

## TÁC ĐỘNG CỦA CÁC THÔNG SỐ TRONG QUÁ TRÌNH TRÍCH LY BẰNG CELLULASE LÊN HÀM LƯỢNG POLYPHENOL TỔNG SỐ VÀ KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HOÁ CỦA DỊCH CHIẾT TỎI ĐEN LÝ SƠN

TRẦN GIA BỬU, ĐÀM SAO MAI, TRẦN LÊ THỰC ĐOAN, ĐỖ HOÀNG NGUYỄN  
Viện Công nghệ sinh học-Thực Phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh  
trangiabuu@iuh.edu.vn

**Tóm tắt.** Tỏi đen là sản phẩm lên men từ tỏi qua một quá trình lên men được kiểm soát chặt chẽ về nhiệt độ và độ ẩm. Tỏi đen là một loại thực phẩm chức năng được ưa chuộng vì sản phẩm có vị ngọt và không còn mùi hăng đặc trưng, hàm lượng các chất chống oxy hóa cũng tăng nhiều lần so với tỏi tươi. Tỏi đen thường được sử dụng trực tiếp thực hoặc dưới dạng các sản phẩm chế biến như viên nang, purée, rượu, cao chiết, nước tỏi đen. Những năm gần đây, một số nhà nghiên cứu cũng đã tiến hành thử nghiệm nhằm đa dạng hóa các dạng sản phẩm chế biến khác từ tỏi đen như bột cao tỏi đen sấy phun hoặc nước ép tỏi trích ly từ enzyme. Tuy nhiên ảnh hưởng của các yếu tố trong quá trình trích ly bằng cellulase tỷ lệ tỏi đen: nước, tỷ lệ enzyme, nhiệt độ dịch hóa và thời gian trích ly lên khả năng chống oxy hóa và hàm lượng polyphenol của nước ép tỏi đen vẫn chưa được nghiên cứu. Ở nghiên cứu này chúng tôi đã khảo sát và chứng minh rằng khi tỏi đen được trích ly ở các điều kiện sau: tỷ lệ tỏi đen: nước (1:10), tỷ lệ cellulase bổ sung 0,06% (w/w), nhiệt độ dịch hóa là 45°C, thời gian trích ly là 3 giờ thì nước ép tỏi đen có hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa cao nhất ( $11,00 \pm 0,16$  mg GAE/g và  $59,26 \pm 3,82\%$ ).

**Từ khóa:** dịch chiết, khả năng chống oxy hóa, polyphenol, tỏi đen, trích ly bằng cellulase.

## EFFECT OF SOME FACTORS OF CELLULASE-ASSISTED EXTRACTION ON POLYPHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LY SON BLACK GARLIC AQUEOUS EXTRACT

**Abstract.** Black garlic is a processed product fermented from raw garlic under a fermentation process in which temperature and humidity are strictly regulated. Black garlic also is a favorite functional food because it has sweet taste and omit of the unpleasant flavor of raw garlic, as well as its antioxidants are increased several times after fermentation process. Black garlic could be used directly or as processing products, including capsule, purée, extract, and juice. Recently, some researchers have studied for diversification of black garlic product such as drying spray black garlic powder and enzyme-assisted black garlic extract. However, the effect of some factors of cellulase-assisted extraction on polyphenol content and antioxidant activity of black garlic extract has not been studied yet. In this research, we investigate and prove that black garlic aqueous extract which is extracted with following conditions: black garlic: water ratio (1:10), cellulase (0.06%) at 45°C in 3 hours possesses the highest values of polyphenol content and antioxidant activity ( $11,00 \pm 0,16$  mg GAE/g và  $59,26 \pm 3,82\%$ ).

**Keyword.** antioxidant activity, aqueous extract, black garlic, polyphenol, cellulase-assisted extraction

### 1. GIỚI THIỆU

Tỏi đen là sản phẩm lên men từ tỏi (*Allium sativum*) qua một quá trình lên men được kiểm soát chặt chẽ về nhiệt độ và độ ẩm. Sau quá trình lên men, sản phẩm tạo thành có màu đen, vị ngọt, không còn mùi cay hăng của tỏi thường và có tác dụng chống oxy hóa hơn nhiều lần so với loại tỏi thông thường. Thành phần hóa học của tỏi đen chứa chủ yếu các axit amin, peptide, protein, enzyme, glycosid, vitamin, ... Các thành phần quý trong tỏi sau khi trải qua quá trình lên men thì hàm lượng các chất chống oxy hóa cũng như hoạt tính

chống oxy hoá của tỏi tăng lên rất nhiều lần. Theo nghiên cứu của Nguyễn T.N. và cộng sự, sau 30 ngày lên men ở 60°C, hàm lượng hợp chất polyphenol tổng số và hàm lượng flavonoid tổng số trong tỏi đen tăng 15.5 lần và 6.5 lần so với tỏi tươi [1]. Nghiên cứu của Sato E. và cộng sự cho thấy hiệu lực chống oxy hóa của tỏi đen cao gấp 25 lần tỏi tươi [2]. Khả năng chống oxy hóa cao của tỏi đen giúp bảo vệ cơ thể khỏi các tổn hại do các gốc tự do sản sinh thông qua các quá trình trao đổi chất bình thường trong cơ thể hoặc từ các tác nhân độc hại bên ngoài như khói bụi, rượu bia, thuốc lá, cafein,... Vì thế tỏi đen trở thành loại thực phẩm lý tưởng để hỗ trợ điều trị cho các bệnh mãn tính như bệnh tim, bệnh Alzheimer,... Ngoài ra, Hồ A.S. và Vũ B.D. đã chứng minh tỏi đen có khả năng bảo vệ chống lại tác động có hại thứ phát của quá trình oxy hóa do xạ trị gây ra [3].

Tỏi đen thường được sử dụng trực tiếp hoặc dưới dạng thực phẩm chức năng, đồ uống chế biến như viên nang, purée, rượu, cao chiết, nước tỏi đen. Những năm gần đây, một số nhà nghiên cứu cũng đã tiến hành thử nghiệm nhằm đa dạng hóa các dạng sản phẩm chế biến khác từ tỏi đen [4, 5]. Năm 2014, nhóm tác giả Vũ B.D. và Nguyễn T. D sử dụng phương pháp sấy phun với maltodextrin:aerosol để tạo nên bột cao khô tỏi đen với hiệu suất thu hồi hoạt chất và hiệu suất sấy phun lần lượt là 91,60% và 86,06% [4]. Nhóm tác giả Kim J. H. và cộng sự đã nghiên cứu và chứng minh nước ép tỏi đen được trích ly bằng enzyme pectinase giúp giảm đường huyết và phục hồi các tổn thương ở đảo tụy trên mô hình chuột tiểu đường do streptozotocin [5]. Tuy nhiên, tác động của các thông số quá trình ly trích lên khả năng chống oxy hóa và hàm lượng các hợp chất polyphenol, một nhóm hợp chất có khả năng chống oxy hóa và có các tác dụng sinh học quan trọng, trong dịch chiết tỏi đen xử lý bằng enzyme cellulase vẫn chưa được làm rõ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định tác động các thông số của quá trình trích ly như tỷ lệ nguyên liệu: nước, tỷ lệ enzyme cellulase bổ sung, nhiệt độ, thời gian thủy phân lên khả năng kháng oxy hóa và hàm lượng các hợp chất polyphenol trong dịch chiết tỏi đen.

## **2. VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP**

### **2.1. Quy trình chiết xuất dịch tỏi đen**

Tỏi tươi nhiều nhánh (*Allium sativum*) được thu mua tại huyện đảo Lý Sơn, Tỉnh Quảng Ngãi vào tháng 6/2017. Sau khi thu mua tỏi, tỏi được phân loại và lựa chọn các củ tỏi không bị hư hỏng vật lý, không sâu mọt để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo. Tỏi được bóc vỏ và lên men trong tủ lão hóa (Shellab, Hoa Kỳ) với nhiệt độ 75°C độ ẩm tương đối 90% sau 15 ngày [6]. Sau khi lên men, tỏi đen được nghiền trong nước với tỷ lệ 1:10 (nguyên liệu: nước) bằng máy xay sinh tố. Hỗn hợp nước tỏi đen được ủ với enzyme cellulase (Novozymes, Đan Mạch, 700 EGU/g) với tỷ lệ 0,06% ở nhiệt độ 45°C trong 3 giờ. Hỗn hợp dịch chiết được đun ở nhiệt độ 90°C trong 5 phút nhằm bất hoạt enzyme cellulase. Sau khi bất hoạt enzyme, chúng tôi tiến hành thu nhận dịch chiết bằng phương pháp lọc chân không qua giấy lọc Whatman số 1. Dịch lọc sẽ được chia nhỏ trong các ống ly tâm 50 mL và lưu trữ ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng ở các thí nghiệm tiếp theo.

### **2.2. Xác định ảnh hưởng của các thông số của quá trình trích ly nhằm thu được dịch chiết tỏi đen có khả năng kháng oxy hóa và hàm lượng polyphenol tổng số**

Nhằm khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu: nước lên khả năng chống oxy hóa và hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết tỏi đen, tỏi đen được nghiền trong nước với các tỷ lệ 1:5, 1:10, 1:15 (tỏi đen: nước) bằng máy xay sinh tố. Sau đó hỗn hợp được ủ với enzyme cellulase 0,06% ở nhiệt độ 45°C trong 3 giờ. Sau khi thủy phân bằng cellulase, hỗn hợp nước tỏi đen sẽ được đun lên nhằm bất hoạt enzyme và lọc qua máy lọc chân không. Dịch lọc sẽ được sử dụng để khảo sát khả năng chống oxy hóa và hàm lượng polyphenol tổng số.

Nhằm khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme bổ sung lên khả năng chống oxy hóa và hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết tỏi đen, tỏi đen được nghiền trong nước với tỷ lệ 1:10 bằng máy xay sinh tố. Sau đó hỗn hợp được ủ với các tỷ lệ enzyme cellulase như sau: 0%, 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,10% ở nhiệt

độ 45°C trong 3 giờ. Sau khi thủy phân bằng cellulase, hỗn hợp nước tỏi đen sẽ được đun lên nhằm bất hoạt enzyme và lọc qua máy lọc chân không. Dịch lọc sẽ được sử dụng để khảo sát khả năng chống oxy hóa và hàm lượng polyphenol tổng số.

Nhằm khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân lên khả năng chống oxy hóa và hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết tỏi đen, tỏi đen được nghiền trong nước với tỷ lệ 1:10 bằng máy xay sinh tố. Sau đó hỗn hợp được ủ với tỷ lệ enzyme cellulase 0,06% ở nhiệt độ 40, 45, 50, 55, 60°C trong 3 giờ. Sau khi thủy phân bằng cellulase, hỗn hợp nước tỏi đen sẽ được đun lên nhằm bất hoạt enzyme và lọc qua máy lọc chân không. Dịch lọc sẽ được sử dụng để khảo sát khả năng chống oxy hóa và hàm lượng polyphenol tổng số.

Nhằm khảo sát ảnh hưởng của thời gian thủy phân lên khả năng chống oxy hóa và hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết tỏi đen, tỏi đen được nghiền trong nước với tỷ lệ 1:10 (nguyên liệu: nước) bằng máy xay sinh tố. Sau đó hỗn hợp được ủ với các tỷ lệ enzyme cellulase như sau 0,06% ở nhiệt độ 45°C trong 1, 2, 3, 4, 5 giờ. Sau khi thủy phân bằng cellulase, hỗn hợp nước tỏi đen sẽ được đun lên nhằm bất hoạt enzyme và lọc qua máy lọc chân không. Dịch lọc sẽ được sử dụng để khảo sát khả năng chống oxy hóa và hàm lượng polyphenol tổng số.

### 2.3. Xác định hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết

Hàm lượng polyphenol tổng số được xác định dựa trên phương pháp đo màu dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu [7]. Dịch chiết tỏi đen (2,4 mL) và trộn với thuốc thử Folin-Ciocalteu (0,15mL) và 0,45 dung dịch 1M NaCO<sub>3</sub>. Hỗn hợp phản ứng được đặt vào buồng tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau thời gian phản ứng, độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng sẽ được đo ở bước sóng 750 nm bằng máy đo quang UV-Vis (Genesys 20 UV-Vis, Hoa Kỳ). Hàm lượng polyphenol tổng số của mẫu được thể hiện qua mg đương lượng gallic acid trên khối lượng chất khô (mg GAE/g)

### 2.4. Xác định khả năng chống oxy hóa của dịch chiết

Khả năng chống oxy hóa được xác định dựa trên vào khả năng khử gốc tự do 1,1 – diphenyl-2-picrylhydrazyl của dịch chiết [8]. Dung dịch 0.2mM DPPH trong ethanol (1 mL) được trộn với 1 mL dung dịch mẫu. Hỗn hợp được giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút ở trong buồng tối. Sau thời gian phản ứng, độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng sẽ được đo ở bước sóng 517 nm bằng máy đo quang UV-Vis (Genesys 20 UV-Vis, Hoa Kỳ).

Khả năng khử gốc tự do DPPH được xác định theo công thức:

$$\text{Khả năng khử gốc tự do DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

Trong đó: Abs control: là độ hấp thụ của mẫu trắng gồm DPPH và ethanol, được đo ở 0 phút, Abs test: là độ hấp thụ của mẫu thử gồm DPPH và dịch trích, được đo sau 30 phút giữ trong tối.

### 2.5. Phương pháp xử lý số liệu

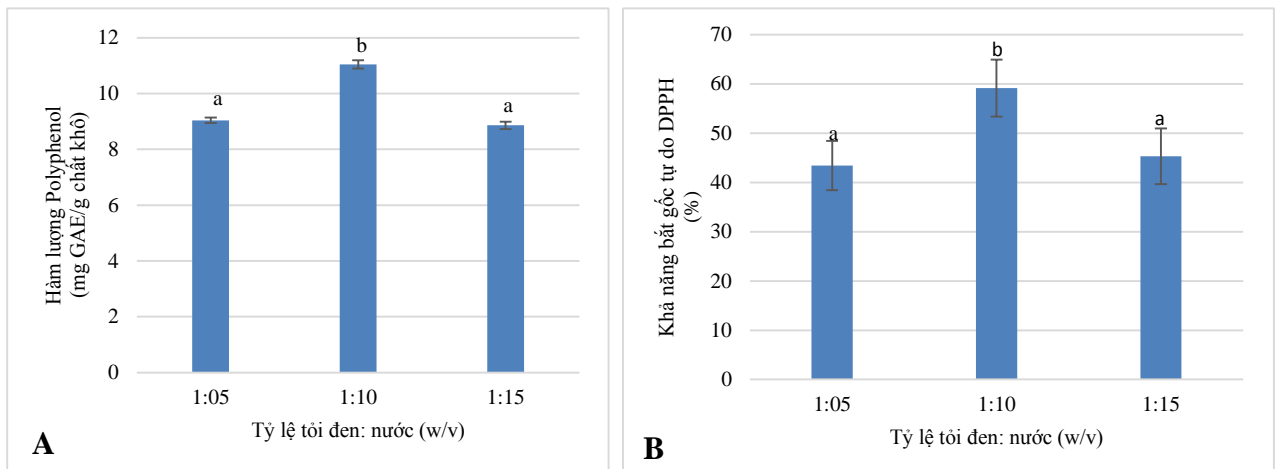
Tất cả các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày dưới dạng số trung bình (của 3 lần lặp lại) ± độ lệch chuẩn. Số liệu được phân tích ANOVA bằng phần mềm xử lý số liệu chuyên dụng Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, Hoa Kỳ). Kiểm định Multiple range test được thực hiện để đánh giá mức độ khác biệt giữa các giá trị với mức độ ý nghĩa là  $p < 0.05$ .

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu: nước lên khả năng chống oxy hóa của dịch chiết tỏi đen và hàm lượng polyphenol tổng số

Tác động của tỷ lệ tỏi đen: nước lên quá trình trích ly polyphenol bằng cellulose được trình bày trong hình 1A. Hàm lượng các hợp chất polyphenol tăng lên cùng với sự tăng tỷ lệ tỏi: nước (w:v) từ 1:5 đến 1:10 (p

< 0,05), tương ứng với đó là giá trị hàm lượng các hợp chất polyphenol thu được tăng từ  $9,04 \pm 0,10$  mg GAE/g lên  $11,04 \pm 0,15$  mg GAE/g. Sau đó, khi chúng tôi tăng tỷ lệ tỏi đen: nước lên 1:15 thì hàm lượng hợp chất polyphenol giảm xuống  $8,86 \pm 0,13$  GAE/g. Kết quả này tương đồng với kết quả của nhóm nghiên cứu của Phạm và cộng sự. Khi nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu: dung môi đến quá trình trích ly polyphenol, Phạm và cộng sự (2017) nhận thấy khi tăng dần tỷ lệ nguyên liệu: nước đến giá trị tối ưu (1:10) thì hàm lượng polyphenol cũng tăng dần rồi đạt cực đại, sau đó hàm lượng polyphenol lại giảm dần khi tăng tỷ lệ nguyên liệu: dung môi (1:12) [9]. Bên cạnh đó, tỷ lệ tỏi đen: nước cũng có ảnh hưởng đến khả năng chống oxy hóa của dịch chiết tỏi đen (Hình 1B). Theo đó, khả năng chống oxy hóa của dịch chiết tăng lên cùng với sự tăng tỷ lệ tỏi: nước (w:v) từ 1:5 đến 1:10 ( $p < 0,05$ ), tương ứng với đó là khả năng bắt gốc tự do DPPH tăng từ  $43,40 \pm 4,99\%$  lên  $59,12 \pm 5,76\%$ . Tuy nhiên, sau đó khi tỷ lệ trích ly tỏi: nước (w:v) tăng lên 1:15 thì khả năng bắt gốc tự do DPPH giảm xuống  $45,28 \pm 5,66\%$ . Chúng tôi nhận thấy khả năng chống oxy hóa của dịch chiết tỏi đen đạt giá trị cực đại ( $59,12 \pm 5,76\%$ ) ở tỷ lệ tỏi đen: nước là 1:10, đồng thời hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết tỏi đen khi trích ly bằng tỷ lệ tỏi đen trên (1:10) cũng đạt giá trị cao nhất ( $11,04 \pm 0,15$  mg GAE/g). Tỷ lệ nguyên liệu: nước (1:10) cũng được nhóm nghiên cứu Kankara và cộng sự chứng minh là tỷ lệ phù hợp để trích ly dịch chiết có hàm lượng flavonoid và khả năng chống oxy hóa tổng cao nhất [10]. Do đó chúng tôi chọn cố định tỷ lệ nguyên liệu: nước là 1:10 để tiến hành những thí nghiệm tiếp theo.

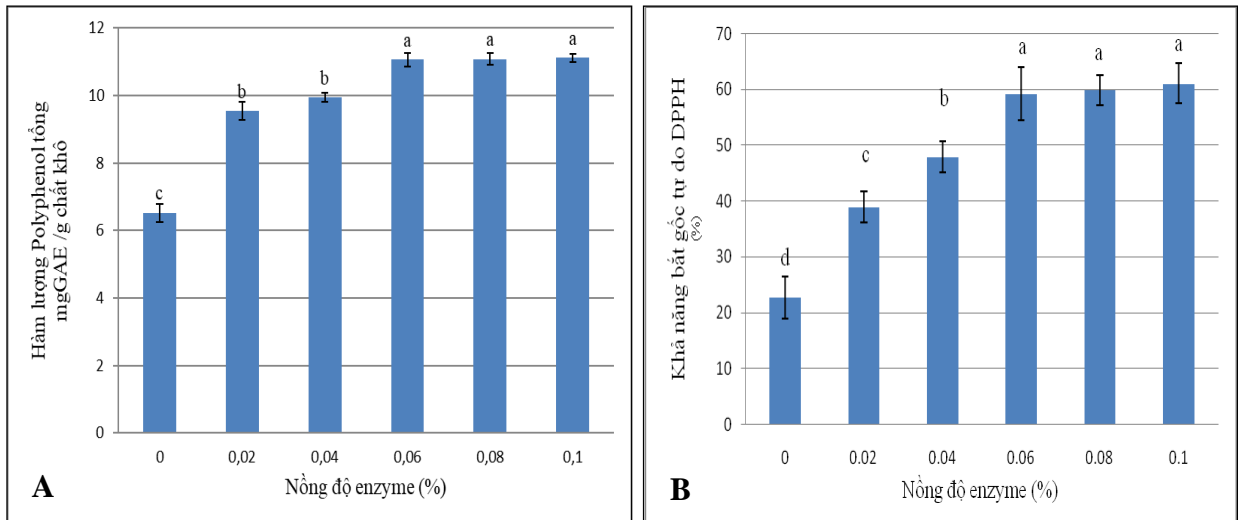


Hình 1. Ảnh hưởng của tỉ lệ tỏi đen: nước đến hàm lượng polyphenol tổng của dịch tỏi đen (A) và khả năng chống oxy hóa (B).

### 3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme lên khả năng chống oxy hóa của dịch chiết tỏi đen và hàm lượng polyphenol tổng số

Kết quả chỉ ra rằng nồng độ enzyme cellulase bổ sung có ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly các hợp chất polyphenol từ tỏi đen. Hàm lượng các hợp chất polyphenol tăng lên cùng với sự tăng nồng độ enzyme từ 0% đến 0,06%, tương ứng giá trị hàm lượng các hợp chất polyphenol thu được tăng từ  $6,52 \pm 0,27$  mg GAE/g lên  $11,05 \pm 0,20$  mg GAE/g. Tuy nhiên, khi nồng độ cellulase tiếp tục tăng đến 0.1% thì hàm lượng các hợp chất polyphenol thu được lại không đổi  $11,11 \pm 0,13$  mg GAE/g. Kết quả này tương đồng với kết quả của nhóm nghiên cứu Sun và cộng sự [11]. Khi khảo sát các yếu tố ảnh hưởng quá trình trích ly hợp chất polyphenol từ trái cây Xoan Nhừ bằng enzyme, Sun Z. và cộng sự nhận thấy khi tăng dần tỷ lệ enzyme từ 0-1.5% thì hàm lượng polyphenol sẽ tăng dần, rồi đạt giá trị cực đại sau đó khi tỷ lệ enzyme tiếp tục tăng (2%) thì hàm lượng polyphenol lại không tăng thêm mà giữ ổn định. Theo Nguyễn và cộng sự (2009), khi thừa cơ chất, vận tốc phản ứng tăng khi nồng độ enzyme tăng nhưng khi nồng độ enzyme bão hòa với nồng độ cơ chất thì vận tốc phản ứng không thay đổi hoặc không tăng thêm khi tăng nồng độ enzyme [12]. Ngoài ra, chúng tôi nhận thấy khả năng bắt gốc tự do DPPH tăng lên cùng với sự tăng nồng độ enzyme từ 0% đến

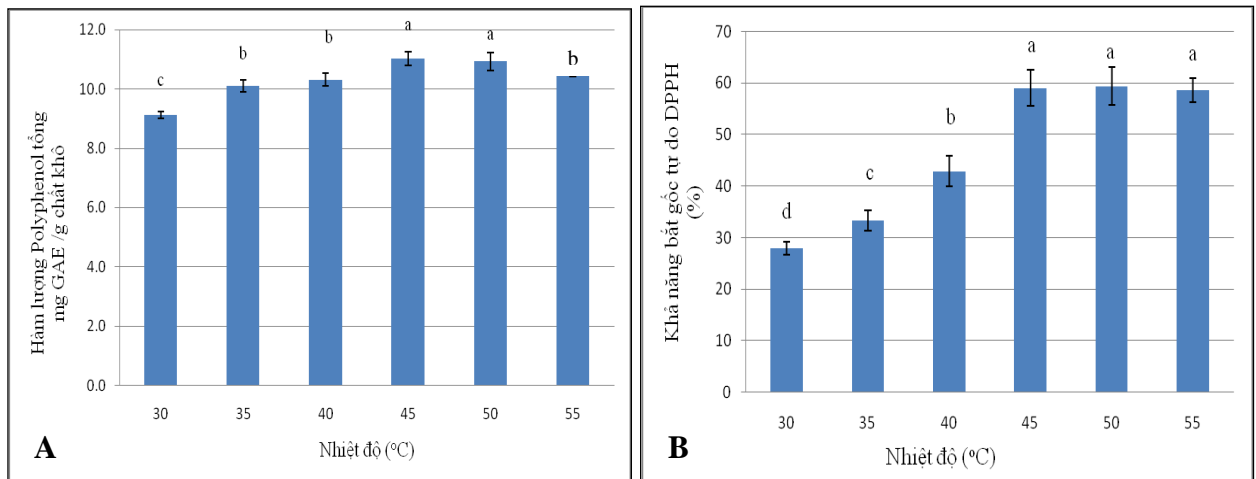
0,1%, tương ứng khả năng bắt gốc tự do DPPH thu được tăng từ  $22,75 \pm 3,74\%$  lên  $61,08 \pm 3,59\%$ . Nồng độ enzyme càng cao thì hiệu suất trích ly các hợp chất chống oxy hóa càng cao, điều này được giải thích dựa trên cơ chế tác dụng của enzyme xúc tác. Khi nồng độ enzyme càng cao, dẫn đến sự tăng khả năng phá vỡ cấu trúc thành tế bào, đây vốn là cơ quan che chở bên ngoài của tế bào làm giải phóng các hợp chất chống oxy hóa bên trong. Tuy nhiên không có sự khác biệt về khả năng bắt gốc tự do DPPH thu được ở các nồng độ enzyme 0,06%; 0,08% và 0,1%. Do đó chúng tôi chọn nồng độ cellulase là 0.06% để tiết kiệm lượng enzyme, chi phí và thu được dịch chiết có khả năng chống oxy hóa cao nhất và ( $59,28 \pm 4,75\%$  và  $11,05 \pm 0,20$  mg GAE/g).



Hình 2. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme bổ sung đến hàm lượng polyphenol tổng của dịch tỏi đen (A) và khả năng chống oxy hóa (B).

### 3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ dịch hóa lên khả năng chống oxy hóa của dịch chiết tỏi đen và hàm lượng polyphenol tổng số

Chúng tôi nhận thấy nhiệt độ dịch hóa có tác động lớn đến khả năng chống oxy hóa và hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết. Cụ thể, khi nhiệt độ trích ly tăng từ 30°C lên 45°C thì khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết tỏi đen tăng từ  $27,97 \pm 1,33\%$  lên  $59,00 \pm 3,51\%$ . Nhưng khi chúng tôi tiếp tục tăng nhiệt độ dịch hóa lên 55°C thì khả năng chống oxy hóa của dịch chiết tỏi đen không khác biệt so với dịch chiết khi dịch hóa ở 45°C ( $58,62 \pm 2,30\%$ ). Ngoài ra, khi tăng nhiệt độ trích ly từ 30°C lên 45°C thì hàm lượng các hợp chất polyphenol trích ly trong dịch chiết cũng tăng ( $9,13 \pm 0,12$  mg GAE/g và  $11,02 \pm 0,23$  mg GAE/g,  $p < 0,05$ ). Tuy nhiên ở nhiệt độ 55°C thì hàm lượng các hợp chất polyphenol giảm. Sở dĩ nhiệt độ tăng thì hiệu suất thu được hàm lượng các hợp chất polyphenol tăng là vì khi tăng nhiệt độ, tăng khuếch tán phân tử từ bên trong ra bên ngoài, cấu trúc của nguyên liệu cũng bị suy yếu do nhiệt độ, tạo điều kiện cho việc giải phóng các chất từ trong tế bào nguyên liệu ra bên ngoài. Mỗi enzyme lại có một khoảng nhiệt độ hoạt động tối ưu, khi nhiệt độ dịch hóa ở trên hoặc dưới khoảng tối ưu thì hoạt tính enzyme sẽ giảm, do đó, khả năng trích ly các hợp chất polyphenol và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết ở ngoài nhiệt độ tối ưu của enzyme cũng giảm. Một số nghiên cứu đã công bố cho thấy mối liên hệ chặt chẽ giữa nhiệt độ dịch hoá với hàm lượng polyphenol, flavonoid tổng và khả năng chống oxy hoá của các dịch trích từ thực vật [13, 14]. Theo Pan và Wu, thì nhiệt độ tối thích cho quá trình trích ly polysaccharides và hợp chất chống oxy hóa từ tỏi bằng cellulase là 45°C. Kết quả trên cũng khá tương đồng với kết quả của chúng tôi, khi chúng tôi trích ly tỏi đen với nhiệt độ 45°C thì hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết tỏi đen đạt giá trị cực đại ( $11,02 \pm 0,23$  mg GAE/g và  $59,00 \pm 3,51\%$ ).



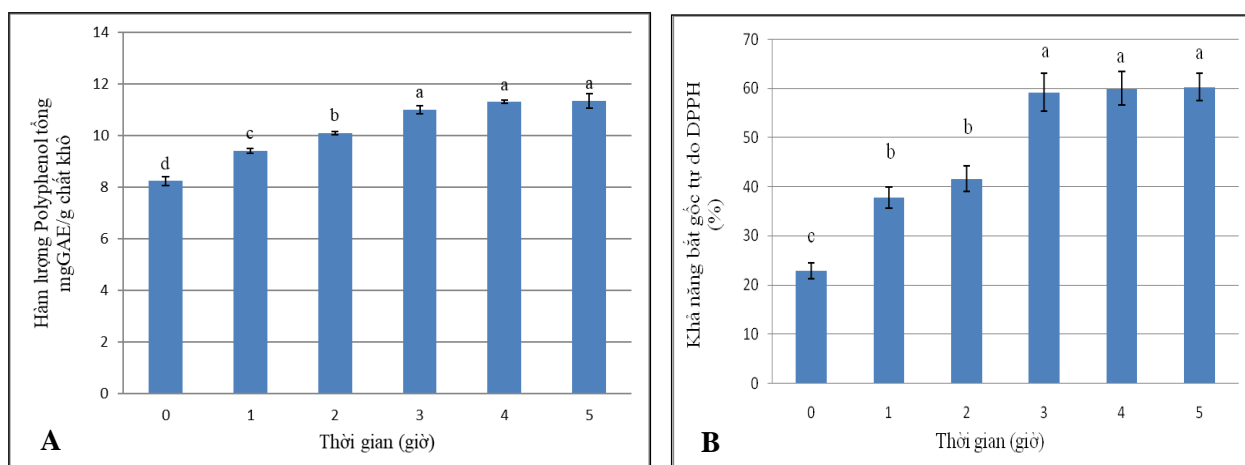
Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ dịch hóa bổ sung đến hàm lượng polyphenol tổng của dịch tỏi đen (A) và khả năng chống oxy hóa (B).

### 3.4. Ảnh hưởng của thời gian trích ly lên khả năng chống oxy hóa của nước ép tỏi đen và hàm lượng polyphenol tổng số

Cũng tương tự như yếu tố nhiệt độ thì thời gian trích ly càng dài thì hiệu suất trích ly các hợp chất phenolic càng cao, các polymer và các hợp chất phenolic sẽ hòa tan vào dung môi trích ly càng nhiều [16]. Tuy nhiên, khi quá trình khuếch tán đã đạt được trạng thái cân bằng hay nói cách khác, nồng độ chất khuếch tán bên trong nguyên liệu và bên ngoài đạt trạng thái cân bằng, khi đó không tồn tại sự chênh lệch về gradient nồng độ. Điều này dẫn đến quá trình khuếch tán chậm lại hoặc không diễn ra nữa. Thời gian trích ly quá dài cũng không có tác động tích cực cho việc trích ly các hợp chất phenolic [17]. Theo Kankara và cộng sự (2014), thời gian trích ly càng dài thì dịch chiết càng tiếp xúc nhiều với nhiệt độ, ánh sáng, oxy, những yếu tố gây phản ứng oxy hóa các hợp chất phenol và phân hủy enzyme [10].

Kết quả cho thấy hàm lượng các hợp chất polyphenol tăng lên cùng với sự tăng của thời gian trích ly từ 0 giờ cho đến 5 giờ (Hình 4A). Khi thời gian trích ly tăng từ 0 giờ đến 3 giờ tương ứng là giá trị hàm lượng các hợp chất polyphenol thu được tăng từ  $8,24 \pm 0,164$  mg GAE/g đến  $11,00 \pm 0,16$  mg GAE/g. Khi thời gian trích ly tiếp tục tăng đến 5 giờ thì hàm lượng các hợp chất polyphenol trong dịch chiết tỏi đen không đổi ( $11,35 \pm 0,29$  mg GAE/g,  $p > 0,05$ ). Đồng thời chúng tôi nhận thấy khả năng bắt gốc tự do DPPH tăng lên cùng với sự tăng của thời gian trích ly từ 0 giờ cho đến 3 giờ, tương ứng là khả năng bắt gốc tự do DPPH thu được tăng từ  $22,93 \pm 1,62\%$  đến  $59,26 \pm 3,82\%$  ( $p < 0,05$ ). Tuy nhiên không có sự khác biệt giữa các khoảng thời gian 3, 4 và 5 giờ. Từ kết quả hình 4A và 4B, chúng tôi chọn thời gian trích ly là 3 giờ nhằm thu dịch chiết có hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa cao nhất. Thời gian trích ly trên (3 giờ) cũng là thời gian tối ưu được Kanrara và cộng sự dùng trích ly và thu được dịch chiết có khả năng chống oxy hóa cao nhất.

30 TÁC ĐỘNG CỦA CÁC THÔNG SỐ TRONG QUÁ TRÌNH TRÍCH LY BẰNG CELLULASE LÊN HÀM LƯỢNG POLYPHENOL TỔNG SỐ VÀ KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HOÁ CỦA DỊCH CHIẾT TỎI ĐEN LÝ SƠN



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng của dịch tỏi đen (A) và khả năng chống oxy hóa (B).

Bảng 1 Bảng tổng hợp ảnh hưởng của các yếu tố tỉ lệ tỏi đen: nước, tỷ lệ enzyme, nhiệt độ và thời gian trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa của dịch tỏi đen.

	Hàm lượng polyphenol tổng số (mg GAE/g chất khô)	Khả năng bắt gốc tự do DPPH (%)
<b>1. Tỷ lệ nguyên liệu: nước</b>		
<b>1:5</b>	9,04 ± 0,10 <sup>a</sup>	43,40 ± 4,99 <sup>a</sup>
<b>1:10</b>	11,04 ± 0,15 <sup>b</sup>	59,12 ± 5,76 <sup>b</sup>
<b>1:15</b>	8,86 ± 0,13 <sup>a</sup>	45,28 ± 5,66 <sup>a</sup>
<b>2. Tỷ lệ enzyme (%)</b>		
<b>0</b>	6,52 ± 0,27 <sup>c</sup>	22,75 ± 3,74 <sup>d</sup>
<b>0,02</b>	9,53 ± 0,27 <sup>b</sup>	38,92 ± 2,74 <sup>c</sup>
<b>0,04</b>	9,93 ± 0,14 <sup>b</sup>	47,90 ± 2,74 <sup>b</sup>
<b>0,06</b>	11,05 ± 0,20 <sup>a</sup>	59,28 ± 4,75 <sup>a</sup>
<b>0,08</b>	11,08 ± 0,16 <sup>a</sup>	59,88 ± 2,74 <sup>a</sup>
<b>0,1</b>	11,11 ± 0,13 <sup>a</sup>	61,08 ± 3,59 <sup>a</sup>
<b>3. Nhiệt độ (°C)</b>		
<b>30</b>	9,13 ± 0,12 <sup>c</sup>	27,97 ± 1,33 <sup>d</sup>
<b>35</b>	10,10 ± 0,20 <sup>b</sup>	33,33 ± 1,99 <sup>c</sup>
<b>40</b>	10,31 ± 0,21 <sup>b</sup>	42,91 ± 2,89 <sup>b</sup>
<b>45</b>	11,02 ± 0,23 <sup>a</sup>	59,00 ± 3,51 <sup>a</sup>

TÁC ĐỘNG CỦA CÁC THÔNG SỐ TRONG QUÁ TRÌNH TRÍCH LY BẰNG CELLULASE LÊN HÀM LƯỢNG POLYPHENOL TỔNG SỐ VÀ KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HOÁ CỦA DỊCH CHIẾT TỎI ĐEN LÝ SƠN

50	10,93 ± 0,30 <sup>a</sup>	59,39 ±
3,69 <sup>a</sup>		
55	10,48 ± 0,07 <sup>b</sup>	58,62 ±
2,30 <sup>a</sup>		
<b>4. Thời gian (giờ)</b>		
0	8,24 ± 0,16 <sup>d</sup>	22,93 ±
1,62 <sup>c</sup>		
1	9,41 ± 0,08 <sup>c</sup>	37,74 ±
2,20 <sup>b</sup>		
2	10,09 ± 0,07 <sup>b</sup>	41,62 ±
2,66 <sup>b</sup>		
3	11,00 ± 0,16 <sup>a</sup>	59,26 ±
3,82 <sup>a</sup>		
4	11,31 ± 0,06 <sup>a</sup>	59,96 ±
3,40 <sup>a</sup>		
5	11,35 ± 0,29 <sup>a</sup>	60,32 ±
2,80 <sup>a</sup>		

Trong bảng trên, các chữ cái a, b, c, d, e biểu thị sự khác biệt về thống kê giữa các số liệu trong cột.

#### 4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát và chứng minh tác động của các yếu tố trong quá trình trích ly bằng cellulase như tỷ lệ tỏi đen: nước, tỷ lệ enzyme bổ sung, nhiệt độ dịch hóa và thời gian trích ly lên khả năng chống oxy hóa và hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết tỏi đen. Chúng tôi cũng xác định được các điều kiện phù hợp như tỷ lệ tỏi đen: nước (1:10), tỷ lệ cellulase bổ sung (0,06%), nhiệt độ dịch hóa (45°C), thời gian trích ly (3 giờ) để trích ly nhằm dịch chiết có hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa cao nhất (11,00 ± 0,16 mg GAE/g và 59,26 ± 3,82%). Quá trình trích ly tỏi đen trước đây chủ yếu bằng nhiệt độ cao để tạo nước ép hoặc cao chiết, do đó kết quả nghiên cứu mở ra một hướng nghiên cứu mới sản xuất các sản phẩm đồ uống có hoạt chất sinh học và khả năng chống oxy hóa cao với phương pháp trích ly bằng enzyme. Đồng thời, nghiên cứu cũng cung cấp những thông số cơ bản để trích ly tỏi đen bằng enzyme để phục vụ cho những nghiên cứu tiếp theo ở quy mô pilot.

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của trường Đại học Công Nghiệp TP. HCM trong khuôn khổ đề tài cấp cơ sở mã số 184-TP08 đã giúp nhóm tác giả hoàn thành nội dung nghiên cứu này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Thị Nguyên, Phan Ngọc Hòa, Lê Thị Thu Thảo, Phan Đình Tuấn. Hiệu quả của việc xử lý nhiệt đến khả năng kháng oxy hóa của tỏi đen sản xuất từ tỏi Phan Rang. Tạp chí Khoa Học và Công Nghệ, ĐHQG Hà Nội, 55, 1, 29-34, 2017.
- [2] E. Sato, M. Kohno, H. Hamano, and Y. Niwano, Increased antioxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation, Plant Foods Hum Nutr, vol. 61, no. 4, pp. 157-160, 2006.
- [3] Hồ Anh Sơn và Vũ Bình Dương, Nghiên cứu tác dụng bảo vệ của dịch chiết tỏi đen đối với một số cơ quan lympho trên chuột bị chiếu xạ, Tạp chí y - dược học quân sự, số 9, 31-38, 2014.
- [4] Vũ Bình Dương và Nguyễn Trọng Điệp, Nghiên cứu điều chế bột cao khô tỏi đen bằng phương pháp phun sấy, Tạp chí y - dược học quân sự, số 5, 13-19, 2014.



32 TÁC ĐỘNG CỦA CÁC THÔNG SỐ TRONG QUÁ TRÌNH TRÍCH LY BẰNG CELLULASE LÊN HÀM LƯỢNG POLYPHENOL TỔNG SỐ VÀ KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HOÁ CỦA DỊCH CHIẾT TỎI ĐEN LÝ SƠN

- [5] J. H. Kim, S. H. Yu, Y. J. Cho, J. H. Pan, H. T. Cho, J. H. Kim, H. J. Bong, Y. J. Lee, M. H. Chang, Y. J. Jeong, G. R. Choi and Y. J. Kim, Preparation of S-allyl cysteine-enriched black garlic juice and its antidiabetic effects in streptozotocin-induced insulin-deficient mice, *J. Agric. Food Chem*, vol 65, no. 2, pp. 358-363, 2016.
- [6] Gia-Buu Tran, Sao-Mai Dam, Nghia-Thu Tram Le, Amelioration of Single Clove Black Garlic Aqueous Extract on Dyslipidemia and Hepatitis in Chronic Carbon Tetrachloride Intoxicated Swiss Albino Mice, *International Journal of Hepatology*, vol. 2018, Article ID 9383950, 2018.
- [7] I. S. Choi, H. S. Cha and Y. S. Lee. (2014). Physicochemical and Antioxidant Properties of Black Garlic, *Molecules*, vol. 19, 16811-16823, 2014
- [8] S. E. Bae, S. Y. Cho, Y. D. Won, S. H. Lee, and H. J. Park, (2014). Changes in S-allyl cysteine contents and physicochemical properties of black garlic during heat treatment, *LWT - Food Science and Technology*, vol. 55, no. 1, 397-402, 2014.
- [9] Phạm Ngọc Khôi và Nguyễn Thị Hoài Nhiên, Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng tới việc chiết tách và xác định tính kháng khuẩn, tính kháng oxy hóa của dịch chiết polyphenol từ cây chhua me đất hoa vàng (*Oxalis corniculata* L.), *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, trường ĐH Công Nghệ TP. HCM*, số 27, tr. 57-66, 2017.
- [10] S. S. Kankara, M. Mustafa, H. M. Ibrahim, R. Nulit and R. Go, Effect of Drying Methods, Solid-Solvent Ratio, Extraction Time and Extraction Temperature on Phenolic Antioxidants and Antioxidant Activity of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae) Leaves Water Extract, *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, vol. 2, no. 12, 1378-1392, 2014.
- [11] Z. Sun, L. Zhang, Y. Fang, H. Huang and M. Wang, Study on enzymatic extraction of polyphenol constituents in *Fructus choerospondiatis*, *Biomedical Research*, vol. 26, no. 2, 321-327, 2015.
- [12] Nguyễn Nhật Minh Phương, Chế Văn Hoàng, Lý Nguyễn Bình và Châu Trần Diễm Ái, Tác động enzyme pectinase đến khả năng trích ly dịch quả và các điều kiện lên men đến chất lượng rượu vang xoài sau thời gian lên men chính. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, số 20a, 127-136, 2011.
- [13] Q. V. Vuong, S. Hirun, P. D. Roach, M.C. Bowyer, P. A. Phillips and C. J. Scarlett, Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica Papaya* leaf aqueous extracts, *Journal of Herbal Medicine*, vol. 3. no. 3, pp. 104-111, 2013.
- [14] S. La, The Effect of Extraction Conditions on Total Phenolic Content and Free Radical Scavenging Capacity of Selected Tropical Fruits' Peel, *Health and the Environment. Journal*, 2013, vol. 4, no. 2, 80-102, 2013.
- [15] S. Pan, S. Wu, Cellulase-assisted extraction and antioxidant activity of the polysaccharides from garlic, *Carbohydr Polym*, vol 111, 606-609, 2014.
- [16] G. Spigno, L. Tramelli and D. M. De Faveri, Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics, *J. Food Eng*, vol. 81, no. 1, pp. 200-208, 2007.
- [17] E. M. Silva, Y. Rogez H and Y. Larondelle, Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methadolog., *Separ. Purif. Tech*, vol. 55, no. 3, pp. 381-387, 2007.

*Ngày gửi bài: 18/09/2018*

*Ngày chấp nhận đăng: 15/03/2019*