

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN CHIẾT XUẤT HỢP CHẤT PHENOLIC VÀ FLAVONOID TỪ QUẢ TÁO MÈO (*Docynia indica*) ĐÔNG KHÔ THÔNG QUA HỖ TRỢ CỦA VI SÓNG

Nguyễn Thị Thu Phương¹, Thái Ngọc Anh¹, Đặng Thảo Yến Linh²,
Nguyễn Thị Lâm Đoàn¹, Lê Thị Ngọc Thúy¹, Trần Thị Nhung¹, Nguyễn Thị Thanh Thủy^{1*}

¹Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Trung tâm Công nghệ Vật liệu, Viện Ứng dụng Công nghệ

*Tác giả liên hệ: nttthuycntp@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 20.02.2021

Ngày chấp nhận đăng: 29.04.2021

TÓM TẮT

Táo mèo (*Docynia indica*) là loại quả có tiềm năng dược lý cao do chứa nhiều hoạt chất chống oxy hóa như phenolic, flavonoid. Nghiên cứu này nhằm mục đích tối ưu hóa điều kiện chiết xuất hoạt chất sinh học từ táo mèo thông qua hỗ trợ của vi sóng. Tác động của các thông số khác nhau bao gồm: nồng độ dung môi, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, công suất vi sóng, thời gian chiết xuất đến việc thu nhận các hoạt chất được nghiên cứu riêng lẻ. Điều kiện chiết xuất được tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology - RSM). Kết quả cho thấy, điều kiện tối ưu để chiết xuất hoạt chất sinh học từ quả táo mèo đông khô là dung môi rượu 40°, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 33,37/1, công suất vi sóng 627,64W (tuy nhiên trên thực tế không điều chỉnh được công suất này nên nhóm tác giả sử dụng công suất sát nhất là 630W), thời gian vi sóng là 3,02 phút, ở điều kiện nêu trên, hàm lượng polyphenol tổng số và flavonoid thu được lần lượt là $42,28 \pm 0,39$ mg GAE/g CK và $15,47 \pm 0,38$ mg CAE/g CK.

Từ khóa: Táo mèo, đông khô, chiết xuất bằng vi sóng, phenolic, flavonoid, khả năng kháng oxy hóa.

Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phenolic and Flavonoid Compounds from Lyophilized *Docynia indica* Fruit

ABSTRACT

Docynia indica is a fruit with high pharmacological potential because it contains many antioxidants such as phenolics and flavonoids. This study aims to optimize conditions for extracting phenolic and flavonoid compounds from this fruit through microwave-assisted. The effects of the various parameters including solvent concentration, solvent/material ratio, microwave power, extraction time on collection capability of bioactive compounds were studied individually. The extraction condition was optimized by Response Surface Methodology (RSM). The results showed that the optimal condition for extracting bioactive substances from lyophilized *Docynia indica* was 40° alcohol solvent, the ratio of solvent/material was 33.37/1, microwave power was 627.64W (However, in fact, this power cannot be adjusted, so the authors used the closest power of 630W), the extraction time is 3.02m. With the above indicated conditions, the total polyphenol and flavonoid contents were obtained 42.28 ± 0.39 mg GAE/g CK and 15.47 ± 0.38 mg CAE/g CK, respectively.

Keywords: *Docynia indica*, lyophilized, microwave-assisted extraction, phenolic, flavonoid, antioxidant.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Táo mèo (*Docynia indica*) được trồng rộng rãi ở Việt Nam, Ấn Độ và một số tỉnh phía nam Trung Quốc. Tại Việt Nam, táo mèo được phân bố chủ yếu ở các tỉnh miền núi phía Bắc với độ cao trên 1.000m như Yên Bái, Lào Cai, Sơn La,

Hà Giang và Lai Châu. Hiện nay, táo mèo được công nhận là loại cây đem lại nguồn thu nhập quan trọng cho các hộ gia đình, phù hợp với mô hình nông lâm kết hợp (Lua & cs., 2013). Thành phần hóa học chính trong táo mèo bao gồm axit tartric, axit citric, vitamin C, tanin, đường. Ngoài ra, táo mèo còn chứa một số hợp chất sinh

học đáng quan tâm như phenolic, alkaloid, flavonoid, proanthocyanidin (Đỗ Tất Lợi, 1999).

Những năm gần đây, nghiên cứu thu nhận hoạt chất chống oxy hóa và kháng khuẩn tự nhiên từ thực vật được quan tâm do nhu cầu ngày càng tăng đối với sản phẩm mang đặc tính dược lý. Nghiên cứu phương pháp thu nhận dịch chiết chứa hoạt chất sinh học có lợi trong táo mèo là cần thiết, giúp nâng cao giá trị cho loại quả này.

Chiết xuất hoạt chất nhờ hỗ trợ vi sóng là một trong những phương pháp nhận được sự quan tâm nhờ thời gian chiết xuất ngắn, hiệu suất chiết xuất cao, năng lượng sử dụng ít hơn phương pháp truyền thống, thích hợp với cả quy mô phòng thí nghiệm và quy mô công nghiệp (Duy & cs., 2019; Kala & cs., 2016). Tuy nhiên, để thu được dịch chứa có hàm lượng hoạt chất cao cần quan tâm đến ảnh hưởng của nhiều yếu tố như nồng độ dung môi, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, công suất vi sóng, thời gian vi sóng... và phải tối ưu hóa các điều kiện kể trên. Một số kỹ thuật tối ưu hóa được phát triển như phương pháp bề mặt đáp ứng (Response surface methodology - RSM) hay mạng thần kinh nhân tạo (Artificial Neural Networks) (Chen & cs., 2006; Khayet & cs., 2011). Trong đó, RSM là phương pháp phổ biến để tối ưu hóa các điều kiện chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nguyên liệu thực vật (Karacabey & Mazza, 2010; Tabaraki & cs., 2012). RSM cũng đã được chứng minh là hữu ích với việc dự đoán chính xác cao và hiệu quả về thời gian (Chen & cs., 2006).

Mùa vụ thu hoạch của táo mèo trong năm ngắn, từ tháng 9 đến tháng 10 và quả cũng chỉ bảo quản lạnh tốt nhất trong vòng một tháng. Sử dụng táo mèo ngoài vụ thu hoạch chỉ có thể là táo mèo khô. Để làm khô, táo mèo được sấy đối lưu hoặc phơi dưới ánh nắng mặt trời. Một lượng lớn các hoạt chất như tocopherol, axit ascorbic, carotenoid và phenolic bị tổn thất do dễ bị biến đổi bởi nhiệt trong thời gian dài (Shofian & cs., 2011). Hiện nay, kỹ thuật sấy đông khô giúp loại bỏ nước ra khỏi thực phẩm mà vẫn giữ được hầu hết màu sắc, dinh dưỡng, hương thơm, thành phần và vị của nguyên liệu,

phù hợp với nguyên liệu chứa thành phần chống oxy hóa nhạy cảm với nhiệt cao.

Mục đích của nghiên cứu này là xác định tác động của điều kiện chiết xuất (nồng độ dung môi, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, công suất vi sóng và thời gian tác động) tới khả năng chiết xuất các hợp chất hoạt tính sinh học và đặc tính kháng oxy hóa từ quả táo mèo đã được sấy đông khô để đưa ra khuyến cáo cho việc nghiên cứu phát triển sản phẩm rượu táo mèo ngâm trong nghiên cứu sau này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Táo mèo đạt độ chín thương mại được thu mua từ Yên Bái vào tháng 9/2019, có đường kính từ 25-55mm; khối lượng từ 22-50 g/quả, được người dân thu hái thủ công, sau đó được vận chuyển về Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam sau 1 ngày thu hái. Quả có màu xanh vàng đặc trưng. Táo mèo được rửa sạch và thái lát bằng máy công nghiệp và cho ngay vào túi PE kín để tránh oxy hóa. Lát cắt táo mèo được bảo quản ngay trong điều kiện lạnh 4-6°C không quá 12 giờ sau đó được sấy đông khô. Táo mèo sau khi sấy đông khô được đóng trong 2 lớp túi PE và đặt trong thùng xốp, bảo quản ở nhiệt độ thường. Lát táo mèo sau sấy có kết cấu xốp tạo điều kiện cho quá trình trích ly các hoạt chất.

- Rượu trắng có độ cồn 30, 35, 40, 45° được đặt tại làng Kiên Lao, xã Xuân Tiến, huyện Xuân Trường, tỉnh Nam Định, rượu được chưng cất theo phương pháp truyền thống.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp công nghệ

Hoạt chất từ quả táo mèo đông khô được trích ly bằng rượu kết hợp hỗ trợ vi sóng với nồng độ khác nhau theo quy trình sau:

Lát táo mèo đông khô → Nghiền, đồng nhất mẫu → Phối trộn với dung môi → Chiết xuất bằng vi sóng → Dịch chiết thô → Lọc tâm → Dịch chiết trong → Phân tích các chỉ tiêu.

Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất hợp chất phenolic và flavonoid từ quả táo mèo (*Docynia indica*) đông khô thông qua hỗ trợ của vi sóng

2.2.2. Bố trí thí nghiệm

Khoảng khảo sát tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, nhiệt độ và thời gian chiết xuất được tham khảo theo nghiên cứu của Shende & cs. (2016). Các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần.

Thí nghiệm 1: Xác định nồng độ dung môi thích hợp: Yếu tố thí nghiệm: dung môi là nước RO (đối chứng), rượu trắng 30, 35, 40, 45°. Yếu tố phi thí nghiệm: thời gian 5 phút, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu: 25/1, công suất vi sóng 450W.

Thí nghiệm 2: Xác định ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu: Yếu tố thí nghiệm: tỷ lệ dung môi/nguyên liệu lần lượt 15/1; 20/1; 25/1; 30/1; 35/1. Yếu tố phi thí nghiệm: thời gian 5 phút, nồng độ rượu (xác định ở thí nghiệm 1), công suất vi sóng 450W.

Thí nghiệm 3: Xác định ảnh hưởng của thời gian: Yếu tố thí nghiệm: thời gian vi sóng lần lượt là 3, 4, 5, 6, 7 phút. Yếu tố phi thí nghiệm: nồng độ rượu (xác định ở thí nghiệm 1), tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (xác định ở thí nghiệm 2), công suất vi sóng 450W.

Thí nghiệm 4: Xác định ảnh hưởng của công suất vi sóng:

Yếu tố thí nghiệm: công suất vi sóng 90W, 270W, 450W, 630W và 900W tương ứng với các chế độ P 10, 30, 50, 70, 90 của lò vi sóng SHARP R-G573VN-B. Yếu tố phi thí nghiệm: nồng độ rượu (xác định ở thí nghiệm 1), tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (xác định ở thí nghiệm 2), thời gian vi sóng (xác định ở thí nghiệm 3).

Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm từ 1 đến 4 gồm: polyphenol tổng số, flavonoid, hoạt độ kháng oxy hóa.

Thí nghiệm 5: Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng chiết xuất các hoạt chất sinh học từ quả táo mèo thông qua hỗ trợ của vi sóng: Tiến hành khảo sát sơ bộ ảnh hưởng của 04 thông số quan trọng đến khả năng chiết polyphenol tổng số, flavonoid từ quả táo mèo đông khô bao gồm: Nồng độ dung môi, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu, thời gian vi sóng, công suất vi sóng. Theo đó, các thí nghiệm sơ bộ về các yếu tố độc lập được thực hiện để lựa chọn phạm vi phù hợp (chính là kết quả của 4 thí nghiệm đơn yếu tố). Bốn yếu tố chính sau đó đã được lựa chọn cho thiết kế BBD (Box Behnken

Design) bao gồm: Nồng độ dung môi (A, %), tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (B, w/w), thời gian vi sóng (C, phút) và công suất vi sóng (D,W). Thiết kế này có ưu điểm là số thí nghiệm sẽ ít hơn so với mô hình lặp tâm (CCD) giúp tiết kiệm thời gian thử nghiệm hơn. Thiết kế thí nghiệm được thực hiện trên phần mềm Design Expert 11.

2.2.3. Phân tích

Xác định chất khô tổng số theo phương pháp sấy đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ 105°C trong thời gian dài, lượng nước trong nguyên liệu sẽ bay hơi đến khối lượng không đổi, toàn bộ phần còn lại là lượng chất khô của nguyên liệu.

Hàm lượng phenolic được xác định theo TCVN 9745-1-2013, độ hấp thụ quang được đo ở bước sóng 765nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Axit gallic được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Kết quả tính bằng mg axit gallic trên khối lượng khô nguyên liệu.

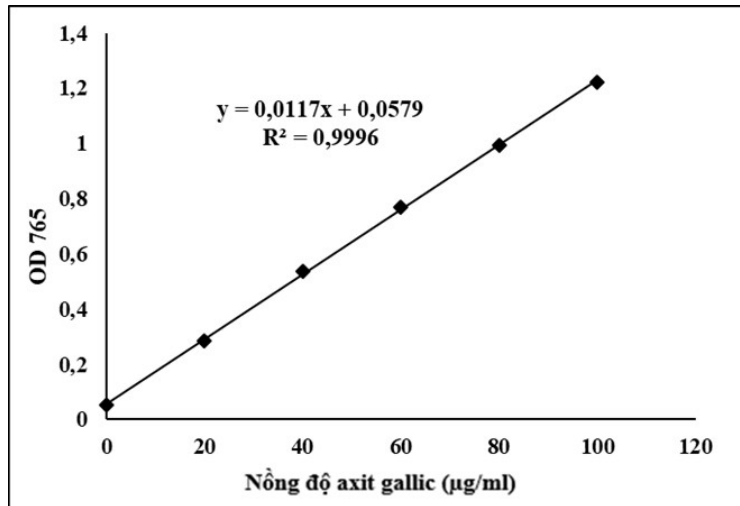
Hàm lượng flavonoid được xác định theo phương pháp được mô tả bởi Xu & Chang (2007), độ hấp thụ quang được đo ở bước sóng 510nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Catechin được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Kết quả tính bằng mg catechin trên khối lượng khô nguyên liệu.

Hoạt tính kháng oxy hóa xác định theo phương pháp đo màu Tabart & cs. (2007), dựa vào khả năng bắt giữ gốc tự do DPPH của chất có tác dụng kháng oxy hóa. Hàm lượng DPPH còn lại trong dung dịch sau phản ứng được xác định bằng phương pháp so màu ở 517nm, từ đó % kim hãm được tính toán và thay vào phương trình đường chuẩn trolox, tính khả năng kháng oxy hóa mẫu.

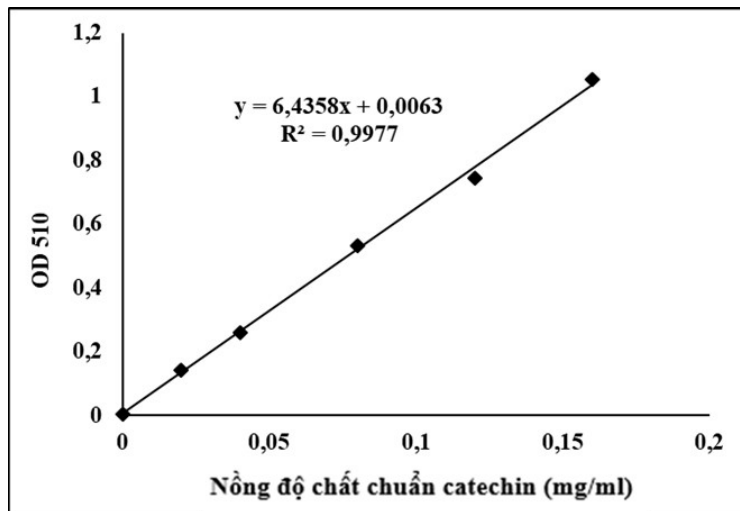
Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: Folin-Ciocalteu 10%; Na₂CO₃ 7,5%; catechin gốc; NaNO₂ 5%; AlCl₃ 10%; NaOH 4%; DPPH gốc; trolox gốc; methanol đều là các hóa chất dùng trong phân tích có xuất từ Đức.

2.2.4. Xử lý số liệu

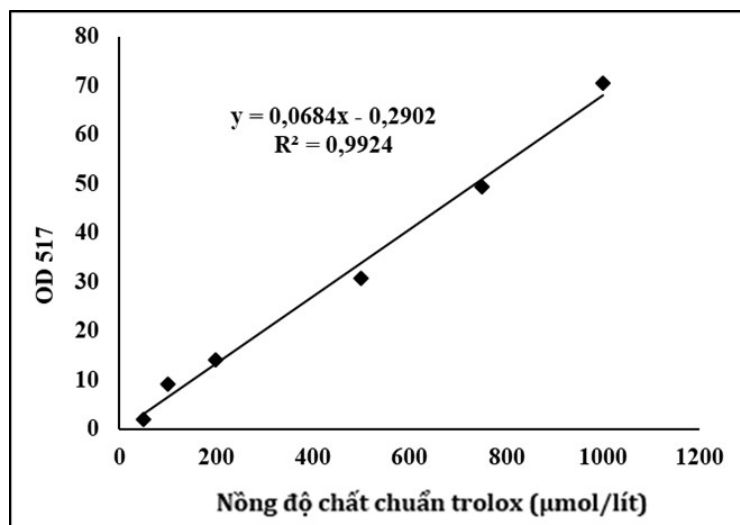
Số liệu được xử lý và phân tích trên phần mềm Microsoft Excel và Minitab 16. Sự khác biệt của giá trị trung bình giữa các công thức được đánh giá nhờ phép so sánh Turkey với mức tin cậy 95%.



Hình 1. Đường chuẩn axit galic

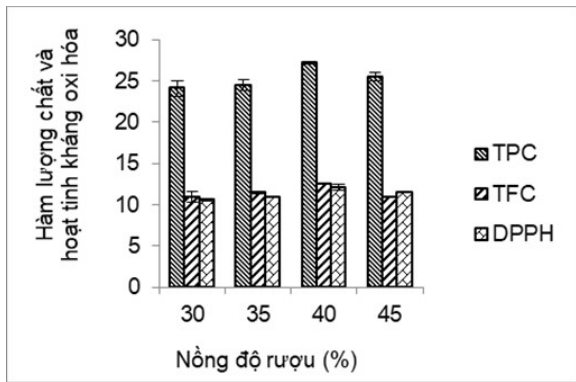


Hình 2. Đường chuẩn catechin

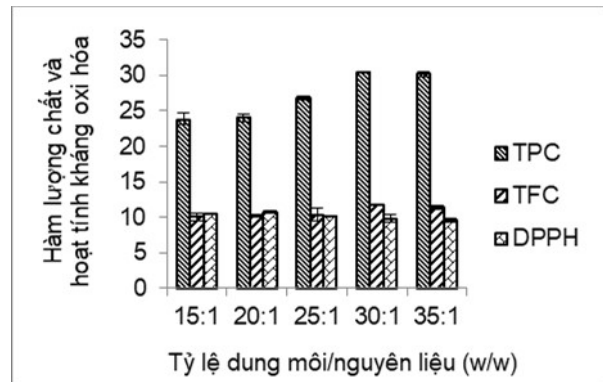


Hình 3. Đường chuẩn trolox

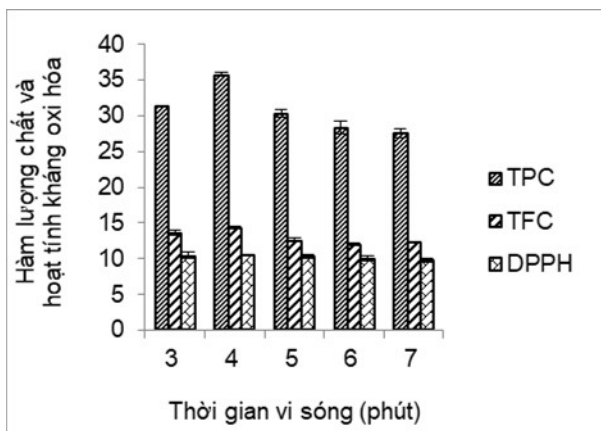
Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất hợp chất phenolic và flavonoid từ quả táo mèo (*Docynia indica*) đông khô thông qua hỗ trợ của vi sóng



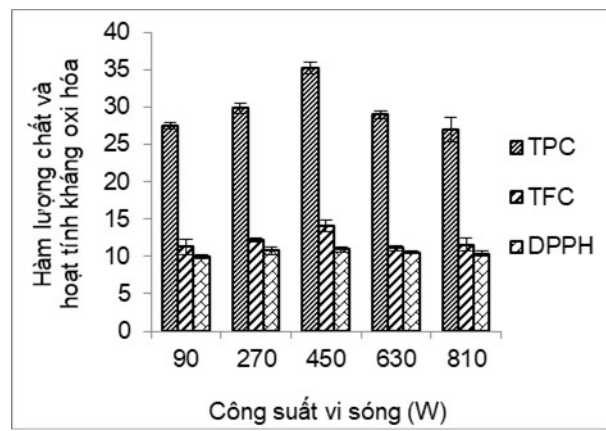
(a)



(b)



(c)



(d)

Chú thích: TPC: Hàm lượng polyphenol tổng số (mg GAE/g CK); TFC: Hàm lượng flavonoid (mg CAE/g CK); DPPH: khả năng kháng oxy hóa của các hoạt chất sinh học (mmol trolox/g CK).

Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hàm lượng và khả năng kháng oxy hóa của các hoạt chất chiết xuất từ quả táo mèo đông khô

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của các điều kiện chiết xuất hoạt chất đến hàm lượng hoạt chất thu được

Để tìm được điểm tâm cho thiết kế thí nghiệm tối ưu, ảnh hưởng của bốn yếu tố độc lập: nồng độ rượu, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, thời gian vi sóng và công suất vi sóng đến hàm lượng hoạt chất sinh học trong dịch chiết được khảo sát. Kết quả thu được trong hình 4.

Kết quả tại hình 4a cho thấy, hàm lượng polyphenol tổng số và flavonoid thu được ít nhất khi chiết xuất bằng dung môi rượu 30°, tăng

dần với dung môi rượu 35°, đạt cao nhất tại dung môi rượu 40° với hàm lượng polyphenol tổng số là 27,20mg GAE/g CK, flavonoid là 12,51mg CAE/g CK sau đó giảm dần với rượu 45°. Khả năng kháng oxy hóa thấp nhất khi chiết bằng rượu 30° và tăng dần với rượu 35° (10,97mmol trolox/g CK), 40° (12,12mmol trolox/g CK) và giảm dần khi sử dụng rượu 45°. Khả năng chiết xuất các hoạt chất phụ thuộc vào mức độ phân cực của dung môi. Nồng độ rượu càng nhỏ, hàm lượng nước càng nhiều, tính phân cực càng lớn (do nước có hằng số điện môi và giá trị liên kết hydro cao hơn rượu). Theo Shende & cs. (2016) xu hướng chiết xuất các hoạt chất của các dung môi tăng dần khi dung

môi có độ phân cực càng bé, tuy nhiên điều này phụ thuộc vào mức độ phân cực của hợp chất cần chiết có trong nguyên liệu. Như vậy, rượu 40° là dung môi cho hàm lượng hoạt chất sinh học và khả năng chống oxy hóa cao nhất, khác biệt có ý nghĩa so với ba nồng độ còn lại ở mức $P = 5\%$. Sau khi lựa chọn được nồng độ dung môi thích hợp, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là yếu tố tiếp theo được lựa chọn để khảo sát.

Kết quả tại hình 4b cho thấy, hàm lượng polyphenol tổng số thu được ít nhất khi chiết xuất với tỷ lệ 15/1, tăng dần ở 20/1, 25/1, 30/1 và đạt giá trị cao nhất tại tỷ lệ 30/1 với hàm lượng 30,48mg GAE/g CK, sau đó giảm nhẹ ở tỷ lệ 35/1. Tuy nhiên, khi chiết xuất ở tỷ lệ 35/1 hàm lượng polyphenol thu được là 30,20mg GAE/g CK, xử lý thống kê cho thấy không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa $P = 5\%$ so với tỷ lệ 30/1. Tương tự, hàm lượng flavonoid thu được cao nhất ở tỷ lệ 30/1 là 11,75mg CAE/g CK, và không có sự khác biệt so với tỷ lệ 35/1 ở mức ý nghĩa $P = 5\%$. Trong khi đó, khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết táo mèo ở tỷ lệ 30/1 và 35/1 thấp hơn so với tỷ lệ 20/1 nhưng sự khác nhau là không có ý nghĩa ở $P = 5\%$. Điều này cho thấy tỷ lệ dung môi/nguyên liệu không ảnh hưởng nhiều đến hoạt độ kháng oxy hóa của dịch chiết. Có thể giải thích rằng, khi lượng dung môi chiết xuất ít, chưa đủ để tiếp xúc với nguyên liệu nên hàm lượng các hoạt chất chiết ra chưa nhiều. Khi tiếp tục tăng lượng dung môi thì sự chênh lệch nồng độ gradient càng lớn, làm tăng hiệu suất chiết xuất nên hàm lượng hoạt chất thu được tăng. Tuy nhiên, khi tăng lượng dung môi đạt đến một trạng thái cân bằng, tức sự chênh lệch nồng độ đạt cân bằng, hàm lượng hoạt chất thu được là tối đa. Nếu tiếp tục tăng lượng dung môi, sự chênh lệch nồng độ không còn tăng nữa, thay vào đó nó có thể làm giảm lượng hoạt chất chiết xuất ra và lãng phí dung môi (Dương Thị Phượng Liên & cs., 2014). Hàm lượng polyphenol và flavonoid đều cao ở tỷ lệ 30/1 nhưng hoạt độ kháng oxy hóa lại giảm nhẹ, có thể do trong táo mèo, ngoài hai loại hoạt chất trên còn có một số hoạt chất khác có tác dụng kháng oxy hóa. Ở tỷ lệ 20/1 có thể đã đạt đến trạng thái cân bằng của các hoạt

chất đó nên khả năng kháng oxy hóa ở tỷ lệ 30/1 giảm so với tỷ lệ 20/1. Nhìn chung, để hàm lượng hoạt chất chống oxy hóa thu được lớn nhất và tránh để lãng phí dung môi, ta chọn tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 30/1. Sau khi lựa chọn tỷ lệ dung môi/nguyên liệu thích hợp, thời gian vi sóng là yếu tố tiếp theo để khảo sát ảnh hưởng của vi sóng tới quá trình chiết xuất.

Kết quả hình 4c chỉ ra rằng hàm lượng polyphenol tổng số, flavonoid và khả năng kháng oxy hóa tăng khi tăng thời gian vi sóng từ 3 phút lên 4 phút. Hàm lượng hoạt chất và khả năng kháng oxy hóa thu được cao nhất khi xử lý với thời gian 4 phút lần lượt là 35,76mg GAE/g CK; 14,36mg CAE/g CK và 10,59mmol trolox/g CK. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng thời gian lên 5, 6, 7 phút, hàm lượng hoạt chất và khả năng oxy hóa đều giảm dần. Ở 5 phút, hàm lượng polyphenol tổng số giảm từ 35,76mg GAE/g CK xuống 30,29mg GAE/g CK - một lượng giảm đáng kể. Tuy nhiên, giá trị hoạt độ kháng oxy hóa ở các tỷ lệ khác nhau thì khác nhau không có ý nghĩa thống kê ở $P = 5\%$, vì vậy thời gian vi sóng ảnh hưởng không nhiều đến hoạt độ kháng oxy hóa. Có thể giải thích rằng, ở cùng một công suất vi sóng, khi tăng thời gian vi sóng thì dịch chiết được xử lý ở nhiệt độ cao nên khả năng chiết xuất các hoạt chất cũng tăng. Tuy nhiên, polyphenol và flavonoid là những hợp chất nhạy cảm với nhiệt độ cao trong thời gian dài, vì vậy đến một khoảng nhiệt độ nhất định, chúng bị phân hủy và mất khả năng kháng oxy hóa. Do đó, thời gian thích hợp để vi sóng chiết dịch là 4 phút. Sau khi lựa chọn thời gian vi sóng thích hợp, công suất vi sóng là yếu tố tiếp theo để khảo sát

Kết quả hình 4d cho thấy, hàm lượng polyphenol tổng số, flavonoid và khả năng kháng oxy hóa thu được cao nhất khi chiết xuất ở 450W với hàm lượng các hoạt chất và khả năng kháng oxy hóa lần lượt là 35,24mg GAE/g CK; 14,06mg CAE/g CK và 10,96 mmol trolox/g CK. Tuy nhiên, tiếp tục tăng công suất lên 630W và 810W, hàm lượng các hoạt chất lại giảm dần. Nghiên cứu trước đây khi chiết xuất hợp chất phenolic từ vỏ lạc, Ballard & cs. (2010) đã kết luận rằng, chiết xuất ở mức công suất vi sóng cao

Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất hợp chất phenolic và flavonoid từ quả táo mèo (*Docynia indica*) đông khô thông qua hỗ trợ của vi sóng

hơn không phải lúc nào cũng đảm bảo thu hồi được nhiều nhất các hoạt chất sinh học so với mức công suất trung bình. Điều này có thể giải thích rằng: hàm lượng polyphenol, flavonoid tăng là do nhiệt độ cao, giải phóng polyphenol từ các hợp chất phenol ở dạng liên kết, có sự chuyển hóa hợp chất polyphenol ở dạng không hòa tan thành hòa tan, có sự phân hủy của lignin dẫn đến phóng thích dẫn xuất axit phenolic hoặc làm phát sinh thêm phenolic mới (Jeong & cs., 2006). Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng công suất vi sóng và thời gian thì hàm lượng polyphenol có khuynh hướng giảm do sự suy thoái hợp chất này. Lemos & cs., (2012) cho rằng, sự gia tăng khả năng kháng oxy hóa một phần do tăng hàm lượng polyphenol, một phần do trong quá trình xử lý nhiệt hình thành các hợp chất mới có tính chất chống oxy hóa, chẳng hạn như melanoidin sinh ra bởi phản ứng Maillard. Tuy nhiên, khi công suất vi sóng cao hơn dẫn đến nhiệt độ cao hơn, thời gian càng kéo dài thì khả năng này càng giảm do sự suy giảm của các chất hóa học tự nhiên có sẵn trong nguyên liệu, sự mất mát các phân tử nước, hình thành các hợp chất mới ổn định hơn nhưng ít có hoạt tính sinh học hơn, do đó ảnh hưởng đến hoạt tính chống oxy hóa. Vì vậy, công suất vi sóng thích hợp để xử lý vi sóng chiết dịch là 450W.

3.2. Tối ưu hóa các điều kiện chiết xuất các hoạt chất từ quả táo mèo đông khô

Dựa vào kết quả của các đơn thí nghiệm trên, có thể thấy rằng nồng độ dung môi ảnh hưởng không nhiều đến khả năng chiết xuất các hoạt chất sinh học từ quả táo mèo đông khô, vì vậy cố định dung môi trong chiết xuất là ethanol 40°. Điều kiện thích hợp khảo sát được từ các thí nghiệm đơn yếu tố được lấy làm điểm

tâm (điểm 0) trong thiết kế tối ưu hóa Box Behnken và được mã hóa như trong bảng 1.

Dựa vào việc mã hóa các mức yếu tố trên, sau khi chạy trên phần mềm thiết kế DX11 (Design Expert 11) với phương pháp bề mặt đáp ứng RSM theo mô hình Box Behnken thu được bảng ma trận với 15 thực nghiệm. Mỗi thực nghiệm có hai lần lặp lại và ba đầu ra tương ứng là polyphenol tổng số, flavonoid và hoạt độ kháng oxy hóa. Kết quả thu được trình bày trong bảng 2.

Kết quả phân tích ANOVA được thể hiện trong bảng 3.

Từ bảng kết quả, nhận thấy:

- Đối với hàm lượng polyphenol, giá trị F-value của mô hình bằng 58,70, giá trị p-value của mô hình <0,001 chứng tỏ mô hình có ý nghĩa. Hệ số hồi quy $R^2 = 0,9653$. Hệ số hồi quy R^2 càng gần 1 thì mô hình càng có ý nghĩa. Kết quả này cho thấy có 96,53% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán của mô hình.

- Đối với hàm lượng flavonoid, giá trị F-value của mô hình bằng 21,20 và giá trị p-value của mô hình <0,001 chứng tỏ mô hình là có ý nghĩa. Hệ số hồi quy $R^2 = 0,9094$. Kết quả này cho thấy có 90,94% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán của mô hình.

- Tuy nhiên, đối với hoạt tính kháng oxy hóa, kết quả thực nghiệm sau khi chạy trên phần mềm Design Expert 11 cho ra giá trị lack of fit có F-value = 6,73 và p-value = 0,0393, tức là mô hình không tương thích/phù hợp. Điều này có thể do ba biến độc lập đưa vào chạy tối ưu (tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, thời gian vi sóng và công suất vi sóng) chưa phải là ba yếu tố có ảnh hưởng lớn nhất đến hoạt độ kháng oxy hóa của dịch chiết.

Bảng 1. Các mức của yếu tố ảnh hưởng

Các yếu tố ảnh hưởng	Đơn vị	Mức các yếu tố		
		-1	0	+1
Tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu	w/w	25/1	30/1	35/1
Thời gian vi sóng	phút	3	4	5
Công suất vi sóng	W	270	450	630

Bảng 2. Thiết kế thực nghiệm và giá trị hàm đầu ra

Lần lặp	Lần chạy	Yếu tố 1	Yếu tố 2	Yếu tố 3	Đầu ra 1	Đầu ra 2	Đầu ra 3
		A	B	C	Y1	Y2	Y3
1	1	-1	-1	0	34,0983	14,0740	10,4909
1	2	+1	-1	0	40,4928	13,9097	9,6892
1	3	-1	+1	0	33,7092	13,7485	11,1014
1	4	+1	+1	0	34,5731	13,9327	11,7086
1	5	-1	0	-1	34,4197	12,8846	11,3944
1	6	+1	0	-1	33,7210	11,8731	9,1990
1	7	-1	0	+1	30,0161	11,0417	10,3444
1	8	+1	0	+1	38,9756	15,0504	11,9096
1	9	0	-1	-1	32,6856	10,5664	9,2693
1	10	0	+1	-1	34,0028	12,5011	11,7887
1	11	0	-1	+1	39,4759	16,0060	11,6004
1	12	0	+1	+1	32,1653	11,7294	9,6892
1	13	0	0	0	36,0007	14,0541	10,3136
1	14	0	0	0	36,5143	14,7528	10,3121
1	15	0	0	0	36,4021	14,6124	10,2278
2	16	-1	-1	0	34,4547	13,9558	10,4785
2	17	+1	-1	0	39,4736	13,7968	9,7010
2	18	-1	+1	0	33,5196	13,7419	11,1167
2	19	+1	+1	0	35,2645	14,1968	10,6690
2	20	-1	0	-1	34,1964	13,2379	11,4846
2	21	+1	0	-1	34,3649	11,1207	9,3038
2	22	-1	0	+1	29,8334	11,4516	10,2557
2	23	+1	0	+1	40,8202	15,8404	11,8972
2	24	0	-1	-1	39,6274	16,4416	11,6158
2	25	0	+1	-1	34,3918	12,4754	11,7909
2	26	0	-1	+1	39,6274	16,4416	11,6158
2	27	0	+1	+1	31,2064	11,4492	10,8808
2	28	0	0	0	35,9331	13,9864	10,2594
2	29	0	0	0	36,3323	14,9763	10,2638
2	30	0	0	0	35,4503	14,1973	10,2894

Chú thích: Y1: Hàm lượng polyphenol tổng số (mg GAE/g CK); Y2: Hàm lượng flavonoid (mg CAE/g CK); Y3: khả năng kháng oxy hóa của các hoạt chất sinh học (mmol trolox/g CK).

Để tối ưu hóa hàm mục tiêu, sử dụng phương pháp hàm kỳ vọng trên phần mềm quy hoạch thực nghiệm Design Expert 11. Kết quả đã tìm được điều kiện tối ưu để chiết xuất polyphenol, flavonoid và hoạt độ kháng oxy hóa từ quả táo mèo đông khô với dung môi rượu 40°, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 33,37/1, thời gian vi sóng là 3,02 phút, công suất vi sóng 627,64W,

ở điều kiện lý thuyết này, hàm lượng polyphenol tổng số, flavonoid dự tính thu nhận lần lượt là 42,83mg GAE/g CK, 16,56mg CAE/g CK. Sau đó, để kiểm tra lại, một thực nghiệm với các thông số trên đã được thực hiện. Đối với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, thời gian có thể điều chỉnh chính xác, tuy nhiên công suất vi sóng theo thiết bị chưa điều chỉnh được. Dựa trên

Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất hợp chất phenolic và flavonoid từ quả táo mèo (*Docynia indica*) đông khô thông qua hỗ trợ của vi sóng

điều kiện thực tế, công suất trên gần nhất với điểm 630W của thiết bị nên công suất này sẽ được sử dụng. Với các điều kiện thực tế như trên, kết quả thực nghiệm đưa ra hàm lượng polyphenol tổng số, flavonoid thu nhận được lần lượt là $41,58 \pm 0,58$ mg GAE /g CK và $15,89 \pm 0,40$ mg CAE/g CK. So sánh với giá trị tiên đoán của phần mềm ở tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 33,37/1, thời gian vi sóng là 3,02 phút, công suất vi sóng 630W hàm lượng polyphenol tổng số, flavonoid thu nhận được lần lượt là $42,28 \pm 0,39$ mg GAE /g CK và $15,47 \pm 0,38$ mg CAE/g CK. Đối với polyphenol tổng số và flavonoid, kết quả này lớn hơn 95% giá trị mà mô hình đã dự đoán. Như vậy sự sai lệch giữa mô hình và thực nghiệm không có ý nghĩa thống kê. Điều đó chứng tỏ mô hình được lựa chọn là phù hợp và dự đoán một cách thỏa đáng kết quả hàm lượng polyphenol tổng số và flavonoid thu được. So sánh kết quả thu được với số liệu từ tác giả Duy & cs. (2019) khi chiết xuất táo mèo sấy khô (ở $60 \pm 5^\circ\text{C}$) ở điều kiện tối ưu (thời gian chiết xuất 50 phút, nồng độ ethanol 65%, công suất vi sóng 440W và pH dịch chiết 5,4) thu được hàm lượng polyphenol, flavonoid lần lượt là $33,57 \pm 0,12$ mg GAE/ g CK; $25,01 \pm 0,11$ mg QE/ g CK. Có thể thấy, hàm lượng polyphenol ở điều kiện chiết

xuất của Duy & cs. (2019) là thấp hơn, tuy nhiên hàm lượng flavonoid lại cao hơn. Sự khác nhau này do nhiều yếu tố: khác biệt về loại nguyên liệu, loại thiết bị, các yếu tố độc lập đưa vào tối ưu.

Dựa vào phân tích số liệu thực nghiệm bằng phần mềm Design Expert 11, đã xác định được mô hình phù hợp là mô hình bậc hai và đã tìm được phương trình hồi quy có dạng như sau:

$$Y1 = 36,1055 + 2,0899A - 1,4799B + 0,7584C - 1,1005AB + 2,5596AC - 2,4051BC - 1,3954C^2$$

$$Y2 = 14,4299 + 0,3490A - 0,3577B + 0,8501C + 1,4407AC - 1,6162BC - 1,3985C^2$$

$$Y3 = 10,2777 - 0,224325A + 0,420631B + 0,362019C + 0,0923375AB + 0,947836AC - 0,8398BC + 0,176146B^2 + 0,405321C^2$$

Trong đó:

A: Tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu;

B: Thời gian vi sóng;

C: Công suất vi sóng;

Y1: Hàm lượng polyphenol tổng số thu nhận;

Y2: Hàm lượng flavonoid tổng số thu nhận;

Y3: Hoạt độ kháng oxy hóa.

Bảng 3. Hệ số hồi quy của các mô hình đa thức bậc hai được dự đoán

Nội dung	Y1-TPC		Y2-TFC		Y3-DPPH	
	Giá trị F	Giá trị p	Giá trị F	Giá trị p	Giá trị F	Giá trị p
Mô hình	58,70	<0,001 ^a	21,20	<0,0001 ^a	301,00	<0,0001 ^a
A - Tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu	155,76	<0,001 ^a	5,47	0,0304 ^{NS}	109,05	<0,0001 ^a
B - Thời gian vi sóng	78,10	<0,001 ^a	5,74	0,0269 ^{NS}	383,44	<0,0001 ^a
C - Công suất vi sóng	20,51	0,002 ^a	32,47	<0,0001 ^a	284,02	<0,0001 ^a
AB	21,60	0,002 ^a	0,3251	0,5752	9,24	0,0067
AC	116,82	<0,001 ^a	46,64	<0,0001 ^a	973,53	<0,0001 ^a
BC	103,14	<0,001 ^a	58,69	<0,0001 ^a	764,21	<0,0001 ^a
A ²	0,4565	0,5074 ^{NS}	0,9928	<0,0001 ^a	1,65	0,2148
B ²	0,9535	0,3411 ^{NS}	1,76	0,2000 ^{NS}	31,03	<0,0001 ^a
C ²	32,05	<0,001 ^a	40,56	<0,0001 ^a	164,32	<0,0001 ^a
Lack of fit	3,97	0,0958 ^{NS}	1,94	0,2741 ^{NS}	6,73	0,0393 ^S
R ²	R ² = 0,9653		R ² = 0,9094		R ² = 0,9930	

Chú thích: Y1: Hàm lượng polyphenol tổng số (mg GAE/g CK); Y2: Hàm lượng flavonoid (mg CAE/g CK); Y3: khả năng kháng oxy hóa của các hoạt chất sinh học (mmol trolox/g CK). ^a: P < 0,05; NS = not significant: không có ý nghĩa, S = significant: có ý nghĩa.

Phương trình hồi quy cho thấy yếu tố tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và công suất vi sóng có ảnh hưởng theo tỷ lệ thuận đến hàm lượng polyphenol và flavonoid thu nhận. Đối với hàm lượng polyphenol, yếu tố thời gian vi sóng ảnh hưởng theo tỷ lệ nghịch đến hàm lượng polyphenol thu nhận. Tương tác ảnh hưởng giữa tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và công suất vi sóng đến hàm lượng polyphenol thu nhận là lớn nhất và tỷ lệ thuận. Đối với hàm lượng flavonoid, tương tác giữa thời gian vi sóng và công suất vi sóng ảnh hưởng theo tỷ lệ nghịch mạnh nhất đến hàm lượng flavonoid của dịch chiết, trong khi đó tương tác giữa tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và thời gian vi sóng không ảnh hưởng hoặc ảnh hưởng không đáng kể đến hàm lượng flavonoid. Tương tác ảnh hưởng giữa tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và công suất vi sóng đến hàm lượng polyphenol thu nhận là lớn nhất và tỷ lệ thuận. Nhìn chung, cả 3 yếu tố đều ảnh hưởng mạnh đến việc thu polyphenol và flavonoid trong quá trình chiết xuất. Khi so sánh các giá trị này với các nghiên cứu khác của tác giả Duy & cs. (2019), thấy có sự giống nhau về ảnh hưởng của yếu tố công suất vi sóng. Sự khác biệt cũng do sự khác nhau về loại nguyên liệu, giống, điều kiện chăm sóc, độ chín thu hái của từng loại nguyên liệu, cùng với đó là việc sử dụng thiết bị, các thông số chiết xuất khác nhau giữa các tác giả.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy sử dụng hỗ trợ vi sóng trong trích ly hoạt chất sinh học từ thực vật là phương pháp triển vọng. Kết quả cho thấy các đơn yếu tố là nồng độ rượu, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, thời gian vi sóng và công suất vi sóng đều có ảnh hưởng mạnh mẽ tới hàm lượng polyphenol và flavonoid chiết xuất từ quả táo mèo đông khô. Điều kiện tối ưu để chiết xuất các hoạt chất sinh học từ quả táo mèo đông khô là tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 33,37/1, thời gian vi sóng là 3,02 phút, công suất vi sóng 627,64W. Tuy nhiên, mô hình chưa tương thích với hàm đầu ra là hoạt độ kháng oxy hóa. Kết quả bước đầu này sẽ tạo cơ sở cho việc phát triển các sản phẩm rượu táo mèo ngâm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen V.C.P., Tsui K.L., Barton R.R. & Meckesheimer M. (2006). A review on design, modeling and applications of computer experiments. *IIE Trans.* 38: 273-291. <https://doi.org/10.1080/07408170500232495>.
- Duy L.X., Cuong N.M., Hoang D.V., Quan P.M., Long P.Q., Tung N.Q., Tuan Anh N., Thinh P.V., Giang B.L., Van N.T. & Toan T.Q. (2019). Optimization of microwave-assisted Extraction of total phenolic and total flavonoid contents from fruits of *Docynia indica* (Wall.) Decne using response surface methodology. *Processes.* 7(8): 485. <https://doi.org/10.3390/pr7080485>.
- Dương Thị Phương Liên, Phan Thị Bích Trâm & Hà Thanh Toàn (2014). Ảnh hưởng quá trình trích ly đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa từ đậu nành. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ.* tr. 8-15.
- Đỗ Tất Lợi (1999). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam.* Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- Jeong S.M., Kim S.Y., Kim S.J., Jeon K.I., Park E., Park H.R. & Lee S.C. (2006). Effect of heat treatment on the antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from persimmon (*Diospyros kaki* L.) peel. *Food chemistry and toxicology.* 70(4): 999-1002.
- Kala H.K., Mehta R., Sen K.K., Tandey R. & Mandal V. (2016). Critical analysis of research trends and issues in microwave assisted extraction of phenolics: have we really done enough. *TrAC trends in analytical chemistry.* 85: 140-152. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.09.007>.
- Karacabey E. & Mazza G. (2010). Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food chemistry.* 119: 343-348.
- Khayet M., Cojocar C. & Essalhi M. (2011). Artificial neural network modeling and response surface methodology of desalination by reverse osmosis. *Journal of membrane science.* 368: 202-214. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.11.030>.
- Lemos M.R.B., Siqueria E.M.A., Arruda S.F. & Zambiasi R.C. (2012). The effect of roasting on the phenolic compounds and antioxidant potential of baru nuts (*Dipteryx alata* Vog). *Food research international.* 48: 592-597.
- Lua H.T., Degrande A., Catacutan D., Hoa N.T. & Cuong V.K. (2014). Study on nutrient compositions of Son tra fruits (*Docynia indica* Wall.). AFLI Technical Report STAGE-1.
- Shende K.M., Singh N.I. & Negi P.S. (2016). Phytochemical characterization and biological activities of *Docynia indica*. *Journal of molecular*

Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất hợp chất phenolic và flavonoid từ quả táo mèo (*Docynia indica*) đông khô thông qua hỗ trợ của vi sóng

- and genetic medicine. 10: 204. doi: 10.4172/1747-0862.1000204.
- Shofian N.M, Azizah A.H., Azizah O., Nazamid S., Farooq A., Mohd S.P.D. & Muhammad R.H. (2011). Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. *International journal of molecular sciences*. 12(7): 4678-4692.
- Tabaraki R., Heidarizadi E. & Benvidi A. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and purification technology*. 98: 16-23.
- Tabart J., Kevers C., Sipel A., Pincemail J., Defraigne J.O. & Dommes J. (2007). Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. *Food chemistry*. 105: 1268-1275.
- Xu B.J. & Chang S.K.C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of food science*. 72(2): 159-166.