

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC VÀ ĐỘ ỔN ĐỊNH BẢO QUẢN CHLOROPHYLL TỪ RONG *Ceratophyllum submersum*

Lê Thị Hồng Ánh^{1, *}, Trần Việt Hưng¹, Hoàng Thị Ngọc Nhon¹

¹Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: anhlth@huit.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn và sự biến đổi trong quá trình bảo quản của chlorophyll được trích ly từ rong *Ceratophyllum submersum*. Nguyên liệu được xử lý, sấy khô và chlorophyll được trích ly từ rong sấy khô bằng ethanol và định lượng bằng phương pháp quang phổ UV-Vis. Hoạt tính kháng oxy hóa được đánh giá đồng thời thông qua các phương pháp gồm: DPPH, ABTS, FRAP, nitric oxide (NO) và khả năng khử (RP) nhằm phản ánh các cơ chế chống oxy hóa khác nhau. Kết quả cho thấy, chlorophyll thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa đáng kể, với giá trị IC₅₀ lần lượt đạt 66,55 µg/mL (DPPH), 49,35 µg/mL (ABTS), 30,5 µg/mL (FRAP) và 29,72 µg/mL (NO), đồng thời khả năng khử tăng tỉ lệ thuận với nồng độ mẫu. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp MIC cho thấy chlorophyll có khả năng ức chế hiệu quả các chủng vi khuẩn *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Salmonella enterica*, với MIC dao động từ 12,5 - 25 µg/mL. Bên cạnh đó, nghiên cứu khảo sát sự suy giảm màu sắc và hoạt tính kháng oxy hóa của chlorophyll sau sấy phun và vi bao bằng maltodextrin trong điều kiện bảo quản gia tốc cho thấy, giá trị ΔE tăng theo thời gian, trong khi khả năng bắt gốc tự do DPPH giảm xuống dưới 50% sau khoảng 7 ngày. Dựa trên mô hình Q10, thời gian bảo quản ước tính của sản phẩm ở 30°C là khoảng 56 ngày. Kết quả nghiên cứu cung cấp dữ liệu định lượng mới về hoạt tính sinh học và độ ổn định của chlorophyll từ rong *C. submersum*, qua đó cho thấy tiềm năng ứng dụng của hợp chất này như một chất chống oxy hóa và kháng khuẩn tự nhiên, đồng thời cung cấp cơ sở khoa học cho việc phát triển các sản phẩm có nguồn gốc sinh học trong lĩnh vực thực phẩm và dược phẩm.

Từ khóa: Chlorophyll, *Ceratophyllum submersum*, kháng khuẩn, kháng oxy hóa.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, xu hướng thay thế phụ gia tổng hợp bằng các hợp chất sinh học có nguồn gốc tự nhiên ngày càng được quan tâm, đặc biệt trong lĩnh vực thực phẩm chức năng, dược phẩm và bảo quản sinh học. Trong số đó, các sắc tố thực vật nổi bật nhờ khả năng kết hợp đồng thời vai trò tạo màu và thể hiện hoạt tính sinh học, góp phần nâng cao giá trị cảm quan và chức năng của sản phẩm [1]. Chlorophyll là sắc tố quang hợp chủ yếu trong thực vật và tảo, có cấu trúc vòng porphyrin chứa ion Mg²⁺ trung tâm, cho phép tham gia vào các phản ứng oxy hóa - khử và trung hòa gốc tự do. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng, chlorophyll và các dẫn xuất của nó có khả năng thể hiện hoạt tính sinh học như chống oxy hóa thông qua cơ chế cho electron hoặc tạo phức với các kim loại xúc tác phản ứng

oxy hóa [2]. Chlorophyll có khả năng bắt gốc tự do hiệu quả và giá trị IC₅₀ phụ thuộc vào nguồn nguyên liệu cũng như phương pháp chiết [3]. Bên cạnh đó, chlorophyll còn thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đáng kể đối với nhiều chủng vi sinh vật gây bệnh. Cơ chế kháng khuẩn được cho là liên quan đến khả năng tạo các loại oxy phản ứng (ROS), làm tổn thương màng tế bào và ức chế chuỗi vận chuyển electron của vi khuẩn [4].

Rong thủy sinh được xem là nguồn nguyên liệu tiềm năng cho việc khai thác chlorophyll nhờ tốc độ sinh trưởng nhanh, chi phí nuôi trồng thấp và hàm lượng sắc tố cao. Trong đó, rong *Ceratophyllum submersum* phân bố rộng rãi ở các ao, hồ, đầm lầy và dòng suối yên tĩnh ở vùng nhiệt đới và ôn đới. Theo y học dân gian, *C. submersum* được sử dụng để điều trị loét, tiêu chảy, vết thương và có tác dụng bảo vệ thận... nhờ chứa lượng đáng kể các hợp chất có hoạt tính

sinh học như chlorophyll [5]. *C. submersum* có hàm lượng sắc tố cao nhưng chưa được khai thác đầy đủ về mặt hoạt tính sinh học. Các nghiên cứu trước đây chủ yếu tập trung vào thực vật trên cạn hoặc vi tảo, trong khi dữ liệu về chlorophyll từ rong thủy sinh vẫn còn hạn chế, đặc biệt là về sự ổn định trong quá trình bảo quản.

Do đó, xuất phát từ những vấn đề nêu trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá toàn diện hoạt tính kháng oxy hóa của chlorophyll từ rong *C. submersum* thông qua nhiều hệ thử nghiệm khác nhau, đồng thời khảo sát hoạt tính kháng khuẩn đối với một số chủng vi sinh vật điển hình. Bên cạnh đó, nghiên cứu còn theo dõi sự biến đổi màu sắc và suy giảm hoạt tính sinh học của chlorophyll trong quá trình bảo quản, qua đó cung cấp cơ sở khoa học cho việc khai thác và ứng dụng nguồn chlorophyll tự nhiên từ rong thủy sinh trong lĩnh vực thực phẩm và dược phẩm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Rong *C. submersum* được thu hoạch tại ao nuôi tôm quảng canh thuộc huyện Gò Công Đông, tỉnh Tiền Giang trước đây. Mẫu rong sau thu hoạch được vận chuyển trong điều kiện lạnh (4 - 5°C) đến phòng thí nghiệm trong vòng 24 giờ. Nguyên liệu được rửa sạch, sấy đối lưu < 50°C với tốc độ gió 1 m/s trong cho đến khi độ ẩm còn khoảng 10% (w/w). Sau đó, mẫu được nghiền bằng máy nghiền cơ học và rây qua lưới 80 mesh để thu bột đồng nhất. Mẫu bột được bảo quản trong túi kín ở 5°C cho đến khi sử dụng.

Các hóa chất sử dụng bao gồm ethanol, methanol, hexan, $MgCO_3$, maltodextrin, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), kali persulfate ($K_2S_2O_8$), Trolox, TPTZ (2,4,6-tripyrindyl-s-triazine), $FeCl_3$, $Na_2[Fe(CN)_5NO]$, cùng các hóa chất phân tích khác. Tất cả hóa chất đạt cấp độ phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị mẫu

Trích ly thu nhận dịch chiết chlorophyll được thực hiện tương tự nghiên cứu trước đây của nhóm tác giả. Cân 500 g mẫu nguyên liệu để tiến hành thí nghiệm bổ sung nước cất 2 lần với tỉ lệ

1/30 (w/v), bổ sung $MgCO_3$ 0,8% (w/w), với công suất vi sóng 360 W và thời gian xử lý 240 giây. Dịch thu được sau khi trích ly tiến hành ly tâm lọc để tách bã thu lượng dịch trong và phần bã sau khi lọc sẽ tiến hành trích ly tiếp tục 2 lần. Sau đó, đem một phần dịch trích xác định hàm lượng bằng phương pháp đo quang phổ UV-VIS để xác định hàm lượng chlorophyll ban đầu [6]. Dịch chiết được xác định hoạt tính sinh học.

Dịch trích chlorophyll từ rong *C. submersum* thu được, được tiếp tục cô quay chân không ở 48°C để thu dịch cô đặc. Tiếp theo, thực hiện bổ sung maltodextrin và sấy phun ở 90°C. Chế phẩm chlorophyll thu được ở dạng bột sau sấy phun với độ ẩm dưới 5% có các giá trị $L^* = 78,27 \pm 0,50$, $a^* = -7,40 \pm 0,15$ và $b^* = 13,44 \pm 0,27$, thể hiện màu xanh đặc trưng của chlorophyll [7].

2.2.2. Xác định hoạt tính kháng oxy hóa

Hoạt tính kháng oxy hóa của dịch chiết chlorophyll được đánh giá bằng năm phương pháp độc lập, bao gồm: DPPH, ABTS, FRAP, nitric oxide (NO) và khả năng khử (reducing power - RP). Tất cả các thí nghiệm được thực hiện lặp lại ba lần.

Phương pháp DPPH: Dung dịch DPPH (0,1 mM) được chuẩn bị trong methanol. Mẫu ở các nồng độ khác nhau (25 - 150 $\mu g/mL$) được phản ứng với dung dịch DPPH trong tối trong 30 phút. Độ hấp thụ được đo tại 517 nm [8]. Thông số khảo sát: Nồng độ dịch chiết chlorophyll: 25, 50, 75, 100, 125 và 150 $\mu g/mL$. Thông số theo dõi: Giá trị IC_{50} .

Phương pháp ABTS: Gốc $ABTS^+$ được tạo thành từ phản ứng giữa ABTS (7 mM) và $K_2S_2O_8$ (2,45 mM) sau 12 - 16 giờ trong tối. Dung dịch được pha loãng đến độ hấp thụ $0,70 \pm 0,02$ tại 734 nm. Mẫu (20 - 100 $\mu g/mL$) được phản ứng với $ABTS^+$ trong 5 phút và đo tại 734 nm [8]. Thông số khảo sát: nồng độ dịch chiết chlorophyll: 20, 40, 60, 80 và 100 $\mu g/mL$. Thông số theo dõi: giá trị IC_{50} .

Phương pháp FRAP: Dung dịch FRAP được chuẩn bị từ đệm acetate (300 mM, pH 3,6), TPTZ (10 mM) và $FeCl_3$ (20 mM). Mẫu (20-100 $\mu g/mL$) phản ứng với dung dịch FRAP trong 30 phút ở 37°C. Độ hấp thụ được đo tại 593 nm [8]. Nồng độ của dịch chiết chlorophyll: 20, 40, 60, 80, 100 $\mu g/mL$.

Phương pháp nitric oxide (NO): Để xác định hoạt tính bất gốc nitric oxide của các mẫu, được thực hiện theo mô tả của Odeyemi và cs (2015) với một số chỉnh sửa [9]. Hệ phản ứng gồm natri nitroprusside (10 mM) trong đệm phosphate (pH 7,4) và mẫu thử (10 - 100 µg/mL) được ủ trong 2,5 giờ ở 25°C. Sau đó, thuốc thử Griess được thêm vào và đo hấp thụ tại 540 nm. Thông số khảo sát: Nồng độ dịch chiết chlorophyll: 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL. Thông số theo dõi: Giá trị IC₅₀.

Khả năng khử (Reducing Power - RP): Mẫu được phản ứng với đệm phosphate và K₃Fe(CN)₆, ủ ở 50°C trong 20 phút, sau đó thêm TCA, ly tâm và phản ứng với FeCl₃. Độ hấp thụ được đo tại 700 nm. Thông số khảo sát: Nồng độ dịch chiết chlorophyll: 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL. Hoạt tính khử được đánh giá thông qua giá trị hấp thụ.

2.2.3. Xác định hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp MIC

Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp vi pha loãng trong đĩa vi chuẩn (microdilution method). Dịch chiết chlorophyll được pha loãng bậc hai từ 400 µg/mL. Các chủng vi khuẩn thử nghiệm bao gồm: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Salmonella enterica* với mật độ ban đầu 10⁶ CFU/mL. Hỗn hợp phản ứng gồm 50 µL dịch vi khuẩn và 50 µL mẫu được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, thêm thuốc thử resazurin (0,015%) để đánh giá sự phát triển vi khuẩn. Giá trị MIC được xác định là nồng độ thấp nhất không gây đổi màu thuốc thử [10].

2.2.4. Đánh giá độ ổn định bảo quản của chiết xuất chlorophyll

Phương pháp hệ số Q₁₀ cho thấy tốc độ phản ứng tăng lên hoặc thời gian bảo quản giảm đi khi nhiệt độ tăng 10°C. Bột chlorophyll được chia thành các mẫu nhỏ, tất cả mẫu này được đặt ở 60°C trong tủ vi khí hậu, theo dõi với tần suất 2 ngày/lần trong vòng 20 ngày. Hệ số Q₁₀ của các mẫu bột chlorophyll được tính theo công thức sau [11]:

$$Q_{\theta(T_2)}^{\theta(T_1)} = \frac{\theta(T_1)}{\theta(T_2)}, \Delta T = T_2 - T_1$$

Trong đó: T₁ và T₂ là nhiệt độ bảo quản tương ứng ở 30°C và 60°C, thời gian mà các mẫu bột chlorophyll được bảo quản ở 30°C ($\theta_{(T_1)}$) và

60°C ($\theta_{(T_2)}$) mất đi sự khác biệt về màu sắc so với mẫu gốc. Các thử nghiệm đo bằng máy đo màu được tiến hành theo các ngày để xác định sự khác biệt về màu sắc giữa các mẫu trên. Thời gian sử dụng được tính bằng công thức $t_s = t_0 \cdot Q_{10}^n$ với $n = \frac{57}{10}$, t_s: Thời gian sử dụng của bột chlorophyll ở nhiệt độ ước tính (ngày) và t₀: thời gian sử dụng của bột chlorophyll khi quan sát thực tế (ngày).

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Xác định hàm lượng chlorophyll bằng UV-VIS

Chlorophyll có phổ hấp thụ ánh sáng cực đại ở các bước sóng 645 nm, 663 nm, độ hấp thụ ở bước sóng này biểu thị cho cường độ của sắc tố hay lượng chlorophyll có trong dung dịch. Dựa vào tính chất này người ta đo các giá trị hấp thụ và định lượng chlorophyll [12].

Công thức tính lượng chlorophyll như sau:

+ Lượng chlorophyll tổng (µg/mL) = 20,2 (A₆₄₅) + 8,02 (A₆₆₃).

+ Lượng chlorophyll a (µg/mL) = 12,7 (A₆₆₃) + 2,69 (A₆₄₅).

+ Lượng chlorophyll b (µg/mL) = 22,9 (A₆₄₅) + 4,68 (A₆₆₃).

Công thức quy đổi µg/mL sang mg/gck:

$$\text{mg/gck} = \frac{C(\mu\text{g/mL}) \times V(\text{mL})}{1.000 \times m(\text{g})}$$

Trong đó: C là nồng độ chlorophyll trong dịch chiết (µg/mL); V là thể tích dịch chiết thu được (mL); M là khối lượng mẫu ban đầu (g) và 1.000 là hệ số dùng để đổi từ microgam sang miligram.

2.3.2. Đo màu

Việc đo màu được xác định theo hệ màu Hunter LAB để quan sát màu sắc của vật rắn thông qua phương trình [13].

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}};$$

$$\Delta E = \sqrt{(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2}$$

Trong đó: L*: độ sáng, giá trị càng cao thì mẫu càng sáng; a*: trục đỏ - xanh lá, giá trị dương thể hiện sắc đỏ, giá trị âm thể hiện sắc xanh lục;

b*: trục vàng - xanh lam, giá trị dương thể hiện sắc vàng, giá trị âm thể hiện sắc xanh dương.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

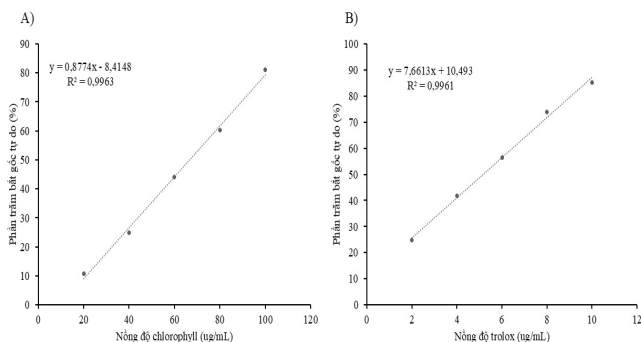
Các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần. Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019 và phương pháp thống kê ANOVA được xử lý bởi phần mềm Minitab 2019.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hoạt tính kháng oxy hóa của chiết xuất chlorophyll từ rong *C. submersum*

3.1.1. DPPH

Hoạt tính kháng oxy hóa của mẫu được đánh giá thông qua phản ứng bắt gốc DPPH. Cụ thể, dung dịch mẫu được pha loãng về nồng độ từ 20 - 100 $\mu\text{g/mL}$. Tiếp đó, để mẫu phản ứng với DPPH và ủ trong tối ở nhiệt độ phòng và đo ở bước sóng 517 nm. Kết quả thể hiện qua hình 1.

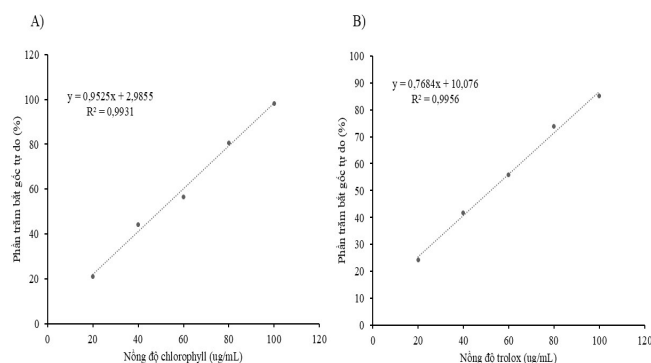


Hình 1. Khả năng bắt gốc tự do của chlorophyll (A), khả năng bắt gốc tự do của trolox (B) bằng phương pháp DPPH

Kết quả ở hình 1 cho thấy khả năng ức chế gốc DPPH tăng tuyến tính theo nồng độ mẫu, đạt giá trị 81,01% tại nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$. So với chất chuẩn trolox, chlorophyll thể hiện hoạt tính thấp hơn, khi trolox chỉ cần nồng độ 8 $\mu\text{g/mL}$ để đạt mức ức chế tương đương (80,11%). Giá trị IC_{50} của chlorophyll được xác định là 66,55 $\mu\text{g/mL}$. Cơ chế kháng oxy hóa của chlorophyll được cho là liên quan chủ yếu đến cấu trúc vòng porphyrin, đóng vai trò như một hệ cho electron thông qua sự hình thành gốc π -cation, từ đó trung hòa các gốc tự do [14]. Không giống như nhiều chất chống oxy hóa hoạt động theo cơ chế cho nguyên tử hydro, chlorophyll chủ yếu tham gia vào quá trình chuyển electron, trong đó ion Mg^{2+} trung tâm đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định cấu trúc và tăng cường hoạt tính oxy hóa-khử [1]. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Hsu và cs (2013), trong đó các dẫn xuất

chlorophyll đều thể hiện khả năng bắt gốc DPPH phụ thuộc nồng độ với giá trị IC_{50} tương đối thấp [15]. Tuy nhiên, so với một số nguồn thực vật khác như *Houttuynia cordata* ($\text{IC}_{50} = 18,38 \mu\text{g/mL}$), hoạt tính của chlorophyll trong nghiên cứu này thấp hơn, cho thấy sự khác biệt đáng kể về hiệu quả chống oxy hóa giữa các nguồn nguyên liệu tự nhiên và phương pháp chiết [16].

3.1.2. ABTS



Hình 2. Khả năng bắt gốc tự do của chlorophyll (A), khả năng bắt gốc tự do của trolox (B) bằng phương pháp ABTS

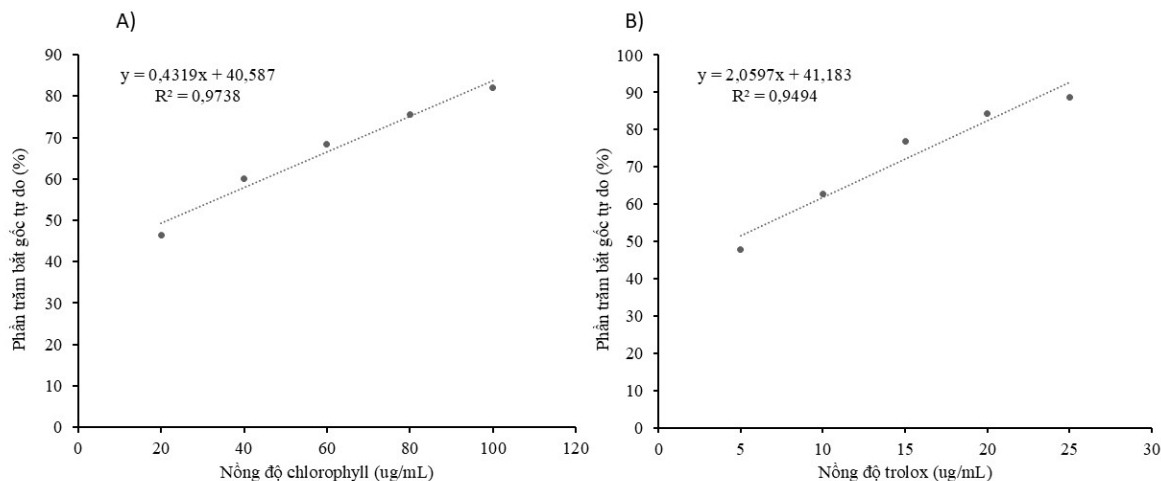
Hoạt tính kháng oxy hóa của dịch chiết chlorophyll tiếp tục được đánh giá bằng phương pháp ABTS, một phép thử phổ biến nhằm xác định khả năng bắt gốc tự do ABTS^+ của các hợp chất sinh học. Kết quả ở hình 2 cho thấy hiệu suất bắt gốc tự do tăng rõ rệt theo nồng độ mẫu, với giá trị ức chế tăng từ 21,06% ở 20 $\mu\text{g/mL}$ lên 98,17% tại 100 $\mu\text{g/mL}$. Giá trị IC_{50} của chlorophyll được xác định là 49,35 $\mu\text{g/mL}$, cho thấy hoạt tính kháng oxy hóa tương đối cao và phụ thuộc nồng độ. So sánh với các nghiên cứu trước, giá trị IC_{50} trong nghiên cứu này tương đương với chlorophyll chiết xuất từ cây nha đam (*Aloe vera*) với $\text{IC}_{50} = 47,49 \mu\text{g/mL}$, thể hiện sự tương đồng về hiệu quả bắt gốc ABTS giữa các nguồn nguyên liệu giàu chlorophyll [17]. Đồng thời, hoạt tính của chlorophyll từ rong lục *C. submersum* đáng kể so với một số nguồn thực vật khác như lá lúa non huyết rồng ($\text{IC}_{50} = 789,63 \mu\text{g/mL}$) [18], cho thấy tiềm năng ứng dụng cao của rong thủy sinh trong khai thác hợp chất chống oxy hóa tự nhiên. Hiện nay, các sản phẩm thực phẩm giàu chlorophyll như đồ uống từ cỏ lúa mạch cũng đã được chứng minh có khả năng chống oxy hóa đáng kể khi đánh giá bằng phương pháp ABTS, từ đó cho thấy thử nghiệm này đã mở rộng thêm một nguồn nguyên liệu thu nhận

chlorophyll có hoạt tính kháng oxy hoá, góp phần nâng cao giá trị nguồn nguyên liệu và tiềm năng ứng dụng trong công nghệ thực phẩm [19].

3.1.3. FRAP

Khả năng chống oxy hóa của chlorophyll từ *C. submersum* L. ngoài được xác định dựa trên

năng lực khử Fe^{3+} thì phương pháp FRAP dựa trên nguyên tắc khử phức hợp Fe^{3+} -TPTZ thành Fe^{2+} -TPTZ ở độ pH thấp tạo ra màu xanh lam. Kết quả thử nghiệm được xác định dựa trên việc theo dõi sự gia tăng độ hấp thụ của dung dịch gốc và được thể hiện ở hình 3.



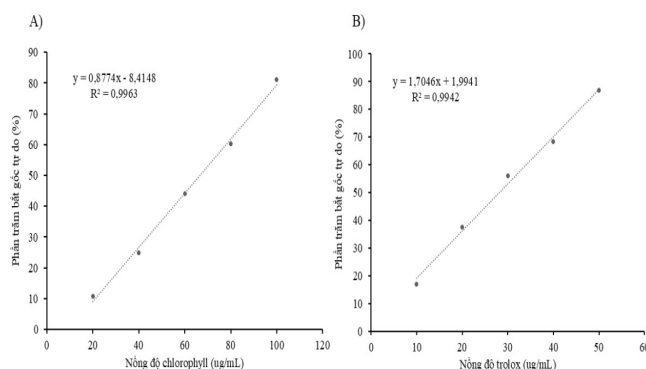
Hình 3. Khả năng bắt gốc tự do của chlorophyll (A), khả năng bắt gốc tự do của trolox (B) bằng phương pháp FRAP

Kết quả thí nghiệm cho thấy, khả năng chống oxy hóa của chiết xuất chlorophyll tăng dần từ 20 $\mu\text{g/mL}$ 46,45% và cao nhất ở 100 $\mu\text{g/mL}$ đạt 81,99% với giá trị IC_{50} là 30,5 $\mu\text{g/mL}$. Trong phép thử FRAP, hệ phản ứng chứa phức Fe^{3+} -TPTZ; khi có mặt chlorophyll, Fe^{3+} bị khử thành Fe^{2+} và tạo thành phức Fe^{2+} -TPTZ có màu xanh đậm, cường độ hấp thụ tỷ lệ thuận với khả năng cho electron của chất khảo sát. Do đó, sự gia tăng mật độ quang quan sát được phản ánh trực tiếp năng lực khử của chlorophyll trong dịch chiết. Antonio và cs (2020) báo cáo chlorophyll và các dẫn xuất đều có khả năng kháng oxy hóa cao đặc biệt là phức kim loại-chlorophyll cho thấy vai trò quan trọng của của ion kim loại trong vòng porphyrin ảnh hưởng lớn đến khả năng kháng oxy hóa của chlorophyll [20]. Ở các mẫu thực phẩm như thức uống cỏ mần, giá trị FRAP đạt xấp xỉ 28,3 $\mu\text{g/mL}$ tương đương với khả năng kháng oxy hóa của chlorophyll chiết xuất từ rong *C. submersum* L. [19]. Hơn nữa, kết quả thu được trong nghiên cứu này phù hợp với các báo cáo trước, trong đó chlorophyll và các dẫn xuất thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa đáng kể trong các hệ thực phẩm và sinh học. Đáng chú ý, giá trị FRAP quan sát được nằm trong khoảng tương đương với các nguồn giàu chlorophyll tự nhiên như tảo Spirulina, cho thấy tiềm năng ứng dụng

của hợp chất này như một chất chống oxy hóa tự nhiên. Sự tương quan giữa nồng độ chlorophyll và giá trị FRAP trong nghiên cứu hiện tại củng cố giả thuyết rằng cơ chế cho electron của vòng porphyrin là yếu tố chi phối hoạt tính kháng oxy hóa của chlorophyll [21].

3.1.4. NO

Kết quả thí nghiệm đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa của chlorophyll thông qua khả năng bắt giữ gốc nitric oxide (NO) được trình bày tại hình 4.



Hình 4. Khả năng bắt gốc tự do của chlorophyll (A), khả năng bắt gốc tự do của trolox (B) bằng phương pháp NO

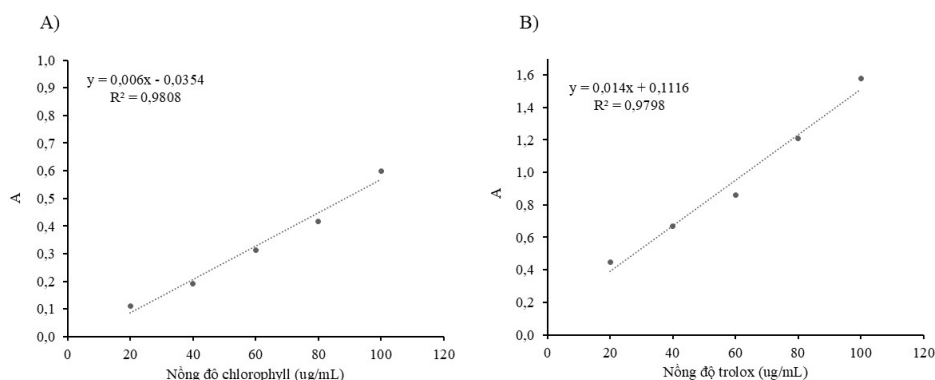
Hoạt tính bắt gốc nitric oxide (NO) của chlorophyll tăng rõ rệt theo nồng độ, với hiệu

suất ức chế tăng từ 42,74% ở 20 $\mu\text{g/mL}$ lên 91,43% tại 100 $\mu\text{g/mL}$, tương ứng với giá trị IC_{50} đạt 29,72 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả này cho thấy mối tương quan thuận giữa nồng độ chlorophyll và khả năng kháng oxy hóa. Trong hệ phản ứng, NO được tạo ra từ sự phân hủy của natri nitroprusside trong điều kiện pH sinh lý và sau đó bị oxy hóa thành nitrit/nitrat trong môi trường hiếu khí; các sản phẩm này được định lượng gián tiếp thông qua phản ứng với thuốc thử Griess. Sự hiện diện của các hợp chất có khả năng cho electron, như chlorophyll, có thể cạnh tranh với oxy trong phản ứng này, từ đó làm giảm sự hình thành nitrit và thể hiện khả năng bắt gốc NO. Xu hướng phụ thuộc nồng độ trong nghiên cứu này phù hợp với các báo cáo trước, trong đó hiệu suất ức chế NO tăng khi nồng độ chlorophyll tăng, mặc dù giá trị

IC_{50} có thể khác nhau tùy thuộc vào nguồn nguyên liệu và điều kiện thí nghiệm [22]. Mặc dù phương pháp NO ít được sử dụng phổ biến hơn so với các hệ DPPH hoặc ABTS, kết quả thu được cho thấy chlorophyll có tiềm năng đáng kể trong việc điều hòa các gốc NO nội sinh, góp phần mở rộng hiểu biết về cơ chế kháng oxy hóa của nhóm hợp chất này [23].

3.1.5. RP

Khả năng khử (RP- Reducing Power) của chlorophyll phản ánh hoạt tính kháng oxy hóa thông qua cơ chế nhường electron, giúp khử Fe^{3+} thành Fe^{2+} ; độ hấp thụ càng cao cho thấy khả năng khử càng mạnh. Khả năng khử (RP) của chlorophyll thể hiện qua kết quả thí nghiệm ở hình 5.



Hình 5. Khả năng bắt gốc tự do của chlorophyll (A), khả năng bắt gốc tự do của Trolox (B) bằng phương pháp RP

Kết quả cho thấy, khả năng khử của chlorophyll tỉ lệ thuận với nồng độ. Khi tăng nồng độ giá trị độ hấp thụ cũng tăng cho thấy hiệu suất khử Fe^{3+} thành Fe^{2+} . Cụ thể, ở nồng độ 20 $\mu\text{g/mL}$ độ hấp thụ ghi nhận $0,109 \pm 0,020$. Khi nồng độ tiếp tục tăng lên đến 100 $\mu\text{g/mL}$, thì độ hấp thụ đạt giá trị $0,600 \pm 0,048$, cao hơn 5,4 lần so với độ hấp thụ ban đầu. Khi độ hấp thụ tại bước sóng 700 nm của mẫu thử càng lớn, tức là mẫu có năng lực khử cao, đồng nghĩa với khả năng chống oxy hóa càng mạnh. So sánh với cao chiết của lá nước chùm ngây ($A = 0,21685$) từ nghiên cứu của Lê Hà Mỹ Phương và cs (2021) cho thấy khả năng khử thấp hơn so với chlorophyll được chiết từ rong *C. submersum* L. [24]. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Roshanak và cs (2016), cho thấy hoạt tính kháng oxy hóa tăng dần theo nồng độ mẫu [25]. Cụ thể, tại nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$, mẫu chiết bằng vi sóng

đạt giá trị đo quang gần 1,2 - cao hơn rõ rệt so với các phương pháp chiết khác, chứng tỏ hiệu quả tăng cường khả năng bắt gốc tự do. Tương tự, nghiên cứu của Bozdogan và cs (2016) cũng ghi nhận giá trị khả năng khử (RP) tăng theo nồng độ mẫu, khẳng định mối tương quan thuận giữa nồng độ chất chiết và hoạt tính kháng oxy hóa [26]. Những kết quả này khẳng định vai trò của chlorophyll như một tác nhân khử mạnh, góp phần quan trọng vào khả năng chống oxy hóa tổng thể của chiết xuất.

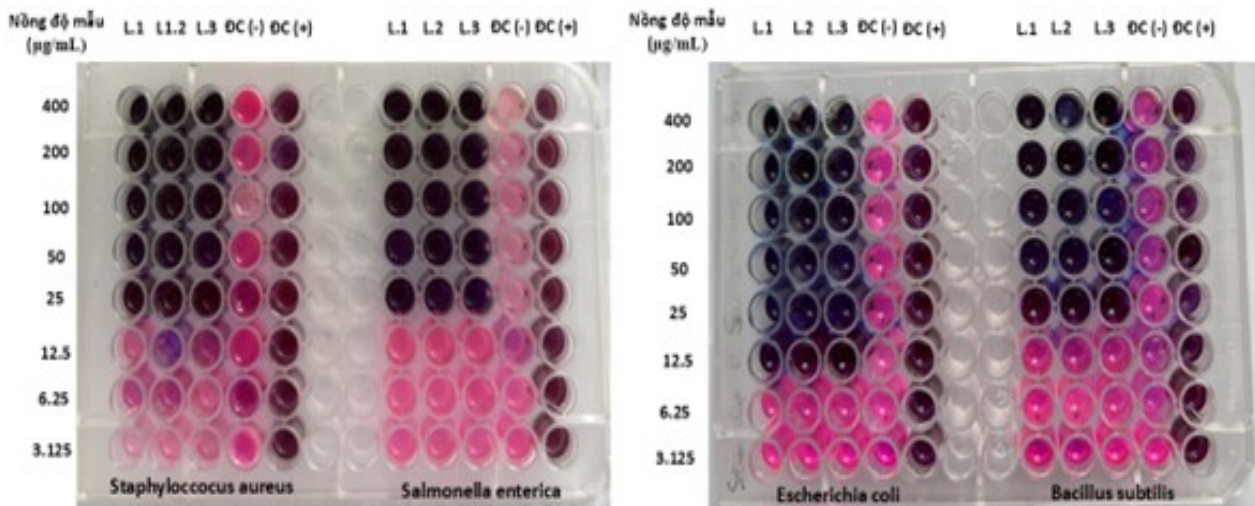
3.2. Hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất chlorophyll từ rong *C. submersum*

Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được xác định bằng phương pháp vi pha loãng [27]. Kết quả về MIC của chlorophyll được trình bày trong hình 6.

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của chlorophyll với nồng độ thử nghiệm nằm trong

khoảng 3,125 - 400 $\mu\text{g/mL}$ thông qua xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) cho thấy, hợp chất này có khả năng ức chế hiệu quả một số chủng vi khuẩn gây bệnh phổ biến. Thử nghiệm được tiến hành trên bốn loại vi khuẩn gồm: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (thuộc nhóm Gram dương) và *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* (thuộc nhóm Gram âm). Màu hồng xuất hiện ở các giếng chứng tỏ có vi khuẩn phát triển, trong khi các giếng có màu tím đậm hoặc đen thể hiện vi khuẩn bị ức chế không hoạt động. Chlorophyll thể hiện hiệu quả kháng khuẩn đáng kể trên cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Cụ thể, đối với *S. aureus* và *B. subtilis*, MIC đạt 25 $\mu\text{g/mL}$, cho thấy hai chủng vi khuẩn Gram dương này có mức độ nhạy cảm tương đối với

chlorophyll. Trong khi đó, *E. coli* có MIC thấp hơn, khoảng 12,5 $\mu\text{g/mL}$, cho thấy chlorophyll có khả năng ức chế mạnh hơn đối với chủng vi khuẩn Gram âm này. Đối với *S. enterica*, MIC tương đương 25 $\mu\text{g/mL}$, phản ánh mức độ nhạy cảm thấp hơn so với *E. coli* nhưng tương đương các chủng Gram dương. Kết quả nghiên cứu của Shergaziev và cs (2024) cũng đã cho thấy hiệu quả của chlorophyll đối vi khuẩn Gram dương, chlorophyll dễ dàng xâm nhập vào bên trong do không có màng tế bào [28]. Hơn nữa, chlorophyll có thể làm rối loạn chuỗi vận chuyển electron, thông qua cơ chế ROS tạo ra các chất oxy hóa gây hại tế bào cũng là nguyên nhân làm cho chlorophyll có thể kháng khuẩn [29].



Hình 6. Kết quả kháng khuẩn bằng phương pháp MIC

Chlorophyll từ rong *C. submersum* L. có khả năng kháng khuẩn, với MIC chỉ trong khoảng 12,5 - 25 $\mu\text{g/mL}$ đối với cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Những kết quả này cho thấy tiềm năng đáng kể của dẫn xuất chlorophyll từ rong *C. submersum* L. trong việc phát triển các hợp chất

kháng khuẩn nguồn gốc tự nhiên, đặc biệt hướng đến việc thay thế hoặc hỗ trợ các chất bảo quản tổng hợp trong thực phẩm, cũng như ứng dụng trong dược phẩm hoặc y học.

3.3. Độ ổn định bảo quản chlorophyll từ rong *C. submersum*

Bảng 1. Sự thay đổi màu và khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH của chlorophyll theo thời gian nghiên cứu dưới điều kiện gia tốc

Ngày	ΔE	%DPPH	Ngày	ΔE	%DPPH
2	$0,73 \pm 0,31^b$	$61,72 \pm 1,45^a$	12	$2,29 \pm 0,43^a$	$35,47 \pm 1,03^e$
4	$0,64 \pm 0,12^b$	$56,31 \pm 1,14^b$	14	$2,49 \pm 0,37^a$	$31,56 \pm 1,85^f$
6	$0,91 \pm 0,34^b$	$51,51 \pm 1,02^c$	16	$2,59 \pm 0,74^a$	$27,75 \pm 0,58^f$
8	$1,10 \pm 0,51^b$	$47,95 \pm 0,65^c$	18	$2,88 \pm 1,26^a$	$24,68 \pm 1,04^g$
10	$1,75 \pm 1,77^b$	$41,66 \pm 0,76^d$	20	$3,07 \pm 0,95^a$	$19,95 \pm 0,91^h$

Nghiên cứu theo dõi sự thay đổi màu sắc và khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH của bột

chlorophyll sau sấy phun trong suốt 20 ngày bảo quản ở điều kiện bảo quản gia tốc (60°C) trong tủ

âm nhằm đánh giá độ ổn định quang học của sắc tố và lớp vi bao trước các tác nhân oxy hóa trong quá trình bảo quản. Hạn sử dụng của bột mô tả thông qua hệ màu CIE L*, a*, b*, độ sai lệch tổng thể ΔE và % DPPH được xác định từ ngày 2, kết quả được biểu diễn trong bảng 1.

Trong quá trình bảo quản gia tốc, giá trị ΔE tăng dần từ $0,73 \pm 0,31$ (ngày 2) lên $3,07 \pm 0,95$ (ngày 20), cho thấy sự biến đổi màu theo thời gian nhưng vẫn nằm trong ngưỡng có thể nhận biết mà chưa ảnh hưởng nghiêm trọng đến cảm quan [30]. Sự suy giảm màu sắc được cho là do quá trình chuyển hóa chlorophyll thành pheophytin thông qua mất ion Mg^{2+} và biến đổi cấu trúc porphyrin. Mặc dù, vi bao maltodextrin ban đầu giúp hạn chế tiếp xúc với oxy, sự gia tăng ΔE sau khoảng 8 ngày cho thấy hiệu quả bảo vệ giảm dần trong điều kiện nhiệt độ cao [31]. Hoạt tính kháng oxy hóa cũng suy giảm đáng kể trong quá trình bảo quản, với giá trị %DPPH giảm từ $61,72 \pm 1,45\%$ xuống $19,95 \pm 0,91\%$ sau 20 ngày. Trong giai đoạn đầu, lớp vi bao vẫn duy trì hiệu quả bảo vệ, tuy nhiên sau đó sự khuếch tán oxy và hấp ướt làm tăng quá trình oxy hóa chlorophyll, dẫn đến giảm khả năng cho electron. Khi hoạt tính giảm xuống dưới 50% (khoảng ngày thứ 7), mẫu được xem là suy giảm chức năng đáng kể. Trong nghiên cứu này, hệ số tăng tốc $Q_{10} = 2$ được sử dụng [32], thời gian bảo quản ở $30^\circ C$ được ước tính khoảng 56 ngày. Tuy nhiên, kết quả này cần được xác nhận thêm bằng thí nghiệm lưu trữ thực tế hoặc mô hình động học Arrhenius để nâng cao độ chính xác trong dự đoán thời hạn sử dụng.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chlorophyll chiết xuất từ *C. submersum* có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh, thể hiện qua giá trị IC_{50} thấp trong các hệ DPPH, ABTS, FRAP và NO, với năng lực khử tăng theo nồng độ. Đồng thời, chlorophyll cho thấy hoạt tính kháng khuẩn trên cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm (MIC: 12,5 - 25 $\mu g/mL$), cho thấy phổ tác dụng rộng. Tuy nhiên, hợp chất này kém ổn định trong quá trình bảo quản, thể hiện qua biến đổi màu (ΔE tăng) và suy giảm hoạt tính sinh học theo thời gian. Vi bao bằng maltodextrin cải thiện độ ổn định ban đầu nhưng hiệu quả giảm trong điều kiện nhiệt độ cao; thời gian bảo quản ước tính ở $30^\circ C$ khoảng 56 ngày (theo mô hình Q_{10}). Nhìn chung,

chlorophyll từ *C. submersum* có tiềm năng ứng dụng như chất chống oxy hóa và kháng khuẩn tự nhiên, song cần tiếp tục tối ưu hóa hệ vi bao, điều kiện bảo quản và mô hình động học để nâng cao tính ổn định và khả năng ứng dụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Lanfer - Marquez, U. M., R. M. C. Barros, and P. Sinnecker (2005). Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International*. 38(8 - 9): 885 - 891.
- [2]. Martins, T., et al. (2023). *Enhancing Health Benefits through Chlorophylls and Chlorophyll-Rich Agro-Food: A Comprehensive Review*. *Molecules*, 28(14), 5344.
- [3]. Perez-Galvez, A., I. Viera, and M. Roca (2020). Carotenoids and chlorophylls as antioxidants. *Antioxidants (Basel)*, 9(6), 505.
- [4]. Nasiruddin, M. and S.N. Sinha (2020). Phytochemical screening and antioxidant, antibacterial efficacy of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 6(2), 187 - 195.
- [5]. Jebamalar, J. and V.J.H. Sumathy (2016). A comparative study on the phytochemical analysis of *Chaetomorpha antennina* and *Ceratophyllum submersum*. *International Journal of Current Research in Multidisciplinary (IJCRM)*, 5 (2), 12 - 20.
- [6]. Hoang Thi Ngoc, N., N. Nguyen Hoang Bao, and D. Ho Phung Thanh (2025). Extraction and spray-drying chlorophyll from *Chaetomorpha aerea* algae. *Tạp chí Khoa học Đại học Công Thương*, 25(3), 143 - 160.
- [7]. Lê Thị Hồng Ánh, et al. (2016) Nghiên cứu thu nhận bột màu chlorophyll từ rong nước lợ *Chaetomorpha* sp. Đồng bằng sông cửu long. *Tạp chí Khoa học Công nghệ thực phẩm*, 10, 30 - 38.
- [8]. Hoang, T.N.N., et al. (2023). Anthocyanin isolation from *Hibiscus sabdariffa* L. flowers by extraction, macroporous D101 resin purification, and biological evaluation. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100848.
- [9]. Odeyemi, S., A. Afolayan, and G. Bradley (2015). In vitro anti-inflammatory and free radical scavenging activities of crude saponins extracted from *Albuca bracteata* Jacq. *Bulb*.

African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 12(4):34. DOI:10.4314/ajtcam.v12i4.6

[10]. Jamdar, S.N., et al. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1), 178 - 184.

[11]. *Natural Product Extraction* (2013). Green Chemistry Series..

[12]. Rajalakshmi, K. and N. Banu (2015). Extraction and estimation of chlorophyll from medicinal plants. *International Journal of Science Research*, 4(11), 209 - 212.

[13]. Nhon, H.T.N., et al. (2022). Enhancement of extraction effectiveness and stability of anthocyanin from *Hibiscus sabdariffa* L. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10, 100408. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100408>.

[14]. Endo, Y., R. Usuki, and T. Kaneda (1985). Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62(9), 1387 - 1390.

[15]. Hsu, C.-Y., et al. (2013). *The Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Chlorophylls and Pheophytins*. Food and Nutrition Sciences, 04(08), 1 - 8.

[16]. Huỳnh Thị Thủy, Đào Hùng Cường, Nguyễn Quang Trung (2019). Một số nghiên cứu bước đầu về thành phần hóa học của Lá diếp cá (*Houttuynia cordata*) thu hái tại Quảng Nam - Đà Nẵng. 17 (4), 41 - 46.

[17]. Suresh, H.D., et al. (2022). Synthesis and bio-evaluation of soluble sodium copper chlorophyllin complexes from the ceaves of Aloe vera. *South African Journal of Botany*, 147, 1086 - 1095.

[18]. Nguyễn Phú Thọ, Nguyễn Hữu Thanh (2023). Nghiên cứu xác định thành phần hoạt chất sinh học từ chiết xuất lá lúa non giống huyết rồng và khả năng ứng dụng. *Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm*, 19(6), 1 - 9.

[19]. Wangcharoen, W. and S. Phimphilai (2016). Chlorophyll and total phenolic contents, antioxidant activities and consumer acceptance

test of processed grass drinks. *Journal of Food Science and Technology*, 53(12), 4135 - 4140.

[20]. Perez-Galvez, A., I. Viera, and M. Roca (2020). Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. *Antioxidants* (Basel), 9(6), 505. <https://doi.org/10.3390/antiox9060505>.

[21]. Stunda-Zujeva, A., et al. (2023). Comparison of antioxidant activity in various spirulina containing products and factors affecting it. *Scientific Reports*, 13(1), 4529.

[22]. Reeta, K. M. and A. Joshi (2023). Evaluation of Free Radical-Scavenging and Nitric Oxide Inhibition Activities of Selected Medicinal Plants. *Material Science Research India*, 20(SpecialIssue1), 31 - 39.

[23]. Aysegul, P. (2012). Evaluation of antioxidant and antifungal potential of *Asphodelus aestivus* Brot. growing in Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(2), 253-265. DOI:10.5897/JMPR11.1229.

[24]. Lê Hà Mỹ Phương và cs (2021). Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết lá và cành cây chùm ngây (*Moringa oleifera* Lam.). *Tạp chí Khoa học Đại Học Lạc Hồng*, 12, 72 - 75.

[25]. Roshanak, S., M. Rahimmalek, and S.A. Goli (2016). Evaluation of seven different drying treatments in respect to total flavonoid, phenolic, vitamin C content, chlorophyll, antioxidant activity and color of green tea (*Camellia sinensis* or *C. assamica*) leaves. *J Food Sci Technol*, 53(1), 721 - 729.

[26]. Bozdogan, A., et al. (2016). *Multiple Antioxidant and Bioherbicidal Assays of the Edible Mushroom Species "Ramaria flava" in the Amanos Mountains*.

[27]. El Shazely, B., et al. (2020). *Resistance Evolution Against Antimicrobial Peptides in Staphylococcus aureus Alters Pharmacodynamics Beyond the MIC*. *Front Microbiol*, 11, 103.

[28]. Shergaziev, U.A., et al. (2024). *Antibacterial activity of chlorophyll polymeric form against test cultures S. aureus and E. coli*. *BIO Web of Conferences*, 83(9), 02001. DOI:10.1051/bioconf/20248302001.

[29]. Sinha, S.N. and M. Nasiruddin (2020). Phytochemical screening and antioxidant, antibacterial efficacy of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 6(2), 187 - 195.

[30]. Faghihi, T., et al. (2021). An experimental study on the effect of four pediatric drug types on color stability in different tooth-colored restorative materials. *Dent Res J (Isfahan)*, 18(1), 75. DOI:10.4103/1735-3327.326648.

[31]. Fang, Z. and B. Bhandari (2010). Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510 - 523.

[32]. Erge, H., et al. (2008). Effect of heat treatment on chlorophyll degradation and color loss in green peas. *GIDA (The Journal of Food)*, 33(5). 225 - 233.

EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES AND STORAGE STABILITY OF CHLOROPHYLL EXTRACTED FROM *Ceratophyllum submersum*

Le Thi Hong Anh¹, Tran Viet Hung¹, Hoang Thi Ngoc Nhon¹

¹*Ho Chi Minh City University of Industry and Trade*

Abstract

This study aimed to evaluate the antioxidant and antibacterial activities, as well as the storage stability, of chlorophyll extracted from *Ceratophyllum submersum*. The raw material was pretreated, dried, and chlorophyll was extracted from the dried biomass using ethanol, followed by quantification by UV-Vis spectrophotometry. Antioxidant activity was comprehensively assessed using multiple assays, including DPPH, ABTS, FRAP, nitric oxide (NO) scavenging, and reducing power (RP), to reflect different underlying mechanisms. The results demonstrated that chlorophyll exhibited significant antioxidant activity, with IC₅₀ values of 66.55 µg/mL (DPPH), 49.35 µg/mL (ABTS), 30.5 µg/mL (FRAP), and 29.72 µg/mL (NO). The reducing power increased proportionally with sample concentration. Antibacterial activity, determined by the minimum inhibitory concentration (MIC) method, revealed effective inhibition against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Salmonella enterica*, with MIC values ranging from 12.5 to 25 µg/mL. In addition, the study investigated changes in color and antioxidant activity of spray-dried and maltodextrin-encapsulated chlorophyll under accelerated storage conditions. The total color difference (ΔE) increased over time, while DPPH radical scavenging activity declined to below 50% after approximately 7 days. Based on the Q₁₀ model, the estimated shelf life of the product at 30°C was approximately 56 days. Overall, this study provides new quantitative insights into the bioactivity and stability of chlorophyll derived from *C. submersum*, highlighting its potential as a natural antioxidant and antibacterial agent, and offering a scientific basis for the development of bio-based products in food and pharmaceutical applications.

Keywords: *Antibacterial, antioxidant, chlorophyll, Ceratophyllum submersum.*

Ngày nhận bài: 25/02/2026

Ngày chuyển phản biện: 12/3/2026

Ngày thông qua phản biện: 16/4/2026

Ngày duyệt đăng: 4/5/2026