dm}) và xác định độ hấp thụ bằng UV-Vis ở bước sóng 548 nm.

Xác định hàm lượng triterpenoid trong mẫu: Dịch chiết mẫu được cô quay loại bỏ dung môi để thu được cao chiết. Cao chiết được hoà tan với 25 mL ethyl acetate. Sau đó, hút 0,1 mL hỗn hợp cho bay hơi ở 60 °C và tiến hành các thao tác như trên. Hàm lượng triterpenoid mg/g chất khô (CK) được tính toán dựa vào công thức (1):

$$A = \frac{C \times V_{dm} \times n}{m \times (100 - a)} \quad (1)$$

trong đó: A là hàm lượng triterpenoid (mg/g CK); C là nồng độ triterpenoid tính toán từ phương trình đường chuẩn (mg/mL); V_{dm} là thể tích dịch chiết đem đi phân tích (mL); n hệ số pha loãng, m là khối lượng nguyên liệu ban đầu (g) và a là độ ẩm nguyên liệu.

2.2.4. Đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết

Đánh giá khả năng kháng oxy hóa của cao chiết được thực hiện bằng phương pháp bắt gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [16]. Dung dịch DPPH có nồng độ 0,2 mM được pha trong methanol. Dịch chiết sau khi cô quay loại bỏ dung môi sẽ thu được cao chiết. Cân khối lượng cao chiết và định mức lên 50 mL bằng dung dịch methanol từ đó tính toán được nồng độ của cao chiết sau khi hòa tan. Sau khi thu được dịch chiết với nồng độ 2700 µg/mL sẽ tiến hành pha loãng thành các nồng độ 200, 300, 400, 500 và 600 µg/mL. Sau đó, 4 mL dung dịch DPPH 0,2 mM được trộn với 2 mL dung dịch mẫu và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, độ hấp thụ được xác định ở bước sóng 517 nm bằng máy UV – Vis. Mẫu trắng được thực hiện tương tự nhưng thay 4 mL mẫu bằng methanol. Axit ascorbic được sử dụng làm đối chứng dương trong thí nghiệm. Dung dịch axit ascorbic có hàm lượng 1000 ppm được pha thành các nồng độ 5, 10, 15, 20 và 25 µg/mL. Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết được thể hiện qua giá trị IC_{50} thể hiện ở công thức (2):

$$(\%)I = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

trong đó: A_0 là độ hấp thụ của mẫu trắng và A là độ hấp thụ của mẫu.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

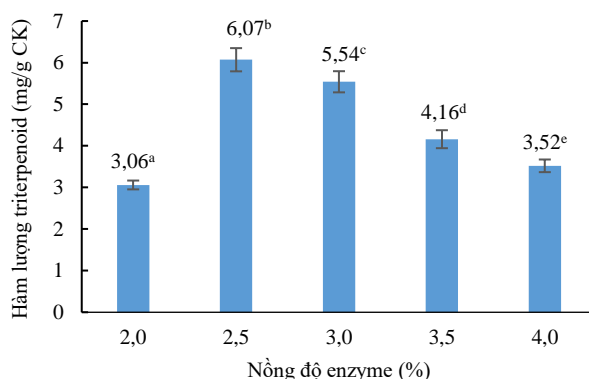
Trong nghiên cứu này, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức được thực hiện bằng phương pháp thống kê ANOVA một chiều (one-way ANOVA) và kiểm định LSD (Least Significant Difference) với $\alpha = 0,05$ bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVII. Các đồ thị được vẽ bằng công cụ Excel (Office 2010, Microsoft Corp., USA).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến hàm lượng triterpenoid

Hàm lượng triterpenoid của từng thí nghiệm được xác định thông qua phương trình đường chuẩn axit ursolic: $y = 2,0067x - 0,0121$; $R^2 = 0,9929$, trong đó: x là nồng độ của triterpenoid mg/mL; y là độ hấp thụ đo ở bước sóng 548 nm.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme cho thấy, hàm lượng triterpenoid tăng khi nồng độ enzyme tăng và điều này phù hợp vì với một lượng cơ chất xác định, khi nồng độ enzyme tăng thì hiệu suất phản ứng enzyme cũng tăng. Tuy nhiên, khi lượng enzyme tăng cao trong khi lượng cơ chất vẫn cố định thì hàm lượng triterpenoid giảm như thể hiện ở Hình 1.

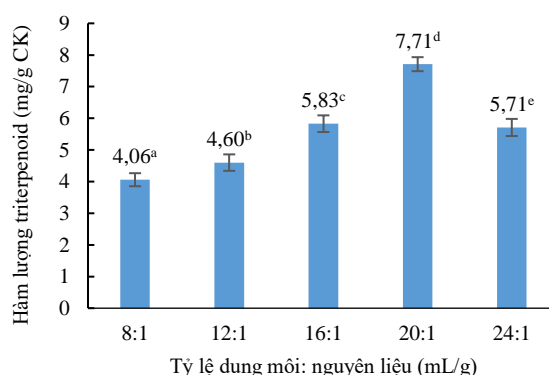


Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến hàm lượng triterpenoid
 Các chữ cái khác nhau trong cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha = 0,05$)

Kết quả thực nghiệm cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hàm lượng triterpenoid khi nồng độ enzyme tăng. Điều này là do khi thay đổi nồng độ enzyme thì hàm lượng triterpenoid tăng và đạt giá trị cao nhất là 6,79 mg/g CK ở nồng độ enzyme 2,5%, điều này có thể giải thích theo phương trình Michaelis-Menten khi nồng độ enzyme càng tăng thì hiệu suất của phản ứng enzyme càng tăng [16], nếu lượng enzyme ít thì cơ chất dư không phản ứng hết với enzyme dẫn đến tốc độ phản ứng của enzyme chậm làm cho quá trình trích ly không hoàn toàn. Bên cạnh đó, khi lượng enzyme tăng đến mức bão hòa cơ chất thì vận tốc phản ứng của enzyme không thay đổi. Do đó, không làm tăng hàm lượng triterpenoid thu được và lãng phí enzyme. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu sử dụng enzyme kết hợp sóng siêu âm trích ly saponin từ củ đấng sâm (*Codonopsis pilosula*) [17]. Từ những lập luận trên, nồng độ enzyme 2,5% là nồng độ phù hợp và cố định cho các bước khảo sát tiếp theo.

3.2. Tỷ lệ dung môi: nguyên liệu

Ethanol được sử dụng làm dung môi trích ly, ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi: nguyên liệu được khảo sát ở các mức từ 8-24 mL/g. Kết quả được thể hiện ở Hình 2.



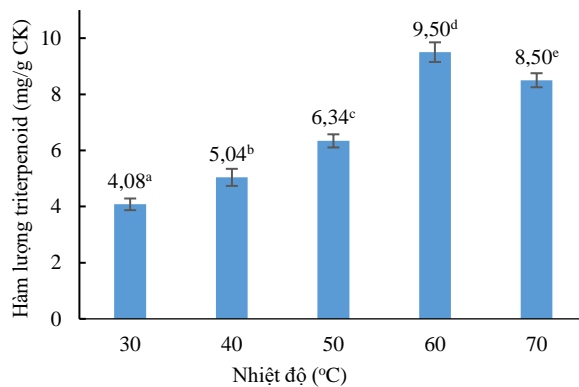
Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi: nguyên liệu đến hàm lượng triterpenoid
 Các chữ cái khác nhau trong cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Lượng dung môi nhiều hay ít đều ảnh hưởng tới quá trình trích ly các hợp chất trong nguyên liệu. Thêm vào đó, kết quả thực nghiệm cho thấy có sự khác biệt ý nghĩa thống kê về

hàm lượng triterpenoid giữa các mức tỷ lệ dung môi: nguyên liệu. Cụ thể, hàm lượng triterpenoid tăng khi tỷ lệ dung môi: nguyên liệu tăng từ 8:1 lên 20:1 mL/g. Triterpenoid đạt giá trị cao nhất là 7,71 mg/g CK ở tỷ lệ 20:1 mL/g và thấp nhất là 4,06 mg/g CK ở tỷ lệ 8:1 mL/g. Trong quá trình trích ly, ethanol là môi trường thâm thấu vào nguyên liệu để hòa tan triterpenoid. Theo nghiên cứu trước đây, tỷ lệ dung môi: nguyên liệu ảnh hưởng đến hàm lượng hợp chất vì tỷ lệ dung môi: nguyên liệu cao có thể gây ra sự chênh lệch nồng độ giữa bên trong và bên ngoài chất nền, có lợi cho việc truyền khối và thúc đẩy sự di chuyển của các dòng dung môi mang theo các chất hòa tan ra bên ngoài [18]. Khi lượng ethanol quá ít thì không đủ để hòa tan triterpenoid, dẫn đến hàm lượng triterpenoid thu được không cao. Ngược lại, khi lượng ethanol nhiều sẽ giúp thúc đẩy quá trình khuếch tán triterpenoid vào dung môi cho đến khi quá trình khuếch tán đạt mức tối đa [19]. Tuy nhiên, khi tỷ lệ dung môi: nguyên liệu tăng lên 24:1 mL/g thì hàm lượng triterpenoid giảm, điều này có thể giải thích rằng do trong quá trình siêu âm có thể trích ly ra nhiều hợp chất hòa tan, gây ra bão hòa dung môi [20]. Do đó, tỷ lệ dung môi: nguyên liệu ở mức 20:1 mL/g được chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Nhiệt độ trích ly

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ được thể hiện ở Hình 3 cho thấy cả năm mức nhiệt độ đều ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng triterpenoid.

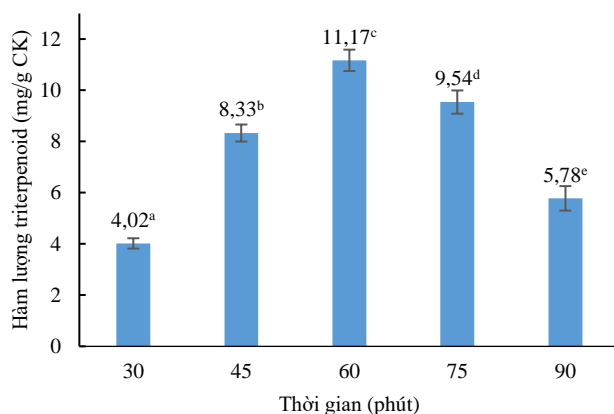


Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng triterpenoid
Các chữ cái khác nhau trong cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Kết quả phân tích phương sai cho thấy, hàm lượng triterpenoid khác nhau có ý nghĩa thống kê ở các mức nhiệt độ trích ly. Từ kết quả như thể hiện ở Hình 3, có thể thấy rằng khi nhiệt độ tăng dần thì hàm lượng triterpenoid cũng tăng và đạt giá trị cao nhất là 9,5 mg/g CK ở 60 °C. Khi nhiệt độ tăng cao, độ hòa tan của triterpenoid, tốc độ khuếch tán, truyền khối tăng lên và giảm độ nhớt của dung môi nên lượng triterpenoid trích được nhiều hơn. Tuy nhiên, khi nhiệt tăng lên 70 °C, hàm lượng triterpenoid giảm, nguyên nhân là do nhiệt độ tăng quá cao tạo điều kiện tăng tốc độ phân hủy các hợp chất trích được, cụ thể là triterpenoid [21]. Kết quả ở Hình 3 cho thấy nhiệt độ 60 °C là thích hợp nhất và nhiệt độ này được chọn để cố định cho các bước khảo sát tiếp theo.

3.4. Thời gian

Thời gian có ảnh hưởng khác nhau lên hàm lượng triterpenoid được trình bày trong Hình 4.

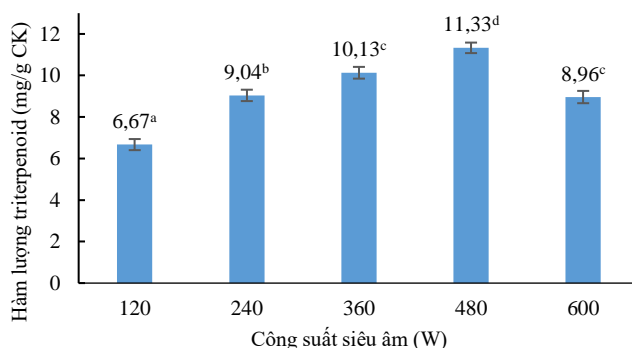


Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng triterpenoid
 Các chữ cái khác nhau trong cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Kết quả thực nghiệm cho thấy có sự khác biệt ý nghĩa thống kê về hàm lượng triterpenoid giữa các mức thời gian. Kết quả cho thấy hàm lượng triterpenoid tăng khi thời gian siêu âm tăng và đạt giá trị cao nhất là 11,17 mg/g CK ở mức thời gian siêu âm là 60 phút. Sau đó hàm lượng giảm đáng kể khi thời gian tăng lên, hàm lượng triterpenoid thấp nhất là 4,02 mg/g CK ở mức thời gian 30 phút. Trong quá trình siêu âm, hiện tượng xâm thực khí và vi xoáy giúp dung môi khuếch tán vào trong tế bào. Các chất tiếp xúc với dung môi và hàm lượng các chất này phụ thuộc vào thời gian tương tác giữa hai pha rắn và lỏng. Ở mức 30 phút, thời gian chưa đủ để dung môi khuếch tán vào nguyên liệu, cho nên hàm lượng triterpenoid thấp. Khi thời gian siêu âm hơn 60 phút, hàm lượng triterpenoid giảm đáng kể do cấu trúc bị phá hủy bởi sóng siêu âm dẫn đến một lượng lớn triterpenoid bị phân hủy [22]. Việc kéo dài thời gian siêu âm sẽ làm gia tăng các tác động nén dẫn lên thành tế bào và làm cho sự biến đổi các hợp chất diễn ra mạnh mẽ hơn, từ đó dẫn đến sự phân hủy một lượng lớn triterpenoid. Vì vậy, 60 phút được chọn là thời gian trích ly thuận lợi.

3.5. Công suất siêu âm

Khi tăng công suất siêu âm từ 120 đến 600 W thì hàm lượng triterpenoid có sự thay đổi và sự thay đổi này có ý nghĩa về mặt thống kê. Tuy nhiên, ở công suất 240 W và 600 W không có sự khác biệt có ý nghĩa như thể hiện ở Hình 5.



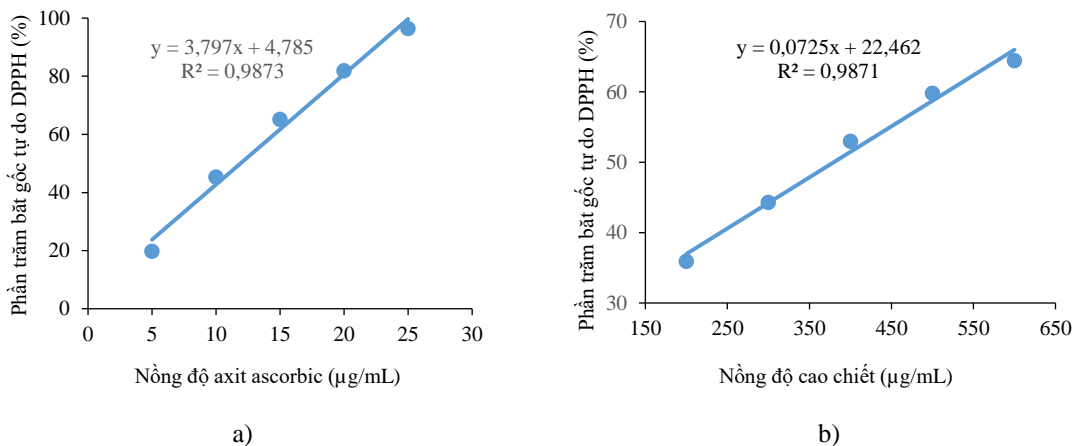
Hình 5. Ảnh hưởng của công suất siêu âm đến hàm lượng triterpenoid
 Các chữ cái khác nhau trong cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê theo phân tích ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Khi công suất siêu âm tăng từ 120 lên 480 W, hàm lượng triterpenoid tăng lên đáng kể và cao nhất là 11,33 mg/g CK khi công suất siêu âm đạt 480 W và giảm khi công suất siêu âm tăng lên 600 W. Khi công suất siêu âm càng lớn thì quá trình xâm thực khí càng mạnh, hiệu ứng vi bọt khí của sóng siêu âm thúc đẩy quá trình giải phóng hoạt chất. Năng lượng siêu âm làm tăng dao động bề mặt, tạo ra áp lực lớn giúp thẩm thấu dung môi tốt hơn và tác động đến tế bào vật liệu, tăng khả năng truyền khối tới bề mặt phân cách, các mô tế bào bị phá vỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho triterpenoid khuếch tán vào dung môi nên hàm lượng tăng lên [23]. Tuy nhiên, khi công suất siêu âm vượt quá 480 W, hiệu quả của quá trình trích ly giảm dần do tăng quá mức số lượng bọt khí trong dung môi, điều này làm giảm hiệu quả quá trình truyền năng lượng vào môi trường và làm giảm hàm lượng triterpenoid trích được. Ngoài ra, khi năng lượng tạo sóng siêu âm cao làm cho nhiệt độ trong lòng dung môi tăng cao dẫn đến khả năng phân hủy triterpenoid. Do đó, 480 W là công suất siêu âm phù hợp cho quá trình trích ly triterpenoid từ nấm linh chi.

Như vậy, hàm lượng triterpenoid thu được là 11,33 mg/g CK và kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây rằng enzyme kết hợp với siêu âm thu được hiệu suất cao hơn so với các phương pháp thông thường [24].

3.6. Đánh giá hoạt tính kháng oxy hoá

Hoạt tính kháng oxy hóa của cao nấm linh chi được xác định dựa vào phần trăm bắt gốc tự do DPPH. Khả năng bắt gốc tự do DPPH của nấm linh chi được xác định dựa vào giá trị IC_{50} tại nồng độ mẫu đó ức chế được 50% gốc tự do. Giá trị IC_{50} càng thấp mẫu sẽ có hoạt tính kháng oxy hóa càng cao và ngược lại. Chất chuẩn axit ascorbic được làm đối chứng. Phần trăm bắt gốc tự do DPPH của axit ascorbic và cao chiết được thể hiện ở Hình 6.



Hình 6. Phần trăm bắt gốc tự do DPPH của axit ascorbic (a) và cao chiết (b)

Kết quả chỉ ra khả năng kháng oxy hóa của cao linh chi tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết. Khi tăng nồng độ cao chiết từ 200-600 µg/mL thì khả năng bắt gốc tự do DPPH tăng từ 35,92-64,43%. Từ đó cho thấy khi nồng độ càng cao thì khả năng kháng oxy của cao chiết càng cao. Giá trị IC_{50} của cao chiết là 379,8 µg/mL, cao hơn gần 31,91 lần so với ascorbic acid với IC_{50} là 11,9 µg/mL. Từ kết quả trên, có thể thấy khả năng kháng oxy hóa của cao linh chi chưa cao. Tuy nhiên, so sánh với các nghiên cứu trước đây, IC_{50} của cao linh chi trong nghiên cứu này cao hơn so với cao chiết methanol nấm linh chi có xuất xứ từ Ấn Độ ($IC_{50} = 290$ µg/mL) [25], xấp xỉ với IC_{50} của cao chiết ethanol từ nấm linh chi nguồn gốc Việt Nam trích ly bằng phương pháp siêu âm với giá trị IC_{50} trong nghiên cứu là 347,13 µg/mL [26]. Ngoài ra, khả năng tiếp cận steric đến vị trí gốc DPPH để ức chế cũng xảy ra, axit béo chuỗi dài hoặc các phân tử lớn

có nhiều vòng, chuỗi dài, cấu trúc phân nhánh có thể làm giảm khả năng tiếp xúc và phản ứng với các gốc tự do, do đó làm giảm hoạt tính chống oxy hóa [27].

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, triterpenoid được trích ly thành công từ nấm linh chi bằng phương pháp enzyme có hỗ trợ siêu âm (ultrasound-assisted enzyme extraction - UAEE). Với các điều kiện trích ly là hàm lượng enzyme 2,5%, tỷ lệ dung môi: nguyên liệu là 20:1 mL/g, nhiệt độ 60 °C, thời gian 60 phút và công suất siêu âm 480 W thu được hàm lượng triterpenoid cao nhất đạt 11,33 mg/g CK. Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết thu nhận ở điều kiện tối ưu được đánh giá khả năng bắt gốc tự do DPPH và giá trị IC₅₀ là 379,8 µg/mL. Do đó, UAEE có thể được coi là một phương pháp trích ly thích hợp và hiệu quả đối với triterpenoid từ nấm linh chi và mở rộng hướng nghiên cứu sâu hơn liên quan đến kỹ thuật trích ly hiện đại này.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ đề tài mã số B2019-20-02. Chúng tôi xin cảm ơn Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM đã hỗ trợ thời gian, phương tiện và cơ sở vật chất cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyen A.N., Johnson T.E., Jeffery D.W., Danner L., and Bastian, S.E. - A cross-cultural examination of Australian, Chinese and Vietnamese consumers' attitudes towards a new Australian wine product containing *Ganoderma lucidum* extract. *Food Research International*, **115** (2019) 393-399.
2. Chen X., Zhang X., Ma Y., Deng Z., Geng C., and Chen J. - Iridal-type triterpenoids with anti-HBV activity from *Iris confusa*, *Fitoterapia* **129** (2018) 126-132.
3. Eom H.J., Kang H.R., Choi S.U., Kim K.H. - Cytotoxic triterpenoids from the barks of *Betula platyphylla* var. *japonica*, *Chemistry and Biodiversity* **14** (4) (2017) e1600400.
4. Shen S.F., Zhu L.F., Wu Z., Wang G., Ahmad Z., and Chang M.W. - Production of triterpenoid compounds from *Ganoderma lucidum* spore powder using ultrasound-assisted extraction, *Preparative biochemistry and biotechnology* **50** (3) (2020) 302-315.
5. Liang C., Tian D., Liu Y., Li H., Zhu J., Li M., and Xia J. - Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids: Ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X and Y, *European Journal of Medicinal Chemistry* **174** (2019) 130-141.
6. Xia Q., Zhang H., Sun X., Zhao H., Wu L., Zhu D., and She G. - A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from *Ganoderma* spp., *Molecules* **19** (2014) 17478-17535.
7. Cheok C.Y., Salman H.A.K., and Sulaiman R. - Extraction and quantification of saponins: A review, *Food Research International* **59** (2014) 16-40.
8. Dat T.D., Viet N.D., My P.L.T., Linh N.T., Thanh V.H., Linh N.T.T., and Hieu N.H. - The application of ethanolic ultrasonication to ameliorate the triterpenoid content extracted from Vietnamese *Ganoderma lucidum* with the examination by gas chromatography, *ChemistrySelect* **6** (10) (2021) 2590-2606.
9. Sit N., Deka S.C., and Misra S. - Combined effect of ultrasound and enzymatic pretreatment on yield and functional properties of taro (*Colocasia esculenta*) starch, *Starch* **66** (11-12) (2014) 959-967.

10. da Silva S. B., dos Santos Garcia V. A., Arroyo P. A., and da Silva C. - Ultrasound-assisted extraction of radish seed oil with methyl acetate for biodiesel production, *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **95** (11) (2017) 2142-2147.
11. Nadar S.S., Rao P., and Rathod V. K. - Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review, *Food Research International* **108** (2018) 309-330.
12. Chakraborty S., Uppaluri R., and Das C. - Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) process for the recovery of bioactive compounds from bitter melon using response surface methodology (RSM), *Food and Bioprocess Technology* **120** (2020) 114-122.
13. Vazquez-Rodriguez B., Gutierrez-Urbe J.A., Antunes-Ricardo M., Santos-Zea L., and Cruz-Suarez L.E. - Ultrasound-assisted extraction of phlorotannins and polysaccharides from *Silvetia compressa* (Phaeophyceae), *Journal of Applied Phycology* **32** (2) (2020) 1441-1453.
14. My P.L.T., My H.T.K., Phuong N.T.X., Dat T.D., Thanh V.H., Nam H.M., and Hieu N.H. - Optimization of enzyme-assisted extraction of ginsenoside Rb1 from Vietnamese *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen roots and anticancer activity examination of the extract, *Separation Science and Technology* **56** (10) (2021) 1687-1698.
15. Chen Y., Xie M.Y., and Gong X.F. - Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*, *Journal of Food Engineering* **81** (1) (2007) 162-170.
16. Thanh V.H., Le Thao My P., Do Dat T., Viet N. D., Phuc N.C.M., Thao N. H., and Hieu N.H. - Integrating of aqueous enzymolysis with ethanolic ultrasonication to ameliorate cordycepin content from Vietnamese *Cordyceps militaris* and biological analysis of extracts, *Chemistry Select* **6** (1) (2021) 16-31.
17. Mạc Xuân Hòa, Ngô Duy Anh Triết - Nghiên cứu thu nhận saponin từ củ đẳng sâm (*Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf) bằng phương pháp trích li có hỗ trợ của enzyme và sóng siêu âm, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Trà Vinh* **12** (2020) 83-91.
18. Yanik D.K. - Alternative to traditional olive pomace oil extraction systems: Microwave-assisted solvent extraction of oil from wet olive pomace, *LWT* **77** (2017) 45-51.
19. d'Alessandro L.G., Kriaa K., Nikov I., and Dimitrov K. - Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry, *Separation and Purification Technology* **93** (2012) 42-47.
20. Sousa A.D., Maia A.I.V., Rodrigues T.H. S., Canuto K.M., Ribeiro P.R.V., Pereira R.D.C.A., de Brito E.S. - Ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus amarus* and its composition evaluation by UPLC-QTOF, *Industrial Crops and Products* **79** (2016) 91-103.
21. Celli G.B., Ghanem A., and Brooks M.S.L. - Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from haskap berries (*Lonicera caerulea* L.) using Response Surface Methodology, *Ultrasonics Sonochemistry* **27** (2015) 449-455.
22. Cai C., Ma J., Han C., Jin Y., Zhao G., and He X. - Extraction and antioxidant activity of total triterpenoids in the mycelium of a medicinal fungus, *Sanghuangporus sanghuang*, *Scientific Reports* **9** (1) (2019) 1-10.
23. Patist A., and Bates D. - Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production, *Innovation Food Science and Emerging Technologies* **9** (2008) 147-154.

24. Hwang A.Y., Yang S.C., Kim J., Lim T., Cho H., and Hwang K.T. - Effects of non-traditional extraction methods on extracting bioactive compounds from chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compared with hot water extraction, *LWT* **110** (2019) 80-84.
25. Rani P., Lal M.R., Maheshwari U., and Krishnan S. - Antioxidant potential of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher basidiomycetes) cultivated on *Artocarpus heterophyllus* sawdust substrate in India, *International Journal of Medicinal Mushrooms* **17** (12) (2015) 1171-1177.
26. Lin M. S., Yu Z. R., Wang B. J., Wang C. C., Weng Y. M., and Koo M. - Bioactive constituent characterization and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* extract fractionated by supercritical carbon dioxide, *Sains Malaysiana* **44** (12) (2015) 685-1691.
27. Xie J., and Schaich K.M. - Re-evaluation of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62** (19) (2014) 4251-4260.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF FACTORS AFFECTING THE EXTRACTION OF TRITERPENOIDS FROM *Ganoderma lucidum* BY ULTRASOUND-ASSISTED ENZYMATIC EXTRACTION

Nguyen Minh Anh^{1,2,3}, Phan Nguyen Cam Chuong^{1,2,3}, Nguyen Duc Viet^{1,2,3},
Tran Do Dat^{1,2,3}, Lu Thi Mong Thy^{1,4}, Huynh Ngoc Oanh^{2,3},
Hoang Minh Nam^{1,2,3}, Mai Thanh Phong^{1,2,3}, Nguyen Huu Hieu^{1,2,3*}

¹VNU-HCM Key Laboratory of Chemical Engineering and Petroleum Processing
(Key CEPP Lab), Ho Chi Minh City University of Technology (HCMUT)

²Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh City University of Technology (HCMUT)

³Vietnam National University Ho Chi Minh City (VNU-HCM)

⁴Ho Chi Minh City University of Food Industry

*Email: nhhieubk@hcmut.edu.vn

Triterpenoids in *Ganoderma lucidum* (*G. lucidum*) are known for their outstanding biological activities such as antioxidant, antibacterial, anticancer, and antidiabetes. The aim of this study was to provide suitable conditions to obtain the highest-triterpenoid *G. lucidum* by ultrasonic-assisted enzyme extraction (UAEE) method. Therefore, the study investigated the conditions affecting the extraction process such as enzyme concentration (%), solvent: material ratio (mL/g), temperature (°C), extraction time (hour), and ultrasonic power (W), according to the single-factor experiment. The results showed that the obtained triterpenoid content was 11.33 mg/g of dry matter with enzyme concentration of 2.5 %, solvent: material ratio of 20:1 mL/g, the temperature of 60 °C, 60 min of ultrasonic time, and ultrasonic power of 480 W. The free radical scavenging ability of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl of the extract with an IC₅₀ value of 379.8 µg/mL. The UAEE method is considered a green approach in extracting high-quality triterpenoid mushrooms, suitable for applications in pharmaceutical technology and functional foods.

Keywords: Antioxidant activity, *Ganoderma lucidum*, triterpenoids, ultrasound-assisted enzymatic extraction.