ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

NGUYỄN THỊ QUY

NGHIÊN CỨU KỸ THUẬT TÁCH CHIẾT SILUMARIN TỪ HẠT KẾ SỮA VÀ AXIT AMIN TỪ ĐẬU TƯƠNG LÀM NGUYÊN LIỆU CHO THỰC PHẨM CHỨC NĂNG TĂNG CƯỜNG CHỨC NĂNG GAN

Ngành: Sinh học

2015

LỜI CẢM ƠN

Để có thể hoàn thành luận văn thạc sĩ một cách hoàn chỉnh, bên cạnh sự nỗ lực cố gắng của bản thân còn có sự hướng dẫn nhiệt tình của quý Thầy Cô, cũng như sự động viên ủng hộ của gia đình và bạn bè trong suốt thời gian học tập nghiên cứu và thực hiện luận văn thạc sĩ.

Xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS.TS. Phạm Việt Cường- Phòng Công nghệ sinh học - Viện Hóa sinh Biển, người đã hết lòng giúp đỡ và tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi hoàn thành luận văn này.

Đồng thời, tôi xin được gửi lời cảm ơn tới TS. Lê Thị Hồng Minh cùng các anh chị em trong phòng Công nghệ sinh học - Viện Hóa sinh Biển đã tận tình giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu để hoàn thành đề tài luận văn.

Xin chân thành biết ơn đến toàn thể quý Thầy Cô trong bộ môn Vi sinh vật học đã tận tình truyền đạt những kiến thức quý báu cũng như tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt quá trình học tập nghiên cứu và cho đến khi thực hiện đề tài luận văn.

Cuối cùng xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình, bạn bè, những người đã không ngừng động viên, hỗ trợ và tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt thời gian học tập và thực hiện luận văn.

Hà Nội, Ngày 21 tháng11năm 2014

Học viên

Nguyễn Thị Quy

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT 4
DANH MỤC CÁC BẢNG 5
DANH MỤC HÌNH ẢNH 6
MỞ ĐẦU 7
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN 9
1.1. Tổng quan về silymarin 9
1.1.1. Cây kế sữa 9
1.1.2. Thành phần hóa học của quả kế sũa 9
1.1.3. Đặc điểm và tính chất của flavonoid 10
1.1.4. Tác dụng sinh học của cây kế sữa. 14
1.1.4.1. Sơ lược về lịch sử sử dụng cây kế sữa làm thuốc. 14
1.1.4.2. Tác dụng dược lý của silymarin và ứng dụng 15
1.1.5. Một số nghiên cứu về tách chiết silymarin 18
1.1.6. Những thành tựu trong nghiên cứu chế phẩm silymarin 18
1.2. Tổng quan về protein đậu tương 20
1.2.1. Cây đậu tương 20
1.2.2. Thành phần hóa học trong quả đậu tương 20
1.2.3. Protein đậu tương 21
1.2.3.1. Thành phần Protein đậu tương 21
1.2.3.2. Tính chất của Protein đậu tương 21
1.2.4. Tác dụng dược lý của Protein hydrolysate đậu tương 23
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠN PHÁP 26
2.1. Vật liệu 26
2.1.1. Nguyên liệu 26
2.1.2. Hoá chất và thiết bị 26
2.2. Phương pháp 27

2.2.1. Phương pháp chiết silymarinbằng dung môi hữu cơ 27
2.2.2. Phương pháp Sắc ký HPLC 28
2.2.3. Phương pháp xác định hàm lượng nhóm amin tự do 29
2.2.4. Phương pháp xác định hàm lượng axit amin tự do 29
2.2.5. Xác định độ độc và hoạt tính của chế phẩm 29
2.2.5.1. Nghiên cứu tác dụng sinh học 29
2.2.5.2. Thử độc tính cấp 30
2.2.5.3. Thử tác dụng bảo vệ gan 30
2.2.5.4. Thử tác dụng lợi mật 31
2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu 32
CHƯƠNG 3 : KẾT QUẢ 33
3.1. Xây dựng quy trình chiết xuất silymarin 33
3.1.1. Nghiên cứu khảo sát dung môi để chiết xuất silymarin 33
3.1.2. Kết quả sắc kí HPLC 37
3.2. Nghiên cứu khả năng thủy phân protein bằng chế phẩm enzyme 39
3.3. Nghiên cứu quy trình thủy phân thu nhận axit amin tự do từ protein đậu tương 42
3.4. Một số đặc tính sinh học của chế phẩm chứa sylimarin 47
3.4.1. Xác định độc tính cấp 48
3.4.2. Tác dụng bảo vệ gan 49
3.4.3. Tác dụng lợi mật 52
3.4.3.1. Tác dụng trên lưu lượng mật 53
3.4.3.2. Tác dụng trên hàm lượng cắn khô và bilirubin trong dịch mật 54
CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 56
4.1. Kết luận 56
4.2. Kiến nghị 56
TÀI LIỆU THAM KHẢO 57

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

ADN	Acid Deoxyribo Nucleic
ARN	Acid Ribonucleic
ALT	Alanine Aminotransaminase
AST	Aspartate Aminotransaminase
CCI_4	Cacbon Tetrachlorid
EtOH	Ethanol
MeOH	Methanol
NaCl	Muối Natriclorua
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphat- Chất truyền tin
TFN-α	Tumor Necrosis Factor- Chất trung gian chính của phản ứng viêm cấp
LD50	Lethal Dose- Liều lượng gây ra cái chết 50% của một nhóm động vật dùng thử nghiệm
HPLC	Sắc kí lỏng hiệu năng cao
SKLM	Sắc kí lớp mỏng
Cs	Cộng sự
CN	Công nguyên
TPCN	Thực phẩm chức năng
WHO	World Health Organization- Tổ chức y tế thế giới
UV	Ultravioler- Phổ tử ngoại

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Kết quả khảo sát dung môi để chiết xuất silymarin 34
Bảng 3.2. Kết quả chiết xuất silymarin bằng các phương pháp khác nhau ... 35
Bảng 3.3: Hàm lượng axit amin trong các dịch thủy phân 39
Bảng 3.4: ảnh hưởng của thời gian thủy phân bột đậu tương bằng protease lên hàm lượng amin tự do 44
Bảng 3.5: Kết quả kiểm tra lượng amin tự do ở bước 3 44
Bảng 3.6: Hàm lượng axit amin tự do của dịch thủy phân đậu tương..... 45
Bảng 3.7: Hàm lượng axit amin tự do của dịch thủy phân đậu tương sau cô đặc 46
Bảng 3.8: Liều uống chế phẩm silymarin trong các lô chuột thực nghiệm thử độc tính cấp 48
Bảng 3.9: Tác dụng của chế phẩm silymarin trên hoạt độ enzym ALT huyết thanh chuột thực nghiệm 51
Bảng 3.10: Tác dụng của chế phẩm silymarin trên bilirubin huyết thanh chuột thực nghiệm. 52
Bảng 3.11: Lưu lượng mật ở các lô chuột thí nghiệm 53
Bảng 3.12: Hàm lượng cắn khô trong dịch mật của chuột thực nghiệm 54
Bảng 3.13: Hàm lượng bilirubin trong dịch mật của chuột thực nghiệm 54

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1: Một số chất chính trong silymarin.....10

Hình 3.1: Sơ đồ quy trình chiết suất silymarin quy mô phòng thí nghiệm.....37

Hình 3.2: Sắc ký đồ mẫu silymarinthu được sau khi tách chiết theo quy trình ở quy mô phòng thí nghiệm.....38

Hình 3.3: Sắc ký đồ mẫu silybin chuẩn.....38

Hình 3.4:Sơ đồ thủy phân protein đậu tương.....40

Hình 3.5: Sơ đồ quy trình thủy phân protein đậu tương.....44

MỞ ĐẦU

Việc dùng thuốc có nguồn gốc từ thảo dược hoặc phối hợp sử dụng thuốc đông dược và tân dược hiện đang được cộng đồng rất coi trọng. Do các loại thuốc thảo dược và sự kết hợp đông –tây y không những chữa được bệnh mà ít có tác dụng phụ. Vì vậy, thuốc có nguồn gốc thảo dược, đặc biệt là những cây thuốc đã được dùng rộng rãi theo kinh nghiệm cổ truyền để chữa bệnh được các nhà khoa học trên thế giới và Việt Nam quan tâm nghiên cứu.

Gan là một trong những cơ quan quan trọng về mặt chuyển hóa các chất của cơ thể con người. Một trong những chức năng quan trọng của gan là tham gia vào quá trình giải độc các chất nội sinh và ngoại sinh. Trong các trường hợp bệnh lý hay sự quá tải các chất độc trong gan, các tế bào gan sẽ bị hủy hoại, dẫn đến các tổn thương trên gan, dần dần làm các tổn thương không hồi phục làm cho gan bị xơ, và mất chức năng giải độc. Bệnh gan là một trong những bệnh phổ biến trong cộng đồng. Có nhiều loại bệnh gan trong đó thường gặp là viêm gan siêu vi, đó là một trong những bệnh truyền nhiễm phổ biến nhất trên thế giới, ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng trong thập niên này. Hiện có 6 loại virus gây viêm gan : A, B, C, D, E và G, trong đó phổ biến và nguy hiểm nhất là siêu vi B và C. Khoảng 2 tỷ người trên thế giới đã hoặc đang nhiễm virus viêm gan B, tập trung chủ yếu ở châu Á và châu Phi. Theo báo cáo của tổ chức y tế thế giới, viêm gan B là một trong mười nguyên nhân gây tử vong nhiều nhất, khoảng 1 triệu ca tử vong mỗi năm do bệnh này và hơn 350 triệu người mang virus này mãn tính. Có khoảng 3% dân số thế giới nhiễm virus viêm gan C và trên 170 triệu người mang virus này mãn tính. Việt Nam là một trong những nước có tỷ lệ viêm gan B cao nhất trên thế giới. Người bị viêm gan mạn tính có nguy cơ ung thư gan cao gấp 20 lần so với người bình thường và 40% trong số họ sẽ tử vong vì ung thư gan [62], [63].

Đã có những bằng chứng cho thấy silymarin trong cây kế sữa có tác dụng chữa bệnh xơ gan do rượu. Một trong những hoạt tính triển vọng của silymarin là chống ung thư, vì vậy có thể sử dụng silymarin kết hợp với phương pháp hóa trị liệu. Silymarin hoạt động như chất chống oxy hóa, bảo vệ mô và loại bỏ chất gây độc cho gan [5], [10].

Protein đậu tương được sử dụng rộng rãi như một thành phần chức năng trong rất nhiều loại thực phẩm chế biến bởi khả năng tạo gel và các tính chất hóa lý, cảm quan và dinh dưỡng cao. Việc thủy phân protein các hạt họ đậu cải thiện các đặc tính dinh dưỡng của chúng như làm chậm quá trình hư hỏng, cải thiện cấu trúc, tăng hoặc giảm độ hòa tan, ngăn cản những tương tác không mong muốn, loại mùi khó chịu và các thành phần độc. [27], [57].

Vì vậy, để có thể sản xuất một số loại sản phẩm tăng cường chức năng gan cũng như hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan đến gan tại Việt Nam, thay thế các sản phẩm nhập ngoại, chính là cơ sở để chúng tôi thực hiện đề tài: "Nghiên cứu kỹ thuật tách chiết silymarin từ hạt kế sữa và axit amin từ đậu tương làm nguyên liệu cho thực phẩm chức năng tăng cường chức năng gan."

Mục tiêu của đề tài

1. Nghiên cứu quy trình tách chiết Sylimarin từ hạt kế sữa.
2. Nghiên cứu quy trình thuỷ phân thu nhận axit amin tự do từ đậu tương

Nội dung nghiên cứu

- Xây dựng quy trình tách chiết silymarin từ hạt kế sữa.
- Xây dựng quy trình thủy phân thu nhận axit amin tự do từ đậu tương.
- Thử độ độc tính cấp của chế phẩm thu được.
- Chứng minh được một số đặc tính sinh học của chế phẩm.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về silymarin

1.1.1. Cây kế sữa

Kế sữa (*Sylibum marianum* (L.) Gaernt) là một loài thực vật có hoa thuộc họ cúc, là loại cây thảo sống một hoặc hai năm, cao 30-150cm. Thân thẳng và phân nhánh. Lá xanh, không có lá kèm, bóng láng, thường có nhiều đốm trắng dọc theo các gân, mép có răng dạng gai, gai màu vàng và rất nhọn; các lá phía trên và ở giữa ôm lấy thân; các lá ở dưới rất to, có phiến chia thuỳ và có cuống. Cụm hoa đầu đơn độc, rộng 3-10cm. Lá bắc ngoài và giữa có một phần phụ hình tam giác màu lục thu lại thành một gai to, ở gốc có 4-6 gai nhỏ, ngắn hơn, ở mỗi bên. Hoa màu tím, hiếm gặp màu trắng, hơi giống nhau, đều có 5 cánh hoa, 5 nhị và bầu 1 ô với 2 lá noãn và 2 vòi nhuỵ phình ở gốc. Quả bế hình bầu dục thuôn, dài 7-8mm, màu đen bóng có vân vàng nhiều hoặc ít, tùy thuộc vào nguồn giống *S.marianum* và điều kiện canh tác [15], [24], [26]. Ra hoa vào tháng 5 đến tháng 8 của năm thứ hai.

Cây có nguồn gốc ở Địa Trung Hải và mọc hoang dại ở nhiều nơi trên thế giới như miền Nam và Trung Âu, Bắc Phi, Trung Đông, Ấn Độ, Trung Quốc, Bắc và Nam Mỹ [26].

1.1.2. Thành phần hóa học của hạt kế sữa

Thành phần hoá học chính của hạt kế sữa là silymarin. Silymarin flavonolignan là phenol tự nhiên gồm một phần flavonoid và một phần lignan. Dịch chiết của hạt cây chứa khoảng 70-80% silymarin flavonolignans và khoảng 20-30% thành phần không xác định, chủ yếu là các hợp chất polyphenol oxy hóa và trùng hợp. Thành phần chính của tổ hợp silymarin là silybin, đồng nghĩa với silybinin. Ngoài silybin là hỗn hợp của 2 diastereomers A và B với tỉ lệ khoảng 1:1, một lượng lớn các flavonolygnants