

TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN TÁCH CHIẾT TINH DẦU TỪ LÁ XÁ XỊ (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn) VỚI SỰ HỖ TRỢ CỦA CELLULASE

Vũ Kim Dung, Lê Sỹ Dũng, Hoàng Văn Sâm

Trường Đại học Lâm nghiệp

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.2022.4.012-021>

TÓM TẮT

Tinh dầu xá xị là nguồn dược liệu quý, nhiều tác dụng: chống đái tháo đường, chống viêm, hạ huyết áp, kháng khuẩn, chống oxy hóa, tan máu, hoạt hóa glycosidase... Tinh dầu từ lá xá xị được thu nhận bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước sử dụng cellulase hỗ trợ xử lý nguyên liệu trước khi chưng cất. Với việc sử dụng phần mềm Design-Expert 12 và quy hoạch thực nghiệm bậc 2 Box-Benken với 3 nhân tố nghiên cứu pH (4 - 6), nhiệt độ (30 - 60°C), tốc độ lắc (0 - 200 vòng/phút), đã xác định được điều kiện tối ưu thu nhận tinh dầu xá xị cao nhất đạt 1,75% với điều kiện pH 5,0; tỷ lệ enzym 1,5%; nhiệt độ 37°C với tốc độ lắc 193 vòng/phút, trong 3 giờ. Hàm lượng tinh dầu tăng 25% so với trước khi tối ưu và tăng 44,6% so với khi không sử dụng enzyme. Kết quả phân tích GC-MS cho thấy tinh dầu từ lá xá xị khi xử lý nguyên liệu với enzyme đã giúp tách được nhiều chất hơn (29 chất) so với đối chứng (27 chất) và làm thay đổi rõ rệt tỷ lệ % của một số chất quan trọng: hàm lượng Cineole đạt 34,60%, Camphor đạt 23,28%. Các thành phần chính trong tinh dầu lá xá xị bao gồm: Cineole, Camphor, Terpeneol, Sabinene, Terpinen-4-ol. Tinh dầu xá xị có khả năng kháng 7 chủng vi khuẩn (*E. coli*, *S. typhimurium*, *Shigella* sp, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*) và 02 chủng nấm (*A. niger*, *Trichoderma* spp) thử nghiệm với đường kính vòng kháng khuẩn 40-67 mm. Nghiên cứu này cho phép chiết xuất tinh dầu xá xị có tiềm năng ứng dụng lớn trong lĩnh vực y dược, mỹ phẩm và thực phẩm.

Từ khóa: Cellulase, thành phần hóa học, tinh dầu, tối ưu, xá xị.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tinh dầu xá xị (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn) là nguồn dược liệu quý có nhiều tác dụng như: chống đái tháo đường, chống viêm, hạ huyết áp, kháng vi sinh vật, chống oxy hóa, tan máu, hoạt hóa glycosidase (Adfa *et al.*, 2016; Ali *et al.*, 2011; Angelini *et al.*, 2006; Jakhetia *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2009; Kalemba *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2019a; Legault *et al.*, 2007; Limsuwan *et al.*, 2013; Uthairatsamee *et al.*, 2012) và thường được chiết xuất từ lá, vỏ thân và rễ cây (Vũ Văn Thông, 2017; Nguyen Xuan Dung *et al.*, 1995; Sylvain, 2014).

Tinh dầu có thể tách từ thực vật bằng nhiều phương pháp: chưng cất lôi cuốn theo hơi nước (Distillation), trích ly bằng dung môi hữu cơ (Solvent Extraction), trích ly Soxhlet (Soxhlet Extraction), ép lạnh (Cold Pressing), dùng chất lỏng siêu tới hạn (Supercritical Fluid Extraction), chưng cất kết hợp vi sóng (Microwave-Assisted Hydrodistillation), trích ly kết hợp với siêu âm (Ultrasound-assisted extraction), trích ly bằng vi sóng khuếch tán kết hợp trọng lực (Microwave hydro diffusion and gravity) (Abd El-Gaber, Amira, 2018; Adfa *et al.*, 2016; Nguyen Dinh Phuc *et al.*, 2019;

Palanuvej *et al.*, 2006). Mỗi phương pháp đều có ưu, nhược điểm riêng, tuy nhiên phương pháp sử dụng enzyme xử lý nguyên liệu thực vật trước khi chưng cất là phương pháp thân thiện môi trường, hiệu suất cao và đã được nhiều tác giả báo cáo (Hoàng Thị Bích, 2017; Eberhardt *et al.*, 2007; Fuentes *et al.*, 2012; Sowbhagya *et al.*, 2009).

Cellulase là hệ enzyme xúc tác thủy phân cellulose của thành tế bào thực vật thành cellobiose và cuối cùng là glucose. Do vậy nghiên cứu sử dụng cellulase để hỗ trợ quá trình thủy phân lớp thành tế bào thực vật, giải phóng tinh dầu giúp tăng hiệu suất tách chiết tinh dầu (Sylvain, 2014).

Thành phần quan trọng trong tinh dầu xá xị bao gồm: cineole 1,8, camphor, sabinene, α -Terpeneol... và hoạt tính sinh học đã được chứng minh (Kumar & Kumari, 2019a; Kumar & Kumari, 2019b; Palanuvej *et al.*, 2006; Pardede, 2017; Salleh *et al.*, 2016; Shareef, 2011). Cineole 1,8 có tác dụng kích thích tuần hoàn, giảm đau và sưng tấy, chống oxy hóa và kháng khuẩn, nấm (Syaliza *et al.*, 2016; Vilela *et al.*, 2009). Camphor là một chất quan trọng trong tinh dầu, được dùng làm thuốc trợ tim

trong các trường hợp trụ tim mạch, choáng ngất và là một trong những thành phần chính trong các loại cao xoa, dầu xoa, cồn xoa bóp với tác dụng sát trùng và chống viêm (Fuentes *et al.*, 2012; Hadacek *et al.*, 2000; Kha, 2004). Camphor đã được sử dụng rộng rãi như một chất thơm trong mỹ phẩm, chất phụ gia tạo hương vị thực phẩm và như một chất bảo quản trong các mặt hàng bánh kẹo. Sabinene có tính chất chống viêm, chống nấm, kháng khuẩn và chống oxy hóa (Francisco *et al.*, 1991). Ngoài ra, chúng có khả năng làm dịu các tình trạng da có vấn đề, giảm đau viêm khớp và hỗ trợ tiêu hóa. α -Terpineol có rất nhiều ưu điểm như không độc với con người ở liều có tác dụng kháng khuẩn, có thể dùng cho mọi lứa tuổi, kể cả trẻ em và trẻ sơ sinh, có tác dụng sát trùng khá rộng trên vi khuẩn, nấm và siêu vi. Ngoài ra α -Terpineol còn có tác dụng tốt cho tim mạch, hạ huyết áp, chất chống oxy hóa, ngăn ngừa ung thư, chống co giật (Kalemba & Kunicka, 2003).

Với hướng nghiên cứu về tinh dầu xá xị, các công bố tại Việt Nam và trên thế giới thường tập trung vào đặc điểm sinh học, phân bố, thành phần và nhân giống *invitro* (Phạm Quốc Hùng và cộng sự, 2010; Trần Hợp, 2002; Khuất Thị Hải Ninh và cộng sự, 2017; Phùng Văn Phê, 2012; Lê Công Sơn và cộng sự, 2013; Vũ Văn Thông, 2017; Abd El-Gaber, Amira, 2018; Nguyen Xuan Dung *et al.*, 1995; Pardede, 2017; Syaliza *et al.*, 2016). Tuy nhiên những nghiên cứu sử dụng enzyme hỗ trợ để tách chiết tinh dầu, thành phần và hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu xá xị sau khi tách chiết còn khá hạn chế. Do vậy, với mục tiêu xác định được các điều kiện tối ưu cho quá trình tiền xử lý nguyên liệu để chung cất tinh dầu xá xị đạt hiệu quả cao. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở khoa học cho việc khai thác và phát triển tinh dầu xá xị tại Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu lá và vỏ thân xá xị thu thập từ Vĩnh Phúc với thời gian từ 11/2021- 3/2022. Mẫu được phân tích hàm lượng, thành phần tinh dầu ngay khi mẫu được vận chuyển về phòng

thí nghiệm. Chế phẩm enzyme Cellulase từ Novozym với hoạt độ 700 UI/ml.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết tinh dầu Xá xị

Thu thập mẫu lá Xá xị vào buổi sáng, thời tiết khô ráo. Mẫu thu hái bảo quản trong túi zip có gắn nhãn đủ thông tin và được vận chuyển bằng đá khô về phòng thí nghiệm.

Phương pháp tách chiết: Tinh dầu xá xị được tách chiết bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước theo Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 7039:2013 (ISO 6571:2008): Gia vị và thảo mộc - xác định hàm lượng dầu dễ bay hơi (phương pháp chưng cất bằng hơi nước) và Dược Điển Việt Nam IV (2009) đối với mẫu tinh dầu có tỷ trọng > 1.

Hàm lượng tinh dầu ($d > 1$) được tính theo công thức:

$$X (\%, v/w) = \frac{a - c}{b} \times 100\%$$

Trong đó:

a: thể tích của tinh dầu và xylene (ml);

b: khối lượng của mẫu đã trừ độ ẩm (g);

c: thể tích xylene cho vào trước khi định lượng (ml).

2.2.2. Tối ưu hóa các điều kiện tách chiết tinh dầu

Tối ưu hóa điều kiện tách chiết tinh dầu xá xị theo phương pháp bề mặt đáp ứng và quy hoạch Box-Benken, sử dụng phần mềm Design-Expert. Ma trận thực nghiệm bao gồm 17 thí nghiệm với khoảng chạy của 3 yếu tố khảo sát là: pH (4 - 6), nhiệt độ (30 - 60°C), tốc độ lắc (0 - 200 vòng/phút). Tinh dầu từ lá Xá xị được chưng cất theo phương pháp lôi cuốn hơi nước. Lá xá xị được xử lý với enzyme cellulase (Amudan *et al.*, 2011). Theo đó thí nghiệm được thực hiện với 100 g mỗi mẫu, dùng nước làm dung môi, mẫu tươi được nghiền tới kích thước < 2 mm, bổ sung đệm phosphate ở các giá trị pH = 4 - 6 và cellulase 1,5 % (v/w), ủ mẫu 3 giờ trên máy lắc với vận tốc 0 - 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30 - 60°C. Sau đó, tiến hành bổ sung nước với tỷ lệ 1/20 (w/v), chưng cất trong 4 giờ và xác định thể tích tinh dầu thu được.

2.2.3. Xác định thành phần hóa học có trong tinh dầu

Thành phần hóa học của tinh dầu Xá xị được xác định bằng phương pháp sắc ký khí nối ghép khối phổ (GS-MS) trên máy GC7890A-MS 5975C của hãng Agilent Technologies, Phòng Phân tích hóa học, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với điều kiện: Nhiệt độ cột HP5MS từ 60 – 240°C, tốc độ tăng nhiệt 4°C/phút, nhiệt độ buồng bơm mẫu ở 180°C, khí mang là heli tốc độ 1,0 ml/phút.

2.2.4. Hoạt tính kháng vi sinh vật

Khả năng kháng vi sinh vật của tinh dầu xá xị được xác định bằng phương pháp đĩa thạch (Mareshah *et al.*, 2021) và được thực hiện trên các chủng vi khuẩn: *Escherichia coli*, *Samonella typhimurium*, *Shigella sp*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*; vi nấm: *Aspergillus niger*, *Trichoderma spp*, *Penecillium sp*.

2.3. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp, số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Excel và Design-Expert version 11 (State-Ease, Inc., Minneapolis, Mỹ).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tối ưu hóa điều kiện tách chiết tinh dầu

Quá trình tối ưu hóa điều kiện enzyme phản ứng với cơ chất trong quá trình chưng cất tinh dầu Xá xị dựa trên cơ sở đã khảo sát điều kiện thích hợp để chiết xuất tinh dầu ở các yếu tố ảnh hưởng riêng rẽ như pH, nhiệt độ, tốc độ lắc, tỷ lệ enzyme/cơ chất, thời gian phản ứng của enzyme (kết quả nghiên cứu không được trình bày trong bài báo), nhận thấy pH, nhiệt độ và tốc độ lắc có ảnh hưởng lớn nhất đến hiệu suất tách chiết tinh dầu. Với pH 4 - 6; nhiệt độ 30 - 50°C; tốc độ lắc 0 – 200 vòng/phút; tỷ lệ cellulase 1,5% (v/w), thời gian thủy phân 3 giờ, hàm lượng tinh dầu xá xị thu được cao nhất. Các khoảng giá trị khác cho hàm lượng tinh dầu thấp hơn. Như vậy, khoảng hoạt động tương ứng của các thông số khảo sát để tối ưu hóa hàm lượng tinh dầu xá xị bao gồm: pH 4 - 6; nhiệt độ 30 - 50°C; tốc độ lắc 0 – 200 vòng/phút.

Ảnh hưởng đồng thời của 3 yếu tố pH (X₁), nhiệt độ (X₂), tốc độ lắc (X₃) được xác định theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm bậc hai để tối ưu điều kiện tách chiết tinh dầu. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng tinh dầu theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (NL/DM)

TT	pH	Nhiệt độ (°C)	Tốc độ lắc (vòng/phút)	Hàm lượng tinh dầu (%)
1	4	30	100	1,58
2	6	30	100	1,61
3	4	50	100	1,64
4	6	50	100	1,56
5	4	40	0	1,64
6	6	40	0	1,56
7	4	40	200	1,70
8	6	40	200	1,67
9	5	30	0	1,61
10	5	50	0	1,63
11	5	30	200	1,72
12	5	50	200	1,67
13	5	40	100	1,75
14	5	40	100	1,73
15	5	40	100	1,71
16	5	40	100	1,71
17	5	40	100	1,70

Kết quả phân tích phương sai của mô hình tối ưu bằng phần mềm DX11 trình bày trong bảng 2 cho thấy cả 3 yếu tố pH, nhiệt độ và tốc độ lắc đều có ảnh hưởng lớn đến quá trình thu nhận tinh dầu từ lá xá xị. Giá trị F của mô hình là 18,85 với $p = 0,0004$ ($p < 0,05$) cho thấy dạng

mô hình đã được lựa chọn đúng. Giá trị p của “Không tương thích” là 0,6569 ($p > 0,05$) cho thấy mô hình này tương hợp với thực nghiệm. Giá trị p của $X_1X_2 < 0,05$ nên sự đồng tác động của yếu tố pH và nhiệt độ ảnh hưởng mạnh tới quá trình thu nhận tinh dầu.

Bảng 2. Kết quả phân tích phương sai ANOVA của mô hình

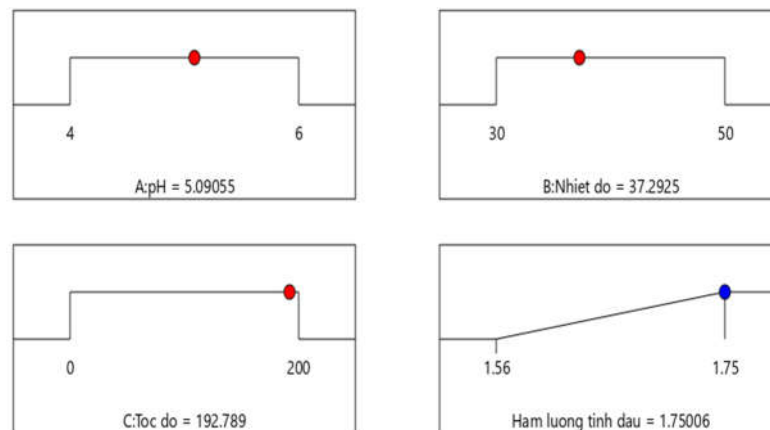
Thông số	Phương sai	Chuẩn F	Mức có nghĩa p
Mô hình	0,0062	18,85	0,0004
pH (X ₁)	0,0032	9,74	0,0168
Nhiệt độ (X ₂)	0,0001	0,1522	0,7081
Tốc độ lắc (X ₃)	0,0128	38,96	0,0004
X ₁ X ₂	0,0030	9,21	0,0190
X ₁ X ₃	0,0006	1,90	0,2103
X ₂ X ₃	0,0012	3,73	0,0948
X ₁ ²	0,0199	60,57	0,0001
X ₂ ²	0,0122	37,02	0,0005
X ₃ ²	0,0003	0,9811	0,3549
Không tương thích	0,0002	0,5833	0,6569

Phương trình hồi quy biểu hiện hàm lượng tinh dầu xá xị mô tả ảnh hưởng của các yếu tố độc lập và các mối tương tác giữa chúng được biểu diễn như sau:

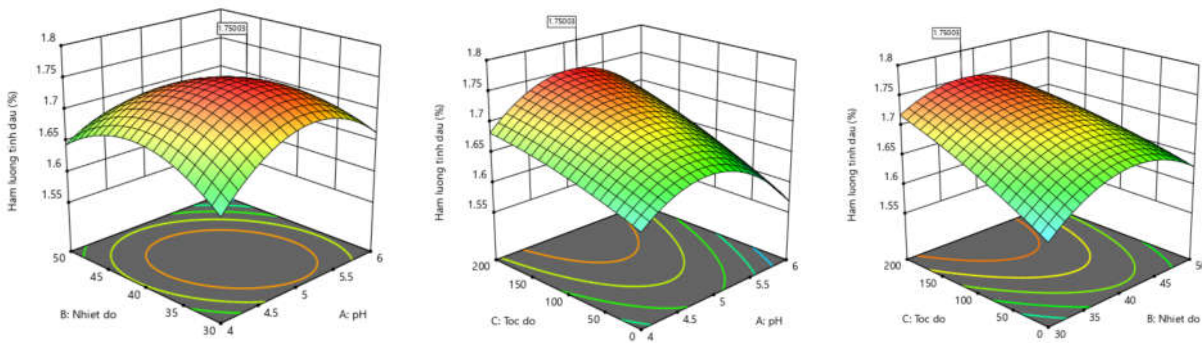
$$Y = -1,355 + 0,765 \cdot X_1 + 0,05825 \cdot X_2 + 0,0065 \cdot X_3 - 0,00275 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,000125 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,000017 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,06875 \cdot X_1^2 - 0,000538 \cdot X_2^2 - 0,0000087 \cdot X_3^2$$

Phương trình hồi quy cho thấy trong các hệ số b₁, b₂, b₃ (thể hiện tác động độc lập của từng yếu tố X₁, X₂, X₃) giá trị tuyệt đối của b₁ (0,765)

là lớn nhất. Điều này chứng tỏ pH ảnh hưởng lớn nhất đến quá trình chiết xuất để thu nhận tinh dầu. Ngược lại, giá trị tuyệt đối của b₃ (0,0065) là nhỏ nhất, cho thấy sự ảnh hưởng của tốc độ lắc tác động ít hơn các yếu tố còn lại tới hàm mục tiêu. Khi đánh giá sự tác động đồng thời giữa các yếu tố, giá trị tuyệt đối của b₁₂ (0,00275) là lớn nhất, chứng tỏ sự tương tác giữa pH và nhiệt độ có ảnh hưởng mạnh tới quá trình thủy phân cơ chất để tách chiết tinh dầu xá xị trong quá trình chưng cất.



Hình 1. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu thủy phân lá xá xị để thu nhận tinh dầu



Hình 2. Bề mặt đáp ứng của hàm lượng tinh dầu theo pH, nhiệt độ và tốc độ lắc

Sử dụng phương pháp hàm kỳ vọng để tối ưu hóa hàm lượng tinh dầu xá xị thu được sau quá trình thủy phân bằng phần mềm Design Expert. Kết quả đã tìm được 100 phương án thí nghiệm để cực đại hàm mục tiêu dự đoán, với phương án tốt nhất là pH = 5,09, nhiệt độ 37,29°C và tốc độ lắc là 192,79 vòng/phút (hình 1). Khi xem xét ảnh hưởng của từng yếu tố (các yếu tố khác được giữ ở mức trung bình) đến hàm lượng tinh dầu (hình 2) cho thấy hàm lượng tinh dầu đạt giá trị cực đại trong các điều kiện trên theo tính toán là 1,75%.

Sau khi tiến hành phân tích tính toán bằng phương pháp bề mặt đáp ứng và quy hoạch Box-Benken sử dụng phần mềm Design-Expert 11. Nhận thấy rằng hàm lượng tinh dầu có thể đạt được 1,75% cao hơn hàm lượng tinh dầu khi chưa tiến hành tối ưu 1,40% (hiệu suất tăng 25%). So sánh với hàm lượng tinh dầu khi không sử dụng enzyme hỗ trợ 1,21% thì hàm lượng tinh dầu khi tối ưu được tăng 44,6%.

Hàm lượng tinh dầu Xá xị tăng lên khi sử dụng enzyme hỗ trợ cũng tương tự với một số công bố gần đây. Theo tác giả Hoàng Thị Bích (2017) hiệu suất thu hồi tinh dầu quế có sử dụng enzyme hỗ trợ tăng đáng kể (31,5 %) so với mẫu đối chứng không sử dụng enzyme. Năm 2014, Sylvain và cộng sự đã chỉ ra việc sử dụng enzyme trong hỗ trợ chiết xuất tinh dầu từ thì là đã giúp tăng 20% hàm lượng tinh dầu thu được so với phương pháp chưng cất truyền thống, ngoài ra việc sử dụng enzyme giúp tăng từ 60-80% hàm lượng capsaicinoids và carotenoids

trong ớt. Freese và Binnings (1993) đã sử dụng enzyme trong quá trình chiết xuất dầu và tinh dầu từ gừng, tỏi, hạt tiêu đã được báo cáo là tăng năng suất của dầu lên 30 - 50% so với đối chứng không xử lý enzyme. Sowbhagya và cộng sự (2009) đã xử lý Cellulase, Pectinase, Protease và Viscozyme trước khi chưng cất tinh dầu từ tỏi làm tăng hàm lượng từ (0,39 - 0,51%) so với đối chứng (0,28%). Các tác giả cũng chứng minh rằng enzyme tạo thuận lợi cho việc khai thác dầu tỏi, dẫn đến sự gia tăng hiệu suất và ít thay đổi hương vị hay tính chất hóa lý của dầu.

Từ kết quả tối ưu thu được, tiến hành thực nghiệm tại điều kiện pH 5,0; tỉ lệ enzyme 1,5%; nhiệt độ 37°C với tốc độ lắc 193 vòng/phút trong thời gian 3 giờ, thí nghiệm thực hiện 3 lần. Hàm lượng tinh dầu thu được từ 1,74 – 1,75%, nằm trong khoảng dự đoán của phương pháp quy hoạch bậc hai Box – Behnken nên mô hình có độ tương thích cao với thực tế. Do vậy, có thể sử dụng các điều kiện tối ưu từ mô hình để nghiên cứu tách chiết tinh dầu xá xị trên quy mô lớn hơn nhằm ứng dụng chiết xuất tinh dầu xá xị trong thực tiễn.

3.2. Thành phần hóa học của tinh dầu lá Xá xị

Kết quả phân tích thành phần tinh dầu lá Xá xị khi sử dụng enzyme cellulase hỗ trợ quá trình tách chiết cho thấy số lượng các chất được nhận diện trong tinh dầu xá xị cao hơn khi không sử dụng enzyme và tỷ lệ tinh dầu khá thay đổi (kết quả thể hiện ở bảng 3).

Bảng 3. Bảng tổng hợp thành phần tinh dầu từ lá Xá xị

TT	Sử dụng cellulase		Không sử dụng cellulase	
	Thành phần	Tỷ lệ (%)	Thành phần	Tỷ lệ (%)
1	Hex-3-en-1-ol (Z)	0,31	Myrcene	0,62
2	Thujene (a)	0,61	Linalool	0,21
3	Pinene (a)	4,20	Elemene (d)	0,36
4	Camphene	0,88	Cubebene (a)	0,19
5	Sabinene	11,07	Copaene (a)	0,15
6	Pinene (b)	2,67	Elemene (b)	2,48
7	Myrcene	1,88	Caryophyllene (E)	47,01
8	Phellandrene (a)	0,26	Guaiene (a)	0,12
9	Terpinene (a)	0,72	Humulene (a)	14,46
10	Cymene (o)	0,17	Germacrene D	5,00
11	Limonene	1,85	Selinene (b)	2,31
12	Phellandrene (b)	0,55	Muurola	0,26
13	Cineole 1,8	34,60	Selinene (a)	1,08
14	Terpinene <g->	1,19	Bulnesene (a)	0,33
15	Sabinene Hydrate (cis)	0,26	Cadinene (d)	0,50
16	Terpinolene	0,44	Elemol	0,38
17	Linalool	0,40	Nerolidol (E)	0,15
18	Sabinene Hydrate (trans)	0,21	Germacrene B	0,15
19	Sabina ketone (dehydro)	0,17	Caryophyllene oxide	12,65
20	Camphor	23,38	Humulene epoxide I	0,27
21	Terpineol (d)	0,61	Humulene epoxide II	2,20
22	Borneol (=Endo-Borneol)	0,44	Cubanol	0,22
23	Terpinen-4-ol	3,18	Pogostol	0,80
24	Terpineol (a)	7,68	CXD	1,86
25	Anethole (E)	0,42	Caryophyllene (14, E)	0,59
26	Caryophyllene (E)	0,56	Farnesol (E, E)	1,02
27	Humulene (a)	0,48	Farnesol (E, Z)	0,18
28	Germacrene D	0,13		
29	Bicyclogermacrene	0,46		
Tổng		99,76		95,55

Kết quả phân tích GC-MS cho thấy tinh dầu từ lá Xá xị khi không sử dụng enzyme hỗ trợ có 27 chất được nhận diện, tổng hàm lượng là 95,55% nhưng chỉ có 7 chất cho hàm lượng >2%. Thành phần chính là các chất thuộc nhóm terpenoids như Caryophyllene (E) (47,01%), Humulene (a) (14,46%), Caryophyllene oxide (12,65%), Germacrene D (5%)...

Tinh dầu từ mẫu có sử dụng cellulase đã xác định 29 chất và cũng có 7 chất hàm lượng >2%, đạt tổng hàm lượng là 99,76% với các chất thuộc terpenoids: Cineole 1,8 (34,60%), Camphor (23,28%), Sabinene (11,07%), Terpineol (a) (7,68%)... với tổng hàm lượng nhóm này là 84,11%.

Thành phần tinh dầu xá xị khá tương đồng

với công bố về thành phần tinh dầu chi *Cinnamomum*. Li và cộng sự (2014) đã xác định thành phần chính trong tinh dầu cây *Cinnamomum longepaniculatum* bao gồm 5 chất: 1,8-cineole; α -terpineol, terpinene-4-alcohol, Safrole và γ -terpinene.

Tinh dầu thu được bằng cách xử lý nguyên liệu với enzyme không chỉ giúp tách được nhiều chất hơn mà còn làm thay đổi rõ rệt thành phần % của một số chất quan trọng trong tinh dầu. Cụ thể như sau:

- Làm giàu một số chất mong muốn trong tinh dầu xá xị như: hàm lượng Cineole 1,8 tăng từ 0% lên 34,60%, Camphor từ 0% lên 23,28%...

- Làm giảm hàm lượng một số chất khác, đặc

biệt Caryophyllene (E) giảm từ 47,01% xuống 0,56%, Humulene (a) giảm từ 14,46% xuống 0,48%.

Sự tăng của các hợp chất trên có thể do quá trình thủy phân lớp thành tế bào thực vật bởi cellulase sẽ giúp giải phóng triệt để các thành phần trong lá xá xị và sự giảm một số thành phần có thể do ủ mẫu lá trong thời gian dài (3 giờ) dẫn đến sự tương tác hoặc chuyển hóa của các thành phần hóa học.

Kết quả nghiên cứu phù hợp với công bố của Hoàng Thị Bích (2017) khi sử dụng kết hợp enzyme cellulase và laccase đã làm thay đổi thành phần tinh dầu quế *C. cassia* từ các nguồn lá, cành và vỏ quế. Theo đó tác giả nhận định một số chất tăng hàm lượng như: hàm lượng cinnamaldehyde tăng từ 69,74% lên 85,60%, o-methoxy-cinnamaldehyde tăng 0,23%; trong khi đó cinnamyl acetat giảm từ 17,2% xuống 1,34%, cinnamyl alcohol giảm từ 0,57% xuống 0,29%. Khi sử dụng hệ enzyme này, tác giả đã tách chiết tinh dầu trầm hương với hàm lượng của các thành phần có giá trị, mang mùi trầm hương đặc trưng cũng tăng lên rõ rệt, tổng các terpen hydrocarbon (3,70%, đối chứng 0%), tổng các terpen chứa oxy (24,76%, đối chứng 8,78%). Amudan và cộng sự (2011) cũng cho rằng sử dụng enzyme (riêng rẽ hay kết hợp) cellulase, pectinase, amylase đều làm tăng hàm lượng tinh dầu và đặc biệt có thể gia tăng hàm lượng eugenol lên 70%.

3.3. Khả năng kháng vi sinh vật

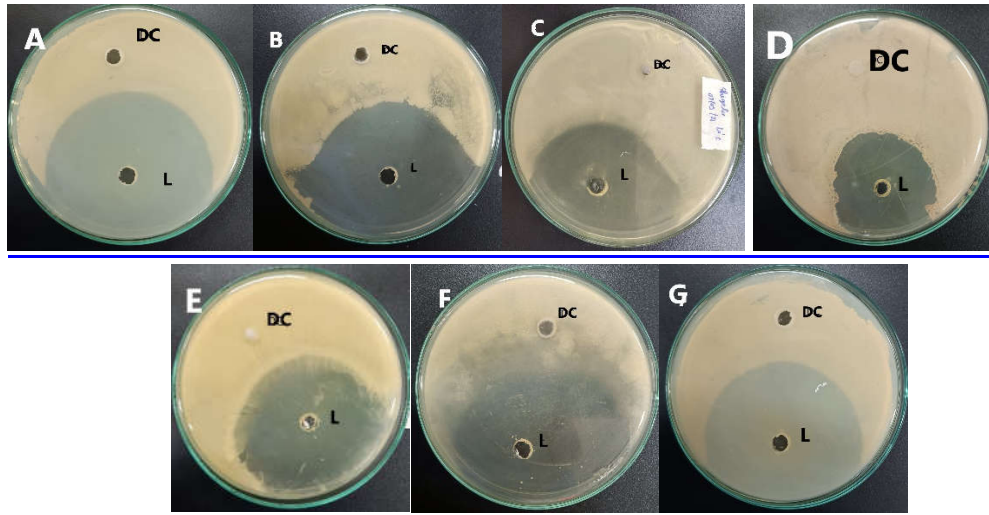
Kết quả bảng 4 cho thấy khả năng kháng khuẩn của tinh dầu đối với 7 chủng vi khuẩn thử nghiệm khá tốt (đường kính vòng kháng 40

– 67 mm). Tinh dầu xá xị có khả năng kháng mạnh nhất với *B. licheniformis* (đường kính vòng kháng 67 mm) và kháng yếu nhất với *B. cereus* (đường kính vòng kháng 40 mm). Đối với 3 chủng nấm kiểm nghiệm, tinh dầu xá xị chỉ có khả năng kháng yếu (đường kính vòng kháng nhỏ): *Trichoderma* spp (8 mm), *A. niger* (5 mm) và không có khả năng kháng nấm *Penicilium* sp. Khả năng kháng vi sinh vật của tinh dầu có thể do trong tinh dầu xá xị chứa các chất có khả năng kháng khuẩn mạnh, bao gồm: Camphor, Cineole 1,8, Sabinene, α -Terpineol...

Kết quả nghiên cứu cho thấy tinh dầu Xá xị có khả năng kháng tốt với nhiều loại vi khuẩn và đường kính vòng kháng lớn, tương đồng với một số nghiên cứu đã công bố. Amudan và cộng sự (2011) cho rằng tinh dầu hương thảo và tinh dầu cỏ xạ hương có khả năng kháng *Staphylococcus epidermidis* với vòng kháng khuẩn lần lượt 48 mm và 53 mm, kháng *S. aureus* (42 mm, 48 mm). Khả năng kháng *S. pyogenes* của tinh dầu cỏ xạ hương (70 mm), tinh dầu hương thảo (69 mm), tinh dầu xả (70 mm), tinh dầu quế (60 mm), tinh dầu *Abies alba* (53 mm)... Vinicius và cộng sự (2012) đã xác định tinh dầu *Cinnamomum zeylanicum* kháng lại *Aspergillus flavus* (650 μ g/mL MIC). Nhiều nghiên cứu đã xác định khả năng kháng nấm của tinh dầu có khả năng kháng *A. flavus* và *A. parasiticus* (Vilela et al., 2009). Do vậy có thể thấy tinh dầu Xá xị (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn.) có tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực y dược, mỹ phẩm và thực phẩm.

Bảng 4. Kết quả hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu Xá xị

Chủng vi sinh vật	Đường kính vòng kháng D - d (mm)	Chủng vi sinh vật	Đường kính vòng kháng D - d (mm)
<i>E. coli</i>	62±1,0	<i>B. licheniformis</i>	67±1,1
<i>S. typhimurium</i>	60±1,2	<i>B. megaterium</i>	64±1,1
<i>Shigella</i> sp	55±1,0	<i>A. niger</i>	5±1,0
<i>B. cereus</i>	40±1,0	<i>Trichoderma</i> spp	8±0,5
<i>B. subtilis</i>	61±1,2	<i>Penicilium</i> sp.	0



Hình 3. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu từ lá Xá xị

(DC: đối chứng (nước cất vô trùng), L: tinh dầu từ lá xá xị, A - Chủng *E. coli*; B - *S. typhimurium*; C - *Shigella*; D - *B. cereus*; E - *B. subtilis*; F - *B. licheniformis*; G - *B. megaterium*)

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã sử dụng enzyme cellulase để xử lý các nguyên liệu lá xá xị trước khi chưng cất cho hiệu suất thu hồi tinh dầu tăng lên rõ rệt, tỷ lệ gia tăng tinh dầu lá xá xị đạt 44,6%. Đặc biệt, quá trình xử lý bằng cellulase đã làm gia tăng hàm lượng chất chính Cineole 1,8 tăng 34,60%, Camphor 23,28%. Nghiên cứu đã sử dụng phương pháp qui hoạch thực nghiệm để tính toán điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân lá xá xị trước khi chưng cất ở pH 5,0, tỉ lệ enzyme 1,5%; nhiệt độ 37°C với tốc độ lác 193 vòng/phút trong thời gian 3 giờ. Dưới điều kiện tối ưu, hàm lượng tinh dầu từ lá xá xị đạt được 1,75%. Hoạt tính kháng vi sinh vật cũng được xác định trên 9 chủng vi sinh vật cho thấy tinh dầu xá xị có khả năng kháng tốt đối với các chủng kiểm định (*E. coli*, *S. typhimurium*, *Shigella* sp, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *A. niger*, *Trichoderma* spp).

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ khoa học công nghệ cấp Quốc gia “Khai thác và phát triển nguồn gen cây Xá xị (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn)” Mã số NVQG-2019/ĐT.14

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Thị Bích (2017), Nghiên cứu sử dụng enzym trong chiết tách và làm giàu một số sản phẩm

nguồn gốc thiên nhiên, Luận án tiến sĩ.

2. Phạm Quốc Hùng, Nguyễn Huy Dũng, Nguyễn Quốc Dũng, Lê Đức Thanh, Lê Mạnh Tuấn, Nguyễn Mạnh Hùng, Trần Văn Hồ, Nguyễn Thị Hằng (2010), Điều tra đánh giá tình trạng bảo tồn các loài thực vật rừng nguy cấp, quý hiếm thuộc danh mục Nghị định 32/2006/NĐ-CP theo vùng sinh thái. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.

3. Trần Hợp (2002), Tài nguyên cây gỗ Việt Nam, Nxb Nông nghiệp.

4. Khuất Thị Hải Ninh, Nguyễn Quỳnh Trang, Bùi Văn Thắng, Vũ Văn Thông (2017), Nghiên cứu nhân giống *in vitro* Re hương *Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp, 10: 42 – 48.

5. Phùng Văn Phê (2012), Nghiên cứu giâm hom cây Xá xị *Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn, làm cơ sở cho công tác bảo tồn ở Vườn Quốc gia Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 50(6): 643-650.

6. Lê Công Sơn, Dương Đức Huyền, Đỗ Ngọc Đài (2013), Tính đa dạng về thành phần loài và giá trị sử dụng của chi Quế (*Cinnamomum*) và chi Bời lời (*Litsea*) họ long não (*Lauraceae juss*) ở Vườn Quốc gia Bạch Mã. Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 5: 649-653.

7. Vũ Văn Thông (2017), Bảo tồn nguồn gen cây Re hương (*Cinnamomum parthenoxylon*) trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên, B2017-TNA-33, 7759. Báo cáo tổng kết B2017-TNA-33.

8. TCVN 7039:2013 (ISO 6571:2008): Gia vị và thảo mộc - xác định hàm lượng dầu dễ bay hơi (phương pháp chưng cất bằng hơi nước).

9. Dược điển Việt Nam IV (2009). Bộ Y tế.

10. Abd El-Gaber, Amira S. (2018), Microwave extraction of essential oil from *Anastatica hierochuntica*

- (L): comparison with conventional hydro-distillation and steam distillation. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(4): 1003-1010.
11. Adfa M., Rizki R., Masayuki N., Salprima Y.S., Kaori T., Mamoru K. (2016), Antileukemic activity of lignans and phenylpropanoids of *Cinnamomum parthenoxylon*. *Bioorg Med Chem Lett*, 26: 761–764.
12. Ali N.A.M., Mohtar M., Shaari K., Rahmani M., Ali A.M. (2011). Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils of *Cinnamomum aureofulvum* Gamb. *J Essent Oil Res*, 14: 135– 138.
13. Amudan R., Kamat D.V., Kamat S.D. (2011), Enzyme-assisted extraction of essential oils from *Syzygium aromaticum*. *South Asian Journal Experimental Biology*, 1(6): 248-254.
14. Angelini P., Rita P., Alessandro M., Barbara V. (2006), Antimicrobial activities of various essential oils against foodborne pathogenic or spoilage moulds. *Annals of microbiology*, 56(1): 65-69.
15. Eberhardt T. L., Xiaobo L., Todd F.S., Chung-Yun H., (2007), Chinese Tallow Tree (*Sapium Sebiferum*) utilization: Characterization of extractives and cell-wall chemistry. *Wood Fiber Science*, 39(2): 319-324.
16. Francisco J., Jean H.L. (1991), Effects of sabinene and γ -terpinene from coastal redwood leaves acting singly or in mixtures on the growth of some of their fungus endophytes. *Biochemical systematics ecology*. 19(8): 643-650.
17. Freese S. and Binnig R. (1993), Enzymic extraction of spice aromas. *J Gordian*, 93: 171-176.
18. Fuentes E., María E.B., Manuel B., Camila C., Fabián L. (2012), Determination of total phenolic content in olive oil samples by UV-visible spectrometry and multivariate calibration. *Food Analytical Methods*, 5(6): 1311-1319.
19. Hadacek F., Greger H. (2000), Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical analysis*, 11(3): 137-147.
20. Jakheta V. Patel R., Khatri P., Pahuja N., Garg S. (2010), *Cinnamon*: a pharmacological review. *Journal of Advanced Scientific Research*, 1: 19– 23.
21. Jia Q., Liu X., Wua X., Wang R., Hu X., Li Y., Huang C. (2009), Hypoglycemic activity of a polyphenolic oligomer-rich extract of *Cinnamomum parthenoxylon* bark in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 16(8): 744-750.
22. Kalemba D., Kunicka A. (2003), Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10): 813-829.
23. Kha L.D. (2004), Investigation of indigenous seedling production capacity in some nurseries in the North of Vietnam and recommendations of seedling production technical measure. Ministry of Agriculture Rural Development Hanoi, Vietnam.
24. Kumar S., Kumari R. (2019a), *Cinnamomum*: review article of essential oil compounds, ethnobotany, antifungal and antibacterial effects. *Open Access Journal of Science*, 3(1): 13-16.
25. Kumar S., Kumari R. (2019b), Pharmacological properties and their medicinal uses of *Cinnamomum*: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71: 1735–1761. <https://doi.org/10.1111/jphp.13173>
26. Legault J., Pichette A. (2007). Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *J Pharm Pharmacol*, 59 (12): 1643–1647.
27. Li Z.W., Yin Z.Q., Qin W., Jia R.Y., Zhou L.J., Xu J. (2014), Anti-bacterial activity of leaf essential oil and its constituents from *Cinnamomum longepaniculatum*. *Int J Clin Exp Med*, 7(7): 1721–1727.
28. Limsuwan S., Voravuthikunchai S.P. (2013), Anti - *Streptococcus pyogenes* activity of selected medicinal plant extracts used in Thai traditional medicine. *Trop JPharm Res*, 12: 535–540.
29. Mareshah A, Sydney S., Linna G., Adrienne S., Tiffany S.R., Keely P., Jeffrey L. (2021), Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. *BMC complementary medicine therapies*, 21(1): 1-14.
30. Nguyen Dinh Phuc, Le Hoang Phuong Thy, Tri Duc Lam, Vo Hoang Yen, Nguyen Thi Ngoc Lan (2019), Extraction of *Jasmine* essential oil by hydrodistillation method and applications on formulation of natural facial cleansers. *Materials Science and Engineering*, 542: 1 - 6, doi:10.1088/1757-899X/542/1/012057.
31. Nguyen Xuan Dung, La Đinh Moi, Nguyen Đình Hung (1995), Constituents of the essential oils of *Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Nees from Vietnam. *Journal Essential Oil Research*, 7: 53 – 56.
32. Palanuvej C., Werawatganone P., Lipipun V. and Ruangrunsi N. (2006), Chemical composition and antimicrobial activity against *Candida albicans* of essential oil from leaves of *Cinnamomum porrectum*. *Thai Journal of Health Research*, 20 (1): 69-78.
33. Pardede A. (2017), Flavonoid rutinoides from *Cinnamomum parthenoxylon* leaves and their hepatoprotective and antioxidant activity. *Med Chem Res*, 26: 2074–2079.
34. Salleh W.M.N.H., Ahmad F., Heng Y.K., Razauden Z. (2016), Essential oil compositions of Malaysian Lauraceae: A mini review. *Pharmaceutical Sciences*, 22(1): 60-67.
35. Shareef A.A (2011), Evaluation of antibacterial activity of essential oils of *Cinnamomum* sp. and *Boswellia* sp. *Journal of Basrah Researches*, 37(5): 60-71.
36. Sowbhagya H.B., Kaul T.P, Suma P.F., Appu A.G., Rao P.S. (2009), Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil. *Food chemistry*, 113(4): 1234-1238.
37. Syaliza A.H., Zaini A., Fasihuddin A. (2016), Chemical Composition of *Cinnamomum* Species

Collected in Sarawak. *Sains Malaysiana*, 45(4): 627–632.

38. Sylvain A. (2014), Tuning of essential oil properties by enzymatic treatment: towards sustainable processes for the generation of new fragrance ingredients. *Molecules*, 19(7): 9203-9214

39. Uthairatsamee S., Wiwat C., Soonthorncharenon N. (2012), A Comparison of antioxidant and antibacterial activities of crude extracts from various parts of *Cinnamomum porrectum* (Roxb) Kosterm. In FORTROP II: Tropical Forestry Change in a Changing World, Conference conducted at Kasetsart University, Bang-kok, Thailand.

40. Vilela G.R, Gustavo S.A., Marisa A.B.R.D.,

Maria H.D.M., José O.B., Maria F.G.F.S, Sebastião C.S., Sônia M.S.P., Maria A.C.D., Eduardo M.G. (2009), Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research*, 45(2): 108-111.

41. Vinicius N.T., Edeltrudes O. L., Fábio S.S. (2012), Antifungal Activity of the Essential Oil of *Cinnamomum zeylanicum* Blume and Eugenol on *Aspergillus flavus*. *Journal of essential oil-bearing plants*, 15(5). DOI:10.1080/0972060X.2012.10644121.

OPTIMIZATION OF ESSENTIAL OIL FROM *Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn LEAVES BY CELLULASE

Vu Kim Dung, Le Sy Dung, Hoang Van Sam

Vietnam National University of Forestry

SUMMARY

Essential oil (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn) is a valuable medicinal herb with many effects such as anti-diabetes, anti-inflammatory, lowering blood pressure, antibacterial, antioxidant, hemolytic, glycosidase activator... The essential oil from *C. parthenoxylon* (Jack) Meisn leaves is obtained by steam distillation using cellulase for pre-treatment. By using Design-Expert 12 software and Box-Benken with 3 research factors, pH (4 - 6), temperature (30 - 60°C), and shaking speed (0 - 200 rpm), which have determined the optimal conditions to obtain the highest essential oil reaching 1.75% with pH 5.0; enzyme rate 1.5%; temperature 37°C with shaking speed 193 rpm, for 3 hours. Essential oil content increased by 25% compared to pre-optimization and by 44.6% increase compared without enzyme support. The results of GC-MS analysis showed that the essential oil from *C. parthenoxylon* (Jack) Meisn leaves separated more substances (29 substances) than traditional distillation (27 substances), in addition, changed the percentage of some important substances in essential oils in which the content of Cineole 1,8 increased by 34.60%, and Camphor increased by 23.28%. The main ingredients in *C. parthenoxylon* (Jack) Meisn leaf essential oil include Cineole 1,8, Camphor, Terpeneol, Sabinene, and Terpinen-4-ol. *C. parthenoxylon* (Jack) Meisn essential oil was resistant to 7 strains of bacteria (*Escherichia coli*, *Samonella typhymurium*, *Shigella*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*) and 02 strains of fungi (*Aspergillus niger*, *Trichoderma spp*) tested with antibacterial ring diameters 40-67mm. Therefore, *C. parthenoxylon* (Jack) Meisn essential oil has great potential for application in the fields of medicine, cosmetics, and food.

Keywords: Cellulase, chemical constituents, *Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn, essential oil, optimization.

Ngày nhận bài : 13/6/2022

Ngày phản biện : 16/7/2022

Ngày quyết định đăng : 29/7/2022