

ẢNH HƯỞNG THỜI GIAN VÀ MỨC NĂNG LƯỢNG SIÊU ÂM ĐẾN HIỆU QUẢ CHIẾT ISOFLAVONE TỪ HẠT ĐẬU NÀNH

THE EFFECT OF TIME AND ULTRASOUND POWER LEVEL ON THE EFFICIENCY OF ISOFLAVONES EXTRACTION FROM SOYBEAN

Trần Thị Ngọc Thu¹, Trương Thị Minh Hạnh², Bùi Xuân Vững³, Nguyễn Thị Đông Phương¹, Lê Thị Tuyết Anh³

¹Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật - Đại học Đà Nẵng; ttnthu@ute.udn.vn

²Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng; tmhanh@dut.udn.vn

³Trường Đại học Sư Phạm - Đại học Đà Nẵng

Tóm tắt - Nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích khảo sát ảnh hưởng đồng thời của thời gian siêu âm và mức năng lượng siêu âm đến hiệu quả chiết isoflavone từ hạt đậu nành với dung môi ethanol 80% (v/v). Tổng nồng độ isoflavone được xác định bằng 6 chất chuẩn isoflavone: daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein và genistein theo phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Qua phân tích ANOVA 2 chiều để đánh giá ảnh hưởng thời gian siêu âm và mức năng lượng siêu âm đến hàm lượng isoflavone thu nhận đã chọn được điều kiện siêu âm là 70% mức năng lượng trong 15 phút. So với phương pháp trích ly bằng chiết khuấy thông thường (ở 30°C và 70°C) và siêu âm-chiết khuấy kết hợp, phương pháp siêu âm có hiệu quả chiết cao hơn phương pháp chiết khuấy ở 30°C nhưng thấp hơn chiết khuấy ở 70°C và siêu âm chiết khuấy kết hợp. Bên cạnh đó, quá trình siêu âm không ảnh hưởng đến hiệu quả bắt gốc tự do DPPH chứng tỏ các hợp chất chiết ra không bị giảm khả năng kháng oxy hóa.

Từ khóa - hạt đậu nành; chiết hỗ trợ siêu âm; isoflavone; mức năng lượng siêu âm; thời gian siêu âm; khả năng bắt gốc tự do DPPH; hoạt tính chống oxy hóa.

1. Đặt vấn đề

Đậu nành được biết đến không chỉ là nguồn cung cấp protein, chất béo không có cholesterol và hàm lượng chất béo bão hòa thấp, cung cấp các axit amin thiết yếu mà còn chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học cao trong đó phải kể đến hợp chất isoflavone [1]. Isoflavone là hợp chất thực vật thứ cấp có cấu trúc tương đồng với hormone nội tiết tố steroid 17 β -estradiol (E), do đó có hoạt tính estrogen yếu nên thường được gọi là phytoestrogen, có tác dụng làm giảm các triệu chứng mãn kinh, giảm nguy cơ mắc bệnh tim mạch, loãng xương [1, 2, 3]. Trong số 12 hợp chất isoflavone có ở đậu nành và các sản phẩm từ đậu nành, các nhóm aglycones (genistein, daidzein và glycitein) và dạng β -glycosides (genistin, daidzin và glycitin) được quan tâm nhiều nhất do có giá trị hoạt tính sinh học cao, ổn định với nhiệt độ, chiếm lượng lớn trong tổng số thành phần isoflavone [2]. Ngoài ra, các hợp chất isoflavone đều có khả năng chống oxy hóa thông qua các kỹ thuật kiểm tra như bắt gốc tự do của 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), đánh giá năng lực chống oxy hóa thông qua khả năng biến dạng Fe³⁺-TPTZ thành dạng Fe²⁺ (phương pháp FRAP) [4].

Là một trong những kỹ thuật chiết hiện đại được xem là công nghệ “xanh” hiện nay, chiết hỗ trợ siêu âm (ultrasound-assisted extraction) được ứng dụng nhiều trong quá trình chiết các hợp chất thiên nhiên, cũng như trong quá trình trích ly isoflavone từ hạt đậu nành, củ sắn dây [1, 2, 3, 5]. Trong phương pháp này, các yếu tố như nhiệt độ siêu âm, tần số siêu âm, thời gian siêu âm và năng lượng siêu âm ảnh hưởng

Abstract - This study aims to investigate the effect of time and power level of ultrasound on the efficiency of isoflavones extraction by 80% ethanol (v/v) from soybean. Total isoflavones concentration is determined with 6 isoflavone standards: daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein and genistein by High-performance liquid chromatography (HPLC) method. Using two-way ANOVA to evaluate the effects of ultrasonic timing and ultrasonic energy levels on the intake of isoflavones, the ultrasound condition selected is 70% of the power level for 15 minutes. Compared to stirring extraction (at 30°C and 70°C), and ultrasound in combination with stirring extraction, the ultrasonic method has higher extraction efficiency than the stirring method at 30°C, but lower than either the stirring method at 70°C or the ultrasound-assisted stirring method. In addition, the ultrasonic process does not affect DPPH-free radical capture, which demonstrates that the antioxidant activity of extracted compounds is not decreased.

Key words - soybean seed; ultrasound assisted extraction; isoflavones; power level of ultrasound; time of ultrasound; DPPH free radical scavenging; antioxidant activity.

đến sự hình thành các ‘cavitation’ - tác nhân đóng một vai trò trung gian để nhận năng lượng và tập trung năng lượng của sóng siêu âm. Các ‘cavitation’ sẽ tác động đến thành tế bào như quá trình phân mảnh, bào mòn thành tế bào, phá vỡ tế bào tùy theo đặc tính nguyên liệu giúp cho dung môi thâm nhập sâu vào nguyên liệu để giải phóng các các vật chất bên trong một cách dễ dàng nên nâng cao hiệu quả chiết isoflavone và rút ngắn thời gian chiết so với các phương pháp chiết truyền thống ở cùng nhiệt độ chiết [2, 3, 5, 6]. Tuy nhiên nếu hình thành các ‘cavitation’ quá nhiều hoặc quá mãnh liệt thì có thể phân hủy hoạt chất làm giảm hàm lượng chiết cũng như ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của chúng mà hiện chưa có các tác giả trong và ngoài nước công bố khi chiết isoflavone.

Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu là khảo sát ảnh hưởng đồng thời của thời gian và mức năng lượng siêu âm đến hiệu quả chiết isoflavone từ đậu nành bằng dung môi ethanol 80% với sự hỗ trợ siêu âm. Từ đó, hiệu quả chiết isoflavone của phương pháp này được so sánh với các phương pháp chiết khuấy thông thường và siêu âm - chiết khuấy kết hợp thông qua hàm lượng chiết và hoạt tính chống oxy hóa của dung dịch chiết bằng khả năng bắt gốc tự do DPPH.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Hạt đậu nành được thu hoạch tại 5 nhà vườn trên khu vực huyện Đại Lộc - Quảng Nam, được làm sạch để loại bỏ các hạt hỏng, các tạp chất ngoại lai, sấy khô ở nhiệt độ

60°C, xay mịn (độ ẩm đạt $9,042 \pm 0,036\%$), bảo quản trong hộp kín ở nhiệt độ $-20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Hóa chất chiết: ethanol tuyệt đối (nồng độ ethanol $\geq 99,7\%$) của công ty cổ phần Bột giặt và Hóa chất Đức Giang Lào Cai (Việt Nam), hóa chất xác định hoạt tính sinh học 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Hóa chất phân tích HPLC: Các chất chuẩn genistin, glycitin, daidzin, genistein, glycitein, daidzein (HPLC, USP), dung môi acetonitrile và nước đề ion theo chuẩn HPLC.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết isoflavones từ hạt đậu nành bằng chiết khuấy, chiết hỗ trợ siêu âm và chiết siêu âm - khuấy kết hợp

a) Phương pháp chiết isoflavones từ hạt đậu nành bằng chiết hỗ trợ siêu âm: Quá trình chiết siêu âm được thực hiện bằng bể siêu âm hiệu DAIHAN (WUC-D22H, Hàn Quốc) có tần số 40kHz, thể tích bể 500mm×300mm×150mm, công suất nhiệt 374W, công suất HF-peak out là 528W. Ở mỗi thí nghiệm, mẫu được chuẩn bị bằng cách tiến hành đóng 250ml dung dịch ethanol 80% vào bình tam giác 500 mL, tiếp tục cân chính xác lượng bột đậu nành theo tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (tính theo hàm lượng chất khô) = 15/1 cho vào bình chiết [1, 5]. Tiến hành siêu âm ở 3 mức năng lượng 60%, 70% và 80% ở các khoảng thời gian 1 phút, 5 phút, 10 phút, 15 phút và 20 phút, nhiệt độ của mẫu được giữ trong khoảng $26,92 \pm 2,33^\circ\text{C}$ [1, 5]. Mẫu sau siêu âm được đem ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút, lọc chân không để thu lấy dịch lọc. Dịch lọc được định mức lên 250 mL bằng ethanol 80% trước khi đưa đi phân tích HPLC.

b) Phương pháp chiết isoflavones từ hạt đậu nành bằng chiết khuấy: ở mỗi thí nghiệm, cùng 1 tỉ lệ lượng mẫu và dung môi như trên, cho hỗn hợp nguyên liệu/dung môi đặt trong bể điều nhiệt rồi tiến hành khuấy trộn mẫu bằng máy khuấy cơ ở 2 mức nhiệt độ là 30°C và 70°C trong 45 phút. Mẫu chiết được xử lý tương tự như Mục 2.2.1.a trước khi đem phân tích HPLC.

c) Phương pháp chiết siêu âm - khuấy kết hợp: Nhằm mục đích tạo được các tác động lẫn lượt phá vỡ tế bào bằng siêu âm để tạo điều kiện cho dung môi xâm thực sâu vào vách tế bào ở nhiệt độ cao mà vẫn giữ được các hoạt tính sinh học của isoflavone, chúng tôi tiến hành thực hiện chiết siêu âm-khuấy kết hợp. Với cùng 1 lượng mẫu và dung môi như trên, tiến hành chiết mẫu qua bước 1 bằng phương pháp siêu âm với điều kiện siêu âm tối ưu thu được ở mục 2.2.1.a, bước 2 thực hiện bước chiết tiếp theo ở 70°C trong 45 phút [8]. Mẫu chiết được xử lý tương tự như Mục 2.2.1.a trước khi đem phân tích HPLC.

2.2.2. Phương pháp xác định hàm lượng isoflavone trong mẫu bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC

- Phân tích sắc ký HPLC: sử dụng máy HPLC (Agilent 1200, USA) có gắn detector DAD; cột C18 pha đảo (Lichrospher®100, 4.6mm x 250nm x 5µm); bộ phận tiêm mẫu tự động, bước sóng 260 nm. Quá trình rửa giải được tiến hành với pha động gồm nước chứa acid phosphoric 0,05 % (v/v) (A) và acetonitril (B) với tỉ lệ nồng độ % (v/v) giữa A với B được thay đổi theo thời gian. Sử dụng quan

hệ tuyến tính giữa nồng độ chất phân tích và diện tích pic để lập thành đường chuẩn cho 6 hợp chất daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, genistein [9]. Dựa vào thời gian lưu và diện tích pic, tính toán được nồng độ A_i (µg/mL) từng hợp chất isoflavone trong dung dịch theo phương trình đường chuẩn. Hàm lượng X_i (µg/g) của mỗi hợp chất isoflavone trên khối lượng chất khô của mẫu nguyên liệu ban đầu được tính theo biểu thức (1):

$$X_i = A_i \times \frac{V}{m} \quad (1)$$

Trong đó: A_i (µg/mL) là nồng độ từng hợp chất isoflavone tính theo phương trình đường chuẩn; V (ml) là thể tích dịch chiết isoflavones từ mẫu đậu nành; m (g) là khối lượng mẫu đậu nành (tính theo hàm lượng chất khô).

Hàm lượng aglycone isoflavone tổng số:

$$\text{Aglycone (µg/g)} = X_{\text{daidzein}} + X_{\text{genistein}} + X_{\text{glycitein}} \quad (2)$$

Hàm lượng glycoside isoflavone tổng số:

$$\text{Glycoside (µg/g)} = X_{\text{daidzin}} + X_{\text{genistin}} + X_{\text{glycitin}} \quad (3)$$

$$\text{Hàm lượng isoflavone tổng số } X(\mu\text{g/g}) = \sum X_i(\mu\text{g/g}) \quad (4)$$

2.2.3. Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa thông qua phản ứng bao vây gốc tự do (DPPH) [8, 10]

Hoạt tính chống oxy hóa của mẫu được xác định thông qua phản ứng bao vây gốc tự do (DPPH) dựa theo phương pháp của Blois (1958) trên nguyên tắc 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) có khả năng tạo ra các gốc tự do bền trong methanol. Tiến hành lấy 2,5 mL thể tích lượng dịch chiết cho vào bình định mức 10mL, từ dịch pha loãng hút lần lượt cho vào các ống nghiệm các thể tích khác nhau và thêm lượng methanol sao cho thành 1000 µL. Tiếp tục cho thêm 3mL dung dịch DPPH có nồng độ 0,1µM, lắc đều và để yên trong tối 30 phút, đo quang phổ UV-Vis các mẫu phản ứng ở bước sóng 515nm, từ đó tính được phần trăm quét gốc tự do DPPH của mẫu thử theo công thức:

$$\text{IC}\% = [(A_{\text{trắng}} - A_{\text{mẫu}})/A_{\text{trắng}}] \times 100\% \quad (5)$$

Trong đó:

IC%: Khả năng ức chế gốc tự do (%); $A_{\text{trắng}}$: Độ hấp thụ của dung dịch DPPH trong methanol; $A_{\text{mẫu}}$: Độ hấp thụ của dung dịch DPPH có bổ sung mẫu phân tích.

Lập phương trình biểu hiện mối tương quan giữa IC% và nồng độ mẫu đã dùng, từ đó tính được giá trị IC_{50} .

2.2.4. Phương pháp chụp ảnh vi cấu trúc bề mặt bằng kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscope-SEM)

Mẫu nguyên liệu trước và sau trích ly qua xử lý và được đo trên máy SEM S-4800 Hitachi tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương để đánh giá tác động của các phương pháp chiết đến bề mặt nguyên liệu

2.2.5. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu hóa lý

Độ ẩm hạt đậu nành được xác định bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi theo TCVN 5613-1991; Hàm lượng protein thô theo Kjeldahl; Hàm lượng lipid thô theo phương pháp Soxhlet; Hàm lượng xơ thô bằng phương pháp thủy phân bằng axit và kiềm mạnh; Hàm lượng tro bằng phương pháp nung; Hàm lượng tinh bột bằng phương pháp thủy phân bằng axit, xác định đường khử bằng phương pháp DNS [11].

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm đều được thực hiện ít nhất 2 lần, kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Các số liệu đều được xử lý bằng phương pháp phân tích phương sai ANOVA, so sánh sự khác nhau có nghĩa ở mức $P \leq 0,05$ thể hiện bằng các chữ số a,b,c,d,e trên đầu các cột, các cột có giống nhau ít nhất một chữ cái thể hiện không có sự khác nhau có nghĩa ở mức 0.05. Sử dụng phần mềm Minitab 18 để xử lý số liệu và phân tích ANOVA 2 chiều.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khảo sát thành phần hóa học của hạt đậu nành

Tiến hành thu nhận 5 mẫu đậu nành tại 5 xã thuộc huyện Đại Lộc-Quảng Nam và phân tích mẫu đại diện cho các kết quả được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hóa học của hạt đậu nành nguyên liệu

STT	Chỉ tiêu	Hàm lượng tính theo HL chất khô (%)
1	Protein thô	37,587 ⁽¹⁾
2	Lipid thô	16,435 $\pm$ 0,066
3	Xơ thô	11,305 $\pm$ 0,030
4	Tro tổng	4,309 $\pm$ 0,077
5	Tinh bột	4,174 $\pm$ 0,063
6	Đường khử	1,330 $\pm$ 0,062

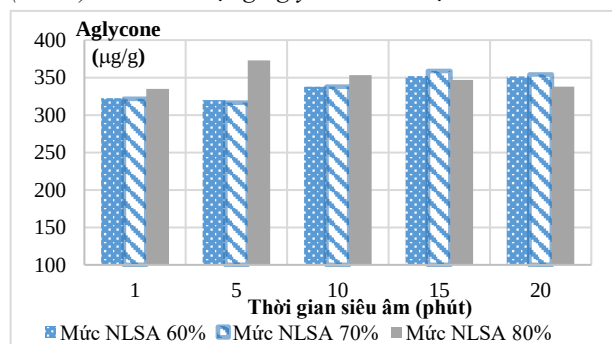
⁽¹⁾Phân tích tại trung tâm QUATEST II theo FAO 14/7

Hạt đậu nành thu nhận đảm bảo các chỉ tiêu về thành phần hóa học của đậu nành thông thường. Hàm lượng protein thô nằm trong khoảng 35-40% thuộc nhóm đậu nành nội địa chiếm đa số [12]. Thành phần đường khử và một số lipid sẽ hòa tan vào dịch trích ly nên cần được tách loại sau này [11].

3.2. Ảnh hưởng thời gian và mức năng lượng siêu âm đến hàm lượng isoflavone thu nhận

Tiến hành chiết siêu âm theo Mục 2.2.1.a, phân tích hàm lượng aglycone, glycoside và isoflavone tổng số theo mục 2.2.2 với kết quả được trình bày ở các mục tiếp theo.

3.2.1. Ảnh hưởng thời gian và mức năng lượng siêu âm (NLSA) đến hàm lượng aglycone thu nhận



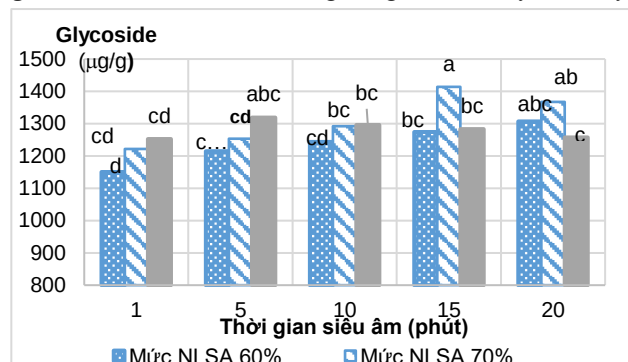
Hình 1. Ảnh hưởng của mức NLSA và thời gian siêu âm đến hàm lượng aglycone

Đồ thị Hình 1 biểu diễn hàm lượng aglycone chiết được từ các mẫu theo thời gian và các mức năng lượng siêu âm (NLSA). Phân tích ANOVA 2 chiều của ảnh hưởng mức NLSA và thời gian siêu âm đến hiệu quả chiết các nhóm thuộc aglycone chỉ ra rằng không có sự khác biệt có nghĩa của hàm lượng aglycone khi thay đổi mức NLSA và thời

gian chiết cũng như không có sự tác động đồng thời của 2 yếu tố này. Nguyên nhân có khả năng là do hàm lượng aglycone chiếm tỉ lệ thấp (chiếm 21,10 $\pm$ 0,55% theo tính toán thực nghiệm giữa các mẫu so với hàm lượng isoflavone tổng số) và khối lượng phân tử nhỏ hơn các glycoside nên chúng dễ dàng được trích ly.

3.2.2. Ảnh hưởng thời gian và mức năng lượng siêu âm (NLSA) đến hàm lượng glycoside thu nhận

Hình 2 biểu diễn hàm lượng glycoside chiết được từ các mẫu bột đậu nành có hỗ trợ siêu âm theo thời gian và các mức năng lượng siêu âm. Kết quả phân tích ANOVA 2 chiều đã cho thấy có sự khác biệt có nghĩa của hàm lượng glycoside chiết được khi thay đổi mức NLSA cũng như thời gian siêu âm và có sự tác động đồng thời của 2 yếu tố này.



Hình 2. Ảnh hưởng của mức NLSA và thời gian siêu âm đến hàm lượng glycoside

Ở mức NLSA 60%, hàm lượng glycoside tăng dần khi tăng thời gian siêu âm từ 1 đến 20 phút. Trong khi đó ở mức NLSA 80% hàm lượng glycoside không có sự khác nhau có nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$, và hàm lượng này nếu so với mức NLSA 70% thì không khác biệt có nghĩa trong khoảng thời gian từ 1 đến 10 phút siêu âm hoặc nhỏ hơn trong khoảng thời gian siêu âm từ 15 đến 20 phút. Ở mức NLSA 70%, hàm lượng chiết của glycoside tăng dần và đạt cực đại tại thời gian siêu âm 15 phút và đây là giá trị lớn nhất so với các mẫu siêu âm. Nguyên nhân là cùng 1 mức năng lượng siêu âm, khi thời gian siêu âm càng dài thì càng tạo điều kiện cho dung môi xâm thực vào vách tế bào, phá vỡ tế bào đồng thời tạo sự khuấy trộn để dung môi thâm nhập [2, 6] thực hiện quá trình chuyển khối và sau đó hàm lượng chiết sẽ không tăng hoặc giảm dần khi đạt cân bằng [5, 13].

Cũng tương tự như vậy, nếu tăng mức NLSA giúp hình thành nhiều cavitation với năng lượng lớn làm tăng quá trình xâm thực, phá vỡ tế bào dẫn đến gia tăng hàm lượng glycoside chiết nhưng sau đó nhanh chóng không tăng hoặc giảm hàm lượng chiết do chính các 'cavitation' sẽ phá hủy các hợp chất chiết được [6].

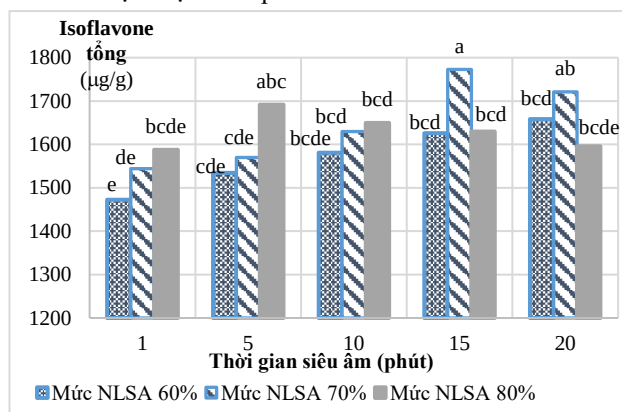
Hàm lượng glycoside tại các điều kiện chiết có sự khác nhau có nghĩa theo phân tích Turkey ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Mẫu có mức NLSA là 70% -15 phút đạt hàm lượng glycoside cực đại và không có sự khác biệt có nghĩa với các mẫu ở mức NLSA 80%-5 phút, 60%-20 phút, 70%-20 phút nhưng có sự khác biệt với các mẫu còn lại.

3.2.3. Ảnh hưởng thời gian và mức năng lượng siêu âm (NLSA) đến hàm lượng isoflavone tổng số thu nhận

Hình 3, biểu diễn sự ảnh hưởng của thời gian siêu âm

và các mức NLSA đến hàm lượng isoflavones tổng số chiết được. Vì hàm lượng glycoside chiếm lượng lớn trong mẫu chiết nên xu hướng hàm lượng isoflavone chiết được cũng tương tự như xu hướng chiết hàm lượng glycoside như đã phân tích ở Mục 3.2.2.

Thật vậy, kết quả phân tích ANOVA 2 chiều đã chỉ ra rằng có sự khác biệt có nghĩa của hàm lượng isoflavone khi thay đổi mức NLSA và thời gian siêu âm, cũng như có sự tác động đồng thời của 2 yếu tố này. Hàm lượng isoflavone tại các điều kiện chiết khác nhau đều có sự khác nhau có nghĩa theo phân tích Turkey ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$. Mẫu có mức NLSA là 70% -15 phút đạt giá trị cực đại là $1773,0 \pm 21,7 \mu\text{g/g}$ isoflavone so với hàm lượng chất khô nguyên liệu ban đầu và không có sự khác biệt có nghĩa với các mẫu ở mức NLSA 80%-5 phút và 70%-20 phút. Do đó điều kiện siêu âm ở mức NLSA là 70% trong khoảng thời gian 15 phút được xem là điều kiện chiết hỗ trợ siêu âm tối ưu. Đối với việc sử dụng bể siêu âm ở nhiệt độ phòng, theo báo cáo của Devanand L cùng cộng sự [1] và Joyce Irene Boye cùng cộng sự [5] thời gian siêu âm được chọn là 15 phút.



Hình 3. Ảnh hưởng của mức NLSA và thời gian siêu âm đến hàm lượng isoflavone tổng

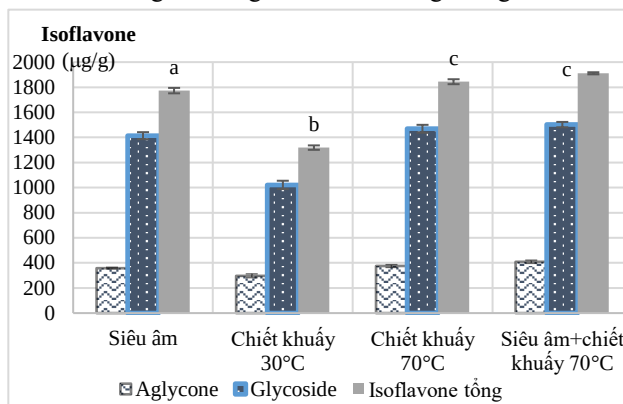
3.3. So sánh ảnh hưởng của chiết bằng siêu âm và chiết khuấy thông thường đến hiệu quả chiết isoflavone trong hạt đậu nành

Tiếp tục so sánh hiệu quả chiết isoflavone bằng phương pháp siêu âm so với phương pháp chiết khuấy thông thường, phương pháp siêu âm-chiết khuấy kết hợp thông qua so sánh về hàm lượng isoflavone, hiệu quả quét gốc tự do DPPH và ảnh chụp SEM của các mẫu nguyên liệu sau khi chiết.

3.3.1. So sánh hiệu quả chiết của phương pháp chiết thông qua hàm lượng isoflavone

Hàm lượng isoflavone thu nhận được thể hiện trong Hình 4. Cùng một điều kiện nhiệt độ chiết 30°C, mẫu chiết hỗ trợ siêu âm cho hàm lượng isoflavone tổng cao hơn mẫu chiết khuấy thông thường, kết quả này cũng phù hợp với báo cáo của Rostago cùng cộng sự [2] khi trích ly isoflavone từ hạt đậu nành. Tuy nhiên nếu so hàm lượng chiết bằng phương pháp siêu âm với các mẫu chiết khuấy ở 70°C và siêu âm- khuấy kết hợp thì lại thấp hơn. Nguyên nhân là do trong chiết khuấy có gia nhiệt 70°C, việc khuấy trộn kết hợp với nhiệt độ giúp quá trình trích ly sâu hơn nên cho hàm lượng isoflavone cao hơn so với mẫu chỉ thực hiện siêu âm ở nhiệt độ phòng. Quá trình chiết khuấy ở 70°C-45 phút sau khi mẫu đã được siêu âm chỉ giúp trích ly thêm nên đạt giá

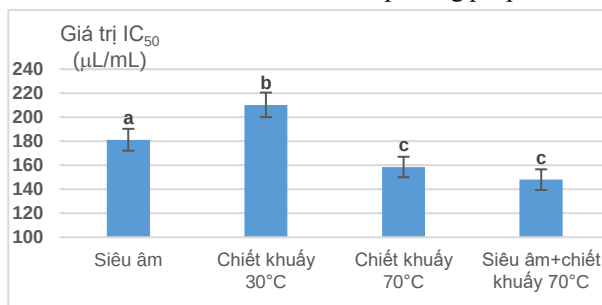
trị chiết cao nhất so với 3 mẫu còn lại nhưng không có sự khác nhau có nghĩa giữa mẫu chiết khuấy ở 70°C và siêu âm-chiết kết hợp. Như vậy quá trình chiết siêu âm- khuấy kết hợp thực sự chưa nâng cao hiệu quả chiết. Nếu so sánh theo thời gian chiết thì phương pháp siêu âm là nhanh nhất, tránh thất thoát dung môi và giảm tiêu tốn năng lượng.



Hình 4. Ảnh hưởng của phương pháp chiết đến hàm lượng isoflavone tổng

3.3.2. So sánh hiệu quả chống oxy hóa của isoflavone trong mẫu chiết thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH

Tiến hành xác định khả năng bắt gốc tự do DPPH của các dịch chiết theo các phương pháp khác nhau theo Mục 2.2.3, sử dụng các giá trị IC_{50} dùng để đánh giá khả năng bắt gốc tự do DPPH của các mẫu khác nhau về phương pháp chiết.



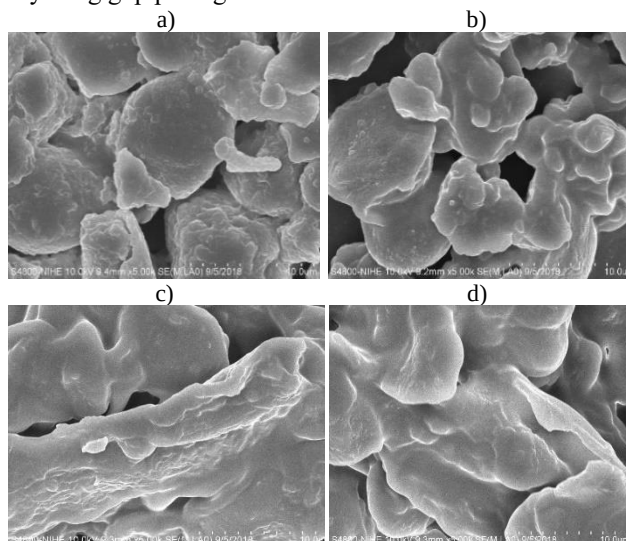
Hình 5. Ảnh hưởng của phương pháp chiết đến hiệu quả bắt gốc tự do DPPH

Hình 5, cùng với phân tích ANOVA cho thấy có sự khác nhau có nghĩa giữa các giá trị IC_{50} của các mẫu, trong đó giá trị IC_{50} của mẫu chiết siêu âm ($181,2 \pm 9,1 \mu\text{L}$) thấp hơn so với phương pháp chiết khuấy ở 30°C ($210,3 \pm 10,2 \mu\text{L}$) và cao hơn mẫu chiết khuấy ở 70°C ($158,5 \pm 8,5 \mu\text{L}$) và mẫu siêu âm-chiết khuấy kết hợp ($148,0 \pm 8,6 \mu\text{L}$). Như vậy, giá trị IC_{50} của mẫu siêu âm-chiết khuấy kết hợp có giá trị thấp nhất. Kết quả này chỉ ra rằng hiệu quả bắt gốc tự do DPPH tỉ lệ thuận với hàm lượng isoflavone trong các mẫu chiết và chứng tỏ quá trình siêu âm không ảnh hưởng đến khả năng kháng oxy hóa của isoflavone trong dịch chiết. Kết quả này cũng tương tự kết quả đánh giá khả năng quét gốc tự do của các hợp chất polyphenol từ cây *Salvia officinalis* L. [14].

3.3.3. So sánh tác động của phương pháp chiết đến nguyên liệu thông qua ảnh chụp SEM

Hình chụp SEM của các mẫu bột đậu nành nguyên liệu và sau khi chiết được thể hiện trong Hình 6. Đối với mẫu bột đậu nành nguyên liệu (Hình 6a), hình SEM thể hiện bề mặt nguyên liệu có những vảy to. Trong khi đó các bề mặt

mẫu nguyên liệu đã qua xử lý đều bị bào mòn các phần cạnh. Mặc dù cơ chế tác động của các quá trình chiết đến nguyên liệu là khác nhau nhưng chưa có sự khác biệt rõ giữa các mẫu chiết khuấy và siêu âm qua hình chụp SEM. Nguyên nhân là do vách tế bào hạt đậu nành khá dày cũng như điều kiện siêu âm và chiết khuấy tác động vừa phải nên bề mặt vách tế bào không xảy ra các biến đổi mạnh, điều này cũng góp phần giải thích các so sánh ở trên.



Hình 6. Hình chụp SEM mẫu trước và sau quá trình chiết

- Bột hạt đậu nành trước khi chiết;
- Bột đậu nành sau khi chiết khuấy ở 70°C;
- Bột đậu nành sau khi chiết siêu âm ở NLSA 70%-15 phút;
- Bột đậu nành sau khi chiết kết hợp siêu âm ở NLSA 70%-15 phút-khuấy 70°C -45 phút.

4. Kết luận

Quá trình chiết isoflavone từ hạt đậu nành bằng phương pháp chiết sử dụng ethanol 80% với sự hỗ trợ siêu âm chịu tác động đồng thời bởi thời gian siêu âm và mức năng lượng siêu âm, từ đó chọn được điều kiện chiết hỗ trợ siêu âm tối ưu là ở điều kiện 70% mức năng lượng trong 15 phút, nhiệt độ phòng $26,9 \pm 2,3^\circ\text{C}$, hàm lượng chiết đạt được cao nhất là $1773,0 \pm 21,7 \mu\text{g/g}$ (khối lượng isoflavone/khối lượng hàm lượng nguyên liệu khô).

Hàm lượng isoflavone chiết được tại điều kiện siêu âm tối ưu cao hơn so với phương pháp chiết khuấy thông thường trong 45 phút ở nhiệt độ 30°C nhưng thấp hơn so với phương pháp chiết khuấy ở 70°C -45 phút cũng như phương pháp siêu âm-chiết khuấy kết hợp trong 60 phút, tuy nhiên thời gian chiết của phương pháp chiết siêu âm là ngắn nhất so với các phương pháp chiết khác.

Hàm lượng isoflavone trong dịch chiết ở các phương pháp chiết khác nhau có tương quan thuận với khả năng bắt gốc tự do DPPH, chứng tỏ trong phương pháp chiết hỗ trợ siêu âm điều kiện siêu âm tối ưu không ảnh hưởng đến hoạt tính chống oxy hóa của isoflavone.

Tóm lại, quá trình chiết hỗ trợ siêu âm nâng cao hiệu quả chiết, đảm bảo được hoạt tính chống oxy hóa của các hợp chất isoflavone và rút ngắn được thời gian chiết, chứng tỏ là công nghệ khả thi cho quá trình phát triển hóa học bền vững [6].

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng trong đề tài có mã số B2017-ĐN06-07.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Devanand L. Luthria, Ronita Biswas, Savithiry Natarajan. "Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean", *Food Chemistry*, 105 (2007) 325–333.
- [2] Tomasz Blicharski, Anna Oniszczuk. "Extraction Methods for the Isolation of Isoflavonoids from Plant Material", *Open Chem*, 15(2017) 34–45.
- [3] Mauricio A. Rostagno, Miguel Palma, Carmelo G. Barroso, "Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones", *Journal of Chromatography A*, 1012 (2003) 119–128.
- [4] Chung Hung Lee, Lin Yang, Jin Ze Xu, Sai Ying Venus Yeung, Yu Huang, Zhen-Yu Chen, "Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides", *Food Chemistry* 90 (2005) 735–741.
- [5] Allaoua Achouri, Joyce Irene Boye, Denis Belanger, "Soybean isoflavones: Efficacy of extraction conditions and effect of food type on extractability", *Food Research International* 38 (2005) 1199–1204.
- [6] Farid Chemat, Natacha Rombaut, Anne-Gaëlle Sicaire, Alice Meullemiestre, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Maryline Abert-Vian. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications (A review)". *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017) 540–560.
- [7] M. C. Lakshmi, L. Jaganmohan Rao, R. Ravi, K. S. M. S. "Raghavarao-Extraction and Concentration of Isoflavones from Soybean (Glycine max)", *Separation Science and Technology*, 48 (2013) 166–174.
- [8] Tran Thi Ngoc Thu, Truong Thi Minh Hanh, "Research on conditions for isoflavones extraction from okara using ultrasound in combination with conventional shaking", *Kỷ yếu hội thảo khoa học toàn quốc 2016 "Tiến bộ kỹ thuật thực phẩm và kỹ thuật sinh học: từ nghiên cứu đến sản xuất"*, 199–207 (2016).
- [9] Mark W. Collison, "Determination of total soy isoflavones in dietary supplements, supplement ingredients, and soy foods by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: collaborative study", *Journal of AOAC Int.* 91(3) (2008) 489–500.
- [10] I.Mujić,Edina Šertović,Stela Jokić, Z. Sarić,Vildana Alibabić, Senka Vidović, Jelena Živković, "Isoflavone content and antioxidant properties of soybean seeds", *Croat. J. Food Sci. Technol* 3(2011)16–20.
- [11] Nguyễn Văn Mùi, *Thực hành hóa sinh học*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, 2007.
- [12] Võ Công Thành, Nguyễn Hoàng Tú và Quan Thị Ái Liên, "Tìm dấu chỉ thị protein tương quan với hàm lượng protein trên hạt đậu nành bằng phương pháp điện di SDS-PAGE", *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ* 16b (2010) 180–188.
- [13] Trần Chí Hải, Nguyễn Tấn Dân, Nguyễn Đình Nam, Lê Thị Hồng Ánh, Phan Văn Mẫn, "Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến quá trình trích ly polyphenol từ lá trà già", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Đại học Đà Nẵng*, 9(106),2016.
- [14] M. Dent, V. Dragović-Uzelac, I. Elez Garofulić, T. Bosiljkov, D. Ježek, and M. Brnčić, "Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.)". *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 29 (3) 475–484 (2015).