

Optimization of enzymatic-assisted extraction of polyphenol from cashew nut testa by using cellulase and pectinase

Huan T. Phan*, Tuyen T. M. Dao, & Phuong T. Nguyen

Faculty of Chemical Engineering and Food Technology, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: May 12, 2024

Revised: June 03, 2024

Accepted: June 07, 2024

Keywords

Antioxidant activity

Cashew nut testa

Enzymatic-assisted extraction

Polyphenols

Response surface methodology

*Corresponding author

Phan Tai Huan

Email:

pthuan@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

A significant amount of cashew nut testa is removed during the processing of cashew kernels, resulting in many negative environmental impacts. The objective of this study was to valorize the cashew nut testa by enzymatic-assisted extraction of polyphenol using a mixture of cellulase and pectinase. A central composite design was employed to analyze the effects of extraction temperature from 41.6°C to 58.4°C, extraction pH from pH 3.2 to pH 4.8, and enzyme concentration from 0.03% to 0.37% (v/w) on extraction efficiency. A second-order response surface model was constructed to elucidate the effects of these independent variables on the response values of total phenolic content (TPC) and free radical scavenging activities [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) assays]. Regression analysis results showed that 91%, 88%, and 92% variations of the response variables of TPC, DPPH and ABTS scavenging activities can be explained by the models, respectively. Under optimal conditions, the predicted value for TPC was 164.26 (mg GAE/g DW), and the free radical scavenging activities according to DPPH and ABTS assays were 936.52 ($\mu\text{mol TE/g DW}$) and 1591.47 ($\mu\text{mol TE/g DW}$), respectively. The experimental results were consistent with the predicted values, demonstrating the suitability of the quadratic model and the success of the response surface method for optimizing the polyphenol extraction from cashew nut testa by using the enzyme mixture.

Cited as: Phan, H. T., Dao, T. T. M., & Nguyen, P. T. (2025). Optimization of enzymatic-assisted extraction of polyphenol from cashew nut testa by using cellulase and pectinase. *The Journal of Agriculture and Development* 23(5), 72-85.

Tối ưu hóa quá trình trích ly polyphenol từ vỏ lụa hạt điều với sự hỗ trợ của hỗn hợp enzyme cellulase và pectinase

Phan Tàì Huân*, Đạo Thì Mộng Tuyền & Nguyễn Thì Phươg

Khoa Công Nghệ Hóa Học và Thực Phẩm, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 12/05/2024

Ngày chỉnh sửa: 03/06/2024

Ngày chấp nhận: 07/06/2024

Từ khóa

Hoạt tính kháng oxy hoá

Phương pháp bề mặt đáp ứng

Polyphenol

Trích ly hỗ trợ enzyme

Vỏ lụa hạt điều

*Tác giả liên hệ

Phan Tàì Huân

Email:

pthuan@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Một lượng lớn vỏ lụa hạt điều bị loại bỏ trong quá trình chế biến nhân hạt điều, gây nhiều tác động tiêu cực đến môi trường. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm nâng cao giá trị gia tăng cho vỏ lụa hạt điều bằng phương pháp chiết xuất dung dịch giàu polyphenol với sự hỗ trợ của hỗn hợp enzyme cellulase và pectinase. Phương pháp quy hoạch thực nghiệm kiểu thí nghiệm phối hợp có tâm được sử dụng để bố trí nghiên cứu nhiệt độ trích ly từ 41,6°C đến 58,4°C; pH trích ly từ pH 3,2 đến pH 4,8; nồng độ enzyme từ 0,03% đến 0,37% (v/w). Mô hình bề mặt đáp ứng bậc 2 được xây dựng để phân tích tác động của các yếu tố thí nghiệm đối với hàm lượng phenolic tổng (TPC), hoạt tính khử gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) và ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Kết quả phân tích hồi quy cho thấy 91%, 88% và 92% sự biến thiên dữ liệu tương ứng hàm mục tiêu TPC, khả năng khử gốc tự do DPPH và ABTS có thể được giải thích bởi các mô hình. Ở điều kiện tối ưu, giá trị dự đoán của TPC là 164,26 (mg GAE/g vật chất khô), năng khử gốc tự do DPPH và ABTS lần lượt là 936,52 (μmol TE/g vật chất khô) và 1591,47 (μmol TE/g vật chất khô). Kết quả thực nghiệm tương đồng với các giá trị dự đoán, cho thấy tính phù hợp của mô hình cũng như sự thành công của phương pháp bề mặt đáp ứng trong việc tối ưu hóa điều kiện trích ly polyphenol từ vỏ lụa hạt điều với hỗn hợp enzyme.

1. Đặt Vấn Đề

Hàng năm, Việt Nam sản xuất một lượng lớn hạt điều (*Anacardium occidentale* L.) dành cho tiêu thụ trong nước và xuất khẩu. Vỏ lụa hạt điều là lớp vỏ mỏng màu đỏ nâu, bao phủ bên ngoài nhân hạt, chiếm 1 - 3% tổng trọng lượng hạt điều (Sharma & ctv., 2020), và thường được loại bỏ trong quá trình chế biến. Hiện tại, vỏ lụa hạt điều được sử dụng chủ yếu làm thức ăn cho gia súc, phân bón sinh học, chất đốt hoặc thải bỏ ra môi trường (Hoang & ctv., 2022). Nghiên cứu trước

đây cho thấy vỏ lụa hạt điều chứa nhiều hợp chất phenolic có hoạt tính sinh học cao, bao gồm catechin, epicatechin, và epigallocatechin, nên có thể được ứng dụng trong chế biến thực phẩm hoặc thực phẩm chức năng (Phan & ctv., 2024). Vì vậy, việc nghiên cứu tận dụng phụ phẩm vỏ lụa hạt điều, một nguồn nguyên liệu phong phú và chi phí thấp, để chiết xuất dịch trích giàu các hợp chất polyphenol là một hướng đi đầy tiềm năng. Tuy nhiên, các phương pháp trích ly truyền thống thông dụng như chiết xuất Soxhlet

và ngâm chiết thường gặp phải nhược điểm về thời gian trích ly kéo dài cùng với nguy cơ gây ô nhiễm môi trường do rò rỉ hơi dung môi.

Về mặt sinh học, thành tế bào vỏ lụa hạt điều được cấu tạo bởi nhiều polysaccharide như cellulose, hemicellulose và pectin (Kaur & ctv., 2023; Anoopkumar & ctv., 2024), tạo ra một cấu trúc ngăn cản sự giải phóng các chất nội bào. Các hợp chất phenolic được bảo vệ bởi các chuỗi polysaccharide này thông qua các liên kết kỵ nước và liên kết hydro. Sử dụng hỗn hợp enzyme thủy phân carbohydrate như cellulase và pectinase trong quá trình trích ly đã được chứng minh là hiệu quả trong việc phá vỡ cấu trúc của thành tế bào, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình giải phóng các phân tử sinh học nội bào và tăng cường hiệu suất chiết xuất polyphenol (Gardossi & ctv., 2010). Ưu điểm của trích ly có sử dụng enzyme là tăng tốc độ chiết xuất và giảm lượng năng lượng tiêu thụ so với các phương pháp trích ly truyền thống không sử dụng enzyme (Puri & ctv., 2012).

Trong nhiều nghiên cứu, phương pháp bề mặt đáp ứng được sử dụng để làm giảm số lượng thí nghiệm cần thiết, nhưng đồng thời vẫn đảm bảo kết quả có ý nghĩa thống kê (Živković & ctv., 2018). Nhằm nâng cao giá trị gia tăng, giá trị sử dụng cho vỏ lụa hạt điều, nghiên cứu này được tiến hành nhằm tạo điều kiện tiền đề sản xuất các chế phẩm dịch trích giàu hợp chất phenolic có khả năng chống oxy hóa cao. Mục tiêu của nghiên cứu là tối ưu hóa quá trình trích ly polyphenol từ vỏ lụa hạt điều sử dụng hỗn hợp enzyme cellulase và pectinase bằng phương pháp bề mặt đáp ứng.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

Hóa chất: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) mua từ Alfa (Anh). 2,2-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) và gallic acid cung cấp bởi Biobasic (Canada).

6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) đến từ Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ). Folin-Ciocalteu do Merck (Đức) cung cấp. Pectinex Ultra SP-L (pectinase ≥ 3.800 PGU/mL) và Celluclast 1,5 L (cellulases, 700 EGU/mL) đến từ Novozymes (Đan Mạch). Nước cất được tinh lọc từ hệ thống siêu lọc Milli-Q của Millipore (Hoa Kỳ). Tất cả các hóa chất khác đều đạt chuẩn phân tích.

Nguyên liệu: Vỏ lụa hạt điều thô được cung cấp bởi công ty TNHH Kimmy Farm tại Thành phố Hồ Chí Minh. Vỏ lụa hạt điều sau đó được xử lý loại bỏ các tạp chất, bao gồm vỏ cứng, phần nhân hạt điều còn sót, cành khô, bụi đất cát,... Nguyên liệu vỏ lụa sau xử lý được nghiền bằng máy xay khô, rồi rây qua rây có kích thước lỗ 0,5 mm. Sau đó, bột vỏ lụa được đóng gói chân không trong các túi PE, và bảo quản lạnh ở nhiệt độ -4°C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Cách tiến hành: Một lượng $1,00 \pm 0,01$ g bột vỏ lụa hạt điều được cho vào bình erlen chứa nước cất làm dung môi trích ly. Dung dịch đệm sodium acetate được sử dụng để điều chỉnh độ pH. Trước khi thực hiện các thí nghiệm chính, một loạt các thí nghiệm sơ bộ đã được thực hiện giúp xác định điều kiện thí nghiệm và phạm vi tối ưu của các tham số cần nghiên cứu. Enzyme Celluclast 1,5 L và Pectinex Ultra SP-L được sử dụng ở tỷ lệ 1:1 (v/v). Quá trình trích ly enzyme diễn ra trong 60 phút và được thực hiện trong bể ổn định nhiệt (Memmert, Đức). Sau quá trình trích ly, hỗn hợp được đun nóng ở 90°C trong 5 phút để bất hoạt enzyme. Mẫu được ly tâm ở 25°C trong 10 phút ở tốc độ 5000 vòng/phút bằng máy ly tâm Universal 320R (Hettich, Đức), và phần dịch ly tâm phía trên được thu nhận để tiến hành các bước phân tích tiếp theo. Hiệu quả trích ly polyphenol được xác định dựa trên hàm lượng phenolic tổng và khả năng chống oxy hóa dựa trên khả năng khử gốc tự do DPPH và ABTS của dịch trích.

Phương pháp xác định hàm lượng phenolic tổng

Hàm lượng phenolic tổng (TPC) được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu như đã được mô tả bởi Phan & ctv. (2022) với một số điều chỉnh nhỏ. Cụ thể, một thể tích 0,1 mL chiết xuất từ vỏ lụa hạt điều được cho phản ứng với 1,8 mL dung dịch Folin-Ciocalteu 10%. Dung dịch được lắc đều rồi ủ trong 5 phút. Sau đó, thêm vào 1,2 mL dung dịch natri cacbonat 15% và 6,9 mL nước cất. Sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ phòng trong điều kiện bóng tối, độ hấp thụ được đo ở bước sóng 735 nm sử dụng máy quang phổ UV-VIS Jenway 7305 (Bibby Scientific, Anh quốc). Dung dịch gallic acid ở các nồng độ khác nhau được sử dụng để dựng đường chuẩn, và nước cất được sử dụng làm mẫu đối chứng. Thí nghiệm được thực hiện ba lần và kết quả được biểu thị dưới dạng miligram đương lượng gallic acid (GAE) trên một gram mẫu tính trên vật chất khô (mg GAE/g VCK).

Phương pháp xác định khả năng khử gốc tự do DPPH

Khả năng khử gốc tự do DPPH của chiết xuất vỏ lụa hạt điều được thực hiện theo phương pháp của Phan & ctv. (2022). Một thể tích 0,1 mL chiết xuất vỏ lụa hạt điều được trộn lẫn với 0,9 mL ethanol và 4,0 mL dung dịch DPPH 0,1 mM. Sau khi lắc nhẹ, hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trong bóng tối. Màu sắc hình thành được xác định bằng cách đo độ hấp thụ tại 517 nm sử dụng máy quang phổ UV-Vis Jenway 7305. Một mẫu đối chứng bằng nước cất được sử dụng, và đường chuẩn được xây dựng với các

nồng độ Trolox khác nhau. Kết quả được biểu thị dưới dạng micromole đương lượng Trolox (TE) trên mỗi gram mẫu theo vật chất khô ($\mu\text{mol TE/g VCK}$).

Phương pháp xác định khả năng khử gốc tự do ABTS

Khả năng khử gốc tự do ABTS của chiết xuất vỏ lụa hạt điều được thực hiện theo phương pháp mô tả bởi Nguyen & Phan (2023) với một số hiệu chỉnh. Cụ thể, một lượng 0,1 mL chiết xuất vỏ lụa hạt điều được trộn với 3,0 mL dung dịch ABTS và 0,9 mL ethanol. Hỗn hợp được lắc nhẹ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút ở điều kiện bóng tối. Xác định độ hấp thụ quang của dung dịch mẫu tại bước sóng 734 nm sử dụng máy quang phổ Jenway 7305. Các nồng độ Trolox khác nhau được sử dụng để dựng đường chuẩn, và nước cất được sử dụng làm mẫu đối chứng. Thí nghiệm được lặp lại ba lần và kết quả được biểu thị theo hoạt tính khử gốc tự do ABTS tính bằng micromole đương lượng Trolox (TE) trên mỗi gram mẫu theo vật chất khô ($\mu\text{mol TE/g VCK}$).

Tối ưu quá trình trích ly:

Phương pháp quy hoạch thực nghiệm kiểu thí nghiệm phối hợp có tâm (central composite design - CCD) được sử dụng để bố trí thí nghiệm tối ưu hóa quá trình trích ly. Số liệu được xử lý bằng phần mềm JMP 10. Mối quan hệ giữa các yếu tố khảo sát và hàm mục tiêu được thể hiện dưới dạng bề mặt đáp ứng. Các yếu tố trong thí nghiệm này là nhiệt độ trích ly (X_1), pH trích ly (X_2), nồng độ enzyme (X_3) theo 5 mức được thể hiện cụ thể trong Bảng 1.

Bảng 1. Các mức của yếu tố trong thí nghiệm tối ưu hóa

Biến thực	Biến mã hóa	Đơn vị	Mức và mã hóa mức của biến				
			a (-1.682)	- (-1)	0 (0)	+ (+1)	A (+1.682)
Nhiệt độ	X ₁	°C	41,6	45	50	55	58,4
pH	X ₂		3,2	3,5	4,0	4,5	4,8
Nồng độ enzyme	X ₃	% (v/w)	0,03	0,1	0,2	0,3	0,37

Phương trình hồi quy được xây dựng để xác định ảnh hưởng của 3 yếu tố X₁, X₂, X₃ đến hàm mục tiêu (chỉ tiêu theo dõi) là một đa thức bậc hai có dạng như Phương trình 1.

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 \quad (1)$$

Chỉ tiêu theo dõi là hàm lượng phenolic tổng Y₁ (mg GAE/g VCK), hoạt tính khử gốc tự do DPPH Y₂ (μmol TE/g VCK), hoạt tính khử gốc tự do ABTS Y₃ (μmol TE/g VCK).

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Đánh giá kết quả mô hình

Phương pháp bề mặt đáp ứng sử dụng các kỹ thuật toán học và thống kê để tối ưu hóa các thông số thực nghiệm trong khi giảm thiểu số đơn vị thí nghiệm cần thiết nhưng vẫn đạt hiệu quả cao. Bảng 2 thể hiện kết quả đánh giá 17 nghiệm thức theo mô hình bề mặt đáp ứng đối với các chỉ tiêu theo dõi là hàm lượng phenolic tổng TPC, khả năng khử gốc tự do DPPH và ABTS của dịch trích.

Trong số các nghiệm thức, hàm lượng phenolic tổng của dịch trích giao động từ 139,56 (mg GAE/g VCK) đến 165,48 (mg GAE/g VCK). Trong khi dịch trích có hoạt tính khử gốc tự do DPPH giao động trong từ 688,85 (μmol TE/g VCK) đến 947,93 (μmol TE/g VCK); và đối với ABTS thì giao động trong khoảng 1004,42 (μmol TE/g VCK) và 1604,9 (μmol TE/g VCK). Sự tương thích của kết quả thí nghiệm đối với mô hình bậc 2 (theo Phương trình 1) được đánh giá bằng phân tích phương sai (ANOVA) sử dụng phép thử kiểm định Fisher (F-test), và được thể hiện trong Bảng 3. Bên cạnh đó, Hình 1 được sử dụng để thể hiện sự tương quan giữa các giá trị dự đoán (Predicted) và kết quả thực nghiệm (Actual) của các chỉ tiêu theo dõi trong 17 nghiệm thức của thiết kế thí nghiệm bề mặt đáp ứng đã thực hiện.

Bảng 2. Kết quả thực nghiệm theo mô hình bề mặt đáp ứng

STT	Mã hoá	Giá trị thực của yếu tố			Y ₁ , TPC (mg GAE/g VCK)	Y ₂ , DPPH (μ mol TE/g VCK)	Y ₃ , ABTS (μ mol TE/g VCK)
		Nhiệt độ	- (-1)	0 (0)			
1	00a	50,0	4,0	0,03	139,56	688,85	1004,42
2	a00	41,6	4,0	0,20	154,55	793,93	1345,91
3	0a0	50,0	3,2	0,20	155,39	791,58	1308,86
4	---+	45,0	3,5	0,30	156,15	792,18	1423,86
5	000	50,0	4,0	0,20	165,48	925,52	1597,24
6	00A	50,0	4,0	0,37	146,1	688,93	1302,2
7	+++	55,0	4,5	0,30	155,7	843,71	1398,31
8	000	50,0	4,0	0,20	164,54	926,25	1604,9
9	---+	45,0	4,5	0,30	163,25	895,67	1312,2
10	++-	55,0	4,5	0,10	148,71	749,26	1242,1
11	---	45,0	3,5	0,10	149,4	755,45	1366,34
12	A00	58,4	4,0	0,20	150,52	719,41	1333,88
13	0A0	50,0	4,8	0,20	152,22	779,69	1394,99
14	---+	45,0	4,5	0,10	146,62	726,63	1324,29
15	++-	55,0	3,5	0,10	148,64	712,74	1202,19
16	000	50,0	4,0	0,20	161,24	947,93	1562,23
17	+++	55,0	3,5	0,30	149,47	716,08	1314,7

*TPC: total phenolic content; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid.

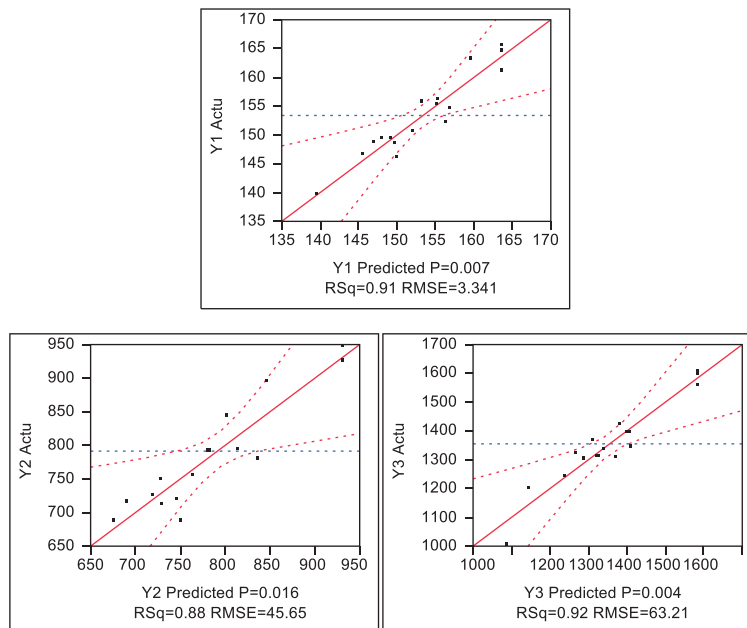
Bảng 3. Kết quả phân tích ANOVA đối với phương trình bậc 2 tối ưu các thông số trích ly

Nguồn	TPC ($R^2 = 0,9050$)					DPPH ($R^2 = 0,8782$)					DPPH ($R^2 = 0,8782$)				
	DF	SS	MS	F	P	DF	SS	MS	F	P	DF	SS	MS	F	P
Model	9	745,07	82,79	7,41	0,0075	9	105160,48	11684,5	5,61	0,0166	9	313296,08	34810,7	8,72	0,0047
Lack of fit	5	68,25	13,65	2,75	0,2876	5	14265,34	2853,07	17,60	0,0546	5	26935,97	5387,19	10,41	0,0900
Pure error	2	9,92	4,96			2	324,25	162,13			2	1035,04	517,52		

*TPC: total phenolic content; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; DF: Bậc tự do; SS: Tổng bình phương; MS: Trung bình bình phương; F: Giá trị thống kê F.

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy phương trình hồi quy bậc hai phù hợp dữ liệu thực nghiệm với hệ số tương quan R^2 cao. Theo Wang & ctv. (2019), một mô hình được cho là phù hợp với các giá trị thực nghiệm khi giá trị của hệ số xác định tương quan R^2 ít nhất phải đạt 0,75. Trong nghiên cứu này với R^2 lần lượt là 0,91; 0,88 và 0,92 cho thấy có 91%; 88% và 92% sự biến thiên dữ liệu tương ứng hàm mục tiêu TPC, và khả năng khử gốc tự do DPPH và ABTS được giải thích bởi các mô hình (Myers &

Montgomery, 2002). Hơn nữa, kết quả phân tích ANOVA cho thấy rằng các phương trình hồi quy có ý nghĩa thống kê cao với $P < 0,01$, đồng thời sự không phù hợp (Lack of fit) đều không thể hiện có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) trong cả ba mô hình. Điều này khẳng định rằng các mô hình hồi quy bậc hai được lựa chọn có đủ độ chính xác để dự đoán tác động của các yếu tố thí nghiệm, bao gồm nhiệt độ, pH và nồng độ enzyme, đối với hàm lượng phenolic tổng cũng như khả năng khử gốc tự do DPPH và ABTS của dịch trích.



Hình 1. Biểu đồ tương quan giá trị thực nghiệm (Actual) và dự đoán (Predicted) đối với chỉ tiêu theo hàm lượng phenolic tổng - TPC (Y_1), khả năng khử gốc DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Y_2), khả năng khử gốc ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Y_3).

3.2. Phân tích bề mặt đáp ứng với hàm lượng phenolic tổng

Bảng 4 thể hiện tác động cụ thể của các tham số chiết xuất như nhiệt độ (X_1), pH (X_2) và nồng độ enzyme (X_3) đến quá trình trích ly polyphenol từ vỏ lụa hạt điều thể hiện qua chỉ tiêu theo dõi

là hàm lượng phenolic tổng TPC (Y_1), hoạt tính khử gốc tự do DPPH (Y_2) và ABTS (Y_3). Tính quan trọng của mỗi hệ số trong Phương trình 1 đối với từng chỉ tiêu theo dõi được xác định bằng giá trị p. Giá trị p càng nhỏ, thì hệ số tương ứng càng quan trọng.

Bảng 4. Các hệ số hồi quy của phương trình bậc hai và các giá trị p tương ứng với các chỉ tiêu theo dõi

Thông số	TPC (Y_1)		DPPH (Y_2)		ABTS (Y_3)	
	Hệ số hồi quy	P	Hệ số hồi quy	P	Hệ số hồi quy	P
Hằng số	163,536	< 0,0001*	930,544	< 0,0001*	1584,264	< 0,0001*
Bậc 1						
X_1	-1,441	0,1551	-20,024	0,1491	-21,207	0,2550
X_2	0,387	0,6813	16,0230	0,2357	8,396	0,6386
X_3	3,090	0,0112*	22,238	0,1149	59,674	0,0101*
Tương tác						
X_1, X_2	0,248	0,8400	11,185	0,5107	34,654	0,1649
X_1, X_3	-1,945	0,1437	-13,498	0,4306	27,911	0,2519
X_2, X_3	2,005	0,1335	27,928	0,1272	-3,239	0,8889
Bậc hai						
X_1^2	-3,218	0,0144*	-53,161	0,0058*	-74,469	0,0055*
X_2^2	-2,769	0,0272*	-42,920	0,0160*	-70,216	0,0074*
X_3^2	-6,649	0,0003*	-77,124	0,0008*	-140,437	0,0001*

Ghi chú: * thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$); TPC: total phenolic content; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid.

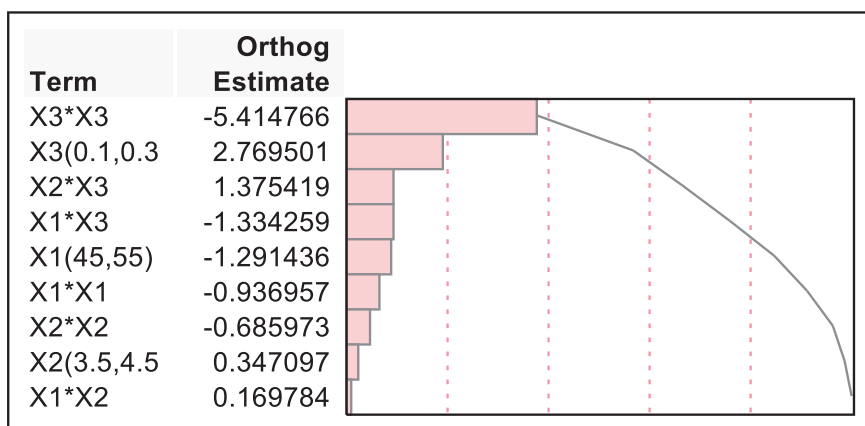
Kết quả cho thấy trong ba giá trị bậc một chỉ có yếu tố nồng độ enzyme ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm mục tiêu Y_1 ($P < 0,05$). Các cặp tương tác ảnh hưởng không có ý nghĩa đến hàm mục tiêu Y_1 . Các giá trị bậc hai của nhiệt độ, pH và nồng độ enzyme đều ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm mục tiêu.

$$Y_1 = 163,536 + 3,090X_3 - 3,218X_1^2 - 2,769X_2^2 - 6,649X_3^2 \quad (2)$$

Kết quả phân tích Pareto (Hình 2) cũng đã khẳng định nồng độ enzyme (X_3) là yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến hàm lượng phenolic tổng của dịch trích, tiếp đến là nhiệt độ trích ly và sau cùng là pH có ít ảnh hưởng nhất.

Phương trình hồi quy theo mã (coded) ba yếu tố (X_1, X_2, X_3) của hàm mục tiêu theo hàm lượng phenolic tổng (Y_1) đối với mô hình tối ưu đã chọn có dạng như Phương trình 2.

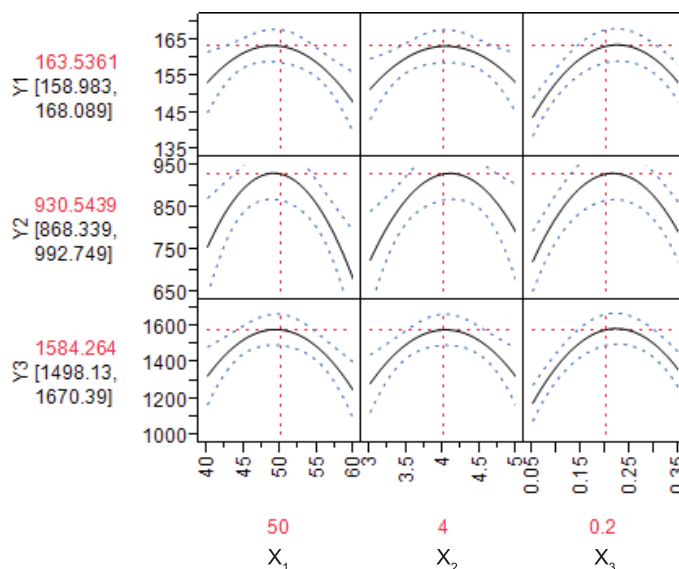
Chiều hướng tác động của các yếu tố khảo sát đến hàm lượng phenolic tổng được thể hiện ở Hình 3. Các yếu tố khảo sát đều ảnh hưởng đến hàm lượng phenolic tổng theo đường cong. Như được thể hiện trong phương trình hồi quy Phương trình 2, cả ba yếu tố khảo sát đều ảnh hưởng ở hàm bậc hai.



Hình 2. Mức độ ảnh hưởng của 3 yếu tố khảo sát độ trích ly (X_1), pH trích ly (X_2) và nồng độ enzyme (X_3) đến chỉ tiêu hàm lượng phenolic tổng.

Ở Hình 3 cho thấy khi nhiệt độ tăng lên gần khoảng 50°C , hàm lượng phenolic tổng của dịch trích cũng tăng theo và đạt mức cao nhất. Sự biến đổi của hàm lượng phenolic tổng theo nhiệt độ có thể được giải thích là do độ hòa tan của các hợp chất phenolic chiết xuất tăng theo nhiệt độ (Cacace & Mazza, 2022). Ngoài ra, nhiệt độ tăng giúp giảm độ nhớt của dung môi làm tăng quá trình truyền khối nên tăng hiệu quả trích ly polyphenol (Dai & Mumper, 2010). Tuy nhiên

khi nhiệt độ tiếp tục tăng cao thì hàm lượng phenolic tổng trích ly bị giảm. Tốc độ trích ly chỉ tăng đến một giới hạn nhiệt độ nhất định trong khoảng nhiệt độ tối ưu. Khi nhiệt độ tăng cao quá mức sẽ làm giảm khả năng xúc tác của enzyme và thậm chí gây bất hoạt enzyme. Ngoài ra khi tăng nhiệt độ trích ly, các hợp chất phenolic trong nguyên liệu có khả năng bị phân hủy do các phản ứng thủy phân, oxy hóa nội tại và polymer hóa (Fernández de Simón & ctv., 1990).



Hình 3. . Chiều hướng tác động của yếu tố khảo sát nhiệt độ trích ly (X_1), pH trích ly (X_2) và nồng độ enzyme (X_3) đến chỉ tiêu theo dõi hàm lượng phenolic tổng (Y_1), hoạt tính khử gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Y_2) và ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Y_3).

Theo Munde & ctv. (2017), mỗi loại enzyme sẽ có một khoảng pH tối ưu nhất định. Nếu pH trích ly nằm ngoài khoảng tối ưu sẽ có thể làm cho enzyme bị biến tính, dẫn đến enzyme ít tương tác với cơ chất, từ đó làm giảm hiệu suất trích ly. Các enzyme Pectinex Ultra SP-L and Celluclast 1,5 L có khoảng pH hoạt động tối ưu khá tương đồng nhau (Lim & ctv., 2024). Hình 3 cho thấy, nếu pH trích ly tăng đến pH 4 thì hàm lượng polyphenol trong dịch trích đạt cao nhất, và sau mức này sẽ giảm dần khi pH tiếp tục tăng. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Tran & ctv. (2021) trong việc kết hợp enzyme cellulase và pectinase để tăng khả năng trích ly các hợp chất polyphenol từ vỏ và thịt quả cà phê.

Ngoài ra kết quả còn cho thấy hàm lượng phenolic tổng tăng khi tăng dần nồng độ hỗn hợp enzyme đến mức khoảng 0,2%. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng nồng độ enzyme hàm lượng phenolic tổng sẽ giảm. Kết quả này có xu hướng

tương đồng với nghiên cứu trích ly phenolic từ bã nho của Drevelegka & Goula (2020), nguyên nhân có thể là do sự giống nhau giữa bản chất của nguyên liệu và enzyme. Các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy rằng vận tốc phản ứng tăng lên khi nồng độ enzyme tăng nhưng khi nồng độ enzyme bão hòa với nồng độ cơ chất, vận tốc phản ứng không thay đổi hoặc không tăng thêm khi tiếp tục tăng nồng độ enzyme (Nguyen & ctv., 2011).

3.3. Phân tích bề mặt đáp ứng với hoạt tính chống oxy hóa

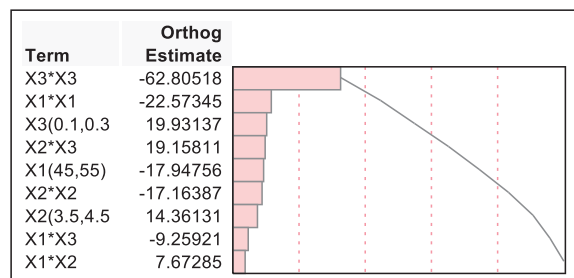
Ảnh hưởng của các yếu tố thí nghiệm đến hoạt tính chống oxy hóa thông qua đánh giá hoạt tính khử gốc tự do được thể hiện trong Bảng 4 và Hình 4. Từ mức ý nghĩa của các hệ số hồi quy, Phương trình 3 và 4 được thiết lập thể hiện mức độ ảnh hưởng và sự tương tác của các yếu tố khảo sát (X_1 , X_2 và X_3) đến hoạt tính khử gốc tự do DPPH (Y_2) và ABTS (Y_3).

$$Y_2 = 930,544 - 53,161X_1^2 - 42,92X_2^2 - 77,124X_3^2 \quad (3)$$

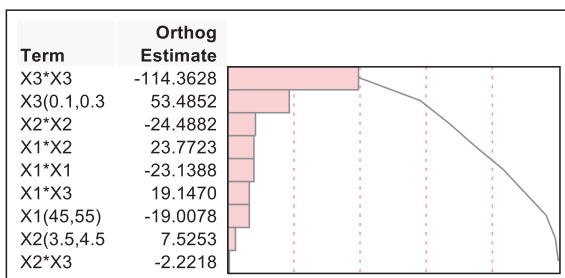
$$Y_3 = 1584,264 + 59,674X_3 - 74,469X_1^2 - 70,216X_2^2 - 140,437X_3^2 \quad (4)$$

Đối với yếu tố bậc 1 khả năng khử gốc tự do ABTS chịu ảnh hưởng bởi yếu tố nồng độ enzyme ($P < 0,05$) với sự tương tác dương, nghĩa là khi gia tăng nồng độ enzyme sẽ tăng hoạt tính chống oxy hóa tăng. Sự tương tác giữa yếu tố không có tác động có ý nghĩa đến khả năng chống oxy

hóa. Bậc hai của cả ba yếu tố đều có ảnh hưởng ý nghĩa đến hàm mục tiêu ($P < 0,05$). Các yếu tố ở bậc hai này tương quan với hoạt tính chống oxy hóa theo chiều ngược, tức khi có sự tăng của các yếu tố này thì hoạt tính khử gốc tự do DPPH và ABTS sẽ giảm và ngược lại.



(A)



(B)

Hình 4. Mức độ ảnh hưởng của 3 yếu tố khảo sát độ trích ly (X_1), pH trích ly (X_2) và nồng độ enzyme (X_3) đến chỉ tiêu hoạt tính khử gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (A) và ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (B).

Chiều hướng tác động của các yếu tố khảo sát đến hoạt tính khử gốc tự do DPPH và ABTS được thể hiện trong Hình 3. Các ảnh hưởng này đều thể hiện theo đường cong, tương thích với phương trình hồi quy bậc hai. Khi nhiệt độ tăng lên 50°C thì khả năng khử gốc tự do DPPH và ABTS của dịch trích cũng tăng và đạt mức cao nhất. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ trích ly tăng vượt quá 50°C thì hoạt tính chống oxy hóa bắt đầu xu hướng giảm. Điều này được lý giải là do hoạt tính chống oxy hóa phụ thuộc vào độ tăng giảm hàm lượng hợp chất phenolic theo nhiệt độ. Bên cạnh đó hoạt tính của các hợp chất phenolic rất nhạy cảm với nhiệt độ cao (Nguyen & Phan, 2023).

Với xu hướng tương tự, khi pH tăng thì hoạt tính khử gốc tự do DPPH và ABTS cũng tăng và đạt giá trị lớn nhất tại pH 4. Sau mức pH này hoạt tính chống oxy hóa giảm dần. Kết quả cũng cho thấy hoạt tính chống oxy hóa theo DPPH và ABTS tăng lên mức cao nhất ở vùng nồng độ enzyme 0,2%. Theo Munde & ctv. (2017) khi tăng nồng độ enzyme đến mức độ nhất định thì

sẽ bão hòa với nồng độ cơ chất trong môi trường, từ đó lượng sản phẩm tạo thành sẽ không thay đổi hoặc giảm xuống do ảnh hưởng của tác nhân oxy hóa trong môi trường trích ly. Phan & ctv. (2018) đã báo cáo rằng chất phenolic là yếu tố chính góp phần tạo nên khả năng chống oxy hóa của nguyên liệu thực vật.

3.4. Tối ưu hóa quá trình trích ly

Trên cơ sở mô hình bậc 2 đã xây dựng được, kết quả tối ưu hóa theo hàm lượng phenolic tổng đạt được tại các điều kiện tối ưu nhiệt độ 48,5°C, pH 4,1 và nồng độ enzyme 0,23% (v/w) là 164,26 (mg GAE/g VCK). Trong khi đó hoạt tính khử gốc tự do DPPH của dịch trích polyphenol theo mô hình tối ưu là 936,52 ($\mu\text{mol TE/g VCK}$) đạt được tại các điều kiện nhiệt độ 49,1°C, pH 4,1 và nồng độ enzyme 0,22% (v/w). Và tại các điều kiện tối ưu nhiệt độ 49,5°C, pH trích ly 4,0 và nồng độ enzyme 0,22% (v/w) thì hoạt tính khử gốc tự do ABTS của dịch trích ước tính đạt được cao nhất là 1591,47 ($\mu\text{mol TE/g VCK}$).

Bảng 5. Các thông số tối ưu của quá trình trích ly polyphenol từ vỏ lụa hạt điều theo mô hình tối ưu và thực nghiệm

	Yếu tố khảo sát			Chỉ tiêu theo dõi		
	Nhiệt độ (°C)	pH	Nồng độ enzyme (v/w)	TPC (mg GAE/g VCK)	DPPH (μmol TE/g VCK)	ABTS (μmol TE/g VCK)
Giá trị dự đoán	48,5	4,1	0,23	164,26	936,52	1591,47
	49,1	4,1	0,22			
	49,5	4,0	0,22			
Giá trị thực nghiệm	49,0	4,0	0,22	165,03 ± 1,17	898,63 ± 25,56	1597,24 ± 22,5
Sai số tương đối				0,47 %	4,05 %	0,36 %

*TPC: total phenolic content; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid

Từ kết quả dự đoán của mô hình, thực hiện kiểm chứng thực tế với các thông số trích ly được tinh chọn phù hợp. Kết quả thể hiện như trong Bảng 5. Có thể kết luận rằng hàm lượng phenolic tổng TPC, hoạt tính khử gốc tự do DPPH và hoạt tính khử gốc tự do ABTS thu được từ thực nghiệm khác biệt không có ý nghĩa với kết quả lý thuyết tính toán từ mô hình (chênh lệch không quá 5%). Điều đó cho thấy mô hình bề mặt đáp ứng được xây dựng có tính chính xác cao và có thể sử dụng để mô phỏng kết quả của quá trình trích ly vỏ lụa hạt điều.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn giữa các tác giả

Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Bộ Giáo Dục & Đào Tạo trong khuôn khổ đề tài mã số B2022 – NLS - 02

4. Kết Luận

Phương pháp quy hoạch thực nghiệm bề mặt đáp ứng đã được sử dụng thành công để tối ưu hóa quá trình trích ly polyphenol từ vỏ lụa hạt điều có sự hỗ trợ của hỗn hợp hai loại enzyme là cellulase và pectinase. Điều kiện trích ly tối ưu được xác định tại nhiệt độ 49°C, pH 4, nồng độ enzyme 0,2% (v/w). Ở điều kiện tối ưu hóa, các giá trị thực nghiệm tương thích với các giá trị được dự đoán từ mô hình bậc hai. Dịch trích vỏ lụa hạt điều đạt được hàm lượng phenolic tổng ở mức 165,03 (mg GAE/g VCK), hoạt tính khử gốc tự do DPPH là 898,63 (μmol TE/g VCK) và hoạt tính khử gốc tự do ABTS là 1597,24 (μmol TE/g VCK). Kết quả nghiên cứu của đề tài là cơ sở để phát triển các chế phẩm giàu polyphenol nhằm nâng cao giá trị gia tăng cho các nguyên liệu phụ phẩm từ thực vật.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Anoopkumar, A. N., Gopinath, C., Annadurai, S., Abdullah, S., Tarafdar, A., Hazeena, S. H., Rajasekharan, R., Kuriakose, L. L., Aneesh, E. M., de Souza Vandenberghe, L. P., de Carvalho, J. C., Soccol, C. R., Binod, P., Madhavan, A., & Sindhu, R. (2024). Biotechnological valorisation of cashew apple: Prospects and challenges in synthesising wide spectrum of products with market value. *Bioresource Technology Reports* 25. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101742>.
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2002). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* 59(4), 379-389. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00497-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00497-1).
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15(10), 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.
- Drevellegka, I., & Goula, A. M. (2020). Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* 149. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.107845>.
- Fernández de Simón B., Pérez-Illarbe J., Hernández T., Gómez-Cordovés C., & Estrella I. (1990). HPLC study of the efficiency of extraction of phenolic compounds. *Chromatographia* 30 (1-2), 35-37. <https://doi.org/10.1007/BF02270445>.
- Gardossi, L., Poulsen, P. B., Ballesteros, A., Hult, K., Švedas, V. K., Vasić-Rački, Đ., Carrea, G., Magnusson, A., Schmid, A., Wohlgemuth, R., & Halling, P. J. (2010). Guidelines for reporting of biocatalytic reactions. *Trends in Biotechnology* 28(4), 171-180. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.01.001>.
- Hoang, T. V., Nguyen, H. X., Nguyen, D. H., La, T. T., & Pham, H. V. (2023). Effect of hydrolyzation conditions on extraction capacity of catechin of cashew nut testa with the support of enzyme Viscozyme L and Pectinex Ultra-L products. *Journal of Science Technology and Food – Ho Chi Minh City University of Food Industry* 23 (1), 40-48. https://doi.org/10.62985/j.huit_ojs.vol23.no1.31.
- Kaur, R., Tarun Kumar, V., Krishna, B. B., & Bhaskar, T. (2023). Characterization of slow pyrolysis products from three different cashew wastes. *Bioresource Technology* 376, 128859. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128859>.
- Lim, J., Kim, H., Kim, G. H. J., Kim, T., Kang, C. G., Kim, S. W., & Kim, D. (2024). Enzymatic upcycling of wild-simulated ginseng leaves for enhancing biological activities and compound K. *Applied Microbiology and Biotechnology* 108(1), 207. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13028-2>.
- Munde, P. J., Muley, A. B., Ladole, M. R., Pawar, A. V., Talib, M. I., & Parate, V. R. (2017). Optimization of pectinase-assisted and tri-solvent-mediated extraction and recovery of lycopene from waste tomato peels. *3 Biotech* 7(3). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0825-3>.
- Myers, R. H., & Montgomery, D. C. (2002). *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments* (1st ed.). New Jersey, USA: Wiley Interscience.
- Nguyen, P. N. M., Che, H. V., Ly, B. N., & Chau, A. T. D. (2011). Effect of pectinase enzyme treatment to juice yield and fermentation conditions to the quality of mango wine (*Mangifera indica*). *CTU Journal of Science* 20a, 127-136.
- Nguyen, T. T., & Phan, H. T. (2023). Microwave assisted extraction of custard apple (*Annona squamosa* L.) peel. *Carpathian Journal of Food Science and Technology* 15(1), 220-231. <https://doi.org/10.34302/crpjfst/2023.15.1.16>.
- Phan, H. T., Dao, U. H., & Nguyen, T. C. T. (2024). Ethanol-modified supercritical CO₂ extraction of cashew (*Anacardium occidentale*) nut testa. *Journal of Food and Nutrition Research* 63(1), 52-59.
- Phan, H. T., Tran, C. T. H., Nguyen, T. H., & Nguyen, T. T. (2022). Extraction of custard apple (*Annona*

- squamosal* L.) peel with supercritical CO₂ and ethanol as co-solvent. *Journal of Food Processing and Preservation* 46(11).
- Phan, K. T. L., Chittrakorn, S., Rutnakornpituk, B., Phan, H. T., & Ruttarattanamongkol, K. (2018). Processing effects on anthocyanins, phenolic acids, antioxidant activity, and physical characteristics of Vietnamese purple-fleshed sweet potato flours. *Journal of Food Processing and Preservation* 42(9). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13722>.
- Puri M., Sharma D., & Barrow C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology* 30(1), 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014>.
- Sharma, P., Gaur, V. K., Sirohi, R., Larroche, C., Kim, S. H., & Pandey, A. (2020). Valorization of cashew nut processing residues for industrial applications. *Industrial Crops and Products* 152. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112550>.
- Tran, T. T. T., Tran, K. M., Ton, N. N. M., & Le, M. V. V. (2021). Combined cellulolytic and pectinolytic enzymes to increase the polyphenol extractability of coffee husks. *VNUHCM Journal of Engineering and Technology* 4(2), 968-976. <https://doi.org/https://doi.org/10.32508/stdjet.v4i2.832>.
- Wang, F. W., Han, S., Zha, J. X., Cheng, R. J., Song, Y. J., & Jiao, Z. (2019). Response surface optimization of supercritical carbon dioxide extraction of tea polyphenols from green tea scraps. *Journal of AOAC International* 102(2), 451-456. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0163>.
- Živković J., Šavikin, K., Janković, T., Čujić, N., & Menković, N. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from pomegranate peel using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 194, 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.11.032>.