

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG THỦY PHÂN LÁ CHÈ XANH BẰNG ENZYME VÀ ỨNG DỤNG ĐỂ CHIẾT TÁCH POLYPHENOL

EFFECTS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS ON ISOLATION YIELD OF POLYPHENOL FROM VIETNAM GREEN TEA (*CAMELLIA SINENSIS*) LEAVES

Lành Thị Ngọc^{1,*}, Phạm Thị Ngọc Mai¹, Nguyễn Quang Tùng²,
Đào Thị Kim Dung³, Đỗ Thị Thanh Trung³, Trần Quốc Toàn³

TÓM TẮT

Nâng cao hiệu quả chiết suất polyphenol từ nguyên liệu chè loại F bằng phương án sử dụng enzyme laccase thô tách từ canh trường nuôi cấy nấm *G. Lucidum* được khảo sát và so sánh với phương pháp chiết nước truyền thống không sử dụng enzyme. Kết quả cho thấy việc xử lý nguyên liệu có sự hỗ trợ của enzyme làm tăng hiệu suất thu hồi polyphenol và không ảnh hưởng tới thành phần có hoạt tính sinh học tốt nhất là EGCG. Kết quả cho thấy, ở điều kiện tối ưu, hiệu suất thu hồi polyphenol khi sử dụng enzyme hỗ trợ tăng > 10%.

Từ khóa: Chiết xuất có enzyme hỗ trợ, polyphenol từ chè xanh, EGCG, laccase.

ABSTRACT

Enzyme Laccase obtained from *Ganoderma Lucidum* mushroom farm is used for enzymatic hydrolysis of waste green tea (*Camellia Sinensis*) leaves. Amount of polyphenol isolated from products of enzymatic hydrolysis was compared with amount of polyphenol isolated from without-enzyme hydrolysis products. Results showed that enzymatic hydrolysis of materials increased isolation yield of polyphenol more than 10% compare to without-enzyme hydrolysis. Moreover, enzymatic hydrolysis did not affect EGCG which is well-known as a high value bioactive compound in *Camellia Sinensis*.

Keywords: Enzyme assisted extraction, polyphenol from green tea leaves, EGCG, laccase.

¹Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên

²Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

³Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

*Email: lanhthingoc@tuaf.edu.vn

Ngày nhận bài: 03/01/2018

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 12/04/2018

Ngày chấp nhận đăng: 25/04/2018

1. MỞ ĐẦU

Việc sử dụng enzyme để nâng cao hiệu quả của quá trình chiết xuất các thành phần có giá trị trong các sản phẩm thiên nhiên được giới chuyên môn ngày nay gọi là kỹ thuật chiết xuất có enzyme hỗ trợ (enzyme-assisted extraction method). Kỹ thuật này sử dụng một số loại enzyme có khả năng chia cắt đặc hiệu các thành phần cấu trúc bao quanh các tế bào thực vật, làm cho quá trình tiếp

xúc giữa dung môi và chất chiết trở nên dễ dàng hơn. Trước đây kỹ thuật này được coi là bí quyết công nghệ và thường được các nhà sản xuất giấu kín, vì thế không thể phát huy hết hiệu quả nó. Ngày nay, các nguyên lý cơ bản của kỹ thuật này hầu hết đã được khoa học làm sáng tỏ, vì thế phạm vi ứng dụng của nó ngày càng được mở rộng. Kỹ thuật chiết xuất có enzyme hỗ trợ trở thành một trong những công cụ quan trọng của hóa học xanh, cho phép tạo ra các công nghệ mới sử dụng các hóa chất thân thiện với môi trường, tiết kiệm về năng lượng và chi phí [1,2,3].

Từ xưa đến nay, chè một loại thức uống quen thuộc đối với mọi người, đặc biệt là đối với người Á Đông. Chè được sử dụng trên toàn thế giới và được xem là một loại thức uống mang tính toàn cầu. Bên cạnh chức năng giải khát, chè có tác dụng sinh lý rất rõ rệt đối với sức khỏe con người. Nhóm các hợp chất polyphenol là thành phần được quan tâm nhiều nhất trong lá chè. Các hợp chất polyphenol của lá chè rất khác với các hợp chất polyphenol được tìm thấy trong các loại cây khác. Các cấu tử chính chiếm đa số là các catechin (C, EC, EGCG, EGC, ECG,...). Cho đến nay, với hoạt tính chống oxy hóa mạnh, các hợp chất catechin trong chè xanh đã được sử dụng trong mỹ phẩm và thực phẩm chức năng. Thành phần catechin chủ yếu Epigallocatechin gallat (EGCG) cũng là chất có hoạt tính mạnh nhất. Hiện nay các công ty dược phẩm trên thế giới đã tách riêng EGCG, đăng ký và thương mại hóa thành một dược chất có tác dụng như tác nhân đơn [4].

Bài báo trình bày nghiên cứu chiết xuất chế phẩm polyphenol giàu EGCG với sự hỗ trợ của enzyme laccase.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu sử dụng nghiên cứu là mẫu chè loại F, trồng tại Tân Cương - Thái Nguyên. Một số chỉ tiêu chất lượng được xác định: Độ ẩm 9,5%; Hàm lượng polyphenol tổng 15,4% và hàm lượng EGCG trong tổng polyphenol 47,89%.

2.2. Enzyme

Enzyme laccase thô: tách từ dịch nuôi cấy nấm linh chi *Ganoderma lucidum* (giống cấp 2 do Viện Di truyền nông nghiệp cung cấp). Giống nấm được hoạt hóa trở lại trên

môi trường PDA và giữ giống trong ống thạch nghiêng ở 4-8°C. Để sản sinh enzyme laccase thô, *G. lucidum* được nuôi cấy trong canh trường PDA lỏng có bổ sung chất cảm ứng ABTS 0,1% (2,2 azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Dịch enzyme laccase thô thu được sau quá trình lọc và ly tâm sẽ được xác định hoạt độ enzyme là 185 UI/ml dựa vào ABTS ở bước sóng 420 nm [5,6].

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp định lượng polyphenol tổng: phương pháp Lowenthal.

2.3.2. Phân tích hàm lượng EGCG

EGCG được phân tích định tính và định lượng bằng hệ thống HPLC Alliance series 2695, detector PDA 2996 của hãng Waters - Mỹ, tại Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Điều kiện phân tích:

- Cột tách: Sunfire -C18 RP (4.6 x 150 mm), 5µm;
- Pha động: Kênh A: H₂O + 0,1% axit fomic; Kênh B: Methanol
- Tốc độ dòng 1 ml/phút, chạy gradient từ 100/0; 85/15; 50/50; 30/70 đến 0/100 (v/v)
- Detector PDA: bước sóng 273 nm
- Chất chuẩn: EGCG của hãng Sigma (≥ 98%)
- Thể tích tiêm 5µl
- EGCG chuẩn (Merck) được cân chính xác 25 mg cho vào bình định mức (25 ml) sau đó thêm MeOH cho đến vạch ta được dung dịch gốc. Pha loãng dung dịch gốc thành các dung dịch có nồng độ 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; và 1,0 mg/ml, sau đó chạy lần lượt các dung dịch có nồng độ trên qua hệ thống HPLC với cột phân tích: Sunfire -C18 RP (4.6 x 150 mm), 5µm
- Các nồng độ EGCG chuẩn 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; và 1,0 mg/ml đã được đo lặp lại 3 lần, kết quả thu được có sự ổn định rất cao về giá trị tích phân (diện tích pic) và thời gian lưu (RT)
- Các mẫu nghiên cứu cũng được phân tích với cùng điều kiện như mẫu chuẩn.

2.3.3. Phương pháp xác định hàm lượng đường khử

Hàm lượng đường khử tổng số trong phần chất lỏng trước và sau khi xử lý enzyme được đo ở 540 nm bằng thuốc thử 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) sử dụng glucose làm đường chuẩn (Ghosh, 1987, Miller, 1959) [7]. Hàm lượng đường khử được qui về đơn vị glucose tự do.

2.3.4. Phương pháp xử lý nguyên liệu bằng enzyme

100 g mẫu bột chè được xử lý bằng cách ngâm với nước (0,5-1 lít) trong 30 phút rồi cho vào bình phản ứng dung tích 2 lít có khuấy, điều chỉnh đến pH = 5 bằng dung dịch đệm citrat. Tiếp theo thêm vào enzyme laccase thô từ dịch lọc môi trường nuôi cấy *G. Lucidum*. Bình phản ứng được ủ trong bể ổn nhiệt ở 50°C trong khoảng thời gian từ 0 - 12h, tốc độ khuấy 90 - 120 vòng/ phút. Sau khi kết thúc quá trình xử lý, một phần sản phẩm được ly tâm ở 6000 vòng/ phút. Tách riêng phần chất lỏng để xác định đường khử. Phần chất rắn được gom lại cùng hỗn hợp thủy phân để tiếp tục chiết xuất polyphenol tương tự như phương pháp

chiết xuất polyphenol mục 2.3.5 [8]. Các thông số chiết xuất pH = 3; tỉ lệ nước/nguyên liệu chè = 10/1; nhiệt độ 85°C; theo dõi thời gian chiết xuất.

2.3.5. Phương pháp chiết xuất polyphenol

Nghiên cứu này sử dụng quy trình chiết xuất polyphenol theo phương pháp chiết nước được Trần Bạch Dương & cs thực hiện tại Viện Hóa Công nghiệp [9].

Chè vụn được nghiền nhỏ đến dưới rây 1,5mm sau đó nạp vào bình chiết. Sử dụng dung dịch axit citric có pH = 3 (dung dịch/nguyên liệu chè = 10/1; l/kg). Gia nhiệt đến 85°C và duy trì khuấy liên tục trong 4 giờ ở nhiệt độ này. Sau 4 giờ, dịch chiết được để nguội xuống nhiệt độ phòng, lọc thu riêng phần dịch nước và phần bã.

Dịch lọc được chiết phân bố cùng với diclometan (v/v = 2/1; 3 lần), thu riêng phần dịch nước và phần dịch diclometan. Sau cùng, dịch nước được chiết lặp lại với ethyl acetate (v/v = 2/1; 3 lần). Dịch chiết ethyl acetate được gộp lại, làm khan bằng Na₂SO₄ khan rồi cô chân không màng mỏng để thu nhận "polyphenol tổng" và thu hồi ethyl acetate.

Hiệu suất so với nguyên liệu:

$$H_1 = \frac{\text{khối lượng polyphenol tổng thu được}}{\text{khối lượng nguyên liệu ban đầu}}$$

Hiệu suất so với lý thuyết: H₂ = H1/15,4

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của việc xử lý enzyme đến hiệu suất thu hồi polyphenol

Trước khi tiến hành chiết xuất polyphenol tổng, mẫu được xử lý riêng rẽ với enzyme laccase. Mẫu đối chứng không sử dụng enzyme cũng được làm song song.

Tác động của các hệ enzyme đến quá trình chiết xuất polyphenol được đánh giá qua sự biến đổi của hiệu suất, thời gian chưng cất và thành phần hóa học của sản phẩm polyphenol tổng.

Các kết quả thu được về tác động của các phương án xử lý nguyên liệu đến hiệu suất được trình bày trên bảng 1.

Bảng 1. Các thông số của quá trình xử lý nguyên liệu bằng enzyme và hiệu suất chiết xuất polyphenol

STT	Hệ enzyme (enzyme / cơ chất; thời gian; nhiệt độ) (pH = 5-6)	Đường khử (µg/ml)	Polyphenol tổng (%)
1	Không có enzyme	0	12,88
2	Laccase thô (0,75%; 3,5h; 40°C)	79,12	14,21
3	Laccase thô (2%; 3h; 50°C)	56,59	13,24
4	Laccase thô (2%; 3h; 40°C)	67,46	13,82
5	Laccase thô (0,75%; 3h; 40°C)	75,78	14,09
6	Laccase thô (0,75%; 4h; 40°C)	82,88	14,66

Quá trình tiến xử lý nguyên liệu chè bằng enzyme làm tăng đáng kể hiệu suất thu hồi polyphenol tổng so với mẫu đối chứng không xử lý enzyme. Sự gia tăng của hiệu suất thu hồi polyphenol tổng có tương quan tỉ lệ thuận với sự gia tăng của hàm lượng đường khử trong dung dịch phản ứng.

Để tìm điều kiện thủy phân trà cho hiệu quả cao nhất, tiến hành khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng, cụ thể là: lượng nước bổ sung/ cơ chất (1 - 10), nhiệt độ (30 - 80°C), pH (3 - 8), tỷ lệ enzyme/cơ chất (10 - 100 UI/g cơ chất) và thời gian ủ enzyme đến hàm lượng đường khử sinh ra cao nhất. Kết quả thu được như trong bảng 2 ÷ 6.

Bảng 2. Ảnh hưởng tỉ lệ nguyên liệu/ nước tới nồng độ đường khử (Điều kiện: tỉ lệ enzyme 2%; 3h; 50°C; pH = 5-6)

Tỷ lệ	Nồng độ đường khử
1:1-1:5	Không đo được
1:6	68,382
1:7	64,277
1:8	57,977
1:9	56,590
1:10	46,012

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới quá trình thủy phân (Điều kiện: tỉ lệ enzyme 2%; 3h; nguyên liệu/nước = 1/9; pH = 5-6)

Nhiệt độ (°C)	Nồng độ đường khử
ĐC (Không E)	50,69
30	52,77
40	83,01
50	61,16
60	55,61

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH tới quá trình thủy phân (Điều kiện: tỉ lệ enzyme 2%; 3h; nguyên liệu/nước = 1/9; 40°C)

pH	Nồng độ đường khử
ĐC (Không E)	50,69
4	60,69
5	66,91
6	67,46
7	65,20
8	54,16
9	58,15

Bảng 5. Ảnh hưởng nồng độ enzyme tới khả năng thủy phân (Điều kiện: pH = 5-6; 3h; nguyên liệu/nước = 1/9; 40°C)

E/Cơ chất (%)	Nồng độ đường khử
0	59,02
0,25	64,19
0,5	64,13
0,75	75,78
1,0	69,88
1,25	71,62
1,5	63,38

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian tới khả năng thủy phân (Điều kiện: pH = 5-6; Tỉ lệ enzyme 0,75%; nguyên liệu/nước = 1/9; 40°C)

Thời gian	Nồng độ đường khử
0h	40,78
1h	61,68

2h	68,87
3h	76,68
4h	82,88
5h	73,27
6h	72,83
7h	68,58

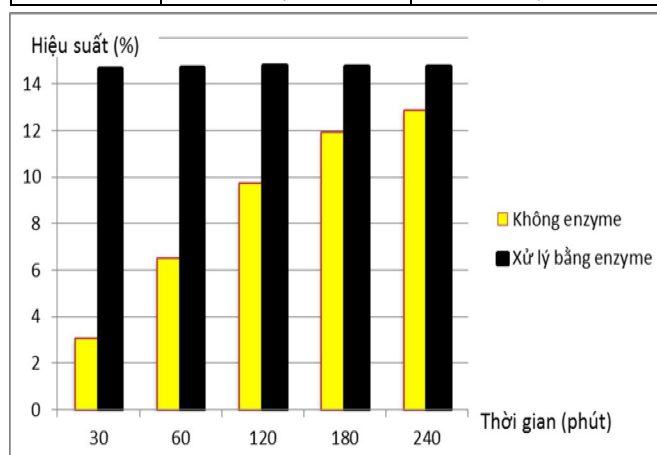
Kết quả đã xác định các điều kiện thủy phân là: lượng nước bổ sung 9/1 (nước/ cơ chất; V/m); nhiệt độ 50°C, pH = 5-6, nồng độ enzyme laccase là 0,75% (tương đương 70UI/g cơ chất) và sau 4h thủy phân cho hàm lượng đường khử sinh ra là lớn nhất (82,88 µg/ml).

3.2. Ảnh hưởng của việc xử lý enzyme đến thời gian chiết xuất polyphenol.

Hỗn hợp sau thủy phân đã tối ưu hóa được bổ sung nước và axit citric để đảm bảo tỉ lệ nước/ nguyên liệu là 10/1 và pH = 3, từ từ nâng nhiệt độ lên 85°C theo đúng quy trình chiết xuất polyphenol. Khảo sát lượng polyphenol thu được theo thời gian chiết xuất và so sánh với đối chứng

Bảng 7. Ảnh hưởng của xử lý nguyên liệu bằng enzyme tới thời gian chiết xuất polyphenol

Thời gian (phút)	Polyphenol tổng	
	Không có enzyme	Đã xử lý enzyme
30	3,05	14,66
60	6,51	14,72
120	9,73	14,78
180	11,92	14,76
240	12,88	14,75



Hình 1. Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của xử lý nguyên liệu bằng enzyme tới thời gian chiết xuất polyphenol

Từ bảng 7 và hình 1 cho thấy, quá trình tiền xử lý enzyme đã nâng cao hiệu quả rõ rệt quá trình chiết xuất polyphenol từ trà xanh. Theo quy trình chiết nước thông thường, phải sau 4h lượng polyphenol chiết xuất mới đạt cực đại và hiệu suất của quá trình so với lượng polyphenol lý thuyết là 83,63%. Với quy trình tiền xử lý với enzyme, chỉ sau 30 phút tiến hành chiết xuất đã thu được lượng polyphenol so với nguyên liệu là 14,66% (hiệu suất 95,19%

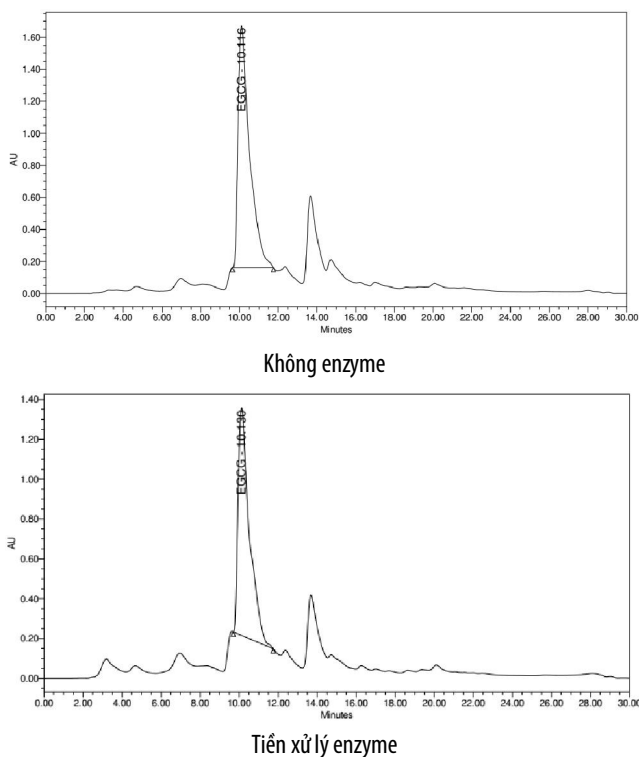
so với lượng polyphenol lý thuyết) lớn hơn rất nhiều so với quy trình không xử lý enzyme.

Khi kéo dài thời gian chiết xuất với nguyên liệu đã xử lý enzyme không giúp tăng cao rõ rệt hiệu quả chiết xuất polyphenol. Chúng tôi cho rằng, quá trình sử dụng enzyme ở giai đoạn tiền xử lý nguyên liệu đã phá vỡ tốt các tế bào, do đó giải phóng các polyphenol thành dạng tự do, quá trình điều chỉnh pH và nâng nhiệt độ chỉ giúp hòa tan tốt các polyphenol này vào môi trường nước. Vì vậy, so với quá trình không xử lý enzyme, ảnh hưởng của thời gian tới quá trình chiết xuất là không đáng kể.

3.3. Đánh giá chất lượng polyphenol thu được theo phương pháp enzyme

Chất lượng polyphenol thu được theo phương pháp sử dụng enzyme được đánh giá thông qua thành phần epigallocatechingalat (EGCG) là thành phần có hoạt tính sinh học tốt nhất và dễ bị biến đổi nhất trong quá trình chế biến. Hàm lượng EGCG được xác định theo phương pháp HPLC (hình 2).

Kết quả cho thấy, với mẫu không sử dụng enzyme đã xác định hàm lượng EGCG trong polyphenol tổng là 42,66% và với mẫu sử dụng enzyme là 42,31%.



Hình 2. Sắc ký đồ HPLC xác định hàm lượng EGCG của các mẫu polyphenol tổng

Như vậy, có thể nhận thấy quá trình tiền xử lý nguyên liệu bằng enzyme laccase không làm ảnh hưởng nhiều đến hàm lượng EGCG.

4. KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy việc tiền xử lý nguyên liệu chè xanh bằng enzyme laccase làm tăng

đáng kể hiệu suất thu hồi polyphenol (hiệu suất > 95% so với 83,63% khi không sử dụng enzyme). Đồng thời, quá trình sử dụng enzyme không làm biến đổi chất lượng EGCG - thành phần nhạy cảm và có hoạt tính tốt nhất trong các polyphenol từ chè xanh.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí từ đề tài "Nghiên cứu công nghệ sản xuất thực phẩm chức năng từ cây chè". **Mã số: TĐH 2017-01.**

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Munish Puri, Deepika Sharma and Colin J. Barrow, 2012. *Enzyme assisted extraction of bioactives from plants*. Trends in Biotechnology, Vol. 30, No. 1, 37-44.
- [2]. F. Chemat and M. Abert Vian (eds.), 2014. *Alternative Solvents for Natural Products Extraction*. Green Chemistry and Sustainable Technology, Springer Verlag, 324 pages.
- [3]. Farid Chemat, Jochen Strube, 2015. *Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice*. John Wiley & Sons, 384 pages.
- [4]. Trần Văn Sung & cs, Tạp chí Khoa học và Công nghệ (2007), 45 (1B), 450.
- [5]. Dương Minh Lam, Trương Thị Chiên, 2013. *Nghiên cứu một số đặc tính sinh học của chủng nấm đấm Trametes maxima CPB30 sinh laccase ứng dụng trong xử lý màu nước ô nhiễm do thuốc nhuộm*. Tạp chí sinh học, 35(4), 477-483.
- [6]. Zhongyang Ding, Lin Peng, Youzhi Chen, Liang Zhang, ZhenghuaGu, Guiyang Shi and Kechang Zhang, 2012. *Production and characterization of thermostable laccase from the mushroom, Ganoderma lucidum, using submerged fermentation*. African Journal of Microbiology Research, Vol. 6 (6), 1147-1157.
- [7]. Miller G. L., 1959. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Anal. Chem. 3, 426-428.
- [8]. Hoàng Thị Bích & cs, 2016. *Investigation of inenzyme treatments to assist extraction of essential oil from the leaves and branches of Cinamomum cassia collected in Yen Bai province*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Tập 54 (2C), 479-485.
- [9]. Trần Bạch Dương & cs, 2014. *Xây dựng và thử nghiệm quy trình công nghệ sản xuất nguyên liệu dược phẩm epigallocatechin gallat (EGCG) từ chè xanh*. Báo cáo tổng kết, Mã số CNHD.ĐT.028/11-12.