

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN TRÍCH LY THU NHẬN TRITERPENSAPONIN TỪ RAU ĐẮNG BIỂN (*Bacopa Monnieri* (L.) WETTST) BẰNG ENZYME CELLULASE

Nguyễn Thị Hương Lan¹, Phùng Thị Ngọc Huyền², Nguyễn Thị Thu Thảo³, Trương Trọng Nguyên⁴, Hoàng Thị Trúc Quỳnh⁵

^{1, 2, 3, 4, 5}Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

⁵quynhhtt@cntp.edu.vn

Ngày nhận bài: 7/11/2018; Ngày duyệt đăng: 17/12/2019

Tóm tắt

Rau đắng biển (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst) còn gọi là rau sam đắng, phân bố rộng ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Trong nghiên cứu này nhóm nghiên cứu sử dụng enzyme cellulase để hỗ trợ trích ly, khai thác hợp chất triterpensaponin từ rau đắng biển. Các yếu tố nghiên cứu sàng lọc bao gồm tỷ lệ nguyên liệu: dung môi; pH; nhiệt độ; thời gian trích ly và nồng độ enzyme sử dụng. Kết quả tối ưu hóa các điều kiện trích ly triterpensaponin từ rau đắng biển bằng enzyme cellulase theo mô hình Plackett – Burman cho thấy nhiệt độ xử lý 50 °C, tỷ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:21 (w/v), nồng độ enzyme 0,81%(v/w), pH 5,3 và thời gian trích ly 37 phút thu được lượng triterpensaponin cao nhất đạt 2,63 (%g/g CK) (cao gấp 1,3 lần so với mẫu đối chứng không có enzyme hỗ trợ). Phương pháp trích ly có sự hỗ trợ của enzyme là một phương pháp có hiệu quả, giúp nâng cao hiệu suất trích ly triterpensaponin từ rau đắng biển.

Từ khóa: *Bacopa monnieri* (L.) Wettst, enzyme cellulase, hàm lượng triterpensaponin, mô hình bề mặt đáp ứng, trích ly.

Optimization of triterpensaponin extraction from *Bacopa monnieri* (L.) Wettst by cellulase enzyme

Abstract

Bacopa monnieri (L.) Wettst is widely distributed in tropical and subtropical areas. In this study, the enzyme assisted extraction, was extracted of triterpensaponin from *Bacopa monnieri*. Screening factors include the ratio of raw materials: solvent; pH; temperature, extracting time and enzyme concentration. The optimum conditions for extracting triterpensaponin from *Bacopa monnieri* with a cellulase enzyme modeled as Plackett-Burman model showed a treatment temperature of 50 °C, a ratio of 1: 21 (w/v), enzyme concentration 0.81% (v/w), pH 5.3 and 37 minutes extraction time achieved the highest triterpensaponin content of 2.63 (% g/g CK). (1.3 times higher than that of control no enzyme). Thus, the enzyme-assisted extraction method is an effective method, which improves the extraction efficiency of triterpensaponins from *Bacopa monnieri*.

Keywords: *Bacopa monnieri* (L.) Wettst, cellulase enzyme, content of triterpensaponin, response surface model, extraction.

1. Mở đầu

Rau đắng biển (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst) là loài cây thân thảo, mọc bò quanh năm, cao 10-20 cm, có lá nhỏ, mỏng nước, hình bầu dục thuôn dài (dài 2-3 cm; rộng 0,5-0,7 cm). Cây có

hoa nhỏ, hình ống cánh mỏng màu tím nhạt hay xanh hoặc trắng, nở từ tháng 5 đến tháng 10. Theo Phạm Hoàng Hộ (2000), lá rau đắng biển khi nghiền nát có mùi hương và vị đắng đặc biệt. Trong y học, rau đắng biển thường được sử dụng

để tăng cường trí nhớ và cải thiện chức năng của não trong các loại thuốc Ayurvedic (Sivarajan, 1994). Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cho thấy rau đắng biển cũng có vai trò được lý như là chất tăng cường nhận thức (Das, 2002; Singh, 1997; Stough, 2001 và Sumathi, 2002), thuốc chống trầm cảm (Pawar và cộng sự, 2001), chất chống oxy hóa (Pawar và cộng sự, 2001; Russo, 2003)... Các nghiên cứu trên cũng chứng minh rằng các tác dụng sinh học trên của rau đắng biển có được chủ yếu do các hợp chất triterpensaponin thuộc nhóm dammaran quyết định. Theo Ngô Văn Thu (1990), triterpensaponin là một nhóm các saponin có phần aglycol là các triterpenoid. Các triterpensaponin có đầy đủ tính chất đặc trưng của saponin như khả năng tạo bọt, khả năng tan trong nước, methanol, ethanol loãng. Đặc biệt, khi chúng tác dụng với acid vô cơ mạnh (acid perchloric, acid sulfuric,...) và thuốc thử vanillin, hơi nóng sẽ cho màu tím hoa cà. Từ đó, nếu kết hợp phản ứng này với phân tích quang phổ UV-VIS thì hàm lượng triterpensaponin trong dịch trích của rau đắng biển hoàn toàn có thể xác định được.

Trong những năm gần đây, kỹ thuật enzyme ngày càng được quan tâm trong các nghiên cứu trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học từ các nguyên liệu thực vật. Kết quả nghiên cứu của Trương Hoàng Duy và cộng sự (2015) cho thấy sử dụng enzyme để hỗ trợ trích ly saponin từ cây đắng sâm cho hiệu quả cao gấp 1,5 lần so với mẫu đối chứng không xử lý enzyme. Khi nghiên cứu sử dụng các loại enzyme hỗ trợ trích ly để khai thác ginsenosides thô từ củ nhân sâm, Shin, và cộng sự (2010) nhận thấy enzyme cellulase cho hiệu quả trích ly cao gấp 5 lần. Tương tự với kết quả trên, nghiên cứu của Sunwoo (2013) cũng xác nhận hàm lượng ginsenosides tổng tăng 184% so với mẫu đối chứng khi sử dụng hỗn hợp gồm 3 enzyme Cellulase, Termamyl, Viscozyme để trích ly từ củ nhân sâm ở điều kiện nhiệt độ 50 °C. Ưu điểm của kỹ thuật xử lý bằng enzyme là ít làm biến đổi các chất có trong tế bào, thực hiện dễ dàng trong mọi điều kiện tại phòng thí nghiệm, sản xuất thử nghiệm và sản xuất công nghiệp, có tính đặc hiệu cao, an toàn

đối với sức khỏe con người, thích hợp sử dụng trong công nghệ chế biến thực phẩm. Vì vậy, trong bài báo này, các nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng và tối ưu hóa quá trình trích ly với sự hỗ trợ của enzyme cellulase nhằm thu nhận được hàm lượng triterpensaponin cao nhất trong rau đắng biển đã được tiến hành.

2. Vật liệu và phương pháp

Nghiên cứu này được thực hiện tại Trung tâm thí nghiệm thực hành – Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp. Hồ Chí Minh trong thời gian từ tháng 1 đến tháng 7/2018.

2.1. Vật liệu

Rau đắng biển tươi sử dụng trong nghiên cứu là rau đắng VietGAP, bao gói 200g/gói, xuất xứ ở Hợp tác xã Nông nghiệp Thương mại Dịch vụ Phú Lộc. Rau đắng được rửa sạch, để ráo nước, cắt nhỏ đến kích thước <0,5cm. Hỗn hợp gồm 100g rau đắng và 60 mL nước cất được xay nhỏ bằng máy xay Philips (HR2108) với tốc độ 12000 vòng/phút trong 2 phút, hỗn hợp sau xay được lọc qua rây Φ1mm. Phần rây được định lượng 50g, đóng gói chân không trong túi khô, sạch và bảo quản ở ngăn đông của tủ lạnh để làm nguyên liệu trong suốt quá trình nghiên cứu.

Chế phẩm enzyme cellulase được sử dụng là sản phẩm thương mại Celluclast 1,5L (Novozymes, Đan Mạch) được cung cấp bởi công ty TNHH Brenntag Việt Nam số 202B – Hoàng Văn Thụ - quận Phú Nhuận – Tp.HCM.

Chất chuẩn acid oleanolic, thuốc thử vanillin (99,9%-Án Độ), acid perchloric (99,9%-Trung Quốc), ethyl acetate (99,9%-Trung Quốc). Các hóa chất và dung môi khác đạt tiêu chuẩn hóa chất dùng phân tích trong nghiên cứu ($\geq 98\%$).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly có sự hỗ trợ enzyme cellulase

Khi nghiên cứu về quá trình trích ly có bổ sung enzyme, các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly thường được tiến hành khảo sát là loại và nồng độ dung môi; nhiệt độ và thời gian trích ly; điều kiện pH của môi trường, lượng enzyme bổ sung... (Choon và cộng sự, 2014);

(Hai và cộng sự, 2016). Do vậy, trong nghiên cứu này, các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly được tiến hành khảo sát bao gồm: tỷ lệ nguyên liệu:nước (tính theo tỷ lệ khối lượng nguyên liệu so với khối lượng dung môi); pH; thời gian, nhiệt độ trích ly và nồng độ enzyme bổ sung (tính theo tỷ lệ % khối lượng enzyme so với khối lượng dung dịch).

Rau đắng biển tươi nghiền nhỏ được cho vào bình tam giác, tiến hành bổ sung nước và enzyme cellulase để tiến hành trích ly. Các thông số ảnh hưởng đến quá trình được khảo sát được trình bày chi tiết trong Bảng 1. Trong đó, ở thí nghiệm 1, lượng enzyme bổ sung được cố định là 10% so với khối lượng nguyên liệu ban

đầu để tiến hành khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu:nước. Từ thí nghiệm 2,3, lượng enzyme bổ sung là 0,5% so với tổng khối lượng dịch trích ly (với tỷ lệ nguyên liệu:nước là kết quả ở thí nghiệm 1). Thí nghiệm 3 đồng thời tiến hành khảo sát 2 yếu tố nhằm đánh giá được tác động cộng hợp của nhiệt độ và thời gian đến hàm lượng triterpensaponin thu được trong dịch trích ly. Kết thúc quá trình xử lý, hỗn hợp được điều nhiệt về nhiệt độ phòng, rồi ly tâm bằng thiết bị ly tâm Hermle - Đức ở tốc độ 5500 vòng/phút trong thời gian 15 phút để loại bã. Phần dịch trong thu được tiến hành xác định hàm lượng triterpensaponin.

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm – khảo sát ảnh hưởng của các thông số công nghệ của quá trình trích ly có sự hỗ trợ enzyme cellulase

Thí nghiệm	Yếu tố cố định	Yếu tố khảo sát
Thí nghiệm 1. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu:nước	Khối lượng nguyên liệu: 5g pH: 5,5 Nhiệt độ trích ly: 50°C Thời gian trích ly: 30 phút Nồng độ enzyme: 10% khối lượng nguyên liệu Khối lượng nguyên liệu: 5g	Tỷ lệ nguyên liệu:nước lần lượt là 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25,
Thí nghiệm 2. Khảo sát ảnh hưởng của pH	Nhiệt độ trích ly: 50°C Thời gian trích ly: 30 phút Nồng độ enzyme: 0,5% (v/w dịch trích) Tỷ lệ nguyên liệu: nước: kết quả thí nghiệm 1 Khối lượng nguyên liệu: 5g	pH: 5,3; 5,5; 6 và 6,5 Thời gian: 0,5; 1; 1,5 và 2h
Thí nghiệm 3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian, nhiệt độ	Nồng độ enzyme: 0,5% (v/w dịch trích) Tỷ lệ nguyên liệu: nước: kết quả thí nghiệm 1 pH kết quả thí nghiệm 2 Khối lượng nguyên liệu: 5g	Nhiệt độ: 40, 50, 60 và 70°C
Thí nghiệm 4. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme	Tỷ lệ nguyên liệu: nước: kết quả thí nghiệm 1 pH kết quả thí nghiệm 2 Nhiệt độ, thời gian: kết quả thí nghiệm 3	Nồng độ enzyme: 0,4; 0,6; 0,8 và 1%

2.2.2. Tối ưu hóa điều kiện trích ly có hỗ trợ enzyme

Quá trình tối ưu hóa điều kiện trích ly được tiến hành thông qua hai bước. Đầu tiên là sàng lọc nhằm đánh giá mức độ ảnh hưởng của 4 yếu tố (tỷ lệ nguyên liệu:nước (w/v), nhiệt độ trích ly (°C), thời gian trích ly (phút), nồng độ enzyme sử dụng (%v/w) đến hàm lượng triterpensaponin

(%g/g chất khô) bằng mô hình Plackett-Burman với 16 thí nghiệm và 03 thí nghiệm ở tâm (Bảng 3). Sau đó, dựa vào mức độ tác động các yếu tố, quá trình tối ưu hóa điều kiện trích ly bằng phương pháp bề mặt đáp ứng theo mô hình hồi quy bậc 2 thiết kế CCF với 24 thí nghiệm và 03 thí nghiệm ở tâm được tiến hành (Bảng 4). Các yếu tố thí nghiệm được mã hóa theo Bảng 2.

Bảng 2. Mã hóa biến trong thí nghiệm tối ưu hóa

Biến	Ký hiệu	Giá trị		
		Thấp (-1)	Cao (1)	Tâm (0)
Tỉ lệ nguyên liệu:nước (w/v)	X ₁	1:18	1:22	1:20
Nhiệt độ trích ly (°C)	X ₂	45	55	50
Thời gian trích ly (phút)	X ₃	15	45	30
Nồng độ enzyme sử dụng (%v/w)	X ₄	0,7	0,9	0,8

Bảng 3. Bố trí thí nghiệm sàng lọc

TT	Biến				Y TT	Biến				Y
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	
1	1	-1	-1	-1	- 11	-1	-1	1	1	-
2	1	1	-1	-1	- 12	1	-1	-1	1	-
3	1	1	1	-1	- 13	-1	1	-1	-1	-
4	1	1	1	1	- 14	-1	-1	1	-1	-
5	-1	1	1	1	- 15	-1	-1	-1	1	-
6	1	-1	1	1	- 16	-1	-1	-1	-1	-
7	-1	1	-1	1	- 17	0	0	0	0	-
8	1	-1	1	-1	- 18	0	0	0	0	-
9	1	1	-1	1	- 19	0	0	0	0	-
10	-1	1	1	-1	-					-

Bảng 4. Bố trí thí nghiệm tối ưu hóa

STT	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y	STT	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y
1	-1	-1	-1	-1	-	15	-1	1	1	1	-
2	1	-1	-1	-1	-	16	1	1	1	1	-
3	-1	1	-1	-1	-	17	-1	0	0	0	-
4	1	1	-1	-1	-	18	1	0	0	0	-
5	-1	-1	1	-1	-	19	0	-1	0	0	-
6	1	-1	1	-1	-	20	0	1	0	0	-
7	-1	1	1	-1	-	21	0	0	-1	0	-
8	1	1	1	-1	-	22	0	0	1	0	-
9	-1	-1	-1	1	-	23	0	0	0	-1	-
10	1	-1	-1	1	-	24	0	0	0	1	-
11	-1	1	-1	1	-	25	0	0	0	0	-
12	1	1	-1	1	-	26	0	0	0	0	-
13	-1	-1	1	1	-	27	0	0	0	0	-
14	1	-1	1	1	-						

Phương trình hồi quy thực nghiệm mô tả sự phụ thuộc của chỉ tiêu theo dõi vào các yếu tố thí nghiệm là một đa thức bậc hai có dạng: $Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{44}X_4^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{14}X_1X_4 + a_{23}X_2X_3 + a_{24}X_2X_4 + a_{34}X_3X_4$

Trong đó Y: hàm lượng triterpensaponin,

(%/g CK); X₁: tỉ lệ nguyên liệu:nước, (w/v); X₂: Nhiệt độ trích ly, (°C); X₃: Thời gian trích ly, (phút); X₄: Nồng độ enzyme, (%v/w)

2.3. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

2.3.1. Phương pháp phân tích

Xây dựng đường chuẩn của acid oleanolic: Dung dịch acid oleanolic có nồng độ 2,5mg/mL

được cho vào các ống nghiệm với các thể tích khác nhau, sau đó 0,2 mL vanillin-acid acetic (5%), 1,2 mL acid perchloric, đun cách thủy và ủ ở 70 °C trong 15 phút. Sau đó, các hỗn hợp được lấy ra, làm lạnh nhanh dưới vòi nước trong 2 phút, rồi định mức bằng ethyl acetate đến 5 mL và xác định độ hấp thụ trên thiết bị quang phổ so màu UV – VIS

ở bước sóng 550 nm (Choon và cộng sự, 2014).

Hàm lượng triterpensaponin trong mẫu được xác định bằng cách thay dung dịch chuẩn acid oleanolic bằng 0,2 mL dịch trích sau ly tâm và thực hiện các thao tác tương tự như trên. Hàm lượng triterpensaponin % (g/g chất khô) được tính theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng triterpensaponin} = \frac{C_x \times 5 \times V \times 100}{0,2 \times m \times (100 - h) \times 1000} (\%)$$

Trong đó: C_x : nồng độ triterpensaponin (mg/mL); m : khối lượng mẫu (g); h : độ ẩm nguyên liệu (%); V : thể tích dịch sau ly tâm (mL).

Độ ẩm của nguyên liệu được xác định bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi tại nhiệt độ 105°C.

2.3.2. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sử dụng phần mềm Statgraphics Centurion XVII phân tích thống kê số liệu thí nghiệm và phân tích phương sai ANOVA ($p < 0,05$) đánh giá sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Thiết kế thí nghiệm và xử lý kết quả tối ưu hóa bằng phần mềm Modde 5.0.

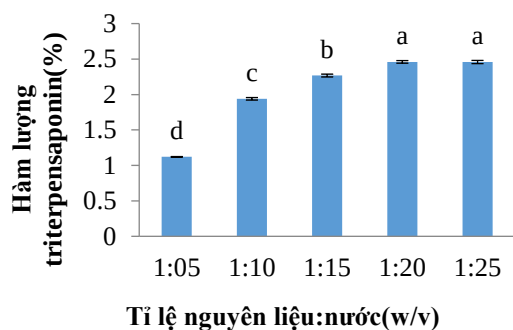
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của các thông số công nghệ trong quá trình trích ly với sự hỗ trợ của enzyme cellulase

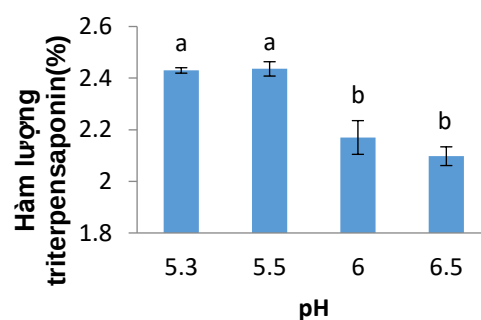
3.1.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu: nước đến khả năng trích ly triterpensaponin

Hàm lượng triterpensaponin có xu thế tăng cùng với sự tăng lên của lượng nước bổ sung. Khi tỷ lệ nguyên liệu: nước tăng từ 1:5 đến 1:25 thì hàm lượng triterpensaponin trong dịch trích tăng 2,192 lần (từ 1,12%/gCK đến 2,46%/gCK) (Hình 1); tuy nhiên, không có sự khác biệt có nghĩa ($p < 0,05$) về hàm lượng triterpensaponin trong dịch trích ly khi tỷ lệ nguyên liệu: dung

môi thay đổi từ 1:20 đến 1:25. Điều này được giải thích là do nước dùng trong quá trình trích ly cần một lượng vừa đủ để ngấm vào nguyên liệu, kéo theo các thành phần hòa tan vào trong dịch trích ly. Khi lượng nước sử dụng ít, hàm lượng triterpensaponin thu được trong dịch trích ly tương ứng sẽ không cao; khi tăng nước vừa đủ, nước sẽ ngấm vào trong thành tế bào thực vật của nguyên liệu, cùng với sự hình thành gradient nồng độ từ trong tế bào ra ngoài môi trường, dung môi kéo theo các thành phần hòa tan của nguyên liệu đi vào dịch trích. Do vậy, tỷ lệ nguyên liệu: nước là 1:20 là thích hợp, vì nếu tiếp tục tăng nước để tăng hiệu quả trích ly là không có ý nghĩa, do hàm lượng các chất tan trong tế bào nguyên liệu có giới hạn. Ngoài ra, việc sử dụng lượng lớn nước mà không đem lại hiệu quả khai thác chất hòa tan sẽ gây nên lãng phí nước, khó khăn cho các bước công nghệ tiếp theo như tiêu tốn năng lượng, hao phí thời gian, công lao động. Kết quả này tương tự kết quả của Trương Hoàng Duy và cộng sự (2015) khi thu nhận dịch saponin thô từ Đẳng sâm *Codonopsis javanica* (Blume) bằng enzyme alpha-amylase.



Hình 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu: nước đến khả năng trích ly triterpensaponin



Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng trích ly triterpensaponin

3.1.2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng trích ly triterpensaponin

Khi pH dịch xử lý thay đổi từ 5,3 đến 6,5 thì hàm lượng triterpensaponin trong dịch trích rau đắng biển có xu thế giảm. Hàm lượng triterpensaponin đạt cao nhất 2,44 %g/gCK tại pH = 5,5 tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa khi pH=5,3 (2,43%g/gCK) (Hình 2). Mỗi loại enzyme có vùng pH hoạt động tối ưu riêng, việc thay đổi giá trị pH khởi điểm pH tối thích đều làm giảm khả năng hoạt động của enzyme, thậm chí là biến tính enzyme. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Yan và cộng sự (2012) khi tìm hiểu tác động của pH đến khả năng hoạt động của enzyme cellulase được sản sinh bởi chủng nấm *Trichoderma reesei*; đối với enzyme này, pH 5,5 là pH tối thích cho hiệu quả thủy phân cellulose tốt nhất. Cũng cần chú ý, trong thí nghiệm này, giá trị pH 5,3 nên được chọn cho quá trình trích ly vì giá trị 5,3 là điểm gần nhất với pH của nguyên liệu trong vùng pH khảo sát.

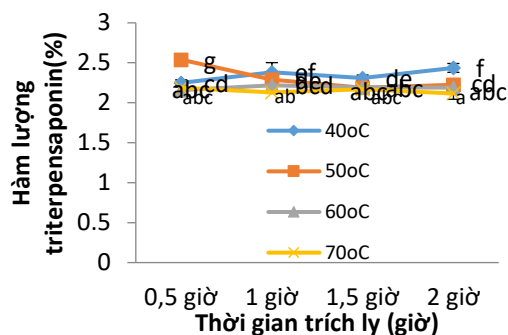
3.1.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian trích ly đến khả năng trích ly triterpensaponin bằng kỹ thuật enzyme

Hình 3 cho thấy hoạt động của enzyme tăng khi nhiệt độ tăng và đạt cực đại trong khoảng 25-30°C và nếu tiếp tục gia tăng nhiệt độ thì hoạt động của enzyme sẽ giảm (Hình 3). Quy luật tác động này tương đồng với kết quả nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến enzyme cellulase từ *Aspergillus terreus* được thực hiện bởi Garg và cộng sự (1981). Đối với quá trình trích ly, nhiệt độ tăng làm các cấu tử chuyển động nhanh hơn,

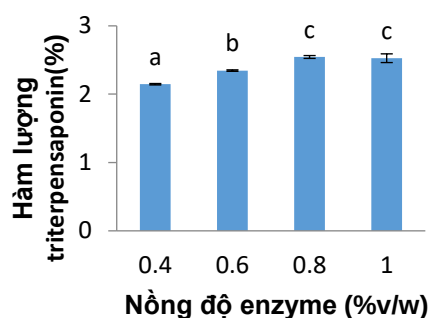
do đó sự hòa tan và khả năng khuếch tán của các cấu tử từ nguyên liệu vào trong dung môi sẽ tăng. Ngoài ra, khi nhiệt độ tăng, độ nhớt của dung môi sẽ giảm, dung môi sẽ dễ dàng xuyên qua lớp nguyên liệu, làm cho diện tích tiếp xúc bề mặt giữa nguyên liệu và dung môi càng lớn và tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình trích ly. Tuy nhiên, trong các phản ứng có sự tham gia của enzyme, việc gia tăng nhiệt độ quá cao trong quá trình trích ly có thể làm biến tính enzyme, biến đổi trung tâm hoạt động của enzyme, khiến phản ứng được xúc tác bởi enzyme không thực hiện được nữa. Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Fleurence (1999), enzyme cellulase hoạt động được trong khoảng nhiệt độ tương đối rộng từ 25°C đến 70°C nhưng chỉ hoạt động tốt nhất trong khoảng nhiệt độ 40-50°C. Còn theo nghiên cứu của Fawzya (2013), enzyme cellulase được sản xuất từ SGC 1609 isolate cho thấy hoạt tính tăng dần khi tăng nhiệt độ từ 30 – 50°C và hoạt tính giảm dần khi tiếp tục tăng nhiệt độ trên 50°C. Khi xét tương quan giữa nhiệt độ và thời gian, ta nhận thấy tại thời gian 30 phút và nhiệt độ 50°C cho hàm lượng triterpensaponin cao nhất là 2,539% g/gCK. Điều này cho thấy hoạt động phân cắt thành tế bào của enzyme cellulase đang diễn ra mạnh mẽ, giúp cho triterpensaponin hoà tan vào dịch trích ly tốt hơn. Song, khi tiếp tục kéo dài thời gian, thì hàm lượng triterpensaponin có xu hướng giảm. Điều này là do sau 30 phút trích ly lượng cơ chất bắt đầu giảm đi, trong khi lượng enzyme vẫn được bảo toàn, dẫn đến sự cạnh tranh cơ chất khiến tốc

độ phân cắt carbohydrate của enzyme cellulase chậm lại, cũng như việc trích ly ở nhiệt độ cao

kéo dài cũng là nguyên nhân khiến enzyme bị biến tính (Hai và cộng sự, 2016).



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian xử lý đến khả năng trích ly triterpensaponin



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến khả năng trích ly triterpensaponin

3.1.4. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến khả năng trích ly triterpensaponin bằng kỹ thuật enzyme

Hàm lượng triterpensaponin trong dịch trích tăng khi tăng nồng độ enzyme. Hàm lượng triterpensaponin ở nồng độ enzyme 0,4%; 0,6%; 0,8% và 1% (v/w) tương ứng lần lượt là 2,15; 2,35; 2,54 và 2,53% g/gCK (Hình 4). Hàm lượng triterpensaponin tăng mạnh từ nồng độ enzyme 0,4% (2,15% g/gCK) đến 0,8% (2,54%g/gCK), tăng 1,19 lần. 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 có sẵn trong mẫu 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 ở nồng độ cao. Xét về mặt động học, vận tốc phản ứng tăng khi nồng độ enzyme tăng nhưng khi nồng độ enzyme bão hòa với nồng độ cơ chất thì tốc độ phản ứng không thay đổi hoặc không tăng thêm khi tăng nồng độ enzyme. Kết quả khảo sát nồng độ enzyme tương tự kết quả của Diệp Ngọc Tú và cộng sự (2002), khi khảo sát về nồng độ enzyme và thời gian xử lý để thu được lượng dịch quả lớn nhất trên thanh long có xuất xứ từ Long An. Tác giả cho rằng: do cơ chất pectin trong thịt quả thanh long lúc này đã liên kết với pectinase nên lượng enzyme dư sẽ không làm gia tăng hiệu quả trích ly. Vì vậy, nồng độ enzyme 0,8% là phù hợp cho thí nghiệm này.

3.2. Tối ưu hóa điều kiện trích ly có hỗ trợ enzyme

3.2.1. Thí nghiệm sàng lọc Plackett Burman

Kết quả thí nghiệm sàng lọc và mức độ ảnh hưởng của các thông số lên hàm mục tiêu được thể hiện qua Bảng 5 và Bảng 6.

Bảng 5: Kết quả thí nghiệm sàng lọc

STT	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y	STT	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y
1	110	45	15	0,7	2,21	11	90	45	45	0,9	2,07
2	110	55	15	0,7	2,31	12	110	45	15	0,9	2,37
3	110	55	45	0,7	2,45	13	90	55	15	0,7	1,91
4	110	55	45	0,9	2,45	14	90	45	45	0,7	1,99

STT	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y	STT	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y
5	90	55	45	0,9	2,30	15	90	45	15	0,9	2,03
6	110	45	45	0,9	2,39	16	90	45	15	0,7	1,90
7	90	55	15	0,9	1,98	17	100	50	30	0,8	2,29
8	110	45	45	0,7	2,36	18	100	50	30	0,8	2,27
9	110	55	15	0,9	2,32	19	100	50	30	0,8	2,27
10	90	55	45	0,7	2,23						

Bảng 6. Kết quả phân tích thống kê (theo mô hình Plackett-Burman) ảnh hưởng của các biến lên hàm mục tiêu là hàm lượng triterpensaponin sau trích ly.

Biến	Hàm lượng triterpensaponin(%g/gCK)	
	Mức độ ảnh hưởng	P value
X ₁	0,30553	3,63718e-020
X ₂	0,0787842	0,000390712
X ₃	0,152062	1,53512e-009
X ₄	0,0679981	0,00189582
Q ² =0,820; R ² =0,850; R ² _{Adj} =0,839		

(*) Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy trên 95% ($P < 0,05$)

Nếu hệ số ảnh hưởng của một biến mang giá trị dương nghĩa là khi giá trị biến đó tăng sẽ làm tăng giá trị hàm mục tiêu; ngược lại, nếu hệ số ảnh hưởng của một biến mang giá trị âm thì khi giá trị biến đó tăng sẽ làm giá trị hàm mục tiêu giảm. Theo kết quả trong Bảng 6, cả bốn yếu tố đều ảnh hưởng dương đến hàm lượng triterpensaponin với độ tin cậy ($P < 0,05$), có ý nghĩa về mặt thống kê. Kết quả này phù hợp với các thí nghiệm đã trình bày bên trên. Trong đó, hàm mục tiêu bị ảnh hưởng lớn nhất bởi thông số tỷ lệ nguyên liệu: nước, kế đến lần lượt là thời gian trích ly, nhiệt độ trích

ly và nồng độ enzyme.

3.2.2. Thí nghiệm tối ưu hóa quá trình trích ly

Kết quả thí nghiệm tối ưu hóa và xử lý số liệu được thể hiện qua Bảng 7 và Bảng 8. Bảng 7 cho thấy các biến vừa tác động độc lập vừa tương quan đến giá trị của Y khi $P < 0,05$. Trong đó, tác động của biến X₁, X₃, X₄, X₁₃, X₂₃, X₂₄ là ảnh hưởng tích cực, còn X₂, X₁₁, X₂₂, X₃₃, X₄₄, X₁₂, X₁₄ và X₃₄ là ảnh hưởng tiêu cực đến giá trị của Y. Một điều đáng chú ý là chỉ có sự tương tác có ý nghĩa giữa thời gian và nhiệt độ trích ly, các cặp yếu tố còn lại không có sự tác động qua lại với nhau.

Bảng 7. Kết quả thí nghiệm tối ưu hóa

STT	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y	STT	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y
1	90	45	15	0,7	2,11	15	90	55	45	0,9	2,34
2	110	45	15	0,7	2,21	16	110	55	45	0,9	2,35
3	90	55	15	0,7	2,04	17	90	50	30	0,8	2,42

STT	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y	STT	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y
4	110	55	15	0,7	2,20	18	110	50	30	0,8	2,57
5	90	45	45	0,7	2,20	19	100	45	30	0,8	2,64
6	110	45	45	0,7	2,43	20	100	55	30	0,8	2,43
7	90	55	45	0,7	2,11	21	100	50	15	0,8	2,51
8	110	55	45	0,7	2,37	22	100	50	45	0,8	2,63
9	90	45	15	0,9	2,19	23	100	50	30	0,7	2,49
10	110	45	15	0,9	2,37	24	100	50	30	0,9	2,45
11	90	55	15	0,9	2,12	25	100	50	30	0,8	2,58
12	110	55	15	0,9	2,20	26	100	50	30	0,8	2,56
13	90	45	45	0,9	2,17	27	100	50	30	0,8	2,56
14	110	45	45	0,9	2,41						

Bảng 8. Kết quả kiểm tra thực nghiệm các thông số tối ưu từ phương trình hồi quy

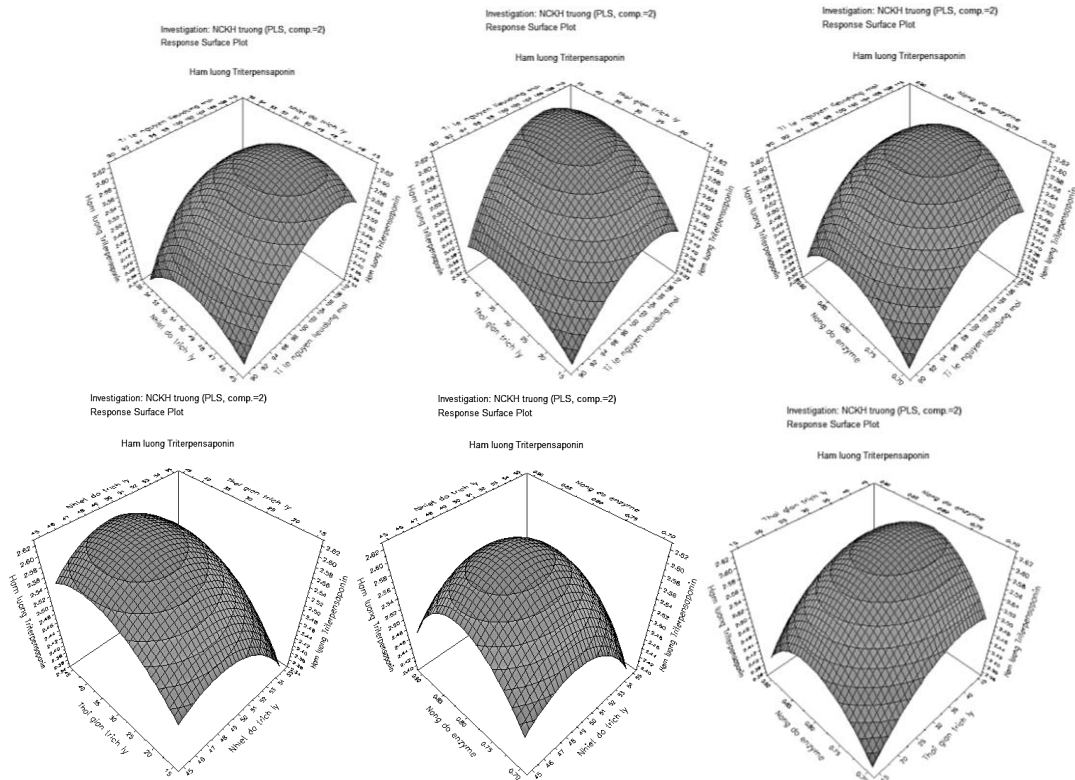
Hệ số	Giá trị	P _{value} *	Hệ số	Giá trị	P _{value} *
a ₀	2,59341	0	a ₄₄	-0,0722454	8,3142e-007
a ₁	0,064647	7,34189e-016	a ₁₂	-0,0104046	0,0548344
a ₂	-0,0255469	8,6788e-005	a ₁₃	0,00949787	0,078934
a ₃	0,0490598	2,31573e-011	a ₁₄	-0,0103601	0,0558505
a ₄	0,020579	0,00126184	a ₂₃	0,011734	0,0309683
a ₁₁	-0,0669453	3,82552e-006	a ₂₄	0,00301207	0,57336
a ₂₂	-0,054518	0,000113009	a ₃₄	-0,00643297	0,231098
a ₃₃	-0,0443881	0,00136697			
Q ² = 0,743					
R ² = 0,923, R ² _{Adj} = 0,906					

Theo Jon và cộng sự (2002), mô hình thí nghiệm là đáng tin cậy khi giá trị biến thiên ảo Q² phải lớn hơn 0,5 và R² nằm trong khoảng 0,80 – 0,97; khi giá trị R² và Q² càng gần 1 thì hàm hồi quy càng mô tả tốt các kết quả thí nghiệm. Như vậy, giá trị R² = 0,923 và Q² = 0,743 hoàn toàn phù hợp với những tiêu chí mà các tác giả này đã đưa ra khi tiến hành quy hoạch thực nghiệm sử dụng phần mềm Modde 5.0. Từ Bảng 8, phương

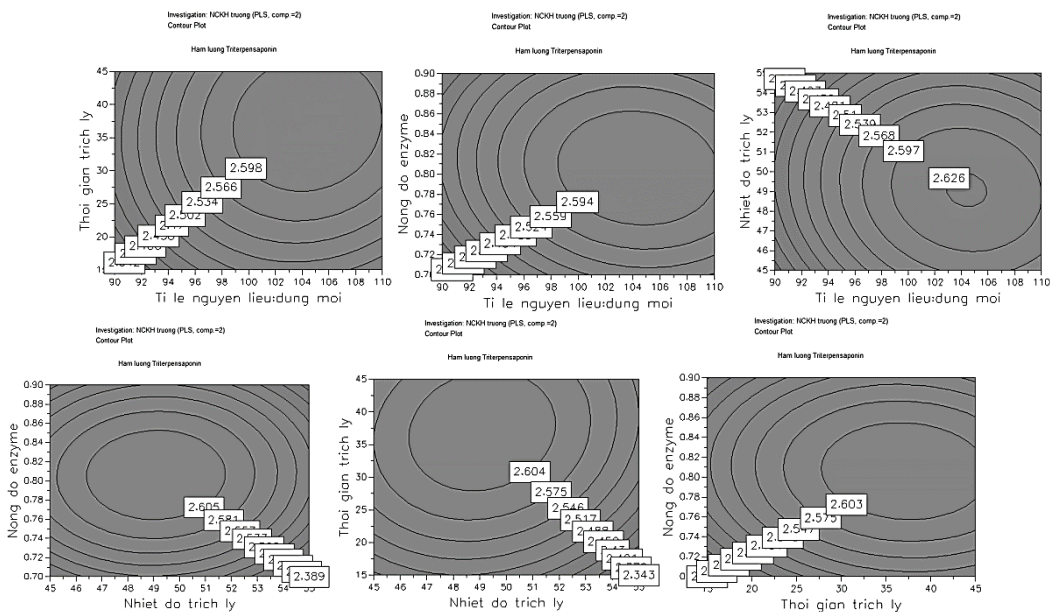
trình hồi quy có dạng như sau (bỏ qua ảnh hưởng của X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₂₄ và X₃₄ vì P > 0,05):

$$Y = 2,59341 + 0,064647X_1 - 0,0255469X_2 + 0,0490598X_3 + 0,020579X_4 - 0,0669453X_1^2 - 0,054518X_2^2 - 0,0443881X_3^2 - 0,0722454X_4^2 + 0,011734X_2X_3$$

Đồ thị bề mặt đáp ứng và đường đồng mức giữa các yếu tố ảnh hưởng lên hàm mục tiêu được thể hiện qua Hình 5 và Hình 6.



Hình 5. Tương quan giữa các yếu tố trong phương trình hồi quy được biểu diễn trên không gian 3 chiều



Hình 6. Tương quan giữa các yếu tố trong phương trình hồi quy được biểu diễn trên mặt phẳng

Kết quả tối ưu thu được: Tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là 1:20,88 (w/v); pH 5,3; nhiệt độ trích ly 49,09 °C; nồng độ enzyme 0,81%(v/w); thời gian trích ly 36 phút 49 giây thu được hàm lượng

triterpensaponin cao nhất 2,63 (%g/g CK) (cao gấp 1,3 lần so với mẫu đối chứng không xử lý enzyme). Khi tiến hành thí nghiệm kiểm chứng tại điều kiện

tối ưu, kết quả thu được hàm lượng triterpensaponin là $2,61 \pm 0,02$ (%g/g CK), chênh lệch không quá 1% so với số liệu ở phương trình tối ưu (Bảng 9).

Bảng 9. Kết quả kiểm tra thực nghiệm các thông số tối ưu từ phương trình hồi quy

	Hàm lượng triterpensaponin (%g/gCK)
Mẫu đối chứng (không xử lý enzyme)	$2,019 \pm 0,019$
Giá trị tối ưu theo phương trình	$2,628^a$
Kết quả thực nghiệm	$2,611^a \pm 0,019$

4. Kết luận

Phương pháp trích ly có sự hỗ trợ của enzyme cellulase có thể được sử dụng nhằm làm tăng hàm lượng triterpensaponin của dịch trích ly từ rau đắng biển. Với điều kiện xử lý tại nồng độ enzyme 0,81%(v/w), tỷ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:20,88 (w/v), pH 5,3, nhiệt độ trích ly 49,09°C, thời gian trích ly 37 phút thu được hàm lượng triterpensaponin cao nhất 2,63 (%g/g CK), cao gấp 1,3 lần so với mẫu đối chứng dịch trích ly không có enzyme hỗ trợ. Như vậy, việc bổ sung enzyme cellulase phù hợp trong quá trình trích ly triterpensaponin từ rau đắng biển mang lại hiệu quả rõ rệt.

Tài liệu tham khảo

- Chaturvedi S., Hemamalini R. and Khare S.K. (2012). Effect of processing conditions on saponin content and antioxidant activity of Indian varieties of soybean (*Glycine max* Linn.). *Annals of Phytomedicine*, 1(1), pp. 62-68.
- Choon Y. C., Hanaa S. and Rabiha S. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, (59), pp.16-40.
- Dar A. and Channa S. (1999). Calcium antagonistic activity of *Bacopa monniera* on vascular and intestinal smooth muscles of rabbit and guinea-pig. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, pp. 167-174.
- Das A., (2002). A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba*. Anticholinesterase and cognitive enhancing activities, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 73, pp. 893-900.
- Trương Hoàng Duy, Lê Phạm Tấn Quốc, Trần Thị Hồng Cẩm, Phạm Thị Kim Ngọc, và Đồng Thị Anh Đào (2015). Tối ưu hóa trích ly thu nhận dịch saponin thô từ *Đảng sâm Codonopsis Javanica* (Blume) Hook.F. bằng enzyme alpha-amylase", *Đặc san thông tin khoa học và công nghệ*, 4(99), tr.1-3.
- Fawzya Y.N., Putri S. and Noriko N. (2013). Identification of SGS 1609 cellulolytic bacteria isolated from Sargassum spec. and characterization of the cellulase produced. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 8 (2), pp. 57-68.
- Fleurence J. (1999). The enzymatic degradation of algal cell walls: A useful approach for improving protein accessibility. *Journal of Applied Phycology*, 11(3), pp. 313–314.
- Garg S.K. and Neelakantan S. (1981). Effect of cultural factors on cellulase activity and protein production by *Aspergillus terreus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 23 (7), pp. 1653-1659.
- Hai T.C., Nam N.D., Hong Anh L. T., Vu T. A. and Man P. V. (2016). Enzyme Assisted Extraction of Polyphenols from the Old Tea Leaves. *Journal of Nutrition and Health Sciences*, 3 (4), pp. 1-6.
- Phạm Hoàng Hộ (2000). *Cây cỏ Việt Nam*, quyển 2. Tp. Hồ Chí Minh, Nhà Xuất bản Trẻ.
- Jon Gabrielsson, Nils-Olof Lindberg and Torbjörn Lundstedt (2002). Multivariate methods in pharmaceutical applications. *Journal of chemometrics*, 16, pp. 141-160.
- Pawar R., Gopalakrishnan C. and Bhutani K.K. (2001). Dammarane triterpene saponin from *Bacopa monniera* as the superoxide inhibitor in polymorphonuclear cells. *Planta Medica*,

- 67, pp. 752-754.
- Qu, W.J., Pan, Z.L. and Ma, H.L. (2010). Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering*, 99 (1), pp. 16-23.
- Russo A. (2003). Nitricoxide-related toxicity in cultured astrocytes: Effect of *Bacopa monniera*. *Life Sciences*, 73, pp. 1517-1526.
- Sairam K. (2001). Prophylactic and curative effects of *Bacopa monniera* in gastric ulcer models. *Phytomedicine*, 8, pp. 423-430.
- Shin, BK., Park, HV. and Han IH., (2010). Enzymatic biotransformation of red ginseng and the compositional change of ginsenosides. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53(5), pp. 553-558.
- Singh K. H. and Dhawan N. B. (1997). Neuropsychopharmacological effects of the Ayurvedic nootropic *Bacopa monniera* Linn. (Brahmi). *Indian Journal of Pharmacology*, 29, pp. 359-365.
- Sivarajan V. V. and Balachandran I. (1994). *Ayurvedic drugs and their plant sources*. NewDelhi: Oxford and IBH Publishing.
- Stough C. (2001). The chronic effects of an extract of *Bacopa monniera* (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects. *Psychopharmacology*, 156, pp. 481-484.
- Sumathi T. (2002). Alcoholic extract of '*Bacopa monniera*' reduces the in vitro effects of morphine withdrawal in guinea-pig ileum. *Journal of Ethnopharmacology*, 82, pp. 75-81.
- Sunwoo H. H., Kim C. T., Kim D. Y., Maeng J. S. and Cho C. W., (2013). Extraction of ginsenosides from fresh ginseng roots (*Panax ginseng* CA Meyer) using commercial enzymes and high hydrostatic pressure. *Biotechnology letters*, 35 (7), pp. 1017-1022.
- Ngô Văn Thu (1990), *Hóa học saponin*, Trường Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh.
- Yan Z., Cao X., Teng Y. and Zhang J. (2012). A Shortcut to the Optimization of Cellulase Production Using the Mutant *Trichoderma reesei* YC-108. *Microbiol*, 52 (4), pp. 670 - 675.