



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.073

NGHIÊN CỨU TRÍCH LY VÀ BẢO QUẢN γ -ORYZANOL, ACID FERULIC TỪ CÁM GẠO

Lê Phạm Văn Anh¹, Lê Nguyễn Đoàn Duy² và Nguyễn Công Hà^{1*}

¹Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Công Hà (email: ncha@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 15/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Study on extraction and preservation of γ -oryzanol and ferulic acid from rice bran

Từ khóa:

Acid ferulic, cám gạo, hoạt tính chống oxi hóa, sóng siêu âm, γ -oryzanol

Keywords:

Antioxidant activity, ferulic acid, rice bran, ultrasonic, γ -oryzanol

ABSTRACT

Rice bran is a plentiful, inexpensive raw material and rich of functional compounds, antioxidants such as γ -oryzanol, ferulic acid and tocopherols. However, most of rice bran after milling is only used as a by-product. Therefore, the study on optimizing conditions for extracting γ -oryzanol and ferulic acid from rice bran of IR50404 variety by ultrasonic technology was done to enhance the value of this material source. Three independent variables in the extraction process including solid-to-ethanol solvent ratio (g/mL), temperature ($^{\circ}$ C) and time (min) were studied. The highest content of γ -oryzanol and ferulic acid (1,544.552 mg/100g DM and 18.537 mg/100g DM, respectively) was obtained in the extracting condition consisting of solid-to-ethanol solvent ratio of 1/20 g/mL, 40 $^{\circ}$ C and 40 minutes. The study on the ratios of extracts/mixtures of solvents (methanol:acetone) used in γ -oryzanol enrichment showed that the appropriate ratio was 1:60 g/mL. The γ -oryzanol and ferulic acid content in the product increased 2,485.604 mg/100g DM and 27.748 mg/100g DM, respectively. Finally, the product was stored in dark glass jars at -18 $^{\circ}$ C for 3 weeks and the results showed little change of γ -oryzanol, ferulic acid content and antioxidant activity of the product.

TÓM TẮT

Cám gạo là một nguồn nguyên liệu dồi dào rẻ tiền nhưng giàu các hợp chất chức năng, chất chống oxy hóa như γ -oryzanol, acid ferulic và tocopherols. Tuy nhiên, hầu hết cám gạo sau quá trình xay xát chỉ được sử dụng như là một phụ phẩm. Vì vậy, nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện trích ly γ -oryzanol và acid ferulic từ cám gạo giống lúa IR 50404 bằng phương pháp sóng siêu âm đã được thực hiện nhằm nâng cao giá trị nguồn nguyên liệu này. Ba thông số được khảo sát trong quá trình trích ly gồm tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ethanol sử dụng (g/mL), nhiệt độ ($^{\circ}$ C) và thời gian trích ly (phút). Hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic thu được trong dịch trích ly cao nhất đạt 1.544,552 mg/100g và 18,537 mg/100g trong điều kiện trích ly có tỷ lệ nguyên liệu và dung môi ethanol sử dụng là 1/20 g/mL ở nhiệt độ 40 $^{\circ}$ C và thời gian 40 phút. Với kết quả thu được, nghiên cứu tiếp tục khảo sát tỷ lệ dịch trích ly và hỗn hợp dung môi (methanol:acetone) sử dụng trong quá trình làm giàu γ -oryzanol. Tỷ lệ dịch trích ly và hỗn hợp dung môi sử dụng thích hợp được lựa chọn là 1/60 g/mL thu được hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic trong sản phẩm tăng lên đạt 2.485,604 mg/100g chất khô nguyên liệu (CKNL) và 27,748 mg/100g CKNL. Cuối cùng, sản phẩm được bảo quản trong bao bì thủy tinh màu tối ở nhiệt độ -18 $^{\circ}$ C trong thời gian 3 tuần cho thấy ít có sự biến động về hàm lượng γ -oryzanol, acid ferulic và hoạt tính chống oxi hóa trong sản phẩm.

Trích dẫn: Lê Phạm Văn Anh, Lê Nguyễn Đoàn Duy và Nguyễn Công Hà, 2019. Nghiên cứu trích ly và bảo quản γ -oryzanol, acid ferulic từ cám gạo. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 292-300.

1 GIỚI THIỆU

Gạo là nguồn lương thực chủ yếu của hơn một nửa dân số thế giới, chiếm 20% tổng lượng lương thực tiêu thụ với sản lượng lúa gạo đạt khoảng 700 đến 800 triệu tấn mỗi năm. Hiện nay, Việt Nam là nước đứng thứ ba trên thế giới về sản lượng xuất khẩu gạo chỉ sau Ấn Độ và Thái Lan. Chính từ sản lượng gạo xuất khẩu lớn đã để lại một lượng lớn phụ phẩm trong quá trình chế biến là cám gạo. Trong cám gạo chứa rất nhiều thành phần có giá trị dinh dưỡng gồm protein, lipid, glucid, vitamin, khoáng... (Cheruvanky *et al.*, 2003). Ngoài ra, trong cám gạo còn chứa nhiều hợp chất đặc biệt quan trọng mà ít được biết đến hơn đó là γ -oryzanol và acid ferulic.

Theo các nghiên cứu khoa học từ năm 1950 đến nay, công dụng nổi bật nhất của γ -oryzanol là chất chống oxy hóa mạnh, làm chậm lại quá trình lão hóa của cơ thể. Ngoài ra, những nghiên cứu gần đây còn cho thấy γ -oryzanol có tác dụng làm giảm lượng cholesterol thừa trong máu, hạ lipid trong máu ngăn ngừa nguy cơ bệnh tim mạch, hạ glucose trong máu ở bệnh nhân tiểu đường tuýp II, tăng cường chức năng dạ dày và gan, ức chế tế bào ung thư đại tràng và dạ dày, giữ ẩm làm trắng và bảo vệ da (Patel and Naik, 2004).

Các nước phát triển hiện nay (Mỹ và Nhật Bản) hay các nước có sản lượng lúa gạo lớn trên thế giới (Trung Quốc, Ấn Độ, Thái Lan, Indonesia) đều phát triển công nghệ sản xuất các sản phẩm chiết xuất từ cám gạo. Tuy nhiên, ở Việt Nam, các chế phẩm γ -oryzanol và acid ferulic đều được nhập từ nước ngoài. Hầu hết, các phòng thí nghiệm nghiên cứu trong nước đều sử dụng phương pháp trích ly cám gạo theo kiểu truyền thống dùng dung môi hữu cơ nên mang đến hiệu quả thu hồi các chất trích ly không cao. Do đó, nghiên cứu “Tối ưu hóa các điều kiện trích ly γ -oryzanol và acid ferulic từ cám gạo bằng phương pháp sóng siêu âm” được thực hiện nhằm nâng cao hiệu quả các chất trích ly như γ -oryzanol và acid ferulic mà vẫn đảm bảo giữ được hoạt tính chống oxy hóa của sản phẩm cuối.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện nghiên cứu

Cám được lấy từ giống lúa IR50404, mua của Xi nghiệp Chế biến gạo Việt Nguyên trực thuộc Công ty Lương thực Tiên Giang. Cám gạo đóng gói trong các túi màu tối không tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời, được bảo quản ở 20°C. Các hóa chất phân tích như: chuẩn γ -oryzanol (Sigma Aldrich, Mỹ); chuẩn acid ferulic (Sigma Aldrich, Mỹ); ethanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) (PA, Trung Quốc); methanol ($\text{CH}_3\text{-OH}$) (Fisher, Mỹ); ethyl acetate ($\text{CH}_3\text{-C(=O)-O-}$

$\text{CH}_2\text{-CH}_3$) (Fisher, Mỹ); acetonitrile ($\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{N}$) (Fisher, Mỹ); acid acetic ($\text{CH}_3\text{-C(=O)OH}$) (Fisher, Mỹ); acetone ($\text{CH}_3\text{-C(=O)-CH}_3$) (Fisher, Mỹ); acid clohydric (HCl) (Fisher, Mỹ); sodium hydroxide (NaOH) (Fisher, Mỹ); DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Sigma Aldrich, Mỹ). Nghiên cứu được tiến hành tại Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ với các trang thiết bị chính được sử dụng như: tủ sấy (Memmert, Đức); siêu âm cột (Bandelin Sonorex, Đức); máy ly tâm (Hermle, Đức); cô quay chân không (Eyela, Nhật); tủ lạnh, tủ đông (Alaska, Trung Quốc); máy HPLC (Shimadzu, Nhật); máy quang phổ UV-Vis (Labomed, Mỹ).

2.2 Quá trình trích ly, làm giàu và bảo quản γ -oryzanol và acid ferulic

Cám xát lấy từ giống lúa IR50404 là nguồn nguyên liệu được lựa chọn sàng lọc qua rây có kích thước 180 μm (80 mesh), chia làm nhiều mẻ đem sấy ở nhiệt độ 100°C trong khoảng 15 phút (Ghasemzadeh *et al.*, 2015). Sau đó, cám được chứa trong các bao bì kín, bảo quản trong tủ mát ở nhiệt độ 20°C để làm mẫu trong suốt quá trình thí nghiệm. Sử dụng kỹ thuật trích ly bằng sóng siêu âm với tần số 20 kHz. Dung môi được lựa chọn trong quá trình trích ly này là ethanol có nồng độ 50% (v/v) (Ghasemzadeh *et al.*, 2015). Lọc và thu dịch trích ly bằng phương pháp ly tâm với tốc độ 4000 rpm trong khoảng 5 phút (Phạm Cảnh Em và *ctv.*, 2016). Sau đó, tiến hành thu nhận phần dịch trích ly vào bình chứa riêng. Loại bỏ dung môi ra khỏi dịch trích ly bằng thiết bị máy cô quay chân không. Sử dụng hỗn hợp dung môi gồm methanol và acetone với tỷ lệ 7:3 cho vào dịch trích ly và kết hợp với quá trình hạ thấp nhiệt độ -20°C trong khoảng 15 phút trong giai đoạn làm giàu γ -oryzanol (Zullaikah *et al.*, 2008). Lúc này hỗn hợp sẽ xuất hiện hai pha: một pha rắn và một pha lỏng, γ -oryzanol chủ yếu sẽ tập trung ở pha lỏng. Lọc thu pha lỏng giàu γ -oryzanol bằng phương pháp lọc bằng giấy lọc. Tiếp tục sử dụng phương pháp cô quay chân không để tách hỗn hợp dung môi methanol và acetone ra khỏi sản phẩm. Cho sản phẩm vào ống bi thủy tinh 5 mL màu tối tránh ánh sáng, đóng kín nắp. Bảo quản sản phẩm và theo dõi ở những nhiệt độ khác nhau trong thời gian 4 tuần.

2.3 Phương pháp xác định hàm lượng γ -oryzanol, acid ferulic và khả năng bắt gốc tự do DPPH

Xác định hàm lượng γ -oryzanol: cân từ 0,1-0,2 g mẫu vào trong ống nghiệm, cho tiếp vào ống nghiệm 10 mL acetone, đậy kín và lắc đều bằng máy vortex trong 10 phút. Lắc đều, hút và bơm mẫu qua màng lọc 0,22 μm vào trong vial. Tiến hành phân tích hàm lượng γ -oryzanol trên hệ thống HPLC (High-

performance liquid chromatography, hiệu Shimadzu, cột C18 có chiều dài 250 mm, đường kính 4,6 mm, đường kính lỗ lọc 5 μ m). Bước sóng hấp thu 330 nm, tỉ lệ pha động là acetone: acetonitrile tương ứng 60:40, tốc độ dòng 1,5 mL/phút, nhiệt độ cột 35°C. Xây dựng đường chuẩn và tính kết quả hàm lượng γ -oryzanol theo phương trình đường chuẩn (Banchuen *et al.*, 2010).

Xác định hàm lượng acid ferulic: cân khoảng 0,3-0,5 g mẫu cho vào bình tam giác 50 ml, sau đó cho 10-20 mL dung dịch NaOH 1 M vào lắc trong 3 giờ, sau đó cho tiếp 5-10 mL dung dịch HCl 2 M vào để trung hòa. Kế tiếp cho 10-20 mL ethyl acetate vào để trích ly trong khoảng 5 phút. Tách lấy cẩn thận phần dịch nổi phía trên, tiến hành lặp lại thêm 2 lần. Sau đó, làm bay hơi hết ethyl acetate trong mẫu. Cho tiếp vào mẫu 3 mL hỗn hợp methanol và nước deion (tỷ lệ 1:1). Lắc đều, hút và bơm mẫu qua màng lọc 0,22 μ m vào trong vial tiến hành phân tích trên HPLC. Bước sóng hấp thu là 320 nm, pha động gồm acid acetic (2,5% (v/v)) và acetonitrile (tỉ lệ pha tương ứng 43:57). Tốc độ dòng 1 mL/phút nhiệt độ cột là 40°C. Acid ferulic chuẩn được sử dụng để lập đường chuẩn (Banchuen *et al.*, 2010).

Xác định khả năng bắt gốc tự do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl): Cho 200 μ l dịch chiết mẫu vào ống nghiệm, cho tiếp vào ống nghiệm 2 ml DPPH (0,5 mM trữ lạnh). Đối với mẫu blank làm tương tự như mẫu thí nghiệm nhưng thay dịch chiết mẫu bằng 200 μ L methanol; giữ các ống nghiệm ở

nhệt độ phòng trong bóng tối và sau 30 phút tiến hành đo ở bước sóng 517 nm. Sử dụng máy UV-Vis IKA để đo các mẫu (Tabaraki and Nateghi, 2011).

2.4 Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu thiết kế phức hợp trung tâm CCD (Central composite design) và sử dụng phương pháp mặt đáp ứng. Số liệu thu thập được xử lý, vẽ đồ thị, tính độ lệch chuẩn (STDEV) bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2016; Phân tích ANOVA với kiểm định LSD và so sánh các mức độ của từng nhân tố bằng chương trình Statgraphics Centurion 15.1.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tối ưu hóa quá trình trích ly γ -oryzanol và acid ferulic

Thí nghiệm này được bố trí theo kiểu thiết kế CCD, sử dụng phương pháp mặt đáp ứng, với số nghiệm thức 2^k +star (k là số nhân tố), điểm trung tâm (central point) lặp lại 2 lần. Các nhân tố được khảo sát trong quá trình trích ly bao gồm: tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (X_1), nhiệt độ (X_2) và thời gian (X_3). Mức độ khảo sát ba nhân tố này được thể hiện trong Bảng 1. Như vậy, thí nghiệm được thực hiện với tổng cộng 16 nghiệm thức, 32 đơn vị thí nghiệm (mỗi nghiệm thức thực hiện 2 lần). Hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic được xác định dựa trên phương pháp của Banchuen *et al.*, (2010) và kết quả thu được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 1: Các nhân tố và mức độ khảo sát

Ký hiệu	Nhân tố	Các giá trị mức độ được mã hóa				
		- α	-1	0	1	α
X_1	Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (g/mL)	1/12	1/15	1/20	1/25	1/28
X_2	Nhiệt độ trích ly (°C)	32	35	40	45	48
X_3	Thời gian trích ly (phút)	23	30	40	50	57

Bảng 2: Hàm lượng γ -oryzanol (Y_1) và acid ferulic (Y_2) thu được trong quá trình trích ly

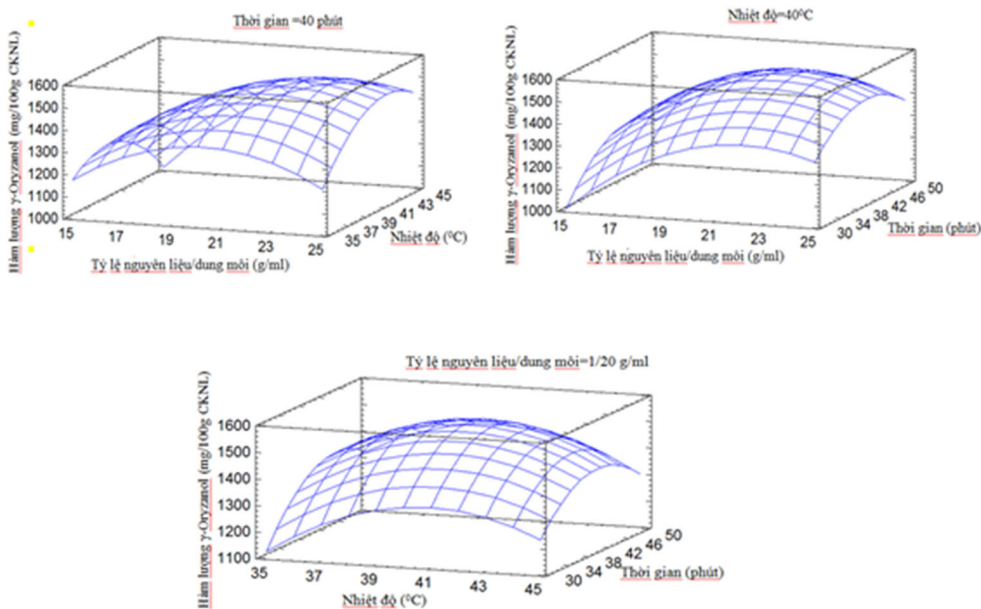
STT	Mã hóa			Kết quả các chỉ tiêu theo dõi	
	X ₁ (g/mL)	X ₂ (°C)	X ₃ (phút)	Y ₁ (mg/100g CKNL)	Y ₂ (mg/100g CKNL)
1	-1	-1	-1	925±0,1	6,5±0,0
2	-1	-1	1	1218±0,1	14,1±0,9
3	-1	1	-1	889±0,1	8,8±0,2
4	-1	1	1	924±0,0	9,4±0,2
5	1	-1	-1	1067±0,0	11,6±0,1
6	1	-1	1	1107±0,0	12,1±0,1
7	1	1	-1	1284±0,1	13,5±0,1
8	1	1	1	1321±0,8	14,2±0,1
9	- α	0	0	819±0,1	6,2±0,1
10	α	0	0	1231±0,1	12,3±0,3
11	0	- α	0	1042±0,1	8,2±0,2
12	0	α	0	1150±0,3	13,3±0,2
13	0	0	α	1296±0,2	17,4±0,1
14	0	0	- α	968±0,1	12,4±0,2
15	0	0	0	1522±0,2	18,3±0,4
16	0	0	0	1529±0,0	18,1±0,2

Ghi chú: Các giá trị trung bình được tính theo khối lượng khô; CKNL: chất khô nguyên liệu

3.1.1 Hàm lượng γ -oryzanol trong dịch trích ly

Từ Bảng 2 và kết quả thể hiện qua Hình 1 cho thấy ở thời gian 40 phút, khi tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi từ 1/12 đến 1/20 g/mL ở nhiệt độ từ 32 đến 40°C, hàm lượng γ -oryzanol thu được trong dịch trích ly tăng từ 819,27 mg/100g CKNL đến 1.529,219 mg/100g CKNL. Trong đó, sự ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đối với hàm lượng γ -oryzanol lớn hơn so với nhiệt độ. Khi tiếp tục tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lên 1/28 g/mL và nhiệt độ tăng lên 48°C, hàm lượng γ -oryzanol trong dịch trích ly có hiện tượng giảm xuống. Nguyên nhân của hiện tượng này là do hàm lượng các tạp chất không

mong muốn trong dịch trích ly tăng cao khi sử dụng lượng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi quá lớn. Trong tự, ở nhiệt độ 40°C, khi tăng thời gian trích ly từ 23 đến 40 phút và đồng thời tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, hàm lượng γ -oryzanol trong dịch trích ly tăng lên đến mức cao nhất. Nhưng tiếp tục tăng hai nhân tố này, hàm lượng γ -oryzanol trong dịch trích ly lại giảm xuống. Mức độ ảnh hưởng của nhân tố thời gian đến hàm lượng γ -oryzanol không lớn hơn so với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi. Khi sử dụng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 g/mL, mức độ tác động của nhân tố thời gian đối với hàm lượng γ -oryzanol lớn hơn so với nhiệt độ trích ly.

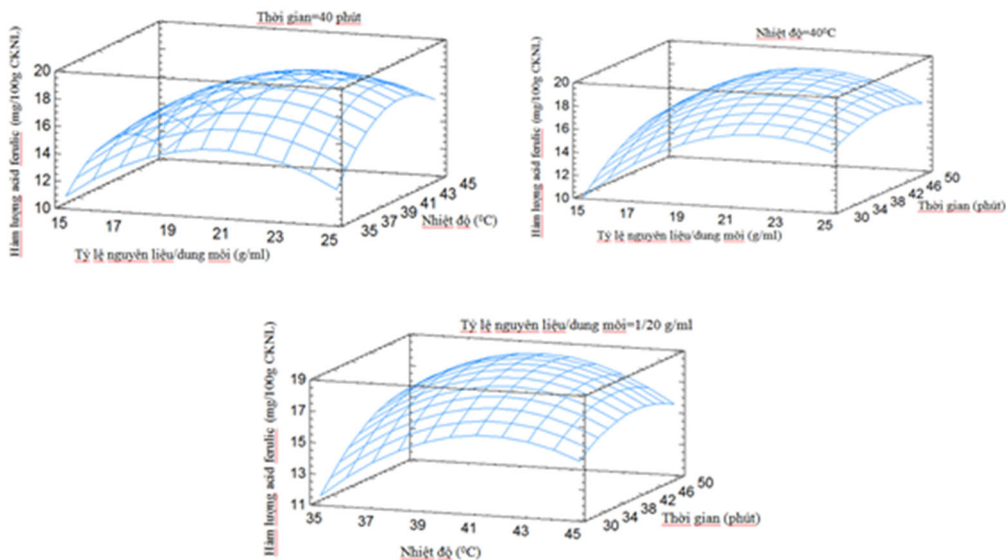


Hình 1: Đồ thị bề mặt đáp ứng của hàm lượng λ -oryzanol

3.1.2 Hàm lượng acid ferulic trong dịch trích ly

Dựa vào Bảng 2 và kết quả ở Hình 2 cho thấy hàm lượng acid ferulic thu được phụ thuộc rất nhiều vào ba nhân tố điều kiện trích ly. Tại điều kiện thời gian trích ly là 40 phút, sử dụng tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi từ 1/12 đến 1/20 g/mL đồng thời tăng nhiệt độ trích ly từ 32 đến 40°C, hàm lượng acid ferulic thu được trong dịch trích ly tăng lên đáng kể từ 6,249 đến 18,361 mg/100g CKNL. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi và nhiệt độ trích ly lên đến 1/28 g/mL và 48°C, hàm lượng acid ferulic trong dịch trích ly lại giảm xuống. Trong đó,

tác động ảnh hưởng của nhân tố tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đối với hàm lượng acid ferulic thu được lớn hơn so với nhân tố nhiệt độ. Tương tự, tại nhiệt độ trích ly 40°C, ảnh hưởng của nhân tố tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đối với hàm lượng ferulic vẫn lớn hơn so với khi tăng thời gian trích ly. Khi tăng thời gian trích ly từ 40 lên 57 phút, hàm lượng ferulic thu được có hiện tượng giảm nhưng không đáng kể. Bên cạnh đó, khi sử dụng một lượng cố định tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 g/mL, đồ thị bề mặt đáp ứng 3D cho thấy rằng ảnh hưởng của nhân tố nhiệt độ đến hàm lượng ferulic thu được thấp hơn so với nhân tố thời gian.



Hình 2: Đồ thị bề mặt đáp ứng của hàm lượng acid ferulic

3.1.3 Kiểm định và so sánh kết quả các điều kiện trích ly tối ưu γ -oryzanol và acid ferulic

Bằng phần mềm xử lý thống kê Statgraphics Centurion XV.I, các giá trị thông số điều kiện trích ly tối ưu cho mô hình được đưa ra gồm tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/20 g/mL; nhiệt độ trích ly 40°C; và thời gian trích ly 40 phút. Để kiểm định các giá trị điều kiện trích ly tối ưu thu được từ mô hình đã xây dựng, các thí nghiệm được thực hiện theo phương án tối ưu nhất đã đề ra. Theo Bảng 3 cho thấy kết quả kiểm định thu được từ thực nghiệm tương đương với kết quả lý thuyết tính toán từ mô hình. Hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic trong dịch trích ly thu được trong thực nghiệm lớn hơn nhưng không đáng kể so với kết quả lý thuyết tính toán từ mô hình. Kết quả kiểm định đã một lần nữa khẳng định tính chính xác cao của mô hình xây dựng. So sánh với kết quả nghiên cứu của Rezka *et al.* (2013), sử dụng dung môi ethanol trích ly γ -oryzanol bằng

phương pháp truyền thống ở nhiệt độ 85°C trong khoảng thời gian thời gian từ 4 đến 6 giờ, thu được nồng độ γ -oryzanol trong dịch trích ly đạt 1,196%. Mặc dù nồng độ γ -oryzanol trong dịch trích ly thu được ở thí nghiệm 1 đạt 1,084% thấp hơn so với nghiên cứu của Rezka *et al.* (2013), nhưng sử dụng phương pháp sóng siêu âm đã giúp cải thiện làm giảm nhiều nhiệt độ và thời gian trích ly. Điều này đã chứng minh được hiệu quả khi sử dụng phương pháp sóng siêu âm để trích ly hoạt chất. Tuy nhiên, hàm lượng γ -oryzanol trong thí nghiệm 1 (Bảng 3) đạt 1.544,552 mg/100g CKNL thấp hơn khi so sánh với kết quả thí nghiệm từ nghiên cứu của Phạm Cảnh Em và *ctv.* (2016). Hàm lượng γ -oryzanol trong nghiên cứu của Phạm Cảnh Em và *ctv.* (2016) thu được từ cám gạo của giống lúa IR50404 đạt 4,85 mg/g khi sử dụng phương pháp trích ly có hỗ trợ vi sóng trong điều kiện tỷ lệ dung môi/cám gạo là 15,78 (wt/wt), nhiệt độ là 53,54°C và thời gian là 9,26 phút.

Bảng 3: Hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic trong dịch trích ly ở điều kiện tối ưu thu được trên lý thuyết và thực nghiệm

Chỉ tiêu theo dõi	Đơn vị	Giá trị thực nghiệm	Giá trị lý thuyết
Hàm lượng γ -oryzanol	mg/100g CKNL	1.545±0,1	1529
Hàm lượng acid ferulic	mg/100g CKNL	18,5±0,2	18,4

Ghi chú: Các giá trị trung bình được tính theo khối lượng khô; CKNL: chất khô nguyên liệu

3.2 Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch trích ly/hỗn hợp dung môi sử dụng trong quá trình làm giàu γ -oryzanol

Thí nghiệm này được thực hiện với một nhân tố là tỷ lệ dịch trích ly/hỗn hợp dung môi sử dụng (X₄),

tương ứng với bốn mức độ tỷ lệ cần khảo sát: 1/20, 1/40, 1/60, 1/80 g/mL. Thí nghiệm có tổng cộng 4 nghiệm thức, 8 đơn vị thí nghiệm (mỗi nghiệm thức thực hiện 2 lần). Hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic được xác định dựa trên phương pháp của Banchuen *et al.*, (2010).

Bảng 4: Hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic thu được trong sản phẩm sau quá trình làm giàu γ -oryzanol

STT	Tỷ lệ dịch trích ly/hỗn hợp dung môi (g/mL)	Hàm lượng γ -oryzanol (mg/100g CKNL)	Hàm lượng acid ferulic (mg/100g CKNL)
1	1/20	2105±0,2 ^c	20,5±0,2 ^c
2	1/40	2278±0,1 ^b	22,9±0,3 ^b
3	1/60	2486±0,1 ^a	27,748±0,2 ^a
4	1/80	2500±0,1 ^a	28,626±0,2 ^a

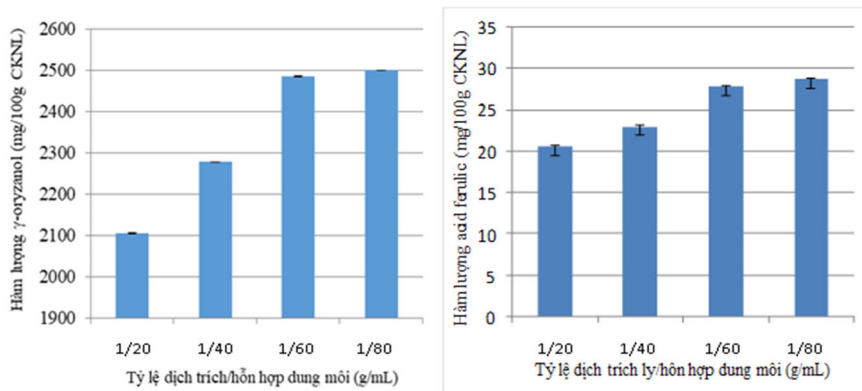
Ghi chú: Các giá trị trung bình có chữ cái đi kèm a, b, c, ... khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ 5%. Các giá trị trung bình được tính theo khối lượng khô; CKNL: chất khô nguyên liệu

Từ kết quả thu được ở Bảng 4 và Hình 3 cho thấy, tỷ lệ dịch trích ly/hỗn hợp dung môi sử dụng trong quá trình có ảnh hưởng không nhỏ đến hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic thu được trong sản phẩm. Khi tăng tỷ lệ dịch trích ly/hỗn hợp dung môi sử dụng từ 1/20, 1/40, đến 1/60 g/mL hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic trong sản phẩm thu được cũng tăng nhanh theo. Kết quả thu được có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%. Điều này chứng minh với một lượng lớn hỗn hợp dung môi sử dụng

(gấp 60 lần lượng dịch trích ly) kết hợp với trữ dung dịch ở nhiệt độ -20°C có thể hoà tan một lượng lớn γ -oryzanol và acid ferulic trong dịch trích ly ban đầu ở thí nghiệm 1. Tuy nhiên, khi tỷ lệ dịch trích ly/hỗn hợp dung môi sử dụng tăng lên 1/80 g/mL hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic thu được có tăng hơn nhưng không đáng kể (theo Bảng 4 và Hình 3). Kết quả thu được hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic trong sản phẩm không có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% so với khi sử dụng tỷ lệ dịch

trích ly/hỗn hợp dung môi là 1/60 g/mL. Nguyên nhân của hiện tượng này là do hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic trong dịch trích ly đã hòa tan gần như triệt để vào hỗn hợp dung môi. Phần pha rắn kết tủa lúc này còn lại một lượng khá nhỏ các γ -oryzanol có độ phân cực kém. Sử dụng một lượng khá lớn hỗn hợp dung môi (gấp 80 lần lượng dịch trích ly) nhưng không mang lại hiệu quả cao làm tăng đáng kể hàm

lượng γ -oryzanol và acid ferulic trong sản phẩm. Với tỷ lệ dịch trích ly/hỗn hợp dung môi sử dụng 1/60 g/ml kết quả nồng độ γ -oryzanol trong sản phẩm đạt 1,744% thấp hơn không đáng kể so với kết quả thu được trong nghiên cứu của Rezka *et al.* (2013) là 1,83%. Do đó, lựa chọn tỷ lệ dịch trích ly/hỗn hợp dung môi sử dụng 1/60 g/mL là nghiệm thức phù hợp.



Hình 3: Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của tỷ lệ dịch trích ly/hỗn hợp dung môi sử dụng đến hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic

3.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ trong quá trình bảo quản sản phẩm cuối

Thí nghiệm được bố trí hai nhân tố gồm: nhiệt độ bảo quản (X_5) tương ứng với ba mức độ khảo sát: -18°C, 5°C và 25°C, và thời gian bảo quản (X_6) tương ứng với bốn mức độ khảo sát trong bốn tuần.

Thí nghiệm có tổng cộng 12 nghiệm thức, 24 đơn vị thí nghiệm (mỗi nghiệm thức được thực hiện 2 lần). Hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic được xác định dựa trên phương pháp của Banchuen *et al.* (2010), hoạt tính chống oxi hóa của sản phẩm (% DPPH - 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) được xác định dựa trên phương pháp của Tabaraki and Nateghi (2011).

Bảng 5: Hàm lượng γ -oryzanol, acid ferulic và hoạt tính chống oxi hóa (DPPH) của sản phẩm ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau trong thời gian bảo quản 4 tuần

Thời gian bảo quản (tuần)	Nhiệt độ bảo quản (°C)			Trung bình thời gian bảo quản	
	25	5	-18		
Hàm lượng γ -oryzanol (mg/g)	1	15,036±0,029	16,643±0,135	17,255±0,005	16,311 ^A
	2	14,691±0,061	15,614±0,182	16,828±0,166	15,711 ^{AB}
	3	12,578±0,118	14,107±0,021	15,936±0,025	14,207 ^B
	4	9,528±0,338	11,853±0,257	14,973±0,013	12,118 ^C
Trung bình nhiệt độ bảo quản	12,958 ^C	14,554 ^B	16,248 ^A		
Hàm lượng acid ferulic (mg/100g)	1	17,066±0,022	18,132±0,129	18,97±0,113	18,056 ^A
	2	15,106±0,543	16,577±0,141	18,306±0,09	16,663 ^{AB}
	3	12,466±0,055	14,704±0,176	17,407±0,329	14,859 ^B
	4	9,087±0,231	12,756±0,213	16,046±0,095	12,63 ^C
Trung bình nhiệt độ bảo quản	13,431 ^C	15,542 ^B	17,682 ^A		
DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (%)	1	41,227±0,183	46,036±0,242	49,266±0,316	45,51 ^A
	2	34,147±0,176	41,7±0,006	47,198±0,13	41,015 ^{AB}
	3	24,973±0,415	34,156±0,005	43,819±0,179	34,316 ^B
	4	11,346±0,231	25,027±0,203	37,11±0,152	24,494 ^C
Trung bình nhiệt độ bảo quản	27,923 ^C	36,73 ^B	44,348 ^A		

Ghi chú: Các giá trị trung bình có chữ cái đi kèm a, b, c, ... (lưu ý a ≠ b ≠ c nhưng a # ab và ab # b) khác nhau trong cùng một hàng hoặc cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa và giống nhau trong cùng một hàng hoặc cột thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức độ 5%. Các giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 2 lần lặp lại và được tính theo khối lượng khô

Kết quả Bảng 5 cho thấy hàm lượng γ -oryzanol, acid ferulic và hoạt tính chống oxi hóa (DPPH) trong sản phẩm đều có sự biến đổi đáng kể và khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% khi bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau. Bảo quản ở nhiệt độ 25°C, hàm lượng các chất và hoạt tính chống oxi hóa (DPPH) của sản phẩm bị biến đổi nhiều nhất. Hàm lượng γ -oryzanol từ 2.485,604 mg/100g CKNL lúc ban đầu giảm còn 1.358,039 mg/100g CKNL vào tuần thứ tư, hàm lượng acid ferulic cũng bị mất đi một lượng khá đáng kể từ 27,748 mg/100g CKNL trong sản phẩm ban đầu giảm còn 12,952 mg/100g CKNL ở tuần cuối. Tương tự, hoạt tính chống oxi hóa (DPPH) ban đầu trong sản phẩm đạt 46,681% thấp hơn 2 lần so với dịch trích từ cám Fajr (93,91%) trong nghiên cứu của Arab *et al.* (2011), sau thời gian bảo quản 4 tuần ở 25°C hoạt tính chống oxi hóa (DPPH) trong sản phẩm còn lại 11,346%. Từ đó, có thể đưa ra kết luận rằng nhiệt độ 25°C không phải là nhiệt độ thích hợp có thể dùng để bảo quản sản phẩm trong thời gian 4 tuần. Ở nhiệt độ bảo quản 5°C, mức độ biến đổi hàm lượng γ -oryzanol, acid ferulic và hoạt tính chống oxi hóa (DPPH) trong sản phẩm thấp hơn khi bảo quản tại 25°C. Sau thời gian bảo quản 4 tuần, lúc này trong sản phẩm hàm lượng γ -oryzanol còn 1.689,424 mg/100g CKNL, acid ferulic còn 18,181 mg/100g CKNL, và hoạt tính chống oxi hóa (DPPH) còn 25,027%. Mặc dù các chỉ tiêu theo dõi của sản phẩm trong thời gian bảo quản ở nhiệt độ 5°C có mức độ biến đổi ít hơn so với khi bảo quản ở 25°C, nhưng mức độ mất mát hàm lượng và hoạt tính các chỉ tiêu theo dõi vẫn còn khá lớn so với sản phẩm lúc đầu. Trong khi đó, khi bảo quản sản phẩm ở nhiệt độ -18°C có thể làm giảm đáng kể sự mất mát về hàm lượng và hoạt tính các chỉ tiêu theo dõi. Ở nhiệt độ bảo quản -18°C sau thời gian bảo quản 4 tuần, lúc này trong sản phẩm hàm lượng γ -oryzanol còn 2.134,122 mg/100g CKNL, acid ferulic còn 22,871 mg/100g CKNL, và hoạt tính chống oxi hóa (DPPH) còn 37,11%. Theo một nghiên cứu của Iqbal *et al.* (2004) trên dịch trích từ cám của các giống lúa khác nhau (Super kernel (RB-kr), Super-2000 (RBs2), Super-basmati (RB-bm), Super-386 (RB-86) và Super-fine (RB-sf)), %DPPH đều chỉ đạt trên dưới 35% và giống có khả năng bẫy gốc tự do tốt nhất vẫn thấp hơn so với sản phẩm được bảo quản 4 tuần ở -18°C trong nghiên cứu này. Ngoài ra, căn cứ vào kết quả thống kê ở Bảng 5 cho thấy được tốc độ biến đổi hàm lượng và hoạt tính của các chỉ tiêu ngày càng tăng theo thời gian bảo quản. Ở ba tuần đầu, hiện tượng giảm hàm lượng γ -oryzanol, acid ferulic, và giảm hoạt tính chống oxi hóa (DPPH) trong sản phẩm gần như không đáng kể. Kết quả thu được không có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%. Nhưng ở tuần thứ tư, hàm lượng các chỉ

tiêu theo dõi, và tính chống oxi hóa (DPPH) của sản phẩm bị giảm nhiều nhất. Kết quả thu được ở tuần thứ tư có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% so với ba tuần đầu. Căn cứ vào mức độ biến đổi của hàm lượng γ -oryzanol, acid ferulic và hoạt tính chống oxi hóa (DPPH) của sản phẩm ở các nhiệt độ khác nhau trong suốt thời gian bảo quản, nên lựa chọn nhiệt độ bảo quản -18°C cho sản phẩm là nghiệm thức phù hợp nhất.

4 KẾT LUẬN

Các điều kiện tối ưu trích ly γ -oryzanol và acid ferulic là tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/20 g/mL, nhiệt độ trích ly 40°C, và thời gian trích ly 40 phút, hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic trong dịch trích ly thu được trên thực nghiệm lần lượt là 1.544,552 mg/100g CKNL và 18,537 mg/100g CKNL. Ở giai đoạn làm giàu γ -oryzanol, khi sử dụng hợp lý tỷ lệ dịch trích ly/hỗn hợp dung môi là 1/60 g/mL, hàm lượng γ -oryzanol và acid ferulic trong sản phẩm tăng lên đáng kể lần lượt là 2.485,604 mg/100g CKNL và 27,748 mg/100g CKNL. Trong quá trình bảo quản sản phẩm, với nhiệt độ bảo quản -18°C, hàm lượng γ -oryzanol, acid ferulic và hoạt tính chống oxi hóa (DPPH) trong sản phẩm được đánh giá là ít bị biến đổi nhiều nhất. Sau thời gian bảo quản 4 tuần, lúc này hàm lượng các chỉ tiêu theo dõi trong sản phẩm lần lượt là γ -oryzanol còn 2.134,122 mg/100g CKNL, acid ferulic còn 22,871 mg/100g CKNL, và hoạt tính chống oxi hóa (DPPH) trong sản phẩm còn 37,11%.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ chính phủ Nhật Bản (Chương trình A15).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arab, F., Alemzadeh, I. and Maghsoudi, V., 2011. Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract. *Scientia iranica*. 18(6): 1402-1406.
- Banchuen, J., Thammarutwasik, P., Ooraikul, B., Wuttijumnong, P. and Sirivongpaisal, P., 2010. Increasing the bio-active compounds contents by optimizing the germination conditions of southern Thai Brown Rice. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*. 32(3): 219-230.
- Cheruvanky, R., 2003. Phytochemical products: rice bran. In: Johnson, I. and Williamson, J., (Eds.). *Phytochemical functional foods*. Food Science and Technology. Woodhead Publishing Inc.. Boca Raton, Florida, pp. 347-376.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar H.Z., Juraimi A.S. and Tayebi-Meigooni, A., 2015. Comparative evaluation of different extraction techniques and

- solvents for the assay of phytochemicals and antioxidant activity of hashemi rice bran. *Molecules*. 20(6): 10822-10838.
- Iqbal, S., Bhangar, M. I. and Anwar, F., 2005. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*. 93(2): 265-272.
- Patel, M. and Naik, S.N., 2004. Gamma-oryzanol from rice bran oil – A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 63: 569-578.
- Phạm Cảnh Em, Nguyễn Thị Kim Mơ, Lê Thị Tường Vi và Nguyễn Trọng Tuấn, 2016. Tối ưu hóa quy trình chiết các thành phần tocopherol và γ -oryzanol trong cám gạo bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*. Tập 21, 101-111.
- Rezka, P.H., Anugerah, F.Y., Zullaikah, S. and Rachimoellah, H.M., 2013. Isolation and characterization of oryzanol from crude rice bran oil. *JURNAL TEKNIK POMITS*. 1(1): 1-6
- Tabaraki, R. and Nateghi, A., 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*. 18(6): 1279-1286.
- Zullaikah, S., Melwita, E. and Ju, Y.H., 2009. Isolation of oryzanol from crude rice bran oil. *Bioresource Technology*. 100(1): 299-302.