BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN THỊ NGUYÊN THẢO

THU NHẬN DỊCH CHIẾT GIÀU HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ CÂY XÁO TAM PHÂN NHẰM ỨNG DỤNG TRONG THỰC PHẨM

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm

Mã số: 9.54.01.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CHUYÊN NGÀNH CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM

Thành phố Hồ Chí Minh – 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN THỊ NGUYÊN THẢO

THU NHẬN DỊCH CHIẾT GIÀU HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ CÂY XÁO TAM PHÂN NHẰM ỨNG DỤNG TRONG THỰC PHẨM

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm
Mã số: 9.54.01.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM

Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Minh Xuân Hồng

PGS.TS. Phan Phước Hiền

Thành phố Hồ Chí Minh - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan mọi kết quả nghiên cứu của đề tài "**Thu nhận dịch chiết giàu hợp chất có hoạt tính sinh học từ cây xáo tam phân nhằm ứng dụng trong thực phẩm**" là công trình nghiên cứu của cá nhân tôi. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực, không sao chép từ bất kỳ một nguồn nào và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác cho tới thời điểm này.

Tác giả luận án



Nguyễn Thị Nguyên Thảo

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện đề tài "**Thu nhận dịch chiết giàu hợp chất có hoạt tính sinh học từ cây xáo tam phân nhằm ứng dụng trong thực phẩm**", tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ và tạo điều kiện của tập thể lãnh đạo, cán bộ, giảng viên, chuyên viên và các em học viên cao học, sinh viên Khoa Công nghệ Hoá học và Thực phẩm – Trường Đại học Nông Lâm Tp.HCM; Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo sau Đại học, cán bộ các phòng, ban chức năng Trường Đại học Nông Lâm Tp.HCM; Ban giám hiệu và Khoa Khoa học Tự nhiên – Trường Đại học Phú Yên; Các thầy cô Bộ môn Công nghệ Thực phẩm – Trường Đại học Bách Khoa Tp.HCM; Các nhà khoa học và Trung tâm chuyển giao công nghệ thuộc Viện Hoá học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam tại Tp.HCM; Các cơ quan, đơn vị tư nhân đã hỗ trợ tôi trong quá trình thực hiện thí nghiệm. Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành về sự giúp đỡ trên.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc của mình đến TS. Nguyễn Minh Xuân Hồng và PGS.TS. Phan Phước Hiền đã tận tình hướng dẫn tôi trong quá trình học tập, thực hiện đề tài và hoàn thành luận án.

Cuối cùng, tôi xin chân thành cảm ơn đến gia đình và bạn bè luôn động viên, khích lệ và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Nghiên cứu sinh



Nguyễn Thị Nguyên Thảo

TÓM TẮT LUẬN ÁN

Tên luận án: Thu nhận dịch chiết giàu hợp chất có hoạt tính sinh học từ cây xáo tam phân nhằm ứng dụng trong thực phẩm.

Tác giả: NCS. Nguyễn Thị Nguyên Thảo

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm. Mã số: 9.54.01.01

Luận án tập trung vào việc nghiên cứu chiết xuất các hợp chất sinh học từ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum) và ứng dụng chúng trong thực phẩm. Mục tiêu của nghiên cứu là (i) xác định thành phần hoá học của cây qua các độ tuổi để chọn ra thời điểm thu hoạch tối ưu; (ii) khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly phenolic và saponin, và tối ưu hóa phương pháp trích ly; (iii) đánh giá hiệu quả cô đặc dịch chiết bằng phương pháp cô đặc lạnh đông; (iv) chọn được hệ màng bao thích hợp bao gói dịch chiết; (v) ứng dụng chế phẩm trích ly từ xáo tam phân trong chế biến bánh quy nhằm đem lại giá trị dinh dưỡng cao.

Đầu tiên, nghiên cứu xác định được lá cây XTP 4 tuổi chứa hàm lượng cao các hợp chất phenolic và saponin, đồng thời là nguồn nguyên liệu có tính bền vững và kinh tế cao hơn so với các bộ phận khác của cây.

Nghiên cứu tiếp tục tối ưu hóa quá trình trích ly bằng cách sử dụng enzyme (pectinase và cellulase) và siêu âm, giúp tăng hiệu suất trích ly các hợp chất sinh học. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng phương pháp kết hợp siêu âm và enzyme (U-EAE) mang lại hiệu quả cao nhất, với hàm lượng phenolic và saponin tăng lần lượt là 95% và 129% so với mẫu không xử lý.

Dịch chiết sau đó được làm giàu bằng kỹ thuật cô đặc lạnh đông khối và đánh giá hiệu quả của quy trình đạt 65 – 67%.

Tiếp theo, nghiên cứu đã sử dụng hệ màng bao sodium alginate-chitosan để bảo vệ dịch chiết, giúp giảm thiểu sự mất mát các hợp chất sinh học trong quá trình bảo quản và chế biến thực phẩm. Đánh giá động học giải phóng các hợp chất từ màng bao

cho thấy hiệu quả của việc bao gói trong việc duy trì hoạt tính của các hợp chất sinh học ở các điều kiện nhiệt độ và pH khác nhau.

Cuối cùng, ứng dụng thực tiễn của nghiên cứu được thể hiện qua việc bổ sung dịch chiết và hạt vi bao vào bánh quy, làm tăng giá trị dinh dưỡng và thời gian bảo quản sản phẩm.

Các kết quả này cung cấp cơ sở khoa học cho việc ứng dụng cây xáo tam phân trong thực phẩm chức năng và dược phẩm, đồng thời mở ra hướng nghiên cứu phát triển sản phẩm mới từ nguồn nguyên liệu thiên nhiên giàu các hợp chất sinh học.

ABSTRACT

The thesis focuses on studying the extraction of bioactive compounds from the xao tam phan (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum) plant and their application in food. The research objectives are (i) to identify the chemical compositions of the XTP plant at different ages to select optimal harvesting time; (ii) to investigate the factors influencing the extraction process of phenolic and saponin compounds, and optimize the extraction method; (iii) to evaluate the efficiency of the extract concentrating using cryo-concentration methods; (iv) to select a suitable encapsulation membrane for the XTP extract; (v) to apply the XTP extract in the biscuit formula for nutritional enhancement.

Firstly, the study has identified that the 4-year-old XTP leaves contain high amounts of phenolics and saponins, and are also a more sustainable and economically viable source than other parts of the plant.

The study has further optimized the extraction process by treatment with enzymes (pectinase and cellulase) and ultrasound, which increases the extraction efficiency of bioactive compounds. The results showed that the combined ultrasound and enzyme method (U-EAE) is the most effective, with phenolic and saponin amounts increasing by 95% and 129%, respectively, compared to the untreated sample.

The extract is then enriched using a freeze concentration technique, and the efficiency of the process has been obtained at 65 - 67%.

Next, the study employed the sodium alginate-chitosan encapsulation membrane to protect the extract and minimize the loss of bioactive compounds during food preservation and processing. The kinetic evaluation of the compound released from the encapsulation showed the effectiveness of encapsulation in maintaining the activity of the bioactives under different temperature and pH conditions.

Finally, the practical application of the research has demonstrated by supplement the extract and microencapsulated beads to biscuits, enhancing the nutritional value and shelf-life of the product.

These results have provided a scientific basis for the application of the XTP plant in functional foods and pharmaceuticals, and generate new directions for developing products from natural resources rich in bioactive compounds.

MỤC LỤC

Lời cam đoan.....i
Lời cảm ơn ii
Tóm tắt luận án..... iii
Abstract v
Mục lục..... vii
Danh mục các từ viết tắt..... xiii
Mục lục bảng.....xv
Mục lục hình xvii
MỞ ĐẦU 1
Chương 1. TỔNG QUAN 5
1.1. Tổng quan về cây xáo tam phân.....5
1.1.1. Đặc điểm thực vật học và sự phân bố 5
1.1.2. Thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của cây xáo tam phân 6
1.1.2.1. Thành phần hoá học 6
1.1.2.2. Hoạt tính sinh học của cây XTP.....11
1.2. Phương pháp thu nhận các hợp chất sinh học từ thực vật.....12
1.2.1. Phương pháp trích ly với sự hỗ trợ của enzyme (EAE).....13
1.2.1.1. Cấu tạo thành tế bào thực vật và cơ chế phân cắt đặc hiệu của các enzyme14
1.2.1.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly enzyme 16
1.2.2. Phương pháp trích ly với sự hỗ trợ của sóng siêu âm (UAE) 17
1.2.2.1. Cơ chế tác động của sóng siêu âm trong môi trường lỏng.....17
1.2.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly bằng siêu âm.....19
1.2.3. Trích ly bằng enzyme có hỗ trợ của sóng siêu âm (UAEE) 20
1.3. Làm giàu các hợp chất sinh học của dịch chiết bằng kỹ thuật cô đặc lạnh.....21
1.3.1. Tổng quan về kỹ thuật cô đặc chất lỏng.....21
1.3.2. Kỹ thuật cô đặc lạnh và một vài ứng dụng trong thực phẩm 22
1.4. Công nghệ vi bao các hợp chất có hoạt tính sinh học.....24

1.4.1. Kỹ thuật vi bao 24
1.4.2. Kỹ thuật vi bao đông tụ (coacervation).....25
1.4.3. Vật liệu màng bao 26
1.4.3.1. Sodium alginate (SA).....26
1.4.3.2. Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC).....27
1.4.3.3. Chitosan.....27
1.4.3.4. Pectin.....27
1.4.4. Động học giải phóng các hợp chất sinh học bên trong hạt vi bao 28
1.4.5. Ứng dụng hạt vi bao trong thực phẩm 29
1.4.5.1. Tổng quan về ứng dụng hạt vi bao trong thực phẩm 29
1.4.5.2. Ứng dụng hạt vi bao vào bánh quy 30
1.4.6. Đánh giá một số tính chất sinh học của thực phẩm bằng phương pháp tiêu hoá trong ống nghiệm (In vitro digestion) 35
1.4.6.1. Phương pháp tiêu hoá trong ống nghiệm (In vitro).....35
1.4.6.2. Khả năng tiếp cận sinh học (bioaccessibility).....35
CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 37
2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....37
2.2. Vật liệu nghiên cứu 37
2.2.1. Xáo tam phân 37
2.2.2. Các chế phẩm enzyme.....38
2.2.3. Vật liệu vi bao và hoá chất phân tích 38
2.2.4. Nguyên liệu làm bánh 39
2.2.5. Thiết bị 39
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....39
2.3.1. Phân tích nguyên liệu 39
2.3.1.1. Khảo sát TPC và TSC ở các bộ phận cây và độ tuổi khác nhau.....39
2.3.1.2. Khảo sát thành phần hoá học của các bộ phận cây xáo tam phân 41
2.3.2. Khảo sát các thông số kỹ thuật của quá trình trích ly các hoạt chất sinh học của xáo tam phân với sự hỗ trợ của enzyme.....41

2.3.2.1. Thí nghiệm sơ bộ.....41
2.3.2.2. Thí nghiệm sàng lọc các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình xử lý enzyme pectinase và cellulase.....43
2.3.2.3. Thí nghiệm tối ưu hóa các thông số trích ly phenolic và saponin từ lá cây xáo tam phân sử dụng hỗn hợp enzyme pectinase và cellulase.....44
2.3.3. Khảo sát các thông số kỹ thuật của quá trình trích ly TPC, TSC từ lá xáo tam phân với sự hỗ trợ của sóng siêu âm.....45
2.3.3.1. Thí nghiệm sơ bộ.....45
2.3.3.2. Tối ưu hóa các thông số trích ly phenolic và saponin từ cây XTP với sự hỗ trợ của siêu âm.....45
2.3.4. So sánh hiệu quả của các phương pháp xử lý.....46
2.3.5. Khảo sát các thông số kỹ thuật của quá trình cô đặc lạnh.....46
2.3.6. Khảo sát các thông số kỹ thuật của quá trình vi bao dịch trích bằng phương pháp giọt tụ.....48
2.3.6.1. Khảo sát ảnh hưởng của loại màng bao đến hiệu quả vi bao.....48
2.3.6.2. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ vật liệu màng bao đến hiệu quả vi bao.....48
2.3.6.3. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ dịch trích và màng bao đến hiệu quả vi bao..48
2.3.6.4. Khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự ổn định của hạt vi bao.....49
2.3.6.5. Khảo sát động học phóng thích TPC, TSC trong môi trường nước.....49
2.3.7. Ứng dụng dịch trích và hạt vi bao trong sản phẩm bánh quy.....49
2.3.7.1. Khảo sát ảnh hưởng tỉ lệ hạt vi bao đến chỉ tiêu chất lượng bánh quy.....49
2.3.7.2. Đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết và hạt vi bao đến chất lượng của bánh quy theo thời gian và nhiệt độ bảo quản.....50
2.3.7.3. Sự giải phóng TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá của bánh quy bổ sung dịch trích XTP trong quá trình tiêu hoá in vitro.....50
2.4. Các phương pháp phân tích và xử lý số liệu.....52
2.4.1. Xác định hàm lượng ẩm.....52
2.4.2. Xác định hàm lượng TPC, TSC.....52
2.4.3. Phân tích sắc ký khối phổ LC-QTOF.....52

2.4.4. Hàm lượng chất khô tổng.....52
2.4.5. Xác định hoạt tính chống oxy hoá.....52
2.4.6. Xác định thành phần hoá học của nguyên liệu.....52
2.4.7. Hiệu quả cô đặc lạnh.....53
2.4.8. Xác định hiệu quả vi bao (MEE: microencapsulation efficiency).....53
2.4.9. Xác định mô hình giải phóng TPC, TSC từ hạt vi bao.....53
2.4.10. Phân tích hình thái học.....54
2.4.11. Phương pháp xác định màu sắc.....54
2.4.12. Phương pháp đo độ cứng bánh.....54
2.4.13. Phương pháp cảm quan.....54
2.4.14. Phương pháp xác định hoạt độ nước (A_w).....55
2.4.15. Tính toán động học phân huỷ TPC, TSC trong điều kiện bảo quản.....55
2.4.16. Chỉ số peroxide (PV).....56
2.4.17. Chỉ số khả năng tiếp cận sinh học (BI).....56
2.4.18. Phương pháp xử lý thống kê.....56
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....57
3.1. Thành phần hoá học của cây xáo tam phân.....57
3.1.1. Hàm lượng TPC và TSC của các bộ phận cây ở những độ tuổi khác nhau.....57
3.1.2. Thành phần hóa học của xáo tam phân.....58
3.2. Trích ly các hoạt chất sinh học từ lá cây XTP với sự hỗ trợ của enzyme.....60
3.2.1. Ảnh hưởng của điều kiện trích ly enzyme đến hàm lượng TPC và TSC trong dịch chiết.....60
3.2.1.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ nước/nguyên liệu.....60
3.2.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến TPC, TSC.....61
3.2.1.3. Ảnh hưởng của thời gian thuỷ phân đến TPC, TSC.....63
3.2.1.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ thuỷ phân đến TPC, TSC.....64
3.2.1.5. Ảnh hưởng của pH dịch chiết đến TPC, TSC.....65
3.2.2. Tối ưu hóa các thông số trích ly phenolic và saponin từ lá cây xáo tam phân sử dụng hỗn hợp enzyme pectinase và cellulase.....66

3.2.2.1. Sàng lọc các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến trích ly bằng enzyme.....66
3.2.2.2. Tối ưu hóa điều kiện trích ly phenolic và saponin từ lá cây xáo tam phân sử dụng hỗn hợp enzyme pectinase và cellulase.....68
3.3. Trích ly các hoạt chất sinh học từ lá XTP với sự hỗ trợ của sóng siêu âm.....74
3.3.1. Ảnh hưởng của năng lượng siêu âm đến TPC và TSC 75
3.3.2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý siêu âm đến hiệu quả trích ly TPC, TSC 76
3.3.3. Tối ưu hoá các thông số trích ly phenolic và saponin từ cây xáo tam phân với sự hỗ trợ của siêu âm.....77
3.4. So sánh hiệu quả của các phương pháp chiết xuất khác nhau 83
3.5. Phân tích thành phần phenolic và saponin trong dịch chiết lá XTP bằng sắc ký khối phổ LC-QTOF.....85
3.6. Khảo sát các thông số kỹ thuật của quá trình cô đặc lạnh 87
3.6.1. Tổng hàm lượng chất khô và hệ số nồng độ 87
3.6.2. Thành phần hoạt chất sinh học trong dịch chiết cô đặc và các phần nước đá...88
3.7. Các thông số kỹ thuật ảnh hưởng đến hiệu quả vi bao dịch trích 91
3.7.1. Ảnh hưởng của các công thức màng bao đến hiệu quả vi bao.....91
3.7.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ SA-chitosan đến hiệu quả vi bao.....94
3.7.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch trích-màng bao đến hiệu quả vi bao 96
3.7.4. Ảnh hưởng của pH đến độ ổn định của hạt vi bao.....99
3.7.4.1. Ảnh hưởng của pH đến độ ổn định hạt vi bao ở điều kiện gia nhiệt 99
3.7.4.2. Ảnh hưởng của pH đến độ ổn định của vi hạt ở điều kiện không gia nhiệt 100
3.7.5. Động học giải phóng TPC, TSC trong môi trường nước.....101
3.8. Ứng dụng dịch trích và vi hạt xáo tam phân trong bánh quy.....104
3.8.1. Ảnh hưởng của tỉ lệ dịch chiết và hạt vi bao đến chất lượng của bánh quy .104
3.8.1.1. Hàm lượng TPC và TSC sau 24 giờ bảo quản.....104
3.8.1.2. Độ cứng sản phẩm sau 24 giờ bảo quản 106
3.8.1.3. Màu sắc của sản phẩm sau 24 giờ bảo quản 107
3.8.1.4. Hoạt độ nước của bánh sau 24 giờ bảo quản 109

3.8.1.5. Đánh giá cảm quan của bánh sau 24 giờ bảo quản 110
3.8.2. Đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết và hạt vi bao xáo tam phân đến chất lượng của bánh quy trong quá trình bảo quản ở điều kiện gia tốc lão hóa.....112
3.8.2.1 Hàm lượng TPC và TSC sau 40 ngày bảo quản ở 30^{o}C, 40^{o}C và 50^{o}C 112
3.8.2.2. Độ cứng của bánh quy sau 40 ngày bảo quản ở 30^{o}C, 40^{o}C và 50^{o}C.....116
3.8.2.3. Màu sắc bánh quy sau 40 ngày bảo quản ở 30^{o}C, 40^{o}C và 50^{o}C.....118
3.8.2.4. Hoạt độ nước của bánh quy sau 40 ngày bảo quản ở 30^{o}C, 40^{o}C và 50^{o}C 121
3.8.2.5. Chỉ số peroxide của bánh quy sau 40 ngày bảo quản ở 30^{o}C, 40^{o}C và 50^{o}C 123
3.8.3. Sự giải phóng TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá của bánh quy bổ sung XTP trong quá trình tiêu hoá in vitro 126
3.8.3.1. Sự giải phóng TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá của bánh quy bổ sung XTP trong môi trường nước cất và môi trường giả định 126
3.8.3.2. Khả năng tiếp cận sinh học của TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hóa sau khi tiêu hóa hạt vi bao và bánh quy trong ống nghiệm 130

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 132
DANH MỤC CÁC CÔNG BỐ KHOA HỌC.....134
TÀI LIỆU THAM KHẢO 135
PHỤ LỤC.....151

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ANOVA	Analysis of variance – Phân tích phương sai
ARSC	ABTS radical scavenging capacity – Khả năng quét gốc tự do ABTS
ASE	Accelerated solvent extraction – Trích ly bằng dung môi được cải tiến
BFC	Block freeze-concentration – Cô đặc lạnh khối
BI	Bioaccessibility Index – Chỉ số khả năng tiếp cận sinh học
CF	Concentrated fluid – Chất lỏng cô đặc
Ck	Chất khô
CS	Control sample – Mẫu đối chứng không qua xử lý enzyme và siêu âm
CSE	Conventional solvent extraction – Trích ly bằng dung môi theo phương pháp truyền thống
CUPRAC	Cupric ion reducing antioxidant capacity – Khả năng chống oxy hóa giảm ion đồng
DPPH	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil
DRSC	DPPH radical scavenging capacity – Khả năng quét gốc tự do DPPH
EAE	Enzyme-assisted extraction – Trích ly bằng enzyme
EE	Escin equivalent – Đương lượng escin
FCR:	Folin-Ciocalteu Reagent – Thuốc thử Folin-Ciocalteu
FFFC:	Falling-film freeze concentration – Cô đặc lạnh đông màng rơi
FRAP	Ferric reducing antioxidant power – Khả năng chống oxy hóa khử sắt
GAE	Gallic acid equivalent – Đương lượng acid gallic
HE:	Hot water extraction – Trích ly bằng nước nóng
HGF	Human gastrointestinal fluid – Dịch tiêu hóa của con người
HPLC:	High pressure liquid chromatography – Sắc ký lỏng hiệu cao năng
MEE	Microencapsulation efficiency – Hiệu quả vi bao
PFC:	Progressive freeze concentration – Cô đặc lạnh đông tăng dần
RO:	Reverse osmosis – Thẩm thấu ngược

SFC:	Suspension freeze concentration – Cô đặc lạnh dạng huyền phù
SFE:	Supercritical fluid extraction – Trích ly bằng chất lỏng siêu tới hạn
SIF	Simulated intestinal fluid – Dịch tiêu hóa ruột dạng mô phỏng
TE:	Trolox equivalent – Đương lượng Trolox
TPC	Total phenolic compounds – Hợp chất phenolic tổng
TSC	Total saponin compounds – Hợp chất saponin tổng
UAE:	Ultrasound-assisted extraction – Trích ly bằng sóng siêu âm
UAEE:	Ultrasound assisted enzymatic extraction – Trích ly bằng enzyme có hỗ trợ của sóng siêu âm
XTP	Xáo tam phân

MỤC LỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các thành phần hoá thực vật của cây xáo tam phân 7
Bảng 1.2. Một số nghiên cứu bổ sung hạt vi bao dịch chiết giàu hợp chất sinh học vào sản phẩm bánh quy.....33
Bảng 2.1. Các biến trong ma trận Plackett-Burman.....43
Bảng 2.2. Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman.....43
Bảng 3.1. Thành phần hóa học trong các bộ phận của xáo tam phân 59
Bảng 3.2. Hệ số ảnh hưởng của các yếu tố trong thí nghiệm Plackett-Burman.....67
Bảng 3.3. Kết quả của thí nghiệm Plackett-Burman 68
Bảng 3.4. Khoảng biến thiên ba yếu tố dùng trong RSM-CCD 68
Bảng 3.5. Ma trận bố trí thí nghiệm mã hóa các biến độc lập.....69
Bảng 3.6. TPC và TSC theo thực nghiệm và dự đoán từ mô hình 69
Bảng 3.7. Các thông số của mô hình RSM-CCD phương pháp hỗ trợ trích ly enzyme 70
Bảng 3.8. TPC và TSC theo dự đoán của mô hình tối ưu và thực tế trích ly 74
Bảng 3.9. Bảng ma trận qui hoạch thực nghiệm và kết quả thu hồi TPC, TSC 78
Bảng 3.10. Các thông số của mô hình RSM-CCD phương pháp hỗ trợ siêu âm 79
Bảng 3.11. TPC và TSC theo dự đoán của mô hình tối ưu và thực tế trích ly 82
Bảng 3.12. TPC and TSC trong dịch chiết xử lý với các phương pháp khác nhau..83
Bảng 3.13. Hàm lượng chất khô trong dịch cô đặc, nước đá và hệ số nồng độ 87
Bảng 3.14. Thành phần các hoạt chất sinh học trong dịch chiết ban đầu, dịch cô đặc và nước đá ở mỗi giai đoạn cô đặc lạnh và hiệu quả quy trình (PE).....88
Bảng 3.15. TPC, TSC còn lại trong hạt vi bao ở các dung dịch pH khác nhau trong điều kiện gia nhiệt 90^{o}C trong 10 phút 99
Bảng 3.16. TPC, TSC còn lại trong hạt vi bao ở các dung dịch pH khác nhau tại điều kiện nhiệt độ phòng và bảo quản lạnh trong 7 ngày.....100
Bảng 3.17. Hệ số hồi quy của các mô hình dự đoán về tốc độ giải phóng TPC, TSC ở các điều kiện nhiệt độ môi trường nước khác nhau.....102

Bảng 3.18. Tổng hàm lượng phenolic trong bánh quy với các công thức bổ sung XTP 105
Bảng 3.19. Tổng hàm lượng saponin trong bánh quy với các công thức bổ sung XTP 105
Bảng 3.20. Độ cứng của bánh quy được đánh giá khi bổ sung dịch trích và vi hạt XTP 106
Bảng 3.21. Màu sắc của bánh quy bổ sung dịch trích ở các tỷ lệ khác nhau 108
Bảng 3.22. Màu sắc của bánh quy kết hợp với hạt vi bao XTP ở các tỷ lệ khác nhau 108
Bảng 3.23. Hoạt độ nước của bánh quy bổ sung dịch trích và hạt vi bao XTP.....110
Bảng 3.24. Động học suy thoái của TPC trong mẫu bánh sau 40 ngày bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau 115
Bảng 3.25. Động học suy thoái của TSC trong mẫu bánh sau 40 ngày bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau 115
Bảng 3.26. Màu sắc của bánh quy sau 40 ngày bảo quản của các mẫu bổ sung dịch trích và vi hạt ở 30^{o}C 119
Bảng 3.27. Màu sắc của bánh quy sau 40 ngày bảo quản của các mẫu bổ sung dịch trích và vi hạt ở 40^{o}C 119
Bảng 3.28. Màu sắc của bánh quy sau 40 ngày bảo quản của các mẫu bổ sung dịch trích và vi hạt ở 50^{o}C 120

MỤC LỤC HÌNH

Hình 1.1. Hình thái giải phẫu của *Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill. Cây bụi thân gỗ cao 1–4 m (a); Cây đang ra hoa (b); Hoa ba cánh điển hình (c); Quả xanh (d); Quả chín cây (e); Quả chín đã bóc ra có hai hạt được bao bọc bởi lớp màng nhầy (f) 5
Hình 1.2. Phổ sóng siêu âm (ultrasound) có tần số lớn hơn 20 kHz 19
Hình 2.1. Quy trình thu hồi bột xáo tam phân.....38
Hình 2.2. Sơ đồ quy trình thí nghiệm 40
Hình 2.3. Sơ đồ quy trình cô đặc lạnh dịch chiết lá XTP.....47
Hình 3.1. Hàm lượng phenolic tổng trong ba bộ phận cây ở các độ tuổi khác nhau 57
Hình 3.2. Hàm lượng saponin tổng trong ba bộ phận cây ở các độ tuổi khác nhau.58
Hình 3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ nước/nguyên liệu (a); nồng độ enzyme (b); thời gian xử lý (c); nhiệt độ (d); pH (e) lên TSC (các đường màu vàng) và TPC (các đường màu đen) trong dịch chiết lá XTP 62
Hình 3.4. Biểu đồ bề mặt đáp ứng của TPC (a-c) và TSC (d-f).....72
Hình 3.5. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình trích ly TPC và TSC 73
Hình 3.6. (A) TPC và (B) TSC của dịch chiết lá XTP xử lý với các mức năng lượng siêu âm khác nhau.....76
Hình 3.7. (A) TPC và (B) TSC của dịch chiết lá XTP xử lý với khoảng thời gian siêu âm khác nhau 77
Hình 3.8. So sánh giá trị thực nghiệm và giá trị ước đoán.....80
Hình 3.9. Biểu đồ bề mặt đáp ứng của TPC (a-c) và TSC (d-f).....81
Hình 3.10. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình trích ly TPC và TSC.....82
Hình 3.11. Ảnh hưởng của 3 hệ màng bao dến hiệu quả vi bao 92
Hình 3.12. Hình dạng ba loại hạt vi bao SA-pectin, SA-HPMC, SA-chitosan.....93
Hình 3.13. Quét vi điện tử (SEM) ở độ phóng đại 40 (1) và 5000 (2) lần của ba loại hạt vi bao SA-chitosan (A), SA-pectin (B) và SA-HPMC (C).....94

Hình 3.14. Ảnh hưởng của tỷ lệ màng bao đến hiệu quả vi bao 95
Hình 3.15. Hình chụp các vi hạt tạo ra từ 4 tỷ lệ màng bao SA-chitosan bằng kính hiển vi điện tử ở độ phóng đại 10 lần 96
Hình 3.16. Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch trích: màng bao đến hiệu quả vi bao.....97
Hình 3.17. Hình dạng vi hạt tạo ra từ 4 tỷ lệ dịch chiết:màng bao 98
Hình 3.18. Hàm lượng TPC (a), TSC (b) giải phóng ở các nhiệt độ khác nhau 102
Hình 3.19. Hình dạng bánh quy bổ sung dịch trích (D) và vi hạt (H) XTP 109
Hình 3.20. Biểu đồ mạng nhện về các thuộc tính cảm quan của bánh quy bổ sung dịch trích XTP.....111
Hình 3.21. Biểu đồ mạng nhện về các thuộc tính cảm quan của bánh quy bổ sung hạt vi bao XTP 111
Hình 3.22. Hàm lượng TPC, TSC của bánh quy bổ sung dịch trích (A1, A2) và hạt vi bao (B1, B2) sau 40 ngày bảo quản tại các mốc nhiệt độ khác nhau 113
Hình 3.23. Biểu đồ phân hủy bậc nhất của TPC, TSC của bánh quy bổ sung dịch trích (A1, A2) và hạt vi bao (B1, B2) sau 40 ngày bảo quản 114
Hình 3.24. Biểu đồ Arrhenius cho sự phân hủy của TPC, TSC trong bánh quy bổ sung dịch trích (A) và bánh quy bổ sung hạt vi bao (B) ở các nhiệt độ bảo quản khác nhau 116
Hình 3.25. Độ cứng bánh quy bổ sung dịch trích sau 40 ngày bảo quản.....117
Hình 3.26. Độ cứng bánh quy bổ sung hạt vi bao sau 40 ngày bảo quản 117
Hình 3.27. Bánh bổ sung dịch chiết (D) và vi hạt XTP (H) sau 40 ngày bảo quản 121
Hình 3.28. Hoạt độ nước của bánh quy bổ sung dịch trích XTP ở các mốc nhiệt độ khác nhau sau 40 ngày bảo quản 122
Hình 3.29. Hoạt độ nước của bánh quy bổ sung hạt vi bao XTP ở các mốc nhiệt độ khác nhau sau 40 ngày bảo quản 122
Hình 3.30. Giá trị peroxide của bánh quy bổ sung dịch trích XTP 124
Hình 3.31. Giá trị peroxide của bánh quy bổ sung vi hạt XTP 125

Hình 3.32. Sự giải phóng TPC, TSC (trái) và hoạt tính chống oxy hoá (phải) trong môi trường nước cất.....126
Hình 3.33. Sự giải phóng TPC, TSC (trái) và hoạt tính chống oxy hoá (phải) trong môi trường HGF 127
Hình 3.34. Chỉ số tiếp cận sinh học (BI) theo TPC, TSC (trái) và ABTS, DPPH (phải) của các mẫu trong môi trường HGF 130

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết và hướng nghiên cứu

Xáo tam phân (XTP) có tên khoa học là (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum), thuộc chi *Paramignya* của họ Cam quýt (Rutaceae) và được biết đến như một loại cây chữa bệnh ở Thái Lan và Việt Nam (Nguyễn Minh Khởi và cộng sự, 2013). Các nghiên cứu trên cây XTP đã minh chứng loài cây này chứa hàm lượng lớn phenol, saponin, flavonoid, proanthocyanidin và chất chống oxy hóa (Nguyen V. T. và cộng sự, 2017b). Các nghiên cứu dược lý gần đây cũng đã cho thấy XTP sở hữu khả năng chống oxy hóa (Nguyen V. T. và cộng sự, 2017a), độc tính tế bào (Nguyen V. T. và cộng sự, 2017b), bảo vệ gan (Nguyen và cộng sự, 2020), kháng viêm (Tuan Anh và cộng sự, 2017), hoạt tính ức chế α-glucosidase (Dang và cộng sự, 2017) và hoạt tính chống ung thư (Nguyen Thi và cộng sự, 2020).

Với sự đa dạng về các hoạt chất có tác dụng phòng và chữa bệnh, đã có khá nhiều các nghiên cứu về thành phần hoá học của cây xáo tam phân cũng như các quy trình phân lập, chiết tách các hoạt chất có tiềm năng làm nguồn dược liệu (Nguyen V. T. và cộng sự, 2015; Dang và cộng sự, 2017; Huong và cộng sự, 2019).

Ở Việt nam, XTP tập trung nhiều tại khu vực Nam Trung Bộ như: Khánh Hòa, Phú Yên, Ninh Thuận, Bình Thuận. Cây dược liệu này đang bị người dân săn lùng khai thác để làm thuốc và bán với giá thành tương đối cao, nên phạm vi phân bố của loài này ngày càng bị thu hẹp và có nguy cơ tuyệt chủng ngoài tự nhiên nếu không có biện pháp bảo tồn hữu hiệu. Phú Yên là vùng đất được thiên nhiên ưu đãi có khí hậu và thổ nhưỡng rất thuận lợi cho sự sinh trưởng của cây XTP. Trước nguy cơ tuyệt chủng, năm 2012 Sở Khoa học Công nghệ tỉnh cùng người dân địa phương đã triển khai nghiên cứu nhân giống và xây dựng mô hình trồng cây dược liệu này. Đến nay, dự án này đã nhân giống và trồng trên 10ha với độ tuổi cây lớn nhất là 12 năm tuổi. Hiện tại, nguồn tiêu thụ cây nhân giống chủ yếu là nguồn thu mua nhỏ lẻ từ người dân làm thuốc uống dân gian hỗ trợ trong điều trị các bệnh ung thư, tiểu đường và tăng cường sức khoẻ.

Đến nay, vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về thành phần hoá học và phương pháp chiết xuất các hoạt chất từ cây XTP nhân giống, cũng như chưa có sự so sánh về hàm lượng hoạt chất và hoạt tính sinh học so với cây tự nhiên. Các nghiên cứu trước đây chủ yếu chiết xuất và phân tách các hoạt chất từ dung môi hữu cơ như ethanol, methanol, hexan…; các hoạt chất khai thác được chỉ dừng lại ở phân tích định tính và định lượng, vẫn chưa được nghiên cứu sâu trong ứng dụng vào sản phẩm cụ thể. Do đó, một phương pháp chiết xuất xanh, thân thiện với môi trường, mang đến sự an toàn và giá trị kinh tế khi ứng dụng các hoạt chất vào lĩnh vực thực phẩm, dược phẩm cần được chú ý.

Các thành phần hoá học thực vật và tác dụng sinh học của XTP đã cho thấy tiềm năng ứng dụng trong dược phẩm và thực phẩm của loại cây này. Việc chiết xuất và cô đặc dịch chiết chứa các hoạt chất sinh học từ nguồn nguyên liệu tự nhiên này là một bước quan trọng trong quá trình sản xuất dược phẩm bổ sung, thực phẩm dinh dưỡng và các sản phẩm chăm sóc sức khỏe khác. Chúng có thể mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe như tăng cường hệ miễn dịch, chống oxy hóa, chống viêm, kiểm soát lượng đường trong máu … Chính vì vậy, việc tối ưu hóa quy trình chiết xuất, cô đặc, và nghiên cứu phát triển công nghệ vi bao dịch chiết cô đặc nhằm tăng khả năng bảo vệ và ổn định các hoạt chất sinh học khi ứng dụng vào sản phẩm thực phẩm, dược phẩm là những hướng nghiên cứu tiếp theo cần được đẩy mạnh.

Với việc kết hợp các hướng nghiên cứu trên, chúng tôi thực hiện đề tài "**Thu nhận dịch chiết giàu hợp chất có hoạt tính sinh học từ cây xáo tam phân nhằm ứng dụng trong thực phẩm**". Theo đó, các hoạt chất sinh học trong dịch chiết xáo tam phân được tối ưu hoá quá trình chiết xuất trong nước với sự hỗ trợ của các chế phẩm enzyme và kỹ thuật siêu âm, đồng thời được làm giàu bằng phương pháp cô đặc lạnh. Để bảo quản các hợp chất sinh học trong dịch chiết cô đặc một cách hiệu quả, kỹ thuật vi bao dịch chiết được nghiên cứu và ứng dụng thử nghiệm trong sản phẩm thực phẩm cụ thể là bánh quy.

Với mong muốn ứng dụng các hoạt chất sinh học quý của cây xáo tam phân nhân giống, chúng tôi hy vọng công trình nghiên cứu của mình sẽ góp phần phát triển các sản phẩm thực phẩm, dược phẩm an toàn, hiệu quả và có nguồn gốc thiên nhiên, đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của người tiêu dùng; đồng thời giúp bảo tồn được nguồn

gen thực vật quý hiếm này một cách bền vững, khuyến khích người dân trồng cây dược liệu, mang lại lợi ích kinh tế và gia tăng thu nhập.

Mục tiêu nghiên cứu của đề tài

Mục tiêu chung: Đề tài nghiên cứu quy trình trích ly và tạo ra chế phẩm giàu hợp chất có hoạt tính sinh học từ cây xáo tam phân nhân giống trồng tại Phú Yên nhằm cung cấp cơ sở khoa học cho việc sử dụng nguồn dược liệu này trong ngành thực phẩm.

Mục tiêu cụ thể: Đề tài khảo sát thành phần hoá học của dịch chiết từ cây XTP nhân giống, nghiên cứu tối ưu hoá các thông số kỹ thuật trong quy trình chiết xuất dịch chiết chứa hợp chất có hoạt tính sinh học từ bộ phận thích hợp của cây XTP, từ đó tạo ra chế phẩm giàu hợp chất phenolic và saponin nhằm ứng dụng trong thực phẩm.

Nội dung nghiên cứu

- Xác định thành phần hoá học của cây XTP nhân giống qua các độ tuổi và bộ phận khác nhau, từ đó chọn ra độ tuổi và bộ phận cây phù hợp để trích ly;
- Khảo sát các thông số kỹ thuật trong quy trình trích ly TPC và TSC từ cây XTP với sự hỗ trợ của enzyme (cellulase, pectinase), sóng siêu âm và sự kết hợp của hai phương pháp này;
- Khảo sát các thông số kỹ thuật trong quy trình cô đặc dịch chiết XTP;
- Khảo sát các thông số kỹ thuật trong quy trình bao gói dịch chiết cô đặc từ XTP bằng phương pháp vi bao giọt tụ, tính ổn định và động học phóng thích TPC và TSC của hạt vi bao XTP;
- Thử nghiệm ứng dụng dịch chiết và hạt vi bao XTP trong sản phẩm bánh quy.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Ý nghĩa khoa học

Luận án đã xác định được thành phần hoá học theo độ tuổi và bộ phận cây XTP nhân giống; đề xuất quy trình trích ly tối ưu TPC và TSC từ cây XTP sử dụng các chế phẩm enzyme kết hợp sóng siêu âm; đưa ra các thông số ảnh hưởng đến hiệu quả của kỹ thuật cô đặc lạnh dạng khối đối với dịch chiết lá XTP; đồng thời tìm ra điều kiện vi bao thích hợp để giữ ổn định chất lượng dịch chiết, nhằm nâng cao giá trị dinh dưỡng, cảm quan và hạn sử dụng cho sản phẩm bánh quy. Kết quả đề tài là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo.

Ý nghĩa thực tiễn

Luận án đã xây dựng được quy trình trích ly các hợp chất sinh học từ lá xáo tam phân, phương pháp cô đặc, vi bao dịch chiết và thử nghiệm trong chế biến bánh quy. Như vậy, đề tài đã góp phần tận dụng phụ phẩm từ cây XTP, nâng cao giá trị kinh tế cho cây, tạo ra sản phẩm thực phẩm có giá trị dinh dưỡng và giá trị chức năng cao.

Luận điểm mới của đề tài:

Về đối tượng nghiên cứu: Các nghiên cứu khác đều thực hiện trên nguồn nguyên liệu cây XTP mọc trong tự nhiên. Nghiên cứu này được thực hiện đối với cây XTP nhân giống trồng tại Phú Yên. Từ đó, việc trích ly các hoạt chất sinh học từ cây XTP có thể được khảo sát để chọn ra cây với độ tuổi phù hợp để thu hoạch và đem lại hiệu quả trích ly cao nhất. Do đó, đề tài góp phần hạn chế việc sử dụng quá mức nguồn nguyên liệu tự nhiên.

Đề tài thực hiện khảo sát hàm lượng phenolic và saponin trong các bộ phận khác nhau của cây và từ đó đề xuất việc sử dụng phù hợp các bộ phận này, chứ không chỉ sử dụng phần rễ như đang được thực hiện trong dân gian. Do đó, đề tài góp phần đề ra hướng sử dụng nguyên liệu thảo dược này một cách có lợi nhất, giúp tiết kiệm nguồn tài nguyên thiên nhiên.

Đề tài sử dụng phương pháp chiết xuất xanh, không sử dụng hóa chất làm dung môi trích ly mà sử dụng kết hợp enzyme và sóng siêu âm để hỗ trợ quá trình trích ly, nhằm tăng hiệu suất trích ly phenolic và saponin.

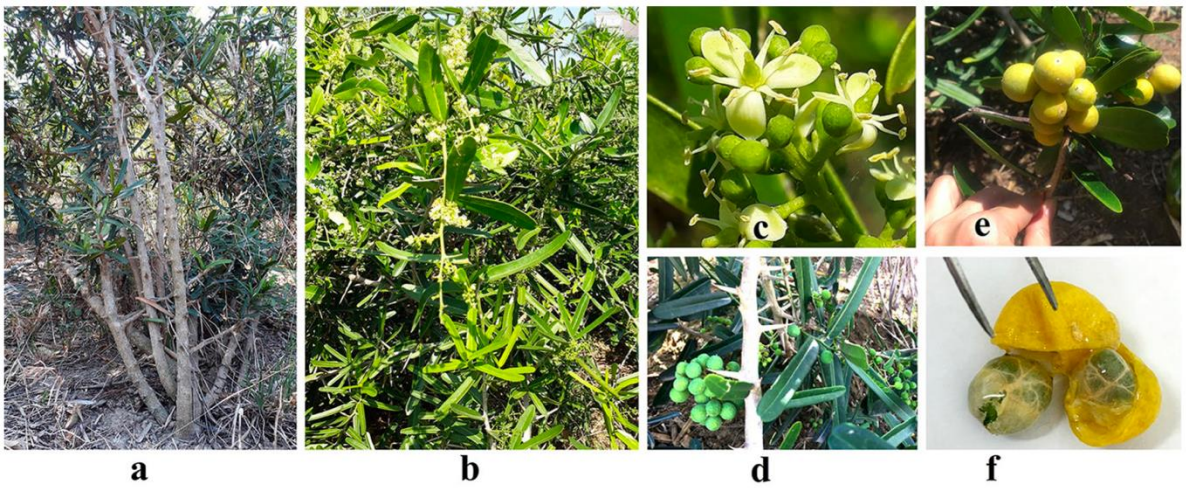
Đề tài sử dụng phương pháp cô đặc lạnh và vi bao giọt tụ để làm giàu và ổn định chế phẩm trích ly từ XTP, vốn chưa có nghiên cứu nào trước đây thực hiện trên XTP. Đề tài thử nghiệm ứng dụng chế phẩm trích ly từ XTP trong chế biến bánh quy để mở rộng phạm vi ứng dụng của nguồn thảo dược này so với phương pháp sử dụng truyền thống.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về cây xáo tam phân

1.1.1. Đặc điểm thực vật học và sự phân bố

Xáo tam phân có tên khoa học là *Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum, có thể được coi là loài *Atalantia trimera* Oliver, thuộc chi *Paramignia*, họ Cam quýt (*Rutaceae*) (Mabberley, 1998). Cây dạng bụi trườn; gai dài, hơi cong xuống; cành không lông. Lá mọc cách, hình thuôn dài đến tròn dài hẹp, kích thước 10-18 x 1-2,5 cm, bìa nguyên hơi uốn xuống, gân phụ 8-10 cặp; cuống ngắn, dài 2-3 mm. Phiến lá có mặt trên xanh đậm, mặt dưới nhạt hơn, bên trong có nhiều điểm dầu. Cụm hoa mọc ở nách gai. Hoa màu trắng ngà; đài 3 răng; cánh hoa 3, dài 4 mm; tiểu nhụy 3, rời nhau. Quả hình cầu, đường kính 14-15 mm. Các bộ phận của cây có tinh dầu, nhiều nhất là ở rễ, mùi thơm dịu rất đặc trưng (Phạm Hoàng Hộ, 1999).



Hình 1.1. Hình thái giải phẫu của *Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill. Cây bụi thân gỗ cao 1–4 m (a); Cây đang ra hoa (b); Hoa ba cánh điển hình (c); Quả xanh (d); Quả chín cây (e); Quả chín đã bóc ra có hai hạt được bao bọc bởi lớp màng nhầy (f) (Phi và cộng sự, 2020)

Chi *Paramignya* phân bố rộng rãi ở vùng nhiệt đới Nam Việt Nam, Nam Philippine, Thailan, Malaysia, Java-Indonesia, Australia, các vùng khô và ẩm ướt của Sri Lanka. Loài *Paramignya* đã xác lập giá trị làm thuốc cổ truyền của mỗi quốc gia. Rễ của loài *P. trimera*, trở thành một vị thuốc dân gian của Việt Nam để điều trị bệnh

viêm gan, tiểu đường và đặc biệt là có khả năng trị ung thư (Dang và cộng sự, 2017; Nguyễn Minh Khởi và cộng sự, 2013).

Cây dược liệu này đang bị người dân săn lùng, khai thác để làm thuốc bán với giá thành tương đối cao, nên phạm vi phân bố của loài này ngày càng bị thu hẹp và có nguy cơ tuyệt chủng ngoài tự nhiên nếu không có biện pháp bảo tồn hữu hiệu. Cây thích hợp với vùng đất nắng nóng, khí hậu khắc nghiệt, không ưa nước, chịu hạn tốt, có khả năng tái sinh tự nhiên bằng chồi nên có thể trồng bằng hạt hay giâm cành, rễ. Hiện nay, các nhà vườn áp dụng phương pháp giâm cành để nhân giống cây xáo tam phân. Nơi có diện tích trồng xáo tam phân lớn nước ta là vùng Ninh Vân, Ninh Hòa, thuộc tỉnh Khánh Hòa, nơi đây có điều kiện thổ nhưỡng thích hợp với loại cây này. Tuy nhiên, hiện nay việc chuyển giao kỹ thuật nhân giống, trồng cây còn hạn chế và xáo tam phân cũng là loại cây khó trồng, lại chậm phát triển. Năm 2014, Trung tâm nông nghiệp tỉnh Khánh Hòa thực hiện đề tài bảo tồn xáo tam phân bằng cách lập vườn cây đầu dòng với số lượng ban đầu 500 cây, đến năm 2015, vườn đã phát triển giâm hom chồi lên 5.000 cây; giai đoạn 2016 - 2017, trung tâm cung cấp cho thị trường khoảng 3.000 cây/năm. Ngoài ra, Công ty TNHH dược liệu Nam Việt cũng đã triển khai phát triển khu vực dược liệu trồng xáo tam phân trên diện tích 40 ha tại hai huyện Vạn Ninh và Ninh Hòa, với tỉ lệ trồng 1.000 cây/ha. Hiện tại thì xáo tam phân đã được trồng rộng rãi hơn tại các tỉnh Phú Yên, Ninh Thuận.

1.1.2. Thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của cây xáo tam phân

1.1.2.1. Thành phần hoá học

Các nghiên cứu về thành phần hóa thực vật của XTP đã được Ninh The Son (2018) tổng hợp và bổ sung thêm một số thành phần mới theo Bảng 1.1. Theo đó sự phân lập và làm sáng tỏ cấu trúc của các hợp chất chính đó là coumarin, alkaloid, phenol, flavonoid, phenol cùng với một số hợp chất khác như chromene, prenylated phenolic và apotirucallane protolimonoid. Trong 67 hợp chất tự nhiên được tìm thấy trên cây XTP có đến 63 hợp chất phenolic và 4 hợp chất khác. Phân tích sự phân bố hợp chất hóa học trong các bộ phận của cây cho thấy: thân chiếm ưu thế với 35 hợp chất, đặc biệt giàu phenol và flavonoid; rễ chứa 29 hợp chất, nổi bật với coumarin và acridone alkaloid; lá chỉ chứa 3 hợp chất, tập trung vào nhóm apotirucallane protolimonoids.

Sự phân bố không đồng đều này phản ánh chức năng sinh học đặc trưng của từng bộ phận cây. Thân và rễ là nguồn chính với đa dạng hợp chất, trong khi lá có thành phần hóa học đặc thù. Một số hợp chất xuất hiện trong cả thân và rễ, cho thấy sự tương đồng về mặt hóa học giữa hai bộ phận này.

Bảng 1.1. Các thành phần hoá thực vật của cây xáo tam phân

Thứ tự	Các hợp chất	Bộ phận	Tài liệu tham khảo
Coumarins and coumarin glycoside			
1	7-Hydroxycoumarin	Rễ	Trịnh Hoàng Dương và cộng sự, 2016
2	7-Methoxycoumarin	Rễ	Trịnh Hoàng Dương và cộng sự, 2016
3	Ostruthin	Rễ, thân	Nguyễn Mạnh Cường và cộng sự, 2013; Trần Thị Thuý Quỳnh và cộng sự, 2014; Trịnh Hoàng Dương và cộng sự, 2016; Tuan Anh và cộng sự, 2017; Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
4	Ninhvanin (8-Methoxyostruthin)	Rễ, thân	Nguyễn Mạnh Cường, và cộng sự, 2013; Trần Thị Thuý Quỳnh và cộng sự, 2014; Trịnh Hoàng Dương và cộng sự, 2016; Tuan Anh và cộng sự, 2017
5	6-(6-Hydroxy-3,7-dimethylocta-2,7-dienyl)-7-hydroxycoumarin	Rễ, thân	Nguyễn Mạnh Cường và cộng sự, 2013
6	Paratrimerin A	Rễ, thân	Nguyễn Mạnh Cường, và cộng sự, 2013
7	Paratrimerin B	Rễ, thân	Nguyễn Mạnh Cường, và cộng sự, 2013
8	Paratrimerin E (8a) 6-(6′,7′-Dihydroxy- 3′,7′-dimethylocta-2′-enyl)-7-hydroxycoumarin (8b)	Rễ, thân	Tuan Anh và cộng sự, 2017; Dang và cộng sự, 2017
9	Paratrimerin F	Rễ	Dang và cộng sự, 2017
10	Umbelliferone	Rễ	Dang và cộng sự, 2017
11	Scopoletin	Rễ	Dang và cộng sự, 2017
12	Xanthyletin	Rễ	Trần Thị Thuý Quỳnh và cộng sự, 2014; Dang và cộng sự, 2017
13	Pandanusin A	Rễ	Dang và cộng sự, 2017
14	8-Geranyl-7-hydroxycoumarin	Thân	Tuan Anh và cộng sự, 2017

Thứ tự	Các hợp chất	Bộ phận	Tài liệu tham khảo
15	6-(7-hydroperoxy-3,7-dimethylocta-2,5-dienyl)-7-hydroxycoumarin	Thân	Tuan Anh và cộng sự, 2017
16	Luvangetin	Thân	Tuan Anh và cộng sự, 2017
17	Demethylsuberosin	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
18	5-O-methylanisocoumarin B	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
19	Trans-3,4-dihydroxy-3,4-dyhydroanofinic acid	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
Acridone alkaloid			
20	Citrusinine-I	Rễ	Trịnh Hoàng Dương và cộng sự, 2016; Dang và cộng sự, 2017
21	Glycocitrine-III	Rễ	Trịnh Hoàng Dương và cộng sự, 2016; Dang và cộng sự, 2017
22	Oriciacridone E	Rễ	Dang và cộng sự, 2017
23	Oriciacridon	Rễ	Trịnh Hoàng Dương và cộng sự, 2016
24	5-Hydroxynoracronycin	Rễ	Trịnh Hoàng Dương và cộng sự, 2016; Dang và cộng sự, 2017
25	Paratrimerin C	Rễ	Dang và cộng sự, 2017
26	Paratrimerin D	Rễ	Dang và cộng sự, 2017
27	Paratrimerin I	Rễ	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
28	(E)-2-(prop- 1-enyl)-N-methyl quinolinium-4-olate	Thân	Nguyen N. T. và cộng sự, 2017
29	(R)-2-ethylhexyl 2H-1,2,3- triazole -4-carboxylate	Thân	Nguyen N. T. và cộng sự, 2017
30	(E)-2-(prop-1-enyl)-N-methyl quinolinium-4-olate	Thân	Nguyen N. T. và cộng sự, 2017
31	(R)-2-ethylhexyl 2H-1,2,3-triazole -4-carboxylate	Thân	Nguyen N. T. và cộng sự, 2017
Flavanones, Flavones, and Flavanone glycoside			
32	Psoralene	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
33	(S)-Marmesin	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
34	5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexa methoxyflavone	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
35	Xylobuxin	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
36	Li- quiritigenin	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
37	5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018

Thứ tự	Các hợp chất	Bộ phận	Tài liệu tham khảo
38	5-Hydroxy-3,7,8,3',4'-penta methoxyflavone	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
39	5,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
40	5,7,8,4'-tetramethoxyflavone	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
Phenol			
41	Methyl 4-hydroxybenzoate	Thân	Bùi Thị Thùy Linh và Đặng Hoàng Phú, 2015; Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
42	Methyl p-(E)-coumarate	Thân	Bùi Thị Thùy Linh và Đặng Hoàng Phú, 2015
43	Methyl syringate	Thân	Bùi Thị Thùy Linh, Đặng Hoàng Phú, 2015; Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
44	Vanillin	Thân	Bùi Thị Thùy Linh, Đặng Hoàng Phú, 2015; Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
45	(E)-Methyl3-(4′-hydroxy-3′,5′-dimethoxyphenyl) acrylate	Thân	Bùi Thị Thùy Linh, Đặng Hoàng Phú, 2015
46	Methyl ferulate	Thân	Bùi Thị Thùy Linh, Đặng Hoàng Phú, 2015
47	Methyl 4-hydroxy-3-methoxybenzoate	Thân	Bùi Thị Thùy Linh, Đặng Hoàng Phú, 2015
48	Vanillic acid	Rễ	Dang và cộng sự, 2017; Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
49	Methyl protocatechuate	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
50	Methyl vanillate	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
51	Syringic acid	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
52	Methyl trans-p-coumarate	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
53	Methyl trans-ferulate	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
54	Methyl trans-sinapate	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
Chromene			
55	Daedalin A	Rễ	Dang và cộng sự, 2017
56	6-(2-Hydroxyethyl)-2,2-dimethyl-2H-1- benzopyran	Thân	Tuan Anh và cộng sự, 2017
57	Paratrimerin Z	Rễ	Phu Hoang Dang và cộng sự, 2024
58	Trans-3,4-dihydroxy-3,4-dihydro anofinic acid	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
Prenylated phenolic			
59	Paratrimerin G	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018

Thứ tự	Các hợp chất	Bộ phận	Tài liệu tham khảo
60	Paratrimerin H	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018
Apotirucallane protolimonoids			
61	25-O-methyl-1,2-dihydro protoxylocarpin D	Lá	Tran và cộng sự, 2023
62	(20S,21R,23R)-21,23-epoxy-7α,24,25-trihydroxy-21-O-methyl-3-oxoapotirucalla-14-ene	Lá	Tran và cộng sự, 2023
63	7α,24,25-trihydroxy-3-oxoapotirucalla-14-en-21,23-olide	Lá	Tran và cộng sự, 2023
Các hợp chất khác			
64	Ninhvanin B	Rễ, thân	Huong và cộng sự, 2019a
65	Paramitrimerol	Rễ, thân	Huong và cộng sự, 2019a
66	Parabacunoic acid	Rễ, thân	Huong và cộng sự, 2019a
67	Pterocarpol	Thân	Nguyen M. T. T. và cộng sự, 2018

Hợp chất phenolic coumarin ostruthin (3) và dẫn xuất 8-methoxy của nó (4) được tìm thấy phổ biến nhất ở cây XTP và được nghiên cứu nhiều nhất cả định tính và định lượng (Ninh The Son, 2018). Phạm Huy Bách và cộng sự (2013) đã phân tích định tính và định lượng hợp chất này từ rễ và thân của cây XTP thu hái tại Khánh Hòa-Việt Nam bằng HPLC xác định được hàm lượng coumarin ostruthin chiếm ưu thế ở rễ 0,050–5,091%, còn ở thân là 0,008–1,364%.

Khi chiết xuất XTP bằng vi sóng trong 40 phút với công suất 360 W, kết quả chỉ ra rằng dịch chiết methanol của rễ giàu saponin, phenolic, flavonoid và proanthocyanidin (lần lượt là 7731,05 mg đương lượng escin; 238,13 mg đương lượng acid gallic; 81,49 mg đương lượng rutin và 58,08 mg đương lượng catechin/g mẫu khô) (Nguyen V. T. và cộng sự, 2017a). Đáng lưu ý là hàm lượng các hoạt chất này cao hơn nhiều so với trong lá (lần lượt là 702,1 mg đương lượng escin; 25,4 mg đương lượng aicd galic; 86,3 mg đương lượng rutin và 5,6 mg đương lượng catechin/g mẫu khô) (Nguyen V. T. và cộng sự, 2017b). Chỉ số ARSC và DRSC thu được từ chiết xuất methanol của rễ XTP (898,03 và 164,31 mg đương lượng trolox (mg TE)/g mẫu khô) và cao hơn đáng kể so với ostruthin (667,35 và 7,52 mg TE/g mẫu khô); trong khi đó khả năng chống oxy hóa của lá XTP lần lượt là 119,2 mg TE/g mẫu khô

(ARSC), 28,0 mg TE/g mẫu khô (DRSC), 13,1 mg TE/g mẫu khô (CUPRAC) và 52,2 mg TE/g mẫu khô (FRAP). Từ dịch chiết rễ cây XTP thu được bằng kỹ thuật trích ly vi sóng trong dung môi methanol, Nguyen V. T. và cộng sự (2015) đã định tính và định lượng được 11 thành phần phenolic, theo đó, kaempferol có hàm lượng cao nhất (16,72 ± 0,10 mg/g mẫu khô) và thấp nhất là caffeic acid (0,34 ± 0,03 mg/g mẫu khô). Năm thành phần phenolic cũng đã được xác định trong dịch chiết methanol của lá gồm có: gallic acid, protocatechuic acid, ellagic acid, rutin và quercetin (Nguyen V. T.và cộng sự, 2017b).

1.1.2.2. Hoạt tính sinh học của cây XTP

Ở Việt Nam, cây XTP đã được Nguyễn Minh Khởi và cộng sự (2013) công bố khảo sát độc tính cấp, tác dụng bảo vệ gan và tác dụng gây độc tế bào ung thư trên 5 dòng tế bào ung thư là ung thư gan HepG2, ung thư đại tràng HTC116, ung thư vú MDA MB231, ung thư buồng trứng OVCAR-8 và ung thư cổ tử cung Hela của ostruthin (6- (3,7-dimethyl-2,6-octadienyl) 7-hydroxy-2H-1-benzopyran-2-1) từ cao chiết methanol, phân đoạn chiết n-hexan.

Để xác định thêm tính chất dược lý của các loài *Paramignya*, dịch chiết đun sôi từ rễ XTP sau đó đã được nghiên cứu về hoạt tính bảo vệ gan chống lại tổn thương do paracetamol gây ra ở chuột (Đỗ Thị Thảo và cộng sự, 2015). Dịch chiết methanol của rễ XTP cũng được đánh giá sinh học bởi Dang và cộng sự (2017), dịch chiết thể hiện hoạt tính ức chế đáng kể enzyme alpha-glucosidase với giá trị IC_{50} là 36,6 μg/mL.

Các hợp chất phenolic, saponin, flavonoid và proanthocyanidin từ các bộ phận của XTP được cho rằng có khả năng phòng ngừa ung thư. Thực nghiệm cho thấy, chiết xuất methanol của rễ XTP có khả năng ức chế mười hai dòng tế bào ung thư, MiaPaCa2 (tuyến tụy), HT29 (ruột kết), A2780 (buồng trứng), H460 (phổi), A431 (da), Du145 (tuyến tiền liệt), BE2-C (u nguyên bào thần kinh), MCF-7 (vú), MCF-10A (vú bình thường) và U87, SJ-G2, SMA (u nguyên bào thần kinh đệm). Ngoài ra, chiết xuất methanol của rễ và bốn phân đoạn chiết bằng HPLC được tiếp tục thử nghiệm khả năng sống sót của tế bào ung thư tuyến tụy (MiaPaCa -2) và tế bào biểu mô ống tụy bình thường (HPDE) của người. Kết quả thu được, bốn phân đoạn HPLC hoạt động yếu trên cả tế bào MiaPaCa2 và HPDE, trong khi chiết xuất methanol từ

rễ và lá cho thấy ảnh hưởng đáng kể lên hai dòng tế bào này do sự hiện diện của các hợp chất phenolic, saponin, flavonoid và proanthocyanidin trong dịch trích (Nguyen V. T. và cộng sự, 2017a; Nguyen V. T. và cộng sự, 2017b).

Ngoài ra, tinh dầu của lá và vỏ quả cũng có hoạt tính sinh học khá cao. Trong Le và cộng sự (2020) đã xác định hoạt tính sinh học của tinh dầu chiết xuất từ lá XTP bao gồm các tác dụng gây độc tế bào, kháng virus, kháng khuẩn, kháng nấm và kháng *trichomonas*. Theo nghiên cứu này, tinh dầu lá XTP ức chế mạnh nhất đối với *Staphylococcus aureus* và nấm *Candida parapsilosis*. Năm 2022, Nguyen Thi và cộng sự (2022) cũng chứng minh tinh dầu vỏ quả XTP có tác dụng ức chế mạnh đối với sáu chủng vi khuẩn đa kháng thuốc lâm sàng bao gồm cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Hoạt tính mạnh nhất đối với các chủng *Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus* và *Salmonella sp.* Ngoài ra, tinh dầu vỏ quả XTP thể hiện khả năng gây độc mạnh đối với tế bào ung thư gan HepG2.

Qua tổng hợp các tài liệu nghiên cứu về cây XTP tại Việt Nam, cho thấy đặc tính hoá thực vật cũng như giá trị sinh dược học của dịch chiết xuất từ loài cây này có tác dụng hỗ trợ điều trị các bệnh viêm nhiễm và ung thư ở người. Một số nghiên cứu gần đây của các tác giả Nguyen V. T. và cộng sự (2017b), Nguyen V. T. & Scarlett (2019) đã khẳng định sự hiện diện của các hợp chất phenolic, saponin, flavonoid và proanthocyanidin trong dịch chiết XTP ảnh hưởng đáng kể đến khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư. Cơ sở khoa học này được sử dụng để tiến hành nghiên cứu quy trình chiết xuất nhằm thu được dịch trích giàu các hợp chất có hoạt tính sinh học từ cây XTP.

1.2. Phương pháp thu nhận các hợp chất sinh học từ thực vật

Từ xa xưa, các cây thuốc có hoạt tính sinh học được sử dụng trong y học cổ truyền hoặc dân gian để điều trị các bệnh khác nhau. Gần đây, việc sử dụng các hợp chất thực vật được coi là an toàn hơn và phù hợp với sinh học của cơ thể con người. Các giá trị dược liệu của cây thuốc nằm trong các thành phần hóa thực vật có hoạt tính sinh học tạo ra các tác động sinh lý cụ thể trên cơ thể con người, các hoạt chất sinh học này bao gồm tannin, alkaloid, carbohydrate, terpenoid, steroid và flavonoid (El Aziz và cộng sự, 2019). Các hợp chất hoạt tính sinh học trong thực vật thường có hàm lượng thấp (Stafford, 2002).

Sự đa dạng hoá các loài thực vật dẫn đến sự khác biệt lớn về hoạt tính sinh học của các hợp chất trong chúng, do đó cần xây dựng các phương pháp chiết tách chuẩn để thu nhận những hợp chất có lợi cho sức khỏe con người. Trước đây, một số phương pháp chiết xuất truyền thống thường được sử dụng để phân tách các hoạt chất sinh học từ nguyên liệu thực vật như chiết Soxhlet, ngâm dầm, và chưng cất. Những thách thức chính của phương pháp chiết xuất truyền thống như thời gian chiết dài, yêu cầu dung môi đắt tiền và có độ tinh khiết cao, bay hơi lượng lớn dung môi, độ chọn lọc chiết xuất thấp và sự phân hủy nhiệt của các hợp chất không bền nhiệt (Wen và cộng sự, 2020). Để khắc phục những hạn chế này, các kỹ thuật chiết xuất mới có triển vọng được giới thiệu. Một số kỹ thuật chiết xuất tiên tiến được đề cập như trích ly có hỗ trợ siêu âm (UAE), enzyme (EAE), vi sóng (MAE), điện trường xung (PEF), chiết xuất chất lỏng siêu tới hạn (SFE) và chiết xuất chất lỏng cao áp (PLE). Các kỹ thuật này được xem là "kỹ thuật xanh" vì sử dụng hóa chất an toàn hơn, thiết kế hiệu quả hơn về năng lượng, sử dụng nguyên liệu tái tạo, giảm thiểu sự phân huỷ các chất, ngăn ngừa ô nhiễm môi trường và an toàn hơn khi sử dụng (Azmir và cộng sự, 2013). Các kỹ thuật này đã được chứng minh là làm giảm đáng kể thời gian cũng như đạt được hiệu quả chiết xuất cao (Nguyen V. T. và cộng sự, 2016).

Trong số các kỹ thuật chiết xuất trên, phương pháp chiết xuất sử dụng enzyme có sự hỗ trợ của sóng siêu âm đã được nghiên cứu khá nhiều và ứng dụng trong thực tế sản xuất các sản phẩm có hoạt chất sinh học. Trong đó, các phương pháp chiết xuất có sự hỗ trợ của enzyme đang được chú ý nhiều hơn vì nhu cầu công nghệ chiết xuất thân thiện với môi trường (Marathe và cộng sự, 2019). Tương tự, phương pháp trích ly với sự hỗ trợ của sóng siêu âm có ưu điểm là thời gian trích ly ngắn, tốn ít năng lượng và dung môi sử dụng. Sóng siêu âm giúp cho hiệu quả trích ly tăng lên đáng kể; các ứng dụng của kỹ thuật siêu âm như một giải pháp sạch, xanh và kinh tế, thay thế cho các kỹ thuật chiết xuất truyền thống, đã được nghiên cứu rộng rãi trong những thập kỷ gần đây (Tiwari, 2015; Chemat và cộng sự, 2017).

1.2.1. Phương pháp trích ly với sự hỗ trợ của enzyme (EAE)

Sử dụng enzyme trong quá trình trích ly các hợp chất sinh học từ nguyên liệu thực vật đã được nghiên cứu và cho thấy hiệu quả trích ly cải thiện đáng kể. Các hợp chất sinh học trong mạng lưới tế bào thực vật được phân tán trong tế bào chất và một số

hợp chất nằm ở mạng lưới polysaccharide và lignin bởi liên kết hydrogen hoặc liên kết kỵ nước. Điều này khiến cho các dung môi rất khó khuyếch tán vào trong mạng lưới, làm cho hiệu suất trích ly thấp. Để đạt hiệu quả trong quá trình trích ly, điều cần thiết là phải hiểu tính đặc hiệu xúc tác và phương thức hoạt động của enzyme, cũng như khảo sát các điều kiện tối ưu và loại enzyme hoặc sự kết hợp enzyme nào thì phù hợp hơn với nguyên liệu thô. Ngoài ra, cần có kiến thức về thành phần cấu tạo thành tế bào của nguyên liệu trước khi lựa chọn enzyme hoặc tổ hợp enzyme cho phù hợp hơn (Nadar và cộng sự, 2018). Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy trích ly với sự hỗ trợ của enzyme có hiệu quả trong việc cắt các liên kết này, giải phóng các hợp chất sinh học ra khỏi màng tế bào, dẫn đến tăng hiệu suất trích ly, giảm lượng dung môi sử dụng và tiêu thụ năng lượng thấp hơn khi so sánh với các phương pháp không sử dụng enzyme (Nag & Sit, 2018; Zhu và cộng sự, 2018).

1.2.1.1. Cấu tạo thành tế bào thực vật và cơ chế phân cắt đặc hiệu của các enzyme

Thành tế bào thực vật bao gồm các polysaccharide có cấu trúc phức tạp như cellulose, hemicellulose, pectin, lignin và thậm chí có cả protein. Cấu trúc này mang lại cho tế bào thực vật sự ổn định và gây cản trở cho quá trình chiết xuất các thành phần nội bào. Do đó, các enzyme thủy phân đặc hiệu được sử dụng để phá vỡ chất nền này nhằm tiếp cận với các thành phần hoạt tính sinh học nằm bên trong bào tương và thậm chí trong các liên kết với thành tế bào (Álvarez García, 2018).

Pectin và pectinase

Pectin là một polymer của các đơn vị α-D-galacturonate và L-rhamnose liên kết với nhau tại vị trí α-1,4 hoặc 1,2 tạo ra các nhánh được gọi là pectic. Khi được liên kết với cellulose, pectin tạo ra độ cứng và liên kết với thành tế bào (Álvarez García, 2018; Danalache và cộng sự, 2018).

Các enzyme phân giải pectin (pectinolytic) bao gồm một số loại như protopectinase, esterase hoặc pectin methyl esterase, và các depolymerase (Kashyap và cộng sự, 2001). Các protopectinase chuyển protopectin không tan thành pectin tan trong nước. Các esterase thủy phân liên kết ester giữa gốc methoxyl và carboxylic trên mạch pectin, tạo acid pectinic hoặc acid pectic và methanol. Depolymerase gồm hai loại: enzyme thủy phân liên kết glycosidic (polymethylgalacturonase (PMG) và polygalacturonase (PG)) và enzyme phân cắt (polymethylgalacturonate lyase

(PMGL) và polygalacturonate lyase (PGL)). PMG tác dụng lên các phân tử acid polygalactorunic đã được methyl hóa (tức là pectin), xúc tác thủy phân các liên kết α-1,4-glycoside ở các vị trí giữa mạch (endo – PMG) hay từ đầu không khử của phân tử pectin (Exo – PMG). PG tác dụng lên các phân tử acid polygalactorunic, xúc tác thủy phân các liên kết α-1,4-glycoside ở các vị trí giữa mạch (endo – PG) hay từ đầu không khử của phân tử pectin (Exo – PG). PMGL xúc tác cắt các phân tử pectin ở các vị trí giữa mạch (Endo-PMGL) hay từ đầu không khử của phân tử pectin (Exo-PMGL). PGL xúc tác cắt các phân tử acid polygalactorunic ở các vị trí giữa mạch (Endo-PGL) hay từ đầu không khử của phân tử acid polygalacturonic (Exo-PGL). Các enzyme thủy phân pectin đã được chứng minh là đặc biệt hiệu quả trong chiết xuất các polyphenol. Hầu hết các hỗn hợp pectinase được bán trên thị trường ngày nay đều chứa cả ba nhóm nói trên, và có cả cellualse và hemicellulase để có được hiệu quả phân cắt tổng hợp (Álvarez García, 2018; Danalache và cộng sự, 2018).

Cellulose và cellulase

Cellulose là một polymer liên kết β-1,4 của các glucose, được tìm thấy trong trái cây và rau củ dưới dạng các sợi nhỏ (microfibril). Nó có chức năng bảo vệ và tạo cấu trúc bằng cách liên kết với các chất tạo màng sinh học khác như hemicellulose và lignin (Álvarez García, 2018; Danalache và cộng sự, 2018).

Cellulase thường được ứng dụng trong công nghiệp, xúc tác quá trình thuỷ phân cellulose. Các enzyme này thường được phân loại dựa trên khả năng phân cắt liên kết glucosidic bên trong hoặc bên ngoài – tại các đầu của vi sợi cellulose. Mặc dù cơ chế hoạt động của enzyme này vẫn chưa được khám phá đầy đủ, người ta cho rằng hoạt động thủy phân của chúng trên thực tế là một hiệu ứng hiệp đồng của ba loại enzyme: endoglucanase, thủy phân tại liên kết β-1,4 glucosidic trong phân tử; exoglucanase, giải phóng cello-biose và glucose; cuối cùng, β-glucosidase hoặc cellobiase phân cắt cellobiose thành glucose (Álvarez García, 2018; Danalache và cộng sự, 2018).

Hemicellulose và hemicellulase

Được tạo thành từ các carbohydrate cao phân tử mạch thẳng tương đồng với cellulose chẳng hạn như xyloglucan và mannan. Hemicellulose liên kết cộng hóa trị với các vi sợi cellulose và lignin, tạo thành các nhánh cấu trúc phức tạp (Álvarez García, 2018; Danalache và cộng sự, 2018). Để phá vỡ tất cả các dạng khác nhau của

hemicellulose, cần phải có sự đa dạng hoá các hoạt động enzyme khác nhau. Hemicellulase được sản xuất rộng rãi trong tự nhiên, bởi các loài nấm như *Trichoderma* hoặc *Aspergillus*, và cũng được tìm thấy trong hệ tiêu hóa của động vật. Hemicellulase bao gồm glycoside hydrolase, carbohydrate esterase, xylanase,... Thông thường, hemicellulase được cho vào hỗn hợp enzyme thương mại, cùng với cellulase, cho phép thuỷ phân hoàn toàn thành tế bào góp phần tiết kiệm chi phí thuỷ phân nguyên liệu (Álvarez García, 2018; Danalache và cộng sự, 2018).

Lignin và ligninase

Lignin là một polymer mạch vòng bao gồm các rượu phenol đơn giản như monolignol, rượu sinapyl và rượu p-coumaryl. Nó mang lại độ cứng và cấu trúc ổn định cho thành tế bào, làm tăng độ cứng của thực vật và trái cây (Álvarez García, 2018). Ligninase khác với các loại enzyme đã được thảo luận trước đây bởi cơ chế hoạt động của chúng dựa trên quá trình oxy hóa, chứ không phải thủy phân. Các enzyme ligninase gồm có phenol oxidase hoặc laccase và lignin peroxidase. Mặc dù chỉ mới được nghiên cứu gần đây, các quá trình phân hủy được xúc tác bởi enzyme này tạo ra các hợp chất phản ứng phân tử thấp, do đó làm thay đổi cấu trúc của lignin. Điều này có thể giải thích một trong những lý do ligninase hiếm khi được sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm so với các enzyme khác (Álvarez García, 2018).

1.2.1.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly enzyme

Hiệu quả của quá trình trích ly enzyme phụ thuộc chủ yếu vào sự tương tác giữa enzyme và cơ chất. Trong quá trình này, enzyme và cơ chất kết hợp tạo thành phức hợp enzyme-cơ chất, dẫn đến sự phá vỡ liên kết trong phân tử cơ chất và tạo ra sản phẩm. Việc bổ sung enzyme làm tăng tốc độ phản ứng cho đến khi nồng độ cơ chất trở thành yếu tố giới hạn (Marathe và cộng sự, 2019).

Sự tương tác enzyme-cơ chất bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như thành phần và nồng độ enzyme, loại dung môi chiết, tỷ lệ chất rắn và lỏng, tỷ lệ enzyme/cơ chất, pH, nhiệt độ và thời gian chiết xuất. Để tối ưu hóa quá trình, các thông số này cần được điều chỉnh phù hợp.

Khi tăng tỷ lệ enzyme/cơ chất có thể cải thiện tốc độ phản ứng xúc tác, nhưng đồng thời làm tăng lượng enzyme sử dụng và chi phí sản xuất.

Nhiệt độ là một yếu tố quan trọng trong phản ứng enzyme, giúp tăng tốc độ phản ứng, đồng thời tăng độ truyền khối. Nhưng mặt khác, nhiệt độ quá cao có thể làm bất hoạt enzyme. Hơn nữa, một số thành phần hoạt chất có thể nhạy cảm với nhiệt, chúng cần nhiệt độ nhẹ trong suốt quá trình xử lý (Marathe và cộng sự, 2019).

Ngoài ra, hầu hết các enzyme chỉ hoạt động trong một phạm vi pH nhất định. Ở pH tối ưu, enzyme hoạt động cao nhất và giá trị pH tối ưu sẽ khác nhau đối với các chất nền khác nhau ngay cả đối với cùng một loại enzyme (Marathe và cộng sự, 2019).

Dung môi có độ hòa tan cao đối với các thành phần trích ly có thể phù hợp hoặc không phù hợp với các enzyme được sử dụng. Chẳng hạn, nhiều enzyme được sử dụng trong trích ly các nguyên liệu thực vật hoạt động trong dung dịch nước, sẽ bị ức chế hoặc thậm chí bất hoạt bởi nồng độ cao của dung môi phân cực như methanol hay ethanol (Wen và cộng sự, 2020).

Thời gian chiết xuất có mối liên hệ chặt chẽ với nồng độ enzyme, vì thời gian có thể giảm xuống còn một nửa giá trị ban đầu nếu nồng độ enzyme tăng gấp đôi. Tương tự, khi đảo ngược các thông số này, có thể thu được kết quả trùng khớp. Tuy nhiên, thời gian chiết xuất kéo dài thường gây ra sự phân hủy các hợp chất hoạt tính sinh học do tiếp xúc lâu ở nhiệt độ cao hoặc xảy ra các quá trình oxy hóa (Muniglia và cộng sự, 2014; Gligor và cộng sự, 2019).

1.2.2. Phương pháp trích ly với sự hỗ trợ của sóng siêu âm (UAE)

Siêu âm là dạng sóng cơ học có tần số từ 20kHz đến 100MHz, có thể truyền trong bất kỳ môi trường nào bằng cách tạo ra các chu kỳ giãn nở và nén. Trong môi trường lỏng, có thể hình thành, phát triển và gây ra sự nổ vỡ của bong bóng khí khi công suất âm đủ cao, kỹ thuật này đã được ứng dụng rộng rãi trong các quá trình xử lý thực phẩm khác nhau (Zhiwei Zhu và cộng sự, 2018a; Zhiwei Zhu và cộng sự, 2018b).

1.2.2.1. Cơ chế tác động của sóng siêu âm trong môi trường lỏng

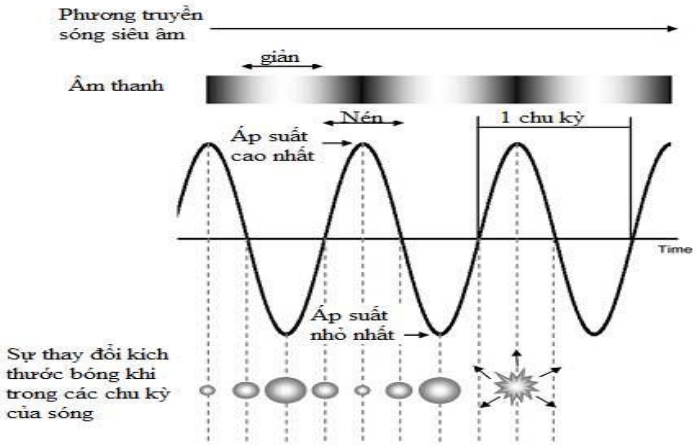
Khi sóng siêu âm truyền trong môi trường lỏng sẽ tạo ra hai hiện tượng quan trọng: sủi bong bóng và vi dòng. Khi sóng siêu âm được truyền trong môi trường chất lỏng, các chu trình kéo và nén liên tiếp được tạo thành. Các chu kỳ nén tác động một áp suất dương lên chất lỏng đẩy các phân tử chất lỏng lại gần nhau, các chu kỳ giãn tác động một áp suất âm kéo các phân tử chất lỏng ra xa nhau. Khi năng lượng đủ cao, chu kỳ giãn có thể vượt qua lực hấp dẫn của các phân tử chất lỏng và hình thành

các lỗ hổng khí từ các phân tử khí tồn tại trong lòng chất lỏng hay còn được gọi là các bong bóng khí, bao gồm bóng khí ổn định và bóng khí tạm thời (Mason và cộng sự, 1996). Bóng khí ổn định có nguồn gốc từ những bong bóng khí nhỏ, kích thước của chúng dao động nhẹ trong các chu trình kéo và nén. Sau hàng ngàn chu trình, chúng tiếp tục hấp thụ năng lượng, tăng thêm về kích thước, kết hợp lại với nhau và tạo thành dòng nhiệt nhỏ (Mason & Lorimer, 2002). Các bóng khí tạm thời có kích cỡ thay đổi rất nhanh chóng, chỉ qua vài chu trình chúng bị vỡ ra. Trong suốt chu trình kéo/nén, bóng khí kéo giãn và kết hợp lại cho đến khi đạt được cân bằng hơi nước ở bên trong và bên ngoài bóng khí. Các bóng khí lớn dần đến một kích cỡ nhất định mà tại đó năng lượng của sóng siêu âm không đủ để duy trì pha khí khiến các bóng khí nổ tung dữ dội. Sự nén đoạn nhiệt nhanh của khí và hơi trong bong bóng tạo ra một nhiệt độ cực kỳ cao trong các bong bóng đang nổ tung tạo ra sóng năng lượng cắt rất cao và tạo ra các dòng xáo trộn trong khu vực sủi bong bóng, kết quả là hình thành những điểm có nhiệt độ và áp suất rất cao (5000 ^{o}C và 5x10^{4} kPa) với vận tốc rất nhanh 106 ^{o}C/giây (Moholkar và cộng sự, 2000). Như vậy, hiện tượng sủi bong bóng (acoustic cavitation) bao gồm sự hình thành, phát triển và nổ tung của các bong bóng trong chất lỏng (Hình 1.2). Hiện tượng sủi bóng khí sẽ góp phần làm giảm kích thước nguyên liệu, giúp cho quá trình trích ly chất chiết diễn ra nhanh hơn và hiệu suất trích ly cao hơn.

Cơ chế vi dòng (microstreaming): Sóng siêu âm cường độ cao truyền trong lòng chất lỏng sẽ gây nên sự kích thích mãnh liệt. Tại bề mặt tiếp xúc giữa 2 pha lỏng/rắn hay khí/rắn, sóng siêu âm gây ra sự hỗn loạn cực độ do tạo thành những vi xoáy. Hiện tượng này làm giảm ranh giới giữa các pha, tăng cường sự truyền khối đối lưu, thúc đẩy xảy ra khuếch tán góp phần thúc đẩy quá trình trích ly (Feng và cộng sự, 2011).

Cơ chế sủi bong bóng và cơ chế vi dòng cho thấy rằng: Sóng siêu âm làm tăng sự trích ly là do lực cắt lớn làm tăng sự truyền khối giữa dung môi và chất cần trích ly (Shen và cộng sự, 2023). Hiện tượng nổ bong bóng khí tạo ra sự chảy rối lớn, sự va chạm bên trong phân tử với vận tốc lớn và sự bất ổn định trong những hạt vi xốp làm tăng sự khuếch tán xoáy lốc và khuếch tán nội. Hơn nữa, hiện tượng sủi bong bóng gần bề mặt lỏng – rắn tạo ra sự va chạm bởi những vi tia và kết quả là bào mòn bề mặt và phá vỡ cấu trúc khối nguyên liệu cần trích ly. Do đó, quá trình sử dụng sóng

siêu âm sẽ làm tăng đáng kể hiệu suất trích ly, tốc độ trích ly, rút ngắn thời gian trích ly các hợp chất; cùng với đó là sự giảm nhiệt độ và thể tích dung môi sử dụng, mà điều này rất có lợi cho việc trích ly các cấu tử mẫn cảm với nhiệt độ và các chất có hoạt tính sinh học (Dzah và cộng sự, 2020). Chính những đặc điểm này mà quá trình trích ly có hỗ trợ sóng siêu âm có ưu thế hơn hẳn so với phương pháp trích ly truyền thống cả về hiệu quả trích ly và mức độ tự động hóa (Tiwari, 2015).



Hình 1.2. Phổ sóng siêu âm (ultrasound) có tần số lớn hơn 20 kHz

(Feng và cộng sự, 2011)

1.2.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly bằng siêu âm

UAE bị ảnh hưởng bởi một số thông số vật lý như cường độ/biên độ, công suất và tần số của sóng siêu âm (Tiwari, 2015). Cường độ/biên độ cao hoặc các mức công suất khác nhau có thể cải thiện quá trình trích ly các hoạt chất bằng sóng siêu âm. Tuy nhiên, biên độ cao có thể làm hỏng đầu dò siêu âm, tăng kích động và giảm mức độ xâm thực. Do đó, biên độ cao là không cần thiết để nâng cao hiệu quả xử lý siêu âm và mức độ xâm thực (Chemat và cộng sự, 2017). Khi tăng tần số siêu âm dẫn đến giảm mức độ xâm thực trong quá trình chiết xuất. UAE tạo ra các bong bóng khí nhờ các chu kỳ kéo nén liên tục. Ở tần số cao, hiện tượng sủi bọt khí sẽ xảy ra khó khăn hơn vì các chu kỳ nén có thể quá ngắn để phát triển kích thước của các bong bóng khí (Wen và cộng sự, 2018). Thời gian và nhiệt độ chiết cũng ảnh hưởng đến hiệu suất của quá trình (Tiwari, 2015). Các thông số khác, liên quan đến quá trình chiết chất lỏng-rắn (như kích thước mẫu và tỷ lệ chất rắn/chất lỏng), cũng tác động đến quá trình trích ly. Dung môi chiết cũng là điều thiết yếu. Dung môi chiết thích hợp phụ

thuộc vào bản chất nguyên liệu, mục tiêu các hợp chất cần thu nhận và cả phương pháp chiết. Dung môi thường được sử dụng trong chiết xuất nguyên liệu thực vật là dung môi phân cực (nước, ethanol), phân cực trung bình (acetone, dichloromethane) và không phân cực (n-hexane, ether, chloroform) (Altemimi và cộng sự., 2017; Abubakar & Haque, 2020). Với xu hướng "chiết xuất xanh", nước (dung môi có độ phân cực cao nhất) được xem là một phương án hữu hiệu trong chiết xuất các hợp chất sinh học từ thực vật (Abubakar & Haque, 2020).

Song song với quá trình tạo ra những lực cắt lớn làm tăng sự truyền khối giữa dung môi và chất cần trích ly của cơ chế sủi bọt, ứng suất cắt phát triển từ các vi xoáy cũng có thể gây bất hoạt hợp chất sinh học được giải phóng. Việc kéo dài thời gian siêu âm tạo ra điều kiện áp suất và nhiệt độ cực đoan. Điều này dẫn đến sự hình thành các gốc tự do HO• và H• thông qua phân tách đồng phân của nước có trong bọt khí. Các gốc tự do này có tính phản ứng cao, tham gia vào chuỗi phản ứng tạo ra hydrogen peroxide (H_2O_2) và các chất oxy hóa hoạt động khác, từ đó oxy hóa các hoạt chất sinh học (Vinatoru và cộng sự, 2017).

1.2.3. Trích ly bằng enzyme có hỗ trợ của sóng siêu âm (UAEE)

Những năm gần đây, một số nghiên cứu hướng đến kỹ thuật trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học kết hợp bởi siêu âm và chế phẩm enzyme, thường được gọi là trích ly bằng enzyme có hỗ trợ của sóng siêu âm (UAEE). UAEE được xem là sự kết hợp của hai phương pháp chiết xuất bổ trợ mang lại nhiều ưu điểm cho quá trình thu nhận dịch trích giàu các hoạt chất sinh học. Trong EAE, các enzyme thúc đẩy quá trình thu nhận dịch trích bằng cách phá vỡ thành và màng tế bào thực vật. Tuy nhiên, enzyme không thể thủy phân hoàn toàn các thành phần cấu thành tế bào (Wu và cộng sự, 2014). UAE có tác dụng hỗ trợ cho EAE, hiện tượng xâm thực khí gây ra bởi sóng siêu âm có thể phá vỡ vật lý cấu trúc khối nguyên liệu để tạo cơ sở cho phản ứng enzyme và kết quả là giải phóng các hợp chất trích ly. Ngoài ra, chỉ riêng hoạt động của các enzyme không thể cải thiện sự truyền khối của dung môi, của các hợp chất trích ly, và cả sự truyền khối của enzyme trong hoặc ngoài khối nguyên liệu. Do đó, các biện pháp vật lý như tăng sự truyền động, rung động thường được ứng dụng trong EAE để tăng cường quá trình truyền khối trong môi trường lỏng, do đó UAE là một lựa chọn lý tưởng vì nó có thể tăng cường truyền khối không chỉ bên ngoài mà còn

cả bên trong khối nguyên liệu cần trích ly (Chemat & Khan, 2011). Hơn nữa, với công suất siêu âm thích hợp sẽ làm tăng diện tích bề mặt tiếp xúc giữa các pha, điều này sẽ khiến các chất nền tiếp xúc với các enzyme dễ dàng hơn và giải phóng nhiều hợp chất hơn. Một số nghiên cứu cho rằng việc tăng cường tốc độ phản ứng của enzyme nhờ siêu âm có thể làm tăng sự tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất khi đó tốc độ giải phóng các hoạt chất cao hơn (Nguyen V. P. T. và cộng sự, 2013). Mặt khác, trong một số trường hợp, hoạt động của enzyme có thể tăng cường hiệu quả xử lý siêu âm. Như đã nêu ở trên, độ nhớt mẫu hay dung môi sẽ ảnh hưởng đáng kể đến tác dụng của siêu âm. Độ nhớt của dịch chiết có thể tăng lên trong quá trình xử lý, đặc biệt là khi nước được dùng làm dung môi, giải phóng một số hợp chất tạo gel trong nước kết quả là ảnh hưởng tiêu cực đến chế độ làm việc của máy siêu âm (Wen và cộng sự, 2020).

UAEE đã được nghiên cứu khá nhiều nhằm đẩy nhanh quá trình chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học từ mô thực vật. Một số nghiên cứu gần đây ứng dụng UAEE để thu nhận các hoạt chất sinh học từ một số nguồn nguyên liệu thực vật như lá Ginkgo biloba (Zhang và cộng sự, 2015), quả lý chua (Xu và cộng sự, 2015), vỏ quả bưởi Shatian (Van Thanh và cộng sự, 2023) và vỏ hạt điều (Lin và cộng sự, 2023), trong đó UAEE đã cải thiện năng suất trích ly các hợp chất.

Kết hợp UAE và EAE có thể tăng hiệu quả và tốc độ trích ly các hợp chất sinh học từ thực vật. UAE giúp enzyme tiếp cận tốt hơn với tế bào bằng cách phá vỡ màng và tăng diện tích bề mặt, đồng thời rút ngắn thời gian trích ly. Tuy nhiên, UAE có thể gây gia nhiệt cục bộ và tạo ra gốc tự do, ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme và làm biến đổi hợp chất sinh học (Wu và cộng sự, 2014). Do đó, cần tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly của enzyme và sóng siêu âm để đảm bảo hiệu quả kết hợp giữa hai phương pháp này cao nhất.

1.3. Làm giàu các hợp chất sinh học của dịch chiết bằng kỹ thuật cô đặc lạnh

1.3.1. Tổng quan về kỹ thuật cô đặc chất lỏng

Việc ứng dụng một phương pháp tối ưu để cô đặc dịch chiết giàu các hợp chất sinh học là điều cần thiết để bảo quản và tạo ra dịch chiết chất lượng cao mang lại nhiều thuận lợi cho ngành khoa học thực phẩm. Tìm kiếm các phương pháp mới và linh hoạt có thể giữ được chất lượng cao của các chất hoá học thực vật để sử dụng lâu

dài hơn vẫn đang được tiến hành trong các nghiên cứu. Hiện nay, có ba phương pháp được sử dụng phổ biến trong sản xuất công nghiệp là công nghệ cô đặc màng, thẩm thấu ngược (RO) và bay hơi (Amran & Jusoh, 2016). Phương pháp cô đặc truyền thống luôn là bay hơi. Tuy nhiên, nhiệt độ cao của quá trình này có thể phá hủy các hợp chất sinh học nhạy cảm với nhiệt, điều này làm giảm lợi ích dinh dưỡng của dịch chiết (Amran & Jusoh, 2016). Mặt khác, kỹ thuật cô đặc màng và RO luôn là phương pháp tốt nhất để cô đặc dịch chiết, vì nó tạo ra nồng độ cao nhất với hiệu suất thu hồi phù hợp (Jusoh và cộng sự, 2009). Công nghệ màng, chẳng hạn như lọc nano, có thể giữ lại các hợp chất phenolic vì màng nano có kích thước lỗ nhỏ hơn kích thước của các hợp chất phenolic. Tuy nhiên, công nghệ màng lọc có thể dễ bị tắc nghẽn màng dẫn đến giảm lưu lượng thẩm thấu, tốn kém chi phí làm sạch và phải bảo dưỡng màng liên tục (Aider và cộng sự, 2007).

Để có một bước tiến lâu dài trong ngành công nghiệp thực phẩm sinh học, điều quan trọng là phải sử dụng các công nghệ với chi phí thấp, hiệu quả và thân thiện với môi trường, không chỉ giúp bảo tồn giá trị dinh dưỡng của các sản phẩm chế biến mà còn giữ được hoạt tính sinh học của các thành phần hóa thực vật (Aider & De Halleux, 2009). Trong bối cảnh này, công nghệ cô đặc lạnh được xem là công nghệ phù hợp cho việc cô đặc các hợp chất sinh học trong các sản phẩm thực phẩm tự nhiên (Aider & De Halleux, 2009). Công nghệ này thúc đẩy quá trình cô đặc các sản phẩm thực phẩm lỏng bằng phương pháp đông lạnh và tiếp theo là tách một phần nước đông lạnh khỏi sản phẩm lỏng (Belén và cộng sự, 2012). Trong công nghiệp thực phẩm, cô đặc lạnh là một công nghệ rất phù hợp bởi khả năng lưu giữ chất lượng dinh dưỡng của thực phẩm lỏng. Đồng thời, các đặc tính cảm quan của sản phẩm được bảo toàn khi sử dụng nhiệt độ thấp (Sánchez và cộng sự, 2011). Theo nghiên cứu của Ding và cộng sự (2019), cô đặc lạnh có khả năng lưu giữ trên 90% các hợp chất thơm dễ bay hơi và các chất chống oxy hóa nhạy cảm với nhiệt như vitamin C, trong khi cô đặc chân không chỉ giữ lại hơn 40%. Hơn nữa, xử lý chất lỏng bằng công nghệ cô đặc lạnh có tiềm năng tiết kiệm năng lượng rất lớn (Lide và Haynes 2010).

1.3.2. Kỹ thuật cô đặc lạnh và một vài ứng dụng trong thực phẩm

Cô đặc lạnh là một công nghệ không nhiệt cho phép cô đặc các dung dịch khác nhau, công nghệ này làm tăng nồng độ bằng cách tách nước khỏi dung dịch, thu được

một pha rất loãng và một pha đậm đặc (Correa và cộng sự, 2018). Trong quá trình này, chất lỏng chứa chất tan được làm lạnh dưới điểm đông trong điều kiện kiểm soát, tránh điểm nhiệt độ eutectic (nhiệt độ tại đó dung môi và chất tan đông lạnh đồng thời). Khi được kiểm soát, quá trình đông lạnh thực phẩm lỏng tạo tinh thể băng trên điểm nhiệt độ eutectic, tăng độ tinh khiết nước kết tinh, bảo toàn tính chất dung dịch ban đầu. Giới hạn trên của nồng độ đông lạnh từ 40-50% hàm lượng chất rắn, phụ thuộc cấu trúc thực phẩm và tỷ lệ chất rắn hòa tan (Morison & Hartel, 2018). Cô đặc có thể lặp lại để giảm nước, tùy thuộc mục đích, hiệu suất mỗi giai đoạn và thành phần thực phẩm (Prestes và cộng sự, 2022). Có ba kỹ thuật cô đặc lạnh đông được sử dụng dựa trên sự phát triển của tinh thể băng:

Công nghệ phổ biến nhất trong công nghiệp là cô đặc dạng huyền phù (SFC) (Miyawaki và cộng sự, 2012). Trong quy trình này, các tinh thể băng nhỏ phát triển thành tinh thể lớn trong các thiết bị kết tinh huyền phù và được tinh chế bằng cơ chế Ostwald. Công nghệ này hiệu quả trong quá trình tách (Ding và cộng sự, 2019), nhưng ở cấp độ hoạt động, nó có các bộ phận có thể tháo rời đòi hỏi chi phí cao hơn (Sánchez và cộng sự, 2009).

Cô đặc khối (BFC) còn được gọi là cô đặc lạnh đông - tan băng, dung dịch cô đặc được làm đông hoàn toàn, sau đó rã đông một phần để thu hồi một phần chất lỏng có nồng độ cao hơn (Aider & De Halleux, 2009). BFC bao gồm ba giai đoạn: đóng băng, làm tan băng và tách phần lỏng cô đặc (Moreno và cộng sự, 2013). Các giai đoạn này xác định hiệu quả của quá trình cô đặc (Nakagawa và cộng sự, 2010). Ngoài ra, quá trình này có thể được lặp lại trong các chu kỳ liên tiếp để tăng nồng độ chất cô đặc (Aider & Ounis, 2012), đây chính là ưu điểm về mặt kinh tế của công nghệ này.

Cô đặc lạnh đông màng (FFC) có hai dạng là cô đặc lạnh tăng dần (PFC) và dạng màng rơi (FFFC). Kỹ thuật FFC được ứng dụng phổ biến là kiểu cô đặc tăng dần (PFC). Đặc điểm của phương pháp này là hình thành một tinh thể băng đơn, được tạo thành từng lớp trên bề mặt trao đổi nhiệt (thay vì nhiều tinh thể băng như trong SFC), sau đó là quy trình rã đông từng phần dưới sự phân tách trọng trường. Phương pháp này có thể thu được hai phần: phần thứ nhất là chất lỏng cô đặc (CF) và phần thứ hai là nước đá (I) (Aider và cộng sự, 2007). Trong phương pháp FFC, kỹ thuật màng rơi FFFC bao gồm quá trình tuần hoàn để tập trung chất lỏng trên một tấm thẳng đứng

tạo thành tảng băng đơn trên bề mặt lạnh, khi màng chất lỏng rơi xuống, băng tan sẽ làm tăng nồng độ của dung dịch thu được (Belén và cộng sự, 2012).

Xem xét các khía cạnh tích cực của kỹ thuật cô đặc đông lạnh, những lợi ích tiềm năng của các thành phần hoạt chất thực vật và tính khả thi của phương pháp thực hiện cũng như chi phí đầu tư cho quy trình, công nghệ cô đặc BFC được chú ý nhiều trong các nghiên cứu gần đây như: cô đặc dịch chiết cà phê (Moreno và cộng sự, 2014), dịch chiết lá mate (Bremer Boaventura và cộng sự, 2013), dịch chiết trà xanh (Meneses và cộng sự, 2021). Các nghiên cứu này cho thấy hiệu quả cô đặc tương đối cao, và bảo toàn hoạt tính sinh học của các thành phần hoá học thực vật. Một trong những ưu điểm chính của BFC là không có các bộ phận chuyển động (máy khuấy hoặc bơm), giúp giảm chi phí sản xuất. Hơn nữa, kỹ thuật này dễ thực hiện, chi phí (năng lượng, vận hành và thiết bị) thấp nhất trong tất cả các quy trình cô đặc đông lạnh (Aider & De Halleux, 2009). Đó chính là cơ sở khoa học cho việc chọn phương pháp cô đặc lạnh của nghiên cứu này, phù hợp với điều kiện thí nghiệm thực tế. Tuy nhiên, hiệu quả cô đặc của kỹ thuật này bị hạn chế, và lớp băng có hệ số truyền nhiệt kém, cần nhiều thao tác để đạt được mức độ cô đặc cao (Ding và cộng sự, 2021).

1.4. Công nghệ vi bao các hợp chất có hoạt tính sinh học

1.4.1. Kỹ thuật vi bao

Các hợp chất sinh học sau khi trích ly, thông thường ở dạng tự do và rất dễ bị giảm hoạt tính (phân huỷ) trong quá trình bảo quản. Bên cạnh đó, khả năng ứng dụng trực tiếp dịch trích giàu các hợp chất sinh học này còn hạn chế. Vì thế, nghiên cứu phương pháp bảo quản dịch trích là vấn đề đáng quan tâm. Vi bao là một trong những phương pháp hiệu quả nhằm bảo vệ và ổn định các hợp chất sinh học trước các tác nhân môi trường như ánh sáng, oxy, nước; kiểm soát việc giải phóng vật liệu được bao gói và che đi mùi, vị một số thành phần trong sản phẩm (Bakry và cộng sự, 2016).

Trong kỹ thuật vi bao, hợp chất được bao gói bên trong một vật liệu cụ thể, tạo ra những quả cầu nhỏ có đường kính từ vài μm đến hàng trăm ngàn μm (Choudhury và cộng sự, 2021). Đặc biệt, vật liệu bao gói có thể ở dạng đồng nhất (gum arabic, sodium alginate, tinh bột...) hoặc dạng hỗn hợp (alginate-pectin, gelatin-pectin...).

Có nhiều phương pháp vi bao được áp dụng nhằm bảo vệ các hợp chất sinh học, được chia thành 3 nhóm: 1) phương pháp hoá lý (giọt tụ, nhũ tương, liposome …); 2)

phương pháp hoá học (polymer hoá) và 3) phương pháp vật lý (sấy phun). Mỗi phương pháp có những ưu và nhược điểm khác nhau, do đó tuỳ thuộc vào mục đích ứng dụng và đặc tính của các hợp chất sinh học mà lựa chọn phương pháp phù hợp. Công nghệ vi bao đã và đang được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm. Để đạt hiệu quả vi bao, việc đánh giá, lựa chọn vật liệu bao gói và hàm lượng vật liệu được bao gói là điều kiện tiên quyết (Vallejo-Castillo và cộng sự, 2020). Một số đặc tính quan trọng đánh giá chất lượng của các sản phẩm bổ sung hạt vi bao đó là khả năng tải trọng của màng bao, tính chất cảm quan của sản phẩm, độ ổn định oxy hóa và khả năng hấp thụ (bioavailability) của hạt vi bao (Barrow và cộng sự, 2013).

Hiện đã có khá nhiều thực phẩm chức năng được bổ sung hạt vi bao chứa các hoạt chất sinh học được sử dụng trên toàn thế giới. Theo Barrow và cộng sự (2013), một số kỹ thuật và hệ thống màng bao đang được ứng dụng nhiều trong thực phẩm đó là công nghệ vi bao đông tụ dạng phức hợp (complex coacervation) và công nghệ sấy phun (spray drying). Trong đó, kỹ thuật đông tụ đem lại hiệu quả tải trọng các hoạt chất bên trong vỏ bao 40 - 90%, đồng thời khả năng tiêu hoá của cơ thể đối với hạt vi bao này tương đối cao. Phương pháp đông tụ thực hiện đơn giản, chi phí đầu tư thấp, phù hợp cho sản xuất liên tục. Hơn nữa, kỹ thuật này có thể dễ dàng thực hiện trong phòng thí nghiệm của trường đại học với chi phí thấp, vật liệu đơn giản. Đó là lý do kỹ thuật vi bao đông tụ được chọn cho nghiên cứu này.

1.4.2. Kỹ thuật vi bao đông tụ (coacervation)

Kỹ thuật đông tụ có thể được định nghĩa là hiện tượng keo tụ bao gồm quá trình phân tách pha lỏng - lỏng của một hoặc hỗn hợp hai polymer tích điện trái dấu được kích hoạt bởi các tương tác tĩnh điện, liên kết hydrogen, tương tác kỵ nước, lực hấp dẫn do phân cực cũng như tương tác hóa học. Năng lượng tương tác giữa các polymer sinh học phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như loại polymer sinh học (khối lượng mol, độ linh hoạt và điện tích), độ pH, lực ion, nồng độ và tỷ lệ của các polymer sinh học (Ozkan và cộng sự, 2019).

Kỹ thuật vi bao đông tụ có thể ở dạng đơn giản hoặc phức hợp, tùy thuộc vào số lượng polymer được sử dụng. Trong khi quá trình đông tụ đơn giản chỉ gồm một loại polymer gắn thêm các tác nhân ưa nước mạnh để tạo dung dịch keo tụ, thì đông tụ

phức hợp được tạo ra bằng cách kết hợp hai hoặc nhiều loại polymer để tạo thành màng bao bọc lấy lõi hoạt chất bên trong (Choudhury và cộng sự, 2021).

1.4.3. Vật liệu màng bao

Trong ứng dụng thực phẩm, một trong những yếu tố quan trọng trong vi bao hoạt chất là việc lựa chọn vật liệu hoặc môi trường đóng gói (Vallejo-Castillo và cộng sự, 2020). Ngoài vai trò bảo vệ các hợp chất sinh học, vỏ bao còn phải an toàn cho quá trình tiêu thụ và tiết kiệm chi phí (Đorđević và cộng sự, 2015). Do đó, vật liệu bao gói thường được chọn trong ứng dụng thực phẩm là các polysaccharide như tinh bột, alginate và pectin, vì chúng ổn định và cho phép giải phóng có kiểm soát các hợp chất sinh học trong đường ruột (Pasukamonset và cộng sự, 2016). Cho đến nay, các sản phẩm giải phóng có kiểm soát được nghiên cứu và cả sản phẩm bán trên thị trường được tạo ra từ hydroxypropyl methylcellulose (polymer không ion (nonionic)), sodium alginate (polymer anion), chitosan (polymer cation), pectin (polymer anion) đều cho thấy tiềm năng lớn trong việc kiểm soát giải phóng các hoạt chất (Rehman và cộng sự, 2019; Li và cộng sự, 2015).

1.4.3.1. Sodium alginate (SA)

Sodium alginate là một polysacaride tự nhiên có cấu trúc thẳng, có khả năng phân hủy sinh học và an toàn cho cơ thể, mang lại độ bền và tính linh hoạt cho vi hạt, có thể được sử dụng trong công nghiệp vì đặc tính tạo gel, tạo nhớt, ổn định và có khả năng giữ nước. Sodium alginate có thể được tổng hợp từ thành tế bào của nhiều loài tảo nâu và từ nhiều loài vi khuẩn khác nhau. Tuy nhiên, alginate chiết xuất từ tảo nâu có tầm quan trọng thương mại đối với các ngành công nghiệp thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm... (Frent và cộng sự, 2022).

Sodium alginate được xem là một chất đồng trùng hợp đa anion có cấu trúc là muối sodium của acid alginic, một acid bao gồm một số nhóm liên tiếp của hai acid uronic: acid β-D-manuronic (M) và α-L-glucuronic (G), liên kết tuyến tính với nhau bằng liên kết 1–4 glycosidic. Chuỗi glucuronic mang lại cho alginate nhiều ưu điểm, chẳng hạn như khả năng tham gia liên kết chéo với các ion calcium và khả năng hình thành gel với các đặc tính cơ học vượt trội (Frent và cộng sự, 2022). Các hạt vi bao alginate đã nhận được nhiều sự chú ý và được xem như một vật liệu bao gói lý tưởng

cho các nguyên liệu thuốc, nhờ ưu điểm như chi phí thấp, không độc hại, tương thích sinh học và khả năng phân hủy sinh học (Uyen và cộng sự, 2019).

1.4.3.2. Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)

HPMC là một cellulose ether trong đó các nhóm hydroxypropyl được thay thế bằng một hoặc nhiều trong số ba gốc hydroxyl có trong mỗi vòng anhydroglucose của cellulose. Các polymer HPMC có độ hòa tan hữu cơ và độ dẻo nhiệt cao hơn so với các polymer methylcellulose (Fareez và cộng sự, 2018). HPMC là loại polymer tan trong nước, không mùi, không vị, không độc hại nên có thể ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm và y học. HPMC được sử dụng rộng rãi trong các công thức vi bao vì đặc tính tạo độ trương nở và làm đặc. Nhiều nghiên cứu ứng dụng thành công hydrogel HPMC trong việc phân tán thuốc có kiểm soát (Belščak-Cvitanović và cộng sự, 2017; Hu và cộng sự, 2018; Sheng và cộng sự, 2021).

1.4.3.3. Chitosan

Chitosan là dẫn xuất của chitin sau khi tách nhóm acetyl nên chitosan có các nhóm amino. Mức độ deacetyl của chitosan là một thông số quan trọng, đặc trưng cho tỉ lệ giữa 2- acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose với 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose trong phân tử chitosan (Truong và cộng sự, 2020).

Chitosan được đánh giá cao là một hệ thống màng bao phân phối các thành phần hoạt tính sinh học. Các hạt vi bao chitosan được báo cáo, chúng có thể tương tác với màng tế bào nhanh hơn và hiệu quả hơn, dẫn đến việc phân phối chính xác các hoạt chất trong hệ thống thực phẩm (Maleki và cộng sự, 2022; Sabaghi và cộng sự, 2021).

1.4.3.4. Pectin

Pectin là một polymer tự nhiên cấu tạo nên thành tế bào của hầu hết các loại thực vật và được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm với vai trò tác nhân làm đặc hoặc ổn định. Pectin chủ yếu là các polymer của rhamnogalacturonan và acid D-galacturonic ($C_6H_{10}O_7$) (Cao và cộng sự, 2020).

Pectin được chia thành hai loại dựa trên mức độ methoxyl hóa tức là khả năng ảnh hưởng đến quá trình tạo gel. Trong phân tử pectin, cơ chế tạo gel khác nhau tùy theo mức độ methoxyl hóa khác nhau. Đối với HMP (High Methoxyl Pectin) (DE > 50%), các liên kết không cộng hóa trị (liên kết hydrogen và tương tác kỵ nước) là nguyên

nhân tạo gel. Ngược lại, quá trình tạo gel diễn ra trong LMP (Low Methoxyl Pectin) (DE < 50%) bởi sự tương tác của các nhóm carboxyl của hai chuỗi lân cận và liên kết ion Ca^{2+}. Pectin, giống như alginate, là vật liệu bao gói tốt nhờ khả năng tạo đặc, tạo gel, dễ sản xuất, chi phí thấp và có lợi cho sức khỏe (Cao và cộng sự, 2020).

Trong số các biopolymer nổi bật là sodium alginate (SA) với khả năng liên kết chéo với các ion calcium, hình thành gel có các đặc tính cơ học vượt trội, đặc biệt chi phí thấp, do đó nhận được nhiều sự chú ý và được xem như một vật liệu bao gói lý tưởng. Tuy nhiên, những hạn chế chính của viên nang SA là độ xốp cao, không ổn định dưới tác động nhiệt, tính cơ học kém và phân hủy nhanh trong môi trường mô phỏng dịch ruột (Hu et al., 2018). Do đó, SA thường được nghiên cứu kết hợp với các polymer saccharide khác như HPMC hoặc chitosan hay pectin để tạo ra hệ phức hợp màng bao có chi phí thấp, đặc tính tạo màng và tính chất cơ học tốt hơn. Nhờ những đặc tính này mà hệ liên hợp màng bao được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm, và được áp dụng trong các chế phẩm giải phóng có kiểm soát (Cao và cộng sự, 2020; Sheng et al., 2021). Đây là cơ sở khoa học cho sự kết hợp các vật liệu màng bao để tìm ra hệ màng bao phù hợp trong nghiên cứu này.

1.4.4. Động học giải phóng các hợp chất sinh học bên trong hạt vi bao

Quá trình giải phóng các hợp chất chứa trong polymer đi vào pha lỏng là một quá trình phức tạp liên quan đến các cơ chế truyền khối khác nhau. Sự giải phóng các hoạt chất từ hạt polymer bao gồm ba cơ chế khác nhau: (i) giải phóng do xói mòn polymer, (ii) khuếch tán qua nền trương nở và (iii) giải phóng khỏi bề mặt hạt (Unagolla & Jayasuriya, 2018). Ngoài ba cơ chế này, quá trình giải phóng hoạt chất có kiểm soát về mặt hóa học cũng có thể xảy ra trong hệ thống polymer hydrogel. Trong trường hợp này, sự giải phóng hoạt chất được xác định bởi các phản ứng hóa học xảy ra giữa mạng lưới polymer và chất được giải phóng (Unagolla & Jayasuriya, 2018). Do vậy, kiến thức về động học giải phóng cần thiết để sử dụng hiệu quả hệ thống phân phối các hoạt chất. Cơ chế giải phóng này phụ thuộc vào tính chất vật lý và hóa học của cả hoạt chất và chất mang, như độ xốp, độ nhám bề mặt, thành phần hóa học, trọng lượng phân tử, tốc độ phân hủy, kích thước hạt, lượng hợp chất, tương tác giữa chất nền với các thành phần (Unagolla & Jayasuriya, 2018).

Mô hình động học được sử dụng phổ biến nhất trong nghiên cứu giải phóng các chất từ các hệ thống hạt polymer là mô hình Ritger-Peppas (Ritger & Peppas, 1987). Mô hình này đã được nhiều nhà nghiên cứu sử dụng thành công để mô tả quá trình giải phóng hoạt chất thông qua cơ chế khuếch tán Fickian (Unagolla & Jayasuriya, 2018). Ngoài ra, còn có mô hình Higuchi (Higuchi, 1961), đây là mô hình mô tả tỷ lệ thuận trực tiếp giữa lượng chất tích lũy được giải phóng theo thời gian dựa trên cách tiếp cận trạng thái giả ổn định, và thường được sử dụng để mô tả cơ chế vận chuyển các chất của màng hydrogel mỏng, hệ thống hydrogel hình cầu. Bên cạnh hai mô hình phổ biến trên, cơ chế giải phóng hoạt chất còn được tính toán dựa trên các mô hình bậc 0, bậc nhất và mô hình Peppas-Sahlin (Unagolla & Jayasuriya, 2018).

Mô hình giải phóng hoạt chất thường được áp dụng trong các hệ thống phân phối hydrogel như chitosan-alginate (Li và cộng sự, 2015), HPMC-alginate (Hu và cộng sự, 2018), cyclodextrin-alginate (Nguyen C. H. và cộng sự, 2022). Việc sử dụng các mô hình thực nghiệm này để mô phỏng đặc tính giải phóng hoạt chất là một hàm số theo thời gian liên quan đến lượng hoạt chất được giải phóng. Các giá trị định lượng từ đường cong giải phóng được giải thích bằng các phương trình toán học. Từ mô hình toán học và phân tích thống kê có thể hiểu được cơ chế hòa tan của các hoạt chất (Jose và cộng sự, 2013). Để nghiên cứu cơ chế giải phóng và dự đoán khả năng phóng thích hợp chất TPC, TSC trong hạt vi bao từ môi trường nước, trong nghiên cứu này, một số mô hình động học được áp dụng để dự đoán tốc độ giải phóng TPC và TSC.

1.4.5. Ứng dụng hạt vi bao trong thực phẩm

1.4.5.1. Tổng quan về ứng dụng hạt vi bao trong thực phẩm

Giá trị sinh học hay tác dụng chức năng của các hạt vi bao chứa các hoạt chất chỉ có thể đạt được bằng cách sử dụng chúng trong các sản phẩm thực phẩm. Tuy nhiên, hiệu quả bao gói tốt không phải lúc nào cũng dẫn đến hoạt tính sinh học tốt hơn do khả năng giải phóng không mong muốn của các hoạt chất, vì vậy sau khi tối ưu hóa quy trình vi bao, cần đảm bảo rằng hợp chất vẫn giữ được các đặc tính của nó trong sản phẩm thực phẩm (Mehta và cộng sự, 2022).

Một số nghiên cứu về phương pháp vi bao đông tụ các hợp chất sinh học như: vi bao nisin trong dịch chiết vỏ bơ với hệ bao collagen - alginate, collagen - pectin (Calderón-Oliver và cộng sự, 2017), hạt nano chitosan-alginate chứa caffeine

(Milkova & Goycoolea, 2020), vi bao zeaxanthin trong dịch chiết *Lycium barbarum* với hệ bao gelatin – sodium carboxymethyl cellulose (Zhang và cộng sự, 2021), hệ gel gelatin/dầu gừng/gum arabic (Ferreira & Nicoletti, 2021). Các nghiên cứu này đã phần nào làm rõ vai trò bảo vệ các hoạt chất trong dịch chiết thực vật của các phức hợp màng polysaccharide tự nhiên trước các tác nhân nhiệt độ, ánh sáng và oxy trong quá trình chiết xuất và ứng dụng vào sản phẩm.

Với nhiều ưu điểm trong việc phát huy các đặc tính và chức năng của hoạt chất sinh học trong thực phẩm, công nghệ vi bao đang trở nên phổ biến đối với người tiêu dùng. Khả năng chống oxy hóa, tác dụng kháng khuẩn, tăng hương vị và ổn định thực phẩm là một số chức năng quan trọng của nhiều hợp chất sinh học được sử dụng để phát triển các sản phẩm thực phẩm. Các phân tích tác dụng kháng vi sinh vật và đánh giá cảm quan sản phẩm được phát triển dành cho các sản phẩm thực phẩm bổ sung vi nang chứa hợp chất sinh học này. Động học phóng thích các hợp chất, cũng như tốc độ phân hủy của chúng, cũng được phân tích để đánh giá tác động tích cực hoặc tiêu cực của quá trình vi bao các thành phần hoạt chất này (Mehta và cộng sự, 2022).

Xu hướng hiện nay trong ngành thực phẩm là tạo ra các sản phẩm tiện lợi và tăng giá trị dinh dưỡng cũng như các đặc tính chức năng của chúng bằng cách kết hợp các hợp chất hoạt tính sinh học khác nhau như tinh dầu, polyphenol, thảo mộc, acid béo omega-3, chất chiết xuất từ thực vật... Do đó, sự thành công và ứng dụng của công nghệ vi bao trong ngành công nghiệp thực phẩm phụ thuộc phần lớn vào khả năng đưa ra các quy trình sản xuất đơn giản và kinh tế ở quy mô công nghiệp. Điều này chắc chắn có thể đạt được khi áp dụng các phương pháp tiên tiến hơn, sử dụng các vật liệu vi bao phù hợp và tương thích, đồng thời đảm bảo tuân thủ các quy định thương mại và an toàn thực phẩm khác nhau (Mehta và cộng sự, 2022).

1.4.5.2. Ứng dụng hạt vi bao vào bánh quy

Tổng quan về bánh quy

'Bánh quy' (biscuit) là từ gốc tiếng Anh thường được dùng để chỉ các sản phẩm nướng nhỏ làm từ nguyên liệu bột mì kết hợp với chất béo, đường và một số thành phần khác. Bánh có hàm lượng ẩm thấp và nếu được đóng gói để bảo vệ khỏi độ ẩm không khí, có thời hạn sử dụng lâu dài (Manley, 2001).

Bánh quy là một loại sản phẩm bắt nguồn từ châu Âu. Người Việt Nam biết đến bánh quy khi người Pháp mang chúng đến nước ta trong chiến tranh vào khoảng cuối thế kỷ thứ XIX. Khi con người bắt đầu khám phá thế giới, bánh quy đã trở thành loại thực phẩm lý tưởng để mang đi đường vì chúng vẫn giữ được hương vị thơm ngon trong thời gian dài. Đây là một trong những món ăn vặt phổ biến nhất vì chúng có hương vị và mùi thơm dễ chịu, ăn được ngay, có nhiều hình dạng khác nhau, hạn sử dụng dài và giá cả phải chăng.

Trong số các sản phẩm làm từ ngũ cốc, bánh quy rất phổ biến và có mặt trên thị trường với nhiều công thức như bánh quy vụn, mềm hoặc xốp, khô và nhẹ, giòn hoặc tinh chế. Ngày nay, ngành công nghiệp thực phẩm, cụ thể là lĩnh vực chế biến bánh đang tìm kiếm các công thức mới để sản xuất các dạng bánh lành mạnh hơn, đáp ứng mong đợi của người tiêu dùng (Pinto và cộng sự, 2014). Nhiều nghiên cứu nhằm mục đích nâng cao hàm lượng chất xơ (Paraskevopoulou và cộng sự, 2019), protein (Mohamed và cộng sự, 2014) và chất chống oxy hóa (Indiarto và cộng sự, 2023) trong bánh quy… tùy thuộc vào nhu cầu của xã hội, đã được tiến hành. Việc bổ sung các hợp chất sinh học giàu hoạt tính chống oxy hoá vào công thức bánh được cho là có hiệu quả trong việc tăng cường giá trị dinh dưỡng và thời hạn sử dụng sản phẩm.

Nguyên liệu sản xuất bánh quy

Khi công nghệ cải tiến trong suốt cuộc Cách mạng công nghiệp thế kỷ XIX, giá đường và bột mì giảm xuống; tác nhân hóa học làm nở bánh như $NaHCO_3$, luôn sẵn có và dồi dào, được sử dụng trong công thức bánh. Điều thú vị là mặc dù bánh quy đã có mặt trên thị trường một thời gian khá lâu nhưng các thành phần thiết yếu của bánh vẫn không thay đổi - như bột mì "mềm" (chứa hàm lượng protein ít hơn bột mì dùng để làm bánh mì), đường và chất béo (bơ, dầu). Ba nguyên liệu chính này đã tạo nên độ mềm, xốp và hương vị đặc trưng của bánh quy.

Bột là một thành phần chính trong bánh quy, bao gồm chủ yếu là tinh bột, protein và nước. Thành phần protein trong bột mì gồm albumin, globulin, gliadin và glutenin, đặc biệt là gliadin và glutenin rất quan trọng cho sự phát triển bột nhào, lưu giữ khí và chất lượng bánh sau khi nướng (Arepally và cộng sự, 2020).

Đường hoạt động như một chất điều chỉnh cấu trúc và hương vị trong bánh quy. Nó được hòa tan một phần hoặc hoàn toàn trong bột bánh quy, tùy thuộc vào sự có

mặt của nước, sau đó kết tinh lại sau khi nướng. Lượng đường sử dụng cũng ảnh hưởng đáng kể đến các đặc tính cảm quan của sản phẩm. Đường kiểm soát sự hydrat hóa, phân tán các phân tử protein và tinh bột để ngăn không cho tạo thành một khối liên tục, khiến sản phẩm trở nên giòn hơn. Trong quá trình nướng, các đường khử (chiếm 10-20% trong bột bánh quy) kết hợp với các acid amin, góp phần tạo ra màu sắc cho bánh quy (Arepally và cộng sự, 2020).

Chất béo là thành phần thứ ba trong bột nhào sau bột mì và đường. Độ mềm mịn và hương vị thơm ngon của bánh quy phụ thuộc vào thành phần và tỉ lệ chất béo trong công thức bánh. Trong quá trình nhào trộn bột, chất béo hạn chế quá trình phát triển mạng gluten (Arepally và cộng sự, 2020).

Nhóm nguyên liêu phụ có thể gồm các chất nhũ hóa/chất hoạt động bề mặt, muối và chất tạo độ nở. Chất nhũ hoá là các lipid phân cực có vai trò làm giảm sức căng bề mặt, phân phối chất béo đồng đều, ngăn ngừa sự di chuyển ẩm và cải thiện kết cấu bột nhào. Muối được thêm vào với nồng độ dưới 2-2,5% so với lượng bột, có tác dụng làm cứng mạng gluten, tăng độ đồng nhất của khối bột, làm chậm quá trình lên men và phản ứng Maillard, đồng thời thúc đẩy quá trình hình thành vỏ bánh. Chất tạo độ nở có vai trò tạo ra bọt khí giúp cho sự phát triển kết cấu bánh quy trong quá trình nướng (Arepally và cộng sự, 2020).

Một số ứng dụng hạt vi bao vào bánh quy

Bánh quy bổ sung các hoạt chất được bao gói là một trong những sản phẩm được quan tâm nhiều hiện nay bởi hương vị và mùi thơm dễ chịu, sẵn sàng để ăn, có nhiều hình dạng khác nhau, có thời hạn sử dụng lâu và giá cả hợp lý (Cayres et al., 2021; Indiarto và cộng sự, 2023). Một số sản phẩm bánh quy kết hợp với những hợp chất sinh học giàu chất chống oxy hoá được bảo quản trong các hệ màng bao được nghiên cứu trong những năm gần đây đã cho thấy tính ưu việt về giá trị dinh dưỡng và gia tăng hạn sử dụng mà không ảnh hưởng đáng kể về mặt cảm quan cũng như sự yêu thích của người tiêu dùng đối với sản phẩm bánh (Bảng 1.2).

Việc bổ sung XTP ở dạng dịch chiết và hạt vi bao với nồng độ cao sẽ giúp gia tăng hàm lượng TPC, TSC trong bánh thành phẩm. Đến nay, việc vi bao dịch chiết XTP dựa trên các polysaccharide vẫn chưa được nghiên cứu và ứng dụng trong thực phẩm.

Bảng 1.2. Một số nghiên cứu bổ sung hạt vi bao dịch chiết giàu hợp chất sinh học vào sản phẩm bánh quy

Nguyên liệu bổ sung	**Đặc điểm sản phẩm**	**Tỷ lệ bổ sung**	**Tác giả**
Dịch chiết lá oliu và hạt vi bao dịch chiết với màng bao alginate-pectin	- Độ ẩm và hoạt độ nước: trong bánh bổ sung hạt vi bao cao hơn bánh không bổ sung (mẫu đối chứng) và bánh bổ sung dịch chiết ở cả hai điều kiện lưu trữ tăng tốc AS1 (55°C, 50% RH, bao bì OPP/OPP có màng kim loại, bóng tối) và AS2 (55°C, 50% RH, ánh sáng UV) - Hàm lượng phenolic: trong bánh bổ sung dịch chiết cao hơn đáng kể so với mẫu bổ sung hạt vi bao và mẫu đối chứng sau khi nướng. Trong quá trình lưu trữ (trong cả hai điều kiện tăng tốc), cả mẫu bổ sung dịch chiết và hạt vi bao đều giảm một chút về TPC. - Hoạt tính chống oxy hóa (được đo bằng phương pháp DPPH) của mẫu bổ sung dịch chiết và hạt vi bao tăng đáng kể so với mẫu đối chứng ở cả hai điều kiện lưu trữ. - Chỉ số peroxide (POV): Trong điều kiện lưu trữ AS1, POV duy trì ở mức tương đối ổn định khoảng 2 meqO_2/kg chất béo ở cả 3 mẫu bánh. Ở điều kiện AS2, POV của bánh quy bổ sung hạt vi bao thấp hơn mẫu bổ sung dịch chiết và cả hai mẫu thấp hơn so với mẫu đối chứng. - Độ cứng bánh: các hạt vi bao đã làm tăng độ cứng của bánh quy so với mẫu đối chứng, trong khi dịch chiết bổ sung không ảnh hưởng đáng kể đến độ cứng. Trong cả hai điều kiện lưu trữ, độ cứng của bánh quy giảm theo thời gian, tăng độ giòn. - Màu sắc bánh: sự khác biệt màu sắc (ΔE) nhỏ nhất được quan sát thấy ở mẫu bánh bổ sung hạt vi bao và cao nhất ở mẫu đối chứng (trường hợp lưu trữ AS1); ΔE của các mẫu đều có giá trị dưới 3, với mẫu bổ sung dịch chiết có ΔE nhỏ nhất (trường hợp lưu trữ AS2).	0,14 g dịch chiết and 0,55 g hạt vi bao (tương ứng hàm lượng phenolic 500 μg GAE/g chất khô)	(Paciulli và cộng sự, 2023)
Bột vi bao dịch chiết vỏ măng cụt với màng bao maltodextrin-arabic gum	- Hàm lượng phenolic (TPC) và flavonoid (TFC): Sự thay đổi hàm lượng bột vi bao có ảnh hưởng đáng kể đến TPC và TFC trong bột nhào và bánh quy socola được sản xuất. Sau khi nướng, TPC và TFC giảm ở tất cả các mẫu, nhưng mức giảm được giảm thiểu ở các mẫu bổ sung hạt vi bao (giảm13,47-13,63% (TPC) và 8,35-8,89% (TFC)) so với mẫu đối chứng (giảm 36,35% (TPC) và 28,39% (TFC)). - Hoạt tính chống oxy hóa (được đo bằng phương pháp DPPH, được biểu thị dưới dạng giá trị IC50 (ppm)): IC50 của các mẫu bột và bánh quy socola có xu hướng giảm khi thêm nhiều bột vi bao dịch chiết vào công thức. IC50 tăng ở tất cả các mẫu trong quá trình nướng cho thấy giảm khả năng chống oxy hóa của mẫu. - Chỉ số peroxide (POV): Trong 7 ngày lưu trữ (bảo quản trong túi alufoil, nhiệt độ phòng 26 ± 2°C) không có hợp chất peroxide được tạo ra trong các mẫu. Sau 35 ngày lưu trữ, các hợp chất peroxide đã được phát hiện.	Dịch chiết được vi bao bổ sung vào bột nhào với hàm lượng 1-7%	(Indiarto và cộng sự, 2023)

	- Độ cứng và độ giòn: của các mẫu bánh tăng lên khi hàm lượng hạt vi bao tăng. Mẫu có hàm lượng hạt vi bao cao nhất (F4) có độ cứng (22,62 ± 0,19 N) và độ giòn (9,75 ± 0,25 mm) cao nhất. So với mẫu đối chứng (F0), độ cứng và độ giòn của mẫu F4 lần lượt cao hơn 45,56% và 122,09%. - Màu sắc bánh: Sự thay đổi hàm lượng hạt vi bao trong công thức bánh có ảnh hưởng đáng kể đến các thông số màu sắc (L*, a*, b*). Càng tăng hàm lượng hạt vi bao, giá trị L* càng thấp, cho thấy bánh quy socola có màu sắc càng tối. - Đánh giá cảm quan: Việc thêm 1-7% hạt vi bao không ảnh hưởng đến hương vị của bánh.		
Bột vi bao dịch chiết vỏ nho đỏ với màng bao maltodextrin	- Độ ẩm: **V**iệc thêm bột vi bao không làm thay đổi đáng kể độ ẩm của bột bánh, nhưng bánh quy có độ ẩm thấp hơn, cho thấy bột vi bao làm tăng sự giải phóng nước trong quá trình nướng. - Hàm lượng phenolic (TPC): Nướng ở 180°C dẫn đến mất mát TPC trung bình là 16,49 %. - Hoạt tính chống oxy hóa (được đo bằng phương pháp ABTS và ORAC): Việc bổ sung bột vi bao làm tăng đáng kể khả năng chống oxy hóa (TEAC) của bột nhào và bánh quy, với phép thử ABTS cho thấy sự thay đổi lớn hơn so với phép thử ORAC. - Màu sắc bánh: việc bổ sung bột vi bao đã dẫn đến những thay đổi về màu sắc bánh. - Độ ổn định oxy hoá: Các công thức bổ sung bột vi bao không ảnh hưởng đáng kể đến độ ổn định oxy hoá của bánh. - Đánh giá cảm quan: Tác động của độ ẩm đến kết cấu bánh khi tăng lượng bột vi bao bổ sung đã ảnh hưởng đáng kể đến mức độ thích của người tiêu dùng, tuy nhiên không có ảnh hưởng đáng kể nào đến mức độ thích về hình dạng, mùi, vị và mức độ thích tổng thể.	Bột vi bao được bổ sung: 1,2 – 2,3 – 3,5% trên tổng khối lượng thành phần, tương ứng với 2,2%, 4,4% và 6,5% trọng lượng bột mì và hàm lượng phenolic 245, 489 và 723 mgGAE/100 bột mì.	(Dordoni và cộng sự, 2019)

1.4.6. Đánh giá một số tính chất sinh học của thực phẩm bằng phương pháp tiêu hoá trong ống nghiệm (In vitro digestion)

1.4.6.1. Phương pháp tiêu hoá trong ống nghiệm (In vitro)

Trong nghiên cứu về mô phỏng tiêu hoá của con người, quá trình tiêu hoá là một quy trình phức tạp và thiết yếu đối với sức khỏe, trong đó thức ăn được phân giải thành các chất dinh dưỡng cơ thể có thể sử dụng được cho sự tăng trưởng, duy trì tế bào và làm nhiên liệu cho cơ thể. Sự tiêu hoá diễn ra qua hai quá trình chính: (i) các chuyển đổi cơ học làm giảm kích thước các hạt thức ăn; và (ii) các chuyển đổi enzyme thuỷ phân các đại phân tử thành các thành phần nhỏ hơn được hấp thu vào máu (Guerra và cộng sự, 2012).

Để mô phỏng tiêu hóa của con người, các nhà khoa học đã thiết kế nhiều hệ thống GSI (Gastro-Intestinal Simulation) khác nhau, từ các bình phản ứng tĩnh đơn lẻ đến các hệ thống đa ngăn và động. So với các mô hình tĩnh, các mô hình động bao gồm các quá trình lý hóa học và cơ học cũng như những thay đổi theo thời gian về điều kiện môi trường trong đường ruột như thực tế. Các mô hình tĩnh là những hệ thống tiêu hóa phổ biến nhất. Giai đoạn dạ dày được tái hiện bằng cách thủy phân thức ăn đồng nhất bằng pepsin, ở pH và nhiệt độ cố định, trong một khoảng thời gian nhất định (pH 1-2, 37°C, 1-3 giờ). Bước này có thể được diễn biến tiếp theo trong cùng một bình phản ứng, bởi giai đoạn ruột non với sự tham gia của các enzyme tụy, với/hoặc không có mật (pH 6-7). Hầu hết các mô hình này được phát triển cho các ứng dụng cụ thể và đã được sử dụng rộng rãi để xác định khả năng tiếp cận sinh học của các chất dinh dưỡng được ăn vào như các chất dinh dưỡng đa lượng, vi lượng, khoáng chất và các thành phần thực vật. Từ khả năng tiếp cận sinh học của các thành phần dinh dưỡng có thể đánh giá tác động của dạng hóa học chất dinh dưỡng, cấu trúc thực phẩm, sự tương tác với các thành phần thực phẩm, các tác động vật lý, sinh học và thời gian vận chuyển đến quá trình hấp thu các thành phần dinh dưỡng trong hệ tiêu hoá người (Guerra và cộng sự, 2012).

1.4.6.2. Khả năng tiếp cận sinh học (bioaccessibility)

Khái niệm về khả năng tiếp cận sinh học có thể được định nghĩa là lượng hợp chất được giải phóng khỏi nền thức ăn trong đường tiêu hóa và sẵn sàng để hấp thụ. Điều

này bao gồm quá trình tiêu hóa biến đổi thức ăn thành nguyên liệu sẵn sàng để hấp thu/đồng hóa vào tế bào biểu mô ruột. Khả năng tiếp cận sinh học thường được đánh giá bằng các quy trình tiêu hóa trong ống nghiệm, thường mô phỏng quá trình tiêu hóa dạ dày và ruột non (Carbonell-Capella và cộng sự, 2014). Khả năng tiếp cận sinh học, có thể phụ thuộc vào cấu trúc hóa học của các hợp chất gây ra bởi quá trình glycosyl hóa, ester hóa và polymer hoá (Gayoso và cộng sự, 2018). Trong các sản phẩm thực vật, hầu hết các hợp chất phenolic được tìm thấy ở dạng glycosyl hóa hoặc ở dạng ester hoặc polymer phải được thủy phân bởi các enzyme đường ruột hoặc hệ vi sinh vật trước khi aglycone được giải phóng có thể được hấp thụ (Carbonell-Capella và cộng sự, 2014).

Việc tiêu thụ các hợp chất sinh học trực tiếp có thể ít hiệu quả hơn vì những hợp chất này khó tan trong dung dịch nước và do đó có khả năng hấp thụ kém. Các hoạt chất sinh học được bao bọc trong màng bao chitosan hay phức hợp màng bao chitosan-alginate đã được báo cáo làm tăng khả năng hấp thụ và khả năng dính vào niêm mạc (Mulia và cộng sự, 2020). Khi đó hệ màng bao đóng vai trò như một hàng rào bảo vệ vật lý đối với các hợp chất hóa học đến ruột kết và chịu được độ acid của dạ dày và độ base của ruột non.

Trong những năm gần đây, nhiều sản phẩm bánh quy đã được bổ sung thêm các thành phần chức năng từ các phụ phẩm thực phẩm chọn lọc hoặc các dịch chiết xuất từ các phụ phẩm này nhằm tăng cường các đặc tính chức năng của chúng một cách tự nhiên (Zieliński và cộng sự, 2020; Tamsone và cộng sự, 2020; Indiarto và cộng sự, 2023). Những sản phẩm bánh quy được phát triển này cho thấy đặc tính vi sinh có thể chấp nhận được và các thuộc tính cảm quan được cải thiện so với các loại bánh quy có bán trên thị trường. Tuy nhiên, sự trao đổi các hoạt chất sinh học trong quá trình tiêu hóa đối với các loại bánh quy bổ sung vẫn chưa được nghiên cứu nhiều. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá khả năng giải phóng và khả năng tiếp cận sinh học của các hoạt chất TPC, TSC từ hạt vi bao và bánh bổ sung XTP, cũng như hoạt tính chống oxy hóa của chúng được thể hiện trong hệ tiêu hoá in vitro, qua đó đánh giá ứng dụng vật liệu SA-chitosan trong bao gói các hoạt chất sinh học như một thành phần cải tiến trong việc phát triển các sản phẩm bánh tốt cho sức khỏe.

CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm của đề tài được thực hiện trong khoảng thời gian từ 03/2021 đến 09/2023 tại các địa điểm:

Các phòng thí nghiệm thuộc Khoa Công nghệ Hoá học và Thực phẩm Đại học Nông Lâm Tp. HCM.

Phòng thí nghiệm Hóa - Công ty cổ phần chăn nuôi C.P. Việt Nam, KCN Biên Hòa 2, Phường Long Bình Tân, TP. Biên Hòa, Tỉnh Đồng Nai.

Phòng thí nghiệm của Trung tâm nghiên cứu và chuyển giao công nghệ thuộcViện Khoa học Vật liệu Ứng dụng - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 01B, đường TL29, Phường Thạnh Lộc, Quận 12, TP. Hồ Chí Minh.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

2.2.1. Xáo tam phân

Cây xáo tam phân nhân giống (*Paramignya trimera* (Oliver) Guillaum) được thu mua tại vườn ươm trồng cây giống ở thành phố Tuy Hoà, tỉnh Phú Yên. Cây thu mua ở độ tuổi từ 2-7 tuổi.

Nguyên liệu tươi bao gồm thân, lá và rễ (lá cây chiếm khoảng 35-45% trọng lượng tươi, rễ dao động từ 2-10% tùy thuộc vào độ tuổi cây). Sau khi thu thập, các mẫu tươi được rửa trong nước để loại bỏ cát và đất, sau đó để ráo nước. Tiếp theo, chúng được cắt thành những mẫu nhỏ và sấy khô ở nhiệt độ 40 ± 2°C cho đến khi độ ẩm 5 ± 2%. Mẫu nguyên liệu được xay mịn và sàng qua rây có kích thước lỗ 0,3mm. Sau đó, chúng được trộn đều để đảm bảo đồng nhất, và chia thành các gói bằng polyamide (PA). Mỗi gói được hút chân không, hàn ghép mí và bảo quản trong tủ đông ở nhiệt độ -20 ± 2°C cho đến khi sử dụng. Sơ đồ quy trình xử lý nguyên liệu được thể hiện ở Hình 2.1.

Chuẩn bị dịch chiết lá XTP

Bột xáo tam phân được ngâm dầm trong nước cất (pH = 4,0) với tỉ lệ 1:40 (w/v) trong 20 phút. Tiếp theo, hỗn hợp XTP được xử lý siêu âm với năng lượng 200W (công suất 5 W/g) ở nhiệt độ 50^{o}C trong thời gian 8 phút. Kết thúc giai đoạn trích ly bằng sóng siêu âm, một hỗn hợp chế phẩm enzyme pectiase và cellulase (tỉ lệ 1:1) được

cho vào dung dịch trích ly với nồng độ 0,8% (v/w) và vẫn giữ ổn định nhiệt độ 50^{o}C trong bể điều nhiệt thêm 120 phút để tối đa hoá hoạt động xúc tác của các chế phẩm enzyme. Sau khi xử lý, hỗn hợp XTP được vô hoạt enzyme ở nhiệt độ 90^{o}C trong 10 phút trước khi lọc thô bằng vải sợi, rồi lọc chân không với giấy lọc (đường kính 11cm, kích thước lỗ 25 μm) bằng bơm chân không (Prismatec, 131, Itu, Brazil) để thu nhận dịch chiết.



Hình 2.1. Quy trình thu hồi bột xáo tam phân

2.2.2. Các chế phẩm enzyme

Các chế phẩm enzyme được dùng cho nghiên cứu trích ly các hoạt chất gồm có Pectinex Ultra SPL và Celluclast 1,5L được sản xuất bởi công ty Novozyme (Đan Mạch). Chế phẩm enzyme được sử dụng trong thí nghiệm tiêu hoá in vitro bao gồm pepsin (Sigma-Aldrich, Mỹ) và pancreatin (Himedia, Ấn Độ). Thông tin về các chế phẩm enzyme được trọng bày trong Bảng A.1-Phụ lục A.

2.2.3. Vật liệu vi bao và hoá chất phân tích

Thông tin về các hoá chất và vật liệu vi bao sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở Bảng A.2-Phụ lục A.

2.2.4. Nguyên liệu làm bánh

Bột mì: Bột mì số 8 Baker's choice của công ty TNHH Ong Vàng (độ ẩm < 13%, protein ≥ 9,5%, chất béo ≤ 3%, carbohydrate ≥ 60%, đường ≤ 15%).

Bột nở: Sản phẩm của công ty Arm & Hammer (Mỹ), có thành phần là $NaHCO_3$.

Trứng gà: Trứng gà tươi là sản phẩm của công ty TNHH Ba Huân.

Bơ: Bơ lạt TH True Milk (chất béo 80,5%, chất đạm ≤ 0,5%, carbohydrate ≤ 0,5%).

Đường: Đường mịn làm bánh (RS)của công ty TNHH Biên Hoà (đường tinh khiết ≥ 97%).

2.2.5. Thiết bị

Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu được trình bày trong Bảng A.3-Phụ lục A.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Các nội dung tiến hành trong nghiên cứu này được trình bày theo sơ đồ Hình 2.2.

2.3.1. Phân tích nguyên liệu

2.3.1.1. Khảo sát TPC và TSC ở các bộ phận cây và độ tuổi khác nhau

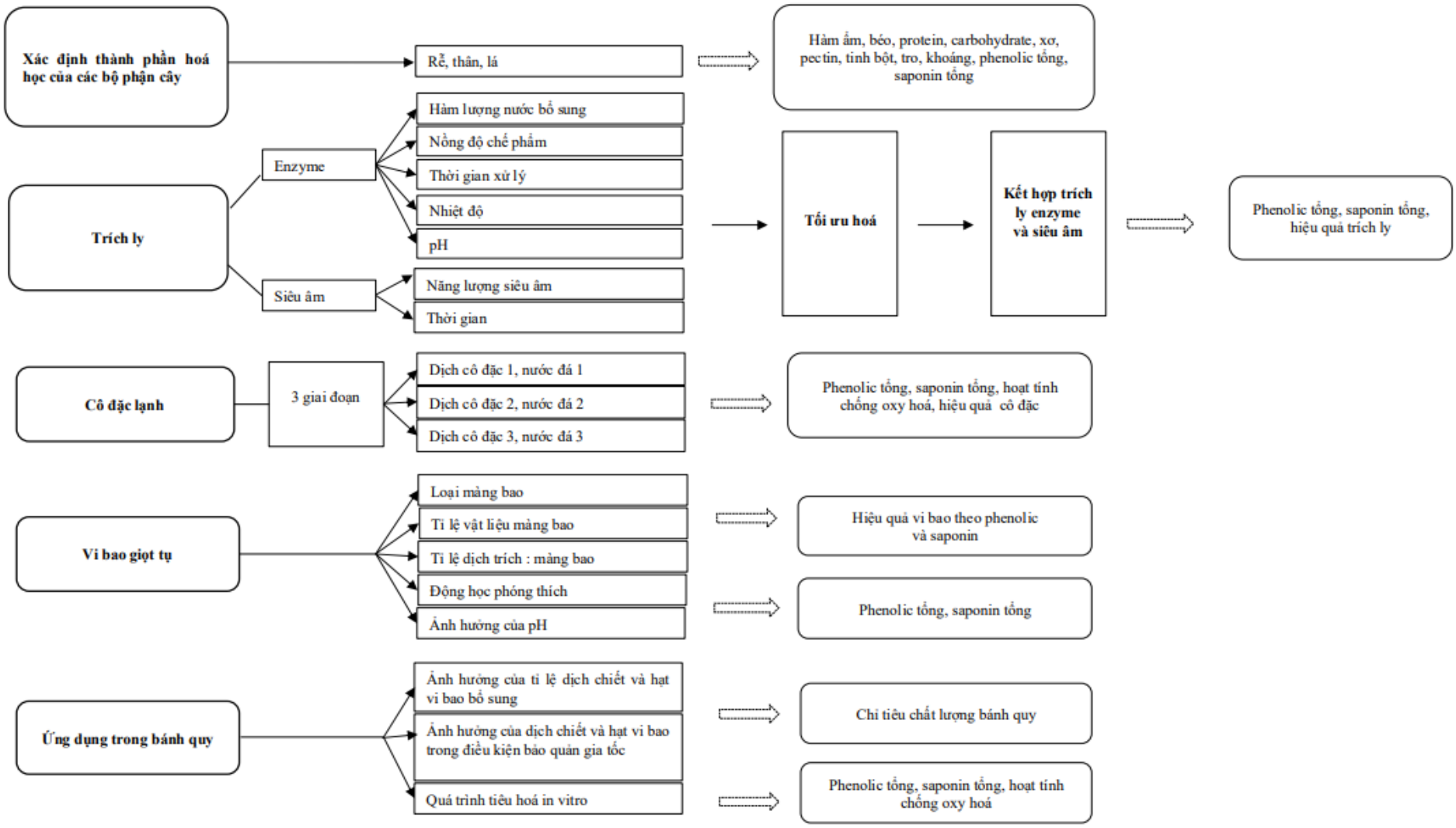
Mục đích: Khảo sát hàm lượng TPC, TSC của các bộ phận cây xáo tam phân ở các độ tuổi khác nhau, từ đó chọn ra độ tuổi có hàm lượng hoạt chất cao nhất.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên 2 yếu tố với 3 lần lặp lại.

Yếu tố thay đổi: Rễ, thân, lá cây xáo tam phân ở 6 độ tuổi: 2, 3, 4, 5, 6, 7 tuổi.

Hàm mục tiêu: Hàm lượng TSC, TPC

Cách thực hiện: Phương pháp chiết mẫu nguyên liệu để phân tích TPC, TSC được kế thừa theo phương pháp của Nguyen V. T. và cộng sự (2015) và có một số điều chỉnh. Cụ thể, 1 g mẫu ở dạng bột được cho vào cốc chứa 100 mL methanol 100%. Hỗn hợp được ngâm ở nhiệt độ phòng trong 20 phút, sau đó được chiết xuất bằng thiết bị siêu âm dạng thanh với công suất 150W và nhiệt độ 45°C trong 4 phút. Quá trình chiết xuất được lặp lại với phần cặn thu được ở các điều kiện tương tự. Sau khi chiết, phần dịch trích được trộn lại và ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 15 phút. Dịch chiết sau đó được đem đi phân tích TPC và TSC.



Hình 2.2. Sơ đồ quy trình thí nghiệm

2.3.1.2. Khảo sát thành phần hoá học của các bộ phận cây xáo tam phân

Mục đích: Khảo sát và so sánh thành phần hoá học của cây XTP ở các bộ phận rễ, thân và lá nhằm xác định bộ phận thích hợp của cây cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên 1 yếu tố với 3 lần lặp lại.

Yếu tố thay đổi: Rễ, thân, lá cây xáo tam phân ở độ tuổi đã chọn từ thí nghiệm trước.

Hàm mục tiêu: Độ ẩm, hàm lượng lipid, xơ trung tính, protein, pectin, tro, khoáng.

2.3.2. Khảo sát các thông số kỹ thuật của quá trình trích ly các hoạt chất sinh học của xáo tam phân với sự hỗ trợ của enzyme

2.3.2.1. Thí nghiệm sơ bộ

a) Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nước/nguyên liệu đến TPC và TSC

Mục đích: Xác định tỷ lệ nước/nguyên liệu thích hợp để trích ly TPC, TSC.

Bố trí thí nghiệm: Bố trí ngẫu nhiên 1 yếu tố, 5 nghiệm thức và 1 mẫu đối chứng.

Yếu tố cố định: Khối lượng mẫu 1g, nồng độ enzyme (pectinase/cellulase) 0,2% (v/w), thời gian xử lý enzyme là 60 phút, pH 4,0 và nhiệt độ ủ 40^{o}C.

Yếu tố thay đổi: Tỷ lệ nước bổ sung so với mẫu nguyên liệu, gồm 5 nghiệm thức: 10:1; 20:1; 40:1; 60:1; 80:1 (v/w).

Hàm mục tiêu: Hàm lượng TSC, TPC.

b) Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến TPC và TSC

Mục đích: Xác định nồng độ enzyme thích hợp để trích ly TPC, TSC.

Bố trí thí nghiệm: Bố trí ngẫu nhiên 1 yếu tố, 5 nghiệm thức và 1 mẫu đối chứng.

Yếu tố cố định: Khối lượng mẫu 1g, tỷ lệ nước bổ sung so với mẫu nguyên liệu (từ kết quả thí nghiệm a), thời gian xử lý là 60 phút, pH 4,0 và nhiệt độ ủ 40^{o}C.

Yếu tố thay đổi: Nồng độ enzyme: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; và 0,5% (v/w).

Tương ứng với hoạt độ enzyme pectinase: 3,8; 7,6; 11,4; 15,2; và 19 U/g (Khối lượng hỗn hợp 60g, hoạt độ enzyme 3800 PGNU/mL).

Tương ứng với hoạt độ enzyme celluase: 0,7; 1,4; 2,1; 2,8; và 3,5 U/g (Khối lượng hỗn hợp 40g, hoạt độ enzyme 700 EGU/mL).

Hàm mục tiêu: Hàm lượng TSC, TPC.

c) Khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến TPC, TSC

Mục đích: Xác định thời gian thích hợp để trích ly TPC, TSC.

Bố trí thí nghiệm: Bố trí ngẫu nhiên 1 yếu tố, 5 nghiệm thức và 5 mẫu đối chứng.

Yếu tố cố định: Khối lượng mẫu 1g, tỷ lệ nước bổ sung so với mẫu nguyên liệu (từ kết quả thí nghiệm a), nồng độ enzyme (từ kết quả thí nghiệm b), và pH 4,0.

Yếu tố thay đổi: Thời gian xử lý: 60, 90, 120, 150 và 180 phút.

Hàm mục tiêu: Hàm lượng TSC, TPC.

d) Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến TPC, TSC

Mục đích: Xác định nhiệt độ thích hợp để trích ly TPC, TSC

Bố trí thí nghiệm: Bố trí ngẫu nhiên 1 yếu tố, 5 nghiệm thức và 5 mẫu đối chứng.

Yếu tố cố định: Khối lượng mẫu 1g, tỷ lệ nước/nguyên liệu (từ kết quả thí nghiệm a), nồng độ enzyme (chọn kết quả thí nghiệm b), thời gian xử lý enzyme (từ kết quả thí nghiệm c) và pH 4,0.

Yếu tố thay đổi: Nhiệt độ xử lý: 30, 40, 50, 60, 70^{o}C.

Hàm mục tiêu: Hàm lượng TSC, TPC.

e) Khảo sát ảnh hưởng của pH đến TPC, TSC

Mục đích: Xác định pH thích hợp để trích ly TPC, TSC.

Bố trí thí nghiệm: Bố trí ngẫu nhiên 1 yếu tố, 5 nghiệm thức và 5 mẫu đối chứng.

Yếu tố cố định: Khối lượng mẫu 1g, tỷ lệ nước/nguyên liệu (chọn kết quả thí nghiệm a), nồng độ enzyme (pectinase/cellulase) (từ kết quả thí nghiệm b), thời gian xử lý (từ kết quả thí nghiệm c) và nhiệt độ xử lý (từ kết quả thí nghiệm d).

Yếu tố thay đổi: pH hỗn hợp: 3; 3,5; 4; 4,5; 5.

Hàm mục tiêu: Hàm lượng TSC, TPC.

Trong các thí nghiệm trên, mẫu đối chứng là mẫu không sử dụng enzyme. Nhiệt độ xử lý được điều chỉnh ở t^{o}C ± 2^{o}C bằng bể điều nhiệt có gắn máy lắc với tốc độ lắc 150 vòng/phút. Khi kết thúc quá trình, enzyme được vô hoạt bằng cách gia nhiệt hỗn hợp ở 90^{o}C trong 10 phút bằng bể điều nhiệt, sau đó làm nguội nhanh bằng cách ngâm trong nước lạnh 2-8^{o}C. Toàn bộ hỗn hợp được ly tâm ở 25^{o}C, 5000 vòng/phút trong 15 phút. Dịch sau ly tâm được lọc qua giấy lọc (New star 201, 110mm, Trung Quốc) thu dịch chiết sử dụng cho phân tích các chỉ tiêu mong muốn.

2.3.2.2. Thí nghiệm sàng lọc các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình xử lý enzyme pectinase và cellulase

Để xác định được các yếu tố và các mức ảnh hưởng đến trích ly TPC, TSC, 5 yếu tố được chọn để làm thí nghiệm là tỉ lệ nước/nguyên liệu, nồng độ hỗn hợp enzyme pectinase-cellulase, thời gian xử lý enzyme, nhiệt độ xử lý enzyme, pH hỗn hợp. Mức thấp (-1) và cao (+1) của 5 yếu tố được liệt kê trong Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Các biến trong ma trận Plackett-Burman

Ký hiệu	Tên yếu tố	Giá trị các yếu tố	
		Thấp (-1)	Cao (+1)
A	Nồng độ hỗn hợp enzyme pectinase-cellulase (1:1) (% v/w)	0,2	1,0
B	Thời gian xử lý enzyme (phút)	60	180
C	Nhiệt độ xử lý enzyme (^oC)	30	70
D	Tỉ lệ nước/nguyên liệu (v/w)	10:1	80:1
E	pH của hỗn hợp	3,0	5,0

Thí nghiệm được thiết kế theo ma trận Plackett-Burman với 12 nghiệm thức (Bảng 2.2) để sàng lọc các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hàm lượng phenolic (mgGAE/g chất khô) và saponin (mgEE/g chất khô) trong dịch chiết.

Bảng 2.2. Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman

Nghiệm thức	Các biến				
	A	B	C	D	E
0a0	0,2	60	30	80	3
---	0,2	60	70	10	3
--+	0,2	60	70	10	5
+--	0,2	180	30	10	5
+-+	0,2	180	30	80	5
a00	0,2	180	70	80	3
00a	1	60	30	10	5
000	1	60	30	80	3
000	1	60	70	80	5
000	1	180	30	10	3
00A	1	180	70	10	3
A00	1	180	70	80	5

2.3.2.3. Thí nghiệm tối ưu hóa các thông số trích ly phenolic và saponin từ lá cây xáo tam phân sử dụng hỗn hợp enzyme pectinase và cellulase

Dựa trên kết quả thí nghiệm theo ma trận Plackett-Burman và kết quả khảo sát sơ bộ, phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) với phương án quay bậc 2 có tâm (Central Composite Design - CCD) được áp dụng để tối ưu hóa điều kiện của quá trình trích ly. Hàm mục tiêu đại diện cho hiệu quả trích ly là TPC và TSC có trong dịch chiết thu được. Mối quan hệ giữa các biến và hàm mục tiêu là phương trình hồi quy đa biến có dạng tổng quát như sau:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i-1}^{3} \sum_{j=i+1}^{3} \beta_{ij} X_i X_j \qquad (2.1)$$

Trong đó, Y là hàm mục tiêu, X_i và X_j là các mức của biến đại diện cho ảnh hưởng của biến lên hàm mục tiêu. β_0 là hằng số, β_i, β_{ii} và β_{ij} là các hệ số của phương trình hồi quy.

Các hệ số của phương trình hồi quy thực nghiệm được ước lượng bằng phương pháp bình phương cực tiểu; sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được kiểm chứng bằng ANOVA (Analysis of Variance) và LSD ở mức ý nghĩa 5% ($p < 0,05$). Tất cả các thí nghiệm được thực hiện ít nhất trong ba lần. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm JMP 13.0 và được biểu thị bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3).

Điều kiện tối ưu được dự đoán và xác minh lại bằng thực nghiệm.

Thí nghiệm xác định thông số tối ưu trích ly trên bộ phận lá được thiết kế như sau:

Yếu tố cố định: Khối lượng mẫu 1g, tỷ lệ nước bổ sung so với mẫu nguyên liệu 40 : 1 (v/w) và pH hỗn hợp 4,0 (chọn kết quả thí nghiệm khảo sát sơ bộ).

Nồng độ enzyme (pectinase/cellulase) (chọn kết quả thí nghiệm b), thời gian xử lý enzyme (chọn kết quả thí nghiệm c) và nhiệt độ xử lý (chọn kết quả thí nghiệm d).

Yếu tố thay đổi: Nồng độ hỗn hợp enzyme pectinase-cellulase (1:1): 0,6 - 0,8% (v/w); thời gian xử lý enzyme: 105 - 135 phút, nhiệt độ ủ enzyme 45 – 55^{o}C

Hàm mục tiêu: Hàm lượng TSC, TPC.

Trong thí nghiệm trên, mẫu đối chứng là mẫu không sử dụng enzyme.

2.3.3. Khảo sát các thông số kỹ thuật của quá trình trích ly TPC, TSC từ lá xáo tam phân với sự hỗ trợ của sóng siêu âm

2.3.3.1. Thí nghiệm sơ bộ

a) Khảo sát ảnh hưởng của năng lượng siêu âm đến TPC và TSC

Mục đích: Đánh giá ảnh hưởng của năng lượng siêu âm đến TPC và TSC.

Bố trí thí nghiệm: Bố trí ngẫu nhiên 1 yếu tố, 5 nghiệm thức và 1 mẫu đối chứng.

Yếu tố cố định: Tỷ lệ nước/mẫu 40:1(v/w) (chọn kết quả thí nghiệm sơ bộ enzyme), thời gian ủ trước siêu âm 20 phút, nhiệt độ 50^{o}C (chọn kết quả thí nghiệm sơ bộ enzyme), thời gian siêu âm 2 phút và pH hỗn hợp 4,0 (chọn kết quả thí nghiệm sơ bộ enzyme). Lưu ý: Nhiệt độ hỗn hợp siêu âm được điều chỉnh ổn định bằng cách ngâm cốc chứa mẫu trong nước 50^{o}C ở 1 phút đầu, sau đó tăng thêm lượng nước đá vào bể ngâm để duy trì ổn định nhiệt độ siêu âm.

Yếu tố thay đổi: Năng lượng siêu âm 150, 190, 210, 230, 250W (tương ứng với công suất siêu âm: 3,75; 4,75; 5,25; 5,75; 6,25 W/g).

Hàm mục tiêu: Hàm lượng TSC, TPC.

b) Khảo sát ảnh hưởng của thời gian xử lý siêu âm đến TPC và TSC

Mục đích: Đánh giá ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến TPC và TSC.

Bố trí thí nghiệm: Bố trí ngẫu nhiên 1 yếu tố, 5 nghiệm thức và 1 mẫu đối chứng.

Yếu tố cố định: Tỷ lệ nước/mẫu 40:1 (chọn kết quả thí nghiệm sơ bộ enzyme) (khối lượng mẫu 3,75g, thể tích nước 150mL), thời gian ủ trước siêu âm 20 phút, nhiệt độ 50^{o}C (chọn kết quả thí nghiệm sơ bộ enzyme), pH hỗn hợp 4,0 (chọn kết quả thí nghiệm sơ bộ enzyme) và năng lượng siêu âm (chọn kết quả thí nghiệm a).

Yếu tố thay đổi: Thời gian siêu âm 0, 2, 4, 6, 8, và 10 phút

Hàm mục tiêu: Hàm lượng TSC, TPC.

2.3.3.2. Tối ưu hóa các thông số trích ly phenolic và saponin từ cây XTP với sự hỗ trợ của siêu âm

Mục đích: Thiết kế bề mặt đáp ứng được sử dụng để tối ưu hóa năng lượng siêu âm, nhiệt độ và thời gian xử lý nhằm khảo sát sự ảnh hưởng đồng thời của 3 yếu tố này đến hàm lượng phenolic tổng và saponin.

Bố trí thí nghiệm: Phần mềm JMP 13 được dùng để thiết kế thí nghiệm mô hình quay bậc 2 có tâm (CCD – Central composite design) và phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM - Response surface methodology) kết hợp. Thí nghiệm được thiết kế theo 3 yếu tố (năng lượng, nhiệt độ, thời gian) bao gồm 17 thí nghiệm trong đó có 3 thí nghiệm tâm.

Điều kiện tối ưu được dự đoán và xác minh lại bằng thực nghiệm.

Yếu tố cố định: Tỷ lệ nước/mẫu 40:1(v/w) (chọn kết quả thí nghiệm sơ bộ enzyme) (khối lượng mẫu 3,75g, thể tích nước 150mL), thời gian ủ trước siêu âm 20 phút, nhiệt độ 50^{o}C (chọn kết quả thí nghiệm sơ bộ enzyme), pH hỗn hợp 4,0 (chọn kết quả thí nghiệm sơ bộ enzyme)

Yếu tố thay đổi: Năng lượng siêu âm 200 – 220 W, thời gian siêu âm 4 – 8 phút.

Hàm mục tiêu: Hàm lượng TSC, TPC.

2.3.4. So sánh hiệu quả của các phương pháp xử lý

Mục đích: Đánh giá hiệu quả các phương pháp xử lý nguyên liệu đến TPC, TSC của dịch chiết thu được, từ đó lựa chọn phương pháp xử lý phù hợp.

Bố trí thí nghiệm: Bố trí ngẫu nhiên 1 yếu tố, 6 nghiệm thức.

Yếu tố thay đổi: Phương pháp xử lý

Phương pháp 1: mẫu đối chứng không xử lý (CONTROL)

Phương pháp 2: mẫu được xử lý bằng enzyme (EAE)

Phương pháp 3: mẫu được xử lý bằng siêu âm (UAE)

Phương pháp 4: mẫu được xử lý enzyme trước, siêu âm sau (E-UAE)

Phương pháp 5: mẫu được xử lý siêu âm trước, xử lý enzyme sau (U-EAE)

Phương pháp 6: mẫu được xử lý đồng thời siêu âm và enzyme (UES-AE)

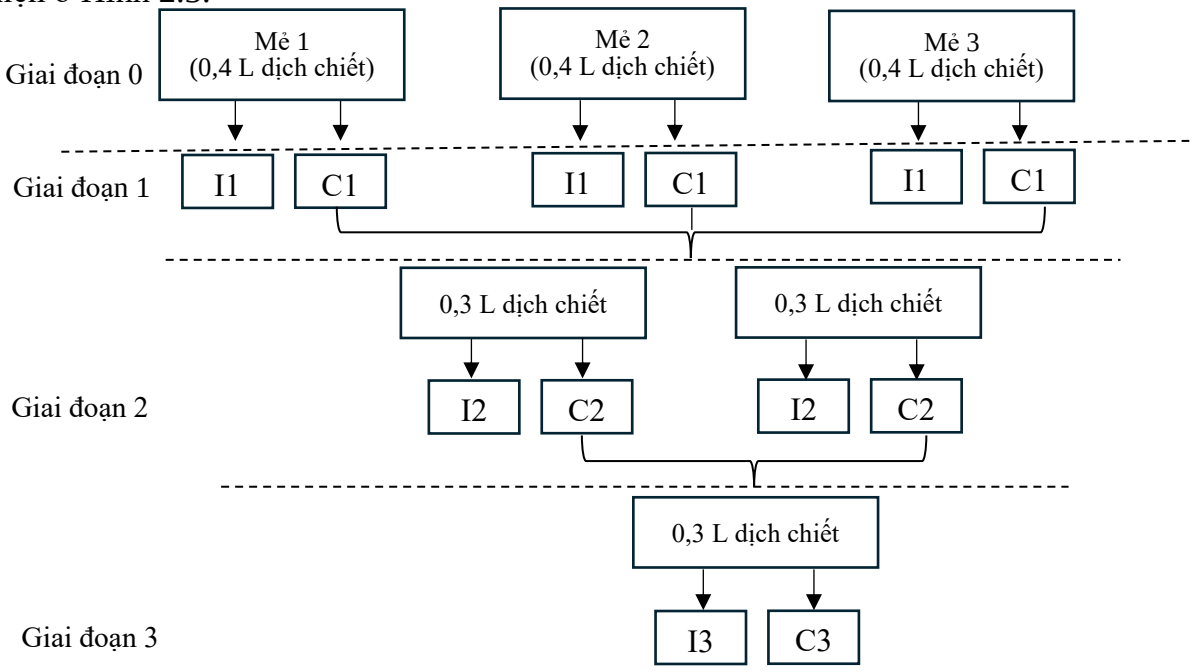
Hàm mục tiêu: Hàm lượng TSC, TPC.

Dịch trích lá xáo tam phân thu được ở trường hợp cho hiệu quả chiết xuất cao nhất tiếp tục phân tích định tính thành phần phenolic và saponin bằng sắc ký khối phổ LC-QTOF. Phương pháp xử lý cho hiệu quả trích ly cao nhất được lựa chọn để ứng dụng trong quy trình trích ly TPC, TSC từ lá cây xáo tam phân.

2.3.5. Khảo sát các thông số kỹ thuật của quá trình cô đặc lạnh

Quy trình thí nghiệm:

Kỹ thuật được áp dụng là cô đặc lạnh dạng khối (block freeze concentration). Nguyên lý của phương pháp này dựa trên sự đông lạnh hoàn toàn dung dịch thực phẩm, tiếp theo đó là quy trình rã đông một phần dưới sự phân tách trọng lực đơn giản. Phương pháp này cho phép thu được hai phần: phần thứ nhất là chất lỏng cô đặc (C) và phần thứ hai là nước đá (I) (Aider & Ounis, 2012). Sơ đồ quy trình thể hiện ở Hình 2.3.



Hình 2.3. Sơ đồ quy trình cô đặc lạnh dịch chiết lá XTP

(Chú thích: C1, C2, C3: dịch cô đặc giai đoạn 1,2, và 3; I1, I2, I3: nước đá giai đoạn 1, 2, và 3)

Cô đặc lạnh được thực hiện theo nghiên cứu trước đây Boaventura và cộng sự (2013) và Haas và cộng sự (2022) với một số sửa đổi. Trong quá trình này, mỗi mẻ dịch chiết trải qua ba giai đoạn đông lạnh ở −20 ± 5 °C (tủ đông Hitachi, R-H350PGV4, Thái Lan) trong 36 giờ. Sau mỗi giai đoạn đông lạnh, dịch chiết được rã đông (nhiệt độ phòng 30 ± 2 °C) cho đến khi đạt 50% thể tích ban đầu để tiếp tục chu kỳ cô đặc tiếp theo. Chất lỏng rã đông (C1, C2, C3) chính là chất lỏng cô đặc và mẫu đông lạnh còn lại được lấy dưới dạng phần băng (I1, I2, I3) ở ba giai đoạn cô đặc lạnh. Dịch chiết cô đặc và nước đá còn lại từ mỗi giai đoạn được bảo quản ở −18 ± 2 °C để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Hàm mục tiêu: Hàm lượng TSC, TPC, hoạt tính chống oxy hoá, hiệu quả cô đặc.

2.3.6. Khảo sát các thông số kỹ thuật của quá trình vi bao dịch trích bằng phương pháp giọt tụ

Vi bao dịch chiết cô đặc từ lá cây xáo tam phân bằng phương pháp giọt tụ dựa trên nghiên cứu của Vallejo-Castillo và cộng sự (2020) với một số sửa đổi (Phụ lục B.1).

2.3.6.1. Khảo sát ảnh hưởng của loại màng bao đến hiệu quả vi bao

Thí nghiệm được tiến hành nhằm mục đích lựa chọn và xác định loại màng bao phù hợp để đạt hiệu quả vi bao tốt nhất. Quá trình chuẩn bị mẫu được thực hiện như trên. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 yếu tố với 3 lần lặp lại.

Yếu tố thay đổi: 3 công thức màng bao đã được chọn lựa dựa trên nghiên cứu của Belščak-Cvitanović và cộng sự (2016) và Tan và cộng sự (2021) gồm hệ màng bao SA:Chitosan, SA:HPMC và SA:Pectin với tỉ lệ 70:30 (w:w)

Yếu tố cố định: Tỉ lệ dịch trích : màng bao (DT:MB) = 1:2 (w:w); nồng độ $CaCl_2$: 3%; thời gian ngâm trong dung dịch $CaCl_2$ 3%: 30 phút

Hàm mục tiêu: Hiệu quả vi bao tính theo TPC, TSC.

2.3.6.2. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ vật liệu màng bao đến hiệu quả vi bao

Thí nghiệm được tiến hành nhằm mục đích lựa chọn và xác định tỉ lệ vật liệu bao so với dịch trích nhằm đạt được hiệu quả vi bao tốt nhất.

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 yếu tố với 3 lần lặp lại.

Yếu tố thay đổi: Tỉ lệ SA/chitosan: 90:10, 80:20; 70:30; 60:40, và 50:50 (w:w)

Yếu tố cố định: Tỉ lệ dịch trích : màng bao (DT:MB) = 1:2 (w:w); nồng độ $CaCl_2$: 3%; thời gian ngâm trong dung dịch $CaCl_2$ 3%: 30 phút.

Hàm mục tiêu: Hiệu quả vi bao tính theo TPC, TSC.

2.3.6.3. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ dịch trích và màng bao đến hiệu quả vi bao

Thí nghiệm được tiến hành nhằm mục đích lựa chọn và xác định tỉ lệ dịch trích – màng bao nhằm đạt được hiệu quả vi bao tốt nhất.

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 yếu tố với 3 lần lặp lại.

Yếu tố thay đổi: Tỉ lệ dịch trích - màng bao: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, và 1:5 (w:w)

Yếu tố cố định: Tỉ lệ vật liệu màng bao; nồng độ $CaCl_2$: 3%; thời gian ngâm trong dung dịch $CaCl_2$ 3%: 30 phút.

Hàm mục tiêu: Hiệu quả vi bao tính theo TPC, TSC.

2.3.6.4. Khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự ổn định của hạt vi bao

Thí nghiệm nhằm mục đích xác định sự ổn định của vi hạt trong các môi trường pH khác nhau ở nhiệt độ phòng (25 – 30^{o}C), 5-10^{o}C và điều kiện gia nhiệt (90^{o}C).

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 2 yếu tố với 3 lần lặp lại.

Yếu tố thay đổi: Điều chỉnh pH của dung dịch đến các giá trị 4, 5, 6, 7, và 8 (hiệu chỉnh pH bằng dung dịch acid acetic và $NaHCO_3$) ở điều kiện nhiệt độ phòng và 5-10^{o}C trong 7 ngày và điều kiện gia nhiệt 90^{o}C trong 10 phút.

Yếu tố cố định: Tỉ lệ hạt/nước ngâm: 1/2 (w/w)

Hàm mục tiêu: Hiệu quả vi bao tính theo TPC, TSC.

Mẫu đối chứng là hạt vi bao không ngâm nước.

2.3.6.5. Khảo sát động học phóng thích TPC, TSC trong môi trường nước

Thí nghiệm được tiến hành nhằm mục đích xác định ảnh hưởng của nhiệt độ nước theo thời gian đến quá trình giải phóng TPC, TSC của hạt vi bao trong môi trường nước cất, từ đó xác định mô hình giải phóng TPC, TSC phù hợp.

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 2 yếu tố với 3 lần lặp lại.

Yếu tố thay đổi: Điều chỉnh nhiệt độ nước đến các giá trị 10^{o}C (ngăn mát tủ lạnh), 30^{o}C, 45^{o}C, 60^{o}C, 75^{o}C trong thời gian 1h, 12h, 24h, 36h, 48h.

Yếu tố cố định: Tỉ lệ hạt/nước ngâm: 1/2 (w/w)

Hàm mục tiêu: Hàm lượng TPC, TSC giải phóng ra môi trường nước.

Mẫu đối chứng là hạt vi bao không ngâm nước.

2.3.7. Ứng dụng dịch trích và hạt vi bao trong sản phẩm bánh quy

Quy trình làm bánh quy được thực hiện theo nghiên cứu trước đây (Indiarto và cộng sự, 2023) và có một vài thay đổi, được trình bày trong Phụ lục B.2.

2.3.7.1. Khảo sát ảnh hưởng tỉ lệ hạt vi bao đến chỉ tiêu chất lượng bánh quy

Thí nghiệm nhằm mục đích xác định tỉ lệ vi hạt và dịch chiết thích hợp cho công thức bánh quy. Thí nghiệm được thiết kế dựa theo nghiên cứu của Indiarto và cộng sự (2023).

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 yếu tố với 3 lần lặp lại.

Yếu tố thay đổi: Tỷ lệ % dịch chiết và vi hạt bổ sung vào bột nhào:

Dịch chiết: 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; và 9,0% (w/w).

Vi hạt: 2,0; 4,0; 7,0; 10,0; và 13,0% (w/w) (tương ứng với tỷ lệ dịch chiết).

Yếu tố cố định: Các thành phần khác của bánh, nhiệt độ và thời gian nướng bánh.

Thời gian đem đi phân tích các chỉ tiêu hoá lý và cảm quan của bánh quy sau khi nướng: 24 giờ.

Hàm mục tiêu: Độ cứng sản phẩm; màu sắc; đánh giá cảm quan; hoạt độ nước; hàm lượng phenolic, saponin.

Mẫu đối chứng là mẫu bánh quy không bổ sung vi hạt hay dịch trích XTP.

Việc chiết xuất TPC và TSC từ bánh quy, được thực hiện theo 2 bước: chiết xuất chất béo và chiết xuất phenolic. Ở bước đầu tiên, 10 g mẫu được khử chất béo ba lần bằng cách chiết chất béo với 25 mL hexan. Phần chất rắn thu được đưa vào tủ sấy 40 ^{o}C trong 2h để thu được mẫu chất rắn không có chất béo. Sau đó, trong bước thứ hai, 5 g mẫu đã khử chất béo được bổ sung với 10 mL ethanol 96% và lắc đều trong 15 phút rồi đem đi đồng hóa 10.000 vòng trong 30 giây. Dùng lọc chân không tách hỗn hợp chất rắn. Dịch chiết sau đó được làm bay hơi bằng thiết bị cô quay. Dịch chiết không dung môi được phân tích TPC, TSC.

2.3.7.2. Đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết và hạt vi bao đến chất lượng của bánh quy theo thời gian và nhiệt độ bảo quản

Thí nghiệm nhằm mục đích xác định thời hạn sử dụng của sản phẩm bổ sung dịch chiết và vi hạt ở các điều kiện môi trường nhiệt độ khác nhau theo TPC, TSC.

Mô tả: Các mẫu bánh được bao gói đuổi khí sau đó tiến hành bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau.

Yếu tố thay đổi:

Nhiệt độ bảo quản với 3 mức: 30^{o}C ± 2; 40^{o}C ± 1, 50^{o}C ± 1

Thời gian bảo quản 1, 10, 20, 30 và 40 ngày

Hàm mục tiêu: độ cứng; màu sắc; hoạt độ nước; chỉ số peroxide; TPC, TSC.

Mẫu đối chứng là mẫu bánh quy không bổ sung vi hạt hay dịch trích XTP.

2.3.7.3. Sự giải phóng TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá của bánh quy bổ sung dịch trích XTP trong quá trình tiêu hoá in vitro

Thí nghiệm nhằm mục đích xác định hàm lượng TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá giải phóng ra môi trường nước cất và trong dịch mô phỏng các điều kiện ở

dạ dày và ruột trong cơ thể người, qua đó đánh giá khả năng tiếp cận sinh học của các hoạt chất này thông qua chỉ số BI (Bioaccessability Index).

Yếu tố cố định: Khối lượng của hạt vi bao, mẫu bánh bổ sung dịch chiết và mẫu bánh bổ sung hạt vi bao.

Hàm mục tiêu: Hàm lượng TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá giải phóng trong nước cất và môi trường giả định của hạt vi bao, bánh quy bổ sung dịch chiết XTP và bánh quy bổ sung hạt vi bao.

Quá trình giải phóng các hợp chất trong hạt vi bao và mẫu bánh bổ sung dịch chiết, hạt vi bao XTP được đánh giá trong ống nghiệm bằng cách mô phỏng dịch tiêu hóa của con người (human gastrointestinal fluid - HGF) và trong nước cất. Thí nghiệm được thực hiện theo Rutz và cộng sự (2017) và El-Messery và cộng sự (2021) với một vài điều chỉnh.

Trong hệ thống này, 0,2g hạt vi bao được ủ trong nước cất hoặc HGF (5 mL) ở 37°C. Sự phóng thích của TSC, TPC và hoạt tính chống oxy hoá trong các mẫu được theo dõi ở 0, 60,120, 180, 240, 300 và 360 phút.

Đối mẫu bánh, 5,0g mẫu được ủ trong HGF (5 mL) ở 37°C. Sự phóng thích của TSC, TPC và hoạt tính chống oxy hoá trong các mẫu được theo dõi ở 0, 60,120, 180, 240, 300 và 360 phút.

Để mô phỏng các điều kiện tương tự như trong cơ thể người, các mẫu được cho vào dung dịch HCl 0,1 M (5 mL) có độ pH 2,0 (đã được điều chỉnh trước đó bằng NaOH 0,2 M) chứa 0,3% (w/v) enzyme pepsin, trong 120 phút đầu tiên các mẫu được lắc với 50 vòng/phút (rpm) (giai đoạn mô phỏng tiêu hoá dạ dày - simulated gastric fluid (SGF)). Sau đó, dung dịch Na_2HPO_4 0,56 M (3,5 mL) được thêm vào, dung dịch này chứa 0,1% (w/v) enzyme pancreatin và 0,1% (w/v) muối mật (bile salts) (giai đoạn mô phỏng tiêu hoá dịch ruột - simulated intestinal fluid (SIF)).

Các mẫu được lấy ra ở các khoảng thời gian khác nhau. Sau đó, đem đi ly tâm 5.000 vòng trong 5 phút. Phần dịch bên trên được đo TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá ABTS, DPPH.

Để chiết xuất TPC và TSC từ bánh quy, được thực hiện theo thí nghiệm 2.3.7.1.

Để chiết xuất TPC và TSC từ hạt vi bao, 2 g mẫu hạt vi bao được bổ sung với 10 mL ethanol 96%, lắc đều trong 15 phút và rồi đem đi đồng hóa 10.000 vòng trong 30 giây. Dùng lọc chân không tách hỗn hợp chất rắn. Dịch chiết sau đó được làm bay hơi bằng thiết bị cô quay. Dịch chiết không dung môi được đông khô và được dùng để phân tích TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá ABTS, DPPH.

2.4. Các phương pháp phân tích và xử lý số liệu

2.4.1. Xác định hàm lượng ẩm

Hàm lượng ẩm của mẫu được xác định theo phương pháp phân tích của AOAC 930.04 (2016) (Phụ lục C.1).

2.4.2. Xác định hàm lượng TPC, TSC

TPC được xác định bằng phương pháp Folin - Ciocalteau (Phụ lục C.2).

TSC được xác định dựa trên nguyên tắc phản ứng tạo màu giữa vanilin và các hợp chất saponin (Phụ lục C.3).

2.4.3. Phân tích sắc ký khối phổ LC-QTOF

Các hợp chất phenolic và saponin trong chiết xuất lá XTP được phân tích bằng máy LC-QTOF-MS, 1290 Infinity II LC-6545 Quadrupole-TOF (Agilent Technologies, USA) (Phụ lục C.4).

2.4.4. Hàm lượng chất khô tổng

Chất khô tổng của mẫu được xác định bằng cách đo sự giảm khối lượng khi sấy trong lò ở 80°C và biểu thị dưới dạng hàm lượng chất khô dịch chiết/tổng khối lượng mẫu khô (g/100 g chất khô) (AOAC, 2005).

2.4.5. Xác định hoạt tính chống oxy hoá

Hoạt tính chống oxy hoá được xác định theo phương pháp ABTS đã cải tiến từ Nguyen V. T. và cộng sự (2015) (Phụ lục C.5).

Hoạt tính chống oxy hoá được xác định theo phương pháp DPPH đã cải tiến từ Nguyen V. T. và cộng sự (2015) (Phụ lục C.6).

2.4.6. Xác định thành phần hoá học của nguyên liệu

Thành phần hóa học của nguyên liệu xáo tam phân được xác định theo các phương pháp sau: Độ ẩm của mẫu xáo tam phân khô được xác định theo phương pháp sấy đến khối lượng không đổi AOAC 930.04 (2016); hàm lượng béo thô xác định bằng phương

pháp chiết Soxhlet cải tiến với dung môi là ether dầu mỏ (ISO 11085:2015); hàm lượng protein thô được ước tính bằng phương pháp Kjeldahl theo AOAC 2001.11 (2016); hàm lượng chất xơ trung tính (chất xơ không hòa tan - IDF) được xác định bằng phương pháp Akom 13 - Kỹ thuật túi lọc (A2000 và A2000I); hàm lượng pectin được đo theo phương pháp IFU số 26 (2005); Tổng hàm lượng tinh bột được định lượng bằng phương pháp đo phân cực (ISO 6493:2000); hàm lượng tro được phân tích theo tiêu chuẩn ISO 5984:2002; hàm lượng canxi, kali, kẽm, sắt, magie và phospho được định lượng bằng ICP-AES (ISO 27085:2009) (Phụ lục C.7).

2.4.7. Hiệu quả cô đặc lạnh

Hệ số nồng độ (CF) ở mỗi giai đoạn cô đặc lạnh được tính theo phương pháp do Aider & Ounis (2012) đề xuất và hiệu quả của quá trình cô đặc lạnh (PE) tính theo da Silva Haas và cộng sự (2022) (Phụ lục C.8).

2.4.8. Xác định hiệu quả vi bao (MEE: microencapsulation efficiency)

Hiệu quả vi bao được thực hiện theo nghiên cứu của Souza và cộng sự (2019) với một số thay đổi (Phụ lục C.9).

2.4.9. Xác định mô hình giải phóng TPC, TSC từ hạt vi bao

Ở những khoảng thời gian thích hợp, các hạt vi bao thu được ngâm trong dung dịch trisodium citrate 5% (w/v) theo tỷ lệ hạt : dung dịch trisodium citrate = 1:5 (w:w) trong 15 phút, rồi đem đi đồng hóa 10.000 vòng/phút trong 30 giây. Dịch sau hoà tan được đo TPC, TSC. Hàm lượng TPC, TSC giải phóng ra được tính theo công thức:

$$\text{TPC/TSC giải phóng (\%)} = \frac{TPC/TSC\ tại\ thời\ điểm\ t}{TPC/TSC\ tại\ thời\ điểm\ t=0} \quad (2.2)$$

Để xác định mô hình giải phóng TPC, TSC phù hợp, các hoạt chất giải phóng được tính toán và đánh giá qua 5 mô hình sau: bậc 0 (phương trình 2.3), bậc nhất (phương trình 2.4), Hixson-Crowell (phương trình 2.5), Higuchi (phương trình 2.6) và Korsmeyer -Peppas (phương trình 2.7). Các phương trình này được tính toán dựa vào phần mềm Origin. Các phương trình toán học biểu diễn các mô hình này được liệt kê như sau:

Mô hình bậc 0: $f_t = K_0 t$ (2.3)

Mô hình bậc 1: $f_t = 1 - e^{-k_1 t}$ (2.4)

Mô hình Hixson-Crowell: $\sqrt[3]{f_0} - \sqrt[3]{f_t} = K_{HC}t$ (2.5)

Mô hình Higuchi: $f_t = K_H\sqrt{t}$ (2.6)

Mô hình Korsmeyer-Peppas: $f_t = K_M t^n$ (2.7)

Trong đó, f_t biểu thị lượng TPC, TSC được giải phóng tại thời điểm t; f_0 là lượng TPC, TSC ban đầu trong hạt vi bao; K_0, k_1, K_{HC}, K_H và K_M lần lượt là các hằng số giải phóng của các phương trình tương ứng. Mô hình động học và cơ chế giải phóng tối ưu được lựa chọn dựa trên hệ số tương quan R^2 và số mũ khuếch tán *n*.

2.4.10. Phân tích hình thái học

Đặc điểm hình thái của các vi hạt được kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử quét (Hitachi Fe-SEM s4800, Tokyo, Nhật Bản), hình ảnh được chụp ở 10,00 kV với các độ phóng đại là 40 và 5000 lần; và kính hiển vi điện tử (Leica DM 2000, Mỹ) đo kích thước hạt ở độ phóng đại 10 lần.

2.4.11. Phương pháp xác định màu sắc

Màu sắc của mẫu thực phẩm được xác định bằng cách sử dụng máy đo màu dựa theo phương pháp đo của Tuyen và cộng sự (2015) (Phụ lục C.10).

2.4.12. Phương pháp đo độ cứng bánh

Đo độ cứng bánh được thực hiện bằng máy phân tích kết cấu (ZwickRoell, Ý) (Phụ lục C.11)..

2.4.13. Phương pháp cảm quan

Tính chất cảm quan của mẫu bánh quy được đánh giá bởi 20 cảm quan viên, hiện đang học ngành Công nghệ Thực phẩm tại Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh. 20 g mẫu thí nghiệm được trưng bày trong đĩa giấy. Cảm quan viên không sử dụng bất kì thực phẩm nào trước 30 phút thực hiện đánh giá cảm quan. Các cảm quan viên được yêu cầu đánh giá màu sắc, mùi thơm, hương vị, kết cấu (độ dai và độ bền đứt) của sản phẩm và khả năng chấp nhận chung. Độ ưa thích của mỗi mẫu được đánh giá thông qua thang thị hiếu 5 điểm, với điểm 1 (rất không thích), 2 (không thích), 3 (không thích cũng không không thích), 4 (thích) và 5 (rất thích) (Mareta, 2019; Indiarto và cộng sự, 2023)

2.4.14. Phương pháp xác định hoạt độ nước (A_w)

Máy đo hoạt độ nước điểm sương (Aqua Lab 3, Decagon Devices, USA), được sử dụng để đo hoạt độ nước của bánh quy. Các mẫu bánh quy được đồng nhất trong cối và được chuyển vào cốc mẫu.

2.4.15. Tính toán động học phân huỷ TPC, TSC trong điều kiện bảo quản

Quá trình phân huỷ TPC và TSC của bánh bổ sung xáo tam phân trong quá trình bảo quản được tính toán bằng cách sử dụng một mô hình động học bậc nhất như sau:

$$C_t/C_o = e^{-kt} \quad (2.8)$$

Trong đó:

C_t là hàm lượng TPC, TSC còn lại trong hạt vi bao tại thời điểm t;

C_o là hàm lượng TPC, TSC còn lại trong hạt vi bao tại thời điểm ban đầu;

k: hằng số tốc độ thất thoát/suy thoái (ngày^{-1}) thu được từ độ dốc của đường cong log C_t/C_o;

t: thời gian bảo quản (ngày)

Lấy logarit phương trình (2.7) được phương trình (2.8):

$$\ln[C_t] = \ln[C_o] - kt \quad (2.9)$$

Từ kết quả thí nghiệm, dựng đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa hàm ln (hàm lượng TPC, TSC) theo thời gian, từ đó xác định hằng số thất thoát k và thời gian "bán huỷ" (một nửa thời gian bảo quản) ($t_{1/2}$). k là hệ số góc của các phương trình đường thẳng (2.8), một nửa thời gian bảo quản ở nhiệt độ cụ thể được tính toán bởi công thức:

$$t_{1/2} = \ln(2)/k \quad (2.10)$$

Phương trình Arrhenius là phương trình biểu thị mối quan hệ giữa năng lượng hoạt hoá, tốc độ phản ứng và nhiệt độ:

$$\log(k) = -\frac{E_a}{RT} + \log(A) \quad (2.11)$$

Trong đó: E_a là năng lượng hoạt hoá của phản ứng (kcal.mol^{-1}); R là hằng số khí lý tưởng (8,314 J.K^{-1}.mol^{-1}); T là nhiệt độ khí lý tưởng (K); A là hệ số tiền luỹ thừa. Phương trình này có dạng y = ax + b. Do đó, đồ thị được vẽ giữa $\log(k)$ và 1/T sẽ có hệ số góc $-\frac{E_a}{R}$. Từ đó tính được năng lượng hoạt hoá E_a theo công thức:

$$k = Ae^{(-\frac{E_a}{RT})} \quad (2.12)$$

2.4.16. Chỉ số peroxide (PV)

Giá trị peroxide của các mẫu bánh quy được xác định theo AOCS Cd 8-53 (AOCS, 1998) và Tuyen và cộng sự (2015) với những sửa đổi nhỏ (Phụ lục C.12).

2.4.17. Chỉ số khả năng tiếp cận sinh học (BI)

Chỉ số khả năng tiếp cận sinh học (BI- Bioaccessibility Index) được tính theo công thức sau (Tamsone và cộng sự, 2020):

$$BI = C_{GE}/C_{BE} \quad (2.13)$$

Trong đó: C_{GE} là TPC, TSC, hoạt tính chống oxy hoá của mẫu sau tiêu hoá.

C_{BE} là TPC, TSC, hoạt tính chống oxy hoá của mẫu không tiêu hoá.

2.4.18. Phương pháp xử lý thống kê

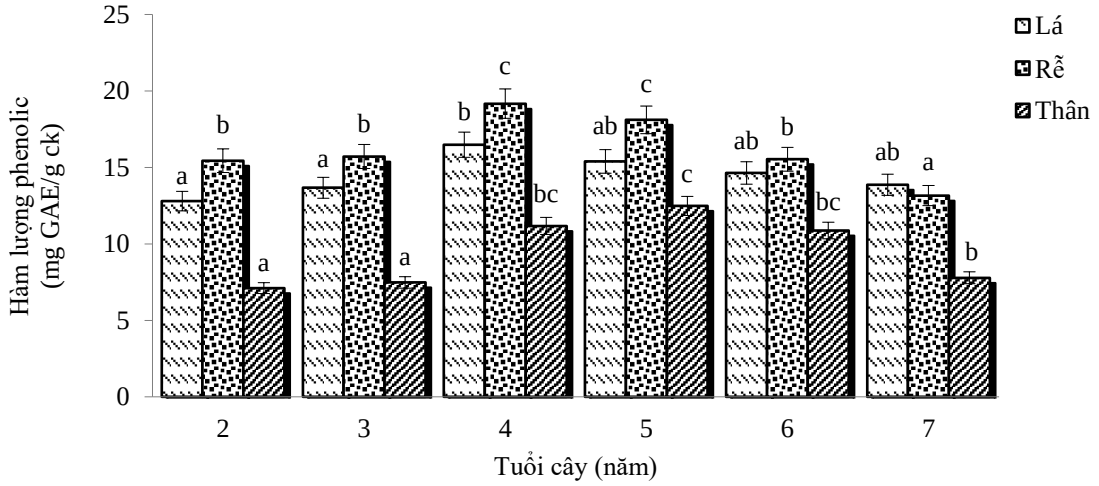
Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu của các thí nghiệm được phân tích thống kê bằng phần mềm JMP 13.0, Origin 2018, Microsoft Excel 2016 và phần mềm Statgraphics Centurion XV. Kết quả được trình bày bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (Mean ± SD). Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được kiểm chứng bằng ANOVA (Analysis of Variance) và LSD ở mức ý nghĩa 5% ($p < 0,05$).

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần hoá học của cây xáo tam phân

3.1.1. Hàm lượng TPC và TSC của các bộ phận cây ở những độ tuổi khác nhau

Việc khảo sát hàm lượng phenolic tổng và saponin của ba bộ phận rễ, thân, lá cây XTP nhân giống ở các độ tuổi khác nhau giúp xác định thời gian thu hoạch cây thích hợp nhằm thu nhận nguyên liệu có hàm lượng hợp chất có hoạt tính sinh học cao nhất. Kết quả phân tích hàm lượng phenolic tổng và saponin trên ba bộ phận cây ở 6 độ tuổi khác nhau cho thấy hàm lượng saponin và phenolic tổng cao nhất ở cây 4 tuổi. Kết quả được biểu thị qua Hình 3.1 (Bảng phụ lục B1.1.) và Hình 3.2 (Bảng phụ lục B1.2.).



Hình 3.1. Hàm lượng phenolic tổng trong ba bộ phận cây ở các độ tuổi khác nhau

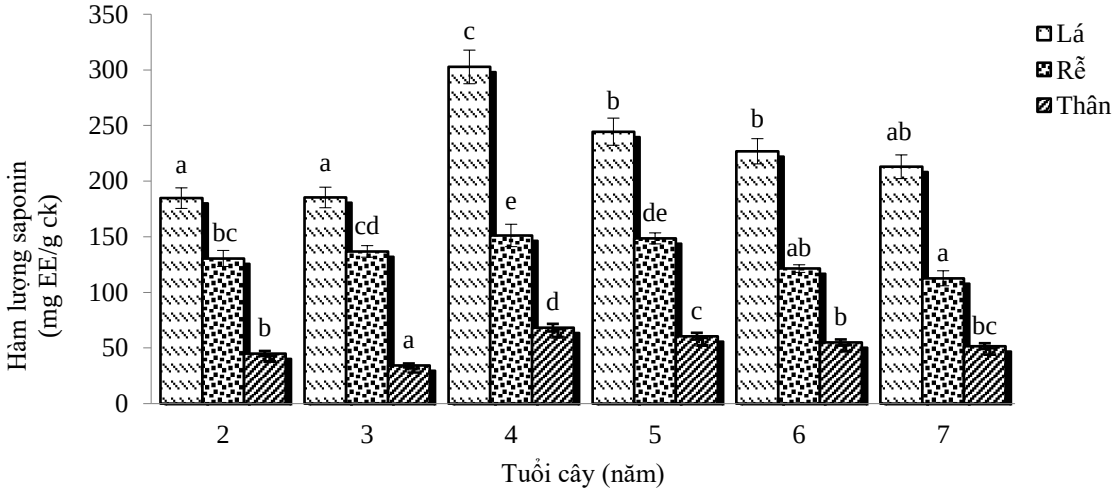
Giá trị cột với các chữ cái trên mỗi cột cùng nền khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Cụ thể, hàm lượng phenolic tổng của cả ba bộ phận lá, rễ và thân cây XTP 4 tuổi cao hơn so với các độ tuổi còn lại có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$). Tương tự, hàm lượng saponin cũng cao nhất ở cây 4 tuổi trên bộ phận lá và thân, tuy nhiên hàm lượng saponin ở rễ không khác biệt giữa cây 4 tuổi và cây 5 tuổi.

Có thể thấy rằng, cây XTP ở giai đoạn 2, 3 năm tuổi còn là giai đoạn đang phát triển chưa hoàn toàn trưởng thành, thành phần chất rắn hòa tan còn hạn chế, do đó hàm lượng phenolic tổng và saponin thấp. Ngược lại, ở giai đoạn 4 và 5 tuổi lúc này rễ đã phát triển hoàn thiện và trưởng thành, do đó hàm lượng phenolic tổng và saponin cao

nhất. Rễ đến độ tuổi 6 và 7 bắt đầu xuất hiện hiện tượng già hóa, do đó hàm lượng phenolic tổng và saponin bị mất dần đi.

Như vậy, cây 4 tuổi cho hàm lượng TPC và TSC cao hơn hẳn so với các độ tuổi còn lại, hơn nữa cây có thời gian thu hoạch ngắn hơn, và có tính kinh tế hơn. Do đó, cây xáo tam phân 4 năm tuổi được chọn làm nguyên liệu cho đề tài trích ly này.



Hình 3.2. Hàm lượng saponin tổng trong ba bộ phận cây ở các độ tuổi khác nhau

Giá trị cột với các chữ cái trên mỗi cột cùng nền khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.1.2. Thành phần hóa học của xáo tam phân

Cây xáo tam phân 4 tuổi có hàm lượng TPC và TSC cao nhất được chọn làm nguyên liệu cho thí nghiệm tiếp theo để phân tích thành phần hóa học của nguyên liệu, từ đó chọn ra bộ phận cây thích hợp về hàm lượng hoạt chất và giá trị kinh tế để thực hiện các nghiên cứu trích ly hoạt chất nhằm ứng dụng trong thực phẩm. Thành phần hoá học của cây xáo tam phân khô được trình bày trong Bảng 3.1.

Từ Bảng 3.1 cho thấy các loại xơ không tan (IDF) bao gồm cellulose, hemicellulose, lignin với hàm lượng trong rễ, thân, lá lần lượt là 66,56; 78,93 và 56,47% ck. Đây là những thành phần quan trọng cấu tạo nên thành tế bào thực vật, rất cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của cây (Broxterman, 2018).

Hàm lượng pectin nằm trong khoảng từ 0,2 - 0,3% ck, tuy hàm lượng thấp nhưng pectin góp phần vào độ cứng và cấu trúc của mô thực vật, là một phần của thành tế bào sơ cấp liên quan đến sự kết dính giữa các tế bào. Độ bền của thành tế bào thực vật phụ

thuộc vào sự định hướng, tính chất cơ học và mối liên kết giữa các chất pectic và sợi cellulose (Ghai và cộng sự, 2012). Do vậy để phá hủy được cấu trúc tế bào thực vật cần sử dụng các loại enzyme đặc hiệu là cellulase và pectinase.

Bảng 3.1. Thành phần hóa học trong các bộ phận của xáo tam phân

Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Rễ	Lá	Thân
Hàm ẩm	%	$5,42^{a} \pm 0,08$	$5,37^{a} \pm 0,08$	$5,01^{b} \pm 0,08$
Béo thô	% ck	$3,52^{a} \pm 0,16$	$5,56^{b} \pm 0,17$	$0,74^{c} \pm 0,16$
Protein thô	% ck	$5,14^{a} \pm 0,15$	$11,56^{b} \pm 0,38$	$5,04^{a} \pm 0,15$
Tinh bột	% ck	$8,63^{a} \pm 1,05$	$4,41^{b} \pm 0,47$	$3,03^{b} \pm 0,47$
Xơ không tan	% ck	$66,56^{a} \pm 1,42$	$56,47^{b} \pm 1,16$	$78,93^{c} \pm 1,42$
Pectin	% ck	$0,27^{a} \pm 0,02$	$0,24^{a} \pm 0,02$	$0,31^{b} \pm 0,02$
Tro	% ck	$4,94^{a} \pm 0,11$	$6,39^{b} \pm 0,22$	$3,58^{c} \pm 0,37$
Kali	% ck	$0,94^{a} \pm 0,02$	$1,66^{a} \pm 0,02$	$0,60^{a} \pm 0,02$
Canxi	% ck	1,52a ± 0,07	2,81b ± 0,17	1,39a ± 0,07
Phot pho	% ck	$0,09^{a} \pm 0,02$	$0,39^{b} \pm 0,02$	$0,11^{a} \pm 0,02$
Magie	% ck	$0,78^{a} \pm 0,05$	$0,33^{b} \pm 0,08$	$0,75^{a} \pm 0,05$
Kẽm	mg/kg ck	$6,16^{a} \pm 2,82$	$18,00^{b} \pm 2,82$	$2,64^{a} \pm 0,08$
Sắt	mg/kg ck	$652,36^{a} \pm 21,30$	$97,22^{b} \pm 10,50$	$210,55^{c} \pm 11,59$
TPC	mgGAE/g ck	$19,17^{a} \pm 0,63$	$16,49^{b} \pm 0,46$	$11,17^{c} \pm 0,76$
TSC	mgEE/g ck	$151,19^{a} \pm 2,24$	$302,65^{b} \pm 3,24$	$68,29^{c} \pm 1,24$

Trong cùng một cột ngang, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Chú thích: TPC, TSC được tính theo đơn vị gam chất khô của dịch chiết mẫu nguyên liệu bằng dung môi methanol. Các thành phần hóa học còn lại được tính theo đơn vị gam chất khô của mẫu nguyên liệu ban đầu.

Kết quả phân tích cũng cho thấy hàm lượng protein của lá là cao nhất trong ba bộ phận, gần như gấp đôi hàm lượng ở rễ và thân cây, trong khi protein của rễ và thân cây gần như tương đồng nhau. Ngoài ra, lá cây XTP còn chứa hàm lượng chất khoáng cao nhất, đặc biệt là canxi, kali và kẽm.

Các hợp chất phenolic và saponin được xem như là các hợp chất thứ cấp chiếm ưu thế trong nhiều loại thực vật. Theo kết quả phân tích nguyên liệu, hàm lượng TPC có nhiều trong rễ (19,27 mgGAE/g ck) và TSC có nhiều trong lá (302,65 mgEE/g ck).

Tuy nhiên khi so sánh với hàm lượng TPC và TSC thu được từ rễ và lá cây XTP theo nghiên cứu của Nguyen V. T. và cộng sự (2015), thì kết quả của chúng tôi thấp hơn. Sự khác biệt này có thể là do quá trình chiết xuất hỗ trợ vi sóng thu được dịch chiết chứa hàm lượng chất chống oxy hóa cao hơn so với quá trình chiết siêu âm (Nguyen V. T. và cộng sự, 2015). Ngoài ra, cây nhân giống 4 tuổi được sử dụng trong nghiên cứu này có thể có hàm lượng hợp chất sinh học thấp hơn so với nguồn nguyên liệu thu hái trong tự nhiên được dùng trong nghiên cứu của Nguyen V. T. và cộng sự (2015). Hàm lượng TPC, TSC trong cây XTP cũng tương đương với một số loại thực vật khác đã được nghiên cứu trước đó như lá đu đủ (Vuong và cộng sự, 2013), lá cây trâm bầu (Edewor và cộng sự, 2016), nha đam (Akbari và cộng sự, 2021), lá khổ qua (Bui-Phuc và cộng sự, 2023). Vì vậy TPC, TSC là mục tiêu để trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học trong xáo tam phân.

Kết quả khảo sát về thành phần hoá học trong ba bộ phận của cây cho thấy lá có hàm lượng protein và khoáng chất cao hơn so với rễ và thân. Đặc biệt, hàm lượng TSC trong lá khá cao. TPC tương đối cao ở bộ phận rễ và lá. Nhìn chung, kết quả khảo sát cho thấy lá cây XTP có mặt trội hơn so với rễ và thân cây về hàm lượng các thành phần dinh dưỡng. Lá cây XTP cũng chiếm tỉ lệ khá cao trong toàn bộ cây, khoảng 39-40% trọng lượng tươi (tuỳ thuộc vào độ tuổi cây) (Nguyen V. T. và cộng sự, 2017b). Ngoài ra, việc thu hoạch lá cũng dễ dàng, mang lại nhiều giá trị kinh tế hơn so với rễ và thân và cũng là nguồn nguyên liệu bền vững. Chính vì vậy, lá cây 4 tuổi được chọn làm nguyên liệu để nghiên cứu trích ly các hoạt chất sinh học ứng dụng trong thực phẩm.

3.2. Trích ly các hoạt chất sinh học từ lá cây XTP với sự hỗ trợ của enzyme

3.2.1. Ảnh hưởng của điều kiện trích ly enzyme đến hàm lượng TPC và TSC trong dịch chiết

3.2.1.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ nước/nguyên liệu

Dung môi là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nguồn nguyên liệu tự nhiên. Khi sử dụng nước là dung môi chiết, một lượng lớn protein, polysaccharide và các chất vô cơ khác có thể cũng sẽ được trích ra khỏi nguyên liệu và làm cản trở quá trình hòa tan các hợp chất

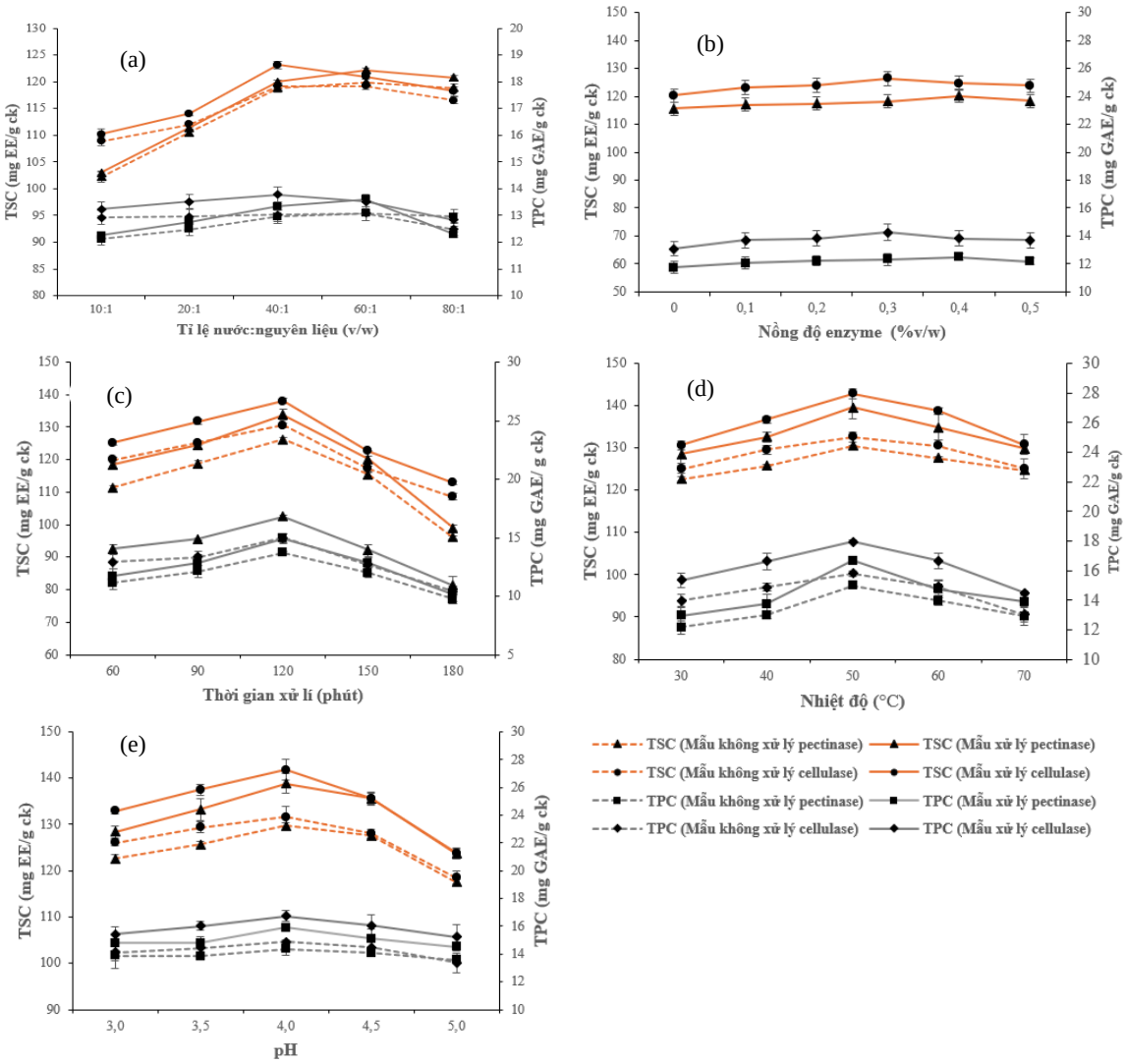
phenolic (Boeing và cộng sự, 2014). Vì thế cần nghiên cứu để chọn được tỉ lệ dung môi sao cho các hợp chất thu được cao nhất mà lượng dung môi sử dụng là ít nhất.

Tỷ lệ nước/nguyên liệu là một tham số quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả trích ly các hợp chất phenolic và saponin. Kết quả được thể hiện trong Hình 3.3a và Bảng D2.1 & 2.2-Phụ lục, cho thấy tỷ lệ nước/nguyên liệu tối ưu cho quá trình thủy phân bởi pectinase và cellulase lần lượt là 60:1 (v/w) và 40:1 (v/w). Trong điều kiện dung môi nước và xử lý enzyme pectinase, TPC và TSC trong dịch chiết tăng cao hơn so với mẫu không xử lý enzyme lần lượt là 3,89% và 4,89%. Khi xử lý với cellulase, TPC và TSC tăng lên tương ứng là 5,54% và 6,68%. Do đó, tác động của tỷ lệ nước/nguyên liệu đến TPC và TSC trong dịch chiết được xử lý bằng pectinase hơi thấp hơn so với cellulase.

Ảnh hưởng của tỷ lệ nước/nguyên liệu đến việc chiết xuất TPC và TSC từ bột lá XTP có thể được giải thích là do khả năng di chuyển của các hợp chất sinh học vào dung môi thông qua cơ chế khuếch tán. Tăng lượng dung môi sẽ cải thiện hiệu suất chiết xuất. Tuy nhiên, hàm lượng nước cao có thể dẫn đến hiện tượng chiết xuất các hợp chất ngoại vi, làm giảm mức độ chiết xuất các hợp chất sinh học chính. Ngoài ra, lượng dung môi sử dụng càng nhiều thì lượng oxy hòa tan vào dịch chiết càng lớn, sự có mặt của oxy không chỉ làm giảm hàm lượng mà còn làm suy giảm các hoạt tính sinh học, do đó sản lượng thu được là không đáng kể và sẽ không hiệu quả về chi phí. Ngược lại, sử dụng quá ít dung môi có thể làm cho quá trình lọc khó khăn do sự hấp thụ của dung môi vào chất rắn (Kossah và cộng sự, 2010).

3.2.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến TPC, TSC

Thành phần cấu trúc chính của thành tế bào thực vật là sợi cellulose kết hợp với hemicellulose. Những sợi này nằm sâu bên trong mạng lưới liên kết với pectin, tất cả được kết nối với protein cấu trúc. Trong mạng lưới liên kết này, pectin đóng vai trò quan trọng như một vật liệu liên kết giữa cellulose và hemicellulose trong tế bào thực vật (Ghai và cộng sự, 2012). Những kiến thức cơ bản về cấu trúc thành tế bào cho thấy các chế phẩm enzyme sử dụng để thủy phân thành tế bào của vật liệu nghiên cứu nên bao gồm sự kết hợp của cellulase, hemicellulase và pectinase.



Hình 3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ nước/nguyên liệu (a); nồng độ enzyme (b); thời gian xử lý (c); nhiệt độ (d); pH (e) lên TSC (các đường màu vàng) và TPC (các đường màu đen) trong dịch chiết lá XTP

Trong nghiên cứu sơ bộ này, các chế phẩm pectinase và cellulase được xem xét là một bước quan trọng để thúc đẩy sự giải phóng TPC và TSC và duy trì tính ổn định của chúng trong môi trường nước. Nhiệt độ thủy phân và pH môi trường được chọn là 40 ^{o}C và 4,0 cho cả pectinase và cellulase. Tỷ lệ nước/nguyên liệu cho quá trình thủy phân của pectinase và cellulase lần lượt là 60:1 (v/w) và 40:1 (v/w). Ảnh hưởng của các nồng độ khác nhau của pectinase hoặc cellulase (trong khoảng từ 0,1% đến 0,5% v/w) đối với thời gian chiết xuất TPC và TSC (60 phút) đã được nghiên cứu.

Như được trình bày trong Hình 3.3b và Bảng D2.3 & 2.4-Phụ lục, có một sự gia tăng đáng kể TPC, TSC, và đạt đỉnh tại nồng độ 0,4% v/w (608U) đối với pectinase và

0,3% v/w (84U) đối với cellulase. Sau đó, các hoạt chất giảm dần đều. Ban đầu, với một lượng cơ chất nhất định, khi tăng dần nồng độ enzyme, tốc độ phản ứng và hàm lượng sản phẩm phản ứng tăng lên. Tuy nhiên, khi nồng độ enzyme để đạt đến trạng thái cân bằng, tốc độ phản ứng không tăng thêm nữa. Lúc này, nồng độ saponin và phenolic không tăng đáng kể hoặc có thể giảm do một số hợp chất phenolic và saponin có thể tạo phức với protein và ức chế enzyme (Li và cộng sự, 2017). Xu hướng này tương tự như các nghiên cứu của Huang và cộng sự (2016) và Li và cộng sự (2017). Trong điều kiện này, mẫu được xử lý bằng pectinase cho thấy sự gia tăng TPC và TSC lần lượt là 5,86% và 6,73% so với mẫu không xử lý enzyme. Ở nồng độ 0,3% v/w, khả năng thủy phân của cellulase cao hơn so với pectinase. Cụ thể, TPC và TSC tăng lên 8,76% và 9,96% so với mẫu đối chứng. Hiện tượng này cho thấy cellulase hiệu quả hơn pectinase trong việc làm yếu/phá huỷ mạng lưới cellulose-phenolic, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc giải phóng phenolic và saponin trong môi trường nước.

3.2.1.3. Ảnh hưởng của thời gian thuỷ phân đến TPC, TSC

Thời gian thuỷ phân là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình trích ly. Nó không chỉ ảnh hưởng đến hiệu suất chiết xuất mà còn ảnh hưởng đến chất lượng dịch chiết và hiệu quả kinh tế. Tìm ra thời gian chiết xuất tối ưu có thể giúp tiết kiệm chi phí và thời gian.

Để xác định thời gian chiết xuất tối ưu, một khảo sát được tiến hành tại các mốc thời gian khác nhau (60, 90, 120, 150 và 180 phút). Các thông số khác được cố định như sau: tỷ lệ nước/nguyên liệu cho sự thủy phân cảu pectinase và cellulase tương ứng là 60:1 (v/w) và 40:1 (v/w), nhiệt độ chiết xuất là 40°C, pH là 4,0, nồng độ peptinase và cellulase tương ứng là 0,4% v/w và 0.3% v/w.

Kết quả được trình bày trong Hình 3.3c và Bảng D2.5 & 2.6-Phụ lục với các số liệu cụ thể. Khi tăng thời gian xử lý từ 0 đến 120 phút đã cải thiện đáng kể TPC, TSC trong cả mẫu thủy phân bởi pectinase và cellulase, đạt đến giá trị tối đa của chúng (pectinase: 14,883 mgGAE/g ck đối với TPC và 133,679 mgEE/g ck đối với TSC; cellulase: 16,664 mgGAE/g ck đối với TPC và 137,980 mgEE/g ck đối với TSC). Tuy nhiên, thời gian xử lý lâu hơn dẫn đến hiện tượng giảm đáng kể hàm lượng phenolic và

saponin trong dịch chiết. Sự biến đổi này là do trong thời gian chiết xuất ban đầu, sự chênh lệch nồng độ giữa dung môi và cơ chất, thúc đẩy quá trình khuếch tán mạnh mẽ, dẫn đến gia tăng lượng chất chiết rời khỏi tế bào. Tuy nhiên, khi thời gian kéo dài, sự chênh lệch nồng độ giữa nguyên liệu và dung môi giảm dần. Tiếp xúc lâu dài với ánh sáng và không khí dẫn đến sự cộng hưởng của nhiệt độ và quá trình oxy hóa, làm giảm hàm lượng và chất lượng phenolic và saponin. Hầu hết các hoạt chất sinh học nhạy cảm với nhiệt độ cao, và việc lưu trữ lâu dài có thể dẫn đến sự phân rã của các hợp chất này, đặc biệt là saponin nhạy cảm với oxy ở nhiệt độ cao (Nguyen V. T. và cộng sự, 2016). Do đó, việc tăng thời gian chiết xuất không chỉ không hiệu quả mà còn yêu cầu thêm thời gian, từ đó làm giảm hiệu quả kinh tế của thiết bị.

Kết quả thí nghiệm cho thấy hàm lượng saponin và phenolic cao nhất trong cả trường hợp thủy phân bởi pectinase lẫn cellulase đều đạt được sau 120 phút. Tương tự, phương pháp xử lý cellulase cho hiệu quả chiết xuất mạnh mẽ hơn so với khi xử lý pectinase. Do đó, thời gian chiết xuất 120 phút được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.1.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ thuỷ phân đến TPC, TSC

Nhiệt độ là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt động enzyme. Mỗi enzym có một phạm vi nhiệt độ cụ thể mà tại đó nó hoạt động tối ưu. Do đó, nhiệt độ đóng vai trò quan trọng trong quá trình chiết xuất phenolic và saponin từ lá *P. trimera*. Trong nghiên cứu này, các mức nhiệt độ là 30, 40, 50, 60 và 70°C được tiến hành. Các thông số khác được cố định như sau: tỷ lệ nước/nguyên liệu cho quá trình thủy phân của pectinase và cellulase lần lượt là 60:1 (v/w) và 40:1 (v/w), pH là 4,0, thời gian thủy phân là 120 phút và nồng độ pectinase, cellulase tương ứng là 0,4% (v/w) và 0,3% (v/w).

Kết quả ở Hình 3.3d và Bảng D2.7 & 2.8-Phụ lục cho thấy, hàm lượng phenolic và saponin có xu hướng tương tự trong cả mẫu được xử lý bằng pectinase và cellulase. Hàm lượng tăng đáng kể ở nhiệt độ 50°C và dần giảm khi nhiệt độ ủ tăng lên đến 70°C. Giá trị cao nhất của TPC và TSC đạt được khi xử lý cellulase lần lượt là 17,796 ± 0,173 mg GAE/g ck và 140,669 ± 0,613 mg GAE/g ck. Hàm lượng TPC và TSC thu được từ quá trình xử lý pectinase có giá trị thấp hơn so với khi xử lý cellulase.

Nguyên do của hiện tượng này đó là việc tăng nhiệt độ chiết xuất đã tăng cường tính tan và sự khuếch tán của các hợp chất phenolic và saponin, giảm độ nhớt dung môi, thúc đẩy quá trình truyền khối và thấm ướt của vật liệu chiết xuất, và cuối cùng gia tăng hiệu quả chiết xuất các hợp chất sinh học (Wang và cộng sự, 2008). Ngoài ra, nhiệt độ cao có thể làm suy yếu cấu trúc thành tế bào và màng tế bào, do đó làm giảm các rào cản của tế bào và tạo điều kiện tiếp xúc tốt hơn giữa dung môi và thành phần hoạt chất, dẫn đến tăng khả năng chiết xuất (Mohamad và cộng sự, 2010). Tuy nhiên, cần lưu ý rằng hoạt động enzyme chỉ tăng lên ở một giới hạn nhiệt độ nhất định, vượt quá giới hạn đó thì hoạt động sẽ giảm đi. Simon và cộng sự (1990) cho rằng nhiệt độ chiết xuất cao có thể dẫn đến phá hủy các hợp chất sinh học trong nguyên liệu thông qua các phản ứng thủy phân, oxy hóa nội sinh và tổng hợp polymer. Trường hợp tương tự được Nguyen G. T. N. & Nguyen T. M. (2021) báo cáo gần đây khi sử dụng cellulase trong quá trình chiết xuất phenolic, flavonoid và các hợp chất sinh học khác từ nấm mộc nhĩ khô. Do đó, nhiệt độ 50°C được coi là tối ưu cho quá trình trích ly bởi enzyme của các thành phần hoạt chất từ lá XTP.

3.2.1.5. Ảnh hưởng của pH dịch chiết đến TPC, TSC

Ngoài các yếu tố đã khảo sát được, pH cũng đóng vai trò quan trọng trong việc đạt được hàm lượng hoạt chất sinh học cần thiết. Mỗi enzyme có một khoảng pH tối ưu. Đối với pectinase, khoảng pH tối ưu trong nghiên cứu này là khoảng 3,5 - 4,5, trong khi đối với cellulase là khoảng 3,5 - 5,5. Hoạt tính enzyme phụ thuộc vào pH của môi trường phản ứng.

Để tăng hiệu quả trích ly lá XTP, chúng tôi đã tiến hành khảo sát các giá trị pH của dịch chiết để xác định pH tối ưu cho hoạt tính của enzyme pectinase và cellulase. Chúng tôi đã thử nghiệm các mức độ pH là 3, 3,5, 4, 4,5 và 5. Các tham số khác được cố định như sau: tỷ lệ nước/nguyên liệu cho quá trình thủy phân pectinase và cellulase lần lượt là 60:1 (v/w) và 40:1 (v/w), thời gian thủy phân 120 phút, và nồng độ pectinase, cellulase tương ứng là 0,4% (v/w) và 0,3% (v/w).

Kết quả được trình bày ở Hình 3.3.e và Bảng D2.9 & 2.10-Phụ lục, trong trường hợp xử lý bằng pectinase, TPC và TSC tiếp tục tăng từ 5,77% lên 9,82% và từ 8,71% lên 11,87%, khi pH tăng từ 3,0 lên 4,0. Tuy nhiên, chúng có xu hướng giảm đều khi

giá trị pH tăng từ 4,0 lên 5,0. Xu hướng biến đổi tương tự đã được quan sát đối với trường hợp xử lý với cellulase. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu của Yin và cộng sự (2018) và Nguyen G. T. N. & Nguyen T. M. (2021). Giải thích cho hiện tượng này có thể là cấu trúc không gian của các enzyme bị biến đổi ở các giá trị pH khác nhau, dẫn đến thay đổi hình dạng và hoạt tính enzyme (Yin và cộng sự, 2011).

Nghiên cứu sơ bộ đã khảo sát được tác động của các chế phẩm pectinase và cellulase lên TPC và TSC trong dịch chiết lá XTP. Kết quả cho thấy điều kiện chiết xuất tối ưu khá tương đồng ở cả hai enzyme này. Tuy nhiên, so với điều kiện thủy phân của pectinase, thì cellulase cần ít nước và hàm lượng enzyme hơn. Kết quả là, cellulase cho hiệu quả thủy phân TPC và TSC cao hơn tương ứng là 1,26 và 1,04 lần so với trường hợp sử dụng pectinase. Do đó, có thể kết luận rằng việc sử dụng một chế phẩm enzyme duy nhất cho chiết xuất lá XTP không đạt được hiệu quả cao trong việc thu nhận dịch chiết XTP giàu các hoạt chất sinh học.

3.2.2. Tối ưu hóa các thông số trích ly phenolic và saponin từ lá cây xáo tam phân sử dụng hỗn hợp enzyme pectinase và cellulase

Dựa trên kết quả thu được từ nghiên cứu sơ bộ về hiệu quả chiết xuất TPC và TSC trong dịch trích XTP khi xử lý pectinase và cellulase, nhằm nâng cao hàm lượng các hoạt chất sinh học này trong dịch chiết được nghiên cứu, việc kết hợp cả hai enzyme và tối ưu hoá phương thức kết hợp này đã được nghiên cứu.

3.2.2.1. Sàng lọc các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến trích ly bằng enzyme

Để xác định được các yếu tố và các mức ảnh hưởng đến hiệu quả trích ly, 5 yếu tố được chọn để làm thí nghiệm là nồng độ hỗn hợp enzyme pectinase-cellulase (A) với tỉ lệ enzyme 1:1 được chọn từ các nghiên cứu trước đó (Ramadan và cộng sự, 2008; Teixeira và cộng sự, 2013), thời gian xử lý enzyme (B), nhiệt độ xử lý enzyme (C), tỉ lệ nước/nguyên liệu (D) và pH hỗn hợp (E). Thí nghiệm được thiết kế theo ma trận Plackett-Burman với 5 yếu tố trong 12 thí nghiệm (Bảng 3.3) để sàng lọc các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến TPC (mgGAE/g ck) và TSC (mgEE/g ck). Mức thấp (-1) và cao (+1) của 5 yếu tố được liệt kê trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Hệ số ảnh hưởng của các yếu tố trong thí nghiệm Plackett-Burman

Ký hiệu	Tên yếu tố	Giá trị các yếu tố		TPC		TSC	
		Thấp (-1)	Cao (+1)	Hệ số ảnh hưởng	Prob>F	Hệ số ảnh hưởng	Prob>F
A	Nồng độ hỗn hợp enzyme (1:1) (%v/w)	0,2	1,0	7,05*	0,0004	4,79*	0,0030
B	Thời gian xử lý enzyme (phút)	60	180	3,03*	0,0231	3,87*	0,0082
C	Nhiệt độ xử lý enzyme (^{0}C)	30	70	-4,67*	0,0034	-7,86*	0,0002
D	Tỉ lệ nước/nguyên liệu (v/w)	10:1	80:1	1,14	0,2970	-0,96	0,3747
E	pH của hỗn hợp	3,0	5,0	1,63	0,1544	-2,32	0,0593

* *Có ý nghĩa ở độ tin cậy α = 0,05*

Kết quả Bảng 3.2 cho thấy các yếu tố thí nghiệm có tác động mạnh đến TPC và TSC. Nếu hệ số ảnh hưởng của một yếu tố là số dương, có nghĩa là yếu tố đó ảnh hưởng nhiều hơn ở mức cao, và ngược lại, giá trị ảnh hưởng là số âm thì yếu tố đó ảnh hưởng nhiều hơn ở mức thấp. Căn cứ vào hệ số ảnh hưởng (chọn các hệ số có giá trị tuyệt đối lớn hơn), xác định được ba yếu tố có tác động mạnh nhất đến TPC và TSC với độ tin cậy trên 95% ($p < 0,05$) là nồng độ hỗn hợp enzyme pectinase-cellulase (A), thời gian xử lý (B) và nhiệt độ xử lý (^{o}C) có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất trích ly TPC và TSC với mức tin cậy 95%, do ba yếu tố này này được đưa vào giai đoạn tối ưu hóa tiếp theo. Hai yếu tố tỉ lệ nước/nguyên liệu (D) và pH (E) được phát hiện là không có ảnh hưởng đáng kể. Mô hình hóa cho TPC (Y_1) và TSC (Y_2) có thể biểu diễn như sau:

$$Y_1 = 16,285 + 0,965A + 0,003B - 0,013C + 0,002D + 0,089E \quad (3.1)$$

$$Y_2 = 133,028 + 3,063A + 0,017B - 0,100C - 0,007D - 0,593E \quad (3.2)$$

Trong đó Y_1, Y_2 lần lượt là TPC (mg GAE/g ck) và TSC (mg EE/g ck); A – Nồng độ hỗn hợp enzym pectinase-cellulase (1:1) (%v/w); B - Thời gian xử lý (phút); C - Nhiệt độ xử lý (^{o}C); D - Tỉ lệ nước/nguyên liệu (v/w); E – pH.

Như vậy, ba yếu tố quan trọng được chọn từ PBD là nồng độ hỗn hợp enzyme pectinase-cellulase, nhiệt độ xử lý và thời gian xử lý được tiếp tục tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng.

Bảng 3.3. Kết quả của thí nghiệm Plackett-Burman

Nghiệm thức	Các biến					TPC (mgGAE/g ck)		TSC (mgEE/g ck)	
	A	B	C	D	E	Thực nghiệm	Mô hình	Thực nghiệm	Mô hình
0a0	0,2	60	30	80	3	16,60	16,67	128,3	129,3
---	0,2	60	70	10	3	15,77	16,03	126,5	125,6
--+	0,2	60	70	10	5	16,44	16,21	123,9	124,6
+--	0,2	180	30	10	5	17,10	17,06	130,3	130,6
+-+	0,2	180	30	80	5	17,11	17,18	130,3	130,1
a00	0,2	180	70	80	3	16,62	16,49	128,2	127,2
00a	1	60	30	10	5	17,47	17,50	132,1	131,0
000	1	60	30	80	3	17,63	17,44	131,9	131,7
000	1	60	70	80	5	17,05	17,11	126,4	126,5
000	1	180	30	10	3	17,58	17,65	134,1	134,2
00A	1	180	70	10	3	17,22	17,14	129,5	130,2
A00	1	180	70	80	5	17,32	17,44	128,3	128,5

3.2.2.2. Tối ưu hóa điều kiện trích ly phenolic và saponin từ lá cây xáo tam phân sử dụng hỗn hợp enzyme pectinase và cellulase

Dựa trên kết quả thí nghiệm theo ma trận Plackett-Burman và kết quả khảo sát sơ bộ từ enzyme pectinase và cellulase, phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) với phương án quay bậc 2 có tâm (Central Composite Design - CCD) được áp dụng để tối ưu hóa điều kiện của quá trình trích ly (Bảng 3.4.). Các mức được chọn cho các yếu tố được đặt dựa trên phân tích PBD trước đó.

Bảng 3.4. Khoảng biến thiên ba yếu tố dùng trong RSM-CCD

Yếu tố	Ký hiệu	Khoảng biến thiên
Nồng độ hỗn hợp enzyme pectinase-cellulase (1:1) (%v/w)	X_1	0,6 – 0,8
Nhiệt độ xử lý enzyme (^{0}C)	X_2	45 – 55
Thời gian xử lý enzyme (phút)	X_3	105 – 135

Mỗi biến được nghiên cứu ở năm cấp độ được mã hóa (-α, -1, 0, 1, α) và tất cả các biến được lấy tại điểm trung tâm của giá trị được mã hóa bằng không. Ma trận cho CCD cùng với các kết quả thử nghiệm và dự đoán được trình bày trong Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Ma trận bố trí thí nghiệm mã hóa các biến độc lập

Yếu tố	Ký hiệu	Mức mã hóa				
		-α	**-1**	**0**	**1**	**α**
Nồng độ hỗn hợp enzyme pectinase-cellulase (1:1) (%v/w)	X_1	0,532	0,6	0,7	0,8	0,868
Nhiệt độ xử lý enzyme (^oC)	X_2	41,6	45	50	55	58,4
Thời gian xử lý enzyme (phút)	X_3	94,8	105	120	135	145,2

Kết quả ở Bảng 3.6 cho thấy TPC trong dịch chiết dao động từ 18,1 – 20,2 mgGAE/g ck và TSC từ 114,6 - 148,9 mgEE/g ck. TPC đạt giá trị cao nhất là 20,2 mgGAE/g ck trong điều kiện là nhiệt độ 58 ^oC, thời gian 120 phút, nồng độ hỗn hợp enzyme 0,7%. Đối với TSC, giá trị đạt cao nhất là 148,9 mgEE/g ck trong thời gian 120 phút, tỉ lệ hỗn hợp enzyme 0,868% ở nhiệt độ 50 ^oC.

Bảng 3.6. TPC và TSC theo thực nghiệm và dự đoán từ mô hình

Thí nghiệm	Các biến	X_1	X_2	X_3	TPC (mgGAE/g chất khô)		TSC (mgEE/g chất khô)	
					Thực nghiệm	Mô hình	Thực nghiệm	Mô hình
1	a00	0,532	50	120	19,0	18,8	142,3	141,0
2	−−−	0,6	45	105	19,4	19,5	114,6	116,6
3	−−+	0,6	45	135	18,1	18,2	136,6	138,0
4	−+−	0,6	55	105	19,3	19,5	134,6	134,7
5	−++	0,6	55	135	19,0	19,0	137,8	136,4
6	0a0	0,7	41,6	120	18,9	18,8	125,7	123,0
7	00a	0,7	50	94,8	19,5	19,3	132,2	130,8
8	000	0,7	50	120	19,4	19,3	135,7	138,1
9	000	0,7	50	120	19,1	19,3	135,4	138,1
10	000	0,7	50	120	19,5	19,3	143,2	138,1
11	00A	0,7	50	145,2	18,6	18,6	138,9	140,2
12	0A0	0,7	58,4	120	20,2	20,2	118,4	121,2
13	+−−	0,8	45	105	18,7	18,8	135,8	137,2
14	+−+	0,8	45	135	18,6	18,5	147,0	146,8
15	++−	0,8	55	105	19,5	19,6	138,1	136,7
16	+++	0,8	55	135	20,1	20,1	128,6	126,6
17	A00	0,868	50	120	19,2	19,2	148,9	150,1

Ảnh hưởng của từng yếu tố: nồng độ hỗn hợp enzyme pectinase-cellulase (X_1), nhiệt độ (X_2) và thời gian (X_3) trích ly cũng như sự tương tác giữa các yếu tố được xác định dựa vào Bảng 3.7.

Bảng 3.7. Các thông số của mô hình RSM-CCD phương pháp hỗ trợ trích ly enzyme

Hệ số hồi quy và giá trị thống kê	**TPC**			**TSC**		
	Hệ số hồi quy	**Giá trị F**	**Giá trị p**	**Hệ số hồi quy**	**Giá trị F**	**Giá trị p**
Hằng số						
X_0	55,732		< 0,0001*	-1282,469		< 0,0001*
Bậc 1						
X_1	-25,765	6,1937	0,0417*	359,670	9,0152	0,0199*
X_2	-0,812	78,5144	< 0,0001*	37,049	0,3482	0,5737
X_3	-0,144	19,9476	0,0029*	5,84	9,7413	0,0168*
Bậc 2						
X_{11}	-9,929	4,0909	0,0828	263,567	7,0448	0,0327*
X_{22}	0,003	1,6831	0,2356	-0,227	32,7173	0,0007*
X_{33}	-0,001	7,1404	0,0319*	-0,004	0,8580	0,3851
Tương tác						
X_{12}	0,398	11,6635	0,0112*	-9,32	15,6708	0,0055*
X_{13}	0,174	20,1525	0,0028*	-1,963	6,2588	0,0409*
X_{23}	0,003	14,7823	0,0063*	-0,066	17,6463	0,0040*
R^2	0,9596			0,9412		
Giá trị p	0,0004			0,0016		

** Có ý nghĩa về mặt thống kê với p < 0,05*

Ý nghĩa thống kê của phương trình được đánh giá bằng cách sử dụng kiểm định F và giá trị P. Kết quả phân tích phương sai được hiển thị trong Bảng 3.7. Mức ý nghĩa của mỗi hệ số được xác định bằng giá trị p, trong đó giá trị p nhỏ hơn sẽ cho thấy mức ý nghĩa cao hơn của hệ số tương ứng. Dựa trên giá trị p của mỗi yếu tố, chúng ta có thể quan sát sự ảnh hưởng của những yếu tố này đến hiệu quả trích ly. Hệ số tương quan R^2 của TPC và TSC lần lượt là 0,9596 và 0,9412, có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$). Điều này chứng tỏ mô hình thực nghiệm có độ tương thích cao với mô hình

suy đoán. Phương trình đa thức bậc hai dự đoán hàm lượng TPC (Y_1) và TSC (Y_2) có dạng như sau:

$$Y_1 = 55,732 - 25,765X_1 - 0,812X_2 - 0,144X_3 - 9,929X_1^2 - 0,001X_3^2 + 0,398X_1X_2 + 0,174X_1X_3 + 0,003X_2X_3 \quad (3.3)$$

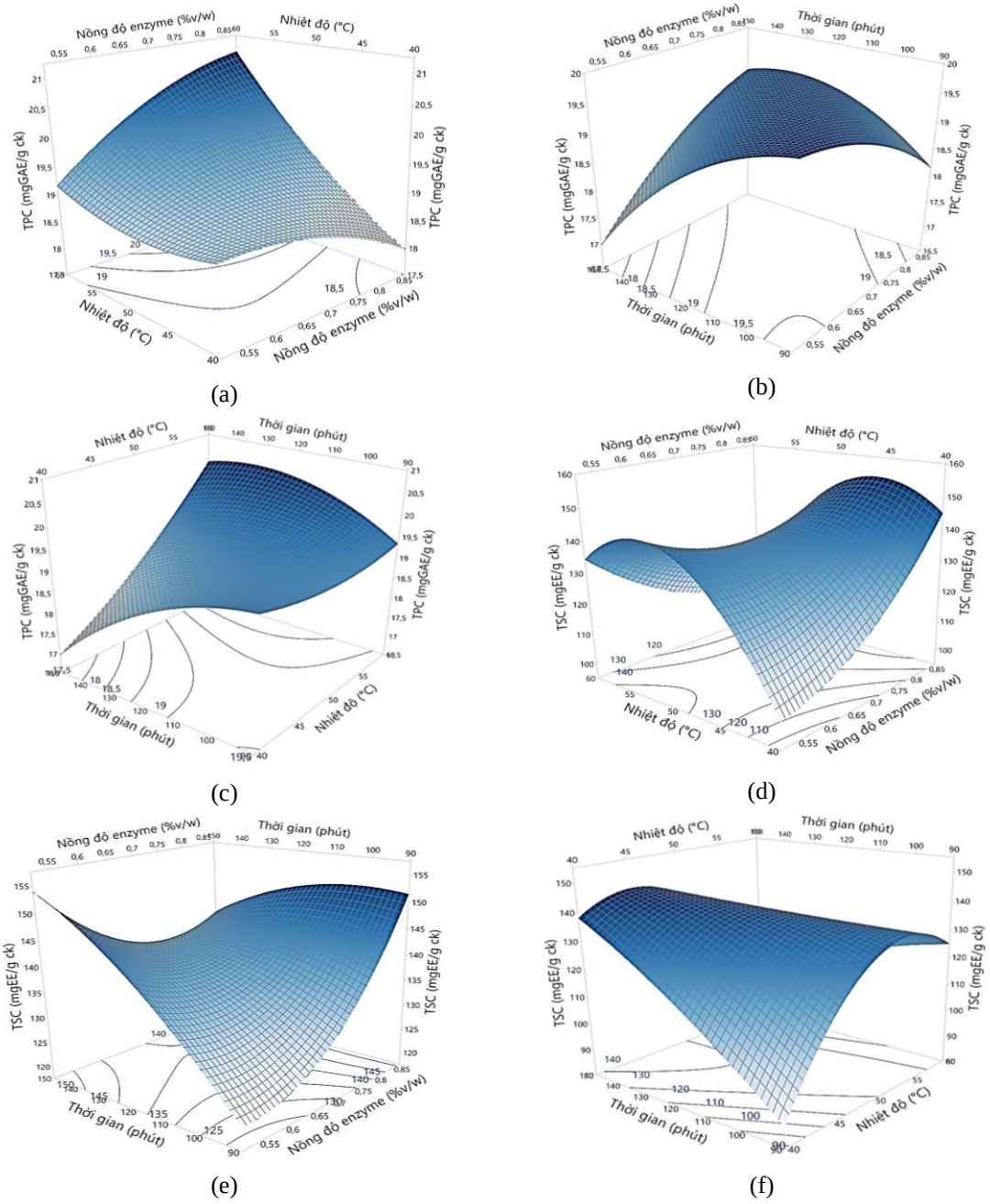
$$Y_2 = -1282,469 + 359,670X_1 + 5,840X_3 + 263,567X_1^2 - 0,227X_2^2 - 9,320X_1X_2 - 1,963X_1X_3 - 0,066X_2X_3 \quad (3.4)$$

Trong đó Y_1: TPC (mg GAE/g ck); Y_2: TSC (mg EE/g ck); X_1: nồng độ enzyme pectinase-cellulase (%v/w); X_2: nhiệt độ xử lý (^oC); X_3: thời gian xử lý (phút).

Từ phương trình hồi quy bậc hai ở trên cho thấy rằng giá trị bậc nhất của ba yếu tố nồng độ hỗn hợp enzyme pectinase-cellulase (X_1), nhiệt độ (X_2), thời gian trích ly (X_3) đều ảnh hưởng đến TPC ($p < 0,05$), trong đó tỉ lệ enzyme tác động mạnh nhất với hệ số hồi quy là -25,765. Đối với TPC, giá trị bậc nhất của phương trình có 2 yếu tố tỉ lệ enzyme và thời gian là ảnh hưởng ($p < 0,05$) với hệ số hồi quy lần lượt là 359,670 và 5,84, còn lại nhiệt độ xử lý không ảnh hưởng đến hiệu quả trích ly.

Giá trị bậc hai của yếu tố thời gian (X_3^2) ảnh hưởng rõ rệt đến TPC ($p = 0,0319$), ngược lại yếu tố nồng độ enzyme (X_1^2) và nhiệt độ trích ly (X_2^2) lại tác động đến TPC ($p < 0,05$). Sự tương tác giữa các yếu tố nồng độ enzyme - nhiệt độ (X_1X_2), nồng độ enzyme - thời gian (X_1X_3) và thời gian - nhiệt độ (X_2X_3) đều ảnh hưởng đến năng suất trích ly trên bộ phận lá xáo tam phân ($p < 0,05$). Điều này cho thấy quá trình trích ly chịu ảnh hưởng rõ rệt khi nồng độ enzyme, nhiệt độ kết hợp với thời gian trích ly biến đổi.

Mô hình bề mặt đáp ứng biểu diễn bằng không gian ba chiều minh họa cho sự ảnh hưởng của các yếu tố đến hiệu quả trích ly được thể hiện qua Hình 3.4.

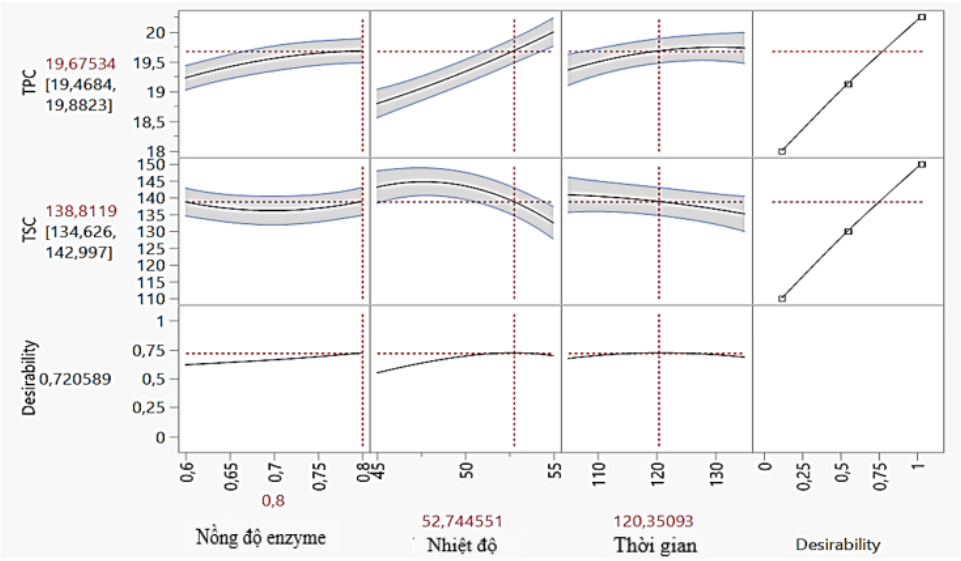


Hình 3.4. Biểu đồ bề mặt đáp ứng của TPC (a-c) và TSC (d-f)

Biểu đồ bề mặt đáp ứng cho thấy mối tương quan của hai yếu tố bất kỳ theo mô hình phi tuyến tính. Đối với trường hợp trích ly TPC (Hình 3.4 (a -c)), ảnh hưởng của nhiệt độ trích ly là đáng kể (giá trị F cao là 78,5144) so với thời gian (F = 19,9476) và nồng độ enzyme (F = 6,1937). Các đường đồng mức đã chỉ ra vùng tối ưu của TPC đạt cao nhất khi thời gian trích ly dao động 110 - 120 phút, nhiệt độ trích ly từ 50^{o}C đến 55^{o}C và nồng độ enzyme từ 0,8 - 0,85%. Các quan sát tương tự cũng thấy rõ trong sơ

đồ bề mặt đáp ứng của TPC (Hình 3.4 (d) - (f)), nồng độ enzyme (F = 9,0152) và thời gian trích ly (F = 9,7413) có ảnh hưởng đáng kể. Hệ số tương tác giữa nồng độ enzyme và nhiệt độ trích ly là một số âm (-9,32), vì vậy nếu gia nhiệt đồng thời cũng tăng nồng độ enzyme trích ly thì TPC sẽ giảm. Những thay đổi trong các điều kiện chiết xuất này gây ra sự phá vỡ thành tế bào khi có mặt enzyme, dẫn đến tăng cường thâm nhập của dung môi vào tế bào để giải phóng các hợp chất làm tăng năng suất trích ly (Meyer và cộng sự, 1998).

TPC và TSC thu được khi trích ly bằng enzyme chịu sự tác động chính của ba yếu tố nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian. Việc tối ưu các thông số cần quan tâm đến cả ba yếu tố cũng như những tương tác của chúng và ảnh hưởng của những tương tác đó đến hiệu quả trích ly. Xử lý thống kê bằng phương pháp bề mặt đáp ứng đã xác định được thông số tối ưu của các yếu tố được mô tả trong Hình 3.5. TPC và TSC thu được lần lượt là 19,67 ± 0,21 mgGAE/g ck và 138,81 ± 4,19 mgEE/g ck khi nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian trích ly tối ưu là 0,80% (v/w), 53°C và 120 phút.



Hình 3.5. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình trích ly TPC và TSC

Để xác định tính chính xác của mô hình, ba lần lặp lại đã được thực hiện để đo TPC và TSC trong điều kiện tối ưu (Bảng 3.8). TPC và TSC thu được trong dịch chiết ở điều kiện thực tế là 19,81 ± 0,12 mgGAE/g ck và 139,87 ± 2,15 mgEE/g ck. Giá trị thử nghiệm thực tế tương tự như giá trị dự đoán của phương trình. Mẫu xử lý enzyme có hàm lượng TPC tăng 64,8% và TSC tăng 13,4% so với mẫu không xử lý enzyme

(mẫu đối chứng). Kết quả thu được ở điều kiện kết hợp hai enzyme cho thấy TPC cao hơn 5 lần và TSC cao hơn gấp 2 lần so với trường hợp chỉ xử lý bằng enzyme pectinase (TPC tăng 9,82% và TSC tăng 6,87% so với mẫu đối chứng) hoặc cellulase (TPC tăng 12,34% và TSC tăng 7,37% so với mẫu đối chứng).

Bảng 3.8. TPC và TSC theo dự đoán của mô hình tối ưu và thực tế trích ly

	Yếu tố khảo sát			**TPC (mgGAE/g ck)**	**TSC (mgEE/g ck)**
	Nồng độ hỗn hợp enzyme (%v/w)	**Nhiệt độ xử lý (°C)**	**Thời gian xử lý (phút)**		
Mẫu không xử lý enzyme	0,0	53,0	120,0	$12,02^{b} \pm 0,37$	$123,29^{B} \pm 2,40$
Giá trị dự đoán	0,8	53,0	120,0	$19,67^{a} \pm 0,21$	$138,81^{A} \pm 4,19$
Giá trị thực tế	0,8	53,0	120,0	$19,81^{a} \pm 0,12$	$139,87^{A} \pm 2,15$

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Việc kết hợp hai enzyme này trong điều kiện tối ưu đã tăng đáng kể TPC và TSC trong dịch chiết lá XTP. Pectinase làm cho pectin bị phá vỡ, dẫn đến sự phá hủy thành tế bào và tạo điều kiện giải phóng các hợp chất phenolic (Fernández và cộng sự, 2015). Cellulase làm tăng tốc độ phân hủy cellulose thành glucose và cellobiose, đẩy nhanh quá trình thủy phân liên kết endo-1,4-β-D-glycosidic trong cellulose, cũng như chuyển đổi cello-oligosaccharide cellotriose thành cellohexaose (Choudhari & Ananthanarayan, 2007). TPC là nhóm thành phần chính tạo nên hoạt tính chống oxy hóa và sinh học của dịch chiết. Do đó, việc kết hợp hai enzyme này để tăng hiệu quả thu nhận các hoạt chất sinh học trong quá trình trích ly là hoàn toàn phù hợp.

3.3. Trích ly các hoạt chất sinh học từ lá XTP với sự hỗ trợ của sóng siêu âm

Kỹ thuật siêu âm đã trở thành một xu hướng tiềm năng trong chiết xuất các hoạt chất từ nguyên liệu thô bởi hiệu quả mang lại đó là rút ngắn thời gian xử lý, giảm năng lượng và thể tích dung môi sử dụng (Dahmoune và cộng sự, 2014). So với các phương pháp chiết xuất truyền thống, sóng siêu âm là mang đến kỹ thuật chiết xuất xanh hơn và hiệu quả hơn cho quá trình chiết xuất thực vật. Hơn nữa, sự phá hủy thành tế bào

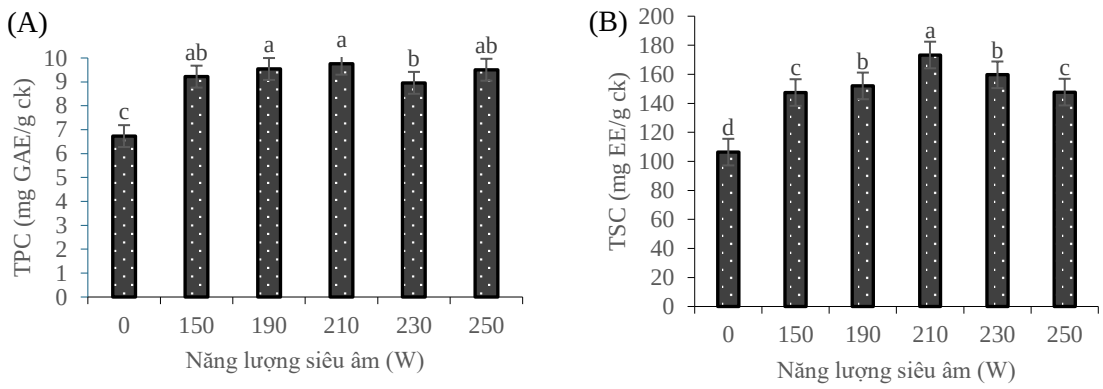
sinh học do hiện tượng xâm thực khí giúp tăng cường giải phóng các hợp chất mục tiêu (Chemat & Khan, 2011). Ngoài ra, các điều kiện vận hành nhẹ nhàng trong UAE không ảnh hưởng đáng kể đến đặc tính và chức năng của hầu hết các hợp chất sinh học, điều này rất quan trọng đối với các thành phần nhạy cảm với nhiệt độ.

3.3.1. Ảnh hưởng của năng lượng siêu âm đến TPC và TSC

Đối với mỗi loại cây thảo dược khác nhau, và từng bộ phân cây khác nhau sẽ có điều kiện trích ly tối ưu khác nhau về năng lượng, thời gian, nhiệt độ, và tỉ lệ dung môi chiết… Trong đó, năng lượng siêu âm là thông tố rất quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến chi phí, thời gian cũng như hiệu suất trích ly. Vì vậy, việc khảo sát năng lượng sóng siêu âm là rất cần thiết. Thí nghiệm khảo sát được lập ra với sáu mức: 0 (mẫu đối chứng), 150, 190, 210, 220, và 250W. Kết quả được thể hiện cụ thể ở Hình 3.6 và Bảng D3.1-Phụ lục.

Nhìn chung, TPC và TSC của các mẫu lá tăng dần khi năng lượng siêu âm tăng lên, đạt đỉnh ở 210 W, sau đó bắt đầu giảm khi tiếp tục tăng năng lượng siêu âm. Ở năng lượng 210 W, lượng hoạt chất sinh học trong các mẫu lá đã được xử lý siêu âm đạt đến mức tối đa, với TPC và TSC cao hơn so với những mẫu chưa xử lý siêu âm lần lượt là 44,98% và 62,91%.

Sóng siêu âm có khả năng cắt mạch cao phân tử không chọn lọc, phá thành tế bào để giải phóng các hợp chất phenolic và saponin, từ đó làm tăng hàm lượng các hoạt chất này trong dịch trích (Chemat & Khan, 2011). Vì vậy năng lượng siêu âm của quá trình xử lý càng cao thì các hợp chất này càng được trích ly dễ dàng. Tuy nhiên một số tác giả đã quan sát thấy rằng sự tăng cường các phản ứng phân cắt bởi sóng âm chỉ xảy ra trong một phạm vi biên độ nhất định. Vượt quá phạm vi đó, tốc độ phản ứng có xu hướng giảm dần. Hiện tượng này đã được giải thích là do gia tăng số lượng bong bóng gần bề mặt pha sẽ gây cản trở việc truyền năng lượng siêu âm vào chất lỏng. Hơn nữa, năng lượng siêu âm quá cao sẽ làm tăng nồng độ của những chất oxy hóa như gốc tự do hydroxyl từ đó làm tăng tốc độ phân hủy các hoạt chất trong dịch trích (Mason và cộng sự, 2002). Điều này giải thích cho hiện tượng sụt giảm hàm lượng các hợp chất TPC, TSC trong dịch trích khi tăng năng lượng xử lý vượt quá 210 W.



Hình 3.6. (A) TPC và (B) TSC của dịch chiết lá XTP xử lý với các mức năng lượng siêu âm khác nhau

Giá trị cột với các chữ cái trên mỗi cột khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

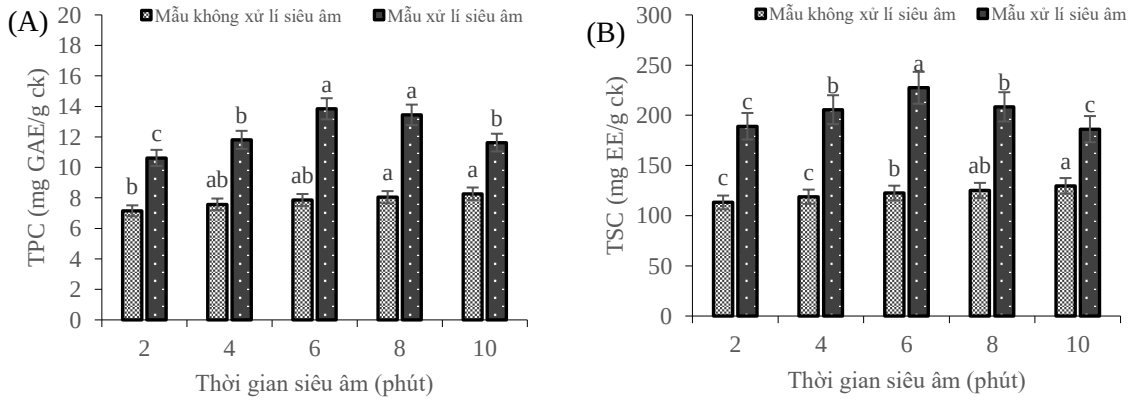
Nhìn chung, mỗi loại nguyên liệu đều có một giá trị năng lượng siêu âm thích hợp để hàm lượng chất chiết thu được là cao nhất. Trong trường hợp chiết xuất các chất chống oxy hóa từ lá oliu thì năng lượng tối ưu cho quá trình trích ly là 600W (Cárcel và cộng sự, 2010). Trong khi đó để trích ly các hợp chất tạo màu từ củ dền đỏ thì năng lượng siêu âm cần đạt được 100W (Sivakumar và cộng sự, 2009). Như vậy tùy thuộc vào tính chất nguyên liệu, bản chất dung môi mà mức độ phá hủy thành tế bào của sóng siêu âm để thúc đẩy quá trình trích ly sẽ khác nhau.

3.3.2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý siêu âm đến hiệu quả trích ly TPC, TSC

Hình 3.7 và Bảng D3.2-Phụ lục thể hiện TPC, TSC biến đổi theo các khoảng thời gian siêu âm khác nhau. Các hợp chất sinh học trong dịch chiết tăng lên khi kéo dài thời gian siêu âm. TPC và TSC tăng nhanh trong 6 phút đầu tiên và đạt hiệu quả chiết xuất cao nhất. Cụ thể hơn, sau khi chiết xuất trong 6 phút, TPC và TSC trong dịch trích thu được lần lượt là 13,844 ± 0,131mg GAE/g ck và 227,393 ± 4,246mg EE/g ck. Sau 6 phút, hàm lượng hoạt chất bắt đầu giảm mạnh theo thời gian. Với thời gian chiết xuất là 6 phút, TPC và TSC tăng lần lượt là 76,09% và 85,62% so với mẫu không xử lý siêu âm. Hiện tượng mất dần TPC và TSC trong dịch chiết khi gia tăng thời gian xử lý siêu âm đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu trước đây (Li và cộng sự, 2013; Minjares-Fuentes và cộng sự, 2014).

Kết quả này có thể được giải thích như sau, sóng siêu âm tạo ra hiện tượng sủi bọt khí và phá vỡ thành tế bào sinh học. Hiện tượng sủi bọt khí tạo ra những bóng khí trong

dung môi đi vào bên trong các tế bào. Quá trình nổ vỡ các bóng khí giúp tăng cường sự thẩm thấu của dung môi vào bên trong các tế bào để giải phóng các thành phần mục tiêu (Mason và cộng sự, 2002). Khi kéo dài quá trình chiết xuất, tất cả các thành tế bào sẽ bị đứt gãy hoàn toàn bởi tác động của các vi sóng và TPC, TSC gia tăng trong một khoảng thời gian nhất định. Tuy nhiên, quá trình chiết xuất chỉ diễn ra triệt để trong một thời gian ngắn và có thể tạo ra các phản ứng không mong muốn trong trường hợp kéo dài thời gian siêu âm. Khi các tế bào thực vật bị gãy vỡ, nhiều tạp chất khác tạo thành trong dịch chiết (Jha & Sit, 2022). Do đó, xảy ra hiện tượng hấp thụ lại một số chất tan trên bề mặt các hạt nguyên liệu. Hơn nữa, khi thời gian kéo dài, lượng gốc tự do do sóng siêu âm sinh ra sẽ tích lũy càng nhiều, từ đó có thể gây phân hủy một số TPC, TSC được chiết vào dịch trích. Vì vậy, không cần kéo dài thời gian chiết xuất sau khi đạt đến hiệu suất tối đa (Dong và cộng sự, 2010).



Hình 3.7. (A) TPC và (B) TSC của dịch chiết lá XTP xử lý với khoảng thời gian siêu âm khác nhau

Giá trị cột với các chữ cái trên mỗi cột cùng nền khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.3.3. Tối ưu hoá các thông số trích ly phenolic và saponin từ cây xáo tam phân với sự hỗ trợ của siêu âm

Phương pháp RSM được sử dụng rộng rãi trong phân tích, tối ưu hóa các điều kiện trích ly trong quy trình chiết xuất các thành phần hợp chất sinh học từ thực vật, cho kết quả dự đoán chính xác so với các thí nghiệm trực giao truyền thống (Hadidi và cộng

sự, 2020). Trong thí nghiệm này có tổng cộng 17 đơn vị thí nghiệm độc lập trong đó 3 thí nghiệm tâm sử dụng để thiết lập mô hình được trình bày cụ thể ở Bảng 3.9.

Bảng 3.9. Bảng ma trận qui hoạch thực nghiệm và kết quả thu hồi TPC, TSC

STT	Mã hóa			Thông số khảo sát			Chỉ tiêu theo dõi	
	X_1	X_2	X_3	Năng lượng (W)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (Phút)	TPC	TSC
1	a	0	0	193	50	6	10,99	235,00
2	−	−	−	200	40	4	11,52	125,77
3	−	−	+	200	40	8	11,74	173,97
4	−	+	−	200	60	4	11,82	203,68
5	−	+	+	200	60	8	10,90	209,45
6	0	a	0	210	33	6	10,74	122,8
7	0	0	a	210	50	3	11,43	141,79
8	0	0	0	210	50	6	11,15	180,23
9	0	0	0	210	50	6	11,14	181,29
10	0	0	0	210	50	6	11,17	183,25
11	0	0	A	210	50	9	11,88	194,25
12	0	A	0	210	67	6	10,34	178,72
13	+	−	−	220	40	4	9,73	124,76
14	+	−	+	220	40	8	11,08	148,95
15	+	+	−	220	60	4	10,85	191,63
16	+	+	+	220	60	8	10,03	178,88
17	A	0	0	227	50	6	10,11	168,16

Bảng 3.9 biểu thị TPC và TSC chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố như năng lượng siêu âm (X_1), nhiệt độ (X_2), thời gian trích ly (X_3) và sự tương tác giữa các yếu tố với nhau. TPC có giá trị thấp nhất là 9,73 mgGAE/g ck (220W, 40°C, 4 phút) và cao nhất là 11,88 mgGAE/ck (210W, 50°C, 9 phút). Trong khi đó, TSC thu được khi trích ly lá cây xáo tam phân giá trị thấp nhất là 122,80 mgEE/g ck (210W; 33°C; 6 phút), và cao nhất là 235,00 mgEE/g ck (193W, 50°C, 6 phút).

Bảng 3.10. Các thông số của mô hình RSM-CCD phương pháp hỗ trợ siêu âm

Hệ số hồi quy	DF	TPC			TSC		
		Hệ số hồi quy	Giá trị F	Giá trị p	Hệ số hồi quy	Giá trị F	Giá trị p
Hằng số							
X_0	9	11,1494		<,0017*	181,8103		<,0036*
Bậc 1							
X_1	1	-0,4228	35,2058	0,0006	-13,2608	17,5568	0,0041
X_2	1	-0,0837	1,3799	0,2785	22,2895	49,6026	0,0002
X_3	1	0,0429	0,3633	0,5657	11,2528	12,6424	0,0093
Bậc 2							
X_{11}	1	-0,2007	6,5350	0,0378	6,3452	3,3120	0,1116
X_{22}	1	-0,2042	6,7678	0,0353	-11,6608	11,1853	0,0123
X_{33}	1	0,1909	5,9119	0,0453	-5,5454	2,5297	0,1558
Tương tác							
X_{12}	1	0,0763	0,6715	0,4395	-2,0738	0,2517	0,6313
X_{13}	1	0,1538	2,7302	0,1424	-5,3163	1,6544	0,2393
X_{23}	1	-0,4138	19,7713	0,0030	-9,9213	5,7618	0,0474
R^2		0,9242			0,9396		
Giá trị p	9	<,0010			<,0008		

** Khác biệt có ý nghĩa thống kê với p < 0,05; X_o: Hằng số; X_1, X_2 và X_3: Hệ số hồi quy tuyến tính của năng lượng siêu âm, nhiệt độ, và thời gian; X_{11}, X_{22} và X_{33}: Hệ số hồi quy bậc hai của năng lượng, nhiệt độ, và thời gian; X_{12}, X_{13} và X_{23}: Hệ số hồi quy cho sự tương tác giữa năng lượng × nhiệt độ, năng lượng × thời gian và nhiệt độ × thời gian.*

Kết quả ANOVA (Bảng 3.10) cho thấy mô hình hồi quy đối với TPC và TSC thu được từ lá cây XTP có có ý nghĩa về mặt thống kê (p <0,05), chứng minh rằng xác suất xảy ra nhiễu trong kết quả thí nghiệm là không quá 5%, điều này cho thấy mô hình được thiết kế có ý nghĩa. Hệ số tương quan R^2_{TPC}= 0,9242 và R^2_{TSC} = 0,9396 cho thấy mô hình thực nghiệm có độ tương thích cao với mô hình dự đoán.

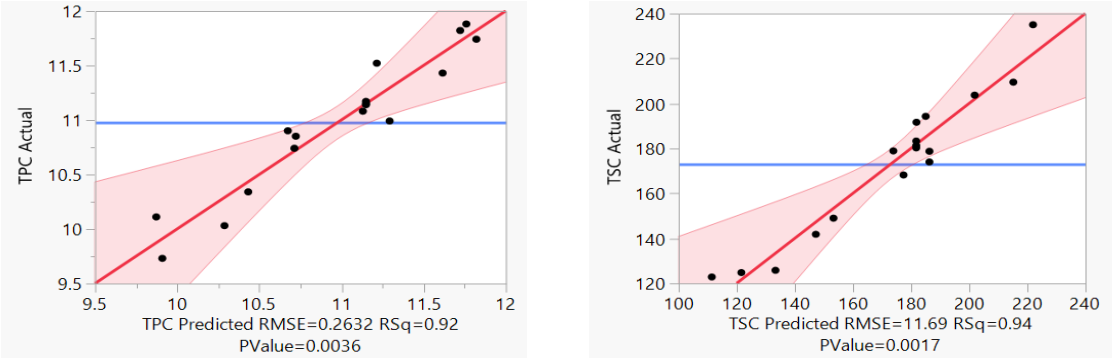
Phương trình hồi quy bậc hai với ba yếu tố đã chọn có dạng như sau:

$$Y_1 = 11{,}1494 - 0{,}4228X_1 - 0{,}2007X_1^2 - 0{,}2042X_2^2 + 0{,}1909X_3^2 - 0{,}4138X_2X_3 \quad (3.5)$$

$$Y_2 = 181{,}8103 - 13{,}2608X_1 + 22{,}2895X_2 + 11{,}2528X_3 - 11{,}6608X_2^2 - 9{,}9213X_{23} \quad (3.6)$$

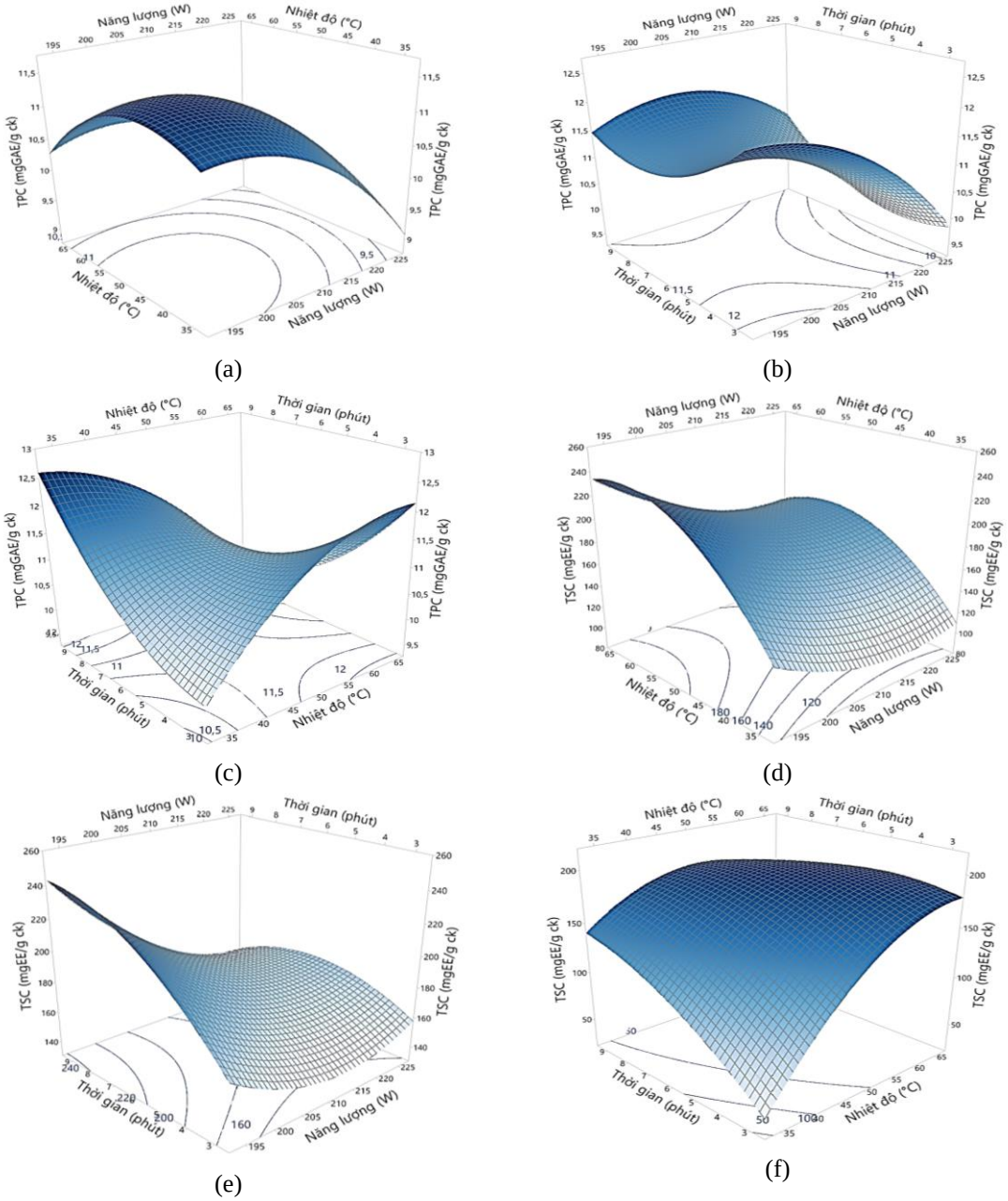
Trong đó: Y_1 là hàm lượng phenolic tổng, Y_2 là hàm lượng saponin tổng trong mô hình trích ly lá cây xáo tam phân. Với X_1 năng lượng siêu âm (W), X_2 nhiệt độ (°C), và X_3 thời gian (phút).

Từ phương trình hồi quy bậc hai và giá trị p trong bảng ANOVA cho thấy giá trị bậc nhất của yếu tố năng lượng ảnh hưởng đến TPC, trong khi đó, TSC chịu ảnh hưởng của cả ba yếu tố năng lượng, nhiệt độ, và thời gian trích ly, trong đó nhiệt độ có tác động mạnh nhất. Ở giá trị bậc hai trong phương trình, cả ba yếu tố đều ảnh hưởng đến TPC, còn TSC chỉ chịu ảnh hưởng bởi nhiệt độ trích ly. Cuối cùng, sự tương tác diễn ra giữa nhiệt độ và thời gian đều có ảnh hưởng đến hàm lượng TPC, TSC với p<0,05. Điều này cho thấy quá trình trích ly dịch chiết từ lá XTP chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố theo thứ tự nhiệt độ > công suất > thời gian.



Hình 3.8. So sánh giá trị thực nghiệm và giá trị ước đoán

Đối với quá trình trích ly TPC, TSC từ lá cây xáo tam phân thì sự tương quan giữa các giá trị cho thấy 17 điểm biểu thị cho 17 đơn vị thí nghiệm (Hình 3.8) nằm gần với giá trị ước đoán và trong vùng ước đoán với hệ số biến thiên thực R^2 của mô hình và giá trị biến thiên ảo Q^2 của TPC lần lượt 0,9242 và 0,8268, và TSC lần lượt là 0,9396 và 0,8621. Cả hai mô hình phân tích TPC và TSC tương đồng nhau. Theo Gabrielsson và cộng sự (2002), mô hình thí nghiệm đáng tin cậy khi giá trị biến thiên ảo Q^2 phải lớn hơn 0,5 và R^2 nằm trong khoảng 0,80-0,97; khi giá trị R^2 và Q^2 càng gần 1 thì hàm hồi qui càng mô tả tốt các kết quả thí nghiệm (Chu và cộng sự, 2002). Như vậy, kết quả của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với những tiêu chí mà các tác giả này đã đưa ra khi tiến hành qui hoạch thực nghiệm sử dụng phần mềm JMP 13.

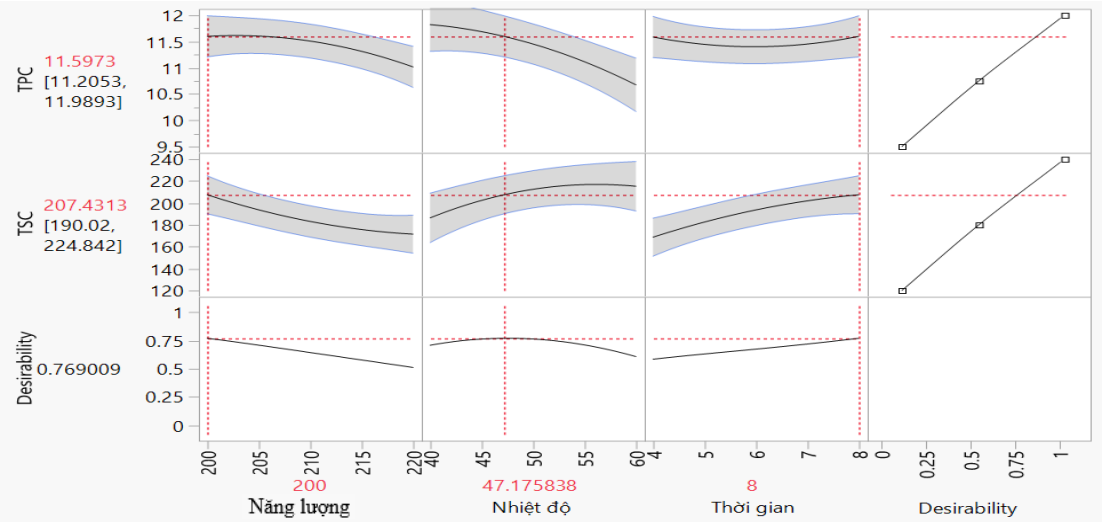


Hình 3.9. Biểu đồ bề mặt đáp ứng của TPC (a-c) và TSC (d-f)

Biểu đồ đáp ứng bề mặt (Hình 3.9) kết hợp biểu đồ tối ưu hoá các yếu tố ảnh hưởng (Hình 3.10) cho thấy hiệu quả trích ly của TPC và TSC có mối tương quan nghịch giữa ba yếu tố thử nghiệm: nhiệt độ (45-65°C), thời gian siêu âm (4-8 phút) và năng lượng siêu âm (200-220W). TPC tăng đều khi năng lượng siêu âm tăng từ 200W và giảm khi vượt quá 203W. Ngược lại, khi năng lượng càng lớn thì TSC thu được càng giảm. Ở nhiệt độ càng cao thì TPC giảm dần, trong khi đó TSC tăng dần đều từ 40 – 58^{o}C và bắt đầu giảm nhẹ khi vượt quá 58^{o}C. Và yếu tố cuối cùng là thời gian trích ly càng kéo

dài thì TSC tăng lên, trong khi đó TPC giảm dần. Điều này cho thấy rằng TPC và TSC trong dịch trích lá xáo tam phân đều chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố trích ly theo xu hướng tỉ lệ nghịch.

Biểu đồ Hình 3.10 biểu thị các điều kiện tối ưu của ba yếu tố thu được từ phương trình hồi quy lần lượt có năng lượng siêu âm 200W, nhiệt độ 47°C, và thời gian xử lý 8 phút. Tại các điều kiện tối ưu, giá trị đáp ứng tối đa của TPC theo mô hình dự đoán đạt giá trị 11,60 mg GAE/g ck và TSC là 207,43 mg EE/g ck.



Hình 3.10. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình trích ly TPC và TSC

**Các đường chấm màu đỏ biểu thị các giá trị dự đoán trên trục y theo sự thay đổi của các yếu tố độc lập trên trục x (mức 0 của mô hình CCD). Các đường liền màu đen là các giá trị dự đoán trung bình và các đường chấm màu xanh lam là phạm vi của các giá trị dự đoán.*

Để kiểm tra độ tin cậy của mô hình, thí nghiệm xác minh đã được tiến hành ở điều kiện tối ưu dự đoán được (200W, 47°C, 8 phút) (Bảng 3.11).

Bảng 3.11. TPC và TSC theo dự đoán của mô hình tối ưu và thực tế trích ly

	Yếu tố khảo sát			**TPC (mgGAE/g chất khô)**	**TSC (mgEE/g chất khô)**
	Năng lượng siêu âm (W)	**Nhiệt độ xử lý (°C)**	**Thời gian xử lý (phút)**		
Mẫu không xử lý	0,0	47,0	8	$7,43^{b} \pm 0,07$	$97,17^{B} \pm 0,23$
Giá trị dự đoán	200	47,0	8	$11,60^{a} \pm 0,89$	$207,43^{A} \pm 4,19$
Giá trị thực tế	200	47,0	8	$14,59^{a} \pm 0,10$	$209,67^{A} \pm 5,17$

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ANOVA (α = 0,05).

Kết quả cho thấy giá trị thực nghiệm TPC và TSC thu được trong dịch chiết lần lượt là 14,59 ± 0,10mgGAE/g ck và 209,67 ± 5,17mgEE/g ck. Giá trị thử nghiệm thực tế tương đồng với giá trị dự đoán của phương trình. Khi so sánh với mẫu không xử lý siêu âm, giá trị này tăng 96,37% đối với TPC và tăng 115,78% đối với TSC.

Kết quả quy hoạch thực nghiệm cho thấy sự thay đổi năng lượng, nhiệt độ hay thời gian siêu âm trong khoảng khảo sát đã làm thay đổi có ý nghĩa hàm lượng các hợp chất phenolic và saponin trong dịch trích xáo tam phân. Năng lượng siêu âm 200W, nhiệt độ 47^{o}C và thời gian 8 phút được xem là những thông số tối ưu để hàm lượng các hợp chất phenolic và saponin đạt giá trị cực đại.

3.4. So sánh hiệu quả của các phương pháp chiết xuất khác nhau

Các thông số tối ưu hóa (tỉ lệ enzyme pectinase-cellulase 0,8%, nhiệt độ xử lý enzyme 53^{o}C, thời gian xử lý enzyme 120 phút, năng lượng siêu âm 200W, nhiệt độ siêu âm 47^{o}C và thời gian siêu âm 8 phút đã được chọn để trích ly TPC và TSC theo các phương pháp xử lý enzyme (EAE), siêu âm (UAE), siêu âm trước enzyme (U-EAE), siêu âm và enzyme đồng thời (UES-AE), enzyme trước siêu âm (E-UAE) và không xử lý (đối chứng). TPC và TSC của dịch chiết từ lá xáo tam phận được trình bày ở Bảng 3.12.

Bảng 3.12. TPC and TSC trong dịch chiết xử lý với các phương pháp khác nhau

PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ		TPC (mg GAE/g ck)	TSC (mg EE/g ck)
Xử lý enzyme	Mẫu đối chứng	$12,02^{a} \pm 0,37$	$123,29^{A} \pm 2,40$
	EAE	$19,81^{b} \pm 0,12$	$139,87^{C} \pm 0,95$
Xử lý siêu âm	Mẫu đối chứng	$7,43^{c} \pm 0,07$	$97,17^{D} \pm 0,23$
	UAE	$14,59^{d} \pm 0,50$	$267,67^{B} \pm 5,17$
Xử lý kết hợp	Mẫu đối chứng	$11,86^{a} \pm 0,21$	$126,87^{A} \pm 2,07$
	U-EAE	$23,11^{e} \pm 0,34$	$291,08^{E} \pm 6,99$
	UES-AE	$18,76^{f} \pm 0,44$	$241,43^{F} \pm 7,11$
	E-UAE	$20,61^{g} \pm 0,47$	$273,65^{B} \pm 4,73$

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ANOVA (α = 0,05).

Chú thích: CONTROL: mẫu đối chứng không xử lý, EAE: mẫu được xử lý enzyme, UAE: mẫu được xử lý siêu âm, E-UAE: mẫu được xử lý enzyme trước, siêu âm sau, U-EAE: mẫu được xử lý siêu âm trước, enzyme sau, UES-AE: mẫu được xử lý đồng thời siêu âm và enzyme.

Kết quả cho thấy dịch chiết từ lá XTP được xử lý bằng enzyme, siêu âm và phương pháp kết hợp enzyme-siêu âm đều gia tăng đáng kể TPC và TSC so với mẫu đối chứng ($p < 0,05$). Cả phương pháp siêu âm và enzyme đều phá vỡ cấu trúc tế bào, tạo điều kiện tiếp xúc giữa dung môi và vật liệu tốt hơn, từ đó nâng cao hiệu suất trích ly.
Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy sự kết hợp giữa xử lý enzyme và siêu âm trên lá XTP (U-EAE, E-UAE) đã thu nhận dịch trích chứa TPC và TSC cao hơn so với việc chỉ sử dụng siêu âm (UAE) hoặc enzyme (EAE). Tuy nhiên, khi xử lý đồng thời UAE và EAE (UES-AE) cho hiệu quả chiết xuất thấp hơn so với việc kết hợp xử lý enzyme-siêu âm (U-EAE hoặc E-UAE). Điều này có thể được cho là do một phần enzyme bị biến đổi bởi sóng siêu âm, dẫn đến giảm hoạt động của nó.

Phương pháp chiết xuất kết hợp enzyme-siêu âm cho thấy U-EAE cho hiệu quả thu nhận TPC và TSC cao nhất. TPC và TSC thu được cao hơn UAE lần lượt là 1,58 và 1,09 lần và cao hơn EAE là 1,17 và 2,08 lần. Kết quả này có xu hướng tương tự với một số nghiên cứu trước đó. Gao và cộng sự (2022) đã chứng minh hiệu quả của kỹ thuật siêu âm-enzyme (U-EAE) trong việc chiết xuất TPC từ *Empetrum nigrum*. TPC thu được khi sử dụng phương pháp kết hợp U-EAE cho kết quả cao hơn 1,62 và 1,73 lần so với UAE và EAE. Tchabo và cộng sự (2015), Li và cộng sự, 2017, Van Thanh và cộng sự (2023) và Lin và cộng sự (2023) cũng đã cho thấy việc kết hợp siêu âm với enzyme (U-EAE hoặc E-UAE) mang lại hiệu quả đáng kể hơn so với các phương pháp chỉ sử dụng siêu âm hoặc enzyme hoặc xử lý nhiệt truyền thống trong việc chiết xuất từ cây dâu tằm, *Trapa quadrispinosa Roxb*, vỏ quả bưởi Shatian và vỏ hạt điều. Tương tự, Zhao và cộng sự (2023) đã chỉ ra rằng phương pháp chiết xuất kết hợp cellulase và siêu âm là phương pháp hiệu quả nhất. Theo tác giả, việc xử lý siêu âm đã làm tăng ái lực giữa cellulase và vật liệu, từ đó cải thiện quá trình hòa tan của chất chiết xuất. Phương pháp này đã tăng hiệu suất lên đến 171% so với các phương pháp chiết xuất truyền thống và chiết xuất bởi enzyme đơn lẻ. Siêu âm và enzyme có thể có hiệu ứng tương hỗ, trong đó siêu âm tạo ra bọt, sự xáo trộn và làm gãy đứt các hợp chất có cấu

trúc phức tạp từ đó làm giảm kích thước của chúng. Điều này tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiếp xúc giữa enzyme với cơ chất và tăng cường hiệu quả tương tác của chúng với cơ chất trong quá trình chiết xuất (Zhao và cộng sự, 2023).

Hiệu quả trích ly TPC, TSC trong lá XTP của các phương pháp được xếp thứ tự như sau: U-EAE > E-UAE > UES-AE > UAE > EAE > CONTROL. Phương pháp U-EAE hiệu quả hơn, tiết kiệm thời gian và chi phí thấp hơn so với các phương pháp chiết xuất khác. Hiệu quả chiết xuất cao của U-EAE có thể là do sự phá vỡ ngẫu nhiên thành tế bào bởi sóng siêu âm kết hợp với sự thuỷ phân chọn lọc của enzyme (Lieu & Le, 2010). Ngoài ra, sự kết hợp của các enzyme khác nhau làm tăng khả năng thẩm thấu của dung môi, dẫn đến giải phóng các hợp chất sinh học và tăng hiệu suất chiết xuất (Miron và cộng sự, 2013). Mức tiêu thụ năng lượng và hiệu suất trích ly là hai yếu tố cần thiết khi ứng dụng vào sản xuất công nghiệp, do vậy U-EAE nên được ưu tiên lựa chọn dựa trên hiệu suất và thời gian chiết xuất (Worrell và cộng sự, 2003).

Kết quả này cũng nhất quán với các nghiên cứu trước đây (Dang B. K. và cộng sự, 2012; Lieu & Le, 2010; Nguyen V. P. T. và cộng sự, 2013), điều đó chứng minh rằng xử lý enzyme kết hợp siêu âm đã tăng cường hiệu quả chiết xuất trong thời gian ngắn. Tương tự, Nag & Sit (2018) đã chứng minh rằng phương pháp U-EAE khi sử dụng chiết xuất polyphenol từ vỏ lựu đạt hiệu quả hơn về mặt kinh tế do hiệu suất chiết xuất cao và tiêu thụ năng lượng thấp hơn so với phương pháp xử lý nhiệt hoặc vi sóng.

3.5. Phân tích thành phần phenolic và saponin trong dịch chiết lá XTP bằng sắc ký khối phổ LC-QTOF

Dịch chiết thu được dưới điều kiện tối ưu của U-EAE tiếp tục phân tích bằng LC-QTOF-MS. Mục đích của phân tích này là để định tính các thành phần hợp chất phenolic và saponin. Thành phần của mỗi peak được xác định bằng tỷ lệ khối lượng điện tử/điện tích (m/z) của các ion đặc trưng và ion phân tử. Mỗi peak của biểu đồ sắc ký được xác định bằng thời gian lưu và các phổ khối lượng điện tử tham khảo trong dữ liệu thư viện UNIFI Waters. Kết quả cho thấy tổng cộng có 18 saponin và 43 hợp chất phenolic được phân tích (Bảng D.4.1- phụ lục). Sự hiện diện của các hợp chất phenolic và saponin trong lá XTP có thể liên quan đến các tác dụng dược lý đa dạng

của cây. Các nghiên cứu làm rõ tính năng dược lý của các hợp chất phenolic và saponin này có thể được tiến hành trong các nghiên cứu tương lai.

Dựa trên các nghiên cứu trước đây, các hợp chất saponin tìm thấy trong dịch chiết lá XTP có nhiều hoạt tính sinh học và lợi ích cho sức khỏe. Chẳng hạn, prosapogenin có tác dụng chống viêm và ung thư (Chung và cộng sự, 2008; Wang và cộng sự, 2013). Cyclopassifloside VI đã được chứng minh có hiệu quả chống trầm cảm (Wang và cộng sự, 2013). Copteroside B cho thấykhả năng ức chế tốt lipase tụy (Fang Li và cộng sự, 2007). Rosamultin thể hiện hoạt tính dược lý đáng kể chống oxi hóa, tổn thương khi thiếu oxy và duy trì sự cân bằng của quá hình thành và hủy phân xương (He và cộng sự, 2021). Ganoderic acid X đã được xác định là một phương thuốc trong điều trị ung thư gan ở người (Li và cộng sự, 2005). Ganoderal A là một chất kích thích tạo xương an toàn và hiệu quả, có thể được sử dụng cho liệu pháp dựa trên tế bào gốc hỗ trợ điều trị các vấn đề thiếu hụt về xương (Wang và cộng sự, 2020). Hơn nữa, kết quả cho thấy chiết xuất lá XTP chứa nhiều saponin triterpenoid hơn saponin steroid.

Các hợp chất phenolic cũng đóng vai trò trong lợi ích cho sức khỏe. Laserpitin đã được phát hiện tăng mức HDL trong huyết thanh và giảm triglyceride nội tạng (Ogawa và cộng sự, 2005). 8-Gingerol cho thấy khả năng ức chế đáng kể sự phát triển của các tế bào ung thư đại trực tràng (Hu và cộng sự, 2020). Syringin cho thấy tác dụng đối với bệnh viêm ruột vi khuẩn (US và cộng sự, 2015). Luteolin có nhiều tác dụng sinh học, bao gồm chống viêm, chống dị ứng và chống ung thư (Lin và cộng sự, 2008). Luteolin-7-glucoside-4'-neohesperidoside cho thấy tiềm năng như một chất ức chế SARS-CoV-2 (Rudrapal và cộng sự, 2022). Liriodendrin đã được đánh giá cao về hoạt tính chống viêm và giảm đau (Jung và cộng sự, 2003).

Kết quả nghiên cứu cho thấy các hợp chất phenolic chiếm ưu thế trong lá XTP. Phần lớn các hợp chất phenolic và saponin trong dịch chiết lá thu nhận được trong nghiên cứu chưa thấy có tác giả công bố xác định sự có mặt các hợp chất này trong cây XTP. Sự khác biệt này có thể là do phương pháp chiết xuất, cụ thể là việc sử dụng các dung môi chiết khác nhau. Trong nghiên cứu này, nước được làm dung môi để chiết xuất, trong khi các nghiên cứu trước đây sử dụng methanol (Nguyen V. T. và cộng sự, 2017b; Tran và cộng sự, 2023).

3.6. Khảo sát các thông số kỹ thuật của quá trình cô đặc lạnh

3.6.1. Tổng hàm lượng chất khô và hệ số nồng độ

Tổng hàm lượng chất khô và hệ số nồng độ của quá trình cô đặc lạnh dạng khối dịch chiết lá XTP được thể hiện trong Bảng 3.13. Hàm lượng chất khô tổng và hệ số nồng độ (CF) tăng lên đáng kể ($P < 0,05$) trong dịch cô đặc ở tất cả các giai đoạn cô đặc lạnh so với dịch chiết lá XTP ban đầu. Hệ số nồng độ tăng từ C1 lên C2 là 29,63%, từ C2 lên C3 là 56,19% và từ C1 lên C3 là 102,47%.

Bảng 3.13. Hàm lượng chất khô trong dịch cô đặc, nước đá và hệ số nồng độ

Các giai đoạn cô đặc lạnh	Hàm lượng chất khô tổng (%)	CF
C0	$11,55 \pm 0,44^{a}$	
C1	$30,59 \pm 0,56^{b}$	$2,74 \pm 0,18^{a}$
I1	$5,48 \pm 0,15^{A}$	
C2	$44,36 \pm 0,56^{c}$	$3,82 \pm 0,25^{b}$
I2	$9,15 \pm 0,15^{B}$	
C3	$52,90 \pm 0,44^{d}$	$4,60 \pm 0,16^{c}$
I3	$19,51 \pm 0,38^{C}$	

Hệ số nồng độ được tính dựa trên hàm lượng chất khô tổng ở từng giai đoạn cô đặc đông lạnh (C1, C2 và C3). Đối với mỗi thông số, các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt thống kê ($p < 0,05$) giữa các chất cô đặc lạnh. C0: dịch chiết XTP đưa vào ban đầu; C1, C2, C3: dịch chiết cô đặc giai đoạn 1,2, và 3; I1, I2, I3: nước đá giai đoạn 1, 2, và 3; CF: hệ số nồng độ.

Hàm lượng chất khô của dịch chiết lá XTP cô đặc và ở các phần nước đá cũng được thể hiện trong Bảng 3.13. Có sự cải thiện rõ rệt về nồng độ chất khô tổng trong suốt quá trình cô đặc khối. Hàm lượng chất khô dao động đáng kể từ 30,67 đến 52,91% trong dịch chiết cô đặc và từ 5,34 đến 19,88% trong các phần nước đá. Chất khô trong dịch chiết cô đặc lạnh ở giai đoạn 1 (C1) tăng lên tới 165,31% so với dịch chiết đầu vào. Trong khi đó, mức tăng ở giai đoạn 2 và 3 lần lượt là 44,18% và 19,65%. Sự gia tăng hàm lượng chất khô không tỷ lệ thuận với quá trình cô đặc vì mức tăng cao nhất được quan sát thấy ở giai đoạn đầu tiên. Xu hướng này cũng tương tự như một số nghiên cứu trước đây của Qin và cộng sự (2021) và da Silva Haas và cộng sự (2022). Trong các phần nước đá, quan sát cho thấy sự gia tăng chất khô hòa

tan trong các phần băng tương ứng của chúng là 70,79% từ I1 đến I2 và lên tới 115,36% từ I2 đến I3. Có thể thấy rằng, từ giai đoạn cô đặc thứ hai trở đi, chất rắn được giữ lại trong phần băng cao hơn so với dịch trích cô đặc và nồng độ cao hơn ở phần băng có thể gây bất lợi về thành phần dinh dưỡng cũng như chất lượng tổng thể của dịch chiết cô đặc. Do đó, từng giai đoạn cô đặc đã được đánh giá thêm về tác động đối với thành phần hoạt tính sinh học của dịch chiết lá XTP cô đặc lạnh để từ đó chọn ra giai đoạn cô đặc tối ưu cho phép giảm thời gian và chi phí liên quan đến quá trình cô đặc đông lạnh, điều này có thể ảnh hưởng đến lợi ích kinh tế.

3.6.2. Thành phần hoạt chất sinh học trong dịch chiết cô đặc và các phần nước đá

Các thành phần TPC, TSC và hoạt tính sinh học của dịch chiết lá XTP thay đổi đáng kể theo các giai đoạn cô đặc lạnh được trình bày trong Bảng 3.14.

Bảng 3.14. Thành phần các hoạt chất sinh học trong dịch chiết ban đầu, dịch cô đặc và nước đá ở mỗi giai đoạn cô đặc lạnh và hiệu quả quy trình (PE)

Các giai đoạn cô đặc lạnh	TPC (mgGAE/g ck)	TSC (mgEE/g ck)	PE (%)		ABTS (mg TE/g ck)	DPPH (mg TE/g ck)
			TPC	TSC		
C0	23,77 ± 0,30^{a}	293,37 ± 4,89^{a}			34,82 ± 0,23^{a}	21,44 ± 0,55^{a}
C1	62,84 ± 0,67^{b}	546,58 ± 5,83^{b}	81,76 ± 1,21^{c}	78,85 ± 0,71^{c}	69,57 ± 0,41^{b}	44,23 ± 0,71^{b}
I1	11,44 ± 0,54^{A}	115,50 ± 3,18^{A}			16,41 ± 0,41^{A}	11,27 ± 0,31^{A}
C2	108,85 ± 2,57^{c}	703,63 ± 7,84^{c}	77,41 ± 0,51^{b}	69,73 ± 0,43^{b}	118,27 ± 2,10^{c}	60,62 ± 0,61^{c}
I2	24,55 ± 0,51^{B}	216,62 ± 4,05^{B}			32,55 ± 0,44^{B}	18,40 ± 0,54^{B}
C3	129,65 ± 2,01^{d}	997,45 ± 7,00^{d}	67,50 ± 0.64^{a}	65,30 ± 0,79^{a}	166,33 ± 3,27^{d}	87,34 ± 0,58^{d}
I3	42,31 ± 0,45^{C}	347,63 ± 3,05^{C}			49,29 ± 0,43^{C}	32,17 ± 0,34^{C}

Hệ số nồng độ được tính dựa trên hàm lượng chất khô tổng ở từng giai đoạn cô đặc đông lạnh (C1, C2 và C3). Đối với mỗi thông số, các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt thống kê ($p < 0,05$) giữa các chất cô đặc lạnh. C0, dịch chiết XTP đưa vào ban đầu; C1, dịch chiết cô đặc giai đoạn 1; C2, dịch chiết cô đặc giai đoạn 2; C3, dịch chiết cô đặc giai đoạn 3; I1, nước đá giai đoạn 1; I2, nước đá giai đoạn 2; I3, nước đá giai đoạn 3; PE, hiệu quả của quá trình cô đặc lạnh.

TPC trong dịch cô đặc C3 tăng hơn 5 lần so với TPC trong dịch chiết ban đầu, trong khi đó TSC chỉ tăng xấp xỉ 3,5 lần trong cùng một mẫu. TPC và TSC liên tục tăng lên trong dịch chiết trong quá trình cô đặc lạnh và theo sự gia tăng hàm lượng chất khô trong dịch cô đặc (Bảng 3.14). Xu hướng này cũng tương tự như quá trình cô đặc lạnh yerba mate (Boaventura và cộng sự, 2013) và nước cam (Haas và cộng

sự, 2022). Quan sát cũng cho thấy rằng TPC và TSC được chuyển một phần sang phần khối băng. Sự gia tăng TPC và TSC trong các phần băng được ghi nhận trong suốt giai đoạn cô đặc lạnh, trong đó I3 cho thấy TPC và TSC tương ứng là 42,31 mg GAE/g ck và 347,63 mg EE/g ck cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với các phần băng khác (I1 và I2). Nhờ có liên kết hydrogen, phenolic và saponin có thể liên kết một số lượng lớn các phân tử nước. Kết quả là, trong quá trình tách đá và chất lỏng đậm đặc, trong nước đá vẫn giàu phenolic và saponin. Hiện tượng này có thể làm giảm hiệu quả của quá trình tách nước bằng phương pháp cô đặc lạnh (Aider và cộng sự, 2007). Kết quả cao nhất về hiệu quả cô đặc của quy trình (PE) được ghi nhận ở giai đoạn cô đặc lạnh đầu tiên, với TPC và TSC thu hồi là 62,84 mg GAE/g ck và 546,58 mg EE/g ck. Ở các giai đoạn tiếp theo, PE giảm đáng kể ($p < 0,05$) so với giai đoạn đầu. Rõ ràng, hiệu quả của quá trình cô đặc lạnh giảm xuống là do do sự gia tăng lưu giữ các chất hòa tan trong băng ở các giai đoạn sau của quy trình. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng PE ở giai đoạn cuối là 65 – 67%, cho thấy quy trình cô đặc lạnh khá hiệu quả. Các nghiên cứu khác cho thấy hiệu quả giảm từ 90% ở giai đoạn đầu xuống còn 30–50% ở giai đoạn cuối của quy trình cô đặc đông lạnh (Aider và cộng sự, 2007).

Xem xét về thành phần phenolic và saponin thì có thể thấy cô đặc lạnh dạng khối sử dụng 3 giai đoạn (C3) cho thấy tiềm năng tốt nhất để thu nhận dịch chiết lá XTP cô đặc có hàm lượng hoạt tính sinh học cao. Meneses và cộng sự (2021) và Haas và cộng sự (2022) khẳng định cô đặc lạnh dạng khối là một phương pháp hiệu quả để bảo quản và tăng hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học trong dịch chiết trà xanh và nước cam.

Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết lá XTP ở từng giai đoạn cô đặc lạnh được đo bằng phương pháp ABTS và DPPH, được thể hiện trong Bảng 3.14. Nghiên cứu này, đã cho thấy sự cải thiện đáng kể ($p < 0,05$) về khả năng chống oxy hóa ở cả hai phương pháp đo. Hoạt tính chống oxy hoá của dịch chiết cô đặc thu được sau giai đoạn cô đặc thứ ba (C3) cao gấp 3,4 lần so với hoạt tính trong dịch chiết ban đầu. Để bổ sung cho việc đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các mẫu dịch chiết cô đặc, phương pháp DPPH được thực hiện song song. Giá trị DPPH trong dịch chiết cô đặc C3 tăng lên gấp 4 lần so với dịch chiết ban đầu đưa vào quá trình cô đặc. Boaventura

và cộng sự (2013) và Haas và cộng sự (2022) cũng lưu ý sự khác biệt đáng kể khi đánh giá DPPH của dịch chiết lá yerba mate và nước cam sau khi cô đặc khối. Orellana-Palma và cộng sự (2020) đã báo cáo rằng quá trình cô đặc lạnh cho phép tăng khả năng chống oxy hóa của dịch cô đặc nhờ vào sự bảo tồn của các thành phần nhạy cảm, chẳng hạn như một số hoạt chất sinh học, và chúng góp phần tạo ra khả năng chống oxy hóa cao. Trong nghiên cứu này, khả năng chống oxy hóa cũng tăng lên ($p < 0,05$) trong các phần nước đá, với TPC và TSC cao nhất thu được ở I3. Khả năng chống oxy hóa của các phần nước đá tăng lên đáng kể ($p < 0,05$) trong giai đoạn thứ ba của quá trình cô đặc lạnh, khẳng định rõ hơn một phần lớn các hợp chất phenolic và saponin đã bị mất ở giai đoạn này. Qua đó, cho thấy sự biến thiên của các thành phần phenolic, saponin qua các giai đoạn cô đặc có mối tương quan chặc chẽ đến hoạt tính chống oxy hoá của dịch cô đặc, và mức độ của chúng có thể bị ảnh hưởng bởi quá trình cô đặc lạnh. Sự ghi nhận này cũng được khẳng định ở các nghiên cứu trước đây của Adorno và cộng sự (2017) và Haas và cộng sự (2022).

Dịch chiết cô đặc C3 đã được phân tích bằng LC-QTOF-MS để xác định các chất phenolic và saponin, kết quả xác định được 33 hợp chất phenolic và 15 hợp chất saponin. So với chiết xuất ban đầu (C0), giảm đi 10 hợp chất phenolic (6-hydroxyluteolin 5-rhamnoside, methyl helianthenoate A glucoside, syringin, (3S,5R,6S,7E,9x)-7-megastigmene-3,6,9-triol 9-glucoside, curcumin dimer 3, 2'-methoxy-3-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,2-propanediol 4'-glucoside, falcarindiol, lentiginosine, isoalangiside, denticulaflavonol), và 3 hợp chất saponin (beta-citraurinene, 13-hydroxydihydromelleolide, periandrin III). Mặc dù có sự giảm đi về số lượng các hoạt chất so với dịch chiết ban đầu, nhưng các hợp chất có dược tính chính yếu vẫn được bảo tồn sau quá trình cô đặc lạnh.

Quy trình cô đặc lạnh dạng khối ba giai đoạn với việc sử dụng một thiết bị đơn giản đã được áp dụng để làm giàu dịch chiết lá XTP trong nghiên cứu này. Nhiệt độ thấp của quá trình cô đặc lạnh đã bảo vệ các hợp chất có hoạt tính sinh học khỏi bị phân hủy và do đó, giá trị dinh dưỡng của dịch chiết cô đặc được bảo tồn. Dịch chiết cô đặc thu được có hàm lượng chất khô, TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá luôn cao hơn so với dịch chiết ban đầu. Các thông số quy trình cho thấy hiệu quả cô đặc

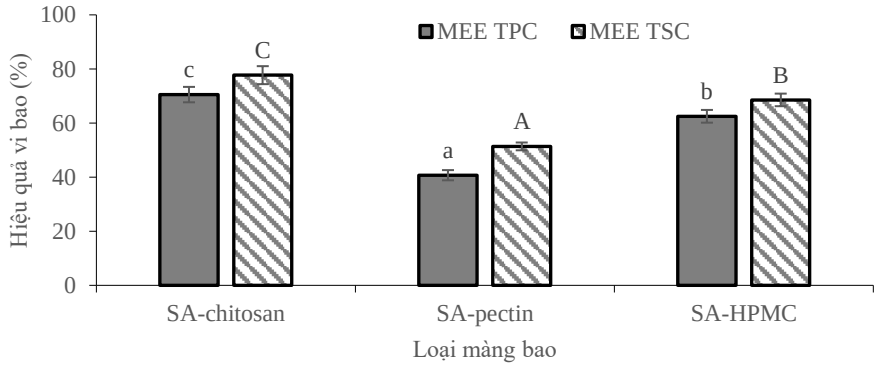
đạt từ 65 – 67% khi kết thúc chu trình cô đặc lạnh. Kỹ thuật cô đặc khối cho thấy hiệu quả làm giàu các hoạt chất trong dịch chiết XTP. Hiệu quả cô đặc cao nhất đã được xác định đối với chất cô đặc lạnh C1 ở giai đoạn thứ nhất, đồng thời đạt được hàm lượng TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá cao nhất trong dịch chiết cô đặc ở giai đoạn cuối cùng (C3), mặc dù cũng mất đi một phần các hoạt chất sinh học và hoạt tính chống oxy hoá vào các phần băng. Có thể nhận thấy lợi ích của việc sử dụng kỹ thuật cô đặc lạnh là rõ ràng, khi chuyển đổi kỹ thuật này sang quy mô công nghiệp sẽ có nhiều cải tiến hơn, như hạn chế sự thất thoát chất rắn hòa tan và các thành phần hoạt chất sinh học do tinh thể băng mang theo.

3.7. Các thông số kỹ thuật ảnh hưởng đến hiệu quả vi bao dịch trích

3.7.1. Ảnh hưởng của các công thức màng bao đến hiệu quả vi bao

Lựa chọn loại màng bao thích hợp, vừa có khả năng bảo vệ được các chất có hoạt tính sinh học vừa an toàn khi sử dụng và hiệu quả về kinh tế là mục tiêu hàng đầu của việc ứng dụng kỹ thuật vi bao trong thực phẩm (Đorđević và cộng sự, 2015). Các vật liệu màng có nguồn gốc từ polysaccharide như tinh bột, alginate, pectin… thường được ưu tiên lựa chọn vì tính ổn định và kiểm soát được quá trình phóng thích các hoạt chất trong đường ruột (Pasukamonset và cộng sự, 2016). Polysaccharide cực kỳ thuận lợi để tạo các liên kết vật lý và hoá học với bất cứ ion phản ứng nào được thêm vào hệ phân tán của chúng với nồng độ thích hợp. Trong đó, sodium alginate được chú ý nhiều trong sự kết hợp với các chất khác như pectin, cellulose, tinh bột, HPMC trong công thức tạo màng vi bao, giúp làm tăng tính ổn định của hệ gel, cấu trúc cơ học và vật lý của hạt vi bao (Belščak-Cvitanović và cộng sự, 2016; Vallejo-Castillo và cộng sự, 2020).

Với mục đích tìm được hệ màng bao polysaccharide phù hợp cho quá trình vi bao dịch cô đặc XTP giàu phenolic và saponin, thí nghiệm đã được tiến hành với 3 hỗn hợp màng bao SA-chitosan, SA-pectin và SA-HPMC. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Hình 3.11 và 3.13. Phụ lục D5.1.



Hình 3.11. Ảnh hưởng của 3 hệ màng bao đến hiệu quả vi bao

Chú thích: MEE: Hiệu quả vi bao (%). Giá trị cột với các chữ cái trên mỗi cột cùng nền khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05).

Kết quả cho thấy hiệu quả vi bao khác nhau ở 3 hệ màng bao. Cụ thể, sự kết hợp giữa SA và chitosan cho hiệu quả vi bao cao nhất đạt hiệu quả lên đến 70,52% đối với TPC và 77,71% khi vi bao TSC.

Trường hợp SA-pectin, pectin có khả năng tạo gel với SA thông qua cầu liên kết giữa Ca^{2+} và COO^- của acid galacturonic không bị ester hóa trên chuỗi pectin theo mô hình hộp trứng (Cao và cộng sự, 2020). Do vậy, hỗn hợp SA-pectin có thể tạo gel khi có mặt ion Ca^{2+}. Các nghiên cứu trước đó của Belščak-Cvitanović và cộng sự (2016) và Vallejo-Castillo và cộng sự (2020) đều cho thấy sự kết hợp giữa pectin và alginate giúp gia tăng hiệu quả vi bao so với chỉ sử dụng alginate.

Trường hợp SA-HPMC, màng bao alginate-HPMC có thể tạo liên kết với ion Ca^{2+}do trong cấu trúc của cả hai chất đều có chứa nhóm ưa nước; cụ thể, HPMC chứa nhóm -OH và SA chứa -OH và -COOH. Trong đó, liên kết chính để tạo thành hạt vi bao là liên kết ion giữa Ca^{2+} và alginate và chuỗi alginate xen vào các chuỗi HPMC tạo thành cấu trúc mạng (Hu và cộng sự, 2018). Do sự tương tác của các hoạt chất phenolic và saponin với HPMC thông qua các tương tác kỵ nước cũng như liên kết hydrogen có vai trò như một liên kết chéo "cross linking" có thể giúp tăng khả năng nhốt các hợp chất này trong hạt vi bao, giảm sự khuếch tán của chúng ra bên ngoài bề mặt trong quá trình làm cứng hạt vi bao (Belščak-Cvitanović và cộng sự, 2016). Theo Giunchedi và cộng sự (2000), khi quan sát hạt vi bao alginate-HPMC dưới kính hiển vi điện tử SEM, màng bao được hình thành từ mạng lưới dầy và chặt chẽ, có thể nhờ vậy mà hiệu quả cố kết các hoạt chất tốt hơn so với khung mạng lưới được hình

thành từ alginate và pectin. Ngoài ra, các hạt vi nang alginate được tìm thấy có cấu trúc rỗng và đặc tính cơ, lý hoá kém tuy nhiên các liên kết chéo được hình thành giữa phenolic, saponin với HPMC giúp gia cố thêm cấu trúc mạng lưới (Belščak-Cvitanović và cộng sự, 2016; Hu và cộng sự, 2018).

Trường hợp SA-chitosan, các cation chitosan liên kết với acid carboxylic của alginate tạo thành cấu trúc màng bao quanh các phân tử hoạt chất (Tan và cộng sự, 2021). Thêm nữa, các ion Ca^{2+} có thể thực hiện liên kết ngang với chitosan, kết nối chặt chẽ các lớp màng tạo nên cấu trúc mạng lưới kép giúp tăng diện tích bề mặt vi hạt và bảo vệ các hoạt chất tốt hơn, do đó phức hệ màng SA-chitosan cho hiệu quả vi bao tốt nhất các hoạt chất trong dịch chiết lá XTP.

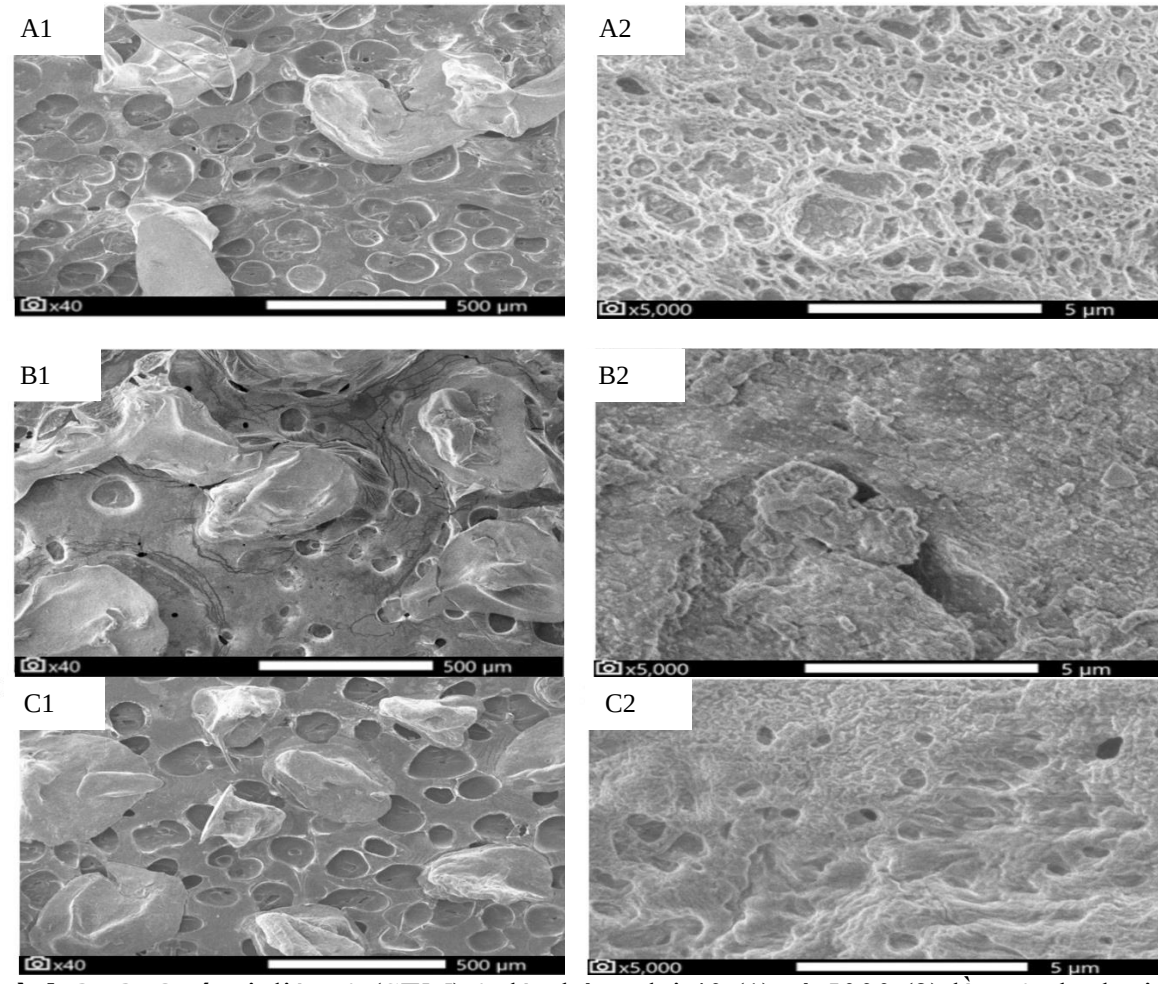
Các hạt vi bao được tạo ra từ ba hệ màng bao có kích thước hạt dao động từ 1,0-1,5mm. Tuy nhiên, các hạt của hệ màng bao SA-chitosan tròn hơn và có độ dai hơn so với hai loại còn lại (Hình 3.12). Điều đó cho thấy SA-chitosan tạo cấu trúc màng có kết cấu bền chặt hơn.



Hình 3.12. Hình dạng ba loại hạt vi bao SA-pectin, SA-HPMC, SA-chitosan

Hình 3.13 thể hiện ảnh SEM của 3 hệ màng bao ở các độ phóng đại khác nhau. Trên mặt cắt ngang, cấu trúc lỗ hydrogel và các gel phối hợp xuất hiện trên cả ba hệ màng bao. Cấu trúc lỗ hydrogel, tạo điều kiện thuận lợi cho việc trao đổi dịch chiết XTP với dung dịch bên ngoài vật liệu. Ở độ phóng đại 40 lần, hình mặt cắt ngang của hệ màng bao SA-chitosan cho thấy số lượng lỗ hydrogel nhiều và phân bố đồng đều hơn so với 2 hệ màng bao còn lại. Trên bề mặt màng SA-HPMC và SA-pectin xuất hiện khá nhiều các gel phối hợp do hiện tượng phân tách giữa SA với HPMC và pectin, do đó làm giảm diện tích bề mặt lỗ hydrogel trên hai hệ màng gel này. Quan sát cấu trúc bề mặt màng ở độ phóng đại 5000 lần, SA- pectin giống như một tấm màng trơn phẳng. Ngược lại, SA-chitosan tạo cấu trúc màng với nhiều lỗ liên tục, do

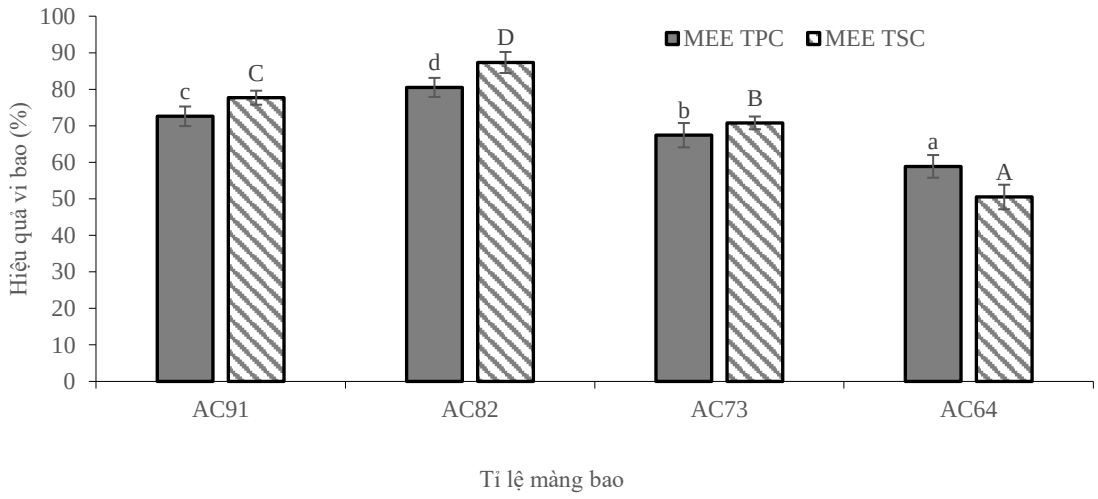
đó tăng diện tích bề mặt lưu giữ dịch chiết trên màng. Để đánh giá toàn diện hơn về hiệu quả vi bao của hệ màng bao SA-chitosan, công thức màng bao tối ưu cho sự kết hợp của hai vật liệu này được tiếp tục khảo sát.



Hình 3.13. Quét vi điện tử (SEM) ở độ phóng đại 40 (1) và 5000 (2) lần của ba loại hạt vi bao SA-chitosan (A), SA-pectin (B) và SA-HPMC (C)

3.7.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ SA-chitosan đến hiệu quả vi bao

Để xác định hỗn hợp các polymer sodium alginate và chitosan giúp hình thành lớp màng bao gói thích hợp cho các hoạt chất phenolic và saponin trong dịch chiết lá XTP, tỷ lệ sau đây của hai loại vật liệu bao gói được chọn: 90:10 (w/w) (AC91), 80:20 (w/w) (AC82), 70:30 (w/w) (AC73), 60:40 (w/w) (AC64). Kết quả của thí nghiệm này được thể hiện ở Hình 3.14. và Phụ lục D5.2.



Hình 3.14. Ảnh hưởng của tỷ lệ màng bao đến hiệu quả vi bao

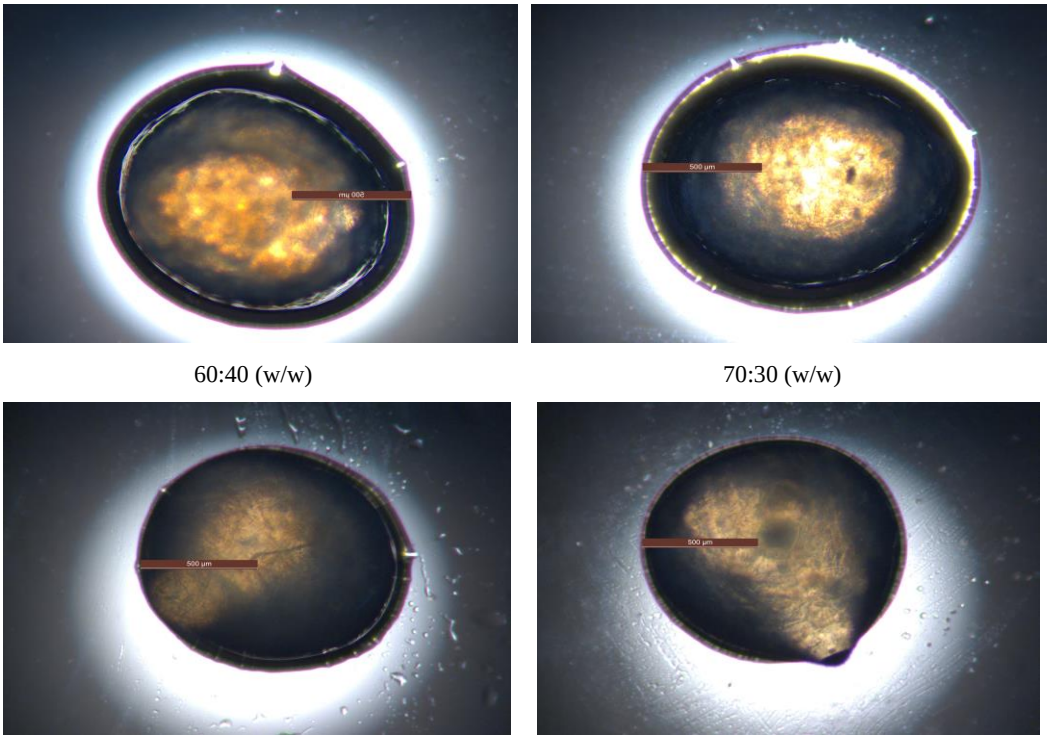
Chú thích: MEE: Hiệu quả vi bao (%). Giá trị cột với các chữ cái trên mỗi cột cùng nền khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả thí nghiệm cho thấy, sự thay đổi về tỷ lệ phối trộn giữa hai loại vật liệu màng bao đã ảnh hưởng đến hiệu quả vi bao phenolic và saponin của dịch trích lá XTP. Khi thay đổi tỉ lệ phối trộn từ 60:40 lên 80:20 thì hiệu quả vi bao TPC tăng từ 58,91% đến 80,50% và khi vi bao TSC tăng từ 50,66% đến 87,22%. SA-chitosan ở tỷ lệ 80:20 cho hiệu quả bao gói phenolic và saponin cao nhất.

Cơ chế tạo màng SA-chitosan chính là cơ chế tạo gel thông qua cầu ion chứa cation (gel ion). Các polymer SA-chitosan có thể tạo liên kết với ion Ca^{2+} vì chúng đều có nhóm ưa nước, đặc biệt chitosan chứa nhóm -OH và alginate có nhóm -OH và -COOH. Tương tác chính trong việc hình thành các hạt bao bọc là liên kết ion giữa Ca^{2+} và alginate, trong đó chuỗi alginate xen kẽ với chuỗi chitosan tạo thành cấu trúc mạng lưới (Truong và cộng sự, 2020). Khi thay đổi tỷ lệ giữa hai màng bao đã tác động đến cơ chế gel cũng như động học hình thành hệ gel này (Cao và cộng sự, 2020).

Từ kính hiển vi điện tử cho thấy kích thước gần đúng của các hạt ở 4 tỷ lệ SA-chitosan dao động từ 1,0-1,5mm (Hình 3.15). Ở tỷ lệ màng bao 60:40 hạt chưa có cấu trúc, hình dạng ổn định, dịch vi bao có xu hướng phân tán rộng và tập trung nhiều ở bề mặt hạt. Hạt được tạo ra từ tỷ lệ màng bao 80:20 cho hình dạng tròn đều, đặc biệt dịch vi bao tập trung vào phần lõi của hạt, ít có sự phân tán dịch vi bao trên bề mặt

hạt như các hạt còn lại. Khi tăng tỷ lệ SA lên 90:10 thì hạt tạo thành có kích thước nhỏ nhất và màu vàng của dịch vi bao nhạt nhất chứng tỏ khả năng nhốt dịch kém nhất ở trường hợp màng bao này. Qua kết quả khảo sát, tỷ lệ màng bao 80:20 của SA-chitosan cho hiệu quả vi bao và cấu trúc hạt tốt nhất khi bao gói dịch trích lá XTP.



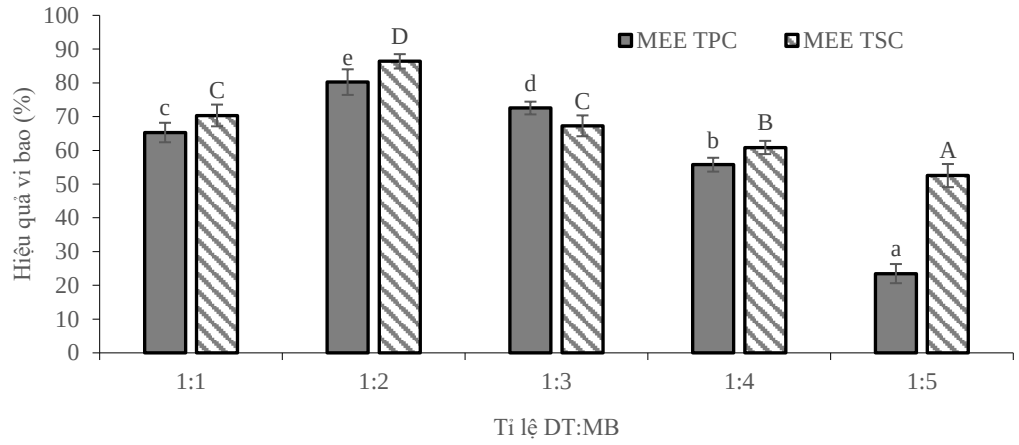
60:40 (w/w) 70:30 (w/w)

80:20 (w/w) 90:10 (w/w)

Hình 3.15. Hình chụp các vi hạt tạo ra từ 4 tỷ lệ màng bao SA-chitosan bằng kính hiển vi điện tử ở độ phóng đại 10 lần

3.7.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch trích-màng bao đến hiệu quả vi bao

Tỷ lệ dịch chiết so với màng bao cũng là một yếu tố quyết định sự hình thành các vi hạt và hiệu quả vi bao dịch trích. Chẳng hạn, nếu tỷ lệ dịch chiết và màng bao không phù hợp, tỷ lệ này quá cao thì việc hình thành hạt sẽ khó khăn. Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch chiết và màng bao ảnh hưởng đến hiệu quả vi bao được thể hiện trên Hình 3.16 và Phụ lục D5.3.



Hình 3.16. Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch trích: màng bao đến hiệu quả vi bao

Chú thích: MEE: Hiệu quả vi bao (%). Giá trị cột với các chữ cái trên mỗi cột cùng nền khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05).

Kết quả xử lý thống kê cho thấy khi nồng độ màng bao thay đổi đã dẫn đến thay đổi hiệu quả vi bao (p<0,05). Khi tỷ lệ dịch trích:màng bao tăng từ 1:1 lên 1:2 tức nồng độ màng bao tăng lên gấp 3 lần so với dịch trích thì hiệu quả vi bao tăng lên và đạt mức cao nhất 80,0% (TPC) và 86,35% (TSC). Tuy nhiên, tiếp tục tăng hàm lượng màng bao lên gấp 6 lần so với dịch trích thì hiệu quả vi bao giảm mạnh.

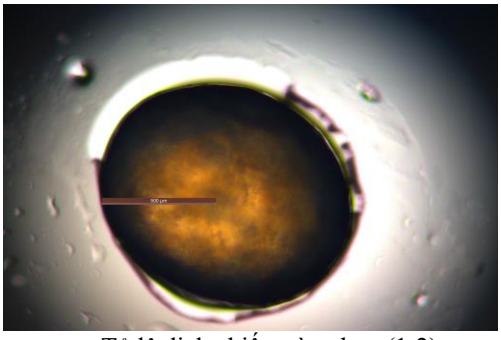
Nồng độ màng bao ảnh hưởng đến quá trình tạo gel và đặc tính của gel như độ nhớt, độ đàn hồi, độ cứng (Farrés & Norton, 2014). Hiệu quả vi bao tại tỷ lệ dịch trích:màng bao 1:2 đạt giá trị cao nhất có thể là do lượng alginate đủ để liên kết với ion Ca^{2+} tạo thành gel với độ bền và khả năng giữ nước tốt, bao gói được nhiều hợp chất bên trong hạt vi bao (Cao và cộng sự, 2020). Mặt khác, khi nồng độ alginate – chitosan khá cao có thể đã làm gia tăng độ nhớt của dịch vi bao, dẫn đến tăng khả năng nhốt giữ không khí trong quá trình khuấy trộn. Điều này có thể đã làm xuất hiện các cụm khí bên trong dịch vi bao làm cản trở sự khuếch tán của Ca^{2+}, giảm cơ hội liên kết của Ca^{2+} và alginate (Cao và cộng sự, 2020).

Hình ảnh được chụp bằng kính hiển vi (Hình 3.17) cho thấy, khi dịch chiết và màng bao được kết hợp theo tỷ lệ 1:2 trong quá trình đóng gói, hỗn hợp có độ đặc cao, tạo ra lớp màng dày và chắc chắn, giúp tạo mạng lưới vững vàng và bảo vệ các hoạt chất phenolic và saponin, đồng thời duy trì độ tròn đều của hạt. Mặc dù khả năng bao gói các hợp chất phenolic và saponin cũng khá tốt ở tỷ lệ 1:1 và 1:3 của dịch

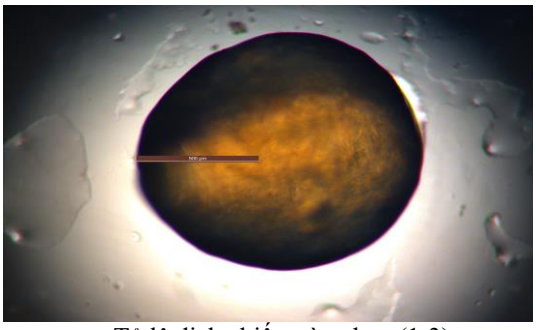
chiết và màng bao, nhưng các hạt này không đạt được độ cầu cao như tỷ lệ 1:2. Ở tỷ lệ 1:4 và 1:5 của dịch chiết và bao, hỗn hợp có độ đặc cao hơn, hạt có xu hướng nhỏ dần và bị biến dạng, mờ đục, dịch trích được bao gói giảm mạnh. Dựa trên hiệu quả bao gói cũng như khả năng hình thành hạt, tỷ lệ dịch chiết: màng bao 1:2 được ghi nhận là tỷ lệ tối ưu. Hạt được tạo ra theo tỷ lệ này giúp gia tăng đáng kể hàm lượng saponin và phenolic cố định trong hạt.



Tỷ lệ dịch chiết:màng bao (1:1)



Tỷ lệ dịch chiết:màng bao (1:2)



Tỷ lệ dịch chiết:màng bao (1:3)



Tỷ lệ dịch chiết:màng bao (1:4)



Tỷ lệ dịch chiết:màng bao (1:5)

Hình 3.17. Hình dạng vi hạt tạo ra từ 4 tỷ lệ dịch chiết:màng bao

Các thí nghiệm đánh giá hiệu quả bao gói dịch trích lá XTP bằng phương pháp giọt tụ với nguyên liệu bao gói từ các polysaccharide đã giúp lựa chọn được điều kiện vi bao tối ưu cho nghiên cứu bao gồm: Tỷ lệ màng bao sodium alginate-chitosan

(80:20 w/w) được chọn bao gói với tỷ lệ dịch trích:màng bao 1:2. Độ ổn định của hệ bao gói này được tiếp tục theo dõi ở các điều kiện môi trường khác nhau nhằm đánh giá khả năng ứng dụng của chúng trong các điều kiện chế biến thực phẩm khác nhau.

3.7.4. Ảnh hưởng của pH đến độ ổn định của hạt vi bao

Nhiệt độ và pH là hai yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến các quá trình chế biến thực phẩm. Quá trình gia nhiệt ức chế sự phát triển của vi sinh vật (90°C trong 10 phút) hay quá trình bảo quản không gia nhiệt (10°C và 30°C) đều có thể ảnh hưởng đến hàm lượng phenolic và saponin trong hạt vi bao chứa dịch chiết XTP khi ứng dụng thực phẩm. pH ảnh hưởng đến tính ổn định của thực phẩm như cấu trúc và các thành phần trong thực phẩm, do đó có thể ảnh hưởng đến sự ổn định của TPC và TSC trong hạt vi bao ứng dụng. Khoảng pH phổ biến mà nhiều loại thực phẩm, cũng như các quá trình chế biến thường gặp như sữa tươi (6,5-6,8), sữa chua và nước trái cây (4,0-4,5), các sản phẩm chế biến từ thịt (4,5-6,5), các sản phẩm chế biến từ rau củ tươi (5,0-7,0), các sản phẩm chế biến từ trứng (7,0-8,0). Vì vậy, thí nghiệm này nghiên cứu khả năng lưu giữ TPC và TSC trong hạt vi bao ở các giá trị pH dao động từ 4 đến 8 (trong điều kiện gia nhiệt (90°C trong 10 phút) và không gia nhiệt (10°C và 30°C trong 7 ngày).

3.7.4.1. Ảnh hưởng của pH đến độ ổn định hạt vi bao ở điều kiện gia nhiệt

Bảng 3.15. TPC, TSC còn lại trong hạt vi bao ở các dung dịch pH khác nhau trong điều kiện gia nhiệt 90ºC trong 10 phút

pH	Hiệu quả vi bao (%)			
	TPC		TSC	
	Mẫu không xử lý nhiệt	Mẫu xử lý nhiệt	Mẫu không xử lý nhiệt	Mẫu xử lý nhiệt
4	$80,08 \pm 3,00^{a}$	$67,74 \pm 2,32^{a}$	$85,45 \pm 2,11^{A}$	$69,51 \pm 3,04^{B}$
5	$80,15 \pm 2,04^{a}$	$72,83 \pm 3,95^{b}$	$85,50 \pm 3,16^{A}$	$74,47 \pm 1,78^{AB}$
6	$80,37 \pm 3,94^{a}$	$74,41 \pm 1,67^{b}$	$85,71 \pm 4,05^{A}$	$77,33 \pm 2,73^{A}$
7	$80,53 \pm 2,98^{a}$	$77,40 \pm 2,27^{b}$	$85,53 \pm 3,11^{A}$	$79,89 \pm 4,22^{A}$
8	$80,14 \pm 3,58^{a}$	$75,31 \pm 2,22^{b}$	$85,58 \pm 1,85^{A}$	$77,67 \pm 2,17^{A}$

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$). Mẫu không xử lý nhiệt là mẫu hạt ngâm trong nước với tỉ lệ 1:2 ở các pH khác nhau trong thời gian 10 phút.

Bảng 3.15 thể hiện hàm lượng phenolic và saponin còn lại trong hạt vi bao ở các dung dịch pH khác nhau. Không có sự thay đổi đáng kể về hàm lượng TPC và TSC trong hạt vi bao khi thay đổi pH từ 5 đến 8. Khi các hạt được ủ ở 90°C trong 10 phút ở các dung dịch pH 5 đến pH 8, TPC và TSC còn lại trong hạt dao động từ 72-77% (TPC) và 74-79% (TSC).

Nhiều nghiên cứu phát hiện rằng nhiệt độ và pH ảnh hưởng đến độ ổn định của polyphenol trong dịch chiết (Zhao và cộng sự, 2008). SA và saponin có nhiều nhóm ưa nước, trong đó phân tử chitosan chứa nhóm –OH và SA chứa nhóm –OH và –COOH là điều kiện tiên quyết để hình thành hydrogel. Sự kết hợp này giúp tăng cường tính bảo vệ nhiệt và độ ổn định của hạt vi bao để chịu được nhiệt độ cao 90°C (Hu và cộng sự, 2018; Sheng và cộng sự, 2021). Nhờ đó hạt vi bao đủ cứng có màng nang chắc chắn với cấu trúc mạng ba chiều, có thể giữ nguyên cấu trúc trong nước nóng, từ từ giải phóng vật liệu lõi bên trong, cải thiện khả năng lưu giữ TPC, TSC.

3.7.4.2. Ảnh hưởng của pH đến độ ổn định của vi hạt ở điều kiện không gia nhiệt

Ngoài các sản phẩm được làm nóng trong quá trình chế biến, một số sản phẩm không được làm nóng hoặc được làm nóng ở nhiệt độ vừa phải trong quá trình sản xuất, chẳng hạn như các sản phẩm lên men (nem chua, sữa chua,...). Để làm rõ khả năng ứng dụng của vi hạt trong sản xuất, thí nghiệm đã khảo sát độ ổn định của vi hạt sau 7 ngày ở nhiệt độ lạnh (10^{o}C) và nhiệt độ phòng (khoảng 30^{o}C). Kết quả thí nghiệm được trình bày trong Bảng 3.16.

Bảng 3.16. TPC, TSC còn lại trong hạt vi bao ở các dung dịch pH khác nhau tại điều kiện nhiệt độ phòng và bảo quản lạnh trong 7 ngày

pH	Hiệu quả vi bao (%)					
	TPC			TSC		
	Mẫu hạt ban đầu	Mẫu bảo quản tủ lạnh	Mẫu bảo quản nhiệt độ phòng	Mẫu hạt ban đầu	Mẫu bảo quản tủ lạnh	Mẫu bảo quản nhiệt độ phòng
4	80,02 ± 2,23	68,47 ± 3,05^{a}	59,32 ± 1,72^{a}	85,16 ± 2,44	70,90 ± 1,94^{A}	66,44 ± 3,37^{A}
5	80,02 ± 2,23	70,35 ± 2,27^{ab}	63,20 ± 3,11^{b}	85,16 ± 2,44	72,48 ± 3,27^{A}	69,27 ± 1,78^{AB}
6	80,02 ± 2,23	72,26 ± 3,16^{ab}	65,49 ± 2,82^{bc}	85,16 ± 2,44	75,46 ± 3,32^{AB}	72,65 ± 2,88^{BC}
7	80,02 ± 2,23	75,35 ± 3,27^{ab}	68,42 ± 1,62^{c}	85,16 ± 2,44	80,87 ± 2,66^{C}	75,84 ± 2,89^{C}
8	80,02 ± 2,23	71,23 ± 3,05^{ab}	66,38 ± 1,11^{bc}	85,16 ± 2,44	78,44 ± 1,72^{BC}	72,48 ± 2,43^{BC}

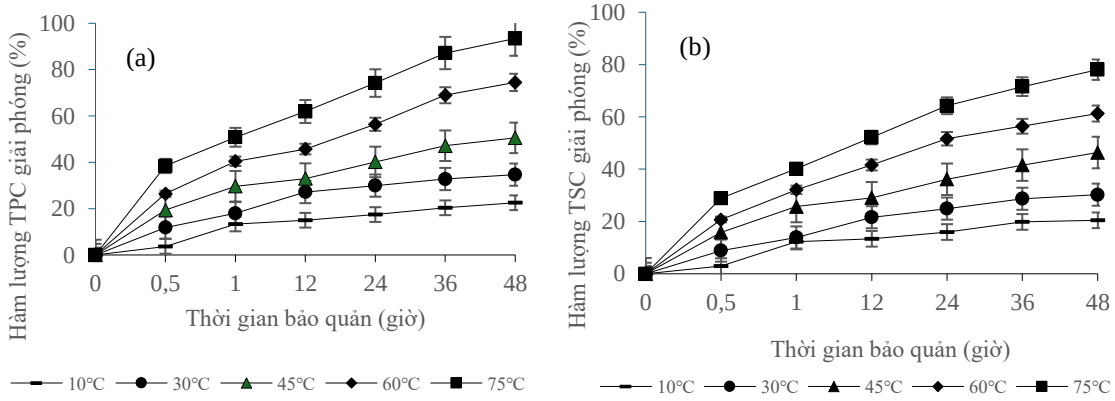
Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ANOVA (α = 0,05).

Tương tự như trường hợp đun nóng, hàm lượng phenolic và saponin trong hạt vi bao sau 7 ngày bảo quản ở nhiệt độ tủ lạnh (10^{o}C) và ở nhiệt độ phòng (30^{o}C) với các điều kiện môi trường pH khác nhau, nhìn chung không có sự khác biệt đáng kể. Khả năng lưu giữ phenolic và saponin ở pH 7 cao nhất ở cả môi trường tủ lạnh và nhiệt độ phòng. Ở điều kiện này, các hoạt chất trong hạt vi bao giảm so với mẫu ban đầu. Cụ thể, các hạt vi bao bảo quản tủ lạnh giảm 6,2% TPC và 5,3% TSC, hạt vi bao bảo quản nhiệt độ phòng giảm gần 17% TPC và 12,3% TSC. Điều này chứng tỏ khi bảo quản ở nhiệt độ lạnh và pH cao, tốc độ mất hoạt chất sinh học chậm hơn so với khi bảo quản ở nhiệt độ phòng và pH thấp.

3.7.5. Động học giải phóng TPC, TSC trong môi trường nước

Quá trình giải phóng TPC, TSC ở các nhiệt độ môi trường nước đã xảy ra theo những khuynh hướng khác nhau theo thời gian (Hình 3.18 và Phụ lục D5.4-B5.7). Nhìn chung, hàm lượng TPC, TSC giải phóng ra môi trường gia tăng theo nhiệt độ. Sau 48 giờ, mẫu hạt trong môi trường nước 10^{o}C giải phóng TPC, TSC từ 20-23%, các mẫu hạt trong môi trường 30^{o}C có hàm lượng các hoạt chất giải phóng dao động 30-35%, trong khi đó ở nhiệt độ 75^{o}C các hoạt chất gần như giải phóng hoàn toàn ra môi trường. Quan sát các mẫu đều cho thấy xu hướng giải phóng các hoạt chất tăng dần cho đến khoảng 12 giờ, sau đó duy trì ổn định cho đến hết 48 giờ. Hiện tượng tốc độ giải phóng tăng dần được quan sát ban đầu, sau đó đạt đến giá trị tiệm cận cũng được báo cáo trước đây (de Farias và cộng sự, 2021; Nguyen C. H. và cộng sự, 2022). Thêm nữa, hiện tượng phóng thích nhanh chóng những hợp chất được bao gói trong các hạt vi bao alginate ra môi trường nước thường xảy ra tại bề mặt viên nang (Belščak-Cvitanović và cộng sự, 2017). Quá trình tạo gel được hình thành ngay lập tức và không thể kiểm soát được do độ hòa tan của alginate trong nước tăng lên, sau đó đạt đến trạng thái ổn định hoặc tăng nhẹ (Sheng và cộng sự, 2021). Nghiên cứu này cũng phát hiện ra rằng HPMC đã tăng cường tính chất phóng thích kéo dài của viên nang alginate bằng cách cung cấp chất nền bên trong đậm đặc hơn. Có thể chitosan đã góp phần tạo nên cấu trúc bền vững và đồng nhất của vi nang alginate-chitosan, từ đó có thể làm chậm sự giải phóng TPC và TSC ra môi trường nước. Li và cộng sự (2015) cũng khẳng định, khi alginate được trộn với chitosan đã kiểm soát được tốc độ giải phóng thuốc đáng kể.

Để nghiên cứu cơ chế giải phóng và dự đoán khả năng phóng thích các hợp chất TPC, TSC trong hạt vi bao từ môi trường nước. Trong nghiên cứu này, các mô hình động học thông thường cho các hạt vi bao đã được áp dụng bao gồm mô hình bậc 0, bậc 1, Hixon-Crosswell, Higuchi và Korsmeyer-Peppas được tính toán thông qua hàm lượng TPC và TSC giải phóng dưới các nhiệt độ khác nhau (Bảng 3.17).



Hình 3.18. Hàm lượng TPC (a), TSC (b) giải phóng ở các nhiệt độ khác nhau

Bảng 3.17. Hệ số hồi quy của các mô hình dự đoán về tốc độ giải phóng TPC, TSC ở các điều kiện nhiệt độ môi trường nước khác nhau

Hợp chất	Mô hình động học	Thông số	Nhiệt độ môi trường (°C)				
			10	30	45	60	75
Phenolic	Bậc 0	K	0,299	0,422	0,575	0,906	1,073
		R^2	0,695	0,783	0,888	0,916	0,935
	Bậc 1	K	0,025	0,018	0,017	0,018	0,017
		R^2	0,417	0,656	0,771	0,806	0,853
	Hixson-Crosswell	K	0,100	0,141	0,192	0,302	0,358
		R^2	0,695	0,783	0,888	0,916	0,935
	Higuchi	K	2,322	3,362	4,337	6,777	8,106
		R^2	0,769	0,924	0,910	0,918	0,962
	Korsmeyer-Peppas	K	7,404	15,611	24,533	33,482	45,559
		n	0,289	0,211	0,171	0,186	0,169
		R^2	0,658	0,945	0,851	0,857	0,922
Saponin	Bậc 0	K	0,287	0,410	0,553	0,760	0,946
		R^2	0,685	0,847	0,892	0,866	0,908
	Bậc 1	K	0,027	0,022	0,018	0,019	0,018
		R^2	0,397	0,706	0,756	0,733	0,803
	Hixson-Crosswell	K	0,096	0,137	0,184	0,253	0,315
		R^2	0,685	0,847	0,892	0,866	0,908
	Higuchi	K	2,227	3,220	4,169	5,877	7,254
		R^2	0,758	0,958	0,912	0,948	0,970
	Korsmeyer-Peppas	K	6.322	11.894	20.718	27.004	35.517
		n	0,314	0,243	0,189	0,205	0,192
		R^2	0,638	0,955	0,851	0,923	0,945

Kết quả ở Bảng 3.17 và Phụ lục D5.8, B5.9 cho thấy, cơ chế giải phóng TPC và TSC phù hợp nhất với mô hình Higuchi và có thể được sử dụng để dự đoán tốc độ giải phóng TPC và TSC, nhờ hệ số R^2 cao. Theo mô hình Higuchi Siepmann & Peppas (2012), quá trình khuếch tán là cơ chế chiếm ưu thế và do đó tỷ lệ giữa lượng hoạt chất tích lũy được giải phóng và căn bậc hai của thời gian thường được xem là một chỉ số đánh giá cơ chế giải phóng hoạt chất có kiểm soát. Quá trình hoà tan các polymer, sự khuếch tán các hợp chất phụ thuộc vào nồng độ giữa chúng với nước và theo căn bậc hai của thời gian giải phóng. Theo cơ chế giải phóng hoạt chất của Higuchi, nồng độ các hoạt chất ban đầu trong hệ thống, C_o, lớn hơn nhiều so với độ hòa tan của các chất ($C_o \gg C_s$). Khi đó, tại bề mặt hấp thụ của viên nang, gradient nồng độ về cơ bản là không đổi. Sau khoảng thời gian Δt, nồng độ của các hoạt chất giải phóng được biểu thị bởi các đường cong tuyến tính. Dưới những điều kiện cụ thể này, Higuchi đã rút ra được mối quan hệ giữa tốc độ giải phóng các hoạt chất và căn bậc hai của thời gian; phân tích toán học dựa trên sự khuếch tán một chiều; độ trương nở hoặc hòa tan của chất mang polymer là không đáng kể; độ khuếch tán của các hoạt chất không đổi (Siepmann & Peppas 2012). Mô hình Higuchi được áp dụng cho quá trình giải phóng thuốc trong các hạt vi bao. Chẳng hạn, Li và cộng sự (2015) đã nghiên cứu ảnh hưởng của các biến số công thức (lượng chitosan-SA, tỷ lệ chitosan/SA, lượng chất pha loãng) lên hằng số tốc độ Higuchi thu được của thuốc trimetazidine hydrochloride hòa tan trong môi trường in vitro. Vu và cộng sự (2023) không chỉ xác định hằng số Higuchi mà còn sử dụng phương trình Korsmeyer–Peppas để đánh giá cơ chế giải phóng của GABA (Gamma-aminobutyric acid) và polyphenol từ mầm đậu nành vi bao đông khô trong gum arabic và whey protein.

Nghiên cứu đã làm rõ hơn về đặc điểm giải phóng và cơ chế giải phóng các hoạt chất TPC, TSC từ hạt vi bao SA-chitosan trong môi trường nước dưới các điều kiện nhiệt độ và thời gian khác nhau. Từ đó, có thể tạo điều kiện tối ưu hóa sản phẩm và tránh hàng loạt thử nghiệm thử và sai gây tốn nhiều thời gian và chi phí. Tuy nhiên, hạn chế đáng chú ý hiện nay trong mô hình toán học giải phóng có kiểm soát là sự phụ thuộc của các nghiên cứu được thực hiện trong các hệ thống thực phẩm mô phỏng. Các sản phẩm thực phẩm là những hệ thống phức tạp, thiếu các cơ chế cơ bản được

xác định rõ ràng. Do đó, cần thiết nghiên cứu cơ chế giải phóng các hoạt chất trong các sản phẩm thực phẩm thực tế (Vu và cộng sự, 2023).

3.8. Ứng dụng dịch trích và vi hạt xáo tam phân trong bánh quy

3.8.1. Ảnh hưởng của tỉ lệ dịch chiết và hạt vi bao đến chất lượng của bánh quy

3.8.1.1. Hàm lượng TPC và TSC sau 24 giờ bảo quản

Sự thay đổi tỷ lệ dịch chiết và hạt vi bao ảnh hưởng đến TPC và TSC trong các mẫu bánh quy (Bảng 3.18 và Bảng 3.19), TPC và TSC trong các mẫu bánh tăng lên ($p < 0,05$) khi gia tăng tỷ lệ bổ sung XTP, xu hướng này cũng được ghi nhận ở các nghiên cứu trước đó (Dordoni và cộng sự, 2019; Indiarto và cộng sự, 2023).

Ở các mẫu đối chứng (mẫu không bổ sung XTP), TPC và TSC ở các mẫu bánh lần lượt là 0,96 mgGAE/g mẫu và 11,03 mg EE/g mẫu. Giá trị này giảm nhẹ so với TPC và TSC đo được trong nguyên liệu bột nhào. Theo Todorovic và cộng sự (2017) hàm lượng polyphenol trong bơ thực vật chiếm 0,27 mg GAE/mL. Trong bột mì nguyên chất, polyphenol có hàm lượng là 241,32 – 283,72 mgGAE/100g (Nadeem và cộng sự, 2017) và saponin chiếm 0,23mg/100g (Ugwuona và cộng sự, 2023). Do đó, thành phần nguyên liệu bột mì và bơ thực là nguồn cung cấp phenolic và saponin trong các mẫu bột nhào. Tuy nhiên, quá trình nướng đã chuyển đổi một phần phenolic và saponin từ dạng liên kết trong nguyên liệu thành dạng tự do trong sản phẩm bánh và dễ bị phân huỷ hơn bởi nhiệt độ cao (Abdel-Aal & Rabalski, 2013). Do đó, TPC và TSC trong các mẫu bánh thấp hơn so với bột nhào.

Khi bổ sung các tỉ lệ XTP ở dạng dịch và dạng vi hạt vào giai đoạn nhào bột, TPC và TSC đo được ở các tỉ lệ cho cả 2 trường hợp là như nhau ($p>0,05$) (Bảng 3.18 và Bảng 3.19). Sau khi nướng thành phẩm thì TPC và TSC có xu hướng biến đổi khác nhau ở mẫu bổ sung dịch trích và mẫu bổ sung hạt vi bao. Cụ thể, những mẫu bánh bổ sung các tỉ lệ dịch trích khác nhau có TPC và TSC giảm đi so với bột nhào tương ứng là 21% và 15%. Trong khi đó, những mẫu bổ sung hạt vi bao có khuynh hướng giảm thất thoát TPC và TSC khi tăng tỉ lệ vi hạt bổ sung từ 7% đến 13%, mức thất thoát ghi nhận được là 11% đối với TPC và 9% đối với TSC. Như vậy, trường hợp

bổ sung vi hạt có mức độ thất thoát TPC và TSC trong quá trình nướng thấp hơn so với trường hợp bổ sung dịch trích khoảng 10% (TPC) và 6% (TSC).

Bảng 3.18. Tổng hàm lượng phenolic trong bánh quy với các công thức bổ sung XTP

Mẫu bổ sung dịch chiết				Mẫu bổ sung hạt vi bao			
Tỉ lệ bổ sung (%w/w)	Bột nhào	Bánh quy	Δ (%)	Tỉ lệ bổ sung (%)	Bột nhào	Bánh quy	Δ (%)
	TPC (mgGAE/g mẫu)				TPC (mgGAE/g mẫu)		
0	1,12 ± 0,02^{a}	0,96 ± 0,02^{A}	14,28 ± 0,32^{A}	0	1,12 ± 0,02^{a}	0,96 ± 0,02^{A}	14,28 ± 0,33^{C}
1	2,72 ± 0,04^{b}	2,13 ± 0,04^{B}	21,69 ± 0,40^{B}	2	2,86 ± 0,04^{b}	2,49 ± 0,04^{B}	12,94 ± 0,64^{B}
3	3,94 ± 0,02^{c}	3,11 ± 0,03^{C}	21,07 ± 0,57^{B}	4	4,00 ± 0,05^{c}	3,52 ± 0,06^{C}	12,00 ± 0,57^{B}
5	4,77 ± 0,03^{d}	3,76 ± 0,02^{D}	21,17 ± 0,62^{B}	7	4,88 ± 0,04^{d}	4,30 ± 0,02^{D}	11,89 ± 0,25^{AB}
7	5,93 ± 0,04^{e}	4,68 ± 0,04^{E}	21,07 ± 0,45^{B}	10	6,03 ± 0,03^{e}	5,31 ± 0,04^{E}	11,94 ± 0,72^{AB}
9	7,42 ± 0,04^{f}	5,86 ± 0,03^{F}	21,02 ± 0,38^{B}	13	7,85 ± 0,03^{f}	6,96 ± 0,03^{F}	11,33 ± 0,82^{A}

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ANOVA (α = 0,05). Δ (%): tỉ lệ % thay đổi từ bột nhào sang bánh.

Vi bao bằng sodium alginate và chitosan đã giúp làm giảm quá trình phân hủy phenolic và saponin ở công đoạn nướng bánh quy. Dordoni và cộng sự (2019) cũng phát hiện hàm lượng polyphenol của bánh quy bổ sung hạt vi bao chứa dịch chiết vỏ nho giảm 16,49% khi nướng ở 180^{o}C; trong khi đó, bánh quy bổ sung dịch chiết vỏ nho không được vi bọc giảm tới 40%. Có thể nhận thấy hiệu quả bảo vệ của các vật liệu màng bao đã giúp các hoạt chất sinh học giảm bớt các tác động khắc nghiệt từ môi trường trong chế biến thực phẩm như nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm, oxy không khí…

Bảng 3.19. Tổng hàm lượng saponin trong bánh quy với các công thức bổ sung XTP

Mẫu bổ sung dịch chiết				Mẫu bổ sung hạt vi bao			
Tỉ lệ bổ sung (%w/w)	Bột nhào	Bánh quy	Δ (%)	Tỉ lệ bổ sung (%)	Bột nhào	Bánh quy	Δ (%)
	TSC (mgEE/g mẫu)				TSC (mgEE/g mẫu)		
0	12,28 ± 0,13^{a}	11,03 ± 0,42^{a}	10,18 ± 0,22^{A}	0	12,28 ± 0,13^{a}	11,03 ± 0,42^{a}	10,18 ± 0,22^{B}
1	39,97 ± 0,46^{b}	33,97 ± 0,45^{b}	15,01 ± 0,37^{B}	2	40,28 ± 0,33^{b}	36,15 ± 0,56^{b}	10,25 ± 0,44^{B}
3	47,72 ± 0,55^{c}	40,46 ± 0,36^{c}	15,21 ± 0,62^{B}	4	52,94 ± 0,42^{c}	47,56 ± 0,47^{c}	10,16 ± 0,37^{B}
5	58,77 ± 0,37^{d}	49,85 ± 0,64^{d}	15,18 ± 0,36^{B}	7	63,88 ± 0,64^{d}	57,58 ± 0,63^{d}	9,86 ± 0,34^{AB}
7	73,28 ± 0,54^{e}	62,18 ± 0,74^{e}	15,15 ± 0,55^{B}	10	79,52 ± 0,71^{e}	72,18 ± 0,55^{e}	9,23 ± 0,41^{A}
9	96,72 ± 0,73^{f}	82,11 ± 0,76^{f}	15,11 ± 0,68^{B}	13	95,77 ± 0,53^{f}	87,15 ± 0,72^{f}	9,00 ± 0,62^{A}

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ANOVA (α = 0,05). Δ (%): tỉ lệ % thay đổi từ bột nhào sang bánh.

3.8.1.2. Độ cứng sản phẩm sau 24 giờ bảo quản

Sự thay đổi tỷ lệ bổ sung dịch trích và vi hạt XTP có ảnh hưởng đáng kể ($p < 0,05$) đến độ cứng của bánh quy, như trong Bảng 3.20.

Bảng 3.20. Độ cứng của bánh quy được đánh giá khi bổ sung dịch trích và vi hạt XTP

Mẫu bổ sung dịch chiết		**Mẫu bổ sung vi hạt**	
Tỉ lệ bổ sung (%w/w)	**Độ cứng (N)**	**Tỉ lệ bổ sung (%w/w)**	**Độ cứng (N)**
0	$17,50 \pm 0,55^{a}$	0	$17,50 \pm 0,55^{A}$
1	$21,06 \pm 0,18^{b}$	2	$25,71 \pm 0,5^{B}$
3	$22,78 \pm 0,41^{c}$	4	$26,91 \pm 0,13^{C}$
5	$24,90 \pm 0,16^{e}$	7	$28,53 \pm 0,48^{D}$
7	$24,73 \pm 0,28^{e}$	10	$28,99 \pm 0,12^{D}$
9	$23,06 \pm 0,38^{d}$	13	$26,85 \pm 0,17^{C}$

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Độ cứng của các mẫu bánh quy có xu hướng tăng lên khi tăng lượng dịch chiết XTP. Ở mẫu bổ sung 9% dịch chiết, bánh có độ cứng tăng hơn 54,63% và mẫu bổ sung 13% hạt vi bao có độ cứng gia tăng 76,29% so với mẫu đối chứng.

TPC và TSC có thể đã ảnh hưởng đến kết cấu của bánh quy. Theo Girard & Awika (2020), polyphenol có thể đóng vai trò như chất khử liên kết disulfide và tăng nhóm thiol cũng như các liên kết cộng hóa trị khác có thể ảnh hưởng đến tính lưu biến của bột, bao gồm độ nhớt, tính lưu biến và độ đàn hồi. Các hợp chất polyphenol cũng có thể ức chế các hạt tinh bột hấp thụ nước trong quá trình hồ hóa vì các polyphenol ưa nước có thể cạnh tranh nước với tinh bột (Xu và cộng sự, 2019), do đó độ cứng của sản phẩm sẽ cao hơn khi TPC trong sản phẩm tăng lên (Indiarto và cộng sự, 2023).

Maltodextrin được cho rằng có thể làm tăng độ cứng của bánh quy vì có thể tạo thành gel trong nước. Một phần nước sẽ cố định và làm giảm đáng kể lượng nước có sẵn cho gluten thực hiện quá trình hydrat hóa, làm tăng độ cứng của bánh quy (Mosafa và cộng sự, 2017). Nó tương tự với tính chất của alginate và chitosan có thể tạo gel với nước, làm giảm lượng nước có sẵn, giảm quá trình hydrat hóa của gluten

bột mì và do đó làm tăng độ cứng của bánh quy. Có thể vì vậy, khi bổ sung hạt vi bao đã làm gia tăng độ cứng của bánh hơn so với trường hợp bánh được bổ sung dịch chiết. Một số nghiên cứu trước đây cũng đã ghi nhận trường hợp tương tự khi tăng lượng hạt vi bao chứa dịch trích từ vỏ măng cụt (Indiarto và cộng sự, 2023) hay tăng dịch chiết lá oliu (Paciulli và cộng sự, 2023) đều làm cho bánh trở nên cứng hơn.

Ở các mẫu bánh bổ sung từ 7% dịch chiết và 8% hạt vi bao trở lên thì bánh có xu hướng mềm hơn so với các mẫu trước đó. Hiện tượng giảm độ cứng có thể do lượng dịch chiết bổ sung khá lớn, dẫn đến thành phẩm bánh vẫn còn độ ẩm khá cao. Král và cộng sự (2021) khi bổ sung dịch chiết thảo dược (đinh hương, quế, bột hạt nho và dịch chiết lá bạc hà) từ 1 – 10% cũng ghi nhận hiện tượng giảm độ cứng của bánh.

3.8.1.3. Màu sắc của sản phẩm sau 24 giờ bảo quản

Bảng 3.21 và Bảng 3.22 cho thấy rằng sự thay đổi tỷ lệ bổ sung dịch trích và hạt vi bao XTP trong công thức bánh đều khác biệt thống kê đối với các thông số màu sắc. Giá trị L* của mẫu bổ sung dịch trích khác biệt đáng kể, trong khi đó các mẫu bổ sung từ 7% hạt vi bao trở lên không khác biệt đáng kể về độ sáng. Kết quả cho thấy, càng tăng hàm lượng XTP thì giá trị L* của bánh quy càng thấp và màu sắc của bánh quy càng đậm. Mẫu bánh quy bổ sung dịch chiết có màu sắc đậm hơn và giá trị L* thấp hơn so với mẫu bánh bổ sung hạt vi bao.

Giá trị a* (độ đỏ) ở các tỷ lệ bổ sung dịch trích khác biệt đáng kể ($p < 0,05$), tuy nhiên ở mẫu bánh bổ sung hạt vi bao từ 7% trở lên mới có sự khác biệt. Giá trị a* của các mẫu có màu tối hơn (giá trị L* thấp hơn) sẽ lớn hơn. Theo Murata (2021), đó là do sắc tố đỏ được tạo ra bởi phản ứng hóa nâu và maillard xảy ra trong quá trình nướng bánh khi tạo ra sắc tố melanoidin màu nâu. Phản ứng maillard phản ứng hóa nâu phi enzyme xảy ra giữa carbohydrate dưới dạng đường khử (có trong nguyên liệu bột mì, đường) và các nhóm amin của protein (trong nguyên liệu trứng) ở nhiệt độ cao. Ngoài ra, giá trị b* (độ vàng) cũng tăng lên khi tỷ lệ bổ sung dịch trích và hạt vi bao tăng lên. Lá của cây XTP có chứa các hợp chất flavan-3,4-diols và tanin cũng góp phần tạo nên sắc tố màu vàng đến nâu. Tuy nhiên, ở các mẫu bánh bổ sung càng nhiều dịch chiết XTP thì không có sự khác biệt về giá trị này.

Bảng 3.21. Màu sắc của bánh quy bổ sung dịch trích ở các tỷ lệ khác nhau

Mẫu bổ sung dịch chiết (%w/w)	L*	a*	b*	ΔE
Đối chứng	60,92 ± 0,03^{f}	6,57 ± 0,01^{a}	26,46 ± 0,02^{a}	-
1	60,65 ± 0,05^{e}	6,62 ± 0,03^{ab}	26,58 ± 0,01^{b}	0,300 ± 0,0005^{a}
3	60,42 ± 0,02^{d}	6,67 ± 0,05^{c}	26,73 ± 0,03^{c}	0,416 ± 0,001^{b}
5	60,29 ± 0,01^{c}	6,74 ± 0,03^{d}	26,79 ± 0,03^{d}	0,731 ± 0,001^{c}
7	59,97 ± 0,03^{b}	6,88 ± 0,04^{e}	26,82 ± 0,05^{de}	1,062 ± 0,0005^{d}
9	59,86 ± 0,05^{a}	6,95 ± 0,04^{f}	26,86 ± 0,02^{e}	1,195 ± 0,001^{e}

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ANOVA (α = 0,05).

Bảng 3.22. Màu sắc của bánh quy kết hợp với hạt vi bao XTP ở các tỷ lệ khác nhau

Mẫu bổ sung vi hạt (%w/w)	L*	a*	b*	ΔE
Đối chứng	60,99 ± 0,03^{e}	6,52 ± 0,01^{a}	26,43 ± 0,05^{a}	-
2	60,76 ± 0,05^{d}	6,58 ± 0,03^{b}	26,48 ± 0,02^{ab}	0,251 ± 0,0005^{a}
4	60,68 ± 0,04^{c}	6,60 ± 0,02^{b}	26,49 ± 0,02^{b}	0,244 ± 0,005^{b}
7	60,48 ± 0,02^{b}	6,66 ± 0,01^{c}	26,56 ± 0,03^{c}	0,460 ± 0,002^{c}
10	60,42 ± 0,04^{ab}	6,75 ± 0,05^{d}	26,56 ± 0,04^{c}	0,541 ± 0,001^{d}
13	60,35 ± 0,05^{a}	6,86 ± 0,05^{e}	26,57 ± 0,01^{c}	0,649 ± 0,001^{e}

Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ANOVA (α = 0,05).

Các mẫu bánh sau khi ra khỏi lò trong 24 giờ được đánh giá có sự khác biệt thống kê về màu sắc (ΔE). ΔE của mẫu bổ sung dịch trích cao hơn so với mẫu bổ sung hạt vi bao. Tại mẫu bổ sung 9% dịch trích giá trị ΔE là 1,195 cao hơn gấp 1,84 lần so với mẫu bổ sung 13% hạt vi bao, cho thấy màu sắc của mẫu bổ sung dịch trích đậm hơn so với mẫu bổ sung hạt vi bao. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Indiarto và cộng sự (2023) nhận thấy rằng khi tăng lượng dịch chiết vỏ măng cụt thì chỉ số

L* càng giảm, a* và b* càng tăng bởi sự hiện diện của α- mangosteen và β-mangosteen, có thể góp phần tạo nên màu vàng. Ngoài ra vỏ măng cụt cũng chứa các hợp chất tương tự với XTP dẫn đến tạo nên sắc tố vàng đến nâu. Cùng với đó, Mai và cộng sự (2022) cũng đã cho thấy khi tăng tỷ lệ bổ sung bột vỏ thanh long thì làm cho giá trị L* giảm, giá trị a* và b* tăng lên.



Hình 3.19. Hình dạng bánh quy bổ sung dịch trích (D) và vi hạt (H) XTP

Hình 3.19 cho thấy các tỷ lệ bổ sung dịch trích và vi hạt XTP có ảnh hưởng đến các đặc tính của bánh về màu sắc khi đo bằng máy. Tuy nhiên giá trị $\Delta E < 5$ nên sẽ không thể cảm nhận được bằng mắt thường, do đó không ảnh hưởng đến khả năng chấp nhận chung của bánh quy về mặt cảm quan.

3.8.1.4. Hoạt độ nước của bánh sau 24 giờ bảo quản

Đánh giá hoạt độ nước của bánh tại các tỷ lệ bổ sung dịch trích và vi hạt XTP khác nhau được thể hiện ở Bảng 3.23. Kết quả cho thấy mẫu bánh quy đối chứng sau khi nướng có hoạt độ nước cao hơn đáng kể (0,353 ± 0,001) ($p < 0,05$) so với các mẫu bánh được bổ sung dịch trích và hạt vi bao. Trường hợp này cũng được ghi nhận tương tự với nghiên cứu của Tamsone và cộng sự (2020), các tác giả này cũng nhận thấy mẫu bánh không bổ sung dịch chiết lá cải ngựa (*Armoracia rusticana* L.) có giá trị hoạt độ nước cao gấp 2 lần so với mẫu bổ sung bột lá (0,188 ± 0,001) và vi hạt (0,177 ± 0,001).

Nhìn chung, tất cả các mẫu bánh đều có hoạt độ nước <0,6, thể hiện sự an toàn về mặt vi sinh. Ở các mẫu bổ sung hạt vi bao có giá trị hoạt độ nước thấp hơn nhiều

(0,158 ± 0,001) so với mẫu bổ sung dịch trích (0,180 ± 0,001). Qua đó cũng thể hiện rằng khi bổ sung hạt vi bao sẽ giúp cho hoạt độ nước có giá trị thấp hơn so với bổ sung trực tiếp dịch trích, từ đó có lợi thế hơn về mặt bảo quản. Mẫu bánh bổ sung 13% hạt vi bao cho thấy giá trị hoạt độ nước tăng lên đáng kể so với các mẫu còn lại ($p < 0,05$). Trong khi đó, từ tỷ lệ dịch chiết bổ sung 7% trở lên các mẫu bánh đã có sự biến đổi rõ rệt về hoạt độ nước

Bảng 3.23. Hoạt độ nước của bánh quy bổ sung dịch trích và hạt vi bao XTP

Mẫu bổ sung dịch chiết		**Mẫu bổ sung hạt vi bao**	
Tỉ lệ bổ sung (%w/w)	**Hoạt độ nước (a_w)**	**Tỉ lệ bổ sung (%w/w)**	**Hoạt độ nước (a_w)**
0	$0,353 \pm 0,001^{e}$	0	$0,353 \pm 0,001^{D}$
1	$0,171 \pm 0,002^{a}$	2	$0,151 \pm 0,001^{A}$
3	$0,172 \pm 0,001^{ab}$	4	$0,151 \pm 0,002^{A}$
5	$0,174 \pm 0,001^{b}$	7	$0,153 \pm 0,002^{AB}$
7	$0,177 \pm 0,002^{c}$	10	$0,155 \pm 0,001^{B}$
9	$0,180 \pm 0,001^{d}$	13	$0,158 \pm 0,001^{C}$

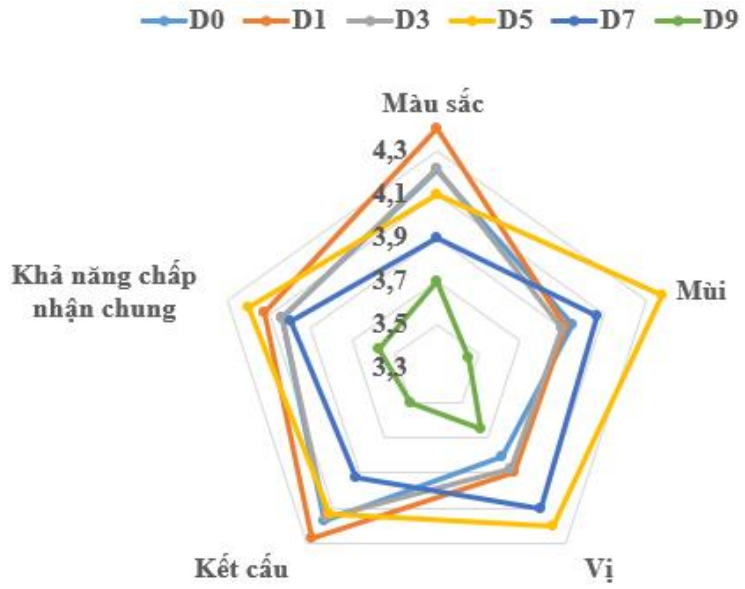
Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi các chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

3.8.1.5. Đánh giá cảm quan của bánh sau 24 giờ bảo quản

Để khẳng định thêm tác động của việc bổ sung dịch chiết và hạt vi bao XTP đến chất lượng bánh quy, các đánh giá cảm quan về màu sắc, mùi, vị và cấu trúc cũng đã được thực hiện trong nghiên cứu trên các mẫu bổ sung dịch trích (1, 3, 5, 7, 9%) và các mẫu bổ sung vi hạt (2, 4, 7, 10, 13). Các kết quả phân tích được thể hiện trong Hình 3.20 và Hình 3.21.

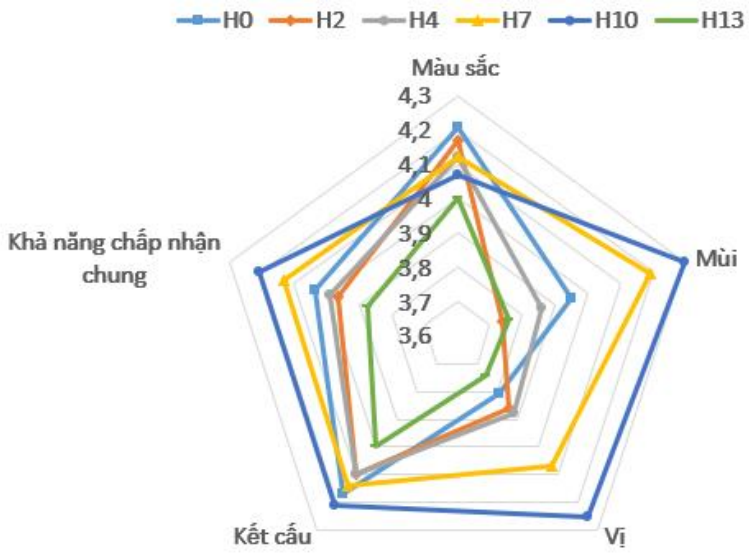
Các thuộc tính về màu sắc và kết cấu (Hình 3.20) cho thấy rằng việc bổ sung dịch trích XTP đã tác động nhiều nhất đến màu sắc. Bánh bổ sung 1% dịch chiết được các cảm quan viên đánh giá cao màu sắc ở tỷ lệ này. Mùi và vị ở các mẫu bánh bổ sung 5% dịch trích đều có điểm số gần tương đương nhau. Về mặt kết cấu, các mẫu bánh có tỷ lệ dịch trích 1, 3, và 5% gần như được đánh giá ngang điểm nhau và tương

đương mẫu đối chứng (D0). Biểu đồ thể hiện rõ mẫu bánh bổ sung 5% dịch chiết có điểm số chấp nhận cao nhất.



Hình 3.20. Biểu đồ mạng nhện về các thuộc tính cảm quan của bánh quy bổ sung dịch trích XTP

(Chú thích: D0, D1, D3, D5, D7, D9: dịch chiết bổ sung tương ứng 0, 1, 3, 5, 7, 9%w/w)



Hình 3.21. Biểu đồ mạng nhện về các thuộc tính cảm quan của bánh quy bổ sung hạt vi bao XTP

(Chú thích: H0, H2, H4, H7, H10, H13: hạt vi bao bổ sung tương ứng 0, 2, 4, 7, 10, 13%w/w)

Các thuộc tính về màu sắc và kết cấu (Hình 3.21) đã cho thấy rằng việc bổ sung 2 – 13% hạt vi bao XTP không làm ảnh hưởng đến hai đặc điểm này. Mùi và vị ở các mẫu bánh có tỷ lệ hạt vi bao bổ sung 2, 4 và 13% đều có số điểm thấp tương đương nhau. Các mẫu bánh chứa 7% và 10% hạt vi bao cho thấy các cảm quan viên đều ưa thích cho cả 4 tính chất màu, mùi, vị và cấu trúc sản phẩm. Tuy nhiên mẫu 10% hạt vi bao được chấp nhận chung cao hơn so với mẫu 7%.

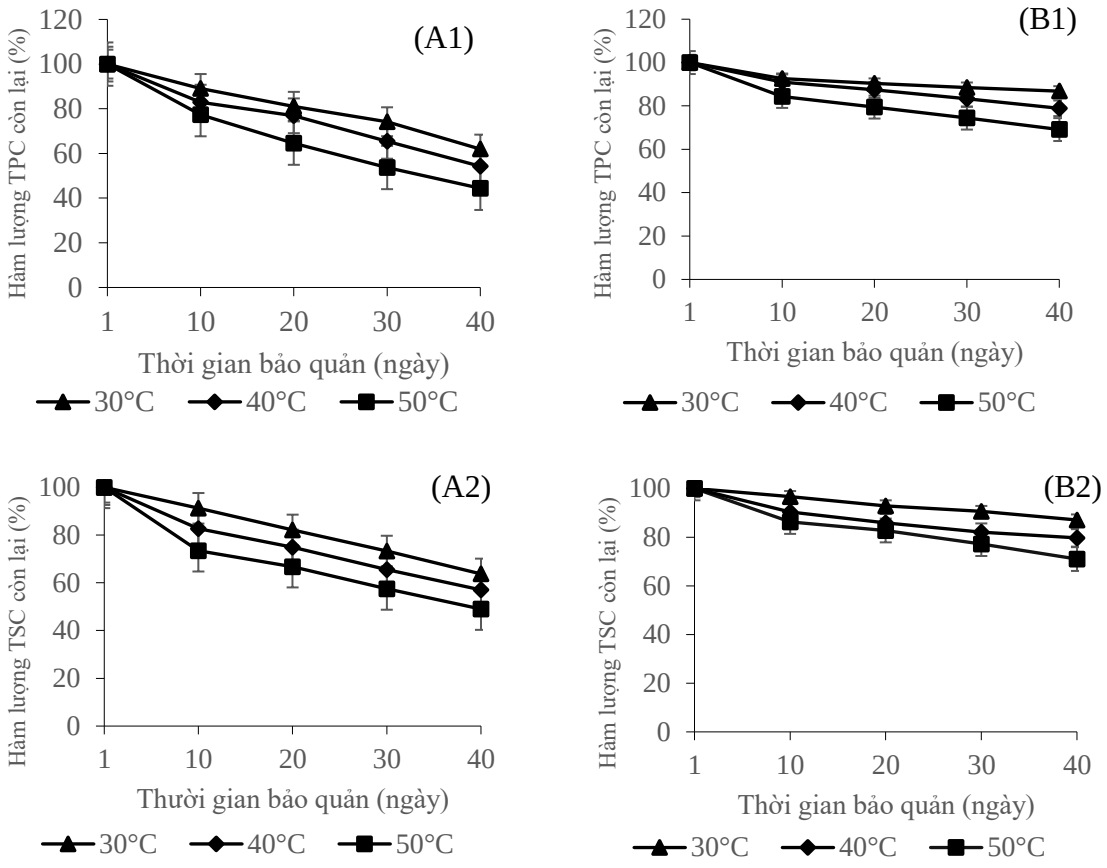
Dựa vào các chỉ tiêu hóa lý và đánh giá cảm quan, bánh quy được bổ sung 10% hạt vi bao và 5% dịch chiết cho các đặc tính mong muốn nhất của sản phẩm. Kế sau mẫu bánh bổ sung 13% hạt vi bao thì mẫu chứa 10% hạt vi bao có TPC và TSC cao nhất so với các mẫu còn lại (Bảng 3.18 và Bảng 3.19). TPC và TSC tại mẫu bánh bổ sung 10% hạt vi bao có TPC và TSC cao hơn đáng kể so với mẫu bổ sung 5% dịch chiết. Ngoài ra, kết quả đánh giá cảm quan cho thấy mẫu bánh chứa 10% hạt vi bao được các cảm quan viên chấp nhận và ưa thích nhất khi so sánh với 4 mẫu còn lại. Vì vậy mẫu bánh bổ sung 10% vi hạt và 5% dịch chiết được lựa chọn để đánh giá trong nghiên cứu tiếp theo.

3.8.2. Đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết và hạt vi bao xáo tam phân đến chất lượng của bánh quy trong quá trình bảo quản ở điều kiện gia tốc lão hóa

3.8.2.1 Hàm lượng TPC và TSC sau 40 ngày bảo quản ở 30^{o}C, 40^{o}C và 50^{o}C

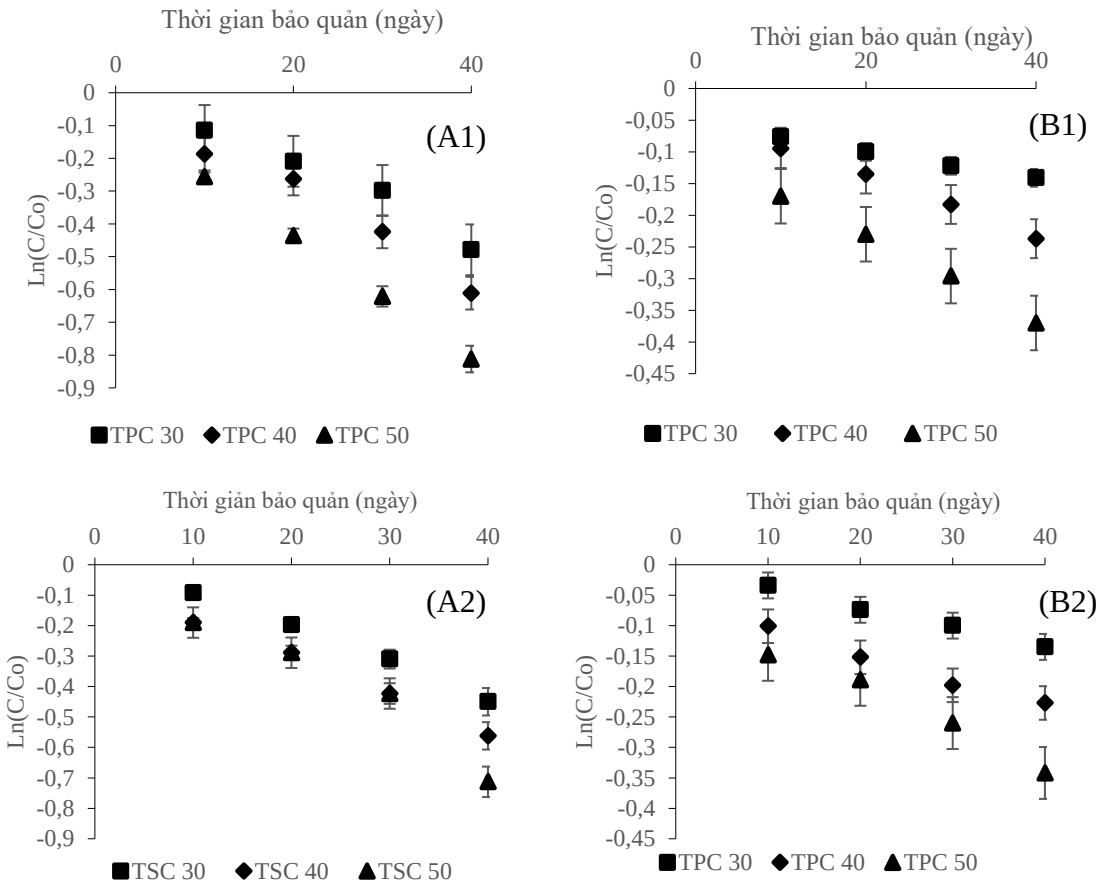
Mẫu bánh bổ sung 5% dịch chiết và 10% hạt vi bao được chọn để tiếp tục khảo sát sự biến đổi TPC và TSC sau 40 ngày bảo quản ở 30^{o}C, 40^{o}C và 50^{o}C được thể hiện ở Hình 3.22.

Qua Hình 3.22 và Phụ lục D7.1-B7.12 có thể thấy rằng TPC và TSC trong các mẫu bánh quy biến đổi khác nhau ($p < 0,05$) theo thời gian tại các nhiệt độ bảo quản khác nhau. Tại nhiệt độ 30^{o}C, sau 40 ngày bảo quản, trong các mẫu bổ sung dịch trích, TPC và TSC còn lại 62-64% so với ban đầu. Trong khi đó, ở các mẫu bổ sung hạt vi bao XTP, hàm lượng hoạt chất trong bánh còn lại 86-87% so với mẫu đối chứng. Tương tự tại các nhiệt độ bảo quản 40^{o}C và 50^{o}C, các mẫu bánh bổ sung dịch trích có xu hướng giảm mạnh TPC và TSC so với mẫu bổ sung vi hạt.



Hình 3.22. Hàm lượng TPC, TSC của bánh quy bổ sung dịch trích (A1, A2) và hạt vi bao (B1, B2) sau 40 ngày bảo quản tại các mốc nhiệt độ khác nhau

Có thể thấy trong Hình 3.23, sự phân huỷ TPC, TSC ở các mẫu bánh trong quá trình bảo quản tuân theo phương trình phản ứng bậc 1. Kết quả này tương tự với các nghiên cứu trước đây (Kyi và cộng sự, 2005; Shi và cộng sự, 2009; Mba và cộng sự, 2019). Bảng 3.24 và Bảng 3.25 thể hiện các thông số động học của quá trình suy thoái phenolic và saponin trong các mẫu bánh bổ sung dịch trích và hạt vi bao tại các điều kiện bảo quản khác nhau.



Hình 3.23. Biểu đồ phân hủy bậc nhất của TPC, TSC của bánh quy bổ sung dịch trích (A1, A2) và hạt vi bao (B1, B2) sau 40 ngày bảo quản

Nhìn chung, nhiệt độ bảo quản càng cao thì tốc độ phân hủy càng nhanh, lượng saponin và phenolic thất thoát càng nhiều. Ở nhiệt độ cao, các chất hoạt chất sinh học có thể chuyển thành các dạng đồng phân khác nhau hoặc bị phân hủy (Gengatharan và cộng sự, 2016), điều này giải thích hiện tượng suy giảm mạnh TPC và TSC trong bánh tại các mức nhiệt cao. Kết quả này một lần nữa khẳng định tính nhạy cảm với nhiệt của các hoạt chất sinh học trong đó có phenolic, Fang & Bhandari (2011) đã nhận thấy các hợp chất này bắt đầu biến đổi khi ở nhiệt độ bảo quản 40°C. Tốc độ phân hủy phenolic của mẫu bổ sung dịch trích ở 30°C (k=0,0120 ngày^{-1}) thấp hơn 2 lần so với mẫu bảo quản ở 50°C (k=0,0203 ngày^{-1}). Tuy nhiên tốc độ phân huỷ saponin ở các mẫu bổ sung dịch chiết ở 30°C (k=0,0113 ngày^{-1}) chỉ thấp hơn 1,58 lần so với mẫu bảo quản ở 50°C (k=0,0178 ngày^{-1}). Có thể thấy, so với các hợp chất

phenolic thì saponin tương đối bền vững hơn dưới tác động của nhiệt độ và thời gian bảo quản.

Kết quả động học suy thoái cũng cho thấy, tốc độ phân hủy phenolic trong các mẫu bổ sung dịch trích ở 30°C (k=0,0120 ngày^{-1}) cao hơn gấp 3,4 lần so với mẫu bổ sung hạt vi bao (k=0,0035 ngày^{-1}) trong cùng nhiệt độ (Bảng 3.24). Khuynh hướng biến đổi tương tự cũng được ghi nhận ở thành phần saponin trong bánh (Bảng 3.25).

Bảng 3.24. Động học suy thoái của TPC trong mẫu bánh sau 40 ngày bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau

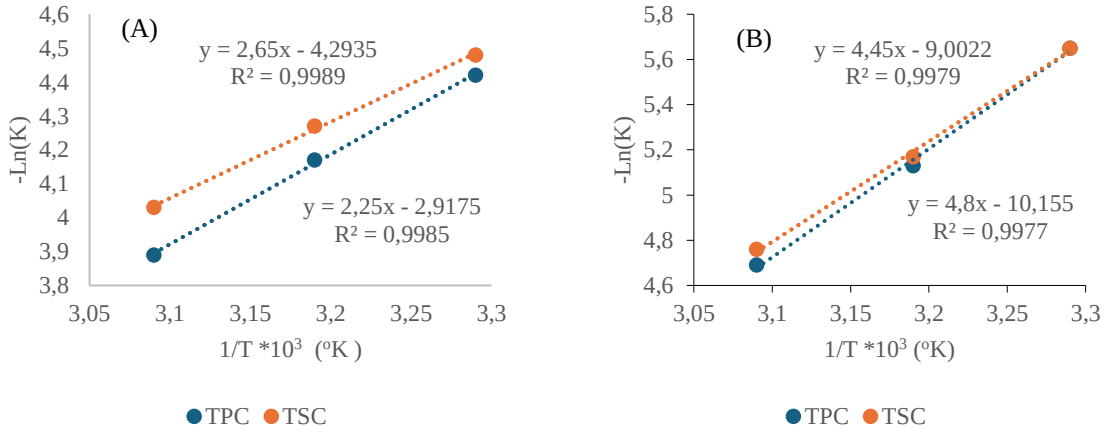
Mẫu bổ sung dịch trích				**Mẫu bổ sung hạt vi bao**			
Nhiệt độ bảo quản (°C)	**Hằng số tốc độ suy thoái k (ngày $^{-1}$)**	**Một nửa thời gian bảo quản (ngày)**	**Năng lượng hoạt hoá (E_a) (kcal.mol^{-1})**	**Nhiệt độ bảo quản (°C)**	**Hằng số tốc độ suy thoái k (ngày $^{-1}$)**	**Một nửa thời gian bảo quản (ngày)**	**Năng lượng hoạt hoá (E_a) (kcal.mol^{-1})**
30	0,0120	58		30	0,0035	196	
40	0,0153	45	5,27	40	0,0059	117	8,90
50	0,0203	34		50	0,0092	75	

Bảng 3.25. Động học suy thoái của TSC trong mẫu bánh sau 40 ngày bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau

Mẫu bổ sung dịch trích				**Mẫu bổ sung hạt vi bao**			
Nhiệt độ bảo quản (°C)	**Hằng số tốc độ suy thoái k (ngày $^{-1}$)**	**Một nửa thời gian bảo quản (ngày)**	**Năng lượng hoạt hoá (E_a) (kcal.mol^{-1})**	**Nhiệt độ bảo quản (°C)**	**Hằng số tốc độ suy thoái k (ngày $^{-1}$)**	**Một nửa thời gian bảo quản (ngày)**	**Năng lượng hoạt hoá (E_a) (kcal.mol^{-1})**
30	0,0113	62		30	0,0035	200	
40	0,0140	49	4,47	40	0,0057	122	8,84
50	0,0178	39		50	0,0086	81	

Hơn nữa, năng lượng hoạt hoá cho quá trình phân huỷ TPC và TSC trong bánh bổ sung dịch chiết (tương ứng là 5,27 và 4,47 kcal.mol^{-1}) và bánh bổ sung hạt vi bao (tương ứng là 8,90 và 8,84 kcal.mol^{-1}) được tính toán từ độ dốc của biểu đồ Arrhenius

(Hình 3.24) cho thấy sự phụ thuộc vào nhiệt độ của phenolic cũng tương tự như saponin. Năng lượng hoạt hoá cho quá trình phân huỷ TPC, TSC ở các mẫu bánh bổ sung hạt vi bao cao hơn đáng kể so với các mẫu bánh bổ sung dịch chiết. Kết quả cho thấy sự suy giảm các hợp chất này ở mẫu bánh bổ sung dịch chiết do nhiệt độ gây ra rõ rệt hơn.



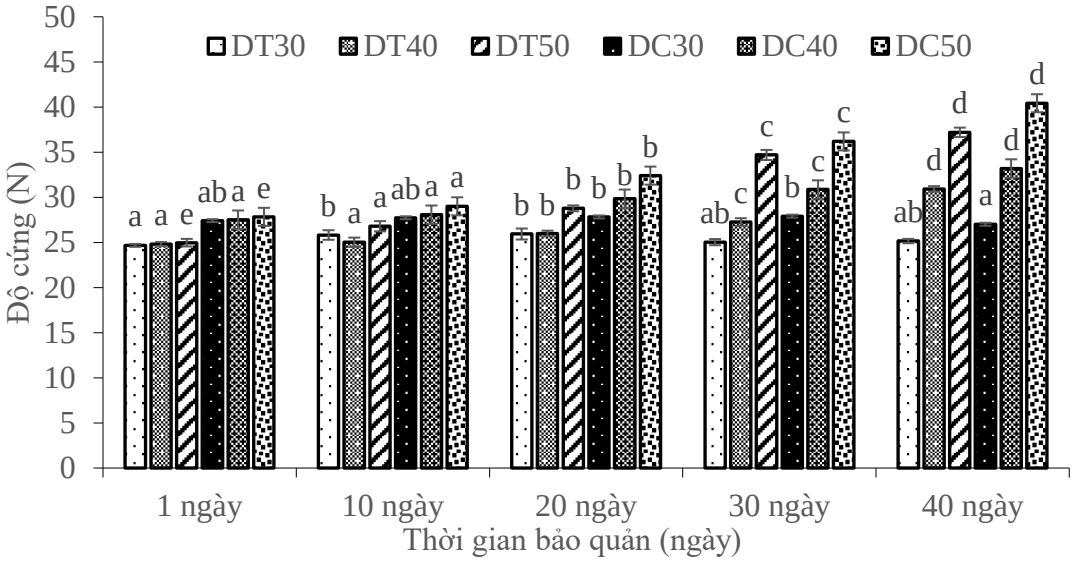
Hình 3.24. Biểu đồ Arrhenius cho sự phân hủy của TPC, TSC trong bánh quy bổ sung dịch trích (A) và bánh quy bổ sung hạt vi bao (B) ở các nhiệt độ bảo quản khác nhau

Có thể thấy rằng, việc bổ sung hạt vi bao sẽ tránh làm thất thoát phenolic và saponin có trong bánh quy, hạn chế các điều kiện bất lợi như các phản ứng nâu hóa, phản ứng oxy hóa… giữ cho bánh bảo quản được lâu hơn so với mẫu bổ sung đơn thuần dịch trích. Tại 30°C, một nửa thời gian bảo quản các hợp chất phenolic và saponin của bánh bổ sung vi hạt lần lượt là 196 ngày và 200 ngày. Trong khi đối với trường hợp bổ sung dịch chiết, bánh chỉ có thời gian là 58 ngày và 62 ngày.

3.8.2.2. Độ cứng của bánh quy sau 40 ngày bảo quản ở 30°C, 40°C và 50°C

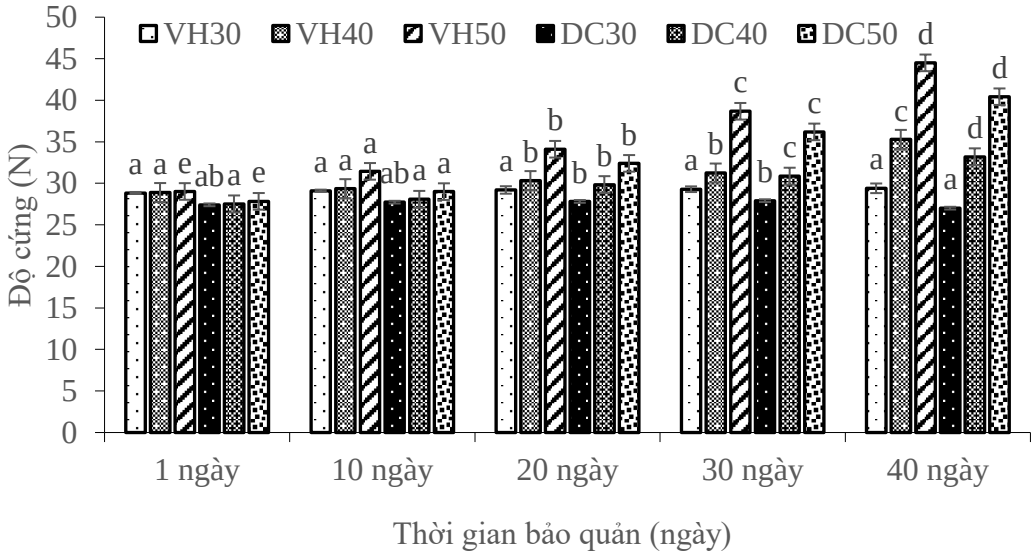
Sự thay đổi nhiệt độ và thời gian bảo quản đã tác động đến độ cứng của bánh quy được thể hiện ở Hình 3.25, 3.26 và Phụ lục D7.13-B7.15. Khi nhiệt độ càng cao thì độ cứng bánh có xu hướng tăng theo. Tại 30°C, mẫu bánh bổ sung dịch trích và vi hạt có giá trị độ cứng lần lượt là 25,15 ± 0,24N và 29,40 ± 0,58N sau 40 ngày bảo quản, trong khi đó các mẫu bánh ở 50°C có độ cứng cao gấp 1,5 lần cho cả trường

hợp bổ sung dịch trích và vi hạt cùng thời gian bảo quản. Ở nhiệt độ càng cao, quá trình thoái hóa tinh bột diễn càng ra mạnh hơn.



Hình 3.25. Độ cứng bánh quy bổ sung dịch trích sau 40 ngày bảo quản

Chú thích: DT30, DT40, DT50: mẫu bánh bổ sung dịch trích bảo quản ở 30, 40 và 50°C; DC30, DC40, DC50: mẫu bánh đối chứng – không bổ sung, bảo quản ở 30, 40 và 50°C. Giá trị cột với các chữ cái trên mỗi cột cùng nền khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05)



Hình 3.26. Độ cứng bánh quy bổ sung hạt vi bao sau 40 ngày bảo quản

Chú thích: VH30, VH40, VH50: mẫu bánh bổ sung hạt vi bao bảo quản ở 30, 40 và 50°C; DC30, DC40, DC50: mẫu bánh đối chứng – không bổ sung, bảo quản ở 30, 40 và 50°C. Giá trị cột với các chữ cái trên mỗi cột cùng nền khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05).

Ở 30^{o}C các mẫu bánh hầu như không có sự thay đổi đáng kể về độ cứng ($p > 0,05$) sau 40 ngày bảo quản. Tuy nhiên, ở nhiệt độ bảo quản cao hơn (40^{o}C, 50^{o}C) các mẫu bánh đã có sự phân hoá rõ rệt về độ cứng ($p < 0,05$) theo thời gian. Độ cứng của bánh quy tăng lên trong quá trình bảo quản ở nhiệt độ tương đối cao có thể do nhiệt độ làm đẩy nhanh quá trình sắp xếp lại phân tử giữa các phân tử tinh bột, chẳng hạn như amylose-amylose và amylose-amylopectin, và làm cho sự tương tác giữa tinh bột và protein trở nên yếu hơn, do đó cấu trúc bánh cứng hơn (Chung và cộng sự, 2014).

3.8.2.3. Màu sắc bánh quy sau 40 ngày bảo quản ở 30^{o}C, 40^{o}C và 50^{o}C

Màu sắc của bánh là một khía cạnh thị giác quan trọng có thể thu hút người tiêu dùng. Do đó, giá trị trung bình của các thông số màu sắc của bánh quy sau khi bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau cho thấy điều kiện bảo quản tối ưu để bảo đảm độ ổn định màu sắc của bánh.

Khi bảo quản bánh ở 30^{o}C, sau 40 ngày cho thấy mẫu bổ sung dịch trích có ΔE lớn nhất ($0,181 \pm 0,03$), cao hơn mẫu đối chứng ($0,132 \pm 0,05$) gần 37% và mẫu bổ sung vi hạt ($0,157 \pm 0,01$) là 15%, điều này làm cho bánh quy bổ sung dịch trích có màu đậm hơn so với 2 mẫu còn lại ở cùng nhiệt độ (Bảng 3.26). Như vậy, việc bổ sung hạt vi bao vào sản phẩm thay vì dịch trích đã cải thiện màu sắc của sản phẩm rất nhiều.

Kết quả Bảng 3.27 cho thấy, màu sắc bánh ở tất cả các mẫu đều khác biệt theo thời gian khi bảo quản ở nhiệt độ 40^{o}C. Như vậy ở nhiệt độ này đã bắt đầu có sự tác động đến các phản ứng tạo màu giữa các thành phần trong nguyên liệu bánh.

Bảng 3.26. Màu sắc của bánh quy sau 40 ngày bảo quản của các mẫu bổ sung dịch trích và vi hạt ở 30°C

Thời gian (ngày)	30°C											
	DỊCH TRÍCH				VI HẠT				ĐỐI CHỨNG			
	L*	a*	b*	ΔE	L*	a*	b*	ΔE	L*	a*	b*	ΔE
1	60,29 ± 0,07^{b}	6,74 ± 0,05^{a}	26,79 ± 0,09^{a}	-	60,42 ± 0,04^{b}	6,75 ± 0,02^{a}	26,56 ± 0,04^{a}	-	60,92 ± 0,03^{b}	6,57 ± 0,03^{a}	26,46 ± 0,02^{a}	-
10	60,18 ± 0,09^{ab}	6,75 ± 0,02^{a}	26,80 ± 0,04^{a}	0,111 ± 0,05^{a}	60,33 ± 0,01^{ab}	6,76 ± 0,03^{a}	26,57 ± 0,02^{a}	0,091 ± 0,01^{a}	60,84 ± 0,02^{a}	6,57 ± 0,01^{a}	26,48 ± 0,04^{a}	0,082 ± 0,01^{a}
20	60,17 ± 0,03^{a}	6,77 ± 0,04^{a}	26,81 ± 0,02^{a}	0,125 ± 0,02^{ab}	60,31 ± 0,05^{a}	6,76 ± 0,01^{a}	26,59 ± 0,03^{a}	0,114 ± 0,04^{a}	60,82 ± 0,07^{a}	6,58 ± 0,03^{a}	26,49 ± 0,07^{a}	0,105 ± 0,02^{a}
30	60,15 ± 0,04^{a}	6,79 ± 0,08^{a}	26,82 ± 0,04^{a}	0,152 ± 0,01^{ab}	60,29 ± 0,03^{a}	6,77 ± 0,06^{a}	26,61 ± 0,02^{a}	0,141 ± 0,05^{ab}	60,81 ± 0,01^{a}	6,58 ± 0,10^{a}	26,50 ± 0,06^{a}	0,117 ± 0,01^{a}
40	60,13 ± 0,06^{a}	6,80 ± 0,03^{a}	26,85 ± 0,01^{a}	0,181 ± 0,03^{b}	60,26 ± 0,06^{a}	6,78 ± 0,01^{a}	26,63 ± 0,08^{a}	0,157 ± 0,01^{b}	60,80 ± 0,06^{a}	6,59 ± 0,09^{a}	26,51 ± 0,04^{a}	0,132 ± 0,05^{a}

Các giá trị theo sau bởi các kí tự (a,b,c…) trong cùng một hàng thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

Bảng 3.27. Màu sắc của bánh quy sau 40 ngày bảo quản của các mẫu bổ sung dịch trích và vi hạt ở 40°C

Thời gian (ngày)	40°C											
	DỊCH TRÍCH				VI HẠT				ĐỐI CHỨNG			
	L*	a*	b*	ΔE	L*	a*	b*	ΔE	L*	a*	b*	ΔE
1	60,29 ± 0,02^{e}	6,74 ± 0,02^{a}	26,79 ± 0,03^{a}	-	60,42 ± 0,04^{a}	6,75 ± 0,05^{a}	26,56 ± 0,04^{a}	-	60,92 ± 0,03^{e}	6,57 ± 0,01^{a}	26,46 ± 0,02^{a}	-
10	60,06 ± 0,03^{d}	6,99 ± 0,03^{b}	27,16 ± 0,02^{b}	0,502 ± 0,08^{a}	60,25 ± 0,01^{a}	6,80 ± 0,03^{ab}	26,95 ± 0,05^{b}	0,428 ± 0,03^{a}	60,71 ± 0,05^{d}	6,67 ± 0,04^{b}	26,56 ± 0,05^{b}	0,253 ± 0,04^{a}
20	59,96 ± 0,05^{c}	7,02 ± 0,04^{b}	27,30 ± 0,06^{c}	0,669 ± 0,01^{a}	60,11 ± 0,02^{a}	6,83 ± 0,01^{bc}	27,01 ± 0,06^{c}	0,552 ± 0,09^{a}	60,53 ± 0,01^{c}	6,76 ± 0,07^{c}	26,69 ± 0,06^{c}	0,491 ± 0,12^{b}
30	59,65 ± 0,09^{b}	7,14 ± 0,10^{c}	27,59 ± 0,04^{d}	1,100 ± 0,02^{b}	59,79 ± 0,02^{ab}	6,88 ± 0,03^{cd}	27,20 ± 0,03^{c}	0,907 ± 0,11^{b}	60,31 ± 0,06^{b}	6,82 ± 0,05^{c}	26,89 ± 0,09^{d}	0,787 ± 0,09^{c}
40	59,41 ± 0,05^{a}	7,22 ± 0,05^{c}	27,81 ± 0,05^{e}	1,430 ± 0,05^{c}	59,56 ± 0,05^{b}	6,91 ± 0,06^{d}	27,47 ± 0,05^{d}	1,262 ± 0,06^{c}	60,10 ± 0,05^{a}	6,95 ± 0,02^{d}	27,01 ± 0,06^{e}	1,113 ± 0,06^{d}

Các giá trị theo sau bởi các kí tự (a,b,c…) trong cùng một hàng thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

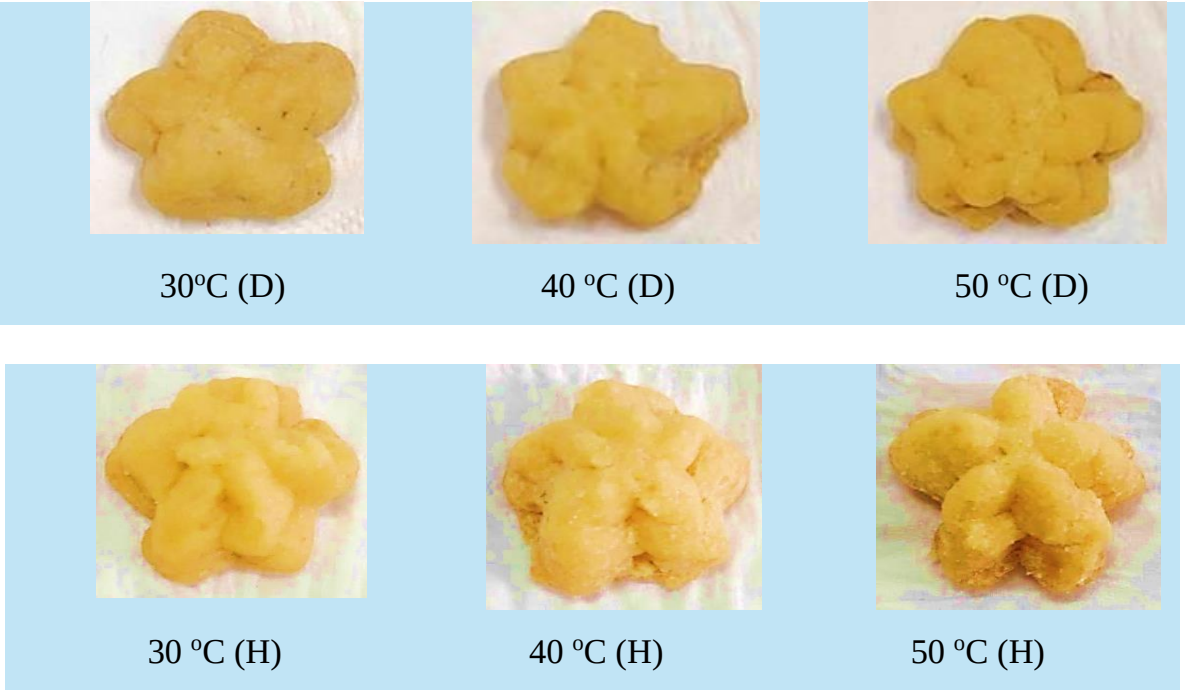
Khi càng nâng nhiệt độ bảo quản lên cao, thì ΔE của mẫu bổ sung dịch trích càng cho thấy rõ sự khác biệt so với mẫu đối chứng. Ở 50°C, sau 40 ngày bảo quản, ΔE của mẫu bổ sung dịch trích lên đến 10,70 ± 0,08; trong khi mẫu đối chứng chỉ 8,74 ± 0,09 (Bảng 3.28). Nhiệt độ càng cao, tốc độ xảy ra các phản ứng phi enzyme càng diễn ra nhanh như phản ứng caramel hóa và phản ứng hóa nâu giữa các thành phần trong nguyên liệu bánh. Thêm vào đó, nguyên nhân sẫm màu bánh quy còn đến từ các sản phẩm oxy hóa và biến đổi các hợp chất phenolic thành quinone và và sự phân huỷ diệp lục tố có trong dịch trích lá XTP thành các hắc tố có màu sẫm khi xử lý nhiệt và bảo quản ở nhiệt độ cao (Taranto và cộng sự, 2012).

Bảng 3.28. Màu sắc của bánh quy sau 40 ngày bảo quản của các mẫu bổ sung dịch trích và vi hạt ở 50°C

Thời gian (ngày)	50°C											
	DỊCH TRÍCH				VI HẠT				ĐỐI CHỨNG			
	L*	a*	b*	ΔE	L*	a*	b*	ΔE	L*	a*	b*	ΔE
1	60,29 ± 0,01^{a}	6,74 ± 0,03^{a}	26,79 ± 0,03^{a}	-	60,42 ± 0,04^{a}	6,75 ± 0,05^{a}	26,56 ± 0,04^{a}	-	60,92 ± 0,03^{a}	6,57 ± 0,01^{a}	26,46 ± 0,02^{a}	-
10	58,08 ± 0,07^{b}	7,20 ± 0,05^{b}	27,98 ± 0,05^{b}	2,55 ± 0,05^{a}	59,05 ± 0,07^{b}	7,01 ± 0,09^{b}	27,45 ± 0,10^{b}	1,654 ± 0,06^{a}	59,15 ± 0,04^{b}	6,78 ± 0,01^{b}	26,89 ± 0,09^{b}	1,83 ± 0,03^{a}
20	56,68 ± 0,02^{c}	7,95 ± 0,10^{c}	28,50 ± 0,11^{c}	4,17 ± 0,03^{b}	57,45 ± 0,12^{c}	7,56 ± 0,10^{c}	28,01 ± 0,06^{c}	3,403 ± 0,03^{b}	58,01 ± 0,08^{c}	7,45 ± 0,09^{c}	27,56 ± 0,07^{c}	3,23 ± 0,11^{b}
30	53,56 ± 0,08^{d}	8,68 ± 0,04^{d}	29,18 ± 0,07^{d}	7,40 ± 0,04^{c}	55,37 ± 0,05^{d}	8,20 ± 0,07^{d}	28,60 ± 0,12^{d}	5,636 ± 0,06^{c}	55,91 ± 0,08^{d}	8,15 ± 0,06^{d}	28,42 ± 0,02^{d}	5,61 ± 0,03^{c}
40	50,38 ± 0,05^{e}	9,20 ± 0,05^{e}	29,98 ± 0,09^{e}	10,70± 0,08^{d}	52,87 ± 0,07^{e}	8,9 ± 0,01^{e}	29,15 ± 0,08^{e}	8,686 ± 0,01^{d}	52,95 ± 0,03^{e}	8,85 ± 0,05^{e}	29,01 ± 0,10^{e}	8,74 ± 0,09^{d}

Các giá trị theo sau bởi các kí tự (a,b,c…) trong cùng một hàng thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

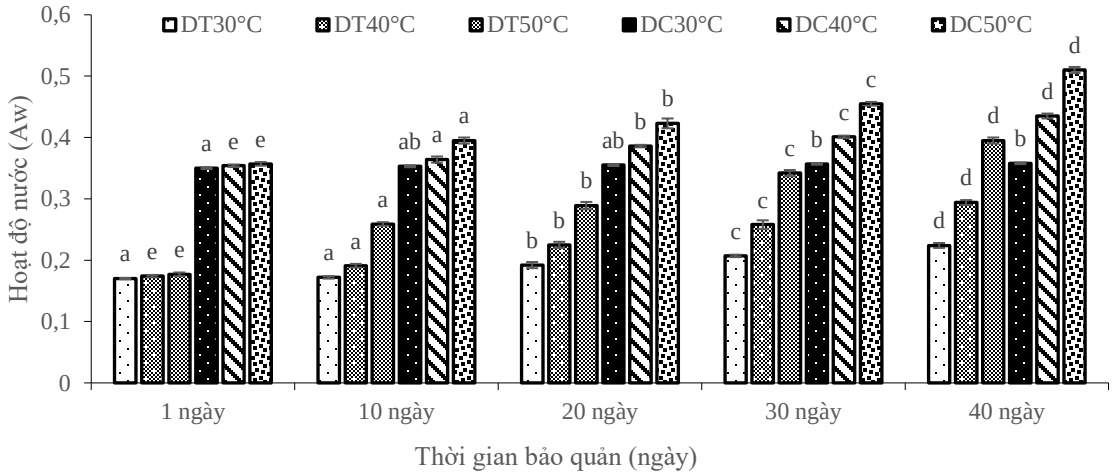
Hình 3.27 phản ánh rõ nét không có sự khác biệt lớn về màu sắc giữa các mẫu bảo quản ở 30^{o}C và 40^{o}C, các mẫu vẫn giữ được màu vàng. Tuy nhiên các mẫu bảo quản ở 50^{o}C bánh đã chuyển sang màu vàng nâu. So với các mẫu bánh bổ sung dịch trích thì các bánh bổ sung vi hạt có màu vàng tươi hơn. Các vi hạt đã giúp dịch chiết XTP bổ sung vào bánh nhưng không gây ra sự khác biệt lớn về màu sắc so với bánh không bổ sung dịch chiết.



Hình 3.27. Bánh bổ sung dịch chiết (D) và vi hạt XTP (H) sau 40 ngày bảo quản

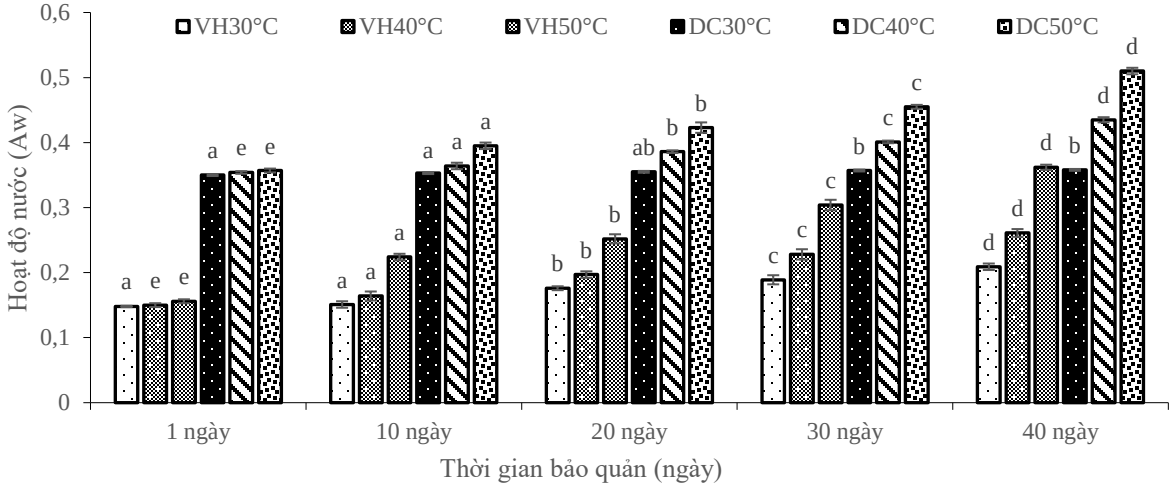
3.8.2.4. Hoạt độ nước của bánh quy sau 40 ngày bảo quản ở 30^{o}C, 40^{o}C và 50^{o}C

Đánh giá hoạt độ nước của các mẫu bánh bổ sung dịch trích và vi hạt ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau thể hiện ở Hình 3.28, 3.29 và Phụ lục D7.16-B7.18. Nhìn chung, các mẫu bánh đều gia tăng hoạt độ nước sau 40 ngày bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ bảo quản, ngoại trừ mẫu đối chứng. Hoạt độ nước gia tăng trong các mẫu bánh quy suốt quá trình bảo quản tương tự như trường hợp bảo quản bánh quy thương mại (Romani và cộng sự, 2016) và bánh quy không chứa gluten bổ sung bột hạt dẻ (Paciulli và cộng sự, 2018) và tất cả đều đạt mức an toàn về mặt vi sinh.



Hình 3.28. Hoạt độ nước của bánh quy bổ sung dịch trích XTP ở các mốc nhiệt độ khác nhau sau 40 ngày bảo quản

Chú thích: DT30, DT40, DT50: mẫu bánh bổ sung dịch trích bảo quản ở 30, 40 và 50°C; DC30, DC40, DC50: mẫu bánh đối chứng – không bổ sung, bảo quản ở 30, 40 và 50°C. Giá trị cột với các chữ cái trên mỗi cột cùng nền khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05).



Hình 3.29. Hoạt độ nước của bánh quy bổ sung hạt vi bao XTP ở các mốc nhiệt độ khác nhau sau 40 ngày bảo quản

Chú thích: VH30, VH40, VH50: mẫu bánh bổ sung hạt vi bao bảo quản ở 30, 40 và 50°C; DC30, DC40, DC50: mẫu bánh đối chứng – không bổ sung, bảo quản ở 30, 40 và 50°C. Giá trị cột với các chữ cái trên mỗi cột cùng nền khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05)

Bánh quy đối chứng sau 40 ngày bảo quản tại 30^{o}C có hoạt độ nước thay đổi không đáng kể (0,358 ± 0,002) so với ban đầu. Đối với bánh quy được bổ sung thêm dịch trích và vi hạt có sự tăng nhẹ giá trị hoạt độ nước so với trước khi bảo quản, lần lượt là 0,224 ± 0,004 và 0,209 ± 0,005. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Tamsone và cộng sự (2020) khi bảo quản bánh quy bổ sung dịch chiết cải ngựa (*Armoracia rusticana* L.) trong 180 ngày thì giá trị hoạt độ nước của mẫu đối chứng hầu như không thay đổi so với mẫu ban đầu.

Hoạt độ nước rất nhạy cảm với nhiệt độ. Nhiệt độ càng cao, nước tự do có trong sản phẩm càng nhiều, dẫn đến hoạt độ nước tăng nhanh hơn so với bảo quản ở nhiệt độ phòng. Ở 50^{o}C, mẫu đối chứng có giá trị hoạt độ nước cao hơn 43% so với ban đầu, mẫu bổ sung dịch trích và vi hạt lần lượt cao gấp 123% và 132% so với ban đầu. Nhiệt độ càng cao, tốc độ xảy ra các phản ứng càng nhanh, làm cho bánh quy trở nên đậm màu hơn so với ban đầu, hoạt độ nước tăng cao, làm cho bánh nhanh hỏng và có hạn sử dụng thấp hơn.

Nhìn chung, khi tăng nhiệt độ bảo quản từ 30^{o}C lên 50^{o}C, sau thời gian 40 ngày, kết quả phân tích hoạt độ nước cho thấy mẫu bổ sung dịch trích và vi hạt có hoạt độ nước tương đương nhau, tuy nhiên cả hai trường hợp cho các mẫu có hoạt độ nước thấp hơn nhiều so với mẫu đối chứng ở cùng điều kiện bảo quản.

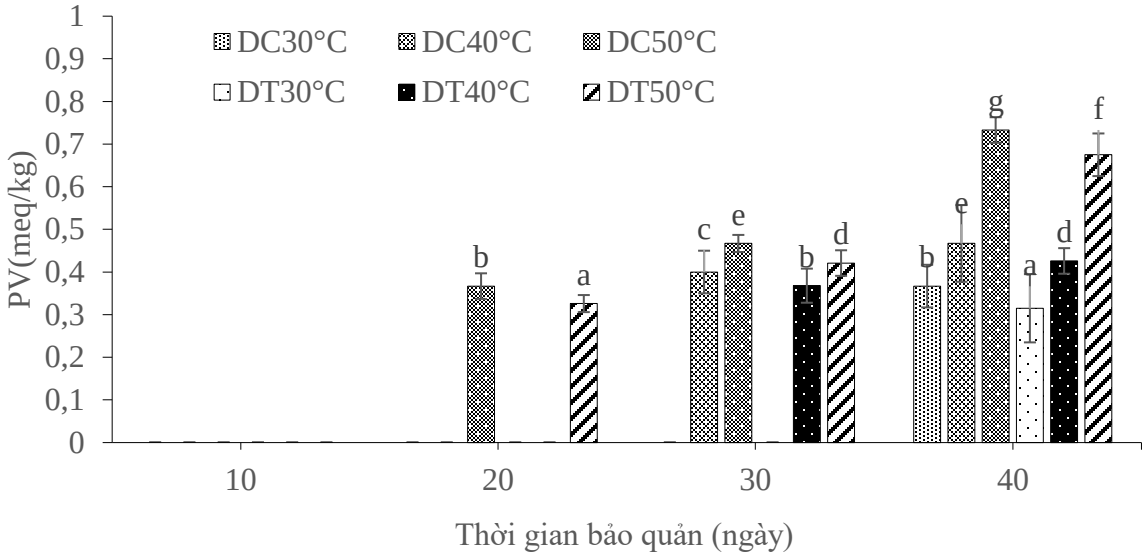
3.8.2.5. Chỉ số peroxide của bánh quy sau 40 ngày bảo quản ở 30^{o}C, 40^{o}C và 50^{o}C

Giá trị peroxide được coi là "tiêu chuẩn vàng" phổ biến nhất của việc đánh giá mức độ độ "ôi" của sản phẩm có chứa chất béo. Giá trị peroxide được định nghĩa là lượng oxy peroxide trên mỗi kg dầu hoặc chất béo, trong đó lượng peroxide được thể hiện bằng mili đương lượng hoặc meq. Việc xác định chỉ số peroxide là xác định chỉ số của quá trình oxy hóa lipid. Khảo sát được thực hiện tại các mốc nhiệt độ 30^{o}C, 40^{o}C và 50^{o}C nhằm đánh giá quá trình oxy hóa lipid của bánh bổ sung dịch trích và vi hạt sau 40 ngày bảo quản (Hình 3.30, 3.31 và Phụ lục D7.19).

Hình 3.30 và Hình 3.31 cho thấy rằng ngày bảo quản thứ 10, 20, 30 tại 30^{o}C, không có giá trị peroxide nào được tạo ra bởi bất kì mẫu nào. Tại ngày bảo quản thứ 40 ở 30^{o}C, ngày bảo quản thứ 30 ở 40^{o}C, và tại ngày bảo quản thứ 20 ở 50^{o}C, giá trị peroxide đã xuất hiện. Việc bổ sung dịch trích và vi hạt đã ảnh hưởng đáng kể ($p < 0,05$) đến chỉ số peroxide của bánh quy. Mức peroxide của từng mẫu thay đổi đáng kể. Mẫu bổ sung vi hạt có chỉ số

peroxide thấp hơn so với mẫu bổ sung dịch trích, và cả 2 mẫu này đều có chỉ số peroxide nhỏ hơn so với mẫu đối chứng. Nồng độ peroxide thấp nhất trong mẫu bổ sung vi hạt là 0,233 meq/kg, so với nồng độ peroxide ở mẫu đối chứng là 0,367 meq/kg và mẫu bổ sung dịch trích là 0,315 meq/kg. Nồng độ peroxide ở mẫu bổ sung vi hạt thấp hơn 57,51% so với mẫu đối chứng và thấp hơn 35,19% so với mẫu bổ sung dịch trích tại 30°C. Trong nghiên cứu bổ sung vi hạt dịch chiết vỏ măng cụt vào bánh, Indiarto và cộng sự (2023) cũng nhận thấy chỉ số peroxide của mẫu bổ sung vi hạt (0,21 meq/kg) thấp hơn so với mẫu đối chứng là 41,66% (0,36 meq/kg) sau 35 ngày bảo quản. Ngoài ra, Ghorbanzade và cộng sự (2017) khi bổ sung vi nang dầu cá vào sữa chua, sau 21 ngày bảo quản, sản phẩm có chỉ số peroxide thấp hơn rất nhiều so với mẫu không vi bọc, mẫu không vi bọc có giá trị peroxide cao hơn 168,33% so với mẫu được vi bọc.

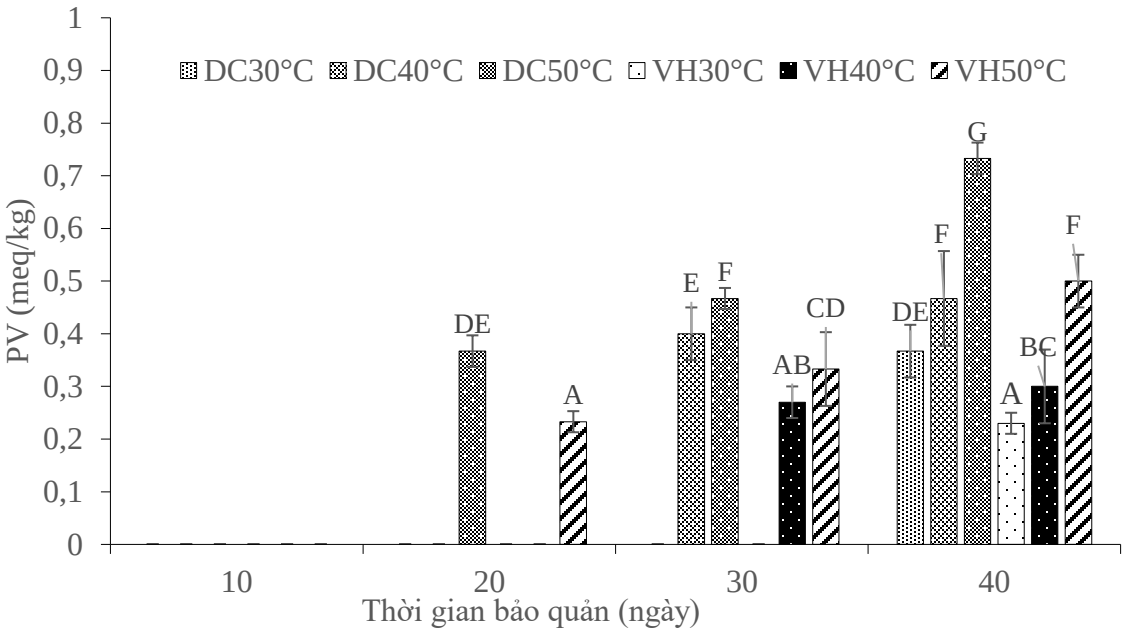
Có thể thấy rằng, việc bổ sung dịch trích và vi hạt làm giảm quá trình oxy hóa lipid bằng cách ức chế giai đoạn khởi đầu hoặc lan truyền của chuỗi các phản ứng oxy hóa (Sinaga & Zulaini, 2020).



Hình 3.30. Giá trị peroxide của bánh quy bổ sung dịch trích XTP

Chú thích: DT30, DT40, DT50: mẫu bánh bổ sung dịch trích bảo quản ở 30, 40 và 50°C; DC30, DC40, DC50: mẫu bánh đối chứng – không bổ sung, bảo quản ở 30, 40 và 50°C. Giá trị cột với các chữ cái trên mỗi cột cùng nền khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê (p < 0,05).

Nhiệt độ càng cao, tốc độ oxy hóa lipid diễn ra càng nhanh, làm cho giá trị peroxide tăng lên nhanh. Tại 50^{o}C, sau 40 ngày bảo quản, giá trị peroxide của đối chứng lên đến 0,633 meq/kg, cao hơn gấp 26,6% so với mẫu bổ sung vi hạt (0,50 meq/kg) và gấp 18,8% so với mẫu bổ sung dịch trích. So với mẫu bổ sung dịch trích, mẫu vi hạt có giá trị peroxide thấp hơn rất nhiều. Tại 50^{o}C, chỉ số peroxide của mẫu bổ sung dịch trích (0,675 meq/kg) cao gấp 35% so với mẫu bổ sung vi hạt (0,50 meq/kg). Astari và cộng sự (2015) cũng nhận thấy hiện tượng bánh quy tảo xoắn gia tăng chỉ số peroxide khi bảo quản ở nhiệt độ cao hơn; có thể túi bảo quản bánh có chứa một lượng oxy không khí, từ đó đẩy nhanh các phản ứng oxy hóa với các gốc tự do alkyl và tạo ra các gốc peroxide. Như vậy,nhiệt độ bảo quản cao hơn có thể làm tăng tốc độ phản ứng oxy hóa bằng cách hình thành các gốc tự do alkyl (Liu và cộng sự, 2019).



Hình 3.31. Giá trị peroxide của bánh quy bổ sung vi hạt XTP

Chú thích: VH30, VH40, VH50: mẫu bánh bổ sung hạt vi bao bảo quản ở 30, 40 và 50^{o}C; DC30, DC40, DC50: mẫu bánh đối chứng – không bổ sung, bảo quản ở 30, 40 và 50^{o}C. Giá trị cột với các chữ cái trên mỗi cột cùng nền khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

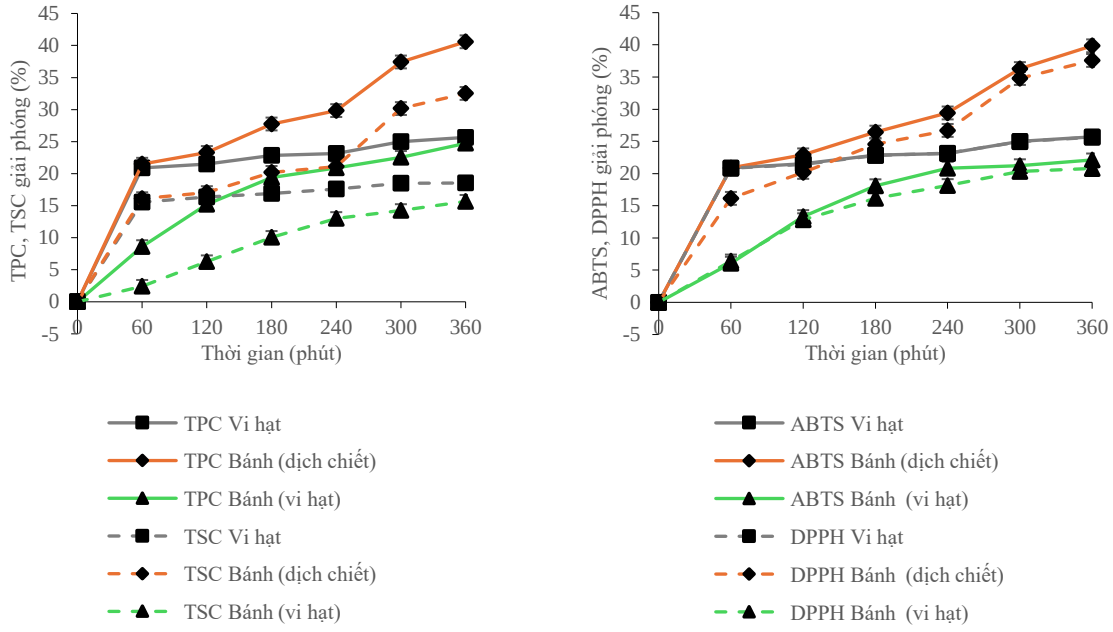
Nói chung, việc sử dụng các thành phần như bơ thực vật ảnh hưởng đến sự hình thành các hợp chất peroxide trong bánh quy. Những thành phần này chứa acid béo không bão hòa, bao gồm acid oleic, linoleic, linolenic, eicosanoic và palmitoleic, dễ bị oxi hóa trong

quá trình nướng và bảo quản (Culetu và cộng sự, 2020). Các acid béo không bão hòa có thể liên kết oxy tại các liên kết đôi để tạo ra các hợp chất hydroperoxide, sau đó có thể chuyển đổi thành aldehyde, lactone và acrolein, các hợp chất này tạo ra mùi và vị ôi thiu cho sản phẩm (Shahidi & Hossain, 2022).

Với những kết quả trên, cho thấy rằng ở điều kiện nhiệt độ 30°C, thời gian bảo quản đối với mẫu bánh quy bổ sung vi hạt là khoảng 196 ngày, gấp 3 lần so với mẫu bổ sung dịch chiết (khoảng 58 ngày). Ở 40°C và 50°C, thời gian bảo quản lần lượt là khoảng 117 và 75 ngày. Vì vậy, để tránh tình trạng sản phẩm giảm chất lượng và hư hỏng, nên bảo quản ở 30°C và dùng trong vòng 6 tháng (dựa theo tốc độ suy thoái TPC và TSC).

3.8.3. Sự giải phóng TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá của bánh quy bổ sung XTP trong quá trình tiêu hoá in vitro

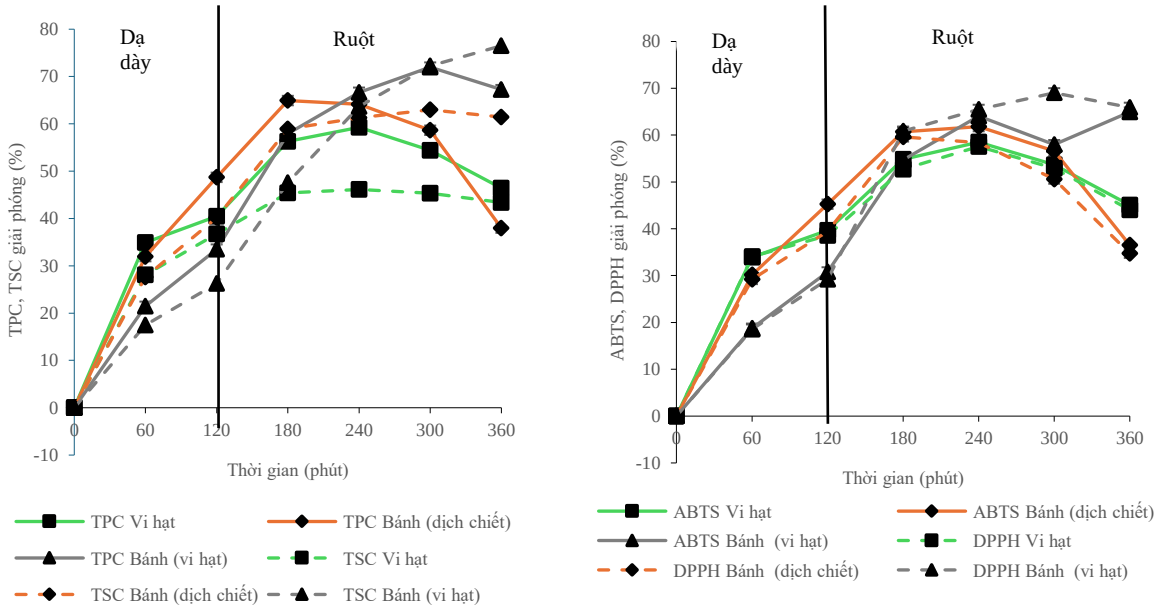
3.8.3.1. Sự giải phóng TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá của bánh quy bổ sung XTP trong môi trường nước cất và môi trường giả định



Hình 3.32. Sự giải phóng TPC, TSC (trái) và hoạt tính chống oxy hoá (phải) trong môi trường nước cất

Hình 3.32 và Phụ lục D7.20-B7.31 cho thấy, ban đầu trong môi trường nước cất, sự giải phóng các hạt vi bao SA-chitosan sau 60 phút duy trì ở mức xấp xỉ 21% đối với TPC và

16% đối với TSC. Sau đó, hàm lượng TPC và TSC tăng nhẹ, đạt đỉnh với mức giải phóng tương ứng là 25,66% và 18,54%. Trong môi trường nước cất, sự giải phóng TPC và TSC diễn ra chậm, có thể môi trường và các điều kiện bất lợi chưa tác động nhiều đến cấu trúc màng vi bao và liên kết giữa các hoạt chất với màng. Điều này tương tự với nghiên cứu của Rutz và cộng sự (2017), khi nghiên cứu khả năng giải phóng carotenoid từ dầu cọ được vi bao chitosan – pectin và chitosan – xanthan trong môi trường nước cất, khả năng giải phóng hoạt chất này khá thấp từ 22 – 43% cho cả 2 loại hạt vi bao. Hoạt tính chống oxy hoá của môi trường nước cất cũng có xu hướng tương tự và đạt gần 26% sau 360 phút.



Hình 3.33. Sự giải phóng TPC, TSC (trái) và hoạt tính chống oxy hoá (phải) trong môi trường HGF

Khi quan sát các mẫu bánh trong môi trường nước cất, sự giải phóng các hoạt chất diễn ra theo những xu hướng khác nhau. Đối với mẫu bánh bổ sung dịch chiết, ban đầu các hoạt chất giải phóng chậm, sau đó quá trình tăng mạnh vào cuối giai đoạn và đạt mức 33-40%. Có thể thời gian kéo dài, khi các phân tử nước đủ khuếch tán sâu vào cấu trúc bánh và làm giảm liên kết giữa các hoạt chất với thành phần polysaccharide bánh, theo đó sự giải phóng các hoạt chất ra môi trường dễ dàng hơn. Các hoạt chất trong bánh phóng thích ra môi trường nước cao hơn so với hạt vi bao. Điều này cho thấy hoạt chất liên kết chặt chẽ với các polymer màng bao hơn so với trong liên kết với các polysaccharide bánh. Ngược lại

với xu hướng giải phóng các hoạt chất ở mẫu bánh bổ sung dịch chiết, các hoạt chất trong mẫu bánh bổ sung hạt vi bao giải phóng khá chậm ở thời gian đầu, đạt đỉnh gần 25% đối với TPC và 16% đối với TSC. Có thể thấy TSC khá bền trong hệ liên kết vi hạt-bánh so với TPC, và mức độ giải phóng các hoạt chất trong mẫu bánh bổ sung hạt vi bao khá thấp hơn so với 2 mẫu còn lại. Hoạt tính chống oxy hoá đo được trong môi trường phóng thích của hai mẫu bánh có xu hướng tương tự như TPC và TSC, theo đó hoạt tính chống oxy hoá DPPH và ABTS (mẫu bánh bổ sung dịch chiết) đo được ở cuối giai đoạn tiêu hoá dao động 38-40% và 21-22% đối với mẫu bánh bổ sung hạt vi bao.

Hình 3.33 và Phụ lục D7.32-B7.42 cho thấy trong HGF, hạt vi bao SA-chitosan đã giải phóng 40,48% TPC và 36,76% TSC trong 120 phút tiêu hoá, và tăng cao nhất tại giai đoạn chuyển tiếp giữa SGF và SIF ở thời gian 180-240 phút. Sự trương nở của SA-chitosan xảy ra đáng kể do một số nhóm carboxyl của SA được chuyển đổi thành dạng acid và sự proton hóa của các nhóm amine của chitosan ở pH thấp do đó cho thấy giải phóng cao các hợp chất TPC và TSC trong điều kiện dạ dày (Zhang và cộng sự, 2002). Tuy nhiên, ở điều kiện pH cao hơn (6,0 -7,0) và trong thời gian dài hơn ở giai đoạn SIF, sự giải phóng các hoạt chất có xu hướng ổn định và giảm dần, sự phóng thích các hoạt chất đến cuối giai đoạn này đạt mức xấp xỉ 58% đối với TPC và 46% đối với TSC. Ở pH cao, ngoài sự tương tác giữa các polymer, các tương tác cảm ứng lưỡng cực-lưỡng cực (dipole–dipole induced interactions) có thể xảy ra giữa các nhóm methyl của các hoạt chất với các polymer và tương tác cảm ứng lưỡng cực ion (ion–dipole-induced interactions) với các nhóm tích điện (Rutz và cộng sự, 2013). Do đó, có sự cân bằng điện tích ở pH gần trung tính, thuận lợi cho sự hình thành phức chất. Sự gia tăng độ pH thúc đẩy quá trình khử proton của các nhóm amine của chitosan, dẫn đến lực đẩy điện tích yếu hơn, giảm độ trương nở, và sự giải phóng các chất bị cản trở (Rutz và cộng sự, 2017). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Mulia và cộng sự (2020), khi nghiên cứu khả năng giải phóng hạt vi bao algiante – chitosan trong điều kiện mô phỏng dạ dày, ruột và đại tràng. Kết quả cũng thu được rằng, tỷ lệ giải phóng cao nhất ở dạ dày khi giải phóng lên đến gần 45%, ở bước tiêu hóa ruột giải phóng chậm (4 tiếng tiếp theo) và sau đó được di chuyển xuống đại tràng và sau 10h tiêu hóa hầu như hoàn toàn (97%) tại môi trường tiêu hóa đại tràng. Rutz và cộng sự (2017) khi quan sát quá

trình giải phóng carotenoid từ hạt vi bao dầu cọ trong màng chitosan, cũng đã khẳng định trong cơ thể con người các hợp chất được bao bọc dự kiến sẽ được giải phóng với số lượng nhỏ trong điều kiện dạ dày. Tuy nhiên, trong điều kiện đường ruột, việc giải phóng diễn ra dần dần và hoàn toàn, hoạt động của các hạt vi bao chứa dầu cọ gần như lý tưởng. Các hạt vi bao chitosan-alginate chứa dịch chiết vỏ măng cụt kỵ nước khi được tối ưu hoá công thức màng bao đã cho kết quả giải phóng hoàn toàn dịch chiết măng cụt đến khu vực đại tràng (tổng lượng giải phóng là 97%) (Mulia và cộng sự, 2020). Kết quả nghiên cứu này một lần nữa cho thấy hiệu quả bảo vệ của hệ màng bao chitosan-alginate đối với các hợp chất sinh học trong môi trường tiêu hoá và tính khả thi của hệ màng bao này khi được ứng dụng làm hệ thống phân phối hoạt tính sinh học; các yếu tố khác nhau ảnh hưởng đến sự giải phóng vật liệu lõi như sự thay đổi nhiệt độ và độ pH, sự hòa tan của vật liệu màng bao, sự khuếch tán, cơ chế phân huỷ và tính thấm chọn lọc.

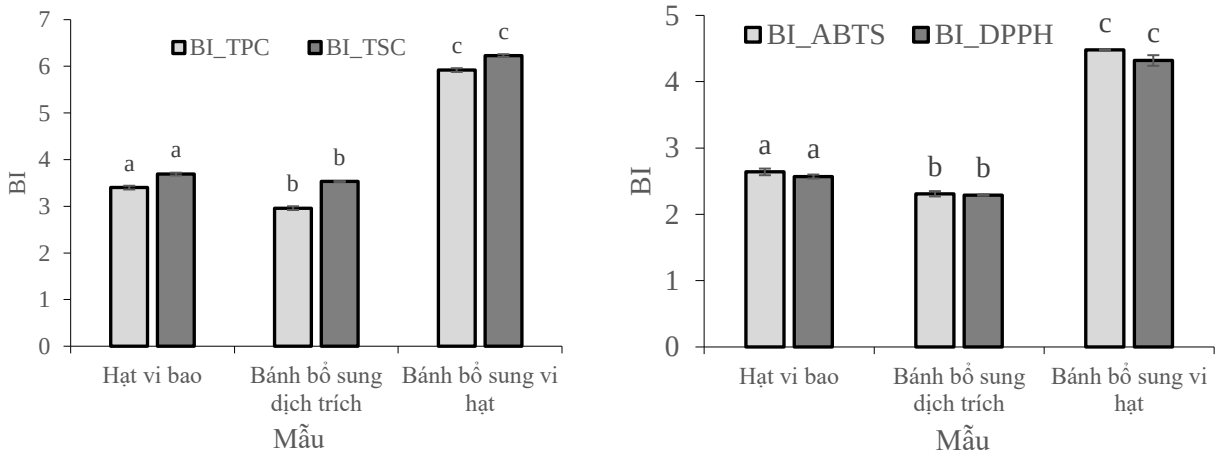
Cùng xu hướng với các mẫu hạt vi bao, ở mẫu bánh bổ sung dịch chiết cũng giải phóng các hoạt chất đạt mức cao nhất từ 59-65% ở giai đoạn chuyển tiếp giữa dạ dày và ruột, sau đó giảm nhẹ. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Mai và cộng sự (2022) khi bổ sung bột vỏ thanh long vào trong bánh quy, cũng cho thấy phenolic giải phóng nhiều nhất ở dạ dày, sau đó các hợp chất này vẫn tiếp tục giải phóng trong ruột nhưng ít hơn. Ngược lại, các mẫu bánh bổ sung hạt vi bao cho thấy khả năng giải phóng tối đa các hoạt chất ở giai đoạn đường ruột từ 240 phút trở đi. Trong khi TSC vẫn còn tiếp tục tăng cao ở giai đoạn cuối thì TPC có xu hướng giảm dần hàm lượng trong môi trường đường ruột. Có thể điều kiện khắc nghiệt của dịch ruột và thời gian tiêu hoá kéo dài đã làm phân huỷ phần lớn các hoạt chất này. Hoạt tính chống oxy hoá của môi trường tiêu hoá giả định đo trong trường hợp này có xu hướng giảm theo sự suy giảm của TPC trong môi trường. Điều này cũng khẳng định các hợp chất TPC trong mẫu bánh bổ sung hạt vi bao quyết định hoạt tính chống oxy hoá của mẫu.

Trước khi ứng dụng vào thực phẩm, các hạt vi bao cho thấy sự giải phóng nhiều hơn trong chất lỏng tương tự tình trạng đường tiêu hóa, nhưng sau khi giải phóng, các hợp chất này bị phân hủy. Sau khi ứng dụng vào bánh quy, lượng giải phóng thấp hơn và các hợp chất được giải phóng ít bị phân hủy trong môi trường tiêu hoá. Điều này cho thấy nền thực

phẩm có khả năng tương tác với các hợp chất sinh học theo những cách khác nhau và bảo vệ chúng. Kết luận này cũng được khẳng định trước đó bởi Rutz và cộng sự (2017), các tác giả này đã nhận ra sự tác động khác nhau của các chất nền thực phẩm (sữa chua, bánh mì) đối với các loại hạt vi bao.

3.8.3.2. Khả năng tiếp cận sinh học của TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hóa sau khi tiêu hóa hạt vi bao và bánh quy trong ống nghiệm

Hàm lượng và hoạt tính chống oxy hoá cao của các hoạt chất trong hạt vi bao và một số thành phần thực phẩm không phải lúc nào cũng đảm bảo khả năng tiếp cận sinh học (bioaccessibility) và khả dụng sinh học (bioavailability) cao trong quá trình tiêu hóa in vitro. Kết quả thu được trong nghiên cứu này (Hình 3.34 và Phụ lục D7.44) cho thấy TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá cao hơn đáng kể trong các mẫu hạt vi bao, bánh quy bổ sung dịch chiết và hạt vi bao được phân tích sau quá trình tiêu hóa so với các mẫu không tiêu hoá, điều này cũng nhất quán với các nghiên cứu trước đây (Zieliński và cộng sự, 2020; Tamsone và cộng sự, 2020).



Hình 3.34. Chỉ số tiếp cận sinh học (BI) theo TPC, TSC (trái) và ABTS, DPPH (phải) của các mẫu trong môi trường HGF

Giá trị cột với các chữ cái trên mỗi cột cùng nền khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Quá trình tiêu hóa in vitro ở đường tiêu hóa bao gồm việc bổ sung enzyme và điều chỉnh độ pH ở từng giai đoạn theo sinh lý của đường tiêu hóa con người. Hiệu quả của quá trình chuyển hóa và hấp thụ các hợp chất TPC và TSC thường phụ thuộc vào các đặc tính lý hóa: cấu trúc cơ bản, kích thước phân tử, độ hòa tan cũng như sự liên hợp với các hợp chất khác

(Carbonell-Capella và cộng sự, 2014). Các chỉ số khả năng tiếp cận sinh học (BI) được sử dụng trong nghiên cứu để đánh giá lượng TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá của các hợp chất này được giải phóng khỏi nền thức ăn sau khi tiêu hóa, làm cho các hợp chất này có sẵn để hấp thụ qua niêm mạc đường tiêu hóa. Kết quả cho thấy trong tất cả các mẫu, BI của TPC, TSC và hoạt tính chống oxy hoá đều vượt quá 1,6, theo Zielíński và cộng sự (2020) những giá trị này cho thấy khả năng tiếp cận sinh học cao. Điều này có thể được giải thích bởi thực tế là trong quá trình tiêu hóa, TPC và TSC được giải phóng khỏi các dạng liên hợp của chúng trong màng bao và thành phần bánh quy. Các bằng chứng trước đây cũng cho thấy TPC của nền thực phẩm được làm giàu bằng nhiều chất tự nhiên khác nhau tăng lên sau khi tiêu hóa (Irakli và cộng sự, 2019; Tamsone và cộng sự, 2020).

Chỉ số BI của ba mẫu nghiên cứu cho kết quả $BI_{\text{bánh bổ sung hạt vi bao}} > BI_{\text{bánh bổ sung dịch chiết}} > BI_{\text{hạt vi bao}}$. BI cao nhất được quan sát thấy đối với bánh quy bổ sung hạt vi bao, cao hơn 50% (TPC) và 43% (TSC) so với mức BI được xác định cho bánh quy bổ sung dịch chiết và 43% (TPC) và 41% (TSC) so với hạt vi bao. Đáng lưu ý là BI tính theo TSC thì luôn cao hơn BI của TPC trong tất cả các mẫu. Điều này khẳng định một lần nữa TSC khá bền trong điều kiện tiêu hoá hơn so với TPC. Giá trị BI dựa trên hoạt tính chống oxy hóa đều thấp hơn nhiều so với BI của TPC và TSC. Theo Zielíński và cộng sự (2020) BI của TPC có mối tương quan thuận với BI của ABTS. Hoạt động nhặt gốc $DPPH^{\cdot}$ và $ABTS^{\cdot}$ bị tác động bởi một số hợp chất phenolic có đặc tính chống oxy hóa trong nền thực phẩm, khi tiếp xúc với quá trình tiêu hóa trong ống nghiệm, tương tác với các hợp chất khác để tạo thành phức hợp khó tiêu hoá. Tuy nhiên, BI cao nhất cho hoạt động nhặt gốc $ABTS^{\cdot}$ và $DPPH^{\cdot}$ đã được xác định đối với mẫu bánh quy bổ sung hạt vi bao dao động từ 4,32-4,48. Kết quả này cũng tương tự như BI của ABTS được đo từ mẫu bánh quy làm từ bột nếp dao động từ 3,22 đến 5,73 của Zielíński và cộng sự (2020).

Thí nghiệm trên cho thấy bánh quy bổ sung hạt vi bao có tiềm năng lớn để ứng dụng sản xuất thương mại khi tỷ lệ hoạt chất giải phóng TPC và TSC đều khá cao tại điều kiện mô phỏng khả năng tiêu hóa của con người.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Nghiên cứu đã xác định cây xáo tam phân nhân giống (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum) 4 năm tuổi có hàm lượng TPC và TSC cao nhất, đặc biệt trong lá cây có hàm lượng protein và khoáng chất cũng vượt trội so với rễ và thân nên phù hợp để trích ly và ứng dụng trong thực phẩm.

Quá trình trích ly TPC và TSC từ lá cây xáo tam phân 4 năm tuổi đạt hiệu quả cao nhất trong các điều kiện: Xử lý siêu âm với năng lượng siêu âm 200W (tương ứng với công suất 5W/g), nhiệt độ 47^{o}C trong 8 phút, sau đó xử lý enzyme với nồng độ enzyme pectinase-cellulase (1:1) là 0,8% (v/w), nhiệt độ xử lý 53^{o}C trong thời gian 120 phút. Dịch chiết thu được chứa 43 hợp chất phenolic và 18 saponin.

Nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả của kỹ thuật cô đặc lạnh đông khối trong việc làm giàu dịch chiết, với khả năng bảo tồn các hợp chất phenolic và saponin chính yếu. Kết quả cô đặc cho thấy hiệu quả đạt từ 65 – 67% về hàm lượng TPC và TSC, cùng với sự gia tăng đáng kể về hoạt tính chống oxy hóa.

Hệ màng bao SA-chitosan với tỷ lệ 80:20 và tỷ lệ dịch trích:màng bao 1:2 cho hiệu quả bao gói tối ưu các hoạt chất, đạt 80-86%. Trong điều kiện xử lý thực phẩm (pH 4-8, 90°C, 10 phút) thì hiệu quả vi bao đạt 68-80%, cho thấy tính ổn định cao của hệ màng bao trong các điều kiện khắc nghiệt. Động học giải phóng TPC và TSC từ vi nang trong môi trường nước tuân theo mô hình Higuchi.

Khi ứng dụng vào bánh quy, tỉ lệ 10% hạt vi bao và 5% dịch trích cho sản phẩm bánh có các đặc tính mong muốn nhất. Trong đó phiên bản vi bao giữ được giá trị dinh dưỡng cao hơn về hàm lượng TPC, TSC và tăng thời hạn sử dụng sản phẩm. Ở điều kiện nhiệt độ 30^{o}C, thời gian bảo quản đối với mẫu bánh quy bổ sung hạt vi bao là khoảng 196 ngày, gấp 3 lần so với mẫu bổ sung dịch chiết (khoảng 58 ngày) (dựa theo tốc độ suy thoái TPC và TSC). Đánh giá về khả năng tiêu hoá in vitro, bánh quy bổ sung hạt vi bao có khả năng giải

phóng các hoạt chất ở ruột non tốt hơn và chỉ số tiếp cận sinh học (BI) cũng cao hơn so với bánh quy bổ sung dịch chiết. Kết quả chứng tỏ chế phẩm trích ly từ lá cây xáo tam phân giàu TPC, TSC có thể được ứng dụng trong các sản phẩm thực phẩm.

Kiến nghị

Một số hướng nghiên cứu tiếp theo được đề xuất như sau:

Phân tích định lượng một số thành phần phenolic và saponin quan trọng trong dịch trích thu được.

Phân tích định tính và định lượng một số thành phần phenolic và saponin quan trọng trong dịch trích sau quá trình xử lý bằng siêu âm hay enzyme để biết được sự biến đổi cũng như tác động của các phương pháp xử lý đến tính chất và hàm lượng của các thành phần này trong dịch trích.

Thử nghiệm trích ly và cô đặc dịch chiết ở quy mô pilot và công nghiệp.

Nghiên cứu sản xuất hạt vi bao bằng phương pháp nhỏ giọt tự động với hệ thống ứng dụng quy mô lớn.

Nghiên cứu ứng dụng hạt vi bao XTP trong một số sản phẩm thực phẩm khác.

DANH MỤC CÁC CÔNG BỐ KHOA HỌC

1. T N T Nguyen, A Q Do, T T Trinh, H N Le, P H Phan, V T Phung, T T T Nguyen and M X H Nguyen. (2023). Ultrasound probe assisted extraction of *Paramignya trimera* (Oliver) Guillaum root, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1155.

2. Thao T.N.N., Tan T.T., Nghia H.L., Tuyen C.K., Hien P.P., and Hong M.X.N. (2024). Aqueous Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolics and Saponins from Xao Tam Phan Plant Parts: Optimization and Comparison of Extraction Efficiency. *Journal Of Technical Education Science*, *19*(03), 77-88.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Abdel-Aal, E.-S. M., & Rabalski, I. (2013). Effect of baking on free and bound phenolic acids in wholegrain bakery products. *Journal of Cereal Science*, *57*(3), 312–318.

[2] Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, *12*(1), 1.

[3] Adorno, W. T., Rezzadori, K., Arend, G. D., Chaves, V. C., Reginatto, F. H., Di Luccio, M., & Petrus, J. C. C. (2017). Enhancement of phenolic compounds content and antioxidant activity of strawberry (Fragaria× ananassa) juice by block freeze concentration technology. *International Journal of Food Science & Technology*, *52*(3), 781–787.

[4] Aider, M., & De Halleux, D. (2009). Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. *LWT-Food Science and Technology*, *42*(3), 679–685.

[5] Aider, M., De Halleux, D., & Akbache, A. (2007). Whey cryoconcentration and impact on its composition. *Journal of Food Engineering*, *82*(1), 92–102.

[6] Aider, M., & Ounis, W. Ben. (2012). Skim milk cryoconcentration as affected by the thawing mode: gravitational vs. microwave-assisted. *International Journal of Food Science & Technology*, *47*(1), 195–202.

[7] Akbari, S., Abdurahman, N. H., Yunus, R. M., Alsaggaf, A. H. A., & Ahmed, N. (2021). LC-QTOF-MS analysis of phenolics and saponins extracted from Aloe vera leaves via microwave technology in optimal condition. *South African Journal of Botany*, *139*, 362–373.

[8] Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, *6*(4). https://doi.org/10.3390/plants6040042

[9] Álvarez García, C. (2018). Chapter 11 - Application of Enzymes for Fruit Juice Processing. In G. Rajauria & B. K. Tiwari (Eds.), *Fruit Juices* (pp. 201–216). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00011-4

[10] Amran, N. A., & Jusoh, M. (2016). Effect of coolant temperature and circulation flowrate on the performance of a vertical finned crystallizer. *Procedia Engineering*, *148*, 1408–1415.

[11] Arepally, D., Reddy, R. S., Goswami, T. K., & Datta, A. K. (2020). Biscuit baking: A review. *Lwt*, *131*, 109726.

[12] Astari, M. D., Dewita, D., & Suparmi, S. (2015). *Shelf life of Spirulina biscuit with different packaging*. Riau University.

[13] Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 426–436. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014

[14] Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(1), 143–182.

[15] Barrow, C. J., Wang, B., Adhikari, B., & Liu, H. (2013). Spray drying and encapsulation of omega-3 oils. In *Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids*. Woodhead Publishing Limited. https://doi.org/10.1533/9780857098863.2.194

[16] Belén, F., Sánchez, J., Hernández, E., Auleda, J. M., & Raventós, M. (2012). One option

for the management of wastewater from tofu production: Freeze concentration in a falling-film system. *Journal of Food Engineering*, *110*(3), 364–373.

[17] Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A., Barišić, L., Vrsaljko, D., Karlović, S., Špoljarić, I., Vojvodić, A., Mršić, G., & Komes, D. (2016). Emulsion templated microencapsulation of dandelion (Taraxacum officinale L.) polyphenols and β-carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. *Food Hydrocolloids*, *57*, 139–152.

[18] Belščak-Cvitanović, A., Jurić, S., Đorđević, V., Barišić, L., Komes, D., Ježek, D., Bugarski, B., & Nedović, V. (2017). Chemometric evaluation of binary mixtures of alginate and polysaccharide biopolymers as carriers for microencapsulation of green tea polyphenols. *International Journal of Food Properties*, *20*(9), 1971–1986.

[19] Boaventura, B. C. B., Murakami, A. N. N., Prudêncio, E. S., Maraschin, M., Murakami, F. S., Amante, E. R., & Amboni, R. D. de M. C. (2013). Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (Ilex paraguariensis A. St. Hil.) through freeze concentration technology. *Food Research International*, *53*(2), 686–692. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.042

[20] Boeing, J. S., Barizão, É. O., e Silva, B. C., Montanher, P. F., de Cinque Almeida, V., & Visentainer, J. V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, *8*, 1–9.

[21] Bremer Boaventura, B. C., MURAKAMI, A. N. N., SCHWINDEN PRUDENCIO, E., Maraschin, M., Murakami, F. S., & Amante, E. R. (2013). Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (Ilex paraguariensis A. St. Hil.) through freeze concentration technology. *Food Research International*, *53*(2), 686–692.

[22] Broxterman, S. E. (2018). *The architecture of the primary plant cell wall: the role of pectin reconsidered*. Wageningen University and Research.

[23] Bui-Phuc, T., Cong-Hau, N., Kim-Ngoc, V.-T., VTD, T., VTD, T., Anh-Dao, L.-T., Dinh-Phong, N., & Hoang-Duy, N. (2023). Effects of extraction conditions on total phenolic compounds, antioxidant capacity and saponin content of Momordica charantia leaves. *AIP Conference Proceedings*, *2907*(1).

[24] Bùi Thị Thùy Linh, Đặng Hoàng Phú, Nguyễn Trung Nhân. (2015). Khảo sát thành phần hóa học cao chloroform của thân cây Xáo tam phân - *Paramignya trimera* (Oliver) Burkill - Họ Rutaceaa . *Tạp Chí Phân Tích Hoá, Lý và Sinh Học*, *20*(4), 297–302.

[25] Bùi Trọng Đạt, Nguyễn Thanh Hồng, Lê Tiến Dũng, N. H. A. (2013). Một coumarin mới và chromene phân lập từ rễ cây Xáo tam phân Paramignya trimera. *Tạp Chí Hóa Học*, *4(51)*(4), 362–365.

[26] Calderón-Oliver, M., Pedroza-Islas, R., Escalona-Buendía, H. B., Pedraza-Chaverri, J., & Ponce-Alquicira, E. (2017). Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation of nisin in combination with an avocado antioxidant extract. *Food Hydrocolloids*, *62*, 49–57.

[27] Cao, L., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K., & Fang, Y. (2020). Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. *Carbohydrate Polymers*, *242*, 116389.

[28] Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(2), 155–171.

[29] Cárcel, J. A., García-Pérez, J. V, Mulet, A., Rodríguez, L., & Riera, E. (2010). Ultrasonically assisted antioxidant extraction from grape stalks and olive leaves. *Physics Procedia*, *3*(1), 147–152.

[30] Cayres, C. A., Ascheri, J. L. R., & Couto, M. A. P. G. (2021). Evaluation of nutritional characteristics and consumers' acceptance of gluten-free sweet biscuits made from rice-based pregelatinized composite flours containing orange pomace and soy protein isolate. *SN Applied Sciences*, *3*, 1–13.

[31] Chemat, F., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(4), 813–835.

[32] Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 540–560. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035

[33] Choudhari, S. M., & Ananthanarayan, L. (2007). Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chemistry*, *102*(1), 77–81.

[34] Choudhury, N., Meghwal, M., & Das, K. (2021). Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods. *Food Frontiers*, *2*(4), 426–442.

[35] Chu, Y.-H., Han, I.-S., & Han, C. (2002). Improved evolutionary operation based on D-optimal design and response surface method. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *19*, 535–544.

[36] Chung, H.-J., Cho, A., & Lim, S.-T. (2014). Utilization of germinated and heat-moisture treated brown rices in sugar-snap cookies. *LWT-Food Science and Technology*, *57*(1), 260–266.

[37] Chung, J. W., Noh, E. J., Zhao, H. L., Sim, J.-S., Ha, Y. W., Shin, E. M., Lee, E. B., Cheong, C. S., & Kim, Y. S. (2008). Anti-inflammatory activity of prosapogenin methyl ester of platycodin D via nuclear factor-kappaB pathway inhibition. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *31*(11), 2114–2120.

[38] Correa, L. J., Ruiz, R. Y., & Moreno, F. L. (2018). Effect of falling-film freeze concentration on bioactive compounds in aqueous coffee extract. *Journal of Food Process Engineering*, *41*(1), e12606.

[39] Culetu, A., Ionescu, V., Todasca, M. C., & Duta, D. E. (2020). Evaluation of the storage-associated changes in the fatty acid profile of oat-based gluten-free cookies prepared with different fats. *Food Science and Biotechnology*, *29*, 759–767.

[40] da Silva Haas, I. C., de Espindola, J. S., de Liz, G. R., Luna, A. S., Bordignon-Luiz, M. T., Prudêncio, E. S., de Gois, J. S., & Fedrigo, I. M. T. (2022). Gravitational assisted three-stage block freeze concentration process for producing enriched concentrated orange juice (Citrus sinensis L.): Multi-elemental profiling and polyphenolic bioactives. *Journal of Food Engineering*, *315*, 110802.

[41] Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., & Madani, K. (2014). Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, *61*, 31–40.

[42] Danalache, F., Mata, P., Alves, V. D., & Moldão-Martins, M. (2018). Chapter 10 - Enzyme-Assisted Extraction of Fruit Juices. In G. Rajauria & B. K. Tiwari (Eds.), *Fruit Juices* (pp. 183–200). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00010-2

[43] Dang, B. K., Huynh, T. V, & Le, V. V. M. (2012). Simultaneous treatment of acerola mash by ultrasound and pectinase preparation in acerola juice processing: optimization of the pectinase concentration and pectolytic time by response surface methodology. *International Food Research Journal*, *19*(2), 509.

[44] Dang, Phu H, Le, T. H., Phan, P. K. T., Le, P. T. T., Nguyen, M. T. T., & Nguyen, N. T. (2017). Two acridones and two coumarins from the roots of Paramignya trimera. *Tetrahedron Letters*, *58*(16), 1553–1557.

[45] Dang, Phu Hoang, Le, T. H., Van Do, T. N., Nguyen, H. X., Nguyen, M. T. T., & Nguyen, N. T. (2024). Paratrimerin Z, an undescribed chromene derivative from the roots of Paramignya trimera. *Natural Product Research*, *38*(2), 327–330.

[46] de Farias, N. S., Silva, B., de Oliveira Costa, A. C., & Müller, C. M. O. (2021). Alginate based antioxidant films with yerba mate (Ilex paraguariensis St. Hil.): Characterization and kinetics of phenolic compounds release. *Food Packaging and Shelf Life*, *28*, 100548.

[47] Ding, Z., Qin, F. G. F., Peng, K., Yuan, J., Huang, S., Jiang, R., & Shao, Y. (2021). Heat and mass transfer of scraped surface heat exchanger used for suspension freeze concentration. *Journal of Food Engineering*, *288*, 110141.

[48] Ding, Z., Qin, F. G. F., Yuan, J., Huang, S., Jiang, R., & Shao, Y. (2019). Concentration of apple juice with an intelligent freeze concentrator. *Journal of Food Engineering*, *256*, 61–72. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.03.018

[49] Dong, J., Liu, Y., Liang, Z., & Wang, W. (2010). Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from Salvia miltiorrhiza root. *Ultrasonics Sonochemistry*, *17*(1), 61–65.

[50] Đỗ Thị Thảo, Nguyễn Thị Cúc, Trần Thu Hường, Phạm Ngọc Khanh, Ninh Thế Sơn, Nguyễn Mạnh Cường. (2015). Tác dụng bảo vệ gan của cao rễ cây Xáo tam phân (Paramignya trimera) trên mô hình chuột bị gây tổn thương gan bằng paracetamol. *Tạp Chí Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam*, *1*(2), 60–64.

[51] Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., & Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, *7*, 452–490.

[52] Dordoni, R., Garrido, G. D., Marinoni, L., Torri, L., Piochi, M., & Spigno, G. (2019). *Research Article Enrichment of Whole Wheat Cocoa Biscuits with Encapsulated Grape Skin Extract*.

[53] Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, *35*(February). https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547

[54] Edewor, T. I., Akpor, O. B., & Owa, S. O. (2016). Determination of antibacterial activity, total phenolic, flavonoid and saponin contents in leaves of Anogeissus leiocarpus (DC.) Guill and Perr. *J Coast Life Med*, *4*(4), 310–314.

[55] El-Messery, T. M., Aly, E., López-Nicolas, R., Sánchez-Moya, T., & Ros, G. (2021). Bioaccessibility and antioxidant activity of PCL-microencapsulated olive leaves polyphenols and its application in yogurt. *Journal of Food Science*, *86*(10), 4303–4315.

[56] El Aziz, M. M. A., Ashour, A. S., & Melad, A. S. G. (2019). A review on saponins from medicinal plants: chemistry, isolation, and determination. *J. Nanomed. Res*, *8*(1), 282–288.

[57] Fang, Z., & Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of

bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, *129*(3), 1139–1147.

[58] Fareez, I. M., Lim, S. M., Zulkefli, N. A. A., Mishra, R. K., & Ramasamy, K. (2018). Cellulose derivatives enhanced stability of alginate-based beads loaded with Lactobacillus plantarum LAB12 against low pH, high temperature and prolonged storage. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *10*, 543–557.

[59] Farrés, I. F., & Norton, I. T. (2014). Formation kinetics and rheology of alginate fluid gels produced by in-situ calcium release. *Food Hydrocolloids*, *40*, 76–84.

[60] Fernández, K., Vega, M., & Aspé, E. (2015). An enzymatic extraction of proanthocyanidins from País grape seeds and skins. *Food Chemistry*, *168*, 7–13.

[61] Ferreira, S., & Nicoletti, V. R. (2021). Microencapsulation of ginger oil by complex coacervation using atomization: Effects of polymer ratio and wall material concentration. *Journal of Food Engineering*, *291*, 110214.

[62] Frent, O. D., Vicas, L. G., Duteanu, N., Morgovan, C. M., Jurca, T., Pallag, A., Muresan, M. E., Filip, S. M., Lucaciu, R.-L., & Marian, E. (2022). Sodium alginate—Natural microencapsulation material of polymeric microparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(20), 12108.

[63] Gabrielsson, J., Lindberg, N., & Lundstedt, T. (2002). Multivariate methods in pharmaceutical applications. *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society*, *16*(3), 141–160.

[64] Gao, Y., Shi, Y., Miao, N., Xing, W., Yun, C., Wang, S., Wang, W., & Wang, H. (2022). A green ultrasound-assisted enzymatic extraction method for efficient extraction of total polyphenols from Empetrum nigrum and determination of its bioactivities. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *109*, 559–567.

[65] Gayoso, L., Roxo, M., Cavero, R. Y., Calvo, M. I., Ansorena, D., Astiasarán, I., & Wink, M. (2018). Bioaccessibility and biological activity of Melissa officinalis, Lavandula latifolia and Origanum vulgare extracts: Influence of an in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, *44*, 146–154.

[66] Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2016). Stability of betacyanin from red pitahaya (Hylocereus polyrhizus) and its potential application as a natural colourant in milk. *International Journal of Food Science & Technology*, *51*(2), 427–434.

[67] Ghai, K., Gupta, A. K., & Gupta, P. K. (2012). Pectin: A Versatile Biopolymer with Numerous Health Benefits and Medical Uses: *Journal of Biologically Active Products from Nature*, *2*(4), 250–255. https://doi.org/10.1080/22311866.2012.10719132

[68] Ghorbanzade, T., Jafari, S. M., Akhavan, S., & Hadavi, R. (2017). Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*, *216*, 146–152.

[69] Girard, A. L., & Awika, J. M. (2020). Effects of edible plant polyphenols on gluten protein functionality and potential applications of polyphenol–gluten interactions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(4), 2164–2199.

[70] Giunchedi, P., Gavini, E., Moretti, M. D. L., & Pirisino, G. (2000). Evaluation of alginate compressed matrices as prolonged drug delivery systems. *AAPS PharmSciTech*, *1*, 31–36.

[71] Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crișan, G., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Enzyme-assisted extractions of polyphenols–A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, *88*, 302–315.

[72] Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion.

Trends in Biotechnology, *30*(11), 591–600.

[73] Haas, I. C. da S., Espindola, J. S. de, de Liz, G. R., Luna, A. S., Bordignon-Luiz, M. T., Prudêncio, E. S., de Gois, J. S., & Fedrigo, I. M. T. (2022). Gravitational assisted three-stage block freeze concentration process for producing enriched concentrated orange juice (Citrus sinensis L.): Multi-elemental profiling and polyphenolic bioactives. *Journal of Food Engineering*, *315*(August 2021). https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110802

[74] Hadidi, M., Ibarz, A., & Pagan, J. (2020). Optimisation and kinetic study of the ultrasonic-assisted extraction of total saponins from alfalfa (Medicago sativa) and its bioaccessibility using the response surface methodology. *Food Chemistry*, *309*, 125786.

[75] He, L., Liu, N., Wang, K., Zhang, L., Li, D., Wang, Z., Xu, G., Liu, Y., & Xu, Q. (2021). Rosamultin from Potentilla anserine L. exhibits nephroprotection and antioxidant activity by regulating the reactive oxygen species/C/EBP homologous protein signaling pathway. *Phytotherapy Research*, *35*(11), 6343–6358.

[76] Higuchi, T. (1961). Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *50*(10), 874–875.

[77] Hu, D., Chen, L., Qu, Y., Peng, J., Chu, B., Shi, K., Hao, Y., Zhong, L., Wang, M., & Qian, Z. (2018). Oxygen-generating hybrid polymeric nanoparticles with encapsulated doxorubicin and chlorin e6 for trimodal imaging-guided combined chemo-photodynamic therapy. *Theranostics*, *8*(6), 1558.

[78] Hu, S., Yao, X., Hao, Y., Pan, A., & Zhou, X. (2020). 8-Gingerol regulates colorectal cancer cell proliferation and migration through the EGFR/STAT/ERK pathway. *International Journal of Oncology*, *56*(1), 390–397.

[79] Hu, Y., Zhang, S., Han, D., Ding, Z., Zeng, S., & Xiao, X. (2018). Construction and evaluation of the hydroxypropyl methyl cellulose-sodium alginate composite hydrogel system for sustained drug release. *Journal of Polymer Research*, *25*, 1–12.

[80] Huang, D., Zhou, X., Si, J., Gong, X., & Wang, S. (2016). Studies on cellulase-ultrasonic assisted extraction technology for flavonoids from Illicium verum residues. *Chemistry Central Journal*, *10*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s13065-016-0202-z

[81] Huong, T. T., Ha, V. T., Cuong, T. D., Son, N. T., Toan, T. Q., Anh, H. T. N., Tram, N. T. T., Woo, S. H., Kim, Y. H., & Cuong, N. M. (2019). New constituents from the roots and stems of Paramignya trimera. *Natural Product Communications*, *14*(6), 1934578X19861015.

[82] Indiarto, R., Reni, R., Utama, G. L., Subroto, E., Pangawikan, A. D., & Djali, M. (2023a). The physicochemical, antioxidant, and sensory properties of chocolate biscuits incorporated with encapsulated mangosteen (Garcinia mangostana L.) peel extract. *International Journal of Food Properties*, *26*(1), 122–138.

[83] Indiarto, R., Reni, R., Utama, G. L., Subroto, E., Pangawikan, A. D., & Djali, M. (2023b). The physicochemical, antioxidant, and sensory properties of chocolate biscuits incorporated with encapsulated mangosteen (Garcinia mangostana L.) peel extract. *International Journal of Food Properties*, *26*(1), 122–138. https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2159429

[84] Irakli, M., Mygdalia, A., Chatzopoulou, P., & Katsantonis, D. (2019). Impact of the combination of sourdough fermentation and hop extract addition on baking properties, antioxidant capacity and phenolics bioaccessibility of rice bran-enhanced bread. *Food Chemistry*, *285*, 231–239.

[85] Jha, A. K., & Sit, N. (2022). Extraction of bioactive compounds from plant materials using

combination of various novel methods: A review. Trends in Food Science & Technology, 119, 579–591.

[86] J. Mason, T., Chemat, F., & Vinatoru, M. (2010). The Extraction of Natural Products using Ultrasound or Microwaves. *Current Organic Chemistry*, *15*(2), 237–247. https://doi.org/10.2174/138527211793979871

[87] Jose, S., Fangueiro, J. F., Smitha, J., Cinu, T. A., Chacko, A. J., Premaletha, K., & Souto, E. B. (2013). Predictive modeling of insulin release profile from cross-linked chitosan microspheres. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *60*, 249–253.

[88] Jung, H.-J., Park, H.-J., Kim, R.-G., Shin, K.-M., Ha, J., Choi, J.-W., Kim, H. J., Lee, Y. S., & Lee, K.-T. (2003). In vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects of liriodendrin isolated from the stem bark of Acanthopanax senticosus. *Planta Medica*, *69*(07), 610–616.

[89] Jusoh, M., Yunus, R. M., & Abu, H. (2009). Performance investigation on a new design for progressive freeze concentration system. *Journal of Applied Sciences*, *9*(17), 3171–3175.

[90] Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, *77*(3), 215–227.

[91] Kossah, R., Nsabimana, C., Zhang, H., & Chen, W. (2010). Optimization of extraction of polyphenols from Syrian sumac (Rhus coriaria L.) and Chinese sumac (Rhus typhina L.) fruits. *Research Journal of Phytochemistry*, *4*(3), 146–153.

[92] Král, O., Javůrková, Z., Dordevic, D., Pospiech, M., Jančíková, S., Fursova, K., & Tremlová, B. (2021). Biscuits polyphenol content fortification through herbs and grape seed flour addition. *Processes*, *9*(8), 1455.

[93] Kyi, T. M., Daud, W. R. W., Mohammad, A. B., Wahid Samsudin, M., Kadhum, A. A. H., & Talib, M. Z. M. (2005). The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans. *International Journal of Food Science & Technology*, *40*(3), 323–331.

[94] Li, C.-H., Chen, P.-Y., Chang, U.-M., Kan, L.-S., Fang, W.-H., Tsai, K.-S., & Lin, S.-B. (2005). Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells. *Life Sciences*, *77*(3), 252–265.

[95] Li, Fang, Li, W., Fu, H., Zhang, Q., & Koike, K. (2007). Pancreatic lipase-inhibiting triterpenoid saponins from fruits of Acanthopanax senticosus. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *55*(7), 1087–1089.

[96] Li, Feng, Mao, Y. D., Wang, Y. F., Raza, A., Qiu, L. P., & Xu, X. Q. (2017). Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction conditions for improving total phenolic content, antioxidant and antitumor activities in vitro from Trapa quadrispinosa Roxb. residues. *Molecules*, *22*(3). https://doi.org/10.3390/molecules22030396

[97] Li, L., Li, J., Si, S., Wang, L., Shi, C., Sun, Y., Liang, Z., & Mao, S. (2015). Effect of formulation variables on in vitro release of a water-soluble drug from chitosan–sodium alginate matrix tablets. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *10*(4), 314–321.

[98] Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Tomao, V., Cravotto, G., & Chemat, F. (2013). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(1), 12–18.

[99] Lieu, L. N., & Le, V. V. M. (2010). Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. *Ultrasonics-Sonochemistry*, *17*(1), 273–279.

[100] Lin, B., Wang, S., Zhou, A., Hu, Q., & Huang, G. (2023). Ultrasound-assisted enzyme extraction and properties of Shatian pomelo peel polysaccharide. *Ultrasonics*

Sonochemistry, *98*, 106507.
[101] Lin, Y., Shi, R., Wang, X., & Shen, H.-M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets*, *8*(7), 634–646.
[102] Liu, K., Liu, Y., & Chen, F. (2019). Effect of storage temperature on lipid oxidation and changes in nutrient contents in peanuts. *Food Science & Nutrition*, *7*(7), 2280–2290.
[103] Mabberley, D. J. (1998). Australian Citreae with notes on other Aurantioideae (Rutaceae). *Telopea*, *7*(4), 333–344.
[104] Mai, T. H. A., & Tran, T. T. T. (2022). *Supplementation of pitaya peel powder to cookie formulation: Effects of ratio of pitaya peel powder on the product quality, predicted glycemic index and antioxidant release during in vitro sequential digestion*.
[105] Maleki, G., Woltering, E. J., & Mozafari, M. R. (2022). Applications of chitosan-based carrier as an encapsulating agent in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, *120*, 88–99.
[106] Manley, D. (2001). *Biscuit, cracker and cookie recipes for the food industry*. Elsevier, 4.
[107] Marathe, S. J., Jadhav, S. B., Bankar, S. B., Dubey, K. K., & Singhal, R. S. (2019). Improvements in the extraction of bioactive compounds by enzymes. *Current Opinion in Food Science*, *25*, 62–72.
[108] Mareta, D. T. (2019). Hedonic test method for measuring instant pindang seasoning powder preferences. *Journal of Science and Applicative Technology*, *3*(1), 34–36.
[109] Mason, Timothy J., & Lorimer, J. P. (2002). Applied Sonochemistry. *Applied Sonochemistry, April 2002*, 2–3. https://doi.org/10.1002/352760054x
[110] Mba, O. I., Kwofie, E. M., & Ngadi, M. (2019). Kinetic modelling of polyphenol degradation during common beans soaking and cooking. *Heliyon*, *5*(5).
[111] Mehta, N., Kumar, P., Verma, A. K., Umaraw, P., Kumar, Y., Malav, O. P., Sazili, A. Q., Domínguez, R., & Lorenzo, J. M. (2022). Microencapsulation as a noble technique for the application of bioactive compounds in the food industry: A comprehensive review. *Applied Sciences*, *12*(3), 1424.
[112] Meneses, D. L., Ruiz, Y., Hernandez, E., & Moreno, F. L. (2021). Multi-stage block freeze-concentration of green tea (Camellia sinensis) extract. *Journal of Food Engineering*, *293*, 110381.
[113] Meyer, A. S., Jepsen, S. M., & Sørensen, N. S. (1998). Enzymatic Release of Antioxidants for Human Low-Density Lipoprotein from Grape Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(7), 2439–2446. https://doi.org/10.1021/jf971012f
[114] Milkova, V., & Goycoolea, F. M. (2020). Encapsulation of caffeine in polysaccharide oil-core nanocapsules. *Colloid and Polymer Science*, *298*, 1035–1041.
[115] Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M. C., Meza-Velázquez, J. A., Simal, S., & Rosselló, C. (2014). Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. *Carbohydrate Polymers*, *106*, 179–189.
[116] Miron, T. L., Herrero, M., & Ibáñez, E. (2013). Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (Melissa officinalis) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, *1288*, 1–9.
[117] Miyawaki, O., Kato, S., & Watabe, K. (2012). Yield improvement in progressive freeze-concentration by partial melting of ice. *Journal of Food Engineering*, *108*(3), 377–382.
[118] Mohamad, M., Ali, M. W., & Ahmad, A. (2010). Modelling for extraction of major phytochemical components from Eurycoma longifolia. *Journal of Applied Sciences*,

10(21), 2572–2577.
[119] Mohamed, G. F., Sulieman, A. M., Soliman, N. G., & Bassiuny, S. S. (2014). *Fortification of biscuits with fish protein concentrate.*
[120] Moholkar, V. S., Rekveld, S., & Warmoeskerken, M. M. C. G. (2000). Modeling of the acoustic pressure fields and the distribution of the cavitation phenomena in a dual frequency sonic processor. *Ultrasonics*, *38*(1–8), 666–670.
[121] Moreno, F. L., Raventós, M., Hernández, E., & Ruiz, Y. (2014). Block freeze-concentration of coffee extract: Effect of freezing and thawing stages on solute recovery and bioactive compounds. *Journal of Food Engineering*, *120*, 158–166.
[122] Moreno, F. L., Robles, C. M., Sarmiento, Z., Ruiz, Y., & Pardo, J. M. (2013). Effect of separation and thawing mode on block freeze-concentration of coffee brews. *Food and Bioproducts Processing*, *91*(4), 396–402.
[123] Morison, K. R., & Hartel, R. W. (2018). Evaporation and freeze concentration. In *Handbook of food engineering* (pp. 705–764). CRC Press.
[124] Mosafa, L., Nadian, N., & Hojatoleslami, M. (2017). Investigating the effect of whole oat flour, maltodextrin and isomalt on textural and sensory characteristics of biscuits using response surface methodology. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *11*, 1780–1786.
[125] Mulia, K., Singarimbun, A. C., & Krisanti, E. A. (2020). Optimization of chitosan–alginate microparticles for delivery of mangostins to the colon area using box–behnken experimental design. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3), 873.
[126] Muniglia, L., Claisse, N., Baudelet, P.-H., & Ricochon, G. (2014). Enzymatic aqueous extraction (EAE). *Alternative Solvents for Natural Products Extraction*, 167–204.
[127] Murata, M. (2021). Browning and pigmentation in food through the Maillard reaction. *Glycoconjugate Journal*, *38*, 283–292.
[128] Nadar, S. S., Rao, P., & Rathod, V. K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, *108*, 309–330.
[129] Nadeem, M., Imran, M., Taj, I., Ajmal, M., & Junaid, M. (2017). Omega-3 fatty acids, phenolic compounds and antioxidant characteristics of chia oil supplemented margarine. *Lipids in Health and Disease*, *16*(1), 1–12.
[130] Nag, S., & Sit, N. (2018). Optimization of ultrasound assisted enzymatic extraction of polyphenols from pomegranate peels based on phytochemical content and antioxidant property. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *12*(3), 1734–1743.
[131] Nakagawa, K., Nagahama, H., Maebashi, S., & Maeda, K. (2010). Usefulness of solute elution from frozen matrix for freeze-concentration technique. *Chemical Engineering Research and Design*, *88*(5–6), 718–724.
[132] Nguyen-Thi, L. H., Nguyen, S. T., Tran, T. P., Phan-Lu, C. N., Van Pham, P., & The Van, T. (2020). Anti-cancer Effect of Xao Tam Phan Paramignya trimera Methanol Root Extract on Human Breast Cancer Cell Line MCF-7 in 3D Model. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1292*, 13–25. https://doi.org/10.1007/5584_2018_148
[133] Nguyen, C. H., Banh, K. S., Dang, C. H., Nguyen, C. H., & Nguyen, T. D. (2022). B-Cyclodextrin/Alginate Nanoparticles Encapsulated 5-Fluorouracil As an Effective and Safe Anticancer Drug Delivery System. Arab. *J. Chem*, *15*, 103814.
[134] Nguyen, G. T. N., & Nguyen, T. M. (2021). Effect of extraction conditions (Temperature, ph and time) by cellulase on chemical properties of dried oyster mushroom (pleurotus sajor-

caju) extract. *Food Research*, *5*(3), 351–358. https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(3).613

[135] Nguyễn Mạnh Cường, Hồ Việt Đức, Nguyễn Văn Tài, Phạm Ngọc Khanh, Vũ Thị Hà, Trần Thu Hường, Nguyễn Duy Nhất (2013). Bước đầu nghien cứu thành phần hóa học cây Xáo tam phân họ Rutaceae. *Tạp chí Hoá học*, *3*(51), 292–296.

[136] Nguyễn Minh Khởi, Phạm Thị Tuyết Hằng, Đỗ Thị Phương (2013). Nghiên cứu độc tính cấp, tác dụng bảo vệ gan và tác dụng gây độc tế bào ung thư của xáo tam phân. *Tạp Chí Dược Liệu*, *18*(1), 14–20.

[137] Nguyen, M. T. T., Dang, P. H., Nguyen, T. N., Bui, L. T. T., Nguyen, H. X., Le, T. H., Van Do, T. N., & Nguyen, N. T. (2018). Paratrimerins G and H, two prenylated phenolic compounds from the stems of Paramignya trimera. *Phytochemistry Letters*, *23*, 78–82.

[138] Nguyen, N. T., Dang, P. H., Vu, N. X. T., Le, T. H., & Nguyen, M. T. T. (2017). Quinoliniumolate and 2 H-1, 2, 3-triazole derivatives from the stems of Paramignya trimera and their α-glucosidase inhibitory activities: in vitro and in silico studies. *Journal of Natural Products*, *80*(7), 2151–2155.

[139] Nguyen, S. T., Do, N. M., Vo, P. H., Nguyen, T. T., Truong, K. D., & Van Pham, P. (2020). Xao tam phan (Paramignya trimera) methanol extract induced apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cell line in vitro. *Science and Technology Development Journal*, *23*(1), 484–489.

[140] Nguyen, T. T. T., & Le, V. V. M. (2013). Effects of ultrasound on cellulolytic activity of cellulase complex. *International Food Research Journal*, *20*(2).

[141] Nguyen Thi, K.-O., Le, T.-H., Nguyen, H.-D., Nguyen, Q.-H., Do, T.-Y., Mai, T.-P.-N., & Le, T.-V.-A. (2022). Phytochemical Composition and Potential Bioactivities of the Essential Oil from the Peels of Paramignya trimera (Oliv.) Guillaum from Vietnam. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *25*(2), 273–281.

[142] Nguyen, V. P. T., Le, T. T., & Le, V. V. M. (2013). Application of combined ultrasound and cellulase preparation to guava (Psidium guajava) mash treatment in juice processing: optimization of biocatalytic conditions by response surface methodology. *International Food Research Journal*, *20*(1), 377–381.

[143] Nguyen, V. T., Bowyer, M. C., Vuong, Q. Van, Altena, I. A. V., & Scarlett, C. J. (2015). Phytochemicals and antioxidant capacity of Xao tam phan (Paramignya trimera) root as affected by various solvents and extraction methods. *Industrial Crops and Products*, *67*, 192–200. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.051

[144] Nguyen, V. T., Pham, N. M. Q., Vuong, Q. Van, Bowyer, M. C., van Altena, I. A., & Scarlett, C. J. (2016). Phytochemical retention and antioxidant capacity of xao tam phan (Paramignya trimera) root as prepared by different drying methods. *Drying Technology*, *34*(3), 324–334. https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1053566

[145] Nguyen, V. T., Sakoff, J. A., & Scarlett, C. J. (2017a). Physicochemical, antioxidant, and cytotoxic properties of Xao Tam Phan (Paramignya trimera) root extract and its fractions. *Chemistry & Biodiversity*, *14*(4), e1600396.

[146] Nguyen, V. T., Sakoff, J. A., & Scarlett, C. J. (2017b). Physicochemical Properties, Antioxidant and Anti-proliferative Capacities of Dried Leaf and Its Extract from Xao tam phan (Paramignya trimera). *Chemistry & Biodiversity*, *14*(6), e1600498.

[147] Nguyen, V. T., & Scarlett, C. (2019). Cytotoxic activity of extracts and fractions from Paramignya trimera root and Phyllanthus amarus against pancreatic cancer cell lines. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, *15*, 245–249.

[148] Ninh The Son. (2018). Notes on the genus Paramignya: phytochemistry and biological

activity. Oakenfull, D. G. (1991). The chemistry of high-methoxyl pectins. *The Chemistry and Technology of Pectin*, 87–108.

[149] Ogawa, H., Nakamura, R., & Baba, K. (2005). Beneficial effect of laserpitin, a coumarin compound from Angelica keiskei, on lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *32*(12), 1104–1109.

[150] Orellana-Palma, P., Tobar-Bolaños, G., Casas-Forero, N., Zúñiga, R. N., & Petzold, G. (2020). Quality attributes of cryoconcentrated calafate (Berberis microphylla) juice during refrigerated storage. *Foods*, *9*(9), 1314.

[151] Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry*, *272*, 494–506.

[152] Paciulli, M., Grimaldi, M., Rinaldi, M., Cavazza, A., Flamminii, F., Di Mattia, C., Gennari, M., & Chiavaro, E. (2023). Microencapsulated olive leaf extract enhances physicochemical stability of biscuits. *Future Foods*, *7*, 100209.

[153] Paciulli, M., Rinaldi, M., Cavazza, A., Ganino, T., Rodolfi, M., Chiancone, B., & Chiavaro, E. (2018). Effect of chestnut flour supplementation on physico-chemical properties and oxidative stability of gluten-free biscuits during storage. *LWT*, *98*, 451–457.

[154] Paraskevopoulou, A., Rizou, T., & Kiosseoglou, V. (2019). Biscuits enriched with dietary fibre powder obtained from the water-extraction residue of maize milling by-product. *Plant Foods for Human Nutrition*, *74*, 391–398.

[155] Passos, C. P., Yilmaz, S., Silva, C. M., & Coimbra, M. A. (2009). Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chemistry*, *115*(1), 48–53.

[156] Pasukamonset, P., Kwon, O., & Adisakwattana, S. (2016). Alginate-based encapsulation of polyphenols from Clitoria ternatea petal flower extract enhances stability and biological activity under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, *61*, 772–779.

[157] Phạm Hoàng Hộ. (1999). *Cây cỏ Việt Nam Quyển II* (p. 439). NXB Trẻ Tp. Hồ Chí Minh.

[158] Phạm Huy Bách, Vũ Văn Tuấn, Nguyễn Thị Hà Ly, Nguyễn Minh Khởi, Phạm Thiên Thương (2013). Phân lập và định lượng ostruthin trong dược liệu xáo tam phân thu hái tại Việt Nam. *Tạp Chí Dược Liệu*, *18*(3), 173–178.

[159] Phi, T. C. M., Chu, H. H., Trieu Le, N., & Nguyen, D. B. (2020). Phylogenetic relationship of Paramignya trimera and its relatives: an evidence for the wide sexual compatibility. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-020-78448-2

[160] Pinto, D., Castro, I., Vicente, A., Bourbon, A. I., & Cerqueira, M. Â. (2014). Functional Bakery Products. *Bakery Products Science and Technology*, 431–452. https://doi.org/10.1002/9781118792001.ch25

[161] Prestes, A. A., Helm, C. V., Esmerino, E. A., Silva, R., da Cruz, A. G., & Prudencio, E. S. (2022). Freeze concentration techniques as alternative methods to thermal processing in dairy manufacturing: A review. *Journal of Food Science*, *87*(2), 488–502.

[162] Qin, F. G. F., Ding, Z., Peng, K., Yuan, J., Huang, S., Jiang, R., & Shao, Y. (2021). Freeze concentration of apple juice followed by centrifugation of ice packed bed. *Journal of Food Engineering*, *291*, 110270.

[163] Ramadan, M. F., Sitohy, M. Z., & Moersel, J.-T. (2008). Solvent and enzyme-aided aqueous extraction of goldenberry (Physalis peruviana L.) pomace oil: Impact of processing on composition and quality of oil and meal. *European Food Research and Technology*, *226*,

1445–1458.

[164] Rehman, A., Ahmad, T., Aadil, R. M., Spotti, M. J., Bakry, A. M., Khan, I. M., Zhao, L., Riaz, T., & Tong, Q. (2019). Pectin polymers as wall materials for the nano-encapsulation of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, *90*, 35–46.

[165] Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, *5*(1), 23–36.

[166] Roldán-Gutiérrez, J. M., Ruiz-Jiménez, J., & De Castro, M. D. L. (2008). Ultrasound-assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction. *Talanta*, *75*(5), 1369–1375.

[167] Romani, S., Rocculi, P., Tappi, S., & Dalla Rosa, M. (2016). Moisture adsorption behaviour of biscuit during storage investigated by using a new Dynamic Dewpoint method. *Food Chemistry*, *195*, 97–103.

[168] Rudrapal, M., Celik, I., Chinnam, S., Ansari, M. A., Khan, J., Alghamdi, S., Almehmadi, M., Zothantluanga, J. H., & Khairnar, S. J. (2022). Phytocompounds as potential inhibitors of SARS-CoV-2 Mpro and PLpro through computational studies. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *29*(5), 3456–3465.

[169] Rutz, J. K., Borges, C. D., Zambiazi, R. C., Crizel-Cardozo, M. M., Kuck, L. S., & Noreña, C. P. Z. (2017). Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. *Food Chemistry*, *220*, 59–66.

[170] Rutz, J. K., Zambiazi, R. C., Borges, C. D., Krumreich, F. D., da Luz, S. R., Hartwig, N., & da Rosa, C. G. (2013). Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, tara gums and xanthan-tara hydrogel matrixes. *Carbohydrate Polymers*, *98*(2), 1256–1265.

[171] Sabaghi, M., Hoseyni, S. Z., Tavasoli, S., Mozafari, M. R., & Katouzian, I. (2021). Strategies of confining green tea catechin compounds in nano-biopolymeric matrices: A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *204*, 111781.

[172] Sánchez, J., Hernández, E., Auleda, J. M., & Raventós, M. (2011). Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant: Process and characterization. *Journal of Food Engineering*, *103*(2), 147–155.

[173] Sánchez, J., Ruiz, Y., Auleda, J. M., Hernández, E., & Raventós, M. (2009). Freeze concentration in the fruit juices industry. *Food Science and Technology International*, *15*(4), 303–315.

[174] Shahidi, F., & Hossain, A. (2022). Role of lipids in food flavor generation. *Molecules*, *27*(15), 5014.

[175] Shen, L., Pang, S., Zhong, M., Sun, Y., Qayum, A., Liu, Y., Rashid, A., Xu, B., Liang, Q., Ma, H., & Ren, X. (2023). A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrasonics Sonochemistry*, *101*(September), 106646. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106646

[176] Sheng, K., Zhang, G., Kong, X., Wang, J., Mu, W., & Wang, Y. (2021a). Encapsulation and characterisation of grape seed proanthocyanidin extract using sodium alginate and different cellulose derivatives. *International Journal of Food Science & Technology*, *56*(12), 6420–6430.

[177] Sheng, K., Zhang, G., Kong, X., Wang, J., Mu, W., & Wang, Y. (2021b). Encapsulation and characterisation of grape seed proanthocyanidin extract using sodium alginate and

different cellulose derivatives. *International Journal of Food Science and Technology*, *56*(12), 6420–6430. https://doi.org/10.1111/ijfs.15299

[178] Shi, J., Xue, S. J., Ma, Y., Li, D., Kakuda, Y., & Lan, Y. (2009). Kinetic study of saponins B stability in navy beans under different processing conditions. *Journal of Food Engineering*, *93*(1), 59–65.

[179] Siepmann, J., & Peppas, N. A. (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*, 163–174.

[180] Simon, J. E., Quinn, J., & Murray, R. G. (1990). Basil: a source of essential oils. *Advances in New Crops*, *1*, 484–489.

[181] Sinaga, R. N., & Zulaini, Z. (2020). The Effect of Mangosteen Rind Extract (Garcinia mangostana L.) Toward Stress Oxidative Parameter, Leukocytes, Leukocytes Type Counts on Male Rats (Rattus norvegicus) with Excessive Physical Activity. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, *8*(A), 904–909.

[182] Sivakumar, V., Anna, J. L., Vijayeeswarri, J., & Swaminathan, G. (2009). Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. *Ultrasonics Sonochemistry*, *16*(6), 782–789.

[183] Souza, C. J. F., Comunian, T. A., Kasemodel, M. G. C., & Favaro-Trindade, C. S. (2019). Microencapsulation of lactase by W/O/W emulsion followed by complex coacervation: Effects of enzyme source, addition of potassium and core to shell ratio on encapsulation efficiency, stability and kinetics of release. *Food Research International*, *121*, 754–764.

[184] Stafford, A. M. (2002). Plant cell cultures as a source of bioactive small molecules. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, *5*(2), 296–303.

[185] Tamsone, L., Galoburda, R., Kruma, Z., & Majore, K. (2020). Physicochemical properties of biscuits enriched with horseradish (*Armoracia rusticana L.*) products and bioaccessibility of phenolics after simulated human digestion. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *70*(4).

[186] Tan, P. Y., Tan, T. B., Chang, H. W., Mwangi, W. W., Tey, B. T., Chan, E. S., Lai, O. M., Liu, Y., Wang, Y., & Tan, C. P. (2021). Pickering emulsion-templated ionotropic gelation of tocotrienol microcapsules: effects of alginate and chitosan concentrations and gelation process parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *101*(14), 5963–5971. https://doi.org/10.1002/jsfa.11249

[187] Taranto, F., Delvecchio, L. N., Mangini, G., Del Faro, L., Blanco, A., & Pasqualone, A. (2012). Molecular and physico-chemical evaluation of enzymatic browning of whole meal and dough in a collection of tetraploid wheats. *Journal of Cereal Science*, *55*(3), 405–414.

[188] Tchabo, W., Ma, Y., Engmann, F. N., & Zhang, H. (2015). Ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAEE) of phytochemical compounds from mulberry (*Morus nigra*) must and optimization study using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, *63*, 214–225.

[189] Teixeira, C. B., Macedo, G. A., Macedo, J. A., da Silva, L. H. M., & Rodrigues, A. M. da C. (2013). Simultaneous extraction of oil and antioxidant compounds from oil palm fruit (*Elaeis guineensis*) by an aqueous enzymatic process. *Bioresource Technology*, *129*, 575–581.

[190] Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *71*, 100–109.

[191] Todorovic, V., Milenkovic, M., Vidovic, B., Todorovic, Z., & Sobajic, S. (2017).

Correlation between antimicrobial, antioxidant activity, and polyphenols of alkalized/nonalkalized cocoa powders. *Journal of Food Science*, *82*(4), 1020–1027.

[192] Tran, T. H., Le, T. H., Nguyen, T.-H. T., Binh Vong, L., Nguyen, M. T. T., Nguyen, N. T., & Dang, P. H. (2023). A new apotirucallane-type protolimonoid from the leaves of Paramignya trimera. *Natural Product Research*, 1–9.

[193] Trần Thị Thúy Quỳnh, Lê Thị Kim Thoa, Phạm Đông Phương (2014). Phân lập một vài hợp chất acridon alcaloid trong rễ xáo tam phân (Paramignya trimera (Oliv.) Burkill). *Tạp Chí Dược Học*, *458*, 61–64.

[194] Trịnh Hoàng Dương, Trần Thu Phương, Hà Diệu Ly, Nguyễn Thụy Vy, Đặng Văn Sơn, Nguyễn Diệu Liên Hoa (2016). Coumarin và acridon alkaloid từ rễ cây Xáo tam phân Paramignya trimera". *Tạp Chí Khoa Học ĐHQGHN: Khoa Học Tự Nhiên và Công Nghệ*, *32*(4), 115–123.

[195] Trong Le, N., Viet Ho, D., Quoc Doan, T., Tuan Le, A., Raal, A., Usai, D., Sanna, G., Carta, A., Rappelli, P., & Diaz, N. (2020). Biological activities of essential oils from leaves of Paramignya trimera (Oliv.) Guillaum and Limnocitrus littoralis (Miq.) Swingle. *Antibiotics*, *9*(4), 207.

[196] Truong, V., Ta, P. N. M., & Nguyen, P. T. (n.d.). Microencapsulation of Gac (Momordica cochinchinensis Spreng.) fruit oil in Ca-Alginate bead produced through Jetcutter. *Journal of Agriculture and Development*, *19*(4), 80–89.

[197] Tuan Anh, H. Le, Kim, D.-C., Ko, W., Ha, T. M., Nhiem, N. X., Yen, P. H., Tai, B. H., Truong, L. H., Long, V. N., & Gioi, T. (2017). Anti-inflammatory coumarins from Paramignya trimera. *Pharmaceutical Biology*, *55*(1), 1195–1201.

[198] Tuyen, C. K., Nguyen, M. H., Roach, P. D., & Stathopoulos, C. E. (2015). A storage study of encapsulated gac (Momordica cochinchinensis) oil powder and its fortification into foods. *Food and Bioproducts Processing*, *96*, 113–125.

[199] Ugwuona, F., Ukom, A., Ejinkeonye, B., Obeta, N., & Ojinnaka, M. (2023). Exploring the possibilities of some selected flour blends for the development of bakery products: Comparison with some physicochemical and functional properties of wheat flour. *Food Science and Technology International*, *29*(2), 105–114.

[200] Unagolla, J. M., & Jayasuriya, A. C. (2018). Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *114*, 199–209.

[201] US, M. R. A. O., Zin, T., Abdurrazak, M., & Ahmad, B. A. (2015). Chemistry and pharmacology of syringin, a novel bioglycoside: A review. *CHEMISTRY*, *8*(3).

[202] Uyen, N. T. T., Hamid, Z. A. A., & Nurazreena, A. (2019). Fabrication and characterization of alginate microspheres. *Materials Today: Proceedings*, *17*, 792–797.

[203] Vallejo-Castillo, V., Rodríguez-Stouvenel, A., Martínez, R., & Bernal, C. (2020). Development of alginate-pectin microcapsules by the extrusion for encapsulation and controlled release of polyphenols from papaya (Carica papaya L.). *Journal of Food Biochemistry*, *44*(9), e13331.

[204] Van Thanh, H., Phi, N. T. L., Khoi, N. T., Hoan, N. X., & Van Hung, P. (2023). Green extraction and biological activity of phenolic extracts from cashew nut testa using a combination of enzyme and ultrasound-assisted treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *103*(11), 5626–5633.

[205] Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, Ijtt. (2017). Ultrasonically assisted extraction

(UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *97*, 159–178.

[206] Vu, A. T., Kha, T. C., & Phan, H. T. (2023). Encapsulation of bioactive compounds from germinated mung bean by freeze-drying, release kinetics, and storage stability. *Foods*, *13*(1), 100.

[207] Vuong, Q. V, Hirun, S., Roach, P. D., Bowyer, M. C., Phillips, P. A., & Scarlett, C. J. (2013). Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of Carica papaya leaf aqueous extracts. *Journal of Herbal Medicine*, *3*(3), 104–111.

[208] Wang, C., Xu, F.-Q., Shang, J.-H., Xiao, H., Fan, W.-W., Dong, F.-W., Hu, J.-M., & Zhou, J. (2013). Cycloartane triterpenoid saponins from water soluble of Passiflora edulis Sims and their antidepressant-like effects. *Journal of Ethnopharmacology*, *148*(3), 812–817.

[209] Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., & Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, *106*(2), 804–810.

[210] Wang, T., Zhang, Z., Cong, Y., Shi, X., Liu, Y., & Zhao, F. (2013). Prosapogenin A induces apoptosis in human cancer cells in vitro via inhibition of the STAT3 signaling pathway and glycolysis. *Oncology Letters*, *6*(5), 1323–1328.

[211] Wang, Y.-Q., Wang, N.-X., Luo, Y., Yu, C.-Y., & Xiao, J.-H. (2020). Ganoderal A effectively induces osteogenic differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells via cross-talk between Wnt/β-catenin and BMP/SMAD signaling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *123*, 109807.

[212] Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., & Luo, X. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *48*, 538–549. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018

[213] Wen, L., Zhang, Z., Sun, D. W., Sivagnanam, S. P., & Tiwari, B. K. (2020). Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(11), 1826–1841. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1602823

[214] Worrell, E., Laitner, J. A., Ruth, M., & Finman, H. (2003). Productivity benefits of industrial energy efficiency measures. *Energy*, *28*(11), 1081–1098.

[215] Xu, J., Wang, W., & Li, Y. (2019). Dough properties, bread quality, and associated interactions with added phenolic compounds: A review. *Journal of Functional Foods*, *52*, 629–639.

[216] Xu, Y., Zhang, L., Yang, Y., Song, X., & Yu, Z. (2015). Optimization of ultrasound-assisted compound enzymatic extraction and characterization of polysaccharides from blackcurrant. *Carbohydrate Polymers*, *117*, 895–902.

[217] Yin, C., Fan, X., Fan, Z., Shi, D., & Gao, H. (2018). Optimization of enzymes-microwave-ultrasound assisted extraction of Lentinus edodes polysaccharides and determination of its antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, *111*, 446–454. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.007

[218] Yin, X., You, Q., & Jiang, Z. (2011). Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from Tricholoma matsutake by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, *86*(3), 1358–1364.

[219] Zhang, H., Alsarra, I. A., & Neau, S. H. (2002). An in vitro evaluation of a chitosan-containing multiparticulate system for macromolecule delivery to the colon. *International*

Journal of Pharmaceutics, *239*(1–2), 197–205.

[220] Zhang, J., Jia, G., Wanbin, Z., Minghao, J., Wei, Y., Hao, J., Liu, X., Gan, Z., & Sun, A. (2021). Nanoencapsulation of zeaxanthin extracted from Lycium barbarum L. by complex coacervation with gelatin and CMC. *Food Hydrocolloids*, *112*, 106280.

[221] Zhang, L., Guo, S., Wang, M., & He, L. (2015). PEG-based ultrasound-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from Ginkgo biloba leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, *80*, 644–650.

[222] Zhao, H., Fan, W., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Shan, L., Lin, Y., & Kong, W. (2008). Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chemistry*, *107*(1), 296–304.

[223] Zhao, L., Ouyang, D., Cheng, X., Zhou, X., Lin, L., Wang, J., Wu, Q., & Jia, J. (2023). Multi-frequency ultrasound-assisted cellulase extraction of protein from mulberry leaf: Kinetic, thermodynamic, and structural properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, *99*, 106554.

[224] Zhu, Zhenzhou, Li, S., He, J., Thirumdas, R., Montesano, D., & Barba, F. J. (2018). Enzyme-assisted extraction of polyphenol from edible lotus (Nelumbo nucifera) rhizome knot: Ultra-filtration performance and HPLC-MS2 profile. *Food Research International*, *111*, 291–298. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.047

[225] Zhu, Zhiwei, Chen, Z., Zhou, Q., Sun, D.-W., Chen, H., Zhao, Y., Zhou, W., Li, X., & Pan, H. (2018). Freezing efficiency and quality attributes as affected by voids in plant tissues during ultrasound-assisted immersion freezing. *Food and Bioprocess Technology*, *11*(9), 1615–1626.

[226] Zhu, Zhiwei, Sun, D.-W., Zhang, Z., Li, Y., & Cheng, L. (2018). Effects of micro-nano bubbles on the nucleation and crystal growth of sucrose and maltodextrin solutions during ultrasound-assisted freezing process. *LWT*, *92*, 404–411.

[227] Zieliński, H., Szawara-Nowak, D., & Wronkowska, M. (2020). Bioaccessibility of anti-AGEs activity, antioxidant capacity and phenolics from water biscuits prepared from fermented buckwheat flours. *LWT*, *123*, 109051.