

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN THỊ XUYÊN

**NGHIÊN CỨU, PHÂN TÍCH CẤU TRÚC, TÍNH CHẤT CỦA LỚP
PHỦ TỪ CHITOSAN VÀ DỊCH CHIẾT VỎ LỤU**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Hà Nội - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Xuyên

**NGHIÊN CỨU, PHÂN TÍCH CẤU TRÚC, TÍNH CHẤT CỦA LỚP
PHỦ TỪ CHITOSAN VÀ DỊCH CHIẾT VỎ LỰU**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hoá phân tích

Mã số: 8 44 01 18

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

TS. Phạm Thị Lan

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn**Nguyễn Thị Xuyên**

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện luận văn, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến người hướng dẫn của tôi, TS. Phạm Thị Lan đã đồng hành và chỉ dẫn tôi rất nhiều. Xin gửi lời cảm ơn đến Trung tâm Phân tích ứng dụng và phòng Hoá sinh – môi trường nhiệt đới, Viện kỹ thuật nhiệt đới đã tạo điều kiện cho tôi thực hành thí nghiệm trong suốt quá trình tôi thực hiện luận văn. Tôi xin cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng, các thầy cô và anh chị chuyên viên của Học viện Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ tôi để luận văn được hoàn thành. Cuối cùng, xin cảm ơn gia đình và bạn bè đã luôn đồng hành trong suốt quá trình tôi học tập để tôi có thể hoàn thành tốt luận văn này.

Xin chân thành cảm ơn!

Tác giả luận văn



Nguyễn Thị Xuyên

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT	v
DANH MỤC HÌNH VẼ.....	vi
DANH MỤC BẢNG BIỂU	viii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	4
1.1. Cấu trúc và các tính chất của chitosan	4
1.1.1. Tổng quan về chitosan	4
1.1.2. Khả năng tạo màng của chitosan.....	4
1.1.3. Đặc tính ức chế vi sinh vật của chitosan.....	5
1.2. Thành phần hóa học của vỏ quả lựu	6
1.3. Tổng quan về quả xoài và các phương pháp bảo quản quả sau thu hoạch	9
1.3.1. Tổng quan về quả xoài	9
1.3.2. Một số phương pháp bảo quản quả hiện nay	9
1.4. Vật liệu nanocomposite trên cơ sở chitosan ứng dụng bảo quản quả..	10
CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM	14
2.1. Hoá chất- dụng cụ	14
2.1.1. Nguyên liệu, hóa chất:.....	14
2.1.2. Thiết bị, dụng cụ:	14
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	15
2.2.1. Phương pháp chiết xuất và làm giàu dịch chiết từ vỏ quả lựu.....	15
2.2.2. Chế tạo màng phủ từ chitosan và dịch chiết vỏ lựu	17
2.2.3. Phương pháp chế tạo lớp phủ có thành phần chitosan/dịch chiết (CS/DC).....	17
2.3. Phương pháp nghiên cứu đặc trưng tính chất của vật liệu.....	17

2.3.1. Xác định độ trong và độ mờ đục.....	17
2.3.2. Phương pháp phổ hồng ngoại	18
2.3.3. Phương pháp nhiệt lượng quét vi sai DSC.....	18
2.3.4. Phân tích hình thái cấu trúc bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM).....	19
2.3.5. Xác định hàm lượng polyphenol tổng (TPC).....	19
2.3.6. Xác định hoạt tính chống oxi hóa	20
2.4. Một số phương pháp xác định sự biến đổi các chỉ tiêu sinh hóa của quả	21
2.4.1. Xác định sự hao hụt khối lượng của quả.....	21
2.4.2. Xác định độ cứng của quả.....	21
2.4.3. Xác định chỉ số màu sắc của vỏ quả	21
2.4.4. Sự thay đổi độ ngọt của quả.....	22
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	23
3.1. Kết quả xác định điều kiện chiết xuất	23
3.2. Kết quả nghiên cứu chế tạo màng phủ bảo quản CS/DC.....	26
3.2.1. Khảo sát điều kiện chế tạo màng	26
3.2.2. Đặc trưng tính chất và hình thái cấu trúc của màng phủ CS/DC.....	32
3.3. Ứng dụng màng phủ CS/DC để bảo quản quả xoài	34
3.3.1. Xác định độ dày của lớp phủ bảo quản.....	34
3.3.2. Đánh giá sự thối hỏng và độ hao hụt khối lượng của quả	34
3.3.2. Kết quả đo độ cứng và hàm lượng đường tổng số của quả.....	38
KẾT LUẬN	40
TÀI LIỆU THAM KHẢO	41

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
CS	Chitosan	chitosan
CS/DC		Chitosan/ dịch chiết vỏ quả lựu
DC1.1		Dịch chiết vỏ quả lựu thu được sau khi chiết etanol
DC1.2		Dịch chiết vỏ quả lựu sau khi chiết etylaxetat
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSC	Differential scanning calorimetry	Phân tích nhiệt quét vi sai
FTIR	Fourier Transform Infrared	Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
PP1		Phương pháp 1
PP2		Phương pháp 2
SEM	Scanning Electron Microscope	Kính hiển vi điện tử quét
TPC	Total polyphenolic content	Hàm lượng polyphenol tổng số
UV-Vis	UV-Vis spectroscopy	Quang phổ hấp thụ phân tử

DANH MỤC HÌNH VẼ

Hình 1. 1. Quá trình đề axetyl hoá chitin.	4
Hình 1. 2. Cấu trúc hoá học của các hợp chất phenolic chính trong vỏ quả lựu	7
Hình 2. 1. Máy cô quay chân không dùng để cô quay dịch chiết từ vỏ quả lựu	16
Hình 2. 2. Quy trình chiết xuất và làm giàu dịch chiết từ vỏ quả lựu.....	16
Hình 2. 3. Phức màu xanh của dịch chiết vỏ lựu và axit gallic	19
Hình 3. 1. Đường chuẩn của axit gallic	23
Hình 3. 2. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa phần trăm bắt gốc tự do P (%) với nồng độ của dịch chiết DC.....	25
Hình 3. 3. Hình ảnh các mẫu thí nghiệm sau khi thêm dung dịch chứa dịch chiết vào các bình phản ứng chứa DPPH. Màu sắc của DPPH nhạt dần (tím → vàng) khi nồng độ của dịch chiết DC tăng dần (từ trái qua phải tương ứng với các mẫu thí nghiệm từ 0 đến 7, trong đó mẫu 0 là mẫu chỉ chứa dung dịch DPPH).	26
Hình 3. 5. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của phần trăm bắt gốc tự do vào nồng độ dung dịch chứa dịch chiết (với công thức CT1).	27
Hình 3. 4. Hình ảnh các mẫu thí nghiệm sau khi thêm DPPH ở các nồng độ cao chiết khác nhau. Màu sắc của DPPH nhạt dần (tím → vàng) khi nồng độ của cao chiết tăng (từ trái qua phải tương ứng với các mẫu từ 0 đến 12, trong đó mẫu 0 là mẫu chỉ chứa dung dịch DPPH).....	27
Hình 3. 6. Ảnh SEM của mẫu a) chitosan (CT0); b) CT1; c) CT2; d) CT3. ..	29
Hình 3. 7. Độ trong suốt và độ mờ đục của các mẫu màng CS/DC.	30
Hình 3. 8. Các chỉ số (L, a, b) thể hiện giá trị màu sắc của các mẫu màng CS/DC.	31
Hình 3. 9. Phổ FT-IR của 1) chitosan; 2) CS/DC và 3) dịch chiết.	32
Hình 3. 10. Đường cong nhiệt DSC của các mẫu chitosan (1); dịch chiết (2) và màng CS/DC (3).	33
Hình 3. 11. Ảnh SEM mặt cắt của a) vỏ quả xoài; b) vỏ quả xoài khi được phủ với công thức CS/DC.	34

Hình 3. 12. Độ cứng của các mẫu quả xoài thay đổi theo thời gian. 38

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 3. 1. Giá trị hiệu suất chiết xuất và hàm lượng polyphenol tổng tương ứng có trong dịch chiết.....	23
Bảng 3. 2. Hàm lượng polyphenol tổng của cao chiết DC1.2 và cao chiết DC	24
Bảng 3. 4. Công thức của các lớp phủ CS/DC.....	26
Bảng 3. 5. Khả năng chống oxi hoá của các công thức tạo màng phủ CS/DC.	28
Bảng 3. 6. Giá trị độ trong/độ mờ của màng CS/DC.....	29
Bảng 3. 7. Hình ảnh một số mẫu quả xoài được theo dõi trong quá trình bảo quản.	35

MỞ ĐẦU

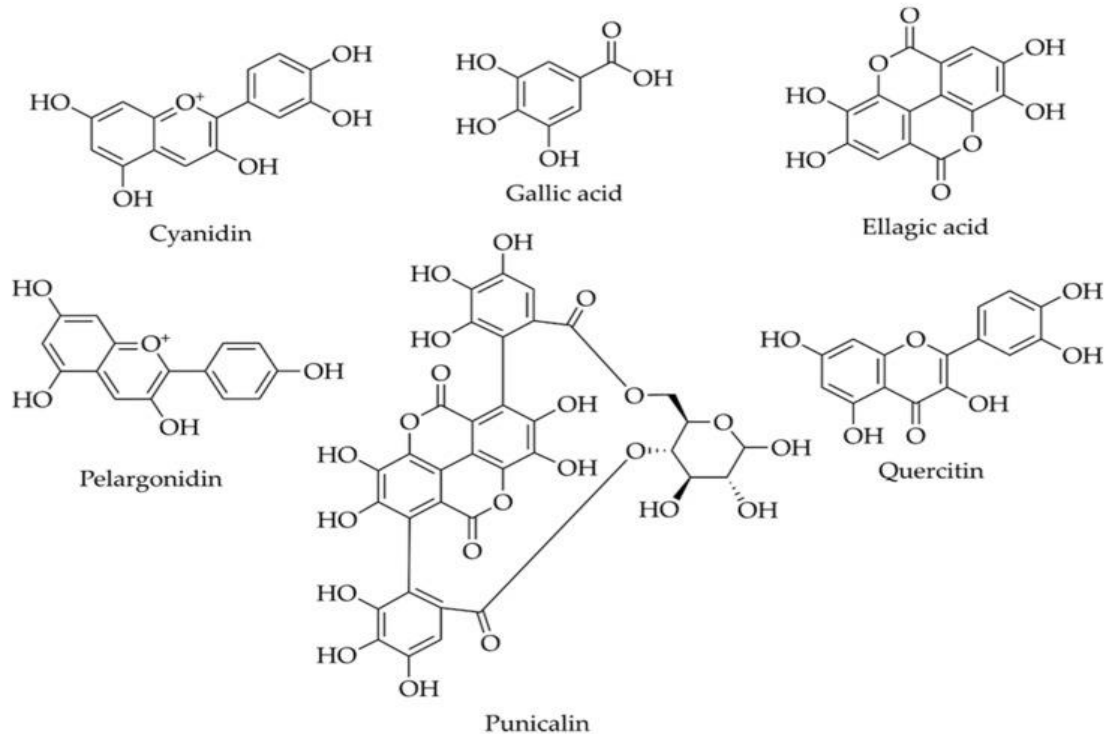
Lý do chọn đề tài

Thời gian gần đây, xu thế nghiên cứu vật liệu an toàn ứng dụng trong bảo quản thực phẩm luôn nhận được sự quan tâm lớn của các nhà khoa học và của toàn xã hội. Việc sử dụng hoá chất để bảo quản có thể giúp thực phẩm tươi lâu hơn, nhưng cũng chứa rất nhiều rủi ro như khi sử dụng quá liều sẽ gây ra ngộ độc cấp tính, dùng một thời gian dài sẽ gây ra ngộ độc mãn tính, có nguy cơ hình thành các bệnh nguy hiểm như ung thư, hình thành khối u, hay đột biến gen [1, 2]. Ngoài ra, vật liệu bao gói thực phẩm trên cơ sở các polymer nhân tạo như polyethylene (PE), polypropylene (PP), polystyrene (PS), Polyvinyle chloride (PVC)... cho thấy tồn tại một số hạn chế nhất định. Hàm lượng chất dinh dưỡng của thực phẩm được bảo quản bằng loại vật liệu này vẫn bị suy giảm trong quá trình bảo quản [1]. Hơn nữa, thời gian phân hủy các vật liệu bao gói này thường kéo dài, khó xử lý, gây ô nhiễm môi trường và có hại sức khỏe của con người. Do vậy, việc nghiên cứu chế tạo vật liệu an toàn, có nguồn gốc từ thiên nhiên, dễ dàng phân huỷ sinh học, thân thiện với môi trường, có khả năng bảo quản tốt là hết sức cần thiết.

Với đặc tính có thể hoà tan tốt trong môi trường acid loãng, độc tính thấp, có nhiều hoạt tính sinh học quý như hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm..., chitosan đang chứng tỏ là vật liệu đầy tiềm năng được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực [3-4]. Đặc biệt, chitosan có khả năng tạo màng ứng dụng trong bảo quản thực phẩm do khả năng dễ dàng điều chỉnh độ ẩm, độ thoáng không khí cho thực phẩm, lại đủ dai, khó xé rách [4-5].

Tuy nhiên, các màng phủ từ chitosan thường rất mỏng, hoạt tính sinh học không cao, hơn nữa, chúng đều có bản chất như một thực phẩm nên cũng chịu các ảnh hưởng tương tự như các thực phẩm khác. Việc bổ sung các chất phụ gia vào màng để cải thiện tính chất cơ lý, cũng như khả năng chống oxi hóa, kháng khuẩn, kháng nấm là hết sức cần thiết [1, 2, 6]. Các dịch chiết giàu polyphenol thu được từ thực vật là một trong các giải pháp thu hút được sự quan tâm nghiên cứu rất lớn của các nhà khoa học [7]. Trong số đó, vỏ quả lựu đã được chứng minh có chứa nhiều hợp chất có giá trị như axit phenolic (axit hydroxycinnamic và hydroxybenzoic), flavonoid (anthocyanin, catechin và các flavonoid phức tạp khác), tannin thủy phân (axit ellagic và gallic,

pedunculagin, punicalin và punicalagin) [8-10]. Bởi vậy, dịch chiết từ vỏ quả lựu mang nhiều hoạt tính sinh học như hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn, chống viêm, chống ung thư... [8-10].



Hình 1. Cấu trúc hóa học của một số phân tử sinh học được xác định trong vỏ quả lựu [11].

Nhờ những đặc tính phù hợp của cả hai thành phần là chitosan có nguồn thiên nhiên và polyphenol từ dịch chiết vỏ lựu, việc chế tạo ra màng phủ an toàn, có tác dụng bảo quản thực phẩm, lại thân thiện môi trường; hơn nữa lại tận dụng được nguồn nguyên liệu sẵn có, rẻ tiền ở Việt Nam hứa hẹn là hướng nghiên cứu hấp dẫn, có tính khoa học và thực tiễn cao.

Sự cần thiết phải tiến hành nghiên cứu

Các lớp phủ trên cơ sở chitosan hứa hẹn có nhiều triển vọng trong bảo quản quả sau thu hoạch. Tuy nhiên, nếu chỉ sử dụng chitosan riêng rẽ thì hiệu quả bảo quản không cao. Vì vậy, việc phối hợp chitosan và các hoạt chất mang nhiều hoạt tính sinh học quý như các polyphenol được chiết xuất từ thực vật như vỏ quả lựu, trà không... để chế tạo các lớp phủ an toàn, có hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm, thân thiện với môi trường là hướng nghiên cứu hấp dẫn và thu hút được sự quan tâm nghiên cứu rất lớn của các nhà khoa học. Ở nước ta, có nguồn nguyên liệu phong phú rẻ tiền,

thậm chí là phụ phẩm nông nghiệp phải thải bỏ nhưng lại chứa nhiều hoạt chất có khả năng oxi hoá cao, kháng khuẩn như vỏ quả lựu. Việc bổ sung dịch chiết từ vỏ quả lựu vào thành phần màng chitosan đã được quan tâm nghiên cứu. Tuy nhiên, các nghiên cứu mới chỉ dừng lại ở việc chế tạo và nghiên cứu một số tính chất của vật liệu composite. Việc ứng dụng các màng phủ thành phần chitosan/dịch chiết để bảo quản quả sau thu hoạch vẫn còn rất sơ sài, chưa được quan tâm đúng mực. Hơn nữa, hàm lượng polyphenol trong dịch chiết ảnh hưởng rất lớn đến hoạt tính sinh học của màng. Vì vậy, trong nghiên cứu này, các polyphenol sẽ được làm giàu từ dịch chiết từ vỏ lựu và bổ sung vào dung dịch chitosan để tạo ra một lớp phủ an toàn với mục tiêu bảo quản và kéo dài thời gian sử dụng của quả sau thu hoạch.

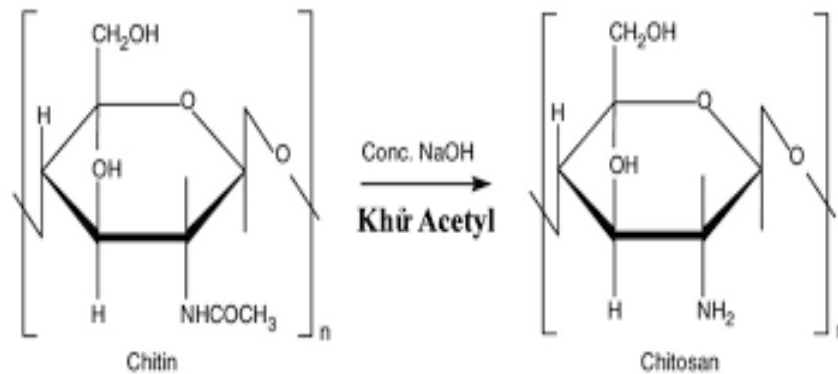
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Cấu trúc và các tính chất của chitosan

1.1.1. Tổng quan về chitosan

Chitosan là một polysaccharide, có cấu tạo giống như cellulose, tuy nhiên, khác với cellulose, trong mạch chitosan có sự hiện diện của nguyên tố nitơ. Chitin là một mucopolysaccharide có nhiều trong tự nhiên và được biết đến dưới tên gọi là 2-acetamido-2-deoxy- β -Dglucose liên kết với nhau bởi liên kết β -(1-4)-glycoside và có thể bị thủy phân bởi enzyme chitinase [12].

Chitosan là một dẫn xuất của quá trình deacetyl để loại bỏ nhóm acetyl của chitin trong môi trường kiềm đậm đặc và được thay thế bởi nhóm amin tại vị trí C2 trên vòng glucan. Chitosan được cấu tạo từ các đơn vị D-glucosamin liên kết với nhau bởi liên kết β -(1-4)-glycoside, còn có thể gọi là polymer tuyến tính của các đơn vị 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose hoặc là poly-(1-4)-D-glucosamin [13]. Trong thực tế, chitosan có nhiều ứng dụng hơn chitin. Chitosan là một polymer sinh học có nguồn gốc thiên nhiên với các đặc tính như có khả năng phân hủy sinh học, tương thích sinh học và thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đáp ứng làm vật liệu chức năng, ứng dụng trong nhiều lĩnh vực [14-16].



Hình 1. 1. Quá trình de acetyl hoá chitin [15].

1.1.2. Khả năng tạo màng của chitosan

Chitosan có thể tạo màng bảo quản trực tiếp cho thịt, cá, thực phẩm và trái cây tươi. Màng từ chitosan có đặc tính thấm chọn lọc tốt đối với CO_2 , O_2 và ethylene, đồng thời kiểm soát quá trình hô hấp của trái cây, giảm sự ngưng đọng hơi nước, vốn là môi trường thuận lợi cho nấm mốc phát triển, từ đó kéo dài thời gian sử dụng cho thực phẩm [17]. Màng chitosan giảm tỷ lệ hoá nâu

do quá trình oxi hoá bởi enzym polyphenoloxidase, giữ cho rau củ tươi hơn và ít bị biến đổi màu hơn [18]. Màng chitosan còn làm chậm quá trình lên men tạo ra các sản phẩm polymer hóa của oquinon, ức chế được hoạt tính oxy hóa của các polyphenol, anthocyanin, flavonoid và tổng lượng các hợp chất phenol ít biến đổi, giữ cho rau quả tươi hơn và ít bị sậm màu [19].

Tính chất cơ học của màng chitosan tương đối tốt, màng có tính dai, khó xé rách, độ bền tương đương với một số chất dẻo được dùng làm các loại bao bì truyền thống.

1.1.3. Đặc tính ức chế vi sinh vật của chitosan

Nhiều nghiên cứu trước đây đã chứng minh chitosan thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn thuộc cả gram âm và gram dương [18]. Khả năng kháng khuẩn của chitosan đối với vi khuẩn gram âm mạnh hơn vi khuẩn gram dương nhưng vi khuẩn gram dương nhạy cảm với chitosan hơn, có thể do vi khuẩn gram âm có lớp màng chắn bên ngoài [19]. Chitosan không những ức chế các vi khuẩn gram dương, gram âm mà cả nấm men và nấm mốc [12, 23, 26]. Khả năng kháng khuẩn của chitosan phụ thuộc các yếu tố như loại chitosan sử dụng (độ deacetyl, khối lượng phân tử), pH môi trường, nhiệt độ, sự có mặt của một số thành phần thực phẩm [20, 23]. Khả năng kháng khuẩn của chitosan và dẫn xuất của nó đã được nghiên cứu bởi một số tác giả, trong đó cơ chế kháng khuẩn cũng đã được giải thích trong một số trường hợp. Mặc dù chưa có một giải thích đầy đủ cho khả năng kháng khuẩn đối với tất cả các đối tượng vi sinh vật, nhưng hầu hết đều cho rằng khả năng kháng khuẩn liên quan đến mức độ hấp phụ chitosan lên bề mặt tế bào. Trong đó, chitosan hấp phụ lên bề mặt vi khuẩn gram âm tốt hơn vi khuẩn gram dương [20]. Sự tương tác giữa các phân tử chitosan mang điện tích dương với các màng tế bào vi sinh vật mang điện tích âm làm thay đổi mật độ điện tích trên vi sinh vật [21, 22]. Chitosan tác dụng lên vị trí mang điện âm của tế bào vi sinh vật dưới tác dụng của nhóm NH_3^+ , do vậy tính thấm của màng tế bào thay đổi. Lúc này, vi sinh vật không thể nhận các chất dinh dưỡng cơ bản cho sự phát triển bình thường như glucose, dẫn đến mất cân bằng giữa bên trong và bên ngoài màng tế bào, cuối cùng dẫn đến sự chết của tế bào. Cơ chế này được cho là do tổn thương bên ngoài màng tế bào, nhưng kết quả của một số thí nghiệm được tiến hành gần đây ở trong phòng thí nghiệm cho thấy cơ chế này

có thể không đơn giản vì nó liên quan đến những thay đổi tính ưa nước và mật độ tích điện của bề mặt tế bào cũng như thay đổi tính chất hấp phụ chitosan của thành tế bào [20]. Chitosan có thể ngăn cản sự phát triển của vi khuẩn do có khả năng lấy đi các ion kim loại quan trọng như Cu^{2+} , Cd^{2+} của tế bào vi khuẩn nhờ hoạt động của các nhóm amino trong chitosan có thể tác dụng với các nhóm anion của bề mặt thành tế bào. Như vậy, vi sinh vật sẽ bị ức chế phát triển do sự mất cân bằng liên quan đến các ion quan trọng [22].

Dung dịch chitosan thường có độ ổn định cao trong thời gian dài. Tuy nhiên, khả năng kháng khuẩn của dung dịch chitosan phụ thuộc vào giá trị pH [24]. Không giống như vi khuẩn gram âm, vi khuẩn gram dương không có màng ngoài. Chitosan là polycationic, do đó, có thể bám dính tốt với màng của vi khuẩn gram dương như *Staphylococcus aureus*. Trong dữ liệu nghiên cứu về vi khuẩn gram dương, các nhà nghiên cứu đã báo cáo rằng vi khuẩn gram dương có chứa acid teichoic và acid lipoteichoic là các polyanionic tương tác với các chất nội bào. Vì lý do trên, khả năng ức chế vi khuẩn của chitosan đối với vi khuẩn gram dương nhạy hơn vi khuẩn gram âm [25].

Các kết quả nghiên cứu gần đây chứng minh chitosan có khả năng ức chế sự phát triển của vi sinh vật. Đặc tính này của chitosan phụ thuộc vào khối lượng phân tử và loại vi sinh vật, ví dụ như, chitosan có khối lượng phân tử 470 kDa ức chế vi khuẩn gram dương như *Lactbacillus* sp, *L. monocytogenes*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *L. brevis*, *L. bulgaris*... rất tốt. Trong khi chitosan có khối lượng phân tử 1.106 kDa có ảnh hưởng đối với vi khuẩn gram âm như *E.coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrioparahaemolyticus* tốt hơn [26, 27]. Theo tác giả Hong và cộng sự, nồng độ chitosan là 0,1%, ở pH 5,6 có khả năng kháng các loại nấm: *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizopus* [28]. Chitosan có khối lượng phân tử từ 5 đến 50 kDa đều kháng tốt vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và nấm *Candida albicans*. Các nghiên cứu cũng chứng minh khi khối lượng phân tử chitosan tăng thì khả năng kháng khuẩn giảm. Khả năng kháng vi sinh vật của chitosan tăng cao ở pH thấp, và giảm khi có mặt các ion Ca^{2+} , Mg^{2+} [29 -31].

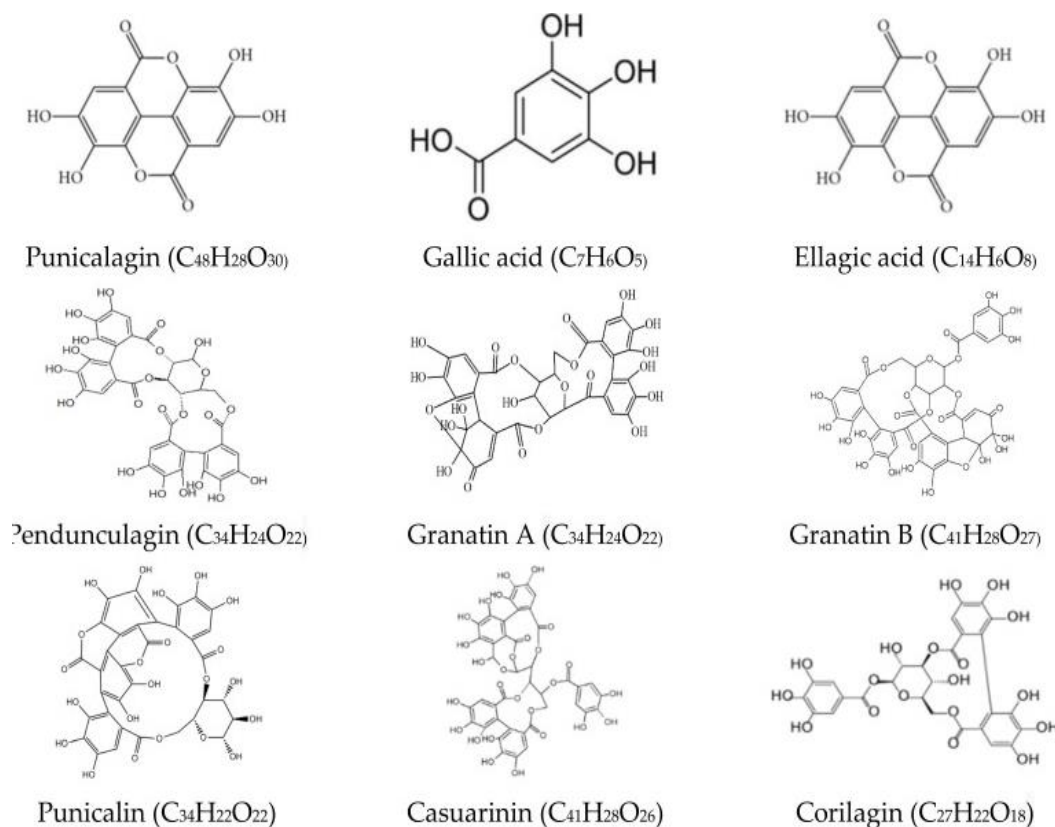
1.2. Thành phần hóa học của vỏ quả lựu

Vỏ quả lựu (*Punica granatum* L., *Punicaceae*), trong Đông y gọi là Thạch lựu bì, có vị chua, chát, tính ấm, độc ít, tác dụng thu liễm, chỉ tả, chỉ huyết,

khu trùng, kháng virus, kháng u, bướu [11].

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của vỏ quả lựu còn hạn chế. Kết quả nghiên cứu của tác giả Đặng Kim Thu và cộng sự cho thấy, phân đoạn dịch chiết ethyl acetat và butanol từ dịch chiết quả lựu có tác dụng bắt gốc tự do DPPH với IC_{50} lần lượt là 21,96 $\mu\text{g/ml}$ và 24,83 $\mu\text{g/ml}$ [34].

Một số hợp chất hoá học mang hoạt tính sinh học có trong vỏ quả lựu có thể kể đến như phenolic, chất xơ... [9, 15]. Hình 1.2 thể hiện cấu trúc hoá học của một số hợp chất phenolic điển hình có trong vỏ quả lựu.



Hình 1. 2. Cấu trúc hoá học của các hợp chất phenolic chính trong vỏ quả lựu [15].

Theo các báo cáo, tổng lượng phenolic nằm trong khoảng từ 18 đến 510 mg/g chất khô trong vỏ quả lựu, khác nhau tùy theo loài, dung môi chiết và phương pháp chiết [9]. Cấu trúc của chúng bao gồm ít nhất một vòng thơm với một hoặc nhiều nhóm thế hydroxyl. Các hợp chất phenolic chính trong vỏ quả lựu có thể kể đến là tannin, flavonoid và axit phenolic [9, 11]. Trong số đó, hàm lượng tannin và flavonoid nằm trong khoảng từ 193 đến 420, 84 và

134 mg/g chất khô trong vỏ quả lựu [11].

Vỏ lựu rất giàu tannin và dẫn xuất của tannin, tất cả đều là phenolic tan trong nước và hầu hết có thể thủy phân được. Một số axit phenolic có trong vỏ quả lựu là axit gallic, ellagic, caffeic, chlorogen, butyric, erucic, ferulic và cinnamic [11]. Thành phần và hàm lượng axit phenolic trong vỏ quả lựu thay đổi tùy thuộc vào môi trường địa lý nơi chúng được trồng. Axit gallic, axit ellagic và axit caffeic được xác định và định lượng từ sáu loại vỏ lựu loài Tunisia có hàm lượng trung bình lần lượt là 123,79, 35,89 và 20,56 mg/100 g [9, 11, 29]. Dựa trên đặc điểm cấu trúc của chúng, các hợp chất này có thể được chia thành bốn nhóm chính là gallotannin, ellagitannin, tannin phức tạp và tannin cô đặc [29]. Là một loại ellagitannin, punicalagin là thành phần chính của tannin trong vỏ quả lựu với hàm lượng cao hơn nhiều so với các hợp chất khác (16,67–245,47 mg/g chất khô) [11]. Punicalagin có thể tạo ra axit ellagic thông qua quá trình thủy phân nội este hóa tự phát của cấu trúc axit hexahydroxybenzoic. Sau đó, axit ellagic có thể kết hợp với các phối tử đường và trùng hợp để tạo thành ellagitannin có cấu trúc phức tạp [9]. Tác dụng chống oxy hóa của chúng được cung cấp bởi các nhóm hydroxyl polyphenol có thể làm giảm hàm lượng các gốc tự do. Ngoài ra, các nhóm hydroxyl catechol trong tannin phức tạp và cô đặc giúp chúng có khả năng tạo phức với sắt và kim loại chuyển tiếp [9, 11]. Tannin cũng có thể phát huy tác dụng kháng khuẩn thông qua các cơ chế sau: ức chế hoạt động của enzyme, kết tủa protein màng và làm cạn kiệt các ion kim loại [29].

Chất xơ là thành phần có hàm lượng nhiều nhất trong vỏ quả lựu, chiếm từ 33% đến 62%, do đó, có thể được sử dụng như một nguồn tự nhiên. Hasnaoui và cộng sự đã so sánh hàm lượng và thành phần chất xơ trong sản phẩm phụ của 12 loài lựu [32]. Vỏ quả lựu sau khi tách có chứa lignin, cellulose, axit uronic và đường trung tính. Trong số đó, lignin có hàm lượng cao nhất.

Xylose, arabinose và galactose chủ yếu được cấu thành từ đường trung tính trong vỏ quả lựu [11]. Hình 1.3 cho thấy cấu trúc của cellulose và galactose. Theo công trình của Colantuono, chất xơ của vỏ quả lựu được sử dụng tốt trong việc tổng hợp các vi hạt alginate, cho thấy hoạt tính chống oxy hóa thậm chí còn cao hơn các sản phẩm thương mại [33]. Tóm lại, vỏ quả lựu

là nguồn cung cấp chất xơ quý giá với các đặc tính lý hóa và chức năng sinh học.

1.3. Tổng quan về quả xoài và các phương pháp bảo quản quả sau thu hoạch

1.3.1. Tổng quan về quả xoài

Xoài (*Mangifera indica* L.), là loại quả nhiệt đới có nguồn gốc Ấn Độ và các vùng giáp ranh như Myanmar, Malaysia, Việt Nam. Theo kết quả điều tra của Viện nghiên cứu cây ăn quả miền Nam (2021), nước ta hiện có khoảng 100 giống xoài, gồm cả giống cũ và mới ngoại nhập, các giống chính gồm có: xoài Cát; xoài Thanh Ca; xoài Xiêm; xoài Tượng; xoài Tứ Quý; xoài Thái.

Xoài là một trong những loại trái cây nhiệt đới chính (chỉ đứng sau chuối) được trồng tại Việt Nam, với sản lượng đứng thứ 13 trên thế giới, tổng diện tích trồng khoảng trên 87.000 ha. Trong năm 2020, tổng sản lượng xoài của Việt Nam đạt 893.000 tấn, tăng 6,5% so với cùng kỳ năm 2019. Xoài được trồng từ Nam chí Bắc, vùng trồng xoài tập trung từ Bình Định trở vào, và được trồng nhiều nhất ở các tỉnh Đồng bằng Sông Cửu Long, chiếm khoảng 48% tổng diện tích xoài cả nước với sản lượng năm 2020 đạt 567.732 tấn tập trung ở Tiền Giang, An Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Cần Thơ, Bến Tre...

Xoài có thành phần chủ yếu là nước (chiếm 82,6%) với nguồn cung cấp năng lượng là 62 Kcal/100g xoài. Trong 100g xoài chứa hàm lượng protein thấp (chiếm 0,6%), hàm lượng đường tổng số cao, đạt 14,8 (g) vì vậy xoài là loại quả có vị ngọt. Xoài là nguồn polyphenol phong phú, các polyphenol được tìm thấy trong xoài gồm mangiferin, axit gallic, gallotannin, quercetin, isoquercetin, axit ellagic và glucogallin. Các vitamin chính trong xoài là vitamin C chiếm 30 mg, vitamin E chiếm 1,12 g. Có tới 25 loại caroten khác nhau đã được xác định trong xoài như vitamin A, lutein, α -carotene và β -carotene...trong đó β -carotene chiếm 445 (μ g/100g).

1.3.2. Một số phương pháp bảo quản quả hiện nay

Hiện nay, có rất nhiều phương pháp bảo quản trái cây được áp dụng vào thực tế và đạt hiệu quả cao. Dựa theo những nguyên lý sinh học người ta chia thành ba nhóm bảo quản chính:

Nhóm thứ nhất bao gồm các phương pháp dựa trên nguyên lý bảo toàn sự sống - Bioza (Boisis). Thời gian bảo quản quả phụ thuộc vào khả năng tự đề kháng bệnh lý và độ bền của từng loại quả khi quá trình sống của chúng được duy trì bình thường. Với phương pháp bảo quản theo nguyên lý này, quả được giữ nguyên trạng thái sống bình thường không cần tác động bất cứ giải pháp xử lý nào, ngoài một vài tác động hạn chế hoạt động sống nhằm giảm mức phân hủy thành phần dinh dưỡng do hô hấp và giảm tổn hao khối lượng tự nhiên do bay hơi nước.

Nhóm thứ hai bao gồm các phương pháp dựa trên nguyên lý tiềm sinh - Anabioza - tức là làm chậm, ức chế hoạt động sống của nguyên liệu và vi sinh vật. Nhờ đó, làm chậm thời gian hư hỏng thối rữa của quả. Trong thực tế, để ức chế hoạt động sống của nguyên liệu cũng như vi sinh vật, cần có sự can thiệp của một số yếu tố vật lý và hóa học. Đó là các biện pháp bảo quản ở nhiệt độ lạnh, lạnh đông, cô đặc, sấy, điều chỉnh thành phần khí quyển, muối chua, dầm giấm,... Đặc điểm chung của phương pháp này là tạo ra môi trường không thuận lợi cho hoạt động sống của nguyên liệu và vi sinh vật, nhờ vậy làm giảm được cường độ của các quá trình sinh học xảy ra trong nguyên liệu cũng như trong vi sinh vật.

Nhóm thứ ba là nhóm các phương pháp dựa trên nguyên lý phi tiềm sinh Abioza. Đó là phương pháp loại bỏ sự sống trong nguyên liệu cũng như vi sinh vật. Đình chỉ sự sống trong nguyên liệu tức là ngăn chặn mọi tác động dẫn đến phân giải thành các thành phần hóa học do các hoạt động của quá trình sinh học xảy ra trong tế bào sống. Khi không còn hoạt động (đã chế biến thành sản phẩm), nguyên liệu mất hoàn toàn tính kháng khuẩn và trở thành môi trường phát triển tốt cho vi sinh vật. Trong trường hợp này, muốn giữ sản phẩm khỏi hư hỏng thì phải tiêu diệt hoàn toàn hoặc ức chế tối đa hoạt động sống của vi sinh vật có trong sản phẩm. Những phương pháp bảo quản thuộc nhóm này gồm: thanh trùng nhiệt, thanh trùng bằng dòng điện cao tần, các phương pháp bảo quản bằng hóa chất hoặc bằng kháng sinh, dùng tia phóng xạ, tia cực tím....

1.4. Vật liệu nanocomposite trên cơ sở chitosan ứng dụng bảo quản quả

Việc bổ sung các hoạt chất có nguồn gốc thiên nhiên vào màng chitosan

chủ yếu làm gia tăng các hoạt tính sinh học có lợi, ứng dụng bảo quản trái cây. Nhóm tác giả Campos và cộng sự đã nghiên cứu chế tạo màng bọc từ chitosan kết hợp với một số hoạt chất như carvacrol có trong tinh dầu cỏ xạ hương, transcinnamaldehyde trong tinh dầu quế và eugenol trong đinh hương [23]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, việc bổ sung các hoạt chất này ở dạng phức hợp với cyclodextrin đã làm tăng lên rõ rệt hoạt tính kháng khuẩn của màng chitosan chống lại bốn chủng vi khuẩn phổ biến *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* và *Listeria monocytogenes*, đồng thời, độ bền kéo của màng chitosan cũng được cải thiện đáng kể khi kết hợp với phức hợp có hàm lượng 0,75% [23]. Bhaskara Reddy và cộng sự đã nghiên cứu chế tạo màng phủ từ chitosan chứa vitamin E có hàm lượng 0,2% có thể ngăn cản và kiểm soát được sự phát triển của nấm mốc trên quả dâu [26].

Tác giả Aikaterini Kyriakidou và cộng sự đã nghiên cứu chế tạo màng từ chitosan kết hợp với dịch chiết từ vỏ lựu – được chiết xuất bằng dung môi DES (là dung dịch của axit và bazo Lewis hoặc Bronsted tạo thành hỗn hợp eutectic) [31]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sự kết hợp của DES choline chloride /glycerol và DES với chiết xuất vỏ quả lựu vào màng bọc đã làm thay đổi đặc tính hấp phụ nước của màng polysaccharide ban đầu. Cụ thể, màng bọc chứa nhiều chất dẻo (thành phần DES) hấp thụ nước nhiều hơn trong môi trường có độ ẩm tương đối cao. Khi bổ sung chiết xuất vỏ quả lựu vào thành phần màng, khả năng hấp phụ nước của màng giảm đi rõ rệt, điều này có thể là do tính chất kỵ nước của các phenolic có trong thành phần của dịch chiết vỏ lựu. Đối với các tính chất cơ học của màng chitosan, những màng được làm bằng 100% chitosan hoặc bao gồm 25% DES ở môi trường có độ ẩm tương đối thấp (25°C) ở trạng thái thủy tinh, thể hiện các giá trị ứng suất kéo cực đại và phần trăm độ giãn dài thấp (% E) tương đối cao. Trong môi trường có độ ẩm tương đối trung bình, các màng này chuyển sang trạng thái đàn hồi, điều này được chứng minh bằng sự đảo ngược mạnh mẽ các giá trị trên về tính chất cơ học.

Tính chất vật lý của màng phủ chitosan với dịch chiết vỏ lựu cũng được quan tâm nghiên cứu [19]. Nishant Kumar và cộng sự đã chế tạo được màng phủ có độ dày 0,142–0,159 mm, độ bền kéo 32,45–35,23 MPa, độ ẩm 11,23–15,28%, độ mờ 0,039–0,061%, hàm lượng nước 1,32–1,60g·mm/m², hàm

lượng phenolic 5,75–32,41 mg/g và thể hiện hoạt tính chống oxy hóa trong khoảng 23,13–76,54% phụ thuộc vào hàm lượng của dịch chiết [16]. Tuy nhiên, màng phủ có hàm lượng dịch chiết cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) lại có độ ổn định nhiệt, độ trong suốt, độ hòa tan, độ trương nở suy giảm. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng chỉ ra, việc bổ sung dịch chiết vỏ quả lựu đã tăng cường đáng kể hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn của màng phủ chitosan [19]. Các đặc tính này hứa hẹn có thể ức chế sự phát triển của mầm bệnh truyền qua thực phẩm trong quá trình chế biến và bảo quản thực phẩm. Cần có những nghiên cứu sâu hơn để ứng dụng màng phủ an toàn bổ sung chiết xuất vỏ quả lựu trên các sản phẩm thực phẩm như trái cây và rau quả nhằm kéo dài thời gian bảo quản và cải thiện chất lượng cũng như độ an toàn của các sản phẩm thực phẩm được bảo quản [20].

Ở nước ta, thời gian gần đây đã có nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu chế tạo màng bảo quản quả sau thu hoạch trên cơ sở chitosan. Nhóm tác giả Nguyễn Quang Tùng, Nguyễn Văn Lợi, Nguyễn Minh Thắng, Nguyễn Xuân Cảnh đã sử dụng chitosan làm màng bảo vệ quả cam và kết quả dung dịch chitosan với nồng độ 1,5% cho kết quả tốt nhất [35]. Ở nồng độ này, có thể kéo dài thời gian bảo quản quả cam đường Canh tới 70 ngày (nhiệt độ 18 – 25°C và độ ẩm 80 - 82%) mà vẫn đảm bảo chất lượng với tỷ lệ thối hỏng là 8,45% và sự hao hụt khối lượng là 8,05%. Tác giả Trần Băng Diệp và cộng sự, sau khi nghiên cứu ảnh hưởng của chitosan tới một số sinh vật gây thối hỏng trên một số loại quả như xoài và thanh long sau thu hoạch cũng có kết luận là chitosan không những kháng khuẩn mà còn có tính kháng nấm cao đối với những chủng nấm gây thối hỏng [36]. Một số nghiên cứu sử dụng màng chitosan bảo quản thực phẩm được thực hiện trước đây như Lê Thanh Long, Nguyễn Thị Thủy Tiên, Hoàng Thị Diệu Hương đã nghiên cứu ảnh hưởng của màng bọc nanochitosan nhằm kéo dài thời hạn sử dụng của trứng gà tươi [37], hay tác giả Lê Thị Minh Thủy đã nghiên cứu phối trộn chitosan - gelatin làm màng bao thực phẩm bảo quản phi lê cá ngừ đại dương [38].

Mặt khác, xu thế nghiên cứu mới gần đây là sử dụng các hợp chất có nguồn gốc từ thực vật để bảo quản các loại thực phẩm. Tác giả Nguyễn Xuân Duy và Nguyễn Anh Tuấn đã sử dụng dịch chiết của hơn 15 loại thực vật có chứa hàm lượng tinh dầu cao có khả năng chống oxy hóa như: ôi, trâu không,

tía tô, rau răm, diếp cá, sả, hoa sữa,... để ngăn chặn sự biến đen ở tôm và oxy hóa chất béo trong cơ thịt cá thu [39]. Chính vì vậy, kết hợp màng chitosan với dịch chiết có nguồn gốc thực vật đang rất được chú trọng và nghiên cứu.

Nhóm tác giả Phạm Thị Hà Vân, Lê Sĩ Ngọc đã chế tạo thành công dung dịch tạo màng chitosan kết hợp nano bạc để bảo quản thanh long ruột đỏ và cho thấy màng phủ có hiệu quả tốt [40]. Quả thanh long được bảo quản có chất lượng tốt và ổn định, thời gian bảo quản được kéo dài hơn so với mẫu đối chứng. Dung dịch chitosan 1% và nano bạc $7,5.10^{-3}M$ phối trộn theo tỉ lệ 3:1 cho kết quả tốt nhất, thời gian bảo quản là 19 ngày ở nhiệt độ thường ($26\pm 10^{\circ}C$) và 30 ngày ở nhiệt độ lạnh ($6\pm 1^{\circ}C$). Tác giả Nguyễn Thị Thương và cộng sự đã nghiên cứu tổng hợp màng kháng khuẩn dựa trên chitosan và chiết xuất trà không ứng dụng trong bao gói và bảo quản thực phẩm [41]. Trong nghiên cứu này, màng kháng khuẩn chitosan/dịch chiết trà không được tổng hợp thành công, dịch chiết trà không như một polyphenol tự nhiên được kết hợp trực tiếp vào mạch chitosan. Ở nồng độ dịch chiết trà không thấp hơn 3% cho thấy có sự phân tán đồng đều của dịch chiết trong màng composite. Khả năng kháng khuẩn mạnh chống lại chủng vi khuẩn *samonella typhimurium* được tìm thấy trong màng chitosan kết hợp với hàm lượng nhỏ chiết xuất trà không. Những kết quả thu được cho thấy rằng, màng chitosan kết hợp với chiết xuất trà không là vật liệu hứa hẹn với hoạt tính kháng khuẩn tốt cho ứng dụng bảo quản thực phẩm.

CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hoá chất- dụng cụ

2.1.1. Nguyên liệu, hóa chất:

STT	Nguyên liệu, hoá chất	Xuất xứ
1	Vỏ lựu khô	Vỏ quả lựu được thu mua tại các chợ dân sinh khu vực Hà Nội, sau đó được sấy khô đến khối lượng không đổi, nghiền nhỏ và lưu giữ trong bình hút ẩm.
2	Xoài (còn cuống, tươi, vỏ xanh, kích thước tương đối đều nhau)	Xoài được cắt từ vườn trên khu vực Thành phố Hà Nội
3	Chitosan 99%	Việt Nam
4	Cồn (96%)	Trung Quốc
5	Etyl axetat ($\geq 95\%$)	Trung Quốc
6	Axit sunfuric ($\geq 95\%$)	Trung Quốc
7	Natri sunfat ($\geq 95\%$)	Trung Quốc
8	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Nhật Bản
9	Axit gallic	Merk – Mỹ
10	Thuốc thử Folin	Merk – Mỹ

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ:

- Máy cô quay chân không: IKA-Đức
- Bể rung siêu âm
- Máy khuấy đũa, máy khuấy từ có gia nhiệt
- Các dụng cụ sử dụng: pipet, phễu thủy tinh, phễu chiết, cốc thủy tinh, ống đong, ống nghiệm, bình định mức...).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết xuất và làm giàu dịch chiết từ vỏ quả lựu

Quy trình chiết xuất vỏ quả lựu được thực hiện theo quy trình chiết xuất các hợp chất thiên nhiên nói chung, bao gồm các bước chiết xuất cạn tổng và chiết phân đoạn trong dung môi etylacetate để làm giàu cạn chiết.

Trong nghiên cứu này, vỏ quả lựu khô được chiết xuất với ethanol có nồng độ khác nhau, việc đánh giá và lựa chọn phương pháp phù hợp dựa trên hiệu suất chiết xuất và hàm lượng polyphenol tổng của cao chiết thu được.

Phương pháp 1: Ngâm vỏ lựu khô đã nghiền nhỏ trong dung môi ethanol 40%, ở 50°C, trong 2 giờ. Sau đó, bã vỏ quả lựu tiếp tục được axit hoá bằng axit sunfuric với nồng độ 20%, cuối cùng được lọc rửa ba lần thu lấy dịch chiết.

Phương pháp 2: Ngâm vỏ lựu đã nghiền nhỏ trong dung môi ethanol 96%, trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó lọc rửa ba lần để thu lấy dịch chiết.

Dịch chiết thu được ở cả hai phương pháp trên được cô quay ở điều kiện áp suất 60 mbar, nhiệt độ 40°C để loại bỏ dung môi, thu được cạn chiết ethanol. Các cạn chiết này được sấy trong tủ sấy chân không ở 50°C đến khối lượng không đổi, kí hiệu lần lượt là DC1 và DC2 tương ứng với hai phương pháp chiết xuất 1 và 2.

Hiệu suất chiết xuất được tính toán theo công thức dưới đây:

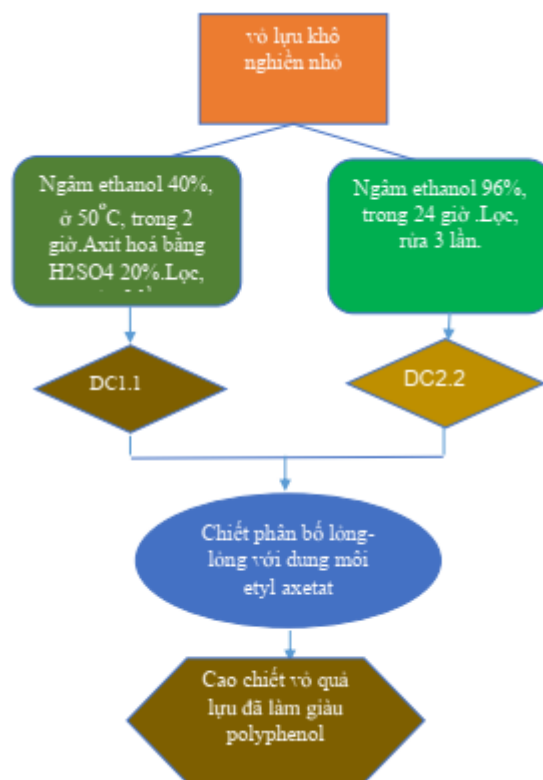
$$H = \frac{m_{\text{cao chiết}}}{m_{\text{vỏ lựu khô}}} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó, $m_{\text{cao chiết}}$ (g) là khối lượng của cao chiết thu được; $m_{\text{vỏ lựu khô}}$ (g) là khối lượng của mẫu vỏ quả lựu khô thực hiện thí nghiệm; H (%) là hiệu suất của quá trình chiết xuất.



Hình 2. 1. Máy cô quay chân không dùng để cô quay dịch chiết từ vỏ quả lựu

Quá trình làm giàu dịch chiết được thực hiện sau khi đã lựa chọn được phương pháp chiết xuất phù hợp. Dịch chiết được phân tán với 1L nước cất và thực hiện quá trình chiết phân bố lỏng – lỏng với dung môi ethylacetate. Quá trình được lặp lại 3 lần. Cuối cùng, loại bỏ dung môi hữu cơ với máy cất quay chân không dưới áp suất 100 mbar, 40°C để thu được cao chiết. Quy trình chiết và làm giàu dịch chiết vỏ quả lựu được thể hiện qua Hình 2.2.



Hình 2. 2. Quy trình chiết xuất và làm giàu dịch chiết từ vỏ quả lựu

2.2.2. Chế tạo màng phủ từ chitosan và dịch chiết vỏ quả

Chế phẩm tạo màng phủ có thành phần từ chitosan và dịch chiết vỏ quả lựu (CS/DC) được chế tạo như sau: 20 g chitosan được hoà tan trong 1L dung dịch axit acetic 1%. Mẫu phản ứng được đồng hoá ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút và khuấy liên tục trong 120 phút ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) bằng máy khuấy đũa tạo thành dung dịch chitosan 2%. Sau đó, 5 mL dịch chiết được bổ sung vào 95ml dung dịch chitosan 2% và tiếp tục khuấy trong 60 phút ở nhiệt độ $45^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Hàm lượng dịch chiết được khảo sát với các giá trị 0,004 g/mL; 0,008 g/mL và 0,012 g/mL.

Để nghiên cứu đặc trưng, tính chất của các lớp màng được tạo thành, 10 mL chế phẩm được đổ ra đĩa peptri và sấy ở $50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ trong 12 giờ để tạo màng.

2.2.3. Phương pháp chế tạo lớp phủ có thành phần chitosan/dịch chiết (CS/DC)

Lớp phủ được tạo thành bằng phương pháp nhúng quả trực tiếp trong chế phẩm CS/DC.

Quy trình tạo màng phủ được thực hiện như sau: Xoài được thu hái tại vườn, chọn những quả to đều nhau, tương đương về trọng lượng và màu sắc và độ chín. Quả xoài được cắt cuống, rửa sạch bằng nước cất 2 lần (rửa 2 lần), để ráo nước và khô tự nhiên. Sau đó, xoài được nhúng trong dung dịch lỏng chitosan/dịch chiết vỏ lựu trong vòng một phút, để khô ráo sau đó xếp quả vào chỗ khô ráo thoáng mát.

Xoài được bảo quản ở nhiệt độ phòng (khoảng $23\text{-}25^\circ\text{C}$) và theo dõi một số chỉ tiêu sinh hóa của quả theo thời gian.

2.3. Phương pháp nghiên cứu đặc trưng tính chất của vật liệu

2.3.1. Xác định độ trong và độ mờ đục

Độ trong suốt và độ mờ đục của màng CS/DC ở các nồng độ dịch chiết khác nhau (0,004mg/mL; 0,008mg/mL; 0,012mg/mL) được xác định theo phương pháp được mô tả trong tài liệu [16].

Phương pháp cụ thể như sau: Mỗi mẫu màng thí nghiệm được cắt theo hình chữ nhật, kích thước 2cmx3cm và đặt trong buồng thử nghiệm quang phổ UV (S80, Biochorm, Mỹ) ở bước sóng 600nm tại Viện Kỹ thuật nhiệt

đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu trắng ở phép đo này là không khí. Ghi lại giá trị Abs_{600} .

Kết quả của cả phép đo độ trong suốt và độ mờ được biểu thị bằng phần trăm và được tính theo các công thức sau:

$$\text{Độ trong suốt (\%)} = \frac{Abs_{600}}{L} \quad (1)$$

$$\text{Độ mờ} = Abs_{600} \times L \quad (2)$$

Trong đó:

Abs_{600} là giá trị độ hấp thụ quang ở bước sóng 600 nm

L là độ dày của màng được tính bằng mm.

2.3.2. Phương pháp phổ hồng ngoại

Phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR) dùng để xác định các dao động đặc trưng của các liên kết hóa học giữa các nguyên tử. Trong khuôn khổ đề tài này, các mẫu màng hoặc dịch chiết và được phân tích phổ hồng ngoại ở chế độ ATR trên máy Nicolet iS10 (hãng Thermo Scientific, Mỹ) tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3.3. Phương pháp nhiệt lượng quét vi sai DSC

Phương pháp phân tích nhiệt lượng quét vi sai (DSC) là kỹ thuật dùng để xác định nhiệt lượng (toả ra hay thu vào) trong quá trình làm nóng hoặc làm lạnh của một chất hoặc một hợp chất và xác định biến thiên enthalpy, nhiệt dung riêng và điểm chuyển hoá thủy tinh, nhiệt độ nóng chảy, nhiệt độ kết tinh. Sử dụng phương pháp DSC trong nghiên cứu này nhằm mục đích đo biến đổi nhiệt lượng, điểm chuyển hoá thủy tinh, chứng minh sự thay đổi tính chất nhiệt của vật liệu.

Dịch chiết vỏ lựu, màng CS/DC được phân tích DSC bằng thiết bị nhiệt lượng vi sai quét (DSC, DSC204F1 (NETZSCH-Germany) tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Cân chính xác khoảng 2-4 mg mẫu trong chén nhôm (Al) và quét trong phạm vi nhiệt độ từ 25°C (nhiệt độ phòng) đến 350°C với tốc độ gia nhiệt không đổi 10K/min trong môi trường khí trơ (N_2).

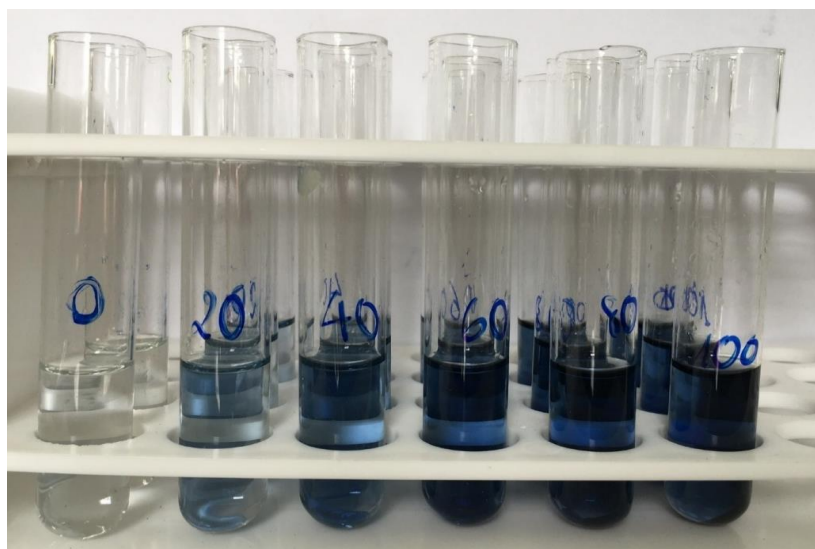
2.3.4. Phân tích hình thái cấu trúc bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM)

Kính hiển vi điện tử quét (SEM) được sử dụng để nghiên cứu hình thái cấu trúc bề mặt và cấu trúc mặt cắt ngang của vật liệu. Ảnh SEM của vật liệu trong luận văn được ghi trên thiết bị JSM-6510LV (hãng Jeol, Nhật Bản) tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Phương pháp này được sử dụng để xác định hình thái cấu trúc của màng chitosan và màng CS/DC.

Mặt cắt ngang của lớp vỏ quả xoài trước và sau khi phủ màng được xác định cấu trúc bằng phương pháp như sau: Vỏ quả xoài được tách ra khỏi quả, để khô tự nhiên, sau đó được ngâm trong nito lỏng trong vòng 15 phút và được bẻ bằng kim chuyên dụng. Vỏ quả xoài đã được nhúng màng phủ bảo vệ được xử lý đặc biệt hơn, vì quy trình ngâm nito lỏng có thể làm lớp phủ tách ra khỏi bề mặt vỏ. Dùng dao nhọn và rất sắc, mỏng để cắt ngang vỏ lựu, cẩn thận lấy miếng vỏ dày khoảng 0,5mm để khô tự nhiên. Sau đó các mẫu vỏ quả xoài được xác định mặt cắt ngang bằng thiết bị kính hiển vi điện tử quét SEM để đánh giá đặc trưng cấu trúc và độ dày của lớp phủ.

2.3.5. Xác định hàm lượng polyphenol tổng (TPC)

Hàm lượng polyphenol tổng trong mẫu thử được xác định bằng phương pháp sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu với chất chuẩn axit gallic. Các polyphenol trong dịch chiết vỏ lựu tạo phức màu xanh với thuốc thử Folin-Ciocalteu và hấp thụ bước sóng $\lambda = 765 \text{ nm}$ (Hình 2.3).



Hình 2. 3. Phức màu xanh của dịch chiết vỏ lựu và axit gallic

Từ đường chuẩn của axit gallic và giá trị mật độ quang của mẫu thử ở cùng điều kiện, xác định được nồng độ polyphenol trong dung dịch mẫu thử và tính được hàm lượng polyphenol tương đương axit gallic (GAE) trong mẫu thử.

Hàm lượng polyphenol tổng trong mẫu được tính theo công thức:

$$TP \text{ (mg GAE/g)} = \frac{C_{đc} \times V \times K \times H}{m} \quad (3)$$

$$TP \text{ (\%)} = \frac{TP \text{ (mg GAE/g)}}{10} \quad (4)$$

Trong đó:

TP: hàm lượng polyphenol tương đương gallic acid (mg GAE/g mẫu);

$C_{đc}$: nồng độ tương đương gallic acid được suy ra từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$);

K: hệ số pha loãng;

H: độ sạch chuẩn gallic acid (97%)

V: thể tích mẫu định mức (10 mL);

m: khối lượng mẫu thử nghiệm (mg).

2.3.6. Xác định hoạt tính chống oxi hóa

Thí nghiệm khảo sát khả năng chống oxi hóa của dịch chiết được tiến hành như sau: Lấy 2 ml dung dịch hoạt chất có nồng độ trong khoảng từ 2.10^{-6} đến $1,5.10^{-5}$ M được nhỏ giọt vào bình phản ứng chứa 5 ml dung dịch DPPH có nồng độ $1,8.10^{-4}$ M (được lưu trữ trong bóng tối, dung dịch DPPH sau khi pha xong tiến hành thí nghiệm luôn để tránh bị oxi hoá). Dung dịch thu được được lắc đều và để 30 phút trong bóng tối. Sau 30 phút, tiến hành đo/ghi phổ UV-Vis ở bước sóng 517 nm. Trong khuôn khổ đề tài này, vitamin C cũng được phân tích đồng thời để đối chứng. Thiết bị UV-Vis (model S80, hãng Biochorm, Anh) được sử dụng tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Khả năng chống oxi hóa (P) của mẫu được xác định theo công thức dưới đây:

$$P = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$

Trong đó:

P: Phần trăm bất gốc tự do, %

A_0 : Mật độ quang của dung dịch DPPH chuẩn;

A: Mật độ quang của mẫu;

Từ các giá trị P đã khảo sát, ta tiến hành xây dựng phương trình tương quan tuyến tính thể hiện sự phụ thuộc giữa nồng độ dung dịch các mẫu thử với phần trăm bất gốc tự do, từ đó xác định được giá trị IC_{50} (là nồng độ mà tại đó mẫu có thể bắt hay phản ứng được với 50 % gốc tự do của DPPH). Giá trị IC_{50} là cơ sở để so sánh hoạt tính các mẫu với nhau. Giá trị IC_{50} thu được càng thấp chứng tỏ dịch chiết có khả năng chống oxi hoá càng cao.

2.4. Một số phương pháp xác định sự biến đổi các chỉ tiêu sinh hóa của quả

2.4.1. Xác định sự hao hụt khối lượng của quả

Xoài được xác định khối lượng hàng ngày bằng cân phân tích 4 số lẻ, model AS220.R2 Plus, hãng Radwag, xuất xứ Ba Lan. Sự chênh lệch về khối lượng giữa mỗi khoảng thời gian bảo quản được coi là độ hao hụt khối lượng. Các lần xác định khối lượng được lặp đi lặp lại ít nhất 3 lần.

2.4.2. Xác định độ cứng của quả

Độ cứng của quả được xác định bằng máy đo độ cứng MARK-10 (Mỹ) tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Độ cứng được xác định dựa trên nguyên lý đo độ lớn của lực cần tác dụng để đầu đo lún đến độ sâu nhất định (2,5 mm) của nguyên liệu. Các mẫu quả xoài được đo ở 3 điểm (đầu, giữa và đuôi quả). Đọc giá trị đo trên máy theo đơn vị N.

2.4.3. Xác định chỉ số màu sắc của vỏ quả

Sự thay đổi màu sắc của vỏ quả xoài thí nghiệm khi được phủ/hoặc không phủ được đo bằng máy đo màu cầm tay ở nhiệt độ phòng ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) [16].

Các giá trị tỷ lệ được ghi lại theo các giá trị màu tỷ lệ CIE L^* , a^* và b^* . Trong đó:

($L^* = 0$ (đen) đến 100 (trắng))

$a^* = -60$ (xanh lục) đến $+60$ (đỏ)

$b^* = -60$ (màu xanh) đến $+60$ (màu vàng)).

Máy đo sắc độ được hiệu chuẩn bằng tám chuẩn hiệu chuẩn.

2.4.4. Sự thay đổi độ ngọt của quả

Độ ngọt của quả xoài được xác định thông qua độ ngọt Brix bằng khúc xạ kế điện tử PAL-1 ATAGO với thang đo Brix 0,0 - 53%. Các mẫu quả xoài sẽ được đo độ ngọt theo các mốc thời gian (0 ngày, 3 ngày, 6 ngày, 9 ngày, 12 ngày). Mẫu quả xoài không được nhúng dung dịch bảo quản cũng được phân tích đồng thời để đối chứng.

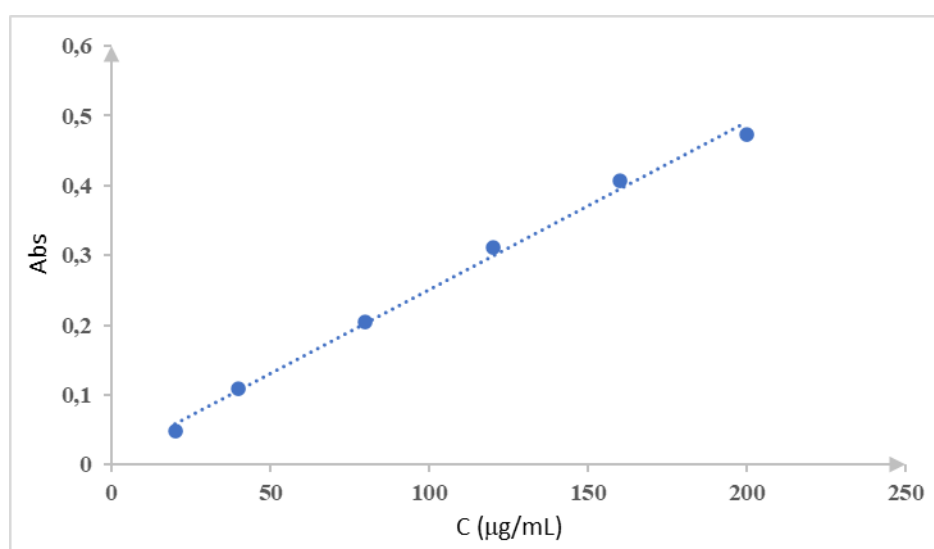
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định điều kiện chiết xuất

Hiệu suất chiết xuất

Từ các kết quả thực nghiệm, hiệu suất của quá trình chiết xuất đã được tính toán. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.1.

Bên cạnh đó, để xác định điều kiện chiết xuất phù hợp, quy trình xác định hàm lượng polyphenol tổng đã được tiến hành. Phương trình đường chuẩn của axit gallic xác định được như sau: $y = 0,0024x + 0,0112$ với hệ số hồi quy $R^2 = 0,995$ (Hình 3.1).



Hình 3. 1. Đường chuẩn của axit gallic

Từ phương trình đường chuẩn của axit gallic, hàm lượng polyphenol tổng của cao chiết vỏ lựu khi được chiết xuất ở các điều kiện khác nhau (DC1.1 và DC1.2) đã được xác định và thể hiện trong Bảng 3.1.

Bảng 3. 1. Giá trị hiệu suất chiết xuất và hàm lượng polyphenol tổng tương ứng có trong dịch chiết.

Tên mẫu chiết	Khối lượng vỏ lựu ban đầu, g	Khối lượng dịch chiết, g	Hiệu suất (%)	Tổng polyphenol (%)
DC1.1	2000	7,6	0,38	106,7±0,19% mg GAE/g*
DC1.2	2000	150	7,5	79,54 ±0,22% mg GAE/g*

*: mg tương đương axit gallic/gam mẫu

Kết quả từ Bảng 3.1 có thể thấy, dịch chiết DC1.1 chứa hàm lượng polyphenol tổng cao hơn so với DC1.2. Tuy nhiên, vì giá trị hiệu suất chiết xuất DC1.1 quá nhỏ (0,38%) so với DC1.2 (7,6%), do đó, điều kiện chiết xuất DC1.2 được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo, do tiết kiệm được chi phí nguyên vật liệu và giảm thiểu được việc sử dụng và thải bỏ dung môi ra môi trường.

Mặt khác, hàm lượng của polyphenol có trong dịch chiết quyết định rất lớn đến khả năng chống oxy hóa của dịch chiết. Do đó, hàm lượng polyphenol tổng (TPC) là chỉ tiêu quan trọng cần làm giàu trong dịch chiết vỏ lựu. Kết quả tính toán được thể hiện trong Bảng 3.2 cho thấy, hàm lượng polyphenol tổng sau khi được làm giàu từ DC1.2 tăng lên một cách đáng kể (từ $79,54 \pm 0,22\%$ mg GAE/g lên $122,2 \pm 0,23$ mg GAE/g). Cùng với kết quả thu được ở nghiên cứu này, có thể thấy, hàm lượng TPC thu được trong vỏ quả lựu được sản xuất và tiêu thụ ở nước ta (189,97 mg GAE/g [43]; 142,78 mg GAE/g, 97,85 mg GAE/g [44] cao hơn đáng kể hàm lượng TPC trong vỏ quả lựu ở một số nước trên thế giới ($48,92 \div 61,38$ mg GAE/g) [46-49].

Bảng 3. 2. Hàm lượng polyphenol tổng của cao chiết DC1.2 và cao chiết DC.

STT	Tên mẫu	Khối lượng mẫu (g)	Tổng polyphenol (%)
1	DC1.2	60,32	$79,54 \pm 0,22\%$ mg GAE/g
2	DC	18,02	$122,2 \pm 0,23\%$ mg GAE/g

Như vậy điều kiện chiết được lựa chọn như sau: ethanol 96%, 24 giờ, chiết 3 lần. Điều kiện chiết xuất này đem lại hiệu suất chiết cao, tổng polyphenol tương đối, phù hợp với các số liệu đã được công bố. Cao chiết sau khi làm giàu sẽ được dùng để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết

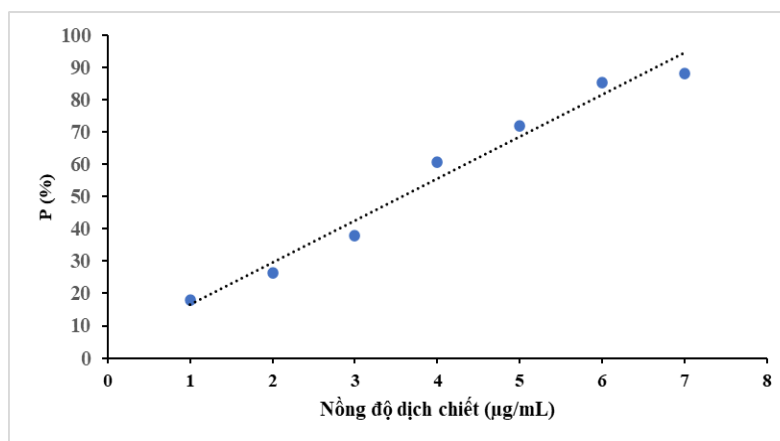
Quá trình chống oxy hóa của các hợp chất chứa polyphenol có thể diễn ra theo ba cơ chế (i) HAT (chuyển nguyên tử hydro); (ii) SET-PT (chuyển electron chưa ghép đôi theo sự chuyển giao proton) hoặc (iii) SPLET (cơ chế chuyển proton mất electron) [49].

Dịch chiết sau khi được làm giàu (mẫu DC) đã được xác định khả năng bắt gốc tự do với DPPH. Kết quả xác định hoạt tính chống oxi hóa của dịch chiết được thể hiện trên Bảng 3.3.

Bảng 3. 3. Kết quả xác định phần trăm bắt gốc tự do (giá trị P, %) phụ thuộc vào nồng độ của dung dịch chứa dịch chiết DC.

Mẫu	Nồng độ của dịch chiết DC ($\mu\text{g/mL}$)	P (%)
1	1	17,84
2	2	26,39
3	4	37,82
4	6	60,58
5	8	72,00
6	10	85,36
7	11	88,25

Từ các giá trị thu được ở Bảng 3.3, dùng phần mềm Excel ta xây dựng được đồ thị thể hiện mối tương quan giữa phần trăm bắt gốc tự do của dịch chiết (P, %) với nồng độ của dung dịch chứa dịch chiết (Hình 3.2). Kết quả tính toán đã xác định được phương trình phụ thuộc tuyến tính của phần trăm bắt gốc tự do (P, %) vào nồng độ của dung dịch DC ($\mu\text{g/mL}$) như sau: $y = 12,977 \cdot x + 3,5562$, với hệ số hồi quy R^2 bằng 0,97.



Hình 3. 2. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa phần trăm bắt gốc tự do P (%) với nồng độ của dịch chiết DC.



Hình 3. 3. Hình ảnh các mẫu thí nghiệm sau khi thêm dung dịch chứa dịch chiết vào các bình phản ứng chứa DPPH. Màu sắc của DPPH nhạt dần (tím → vàng) khi nồng độ của dịch chiết DC tăng dần (từ trái qua phải tương ứng với các mẫu thí nghiệm từ 0 đến 7, trong đó mẫu 0 là mẫu chỉ chứa dung dịch DPPH).

Từ phương trình tương quan ở trên ta xác định được giá trị IC_{50} là 3,2 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả này cho thấy khả năng chống oxi hoá của dịch chiết thu được trong nghiên cứu này có giá trị tương đương với kết quả nghiên cứu trước đó [34]. Giá trị IC_{50} của mẫu đối chứng dương (vitamin C) cũng được xác định đồng thời để đối chứng. Kết quả tính toán cho thấy, giá trị IC_{50} của mẫu đối chứng dương là 3,12 $\mu\text{g/mL}$ thấp hơn giá trị IC_{50} của dịch chiết không nhiều, chứng tỏ hoạt tính chống oxi hóa hiệu quả của mẫu dịch chiết từ vỏ lựu trong nghiên cứu này.

3.2. Kết quả nghiên cứu chế tạo màng phủ bảo quản CS/DC

3.2.1. Khảo sát điều kiện chế tạo màng

Một số nghiên cứu cho thấy, dung dịch chitosan thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxi hóa không cao, do đó, cần bổ sung một số hoạt chất mang hoạt tính sinh học để nâng cao hiệu quả bảo quản [20-22].

Bảng 3. 3. Công thức của các lớp phủ CS/DC.

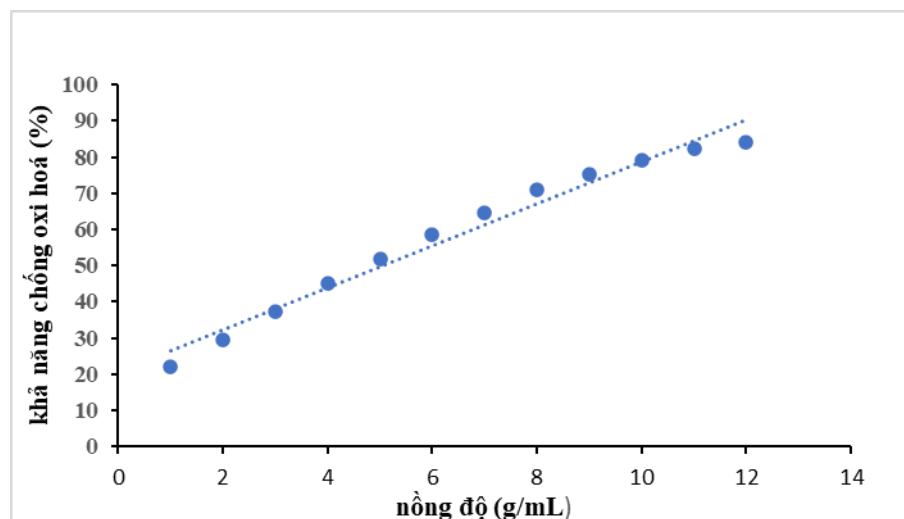
Công thức tạo màng	Nồng độ dung dịch chứa dịch chiết (DC), g/mL
CT0	0
CT1	0,004
CT2	0,008
CT3	0,012

Với mục đích nâng cao hoạt tính cho lớp màng phủ chitosan và hiệu quả bảo quản, trong khuôn khổ đề tài này, dịch chiết DC đã được bổ sung vào thành phần của lớp phủ chitosan. Trong các thí nghiệm khảo sát công thức tạo màng phủ, 5 mL dịch chiết vỏ quả lựu (DC) đã được bổ sung vào 95 mL dung dịch chitosan 2% theo các công thức được liệt kê trong Bảng 3.4.

Để lựa chọn được hàm lượng dịch chiết phù hợp, nghiên cứu này đã đánh giá hoạt tính chống oxy hoá của các công thức tạo màng phủ CS/DC, độ trong suốt, độ hoà tan và màu sắc của màng.

Khả năng chống oxy hoá

Các hợp chất polyphenol tự nhiên có trong vỏ quả lựu đóng vai trò là chất ức chế, kiểm soát và làm giảm sự phát triển của vi sinh vật. Các hợp chất chống oxy hóa tự nhiên rất hữu ích trong các ngành công nghiệp chế biến thực phẩm để làm chậm và kiểm soát sự hư hỏng của sản phẩm thực phẩm [7]. Khả năng chống oxy hoá của các công thức tạo màng CS/DC được tiến hành khảo sát thông qua thí nghiệm bắt gốc tự do của DPPH. Hình 3.5 thể hiện giá trị phần trăm bắt gốc tự do của DPPH tương ứng với các giá trị nồng độ của công thức chế tạo màng CT1. Kết quả cho thấy, khả năng chống oxy hóa của các công thức chế tạo màng phụ thuộc tuyến tính vào nồng độ của mẫu thử theo phương trình $y = 5,8158x + 20,615$ với hệ số hồi quy $R^2 = 0,9752$.



Hình 3. 4. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của phần trăm bắt gốc tự do vào nồng độ dung dịch chứa dịch chiết (với công thức CT1).



Hình 3. 5. Hình ảnh các mẫu thí nghiệm sau khi thêm DPPH ở các nồng độ cao chiết khác nhau. Màu sắc của DPPH nhạt dần (tím → vàng) khi nồng độ của cao chiết tăng (từ trái qua phải tương ứng với các mẫu từ 0 đến 12, trong đó mẫu 0 là mẫu chỉ chứa dung dịch DPPH).

Tương tự như vậy, các thí nghiệm xác định khả năng chống oxi hóa của các công thức tạo màng phủ CT2, CT3 cũng được tiến hành. Kết quả tính toán được thể hiện trong Bảng 3.5.

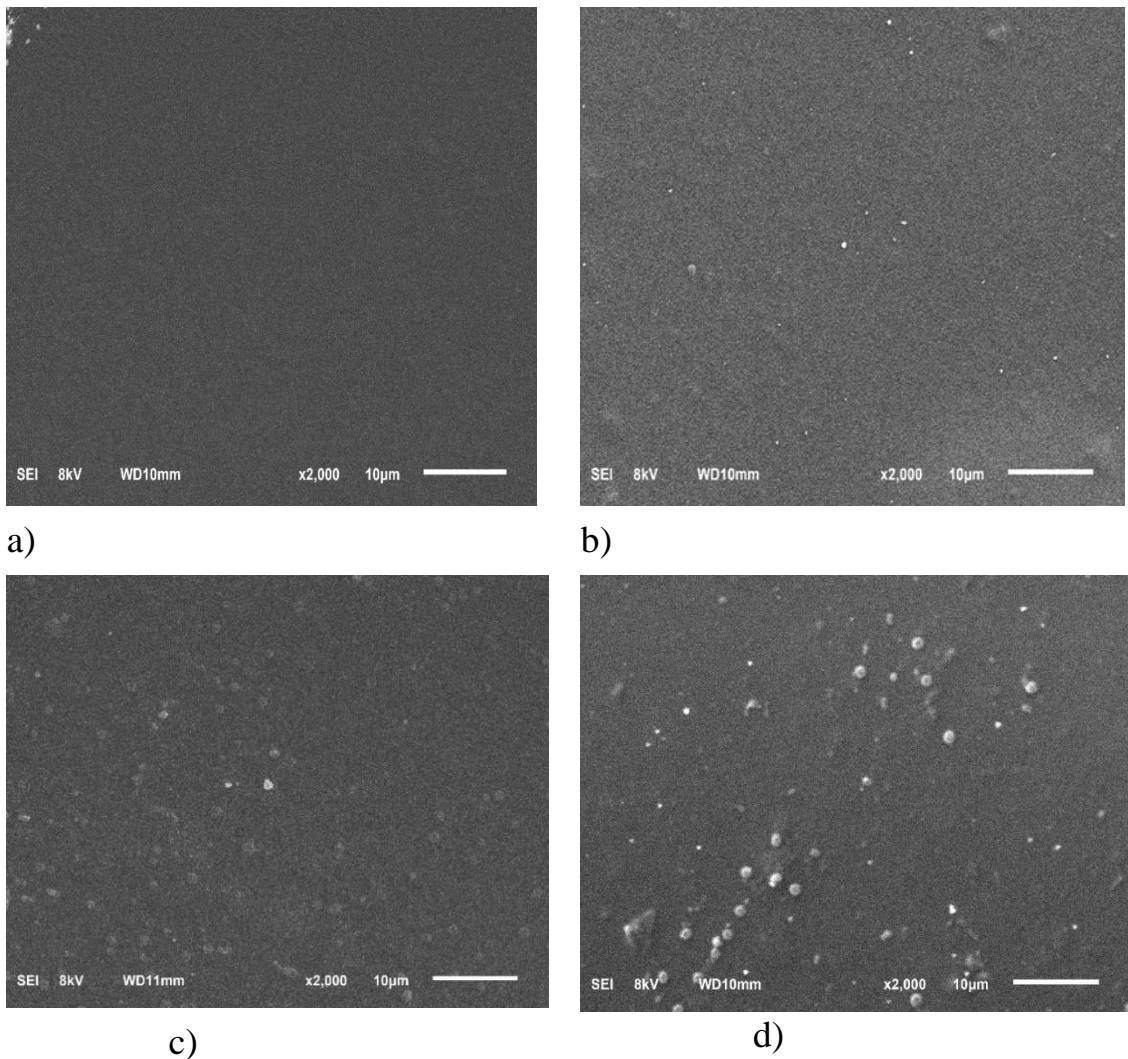
Bảng 3. 4. Khả năng chống oxi hoá của các công thức tạo màng phủ CS/DC.

STT	Công thức mẫu	Giá trị IC_{50} , g/mL
1	CT1	5,05
2	CT2	3,65
3	CT3	3,58

Từ Bảng 3.5 có thể thấy, các màng phủ thành phần CS/DC đều thể hiện khả năng chống oxi hoá tốt với các giá trị IC_{50} giảm dần theo chiều tăng hàm lượng dịch chiết trong công thức tạo màng.

Kết quả phân tích hình thái cấu trúc bề mặt của màng phủ

Kết quả phân tích hình thái cấu trúc bề mặt của màng phủ CS và CS/DC được thể hiện trên Hình 3.7. Từ ảnh SEM của các mẫu có thể thấy, trên bề mặt các mẫu màng có sự kết tụ các hoạt chất có trong dịch chiết. Sự kết tụ rõ rệt nhất được quan sát thấy ở mẫu CT2 và CT3 có hàm lượng dịch chiết lớn hơn các mẫu còn lại.



Hình 3. 6. Ảnh SEM của mẫu a) chitosan (CT0); b) CT1; c) CT2; d) CT3.

Độ trong/độ mờ của màng

Độ trong suốt hoặc độ mờ đục là một trong các tính chất vật lý quan trọng của màng phủ bảo quản, mô tả đặc tính nhìn xuyên qua hoặc ngăn chặn sự truyền ánh sáng. Giá trị truyền qua của màng cao thể hiện độ trong suốt tốt, thực tế là ánh sáng nhìn thấy (660 nm) có thể đi qua màng nhiều hơn [16]. Kết quả về độ trong suốt và độ mờ đục của màng được thể hiện trong Bảng 3.6.

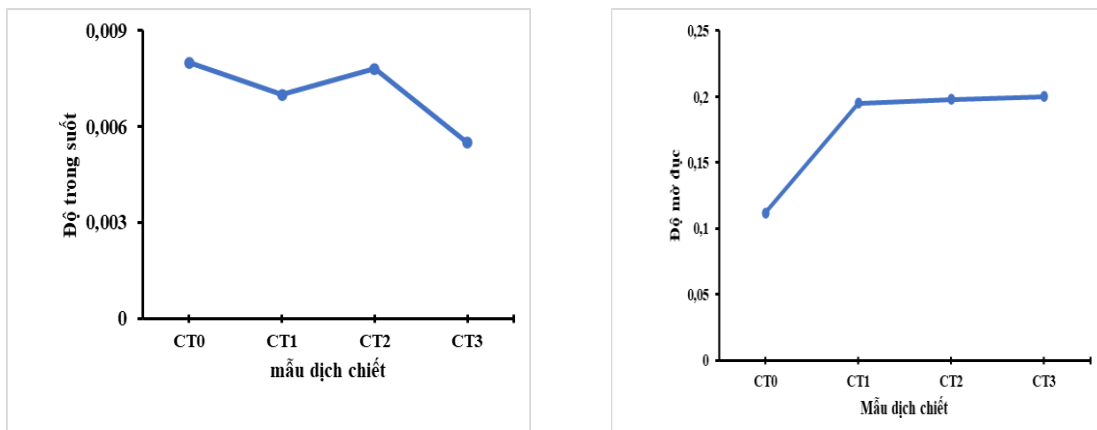
Bảng 3. 5. Giá trị độ trong/độ mờ của màng CS/DC.

STT	Công thức tạo màng	Abs₆₀₀	Chiều dày màng, µm	Độ trong suốt	Độ mờ
1	CT0	0,040	5,00	0,0080	0,112
2	CT1	0,039	5,13	0,0070	0,195

3	CT2	0,038	5,31	0,0078	0,198
4	CT3	0,036	5,63	0,0055	0,200

Kết quả nghiên cứu cho thấy, độ trong suốt của các công thức tạo màng CS/DC, khi được bổ sung dịch chiết, đều nhỏ hơn giá trị tương ứng của công thức chỉ chứa chitosan (CT0). Điều này cho thấy, việc bổ sung dịch chiết vào thành phần chế tạo màng đã làm giảm độ trong suốt của các màng phủ, từ đó cản trở sự xuyên qua của ánh sáng. Điều này có thể là do sự hiện diện của các phân tử polyphenol hoặc tannin thủy phân có trong thành phần dịch chiết, làm thay đổi cấu trúc và diện tích lỗ xốp bên trong màng [30]. Tuy nhiên, ở mẫu màng CT2, mặc dù có hàm lượng dịch chiết nhỏ hơn mẫu được phủ bởi CT3, nhưng giá trị độ trong suốt lại cao hơn, có thể là do sự phân tán một cách đồng đều các hợp chất hóa học có trong dịch chiết vào màng chitosan. Trong ba công thức tạo màng, các công thức CT1, CT2 có độ trong suốt tốt hơn.

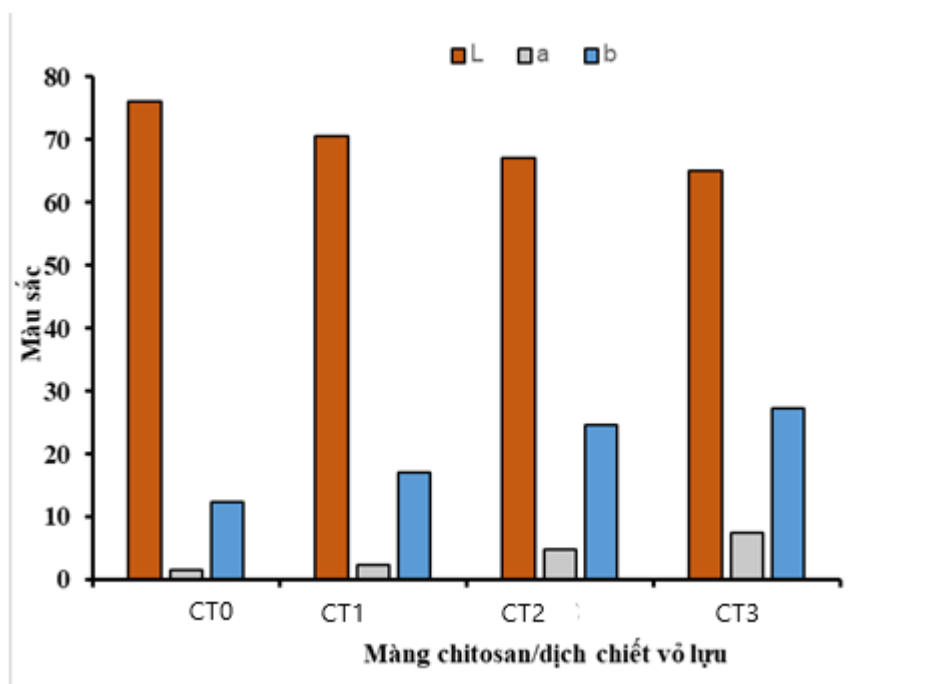
Ngược lại, độ mờ đục của các mẫu màng CS/DC đều cao hơn giá trị tương ứng của mẫu CT0. Nồng độ dịch chiết tăng lên thì độ mờ đục của màng tăng lên. Như vậy, việc đưa dịch chiết đã làm giảm độ trong suốt và tăng độ mờ đục của màng chitosan.



Hình 3. 7. Độ trong suốt và độ mờ đục của các mẫu màng CS/DC.

Màu sắc của màng CS/DC

Màu sắc là đặc tính vật lý quan trọng ảnh hưởng đến hình thức bên ngoài của sản phẩm. Nghiên cứu này đã chứng minh, độ đậm, đỏ, vàng của mẫu màng tăng lên theo chiều tăng nồng độ dịch chiết vỏ lựu, do sự hiện diện của chất chống oxi hoá và sắc tố anthocyanin [16].



Hình 3. 8. Các chỉ số (L, a, b) thể hiện giá trị màu sắc của các mẫu màng CS/DC.

Mô hình CIE L^*a^*b được xây dựng dựa trên khả năng cảm nhận màu sắc của mắt người. Các giá trị L, a, b mô tả tất cả các màu mà mắt của một người bình thường có thể nhìn thấy được. Hệ màu Lab là mô hình dạng hình cầu được biểu diễn bằng tổ hợp 3 kênh xử lý (3 trục):

- Trục L: là trục thẳng đứng biểu diễn độ sáng của màu. Có giá trị từ đen (0) đến trắng (100);
- Trục a: Chứa các giá trị màu từ màu xanh lá cây (âm) đến màu đỏ (dương);
- Trục b: Chứa các giá trị màu từ màu xanh dương (âm) đến màu vàng (dương).

Từ Hình 3.9 có thể thấy, mẫu CT3 có giá trị L thấp nhất, chứng tỏ là mẫu có màu đậm nhất. Độ trong của màng giảm theo chiều tăng nồng độ dịch chiết. Ngược lại, các giá trị a và b tăng dần theo chiều tăng nồng độ dịch chiết có trong mẫu.

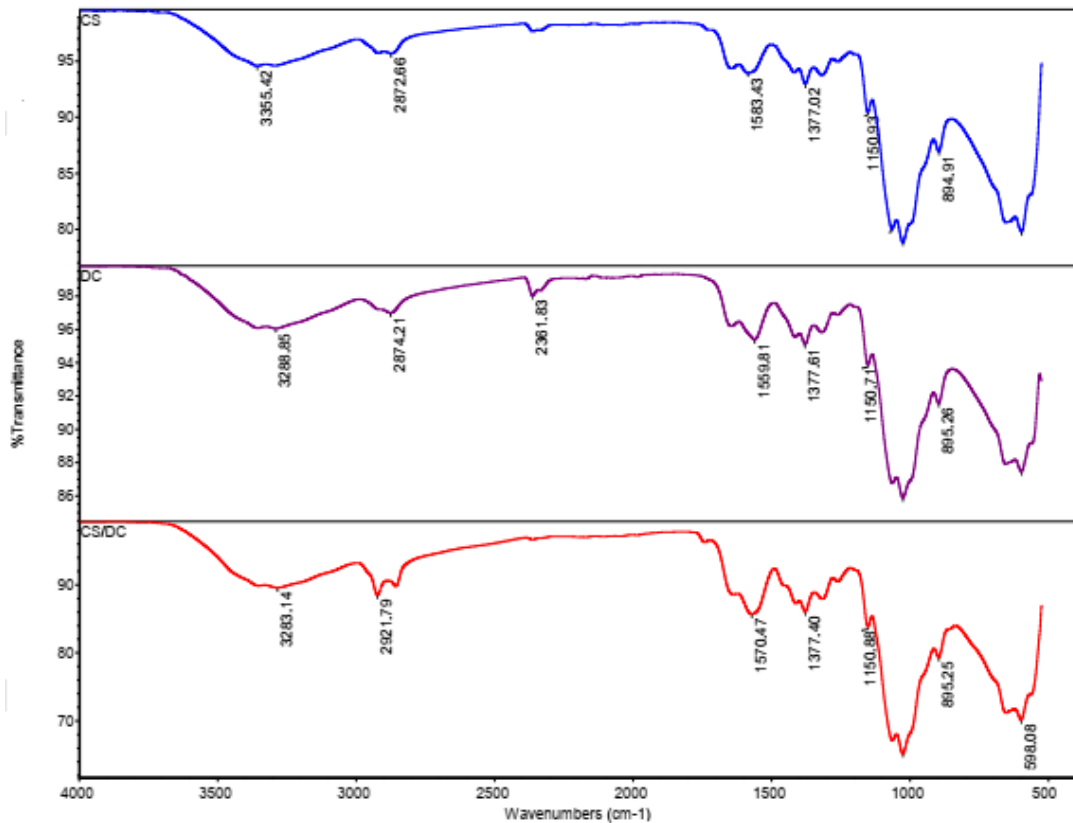
Như vậy, từ các kết quả nghiên cứu ở tiểu mục 3.2.1, mẫu tạo màng công thức CT2 (dung dịch chitosan 2%, hàm lượng dịch chiết 0,008 g/mL) được lựa chọn là mẫu để chế tạo màng phủ bảo quản.

3.2.2. Đặc trưng tính chất và hình thái cấu trúc của màng phủ CS/DC

Kết quả phân tích quang phổ hồng ngoại FT-IR

Màng phủ CS/DC được phân tích phổ hồng ngoại để xác định thành phần và sự thay đổi cấu trúc hóa học có thể có, khi bổ sung dịch chiết vào màng. Kết quả được thể hiện trong Hình 3.9.

Từ Hình 3.9 có thể thấy, phổ FT-IR của màng CS/DC thể hiện đầy đủ các dải hấp thụ đặc trưng các nhóm chức của cả chitosan và một số hợp chất trong dịch chiết. Dải dao động hóa trị nằm trong vùng từ 3252 đến 3450 cm^{-1} được gán cho dao động kéo dài của các liên kết N–H và O–H, có thể tìm thấy trong axit tannic, axit ellagic và axit galic [16, 25]. Các đỉnh hấp thụ ở số sóng 2930 cm^{-1} , 1732 cm^{-1} và 1548 cm^{-1} được gán cho dao động các nhóm C–H và C=O có trong thành phần của chitosan và một số hợp chất trong dịch chiết [16, 25]. Dải dao động với đỉnh hấp thụ cực đại tại bước sóng 1404 cm^{-1} , 1350 cm^{-1} và 1230 cm^{-1} được gán cho dao động của vòng thơm của một số hợp chất có trong dịch chiết [16, 25].



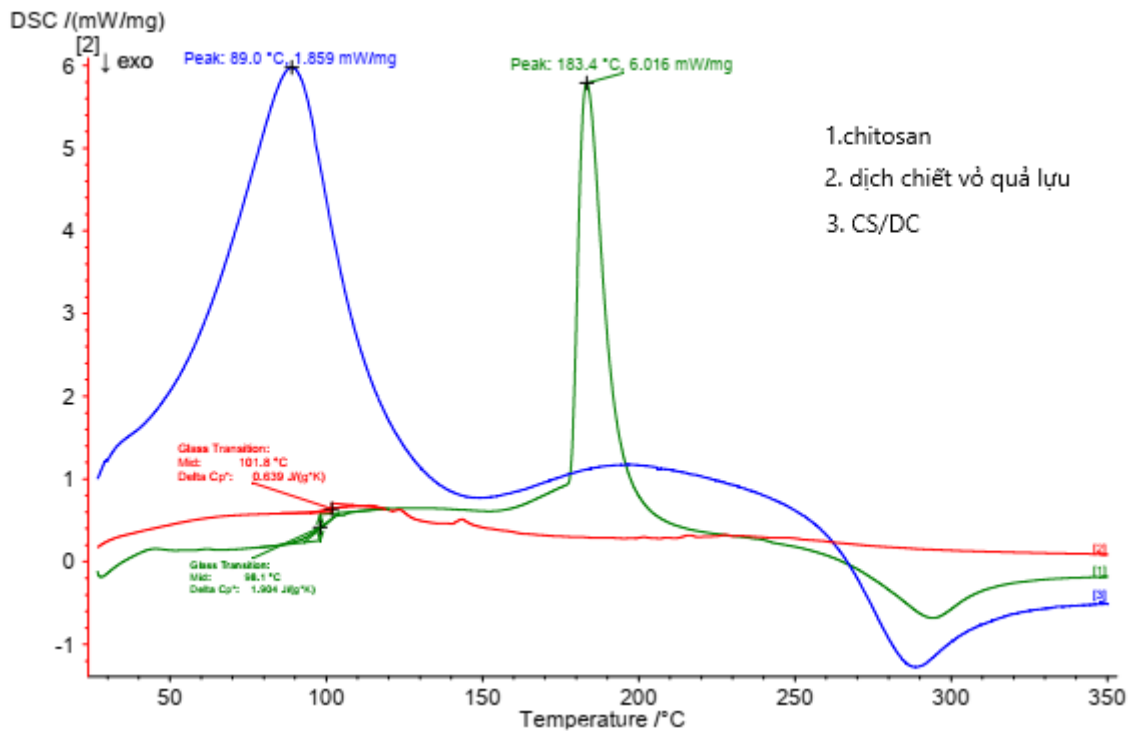
Hình 3. 9. Phổ FT-IR của 1) chitosan; 2) CS/DC và 3) dịch chiết.

Dải dao động khá mạnh ở số sóng 1030 cm^{-1} được gán cho dao động giãn dài của liên kết C–O–H của axit cacboxylic – là thành phần có trong dịch

chiết [11]. Kết quả phân tích phổ FT-IR của chitosan và mẫu màng CS/DC cho thấy, không có dải dao động mới được hình thành hoặc biến mất, chứng tỏ rằng khi bổ sung dịch chiết vào màng phủ chitosan, không có liên kết hóa học nào được hình thành. Sự gia tăng cường độ và dịch chuyển các dải dao động kéo dài C–H ở 3410 cm^{-1} , 2918 cm^{-1} , 1539 cm^{-1} , 1406 cm^{-1} và 1060 cm^{-1} , phản ánh một số tương tác vật lý đã hình thành giữa các hợp chất có trong dịch chiết với chitosan [18, 20].

Kết quả phân tích nhiệt lượng quét vi sai DSC

Màng CS/DC được phân tích tính chất nhiệt với máy đo nhiệt lượng kế vi phân. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trên Hình 3.10.



Hình 3. 10. Đường cong nhiệt DSC của các mẫu chitosan (1); dịch chiết (2) và màng CS/DC (3).

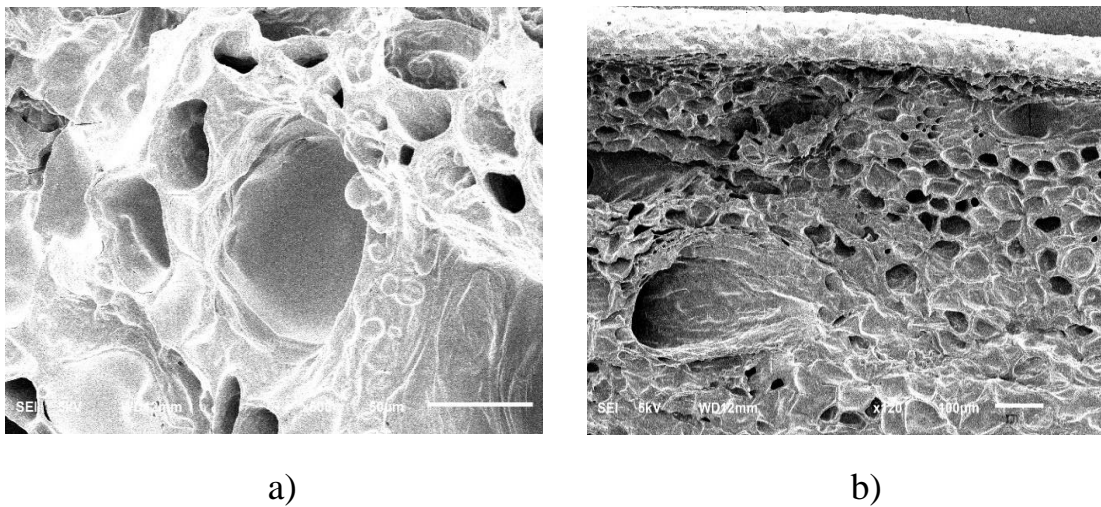
Từ Hình 3.10 có thể thấy, nhiệt độ nóng chảy của màng chitosan (đường cong 1, Hình 3.10 là $183,4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Việc bổ sung dịch chiết đã làm giảm đáng kể nhiệt độ nóng chảy của mẫu CS/DC xuống $89,0^{\circ}\text{C}$ (đường cong 3, Hình 3.10). Tuy nhiên, điều này không gây ảnh hưởng đến việc ứng dụng làm màng bảo quản quả sau thu hoạch, do màng phủ CS/DC được tạo thành theo phương pháp nhúng quả trực tiếp vào chế phẩm tạo màng, ở điều kiện nhiệt độ phòng (khoảng $25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.3. Ứng dụng màng phủ CS/DC để bảo quản quả xoài

Chế phẩm tạo màng phủ bảo quản đã được xác định điều kiện chế tạo, đặc trưng tính chất, hình thái cấu trúc. Chế phẩm này được ứng dụng để thử nghiệm khả năng bảo quản quả xoài. Kết quả theo dõi một số chỉ tiêu sinh hóa của quả trong quá trình bảo quản được thể hiện trong tiểu mục này.

3.3.1. Xác định độ dày của lớp phủ bảo quản

Hình 3.11 thể hiện ảnh SEM mặt cắt ngang của các vỏ quả xoài khi được phủ bởi các công thức CS/DC. Vỏ quả xoài không được phủ màng bảo vệ cũng được phân tích đồng thời để đối chứng.













Hình 3. 11. Ảnh SEM mặt cắt của a) vỏ quả xoài; b) vỏ quả xoài khi được phủ với công thức CS/DC.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, lớp phủ CS/DC tương đối đồng đều, với độ dày khoảng 11-30 μm , giúp cho bề mặt vỏ quả có độ mịn tốt hơn, các kết cấu bên, chặt hơn, tránh mất nước, hơi ẩm từ thịt quả ra môi trường ngoài, góp phần nâng cao hiệu quả bảo quản quả.

3.3.2. Đánh giá sự thối hỏng và độ hao hụt khối lượng của quả

Trong nghiên cứu này, các mẫu quả được nhúng trực tiếp vào công thức tạo màng phủ bảo quản CS/DC. Các mẫu quả không được nhúng trong chế phẩm tạo màng bảo quản cũng được theo dõi và phân tích đồng thời để đối chứng. Mỗi công thức được thực hiện với 10 quả. Điều kiện bảo quản được theo dõi là điều kiện tự nhiên, có nhiệt độ trong khoảng 23-25°C, độ ẩm tương đối là 80%. Một số hình ảnh điển hình trong quá trình thực nghiệm được liệt kê trong Bảng 3.7.

Bảng 3. 6. Hình ảnh một số mẫu quả xoài được theo dõi trong quá trình bảo quản.

Ngày	Mẫu quả xoài đối chứng	Mẫu quả xoài nhúng CS/DC
0		
1		
3		
6		
9		



Từ Bảng 3.7 có thể thấy sự thay đổi màu sắc của vỏ quả xoài được theo dõi trong vòng 15 ngày. Qua đánh giá trực quan, có thể nhận thấy, các mẫu quả xoài được phủ bởi màng phủ CS/DC có thời gian bảo quản tốt hơn hẳn so với mẫu đối chứng. Sau 3 ngày, mẫu quả đối chứng đã chuyển sang màu vàng, chín dần và đến ngày thứ 9, đã xuất hiện các đốm đen gây thối hỏng, màu quả chuyển hoàn toàn sang vàng. Các mẫu quả bảo quản cho thấy thời gian chín lâu hơn, đến ngày thứ 12 mới xuất hiện màu vàng trên vỏ quả và chỉ bị thối hỏng từ ngày thứ 13.

Từ kết quả theo dõi và đánh giá, tỷ lệ thối hỏng của quả được tính toán và thể hiện trong Bảng 3.8.

Bảng 3.8. Tỷ lệ thối hỏng (%) của các mẫu xoài bảo quản và các mẫu xoài đối chứng.

Ngày	Mẫu xoài đối chứng	Mẫu xoài bảo quản
0	0	0
3	5	0
6	9	2
9	15	8
12	25	12

13	30	15
15	50	20

Như vậy, việc sử dụng màng phủ bảo quản thành phần CS/DC đã làm tỷ lệ thối hỏng của các mẫu xoài giảm bớt 7 % ở ngày theo dõi thứ 9. Đây là thời điểm mà tỷ lệ thối hỏng của các mẫu đối chứng đạt ngưỡng giá trị 15% và được coi là thời gian bảo quản của lô xoài đối chứng. Việc sử dụng màng bảo quản cũng làm thời gian bảo quản của lô xoài lên đến 13 ngày (thời điểm tỷ lệ thối hỏng đạt giá trị 15 %), tăng 4 ngày so với lô đối chứng.

Sự tổn hao khối lượng cũng là một tiêu chí quan trọng để đánh giá hiệu quả bảo quản của lớp phủ. Bảng 3.9 thể hiện sự thay đổi khối lượng của các mẫu xoài thí nghiệm trong quá trình theo dõi.

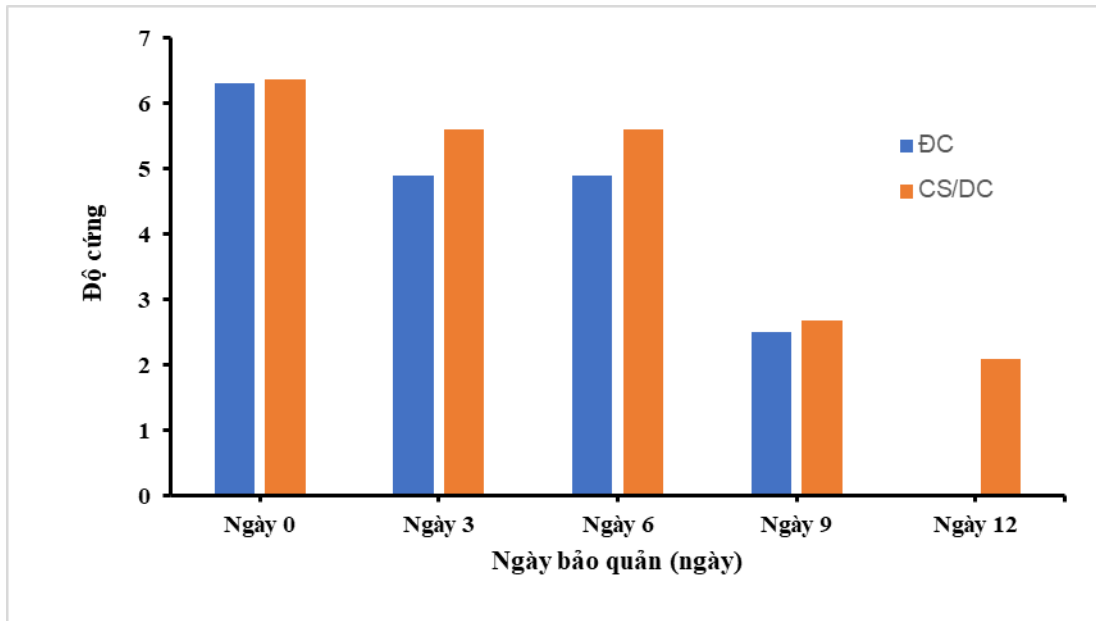
Bảng 3.9. Độ hao hụt khối lượng của các mẫu quả xoài trong quá trình bảo quản.

Ngày	Độ hao hụt khối lượng	
	Mẫu quả đối chứng	Mẫu quả bảo quản
3	4,23	2,42
6	5,98	4,12
9	7,95	4,87
12	-	5,23
13	-	6,54
15	-	7,65

Từ Hình 3.12 có thể thấy, các mẫu quả xoài đối chứng có tốc độ hao hụt khối lượng rất nhanh. Việc sử dụng màng phủ bảo quản đã làm chậm lại đáng kể quá trình mất nước của quả, giúp cho quả giữ được độ tươi lâu hơn so với mẫu đối chứng. Như vậy, việc bổ sung dịch chiết vào màng phủ đã hạn chế được độ hao hụt khối lượng lên 3,08 % ở ngày thứ 9 của quá trình bảo quản.

3.3.2. Kết quả đo độ cứng và hàm lượng đường tổng số của quả

Độ cứng của quả khi được phủ bởi màng phủ CS/DC được khảo sát theo thời gian. Các mẫu quả không được phủ màng cũng được phân tích đồng thời để đối chứng. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.14.



Hình 3. 12. Độ cứng của các mẫu quả xoài thay đổi theo thời gian.

Khi quả xoài dần chín, kết cấu và cấu trúc tế bào của vỏ thay đổi, độ cứng của quả giảm dần theo thời gian, màu sắc của vỏ quả biến đổi từ màu xanh, dần chuyển sang vàng và thâm đen khi bị hỏng. Do đó, độ cứng của vỏ quả được coi là chỉ tiêu khá quan trọng để đánh giá hiệu quả bảo vệ của lớp phủ. Từ Hình 3.14 có thể nhận thấy, các mẫu xoài khi được phủ bởi công thức bảo quản CS/DC có độ cứng giảm ít hơn so với các mẫu xoài đối chứng.

Quá trình chín của quả kéo theo sự tăng dần hàm lượng đường (độ ngọt) trong quả. Khi đạt đến ngưỡng cực đại, hàm lượng đường của quả lại có xu hướng giảm do quá trình chuyển hóa đường thành axit. Khi quả được bảo quản, hai quá trình này diễn ra chậm hơn. Bảng 3.10 thể hiện sự thay đổi hàm lượng đường tổng số của các mẫu quả theo thời gian. Kết quả nghiên cứu cho thấy, giá trị hàm lượng đường tổng số của các mẫu bảo quản tại các thời điểm theo dõi đều thấp hơn so với mẫu đối chứng, chứng tỏ việc sử dụng công thức tạo màng CS/DC đã làm chậm lại đáng kể quá trình chín của quả. Tại ngày thứ 9 của quá trình bảo quản - thời điểm được coi là thời gian bảo quản của mẫu đối chứng (khi tỷ lệ thối hỏng đạt giá trị 15%), giá trị đường tổng số của mẫu đối chứng cao hơn mẫu bảo quản 2,99 %.

Bảng 3.10. Hàm lượng đường tổng số của các mẫu quả xoài trong quá trình bảo quản.

Công thức	Hàm lượng đường tổng số, %				
	Ngày 0	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 13
Đối chứng	3,96	7,32	11,05	12,76	-
CS/DC	3,96	5,84	7,05	9,77	13,83

Tuy nhiên, giá trị đường tổng số của các mẫu quả được bảo quản bởi màng phủ cao hơn so với giá trị tương ứng của mẫu đối chứng ở ngày cuối của quá trình bảo quản (1,07 %, Bảng 3.10), chứng tỏ màng phủ không những kéo dài được thời gian bảo quản thêm 4 ngày, mà còn nâng cao được giá trị dinh dưỡng của quả.

KẾT LUẬN

1. Trong nghiên cứu này, dịch chiết từ vỏ quả lựu đã được chiết xuất với điều kiện chiết suất ngâm vỏ lựu với cồn 96° trong 24 giờ, sau đó được làm giàu với etyl axetat. Dịch chiết thu được có hàm lượng polyphenol tổng là 122,2 mg GAE/g và thể hiện hoạt tính chống oxi hóa thông qua khả năng bắt gốc tự do của DPPH với giá trị IC_{50} đạt được là 3,2 μ g/mL.

2. Lớp phủ từ chitosan và dịch chiết (CS/DC) đã được khảo sát điều kiện tổng hợp với các hàm lượng dịch chiết khác nhau. Công thức CS/DC có nồng độ dung dịch chitosan 2% được pha trong axit axetic 1%, hàm lượng dịch chiết 0,008 g/mL thích hợp nhất trong khoảng nghiên cứu để tạo màng phủ bảo quản quả xoài. Lớp phủ có độ phân tán dịch chiết trong màng chitosan tương đối đồng đều với độ trong suốt đạt được là 0,078 và độ mờ đục là 0,198. Kết quả phân tích phổ hồng ngoại và nhiệt quét vi sai cho thấy, không có liên kết hóa học nào được hình thành khi bổ sung dịch chiết vào màng chitosan, độ bền nhiệt của màng CS/DC kém hơn so với màng CS, tuy nhiên, không gây ảnh hưởng đến phương pháp nhúng quả trực tiếp để tạo màng.

3. Công thức tạo lớp phủ CS/DC được ứng dụng thử nghiệm với quả xoài. Kết quả cho thấy, màng phủ bám đều trên bề mặt quả với độ dày khoảng 11-30 μ m. Lớp phủ cho thấy hiệu quả bảo quản tốt hơn so với mẫu đối chứng ở điều kiện nhiệt độ phòng, kéo dài thời gian bảo quản thêm 4 ngày, giảm tỷ lệ thối hỏng, độ cứng và độ hao hụt khối lượng của quả. Quả khi được bảo quản cho thấy hàm lượng đường tổng số ở ngày cuối của quá trình bảo quản có giá trị cao hơn so với mẫu đối chứng chứng tỏ màng phủ không những kéo dài được thời gian bảo quản, mà còn nâng cao được giá trị dinh dưỡng của quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. R.L. Abarca, F.J. Rodríguez, A. Guarda, M.J. Galotto, J.E. Bruna, M.A. Fávoro Pérez, F.R. Souza, M. Padula, 2017. Application of β -cyclodextrin/2-nonanone inclusion complex as active agent to design of antimicrobial packaging films for control of *Botrytis cinerea*. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 1585–1594.
2. H. Cui, M. Bai, L. Lin, 2018. Plasma-treated poly (ethylene oxide) nanofibers containing tea tree oil/ β -cyclodextrin inclusion complex for antibacterial packaging. *Carbohydrate Polymers*, 179, 360–369.
3. I. R. Entsar, E. T. B. Mohamed, V. S. Christian, S. Guy, S. Walter, 2003. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action, *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465.
4. Kurita K., 2001. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin, *Progress in Polymer Science*, 26, 1921-1967.
5. Chien P.J., Shen F., Yang F.H., 2007. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit, *Journal of Food Engineering*, 78, 225-229.
6. Aytac Z., Keskin N.O.S., Tekinay T., Uyar T., 2017. Antioxidant α -tocopherol/ γ cyclodextrin-inclusion complex encapsulated polylactic acid electrospun nanofibrous web for food packaging, *Journal of Applied Polymer Science*, 134, 44858.
7. Arantzazu V., Ana C.M., Marina R., María C.G. and Alfonso J., 2014, Natural additives and agricultural wastes in biopolymer formulations for food packaging. *Alicante, Spain*. 81, 12-16.
8. Singh B., Singh J.P., Kaur A., Singh N., 2018, Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food Chem.* 261, 75–86.
9. Pirzadeh M., Caporaso N., Rauf A., Shariati M.A., Yessimbekov Z., Khan M.U., 2020. Pomegranate as a source of bioactive constituents: A review on their characterization properties and applications, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 0, 1–18.

10. Bar-Ya'akov I., Tian L., Amir R., Holland D., 2019. Primary metabolites, anthocyanins in the pomegranate fruit. *Front. Plant Sci.*, 10, 1–19.
11. Li J., He X., Li M., Zhao W., Liu L., Kong X., 2015. Chemical fingerprint and quantitative analysis for quality control of polyphenols extracted from pomegranate peel by HPLC. *Food Chem*;176, 7–11.
12. Rinaudo M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
13. Honarkar H. and Barikani M., 2009. Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 140, 1403-1420.
14. Kurita K., Tomita K., Tada T., Ishii S., Nishimura S. I. and Shimoda K., 1993. Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic properties. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 31, 485-491.
15. Muzzarelli R. A.A., 1973. Natural chelating polymers. Alginic acid, chitin and chitosan, 28-38.
16. Kumar N., Pratibha, Trajkovska Petkoska A., Khojah E., Sami R., Al-Mushhin A.A.M., 2021. Chitosan Edible Films Enhanced with Pomegranate Peel Extract: Study on Physical, Biological, Thermal, and Barrier Properties. *Materials*, 14, 3305.
17. Dominguez-Martinez B. M., Martínez-Flores H. E., Berrios J. D. J., Otoni C. G., Wood F. and Velazquez G., 2017. Physical characterization of biodegradable films based on chitosan, polyvinyl alcohol and opuntia mucilage. *Journal of Polymers and the Environment*, 25, 683-691.
18. Chao Duan, Xin Meng, Jingru Meng, Hassan Khan, Lei Dai, Avik Khan, Xingye An, 2019. Chitosan as A Preservative for Fruits and Vegetables: A Review on Chemistry and Antimicrobial Properties. *Journal of Bioresources and Bioproducts* , 4, 11-21.
19. Ambigaipalan P., De Camargo A.C., Shahidi F., 2016 .Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem*, 64, 6584–6604.

20. Abdul-Rahman and Abass A.F., 2021. Preparation of Edible Films Made from Chitosan with Pomegranate Peel Extract and Study Its Barrier, Mechanical and Antioxidant Properties IOP Conf. Ser.:*Earth Environ. Sci.*, 761, 012122.
21. Gil-Martín E., et al. (2022). "Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products." *Food Chemistry* , 378, 131918.
22. Yan L., Zhou X., Shi L., Shalimu D., Ma C., Liu Y.,2017. Phenolic profiles and antioxidant activities of six Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Int.J.FoodProp.*, 20, S94–S107.
23. Campos V.R., Proença P.L.F., Oliveira J.L., Melville C., Vechia D., et al, 2018.Chitosan nanoparticles functionalized with β -cyclodextrin:a promising carrier for botanicalpesticides, *Scientific Reports*, 8, 2067- 2082.
24. Yriakidou A., Makris D.P., Lazaridou A., Biliaderis C.G., Mourtzinis I., 2021. Physical Properties of Chitosan Films Containing Pomegranate Peel Extracts Obtained by Deep Eutectic Solvents. *Foods*, 10, 1262.
25. E.Poverenov, R.Granit, S.Gabai, 2013. Encapsulation and controlled release of antifungal propionic acid utilizing biodegradable active films based on natural polymers, *European Food Research and Technology*, 237(1), 19–26.
26. Bhaskara R., Belkacemi R., Corcuff F., 2000. “Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit,” *Postharvest Biology and Technology*, vol. 20, no. 1, pp. 39-51.
27. Shahbazi Y., 2017. The properties of chitosan and gelatin films incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil as biodegradable materials for active food packaging, *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 746-753.
28. No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Meyers S.P., 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol*, 74(1-2), 65-72.

29. Palma, M., et al. (2013). Extraction of Natural Products: Principles and Fundamental Aspects. The Royal Society of Chemistry Books.
30. Qin.Y.Y, Zhang.Z.H, Li.L, 2015, Physio mechanical properties of an active chitosan film incorporated with montmorillonite and natural antioxidant extracted from pomegranate rind, J.Food Sci.Technol, 52, 1471-1479.
31. Aikaterini Kyriakidou , Dimitris P Makris , Athina Lazaridou, Costas G Biliaderis , Ioannis Mourtzinis ,2021, Physical Properties of Chitosan Films Containing Pomegranate Peel Extracts Obtained by Deep Eutectic Solvents, Foods, 10(6), 1262; <https://doi.org/10.3390/foods10061262>
32. Hasnaoui, Bernard Wathelet, Ana Jiménez-Araujo, 2014, Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties, Food Chemistry, 160, 196-203.
33. Antonio Colantuono, Rosalia Ferracane , Paola Vitaglione, 2016, *In vitro* bioaccessibility and functional properties of polyphenols from pomegranate peels and pomegranate peels-enriched cookies, Food & Function 7(10):4247-4258, DOI:10.1039/C6FO00942E.
34. Đặng Kim Thu, Nguyễn Lê Quyên, Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Thanh Hải, Bùi Thanh Tùng (2019). Đánh giá tác dụng chống oxy hóa và khả năng ức chế enzym Protein tyrosin phosphatase 1B của các phân đoạn dịch chiết quả Lựu (*Punica granatum* Linn.). Dược Học, 516:54-56, 67.
35. Nguyễn Quang Tùng, Nguyễn Văn Lợi, Nguyễn Minh Thắng, Nguyễn Xuân Cảnh, 2019, Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chitosan đến chất lượng và thời gian bảo quản quả cam đường canh, Tạp chí Khoa học & Công nghệ, số 54, 51-56.
36. Trần Băng Diệp, Nguyễn Duy Lâm, Trần Minh Quỳnh, Tamikazu Kum (2000), Nghiên cứu ảnh hưởng của chitosan trong bảo quản sau thu hoạch , Tạp chí KHKT rau quả, 24 (4), 30-35.
37. Lê Thanh Long, Nguyễn Thị Thuỷ Tiên , Hoàng Thị Diệu Hương, 2020, Ảnh hưởng của màng bọc nanochitosan nhằm kéo dài thời hạn sử dụng của trứng gà tươi, Tạp chí Khoa học và Công nghệ nông nghiệp,6(2)-2022, 3046-3055.

38. Lê Thị Minh Thùy, 2008, Nghiên cứu phối trộn chitosan-gelatin làm màng bao thực phẩm bao gói bảo quản phi lê cá ngừ đại dương, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 1, 147-153.
39. Nguyễn Xuân Duy và Nguyễn Anh Tuấn, 2013, Sàng lọc thực vật có hoạt tính chống oxy hoá và áp dụng trong chế biến thủy sản, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 28, 59-68.
40. Phạm Thị Hà Vân, Nguyễn Thị Thúy Liễu, Lê Sĩ Ngọc, Nguyễn Hoàng Thảo Ly, 2017. Nghiên cứu ứng dụng màng chitosan-nano bạc trong bảo quản nhằm nâng cao chất lượng thanh long sau thu hoạch, Tạp chí khoa học Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh, 14 (3), 47-56.
41. Nguyễn Thị Thương, Hoàng Ngọc Bích, 2018. Nghiên cứu tổng hợp màng kháng khuẩn dựa trên chitosan và chiết xuất Trà không ứng dụng trong bao gói và bảo quản thực phẩm, Tạp chí Khoa học & Công nghệ, 1(4).
42. Lê Thanh Phước, Nguyễn Thúy Vi và Tôn Nữ Liên Hương, 2021. Các phương pháp tạo màng bảo quản họ cam quýt, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Tập 57, Số chuyên đề Công nghệ thực phẩm, 136-142
43. Lý Hải Triều, Võ Tuấn Anh, Nguyễn Việt Hồng Phong, Phạm Thị My Sa, 2019. Khảo sát thành phần hoá học, hoạt tính kháng oxy hoá và độc tính cấp đường uống của cao chiết từ vỏ quả lựu, Tạp chí Y Dược học – Trường Đại học Y Dược Huế, Tập 9, số 4.
44. Nguyễn Thị Vân, Nguyễn Thị Anh Thư, Trần Thị Phương Hạnh, Nguyễn Thị Tâm, 2023. Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất từ vỏ lựu, bã nho và hạt đu đủ. Tạp chí trường Đại học Tây Nguyên, số 59, 76-83.
45. Marinova D., Ribarova F., Atanassova M., 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 40, 255-260.
46. Salama A.A., Ismael N.M., Bedewy M., 2021. The Anti-inflammatory and Antiatherogenic In Vivo Effects of Pomegranate Peel Powder: From Waste to Medicinal Food. Journal of Medicinal Food, 24 (2), 145-150.
47. Saleh M., Amro L., Barakat H. et al, 2021. Fruit by-product processing and bioactive compounds. J. Food Qual, 5513358, DOI: 10.1155/2021/5513358.

48. Omer H. A., Abdel-Magid S. S., Awadalla I. M., 2019. Nutritional and chemical evaluation of dried pomegranate (*Punica granatum* L.) peels and studying the impact of level of inclusion in ration formulation on productive performance of growing Ossimi lambs. *Bull. Natl. Res. Cent*, 43, 1– 10, DOI: 10.1186/s42269-019-0245-0.
49. Farrokhnia M., 2020. Density Functional Theory Studies on the Antioxidant Mechanism and Electronic Properties of Some Bioactive Marine Meroterpenoids: Sargahydroquionic Acid and Sargachromanol. *ACS Omega*, 5(32): 20382–20390.