

## EFFECT OF ALKALINE HYDROLYSIS FACTORS ON ANTI-BACTERIAL ACTIVITY OF SOLUBLE LIGNIN DERIVED FROM *Annona Squamosa* Linn PEEL

Le Cong Tuan<sup>1</sup>, Le Duy Khuong<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>University of Sciences - Hue University, <sup>2</sup>School of Interdisciplinary studies and Arts - Vietnam National University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<b>Received:</b> 13/5/2024	This paper extracted the soluble lignin from dried <i>Annona Squamosa</i> Linn. peel and evaluated its antibacterial activity. The alkaline hydrolysis was used to break the insoluble-lignin structure to soluble lignin. To isolate the soluble lignin from hydrolysates, the pH adjustment method using concentrated H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> was applied. The precipitated lignin was then weighted and evaluated antibacterial activity. Factors affecting the extraction efficiency of alkaline hydrolysis were investigated, including NaOH concentrations of 1.25; 2.5; 3.75, and 5 g/L, temperatures of 25, 50, 75, 105 °C and extract times of 60, 90, 120, and 150. The results showed that all tested parameters significantly impacted the weight of lignin and its antibacterial ability. The optimal condition was NaOH concentration of 2.5 g/L, temperature of 75 °C, extract time of 90 minutes. In that optimal condition, 0.76 g of precipitated lignin was obtained. The highest diameters of the zone of inhibition on <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella typhi</i> was 288 mm and 303 mm, equivalent to 87.3% and 94.7% compared to the positive control, respectively. These results showed that the dried <i>Annona Squamosa</i> Linn peel is a potential source for antibacterial chemicals.
<b>Revised:</b> 10/6/2024	
<b>Published:</b> 11/6/2024	
<b>KEYWORDS</b>	
Anti-bacterial	
<i>Annona Squamosa</i> Linn	
Alkaline treatment	
Lignin	
Hydrolysis	

## ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC ĐIỀU KIỆN THỦY PHÂN KIỀM ĐẾN HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA LIGNIN HÒA TAN TỪ VỎ QUẢ NA *ANNONA SQUAMOSA* LINN

Lê Công Tuấn<sup>1</sup>, Lê Duy Khuong<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học - Đại học Huế, <sup>2</sup>Trường Khoa học liên ngành và Nghệ thuật - Đại học Quốc gia Hà Nội

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<b>Ngày nhận bài:</b> 13/5/2024	Nghiên cứu này được thực hiện để thu nhận lignin hòa tan từ vỏ quả Na và đánh giá khả năng kháng khuẩn của lignin thu nhận được. Phương pháp thủy phân bằng dung dịch kiềm loãng được sử dụng để phá hủy cấu trúc lignin trong thành phần chất xơ của thực vật, từ đó tạo ra lignin hòa tan trong dung dịch. Để tách chiết lignin hòa tan, phương pháp điều chỉnh pH sử dụng H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> được áp dụng. Kết tủa lignin sau khi được tách ra đem xác định khối lượng và đánh giá khả năng kháng khuẩn. Các yếu tố ảnh hưởng đến khối lượng kết tủa đã được khảo sát gồm; dãy nồng độ NaOH 1,25; 2,5; 3,75; 5 g/L, dãy nhiệt độ 25, 50, 75, 105 °C, và dãy thời gian phản ứng 60, 90, 120, 150 phút. Kết quả cho thấy các thông số khảo sát đều có ảnh hưởng đến khối lượng thu nhận kết tủa lignin và hoạt tính kháng khuẩn. Điều kiện tối ưu được lựa chọn là nồng độ NaOH 2,5 g/L, nhiệt độ 75 °C, thời gian 90 phút. Tại chế độ tối ưu thu được 0,76 g kết tủa lignin. Đường kính vòng kháng khuẩn <i>Escherichia coli</i> cao nhất là 288 mm, tương ứng với 87,3% so với đối chứng dương; trong khi đó với <i>Salmonella typhi</i> cao nhất đạt 303 mm, tương ứng 94,7% so với đối chứng dương. Kết quả này cho thấy vỏ quả Na là nguồn nguyên liệu tiềm năng để thu nhận các chất có hoạt tính kháng khuẩn.
<b>Ngày hoàn thiện:</b> 10/6/2024	
<b>Ngày đăng:</b> 11/6/2024	
<b>TỪ KHÓA</b>	
Hoạt tính kháng khuẩn	
<i>Annona squamosa</i> Linn.	
Tiền xử lý kiềm	
Lignin	
Thủy phân	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.10378>

\* Corresponding author. Email: leduykhuong@vnu.edu.vn

## 1. Đặt vấn đề

Quả Na (*Annona squamosa* Linn) là cây ăn quả có nguồn gốc từ khu vực châu Mỹ nhiệt đới. Trong chi *Annona*, đây là loài được trồng rộng rãi nhất trên thế giới do tính thích nghi cao. Đặc biệt, Na vô cùng thích hợp với khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới [1]. Na được trồng thương mại tại một số nước như Mỹ, Malaysia, Philipin. Trong số các loài thực vật ở Việt Nam, các cây thuộc họ Na được biết có 29 chi cùng khoảng 178 loài và 23 thứ [2]. Trong đó chi Na có bốn loài, với ba loài thường gặp ở dạng cây trồng: cây Na (*Annona squamosa* L.), Na xiêm (*Annona muricata* L.), bình bát (*Annona reticulata* L.) [2]. Do giá trị dinh dưỡng cao, Na không chỉ được sử dụng quả tươi mà còn được chế biến thành nhiều loại sản phẩm như nước ép, kẹo, trà, mứt. Tuy nhiên, những sản phẩm từ Na này chỉ sử dụng thịt quả chín để ép nước, nghiền bột, các phần như vỏ và hạt sẽ được loại bỏ trước khi chế biến, trở thành phế phẩm. Lượng phế phẩm này tích tụ lại nếu không có biện pháp xử lý hợp lý có thể gây ô nhiễm môi trường và lãng phí tài nguyên.

Vỏ quả Na có hàm lượng đường thấp, dao động trong khoảng 1-8% khối lượng. Chất xơ chiếm chủ yếu và dao động trong khoảng 35-85% khối lượng vỏ [3] - [5]. Chất xơ trong vỏ quả Na nói riêng và thực vật nói chung là các phân tử carbohydrate (monosaccharide hoặc polisaccharide) chiếm phần lớn khối lượng của chúng. Trong các phụ phẩm nông nghiệp, các thành phần có trong chất xơ cần chú ý đến là cellulose và lignin. Lignin là polymer nhóm carbohydrate có cấu trúc vòng thơm, có khối lượng phân tử lớn và không có công thức xác định, bao quanh cellulose, giúp ngăn cản vi sinh vật gây bệnh ở thực vật [6] - [8].

Trên thế giới và Việt Nam hiện nay, đã có một số nghiên cứu phân hủy lignin từ vật liệu lignocelluloses [6] - [8]. Các nguyên liệu lignocellulose được nghiên cứu xử lý lignin là rơm rạ, bã mía, lõi ngô cho mục tiêu sản xuất cồn nhiên liệu. Theo nghiên cứu của nhóm tác giả George, lignin được xử lý bằng NaOH 1% (w/v), sau đó sử dụng H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc để tạo điều kiện cho lignin kết tủa. Khi sử dụng phương pháp này có thể thu 48,3% lignin có trong nguyên liệu thô [9]. Với thành phần lignin có cấu trúc là các polymer thơm, do đó đã có nhiều nghiên cứu tách chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học từ lignin [10] - [12]. Hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất từ lignin bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác nhau, chẳng hạn như nguồn gốc hoặc phương pháp chiết xuất. Một số lignin được chiết xuất bằng các phương pháp khác nhau như lignin kraft, lignin thủy phân, organosol lignin [10] - [12]. Trong quy trình kraft, các vật liệu lignocellulose được xử lý bằng dung dịch NaOH và NaHS trong phạm vi nhiệt độ từ 150-170°C. Sau khi xử lý, các liên kết ether lignin bị phân cắt và lignin được chuyển thành các mảnh nhỏ, còn được gọi là lignin-hòa tan trong kiềm. Đối với phương pháp organosol, lignin được hòa tan trong dung môi hữu cơ (acetic acid, ceton và ester), organosol lignin rất tinh khiết, không chứa sulfuric và ít biến tính hơn [13].

Nhiều nghiên cứu trước đây đã sử dụng dung môi hữu cơ để chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học từ quả Na [14] - [22]. Tuy nhiên, hiện chưa có các nghiên cứu về điều kiện thủy phân vỏ quả Na thu nhận các hợp chất lignin và đánh giá hoạt tính sinh học của loại hợp chất này. Với các lý do nêu trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá một số điều kiện thủy phân vỏ quả Na bằng dung dịch NaOH đến khối lượng kết tủa lignin thu được và khả năng kháng khuẩn của kết tủa lignin từ vỏ quả Na.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

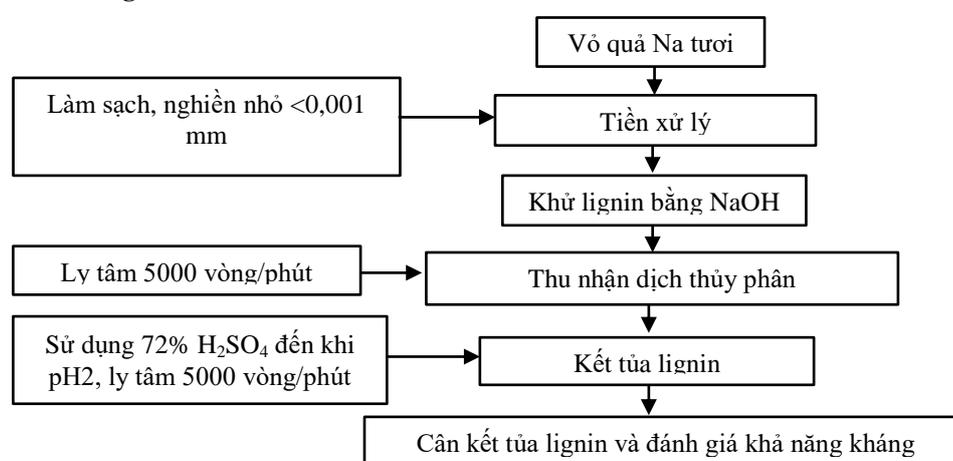
Vỏ quả Na được thu gom tại xã An Sinh, thị xã Đông Triều, tỉnh Quảng Ninh. Sau khi tách bỏ phần thịt quả còn sót lại, vỏ quả Na được rửa sạch, đun sôi bằng nước cất để loại bỏ phần đường còn sót lại và các tạp chất trong vỏ quả Na. Vỏ được sấy khô ở 70 °C và nghiền nhỏ đến kích thước < 0,01 mm. Vỏ quả Na sau quá trình tiền xử lý được trình bày trong hình 1, dạng bột có kích thước đồng đều, màu nâu nhạt. Vỏ quả Na được bảo quản trong túi zip cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Nguyên liệu vỏ quả Na trước và sau xử lý sơ bộ

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Thiết kế thí nghiệm



Hình 2. Thiết kế thí nghiệm

Vỏ quả Na sau khi tiền xử lý loại các tạp chất, nghiền nhỏ đến kích thước đồng đều được sử dụng để tiến hành thủy phân bằng dung dịch kiềm để khử lignin dạng cấu trúc sang dạng hòa tan trong dung dịch kiềm. Lignin được tách ra khỏi dung dịch kiềm qua quá trình acid hóa bằng  $H_2SO_4$ . Các bước tiến hành thí nghiệm được mô tả trong hình 2.

### 2.2.2. Khử lignin bằng kiềm

Phương pháp khử lignin bằng kiềm được thực hiện theo phương pháp của Rocha và cộng sự [9] có điều chỉnh một phần. Cân 10 g vỏ quả Na vào cốc thủy tinh 200 mL, thêm 100 mL dung dịch NaOH ở các nồng độ khác nhau (1,25; 2,5; 3,75; 5 g/L). Dùng đũa thủy tinh khuấy đều, sau đó tiến hành gia nhiệt ở các nhiệt độ khác nhau (25, 50, 75, 105 °C) trong các khoảng thời gian khác nhau (60, 90, 120, 150 phút) để phân hủy lignin. Sau khi kết thúc thời gian gia nhiệt, phần vỏ quả Na chưa bị thủy phân được tách ra khỏi dung dịch thủy phân bởi quá trình ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dung dịch thủy phân được bảo quản ở 4 °C cho quá trình kết tủa lignin.

### 2.2.3. Kết tủa lignin

Để thu nhận lignin hòa tan trong dung dịch thủy phân, phương pháp kết tủa sử dụng  $H_2SO_4$  đậm đặc được tiến hành [9]. Dung dịch thủy phân được thêm vào acid  $H_2SO_4$  98% cho đến khi pH dung dịch đạt khoảng pH = 2. Lignin kết tủa được tách ra bởi quá trình ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó rửa kết tủa 6 lần sử dụng 100 mL nước cất đến khi pH đạt khoảng 6. Lignin sau khi được rửa sạch đem sấy khô ở 70 °C và cân xác định khối lượng. Lignin được bảo quản ở nhiệt độ 4 °C cho các nghiên cứu tiếp theo.

### 2.2.4. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

Các chủng vi khuẩn chỉ thị *Escherichia coli* (ATCC 25922) và *Salmonella typhi* (MTCC 3216) được nuôi cấy trong 10 mL môi trường dinh dưỡng Luria Bertani (LB) đã thanh trùng, nhiệt độ nuôi ở 37 °C trong 16-18 giờ. Lấy 1 mL dịch nuôi cấy vi khuẩn trải đều trên bề mặt đĩa petri có môi trường thạch agar Mueller Hinton Agar (MHA). Sau đó, đục giếng thạch đường kính 6 mm trên đĩa petri. Sử dụng micropipette hút 25  $\mu$ L lignin hòa tan trong dimethyl sulfoxide (DMSO) hoặc đệm  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  pH = 8 vào giếng thạch. DMSO được sử dụng là mẫu đối chứng âm. Chất kháng sinh chuẩn Ampicillin được lựa chọn là mẫu đối chứng dương. Các đĩa petri được nuôi ẩm ở 37 °C trong 24 giờ. Đường kính vòng kháng khuẩn (đơn vị mm) được đo và ghi chép lại.

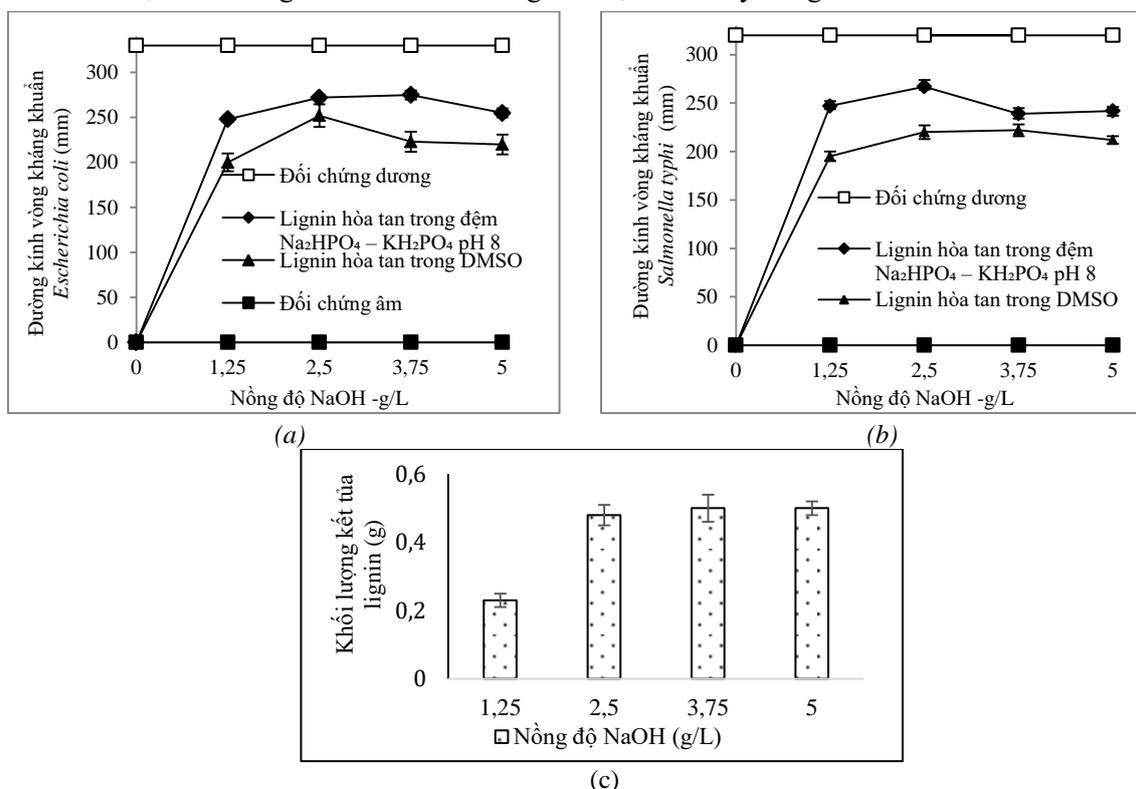
### 2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu và kết quả trong nghiên cứu này được xử lý và phân tích thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2007. Số lần lặp lại cho mỗi thông số phân tích là n=3.

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH

Cân 10 g vỏ quả Na vào bình thủy tinh chứa 100 mL dung dịch NaOH ở các nồng độ 1,25; 2,5; 3,75; 5 g/L, tương đương tỷ lệ rắn/lỏng 1/10. Sau khi khuấy đều vỏ Na được tiến hành xử lý nhiệt ở 30 °C trong thời gian 60 phút. Tiếp theo, sử dụng giấy lọc để phân tách dung dịch và bã vỏ quả Na sau xử lý. Dung dịch thu nhận sau khi lọc được chuẩn độ đến pH = 2 bằng  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98% và ly tâm 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút để tách kết tủa. Sau đó, kết tủa được rửa bằng nước cất đến khi pH bằng 7. Sau đó, kết tủa được sấy khô và cân xác định khối lượng thu được, thể hiện trong hình 3c. Hoạt tính kháng khuẩn của kết tủa lignin được trình bày trong hình 3a và 3b.



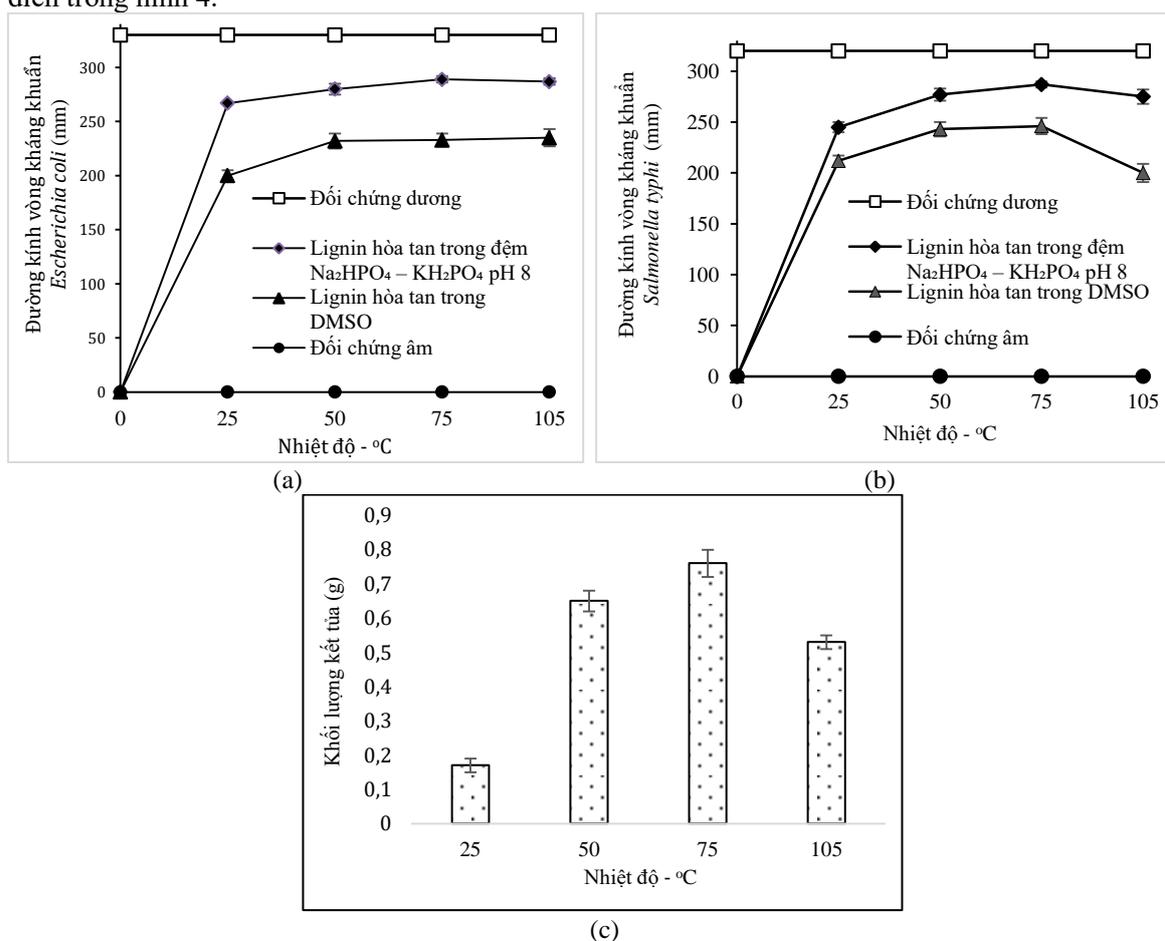
**Hình 3.** Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến: (a) khả năng kháng *E. coli*, (b) khả năng kháng *S. typhi*, (c) khối lượng kết tủa lignin

Từ hình 3c cho thấy, khối lượng bột kết tủa thu nhận tỷ lệ thuận với nồng độ NaOH. Bột kết tủa thu được tăng từ 0,23 g tới 0,5 g tương ứng với nồng độ NaOH tăng từ 1,25 đến 3,75 g/L. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ NaOH từ 2,5 g/L đến 5 g/L, khối lượng lignin tăng không đáng kể.

Để đánh giá khả năng kháng khuẩn của bột kết tủa, cân 20 mg kết tủa lignin vào ống eppendorf 1,5 mL chứa 600  $\mu$ L dung dịch DMSO và dung dịch đệm  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  pH = 8. Dùng sóng siêu âm đánh tan bột lignin và sử dụng để thử khả năng kháng khuẩn trên *Escherichia coli* và *Salmonella typhi*. Kết tủa lignin trong DMSO có khả năng kháng khuẩn thấp hơn so với pha trong đệm  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  pH = 8. Lignin tan tốt hơn trong đệm  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  pH = 8, đây có thể là 1 trong các nguyên nhân giúp lignin hòa tan trong đệm kháng khuẩn tốt hơn. Tuy nhiên, vẫn cần có các nghiên cứu sâu hơn. Kết quả hình 3a và 3b cho thấy đường kính vòng kháng khuẩn *E.coli* và *S.typhi* cao nhất tương ứng ở nồng độ NaOH 3,75 g/L, đạt 275 mm, và 2,5 g/L, đạt 267 mm, khi kết tủa lignin hòa tan trong đệm  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  pH = 8. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ NaOH 2,5 g/L lên 3,75 g/L thì khả năng kháng khuẩn thay đổi không đáng kể. Do đó, nồng độ NaOH 2,5 g/L được sử dụng cho những thí nghiệm tiếp theo.

### 3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân

Cân 10 g vỏ quả Na vào bình thủy tinh chứa 100 mL dung dịch NaOH ở nồng độ 2,5 g/L, tỷ lệ rắn/lỏng 1/10. Sau đó, tiến hành xử lý nhiệt vỏ quả Na ở các khoảng nhiệt độ  $T = [25, 50, 75, 105]$  °C trong 60 phút. Kết quả khối lượng kết tủa lignin và khả năng kháng khuẩn được biểu diễn trong hình 4.



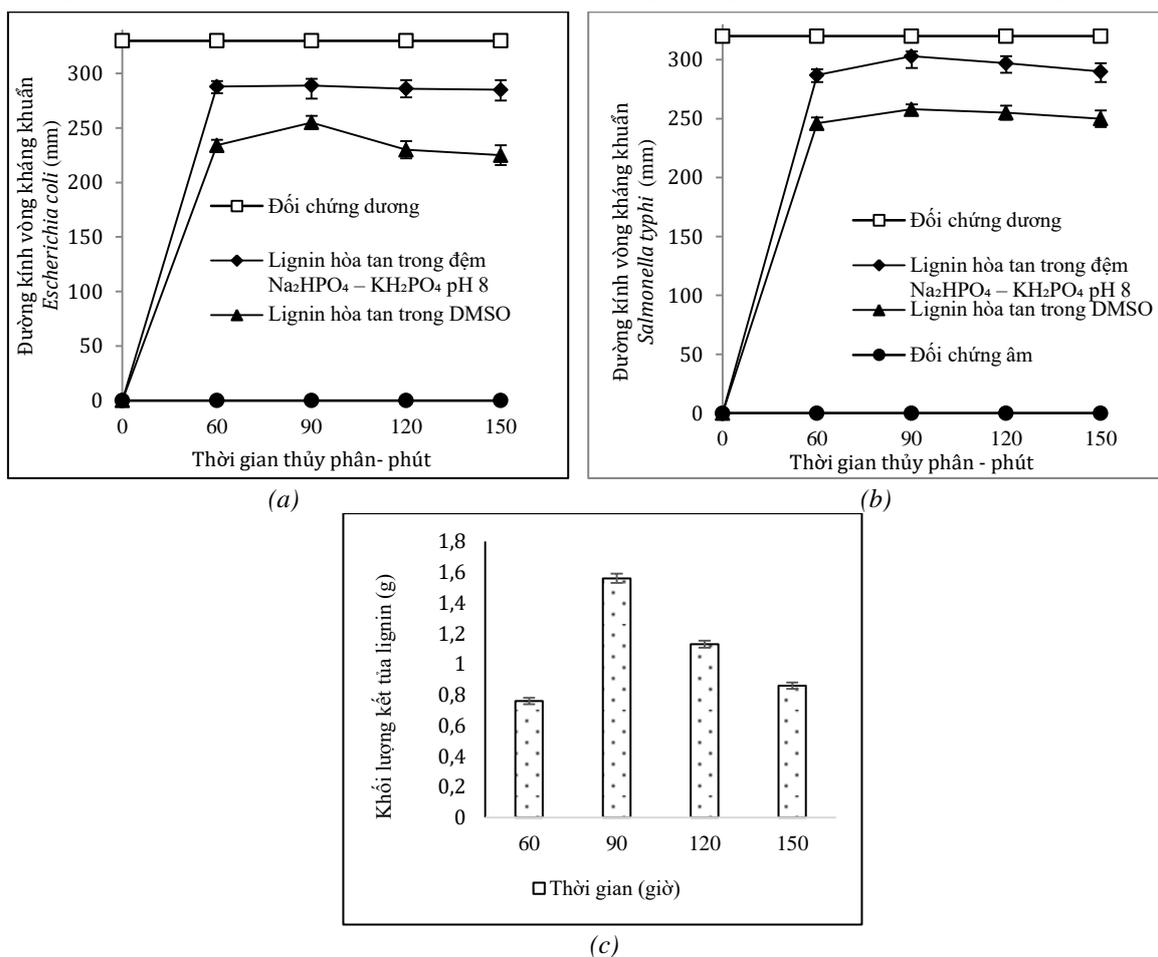
**Hình 4.** Ảnh hưởng của nhiệt độ NaOH đến: (a) khả năng kháng *E. coli*, (b) khả năng kháng *S. typhi*, (c) khối lượng kết tủa lignin

Hình 4c cho thấy khối lượng bột vỏ quả Na bị thủy phân tăng dần theo sự gia tăng của nhiệt độ. Khối lượng kết tủa cao nhất thu được tại nhiệt độ 75 °C đạt giá trị 0,76 g. Trong khoảng nhiệt độ từ 25-75 °C, khối lượng kết tủa lignin thu được có xu hướng gia tăng từ 0,17-0,76 g. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng từ 75 °C lên 100 °C thì khối lượng kết tủa lignin thu được giảm mạnh đạt 0,53 g.

Cân 20 mg bột kết tủa vào ống eppendorf có chứa 600  $\mu$ L dung dịch DMSO và dung dịch đệm  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  pH = 8. Dịch pha được mang đi thử khả năng kháng khuẩn *E.coli* và *S.typhi*. Kết quả hình 4a và 4b cho thấy kết tủa lignin pha trong dung dịch đệm  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  pH = 8 có khả năng kháng khuẩn cao hơn khi pha trong DMSO. Đường kính vòng kháng khuẩn *Escherichia* đạt cao nhất là 289 mm ở chế độ thủy phân ở nhiệt độ 75 °C, đạt 87,5% so với đối chứng dương Ampicillin nồng độ 0,15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (330 mm). Tương tự khả năng kháng *E. coli*, ở chế độ khử lignin với nhiệt độ 75 °C, đường kính vòng kháng khuẩn *Salmonella* cao nhất là 297 mm, đạt 92% so với đối chứng dương. Do đó, nhiệt độ 75 °C được chọn để tiến hành thí nghiệm tiếp theo.

### 3.3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý kiềm

Cân 10 g vỏ quả Na vào cốc thủy tinh chứa 100 mL dung dịch NaOH ở nồng độ 2,5 g/L, tỷ lệ NaOH/bột vỏ quả Na là 1/10. Nhiệt độ thủy phân được cố định ở 75 °C trong các khoảng thời gian  $t = [60, 90, 120, 150]$  phút. Thí nghiệm được tiến hành tương tự như trong mục 3.1 và 3.2. Kết quả xác định khối lượng kết tủa lignin và khả năng kháng khuẩn được trình bày trong hình 5.



Hình 5. Ảnh hưởng của yếu tố thời gian đến: (a) khả năng kháng *E. coli*, (b) khả năng kháng *S. typhi*, (c) khối lượng kết tủa lignin

Hình 5c cho thấy khối lượng kết tủa lignin tăng lên khi kéo dài thời gian từ 60 đến 90 phút. Từ 90 đến 150 phút khối lượng kết tủa thu được giảm. Kết quả cho thấy khi thời gian xử lý kiềm kéo dài có thể phá hủy cấu trúc lignin. Khối lượng kết tủa cao nhất đạt được sau 90 phút khử lignin là 1,56 g.

Tiếp theo, cân 20 mg bột kết tủa của từng mẫu thí nghiệm vào ống eppendorf chứa 600  $\mu$ L dung dịch DMSO và dung dịch đệm  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  pH = 8. Dịch pha được đánh giá khả năng kháng khuẩn *E. coli* và *S. typhi*. Hình 5a và 5b cho thấy đường kính vòng kháng khuẩn *E. coli* cao nhất là 288 mm khi thời gian khử lignin là 60 phút, đối với *S. typhi* là 90 phút, với đường kính vòng kháng khuẩn là 303 mm, đạt 94,7% so với đối chứng dương Ampicillin nồng độ 0,15  $\mu\text{g/mL}$  (320 mm). Kết quả cho thấy, sau 60 phút khử lignin hiệu quả kháng khuẩn thay đổi không đáng kể, tuy nhiên từ 60 lên 90 phút làm tăng khối lượng kết tủa lignin đáng kể. Kết quả này cho thấy khối lượng lignin thu được không tỷ lệ thuận với khả năng kháng khuẩn. Khi kéo dài thời gian từ 60 đến 90 phút, một số cấu trúc lignin có hoạt tính kháng khuẩn có thể bị phá vỡ làm cho hoạt tính kháng khuẩn bị giảm. Vì vậy, dù tăng khối lượng lignin nhưng không làm tăng khả năng kháng khuẩn. Do đó, thời gian khử lignin tối ưu là 90 phút.

Từ những kết quả nghiên cứu trên, có thể kết luận rằng, nhiệt độ 75 °C, thời gian 90 phút và nồng độ NaOH bằng 2,5 g/L sẽ là các giá trị tối ưu khi thực hiện xử lý bột vỏ quả Na (*Annona squamosa* Linn.) bằng phương pháp Nhiệt-Kiểm cho mục tiêu thu khối lượng kết tủa lignin và khả năng kháng khuẩn.

#### 4. Kết luận

Kết quả của nghiên cứu đã xác định được chế độ tối ưu cho mục tiêu khử và thu nhận lignin từ vỏ quả Na (*Annona squamosa* Linn.) bằng phương pháp thủy phân với dung dịch NaOH. Chế độ tối ưu bao gồm nồng độ NaOH là 2,5 g/L, thời gian xử lý 90 phút và nhiệt độ là 75 °C. Khả năng kháng khuẩn *Escherichia coli* và *Salmonella typhi* của kết tủa lignin phụ thuộc vào điều kiện khử lignin. Vỏ quả Na là nguồn cung cấp tiềm năng các hoạt chất nhờ quá trình phân hủy lignin bằng kiềm. Kết quả của nghiên cứu này là bước đầu để mở ra các nghiên cứu tiếp theo nhằm hướng tới khai thác các hoạt chất có trong vỏ quả na và các vật liệu giàu lignin khác.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] F. T. C. Souza *et al.*, "Production of nutritious flour from residue custard apple ( $\mu\text{L}$ ) for the development of new products," *Journal of Food Quality*, vol. 2018, 2018, Art. no. 5281035, doi: 10.1155/2018/5281035.
- [2] B. T. M. Nguyet, "Research on the chemical composition and biological activities of *Annona squamosa* L. and *Melodoum fruticosum* Lour. of the Annonaceae family in Vietnam," (In Vietnamese), PhD thesis, Vinh University, 2014.
- [3] S. E. L. M. Chimbevo, "Preliminary screening of nutraceutical potential of fruit pulp, peel and seeds from *Annona squamosa* (L.) and *Annona muricata* (L.) growing in coast region of Kenya," *American Journal of BioScience*, vol. 7, no. 3, pp. 1-70, 2019, doi: 10.11648/j.ajbio.20190703.11.
- [4] M. G. Shehata, M. M. Abu-Serie, N. M. A. El-Aziz, and S. A. El-Sohaimy, "Nutritional, phytochemical, and in vitro anticancer potential of sugar apple (*Annona squamosa*) fruits," *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 62-24, Mar. 18, 2021.
- [5] J. S. K. Shardul, K. Prajakta, T. Prafullachandra, P. Santosh, and R. Arun, "Proximate Analysis of Peel and Seed of *Annona Squamosa* (Custard Apple) Fruit," *Research Journal of Chemical Sciences*, vol. 3, no. 2, pp. 92-94, 2013.
- [6] L. D. Khuong *et al.*, "Effect of chemical factors on integrated fungal fermentation of sugarcane bagasse for ethanol production by a white-rot fungus, *Phlebia* sp. MG-60," *Bioresource Technology*, vol. 167, pp. 33-40, 2014.
- [7] L. D. Khuong, R. Kondo, R. De Leon, T. K. Anh, K. Shimizu, and I. Kamei, "Bioethanol production from alkaline-pretreated sugarcane bagasse by consolidated bioprocessing using *Phlebia* sp. MG-60," *International Biodeterioration Biodegradation*, vol. 88, pp. 62-68, 2014.

- [8] C. L. Tri, L. D. Khuong, and I. Kamei, "Butanol production from alkaline pretreated bamboo using co-culture of wood-rotting fungus *Phlebia* sp. MG-60-P2 and bacterium *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*," *Biomass Conversion Biorefinery*, pp. 1-8, 2023, doi: 10.1007/s13399-023-04320-8.
- [9] G. J. Rocha, C. Martín, V. F. D. Silva, E. O. Gómez, and A. R. Gonçalves, "Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification," *Bioresource Technology*, vol. 111, pp. 447-452, 2012.
- [10] A. Barapatre, A. S. Meena, S. Mekala, A. Das, and H. Jha, "In vitro evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of lignin fractions extracted from *Acacia nilotica*," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 86, pp. 443-453, 2016.
- [11] G. Vazquez-Olivo, L. X. López-Martínez, L. Contreras-Angulo, and J. B. Heredia, "Antioxidant capacity of lignin and phenolic compounds from corn stover," *Waste Biomass Valorization*, vol. 10, pp. 95-102, 2019.
- [12] O. Yu and K. H. Kim, "Lignin to materials: A focused review on recent novel lignin applications," *Applied Sciences*, vol. 10, no. 13, p. 4626, 2020.
- [13] F. C. Lobo, A. R. Franco, E. M. Fernandes, and R. L. Reis, "An overview of the antimicrobial properties of lignocellulosic materials," *Molecules*, vol. 26, no. 6, p. 1749, 2021.
- [14] R. Saha, "Pharmacognosy and pharmacology of *Annona squamosa*," *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, vol. 2, pp. 1183-1189, 2011.
- [15] M. M. Rahman, S. Parvin, M. E. Haque, M. E. Islam, and M. A. Mosaddik, "Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa*," *Fitoterapia*, vol. 76, no. 5, pp. 484-489, 2005.
- [16] J. Kumar, T. Rekha, S. Devi, M. Kannan, A. Jaswanth, and V. Gopal, "Insecticidal activity of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa*," *Journal of Chemical Pharmaceutical Research*, vol. 2, no. 5, pp. 177-180, 2010.
- [17] R. Vijayalakshmi and T. Nithiya, "Antimicrobial activity of fruit extract of *Annona squamosa* L.," *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 4, pp. 1257-1267, 2015.
- [18] S. Hemalatha, P. Amudha, N. P. Bharathi, and V. Vanitha, "Determination of bioactive phytochemicals from hydroethanolic extract of *Annona squamosa* (Linn.) Leaf By Gc-MS," *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 8, no. 6, pp. 2539-2544, 2017.
- [19] G. A. El-Chaghaby, A. F. Ahmad, and E. S. Ramis, "Evaluation of the antioxidant and antibacterial properties of various solvents extracts of *Annona squamosa* L. leaves," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 7, no. 2, pp. 227-233, 2014.
- [20] S. Roy and P. Lingampeta, "Solid wastes of fruits peels as source of low cost broad spectrum natural antimicrobial compounds-furanone, furfural and benzenetriol," *International Journal of Research in Engineering and Technology*, vol. 3, no. 7, pp. 273-279, 2014.
- [21] V. Kothari and S. Seshadri, "In vitro antibacterial activity in seed extracts of *Manilkara zapota*, *Annona squamosa*, and *Tamarindus indica*," *Biological research*, vol. 43, no. 2, pp. 165-168, 2010.
- [22] G. H. F. Viera, J. A. Mourão, Â. M. Ângelo, R. A. Costa, and R. H. S. D. F. Vieira, "Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 52, pp. 129-132, 2010.