TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN TRÍCH LY HỢP CHẤT POLYPHENOL TỪ VỎ MÃNG CẦU TA (*Annona squamosal* L.) SỬ DỤNG ENZYME CELLUCLAST 1,5L

Nguyễn Đình Dũng*, Vũ Thị Hường
Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM
*Email: *dungnd@cntp.edu.vn*
Ngày nhận bài: 02/4/2019; Ngày chấp nhận đăng: 05/6/2019

TÓM TẮT

Nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố công nghệ đến hiệu quả trích ly hợp chất polyphenol từ vỏ mãng cầu ta bằng enzyme. Các yếu tố ảnh hưởng bao gồm: nhiệt độ, thời gian, tỷ lệ enzyme celluclast 1,5L/dung môi. Bằng việc áp dụng phương pháp đáp ứng bề mặt và bố trí 17 thí nghiệm theo mô hình Box-Behnken với 5 lần lặp lại tại giá trị trung tâm đã xây dựng được mô hình mô tả việc trích ly các hợp chất polyphenol và 3 yếu tố ảnh hưởng. Kết quả cho thấy, điều kiện để thu được dịch trích có hàm lượng polyphenol cao nhất là thời gian trích ly 67,69 phút, nhiệt độ 51 ºC và tỷ lệ enzyme celluclast 1,5L/dung môi là 1,8% (v/w). Trong điều kiện này, dịch chiết thu được có hàm lượng polyphenol tổng số là 48,23 mg GAE/g DW. Mô hình được kiểm tra lại bằng cách tiến hành thực nghiệm lặp lại 4 lần tại điều kiện tối ưu. Kết quả thực nghiệm thu được không sai khác so với kết quả tính toán được từ mô hình ($p<0,05$).

Từ khóa: Mãng cầu ta, *Anona squamosal* L., enzyme celluclast 1,5L, polyphenol.

1. MỞ ĐẦU

Mãng cầu ta *(Anona squamosal* L.) là một loại cây quan trọng và phân bố rộng rãi ở châu Mỹ nhiệt đới và châu Á [1]. Loại cây này từ lâu đã được sử dụng như một cây thuốc dân gian điều trị bệnh động kinh, rối loạn nhịp tim, vấn đề về tim, nhiễm giun, táo bón, xuất huyết, nhiễm khuẩn, khó tiểu và sốt [2]. Quả mãng cầu ta có dạng hình cầu hoặc hình trái tim, đường kính 5-10 cm với nhiều vòng tròn ngoài vỏ. Thịt quả vị ngọt, mùi thơm giống như hương vị trứng sữa và được sử dụng rộng rãi để làm nước ép, thạch và sản xuất rượu vang. Việc chế biến các sản phẩm từ vỏ mãng cầu sẽ để lại một lượng đáng kể các bộ phận không ăn được, trong đó có vỏ mãng cầu ta. Trong các nghiên cứu trước đây, hàm lượng phenolic (37,9 mg/mL) và khả năng chống oxy hóa (IC_{50} = 104,712 µg/mL) cực cao đã được tìm thấy trong vỏ mãng cầu, cho thấy tiềm năng của nó được sử dụng như một nguồn chất chống oxy hóa tự nhiên [1, 3, 4]. Tuy nhiên, nguồn phụ phẩm này chưa được tận dụng trong công nghiệp thực phẩm mà mới chỉ được xử lý làm phân bón, thức ăn gia súc hoặc thải ra ngoài môi trường.

Polyphenol là những hợp chất thơm chứa nhóm hydroxyl đính trực tiếp với nhân benzene, có nhiều trong thực vật như rau, quả, hoa và một số bộ phận của thực vật [5]. Polyphenol đóng vai trò hết sức quan trọng đối với đời sống thực vật như tạo màu sắc đặc trưng, bảo vệ thực vật khỏi những tác nhân xâm hại của côn trùng, sự oxy hóa và tác dụng của tia cực tím. Về y học, polyphenol là một trong những hợp chất tự nhiên có nhiều tác

dụng như chống oxy hóa mạnh, kháng viêm, kháng khuẩn, chống dị ứng, chống lão hóa và một số bệnh tật liên quan đến ung thư [6].

Quá trình trích ly các hợp chất từ thực vật bằng phương pháp truyền thống thường tốn nhiều thời gian nhưng hiệu suất thu hồi không cao. Thời gian gần đây, người ta thường sử dụng các loại enzyme để nâng cao hiệu suất trích ly vì phương pháp này có nhiều ưu điểm như thiết bị đơn giản, dễ thực hiện, điều kiện ôn hòa. Nghiên cứu này tiến hành khảo sát và đánh giá tác động của enzyme celluclast 1,5L đến khả năng trích ly các hợp chất polyphenol trong vỏ mãng cầu ta. Nghiên cứu tập trung khảo sát ảnh hưởng các yếu tố công nghệ là nhiệt độ, thời gian, tỷ lệ enzyme/nguyên liệu. Từ đó, tìm ra những thông số tối ưu cho quá trình trích ly polyphenol đạt hiệu quả cao nhất, góp phần nâng cao giá trị của quả mãng cầu ta và giảm ô nhiễm môi trường.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Nguyên liệu chính: Vỏ mãng cầu ta được tách ra từ quả mãng cầu ta chín (*Anona Squamosal* L.*)* trồng tại Việt Nam, làm sạch, sấy khô đến độ ẩm 10%, nghiền, rây đạt kích thước từ ≤ 2 mm.

Hóa chất: Folin-Ciocalteu, acid gallic (Sigma - Đức), Na_2CO_3, acid acetic (Xilong, Trung Quốc), enzyme Celluclast 1,5L) (Novozymes - Đan Mạch), nước cất 2 lần.

Thiết bị: Máy sấy đối lưu (Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh), máy hấp thu quang phổ V730 (Jasco, Nhật Bản), máy ly tâm Z206A (Hermale, Đức).

Các dụng cụ: Bình tam giác, bình định mức, nhiệt kế, pipet…

2.2. Quy trình trích ly

Cân 1 g bột vỏ mãng cầu ta khô (độ ẩm 10%) cho vào 15 mL dung dịch đệm acetate có pH 4,5. Các yếu tố khảo sát bao gồm: thời gian trích ly (20-100 phút), nhiệt độ trích ly (40-60 ºC), tỷ lệ enzyme celluclast 1,5L/dung môi (0,5%-2,5% (v/w)) thay đổi theo từng thí nghiệm. Sau khi trích ly bằng enzyme, hỗn hợp sẽ được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 5 phút bằng thiết bị ly tâm. Sau đó, tiến hành lọc bằng giấy lọc để loại bỏ phần bã còn lẫn trong dịch trích và xác định hàm lượng polyphenol có trong dịch trích ly.

2.3. Bố trí thí nghiệm

2.3.1. Ảnh hưởng điều kiện trích ly bằng enzyme đến hàm lượng polyphenol có trong dịch trích ly

Trong nghiên cứu này, các yếu tố được khảo sát bằng phương pháp đơn yếu tố. Cụ thể, các yếu tố được lần lượt khảo sát độc lập là thời gian, nhiệt độ và tỷ lệ enzyme celluclast 1,5L/nguyên liệu. Khi một yếu tố được khảo sát thì các yếu tố còn lại sẽ được cố định ở một mức được lựa chọn. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Chỉ tiêu đánh giá là lượng polyphenol có trong dịch trích ly. Các yếu tố được khảo sát là thời gian trích ly (20-100 phút, bước nhảy 20 phút), nhiệt độ trích ly (40-60 ºC, bước nhảy 5 ºC) và enzyme celluclast 1,5L/nguyên liệu (0,5%-2,5% (v/w), bước nhảy 0,5%). Các thí nghiệm thực hiện tại tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/15 (w/v), pH 4,5.

2.3.2. Thí nghiệm tối ưu hóa

Phương pháp bề mặt đáp ứng được lựa chọn để tối ưu hóa điều kiện chiết polyphenol từ vỏ mãng cầu ta. 3 thông số quan trọng của quá trình chiết được nghiên cứu bao gồm thời gian (X_1), nhiệt độ (X_2), tỷ lệ enzyme celluclast 1,5L/nguyên liệu (X_3). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu mô hình Box-Behnken và ma trận thí nghiệm được xây dựng bằng phần mềm JMP 10. Trong các nghiên cứu thăm dò thực hiện trước đó đã xác định được giá trị biên của các nhân tố trích ly như trình bày trong Bảng 1. Trong số 17 thí nghiệm được tiến hành (Bảng 2), 12 thí nghiệm ở 2 mức (trên và dưới) và 5 thí nghiệm ở tâm. Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình. Mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của các biến độc lập đối với biến phụ thuộc có dạng hàm đa thức bậc hai có dạng tổng quát như sau:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

Trong đó:

b_0: hệ số hồi quy

b_1, b_2, b_3: hệ số tuyến tính

b_{11}, b_{22}, b_{33}: hệ số tương tác đôi

Bảng 1. Các mức mã hóa giá trị yếu tố khảo sát cho thí nghiệm tối ưu

Các biến độc lập	Các giá trị được mã hóa		
	-1	0	+1
X_1: Thời gian (phút)	40	60	80
X_2: Nhiệt độ (^oC)	45	50	55
X_3: Tỷ lệ enzyme celluclast 1,5L/nguyên liệu (v/w)	1%	1,5%	2%

2.4. Phương pháp phân tích

Hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu [7], cụ thể như sau:

Lấy 1 mL mẫu đã được pha loãng thêm vào 2,5 mL dung dịch Folin-Ciocalteu 0,1N, chờ 4 phút. Sau đó, thêm 2 mL dung dịch Na_2CO_3 7,5%. Sau khi ủ ở nhiệt độ phòng (23-25 °C) trong 120 phút, độ hấp thụ của hỗn hợp được đo bằng máy quang phổ V730 (Jasco, Nhật Bản) tại bước sóng 760 nm. Acid gallic được sử dụng để xây dựng đường chuẩn và kết quả được biểu thị bằng mg acid gallic tương đương lượng acid gallic (GEA) trên 1 g chất khô (mg GEA/g DW).

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

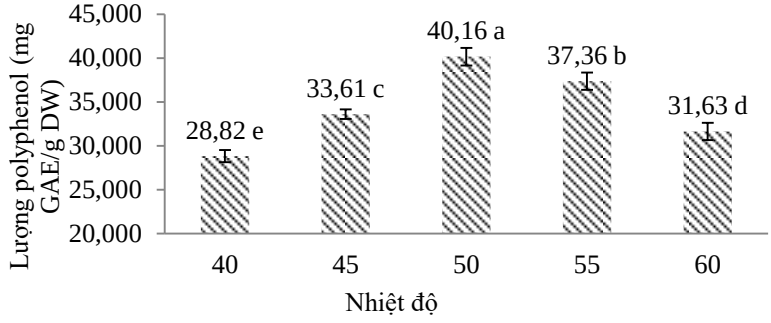
Tất cả các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần để đảm bảo tiến hành phân tích ANOVA. Số liệu được phân tích ANOVA bằng phần mềm xử lý số liệu thống kê chuyên dụng JMP 10. Kiểm định Student's được thực hiện để đánh giá mức độ khác biệt có ý nghĩa giữa các giá trị với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ trích ly

Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng rất mạnh mẽ đến quá trình trích ly các hợp chất thứ cấp nói chung và các hợp chất polyphenol kháng oxi hoá nói riêng. Khi nhiệt độ tăng làm tăng tốc độ khuếch tán và do đó tăng lượng polyphenol trích ly được từ nguyên liệu. Tuy nhiên, nếu nhiệt độ tăng quá cao sẽ dẫn đến sự phá huỷ các các hợp chất polyphenol hay vẫn còn ở trong nguyên liệu [8].

Thí nghiệm này khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ trích ly lần lượt là 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C và 60 °C với dung môi là dung dịch đệm có pH 4,5, tỷ lệ enzyme celluclast 1,5L/nguyên liệu là 1,5 (v/w), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/15 (w/v), thời gian trích ly 40 phút.

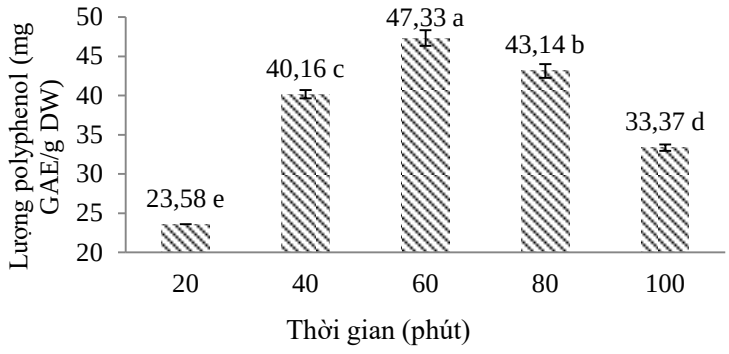


Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng (mg GAE/g DW)

Kết quả cho thấy khi nhiệt độ tăng từ 40 °C đến 50 °C, hàm lượng polyphenol tăng từ 28,82 mg GAE/g DW lên 40,16 mg GAE/g DW và khi tiếp tục tăng nhiệt độ đến 60 °C thì hàm lượng polyphenol giảm còn 31,63 mg GAE/g DW. Có được kết quả này có thể do trong quá trình nghiền và trích ly hợp chất, dịch trích có trạng thái keo, khả năng giữ nước lớn nên hợp chất polyphenol không thoát ra được dẫn đến hiệu quả trích ly không cao [9]. Vì vậy, khi tăng nhiệt độ thì độ nhớt giảm, vận tốc phản ứng của enzyme tăng và hàm lượng polyphenol thoát ra nhiều hơn. Tuy nhiên, khi nhiệt độ cao hơn 60 °C - nhiệt độ thích hợp cho hoạt động của enzyme polyphenoloxidase nên các phản ứng oxy hóa polyphenol diễn ra mạnh dẫn đến lượng polyphenol sẽ giảm [10]. Kết quả này phù hợp với những thông tin cung cấp từ nhà sản xuất, chế phẩm enzyme celluclast 1,5L có khoảng nhiệt độ hoạt động tốt nhất từ 50-55 °C. Từ kết quả trên, nhiệt độ 50 °C được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của thời gian trích ly

Thời gian trích ly cũng đóng vai trò nhất định trong toàn bộ quá trình trích ly polyphenol. Nó không chỉ ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly mà còn ảnh hưởng đến chi phí và đặc biệt là chất lượng của dịch chiết [11,12]. Các mốc thời gian 20, 40, 60, 80, 100 phút được lựa chọn để khảo sát. Điều kiện khảo sát thời gian trích ly với dung môi là dung dịch đệm có pH 4,5, tỷ lệ enzyme celluclast 1,5L/nguyên liệu là 1,5 (v/w), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/15 (w/v), nhiệt độ trích ly 50 °C.

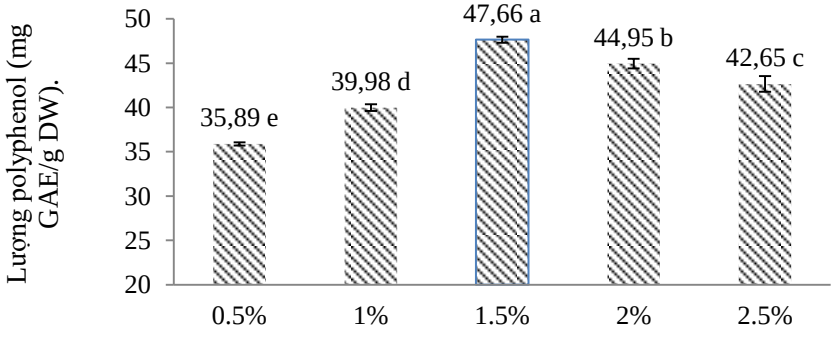


Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian trích ly đến hàm lượng (mg GAE/g chất khô)

Khi tăng thời gian trích ly từ 20 phút đến 60 phút thì hàm lượng polyphenol tăng từ 23,58 mg GAE/g DW đến 47,32 mg GAE/g DW. Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng thời gian trích ly đến 100 phút thì hàm lượng polyphenol giảm dần xuống 33,37 mg GAE/g DW. Theo trích ly thông thường (không bổ sung enzyme), thời gian trích ly càng dài thì lượng chất tan trích được ra dung môi càng tăng đến mức giới hạn. Nhưng khi môi trường trích ly có bổ sung enzyme, nếu thời gian trích dài thì hoạt tính enzyme có thể bị ảnh hưởng bởi chính thành phần các chất có trong dịch chiết. Kết quả một số nghiên cứu đã cho thấy, hợp chất catechin có thể ức chế enzyme bởi tương tác cạnh tranh trực tiếp [13,14]. Mặt khác, một lượng chế phẩm enzyme tác động với một lượng cơ chất đến một thời điểm nhất định, lượng cơ chất gần như cạn kiệt, hoạt tính kháng oxy hóa thu nhận được bắt đầu giảm do bị oxy hóa bởi môi trường xung quanh, có thể làm giảm hàm lượng và hoạt tính của polyphenol trích ly [15]. Điều này sẽ làm ảnh hưởng đến khả năng hoạt động của enzyme. Như vậy thời gian trích ly 60 phút được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme celluclast 1,5L/nguyên liệu

Điều kiện khảo sát tỷ lệ enzyme celluclast 1,5L/nguyên liệu ở 5 mức với dung môi là dung dịch đệm có pH 4,5, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/15 (w/v), nhiệt độ trích ly 50 °C, thời gian trích ly 60 phút.



Hình 3. Ảnh hưởng tỷ lệ enzyme celluclast 1,5L/nguyên liệu đến hàm lượng (mg GAE/g DW)

Kết quả cho thấy, khi tăng tỷ lệ enzyme celluclast 1,5L 1,5L/nguyên liệu từ 0,5% lên 1,5% thì hàm lượng polyphenol tăng từ 35,89 mg GAE/g DW lên 47,66 mg GAE/g DW. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng tỷ lệ enzyme celluclast 1,5L 1,5L/nguyên liệu lên 2,5% thì hàm

lượng polyphenol không tăng nữa mà lại giảm xuống còn 42,65 mg GAE/g DW. Có được kết quả như vậy có thể là do: Một là do càng nhiều enzyme được thêm vào, các polysaccharide của thành tế bào càng bị thủy phân nhiều, đặc biệt là mối liên kết giữa polysaccharide-lignin vì vậy mà hợp chất polyphenol được giải phóng ra nhiều hơn [16-18]. Hai là enzyme trực tiếp xúc tác phá vỡ liên kết ether và este giữa phenol và polyme của thành tế bào thực vật [14]. Ba là nếu tỷ lệ enzyme tăng quá cao, hàm lượng polyphenol trích ly sẽ tăng chậm hơn do sự bão hòa cơ chất [12]. Bốn là, trong trường hợp thừa cơ chất thì vận tốc phản ứng sẽ tăng khi tăng nồng độ dung dịch enzyme, nhưng khi nồng độ dung dịch enzyme bão hòa với cơ chất thì vận tốc phản ứng không thay đổi khi tăng nồng độ dung dịch enzyme [19]. Từ kết quả nêu trên, chọn tỷ lệ enzyme/nguyên liệu là 1,5% (v/w) cho nghiên cứu tiếp theo.

3.4. Tối ưu hóa điều kiện trích ly

Ở thí nghiệm này, thời gian (X_1): 40-80 phút, nhiệt độ (X_2): 45-55 °C, tỷ lệ enzyme/nguyên liệu (X_3): 1% - 2% (v/w), được khảo sát đồng thời nhằm mục đích xây dựng một mô hình toán học mô tả mối quan hệ giữa các yếu tố ảnh hưởng tới lượng polyphenol (Y) thu được và tìm ra điều kiện của quá trình xử lý enzyme để lượng polyphenol thu được là cao nhất. Các mức của yếu tố thí nghiệm được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả bố trí thí nghiệm đầy đủ theo mô hình Box-Behnken

STT	Thí nghiệm	Biến chuẩn			Biến thực			Lượng polyphenol (mg GAE/g DW)
		X_1	X_2	X_3	Thời gian (phút)	Nhiệt độ (°C)	Tỷ lệ enzyme/nguyên liệu (v/w)	
1	−−0	-1	-1	0	40	45	1,5%	38,45
2	−0−	-1	0	-1	40	50	1%	39,38
3	−0+	-1	0	+1	40	50	2%	40,43
4	−+0	-1	+1	0	40	55	1,5%	37,36
5	0−−	+0	-1	-1	60	45	1%	40,16
6	0−+	+0	-1	+1	60	45	2%	43,34
7	000	0	0	0	60	50	1,5%	47,41
8	000	0	0	0	60	50	1,5%	46,93
9	000	0	0	0	60	50	1,5%	46,72
10	000	0	0	0	60	50	1,5%	47,30
11	000	0	0	0	60	50	1,5%	47,88
12	0+−	0	+1	-1	60	55	1%	43,29
13	0++	0	+1	+1	60	55	2%	45,76
14	+−0	+1	-1	0	80	45	1,5%	41,27
15	+0−	+1	0	-1	80	50	1%	42,38
16	+0+	+1	0	+1	80	50	2%	46,56
17	++0	+1	+1	0	80	55	1,5%	43,51

Sau khi xử lý bằng phần mềm JPM 10, thu được kết quả phân tích phương sai và giá trị các hệ số của mô hình trong Bảng 3 và Bảng 4.

Bảng 3. Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) ảnh hưởng của các nhân tố trích ly đến hàm mục tiêu

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng bình phương	Giá trị trung bình bình phương	Kiểm định tỷ số F
Mô hình	9	189,20716	21,0230	45,2312
Sai số	7	3,25353	0,4648	Prob > F
Tổng số	16	192,46069		<,0001*

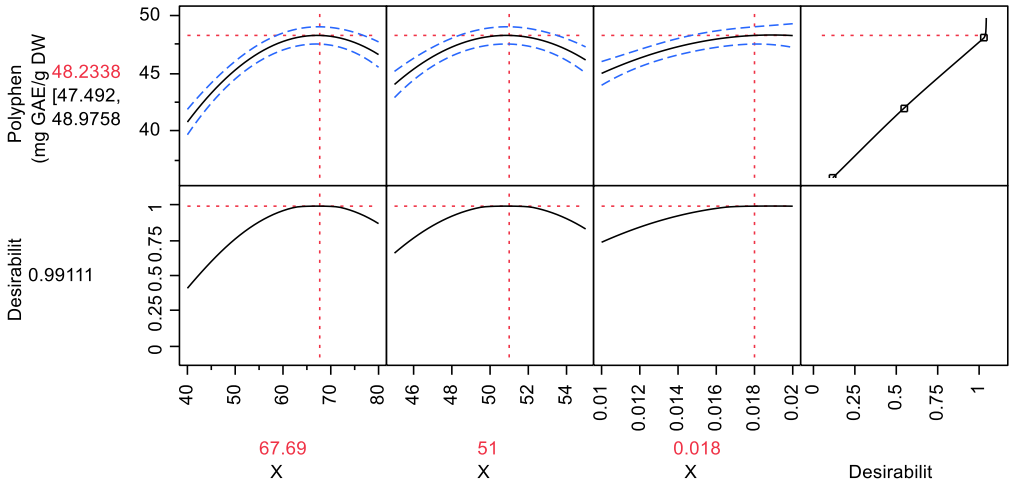
Bảng 4. Ước lượng tham số mô hình dự đoán sự ảnh hưởng của các biến đến hàm mục tiêu

Hệ số	Giá trị	Độ lệch chuẩn	Tỷ số t	Prob>|t|
Hệ số tự do	47,248	0,30489	154,97	<,0001*
X_1 (40,80)	2,2625	0,241037	9,39	<,0001*
X_2 (45,55)	0,8375	0,241037	3,47	0,0103*
X_3 (1%,2%)	1,36	0,241037	5,64	0,0008*
X_1*X_2	0,8325	0,340878	2,44	0,0446*
X_1*X_3	0,7825	0,340878	2,30	0,0554
X_2*X_3	-0,1775	0,340878	-0,52	0,6186
X_1*X_1	-4,02525	0,332246	-12,12	<,0001*
X_2*X_2	-3,07525	0,332246	-9,26	<,0001*
X_3*X_3	-1,03525	0,332246	-3,12	0,0169*

Từ các hệ số của mô hình (Bảng 4), mô hình mô tả ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ (thời gian, nhiệt độ, tỷ lệ enzyme/nguyên liệu) đến hàm lượng polyphenol được biểu diễn như sau:

$$Y = 47,25 + 2,26\ X_1 + 0,84\ X_2 + 1,36\ X_3 + 0,83\ X_1X_2 - 4,03\ X_1^2 - 3,08\ X_2^2 - 1,04\ X_3^2$$

Từ mô hình trên và kết quả phân tích phương sai ở Bảng 4 cho thấy cả 3 yếu tố thời gian, nhiệt độ, tỷ lệ enzyme/nguyên liệu đều ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm lượng polyphenol ($p < 0,05$). Tuy nhiên, các yếu tố công nghệ khác nhau có chiều ảnh hưởng cũng khác nhau. Kết quả từ mô hình cho thấy các yếu tố công nghệ riêng lẻ thời gian (X_1), nhiệt độ (X_2), tỷ lệ enzyme/nguyên liệu (X_3) đều có ảnh hưởng đến hàm mục tiêu Y (với giá trị p lần lượt là <0,0001, 0,0103 và 0,0008) và bình phương của chúng cũng ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm này (< 0,0001, <0,0001 và 0,0169) trong khi đó các cặp tương tác ảnh hưởng không có ý nghĩa đến hàm mục tiêu ($p > 0,05$) trừ cặp tương tác nhiệt độ - thời gian ($p < 0,05$).



Hình 4. Mô hình đáp ứng bề mặt sự ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ tới hàm lượng polyphenol của dịch chiết thu được tại điểm tối ưu.

Mô hình đáp ứng bề mặt (Hình 4) thể hiện sự tương tác của từng cặp yếu tố và dựa vào mô hình này có thể xác định được giá trị tối ưu của từng yếu tố ảnh hưởng làm cho hàm đáp ứng đạt giá trị cực đại. Kết quả cho thấy hàm lượng polyphenol đạt cực đại 48,23 mg GAE/g DW khi được trích ly ở điều kiện thời gian 67,69 phút, nhiệt độ 51 °C và tỷ lệ enzyme/nguyên liệu là 1,8% (v/w). Kết quả này cho thấy hàm lượng polyphenol của vỏ quả mãng cầu ta cao hơn so vơi quả mơ, bơ, chuối, nho đỏ, táo, đào [8]. Điều này cho thấy vỏ mãng cầu ta là nguồn polyphenol mới cần nghiên cứu, khai thác và ứng dụng trong tương lai.

Sau khi xác định được các điều kiện tối ưu trên, tiến hành thực nghiệm để kiểm chứng các điều kiện tối ưu nhằm đánh giá tính xác thực của mô hình. Khi tiến hành thí nghiệm lặp lại 4 lần tại điều kiện tối ưu, kết quả thu được về hàm lượng polyphenol tổng số không có sự khác biệt so với các kết quả tính toán từ mô hình ($p < 0,05$).

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được các yếu tố thời gian trích ly, nhiệt độ trích ly và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm lượng polyphenol tổng số. Ba yếu tố này được chọn để đưa vào mô hình mô tả quá trình trích ly polyphenol từ vỏ mãng cầu ta.

Bên cạnh đó, bài báo đã xây dựng được mô hình mô tả ảnh hưởng của các yếu tố thời gian (X_1), nhiệt độ (X_2) và tỷ lệ enzyme/nguyên liệu (X_3) đến hàm lượng polyphenol (Y) như sau:

$$Y = 47,25 + 2,26X_1 + 0,84\ X_2 + 1,36\ X_3 + 0,83\ X_1X_2 - 4,03X_1^2 - 3,08X_2^2 - 1,04\ X_3^2$$

Điều kiện trích ly tối ưu cho phép thu được dịch chiết có hàm lượng polyphenol cao nhất là 48,23 mg GAE/g DW với thời gian trích ly 67,69 phút, nhiệt độ 51 °C và tỷ lệ enzyme/nguyên liệu là 1,8% (v/w).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kumar R., Roopan S.M., Prabhakarn A., Khanna V.G., Chakroborty S. - Agricultural waste *Annona squamosa* peel extract: Biosynthesis of silver nanoparticles, Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc **90** (2012) 173-176.

2. Srivastava S., Lal V.K., Pant K.K. - Medicinal potential of *Annona squamosa*: At a glance, Journal of Pharmacy Research **4** (12) (2011) 4596–4598.
3. Deng G.F., Shen C., Xu X.R., Kuang R.D., Guo Y.J., Zeng L.S., Gao L.L., Lin X., Xie J.F., Xia E.Q. - Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds, International Journal of Molecular Science **13** (7) (2012) 8308-8323.
4. Roy N. and Sasikala S. - Effects of blanching and drying treatment on the phtyochemical properties of *Annona squamosa* peel, Biosciences Biotechnology Research Asia **3** (2) (2016) 1147-1152.
5. Lê Ngọc Tú, Lê Văn Chư, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thắng, Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẩn và Lê Doãn Diên - Hóa sinh học công nghiệp, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật (2002).
6. Jin D. and Russell J. M. - Plant phenolic: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, Molecules **15** (10) (2010) 7313-7352.
7. Singleton V.L., Rossi J.A. - Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, American Journal of Enology and Viticulture **16** (3) (1965) 144-158.
8. Chan S. W., Lee C. Y., Yap C. F., Wan Aida W. M. and Ho, C. W - Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels, International Food Research Journal **16** (2) (2009) 203-213.
9. Mai Thanh Trung, Nguyễn Vương Tường Vân, Nguyễn Công Hà và Lê Nguyễn Đoan Duy, Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng trích ly dịch quả sơ ri (*magnolyophyta glabra)* bằng enzyme, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học **42** (2016) 11-18.
10. Akuwah G.A., Mariam A., Chin J.H. - The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf, Pharmacognosy Magazine **5** (17) (2009) 81- 85.
11. Gomez-Garcia R., Martınez-Avila G.C.G., Aguilar C.N. - Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenolics from grape (*Vitis vinifera* L.) residues, 3 Biotech **2** (4) (2012) 297-300.
12. Hoàng Ngọc Tú - Sử dụng chế phẩm enzyme hỗ trợ quá trình trích ly protein từ hạt chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.), Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Bách Khoa TP.HCM (2014).
13. Persson I.A., Josefsson M., Persson K., Andersson R.G. - Tea flavanols inhibit angiotensin-converting enzyme activity and increase nitric oxide production in human endothelial cells, Journal of Pharmacy and Pharmacology **58** (8) (2006) 1139-1144.
14. Hong Y.H., Jung E.Y., Park Y., Shin K.S., Kim T.Y., Yu K.W., Chang U.J., Suh H.J. - Enzymatic improverment in the polyphenol extractability and antioxydant activity of green tea extracts, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **77** (1) (2013) 22-29.
15. Mai Cang Huỳnh, Trương Vĩnh, Debaste Frédéric - Optimisation of enzyme-assisted extraction of oil rich in carotenoids from Gac fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng.), Food Technology and Biotechnology **51** (4) (2013) 488-499.
16. Nguyen T. Thanh T. - Preparations application enzyme pectinase solution extraction ambarella fruit rich in antioxidant compounds, Master's thesis Encyclopedic University (2014).

17. Ngoc T. N., Phuoc H. P., Ngoc O. H. - Optimizing the extraction conditions of phenolic compounds from fresh tea shoot, Journal of Food and Nutrition Sciences **3** (1-2) (2015) 106 -111.
18. Li F., Bo-Tao X., Xiang-Rong X., Ren-You G., Yuan Z., En-Qin X., Hua-Bin L. - Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits, Food Chemistry **129** (2) (2011) 345-350.
19. Nguyễn Nhật Minh Phương, Chế Văn Hoàng, Lý Nguyễn Bình và Châu Trần Diễm Ái, - Tác động enzyme pectinase đến khả năng trích ly dịch quả và các điều kiện lên men đến chất lượng rượu vang xoài sau thời gian lên men chính, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ **20a** (2011) 127-136.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF POLYPHENOL EXTRACTIONS FROM CUSTARD APPLE (*Annona squamosa* L.) USING CELLUCLAST 1,5L

Nguyen Dinh Dung*, Vu Thi Huong
Ho Chi Minh City University of Food Industry
*Email: *dungnd@cntp.edu.vn*

This paper assessed the effects of some factors on extraction of polyphenols from custard apple (*Annona squamosa* L.) using enzymes. The factors influencing the extraction include temperature, extraction time, ratio of enzyme celluclast 1,5L to material. The surface response methodology and Box-Behnken experimental design were applied, 17 experiments were arranged with the center point replicated six times to build a model describing extraction process and 3 factors affecting the exaction of phenolic compounds. The results showed that conditions for extract of the highest polyphenol content included the extraction time of 67.69 minutes, temperature of 51 °C and celluclast 1,5L to solvent ratio of 1.8% (v/w). Under these conditions, 48.23 mg GAE/g DW of total phenolic content was extracted. The model was tested by repeating the experiment 4 times with the optimized conditions. There is a nonsignificant test result ($p < 0.05$) between the experiment and the model.

Keywords: Custard apple, *Anona squamosa* L., celluclast 1,5L, polyphenol.