

BUỚC ĐẦU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ ENZYME ĐỂ TRÍCH LY CÁC HOẠT CHẤT THỨ CẤP TỪ RỄ CÂY ĐĂNG SÂM (*Codonopsis javanica*)

Phan Phước Hiền⁵, Võ Thị Thao

Tóm tắt: Đăng sâm *Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f. phân bố chủ yếu ở vùng núi Tây nguyên, tập trung nhiều nhất là Kontum. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng Viscozyme (Novozyme) để tiến hành trích ly và xác định hàm lượng saponin triterpenoid từ Đăng sâm. Saponin triterpenoid 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 Viscozyme ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 1 giờ, nồng độ enzyme là 0,4%, tỷ lệ nguyên liệu:enzyme là 1:7 (g:ml) thì hàm lượng saponin triterpenoid thu được là 88,7±5,2 mg/100g cao hơn 1,5 lần khi không sử dụng enzyme ở cùng điều kiện.

Từ khóa: Đăng sâm *Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f., Viscozyme, Saponin triterpenoid, nồng độ enzyme

Abstract: Đăng sâm *Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f. mainly distributed in the highland mountain region in Viet Nam, concentrated mostly in Kontum province. In this study, for the first time Viscozyme (Novozyme) was used to extract and determine the content of saponin triterpenoid from its root. Saponin triterpenoid is one of the medicinal components concentrated mainly in tuberous roots. The results showed that when using Viscozyme extraction at 30°C for 1 hour, the enzyme concentration was 0.4%, the ratio of material: enzyme was 1:7 (g:ml), the amount of triterpenoid saponin obtained was 88.7 ± 5.2 mg / 100g 1.5 times higher not using the enzyme under the same conditions.

Key words: “Đăng sâm” *Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f., Viscozyme, Saponin triterpenoid, enzyme concentration.

1. Lời mở đầu

Đăng sâm là một loại cây thân thảo sống lâu năm, mọc bò hay leo bằng thân quấn. Thân màu tím sẫm, dài 2-3m, phân nhánh nhiều. Rễ củ, hình trụ dài 10-12 cm, đường kính có thể đạt 1-1,7cm. Đầu rễ phình to, trên có nhiều vết sẹo lồi của thân củ, phía dưới có phân nhánh và có rễ con dạng tua nhỏ, mặt ngoài màu vàng nhạt, khi khô màu vàng xám, có nếp nhăn dọc và ngang, phần lõi màu trắng ngà. [1], [2], [3]

⁵ Phó Giáo sư - Tiến sĩ Trường Đại học Nam Cần Thơ

Rễ Đảng sâm còn tươi có chứa đường, saponin, acid amin và chất béo [1]. Hàm lượng saponin trong Đảng sâm là cao nhất 3,12 [4]. Rễ Đảng sâm có vị ngọt, cay, tính mát; có công dụng thanh nhiệt (hạ sốt), lợi tiểu, giải độc. Thường được sử dụng trong các bài thuốc chữa đau răng, đau bụng, cảm mạo, bệnh gan, cao huyết áp, tiểu đường, rong kinh, băng huyết,... và sử dụng làm thuốc bổ giúp bồi bổ sức khỏe.

Đông y coi Đảng sâm có thể dùng thay thế nhân sâm trong các bệnh thiếu máu, vàng da, bệnh bạch huyết, viêm thượng thận, nước tiểu có albumin, chân phù đau. Còn dùng làm thuốc bổ dạ dày, chữa ho, tiêu đờm, lợi tiểu. *Người ta còn gọi Đảng sâm là nhân sâm của người nghèo vì có mọi công dụng của nhân sâm mà lại rẻ tiền hơn* [1].

Saponin hay saponosid là một nhóm các glycoside có phần saponenin 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, Sao biển [5]. Công dụng của saponin được tạo ra từ khả năng hoạt động của chúng, chống viêm, kháng khuẩn, kháng nấm, ức chế virus. Một số có tác dụng trong điều trị viêm loét dạ dày và viêm da, chống viêm, kháng khuẩn, kháng nấm, ức chế virus.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng Viscozyme để tiến hành trích ly saponin triterpenoid từ Đảng sâm.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đảng sâm tươi thu hoạch ở Manden, huyện Konplong thuộc tỉnh Kontum được rửa sạch, cắt lát và sấy khô ở 60°C đến khi đạt độ ẩm 15%. Sau đó được xay và rây qua lỗ rây 250µm để đồng nhất kích thước bột, bảo quản trong các túi kín để tránh ẩm, mốc; lưu trữ trong ngăn mát tủ lạnh cho các thí nghiệm.

Enzyme Viscozyme L sử dụng là enzyme thương mại được cung cấp bởi công ty Novozymes, Copenhagen - Đan Mạch

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Định lượng saponin dựa vào phương pháp quang phổ: vanilin và acid vô cơ mạnh 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. [6]

- Xác định hàm lượng triterpenoid:

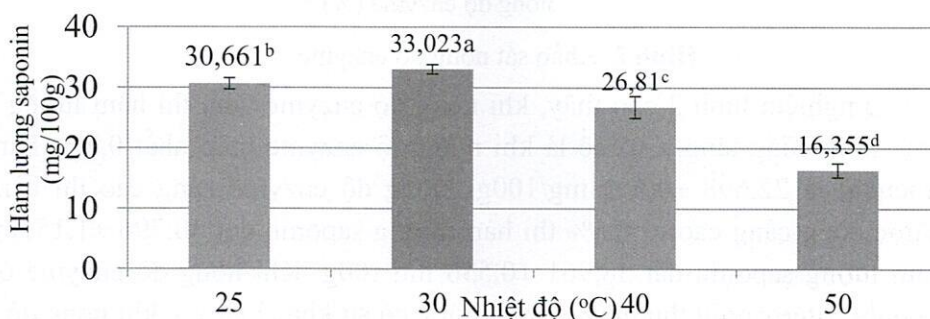
• Dụng đường chuẩn bằng acid oleanolic: Dung dịch acid oleanolic được pha với nồng độ khác nhau, bổ sung vào các chất vanillin - acetic acid (5%), acid pechoric (72%), acid acetic băng, đun ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 15 phút, cho đến khi dung dịch chuyển sang màu tím hoa cà. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 548 nm. [7]

• Quy trình trích ly và xác định hàm lượng saponin triterpenoid từ Đảng sâm: Sau khi Đảng sâm được xử lý bằng enzyme sẽ trích ly bằng ethanol 70°, trong 1 giờ. Dịch trích ly được lọc ly tâm. Sau đó sẽ được cô khan ethanol thu cao Đảng sâm. Thủy phân cao chiết Đảng sâm bằng H₂SO₄ 5% ở nhiệt độ 100°C, trong 2 giờ. Dịch thu được sẽ được lắc với n-hexane theo tỷ lệ 1:1 (v/v) đến khi không còn màu, bốc hơi n-hexane ở nhiệt độ 50°C, thu cặn. Hòa tan cặn bằng methanol và định mức thành 10ml. Tiến hành lấy dịch và phân tích hàm lượng saponin triterpenoid.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khảo sát nhiệt độ tác động của enzyme

Khảo sát này đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ ủ đến quá trình xử lý nguyên liệu bột Đảng sâm bằng enzyme thu nhận saponin triterpenoid.



Hình 1. Khảo sát nhiệt độ tác động của enzyme

Các giá trị có cùng ký tự chữ cái thì không có sự khác biệt có ý về mặt thống kê với mức ý nghĩa $\alpha \leq 5\%$, sự khác biệt được đánh giá dựa vào bảng phân tích ANOVA.

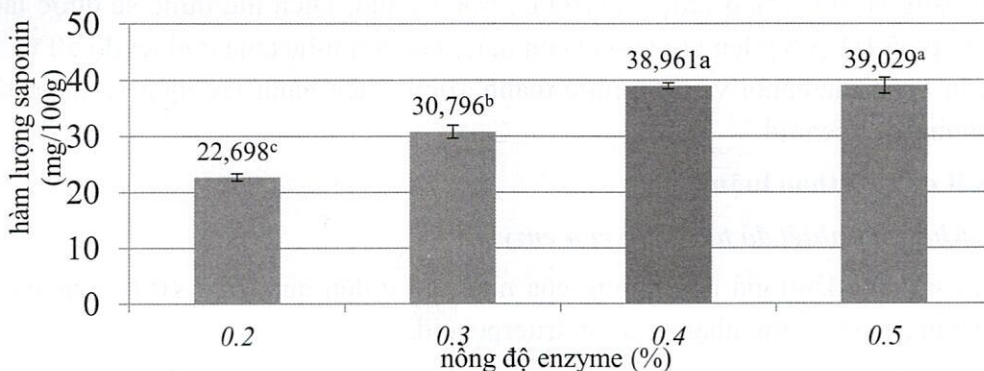
Trong khảo sát này, chúng tôi tiến hành khảo sát nhiệt độ tác động của enzyme từ 25°C đến 50°C. Ở nhiệt độ 30°C là hoạt động của enzyme hiệu quả nhất, hàm lượng saponin triterpenoid thu nhận được cao nhất là $33,023 \pm 0,766$ mg/100g ở 30°C và thấp nhất là $16,355 \pm 1,151$ mg/100g ở 50°C.

Theo kết quả của S. A. Palanlyandl và cộng sự (2015), khi tăng nhiệt độ xử lý nguyên liệu nhân sâm (*Panax ginseng* C.A. Meyer) bằng Viscozyme thì hàm lượng saponin thu nhận được càng tăng và đạt cao nhất ở 45°C [8]. So với kết quả của các thí nghiệm này, nhiệt độ xử lý nguyên liệu bằng enzyme theo kết quả thí nghiệm của chúng tôi là thấp hơn, điều này giúp giảm chi phí gia nhiệt, đồng thời bảo vệ được hoạt tính của các hợp chất dễ bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ có trong Đảng sâm.

Từ những phân tích và nhận định trên, chúng tôi chọn nhiệt độ xử lý bột Đảng sâm với enzyme ở nhiệt độ 30°C. Nhiệt độ này sẽ được cố định cho các khảo sát tiếp theo.

3.2. Khảo sát nồng độ enzyme

Khảo sát nồng độ enzyme ảnh hưởng đến quá trình xử lý nguyên liệu Đàng sâm nhằm chọn ra nồng độ enzyme mà saponin triterpenoid có hàm lượng cao nhất.



Hình 2. Khảo sát nồng độ enzyme

Số liệu thực nghiệm hình 2 cho thấy, khi nồng độ enzyme tăng thì hàm lượng saponin triterpenoid thu được cũng tăng. Cụ thể là khi nồng độ enzyme thấp nhất 0,2%, hàm lượng saponin triterpenoid là $22,698 \pm 0,651$ mg/100g. Nồng độ enzyme càng cao thì hàm lượng saponin thu được cũng càng cao, ở 0,3% thì hàm lượng saponin đạt $30,796 \pm 1,151$ mg/100g, ở 0,4% thì hàm lượng saponin đạt $38,961 \pm 0,536$ mg/100g. Khi nồng độ enzyme ở 5% thì hàm lượng saponin triterpenoid thu nhận được không có sự khác biệt với khi nồng độ enzyme 0,4% ở mức ý nghĩa 95% khi xử lý theo ANOVA.

Nồng độ enzyme là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu suất thu saponin triterpenoid. Khi nồng độ enzyme càng cao thì phản ứng diễn ra càng nhanh, vận tốc phản ứng tăng nhanh. Nồng độ enzyme càng cao thì phản ứng diễn ra càng nhanh, vận tốc phản ứng tăng nhanh. Nồng độ enzyme tăng đến một giá trị, cụ thể là 0,4% (v/v) thì vận tốc phản ứng đạt cực đại $V=V_{max}$ theo phương trình Michaelis-Menten, hàm lượng saponin thu được đạt ổn định. Theo kết quả của Trương Hoàng Duy và cs đưa ra (2014): nồng độ enzyme càng cao thì hàm lượng saponin triterpenoid thu được cũng càng tăng và nồng độ enzyme tối ưu là 0,5% [9].

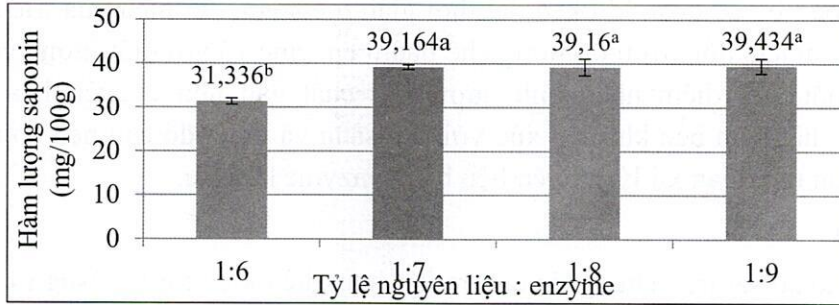
Từ kết quả trên, chúng tôi chọn nồng độ enzyme là 0,4%, ứng với nồng độ enzyme này thì hàm lượng saponin triterpenoid thu nhận được tốt nhất và phù hợp với lợi ích kinh tế hơn.

3.3. Khảo sát tỷ lệ nguyên liệu: enzyme

Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu: enzyme (g/ml) đến quá trình xử lý nguyên liệu Đàng sâm bằng enzyme thu nhận saponin triterpenoid.

Chúng tôi khảo sát tỷ lệ nguyên liệu: enzyme (w/v) là từ 1:6 đến 1:9, khi tăng tỷ lệ nguyên liệu: enzyme lên thì hàm lượng saponin triterpenoid thu nhận được cũng tăng, tuy nhiên khi tiếp tục tăng tỷ lệ này thì hàm lượng saponin triterpenoid không tăng nữa. Cụ thể là khi tỷ lệ

nguyên liệu : enzyme là 1 : 6 thì hàm lượng saponin thu được thấp nhất $41,3 \pm 1,1$ mg/100g, khi tăng tỷ lệ lên 1 : 7 thì hàm lượng saponin đạt $56,7 \pm 1,5$ mg/100g, khi tăng tỷ lệ lên 1 : 8 và 1 : 9 thì hàm lượng saponin triterpenoid tăng không đáng kể ở mức ý nghĩa 95% khi xử lý theo ANOVA.



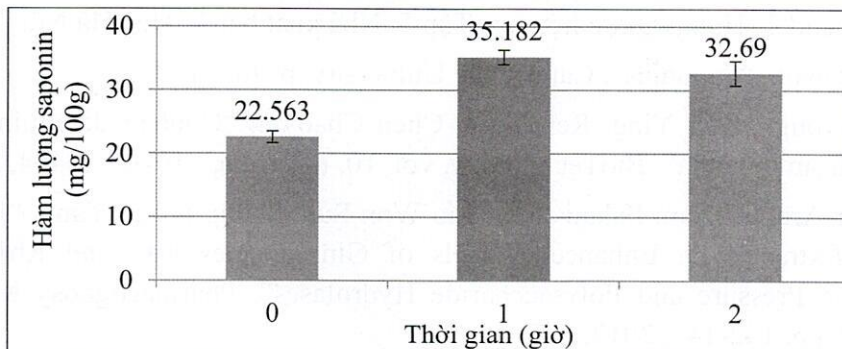
Hình 3. Khảo sát tỷ lệ nguyên liệu : enzyme

Thành phần chính của thành tế bào thực vật gồm pectin, cellulose, hemicellulose.... Khi sử dụng Viscozyme có thành phần là pectinase và cellulase, chúng sẽ thủy phân pectin và cellulose trong cấu trúc mô thực vật và từ đó dịch trong tế bào thoát ra bên ngoài dễ dàng hơn. Kết quả thí nghiệm như Trương Hoàng Duy và cộng sự (2014) đưa ra: khi tăng tỷ lệ nguyên liệu : enzyme thì hàm lượng saponin triterpenoid thu nhận được cũng tăng và tỷ lệ tối ưu là 1 : 5 [9].

Từ những kết quả trên, chúng tôi chọn tỷ lệ nguyên liệu : enzyme là 1 : 7 cho các thí nghiệm sau sẽ tiết kiệm lượng enzyme sử dụng, phù hợp với lợi ích kinh tế.

3.4. Khảo sát thời gian tác động của enzyme

Khảo sát này đánh giá ảnh hưởng của thời gian tác động của enzyme đến quá trình trích ly thu nhận saponin triterpenoid từ Đẳng sâm bằng Viscozyme. Chúng tôi chọn thời gian xử lý sao cho phù hợp, đạt được hiệu quả thu saponin triterpenoid cao.



Hình 4. Khảo sát thời gian xử lý nguyên liệu bằng enzyme

Khi thời gian xử lý bằng enzyme tăng lên từ 0 giờ đến 1 giờ thì hàm lượng saponin triterpenoid thu được tăng lên từ $22,563 \pm 0,928$ mg/100g đến $35,182 \pm 1,151$ mg/100g. Tuy nhiên khi tăng thời gian xử lý lên 2 giờ thì hàm lượng saponin triterpenoid thu được lại giảm còn $32,69 \pm 1,93$ mg/100g.

Phản ứng thủy phân của enzyme phải cần có thời gian tối thiểu để enzyme đủ thời gian tác động đến toàn bộ cơ chất, khi kéo dài thời gian ủ enzyme thì hiệu quả trích ly cũng tăng thêm [10]. Tuy nhiên, đối với một lượng chế phẩm enzyme và với một lượng cơ chất có giới hạn thì đến một thời điểm nhất định, lượng cơ chất gần như chuyển hóa hết. Saponin triterpenoid là chất kém bền khi tiếp xúc với ánh sáng và nhiệt độ cao nên có thể đã bị biến đổi phần nào khi thời gian xử lý nguyên liệu bằng enzyme kéo dài.

Kết luận

Qua các khảo sát trên chúng tôi đưa ra kết luận điều kiện xử lý Đảng sâm với enzyme được tối ưu là: nhiệt độ tác động của enzyme ở 30°C , nồng độ enzyme là 0,4%, trong thời gian 1 giờ, với tỷ lệ nguyên liệu: enzyme 1:7. Từ những khảo sát nghiên cứu điều kiện trích ly Đảng sâm bằng enzyme sẽ tạo tiền đề cho các ứng dụng sản phẩm Đảng sâm có giá trị cao về chất lượng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Đỗ Huy Bích và cs, Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam. NXB Khoa học và Kỹ thuật Tp. HCM, 2006.
- [2]. Sách đỏ Việt Nam. NXB Khoa học Tự nhiên và công nghệ, 2007.
- [3]. Đỗ Tất Lợi, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB Y học, 2004.
- [4]. Hoàng Minh Chung, “Nghiên cứu tác dụng bổ khí của Đảng sâm Việt Nam”, Tạp chí Dược liệu, vol. tập 7, pp. 118-120, 2002.
- [5]. N. V. Thu and T. Hùng, Dược liệu học Tập 1: Nhà xuất bản Y Học Hà Nội, 2011.
- [6]. K. Hostettmann, “Saponins”, Cambridge University, p. 144, 1995.
- [7]. Han Benyong, Chen Ying, Ren Ying, Chen Chaoyin, “Content determination of total saponins from *Opuntia*”, BioTechnology, vol. 10, no. 18, pp. 10400-10404, 2014.
- [8]. Sasikumar Arunachalam Palaniyandi, Joo Won Suh, Seung Hwan Yang, “Preparation of Ginseng Extract with Enhanced Levels of Ginsenosides Rg1 and Rb1 using High Hydrostatic Pressure and Polysaccharide Hydrolases”, Pharmacognosy Magazine, vol. 13, no. 49, pp. 142-147, 2017.

- [9]. Trương Hoàng Duy, “Optimize extraction of crude saponin triterpenoid from *codonopsis javanica* (Blume) Hook.f. using enzyme cellulase”, *International Journal of Pharmaceutical Research & Development (IJPRD)*, vol. 6, 2014.
- [10]. A. K. Landbo, K. Kaack and A.S. Meyer, “Statically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice”, vol. 8, no. 1, pp. 135-142, 2007.

