

Extraction of phenolic acids from coffee husks

Duc C. Nguyen¹, Hien D. Nguyen¹, Vinh D. H. Nguyen^{1,2}, & Ly T. P. Trinh^{1,2*}

¹Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University,
Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: January 18, 2025

Revised: April 02, 2025

Accepted: April 08, 2025

Keywords

Antioxidant activity

Coffee husks

Enzyme-assisted extraction

Phenolic acids

Reflux

*Corresponding author

Trinh Thi Phi Ly

Email:

phily@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

Coffee husk, an abundant by-product of coffee processing, contains bioactive compounds, particularly phenolic acids, such as chlorogenic acid, caffeic acid, and protocatechuic acid. This study investigated the extraction efficiency of phenolic acids by reflux and enzyme-assisted extraction. The results showed that the reflux method using 50% ethanol solvent for 180 min achieved a total phenolic content of 27.10 mg GAE/g, lower than the extraction methods using Celluclast and Viscozyme enzymes with polyphenol contents of 27.96 and 28.52 mg GAE/g, respectively. The reflux method with water and 50% ethanol gave the highest extraction yield of chlorogenic acid, reaching 135.35 and 134.10 mg/100 g, respectively. While the Celluclast enzyme gave the highest protocatechuic acid level of 81.96 mg/100 g after 15 min. Interestingly, caffeic acid increased rapidly to 67.74 mg/100 g after 60 min using Viscozyme, 16.5 times higher than that obtained from the reflux extraction. Regarding antioxidant activity, the reflux extract showed higher radical scavenging capacity when evaluated by the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay (62.89 mg Trolox/g) compared with its antioxidant activity determined by the ABTS assay. In contrast, enzymatic extracts exhibited higher antioxidant capacity when evaluated using the ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) assay, with values ranging from 76.51 to 77.57 mg Trolox/g. Choosing the appropriate extraction method to recover bioactive substances from coffee husk is a crucial step to intensively develop specific applications of coffee husks in related fields.

Cited as: Nguyen, D. C., Nguyen, H. D., Nguyen, V. D. H., & Trinh, L. T. P. (2026). Extraction of phenolic acids from coffee husks. *The Journal of Agriculture and Development* 25(1), 95-109.

Nghiên cứu chiết xuất các phenolic acid từ vỏ quả cà phê

Nguyễn Công Đức¹, Nguyễn Duy Hiền¹, Nguyễn Dương Hoàng Vinh^{1,2} & Trịnh Thị Phi Ly^{1,2*}

¹Khoa Khoa Học Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

²Viện Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 18/01/2025

Ngày chỉnh sửa: 02/04/2025

Ngày chấp nhận: 08/04/2025

Từ khóa

Chiết xuất có hỗ trợ enzyme

Chống oxy hóa

Đun hồi lưu

Phenolic acid

Vỏ cà phê

*Tác giả liên hệ

Trịnh Thị Phi Ly

Email: phily@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Vỏ quả cà phê, một phụ phẩm dồi dào trong quá trình sản xuất cà phê, chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt là các phenolic acid như chlorogenic acid, caffeic acid và protocatechuic acid. Nghiên cứu này đánh giá hiệu quả chiết xuất các phenolic acid của phương pháp đun hồi lưu và chiết xuất có hỗ trợ enzyme. Kết quả nghiên cứu cho thấy, phương pháp đun hồi lưu sử dụng dung môi ethanol 50% trong thời gian 180 phút đã đạt hiệu quả chiết xuất polyphenol 27,10 mg GAE/g, thấp hơn so với phương pháp chiết xuất bằng enzyme Celluclast và Viscozyme với hàm lượng polyphenol tương ứng là 27,96 và 28,52 mg GAE/g. Phương pháp đun hồi lưu với nước và ethanol 50% cho hiệu quả chiết xuất chlorogenic acid cao nhất đạt lần lượt 135,35 và 134,10 mg/100 g. Trong khi enzyme Celluclast cho hiệu quả chiết xuất protocatechuic acid tối ưu 81,96 mg/100 g sau 15 phút. Lượng caffeic acid gia tăng nhanh chóng đạt 67,74 mg/100 g sau 60 phút sử dụng Viscozyme, cao gấp 16,5 lần so với phương pháp đun hồi lưu. Phương pháp bắt gốc tự do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) phù hợp với chiết xuất bằng phương pháp đun hồi lưu với dung môi, cho hàm lượng chất chống oxy hóa tương đương 62,89 mg Trolox/g. Trong khi thử nghiệm ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) nhạy hơn với chiết xuất bằng enzyme, cho kết quả hợp chất chống oxy hóa tương đương 76,51 - 77,57 mg Trolox/g. Chọn lựa phương pháp chiết xuất thích hợp để thu nhận hiệu quả các hoạt chất sinh học là bước quan trọng để phát triển sâu hơn các ứng dụng cụ thể của vỏ cà phê trong các lĩnh vực liên quan.

1. Đặt Vấn Đề

Ngành sản xuất cà phê toàn cầu là một trong những ngành nông nghiệp lớn nhất, với

hơn 70 quốc gia tham gia sản xuất. Hằng năm, quá trình chế biến hạt cà phê tạo ra hàng triệu tấn phụ phẩm vỏ cà phê, chiếm 40 - 50% khối lượng quả cà phê (Murthy & Naidu, 2012). Vỏ

cà phê chứa nhiều hợp chất hữu cơ và dinh dưỡng, gây ô nhiễm đất, nước và phát thải khí nhà kính khi thải bỏ ra môi trường. Ngoài ra, vỏ cà phê rất giàu phenolic acid, flavonoid và các hợp chất sinh học, trong đó có chlorogenic acid, caffeic acid và protocatechuic acid được chứng minh có đặc tính chống oxy hóa, chống viêm và kháng khuẩn (Baiano, 2014; Dorsey & Jones, 2017; Klingel & ctv., 2020). Những hợp chất này có giá trị cao trong dược phẩm, thực phẩm chức năng và mỹ phẩm. Do đó, việc khai thác chúng không chỉ nâng cao giá trị kinh tế mà còn góp phần giảm chất thải và hướng đến mục tiêu phát triển bền vững.

Quá trình chiết xuất là bước quan trọng nhất trong việc thu nhận các hợp chất phenolic từ nguyên liệu ban đầu, ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất và chất lượng của các hợp chất có hoạt tính sinh học (Quatrin & ctv., 2019). Các phương pháp chiết xuất truyền thống như đun hồi lưu với dung môi với ưu điểm dễ vận hành nên có thể thực hiện ở quy mô lớn nhưng thời gian kéo dài và có thể ảnh hưởng đến các hợp chất kém bền nhiệt (Mungwari & ctv., 2025). Các kỹ thuật chiết xuất tiên tiến như sóng siêu âm hoặc vi sóng có khả năng cải thiện những hạn chế trên nhưng yêu cầu đầu tư thiết bị hiện đại và đắt tiền (Vilkhu & ctv., 2008). Tuy nhiên các phương pháp chiết xuất bằng dung môi thường kém hiệu quả với một số hợp chất phenolic liên kết chặt chẽ với các thành phần polysaccharide của vách tế bào thực vật (Trinh & ctv., 2018; Barros & ctv., 2019). Hiện nay, chiết xuất với sự hỗ trợ enzyme được đánh giá là một phương pháp xanh, hiệu quả và thân thiện với môi trường, giúp phá vỡ liên kết phenolic - polysaccharide của vách tế bào và tăng đáng

kể hiệu suất chiết (Trinh & ctv., 2018; Barros & ctv., 2019).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hiệu quả chiết xuất polyphenol tổng số, protocatechuic acid, chlorogenic acid và caffeic acid bằng hai kỹ thuật chiết xuất khác nhau gồm phương pháp đun hồi lưu với dung môi và chiết xuất bằng các enzyme thủy phân polysaccharide. Bên cạnh đó, khả năng chống oxy hóa thông qua thử nghiệm loại bỏ gốc tự do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) và ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) của dịch chiết vỏ cà phê cũng được đánh giá. Kết quả nghiên cứu cho thấy, việc sử dụng các kỹ thuật chiết xuất tối ưu không chỉ tận dụng tối đa nguồn tài nguyên địa phương mà còn mở ra cơ hội phát triển các sản phẩm giá trị cao ứng dụng trong thực phẩm chức năng và dược phẩm. Bên cạnh đó, khai thác hiệu quả vỏ cà phê giúp tăng thu nhập cho nông dân, đồng thời giảm thiểu lượng chất thải từ ngành cà phê, góp phần bảo vệ môi trường và giảm tác động tiêu cực đến sinh thái địa phương.

2. Vật Liệu và Phương Pháp

2.1. Vật liệu

Vỏ quả cà phê Robusta được thu thập vào tháng 12 tại Lâm Đồng, Việt Nam. Mẫu vỏ cà phê sau khi thu hoạch được xử lý bằng cách sấy khô ở 50°C, nghiền mịn và sàng qua rây có kích thước lỗ ≤ 1 mm nhằm đảm bảo độ đồng nhất. Độ ẩm của mẫu được xác định trước khi tiến hành các thí nghiệm là 14,12%.

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu bao gồm protocatechuic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

(DPPH), và 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), tất cả đều được cung cấp bởi Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dung môi acetonitrile, acetic acid và methanol đạt tiêu chuẩn phân tích HPLC (Fisher). Thuốc thử Folin-Ciocalteu's phenol reagent được cung cấp bởi Supelco (Merck). Các enzyme được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm Celluclast 1.5 L (700 EGU/g) và Viscozyme L (300 AGU/mL) được cung cấp bởi Novozymes.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Xác định độ ẩm của nguyên liệu

Độ ẩm của nguyên liệu được xác định bằng phương pháp sấy ở nhiệt độ 105°C. Cân mẫu thử 2 - 5 g được cho vào chén thủy tinh đã sấy khô ở 105°C và làm nguội trong bình hút ẩm. Khối lượng của chén và mẫu trước khi sấy được cân và ghi nhận là W1. Chén chứa mẫu được sấy ở 105°C cho đến khi khối lượng không đổi. Sau khi sấy, chén được làm nguội trong bình hút ẩm và cân lại để xác định khối lượng của chén và mẫu sau khi sấy, ghi nhận là W2. Độ ẩm của mẫu được tính theo công thức:

$$W\% = \frac{W_1 - W_2}{m} \times 100$$

Trong đó:

- W1 (g) là khối lượng của mẫu thử và chén trước khi sấy;
- W2 (g) là khối lượng của mẫu thử và chén sau khi sấy;
- m (g) là khối lượng khô của mẫu thử trước khi sấy.

2.2.2. Chiết xuất các phenolic acid bằng phương pháp đun hồi lưu

Vỏ quả cà phê được ngâm trong các dung môi khác nhau bao gồm nước, ethanol 96% và ethanol 50% (v/v). Tỷ lệ nguyên liệu : dung môi là 1 : 50 (w/v). Sau đó, hỗn hợp được đun sôi hồi lưu trong 60, 120, 180 và 240 phút. Dịch chiết vỏ cà phê thu được bằng cách lọc qua giấy lọc Whatman số 1 và màng lọc nylon 0,22 µm, sau đó được xác định hàm lượng polyphenol tổng số và các phenolic acid. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành ba lần lặp lại.

2.2.3. Chiết xuất các phenolic acid bằng enzyme

Vỏ quả cà phê được ngâm đêm citrate (50 mM, pH 4,8) với tỉ lệ nguyên liệu : dung dịch 1 : 50 (w/v), sau đó xử lý nhiệt ở 121°C trong 15 phút (autoclave). Sau khi hỗn hợp nguội sẽ bổ sung hai loại enzyme bao gồm Celluclast và Viscozyme với liều lượng enzyme : cơ chất là 2% (w/w). Quá trình chiết xuất diễn ra trong điều kiện nhiệt độ 50°C với tốc độ lắc 120 vòng/phút (Tran & ctv., 2021). Lấy mẫu sau 15, 30, 45 và 60 phút để xác định hàm lượng polyphenol tổng số và các phenolic acid. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành ba lần lặp lại.

2.2.4. Xác định hàm lượng polyphenol tổng số

Hàm lượng polyphenol tổng số (TPC) được xác định với phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử (UV - Vis) bằng cách hút 100 µL mẫu dịch chiết vào ống nghiệm, sau đó thêm 100 µL thuốc thử Folin-Ciocalteu ủ trong 5 phút. Tiếp tục thêm 300 µL sodium carbonate 20%, tiến hành định mức bằng nước cất để đạt thể tích 5 mL và ủ trong 1 tiếng ở nhiệt độ phòng trong điều kiện tối. Gallic acid được sử dụng

làm chuẩn với nồng độ từ 50 - 250 mg/L. Tiến hành đo độ hấp thụ phân tử của dung dịch ở bước sóng hấp thụ cực đại 730 nm và ghi nhận kết quả (Singleton & ctv., 1999). Hàm lượng polyphenol tổng số TPC (mg/g) được tính theo công thức:

$$TPC (mg/g) = \frac{C \times V}{m}$$

Trong đó:

- C (mg/L) là nồng độ polyphenol trong mẫu được tính toán dựa trên đường chuẩn gallic acid;
- V (L) là thể tích dịch chiết vỏ cà phê;
- m (g) là khối lượng nguyên liệu khô đem chiết.

2.2.5. Định lượng các phenolic acid bằng kỹ thuật sắc ký lỏng pha đảo

Xác định hàm lượng các phenolic acid trong dịch chiết vỏ cà phê bao gồm protocatechuic acid (PCA), chlorogenic acid (CGA) và caffeic acid (CA) được thực hiện bằng kỹ thuật sắc ký lỏng pha đảo (RP-HPLC) được trang bị đầu dò DAD (Agilent 1260 Infinity II). Cột Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 150 × 4,6 mm, kích thước hạt 5 µm được vận hành ở nhiệt độ 35°C. Pha động A bao gồm nước khử ion chứa 1% acetic acid, pha động B là acetonitrile chứa 1% acetic acid. Chương trình rửa giải gradient được thực hiện như sau: 0 - 2 phút (5% B); 2 - 17 phút (5 - 40% B); 17 - 20 phút (40 - 40% B); 20 - 21 phút (40 - 5% B); 21 - 25 phút (5 - 5% B). Tốc độ dòng 1 mL/phút. Protocatechuic acid được phát hiện ở bước sóng 270 nm, chlorogenic acid và caffeic acid được phát hiện ở bước sóng 320 nm (Le & ctv., 2022).

2.2.6. Đánh giá khả năng chống oxy hóa của dịch chiết vỏ cà phê

Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết vỏ cà phê được xác định bằng thử nghiệm DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) bằng cách hút 0,5 mL dung dịch mẫu thử vào các ống nghiệm có chứa sẵn 3 mL ethanol 96%, tiếp tục thêm vào 1 mL DPPH 0,5 mM pha trong methanol và lắc đều. Hỗn hợp được để yên trong tối 30 phút và đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm, mẫu đối chứng thay dung dịch mẫu thử bằng nước cất (Blois, 1958; Chanda & Dave, 2009).

Thử nghiệm ABTS (2,2'-Azino(bis-3-ethyl-Benzothiazoline-6-Sulfonic acid)) được thực hiện để đánh giá khả năng chống oxy hóa dựa trên khả năng bắt gốc tự do ABTS của mẫu thử. Dung dịch thuốc thử ABTS được chuẩn bị bằng cách hòa tan 39,19 mg ABTS trong nước cất và định mức đến 10 mL để tạo dung dịch ABTS, sau đó trộn với dung dịch ammonium persulfate 2,45 mM theo tỷ lệ 1 : 0,5. Hỗn hợp này được ủ trong điều kiện tối từ 12 - 16 giờ để quá trình oxy hóa diễn ra hoàn toàn và đạt độ hấp thụ cực đại. Tiếp theo, dung dịch được pha loãng bằng ethanol 96% sao cho độ hấp thụ tại bước sóng 734 nm đạt giá trị $0,70 \pm 0,02$. Trong thử nghiệm này, 0,1 mL mẫu thử được cho vào ống nghiệm, sau đó thêm 2 mL dung dịch thuốc thử ABTS. Hỗn hợp được ủ trong điều kiện tối trong 6 phút trước khi đo độ hấp thụ tại bước sóng 734 nm. Mẫu đối chứng thay dung dịch mẫu thử bằng nước cất. Ascorbic acid (10 - 50 mg/L) và Trolox (20 - 100 mg/L) được sử dụng làm chất chuẩn để xây dựng đồ thị chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ chất chuẩn và khả năng bắt gốc tự do (%). Kết quả khả năng chống oxy hóa của dịch chiết từ thịt vỏ cà

phê được quy đổi về lượng Trolox (TE) tương đương (Re & ctv., 1999; Prasedya & ctv., 2021).

Khả năng bắt gốc tự do DPPH và ABTS được tính bằng công thức sau:

$$AC = \left[1 - \frac{Abs_s}{Abs_c} \right] \times 100$$

Trong đó:

- Abs_c là độ hấp thụ của mẫu đối chứng;
- Abs_s là độ hấp thụ của mẫu thử;
- AC là khả năng bắt gốc tự do (%).

2.3. Xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được thực hiện lặp lại ba lần. Dữ liệu thu thập từ các thí nghiệm được xử lý và phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel và thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch tiêu chuẩn (SD). Phần mềm Minitab được sử dụng để thực hiện phân tích thống kê, bao gồm phân tích ảnh hưởng 1 yếu tố (one-way analysis of variance) và trắc nghiệm phân hạng Tukey được sử dụng để xác định sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) giữa các giá trị trung bình.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Ảnh hưởng của phương pháp đun hồi lưu đến hiệu suất chiết polyphenol và phenolic acid

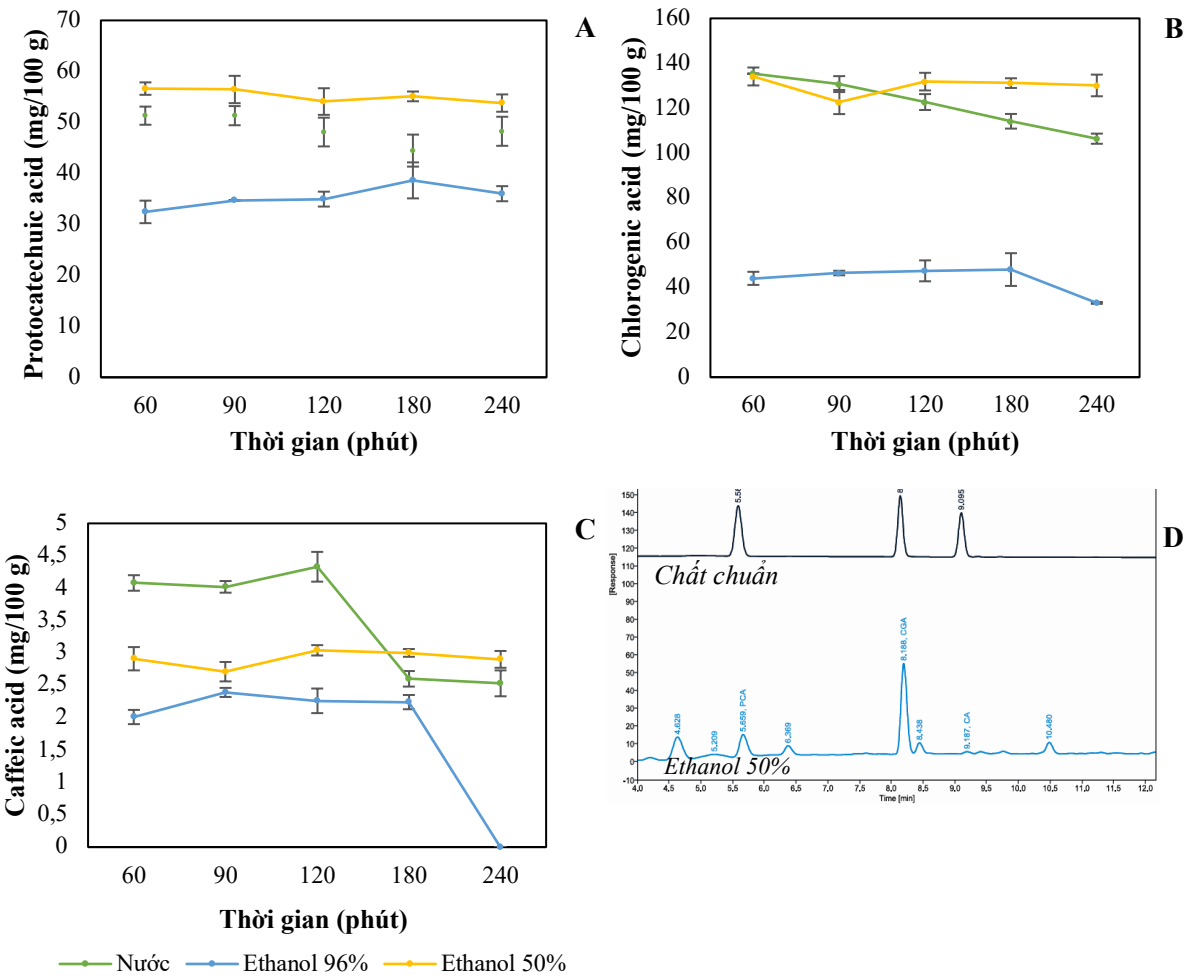
Vỏ cà phê là một nguồn nguyên liệu giàu các hợp chất polyphenol có tiềm năng ứng dụng trong thực phẩm và dược phẩm nhưng chưa được khai thác và sử dụng đúng mức. Trong nghiên cứu này, các hợp chất polyphenol được chiết bằng phương pháp đun hồi lưu bằng các dung môi khác nhau bao gồm nước, ethanol và ethanol 50% trong thời gian chiết 60 - 240 phút. Kết quả Bảng 1 cho thấy, loại dung môi sử dụng ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng polyphenol tổng. Trong đó, ethanol 50% có hiệu quả chiết xuất cao nhất với hàm lượng TPC đạt 27,10 mg GAE/g sau 180 phút. Thời gian chiết từ 120 - 240 phút cho hiệu quả polyphenol khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê. Một nghiên cứu gần đây cũng cho thấy ethanol 50% chiết xuất TPC từ vỏ cà phê cho hiệu quả tối ưu đạt 18,5 mg GAE/100 g (Pham & Tran, 2020). Trong khi đó, sử dụng ethanol 96% kém hiệu quả nhất, TPC chỉ đạt 5,44 mg GAE/g sau 240 phút.

Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất là yếu tố quan trọng để nâng cao hiệu quả thu hồi hợp chất phenolic từ phụ phẩm vỏ cà phê, đồng thời mở ra tiềm năng ứng dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm và dược phẩm.

Bảng 1. Ảnh hưởng của dung môi đến quá trình chiết xuất polyphenol từ vỏ cà phê

Thời gian (phút)	Hàm lượng polyphenol tổng (mg GAE/g)		
	Nước	Ethanol 96%	Ethanol 50%
60	17,20 ^c ± 0,21	3,74 ^b ± 0,02	23,01 ^c ± 0,96
90	18,37 ^b ± 0,67	3,76 ^b ± 0,41	24,76 ^{bc} ± 0,81
120	16,12 ^c ± 0,24	4,29 ^{ab} ± 0,26	25,89 ^{ab} ± 0,95
180	18,34 ^b ± 0,03	4,72 ^{ab} ± 0,94	27,10 ^a ± 0,37
240	19,83 ^a ± 0,22	5,44 ^a ± 0,25	26,21 ^{ab} ± 0,31

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau khác nhau có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$).



Kết quả phân tích các phenolic acid trong dịch chiết vỏ cà phê bao gồm chlorogenic acid (CGA), protocatechuic acid (PCA) và caffeic acid (CA) được thể hiện trong Hình 1. Nước và ethanol 50% có hiệu quả chiết xuất CGA, PCA và CA cao hơn ethanol 96%. Chlorogenic acid là phenolic acid dồi dào nhất trong vỏ quả cà phê đạt 135,35 mg/100 g khi chiết bằng nước trong 60 phút, khác biệt không có ý nghĩa với dung môi ethanol 50% trong 60 phút đạt 134,10 mg/100 g. Hàm lượng PCA cao nhất 56,63 mg/100 g khi chiết bằng ethanol 50% trong thời gian 60 phút. Các nghiên cứu trước đây cũng ghi nhận hiệu quả của ethanol 50% trong chiết xuất hợp chất phenolic acid từ vỏ cà phê. Hàm lượng CGA đạt 0,59 mg/mL khi sử dụng ethanol 50% cao hơn so với việc sử dụng nước và ethanol 99% với hàm lượng CGA lần lượt là 0,002 mg/mL và 0,14 mg/mL (Chen & ctv., 2021). Dung môi ethanol 96% kém hiệu quả trong việc chiết xuất các phenolic acid. Caffeic acid hiện diện trong vỏ cà phê với hàm lượng thấp nhất trong ba loại, đặc biệt CA bị phân hủy và giảm nhanh chóng từ 180 - 240 phút khi chiết bằng ethanol 96%. Caffeic acid là một hydroxycinnamic acid không bền, bị phân hủy khi quá trình rang hạt cà phê kéo dài hơn 20 phút ở 160°C hoặc sau 10 phút ở 220°C (Mehaya & Ayman, 2020). Nghiên cứu trước đây cũng ghi nhận hàm lượng caffeic

acid giảm khi tăng nồng độ ethanol từ 60 - 80% (Lukashou & ctv., 2020). Hàm lượng caffeic acid giảm 8,90% khi chiết xuất bằng phương pháp siêu âm trong ethanol 80% và trong nước chỉ giảm 1,02% (Sun & ctv., 2013).

3.2. Ảnh hưởng của phương pháp chiết xuất bằng enzyme đến hiệu quả chiết polyphenol và phenolic acid

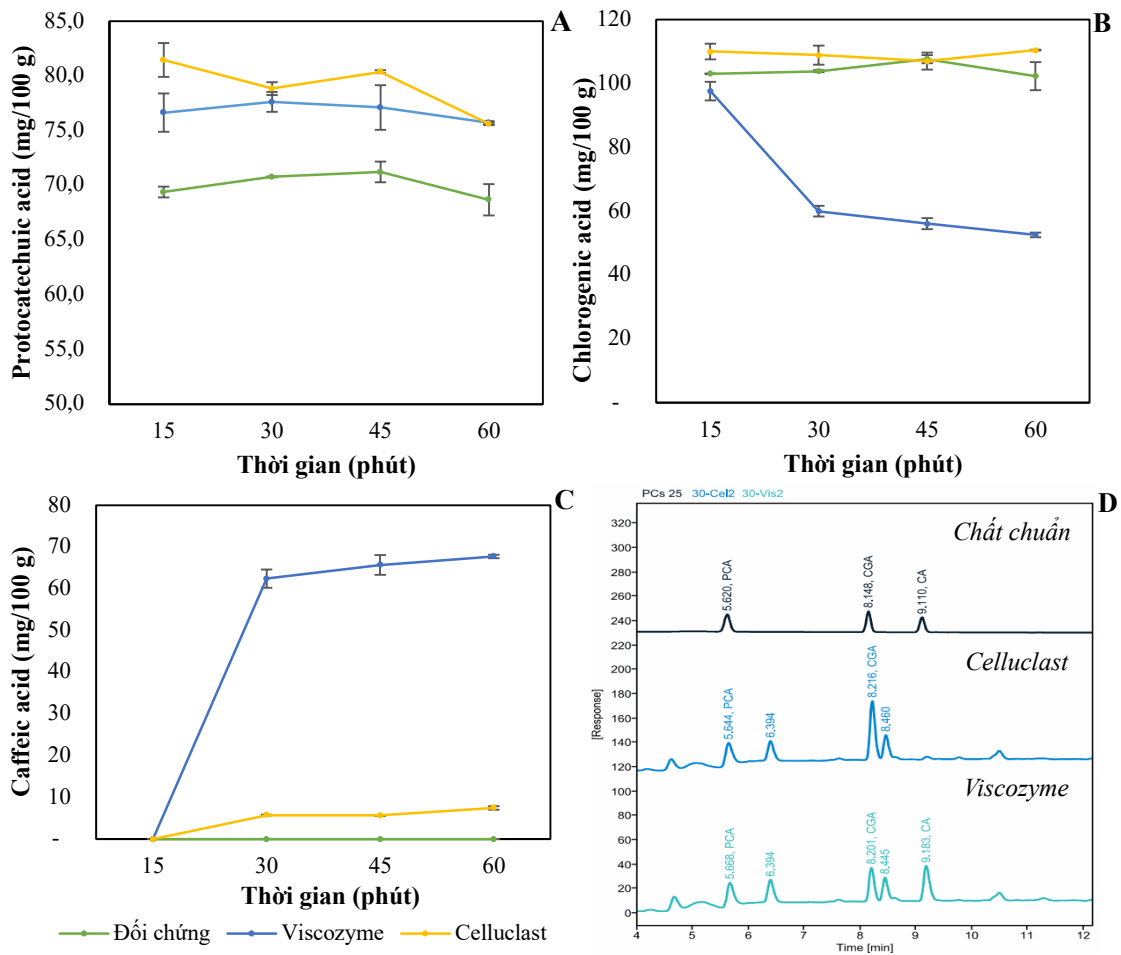
Phương pháp chiết xuất bằng enzyme dựa vào khả năng xúc tác đặc hiệu của enzyme để phá vỡ các thành phần của vách tế bào thực vật như cellulose, hemicellulose và pectin, từ đó giải phóng các hợp chất polyphenol liên kết với vách tế bào.

Kết quả Bảng 2 cho thấy enzyme ảnh hưởng đến hiệu quả chiết polyphenol tổng. Viscozyme cho hiệu quả chiết TPC cao nhất đạt 28,52 mg GAE/g trong 15 phút, cao hơn phương pháp chiết hồi lưu (27,10 mg GAE/g với ethanol 50% trong 180 phút) ($P < 0,05$). Chiết xuất bằng Celluclast cho kết quả TPC đạt tối đa 27,95 mg GAE/g sau 30 phút. Hàm lượng TPC giảm khi kéo dài thời gian chiết bằng enzyme. Mẫu đối chứng là mẫu xử lý nhiệt (120°C, 15 phút) nhưng không bổ sung enzyme cho kết quả TPC thấp nhất.

Bảng 2. Ảnh hưởng của enzyme đến quá trình chiết xuất polyphenol từ vỏ cà phê

Thời gian (phút)	Hàm lượng polyphenol tổng số (mg GAE/g)		
	Đối chứng	Viscozyme	Celluclast
15	26,56 ^a ± 0,85	28,52 ^a ± 0,11	26,61 ^b ± 0,50
30	26,43 ^a ± 0,84	25,68 ^b ± 1,31	27,95 ^a ± 0,87
45	25,73 ^a ± 1,28	25,25 ^b ± 1,66	27,33 ^{ab} ± 0,81
60	25,75 ^a ± 2,04	25,15 ^b ± 1,57	26,67 ^b ± 0,38

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau khác nhau có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$).



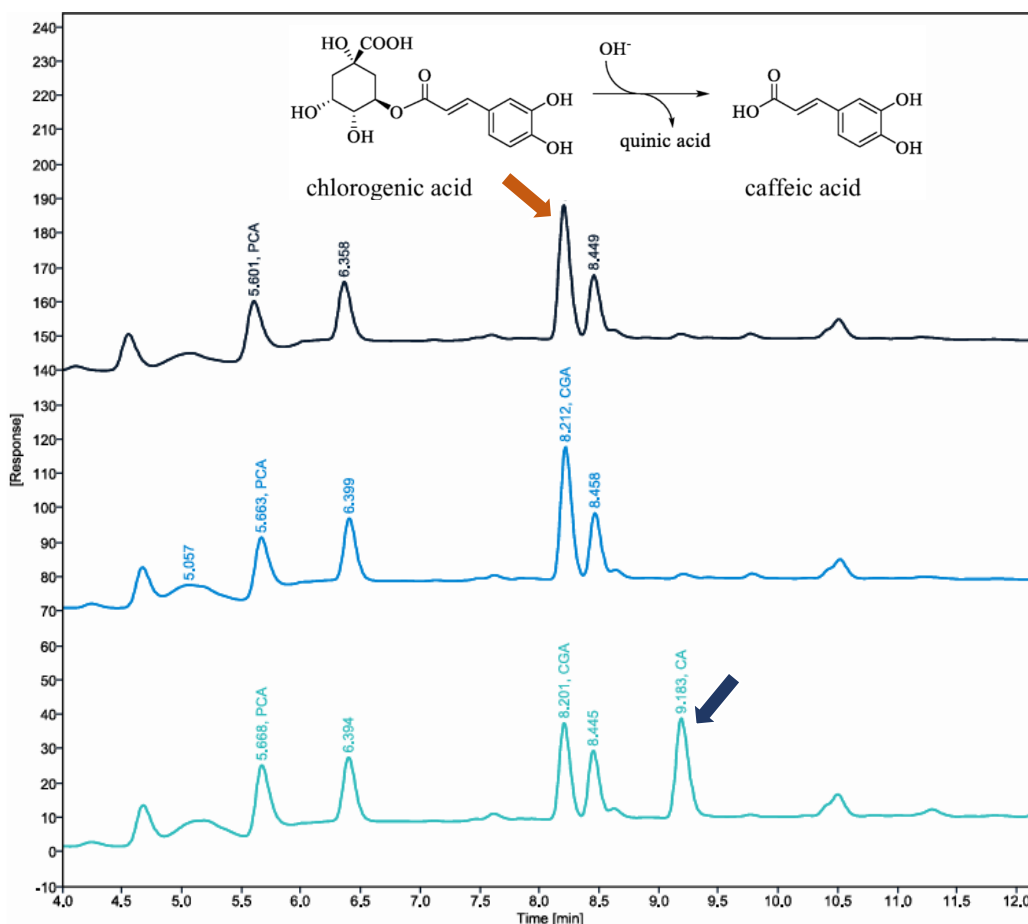
Hình 2. Ảnh hưởng của enzyme đến hiệu quả chiết các phenolic acid. A: hàm lượng protocatechuic acid (PCA); B: chlorogenic acid (CGA); C: caffeic acid (CA); (D): sắc ký đồ so sánh kết quả phân tích dịch chiết vỏ cà phê bằng Celluclast và Viscozyme tại 30 phút.

Kết quả phân tích thành phần dịch chiết vỏ cà phê bằng kỹ thuật sắc ký lỏng pha đảo (Hình 2) chỉ ra rằng nghiệm thức Celluclast có hiệu quả chiết PCA cao nhất đạt $81,96 \pm 3,67$ mg/100 g sau 15 phút, cao gấp 1,4 lần so với phương pháp đun hồi lưu bằng ethanol 50% (56,63 mg/100 g). Celluclast và Viscozyme đều cải thiện hiệu quả chiết PCA so với mẫu không sử dụng enzyme (đối chứng). Tuy nhiên kéo dài thời gian chiết xuất từ 15 - 60 phút làm giảm hàm lượng PCA được ghi nhận trên cả

Celluclast và Viscozyme. Celluclast có hiệu quả chiết xuất CGA cao hơn Viscozyme, đạt $109,99 \pm 2,46$ mg/100 g sau 15 phút và khác biệt không có ý nghĩa ($P < 0,05$) khi kéo dài thời gian chiết từ 15 - 60 phút. Ngược lại, hàm lượng CGA giảm nhanh chóng khi sử dụng Viscozyme từ 15 - 30 phút và tiếp tục giảm khi thời gian chiết xuất kéo dài 60 phút. Đáng chú ý, hàm lượng caffeic acid tăng nhanh chóng từ 15 - 30 phút ở nghiệm thức sử dụng Viscozyme đạt 62,43 mg/ 100 g sau 30 phút. Sắc ký đồ phân tích dịch

chiết vỏ cà phê bằng Viscozyme sau 30 phút cho thấy sự xuất hiện peak CA (9,18 phút; Hình 3) khác biệt với các mẫu chiết bằng Celluclast và đun hồi lưu. Chlorogenic acid là một ester của caffeic acid và quinic acid, sự phân cắt liên kết ester của CGA trong một số điều kiện nhất định làm giải phóng và gia tăng hàm lượng caffeic acid (Landbo & Meyer, 2001; Pinelo & ctv., 2007; Vasileva & ctv., 2020). Sự suy giảm đáng kể hàm lượng CGA khi sử dụng enzyme Viscozyme chứng tỏ rằng CGA bị phân cắt mạnh mẽ làm gia tăng nhanh chóng CA và hàm lượng CA đạt tối đa sau 60 phút (67,74 mg/100 g), cao gấp 16,5 lần so với phương pháp đun hồi lưu (4,09 mg/100 g với nước ở 60 phút). Kết quả tương tự về sự chuyển hóa CGA thành CA trên táo xanh cũng

được công bố khi sử dụng Viscozyme (Zheng & ctv., 2009). Viscozyme được báo cáo có hiệu quả chiết xuất hợp chất phenolic, flavonoid, và chất chống oxy hóa từ vỏ chuối cao hơn cellulase và pectinase (Islam & ctv., 2023). Chlorogenic acid trong nước ép táo được báo cáo bị thủy phân bởi enzyme p-coumaryl esterase, làm gia tăng hàm lượng CA (Siebert & ctv., 2019). Sự khác biệt về thành phần các enzyme dẫn đến hiệu quả chiết các phenolic acid khác nhau. Viscozyme là một hỗn hợp các enzyme phân hủy vách tế bào thực vật bao gồm arabinase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase, and xylanase trong khi Celluclast chỉ chứa cellulase và β -glucosidase. Sử dụng Celluclast không làm giảm CGA và CA tăng không đáng kể trong 60 phút quan sát.



Hình 3. Sắc kí đồ phân tích dịch chiết vỏ cà phê bằng Viscozyme tại 15 và 30 phút.

PCA: protocatechuic acid; CGA: chlorogenic acid; CA: caffeic acid.

3.3. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết vỏ cà phê

Trong nghiên cứu này, hoạt tính chống oxy hóa của chiết xuất vỏ cà phê được xác định bằng thử nghiệm DPPH và ABTS (Bảng 3). Khả năng chống oxy của dịch chiết vỏ cà phê được quy về hàm lượng ascorbic acid (AAE) và Trolox tương đương (TE). Thử nghiệm DPPH là một trong những phương pháp phổ biến để đo lường khả năng bắt gốc tự do của các hợp chất chống oxy hóa. Mẫu chiết bằng phương pháp đun hồi lưu với ethanol 50% có hiệu quả chống oxy hóa (62,89 mg TE/g) cao hơn mẫu chiết xuất bằng enzyme (53,84 - 54,32 mg TE/g) mặc dù hàm lượng polyphenol tổng của dịch chiết từ hai phương pháp khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê. Hàm lượng các phenolic acid như CGA, PCA và CA trong dịch chiết vỏ cà phê thu nhận từ hai phương pháp khác nhau dẫn đến khả năng chống oxy hóa khác nhau. Dịch chiết thu được bằng phương pháp đun hồi lưu có hàm lượng CGA (134,10 mg/100 g) cao hơn phương pháp enzyme nhưng hàm lượng PCA (56,63 mg/ 100 g) và CA (2,91 mg/ 100 g) thấp hơn. Để đánh giá tổng thể hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết hay nguyên liệu cần nhiều thử nghiệm khác. ABTS được đề xuất là một phương pháp phù hợp để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các nguyên liệu chứa các hợp chất ưa nước và nhiều sắc tố (Floegel & ctv., 2011). Nghiên cứu này cũng cho thấy ABTS là phương pháp ước lượng chính xác hơn hàm lượng chất chống oxy hóa trong trái cây, rau và đồ uống. Khả năng chống oxy hóa đo bằng thử nghiệm ABTS tương quan chặt chẽ với ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) cùng với hàm lượng phenolic và flavonoid trong 50

loại thực phẩm giàu chất chống oxy hóa theo cơ sở dữ liệu của Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ (USDA) (Floegel & ctv., 2011). Trong thử nghiệm ABTS, hợp chất chống oxy hóa chiết xuất bằng enzyme (76,51 - 77,57 mg TE/g) cao hơn chiết xuất bằng phương pháp đun hồi lưu (61,61 mg TE/g). Chiết xuất bằng hai loại enzyme Celluclast và Viscozyme cho kết quả hợp chất chống oxy hóa khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ($P > 0,05$). Kết quả chống oxy hóa đo bằng thử nghiệm ABTS cao hơn DPPH, điều này có thể được giải thích bởi sự khác biệt trong cơ chế phản ứng và môi trường thực hiện của hai phương pháp. Phương pháp DPPH, sử dụng gốc tự do ổn định DPPH, hoạt động tốt trong các dung môi hữu cơ như ethanol hoặc methanol, nhưng hạn chế với các hợp chất ưa nước. Trong khi đó, phương pháp ABTS, dựa trên khả năng khử của gốc ABTS⁺, hoạt động linh hoạt hơn, phù hợp trong cả môi trường nước và dung môi hữu cơ, từ đó đo lường hiệu quả hơn các hợp chất tan trong nước. Nghiên cứu của Re & ctv. (1999) đã khẳng định rằng phương pháp ABTS nhạy hơn đối với các chất chống oxy hóa ưa nước so với DPPH. Bên cạnh đó, Prior & ctv. (2005) cũng chỉ ra rằng việc sử dụng cả hai phương pháp này sẽ giúp đánh giá toàn diện hơn về khả năng chống oxy hóa của mẫu, đặc biệt trong nghiên cứu thực phẩm và dược phẩm. Kết quả khác biệt khi phân tích mẫu bằng hai thử nghiệm khác nhau được báo cáo bởi Dinh (2023) khi đánh giá khả năng kháng oxy hóa của gallic acid, với IC₅₀ là $2,23 \pm 0,02 \mu\text{M}$ khi thử nghiệm bằng DPPH và $12,20 \pm 0,03 \mu\text{M}$ bằng ABTS. Nghiên cứu của Huynh & ctv. (2021) đã xác định hoạt tính chống oxy hóa của vỏ cóc thông qua các phương pháp ABTS và DPPH, với giá trị IC₅₀ lần lượt là 20,461 và

81,734 $\mu\text{g/mL}$. Tương tự, nghiên cứu của Le & ctv. (2022) cũng đánh giá hiệu quả chống oxy hóa từ các dịch chiết hoa Xuyên Chi, ghi nhận kết quả IC_{50} là 31,54 $\mu\text{g/mL}$ (DPPH) và 35,33 $\mu\text{g/mL}$ (ABTS).

Bảng 3. Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết vỏ cà phê bằng thử nghiệm DPPH và ABTS

Phương pháp	DPPH mg TE/g	ABTS mg TE/g
Ethanol 50% 120 phút	62,89 ^a $\pm$ 0,87	61,61 ^b $\pm$ 2,33
Viscozyme 30 phút	53,84 ^b $\pm$ 0,16	76,51 ^a $\pm$ 2,17
Celluclast 30 phút	54,32 ^b $\pm$ 1,08	77,57 ^a $\pm$ 1,83

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau khác nhau có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$).

4. Kết Luận

Hiệu quả chiết xuất polyphenol từ vỏ quả cà phê đạt 27,10 mg GAE/g bằng phương pháp đun hồi lưu trong 180 phút với ethanol 50% và 28,52 mg GAE/g khi sử dụng enzyme Viscozyme trong 15 phút. Phương pháp đun hồi lưu với nước cho hiệu quả chiết xuất chlorogenic acid cao nhất với hàm lượng 135,35 mg/100 g sau 60 phút, trong khi enzyme Celluclast cho hiệu quả chiết xuất protocatechuic acid tối ưu đạt 81,96 mg/100 g sau 15 phút. Đặc biệt, caffeic acid được ghi nhận ở mức cao 67,74 mg/100 g sau 60 phút nhờ hoạt động của enzyme Viscozyme. Dịch chiết vỏ cà phê bằng enzyme phù hợp với thử nghiệm bắt gốc tự do ABTS, trong khi thử nghiệm DPPH nhạy hơn đối với dịch chiết bằng phương pháp đun hồi lưu với dung môi. Sử dụng phương pháp chiết xuất phù hợp để thu nhận hiệu quả các hoạt chất cụ thể là bước

đầu để ứng dụng vỏ quả cà phê trong lĩnh vực thực phẩm chức năng hoặc dược phẩm.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan nghiên cứu do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Lời Cảm Ơn

Cảm ơn Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh đã cấp kinh phí để thực hiện đề tài nghiên cứu khoa học cấp cơ sở với mã số CS-SV24-KHSH-02.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

Baiano, A. (2014). Recovery of biomolecules from food wastes: A review. *Molecules* 19(9), 14821-14842. <https://doi.org/10.3390/molecules190914821>.

- Barros, H., Baseggio, A. M., Angolini, C. F. F., Pastore, G. M., Cazarin, C. B. B., & Marostica-Junior, M. R. (2019). Influence of different types of acids and pH in the recovery of bioactive compounds in jabuticaba peel (*Plinia cauliflora*). *Food Research International* 124, 16-26. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.010>.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181(4617), 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
- Chanda, S., & Dave, R. (2009). *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research* 3, 981-996.
- Chen, C. Y., Shih, C. H., Lin, T. C., Zheng, J. H., Hsu, C. C., Chen, K. M., Lin, Y. S., & Wu, C. T. (2021). Antioxidation and tyrosinase inhibitory ability of coffee pulp extract by ethanol. *Journal of Chemistry* 2021, 8649618. <https://doi.org/10.1155/2021/8649618>.
- Dinh, Q. H. (2023). A combination of experimental research and theoretical physical chemistry in investigating the antioxidant potential of gallic acid. *Hue University Journal of Science* 132(1A), 41-48. <https://doi.org/10.26459/hueunijns.v132i1A.6892>.
- Dorsey, B., & Jones, M. (2017). Healthy components of coffee processing by-products. In Galanakis, C. M. (Ed.), *Handbook of coffee processing by-products: Sustainable applications* (1st ed., 27-62). New York, USA: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811290-8.00002-5>.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(7), 1043-1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>.
- Huynh, K. Y., Nguyen, T. T., Tran, T. M., Phung, T. H., Nguyen, H. S., Tran, H. L., Truong, T. T. T., & Le, T. T. (2021). Antioxidant and antimicrobial activities of ethanolic extract of *Lumnitzera racemosa* Willd. leaves. *Can Tho University Journal of Science* 57(5A), 44-51. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.140>.
- Islam, M. R., Kamal, M. M., Kabir, M. R., Hasan, M. M., Haque, A. R., & Hasan, S. M. K. (2023). Phenolic compounds and antioxidant activity of banana peel extracts: Testing and optimization of enzyme-assisted conditions. *Measurement: Food* 10, 100085. <https://doi.org/10.1016/j.measfoo.2023.100085>.
- Klingel, T., Kremer, J. I., Gottstein, V., Rajcic de Rezende, T., Schwarz, S., & Lachenmeier, D. W. (2020). A review of coffee by-products including leaf, flower, cherry, husk, silver skin, and spent grounds as novel foods within the European Union. *Foods* 9(5), 665. <https://doi.org/10.3390/foods9050665>.
- Landbo, A. K., & Meyer, A. S. (2001). Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(7), 3169-3177. <https://doi.org/10.1021/jf001443p>.
- Le, N. T. D., Nguyen, T. V. A., Huynh, V. B., & Trinh, T. P. L. (2022). Optimization of the extraction of polyphenols from red glorybower (*Clerodendrum japonicum*) leaf by response surface methodology. In *Proceedings of The National Conference on Biotechnology 2022* (1-7). Ha Noi, Vietnam: Natural Science and Technology Publishing House.
- Le, L. S., Le, T. H., Nguyen, Q. M., Ho, X. A. V., Tran, T. M., Nguyen, V. T., Nguyen, D. G. C., Le, T. T., & Tran, T. V. T. (2022). Chemical composition and antioxidant activities of extracts from *Bidens pilosa*. *Hue University Journal of Science:*

- Natural Science* 131(1C), 35-45. <https://doi.org/10.26459/hueunijns.v131i1C.6670>.
- Lukashou, R., Gurina, N., Lyubakovskaya, L., & Grigorovich, A. (2020). Water-ethanol extraction of hydroxycinnamonic acid from brown knapweed. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 9(6), 3094-3098.
- Mehaya, F. M., & Mohammad, A. A. (2020). Thermostability of bioactive compounds during roasting process of coffee beans. *Heliyon* 6(11), 05350. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05350>.
- Mungwari, C. P., King'ondur, C. K., Sigauke, P., & Obadele, B. A. (2025). Conventional and modern techniques for bioactive compounds recovery from plants: A review. *Scientific African* 27, 02509. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02509>.
- Murthy, P., & Naidu, M. (2012). Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology* 5(3), 897-903. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0363-z>.
- Pham, T. H. T., & Tran, T. T. H. (2020). Research on factors affecting the extractability of antioxidant compounds from coffee husks. *Science & Technology Development Journal - Engineering and Technology* 3(1), 634. <https://doi.org/10.32508/stdjet.v3i1.634>.
- Pinelo, M., Tress, A., Pedersen, M., Arnous, A., & Meyer, A. (2007). Effect of cellulases, solvent type and particle size distribution on the extraction of chlorogenic acid and other phenols from spent coffee grounds. *American Journal of Food Technology* 7(12), 641-651. <https://doi.org/10.3923/ajft.2007.641.651>.
- Prasedya, E. S., Frediansyah, A., Martyasari, N. W. R., Ilhami, B. K., Abidin, A. S., Padmi, H., Fahrurrozi, Juanssilfero, A. B., Widyastuti, S., & Sunarwidhi, A. L. (2021). Effect of particle size on phytochemical composition and antioxidant properties of *Sargassum cristaefolium* ethanol extract. *Scientific Reports* 11, 17876. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95769-y>.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.
- Quatrin, A., Pauletto, R., Maurer, L. H., Minuzzi, N., Nichelle, S. M., Carvalho, J. F. C., Maróstica, M. R., Rodrigues, E., Bochi, V. C., & Emanuelli, T. (2019). Characterization and quantification of tannins, flavonols, anthocyanins and matrix-bound polyphenols from jaboticaba fruit peel: A comparison between *Myrciaria trunciflora* and *M. jaboticaba*. *Journal of Food Composition and Analysis* 78, 59-74. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.01.010>.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).
- Siebert, M., Berger, R. G., & Pfeiffer, F. (2019). Hydrolysis of chlorogenic acid in apple juice using a p-coumaryl esterase of *Rhizoctonia solani*. *Journal of The Science of Food and Agriculture* 99(15), 6644-6648. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9940>.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178.
- Sun, Y., Qiao, L., Ye, X., Liu, D., Zhang, X., & Huang, H. (2013). The Sonodegradation of Caffeic Acid under Ultrasound Treatment: Relation to

- Stability. *Molecules* 18(1), 561-573. <https://doi.org/10.3390/molecules18010561>.
- Tran, T. T. T. K., Tran, M. N., & Ton, N. M. (2021). Combined cellulolytic and pectinolytic enzymes to increase the polyphenol extractability of coffee husks. *VNUHCM Journal of Engineering and Technology* 4(2), 968-976.
- Trinh, L. T. P., Choi, Y., & Bae, H. J. (2018). Production of phenolic compounds and biosugars from flower resources via several extraction processes. *Industrial Crops and Products* 125, 261-268. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.008>.
- Vasileva, L. V., Savova, M. S., Amirova, K. M., Balcheva-Sivenova, Z., Ferrante, C., Orlando, G., Wabitsch, M., & Georgiev, M. I. (2020). Caffeic and chlorogenic acids synergistically activate browning program in human adipocytes: Implications of AMPK- and PPAR-mediated pathways. *International Journal of Molecular Sciences* 21(24), 9740. <https://doi.org/10.3390/ijms21249740>.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound-assisted extraction in the food industry: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9(2), 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>.
- Zheng, H. Z., Hwang, I. W., & Chung, S. K. (2009). Enhancing polyphenol extraction from unripe apples by carbohydrate-hydrolyzing enzymes. *Journal of Zhejiang University Science B* 10(12), 912-919. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0920186>.