

BƯỚC ĐẦU TRỒNG THỬ NGHIỆM VÀ TÁCH CHIẾT HOẠT CHẤT MIRACULIN TRONG TRÁI CÂY THẦN KỲ (*SYNSEPALUM DULCIFICUM* DANIELL)

Trần Danh Thế, Vũ Văn Độ, Ngô Kế Sương

Viện Sinh Học Nhiệt Đới TP. HCM

(Bài nhận ngày 02 tháng 12 năm 2009, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 14 tháng 04 năm 2010)

TÓM TẮT: Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành trồng thử nghiệm cây thần kỳ (*Synsepalum dulcificum*) trong điều kiện khí hậu, thổ nhưỡng tại thành phố Hồ Chí Minh. Các điều kiện sinh trưởng cũng như đặc điểm sinh học cây thần kỳ đã được ghi nhận. Phân tích thành phần hóa học trong thịt quả cho thấy có chứa tinh dầu, carotenoid, phytosterol, acid béo, flavonoid, polyphenol, acid hữu cơ, saponin steroid, đường khử, hợp chất uronic. Hoạt chất miraculin trong trái cây thần kỳ được chiết trong dung dịch muối loãng (NaCl 0,5M) và qua tinh chế bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion thu được hoạt chất có độ tinh sạch cao và được ghi nhận là có khả năng biến đổi vị chua của acid citric trở nên ngọt tương đương với độ ngọt của đường saccharose 0,4M. Đặc điểm này mở ra nhiều triển vọng trong việc trồng cây thần kỳ với quy mô lớn để sản xuất miraculin, ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, y dược trong tương lai.

Từ khóa: miraculin, miracle fruit, *Synsepalum dulcificum*, glycoprotein, sắc ký trao đổi ion, cây thần kỳ

1. GIỚI THIỆU

Cây *Synsepalum dulcificum* là loại cây tiểu mộc, phát triển chậm có nguồn gốc từ Tây Phi. Năm 1725 nhà thám hiểm người Pháp là Reynaud des Marchais phát hiện ra cây này khi ông ghé lại một ngôi làng ở Ghana và thấy rằng thức ăn của các thổ dân nơi đây đều rất chua và không hề có đường nhưng sau khi nhai một loại trái cây màu đỏ thì các vị chua này trở thành vị ngọt, người địa phương cũng sử dụng loại trái cây này để làm rượu palm chua (sour palm wine) ngọt hơn và để dậy men bánh mì ngô (maize bread)[11]. Đến năm 1852, cây này mới được Daniel mô tả tỉ mỉ về đặc tính kỳ lạ này và phát hiện ra chất miraculin là thành phần chính của cây, ông định danh là *Synsepalum dulcificum*, họ Sapotaceae [5]. Và đồng thời, đặt tên là miracle fruit “cây kỳ diệu”. Thử trái cây này có chứa chất miraculin bản chất là một loại glycoprotein, có khả năng biến vị chua, đắng... thành vị ngọt sau khi nhai loại quả này[6]. Đến năm 1968, miraculin mới được ly trích đầu tiên bởi Kenzo Kurihara và Lloyd Beidler, đại học Florida [4]. Chất miraculin là loại chất điều vị hứa hẹn nhiều triển vọng trong tương lai. Người ăn kiêng có thể ăn cả kilogram chanh mà vẫn thấy ngọt. Hơn nữa chất miraculin không chứa năng lượng nên sẽ là loại trái cây lý tưởng cho những người có nhu cầu muốn giảm cân, là chất có thể sử dụng thay thế cho các loại đường chứa nhiều năng

lượng hay là những chất ngọt nhân tạo có thể gây ra những tai biến cho người tiêu dùng. Loại quả đặc biệt này cũng được sử dụng như một chất làm ngọt để những người bị tiểu đường phải ăn kiêng có thể sử dụng các chất có hàm lượng calo thấp thay thế các chất ngọt có hàm lượng calo cao như đường ăn, tinh bột v.v. Nếu như người bệnh phải điều trị bằng những thứ thuốc đắng đến không thể chịu nổi thì có thể ăn một quả thần kỳ trước khi uống thuốc[11]. Bên cạnh đó cây thần kỳ có thể sử dụng như một loại cây cảnh tuyệt đẹp, cây cho quả sai, mọng, chín đỏ rực và được nhiều người rất ưa thích.

Cây thần kỳ từ Đài Loan được du nhập vào Việt Nam khoảng 5 năm trước. Có thể nói rằng đây là giống cây mới, quý và đang còn rất hiếm ở nước ta nên những nghiên cứu khoa học trên giống cây này còn rất hạn chế.

Xuất phát từ thực tiễn đó chúng tôi đã tiến hành điều tra và nghiên cứu một số đặc điểm sinh học, đặc điểm thích nghi của cây thần kỳ với điều kiện thổ nhưỡng, khí hậu ở Việt Nam để chọn ra vùng đất thích hợp và cho năng suất cao, định hướng cho việc sản xuất trên qui mô lớn. Khảo sát một số thành phần hoá sinh trong thịt trái và đề xuất phương pháp tách chiết miraculin nhằm tạo cơ sở cho những nghiên cứu về sau.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Trái *Synsepalum dulcificum* được thu tại vườn cây Minh Tân (05 Vườn Thuốc, Cây Đa, Tân Phú Trung, Củ Chi) và tại vườn cây thuộc xã An Bình – thị xã Vĩnh Long, trái chín đỏ, không sâu bệnh, dập nát, chọn quả to, đẹp, mẫu được hái ngay trên cây, bọc lại bằng giấy thấm, đựng vào hộp nhựa và nhanh chóng chuyển về phòng thí nghiệm bảo quản lạnh 1 – 4°C, trái *Synsepalum dulcificum* được tách lấy phần thịt trái cho vào chén sứ lớn đem sấy ở tủ sấy 40°C qua đêm (12 giờ). Sau đó lấy mẫu ra nghiền nhỏ trong cối sứ, rây bằng rây có kích thước lỗ 1 – 2 mm, được bột khô, mịn, có màu đỏ, bảo quản lạnh sử dụng trong các thí nghiệm.

2.2. Phương pháp

– Điều tra đặc điểm sinh học và đặc điểm sinh trưởng cây *Synsepalum dulcificum*

Khảo sát một số đặc điểm sinh học cây *Synsepalum dulcificum* và thời vụ thu hoạch trái được trồng tại TP. Hồ Chí Minh.

– Điều tra tình hình trồng trọt *Synsepalum dulcificum* ở một số tỉnh phía Nam

Chúng tôi đã tiến hành điều tra tình hình trồng trọt cây *Synsepalum dulcificum* về số lượng cây, nguồn gốc tại một số tỉnh phía Nam từ đó đánh giá sơ bộ về trữ lượng của nguyên liệu đang khảo sát.

– Xác định hàm lượng một số thành phần sinh hóa trong thịt quả

Chúng tôi tiến hành định lượng một số thành phần sinh hóa cơ bản trong thịt quả *Synsepalum dulcificum* bao gồm: đường tổng số hòa tan, đường khử, protein, đạm tổng số, khoáng tổng số.

– Khảo sát thành phần hóa học trong thịt quả *Synsepalum dulcificum*

Theo các phương pháp thông thường [1, 2, 9] chúng tôi đã tiến hành định tính sơ bộ các nhóm hợp chất có trong thịt quả bằng cách chiết thịt quả với các dung môi khác nhau, dịch

chiết sau đó được thử với các thuốc thử đặc trưng.

+ Alkaloid được xác định dựa vào phản ứng màu với thuốc thử Mayer, Wagner, Dragendof

+ Sterol được xác định dựa trên phản ứng màu với thuốc thử Liebermanm

+ Flavon được xác định dựa trên phản ứng Shinoda

+ Tannin được xác định bằng cách trung hòa dịch chiết với acetate Na sau đó thêm dung dịch FeCl_3 5%

+ Đường khử được xác định dựa trên phản ứng màu với thuốc thử Fehling

– Tách chiết và tinh chế miraculin một thành phần quan trọng trong thịt quả

15,58g thịt quả *S. dulcificum* được nghiền nhuyễn và đồng nhất trong 400ml nước trong 5 phút, dịch thu được đem ly tâm 13000 v/p trong 30 phút và thu cặn, chiết cặn này 3 lần với NaCl 0,5M mỗi lần 120ml, ly tâm dịch muối 13000 v/p trong 30 phút, tủa phân đoạn bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ đến bão hòa, ly tâm 13000 v/p trong 40 phút thu tủa, hòa tan tủa vào 50ml đệm KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 0,01M pH = 6,8 thu được dịch thô [9,11], dịch thô này được tiến hành tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion với nhựa RexynTM 101, cột (2 x 10cm), dung môi rửa giải là gradient nồng độ NaCl (0 – 1M) trong đệm KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 0,01M pH = 6,8, tốc độ dòng chảy 20ml/h, thể tích mỗi phân đoạn là 5ml. Các phân đoạn được đo ở bước sóng $\lambda = 280\text{nm}$ [10], mức độ tinh khiết được xác định bằng sắc ký bản mỏng silicagel 60F₂₅₄ trên hệ 3 dung môi [3], hiện màu bằng thuốc thử Coomassie Brilliant Blue, miraculin được xác định dựa vào đặc tính biến đổi vị chua của acid citric thành vị ngọt [8].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm sinh học và sinh trưởng cây *Synsepalum dulcificum*

Bảng 1. Các chỉ tiêu sinh trưởng

STT	Chỉ tiêu nghiên cứu	Đơn vị tính	Kết quả nghiên cứu
1	Thời gian gieo hạt đến nảy mầm	ngày	30
2	Thời gian nảy mầm đến lúc có 2 lá mầm	ngày	28
3	Thời gian từ khi nảy mầm đến có hoa	năm	3 – 3.5
4	Tốc độ tăng trưởng chiều cao/tháng	cm	2 -3
5	Từ khi xuất hiện nụ đến hoa đầu tiên nở	ngày	24-28
6	Thời gian nở hết một chùm hoa	ngày	6-7
7	Thời gian từ nở hoa đến chín trái	ngày	45-50
8	Độ vươn xa của rễ	cm	90-100

Bảng 2. Đặc điểm sinh học cây *Synsepalum dulcificum*

Bộ phận nghiên cứu	Kết quả nghiên cứu
Rễ	Rễ <i>Synsepalum dulcificum</i> thuộc loại rễ ăn nông, có rễ cái, đại bộ phận tập trung ở vùng 0 - 40cm, độ vươn xa của rễ khá rộng nếu được trồng ngoài tự nhiên, thường cách gốc khoảng từ 0 - 100cm, có nhiều rễ tơ. Sự phân bố của rễ còn phụ thuộc vào đất trồng.
Thân và tán	Đây là loại cây tiểu mộc nhỏ, phát triển rất chậm và có thể cao từ 1,2 - 1,5m nếu trồng trong chậu, cao 3,0 - 4,5m nếu trồng ngoài tự nhiên. Khoảng 10 năm cây mới có thể cao được 1,2 - 1,5m. Tán cây tạo thành hình chóp. Có một thân chính, 4-5 nhánh phụ .
Hoa	Hoa <i>Synsepalum dulcificum</i> nhỏ có màu trắng, mùi rất thơm, có lông tơ ở mặt ngoài, đường kính khi nở khoảng 0,3 – 0,5 mm. Cuống nhỏ dài 0,2-0,3mm. Đầu tiên ở nách lá xuất hiện mầm hoa, dần dần lớn lên thành nụ, trên một cành thường có 15 – 20 nụ ở nách lá, sau này nở thành hoa. Hoa mọc tập trung hay đơn độc từ nách lá ở gần ngọn nhánh. Hoa có cánh dính liền ở đáy. Cánh hoa chia làm 5 thùy, dính nhau ở đáy tạo thành hình ống. Hoa có 5 tiểu nhị thấp hơn rất nhiều với nướm nhụy cái, tiểu nhị dính chính diện với cánh hoa, bộ nhụy cái gồm bầu noãn, có một chỉ nhụy và một nướm mọc dài ra khỏi bao hoa, sau khi thụ tinh chỉ nhụy không bị tiêu biến đi mà tồn tại song song với sự phát triển của quả
Lá	Lá nguyên, dày, dài, bóng, mọc so le hay tạo thành chùm ở đầu các ngọn nhánh phụ, lá non màu xanh nhạt và đậm dần khi già. Lá xanh hàng niên, quanh năm không rụng lá và chỉ thường lá già mới rụng.
Quả	Chiều dài trung bình của quả khoảng từ 2- 3,5cm. Đường kính quả khoảng từ 1 – 1,8 cm. Trọng lượng quả khoảng từ 1 - 2g. Vỏ quả mỏng, có một lớp phấn trắng trên bề mặt. Khi quả còn non có màu xanh đậm nhưng khi chín quả có màu đỏ, mọng nước. Thịt quả khi chín có màu trắng, hơi nhớt, khi ăn lại có vị thanh chua. Mỗi quả chỉ có một hạt, hạt có dạng hình elip, kích thước từ 1,0 – 1,5 cm. Vỏ hạt cứng và gồm có 2 mặt, mặt trên trơn, mặt dưới nhám có đường xê dọc. Bên trong vỏ, hạt gồm hai tử diệp có màu xanh và áp sát, dính nhau ở cán phôi.

Qua bảng 1, cho thấy cây *Synsepalum dulcificum* sinh trưởng rất chậm thời gian từ khi nảy mầm đến lúc ra hoa là 3 – 3,5 năm nhưng đặc điểm quan trọng là hoa có thể ra quanh năm, trên cây hoa và trái thường song song tồn tại nên rất phù hợp cho việc canh tác

nhiều vụ trong năm. Khoảng 10 năm cây đạt chiều cao tối đa.

Qua mô tả trong bảng 2 cho thấy rằng cây *Synsepalum dulcificum* có hệ rễ khá phát triển, nhiều nhánh, kiểu dáng đẹp lại có trái thường xuyên, trên cây thường xuyên có trái chín đỏ rực nên trông rất đẹp mắt.



(A)



(B)



(C)

Hình 1. Minh họa đặc điểm sinh học cây *Synsepalum dulcificum* (A), Cây *Synsepalum dulcificum* 3 năm tuổi; (B), Hoa; (C), Quả

3.2. Tình hình trồng trọt *Synsepalum dulcificum* tại Việt Nam

Cây *Synsepalum dulcificum* có mặt ở Việt Nam vào năm 2006 do một thương gia người Đài Loan mang đến trồng tại quận Hóc Môn,

Tp Hồ Chí Minh và từ đó phong trào trồng cây này để cung cấp cho nhu cầu sử dụng làm cây cảnh phát triển rộng rãi. Chúng tôi đã ghi nhận được số lượng cây trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả điều tra về số lượng cây *Synsepalum dulcificum*

Địa điểm	Quận 12	Củ Chi	Hóc Môn	Xã An Bình (thị xã Vĩnh Long)
Số lượng cây	50	300	15000	3000

Qua điều tra về số lượng cây, chúng tôi nhận thấy rằng cây *Synsepalum dulcificum* được trồng còn rất ít, đa số là cây con, cây trưởng thành và đã có quả là rất ít. Nhiều nhất là ở huyện Hóc Môn với khoảng 15.000 cây. Vào năm 2006 tại xã An Bình – Thị xã Vĩnh Long đã phát triển và trồng cây *Synsepalum dulcificum* với quy mô lớn. Hiện nay đã có hơn 3.000 gốc và bắt đầu cho những vụ thu hoạch đầu tiên. Đây là giống cây mới vì vậy việc phổ

biến giống cây này có thể cần vài năm nữa mới đánh giá hết được tiềm năng của nó.

3.3. Kết quả định lượng một số thành phần sinh hóa cơ bản trong thịt quả

Bảng 4. Bảng tóm tắt thành phần sinh hoá cơ bản

Tên thành phần	Hàm lượng (g/100g nguyên liệu)
Hàm lượng nước	68,900
Đường tổng số hoà tan	2,385
Hàm lượng đường khử	0,404
Hàm lượng protein	0,104
Hàm lượng đạm tổng số	1,918
Khoáng tổng số	0,998

Theo kết quả thu được từ bảng 4, hàm lượng nước trong thịt quả khá cao 68,900 %, ngoài ra còn chứa nhiều saccharide và protein,

khoáng tổng số là 0,998% vì vậy có thể thấy rằng trong thành phần thịt quả rất có giá trị dinh dưỡng

Bảng 5. Thành phần hoá thực vật trong thịt trái *Synsepalum dulcificum*

Loại dung dịch chiết			Thuốc thử	Kết quả	Tên hợp chất
Dịch eter	Dịch cồn	Dịch acid			
+			Bốc hơi đến cạn và ngửi	Mùi thơm nhẹ	Tinh dầu
+			H ₂ SO ₄ dd	Màu vàng chuyển sang đỏ nâu	Carotenoid
+++			TT Lieberman	Có vòng ngăn cách	Phytosterol
+			Nhỏ dung dịch lên giấy và hơi khô	Có để lại vết mờ	Acid béo
-	-		KOH 10%	Giữ nguyên màu vàng	Antraglucosid
++	++		Mg và HCl dd	Có màu đỏ	Flavonoid
			Thuốc thử Mayer	Không có tủa	Alcaloid
-	-		TT Dragendorff	Không có tủa	
-	-		TT Bouchardat	Không có tủa	
	+++	+++	Na acetat và FeCl ₃ 3%	Màu đen	Polyphenol
	+	+	Na ₂ CO ₃	Có sủi bọt li ti	Acid hữu cơ
	-		TT Lieberman	Không màu	Sterolic
	±		KOH, HCl	Hơi đỏ, vàng	Anthocyanosid
	+++		Lắc mạnh	Có bọt, bền	Saponin
	+++		CHCl ₃ + Acetic acid, nhỏ từ từ H ₂ SO ₄ dd	Vòng phân cách màu xanh	Saponin steroid
	+++	+++	TT Fehling	Tủa đỏ gạch	Đường khử
		+++	Còn(C ₂ H ₅ OH) 90°	Tủa nhiều	Hợp chất Uronic

Ghi chú: (+) có biểu hiện; (++) biểu hiện rõ; (+++) biểu hiện rất rõ; (-) không biểu hiện; (±) nghi ngờ

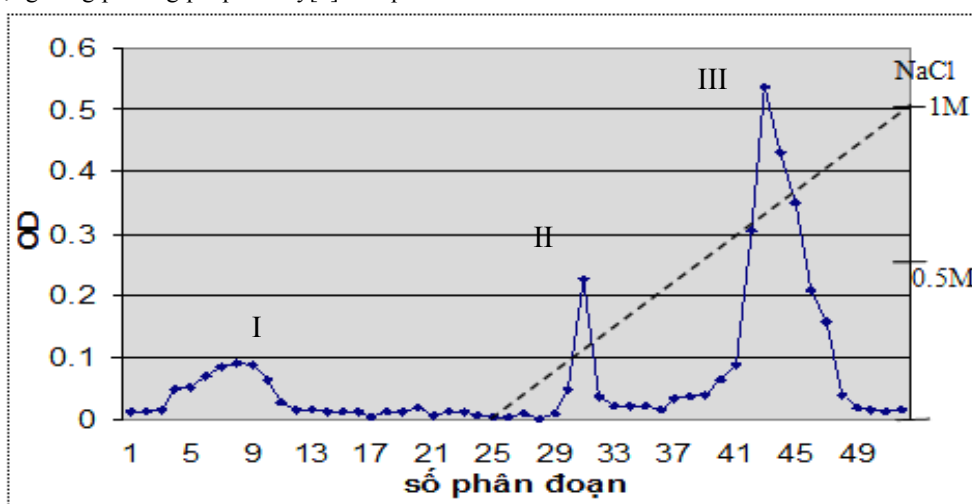
Qua số liệu trên bảng 5, chúng ta thấy rằng trong thịt quả *Synsepalum dulcificum* chứa rất nhiều hoạt chất khác nhau. Trong đó có các nhóm chất có thể sử dụng làm dược liệu như tinh dầu, flavonoid, polyphenol, saponin, để có hướng sử dụng hiệu quả những nhóm chất này cần tiếp tục nghiên cứu.

3.4. Tách chiết và tinh chế miraculin

Protein tổng số sau khi tủa bằng dung dịch dung dịch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ đến bão hoà được định lượng bằng phương pháp Lowry[7] kết quả thu

được 12066,615 (μg) protein, lượng protein này được hòa tan vào 50ml đệm $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 0,01M pH = 6,8 và tiến hành chạy sắc ký trao đổi ion, kết quả được thể hiện trong đồ thị.

Qua sắc ký trao đổi ion ta thu được 3 peak chính, peak I có được trước lúc rửa giải bằng gradient nồng độ NaCl là thành phần không được liên kết với nhựa trao đổi ion nên không phải là đối tượng quan tâm và bị loại bỏ vì lúc này lực ion chưa đủ mạnh để giải ly đối tượng đang được liên kết với nhựa trao đổi ion[9], peak I có được có thể là một loại protein khác. Peak II và III có thể là miraculin và được xác định qua sắc ký bản mỏng.



Hình 2. Các phân đoạn thu được qua sắc ký trao đổi ion

Bảng 6. Kết quả sắc ký bản mỏng các phân đoạn trên 3 hệ dung môi

Hệ dung môi	Benzen : cloroform 1 : 1			Cloroform:diethyl ether 6 : 4			Cloroform : methanol 9 : 1		
Phân đoạn chấm	Dạng thô	Peak II	Peak III	Dạng thô	Peak II	Peak III	Dạng thô	Peak II	Peak III
Rf	0,04	0,00	0,00	0,32 0,67	0,32	0,32	0,50 0,75 0,78	0,50	0,50

Với hệ dung môi gồm Benzen : cloroform (1:1) không có khả năng phân tách mẫu nhưng ở dạng thô có thể thấy được một vết với $R_f = 0,04$. Ở hệ 2 có thể đẩy mẫu ra khoảng giữa, dạng thô đã tách ra 2 vạch, peak II và III chưa thấy thêm vạch lạ. Ở hệ 3 có thể đẩy mẫu đi

khá xa và dạng thô xuất hiện thêm 1 vết lạ, ở peak II và III không thấy thêm vết lạ. Như vậy ở cả 3 hệ, peak II và III có R_f như nhau nên chúng tôi nhận định là một chất và không thấy thêm vết lạ nên peak II và III phân lập được là

khá tinh sạch và dạng thô có thể có nhiều hơn 3 loại protein

Với peak II và III để nhận định đây là miraculin chúng tôi đã thử hoạt tính bằng phương pháp cảm quan[4] thông qua đặc tính biến đổi vị chua của acid citric thành vị ngọt và chúng tôi đã ghi nhận được acid citric 0,1M có độ ngọt tương đương với dung dịch saccharose 0,4M

4.KẾT LUẬN

Về đặc điểm sinh học cây *S.dulcificum* có thân tiêu mộc, phát triển chậm, có nhiều nhánh phụ có thể uốn để tạo bonsai, thích hợp để làm kiểng. Lá xanh hàng niên, lá ít khi rụng. Phân tích hoa cho thấy hoa *S.dulcificum* mang những đặc điểm của những loài thuộc họ Sapotaceae. Quả chín màu đỏ, mọng nước. Hệ rễ khá phát

triển nếu trồng ngoài tự nhiên. Thích hợp trồng với khí hậu ở miền Nam Việt Nam.

Về diện tích và số lượng cây thì ở thành phố Hồ Chí Minh có khoảng 20.000 cây trong đó ở Hóc Môn là nhiều nhất với 15.000 cây.

Phân tích sơ bộ thành phần hóa học trong thịt quả cho thấy có chứa tinh dầu, carotenoid, phytosterol, acid béo, flavonoid, polyphenol, acid hữu cơ, saponin steroid, đường khử, hợp chất uronic. Thành phần sinh hóa có trong thịt quả gồm: nước 68,900%, đường tổng số hoà tan 2,385%, đường khử 0,404%, protein 0,104%, nitơ tổng số 1,918%, khoáng tổng số 0,998%.

Miraculin có thể tách chiết và tinh sạch theo cách đơn giản, sau khi tinh chế được ghi nhận là có khả năng làm cho acid citric trở nên ngọt tương đương dung dịch saccharose 0,4M.

PRELIMINARY RESULTS OF TRIAL CULTIVATION AND CHEMICAL ANALYSIS OF MIRACULIN FROM MIRACLE FRUIT (*SYNSEPALUM DULCIFICUM* DANIELL)

Tran Danh The, Vu Van Do, Ngo Ke Suong
Institute Of Tropical Biology, Ho Chi Minh City

ABSTRACT: In this study, some experiments were carried out in growing of miracle fruit under climate and soil conditions of Ho Chi Minh City. The agro-biological parameters are collected. The chemical analysis results showed that the essential oil, carotenoid, phytosterol, fatty acids, flavonoids, polyphenols, organic acids, saponin steroids, sugar reducing agent, uronic compounds all were present in the miracle fruits. The miraculin from miracle fruit which was extracted with 0.5M NaCl solution and purified by ion exchange chromatography (with Rexyn 101 resin) can change the citric acid into sweet taste (equivalent saccharose 0.4M). This particular trait will provide new opportunity for using miraculin in the pharmaceutical and food industries in the future.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Khắc Quỳnh Cừ, *Bài giảng chiết xuất dược liệu, bộ môn dược liệu*, Đại học Y – Dược TP. Hồ Chí Minh, trang 45 – 97, (1999).
- [2]. Nguyễn Văn Đán, Nguyễn Viết Tự, *Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc*, NXB Y học, trang 217 – 445, (1985).
- [3]. Nguyễn Kim Phi Phụng, *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, NXB. Đại Học Quốc Gia TP. Hồ Chí Minh, trang 247, (2007).
- [4]. Ngô [Thị Hồng Thư](#), *Kiểm nghiệm thực phẩm bằng phương pháp cảm quan*, NXB Khoa học và kỹ thuật, (1989).
- [5]. Beidler, L., and Kurihara, K. *Taste-Modifying Protein from Miracle Fruit*, Science, Vol. 161, September, (1968).
- [6]. Daniell WF, *On the Synsepalum dulcificum, De Cand or Miraculous berry Of Western Africa*. Pharmaceutical Journal, 1851–2, 11, pp. 445– 448, (1852).

- [7]. Kurihara, K., Kurihara, Y., and Beidler, L. M. *Olfaction and Taste III*, pp. 450-469, Rockefeller University Press, New York, (1969).
- [8]. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. J. BWZ. *Biochemical journal*. 193, 265-275,(1951).
- [9]. Noriko Takahashi, Hiromu Hitotsuya, Hiroyuki Hanzawa, Yoji Arata, and Yoshie Kurihara, *Structural Study of Asparagine-linked Oligosaccharide Moiety of Taste-modifying Protein, Miraculin*, University of Tokyo, Hongo, Tokyo, Japan (1989).
- [10]. Richard J.P Cannell, *Natural products isolation*, Humana Press, Totowa, New Jersey,(1998).
- [11]. Sarroch Theerasilp and Yoshie Kurihara, *Complete Purification and Characterization of the Taste-modifying Protein, Miraculin, from Miracle Fruit*, From the Department of Chemistry, Faculty of Education, Yokohama National University, Yokohama, Japan, (1988).
- [12]. The Wall Street Journal, Vol 74, Friday, March 30, (2007).