



DOI:10.22144/ctujos.2025.007

NGHIÊN CỨU PHÁ VÁCH BÀO TỬ NẤM LINH CHI BẰNG NITƠ LỎNG KẾT HỢP SÓNG SIÊU ÂM VÀ NGHIỀN BI

Lương Thị Ngọc Hân*, Đỗ Thị Như Thảo, Nguyễn Trần Đức Duy, Lê Thành Hưng, Hoàng Đắc Hiệt, Nguyễn Thị Loan và Nguyễn Phạm Trúc Phương
Phòng thí nghiệm Bảo tồn Lai tạo và Phát triển giống Nấm, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): ngochanlt96@gmail.com

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 27/06/2024

Sửa bài (Revised): 30/08/2024

Duyệt đăng (Accepted): 16/12/2024

Title: Research on breaking the spores of *Ganoderma lucidum* using liquid nitrogen combined with ultrasonic waves and mechanical grinding

Author(s): Luong Thi Ngoc Han*, Do Thi Nhu Thao, Nguyen Tran Duc Duy, Le Thanh Hung, Hoang Dac Hiet, Nguyen Thi Loan and Nguyen Pham Truc Phuong

Affiliation(s): Laboratory of Preservation Breeding and Development of Fungal Stock, Research and Development Center for High-technology Agriculture, Viet Nam

TÓM TẮT

Nấm linh chi là loại dược liệu quý từ thiên nhiên có công dụng hỗ trợ sức khỏe. Các hợp chất được nghiên cứu nhiều ở nấm linh chi như polysaccharid, triterpenoid... Mặc dù có một lượng lớn các hoạt chất sinh học được tìm ra trong nấm linh chi nhưng việc chiết xuất các hoạt chất này đa số được thực hiện trên quả thể và tơ nấm, có rất ít nghiên cứu trích ly trên bào tử nấm. Bào tử được cấu tạo bởi lớp vách đôi rất bền vững nên làm giảm khả năng chiết xuất các hợp chất. Việc nghiên cứu phá vách bào tử linh chi là bước quan trọng cho quá trình phân tích hợp chất có trong bào tử. Trong nghiên cứu này, bào tử linh chi bị phá vách bằng sóng siêu âm sau khi được làm lạnh nhanh bằng nitơ lỏng ở biên độ 70%, 120 phút kết hợp với nghiền cơ học ở tần số 30Hz, 90 phút cho kết quả hiệu suất thu hồi polysaccharide cao nhất là 10,74% và triterpenoid là 38,18 mg/g chất khô cao hơn bào tử chưa phá vách lần lượt 3,55 và 128,99 lần.

Từ khóa: Bào tử, *Ganoderma lucidum*, nấm linh chi, nghiền cơ học, sóng siêu âm

ABSTRACT

Lingzhi mushroom is a precious natural medicinal herb with many health-supporting properties. Various bioactive compounds in lingzhi mushrooms, such as polysaccharides, steroids, organic germanium, and triterpenoids have been extensively studied. Despite the abundance of bioactive compounds found in lingzhi mushrooms, the analysis and extraction of these compounds are mostly conducted on fruiting bodies and mycelium, with very few studies on the extraction from lingzhi spores. Spores are enclosed by a tough double-layered wall, reducing the ability to extract compounds. Therefore, breaking the spore wall of lingzhi mushrooms is an important stage in analyzing the components of spores. In this study, lingzhi spore walls were disrupted using ultrasound waves in a cold environment after rapid freezing with liquid nitrogen at 70% amplitude for 120 minutes, combined with mechanical grinding with liquid nitrogen at a shaking frequency of 30Hz for 90 minutes, resulting in the highest recovery efficiency of polysaccharides at 10.737% and triterpenoids at 38.182 mg/g dry weight, compared to the control (unbroken spores) at 3.55 and 128.99 times, respectively.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, Lingzhi mushroom, mechanical grinding, spores, ultrasound waves

1. GIỚI THIỆU

Nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) là một loại dược liệu được sử dụng làm thuốc từ xưa đến nay. Theo các tài liệu nghiên cứu, nấm linh chi có nhiều công dụng trong việc hỗ trợ điều hoà huyết áp, tăng khả năng miễn dịch cho cơ thể, hỗ trợ giải độc và cải thiện bệnh viêm gan mãn tính, xơ gan, thần kinh suy nhược (Oke et al., 2022). Có nhiều công trình trên thế giới đã định danh được các hoạt chất và xác định tác dụng dược lý của nấm linh chi như: germanium, acid ganoderic, acid ganodermic, acid oleic, ganodosteron, ganoderan, adenosin, β -D-glucan. Trong một nghiên cứu về các thành phần không bay hơi của *G. lucidum*, người ta thấy rằng nấm chứa 1,8% tro, 26–28% carbohydrate, 3–5% chất béo thô, 59% chất xơ thô và 7–8% protein thô (Mau et al., 2001). Triterpenoid và polysaccharide được xem là thành phần chủ yếu có trong nấm được chú ý nhiều nhất. Chính vì lý do đó mà hiện nay việc trồng và sử dụng nấm linh chi đang trở nên rất phổ biến và được nhiều người quan tâm.

Bên cạnh đó, bào tử do nấm linh chi phóng thích ra được cho là tinh chất của nấm chứa nhiều chất dinh dưỡng và các đặc tính dược lý, là sản phẩm rất tốt cho sức khoẻ nhưng lại ít được quan tâm nghiên cứu trích ly hoạt chất. Cấu tạo bào tử nấm linh chi gồm 2 lớp vỏ cứng, việc phá vỡ bào tử nấm linh chi để trích ly hoạt chất bên trong bào tử là điều đáng được quan tâm. Một số nghiên cứu so sánh về hiệu quả của bào tử nấm khi bị phá vỡ lớp vỏ và bào tử nấm linh chi còn nguyên đã được nghiên cứu trên các tế bào ung thư, kết quả cho thấy sử dụng bào tử nấm linh chi đã phá vách có hoạt động hiệu quả hơn. Do đó, để thu được hoạt chất có trong bào tử nấm linh chi tốt nhất thì cấu trúc lớp vỏ của bào tử cần được phá vỡ (Soccol et al., 2016). Trong nhiều phương pháp phá vỡ thì sóng siêu âm đã được nghiên cứu là có hiệu quả. Phá vỡ vách bào tử bằng sóng siêu âm đã bắt đầu được các nhà khoa học quan tâm nhiều hơn nhờ dễ vận hành, tiêu ít dung môi và sử dụng nhiệt độ thấp, tốn ít năng lượng nên dễ dàng áp dụng ở quy mô sản xuất thương mại (Nguyen et al., 2023). Bên cạnh đó phương pháp nghiền bi cũng là một phương pháp hiệu quả, dễ dàng ứng dụng vào thực tiễn. Tuy nhiên, trong quá trình phân ly bằng sóng siêu âm hay trong quá trình nghiền bằng bi, hiện tượng nhiệt có thể sản sinh ra ảnh hưởng đến thành phần hoạt chất trong bào tử, do đó việc tiền xử lý bào tử nấm linh chi với nitơ lỏng được dùng để giúp giữ nhiệt trong quá trình nghiền (Nguyen et al., 2022). Do nitơ lỏng có tác dụng làm lạnh nhanh, có thể giúp bào tử đạt đến nhiệt độ -196°C. Đồng thời ở nhiệt độ lạnh -196°C,

tế bào bị đè nén có thể tác động thêm nhằm tạo được sự phá vỡ nhỏ cho vách bào tử nấm linh chi. Việc kết hợp các phương pháp với nhau để đưa ra một quy trình phá vách bào tử nấm linh chi đơn giản, đem lại hiệu quả trích ly hoạt chất cao, có thể ứng dụng rộng rãi trong việc tạo ra các sản phẩm thực phẩm từ bào tử nấm linh chi đã được phá vách để phục vụ cho sức khỏe của con người.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu nghiên cứu

Bào tử nấm linh chi (*G. lucidum*) chưa phá vách thương mại (Việt Nam) do Trường Đại học Nông lâm thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

Thiết bị: máy đo quang phổ (UV5Nano, Mettler toledo, Thụy Sĩ), máy phá mẫu siêu âm (Branson SLPe Digital Sonifier, Mỹ), bồn ủ nhiệt (Lab. Companion, Hàn Quốc), Pipet (Mettler toledo, Thụy Sĩ), máy ly tâm (Hettich, Đức), máy nghiền bi (TissueLyser II, Qiagen), tủ mát (MPR-514R Panasonic, Nhật Bản), kính hiển vi (VMI0576, ZEISS, Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định hàm lượng polysaccharide hòa tan

Hàm lượng polysaccharide hòa tan được định lượng bằng phương pháp phenol-sulfuric acid, được mô tả bởi Nielsen (Nielsen, 2010). Các bước được mô tả tóm tắt như sau: cân 1,0 g bào tử nấm Linh chi đã được phá vỡ, chiết với 45 ml dung môi NaOH 6% ở nhiệt độ 70°C trong 10 phút. Ly tâm dịch chiết tại 4000 vòng/phút trong 5 phút, lọc và thu dịch lọc vào cốc thủy tinh 100 ml; tương tự, rửa lại cặn, ly tâm, lọc và thu dịch lọc gộp chung vào cốc thủy tinh 100 ml; bổ sung thêm dung môi cho đủ 50 ml. Dịch chiết này được dùng để định lượng polysaccharide.

Mẫu thử: 400 μ l dịch mẫu chứa polysaccharide cho tác dụng với 200 μ l dung dịch phenol 5%, cho thêm 1 ml H₂SO₄ đậm đặc và để 30 phút ở nhiệt độ phòng. Màu của phản ứng được phát hiện trên máy quang phổ ở bước sóng 490 nm. Hàm lượng polysaccharide được định lượng dựa trên số đo OD thu được của mẫu thí nghiệm đối chiếu với đồ thị chuẩn glucose.

2.2.2. Xác định hàm lượng triterpenoid

Phương pháp định lượng triterpenoid dựa theo mô hình của Chen et al. (2007) và điều chỉnh cho phù hợp với thí nghiệm. Trước tiên, 1,0 g bào tử nấm Linh chi đã được phá vỡ được cho vào erlen 250 ml, chiết với 50 ml ethanol 96° ở nhiệt độ 70°C trong 15 phút. Dịch chiết được ly tâm tại 4000 vòng/phút

trong 5 phút, lọc và thu dịch lọc vào cốc thủy tinh 100 ml; tương tự, rửa lại cặn với 5 ml dung môi, đem ly tâm, lọc và thu dịch lọc gộp chung vào cốc thủy tinh 100 ml. Sau đó, dịch lọc được cô cạn trên bồn ủ nhiệt ở 70°C cho đến khi cặn khô. Cặn được hòa tan bằng 2 ml methanol, cho toàn bộ dịch vào bình định mức 10 ml, bổ sung methanol cho vừa đủ 10 ml. Mẫu này được dùng cho quy trình định lượng triterpenoid.

Tiến hành thí nghiệm: hút 250 µl dịch chiết có chứa methanol sang bình định mức 10 ml, cho bay hơi hết methanol trong bồn ủ nhiệt ở nhiệt độ 70°C. Sau đó, 0,3 ml vanillin – acetic lạnh 5% và 1 ml HClO₄ được thêm vào; đem ủ trong bồn ủ nhiệt 70°C trong 25 phút, sau đó làm lạnh trong tủ mát 3 phút; bổ sung tiếp acid acetic lạnh vào bình định mức cho đến vạch 10 ml; đem mẫu đo mật độ quang ở bước sóng 544 nm và đối chiếu với đồ thị chuẩn oleanolic acid để tính hàm lượng triterpenoid. Lưu ý: phải cho bay hơi hết dung môi trong dịch chiết mẫu và dung dịch chuẩn vì dung môi làm ảnh hưởng đến mẫu khi phân tích, chất chuẩn là oleanolic acid.

2.2.3. Phương pháp phá vỡ vách bào tử dùng sóng siêu âm kết hợp với nitor lỏng

Xử lý mẫu với nitor lỏng: Nitor lỏng được cho vào cốc thủy tinh 250 ml chứa 20 g mẫu bào tử linh chi gây ra hiện tượng shock nhiệt cho bào tử.

Sau khi nitor lỏng bay hơi hết, nước cất lạnh được cho vào cốc thủy tinh chứa 20 g bào tử linh chi đã được xử lý với nitor lỏng và đem mẫu đi phá vỡ bằng máy phá mẫu siêu âm (Branson SLPe Digital Sonifier, Mỹ). Trong quá trình nghiền mẫu bằng sóng siêu âm, cốc thủy tinh được đựng trong khay (kích thước 27 x 20 x 10 cm), được làm lạnh liên tục bằng đá gel để tạo môi trường lạnh. Nhiệt độ khay đá lạnh được kiểm soát bằng nhiệt kế.

– Thí nghiệm 1: Biên độ phá mẫu (amplitude) được khảo sát ở 30%, 50%, 70% và 100% máy phá mẫu được sử dụng chế độ liên tục (continuous) trong 30 phút. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Từ thí nghiệm, ta chọn ra biên độ phá tối ưu nhất tiến hành khảo sát thời gian phá mẫu.

– Thí nghiệm 2: Thời gian phá mẫu được khảo sát ở 30 phút, 60 phút, 90 phút 120 phút và 150 phút, máy phá mẫu được sử dụng chế độ liên tục (continuous) với biên độ được thiết lập theo thí nghiệm trên. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Sau khi mẫu được phá vỡ, mẫu được đem đi ly tâm 4000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ nước và sấy khô ở 50°C. Soi cấu trúc của bào tử linh chi dưới kính hiển vi và đo hàm lượng hoạt chất được mô tả

ở 2.2.1 và 2.2.2 để tìm ra biên độ, thời gian phá mẫu bằng sóng siêu âm tốt nhất.

2.2.4. Phương pháp phá vỡ vách bào tử dùng nghiền cơ học kết hợp với nitor lỏng

Xử lý mẫu với nitor lỏng tương tự như trên.

Sau khi nitor lỏng bay hơi hết, 20 g bào tử linh chi được cho vào cốc nghiền 500 ml và đem ủ trong nitor lỏng trong 10 phút. Sau đó, bào tử linh chi được đem đi phá vỡ bằng máy nghiền bi (bi thép Ø 5 mm) (TissueLyser II, Qiagen).

– Thí nghiệm 1: Tần số lắc được khảo sát 10Hz, 20Hz và 30Hz trong thời gian 30 phút. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

– Thí nghiệm 2: Thời gian nghiền mẫu được khảo sát ở 15, 45, 60, 90 và 120 phút với tần số lắc được thiết lập ở thí nghiệm trên. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Sau thời gian nghiền, cấu trúc của bào tử linh chi được quan sát dưới kính hiển vi và đánh giá thành phần polysaccharide hòa tan và triterpenoid.

2.2.5. Phương pháp phá vỡ vách bào tử dùng kết hợp sóng siêu âm và nghiền cơ học với làm lạnh bằng nitor lỏng

Thí nghiệm được thực hiện dựa trên các kết quả thu được từ nội dung 2.2.3 và 2.2.4. Thứ tự nghiền bằng sóng siêu âm và máy nghiền bi được khảo sát:

➤ Thí nghiệm 1:

Xử lý mẫu với nitor lỏng: Sau khi nitor lỏng bay hơi hết, nước cất lạnh được cho vào cốc thủy tinh chứa bào tử linh chi đã được xử lý với nitor lỏng và đem mẫu đi phá vỡ bằng máy phá mẫu siêu âm (Branson SLPe Digital Sonifier, Mỹ) với biên độ và thời gian được xác định ở nội dung 2.2.3. Trong quá trình nghiền mẫu bằng sóng siêu âm, cốc thủy tinh được đựng trong khay đá lạnh để tạo môi trường lạnh.

Sau khi phá bằng sóng siêu âm, mẫu tiếp tục được cho vào cốc nghiền và đem ủ trong nitor lỏng trong 10 phút. Sau đó, bào tử linh chi được đem đi phá vỡ bằng máy nghiền bi (TissueLyser II, Qiagen) với tần số lắc và thời gian xác định được ở nội dung 2.2.4. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

➤ Thí nghiệm 2:

Xử lý mẫu với nitor lỏng: Sau khi nitor lỏng bay hơi hết, bào tử linh chi được cho vào cốc nghiền và đem ủ trong nitor lỏng trong 10 phút. Sau đó, bào tử linh chi được đem đi phá vỡ bằng máy nghiền bi với

tần số lắc và thời gian xác định được ở nội dung 2.2.4.

Sau khi mẫu được nghiền bằng máy nghiền bi, nước cất lạnh được cho vào cốc thủy tinh chứa bào tử linh chi đã được nghiền bằng máy nghiền bi và đem mẫu đi phá vỡ bằng máy phá mẫu siêu âm với biên độ và thời gian được xác định ở nội dung 2.2.3. Trong quá trình nghiền mẫu bằng sóng siêu âm, cốc thủy tinh được đựng trong khay đá lạnh để tạo môi trường lạnh. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Sau thời gian nghiền, cấu trúc của bào tử linh chi được quan sát dưới kính hiển vi và đánh giá thành phần polysaccharide hòa tan và triterpenoid.

2.2.6 Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Minitab 21 và Excel 2016. Phương pháp so sánh Turkey được sử dụng để xác định sự khác biệt giữa các giá trị trung bình, có ý nghĩa với độ tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiệm thức phương pháp phá vỡ vách bào tử dùng sóng siêu âm kết hợp với nitơ lỏng

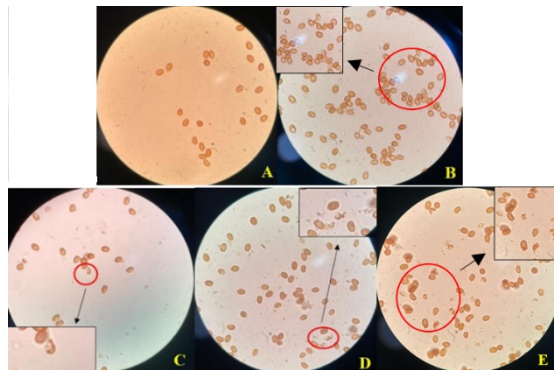
3.1.1. Khảo sát biên độ phá mẫu bằng sóng siêu âm

Sau khi quan sát dưới kính hiển vi (độ phóng đại 100x) có thể thấy ở biên độ phá mẫu 30% vách bào tử linh chi còn nguyên vẹn (Hình 1B), bào tử bị phá ở biên độ 30% không có sự khác biệt so với bào tử ban đầu chưa phá vách (Hình 1A). Hình 1D, E ở biên độ phá mẫu 70% và 100%, có thể thấy vách bào tử linh chi bắt đầu bị vỡ rõ rệt so với bào tử chưa phá vách (Hình 1A).

Kết quả Bảng 1 cho thấy trong cùng một thời gian phá mẫu (30 phút), biên độ phá mẫu có hiệu suất thu hồi hàm lượng hoạt chất cao nhất là 100%, thấp nhất là 30%. Hàm lượng polysaccharide hoà tan và triterpenoid ở biên độ phá mẫu 70% cao hơn so với biên độ phá mẫu 30% lần lượt 2,45 và 2,14 lần.

Nguyên nhân là khi công suất siêu âm càng lớn thì quá trình xâm thực khí càng mạnh, hiệu ứng vi bọt khí của sóng siêu âm thúc đẩy quá trình giải phóng hoạt chất. Năng lượng siêu âm làm tăng dao động bề mặt, tạo ra áp lực lớn giúp thẩm thấu dung môi tốt hơn và tác động đến tế bào vật liệu, tăng khả năng truyền khối tới bề mặt phân cách, các mô tế bào bị phá vỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho triterpenoid khuếch tán vào dung môi nên hàm lượng hoạt chất tăng lên (Hwang et al., 2019). Điều

này chứng tỏ biên độ càng cao thì hoạt chất thu được càng nhiều. Tuy nhiên, hoạt chất thu được ở biên độ 70% và 100% khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ($P > 0,05$). Biên độ 100% sinh nhiệt nhiều hơn nếu tăng thời gian khảo sát, ảnh hưởng đến hàm lượng hoạt chất thu được và không mang lại hiệu quả kinh tế (Nguyen et al., 2022). Biên độ nên chọn là 70% để tiếp tục khảo sát thời gian phá mẫu tốt nhất.



Hình 1. Cấu trúc bào tử Linh chi sau khi bị phá ở các biên độ trong 30 phút dưới kính hiển vi (độ phóng đại 100X)

(A) Bào tử chưa phá vách, (B) biên độ 30%, (C) biên độ 50%, (D) biên độ 70%, (E) biên độ 100% (Ghi chú: vùng khoanh đỏ là bào tử linh chi bị vỡ có thể nhìn thấy)

Bảng 1. Ảnh hưởng của biên độ phá mẫu đến hàm lượng polysaccharide hoà tan và triterpenoid

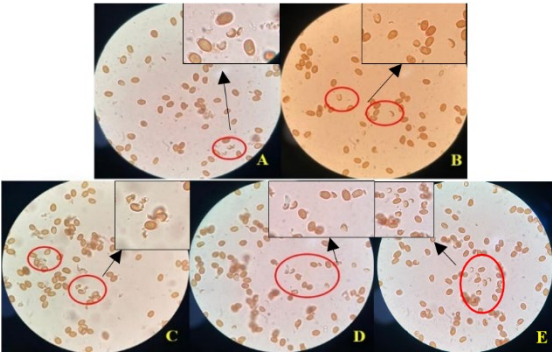
Biên độ	Polysaccharide (%)	Triterpenoid (mg/g chất khô)
Đối chứng	0,286 ^d ± 0,001	0
30%	1,720 ^c ± 0,002	3,370 ^c ± 0,002
50%	3,188 ^b ± 0,002	4,093 ^b ± 0,002
70%	4,218 ^a ± 0,006	7,214 ^a ± 0,002
100%	4,423 ^a ± 0,005	7,220 ^a ± 0,006

Ghi chú: Số liệu trên đã được thể hiện dưới dạng $TB \pm SD$. Trong cùng một cột giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm không có ý nghĩa về mặt thống kê ($P > 0,05$)

3.1.2. Khảo sát thời gian phá mẫu bằng sóng siêu âm

Tương tự nội dung trên, bào tử linh chi được xử lý với nitơ lỏng, sau đó mẫu được phá bằng máy sóng siêu âm ở biên độ 70% trong 45 phút, 60 phút, 90 phút, 120 phút và 150 phút. Kết quả quan sát dưới kính hiển vi được thể hiện ở Hình 2 cho thấy thời gian càng dài thì vách bào tử linh chi bị vỡ càng nhiều. Ta tiến hành kiểm tra hàm lượng hoạt chất polysaccharide hoà tan

và triterpenoid của cả 5 nghiệm thức để tìm thời gian phá mẫu thích hợp.



Hình 2. Cấu trúc bào tử linh chi khi bị phá ở biên độ 70% sau các mốc thời gian dưới kính hiển vi (độ phóng đại 100X)

(A) 45 phút, (B) 60 phút, (C) 90 phút, (D) 120 phút, (E) 150 phút

(Ghi chú: vùng khoanh đỏ là bào tử linh chi bị vỡ có thể nhìn thấy)

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian phá mẫu đến hàm lượng polysaccharide hoà tan và triterpenoid

Thời gian	Polysaccharide (%)	Triterpenoid (mg/g chất khô)
Đối chứng	0,474 ^f ± 0,008	0
45	5,508 ^c ± 0,001	8,286 ^c ± 0,003
60	6,528 ^d ± 0,002	9,229 ^d ± 0,004
90	9,643 ^c ± 0,001	9,462 ^c ± 0,002
120	12,947 ^a ± 0,001	12,431 ^a ± 0,001
150	11,441 ^b ± 0,004	10,523 ^b ± 0,003

Ghi chú: Số liệu trên đã được thể hiện dưới dạng TB±SD. Trong cùng một cột giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm không có ý nghĩa về mặt thống kê ($P > 0,05$)

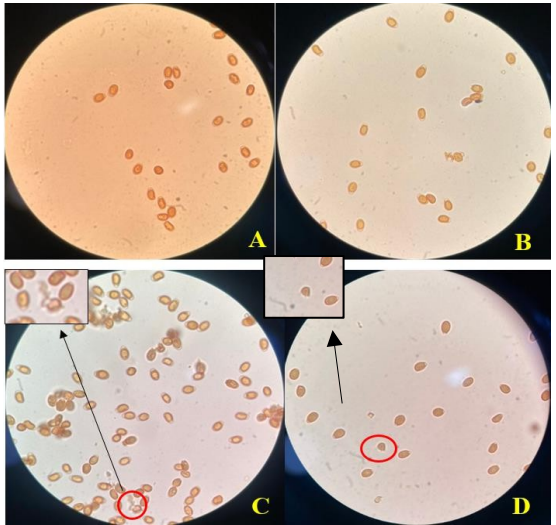
Thời gian phá mẫu bằng sóng siêu âm có ảnh hưởng đến hàm lượng polysaccharide hoà tan và triterpenoid. Ở biên độ 70%, thời gian phá mẫu 120 phút cho hàm lượng hoạt chất thu được cao hơn hẳn các thời gian còn lại, cụ thể hiệu suất thu hồi polysaccharide hoà tan ($12,947^a \pm 0,001$) cao gấp 27,3 lần và triterpenoid ($12,431^a \pm 0,001$ mg/g chất khô) cao gấp 12,4 lần mẫu đối chứng là bào tử còn nguyên vách. Thời gian phá mẫu 45 phút cho kết quả thu hồi hoạt chất thấp nhất, hàm lượng polysaccharide và triterpenoid chỉ bằng lần lượt 0,43 lần và 0,67 lần so với thời gian phá mẫu 120 phút. Ở thời gian 150 phút phá mẫu, hàm lượng hoạt chất thu được bắt đầu giảm. Ở nghiên cứu của Nguyen et al. (2022), hàm lượng triterpenoid giảm khi phá mẫu quá 60 phút, nguyên nhân là do nhiệt độ tăng quá cao tạo điều kiện tăng tốc độ phân hủy các hợp chất

trích được, cụ thể là triterpenoid (Nguyen et al., 2022). Để khắc phục nhược điểm trên của phương pháp phá mẫu này, ta cần duy trì môi trường phá mẫu không quá 50°C. Tuy nhiên, khi phá mẫu quá 120 phút, nhiệt tỏa ra từ máy sóng siêu âm đã làm ảnh hưởng đến hàm lượng hoạt chất thu được. Như vậy, phương pháp phá vỡ vách bào tử dùng sóng siêu âm kết hợp với nitơ lỏng đạt hàm lượng hoạt chất polysaccharide và triterpenoid cao nhất lần lượt là $12,947^a \pm 0,001$ và $12,431^a \pm 0,001$ mg/g chất khô ở biên độ 70% trong 120 phút.

3.2. Nghiên cứu phương pháp phá vỡ vách bào tử dùng nghiền cơ học kết hợp với nitơ lỏng

3.2.1 Khảo sát tần số phá mẫu bằng máy nghiền bi

Khi quan sát dưới kính hiển vi (Hình 3B) thì thấy ở tần số phá mẫu 10Hz, vách bào tử linh chi không có khác biệt so với bào tử còn nguyên vách (Hình 3A). Ở tần số 20Hz (Hình 3C) đã có sự thay đổi nhưng chưa rõ ràng ở vách bào tử. Khi tăng tần số phá mẫu lên 30Hz, quan sát dưới kính hiển vi thấy một số bào tử linh chi đã bị vỡ vách.



Hình 3. Cấu trúc bào tử linh chi sau khi lắc ở các tần số trong 30 phút dưới kính hiển vi (độ phóng đại 100X)

(A) Bào tử nguyên vách (B) tần số 10Hz, (C) tần số 20Hz, (D) tần số 30Hz

(Ghi chú: vùng khoanh đỏ là bào tử linh chi bị vỡ có thể nhìn thấy)

Hàm lượng polysaccharide trong nấm Linh chi từ 1– 1,2%, hàm lượng polysaccharide trong nấm linh chi khô không được ít hơn 0,5% và xem như tiêu chuẩn để đánh giá chất lượng dược liệu nấm

Linh chi (Nguyen et al., 2018). Kết quả Bảng 3 cho thấy hàm lượng polysaccharide hoà tan ở tần số 10Hz ($0,845^c \pm 0,005\%$) thu được có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê so với mẫu đối chứng ($0,272^d \pm 0,001\%$), nhưng theo nghiên cứu của tác giả Li (2014) khi hàm lượng polysaccharide $< 0,91\%$ (hàm lượng polysaccharide trích ly từ bào tử còn nguyên vách) điều này cho thấy ở tần số phá mẫu 10Hz vách bào tử vẫn còn nguyên vẹn (Li et al., 2014). Kết quả này cho thấy, khi tần số phá mẫu tăng lên 20Hz, 30Hz thì hàm lượng hoạt chất thu được càng tăng. Hàm lượng triterpenoid ở tần số 20Hz, 30Hz cao hơn ở tần số 10Hz lần lượt là 3,07 lần và 4,90 lần. Như vậy, hoạt chất thu được cao nhất ở thí nghiệm này là $3,511^a \pm 0,005\%$ (hàm lượng polysaccharide hoà tan) và $6,527^a \pm 0,001$ mg/g chất khô (hàm lượng triterpenoid) ở tần số 30Hz khi phá mẫu bằng máy nghiền bi.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tần số phá mẫu đến hàm lượng polysaccharide hoà tan và triterpenoid

Tần số	Polysaccharide (%)	Triterpenoid (mg/g chất khô)
Đối chứng	$0,272^d \pm 0,001$	$0,121^d \pm 0,001$
10Hz	$0,845^c \pm 0,005$	$1,332^c \pm 0,006$
20Hz	$2,118^b \pm 0,006$	$4,093^b \pm 0,004$
30Hz	$3,511^a \pm 0,005$	$6,527^a \pm 0,001$

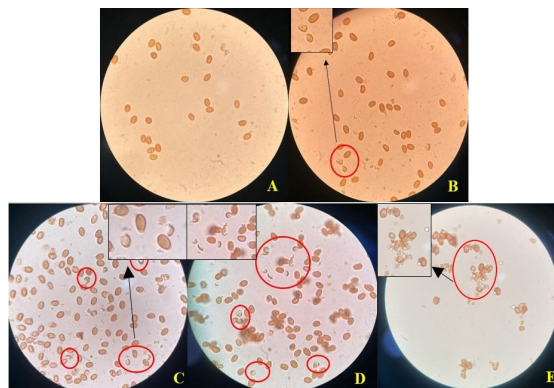
Ghi chú: Số liệu trên đã được thể hiện dưới dạng $TB \pm SD$. Trong cùng một cột giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm không có ý nghĩa về mặt thống kê ($P > 0,05$)

3.2.1. Khảo sát thời gian phá mẫu bằng máy nghiền bi

Nhìn chung, Hình 4A không thấy sự thay đổi của vách bào tử linh chi khi quan sát dưới tiêu cự 100X, bước đầu cho thấy ở sau 15 phút nghiền bi, tác động chưa đủ để phá vỡ vách bào tử. Nhận thấy đều có sự phá vỡ ở vách bào tử sau khi nghiền bằng máy nghiền bi ở các mốc thời gian khảo sát còn lại (45, 60, 90, 120 phút). Kết quả trình bày ở Bảng 4 cũng cho thấy thời gian phá mẫu ở phương pháp nào (sóng siêu âm hay nghiền bi) cũng đều ảnh hưởng đến hàm lượng hoạt chất trích ly trong mẫu.

Kết quả thực nghiệm cho thấy có sự khác biệt ý nghĩa thống kê về hàm lượng polysaccharide hoà tan và triterpenoid qua từng mốc thời gian khảo sát. Cụ thể, hàm lượng polysaccharide hoà tan và triterpenoid tăng khi thời gian phá mẫu nghiền bi mẫu tăng. Hàm lượng polysaccharide và triterpenoid thấp nhất là $2,936^d \pm 0,054\%$, $6,329^d \pm 0,004$ mg/g chất khô ở thời gian 15 phút và cao nhất lần lượt là $7,725^a \pm 0,033\%$ và $10,896^a \pm 0,036$ mg/g

chất khô ở thời gian 120 phút. Phương pháp này cho thấy hiệu quả chiết polysaccharides hòa tan khi dùng bi thép nghiền cao hơn so với dùng hạt thủy tinh (3,68%) (Bien & Nguyen, 2018). Ở một nghiên cứu mới đây của nhóm sinh viên ở đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh, vách bào tử nấm linh chi bị phá bằng phương pháp nghiền cơ học, tỷ lệ phá vách bào tử nấm linh chi đạt trên 85% (Nguyen et al., 2023). Từ những điều trên cho thấy phương pháp nghiền cơ học đạt hiệu suất thu hồi hoạt chất hiệu quả, cụ thể khi ở tần số 30 Hz trong 90 phút vì hàm lượng hoạt chất thu được ở thời gian 90 và 120 phút khác biệt không có ý nghĩa ($P > 0,05$) nên chọn 90 phút là thời gian phá mẫu thích hợp nhất.



Hình 4. Cấu trúc bào tử Linh chi khi lắc ở tần số 30Hz qua các mốc thời gian dưới kính hiển vi (độ phóng đại 100X)

(A) 15 phút, (B) 45 phút, (C) 60 phút, (D) 90 phút, (E) 120 phút

(Ghi chú: vùng khoanh đỏ là bào tử linh chi bị vỡ có thể nhìn thấy)

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian phá mẫu bằng máy nghiền bi đến hàm lượng polysaccharide hoà tan và triterpenoid

Thời gian	Polysaccharide (%)	Triterpenoid (mg/g chất khô)
Đối chứng	$0,353^c \pm 0,002$	$0,121^c \pm 0,001$
15	$2,936^d \pm 0,054$	$6,329^d \pm 0,004$
45	$4,986^c \pm 0,005$	$6,876^c \pm 0,005$
60	$5,825^b \pm 0,003$	$8,250^b \pm 0,009$
90	$7,693^a \pm 0,002$	$10,859^a \pm 0,006$
120	$7,725^a \pm 0,033$	$10,896^a \pm 0,036$

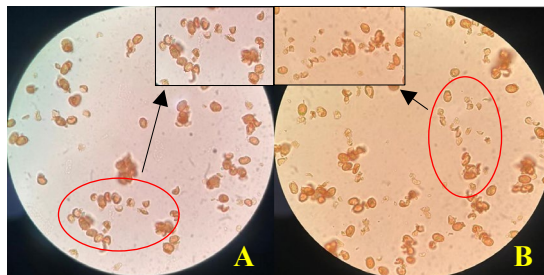
Ghi chú: Số liệu trên đã được thể hiện dưới dạng $TB \pm SD$. Trong cùng một cột giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm không có ý nghĩa về mặt thống kê ($P > 0,05$)

3.3. Nghiên cứu phương pháp phá vỡ vách bào tử dùng sóng siêu âm và nghiền cơ học kết hợp với nitor lỏng

Từ Hình 5, quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 100x cho thấy bào tử linh chi bị phá vỡ gần như nhau ở cả 2 nghiệm thức, phần lớn bào tử đều bị vỡ vách. Cấu trúc bào tử nấm linh chi rất chắc, nếu bào tử chưa được phá hủy thì dung môi chiết xuất rất khó có thể thẩm hiệu quả qua cấu trúc màng để lôi kéo được hoạt chất bên trong. Kết quả từ biểu đồ Hình 6 cho thấy cả 2 nghiệm thức có hiệu suất thu hồi hoạt chất tốt, điều đó chứng minh vách bào tử linh chi đã bị tác động mạnh mẽ khi kết hợp cả 2 phương pháp phá vỡ mẫu.

Hàm lượng polysaccharide thu được ở nghiệm thức SA ($10,737^a \pm 0,01\%$) và nghiệm thức NS ($10,030^b \pm 0,011\%$) cao hơn mẫu đối chứng lần lượt là 3,55 và 3,31 lần. Ở hàm lượng triterpenoid, nghiệm thức SN lại có ($38,182^a \pm 0,012$ mg/g chất khô) cao hơn nghiệm thức NS ($30,973^b \pm 0,01$ mg/g chất khô), cả 2 nghiệm thức đều cao hơn gấp 104 -

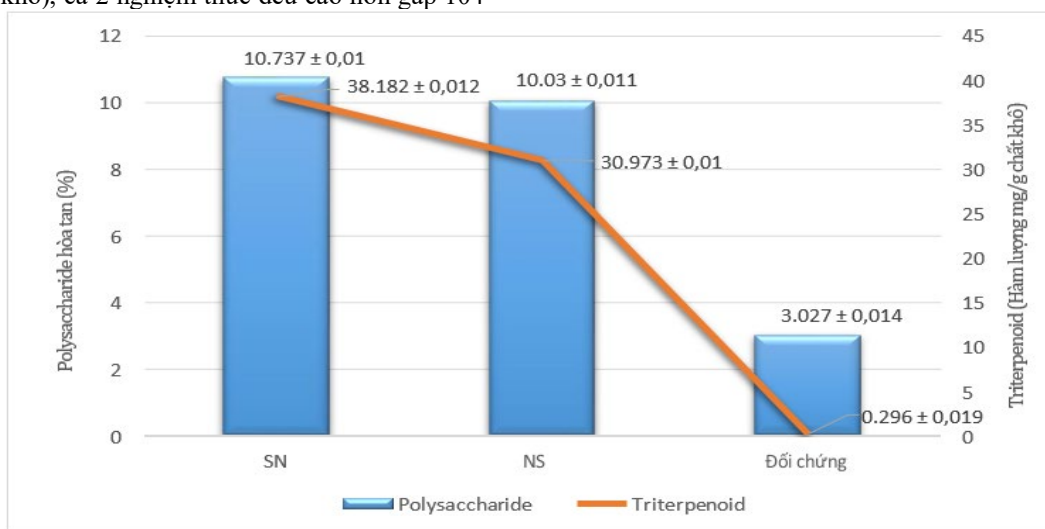
129 lần so với đối chứng ở cùng điều kiện và nồng độ mẫu (số liệu có ý nghĩa về mặt thống kê $P \leq 0,05$). Điều này cho thấy ở phương pháp phá vỡ mẫu kết hợp sóng siêu âm và nghiền bi (SN) có hiệu suất thu hồi hoạt chất tốt hơn.



Hình 5. Cấu trúc bào tử Linh chi ở 2 nghiệm thức dưới kính hiển vi (độ phóng đại 100X)

(A): Phá mẫu kết hợp SSA và NB

(B): Phá mẫu kết hợp NB và SSA



Hình 6. Hàm lượng polysaccharide hoà tan và triterpenoid của 2 nghiệm thức (SN: phá mẫu bằng sóng siêu âm kết hợp nghiền bi và NS: phá mẫu bằng nghiền bi kết hợp sóng siêu âm)

Trong những nghiên cứu về phương pháp phá vỡ vách bào tử linh chi, carbon dioxide siêu tới hạn (SC – CO₂) được sử dụng để phá vỡ lớp bào tử của bào tử *G. lucidum*, hiệu suất chiết xuất của polysaccharide đạt 2,98%, nhưng thấp hơn phương pháp phá vỡ vách bào tử dùng sóng siêu âm và nghiền cơ học kết hợp với nitor lỏng 3,6 lần ($10,737 \pm 0,01\%$) (Fu et al., 2009). Hàm lượng polysaccharide khi chiết kết hợp hỗn hợp enzyme dịch trích ly từ nấm *Tricoderma harzianum* T2; enzyme thương mại C20032 theo tỉ lệ 1:1 và phương

pháp sóng siêu âm thì hàm lượng hoạt chất tốt nhất thu được là 16,80%, tuy thu hàm lượng cao hơn nhưng thời gian phá mẫu dài (10 ngày) (Chen et al., 2007). Ở một nghiên cứu khác, khi kết hợp nghiền cơ học và dung môi chiết ở điều kiện nhiệt độ tối ưu thu được hàm lượng polysaccharide 3,72% và hàm lượng triterpenoid 35,45 mg/g chất khô (Bien & Nguyen, 2018). Cả 2 hàm lượng hoạt chất ở nghiên cứu này đều thấp hơn phương pháp phá vỡ kết hợp SSA và NB lần lượt là 2,89 và 1,08 lần.

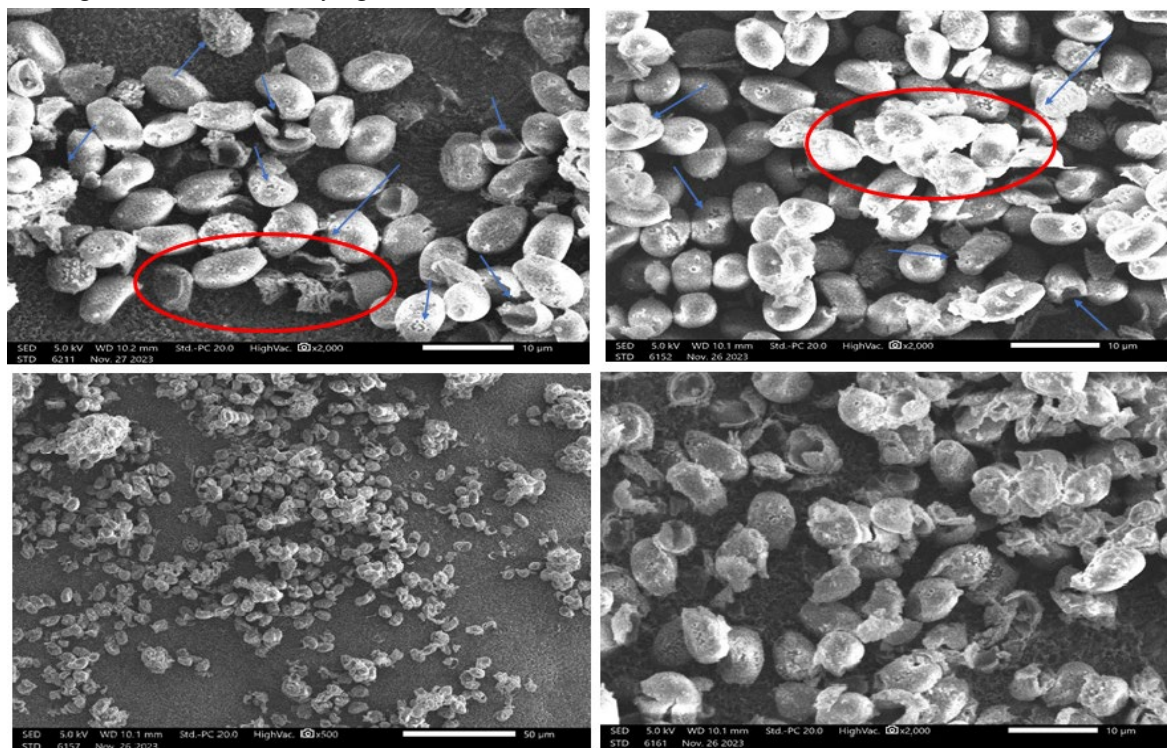
Nghiên cứu của Zhao (2014) cho thấy sự gia tăng các thành phần hoạt tính sinh học của polysaccharide, protein và acid béo từ bào tử linh chi được xử lý bằng sóng siêu âm khi so sánh với các bào tử đã phá vách có sẵn trên thị trường. Các kết quả hiện tại chỉ ra rằng phương pháp siêu âm kết hợp trong bể nước đá (môi trường lạnh) có hiệu quả hơn trong việc thu hoạt chất sinh học từ bào tử linh chi và có thể là một kỹ thuật mang lại hiệu quả kinh tế để sản xuất bào tử linh chi bị phá vách có chất lượng cao (Zhao et al., 2014). Cho đến hiện tại, phương pháp phá vách bào tử linh chi thu được hoạt chất polysaccharide cao nhất (40,08%) bằng máy nghiền mịn ly tâm tốc độ cao, khi đó tỉ lệ phá vỡ bào tử đạt đến 100%, kỹ thuật này lại đơn giản, không cần thiết bị chuyên dụng (Ma et al., 2007).

3.4. Kết quả chụp SEM

So sánh hình 7A và 7B thấy tỉ lệ vỡ vách bào tử của sóng siêu âm cao hơn máy nghiền bi. Sự khác

biệt này là do năng lượng siêu âm làm tăng dao động bề mặt, tạo ra áp lực lớn giúp thâm thấu dung môi tốt hơn và tác động đến tế bào vật liệu, tăng khả năng truyền khối tới bề mặt phân cách, làm các mô tế bào bị phá vỡ tốt hơn.

Phương pháp phá vách bào tử nấm linh chi này được thực hiện bằng máy sóng siêu âm ở biên độ 70% trong 120 phút trong môi trường lạnh, kết hợp với máy nghiền cơ học ở tần số 30Hz trong 90 phút sau khi bào tử được gây sốc nhiệt bởi nitor lỏng. Kết quả quan sát dưới kính hiển vi quét (SEM) ở hình 7C và Hình 7D cho thấy hơn 80% (đánh giá cảm quan) vách bào tử linh chi đều bị tác động và vỡ nát. Điều này chứng minh hiệu quả của việc trích ly hoạt chất ở nội dung 3.3 cho hiệu suất thu hồi polysaccharide và triterpenoid cao hơn lần lượt gấp 3,55 lần và 128,99 lần so với mẫu đối chứng (bào tử linh chi chưa phá vách).



Hình 7. Kết quả chụp SEM

(A) Phá mẫu bằng sóng siêu âm ở biên độ 70% trong 120 phút

(B) Phá mẫu bằng máy nghiền bi ở tần số 30Hz trong 90 phút

(C) Phá mẫu kết hợp bằng sóng siêu âm ở biên độ 70% trong 120 phút và nghiền bi 30Hz trong 90 phút (bar = 50 μm)

(D) Phá mẫu kết hợp bằng sóng siêu âm ở biên độ 70% trong 120 phút và nghiền bi 30Hz trong 90 phút (bar = 10 μm)

(Chú thích: vòng tròn đỏ, mũi tên xanh: bào tử linh chi bị vỡ vách)

4. KẾT LUẬN

Thông số của phương pháp phá vỡ vách bào tử dùng sóng siêu âm kết hợp với nitơ lỏng được xác định: ở biên độ 70% trong 120 phút phá mẫu thu được hoạt chất polysaccharide hoà tan và triterpenoid cao nhất. Ở phương pháp phá vỡ vách bào tử dùng nghiền cơ học kết hợp với nitơ lỏng, tần số lắc và thời gian để thu được hàm lượng hoạt chất tốt nhất là 30Hz, 90 phút. Phương pháp phá vỡ vách bào tử dùng sóng siêu âm và nghiền cơ học kết hợp

với nitơ lỏng cho kết quả hiệu suất thu hồi polysaccharide cao nhất là $10,737 \pm 0,01\%$ và triterpenoid là $38,182 \pm 0,012$ mg/g chất khô, cao hơn lần lượt gấp 3,55 lần và 128,99 lần so với mẫu đối chứng. Có thể kéo dài thời gian phá mẫu từ 60 phút lên 120 phút mà không làm tăng tốc độ phân hủy các hợp chất trích được, cụ thể là triterpenoid. Tuy nhiên, do điều kiện trang thiết bị chưa đáp ứng với tần số phá mẫu cao, nên chỉ có thể áp dụng tần số tối đa 30 Hz, kết quả này có thể làm tiền đề cho những nghiên cứu sau này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

- Bien, D. C., & Nguyen, T. H. A. (2018). Combination of Mechanical and Chemical Methods to Optimize the Extraction of Triterpenoids and Polysaccharides from Red Reishi Mushroom (*Ganoderma lucidum*) Spores: Final Report of the Scientific Research Program 2018. (in Vietnamese)
- Chen, Y. X. M.-Y., & Gong, X.-F. (2007). Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 162-170. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.018>
- Fu, Y.-J., Liu, W., Zu, Y.-G., Shi, X.-G., Liu, Z.-G., Schwarz, G., & Efferth, T. (2009). Breaking the spores of the fungus *Ganoderma lucidum* by supercritical CO₂. *Food Chemistry*, 112(1), 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.044>
- Hwang, A. Y., Yang, S. C., Kim, J., Lim, T., Cho, H., & Hwang, K. T. (2019). Effects of non-traditional extraction methods on extracting bioactive compounds from chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compared with hot water extraction. *Food Science and Technology*, 80-84. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.073>
- Li, J.-J., Hu, X.-Q., Zhang, X.-F., Liu, J.-J., & Cao, L.-S. (2014). Study on variation of main ingredients from spores and fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 39(21), 4246-4251.
- Oke, M. A., Afolabi, F. J., Oyeleke, O. O., Kilani, T. A., Adeosun, A. R., Olanbiwoninu, A. A., & Adebayo, E. A. (2022). *Ganoderma lucidum*: Unutilized natural medicine and promising future solution to emerging diseases in Africa. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 952027. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.952027>
- Ma, J., Fu, Z., Ma, P., Su, Y., & Zhang, Q. (2007). Breaking and characteristics of *Ganoderma lucidum* spores by high speed centrifugal shearing pulverizer. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.*, 22(4), 617-621. <https://doi.org/10.1007/s11595-006-4617-6>
- Nguyen, T. H. L., Trinh, T. T. D., Truong, D. V., Phan, T. C., Le, T. M., Tran, T. V., Huynh, T. N., Nguyen, H. T. T., Vo, T. L., & Huynh, T. T. N. (2023). Research on production of health protection products from broken-walled *Ganoderma* spores. *University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City*, 225-296. (in Vietnamese)
- Nguyen, A. M., Phan, C. N. C., Nguyen, V. D., Tran, D. D., Lu, T. T. M., Huynh, O. N., Hoang, N. M., Mai, P. T., & Nguyen, H. H. (2022). Survey on factors affecting the extraction process of triterpenoids from *Ganoderma lucidum* by ultrasonic-assisted enzyme method. *Journal of Science, Technology, and Food*, 22(1), 101-111. (in Vietnamese)
- Nguyen, B. V., Pham, P. T., & Nguyen, L. T. (2018). Study on the factors affecting the extraction of polysaccharide content from red lingzhi. *Journal of Science Technology*, 180(04), 3-8. (in Vietnamese)
- Nielsen, S. S. (2010). Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. *Food analysis laboratory manual*, 47-53. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_6
- Mau, J. L., Lin, H. C., & Chen, C. C. (2001). Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International*, 34(6), 521-526. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00067-9](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00067-9)
- Soccol, C. R., Bissoqui, L. Y., Rodrigues, C., Rubel, R., Sella, S. R., Leifa, F., Fan, S. V., Luciana, P. S., & Soccol, V. T. (2016). Pharmacological properties of biocompounds from spores of the lingzhi or reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes): A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18(9), 757-767. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i9.10>
- Zhao, D., Chang, M. W., Li, J. S., Suen, W., & Huang, J. (2014). Investigation of ice-assisted sonication on the microstructure and chemical quality of *Ganoderma lucidum* spores. *Journal of Food Science*, 79(11), E2253-E2265. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12681>