

Ứng dụng chế phẩm Viscozyme L để trích ly Polyphenol từ lá trà xén cành kim tuyến

• Huỳnh Thị Phương

• Huỳnh Ngọc Oanh

Trường Đại Học Bách Khoa, ĐHQG-HCM

• Phan Phước Hiền

Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM

(Bài nhận ngày 16 tháng 04 năm 2014, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 05 tháng 10 năm 2014)

TÓM TẮT

Khảo sát điều kiện hoạt động của Viscozyme L nhằm tăng hàm lượng polyphenol thu được trong dịch chiết từ lá trà xanh xén cành Kim Tuyến được quan tâm trong nghiên cứu này. Với lượng dung môi nước thích hợp (tỷ lệ nguyên liệu:nước là 1:20), chế phẩm enzyme Viscozyme L thể hiện hoạt tính tối ưu ở 40 - 45°C, tỷ lệ enzyme:cơ chất là 0.06(v/w), thời gian trích ly trong vòng 90 phút, chế độ lắc 60 vòng/phút thì lượng polyphenol tổng thu được trong dịch

chiết trà xén đạt cao nhất 23.49% chất khô. Ở cùng điều kiện trích ly (tỷ lệ nguyên liệu:nước là 1:20, nhiệt độ 45°C, thời gian 90 phút, chế độ lắc 60 vòng/phút), polyphenol tổng và hoạt tính kháng oxy hóa quét gốc tự do 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) của dịch chiết trà xanh được bổ sung Viscozyme L (23.98 % và IC₅₀ 236.98μL) đều cao hơn dịch chiết không có enzyme (15.75 %w/w với IC₅₀ 328.98μL).

Từ khóa: Polyphenol, Viscozyme L, lá trà xanh xén cành Kim Tuyến, DPPH

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo báo cáo của Ban Tuyên Giáo Tỉnh Ủy Thái Nguyên tại Festival Trà Thái Nguyên - Việt Nam lần thứ hai năm 2013, diện tích trồng trà của Việt Nam khoảng trên 100.000 ha, với nhiều vùng trà nổi tiếng như Thái Nguyên, Phú Thọ, Yên Bái, Lâm Đồng... Năng suất bình quân trà của cả nước đạt hơn 77 tạ/ha, sản lượng đạt gần 824.000 tấn búp trà tươi. Tuy nhiên việc khai thác, chế biến mới chỉ dừng lại ở bước sản xuất sản phẩm trà từ nguồn nguyên liệu búp và lá non, do đó đã bỏ phí một lượng lớn lá già và trà vụn. Chính vì vậy, việc nghiên cứu khai thác các hợp chất, đặc biệt là polyphenol từ nguồn nguyên liệu lá già và trà xanh

vụn là một hướng nghiên cứu nhằm nâng cao giá trị và nguồn lợi từ cây trà Việt Nam.

Trong sản xuất trà Oolong, nguyên liệu sử dụng phải là đợt trà (1 tôm 2 lá). Do đó, những phần còn lại của cây trà – trà xén cành (từ tầng lá thứ 3, thứ 4 trở xuống gốc cây trà) hầu như được tiêu thụ với giá thành không cao, mặc dù hàm lượng các chất trong trà xén giảm không đáng kể so với đợt trà [2,3]. Chính vì thế việc tìm ra giải pháp để nâng cao giá trị trà xén cành là một vấn đề rất có ý nghĩa kinh tế.

Hợp chất polyphenol là thành phần được quan tâm nhiều nhất trong trà. Polyphenol chính trong

trà xanh là các flavonoid (catechin-C, epicatechin-EC, galocatechin-GC, epigallocatechin-EGC, galocatechingallate-GCG, epicatechin gallate-ECG, epigallocatechin gallate-EGCG, và proanthocyanidin) [1,5] với những đặc tính quý giá như kháng oxy hóa, khả năng phòng ngừa ung thư... [7,12]. Do đó việc trích ly thu nhận polyphenol từ trà xanh nói riêng và một số nguyên liệu khác nói chung như lá sakê, lá dâu... để bổ sung vào thực phẩm, mỹ phẩm hoặc dược phẩm đang là hướng nghiên cứu và phát triển mang lại nhiều giá trị cho nhà sản xuất (đa dạng hóa sản phẩm) cũng như người tiêu dùng (sản phẩm có lợi cho sức khỏe).

Để trích ly polyphenol có trong trà xanh, nhiều phương pháp khác nhau đã được thực hiện [2,4,5]. Tuy nhiên, kết quả đạt được vẫn còn hạn chế bởi có thể là hiệu suất trích ly thấp, dung môi sử dụng nhiều không đảm bảo tính an toàn hoặc chi phí cao để loại bỏ dung môi ra khỏi sản phẩm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phương pháp trích ly trà xén cành có sự hỗ trợ của chế phẩm Viscozyme L nhằm thu nhận hàm lượng polyphenol cao nhất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Trà xanh xén cành Kim Tuyên được Nhà máy trà Công Ty Cổ Phần Chế Biến Hàng Xuất Khẩu Cầu Tre, Bảo Lâm, Lâm Đồng cung cấp.

- Chế phẩm enzyme Viscozyme L sử dụng (của hãng Novozyme) có nguồn gốc từ chủng *Aspergillus aculeatus*. Viscozyme L là hỗn hợp các carbohydrase bao gồm arabanase, cellulase, hemicellulase, beta-glucanase và xylanase. Điều kiện hoạt động của Viscozyme là pH 3-5 và nhiệt độ 50-55°C, hoạt tính ban đầu 100FBG (Fungal Beta-Glucanase)/ml.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định polyphenol tổng

Nguyên liệu trà xén cành sau khi diệt men được tiến hành trích ly kiệt chất khô hòa tan bằng

cách đun sôi cách thủy với nước trong khoảng thời gian 90 phút rồi lọc. Tiếp tục chiết cho đến khi dịch chiết không còn xuất hiện màu xanh với thuốc thử FeCl₃ 3%. Dịch trà thu được qua các lần chiết hòa chung với nhau để xác định polyphenol tổng có trong nguyên liệu ban đầu.

Polyphenol tổng số được xác định theo phương pháp của L.H.Yao và cộng sự (2006) [11] với những cải tiến gần đây [16,18,19]. 1ml dịch chiết trà, 4ml nước cất, 5ml dung dịch muối tartarate và dùng dung dịch đệm phosphate pH 7.5 định mức lên 25ml. Đo hấp thụ ở 540nm. Kết quả hàm lượng polyphenol tổng tính theo công thức:

$$\text{Polyphenol tổng (\% w/w)} = (3,914 \cdot E \cdot V_1 \cdot 100) / (1000 \cdot V_1 \cdot w)$$

Trong đó:

E kết quả đo OD_{540nm}

V tổng thể tích dịch chiết

V₁ thể tích dịch chiết sử dụng

w khối lượng khô của mẫu trà

2.2.2. Xác định hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp bắt gốc tự do của 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Khả năng quét gốc tự do DPPH của dịch chiết trà xén được thực hiện theo phương pháp của tác giả Larrauri và cộng sự [10] với một số cải biến. Mỗi thể tích dịch chiết khác nhau (từ 100 - 500μl) thêm 2.9ml dung dịch DPPH (0.1mM) pha trong methanol 80%. Sau đó dùng nước cất bổ sung cho đủ thể tích là 4ml. Mẫu được ủ trong tối 30 phút ở nhiệt độ phòng. Đo quang phổ ở bước sóng 517nm. Acid ascorbic dùng làm chất đối chứng. Khả năng bắt gốc tự do của dịch trà xén được tính như sau:

$$\text{Tỷ lệ bắt gốc tự do DPPH(\%)} = [1 - (A_{\text{mẫu}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{đối chứng}}] \times 100$$

Trong đó: A_{mẫu} là độ hấp thụ của dịch trích trà xén cành và DPPH

Ablank là độ hấp thu của dung dịch methanol và dịch trà

Đối chứng là độ hấp thu của dung dịch methanol và DPPH.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát nguyên liệu trà xén ban đầu

Trà Kim Tuyên 27 (đọt trà và trà xén cành) được tiến hành kiểm tra một số chỉ tiêu như sau:

Bảng 1. Một số chỉ tiêu nguyên liệu trà xanh

Nguyên liệu	Độ ẩm ¹ (% w/w)	Hàm lượng tro ¹ (% w/w)	Polyphenol tổng ¹ (% w/w)		
			Chiết lần 1	Chiết lần 2	Chiết lần 3
Đọt trà	74.24±0.104	2.13±0.071	22.36±0.418	10.16±0.3	2.35±0.102
Trà xén	65.64±0.951	3.05±0.067	19.71±0.492	8.13±0.335	1.08±0.135

¹ Giá trị trung bình ± Độ lệch chuẩn

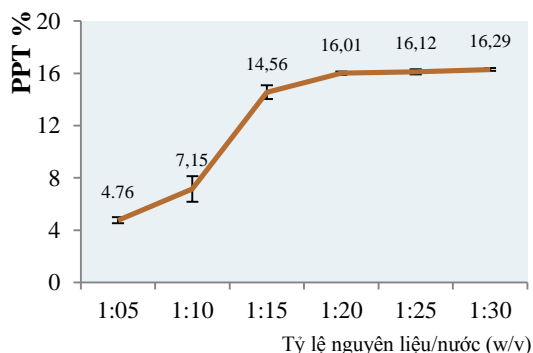
Qua khảo sát sơ bộ nguyên liệu ban đầu, hàm lượng polyphenol tổng của trà Kim Tuyên 27 lần lượt khoảng 34% ở đọt và 28% ở trà xén cành (lần chiết thứ 4 hàm lượng polyphenol rất thấp nên xem như không đáng kể). Như vậy ngoài đọt non (búp 1-2 lá), trà xén cành là nguồn nguyên liệu giá trị thấp nhưng lại chứa hàm lượng polyphenol tương đối cao.

3.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly

Ảnh hưởng của điều kiện trích ly lên hoạt động enzyme Viscozyme L được thể hiện thông qua hàm lượng polyphenol thu nhận được.

3.2.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu và nước

Điều kiện khảo sát tỷ lệ nước và nguyên liệu với tỷ lệ Viscozyme:nguyên liệu là 0.03, nhiệt độ 40°C trong 60 phút.

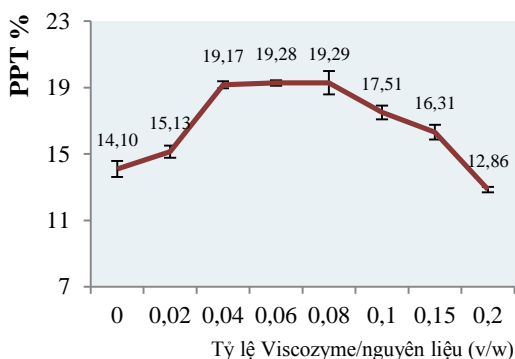


Hình 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ chiết

Qua biểu đồ hình 1 cho thấy cùng một khối lượng mẫu trà nếu lượng dung môi nước càng tăng thì hàm lượng polyphenol thu được trong dịch chiết càng cao. Nếu tỷ lệ chiết là 1:5 thì hàm lượng polyphenol tổng thu được rất thấp (4.76% w/w), tăng dần và đạt cao nhất tại tỷ lệ chiết 1:30 (16,29% w/w). Tuy nhiên, khi tăng tỷ lệ chiết từ 1:20 lên 1:25 và 1:30 thì polyphenol tổng tăng không đáng kể, tương ứng 16.01; 16.12; 16.29 % w/w (không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5%). Đồng thời, nếu lượng dung môi trong dịch chiết nhiều sẽ là một vấn đề khó khăn cũng như phải tốn kém về kinh tế, thời gian để loại dung môi. Như vậy, mẫu được trích ly với tỷ lệ nguyên liệu: nước là 1:20 (g/ml) là mẫu tốt nhất cho thí nghiệm này và được chọn làm giá trị tỷ lệ chiết cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ Viscozyme và nguyên liệu

Điều kiện khảo sát tỷ lệ Viscozyme:nguyên liệu với tỷ lệ chiết 1:20, nhiệt độ 40°C trong 60 phút.

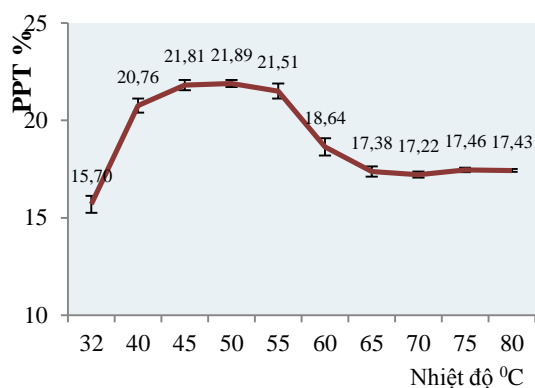


Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ Viscozyme

Từ biểu đồ hình 2 cho thấy khi tăng hàm lượng Viscozyme thì hiệu quả trích ly polyphenol tăng đến một giới hạn nhất định. Ở tỷ lệ Viscozyme: nguyên liệu là 0.08 thì hàm lượng polyphenol thu nhận được là cao nhất 19.29%, tức tăng 5.19% so với mẫu đối chứng không có enzyme. Tuy nhiên không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa thống kê 5% so với tỷ lệ 0.06 có hàm lượng polyphenol tổng là 19.08%. Mặt khác, nếu tiếp tục tăng nồng độ Viscozyme thì hàm lượng polyphenol tổng thu nhận được sẽ bắt đầu giảm, đáng kể nhất khi tỷ lệ Viscozyme: nguyên liệu là 0.2 thì polyphenol tổng chỉ đạt 12.86%, thấp hơn cả mẫu đối chứng không có enzyme. Khi sử dụng lượng enzyme vượt ngưỡng xúc tác tối ưu cho quá trình thủy phân thì hiệu quả trích ly chất tan không tăng thêm, trong đó có polyphenol. Điều này không có lợi cho quá trình trích ly mà lại gây lãng phí. Vì vậy tỷ lệ Viscozyme:nguyên liệu là 0.06 được dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ trích ly

Điều kiện khảo sát nhiệt độ trích ly với tỷ lệ chiết 1:20, tỷ lệ Viscozyme:nguyên liệu là 0.06, thời gian 60 phút.

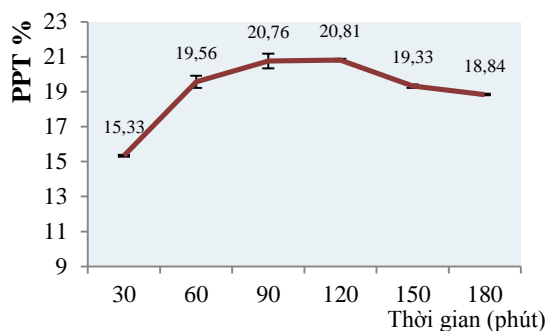


Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Trên thực nghiệm đối với nguyên liệu trà xén cành Kim Tuyên thì Viscozyme L thể hiện hoạt tính cao nhất trong khoảng 45 -50°C (theo biểu đồ hình 3). Kết quả này phù hợp với những thông tin cung cấp từ nhà sản xuất Viscozyme L có khoảng nhiệt độ hoạt động là 25-55°C. Tại khoảng nhiệt độ tối ưu này, hàm lượng polyphenol tổng đạt hơn 21%. Khi nhiệt độ vượt ngưỡng 55°C thì hoạt tính enzyme giảm đáng kể thể hiện qua hàm lượng polyphenol tổng thu nhận được giảm (khoảng hơn 17%). Có thể thấy rằng, ở khoảng nhiệt độ trên 70°C thì có xảy ra quá trình trích ly bằng nhiệt vì lúc này enzyme đã bắt đầu bị giảm hoạt tính [7]. Chính vì thế hàm lượng polyphenol thu được khi trích ly ở nhiệt độ trên 70°C cao hơn so với nhiệt độ phòng (32°C). Giá trị polyphenol thu được ở 45°C và 50°C không có sự khác biệt đáng kể là 21.81% và 21.89%. Do đó để tiết kiệm chi phí về năng lượng cũng như giảm đến mức thấp nhất tác động nhiệt lên hợp chất polyphenol [3] thì nhiệt độ trích ly là 45°C được lựa chọn.

3.2.4. Ảnh hưởng của thời gian trích ly

Điều kiện khảo sát thời gian trích ly với tỷ lệ chiết 1:20, tỷ lệ Viscozyme:nguyên liệu là 0.06, nhiệt độ 45°C.

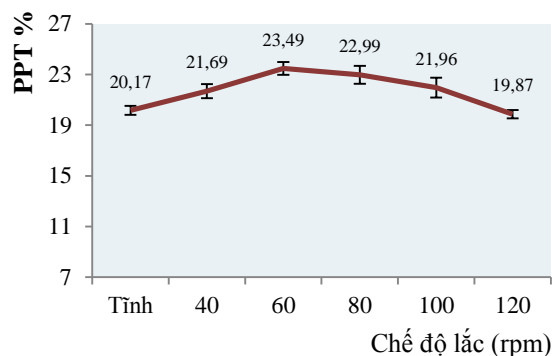


Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian

Qua biểu đồ hình 4 cho thấy yếu tố thời gian có ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme Viscozyme L. Khi tăng thời gian trích ly từ 30 phút đến 120 phút thì hàm lượng polyphenol tổng thu được tăng từ 15.33% lên 20.81%. Tuy nhiên polyphenol tổng thu được giữa 90 phút và 120 phút khác biệt không đáng kể. Nếu tiếp tục tăng thời gian trích ly thì hàm lượng polyphenol sẽ giảm nhẹ. Theo trích ly thông thường (không bổ sung enzyme), thời gian trích ly càng dài thì lượng chất tan trích được ra môi trường dung môi càng tăng đến mức giới hạn. Nhưng khi môi trường trích ly có bổ sung enzyme, nếu thời gian trích quá lâu thì hoạt tính enzyme có thể bị ảnh hưởng bởi chính thành phần các chất có trong dịch chiết. Kết quả một số nghiên cứu đã cho thấy, hợp chất catechin có thể ức chế enzyme bởi tương tác cạnh tranh trực tiếp [13,17]. Điều này sẽ làm ảnh hưởng đến khả năng hoạt động của enzyme. Như vậy thời gian trích ly tối ưu được chọn là 90 phút.

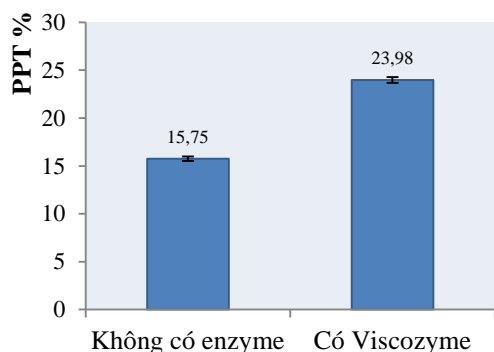
3.2.5. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Điều kiện khảo sát tốc độ lắc với tỷ lệ chiết 1:20, tỷ lệ Viscozyme:nguyên liệu là 0.06, nhiệt độ 45⁰C thời gian 90 phút. Mẫu đối chứng tương tự nhưng trích ly ở chế độ tĩnh.



Hình 5. Ảnh hưởng của chế độ lắc

Biểu đồ hình 5 cho thấy chế độ ảnh hưởng đến quá trình trích ly trà xén cành Kim Tuyên thể hiện qua hàm lượng polyphenol thu nhận được. Hàm lượng polyphenol tổng đạt cao nhất (23.49%) ở chế độ lắc 60vòng/phút, tăng 3.32% so với ù tĩnh (20.17%). Điều này có thể lý giải là do tác động cơ học của quá trình lắc sẽ tăng điều kiện tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất giúp cho phản ứng xảy ra nhanh và triệt để hơn. Đồng thời, trích ly là quá trình khuếch tán chất tan do sự chênh lệch nồng độ giữa bên trong tế bào và ngoài môi trường (theo định luật Fick I). Nếu quá trình trích ly xảy ra ở điều kiện tĩnh thì sau một thời gian sẽ dẫn đến sự cân bằng cục bộ nồng độ chất tan giữa trong và ngoài tế bào. Điều này đồng nghĩa với việc quá trình trích ly sẽ ngừng hoặc diễn ra rất chậm. Do đó nếu có sự đảo trộn trong dịch trích ly thì sẽ khắc phục vấn đề này và hiện tượng ức chế ngược enzyme. Tuy nhiên nếu chế độ lắc quá mạnh (trên 100vòng/phút) thì không đem lại hiệu quả cao, thậm chí polyphenol tổng thu được còn có xu hướng giảm dần (biểu đồ hình 5). Vì vậy chế độ lắc 60vòng/phút được lựa chọn.



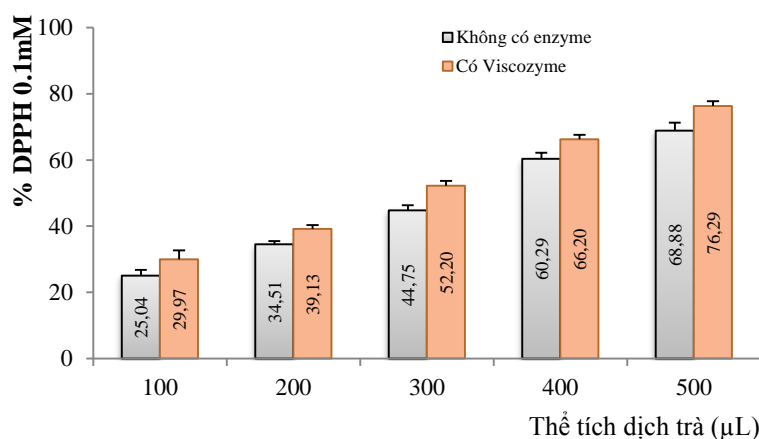
Hình 6. Hiệu quả sử dụng chế phẩm Viscozyme L

Khi so sánh hiệu quả sử dụng chế phẩm Viscozyme, biểu đồ hình 6 cho thấy chế phẩm

Viscozyme hỗ trợ quá trình trích ly rất tốt thể hiện qua hàm lượng polyphenol thu nhận được tăng từ 15.75% (không có enzyme) lên 23.98% khi có Viscozyme.

3.3. Hoạt tính kháng oxy hóa với phương pháp bắt gốc tự do DPPH

Dịch chiết trà xén cành thu được khi trích ly ở điều kiện tối ưu đã khảo sát được xác định khả năng kháng oxy hóa. Phương pháp bắt gốc DPPH đã được sử dụng rộng rãi để xác định hoạt tính kháng oxy hóa của dịch chiết nhiều loại thực vật [15]. Khả năng kháng oxy hóa phụ thuộc vào lượng dịch mẫu sử dụng (nồng độ chất chống oxy hóa khác nhau) (đồ thị hình 7).



Hình 7. Tỷ lệ bắt gốc tự do DPPH

Khi lượng dịch trà sử dụng tăng 100 - 500μL thì tỷ lệ bắt gốc DPPH đều tăng tương ứng từ 25.04 – 68.88% với mẫu đối chứng không sử dụng enzyme và 29.97 – 76.29% với mẫu sử dụng Viscozyme. Tại cùng một thể tích dịch chiết trà xén cành, phương pháp trích có bổ sung chế phẩm Viscozyme thu được dịch chiết có khả năng kháng oxy hóa (76.29% với 500μL dịch) cao hơn phương pháp không sử dụng chế phẩm (68.88% với 500μL). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của tác giả Yang Hee Hong và cộng sự (2013)

[17]. Theo đó, việc sử dụng các chế phẩm enzyme khác nhau (trong đó có Viscozyme) sẽ làm tăng hàm lượng polyphenol tổng và hoạt tính kháng oxy hóa của dịch chiết trà xanh. Hoạt tính chống oxy hóa của các chất có thể được đánh giá dựa vào giá trị IC_{50} của chất đó. IC_{50} là hàm lượng chất chống oxy hóa cần thiết để quét 50% gốc tự do trong dung dịch DPPH. Tại giá trị IC_{50} , hoạt tính kháng oxy hóa của mẫu đạt 50%. Như vậy, giá trị IC_{50} càng thấp thì hoạt tính kháng oxy hóa càng cao và ngược lại.

Bảng 2. Hàm lượng polyphenol tổng và IC₅₀ của dịch trà và Vitamin C

Mẫu	Polyphenol tổng (%)	IC ₅₀ * (μL)
Không có enzyme ¹	15.75 ± 0.193 ^a	328.98 ^a
Có Viscozyme ²	23.98 ± 0.246 ^b	236.98 ^b
Vitamin C ³		107.21 ^c

Các ký tự ^{a, b, c} khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0.05$). Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

¹ Dịch chiết trà thu được khi trích ly không bổ sung enzyme

² Dịch chiết trà thu được khi trích ly bổ sung chế phẩm Viscozyme

³ Dung dịch chuẩn Vitamin C (2mg/ml).

*Lượng thể tích dịch chứa hàm lượng chất chống oxy hóa cần thiết để quét được 50% gốc tự do trong 2.9ml dung dịch DPPH 0.1mM.

Trong bảng 2, hàm lượng polyphenol tổng trong dịch chiết trà xanh tăng thì giá trị IC₅₀ giảm. Điều này chứng tỏ rằng, hàm lượng polyphenol tăng là nguyên nhân dẫn đến khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết trà xanh có sử dụng chế phẩm Viscozyme cũng tăng. Hai nhóm polyphenol hiện diện chính trong trà là flavan-3-ols và flavonols. Flavan-3-ols chiếm 77% các hợp chất phenolic trong trà xanh và flavonols chiếm 13%. Khả năng kháng oxy hóa của trà chủ yếu do nhóm catechin (thuộc Flavan-3-ols) quyết định [14].

4. KẾT LUẬN

Bước đầu nghiên cứu này đã xác định được điều kiện tối ưu cho chế phẩm Viscozyme L hoạt động trong quá trình trích ly trà xén cành Kim Tuyên như sau tỷ lệ nguyên liệu:nước là 1:20; tỷ lệ Viscozyme:nguyên liệu là 0.06 (v/w); nhiệt độ 45⁰C; thời gian 90 phút, chế độ ủ lắc 60vòng/phút. Dịch trích ly trà xén cành Kim Tuyên có bổ sung chế phẩm Viscozyme L ở điều kiện tối ưu chứa hàm lượng polyphenol tổng tăng thêm 8.23% (w/w) (so với dịch trích không bổ sung enzyme 15.75 %w/w) và hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp quét gốc tự do trong 2.9ml dung dịch DPPH 0.1mM đạt 76.29% tại 500μL dịch chiết.

Use of Viscozyme L to extract polyphenols from Kim Tuyen green tea

- **Huynh Thi Phuong**
- **Huynh Ngoc Oanh**

University of Technology, VNU-HCM - ngocoanh_huynh@yahoo.com

- **Phan Phuoc Hien**

HoChiMinh City Nong Lam University

ABSTRACT

Polyphenol production in Kim Tuyen green tea extract was surveyed in this study by optimizing appropriate conditions for Viscozyme L. The optimum amount of water added was 1:20 (w material: w water), the ratio 0.06 v enzyme: w extract, Viscozyme L showed the highest activity at 40 - 45°C in 90 min at 60 rpm. Total polyphenol in green tea extract collected from the conditions above reached its peak at 23.49% of dry content

(w/w). The total polyphenol and antioxidant activities by carried out by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay of green tea extract (collected by the conditions above) treated with Viscozyme L (23.98%) showed IC₅₀ value at 276.98µL, which was significantly higher antioxidant activities of those treated with non-enzyme extraction (15.75% w/w), with IC₅₀ value at 328.98µL.

Keywords: polyphenols, Viscozyme L, Kim Tuyen green tea, DPPH

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Hà Thị Thanh Bình, *Nghiên cứu một số đặc điểm hoá học và tác dụng sinh học của các hợp chất polyphenol trong lá cây chè ở Tân Cương (Thái Nguyên) và Xuân Mai (Hà Nội)*, Luận án tiến sĩ sinh học, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội, (2006).
- [2]. Vũ Hồng Sơn, Hà Duyên Tư, *Nghiên cứu trích ly polyphenol từ chè xanh vụn. Phần 2. Tối ưu hóa quá trình trích ly polyphenol bằng phương pháp hàm mong đợi*, Tạp chí khoa học và công nghệ, (2009).
- [3]. Vũ Thị Thư và cộng sự, *Các hợp chất hóa học có trong chè và một số phương pháp phân tích thông dụng trong sản xuất chè ở Việt Nam*, NXB Nông Nghiệp, (2001).
- [4]. C. M. C., *Handbook of the inspection techniques on tea quality*, Hangzhou, China: The Chinese National Centre of Tea Quality Control and Inspection, (1991).
- [5]. Huiling Liang, Yuerong Liang, Junjie Dong, Jianliang Lu, Hairong Xu, Hui Wang, *Decaffeination of fresh green tea leaf (Camellia sinensis) by hot water treatment*, Food Chemistry, Vol.101, 1451-1456, (2006).
- [6]. Hyong Seok Park, Hee Jin Lee, Min Hye Shin, Kwang-Won Lee, Hojoung Lee, Young-Suk Kim, Kwang Ok Kim, Kyoung Heon Kim, *Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical*

- carbon dioxide*, Food Chemistry, Vol.105, 1011-1017, (2007).
- [7]. Jian-Liang Lu, Ming-Yan Wu, Xiao-Li Yang, Zhan-Bo Dong, Jian-Hui Ye, Devajit Borthakur, Qing-Lei Sun, Yue-Rong Liang, *Decaffeination of tea extracts by using poly (acrylamide-co-ethylene glycol dimethylacrylate) as adsorbent*, Journal of Food Engineering, Vol.97, 555-562, (2009).
- [8]. Johnson J.J., Bailey H.H., Mukhtar H., *Green tea polyphenols for prostate cancer chemoprevention: a translational perspective*, Phytomedicine, 17, 3–13, (2010). [PubMed: 19959000]
- [9]. Korkina, L.G.; Afanas'ev, I.B., *Antioxidant and chelating properties of flavonoids*, Adv.Pharmacol,38, 151–163, (1997).
- [10]. Larrauri, J.A.; Sanchez-Moreno, C.; Saura-Calixto, F., *Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels*, J. Agr. Food Chem.,46, 2694-2697, (1998).
- [11]. L.H. Yao et al., *Phenolic compounds in tea from Australian supermarkets*, Food Chemistry, Vol.96, 614-620, (2006).
- [12]. Muralidharan, D., *Spectrophotometric analysis of catechins and condensed tannins using Ehrlich's reagent*, Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, 81, 231–233, (1997).
- [13]. Persson I.A.L., Josefsson M., Persson K., and Andersson R.G.G., *Tea flavanols inhibit angiotensin-converting enzyme activity and increase nitric oxide production in human endothelial cells*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 58, 1139-1144, (2006).
- [14]. Salmah Yusof, *Quality of soursop juice after pectinase enzyme treatment*, Journal of Food Chemistry, 51, 83-88, (1994).
- [15]. Sanchez-Moreno, C., *Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems*, Food Sci. Technol. Int.,8, 121-137, (2002).
- [16]. Yang CS, Wang X, Lu G, Picinich SC, *Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance*, Nat Rev Cancer, 9, 429–439, (2009). [PubMed: 19472429]
- [17]. Yang Hee Hong et al., *Enzymatic improvement in the polyphenol extractability and antioxidant activity of green tea extracts*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 77 (1), 22-29, 2013.
- [18]. Yao, L. H., Cheng, C., Chen, Y., & Liu, Y., *The kinetics of green tea infusion*, Food Science, 3–6, (1992).
- [19]. Yao, L. H., Chen, Y., & Cheng, C., *The kinetics of black tea infusion*, Journal of Food and Fermentation and Industry, 19, 38–44, (1993).