

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN XỬ LÝ ENZYME NHẪM THU NHẬN DỊCH CHIẾT CỦ HOÀNG SİN CỎ SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP BỀ MẶT ĐÁP ỨNG

Đỗ Thị Thanh Huyền¹*, Nguyễn Mạnh Đạt¹, Nguyễn Thế Huỳnh¹,
Nguyễn Thị Thu¹, Nguyễn Thị Hồng Lĩnh¹,
Chu Thắng¹, Nguyễn Khánh Hồng²

¹ Viện Công nghiệp thực phẩm, Bộ Công Thương

² Viện Đại học Mở Hà Nội

*Email: huyendt@firi.vn

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là thiết lập kế hoạch thực nghiệm đa yếu tố và sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) để tối ưu hóa quá trình xử lý enzyme thu nhận dịch chiết củ hoàng sin cỏ có hàm lượng đường fructooligosaccharides (FOS) tối đa và tốc độ dòng thấm màng siêu vi lọc (UF) cao. Tiến hành xử lý dịch chiết củ hoàng sin cỏ ở điều kiện: Nồng độ pectinase G (0,2 - 0,5%), nồng độ cellulase T4 (0,2 - 0,5%), nhiệt độ (45 - 55°C) và thời gian (60 - 120 phút). Mô hình hồi quy với hệ số xác định có ý nghĩa $R^2 = 0,9879$ và $0,9853$, tương ứng với sự thay đổi của hàm lượng đường FOS và tốc độ dòng thấm màng UF. Nồng độ pectinase G và cellulase T4 là yếu tố ảnh hưởng lớn đến khả năng thu nhận đường FOS và tốc độ thấm màng lọc ($p < 0,05$) đối với tất cả các biến phụ thuộc. Dựa trên biểu đồ bề mặt phản ứng và đường đồng mức, điều kiện xử lý enzyme tối ưu ở nồng độ pectinase G là 0,39%, nồng độ cellulase là T4 0,4%, nhiệt độ 50,4°C và thời gian 97,5 phút. Với điều kiện tối ưu này, thu nhận đường FOS đạt 32,14%, tốc độ dòng thấm đạt 7,64 L/h/m², thu nhận đường FOS tăng 26,0% và tốc độ dòng thấm màng lọc tăng 53,4% so với mẫu đối chứng (không xử lý bằng enzyme). Dịch chiết củ hoàng sin cỏ sau quá trình xử lý enzyme và lọc màng siêu vi lọc, có thể được sử dụng trong sản xuất nước uống hoặc làm nguyên liệu để phát triển các sản phẩm thực phẩm khác.

Từ khóa: Bề mặt đáp ứng, dịch chiết củ hoàng sin cỏ, xử lý enzyme, fructooligosaccharides, tốc độ thấm màng lọc.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Củ hoàng sin cỏ (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob.) là loại rễ củ có thành phần cacbohydrate chứa 60 - 70% inulin, inulin trong củ hoàng sin cỏ có mức độ trùng hợp thấp (DP từ 3 - 10), do đó được coi là fructooligosaccharides [1]. Củ hoàng sin cỏ có độ ngọt khoảng 70% so với đường sucrose, vị ngọt của củ do có đường FOS, fructose, glucose và sucrose [2]. Thành phần của củ tươi gồm: Nước 81,7%, saccharide 13 - 16%, chất xơ 0,9%, protein 1,09%, chất béo 0,08% và tro 1,1% [3, 4]. FOS được công nhận là prebiotic và chất xơ hòa tan, FOS không bị thủy phân bởi enzyme tiêu hóa có trong dạ dày và ruột non của người, vì vậy,

FOS không sinh năng lượng, không làm tăng đường trong máu. Bên cạnh đó, tại ruột già FOS được lên men bởi vi khuẩn hữu ích *Bifidobacteria*, tạo ra các axit mạch ngắn ức chế các vi sinh vật đường ruột có hại, giúp tăng hệ vi sinh hữu ích, giảm rối loạn tiêu hóa... [5]. Hiện nay, củ hoàng sin cỏ được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm dưới dạng nguyên liệu bổ sung với các đặc tính như: Prebiotic, chất làm ngọt, chất xơ và làm thực phẩm ăn kiêng cho người bị bệnh béo phì và bệnh đái tháo đường [6].

Polysaccharide có trong củ hoàng sin cỏ chủ yếu là cellulose và hemicellulose và lượng nhỏ pectin [7]. Do đó, khi lọc thường hình thành cặn

bám trên màng làm giảm tốc độ dòng và làm tắc nghẽn màng lọc. Tuy nhiên, các hợp chất cellulose, hemicellulose và pectin sẽ được phân hủy bởi quá trình tiền xử lý dịch bởi enzyme pectinase, cellulase nhằm tăng dòng thẩm trong quá trình siêu vi lọc và thẩm thấu ngược của dịch chiết [8, 9]. Quá trình xử lý dịch chiết bằng enzyme nhằm thủy phân polysaccharide thường bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố như nồng độ enzyme, nhiệt độ, thời gian [10, 11]. Bên cạnh đó, để thu được xi-rô từ củ hoàng sin cô có hàm lượng FOS cao, xử lý dịch chiết củ hoàng sin cô sử dụng enzyme pectinase, cellulase thương mại của hãng Novozyme (Đan Mạch) và ảnh hưởng của nó đối với quá trình lọc màng đã được thực hiện. Tuy nhiên, ảnh hưởng của từng yếu tố xử lý đối với thu nhận FOS và hiệu suất lọc qua màng siêu vi lọc chưa được làm rõ [12, 13].

Trong nghiên cứu này, nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian của quá trình xử lý được chọn là các biến độc lập để tối ưu hóa dịch chiết củ hoàng sin cô sử dụng enzyme pectinase và cellulase (Amano - Nhật Bản). Đây là những yếu tố chính ảnh hưởng đến cơ chế hoạt động của enzyme đối với dịch chiết củ hoàng sin cô [13, 14]. Mục tiêu của nghiên cứu này là thực nghiệm đa yếu tố (nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian) và tối ưu quá trình thu nhận đường FOS cao nhất và khả năng lọc nhanh dịch chiết từ củ hoàng sin cô bằng phương pháp bề mặt đáp ứng.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Vật liệu thí nghiệm

Củ hoàng sin cô thu tại huyện Bát Xát, tỉnh Lào Cai, loại củ 10 tháng tuổi. Củ được rửa sạch, loại bỏ các vết thối hỏng và bảo quản trong tủ lạnh ($8 \pm 2^\circ\text{C}$) cho đến khi sử dụng.

Màng UF có khối lượng phân tử 10 kDa (UF-10), diện tích hoạt động 0,00572 m², được làm bằng polyethersulfone (hãng Synder Filtration, Vacaville, Hoa Kỳ).

2.1.2. Enzyme

Enzyme pectinase G “Amano” (viết tắt pectinase G) từ chủng *Aspergillus pulverulentus*, có hoạt tính endo PGase ≥ 1.200 U/g và cellulase

T “Amano” 4 (cellulase T4) từ chủng *Trichoderma reesei* có hoạt tính cellulase ≥ 280 U/g. Hai enzyme này hoạt động ở pH tối ưu 4,5 - 5,0 do Công ty Amano Enzyme Inc. Nagoya, Nhật Bản cung cấp.

2.2. Phương pháp thực hiện

2.2.1. Xử lý củ hoàng sin cô

Củ hoàng sin cô rửa sạch, cắt lát dày khoảng 1,5 mm x 0,5 mm và chần bằng hơi nước nóng 95°C chứa 0,2% axit ascorbic và 0,5% canxi clorua trong 6 phút, sau đó rửa lại và làm lạnh trong bể nước đá trong 3 phút [4]. Bổ sung nước theo tỷ lệ củ: nước là 1: 2, nghiền nhỏ củ bằng máy xay sinh tố trong 2 - 3 phút cho đến khi thu được dịch đồng nhất và sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình xử lý bằng enzyme.

2.2.2. Xử lý dịch củ hoàng sin cô bằng enzyme

- Xử lý dịch củ đơn yếu tố: Tiến hành xử lý dịch củ hoàng sin cô riêng rẽ theo từng yếu tố tại nồng độ enzyme pectinase G (0,1 - 1,0%), nồng độ enzyme cellulase T4 (0,1 - 1,0%), nhiệt độ (40 - 60°C) và thời gian (30 - 150 phút). Dựa trên kết quả xử lý đơn yếu tố, xác định khoảng phù hợp để tiến hành xử lý điều kiện xử lý dịch củ đa yếu tố.

- Xử lý dịch củ đa yếu tố: Dịch củ hoàng sin cô được xử lý bằng enzyme theo các điều kiện khác nhau như trong bảng 1. Mẫu đối chứng là mẫu không có enzyme được xử lý ở 80°C trong 60 phút [15]. Quá trình xử lý được thực hiện trong bể ổn nhiệt (Elma, S 300H, Elmasonic, Đức) có kiểm soát nhiệt độ với độ chính xác $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Độ pH của dịch củ hoàng sin cô sau quá trình xử lý củ được giữ ở giá trị pH là 4,5 và được loại trừ khỏi thiết kế thí nghiệm RMS vì độ pH được coi là tối ưu cho enzyme pectinase và cellulase [13]. Kết thúc quá trình xử lý enzyme nâng nhiệt độ lên 90°C trong 5 phút, sau đó làm nguội dung dịch bằng nước lạnh đến nhiệt độ phòng và lọc dịch qua giấy lọc, loại bỏ chất rắn lơ lửng, bảo quản trong tủ -5°C và sử dụng cho quá trình UF.

2.2.3. Phương pháp bố trí thí nghiệm và tối ưu hóa điều kiện xử lý dịch chiết

Bốn thông số của quá trình xử lý gồm: Nồng độ pectinase G (A), nồng độ cellulase T4 (B),

hiệt độ (C) và thời gian (D). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu trục tâm quay (Rotatable Central Composite Design - RCCD) và ma trận thí nghiệm

được xây dựng bằng phần mềm *Design Expert 13.0* được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Phạm vi và mức độ thử nghiệm của các biến độc lập

Biến thực	Đơn vị	Biến mã hóa	Khoảng biến thiên	Mức mã hóa				
				-α	-1	0	+1	+α
Pectinase G	%	A	0,2 - 0,5	0,05	0,2	0,35	0,5	0,65
Cellulase T4	%	B	0,2 - 0,5	0,05	0,2	0,35	0,5	0,65
Nhiệt độ	°C	C	45 - 55	40,0	45,0	50,0	55,0	60,0
Thời gian	phút	D	60 - 120	30,0	60,0	90,0	120,0	150,0

Trong số 30 thí nghiệm được tiến hành (Bảng 2), có 16 (2⁴) thí nghiệm ở hai mức (trên và dưới), 8 (2 × 4) thí nghiệm ở điểm sao và 6 thí nghiệm ở tâm. Mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của các biến độc lập đối với biến phụ thuộc có dạng hàm đa thức bậc hai có dạng tổng quát như sau:

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_4D + b_{12}AB + b_{13}AC - b_{14}AD - b_{23}BC - b_{24}BD + b_{34}CD - b_1A^2 - b_2B^2 - b_3C^2 - b_4D^2 \quad (1)$$

Trong đó: Y là biến phụ thuộc (hàm mục tiêu); b_1, b_2, b_3, b_4 là các hệ số bậc 1; $b_{11}, b_{22}, b_{33}, b_{44}$ là hệ số bậc 2; b_{12}, b_{23}, b_{34} là hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; $A, B, C, D, AB, AC, AD, BC, BD, CD, A^2, B^2, C^2, D^2$ là biến mã hóa (biến độc lập) ảnh hưởng đến hàm mục tiêu Y.

2.2.4. Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Dựa vào kết quả thu được từ thí nghiệm theo RSM-CCD, phần mềm Design-Expert 13 phân tích và đề xuất các giải pháp để thu được hàm lượng FOS và tốc độ thẩm màng UF cao nhất. Sau đó thí nghiệm kiểm định thực tế mô hình được thực hiện 3 lần lặp lại, lấy kết quả trung bình.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Phương pháp xác định hàm lượng fructooligosaccharide

Hàm lượng FOS được phân tích bằng phương pháp quang phổ sử dụng KIT fructan thương mại K-FRUC Kit, hãng Megazyme Ireland [16]. Các quy trình phân tích do nhà sản xuất đề xuất được tuân thủ nghiêm ngặt và hàm lượng đường FOS

được tính toán và biểu thị bằng phần trăm (%) khối lượng khô. Hàm lượng FOS được tính theo công thức (2):

$$FOS (\%w/w) = \Delta A \times F \times 5 \times 25 \times \frac{1.1}{0.2} \times \frac{100}{W} \times \frac{1}{1000} \times \frac{162}{180} \times D \quad (2)$$

Trong đó: ΔA là độ hấp thụ mẫu – độ hấp thụ mẫu trắng; F là hệ số chuyển đổi giá trị độ hấp thụ thành μg D-fructose (=54,5 mg D-fructose)/(độ hấp thụ của 54,5 mg D-fructose); 5 là hệ số để chuyển đổi từ 0,2 ml trong phân tích thành 1,0 ml; 25 là thể tích chất chiết được sử dụng (ml); $\frac{1.1}{0.2}$ là 0,2 ml được lấy từ 1,1 ml dịch phân hủy enzyme để phân tích; W là khối lượng của mẫu chiết (mg); $\frac{100}{W}$ là hệ số để biểu thị fructan dưới dạng phần trăm khối lượng mẫu; $\frac{1}{1000}$ là hệ số để chuyển đổi từ g sang mg; $\frac{162}{180}$ là hệ số để chuyển đổi từ D-fructose tự do thành anhydrofructose và anhydroglucose; D là độ pha loãng thêm của dịch chiết mẫu.

2.3.2. Xác định tốc độ dòng thẩm màng

Điều kiện lọc UF được thực hiện ở 25°C và áp suất lọc là 1,2 bar (theo khuyến cáo của nhà sản xuất) tuần hoàn tất cả dòng không qua màng trong bể cấp liệu. Quá trình UF dừng lại khi đạt 80% khả năng thu hồi dịch không qua màng. Khi kết thúc quá trình lọc, dòng không qua màng (retentate) và dòng qua màng (permenate) được lưu giữ riêng biệt ở 10°C. Sau mỗi thí nghiệm, màng UF được làm sạch bằng dung dịch NaOH (0,35 g/l pH 10 -

10,5) và dung dịch axit citric (5 g/l pH 2,0) [12]. Các mẫu dòng không qua màng được sử dụng phân tích đường FOS, dòng qua màng dùng để xác định tốc độ thẩm màng lọc. Hiệu suất lọc được xác định qua tốc độ dòng thẩm qua màng lọc J (L/h/m²) và được mô tả trong phương trình (3) [8].

$$J = \frac{1}{Am} \times \frac{\Delta W}{\Delta t} \quad (3)$$

Trong đó: Am là diện tích màng lọc (m²); $\Delta W/\Delta t$ là dung lượng thẩm; ΔW thu được theo thời gian Δt (L/h).

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Design-Expert (phiên bản 13, Stat-Ease Inc., USA) để phân tích phương sai (ANOVA), tính toán hệ số của phương trình hồi quy và đề xuất giải pháp cho mô hình tối ưu hóa.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thiết lập mô hình tối ưu hóa

Sau khi tiến hành thực nghiệm như quy hoạch, thu được kết quả hàm lượng đường FOS và tốc độ dòng thẩm qua màng UF (P_{flux}) được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả bố trí thí nghiệm theo quy hoạch trực tâm quay

STT	Yếu tố ảnh hưởng								Giá trị hàm mục tiêu	
	Biến mã hóa				Biến thực					
	A	B	C	D	Pectinase G (%)	Cellulose T4 (%)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Đường FOS (%)	P _{flux} (L/h/ <i>m</i> ²)
1	-1	-1	-1	-1	0,2	0,2	45,0	60,0	22,030	4,400
2	1	-1	-1	-1	0,5	0,2	45,0	60,0	22,760	5,400
3	-1	1	-1	-1	0,2	0,5	45,0	60,0	27,750	6,350
4	1	1	-1	-1	0,5	0,5	45,0	60,0	26,750	7,075
5	-1	-1	-1	1	0,2	0,2	55,0	60,0	22,250	5,110
6	1	-1	-1	1	0,5	0,2	55,0	60,0	25,580	7,025
7	-1	1	-1	1	0,2	0,5	55,0	60,0	25,300	6,300
8	1	1	-1	1	0,5	0,5	55,0	60,0	26,240	7,550
9	-1	-1	1	-1	0,2	0,2	45,0	120,0	23,100	6,275
10	1	-1	1	-1	0,5	0,2	45,0	120,0	25,430	6,850

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

11	-1	1	1	-1	0,2	0,5	45,0	120,0	26,020	7,500
12	1	1	1	-1	0,5	0,5	45,0	120,0	26,300	7,200
13	-1	-1	1	1	0,2	0,2	55,0	120,0	24,500	6,040
14	1	-1	1	1	0,5	0,2	55,0	120,0	27,930	7,325
15	-1	1	1	1	0,2	0,5	55,0	120,0	26,430	6,250
16	1	1	1	1	0,5	0,5	55,0	120,0	29,500	7,110
17	$-\alpha$	0	0	0	0,05	0,35	50,0	90,0	24,300	4,725
18	α	0	0	0	0,65	0,35	50,0	90,0	28,800	7,530
19	0	$-\alpha$	0	0	0,35	0,05	50,0	90,0	25,140	5,375
20	0	α	0	0	0,35	0,65	50,0	90,0	29,540	7,375
21	0	0	0	$-\alpha$	0,35	0,35	40,0	90,0	20,230	5,925
22	0	0	0	α	0,35	0,35	60,0	90,0	21,380	6,550
23	0	0	$-\alpha$	0	0,35	0,35	50,0	30,0	26,350	5,725
24	0	0	α	0	0,35	0,35	50,0	150,0	29,200	7,350
25	0	0	0	0	0,35	0,35	50,0	90,0	32,940	7,470
26	0	0	0	0	0,35	0,35	50,0	90,0	33,820	7,600
27	0	0	0	0	0,35	0,35	50,0	90,0	33,670	7,550
28	0	0	0	0	0,35	0,35	50,0	90,0	32,360	7,675
29	0	0	0	0	0,35	0,35	50,0	90,0	32,890	7,425

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

30	0	0	0	0	0,35	0,35	50,0	90,0	32,760	7,780
Đối chứng	-	-	-	-	-	-	80,0	90,0	25,5	4,98

3.2. Phân tích sự có nghĩa và sự tương quan của mô hình

Kết quả ở bảng 2 và phân tích hồi quy tuyến tính của 30 thí nghiệm được thể hiện trong phương trình đa thức bậc hai (phương trình 4 và 5) và được biểu diễn bằng đồ thị trong hình 1 và 2 (các đường đồng mức). Phân tích ANOVA được phương trình hồi quy hàm mục tiêu hàm lượng đường FOS (Y1) và tốc độ dòng thấm qua màng lọc (Y2) như sau:

$$Y1 = 33,07 + 0,9212*A + 1,23*B + 0,4121*C + 0,6771*D - 0,4081*AB + 0,5269*AC + 0,3194*AD - 0,3931*BC - 0,3831*BD + 0,4644*CD - 1,65*A^2 - 1,45*B^2 - 3,09*C^2 - 1,35*D^2 \quad (4)$$

$$Y2 = 7,58 + 0,5383*A + 0,4546*B + 0,1212*C + 0,3579*D - 0,14*AB + 0,2609*AC - 0,1544*AD - 0,2181*BC - 0,2356*BD - 0,2412*CD - 0,3364*A^2 - 0,2745*B^2 - 0,3089*C^2 - 0,2339*D^2 \quad (5)$$

Bảng 3. Kết quả phân tích hồi quy hàm lượng đường FOS và tốc độ dòng thấm màng lọc

Mô hình	Hàm lượng đường FOS (%)		Tốc độ dòng thấm màng siêu vi lọc (Y2)	
	Giá trị F	Giá trị p	Giá trị F	Giá trị p
Giá trị kiểm định của mô hình	87,29	< 0,0001 ^s	40,21	< 0,0001 ^s
A	58,58	< 0,0001 ^s	151,32	< 0,0001 ^s
B	104,36	< 0,0001 ^s	107,90	< 0,0001 ^s
C	11,72	0,0038 ^s	7,68	0,0143 ^s
D	31,64	< 0,0001 ^s	66,89	< 0,0001 ^s
AB	7,66	0,0143 ^s	6,82	0,0196 ^s
AC	12,77	0,0028 ^s	14,90	0,0015 ^s
AD	4,69	0,0468 ^s	8,30	0,0114 ^s
BC	7,11	0,0176 ^s	16,56	0,0010 ^s

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

<i>BD</i>	6,75	0,0201 ^S	19,33	0,0005 ^S
<i>CD</i>	9,92	0,0066 ^S	20,26	0,0004 ^S
<i>A</i>²	215,23	< 0,0001 ^S	67,51	< 0,0001 ^S
<i>B</i>²	166,84	< 0,0001 ^S	44,96	< 0,0001 ^S
<i>C</i>²	752,25	< 0,0001 ^S	56,92	< 0,0001 ^S
<i>D</i>²	142,82	< 0,0001 ^S	32,63	< 0,0001 ^S
Không tương thích	1,16	0,4622	3,49	< 0,0001 ^S
Hệ số xác định (R^2)	0,9879		0,9740	
Hệ số biến dị (CV%)	2,18		3,22	
Hệ số (R^2) hiệu chỉnh	0,9766		0,9498	
Hệ số (R^2) tiên đoán	0,9459		0,8648	

Ghi chú: S (significant): Có nghĩa ($p < 0,05$); NS (non-significant): Không có nghĩa ($p > 0,05$).

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, giá trị kiểm định F (F - value) của mô hình Y1 là 87,29 và Y2 là 40,21 với giá trị $p < 0,0001$ cho thấy, mô hình hoàn toàn có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 99,99%. Các biến A, B, C, D, AB, AC, AD, BC, BD, CD, A^2 , B^2 , C^2 , D^2 có giá trị p đều nhỏ hơn 0,05 chứng tỏ bốn yếu tố pectinase G, cellulose T4, nhiệt độ và thời gian tương tác nhau có ý nghĩa thống kê. Sự không tương thích của Y1 là 1,16 ($p = 0,4622$) và Y2 là 3,49 ($p < 0,0001$), điều đó chứng minh sự không tương thích không có ý nghĩa, hay mô hình Y1 và Y2 hoàn toàn tương thích với thực nghiệm.

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy, hệ số xác định (R^2) của mô hình Y1 là 0,9879 thể hiện mô hình hàm mục tiêu hàm lượng đường FOS phù hợp với số liệu ở mức 98,79% và Y2 là 0,974 thể hiện mô hình hàm mục tiêu tốc độ dòng thấm màng lọc phù hợp với số liệu ở mức 97,4%.

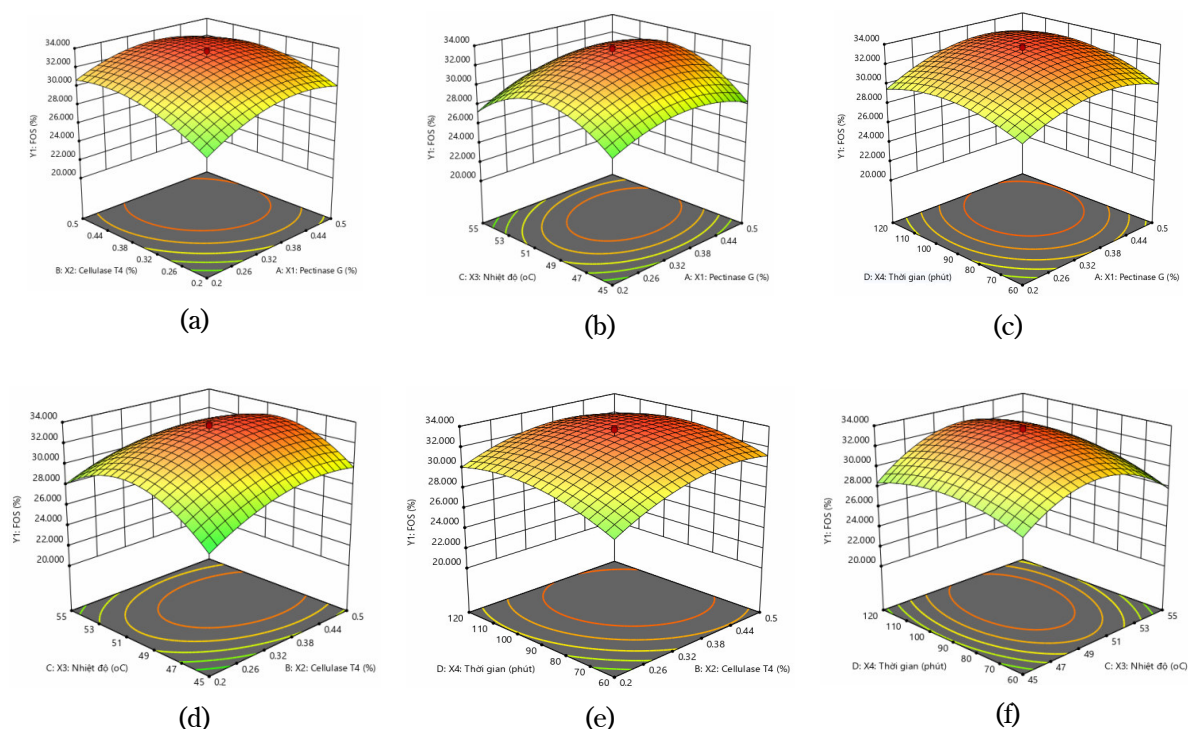
Hệ số R^2 điều chỉnh Y1 là 0,9766 cho thấy, các biến độc lập nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian giải thích được 97,66% sự biến thiên của hàm lượng đường FOS, còn lại 2,34% được giải thích bởi các biến ngoài mô hình và sai số ngẫu nhiên. Tương tự, hệ số R^2 điều chỉnh Y2 là 0,9498 sẽ có 94,98% sự biến thiên của tốc độ dòng thấm, còn lại 5,02% các biến ngoài mô hình và sai số ngẫu nhiên. R^2 dự đoán Y1 là 0,9459 phù hợp với R^2 điều chỉnh là 0,9766 và R^2 dự đoán Y2 là 0,8646 phù hợp với R^2 điều chỉnh là 0,9498; tức là sự khác biệt Y1 và Y2 nhỏ hơn 0,2. Tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu Y1 là 33,7 và Y2 là 7,58, đều có giá trị lớn hơn 4 chỉ ra rằng tín hiệu đã đầy đủ. Hệ số biến dị của thí nghiệm Y1 ở mức thấp là 2,18% và Y2 là 2,45% chứng tỏ thí nghiệm thực hiện chính xác và độ lặp lại cao [17].

3.3. Ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình xử lý dịch củ hoàng sin cô

Đường đồng mức ba chiều gồm các trục X và Y đại diện cho 2 yếu tố, trục Z là một trong 2 chỉ số đánh giá là hàm lượng đường FOS và tốc độ dòng

thấm màng siêu vi lọc (Hình 1 và 2). Mỗi hình thể hiện tác động của hai yếu tố và hai yếu tố còn lại cố định ở mức độ trung bình.

3.3.1. Ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình thu nhận đường FOS



Hình 1. Đường đồng mức ba chiều biểu thị thông số tối ưu đến hàm lượng đường FOS

(a): Pectinase G và Cellulose T4; (b): Pectinase G và nhiệt độ; (c): Pectinase G và thời gian; (d): Cellulose T4 và nhiệt độ; (e): Cellulose T4 và thời gian; (f): Thời gian và nhiệt độ.

Hình 1a cho thấy, sự tương tác của 2 yếu tố pectinase G và cellulose T4 có ý nghĩa ảnh hưởng đến hàm lượng đường FOS thu được $p < 0,05$ ($p = 0,0043$). Khi tăng đồng thời nồng độ pectinase G 0,33 - 0,45% và cellulose T4 là 0,33 - 0,46%, hàm lượng FOS thu nhận cao (đạt trên 33%), nếu nồng độ enzyme tiếp tục tăng thì hàm lượng FOS sẽ giảm. Theo quy luật nghiên cứu, vận tốc phản ứng tăng khi nồng độ enzyme tăng, nhưng khi nồng độ enzyme bão hòa với nồng độ cơ chất thì vận tốc phản ứng không thay đổi khi tăng nồng độ enzyme [13]. Hình 1b thể hiện tương tác có ý nghĩa của cặp yếu tố nồng độ pectinase G với nhiệt độ đối với thu nhận FOS do $p < 0,05$ ($p = 0,0028$). Kết quả thu nhận đường FOS cao khi pectinase G trong khoảng 0,33 - 0,46% và nhiệt độ trong

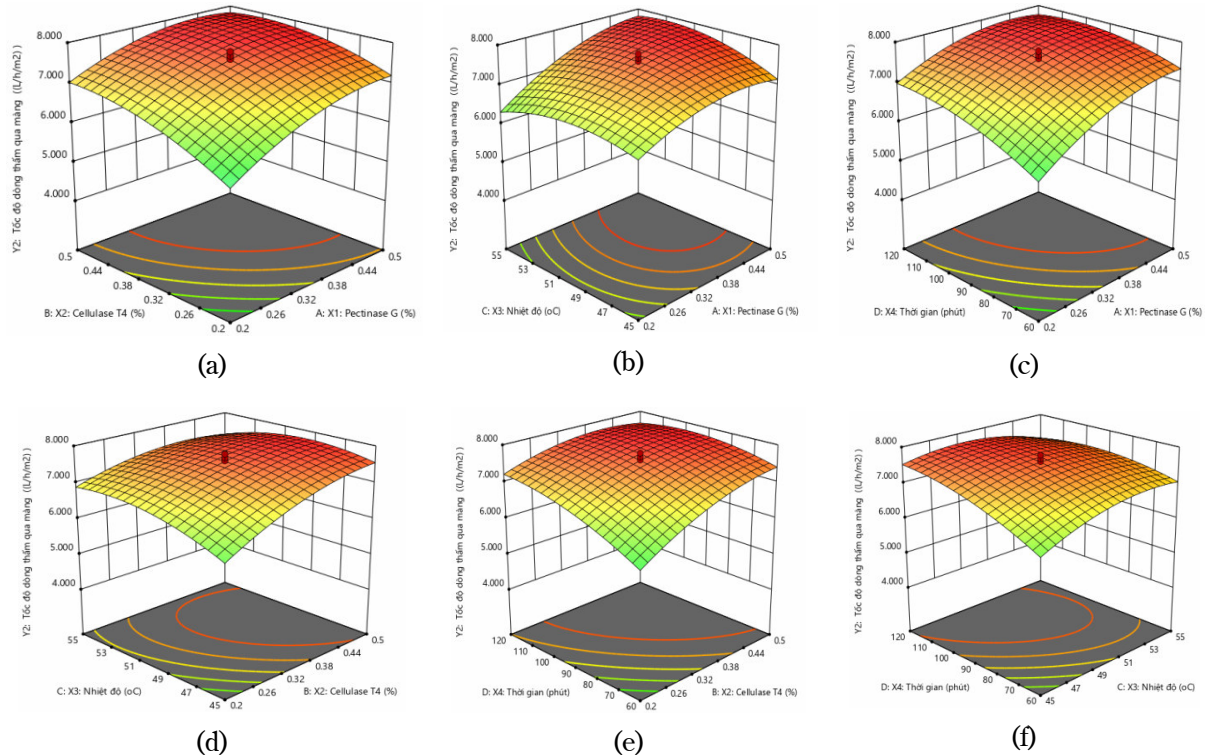
khoảng 49 - 51,5°C. Bên cạnh đó, cellulose T4 tương tác với nhiệt độ $p < 0,05$ ($p = 0,0176$) hàm lượng FOS tăng khi nồng độ cellulase T4 cùng nhiệt độ tăng và đạt cực đại trong khoảng 0,34 - 0,41% với nhiệt độ trong khoảng 49 - 53°C, nếu nồng độ cellulase T4 và nhiệt độ tiếp tục tăng thì hàm lượng FOS sẽ giảm (Hình 1d).

Sự tương tác của nồng độ pectinase G, cellulose T4 với thời gian phút (Hình 1c và 1e), cho kết quả thu nhận đường FOS cao trong khoảng thời gian tăng từ 83 - 114 phút khi sử dụng pectinase G 0,33 - 0,45% hoặc cellulose T4 trong khoảng 0,32 - 0,47%. Với sự tương tác cặp yếu tố nhiệt độ và thời gian (Hình 1f) có nghĩa đến hàm lượng FOS thu được $p < 0,05$ ($p = 0,0066$). Thu nhận đường FOS cao trong khoảng thời gian 85 -

108 phút và nhiệt độ 49,5 - 51,5°C. Khi nhiệt độ và thời gian tăng thì thu nhận đường FOS giảm dần, khi nhiệt độ tăng trên 52°C đường FOS giảm có

thể do protein bị biến tính dẫn đến hoạt tính enzyme giảm ở nhiệt độ cao.

3.3.2. Ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình lọc màng siêu vi lọc



Hình 2. Đường đồng mức ba chiều biểu thị thông số tối ưu đến tốc độ dòng thấm màng lọc

(a): Pectinase G và Cellulose T4; (b): Pectinase G và nhiệt độ; (c): Pectinase G và thời gian; (d): Cellulose T4 và nhiệt độ; (e): Cellulose T4 và thời gian; (f): Thời gian và nhiệt độ.

Hình 2a và bảng 3 thể hiện tương tác có ý nghĩa của nồng độ pectinase G và cellulose T4 đối với tốc độ dòng thấm màng lọc $p < 0,05$ ($p = 0,0196$). Tốc độ dòng thấm tăng tuyến tính khi nồng độ pectinase G từ 0,4 - 0,5% hoặc cellulose T4 từ 0,39 - 0,5%. Tốc độ dòng thấm tăng có thể xảy ra khi đồng thời giảm cellulose T4 từ 0,2 - 0,42% và tăng pectinase G từ 0,2 - 0,42%. Kết quả này phù hợp với các nguyên lý chung của quá trình xử lý enzyme trước khi lọc, enzyme pectinase và cellulose có hiệu quả trong việc thủy phân và giảm kích thước phân tử polysaccharide có trong củ hoàng sin cô, tăng tốc độ dòng thấm và tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình lọc [13].

Sự tương tác giữa nồng độ pectinase G và nhiệt độ có ý nghĩa $p < 0,05$ ($p = 0,015$) đối với tốc

độ dòng thấm màng UF. Khi tăng pectinase G từ 0,28 - 0,5% ở nhiệt độ 45 - 55°C thì tốc độ dòng thấm màng UF đạt giá trị cao (lớn hơn 7,0 L/h/m²) (Hình 2b). Đối với tương tác nồng độ pectinase G và thời gian (Hình 2c) cho thấy, pectinase G và thời gian có thể không phụ thuộc lẫn nhau nếu tăng pectinase G (0,36 - 0,5%) hoặc thời gian (104 - 120 phút) cho tốc độ dòng thấm màng đạt cao nhất. Nếu tăng pectinase G từ 0,2 - 0,36%, đồng thời giảm thời gian trong khoảng 60 - 104 phút, tốc độ dòng thấm màng UF đạt do có sự tương tác của nồng độ pectinase G và thời gian $p < 0,05$ ($p = 0,0114$).

Đối với tương tác cellulose T4 với nhiệt độ, tốc độ thấm màng UF đạt cao khi có sự tương tác đồng thời cellulose T4 trong khoảng 0,2 - 0,3% và nhiệt độ trong khoảng 45 - 52°C, ở nhiệt

độ lớn hơn 52°C cần có tương tác với lượng nhỏ cellulose T4 (0,2 - 0,23%), khi tăng cellulose T4 từ 0,31 - 0,5% thì tốc độ màng thấm UF không phụ thuộc vào nhiệt độ trong khoảng 45 - 55°C (Bảng 3 và hình 2d). Hình 2e và bảng 3 thể hiện sự tương tác giữa cellulose T4 và thời gian tới tốc độ thấm màng UF có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ ($p = 0,0005$), cellulose T4 tăng từ 0,2 - 0,36% cần thiết có sự tương tác với yếu tố thời gian tăng từ 60 - 100 phút. Bên cạnh đó, tốc độ dòng thấm màng có thể đạt cao khi cellulose T4 trong khoảng 0,37 - 0,5%, hoặc thời gian từ 60 - 101 phút. Sự tương tác thời gian và nhiệt độ tới tốc độ thấm màng có ảnh hưởng nhỏ tới tốc độ thấm màng, khi thời gian nhỏ hơn 82 phút hoặc nhiệt độ nhỏ hơn 50°C thì cần có sự tương tác đồng thời cả hai yếu tố, trong khi thời gian lớn hơn 82 phút hoặc nhiệt độ lớn hơn 50°C thì tốc độ thấm màng đạt cao.

3.4. Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Kết quả phân tích tối ưu hóa 30 thí nghiệm tại bảng 2 trên phần mềm Design -Expert® 13.0 cho thấy, khi sử dụng nồng độ pectinase G 0,35%, cellulose T4 là 0,35%, thời gian 90 phút và nhiệt độ 50°C. Hàm lượng FOS thu được cao nhất là 33,82%, tốc độ dòng thấm màng lọc UF đạt 7,78 L/h/m².

Tuy nhiên, để tối ưu hóa quá trình sản xuất cần ưu tiên thu nhận hàm lượng đường FOS cao và tốc độ dòng thấm màng cao nhất. Tiến hành kiểm tra tính đúng đắn của mô hình tối ưu, tại 01 điểm tối ưu ngẫu nhiên theo mô hình gợi ý ở bảng 4 tại các thông số: Nồng độ pectinase G là 0,39% và cellulose T4 là 0,40%, nhiệt độ 50,4°C và thời gian 97,5 phút, từ đó chọn kết quả mong đợi tối ưu nhất. Qua kết quả kiểm định giá trị tối ưu từ thực tế, hàm lượng FOS thu được đạt cao nhất là 32,14% và tốc độ dòng thấm màng UF là 7,64 L/h/m². Kết quả kiểm nghiệm thực tế cho thấy, hàm lượng FOS thu được và tốc độ dòng thấm màng thấp hơn so với mô hình thuật toán, đã thể hiện tính phù hợp với giá trị đã tối ưu của mô hình. Như vậy, điều kiện xử lý enzyme tối ưu đề xuất là pectinase G 0,39%, cellulose T4 là 0,4%, nhiệt độ 50,4°C và thời gian 97,5 phút.

Bảng 2 và 4 cho thấy, điều kiện xử lý tại nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian tối ưu có kết quả thu nhận đường FOS đạt cao nhất là 32,14% và tốc độ dòng thấm màng UF đạt 7,64 L/h/m². Như vậy, quá trình xử lý bằng enzyme đã thu nhận đường FOS tăng 26,0% và tốc độ dòng thấm tăng 53,4% so với mẫu không xử lý enzyme trước khi lọc (25,5% và 4,98 L/h/m², tương ứng).

Bảng 4. Kiểm định giá trị tối ưu đạt được từ mô hình so với thực nghiệm

Điều kiện tối ưu				Theo thuật toán		Giá trị thực nghiệm (*) tại các thông số tối ưu	
A	B	C	D	Đường FOS (%)	P _{flux} (L/h/m ²)	Đường FOS (%)	P _{flux} (L/h/m ²)
0,39	0,40	50,4	97,5	33,52	7,86	32,14 ± 0,02	7,64 ± 0,03

Ghi chú: (*): Giá trị trung bình của ba lần thực nghiệm (n=3).

4. KẾT LUẬN

Phương pháp bề mặt đáp ứng được sử dụng thành công để thiết lập các biến tối ưu trong quá trình xử lý dịch chiết củ hoàng sin cô bằng enzyme trước khi lọc màng UF. Xử lý với enzyme pectinase G và cellulose T4 đã cho hiệu suất lọc UF tốt hơn và thu nhận đường FOS cao. Các điều kiện xử

lý tối ưu ở nồng độ pectinase G là 0,39%, cellulose T4 là 0,40%, nhiệt độ 50,4°C và thời gian 97,5 phút. Với điều kiện xử lý được tối ưu hóa này, thu được dịch chiết của hoàng sin cô có hàm thu nhận đường FOS tăng 26,0% và tốc độ dòng thấm màng UF tăng 53,4% so với mẫu không xử lý bằng enzyme.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này là một phần công việc của Dự án Hợp tác nghiên cứu mã số 2023-1 (Reference number: 5F75Ra1212) giữa Công ty Amano Enzyme Inc., Nhật Bản và Viện Công nghiệp thực phẩm - Bộ Công Thương) kinh phí tài trợ nghiên cứu bởi Amano Enzyme Inc., Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Franco T. S., Camila A. P., Luciana de S. N. E. and Maria L. M. (2015). Foam mat drying of yacon juice: Experimental analysis and computer simulation. *Journal of Food Engineering*, 158: 48 - 57.
2. Ojansivu I., Ferreira C. L. and Salminen S. (2011). Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(1): 40 - 46.
3. Lachman, J., E. C. Fernandez and M. Orsak (2003). Yacon (*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl.) H. Robinson) chemical composition and use a review. *Plant, Soil and Environment*, 49(6): 283 - 290.
4. Đỗ Thị Thanh Huyền, Nguyễn Mạnh Đạt, Chu Thắng, Nguyễn Thị Hồng Linh, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Văn Sơn (2023). Ảnh hưởng của phương pháp xử lý tới quá trình lưu giữ fructooligosaccharide trong củ hoàng sin cô sau thu hoạch. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 1: 156 - 164.
5. Pedreschi, R., D. Campos, G. Noratto, R. Chirivos and Z. Cisneros, L. (2003). Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. *J. Agric. Food Chem*, 51(18): 5278 - 5284.
6. Shoaib, M. and *et al.* (2016). *Inulin: properties, health benefits and food applications*. *Carbohydrate Polymers*, 147: 444 - 454.
7. Castro A., Cespedes G., Carballo S., Bergenstahl B. and T. E. (2013). Dietary fiber, fructooligosaccharides and physicochemical properties of homogenized aqueous suspensions of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Food Research International*, 50: 392 - 400.
8. Yee W. P., Nor M. Z. M., Basri M. S. M. and Roslan J. (2021). Membrane-based clarification of banana juice: pre-treatment effect on the flux behaviour, fouling mechanism and juice quality attributes. *Food Research*, 5(57): 57 - 64.
9. Abdullah A. G. L., Sulaiman N. M., Aroua M. K. and N. M. J. M. M. (2007). Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *Journal of Food Engineering*, 81(1): 65 - 71.
10. Sin H. N., Yusof S., Sheikh Abdul Hamid N. and R. R. Abd. (2006). Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 73: 313 - 319.
11. Lee W. C., Yusof S., Hamid N. S. A. and Baharin B. S. (2006). Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *Journal of Food Engineering*, 73: 55 - 63.
12. Brites M. L. and Noreña C. P. Z. (2015). Obtaining Fructooligosaccharides form Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) by an ultrafiltration process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(04): 1011 - 1020.
13. Maria de F. G. da S., Ana P. D., Fernando A. Pi. de A., Claudia O. P., Lorena M. A. e S., Edy S. de B., Nedio J. W., Ana C. V. de L., Sueli R., Wesley F. G. and D. F. P. (2018e). Optimization of enzymatic treatment to produce yacon juice clarified by microfiltration with high levels of chlorogenic acid and fructooligosaccharides. *J Food Process Preserv.* e13641.
14. Maria, d. F. G. d. S., P. D. Ana, A. P. d. A. Fernando, S. d. B. Edy, J. W. Nedio, M. A. e. S. Lorena, R. V. R. Paulo, R. Sueli, A. K. T. Carlos and F. P. Dorasilvia (2018). Evaluation of nutritional and chemical composition of yacon syrup using ¹H NMR and UPLC-ESI-Q-TOF-MS. *Food Chemistry*, 245: 1239 - 1247.
15. Muir, J. G., S. J. Shepherd, O. Rosella, R. Rose, J. S. Barrett and P. R. Gibson (2007). Fructan and free fructose content of common Australian vegetable and fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16): 6619 - 6627.

16. Neogen and Megazyme (2022). Fructan Assay Protocol K-FRUC. https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-FRUC_DATA.pdf

17. Douglas, C. M. (2013). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Son Inc. Eighth Edition.

OPTIMIZATION OF TREATMENT CONDITIONS OF HOANG SIN CO EXTRACT USING RESPONSE SURFACE METHOD

Do Thi Thanh Huyen¹, Nguyen Manh Dat¹, Nguyen The Huynh¹,
Nguyen Thi Thu¹, Nguyen Thi Hong Linh¹, Chu Thang¹, Nguyen Khanh Hong²

¹*Department of enzyme and protein technology, Food Industries Research Institute*

²*Faculty of Biotechnology, Ha Noi Open University*

Summary

Response surface methodology was used to establish optimal conditions for the enzymatic treatment of the cylindrical root extract with maximum fructooligosaccharides (FOS) uptake and high membrane permeate flow rates. Process the extract under the following conditions: pectinase G concentration (0.2 - 0.5%), cellulase T4 concentration (0.2 - 0.5%), temperature (45 - 55°C) and time (60 - 120 minutes). Regression model with significant coefficient of determination $R^2 = 0.9879$ and 0.9853 , corresponding to the change in FOS sugar content and ultrafiltration membrane permeation flow rate. Pectinase G concentration is a factor that greatly affects the ability to absorb FOS sugar and membrane permeation rate ($p < 0.05$) for all dependent variables. Based on the reaction surface plot and contour lines, the optimal enzyme treatment conditions were at pectinase G concentration of 0.39%, cellulase T4 concentration of 0.4%, temperature 50.4°C and time 97.5 minutes. With these optimal conditions, the FOS content is 32.14%, the permeate flow rate is 7.64 L/h/m² and compared to the control sample (not treated with enzymes) it increased by 26.0% (FOS content), 53.4% (permeate flow rate). After enzyme treatment and filtration, the extract of hoang sin co roots can be used in drinking water formulas or as raw materials to develop other products.

Keywords: *Fructooligosaccharides, enzyme treatment, response surface methodology, permeate flux, yacon juice.*

Ngày nhận bài: 25/10/2023

Ngày chuyển phản biện: 10/11/2023

Ngày thông qua phản biện: 16/11/2023

Ngày duyệt đăng: 15/7/2024