

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN CHIẾT VỚI SỰ HỖ TRỢ SIÊU ÂM ĐỂ THU NHẬN POLYPHENOL CÓ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA TỪ LOÀI RONG ĐỎ GRACILARIA SALICORNIA

OPTIMIZATION OF ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION CONDITIONS FOR PHENOLICS WITH ANTIOXIDANT CAPACITY FROM RED ALGA GRACILARIA SALICORNIA

Đỗ Trần Lâm¹, Phạm Hồng Ngọc Thùy¹,
Nguyễn Văn Minh¹, Nguyễn Thế Hân¹

¹Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang
Tác giả liên hệ: Nguyễn Thế Hân (hannt@ntu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 14/11/2020; Ngày phản biện thông qua: 25/12/2020; Ngày duyệt đăng: 28/12/2020

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm mục đích tối ưu hóa điều kiện chiết polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa từ loài rong đỏ *Gracilaria salicornia* (*G. salicornia*) với sự hỗ trợ của siêu âm bằng phương pháp bề mặt đáp ứng theo mô hình Box-Behnken. Các yếu tố được chọn để khảo sát sự ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa của rong đỏ *G. salicornia* trong quá trình chiết bao gồm: Nhiệt độ chiết, thời gian chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi, với nước được chọn là dung môi chiết. Kết quả nghiên cứu cho thấy thời gian chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi có ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng polyphenol của rong *G. salicornia* ($p < 0,05$). Trong đó, thời gian chiết có ảnh hưởng tỉ lệ thuận đến hàm lượng polyphenol, ngược lại tỉ lệ nguyên liệu/dung môi có ảnh hưởng tỉ lệ nghịch. Ngoài ra, nghiên cứu đã tìm ra được điều kiện chiết tối ưu với sự hỗ trợ của siêu âm để thu nhận polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa từ rong đỏ *G. salicornia* như sau: Nhiệt độ chiết 60°C, thời gian chiết 40 phút và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 3/100 (g/ml). Tại điều kiện tối ưu hàm lượng polyphenol thu được là $93,95 \pm 3,05$ (mg GAE/100g) và khả năng chống oxy hóa khử sắt là $54,76 \pm 0,89$ (mg TE/100g).

Từ khóa: *Gracilaria salicornia*, polyphenol, hoạt tính chống oxy hóa, chiết với sự hỗ trợ siêu âm

ABSTRACT

This study aimed to optimize ultrasound-assisted extraction (UAE) conditions of the red seaweed *Gracilaria salicornia* (*G. salicornia*) for total phenolic content (TPC) with antioxidant power using response surface methodology (RSM) based on a Box-Behnken design. The effects of various extraction conditions on TPC and antioxidant activities of *G. salicornia* were investigated including extraction temperature, extraction time and material to solvent ratio with water selected as the extraction solvent. The results indicated that extraction time and material to solvent ratio significantly affected TPC of *G. salicornia* ($p < 0.05$). Of these, extraction time had a positive effect on TPC, while material to solvent ratio had a negative effect. Additionally, the optimum ultrasound-assisted extraction conditions were found to be extraction temperature of 60 °C, extraction time of 40 min and material to solvent of 3/100 (g/ml). Under these conditions, the experimental yield of total phenolic compounds and ferric reducing antioxidant power were 93.95 ± 3.05 (mg GAE/100g) and 54.76 ± 0.89 (mg TE/100g), respectively.

Keywords: *Gracilaria salicornia*, polyphenol, antioxidant capacity, ultrasound-assisted extraction

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam có đường bờ biển dài 3260 km, hệ rong biển phong phú với khoảng 1000 loài và được chia thành 3 nhóm chính (rong nâu, rong lục và rong đỏ) với 700 loài đã được định danh [7]. Từ lâu rong biển được xem là một nguồn thực phẩm cho con người, thức ăn cho động vật và nguyên liệu cho một số bài thuốc truyền

thống. Tuy nhiên, các loài rong biển được sử dụng chủ yếu ở dạng thô hoặc là những sản phẩm thông qua các quá trình xử lý đơn giản và hiệu quả chưa cao.

Việc thu nhận các hợp chất các hợp chất có hoạt tính sinh học và chất chống oxy hóa có nguồn gốc tự nhiên để thay thế cho các hợp chất tổng hợp đang là một hướng nghiên cứu

triển vọng trong những năm gần đây. Mặc dù Việt Nam có lợi thế về nguồn lợi rong biển phong phú nhưng các nghiên cứu về đối tượng này còn hạn chế và chủ yếu tập trung vào đối tượng rong nâu. Cụ thể, Cường và cộng sự (2016) đã đánh giá khả năng chống oxy hóa của một số loài rong nâu thu hoạch tại vùng biển Khánh Hòa [6], Thịnh và cộng sự (2013) đã tách chiết một số hợp chất fucoidans và thử nghiệm khả năng kháng tế bào ung thư từ một số loài rong nâu ở Việt Nam [20].

Phương pháp chiết có hỗ trợ sóng siêu âm là một phương pháp chiết hiện đại, hiệu quả, dễ thực hiện, chi phí thấp và dễ dàng áp dụng trên quy mô lớn so với các phương pháp chiết khác như phương pháp chiết hỗ trợ vi sóng, phương pháp chiết Soxhlet và phương pháp chiết carbondioxide lỏng siêu tới hạn [22, 23]. Gần đây, nhiều nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả của phương pháp chiết có hỗ trợ siêu âm để chiết các hợp chất sinh học từ thực vật so với phương pháp chiết truyền thống. Khan và cộng sự (2010) nghiên cứu chiết tách hợp chất polyphenol từ vỏ cam cho thấy quá trình chiết có hỗ trợ sóng siêu âm cho kết quả nhanh gấp 3 lần so với phương pháp chiết thông thường [11]. Pan và cộng sự (2012) nghiên cứu chiết rút flavonoid từ hạt táo gai (hawthorn seed) cho thấy việc chiết có hỗ trợ sóng siêu âm cho hiệu suất thu hồi flavonoid cao hơn phương pháp chiết hồi lưu thông thường 1,32 lần [13].

Tuy nhiên, việc sử dụng phương pháp chiết có hỗ trợ siêu âm để trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học từ rong biển, đặc biệt là rong đỏ còn hạn chế. Thêm vào đó, việc thiết lập một quá trình chiết tối ưu để thu nhận các hợp chất có hoạt tính sinh học từ rong biển là cần thiết nhằm khai thác hiệu quả nguồn lợi từ rong biển. Trong rất nhiều phương pháp tối ưu thì phương pháp bề mặt đáp ứng với sự hỗ trợ của các phần mềm xử lý số liệu được xem là phương pháp hữu ích, giúp tiết kiệm thời gian và chi phí. Do đó, nghiên cứu này sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng để tối ưu hóa quá trình chiết có hỗ trợ siêu âm nhằm thu nhận dịch chiết polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa từ loài rong đỏ *G. salicornia*.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

1.1. Rong biển

Nghiên cứu sử dụng rong *Gracilaria salicornia* (Hình 1). Mẫu rong được thu hoạch ở giai đoạn trưởng thành tại vùng biển Nha Trang (Sông Lô, Bãi Tiên, Hòn Chông) trong khoảng thời gian từ tháng 4 đến tháng 6 năm 2020. Mẫu rong thu hoạch được định danh bởi chuyên gia về rong biển (Ths. Đỗ Anh Duy, Viện nghiên cứu Hải sản) theo phương pháp hình thái học.

Mẫu rong sau khi thu hoạch được rửa sạch bằng nước biển và vận chuyển về phòng thí nghiệm công nghệ chế biến, Trường Đại học Nha Trang. Tại phòng thí nghiệm, mẫu rong được phơi khô dưới bóng râm đến độ ẩm dưới 12%. Sau đó, mẫu rong được nghiền nhỏ, bảo quản trong các túi PA hút chân không ở nhiệt độ < -20°C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Rong đỏ *Gracilaria salicornia*.

1.2. Hóa chất

Thuốc thử Folin-Ciocalteu và 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) được cung cấp bởi công ty Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ); nước sử dụng trong nghiên cứu là nước cất và các hóa chất khác gồm: acid gallic; trolox; acid ascorbic; methanol; acid acetic; $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Na_2CO_3 ; FeCl_3 ; HCl đều đạt tiêu chuẩn dùng để phân tích.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Xác định điều kiện biên cho thí nghiệm tối ưu

Quá trình chiết được thực hiện trong bể siêu âm Branson 2510 (100W, 42 kHz). Nước được

lựa chọn là dung môi chiết vì nước là dung môi rẻ, an toàn, thân thiện với môi trường. Hơn thế nữa, nước đã được chứng minh là có hiệu quả khi sử dụng để trích ly các hợp chất polyphenol và các chất chống oxy hóa trong một số loại nguyên liệu thực vật như *Helicteres hirsuta*, lá đu đủ *Carica* và tảo *Chlorella vulgaris* [15, 19, 22]. Nhiệt độ chiết được chọn từ 30 đến 60°C cho thí nghiệm tối ưu vì đây là khoảng nhiệt độ làm việc của bể siêu âm. Sự ảnh hưởng của các yếu tố khác gồm thời gian chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến quá trình chiết hợp chất polyphenol từ rong *G. salicornia* được tiến hành đánh giá một cách độc lập. Từ các kết quả khảo sát này xác định được các điều kiện biên về thời gian chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi để thực hiện thí nghiệm tối ưu.

Để đánh giá ảnh hưởng của thời gian chiết, mẫu rong được chiết với dung môi là nước với tỉ lệ nguyên liệu/dung môi được giữ cố định là 3/100 (g/ml), quá trình chiết được thực hiện ở 40°C trong bể siêu âm Branson 2510 (100W, 42 kHz) ở các mốc thời gian chiết khác nhau (10, 20, 30, 40, 50 và 60 phút). Sau đó làm lạnh nhanh dịch chiết trong nước đá lạnh, lọc qua giấy lọc Whatman no.1 và tiến hành xác định hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa khử sắt. Khoảng thời gian chiết thích hợp được chọn dựa trên hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa khử sắt của dịch chiết.

Anh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi được xác định ở các tỉ lệ khác nhau (3/100, 5/100, 7/100 và 9/100 g/ml). Mẫu rong được chiết trong bể siêu âm Branson 2510 (100W, 42 kHz), nước được sử dụng là dung môi với các tỉ lệ nguyên liệu/dung môi thay đổi từ 3/100 đến 9/100 g/ml ở nhiệt độ cố định là 40°C trong thời gian 20 phút (thời gian chiết được xác định dựa trên kết quả của thí nghiệm trên). Việc xác định khoảng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi để tiến hành tối ưu dựa trên hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa khử sắt của dịch chiết.

2.2. Bố trí thí nghiệm tối ưu theo phương pháp bề mặt đáp ứng

Nghiên cứu này sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng với mô hình Box-Behnken để thực hiện tối ưu hóa điều kiện chiết polyphenol

từ rong biển *G. salicornia* với 3 biến số độc lập (nhiệt độ, thời gian và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi) và hai hàm mục tiêu Y1 (hàm lượng polyphenol) và Y2 (khả năng chống oxy hóa khử sắt). Ma trận thí nghiệm được xây dựng bằng phần mềm JMP 10.0 gồm 15 thí nghiệm trong đó có 3 thí nghiệm ở tâm và mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Phương trình hồi quy có dạng:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}(X_1X_2) + b_{13}(X_1X_3) + b_{23}(X_2X_3) + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

Trong đó:

X_1 là nhiệt độ chiết (°C); X_2 là thời gian chiết (phút); X_3 là tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml)

b_0 là hệ số tự do; b_1, b_2, b_3 là các hệ số bậc 1; b_{11}, b_{22}, b_{33} là các hệ số bậc 2; b_{12}, b_{13}, b_{23} là hệ số tương tác của từng cặp yếu tố X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3 .

Kết quả được xử lý bằng phần mềm JMP 10.0 để xác định phương trình hồi quy và xác định điều kiện tối ưu để thu dịch chiết giàu polyphenol và có hoạt tính chống oxy hóa.

2.3. Xác định hàm lượng polyphenol tổng số (TPC)

Hàm lượng polyphenol tổng số được xác định theo phương pháp của Vương và cộng sự (2013) [22]. Dịch chiết được pha loãng ở nồng độ thích hợp, sau đó lấy 0,5 ml mẫu đã pha loãng và thêm vào 2,5 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% (v/v), 2 ml Na_2CO_3 7,5% (w/v). Hỗn hợp được lắc đều trên máy vortex và giữ trong tối 60 phút trước khi xác định độ hấp thụ trên thiết bị quang phổ UV-VIS (Biochrom Libra S50) ở bước sóng 765 nm. Axit gallic được sử dụng làm chất chuẩn và hàm lượng polyphenol được biểu diễn tương đương mg axit gallic trên 100g chất khô (mg GAE/100g).

2.4. Xác định khả năng chống oxy hóa khử sắt (FRAP)

Khả năng chống oxy hóa khử sắt được xác định dựa trên phương pháp của Phạm và cộng sự (2015) [15]. Dung dịch phản ứng được chuẩn bị gồm: chất phản ứng A (dung dịch đệm acetate 300 mM, pH 3,6), chất phản ứng B (TPTZ 10 mM được pha trong dung dịch HCl 40 mM) và chất phản ứng C (dung dịch $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 20mM). Trước khi dùng, dung dịch phản ứng được chuẩn bị bằng cách trộn các chất phản ứng A, B, C ở

ti lệ 10:1:1. Phân tích được thực hiện bằng cách trộn 0,15 ml dịch chiết với 2,85 ml dung dịch phản ứng và giữ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Độ hấp thụ của hỗn hợp được đo ở bước sóng 593 nm bằng máy quang phổ UV-VIS (Biochrom Libra S50). Trolox được sử dụng làm chất chuẩn và kết quả được biểu diễn tương đương mg trolox trên 100g chất khô (mg TE/100g).

3. Xử lý số liệu

Tất cả thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần. Số liệu được tính toán bằng phần mềm SPSS 22.0 và kết quả được thể hiện là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Kết quả phân tích ANOVA với độ tin cậy 95% và so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức qua phép thử Duncan. Thiết kế thí nghiệm tối ưu được thực hiện bằng phần mềm JMP 10.0.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả xác định điều kiện biên về thời gian chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi cho thí nghiệm tối ưu

1.1. Thời gian chiết

Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa khử sắt của dịch chiết rong *G. salicornia* được trình bày ở Bảng 1. Kết quả cho thấy hàm lượng polyphenol của dịch chiết tăng dần khi tăng

thời gian chiết từ 10 phút lên 40 phút, sau 40 phút hàm lượng polyphenol giảm nhẹ nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Hàm lượng polyphenol khi chiết ở 20, 30 và 40 phút cũng không khác nhau đáng kể ($p > 0,05$). Hàm lượng polyphenol thấp nhất khi chiết trong thời gian 10 phút ($77,51 \pm 1,12$ mg GAE/100g). Hàm lượng polyphenol tăng theo thời gian chiết có thể được giải thích là do các hợp chất polyphenol và các hợp chất sinh học khác vẫn còn lại trong thành tế bào của nguyên liệu nếu thời gian chiết ngắn, do đó cần thời gian dài hơn để giải phóng các hợp chất này ra ngoài [5]; tuy nhiên, sau một khoảng thời gian chiết nhất định thì hàm lượng polyphenol có chiều hướng giảm dần vì các hợp chất polyphenol trong dịch chiết dễ bị biến đổi do sự tác động của oxy, ánh sáng và nhiệt độ. Hiện tượng này còn phụ thuộc vào tính chất của nguyên liệu và đặc tính của các hợp chất cần tách chiết [18]. Số liệu từ Bảng 1 cho thấy khả năng chống oxy hóa khử sắt của dịch chiết khi tăng thời gian chiết từ 10 phút đến 60 phút không khác biệt ($p > 0,05$). Do đó, khoảng thời gian từ 10 đến 40 phút được chọn làm giới hạn biên cho thí nghiệm tối ưu và 20 phút là thời gian được chọn để xác định ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến quá trình chiết các hợp chất polyphenol có khả năng chống oxy hóa khử sắt từ rong *G. salicornia*.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa khử sắt của dịch chiết rong *G. salicornia*

Thời gian chiết	Hàm lượng polyphenol (mg GAE/100g)	Khả năng chống oxy hóa khử sắt (mg TE/100g)
10	77,51 ± 1,12 ^b	48,58 ± 1,70 ^a
20	87,48 ± 1,55 ^a	52,59 ± 3,20 ^a
30	88,56 ± 1,98 ^a	54,21 ± 1,01 ^a
40	91,15 ± 1,62 ^a	49,25 ± 2,80 ^a
50	85,95 ± 2,18 ^{ab}	50,74 ± 2,48 ^a
60	85,91 ± 2,46 ^{ab}	50,01 ± 1,26 ^a

Ghi chú: GAE: gallic acid equivalents (tương đương với acid gallic); TE: trolox equivalents (tương đương với trolox). Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

1.2. Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết. Việc tăng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi từ 3/100 đến 9/100 g/ml làm cho hàm lượng polyphenol giảm đi đáng kể ($p < 0,05$). Cụ thể, hàm lượng polyphenol ở tỉ lệ nguyên liệu/dung môi 9/100 (g/ml) là $60,15 \pm 0,28$ mg GAE/100g, giảm gần 1,5 lần so với hàm lượng polyphenol ở tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 3/100 (g/ml). Hiện tượng này có thể giải thích là do việc tăng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi sẽ làm thay đổi gradient nồng độ của các hợp chất polyphenol với dung môi dẫn đến giảm hiệu suất của quá trình chiết [10], kết quả tương tự

cũng được tìm thấy ở nghiên cứu của Phạm và cộng sự (2017) trên đối tượng cây *Helicteres hirsuta* [16].

Tương tự, khả năng chống oxy hóa khử sắt của dịch chiết cũng giảm dần khi tăng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi. Ở tỉ lệ 3/100 (g/ml) thì giá trị chống oxy hóa khử sắt là $52,59 \pm 3,20$ mg TE/100g, nhưng khi tăng tỉ lệ lên 5/100 và 7/100 thì giá trị chống oxy hóa khử sắt giảm lần lượt là 14% và 23%. Nếu tiếp tục tăng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi lên 9/100 (g/ml) thì khả năng chống oxy hóa khử sắt không thay đổi ($p > 0,05$) so với tỉ lệ 7/100 (g/ml). Do đó, khoảng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi từ 3/100 – 7/100 (g/ml) được chọn cho thí nghiệm của mô hình tối ưu.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa khử sắt của dịch chiết rong *G. salicornia*

Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml)	Hàm lượng polyphenol (mg GAE/100g)	Khả năng chống oxy hóa khử sắt (mg TE/100g)
3/100	$87,48 \pm 1,55^a$	$52,59 \pm 3,20^a$
5/100	$75,89 \pm 3,92^b$	$45,45 \pm 2,47^b$
7/100	$63,79 \pm 1,19^c$	$40,40 \pm 2,78^b$
9/100	$60,15 \pm 0,28^c$	$39,08 \pm 1,22^b$

Ghi chú: GAE: gallic acid equivalents (tương đương với acid gallic); TE: trolox equivalents (tương đương với trolox). Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

2. Tối ưu hóa điều kiện chiết

Các thí nghiệm thiết kế theo mô hình Box-Behnken được thực hiện để đánh giá sự ảnh hưởng của các yếu tố, sự tương tác giữa các yếu tố trong quá trình chiết đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết rong *G. salicornia*, xây dựng các phương trình hồi quy và tìm ra được điều kiện chiết tối ưu. Sau khi tìm được mô hình toán học dự đoán giá trị polyphenol và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết thì cần phân tích tính phù hợp của mô hình để tránh việc mô hình đưa ra kết quả không đồng nhất với giá trị thực nghiệm [17]. Kết quả thực nghiệm (Bảng 3) cho thấy hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa khử sắt dao động lần lượt từ 68,30 – 91,18 (mg GAE/100g) và 41,94 – 51,66 (mg TE/100g). Kết quả phân tích phương sai (Bảng 4) thể hiện mức độ phù hợp của của mô hình. Giá trị p lack

of fit của mô hình ứng với hàm mục tiêu là hàm lượng polyphenol là 0,29 ($p > 0,05$) cho thấy sự phù hợp của mô hình, giá trị $R^2 = 0,99$ chỉ ra sự phù hợp 99% của giá trị dự đoán so với giá trị thực tế, giá trị PRESS là 168, giá trị p of model 0,0005 và giá trị F model là 36,74 cũng cho thấy mức độ tin cậy của mô hình sử dụng để dự đoán giá trị polyphenol từ dịch chiết. Tương tự, với hàm mục tiêu là khả năng chống oxy hóa khử sắt, kết quả phân tích phương sai cũng cho thấy độ đáng tin cậy của mô hình với giá trị p lack of fit là 0,98 ($p > 0,05$) và giá trị $R^2 = 0,88$ thể hiện sự phù hợp 88% của giá trị dự đoán và giá trị thực tế. Từ kết quả trên cho thấy hai mô hình toán học dự đoán hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa khử sắt của dịch chiết rong *G. salicornia* có độ tin cậy cao và hoàn toàn phù hợp để sử dụng cho nghiên cứu này.

Bảng 3. Kết quả thực nghiệm theo mô hình Box-Behnken

STT	Biến thực			Hàm mục tiêu	
	Nhiệt độ chiết (°C)	Thời gian chiết (phút)	Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (g/100ml)	Hàm lượng polyphenol (mg GAE/100g)	Khả năng chống oxy hóa khử sắt (mg TE/100g)
1	30	40	5	78,55	44,79
2	45	25	5	76,24	42,84
3	45	40	3	89,70	46,36
4	60	10	5	72,79	47,67
5	30	25	7	68,30	40,96
6	60	40	5	81,89	51,66
7	45	10	7	66,97	42,71
8	45	25	5	74,71	44,04
9	30	10	5	76,72	47,03
10	45	25	5	76,95	47,80
11	45	40	7	70,54	41,94
12	60	25	3	90,34	48,72
13	30	25	3	91,18	43,78
14	45	10	3	81,53	43,38
15	60	25	7	70,82	44,00

Ghi chú: GAE: gallic acid equivalents (tương đương với acid gallic); TE: trolox equivalents (tương đương với trolox).

Bảng 4: Kết quả phân tích phương sai xác định mức độ phù hợp của mô hình

	Hàm lượng polyphenol	Khả năng chống oxy hóa khử sắt
<i>p</i> lack of fit	0,29	0,98
<i>R</i> ²	0,99	0,88
Adjust <i>R</i> ²	0,95	0,66
PRESS	168	43
<i>F</i> ratio of model	36,74	4,15
<i>p</i> of model > <i>F</i>	0,0005	0,0107

Tiến hành xử lý số liệu trên phần mềm JMP 10 tìm được phương trình bậc 2 thể hiện mối tương quan của các yếu tố trong quá trình chiết đến các hàm mục tiêu là hàm lượng polyphenol (*Y*₁) và khả năng chống oxy hóa khử sắt (*Y*₂) như sau:

$$Y_1 = 135,65 + 0,17X_2 - 9,94X_3 + 0,01X_1^2$$

$$Y_2 = 47,30 - 0,695X_1 + 6,55X_3 - 0,59X_3^2$$

Dựa vào các biểu đồ 3D (Hình 2 và Hình 3) và kết quả phân tích hồi quy các hệ số của phương trình (Bảng 5) có thể đánh giá được

mức độ ảnh hưởng của các biến số của phương trình. Kết quả cho thấy thời gian chiết (*X*₂) và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (*X*₃) là hai yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng polyphenol (*p* < 0,05). Trong đó, thời gian có ảnh hưởng tỉ lệ thuận, ngược lại tỉ lệ nguyên liệu/dung môi có ảnh hưởng tỉ lệ nghịch. Cụ thể, khi tăng thời gian chiết trong khoảng thời gian nghiên cứu từ 10 đến 40 phút thì hàm lượng polyphenol tăng dần. Tuy nhiên, khi tăng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi từ 3 đến 7 g/100ml thì hàm lượng

polyphenol giảm mạnh. Sự tương tác giữa các biến số không có sự ảnh hưởng đáng kể đến các hàm mục tiêu ($p > 0,05$). Đối với các biến số bậc 2 thì X_1^2 cho thấy ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng polyphenol ($p < 0,05$), các biến số còn lại ảnh hưởng không đáng kể ($p > 0,05$). Đối với hàm mục tiêu là khả năng chống oxy hóa khử sắt thì kết quả cho thấy nhiệt độ chiết X_1 và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi X_3 ảnh hưởng đáng kể đến khả năng chống oxy hóa khử sắt ($p < 0,05$). Sự tương tác giữa các biến số không ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu ($p > 0,05$). Đối với các biến số bậc 2 thì X_3^2 cho thấy sự ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu khả năng chống oxy hóa khử sắt ($p < 0,05$). Hình 3 cho thấy khi tăng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi từ 3 đến 4 g/100ml thì giá trị FRAP tăng nhẹ, sau đó nếu tiếp tục tăng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi thì giá trị FRAP giảm dần.

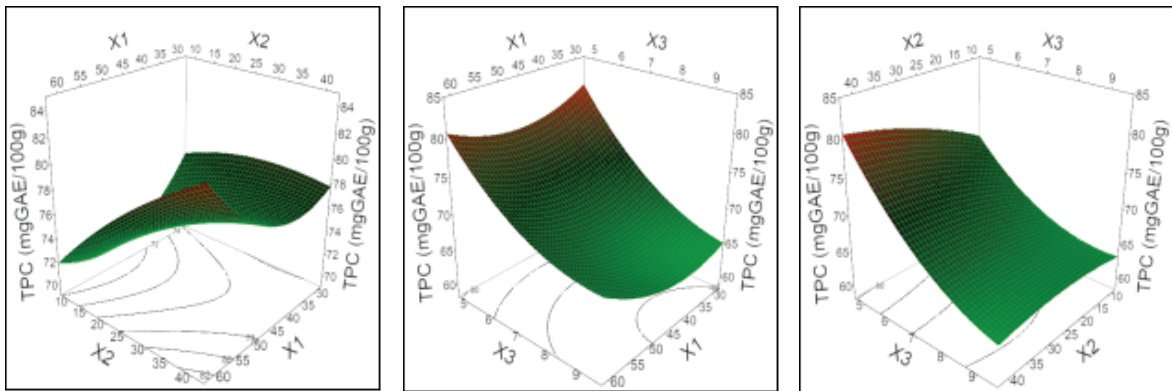
Mô hình đưa ra dự đoán về hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa đạt cao nhất lần lượt là $94,05 \pm 6,86$ mg GAE/100g và $52,04 \pm 7,23$ mg TE/100g tại điều kiện nhiệt độ chiết là 60°C , thời gian chiết 40 phút và tỉ

lệ nguyên liệu/dung môi là 3/100 (g/ml). Tiến hành thí nghiệm kiểm chứng tại điểm tối ưu thu được kết quả như sau: hàm lượng polyphenol của dịch chiết rong *G. salicornia* đạt $93,95 \pm 3,05$ (mg GAE/100g) và khả năng chống oxy hóa khử sắt là $54,76 \pm 0,89$ (mg TE/100g). So sánh kết quả thực nghiệm và kết quả dự đoán cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) thể hiện sự phù hợp và đáng tin cậy của mô hình dự đoán.

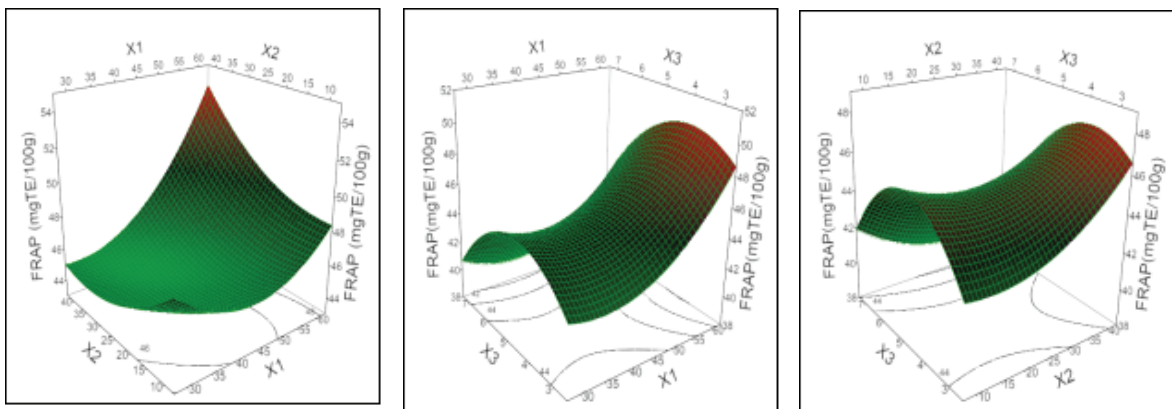
Tùy vào đối tượng nghiên cứu khác nhau sẽ có các điều kiện thời gian, nhiệt độ và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi khác nhau [1]. Cụ thể, Đặng Xuân Cường và cộng sự (2012) đã đưa ra điều kiện tối ưu để chiết tách các hợp chất sinh học từ rong nâu *Sargassum vietnamense* là nhiệt độ chiết 40°C , thời gian chiết là 31 giờ và tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 32/1(v/w) [2]. Một nghiên cứu khác trên đối tượng rong nâu *S. aemulum* cho thấy điều kiện chiết tối ưu là 48°C , thời gian chiết 36 giờ và tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 42/1 [3], cả hai nghiên cứu trên đều sử dụng phương pháp ngâm chiết truyền thống.

Bảng 5. Hệ số của phương trình hồi quy và kết quả phân tích phương sai

	Hàm lượng polyphenol		Khả năng chống oxy hóa sắt	
	Hệ số	Prob > t	Hệ số	Prob > t
b0	135,65	< 0,0001*	47,30	< 0,0001*
b1	-1,23	0,8190	-0,695	0,0227*
b2	0,17	0,0040*	-0,363	0,4439
b3	-9,94	< 0,0001*	6,55	0,0454*
b12	0,008	0,0720	0,0069	0,1238
b13	0,028	0,3412	-0,0158	0,5973
b23	-0,038	0,2096	-0,03	0,3164
b11	0,01	0,0426*	0,008	0,0912
b22	-0,003	0,4291	0,005	0,2795
b33	0,49	0,0664	-0,59	0,0433*



Hình 2. Biểu đồ 3D thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ (X1), thời gian (X2) và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (X3) đến hàm lượng polyphenol của dịch chiết rong *G. salicornia*.



Hình 3. Biểu đồ 3D thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ (X1), thời gian (X2) và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (X3) đến khả năng chống oxy khử sắt của dịch chiết rong *G. salicornia*.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được ảnh hưởng của các điều kiện chiết (nhiệt độ chiết, thời gian chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi) với sự hỗ trợ của siêu âm đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa khử sắt của rong đỏ *G. salicornia* thu nhận tại vùng biển Nha Trang, và tìm được thông số tối ưu cho quá trình chiết như sau: nhiệt độ 60°C, thời gian chiết 40 phút và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 3/100 (g/ml). Kết quả thực nghiệm kiểm chứng cho thấy các mô hình dự đoán hàm lượng polyphenol và

khả năng chống oxy hóa khử sắt của rong đỏ *G. salicornia* đáng tin cậy và phù hợp với thực nghiệm. Dịch chiết chứa các hợp chất polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa từ rong đỏ *G. salicornia* có thể được ứng dụng để ngăn ngừa và hạn chế quá trình oxy hóa lipid trong thực phẩm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài khoa học công nghệ cấp tỉnh Khánh Hòa (mã số: ĐT-2017-20902-ĐL).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Đặng Văn Giáp (2002), “Thiết kế và tối ưu hóa công thức và quy trình”, NXB Y học, Hà Nội.
2. Đặng Xuân Cường, Vũ Ngọc Bội, Trần Thị Thanh Vân (2012), “Tối ưu hóa quá trình tách chiết Phlorotannin từ rong nâu (*Sargassum vietnamense*) thu mẫu tại Nha Trang - Khánh Hòa”, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, số 3/2012, trang 83-87.
3. Đặng Xuân Cường, Vũ Ngọc Bội, Trần Thị Thanh Vân, Đào Trọng Hiếu (2013), “Tối ưu hóa công đoạn chiết Phlorotannin từ rong nâu *Sargassum aemulum*”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, số 3+4/2013, trang 135-139.

Tiếng Anh

4. Alfarsi, M. A., & Lee, C.Y. (2008), “Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds”, *Food Chemistry*, 108, 977-985.
5. Bi, Y., Lu, Y., Yu, H., & Luo, L. (2019), “Optimization of ultrasonic-assisted extraction of bioactive compounds from *Sargassum henslowianum* using response surface methodology”, *Pharmacognosy Magazine*, 15, 156-163.
6. Cuong, D. X., Boi, V. N., & Van, T. T. T. (2016), “Effect of storage time on phlorotannin content and antioxidant activity of six *Sargassum* species from Nhatrang Bay, Vietnam”, *Journal of Applied Phycology*, 28, 567-572.
7. Dang, D. H., & Hoang, T.M. (2004), “Nutritional analysis of Vietnamese seaweeds for food and medicine”, *BioFactors*, 22, 323-325.
8. Dang, T. T., Quan, V. V., Schreider, M. J., Bowyer, M. C., Van Altena, I. A., & Scarlett, C. J. (2017), “Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant activities of the alga *Hormosira banksii* using response surface methodology”, *Journal of Applied Phycology*, 29, 3161-3173.
9. Fernández-Barbero, G., Pinedo, C., Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., & García-Barroso, C. (2019), “Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) fruit through a Box-Behnken experimental design”, *Food Science and Technology*, 2061, 1-12.
10. Gertenbach, D. (2001), Solid - liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals, in: *Functional foods: biochemical and processing aspects*, Mazza, G., Maguer, M. L., Shi, J., (Eds.), CRC Press, Boca Raton, pp. 331-366.
11. Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010), “Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (*flavanone glycosides*) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel”, *Food Chemistry*, 119, 851-858.
12. Lecour, S., & T Lamont, K. (2011), “Natural polyphenols and cardioprotection”, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11, 1191-1199.
13. Pan, G., Yu, G., Zhu, C., & Qiao, J. (2012), “Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS)”, *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, 486-490.
14. Peschel, W., Sanchez, F., Plescher, A., Gartzia, I., Jimenez, D., Lamuela - Raventos, R., & Buxaderas, S. (2006), “An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes”, *Food Chemistry*, 97, 137-150.
15. Pham, H. N. T., Nguyen, V. T., Vuong, Q. V., Bowyer, M. C., & Scarlett, C. J. (2015), “Effect of extraction solvents and drying methods on the physicochemical and antioxidant properties of *Helicteres hirsuta* Lour.

Leaves”, *Technologies*, 3, 285-301.

16. Pham, H. N., Van Vuong, Q., Bowyer, M. C., & Scarlett, C. J. (2017), “Optimization of ultrasound-assisted extraction of *Helicteres hirsuta* Lour. for enhanced total phenolic compound and antioxidant yield”, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 7, 113-123.
17. Prakash Maran, J., Manikandan, S., Thirugnanasambandham, K., Vigna Nivetha, C., & Dinesh, R. (2013), “Box-Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide”, *Carbohydrate Polymers*, 92, 604-611.
18. Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Rees, J.F., & Larondelle, Y. (2007), “Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region”, *Food Chemistry*, 101, 1012-1018.
19. Stramarkou, M., Papadaki, S., Kyriakopoulou, K., & Krokida, M. (2017). Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*, *Journal of Applied Phycology*, 29, 2947-2960.
20. Thinh, P. D., Menshova, R. V., Ermakova, S. P., Anastyuk, S. D., Ly, B. M., & Zvyagintseva, T. N. (2013), “Structural characteristics and anticancer activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum mcclurei*”, *Marine Drugs*, 1456-1476.
21. Virot, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. C. G., Chemat, F. (2010), “Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction”, *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 1066-1074.
22. Vuong, Q. V., Hirun, S., Roach, P. D., Bowyer, M. C., Phillips, P. A., & Scarlett, C. J. (2013), “Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts”, *Journal of Herbal Medicine*, 3, 104-111.
23. Wang, J., Sun, B. G., Cao, Y. P., Tian, Y., & Li, X. H. (2008), “Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran”, *Food Chemistry*, 106, 804-810.