

MAGDALENA JESZKA-SKOWRON, EWA FLACZYK,  
JOANNA KOBUS-CISOWSKA, ALICJA KOŚMIDER, DANUTA GÓRECKA

## OPTIMALIZACJA PROCESU EKSTRAKCJI ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH O AKTYWNOŚCI PRZECIWDRODNIKOWEJ Z LIŚCI MORWY BIAŁEJ ZA POMOCĄ METODY PŁASZCZYZNY ODPOWIEDZI (RSM)

### Streszczenie

Liście morwy zawierają polifenole, alkaloidy, terpenoidy oraz steroidy. Ich ekstrakty mogą być cennym składnikiem żywności prozdrowotnej.

Celem pracy była optymalizacja procesu ekstrakcji związków fenolowych z liści morwy oraz ocena aktywności przeciwrodnikowej uzyskanych ekstraktów testem DPPH, z wykorzystaniem metody powierzchni odpowiedzi (Response Surface Methodology).

Na podstawie RSM, w wybranych zakresach stężenia etanolu w wodzie i w wybranej temperaturze procesu ekstrakcji, uzyskano największe zawartości polifenoli i najwyższą aktywność przeciwrodnikową. Wartości przewidywane nie różniły się istotnie od wartości oznaczonych eksperymentalnie ( $p \leq 0,001$ ). Stężenie etanolu w wybranym ekstrakcie wyniosło 65 %, a temperatura procesu ekstrakcji: 63 °C.

**Słowa kluczowe:** liście morwy białej, proces ekstrakcji, polifenole ogółem, aktywność przeciwrodnikowa, Response Surface Methodology

### Wprowadzenie

Ekstrakty z liści morwy, ze względu na właściwości biologiczne, są cennym surowcem do produkcji prozdrowotnych produktów wspomagających układ krążenia i aktywność przeciwcukrzycową. Liście morwy są zasobne w związki bioaktywne, takie jak: polifenole, alkaloidy, steroidy oraz terpeny. Głównymi substancjami o właściwościach przeciwutleniających w liściach są: glikozydy flawonoli (3-(6-malonylo-

---

*Dr inż. M. Jeszka-Skowron, Instytut Chemii i Elektrochemii Technicznej, Wydz. Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, Pl. Marii Skłodowskiej-Curie 5, 60-965 Poznań, prof. dr hab. E. Flaczyk, dr inż. J. Kobus-Cisowska, prof. dr hab. D. Górecka, Katedra Technologii Żywności Człowieka, dr inż. A. Kośmider, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań.  
Kontakt: magdalena.jeszka-skowron@put.poznan.pl*

glikozyd) kwercetyny, 3-(6-malonyloglikozyd) kemferolu, rutyna, izokwercytryna), kumaryny (skopolina, skimina) oraz fenolokwasy (kwas chlorogenowy i kwas kawowy) [11, 13, 15, 17]. Liście zawierają także alkaloidy, w tym pochodne piperydynowe: (1,5-dideoksy-1,5-imino-D-sorbitol (DNJ) oraz fagomina), polihydroksylowane pochodne pirolidyny i alkaloidy nortropanowe [4]. Związki te wykazują udokumentowaną aktywność przeciwmiażdżycową i przeciwcukrzycową [6, 13, 18]. Również owoce morwy mają wysoki potencjał przeciwutleniający [3].

Dotychczas nie optymalizowano procesu ekstrakcji związków fenolowych z liści morwy polskiej odmiany wielkolistnej żółwińskiej. Na podstawie wcześniejszych analiz ekstraktów do niniejszej pracy wybrano ekstrakt etanolowy, ponieważ zawierał istotnie więcej polifenoli ogółem oraz charakteryzował się wyższą aktywnością przeciwrodnikową niż ekstrakt acetonowy czy wodny pozyskany z liści morwy [12].

W celu optymalizacji warunków ekstrakcji zastosowano metodę płaszczyzny odpowiedzi (ang. *Response Surface Methodology* - RSM), która wykorzystuje metody analizy matematycznej oraz statystycznej do określenia interakcji między badanymi zmiennymi pozwalającymi na wyznaczenie właściwej odpowiedzi przy minimalnej liczbie doświadczeń [5]. Plan centralny kompozycyjny jest jednym z najpopularniejszych form RSM, stosowany w celu optymalizacji różnych procesów związanych z żywnością i roślinami, takimi jak: proces ekstrakcji związków bioaktywnych [10, 20, 23], mielenie [9], procesy fermentacji roślin [8] czy produkcja dietetycznych produktów skrobiowych [19].

Celem pracy była optymalizacja procesu ekstrakcji związków fenolowych oraz aktywności przeciwrodnikowej z liści morwy białej za pomocą mieszaniny etanolu i wody, na podstawie zastosowanego planowania doświadczeń metodą powierzchni odpowiedzi (RSM). W pracy postawiono hipotezę, że metoda RSM pozwoli uzyskać optymalne warunki ekstrakcji przy stosunkowo niskich nakładach surowcowych i odczynnikowych.

### **Material i metody badań**

Liście morwy białej (*Morus alba L.*) odmiany wielkolistnej żółwińskiej zebrano na początku sierpnia 2009 roku na plantacji Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu, w Zakładzie Doświadczalnym Pętkowo. Liście wraz z szypułkami wysuszone w temperaturze  $60 \pm 1$  °C i zmielono do postaci proszku o stopniu rozdrobnienia 0,8 - 0,08 mm [16]. Susz z liści przechowywano w pojemnikach (PE) bez dostępu światła w temp.  $4,0 \pm 0,5$  °C.

Do uzyskania związków fenolowych z liści morwy zastosowano trzykrotną ekstrakcję. W pierwszym etapie 2 g proszku z liści morwy zalewano 40 ml mieszaniny rozpuszczalników etanolu z wodą. Zakres temperatur oraz stężenie etanolu w wodzie przyjęte w doświadczeniu przedstawiono w tab. 1. i 2. Całość wytrząsano w łaźni

wodnej w określonej temperaturze przez 15 min i stałej amplitudzie, a supernatant dekantowano. W drugim i trzecim etapie ekstrakcji liście ponownie zalewano rozpuszczalnikiem w ilości 30 ml i wytrząsano przez 15 min. Roztwory z trzech etapów łącznie, filtrowano (Whatman 1 : 11  $\mu\text{m}$ ) i uzyskiwano 100 ml ekstraktu. Stałymi parametrami procesu ekstrakcji we wszystkich doświadczeniach były: stopień rozdrobnienia liści, stosunek masy surowca do ilości rozpuszczalnika, wytrząsanie z taką samą amplitudą oraz czas ekstrakcji. W zaplanowanych doświadczeniach sumaryczny czas ekstrakcji wyniósł 45 min. Wykonano trzykrotną ekstrakcję po 15 min [2]. Wydajność procesu ekstrakcji wyniosła  $27,55 \pm 0,22 \%$ .

Ogólną zawartość polifenoli w świeżych ekstraktach z liści morwy oznaczano przy użyciu odczynnika Folina-Ciocalteu'a [7]. Metoda polegała na pomiarze zmiany barwy żółtego odczynnika Folina-Ciocalteu'a zredukowanego grupami hydroksylowymi związków fenolowych w środowisku węglanu sodu na barwę niebieską. Absorbancję próbek mierzono przy użyciu spektrofotometru firmy Metertek SP-830 (Tajwan), przy długości fali  $\lambda = 765 \text{ nm}$ ). Do wykreślenia krzywej kalibracyjnej użyto roztworów alkoholowych kwasu galusowego jako wzorca ( $r = 0,99$ ). Wyniki wyrażano jako równoważnik kwasu galusowego (GAE) w  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  suchej masy ekstraktu. W celu obliczenia suchej masy ekstraktu świeże ekstrakty pozyskane z liści morwy zagęszczano do sucha.

Oznaczenie aktywności przeciwrodnikowej świeżych ekstraktów z liści morwy wykonywano metodą spektrofotometryczną z użyciem stabilnego rodnika 2,2'-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH) [1]. Polegało ono na określeniu stopnia wygaszania rodników DPPH przez zawarte w ekstraktach przeciwutleniacze, czemu towarzyszyło zmniejszenie intensywności barwy purpurowej i przejście w barwę żółtą. Absorbancję próbek, po upływie 30-minutowej inkubacji w temp.  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  bez dostępu światła, mierzono przy długości  $\lambda = 517 \text{ nm}$  (Metertek SP-830, Tajwan).

Zdolność wygaszania wolnych rodników DPPH obliczano z równania:

$$AA = 100 - \frac{(E_w - E_0)}{E_k} 100 \%,$$

gdzie:

AA – zdolność wygaszania wolnych rodników DPPH [%],

$E_w$  – absorbancja próbki właściwej (ekstrakt z liści morwy) z roztworem DPPH,

$E_0$  – absorbancja próbki właściwej bez dodatku roztworu DPPH,

$E_k$  – absorbancja próbki kontrolnej (alkoholowy roztwór DPPH).

Jednocześnie wyznaczano badaną aktywność przeciwrodnikową w mM Trolox/100 g suchej masy ekstraktu. Testy wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyboru odpowiedniego modelu (powierzchni), służącego do określenia poziomów zmiennych (temperatura, stężenie etanolu), przy których proces ekstrakcji osiąga

wartości ekstremalne (optymalne) przy przyjętych ograniczeniach, kierowano się wartościami współczynnika determinacji ( $R^2$ ) oraz skorygowanego współczynnika determinacji ( $Adj R^2$ ). Kierowano się również rezultatem testu braku dopasowania (*Lack of fit*) ( $p \geq 0,05$ ) oraz wartością współczynnika dopasowania modelu (*Desirability*) [14]. Pozostałe wyniki poddano jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA). Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi analizowano za pomocą testu Tukeya. Do określenia stopnia wzajemnych powiązań pomiędzy poszczególnymi parametrami obliczono współczynnik korelacji Pearsona ( $r$ ). Testowanie prowadzono na poziomie istotności  $p \leq 0,05$ . Wszystkie analizy wykonano w programie Statistica 10,0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

### Wyniki i dyskusja

W pracy przeanalizowano wpływ stężenia rozpuszczalników (etanolu z wodą) oraz wpływ temperatury procesu ekstrakcji na zawartość związków fenolowych i potencjał przeciwrodnikowy, mierzony testem DPPH w ekstrakcie etanolowym z liści morwy białej odmiany wielkolista żółwińska (tab. 1).

Tabela 1. Wybrane parametry wstępne RSM ekstraktu etanolowego z liści morwy.

Table 1. Selected preliminary RSM parameters of ethanol extract from mulberry leaves.

Czynnik Factor	Nazwa czynnika Name of Factor	Jednostka Unit	Typ Type	Najniższy poziom czynnika The lowest level of Factor	Najwyższy poziom czynnika The highest level of Factor
$X_1$	Stężenie etanolu Ethanol concentration	[%]	Numeryczny Numeric	60	96
$X_2$	Temperatura ekstrakcji Temperature of extraction	[°C]		20	70

Sumaryczny czas ekstrakcji wszystkich doświadczeń był jednakowy i wynosił 45 min. Na podstawie powyższych danych program wyznaczył 13 doświadczeń, które obejmowały pięć powtórzeń dla punktu centralnego (tab. 2).

Po wykonaniu analiz empirycznych, czyli po oznaczeniu stężenia polifenoli i aktywności przeciwutleniającej badanych ekstraktów oraz estymacji z wykorzystaniem zgromadzonych danych, wybrano na podstawie wartości współczynnika determinacji ( $R^2$ ) oraz poprawionego współczynnika determinacji ( $Adj R^2$ ) odpowiedni zredukowany model kwadratowy, a program wyznaczył optymalne poziomy czynniki  $X_1$  (rozpuszczalnika – etanolu) oraz  $X_2$  (temperatury). Wyniki te zweryfikowano, oznaczając w kolejno wyznaczonym ekstrakcie rzeczywistą zawartość polifenoli ogółem oraz aktywność przeciwrodnikową testem DPPH.

Tabela 2. Plan centralny kompozycyjny oraz wyniki doświadczeń obejmujące odpowiedzi odnoszące się do ekstraktów etanolowych z liści morwy.

Table 2. Central composition plan and experimental results to comprise responses referring to ethanol extracts of mulberry leaves.

Kolejność doświadczeń* Sequence of experiments	Kolejność doświadczeń** Sequence of experiments	Typ Type	Czynnik X <sub>1</sub> Stężenie etanolu Factor X <sub>1</sub> Ethanol concentration [%]	Czynnik X <sub>2</sub> Temperatura Factor X <sub>2</sub> Temperature [°C]	Odpowiedź 1 Polifenole Response 1 Phenolics [mg GAE/g s.m. ekstraktu/dry mass of extract]	Odpowiedź 2 DPPH Response 2 [mM Trolox/100 g s.m. ekstraktu/dry mass of extract]
1	13	Fact	65,00	28,00	99,37 ± 8,91	24,54 ± 0,99
2	10	Fact	91,00	28,00	34,92 ± 4,49	8,29 ± 0,31
3	8	Fact	65,00	63,00	116,40 ± 6,59	33,02 ± 0,59
4	1	Fact	91,00	63,00	68,78 ± 2,60	15,38 ± 0,35
5	3	Axial	59,62	45,50	93,38 ± 6,24	28,20 ± 0,28
6	5	Axial	96,38	45,50	29,09 ± 3,68	2,43 ± 0,54
7	2	Axial	78,00	20,75	70,92 ± 2,89	17,00 ± 0,60
8	11	Axial	78,00	70,25	112,8 ± 5,26	40,51 ± 0,64
9	7	Center	78,00	45,50	97,66 ± 0,01	23,33 ± 0,27
10	9	Center	78,00	45,50	94,13 ± 1,33	23,75 ± 1,10
11	1	Center	78,00	45,50	86,11 ± 1,70	20,65 ± 0,60
12	6	Center	78,00	45,50	82,90 ± 4,01	21,61 ± 0,74
13	4	Center	78,00	45,50	94,45 ± 2,31	18,82 ± 0,45

Objaśnienia / Explanatory notes:

\* - kolejność nierandomizowana / non-randomized sequence; \*\* - kolejność randomizowana / randomized sequence; DPPH – 2,2'-difenylo-1-pikrylohydrazyl

Zawartość polifenoli w etanolowych ekstraktach z liści morwy wynosiła od 34,92 do 116,40 mg GAE/g s.m. ekstraktu, natomiast aktywność przeciwrodnikowa mieściła się w przedziale: 2,43 - 40,51 mM Trolox/100 g s.m. ekstraktu (tab. 2).

Wyniki analizy wariancji zredukowanego modelu kwadratowego przedstawiono w tab. 3. Test braku dopasowania (*Lack of Fit*) okazał się nieistotny w porównaniu z błędem czystym (*Pure Error*). Jednocześnie test braku dopasowania został potwierdzony wysokimi współczynnikami determinacji oraz skorygowanego współczynnika determinacji, które wyniosły odpowiednio:  $R^2 = 96,16\%$ ,  $Adj. R^2 = 94,88\%$  (polifenole ogółem) oraz  $R^2 = 94,61\%$ ,  $Adj. R^2 = 91,91\%$  (aktywność przeciwrodnikowa badana testem DPPH).

Tabela 3. Wyniki analizy wariancji zredukowanego modelu kwadratowego.

Table 3. Analysis of variance results of reduced quadratic model.

Wyszczególnienie Item	Polifenole ogółem Total phenolic content					Aktywność przeciwrodnikowa (DPPH) DPPH scavenging activity				
	SS	DF	MS	F	Prob	SS	DF	MS	F	Prob
Model	8101,09	3	2700,36	75,09	< 0,0001	1097,55	4	274,39	35,08	< 0,0001
A - stężenie etanolu A - ethanol concentration	5150,61	1	5150,61	143,23	< 0,0001	618,36	1	618,36	79,06	< 0,0001
B - temp. B - temp.	1515,73	1	1515,73	42,15	0,0001	297,90	1	297,90	38,09	0,0003
A <sup>2</sup>	1434,76	1	1434,76	39,90	0,0001	89,68	1	89,68	11,47	0,0096
B <sup>2</sup>						68,14	1	68,14	8,71	0,0184
Reszta Residue	323,64	9	35,96			62,57	8	7,82		
Brak dopasowania Lack of Fit	168,07	5	33,61	0,86	0,5721	46,33	4	11,58	2,85	0,1671
Czysty błąd Pure Error	155,56	4	38,89			16,24	4	4,06		

Objaśnienia: / Explanatory notes:

SS - suma kwadratów / sum of squares; DF - stopnie swobody / degrees of freedom; F - wartość F / F value; MS - średni kwadrat / mean square; Prob - prawdopodobieństwo / probability.

Na podstawie powyższych wyników i wybranego modelu pogram wyznaczył przewidywane wartości polifenoli oraz aktywność przeciwrodnikową (tab. 4). Ilości polifenoli oznaczone doświadczalnie nie różniły się statystycznie istotnie od wartości przewidywanych ( $p \leq 0,001$ ) i zawarte były w przedziale ufności 95 % średniej.

Po analizie wpływu stężenia etanolu i temperatury procesu ekstrakcji na zawartość polifenoli w ekstrakcie etanolowym z liści morwy stwierdzono, że wraz ze wzrostem temperatury tego procesu wzrastała zawartość polifenoli w badanym ekstrakcie (rys. 1). Z kolei, im stężenie etanolu w układzie ekstrakcyjnym wzrastało, tym zawartość polifenoli malała.

W badaniach ustalono empirycznie, że stężenie rozpuszczalników miało decydujący wpływ na pozyskanie większej ilości polifenoli, przy czym ekstrakcja trzykrotna w sumarycznym czasie 45 min umożliwiła uzyskanie największej zawartości związków fenolowych. Podobne zależności uzyskali Katsube i wsp. [15], którzy analizowali parametry procesu ekstrakcji glikozydów flawonoli z liści morwy za pomocą etanolu o różnym stężeniu.

Tabela 4. Wartości przewidywane oraz oznaczone doświadczalnie w ekstrakcie etanolemym z liści morwy.

Table 4. Predicted and experimentally determined values in ethanol extract from mulberry leaves.

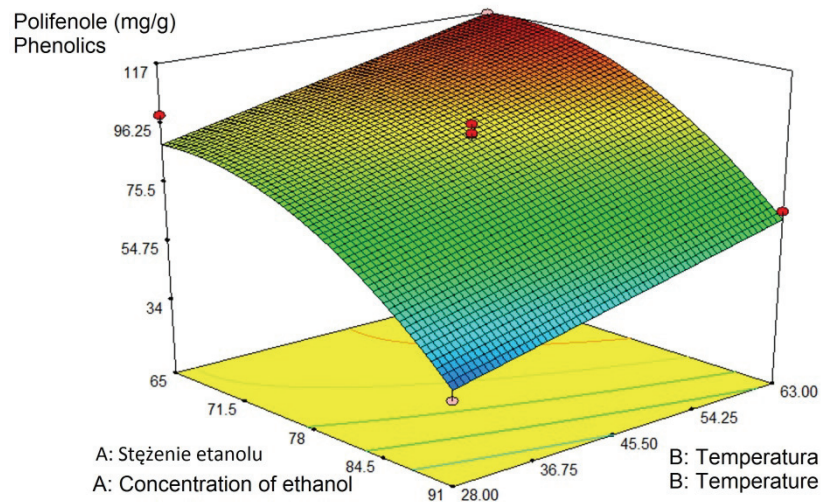
Odpowiedź Response	Wartości przewidywane Predicted values	Przewidywany błąd standardowy Predicted standard error	95 % minimum	95 % maksimum maximum	Wartości oznaczone doświadczalnie Experimentally determined values
Polifenole* Phenolics	116,81 <sup>a</sup>	3,54	108,81	124,81	116,91 <sup>a</sup> ± 0,01
Aktywność przeciwrodnikowa DPPH** DPPH scavenging activity	36,06 <sup>A</sup>	1,71	32,12	40,01	38,81 <sup>A</sup> ± 0,02

Objaśnienia: / Explanatory notes:

różne litery w wierszach wskazują statystyczną istotność różnic w teście Tukeya przy  $p \leq 0,001$  / different letters in rows point out statistical significance of differences in Tukey's test at  $p \leq 0.001$ ; \* mg GAE/g s.m. ekstraktu / mg GAE/g of dry mass of extract; \*\* mM Trolox /100 g s.m. ekstraktu / mM Trolox /100 g of dry mass of extract.

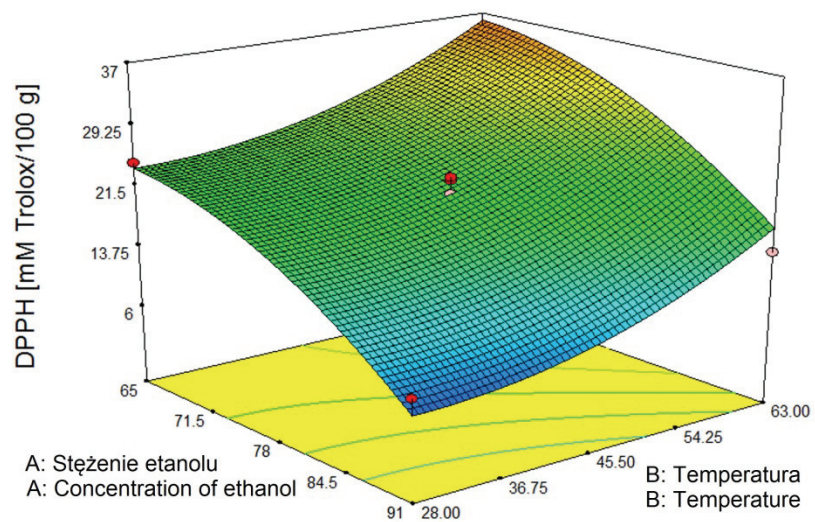
Na wyniki procesu ekstrakcji, rozumiane jako największa ilość wyekstrahowanych polifenoli i najwyższa aktywność przeciwrodnikowa, wpływała również temperatura ekstrakcji. Na ogół przyjmuje się, że wraz ze wzrostem temperatury wzrasta ilość ekstrahowanych związków. Jednakże zbyt wysoka temperatura może powodować rozkład związków termolabilnych i zmiany w składzie związków bioaktywnych. Dlatego w przeprowadzonych doświadczeniach, w których badano zakres temp. 20 - 70 °C, optymalna temperatura ekstrakcji roztworem etanolowo-wodnym wyniosła 63 °C.

Jednocześnie po przeanalizowaniu wpływu stężenia etanolu i temperatury procesu ekstrakcji na aktywność przeciwrodnikową (DPPH) ekstraktu etanolowego z liści morwy stwierdzono, że aktywność przeciwutleniająca badanych ekstraktów wzrastała wraz ze zmniejszaniem się stężenia etanolu w wodzie (od 99 do 65 % etanolu) (rys. 2). Aktywność przeciwrodnikowa ekstraktu o stężeniu etanolu wynoszącym 65 % wyniosła powyżej 37 mM Trolox/100 g s.m. ekstraktu. Natomiast powyżej stężenia 78 % etanolu aktywność przeciwrodnikowa ekstraktu stopniowo obniżała się. Temperatura ekstrakcji również miała istotny wpływ na aktywność badanych ekstraktów i wraz z jej zwiększaniem wzrastała aktywność ekstraktów mierzona testem DPPH. Natomiast w zakresie temperatur 28,0 - 45,5 °C aktywność przeciwrodnikowa wynosiła od 2 do 8 mM Trolox/100 g s.m.



Rys. 1. Wpływ stężenia etanolu i temperatury procesu ekstrakcji na zawartość polifenoli w ekstrakcie etanolowym z liści morwy.

Fig. 1. Effect of ethanol concentration and temperature of extraction process on content of phenolics in ethanol extract from mulberry leaves.



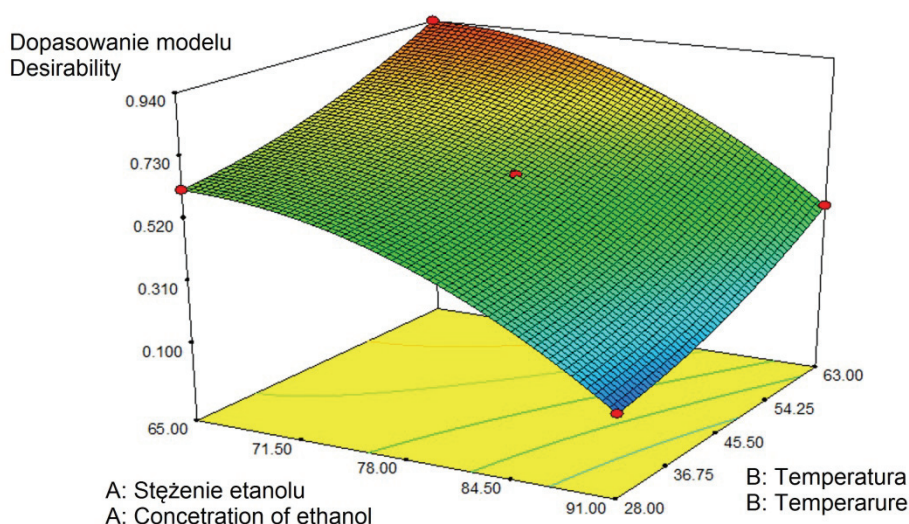
Rys. 2. Wpływ stężenia etanolu i temperatury procesu ekstrakcji na aktywność przeciwrodnikową (DPPH) ekstraktu etanolowego z liści morwy.

Fig. 2. Effect of concentration of ethanol and temperature of extraction process on antiradical activity (DPPH) of ethanol extract from mulberry leaves.



Dopasowanie modelu było najwyższe przy 65-procentowym stężeniu etanolu w wodzie, natomiast malało wraz z jego wzrostem (rys. 3). Zaobserwowano także, że temperatura procesu ekstrakcji w zadanym zakresie, czyli od 28 do 63 °C wpływała istotnie na dopasowanie modelu. W temperaturze poniżej 63 °C istotnie obniżało się dopasowanie modelu, w szczególności, gdy stężenie rozpuszczalnika wyniosło 91 %, to wartość dopasowania modelu była równa 0.

Program wyliczył optymalne poziomy stężenia etanolu w wodzie i temperatury procesu ekstrakcji tj. odpowiednio: 65 % oraz 63 °C. Stosując powyższe parametry procesu ekstrakcji uzyskano największe stężenie polifenoli i najwyższą aktywność przeciwrodnikową oznaczoną testem DPPH o dopasowaniu modelu wynoszącym 0,94. Optymalny proces wydobywania związków o aktywności przeciwutleniającej z liści morwy białej odmiany wielkolistej żółwińskiej pozwolił na zastosowanie stosunkowo niskich nakładów surowcowych, odczynnikowych i czasowych.



Rys. 3. Wpływ stężenia etanolu i temperatury procesu ekstrakcji na dopasowanie modelu.

Fig. 3. Effect of concentration of ethanol and temperature of extraction process on Desirability of model.

Zastosowane w modelu RSM odpowiedzi pozwoliły określić współzależność liniową pomiędzy zawartością polifenoli ogółem oraz aktywnością przeciwrodnikową z rodnikiem DPPH. Wysoka wartość współczynnika korelacji Pearsona ( $r = 0,92$ ; przy  $p \leq 0,001$ ) potwierdziła wystąpienie istotnych zależności liniowych, co znaczy, że wraz ze wzrostem zawartości polifenoli wzrastała aktywność przeciwrodnikowa mierzona

testem DPPH. Podobne zależności w różnych surowcach zielarskich przedstawili Sierżant i wsp. [22]. Karacabey i Mazza [14] określili, że aktywność przeciwutleniająca ekstraktów etanolowych z moszczu winogron mierzona testami TEAC oraz ORAC była wysoko skorelowana z zawartością polifenoli w badanych ekstraktach, odpowiednio  $r = 0,95$  oraz  $r = 0,89$  przy  $p \leq 0,001$ . Również Sielicka i wsp. [21] stwierdzili dodatnią korelację pomiędzy zawartością polifenoli a aktywnością przeciwutleniającą oznaczoną testem DPPH w herbatkach ziołowych i ziołowo-owocowych ( $r = 0,70$ ). Dodatnia korelacja pomiędzy aktywnością przeciwrodnikową i zawartością związków fenolowych wskazuje, że mechanizm działania przeciwutleniającego związków zawartych w ekstrakcie polega na neutralizacji wolnych rodników. Tak więc otrzymany ekstrakt alkoholowy, jako bioaktywny komponent, może być szeroko stosowany w żywności o znaczeniu prozdrowotnym.

### Wnioski

1. Zastosowanie modelu RSM w celu optymalizacji procesu ekstrakcji liści z morwy pozwoliło określić optymalne warunki procesu ekstrakcji związków bioaktywnych przy wykonaniu minimalnej liczby doświadczeń.
2. Stwierdzono wysoką współzależność liniową pomiędzy zawartością polifenoli ogółem a aktywnością przeciwrodnikową mierzoną testem DPPH.
3. Wybrany ekstrakt mógłby być komponentem wieloskładnikowych produktów bioaktywnych.

*Praca została wykonana w ramach projektów nr N N312 209138 oraz PO IG 01.01.02-00-061/09 „Nowa żywność bioaktywna o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych”.*

### Literatura

- [1] Amarowicz R., Pegg R.B., Bautista D.A.: Antibacterial activity of green tea polyphenols against *Escherichia coli* K12. *Nahrung*, 2000, **44** (1) 60-62.
- [2] Amarowicz R., Piskuła M., Honke J., Rudnicka B., Troszyńska A., Kozłowska H.: Extraction of phenolic compounds from lentil seeds (*Lens culinaris*) with various solvents. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1995, **45**, 53-62.
- [3] Arfan M., Khan R., Rybarczyk A., Amarowicz R.: Antioxidant activity of mulberry fruit extracts. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, **13**, 2472-2480.
- [4] Asano N., Yamashita T., Yasuda K., Ikeda K., Kizu H., Kameda Y., Kato A., Nash R.J., Lee H.S., Ryu K.S.: Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 4208-4213.
- [5] Bogucki M.: Optymalizacja jednokryterialna. Model jednoczynnikowy. *Motrol*, 2009, **11**, 22-30.
- [6] Butt M.S., Nazir A., Sultan M.T., Schroen K.: *Morus alba* L. nature's functional tonic. *Trends Food Sci. Technol.*, 2008, **19**, 505-512.

- [7] Cheung L.M., Cheung P.C.K., Ooi V.E.C.: Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.*, 2003, **81** (2), 249-255.
- [8] Dhandhukia P.C., Thakkar V.R.: Response surface methodology to optimise the nutritional parameters for enhanced production of jasmonic acid by *Lasiodiplodia theobromae*. *J. Appl. Microbiol.*, 2008, **105** (3), 636-643.
- [9] Ghodke S.K., Ananthanarayan L., Rodrigues L.: Use of response surface methodology to investigate the effects of milling conditions on damaged starch, dough stickiness and chapatti quality. *Food Chem.*, 2009, **112** (4), 1010-1015.
- [10] Huang W., Li Z., Niu H., Li D., Zhang J.: Optimization of operating parameters for supercritical carbon dioxide extraction of lycopene by response surface methodology. *J. Food Eng.*, 2008, **89** (3), 298-302.
- [11] Jeszka M., Flaczyk E.: HPLC analysis – determination of flavonols in *Morus alba* leaves, III. International Scientific Conference of PhD. Students, Nitra, Slovakia 2008, 28 November, pp. 118-120.
- [12] Jeszka M., Kobus J., Flaczyk E.: Określenie potencjału antyoksydacyjnego ekstraktów z liści morwy białej. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2009, **XLII**, 885-889.
- [13] Jeszka-Skowron M., Flaczyk E., Jeszka J., Krejpcio Z., Król E., Buchowski M.S.: Mulberry leaf extract intake reduces hyperglycaemia in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats fed high-fat diet. *J. Funct. Foods*, 2014 (w druku).
- [14] Karacabey E., Mazza G.: Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food Chem.*, 2010, **119** (1), 343-348.
- [15] Katsube T., Imawaka N., Kawano Y., Yamazaki Y., Shiwaku K., Yamane Y.: Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chem.*, 2006, **97** (1), 25-31.
- [16] Katsube T., Tsurunaga Y., Sugiyama M., Furunod T., Yamasaki Y.: Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Food Chem.*, 2009, **113**, 964-969.
- [17] Katsube T., Yamasaki M., Shiwaku K., Ishijima T., Matsumoto I., Abe K., Yamasaki Y.: Effect of flavonol glycoside in mulberry (*Morus alba* L.) leaf on glucose metabolism and oxidative stress in liver in diet-induced obese mice. *J. Sci. Food Agric.*, 2010, **90**, 2386-2392.
- [18] Kumar V.R., Chauhan S.: Mulberry: Life enhancer. *J. Med. Plant Res.*, 2008, **2** (10), 271-278.
- [19] Le Thanh-Blicharz J., Białas W., Lewandowicz G.: Response surface optimization of manufacturing of dietary starch products. *Acta Scient. Polon., Technol. Aliment.*, 2009, **8** (4), 51-62.
- [20] Lee W.C., Yusof S., Hamid N.S.A., Baharin B.S.: Optimizing conditions for hot water extraction of banana juice using response surface methodology (RSM). *J. Food Eng.*, 2006, **75** (4), 473-479.
- [21] Sielicka M., Pacholek B., Zagórska A.: Właściwości przeciwutleniające wybranych herbatek będących suplementami diety. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, **5** (72), 112-122.
- [22] Sierżant K., Pyrkosz-Biardzka K., Gabrielska J.: Właściwości przeciwutleniające naturalnych ekstraktów polifenolowych z wybranych roślin w układach modelowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **6** (85), 41-53.
- [23] Silva E.M., Rogez H., Larondelle Y.: Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Sep. Purif. Technol.*, 2007, **55**, 381-387.

**OPTIMIZING PROCESS OF EXTRACTING PHENOLIC COMPOUNDS HAVING  
ANTIRADICAL ACTIVITY FROM WHITE MULBERRY LEAVES BY MEANS  
OF RESPONSE SURFACE METHODOLOGY (RSM)**

S u m m a r y

Mulberry leaves contain polyphenols, alkaloids, terpenoids, and steroids. Their extracts can be a valuable component of the pro health food.

The objective of the research study was to optimize the process of extracting phenolic compounds from mulberry leaves and to assess the antiradical activity of derived extracts by a DPPH test, with the use of a response surface methodology (RSM).

Based on RSM, the highest contents of polyphenols and the highest antioxidant activity were obtained within the selected ranges of the ethanol concentration in water and at a selected temperature of the extraction process. The predicted values did not differ significantly from the experimentally determined values ( $p \leq 0.001$ ). The rate of ethanol concentration in the selected extract was 65 %, and the temperature of extraction process was 63 °C.

**Key words:** white mulberry leaves, extraction process, total phenolics, antiradical activity, Response Surface Methodology 