

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH CHIẾT POLYSACCHARIDE TỪ NẤM TRẮNG SỮA VÀ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA

Nguyễn Quang Mẫn¹, Lê Trung Hiếu^{*2}, Lê Lâm Sơn², Trần Thanh Minh²,
Hồ Xuân Anh Vũ², Lê Thị Diệu Ái², Lương Quang Huy², Lê Thị Kim Dung¹,
Lê Thị Mỹ Linh¹, Trần Thị Văn Thi²

¹Khoa Cơ Bản, Trường Đại học Y- Dược, Đại học Huế

²Khoa Hóa, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

*Email: lthieu@hueuni.edu.vn

Ngày nhận bài: 23/8/2021; ngày hoàn thành phân biện: 13/9/2021; ngày duyệt đăng: 4/4/2022

TÓM TẮT

Mục tiêu của bài báo này là thiết kế các thí nghiệm để tối ưu hóa quá trình chiết xuất polysaccharide từ nấm Trắng sữa. Hàm lượng polysaccharide thu được 5,16% với các điều kiện chiết tối ưu: nhiệt độ chiết 100 °C, thời gian chiết 4 giờ, số lần chiết 3, tỉ lệ mẫu trên dung môi chiết (nước) 1:50 (g/mL) và tỉ lệ ethanol 96% dùng để tủa polysaccharide trên dịch chiết (4:1). Hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của polysaccharide được khảo sát. Kết quả cho thấy, polysaccharide từ nấm Trắng sữa có tiềm năng chống oxy hóa đáng kể thông qua mô hình bắt gốc tự do 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (IC₅₀ = 438,52 µg/mL) và tổng khả năng chống oxy hóa (total antioxidant capacity (TAC)) (hàm lượng chất chống oxy hóa quy về nguyên liệu nấm Trắng sữa là 38,43±0,32 mGA/g hoặc 27,82±0,14 mAS/g).

Từ khóa: Nấm Trắng sữa; polysaccharide; chiết xuất; tối ưu hóa, hoạt tính chống oxy hóa.

1. MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, nhiều loại nấm đã được nghiên cứu rộng rãi về hoạt tính chống oxy hóa và ức chế tế bào ung thư [1], [2]. Các nghiên cứu trước cho thấy, việc tăng cường các chất chống oxy hóa có nguồn gốc tự nhiên làm giảm nguy cơ mắc nhiều bệnh về tim mạch và ung thư [3].

Nấm Trắng sữa (*Calocybe indica*) loại thực phẩm phổ biến trong bữa ăn hàng ngày của mỗi người dân Việt Nam, được xem là một loại “thịt sạch” cao cấp với hàm lượng protein tương đối cao, ngoài ra còn có các vitamin và khoáng chất [4]. Không chỉ là món ăn ngon, các nghiên cứu còn cho thấy: nấm trắng sữa có tác dụng tăng cường

khả năng miễn dịch của cơ thể, chống ung thư và kháng virus, giải độc và bảo vệ tế bào gan, hạ đường huyết và chống oxy hóa [5], [6], [7]. Bên cạnh đó, các hợp chất polysaccharide đã được phân lập từ nấm này có khả năng chống oxy hóa và chống lão hóa [7], [8].

Các polysaccharide tự nhiên thu hút sự chú ý của các nhà nghiên cứu do những lợi thế rõ ràng của chúng chẳng hạn như: tính tương thích sinh học, không độc hại và có nhiều công dụng trong lĩnh vực dược phẩm và thực phẩm [9], [10]. Việc khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của polysaccharide là việc làm hết sức cần thiết để nâng cao khả năng ứng dụng và phát triển của của nhóm hợp chất này. Đã có một số nghiên cứu về quá trình chiết xuất polysaccharide với hoạt tính chống oxy hóa [11], [12]. Tuy nhiên, theo hiểu biết của chúng tôi, chưa có nghiên cứu nào về tối ưu hóa quá trình chiết polysaccharide và hoạt tính chống oxy hóa của polysaccharide từ nấm Trắng sữa.

Với các cơ sở trên, mục tiêu của bài báo này là thiết kế các thí nghiệm để chiết xuất polysaccharide và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của polysaccharide từ nấm Trắng sữa. Khả năng chống oxy hóa của polysaccharide được đánh giá thông qua phương pháp xác định tổng khả năng chống oxy hóa (total antioxidant capacity (TAC) và phương pháp bắt gốc tự do DPPH.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu, hóa chất và thiết bị

Nấm trắng sữa (*Calocybe indica*) được thu hái vào ngày 15 tháng 6 năm 2020 tại xã Phú Lương, huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế. Mẫu được TS. Nguyễn Ngọc Lương cán bộ Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế xác định tên loài. Phương pháp sử dụng là định danh bằng trình tự ITS (kích thước khoảng 700 kpb bao gồm một phần 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA ITS2 và một phần 28 rRNA) và đối chiếu kết quả với cơ sở dữ liệu Genbank của NCBI. Mẫu được lưu giữ tại Khoa Hóa, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.



Hình 1. Nấm Trắng sữa được nuôi trồng tại huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế.

Tất cả hóa chất đều đạt tiêu chuẩn phân tích: phenol, H_2SO_4 , D-glucose, NaH_2PO_4 , $(NH_4)_2MoO_4$ (Guang dong, Trung Quốc), ethanol (Việt Nam), Gallic acid, Quercetin (Sigma-Aldrich), DPPH (Merck).

Thiết bị chính được sử dụng là máy ly tâm (Mikro 22R, Human, Đức), máy quang phổ Jasco V-630 (Nhật Bản).

2.2. Quy trình chiết xuất polysaccharide (PS)

Quá trình chiết xuất polysaccharide được thực hiện qua hai giai đoạn: chiết xuất polysaccharide (PS) từ nấm và kết tủa PS bằng ethanol. Trong thí nghiệm nghiên cứu, kỹ thuật chiết hồi lưu được sử dụng kết hợp với khảo sát đơn biến các thông số: thời gian chiết, nhiệt độ chiết, tỷ lệ nước với nguyên liệu, số lần chiết và tỷ lệ ethanol trên thể tích chiết.

- Giai đoạn chiết PS: 3 gam mẫu nguyên liệu (dạng bột) được phân tán trong bình 250 mL, sau đó tiến hành thí nghiệm với các điều kiện khảo sát: nhiệt độ chiết (60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C và 100 °C), thời gian chiết (2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ và 6 giờ), tỷ lệ mẫu với nước (1:30, 1:40, 1:50, 1:60 và 1:70 (g /mL)) và số lần chiết (2, 3, 4, và 5). Khi quá trình chiết xuất PS kết thúc, hỗn hợp được làm lạnh đến nhiệt độ phòng bằng cách sử dụng nước lạnh, lọc và tiến hành cô cạn dung dịch, định mức đến 50 mL.

- Giai đoạn kết tủa PS: Tỷ lệ ethanol 96% trên thể tích dịch chiết (2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1) được khảo sát để kết tủa hoàn toàn PS. Kết tủa thu được bằng cách ly tâm và sau đó rửa tuần tự bằng ethanol và aceton lạnh. Cuối cùng sản phẩm được sấy chân không ở 40 °C để thu được bột PS thô hòa tan trong nước.

2.3. Phân tích định tính và định lượng các polysaccharide hòa tan trong nước

Hàm lượng polysaccharide được xác định thông qua phương pháp Dubois. PS được phân tán trong nước cất, sau đó lên màu với thuốc thử phenol – acid sulphuric, tiến hành đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 490 nm để xác định nồng độ, chất chuẩn là

D-glucose [13]. Phương trình đường chuẩn của D- glucose thu được: $Y = 0,0082X - 0,0082$ với $R = 0,9999$. Hàm lượng polysaccharide được tính theo phương trình:

$$\text{Hàm lượng PS (\%)} = \frac{OD + 0.0082}{0.0082} \times V \times \frac{100}{m \times (1 - W)} \times \frac{162}{180}$$

Trong đó:

V: thể tích dung dịch sau khi hòa tan

m: khối lượng mẫu ban đầu

W: độ ẩm của mẫu

2.4. Phương pháp đánh giá khả năng chống oxy hóa

2.4.1. Phương pháp xác định tổng khả năng chống oxy hóa (total antioxidant capacity (TAC))

Tổng khả năng chống oxy hóa của mẫu được xác định thông qua việc đánh giá khả năng cho electron của mẫu thử bằng phương pháp phosphor molybdenum. Nguyên tắc của phương pháp này là dựa trên cơ sở khả năng khử Mo (VI) về Mo (V) tạo phức màu xanh lá cây trong môi trường acid.

Polysaccharide được hòa tan trong nước vừa đủ. Sau đó, lấy 0,3 mL dịch chiết thêm vào 3 mL dung dịch thuốc thử (H_2SO_4 0,6 M, NaH_2PO_4 28 mM và $(NH_4)_2MoO_4$ 4 mM), đậy kín và ủ 95 °C trong 90 phút. Mẫu được làm lạnh về nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ quang của dung dịch sau phản ứng được đo ở bước sóng 695 nm. Hàm lượng chất chống oxy hóa được quy tương đương với số mg gallic acid/ gam dược liệu và được xác định thông qua phương trình hồi quy tuyến tính [14], [15]. Tất cả thí nghiệm được lặp lại 3 lần, giá trị biểu diễn dưới dạng: ($X_{\text{trung bình}} \pm S$ (S: stdev); n = 3).

2.4.2. Phương pháp xác định tác dụng bắt gốc tự do DPPH

Hoạt tính chống oxy hóa thể hiện qua khả năng làm giảm màu của DPPH, được xác định bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 517 nm [14], [16]. Pha dung dịch DPPH nồng độ 100 μ M trong ethanol 50% ngay trước khi dùng. Hỗn hợp phản ứng có thể tích 3 mL, gồm 1,5 mL mẫu và 1,5 mL dung dịch DPPH nồng độ 100 μ M. Pha loãng mẫu để khảo sát ở các nồng độ 100 μ g/mL; 80 μ g/mL; 60 μ g/mL; 40 μ g/mL, 20 μ g/mL. Các hỗn hợp phản ứng được lắc trong 1 phút và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, rồi tiến hành đo quang ở bước sóng 517 nm. Tác dụng bắt gốc tự do DPPH được đánh giá qua giá trị IC_{50} . Giá trị IC_{50} được định nghĩa là nồng độ của mẫu mà tại đó mẫu có thể ức chế 50% DPPH. Giá trị IC_{50} càng nhỏ thì mẫu có hoạt tính càng cao.

Công thức tính:

$$S_{ADPPH} (\%) = [(Ac - As)/Ac] \times 100 \quad (2.1)$$

Trong đó: SA_{DPPH} (%): tỉ lệ bắt gốc tự do (Scavenging Activity) của mẫu nghiên cứu

As: mật độ quang của mẫu khảo sát

Ac: mật độ quang của dung dịch DPPH

2.5. Xử lý số liệu

Tất cả các phân tích được thực hiện ít nhất ba lần và các giá trị này sau đó được trình bày dưới dạng giá trị trung bình cùng với độ lệch chuẩn (Xtrung bình \pm Sd (S: Standard deviation). Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm Excel (version 16.0.4266.1001). So sánh thống kê được thực hiện với phân tích phương sai một chiều và giá trị $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các điều kiện thích hợp để chiết polysaccharide từ nấm Trắng sữa

3.1.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng PS thu được

Trong thí nghiệm này, để đánh giá sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất tách chiết polysaccharide, chúng tôi tiến hành khảo sát khoảng nhiệt độ chiết từ 60 đến 100 °C với tỷ lệ mẫu: thể tích nước (g/mL) 1:50, thời gian chiết 3 giờ, số lần chiết là 3 lần, tỷ lệ ethanol 96 %: dịch chiết (v/v) 4:1. Kết quả hàm lượng PS được mô tả ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến PS thu được

Nhiệt độ chiết (°C)	60	70	80	90	100
Hàm lượng PS thu được (%)	3,99 \pm 0,03	4,35 \pm 0,03	4,69 \pm 0,03	4,81 \pm 0,02	5,04 \pm 0,02

Từ bảng 1 cho thấy: khi tăng nhiệt độ từ 60 đến 100 °C thì hàm lượng PS thu được tăng từ 3,99% đến 5,04% và đạt hiệu suất cao nhất là 5,04 \pm 0,02% ở 100 °C. Khi nhiệt độ tăng làm gia tăng độ khếch tán của polysaccharide và tăng độ hòa tan của polysaccharide từ các tế bào nấm vào trong dung môi chiết.

Kết quả mà chúng tôi thu được phù hợp với nghiên cứu của tác giả Chun-Lin Ye [17]. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn nhiệt độ chiết tối ưu là 100°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ mẫu: thể tích nước đến hàm lượng PS thu được

Ở nghiên cứu này, các điều kiện chiết được giữ cố định: nhiệt độ chiết 100 °C, thời gian chiết 3 giờ, số lần chiết là 3, tỷ lệ ethanol 96%: dịch chiết (v/v) 4:1 và tiến hành thay đổi tỷ lệ mẫu: thể tích nước (g/mL) với các tỉ lệ khác nhau 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70. Kết quả PS thu được được mô tả ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ mẫu: thể tích nước (g/mL) đến PS thu được

Mẫu: nước (g/mL)	1:30	1:40	1:50	1:60	1:70
Hàm lượng PS thu được (%)	4,44±0,03	4,80±0,04	5,04±0,02	5,05±0,04	5,05±0,03

Kết quả từ bảng 2 cho thấy khi thể tích dung môi tăng thì hàm lượng PS thu được tăng và ở tỷ lệ mẫu: thể tích dung môi (g/mL) là 1:30 đến 1:50 cho thấy hàm lượng PS tăng nhanh. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng tỷ lệ lên 1:60 và 1:70 thì hàm lượng polysaccharide không tăng (hàm lượng PS ở các tỉ lệ 1:50, 1:60 và 1:70 là không sai khác nhau khi xử lý thống kê bằng phương pháp TUKEY HSD, Anova một yếu tố với $p=0,05$). Từ kết quả trên, chúng tôi kết luận rằng tỷ lệ mẫu: thể tích dung môi (g/mL) để thu được hàm lượng PS cao là 1:50 và tỉ lệ này sử dụng làm điều kiện tối ưu cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng PS thu được

Từ kết quả tối ưu hóa các điều kiện ở trên, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng thời gian chiết đến hàm lượng PS thu được với số giờ lần lượt là 2, 3, 4, 5, 6 giờ và cố định các điều kiện chiết: tỷ lệ mẫu: thể tích nước (v/v) 1:50, nhiệt độ 100°C, số lần chiết 3 lần với tỷ lệ ethanol 96°: dịch chiết (v/v) 4:1. Kết quả hàm lượng PS được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng PS thu được

Thời gian chiết (giờ)	2	3	4	5	6
Hàm lượng PS thu được (%)	4,59±0,04	5,04±0,02	5,16±0,02	5,01±0,04	4,93±0,02

Kết quả từ bảng 3 chỉ ra rằng, thời gian chiết có ảnh hưởng đến hàm lượng PS thu được và tỷ lệ thuận với nhau, với thời gian chiết tăng từ 2 đến 4 giờ thì hàm lượng PS tăng. Thời gian chiết 4 giờ cho hàm lượng PS cao nhất là 5,16%. Tuy nhiên, sau thời điểm này khi tăng thời gian chiết lên 5 và 6 giờ thì hàm lượng PS bắt đầu giảm. Theo chúng tôi, điều này được giải thích như sau: thời gian chiết tăng giúp tăng hàm lượng PS, nhưng thời gian chiết kéo dài cũng có thể gây ra sự thay đổi cấu trúc của polysaccharide (có thể xảy ra quá trình thủy phân PS), vì vậy sẽ làm hàm lượng PS giảm. Do đó, chúng tôi chọn thời gian chiết thích hợp để thu được hàm lượng PS cao nhất là 4 giờ. Kết quả chúng tôi thu được phù hợp với bài báo nghiên cứu của tác giả Chun-Lin Ye [17].

3.1.4. Ảnh hưởng của số lần chiết đến hàm lượng PS thu được

Trong thí nghiệm này, số lần chiết được thay đổi lần lượt là 2, 3, 4, 5 lần khi các điều kiện chiết được giữ cố định như sau: tỷ lệ mẫu: thể tích nước (v/v) 1:50, nhiệt độ 100 °C, thời gian chiết 4 giờ, tỷ lệ ethanol 96 %: dịch chiết (v/v) 4:1. Kết quả hàm lượng PS được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của số lần chiết đến hàm lượng PS thu được

Số lần chiết (n)	2	3	4	5
Hàm lượng PS thu được (%)	4,45±0,02	5,16±0,02	5,16±0,04	5,18±0,03

Số liệu ở bảng 4 đã chỉ ra rằng số lần chiết tỷ lệ thuận với hàm lượng PS thu được khi số lần chiết tăng từ 2 đến 3, hàm lượng PS tăng từ 4,45±0,02% lên 5,18±0,03%. Khi tăng số lần chiết lên 4 và 5 lần thì hàm lượng PS không có sự sai khác khi chiết 3 lần, khi xử lý thống kê bằng phương pháp TUKEY HSD, Anova một yếu tố với $p=0,05$. Do đó, chúng tôi kết luận rằng số lần chiết cho hàm lượng PS cao nhất là 3 lần. Kết quả mà chúng tôi thu được phù hợp với bài báo nghiên cứu của tác giả Kai Feng khi chiết PS từ loài Sùng Thảo [18].

3.1.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi ethanol đến hàm lượng PS thu được

Để tìm ra tỷ lệ ethanol 96 %: dịch chiết (v:v) thu được hàm lượng PS cao nhất, chúng tôi đã tiến hành khảo sát thay đổi ở các tỷ lệ: 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 và giữ cố định các điều kiện chiết như sau: tỷ lệ mẫu: thể tích nước (g/mL) 1:50, nhiệt độ chiết 100 °C với thời gian chiết 4 giờ, chiết 3 lần. Hàm lượng PS được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ ethanol 96 %: dịch chiết (v:v) đến hàm lượng PS thu được

EtOH 96 %: dịch chiết (v/v)	2:1	3:1	4:1	5:1
Hàm lượng PS thu được (%)	4,56±0,05	4,91±0,05	5,16±0,02	5,17±0,05

Dựa vào bảng số liệu 5 cho thấy, khi tăng tỷ lệ ethanol 96% lên thì hàm lượng PS thu được tăng. Ở tỷ lệ 2:1 đến 4:1 thì hàm lượng PS tăng mạnh từ 4,56±0,05 đến 5,16±0,02%. Khi xử lý thống kê, hàm lượng PS thu được ở tỷ lệ 4:1 và 5:1 không sai khác nhau. Vì vậy, chúng tôi chọn tỷ lệ ethanol 96 %: dịch chiết (v:v) để kết tủa PS là 4:1.

3.2. Hoạt tính chống oxy hóa của PS từ nấm Tráng sữa

Sau khi tối ưu hóa điều kiện chiết xuất PS, chúng tôi tiến hành đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các PS thu được.

3.2.1. Tổng khả năng chống oxy hoá theo mô hình phosphor molybdenum

Tổng hàm lượng chất chống oxy hóa (Total Antioxidant Concentration, TAC) có trong mẫu được liệt kê được quy về số mg gallic acid/g mẫu và mg ascorbic acid/g mẫu. Xây dựng đường chuẩn phosphor molybdenum với chất chuẩn là gallic acid hoặc ascorbic acid trong khoảng nồng độ từ 0,1 mg/mL đến 0,5 mg/mL. Các nồng độ dung dịch: 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,5 mg/mL, tương ứng với mật độ quang: theo chất chuẩn gallic acid là 0,412; 0,614; 0,824; 1,002; 1,194 và theo chất chuẩn ascorbic acid là 0,434; 0,941; 1,423; 1,875; 2,246. Từ đó thu được phương trình hồi quy tuyến tính tương ứng của gallic acid: $Abs = 1,952 C_{GA} + 0,2263$ với hệ số tương quan $R = 0,9995$ và của ascorbic acid: $Abs = 4,558 C_{SA} + 0,0164$, với hệ số tương quan $R = 0,9983$.

Tối ưu hóa quá trình chiết polysaccharide từ nấm Trắng sữa và hoạt tính chống oxy hóa

Tổng khả năng chống oxy hóa của dược liệu đều thể hiện cao nhất ở nồng độ cao chiết 4 mg/mL, tại nồng độ này hàm lượng chất chống oxy hóa quy về nguyên liệu nấm Trắng sữa là $38,43 \pm 0,32$ mGA/g hoặc $27,82 \pm 0,14$ mAS/g.

3.2.2. Khả năng bắt gốc tự do DPPH

Gốc DPPH là gốc tự do hữu cơ ổn định có sự hấp thụ ở bước sóng 517 nm. Khả năng hấp thụ này sẽ mất đi khi gốc DPPH nhận điện tử hoặc nguyên tử hydro, dẫn đến sự đổi màu đáng chú ý: từ màu tím sang màu vàng. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của các dung dịch chiết ở nồng độ khác nhau được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dung dịch PS ở nồng độ khác nhau.

Ascorbic acid					
Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	0,8	4	10	20	100
Tỉ lệ bắt gốc tự do DPPH (%)	37,08	88,81	92,40	93,80	96,65
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	1,60				
Dung dịch PS					
Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	200	300	400	500	600
Tỉ lệ bắt gốc tự do DPPH (%)	33,53	41,81	47,95	54,68	59,55
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	438,52				

Kết quả ở bảng 6 cho thấy: dung dịch PS của nấm Trắng sữa có khả năng chống oxy hóa với giá trị IC₅₀ 438,52 $\mu\text{g/mL}$, khả năng bắt gốc DPPH tăng cùng với sự tăng nồng độ dung dịch. Ở nồng độ 600 $\mu\text{g/mL}$, khả năng bắt gốc tự do DPPH của PS gần 60%. Thực nghiệm trên đã cho thấy kết quả rất thú vị khi mẫu nấm Trắng sữa có hoạt tính cao hơn dược liệu *Ophiocordyceps sobolifera* [19], nấm Linh chi và nấm Đông cô [20]. Kết quả cho thấy, PS từ nấm Trắng sữa có tiềm năng chống oxy hóa.

4. KẾT LUẬN

Trên cơ sở khảo sát đơn biến, đã tối ưu hóa quá trình chiết xuất polysaccharide từ nấm Trắng sữa với các thông số chiết như sau: nhiệt độ chiết 100 °C, thời gian chiết 4 giờ, số lần chiết 3, tỉ lệ mẫu trên dung môi chiết (nước) 1:50 g/mL và tỉ lệ ethanol trên dịch chiết 4:1. PS từ nấm Trắng sữa cho thấy khả năng chống oxy hóa trong cả hai mô hình phosphor molybdenum và bắt gốc tự do DPPH. Hàm lượng tổng các chất chống oxy hóa là $38,43 \pm 0,32$ mGA/g hoặc $27,82 \pm 0,14$ mAS/g. Ở nồng độ 600 $\mu\text{g/mL}$, dung dịch PS có khả năng bắt gần 60% gốc tự do DPPH.

Như vậy, PS từ nấm Trắng sữa hứa hẹn là một nguồn dược liệu chống oxy hóa tiềm năng.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả chân thành cảm ơn sự hỗ trợ tài chính của Đại học Huế để thực hiện nghiên cứu này trong khuôn khổ đề tài mã số DHH 2021 – 04 – 138.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Zhao, L., Zhao, G., Hui, B., Zhao, Z., Tong, J., & Hu, X. (2004). Effect of selenium on increasing the antioxidant activity of protein extracts from a selenium-enriched mushroom species of the Ganoderma Genus. *Journal of food science*, 69(3), FCT184-FCT188.
- [2] Mishra, K. K., Pal, R. S., Arunkumar, R., Chandrashekara, C., Jain, S. K., & Bhatt, J. C. (2013). Antioxidant properties of different edible mushroom species and increased bioconversion efficiency of *Pleurotus eryngii* using locally available casing materials. *Food chemistry*, 138(2-3), 1557-1563.
- [3] Masisi, K., Beta, T., & Moghadasian, M. H. (2016). Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. *Food chemistry*, 196, 90-97.
- [4] Subbiah, K. A., & Balan, V. (2015). A comprehensive review of tropical milky white mushroom (*Calocybe indica* P&C). *Mycobiology*, 43(3), 184-194.
- [5] Chatterjee, S., Dey, A., Dutta, R., Dey, S., & Acharya, K. (2011). Hepatoprotective effect of the ethanolic extract of *Calocybe indica* on mice with CCl₄ hepatic intoxication. *Int J PharmTech Res*, 3(4), 2162-2168.
- [6] Ghosh, S. K., Bera, T., & Pal, S. (2020). Antiproliferative, Apoptotic, and Antimigration Property of Ethyl Acetate Extract of *Calocybe indica* against HeLa and CaSki Cell Lines of Cervical Cancer, and its Antioxidant and Mycochemistry Analysis. *Middle East Journal of Cancer*, 11(4), 454-468.
- [7] Govindan, S., Johnson, E. E. R., Christopher, J., Shanmugam, J., Thirumalairaj, V., & Gopalan, J. (2016). Antioxidant and anti-aging activities of polysaccharides from *Calocybe indica* var. APK2. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 68(6), 329-334.
- [8] Mandal, E. K., Maity, K., Maity, S., Gantait, S. K., Maiti, S., Maiti, T. K., ... & Islam, S. S. (2011). Structural characterization of an immunoenhancing cytotoxic heteroglycan isolated from an edible mushroom *Calocybe indica* var. APK2. *Carbohydrate research*, 346(14), 2237-2243.
- [9] Zhou, X., Gong, Z., Su, Y., Lin, J., & Tang, K. (2009). Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(3), 279-291.
- [10] He, L., Yin, N., Cheng, J. W., Wu, X. Q., Jiang, J. X., & Song, X. L. (2009). Structural features of a new heteropolysaccharide from the fruit bodies of *Melia azedarach* and its effect on cytotoxic activity. *Fitoterapia*, 80(7), 399-403.
- [11] Zhang, A., Li, X., Xing, C., Yang, J., & Sun, P. (2014). Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus eryngii* using response surface methodology. *International journal of biological macromolecules*, 65, 28-32.

- [12] Wang, Q., Sun, Y., Yang, B., Wang, Z., Liu, Y., Cao, Q., ... & Kuang, H. (2014). Optimization of polysaccharides extraction from seeds of *Pharbitis nil* and its anti-oxidant activity. *Carbohydrate polymers*, 102, 460-466.
- [13] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*. 1951;168(4265): 167-167.
- [14] Nair, V. D., Panneerselvam, R., & Gopi, R. (2012). Studies on methanolic extract of *Rauvolfia* species from Southern Western Ghats of India–In vitro antioxidant properties, characterisation of nutrients and phytochemicals. *Industrial Crops and Products*, 39, 17-25.
- [15] Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.
- [16] Wong, S. P., Leong, L. P., & Koh, J. H. W. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food chemistry*, 99(4), 775-783.
- [17] Ye, C. L., & Jiang, C. J. (2011). Optimization of extraction process of crude polysaccharides from *Plantago asiatica* L. by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 495-502.
- [18] Feng, K., Chen, W., Sun, L., Liu, J., Zhao, Y., Li, L., ... & Zhang, W. (2015). Optimization extraction, preliminary characterization and antioxidant activity in vitro of polysaccharides from *Stachys sieboldii* Miq. tubers. *Carbohydrate Polymers*, 125, 45-52.
- [19] Van Khoa, T., Vu, H. X. A., Kiet, T. T., & Van Thi, T. T. (2019). Effect of extraction temperatures on in vitro antioxidant activities of polysaccharides from *Ophiocordyceps sobolifera*. *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 128(1D), 17-21.
- [20] Shah, P., & Modi, H. A. (2015). Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for determination of antioxidant activity. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*, 3(6), 636-41.

EXTRACTION OPTIMISATION OF *CALOCYBE INDICA* POLYSACCHARIDES WITH THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITIES

Nguyen Quang Man¹, Le Trung Hieu^{*2}, Le Lam Son², Tran Thanh Minh²,
Ho Xuan Anh Vu², Le Thi Dieu Ai², Luong Quang Huy², Le Thi Kim Dung¹,
Le Thi My Linh¹, Tran Thi Van Thi²

¹Faculty of Basic Sciences, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

²Faculty of Chemistry, University of Sciences, Hue University

*Email: lthieu@hueuni.edu.vn

ABSTRACT

The objective of the work reported in this paper was to design experiments to optimize the yield of polysaccharides from the *Calocybe indica*. From this study, it could be concluded that the maximum yield of the polysaccharides 5,16% could be obtained with extraction time 4 hrs, extraction temperature 100 °C, the ratio of sample to water 1:50, extraction number times 3 and the ratio of ethanol 96% to extract volume 4:1. The antioxidant activities of polysaccharides were evaluated *in vitro*. Polysaccharides from *Calocybe indica* demonstrated appreciable antioxidant potential on total antioxidant activity (The content of antioxidants in terms of *Calocybe indica* is 38.43±0.32 mGA/g or 27.82±0.14 mAs/g) and DPPH radical scavenging activity (IC₅₀ = 438,52 µg/mL).

Keywords: *Calocybe indica*; polysaccharides; extraction; optimization, antioxidant activities.



Nguyễn Quang Mẫn sinh năm 1987. Ông tốt nghiệp Thạc sỹ Hóa học, chuyên ngành Hóa Hữu Cơ năm 2012 tại trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Ông hiện là giảng viên của Khoa Cơ bản, trường Đại học Y Dược, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Tổng hợp vật liệu và ứng dụng xúc tác, tách và ứng dụng hợp chất thiên nhiên, phân tích các hợp chất hữu cơ.



Lê Trung Hiếu sinh năm 1987. Ông tốt nghiệp Tiến sĩ Hóa Hữu cơ năm 2018 tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Ông hiện là giảng viên của Khoa Hóa học, trường ĐHKH Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Hóa học các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học, phân tích hợp chất hữu cơ.



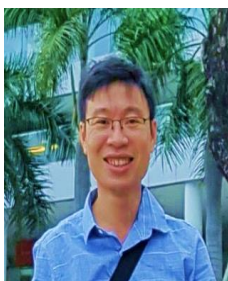
Lê Lâm Sơn sinh năm 1984. Ông tốt nghiệp Thạc sỹ Hóa học năm 2008 tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Ông hiện là giảng viên của Khoa Hóa học, trường ĐHKH Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Hóa học hữu cơ cho thực phẩm, hóa dược, Vật liệu xúc tác cho phản ứng hữu cơ.



Trần Thanh Minh sinh năm 1980. Ông tốt nghiệp thạc sỹ Hóa học năm 2007 tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Ông hiện là giảng viên của Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Hóa hữu cơ.



Hồ Xuân Anh Vũ, sinh ngày 23/03/1985 tại Thừa Thiên Huế. Ông tốt nghiệp cử nhân chuyên ngành Hóa học năm 2009 tại trường Đại học Khoa học, Đại học Huế; tốt nghiệp thạc sỹ chuyên ngành Hóa học Phân tích năm 2012 tại trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Hiện đang là nghiên cứu sinh tại trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Hiện nay, ông đang công tác tại bộ môn Hóa phân tích, khoa Hóa học của trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.



Lê Thị Diệu Ái sinh ngày 12/11/2000 tại Thừa Thiên Huế. Cô đang là sinh viên Khoa Hóa học, trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Hóa học các hợp chất có hoạt tính sinh học



Lương Quang Huy sinh ngày 18/08/2000 tại Thừa Thiên Huế. Anh đang là sinh viên Khoa Hóa học, trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Hóa học các hợp chất có hoạt tính sinh học



Lê Thị Kim Dung sinh ngày 08/11/1984. Bà tốt nghiệp đại học năm 2008 ngành Hóa Phân tích tại Trường Đại học quốc gia V.N. Karazin Kharkiv, Ucraina. Năm 2009, bà tốt nghiệp thạc sĩ chuyên ngành Hóa Phân tích tại Trường Đại học quốc gia V.N. Karazin Kharkiv, Ucraina. Hiện tại, bà đang công tác tại Khoa Cơ bản, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Phân tích kim loại độc trong nước



Lê Thị Mỹ Linh sinh ngày 28/09/1997. Cô nhận bằng Cử nhân Hóa học năm 2019 tại trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế. Hiện tại, cô đang công tác tại Khoa Cơ bản, trường Đại học Y – Dược, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Tách và ứng dụng hợp chất thiên nhiên.



Trần Thị Văn Thi sinh ngày 10/10/1962. Bà tốt nghiệp cử nhân Hóa học năm 1984 tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, Thạc sĩ Hóa học năm 1997 tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, Tiến sĩ Hóa hữu cơ năm 2002 tại Khoa Hóa, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội, Phó giáo sư năm 2006. Bà hiện là giảng viên của Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Hóa học hữu cơ cho thực phẩm, hóa dược, Vật liệu xúc tác cho phản ứng hữu cơ.

