

25. Y. Zhang, H. Xiong, X. Xu, X. Xue, M. Liu, S. Xu and X. Li (2018). Compounds identification in semen cuscuteae by ultra-high-performance liquid chromatography (UPLCs) coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, 23(5), 1199. Doi: 10.3390/molecules23051199.
26. Abdulla, R., Mansur, S., Lai, H., Ubul, A., Sun, G., Huang, G., & Aisa, H. A. (2017). Qualitative analysis of polyphenols in macroporous resin pretreated pomegranate husk extract by HPLC - QTOF - MS. *Phytochem Anal*, 28(5), 465 - 473. Doi: 10.1002/pca.2695.
27. Y. Hassaan, H. Handoussa, A. H. El-Khatib, M. W. Linscheid, N. El Sayed, and N. Ayoub (2014). Evaluation of plant phenolic metabolites as a source of Alzheimer's drug leads, *Biomed Res Int*, 1014(1), 843263. Doi: 10.1155/2014/843263.
28. R. Jaiswal, H. Karakoşse, S. Rußmann, K. Goldner, M. Neumueller, D. Treutter, and N. Kuhnert (2013). Identification of phenolic compounds in plum fruits (*Prunus salicina* L. and *Prunus domestica* L.) by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry and characterization of varieties by quantitative phenolic fingerprints. *J Agric Food Chem*, 61(49), 12020 - 31. Doi: 10.1021/jf402288j.
29. C. Jiang and P. J. Gates (2024). Systematic Characterisation of the Fragmentation of Flavonoids Using High-Resolution Accurate Mass Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *Molecules*, 29(22), 5246. Doi: 10.3390/molecules29225246.
30. Y. Sun, L. Liu, Y. Peng, B. Liu, D. Lin, L. Li, and S. Song (2015). Metabolites characterization of timosaponin AIII in vivo and in vitro by using liquid chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 997, 236 - 43. Doi: 10.1016/j.jchromb.2015.06.015.
31. A.F. Alves, A. Katchborian-Neto, P.C.P. Bueno, F. Carnevale-Neto, R. Casoti, M.S. Ferreira... and D. A. Chagas-Paula (2024). LC-MS/DIA-based strategy for comprehensive flavonoid profiling: an *Ocotea* spp. applicability case. *RSC advances*, 14(15), 10481-10498. Doi: 10.1039/D4RA01384K.
32. L. d. S. Farias and A. S. Mendez (2014). LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata* subsp. pruinosa," *Quimica Nova*, 37, 483-486. Doi: 10.5935/0100-4042.20140069.
33. J. Cao, C. Yin, Y. Qin, Z. Cheng, and D. Chen (2014). Approach to the study of flavone di - C - glycosides by high performance liquid chromatography - tandem ion trap mass spectrometry and its application to characterization of flavonoid composition in *Viola yedoensis*. *J Mass Spectrom*, 49(10), 1010-1024. Doi: 10.1002/jms.3413.
34. T. Du, Y. Wang, H. Xie, D. Liang, and S. Gao (2024). Fragmentation Patterns of Phenolic C-Glycosides in Mass Spectrometry Analysis. *Molecules*, 29(13), 2953. Doi: 10.3390/molecules29132953
35. M. A. Farag, A. Porzel, J. Schmidt, and L. A. Wessjohann (2012). Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L.(hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. *Metabolomics*, 8, 492 - 507. Doi: 10.1007/s11306-011-0335-y
36. X. Li, H. Liu, J. Li, X. Zhao, S. Wang, and X. Zheng (2009). Simultaneous determination of Berberine and Palmatine in rabbit plasma by LC-MS-MS and its application in pharmacokinetic study after oral administration of Coptidis and Coptidis-Gardeniae couple extract, *Chromatographia*, 70, 1113 - 1119. Doi: 10.1365/s10337-009-1308-4
37. D. Escobar-Avello, J. Lozano-Castellón, C. Mardones, A. J. Pérez, V. Saéz, S. Riquelme... and A. Vallverdú-Queralt (2019). Phenolic profile of grape canes: Novel compounds identified by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS, *Molecules*, 24(20), 3763.
38. N. Kuhnert, M. N. Clifford, and A. Müller (2010). Oxidative cascade reactions yielding polyhydroxy-theaflavins and theacitrins in the formation of black tea thearubigins: Evidence by

- tandem LC-MS. *Food & Function*, 1(2), 180 - 199. Doi: 1039/C0FO00066C.
39. C. E. Randolph, D. L. Marshall, S. J. Blanksby, and S. A. McLuckey (2020). Charge-switch derivatization of fatty acid esters of hydroxy fatty acids via gas-phase ion/ion reactions, *Anal chimica acta*, 1129, 31 - 39. Doi: 10.1016/j.aca.2020.07.005.
40. L. Zhao, R. S. Pei, B. P. Ji, Y. C. Luo, D. Zhang, Z. Y. Xu, and X. N. Jia (2010). Antioxidant activity of aqueous extract fractions of velvet antler (*Census elaphus Linnaeus*). *Journal of Food and Drug Analysis*, 18(5), 3.
41. S. Rodriguez, J.-L. Wolfender, J. Msonthi, and K. Hostettmann (1996). Quantitative and qualitative analysis of the saponins from berries of cultivated *Phytolacca dodecandra* by LC/UV and LC/MS. UZ Publications, 283 - 295.
42. J. Kaur, V. Dhiman, S. Bhadada, O. P. Katare and G. Ghoshal (2022). LC/MS guided identification of metabolites of different extracts of *Cissus quadrangularis*. *Food Chem Adv* 1, 100084. Doi: 10.1016/j.focha.2022.100084.

STUDYING THE EFFECT OF ULTRASOUND ON THE EXTRACTION OF POLYPHENOL AND SAPONIN FROM *Musa balbisiana* CORM AND INFLORESCENCE

Hoang Thi Ngoc Nhon¹, Luu Thi Quynh Hoa¹,

Ngo Thi Huyen Trang¹, Le Thi Hong Anh¹

¹*Ho Chi Minh city University of Industry and Trade*

Abstract

Musa balbisiana corm and inflorescence contain lots of health-promoting active ingredients such as saponins and polyphenols. This study aims to evaluate the effectiveness of ultrasound-assisted extraction (UAE) on the efficiency on extraction to obtain polyphenol- and saponin-rich extracts from corm and inflorescence of *M. balbisiana*, thereby optimizing the extraction process. The results showed that UAE resulted in total polyphenol content (TPC) of 60.22 mgGAE/gdm (corm) and 50.06 mg GAE/gdm (inflorescence), respectively and total saponin content (TSC) values of 51.11 mg/gdm (corm) and 54.12 mg/gdm (inflorescence). Under optimal conditions with 30.07% ultrasonic amplitude for 15.30 min of ultrasonic time, TPC and TSC contents reached 62.11 mg GAE/gdm and 54.08 mg/gdm (corm) and 52.94 mg GAE/gdm and 56.60 mg/gdm (inflorescence), respectively. The SEM results also showed that the effectiveness of ultrasound waves changed the cell structure of the raw materials and supported the extraction process. In addition, the liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) results showed that the extracts from *M. balbisiana* corm and inflorescence mainly contained two main groups of biological compounds: polyphenols (such as quercetin, kaempferol glycoside, chlorogenic acid, procyanidin) and saponins (such as ginsenoside F1, notoginsenoside, chikusetsusaponin). The results also showed that corm was richer in polyphenols, while inflorescence had a higher saponin content.

Keywords: *Musa balbisiana*, optimization, saponin, polyphenol, ultrasound.

Ngày nhận bài: 23/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 7/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 25/7/2025

Ngày duyệt đăng: 8/8/2025

ẢNH HƯỞNG CỦA QUÁ TRÌNH NGÂM VÀ NẤY MẦM ĐẾN HÀM LƯỢNG POLYPHENOL VÀ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HOÁ TRONG DỊCH CHIẾT HẠT MẦM ĐẬU ĐEN XANH LÒNG (*Vigna unguiculata*)

Phan Thị Bé¹, Đỗ Thị Bích Thủy^{2,*}, Võ Văn Quốc Bảo¹,
Nguyễn Văn Đức¹, Trần Bảo Khánh¹, Nguyễn Phan Hạ Vi³

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

² Trường Kỹ thuật và Công nghệ, Đại học Duy Tân

³ Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

*Email: dotbichthuy@duytan.edu.vn

TÓM TẮT

Đậu đen xanh lòng (*Vigna unguiculata*) là loại hạt giàu hợp chất polyphenol và flavonoid có hoạt tính chống oxy hoá mạnh. Nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của điều kiện ngâm và nảy mầm đến hàm lượng polyphenol, flavonoid và hoạt tính chống oxy hoá trong dịch chiết hạt đậu đen nảy mầm. Các chỉ tiêu được phân tích gồm: Polyphenol tổng số (TPC), flavonoid tổng số (TFC) và hoạt tính khử gốc tự do (DPPH, ABTS). Kết quả nghiên cứu cho thấy, điều kiện ngâm ở 35°C trong 6 giờ giúp đạt tỷ lệ nảy mầm cao nhất (96,3%). Trong giai đoạn nảy mầm, nhiệt độ và thời gian là yếu tố quyết định đến khả năng tích lũy hợp chất có hoạt tính sinh học. Khi nảy mầm ở 25 - 30°C trong 48 - 72 giờ, TPC tăng 60,3%, TFC tăng 154,5%, hoạt tính DPPH tăng 203,5% và ABTS tăng 73,3% so với hạt chưa nảy mầm ($p < 0,05$). Tối ưu hoá theo mô hình thiết kế thực nghiệm xác định điều kiện tối ưu là 28,79°C trong 54,06 giờ. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các chỉ tiêu đạt giá trị cực đại với độ tương thích cao giữa dự đoán và thực nghiệm. Kết quả nghiên cứu khẳng định, quá trình ngâm và nảy mầm là phương pháp sinh học hiệu quả nhằm nâng cao giá trị chức năng của hạt đậu đen, mở ra triển vọng ứng dụng trong sản xuất thực phẩm giàu chất chống oxy hoá từ nguyên liệu tự nhiên.

Từ khoá: Hoạt tính chống oxy hoá, nảy mầm, polyphenol, *Vigna unguiculata*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu đen xanh lòng (*Vigna unguiculata*) là giống đậu phổ biến ở miền Trung Việt Nam, giàu giá trị dinh dưỡng và chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như: Polyphenol, flavonoid [1 - 7]. Hàm lượng polyphenol tổng số trong giống đậu này dao động từ 15,20 - 19,99 mg GAE/g chất khô [8]. Nảy mầm được xem là phương pháp sinh học hiệu quả giúp cải thiện giá trị dinh dưỡng và tăng hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học [9]. Quá trình này kích hoạt các enzyme thủy phân như: Protease, amylase, cellulase..., thúc đẩy sự chuyển hóa và sinh tổng hợp polyphenol [10 - 12]. Chế độ ngâm và nảy mầm (thời gian và nhiệt độ) có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả của quá trình này [12 - 14]. Hạt đậu nành (*Glycine max* L.) sau 6

ngày nảy mầm, hàm lượng polyphenol tăng từ 548,0 lên 1.159,5 mg GAE/100 g chất khô [15]. Hàm lượng polyphenol lần lượt là 950 và 910 mg/100 g đối với mầm đậu nành vàng và xanh được nảy mầm ở 21°C trong 6 ngày [16]. Hàm lượng polyphenol của giống đậu nành Trung Quốc ZH13 khi được nảy mầm ở nhiệt độ 30°C chỉ đạt khoảng 35 mg/100 g [17]. Sau 6 ngày nảy mầm hạt đậu nành, hoạt tính chống oxy hoá được ông bố là tăng 188,03% so với mẫu chưa nảy mầm. Hạt djulis (*Chenopodium formosanum*) khi được nảy mầm ở 25°C trong 48 giờ cho thấy hiệu quả vượt trội về việc tăng hàm lượng TPC và khả năng khử gốc tự do DPPH [18]. Hơn nữa, các giống đậu khác nhau được công bố có hàm lượng polyphenol tổng số là không giống nhau [19 - 20]. Như vậy,

nảy mầm được ứng dụng như một phương pháp sinh học hiệu quả để tạo nguyên liệu thực phẩm giàu các hợp chất chống oxy hóa. Hiệu quả sinh tổng hợp các hợp chất này chịu ảnh hưởng bởi nhiệt độ, độ ẩm, thời gian nảy mầm và đặc điểm giống. Chính vì vậy, nghiên cứu ảnh hưởng của quá trình ngâm và nảy mầm đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hoá trong dịch chiết hạt mầm đậu đen xanh lòng (*Vigna unguiculata*) là cần thiết.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Hạt đậu đen xanh lòng (*Vigna unguiculata*) được thu hoạch trên địa bàn thành phố Huế.

Hoá chất sử dụng trong nghiên cứu: Thuốc thử Folin – Ciocalteu; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH); 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS); 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox); AlCl₃, gallic axit và catechin được mua từ Sigma-Aldrich (Steinheim, Đức).

2.2. Bố trí thí nghiệm để xác định nhiệt độ và thời gian ngâm thích hợp

Hạt đậu đen được ngâm trong nước vô trùng tại 3 mức nhiệt độ khác nhau: 25°C, 35°C và 45°C. Mẫu hạt được lấy định kỳ sau mỗi 2 giờ và sấy ở 105°C cho đến khi khối lượng không đổi, nhằm xác định thủy phần theo phương pháp khối lượng. Các mẫu hạt có giá trị thủy phần trong khoảng 40 - 50% được lựa chọn để tiến hành thí nghiệm nảy mầm.

2.3. Đánh giá tỷ lệ nảy mầm sau ngâm

Các mẫu hạt sau khi ngâm được nảy mầm ở 30°C trong 24 giờ. Hạt được trải đều trên khay chứa lớp bông ẩm vô trùng, phủ bằng hai lớp gạc, giữ ẩm bằng cách phun sương và nhằm hạn chế sự bốc hơi nước. Sau thời gian nảy mầm, tỷ lệ nảy mầm được xác định. Tiêu chí nảy mầm là quan sát được phần rễ mầm bắt đầu nhô ra khỏi vỏ hạt [21]. Tỷ lệ nảy mầm (%) được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ nảy mầm (\%)} = \left(\frac{\text{Số hạt nảy mầm}}{\text{Tổng số hạt}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Dựa vào kết quả tỷ lệ nảy mầm để xác định nhiệt độ và thời gian ngâm phù hợp.

2.4. Bố trí thí nghiệm xác định nhiệt độ và thời gian nảy mầm thích hợp

Các mẫu hạt sau ngâm ở nhiệt độ và thời gian thích hợp (kết quả của mục 2.3 và 2.4) được nảy mầm ở các nhiệt độ từ 20-35°C. Mẫu được lấy định kỳ sau mỗi 12 giờ, kéo dài đến 108 giờ (được ký hiệu từ G0, G12; G24; G36; G48; G60; G72; G84; G96; G108) và được sấy thăng hoa (freeze-dried). Sau đó, mẫu được nghiền mịn (<1 mm) bằng cối sứ trong điều kiện khô và bảo quản trong lọ kín ở -20°C cho đến khi xác định các chỉ tiêu (hàm lượng polyphenol, flavonoid và hoạt tính chống oxy hoá).

2.5. Xác định thủy phần

Mẫu thí nghiệm đã nghiền (<1 mm) (5 g) (W₁, g) được cho vào cốc sấy và tiến hành sấy ở nhiệt độ (105 - 106°C), trong 3 giờ ± 5 phút. Mẫu đã sấy được làm nguội trong bình hút ẩm 20 phút ở nhiệt độ phòng và xác định lại khối lượng mẫu sau sấy (W₂, g). Thủy phần của mẫu (X%, w/w) được biểu thị theo phần trăm khối lượng, được tính theo công thức [22]:

$$X = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (2)$$

2.6. Chuẩn bị dịch chiết từ hạt mầm đậu đen xanh lòng

Mẫu hạt mầm đậu đen xanh lòng đã nghiền mịn (5 g) được chiết với ethanol 70% (50 mL) dưới tác động của siêu âm 40 kHz - 180 W (Jeken TUC-65) ở nhiệt độ 40°C trong 30 phút. Hỗn hợp sau chiết được ly tâm ở 10.000 vòng/phút, 4°C trong 10 phút, dịch nổi được lọc qua màng Biologix 0,45 µm, cô đặc chân không ở 40°C, sau đó phần dịch cô đặc được điều chỉnh thể tích bằng ethanol 50% (v/v). Dịch chiết được bảo quản ở -20°C cho đến khi phân tích hàm lượng polyphenol tổng số (TPC), flavonoid tổng số (TFC) và hoạt tính chống oxy hóa bằng các phép thử DPPH và ABTS. Toàn bộ quy trình được lặp lại 3 lần [23, 24].

2.7. Xác định hàm lượng polyphenol tổng số

Dịch chiết chứa polyphenol đã pha loãng ở tỷ lệ thích hợp (200 µL) được cho vào 1,5 mL polyphenol thuốc thử Folin-Ciocalteu 0,2 N. Hỗn hợp được vortex, để yên trong 5 phút và tiếp tục

trộn đều với 1,5 mL dung dịch natri carbonat (75 g/L). Hỗn hợp phản ứng để ở điều kiện tối, nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Tiếp đến, độ hấp thụ được đo tại bước sóng 765 nm bằng máy quang phổ (Ultrospec 1100 pro, Amersham Biosciences, Hoa Kỳ). Gallic axit được sử dụng làm chất chuẩn và kết quả được biểu thị dưới dạng miligam tương đương gallic axit trên mỗi gam chất khô (mg GAE/gDW) [25].

2.8. Xác định hàm lượng flavonoid tổng số

Dịch chiết đã pha loãng ở nồng độ thích hợp (1 mL) được cho vào 0,3 mL NaNO_2 (5%). Sau 5 phút, hỗn hợp được bổ sung 0,3 mL AlCl_3 (10%) và sau đó 1 phút, thêm vào 2 mL NaOH 1 M. Độ hấp thụ quang học được đo tại bước sóng 510 nm. Catechin được sử dụng làm chất chuẩn và kết quả hàm lượng flavonoid tổng số được biểu thị dưới dạng miligam catechin tương đương trên mỗi gam chất khô (mg CAE/g DW) [26].

2.9. Xác định hoạt tính khử gốc tự do DPPH

Dịch chiết (200 μL) đã pha loãng ở nồng độ thích hợp được bổ sung 3,8 mL dung dịch DPPH nồng độ 60 $\mu\text{mol/L}$ (trong methanol). Sau khi ủ trong 60 phút ở nhiệt độ phòng và tránh ánh sáng, độ hấp thụ được đo tại bước sóng 515 nm bằng máy quang phổ. Mối tương quan giữa nồng độ Trolox và hoạt tính khử DPPH được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Hoạt tính khử gốc tự do DPPH được biểu thị dưới dạng micromol Trolox tương đương trên mỗi gam chất khô ($\mu\text{mol TE/g DW}$) [27, 28].

2.10. Xác định hoạt tính khử gốc tự do ABTS

Tác nhân phản ứng ABTS^+ được chuẩn bị bằng cách trộn dung dịch ABTS 7 mmol/L với dung dịch kali persulfat 2,45 mmol/L theo tỉ lệ 1: 1 (v/v). Hỗn hợp được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng từ 12 – 16 giờ trước khi sử dụng. Sau đó, dung dịch ABTS^+ được pha loãng bằng methanol và điều chỉnh độ hấp thụ về $0,700 \pm 0,020$ tại bước sóng 734 nm. Tiếp theo, mẫu chiết (100 μL) đã pha loãng nồng độ thích hợp được thêm vào 3,0 mL dung dịch ABTS^+ . Sau khi ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng trong điều kiện tối, độ hấp thụ được đo tại 734 nm bằng máy quang phổ. Mối tương quan giữa nồng độ Trolox và hoạt tính khử gốc ABTS^+

được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Kết quả được biểu thị dưới dạng micromol Trolox tương đương trên mỗi gam chất khô ($\mu\text{mol TE/g DW}$) [29].

2.11. Phương pháp tối ưu hóa bằng quy hoạch thực nghiệm

Dựa vào kết quả phần 2.5 chọn mức thấp và cao của biến trong thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa bằng quy hoạch thực nghiệm. Theo đó, có 2 yếu tố đầu vào liên tục (nhiệt độ và thời gian) và tối ưu hóa 4 mục tiêu đầu ra là TPC, TFC, DPPH và ABTS. Ma trận quy hoạch thực nghiệm được thiết kế theo mô hình thí nghiệm trung tâm Central Composite Design (CCD), chọn face-centered CCD ($\alpha=1$).

Từ đó, có tất cả 13 thí nghiệm (4 thí nghiệm theo thiết kế toàn phần cho 2 yếu tố (2^2): $(-1,-1)$, $(1,-1)$, $(-1,1)$, $(1,1)$; 4 thí nghiệm điểm trục: $(-a,0)$, $(a,0)$, $(0,-a)$, $(0,a)$ ($\alpha=1$) và 5 thí nghiệm trung tâm $(0,0)$ (Bảng 4).

2.12. Phân tích thống kê

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các số liệu được phân tích phương sai (ANOVA), phần mềm Minitab phiên bản 20 với kiểm định Tukey ($p < 0,05$). Tất cả số liệu trình bày trong các bảng ở phần kết quả là giá trị trung bình của ba lần lặp lại cùng với độ lệch chuẩn (Standard Deviation, SD).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự thay đổi thủy phân hạt đậu đen xanh lòng trong quá trình ngâm ở các nhiệt độ khác nhau

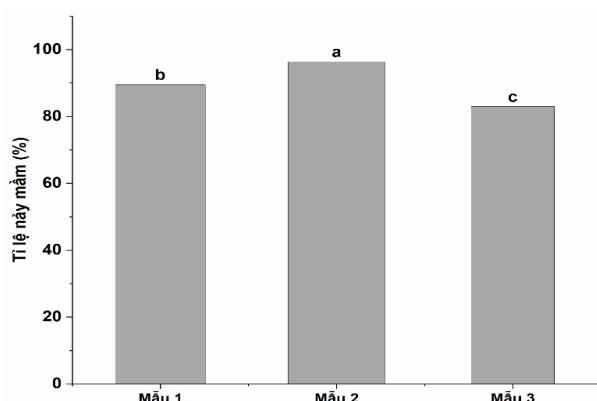
Kết quả cho thấy, thủy phân của hạt đậu đen xanh lòng tăng đáng kể theo thời gian và nhiệt độ ngâm (Bảng 1). Hạt ngâm ở nhiệt độ cao hấp thụ nước nhanh hơn. Ở cùng một thời điểm, hạt ngâm ở nhiệt độ cao hấp thụ nước nhanh hơn. Sau 8 giờ, thủy phân đạt 47,81% ở 25°C, 55,83% ở 35°C và 63,42% ở 45°C. Khi thủy phân của hạt đạt trong khoảng 40 – 50% sẽ phù hợp cho hạt nảy mầm [30]. Bảng 1 cho thấy, hạt đạt được mức thủy phân thích hợp là: (1) Mẫu 1: Hạt được ngâm ở 25°C trong 8 giờ, (2) Mẫu 2: Hạt được ngâm ở 35°C trong 6 giờ, (3) Mẫu 3: Hạt được ngâm ở 45°C trong 4 giờ. Các mẫu (Mẫu 1, 2 và 3) được dùng để khảo sát tỷ lệ nảy mầm nhằm chọn thời gian và nhiệt độ ngâm phù hợp.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian ngâm đến thủy phần (%) của hạt

Thời gian ngâm (giờ)	Nhiệt độ ngâm (°C)		
	25	35	45
2	12,96 ^j ± 0,23	16,57 ⁱ ± 0,36	29,06 ^g ± 0,32
4	18,76 ^h ± 0,07	32,37 ^f ± 0,55	46,68 ^{cd} ± 0,34
6	39,12 ^e ± 0,05	46,27 ^d ± 0,27	56,17 ^b ± 0,62
8	47,81 ^c ± 0,66	55,83 ^b ± 0,66	63,42 ^a ± 0,55

Ghi chú: Số liệu trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn ($n = 3$). Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các tổ hợp xử lý ($p < 0,05$), kiểm định Tukey HSD sau ANOVA hai nhân tố.

3.2. Ảnh hưởng của điều kiện ngâm đến tỉ lệ nảy mầm của hạt đậu đen xanh lòng



Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian ngâm đến tỉ lệ nảy mầm

Ghi chú: Các giá trị có chữ cái khác nhau cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). (Mẫu 1: Ngâm ở 25°C, 8 giờ; mẫu 2: Ngâm ở 35°C, 6 giờ; mẫu 3: Ngâm ở 45°C, 4 giờ).

Các mẫu hạt lựa chọn ở mục 3.1 được sử dụng để khảo sát tỉ lệ nảy mầm. Hình 1 cho thấy, mẫu 2 (ngâm ở 35°C trong 6 giờ đạt thủy phần 46,27 ± 0,27%) cho tỉ lệ nảy mầm cao nhất 96,3 ± 0,04%. Trong khi, mẫu 1 (ngâm ở 25°C, trong 8 giờ thủy phần đạt 47,81 ± 0,66%) có tỉ lệ nảy mầm chỉ đạt 89,43 ± 0,46%. Tương tự, mẫu 3 (ngâm ở 45°C trong 4 giờ, thủy phần đạt 46,68 ± 0,34%) có tỉ lệ nảy mầm thấp nhất 82,97 ± 0,32%. Điều này có thể là do nhiệt độ thấp làm chậm quá trình hoạt hoá enzyme và trao đổi chất, từ đó làm trì hoãn sự nảy mầm. Theo Szczerba và cs (2021), đối với 4 giống đậu nành (*Glycine max* L.), tại 10°C, không có giống nào nảy mầm sau 48 giờ, trong khi nhiệt độ nảy mầm tăng lên 25°C, hoạt động của enzyme α -amylase đã tăng lên đáng kể nên cải thiện rõ rệt

về tỉ lệ nảy mầm [31]. Sự suy giảm tỉ lệ nảy mầm trong điều kiện nhiệt độ quá cao (ở 45°C) có thể liên quan đến hiện tượng thoát ly các chất tan, phá vỡ cấu trúc tế bào hoặc làm giảm khả năng duy trì môi trường nội bào cần thiết cho mầm phát triển [32].

Như vậy, điều kiện thích hợp để ngâm hạt trước khi nảy mầm là ở 35°C trong khoảng thời gian 6 giờ.

3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian nảy mầm đến hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số trong hạt đậu đen xanh lòng

Nhiệt độ và thời gian nảy mầm ảnh hưởng rõ rệt đến hàm lượng TPC và TFC của hạt đậu đen (Bảng 2). Ở cùng một thời gian, giá trị TPC và TFC cao nhất đạt được ở 25°C và 30°C, khi tăng nhiệt độ lên 35°C, hàm lượng các hợp chất này có xu hướng giảm. Cả 2 chỉ tiêu này tăng dần theo thời gian nảy mầm và đạt cao nhất trong khoảng 36 – 72 giờ, sau đó giảm nhẹ. Tại 25°C sau 48 giờ, hàm lượng TPC và TFC đạt cực đại lần lượt là 17,63 ± 0,22 (mg GAE/g DW) và 2,75 ± 0,02 (mg CAE/g DW), tăng 60,3% và 154,5% so với hạt chưa nảy mầm.

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu trên hạt djlis (*Chenopodium formosanum*) ở Đài Loan [18], theo đó hạt được nảy mầm ở 25°C cho giá trị TPC cao hơn so với 30°C. Đồng thời, nó cũng tương đồng với xu hướng tăng TPC trong quá trình nảy mầm ở đậu nành (*Glycine max*), đậu xanh (*Vigna radiata*) và đậu đen (*Phaseolus vulgaris*) [33]. Tuy nhiên, mức TPC trong hạt đậu đen xanh lòng cao hơn nhiều, có thể do đặc điểm giống đậu đen xanh lòng và điều kiện sinh trưởng khác biệt.

Nhìn chung, TFC của hạt tăng đáng kể trong quá trình nảy mầm, tuy có sự khác biệt giữa các loại đậu. Ở đậu xanh, TFC đạt 5,58 mg RE/g FW (tính theo khối lượng tươi) vào ngày thứ năm, với tốc độ tăng trưởng nhanh nhất vào ngày thứ ba. Trong khi đó, đậu đen có tốc độ tăng chậm hơn nhưng ổn định, đạt đỉnh vào ngày thứ tư với mức 4,25 mg RE/g FW. TFC của đậu nành tương đối thấp hơn, chỉ đạt 2,81 mg RE/g FW vào ngày thứ 5 [33]. Nhiệt độ và thời gian nảy mầm thích hợp cho mỗi loại hạt cũng khác nhau và có vai trò quyết định trong việc kích hoạt quá trình sinh tổng hợp các hợp chất chống oxy hoá. Thời gian 36 – 72 giờ và nhiệt độ 25 – 30°C là điều kiện nảy mầm thích hợp để TPC và TFC trong hạt đậu đen xanh lòng đạt giá trị cao.

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian nảy mầm đến hoạt tính chống oxy hoá của hạt đậu đen

Kết quả phân tích khả năng chống oxy hoá bằng thử nghiệm với DPPH và ABTS (Bảng 3), chịu ảnh hưởng rõ rệt bởi điều kiện nảy mầm. Cả 2 chỉ tiêu này có giá trị khá cao ở nhiệt độ nảy mầm 25°C và 30°C trong khoảng thời gian 48 – 72 giờ, sau đó, suy giảm khi kéo dài thời gian nảy mầm.

Ở 25°C sau 48 giờ, hoạt tính DPPH và ABTS lần lượt đạt 34,48 $\mu\text{molTE/g DW}$ và 55,44 $\mu\text{molTE/g DW}$, gấp 203,5% và 73,3% so với hạt chưa nảy mầm. Hiệu quả này có thể do quá trình giải phóng các hợp chất polyphenol tự do dưới tác động của các enzyme nội sinh được hoạt hoá trong giai đoạn đầu của quá trình nảy mầm như esterase, protease, amylase và cellulase [15]. Nghiên cứu trên đậu đen và đậu Hà Lan cho thấy, hoạt tính chống oxy hoá tăng rõ rệt trong 6 - 7 ngày nảy mầm ở 25°C [34]. Lu và cs (2024) cũng ghi nhận hạt djulis (*Chenopodium formosanum*) nảy mầm ở 25°C có giá trị DPPH cao nhất, nhưng suy giảm khi nảy mầm ở 30°C [18].

Ngược lại ở 20°C, hoạt tính DPPH và ABTS trong hạt đậu đen xanh lòng chỉ tăng nhẹ trong suốt quá trình nảy mầm, có thể do điều kiện nhiệt độ thấp không đủ kích hoạt enzyme. Mức suy giảm rõ rệt ở 35°C, sau 108 giờ, giá trị DPPH chỉ còn 8,5 $\mu\text{molTE/g DW}$ và ABTS giảm còn 29,5 $\mu\text{molTE/g DW}$. Điều này có thể do stress nhiệt gây mất ổn định các enzyme tham gia vào sinh tổng hợp các hợp chất chống oxy hoá, đồng thời thúc đẩy các phản ứng oxy hoá ngược [18]. Xu hướng tăng hoạt tính chống oxy hoá theo thời gian nảy mầm đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu. Theo Chen và cs (2016), trong hạt kê (*Phalaris canariensis* L.) thử nghiệm với DPPH tăng gấp 7 - 10 lần sau 120 giờ nảy mầm [35]. Huang và cs (2014) đã ghi nhận hoạt tính chống oxy hoá cao nhất trong đậu nành và đậu xanh đạt được sau 72 giờ nảy mầm. Điều này cho thấy, giai đoạn đầu nảy mầm là thời điểm tích lũy mạnh các hợp chất chống oxy hoá trong cây họ đậu [36]. Ngoài ra, mối tương quan giữa TPC, TFC và hoạt tính chống oxy hoá cũng được thể hiện rõ. Điều đó có nghĩa là khi TPC, TFC tăng, hoạt tính chống oxy hoá cũng tăng theo. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra mối tương quan tỷ lệ thuận giữa TPC và hoạt tính chống oxy hoá. Trong hạt kê, hệ số tương quan này đạt tới $r = 0,99$ [35], trong hạt djulis (*Chenopodium formosanum*) là $r = 0,98$ [18]. Theo Mbaïogaou và cs (2022), hệ số xác định $R^2 > 0,97$ giữa TPC và hoạt tính DPPH, cho thấy TPC là yếu tố chính chi phối khả năng khử gốc tự do của đậu đen [37].

Như vậy, điều kiện nảy mầm thích hợp để tăng hoạt tính chống oxy hoá trong hạt đậu đen là 25°C - 30°C trong 48 - 72 giờ. Do đó, phạm vi nhiệt độ và thời gian này được chọn mức cao và thấp cho thiết kế thực nghiệm tối ưu hóa với 4 mục tiêu là TPC, TFC, khả năng chống oxy hoá theo DPPH và ABTS ở phần tiếp theo.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên hàm lượng TPC và TFC

Mẫu	Hàm lượng TPC (mg GAE/g DW)				Hàm lượng TFC (mg CAE/g DW)			
	20°C	25°C	30°C	35°C	20°C	25°C	30°C	35°C
Hạt chưa nảy mầm	11,00 [±] ± 0,05				1,09 ⁿ ± 0,01			
G0	10,12 ^p ± 0,07				0,93 ^o ± 0,02			
G12	9,47 ^{qr} ± 0,01	9,31 ^r ± 0,22	12,04 ^m ± 0,11	13,53 ^k ± 0,12	0,69 ^r ± 0,01	1,16 ⁿ ± 0,04	0,80 ^q ± 0,03	1,29 ^m ± 0,04

G24	9,51 ^{qr} ± 0,15	14,41 ^j ± 0,27	15,63 ^h ± 0,29	15,74 ^{gh} ± 0,07	0,88 ^{op} ± 0,02	1,92 ^{hi} ± 0,02	1,99 ^{gh} ± 0,02	1,92 ^{hi} ± 0,02
G36	9,83 ^{pq} ± 0,08	16,19 ^{stg} ± 0,05	17,29 ^{abc} ± 0,06	17,03 ^{bc} ± 0,09	0,85 ^{pq} ± 0,01	2,14 ^f ± 0,02	2,51 ^c ± 0,02	2,29 ^d ± 0,04
G48	11,31 ^{no} ± 0,18	17,63 ^a ± 0,22	17,26 ^{abc} ± 0,08	16,98 ^{bc} ± 0,13	1,61 ⁱ ± 0,02	2,75 ^a ± 0,02	2,70 ^{ab} ± 0,02	2,21 ^{ef} ± 0,00
G60	11,72 ^{mn} ± 0,44	17,59 ^a ± 0,04	17,17 ^{abc} ± 0,02	16,94 ^{cd} ± 0,02	1,62 ⁱ ± 0,01	2,77 ^a ± 0,03	2,62 ^b ± 0,02	2,21 ^{def} ± 0,02
G72	12,63 ⁱ ± 0,06	17,36 ^{ab} ± 0,09	17,03 ^{bc} ± 0,08	16,88 ^{cd} ± 0,09	1,61 ⁱ ± 0,01	2,76 ^a ± 0,01	2,64 ^b ± 0,01	1,85 ^j ± 0,02
G84	12,64 ⁱ ± 0,09	17,19 ^{abc} ± 0,17	16,47 ^{de} ± 0,17	16,24 ^{ef} ± 0,28	1,71 ^k ± 0,02	2,67 ^b ± 0,03	2,26 ^{de} ± 0,02	1,83 ^j ± 0,01
G96	12,86 ⁱ ± 0,01	16,30 ^{ef} ± 0,09	14,91 ⁱ ± 0,01	13,37 ^k ± 0,04	1,81 ^j ± 0,03	2,51 ^c ± 0,05	2,03 ^g ± 0,01	1,66 ^{kl} ± 0,03
G108	12,86 ⁱ ± 0,19	15,84 ^{gh} ± 0,13	14,37 ^j ± 0,13	12,65 ^j ± 0,13	1,81 ^j ± 0,05	2,04 ^g ± 0,03	1,87 ^{ij} ± 0,02	1,61 ^l ± 0,01

Ghi chú: Số liệu trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các tổ hợp xử lý (p < 0,05), kiểm định Tukey HSD sau ANOVA hai nhân tố.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên hoạt tính chống oxy hoá ABTS và DPPH

Mẫu	Giá trị hoạt tính chống oxy hoá ABTS (μmolTE/g DW)				Giá trị hoạt tính chống oxy hoá DPPH (μmolTE/g DW)			
	20°C	25°C	30°C	35°C	20°C	25°C	30°C	35°C
Hạt chưa nảy mầm	31,99 ^{op} ± 0,13				11,36 ^r ± 0,04			
G0	28,60 ^r ± 0,43				9,07 st ± 0,05			
G12	28,93 ^r ± 0,31	39,39 ^{kl} ± 0,61	40,47 ^k ± 1,23	42,18 ^j ± 0,61	9,06 st ± 0,10	14,23 ^o ± 0,12	15,04 ⁿ ± 0,17	18,48 ^m ± 0,11
G24	32,00 ^{op} ± 0,22	47,12 ^h ± 0,19	48,71 ^g ± 0,43	49,77 ^{fg} ± 0,24	9,15 st ± 0,10	24,00 ^l ± 0,33	25,08 ^k ± 0,12	27,03 ^{hij} ± 0,49
G36	32,26 ^o ± 0,35	53,29 ^{bc} ± 0,71	52,04 ^{cd} ± 0,21	49,99 ^{efg} ± 0,20	9,14 st ± 0,02	26,74 ^{ij} ± 0,18	26,36 ^j ± 0,34	28,88 ^f ± 0,59
G48	35,00 ⁿ ± 0,87	55,44 ^a ± 0,65	53,83 ^b ± 0,28	51,36 ^{de} ± 0,32	9,73 ^s ± 0,03	34,48 ^a ± 0,05	33,00 ^b ± 0,08	30,12 ^e ± 0,16
G60	37,25 ^m ± 0,66	53,55 ^b ± 0,51	53,28 ^{bc} ± 0,51	51,25 ^{def} ± 0,11	11,81 ^{qr} ± 0,13	33,86 ^a ± 0,30	32,79 ^{bc} ± 0,00	29,33 ^f ± 0,08
G72	38,59 ^{lm} ± 0,75	52,53 ^{bcd} ± 0,34	51,98 ^{cd} ± 0,24	47,12 ^h ± 0,27	11,62 ^{qr} ± 0,03	33,92 ^a ± 0,28	32,26 ^{cd} ± 0,14	27,72 ^g ± 0,37
G84	42,81 ^j ± 0,14	49,14 ^g ± 0,16	51,21 ^{def} ± 0,13	39,84 ^{kl} ± 0,13	12,17 ^{pq} ± 0,19	32,81 ^{bc} ± 0,24	31,81 ^d ± 0,10	27,30 ^{ghi} ± 0,37
G96	43,37 ^j ± 0,55	45,01 ⁱ ± 0,50	43,55 ^{ij} ± 0,43	30,60 ^{pq} ± 0,42	12,52 ^p ± 0,23	30,45 ^e ± 0,25	29,04 ^f ± 0,24	13,77 ^o ± 0,14
G108	42,79 ^j ± 0,18	43,44 ^j ± 0,39	42,48 ^j ± 0,48	29,46 ^{qr} ± 0,13	12,57 ^p ± 0,14	27,60 ^{gh} ± 0,09	25,31 ^k ± 0,12	8,51 ^l ± 0,13

Ghi chú: Số liệu trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các tổ hợp xử lý (p < 0,05), kiểm định Tukey HSD sau ANOVA hai nhân tố.

3.5. Kết quả tối ưu hoá chế độ nảy mầm

Để tối ưu hóa chế độ nảy mầm, hai yếu tố đầu vào là nhiệt độ và thời gian được chọn trong

khoảng 20 - 35°C và 24 - 72 giờ (Bảng 4). Việc thiết lập ma trận thực nghiệm được trình bày ở phần 2.11.

Bảng 4. Ma trận quy hoạch thực nghiệm và kết quả thí nghiệm

TT	Yếu tố ảnh hưởng				Kết quả đầu ra			
	Mã hóa		Giá trị thực		TPC (Y ₁)	TFC (Y ₂)	DPPH (Y ₃)	ABTS (Y ₄)
	X ₁	X ₂	Nhiệt độ nảy mầm (°C)	Thời gian nảy mầm (giờ)				
1	-1	0	20,0	48	11,31	1,61	9,73	35,00
2	0	-1	27,5	24	15,01	1,96	24,49	48,12
3	-1	-1	20,0	24	9,51	0,88	9,15	32,00
4	1	-1	35,0	24	15,74	1,92	27,03	49,77
5	1	0	35,0	48	16,98	2,21	30,12	51,36
6	0	0	27,5	48	17,42	2,73	33,75	54,44
7	0	1	27,5	72	17,30	2,74	33,09	52,13
8	-1	1	20,0	72	12,63	1,61	11,62	38,59
9	0	0	27,5	48	17,41	2,71	33,75	54,50
10	1	1	35,0	72	16,88	1,85	27,72	47,12
11	0	0	27,5	48	17,45	2,71	33,78	54,37
12	0	0	27,5	48	17,39	2,70	33,69	53,90
13	0	0	27,5	48	17,37	2,72	33,72	54,20

Ghi chú: Mã hóa (X₁, X₂) tương ứng với hai yếu tố đầu vào: X₁ – nhiệt độ nảy mầm (°C), X₂ – thời gian nảy mầm (giờ), với ba mức mã hóa -1, 0 và +1.

Từ kết quả đầu ra của 13 thí nghiệm (Bảng 4), phương trình hồi quy của các hàm mục tiêu sau khi loại bỏ những hệ số có giá trị p > 0,05 được thiết lập với R² tương ứng và kết quả tối ưu hóa (Bảng 5). Bảng 5 cho thấy: (1) Tất cả các mô hình đều là mô hình bậc hai, cho phép mô tả mối quan hệ phi tuyến tính giữa các yếu tố và kết quả. (2) Các hệ số R² rất cao cho tất cả các mô hình (trên 97%) cho thấy các mô hình này rất đáng tin cậy trong việc dự đoán các chỉ số TPC, TFC, DPPH và

ABTS dựa trên nhiệt độ và thời gian nảy mầm. (3) Sự hiện diện của các hệ số bậc hai (X₁², X₂²) âm trong tất cả các phương trình cho thấy rằng tất cả các hàm mục tiêu đều có một điểm cực đại (tối ưu) trong khoảng nghiên cứu, không phải là mối quan hệ tuyến tính đơn thuần. (4) Sự có mặt của hệ số tương tác (X₁*X₂) trong các phương trình TPC, TFC và ABTS cho thấy rằng ảnh hưởng của một yếu tố lên kết quả phụ thuộc vào mức độ của yếu tố còn lại.

Bảng 5. Phương trình hồi quy và kết quả tối ưu hóa

Hàm mục tiêu	Phương trình hồi quy	R ²	Giá trị cực đại (nhiệt độ nảy mầm tối ưu (28,79°C) và thời gian nảy mầm tối ưu (54,06 giờ))	Kết quả thí nghiệm kiểm chứng
TPC	$Y_1 = -40,55 + 3,305 X_1 + 0,2657 X_2 - 0,05116 X_1^2 - 0,001507 X_2^2 - 0,002750 X_1 * X_2$	99,41%	17,87 (mg GAE/g DW)	17,92 ± 0,13
TFC	$Y_2 = -12,490 + 0,8723 X_1 + 0,0997 X_2 - 0,01413 X_1^2 - 0,000616 X_2^2 - 0,001111 X_1 * X_2$	98,40%	2,77 (mg CAE/g DW)	2,75 ± 0,02
DPPH	$Y_3 = -179,8 + 12,99 X_1 - 0,2121 X_1^2 - 0,00532 X_2^2$	97,27%	34,68 (μmolTE/g DW)	34,81 ± 0,37

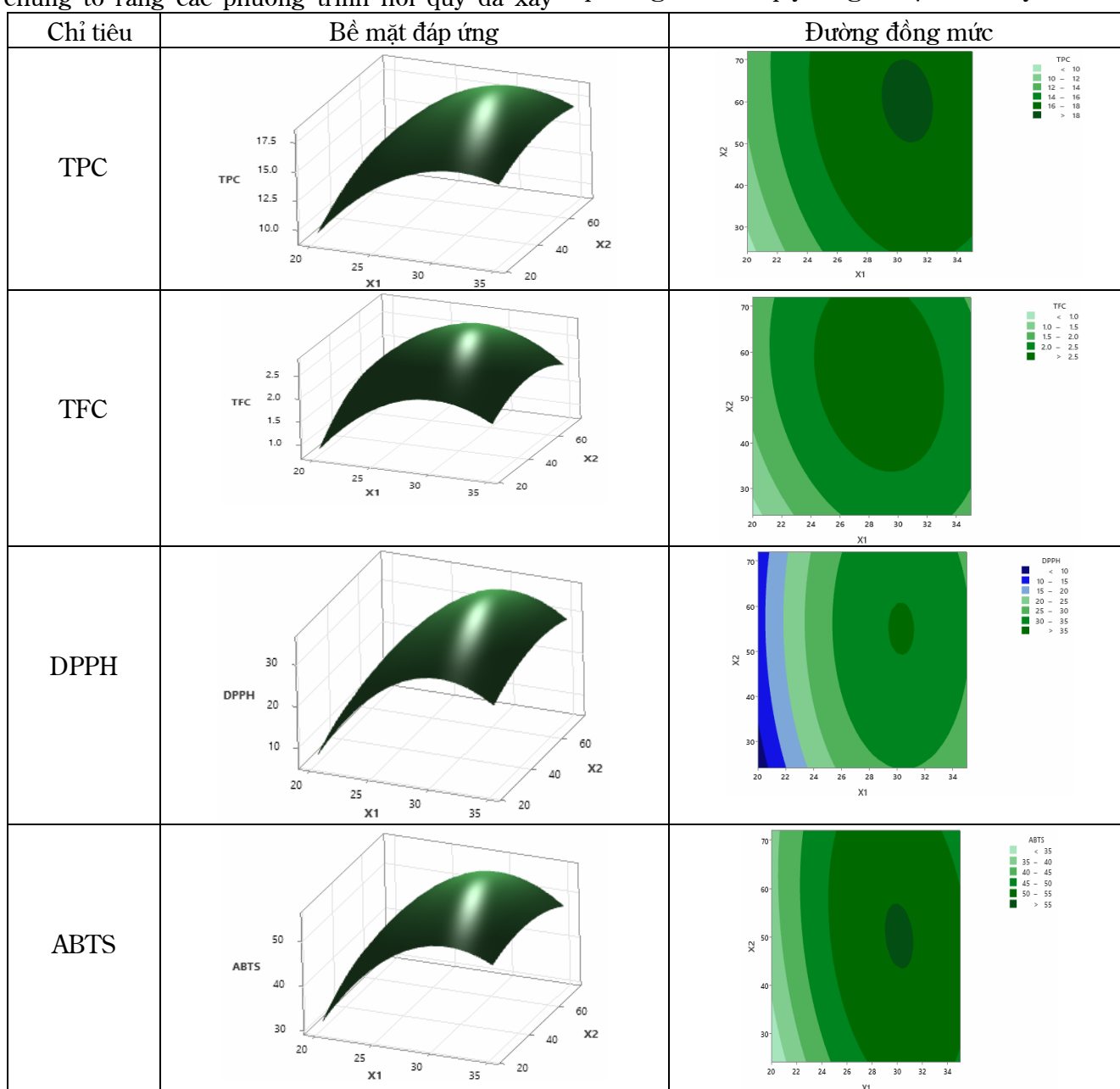
ABTS	$Y_4 = -133,7 + 11,075 X_1 + 0,872 X_2 - 0,1729 X_1^2 - 0,00483 X_2^2 - 0,01283 X_1 * X_2$	98,57%	54,88 (μmolTE/g DW)	55,01 ± 0,30
------	--	--------	---------------------	--------------

Bảng 5 cho thấy, nhiệt độ nảy mầm tối ưu và thời gian nảy mầm tối ưu là 28,79°C và 54,06 giờ. Tại nhiệt độ và thời gian nảy mầm tối ưu giá trị cực đại của hàm tối ưu là TPC: 17,87 mg GAE/g DW, TFC: 2,77 mg CAE/g DW, DPPH: 34,68 μmolTE/g DW và ABTS: 54,88 μmolTE/g DW.

So sánh kết quả tối ưu theo dự đoán của mô hình với kết quả thí nghiệm kiểm chứng cho thấy, các giá trị này khá gần nhau (Bảng 5). Điều này chứng tỏ rằng các phương trình hồi quy đã xây

dựng có khả năng dự đoán chính xác các giá trị tối ưu và các điều kiện tối ưu tìm được là đáng tin cậy nên cung cấp cơ sở vững chắc cho việc áp dụng các điều kiện này trong thực tế để đạt được hiệu quả mong muốn.

Để thể hiện một cách trực quan về kết quả tối ưu hóa, các bề mặt đáp ứng, biểu đồ 3D cho thấy, mối quan hệ giữa hai yếu tố đầu vào (trục X và Y) và một đáp ứng đầu ra (trục Z), tương ứng với các phương trình hồi quy bảng 5 được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Biểu đồ bề mặt đáp ứng, đường đồng mức thể hiện trực quan về kết quả tối ưu hóa

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chứng minh rằng điều kiện ngâm và nảy mầm ảnh hưởng rõ rệt đến hàm lượng polyphenol, flavonoid và hoạt tính chống oxy hoá của hạt đậu đen xanh lòng. Quá trình ngâm ở nhiệt độ 35°C trong 6 giờ giúp hạt đạt độ thủy phần lý tưởng cho nảy mầm, trong khi giai đoạn nảy mầm ở 25 - 30°C trong 48 - 72 giờ là điều kiện tối ưu để gia tăng tích lũy hợp chất có hoạt tính sinh học. Phân tích tối ưu hóa cho thấy điều kiện tối ưu đạt được tại 28,79°C và 54,06 giờ, với các chỉ tiêu TPC, TFC, DPPH và ABTS đều đạt mức cao nhất, khẳng định tính hiệu quả và độ tin cậy của mô hình dự đoán.

Những kết quả này không chỉ góp phần làm sáng tỏ cơ chế sinh hóa trong quá trình nảy mầm của hạt đậu đen, mà còn đặt nền móng cho việc ứng dụng trong chế biến các sản phẩm thực phẩm chức năng tự nhiên, hướng đến giá trị dinh dưỡng cao và an toàn cho sức khỏe người tiêu dùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. FAO (2010). Production Statistics: Dry cowpea. Rome: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
2. Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 52(4), 673 - 751.
3. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933 - 956.
4. Tsamo, C. V. P., Herent, M. F., Tomekpe, K., Rogez, H., Larondelle, Y., Andre, C. M. (2019). Phenolic profiling in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) reveals primary and secondary metabolites affected by storage and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(8), 2191 - 2200.
5. Lee, C. Y., Mitchell, A. E., Shibamoto, T. (2000). Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables and their health benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(8), 1113 - 1117.
6. Krygier, K., Sosulski, F. W., Hogge, L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. Extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 330 - 334.
7. Tsamo, M. H., Mohammed, M., Papoh Nidibewu, P., Dakora, F. D. (2019). Seed coat metabolite profiling of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) accessions from Ghana using UPLC-PDA-QTOF-MS and chemometrics. *Natural Product Research*, 1 - 5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1701964>.
8. Yusnawan, E., Inayati, A., Baliadi, Y. (2021). Total phenolic content and antioxidant activity in eight cowpea (*Vigna unguiculata*) genotypes. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 924(1), 012047. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/924/1/012047>.
9. Guzmán-Ortiz FA, Robles-Ramírez MD, Sánchez-Pardo B, Berrios J, Mora-Escobedo R. (2014). Changes in nutritional and bioactive components of germinated soybean. *Plant Foods Hum Nutr*. 69(2): 131 - 137
10. Robles-Ramírez, M. D., Mora-Escobedo, R., Ramón-Gallegos, E., Torres-Torres, N. (2012). Cytotoxic effect of protein hydrolysates from germinated soybeans on human cancer cells. *Food Chemistry*, 132(4), 1955 - 1960.
11. Ojwang, L. O., Dykes, L., Glover, D., Awika, J. M. (2013). Proanthocyanidin profile of cowpea (*Vigna unguiculata*) reveals catechin-O-glucoside as the dominant compound. *Food Research International*, 52(1), 119 - 125.
12. Xu, B., Chang, S. K. C. (2008). Total phenolic content and antioxidant properties of germinated food legumes. *Food Chemistry*, 110(1), 1 - 13.
13. Dueñas, M., Hernández, T., Estrella, I., Fernández, D. (2009). Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of legumes. *Food Chemistry*, 113(4), 980 - 987.
14. Chauhan, D., Kumar, K., Ahmed, N., Thakur, P., Rizvi, Q. U. E. H., Jan, S., Yadav, A. N. (2022). Impact of soaking, germination, fermentation, and roasting treatments on nutritional, anti-nutritional, and bioactive composition of black soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 10(5), 186 - 192.