

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH THU NHẬN CHẤT MÀU BETACYANIN TỪ THỊT QUẢ THANH LONG BẰNG PHƯƠNG PHÁP TRÍCH LY CÓ HỖ TRỢ SIÊU ÂM

Nguyễn Hoàng Anh¹, Mạc Xuân Hoà^{1,*}

TÓM TẮT

Thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) là loại trái cây chứa nhiều betacyanin – một loại chất màu tự nhiên có màu sắc từ đỏ đến tím. Mục tiêu của nghiên cứu này là ứng dụng phương pháp bề mặt đáp ứng nhằm tối ưu hóa quá trình trích ly chất màu betacyanin có hỗ trợ siêu âm từ trái thanh long ruột đỏ với 2 thông số là thời gian và công suất siêu âm. Mối quan hệ giữa điều kiện trích ly và hàm lượng betacyanin thu nhận được tương thích ý nghĩa với một mô hình hồi quy bậc 2 có hệ số xác định R^2 bằng 0,99. Hàm lượng betacyanin thu nhận ước lượng cao nhất bằng 15,59 mg/100 g ở điều kiện tối ưu là thời gian 10,2 phút và công suất 262,5 W (35% của 750 W). Không có sự khác biệt ý nghĩa giữa điều kiện tối ưu dự đoán và điều kiện tối ưu được xác minh bằng thực nghiệm ($p > 0,05$).

Từ khoá: Betacyanin, phương pháp bề mặt đáp ứng, thanh long ruột đỏ, trích ly có hỗ trợ siêu âm.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thanh long có tên khoa học là *Hylocereus* spp., thuộc họ Xương rồng (Cactaceae). Việt Nam là một trong những nước có diện tích và sản lượng thanh long lớn nhất châu Á và cũng là nước xuất khẩu thanh long hàng đầu thế giới. Thanh Long hiện đang được trồng trên 32 tỉnh/thành phố, nhưng phát triển mạnh thành các vùng chuyên canh quy mô lớn tập trung ở các tỉnh như Bình Thuận, Tiền Giang và Long An; diện tích thanh long của 3 tỉnh này chiếm 93% tổng diện tích và 95% sản lượng của cả nước, tổng sản lượng vào khoảng 1,2 triệu tấn vào năm 2019.

Sử dụng chất màu tự nhiên thay thế cho chất màu tổng hợp, nhằm nâng cao tính an toàn cho sản phẩm đang là xu hướng trong ngành chế biến thực phẩm. Gần đây, thanh long ruột đỏ được các nhà nghiên cứu chú ý đến nhờ có chứa hàm lượng cao chất màu betacyanin, một loại hợp chất chứa nitrogen tan tốt trong nước và thuộc nhóm chất betalains [1]. Thanh long ruột đỏ có chứa betacyanin ở cả vỏ và thịt quả; trong đó, betacyanin có nhiều ở thịt quả hơn ở vỏ [2]. Betacyanin có chứa axit betalamic và nhóm acrylic amine, đây là các thành phần dễ dàng nhường electron nên chúng khó có khả năng bắt các gốc tự do trong dung dịch; nhờ vậy mà ngoài khả năng tạo màu, betacyanin còn là một chất chống oxy hóa tự nhiên [3].

Để nâng cao hiệu quả trích ly các hợp chất tự nhiên từ thực vật, nhiều phương pháp trích ly mới đã được áp dụng như phương pháp enzyme, phương pháp siêu âm, phương pháp vi sóng. Trong đó, siêu âm đã được ứng dụng rộng rãi trong trích ly nhiều hợp chất khác nhau từ thực vật và giúp nâng cao đáng kể hiệu suất trích ly so với phương pháp truyền thống [4]. Sóng siêu âm gây ra hiện tượng tạo và vỡ bọt khí, kết quả là tạo áp lực giúp phá vỡ tế bào thực vật và tăng tốc độ khuếch tán phân tử [5, 6]. Vinatoru và cs. (2001) khẳng định sóng siêu âm làm tăng 34% hiệu suất trích ly các hợp chất hòa tan từ một số loại thảo mộc [7]; hiệu suất trích ly saponin từ củ gừng tăng gấp ba lần khi được chiếu sóng siêu âm [8]. Ngoài ra, hiệu suất trích ly isoflavones từ đậu nành bằng siêu âm cũng tăng thêm 15% so với mẫu đối chứng [9]. Tuy nhiên, các nghiên cứu ứng dụng siêu âm trong trích ly betacyanin từ thịt quả thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) trồng tại Việt Nam còn rất hạn chế. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là tối ưu hóa các thông số của quá trình trích ly thu nhận chất màu betacyanin từ thịt quả trái thanh long ruột đỏ khi có hỗ trợ siêu âm.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Thanh long ruột đỏ thu mua tại chợ đầu mối nông sản thực phẩm Thủ Đức, thành phố Hồ Chí Minh; những trái được chọn cho nghiên cứu được thu hoạch sau 1,5 tháng từ thời điểm ra hoa. Ethanol dùng cho thực phẩm có độ tinh khiết 98% (theo thể

¹ Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: xuanhoamac@gmail.com

tích, v/v) do hãng Merck (Đức) sản xuất. Chế phẩm pectinex Ultra SP- L (26000 PG/ml; Novozyme).

2.2. Phương pháp nghiên cứu quá trình trích ly

2.2.1. Phương pháp trích ly betacyanin

Thịt quả thanh long được xay nhỏ để thu puree. Tiếp theo, puree được xử lý bằng 0,25% (v/v) enzyme pectinase trong 25 phút ở 30°C. Sau đó, 100 g puree được trộn với 100 g dung môi (tỷ lệ ethanol 98% (v/v): nước cất bằng 8:2 theo thể tích) trong becher 250 ml. Quá trình trích ly được thực hiện trên thiết bị phát sóng siêu âm (công suất cực đại 750W, tần số 20 kHz, năng suất tối đa 1000 ml, Sonics, Mỹ). Theo đó, hỗn hợp puree-dung môi trong becher được làm lạnh bằng cách ngâm trong nước đá để giữ nhiệt độ tăng không quá 20°C khi siêu âm; đầu phát siêu âm được nhúng ngập vào nguyên liệu 2 cm tại tâm becher. Các thông số của quá trình siêu âm là thời gian (phút) và công suất (tỷ lệ % tính theo 750W) được kiểm soát theo kế hoạch thực nghiệm. Sau quá trình trích ly, hỗn hợp puree-dung môi được lọc thô qua rây 0,1 mm và lọc tinh dưới áp suất chân không qua giấy lọc. Dịch lọc sau đó được đem đi xác định hàm lượng betacyanin.

2.2.2. Phương pháp phân tích hàm lượng betacyanin

Hàm lượng betacyanin trong dịch lọc được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang ở bước sóng cực đại 538 nm theo mô tả của Lim và cs (2011) [10]. Theo đó, hàm lượng betacyanin (mg/100 gr) được tính theo công thức sau:

$$Bc = \frac{A \times V \times F \times M}{\epsilon \times L \times W} \times 100$$

Trong đó: A là độ hấp thụ ở 538 nm; V là thể tích bình định mức (ml); F là hệ số pha loãng; M là khối lượng phân tử betacyanin (550 g/mol); ϵ là hệ số hấp thụ của betacyanin trong nước ($\epsilon = 60000 \text{ l/mol.cm}$); L là chiều dài truyền quang (1 cm); W là khối lượng mẫu (g). Tất cả các phép đo được thực hiện 3 lần trên thiết bị PhotoLab 6100 VIS (Đức).

2.2.3. Thí nghiệm 1: Xác định miền ảnh hưởng của các yếu tố

Điều kiện siêu âm được khảo sát bằng phương pháp thực nghiệm 1 yếu tố ở 1 thời gian để xác định quy luật ảnh hưởng và khoảng biến thiên của 2 thông số. Theo đó, yếu tố thời gian siêu âm được khảo sát ở 7 mức: 0, 5, 10, 15, 20, 25 và 30 phút; khi đó công suất siêu âm được cố định ở 35% (tương ứng 262,5W). Sau đó, thời gian siêu âm được cố định ở mức tốt nhất trong 7 mức trên; yếu tố công suất siêu âm tiếp tục được khảo sát ở 6 mức: 0% (không siêu âm), 20% (150W), 25% (187,5W), 30% (225W), 35% (262,5W) và 40% (300W). Hiệu quả trích ly ở các mức yếu tố được đánh giá thông qua hàm lượng betacyanin của dịch lọc. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần ($n = 3$) và được trình bày dưới dạng kí hiệu $\bar{x} \pm SD$. Sự khác biệt về mật thống kê được đánh giá bằng phương pháp phân tích phương sai 1 chiều (ANOVA 1 chiều) trên phần mềm SAS JMP 10 với $\alpha = 0,05$.

2.2.4. Thí nghiệm 2: Tối ưu hoá quá trình trích ly

Sau khi xác định được miền ảnh hưởng của các yếu tố thời gian và công suất siêu âm, tiến hành xác định các giá trị tối ưu của 2 thông số này bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm tìm hàm hồi quy.

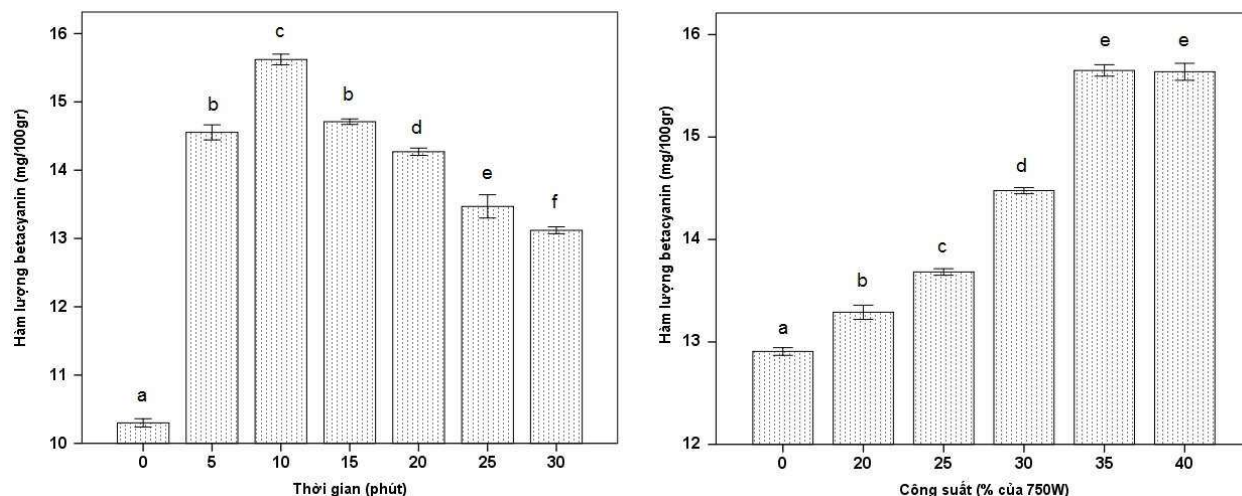
2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Ở thí nghiệm khảo sát, sự khác biệt về hàm lượng betacyanin ở các điều kiện trích ly được kiểm định bằng 2 phương pháp: phân tích phương sai (ANOVA – Analysis of Variance), kiểm định hậu tố (LSD - Least Significant Difference). Ở thí nghiệm tối ưu hóa, phần mềm JMP 10.0 được sử dụng để thiết kế thí nghiệm, mô hình hóa và tối ưu hóa. Kiểm định Student được sử dụng để kiểm tra sự khác biệt ở thí nghiệm xác minh điều kiện tối ưu. Mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định miền ảnh hưởng của các yếu tố

Kết quả thực nghiệm cho thấy cả 2 thông số đều ảnh hưởng có nghĩa lên hàm lượng betacyanin ($p < 0,05$; ANOVA một chiều). Kết quả thực nghiệm được mô tả ở hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian và công suất siêu âm lên hàm lượng betacyanin

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Các mức yếu tố được đánh dấu bằng các ký tự khác nhau (a-f) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Kết quả ở hình 1 cho thấy, ở công suất 35% (trung đương 265 W) hàm lượng betacyanin thu nhận tăng nhanh (1,5 lần) khi thời gian thay đổi từ 0 phút 10 phút; khi thời gian kéo dài trên 10 phút thì hàm lượng betacyanin có xu hướng giảm. Hiệu quả thu nhận cao nhất bằng 15,62 mg/100 gr ở thời gian 10 phút. Hiệu quả trích ly giảm khi thời gian kéo dài trên 10 phút là do betacyanin bị thất thoát bởi quá trình oxy hóa và tác động của ánh sáng. Yen-Ming Wong và Lee-Fong Siow (2015) quan sát thấy dịch ép thanh long có hàm lượng betacyanin cao hơn khi được bảo quản trong bóng tối và quá trình khuấy trộn làm phân hủy trung bình 50% lượng betacyanin do quá trình này làm tăng nồng độ oxy trong dịch ép thanh long [11]. Tính ổn định của betacyanin cũng được tăng cường khi oxy được loại bỏ trong nghiên cứu của Huang và cs (1987) [12].

Tiếp theo ở thời gian trích ly cố định 10 phút, hàm lượng betacyanin trong dịch lọc tăng dần từ 12,92 mg/100 g lên 15,65 mg/100 g khi công suất chạy từ 0% (không hỗ trợ siêu âm) đến 35% (262,5 W); ở mức năng lượng cao hơn (40% hay 300 W) thì hiệu quả trích ly không thay đổi có ý nghĩa ($p > 0,05$; kiểm định LSD). Sự khác biệt về kết quả thu được ở đây là nhờ hiện tượng tạo và vỡ bọt khí do sóng siêu âm gây ra, kết quả là tạo áp lực giúp phá vỡ tế bào thực vật và tăng tốc độ khuếch tán phân tử [5, 6]. Cụ thể hơn, hiệu quả trích ly được quan sát thấy ở đây do 3 hiệu ứng sau tạo ra: (1) hiện tượng sủi bọt trong dung môi, (2) khả năng tăng cường sự thâm nhập sâu hơn của dung môi trích ly vào mạng lưới cấu trúc nguyên

liệu; (3) tác động cơ học làm tăng diện tích tiếp xúc bề mặt giữa nguyên liệu và dung môi [11, 13, 14].

3.2. Tối ưu hoá quá trình trích ly

Phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology – RSM) với phương án quay bậc 2 có tâm (Central Composite Design – CCD) được áp dụng để tối ưu hóa điều kiện của quá trình trích ly với 2 biến đầu vào là thời gian (X_1) và công suất siêu âm (X_2). Hàm mục tiêu đại diện cho hiệu quả trích ly là hàm lượng betacyanin trong dịch lọc. Theo đó, phương án thực nghiệm bao gồm 11 thí nghiệm; trong đó 4 thí nghiệm ở tâm, 4 thí nghiệm ở điểm sao và 3 thí nghiệm lặp ở tâm. Mức tốt nhất ở thí nghiệm khảo sát (thời gian 10 phút, công suất 35% (262,5 W)) được chọn làm mức tâm cho thí nghiệm tối ưu hóa với khoảng biến thiên của 2 biến được thể hiện trong bảng 1. Kết quả thực nghiệm được trình bày ở bảng 2.

Bảng 1. Các mức của biến đầu vào trong thí nghiệm tối ưu hoá

	Mức thấp	Mức tâm	Mức cao
Thời gian (X_1 , phút)	7	10	13
Công suất (X_2 , %)	30	35	40

Các hệ số của phương trình hồi quy thực nghiệm được ước lượng bằng phương pháp bình phương cực tiểu; tính tương thích chung của mô hình được đánh giá bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA; $\alpha = 0,05$); ý nghĩa của các hệ số được kiểm tra bằng kiểm định Student ($\alpha = 0,05$). Điều kiện tối ưu được dự đoán và xác minh lại bằng thực nghiệm.

Bảng 2. Ma trận thực nghiệm của thí nghiệm tối ưu hoá

Thí nghiệm	Biến		Hàm mục tiêu	
	X ₁	X ₂	Y thực nghiệm	Y dự đoán
1	7	30	13,64	13,73
2	7	40	15,16	15,06
3	13	30	14,92	15,04
4	13	40	14,53	14,45
5	5,5	35	13,85	13,86
6	14,5	35	14,41	14,39
7	10	25	13,68	13,58
8	10	45	14,22	14,32
9	10	35	15,73	15,72
10	10	35	15,75	15,72
11	10	35	15,7	15,72

Ghi chú: X₁: thời gian siêu âm (phút); X₂: công suất siêu âm (% của 750 W); Y_{thực nghiệm}: hàm lượng betacyanin xác định trên thực nghiệm (mg/100g); Y_{dự đoán}: hàm lượng betacyanin tính toán từ phương trình hồi quy (mg/100 g).

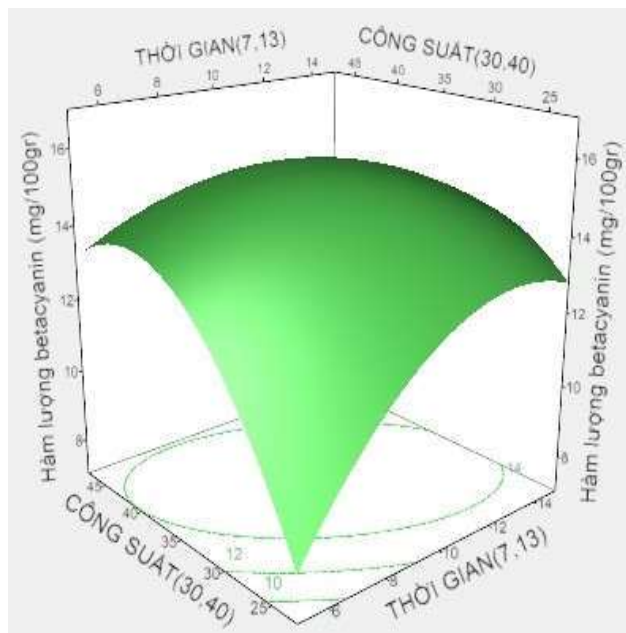
Bảng 3 trình bày kết quả phân tích phương sai cho mô hình hồi quy. Kết quả cho thấy trị số p < 0,05; như vậy, có ít nhất một hệ số b_i khác không; nói cách khác, mô hình hồi quy tương thích với thực nghiệm. Giá trị R² bằng 0,99 cho thấy có 99% sự biến thiên của hàm mục tiêu có thể được bởi các tác động của yếu tố thí nghiệm.

Bảng 3. Phân tích phương sai cho mô hình hồi quy (ANOVA)

Nguồn	df	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F	p
Mô hình	5	6,59	1,32	108,44	<0,0001
Sai số	5	0,06	0,01		
Tổng	10	6,65			

Kết quả ở bảng 4 cho biết cụ thể hơn về ý nghĩa của từng hệ số b_i. Theo đó, tất cả các hệ số trong mô hình đều có ý nghĩa thống kê với p < 0,05. Như vậy, phương trình hồi quy có thể được viết như sau:

$$\text{Hàm lượng betacyanin (mg/100 g)} = 15,724 + 0,175X_1 + 0,184X_2 - 0,477X_1X_2 - 0,710X_1^2 - 0,444X_2^2$$

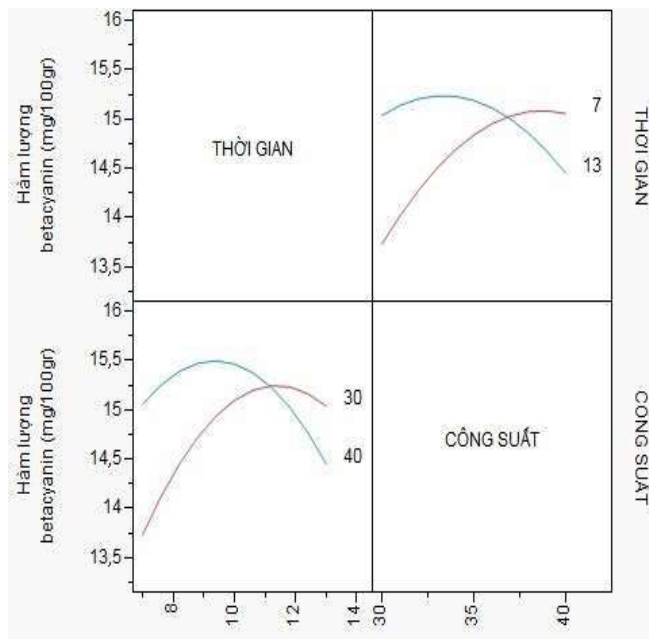


Hình 2. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối quan hệ giữa điều kiện trích ly và hàm lượng betacyanin

Bảng 4. Kiểm tra ý nghĩa các hệ số của phương trình hồi quy

Thành phần	Ước số của b _i	Sai số chuẩn	t	p
Điểm cắt	15,72	0,06	256,93	<0,0001
X ₁	0,18	0,04	4,64	0,0057
X ₂	0,18	0,03	5,79	0,0022
X ₁ *X ₂	-0,48	0,06	-8,66	0,0003
X ₁ *X ₁	-0,71	0,04	-16,24	<0,0001
X ₂ *X ₂	-0,44	0,03	-17,67	<0,0001

Mối quan hệ giữa điều kiện trích ly với hàm lượng betacyanin được mô tả ở hình 2. Dựa vào phương trình hồi quy có thể thấy rằng các hệ số liên quan đến công suất và thời gian đều dương, có nghĩa là hai thông số này có mối quan hệ thuận với hàm mục tiêu. Ngoài ra, có tồn tại hiệu ứng tương tác giữa 2 yếu tố này (p < 0,05). Theo đó, ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng betacyanin không giống nhau ở các mức công suất khác nhau; cụ thể, công suất càng cao thì thời gian để hàm lượng betacyanin đạt cao nhất càng ngắn (Hình 3). Hàm lượng betacyanin trích ly được đạt cực đại trong khoảng thời gian 10 phút ở công suất 40% (300 W); còn ở 30% (225 W) thì cần đến 12 phút.



Hình 3. Tương tác giữa thời gian và công suất siêu âm

Với sự hỗ trợ của phần JMP 10, điều kiện tối ưu được xác định như sau: thời gian 10 phút và công suất 35% (262,5 W). Ở điều kiện này, hàm lượng betacyanin thu nhận được bằng 15,59 mg/100 g. Thí nghiệm xác minh được thực hiện ở điều kiện tối ưu ở trên; kết quả thực nghiệm cho thấy hàm lượng betacyanin trung bình bằng $15,57 \pm 0,047$ mg/100 g ($n = 3$); ngoài ra, hàm lượng betacyanin không có sự khác biệt ý nghĩa giữa giá trị dự đoán và giá trị xác minh bằng thực nghiệm ở trên ($p < 0,05$; kiểm định Student).

4. KẾT LUẬN

Điều kiện tối ưu của quá trình thu nhận chất màu betacyanin bằng siêu âm được xác định bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm. Kết quả thực nghiệm cho thấy hàm lượng betacyanin cao nhất bằng 15,59 mg/100 g. Nghiên cứu này góp phần mở ra hướng đi mới cho ngành chế biến các sản phẩm từ trái cây ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Rebecca, O., A. N. Boyce, and S. Chandran, (2010). Pigment identification and antioxidant properties of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *African Journal of Biotechnology*. 9(10): p. 1450-1454.
2. Le Bellec, F., F. Vaillant, and E. Imbert, (2006). Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. *Fruits*. 61(4): p. 237-250.
3. Esquivel, P., F.C. Stintzing, and R. Carle, (2007). Phenolic compound profiles and their corresponding antioxidant capacity of purple pitaya (*Hylocereus* sp.) genotypes. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 62(9-10): p. 636-644.
4. Vilku, K., *et al.* (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 9(2): p. 161-169.
5. Dang, B., T. Huynh, and V. Le (2012). Simultaneous treatment of acerola mash by ultrasound and pectinase preparation in acerola juice processing: optimization of the pectinase concentration and pectolytic time by response surface methodology. *International Food Research Journal*. 19(2): p. 509.
6. Lieu, L. N. and V. V. M. Le (2010). Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. *Ultrasonics-Sonochemistry*. 17(1): p. 273-279.
7. Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics - Sonochemistry*. 8(3): p. 303-313.
8. Wu, J., L. Lin, and F.-t. Chau (2001). Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrasonics Sonochemistry*. 8(4): p. 347-352.
9. Rostagno, M. A., M. Palma, and C. G. Barroso (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*. 1012(2): p. 119-128.
10. Lim, S., *et al.* (2011). Effect of extraction parameters on the yield of betacyanins from pitaya fruit (*Hylocereus polyrhizus*) pulps. *Journal of Food Agriculture & Environment*. 9(2): p. 158-162.
11. Wong, Y.-M. and L.-F. Siow (2015). Effects of heat, pH, antioxidant, agitation and light on betacyanin stability using red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) juice and concentrate as models. *Journal of food science and technology*. 52(5): p. 3086-3092.
12. Huang, A. and J. V. ELBE (1987). Effect of pH on the degradation and regeneration of betanin. *Journal of Food Science*. 52(6): p. 1689-1693.

13. Ma, Y., *et al.* (2008). Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*. 15(3): p. 227-232.

14. Veličković, D. T., *et al.* (2008). Ultrasonic extraction of waste solid residues from the *Salvia* sp. essential oil hydrodistillation. *Biochemical Engineering Journal*. 42(1): p. 97-104.

OPTIMIZATION FOR OBTAINING BETACYANIN PIGMENT FROM RED-FLESHED DRAGON FRUIT BY USING ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION

Nguyen Hoang Anh¹, Mac Xuan Xoa^{1,*}

¹*Faculty of Food Science and Technology, Ho Chi Minh city University of Food Industry*

**Email: xuanhoamac@gmail.com*

Summary

Red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) is rich in betacyanin – a natural pigment creating colours from red to violet. The aim of this research was to optimize the operating parameters in ultrasound assisted extraction process such as extraction time, acoustic power on the betacyanin content from flesh of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) using the central composite design (CCD) of the response surface methodology. The relationship between the betacyanin content and conditions of extraction significantly fitted a second-order regression model ($p < 0.05$) with R^2 of 0.99. The estimated optimum condition to reach the highest betacyanin content of 15.59 mg/100 g was extraction time of 10.20 mins and acoustic power of 262.5 W. The verification experiment showed no significant difference between optimized condition and predicted condition ($p > 0.05$).

Keywords: *Betacyanin, response surface design, red-fleshed dragon fruit (Hylocereus polyrhizus), ultrasound assisted extraction.*

Người phản biện: PGS.TS. Hoàng Thị Lệ Hằng

Ngày nhận bài: 15/9/2021

Ngày thông qua phản biện: 18/10/2021

Ngày duyệt đăng: 25/10/2021