



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)** (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



2-0002407

(51)⁷ **A61K 36/06; C08B 37/00** (13) **Y**

(21) 2-2016-00122 (22) 14/04/2016
(45) 25/09/2020 390 (43) 25/10/2017 355A
(73) Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch (VN)
60 Trung Kính, Trung Hòa, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội
(72) Nguyễn Đức Tiến (VN); LƯU THỊ GẮM (VN).

(54) **QUY TRÌNH TRÍCH LY LENTINAN TỪ NẤM HƯƠNG (LENTINULA EDODES)
BẰNG CÁCH SỬ DỤNG SÓNG SIÊU ÂM**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình trích ly lentinan từ nấm hương (*Lentinula edodes*) bằng cách sử dụng sóng siêu âm, bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu: nấm hương (*Lentinula edodes*) nguyên liệu sạch, không bị mốc, đạt chỉ tiêu an toàn thực phẩm về vi sinh vật, kim loại nặng và aflatoxin; bảo quản ở nhiệt độ phòng, sấy khô; giữ độ ẩm cho nguyên liệu nấm hương từ 9-12%; b) xử lý nấm hương nguyên liệu: nấm hương được nghiền nhỏ về kích thước $\leq 0,8$ mm, bột nguyên liệu sau nghiền được bảo quản ở nhiệt độ phòng; c) trích ly nguyên liệu: bột nấm hương nguyên liệu kích thước $\leq 0,8$ mm được trích ly trên hệ thống trích ly bằng sóng siêu âm (tần số siêu âm 20 KHZ, bể siêu âm 20 lít), trích ly bằng dung môi nước khử ion-NaOH 0,35%, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 6/1 (thể tích/khối lượng), nhiệt độ 65°C, siêu âm 6 phút, cường độ siêu âm 58w/cm²; d) lọc dịch trích ly thu dịch trích ly lentinan: lọc lần 1 qua vải, lần 2 qua màng lọc 0,1 μ m, tách bã để thu dịch chiết chứa lentinan.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình trích ly thu nhận hoạt chất sinh học từ nấm hương (*Lentinula edodes*) có hàm lượng hoạt chất lentinan cao ứng dụng cho chế biến thực phẩm chức năng, cụ thể là đề cập đến quy trình trích ly lentinan từ nấm hương (*Lentinula edodes*) bằng cách sử dụng sóng siêu âm.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Hiện nay có nhiều phương pháp trích ly thu nhận hoạt chất sinh học từ nấm hương, trong đó phương pháp trích ly truyền thống có bản chất là phương pháp cơ học phá vỡ vật lý, giải phóng các chất bên trong tế bào vào môi trường xung quanh. Các thiết bị bao gồm máy đồng nhất, máy nghiền và khuấy trộn, quá trình phá vỡ được thực hiện bằng hiệu ứng va chạm của tế bào dưới tác dụng của áp suất dẫn đến phá vỡ tế bào, giải phóng phân tử hoạt chất bên trong. Nhược điểm của phương pháp này là chi phí năng lượng cao, tốn nhiều thời gian và hàm lượng chất tan thu được hoạt chất trong dịch chiết cũng không cao.

Với phương pháp hóa học bằng cách thẩm thấu hóa màng ngăn bên ngoài tế bào, sử dụng dung môi hữu cơ: metanol, etanol, benzen, ... tác động để tạo thành kênh dẫn qua màng tế bào. Nhược điểm của phương pháp này là tốc độ chiết xuất chậm, giá thành cao và yêu cầu phải loại bỏ dung môi chiết tách từ sản phẩm cuối cùng.

Công bố đơn quốc tế số WO2013/140185 (A) đề cập đến phương pháp trích ly lentinan từ nấm hương (*Lentinula edodes*) bằng sóng siêu âm bằng cách ngâm nấm hương trong nước cất, sau đó xử lý bằng sóng siêu âm trong 40 phút, công suất 90W. Lentinan có thể được chiết bằng nước nóng (lên đến 100°C) hoặc sử dụng dung môi kiềm NaOH/NaBH₄. Nước sau đó được loại bỏ và etanol được bổ sung, làm lạnh và thu phần kết tủa. Hạn chế của quy trình này là tốn nhiều thời gian trích ly và trích ly ở nhiệt độ cao, sẽ làm giảm hoạt tính của hoạt chất lentinan.

Tài liệu “Study on methodology of Lentinan by ultrasonic extracted and ultra-filtration (Nian Bao-yi et al, Department of Chemistry & Biological Engineering,

Sanming College, Sanming 365004, China, 2004)” đề cập đến phương pháp trích ly lentinan từ nấm hương bằng cách xử lý bột nấm hương với nước cất, khảo sát quá trình trích ly ở các điều kiện nhiệt độ từ 50-90°C, thời gian tách chiết từ 60-180 phút, tỉ lệ nước/nguyên liệu từ 40-80 mL/g, sau đó xử lý bằng sóng siêu âm công suất 80W, thời gian 13 phút. Phần dịch được tách riêng, sau đó kết tủa lại bằng etanol. Hạn chế của quy trình này là trích ly 2 lần, thời gian trích ly dài gấp 10-30 lần so với trích ly bằng sóng siêu âm, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu cũng cao hơn, dẫn tới quá trình tách hoạt chất, thu hồi dung môi sau trích ly sẽ tốn thời gian, làm tổn hao thiết bị.

Tài liệu “Optimization of ultrasound-assisted extraction of *Lentinula edodes* polysaccharides using response surface methodology (Ping Yang et al, Advance Journal of Food Science and Technology)” đề cập đến quy trình trích ly lentinan bằng sóng siêu âm bằng cách sử dụng dung môi là nước, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/15, sử dụng sóng siêu âm có công suất 80W trong thời gian 13 phút. Hạn chế phương pháp này là hàm lượng dung môi sử dụng cao làm tăng lượng tạp chất, ngoài ra còn gây ảnh hưởng tới quá trình lọc xử lý dịch trích ly sau này về thời gian, cũng như hao phí về dung môi.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Do đó, mục đích của giải pháp hữu ích là sử dụng sóng siêu âm có cường độ 58w/cm^2 với tần số 20 kHz cho quá trình tách chiết hoạt chất sinh học từ nấm hương bằng cách phá vỡ thành tế bào cho hoạt chất được tách ra dễ dàng và thu được hoạt chất với hàm lượng cao.

Để đạt được mục đích trên, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình trích ly lentinan từ nấm hương (*Lentinula edodes*) bằng cách sử dụng sóng siêu âm, bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu: nấm hương nguyên liệu sạch, không bị mốc, đạt chỉ tiêu an toàn thực phẩm về vi sinh vật, kim loại nặng và aflatoxin; bảo quản nhiệt độ phòng, sấy khô; giữ độ ẩm cho nguyên liệu nấm hương từ 9-12%;

b) xử lý nấm hương nguyên liệu: nấm hương được nghiền nhỏ về kích thước $\leq 0,8\text{mm}$, bột nguyên liệu sau nghiền được bảo quản ở nhiệt độ phòng;

c) trích ly nguyên liệu: bột nấm hương nguyên liệu kích thước $\leq 0,8$ mm được trích ly trên hệ thống trích ly bằng sóng siêu âm (tần số siêu âm 20 kHz, bể siêu âm 20 lít), trích ly bằng dung môi nước khử ion-NaOH 0,35%, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 6/1 (thể tích/khối lượng), nhiệt độ 65°C, thời gian siêu âm 6 phút, cường độ siêu âm 58w/cm²;

d) lọc dịch trích ly thu dịch trích ly lentinan: lọc lần 1 qua vải, lần 2 qua màng lọc 0,1µm, tách bã để thu dịch chiết chứa lentinan.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là hình vẽ dạng sơ đồ quy trình trích ly lentinan từ nấm hương (*Lentinula edodes*) theo giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn thông qua các phương án ưu tiên, tuy nhiên cần phải hiểu rằng giải pháp hữu ích không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình trích ly lentinan từ nấm hương (*Lentinula edodes*) bằng cách sử dụng sóng siêu âm, bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu: nấm hương (*Lentinula edodes*) nguyên liệu sạch, không bị mốc, đạt chỉ tiêu an toàn thực phẩm về vi sinh vật, kim loại nặng và aflatoxin; bảo quản nhiệt độ phòng, sấy khô; giữ độ ẩm cho nguyên liệu nấm hương từ 9-12%;

b) xử lý nấm hương nguyên liệu: nấm hương được nghiền nhỏ về kích thước $\leq 0,8$ mm, bột nguyên liệu sau nghiền được bảo quản ở nhiệt độ phòng;

c) trích ly nguyên liệu: bột nấm hương nguyên liệu kích thước $\leq 0,8$ mm được trích ly trên hệ thống trích ly bằng sóng siêu âm (tần số siêu âm 20 kHz, bể siêu âm 20 lít), trích ly bằng dung môi nước khử ion-NaOH 0,35%, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 6/1 (thể tích/khối lượng), nhiệt độ 65°C, siêu âm 6 phút, cường độ siêu âm 58w/cm²;

d) lọc dịch trích ly thu dịch trích ly lentinan: lọc lần 1 qua vải, lần 2 qua màng lọc 0,1µm, tách bã để thu dịch chiết chứa lentinan.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn thông qua các ví dụ. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng ví dụ này chỉ với mục đích minh họa cụ thể hơn cho giải pháp hữu ích và không làm giới hạn giải pháp hữu ích theo bất kỳ cách nào. Ví dụ 1: Đánh giá các chỉ tiêu chất lượng, chỉ tiêu an toàn vệ sinh thực phẩm của nấm hương (*Lentinula edodes*) nguyên liệu.

Từ kết quả xác định độ ẩm, thành phần dinh dưỡng, hoạt chất sinh học, chỉ tiêu an toàn thực phẩm của các mẫu nấm hương (*Lentinula edodes*) nguyên liệu ở một số cơ sở sản xuất trong nước và lựa chọn nguyên liệu cho trích ly có hàm lượng lentinan đạt $4,81 \pm 1,16$ %, độ ẩm < 17 %, đảm bảo các chỉ tiêu an toàn thực phẩm về vi sinh vật và kim loại nặng.

Bảng 1: Kết quả xác định chỉ tiêu chất lượng của nấm hương (*Lentinula edodes*) nguyên liệu:

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả
1	Lentinan	% mg	$4,81 \pm 1,16$
2	Độ ẩm	%	$15,1 \pm 1,9$
3	Cảm quan	Màu sắc	Sáng màu, không mốc

Chỉ tiêu an toàn vệ sinh thực phẩm của nấm hương (*Lentinula edodes*) nguyên liệu được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 2: Kết quả phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật trong nấm hương (*Lentinula edodes*) nguyên liệu

TT	Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả	Giới hạn cho phép	Phương pháp thử nghiệm
1	Tổng số vi khuẩn hiếu khí	CFU/g sản phẩm	6	10^4	TCVN 5165 - 90
2	Coliforms (37°C/ 48 giờ)	CFU/g sản phẩm	KPH	10	TCVN 6848 - 01
3	<i>E. coli</i> (37°C/ 96 giờ)	CFU/g sản phẩm	KPH	0	TCVN 6848 - 08
4	<i>S.aureus</i> (37°C/ 48 giờ)	CFU/g sản phẩm	KPH	3	TCVN 4830 - 89

5	<i>C.perfringens</i>	CFU/g sản phẩm	KPH	10	TCVN 4991 – 2005
6	Salmonella (37°C/ 48 giờ)	CFU/25g sản phẩm	KPH	0	TCVN 4829 - 89
7	<i>B.cereus</i>	CFU/g sản phẩm	KPH	10	TCVN 4992- 89
8	Tổng số bào tử nấm men – mốc	CFU/g sản phẩm	KPH	102	TCVN 6265-2007

Hàm lượng kim loại nặng của nấm hương (*Lentinula edodes*) nguyên liệu được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3: Kết quả phân tích các chỉ tiêu hàm lượng kim loại nặng của nấm hương (*Lentinula edodes*) nguyên liệu

TT	Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả	Giới hạn cho phép*	Phương pháp thiết bị
1	Hàm lượng chì (Pb)	mg/kg	0,011	≤ 10,0	AOAC 994,02; hoặc ISO 12193:2004
2	Hàm lượng Asen (As)	mg/kg	KPH	≤ 5,0	AOAC 952,13 hoặc AOAC 986,15
3	Hàm lượng Cadimi (Cd)	(mg/kg)	KPH	≤ 0,3	AOAC 2000(F-AA)
4	Hàm lượng thủy ngân (Hg)	(mg/kg)	KPH	≤ 0,5	AOAC -1997
5	Hàm lượng đồng (Cu)	(mg/kg)	KPH	≤ 5,0	ISO 8.294:1994

Hàm lượng các chất không mong muốn của nấm hương (*Lentinula edodes*) nguyên liệu được mô tả trong bảng 4.

Bảng 4: Kết quả phân tích hàm lượng các chất không mong muốn của nấm hương (*Lentinula edodes*) nguyên liệu

TT	Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả	Giới hạn tối đa*	Phương pháp thiết bị
----	----------	-------------	---------	------------------	----------------------

1	Aflatoxin	µg/kg	KPH	≤ 5,0	HPLC
---	-----------	-------	-----	-------	------

Ghi chú: KPH: Không phát hiện (nghĩa là dưới ngưỡng phát hiện của phương pháp (0,002 mg/kg).

*Quy định giới hạn tối đa nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm, mục Quy định giới hạn cho phép vi sinh vật trong thức ăn đặc biệt (dùng trực tiếp, không qua xử lý nhiệt trước khi sử dụng). (Ban hành kèm theo Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT ngày 19 tháng 12 năm 2007 của Bộ trưởng Bộ Y Tế)

Kết quả xác định các chỉ tiêu về an toàn vệ sinh thực phẩm của nấm hương (*Lentinula edodes*) nguyên liệu cho thấy sản phẩm đạt các chỉ tiêu về an toàn vệ sinh thực phẩm về các chỉ tiêu vi sinh vật, hàm lượng kim loại nặng và độc tố, phù hợp với tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm đã ban hành.

Do vậy, kết luận là nguyên liệu nấm hương (*Lentinula edodes*) đủ các điều kiện để thực hiện quy trình trích ly lentinan.

Ví dụ 2: So sánh phương pháp trích ly lentinan từ nấm hương (*Lentinula edodes*) bằng sử dụng sóng siêu âm và không sử dụng sóng siêu âm.

Bảng 5: So sánh phương pháp trích ly lentinan từ nấm hương bằng sử dụng sóng siêu âm và không sử dụng sóng siêu âm

Chỉ tiêu so sánh	Đơn vị	Trích ly lentinan sử dụng sóng siêu âm cường độ 58w/cm ² với tần số 20 kHz		Trích ly lentinan không sử dụng sóng siêu âm	
Loại dung môi		NaOH 0,35%		NaOH 0,35%	Nước
Tỉ lệ dung môi/nguyên liệu	lít/kg	6		6	6
Kích thước nguyên liệu	mm	0,8		0,8	30
Nhiệt độ trích ly	°C	65 ± 2		65 ± 2	98 ± 2
Thời gian trích ly	phút	6		6	180
lentinan (% so với)	%	5,391 ± 0,016		0,462 ± 0,021	3,978 ± 0,037

nấm hương nguyên liệu)				
Chất khô hòa tan thu được so với nấm hương nguyên liệu	(%)	16,992±0,042	1,812±0,056	7,937±0,061

Kết quả cho thấy trích ly bằng sóng siêu âm cường độ $58\text{w}/\text{cm}^2$ với tần số 20 kHz ở nhiệt độ $65 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 6 phút cho dịch trích ly thu được hàm lượng lentinan đạt $5,391 \pm 0,016$ % lentinan và lượng chất khô thu được $16,992 \pm 0,042$ %, còn phương pháp trích ly không sử dụng sóng siêu âm, trích ly ở nhiệt độ $65 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 6 phút cho dịch trích ly thu được hàm lượng lentinan đạt $0,462 \pm 0,021$ % lentinan và lượng chất khô thu được $1,812 \pm 0,056$ %, trích ly không sử dụng sóng siêu âm ở nhiệt độ $98 \pm 2^\circ\text{C}$ (theo phương pháp truyền thống) trong 180 phút (3 giờ) cho dịch trích ly thu được hàm lượng lentinan đạt $3,978 \pm 0,037$ % lentinan và lượng chất khô thu được $7,937 \pm 0,061$ %.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình trích ly lentinan theo giải pháp hữu ích cho thấy trích ly bằng sóng siêu âm cường độ $58\text{w}/\text{cm}^2$ với tần số 20 kHz ở nhiệt độ $65 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 6 phút cho dịch trích ly thu được hàm lượng lentinan đạt cao đạt $5,391 \pm 0,016$, lượng chất khô thu được $16,992 \pm 0,042$ % so với nguyên liệu, hàm lượng lentinan tăng trung bình 12 lần so với trích ly không sử dụng sóng siêu âm và hàm lượng chất khô cũng tăng trung bình 9 lần. Theo phương pháp truyền thống ở nhiệt độ $98 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 180 phút (3 giờ) cho dịch trích ly thu được hàm lượng lentinan đạt $3,978 \pm 0,037$ % lentinan và lượng chất khô thu được $7,937 \pm 0,061$ %. Để so sánh được phương pháp trích ly bằng sóng siêu âm cho hàm lượng lentinan cao gấp 1,6 lần và lượng chất khô hòa tan cũng cao gấp 2 lần, thời gian ngắn hơn 30 lần so phương pháp truyền thống

YÊU CẦU BẢO HỘ

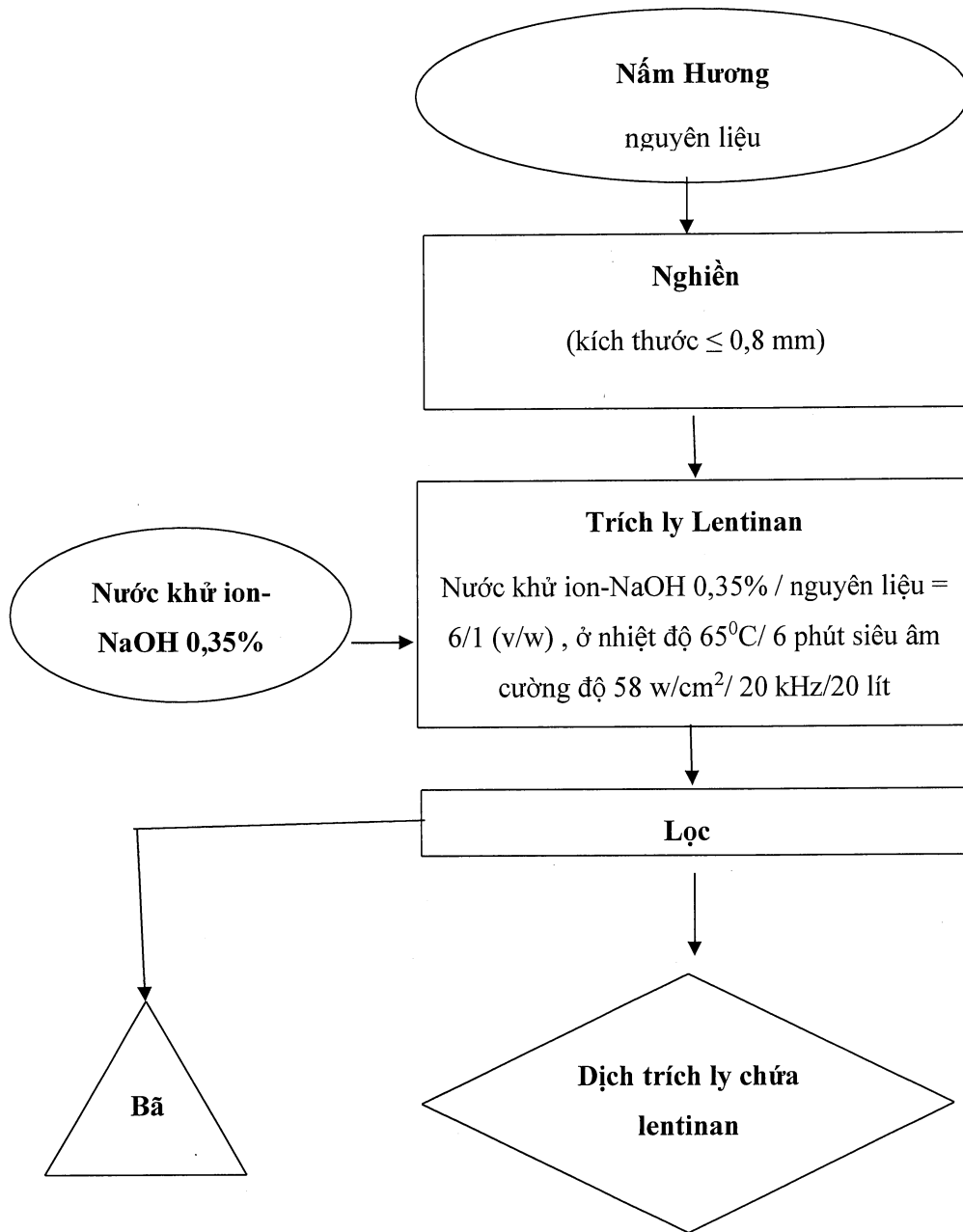
1. Quy trình trích ly lentinan từ nấm hương (*Lentinula edodes*) bằng cách sử dụng sóng siêu âm, bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu: nấm hương (*Lentinula edodes*) nguyên liệu sạch, không bị mốc, đạt chỉ tiêu an toàn thực phẩm về vi sinh vật, kim loại nặng và aflatoxin; bảo quản ở nhiệt độ phòng, sấy khô; giữ độ ẩm cho nguyên liệu nấm hương từ 9-12%;

b) xử lý nấm hương nguyên liệu: nấm hương được nghiền nhỏ về kích thước $\leq 0,8\text{mm}$, bột nguyên liệu sau nghiền được bảo quản ở nhiệt độ phòng;

c) trích ly nguyên liệu: bột nấm hương nguyên liệu kích thước $\leq 0,8\text{ mm}$ được trích ly trên hệ thống trích ly bằng sóng siêu âm (tần số siêu âm 20 KHZ, bể siêu âm 20 lít), trích ly bằng dung môi nước khử ion-NaOH 0,35%, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 6/1 (thể tích/khối lượng), nhiệt độ 65°C, siêu âm 6 phút, cường độ siêu âm 58w/cm²;

d) lọc dịch trích ly thu dịch trích ly lentinan: lọc lần 1 qua vải, lần 2 qua màng lọc 0,1 μm , tách bã để thu dịch chiết chứa lentinan.



Hình 1