

BUILDING A PROCESS OF HYDROLYZING SHIITAKE MUSHROOM (*Lentinus edodes*) TO CREATE HEALTH PROTECTION PRODUCT

Nguyen Anh Thu*, Huynh Vu, Do Thi Nhu Thao, Tran Thi An, Nguyen Pham Truc Phuong

Research and Development Center for Hi-tech Agriculture

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 18/12/2022 Revised: 14/4/2023 Published: 19/4/2023	According to studies, <i>Lentinus edodes</i> is used medicinally for immune dysfunction, cancer, allergies, fungal infections, flu, frequent colds, bronchitis, heart disease, hyperlipidemia, hypertension, infectious diseases, diabetes, and hepatitis. Therefore, this study was carried out with the aim of building a technological process for shiitake mushroom hydrolysis, obtaining bioactive fractions. The research results of the topic include the hydrolysis process of shiitake mushrooms with the following parameters: 7.27g raw materials of shiitake mushrooms, 1.3mL Celluclast, and 1.13g Flavourzyme, time of phase 1 hydrolysis (with Celluclast 1.5L) is 16 hours, hydrophane two times (addition of Flavourzyme) is 7 hours, the reaction volume and temperature were 100 mL and 55°C, pH 6 stops the reaction at 95°C for 5 minutes, inhibitory activity α-glucosidase inhibition reached 30.52%.
KEYWORDS	
Hydrolyzing <i>Lentinus edodes</i> Celluclast® 1.5L Flavourzyme α-glucosidase	

XÂY DỰNG QUY TRÌNH THỦY PHÂN NẤM HƯƠNG (*Lentinus edodes*) TẠO SẢN PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE

Nguyễn Anh Thu*, Huỳnh Vũ, Đỗ Thị Như Thảo, Trần Thị An, Nguyễn Phạm Trúc Phương

Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 18/12/2022 Ngày hoàn thiện: 14/4/2023 Ngày đăng: 19/4/2023	Các nghiên cứu cho thấy nấm hương được sử dụng trong y học cho các bệnh liên quan đến suy giảm chức năng miễn dịch, ung thư, dị ứng môi trường, nhiễm nấm, cúm và cảm lạnh thường xuyên, viêm phế quản, bệnh tim, tăng lipid trong máu, tăng huyết áp, bệnh truyền nhiễm, bệnh tiểu đường, viêm gan. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu xây dựng quy trình công nghệ thủy phân nấm hương, thu nhận phân đoạn có hoạt tính sinh học. Kết quả nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình thủy phân chân nấm hương với các thông số: nguyên liệu chân nấm hương 7,27g, enzyme Celluclast 1,3 mL và Flavourzyme 1,13g, thời gian thủy phân pha 1 (với enzyme Celluclast) là 16 giờ, thời gian thủy pha 2 (bổ sung thêm enzyme Flavourzyme) là 7 giờ, thể tích phản ứng 100 mL, nhiệt độ phản ứng 55°C, pH 6 dừng phản ứng bằng nhiệt độ 95°C trong 5 phút, hoạt tính ức chế α-glucosidase đạt 30,52%.
TỪ KHÓA	
Thủy phân <i>Lentinus edodes</i> Celluclast® 1.5L Flavourzyme α-glucosidase	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7136>

* Corresponding author. Email: anhtubio@gmail.com

1. Giới thiệu

Nấm hương hay còn gọi là nấm đông cô, có tên khoa học là *Lentinus edodes* một loại nấm ăn được phổ biến phân bố ở Đông Á, thường được dùng làm thực phẩm và thảo mộc ở Trung Quốc [1]. Trong nấm hương chứa hàm lượng dinh dưỡng cao như các hợp chất phenolic, nhiều loại vitamin, chất xơ, khoáng chất và ergosterol [2]. Phần lớn thành phần dinh dưỡng của nấm hương tươi là nước chiếm đến 914 g/kg, lượng protein ở mũ nấm và thân nấm lần lượt chiếm 28,4% và 18,8%, tổng lượng chất béo có trong nấm hương là 21,22 g/kg, trong đó 77,7% là chất béo không bão hoà và 22,3% chất béo bão hoà và có hàm lượng acid linoleic cao (76%). Hàm lượng chất xơ ở mũ và thân nấm lần lượt là 82,94 g/kg và 25,68 g/kg, tổng lượng đường ở thân nấm cao (439,56 g/kg) cao hơn hẳn so với mũ (420,16 g/kg); ngoài ra hàm lượng tro ở mũ và thân lần lượt là 62,6 g/kg và 41,47 g/kg [3].

Nấm hương được sử dụng trong y học cho các bệnh liên quan đến suy giảm chức năng miễn dịch, ung thư, dị ứng môi trường, nhiễm nấm, cúm và cảm lạnh thường xuyên, viêm phế quản, bệnh tim, tăng lipid trong máu, tăng huyết áp, bệnh truyền nhiễm, bệnh tiểu đường, viêm gan [4]. Hợp chất có hoạt tính sinh học được nghiên cứu kỹ lưỡng nhất trong nấm hương là lentinan polysaccharit. Lentinan được chấp nhận như một liệu pháp hỗ trợ trong hóa trị liệu [5]. Hợp chất đáng chú ý tiếp theo là eritadenine, là một chất chuyển hóa thứ cấp được sản xuất bởi *L. edodes*. Tác dụng của eritadenine là hạ thấp nồng độ cholesterol trong máu. Hàm lượng eritadenine trong 1 kg nấm hương khô khoảng 400-700 mg [6]. Theo Afrin và cộng sự [7], eritadenine tách từ mũ *L. edodes* bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) cho 642,8 mg/100g trọng lượng khô, eritadenine ức chế men chuyển angiotensin (ACE) với IC₅₀ 0,091 μ M IC₅₀, trong khi IC₅₀ của captopril là 0,025 μ M. Yang và cộng sự [8] khi sử dụng exo-polymer từ nấm hương *L. edodes* với liều 200 mg/kg thể trọng trên chuột bị tiểu đường do streptozotocin gây ra cho thấy tác dụng giảm đường huyết 21,5% và tăng insulin lên tới 22,1% so với nhóm đối chứng. Laurino và cộng sự [9] đã nghiên cứu tác dụng của nấm hương đến tiểu đường thai kỳ trên chuột. Kết quả cho thấy, nấm hương có đặc tính chống oxy hóa giảm thiểu thiệt hại do tiểu đường thai kỳ thông qua các chỉ số insulin, alanine aminotransferase và aspartate aminotransferase, triglyceride và cholesterol toàn phần; giảm tổn thương gan do streptozotocin.

Tại Việt Nam hiện đã có một số khảo sát thu nhận lentinan, hoặc khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa, kháng ung thư của nấm hương. Hầu hết các nghiên cứu sử dụng phương pháp chiết cao sử dụng các dung môi hữu cơ hoặc dùng nước để chiết sau đó thu hồi bằng ethanol [10]. Tuy nhiên, chưa có các nghiên cứu đến hoạt tính sinh học của dịch thủy phân nấm hương bởi các hệ enzyme protease hay Celluclast. Sản phẩm từ dịch thủy phân bởi protease thường là các peptide với các kích thước khác nhau có các hoạt tính sinh học như kháng oxy hóa, kháng ung thư, tăng cường miễn dịch, kháng viêm, ức chế các enzyme ảnh hưởng đến tiểu đường type 2, ức chế men chuyển angiotensin (ACE), kháng khuẩn, hỗ trợ tiêu hóa, v.v. Sản phẩm từ dịch thủy phân bởi Celluclast là các polysaccharide hoặc các oligosaccharide, đây là những phân tử có các hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, hỗ trợ miễn dịch, hỗ trợ điều trị tiểu đường type 2, v.v. Với quy trình thủy phân sinh học, các phân tử có hoạt tính thu được đều có giá trị dinh dưỡng và khả năng trở thành các sản phẩm an toàn cao hơn. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đưa ra thông số quy trình phù hợp để thủy phân nấm hương, sử dụng kết hợp hệ enzyme protease và Celluclast để thu dịch thủy phân có các phân tử với kích thước nhỏ như các peptide hoặc các phức hợp peptide-polysaccharide và xác định hoạt tính ức chế α – glucosidase nhằm tạo nguồn nguyên liệu đáp ứng sản xuất các sản phẩm bảo vệ sức khỏe.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu: Chân nấm hương khô Nguyên Long được cung cấp bởi công ty TNHH thương mại dịch vụ thực phẩm Vị Việt Ngon. Chân nấm hương được xay thành dạng bột. Cân chính xác

250 g bột chân nấm hương, thêm chính xác 5000 ml nước, đậy kín, cân xác định khối lượng, để yên 1 h, sau đó đun sôi nhẹ dưới hồi lưu 1 h, để nguội, dùng nước bổ sung khối lượng bị giảm để thu dịch chiết bằng phễu lọc [11]. Bã sau khi lọc được sấy khô đến khối lượng không đổi để sử dụng làm cơ chất cho thí nghiệm thủy phân.

Enzyme: Celluclast® 1,5L (Novozymes, Đan Mạch) dạng lỏng, được sản xuất từ nấm *Trichoderma reesi*, hoạt tính cellulases: 700 EGU/g (EGU – Beta-glucanase Units), hoạt động ở pH 4,5-6, nhiệt độ 50-60°C; Flavourzyme® 500 MG (Novozymes, Đan Mạch), hoạt tính : 500 LAPU/g (Leucine aminopeptidase units), điều kiện hoạt động thích hợp ở pH 5-7, nhiệt độ 50-55°C.

Hóa chất: α -glucosidase (Sigma-aldrich), acarbose (Sigma-aldrich), α -PNPG (Sigma-aldrich), thuốc thử Folin (Mecrk), albumin (Sigma-aldrich), Na-K tartrate (Mecrk),...

Thiết bị: Máy đo quang phổ (UV5Nano, Mettler toledo, Thụy Sĩ), máy ổn nhiệt (Lab.companion, Jeiotech, Hàn Quốc), máy đo pH (SevenExcellence, Mettler toledo, Thụy Sĩ), tủ sấy (Esco, Singapore), Pipet (Mettler toledo, Thụy Sĩ),...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát thời gian thủy phân

Quá trình thủy phân được thực hiện với enzyme Celluclast trước và enzyme Flavourzyme sau, các thông số cố định ở nhiệt độ 55°C, pH 6 (dệm phosphate), nồng độ cơ chất 5%, bổ sung 1% Celluclast khảo sát dịch thủy phân trong 20 giờ (pha 1), bổ sung 1% Flavourzyme khảo sát dịch thủy phân trong 9 giờ (pha 2). Chọn thời gian thủy phân thích hợp cho từng loại enzyme. Thể tích thủy phân: 100 ml/erlen. Thực hiện phản ứng sử dụng máy khuấy từ gia nhiệt. Thí nghiệm lặp lại 3 lần. Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng đường khử (pha 1), hàm lượng protein (pha 2).

2.2.2. Khảo sát nồng độ cơ chất

Cố định pH 6, nhiệt độ 55°C, thay đổi nồng độ cơ chất 1-10%; bổ sung 1% Celluclast (pha 1) với thời gian phản ứng là kết quả thí nghiệm 1, bổ sung 1% Flavourzyme (pha 2) thời gian phản ứng là kết quả thí nghiệm 1. Thể tích thủy phân: 100 ml/erlen. Thực hiện phản ứng sử dụng máy khuấy từ gia nhiệt. Thí nghiệm lặp lại 3 lần. Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng đường khử (pha 1), hàm lượng protein (pha 2), hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase.

2.2.3. Khảo sát nồng độ enzyme

Cố định pH 6, nhiệt độ 55°C, nồng độ cơ chất là kết quả thí nghiệm 2; bổ sung 0,5-1,5% Celluclast (pha 1) với thời gian phản ứng là kết quả thí nghiệm 1, bổ sung 0,5-1,5% Flavourzyme (pha 2) thời gian phản ứng là kết quả thí nghiệm 1. Thể tích thủy phân: 100 ml/erlen. Thực hiện phản ứng sử dụng máy khuấy từ gia nhiệt. Thí nghiệm lặp lại 3 lần. Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng đường khử (pha 1), hàm lượng protein (pha 2), hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase.

2.2.4. Tối ưu hóa quy trình thủy phân bằng phần mềm Design-Expert

Cố định các yếu tố pH, nhiệt độ và thời gian thủy phân. Mô hình kiểm tra các biến thử nghiệm cần thiết cho hoạt tính ức chế tối ưu bằng thiết kế Box-Behnken và phương pháp bề mặt đáp ứng thể hiện ở Bảng 1. Trong nghiên cứu này, xác định giá trị tối ưu của 3 yếu tố lượng nguyên liệu, lượng enzyme cellulase, lượng enzyme protease ở 3 mức (-1, 0 và +1) với 17 thí nghiệm, trong đó có 5 thí nghiệm ở mức trung tâm, sử dụng phần mềm Design-Expert.

Hàm đáp ứng được chọn: Hoạt tính ức chế α -glucosidase.

Bảng 1. Các yếu tố sử dụng trong Box – Behnken

Yếu tố	Đơn vị	Kí hiệu	Mức
Lượng nguyên liệu	%	A	-1 0 +1
Lượng enzyme cellulase	%	B	-1 0 +1
Lượng enzyme protease	%	C	-1 0 +1

Bã chân nấm hương được cân khối lượng theo 3 mức (-1, 0 và +1) với 17 thí nghiệm. Thể tích thủy phân: 100 ml/erlen. Thực hiện phản ứng sử dụng máy khuấy từ gia nhiệt. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

2.2.5 Phương pháp xác định hoạt tính ức chế α -glucosidase

Phản ứng ức chế sự thủy phân pNPG của enzyme α -glucosidase được thực hiện theo phương pháp của Hogan [12].

2.2.6 Phương pháp xác định hàm lượng đường khử

Xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp quang phổ với thuốc thử DNS của Miller (1959) [13].

2.2.7 Phương pháp xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein tan trong dung dịch được xác định theo phương pháp Lowry, dùng albumin huyết thanh bò (BSA) làm chất chuẩn [14].

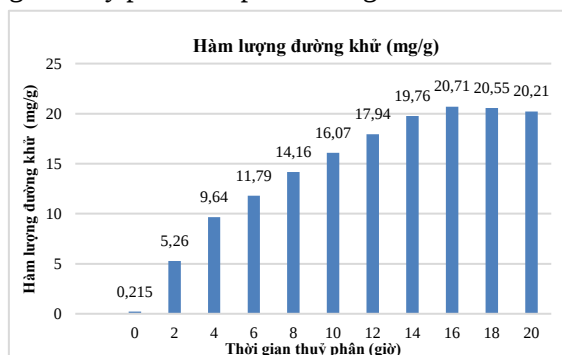
2.2.8 Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các kết quả thực nghiệm được phân tích bằng phần mềm Excel và SPSS Statistics 20. Phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) với kiểm định LSD được sử dụng để xác định sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa các giá trị trung bình.

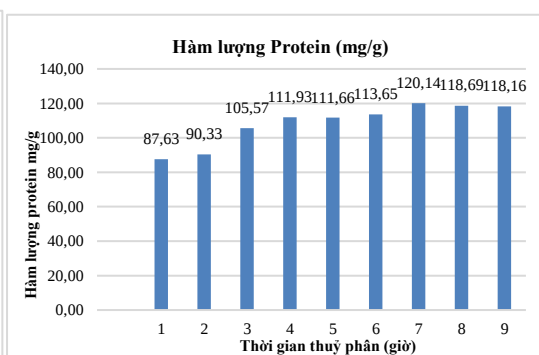
3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Khảo sát thời gian thủy phân

Thời gian là một trong những yếu tố ảnh hưởng nhiều đến quá trình thủy phân của enzyme. Kết quả thí nghiệm cho thấy, ở pha 1, nồng độ đường khử tăng dần theo thời gian thủy phân. Trong khoảng thời gian 0 giờ đến 16 giờ lượng đường khử tăng dần 0,215-20,70 mg/g. Sau 16 giờ, nồng độ glucose có xu hướng giảm (20,70-20,21 mg/g) do sản phẩm glucose tích tụ trong dung dịch gây hiệu ứng ức chế ngược lên enzyme và những phần cellulose dễ bị thủy phân cạn kiệt, thể hiện ở Hình 1. Ngoài ra, hoạt tính enzyme sẽ bị giảm sau một thời gian tác động, một số enzyme bị nhốt trong cấu trúc xốp của cellulose. Với kết quả thu được như trên thì có thể chọn thời gian thủy phân cho pha 1 là 16 giờ. Ở pha 2, sau thời gian thủy phân với Celluclast, các cấu trúc tế bào được phá vỡ sinh ra lượng protein nhất định tại thời điểm kết thúc pha 1. Với tác dụng của enzyme Flavourzyme, lượng protein tiếp tục tăng trong khoảng thời gian 0 giờ đến 7 giờ (4,71-120,14 mg/g). Trong khoảng thời gian 7 giờ đến 9 giờ, lượng protein đo được có dấu hiệu giảm xuống (120,14-118,16 mg/g), thể hiện ở Hình 2. Với kết quả thu được thì có thể chọn thời gian thủy phân cho pha 2 là 7 giờ.



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng đường khử



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng protein

3.2. Khảo sát nồng độ cơ chất

Tỷ lệ cơ chất là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình thủy phân. Nếu lượng cơ chất quá ít, quá trình thủy phân sẽ không hiệu quả, ngược lại nếu lượng cơ chất quá nhiều cũng ức chế quá trình thủy phân. Khi tăng lượng cơ chất từ 1-7% và hàm lượng đường khử tăng dần (17,1-23,06 mg/g), khi cơ chất tăng từ 7-10% thì lượng đường khử có xu hướng giảm (23,06-16,14 mg/g); ở pha 2, hàm lượng cơ chất tăng 1-6% hàm lượng protein tăng dần (76,7-121,7 mg/g) và giảm khi nồng độ cơ chất ở mức 6-10% (121,7-79,9 mg/g). Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase cao nhất ở mức nguyên liệu 7-8% và phần trăm ức chế là 19,18%, thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng đường khử, hàm lượng protein, phần trăm ức chế α -glucosidase đo được ở thí nghiệm khảo sát nồng độ cơ chất

Nồng độ cơ chất (%)	Hàm lượng đường khử (mg/g)	Hàm lượng protein (mg/g)	Phần trăm ức chế α -glucosidase (%)
1	17,10 ^d ± 1,39	76,72 ^e ± 2,67	5,11 ^g ± 0,20
2	19,86 ^c ± 0,64	83,05 ^{de} ± 6,46	7,59 ^f ± 0,39
3	19,27 ^b ± 0,56	93,35 ^{bcd} ± 8,01	10,12 ^e ± 0,25
4	19,94 ^b ± 0,96	102,48 ^b ± 3,26	13,60 ^d ± 0,48
5	20,97 ^{bc} ± 0,4	117,76 ^a ± 3,79	15,87 ^c ± 1,43
6	22,30 ^{ab} ± 0,86	121,65^a ± 5,01	18,88 ^b ± 0,18
7	23,06^a ± 0,63	112,98 ^a ± 2,76	19,18^a ± 0,20
8	22,43 ^{ab} ± 0,09	101,18 ^{bc} ± 2,21	19,05 ^a ± 0,27
9	19,08 ^c ± 0,51	91,11 ^{cd} ± 2,80	17,19 ^b ± 0,86
10	16,14 ^d ± 84	79,88 ^e ± 1,41	16,23 ^b ± 1,04

Như vậy có sự tương quan giữa nồng độ đường khử, nồng độ protein và hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase, nồng độ đường khử và protein cao thì hoạt chất cũng cao, nồng độ đường khử và protein giảm thì hoạt chất cũng giảm. Quá trình thủy phân hiệu quả nhất thì lượng hoạt chất sinh ra sẽ nhiều nhất. Trong thí nghiệm này, nồng độ cơ chất 7% là phù hợp nhất.

3.3. Khảo sát nồng độ enzyme

Bảng 3. Hàm lượng đường khử, hàm lượng protein, phần trăm ức chế α -glucosidase trong thí nghiệm khảo sát nồng độ enzyme

Nồng độ enzyme (%)	Hàm lượng đường khử (mg/g)	Hàm lượng protein (mg/g)	Phần trăm ức chế α -glucosidase (%)
0,5	10,37 ^d ± 0,33	92,44 ^d ± 1,85	13,26 ^d ± 0,57
0,7	15,32 ^c ± 0,67	100,87 ^c ± 3,27	16,53 ^{bc} ± 0,42
0,9	20,40 ^b ± 0,80	107,49 ^b ± 2,56	22,21 ^a ± 0,41
1,1	24,22^a ± 0,52	120,46^a ± 1,58	22,51^a ± 1,04
1,3	23,32 ^a ± 0,77	112,41 ^b ± 0,87	18,25 ^b ± 1,13
1,5	19,68 ^b ± 1,01	109,19 ^b ± 4,59	15,85 ^c ± 0,66

Ở thí nghiệm này, hàm lượng cơ chất sử dụng là 7%. Lượng enzyme thay đổi từ 0,5-1,5%. Kết quả thí nghiệm cho thấy hàm lượng đường khử tăng mạnh (10,37-24,22 mg/g) khi nồng độ enzyme Celluclast tăng từ 0,5-1,1%, hàm lượng đường khử giảm dần (24,22-19,68 mg/g) khi nồng độ enzyme tiếp tục tăng 1,1-1,5%. Hàm lượng protein tăng mạnh (92,4-120,5 mg/g) khi nồng độ enzyme Flavourzyme tăng từ 0,5-1,1%, hàm lượng protein giảm (120,5-109,2 mg/g) khi nồng độ enzyme tiếp tục tăng từ 1,1-1,5%, thể hiện ở Bảng 3. Về nguyên tắc, với một lượng cơ chất xác định, khi nồng độ enzyme càng lớn thì hiệu suất của phản ứng enzyme càng tăng. Tuy nhiên, nếu lượng enzyme tăng quá cao so với lượng cơ chất thì hiệu suất phản ứng sẽ không tăng thêm do lượng enzyme dư thừa dẫn đến sự cạnh tranh cơ chất. Ngoài ra, trong hệ phản ứng enzyme dị thể, khả năng tiếp xúc không tốt giữa enzyme trong pha lỏng và cơ chất ở dạng rắn cũng là một yếu tố hạn chế hoạt tính của enzyme, kể cả khi sử dụng nồng độ cao. Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase cao nhất trong thí nghiệm này là ở nồng độ enzyme 1,1%.

Như vậy, các thông số cho quá trình thủy phân sẽ là: thời gian thủy phân với enzyme Celluclast là 16 giờ và với enzyme Flavourzyme là 7 giờ; lượng nguyên liệu 7 g, nồng độ enzyme Celluclast là 1,1%, nồng độ enzyme Flavourzyme là 1,1%.

3.4. Tối ưu hóa quy trình thủy phân bằng phần mềm Design-Expert

Thí nghiệm tối ưu được thiết kế phù hợp với từng loại cơ chất, pH 6, nhiệt độ thủy phân 55°C, thời gian thủy phân ở pha 1 là 16 giờ, ở pha 2 là 7 giờ. Có 3 yếu tố được đưa vào thí nghiệm tối ưu là nồng độ cơ chất, nồng độ enzyme Celluclast và nồng độ enzyme Flavourzyme ở 3 mức (-1; 0 và +1), thể hiện ở Bảng 4 với 17 nghiệm thức (Bảng 5), trong đó có 5 thí nghiệm ở trung tâm theo mô hình Box-Behnken.

Bảng 4. Nồng độ 3 yếu tố sử dụng trong Box-Behnken

Yếu tố	Đơn vị	Ký hiệu	Mức		
			-1	0	+1
Chân nấm hương	g	A	6	7	8
Celluclast	ml	B	0,9	1,1	1,3
Flavourzyme	g	C	0,9	1,1	1,3

Kết quả thí nghiệm cho thấy hoạt tính của dịch thủy phân thực nghiệm thu được có sự chênh lệch không đáng kể so với kết quả dự đoán từ phần mềm DE.

Bảng 5. Hoạt tính của dịch thủy phân chân nấm hương của các nghiệm thức theo Box-Behnken

NT	Cơ chất	Celluclast	Flavourzyme	Hoạt tính ức chế α -glucosidase	
				Thực nghiệm	Mô hình
1	6	0,9	1,1	22,86	22,97
2	8	0,9	1,1	29,96	30,09
3	6	1,3	1,1	26,17	26,04
4	8	1,3	1,1	29,35	29,24
5	6	1,1	0,9	20,88	21,04
6	8	1,1	0,9	26,16	26,30
7	6	1,1	1,3	22,49	22,35
8	8	1,1	1,3	27,57	27,41
9	7	0,9	0,9	26,63	26,36
10	7	1,3	0,9	26,67	26,65
11	7	0,9	1,3	26,73	26,76
12	7	1,3	1,3	28,41	28,68
13	7	1,1	1,1	29,6	30,10
14	7	1,1	1,1	30,5	30,10
15	7	1,1	1,1	30,1	30,10
16	7	1,1	1,1	29,7	30,10
17	7	1,1	1,1	30,6	30,10

Kết quả phân tích ANOVA một chiều cho thấy (Bảng 6), mô hình có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$ với hệ số hồi quy $R^2 = 0,9921 > 0,75$ chứng tỏ mô hình tương thích với thực nghiệm. Hơn nữa, R^2 dự đoán (0,9573) tương thích với R^2 hiệu chỉnh (0,9819) và Adeq Precision = 29,608 > 4 chứng tỏ mô hình đủ độ chính xác cho thí nghiệm tối ưu hóa môi trường

Phương trình hồi quy theo hoạt tính như sau:

$$Y = 30,1 + 2,58A + 0,55B + 0,61C - 0,98AB - 0,05AC + 0,41BC - 2,93A^2 - 0,09B^2 - 2,9C^2$$

Trong đó: Y là hoạt tính ức chế α -glucosidase (%); A Cơ chất (g); B nồng độ enzyme Celluclast (mL); C nồng độ enzyme Flavourzyme (g).

$R^2 = 0,9921$; CV=1,46%; R^2 điều chỉnh=0,9819; R^2 -dự đoán=0,9573; Adeq Precision=29,608

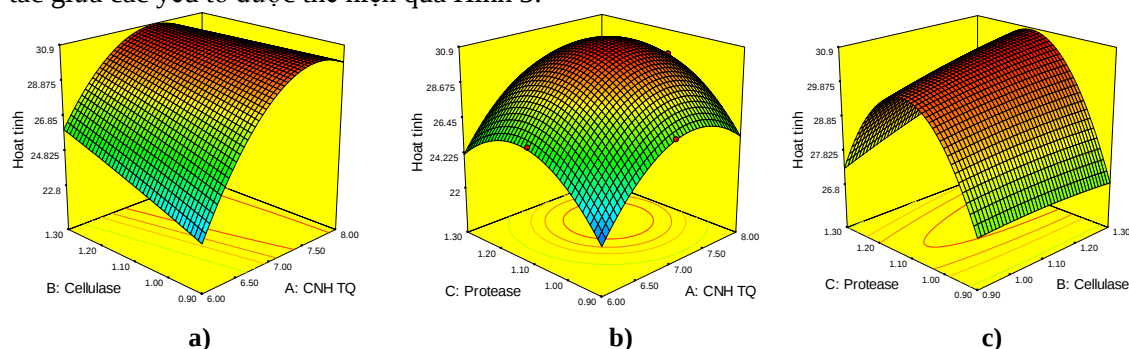
Sau khi phân tích các số liệu của mô hình Box-Behnken, chúng tôi đã sử dụng phần mềm Design-Expert để dự đoán thành phần môi trường tối ưu cho quá trình thủy phân chân nấm hương thu được hoạt tính cao nhất. Thông số được đưa ra như sau: nguyên liệu 7,27g, enzyme

Celluclast 1,3 mL và enzyme Flavourzyme 1,13g trong 100 mL đệm với hoạt tính ức chế dự đoán đạt 30,87%.

Bảng 6. Kết quả phân tích ANOVA của mô hình Box – Behnken

Biến độc lập	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	F-value	p-value
Mô hình	139,30	9	15,48	97,18	< 0,0001
A-Cơ chất	53,25	1	53,25	334,34	< 0,0001
B-Celluclast	2,44	1	2,44	15,33	0,0058
C-Flavourzyme	2,95	1	2,95	18,54	0,0035
AB	3,84	1	3,84	24,12	0,0017
AC	0,01	1	0,01	0,06	0,8093
BC	0,67	1	0,67	4,22	0,0790
A ²	36,02	1	36,02	226,18	< 0,0001
B ²	0,03	1	0,03	0,21	0,6576
C ²	35,41	1	35,41	222,33	< 0,0001

Bên cạnh đó, để xác định sự tương tác của mỗi biến cho hoạt tính ức chế tối ưu, đồ thị tương tác bề mặt ba chiều được xây dựng với trục z thể hiện trọng lượng hoạt tính ức chế và hai biến độc lập bất kỳ trục x, y và biến còn lại duy trì ở mức 0 (mức trung tâm). Quy luật của sự tương tác giữa các yếu tố được thể hiện qua Hình 3.



Hình 3 Bề mặt đáp ứng của hoạt tính ức chế α-glucosidase trong thí nghiệm tối ưu hoá

Hình 3a cho thấy, mặt đáp ứng bề mặt thể hiện sự tương tác của cặp yếu tố nguyên liệu và enzyme cellulase, từ đó có thể xác định được giá trị tối ưu cho hàm đáp ứng cực đại. Khi cố định yếu tố enzyme Flavourzyme và thay đổi giá trị hai yếu tố nguyên liệu và enzyme Celluclast, hoạt tính ức chế tăng lên, khi nguyên liệu tăng từ 6g đến 7,27g và lượng enzyme Celluclast tăng từ 0,9 mL đến 1,3 mL. Tiếp tục tăng nguyên liệu từ 7,27g lên 8g thì hoạt tính giảm xuống. Hình 3b, khi cố định yếu tố enzyme Celluclast và thay đổi giá trị hai yếu tố nguyên liệu và enzyme Flavourzyme, hoạt tính ức chế tăng lên, khi nguyên liệu tăng từ 6g đến 7,27g và lượng enzyme Flavourzyme tăng từ 0,9g đến 1,13g. Tiếp tục tăng nguyên liệu từ 7,27g lên 8g và tăng lượng Flavourzyme từ 1,13g đến 1,3g thì hoạt tính giảm xuống. Hình 3c, khi cố định yếu tố nguyên liệu và thay đổi giá trị hai yếu tố Celluclast và Flavourzyme, hoạt tính ức chế tăng lên, khi Celluclast tăng từ 0,9 mL đến 1,3 mL và lượng enzyme Flavourzyme tăng từ 0,9g đến 1,13g. Tiếp tục tăng lượng Flavourzyme từ 1,13g đến 1,3g thì hoạt tính giảm xuống.

Mô hình được kiểm chứng khi thực hiện thí nghiệm tại các giá trị tối ưu gồm nguyên liệu CNHTQ 7,27g, enzyme Celluclast 1,3 mL và Flavourzyme 1,13 g, thể tích phản ứng 100 mL. Kết quả hoạt tính ức chế đạt 30,52%, phù hợp với kết quả dự đoán từ mô hình.

Như vậy, các thông số tối ưu của quá trình thủy phân: cơ chất 7,27g, enzyme Celluclast 1,3 mL và Flavourzyme 1,13g, thời gian thủy phân pha 1 (với enzyme Celluclast) là 16 giờ, thời gian thủy phân pha 2 (bổ sung thêm enzyme Flavourzyme) là 7 giờ, thể tích phản ứng 100 mL, nhiệt

độ phản ứng 55°C, pH 6 dùng phản ứng bằng nhiệt độ 95°C trong 5 phút, hoạt tính ức chế α -glucosidase đạt 30,52%.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình thủy phân chân nấm hương khô. Chân nấm hương khô được xay thành dạng bột, sau đó tiến hành chiết nóng chân nấm hương, bã sau khi chiết nóng sẽ dùng làm nguyên liệu để xây dựng quy trình thủy phân. Quá trình thủy phân được thực hiện với enzyme Cellulast trước và enzyme Flavourzyme sau. Kết quả ghi nhận các thông số của quá trình thủy phân: nguyên liệu chân nấm hương sau khi chiết nóng 7,27g, enzyme Celluclast 1,3 mL và Flavourzyme 1,13g, thời gian thủy phân pha 1 (với enzyme Celluclast) là 16 giờ, thời gian thủy phân pha 2 (bổ sung thêm enzyme Flavourzyme) là 7 giờ, thể tích phản ứng 100 mL, nhiệt độ phản ứng 55°C, pH 6 dùng phản ứng bằng nhiệt độ 95°C trong 5 phút, hoạt tính ức chế α -glucosidase đạt 30,52%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] Z. Zhang, G. Lv, H. Pan, Y. Wu, and L. Fan, "Note Effects of Different Drying Methods and Extraction Condition on Antioxidant Properties of Shiitake (*Lentinus edodes*)," *Food Science. Technology, Res.*, vol. 15, no. 5, pp. 547-552, 2009.
- [2] A. Fernandes, J. C. M. Barreira, A. L. Antonio, M. B. P. P. Oliveira, A. Martins, and I. C. F. R. Ferreira, "Extended use of gamma irradiation in wild mushrooms conservation: Validation of 2 kGy dose to preserve their chemical characteristics," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 67, pp. 99-105, 2016.
- [3] A. Wang, L. Liu, G. Tian, S. Wei, and F. Xu, "Evaluation of nutritional values of shiitake mu S.shroom (*Lentinus edodes*) stipes," *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 12, no. 3, pp. 2012-2019, 2018.
- [4] P. S. Bisen, R. K. Baghel, B. S. Sanodiya, G. S. Thakur, and G. B. K. S. Prasad, "*Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 17, pp. 2419-2430, 2010.
- [5] M. S. Mantovani, F. B. Marilanda, P. F. A. José, J. O. Rodrigo, F. S. Ariane, and R. R. Lúcia, "β-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer," *Mutation Research*, vol. 658, pp. 154-161, 2008.
- [6] M. Saito, T. Yamashita, and T. Kaneda, "Quantitative analysis of eritadenine in "Shiitake" mushroom and other edible fungi," *Eiyo to Shokuryo*, vol. 28, pp. 503-505, 1975.
- [7] S. Afrin, M. A. Rakib, B. H. Kim, J. O. Kim, and Y. L. Ha, "Eritadenine from Edible Mushrooms Inhibits Activity of Angiotensin Converting Enzyme in Vitro," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 64, no. 11, pp. 2263-2268, 2016, doi:10.1021/acs.jafc.5b05869.
- [8] B. K. Yang, D. H. Kim, S. C. Jeong, S. Das, Y. S. Choi, J. S. Shin, S. C. Lee, and C. H. Song, "Hypoglycemic effect of a *Lentinus edodes* exopolymer produced from a submerged mycelial culture," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 66, pp. 937-942, 2002.
- [9] L. F. Laurino, F. J. M. Viroel, C. Erika, S. Sara, B. P. Thaisa, M. R. C. Raquel, A. V. Edilma, F. J. Angela, H. Alexandre, G. Denise, and G. Marli, "*Lentinus edodes* Exposure before and after Fetus Implantation: Materno-Fetal Development in Rats with Gestational Diabetes Mellitus," *Nutrients*, vol. 11, no. 11, 2019, Art. no. 2720.
- [10] P. L. Hoang, T. L. A. Nguyen, H. V. Nguyen, D. D. Hoang, D. Q. Le, and D. M. Nguyen, "Some conditions affect the extraction of Lentinan from Vietnamese dried shiitake mushrooms," *Journal of Vietnam Science and Technology*, vol. 61, no. 3, pp. 67-72, 2018.
- [11] Vietnam Pharmacopoeia Council, Vietnamese pharmacopoeia IV, Ha Noi Publishing House, Hanoi, Appendix 12.10, 2009.
- [12] S. Hogan, L. Zhang, J. Li, S. Sun, C. Canning, and K. Zhou, "Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase," *Nutrition & Metabolism*, vol. 7, pp. 71-79, 2010.
- [13] G. L. Miller, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing sugar," *Analytical Chemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 426-428, 1959.
- [14] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *Journal of biological chemistry*, vol. 193, pp. 265-275, 1951.