



## TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH TRÍCH LY POLYSACCHARIDE VÀ TANNIN TRONG NẤM LINH CHI ĐỎ (*Ganoderma lucidum*)

Phạm Bảo Trương<sup>1</sup> và Nguyễn Minh Thủy<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cao học CNTP K19, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 15/08/2014

Ngày chấp nhận: 26/02/2015

### Title:

Effects of temperature and time on extraction of polysaccharide and tannins from red lingzhi (*Ganoderma lucidum*)

### Từ khóa:

Nấm linh chi, nhiệt độ, thời gian, polysaccharide, tannin

### Keywords:

Lingzhi mushroom, temperature, time, polysaccharides, tannins

### ABSTRACT

The effects of temperature (70÷130°C) and extraction time (15÷90 minutes) on the polysaccharide and tannin content of red lingzhi were studied. Optimizing extraction process was realized based on the experimental design of times and temperatures. The results showed that temperature of 130°C and extraction time of 30 minutes produced the highest polysaccharide content (684.1 ±14.5 mg/l). Meanwhile, the highest tannin content (630.9 ±18.2 mg/l) achieved by implementing the extraction process at temperature of 120°C for 45 minutes. A response surface model to describe the combined temperature and time effects on the extraction of polysaccharide (or tannin) content was presented.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện trên cơ sở khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ (70÷130°C) và thời gian trích ly (15÷90 phút) đến hàm lượng polysaccharide và tannin trong nấm linh chi đỏ. Tối ưu hóa quy trình trích ly được thực hiện dựa trên bố trí thí nghiệm về thời gian và nhiệt độ. Kết quả nghiên cứu cho thấy nhiệt độ 130°C và thời gian trích ly 30 phút cho hàm lượng polysaccharide trong nước linh chi cao nhất (684,1 ± 14,5 mg/l). Trong khi đó, hàm lượng tannin cao nhất (630,9 ±18,2 mg/l) đạt được khi thực hiện quá trình trích ở nhiệt độ 120°C và thời gian 45 phút. Mô hình bề mặt đáp ứng diễn tả ảnh hưởng của kết hợp nhiệt độ và thời gian trích ly đến hàm lượng polysaccharide (hoặc tannin) được xác định.

## 1 GIỚI THIỆU

Nấm linh chi (*ganoderma lucidum*) cung cấp một lượng đáng kể các chất có hoạt tính sinh học như polysaccharide (giàu  $\beta$ -glucan), tannin, triterpenoid, steroid, saponin... Trong đó, polysaccharide được xem là nhóm chất rất quan trọng bởi vì chúng có khả năng chống lại tế bào ung thư (Sakai và Chihara, 1995) và tannin là nhóm chất có khả năng chống oxy hóa rất cao. Việc trích ly các hoạt chất sinh học có trong nấm linh chi phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố như loại dung môi, nhiệt độ trích ly, thời gian trích ly...

trong tất cả các loại dung môi thì nước được xem là loại dung môi tốt nhất cho quá trình trích ly bởi vì nước không độc hại, không dễ cháy, giá thành rẻ và có thể ứng dụng trong sản xuất thực phẩm một cách dễ dàng (Herrer *et al.*, 2006). Tùy thuộc vào điều kiện nhiệt độ có thể trích ly được các nhóm chất khác nhau bao gồm các hợp chất phân cực được trích ly ở nhiệt độ thấp và các hợp chất không phân cực được trích ly ở nhiệt độ cao (trên 100°C). Trích ly ở nhiệt độ dưới 100°C sẽ xảy ra quá trình hòa tan các phân tử polysaccharide mạch ngắn và tannin hòa tan, ngược lại trích ly trên 100°C sẽ xảy

ra quá trình hòa tan các phân tử hemicellulose (Sattler *et al.*, 2008) và tannin không hòa tan. Nghiên cứu của Askin *et al.* (2007) cho rằng việc tăng nhiệt độ trích ly trên 100°C sẽ làm tăng đáng kể hàm lượng polysaccharide trong nấm linh chi đỏ, tuy nhiên nhiệt độ trích ly không được vượt quá 200°C do quá trình phân hủy các hợp chất hữu cơ xảy ra, đặc biệt là polysaccharide. Bên cạnh đó, tannin cũng là nhóm chất có nhiệt độ phân hủy không ổn định tùy thuộc vào loại tannin và điều kiện môi trường. Mục tiêu mà đề tài hướng tới là chọn nhiệt độ và thời gian trích ly tối ưu nhằm thu được hàm lượng hoạt chất sinh học cao nhất, trong đó trọng tâm là 2 nhóm chất polysaccharide và tannin để có thể ứng dụng hiệu quả trong sản xuất các sản phẩm có liên quan.

**2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**2.1 Chuẩn bị mẫu và bố trí thí nghiệm**

Nấm linh chi đỏ đã cắt mỏng có độ ẩm trong

**Bảng 1: Tổ hợp các nghiệm thức thực hiện**

Nhiệt độ trích ly (°C)	Thời gian trích ly (phút)					
	15	30	45	60	75	90
70	x	x	x	x	x	x
80	x	x	x	x	x	x
90	x	x	x	x	x	x
100	x	x	x	x	x	x
110	x	x	x	x	-	-
120	x	x	x	-	-	-
130	x	x	-	-	-	-

Dấu (X) là các nghiệm thức được thực hiện, dấu (-) là các nghiệm thức không thực hiện do điều kiện thiết bị

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên theo tổ hợp giữa nhiệt độ trích ly 70÷130°C (cách nhau 10°C) và thời gian trích ly 15÷90 phút (cách nhau 15 phút) (Bảng 1). Cân chính xác 10 gr nấm linh chi đã nghiền mịn và cho vào túi vải có kích thước lỗ lọc < 0,5 mm. Bổ sung 500 ml nước cất (tỷ lệ nấm linh chi và nước được chọn trong nghiên cứu đồng thời của nhóm tác giả) và cho tất cả vào bình trích ly. Thực hiện các thí nghiệm theo nhiệt độ và thời gian đã bố trí.

**2.2 Phân tích mẫu**

Các hợp chất có hoạt tính sinh học trong nấm linh chi đỏ được phân tích bao gồm polysaccharide (giàu β-glucan) và tannin.

Định lượng polysaccharide (g/l) theo phương pháp phenol - acid sulfuric đặc (Foster *et al.*, 1961), đo độ hấp thụ dung dịch tại bước sóng 488 nm so với đường chuẩn glucose (Harshal và Priscilla, 2011).

khoảng 8-10% (Hình 1) (cơ sở sản xuất nấm linh chi Cát Sơn, 42 Đội Cần - Bảo Lộc, Lâm Đồng).

Thiết bị sử dụng cho nghiên cứu bao gồm: máy nghiền cắt (2 lưỡi dao), bể điều nhiệt (waterbath), nồi áp suất. Bình trích ly chịu nhiệt trên 100°C (bình trung tính Schott Duran, Đức, chịu được áp suất và chân không từ 1 – 1,5 bar - ISO 4796-1, chống sốc nhiệt 30 K và nhiệt độ tối đa 140°C) được sử dụng.



**Hình 1: Nấm linh chi đỏ dạng nguyên tai và cắt mỏng**

Hàm lượng tannin được định lượng theo g/l dựa vào phản ứng oxy hóa khử KMnO<sub>4</sub> với chỉ thị indigocarmin (Muller và Allan, 1992).

**2.3 Phân tích thống kê**

Phân tích thống kê (STATGRAPHIC) được sử dụng để chọn mô hình phù hợp cho các dữ liệu thu thập. Mô hình (1) được đề xuất (giá trị Y) trong trường hợp này:

$$Y = b_0 + b_n X_n + b_{nn} X_n^2 + b_{nm} X_n X_m \tag{1}$$

Trong đó:  $b_0$  là hệ số;  $b_n$ ,  $b_{nn}$  và  $b_{nm}$  là các hệ số bậc 1, bậc 2 của phương trình hồi quy;  $X_n$ ,  $X_m$  là các giá trị của biến độc lập.

Để chọn được các điều kiện tối ưu, phân tích hồi quy đa biến được áp dụng diễn tả sự thay đổi hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học (polysaccharide và tannin) của nấm linh chi được xác định là biến phụ thuộc vào nhiệt độ và thời gian trích ly được ghi nhận (ký hiệu là  $X_1$  và  $X_2$

tương ứng). Kiểm định sự tương thích của dữ liệu theo mô hình và thực nghiệm được thực hiện. Để xác định chính xác giá trị cực đại (giá trị tối ưu) của phương trình hồi quy đa biến có thể áp dụng tính chất đạo hàm, tìm điểm dừng của mô hình, lập bảng biến thiên bao gồm các điểm dừng và các điểm quan tâm nhằm tìm ra điểm cực đại của phương trình (giá trị tối ưu lý thuyết).

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian trích ly đến hàm lượng polysaccharide

##### 3.1.1 Nhiệt độ trong khoảng 70÷100°C

Kết quả thống kê cho thấy khi tăng nhiệt độ trích ly từ 70-100°C thì hàm lượng polysaccharide cũng tăng có ý nghĩa (Bảng 2). Khi thời gian trích ly tăng từ 15 đến 60 phút thì hàm lượng polysaccharide trong dịch cũng tăng, hàm lượng này cũng không tăng thêm khi trích ly với thời

gian dài hơn (60 đến 90 phút). Tuy nhiên, hàm lượng này tăng có ý nghĩa thống kê trong khoảng nhiệt độ trích ly được thực hiện (70-90°C). Ở nhiệt độ này đã xảy ra quá trình trích ly các phân tử polysaccharide hòa tan mà chủ yếu là polysaccharide peptide với khối lượng phân tử khoảng  $5 \times 10^5$  Da. Phân tử polysaccharide peptide được cấu tạo từ các phân tử polysaccharide và các amino acid, trong đó phần polysaccharide bao gồm glucose, galactose, arabinose, xylose và mannose, các phân tử liên kết với nhau thông qua liên kết  $\beta$ -glucoside. Khoảng 17 loại acid amin liên kết với các phân tử polysaccharide (Chan *et al.*, 2006). Chính các gốc acid amin có tính phân cực làm cho các phân tử hòa tan dễ dàng hơn khi tăng nhiệt độ. Do đây là quá trình trích ly các phân tử chất tan nên thời gian trích ly kéo dài cũng làm tăng hàm lượng polysaccharide hòa tan cho đến khi đạt đến hàm lượng tối ưu.

**Bảng 2: Hàm lượng polysaccharide (mg/l) trong dịch linh chi theo nhiệt độ (70÷100°C) và thời gian trích ly (15÷90 phút)**

Nhiệt độ trích ly (°C)	Thời gian trích ly (phút)						Trung bình
	15	30	45	60	75	90	
70	250,2	260,2	310,6	383,0	392,2	416,0	330,4 <sup>a</sup>
80	249,8	259,6	322,3	415,3	407,4	447,3	350,3 <sup>b</sup>
90	256,1	293,3	459,1	458,5	459,0	446,9	395,5 <sup>c</sup>
100	391,2	420,4	466,9	477,6	483,1	470,7	451,6 <sup>d</sup>
Trung bình	286,8 <sup>a</sup>	308,4 <sup>b</sup>	389,7 <sup>c</sup>	433,6 <sup>d</sup>	435,4 <sup>d</sup>	445,2 <sup>d</sup>	

Ghi chú: Các chữ trong cùng một cột hoặc một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các trung bình nghiệm thức (độ tin cậy 95%)

Tương quan giữa hàm lượng polysaccharide với nhiệt độ và thời gian trích ly có thể được diễn tả theo phương trình 2.

$$Y = 1474,08 + 0,0015 X_1^3 - 0,0001 X_2^3 - 0,0051 X_1^2 X_2 - 0,0002 X_1 X_2^2 + 0,8421 X_1 X_2 - 25,946 X_1 - 29,306 X_2 \quad (2)$$

Trong đó Y là hàm lượng polysaccharide (mg/l), X<sub>1</sub> là nhiệt độ trích ly (°C) và X<sub>2</sub> là thời gian trích ly (phút).

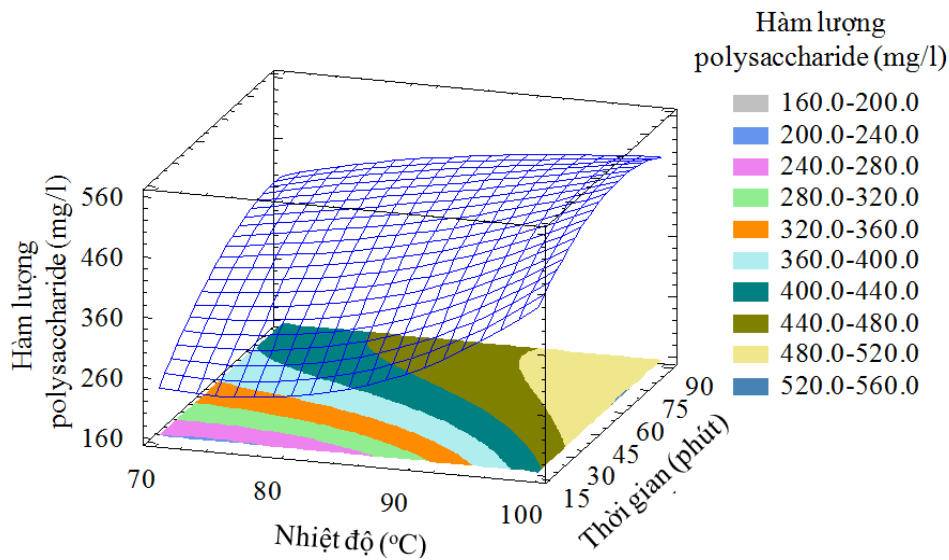
Mô hình bề mặt đáp ứng (Hình 2) cho thấy ảnh hưởng đồng thời của nhiệt độ và thời gian trích ly đến hàm lượng polysaccharide (mg/l) trong dịch trích.

Để xác định thời gian trích ly tối ưu ứng với nhiệt độ tới hạn 100°C, có thể thay X<sub>1</sub> = 100°C vào phương trình 2 và thu được phương trình 3.

$$Y = 380,52 - 0,0001 X_2^3 - 0,0200 X_2^2 + 3,9037 X_2 \quad (3)$$

Trong đó Y là hàm lượng polysaccharide (mg/l), X<sub>2</sub> là thời gian trích ly (15÷90 phút).

Lấy đạo hàm Y' của phương trình 3, cho Y'=0, tìm được 2 điểm dừng X<sub>21</sub>=-198,8 và X<sub>22</sub> = 65,5 (phút). Dựa vào kết quả xét dấu (thể hiện ở Bảng 3) cho thấy thời gian và nhiệt độ trích ly tương ứng là 65,5 phút và 100°C, hàm lượng polysaccharide đạt được cao nhất. Nhiệt độ trích từ 70 đến 100°C chỉ có thể ly trích được các phân tử polysaccharide mạch ngắn. Sau thời gian trích ly 65,5 phút thì hàm lượng polysaccharide sẽ không tăng do quá trình trích ly hầu như đã xảy ra hoàn toàn và thời gian trích ly kéo dài có thể gây ra sự phân hủy các polysaccharide mạch ngắn có cấu trúc không bền vững và hậu quả có thể làm cho hàm lượng polysaccharide giảm.



**Hình 2: Biểu đồ bề mặt đáp ứng thể hiện tương quan giữa nhiệt độ và thời gian trích ly đến hàm lượng polysaccharide (mg/l) trong khoảng nhiệt độ 70-100°C**

**Bảng 3: Biến thiên của hàm lượng polysaccharide theo thời gian**

<b>X<sub>2</sub> (phút)</b>	-198,8	15	65,5	90
<b>Y'</b>	0	+	0	-
<b>Y (mg/l)</b>	-402,6	434,2	549,8	496,9

Trong khoảng nhiệt độ trích ly 70÷100°C và thời gian trích ly 15÷90 phút, hàm lượng polysaccharide được tính bằng cách thay giá trị X<sub>1</sub> € (70÷100) và X<sub>2</sub> € (15÷90) vào phương trình 2. Phương trình tương quan giữa hàm lượng polysaccharide được tính theo phương trình 2 và hàm lượng polysaccharide thực nghiệm có hệ số tương quan khá cao (R<sup>2</sup>=0,90), cho phép sử dụng mô hình tính toán để ước lượng hàm lượng polysaccharide theo nhiệt độ (70÷100°C) và thời gian trích ly (15÷90 phút).

**3.1.2 Nhiệt độ trong khoảng 110-130°C**

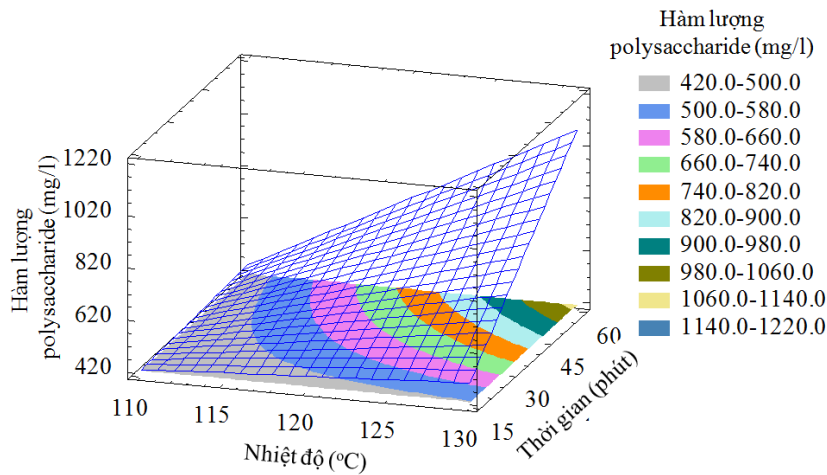
Trong khoảng nhiệt độ từ 110 đến 130°C, hàm lượng polysaccharide tương quan với nhiệt độ và thời gian trích ly được diễn tả theo phương trình 4 (hệ số tương quan R<sup>2</sup>=0,942).

$$Y = 1072,94 - 5,99 X_1 - 68,65 X_2 + 0,63 X_1 X_2 \quad (4)$$

Trong đó Y là hàm lượng polysaccharide (mg/l), X<sub>1</sub> là nhiệt độ trích ly (°C) và X<sub>2</sub> là thời gian trích ly (phút).

Kết quả thể hiện trên mô hình bề mặt đáp ứng (Hình 3) cho thấy ở nhiệt độ 110°C, khi tăng thời

gian trích ly từ 15 đến 60 phút thì hàm lượng polysaccharide tăng rất ít. Tuy nhiên, hàm lượng polysaccharide lại tăng rất mạnh khi trích ly ở nhiệt độ 120 và 130°C khi thời gian trích ly tăng từ 15 đến 60 phút. Nguyên nhân tăng cao hàm lượng này có thể do nhiệt độ cao đã tạo điều kiện tốt cho quá trình trích ly thêm phần lớn các phân tử hemicellulose (Sattler *et al.*, 2008). Những phân tử này có cấu trúc phân nhánh nên có thể bị thủy phân thành các phân tử có khối lượng nhỏ hơn (Yu *et al.*, 2008) khi xử lý ở nhiệt độ cao. Do vậy ở nhiệt độ trên 120°C, ngoài trích ly các phân tử hòa tan như polysaccharide-peptide, còn có thể ly trích thêm hemicellulose trong thành tế bào (Sattler *et al.*, 2008). Đồng thời quá trình trích ly ở nhiệt độ cao sẽ làm cho kích thước phân tử của các hợp chất polysaccharide nhỏ hơn. Kết quả nghiên cứu của Matsunaga *et al.* (2013) cho rằng ở nhiệt độ 135°C kích thước của polysaccharide trong khoảng 0,5-6 μm (2 μ chiếm tỷ lệ cao nhất) và khi tăng nhiệt độ lên 170°C thì kích thước của polysaccharide sẽ dao động trong khoảng 0,5-3 μm (1μ chiếm tỷ lệ cao nhất). Thành phần polysaccharide hòa vào trong dịch trích ly nằm linh chi ở nhiệt độ cao phần lớn là β-glucan với cấu trúc phân tử rất nhỏ (Askin, 2007). Trong khoảng nhiệt độ trích ly 110÷130°C và thời gian trích ly 15÷60 phút, hàm lượng polysaccharide dự đoán có thể được tính bằng cách thay giá trị X € (110÷130) và Y € (15÷60) vào phương trình 4.



**Hình 3: Biểu đồ bề mặt đáp ứng thể hiện tương quan giữa nhiệt độ và thời gian trích ly đến hàm lượng polysaccharide (mg/l) trong khoảng nhiệt độ 110-130°C**

**Bảng 4: Biến thiên hàm lượng polysaccharide theo nhiệt độ và thời gian trích ly**

<b>X<sub>1</sub> (°C)</b>	<b>108,9</b>	110	110	120	130
<b>X<sub>2</sub> (phút)</b>	<b>9,5</b>	15	30	30	30
<b>Y'(X<sub>1</sub>)</b>	0	+	+	+	+
<b>Y'(X<sub>2</sub>)</b>	0	+	+	+	+
<b>Y (mg/l)</b>	420,22	423,79	433,54	562,64	691,74

Dựa vào kết quả xét dấu hàm số ở Bảng 4, có thể thấy hàm số Y là hàm tăng trong khoảng nhiệt độ từ 110-130°C, vì vậy hàm lượng polysaccharide sẽ tăng khi tăng nhiệt độ hoặc thời gian trích ly. Tuy nhiên, việc gia tăng nhiệt độ sẽ xảy ra quá trình phân hủy các hợp chất hữu cơ, trong đó có cả polysaccharide. Kết quả nghiên cứu của Askin *et al.* (2007) cho rằng khi tăng nhiệt độ trên 200°C và giữ nhiệt trên 30 phút, hàm lượng các chất hữu cơ (polysaccharide) giảm mạnh. Kết quả thực nghiệm cho thấy hàm lượng polysaccharide cao nhất (684,1±14,5 mg/l) khi thực hiện quá trình trích ly ở 130°C trong thời gian 30 phút, kết quả này phù hợp

**Bảng 5: Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian trích ly đến hàm lượng tannin (mg/l)**

Nhiệt độ trích ly (°C)	Thời gian trích ly (phút)					Trung bình	
	15	30	45	60	75		
70	179,2 <sup>a</sup>	280,3 <sup>cd</sup>	295,1 <sup>de</sup>	352,9 <sup>fg</sup>	321,8 <sup>ef</sup>	329,6 <sup>f</sup>	293,2 <sup>A</sup>
80	226,1 <sup>b</sup>	333,8 <sup>f</sup>	321,5 <sup>ef</sup>	345,5 <sup>fg</sup>	456,8 <sup>kl</sup>	442,9 <sup>k</sup>	354,5 <sup>B</sup>
90	248,1 <sup>bc</sup>	323,9 <sup>ef</sup>	387,0 <sup>h</sup>	374,4 <sup>gh</sup>	485,5 <sup>lm</sup>	471,2 <sup>kl</sup>	381,7 <sup>C</sup>
100	333,1 <sup>f</sup>	469,2 <sup>kl</sup>	506,7 <sup>mn</sup>	555,6 <sup>o</sup>	596,1 <sup>p</sup>	522,3 <sup>n</sup>	497,2 <sup>D</sup>
Trung bình	246,7 <sup>A</sup>	351,8 <sup>B</sup>	377,6 <sup>C</sup>	407,1 <sup>D</sup>	465,0 <sup>E</sup>	441,5 <sup>F</sup>	

Ghi chú: Các chữ thường khác nhau trong cùng một cột hoặc 1 hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức (độ tin cậy 95%)

Các chữ in hoa khác nhau trong cùng một cột hoặc một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các trung bình nghiệm thức (độ tin cậy 95%)

với mô hình dự đoán (hàm lượng polysaccharide là 691,7 mg/l).

Từ phương trình 4, lấy đạo hàm Y' theo X<sub>1</sub> và X<sub>2</sub>. Khi đó Y'(X<sub>1</sub>) = -5,99 + 0,63 X<sub>2</sub> và Y'(X<sub>2</sub>) = -68,65 + 0,63 X<sub>1</sub>. Cho Y'(X<sub>1</sub>) = 0 và Y'(X<sub>2</sub>) = 0, ta có điểm dừng X = 108,9 và Y = 9,5.

Phương trình tương quan giữa hàm lượng polysaccharide dự đoán theo mô hình và thực nghiệm thể hiện hệ số tương quan cao (R<sup>2</sup>=0,939). Như vậy có thể dựa trên mô hình được thiết lập để ước lượng hàm lượng polysaccharide với độ chính xác tương đối cao trong khoảng nhiệt độ trích ly 110÷130°C trong thời gian từ 15÷60 phút.

### 3.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian trích ly đến hàm lượng tannin (mg/l)

Kết quả thống kê cho thấy trong cùng một thời gian trích ly, khi tăng nhiệt độ từ 70÷100°C thì hàm lượng tannin luôn tăng và có khác biệt ý nghĩa (Bảng 5).



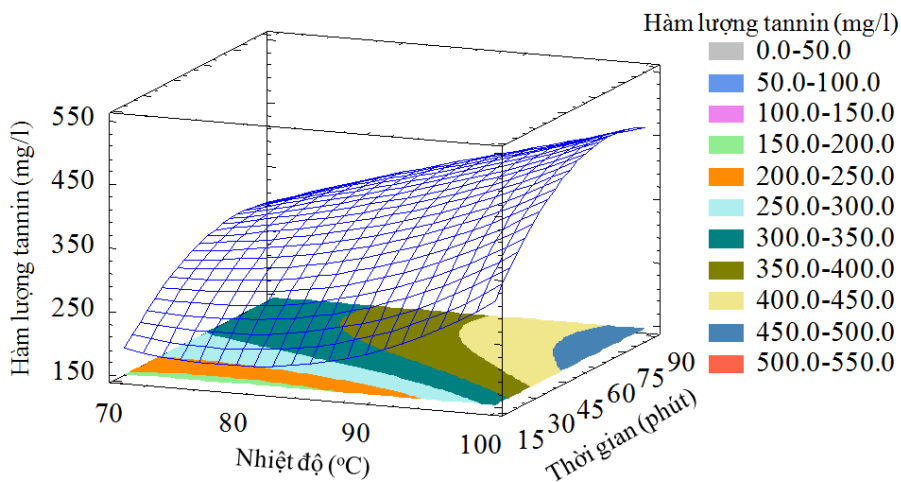
Trong cùng một nhiệt độ trích ly, khi tăng thời gian trích ly thì hàm lượng tannin chỉ tăng trong 75 phút đầu tiên, sau đó không tăng nữa. Với nhiệt độ trích ly từ 70 đến 100°C và thời gian từ 15 đến 90 phút thì tương quan giữa hàm lượng tannin với nhiệt độ và thời gian trích ly được biểu diễn theo phương trình 5 ( $R^2=0,902$ ).

$$Y = 1450,23 + 0,0013 X_1^3 - 0,0039 X_1^2 X_2 - 0,0005 X_1 X_2^2 + 0,7342 X_1 X_2 - 25,3506 X_1 - 27,1415 X_2 \quad (5)$$

Trong đó: Y là hàm lượng tannin (mg/l),  $X_1$  là

nhiệt độ trích ly (°C) và  $X_2$  là thời gian trích ly (phút).

Mô hình bề mặt đáp ứng (Hình 4) cho thấy hàm lượng tannin thu được từ quá trình trích phụ thuộc vào thời gian nhiều hơn là nhiệt độ. Hàm lượng tannin tăng rất chậm khi tăng nhiệt độ trong khoảng 70 đến 100°C, trong khi đó hàm lượng này lại tăng rất nhanh khi thời gian trích ly tăng trong khoảng 15 đến 90 phút. Tuy nhiên khi thời gian trích ly tăng đến một lúc nào đó thì hàm lượng tannin không tăng được nữa và có chiều hướng suy giảm (thể hiện qua độ cong của bề mặt đáp ứng).



**Hình 4: Bề mặt đáp ứng thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian trích ly đến hàm lượng tannin (mg/l) trong khoảng nhiệt độ 70-100°C**

Giá trị cao nhất trên bề mặt đáp ứng có thể tìm được bằng cách thay giá trị  $X_1 = 100^\circ\text{C}$  vào phương trình 5 và thu được phương trình 6.

$$Y = 215,17 + 7,2836 X_2 - 0,05 X_2^2 \quad (6)$$

Trong đó Y là hàm lượng tannin (mg/l) và  $X_2$  thời gian trích ly (phút). Lấy đạo hàm  $Y'$  của phương trình 6. Cho  $Y'=0$ , điểm dừng  $X_2 = 72,8$  được tìm thấy.

**Bảng 6: Biến thiên hàm lượng tannin theo nhiệt độ và thời gian trích ly**

$X_2$ (phút)	15	72,8	90
$Y'$		+	0
$Y$ (mg/l)	313,2	480,4	465,7

Kết quả xét dấu thể hiện ở Bảng 6 cho thấy ứng với nhiệt độ 100°C, khi tăng thời gian trích ly đến 72,8 phút thì hàm lượng tannin sẽ cao nhất (điểm cao nhất của bề mặt đáp ứng Hình 4). Nếu tiếp tục tăng thời gian trích ly thì hàm lượng tannin sẽ

không tăng và có chiều hướng suy giảm nhưng không đáng kể.

Bên cạnh đó, kết quả được trình bày ở Bảng 7 cho thấy các nghiệm thức 1, 5, 7, 8, 10 không thể hiện sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê, điều đó có nghĩa là khi tăng nhiệt độ lên trong khoảng 110-130°C sẽ rút ngắn được thời gian trích ly mà vẫn có thể cho hiệu suất trích tannin tối ưu (Adachi *et al.*, 2013). Kết quả thực nghiệm cho thấy hàm lượng tannin không giảm khi tăng nhiệt độ trong khoảng 110-130°C, chứng tỏ tannin không bị oxy hóa trong quá trình trích ly. Tannin có thể bị oxy hóa khi có mặt của oxy ở nhiệt độ tương đối cao dưới tác dụng của enzyme polyphenol oxydase (Lê Ngọc Tú, 2003). Tuy nhiên, quá trình trích ly thực hiện trong môi trường nước nên có thể hạn chế tiếp xúc tannin với oxy nên có thể làm giảm đáng kể tiến trình oxy hóa. Đồng thời việc tăng nhiệt độ cao sẽ góp phần vô hoạt enzyme polyphenol oxydase, vì vậy tannin đã thiếu điều kiện cần và đủ để quá trình oxy hóa có thể xảy ra.

**Bảng 7: Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian trích ly đến hàm lượng tannin trong dịch linh chi**

Thí nghiệm thứ	Tổng hợp thí nghiệm thứ		Hàm lượng tannin (mg/l)
	[Nhiệt độ (°C) – Thời gian (phút)]		
1	100 - 75 (gần với điểm tối ưu của bề mặt đáp ứng Hình 6)		596,1 <sup>d</sup>
2	110 - 15		401,7 <sup>a</sup>
3	110 - 30		544,0 <sup>c</sup>
4	110 - 45		532,1 <sup>c</sup>
5	110 - 60		596,7 <sup>d</sup>
6	120 - 15		428,1 <sup>a</sup>
7	120 - 30		620,0 <sup>d</sup>
8	120 - 45		630,9 <sup>d</sup>
9	130 - 15		479,1 <sup>b</sup>
10	130 - 30		615,2 <sup>d</sup>

Ghi chú: Các số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các trung bình thí nghiệm mang chữ số mũ giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

Ở các khoảng nhiệt độ và thời gian này, hàm lượng tannin dự đoán được tính bằng cách thay giá trị  $X_1 \in (70 \div 100)$  và  $X_2 \in (15 \div 90)$  vào phương trình 5. Phương trình tương quan giữa hàm lượng tannin được ước tính và thực nghiệm có hệ số xác định tương quan khá cao ( $R^2=0,901$ ). Như vậy, có thể dựa trên mô hình dự đoán để ước lượng hàm lượng tannin trong khoảng nhiệt độ trích ly từ 70 đến 100°C với thời gian từ 15÷90 phút.

#### 4 KẾT LUẬN

Có thể thiết lập được tương quan tốt giữa nhiệt độ và thời gian trích ly với hàm lượng polysaccharide (hoặc tannin) ở 2 khoảng nhiệt độ khác nhau (70÷100°C và 110÷130°C). Nhiệt độ trích ly thấp hơn 100°C yêu cầu thời gian trích ly dài hơn để có thể đạt được giá trị hàm lượng polysaccharide và tannin tối ưu. Tuy nhiên khi tăng nhiệt độ cao hơn 100°C thì thời gian trích ly ngắn mà vẫn đảm bảo được hiệu suất trích tối ưu (hàm lượng cao nhất của tannin và polysaccharide đạt được). Kết quả thực nghiệm cho thấy nhiệt độ trích ly 130°C trong 30 phút cho hàm lượng polysaccharide tối ưu (684,1±14,5 mg/l), trong khi hàm lượng tannin tối ưu 630,9±18,2 (mg/l) ở nhiệt độ trích ly 120°C trong thời gian 45 phút. Mặc dù, nhiệt độ cao tốt cho quá trình trích ly (như đã đề cập), tuy nhiên sẽ hạn chế trong việc chọn lựa thiết bị và hao tổn năng lượng khi thực hiện ở nhiệt độ cao hơn 130°C, do vậy tùy theo mục đích sử dụng mà có thể lựa chọn nhiệt độ trích ly và thời gian trích ly tối ưu để sản xuất các sản phẩm từ linh chi.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adachi M, Kowhakul W, Masamoto H and Shigematsu M. 2013. Bioactivities of  $\beta$ -glucan and tannin extracted with superheated

water by using a macchinetta extractor. International Conference on Biology, Environment and Chemistry, 58, pp. 72-75.

2. Askin R, Sasaki M, Goto M. 2007. Sub- and supercritical fluid extraction of bioactive compound from *Ganoderma Lucidum*. Proceeding of International of Symposium on Ecotobia Science, 07, pp. 575-577.
3. Atanassova M, Christova V. 2009. Determination of tannin content by titrimetric method for comparison of different plant species. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 44, pp. 413-415.
4. Chan WK, Law HK, Lin ZB, Lau YL and Chan GC. 2007. Response of human dendritic cells to different immunomodulatory polysaccharides derived from mushroom and barley. International Immunology, 19, pp.891-899.
5. Foster DS and Cornella TS. 1961. Colorimetric Method of Analysis. 1961. Nostrand Company Inc. Princeton New Jersey, 08, pp. 162.
6. Harshal AP, Priscilla MD. 2011. Spectrophotometric estimation of total polysaccharides in *Cassia tora* gum. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 03, pp. 93-95.
7. Lê Ngọc Tú. 2003. Hóa học thực phẩm. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
8. Matsunaga Y, Wahyudiono, Machmudah S, Askin R, Quitain AT, Sasaki M and Goto M. 2013. Hydrothermal extraction and micronization of polysaccharides from *ganoderma lucidum* in a one step process. Bioresources, 8 (01), pp. 461-471.

9. Mizuno T, Sakai T and Chihara G. 1995. Health foods and medicinal usages of mushrooms. *Food Reviews International*, 11, pp. 69-81.
10. Muller HI and Allan AB. 1992. Tannin - their biochemistry and nutritional properties. *Advances in plant cell biochemistry and biotechnology*, 01, pp. 151-217.
11. Sakai T and Chihara G. 1995. Health foods and medicinal usages of mushrooms. *Food Reviews International*, 11, pp. 69-81.
12. Sattler C, Labbe N, Harper D, Elder T, Rials T. 2008. Effects of hot water extraction on physical and chemical characteristics of oriented strand board (OSB) wood flakes. *Clean Soil Air Water*, 36, pp. 674- 681.
13. Scheller HV, Ulvskov P. 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, pp. 263-289.
14. Song T, Pranovich A, Holmbom B, 2012. Hot-water extraction of ground spruce wood of different particle size. *Bioresources*, 7, pp. 4214- 4225.
15. Sye WT. 1991. Improvement method of extraction and high performance liquid chromatographic separation of ganoderic acid from *Ganoderma Lucidum*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 38, pp. 179.
16. Yu Y, Lou X, Wu H, 2008. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. *Energy and Fuels*, 22, pp. 46-60.