

Ảnh hưởng của kỹ thuật trích ly đến hoạt tính sinh học cao nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*) giàu polysaccharide

Nguyễn Thị Kim Ngân¹, Ngô Thị Thùy Linh¹, Trần Đỗ Đạt¹, Nguyễn Đức Việt²,
Hoàng Minh Nam^{2,3}, Mai Thanh Phong^{2,3}, Nguyễn Hữu Hiếu^{1,2,3*}

¹Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Hóa học và Dầu khí, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh,
268 Lý Thường Kiệt, phường 14, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 268 Lý Thường Kiệt, phường 14, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 9/8/2021; ngày chuyển phản biện 13/8/2021; ngày nhận phản biện 13/9/2021; ngày chấp nhận đăng 16/9/2021

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, cao nấm Linh chi giàu polysaccharide (PS) được thu nhận bằng nhiều kỹ thuật trích ly khác nhau như: nước nóng (hot water extraction - HWE), nước nóng có hỗ trợ siêu âm (ultrasonic-assisted hot water extraction - UHWE), enzyme (enzyme-assisted extraction - EAE) và enzyme có hỗ trợ siêu âm (ultrasonic-assisted enzyme extraction - UAEE). Tổng hàm lượng PS cao nhất là $3,721 \pm 0,134\%$ đối với UAEE, cao hơn so với HWE ($1,783 \pm 0,156\%$), UHWE ($1,886 \pm 0,148\%$) và EAE ($2,133 \pm 0,139\%$). Cao nấm Linh chi được thử nghiệm hoạt tính kháng oxy hóa với gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) và năng lực khử sắt. Hoạt tính kháng khuẩn của cao trích được đánh giá qua thông số nồng độ ức chế 50% (IC_{50}). Khả năng bắt gốc tự do DPPH của cao nấm trích bằng kỹ thuật UAEE đạt 42,334%, đồng thời kết quả khảo sát năng lực khử sắt cho thấy, khả năng khử của cao trích bằng UAEE tốt hơn so với 3 kỹ thuật trích ly HWE, UHWE và EAE. Ngoài ra, cao nấm Linh chi trích ly bằng UAEE thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* và *Staphylococcus aureus* với IC_{50} trong khoảng 0,069-0,096 g/ml.

Từ khóa: kháng khuẩn, kháng oxy hóa, nấm Linh chi, polysaccharide.

Chỉ số phân loại: 2.4

1. Đặt vấn đề

Nấm Linh chi có tên khoa học là *Ganoderma lucidum* thuộc họ Ganodermataceae, là một trong những loại nấm được liệu được biết đến rộng rãi, ứng dụng nhiều trong các loại thuốc thảo dược và thực phẩm chức năng ở các nước châu Á như Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Việt Nam. Nấm Linh chi là một loại nấm lớn, sẫm màu, có bề ngoài bóng và kết cấu dạng gỗ [1, 2]. Loại nấm này chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học như PS, triterpenoid, alkaloid, flavonoid, stereroid, protein, acid amin, enzyme, vitamin và khoáng chất [3]. Trong đó, PS và triterpenoid trong nấm Linh chi đang được nghiên cứu rộng rãi vì các hoạt tính sinh học như điều hòa miễn dịch, hạ đường huyết, kháng khuẩn, kháng oxy hóa, các hoạt động chống lão hóa, ngăn ngừa hình thành khối u, ức chế enzyme α -glucosidase, kháng viêm và bảo vệ gan [2, 4]. Chính vì vậy, việc thu nhận cao nấm Linh chi giàu hoạt tính sinh học là cần thiết.

Các kỹ thuật trích ly thu nhận các hợp chất chuyển hóa thứ cấp của thực vật đã và đang thu hút nhiều sự quan tâm trong suốt các thập kỷ qua. Hầu hết, quá trình trích ly đều tốn thời gian, công sức, sử dụng lượng lớn dung môi và sự phân hủy của các hợp chất mong muốn do quá trình trích ly cần nhiệt độ cao liên tục [5]. Vì vậy, việc tìm ra kỹ thuật

trích ly phù hợp nhằm giúp nâng cao hiệu suất trích ly là cần thiết. Kỹ thuật trích ly có thể được phân thành loại thông thường và hiện đại. Các kỹ thuật thông thường như HWE, chưng cất thủy phân và Soxhlet có thể thu nhận cao trích với nồng độ và hoạt tính thấp do dịch chiết dễ bị lôi kéo và bay hơi cùng với dung môi [6]. Các kỹ thuật này yêu cầu nhiệt độ cao hơn, thời gian xử lý lâu, thể tích dung môi lớn, có thể dẫn đến việc chiết xuất nhiều thành phần không mong muốn gây ảnh hưởng xấu đến hợp chất. Mặc dù HWE được sử dụng khá phổ biến, nhưng HWE chỉ có thể chiết xuất PS từ thành tế bào do đặc tính thành tế bào của nấm Linh chi, dẫn đến việc trích ly PS với hàm lượng thấp [7]. Bên cạnh đó, trích ly bằng Soxhlet được sử dụng với một số dung môi, kỹ thuật này mất vài giờ thậm chí hơn 24 giờ để trích ly và sử dụng lượng lớn dung môi [8]. Ngược lại, các kỹ thuật trích ly hiện đại như kỹ thuật lưu chất siêu tới hạn (Supercritical fluid extraction - SFE), EAE, vi sóng (Microwave-assisted extraction - MAE), có hỗ trợ của siêu âm (Ultrasonic-assisted extraction - UAE) và UAEE có hiệu suất trích ly cao và khắc phục được những nhược điểm của các kỹ thuật thông thường. Ưu điểm của các kỹ thuật hiện đại so với các kỹ thuật thông thường là hạn chế sử dụng dung môi hữu cơ và giảm thiểu sự phân hủy của các hợp chất [9]. Kỹ thuật EAE dựa trên nguyên tắc enzyme

*Tác giả liên hệ: Email: nhieuu@hcmus.edu.vn

Effects of extraction technology on bioactivities from polysaccharide-rich *Ganoderma lucidum*

Thi Kim Ngan Nguyen¹, Thi Thuy Linh Ngo¹,
Do Dat Tran¹, Duc Viet Nguyen², Minh Nam Hoang^{2,3},
Thanh Phong Mai^{2,3}, Huu Hieu Nguyen^{1,2,3*}

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

268 Ly Thuong Kiet Street, Ward 14, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

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

268 Ly Thuong Kiet Street, Ward 14, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Vietnam National University, Ho Chi Minh City,

Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 9 August 2021; revised 13 September 2021; accepted 16 September 2021

Abstract:

In this study, the polysaccharide-riched extract from *Ganoderma lucidum* was obtained by different extraction methods including hot water extraction (HWE), ultrasonic-assisted hot water extraction (UHWE), enzyme-assisted extraction (EAE), and ultrasonic-assisted enzyme extraction (UAEE). The total polysaccharide content in UAEE ($3.721 \pm 0.134\%$) was higher than HWE ($1.783 \pm 0.156\%$), UHWE ($1.886 \pm 0.148\%$), and EAE ($2.133 \pm 0.139\%$). The *G. lucidum* extract was then evaluated for antioxidant activity by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods. The antibacterial activity was assessed via half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}). The DPPH radical scavenging activity of extract from UAEE was 42.334%, while the result obtained from FRAP shows much better than HWE, UHWE, and EAE methods. Furthermore, *G. lucidum* extracted by UAEE showed antibacterial activity against *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus* with IC_{50} in the range of 0.069-0.096 g/ml.

Keywords: antibacteria, anti-oxidation, *Ganoderma lucidum*, polysaccharide.

Classification number: 2.4

liên kết với cơ chất, cấu trúc và hình thái của enzyme thay đổi để phù hợp với sự tương tác giữa enzyme và cơ chất, làm phá vỡ thành tế bào thực vật, giải phóng thành phần nội bào [10]. Đối với kỹ thuật UAEE được phát triển thêm nhằm rút ngắn thời gian và tăng năng suất trích ly các hợp chất chuyển hóa thứ cấp, nâng cao chất lượng của các hợp chất [11]. Theo các nghiên cứu trước đây, hàm lượng PS khi trích ly bằng UAE với công suất 210 W, nhiệt độ 80°C sau 100 phút cho hiệu suất đạt 0,63% [12], UAEE thu nhận hàm lượng PS đạt 3,21% với điều kiện nhiệt độ trích ly 45°C, trong 30 phút, nồng độ enzyme 3% [13]. Kỹ thuật trích ly kết hợp sóng siêu âm và enzyme Pectinex (Pectinex ultra SP-L là hệ enzyme gồm pectinase, cellulase, hemicellulase, β -glucanase, xylanase và α -amylase) [14] giúp đẩy nhanh quá trình trích ly, vì enzyme có tính chọn lọc cơ chất và đặc hiệu cao, tùy vào loại cơ chất, thì vị trí phân cắt tương ứng với từng loại enzyme sẽ khác nhau [15].

Mục đích của nghiên cứu này là khảo sát ảnh hưởng của các kỹ thuật trích ly HWE, UHWE, EAE, UAEE lên hàm lượng PS, đồng thời thử nghiệm các hoạt tính sinh học như kháng oxy hóa và kháng khuẩn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và hóa chất

Nấm Linh chi được nuôi trồng ở huyện Củ Chi, TP Hồ Chí Minh. Nguyên liệu được sấy và nghiền thành dạng bột. Ethanol (C_2H_5OH) 95%, axit sunfuric (H_2SO_4) 98%, axit ascorbic, axit acetic (CH_3COOH), phenol (C_6H_6O), kali ferricyanid ($C_6N_6FeK_3$), axit cloacetic ($ClCH_2CO_2H$) được thu mua từ Công ty TNHH khoa học Xilong (Trung Quốc). Enzyme Pectinex Ultra SP-L được cung cấp bởi Công ty TNHH Brentag Việt Nam. D-glucose, DPPH được mua từ Sigma-Aldrich Chemical Co., Ltd (Mỹ).

2.2. Phương pháp thí nghiệm

HWE: Nấm Linh chi (2 g) sau khi nghiền được bổ sung vào erlen 250 ml chứa 100 ml nước cất, đun sôi trong nồi cách thủy ở 90°C trong khoảng thời gian xác định. Hỗn hợp huyền phù được lọc bằng thiết bị lọc chân không. Dịch lọc được cô quay bằng thiết bị cô quay chân không ở nhiệt độ 50°C cho đến khi thu nhận cao nấm Linh chi với khối lượng không đổi. Trữ mẫu ở nhiệt độ 4°C để tiến hành phân tích mẫu tiếp theo [16].

UHWE: Nấm Linh chi (2 g) sau khi nghiền được bổ sung vào erlen 250 ml chứa 100 ml nước cất, trích ly với điều kiện nhiệt độ siêu âm ở 90°C, công suất 240 W trong các khoảng thời gian xác định. Sau đó, hỗn hợp huyền phù được lọc bằng thiết bị lọc chân không. Dịch lọc được cô quay bằng thiết bị cô quay chân không ở nhiệt độ 50°C cho đến khi thu nhận cao nấm với khối lượng không đổi. Trữ mẫu ở nhiệt độ 4°C để tiến hành phân tích mẫu.

EAE: Nấm Linh chi (2 g) được bổ sung vào bình tam giác 250 ml chứa 100 ml nước cất, dung dịch đệm acetate (pH 7,9). Hỗn hợp huyền phù được bổ sung hệ enzyme Pectinex Ultra SP-L (3% khối lượng), khuấy từ từ ở 50°C trong các khoảng thời gian xác định. Kết thúc quá trình phản ứng, hỗn hợp được đun sôi tới 80°C trong 30 phút nhằm bất hoạt enzyme. Sau đó, hỗn hợp được loại bỏ dung môi bằng thiết bị cô quay chân không đến khi thu được cao nấm Linh chi với khối lượng không đổi. Trữ mẫu ở nhiệt độ 4°C [16].

UAEE: Nấm Linh chi (2 g) sau khi sấy khô, được bổ sung thêm 100 ml nước cất, dung dịch đệm, chỉnh đến pH 7,9, enzyme Pectinex Ultra SP-L (3% khối lượng) và trích ly với điều kiện nhiệt độ siêu âm ở 50°C, công suất 240 W trong khoảng thời gian xác định. Tiến hành lọc loại bã bằng thiết bị lọc chân không, dịch lọc được gia nhiệt đến 80°C trong 30 phút để bất hoạt enzyme. Sau đó, dịch lọc được cô quay chân không để loại bỏ dung môi. Đem sấy khô đến khối lượng không đổi, thu được mẫu cao nấm. Trữ lạnh mẫu ở nhiệt độ 4°C.

Xác định hàm lượng PS: Hàm lượng PS được xác định bằng phương pháp phenol - axit sunfuric [17]. Pha dung dịch D-glucose 1000 được chuẩn bị bằng cách cân 100 mg D-glucose cho vào 100 ml nước cất, sau đó pha loãng 10 lần thu được dung dịch D-glucose ở các nồng độ 20, 40, 60, 80 và 100 µg/ml. Hút 2 ml dung dịch chuẩn D-glucose ở các nồng độ khác nhau vào ống nghiệm, sau đó thêm vào mỗi ống nghiệm 1 ml phenol 5%, 5 ml H₂SO₄ (98%), lắc đều để phản ứng xảy ra nhanh và đồng nhất. Thực hiện tương tự với mẫu cao trích thu được từ nấm Linh chi. Hàm lượng PS xác định bằng phương pháp đo mật độ quang tại bước sóng 488 nm và dựa trên đường chuẩn D-glucose theo công thức sau:

$$H = \frac{C_{PS} \times V \times n}{m} \quad (1)$$

trong đó: C_{ps} (mg/l) là nồng độ PS trong cao trích; V (ml) là thể tích cao trích đem phân tích; n là hệ số pha loãng; m (g) là khối lượng nguyên liệu thô ban đầu.

2.3. Hoạt tính kháng oxy hóa

Khả năng bắt gốc tự do DPPH: Đánh giá khả năng kháng oxy hóa được thực hiện bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH. DPPH là một gốc tự do nhân tạo, ổn định, có màu tím, độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 517 nm và không thể tham gia phản ứng với các chất có khả năng cho nguyên tử hydro, sau phản ứng sẽ làm giảm cường độ màu tím của dung dịch và chuyển sang màu vàng. Từ đó, có thể đánh giá khả năng kháng oxy hóa của hợp chất. Cao nấm Linh chi được hòa tan trong methanol để thu được các nồng độ khác

nau, axit ascorbic là đối chứng dương. Hỗn hợp phản ứng bao gồm 2 ml dịch chiết tương ứng với nồng độ đã chuẩn bị trước đó và 4 ml dung dịch DPPH. Lắc đều hỗn hợp và để yên 30 phút trong tối ở nhiệt độ phòng. Phản trăm bắt gốc tự do DPPH được tính bằng công thức sau:

$$\%I = \frac{A_B - (A_S - A_C)}{A_B} \times 100\% \quad (2)$$

trong đó: I là phần trăm bắt gốc DPPH; A_B là độ hấp thụ của mẫu trắng; A_S là độ hấp thụ của mẫu; và A_C là độ hấp thụ của mẫu màu.

Khả năng khử sắt: Các hợp chất có khả năng kháng oxy hóa phản ứng với kali ferricyanide tạo thành kali ferrocyanide. Sau đó, hợp chất này phản ứng với ferric trichloride tạo ra ferrocyanide ferric là một phức màu xanh lam với độ hấp thụ tối đa ở 700 nm. Chuẩn bị 1 ml mẫu cao nấm Linh chi ở các nồng độ khảo sát khác nhau được bổ sung thêm 2,5 ml dung dịch đệm phosphate 0,2 M (pH 6,6) và 2,5 ml kali ferricyanid, lắc và ủ ở nhiệt độ 50°C trong 20 phút. Sau đó, mỗi ống nghiệm được bổ sung thêm 2,5 ml dung dịch axit tricloacetic 10%. Hỗn hợp được ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 10 phút. Dùng pipet hút 2,5 ml dung dịch mẫu vào 2,5 ml nước cất và 0,5 ml dung dịch FeCl₃ 0,1%. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 700 nm, giá trị độ hấp thụ phản ánh khả năng khử của mẫu. Giá trị mật độ quang càng cao chứng tỏ năng lực khử sắt của mẫu càng cao. Mỗi nồng độ lặp lại 3 lần, axit ascorbic được sử dụng làm đối chứng. Năng lực khử sắt được tính theo công thức sau:

$$Q = A_S - A_B \quad (3)$$

trong đó: Q là năng lực khử sắt; A_S và A_B lần lượt là độ hấp thụ của mẫu và mẫu trắng.

Hoạt tính kháng khuẩn: Khả năng kháng khuẩn của cao nấm Linh chi được đánh giá qua thông số IC₅₀ trên các chủng vi khuẩn kiểm định: *B. cereus*, *B. subtilis* và *S. aureus*. Mẫu vi khuẩn được hoạt hóa trên môi trường nuôi cấy dinh dưỡng, sau đó mẫu cao trích được bổ sung vào môi trường nuôi cấy, ủ ở 37°C trong 24 giờ. Tế bào vi khuẩn có thể tạo hệ huyền phù trong nước tạo độ đục cho môi trường. Tiến hành xác định mật độ tế bào vi sinh thông qua đo độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 550-610 nm. Gentamicin được sử dụng làm mẫu đối chứng. Phản trăm ức chế vi khuẩn được tính theo công thức sau:

$$I_{UC} = \frac{A_m - A_{(+)}}{A_{(-)} - A_{(+)}} \times 100\% \quad (4)$$

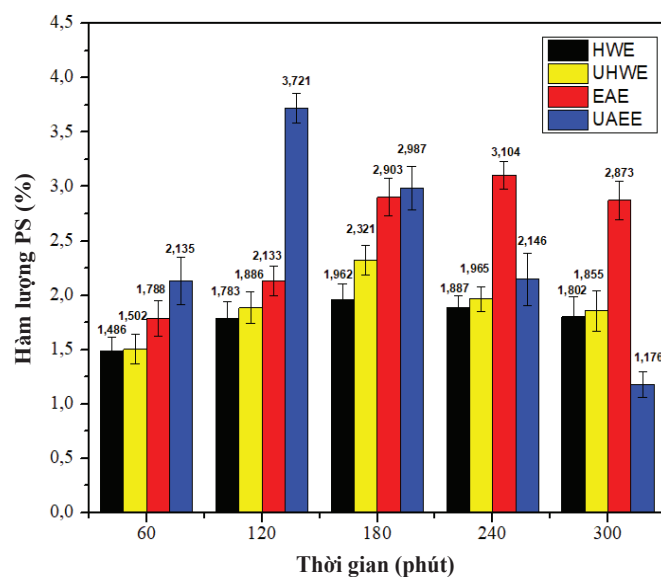
trong đó: I_{UC} là phần trăm ức chế vi khuẩn; A_m là độ hấp thụ của mẫu chứa vật liệu cần thử nghiệm; A₍₊₎ là độ hấp thụ

của mẫu chứa chất kháng khuẩn biết trước nồng độ ức chế tối thiểu; $A_{(-)}$ là độ hấp thụ của mẫu không chứa chất kháng khuẩn.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của kỹ thuật trích ly đến hàm lượng PS

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các kỹ thuật trích ly đến hàm lượng PS được thể hiện ở hình 1. Kết quả cho thấy, PS được trích bằng 3 kỹ thuật HWE, UHWE và EAE tăng khi kéo dài thời gian trích ly. Đối với EAE, hàm lượng PS cao nhất đạt $3,104 \pm 0,126\%$, với thời gian phản ứng 240 phút, sau đó giảm xuống khi kéo dài thời gian phản ứng tới 360 phút. Bên cạnh đó, UHWE cho hàm lượng PS ($2,321 \pm 0,135\%$) cao hơn so với HWE ($1,962 \pm 0,142\%$) trong 180 phút [16]. Tuy nhiên, hàm lượng PS thu được từ 2 kỹ thuật này vẫn thấp hơn khi so với EAE ở cùng thời gian phản ứng. Mặt khác, hàm lượng PS được trích ly bằng UAEE ($3,721 \pm 0,142\%$) cao hơn so với 3 kỹ thuật HWE, UHWE và EAE lần lượt là $1,783 \pm 0,142$, $1,886 \pm 0,148$ và $2,133 \pm 0,126\%$ trong cùng điều kiện trích ly 2 g nấm Linh chi với thời gian 120 phút. Do đó, kỹ thuật UAEE giúp nâng cao hàm lượng PS, rút ngắn thời gian trích ly.



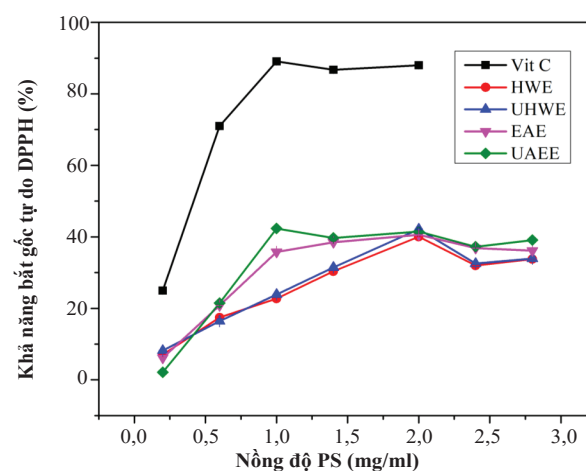
Hình 1. Ảnh hưởng của phương pháp trích ly lên hàm lượng PS.

Kết quả có thể giải thích là do cấu trúc đặc biệt của thành tế bào nấm Linh chi chủ yếu được cấu tạo bởi các PS trọng lượng phân tử khác nhau như chitin, cellulose và β -glucan. Trong đó, chitin và cellulose hầu như không tan trong nước [18]. Điều này dẫn đến, HWE không trích ly được nhiều PS khi so sánh với EAE cùng thời gian trích ly. Vì kỹ thuật

EAE dựa trên khả năng enzyme thủy phân và phá vỡ cấu trúc thành tế bào thành những phân tử có khối lượng thấp giúp các phân tử dễ dàng hòa tan trong dung môi. Ngoài ra, sự hỗ trợ của sóng siêu âm từ kỹ thuật UAEE có thể cải thiện hoạt tính của enzyme và khuếch tán vào trong dung môi làm tăng hiệu quả trích ly [11]. Bên cạnh đó, yếu tố thời gian cũng ảnh hưởng đến hàm lượng PS, khi kéo dài thời gian sẽ làm giảm hàm lượng cao trích ly. Với quá trình siêu âm ở nhiệt độ cao thì việc kéo dài thời gian có thể làm biến đổi các phân tử trong cao trích ly, do đó sẽ ảnh hưởng đến chất lượng và làm giảm hàm lượng PS trong cao trích [19, 20].

3.2. Hoạt tính kháng oxy hóa

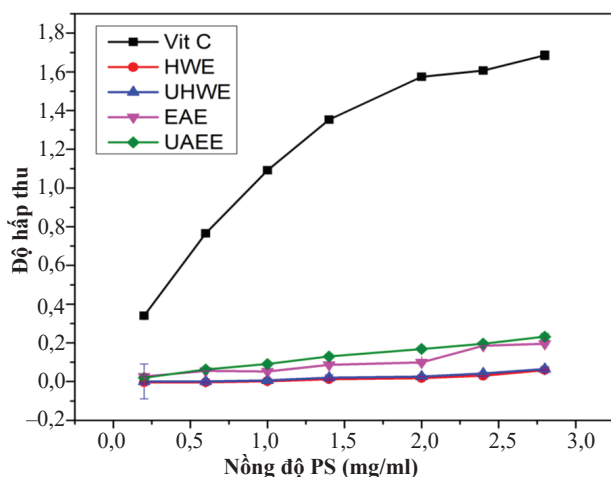
Khả năng bắt gốc tự do DPPH: Khả năng các bắt tự do DPPH của axit ascorbic và cao nấm Linh chi được trích ly bằng HWE, UHWE, EAE và UAEE được thể hiện ở hình 2. Đối với axit ascorbic cho thấy, khả năng bắt gốc tự do DPPH tăng từ 24,929 lên 89,091% khi tăng nồng độ từ 0,2 đến 1 mg/ml. Tuy nhiên, khi nồng độ của axit ascorbic tiếp tục tăng trên 1 mg/ml, khả năng bắt gốc tự do tương đối ổn định. Cao nấm Linh chi thu được bằng các kỹ thuật HWE, UHWE, EAE và UAEE cho khả năng bắt gốc tự do thấp hơn so với axit ascorbic. Đối với kỹ thuật UAEE và EAE, khả năng bắt gốc tự do tăng khi nồng độ tương ứng tăng từ 0,2 đến 1 mg/ml, UAEE cho thấy khả năng bắt gốc tự do (42,338%) cao hơn EAE (35,756%) ở cùng nồng độ 1 mg/ml. Khi tiếp tục tăng nồng độ PS, khả năng bắt gốc tự do của cao nấm Linh chi được trích bằng UAEE bắt đầu giảm nhẹ, tuy nhiên vẫn cao hơn so với kỹ thuật EAE. Tương tự, với kỹ thuật HWE và UHWE, cao nấm Linh chi cho khả năng bắt gốc tự do cao nhất, lần lượt là 40,015 và 42,123% ở nồng độ 2 mg/ml.



Hình 2. Khả năng bắt gốc tự do DPPH của axit ascorbic và cao nấm Linh chi thu được bằng các kỹ thuật HWE, UHWE, EAE và UAEE.

Kết quả có thể giải thích là do khả năng bắt gốc tự do DPPH tương quan với liên kết glucose- (1-6) glycosyl [21]. Liên kết glucose-(1-6) và arabinose-(1-4) được cho là 2 liên kết chủ yếu có khả năng bắt gốc tự do DPPH [22]. Ngoài ra, PS thu được từ UAEE cho nhiều liên kết β -glycoside hơn HWE nên có khả năng bắt gốc tự do tốt hơn [16]. Kết quả nghiên cứu này chứng minh nấm Linh chi được trích ly bằng UAEE có khả năng bắt gốc tự do cao hơn cao nấm giàu PS từ các loài nấm *Auricularia cornea*, *Auricularia auricula* và *Mulberry fungus* thể hiện hoạt tính oxy hóa tối đa khi nồng độ PS là 1,2 mg/ml có thể bắt 37,8, 40,3 và 31,1% DPPH [23]; *Porphyra haitanensis* với nồng độ PS 2 mg/ml bắt 34,63% DPPH [24].

Khả năng khử Fe^{3+} (PFRAP): Khả năng tạo phức với kim loại là một tính chất quan trọng của chất kháng oxy hóa vì làm giảm nồng độ của các kim loại chuyển tiếp, đồng thời là xúc tác cho phản ứng tạo gốc tự do trong hệ thống sinh học. Hình 3 thể hiện sự tương quan giữa độ hấp thụ của phức sắt (III) ferrocyanide và chất kháng oxy hóa.

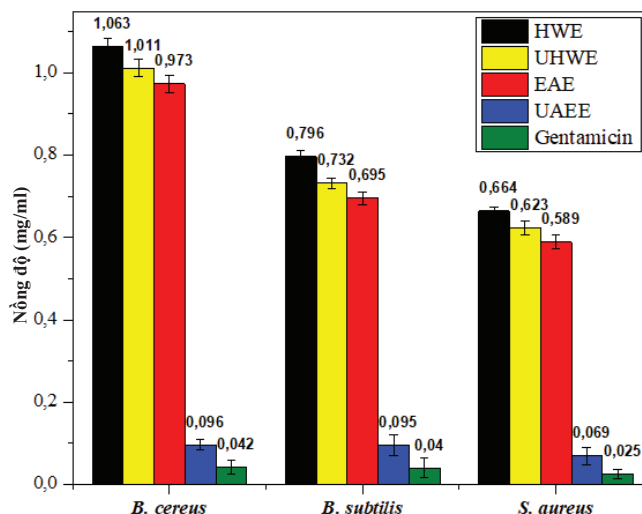


Hình 3. Khả năng khử sắt của axit ascorbic và cao nấm Linh chi thu được bằng các kỹ thuật HWE, UHWE, EAE, UAEE.

Khi so với axit ascorbic, cao nấm Linh chi được trích ly bằng kỹ thuật HWE, UHWE, EAE và UAEE đều cho khả năng khử sắt thấp hơn. Đối với UAEE, khi nồng độ tăng từ 0,2 đến 2,8 mg/ml thì năng lực khử sắt tăng (độ hấp thụ tăng từ 0,020 đến 0,232), cao hơn so với EAE (độ hấp thụ tăng từ 0,026 đến 0,195). Tương tự, cao nấm Linh chi thu được từ kỹ thuật HWE (độ hấp thụ từ 0 đến 0,059) và UHWE (độ hấp thụ từ 0 đến 0,065) cho thấy năng lực khử sắt thấp hơn so với UAEE. Kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy, cao nấm Linh chi thu được bằng HWE có năng lực khử lần lượt là 0,118, 0,138, 0,101 và 0,007 [25]. Các kết quả này đều thấp hơn so với cao nấm Linh chi được thu bằng kỹ thuật UAEE.

3.3. Hoạt tính kháng khuẩn của cao nấm Linh chi

Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn của cao nấm Linh chi từ các kỹ thuật UAEE và HWE thông qua giá trị IC_{50} được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Kết quả thử nghiệm kháng khuẩn của cao nấm Linh chi thu được bằng các kỹ thuật HWE, UHWE, EAE và UAEE.

Cao nấm giàu PS được trích bằng kỹ thuật HWE, UHWE, EAE và UAEE được khảo sát hoạt tính với 3 chủng vi khuẩn kiểm định *B. cereus*, *B. subtilis* và *S. aureus* được thể hiện ở hình 4. Kết quả cho thấy, cao nấm Linh chi thu được bằng UAEE (IC_{50} trong khoảng 0,069-0,096 mg/ml) thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt hơn so với EAE (0,589-0,973 mg/ml), UHWE (0,623-1,011 mg/ml) và HWE (0,664-1,063 mg/ml). Kết quả này có thể giải thích là do cao nấm thu được từ UAEE có các đơn vị glucose và galactose là những yếu tố tương tác với lớp vỏ vi khuẩn, thậm chí kỹ thuật UAEE còn cho thấy sự xuất hiện của PS sunfat, là một chất có khả năng kháng khuẩn cao [26]. Ngoài ra, một trong những cơ chế diệt khuẩn của PS là phá vỡ thành tế bào và màng tế bào chất, dẫn đến giải phóng protein và các phân tử thiết yếu trong tế bào, đồng thời DNA có thể bị phân hủy sau khi PS xâm nhập vào tế bào dẫn đến vi khuẩn không thể phát triển và bị tiêu diệt [27]. Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của cao nấm Linh chi trong nghiên cứu này cho thấy hoạt tính tốt hơn đối với hàm lượng PS thu nhận từ *Malva sylvestris* bằng kỹ thuật EAE với enzyme cellulase, trong khoảng nồng độ 3-15 mg/ml đối với chủng vi khuẩn *B. cereus* và *S. aureus* [28].

4. Kết luận

Hàm lượng PS trong nấm Linh chi chịu ảnh hưởng bởi các kỹ thuật trích ly khác nhau. Kết quả của nghiên cứu cho thấy, hàm lượng PS cao nhất ($3,721 \pm 0,134\%$) thu được bằng phương pháp UAEE. Bên cạnh đó, kỹ thuật UAEE cũng thể

hiện khả năng kháng oxy hóa cao hơn so với các kỹ thuật khác thông qua phương pháp thử nghiệm khả năng bắt gốc tự do DPPH và năng lực khử sắt. Ngoài ra, cao nấm Linh chi còn thể hiện khả năng kháng khuẩn cao với 3 chủng vi khuẩn *B. cereus*, *B. subtilis* và *S. aureus*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số B2019-20-02. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Li, F. Gu, C. Cai, et al. (2020), "Purification, structural characterization, and immunomodulatory activity of the polysaccharides from *Ganoderma lucidum*", *International Journal of Biological Macromolecules*, **143**, pp.806-813, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.141.
- [2] J. Lu, R. He, P. Sun, et al. (2020), "Molecular mechanisms of bioactive polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), a review", *International Journal of Biological Macromolecules*, **150**, pp.765-774, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.035.
- [3] M.F. Ahmad (2020), "*Ganoderma lucidum*: A rational pharmacological approach to surmount the cancer", *Journal of Ethnopharmacology*, **260**, DOI: 10.1016/j.jep.2020.113047.
- [4] K.S. Gill, Navgeet, S. Kumar (2017), "*Ganoderma lucidum* targeting lung cancer signaling: A review", *Tumor Biology*, **39**(6), DOI: 10.1177/1010428317707437.
- [5] D.P. Fulzele, R.K. Satdive (2005), "Comparison of techniques for the extraction of the anti-cancer drug camptothecin from *Nothapodytes foetida*", *Journal of Chromatography A*, **1063**(1-2), pp.9-13, DOI: 10.1016/j.chroma.2004.11.020.
- [6] G. Zengin, A. Cvetanović, U. Gašić, et al. (2020), "Modern and traditional extraction techniques affect chemical composition and bioactivity of *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip", *Industrial Crops and Products*, **146**, DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112202.
- [7] C. Cai, Y. Wang, W. Yu, et al. (2020), "Temperature-responsive deep eutectic solvents as green and recyclable media for the efficient extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*", *Journal of Cleaner Production*, **274**, DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.123047.
- [8] M. Barriada-Pereira, E. Concha-Graña, M.J. González-Castro, et al. (2003), "Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction in the analysis of 21 organochlorine pesticides in plants", *Journal of Chromatography A*, **1008**(1), pp.115-122, DOI: 10.1016/S0021-9673(03)01061-6.
- [9] Z. Liang, P. Zhang, Z. Fang (2022), "Modern technologies for extraction of aroma compounds from fruit peels: A review", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **62**, pp.1284-1307, DOI: 10.1080/10408398.2020.1840333.
- [10] S.S. Nadar, P. Rao, V.K. Rathod (2018), "Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review", *Food Research International*, **108**, pp.309-330, DOI: 10.1016/j.foodres.2018.03.006.
- [11] W. Tchabo, Y. Ma, F.N. Engmann, et al. (2015), "Ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAE) of phytochemical compounds from mulberry (*Morus nigra*) must and optimization study using response surface methodology", *Industrial Crops and Products*, **63**, pp.214-225, DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.09.053.
- [12] S. Zheng, W. Zhang, S. Liu (2020) "Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides and triterpenoids from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* and evaluation of their *in vitro* antioxidant capacities", *PLOS ONE*, **15**(12), DOI: 10.1371/journal.pone.0244749.
- [13] D.T. Do, D.H. Lam, T. Nguyen, et al. (2021), "Utilization of response surface methodology in optimization of polysaccharides extraction from Vietnamese red *Ganoderma lucidum* by ultrasound-assisted enzymatic method and examination of bioactivities of the extract", *The Scientific World Journal*, **2021**, DOI: 10.1155/2021/7594092.

- [14] A. Tanriseven, Y. Aslan (2005) "Immobilization of pectinase ultra SP-L to produce fructooligosaccharides", *Enzyme and Microbial Technology*, **36**(4), pp.550-554, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.12.001.
- [15] H. Zhang, L. Han, H. Dong (2021), "An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **140**, DOI: 10.1016/j.rser.2021.110758.
- [16] T.Q. Hoa, T.T.P. Mai, H.M. Nam, et al. (2018), "Extraction of polysaccharides from lingzhi by ultrasonic-assisted enzymatic method", *Vietnam Journal of Science and Technology*, **56**(4A), pp.171-181.
- [17] S.S. Nielsen (2017), "Total carbohydrate by phenol-sulfuric acid method", *Food Analysis Laboratory Manual*, Springer, 3rd ed., pp.137-141.
- [18] D.D. Chen, L. Shi, S.N. Yue, et al. (2019), "The Slit2-MAPK pathway is involved in the mechanism by which target of rapamycin regulates cell wall components in *Ganoderma lucidum*", *Fungal Genetics and Biology*, **123**, pp.70-77, DOI: 10.1016/j.fgb.2018.12.005.
- [19] Q.V. Nguyen, J.B. Eun (2011), "Antioxidant activity of solvent extracts from Vietnamese medicinal plants", *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**(13), pp.2798-2811.
- [20] C. Cai, J. Ma, C. Han, et al. (2019) "Extraction and antioxidant activity of total triterpenoids in the mycelium of medicinal fungus, *Sanghuangporus sanghuang*", *Scientific Reports*, **9**(1), pp.1-10, DOI: 10.1038/s41598-019-43886-0.
- [21] T. Lo, C.A. Chang, K.H. Chiu, et al. (2011), "Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods", *Carbohydrate Polymers*, **86**(1), pp.320-327, DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.04.056.
- [22] Y. Nie, H. Jiang, Y. Su, et al. (2012), "Purification, composition analysis and antioxidant activity of different polysaccharides from the fruiting bodies of *Pholiota adiposa*", *African Journal of Biotechnology*, **11**(65), pp.12885-12894, DOI: 10.5897/AJB11.3117.
- [23] Y. Su, L. Li (2020), "Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from four auriculariales", *Carbohydrate Polymers*, **229**, DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115407.
- [24] B.M. Khan, H.M. Qiu, S.Y. Xu, et al. (2020), "Physicochemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharides derived from *Porphyra haitanensis*", *International Journal of Biological Macromolecules*, **145**, pp.1155-1161, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.040.
- [25] Y. Kan, T. Chen, Y. Wu, et al. (2015), "Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* using response surface methodology", *International Journal of Biological Macromolecules*, **72**, pp.151-157, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.07.056.
- [26] P. Vijayabaskar, N. Vaseela, G. Thirumaran (2012), "Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*", *Chinese Journal of Natural Medicines*, **10**(6), pp.421-428, DOI: 10.1016/S1875-5364(12)60082-X.
- [27] F. He, Y. Yang, G. Yang, et al. (2010), "Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03", *Food Control*, **21**(9), pp.1257-1262, DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.02.013.
- [28] H. Rostami, S. Gharibzadeh (2017), "Cellulase-assisted extraction of polysaccharides from *Malva sylvestris*: Process optimization and potential functionalities", *International Journal of Biological Macromolecules*, **101**, pp.196-206, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.078.