

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH CHIẾT XUẤT MỘT SỐ HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TRONG HẢI SÂM (*HOLOTHURIA SCABRA*)

OPTIMIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM SEA CUCUMBERS (*HOLOTHURIA SCABRA*)

Ngô Thị Minh Phương*

Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật - Đại học Đà Nẵng¹

*Tác giả liên hệ: ntmphuong@ute.udn.vn

(Nhận bài: 07/9/2022; Chấp nhận đăng: 26/10/2022)

Tóm tắt - Bài báo này nghiên cứu tối ưu hóa quá trình chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm để chiết xuất một số hợp chất có hoạt tính sinh học trong hải sâm bằng cách thiết kế thí nghiệm và tính toán trên phần mềm Design expert (phiên bản 7.1 Trial, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA). Kết quả cho thấy, nhiệt độ và thời gian siêu âm có ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất. Điều kiện tối ưu để chiết xuất là nhiệt độ 51,9°C; Thời gian 38,97 phút và hàm lượng flavonoid, phenolic và saponin thu được từ hải sâm tương ứng là 5,02 mg GAE/g; 1,48 mg RE/g; 0,36 mg DE/g. Kết quả này cho thấy, tiềm năng trong việc chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm để sản xuất hợp chất hoạt tính sinh học từ hải sâm nhằm ứng dụng trong y học và thực phẩm chức năng.

Từ khóa - Flavonoid; hải sâm; phenolic; saponin; tối ưu hóa

1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, Việt Nam có các công trình khoa học nghiên cứu về sinh vật biển, một trong các xu hướng mới mở ra là tìm kiếm các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học cao từ sinh vật biển. Từ đó nghiên cứu thành phần, cấu trúc và tổng hợp nên các hợp chất có giá trị y học cao [1].

Trong sự đa dạng của sinh vật biển thì hải sâm là một trong những loài nhận được sự quan tâm đặc biệt của các nhà khoa học trong và ngoài nước. Ở Việt Nam và các quốc gia ven biển Thái Bình Dương hải sâm không những có giá trị ẩm thực mà còn mang giá trị y học. Nhiều loại có các có hoạt tính sinh học được sử dụng để chế tạo các dược phẩm trị hen suyễn, thấp khớp, chất điều trị ung thư... Đặc biệt, các món ăn từ hải sâm có giá trị dinh dưỡng rất lớn, đặc biệt trong việc trị các chứng bệnh về sinh lý [2].

Theo các nghiên cứu trước cho thấy, trong hải sâm chứa một lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học như phenolic, flavonoid, saponin... Các hợp chất này thể hiện các hoạt động dược học vô cùng phong phú đa dạng như chống ung thư, kháng sinh, kháng viêm, kháng virus, chống oxy hóa,... [3-5]. Hiện nay, các nghiên cứu, đánh giá cũng như ứng dụng các hoạt tính sinh học của hải sâm ở Việt Nam vẫn còn rất khiêm tốn, chưa tận dụng được hết nguồn tài nguyên biển quý giá này. Sóng siêu âm có tác dụng làm tăng sự hòa tan của chất tan vào dung môi và tăng quá trình khuếch tán chất tan. Sóng siêu âm cường độ cao cũng có thể phá vỡ cấu trúc tế bào, thúc đẩy quá trình chiết. Ưu điểm của phương pháp chiết xuất với sự hỗ trợ của siêu âm là rút ngắn đáng kể thời gian chiết, có thể áp dụng được cho hầu hết các loại dung môi có độ phân cực khác nhau, lượng dung môi sử dụng ít, chi phí thấp và giảm ô nhiễm môi trường [6].

Abstract - This study aims to optimize ultrasound-assisted extraction parameters affecting bioactive compounds yield from sea cucumbers, such as temperature, time by designing experiments and calculations on Design expert Software (version 7.1 Trial, Stat – Ease Inc., Minneapolis, USA). It was found that, ultrasonic temperature and time played the important role in the extraction process. The optimum conditions for extraction of these bioactive compounds were 51.92°C; 38.97 minutes and the yield of flavonoid, phenolic and saponin were 5.02 mg GAE/g; 1.48 mg RE/g; 0.36 mg DE/g, respectively. The results prove the potentials for the ultrasonic-assisted extraction to produce bioactive compounds from sea cucumbers for medical and functional food applications.

Key words - Flavonoid; sea cucumber; phenolic; saponin; optimization

Để khai thác hiệu quả nguồn tài nguyên quý này, việc nghiên cứu tách chiết các hoạt chất sinh học từ hải sâm là rất cần thiết và cũng là lí do chọn đề tài “Nghiên cứu tối ưu hóa quá trình chiết xuất một số hợp chất có hoạt tính sinh học từ hải sâm”. Nghiên cứu thực hiện khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian siêu âm đến hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học chứa trong hải sâm, cũng như tối ưu hóa các điều kiện thực nghiệm để có được hiệu quả chiết xuất cao nhất. Từ đó, tạo cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo trong lĩnh vực tìm kiếm những hoạt chất có thể ứng dụng vào trong thực tế cuộc sống đồng thời góp phần bảo tồn các loài quý hiếm, các loài có vai trò quan trọng đối với hệ sinh vật biển.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và chuẩn bị mẫu

2.1.1. Nguyên liệu

Hải sâm có tên khoa học là *Holothuria scabra* có nguồn gốc ở Cam Ranh, Khánh Hòa. Sau khi thu nhận, đưa về phòng thí nghiệm, làm sạch và sấy khô ở 60°C đến độ ẩm cuối cùng là 6%, sau đó nghiền mịn đến kích thước khoảng 0,2 – 0,5mm. Sau đó, bảo quản bột trong lọ kín ở nhiệt độ phòng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thí nghiệm chiết xuất một số chất có hoạt tính sinh học có sự hỗ trợ của sóng siêu âm

Các thí nghiệm của quá trình chiết xuất dưới tác dụng của sóng siêu âm được thực hiện trong bể siêu âm (WUC.D2211, Daihan, Hàn Quốc) với công suất 528W, tần số siêu âm 40kHz.

Theo một số tài liệu tham khảo, có thể sử dụng các dung môi ethanol:nước; methanol:nước; isopropyl alcohol: nước;

¹ The University of Danang - University of Technology and Education (Thi Minh Phuong Ngo)

methanol:acetone; isopropyl alcohol:acetone để chiết xuất một số hợp chất có hoạt tính sinh học như phenolic, flavonoid, saponin. Trong đó, dung môi methanol:nước cất cho kết quả tốt nhất và thường được sử dụng [6, 7].



Hình 1. Thiết bị siêu âm

Trong mỗi thí nghiệm, 5g hải sâm được phối trộn với dung môi methanol:nước cất (methanol:nước cất với tỉ lệ 3:1) với tỉ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:20 (g/ml). Tiến hành chiết ở các khoảng nhiệt độ 40°C, 50°C, 60°C, 70°C và thời gian 20 phút, 30 phút, 40 phút và 50 phút, mức năng lượng siêu âm được cố định là 60%. Sau khi chiết, mẫu được làm nguội trong bể nước đá trong 5 phút và sau đó ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch chiết. Sau đó, dịch chiết được lọc qua Whatman số 1 và loại bỏ dung môi bằng thiết bị cô quay chân không ở 40°C. Dịch chiết được bảo quản trong lọ thủy tinh ở 4°C để phân tích hàm lượng một số hợp chất có hoạt tính sinh học [8].

Thí nghiệm khảo sát đơn biến của quá trình chiết xuất một số hợp chất có hoạt tính sinh học từ hải sâm có sự hỗ trợ của sóng siêu âm

Nguyên liệu được xử lý đưa vào thực hiện quá trình chiết xuất dưới tác dụng của sóng siêu âm, sự ảnh hưởng của thời gian siêu âm và nhiệt độ siêu âm được nghiên cứu bởi khảo sát đơn biến như sau:

- Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm: Yếu tố cố định là thời gian siêu âm là 30 phút, tỉ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:20, mức năng lượng siêu âm là 60%. Thí nghiệm được bố trí khảo sát ở 4 mức nhiệt độ: 40°C, 50°C, 60°C, 70°C.

- Khảo sát ảnh hưởng của thời gian siêu âm: Yếu tố cố định là nhiệt độ siêu âm là 50°C, tỉ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:20, mức năng lượng siêu âm là 60%. Thí nghiệm được bố trí khảo sát ở 4 mức thời gian: 20 phút, 30 phút, 40 phút và 50 phút.

Ảnh hưởng của từng yếu tố được đánh giá bằng cách xác định hàm lượng phenolic, flavonoid và saponin.

Tối ưu hóa quá trình chiết xuất một số hợp chất có hoạt tính sinh học từ hải sâm có sự hỗ trợ của sóng siêu âm

Bài toán đặt ra là tối ưu hóa bằng thực nghiệm quá trình chiết tách phenolic, flavonoid và saponin có dạng như sau:

$$Y_{\max} = Y(x_1, x_2)$$

Y: hàm lượng phenolic, flavonoid và saponin thu nhận;

x₁: Nhiệt độ chiết; x₂: Thời gian chiết;.

Chọn phương án quy hoạch trực giao cấp 2 TYT 2k

Mô tả toán học được biểu diễn như sau:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2$$

Trong đó: b₁, b₂ là các hệ số bậc 1 và b₁₂ là hệ số tương tác giữa từng cặp yếu tố; b₁₁, b₂₂, là các hệ số bậc hai.

Số thí nghiệm tiến hành: 2k + 2k + n₀

k: số yếu tố ảnh hưởng, ở đây k = 2

2k là số thí nghiệm của quy hoạch trực giao cấp 1

2k là số thí nghiệm tại các điểm sao

- n₀ là số thí nghiệm tại tâm, chọn n₀ = 3;

- Như vậy số thí nghiệm cần thực hiện là N = 11.

Thiết kế ma trận thí nghiệm và tối ưu hóa các điều kiện chiết tách bằng phần mềm Design expert 7.1.

2.2.2. Phương pháp xác định hàm lượng phenolic tổng

- Nguyên tắc: Tổng hàm lượng phenolic được xác định bằng cách sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu [9, 10]. Trong thành phần thuốc thử Folin-Ciocalteu có phức hợp phospho-wolfram-phosphomolydat. Phức hợp này sẽ bị khử bởi các hợp chất polyphenol tạo thành sản phẩm sản ứng màu xanh thẫm.

- Cách tiến hành: Để xác định tổng hàm lượng phenolic, ta tiến hành lấy 0,5 ml dịch chiết (50 mg / ml) được thêm vào 2,5 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% và 1,25 ml natri cacbonat 20% cho vào ống nghiệm và đậy kín. Ống nghiệm được lắc đều và ủ ở nhiệt độ môi trường (28°C) trong 40 phút. Độ hấp thụ của hỗn hợp sau đó được đo ở bước sóng 725 nm trong máy quang phổ.

Tổng hàm lượng phenolic của dịch chiết được tính toán từ một phương trình thu được từ đường chuẩn được tạo ra với dung dịch acid gallic hòa tan trong metanol và được biểu thị bằng đương lượng axit gallic (GAE) trên một gam chất khô.

$$P = \frac{c \times V}{m}$$

Trong đó:

P: tổng hàm lượng của các hợp chất phenolic (mg GAE/g);

c: nồng độ của acid gallic đương lượng từ đường chuẩn (µg/g);

V: thể tích dịch chiết (ml);

m: khối lượng chất khô có trong V (g).

2.2.3. Phương pháp xác định hàm lượng flavonoid

- Nguyên tắc: Tổng hàm lượng flavonoid được xác định bằng cách sử dụng xét nghiệm so màu nhôm clorua [9,11].

- Cách tiến hành: Tổng hàm lượng flavonoid được thực hiện bằng cách thêm 0,5 ml dịch chiết (50 mg/ml) vào 0,3 ml NaNO₂ (5%) trong một ống nghiệm được đậy kín và lắc đều. Sau khi ủ trong 5 phút; 0,3 ml AlCl₃(10%) được thêm vào ống nghiệm và tiếp tục ủ trong 1 phút. Khoảng 2 ml NaOH (1M) và 1,4 ml nước cất được thêm vào hỗn hợp và lắc đều trước khi đo độ hấp thụ ở bước sóng 510 nm trong máy quang phổ.

Tổng hàm lượng flavonoid đối với mỗi dịch chiết được tính toán từ phương trình thu được từ đường chuẩn được tạo ra với dung dịch rutin hòa tan trong metanol, trong đó Tổng hàm lượng flavonoid được biểu thị bằng đương lượng rutin (RE) trên một gam chất khô.

Hàm lượng flavonoid trong rutin đương lượng được tính theo công thức sau:

$$F = \frac{c \times V}{m}$$

Trong đó:

F: tổng hàm lượng của các hợp chất flavonoid (mg QE/g);

c: nồng độ của quercetin đương lượng từ đường chuẩn (µg/g);

V: thể tích dịch chiết (ml);

m: khối lượng chất khô có trong V (g).

2.2.4. Phương pháp xác định hàm lượng saponin

- Nguyên tắc: Tổng hàm lượng saponin được xác định theo những sửa đổi nhỏ đối với phương pháp đo lượng axit vanilin-sulfuric [9, 12].

- Cách tiến hành: Để xác định tổng hàm lượng saponin, ta tiến hành cho vào ống nghiệm 0,25 ml dịch chiết (50 mg/ml); 0,25 ml thuốc thử vanilin (8%) và 0,25 ml H₂SO₄ 72% trong ống nghiệm được đậy kín.

- Ống nghiệm được lắc đều và đun trên nồi cách thủy nóng duy trì ở 60°C. Sau 10 phút, hỗn hợp mẫu được làm lạnh trong nước đá lạnh trong 4 phút, sau đó, đo độ hấp thụ ở bước sóng 544 nm, sử dụng máy quang phổ. Hàm lượng saponin được tính toán từ phương trình thu được từ đường chuẩn được tạo ra với dung dịch diosgenin hòa tan trong metanol và tổng hàm lượng saponin được biểu thị bằng đương lượng diosgenin (DE) trên gam chất khô.

Hàm lượng saponin trong đương lượng diosgenin được tính theo công thức sau:

$$S = \frac{c \times V}{m}$$

Trong đó:

S: tổng hàm lượng của các hợp chất Saponin (mg DE/g);

c: nồng độ của diosgenin đương lượng từ đường chuẩn (μg/g);

V: thể tích dịch chiết (ml);

m: khối lượng chất khô có trong V (g).

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và phần mềm thống kê Minitab 18. Kết quả phân tích ANOVA với độ tin cậy 95%, so sánh sự khác biệt có ý nghĩa của các số liệu biểu diễn giá trị trung bình.

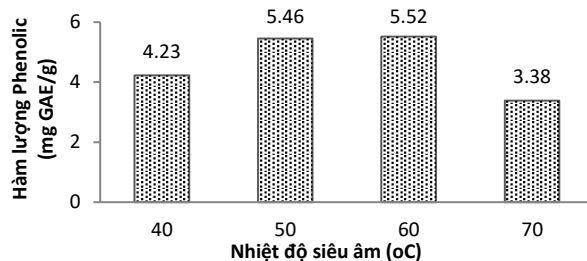
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm đến hàm lượng một số hợp chất có hoạt tính sinh học có trong hải sâm

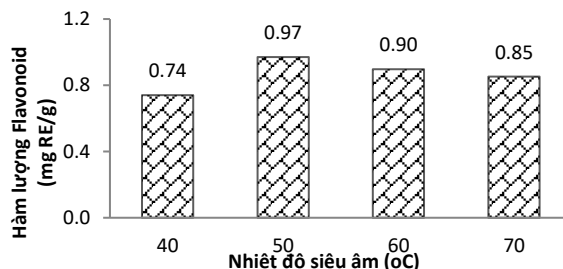
Ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm đến hàm lượng một số hợp chất có hoạt tính sinh học trong hải sâm được biểu diễn ở các đồ thị Hình 2, Hình 3 và Hình 4.

Nhiệt độ là yếu tố quan trọng không những ảnh hưởng tới hiệu suất chiết mà còn ảnh hưởng đến chất lượng phenolic. Nhiệt độ làm giảm độ nhớt của dung dịch, tăng tốc độ thâm thấu của dung môi vào tế bào và tăng hiệu suất trích li. Tuy nhiên, chiết ở nhiệt độ quá cao thì tăng chi phí ổn nhiệt và tăng nguy cơ giảm chất lượng của dịch chiết do các chất có hoạt tính sinh học trong dịch chiết nhạy cảm với yếu tố nhiệt độ.

Đồ thị ở Hình 2 cho thấy, hàm lượng phenolic trong hải sâm thu được cao nhất khi được siêu âm ở nhiệt độ 50°C và 60°C (với hàm lượng phenolic tương ứng là 5,46 và 5,52 mg GAE/g chất khô) và thấp nhất khi ở 70°C (3,38mg GAE/g chất khô). Hợp chất phenolic có xu hướng ngày càng tăng trong thời gian đầu của quá trình chiết xuất là do có chênh lệch về nồng độ của các hợp chất phenolic giữa dung môi và trong tế bào. Nhưng khi tăng nhiệt độ siêu âm đến 70°C thì hàm lượng phenolic giảm có thể do bị phân hủy ở nhiệt độ cao 70°C.

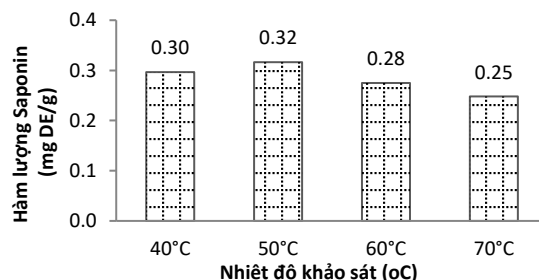


Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng phenolic (mg GAE/g) trong hải sâm



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng flavonoid (mg RE/g) trong hải sâm

Từ đồ thị Hình 3, có thể thấy hàm lượng flavonoid trong hải sâm tăng dần khi nhiệt độ chiết siêu âm tăng từ 40°C đến 50°C. Khi nhiệt độ chiết tăng đến 60-70°C thì hàm lượng flavonoid không tăng mà bắt đầu giảm. Tăng nhiệt độ có thể đẩy nhanh quá trình trương nở của nguyên liệu thô, làm mềm và vỡ sinh thực vật, làm suy yếu tương tác phenol-protein và phenol-polysaccharide, tăng khả năng hòa tan của các hợp chất chiết xuất và tốc độ khuếch tán dung môi, và giảm độ nhớt và sức căng bề mặt [13]. Kết quả là, khi nhiệt độ tăng dần, sự chuyển khối lượng của các hợp chất từ hải sâm được cải thiện. Nhưng đến một giá trị nhất định, hàm lượng flavonoid giảm dần. Có thể giải thích, dưới tác dụng của nhiệt độ cao thì hợp chất phenolic bị chuyển hóa đồng thời nhiệt độ cao làm cho dung môi bay hơi ảnh hưởng đến hiệu quả chiết phenolic.



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng saponin (mg DE/g) trong hải sâm

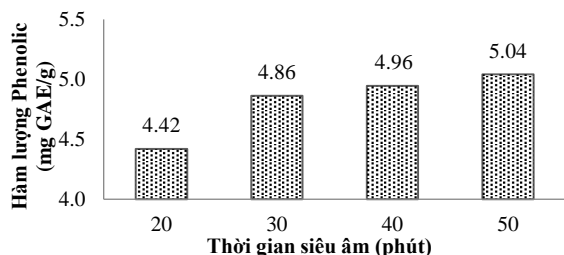
Kết quả ở đồ thị Hình 4 cho thấy hàm lượng saponin trong hải sâm cao nhất khi được chiết siêu âm ở nhiệt độ 50°C (0,32 mg DE/g chất khô) và thấp nhất khi ở 70°C (0,25mg DE/g chất khô). Hàm lượng saponin tăng khi nhiệt độ siêu âm tăng từ 40 – 50°C, tuy nhiên sau đó giảm xuống dần. Điều này có thể được giải thích là do trong quá trình chiết bằng dung môi methanol:nước, khi tăng nhiệt độ làm cho động học của quá trình chiết cũng tăng lên và các chất được chiết ra khỏi tế bào tốt hơn. Tuy nhiên, khi nhiệt độ càng tăng, một số chất có thể bị phân hủy, đồng thời nồng độ của các chất có mặt trong dung môi chiết tăng dần đến bão hòa và làm giảm khả năng chiết

tách các chất. Ngoài ra, hàm lượng saponin giảm dần khi tăng nhiệt độ chiết lên 60°C, 70°C có thể liên quan đến mức độ bay hơi của dung môi [14].

Từ những kết quả thu được, nhiệt độ hợp lý để siêu âm nhằm chiết xuất một số hợp chất có hoạt tính sinh học từ hải sâm là 50°C.

3.2. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến hàm lượng một số hợp chất có hoạt tính sinh học có trong hải sâm

Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến hàm lượng một số hợp chất có hoạt tính sinh học trong hải sâm được biểu diễn ở các biểu đồ Hình 5, Hình 6 và Hình 7.

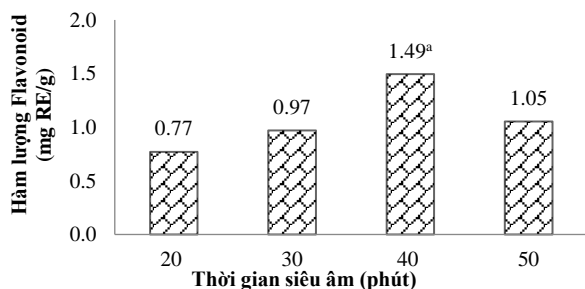


Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng phenolic (mg GAE/g) trong hải sâm

Kết quả ở Hình 5 cho thấy hàm lượng phenolic trong hải sâm cao khi được chiết siêu âm trong khoảng 40 phút (4,96 mg GAE/g chất khô). Khi kéo dài thời gian siêu âm đến 50 phút thì hàm lượng phenolic hầu như không tăng (5,04 mg GAE/g chất khô).

Hàm lượng phenolic tăng dần theo thời gian siêu âm. Theo một vài nghiên cứu cho thấy, thời gian trích ly quá dài sẽ tạo điều kiện cho các phản ứng hóa học xảy ra, một phần phenolic bị oxy hóa, một phần do phản ứng phân hủy nhiệt và phản ứng trùng hợp của các hợp chất phenolic với nhau, làm ảnh hưởng đến chất lượng phenolic thu được. Ngược lại, nếu rút ngắn thời gian trích thì cấu trúc nguyên liệu chưa kịp bị phá vỡ, lượng phenolic chưa được trích hết, làm giảm hiệu suất trích ly.

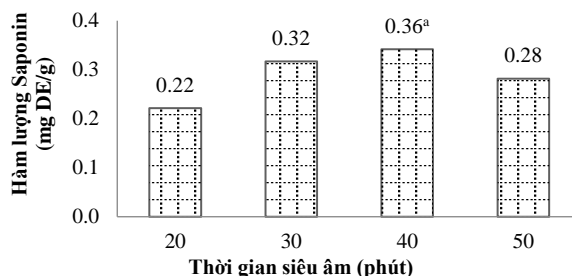
Kết quả ở đồ thị Hình 6 cho thấy, trong cùng một điều kiện, nhưng ở các thời gian chiết khác nhau thì hàm lượng flavonoid toàn phần thu được cũng khác nhau. Thời gian siêu âm cho hàm lượng flavonoid cao nhất là ở 40 phút (1,50mg RE/g chất khô), và thấp nhất ở 20 phút (0,77mg RE/g chất khô). Hàm lượng flavonoid tăng dần từ 20 phút đến 40 phút và giảm ở 50 phút.



Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng flavonoid (mg RE/g) trong hải sâm

Kết quả này có thể giải thích là do thời gian tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi ngắn nên chỉ có những hợp chất hữu cơ có kích thước nhỏ hòa tan vào dung môi. Khi tăng thời

gian siêu âm, các hợp chất có khối lượng phân tử lớn sẽ được trích ly ra khỏi nguyên liệu dưới ảnh hưởng của dung môi phân cực, do đó hàm lượng flavonoid toàn phần thu được cũng tăng lên. Khi đến một giai đoạn nhất định, hàm lượng flavonoid toàn phần hầu như không tăng lên mà có xu hướng giảm xuống. Nguyên nhân của nó có thể là do tác động của cường độ sóng siêu âm trong thời gian dài đã làm cho một số flavonoid toàn phần nhạy cảm với sóng siêu âm bị phân hủy [8]. Mặt khác, nguyên liệu được ngâm trong dung môi một thời gian dài sẽ trương nở làm che lấp các khoảng trống trong nguyên liệu, cản trở khả năng thẩm thấu của dung môi vào nguyên liệu nên hiệu suất chiết flavonoid toàn phần giảm. Điều này chứng tỏ rằng thời gian siêu âm ảnh hưởng đến hàm lượng flavonoid nhiều hơn so với hàm lượng phenolic.



Hình 7. Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng saponin (mg DE/g) trong hải sâm

Kết quả ở Hình 7 cho thấy rằng, ở các thời gian chiết khác nhau thì hàm lượng saponin thu được cũng khác nhau. Thời gian siêu âm cho hàm lượng saponin cao nhất là 40 phút (0,34mg DE/g chất khô), và thấp nhất ở 20 phút (0,22mg DE/g chất khô). Hàm lượng saponin tăng dần từ 20 phút đến 40 phút và giảm ở 50 phút. Điều này có thể giải thích rằng tại thời điểm siêu âm 40 phút là thời điểm hòa tan lượng chất bão hòa nhiều nhất. Tuy nhiên sau đó, các chất trong nguyên liệu hầu như đã được chiết tách và trong thời gian dài có thể bị bay hơi.

Từ những kết quả thu được, thời gian siêu âm hợp lý để chiết xuất một số hợp chất có hoạt tính sinh học từ hải sâm là 40 phút.

3.3. Tối ưu hóa quá trình chiết xuất một số hợp chất có hoạt tính sinh học từ hải sâm

Theo các nghiên cứu khảo sát trước, đã chọn được dung môi thích hợp cho việc chiết xuất một số hợp chất có hoạt tính sinh học từ hải sâm là dung môi methanol:nước (tỉ lệ 3:1) với tỉ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:20 (g/ml) và các điều kiện thí nghiệm, các mức yếu tố được mô tả ở Bảng 1.

Bảng 1. Các mức của yếu tố ảnh hưởng

Các yếu tố ảnh hưởng	Mức các yếu tố				
	Mức * -α	Mức dưới -1	Mức cơ sở 0	Mức trên +1	Mức * +α
x ₁ , Nhiệt độ (°C)	64,14	60	50	40	35,86
x ₂ , Thời gian (phút)	54,14	50	40	30	25,86

Thiết kế trên phần mềm Design expert 7.1, thu được ma trận thực nghiệm và tổ chức thí nghiệm thì thu được kết quả như ở Bảng 2.

Phân tích phương sai ANOVA của mô hình hồi quy bậc hai đối với hàm lượng phenolic, thu được kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 2. Ma trận thực nghiệm và kết quả thí nghiệm (TN)

Thí nghiệm	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	P (mgGAE/g)	F (mg RE/g)	S (mgDEE/g)
1	-α	0	3,41	0,95	0,34
2	+	-	5,52	0,90	0,28
3	0	0	5,01	1,42	0,36
4	0	+α	4,96	0,93	0,26
5	0	0	4,82	1,56	0,34
6	+α	0	4,11	0,89	0,32
7	-	+	3,99	0,74	0,16
8	-	-	4,23	0,74	0,3
9	0	-α	4,64	0,87	0,27
10	+	+	4,09	0,53	0,42
11	0	0	5,05	1,5	0,37

Bảng 3. Bảng phân tích hồi quy giữa hàm lượng phenolic và các điều kiện chiết xuất

Các biến số hồi quy	Các hệ số b	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	Kiểm định ý nghĩa (0,05)
x ₀	4,97				+
x ₁	0,3	0,71	5,48	0,0663	-
x ₂	-0,15	0,19	1,43	0,2849	-
x ₁ x ₂	-0,3	0,35	2,74	0,1588	-
x ₁ ²	-0,56	1,75	13,57	0,0142	+
x ₂ ²	-0,037	7,853.10 ⁻³	0,061	0,8151	-
Lack of Fit		0,22	14,26	0,0662	-

Ghi chú: +: có nghĩa; -: không có nghĩa

Dựa vào các kết quả phân tích ở Bảng 3, tìm được phương trình hồi quy có dạng như sau:

$$Y = 4,96 - 0,56x_1^2 \quad (1)$$

Trong đó: Y: Hàm lượng phenolic (mg GAE/g chất khô); x₁: Nhiệt độ chiết (°C).

Giá trị “Lack of Fit” là 0,0662 > p = 0,05 cho thấy mô hình đã chọn là phù hợp với thực nghiệm khi tiến hành thí nghiệm.

Kết quả phân tích ANOVA và phương trình hồi quy cũng cho thấy nhiệt độ chiết ảnh hưởng tới hàm lượng phenolic thu được, cụ thể là trong khoảng nhiệt độ khảo sát tối ưu, khi nhiệt độ càng cao thì hàm lượng phenolic thu được càng thấp. Điều đó chứng tỏ, phenolic là một hợp chất nhạy cảm với nhiệt. Nhiệt độ cao làm phá vỡ cấu trúc của phenolic, làm giảm hàm lượng phenolic thu được.

Phân tích phương sai ANOVA của mô hình hồi quy bậc hai đối với hàm lượng flavonoid, thu được kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Bảng phân tích hồi quy giữa hàm lượng flavonoid và các điều kiện chiết xuất

Các biến số hồi quy	Các hệ số b	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	Kiểm định ý nghĩa (0,05)
x ₀	1,5				+
x ₁	-0,017	2,273.10 ⁻³	0,11	0,7526	-
x ₂	0,036	0,010	0,50	0,5128	-
x ₁ x ₂	-0,092	0,034	1,67	0,2528	-
x ₁ ²	-0,34	0,62	30,42	0,0027	+
x ₂ ²	-0,35	0,66	32,28	0,0024	+
Lack of Fit		0,031	6,26	0,1409	-

Ghi chú: +: có nghĩa; -: không có nghĩa

Dựa vào kết quả trình bày trong Bảng 4 và kết quả phân

tích của phần mềm Design expert 7.1, đã đưa ra được phương trình hồi quy thể hiện mối liên hệ giữa các đại lượng như sau:

$$Y = 1,5 - 0,0027x_1^2 - 0,024x_2^2 \quad (2)$$

Trong đó: Y: Hàm lượng flavonoid (mg RE/g chất khô); x₁: Nhiệt độ chiết (°C); x₂: Thời gian chiết (phút).

Giá trị “Lack of Fit” là 0,1409 > p = 0,05 thấy mô hình đã chọn là phù hợp với thực nghiệm khi tiến hành thí nghiệm. Hệ số hồi quy (R²) tìm được là 0,91. Kết quả này cho thấy rằng có 91% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán theo mô hình.

Kết quả phân tích ANOVA và phương trình hồi quy cũng cho thấy nhiệt độ chiết và thời gian chiết ảnh hưởng trực tiếp tới hàm lượng flavonoid thu được, cụ thể là khi nhiệt độ và thời gian càng cao thì hàm lượng flavonoid thu được càng ít. Điều đó chứng tỏ, flavonoid cũng là hợp chất dễ bị biến đổi theo thời gian và nhiệt độ.

Phân tích phương sai ANOVA của mô hình hồi quy bậc hai đối với hàm lượng saponin, thu được kết quả được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Bảng phân tích hồi quy giữa hàm lượng saponin và các điều kiện chiết xuất

Các biến số hồi quy	Các hệ số b	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	Kiểm định ý nghĩa (0,05)
x ₀	0,36				+
x ₁	0,026	5,603.10 ⁻³	2,92	0,1483	-
x ₂	-1,768. 10 ⁻³	2,5.10 ⁻⁵	0,013	0,9136	-
x ₁ x ₂	0,07	0,020	10,21	0,0241	+
x ₁ ²	-0,015	1,306.10 ⁻³	0,68	0,4471	-
x ₂ ²	0,048	0,013	6,69	0,0490	+
Lack of Fit		3,045.10 ⁻³	13,05	0,0720	-

Ghi chú: +: có nghĩa; -: không có nghĩa

Kết quả phân tích ANOVA bằng phần mềm Design expert 7.1, cho thấy nhiệt độ chiết (x₁); thời gian chiết (x₂) là các yếu tố ảnh hưởng tới hiệu suất chiết xuất saponin trong hải sâm. Cụ thể, các yếu tố đó được cho là có ý nghĩa ở giá trị p < 0,05 và các hệ số sau khi phân tích hồi quy ANOVA được trình bày ở Bảng 5. Dựa vào kết quả trình bày trong 5 và kết quả phân tích ở phần mềm Design expert 7.1, đã đưa ra được phương trình hồi quy thể hiện mối liên hệ giữa các đại lượng như sau:

$$Y = 0,36 + 0,07x_1x_2 + 0,048x_2^2 \quad (3)$$

Trong đó: Y: Hàm lượng saponin (mg DE/g chất khô); x₁: Nhiệt độ chiết (°C); x₂: Thời gian chiết (phút).

Kết quả phân tích ANOVA và phương trình hồi quy cũng cho thấy nhiệt độ chiết và thời gian chiết hỗ trợ lẫn nhau ảnh hưởng trực tiếp tới hàm lượng saponin thu được, cụ thể là khi nhiệt độ và thời gian càng cao thì hàm lượng saponin thu được càng nhiều.

Để tối ưu hóa hàm lượng ba hợp chất có hoạt tính sinh học từ hải sâm bằng phương pháp siêu âm (cụ thể là điều kiện thời gian và nhiệt độ siêu âm), sử dụng phương pháp hàm kì vọng trên phần mềm quy hoạch thực nghiệm Design expert 7.1. Kết quả đã tìm được điều kiện tối ưu để chiết xuất phenolic, flavonoid và saponin là nhiệt độ 51,90°C; thời gian 38,97 phút và hàm lượng phenolic, flavonoid và saponin thu được lần lượt là 5,02 mg GAE/g; 1,48 mg RE/g; 0,36 mg DE/g.

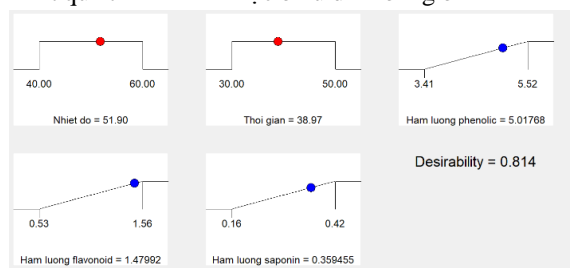
Tiến hành làm thí nghiệm kiểm chứng thì thu được kết quả gần đúng với kết quả dự đoán theo mô hình với hàm lượng phenolic, flavonoid và saponin thu được lần lượt là 5,00 mg GAE/g; 1,46 mg RE/g; 0,37 mg DE/g.

Bảng 6. Bảng kết quả dự đoán theo mô hình và thực nghiệm

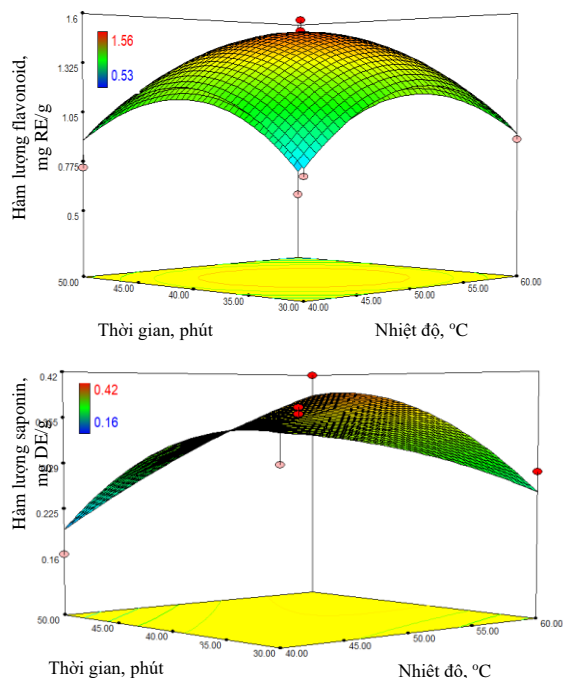
Thông số đo	Đơn vị đo	Dự đoán theo mô hình	Kết quả thực nghiệm
Phenolic	mg GAE/g	5,02	5,00
Flavonoid	mg RE/g	1,48	1,46
Saponin	mg DE/g	0,36	0,37

So sánh với kết quả nghiên cứu của tác giả A.Ceesay và cộng sự hay nhóm tác giả S. Van Dyck, P. Gerbaux, and P. Flammang, hàm lượng một số hợp chất có hoạt tính sinh học của hải sâm trong nghiên cứu này cao hơn hoặc tương đương [7, 15].

Kết quả tối ưu hóa được biểu diễn bằng biểu đồ Hình 8:



Hình 8. Biểu đồ biểu diễn kết quả tối ưu hóa hàm lượng phenolic, flavonoid và saponin từ hải sâm



Hình 9. Đồ thị biểu diễn sự ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian siêu âm đến hàm lượng phenolic, flavonoid và saponin thu được

Các đồ thị ở Hình 9 thể hiện sự ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian siêu âm yếu tố đến hàm lượng phenolic, flavonoid và saponin trong hải sâm.

4. Kết luận

Bài báo đã sử dụng phương pháp qui hoạch thực nghiệm và tính toán kết quả dựa trên phần mềm Design expert (phiên bản 7.1 Trial, Stat-Ease Inc., Minneapolis,

USA) để tìm được các điều kiện tối ưu để chiết xuất một số hợp chất có hoạt tính sinh học từ hải sâm (hàm lượng phenolic, flavonoid và saponin) là nhiệt độ 51,9°C; thời gian 38,97 phút và ở điều kiện này hàm lượng phenolic, flavonoid và saponin thu được từ hải sâm lần lượt là 5,02 mg GAE/g; 1,48 mg RE/g; 0,36 mg DE/g. Kết quả này mở ra cơ hội mới cho việc ứng dụng hải sâm trong lĩnh vực sản xuất thực phẩm chức năng và y dược.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đào Tấn Hồ, "Đặc điểm hình thái các loài hải sâm có giá trị thương mại ở biển Việt Nam", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển*, 2, 2006, 70-89.
- [2] Châu Văn Minh*, Nguyễn Xuân Cường, Nguyễn Hải Đăng, Nguyễn Phương Thảo, Trần Hồng Quang, Nguyễn Hữu Tùng, Nguyễn Hoài Nam, Nguyễn Văn Hùng, Phan Văn Kiệm, "Điểm lại một số loài sinh vật biển Việt Nam trong giai đoạn 2006-2012", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50 (6), 2012, 825-837.
- [3] R. Pangestuti, Z. Arifin, "Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers", *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(3), 2007, 1-11.
- [4] M-S. Lee, JY-W. Chan, S-K. Kong, B. Yu, VO. Eng-Choon, HW. Nai-Ching, K-P. Fung, "Effects of polyphyllin D, a steroidal saponin in Paris polyphylla, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft", *Cancer biology & therapy*, 4(11), 2005, 1248-1254.
- [5] J. Mamelona, E. Pelletier, K. Girard-Lalancette, J. Legault, S. Karboune, S. Kermasha, "Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*", *Food Chemistry*, 104, 2007, 1040-1047.
- [6] Z. Mojerlou, A. Elhamirad, Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of phenolic compounds from olive cake, *J Food Sci Technol*, 55(3), 2018, 977-984.
- [7] K.H. Dewi, M. Markom, R.W.W. Daud, "Parameter Optimization in the Extraction of Sea Cucumber (*Holothuria Scabra J*) as a Source of Testosterone", *Advanced Material Research*, Vols 233-235, 1358-1362.
- [8] A. Hossain, J. Yeo, D. Dave and F. Shahidi, (2022), "Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Sea Cucumber (*Cucumaria frondosa*) Processing Discards as Affected by High-Pressure Processing (HPP)", *Antioxidants*, 11, 337. <https://doi.org/10.3390/antiox11020337>
- [9] A. Ceesay, M.N. Shamsudin, M. Aliyu-Paiko, I.S. Ismail, M. F.Nazarudin, and N.M. Alipiah, "Extraction and Characterization of Organ Components of the Malaysian Sea Cucumber *Holothuria leucospilota* Yielded Bioactives Exhibiting Diverse Properties", *BioMed Research International*, Volume 2019, Article ID 2640684, 2019, 1-16, <https://doi.org/10.1155/2019/2640684>.
- [10] J. Mamelona, E. Pelletier, K. Girard-Lalancette, J. Legault, S. Karboune, and S. Kermasha, "Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*", *Food Chemistry*, 104 (3), 2007, 1040-1047.
- [11] J. Zhishen, T. Mengcheng, and W. Jianming, "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals", *Food Chemistry*, 64 (4), 1999, 555-559.
- [12] H. P. S. Makkar and K. Becker, "Potential of *J. curcas* meal as a protein supplement to livestock feed, constraints to its utilization and possible strategies to overcome constraints", *Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas**, G. M. Gubitza, M. Mittelbach, and M. Trabi, Eds., 1997, 190-205.
- [13] T. Sirichan, I. Kijpatanasilp, N. Asadatorn, K. Assatarakul, "Optimization of ultrasound extraction of functional compound from makiang seed by response surface methodology and antimicrobial activity of optimized extract with its application in orange juice", *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 83, 2022, 105916.
- [14] S. Van Dyck, P. Gerbaux, and P. Flammang, "Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian ocean", *Marine Drugs*, 8(1), 2010, 173-189.
- [15] A.Ceesay, M. N. Shamsudin, M. Aliyu-Paiko, I.S. Ismail, M.F. Nazarudin and N. M. Alipiah, "Extraction and Characterization of Organ Components of the Malaysian Sea Cucumber *Holothuria leucospilota* Yielded Bioactives Exhibiting Diverse Properties", *BioMed Research International*, Volume 2019, Article ID 2640684, 16 pages <https://doi.org/10.1155/2019/2640684>