

TRÍCH LY POLYPHENOL TRONG NẤM THUỖNG HOÀNG VỚI SỰ HỖ TRỢ CỦA SÓNG SIÊU ÂM

Đến tòa soạn ngày 09/03/2021

Nguyễn Đức Vượng, Lê Thị Thuý Hoà, Lê Ngọc Anh, Trần Đình Thắng, Nguyễn Ngọc Tuấn
Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

SUMMARY

ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF POLYPHENOL FROM PHELLINUS IGNIARIUS

Phellinus igniarius has strong cell structure properties, making it difficult to extract and acquire bioactive compounds. Therefore, this study investigated the extraction process (alcohol solvent) of collecting polyphenol compounds from this fungus under the assistance of ultrasonic waves (UAE). The influencing factors include ultrasonic amplitude, alcohol solvent concentration, material-solvent ratio, extraction time and extraction temperature to total extracted polyphenol content were investigated. The total obtained polyphenols reached a maximum of 22.7 ± 0.8 mg/g at the extraction conditions including alcohol solvent concentration of 80%, ultrasonic amplitude of 25%, material-solvent ratio 1 - 30 (%w/v), extraction time of 280 minutes and use temperature at 60°C. These results of this study have useful reference value for studies related to polyphenol extraction from *Phellinus igniarius*.

Keywords: *Phellinus igniarius*, polyphenol, ultrasound, extraction.

1. GIỚI THIỆU

Phellinus igniarius (L.) Quel, 1886, một loại nấm nổi tiếng thuộc chi *Phellinus* là loại nấm được liệu được sử dụng rộng rãi ở Đông Á như Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc và các quốc gia khác để điều trị các bệnh với các hợp chất chuyển hóa thứ cấp khác nhau bao gồm polysaccharide, flavonoid, polyphenol, steroid và các acid hữu cơ [1-4]. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng polyphenol từ *Phellinus igniarius* có đặc tính chống oxy hóa và gây độc tế bào, ngăn ngừa đột quỵ do thiếu máu cục bộ [5], chống ung thư biểu mô gan ở người [6].

Quá trình trích ly được sử dụng rộng rãi như một quá trình tách chiết chất có hoạt tính sinh học từ thực vật [7]. Cho đến hiện nay nhiều loại dung môi khác nhau đã được sử dụng để chiết xuất polyphenol từ nguyên liệu thực vật [8-9]. Các yếu tố ảnh hưởng tới hiệu suất trích ly bao gồm loại dung môi, nồng độ và tỷ lệ

dung môi so với mẫu, nhiệt độ và thời gian trích ly, các biện pháp hỗ trợ khác như sóng siêu âm, hồng ngoại, v.v.

Phương pháp trích ly có hỗ trợ sóng siêu âm (Ultrasound Assisted Extraction – UAE) là phương pháp sử dụng năng lượng sóng siêu âm trong quá trình trích ly, làm tăng cường quá trình phá vỡ cấu trúc tế bào, tăng cường quá trình chuyển khối, từ đó có thể làm tăng hiệu suất trích ly [10]. UAE được áp dụng để hỗ trợ việc thu nhận các hợp chất bị phân hủy bởi nhiệt và không ổn định. UAE thường được sử dụng trong việc khai thác nhiều loại sản phẩm tự nhiên [11]. Trích ly với sự hỗ trợ của sóng siêu âm là một trong những phương pháp hiệu quả để tối ưu hóa hàm lượng của các hợp chất polyphenol được biết đến là có tác động tích cực đáng kể đến tốc độ chiết xuất trong công nghiệp hóa chất và thực phẩm [12]. Các yếu tố kỹ thuật ảnh hưởng tới hiệu suất trích ly cũng

như mức độ phá vỡ tế bào bao gồm công suất siêu âm, biên độ sóng siêu âm, tần số siêu âm; trong đó tần số siêu âm là yếu tố có ảnh hưởng mạnh nhất [13, 14].

Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố (bao gồm biên độ sóng siêu âm, nồng độ dung môi EtOH, tỷ lệ dung môi so với mẫu, nhiệt độ chiết và thời gian chiết) đến việc trích ly polyphenol từ nguyên liệu nấm thượng hoàng. Từ đó, xác định điều kiện thông số của quá trình trích ly với sự hỗ trợ của sóng siêu âm phù hợp. Bên cạnh hàm mục tiêu chính là hàm lượng polyphenol thu nhận được, sự phá vỡ cấu trúc của tế bào nấm thượng hoàng dưới tác động của vi sóng cũng được xác định.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Nấm thượng hoàng (*P. igriarius*) sau khi sấy lạnh được tiến hành nghiền mịn. Bột nấm thượng hoàng được cung cấp từ Công ty TNHH Linh Chi Vina. Địa chỉ tại 394/1 Hà Huy Giáp, phường Thạnh Lộc, quận 12, thành phố Hồ Chí Minh.

Thuốc thử Folin-Ciocalteu được cung cấp bởi Merck, Đức (HC97724201). Các hóa chất khác (cồn, sodium carbonate) ở dạng hóa chất phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của biên độ sóng siêu âm đến khả năng phá vỡ cấu trúc tế bào

Thí nghiệm được tiến hành với thiết bị siêu âm Ultrasonic Processor (Mỹ), tần số 20 kHz, công suất 750 watts. Máy có thể chỉnh các mức % công suất khác nhau. Khảo sát khả năng phá vỡ tế bào qua việc siêu âm ở các mức 0, 25 và 37%. Các yếu tố cố định khác bao gồm: khối lượng nấm thượng hoàng (đã được nghiền và đồng nhất) 7g, nồng độ dung môi 80%, tỷ lệ nguyên liệu với dung môi 1/ 20 (w/v), nhiệt độ trích ly 40°C và thời gian trích ly 20 phút.

Sau khi trích ly, tiến hành lọc để thu bã nguyên liệu. Cấu trúc tế bào được xác định bằng phương pháp chụp SEM.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của năm yếu tố đến đến polyphenol tổng thu được

Ảnh hưởng của năm yếu tố bao gồm nồng độ dung môi cồn, biên độ sóng siêu âm, tỷ lệ nguyên liệu - dung môi (w/v), nhiệt độ trích ly, và thời gian trích ly đến polyphenol tổng thu được được khảo sát lần lượt.

Khoảng sát lần lượt của các biến được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Tên và khoảng khảo sát của các yếu tố khảo sát

Số TT	Tên biến khảo sát	Khoảng khảo sát	Bước nhảy
1	Nồng độ dung môi cồn (%)	60 - 90	10
2	Biên độ sóng siêu âm (%)	20 - 35	5
3	Tỷ lệ nguyên liệu với dung môi (% w/v)	1/70 - 1/10	1/20
4	Nhiệt độ trích ly (°C)	40 - 70	10
5	Thời gian trích ly (phút)	250 - 340	30

Chuẩn bị 4 ống falcon, mỗi ống chứa 0,5g nấm thượng hoàng. Thêm dung môi cồn (nồng độ xác định) vào 4 ống chứa mẫu theo tỷ lệ nguyên liệu – dung môi xác định. Cài đặt nhiệt độ trích ly xác định bằng bể ổn nhiệt (water incubator), biên độ sóng siêu âm được điều chỉnh theo các mức % khác nhau, và tiến hành trích ly ở các khoảng thời gian khảo sát. Mẫu được đem đi lọc để thu được dung dịch trích ly. Sau đó định mức dung dịch tới 50ml bằng dung môi cồn.

Mẫu trắng và mẫu phân tích được chuẩn bị và đo độ hấp thu theo mục 2.2.7. Hàm lượng polyphenol tổng thu được được tính theo công thức (1) và được dùng làm tiêu chí đánh ảnh hưởng cũng như chọn kiện chiết tốt nhất của yếu tố khảo sát.

Điều kiện chiết tốt nhất của thí nghiệm trước được áp dụng vào thí nghiệm sau để khảo sát ảnh hưởng của yếu tố kế tiếp.

2.2.3. Định lượng polyphenol tổng thu được

Chuẩn bị mẫu đo độ hấp thu quang:

Polyphenol tổng được xác định theo phương pháp Folin – Ciocalteu (hay Folin – Denis) sử dụng acid galic làm chất chuẩn [15]. Lấy 1,0 ml dịch chiết mẫu đã được pha loãng 20 lần vào ống nghiệm. Cho 5,0 ml thuốc thử Folin –

Ciocalteu 10% vào ống nghiệm và lắc đều. Cho 4,0 ml Na₂CO₃ 7,5% vào ống nghiệm rồi đập nắp và lắc đều. Mẫu được giữ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Mẫu được đo độ hấp thụ ở bước sóng ở 765nm. Mẫu trắng được tạo tương tự như các mẫu phân tích nhưng 1,0 ml mẫu dịch chiết được thay bằng 1,0 ml nước cất.

Xác định polyphenol tổng:

Polyphenol tổng thu được được xác định theo khối lượng mẫu nấm và được tính theo công thức (1):

$$X \text{ (mg/g)} = \frac{C_x}{C} \cdot \frac{1}{a} \cdot \frac{V_{dm}}{100 - W} \cdot k \quad (1)$$

Trong đó:

X: Hàm lượng chất trong 1 gam mẫu khô (mg/g mẫu khô)

C_x: polyphenol tổng có trong dịch trích ly được tính toán từ đường chuẩn (µg/ml)

a: khối lượng mẫu ngâm cao chiết (g)

C: giá trị quy đổi ppm (C = 10³)

V_{dm}: thể tích dịch chiết sau khi định mức (ml)

k: hệ số pha loãng (nếu có)

W: độ ẩm mẫu (%)

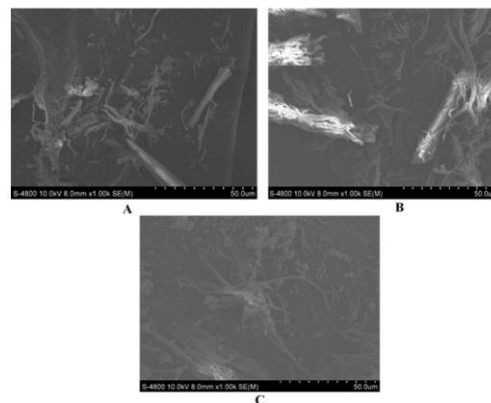
2.3. Xử lý và đánh giá số liệu

Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Kết quả được lấy là trung bình của 3 lần lặp lại ± độ lệch chuẩn. Phân tích phương sai ANOVA với khoảng tin cậy 95% được lựa chọn kết hợp với kiểm định hậu nghiệm Tukey HSD được áp dụng để xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê hay không khi thay đổi giá trị của các yếu tố khảo sát.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của biên độ sóng siêu âm đến khả năng phá vỡ cấu trúc tế bào

Trích ly là quá trình tác động lên cấu trúc tế bào để giải phóng các hợp chất bên trong nguyên liệu việc này là quá trình dựa vào một tác động lên tế bào nguyên liệu. Việc sử dụng sóng siêu âm là sử dụng công suất tác động vào tế bào làm phá vỡ cấu trúc của nó để giải phóng các hợp chất ra ngoài dung môi chiết. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong Hình 1 cho thấy, việc sử dụng sóng siêu âm có ảnh hưởng đến việc phá vỡ cấu trúc tế bào nấm.



Hình 1. Kết quả chụp SEM của các mẫu nấm Thượng hoàng ở độ phóng đại 5000. Mẫu không có tác động của sóng siêu âm (A); Mẫu có tác động của sóng siêu âm ở mức 25% (B); Mẫu có tác động của siêu âm ở mức 37% (C) Hình 1 cho thấy, so với mẫu không có tác dụng của sóng siêu âm thì mẫu có biên độ sóng siêu âm là 25% thì đã có sự thay đổi về cấu trúc tế bào và khi tăng lên 37% thì mức độ thay đổi về mặt cấu trúc nấm có tỷ lệ cao hơn và các sợi nấm có mức độ đứt gãy cao hơn nhiều so với mẫu có biên độ thấp.

Điều này có thể nói biên độ sóng siêu âm có mức độ ảnh hưởng đến cấu trúc tế bào nấm, việc sử dụng sóng siêu âm làm phá vỡ cấu trúc tế bào của các sợi nấm với biên độ cao hơn thì mức độ phá vỡ càng cao. Mà việc phá vỡ cấu trúc tế bào giúp giải phóng các hợp chất chứa hoạt tính sinh học bên trong nội bào ra bên ngoài dung môi trong đó có hợp chất polyphenol. Có thể nói, trích ly có hỗ trợ sóng siêu âm có hiệu quả trích ly các hợp chất nói chung và polyphenol nói riêng từ nấm Thượng hoàng đem lại hiệu quả cao.

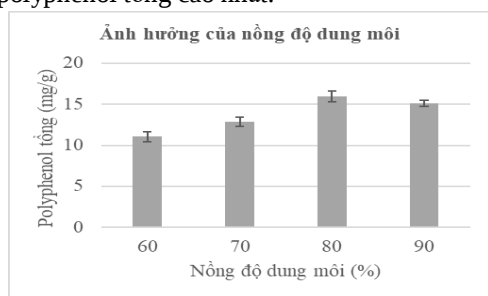
3.2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hiệu suất trích ly tính theo hàm lượng polyphenol

Kết quả thí nghiệm được trình bày trong Hình 2, cho thấy nồng độ dung môi là yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình trích ly polyphenol từ nấm Thượng hoàng.

Từ Hình 2 cho thấy, khi nồng độ dung môi tăng từ 60 lên 80% hàm lượng polyphenol tổng trong các mẫu tăng dần từ 11,1 ± 0,6 lên 15,9 ± 0,6 mg/g và khi nồng độ còn là 90% thì hàm lượng lại giảm (15,1 ± 0,3 mg/g). Nguyên nhân

được giải thích là khi nồng độ tăng quá cao sẽ làm thành tế bào bị mất nước cục bộ dẫn đến hiện tượng các tế bào bị khô và co lại ngăn chặn quá trình trích ly [16]. Có thể thấy nồng độ dung môi ảnh hưởng nhiều đến việc hòa tan các chất có hoạt tính sinh học vì thế cần khảo sát và chọn loại dung môi thích hợp với phương pháp trích ly và hợp chất mong muốn trích ly. Điều này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Thị Ngọc Thúy và cộng sự (2020) khi khảo sát sự ảnh hưởng của dung môi và pH ảnh hưởng đến quá trình trích ly các hợp chất có khả năng kháng oxy hóa từ tía tô [17].

Kết quả cho thấy có tồn tại sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$); kết hợp với kết quả kiểm định hậu nghiệm cho thấy mẫu trích ly bằng dung môi cồn có nồng độ 80% cho giá trị polyphenol tổng cao nhất.



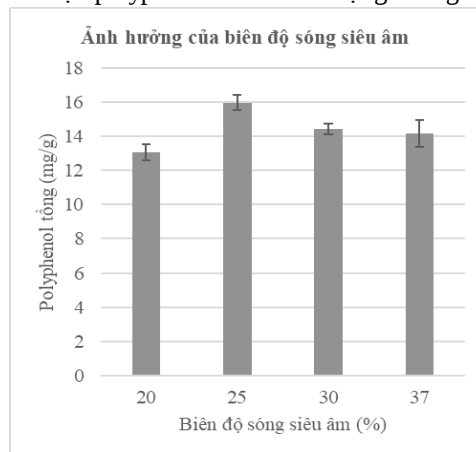
Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến polyphenol tổng thu được

3.3. Ảnh hưởng của biên độ sóng siêu âm đến hàm lượng polyphenol tổng thu được
Biên độ sóng siêu âm là một yếu tố quan trọng trong việc chiết xuất hợp chất trong nguyên liệu. Kết quả thu được được trình bày trong Hình 3 cho thấy biên độ sóng siêu âm ảnh hưởng đến quá trình trích ly nấm Thượng Hoàng. Polyphenol tổng thu được tăng từ 13,1 ± 0,4 lên 15,9 ± 0,4 mg/g khi biên độ sóng tăng từ 20 lên 25%. Tuy nhiên khi tăng biên độ lên 30% (14,4 ± 0,3 mg/g) và 37% (14,1 ± 0,7 mg/g) thì hàm lượng polyphenol lại giảm với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Biên độ sóng siêu âm có ảnh hưởng đến cấu trúc tế bào nấm, từ đó các hợp chất mang hoạt tính sẽ được giải phóng đi ra ngoài dung môi nên khi biên độ càng cao thì sẽ phá vỡ được nhiều cấu trúc tế bào làm giải phóng được nhiều hoạt tính sinh học như polysaccharide và polyphenol. Tuy nhiên theo kết quả thu được hàm lượng polyphenol trong dịch trích ly của mẫu qua xử lý siêu âm tại biên độ 30 và 37% thấp đi so với hàm lượng này trong mẫu được

xử lý ở biên độ 25%. Điều này có thể giải thích là do ở biên độ sóng lớn, cấu trúc tế bào nấm bị tác động mạnh, có thể làm cho các hợp chất trong đó bị biến tính nên làm giảm hàm lượng polyphenol trong dịch trích ly.

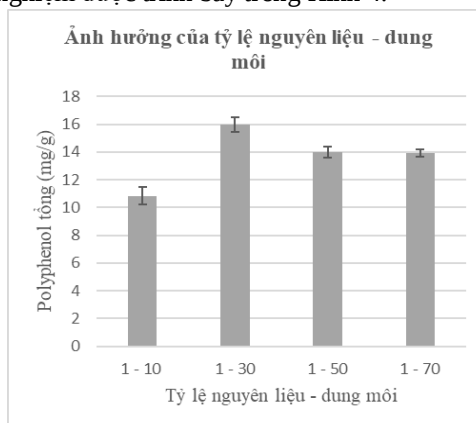
Kết quả cho thấy với giá trị biên độ của sóng siêu âm là 25%, dịch trích ly thu được hàm lượng polyphenol tổng cao nhất. Đây là một kết quả hấp dẫn và có tính tham khảo cao cho các nghiên cứu tiếp theo liên quan đến trích ly thu nhận polyphenol từ nấm Thượng hoàng.



Hình 3. Ảnh hưởng của biên độ sóng siêu âm đến hàm lượng polyphenol tổng thu được

3.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu – dung môi đến hàm lượng polyphenol tổng thu được

Tỷ lệ nguyên liệu – dung môi là một yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly polyphenol. Lượng dung môi tối thiểu phải đảm bảo ngập qua bề mặt của nguyên liệu khi đó nguyên liệu mới có thể tiếp xúc với dung môi. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong Hình 4.



Hình 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu – dung môi đến hàm lượng polyphenol tổng thu được

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu – dung môi đến hàm lượng polyphenol

tổng thu được được trình bày ở Hình 4. Với kết quả phân tích phương sai và kiểm định hậu nghiệm, tỷ lệ nguyên liệu – dung môi giảm từ 1 – 10 lên 1 – 30 ($10,8 \pm 0,6$ lên $15,1 \pm 0,5$ mg/g) thì hàm lượng polyphenol thu được càng tăng và cao nhất ở tỷ lệ là 1/30 với $p < 0,05$ có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (theo kết quả phân tích ANOVA 1 yếu tố). Tuy nhiên khi tiếp tục tăng tỷ lệ lên thì hàm lượng polyphenol lại giảm nhẹ với 2 tỷ lệ còn lại (1 – 50, 1 – 70).

Theo bài nghiên cứu của Cacace và cộng sự (2003) cho rằng tỷ lệ dung môi cao có thể thúc đẩy mức độ chênh lệch gradient nồng độ càng tăng, việc này dẫn đến tăng tốc độ khuếch tán của quá trình trích ly chất rắn bằng dung môi được tốt hơn [18]. Việc này trợ giúp các hợp chất mang hoạt tính sinh học tiếp xúc với dung môi trích ly làm tăng hiệu suất.

Với tỷ lệ dung môi và nguyên liệu càng lớn thì hiệu suất chiết xuất càng cao tuy nhiên nếu đạt được tỷ lệ với hiệu suất trích ly cao nhất khi càng tăng nồng độ thì hàm lượng hợp chất chiết xuất ra là giảm. Nguyên nhân là khi đạt được tỷ lệ tối ưu giữa các mẫu thì hàm lượng polyphenol đã chiết xuất ra hết lúc này có sự chênh lệch nồng độ giữa bã mẫu và dung môi trích ly nên 1 phần nồng độ sẽ đi vào bã để tạo nên cân bằng nồng độ nên sẽ có hiện tượng giảm nhẹ ở mẫu tỷ lệ 1/50, tuy nhiên ở các tỷ lệ mẫu sau cùng lại giữ ở mức ổn định.

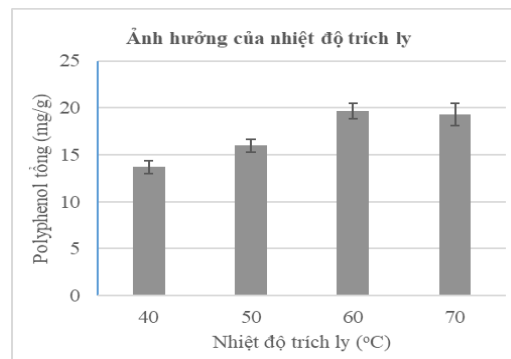
Việc này nếu lựa chọn tỷ lệ không hợp lý sẽ làm tốn thời gian và dung môi trích ly nếu lượng dung môi ít thì dẫn đến trích ly không hoàn toàn, lượng dung môi lớn thì có thể gây lãng phí vì vậy với tỷ lệ 1 – 30 là phù hợp.

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng thu được

Nhiệt độ có tác dụng làm tăng khả năng hòa tan và khuếch tán các hợp chất, khi nhiệt độ tăng quá cao sẽ dẫn đến phá vỡ hay biến đổi hợp chất sinh học. Kết quả khảo sát giữa các mẫu được trình bày ở Hình 5 cho thấy được việc ảnh hưởng đáng kể của nhiệt độ trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng. Từ kết quả ở Hình 5 ta thấy khi nhiệt độ trích ly tăng từ 40 lên 60°C thì hàm lượng polyphenol cũng tăng

từ $13,6 \pm 0,6$ lên $19,6 \pm 0,8$ mg/g tuy nhiên khi tiếp tục tăng lên 70°C thì hàm lượng polyphenol lại giảm ($19,2 \pm 1,1$ mg/g) điều này có thể giải thích là khi tăng nhiệt lên cao thì polyphenol trong dịch trích ly bị phá hủy một phần dẫn đến việc giảm. Phân tích phương sai kết hợp với kiểm định hậu nghiệm cho thấy kết quả có tồn tại sự khác biệt đáng kể có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Các nghiên cứu trước đây đã nhận định năng suất chiết xuất hợp chất polyphenol sẽ tăng lên khi tăng nhiệt độ chiết. Bên cạnh đó nhiệt độ có thể tăng cường thu hồi các hợp chất polyphenol từ nguyên liệu thực vật bằng cách tăng mức độ khuếch tán của dung môi vào tế bào thực vật và cũng tăng cường khả năng hòa tan của hợp chất polyphenol vào dung môi chiết [18, 19].



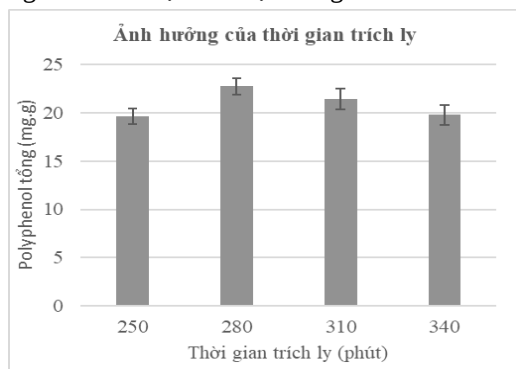
Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng thu được

Thêm vào đó theo nghiên cứu của Juntachote và cộng sự (2006) đã báo cáo rằng nhiệt độ quá trình trích ly cao sẽ làm tăng sự chuyển khối của các hợp chất polyphenol và cũng làm giảm độ nhớt của dung môi và sức căng bề mặt nên thúc đẩy quá trình trích ly polyphenol. Ngoài ra, việc gia nhiệt nhẹ sẽ là mềm mô thực vật do đó thuận lợi cho việc giải phóng các hợp chất polyphenol trong nguyên liệu [20].

3.6. Ảnh hưởng của thời gian trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng thu được

Thời gian siêu âm là yếu tố quan trọng trong việc chiết các hợp chất polyphenol vì thời gian siêu âm có tác động đến hiệu suất trích ly đồng thời còn có tác động đến thời gian và chi phí tiến hành. Nhiệt độ trích ly ảnh hưởng nhiều

đến bản chất của hoạt tính sinh học. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trong Hình 6.



Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng thu được

Kết quả phân tích được trình bày trong Hình 6, với kết quả phân tích phương sai và kiểm định hậu nghiệm, thời gian trích ly tăng từ 250 lên 280 phút thì hàm lượng polyphenol thu được cũng tăng đáng kể (từ $19,6 \pm 0,8$ lên $22,7 \pm 0,8$ mg/g) với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng thời gian lên thì hàm lượng polyphenol lại giảm dần với 310 và 340 phút. Điều này có thể giải thích là do hầu hết các hoạt chất sinh học nhạy cảm với nhiệt độ cao, giữ gia nhiệt ở thời gian dài sẽ dẫn đến sự phân hủy các hoạt chất sinh học tương tự trong báo cáo nghiên cứu của Vũ Hồng Sơn và Hà Duyên Tư (2009) [21].

4. KẾT LUẬN

Sóng siêu âm có ảnh hưởng đến sự phá vỡ tế bào nấm thương hoàng. Điều này dẫn đến hệ quả ảnh hưởng đến tổng hàm lượng polyphenol thu nhận trong quá trình trích ly khi có hỗ trợ của sóng siêu âm. Bên cạnh ảnh hưởng của sóng siêu âm, các yếu tố khác bao gồm nồng độ dung môi còn, tỷ lệ nguyên liệu - dung môi (w/v), nhiệt độ trích ly, và thời gian trích ly cũng đều có ảnh hưởng đến tổng polyphenol thu được sau quá trình chiết. Điều kiện trích ly phù hợp đã được xác định. Tại điều kiện trích ly này, hàm lượng polyphenol tổng đạt được là $22,759 \pm 0,858$ mg/g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. T. Nakamura, S. Matsugo, Y. Uzuka, S. Matsuo, and H. Kawagishi, *Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured Phellinus linteus*, Bioscience,

- biotechnology, and biochemistry, **68**(4), p. 868-872, (2004).

2. W. Dong, L. Ning, W.-d. Lu, C.-c. Li, R.-p. Chen, X.-n. Jia, L. Wang, and L.-z. Guo, *Tumor-inhibitory and liver-protective effects of Phellinus igniarius extracellular polysaccharides*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, **25**(4), p. 633-638, (2009).

3. X.-k. Ma, D. dan Guo, E. C. Peterson, Y. Dun, and D. yang Li, *Structural characterization and anti-aging activity of a novel extracellular polysaccharide from fungus Phellinus sp. in a mammalian system*, Food & function, **7**(8), p. 3468-3479, (2016).

4. Y. Wang, J.-x. Yu, C.-l. Zhang, P. Li, Y.-s. Zhao, M.-h. Zhang, and P.-g. Zhou, *Influence of flavonoids from Phellinus igniarius on sturgeon caviar: antioxidant effects and sensory characteristics*, Food Chemistry, **131**(1), p. 206-210, (2012).

5. I.-K. Lee and B.-S. Yun, *Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi Phellinus and Inonotus spp., and their medicinal importance*, The Journal of antibiotics, **64**(5), p. 349-359, (2011).

6. T.-Y. Song, H.-C. Lin, N.-C. Yang, and M.-L. Hu, *Antiproliferative and antimetastatic effects of the ethanolic extract of Phellinus igniarius (Linneaus: Fries) Quelet*, Journal of ethnopharmacology, **115**(1), p. 50-56, (2008).

7. K. Chew, M. Khoo, S. Ng, Y. Thoo, W. W. Aida, and C. Ho, *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**(4), p. 1427, (2011).

8. U. Chavan, F. Shahidi, and M. Naczsk, *Extraction of condensed tannins from beach pea (Lathyrus maritimus L.) as affected by different solvents*, Food Chemistry, **75**(4), p. 509-512, (2001).

9. Q.-W. Zhang, L.-G. Lin, and W.-C. Ye, *Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review*, Chinese medicine, **13**(1), p. 1-26, (2018).

10. T. J. Mason, E. Riera, A. Vercet, and P. Lopez-Buesa, *Application of ultrasound*, in *Emerging technologies for food processing*. 2005, Elsevier. p. 323-351.
11. F. Chemat, N. Rombaut, A.-G. Sicaire, A. Meullemiestre, A.-S. Fabiano-Tixier, and M. Abert-Vian, *Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review*, *Ultrasonics sonochemistry*, **34** p. 540-560, (2017).
12. X. Chen, X. Li, X. Zhu, G. Wang, K. Zhuang, Y. Wang, and W. Ding, *Optimization of Extrusion and Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Jizi439 Black Wheat Bran*, *Processes*, **8**(9), p. 1153, (2020).
13. M. K. Khan, M. Abert-Vian, A.-S. Fabiano-Tixier, O. Dangles, and F. Chemat, *Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (Citrus sinensis L.) peel*, *Food Chemistry*, **119**(2), p. 851-858, (2010).
14. Y. Ma, X. Ye, Y. Hao, G. Xu, G. Xu, and D. Liu, *Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (Citrus reticulata) peel*, *Ultrasonics sonochemistry*, **15**(3), p. 227-232, (2008).
15. V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent*, *Methods in enzymology*, **299** p. 152-178, (1999).
16. J. Lako, V. C. Trenerry, M. Wahlqvist, N. Wattanapenpaiboon, S. Sotheeswaran, and R. Premier, *Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods*, *Food Chemistry*, **101**(4), p. 1727-1741, (2007).
17. N. T. N. Thúy, N. T. T. Huyền, T. Q. Duy, P. H. T. Nga và C. T. C. Tú, *Ảnh hưởng của dung môi và pH đến quá trình trích ly các hợp chất có khả năng kháng oxy hóa từ tía tô (Perilla frutescens)*, *Tạp chí khoa học công nghệ và thực phẩm*, **14**(1), p. 66, (2020).
18. J. Cacace and G. Mazza, *Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries*, *Journal of Food Engineering*, **59**(4), p. 379-389, (2003).
19. W. Vongsangnak, J. Gua, S. Chauvatcharin, and J.-J. Zhong, *Towards efficient extraction of notoginseng saponins from cultured cells of Panax notoginseng*, *Biochemical Engineering Journal*, **18**(2), p. 115-120, (2004).
20. T. Juntachote, E. Berghofer, F. Bauer, and S. Siebenhandl, *The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary*, *International journal of food science & technology*, **41**(2), p. 121-133, (2006).
21. V. H. Sơn và H. D. Tư, *Nghiên cứu trích li polyphenol từ chè xanh vụn. Phần 1. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích li polyphenol*, *Tạp chí khoa học công nghệ và thực phẩm*, **1**, (2009).