



ẢNH HƯỞNG QUÁ TRÌNH TRÍCH LY ĐẾN HÀM LƯỢNG POLYPHENOL VÀ KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HÓA TỪ ĐẬU NÀNH

Dương Thị Phượng Liên¹, Phan Thị Bích Trâm¹ và Hà Thanh Toàn³

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

³ Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/9/2014

Ngày chấp nhận: 07/11/2014

Title:

Effects of extraction process on polyphenol content and antioxidant activity of soybean

Từ khóa:

Đậu nành, polyphenol, flavonoid, trích ly, khả năng chống oxy hóa, trung hòa gốc tự do DPPH

Keywords:

Soybeans, phenolics, flavonoids, extraction, antioxidant activity, DPPH radical scavenging

ABSTRACT

In this research, a set of experiments was carried out for identifying the optimum conditions of independent variables affecting polyphenol content extraction efficiency and antioxidant activity of soybean seeds (*Glycine max* L.). They included the use of different organic solvents (methanol, ethanol and acetone); concentrations of solvent (40, 50, 60, 70, 80, and 90 v/v %); the soybean-to-solvent ratio (1:4, 1:6, 1:8 and 1:10) and the number extraction cycles (2, 3 and 4); the extraction time (2, 3 and 4 hours) and the temperature (30, 40, 50 and 60°C). The extraction abilities of polyphenols manifested in forms of total polyphenol and total flavonoid contents (TPC and TFC) as well as the antioxidant activity by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging (DPPH) were used as assessment indicators. Generally, high extraction yield was obtained using aqueous acetone 70% as solvent; the most suitable soybean-to-solvent ratio was 1:6 for 3 cycles of extraction. The extraction yield could further increase using 3 hours for each cycle of extraction at the temperature of 40°C.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành trên cơ sở xác lập điều kiện tối ưu của các biến phụ thuộc ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly polyphenol và khả năng chống oxy hóa của đậu nành (*Glycine max* L.). Các yếu tố khảo sát bao gồm loại dung môi sử dụng (methanol, ethanol và acetone); nồng độ dung môi (40, 50, 60, 70, 80 và 90 % v/v); tỷ lệ đậu nành trong dung môi (1:4, 1:6, 1:8, 1:10) và số lần trích ly (2, 3, 4); thời gian trích ly (2, 3, 4 giờ) và nhiệt độ (30, 40, 50, 60°C). Hiệu quả quá trình trích ly polyphenol thể hiện qua hàm lượng polyphenol tổng số (TPC) và flavonoid tổng số (TFC) cũng như hoạt tính chống oxy hóa thông qua khả năng trung hòa gốc tự do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) được sử dụng như chỉ tiêu đánh giá. Nhìn chung, hiệu suất trích ly cao khi sử dụng dung môi acetone 70%; tỷ lệ đậu nành và dung môi thích hợp là 1:6 với 3 lần trích ly. Hiệu suất trích ly có thể được nâng cao khi trích ly ở nhiệt độ 40°C trong 3 giờ cho mỗi lần trích.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu nành (*Glycine max* L. Merrill) là nguồn nguyên liệu thực phẩm được sử dụng rộng rãi và

được đánh giá như thành phần mong muốn tăng cường sức khỏe vì khả năng phòng chống ung thư, bệnh tim mạch, loãng xương và các triệu chứng mãn kinh (Adlercreutz và Mazur, 1997; Omoni và

Aluko, 2005; Bolanho và Beléia, 2011). Những lợi ích sức khỏe đáng kể đến là các polyphenol đậu nành có hoạt tính sinh học, bao gồm khả năng chống oxy hóa, chống tăng sinh, và các hiệu ứng làm giảm cholesterol cũng như liên kết với các thụ thể estrogen (Isanga và Zhang, 2008). Các hợp chất polyphenol được biết như chất chống oxy hóa và như vậy chúng có thể nhặt rác gốc tự do – được tạo thành trong cơ thể do các ảnh hưởng có hại của các loài phản ứng gây ra các oxit phân tử sinh học có thể làm hỏng các tế bào và gây ra những thay đổi cấu trúc mô (Madhavi *et al.*, 1995; Bolanho và Beléia, 2011).

Quá trình trích ly được biết đến rộng rãi như là một quá trình tách chiết chất có hoạt tính sinh học thực vật từ nguyên liệu (Chew *et al.*, 2011). Nhiều hệ dung môi khác nhau đã được sử dụng để chiết xuất polyphenol từ nguyên liệu thực vật (Chavan *et al.*, 2001). Cả hiệu suất trích ly và hoạt tính chiết xuất phụ thuộc rất lớn vào dung môi (Tân *et al.*, 2013). Năng lực chống oxy hóa của các hợp chất polyphenol bị tác động mạnh mẽ bởi độ phân cực của dung môi được sử dụng trích ly. Do đó, việc lựa chọn các dung môi là rất quan trọng đối với các mẫu nguyên liệu thực vật. Hệ dung môi trích ly thường được lựa chọn theo mục đích trích ly, khả năng phân cực của các thành phần mục tiêu, độ phân cực của các thành phần không mong muốn, tổng chi phí, an toàn và vấn đề môi trường (Wang *et al.*, 2008.). Dung môi acetone, ethanol và methanol đã được sử dụng rộng rãi để chiết xuất các thành phần polyphenol từ nguyên liệu thực vật, đặc biệt là các loại thảo mộc và cây thuốc (Tabart *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008.). Hiệu suất trích ly không chỉ phụ thuộc vào dung môi mà còn về phương pháp trích ly (Goli *et al.*, 2004.). Phương pháp trích ly phải cho phép hoàn thành trích ly các hợp chất mục tiêu và phải tránh biến đổi hóa học của chúng (Zuo *et al.*, 2002.). Ngoài ra, không có phương pháp trích ly duy nhất áp dụng cho tất cả các mẫu thực phẩm vì sự phức tạp của các hợp chất polyphenol và tương tác của nó với các hợp chất hoạt tính sinh học khác trong các mẫu thực phẩm. Một số yếu tố có thể góp phần ảnh hưởng đến tốc độ trích ly và chất lượng của các hợp chất polyphenol mang hoạt tính sinh học được chiết xuất, bao gồm cả phương pháp trích ly, loại dung môi, nồng độ dung môi, thời gian tiếp xúc hai pha, nhiệt độ trích ly, tỷ lệ nguyên liệu và dung môi cùng với kích thước hạt nguyên liệu (Chew *et al.*, 2011; Jin Dai *et al.*, 2010; Pinelo *et al.*, 2005).

Theo Silva *et al.* (2007), phương pháp chiết xuất các hợp chất polyphenol khác nhau cho từng

loại nguyên liệu thực vật và một phương pháp trích ly hợp chất phenol lý tưởng cho một nguồn nguyên liệu riêng biệt phải được thiết kế riêng và tối ưu hóa. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá hiệu quả của các loại dung môi, nồng độ dung môi, tỷ lệ đậu nành với dung môi cũng như số chu kỳ trích ly, nhiệt độ và thời gian trích ly đến khả năng tách hợp chất polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của chúng trong đậu nành.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Chuẩn bị nguyên liệu

Đậu nành (*Glycine max L.*, giống MTĐ 760) đã được cung cấp từ Bộ môn Di Truyền Giống Nông nghiệp, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ. Đậu nành sạch được nghiền nhỏ (Giao *et al.*, 2009), khử chất béo trong hệ thống Soxhlet với hexane trong 10 giờ (Weidner *et al.*, 2012) và được trữ ở 5°C sau khi loại bỏ hexane.

Khối lượng 0,5g bột đậu nành đã khử chất béo được chiết xuất mỗi lần với lượng dung môi theo tỷ lệ như bố trí trong thí nghiệm kết hợp với lắc đều, chiết xuất từ những lần trích được kết hợp để xác định TPC, TFC và khả năng chống oxy hóa.

2.2 Bố trí thí nghiệm

Nghiên cứu loại dung môi ảnh hưởng trên TPC, TFC và hoạt tính chống oxy hóa được thực hiện với ba loại dung môi là methanol, acetone và ethanol (70%, v/v). Nghiên cứu của nồng độ dung môi trên TPC, TFC và hoạt tính chống oxy hóa được thực hiện với nồng độ của dung môi tương ứng 40, 50, 60, 70, 80 và 90 (% v/v). Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ đậu nành trong dung môi (01:04, 01:06, 01:08 và 01:10) và số chu kỳ trích ly (2, 3 và 4 lần) trên TPC, TFC và hoạt tính chống oxy hóa được thiết kế dưới hình thức thí nghiệm hai yếu tố. Tương tự như vậy, các tác động của thời gian trích ly (2, 3 và 4 giờ) và nhiệt độ (30, 40, 50 và 60°C) trên TPC, TFC và hoạt tính chống oxy hóa được bố trí theo tác động của hai yếu tố và phương pháp giai thừa.

2.3 Phương pháp phân tích

Xác định TPC trong chiết xuất: TPC được ước tính bằng phương pháp Folin-Ciocalteu (Susu Giang *et al.*, 2013). Hàm lượng polyphenol tổng của mẫu được thể hiện qua mg đương lượng acid galic trên mỗi gram chất khô (mg GAE/g).

Xác định hàm lượng flavonoid tổng số (TFC): TFC được xác định bằng phương pháp đo màu như mô tả của Ozsoy *et al.* (2008). Các kết quả được

thể hiện qua mg đương lượng quercetin (QE) trên mỗi g chất khô mẫu phân tích (mg QE/g).

Hoạt tính chống oxy hóa: Hoạt tính chống oxy hóa của các hóa chất có hoạt tính sinh học được chiết xuất từ đậu nành được đánh giá bằng cách đo hoạt tính trung hòa gốc tự do thông qua phản ứng mất màu tím của dung dịch 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) trong methanol. Khảo nghiệm quang phổ này sử dụng gốc tự do DPPH ổn định như thuốc thử và đã được mô tả bởi Anshu *et al.* (2011).

Phân tích thống kê số liệu: Tất cả các kết quả thực nghiệm được phân tích bằng phần mềm Statgraphics Centurion (Phiên bản 15.2.11.0). Mỗi khảo nghiệm đã được thực hiện trong ba lần. Phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) với kiểm định LSD được sử dụng để xác định sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0.05$) giữa các trung bình.

Bảng 1: Ảnh hưởng của loại dung môi đến hàm lượng TPC, TFC và khả năng trung hòa gốc tự do của đậu nành

Loại dung môi	TPC (mg GAME/g)	TFC (mg QE/g)	Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH (%)
Methanol	2,44 ^c ± 0,02	0,89 ^c ± 0,03	57,7 ^c ± 0,38
Ethanol	2,61 ^b ± 0,01	1,11 ^b ± 0,03	71,0 ^b ± 0,44
Acetone	2,82 ^a ± 0,03	1,61 ^a ± 0,01	76,4 ^a ± 0,40

Thể hiện giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn, các chữ cái giống nhau biểu thị sự không khác biệt theo cột với mức ý nghĩa 5%

Các kết quả có được hoàn toàn phù hợp về độ phân cực của dung môi dùng để chiết tách và tính tan của các hợp chất polyphenol trong nguyên liệu. Độ phân cực của acetone, ethanol và methanol là 0,355, 0,654 và 0,762 tương ứng (Tân *et al.*, 2013). Dung dịch acetone trong nước là một dung môi tốt cho chất chống oxy hóa phân cực và hữu ích hơn để chiết xuất polyphenol từ phức hợp protein, khi chúng xuất hiện sẽ làm giảm liên kết phức polyphenol-protein (Chirinos *et al.*, 2007; Al-Farsi và Lee, 2008). Trong thực tế, việc sử dụng dung môi acetone trong nước có nhiều thuận lợi hơn việc sử dụng dung môi ethanol và methanol trong nước như hiệu suất trích ly cao hơn. Do đó, acetone

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của các loại dung môi đến hàm lượng TPC, TFC và hoạt tính chống oxy hóa từ chiết xuất đậu nành

Bảng 1 thể hiện hàm lượng TPC, TFC và khả năng trung hòa gốc tự do của đậu nành từ ba loại dung môi là acetone, methanol và ethanol. Trong các dung môi khảo sát, dung môi acetone cho hiệu suất trích ly polyphenols (TPC và TFC) hiệu quả nhất. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả về khả năng trung hòa gốc tự do DPPH. Hỗn hợp chiết xuất bằng dung môi acetone thể hiện khả năng trung hòa gốc tự do DPPH mạnh nhất (76,4%). Nhiều nghiên cứu trước đây đã cho thấy, acetone là dung môi tốt nhất cho chiết xuất proanthocyanidins và tannin (Chirinos *et al.*, 2007; Tabart *et al.*, 2007).

được sử dụng làm dung môi cho các giai đoạn tiếp theo của nghiên cứu này. Tuy nhiên, cần phải kiểm tra việc thay đổi tỷ lệ phần trăm nước trong acetone (% v/v) có thể nâng cao hiệu quả trích ly TPC từ đậu nành.

3.2 Ảnh hưởng của nồng độ dung môi acetone đến hàm lượng TPC, TFC và hoạt tính chống oxy hóa từ chiết xuất đậu nành

Ảnh hưởng của nồng độ dung môi acetone đến hàm lượng polyphenol, flavonoid và khả năng trung hòa gốc tự do DPPH trong dịch chiết đậu nành được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2: Ảnh hưởng của nồng độ dung môi acetone đến hàm lượng TPC, TFC và khả năng trung hòa gốc tự do của đậu nành

Loại dung môi	TPC (mg GAME/g)	TFC (mg QE/g)	Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH (%)
40	3,88 ^a ± 0,04	1,36 ^c ± 0,02	51,0 ^d ± 0,36
50	3,77 ^b ± 0,04	1,45 ^b ± 0,04	51,9 ^d ± 0,19
60	3,07 ^c ± 0,05	1,45 ^b ± 0,05	65,4 ^c ± 0,72
70	2,82 ^d ± 0,03	1,61 ^a ± 0,01	76,6 ^a ± 0,45
80	2,25 ^e ± 0,05	1,67 ^a ± 0,05	66,7 ^b ± 0,85
90	1,10 ^f ± 0,03	0,83 ^d ± 0,02	27,4 ^e ± 0,40

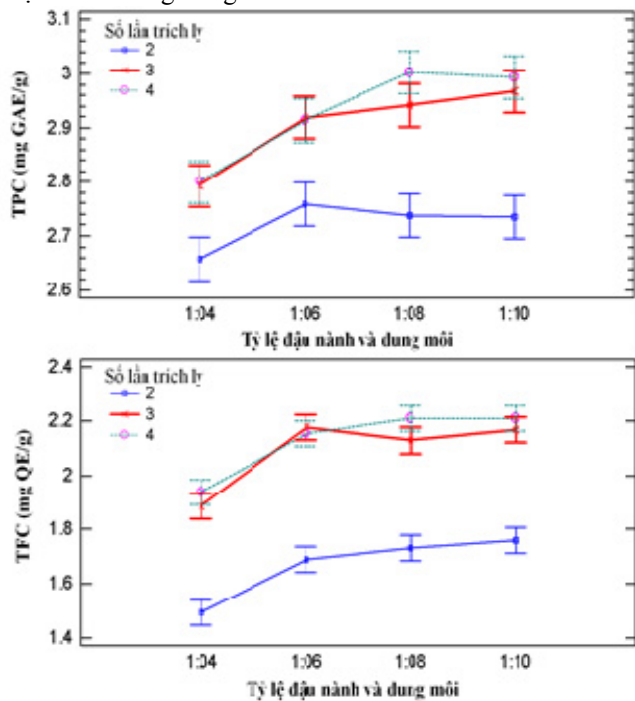
Thể hiện giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn, các chữ cái giống nhau biểu thị sự không khác biệt theo cột với mức ý nghĩa 5%

Nồng độ acetone có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng trích ly của cả TPC và TFC từ đậu nành, đồng thời chúng cũng ảnh hưởng đến khả năng trung hòa gốc tự do của đậu nành.

Như được thể hiện trong Bảng 2, hàm lượng TPC tăng khi giảm nồng độ acetone. Tuy nhiên, hàm lượng TFC biến đổi theo theo dạng đường cong theo nồng độ acetone và TFC đạt tối đa tương ứng với nồng độ acetone 70–80% (v/v) và lại giảm xuống có ý nghĩa ($p < 0,05$) khi tiếp tục tăng nồng độ acetone đến 90%. Sự thay đổi TFC tương tự với sự biến đổi về khả năng chống oxy hóa (Bảng 2), trong đó khả năng trung hòa gốc tự do đạt đến giá trị tối đa khi nồng độ acetone sử dụng là 70%. Quy tắc khác biệt trong sự thay đổi của TPC có thể là do khi hàm lượng nước nhiều hơn trong dung dịch acetone giúp các protein hòa tan trong nước trích nhiều hơn. Phản ứng của các protein hòa tan và thuốc thử Folin dẫn đến sự thay đổi giá trị đọc được của độ hấp thụ và làm sai lệch kết quả. Dựa vào các kết quả phân tích trên, nồng độ acetone 70% (v/v) được lựa chọn cho bước nghiên cứu tiếp theo.

3.3 Ảnh hưởng của tỷ lệ đậu nành và dung môi acetone cùng với số lần trích đến hàm lượng TPC, TFC từ chiết xuất đậu nành

Ảnh hưởng của tỷ lệ đậu nành trong dung môi



Hình 1: Ảnh hưởng tỷ lệ đậu nành trong dung môi và số lần trích ly đến TPC và TFC

Thể hiện qua giá trị trung bình và LSD, $p = 0,05$

acetone cùng số lần trích ly đến TPC và TFC được thể hiện trên Hình 1. Có thể quan sát thấy rằng cả số lần trích ly cùng với tỷ lệ đậu nành trong dung môi acetone ảnh hưởng đáng kể đến cả TPC và TFC. Tỷ lệ đậu nành trong dung môi là 1:06 (w/v) cho hàm lượng cao nhất của cả TPC và TFC. Gia tăng hơn nữa tỷ lệ đậu nành trong dung môi (tức từ 1:06–1:10) không tăng đáng kể ($p > 0,05$) hàm lượng của cả TPC và TFC. Theo Tân *et al.* (2011), một tỷ lệ dung môi cao có thể được tìm thấy và cho là thuận lợi trong việc trích ly các hợp chất polyphenol.

Các kết quả này phù hợp với nguyên tắc truyền khối mà động lực cho khối lượng chuyển khối được coi là gradient nồng độ giữa chất rắn và dung môi. Tỷ lệ dung môi cao có thể thúc đẩy một gradient nồng độ càng tăng, dẫn đến tăng tốc độ khuếch tán cho phép quá trình trích ly chất rắn bằng dung môi được tốt hơn (Cacace và Mazza, 2003; Al-Farsi và Chang, 2007). Ngoài ra, cơ hội của các thành phần hoạt tính sinh học tiếp xúc với dung môi trích ly được mở rộng với sự gia tăng lượng dung môi, dẫn đến tăng hiệu suất trích ly (Zhang *et al.*, 2007). Tuy nhiên, sản lượng thành phần hoạt tính sinh học sẽ không tiếp tục tăng khi đã đạt được sự cân bằng (Herodež *et al.*, 2003).

Trích ly nhiều lần là một phương pháp quan trọng để nâng cao sản lượng trích ly của polyphenol (Chen *et al.*, 2013). Ba chu kỳ trích ly cho kết quả cao hơn có ý nghĩa đối với cả hai thành phần TPC và TFC hơn so với sử dụng hai chu kỳ trích ly. Tuy nhiên, với bốn chu kỳ trích ly không thể cải thiện năng suất của cả hai thành phần TPC và TFC (Hình 1).

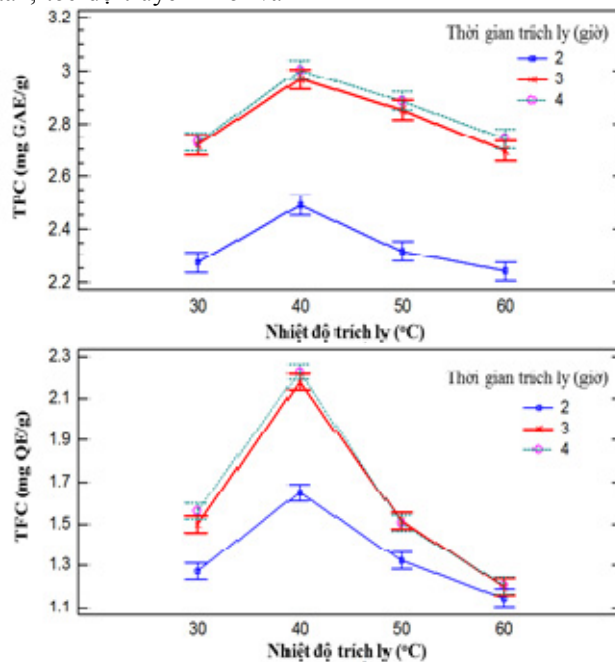
Từ kết quả thu được, tỷ lệ đậu nành và dung môi acetone là 1:06 (w/v) cùng với ba chu kỳ trích ly là điều kiện tối ưu để trích TPC và TFC từ đậu nành.

3.4 Ảnh hưởng của tỷ lệ đậu nành và dung môi acetone cùng với số lần trích đến hàm lượng TPC, TFC và hoạt tính chống oxy hóa từ chiết xuất đậu nành

Việc lựa chọn thời gian và nhiệt độ trích ly thích hợp là bước cuối cùng trong chuỗi thí nghiệm. Sự thay đổi của TPC và TFC theo thời gian và nhiệt độ trích ly được biểu diễn trên Hình 2. Ảnh hưởng của các yếu tố này đến khả năng chống oxy hóa được thể hiện trong Hình 3. Hàm lượng TPC và TFC tăng đáng kể theo nhiệt độ tăng và đạt đến đỉnh điểm tương ứng với nhiệt độ 40°C, sau đó giảm xuống có ý nghĩa ($p < 0,05$).

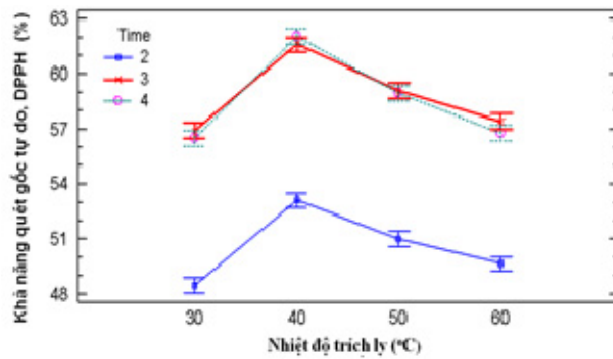
Theo Spigno *et al.* (2007), nhiệt độ trích ly tác động đến khả năng hòa tan, tốc độ truyền khối và

sự ổn định của các hợp chất polyphenol. Kết quả xác nhận thực tế là dưới một giới hạn nhất định, nhiệt độ cao nâng cao hiệu quả trích ly do tăng cường mức độ khuếch tán và độ hòa tan của chất phân tích trong các dung môi (Ju và Howard, 2003). Vượt quá giới hạn nhất định đó, nhiệt độ trích ly cao sẽ làm giảm TPC và TFC. Quan sát kết quả nghiên cứu cho thấy kéo dài thời gian trích ly từ 2 đến 3 giờ TPC và TFC trong dung môi tăng lên đáng kể. Tuy nhiên, không có khác biệt đáng kể cả TPC và TFC khi kéo dài thời gian trích ly lên đến 4 giờ. Kết quả này có thể được giải thích bằng định luật thứ hai của Fick về sự khuếch tán khi dự đoán trạng thái cân bằng cuối cùng giữa nồng độ chất tan trong ma trận chất rắn trong dung môi có thể đạt được sau một thời gian nhất định (Silva *et al.*, 2007). Ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ trích ly đến khả năng trung hòa gốc tự do DPPH cho thấy một xu hướng tương tự như đối với TPC và TFC (Hình 3). Kết quả thú vị là có mối tương quan tuyến tính rất chặt chẽ giữa khả năng trung hòa gốc tự do DPPH và TPC với $R^2 = 0,97$ (Hình 4). Điều này xác nhận rằng polyphenol có khả năng đóng góp vào các hoạt động quét gốc tự do (Miliauskas *et al.*, 2004). Kết quả tương tự cũng đã được công bố bởi các tác giả khác nhau (Katalinic *et al.*, 2004; Maksimovic *et al.*, 2005; Miliauskas *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005 và Turkmen *et al.*, 2006)



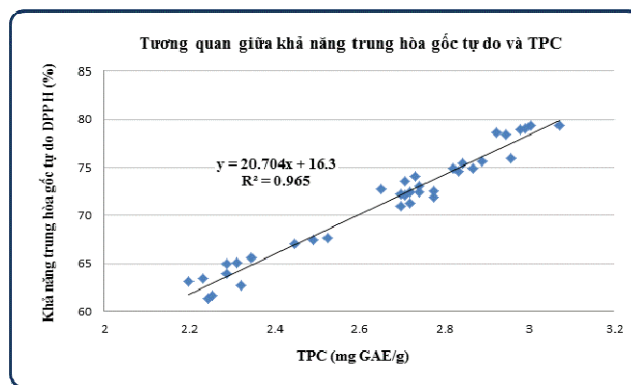
Hình 2: Ảnh hưởng nhiệt độ và thời gian trích ly đến TPC và TFC

Thể hiện qua giá trị trung bình và LSD, $p = 0,05$



Hình 3: Ảnh hưởng nhiệt độ và thời gian trích ly đến khả năng trung hòa gốc tự do

Thể hiện qua giá trị trung bình và LSD, $p = 0,05$



Hình 4: Tương quan giữa TPC và khả năng trung hòa gốc tự do

4 KẾT LUẬN

Acetone được chứng minh là dung môi tốt nhất để trích ly polyphenol từ đậu nành. Các điều kiện tối ưu cho quá trình trích TPC và TFC cũng như hoạt tính chống oxy hóa tối đa được xác định là nồng độ acetone 70% (v/v), tỷ lệ đậu nành trong dung môi tương ứng 1:06 (w/v) với ba chu kỳ với 3 giờ cho mỗi chu kỳ trích ly ở nhiệt độ 40°C. Với những điều kiện này, hàm lượng TPC và TFC là $2,97 \pm 0,04$ mgGAE/g (đb) và $2,18 \pm 0,06$ mgQE/g (đb) tương ứng. Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH đạt $78,96 \pm 0,34\%$ và có một mối tương quan chặt chẽ với tổng hàm lượng polyphenol.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adlercreutz H. and Mazur W. 1997. Phyto-oestrogens and western diseases. *Ann. Med.*, v. 29, p. 95-102.
2. Al-Farsi M. A. and Chang Y. L. 2007. Optimization of phenolics and dietary fiber extraction from date seeds. *Food Chemistry* 108: 977-985.
3. Al-Farsi M. A. and Lee C. Y. 2008. Optimization of phenolics and dietary fiber extraction from date seeds. *Food Chemistry* 108: 977-985.
4. Anshu Singh, Arindam Kuila, Geetanjali Yadav and Rintu Banerjee. 2011. Process Optimization for the Extraction of Polyphenols from Okara. *Food Technol. Biotechnol.* 49 (3) 322–328. ISSN 1330-9862.
5. Bolanho Beatriz Cervejeira, Adelaide Del Pino Beléia. 2011. Bioactive compounds and antioxidant potential of soy products. *Alim. Nutr., Araraquara*, v. 22, n. 4, p. 539-546, out./dez. 2011. ISSN 0103-4235, ISSN 2179-4448 on line.
6. Cacace J. E. and Mazza G. 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* 59: 379–389.
7. Chavan U. D., Shahidi F. and Naczka, M. 2001. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus L.*) as

- affected by different solvents. *Food Chemistry* 75: 509–512.
8. Chen Xiao-xin, Xiao-bing Wu, Wei-ming Chai, Hui-ling Feng, Yan Shi, Han-tao Zhou, Qing-xi Chen. 2013. Optimization of extraction of phenolics from leaves of *Ficus irens*. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 903-915. ISSN 1673-1581 (Print); ISSN 1862-1783 (Online), www.zju.edu.cn/jzus; www.springerlink.com.
 9. Chew K.K., Ng S.Y., Thoo Y.Y., Khoo M.Z., Wan Aida W.M. and Ho C.W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of Orthosiphon stamineus extracts. *International Food Research Journal*, 18: 1427-1435.
 10. Chirinos R., Rogez H., Campos D., Pedreschi R. and Larondelle Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology* 55(2): 217-225.
 11. Giao M.S., Pereira C.I., Fonseca S.C., Pintado M.E., Malcata F.X. 2009. Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants *Agrimonia eupatoria*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. *Food Chem.* 117, 412–416.
 12. Goli A. H., Barzegar M. and Sahari M. A. 2004. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry* 92:521–525.
 13. Herodež Š. S., Hadolin M., Škerget M. and Knez Ž. 2003. Solvent extraction study of antioxidants from *Melissa officinalis* L. leaves. *Food Chemistry* 80: 275-282.
 14. Isanga J. and Zhang G. (2008). Soybean bioactive components and their implications to health -a review. *Food Reviews International*, 24, 252–276.
 15. Jin Dai and Russell J. Mumper. 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15, 7313-7352; doi:10.3390/molecules15107313. ISSN 1420-3049, www.mdpi.com/journal/molecules.
 16. Ju ZY, Howard LR. 2003. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *J Agric Food Chem.* 51(18):5207–5213.
 17. Katalinic´ V., Milos M., Modun D., Music´ I. and Boban M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)- catechin. *Food Chemistry*, 80, 593–600.
 18. Madhavi D. L.; Deshpande S. S. and Salunkhe D. K. 1995. *Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives*. New York: Marcel Dekker, 490p.
 19. Maksimovic´ Z., Malenc´ic´ D. and Kovac´evic´ N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*, 96, 873–877.
 20. Miliuskas G., Venskutonis P. R. and Van Beek T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85, 231–237.
 21. Nihal Turkmen, Ferda Sari, Y. Sedat Velioglu. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry* 99, 835–841.
 22. Omoni A. O. and Aluko R. E. (2005). Soybean foods and their benefits: Potential mechanisms of action. *Nutrition Reviews*, 63, 272–283.
 23. Ozsoy N., Can A., Yanardag R. and Akev N. 2008. Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chemistry* 110: 571-583.
 24. Pinelo M., Rubilar M., Jerez M., Sineiro J. and Nuñez M. J. 2005. Effect of solvent, temperature, solvent to solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2111-2117.
 25. Silva E. M., Rogez H. and Larondelle Y. 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using

- response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 55: 381-387.
26. 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. *Journal of Food Engineering* 81: 200 – 208.
 27. Susu Jiang, Weixi Cai and Baojun Xu (2013) Food Quality Improvement of Soy Milk Made from Short-Time Germinated Soybeans. *Foods* 2, 198-212.
 28. Tabart J., Kevers C., Sipel A., Pincemail J., Defraigne J. O. and 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.
 29. Tan M. C., Tan C. P. and Ho C. W. 2013. Effects of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems. *International Food Research Journal* 20(6): 3117-3123.
 30. Tan P. W., Tan C. P. and Ho C. W. 2011. Antioxidant properties: Effects of solid-to-solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of Pegaga (*Centella asiatica*). *International Food Research Journal* 18: 557-562.
 31. Wang J., Sun B. G., Cao Y., Tian Y. and Li X. H. 2008. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry* 106: 804-810.
 32. Weidner S., Powalka A., Karamac M. and Amarowicz R. 2012. Extracts of phenolic compounds from seeds of three wild grapevines—Comparison of their antioxidant activities and the content of phenolic compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3444–3457.
 33. Yu J., Ahmedna M. and Goktepe I. (2005). Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chemistry*, 90, 199–206.
 34. Zhang S. Q., Bi H. M. and Liu C. J. 2007. Extraction of bio-active components from *Rhodiola sachalinensis* under ultrahigh hydrostatic pressure. *Separation and Purification Technology* 57: 277-282.
 35. Zuo Y., Chen H. and Deng Y. 2002. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, oolong, black and pureh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta* 57: Adlercreutz H. and Mazur W. 1997. Phyto-oestrogens and western diseases. *Ann. Med.*, v. 29, p. 95-102.