

# Một số điều kiện ảnh hưởng đến quá trình tách chiết Lentinan từ nấm hương khô Việt Nam

Hoàng Phương Lan\*, Nguyễn Thị Lan Anh, Nguyễn Hà Việt, Hoàng Danh Dự,  
Lê Đăng Quang, Nguyễn Đức Minh

*Viện Hóa học công nghiệp Việt Nam*

Ngày nhận bài 23/5/2018; ngày chuyển phản biện 30/5/2018; ngày nhận phản biện 2/7/2018; ngày chấp nhận đăng 10/7/2018

## **Tóm tắt:**

Bài báo đề cập việc nghiên cứu khảo sát các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình tách chiết Lentinan từ nấm hương ở Việt Nam với quy mô tách chiết 20 kg nguyên liệu khô/mẻ; trong đó, nước nóng RO được sử dụng làm dung môi tách chiết và etanol 95<sup>o</sup> làm dung môi kết tủa thu hồi sản phẩm. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã dùng phương pháp phenol-sulfuric để xác định hàm lượng Lentinan ( $\beta$ -glucan), nguyên tắc là dựa trên sự hấp thụ tại bước sóng 490 nm của phức chất tạo bởi phenol và cacbohydrate. Kết quả đã xác định được các điều kiện thích hợp để tách chiết Lentinan từ nấm hương khô như sau: tỷ lệ nấm hương khô/nước = 1/2,5 (w/v); nhiệt độ dung môi chiết (nước RO): 100<sup>o</sup>C; thời gian chiết: 80 phút; tỷ lệ dịch chiết/etanol 95<sup>o</sup> = 1/2 (v/v).

**Từ khóa:** Lentinan, nấm hương, polysacarit,  $\beta$ -glucan.

**Chỉ số phân loại:** 2.10

## **Mở đầu**

Lentinan là một  $\beta$ -glucan từ nấm hương, polysacarit mang hoạt tính sinh học. Đây là chất tăng cường miễn dịch mới phổ biến nhất hiện nay.

Lentinan đã được chứng minh là làm tăng sức đề kháng hệ miễn dịch (như tế bào lympho ở máu ngoại vi). Một nghiên cứu tại Nhật Bản cho thấy, những bệnh nhân ung thư đang hóa trị nếu dùng thêm Lentinan thì hiệu quả hóa trị sẽ tăng lên, khả năng sống sót cao hơn và sự tiến triển của ung thư sẽ bị kìm hãm [1, 2]. Vì vậy ở Nhật Bản, Lentinan đã được chấp nhận như một liệu pháp phụ trợ trong tiến trình dùng hóa trị liệu [3]. Hàng năm, Nhật Bản tách chiết ở quy mô công nghiệp cho ra khoảng vài trăm ngàn tấn Lentinan chất lượng cao từ nấm hương, có giá trị lên tới hàng trăm triệu USD [4].

Trong khi đó ở Việt Nam có nguồn nấm hương dồi dào, trồng rất nhiều tại các tỉnh/thành phố nhưng chủ yếu dùng làm thực phẩm mà chưa phát triển để làm nấm dược liệu. Nghiên cứu này đề cập một số điều kiện ảnh hưởng đến quá trình tách chiết Lentinan từ nấm hương khô hướng tới khai thác nguồn nấm hương có sẵn và hy vọng sẽ đưa ra sản phẩm Lentinan chất lượng cao, hàm lượng ổn định, giá thành cạnh tranh để ứng dụng làm thực phẩm chức năng,

góp phần nâng cao giá trị nấm hương của Việt Nam.

## **Vật liệu và phương pháp**

### ***Vật liệu***

- Nấm hương khô (*Lentinula edodes*), độ ẩm  $\leq 15\%$ , thu mua vào khoảng tháng 2/2018 tại Sapa (Lào Cai) và Đà Lạt (Lâm Đồng).

- Tai nấm mặt trên màu nâu hoặc nâu nhạt, mặt dưới có nhiều bản mỏng xếp lại màu ngà. Thịt nấm màu trắng ngà. Cuống hình trụ dài khoảng 0,5-1 cm, màu nâu sáng. Đường kính tai nấm khoảng 2-3 cm. Trung bình 100 g nấm khô có khoảng 25-30 cái nấm. Sử dụng tai nấm và cuống nấm.

- Mẫu được rửa sạch, nghiền nhỏ (khoảng 1-2 mm).

### ***Hóa chất***

Etanol 95<sup>o</sup> (PA); H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (PA), D-glucose (PA), NaOH (PA), đều có nguồn gốc từ Merk (Đức). Nước cất hai lần được điều chế tại phòng thí nghiệm.

### ***Thiết bị***

Máy đo pH HD2002 EDGE (Mỹ), máy ly tâm EBA Hettich (Đức), máy so màu UV UH5300 (Hitachi, Nhật Bản), máy cất chân không IK RV 10 (Đức), máy sấy đông khô VaCo 5 Zirbus (Đức).

\*Tác giả liên hệ: Email: hoanglan75bio@yahoo.com.vn

## Some conditions affecting the Lentinan extraction from dried *Lentinula edodes* in Vietnam

Phuong Lan Hoang\*, Thi Lan Anh Nguyen,  
Ha Viet Nguyen, Danh Du Hoang,  
Dang Quang Le, Duc Minh Nguyen

Vietnam Institute of Industrial Chemistry

Received 23 May 2018; accepted 10 July 2018

### Abstract:

This study presents the investigation of the conditions affecting Lentinan extraction from *Lentinula edodes* in Vietnam. RO hot water was used as the extracting solvent, and ethanol 95<sup>o</sup> was used as a solvent to precipitate recovered product. The scale of the extraction was 20 kg dry material/batch. The authors used the phenol-sulfuric acid method to determine the content of Lentinan ( $\beta$ -glucan) based on the absorption at the 490 nm wavelength of the complex formed by phenol and carbohydrate. The results indicated that the appropriate conditions for extracting Lentinan from dried *Lentinula edodes* were as follows: dried *Lentinula edodes*:water (RO) = 1:2.5 (w/v), temperature of solvent (RO water): 100<sup>o</sup>C, time of extraction: 80 minutes, extract:ethanol 95<sup>o</sup> = 1/2 (v/v).

**Keywords:** Lentinan, *Lentinula edodes*, polysaccharide,  $\beta$ -glucan.

**Classification number:** 2.10

### Phương pháp xác định hàm lượng Lentinan ( $\beta$ -glucan)

Phương pháp phenol-sulfuric xác định Lentinan ( $\beta$ -glucan) dựa trên việc hấp thụ tại bước sóng 490 nm của phức chất tạo bởi phenol và cacbohydrate. Hàm lượng  $\beta$ -glucan được xác định bằng cách so sánh với một đường chuẩn. Sử dụng máy quang phổ hấp thụ, chọn bước sóng 490 nm, xây dựng đường chuẩn, đo các mẫu phân tích. Tùy từng điều kiện, phương pháp phenol-sulfuric có độ chính xác đến  $\pm 2\%$  [5].

### Phương pháp tách chiết Lentinan

Bột nấm hương khô cho vào nước, đun cách thủy ở nhiệt độ nhất định trong một khoảng thời gian, ly tâm loại bỏ bã, thu dịch chiết. Bổ sung từ từ ethanol lạnh 20<sup>o</sup>C vào dịch chiết, xuất hiện kết tủa, để yên khoảng 20 phút. Ly tâm, phần dịch đem cất chân không thu hồi cặn. Phần kết tủa đem

đông lạnh bằng nitơ lỏng (24h), sấy đông khô (30h), thu sản phẩm thô. Sản phẩm thô hòa tan vào nước nóng 100<sup>o</sup>C, ly tâm 5000 vòng/phút để loại bỏ phần không tan, thu phần dịch trong, kết tủa bằng etanol 95<sup>o</sup> ở 20<sup>o</sup>C để qua đêm, ly tâm lấy kết tủa, sấy đông khô (30h), thu được Lentinan, đem phân tích hàm lượng.

Quy mô chiết 20 kg nguyên liệu khô/mẻ. thiết bị chiết bằng inox, dung tích 100 lít, có nắp kín, gia nhiệt tự động.

### Tính toán xác định hàm lượng $\beta$ -glucan

$$\text{Hàm lượng } \beta\text{-glucan (\%)} = \frac{x(g) \times 10^{-3} \times 8}{KLMPT(g)} \times 100$$

Trong đó, x là số gam xác định từ đường chuẩn; 8 là hệ số pha loãng; KLMPT là khối lượng mẫu ban đầu đem phân tích.

Giá trị trung bình được tính từ 3 mẫu song song. Số liệu được xử lý thống kê bằng Microsoft Excel.

### Phương pháp lấy mẫu ngẫu nhiên

- Việc lấy mẫu để khảo sát nguồn nguyên liệu được thực hiện cho từng lô nguyên liệu.

- Khối lượng mỗi mẫu nguyên liệu lấy phải lớn hơn hoặc bằng 100 g và được gắn mã số theo từng lô. Yêu cầu độ ẩm của mẫu nấm hương khô  $\leq 15\%$ .

- Số lượng mẫu nguyên liệu tương ứng khối lượng nguyên liệu: từ 10 kg trở xuống lấy ít nhất 01 mẫu, từ 10-30 kg lấy ít nhất 02 mẫu, từ 30-100 kg lấy ít nhất 03 mẫu.

- Vị trí lấy mẫu: lấy mẫu sau khi đã được nhập kho nguyên liệu hoặc lấy mẫu tại kho của bên bán nguyên liệu.

- Cách lấy mẫu: mẫu được lấy ngẫu nhiên, đảm bảo tính đại diện nhất cho toàn bộ lô nguyên liệu, công khai và khách quan.

### Kết quả và thảo luận

Năm 2013 nhóm tác giả đã nghiên cứu quy trình chiết tách Lentinan từ nấm hương (*Lentinula edodes*) quy mô phòng thí nghiệm 100 g nấm hương khô/mẻ [6]. Quá trình tách chiết được thực hiện trong dung môi là nước và sử dụng ethanol làm dung môi thu hồi sản phẩm. Thiết bị chiết là cốc thủy tinh, nắp hờ, máy khuấy cơ, gia nhiệt bằng bếp cách thủy. Kết quả đã xác định được các thông số công nghệ thích hợp để chiết 100 g mẫu bột nấm hương khô như sau: tỷ lệ bột nấm hương/nước: 1/3 (w/v); nhiệt độ dung môi: 100<sup>o</sup>C; thời gian chiết: 75 phút; nồng độ etanol: 95<sup>o</sup>; tỷ lệ dịch chiết/etanol = 1/2 (v/v); chất chiết Lentinan thu được có hàm lượng  $\geq 43\%$ .

Nhằm hoàn thiện quy trình công nghệ phục vụ cho các

bước triển khai tiếp và để có thể áp dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tế, nhóm tác giả tiếp tục khảo sát kiểm tra lại một số điều kiện tách chiết Lentinan ở quy mô lớn hơn và bổ sung các thông số cần thiết. Cụ thể nghiên cứu quá trình tách chiết với quy mô 20 kg nấm hương khô/mẻ thực hiện trên thiết bị chiết bằng inox, dung tích 100 lít, khuấy đảo, có nắp kín, gia nhiệt tự động.

Các yếu tố chủ yếu ảnh hưởng đến quá trình tách chiết là: tỷ lệ nấm hương/dung môi (nước RO), nhiệt độ dung môi chiết, thời gian chiết, tỷ lệ dịch chiết/etanol 95<sup>o</sup>(v/v), tốc độ khuấy.

Hiệu quả chiết tách Lentinan được đánh giá thông qua khối lượng chất chiết và hàm lượng Lentinan thu được sau quá trình chiết.

#### **Khảo sát tỷ lệ nấm hương khô và nước trong quá trình chiết Lentinan**

Sử dụng nước là dung môi để tách chiết Lentinan từ nấm hương, tỷ lệ nấm hương khô/nước đặc biệt quan trọng trong quá trình tách chiết. Lượng nước ít quá thì Lentinan sẽ không được chiết tách hoàn toàn. Lượng nước quá nhiều thì ở giai đoạn kết tủa thu hồi Lentinan sẽ tốn nhiều etanol, hoặc tốn nhiều năng lượng để cô đặc dịch chiết, làm tăng chi phí, giảm hiệu quả kinh tế.

Tiến hành tách chiết Lentinan với khối lượng mẫu là 20 kg bột nấm hương/mẫu và các tỷ lệ nấm hương khô/nước lần lượt là 1/2, 1/2,5, 1/3, 1/4 (w/v). Sử dụng các điều kiện chiết tách là: nhiệt độ nước RO 100<sup>o</sup>C, thời gian chiết 60 phút, nồng độ etanol 95<sup>o</sup>, tỷ lệ dịch chiết/etanol = 1/2 (v/v), tốc độ khuấy 120 vòng/phút. Kết quả thu được trình bày ở bảng 1.

**Bảng 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm hương khô/nước đến quá trình tách chiết Lentinan quy mô 20 kg/mẻ.**

Tỷ lệ nấm hương khô /nước (w/v)	Lượng nấm hương khô ban đầu (kg)	Khối lượng chất chiết (g)	Hàm lượng Lentinan trong chất chiết (%)
1/2	20	407,91	43,79
<b>1/2,5</b>	<b>20</b>	<b>432,71</b>	<b>45,28</b>
1/3	20	439,12	45,67
1/4	20	439,19	45,69

Qua bảng 1 ta thấy, khối lượng chất chiết và hàm lượng Lentinan tăng theo lượng nước, cụ thể tỷ lệ nấm hương khô/nước (w/v) thay đổi từ 1/2 đến 1/4 thì khối lượng chất chiết tăng từ 407,91-439,19 g, hàm lượng Lentinan tăng từ 43,79 đến 45,69%.

Tuy nhiên, nếu dùng tỷ lệ nấm khô/nước = 1/4 hoặc 1/3

sẽ tốn năng lượng hơn, vì khi đó lượng nước dùng nhiều gấp 3 hoặc 4 lần lượng nguyên liệu nấm, thời gian làm nóng dung môi lâu hơn so với tỷ lệ nấm khô/nước = 1/2,5, đồng thời, thời gian cô đặc dịch chiết sau khi chiết cũng kéo dài hơn, làm tăng chi phí, trong khi đó khối lượng chất chiết (439,12-439,19 g) và hàm lượng Letinan (45,67-45,69%) không tăng hơn nhiều so với kết quả chiết thu được từ tỷ lệ nấm hương khô/nước = 1/2,5 (w/v), hàm lượng Lentinan là 45,28% và khối lượng chất chiết là 432,71 g.

Trước đó nhóm nghiên cứu đã đưa ra kết quả chiết tách Lentinan quy mô phòng thí nghiệm (100 g bột nấm hương/mẫu) với tỷ lệ nấm hương khô/nước thích hợp là 1/3 (w/v) [6]. Kết quả bảng 1 cho thấy, tỷ lệ nấm hương khô/nước = 1/2,5 (w/v) ở quy mô chiết 20 kg nguyên liệu nấm khô/mẻ thấp hơn so với tỷ lệ nấm hương khô/nước quy mô phòng thí nghiệm (100 g bột nấm hương/mẫu). Điều này có thể giải thích: ở quy mô phòng thí nghiệm, thiết bị chiết là cốc thủy tinh, nắp hở, gia nhiệt bằng bếp cách thủy, làm cho lượng dung môi hao hụt một cách đáng kể [6]. Ở quy mô 20 kg nguyên liệu khô/mẻ, thiết bị chiết bằng inox, có nắp kín, gia nhiệt tự động, thời gian gia nhiệt nhanh, ít hao hụt năng lượng ra môi trường xung quanh nên tiết kiệm lượng dung môi chiết (nước) hơn so với quy mô phòng thí nghiệm 100 g nguyên liệu/mẻ.

Patent US 5780097 sử dụng tỷ lệ nấm hương khô/nước = 1/10 (w/v), sau khi chiết ở 80<sup>o</sup>C, người ta cô bớt dịch chiết và bổ sung vào dịch chiết 10% maltodextrin (chất mang), rồi đông khô, tạo ra chế phẩm gọi là bột nấm hương có hàm lượng Lentinan 1-2% [7].

Lựa chọn tỷ lệ nấm hương khô/nước = 1/2,5 (w/v) là phù hợp nhất với quy mô chiết 20 kg nguyên liệu nấm khô/mẻ, giảm thời gian và năng lượng để cô đặc dịch chiết, không bổ sung chất mang, sản phẩm tạo ra là chất chiết chứa hàm lượng Lentinan cao 45,28%.

#### **Khảo sát tốc độ khuấy trong quá trình tách chiết Lentinan**

Tốc độ khuấy trộn nguyên liệu có ảnh hưởng nhiều đến khối lượng chất chiết và hàm lượng Lentinan thu được, vì khuấy trộn làm tăng quá trình khuếch tán, tăng tốc độ chiết. Tốc độ khuấy phù hợp làm giảm thời gian tách chiết, giảm chi phí, tăng hiệu quả kinh tế. Do đó, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của tốc độ khuấy trộn nguyên liệu tới khối lượng chất chiết và hàm lượng Lentinan để tìm ra tốc độ khuấy thích hợp. Với thông số chiết như trên, các tốc độ được khảo sát là: 90 vòng/phút, 110 vòng/phút, 130 vòng/phút, 150 vòng/phút, 170 vòng/phút. Kết quả thể hiện ở bảng 2.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy trong quá trình tách chiết Lentinan.**

Tốc độ khuấy (vòng/phút)	Lượng nấm hương khô ban đầu (kg)	Khối lượng chất chiết (g)	Hàm lượng Lentinan trong chế phẩm (%)
90	20	130,11	13,90
110	20	237,9	27,44
<b>130</b>	<b>20</b>	<b>423,6</b>	<b>48,32</b>
150	20	578,65	35,37
170	20	599,79	34,13

Qua kết quả ở bảng 2 cho thấy, tốc độ khuấy khác nhau có ảnh hưởng khác nhau tới khối lượng chất chiết thu được và hàm lượng Lentinan, trong đó tốc độ khuấy 130 vòng/phút cho hàm lượng Lentinan trong chất chiết cao nhất. Khi tốc độ khuấy là 150-170 vòng/phút, dịch chiết rất khó lọc, mặc dù khối lượng chất chiết rất cao từ 578,65-599,79 g nhưng hàm lượng Lentinan giảm nhiều (35,37-34,13%). Vì vậy tốc độ khuấy 130 vòng/phút là phù hợp cho các nghiên cứu tiếp theo.

**Khảo sát nhiệt độ dung môi chiết thích hợp cho quá trình chiết Lentinan**

Các thông số để tách chiết Lentinan từ nấm hương như trên với nhiệt độ dung môi chiết thay đổi từ 50-100°C. Kết quả ảnh hưởng của nhiệt độ dung môi tới quá trình tách chiết Lentinan được thể hiện trong bảng 3.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ dung môi tới quá trình chiết Lentinan.**

Nhiệt độ dung môi chiết (°C)	Lượng nấm hương khô ban đầu (kg)	Khối lượng chất chiết (g)	Hàm lượng Lentinan trong chất chiết (%)
50	20	68,1	8,22
60	20	96,7	9,63
70	20	160,9	16,72
80	20	310,4	30,62
90	20	313,5	32,62
<b>100</b>	<b>20</b>	<b>424,7</b>	<b>48,36</b>

Qua bảng 3 cho thấy, nhiệt độ dung môi chiết ảnh hưởng rất nhiều đến quá trình chiết tách Lentinan, nếu nhiệt độ dung môi chiết chỉ khoảng 50-60°C hiệu quả chiết rất thấp, khối lượng chất chiết thu được 68,1-96,7 g, hàm lượng Lentinan trong chất chiết chỉ khoảng 8,22-9,63%. Khi nhiệt độ dung môi chiết tăng dần, hiệu quả chiết tách cũng tăng theo. Ở nhiệt độ chiết 90°C, hiệu quả chiết tăng vọt, khối lượng chất chiết thu được là 313,5 g, hàm lượng Lentinan trong chế phẩm thô đạt 32,62%. Ở 100°C, hiệu quả chiết đạt cao nhất, tương ứng với khối lượng chất chiết thu được 424,7 g và hàm lượng Lentinan trong chế phẩm đạt 48,36%.

Nhìn chung, nhiệt độ dung môi ở quy mô chiết 20 kg

nguyên liệu nấm khô/mẻ tương đương nhiệt độ dung môi chiết ở quy mô phòng thí nghiệm (100 g nguyên liệu khô/mẻ).

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Nor Azreen Mohd Jamil và cộng sự (2013) cũng chiết tách Lentinan từ nấm hương bằng nước ở nhiệt độ 100°C và chiết hai lần [8]. Trong khi đó, tác giả Tanaka, patent US5780097 cho rằng quá trình chiết tách Lentinan chỉ nên duy trì ở 85-90°C và bổ sung cyclodextrin vào dịch chiết làm chất mang cho Lentinan [7]. Ngược lại, các tác giả của patent CN 103059162 A lựa chọn nhiệt độ chiết rất cao (140-180°C) để tách chiết Lentinan từ nấm hương trong môi trường kiềm [9].

Nhóm nghiên cứu cho rằng, nhiệt độ nước 100°C là thích hợp nhất để tách chiết Lentinan từ nấm hương vì ở nhiệt độ này Lentinan không bị biến tính. Mặt khác, nhiệt độ chiết cao hơn 100°C để chiết ra các sản phẩm phụ không mong muốn, sản phẩm sau chiết sẽ khó tinh chế.

**Khảo sát thời gian chiết thích hợp cho quá trình tách chiết Lentinan**

Trong quá trình chiết tách cần lựa chọn thời gian chiết thích hợp nhằm nâng cao hiệu quả chiết, đồng thời không làm biến đổi chất lượng và hàm lượng Lentinan.

Tiến hành tách chiết 20 kg mẫu bột nấm hương khô trong điều kiện: dung môi chiết là RO: 50 lít; nhiệt độ dung môi chiết 100°C; thời gian chiết thay đổi từ 20-90 phút, thời gian gia nhiệt: 15 phút; nồng độ etanol: 90%; tỷ lệ dịch chiết/etanol = 1/2 (v/v).

Ảnh hưởng của thời gian chiết tới quá trình tách chiết Lentinan được thể hiện trong bảng 4.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian chiết tới quá trình chiết Lentinan.**

Thời gian chiết (phút)	Lượng nấm hương khô ban đầu (kg)	Khối lượng chất chiết (g)	Hàm lượng Lentinan (%)
50	20	27,6	2,42
60	20	59,1	3,98
70	20	129,2	11,27
<b>80</b>	<b>20</b>	<b>423,6</b>	<b>48,32</b>
90	20	558,3	36,67

Qua bảng 4 cho thấy, nếu thời gian chiết quá ngắn (chỉ khoảng 50 phút), hiệu quả chiết sẽ rất thấp, khối lượng chế phẩm thu được là 27,6 g, hàm lượng Lentinan trong chế phẩm chỉ khoảng 2,42%. Nếu thời gian chiết kéo dài 60 phút, hiệu quả chiết cũng tăng lên rõ rệt, khối lượng chế phẩm thô thu được là 59,1 g, nhưng hàm lượng Lentinan trong chế phẩm chỉ khoảng 3,98%. Thời gian chiết thích hợp nhất ở đây là 80 phút, khi đó hàm lượng Lentinan trong chế phẩm đạt cao nhất (48,32%). Nếu kéo dài thời gian chiết

tới 90 phút, hiệu quả chiết lại giảm, thể hiện ở khối lượng chế phẩm thô thu được rất cao (558,3 g) nhưng hàm lượng Lentinan trong chế phẩm chỉ đạt 36,67%, chứng tỏ nếu kéo dài thời gian chiết sẽ tạo ra sản phẩm bị lẫn nhiều tạp chất hoặc các polysaccharit không mong muốn.

Nhìn chung, thời gian chiết ở quy mô 20 kg nguyên liệu nấm khô/mẻ không chênh lệch so với thời gian chiết ở quy mô phòng thí nghiệm (100 g nguyên liệu khô/mẻ). Tuy nhiên, có sự khác biệt đáng kể về khối lượng chất chiết và hàm lượng Lentinan trong chất chiết ở hai quy mô này. Ở quy mô 20 kg nguyên liệu khô/mẻ, khối lượng chất chiết thu được tăng khoảng 10% và hàm lượng Lentinan trong chất chiết tăng khoảng 7-8% so với quy mô 100 g nguyên liệu khô/mẻ. Có thể ở quy mô chiết 20 kg nguyên liệu khô/mẻ với hệ thiết bị chiết đồng bộ khép kín hơn so với quy mô phòng thí nghiệm, giảm hao hụt nguyên liệu và năng lượng, nên nâng cao được hiệu quả thu hồi sản phẩm chiết. Tác giả Nor Azreen Mohd Jamil và cộng sự (2013) tách Lentinan từ 300 g nấm hương khô bằng nước nóng và dung dịch kiềm cần 25,5 giờ liên tục để tinh chế được Lentinan hàm lượng cao 90%, nhưng chỉ cần 90 phút để tách được Lentinan thô [8]. Trong khi đó, Yap và Ng (2001) dùng nước nóng để tách từ 100 g nấm hương khô thu được 300 mg Lentinan tinh khiết phải cần thời gian là 72 giờ [10]. Monic Tomassen và cộng sự (2011) thì dùng kỹ thuật sóng siêu âm để tách chiết Lentinan thô  $\geq 40\%$  từ 100 g nấm hương khô cần 50 phút, tuy nhiên để tinh chế Lentinan có hàm lượng  $\geq 90\%$  cần khoảng 75-80 giờ [11].

Nhóm nghiên cứu khảo sát thực tế thấy thời gian 80 phút là thích hợp nhất để tách chiết Letinan có hàm lượng  $>45\%$  từ 20 kg nguyên liệu khô/mẻ. Kết quả này về cơ bản là phù hợp với những thông số nghiên cứu của các tác giả vừa đề cập ở trên.

#### **Khảo sát tỷ lệ dịch chiết và etanol 95<sup>o</sup> trong quá trình thu hồi Lentinan**

Trong quá trình chiết tách Lentinan từ nấm hương sử dụng etanol 95<sup>o</sup> để thu hồi Lentinan từ dịch chiết thô cho thấy: etanol là một dung môi linh hoạt, có thể pha trộn với nước; Lentinan là một  $\beta$ -glucan, đây nổi  $\beta$ -1,3-glucan làm cho mạch polysaccharit có dạng xoắn; (1,3)- $\beta$ -D-glucan tan trong nước nóng và tan một phần trong nước lạnh, tuy nhiên Lentinan không tan trong etanol. Dựa vào đặc tính này, sử dụng etanol để tách Lentinan ra khỏi dung dịch.

Tỷ lệ dịch chiết/etanol 95<sup>o</sup> ảnh hưởng nhiều đến hiệu quả thu nhận Lentinan và tỷ lệ này có ý nghĩa quan trọng trong sản xuất ở quy mô lớn, vì nó tác động lớn tới giá thành sản phẩm.

Tiến hành tách chiết 20 kg mẫu bột nấm hương khô trong điều kiện: dung môi chiết là nước RO: 50 lít, nhiệt độ dung

môi chiết: 100<sup>o</sup>C; thời gian chiết: 80 phút; nồng độ etanol: 95<sup>o</sup>; tỷ lệ dịch chiết/etanol thay đổi từ 1/1 đến 1/3 (v/v). Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dịch chiết và etanol 95<sup>o</sup> trong quá trình thu hồi Lentinan được thể hiện trong bảng 5.

**Bảng 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch chiết và etanol 95<sup>o</sup> trong quá trình thu hồi Lentinan.**

Tỷ lệ dịch chiết/etanol 95 <sup>o</sup> (v/v)	Lượng nấm hương khô ban đầu (kg)	Khối lượng chất chiết (g)	Hàm lượng Lentinan trong chế phẩm (%)
1/1	20	137,5	12,90
1/2	20	423,6	48,33
1/3	20	552,65	37,04

Từ bảng 5 thấy rằng, nếu tỷ lệ dịch chiết/etanol là (1/1) thì lượng Lentinan không được kết tủa hoàn toàn, do vậy khối lượng chất chiết chỉ là 137,5 g và hàm lượng Lentinan là 12,9%. Nếu lượng etanol cho vào gấp hai lần dịch chiết (dịch chiết/etanol = 1/2) thì khối lượng chất chiết thu được không phải là cao nhất (423,6 g), nhưng hàm lượng Lentinan trong chế phẩm đạt cao nhất là 48,33%. Trong khi đó, nếu dịch chiết/etanol = 1/3 thì khối lượng chất chiết thu được là cao nhất (552,65 g) nhưng hàm lượng Lentinan trong chế phẩm lại bị giảm còn 37,04%. Chứng tỏ nếu sử dụng lượng etanol quá nhiều cũng không tốt, vì làm giảm hiệu quả thu hồi Lentinan, điều này có thể là do lượng etanol quá nhiều tạo kết tủa nhanh, kéo theo các thành phần polysaccharit không mong muốn hoặc các tạp chất khác.

Nhóm tác giả của patent CN 103724447 A cũng sử dụng etanol để thu hồi Lentinan từ dịch chiết nấm hương. Dịch chiết thô nấm hương sau khi được cô đặc, bổ sung etanol 90<sup>o</sup> vào với tỷ lệ dịch chiết/etanol = 1/8 (v/v), ly tâm, thu kết tủa. Phần dịch sau ly tâm bổ sung tiếp etanol với tỷ lệ như vậy, ly tâm thu hồi kết tủa. Lặp lại ba lần như vậy. Theo quy trình đó, phần kết tủa thu được là Lentinan hàm lượng 7-10% [12]. Việc sử dụng etanol với khối lượng gấp khoảng 8 lần dịch chiết, chi phí sẽ rất lớn, tuy nhiên hàm lượng Letinnan khá thấp (7-10%). Hơn nữa, etanol được bổ sung lại vào dịch ly tâm nhiều lần sẽ kết tủa thêm nhiều thành phần polysaccharit không mong muốn hoặc các tạp chất khác lẫn trong sản phẩm Lentinan sẽ làm giảm hàm lượng Lentinan trong sản phẩm cuối cùng.

Nhóm nghiên cứu lựa chọn phương pháp chiết tách Lentinan từ nấm hương bằng nước nóng 100<sup>o</sup>C, dịch chiết thu được đem cô đặc, bổ sung vào đó etanol 95<sup>o</sup> với tỷ lệ dịch chiết/etanol = 1/2 (v/v), sau đó đem ly tâm, thu được kết tủa là Lentinan có hàm lượng  $\geq 45\%$ . Xét về mặt kinh tế, phương pháp này hiệu quả, ít tốn thời gian, chi phí thấp, dung môi chiết thân thiện môi trường. Hơn nữa, đây là phương pháp rất phù hợp với các trang thiết bị và điều kiện chiết tách tại Việt Nam, hướng tới việc đưa ra quy trình sản xuất Lentinan ở quy mô lớn hơn.

## Kết luận

Sau khi nghiên cứu, khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách chiết và thu nhận Lentinan từ nấm hương khô tại Việt Nam, quy mô chiết 20 kg nguyên liệu khô/mẻ, chúng tôi đã xác định được các điều kiện thích hợp để tách chiết Lentinan như sau:

- Tỷ lệ nấm hương khô/nước = 1/2,5 (w/v).
- Tốc độ khuấy 130 vòng/phút.
- Nhiệt độ dung môi chiết (nước RO): 100°C.
- Thời gian chiết: 80 phút.
- Tỷ lệ dịch chiết/etanol 95° = 1/2 (v/v).
- Hàm lượng Lentinan trong chất chiết  $\geq 48\%$ .

Do giới hạn của khuôn khổ bài báo này, chúng tôi chỉ đề cập tới việc nghiên cứu các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình chiết tách từ nấm hương khô bằng nước nóng kết hợp với biện pháp khuấy trộn và dùng etanol thu hồi sản phẩm Lentinan có hàm lượng 30-50% ứng dụng làm nguyên liệu sản xuất thực phẩm chức năng. Trong bài báo khác, chúng tôi sẽ trình bày ảnh hưởng của các biện pháp công nghệ (khuấy trộn, siêu âm, vi sóng, trích ly liên tục...) tới hiệu quả chiết suất Lentinan ở quy mô công nghiệp.

## LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn Bộ Công thương và Ban điều hành Chương trình hóa dược, Cục Hóa chất đã cấp kinh phí thực hiện đề tài thông qua Hợp đồng số 073/2016/HĐ-ĐT.CNHD.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S. Hazama, S. Watanabe, M. Ohashi, et al. (2009), "Efficacy of orally administered superfine dispersed Lentinan (beta-1,3-glucan) for the treatment of advanced colorectal cancer", *Anticancer Res.*, **29**(7), pp.2611-2617.

[2] H. Kataoka, T. Shimura, T. Mizoshita, et al. (2009), "Lentinan with S-1 and paclitaxel for gastric cancer chemotherapy improve patient quality of life", *Hepatogastroenterology*, **56**(90), pp.547-550.

[3] Mantovani, et al. (2008), " $\beta$ -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer", *Mutation Research*, **658**, pp.154-161.

[4] Steven Anderson, Dave Marcouiller (2009), *Growing Shiitake Mushrooms*, Oklahoma Cooperative Extension service, <http://www.osuextra.com>.

[5] Nguyễn Văn Mùi (2001), *Thực hành hóa sinh học*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.

[6] Hoàng Phương Lan và cs (2013), *Nghiên cứu quy trình chiết tách Lentinan từ nấm hương (Lentinula edodes) sử dụng làm thực phẩm chức năng*, Báo cáo kết quả đề tài nghiên cứu khoa học và công nghệ cấp Bộ Công thương.

[7] Yoshio Tanaka (1998), *Process for preparation of powdery extract of shiitake mushroom*, Patent US 5780097.

[8] Nor Azreen Mohd Jamil, et al. (2013), "LCMS-QTOF Determination of Lentinan-Like  $\beta$ -D-Glucan Content Isolated by Hot Water and Alkaline Solution from Tiger's Milk Mushroom, Termite Mushroom, and Selected Local Market Mushrooms", *Journal of Mycology*, doi.org/10.1155/2013/718963.

[9] Hu Wei (2013), *Novel method for effectively extracting Lentinan*, Patent CN 103059162 A.

[10] A.T. Yap, M.L.M. Ng (2001), "An improved method for the isolation of lentinan from the edible and medicinal shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetideae)", *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **3**, pp.6-19.

[11] Monic Tomassen E.A.H.J. Hendrix, A.S.M. Sonnenberg, H.J. Wichers, J.J. Mes (2011), *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7) 2011: 254-262*.

[12] Ding Jianxun, Xu Weigu, Zhuang Xiuli, Chen Xuesi (2013), *Extraction and classification method of Lentinan*, Patent CN 103724447 A.