

# TỐI ƯU HÓA CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH TRÍCH LY SAPONIN VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA DỊCH TRÍCH RỄ ĐẰNG SÂM BẰNG PHƯƠNG PHÁP TRÍCH LY HỖ TRỢ ENZYME

● HOÀNG THỊ THÙY TRANG - NGUYỄN THỊ THU HUYỀN - HOÀNG THỊ NGỌC NHƠN

## TÓM TẮT:

Nghiên cứu này trình bày kết quả tối ưu 02 yếu tố nhiệt độ và thời gian trích ly ảnh hưởng đến hàm lượng saponin cũng như hoạt tính kháng oxy hóa của dịch trích rễ đấng sâm *Codonopsis javanica* bằng phương pháp trích ly có sự hỗ trợ của enzyme cellulase. Bằng việc áp dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology) và bố trí 12 thí nghiệm kiểu trực tâm quay (Rotatable Central Composite Design), đã đưa ra mô hình mô tả ảnh hưởng của thời gian trích ly ( $X_1$ ) và nhiệt độ trích ly ( $X_2$ ) đến hàm lượng saponin ( $Y_1$ ) và khả năng kháng oxy hóa ( $Y_2$ ) của dịch chiết rễ đấng sâm:  $Y_1 = 2.880 + 0.203X_2 - 0.103X_1^2 - 0.112X_2^2$  và  $Y_2 = 71.4275 + 2.49X_2 - 3.18X_1^2 - 1.84X_2^2$ . Theo mô hình, hàm lượng saponin đạt giá trị cực đại là 2.98 mg/g khi trích ly với thời gian 88.60 phút và nhiệt độ 51.63°C. Bên cạnh đó, với điều kiện tách chiết ở nhiệt độ 50.77°C trong thời gian 85.20 phút thì khả năng kháng oxy hóa đạt cực đại là 72.346%.

**Từ khóa:** *Codonopsis javanica*, đấng sâm, tối ưu hóa, saponin, kháng oxy hóa.

## 1. Giới thiệu

Đấng sâm (*Codonopsis javanica*) được coi là một vị thuốc quý trong lĩnh vực y dược, với nhiều công dụng như bồi bổ ngũ tạng, nâng cao thể lực, chữa ho, tiêu đờm, tăng cường khả năng miễn dịch cho cơ thể [1]. Các nghiên cứu hóa sinh thực vật cho thấy trong các loài *Codonopsis* có chứa chủ yếu là các polyacetylenes, phenylpropanoids, alkaloids, triterpenoids và polysaccharides [2]. Trong đó, saponin được coi là hoạt chất chính tạo nên công dụng của đấng sâm. Saponin được chia thành hai nhóm chính là triterpenoid và steroid glycoside, đặc tính cấu trúc của chúng quyết định bởi số lượng đơn vị đường gắn ở các vị trí khác nhau và thể hiện nhiều hoạt tính sinh học đáng

chú ý. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, saponin sở hữu các hoạt tính như kháng đông máu, kháng khuẩn, chống kí sinh trùng, chống ung thư và kháng virus [3]. Với nhiều đặc tính dược lý quan trọng, saponin là một tiềm năng lớn trong ngành công nghiệp dược phẩm.

Việc thu nhận và ứng dụng các hợp chất có hoạt tính sinh học quý như saponin đặt ra một vấn đề cho việc thiết lập một quá trình chiết tối ưu. Trong số những phương pháp quy hoạch thực nghiệm hiện đại thì phương pháp bề mặt đáp ứng với sự hỗ trợ của các phần mềm xử lý số liệu đã trở thành một công cụ hữu ích giúp các nhà nghiên cứu thực hiện các quá trình tối ưu hóa đa nhân tố, nhằm tiết kiệm thời gian và chi phí [4]. Nghiên cứu này thực

hiện tối ưu hóa ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian trích ly saponin từ rễ đẳng sâm, đồng thời đánh giá khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết thu được.

**2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu**

**2.1. Vật liệu nghiên cứu**

Rễ đẳng sâm 2 năm tuổi được thu hoạch ở xã Măng Ri, huyện Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum. Nguyên liệu sau khi lấy về rửa sạch, cắt lát, sấy khô và xay nghiền nhỏ, sau đó sàng qua rây 0.3mm. Bảo quản bột nguyên liệu trong túi hút chân không ở nhiệt độ thường với độ ẩm nguyên liệu luôn <10%.

Enzyme cellulase (Viscozyme Cassava C.), được cung cấp bởi Công ty TNHH Brentag Việt Nam, điều kiện hoạt động tối ưu ở nhiệt độ 50 - 60°C, pH 4.5 - 5.5.

**2.2. Hóa chất**

Nước cất, chuẩn acid oleanolic, Acid perchloric, Vanillin, Acid acetic, 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), etyl acetate, K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.

**2.3. Phương pháp nghiên cứu**

**2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm**

*Thiết kế thí nghiệm tối ưu*

Phương pháp bề mặt đáp ứng RSM (Response Surface Methodology) được sử dụng để tối ưu điều kiện trích ly saponin bằng enzyme. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu trực tâm quay (Rotatable Central Composite Design, ma trận được thiết kế 12 thí nghiệm với các phương pháp thống kê toán học. Hàm mục tiêu lựa chọn là hàm lượng saponin thu được sau quá trình trích ly và phân trăm bất gốc tự do ABTS<sup>+</sup> của dịch chiết.

**2.3.2. Xác định hàm lượng saponin tổng**

Hút chính xác 0.2ml dịch trích sau khi đã định mức vào ống nghiệm, sau đó thêm 0.2ml dung dịch vanillin- acid acetic (5%), 1.2ml acid pechloric, đun cách thủy và ủ ở 70°C, 15 phút. Hỗn hợp sau khi ủ được làm mát bằng nước lạnh trong 2 phút, sau đó thêm etyl acetate sao cho tổng thể tích là 5ml. Hàm lượng saponin được xác định bằng phương pháp quang phổ so màu ở bước sóng 550nm [5]. Acid oleanolic được sử dụng làm chất chuẩn. Kết quả tính được tính theo đơn vị mg/g chất khô.

**2.3.3. Phương pháp xác định khả năng kháng oxy hóa**

Thử nghiệm kháng oxy hóa ABTS<sup>+</sup> được tiến hành theo phương pháp của Roberta Re và cộng

sự (1998) [6] với một số hiệu chỉnh. Dung dịch gốc tự do ABTS<sup>+</sup> được chuẩn bị bằng cách cho dung dịch ABTS nồng độ 7mM vào dung dịch K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> nồng độ 2.45mM với thể tích bằng nhau rồi ủ dung dịch trong bóng tối từ 12 - 16 giờ. Sau đó, dung dịch được pha loãng bằng nước cất rồi hiệu chỉnh đến độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 734nm, dung dịch này được dùng cho các thí nghiệm tiếp theo. Thử nghiệm được tiến hành bằng cách thêm 10μl mẫu dịch trích vào 990μl dung dịch gốc tự do ABTS<sup>+</sup> và ủ ở nhiệt độ phòng trong 6 phút. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 734nm. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập. Khả năng ức chế gốc tự do ABTS<sup>+</sup> được tính dựa theo công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế ABTS}^+ = \frac{\text{Abs(đc)} - \text{ABS(m)}}{\text{Abs(đc)}} \times 100$$

Trong đó, Abs(đc) là độ hấp thụ của mẫu không có dịch chiết, Abs(m) là độ hấp thụ của mẫu có dịch chiết.

**2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu**

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý số liệu thô trên phần mềm Microsoft Excel 2010, đánh giá sự khác biệt và chọn các thông số phù hợp dựa trên phân tích của phần mềm JMP 10.0, Modde 5.

**3. Kết quả và bàn luận**

**3.1. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng saponin và khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết rễ đẳng sâm**

Các yếu tố được lựa chọn khảo sát là thời gian (X<sub>1</sub>) và nhiệt độ (X<sub>2</sub>), hàm mục tiêu là Y<sub>1</sub> (hàm lượng saponin) và Y<sub>2</sub> (khả năng bất gốc tự do ABTS<sup>+</sup>). Giá trị tại tâm và các mức trên dưới được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1. Các mức thí nghiệm sử dụng trong mô hình**

Thông số	Mức thấp	Mức tâm	Mức cao
Thời gian (X <sub>1</sub> )	60	75	90
Nhiệt độ (X <sub>2</sub> )	45	50	55

Với các mức thí nghiệm như trên, tiến hành thí nghiệm theo bảng ma trận thực nghiệm để xác định hàm lượng saponin và khả năng kháng oxy hóa ở các điều kiện khác nhau, thu được kết quả ở Bảng 2.

**Bảng 2. Ma trận thực nghiệm và kết quả hàm lượng saponin và khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết**

Số TN	Biến mã hóa		Biến thực		Hàm mục tiêu	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Thời gian (phút)	Nhiệt độ (°C)	Hàm lượng (mg/g)	% bắt gốc tự do ABTS <sup>+</sup> (%)
1	-1	-1	60	45	2.446	63.10
2	-1	1	60	55	2.804	67.86
3	1	-1	90	45	2.589	64.58
4	1	1	90	55	2.946	69.64
5	-√2	0	53.79	50	2.554	63.69
6	√2	0	96.21	50	2.732	66.67
7	0	-√2	75	42.93	2.304	64.29
8	0	√2	75	57.07	2.946	71.43
9	0	0	75	50	2.804	74.40
10	0	0	75	50	2.875	69.64
11	0	0	75	50	3.054	72.62
12	0	0	75	50	2.786	69.05

Phân tích phương sai ANOVA được dùng để đánh giá mức độ phù hợp của mô hình. Kết quả phân tích ANOVA bằng phần mềm JMP cho thấy

sự ảnh hưởng tuyến tính, bình phương của các biến độc lập, sự tương tác của các biến và các hệ số hồi quy đã được xác định (Bảng 3)

**Bảng 3. Phân tích thống kê ANOVA**

Nguồn	Bậc tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
<b>Hàm lượng saponin</b>					
Mô hình (Model)	5	0.48840692	0.097681	10.2010	0.0068*
Sai số (Error)	6	0.05745375	0.009576		
Tổng (C. Total)	11	0.54586067			
Sự không phù hợp (Lack of fit)	3	0.01254100	0.004180	0.2792	0.8387
Sai số thuần (Pure error)	3	0.04491275	0.014971		
Sai số tổng (Total error)	6	0.05745375			
Coefficient of determination, R <sup>2</sup> = 0.8947, Adjusted R <sup>2</sup> = 0.8070, *. Mức ý nghĩa ở p<0.01					
<b>Khả năng kháng oxy hóa</b>					
Mô hình (Model)	5	130.97749	26.1955	8.1310	0.0120*
Sai số (Error)	6	19.33020	3.2217		
Tổng (C.Total)	11	150.30769			
Sự không phù hợp (Lack of fit)	3	0.224724	0.07491	0.0118	0.9979
Sai số thuần (Pure error)	3	19.105475	6.36849		
Sai số tổng (Total error)	6	19.330199			
Coefficient of determination, R <sup>2</sup> = 0.8714, Adjusted R <sup>2</sup> = 0.7642, *. Mức ý nghĩa ở p<0.01					

Theo Joglekal và May,  $R^2$  là thước đo cho mức độ phù hợp của mô hình và ít nhất phải bằng 0.8 [7]. Hệ số tương quan  $R^2$  của 2 mô hình là 0.8947 và 0.8714 cho thấy rằng có 89.47% sự biến thiên dữ liệu được giải thích bởi mô hình 1 và 87.14% sự biến thiên dữ liệu được giải thích bởi mô hình 2. Hơn nữa, mức độ phù hợp của mô hình cũng được đánh giá thông qua giá trị F của Lack of fit (sự không phù hợp). Mô hình tương quan tốt cần có sự phù hợp giữa thực tế là lý thuyết. Vì vậy 2 mô hình thu được với giá trị Lack of fit không có ý nghĩa thống kê cho thấy sự phù hợp của mô hình với thực nghiệm. Bên cạnh đó, giá trị P được sử dụng như là một công cụ để kiểm tra mức ý nghĩa của từng hệ số hồi quy. Cụ thể, các yếu tố có giá trị  $P < 0.05$  được xem là có ảnh hưởng đến hàm mục tiêu. Từ các hệ số mô hình (Bảng 4), mô hình phản ánh thực tế ảnh hưởng của 2 yếu tố nhiệt độ và thời gian trích ly đến hàm lượng saponin và khả năng kháng oxy hóa của dịch trích từ rễ đẳng sâm như sau:

$$Y_1 = 2.880 + 0.203X_2 - 0.103X_1^2 - 0.112X_2^2$$

$$Y_2 = 71.4275 + 2.49X_2 - 3.18X_1^2 - 1.84X_2^2$$

Với  $Y_1$  là hàm lượng saponin (mg/g),  $Y_2$  là % bất gốc tự do ABTS<sup>+</sup>(%),  $X_1$  là thời gian trích ly (phút),  $X_2$  là nhiệt độ trích ly (°C).

Mô hình đáp ứng bề mặt thể hiện sự tương tác của từng cặp yếu tố và dựa vào mô hình này có thể xác định được giá trị tối ưu của từng yếu tố ảnh hưởng làm cho hàm đáp ứng đạt giá trị cực đại. Hàm lượng saponin đạt giá trị cực đại là 2.98mg/g khi trích ly với thời gian 88.60 phút và nhiệt độ 51.63°C (Hình 1). Bên cạnh đó, với điều kiện tách chiết ở nhiệt độ 50.77°C trong thời gian 85.20 phút thì khả năng chống oxy hóa đạt cực đại là 72.346% (Hình 2). Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng saponin trong rễ đẳng sâm khi trích ly bằng phương pháp hỗ trợ enzyme cao hơn một số loài thực vật khác. Trong nghiên cứu của Hà Thị Thanh Nga và cộng sự [8], hàm lượng saponin thu được trong định lượng sau quá trình tối ưu là 1.73mg/g. Trong nghiên cứu của Trần Bảo Huy và cộng sự [9]

Bảng 4. Hệ số hồi quy của mô hình

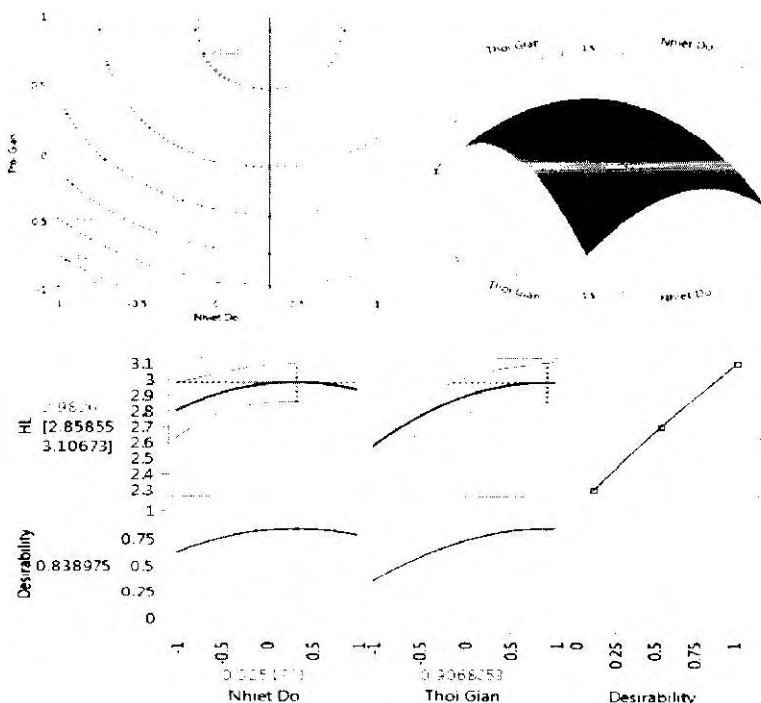
Thông số mô hình	Hệ số hồi quy mô hình 1	Hệ số hồi quy mô hình 2
$X_0$	2.880*	71.427*
$X_1$	0.067	0.934
$X_2$	0.203*	2.489*
$X_1^2$	-0.103*	-3.18*
$X_2^2$	-0.112*	-1.84*
$X_1X_2$	-0.00025	0.075
$R^2$	0.8947	0.8714
$R^2$ hiệu chỉnh	0.8070	0.7642

\*. Mức ý nghĩa ở 0.05

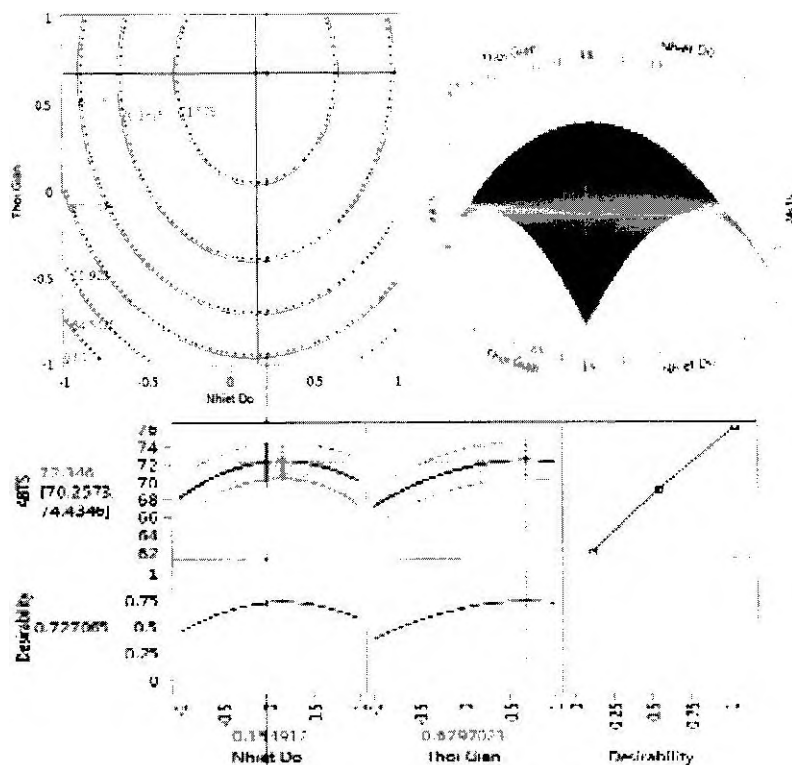
hàm lượng saponin thu được từ *Pseuderanthemum palatiferrum* (Nees) Radlk bằng phương pháp hỗ trợ enzyme sau quá trình tối ưu đạt 2.225mg/g.

Ngoài ra, phương pháp trích ly bằng enzyme ở khoảng nhiệt độ 40 - 50°C bảo toàn được các hợp chất có hoạt tính sinh học ở trong nguyên liệu.

Hình 1. Mô hình đáp ứng bề mặt sự ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ đến hàm lượng saponin thu được và giá trị hàm lượng saponin tại thời điểm tối ưu.



Hình 2: Mô hình đáp ứng bề mặt sự ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ đến khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết và giá trị % bất gốc tự do ABTS+ tại điểm tối ưu



Sau khi xác định được điều kiện trích ly tối ưu như trên, chúng tôi tiến hành thực nghiệm kiểm chứng kết quả bằng việc lặp lại thí nghiệm 3 lần tại điều kiện tối ưu, kết quả hàm lượng saponin thu được và khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết không có sự khác biệt so với kết quả tính toán từ mô hình.

#### 4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được mô hình mô tả ảnh hưởng của 2 yếu tố thời gian trích ly ( $X_1$ ) và nhiệt độ trích ly ( $X_2$ ) đến hàm lượng saponin ( $Y_1$ ) và khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết ( $Y_2$ ). Hàm lượng saponin đạt giá trị cực đại là 2.98mg/g khi trích ly với thời gian 88.60 phút và nhiệt độ 51.63°C. Bên cạnh đó, với điều kiện tách chiết ở nhiệt độ 50.77°C trong thời gian 85.20 phút thì khả năng chống oxy hóa đạt cực đại là 72.346% ■

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Y học, Nxb Thời đại.
2. J.-Y. He, N. Ma, S. Zhu, K. Komatsu, Z.-Y. Li, and W.-M. Fu. (2015). The genus *Codonopsis* (Campanulaceae): A review of phytochemistry, bioactivity and quality control. *Journal of natural medicines*, 69, 1-21.
3. C. Y. Cheok, H. A. K. Salman, and R. Sulaiman (2014), Extraction and quantification of saponins: A review, *Food Research International*, 59, 16-40.
4. Y. Chen, M.-Y. Xie, and X.-F. Gong. (2007). Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *Journal of Food Engineering*, 81, 162-170.
5. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
6. Joglekar, A.M. and May, A.T. (1987). Product Excellence through Design of Experiments. *Cereal Foods World*, 32, 857-868.
7. Hà Thị Thanh Nga, Trương Bảo Nghi, Đỗ Hồng Phương Thảo, Trần Chí Hải (2019), Nghiên cứu quá trình trích ly saponin triterpenoid tổng từ lá đinh lăng với sự hỗ trợ của kỹ thuật siêu âm", *Tạp chí Công Thương*, Số 22 tháng 12/2019, 341-347.
8. T. B. Huy, N. T. Lien Phuong, B. K. Nga, H. N. Oanh, and N. H. Hieu. (2019). Enzyme-Assisted Extraction of Triterpenoid Saponins from *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. Dry Leaf Powder and Bioactivities Examination of Extract. *ChemistrySelect*, 4, 8129-8134.

Ngày nhận bài: 7/6/2020

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 17/6/2020

Ngày chấp nhận đăng bài: 27/6/2020

Thông tin tác giả:

1. HOÀNG THỊ THÙY TRANG

2. ThS. NGUYỄN THỊ THU HUYỀN

3. ThS. HOÀNG THỊ NGỌC NHƠN

Khoa Công nghệ Thực phẩm

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

## **MAXIMIZING SAPONIN EXTRACTION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM THE EXTRACT OF CODONOPSIS JAVANICA FRUITS BY USING THE ENZYME-ASSISTED METHOD**

● **HOANG THI THUY TRANG**

Faculty of Food Technology,

Ho Chi Minh City University of Food Industry

● Master. **NGUYEN THI THU HUYEN**

Faculty of Food Technology,

Ho Chi Minh City University of Food Industry

● Master. **HOANG THI NGOC NHON**

Faculty of Food Technology,

Ho Chi Minh City University of Food Industry

### **ABSTRACT:**

This study presents the optimal extraction temperature and extraction time affecting the total saponin content and the antioxidant activity of the extract of *Codonopsis javanica* which is extracted by using the cellulase-assisted extraction method. By using the Response Surface Methodology method and conducting 12 experiments based on the Rotatable Central Composite Design, this study describes the effects of the extraction time ( $X_1$ ) and the extraction temperature ( $X_2$ ) to the total saponin content ( $Y_1$ ) and the antioxidant ability ( $Y_2$ ) of extract:  $Y_1 = 2.880 + 0.203X_2 - 0.103X_1^2 - 0.112X_2^2$  và  $Y_2 = 71.4275 + 2.49X_2 - 3.18X_1^2 - 1.84X_2^2$ . This study's research model indicates that the maximum total saponin content could reach 2.98 mg/g at 51.63°C in 88.6 mins while the maximum antioxidant ability could reach 72.346% at 50.77°C, in 85.2 min.

**Keywords:** *Codonopsis javanica*, optimization, saponin, antioxidant.