

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG ENZYME TRONG TÁCH CHIẾT CÁC HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ TRÁI THANH LONG

Nguyễn Phạm Hương Huyền, Phạm Minh Tuấn

Khoa Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Khảo sát ban đầu xây dựng được quy trình trích ly betacyanin từ vỏ thanh long ruột đỏ sử dụng enzyme cellulase và tạo dịch quả giàu lycopene sử dụng enzyme pectinase. Các thông số phù hợp để thu được sản phẩm giàu các chất này được xác định bao gồm: nhiệt độ là 30°C (vỏ) và 50°C (ruột); tỷ lệ enzyme phù hợp là 0,7% w/w (vỏ) và 0,5% w/w (ruột); thời gian ủ là 90 phút (vỏ) và 60 phút (ruột); pH là 6 (vỏ) và 4 (ruột).

Từ khóa: Betacyanin, cellulase, lycopene, pectinase, thanh long.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sản lượng thanh long những năm gần đây ở Việt Nam đang tăng lên đáng kể. Các giống thanh long mà nước ta đang canh tác hiện nay như thanh long ruột trắng và ruột đỏ. Ở các tỉnh Nam Trung Bộ và Nam Bộ, thanh long ruột trắng được trồng phổ biến, nổi tiếng nhất là ở Bình Thuận – địa phương có diện tích thanh long lớn nhất cả nước.

Thanh long có tên khoa học là *Hylocereus* spp., thuộc họ Xương rồng (*Cactaceae*). Việt Nam là một trong những nước có diện tích và sản lượng thanh long lớn nhất châu Á và cũng là nước xuất khẩu thanh long hàng đầu thế giới. Theo Hiệp hội Rau quả Việt Nam, hiện nay nước ta có 35,665 ha diện tích trồng thanh long với tổng sản lượng đạt khoảng 614,246 tấn (Ánh Dương, 2023). Thanh long ruột đỏ chứa nhiều vitamin C, carbohydrate, chất xơ, betacyanin và polyphenol tốt cho sức khỏe, hạn chế quá trình oxy hóa. Thanh long ruột đỏ được tiêu thụ chủ yếu ở dạng tươi. Chế biến đa dạng hóa sản phẩm giúp nâng cao giá trị kinh tế trái thanh long là điều cần được quan tâm. Tuy nhiên, quá trình thương mại hóa các sản phẩm này gặp nhiều khó khăn do giá thành, chất lượng sản phẩm...

Có các nghiên cứu trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học từ trái thanh long, tập trung nhiều nhất là hai hợp chất betacyanin và lycopene. Betacyanin được tách chiết bằng cách sử dụng dung môi ethanol (Vũ Thị Thanh Đào *et al.*, 2017), phương pháp vi sóng (Đào Thị Mỹ Linh *et al.*, 2020), phương pháp siêu âm kết hợp với enzyme pectinase (Thanh Thị Ha Le *et al.*, 2020). Lycopene được tách chiết trong dịch quả thanh long bằng cách kết hợp nước và hexane (Charoensiri và *et al.*, 2009). Đến giờ, chưa có nghiên cứu nào đánh giá toàn diện hiệu quả sử dụng enzyme trong tách chiết các hợp chất này từ vỏ và ruột thanh long.

Vì thế, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích ứng dụng enzyme pectinase và cellulase trong quá trình xử lý vỏ và ruột thanh long để tách chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học như betacyanin và lycopene.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Thanh long ruột đỏ được mua ở siêu thị Big C Trường Chinh (Thành phố Hồ Chí Minh) với đặc điểm là ruột đỏ, chín đều, trọng lượng mỗi trái đạt 500-600g. Đầu tiên, thanh long tươi được rửa sạch, phần thịt quả và vỏ được tách riêng và sử dụng cho hai khảo sát khác nhau.

Pectinase được mua từ công ty TNHH CFOOD Việt Nam. Cellulase được mua từ công ty TNHH TM Việt Hoàng Long. Thông số của hai enzyme này được tổng hợp trong Bảng 1.

Bảng 1. Thông tin về hoạt tính enzyme pectinase và enzyme cellulase

Loại enzyme	Nguồn vi sinh vật	Hoạt tính	Nhiệt độ tối ưu	pH tối ưu
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	60.000 UI/g	40-55°C	3,5-4
Cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	10.000 UI/g	50°C	4 - 5

Các hóa chất khác sử dụng trong nghiên cứu được mua từ công ty Xilong Scientific Co., Ltd (Trung Quốc).

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát các thông số ảnh hưởng đến quá trình thu dịch chiết giàu betacyanin từ vỏ thanh long

Đối với thí nghiệm khảo sát chọn cách xử lý nguyên liệu thì vỏ thanh long được xử lý theo hai cách khác nhau. Xử lý ướt thì vỏ tươi đã loại tai xanh được xay nhuyễn hoàn toàn. Còn xử lý khô thì phần vỏ đã loại tai xanh, cắt nhỏ 3 × 3 cm, sau đó được sấy khô ở 70°C trong 6 giờ. Vỏ khô được xay bằng máy xay bột khô và rây qua kích thước lỗ 0,3 mm. Bột thu được bảo quản trong túi zip ở 4°C trong suốt thời gian tiến hành nghiên cứu. Nguyên liệu, enzyme (pectinase và cellulase), nước cất được trộn đều với tỷ lệ 1:1:25 (w/w/v), ủ ở nhiệt độ 50°C trong 60 phút. Sau đó, bất hoạt enzyme ở 0°C trong 5 phút, ly tâm 5000 vòng/phút trong 45 phút, thu dịch nổi và xác định hàm lượng betacyanin thu được để chọn loại enzyme phù hợp cho các khảo sát tiếp theo.

Dựa trên đặc tính của enzyme được sử dụng, các yếu tố được khảo sát bao gồm nhiệt độ (40, 50, 60°C), tỷ lệ enzyme/dung môi (0,1%; 0,3%; 0,5%, 0,7% w/v), pH (3, 4, 5, 6) và thời gian (30, 60, 90, 120 phút). Sau đó, hỗn hợp được bất hoạt enzyme ở 0°C trong 5 phút, lọc thô qua rây 0,4 mm, dịch lọc được ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 15 phút. Dịch nổi chứa betacyanin được thu nhận và hàm lượng betacyanin được xác định như mô tả ở phương pháp phân tích.

Khảo sát các thông số ảnh hưởng đến quá trình thu dịch quả giàu lycopene từ thịt quả thanh long

Thanh long sau khi rửa sạch, lột vỏ được đem cân định lượng 50 g mỗi mẫu và xay nhuyễn bằng máy xay sinh tố để thu puree. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với hỗn hợp 50 g puree thanh long trộn với 50 ml nước cất (pH của hỗn hợp xấp xỉ bằng 4).

Dựa trên đặc tính của enzyme được sử dụng, các yếu tố được khảo sát bao gồm tỷ lệ enzyme/nguyên liệu (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4% w/w), nhiệt độ (30°C, 40°C, 50°C, 60°C), pH (3; 3,5; 4; 4,5). Sau đó, hỗn hợp được bất hoạt enzyme ở 0°C trong 5 phút, lọc thô qua rây 0,4 mm, dịch lọc được ly tâm ở tốc độ 5500 vòng/phút trong 15 phút. Dịch nổi chứa lycopene được thu nhận, hiệu suất thu hồi dịch và hàm lượng lycopene trong dịch quả được xác định như mô tả ở phương pháp phân tích (Wayne và *et al.*, 2002).

Phương pháp phân tích

Hàm lượng betacyanin được xác định thông qua phương pháp đo mật độ quang. Công thức xác định hàm lượng betacyanin (mg/100 chất khô) như sau (Ramli *et al.*, 2014).

$$BC = \frac{A_{538} \times V \times DF \times M \times 100}{\epsilon \times L \times W}$$

Trong đó: A_{538} : Độ hấp thụ ở bước sóng 538 nm; L: Chiều dài đường truyền 1,0 cm; DF: Hệ số pha loãng (5 lần); V: Thể tích dung dịch mẫu (1 ml); ϵ : Hệ số mol của betacyanin (60000 L/mol.cm); M: Khối lượng phân tử của betacyanin (550 g/mol).

Hàm lượng lycopene trong mẫu được xác định theo phương pháp của Wayne và đồng tác giả (2002). Đầu tiên, lấy 0,6 g mẫu đã nghiền và được đồng nhất cho vào bình tam giác 100 ml. Bổ sung 5ml BHT (BHT 0,05% trong acetone), 5 ml ethanol 95%, 10 ml hexan. Bịt kín mẫu thí nghiệm bằng màng PE và bọc giấy bạc. Lắc ở nhiệt độ phòng 130 vòng/phút trong 15 phút. Sau đó bổ sung thêm 3 ml nước khử ion và lắc tiếp 5 phút. Mẫu được đặt ở nhiệt độ phòng trong 5 phút để tách pha, thu lấy pha dung môi phía trên và tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 503 nm. Hàm lượng lycopene (mg/kg thịt quả) trong mẫu được tính theo công thức sau.

$$H = \frac{A_{503} \times 31,2}{g \text{ thịt quả}}$$

Trong đó: A_{503} : Độ hấp thụ ở bước sóng 503 nm.

Hàm lượng acid tổng được xác định bằng phương pháp chuẩn độ NaOH 0,1N theo TCVN 4589:1988. Hàm lượng vitamin C được xác định thông qua phản ứng khử iod. Hàm lượng nitơ amin được xác định bằng cách sử dụng formaldehyt và NaOH.

Mỗi thí nghiệm đều được lặp lại ít nhất 3 lần. Số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 365 và Statgraphics centurion XVI.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát các thông số ảnh hưởng đến quá trình thu dịch chiết giàu betacyanin từ vỏ thanh long

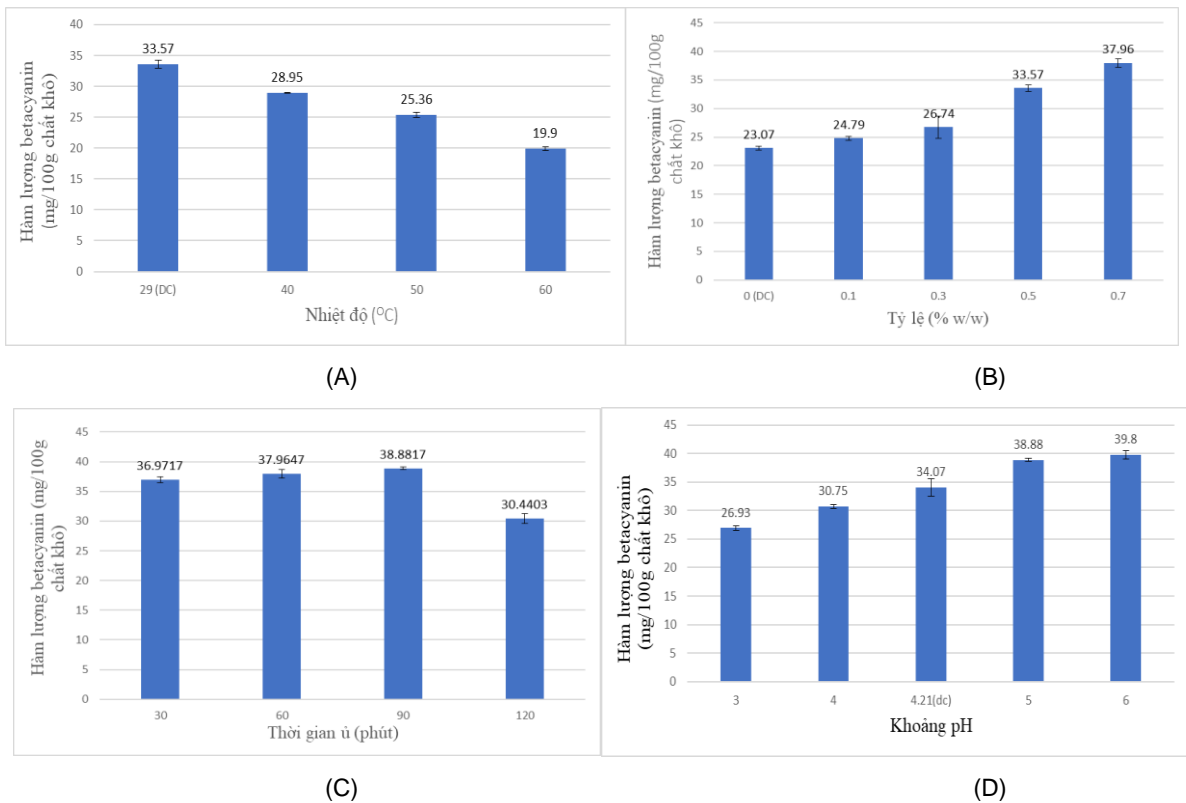
Hàm lượng betacyanin của vỏ thanh long xử lý ướt và khô được tổng hợp trong Bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng betacyanin thu được khi xử lý với các enzyme khác nhau

Enzyme	Nguyên liệu	Hàm lượng betacyanin (mg/100g chất khô)
Pectinase	Tươi	12.07 ^a ±0.74
	Khô	21.66 ^b ±0.30
Cellulase	Tươi	17.34 ^a ±0.06
	Khô	25.36 ^b ±0.37

Nguyên liệu khô (sấy) có hàm lượng betacyanin cao nhất là 21,66 mg/100g chất khô đối với enzyme pectinase và 25,36 mg/100 g chất khô đối với enzyme cellulase. Điều này có thể giải thích do thành phần của vỏ thanh long có hàm lượng chất xơ cao (69,30 g/100 g). Cellulase phản ứng với cellulose có trong thành tế bào phá vỡ cấu trúc màng tế bào giải phóng betacyanin. Nguyên liệu ở trạng thái khô và enzyme cellulase được chọn để khảo sát các thông số tiếp theo.

Hàm lượng betacyanin của vỏ thanh long thu được dưới các điều kiện khác nhau được tổng hợp và minh họa trong các hình dưới đây.



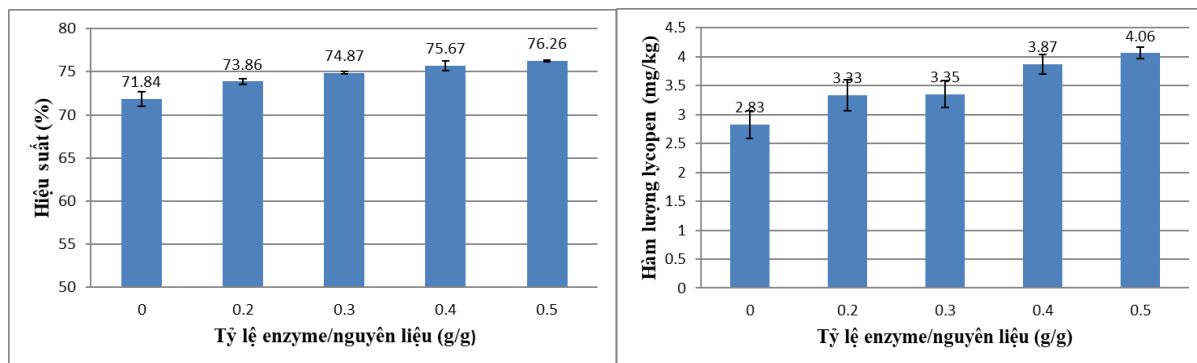
Hình 1. Ảnh hưởng của các thông số nhiệt độ (A), tỷ lệ enzyme/nguyên liệu (B), thời gian ủ (C) và giá trị pH (D) đến hàm lượng betacyanin thu được

Chọn nhiệt độ phòng ở 29°C là đối chứng âm vì ở nhiệt độ này hàm lượng betacyanin thu được cao nhất là 33,57 mg/100 g chất khô. Khi tăng nhiệt độ lên cao thì hàm lượng betacyanin sẽ càng giảm vì betalain thường được biết đến như các chất màu không ổn định nhiệt, tốc độ phân hủy tăng nhanh cùng với sự gia tăng nhiệt độ và thời gian gia nhiệt (Harivaindaran *et al.*, 2008).

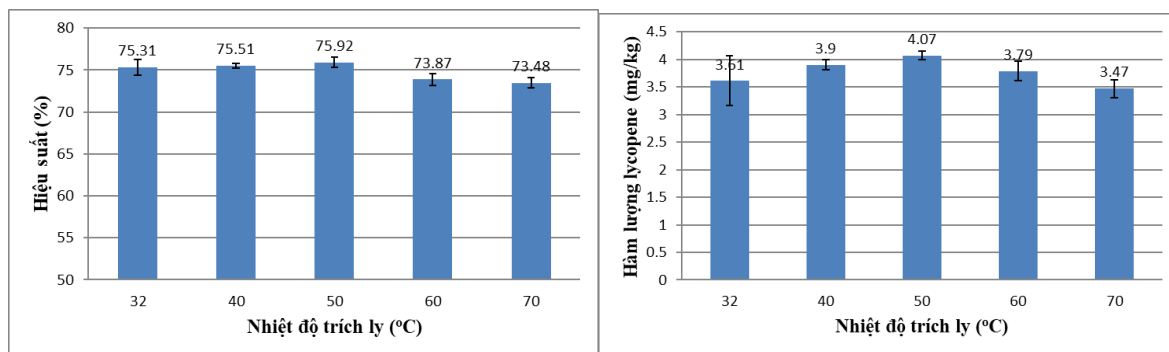
Chọn tỷ lệ enzyme 0,7% vì ở tỷ lệ này hàm lượng betacyanin đạt cao nhất trong các công thức thí nghiệm với 37,96 mg/100 g chất khô. Ta có thể thấy khi tỷ lệ enzyme tỷ lệ thuận với hàm lượng betacyanin thu được, với tỷ lệ enzyme càng cao thì hàm lượng betacyanin càng cao. Ở các mốc thời gian ủ khác nhau trong khoảng 30-90 phút, hàm lượng betacyanin thu được tăng dần và đạt giá trị cao nhất là 38,88 mg/100g chất khô, nhưng khi tăng thời gian ủ lên 120 phút thì hàm lượng betacyanin thu được giảm xuống chỉ còn khoảng 30,33 mg/100g. Thời gian ủ 90 phút được chọn cho thí nghiệm tiếp theo. Dựa vào hình 1(D), ta thấy pH tỷ lệ thuận với hàm lượng betacyanin. Chọn pH bằng 6 vì ở pH này, hàm lượng betacyanin đạt cao nhất là 39,80 mg/100 g chất khô.

Khảo sát các thông số ảnh hưởng đến quá trình thu dịch quả giàu lycopene từ thịt quả thanh long

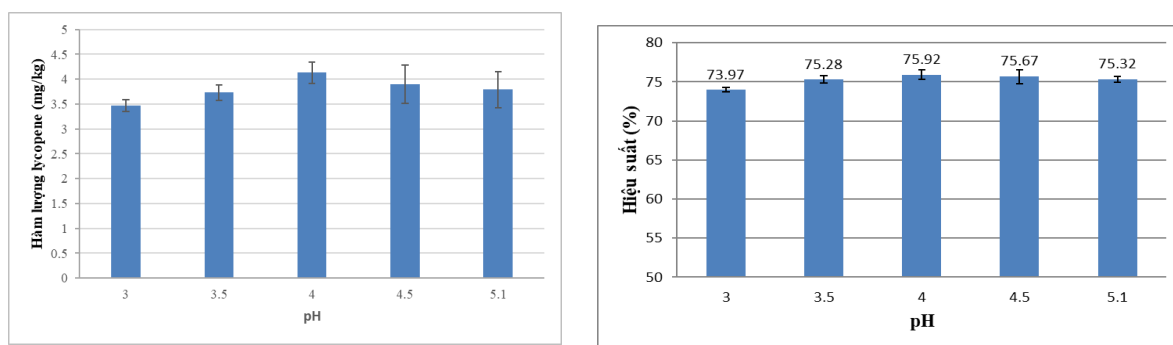
Quan sát hình 2A, khi lượng enzyme càng tăng thì lượng dịch quả và hàm lượng lycopene thu được cũng tăng. Đối với mẫu không xử lý enzyme, hiệu suất thu hồi dịch quả (71,84%) và hàm lượng lycopene (2,83 mg/kg) thấp hơn các mẫu có xử lý. Khi tăng tỷ lệ enzyme từ 0,2% w/w lên 0,5% w/w, hiệu suất thu hồi dịch tăng từ 73,86% lên 76,26%; hàm lượng lycopene tăng từ 3,33 mg/kg lên 4,06 mg/kg. Vì vậy, chọn tỷ lệ enzyme 0,5% là thích hợp cho các thí nghiệm tiếp theo.



(A)



(B)



(C)

Hình 2. Ảnh hưởng của các thông số tỷ lệ enzyme/nguyên liệu (A), nhiệt độ (B), pH (C) đến hiệu suất thu hồi dịch quả và hàm lượng lycopene thu được

Khi nhiệt độ tăng từ 32°C đến 50°C thì hiệu suất của dịch thanh long thu được cũng tăng tương ứng từ 75,31% đến 75,92% (nhưng không có sự khác biệt về mặt thống kê); hàm lượng lycopene cũng tăng từ 3,61mg/kg đến 4,07 mg/kg. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng lên 60°C-70°C thì hiệu suất thu hồi dịch quả và hàm lượng lycopene thu được giảm, nhưng không có sự chênh lệch lớn giữa 2 nhiệt độ này. Có thể giải thích điều này là do nhiệt độ cao sẽ làm cho hoạt tính enzyme giảm, trong khi đó ở nhiệt độ thấp, enzyme chưa được hoạt động tối ưu dẫn đến hiệu suất thu hồi thấp. Tuy nhiên, ở nhiệt độ 50°C đạt hiệu suất và hàm lượng lycopene cao nhất, tương ứng 75,92% và 4,07 mg/kg. Nhiệt độ thủy phân 50°C là nhiệt độ tối ưu của enzyme pectinase. Các phân tử enzyme

có động năng lớn, tăng phản ứng giữa enzyme và cơ chất, nhiệt độ tăng làm giảm độ nhớt dịch quả, tăng khả năng phân tán của enzyme trong dịch quả, từ đó tăng cơ hội tiếp xúc giữa enzyme với cơ chất.

Giá trị pH ảnh hưởng khá rõ đến hiệu suất dịch quả thu được sau quá trình thủy phân, hiệu suất dịch quả thu hồi cao nhất khi khảo sát ở giá trị pH 4, giá trị tối ưu của enzyme pectinase. Khi tăng pH dịch quả 4,5; hiệu suất thu hồi dịch và hàm lượng lycopene giảm nhẹ. Hiệu suất thu hồi dịch quả và hàm lượng lycopene thu được thấp nhất ở pH 3. Như vậy pH 4 là tối ưu cho quá trình thủy phân với hiệu suất dịch quả thu hồi cao nhất (75,97%), hàm lượng lycopene cao nhất (4,13 mg/kg).

Kết quả đánh giá phân tích các thành phần dịch quả thanh long cho thấy: nồng độ acid tổng là 0,256% g/L, hàm lượng vitamin C là 52,8 mg/l; nồng độ nitơ amin là 0,287 g/L; độ brix là 6%, giá trị pH là 4,07.

KẾT LUẬN

Khảo sát ban đầu xây dựng quy trình thu nhận các sản phẩm giàu hợp chất có hoạt tính sinh học cao từ trái thanh long. Dịch vỏ quả chứa 39,8 mg betacyanin/100g chất khô thu được khi sử dụng enzyme cellulase tách chiết ở 30°C, pH bằng 6, tỷ lệ enzyme/nguyên liệu là 0,7% w/v, 90 phút. Đối với dịch quả thì thông số phù hợp nhất khi sử dụng enzyme pectinase là tỷ lệ enzyme/nguyên liệu là 0,5% w/w, pH là 4, 50 phút, 50°C. Ở điều kiện này thì hiệu suất trích ly dịch quả tăng 4,13% và hàm lượng lycopene tăng gần 50% so với đối chứng. Kết quả của nghiên cứu có thể được sử dụng nhằm phát triển quy trình sản xuất các sản phẩm giàu các chất có hoạt tính sinh học từ trái thanh long tại Việt Nam.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn các bạn Phan Thị Mỹ Kim và Nguyễn Thị Luận đã hỗ trợ cho quá trình thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ánh Dương (2023) Tìm hướng đi cho xuất khẩu thanh long vào thị trường EU (<https://tuyengiao.vn/tim-huong-di-cho-xuat-khau-thanh-long-vao-thi-truong-eu-151892>).
- Charoensiri R, Kongkachuichai R, Suknicom S, and Sungpuag P (2009). Beta-carotene, lycopene, and alpha-tocopherol contents of selected Thai fruits. *Food Chem*, 113(1): 202-207.
- Đào Thị Mỹ Linh, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, and Phạm Thị Phương Thùy (2020). Tối ưu hóa quá trình tách chiết Betacyanin từ vỏ thanh long (*Hylocereus undatus*) bằng phương pháp vi sóng. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 129(1A): 11–20.
- Harivaindaran KV, Rebecca OP, and Chandran S (2008). Study of optimal temperature, pH and stability of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel for use as potential natural colorant. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11(18): 2259-2263.
- Ramli NS, Ismail P and Rahmat A (2014). Influence of Conventional and Ultrasonic-Assisted Extraction on Phenolic Contents, Betacyanin Contents, and Antioxidant Capacity of Red Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *The Scientific World Journal*: 1–7.
- Thanh Thi Ha Le and Ngọc Lieu Le (2020). Antioxidant capacities and betacyanin lc-ms profile of red-fleshed dragon fruit juice (*Hylocereus polyrhizus*) extracted by ultrasound-assisted enzymatic treatment and optimized by response surface methodology. *J Food Process Pres* 45.3 (2021): e15217.
- Vũ Thị Thanh Đào (2017). Nghiên cứu khả năng trích ly và bảo quản chất màu tự nhiên từ vỏ quả thanh long ruột đỏ. *Tạp chí Khoa học* 27: 08-2017.

EVALUATION OF ENZYME EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM RED DRAGON FRUIT

Nguyen Pham Huong Huyen*, Pham Minh Tuan

Faculty of Biology and Environment, Ho Chi Minh City University of Industry and Trade (Huit), Vietnam

SUMMARY

The initial investigations established an extraction process of betacyanin-rich product from red dragon fruit peel using cellulase enzyme and lycopene-rich fruit juice from red dragon flesh using pectinase enzyme. The appropriate parameters to obtain these products are determined as the temperature of 30°C (peel) and 50°C (flesh); the enzyme/material ratio of 0.7% w/w (peel) and 0.5% w/w (flesh); the incubation time of 90 minutes (peel) and 60 minutes (flesh); and the pH of 6 (peel) and 4 (flesh).

Keywords: Betacyanin, cellulase, lycopene, pectinase, dragon fruit.

* Author for correspondence: Tel: 0988608939; Email: huyenph@huit.edu.vn