

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG ENZYME THỦY PHÂN TRONG CHIẾT XUẤT HỢP CHẤT SINH HỌC CÓ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA TỪ LÁ VỐI (*CLEISTOCALYX OPERCULATUS*)

STUDY ON THE APPLICATION OF HYDROLYTIC ENZYMES FOR THE EXTRACTION OF ANTIOXIDANT BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *CLEISTOCALYX OPERCULATUS* LEAVES

Vũ Đình Giáp^{1,*}, Đỗ Hữu Nghị²

DOI: <https://doi.org/10.57001/huinh5804.2026.180>

TÓM TẮT

Lá vối (*Cleistocalyx operculatus*) phân bố rộng rãi tại Việt Nam và được biết đến là nguồn giàu các hợp chất sinh học quan trọng, bao gồm axit phenolic, flavonoid, cùng một số vitamin và khoáng chất có hoạt tính chống oxy hóa mạnh. Nhờ khả năng trung hòa các gốc tự do, những hợp chất này góp phần bảo vệ tế bào, giảm nguy cơ lão hóa, viêm nhiễm và các bệnh lý tim mạch. Nhiều nghiên cứu cũng ghi nhận rằng cao chiết lá vối có tiềm năng trong kiểm soát đường huyết, kháng khuẩn và hỗ trợ tiêu hóa, qua đó mở ra triển vọng ứng dụng trong sản xuất thực phẩm chức năng và dược phẩm. Trong nghiên cứu này, các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất hợp chất sinh học từ lá vối, bao gồm thời gian, pH, nhiệt độ và hoạt độ enzyme đã được khảo sát. Kết quả cho thấy cao chiết thu được từ quá trình xử lý bằng enzyme có hàm lượng phenolic tổng số (TPC) và hoạt tính chống oxy hóa cao hơn đáng kể so với mẫu đối chứng sử dụng enzyme bất hoạt. Điều kiện chiết xuất thích hợp được xác định là 45°C, pH 5,5, tỷ lệ rắn/lỏng 1:20, thời gian 24 giờ, cùng với hoạt độ cellulase và pectinase ở mức 150 U/gds/E. Ở điều kiện này, tổng hàm lượng TPC và khả năng chống oxy hóa đạt giá trị cao nhất, lần lượt là 25,94mg GAE/gds và 57,89%. Những kết quả này khẳng định rằng phương pháp chiết xuất có hỗ trợ enzyme thủy phân là một tiếp cận hiệu quả để thu nhận các hợp chất sinh học từ lá vối. Kỹ thuật này không chỉ cải thiện hiệu suất chiết xuất mà còn góp phần bảo toàn các hoạt chất có giá trị, từ đó tăng cường tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và sản xuất sản phẩm chức năng.

Từ khóa: Hợp chất phenolic, hoạt tính chống oxy hóa, lá vối, *cleistocalyx operculatus*, enzymes thủy phân.

ABSTRACT

Cleistocalyx operculatus is widely distributed in Vietnam and is rich in important bioactive compounds such as phenolic acids, flavonoids, and various essential vitamins and minerals, all of which possess strong antioxidant activities. These compounds help neutralize free radicals, protect cells, and prevent aging, inflammation, and cardiovascular diseases. Previous studies have shown that *C. operculatus* leaf extract possesses hypoglycemic, antibacterial, and digestive-improving properties. Due to these health-promoting effects, *C. operculatus* leaf hold great potential for application in the development of functional foods and pharmaceuticals. In this study, the factors affecting the extraction of bioactive compounds from *C. operculatus* leaves, including time, pH, temperature, and enzyme activity, were investigated. The results showed that the dry extract obtained by enzyme treatment had significantly higher phenolic content (TPC) and antioxidant activity than the control samples (inactivated enzyme). The optimal extraction conditions were determined to be 45°C, pH 5.5, solid/liquid ratio of 1:20, for 24 hours, cellulase and pectinase activities (150 U/gds/E). Under these conditions, the total TPC content and antioxidant capacity reached the highest values, 25.94mg GAE/gds and 57.89%, respectively. This study confirmed that the extraction method assisted by hydrolytic enzymes is an effective approach to recover biological compounds from *C. operculatus* leaves. This technique not only improves extraction efficiency but also helps preserve valuable active ingredients, opening up potential applications in the food, pharmaceutical and functional product industries.

Keywords: Phenolic compounds, antioxidant activity, *cleistocalyx operculatus*, hydrolyzing enzymes.

¹Viện Công nghệ - HaUI, Đại học Công nghiệp Hà Nội

²Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Email: giapvudinh@gmail.com; giapvd@hauai.edu.vn

Ngày nhận bài: 15/01/2026

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 25/3/2026

Ngày chấp nhận đăng: 29/6/2026

1. GIỚI THIỆU

Axit phenolic là một nhóm polyphenol đặc trưng bởi cấu trúc vòng thơm gắn nhóm hydroxyl và carboxyl, phân bố phổ biến trong thực vật. Tổng hàm lượng hợp chất phenolic (TPC) đại diện cho toàn bộ lượng phenolic trong mẫu sinh học, bao gồm axit phenolic, flavonoid, tannin, lignin và các hợp chất liên quan. Các polyphenol này có nguồn gốc chủ yếu từ thực vật và được tìm thấy nhiều trong trái cây, rau củ, ngũ cốc nguyên hạt, trà, cà phê và một số loại đồ uống lên men. Nhờ đặc tính chống oxy hóa mạnh và khả năng chống viêm, polyphenol được xem là nhóm hợp chất sinh học quan trọng trong phòng ngừa và hỗ trợ điều trị các bệnh lý mãn tính như bệnh tim mạch, tiểu đường, rối loạn chuyển hóa và ung thư [1]. Lá vối là dược liệu quen thuộc trong y học cổ truyền Việt Nam, và các nghiên cứu hiện đại đã khẳng định rằng lá vối chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt là các polyphenol như flavonoid, tannin và axit phenolic. Nhờ đặc tính chống oxy hóa và chống viêm, các hợp chất này góp phần giải thích cơ chế tác dụng sinh học của lá vối trong hỗ trợ tiêu hóa, điều hòa đường huyết và phòng ngừa các bệnh liên quan đến stress oxy hóa. Nhiều nghiên cứu cho thấy các polyphenol trong lá vối có khả năng trung hòa gốc tự do, ức chế quá trình viêm và cải thiện chức năng tim mạch [2]. Tương tự, hàm lượng polyphenol đáng kể cũng được ghi nhận trong lá của cây *Syzygium nervosum*, một loài khác thuộc họ Myrtaceae, phân bố tại nhiều vùng nhiệt đới [3]. Những bằng chứng này cho thấy tiềm năng ứng dụng lớn của các loài cây bản địa trong phát triển sản phẩm thực phẩm chức năng và dược phẩm có nguồn gốc tự nhiên.

Việt Nam được ghi nhận là một trong những quốc gia có mức độ đa dạng sinh học cao trên thế giới, với hệ sinh giới phong phú bao gồm hàng chục nghìn loài sinh vật, trong đó có khoảng 12.000 loài thực vật bậc cao và hơn 2.200 loài nấm đã được thống kê [4]. Nhiều loài nấm trong số này có khả năng tiết ra các enzyme ngoại bào mang hoạt tính thủy phân mạnh như cellulase, pectinase và một số enzyme phân giải polysaccharide khác. Các enzyme này đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân giải lignocellulose, thành phần cấu trúc chủ yếu của thành tế bào thực vật, qua đó giải phóng các hợp chất hữu cơ có hoạt tính sinh học, góp phần mở rộng khả năng ứng dụng trong các lĩnh vực y dược, công nghệ sinh học và xử lý sinh khối. Trong quá trình chiết xuất hợp chất sinh học từ lá vối, đặc biệt là tổng hàm lượng hợp chất phenolic, các enzyme thủy phân như cellulase và

pectinase được sử dụng nhằm phân giải các polysaccharide cấu trúc của thành tế bào thực vật (cellulose, hemicellulose và pectin). Sự phân giải này giúp phá vỡ cấu trúc vách tế bào, từ đó giải phóng hiệu quả các hợp chất phenolic bị liên kết hoặc bị giữ trong mạng lưới lignocellulose. Cellulase xúc tác sự phân giải cellulose thành các đường đơn và oligosaccharide, từ đó phá vỡ cấu trúc lignocellulose và tạo điều kiện thuận lợi cho việc giải phóng các hợp chất phenolic [5]. Trong khi đó, pectinase phân giải pectin, thành phần chính của lớp trung gian vách tế bào, đặc biệt phổ biến trong mô thực vật mềm. Hoạt động của pectinase làm mềm và phá vỡ tính toàn vẹn của mô, hỗ trợ đáng kể quá trình tách chiết các hợp chất phenolic. Trong nghiên cứu này, việc kết hợp cellulase và pectinase nhằm tối ưu quá trình thu hồi các hợp chất phenolic có hoạt tính sinh học từ lá vối. Sự phối hợp giữa hai enzyme không chỉ cải thiện hiệu suất chiết xuất và nâng cao hàm lượng các hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa mà còn giúp giảm sự phụ thuộc vào các phương pháp xử lý hóa học mạnh, qua đó mang lại quy trình thân thiện với môi trường và an toàn hơn cho sức khỏe.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Lá vối (*Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr. & Perry) được thu mua tại chợ Minh Khai, phường Tây Tựu, Hà Nội. Mẫu nghiên cứu được chọn là lá vối bánh tẻ từ cây trưởng thành, không quá non cũng không quá già, có màu xanh đậm, bề mặt nguyên vẹn, không bị sâu bệnh hay dập nát. Ngay sau khi thu mua, lá được loại bỏ cành và cuống, rửa sạch nhiều lần bằng nước máy và tráng lại bằng nước cất nhằm loại bỏ bụi bẩn, tạp chất và vi sinh vật bám trên bề mặt. Mẫu lá sau đó được để ráo ở nhiệt độ phòng trong khoảng 1 giờ trước khi tiến hành sấy. Quá trình sấy được thực hiện bằng tủ sấy đối lưu ở $60 \pm 2^\circ\text{C}$ cho đến khi mẫu đạt khối lượng không đổi (khoảng 48 giờ). Mẫu sấy khô được nghiền bằng máy nghiền inox và rây qua sàng 0,5mm để thu được bột đồng nhất.

Bột lá vối sau khi nghiền được đóng gói trong túi PE hút chân không. Mẫu được lưu trữ tại phòng thí nghiệm Viện Công nghệ - HaUI, Đại học Công nghiệp Hà Nội, trong điều kiện khô thoáng, tránh ẩm và hạn chế tiếp xúc với ánh sáng trực tiếp. Hai enzyme được sử dụng trong nghiên cứu gồm cellulase (hoạt độ riêng 10.000U/g) và pectinase (5.000U/g) do hãng Novozymes (Đan Mạch) cung cấp. Cả hai enzyme đều có khoảng nhiệt độ hoạt động tối ưu 40 - 45°C và pH tối ưu 5,5.

2.2. Xác định điều kiện thích hợp tách chiết TPC bằng enzyme thủy phân

Mẫu bột lá vối (5,0g cho mỗi thí nghiệm) được hòa trong dung dịch đệm 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) 100mM, pH 5,0, với tỷ lệ rắn/lỏng 1:20 (w/v). Hỗn hợp sau đó được xử lý bằng sóng siêu âm ở 50°C trong 30 phút nhằm phá vỡ cấu trúc tế bào và tăng khả năng tiếp cận cơ chất của enzyme. Tiếp theo, mẫu được ủ với cellulase và pectinase ở hoạt độ 50 U/gds/E (đơn vị enzyme trên mỗi gam chất khô cho mỗi loại enzyme), trong điều kiện nhiệt độ 40°C và pH 5,0. Các mẫu phản ứng được thu thập tại các thời điểm 6, 12, 18, 24, 36 và 48 giờ để theo dõi quá trình thủy phân thông qua phân tích hàm lượng phenolic tổng số (TPC).

Để đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện phản ứng đến hàm lượng TPC, nghiên cứu tiến hành khảo sát từng yếu tố theo nguyên tắc một yếu tố thay đổi trong khi các yếu tố khác được giữ cố định dựa trên các thông số tối ưu thu được từ thí nghiệm trước đó. Ảnh hưởng của nhiệt độ được khảo sát tại các mức 30, 35, 40, 45 và 50°C, trong điều kiện cố định pH 5,0, hoạt độ enzyme của cả hai enzyme 50 U/gds/E, tỷ lệ rắn/lỏng 1:20 và thời gian ủ đã được xác định từ thí nghiệm tối ưu hóa. Ảnh hưởng của pH được khảo sát tại các giá trị 4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 và 7,0, trong điều kiện cố định nhiệt độ và thời gian ủ đã xác định trước, cùng hoạt độ enzyme 50U/gds/E và tỷ lệ rắn/lỏng 1:20. Tiếp theo, ảnh hưởng của hoạt độ hỗn hợp enzyme được đánh giá tại các mức 50, 100, 150, 200 và 250U/gds, trong khi các thông số nhiệt độ, thời gian và pH được giữ cố định theo điều kiện đã tối ưu trước đó, với tỷ lệ rắn/lỏng không thay đổi. Mẫu đối chứng sử dụng enzyme đã được bất hoạt ở 95°C trong 30 phút. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp được lọc qua giấy lọc Whatman số 41, tiếp đó ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 30 phút. Dịch chiết thu được được sử dụng để phân tích hàm lượng TPC và hoạt tính chống oxy hóa nhằm đánh giá hiệu quả quá trình chiết xuất.

2.3. Xác định tổng hàm lượng TPC

Tổng hàm lượng hợp chất phenolic trong các mẫu được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu [6]. Một miligam cao chiết khô được hòa tan trong 1ml dimethyl sulfoxide (DMSO). Từ dung dịch này, 0,5ml được trộn với 2,5ml thuốc thử Folin-Ciocalteu (10%). Sau 10 phút, thêm 2,5ml dung dịch natri cacbonat 7,5% vào hỗn hợp và khuấy đều trong 10 phút. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong bóng tối ở 45°C trong 45 phút. Sau khi ủ, độ hấp thụ được đo tại bước sóng 760nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Axit gallic được pha ở các nồng độ 1,25; 2,5; 5; 10; 15

và 20µg/ml trong ethanol tinh khiết để xây dựng đường chuẩn. Hàm lượng phenolic tổng số được biểu thị dưới dạng miligam axit gallic tương đương trên mỗi gam cao chiết khô (mg GAE/g) [7].

2.4. Xác định hoạt tính chống oxy hóa

Khả năng khử gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) của mẫu được đánh giá theo phương pháp của Brand-Williams và cộng sự [8]. Mẫu cao chiết khô được hòa tan trong DMSO ở nồng độ 100%. Dung dịch DPPH được chuẩn bị trong ethanol 96%. Độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng được đo tại bước sóng 515nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Khả năng khử gốc tự do (SC, %) của mẫu được tính theo công thức sau:

$$SC (\%) = \left[100 - \frac{\text{Abs(mẫu thử nghiệm)} - \text{Abs(mẫu trắng)}}{\text{Abs(mẫu đối chứng âm)}} \times 100 \right] \pm \sigma$$

Độ lệch chuẩn (σ) được tính theo công thức của Duncan như sau:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(\sum x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

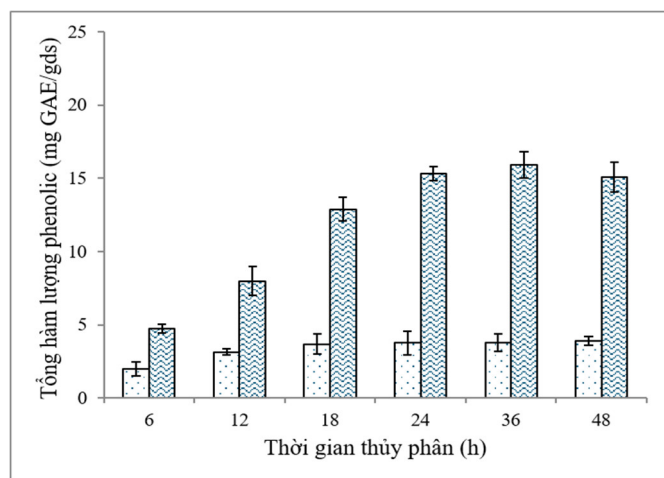
3.1. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng TPC và hoạt tính chống oxy hóa

Kết quả trên hình 1 cho thấy ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng TPC trong dịch chiết lá vối sử dụng hỗn hợp hai enzyme. Hàm lượng TPC tăng dần theo thời gian phản ứng, đặc biệt rõ rệt ở các mẫu được bổ sung enzyme. Ở thời điểm 6 giờ, hàm lượng phenolic còn thấp (< 5mg GAE/gds), cho thấy quá trình thủy phân mới khởi đầu và enzyme chưa có đủ thời gian để tác động mạnh lên cấu trúc thành tế bào của nguyên liệu. Khi thời gian thủy phân được kéo dài đến 12 và 18 giờ, hàm lượng TPC tăng nhanh (7 - 13mg GAE/gds ở các mẫu có enzyme), phản ánh sự phá vỡ đáng kể cấu trúc polymer của thành tế bào và sự giải phóng phenolic vào dung dịch chiết. Từ 24 đến 36 giờ, hàm lượng TPC tiếp tục tăng và đạt giá trị cao nhất (khoảng 16 - 17mg GAE/gds), cho thấy hoạt tính enzyme ổn định và hiệu quả trong giai đoạn này. Đây được xem là khoảng thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân nhằm thu nhận lượng TPC cao nhất từ lá vối.

Tuy nhiên, sau 36 giờ, tổng hàm lượng TPC có xu hướng giảm nhẹ tại thời điểm 48 giờ, cho thấy phản ứng có thể đã đạt trạng thái bão hòa hoặc xảy ra sự phân hủy một phần các hợp chất phenolic đã được giải phóng khi kéo dài thời gian thủy phân. Hiện tượng này phù hợp với

nguyên lý sinh hóa về giới hạn hoạt tính xúc tác của enzyme cũng như sự ổn định không bền vững của các hợp chất phenolic trong điều kiện chiết kéo dài. Bên cạnh đó, sự khác biệt rõ rệt giữa mẫu có enzyme và mẫu đối chứng (enzyme bất hoạt) ở tất cả các thời điểm khẳng định tính ưu việt của phương pháp chiết hỗ trợ enzyme. Đặc biệt, tại thời điểm tối ưu (36 giờ), tổng hàm lượng TPC của mẫu xử lý enzyme cao hơn hơn 3 lần so với mẫu đối chứng, minh chứng cho vai trò quan trọng của enzyme trong việc phá vỡ cấu trúc mô thực vật và thúc đẩy giải phóng các hợp chất hoạt tính sinh học.

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với các báo cáo trước đó. Cụ thể, hàm lượng phenolic trong dịch chiết bưởi đạt mức cao nhất (1,4mg/g) khi được thủy phân bằng Cellzyme MX, tăng 28% so với mẫu đối chứng [9]. Điều này một lần nữa khẳng định rằng việc sử dụng enzyme hỗ trợ có vai trò quan trọng trong việc nâng cao hiệu suất chiết tách các hợp chất phenolic. Tương tự, Khôi và cộng sự ghi nhận hàm lượng polyphenol trong vỏ củ mã thầy tăng mạnh trong 1 - 9 giờ đầu và đạt 89,13mg GAE/g chất khô (tăng 3,3 lần), nhưng giảm xuống còn 33,38 mg GAE/g khi thời gian chiết kéo dài đến 24 giờ (giảm 1,35 lần) [10]. Quyên khi nghiên cứu trên lá bí đất cũng báo cáo rằng hàm lượng polyphenol tăng nhanh từ 17,16 lên 34,80mg GAE/g khi thời gian chiết tăng từ 10 đến 40 phút, nhưng không tăng đáng kể khi kéo dài lên 50 - 60 phút [11]. Như vậy, các kết quả cho thấy hàm lượng TPC tăng đáng kể trong 24 giờ đầu và gần đạt đến ngưỡng cực đại; trong khi đó, giai đoạn 24 - 36 giờ chỉ ghi nhận mức tăng nhẹ và không có ý nghĩa rõ rệt về mặt hiệu quả chiết. Do vậy, thời gian 24 giờ được xác định là điều kiện thủy phân thích hợp để thu nhận hàm lượng TPC cao nhất.



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng TPC: (▨) Hỗn hợp enzyme cellulase và pectinase (50 U/gds/E) and (□) Enzyme bất hoạt (Đối chứng)

Kết quả ở bảng 1 cho thấy khả năng bẫy gốc tự do (SC%) của mẫu được thủy phân bằng enzyme tăng rõ rệt theo thời gian so với mẫu đối chứng (enzyme bất hoạt). Trong 6 - 12 giờ đầu, SC chỉ đạt 24 - 26%, phản ánh mức độ giải phóng phenolic còn hạn chế. Từ 18 giờ trở đi, SC tăng mạnh lên 53,32% và duy trì ở mức cao, ổn định trong khoảng 18 - 48 giờ (khoảng 52 - 53%). Ngược lại, mẫu đối chứng hầu như không biến động, chỉ dao động 9,3 - 9,9%, khẳng định hiệu quả chiết tách hoàn toàn phụ thuộc vào hoạt tính enzyme. Những kết quả này cho thấy cellulase và pectinase đóng vai trò then chốt trong việc giải phóng các hợp chất phenolic có khả năng chống oxy hóa, đặc biệt sau mốc 18 giờ. Khoảng thời gian 18 - 36 giờ được xem là tối ưu, khi SC duy trì ở mức cao và ổn định, trong khi kéo dài phản ứng đến 48 giờ ghi nhận sự suy giảm nhẹ.

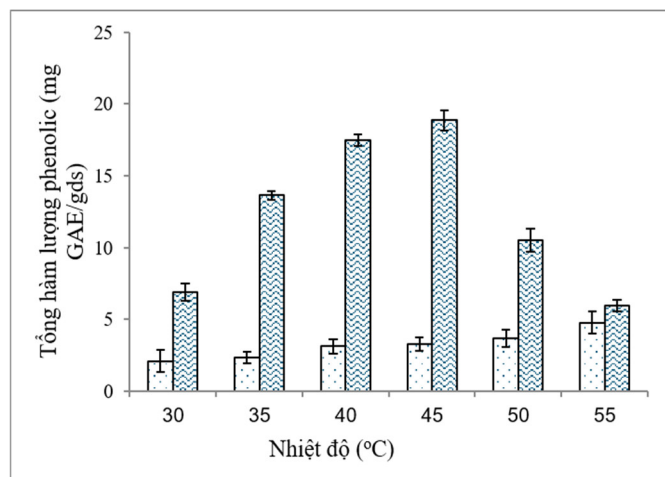
Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hoạt tính chống oxy hóa

Thời gian tách chiết (h)	Khả năng bẫy gốc tự do (SC, %), điều kiện phản ứng (40°C, pH 5,0, 50 U/gds/E)	
	Hỗn hợp cellulase và pectinase (Mẫu thử nghiệm)	Enzyme bất hoạt (Đối chứng)
6	24,43 ± 0,15	9,31 ± 0,19
12	25,87 ± 0,14	9,50 ± 0,12
18	53,32 ± 0,11	9,83 ± 0,17
24	52,12 ± 0,16	9,65 ± 0,16
36	53,26 ± 0,19	9,88 ± 0,13
48	52,54 ± 0,07	9,75 ± 0,09

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng TPC và hoạt tính chống oxy hóa

Kết quả trình bày ở hình 2 cho thấy hàm lượng TPC biến thiên rõ rệt theo nhiệt độ khảo sát. Khi nhiệt độ tăng từ 30°C lên 45°C, hàm lượng TPC trong mẫu có bổ sung enzyme tăng mạnh, từ khoảng 6,8mg GAE/gds lên gần 19mg GAE/gds. Đây là giá trị cao nhất trong toàn bộ dải nhiệt độ khảo sát, cho thấy 45°C là mức nhiệt tối ưu cho quá trình giải phóng TPC dưới tác động enzyme. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng lên 50°C và 55°C, hàm lượng TPC giảm đáng kể, còn lần lượt 11mg GAE/gds và 6 mg GAE/gds. Sự suy giảm này có thể xuất phát từ hiện tượng biến tính enzyme ở nhiệt độ cao hoặc sự phân hủy một phần các hợp chất phenolic, dẫn đến hiệu suất chiết giảm. Đối với mẫu đối chứng sử dụng enzyme bất hoạt, hàm lượng TPC tại tất cả các mức nhiệt đều thấp (2 - 4mg GAE/gds) và gần như không thay đổi theo nhiệt độ, qua đó khẳng định vai trò quyết định của enzyme trong quá trình giải phóng TPC từ lá bưởi. Kết quả này phù hợp với

nhận định trong các nghiên cứu trước đây rằng polyphenol là nhóm hợp chất nhạy nhiệt; khi nhiệt độ vượt quá mức tối ưu, các phản ứng oxy hóa và phân hủy nhiệt có thể xảy ra, làm giảm hàm lượng phenolic thu được. Điều này giải thích vì sao TPC đạt giá trị cao nhất ở khoảng 40 - 45°C và suy giảm ở nhiệt độ cao hơn [12].



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng TPC: (▨) Hỗn hợp enzyme cellulase và pectinase (50 U/gds/E) and (□) Enzyme bất hoạt (Đối chứng)

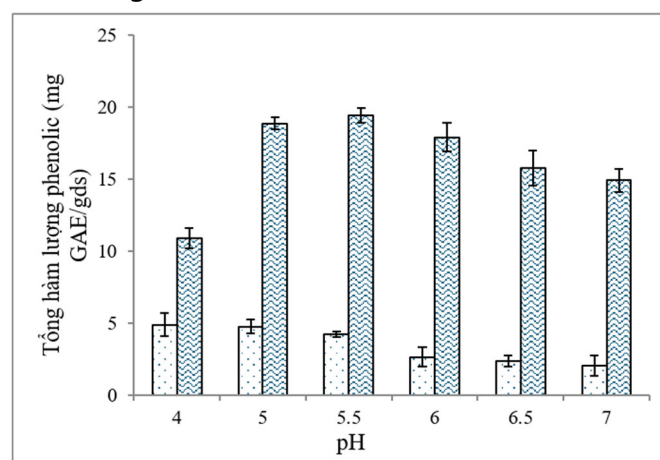
Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính chống oxy hóa

Nhiệt độ (°C)	Khả năng bắt gốc tự do (SC, %), điều kiện phản ứng (pH 5,0, 50 U/gds/E, sau 24h ủ)	
	Hỗn hợp cellulase và pectinase (Mẫu thử nghiệm)	Enzyme bất hoạt (Đối chứng)
30	17,63 ± 0,13	9,06 ± 0,18
35	24,43 ± 0,11	9,32 ± 0,10
40	56,32 ± 0,17	9,65 ± 0,12
45	57,16 ± 0,13	9,89 ± 0,10
50	21,27 ± 0,18	12,63 ± 0,16
55	16,54 ± 0,12	16,36 ± 0,11

Kết quả trình bày ở bảng 2 cho thấy, khả năng bắt gốc tự do của dịch chiết lá với thay đổi đáng kể theo nhiệt độ xử lý. Hoạt tính chống oxy hóa (SC%) được phân hóa thành hai nhóm rõ rệt. Nhóm có SC > 50% gồm các mẫu thủy phân ở 40°C (56,32%) và 45°C (57,16%), thể hiện hoạt tính mạnh. Đây được xem là khoảng nhiệt tối ưu, khi hoạt động xúc tác của enzyme đạt hiệu quả cao, giúp giải phóng các hợp chất chống oxy hóa, đặc biệt là polyphenol và flavonoid từ mô lá với. Ngược lại, tại các mức nhiệt thấp hơn (30 - 35°C), enzyme hoạt động kém hiệu quả, dẫn đến SC chỉ đạt 17,63 - 24,43%. Trong khi đó, ở 50 - 55°C, hoạt tính giảm mạnh (16,54 - 21,27%) do nguy cơ biến tính enzyme ở nhiệt độ cao, làm suy giảm khả

năng thủy phân và giải phóng hoạt chất. Đáng chú ý, các mẫu đối chứng sử dụng enzyme bất hoạt cho thấy SC hầu như không thay đổi giữa các mức nhiệt, khẳng định enzyme là yếu tố quyết định trong việc tăng cường hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết. Xu hướng biến thiên SC% theo nhiệt độ trong nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Al-Farsi và Lee, khi hoạt tính DPPH của dịch chiết hạt chà là đạt giá trị cao nhất ở khoảng 40 - 45°C và giảm đáng kể trên 50°C do sự phân hủy và oxy hóa các hợp chất phenolic. Sự tương đồng này củng cố nhận định rằng hoạt tính chống oxy hóa đạt mức tối ưu trong dải nhiệt trung bình và suy giảm ở nhiệt độ cao [13].

3.3. Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng TPC và hoạt tính chống oxy hóa



Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng TPC: (▨) Hỗn hợp enzyme cellulase và pectinase (50 U/gds/E) and (□) Enzyme bất hoạt (Đối chứng)

Kết quả hình 3 cho thấy, ảnh hưởng rõ rệt của pH đến hàm lượng TPC thu được từ chiết xuất lá với. Trong khoảng pH từ 5 đến 5,5, hàm lượng TPC đạt giá trị cao nhất (20mg GAE/gds), phản ánh khả năng giải phóng mạnh mẽ các hợp chất TPC trong điều kiện axit nhẹ. Điều này có thể do ở pH này cấu trúc tế bào thực vật bị giãn nở thích hợp, tạo điều kiện thuận lợi cho enzyme hoặc dung môi xâm nhập và hòa tan các hợp chất TPC tự do hoặc liên kết yếu với thành tế bào. Khi pH vượt quá 6,0, hàm lượng TPC bắt đầu giảm dần, có thể do các nhóm hydroxyl phenolic bị ion hóa, làm giảm khả năng hòa tan trong dung môi, pH cao ảnh hưởng đến độ ổn định của hợp chất TPC, dễ bị oxy hóa, và hoạt tính enzyme thủy phân có thể bị ức chế ngoài khoảng pH tối ưu. Kết quả này phù hợp với các báo cáo trước đây, trong đó việc điều chỉnh pH dung môi chiết được ghi nhận có ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng phenolic và hoạt tính chống oxy hóa. Cụ thể, Şeyhahmet và Şahin cho thấy sự thay đổi pH dẫn đến biến động rõ rệt của TPC và hoạt tính chống oxy

hóa khi chiết từ *Brassica oleracea*, nhấn mạnh rằng pH là một yếu tố then chốt trong việc tối ưu hóa thu nhận các hợp chất phenolic [14].

Kết quả bảng 3 cho thấy, pH phản ứng có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng bẫy gốc tự do của dịch chiết từ lá vối trong điều kiện sử dụng hỗn hợp enzyme thủy phân. Quá trình này được thực hiện khi bổ sung cellulase và pectinase (50 U/gds/E) ở 45°C trong 24 giờ. Cụ thể, khả năng bẫy gốc tự do đạt giá trị cao nhất tại pH 5,5 (56,43%), sau đó giảm dần khi pH tăng hoặc giảm khỏi giá trị tối ưu này. Ở pH 4,0 và 7,0, hoạt tính chống oxy hóa giảm xuống đáng kể, chỉ còn 40,89% và 34,51%, tương ứng. Khi so sánh với mẫu đối chứng sử dụng enzyme bất hoạt, khả năng bẫy gốc tự do ở tất cả các mức pH đều thấp hơn rõ rệt, dao động từ 8,65% đến 16,43%. Điều này khẳng định vai trò xúc tác của enzyme thủy phân trong việc giải phóng các hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa từ lá vối. Ngoài ra, khả năng bẫy gốc tự do của cao chiết giảm đi ở các pH ngoài khoảng tối ưu (pH 5,0 - 6,0) có thể do cấu trúc và hoạt tính của enzyme bị ảnh hưởng, làm giảm hiệu quả thủy phân thành phần cấu trúc thực vật và giải phóng các hợp chất sinh học. Như vậy, pH 5,5 được xác định là điều kiện thích hợp để chiết xuất hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa từ lá vối.

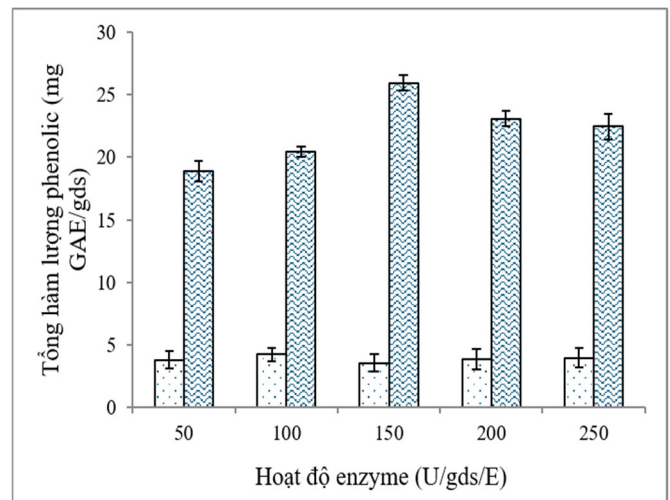
Bảng 3. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính chống oxy hóa

pH	Khả năng bẫy gốc tự do (SC, %), điều kiện phản ứng (45°C, 50 U/gds/E, sau 24h ủ)	
	Hỗn hợp cellulase và pectinase (Mẫu thử nghiệm)	Enzyme bất hoạt (Đối chứng)
4,0	40,89 ± 0,43	16,43 ± 0,23
5,0	56,06 ± 0,13	15,52 ± 0,15
5,5	56,43 ± 0,26	14,76 ± 0,19
6,0	55,16 ± 0,15	14,09 ± 0,14
6,5	48,20 ± 0,12	9,65 ± 0,18
7,0	34,51 ± 0,25	8,65 ± 0,12

3.4. Ảnh hưởng của hoạt độ enzyme đến hàm lượng TPC và hoạt tính chống oxy hóa

Kết quả hình 4 cho thấy, hoạt độ enzyme ảnh hưởng rõ rệt đến hàm lượng TPC chiết xuất từ lá vối. Khi tăng hoạt độ enzyme từ 50 đến 150U/gds, hàm lượng TPC tăng dần và đạt giá trị cao nhất tại 150U/gds (~23,7mg GAE/gds). Sau đó, khi tiếp tục tăng đến 200 và 250U/gds, hàm lượng TPC giảm nhẹ, dù vẫn cao hơn các mức enzyme thấp. Điều này chứng tỏ rằng việc sử dụng enzyme cellulase, pectinase đã hỗ trợ phá vỡ cấu trúc thành tế bào, giải phóng các hợp chất TPC bị ràng buộc

trong vách tế bào thực vật. Enzyme phá vỡ cellulose và hemicellulose sẽ giải phóng TPC như acid chlorogenic, gallic và caffeic, là các hợp chất phenolic chủ yếu có trong lá vối [15]. Tuy nhiên, khi vượt quá hoạt độ tối ưu (150U/gds), sự sụt giảm nhẹ của tổng hàm lượng TPC có thể do quá trình phân hủy phenolic trong điều kiện enzyme cao, tái hấp phụ vào chất rắn không tan, hoặc do hiện tượng ức chế enzyme do tích lũy sản phẩm. Do đó, hỗn hợp enzyme sử dụng với hoạt độ 150U/gds là phù hợp trong điều kiện thí nghiệm.



Hình 4. Ảnh hưởng của hoạt độ enzyme đến hàm lượng TPC: (▨) Hỗn hợp enzyme cellulase và pectinase and (□) Enzyme bất hoạt (Đối chứng)

Kết quả bảng 4 cho thấy, nhìn chung khả năng bẫy gốc tự do của chiết xuất lá vối tăng đáng kể khi hoạt độ enzyme tăng. Tại hoạt độ 50 U/gds/E, mẫu ẩm tính với SC < 50%. Từ 100 đến 150U/gds/E, SC tăng lên trên 57%, đạt giá trị cao nhất ở 150U/gds/E (57,89%). Đây được xem là ngưỡng tối ưu, nơi enzyme thủy phân hiệu quả thành tế bào thực vật, giúp giải phóng các hợp chất chống oxy hóa mạnh, đặc biệt từ lá vối vốn chứa nhiều polyphenol và tanin. Tại 200U/gds/E, SC bắt đầu giảm nhẹ (~55,19%), cho thấy hoạt tính enzyme đã đạt đến mức bão hòa, hoặc có thể xảy ra ức chế phản hồi hoặc phân hủy một phần hợp chất hoạt tính do enzyme hoạt động quá mức. Tại 250U/gds/E, SC giảm xuống dưới 50% (48,59%), cho thấy liều lượng enzyme quá cao có thể gây bất lợi, không những không tăng hiệu quả chiết xuất mà còn làm mất hoặc biến tính một phần các hợp chất TPC, dẫn đến giảm khả năng bẫy gốc tự do. Ở tất cả các mức enzyme bất hoạt (đối chứng), SC đều rất thấp (9,57% - 15,83%), khẳng định vai trò rõ ràng của enzyme trong việc thúc đẩy chiết xuất hoạt chất chống oxy hóa từ lá vối. Do đó, so với phương pháp chiết xuất đối chứng, hoạt tính chống oxy hóa cao hơn trong hệ thống chiết xuất hỗ trợ enzyme.

Bảng 4. Ảnh hưởng của hoạt độ enzyme đến hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt độ cellulase và pectinase (U/gds/E)	Khả năng bắt gốc tự do (SC, %), điều kiện phản ứng (45°C, pH 5,5, sau 24h ủ)	
	Hỗn hợp cellulase và pectinase (Mẫu thử nghiệm)	Enzyme bất hoạt (Đối chứng)
50	41,67 ± 0,23	12,43 ± 0,21
100	55,78 ± 0,14	15,83 ± 0,17
150	57,89 ± 0,20	14,04 ± 0,19
200	55,19 ± 0,12	13,89 ± 0,14
250	48,59 ± 0,19	9,57 ± 0,12

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chứng minh rằng chiết xuất lá với bằng phương pháp hỗ trợ enzyme là một kỹ thuật hiệu quả, giúp nâng cao đáng kể hàm lượng TPC và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết. Trong điều kiện thích hợp (45°C, pH 5,5, sau 24 giờ, hoạt độ cellulase và pectinase sử dụng 150U/gds/E). Trong điều kiện đó, hàm lượng TPC đạt 25,94mg GAE/gds và khả năng chống oxy hóa đạt 57,89%. Kết quả này khẳng định tiềm năng ứng dụng của enzyme trong khai thác hoạt chất sinh học từ lá với phục vụ ngành thực phẩm chức năng và dược phẩm.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn Viện Công nghệ - HaUI, Đại học Công nghiệp Hà Nội đã hỗ trợ máy móc và thiết bị để thực hiện các nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Shahidi F., Ambigaipala, P., "Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review," *J. Funct. Foods.*, 18, 820-897, 2015.

[2]. Thanh D. T., Tan M. T., My N. T., "Phytochemical composition, antioxidant, anti-Helicobacter pylori, and enzyme inhibitory evaluations of *Cleistocalyx operculatus* flower bud and leaf fractions," *BioTech.*, 13(4), 42, 2024.

[3]. Pandey K. B., Rizvi S. I., "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease," *Oxidative Med. Cell. Longev.*, 2, 270-278, 2009.

[4]. Kiet T. T., *Mushrooms in Vietnam*. Publishing House for Natural Science and Technology, 1 (2nd Edition), 2022.

[5]. Hoàng Q. T. T., Nguyễn T. T. M., Trần H. T. T., "Đánh giá khả năng trích ly polyphenol từ lá vối (*Cleistocalyx operculatus*) bằng phương pháp siêu âm và xử lý bằng enzyme cellulase," *Tạp chí Khoa học Đại học Văn Hiến*, 5(4), 100-105, 2017.

[6]. Waterhouse A. L., "Determination of total phenolics," In Wrolstad R. E. (Ed.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 11.1.1-11.1.8, 2001.

[7]. Milan S. S., "Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts," *Kragujevac J. Sci.*, 33, 63-72, 2011.

[8]. Brand-Williams W., Cuvelier M. E., "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity," *LWT-Food Sci Technol.*, 28, 25-30, 1995.

[9]. Li B. B., Smith B., Hossain M. M., "Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method," *Sep Purif Technol.*, 48, 189-196, 2006.

[10]. Khoi P. N., Duyen N. T. M., "Consideration of conditioning agent extracted and antibacterial, antioxidant activities of polyphenol from mangrove trumpet tree (*Dolichandrone spathacea*)," *Natural Science and Technology*, 14(12), 181-193, 2017.

[11]. Quyen P. T. K., Minh N. V., Han N. T., "Effect of Extraction Conditions on Polyphenol Content and Antioxidant Activity of the Extract from *Gynura Procumbens* (Lour) Merr. Leaves," *Vietnam J. Agri. Sci.*, 14(8), 1248-1260, 2016.

[12]. Antony A., Farid M., "Effect of temperatures on polyphenols during extraction," *Appl. Sci.*, 12(4), 2107, 2022.

[13]. Al-Farsi M. A., Lee C. Y., "Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds," *Food Chem.*, 108(3), 977-985, 2008.

[14]. Aye Ş., Şahin Z., "The effect of pH and extraction time on total phenolic content and antioxidant properties of coloured water extracts from *Brassica Oleracea*," *Int. J. Agric. Environ. Food Sci.*, 8(1), 20-24, 2024.

[15]. Pinelo M., Rubilar M., Sineiro J., "Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace," *J. Agric. Food Chem.*, 52(26), 7848-7856, 2004.

AUTHORS INFORMATION

Vu Dinh Giap¹, Do Huu Nghi²

¹HaUI Institute of Technology, Hanoi University of Industry, Vietnam

²Institute of Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam