

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TRÍCH LY POLYPHENOL TỪ LÁ VỐI (*CLEISTOCALYX OPERCULATUS*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP SIÊU ÂM VÀ XỬ LÝ BẰNG ENZYME CELLULASE

Hoàng Thị Trúc Quỳnh¹, Nguyễn Thị Minh Thôi², Trần Thị Thu Hương³

^{1, 2, 3} Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp. Hồ Chí Minh

³quynhhtt@cntp.edu.vn

Ngày nhận bài: 4/8/2017; Ngày duyệt đăng: 05/9/2017

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng các thông số công nghệ của quá trình xử lý bằng sóng siêu âm và xử lý bằng enzyme cellulase lên quá trình trích ly polyphenol từ lá vối tươi được khảo sát bằng phương pháp thực nghiệm. Các thông số được khảo sát của quá trình trích ly có siêu âm là thời gian xử lý (5, 10, 15 phút) và công suất siêu âm (20, 25, 30, 35% tính theo công suất cực đại 750W). Các thông số công nghệ được khảo sát của quá trình trích ly có hỗ trợ xử lý bằng enzyme cellulase là nồng độ enzyme (0,5; 1; 1,5; 2%v/w) và thời gian xử lý (30, 45, 60, 75 phút). So với phương pháp trích ly truyền thống hàm lượng polyphenol tổng số (TPC) trong dịch trích chỉ đạt 49,493 mgGAE/g chất khô, phương pháp trích ly có hỗ trợ siêu âm cho hàm lượng TPC cao gấp 1,41 lần, phương pháp trích ly có hỗ trợ xử lý enzyme cho hàm lượng TPC cao gấp 1,66 lần. Hoạt tính kháng oxy hóa (tính bằng khả năng khử gốc tự do DPPH) cao nhất của dịch trích ly có siêu âm đạt 72,79% và của dịch trích ly có xử lý enzyme đạt 86,27% đều cao hơn so với mẫu đối chứng trích ly truyền thống (53,02%).

Từ khóa: lá vối, trích ly, polyphenol, kháng oxy hóa gốc tự do DPPH, enzyme cellulase, siêu âm

ABSTRACT

Evaluate the efficiency extraction of polyphenol

from *Cleistocalyx operculatus* by methods ultrasound and enzyme cellulase treatment

In this study, the influence of technical parameters of ultrasound and cellulase enzyme treatment on polyphenol extraction from fresh floret leaves was investigated by a factorial experimental method. The investigated parameters of ultrasonic extraction are the processing time (5, 10, 15 minutes) and the ultrasonic power (20, 25, 30, 35% calculated at a maximum power of 750W). The technological parameters of the extraction by assisted cellulase enzyme treatment were enzyme concentrations (0,5; 1; 1,5; 2% v / w) and treatment time (30, 45, 60, 75 minutes). Compared with the traditional extraction method that produced a total polyphenol content (TPC) of 49,493 mgGAE / g dry matter, the ultrasonic extraction produced TPC content was 1,41 times higher, and enzyme treatment extraction produced TPC content that was 1,66 times higher. Antioxidant activity (calculated by DPPH radical elimination capacity) was higher in ultrasonic extraction at 72,79%, and highest in enzymatic extraction with 86,27%, whereas the traditionally extracted control sample yielded 53,02%.

Keywords: *Cleistocalyx operculatus* leaves, extract, polyphenol, antioxidant capacity, cellulase enzyme, ultrasound

1. Mở đầu

Cây vối còn gọi là chè vối, chè gỏi... có tên khoa học là *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr. et Perry thuộc họ Sim (Myrtaceae). Cây được phân bố chủ yếu ở Việt Nam, Trung Quốc và một số nước nhiệt đới. Ở Việt Nam, cây thường mọc hoang hoặc được trồng ở khắp các vùng quê thuộc đồng bằng Bắc và Trung Bộ để

lấy lá, nụ hoa làm trà uống và làm thuốc (Đỗ Tất Lợi, 2000). Từ lâu, lá và nụ vối đã được dân gian sử dụng để nấu nước uống có tác dụng giải nhiệt, mùi thơm dễ chịu lại có tác dụng tiêu thực. Một nghiên cứu thực hiện trên 28 loại thực vật ăn được ở Việt Nam cũng xác định nụ vối là một trong bốn nguyên liệu tiềm năng có hoạt tính sinh học bằng hoặc cao hơn lá ổi. Hàm lượng

polyphenol tổng của các thành phần từ cây vối cao, tương đương 146,6mg catechin/g nguyên liệu lá vối khô (Trương Tuyết Mai, 2008) và 128 mg catechin/g nguyên liệu nụ vối khô (Trương Tuyết Mai, 2007). Ngoài ra, nước sắc lá vối có tính kháng khuẩn, lợi mật, ức chế sự phát triển tế bào ung thư (Đào Thị Thanh Hiền, 2003), có tác dụng kháng sinh đặc biệt với *Streptococcus*, vi trùng bạch cầu và *Streptococcus pneumonia* (Nguyễn Đức Minh, 1986).

Quá trình trích ly được biết đến rộng rãi như là một quá trình tách chiết các chất hòa tan từ nguyên liệu (Chew, 2011). Trong công nghệ sản xuất trà hòa tan, trích ly là công đoạn quan trọng quyết định đến chất lượng thành phẩm. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng của enzyme làm tăng hiệu quả trích ly trong quá trình sản xuất. Chee-Hway Tsai và cộng sự (1986) nghiên cứu ứng dụng xử lý enzyme trên trà đen, khi sử dụng các enzyme: tannase, cellulase, papain, pectinase, hemicellulase cho kết quả hàm lượng chất hòa tan trong trà tăng từ 0,3% đến 10%. Nghiên cứu Bent (1984) đã sử dụng enzyme trong sản xuất trà uống liền cho thấy cao chiết của trà có xử lý enzyme tăng 2,25 lần so với trà không xử lý enzyme, đồng thời giảm độ đục của dịch chiết cao trà.

Sóng siêu âm được biết đến có khả năng thay đổi tính chất vật lý và hóa học của nguyên liệu thực vật. Hiệu ứng sinh vi bọt khí của sóng siêu âm thúc đẩy sự giải phóng các thành phần hòa tan. Năng lượng siêu âm làm tăng dao động ở bề mặt, làm ảnh hưởng tới lớp ranh giới khuếch tán, tạo ra sự co giãn ở bề mặt vật liệu, qua đó tăng cường quá trình truyền khối. Nhiều tác giả cho rằng, siêu âm là một trong những phương pháp đầy triển vọng hỗ trợ cho quá trình trích ly (Luque-García, 2003) đặc biệt là trích ly các hợp chất từ thiên nhiên (Escalpez, 2011). Thực tế đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật siêu âm nhằm trích ly các hợp chất phenolic trên các vật liệu khác nhau như hạt nho (Kashif, 2009) hay lá olive (Japón-Luján, 2006)...nhưng chưa nghiên cứu cho lá vối. Vì vậy, nghiên cứu ảnh hưởng của các thông số công nghệ trong quá trình trích ly có hỗ trợ xử lý bằng sóng siêu âm

và trích ly hỗ trợ xử lý bằng enzyme cellulase được đánh giá thông qua chỉ tiêu: hàm lượng polyphenol tổng (TPC- mgGAE/g chất khô) và khả năng khử gốc tự do DPPH (% ức chế DPPH) của dịch sau trích ly đã được thực hiện.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Nguyên, vật liệu, dụng cụ thí nghiệm

Lá vối tươi được thu mua tại vùng trồng ở xã Hồng Thái, huyện Bắc Bình, tỉnh Bình Thuận vào tháng 2-3/2017. Sau khi thu hái, lá được lựa chọn là lá bánh tẻ (lá thứ 3-6 tính từ đỉnh cành), có màu xanh đậm, không bị vàng úa và không bị bệnh đốm lá. Lá vối sau khi được rửa sạch, để ráo nước, sấy ở 70°C đến độ ẩm < 10%, nghiền đến kích thước 0,5 - 1mm và đóng gói chân không trong túi PE kín tối màu, khô, sạch và vận chuyển về phòng thí nghiệm làm nguyên liệu cho nghiên cứu.

Thiết bị sử dụng: tủ sấy Ecocell, thiết bị siêu âm Sonics, máy ly tâm Hermle Z206A, máy lắc ống nghiệm Vortex, máy đo quang Model Photolab 6100 Vis, bể ổn nhiệt, cân sấy ẩm hồng ngoại.

Hóa chất: acid Gallic, thuốc thử Folin – Ciocalteu 0,1N (Merck, Đức), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Sigma, Mỹ).

Enzyme cellulase dùng trong nghiên cứu là sản phẩm thương mại Viscozyme® L (Sigma, Mỹ), có thành phần chính là enzyme Endoglucanase, ở dạng lỏng có màu nâu và độ nhớt là 1,22 g/ml được bảo quản ở nhiệt độ 4 ÷ 8°C. Nhiệt độ khuyến cáo của enzyme từ 40 ÷ 50°C, pH = 4 ÷ 5,5; hoạt độ 700 FBGU/g.

Thí nghiệm được thực hiện tại Trung tâm Thí nghiệm thực hành, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Ảnh hưởng của điều kiện xử lý enzyme lên hàm lượng polyphenol và khả năng khử gốc tự do của dịch trích ly

Cân 5g bột lá vối khô, chuyển vào cốc 100ml, tỷ lệ bột lá vối và nước sử dụng để trích ly là 1:10, nồng độ enzyme sử dụng lần lượt 0,5; 1; 1,5; 2% (v/w). Hỗn hợp được giữ ổn định trong bể ổn nhiệt ở 50°C. Thời gian xử lý lần lượt được khảo sát ở 30, 45, 60 và 75 phút. Kết thúc quá

trình xử lý, toàn bộ dịch đem đi ly tâm ở tốc độ 4.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Phân tích phần dịch trong thu được từ quá trình ly tâm để xác định TPC và % ức chế DPPH (Hai, 2016).

2.2.2. Ảnh hưởng của điều kiện siêu âm lên hàm lượng polyphenol và khả năng khử gốc tự do của dịch trích ly

Cân 5g bột lá vối khô, chuyển vào cốc 100ml, tỷ lệ bột lá vối và nước sử dụng để trích ly là 1:10, xử lý hỗn hợp với sóng siêu âm của máy phát siêu âm Sonics (công suất cực đại 750W, tần số 20kHz). Khảo sát ở các mức công suất 20, 25, 30, 35% so với công suất cực đại (tương ứng 150; 187,5; 225; 262,5W), thời gian xử lý 5, 10, 15 phút. Kết thúc quá trình xử lý, làm nguội hỗn hợp về nhiệt độ phòng, toàn bộ dịch đem đi ly tâm ở tốc độ 4.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Phân tích phần dịch trong thu được từ quá trình ly tâm để xác định TPC và % ức chế DPPH. (Trần Chí Hải, 2016).

2.2.3. Đánh giá khả năng trích ly polyphenol của hai phương pháp siêu âm và xử lý bằng enzyme cellulase

Mẫu đối chứng được chuẩn bị: Cân 5g bột lá vối khô, chuyển vào cốc 100ml, tỷ lệ bột lá vối và nước sử dụng để trích ly là 1:10. Thực hiện trích ly ở 60°C (giữ trong bể ổn nhiệt) với thời gian 60 phút. Kết thúc quá trình xử lý, làm nguội hỗn hợp về nhiệt độ phòng, toàn bộ dịch đem đi ly tâm ở tốc độ 4.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Phần dịch trong thu được sau ly tâm được sử dụng để đo TPC và % ức chế DPPH.

Đối chiếu kết quả phân tích này với kết quả tốt nhất đạt được ở Thí nghiệm 2.2.1 và 2.2.2, qua đó đánh giá khả năng trích ly polyphenol của các phương pháp trong nghiên cứu.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Xác định hàm lượng polyphenol

Hàm lượng polyphenol được xác định theo phương pháp Folin-Ciocalteu với chất chuẩn là acid gallic (Fu, 2011). Tiến hành pha loãng dung dịch với nồng độ phù hợp (dịch thu được ở phần chiết mẫu). Sau đó, hút 0,5ml dung dịch

mẫu đã pha loãng vào ống nghiệm. Thêm vào 2,5ml dung dịch Folin-Ciocalteu (đã pha loãng 10 lần) và đồng nhất bằng máy Vortex, để dung dịch phản ứng trong 4 phút. Tiếp tục, thêm 2,0ml dung dịch Na_2CO_3 7,5% và lắc đều. Để dung dịch ở nhiệt độ phòng trong bóng tối 2 giờ. Sau đó đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 760nm. Hàm lượng polyphenol được biểu diễn theo miligam đương lượng acid gallic trong 1g chất khô - mgGAE/g chất khô.

2.3.2. Xác định khả năng kháng oxy hóa

Khả năng chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp DPPH (Tarbart và cộng sự, 2009). Về nguyên tắc, các chất kháng oxy hóa sẽ trung hòa gốc DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) bằng cách cho hydrogen, làm giảm độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và màu của dung dịch phản ứng nhạt dần, chuyển từ màu tím sang màu vàng nhạt. Giá trị mật độ quang OD càng thấp chứng tỏ khả năng bắt gốc tự do DPPH càng cao.

Quy trình thí nghiệm thực hiện như sau: Dung dịch gốc DPPH được chuẩn bị bằng cách hòa tan 24mg DPPH trong 100mL methanol và bảo quản ở -20°C. Dung dịch DPPH được chuẩn bị bằng cách lấy 10mL dung dịch gốc cho vào 45mL methanol (để có độ hấp thụ là $1,1 \pm 0,02$ đơn vị khi so màu ở bước sóng 517nm). Lấy 150μL dịch chiết mẫu và cho vào 2850 μL dung dịch DPPH rồi để trong bóng tối 30 phút. Tiến hành so màu ở bước sóng 517nm (cùng ống nghiệm đối chứng không chứa dịch chiết). Kết quả được biểu thị bằng % ức chế DPPH theo công thức:

$$AA = \frac{OD_{\text{control}} - OD_m}{OD_{\text{control}}} * 100$$

Trong đó:

OD_m : giá trị mật độ quang OD của mẫu thử

OD_{control} : giá trị mật độ quang OD của mẫu control

AA: % ức chế DPPH

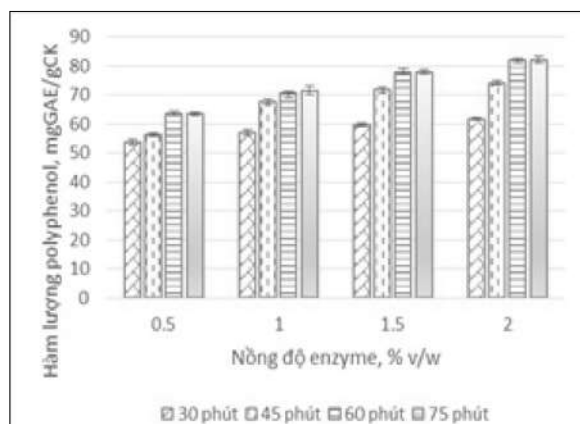
2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Trong nghiên cứu này, mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần, kết quả được biểu diễn bằng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (mean $\pm$ SD). Xử lý thống kê số liệu thực nghiệm bằng ANOVA.

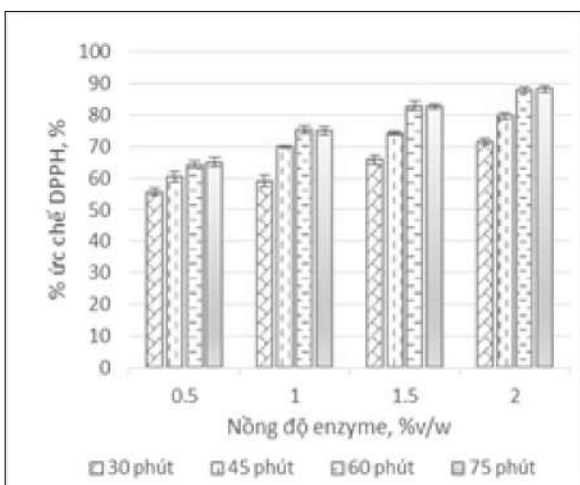
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả ảnh hưởng của điều kiện xử lý enzyme lên hàm lượng polyphenol và khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch trích ly

Ảnh hưởng của nồng độ enzyme và thời gian xử lý lên hàm lượng polyphenol (TPC) và hoạt tính khử gốc tự do DPPH (% ức chế DPPH) của dịch trích ly được thể hiện trong Hình 1.



(a)



(b)

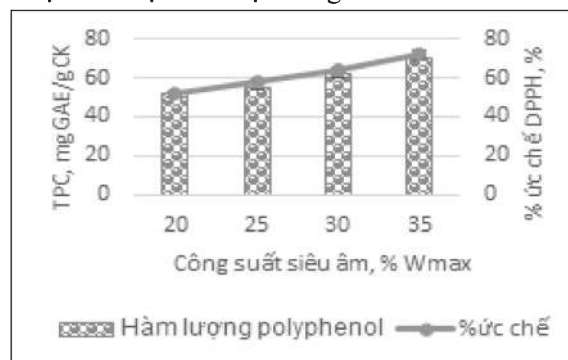
Hình 1: Ảnh hưởng của nồng độ enzyme và thời gian xử lý lên hàm lượng polyphenol (a) và khả năng khử gốc tự do DPPH (b) của dịch trích ly

Từ Hình 1 có thể thấy, ở cả 4 nồng độ enzyme thí nghiệm, khi thời gian xử lý tăng từ 30 đến 60 phút thì TPC và % ức chế DPPH đều tăng có ý nghĩa ($p < 0,05$). Cụ thể, khi nồng độ enzyme 1%v/w, thời gian xử lý enzyme là 60 phút, TPC đạt 70,72 mg GAE/g chất khô, gấp 1,24 lần so với mẫu xử lý enzyme trong 30 phút (57,18 mg GAE/g chất khô); % ức chế DPPH tăng 1,27 lần (từ 59,10 đến 75,39%). Khi tăng

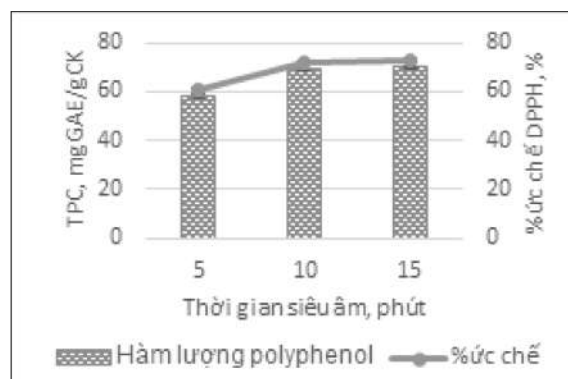
thời gian xử lý lên 75 phút, TPC và % ức chế DPPH tăng nhưng không đáng kể (1,01 lần so với mẫu khảo sát ở 60 phút). Xu hướng này cũng lặp lại khi tăng nồng độ enzyme lên 1,5 và 2%. Điều này là do thời gian càng tăng thì hàm lượng polyphenol trích ly ra càng nhiều, tuy nhiên đến một giới hạn nào đó sự tiếp xúc giữa các thành phần được trích ra của lá với với không khí đủ lâu, làm xảy ra sự oxy hóa các chất có trong mẫu đồng thời tạo điều kiện cho enzyme polyphenol oxidase hoạt động mạnh chuyển hóa polyphenol làm giảm hàm lượng polyphenol tổng nhanh hơn mẫu so với phương pháp trích ly truyền thống không bổ sung enzyme (Mai, 2007). Từ đó, hoạt tính kháng oxy hóa gốc tự do DPPH cũng giảm theo.

3.2. Kết quả ảnh hưởng của điều kiện siêu âm lên hàm lượng polyphenol và khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch trích ly

Ảnh hưởng của công suất và thời gian siêu âm lên TPC và % ức chế DPPH của dịch trích ly được thể hiện lần lượt trong Hình 2 và Hình 3.



Hình 2. Ảnh hưởng của công suất siêu âm lên TPC và % ức chế DPPH của dịch trích ly



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm lên TPC và % ức chế DPPH của dịch trích ly

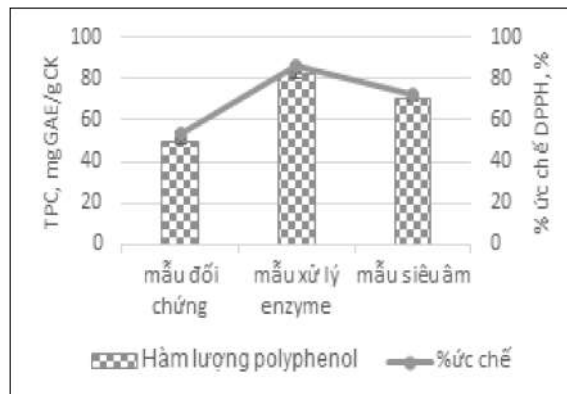
Kết quả từ Hình 2 cho thấy công suất siêu âm ảnh hưởng có ý nghĩa đến TPC và % ức chế DPPH của dịch trích ly ($p < 0,05$). Trong thời gian xử lý 10 phút, khi tăng công suất siêu âm từ 150 đến 262,5W (tương ứng 20-35% công suất cực đại), TPC tăng 1,35 lần (từ 51,78 lên 69,82mgGAE/gCK) và % ức chế tăng 1,39 lần (từ 52,29 đến 72,54%). Hiệu quả trích ly các hợp chất khi sử dụng sóng siêu âm tăng lên là nhờ sự tạo thành các bọt khí trong dung môi khi sóng truyền qua. Dưới tác dụng của sóng, các bọt khí bị kéo nén, sự tăng áp suất và nhiệt độ làm các bọt khí nổ vỡ, làm tăng sự thoát ra của các chất nội bào vào dung dịch. Công suất siêu âm càng lớn thì hiện tượng xâm thực khí càng mạnh do đó cấu trúc thành tế bào bị phá vỡ nhiều hơn và hiệu quả trích ly chất chiết tăng lên. Giải thích này tương tự với nghiên cứu các tác giả Carla Da Porto (2013) khi ứng dụng sóng siêu âm để trích ly polyphenol từ hạt nho và tác giả Hemwimol (2006) trích ly anthroquinones từ rễ cây nhàu.

Từ Hình 3, có thể nhận thấy TPC và % ức chế DPPH tăng lần lượt 1,2 và 1,18 lần khi tăng thời gian xử lý từ 5 phút lên 10 phút ở công suất 262,5W. Tuy nhiên, khi thời gian xử lý tăng lên 15 phút, TPC thu được trong dịch trích không có sự khác biệt đáng kể (từ 69,82 lên 70,03mgGAE/gCK, $p > 0,05$). Quy luật này tương tự với các nghiên cứu đã được ghi nhận trước đây khi sử dụng sóng siêu âm hỗ trợ quá trình trích ly dịch quả từ trái dâu tằm của tác giả Phan và cộng sự (2012), dịch quả chuối của tác giả Trần và cộng sự (2015).

3.3. Đánh giá khả năng trích ly polyphenol của hai phương pháp trích ly với sự hỗ trợ của sóng siêu âm và trích ly có xử lý bằng enzyme cellulase

Khả năng trích ly polyphenol của 2 phương pháp được đánh giá dựa trên cơ sở đối chiếu với mẫu đối chứng không xử lý siêu âm hoặc enzyme. Kết quả phân tích thống kê số liệu thực nghiệm cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về TPC và % ức chế DPPH của dịch chiết giữa các phương pháp ($p < 0,05$). Hình 4 cho thấy phương pháp trích ly có hỗ trợ bằng enzyme cellulase cho TPC và % ức chế DPPH cao hơn gấp 1,66 và

1,62 lần so với phương pháp trích ly đơn thuần. Trong khi đó trích ly có hỗ trợ siêu âm cho TPC và % ức chế DPPH cao hơn gấp 1,41 và 1,37 lần so với phương pháp trích ly đơn thuần. Cả hai phương pháp đều giúp tăng hiệu quả trích ly polyphenol từ nguyên liệu ban đầu.



Hình 4: So sánh TPC và % ức chế DPPH của 3 phương pháp trích ly

4. Kết luận

Phương pháp trích ly hỗ trợ enzyme cellulase ở điều kiện nồng độ enzyme 2% v/w xử lý trong 75 phút cho TPC cao nhất (82,16mgGAE/gCK). Phương pháp hỗ trợ bằng sóng siêu âm đạt TPC cực đại (70,03mgGAE/gCK) ở điều kiện công suất 262,5W trong 15 phút. Trong phạm vi của nghiên cứu này, khả năng trích ly polyphenol của mẫu có hỗ trợ enzyme cao hơn so với mẫu hỗ trợ siêu âm 14,7%. Cả hai phương pháp trích ly có hỗ trợ kỹ thuật siêu âm và xử lý enzyme đều cho khả năng trích ly polyphenol cao hơn so với phương pháp trích ly đơn thuần. Tuy nhiên, để có kết quả so sánh toàn diện hơn cần thiết thực hiện thêm các nghiên cứu tối ưu hóa ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ lên hiệu quả trích ly của cả hai phương pháp trên. Kết quả của nghiên cứu có thể thấy, việc ứng dụng kỹ thuật siêu âm hoặc kỹ thuật xử lý enzyme vào quá trình trích ly nhằm mục đích gia tăng khả năng trích ly polyphenol từ nguyên liệu thực vật là hoàn toàn khả thi và có tính ứng dụng cao trong thực tiễn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Da Porto, C., Porretto, E., and Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20 (2013),

- pp. 1076–1080.
- Chee Hway Tsai (1983). Patentsuche: *Enzymatic treatment of black tea leaf*. US 4639375 A, 12. Aug.
- Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Wan Aida, M. and Ho, C. W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18 (4), pp. 1427-1435.
- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A. and Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Reviews*, Springer US, pp. 108-120.
- Fu, L., Xu, B. T., Xu, X. R., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xia, E. Q. and Li, H. B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129, pp. 345-350.
- Trần Chí Hải, Nguyễn Tấn Dân, Nguyễn Đình Nam, Lê Thị Hồng Ánh và Phan Văn Mẫn, (2016). Ảnh hưởng của sóng siêu âm lên quá trình trích ly polyphenol từ lá trà già. *Tạp chí Khoa học công nghệ Đại học Đà Nẵng*, 9 (106), tr. 69-72.
- Hai, T. C., Nam, N. D., Hong Anh, L. T., Vu T. A., and Man, P. V. (2016), Enzyme Assisted Extraction of Polyphenols from the Old Tea Leaves, *Journal of Nutrition and Health Sciences*, 3 (4), pp. 1-6.
- Trần Thị Hồng Hạnh và Lê Văn Việt Mẫn (2015). Ảnh hưởng của một số thông số công nghệ trong quá trình xử lý siêu âm đến hiệu suất thu hồi và chất lượng dịch quả chuối (*Musa paradisiaca* L.). *Science and Technology Development*, 18 (K5), pp. 68-74.
- Hemwimol, S., Pavasant, P. and Shotipruk, A. (2006). Ultrasound-assisted extraction of anthroquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13 (6), pp. 543–548.
- Japón-Luján, R, Luque-Rodríguez, J. M., and Luque de Castro, M. D. (2006). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J. Chromatogr A*, 1108 (1), pp. 76-82. Epub 2006 Jan 26.
- Ghafoor, K. and Yong Hee Choi (2009). Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidants from Grape Peel through Response Surface Methodology. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 52 (3), pp. 295-300.
- Phạm Thanh Kỳ, Đào Thị Thanh Hiền và Lê Mai Hương (2003). Nghiên cứu một số tác dụng sinh học của lá cây vối. *Tạp chí Dược học*, 3, tr. 22-25.
- Luque-Garcia, J. L. and Luque de Castro, M. D. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (1), pp. 41-47.
- Đỗ Tất Lợi (2000). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. NXB Y học.
- Mai T. T. and Chuyen N. V. (2007). Anti-hyperglycemic activity of an aqueous extract from flower buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71 (1), pp. 69-76.
- Trương Tuyết Mai, Phạm Lan Anh, Trương Hoàng Kiên, Nguyễn Văn Sỹ, Nguyễn Thị Phương Thúy và Nguyễn Thị Lâm, (2012). Xác định hàm lượng polyphenol toàn phần, khả năng triệt tiêu gốc tự do và khả năng ức chế men alpha-glucosidase của hỗn hợp vos chiết tách từ lá vối, lá ổi và lá sen. *Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm*, 8 (1), pp. 33-38.
- Phan, L. H. N., Nguyen, T. N. T. and Le, V. V. M. (2014). Ultrasonic treatment of mulberry (*Morus alba*) mash in the production of juice with high antioxidant level. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50 (3A), tr. 204-209.
- Petersen, B. R. (1984). Patentsuche: *Enzymatic method for production of instant tea*. US4483876 A, 20 (Nov).
- Tarbart J., Kever, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O. and Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113, pp. 1226-1233.
- Nguyễn Quang Vinh, Nguyễn Thị Minh Hiếu và Trịnh Xuân Canh (2014). Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến hàm lượng Polyphenol tổng số và khả năng kháng oxy hóa của đài hoa búp giấm (*Hibiscus sadariffal*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học An Giang*, 4, tr. 74-78.