



Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ

Số chuyên đề: Nông nghiệp

website: sj.ctu.edu.vn



DOI:10.22144/ctu.jsi.2018.073

TỐI ƯU HÓA CÁC THÔNG SỐ QUÁ TRÌNH XỬ LÝ ENZYME ĐỂ TĂNG SẢN LƯỢNG DỊCH TRÍCH VÀ CÁC HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ TRÁI THANH TRÀ (*Bouea macrophylla* Griffith) BẰNG PHƯƠNG PHÁP BỀ MẶT ĐÁP ỨNG

Nguyễn Thị Huỳnh Như^{1*}, Nguyễn Minh Thủy² và Nguyễn Thị Diễm Sương³

¹Học viên cao học ngành Công nghệ thực phẩm, khóa 23, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

³Sinh viên ngành Công nghệ thực phẩm, khóa 40, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Huỳnh Như (email: huynhnhu1003@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 08/06/2018

Ngày duyệt đăng: 03/08/2018

Title:

Using response surface methodology to optimize parameters of enzymatic process for increasing juice yield and bioactive compounds from gandraia *Bouea macrophylla* (Griffith) fruits

Từ khóa:

Enzyme, hiệu suất thu hồi, hợp chất có hoạt tính sinh học, thanh trà, tối ưu hóa, trích ly

Keywords:

Bioactive compounds, *Bouea macrophylla*, enzyme, extraction, juice recovery, optimization

ABSTRACT

Bouea macrophylla (*Bouea macrophylla* Griffith) from Binh Minh, Vinh Long province was used for the study. The effect of extraction conditions, such as types of enzyme (pectinase and hemicellulase) with different concentrations ranging from 0.03 to 0.05% for 30 to 60 mins on juice recovery and the contents of bioactive compounds were studied. The obtained results showed that the sample was treated by pectinase concentration of 0.04% for 45 mins given the highest juice recovery (85.33%). At these treatment conditions, the content of total polyphenols, beta-carotene, vitamin C were 39.42 mgGAE/mL, 0.83 µg/mL, and 32.12%, respectively. Response surface methodology with central composite design was employed to optimize pectinase concentration (0.035÷0.045%) and incubation time (40÷50 mins). Based on response surface and desirability graph, the optimum conditions for extraction of *Bouea macrophylla* pulp were at the concentration of 0.041% of pectinase enzyme for the incubation time of 43.2 mins resulted in highest juice yield (86.95%), and the contents of polyphenol, beta-carotene and vitamin C were 38.94 mgGAE/mL, 0.83 µg/mL, 32.52 mg%, respectively.

TÓM TẮT

Nghiên cứu quá trình trích ly dịch quả được thực hiện trên trái thanh trà (*Bouea macrophylla* Griffith) ở thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Ảnh hưởng của điều kiện trích ly, bao gồm: loại enzyme (pectinase và hemicellulase), nồng độ enzyme (0,03÷0,05%) và thời gian trích ly (30÷60 phút) đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng các hợp chất sinh học của dịch quả thanh trà được nghiên cứu. Kết quả đạt được cho thấy thịt quả nghiền thanh trà được xử lý với nồng độ enzyme pectinase 0,04% trong 45 phút cho hiệu suất thu hồi dịch quả là cao nhất (85,33%). Với điều kiện xử lý này, hàm lượng các hợp chất sinh học polyphenol tổng, beta-carotene, vitamin C tương ứng là 39,42 mgGAE/mL, 0,83 µg/mL, 32,12 mg%. Thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng với mô hình phức hợp trung tâm được sử dụng để tối ưu nồng độ enzyme pectinase (0,035÷0,045%) và thời gian ủ (40÷50 phút). Dựa vào các biểu đồ và phân tích dữ liệu, điều kiện tối ưu cho quá trình trích ly dịch quả thanh trà là 0,041% enzyme pectinase và ủ trong thời gian 43,2 phút cho hiệu suất thu hồi (86,95%) cao nhất và hàm lượng polyphenol tổng số, vitamin C, beta-carotene tương ứng là 38,94 mgGAE/mL, 32,52 mg%, 0,83 µg/mL.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Huỳnh Như, Nguyễn Minh Thủy và Nguyễn Thị Diễm Sương, 2018. Tối ưu hóa các thông số quá trình xử lý enzyme để tăng sản lượng dịch trích và các hợp chất có hoạt tính sinh học từ trái thanh trà (*Bouea macrophylla* Griffith) bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Nông nghiệp): 117-125.

1 GIỚI THIỆU

Thanh trà là đặc sản thứ hai, sau bưởi Năm Roi của thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Thời vụ trái chín vào khoảng tháng giêng đến cuối tháng 3 âm lịch. Điểm đặc biệt của trái thanh trà Bình Minh là tính chất quý hiếm của nó. Trái thanh trà có 2 loại chua và ngọt, ngoài mùi vị thơm ngon, màu sắc và mẫu mã trái đẹp, trái thanh trà còn chứa nhiều chất dinh dưỡng quý và cần thiết cho cơ thể. Bên cạnh các thành phần chủ yếu là nước, acid hữu cơ và đường, trái còn chứa các chất chống oxy hóa (Rajan and Bhat, 2016) như: flavonoids, beta-carotene và vitamin C, nhiều dạng vitamin nhóm B (B1, B2 và B3). Nhiều enzyme và khoáng chất như: calcium, phosphor, sắt cũng hiện diện trong trái (Siripanuwat et al., 2012). Do sở hữu nhiều chất dinh dưỡng quan trọng, trái thanh trà có những đặc điểm quý như: ngăn ngừa ung thư, giảm cholesterol, giúp tiêu hóa, điều chỉnh đường huyết, giảm cân, tốt cho hoạt động của tim, bổ mắt, làm giảm các phá hoại do quá trình oxy hóa gây ra bởi các gốc tự do, làm chậm quá trình lão hóa (Rajan and Bhat, 2016). Với giá trị chất lượng cao và khan hiếm trong năm, cùng với tình trạng hư hỏng nhanh của trái thanh trà sau thu hoạch ở điều kiện nhiệt độ bình thường, người tiêu dùng khó tiếp cận với loại nguyên liệu có giá trị dinh dưỡng này trong đời sống hàng ngày. Hiện nay ở vùng trồng, trái thanh trà chỉ được sử dụng đơn giản ăn tươi, dầm đường và đá tạo ra loại nước giải khát, nấu canh chua, trộn gỏi, kho chung với cá hoặc sên làm mứt, chưa tìm thấy nhiều công trình nghiên cứu chế biến đa dạng sản phẩm từ trái thanh trà mặc dù nguồn nguyên liệu “ngon-sạch-lạ” này hiện diện rất lâu đời ở nước ta. Vì vậy, việc áp dụng các kỹ thuật chế biến (cũng là mục tiêu tồn trữ) nguồn nguyên liệu này để có thể sử dụng và chế biến sản phẩm quanh năm là vấn đề cần quan tâm. Trong chế biến các dạng nước ép đối với các loại quả có phần thịt quả khó tách nước, nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy việc bổ sung enzyme đạt được hiệu suất thu hồi cao hơn (Demir et al., 2000; Will et al., 2000; Nguyễn Minh Thủy và ctv., 2013). Các enzyme giúp làm mềm các mô thực vật, hỗ trợ giải phóng các thành phần trong tế bào và cải thiện hiệu suất trích ly (Muhammad, 2009). Quá trình trích ly dịch quả cũng là công đoạn quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng và nâng cao giá trị kinh tế cho tiến trình sản xuất (Nguyễn Minh Thủy và Nguyễn Thị Mỹ Tuyền, 2016).

Mục tiêu của nghiên cứu này là ứng dụng hiệu quả hai loại enzyme ở các mức nồng độ và thời gian ủ/trích ly khác nhau để khảo sát tác động của chúng đến hiệu suất trích ly và chất lượng dịch quả thanh trà (các hợp chất sinh học). Hiệu suất trích ly và hàm

lượng cao nhất các hợp chất sinh học quý trong dịch quả thanh trà được ước tính và ảnh hưởng của các biến độc lập được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình bề mặt đáp ứng, đã được sử dụng tối ưu hóa trong các ứng dụng công nghiệp và các quá trình khác do tính tiện lợi và thực tế của chúng (Kurozawa et al., 2008).

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Chuẩn bị nguyên liệu

Trái thanh trà (chua và ngọt) được thu hoạch ở ấp Đông Hưng 2, xã Đông Thành, thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Sau khi thu hoạch, trái được phân loại theo độ chín và kích cỡ. Chọn trái có mức độ chín nhất (màu vàng sậm) cho tiến trình nghiên cứu. Sau khi chọn, trái được rửa sạch bên ngoài và cho vào thiết bị chà (Pulper Finisher), tách vỏ và hạt, thu thịt quả nghiên cứu thanh trà. Trữ thịt quả nghiên cứu tủ đông (-10°C) cho các nghiên cứu thực hiện.

Enzyme pectinase thương mại (Pectinex Ultra SP-L, Cty Novozymes Singapore) thành phần: polygalacturonase PGU: 10589; tỷ trọng: 1,163; total viable count/G: 100; vi khuẩn coliform /G10;

Enteropathogenic E. Coli: không phát hiện; Salmonella: không phát hiện. Sản phẩm được chứng nhận độ tinh khiết của sản phẩm enzyme chất lượng cao bởi Ủy ban hội đồng các chuyên gia về phụ gia thực phẩm (gọi tắt là JECFA) do Tổ chức Y tế thế giới (WHO) và Tổ chức Nông lương Liên hiệp quốc (FAO) phối hợp điều hành.

Enzyme hemicellulase: hoạt tính 150 Ku, thu nhận từ *Aspergillus niger*, USA.

2.2 Bố trí thí nghiệm

2.2.1 Ảnh hưởng của loại và nồng độ enzyme (pectinase và hemicellulase), thời gian xử lý đến hiệu quả trích ly và chất lượng nước ép thanh trà

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 nhân tố và 3 mức độ: loại enzyme (pectinase, hemicellulase), nồng độ enzyme (0,03÷0,05) và thời gian thủy phân (30÷60 phút). Cân thịt quả thanh trà nghiền và pha loãng thịt quả nghiền với nước cất theo tỷ lệ 1:1, bổ sung enzyme với các loại và nồng độ khác nhau, riêng mẫu đối chứng không xử lý enzyme. Ủ ở nhiệt độ 35÷40°C trong các mức thời gian 30, 45 và 60 phút. Thực hiện vô hoạt enzyme ở nhiệt độ 99±1°C trong 5 phút trước khi ép tách dịch thanh trà. Xác định hiệu suất trích ly (H%), được tính bằng tỷ số giữa m (khối lượng dịch trích thu được, kg) và m_0 (khối lượng nguyên liệu ban đầu, kg) và chất lượng dịch quả (hàm lượng polyphenol tổng, β -carotene và vitamin C).

2.2.2 **Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng (nồng độ enzyme, thời gian trích ly) đến hiệu suất thu hồi dịch quả và hàm lượng tối đa các hợp chất có hoạt tính sinh học**

Dựa trên cơ sở đã chọn nồng độ và loại enzyme thích hợp từ kết quả nghiên cứu, thiết kế tối ưu hóa các nồng độ enzyme lân cận bằng phương pháp bề mặt đáp ứng nhằm xác định các thông số tối ưu cho quá trình trích ly dịch trái thanh trà. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với hai nhân tố bao gồm nồng độ enzyme (X_1) và thời gian xử lý (X_2) với 5 mức độ (- α ; -1; 0; +1; + α) theo mô hình phức hợp trung tâm, trong đó có 2 điểm tâm với tổng số nghiệm thức là 10 (Bảng 1).

Thịt quả thanh trà nghiên cứu được cân chính xác khối lượng (1 kg), bổ sung enzyme với các nồng độ và ù ở các thời gian được bố trí theo 10 nghiệm thức (Bảng 1). Thực hiện vô hoạt enzyme ở nhiệt độ $99 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 5 phút trước khi ép tách dịch thanh trà. Xác định hiệu suất thu hồi (H%) và chất lượng nước ép (hàm lượng polyphenol tổng, β -carotene và vitamin C).

Bảng 1: Bố trí thí nghiệm theo mô hình phức hợp trung tâm

STT	X_1	X_2
1	0	0
2	-1	-1
3	1	-1
4	-1	1
5	1	1
6	- α	0
7	+ α	0
8	0	- α
9	0	+ α
10	0	0

2.3 Các phương pháp phân tích

Các hợp chất có hoạt tính sinh học trong dịch quả thanh trà được phân tích bao gồm polyphenol tổng, β -carotene và vitamin C.

Hàm lượng polyphenol tổng: phân tích dựa trên phương pháp Folin-Ciocalteu (Hossain *et al.*, 2013).

Hàm lượng β -carotene: xác định bằng phương pháp quang phổ (Fikselova *et al.*, 2008)

Định lượng vitamin C: theo phương pháp chuẩn độ Iod (Nguyễn Văn Mùi, 2001)

2.4 Xử lý và thống kê dữ liệu thu thập

Các dữ liệu thu được trong quá trình nghiên cứu được tính toán và vẽ đồ thị bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 5% và phương pháp bề mặt đáp ứng sử dụng phần mềm Statgraphic Centurion XV.I (Hoa Kỳ).

Phân tích thống kê (Statgraphic) được sử dụng để chọn mô hình phù hợp cho các dữ liệu thu thập. Mô hình (1) được đề xuất (giá trị Y) trong trường hợp này:

$$Y = b_0 + b_n X_n + b_{nn} X_n^2 + b_{nm} X_n X_m \quad (1)$$

Trong đó, b_0 là hệ số; b_n , b_m và b_{nm} là các hệ số bậc 1, bậc 2 của phương trình hồi quy; X_n , X_m là các giá trị của biến độc lập.

Để chọn điều kiện tối ưu, phân tích hồi quy đa biến được áp dụng diễn tả sự thay đổi hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học (polyphenol tổng, beta-carotene, vitamin C) của dịch quả thanh trà được xác định là biến phụ thuộc vào nồng độ enzyme và thời gian trích ly được ghi nhận (ký hiệu là X_1 và X_2 tương ứng). Kiểm định sự tương thích của dữ liệu theo mô hình và thực nghiệm được thực hiện.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của loại và nồng độ enzyme (pectinase, hemicellulase) và thời gian trích ly đến hiệu suất thu hồi và chất lượng dịch quả thanh trà

3.1.1 Ảnh hưởng của loại và nồng độ enzyme (pectinase, hemicellulase) và thời gian trích ly đến hiệu suất thu hồi dịch quả

Hiệu suất trích ly dịch quả thanh trà được xử lý bằng enzyme pectinase và hemicellulase ở các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2: Ảnh hưởng của loại và nồng độ enzyme (pectinase và hemicellulase) và thời gian ủ/trích ly đến hiệu suất thu hồi dịch quả thanh trà (pH = 3,2)

Loại enzyme	Nồng độ enzyme (%)	Thời gian trích ly (phút)	Hiệu suất thu hồi (%)
Enzyme Pectinase	0,03	30	78,67*±0,10**
		45	79,56±0,77
		60	80,44±0,92
	0,04	30	83,11±0,77
		45	85,33±1,00
		60	81,33±1,00
	0,05	30	83,11±0,77
		45	84,00±1,00
		60	81,78±0,77
Enzyme Hemicellulase	0,03	30	77,78±0,77
		45	80,00±1,00
		60	79,11±1,54
	0,04	30	80,00±1,33
		45	81,78±0,77
		60	82,67±0,10
	0,05	30	81,78±1,54
		45	81,55±0,39
		60	81,78±0,77

Ghi chú: * Giá trị trung bình; ** Độ lệch chuẩn của giá trị trung bình

Pectin cùng với hemicellulose, cellulose tạo nên thành tế bào vững chắc. Khi nghiền dịch quả, pectin sẽ phóng thích theo làm cho độ nhớt dịch trích tăng cao, quá trình trích ly dịch quả trở nên khó khăn hơn (Nguyễn Minh Thủy và *ctv.*, 2013). Khi bổ sung enzyme pectinase và hemicellulase vào dịch quả thanh trà, quá trình trích ly dịch quả trở nên dễ dàng hơn, kết quả thu nhận đã cho thấy khi bổ sung từng loại enzyme pectinase và hemicellulase vào dịch quả thanh trà, enzyme pectinase đã cho hiệu suất thu hồi dịch quả cao hơn so với hemicellulase (Bảng 3).

Bảng 3: Ảnh hưởng của enzyme pectinase và hemicellulase đến hiệu suất thu hồi dịch quả thanh trà (pH =3,2)

Loại enzyme	Hiệu suất thu hồi (%)
Enzyme pectinase	81,93 ^a
Enzyme hemicellulase	80,72 ^b

Ghi chú: các chữ cái đi kèm với các trung bình nghiệm thức khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa (độ tin cậy 95%)

Khi bổ sung chế phẩm pectinase vào dịch quả thanh trà, hiệu suất trích ly dịch quả cao (81,93%) và khác biệt ý nghĩa thống kê so với mẫu bổ sung enzyme hemicellulase (80,72%). Enzyme pectinase là hệ enzyme thương mại bao gồm enzyme hemicellulase, cellulose, protease, ... khi được bổ sung vào khối thịt quả thanh trà nghiền, chúng sẽ lần lượt phân cắt các thành phần cấu tạo nên thành tế bào, phá vỡ cấu trúc và giải phóng các thành phần bên trong (bao gồm nước và các hợp chất

màu). Chính vì vậy, lượng dịch quả thanh trà tăng lên đáng kể. Bên cạnh đó, việc bổ sung enzyme hemicellulase, cellulose được phân cắt làm cho thành tế bào trở nên lỏng lẻo, tế bào bị phá vỡ nên dễ dàng thoát nước, thu hồi dịch quả thanh trà nhiều hơn khi không bổ sung enzyme (74,67%).

Bảng 4: Ảnh hưởng của nồng độ enzyme (pectinase và hemicellulase) đến hiệu suất thu hồi dịch quả thanh trà (pH =3,2)

Nồng độ enzyme (%)	Hiệu suất thu hồi (%)
0,03	79,26 ^b
0,04	82,37 ^a
0,05	82,33 ^a

Ghi chú: các chữ cái đi kèm với các trung bình nghiệm thức khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa (độ tin cậy 95%)

Dịch nghiền được bổ sung enzyme pectinase, hemicellulase ở các nồng độ đã thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về lượng dịch thanh trà trích ly được thu hồi (Bảng 4). Hiệu suất thu hồi dịch quả có khuynh hướng tăng (từ 79,26 đến 82,37%) khi bổ sung enzyme từ nồng độ 0,03 đến 0,04% vào thịt quả thanh trà nghiền. Nếu tiếp tục tăng nồng độ enzyme lên 0,05% cho vào dịch nghiền thanh trà thì hiệu suất trích ly dịch quả không thay đổi đáng kể (82,33%) và không tìm thấy sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với khi sử dụng nồng độ enzyme là 0,04%. Khi thừa cơ chất, vận tốc phản ứng tăng khi nồng độ enzyme tăng nhưng khi nồng độ enzyme bão hòa với nồng độ cơ chất, vận tốc phản ứng không thay đổi hoặc

không tăng thêm khi tăng nồng độ enzyme (Nguyễn Nhật Minh Phương và *ctv.*, 2011).

Bảng 5: Ảnh hưởng của thời gian ủ/trích ly đến hiệu suất thu hồi dịch quả thanh trà (pH = 3,2)

Thời gian trích ly	Hiệu suất thu hồi (%)
30	80,74 ^b
45	82,04 ^a
60	81,18 ^b

Ghi chú: các chữ cái đi kèm với các trung bình nghiệm thức khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa (độ tin cậy 95%)

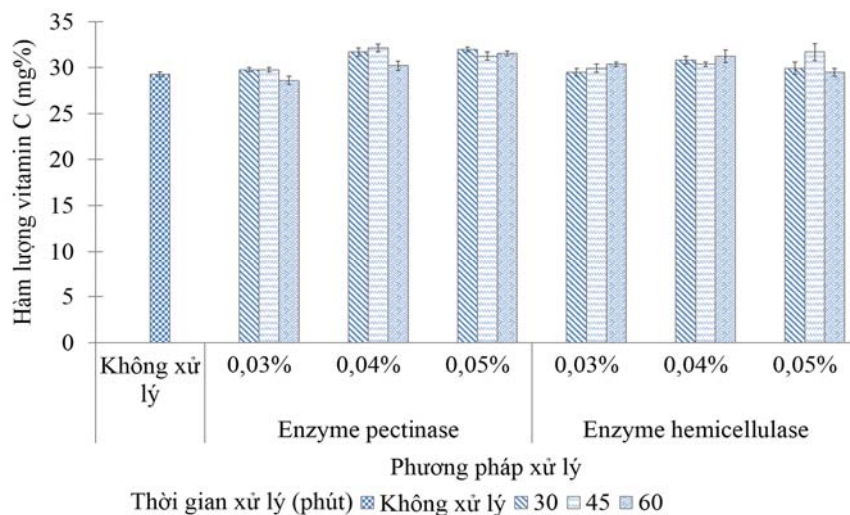
Bên cạnh đó, thời gian ủ dịch quả nghiền cũng cho hiệu suất thu hồi dịch quả thanh trà cao (Bảng 5). Khi tăng thời gian ủ/trích ly dịch quả từ 30 lên 45 phút thì hiệu suất thu hồi dịch quả có xu hướng tăng từ 80,74 đến 82,04%. Nguyễn Nhật Minh Phương và *ctv.* (2011) cho rằng kéo dài thời gian hoạt động thủy phân của enzyme là cần thiết để tạo ra lượng dịch quả nhiều, nhưng thời gian quá dài cũng không tạo ra lượng sản phẩm nhiều hơn mà có thể mất nhiều thời gian, tương đồng kết quả thu nhận của nghiên cứu này, ủ ở 60 phút thì hiệu suất thu hồi có xu hướng giảm ít (81,18%). Ngược lại, thời gian thủy phân quá ngắn (30 phút) là không đủ cho phản ứng thủy phân nên hiệu suất thu hồi dịch quả cũng thấp (80,74%). Do đó, enzyme pectinase

0,04% được bổ sung vào dịch quả thanh trà và thời gian ủ (trích ly) là 45 phút cho hiệu suất thu hồi cao nhất (85,33%).

3.1.2 Ảnh hưởng của loại, nồng độ enzyme và thời gian trích ly đến chất lượng dịch quả thanh trà

Hàm lượng vitamin C

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng acid ascorbic trong dịch quả thanh trà sau khi trích ly có sự khác biệt ý nghĩa giữa mẫu có bổ sung enzyme pectinase và hemicellulase (Hình 1). Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng vitamin C trong dịch quả thanh trà xử lý enzyme thể hiện cao hơn so với mẫu không xử lý (đối chứng). Nồng độ enzyme pectinase sử dụng 0,04% và thời gian ủ/trích ly 45 phút cho dịch trích có hàm lượng vitamin C cao nhất (32,12 mg%). Khi nồng độ enzyme pectinase sử dụng cao hơn (0,05%), hiệu suất trích ly tăng và thể hiện sự khác biệt ý nghĩa so với các nồng độ xử lý enzyme khác, có thể do enzyme nồng độ cao đã phân cắt pectin thành tế bào mạnh mẽ hơn, cấu trúc tế bào trở nên lỏng lẻo, chất hòa tan khuếch tán ra ngoài nhiều nên hàm lượng vitamin C phân tích được cao hơn (El-Zoghbi *et al.*, 1992). Thời gian ủ mẫu cũng ảnh hưởng đến sự thay đổi hàm lượng acid ascorbic, thời gian ủ mẫu dài có thể làm giảm hàm lượng này do vitamin C dễ bị oxy hóa ở nhiệt độ khí quyển thông thường.



Hình 1: Ảnh hưởng của phương pháp xử lý enzyme và thời gian trích ly đến hàm lượng vitamin C trong dịch quả thanh trà

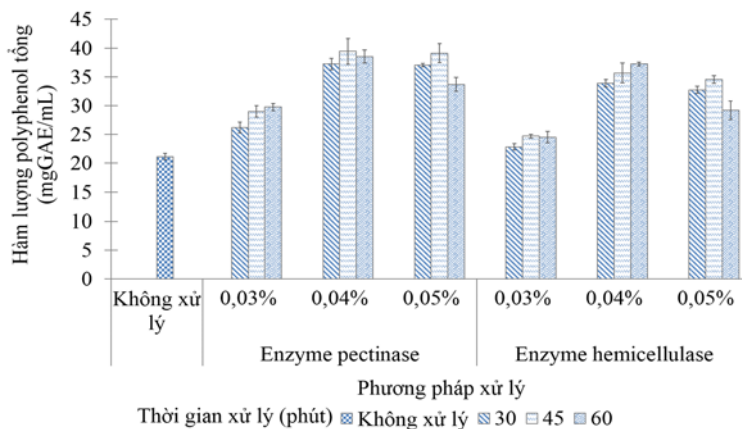
Hàm lượng polyphenol tổng (TPC)

TPC cao ở các mẫu dịch quả thu nhận khi bổ sung enzyme (pectinase và hemicellulase) ở các mức nồng độ khác nhau và thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa so với mẫu đối chứng (không bổ sung enzyme) (Hình 2). Xử lý enzyme làm tăng khả năng phá hủy tế bào, tăng khả năng hòa tan, giảm độ nhớt

dung dịch và giải phóng các hợp chất có hoạt tính sinh học (Sharma *et al.*, 2014; Neidhart *et al.*, 2002). Khi bổ sung enzyme pectinase và hemicellulase vào dịch quả, TPC trong dịch quả thanh trà có xu hướng tăng từ 0,03% lên 0,04% và giảm xuống khi bổ sung ở nồng độ 0,05%, TPC trong dịch trích thanh trà cao nhất khi bổ sung enzyme pectinase 0,04%. Khi cơ chất tiếp xúc với enzyme, phá vỡ

thành tế bào sẽ phóng thích phenolic từ các hợp chất phenol ở dạng liên kết, có sự chuyển hóa hợp chất phenolic ở dạng không hòa tan thành hòa tan, có sự phân hủy của lignin dẫn đến phóng thích dẫn xuất acid phenolic hoặc làm phát sinh thêm phenolic mới, làm cho TPC trong dịch quả tăng. Khi thừa cơ chất,

vận tốc phản ứng tăng khi nồng độ enzyme tăng nhưng khi nồng độ enzyme bão hòa với nồng độ cơ chất thì vận tốc phản ứng không thay đổi hoặc không tăng thêm khi tăng nồng độ enzyme (Nguyễn Nhật Minh Phương và *ctv.*, 2011).

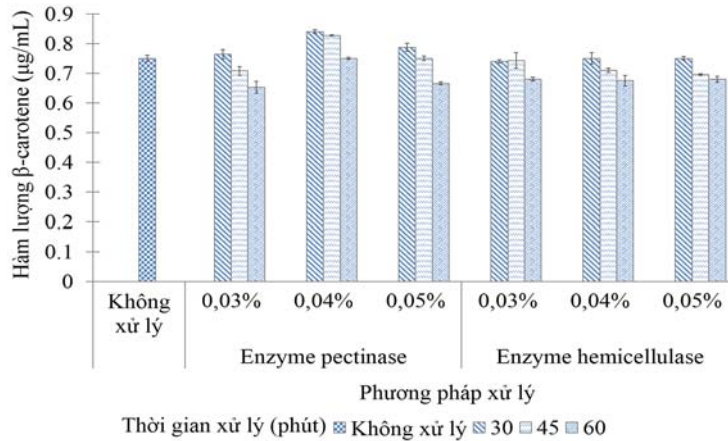


Hình 2: Ảnh hưởng của phương pháp xử lý enzyme và thời gian trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng trong dịch quả thanh trà

Khi bổ sung nồng độ enzyme pectinase 0,04% kết hợp với thời gian ủ 30 và 45 phút, TPC trong dịch quả thanh trà có xu hướng tăng (từ 37,23 lên 39,42 mgGAE/mL), tiếp tục tăng thời gian ủ lên 60 phút, TPC trong dịch quả có khuynh hướng giảm xuống (38,53 mgGAE/mL). Khuynh hướng tăng giảm hàm lượng polyphenol trong dịch trích theo thời gian cũng tương tự khi bổ sung enzyme pectinase 0,05% vào dịch nghiền thanh trà và TPC trong dịch quả thanh trà cao khi bổ sung enzyme hemicellulase ở nồng độ 0,04%. Sự thẩm dung môi và hòa tan chất khô tăng khi thời gian ủ/trích ly tăng đã cải thiện hiệu quả và tốc độ trích ly, vì vậy hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học trong dịch quả cao hơn. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng thời gian trích ly, TPC trong dịch quả thanh trà có khuynh hướng giảm, có lẽ do sự suy thoái của các hợp chất phenolic trong điều kiện khí quyển khi oxy hiện diện.

Hàm lượng β -carotene

Loại, nồng độ enzyme pectinase và hemicellulase và thời gian ủ/trích ly cũng có ảnh hưởng đến hàm lượng β -carotene của dịch trích thanh trà (Hình 3). Hàm lượng β -carotene của dịch quả thanh trà ở các mẫu bổ sung enzyme pectinase và hemicellulase có khuynh hướng giảm theo thời gian ủ enzyme từ 30 đến 40 phút, do khi ủ/trích ly trong thời gian dài, β -carotene dễ bị phá hủy bởi các tác nhân như các phản ứng pectolytic, ánh sáng, nhiệt độ quá trình oxy hóa (Ferreira and Rodriguez-Amaya, 2008). Tuy nhiên, hàm lượng β -carotene trong dịch quả thanh trà có khuynh hướng cao (0,84 và 0,83 μ g/mL) khi sử dụng enzyme pectinase 0,04% kết hợp với thời gian ủ 30 và 45 phút. Ghosh and Biswas (2016) đã báo cáo enzyme pectinase hỗ trợ tốt quá trình trích ly carotenoid của quả bí ngô, dẫn đến làm tăng sản lượng carotenoid 33,3% (w/w) trong trường hợp mẫu được xử lý bằng pectinase.



Hình 3: Ảnh hưởng của phương pháp xử lý và thời gian trích ly đến hàm lượng β-carotene trong dịch quả thanh trà

3.2 Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng (nồng độ enzyme, thời gian trích ly) đến quá trình trích ly dịch quả

3.2.1 Hiệu suất trích ly dịch quả

Hiệu suất trích ly (HSTL) dịch quả cũng chịu ảnh hưởng của nồng độ enzyme pectinase (X_1 :

0,035-0,045%) và thời gian trích ly (X_2 : 40-50 phút). Kết quả phân tích thống kê (Bảng 6) cho thấy ảnh hưởng của từng biến độc lập riêng lẻ (X_1 , X_2), giá trị bậc hai (X_1^2 , X_2^2) và hay tương tác (X_1X_2) đều thể hiện có ý nghĩa ($P < 0,05$) khi tham gia vào mô hình.

Bảng 6: Kiểm tra mức độ ý nghĩa của các hệ số hồi quy cho HSTL dịch quả

Nguồn	Tổng bình phương	Độ tự do	Tỷ số F	Giá trị P
X_1	10,794	1	6,06	0,0221
X_2	830,850	1	466,62	0,0000
X_1^2	144,678	1	81,25	0,0000
X_1X_2	30,925	1	17,37	0,0004
X_2^2	214,753	1	120,61	0,0000

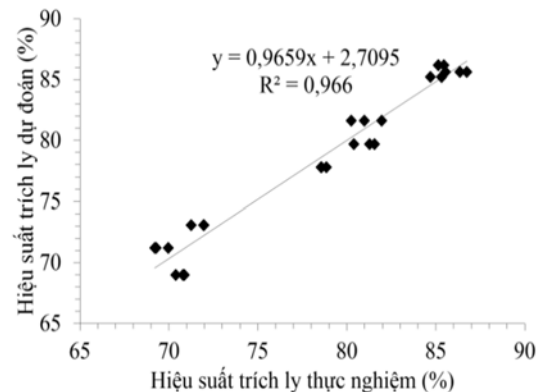
Mô hình tương quan xây dựng từ thí nghiệm đã thỏa điều kiện với hệ số xác định R^2 cao ($R^2=96,65\%$) và giá trị R^2 hiệu chỉnh đạt 95,96%. Mặt khác, giá trị R^2 của mô hình còn thể hiện sự tương thích cao giữa các giá trị thực nghiệm và dự đoán. Mô hình tương quan được đánh giá tốt khi hệ số xác định tương quan R^2 lớn hơn 0,8 (Guan and Yao, 2008). Mô hình hồi quy đa chiều mô tả mối quan hệ giữa HSTL dịch quả và các biến độc lập được thiết lập (phương trình 2).

$$HSTL (\%) = -511,17 + 13417,2X_1 + 15,64X_2 + 129919X_1^2 - 64,2133X_1X_2 + 0,1583X_2^2 \quad (R^2=0,97) \quad (2)$$

Trong đó, X_1 là nồng độ enzyme pectinase (%), X_2 là thời gian trích ly (phút).

Mức độ tương thích giữa HSTL dịch quả thực nghiệm và dự đoán theo phương trình hồi quy 2 đã được tìm thấy: $y = 0,9659x + 2,7095$ với hệ số xác định tương quan $R^2 = 0,966$ (Hình 4). Đồ thị bề mặt đáp ứng thể hiện tác động của nồng độ enzyme

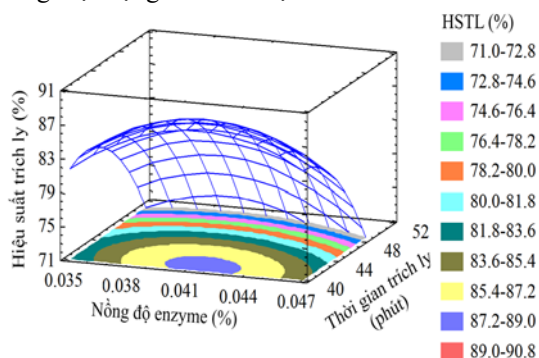
pectinase và thời gian trích ly đến HSTL dịch quả thanh trà (Hình 5).



Hình 4: Tương quan giữa HSTL thực nghiệm và dự đoán theo mô hình (2)

Nồng độ enzyme và thời gian trích ly ảnh hưởng đồng thời đến HSTL. Việc kéo dài thời gian ủ thuận lợi cho quá trình thủy phân, tạo điều kiện cho enzyme tiếp xúc với cơ chất. Cụ thể, khi nồng độ enzyme pectinase 0,045% thời gian ủ 45 phút, hiệu

suất thu hồi dịch quả thanh trà cao (92,22%). Tuy nhiên, nếu nồng độ enzyme càng cao và thời gian ủ quá dài thì hiệu suất trích ly có khuynh hướng giảm, có thể là do mỗi enzyme chỉ có thể hoạt động tốt trong một trạng thái nhất định.



Hình 5: Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện tương quan giữa nồng độ enzyme pectinase và thời gian trích ly đến hiệu suất thu hồi dịch quả

3.2.2 Chất lượng dịch quả thanh trà

Từ cơ sở dữ liệu thực nghiệm thu nhận, các phương trình hồi quy thể hiện ảnh hưởng của nồng độ enzyme pectinase (X_1) và thời gian (X_2) ủ/trích ly đến hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học [TPC, beta-carotene (BETA) và vitamin C (VIT C)] được xây dựng (phương trình 3, 4, 5) với hệ số tương quan khá cao ($R^2 \geq 0,84$), vì vậy có thể sử dụng mô hình để dự đoán hàm lượng các hợp chất sinh học

theo nồng độ và thời gian ủ/trích ly. Độ tương thích của các giá trị thực nghiệm và dự đoán từ mô hình (TPC, BETA và VIT C) đã được tìm thấy ($R^2 \geq 0,84$).

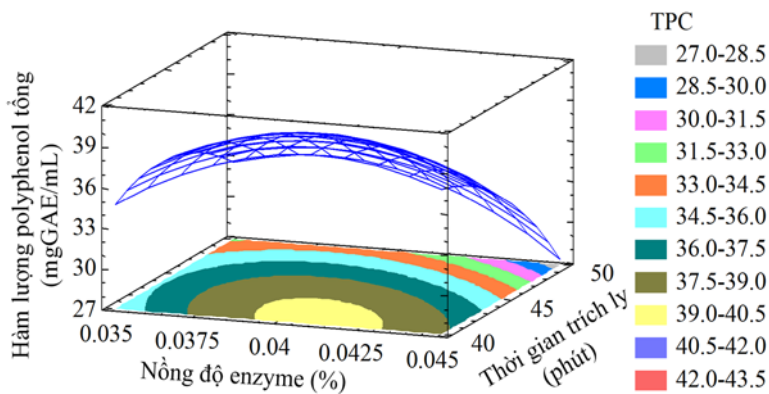
$$\text{TPC (mgGAE/mL)} = - 437,14 + 13445,2X_1 + 9,9X_2 - 122900X_1^2 - 82,79X_1X_2 - 0,08X_2^2 \quad (R^2=0,92) \quad (3)$$

$$\text{BETA (}\mu\text{g/mL)} = - 3,93 + 29,5X_1 + 0,18X_2 - 609,99X_1^2 + 0,5X_1X_2 - 0,002X_2^2 \quad (R^2=0,88) \quad (4)$$

$$\text{VIT C (mg\%)} = - 189,16 + 5198,44X_1 + 5,4X_2 - 46633,8X_1^2 - 30,56X_1X_2 - 0,05X_2^2 \quad (R^2=0,84) \quad (5)$$

Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện ảnh hưởng của nồng độ enzyme pectinase và thời gian trích ly dịch quả đến hàm lượng polyphenol tổng số được xây dựng (Hình 6). Các mô hình bề mặt đáp ứng của β -carotene và vitamin C cũng được xây dựng (dữ liệu không trình bày đầy đủ ở đây). Từ các mô hình bề mặt đáp ứng được xây dựng, có thể chọn Explore Response Surface (từ chương trình Statgraphic) để dò tìm nhanh các điểm tối ưu từ các đồ thị. Kết quả thu nhận hiệu quả trích ly dịch quả tối ưu của enzyme pectinase khi thực hiện ở nồng độ enzyme 0,041% và 43,2 phút trích ly.

Kết quả kiểm định (Bảng 7) cho thấy các dữ liệu thực nghiệm thu nhận được tương đương với kết quả tính toán từ các mô hình.



Hình 6: Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện tương quan giữa nồng độ enzyme pectinase và thời gian trích ly dịch quả thanh trà đến hàm lượng polyphenol tổng số

Bảng 7: HSTL và hàm lượng các hợp chất sinh học (polyphenol, β -carotene, vitamin C) lý thuyết và thực nghiệm ở điều kiện tối ưu

Chỉ tiêu theo dõi	Đơn vị	Giá trị thực nghiệm	Giá trị lý thuyết
Hiệu suất trích ly	%	86,85 \pm 0,075**	86,95
Hàm lượng polyphenol tổng	mgGAE/mL	38,34 \pm 0,65	38,94
Hàm lượng β -carotene	μ g/mL	0,81 \pm 0,006	0,83
Hàm lượng vitamin C	mg%	31,95 \pm 0,67	32,52

Ghi chú: * Giá trị trung bình; ** Độ lệch chuẩn của giá trị trung bình

4 KẾT LUẬN

Các phương trình hồi quy thể hiện ảnh hưởng của nồng độ enzyme pectinase và thời gian ủ/trích ly đến HSTL và hàm lượng các hợp chất sinh học được xây dựng (với hệ số xác định tương quan cao $\geq 0,84$). Kết quả tối ưu hóa đồng thời nhiều bề mặt đáp ứng cho thấy hiệu suất thu hồi và chất lượng dịch quả đạt giá trị cao khi bổ sung enzyme pectinase vào dịch quả với nồng độ 0,041% và thời gian 43,5 phút. Tại điểm tối ưu này, dịch quả thanh trà thu được với hiệu suất dịch quả là 86,64% và hàm lượng các hợp chất sinh học polyphenol tổng, β -carotene và vitamin C lần lượt là 38,89 mgGAE/mL, 32,41 mg%, 0,83 $\mu\text{g/mL}$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Demir, N., Acar, J., Sarioglu K. and Mutlu, M., 2000. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3. Immobilized pectinase for mash treatment. *Journal of Food Engineering*, 47 (4): 275-280.
- El-Zoghbi, M., El-Shamei, Z. and Habiba, R., 1992. Effect of enzyme application on some properties of guava puree. *Fluessiges Obst (Germany, FR)*.
- Ferreira, J.E.M., and Rodriguez-Amaya, D.B., 2008. Degradation of lycopene and β -carotene in model systems and in lyophilized guava during ambient storage: Kinetics, structure, and matrix effects. *Journal of Food Science*, 73(8): C589-C594.
- Fikselova, M., Silhar, S., Marecek, J. and Francakova, H., 2008. Extraction of carrot (*Daucus carota* L.) carotenes under different conditions. *Czech Journal of Food Science*, 26(4): 268-274.
- Ghosh, D. and Biswas, P.K., 2016. Enzyme-Aided Extraction of Carotenoids from Pumpkin Tissues. *Indian Chemical Engineer*, 58(1): 1-11.
- Guan, X. and Yao, H., 2008. Optimization of viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 106(1): 345-351.
- Hossain, M.A., AL-Raqmi, K.A.S., AL-Mijizy, Z.H., Weli, A.M. and Al-Riyami, Q., 2013. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(9): 705-710.
- Kurozawa, L.E., Park, K.J. and Hubinger, M.D., 2008. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 73(5): C405-C412.
- Muhammad, T.N., 2009. Production, purification and characterization of carboxymethyl cellulase for food applications. Doctoral dissertation. University of Agriculture Faisalabad.
- Neidhart, S., Reiter M., Mensah-Wilson, M., Stemmer, G., Braig, C., Sevinç, S. and Carle, R., 2002. Possibilities for improving quality of fruit juices and drinks from tropical fruits by homogenization and addition of pectin. In *International Symposium Sustaining Food Security and Managing Natural Resources in Southeast Asia*, Jan, pp. 8-11.
- Nguyễn Minh Thủy và Nguyễn Thị Mỹ Tuyền, 2016. Kỹ thuật sau thu hoạch (bảo quản và chế biến) một số loại nông sản ở Đồng bằng sông Cửu Long. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ. 686 trang.
- Nguyễn Minh Thủy, Nguyễn Thị Nếp, Nguyễn Phú Cường, Nguyễn Thị Mỹ Tuyền, Đinh Công Dinh và Hồ Thanh Hương, 2013. Khảo sát ảnh hưởng của các thành phần bổ sung và điều kiện xử lý đến chất lượng nước khóm-chanh dây. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 27(b): 48-55.
- Nguyễn Nhật Minh Phương, Lý Nguyễn Bình, Châu Trần Diễm Ái và Chế Văn Hoàng, 2011. 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*, 20(a): 127-136.
- Nguyễn Văn Mùi, 2001. Thực hành hóa sinh học. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, 176 trang.
- Rajan, N.S. and Bhat, R., 2016. Antioxidant compounds and antioxidant activities in unripe and ripe kundang fruits (*Bouea macrophylla* Griffith). *Fruits*, 71(1): 41-47.
- Sharma, H.P., Patel, H. and Sharma, S., 2014. Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruits: A Review. *Trends in Post Harvest Technology*, 2(1): 01-14.
- Siripanuwat, K., Suna, P., Satsit, N., Boonyarat, C., Chulikhit, Y. and Daodee, S., 2012. The analysis of trace element and carotenoid content in *Bouea burmanica*. The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 "Pharmacy Profession in Harmony". Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand.
- Will, F., Bauckhage, K. and Dietrich, H., 2000. Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of the corresponding juices. *European Food Research and Technology*, 211(4): 291-297.