

ẢNH HƯỞNG CÁC YẾU TỐ CÔNG NGHỆ ĐẾN HIỆU SUẤT TRÍCH LY POLYPHENOL, FLAVONOID VÀ HOẠT TÍNH BẮT GỐC TỰ DO DPPH CỦA DỊCH TRÍCH TRÁI VỎ (*Ficus auriculata*) SỬ DỤNG THIẾT KẾ NHÂN TỐ HAI MỨC

Võ Tấn Hậu^{1,*}, Huỳnh Quốc Việt¹, Nguyễn Thị Thà¹

TÓM TẮT

Polyphenol là các hợp chất phenol tự nhiên, hiện nay nhận được nhiều sự quan tâm của các nhà nghiên cứu và người tiêu dùng do vai trò phòng chống các bệnh thoái hóa. Cây vả (*Ficus auriculata* Lour.) là loài cây đặc hữu ở Việt Nam với điểm đặc trưng có lá và quả to hơn sung cũng như trái rất ít khi chín. Sử dụng thiết kế nhân tố 2 mức để nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố độc lập gồm: Nồng độ ethanol (20 - 90%), tỷ lệ lỏng - rắn (10 - 20 ml/g), pH dung môi trích (3 - 7), nhiệt độ (30 - 700 °C) và thời gian trích ly (60 - 240 phút) đến các yêu cầu: Hiệu suất trích ly, hiệu suất thu hồi polyphenol và flavonoid cũng như khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch trích ly được. Trong các yếu tố nghiên cứu, nồng độ ethanol là yếu tố tác động chính ($p = 0,0002$) trong quá trình trích ly polyphenol từ trái vả để đạt hiệu suất thu hồi polyphenol và flavonoid cũng như khả năng bắt gốc tự do DPPH cao. Yếu tố nhiệt độ và thời gian gần như không có tác động. Từ các kết quả này, các nhân tố và vùng thực nghiệm cũng có thể được lựa chọn gồm: Nồng độ ethanol (55 - 90%), tỷ lệ lỏng - rắn (10 - 20 ml/g) và pH dung môi trích (4 - 6) để thực hiện tối ưu hóa quá trình trích ly polyphenol và flavonoid từ trái vả.

Từ khóa: *DPPH, flavonoid, polyphenol, thiết kế nhân tố, trái vả.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Polyphenol hay còn gọi là các hợp chất phenol tự nhiên là nhóm các hợp chất trao đổi thứ cấp có cấu trúc khá đa dạng hiện diện rất phổ biến trong các loài thực vật, đặc biệt là các loại rau quả và là thành phần tích hợp trong chế độ ăn của con người [1-3]. Ngày nay nhóm hợp chất này đã và đang được xem là đối tượng quan tâm của các nhà nghiên cứu và người tiêu dùng bởi một số vai trò của nhóm hợp chất này với sức khỏe con người [4-6].

Hiện nay, các chế phẩm polyphenol trích ly từ nguồn nguyên liệu thực vật đã trở nên phổ biến trong công thức phát triển các sản phẩm thực phẩm chức năng, mỹ phẩm cũng như sử dụng làm phụ gia chế biến các sản phẩm thực phẩm từ thịt và thủy sản [7-11] nhờ hoạt tính kháng oxy hóa,

nâng cao hệ miễn dịch cùng những chức năng khác (phòng ngừa bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh tim mạch. Theo nghiên cứu của Adebooye và cs (2018) [12], khối lượng polyphenol chiết xuất công nghiệp vào năm 2015 đạt 16,380 tấn và ước tính tăng đến 33,880 tấn vào năm 2024 với giá trị khoảng 1,33 tỷ USD.

Cây vả (*Ficus auriculata* Lour) hay còn gọi là sung tai voi hay sung lá rộng thuộc họ Dâu tằm (Moraceae) là loài cây đặc hữu ở Việt Nam cũng như vùng Đông Nam Á với điểm đặc trưng có lá và quả to hơn sung, phân bố nhiều ở một số nước như Myanmar, Pakistan, Bhutan, Nepal, Thái Lan, Việt Nam và Ấn Độ [13]. Ở Việt Nam, cây vả mọc tự nhiên cũng như được trồng nhiều ở tỉnh Thừa Thiên Huế, đặc biệt là giống vả đỏ với sản lượng ước tính khoảng 100 tấn trái tươi mỗi năm với giá bán khá rẻ. Theo Puangpradab và cs (2018) [14], Shahinuzzaman và cs (2021) [15], trái vả là nguồn giàu các hợp chất polyphenol; các hợp chất polyphenol là cơ sở hoạt tính kháng oxy hóa,

¹ Phòng Chế biến và Bảo quản Nông sản Thực phẩm, Phân viện Công nghiệp Thực phẩm tại thành phố Hồ Chí Minh
*Email: hauvt@firi.vn

kháng khuẩn và hoạt tính bảo vệ gan [16 - 19] của dịch trích trái và trong các nghiên cứu *in vitro*.

Quá trình trích ly là sự rút chất hoà tan có trong chất lỏng hoặc chất rắn bằng một chất hoà tan khác (gọi là dung môi) nhờ quá trình khuếch tán của các chất có nồng độ khác nhau giữa 2 pha. Đây là công đoạn quan trọng nhất trong quá trình thu hồi và tinh chế các hợp chất có hoạt tính sinh học nói chung và các polyphenol nói riêng từ nguồn nguyên liệu thực vật và quá trình này chịu sự tác động của nhiều yếu tố công nghệ (các tham số trích ly).

Do vậy, nghiên cứu tác động của các yếu tố công nghệ gồm nồng độ ethanol, tỷ lệ lỏng - rắn, pH dung môi trích, nhiệt độ và thời gian trích đến hiệu suất trích ly, hiệu suất thu hồi polyphenol tổng và flavonoid tổng cũng như khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch trích trái và sử dụng thiết kế nhân tố hai mức bán phần nhằm sàng lọc các yếu tố tác động chính cũng như lựa chọn và xác định vùng thực nghiệm để thực hiện tối ưu hóa quá trình trích ly sau này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Trái và tươi (trái già được thu hái theo kinh nghiệm của người trồng) có nguồn gốc từ huyện Phú Lộc, tỉnh Thừa Thiên Huế được mua từ Công ty TNHH Sản xuất Thương mại và Dịch vụ Lộc Mai. Mẫu sau nhận về phòng thí nghiệm được rửa sạch, gọt bỏ phần không ăn được (cuống và phần hư hỏng do va đập vật lý) rồi để ráo nước khoảng 1 giờ. Cắt trái và thành những lát mỏng có độ dày 2 - 2,5 mm rồi ngâm trong axit xitric 1,5% trong 20 phút, sau đó chần ở nhiệt độ 85 - 90°C trong 20 phút rồi sấy ở nhiệt độ 75°C trong 5,5 giờ. Nghiền nguyên liệu sau sấy thành bột qua rây 1 - 2 mm, lưu trữ mẫu trong lọ thủy tinh tối màu có nắp. Bột trái và thu được có độ ẩm 5,5%, hàm lượng polyphenol tổng đạt 18,5 mg GAE/g nguyên liệu khô và flavonoid tổng đạt 19,1 mg CE/g nguyên liệu khô.

Các hóa chất sử dụng: Axit xitric, NaNO_2 , AlCl_3 , Na_2CO_3 , thuốc thử Folin Ciocalteu, axit gallic, catechin, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) mua từ Công ty Sigma-Aldrich và

Sharlau. Dung môi dùng phân tích: Ethanol, methanol, aceton là dung môi dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) mua từ Công ty Sharlau. Dung môi dùng nghiên cứu trích ly: Ethanol thực phẩm 96 độ cồn, Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Trích ly

Thủ tục trích ly thực hiện dựa trên cơ sở thiết kế nhân tố hai mức với 5 yếu tố gồm nồng độ ethanol (X_1 ; %), tỷ lệ lỏng - rắn (X_2 ; ml/g), pH dung môi trích (X_3), nhiệt độ (X_4 ; °C) và thời gian trích (X_5 ; phút) sử dụng 2 mức tại mỗi yếu tố (mức cao và mức thấp) như trong bảng 1.

Bảng 1. Các mức yếu tố sử dụng trong thiết kế nhân tố hai mức

Yếu tố	Ký hiệu	Mức yếu tố	
		Thấp (-)	Cao (+)
Nồng độ ethanol (%)	X_1	20	90
Tỷ lệ lỏng - rắn (ml/g)	X_2	10	20
pH	X_3	3	7
Nhiệt độ (°C)	X_4	30	70
Thời gian trích (giờ)	X_5	60	240

Cho 10 g bột trái và khô vào bình cầu đáy tròn dung tích 500 ml. Tiếp theo cho lượng dung môi trích ly đã điều chỉnh pH vào rồi tiến hành trích ly theo phương pháp trích nóng. Các giá trị nồng độ ethanol (%), tỷ lệ lỏng rắn (ml/g), pH dung môi trích, nhiệt độ (°C) và thời gian trích ly (phút) tại mỗi điểm thí nghiệm theo như bảng 2. Sau khi mỗi thí nghiệm kết thúc, hỗn hợp trích ly sẽ được lọc để tách bã rắn và dịch qua lọc thu được sẽ tiến hành phân tích và tính các giá trị đáp ứng. Hiệu suất trích ly (Y_1), hiệu suất thu hồi polyphenol tổng (Y_2) và hiệu suất thu hồi flavonoid tổng (Y_3) được tính theo các phương trình sau:

$$Y_1 = \frac{\text{Gram chất khô sau trích ly}}{\text{Gram nguyên liệu ban đầu}} \quad (1)$$

$$Y_2 = \frac{\text{Polyphenol tổng sau trích ly}}{\text{Polyphenol tổng trong nguyên liệu}} \quad (2)$$

$$Y_3 = \frac{\text{Flavonoid tổng sau trích ly}}{\text{Flavonoid tổng trong nguyên liệu}} \quad (3)$$

Bảng 2. Ma trận thực nghiệm và đáp ứng theo thiết kế nhân tố bán phần hai mức

Thí nghiệm	Yếu tố					Đáp ứng			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
1	20	10	7	70	240	4,05	38,41	38,57	64,83
2	90	20	7	30	60	6,25	79,91	55,14	75,21
3	90	10	7	30	240	6,75	74,01	55,79	75,39
4	20	10	7	30	60	6,95	35,05	30,4	50,97
5	20	10	3	70	60	8,05	40,51	39,17	62,44
6	90	10	3	30	60	8,35	78,56	58,66	78,40
7	20	10	3	30	240	8,50	39,42	32,07	61,84
8	90	20	3	30	240	9,15	80,18	65,47	80,23
9 ^a	55	15	5	50	150	10,10	70,32	45,00	69,41
10 ^a	55	15	5	50	150	10,30	71,95	46,68	67,41
11 ^a	55	15	5	50	150	10,40	70,10	46,98	66,63
12	90	20	3	70	60	10,55	86,77	72,12	85,51
13	90	10	7	70	60	10,95	80,73	58,07	81,33
14	20	20	3	30	60	11,95	49,71	41,18	60,83
15	20	20	7	70	60	12,20	54,47	40,21	68,03
16	20	20	7	30	240	12,30	47,70	41,97	65,58
17	90	20	7	70	240	13,95	82,27	69,92	98,53
18	90	10	3	70	240	14,25	81,59	57,00	93,21
19	20	20	3	70	240	14,30	59,85	42,06	68,60

Ghi chú: X₁ là nồng độ ethanol (%); X₂ là tỷ lệ lỏng rắn (v/w); X₃ là pH; X₄ là nhiệt độ (°C); X₅ là thời gian (phút); Y₁ là hiệu suất trích (%); Y₂ là hiệu suất thu hồi polyphenol tổng (%); Y₃ là hiệu suất thu hồi flavonoid tổng (%); Y₄ là khả năng bắt gốc tự do DPPH (%);^a Điểm trung tâm

2.2.2. Xác định hàm lượng polyphenol tổng

Hàm lượng polyphenol tổng trong dịch trích trái và được ước tính theo phương pháp đo màu với thuốc thử Folin - Ciocalteu [14] có sự điều chỉnh. Lấy 1 ml dịch trích trái và sau ly tâm vào ống nghiệm, cho tiếp 5 ml thuốc thử Folin - Ciocalteu

0,2 M vào rồi lắc mạnh. Sau 1 phút, cho 4 ml Na₂CO₃ 7,5% vào, lắc đều rồi để trong tối trong 30 phút. Đo độ hấp thụ dung dịch thu được bằng máy UV - 1800 ở bước sóng 765 nm. Hàm lượng polyphenol tổng trong dịch chiết được tính bằng mg đương lượng axit gallic (GAE)/tổng thể tích

dịch trích thu được và hiệu suất thu hồi polyphenol được tính theo phương trình (2).

2.2.3. Xác định hàm lượng flavonoid tổng

Hàm lượng flavonoid tổng trong dịch trích trái vả được ước tính theo phương pháp đo màu với tác nhân $AlCl_3$ [20] có sự điều chỉnh. Lấy 1 ml dịch trích trái vả sau ly tâm vào bình định mức 10 ml đã có sẵn 4 ml nước cất. Thêm vào 0,3 ml dung dịch natri nitrit 5%, lắc mạnh. Để yên 5 phút, thêm tiếp vào 0,3 ml $AlCl_3$ 10% vào, lắc mạnh. 1 phút sau cho thêm vào 2 ml dung dịch NaOH 1N, lắc mạnh rồi định mức bằng nước cất đến vạch, lắc đều rồi để yên trong tối ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Đo độ hấp thụ dung dịch thu được bằng máy UV - 1800 ở bước sóng 510 nm. Hàm lượng flavonoid tổng trong dịch chiết được tính bằng mg đương lượng catechin (CE)/tổng thể tích dịch trích thu được và hiệu suất thu hồi flavonoid được tính theo phương trình (3).

2.2.4. Hoạt tính bắt gốc tự do

Hoạt tính bắt gốc tự do của dịch trích trái vả được ước tính theo phương pháp đo màu với tác nhân DPPH [14, 21] có sự điều chỉnh. Lấy 1 ml dịch trích trái vả sau ly tâm vào ống nghiệm, cho tiếp 2 ml DPPH 40 ppm trong ethanol tuyệt đối vào rồi lắc mạnh. Để ống nghiệm trong tối 30 phút ở nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thụ dung dịch thu được bằng máy UV-1800 ở bước sóng 517 nm. Thực hiện tương tự với mẫu trắng bằng 1 ml ethanol 96%. Hoạt tính bắt gốc tự do của dịch trích trái vả được tính theo phương trình (4).

$$\% \text{ Bắt gốc tự do DPPH} = \frac{(A_t - A_m)}{A_t} \times 100 \quad (4)$$

Trong đó: A_t là độ hấp thụ của mẫu trắng và A_m là độ hấp thụ của mẫu dịch trích ở cùng bước sóng 517 nm.

2.2.5. Thiết kế thực nghiệm và phân tích thống kê

Để đánh giá tác động của 5 yếu tố công nghệ tại 2 mức của mỗi yếu tố, đã sử dụng thiết kế thực nghiệm nhân tố 2 mức bán phần gồm 16 thí nghiệm ngẫu nhiên và 3 thí nghiệm tại tâm phương án (Bảng 2) sử dụng phần mềm thiết kế thực nghiệm Design-Expert v13 (Minneapolis, USA). Tại mỗi điểm thí nghiệm thực hiện 3 lần và

kết quả là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD). Phân tích phương sai một nhân tố (ANOVA) thực hiện ở mức $p \leq 0,05$ để xác định ý nghĩa thống kê của mô hình.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Mặc dù có một số nhược điểm như hiệu suất thu hồi chất đích thấp và sử dụng lượng dung môi lớn, nhưng hiện nay kỹ thuật chiết dung môi vẫn được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp để thu hồi các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nguyên liệu thực vật do thao tác đơn giản, phạm vi ứng dụng rộng và chi phí đầu tư thấp [22]. Trong kỹ thuật này, các dung môi trích ly thường được sử dụng là ethyl acetate, acetone, propanol, metanol, ethanol và nước. Tuy nhiên, ethanol kết hợp với nước hiện phổ biến trong công nghiệp vì chúng an toàn hơn và ít tác động đến môi trường so với các dung môi hữu cơ khác [23]. Nghiên cứu của Thoo và cs (2010) cho thấy, hệ dung môi nhị phân có khả năng trích ly vượt trội hơn so với một dung môi đơn nhất do thành phần cũng như cấu trúc và tính chất hóa lý của các hợp chất polyphenol từ các nguồn thực vật khác nhau [24].

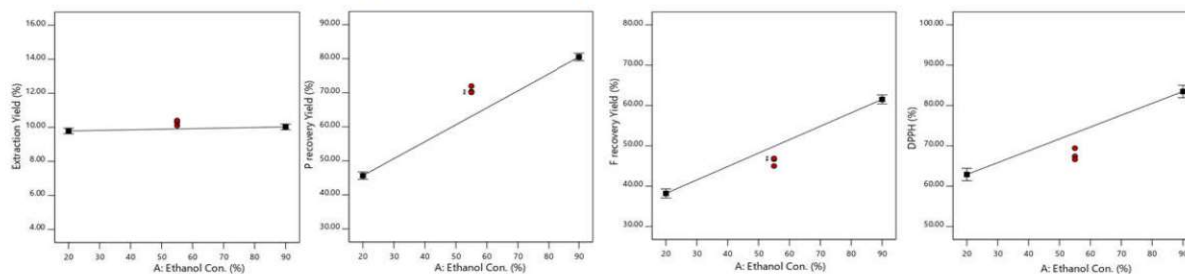
Việc phân tích các số liệu thực nghiệm trong bảng 2 sử dụng chương trình Design-Expert, tác động của từng yếu tố (nồng độ ethanol, tỷ lệ lỏng rắn, pH dung môi trích, nhiệt độ và thời gian trích) cũng như tương tác giữa chúng đến các đáp ứng hiệu suất trích ly, hiệu suất thu hồi polyphenol tổng, hiệu suất thu hồi flavonoid tổng và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH được đánh giá qua giá trị phần trăm đóng góp vào sự thay đổi giá trị đáp ứng đã chọn với mức ý nghĩa theo giá trị p như trong bảng 3.

3.1. Ảnh hưởng nồng độ ethanol đến các đáp ứng nghiên cứu

Nồng độ ethanol (X_1) có tác động mạnh đến đáp ứng hiệu suất thu hồi polyphenol tổng (Y_2 ; 88,65%), hàm lượng flavonoid tổng (Y_3 ; 82,66%) và khả năng bắt gốc tự do DPPH (Y_4 ; 70,13%) như trong hình 1 với giá trị của Y_2 , Y_3 và Y_4 cùng tăng khi nồng độ ethanol tăng, nghĩa là độ phân cực của hỗn hợp dung môi trích ly giảm. Kết quả này là phù hợp khi thành phần dịch trích trái vả chủ yếu là các hợp chất polyphenol ít phân cực như

catechin [25]. Tuy nhiên X_1 không tác động có ý nghĩa đến đáp ứng hiệu suất trích ly (Y_1 ; $p = 0,2716 > 0,05$) mặc dù tương tác giữa X_1X_2 lại có đóng góp

đáng kể cho đáp ứng này (23,84%). Do vậy nên chọn X_1 làm yếu tố tối ưu hóa quá trình trích ly với khoảng nồng độ khảo sát 55 - 90%.



Hình 1. Ảnh hưởng nồng độ ethanol (X_1) đến các đáp ứng Y_1 , Y_2 , Y_3 và Y_4

Bảng 3. Phần trăm đóng góp và giá trị p của các biến

Biến	Phần trăm đóng góp (%)				Giá trị p của đáp ứng			
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
X_1	0,16	88,65	82,66	70,13	0,2716	0,0002	0,0005	0,0012
X_2	22,25	6,00	8,09	3,00	0,0005	0,0031	0,0050	0,0271
X_3	5,86	0,66	0,74	0,32	0,0037	0,0271	0,0509	0,1904
X_4	14,02	1,83	3,15	14,17	0,0010	0,0100	0,0126	0,0060
X_5	2,74	0,01	0,15	5,35	0,0109	0,6295	0,1968	0,0155
X_1X_2	23,84	2,22	0,15	0,36				
X_1X_3	0,36	0,02	0,29	0,32				
X_1X_4	17,64	0,00	0,14	1,57				
X_1X_5	2,74	0,21	0,00	0,18				
X_2X_3	3,62	0,00	0,22	3,27				
X_2X_4	0,91	0,16	0,05	0,03				
X_2X_5	3,86	0,00	0,44	0,00				
X_3X_4	0,00	0,00	0,26	0,75				
X_3X_5	1,86	0,20	3,25	0,38				
X_4X_5	0,11	0,00	0,34	0,27				

Ghi chú: X_1 là nồng độ ethanol (%); X_2 là tỷ lệ lỏng - rắn (v/w); X_3 là pH; X_4 là nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$); X_5 là thời gian (phút); Y_1 là hiệu suất trích ly (%); Y_2 là hiệu suất thu hồi polyphenol tổng (%); Y_3 là hiệu suất thu hồi flavonoid tổng (%); Y_4 là khả năng bắt gốc tự do DPPH (%).

3.2. Ảnh hưởng tỷ lệ lỏng - rắn đến các đáp ứng nghiên cứu

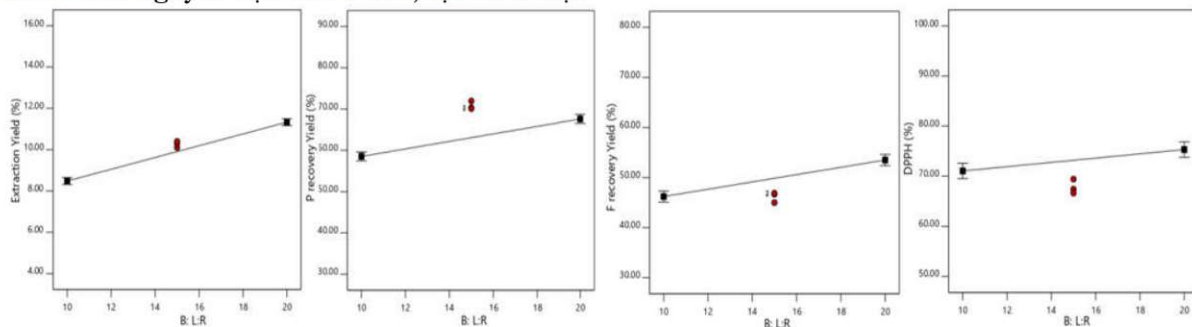
Hình 2 cho thấy, tỷ lệ lỏng - rắn tác động có ý nghĩa đối với cả bốn đáp ứng nghiên cứu nhưng

mạnh nhất là đối với đáp ứng hiệu suất trích ly (Y_1 ; 22,25%, $p = 0,0005$).

Kết quả này là phù hợp với các nguyên lý chung của quá trình trích ly lỏng-rắn và tương tự

như kết quả nghiên cứu của Prasad và cs (2012) [26]. Khi tăng tỷ lệ lỏng - rắn, lượng dung môi đi vào tế bào nguyên liệu nhiều hơn, tạo điều kiện

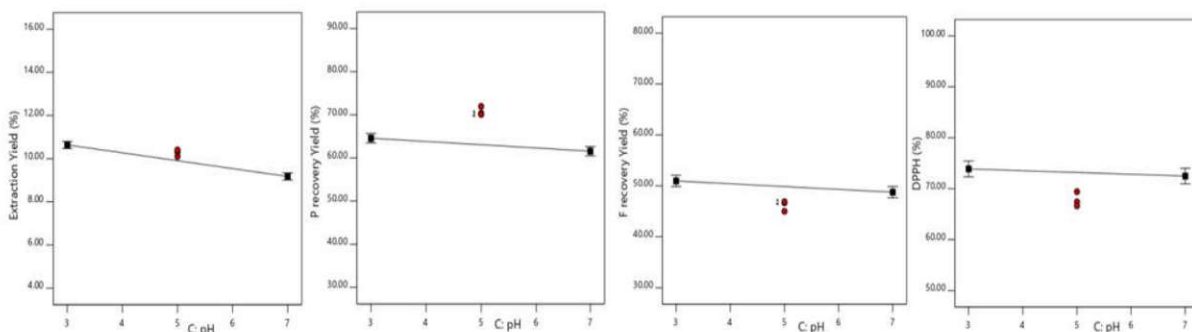
thuận lợi cho việc hòa tan các hợp chất trích vào dung môi và khuếch tán dễ dàng ra khỏi tế bào.



Hình 2. Ảnh hưởng tỷ lệ lỏng - rắn (X₂) đến các đáp ứng Y₁, Y₂, Y₃ và Y₄

Bảng 2 cho thấy, hiệu suất trích ly (Y₁) đạt giá trị cao nhất là 14,30% khi nồng độ ethanol 20%, tỷ lệ lỏng - rắn = 20 ml/g, pH = 3, nhiệt độ trích ly 70°C và thời gian trích ly là 240 phút. Đây là điểm có độ phân cực cao nhất trong khoảng nồng độ ethanol khảo sát. Tuy nhiên, tại điểm thí nghiệm này, hiệu suất thu hồi polyphenol (Y₂), hiệu suất thu hồi flavonoid (Y₃) và khả năng bắt gốc tự do DPPH (Y₄) chỉ đạt lần lượt 59,85%, 42,06% và 68,60%. Vì lý do này nên loại bỏ đáp ứng Y₁ và chọn tỷ lệ lỏng - rắn từ 10 đến 20 ml/g làm cơ sở tối ưu hóa.

3.3. Ảnh hưởng pH đến các đáp ứng nghiên cứu



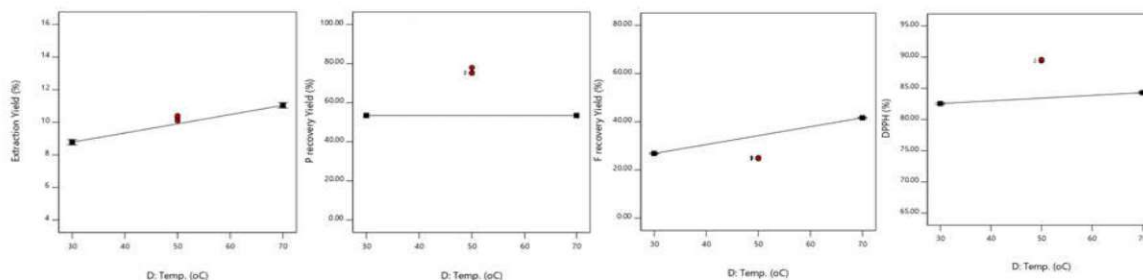
Hình 3. Ảnh hưởng pH (X₃) đến các đáp ứng Y₁, Y₂, Y₃ và Y₄

3.4. Ảnh hưởng nhiệt độ đến các đáp ứng nghiên cứu

Nhiệt độ gần như không có ảnh hưởng đến đáp ứng hiệu suất thu hồi polyphenol (Y₂) nhưng có tác động yếu đến đáp ứng hiệu suất trích ly (Y₁; 14,02%), hiệu suất thu hồi flavonoid (Y₃; 3,15%) và khả năng bắt gốc tự do DPPH (Y₄; 14,17%) với

Bảng 3 và hình 3 cho thấy, pH dung môi trích chỉ tác động yếu đến hiệu suất trích ly (Y₁; 5,86%), hầu như không tác động đến hiệu suất thu hồi polyphenol (Y₂) cũng như tác động không có ý nghĩa thống kê với đáp ứng hiệu suất thu hồi flavonoid (Y₃; $p = 0,0509$) và khả năng bắt gốc tự do DPPH (Y₄; $p = 0,1904$). Tuy nhiên, kết quả thực nghiệm trong bảng 2 cho thấy, cả đáp ứng Y₂ và Y₃ đạt giá trị cao nhất ở pH = 3 khi nhiệt độ = 70°C và có khuynh hướng giảm khi tăng pH ở cùng nhiệt độ trích. Điều này cho thấy, tác dụng bảo vệ các hợp chất polyphenol trong vùng pH axit [27–28]. Nên chọn X₃ làm yếu tố tối ưu hóa quá trình trích ly với khoảng pH khảo sát 4-6.

khuynh hướng tăng khi nhiệt độ tăng (Hình 4). Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Jokić và cs (2009) [29]. Về lý thuyết, khi thực hiện trích ly ở nhiệt độ cao, mô thực vật sẽ trở nên mềm hơn và làm yếu tương tác màng tế bào sẽ dẫn đến tăng hiệu suất thu hồi [30]. Do vậy nên cố định nhiệt độ ở mức 70°C trong thí nghiệm nghiên cứu tối ưu quá trình trích ly.

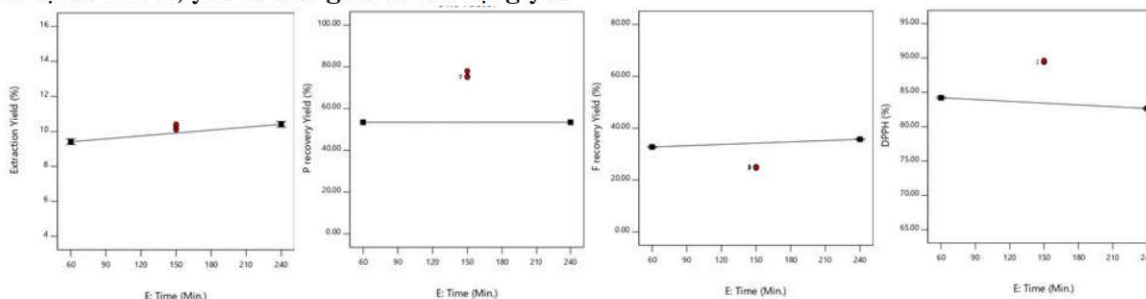


Hình 4. Ảnh hưởng nhiệt độ (X_4) đến các đáp ứng Y_1 , Y_2 , Y_3 và Y_4

3.5. Ảnh hưởng thời gian trích đến các yêu cầu nghiên cứu

Hình 5 cho thấy, thời gian gần như không có tác động đến hiệu suất trích ly (Y_1 ; 2,74%), hiệu suất thu hồi polyphenol (Y_2 ; 0,01) và hiệu suất thu hồi flavonoid (Y_3 ; 0,15). Với yêu cầu hoạt tính bắt gốc tự do DPPH, yếu tố thời gian có tác động yếu

(5,35%) và tiêu cực, nghĩa là khi tăng thời gian trích ly hoạt tính bắt gốc tự do giảm. Điều này là do sự biến đổi các chất polyphenol dưới tác dụng của nhiệt độ và môi trường trích ly có nước trong thời gian dài [30]. Với kết quả này, nên cố định yếu tố thời gian là 150 phút trong thí nghiệm nghiên cứu tối ưu quá trình trích ly.



Hình 5. Ảnh hưởng thời gian (X_5) đến các yêu cầu Y_1 , Y_2 , Y_3 và Y_4

4. KẾT LUẬN

Thiết kế nhân tố 2 mức bán phần đã được áp dụng thành công để xác định các yếu tố ảnh hưởng quan trọng đến các yêu cầu hiệu suất trích ly, hiệu suất thu hồi polyphenol và flavonoid cũng như hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dịch trích trái vả. Nồng độ ethanol là yếu tố đóng góp quan trọng nhất vào hiệu quả trích ly các hợp chất polyphenol sử dụng môi ethanol - nước như là hệ dung môi trích ly. Ngoài ra, đã lựa chọn 3 yếu tố với khoảng giá trị thích hợp cho quá trình tối ưu nhằm tiết kiệm thời gian và chi phí thực hiện gồm nồng độ ethanol (55 - 90%), tỷ lệ lỏng - rắn (10 - 20 ml/g) và pH dung môi trích (4 - 6).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. El Gharras H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *Int. J. Food Sci.*, 44 (12), 2512 - 2518.
2. Li A. N., Li S., Zhang Y. J., Xu X. R., Chen, Y. M. and Li, H. B. (2014). Resources and biological

activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6 (12), pp. 6020 - 6047.

3. Durazzo A., Lucarini M., Souto E. B., Cicala, C., Caiazzo E. *et al.* (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytother. Res.*, 33 (9), 2221 - 2243.

4. Bertelli A., Biagi M., Corsini M., Baini G., Cappellucci G. and Miraldi E. (2021). Polyphenols: From theory to practice. *Foods*, 10 (11), 2595.

5. Tsao R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2 (12), 1231 - 1246.

6. Rasouli H., Farzaei M. H. and Khodarahmi R. (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *Int. J. Food Prop.*, 20 (sup. 2), 1700 - 1741.

7. Kumar Y., Yadav D. N., Ahmad T. and Narsaiah K. (2015). Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 14 (6), 796 - 812.

8. Papuc C., Goran G. V., Predescu C. N., Nicorescu V. and Stefan, G. (2017). Plant polyphenols as antioxidant and antibacterial agents for shelf-life extension of meat and meat products: classification, structures, sources, and action mechanisms. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 16 (6), 1243 - 1268.
9. Maqsood S., Benjakul S., Abushelaibi A. and Alam A. (2014). Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: A detailed review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 13 (6), 1125 - 1140.
10. Zillich O. V., Schweiggert - Weisz U., Eisner P. and Kersch M. (2015). Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 37 (5), 455 - 464.
11. Ofosu F. K., Daliri E. B. M., Elahi F., Chelliah R., Lee B. H. and Oh D. H. (2020). New insights on the use of polyphenols as natural preservatives and their emerging safety concerns. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 525810.
12. Adebooye O. C., Alashi A. M. and Aluko R. E. (2018). A brief review on emerging trends in global polyphenol research. *J. Food Biochem.*, 42 (4), e12519.
13. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm và cộng sự (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Tập 2. Nxb Khoa học và Kỹ thuật, 1044 - 1045.
14. Puangpradab R., Suksathan R., Saratan N. and Puangsombat P. (2018). Antioxidant properties and nutritive values of native figs consumed in northern Thailand. *Acta Horticulturae*, 1210, 281 - 287.
15. Shahinuzzaman M., Akhtar P., Amin N., Ahmed Y., Anuar F. H. *et al.* (2021). New insights of phenolic compounds from optimized fruit extract of *Ficus auriculata*. *Sci. Rep.*, 11 (1), 12503.
16. El-Fishawy A., Zayed R. and Afifi S. (2011). Phytochemical and pharmacological studies of *Ficus auriculata* Lour. *J. Nat. Prod.*, 4, 184 - 195.
17. Kavitha C. C. I. and Revikumar K. G. (2017). *Ficus auriculata* (elephant ear fig): a phytochemical and pharmacological review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6 (5), 274 - 283.
18. Tran Truong Giang, Luu Thi Nghia, Do Thi Hong Tuoi, Huynh Ngoc Trinh (2019). *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* hepatoprotective effects of total ethanolic extract from *Ficus auriculata* fruits. *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, 24 (5), 297 - 300.
19. Saklani S. and Chandra S. (2012). *In vitro* antimicrobial activity, nutritional profile and phytochemical screening of wild edible fruit of Garhwal Himalaya (*Ficus auriculata*). *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 12 (2), 61 - 64.
20. Haida Z., Ab Ghani S., Nakasha J. J. and Hakiman M. (2022). Determination of experimental domain factors of polyphenols, phenolic acids and flavonoids of lemon (*Citrus limon*) peel using two - level factorial design. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29 (1), 574 - 582.
21. Blois M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181 (4617), 1199 - 1200.
22. Mojzer B. E., Knez Hrncić M., Škerget M., Knez Ž. and Bren U. (2016). Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, 21 (7), 901.
23. Spigno G., Tramelli L. and De Faveri D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.*, 81 (1), 200 - 208.
24. Thoo Y. Y., Ho S. K., Liang J. Y., Ho C. W. and Tan C. P. (2010). Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chem.*, 120 (1), 290 - 295.
25. Saini R. (2012). Comparative study of three wild edible fruits of uttrakhand for antioxidant, antiproliferative activities and polyphenolic

composition. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, 3 (4), 158 - 167.

26. Prasad K. N., Kong K. W., Ramanan R. N., Azlan A. and Ismail A. (2012). Selection of experimental domain using two - level factorial design to determine extract yield, antioxidant capacity, phenolics, and flavonoids from *Mangifera pajang* Kosterm. *Sep. Sci. Technol.*, 47 (16), 2417 - 2423.

27. Devi P., Singh S., Sangwan S., Dalal P. and Moond M. (2020). Effect of pH on antioxidant and phytochemical activities of Mulhatti roots (*Glycyrrhiza glabra* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology A*, 11, 276 - 282.

28. Wiyono T., Nurhayati R., Herawati E. R. N. and Laila, U. (2020). The effect of time, pH and solvent composition on cocoa shell polyphenol extraction and its antioxidant activity: response

surface method approach. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 462, 012029.

29. Jokić, S., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Velić, D., Tomas, S., Bilić, M., & Bešvir, Ž. (2009). The effect of solvent and temperature on extraction yield of phenolic compounds from soybeans, antioxidant activity and colour of extracts. The effect of solvent and temperature on extraction yield of phenolic compounds from soybeans, antioxidant activity and colour of extracts., 293 - 299.

30. Che Sulaiman, I. S., Basri, M., Fard Masoumi, H. R., Chee, W. J., Ashari, S. E., & Ismail, M. (2017). Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti - radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chemistry Central Journal*, 11 (1), 1 - 11.

EFFECTS OF TECHNOLOGICAL FACTORS ON EXTRACTION YIELD, POLYPHENOLS, FLAVONOIDS AND DPPH FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF *Ficus auriculata* FRUIT EXTRACT USING TWO LEVEL FACTORIAL DESIGN

Vo Tan Hau^{1,*}, Huynh Quoc Viet¹, Nguyen Thi Tha¹

¹Food Industries Research Institute, Branch in Ho Chi Minh city

*Email: hauvt@firi.vn

Summary

Nowadays, polyphenolic compounds have attracted great interest due to their roles in the prevention of degenerative diseases and have used as the input material for manufacturing functional foods, nutraceutical and pharmaceutical products. *Ficus auriculata* Lour. is an endemic tree species in Vietnam with the characteristic of having larger leaves and fruits than figs as well as the fruit rarely ripening. Previous researches have revealed fruits of the species is rich source of polyphenolic compounds with antioxidant and antimicrobial activities; which they could be used as a source of potent natural ingredients and additives. In this study, two level factorial design was used to study the influence of the following dependent factors, namely ethanol concentration (20 - 90%), liquid to solid ratio (10 - 20; ml/g), pH (3 - 7), extraction temperature (30 - 70°C) and time (60 - 240 min.) on extraction yield, polyphenol and flavonoid recovery yield as well as DPPH free radical scavenging activity from *Ficus auriculata* fruits. Among all the factors, ethanol concentration is the main influencing factor ($p = 0.0002$) in obtaining higher yield of polyphenols and flavonoids as well as DPPH free radical scavenging capacity. The extraction time and temperature factor have almost no impact. From these results, the factors and their experimental regions can also be selected, including: ethanol concentration (55 - 90%), liquid - solid ratio (10 - 20 ml/g) and extraction solvent pH (4 - 6), to optimize the extraction process.

Keywords: DPPH, flavonoid, factorial design, polyphenol, *Ficus auriculata*.

Người phản biện: TS. Nguyễn Duy Tân

Ngày nhận bài: 24/02/2023

Ngày thông qua phản biện: 21/3/2023

Ngày duyệt đăng: 28/3/2023