

KHẢO SÁT MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG TỚI QUÁ TRÌNH CHIẾT β -GLUCAN TỪ ĐỂ NẤM *Cordyceps militaris*

Vũ Thị Lan Anh, Võ Thị Kiều Thanh, Nguyễn Thị Lan Thanh

Viện Sinh học nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Cordyceps militaris (*C. militaris*), hay còn gọi là nấm đông trùng hạ thảo, là một loại nấm có giá trị dược liệu cao và được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền. Hiện nay *C. militaris* đã được nuôi trồng nhân tạo ở nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Tuy nhiên, quá trình nuôi trồng *C. militaris* sẽ tạo ra một lượng lớn phụ phẩm là để nấm sau khi thu hoạch quả thể. Để nấm *C. militaris* còn chứa nhiều hoạt chất trong đó có β -glucan nên có thể được tận dụng để chiết xuất thu nhận β -glucan. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm lựa chọn các điều kiện chiết thích hợp cho quá trình chiết xuất β -glucan từ để nấm *C. militaris*. Trong nghiên cứu, điều kiện xử lý nguyên liệu trước khi chiết thích hợp là ngâm bột để nấm bằng cồn 95° trong thời gian 12 giờ. Phương pháp tách chiết có sự hỗ trợ siêu âm với các điều kiện siêu âm ở nhiệt độ 80°C, công suất 200 W, tần số 37 kHz và thời gian 30 phút cho hàm lượng β -glucan trong dịch chiết cao hơn so với phương pháp không có hỗ trợ sóng siêu âm. Các điều kiện thích hợp cho quá trình chiết β -glucan là nhiệt độ chiết 100°C, giá trị pH dung môi là 10, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/50 (g/mL) và thời gian chiết 5 giờ. Hàm lượng β -glucan thu được sau quá trình chiết xuất là 12,418 g/100 g bột để nấm.

Từ khóa: β -glucan, chiết kiềm, *Cordyceps militaris*, hỗ trợ siêu âm, polysaccharide.

MỞ ĐẦU

β -glucan là một nhóm polysaccharide được tạo nên từ các đơn phân là D-glucose gắn với nhau bằng liên kết β -(1-3), β -(1-4) hoặc β -(1-6) glycoside. β -glucan được chứng minh có nhiều tác dụng hữu ích đối với sức khỏe con người như giảm đường huyết, điều hòa miễn dịch, chống ung thư, chống oxy hóa, chống viêm và được tìm thấy trong thành tế bào của nấm, nấm men, vi khuẩn, tảo, địa y cũng như các loại ngũ cốc như yến mạch, lúa mạch (Susanti *et al.*, 2018). Trong các loại nấm, *Cordyceps militaris* được đánh giá là một trong những nguồn giàu β -glucan, với hàm lượng trong quả thể chiếm khoảng 34,3% trọng lượng khô (McCleary và Draga, 2016).

Nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris* chứa nhiều hoạt chất sinh học quý (cordycepin, adenosine, acid γ -aminobutyric, polysaccharide...) và hiện đang được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp dược phẩm, mỹ phẩm, thực phẩm chức năng... (Jędrejko *et al.*, 2021). Với giá trị dược liệu cao và nhu cầu sử dụng ngày càng tăng, việc nuôi trồng nhân tạo *C. militaris* đã được phát triển mạnh trong những năm gần đây. Để sản xuất quả thể nấm *C. militaris* với quy mô lớn, giống nấm được nuôi trên các giá thể giàu dinh dưỡng, chứa nhiều thành phần khác nhau như gạo lứt, lúa mạch, đậu nành, cám gạo, nhộng tằm, nước dừa... và trong các điều kiện môi trường như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng được kiểm soát nghiêm ngặt. Khi đạt kích thước thích hợp, quả thể nấm *C. militaris* sẽ được thu hoạch, sản phẩm phụ là để nấm còn lại bao gồm hệ sợi nấm, một phần quả thể còn sót lại và môi trường cơ chất chưa sử dụng hết. Để nấm *C. militaris* còn chứa nhiều chất dinh dưỡng và các hoạt chất trong đó có β -glucan nên việc nghiên cứu tìm hướng phát triển các sản phẩm thương mại từ để nấm sẽ giúp tận dụng tối đa lợi ích từ nguồn nấm *C. militaris* nuôi trồng nhân tạo, đồng thời góp phần bảo vệ môi trường. Hiện nay đã có một số nghiên cứu tận dụng để nấm *C. militaris* làm thức ăn chăn nuôi hoặc dùng để chiết xuất adenosine và cordycepin (Nguyen *et al.*, 2018). Mặc dù vậy, cho đến nay vẫn chưa có một nghiên cứu nào về việc thu nhận β -glucan từ để nấm *C. militaris*.

β -glucan đã được thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau như từ các loại nấm ăn, nấm men, ngũ cốc và các nguồn nguyên liệu khác. Trong các phương pháp chiết xuất β -glucan thông dụng thì chiết kiềm được sử dụng rộng rãi nhờ có hiệu quả cao và chi phí thấp. Ngoài ra các kỹ thuật chiết xuất mới như chiết có hỗ trợ siêu âm, vi sóng, enzyme,... cũng đã được sử dụng để tăng hiệu quả chiết xuất (Leong *et al.*, 2021). Nghiên cứu này sẽ khảo sát một số điều kiện chiết xuất β -glucan từ để nấm *C. militaris*, làm tiền đề cho việc sản xuất thực phẩm chức năng chứa β -glucan từ để nấm, giúp tận dụng được nguồn phụ phẩm từ việc nuôi trồng *C. militaris* để tạo sản phẩm có giá trị kinh tế cao hơn.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Để nấm *C. militaris* được thu nhận tại hộ kinh doanh Hoàng Thảo, phường Long Trường, Tp. Thủ Đức, Tp. Hồ Chí Minh. Để nấm được phơi khô, sau đó xay thành bột và rây qua rây lọc 1 mm. Bộ Kit thử β -glucan (nấm men và nấm) do hãng Megazyme - Ireland sản xuất.

Phương pháp nghiên cứu

Sơ đồ tách chiết β -glucan từ đế nấm *C. militaris*

Quá trình tách chiết β -glucan từ đế nấm *C. militaris* được tiến hành theo sơ đồ tổng quát trong Hình 1. Dịch lọc sau khi chiết được trung hòa bằng dung dịch H_2SO_4 0,1 N để điều chỉnh về giá trị pH là 7 trước khi tiến hành phân tích hàm lượng β -glucan.

Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng tới quá trình chiết β -glucan

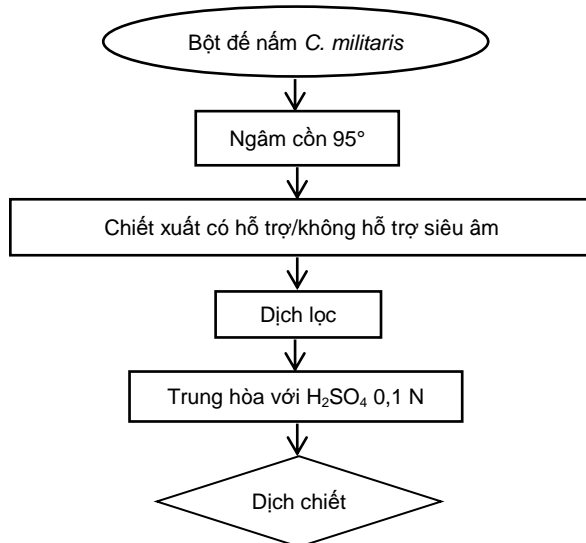
Khảo sát quá trình xử lý bột đế nấm bằng cồn và phương pháp tách chiết có hỗ trợ hoặc không hỗ trợ siêu âm: Cân chính xác mỗi mẫu 4 g bột đế nấm *C. militaris*. Các mẫu bột đế nấm được bố trí ba nghiệm thức: không ngâm cồn, ngâm với 120 mL cồn 95° trong 5 phút và ngâm với 120 mL cồn 95° trong 12 giờ (tỷ lệ nguyên liệu/cồn là 1/30 (g/mL)). Sau thời gian ngâm, lọc bỏ phần dịch nổi bằng giấy lọc Whatman số 1 (Anh). Sau đó thêm vào 120 mL nước cất để tiến hành chiết β -glucan. Đối với phương pháp tách chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm, các mẫu được siêu âm với các điều kiện là công suất siêu âm 200 W, tần số 37 kHz, nhiệt độ 80°C trong thời gian 30 phút. Quá trình chiết xuất được tiến hành ở 90°C trong 4 giờ. Sau đó lọc bằng giấy lọc Whatman số 1 để thu dịch chiết và xác định hàm lượng β -glucan trong dịch chiết.

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình chiết β -glucan với các nhiệt độ khảo sát lần lượt là 70, 80, 90 và 100°C. Các thông số được giữ cố định bao gồm: ngâm bột đế nấm với cồn 95° trong 12 giờ, tách chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm (80°C, 200 W, 37 kHz, 30 phút), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30 (g/mL), dung môi chiết là nước cất có giá trị pH là 7, thời gian chiết 4 giờ.

Khảo sát ảnh hưởng của pH dung môi đến quá trình chiết β -glucan với các giá trị pH khảo sát lần lượt là 7, 8, 9, 10, 11 và 12. Dung môi là nước cất được điều chỉnh về các giá trị pH khảo sát bằng dung dịch NaOH 1 N. Các thông số được giữ cố định bao gồm: ngâm bột đế nấm với cồn 95° trong 12 giờ, tách chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm (80°C, 200 W, 37 kHz, 30 phút), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30 (g/mL), nhiệt độ chiết 100°C, thời gian chiết 4 giờ.

Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến quá trình chiết β -glucan với các tỷ lệ khảo sát lần lượt là 1/30, 1/40, 1/50, 1/60 và 1/70 (g/mL). Các thông số được giữ cố định bao gồm: ngâm bột đế nấm với cồn 95° trong 12 giờ, tách chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm (80°C, 200 W, 37 kHz, 30 phút), nhiệt độ chiết 100°C, pH dung môi là 10, thời gian chiết 4 giờ.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến quá trình chiết nước β -glucan với các thời gian chiết khảo sát lần lượt là 3, 4, 5, 6 và 7 giờ. Các thông số được giữ cố định bao gồm: ngâm bột đế nấm với cồn 95° trong 12 giờ, tách chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm (80°C, 200 W, 37 kHz, 30 phút), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/50 (g/mL), nhiệt độ chiết 100°C, pH dung môi là 10.



Hình 1. Sơ đồ tách chiết β -glucan từ đế nấm *C. militaris*

Phương pháp phân tích

Hàm lượng β -glucan được xác định bởi sự chênh lệch giữa tổng glucan và α -glucan bằng bộ Kit thử β -glucan cho nấm men và nấm của Megazyme (Ireland), cách thực hiện được tiến hành theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

Xác định tổng glucan: Cân chính xác khoảng 90 mg mẫu cho vào ống nghiệm có nắp vặn, thêm vào 2 mL dung dịch H₂SO₄ 12 M (giữ lạnh trong đá), vặn nắp ống và trộn đều bằng máy vortex, ủ trong bể nước đá 2 giờ. Thêm 4 mL nước cất vào mỗi ống, vặn nắp và trộn đều trong 10 giây. Sau đó thêm 6 mL nước cất, vặn nắp và trộn đều thêm 10 giây. Nới lỏng nắp và đặt ống nghiệm trong bể nước sôi. Sau 5 phút, vặn chặt nắp và tiếp tục ủ trong 2 giờ. Làm nguội ống nghiệm đến nhiệt độ phòng và cẩn thận nới lỏng nắp. Chuyển toàn bộ nội dung của từng ống nghiệm vào một bình định mức 100 mL, tráng ống bằng đệm sodium acetate 200 mM (pH 4,5). Thêm 6 mL dung dịch NaOH 8 M vào bình định mức và điều chỉnh thể tích với đệm sodium acetate 200 mM (pH 4,5) cho đủ 100 mL. Trộn các thành phần bằng cách đảo ngược. Ly tâm một phần dung dịch ở 13000 vòng/phút trong 10 phút. Chuyển 0,1 mL dịch nổi vào phần đáy của một ống nghiệm, thêm 0,1 mL hỗn hợp exo-1,3-β-glucanase (20 U/mL) và β-glucosidase (4 U/mL) trong đệm sodium acetate 200 mM (pH 4,5) vào đáy của ống nghiệm, trộn đều bằng máy vortex và ủ ở 40°C trong 60 phút. Tiếp tục thêm 3 mL thuốc thử GOPOD vào ống nghiệm và ủ ở 40°C trong 20 phút. Đo độ hấp thụ quang của dung dịch ở 510 nm, đây là độ hấp thụ của mẫu thử nghiệm tổng glucan. Mẫu thử không bao gồm 0,2 mL đệm sodium acetate 200 mM (pH 4,5) và 3 mL thuốc thử GOPOD. Mẫu D-glucose chuẩn bao gồm 0,1 mL dung dịch D-glucose chuẩn (1 mg/mL); 0,1 mL đệm sodium acetate 200 mM (pH 4,5) và 3 mL thuốc thử GOPOD. Mẫu thử không và mẫu D-glucose chuẩn được ủ ở 40°C trong 20 phút và đo độ hấp thụ quang ở 510 nm.

Xác định α-glucan: Cân chính xác khoảng 100 mg mẫu cho vào ống nghiệm. Thêm vào một cục khuấy từ (5 × 15 mm), tiếp theo là 2 mL NaOH 1,7 M và khuấy 20 phút trong một bể nước đá trên một máy khuấy từ. Thêm 8 mL đệm sodium acetate 1,2 M (pH 3,8) vào mỗi ống và trộn đều bằng máy vortex. Ngay lập tức thêm 0,2 mL hỗn hợp amyloglucosidase (1630 U/mL) và invertase (500 U/mL) vào ống nghiệm, trộn đều bằng máy vortex và để ống nghiệm trong bể ổn nhiệt ở 40°C. Ủ ống nghiệm ở 40°C trong 30 phút. Chuyển toàn bộ dung dịch trong ống nghiệm vào bình định mức 100 mL và điều chỉnh thể tích bằng nước cất. Sau đó ly tâm một phần dung dịch ở 13000 vòng/phút trong 10 phút. Chuyển 0,1 mL dịch nổi vào một ống nghiệm, thêm vào 0,1 mL đệm sodium acetate 200 mM (pH 4,5) cùng 3 mL thuốc thử GOPOD và ủ ở 40°C trong 20 phút. Đo độ hấp thụ của dung dịch ở 510 nm, đây là độ hấp thụ của mẫu thử nghiệm α-glucan.

Tổng glucan (% w/w) = $\Delta A \times \frac{F}{W} \times 90$ α-glucan (% w/w) = $\Delta A \times \frac{F}{W} \times 90$ β-glucan = Tổng glucan – α-glucan

Trong đó: ΔA: độ hấp thụ của mẫu thử nghiệm (tổng glucan hoặc α-glucan) – độ hấp thụ của mẫu thử không

F: hệ số chuyển đổi độ hấp thụ thành μg của D-glucose, $F = \frac{100 \text{ (}\mu\text{g của D-glucose chuẩn)}}{\text{Độ hấp thụ GOPOD của 100 } \mu\text{g D-glucose chuẩn}}$

W: khối lượng của mẫu phân tích (mg)

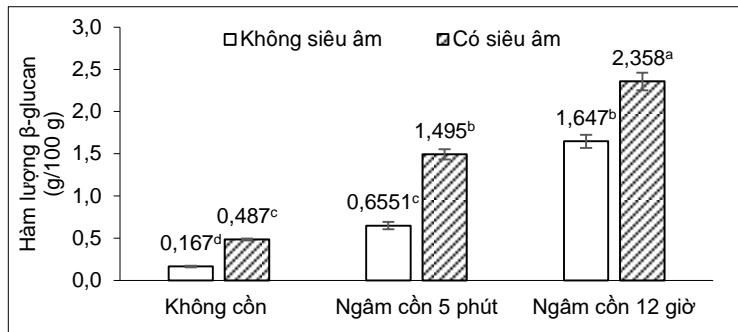
Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và phần mềm thống kê JMP ® 11. Các thí nghiệm trong nghiên cứu được lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trung bình được so sánh bằng phân tích One-way Anova và kiểm định Tukey.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát quá trình xử lý nguyên liệu và phương pháp chiết

Kết quả khảo sát quá trình xử lý nguyên liệu bằng cồn và lựa chọn phương pháp chiết được trình bày trong Hình 2. Xử lý bột để nấm bằng cồn 95° trước khi chiết sẽ thu được hàm lượng β-glucan cao hơn so với khi không xử lý bằng cồn. Đồng thời, phương pháp chiết có hỗ trợ siêu âm (80°C, 200 W, 37 kHz, 30 phút) cho hàm lượng β-glucan cao hơn phương pháp không hỗ trợ siêu âm. Hàm lượng β-glucan thu được là cao nhất khi bột để nấm được ngâm cồn trong 12 giờ và chiết xuất có hỗ trợ siêu âm (2,358 ± 0,104 g/100 g bột để nấm). Thành phần chất béo trong quả thể *C. militaris* chiếm 8,8% và trong hệ sợi nấm chiếm 2,2% trọng lượng khô (Chan *et al.*, 2015). Việc xử lý bột để nấm *C. militaris* bằng cồn sẽ giúp hòa tan chất béo và loại bỏ các hợp chất phân tử thấp làm cho thành tế bào dễ thấm thấu hơn, do đó làm tăng hiệu quả chiết xuất (Frioui *et al.*, 2018). Trong nghiên cứu của Liu và đồng tác giả (2020), bột nấm *C. militaris* cũng được ngâm cồn 95° trong 12 giờ trước khi trích ly để thu nhận polysaccharide. Kết quả thí nghiệm cho thấy phương pháp chiết có sự hỗ trợ của sóng siêu âm giúp cải thiện khả năng chiết β-glucan từ để nấm. Sóng siêu âm sẽ tạo ra các bong bóng khí trong dung môi và khi các bong bóng này vỡ ra sẽ dẫn đến sự phá vỡ các màng sinh học, giúp giải phóng của các hợp chất, tăng cường sự thâm nhập của dung môi vào các nguyên liệu, từ đó có thể tăng hiệu suất chiết xuất (Villares *et al.*, 2012). Như vậy, việc xử lý bột để nấm bằng cách ngâm cồn 95° trong thời gian 12 giờ và chiết có hỗ trợ sóng siêu âm cho hàm lượng β-glucan trong dịch chiết cao nhất và được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

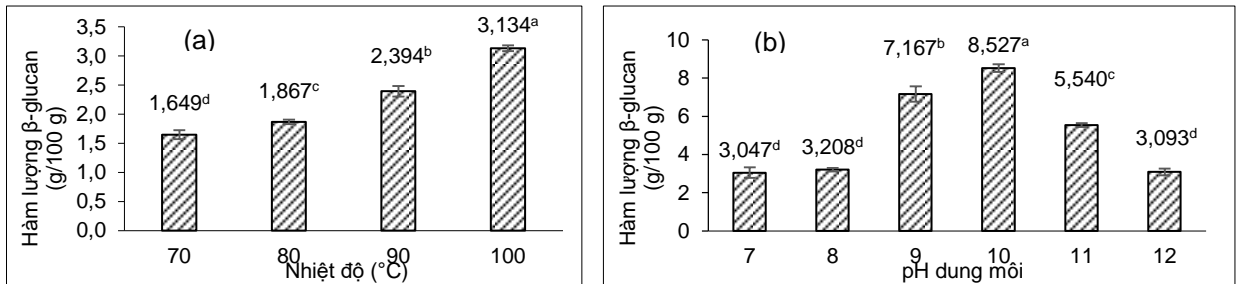


Hình 2. Ảnh hưởng của phương pháp xử lý nguyên liệu với cần và phương pháp chiết lên quá trình chiết β -glucan

(Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Ảnh hưởng của nhiệt độ lên quá trình chiết β -glucan

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên quá trình chiết β -glucan (Hình 3a) cho thấy khi nhiệt độ chiết tăng thì hàm lượng β -glucan cũng tăng theo. Hàm lượng β -glucan thu được thấp nhất khi ở nhiệt độ 70°C (1,649 ± 0,076 g/100 g bột đế nấm) và đạt giá trị cao nhất ở nhiệt độ chiết là 100°C (3,134 ± 0,049 g/100 g bột đế nấm). Nhiệt độ là một yếu tố có tác động mạnh lên khả năng chiết xuất polysaccharide trong nấm. Nhiệt độ tăng làm gia tăng độ khuếch tán và hòa tan của polysaccharide từ tế bào nấm vào trong dung môi chiết, từ đó làm tăng hiệu suất chiết xuất (Smiderle *et al.*, 2017). Wang và đồng tác giả (2021) sử dụng nhiệt độ 95°C để chiết β -glucan từ quả thể nấm *C. militaris*. Trong khi đó, nghiên cứu của Liu và đồng tác giả (2020) sử dụng nhiệt độ chiết là 90°C để trích ly polysaccharide từ sợi nấm *C. militaris*. Trong nghiên cứu này, nhiệt độ chiết 100°C cho hàm lượng β -glucan trong dịch chiết cao nhất do đó được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH dung môi lên quá trình chiết β -glucan. (a) Nhiệt độ, (b) pH dung môi

(Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

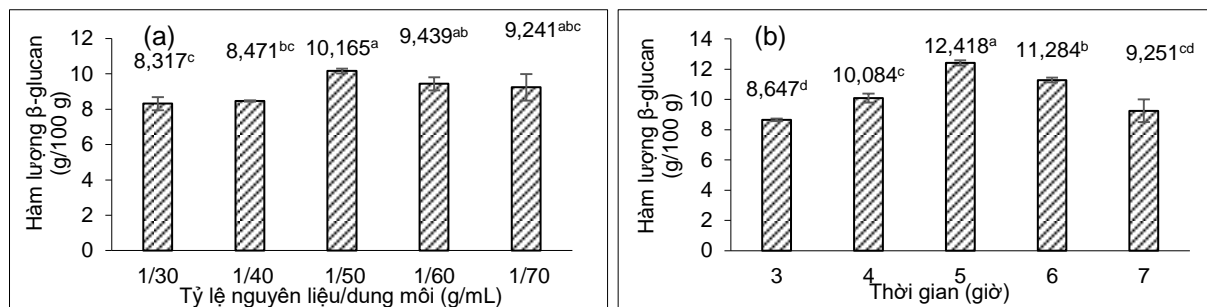
Ảnh hưởng của pH dung môi lên quá trình chiết β -glucan

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH dung môi lên quá trình chiết β -glucan (Hình 3b) cho thấy ban đầu khi pH dung môi tăng từ pH 7 lên pH 10 thì hàm lượng β -glucan cũng tăng theo, nhưng khi giá trị pH dung môi tăng lên 11 thì hàm lượng β -glucan lại giảm mạnh. Trong các pH dung môi khảo sát thì hàm lượng β -glucan thu được cao nhất khi dung môi có giá trị pH là 10 (8,527 ± 0,198 g/100 g bột đế nấm). Kết quả thí nghiệm cho thấy môi trường kiềm thích hợp cho quá trình trích ly β -glucan từ bột đế nấm. Việc chiết xuất bằng kiềm giúp phá hủy vách tế bào nấm, phân cắt liên kết giữa glucan và protein trong vách tế bào, cho phép sự giải phóng của polysaccharide nội bào và chiết xuất các glucan tan trong kiềm (Leong *et al.*, 2021). Nghiên cứu của Lee và đồng tác giả (2017) cũng lựa chọn dung môi có pH 10 để trích ly β -glucan từ cám yến mạch. Trong nghiên cứu này, ban đầu việc tăng giá trị pH của dung môi sẽ làm tăng hàm lượng β -glucan, nhưng khi giá trị pH của dung môi quá cao thì hàm lượng β -glucan lại giảm xuống. Nguyên nhân có thể là do trong môi trường kiềm mạnh, một phần β -glucan bị phân giải do sự thủy phân của liên kết (1,3)-glycoside (Gangopadhyay *et al.*, 2015). Như vậy, sử dụng dung môi có giá trị pH là 10 cho hàm lượng β -glucan trong dịch chiết cao nhất và được chọn để chiết β -glucan từ đế nấm *C. militaris* trong các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lên quá trình chiết β -glucan

Theo kết quả thể hiện trong Hình 4a, hàm lượng β -glucan tăng dần khi tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thay đổi từ 1/30 đến 1/50 (g/mL). Giữa các tỷ lệ 1/50, 1/60 và 1/70 (g/mL) thì hàm lượng β -glucan thu được không có sự khác biệt về mặt thống kê. Ở tỷ lệ 1/30 và 1/40 (g/mL), lượng dung môi sử dụng ít sẽ dẫn đến việc khả năng tách chiết không hoàn toàn nên hàm lượng β -glucan thu được trong dịch chiết thấp. Khi tăng lượng dung môi lên sẽ làm tăng khả năng tiếp xúc của nguyên liệu với dung môi, tăng khả năng khuếch tán của chất rắn vào dung môi, dẫn đến hiệu quả chiết xuất tăng lên. Tuy nhiên, hàm lượng hoạt chất sẽ không tiếp tục tăng khi quá trình trích ly

đạt trạng thái cân bằng, khi đó việc tiếp tục tăng lượng dung môi sẽ gây lãng phí dung môi và làm loãng dịch chiết (Nguyễn *et al.*, 2018). Nghiên cứu của Liu và đồng tác giả (2020) đã chọn 1/40 (g/mL) là tỷ lệ nguyên liệu/dung môi để chiết nước nóng polysaccharide từ sợi nấm *C. militaris*. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/50 (g/mL) cho hàm lượng β -glucan trong dịch chiết cao, đồng thời sử dụng lượng dung môi ít hơn tỷ lệ 1/60 và 1/70 (g/mL) nên được chọn để chiết β -glucan từ đế nấm *C. militaris* trong các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi và thời gian lên quá trình chiết β -glucan.
(a) Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, (b) Thời gian chiết

(Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Ảnh hưởng của thời gian chiết lên quá trình chiết β -glucan

Kết quả phân tích hàm lượng β -glucan theo thời gian chiết cho thấy khi tăng thời gian từ 3 đến 5 giờ thì hàm lượng β -glucan tăng lên, nhưng khi tiếp tục kéo dài thời gian chiết lên 6 giờ thì hàm lượng β -glucan giảm xuống (Hình 4b). Hàm lượng β -glucan đạt giá trị cao nhất ở thời gian chiết là 5 giờ và thấp nhất ở thời gian chiết là 3 giờ và 7 giờ. Trong quá trình chiết xuất, thời gian chiết tăng thì các hoạt chất trong nguyên liệu khuếch tán từ tế bào ra dung môi nhiều hơn dẫn đến hàm lượng β -glucan tăng lên. Tuy nhiên, thời gian chiết quá dài lại làm hàm lượng β -glucan thu được giảm xuống, có thể là do một phần β -glucan đã bị hao hụt do sự phân cắt của liên kết 1-3 glycoside trong môi trường kiềm (Gangopadhyay *et al.*, 2015). Thời gian chiết quá dài còn gây lãng phí năng lượng và kéo dài quá trình sản xuất. Kết quả thu được cho thấy thời gian trích ly 5 giờ cho hàm lượng β -glucan trong dịch chiết cao nhất và được chọn để tiến hành trích ly β -glucan từ đế nấm *C. militaris*. Hàm lượng β -glucan thu được trong dịch chiết qua quá trình chiết xuất đế nấm *C. militaris* là 12,418 g/100 g bột đế nấm.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã khảo sát và tuyển chọn một số điều kiện chiết xuất β -glucan từ đế nấm sau khi thu hoạch quả thể *C. militaris*. Các điều kiện thích hợp cho quá trình chiết β -glucan từ đế nấm *C. militaris* là bột đế nấm được xử lý bằng cách ngâm cồn 95° trong 12 giờ; chiết xuất có sự hỗ trợ của sóng siêu âm ở các điều kiện 80°C, 200 W, 37 kHz, 30 phút; nhiệt độ chiết 100°C; giá trị pH của dung môi là 10; tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/50 (g/mL) và thời gian chiết 5 giờ. Hàm lượng β -glucan thu được trong dịch chiết là 12,418 g/100 g bột đế nấm.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí cho đề tài khoa học công nghệ cấp cơ sở năm 2024 của Viện Sinh học nhiệt đới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chan JSL, Barseghyan GS, Asatiani MD, Wasser SP (2015). Chemical composition and medicinal value of fruiting bodies and submerged cultured mycelia of caterpillar medicinal fungus *Cordyceps militaris* CBS-132098 (Ascomycetes). *Int J Med Mushrooms*, 17(7): 649-659.
- Gangopadhyay N, Hossain MB, Rai DK, Brunton NP (2015). Optimisation of yield and molecular weight of β -glucan from barley flour using response surface methodology. *J Cereal Sci*, 62: 38-44.
- Jędrejko KJ, Lazur J, Muszyńska B (2021). *Cordyceps militaris*: An overview of its chemical constituents in relation to biological activity. *Foods*, 10(11): 2634.
- Lee YT, Puligundla P, Schwarz PB (2017). Molecular weight, solubility and viscosity of β -glucan preparations from barley pearling byproducts. *Sains Malays*, 46(5): 713-718.
- Leong YK, Yang FC, Chang JS (2021). Extraction of polysaccharides from edible mushrooms: Emerging technologies and recent advances. *Carbohydr Polym*, 251: 117006.
- Liu Y, Li Y, Zhang H, Li C, Zhang Z, Liu A, Wu W (2020). Polysaccharides from *Cordyceps militaris* cultured at different pH: Sugar composition and antioxidant activity. *Int J Biol Macromol*, 162: 349-358.
- McCleary BV, Draga A (2016). Measurement of β -glucan in mushrooms and mycelial products. *J AOAC Int*, 99(2): 364-373.
- Nguyen TT, Le TLC, Do TTH, La TQN, Tran TPT, Truong QP, Khuat HT (2018). Extraction of adenosine and cordycepin from spent solid medium of *Cordyceps militaris* culture. *Vietnam J Sci Technol*, 56(4A): 221-228.

- Nguyễn TNT, Nguyễn TTH, Trương QD, Phan HTN, Cao TCT (2018) Ảnh hưởng của dung môi và pH đến quá trình trích ly các hợp chất có khả năng kháng oxy hóa từ tía tô (*Perilla frutescens*). *Tạp chí Khoa học công nghệ và Thực phẩm*, 14(1): 66-74.
- Smiderle FR, Morales D, Gil-Ramírez A, de Jesus LI, Gilbert-López B, Iacomini M, Soler-Rivas CJCP (2017). Evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extractions to obtain β -d-glucans from mushrooms. *Carbohydr Polym*, 156: 165-174.
- Villares A, Mateo-Vivaracho L, Guillamón E (2012). Structural features and healthy properties of polysaccharides occurring in mushrooms. *Agriculture*, 2(4): 452-471.
- Wang J, Wang Y, Yang X, Lin P, Liu N, Li X, Zhang B, Guo S (2021). Purification, structural characterization, and PCSK9 secretion inhibitory effect of the novel alkali-extracted polysaccharide from *Cordyceps militaris*. *Int J Biol Macromol*, 179: 407-417.

RESEARCH ON SOME FACTORS AFFECTING THE EXTRACTION OF β -GLUCAN FROM SPENT MUSHROOM SUBSTRATE OF *CORDYCEPS MILITARIS*

Vu Thi Lan Anh^{*}, Vo Thi Kieu Thanh, Nguyen Thi Lan Thanh

Institute of Tropical Biology - Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Cordyceps militaris, also known as Dong Trung Ha Thao, is a highly valued medicinal fungus widely used in traditional medicine. Currently, *Cordyceps militaris* is being cultivated in many countries around the world, including Vietnam. However, the cultivation process of *Cordyceps militaris* generates a large amount of by-product, which is the spent mushroom substrate after harvesting the fruiting bodies. The spent mushroom substrate still contains many active ingredients, including β -glucan, and can be utilized to extract β -glucan. This study was conducted to obtain suitable extraction conditions for the extraction of β -glucan from the spent mushroom substrate. In this study, the suitable pre-treatment condition for the raw material before extraction was to soak the spent mushroom substrate powder in ethanol 95° for 12 hours. The ultrasound-assisted extraction (80°C, 200 W, 37 kHz, 30 minutes) gave a higher content of β -glucan in the extract than the extraction without ultrasound wave. The suitable conditions for β -glucan extraction were a temperature of 100°C, a solvent pH of 10, a material-to-solvent ratio of 1/50 (g/mL), and an extraction time of 5 hours. The β -glucan content obtained after the extraction process was 12.418 g/100 g spent mushroom substrate powder.

Keywords: β -glucan, alkali extraction, *Cordyceps militaris*, ultrasound-assisted, polysaccharide.

^{*} Author for correspondence: Tel: +84-933099020; Email: lananh06sh@gmail.com