

TỐI ƯU HÓA TRÍCH LY THU NHẬN DỊCH SAPONIN THÔ TỪ ĐĂNG SÂM *CODONOPSIS JAVANICA* (BLUME) HOOK. F. BẰNG ENZYME ALPHA – AMYLASE

Tóm tắt: Đăng sâm *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. thuộc họ hoa chuông Campanulaceae, được trồng nhiều ở Lâm Đồng, Việt Nam. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng enzyme alpha-amylase để tiến hành trích ly và xác định hợp chất saponin thô từ đăng sâm. Saponin là một trong những thành phần dược liệu tập trung chủ yếu ở rễ củ. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng khi tiến hành trích ly bằng enzyme alpha-amylase với pH 5,5; ù ở 85°C trong thời gian tối ưu 1,9 giờ; hàm lượng enzyme sử dụng là 0,47% thì hàm lượng saponin tổng thu được 1557,23 mg/100g cao hơn 1,5 lần khi không sử dụng enzyme ở cùng điều kiện.

Từ khóa: Đăng sâm, enzyme alpha-amylase, trích ly, saponin thô

I. PHẦN MỞ ĐẦU

Đăng sâm *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. thuộc dạng cây nhỏ, mọc bò hay leo có rễ hình trụ dài, hơi cong queo, phân nhánh và có rễ con dạng tua nhỏ, dài 10 - 20 cm, đường kính của rễ đối với cây trồng được liệu từ 0,5 đến 1,5 cm^[1]. Trong rễ Đăng sâm sống và chế biến có đường, saponin, acid amin và chất béo, băng sắc ký lớp mỏng, bước đầu đã xác định được 5 vết trong saponin của Đăng sâm sống và chưng cất 2 giờ, hàm lượng saponin trong mẫu chế (1,47%) thấp hơn mẫu sống (2,17%)^[2].

Saponin hay saponosid là một nhóm các glycoside có phần genin có cấu trúc triterpen hay steroid 27 carbon gặp rộng rãi trong thực vật, cũng được tìm thấy rộng rãi trong động vật thân mềm như hải sâm *Strichobus japonicus Selenka*, sao biển *Astropecten polyacanthus*. Tiền tố latin sapo có nghĩa là xà phòng vì khả năng tạo bọt như xà phòng. Tùy theo tính chất hóa

học của aglycone (được gọi là sapogenin), các saponin được chia thành saponin steroid và triterpenoid^[4]. Triterpenoid saponin chủ yếu chứa aglycones với 30 nguyên tử carbon hoặc dẫn xuất của chúng. Các cấu trúc cốt lõi thường xảy ra nhất là oleanans pentacyclic (saponin triterpenoid 5 vòng) và dammarans tetracyclic (saponin triterpenoid 4 vòng)^[3].

Công dụng của saponin có khả năng chống viêm, kháng khuẩn, kháng nấm, ức chế virus. Một số có tác dụng trong điều trị viêm loét dạ dày và viêm da^[5].

Hoon H. Sunwoo (2013) đã tiến hành kết hợp các enzyme cellulase, anpha amylase, viscozyme để thủy phân nhân sâm thu nhận saponin và kết quả cho thấy khi sử dụng enzyme anpha amylase thu hàm lượng saponin không có sự khác biệt nhiều với việc sử dụng enzyme cellulase^[6]. Như vậy việc sử dụng enzyme anpha amylase vào việc tách chiết cho đối tượng Đăng sâm

|| Th.S Trương Hoàng Duy¹

|| Th.S Lê Phạm Tấn Quốc¹

|| Th.S Trần Thị Hồng Cẩm²

|| Th.S Phạm Thị Kim Ngọc³

|| GS.TS Đống Thị Anh Đào⁴

⁽¹⁾ Viện CN Sinh học & Thực phẩm, Trường ĐH Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh

⁽²⁾ Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường ĐH Công nghiệp Thực phẩm Tp. Hồ Chí Minh

⁽³⁾ Khoa hóa học và CNTP, trường ĐH Bà Rịa - Vũng Tàu

⁽⁴⁾ Trường ĐH Bách Khoa Tp. Hồ Chí Minh

là hướng khả thi.

Trong nghiên cứu này, tác giả sử dụng enzyme α -amylase để tiến hành trích ly hợp chất saponin thô từ Đăng sâm.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đăng sâm: 3 năm tuổi được lấy từ Công ty Sâm Cao Lâm, thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng. Mẫu thượng đẳng nhân sâm sau khi lấy về được xay nghiền nhỏ, đóng gói chân không và bảo quản ở 4°C và mẫu này sẽ được sử dụng trong các nghiên cứu.

Enzyme α -amylase sử dụng là enzyme thương mại có tên là Termamyl 120L được cung cấp bởi Công ty Novozymes.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát nguyên liệu Đàng sâm

Độ ẩm nguyên liệu được đo bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi.

Định danh saponin dựa vào phương pháp quang phổ: vanilin và acid vô cơ mạnh (acid sunfuric, acid photphoric, acid perchloric) kết hợp với genin cho sản phẩm màu hấp thụ cực đại ở bước sóng ánh sáng trong khoảng 510 - 620 nm. Một phản ứng tách nước có thể xảy ra tạo thành nhóm methylene chưa no gây nên màu tím hoa cà cho sản phẩm với aldehyde^[3].

2.2.2. Xác định hàm lượng saponin

- Dùng đường chuẩn bằng acid oleanolic

Dung dịch acid oleanolic được pha với nồng độ 2000ppm, sau đó được cho vào các ống nghiệm với các thể tích khác nhau, sau đó bổ sung vào các chất vanillin - acetic acid (8%), acid pechoric (đậm đặc), ethyl - acetat, đun ở nhiệt độ 60°C trong thời gian là 45 phút cho đến khi dung dịch chuyển sang màu tím hoa cà, đo độ hấp thụ ở bước sóng 550 nm^[7].

- Xác định saponin trong mẫu

Mẫu sau khi trích ly được lọc và định mức lên 100 ml. Hút 0,2 ml mẫu từ bình định mức cho vào ống nghiệm, bổ sung 0,2 ml vanillin-acid acetic (8%), 1,2ml acid perchloric, đun cách thủy (nhiệt độ khoảng 60°C), thời gian đun là 45 phút. Khi mẫu sẽ chuyển sang màu tím hoa cà, đo độ hấp thụ ở bước sóng 550 nm.

2.2.3. Thiết kế Plackett-Burman sàng lọc thí nghiệm và tối ưu hóa theo phương pháp bề mặt RSM

Để xác định các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly thu nhận saponin từ Đàng sâm bằng enzyme α -amylase, 5 yếu tố được chọn từ khảo sát trên bao gồm: tỉ lệ nguyên liệu: nước (w/v), pH, nhiệt độ $^{\circ}$ u, thời gian $^{\circ}$ u, hàm lượng enzyme. Thí

nhệm được thiết kế theo ma trận Plackett-Burman với 5 yếu tố và 12 thí nghiệm để sàng lọc các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình trích ly TS từ thượng đẳng nhân sâm (Bảng 2).

Các yếu tố được sàng lọc có ảnh hưởng đến quá trình trích ly sẽ được đưa vào tối ưu hóa theo phương pháp bề mặt RSM dạng ngoại tiếp đường tròn toàn phương, ngẫu nhiên. Hàm đáp ứng được chọn là hàm lượng saponin. Mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc 2.

2.2.4. Xử lý số liệu

Số liệu thực nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình sau đó dùng phần mềm JMP 9.0 và Modde 5.0 để phân tích số liệu.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thiết kế Plackett-Burman sàng lọc thí nghiệm

Giá trị ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu: nước (w/v), pH, nhiệt độ $^{\circ}$ u, thời gian $^{\circ}$ u, hàm lượng enzyme được tính toán bằng phần mềm JMP (Bảng 1). Giá trị nào có ảnh hưởng dương và lớn sẽ ảnh hưởng đến hàm lượng saponin thu nhận được khi dùng enzyme α -amylase để trích ly. Hàm lượng enzyme sử dụng (%) và thời gian $^{\circ}$ u (giờ) có ảnh hưởng mạnh nhất đến quá trình trích ly thu nhận saponin từ Đàng sâm với mức ý nghĩa 5%. Vì vậy hàm lượng enzyme sử dụng (%) và thời gian $^{\circ}$ u (giờ) sẽ là 2 yếu tố được chọn để tiến hành tối ưu hóa.

3.2. Tối ưu hóa theo phương pháp bề mặt RSM

Sau khi tiến hành sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng, tác giả tiến hành tối ưu hóa các yếu tố được chọn. Yếu tố hàm lượng enzyme (%) chọn trong khoảng 0,4 đến 0,6, giá trị tâm là 0,5 và yếu tố thời gian $^{\circ}$ u (giờ) chọn trong khoảng 1 giờ đến 3 giờ, giá trị tâm là 2 giờ. Các thông số còn lại như tỉ lệ nguyên liệu: nước (w/v) 1:8, pH 5,5, nhiệt độ $^{\circ}$ u 85°C được

cố định (căn cứ vào thí nghiệm sơ bộ). Sử dụng phần mềm Modde 5 để phân tích kế hoạch thực nghiệm và dữ kiện quá trình.

Mô hình toàn phương bậc 2 được xác định bằng phương pháp hồi quy đa biến, sau khi phân tích dữ liệu, phương trình hồi quy bậc 2 có dạng:

$$Y = 15,35 + 263,5X_1 - 82,48X_2 - 300,03X_1^2 - 302,23X_2^2 + 136,38X_1X_2$$

Trong đó giá trị Y, X_1 , X_2 lần lượt là hàm lượng saponin thu nhận được khi xử lý bằng enzyme α -amylase, hàm lượng enzyme (%), thời gian $^{\circ}$ u (giờ).

Dựa vào phương trình hồi quy ta nhận thấy X_1 có ảnh hưởng dương đến hàm lượng saponin thu nhận được, X_2 , X_1^2 , X_2^2 có ảnh hưởng âm và sự tương tác X_1X_2 là có ý nghĩa về mặt thống kê.

Từ Bảng 3, hệ số hồi quy R^2 tính được là 0,979 và hệ số biến thiên ảo Q^2 là 0,851. Giá trị R^2 và Q^2 càng tiến đến 1 thì mức độ tin cậy của mô hình hồi quy càng cao.

Điều kiện tối ưu cho quá trình trích ly thu nhận saponin từ Đàng sâm được xác định bằng phần mềm Modde 5.0: hàm lượng enzyme 0,47%; thời gian $^{\circ}$ u 1,9 giờ. Ở điều kiện tối ưu này, hàm lượng saponin thu nhận được dự đoán theo phương trình hồi quy là 1593,52mg/100g.

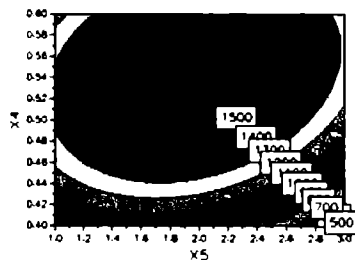
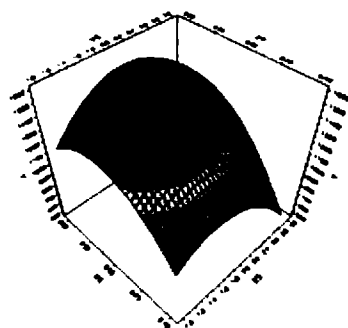
Để kiểm chứng hàm lượng saponin dự đoán theo mô hình, tác giả tiến hành thực hiện thí nghiệm với điều kiện tối ưu hóa (lặp lại 3 lần), đồng thời thực hiện mẫu đối chứng ở cùng điều kiện nhưng không sử dụng enzyme. Hàm lượng saponin thu nhận được khi xử lý bằng enzyme là 1557,23 mg/100g, chênh lệch 2,27% (<5%) so với hàm lượng saponin dự đoán từ mô hình, kết quả này chấp nhận được, trong khi đó mẫu đối chứng có hàm lượng saponin là 1038,15 mg/100g thấp hơn 1,5 lần so với mẫu sử dụng trích ly bằng enzyme. Như vậy ta nhận thấy rằng với việc sử dụng

enzyme α -amylase trong quá trình trích ly thu nhận saponin cho hiệu quả trích ly tốt hơn.

IV. KẾT LUẬN

Phương pháp sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng theo mô hình thí nghiệm Plackett-Burman và phương pháp tối ưu hóa đáp ứng bề mặt RSM đã cho thấy hiệu quả trong nghiên cứu này.

Phương pháp trích ly thu nhận saponin bằng enzyme α -amylase cho kết quả tốt hơn so với việc trích ly bằng nước ở cùng điều kiện. Hàm lượng saponin trích ly cao hơn 1,5 lần so với nước, điều kiện thu nhận saponin tối ưu đã được xác định với hai yếu tố ảnh hưởng mạnh nhất là hàm lượng enzyme sử dụng và thời gian ủ.



Hình 1. Biểu đồ biểu diễn mối liên hệ giữa hàm lượng enzyme và thời gian ủ với hàm lượng saponin thu nhận được

Bảng 1. Các biến trong ma trận Plackett-Burman và ảnh hưởng của chúng

Ký hiệu	Tên yếu tố	Thấp (-)	Cao (+)	Ảnh hưởng	Prob > F
X ₁	Tỉ lệ nguyên liệu: nước	1:7	1:9	-0,58 ^b	0,5824
X ₂	pH	5	6	-1,1 ^b	0,3131
X ₃	Nhiệt độ ủ	80	90	-1,15 ^b	0,2938
X ₄	Hàm lượng enzyme (%)	0,4	0,6	3,31 ^a	0,0161
X ₅	Thời gian ủ (giờ)	1	3	7,3 ^a	0,0003

^a có ý nghĩa ở độ tin cậy 5%; ^b không có ý nghĩa ở độ tin cậy 5%

Bảng 2. Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman

Yếu tố	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Thực nghiệm (mg/100g)
+++++	45	6	90	0,6	3	1456,37
--+++	35	6	80	0,6	3	1440,71
---++	35	5	90	0,4	3	1401,04
+---+	45	5	80	0,6	1	1195,39
-++--	35	6	80	0,4	3	1430,36
---+-	35	5	90	0,4	1	807,54
---+-	35	5	80	0,6	1	1219,22
+----	45	5	80	0,4	3	1466,27
++---	45	6	80	0,4	1	820,51
+++--	45	6	90	0,4	1	851,27
-+++-	35	6	90	0,6	1	1172,16
-+++-	45	5	90	0,6	3	1474,21

Bảng 3. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy

Nguồn biến thiên	Tổng bình phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương	P
Hồi quy	1,48x10 ⁶	5	295084	0
Phân dư	31570,2	5	6314,05	
Tổng	1,51x10 ⁶	10	150699	
R ²			0,979	
Q ²			0,851	

T.H.D, L.P.T.Q, T.T.H.C, P.T.K.N, Đ.T.A.Đ

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam Tập I, NXB khoa học và kỹ thuật, 2004, tr 739-743.
 [2] H. M. Chung, "Nghiên cứu thành phần hóa học của vị thuốc Đảng sâm Việt Nam," *Tạp chí dược liệu*, pp. 3-6, 118-120, 2002.
 [3] K. Hostettmann, Saponins, Cambridge University, 1995, p. 144.
 [4] S. D. Desai, "Saponins and their Biological Activities," *Pharma Time*, vol. 41, no. 3, 2009.
 [5] Sammy Emara, Khaled M. Mohamed, Tsutomu Masujima a, "Separation of naturally occurring triterpenoid saponins by capillary zone electrophoresis," *Biomedical Chromatography*, pp. 252-256, 2001.
 [6] H. H. Sunwoo, "Extraction of ginsenosides from fresh ginseng roots (Panax ginseng C.A. Meyer) using commercial enzymes and high hydrostatic pressure," *Biotechnol Lett*, 2013.
 [7] Xiang, Z. B., Tang, C. H., Chen, G., & Shi, Y. S., "Studies on colorimetric determination of oleanolic acid in Chinese quince," *Natural Product Research and Development*, vol. 13, pp. 23-26, 2001.