

NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA TRÍCH LY ANTHOCYANIN TỪ GẠO NẾP THAN (*Oryza rufipogon*)

Lê Thị Hồng Anh^{1,*}, Nguyễn Lê Trâm¹, Hoàng Thị Ngọc Nhon¹

¹ Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: anhlth@huit.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của các phương pháp khác nhau như trích ly có hỗ trợ của vi sóng, sóng siêu âm và enzyme đến thu nhận và tối ưu hóa quá trình trích ly anthocyanin từ gạo nếp than (*Oryza rufipogon*). Kết quả cho thấy, phương pháp siêu âm đạt hiệu quả cao nhất và được lựa chọn để tối ưu hóa bằng thiết kế Box-Behnken kết hợp phương pháp bề mặt đáp ứng. Điều kiện tối ưu được xác định tại biên độ siêu âm 31,73%, thời gian siêu âm 6,97 phút và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/21,62 (w/v), với hàm lượng anthocyanin đạt 0,964 mg/g_{ck}; kết quả kiểm chứng thực nghiệm đạt $0,945 \pm 0,028$ mg/g_{ck}, sai lệch nhỏ hơn 5% so với giá trị dự đoán của mô hình. Kết quả nghiên cứu khẳng định tiềm năng ứng dụng của phương pháp siêu âm kết hợp tối ưu hóa điều kiện trích ly để nâng cao hiệu suất trích ly anthocyanin từ gạo nếp than, góp phần định hướng phát triển các sản phẩm thực phẩm và dược liệu có giá trị gia tăng cao.

Từ khóa: Anthocyanin, enzyme, gạo nếp than, *Oryza rufipogon*, vi sóng, siêu âm.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Anthocyanin là nhóm hợp chất polyphenol thuộc họ flavonoid, tồn tại phổ biến trong thực vật và chịu trách nhiệm tạo nên các sắc tố đỏ, tím và xanh đặc trưng của hoa, quả và một số loại hạt. Về cấu trúc hóa học, anthocyanin là các glycoside của anthocyanidin, trong đó phần aglycone quyết định màu sắc và phần đường ảnh hưởng đến độ tan và độ ổn định của hợp chất [1]. Tính chất màu sắc của anthocyanin phụ thuộc mạnh vào pH môi trường, chuyển từ dạng flavylium cation màu đỏ ở pH thấp sang dạng base quinoidal màu xanh ở pH cao [2]. Ngoài vai trò tạo màu tự nhiên, anthocyanin còn được quan tâm rộng rãi nhờ các hoạt tính sinh học quan trọng như: Chống oxy hóa, kháng viêm, bảo vệ tim mạch và chống ung thư [3]. Chính vì vậy, anthocyanin ngày càng được xem là một hợp chất tiềm năng thay thế chất màu tổng hợp trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm.

Gạo nếp than (*Oryza rufipogon*) là một giống lúa giàu hợp chất phenolic, đặc biệt là anthocyanin, với hàm lượng tập trung chủ yếu ở lớp vỏ cám. Các anthocyanin chính trong gạo nếp than bao gồm cyanidin-3-glucoside và peonidin-3-glucoside, đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính sinh học của nguyên liệu. Bên cạnh đó, gạo nếp than còn chứa các hợp chất dinh dưỡng như

protein, chất xơ và khoáng chất, góp phần nâng cao giá trị dinh dưỡng và chức năng [4, 5]. Các nghiên cứu trong nước cũng cho thấy, gạo nếp than là nguồn anthocyanin dồi dào và có tiềm năng ứng dụng cao trong thực phẩm chức năng và chất màu tự nhiên [6, 7].

Các phương pháp trích ly anthocyanin truyền thống như ngâm tĩnh thường bị hạn chế về hiệu suất do khả năng khuếch tán thấp và cấu trúc vách tế bào bền vững. Để khắc phục, nhiều kỹ thuật trích ly hiện đại đã được phát triển như: Vi sóng (MAE), siêu âm (UAE) và enzyme (EAE) [8]. Phương pháp vi sóng giúp gia tăng tốc độ gia nhiệt và phá vỡ cấu trúc tế bào, từ đó nâng cao hiệu suất trích ly [9]. Trong khi đó, siêu âm tạo ra hiện tượng cavitation giúp tăng cường tiếp xúc giữa dung môi và nguyên liệu [10]. Ngoài ra, enzyme như cellulase và pectinase có khả năng phân giải thành tế bào, giải phóng anthocyanin hiệu quả hơn. Việc kết hợp các phương pháp này đã được chứng minh là có thể cải thiện đáng kể hiệu suất và chất lượng dịch chiết anthocyanin. Kỹ thuật siêu âm có vai trò tích cực trong việc nâng cao hiệu suất chiết anthocyanin từ cám gạo nhờ khả năng phá vỡ cấu trúc mô và rút ngắn thời gian trích ly. Hàm lượng anthocyanin thu được đạt khoảng 44 mg/100g_{ck} và có thể tối ưu lên đến 46,3 mg/100g_{ck}, cao hơn đáng kể so với

phương pháp chiết truyền thống [6, 7]. Tuy nhiên, việc khai thác hiệu quả nguồn anthocyanin từ nguyên liệu này vẫn còn hạn chế do ảnh hưởng của cấu trúc tế bào và điều kiện trích ly.

Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về trích ly anthocyanin từ các nguồn thực vật khác nhau, nhưng việc tối ưu hóa quá trình trích ly từ gạo nếp than *O. rufipogon* vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ, đặc biệt trong việc kết hợp các công nghệ hỗ trợ hiện đại. Các yếu tố ảnh hưởng đến trích ly anthocyanin có hỗ trợ của vi sóng, sóng siêu âm và enzyme chưa được so sánh đồng thời cũng như tìm điều kiện tối ưu trích ly. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả của các phương pháp trích ly cũng như tối ưu hóa quá trình trích ly anthocyanin từ gạo nếp than, góp phần nâng cao hiệu suất thu nhận và làm cơ sở cho các ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Gạo nếp than (*O. rufipogon*) sử dụng trong nghiên cứu này được thu hoạch tại phường Mỹ Xuyên, tỉnh Sóc Trăng (cũ), nay là thành phố Cần Thơ, được canh tác theo tiêu chuẩn VietGAP. Hạt gạo được làm sạch, sấy ở khoảng 50°C trong 2 giờ, sau đó nghiền mịn để thu bột gạo có độ ẩm < 10%. Mẫu bột được bảo quản ở 4°C và được sử dụng cho toàn bộ thí nghiệm.

Các hóa chất sử dụng bao gồm: Ethanol, HCl, axit acetic, natri acetate và dung dịch đệm acetate (pH 5,5). Hóa chất được cung cấp bởi Merck và Sigma-Aldrich đều đạt cấp độ tinh khiết phân tích. Enzyme cellulase (≥ 700 U/g) thu nhận từ nấm *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Ảnh hưởng của vi sóng đến trích ly anthocyanin từ gạo nếp than.

Ảnh hưởng của thời gian và công suất vi sóng đến hiệu quả trích ly anthocyanin được khảo sát trong điều kiện kiểm soát. Mẫu bột gạo nếp than (1 g, tính theo chất khô) được trích ly bằng ethanol 60% (v/v) với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1: 20 (w/v). Lò vi sóng (Faster Mov Smart) được làm nóng trước 45 giây. Thời gian vi sóng được khảo sát ở các mức 10 - 30 giây theo chế độ gián đoạn (thời gian bức xạ là 5 giây, khoảng cách

giữa các lần bức xạ là 10 giây), trong khi các thông số khác được giữ cố định theo điều kiện tối ưu trước đó. Công suất vi sóng được khảo sát trong khoảng 140 - 700 W, sử dụng thời gian tối ưu, với chế độ vận hành gián đoạn (thời gian bức xạ là 10 giây, khoảng cách giữa các lần bức xạ là 10 giây). Sau xử lý, dịch chiết được ly tâm loại cặn và xác định hàm lượng anthocyanin tổng bằng phương pháp vi sai pH (mg/g_{ck}). Phương pháp vi sóng được ghi nhận có khả năng tăng hiệu suất trích ly các hợp chất phenolic do tăng cường phá vỡ cấu trúc tế bào và rút ngắn thời gian chiết [9, 11].

2.2.2. Ảnh hưởng của siêu âm đến trích ly anthocyanin từ gạo nếp than

Ảnh hưởng của các thông số siêu âm đến hiệu quả trích ly anthocyanin được khảo sát thông qua ba yếu tố chính bao gồm: Biên độ, thời gian siêu âm và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi. Trong tất cả các thí nghiệm, mẫu (3 g) được trích ly bằng ethanol 60% (v/v) ở pH = 2, sau đó ủ trong bể ổn nhiệt (55°C, 50 phút) trong điều kiện tránh ánh sáng và ly tâm để loại bỏ cặn. Cụ thể, biên độ siêu âm được khảo sát trong khoảng 20 - 40% (công suất tối đa của thiết bị siêu âm đầu dò, Sonics VCX 750) với thời gian xử lý 6 phút và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1: 15 (w/v). Tiếp theo, thời gian siêu âm được khảo sát từ 2 - 10 phút tại biên độ tối ưu thu được từ thí nghiệm trước. Cuối cùng, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi được khảo sát trong khoảng 1: 10 - 1: 30 (w/v) dưới các điều kiện siêu âm tối ưu. Hàm lượng anthocyanin tổng được xác định bằng phương pháp vi sai pH và biểu thị theo mg/g chất khô (mg/g_{ck}). Phương pháp siêu âm được chứng minh có khả năng tăng hiệu suất trích ly hợp chất phenolic nhờ hiện tượng cavitation, giúp phá vỡ cấu trúc tế bào và tăng cường khuếch tán chất tan [11, 12].

2.2.3. Ảnh hưởng của enzyme cellulase đến trích ly anthocyanin từ gạo nếp than

Quá trình trích ly anthocyanin có hỗ trợ enzyme (EAE) được tiến hành nhằm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cellulase và thời gian ủ enzyme đến hàm lượng anthocyanin thu hồi. Mẫu (2 g, tính theo chất khô) được phối trộn với cellulase ở các mức 0,2 - 1,0% (w/w), bổ sung đệm acetate pH 5,5 theo tỷ lệ 1: 25 (w/v) và ủ ở 45°C; thời gian ủ được cố định ở 60 phút khi

khảo sát nồng độ enzyme; ngược lại, nồng độ enzyme được giữ ở mức tối ưu từ thí nghiệm trước khi khảo sát thời gian ủ (30 - 150 phút). Sau giai đoạn tiền xử lý enzyme, bổ sung ethanol 96% theo tỷ lệ 1: 10 (w/v), điều chỉnh pH = 2 để đạt nồng độ dung môi xấp xỉ 60% ethanol, sau đó tiếp tục ủ ở 55°C trong 50 phút trong điều kiện tránh ánh sáng; dịch chiết được ly tâm loại bã trước khi phân tích. Hàm lượng anthocyanin tổng được định lượng bằng phương pháp vi sai pH và biểu thị theo mg/g_{ck}. Cách tiếp cận, dùng cellulase được lựa chọn do enzyme thủy phân

thành tế bào, hỗ trợ giải phóng chất màu và tăng khuếch tán chất tan, từ đó có thể cải thiện hiệu suất thu hồi anthocyanin so với trích ly dung môi đơn thuần [13, 14].

2.2.4. Tối ưu hóa quá trình trích ly anthocyanin từ gạo nếp than

Quá trình tối ưu hóa dựa trên thiết kế Box-Behnken với ba yếu tố biến độc lập là biên độ siêu âm (X₁, %), thời gian siêu âm (X₂, phút), tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (X₃, w/v). Thực hiện mã hóa các mức yếu tố trên (Bảng 1).

Bảng 1. Mã hóa các mức yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly anthocyanin

Các yếu tố ảnh hưởng	Mức các yếu tố		
	-1	0	+1
Biên độ siêu âm (X ₁ , %)	20	30	40
Thời gian siêu âm (X ₂ , phút)	2	6	10
Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (X ₃ , w/v)	1/10	1/20	1/30

Quy trình tối ưu hóa điều kiện trích ly anthocyanin từ gạo nếp than được thực hiện bằng phương pháp trích ly cho hiệu quả cao nhất đã sàng lọc (hỗ trợ vi sóng, siêu âm hoặc hỗ trợ enzyme), sử dụng thiết kế đáp ứng bề mặt Box-Behnken (BBD) [15]. Mô hình hồi quy bậc hai được xây dựng theo dạng tổng quát $Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ij} X_i X_j + \sum b_{ii} X_i^2$

Trong đó: Y hàm lượng anthocyanin (mg/g_{ck}); b₀ là hằng số; b_i là hệ số ảnh hưởng tuyến tính của các yếu tố X_i; b_{ij} là hệ số tương tác giữa các yếu tố; b_{ii} là hệ số ảnh hưởng bậc hai (hiệu ứng cong). Từ các kết quả phân tích phương sai (ANOVA), mô hình được đánh giá dựa trên các thông số thống kê như: Hệ số tương quan R², hệ số tương quan hiệu chỉnh (R²_{adj}), giá trị p (p-value) của mô hình, kiểm định độ phù hợp (Lack of Fit) và biểu đồ bề mặt đáp ứng (Response Surface). Hệ số R² càng gần 1 cho thấy mức độ phù hợp của mô hình với dữ liệu thực nghiệm càng cao, R² hiệu chỉnh phản ánh mức độ giải thích biến phụ thuộc đã được hiệu chỉnh theo số lượng biến độc lập, giúp đánh giá mô hình một cách chính xác hơn và tránh hiện tượng quá khớp. Giá trị p nhỏ hơn 0,05 cho thấy mô hình có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95% [16].

2.3. Xác định hàm lượng anthocyanin

Hàm lượng anthocyanin tổng (mg/g_{ck}) được xác định bằng phương pháp vi sai pH. Độ hấp thụ của dịch chiết anthocyanin được đo bằng quang

phổ UV - Vis tại bước sóng 520 nm. Hàm lượng anthocyanin được tính theo đơn vị tương đương cyanidin-3-glucoside dựa trên công thức sau [17]:

$$\text{Hàm lượng anthocyanin (mg/g)} = \frac{A \times DF \times MW \times V}{\epsilon \times L \times m}$$

Trong đó: A là (A_{λ_{max}} - A_{λ₇₀₀})_{pH=1} - (A_{λ_{max}} - A_{λ₇₀₀})_{pH=4,5}; DF là hệ số pha loãng; L là chiều dài cuvet (1 cm); MW là khối lượng phân tử của cyanidin 3-glucoside, MW = 449,2 g/mol; V là thể tích dung dịch màu sau pha loãng (mL); ε là hệ số hấp thụ mol (l.mol⁻¹.cm⁻¹), ε = 26.900 l.mol⁻¹.cm⁻¹; m là khối lượng mẫu (g)

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần. Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019 và phương pháp thống kê ANOVA được xử lý bởi phần mềm Minitab 2019 và tối ưu hóa được xử lý bởi phần mềm JMP Pro 17.

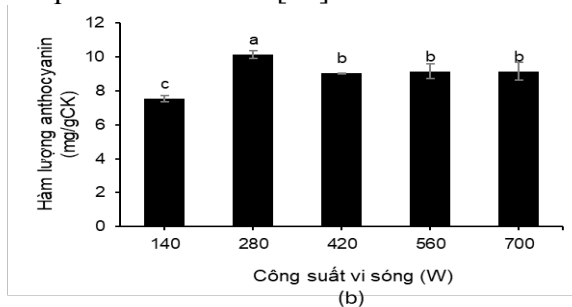
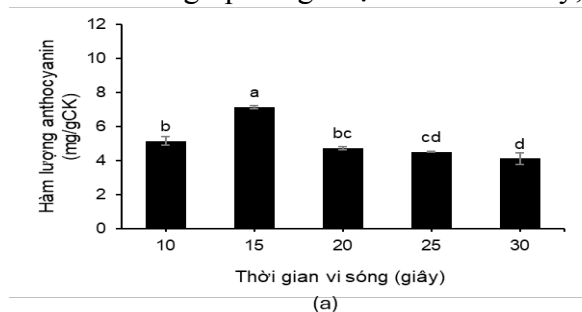
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng vi sóng đến trích ly anthocyanin từ gạo nếp than

Công suất và thời gian vi sóng là hai thông số quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả trích ly anthocyanin, do chi phối đồng thời quá trình truyền nhiệt và phá vỡ cấu trúc tế bào. Kết quả khảo sát ở hình 1 cho thấy, khi công suất vi sóng tăng từ 140 W lên 280 W, hàm lượng anthocyanin tăng đáng kể từ 7,54 ± 0,17 lên

$10,12 \pm 0,22$ mg/g_{ck} chứng tỏ được rằng sự gia tăng năng lượng vi sóng đã thúc đẩy quá trình khuếch tán và giải phóng anthocyanin khỏi ma trận tế bào. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng công suất lên 420 - 560 W, hàm lượng anthocyanin giảm rõ rệt. Hiện tượng này có thể được giải thích do cường độ vi sóng cao làm tăng nhanh nhiệt độ hệ, mặc dù ban đầu giúp tăng hiệu suất trích ly,

nhưng đồng thời cũng thúc đẩy quá trình phân hủy nhiệt của anthocyanin – một hợp chất nhạy cảm với nhiệt, đặc biệt do sự hiện diện của các nhóm glycoside trong cấu trúc phân tử [18]. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của N.Pap và cs (2013), khi điều kiện vi sóng trung bình cho hiệu suất thu hồi anthocyanin cao nhất từ quả mâm xôi đen [19].

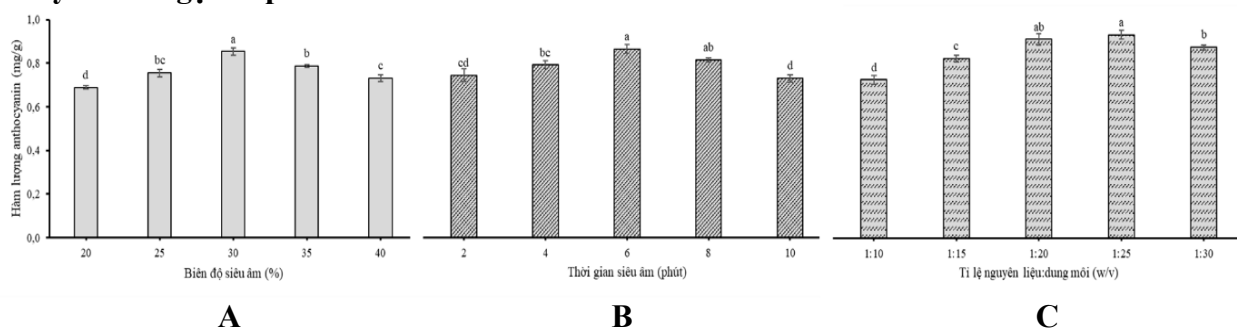


Hình 1. Ảnh hưởng của công suất (a) và thời gian (b) vi sóng đến quá trình trích ly anthocyanin

Bên cạnh đó, thời gian vi sóng cũng thể hiện ảnh hưởng tương tự đến hiệu suất trích ly. Khi thời gian tăng từ 10 - 15 giây, hàm lượng anthocyanin tăng từ $5,16 \pm 0,25$ lên $7,14 \pm 0,09$ mg/g_{ck}; tuy nhiên, khi kéo dài thời gian xử lý đến 20 - 30 giây, hàm lượng anthocyanin có xu hướng giảm. Điều này cho thấy, việc kéo dài thời gian vi sóng vượt ngưỡng tối ưu dẫn đến tích lũy nhiệt quá mức trong hệ, làm tăng áp suất nội bào và gây phá hủy cấu trúc tế bào một cách không kiểm soát, đồng thời thúc đẩy sự thoái hóa các hợp chất nhạy nhiệt như anthocyanin. Ngoài ra, sự gia tăng hằng số điện môi của dung môi dưới tác động vi sóng cũng làm gia tăng tương tác năng lượng, góp phần gây phân hủy hợp chất mục tiêu trước khi được thu nhận hoàn toàn [19]. Do đó, việc tối ưu đồng thời công suất và thời gian vi sóng là cần thiết nhằm đạt hiệu quả trích ly cao nhất trong khi vẫn duy trì được tính ổn định của anthocyanin.

Kỹ thuật siêu âm được xem là một phương pháp hiệu quả trong trích ly các hợp chất tự nhiên từ nguyên liệu thực vật nhờ khả năng tăng cường hiện tượng xâm thực (cavitation), phá vỡ cấu trúc tế bào và thúc đẩy quá trình khuếch tán chất tan. Kết quả ở hình 2 cho thấy, các thông số kỹ thuật như biên độ siêu âm, thời gian xử lý và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất thu hồi anthocyanin. Cụ thể, khi tăng biên độ siêu âm từ 20% lên 30%, hàm lượng anthocyanin tăng và đạt giá trị cao nhất tại 30% ($0,854 \pm 0,018$ mg/g_{ck}); tuy nhiên, khi tiếp tục tăng lên 40%, hàm lượng giảm xuống $0,732 \pm 0,017$ mg/g_{ck}. Điều này có thể giải thích, do ở mức biên độ tối ưu, hiệu ứng xâm thực giúp phá vỡ thành tế bào hiệu quả và tăng cường truyền khối, trong khi biên độ quá cao làm gia tăng nhiệt độ và áp suất cục bộ, dẫn đến sự suy thoái anthocyanin [20, 21].

3.2. Ảnh hưởng sóng siêu âm đến trích ly anthocyanin từ gạo nếp than



Hình 2. Ảnh hưởng của biên độ siêu âm (A), thời gian siêu âm (B), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (C) đến quá trình trích ly anthocyanin

Tương tự, thời gian siêu âm cũng ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu suất trích ly. Khi tăng thời gian từ 2 lên 6 phút, hàm lượng anthocyanin tăng từ $0,746 \pm 0,029$ lên $0,866 \pm 0,020$ mg/g_{ck}, nhưng giảm xuống $0,815 \pm 0,010$ mg/g_{ck} khi kéo dài đến 8 phút. Kết quả này cho thấy, thời gian xử lý quá dài có thể gây phân hủy các hợp chất nhạy nhiệt như anthocyanin, làm giảm hiệu quả thu hồi [22]. Xu hướng này phù hợp với các kết quả nghiên cứu trước đây, trong đó thời gian siêu âm tối ưu thường nằm trong khoảng 5 - 6 phút đối với các nguyên liệu giàu anthocyanin [23, 24].

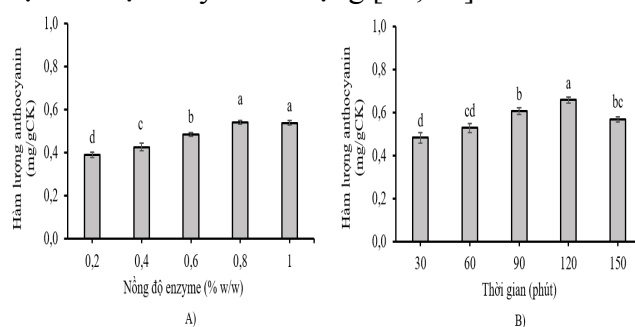
Bên cạnh đó, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi cũng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình khuếch tán. Khi tăng tỷ lệ từ 1/10 lên 1/25 (w/v), hàm lượng anthocyanin tăng từ $0,727 \pm 0,021$ lên $0,934 \pm 0,019$ mg/g_{ck}, sau đó giảm nhẹ khi tăng lên 1/30 (w/v). Hiện tượng này có thể được giải thích bởi sự gia tăng chênh lệch nồng độ giữa pha rắn và dung môi giúp thúc đẩy quá trình khuếch tán; tuy nhiên, khi lượng dung môi quá lớn, dịch chiết bị pha loãng, làm giảm hiệu quả thu hồi. Như vậy, điều kiện siêu âm tối ưu để trích ly anthocyanin trong nghiên cứu này là biên độ 30%, thời gian 6 phút và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/25 (w/v), với hàm lượng anthocyanin đạt $0,934 \pm 0,019$ mg/g_{ck}. Các điều kiện này đảm bảo cân bằng giữa hiệu quả phá vỡ cấu trúc tế bào và hạn chế sự suy thoái của anthocyanin, qua đó nâng cao hiệu suất trích ly và duy trì chất lượng dịch chiết.

3.3. Ảnh hưởng enzyme đến trích ly anthocyanin từ gạo nếp than

Việc sử dụng enzyme hỗ trợ trong quá trình trích ly đã trở nên phổ biến nhờ khả năng xúc tác sinh học hiệu quả, giúp phá vỡ cấu trúc thành tế bào thực vật và giải phóng các hợp chất mục tiêu. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ enzyme và thời gian ủ đến quá trình trích ly anthocyanin từ gạo nếp than được thể hiện ở hình 3.

Việc sử dụng enzyme trong trích ly anthocyanin được chứng minh là một phương pháp hiệu quả nhờ khả năng xúc tác sinh học giúp phá vỡ cấu trúc thành tế bào và giải phóng các hợp chất nội bào, từ đó nâng cao hiệu suất thu hồi và chất lượng dịch chiết. Kết quả ở hình 3 cho thấy nồng độ enzyme cellulase có ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng anthocyanin. Cụ thể, khi

nồng độ enzyme tăng từ 0,2% lên 0,8%, hàm lượng anthocyanin tăng và đạt giá trị cao nhất tại 0,8% ($0,539 \pm 0,007$ mg/g_{ck}); tuy nhiên, khi tiếp tục tăng lên 1%, sự gia tăng không còn có ý nghĩa ($0,541 \pm 0,012$ mg/g_{ck}). Điều này có thể giải thích do khi đạt đến ngưỡng bão hòa cơ chất, tốc độ phản ứng enzyme không tiếp tục tăng, trong khi lượng enzyme dư thừa có thể làm thay đổi cấu trúc mô và kéo theo sự giải phóng các hợp chất không mong muốn, ảnh hưởng đến độ tinh khiết của dịch chiết [25]. Kết quả này tương đồng với các kết quả nghiên cứu trước, mặc dù nồng độ enzyme tối ưu có thể thay đổi tùy theo nguyên liệu và loại enzyme sử dụng [26, 27].



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme (A) và thời gian ủ (B)

đến quá trình trích ly anthocyanin

Bên cạnh đó, thời gian ủ enzyme cũng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả trích ly. Khi tăng thời gian ủ từ 30 đến 120 phút, hàm lượng anthocyanin tăng đáng kể và đạt cực đại tại 120 phút ($0,657 \pm 0,014$ mg/g_{ck}); tuy nhiên, khi kéo dài đến 150 phút, hàm lượng giảm xuống còn $0,568 \pm 0,013$ mg/g_{ck}. Xu hướng này phản ánh đặc điểm động học của phản ứng enzyme, trong đó cần một khoảng thời gian đủ dài để enzyme tiếp xúc và thủy phân cấu trúc thành tế bào. Tuy nhiên, thời gian xử lý kéo dài có thể dẫn đến sự suy giảm hoạt tính enzyme, gia tăng quá trình oxy hóa và phân hủy thứ cấp của anthocyanin, làm giảm hiệu suất thu hồi [28]. Kết quả này phù hợp với các kết quả nghiên cứu trước đây, trong đó thời gian xử lý enzyme tối ưu thường nằm trong khoảng 1-2 giờ tùy thuộc vào hệ enzyme và nguyên liệu [29, 30]. Từ kết quả cho thấy, điều kiện tối ưu cho quá trình trích ly anthocyanin có hỗ trợ enzyme là nồng độ cellulase 0,8% kết hợp với thời gian ủ 120 phút. Các điều kiện này đảm bảo hiệu quả phá vỡ cấu trúc tế bào, tối đa hóa khả năng giải phóng anthocyanin đồng thời hạn

chế sự suy thoái hợp chất, qua đó nâng cao hiệu suất và chất lượng dịch chiết.

3.4. Tối ưu hóa trích ly anthocyanin từ gạo nếp than

Sau khi khảo sát trên hai phương pháp trích ly anthocyanin từ gạo nếp than là trích ly có hỗ trợ vi sóng, siêu âm và trích ly có hỗ trợ enzyme cho thấy phương pháp trích ly có hỗ trợ siêu âm

đạt hiệu quả cao nhất. Vì thế, tiến hành tối ưu hóa điều kiện trích ly anthocyanin có hỗ trợ siêu âm nhằm nâng cao hiệu suất trích ly anthocyanin từ gạo nếp than và sử dụng phần mềm JMP Pro 17 với phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) thiết kế theo mô hình Box Behnken thu được 15 thực nghiệm với hàm mục tiêu là hàm lượng anthocyanin (mg/g_{ck}) (Bảng 2).

Bảng 2. Thiết kế thực nghiệm và kết quả

Thí nghiệm	X ₁	X ₂	X ₃	Y (mg/g _{ck})
1	-1	-1	0	0,756
2	-1	+1	0	0,782
3	+1	-1	0	0,803
4	+1	+1	0	0,915
5	0	-1	-1	0,778
6	0	-1	+1	0,876
7	0	+1	-1	0,893
8	0	+1	+1	0,837
9	-1	0	-1	0,735
10	+1	0	-1	0,784
11	-1	0	+1	0,822
12	+1	0	+1	0,874
13	0	0	0	0,952
14	0	0	0	0,941
15	0	0	0	0,971

Phân tích phương sai được dùng để đánh giá mức độ phù hợp của mô hình. Kết quả phân tích ANOVA bằng phần mềm JMP Pro 17 cho thấy sự

ảnh hưởng tuyến tính, bình phương của các biến độc lập, sự tương tác của các biến và các hệ số hồi quy được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phân tích phương sai của phương trình hồi quy

Nguồn	DF	Tồn bình phương	Trung bình bình phương	P-value
Mô hình	9	0,07597552	0,008442	
Sai số	5	0,00399942	0,000800	0,0092*
Tổng hiệu chỉnh	14	0,07997493		
Độ không phù hợp của mô hình	3	0,00353875	0,001180	5,1212
Sai số thuần	2	0,00046067	0,000230	0,1677
Tổng sai số	5	0,00399942		

Bảng 4. Giá trị ước lượng các hệ số hồi quy của mô hình dự đoán hàm lượng anthocyanin

Nguồn	DF	Tồn bình phương	Trung bình bình phương	P-value
Mô hình	9	0,07597552	0,008442	
Sai số	5	0,00399942	0,000800	0,0092*
Tổng hiệu chỉnh	14	0,07997493		
Độ không phù hợp của mô hình	3	0,00353875	0,001180	5,1212
Sai số thuần	2	0,00046067	0,000230	0,1677
Tổng sai số	5	0,00399942		

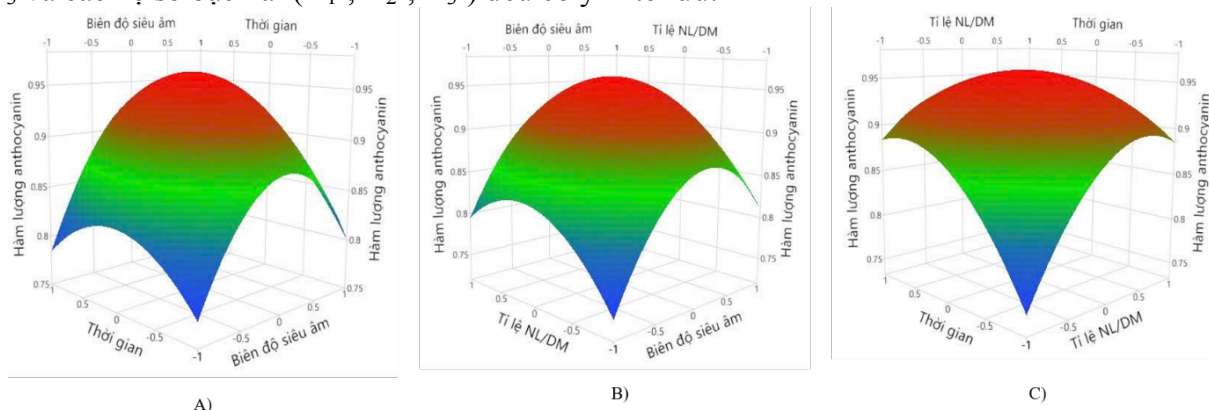
Do vậy, phân tích ý nghĩa các hệ số hồi quy tìm phương trình hồi quy có dạng như sau:

$$Y = 0,955 + 0,035X_1 + 0,027X_2 + 0,027X_3 - 0,039X_2X_3 - 0,092X_1^2 - 0,049X_2^2 - 0,059X_3^2$$

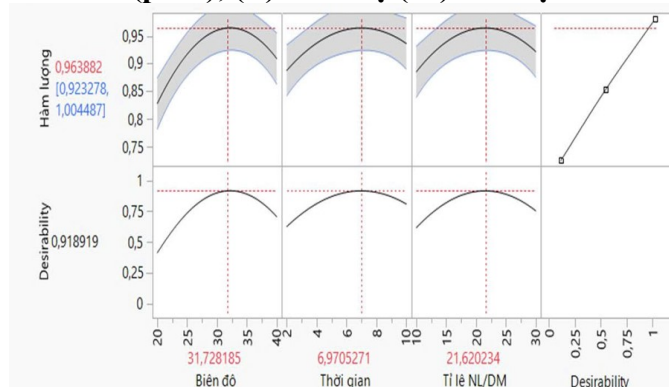
Kết quả ở bảng 4 cho thấy các yếu tố tuyến tính gồm biên độ siêu âm (X₁), thời gian siêu âm (X₂) và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (X₃) đều có ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm lượng

anthocyanin ($p < 0,05$). Ngược lại, các tương tác X_1X_2 và X_1X_3 không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) và được loại khỏi mô hình. Hệ số tương tác X_2X_3 và các hệ số bậc hai (X_1^2 , X_2^2 , X_3^2) đều có ý

nghĩa ($p < 0,05$) và mang giá trị âm, cho thấy sự tồn tại của điểm cực đại và xu hướng giảm hàm lượng anthocyanin khi các biến vượt quá giá trị tối ưu.



Hình 4. Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện ảnh hưởng của các yếu tố, (A) biên độ (%) và thời gian siêu âm (phút), (B) Biên độ (%) và tỉ lệ NL/DM (w/v), (C) Thời gian (phút) và tỉ lệ NL/DM (w/v)



Hình 5. Mô hình dự đoán hàm lượng anthocyanin

Phân tích phương sai (ANOVA) được sử dụng nhằm đánh giá mức độ phù hợp của mô hình hồi quy bậc hai trong thiết kế Box - Behnken. Kết quả cho thấy, mô hình có ý nghĩa thống kê với giá trị p nhỏ hơn 0,05, đồng thời hệ số xác định $R^2 = 0,95$ chứng tỏ 95% sự biến thiên của hàm lượng anthocyanin được giải thích bởi mô hình, đáp ứng yêu cầu về độ phù hợp theo Guan và Yao (2008) [31]. Kiểm định Lack-of-Fit không có ý nghĩa ($p = 5,1212 > 0,05$), cho thấy không có sự sai khác đáng kể giữa giá trị dự đoán và thực nghiệm, khẳng định tính phù hợp và độ tin cậy của mô hình.

Từ mô hình hồi quy thu được, điều kiện tối ưu được xác định với biên độ siêu âm 31,73%, thời gian siêu âm 6,97 phút và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/21,62 (w/v), tại đó hàm lượng anthocyanin đạt giá trị cực đại 0,964 mg/g_{ck}. Kết quả mô phỏng bề mặt đáp ứng (Hình 4) cho thấy cả ba yếu tố đều ảnh hưởng đáng kể đến quá trình trích ly. Cụ thể,

sự gia tăng biên độ siêu âm làm tăng hiệu ứng cavitation, thúc đẩy phá vỡ thành tế bào và tăng khả năng khuếch tán; trong khi đó, tỷ lệ dung môi lớn hơn giúp tăng gradient nồng độ, từ đó nâng cao hiệu suất trích ly [32]. Tuy nhiên, khi các yếu tố này vượt quá ngưỡng tối ưu hoặc kết hợp ở mức cao, hiện tượng phân hủy anthocyanin và trạng thái cân bằng khuếch tán xảy ra, dẫn đến giảm hiệu suất thu hồi [33]. Kết quả kiểm chứng thực nghiệm tại điều kiện tối ưu cho thấy hàm lượng anthocyanin đạt $0,945 \pm 0,028$ mg/g_{ck}, sai lệch 1,97% so với giá trị dự đoán (0,964 mg/g_{ck}) (Hình 5), nhỏ hơn 5%. Điều này chứng tỏ mô hình hồi quy có độ chính xác cao và khả năng dự đoán tốt, phù hợp cho việc tối ưu hóa quá trình trích ly anthocyanin từ gạo nếp than.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chứng minh rằng phương pháp trích ly có hỗ trợ siêu âm là hiệu quả hơn trong việc thu nhận anthocyanin từ gạo nếp than so với các phương pháp vi sóng và enzyme. Các yếu tố công nghệ như: Biên độ siêu âm, thời gian xử lý và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đều có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất trích ly. Thông qua thiết kế Box - Behnken và mô hình bề mặt đáp ứng, điều kiện tối ưu đã được xác định với hàm lượng anthocyanin đạt 0,964 mg/g_{ck}. Kết quả kiểm chứng thực nghiệm cho thấy độ sai lệch ($< 5\%$), khẳng định độ tin cậy và khả năng dự đoán của mô hình. Nhìn chung, việc tối ưu hóa các thông số siêu âm không chỉ giúp nâng cao hiệu suất trích ly mà còn góp phần duy trì tính ổn định

của anthocyanin. Kết quả nghiên cứu góp phần cung cấp cơ sở khoa học cho việc định hướng lựa chọn phương pháp trích ly anthocyanin từ gạo nếp than, làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo hướng tới phát triển sản phẩm có giá trị gia tăng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. S. Chen *et al.* (2024). Anthocyanin and its bioavailability, health benefits, and applications: A comprehensive review. *Food Reviews International*. 40(10), 3666 - 3689.
- [2]. A. Castañeda-Ovando *et al.* (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review." *Food Chemistry*, 113(4), 859 - 871.
- [3]. P. Bharathy and P. V. Thanikachalam (2025). Pharmacological relevance of anthocyanin derivative: A review. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*. vol. 14, p. 100565.
- [4]. H. Zhang *et al.* (2015). Phenolic compounds and antioxidant properties of breeding lines between the white and black rice. *Food Chem*, 172, 630 - 639.
- [5]. A. Poonia and S. Pandey (2021). Bioactive compounds, nutritional benefits and food applications of black rice: a review. *Nutrition & Food Science*. 52(3), 466 - 482.
- [6]. L. T. K. Loan *et al.* (2022). Nghiên cứu trích ly anthocyanin trong cám gạo cẩm trồng tại Cai Lậy (Tiền Giang) bằng phương pháp hỗ trợ sóng siêu âm. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 5, 40 - 45.
- [7]. L. T. K. Loan *et al.* (2021). Tối ưu hóa quá trình trích ly anthocyanin trong cám gạo cẩm bằng sóng siêu âm. *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, Đại học Thái Nguyên*, 874 - 879.
- [8]. J. Tan *et al.* (2022). Extraction and purification of anthocyanins: A review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 8, 100306.
- [9]. W. Routray and V. Orsat (2011). Microwave - assisted extraction of flavonoids: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 409 - 424.
- [10]. S. Sethi and V. K. Rathod (2025). Recent advances in ultrasound-assisted extraction of natural products using novel solvents: a mini-review. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 48, 101132.
- [11]. F. Chemat *et al.* (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem*, 34, 540 - 560.
- [12]. L. Wang, C. L. (2026). Weller, and Technology. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, 17(6), 300 - 312.
- [13]. T. L. Swer *et al.* (2018). Optimization of enzyme aided extraction of anthocyanins from *Prunus nepalensis* L. *Lwt*, 91, 382 - 390.
- [14]. T. L. Swer *et al.* (2016). Evaluation of enzyme treatment conditions on extraction of anthocyanins from *Prunus nepalensis* L. *Int J Biol Macromol*, 92, 867 - 871.
- [15]. G. E. Box and D. W. Behnken (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2(4), 455 - 475.
- [16]. R. H. Myers, D. C. Montgomery, and C. M. Anderson-Cook (2016). *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons.
- [17]. T. Maier *et al.* (2008). Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace, 227, 267 - 275.
- [18]. I. E. Garofulić *et al.* (2013). The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca)." *Journal of Food Engineering*, 117(4), 437 - 442.
- [19]. N. Pap *et al.* (2013). Microwave-assisted extraction of anthocyanins from black currant marc. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 2666 - 2674.
- [20]. Z.-S. Zhang *et al.* (2018). Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed." *Separation and Purification Technology*, 62(1), 192 - 198.
- [21]. J. Sun *et al.* (2016). Stability, antioxidant capacity and degradation kinetics of pelargonidin-3-glucoside exposed to ultrasound power at low temperature." *Molecules*, 21(9).
- [22]. B. K. Tiwari *et al.* (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice." *Ultrason Sonochem*, 17(3), 598 - 604.

- [23]. S. Oancea *et al.* (2013). Conventional and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from blackberry and sweet cherry cultivars. *Acta Chim Slov*, 60 (2), 383 -389.
- [24]. S. Mane *et al.* (2015). Effect of ultrasound on the extraction of total anthocyanins from Purple Majesty potato. *Ultrason Sonochem*. 27, 509 - 514.
- [25]. B. B. Li, B. Smith, and M. M. Hossain (2006). Extraction of phenolics from citrus peels. *Separation and Purification Technology*, 48(2), pp. 189 - 196.
- [26]. M. Kumar *et al.* (2022). "Optimization of the use of cellulolytic enzyme preparation for the extraction of health promoting anthocyanins from black carrot using response surface methodology. *Lwt*, 163.
- [27]. P. R. Amulya and R. Ul Islam. (2023). Optimization of enzyme-assisted extraction of anthocyanins from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel. *Food Chem X*, 18, 100643.
- [28]. R. Ravanfar, A. M. Tamadon, and M. Niakousari. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from red cabbage using Taguchi design method." *J Food Sci Technol*, 52(12), 8140 - 8147.
- [29]. N. Stanek-Wandzel *et al.* (2024). Evaluation of Cellulase, Pectinase, and Hemicellulase Effectiveness in Extraction of Phenolic Compounds from Grape Pomace. *Int J Mol Sci*. 25(24) :13538. DOI:10.3390/ijms252413538
- [30]. P. G. Kapasakalidis, R. A. Rastall, and M. H. Gordon. (2009). Effect of a cellulase treatment on extraction of antioxidant phenols from black currant (*Ribes nigrum* L.) pomace. *J Agric Food Chem*, 57(10), 4342 - 4351.
- [31]. X. Guan and H. Yao. (2008). Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 106(1), 345-351.
- [32]. F. Li *et al.* (2019). Simultaneous optimization of the acidified water extraction for total anthocyanin content, total phenolic content, and antioxidant activity of blue honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* L.) using response surface methodology. *Food Sci Nutr*, 7(9), 2968 - 2976.
- [33]. R. Muangrat. (2023). Optimizing Ultrasound Probe Extraction for Anthocyanin and Phenolic Content from Purple Waxy Corn's Dried Cobs: Impact of extraction temperature and time. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 11(2), 830 - 843.

OPTIMIZATION OF ANTHOCYANIN EXTRACTION FROM BLACK GLUTINOUS RICE

(*Oryza rufipogon*)

Le Thi Hong Anh¹, Nguyen Le Tram¹, Hoang Thi Ngoc Nhon¹

¹Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

Abstract

This study aimed to evaluate the effects of different extraction techniques, including microwave-assisted extraction (MAE), ultrasound-assisted extraction (UAE), and enzyme-assisted extraction (EAE), on the recovery and optimization of anthocyanins from black glutinous rice (*Oryza rufipogon*). The results indicated that UAE achieved the highest efficiency and was therefore selected for further optimization using a Box-Behnken design combined with response surface methodology. The optimal conditions were determined as ultrasound amplitude of 31.73%, extraction time of 6.97 min, and solid-to-solvent ratio of 1/21.62 (w/v), under which the anthocyanin content reached 0.964 mg/g dry weight. Experimental validation yielded 0.945 ± 0.028 mg/g dry weight, with a deviation of less than 5% from the predicted value. These findings confirm the potential of UAE combined with statistical optimization in enhancing anthocyanin recovery from black glutinous rice, contributing to the development of high-value food and pharmaceutical products.

Keywords: Anthocyanin, enzyme, black glutinous rice, *Oryza rufipogon*, microwave, ultrasound.

Ngày nhận bài: 25/12/2025

Ngày chuyển phản biện: 19/3/2026

Ngày thông qua phản biện: 02/4/2026

Ngày duyệt đăng: 10/4/2026