

TẠP CHÍ

p-ISSN 3093 - 3382
e-ISSN 3093 - 3153

Nông nghiệp & Môi trường

SCIENCE JOURNAL OF AGRICULTURE AND ENVIRONMENT
TẠP CHÍ KHOA HỌC CỦA BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ MÔI TRƯỜNG

Số đặc biệt

**SINH HỌC THỰC PHẨM
& ĐỒ UỐNG**

Tháng 9
2025

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Editorial Committee

1. CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG:

PHÙNG ĐỨC TIẾN

2. PHÓ CHỦ TỊCH KIÊM TỔNG THƯ KÝ HỘI ĐỒNG:

NGUYỄN THỊ THANH THỦY

3. CÁC ỦY VIÊN:

NGUYỄN HỮU NINH

Vụ Khoa học, Công nghệ và Môi trường

TRẦN ĐÌNH LUÂN

Cục Thủy sản

VÕ ĐẠI HẢI

Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

TRẦN ĐÌNH HÒA

Viện Khoa học Thủy lợi Việt Nam

PHẠM VĂN TOÀN

Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

PHẠM ANH TUẤN

*Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ
sau thu hoạch*

TRẦN CÔNG THẮNG

*Viện Chính sách và
Chiến lược phát triển nông nghiệp nông thôn*

PHẠM DOÃN LÂN

Viện Chăn nuôi

TRỊNH MINH THỤY

Trường Đại học Thủy lợi

PHẠM VĂN ĐIỀN

Trường Đại học Lâm nghiệp

PHẠM VĂN CƯỜNG

Học viện Nông nghiệp Việt Nam

LÊ ANH TUẤN

Đại học Bách Khoa Hà Nội

TRẦN ĐĂNG HÒA

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

NGUYỄN THANH PHƯƠNG

Trường Đại học Cần Thơ

BÙI HUY HIỀN

Hội Khoa học Đất Việt Nam

NGÔ XUÂN BÌNH

*Ban Chủ nhiệm Chương trình công nghệ
sinh học, Bộ Khoa học và Công nghệ*

LÊ MẠNH HÙNG

*Hội Khoa học và Kỹ thuật Thủy lợi
thành phố Hồ Chí Minh*

NGUYỄN VĂN CẨM

Hội Thú y Việt Nam

BÙI CHÍ BỬU

*Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền
Nam, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*

TRẦN VĂN CHỨ

Trường Đại học Lâm nghiệp

PHẠM QUANG THU

*Trung tâm Nghiên cứu Bảo vệ rừng,
Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam*

NGUYỄN DUY HOAN

*Trường Đại học Nông Lâm,
Đại học Thái Nguyên*

NGUYỄN VĂN THANH

Học viện Nông nghiệp Việt Nam

LÊ ĐỨC NGOAN

Hiệp hội thức ăn chăn nuôi Việt Nam

ĐỖ KIM CHUNG

Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TẠP CHÍ

NÔNG NGHIỆP & MÔI TRƯỜNG

p-ISSN 3093-3382
e-ISSN 3093-3153

NĂM THỨ HAI MƯƠI LĂM

SỐ ĐẶC BIỆT
SINH HỌC THỰC PHẨM & ĐỒ UỐNG

Tháng 9/2025

TỔNG BIÊN TẬP
TS. ĐÀO XUÂN HÙNG
ĐT: 024.37711070

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP
ThS. KIỀU ĐĂNG TUYẾT
ĐT: 024.38345457

TOÀ SOẠN
Số 10 Nguyễn Công Hoan
Phường Giảng Võ - TP. Hà Nội
ĐT: 024.37711072
Fax: 024.37711073
E-mail: tapchinmt@mae.gov.vn
<http://tapchikhoahoc.nnmt.net.vn>

Giấy phép số:
23/GP - BVHTTDL
Bộ Văn hoá, Thể thao và Du lịch
cấp ngày 25 tháng 4 năm 2025

Chế bản tại Tạp chí
Nông nghiệp và Môi trường
In tại Công ty TNHH Sản xuất
Thương mại Hưng Hà

Đơn vị phát hành: Công ty
Phát hành báo chí Trung ương
ĐT: 0913023486

MỤC LỤC

- | | |
|---|--------|
| ❑ NGUYỄN THỊ HỒNG HÀ, NGUYỄN NGỌC HUYỀN, NGUYỄN THỊ HƯƠNG TRÀ, VŨ THU DIỄM, LÊ THỊ TRANG. Nghiên cứu một số yếu tố công nghệ ảnh hưởng đến khả năng tạo sinh khối chủng <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DR27 | 5-12 |
| ❑ ĐỖ THỊ CẨM VÂN, BÙI THỊ THU UYÊN, NGUYỄN THỊ NGOAN, BÁ THỊ DƯƠNG, NGUYỄN THỊ PHƯƠNG DUNG, LƯU NGỌC SINH, TRẦN ĐĂNG THUẦN, PHẠM ANH TUẤN. Nghiên cứu tuyển chọn một số chủng vi tảo của loài <i>Chlorella</i> giàu protein | 13-21 |
| ❑ ĐẶNG HỒNG ÁNH, PHẠM HOÀI THU, PHẠM THỊ THU, TRẦN BẢO TRÂM, VŨ XUÂN TAO. Nghiên cứu quy trình công nghệ lên men nước chanh dây có độ cồn thấp từ quả chanh dây thu hoạch tại tỉnh Đắk Nông | 22-31 |
| ❑ NGUYỄN THỊ TRANG, NGUYỄN THỊ MINH KHANH, LÊ HỒNG QUANG. Nghiên cứu tạo chế phẩm enzyme từ nấm mốc <i>Aspergillus oryzae</i> ứng dụng trong thủy phân dịch đu đủ lên men | 32-40 |
| ❑ TRƯƠNG HƯƠNG LAN, NGUYỄN THỊ VIỆT HÀ, DƯƠNG ĐỨC HANH. Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm enzyme β -glucosidase chuyển hóa isoflavone từ dạng glucoside sang dạng alycone trong dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc | 41-50 |
| ❑ NGUYỄN THỊ HỒNG LĨNH, NGUYỄN MẠNH ĐẠT, ĐỖ THỊ THANH HUYỀN, CHU THẮNG, NGUYỄN THỊ THU. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng của nước ép Hoàng sin cô - dứa đóng chai | 51-60 |
| ❑ VŨ TẤN HẬU, HỒ KIM VĨNH NGHI, NGUYỄN THỊ THÀ. Tối ưu hóa quá trình thủy phân tinh bột để sản xuất chất xơ không hòa tan từ cám gạo sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng | 61-69 |
| ❑ LÊ TUẤN PHÚC, BÙI UYỂN DIỄM, HOÀNG QUỐC TUẤN, PHẠM NGỌC HÙNG, LẠI QUỐC ĐẠT, NGUYỄN HOÀNG DŨNG, CUNG THỊ TỐ QUỲNH. Bước đầu xây dựng các dấu hiệu nhận diện về thành phần hóa học của hạt tiêu đen ở một số vùng trồng tiêu chính tại Việt Nam | 70-78 |
| ❑ NGUYỄN ĐẶNG BÌNH THÀNH, TRẦN THỊ THU HẰNG, TỐNG THỊ HOÀNG DƯƠNG. Nghiên cứu mô hình hóa quá trình thủy phân tinh bột và đường hóa trong công nghệ sản xuất bia | 79-87 |
| ❑ PHẠM NGỌC HÙNG, NGUYỄN CHÍNH NGHĨA, CHU KỲ SƠN. Đánh giá vòng đời sản phẩm (LCA) của quy trình sản xuất cồn thực phẩm từ gạo theo công nghệ không gia nhiệt ở quy mô 1 tấn nguyên liệu/mẻ | 88-96 |
| ❑ ĐÀM THÚY HẰNG, VŨ NHẬT MINH, PHẠM TUẤN ANH. Nghiên cứu phân lập, tuyển chọn và đánh giá đặc tính probiotic của một số chủng vi khuẩn phân lập từ phân chồn | 97-107 |

TẠP CHÍ

**NÔNG NGHIỆP
& MÔI TRƯỜNG**

p-ISSN 3093-3382
e-ISSN 3093-3153

NĂM THỨ HAI MƯƠI LĂM

SỐ ĐẶC BIỆT
SINH HỌC THỰC PHẨM & ĐỒ UỐNG

Tháng 9/2025

TỔNG BIÊN TẬP
TS. ĐÀO XUÂN HƯNG
ĐT: 024.37711070

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP
ThS. KIỀU ĐĂNG TUYẾT
ĐT: 024.38345457

TOÀ SOẠN
Số 10 Nguyễn Công Hoan
Phường Giảng Võ - TP. Hà Nội
ĐT: 024.37711072
Fax: 024.37711073
E-mail: tapchinnmt@mae.gov.vn
<http://tapchikhoahoc.nnmt.net.vn>

Giấy phép số:
23/GP - BVHTTDL
Bộ Văn hoá, Thể thao và Du lịch
cấp ngày 25 tháng 4 năm 2025

Chế bản tại Tạp chí
Nông nghiệp và Môi trường
In tại Công ty TNHH Sản xuất
Thương mại Hưng Hà

Đơn vị phát hành: Công ty
Phát hành báo chí Trung ương
ĐT: 0913023486

MỤC LỤC

- ❑ NGUYỄN HÀ TRUNG, NGUYỄN THỊ TÂM THƯ, PHẠM NGUYỄN TUẤN KIẾT, PHẠM KIÊN CƯỜNG, CHU KỲ SƠN. Nghiên cứu quy trình thủy phân kết hợp siêu âm và enzyme nhằm nâng cao hiệu suất thu nhập peptide chống oxy hóa từ phụ phẩm cá ngừ 108-115
- ❑ NGUYỄN THỊ CHÀ, NGUYỄN TIẾN THÀNH, HỒ PHÚ HÀ. Nghiên cứu ứng dụng nanochitin để giảm muối cho sản phẩm giò lụa 116-124
- ❑ LÊ TUÂN, LÊ THỊ NGỌC ANH, TRẦN THỊ THẢO NGUYỄN, NGUYỄN CHÍNH NGHĨA. Nghiên cứu quá trình lên men nước dứa sử dụng kết hợp nấm men *Saccharomyces* và vi khuẩn *Komagataeibacter* nhằm tạo sản phẩm đồ uống có độ cồn thấp 125-132
- ❑ LƯƠNG HỒNG NGA, LÊ THỊ NGUYỆT, NGUYỄN QUANG ĐỨC, PHẠM THỊ QUỲNH, PHÙNG THỊ THỦY, PHÙNG THỊ ANH MINH, VŨ HỒNG SƠN. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số tác nhân đến chất lượng của đậu phụ 133-141
- ❑ NGUYỄN HẢI VÂN, LƯƠNG HỒNG NGA, VŨ HỒNG SƠN, NGUYỄN THỊ HẰNG, PHẠM VĂN BẮC, NGHIÊM THỊ HOÀI THƯƠNG, NGUYỄN HÀ ANH, HỒ PHÚ HÀ. Nghiên cứu xác định tính chất đặc trưng của đậu phụ sản xuất bằng nước chua tại một số quận, huyện trên địa bàn thành phố Hà Nội 142-153
- ❑ TRẦN THANH QUỲNH ANH, VÕ VĂN QUỐC BẢO, ĐỖ THỊ BÍCH THỦY. Tuyển chọn chủng *Lactobacillus fermentum* có tiềm năng probiotic và khả năng sinh tổng hợp gamma aminobutyric axit (GABA) cao nhằm ứng dụng trong sản xuất thực phẩm chức năng 154-163
- ❑ MAI CÁT DUYÊN, VÕ HUỲNH NHƯ, LÊ DUY NGHĨA, DƯƠNG KIM THANH, PHAN THỊ THANH QUẾ. Ảnh hưởng của điều kiện trích ly bằng enzyme đến chất lượng dầu hạt thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) 164-174
- ❑ PHẠM THỊ DỊU, NGUYỄN THỊ HỒNG, VŨ TUẤN DƯƠNG, TRẦN THỊ MAI HƯƠNG, NGUYỄN THÚY AN, TRỊNH THU TRANG, NGUYỄN HOÀNG ANH, BÙI VĂN HỢI, CHU ĐÌNH BÌNH, PHAN THỊ PHƯƠNG THẢO. Phân tích các amin sinh học trong nem chua bằng phương pháp LC - MS 175-184
- ❑ HOÀNG THỊ NGỌC NHON, LƯU THỊ QUỲNH HOA, NGÔ THỊ HUYỀN TRANG, LÊ THỊ HỒNG ÁNH. Nghiên cứu ảnh hưởng của sóng siêu âm đến thu nhận chiết xuất giàu polyphenol và saponin từ củ và hoa cây chuối hột (*Musa balbisiana*) 185-196
- ❑ PHAN THỊ BÉ, ĐỖ THỊ BÍCH THỦY, VÕ VĂN QUỐC BẢO, NGUYỄN VĂN ĐỨC, TRẦN BẢO KHÁNH, NGUYỄN PHAN HẠ VI. Ảnh hưởng của quá trình ngâm và nảy mầm đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa trong dịch chiết hạt mầm đậu đen xanh lòng (*Vigna unguiculata*) 197-207
- ❑ NGUYỄN THỊ THÙY DUNG, LÊ CẨM THỊ, NGUYỄN QUỐC DUY, TRẦN THỊ TƯỜNG VI, HUỲNH QUỐC TRUNG, LƯƠNG TRỌNG KHOA, NGUYỄN DUY LÂM, NGUYỄN THỊ VÂN LINH. Ảnh hưởng của phương pháp sấy lên tính chất hóa lý, thành phần ginsenoside và hoạt tính sinh học của dịch chiết lá sâm Ngọc Linh 208-216

**VIETNAM JOURNAL OF
AGRICULTURE AND
ENVIRONMENT**

**p-ISSN 3093-3382
e-ISSN 3093-3153**

**SPECIAL ISSUE
BIOLOGY OF FOOD AND BEVERAGES**

September – 2025

**Editor-in-Chief
Dr. DAO XUAN HUNG**
Tel: 024.37711070

**Deputy Editor-in-Chief
MS. KIEU DANG TUYET**
Tel: 024.38345457

Head-office
No 10 Nguyenconghoan
Giangvo - Hanoi - Vietnam
Tel: 024.37711072
Fax: 024.37711073
E-mail: tapchinmnt@mae.gov.vn
<http://tapchikhoahoc.nnmt.net.vn>

License No.23/GP - BVHTTDL
issued by the Ministry of Culture,
Sports and Tourism on April 25, 2025

Printing in Hung Ha trading
production company Limited

CONTENTS

- | | |
|--|--------|
| ❑ NGUYEN THI HONG HA, NGUYEN NGOC HUYEN, NGUYEN THI HUONG TRA, VU THU DIEM, LE THI TRANG. Study on technological factors affecting biomass production of <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DR27 | 5-12 |
| ❑ DO THI CAM VAN, BUI THI THU UYEN, NGUYEN THI NGOAN, BA THI DUONG, NGUYEN THI PHUONG DUNG, LUU NGOC SINH, TRAN DANG THUAN, PHAM ANH TUAN. Research on screening high-protein chlorella strains | 13-21 |
| ❑ DANG HONG ANH, PHAM HOAI THU, PHAM THI THU, TRAN BAO TRAM, VU XUAN TAO. Study on the fermentation process for producing low - alcohol passion fruit beverage from passion fruit harvested in Dak Nong province | 22-31 |
| ❑ NGUYEN THI TRANG, NGUYEN THI MINH KHANH, LE HONG QUANG. Study on the production of enzyme preparation from <i>Aspergillus oryzae</i> for application in the hydrolysis of fermented papaya extract | 32-40 |
| ❑ TRUONG HUONG LAN, NGUYEN THI VIET HA, DUONG DUC HANH. Research on the application of β -glucosidase enzyme preparation for the conversion of isoflavones from glucoside to aglycone form in concentrated germinated soy milk | 41-50 |
| ❑ NGUYEN THI HONG LINH, NGUYEN MANH DAT, DO THI THANH HUYEN, CHU THANG, NGUYEN THI THU. Study of factors affecting the quality of yacon with pineapple juice process | 51-60 |
| ❑ VO TAN HAU, HO KIM VINH NGHI, NGUYEN THI THA. Optimization of starch hydrolysis conditions for insoluble dietary fiber production from rice bran using response surface methodology | 61-69 |
| ❑ LE TUAN PHUC, BUI UYEN DIEM, HOANG QUOC TUAN, PHAM NGOC HUNG, LAI QUOC DAT, NGUYEN HOANG DUNG, CUNG THI TO QUYNH. Initial development of chemical markers for black pepper (<i>Piper nigrum</i> L.) from major growing regions in Vietnam | 70-78 |
| ❑ NGUYEN DANG BINH THANH, TRAN THI THU HANG, TONG THI HOANG DUONG. Modeling of mashing process in brewing engineering | 79-87 |
| ❑ PHAM NGOC HUNG, NGUYEN CHINH NGHIA, CHU KY SON. Life cycle assessment (LCA) of a no-cook process for ethanol production from rice at an pilot scale of 1-ton per batch | 88-96 |
| ❑ DAM THUY HANG, VU NHAT MINH, PHAM TUAN ANH. Isolation and evaluation of probiotic properties of two bacterial strains isolated from civet feces | 97-107 |

**VIETNAM JOURNAL OF
AGRICULTURE AND
ENVIRONMENT**

**p-ISSN 3093-3382
e-ISSN 3093-3153**

**SPECIAL ISSUE
BIOLOGY OF FOOD AND BEVERAGES**

September - 2025

**Editor-in-Chief
Dr. DAO XUAN HUNG**
Tel: 024.37711070

**Deputy Editor-in-Chief
MS. KIEU DANG TUYET**
Tel: 024.38345457

Head-office
No 10 Nguyenconghoan
Giang Vo - Hanoi - Vietnam
Tel: 024.37711072
Fax: 024.37711073
E-mail: tapchinnmt@mae.gov.vn
http://tapchikhoahoc.nnmt.net.vn

License No.23/GP - BVHTTDL issued
by the Ministry of Culture, Sports and
Tourism on April 25, 2025

Printing in Hung Ha trading
production company Limited

CONTENTS

- ❑ NGUYEN HA TRUNG, NGUYEN THI TAM THU, PHAM NGUYEN TUAN KIET, PHAM KIEN CUONG, CHU KY SON. Research on the hydrolysis process combined with ultrasound and enzymes to enhance the efficiency of obtaining antioxidant peptides from tuna byproducts 108-115
- ❑ NGUYEN THI CHA, NGUYEN TIEN THANH, HO PHU HA. Application of nanochitin in salt reduction in Vietnamese pork sausage (Gio lua) 116-124
- ❑ LE TUAN, LE THI NGOC ANH, TRAN THI THAO NGUYEN, NGUYEN CHINH NGHIA. Research on fermentation of pineapple juice using *Saccharomyces* and *Komagataeibacter* strains for low alcohol beverage production 125-132
- ❑ LUONG HONG NGA, LE THI NGUYET, NGUYEN QUANG DUC, PHAM THI QUYNH, PHUNG THI THUY, PHUNG THI ANH MINH, VU HONG SON. Effects of various coagulating agents on some tofu qualities 133-141
- ❑ NGUYEN HAI VAN, LUONG HONG NGA, VU HONG SON, NGUYEN THI HANG, PHAM VAN BAC, NGHIEM THI HOAI THUONG, NGUYEN HA ANH, HO PHU HA. Identification some characteristics of tofu produced by fermented tofu whey in various districts of Ha Noi city 142-153
- ❑ TRAN THANH QUYNH ANH, VO VAN QUOC BAO, DO THI BICH THUY. Screening of probiotic and GABA-producing potential of *Lactobacillus fermentum* M38 strains, aiming for application in functional food fermentation 154-163
- ❑ MAI CAT DUYEN, VO HUYNH NHU, LE DUY NGHIA, DUONG KIM THANH, PHAN THI THANH QUE. Effect of enzyme extraction conditions on the quality of red-fleshed dragon fruit seed oil (*Hylocereus polyrhizus*) 164-174
- ❑ PHAM THI DIU, NGUYEN THI HONG, VU TUAN DUONG, TRAN THI MAI HUONG, NGUYEN THUY AN, TRINH THU TRANG, NGUYEN HOANG ANH, BUI VAN HOI, CHU DINH BINH, PHAN THI PHUONG THAO. Analysis of biogenic amines in fermented pork sausage using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) 175-184
- ❑ HOANG THI NGOC NHON, LUU THI QUYNH HOA, NGO THI HUYNH TRANG, LE THI HONG ANH. Studying the effect of ultrasould on the extraction of polyphenol and saponin from *Musa balbisiana* corm and inflorescence 185-196
- ❑ PHAN THI BE, DO THI BICH THUY, VO VAN QUOC BAO, NGUYEN VAN DUC, TRAN BAO KHANH, NGUYEN PHAN HA VI. Effects of soaking and germination on polyphenol content and antioxidant activity in black bean (*Vigna unguiculata*) seeds 197-207
- ❑ NGUYEN THI THUY DUNG, LE CAM THI, NGUYEN QUOC DUY, TRAN THI TUONG VI, HUYNH QUOC TRUNG, LUONG TRONG KHOA, NGUYEN DUY LAM, NGUYEN THI VAN LINH. Effects of drying methods on physicochemical properties, ginsenoside profiles and bioactivities of extracts from Ngoc Linh ginseng leaves 208-216

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ CÔNG NGHỆ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO SINH KHỐI CHŨNG *Lactiplantibacillus plantarum* DR27

Nguyễn Thị Hồng Hà^{1*}, Nguyễn Ngọc Huyền¹,

Nguyễn Thị Hương Trà¹, Vũ Thu Diễm¹, Lê Thị Trang¹

¹ Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch

*Email: ngthongha77@gmail.com

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định được ảnh hưởng của một số yếu tố công nghệ đến khả năng tạo sinh khối chủng *Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum* DR27). Bài báo trình bày các kết quả tối ưu hóa điều kiện lên men nhằm nâng cao sản lượng thu hồi sinh khối từ chủng *L. plantarum* DR27 được phân lập từ bã dong riềng. Bằng phương pháp khảo sát ảnh hưởng của từng yếu tố, đã xác định được điều kiện tối ưu cho khả năng tạo sinh khối chủng nghiên cứu: Môi trường lên men nước chiết cà chua với nguồn các-bon là fructose oligosaccharide (FOS) 1%, nguồn nitơ là cao nấm men 0,5%, nồng độ CaCl_2 10 mM; pH môi trường 6,5, tỷ lệ giống cấp 6%, nhiệt độ nuôi cấy 37°C, tốc độ lắc 50 vòng/phút, sau 32 giờ lên men thu hồi sinh khối *L. plantarum* DR27 đạt 10^9 CFU/ml.

Từ khóa: *L. plantarum* DR27, sinh khối, bã dong riềng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo thống kê chưa đầy đủ, ước tính ở Việt Nam, dong riềng được trồng với diện tích khoảng 30.000 ha, sản xuất hàng năm gần 300.000 tấn củ tươi và có xu hướng ngày càng tăng [1]. Tinh bột dong riềng và miến dong là 2 loại sản phẩm được chế biến từ củ dong riềng ở các làng nghề hoặc hợp tác xã sản xuất. Bên cạnh mặt tích cực của cây dong riềng mang lại, thì trong quá trình chế biến đã thải ra một lượng phụ phẩm là bã dong riềng khá lớn, chiếm khoảng 80% nguyên liệu. Chỉ tính riêng trên địa bàn tỉnh Bắc Kạn, giai đoạn từ năm 2019 - 2021, lượng nguyên liệu đầu vào và bã thải ở làng nghề khoảng 34.000 tấn/năm và 28.000 tấn/năm. Hiện nay, chỉ một phần nhỏ lượng bã dong riềng được người dân ủ làm phân bón theo phương pháp thủ công, còn lại phần lớn bã dong riềng chưa được xử lý thích hợp, gây ô nhiễm nguồn đất, nước... cho khu sản xuất cũng như vùng lân cận.

Chế biến, bảo quản thức ăn thô xanh bằng phương pháp lên men chua đã được áp dụng rộng

rãi trên toàn thế giới. Hàng năm, hơn 200 triệu tấn thức ăn thô xanh được bảo quản bằng phương pháp này ở Tây Âu và Mỹ. Lên men chua dựa trên quá trình lên men tự nhiên nhờ các vi khuẩn lactic lên men carbohydrates hòa tan thành các axit hữu cơ, chủ yếu là axit lactic dưới điều kiện kỵ khí. Kết quả của quá trình là giảm pH, ức chế những vi khuẩn bất lợi và do đó thức ăn thô xanh được bảo quản. Nếu lên men tự nhiên, mật độ hệ vi khuẩn lactic có sẵn trong nguyên liệu thấp, không thể chiếm ưu thế trong quá trình lên men, do đó sẽ không ngăn chặn được hoạt động của các vi sinh vật bất lợi. Để có được thức ăn lên men chua có chất lượng tốt cần phải bổ sung các chế phẩm vi khuẩn lactic phù hợp.

Hiện nay, các công trình nghiên cứu trong và ngoài nước cho thấy, lên men tạo sinh khối vi khuẩn lactic chịu ảnh hưởng của một số yếu tố gồm: Nuôi cấy, nguồn dinh dưỡng, nhiệt độ, thời gian lên men... Nghiên cứu của Vázquez và cs (2014) [2] đã thăm dò các loại môi trường nuôi cấy để sản xuất sinh khối của 3 chủng: *L. salivarius* DSPV002P, *L. salivarius* DSPV008P và *L. salivarius*

DSPV011P với nguồn các-bon là đạm whey, nguồn nitơ là cao nấm men và các muối khoáng $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng *L. salivarius* DSPV008P phát triển kém trong tất cả các công thức môi trường. Thành phần môi trường có cao nấm men và $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ đã làm tăng sự phát triển của *L. salivarius* DSPV011P, *L. salivarius* DSPV002P. Còn chủng *L. salivarius* DSPV011P là chủng có khả năng phát triển trên các môi trường thay thế môi trường MRS, lượng sinh khối đạt 9,22 Log (CFU/ml) với giá thành môi trường thấp hơn 12 lần so với môi trường MRS [2]. Nguồn các-bon là các prebiotic: FOS, GOS, inulin và lactulose cũng đã được nghiên cứu, môi trường chứa đường FOS đã gia tăng mật độ tế bào từ 0,8 - 1,72 log CFU/ml so với nguồn các-bon truyền thống là glucose [3]. Sự kết hợp nguồn nitơ tinh bột ngô, chiết xuất mầm lúa mì cho sự phát triển của chủng *L. plantarum* RPR42 trong môi trường cơ bản ri đường. Kết quả nghiên cứu cho thấy, thay thế nước chiết thịt bò và cao nấm men bằng các nguồn nitơ trên đã tăng sản lượng sinh khối lên đến 12 g/l trong 24 giờ nuôi cấy, mật độ tế bào đạt $9,81 \times 10^9$ CFU/ml. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, việc sản xuất sinh khối chủng *L. plantarum* RPR42 ở qui mô lớn rất khả thi với chi phí thấp đáng kể so với môi trường MRS [4]. Chang và cs (2017) [5] đã nghiên cứu tối ưu môi trường nuôi cấy cho sản xuất sinh khối *L. rhamnosus* ATCC 7469 bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Thành phần môi trường gồm: Glucose 4,4% (w/v), cao nấm men 6% (w/v), tryptone 6% (w/v), tween 80 0,11%, magnesium sulfate 0,02%, manganese sulfate 0,005%, ở điều kiện nuôi cấy nhiệt độ 37°C, tốc độ lắc 120 vòng/phút trong 16 - 20 giờ, pH ban đầu là 6,9, mật độ tế bào đạt cao nhất 10,06 log CFU/ml khi so với trường MRS (9,823 log CFU/ml) [5].

Nâng cao sản lượng sinh khối và mật độ tế bào là mục đích hướng tới cho sản xuất chế phẩm vi khuẩn lactic. Vì vậy, trong nghiên cứu này, việc khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng tạo sinh khối *L. plantarum* DR27 đã được tiến hành nhằm tạo tiền đề cho sản xuất chế phẩm lactic để xử lý phụ phẩm bã dong riềng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng

Chủng vi khuẩn *L. plantarum* DR27 phân lập từ bã dong riềng lấy mẫu tại tỉnh Bắc Kạn (trước đây), có trong bộ sưu tập giống của Bộ môn Nghiên cứu Công nghệ sinh học sau thu hoạch - Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch cung cấp.

2.1.2. Môi trường

Môi trường MRS; môi trường nước chiết cà chua.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xác định số lượng vi khuẩn lactic

Sử dụng phương pháp pha loãng hàng loạt và cấy ở nồng độ giới hạn để đếm số lượng khuẩn lạc hình thành (cell forming unit - CFU). Từ đó, tính được số lượng tế bào sống trong 1 ml dịch nuôi cấy, coi mỗi khuẩn lạc là kết quả của sự phát triển thành một tế bào. Sự phân bố các khuẩn lạc phải hợp lý: Độ pha loãng càng cao thì số khuẩn lạc càng ít. Tổng số vi khuẩn lactic có trong 1 g (1 ml) mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times f_1 \times v}$$

Trong đó: $\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa đã chọn; n_1 là số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 1 (độ pha loãng thấp nhất); n_2 là số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ hai (độ pha loãng tiếp theo); f_1 là hệ số pha loãng của đĩa đếm thứ 1; v là thể tích mẫu cấy vào mỗi đĩa petri.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố dinh dưỡng

Môi trường dinh dưỡng phổ biến dùng cho nuôi cấy vi khuẩn lactic là môi trường MRS, môi trường này nếu sử dụng cho sàng lọc, phân loại, giữ giống ở qui mô thí nghiệm thì rất thích hợp nhưng nếu dùng để lên men ở qui mô lớn lại cần phải tính toán hiệu quả kinh tế do giá thành của môi trường MRS khá cao và tốn kém. Bởi vậy, để có thể ứng dụng vi khuẩn lactic cho chế biến thức ăn ủ chua từ cơ chất bã dong riềng, đã tiến hành các thí nghiệm lựa chọn các môi trường khác nhau

nhằm tìm ra một môi trường kinh tế, phù hợp với quá trình sản xuất sau này.

Nhân giống: Chủng *L. plantarum* DR27 trong ống thạch nghiêng được cấy chuyển vào các bình tam giác chứa môi trường nhân giống, nuôi ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \pm 2$, lắc 75 vòng/phút. Sau 20 giờ thu hồi giống, đảm bảo mật độ đạt khoảng 10^8 CFU/ml.

Mỗi phương án thử nghiệm được tiến hành với 150 ml dịch môi trường. Các thử nghiệm được khảo sát với 4 loại môi trường dinh dưỡng (MRS, nước chiết cà chua, nước chiết giá đỗ và nước chiết bắp cải); 3 nguồn các-bon (saccharoza, lactoza và fructose oligo saccharide (FOS)); 3 nguồn nitơ (cao nấm men, pepton và trypton). Phân phối môi trường tương ứng với mỗi thí nghiệm, khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Giống vi khuẩn *L. plantarum* DR27 được cấy vào môi trường với tỉ lệ 8%. Lên men ở 37°C , tốc độ lắc 75 vòng/phút trong 48 giờ. Đánh giá mật độ tế bào thu ở mỗi thí nghiệm.

2.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ CaCl_2

Vi khuẩn lactic là loại không sinh bào tử, khá nhạy cảm khi tiếp xúc với nhiệt độ cao và có thể sống, phát triển được đến nhiệt độ 47°C , bị chết khi ở $60 - 80^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 10 - 30 phút. Nhằm mục đích cải thiện độ ổn định nhiệt độ và tăng khả năng sống sót của vi khuẩn lactic trong quá trình sấy, hay khi tiếp xúc với nhiệt độ cao bằng cách bổ sung Ca^{+2} trong quá trình lên men tạo tích lũy canxi trong tế bào vi khuẩn: Chủng *L. plantarum* DR27 được nuôi cấy trên môi trường lựa chọn từ kết quả nghiên cứu ở mục 2.2.2. Nồng độ CaCl_2 bổ sung vào môi trường ở 4 mức nồng độ: 5, 10, 15, 20 mM, đối chứng không bổ sung CaCl_2 . Giống vi khuẩn lactic cấy vào môi trường với tỉ lệ 8%, nuôi cấy lắc 75 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ. Dịch nuôi cấy được xử lý nhiệt bằng cách lấy 1 ml dịch sau khi lên men để vào ống eppendorf rồi ngâm trong bể ổn nhiệt ở 60°C , duy trì trong 30 phút. Dịch nuôi sau khi xử lý nhiệt tiến hành đánh giá mật độ tế bào ở các thực nghiệm.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy

Mỗi thử nghiệm được khảo sát với 5 dải nhiệt độ (25°C , 30°C , 37°C , 40°C , 45°C); 6 giá trị pH (4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0); 5 chế độ nuôi (nuôi tĩnh, 25

vòng/phút, 50 vòng/phút, 75 vòng/phút và 100 vòng/phút); 4 tỷ lệ giống vi khuẩn *L. plantarum* DR27 (4; 6; 8; 10%), thời gian nuôi 48 giờ. Đánh giá mật độ tế bào thu ở mỗi thí nghiệm.

2.2.5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Thí nghiệm xác định động học sinh trưởng của chủng *L. plantarum* DR27 được tiến hành trên môi trường với nguồn các-bon, nitơ, nhiệt độ, tốc độ lắc và tỷ lệ giống khảo sát từ thí nghiệm trước. Trong quá trình lên men, tiến hành lấy mẫu từ 0 - 52 giờ (cứ 4 tiếng lấy mẫu một lần), sau đó đánh giá mật độ tế bào của chủng *L. plantarum* DR27 và lượng axit lactic tạo thành ở các khoảng thời gian lấy mẫu.

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

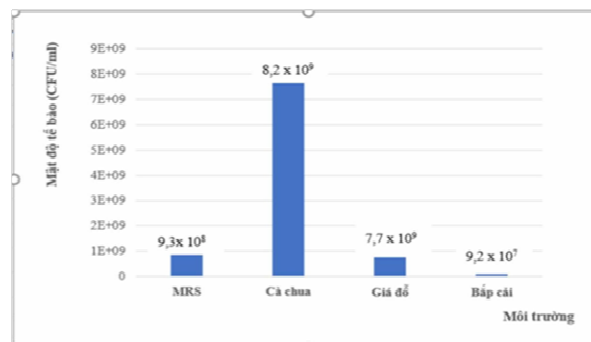
Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2010 và SPSS 20.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng

3.1.1. Ảnh hưởng của môi trường

Kết quả lựa chọn môi trường nhân nuôi *L. plantarum* DR27 được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo sinh khối *L. plantarum* DR27

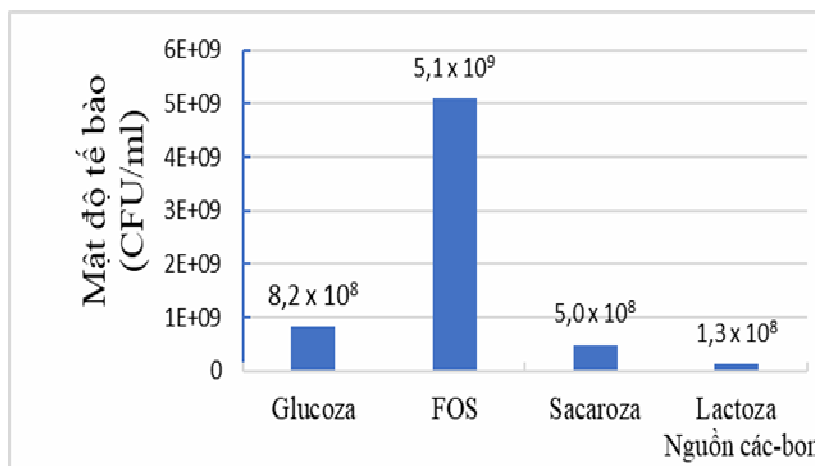
Bảng 1 cho thấy, khi lên men chủng *L. plantarum* DR29 trên các môi trường lên men khác nhau thì mật độ tế bào của chủng *L. plantarum* DR27 thay đổi đáng kể. Ở môi trường nước chiết bắp cải, mật độ tế bào chỉ đạt $9,2 \times 10^7$ CFU/ml, mật số tế bào đã giảm rõ rệt so với môi trường MRS. Tuy nhiên, ở môi trường nước chiết cà chua, chủng vi khuẩn lactic phát triển khá tốt, mật độ tế bào là $8,2 \times 10^8$ CFU/ml, thấp hơn không đáng kể so với môi trường MRS. Như vậy, đối với qui mô sản xuất lớn, đã lựa chọn môi trường nước chiết cà

chua là môi trường thích hợp cho nhân nuôi chủng *L. plantarum* DR27.

3.1.2. Ảnh hưởng của nguồn các-bon

Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của 4 nguồn các-bon trong môi trường nước chiết cà chua đến sự tạo sinh khối chủng *L. plantarum* DR27 gồm: Glucoza, saccaroza, lactose và FOS (fructooligosaccharide).

Đây là các nguồn các-bon phổ biến và đã được Nguyễn Thị Mỹ Lệ (2018) [3, 7], Frédéric và Luc (2004) [6] chỉ ra là có ảnh hưởng đến sự phát triển và khả năng sinh axit của chủng vi khuẩn lactic. Kết quả nghiên cứu nguồn các-bon được thể hiện ở hình 2.



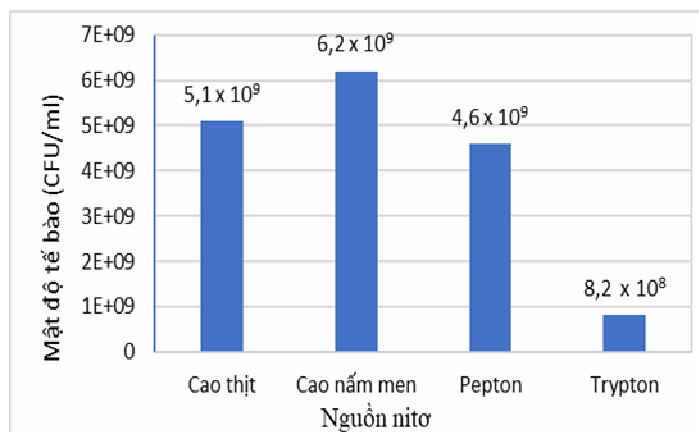
Hình 2. Ảnh hưởng nguồn các-bon đến khả năng tạo sinh khối *L. plantarum* DR27

Hình 2 cho thấy, sự phát triển của chủng *L. plantarum* DR27 có sự khác nhau trên 4 nguồn các-bon khảo sát, chủng *L. plantarum* DR27 phát triển tốt nhất trên môi trường có nguồn các-bon là FOS, thể hiện ở mật độ tế bào đạt $5,1 \times 10^9$ CFU/ml; thấp nhất trên môi trường có nguồn các-bon là lactoza, mật độ tế bào chỉ đạt $1,3 \times 10^8$ CFU/ml. Từ kết quả này, đã lựa chọn FOS là nguồn các-bon trong nghiên cứu các điều kiện thích hợp cho lên men tạo sinh khối chủng *L. plantarum* DR27. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Mỹ Lệ (2018) [3] khi bổ sung nguồn các-bon là các loại

prebiotics (FOS, GOS) thay thế nguồn các-bon là glucose đã tăng mật độ tế bào trong khoảng 0,87 - 1,72 log CFU/ml. Điều này khẳng định, do lượng các-bon từ FOS đã góp phần kích thích sự tăng tốc độ tăng trưởng của vi khuẩn lactic.

3.1.3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sự phát triển *L. plantarum* DR27, đã sử dụng một số nguồn nitơ thông dụng dựa trên các môi trường lên men vi khuẩn lactic của Adesokan và cs (2009) [8]. Kết quả nghiên cứu nguồn nitơ được trình bày ở hình 3.



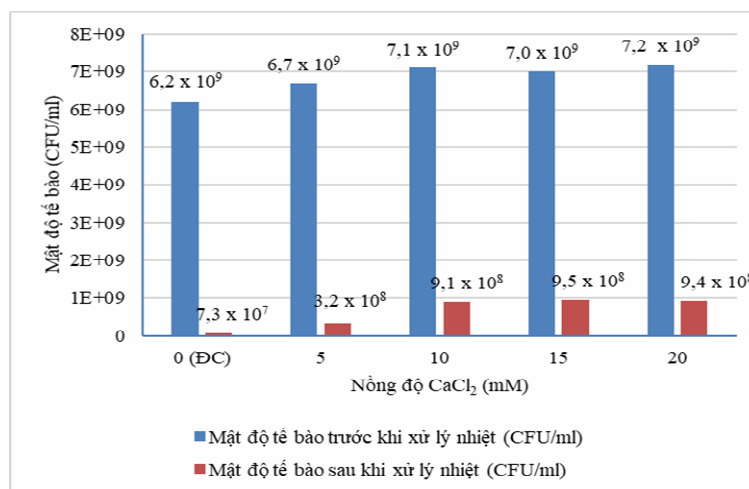
Hình 3. Ảnh hưởng nguồn nitơ đến khả năng tạo sinh khối của chủng *L. plantarum* DR27

Hình 3 cho thấy, nguồn nitơ ảnh hưởng nhiều đến sinh trưởng của chủng *L. plantarum* DR27. Với nguồn nitơ hữu cơ là cao nấm men, chủng *L. plantarum* DR27 phát triển và sinh axit lactic cao nhất, đạt mật độ tế bào là $6,2 \times 10^9$ CFU/ml. Trên môi trường sử dụng nguồn nitơ khác, sự phát triển và sinh axit lactic của chủng đều thấp hơn. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Adesokan và cs (2009) [8] trên chủng *L. plantarum*, theo đó, sau 48 giờ nuôi cấy khi môi trường có chứa nguồn nitơ riêng rẽ là cao nấm men cho mật độ tế bào và sản sinh axit lactic cao nhất, khi đó lượng axit lactic đạt 29,8 g/l, nguồn

nitơ là KNO_3 sự sản sinh axit lactic giảm còn là 8,5 g/l [9]. Vì vậy, cao nấm men được lựa chọn là nguồn nitơ trong môi trường nuôi cấy chủng *L. plantarum* DR27.

3.1.4. Ảnh hưởng của nồng độ $CaCl_2$

Kiểm tra khả năng chịu nhiệt của vi khuẩn khi tiếp xúc với nhiệt độ khi sấy khô, với phương pháp sấy đông khô là $-55^\circ C$; sấy chân không và sấy bơm nhiệt dao động từ $35 - 60^\circ C$, thì dịch sau nuôi cấy được đặt ở nhiệt độ $60^\circ C$ trong 30 phút, sau đó tiến hành đánh giá mật độ tế bào ở các thực nghiệm. Kết quả được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ $CaCl_2$ đến khả năng chịu nhiệt *L. plantarum* DR27

Hình 4 cho thấy, khi môi trường được bổ sung $CaCl_2$ với 4 nồng độ trên đã không ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng *L. plantarum* DR27 mà còn tăng nhẹ mật độ tế bào *L. plantarum* DR27 thu được. Có sự khác biệt đáng kể về khả năng chịu nhiệt của *L. plantarum* DR27 thu được từ môi trường có bổ sung với 10 - 20 mM $CaCl_2$, đã tăng khả năng chống chịu nhiệt của chủng vi khuẩn *L. plantarum* DR27, sau khi xử lý nhiệt vẫn đạt $9,1 - 9,4 \times 10^8$ CFU/ml, còn đối chứng là $7,3 \times 10^7$ CFU/ml.

3.2. Ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ

3.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ là một trong các yếu tố ảnh hưởng mạnh đến quá trình sống, phát triển và sinh tổng hợp của vi sinh vật. Để xác định nhiệt độ tối ưu cho chủng *L. plantarum* DR27 sinh trưởng và phát triển, đã khảo sát ở các dải nhiệt độ 25, 30, 37, 40, $45^\circ C$. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

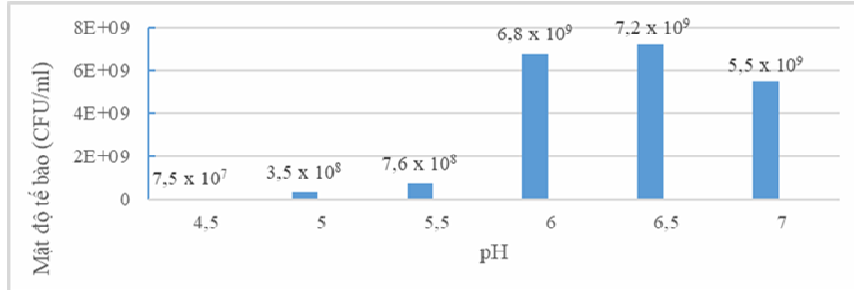
Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng tạo sinh khối *L. plantarum* DR27

Nhiệt độ ($^\circ C$)	Mật độ tế bào (CFU/ml)
25	$6,5 \times 10^8$
30	$5,5 \times 10^9$
37	$7,1 \times 10^9$
40	$4,0 \times 10^8$
45	$1,4 \times 10^8$

Bảng 1 cho thấy, khả năng tạo sinh khối của chủng *L. plantarum* DR27 phụ thuộc rõ rệt vào nhiệt độ. Nhiệt độ thích hợp nhất cho sinh trưởng và phát triển chủng *L. plantarum* DR27 là $37^\circ C$, ở nhiệt độ này mật độ tế bào đạt $7,1 \times 10^9$ CFU/ml. Đây cũng là nhiệt độ sinh trưởng của các chủng *L. plantarum* nói chung. Ngoài ra, nhiệt độ $30^\circ C$ cũng là nhiệt độ thích hợp cho chủng này phát triển [9]. Khả năng tạo sinh khối của *L. plantarum* DR27

giảm ở nhiệt độ 40°C và 45°C, tốc độ sinh trưởng là kém hơn. Vì thế, đã lựa chọn nuôi cấy chủng *L. plantarum* DR27 ở nhiệt độ 37°C trong các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2. Ảnh hưởng của pH



Hình 5. Ảnh hưởng pH môi trường đến khả năng tạo sinh khối chủng *L. plantarum* DR27

Hình 5 cho thấy, pH thích hợp cho phát triển tốt nhất là 6,5, đạt mật độ tế bào cao nhất là $7,2 \times 10^9$ CFU/ml. Ở pH 4,5 thu được mật độ tế bào thấp nhất là $7,5 \times 10^7$ CFU/ml. Khi tăng lên pH cao hơn pH 6,5 quá trình lên men vẫn diễn ra nhưng chủng phát triển kém cao hơn so với pH 6,5. Hơn nữa, khi ở pH trung tính và kiềm còn là điều kiện tốt cho các vi sinh vật khác dễ nhiễm tạp vào môi trường.

3.2.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống

Bảng 2. Ảnh hưởng tỷ lệ giống đến khả năng tạo sinh khối của chủng *L. plantarum* DR27

Tỷ lệ giống (%)	Mật độ tế bào (CFU/ml)
4	$6,0 \times 10^8$
6	$7,2 \times 10^9$
8	$7,8 \times 10^9$
10	$8,0 \times 10^9$

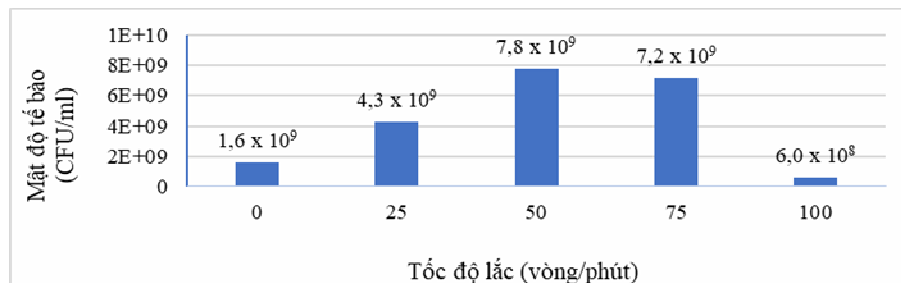
Xác định tỷ lệ giống thích hợp cho quá trình lên men không những tiết kiệm được môi trường

pH có ảnh hưởng rất lớn tới khả năng tạo sinh khối vi khuẩn lactic, đồng thời, cũng tác động đến sự sinh trưởng của vi sinh vật. Thực nghiệm khảo sát ở 6 mức pH: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0. Kết quả được thể hiện ở hình 5.

giống mà còn tạo cho quá trình lên men đạt được kết quả cao. Bảng 2 cho thấy, tỷ lệ giống có ảnh hưởng đến sinh trưởng của *L. plantarum* DR27. Ở tỷ lệ giống 4% tế bào phát triển kém ($6,0 \times 10^8$ CFU/ml). Khi tỷ lệ giống cấy tăng lên 6 - 10% thì sự sinh trưởng biến đổi nhiều, mật độ tế bào đạt $7,2 - 8,0 \times 10^9$ CFU/ml. Khả năng sinh trưởng thay đổi không nhiều trong khoảng tiếp giống từ 6 - 10% (v/v). Do đó, để tiết kiệm chi phí thì tỷ lệ giống cấy thích hợp được lựa chọn cho quá trình lên men vi khuẩn lactic là từ 6%.

3.2.4. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Vi khuẩn lactic là loại vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc, nhằm tìm được thông số về tốc độ lắc thích hợp cho chủng *L. plantarum* DR27 khi nuôi cấy, đã tiến hành khảo sát tốc độ lắc: 0 vòng/phút (nuôi tĩnh); 25 vòng/phút, 50 vòng/phút, 75 vòng/phút và 100 vòng/phút. Kết quả được thể hiện ở hình 6.



Hình 6. Ảnh hưởng tốc độ lắc đến khả năng tạo sinh khối của chủng *L. plantarum* DR27

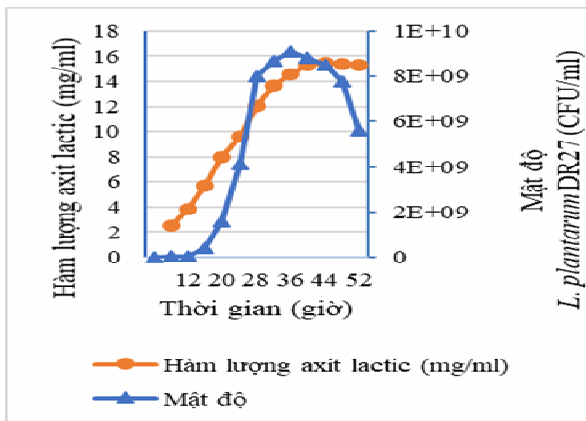
Hình 6 cho thấy, khi nuôi cấy vi khuẩn lactic với tốc độ lắc 0 vòng/phút hay 25 vòng/phút mật độ tế bào *L. plantarum* DR27 thu được là $1,6 \times 10^9$ CFU/ml và $4,3 \times 10^9$ CFU/ml. Với điều kiện này ở

sự phát triển của vi khuẩn xảy ra ở tốc độ chậm hơn, do đó, tích lũy sinh khối không cao. Khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng *L. plantarum* DR27 đạt tối đa là $7,8 \times 10^9$ CFU/ml ở

tốc độ lắc 50 vòng/phút. Ở tốc độ lắc cao hơn thì khả năng sinh trưởng của chủng không tăng mà thậm chí còn giảm nhẹ khi ở tốc độ lắc 100 vòng/phút. Điều này có thể do *L. plantarum* DR27 thuộc loại vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc, nên trong quá trình sinh trưởng và phát triển nhu cầu cần oxy của vi khuẩn này chỉ cần một lượng tối hạn. Đôi khi sự cung cấp quá mức oxy đã ảnh hưởng tới tốc độ sinh trưởng cũng như khả năng tạo sinh khối của chủng.

3.2.5. Động học quá trình nhân nuôi chủng *L. plantarum* DR27

Sự sinh trưởng, phát triển quần thể vi khuẩn *L. plantarum* DR27 tuân theo quy luật bắt buộc qua các giai đoạn: Pha lag (pha thích ứng), pha log



Hình 7. Động học phát triển của chủng *L. plantarum* DR27

Kết quả nghiên cứu cho thấy, pH của dịch lên men giảm dần theo thời gian, tương ứng với sự tăng lên về hàm lượng axit trong dịch nuôi. Hàm lượng axit tổng sinh ra lớn nhất là 44 giờ đạt 15,49 g/l. Tuy nhiên, chủng đạt mật độ sinh khối cao nhất tại thời điểm 36 giờ nuôi cấy (đạt 9,1 x 10⁹ CFU/ml) và bắt đầu suy vong sau 40 giờ nuôi cấy. Vì vậy, khi sử dụng sinh khối chủng *L. plantarum* DR27 dùng tạo chế phẩm giống khởi động cho lên men bã dong riêng sản xuất thức ăn chăn nuôi nên thu nhận sinh khối vào khoảng thời gian 32 giờ sau khi nuôi cấy để đạt được lượng sinh khối cao (8,7 x 10⁹ CFU/ml) và khi đó khả năng sinh trưởng của chủng tốt. Kết quả nghiên cứu của Hager và cs (2019) [10] cho thấy, thời gian thích hợp cho chủng *L. plantarum* phát triển thu sinh khối từ 25 - 35 giờ phụ thuộc vào đặc tính chủng giống và quy mô sản xuất, sinh tổng hợp axit lactic

(phát triển lũy tiến), pha cân bằng và pha suy vong. Theo dõi động học quá trình sinh trưởng của chủng *L. plantarum* DR27 trong thời gian 8 - 52 giờ, nghiên cứu sẽ xác định thời điểm nhân giống và thời điểm thu hoạch tế bào cho khả năng sinh trưởng và sinh axit lactic của chủng *L. plantarum* DR27 đạt kết quả cao. Chủng *L. plantarum* DR27 được nuôi cấy trong môi trường nước chiết cà chua (FOS 1%, cao nấm men 1%, CaCl₂ 10 mM, pH 6,5; tỷ lệ giống 6%). Nhiệt độ nuôi 37°C với tốc độ lắc 50 vòng/phút. Tiến hành nuôi trong 52 giờ, cứ sau 4 giờ tiến hành lấy mẫu xác định khả năng tạo sinh khối và hàm lượng axit. Sau khi tiến hành thí nghiệm, kết quả được thể hiện ở hình 7 và 8.



Hình 8. Môi trường nuôi cấy chủng *L. plantarum* DR27 ở giờ nuôi thứ 8, 20, 32, 48 giờ

đã giảm dần sau 40 giờ. Từ kết quả nghiên cứu, đã chọn thời gian 32 giờ là thời gian dừng nuôi cấy chủng *L. plantarum* DR27.

4. KẾT LUẬN

Đã xác định được điều kiện tối ưu cho khả năng tạo sinh khối chủng *L. plantarum* DR27 là môi trường lên men nước chiết cà chua với nguồn các-bon là fructoseoligosaccharide (FOS) 1%, nguồn nitơ là cao nấm men 0,5%, nồng độ CaCl₂ 10 mM; pH môi trường 6,5, tỷ lệ giống cấy 6%, nhiệt độ nuôi cấy 37°C, tốc độ lắc 50 vòng/phút, sau 32 giờ lên men thu hồi sinh khối *L. plantarum* DR27 đạt mật độ 8,7 x 10⁹ CFU/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Đức Ngoan, Nguyễn Thị Hoa Lý, Dư Thị Thanh Hằng (2005). *Giáo trình thức ăn gia súc*. Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

2. Vázquez-Fresno R., Llorach R., Marinic J., Tulipani S., Garcia-Aloy M., Espinosa-Martos I., Jiménez E., Rodríguez, J. M., Andres-Lacueva C (2014). Urinary metabolomic fingerprinting after consumption of a probiotic strain in women with mastitis. *Pharm. Res*, 87: 160 - 165.
3. Nguyễn Thị Mỹ Lệ (2018). Vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* 39-183 được sấy phun bằng vi màng prebiotics. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 12, 11 - 20.
4. Moslem P (2020). Using various approaches of design of experiments for high cell density production of the functionally probiotic *Lactobacillus plantarum* Strain RPR42 in a cane molasses-based medium. *Content available from Current Microbiology*, 77: 1756 - 1766.
5. Chang-Ho, K., Yonggyeong, K., Nam-Soo, P. (2017). Effect of pumpkin powder as cryoprotectant to improve the viability of freeze dried lactic acid bacteria. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 32: 251 - 255.
6. Frédéric, L. and Luc, D. V (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 67 - 78.
7. Ibourahema, C., Robin, D., Jacqueline, D., Marie-Laure, F., Georges, L. and Philippe, T (2010). The Resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *International Journal of Microbiology*, 21: 1 - 9.
8. Adesokan I. A., Odetoynbo B. and Okanlawon B. M (2009). Optimization of lactic acid production by lactic acid bacteria isolated from some traditional fermented food in nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(5): 611 - 615.
9. Alison, S., Xuanqian Xie, M. D., Lama, S. and Nandini, D (2016). *Lactobacillus* probiotics in the prevention of diarrhea associated with *Clostridium difficile*: a systematic review and Bayesian hierarchical meta-analysis. *CMAJ Open*, 4(4): 706 - 718.
10. Hager, A., Xianjun, Y., Azizza, M., Junfeng, B. and Tao, S. (2019). Fermentation Characteristics of *Lactobacillus Plantarum* and *Pediococcus*. Species isolated from sweet sorghum silage and their application as silage inoculants. *Appl. Sci.*, 9, 1 - 17.

STUDY ON TECHNOLOGICAL FACTORS AFFECTING BIOMASS PRODUCTION OF *Lactiplantibacillus plantarum* DR27

Nguyen Thi Hong Ha¹, Nguyen Ngoc Huyen¹,

Nguyen Thi Huong Tra¹, Vu Thu Diem¹, Le Thi Trang¹

¹*Vietnam Institute of Agricultural Engineering and Post – Harvest Technology*

Abstract

The objective of this study was to investigate the effects of several technological factors on biomass production of *Lactiplantibacillus plantarum* DR27 (*L. plantarum* DR27). This paper presents the results of optimizing fermentation conditions to enhance biomass yield from *L. plantarum* DR27, a strain isolated from *Canna edible* Ker. residue. Using a single-factor experimental approach, the optimal conditions for biomass production were determined as follows: Tomato extract medium supplemented with 1% fructoseoligosaccharide (FOS) as the carbon source, 0.5% yeast extract as the nitrogen source, 10 mM CaCl₂, an initial pH of 6.5, inoculum of 6%, incubation temperature of 37°C, shaking speed of 50 rpm, and fermentation duration of 32 hours. Under these conditions, the biomass concentration of *L. plantarum* DR27 reached 10⁹ CFU/mL.

Keywords: *L. plantarum* DR27, biomass, *Canna edible* Ker. residue.

Ngày nhận bài: 16/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 8/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 25/7/2025

Ngày duyệt đăng: 6/8/2025

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI TẢO CỦA LOÀI *Chlorella* GIÀU PROTEIN

Đỗ Thị Cẩm Vân¹, Bùi Thị Thu Uyên², Nguyễn Thị Ngoan², Bá Thị Dương²,
Nguyễn Thị Phương Dung³, Lưu Ngọc Sinh⁴, Trần Đăng Thuận^{3,*}, Phạm Anh Tuấn⁵

¹*Viện Công nghệ HaUI, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội*

²*Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

³*Khoa Khoa học Ứng dụng, Trường Đại học Công nghệ Giao thông Vận tải*

⁴*Khoa Công nghệ Kỹ thuật Môi trường, Trường Đại học Thủ đô Hà Nội*

⁵*Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch*

*Email: tdangthuan@ich.vast.vn

TÓM TẮT

Chlorella được đánh giá là nguồn protein bền vững cho thị trường toàn cầu, thay thế một phần protein truyền thống. Các nghiên cứu về sản xuất protein bởi vi tảo *Chlorella* chủ yếu tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng gồm: Ánh sáng, nhiệt độ, nguồn các-bon, nguồn nitơ, nguồn photpho, pH, chế độ khuấy trộn, phương pháp nuôi đến năng suất sinh khối và hàm lượng protein tích lũy. Nghiên cứu sử dụng một số chủng mới phân lập gồm: *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo để khảo sát ảnh hưởng của 3 yếu tố: Ánh sáng, pH, tỷ lệ N/P đến tăng trưởng sinh khối khô và hàm lượng protein. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sinh khối khô sản xuất bởi 3 chủng: *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo sau quá trình khảo sát và tối ưu đều đạt trên 2,5 g/L, các vi tảo đều có thể sản xuất trên 40% khối lượng khô tế bào là protein. Trong điều kiện kiểm soát ánh sáng 9.000 lux, pH trên 7 và tỷ lệ N/P trên 35/1, *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo có thể đạt hàm lượng protein tương ứng 58,82 và 66,70%. Riêng *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo đạt trên 55% và tương đương với chất lượng *Chlorella* cung cấp trên thị trường hiện nay với hàm lượng protein trên 55%. Kết quả nghiên cứu cho thấy, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo là 2 chủng tiềm năng để sản xuất protein.

Từ khóa: *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo, quang dưỡng, protein.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi tảo *Chlorella* là một chi gồm khoảng 13 loài tảo lục đơn bào hoặc dạng tập đoàn thuộc ngành *Chlorophyta* [1, 2]. Loài *Chlorella* có *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella*... [3]. Sinh trưởng của *Chlorella* đã được nghiên cứu rộng rãi về khả năng quang hợp, thành phần dinh dưỡng và các ứng dụng tiềm năng. Từ lâu, *Chlorella* đã được xem xét như một nguồn thực phẩm và năng lượng tiềm năng nhờ hiệu suất quang hợp cao. Hiện nay, *Chlorella* được sản xuất và phân phối trên toàn thế giới như một loại thực phẩm bổ sung, chứa nhiều chất dinh dưỡng và vitamin, bao gồm: Vitamin D và B12, những

vitamin thường vắng mặt trong các nguồn thực phẩm có nguồn gốc thực vật. Các loài *Chlorella* có tiềm năng lớn để được sử dụng làm nguồn protein thay thế vì hơn 80% trong số chúng có thể được con người tiêu hóa và tương đương cả về số lượng và chất lượng với các loại protein thực vật thông thường khác [4]. Về khối lượng, protein dao động từ 51 - 58% ở *C. vulgaris* và 57% ở *C. pyrenoidosa* theo khối lượng khô trong điều kiện tăng trưởng giàu nitơ [5]. Về chất lượng, hầu hết các loại tảo siêu nhỏ đều chứa tất cả các axit amin thiết yếu mà động vật có vú không thể tổng hợp được. Do đó, phải lấy từ lượng thức ăn của chúng. Cụ thể, chỉ số axit amin thiết yếu của *C. pyrenoidosa* chỉ ra rằng,

tất cả các axit amin thiết yếu đều có ở hàm lượng lớn [6].

Các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng protein sản xuất bởi vi tảo bao gồm: Ánh sáng, nhiệt độ, nguồn các-bon, nguồn nitơ, nguồn photpho, pH, chế độ khuấy trộn, phương pháp nuôi (quang dưỡng, tạp dưỡng, dị dưỡng) [7, 8]. Phương pháp quang dưỡng sử dụng nguồn các-bon vô cơ như CO_2 hoặc HCO_3^- có lợi ích là đóng góp vào sự giảm khí nhà kính và lộ trình trung hòa các-bon do vi tảo quang hợp sử dụng CO_2 để tổng hợp nên sinh khối. Sản xuất 1 kg sinh khối vi tảo giàu protein, cần tới 1,8 kg CO_2 . Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố: Ánh sáng, pH, tỷ lệ N/P đến hàm lượng protein sản xuất bởi một số vi tảo của loài *Chlorella* bao gồm: Vi tảo *Chlorella sorokiniana* TH01, *Chlorella sorokiniana* HCN, *Chlorella sorokiniana* Cbeo; lựa chọn ra chủng có khả năng sản xuất trên 40% hàm lượng protein; xác định thành phần axit amin của sinh khối vi tảo *Chlorella sorokiniana* TH01, *Chlorella sorokiniana* HCN, *Chlorella sorokiniana* Cbeo.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguồn vi tảo

Vi tảo *Chlorella sorokiniana* TH01, *Chlorella sorokiniana* HCN, *Chlorella sorokiniana* Cbeo được cung cấp bởi Phòng vật liệu tiên tiến, Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Tảo giống TH01, HCN, Cbeo được nuôi cấy duy trì trong các bình tam giác 250 mL với thể tích làm việc 100 mL môi trường BG-11 có thành phần hóa học gồm (g/L): NaNO_3 , 1,5; K_2HPO_4 , 0,04; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,075; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,036; citric axit, 0,006; ferric ammonium citrate, 0,006; EDTA (ethylenediaminetetraacetic axit), 0,001; Na_2CO_3 , 0,02; dung dịch A5, 1 mL/L; agar, 10. Dung dịch A5 gồm các thành phần: H_3BO_3 , 2,86 g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,81 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,222 g/L; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,39 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,079 g/L; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,0494 g/L. Nhiệt độ trong quá trình nuôi cấy được duy trì ở mức 25 - 27°C. Nguồn sáng là 1 bóng đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng 4.500 lux, chu kỳ chiếu sáng là 24 giờ sáng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nhân giống vi tảo và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và hàm lượng protein tích lũy bởi vi tảo

Vi tảo giống *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo được nuôi duy trì trong bình tam giác 250 mL chứa 100 mL môi trường BG-11 tiết trùng vòng 6 - 8 ngày để đạt mật độ tế bào trên $3,5 \times 10^6$ TB/mL (tương đương $\text{OD}_{750} = 3,0$ Abs hoặc 1,5 g/L). Sau đó, mẫu vi tảo được cấy vào trong chai Duran 1.000 mL chứa môi trường BG-11 (đã được điều chỉnh pH và dinh dưỡng) đã tiết trùng ở tỷ lệ giống 10% (v/v), nuôi dưới điều kiện sục 5% CO_2 (0,1 vvm) dưới điều kiện ánh sáng xác định. Bình phản ứng được trang bị 3 đầu ống inox 304 (Φ6) để sục khí, lấy mẫu và thoát khí. Đầu inox 304 sục khí được nối với ống silicon kết nối với đồng hồ đo lưu lượng khí đến máy sục khí Fujimac. Các yếu tố gồm: Ánh sáng (4.500, 9.000, 13.500 lux), pH (5, 6, 7, 8, 9), nồng độ CO_2 (5%), nồng độ NaNO_3 (0,44 - 1,74 g/L), nồng độ KH_2PO_4 (40 mg/L), sục khí (0,1 vvm) và thời gian nuôi (0 - 12 ngày) ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng và hàm lượng protein tích lũy bởi sinh khối vi tảo.

Sinh khối vi tảo được thu hoạch bằng phương pháp ly tâm ở 5.000 vòng/phút, 25°C trong 5 phút. Sinh khối tảo được rửa với nước vài lần và lặp lại ly tâm. Sau đó, sấy khô ở dưới 40°C bằng phương pháp sấy lạnh đến khối lượng không đổi. Sinh khối tảo được nghiền thành bột tảo có kích thước đồng nhất dưới 0,5 mm để phục vụ nghiên cứu chiết và định lượng protein [9].

2.2.2. Phương pháp đo tăng trưởng của vi tảo

Sự phát triển của vi khuẩn lam được theo dõi hàng ngày bằng cách đo mật độ quang học ở bước sóng 680 nm (OD_{680}) bằng máy đo phổ. Khối lượng tế bào khô (DCW) được xác định bằng cách lấy 10 mL mẫu từ dịch vụ nuôi cấy vi khuẩn lam, lọc qua màng lọc (0,45 μm) và sấy khô ở 105°C trong 24 giờ để thu được khối lượng sinh khối đã làm khô. Nồng độ sinh khối (g/L) được tính toán từ khối lượng khô vi khuẩn tạo ra trên một lít. Tốc độ tăng trưởng cụ thể (μ , ngày⁻¹) của dòng vi khuẩn lam được xác định bằng công thức sau:

$$\mu = \frac{\ln \frac{X_2}{X_1}}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Trong đó: X_1 và X_2 là nồng độ sinh khối vi khuẩn lam (g/L) được đo tại thời gian nuôi t_1 và t_2 (ngày).

2.2.3. Phân tích định tính và định lượng protein

Nghiên cứu này sử dụng phương pháp định lượng protein bằng phân tích nguyên tố N bằng máy CHNSO Analyzer (2.400 CHNS/O Series II System, PerkinElmer, Mỹ), sau đó, nhân với hệ số qui đổi 6,25. Thành phần axit amin của protein vi tảo được phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC [10, 11].

2.2.4. Phân tích số liệu

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và kết quả đo được là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel. Kết quả của các thí nghiệm so sánh sự khác nhau thông qua chỉ số p -value, với $p < 0,05$ được xem là sự sai khác có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của ánh sáng

Sự tăng trưởng sinh khối và hàm lượng protein tích lũy trong sinh khối của 3 chủng vi tảo *Chlorella sorokiniana* TH01, HCN và Cbeo dưới các điều kiện cường độ ánh sáng khác nhau được thể hiện trong hình 1. Phân tích thống kê cho thấy, cả yếu tố cường độ ánh sáng và giống tảo đều ảnh hưởng đáng kể đến sinh trưởng và khả năng tích lũy protein ($p < 0,05$).

Cụ thể, ở chủng *C. sorokiniana* Cbeo, khi cường độ ánh sáng tăng từ 4.500 lên 13.500 lux, sinh khối tăng rõ rệt từ $2,69 \pm 0,05$ g/L lên $4,30 \pm 0,07$ g/L (tăng 59,85%, $p < 0,05$). Đồng thời, hàm lượng protein tích lũy tăng từ $40,28 \pm 0,82\%$ lên $64,44 \pm 1,05\%$ (tăng 60,05%, $p < 0,05$). Mức gia tăng này cho thấy, *C. sorokiniana* Cbeo phản ứng tích cực và bền vững với việc tăng cường độ ánh sáng, cả về sinh trưởng và tích lũy protein.

Đối với *C. sorokiniana* TH01, sinh khối cũng tăng dần từ $2,24 \pm 0,04$ g/L ở 4.500 lux lên $2,97 \pm$

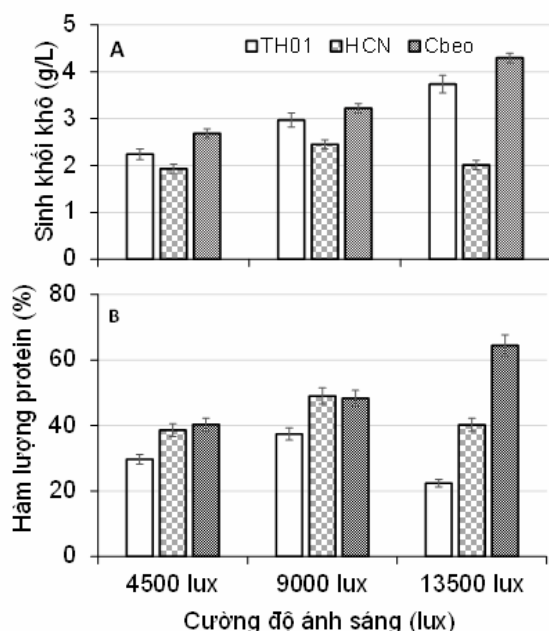
$0,06$ g/L ở 9.000 lux và đạt giá trị cao nhất $3,74 \pm 0,05$ g/L ở 13.500 lux (tăng tổng cộng 66,96%, $p < 0,05$ so với 4.500 lux). Tuy nhiên, xu hướng tích lũy protein lại khác biệt: Hàm lượng protein tăng từ $29,70 \pm 0,63\%$ (4.500 lux) lên $37,42 \pm 0,85\%$ (9.000 lux; $p < 0,05$) nhưng giảm mạnh xuống $22,41 \pm 0,54\%$ khi ánh sáng đạt 13.500 lux ($p < 0,05$ so với 9.000 lux). Kết quả nghiên cứu cho thấy, mức ánh sáng cao nhất thúc đẩy sinh trưởng nhưng gây ức chế quá trình tích lũy protein, có thể do stress quang hợp hoặc sự ưu tiên chuyển hóa sang các hợp chất khác.

Ở *C. sorokiniana* HCN, sinh khối và hàm lượng protein tăng đáng kể khi cường độ ánh sáng tăng từ 4.500 lux ($1,93 \pm 0,03$ g/L; $38,61 \pm 0,77\%$) lên 9.000 lux ($2,45 \pm 0,04$ g/L; $49,05 \pm 0,90\%$) ($p < 0,05$). Sau đó, giảm còn $2,01 \pm 0,05$ g/L và $40,21 \pm 0,68\%$ ở 13.500 lux ($p < 0,05$ so với 9.000 lux). Điều này cho thấy, chủng HCN chỉ đạt hiệu suất sinh trưởng và tích lũy protein tối ưu ở mức ánh sáng trung bình, trong khi ánh sáng cao gây tác động bất lợi.

Tổng hợp kết quả cho thấy, phản ứng của 3 chủng *C. sorokiniana* đối với cường độ ánh sáng là khác biệt rõ rệt, cả về xu hướng và mức độ biến đổi. Trong khi Cbeo duy trì xu hướng tăng đồng thời ở cả sinh khối và protein khi ánh sáng tăng, TH01 và HCN chỉ đạt cực đại ở mức 9.000 lux và giảm ở 13.500 lux. Điều này cung cấp cơ sở khoa học cho việc lựa chọn cường độ ánh sáng thích hợp trong nuôi cấy nhằm tối ưu hóa sản lượng và chất lượng sinh khối.

Cường độ ánh sáng tác động đáng kể đến sự phát triển của tảo và sản xuất protein. Nhìn chung, việc tăng cường độ ánh sáng sẽ thúc đẩy sự phát triển đến một điểm nhất định (ngưỡng ức chế quang hợp), nhưng ngưỡng này khác nhau giữa các loài. Ngoài điểm này, ánh sáng quá mức có thể cản trở sự phát triển. Cường độ ánh sáng cũng ảnh hưởng đến hàm lượng protein; protein giảm ở một số loài khi có nhiều ánh sáng hơn, trong khi những loài khác lại có sự tích tụ protein tăng lên. Ví dụ, hàm lượng protein giảm khi tăng cường độ chiếu sáng được ghi nhận ở *C. vulgaris* (từ 61,0 xuống 46,6%) và *A. platensis* (từ 43,8 lên 33,6%) trong điều kiện nuôi là 6% CO₂ và năm mức cường

độ ánh sáng 80, 120, 160, 200 và 245 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$. Trong đó, khả năng tăng năng suất sinh khối tảo bằng cách tăng cường độ chiếu sáng cho các vi tảo được chọn nghiên cứu gồm: *Arthrospira platensis*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella vulgaris*, *Gloeotila pulchra*, *Elliptochloris subsphaerica* là không đáng kể [12].



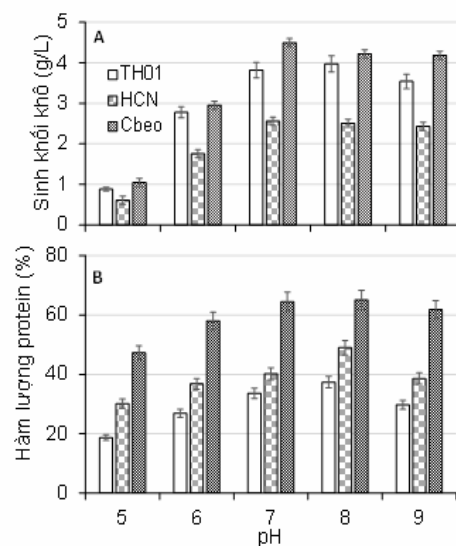
Hình 1. Ảnh hưởng của ánh sáng đến tăng trưởng sinh khối (A) và hàm lượng protein tích lũy trong sinh khối của vi tảo *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo (B)

3.2. Ảnh hưởng của pH

Tăng trưởng sinh khối và hàm lượng protein tích lũy trong sinh khối vi tảo *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo dưới các điều kiện pH ban đầu khác nhau được thể hiện trong hình 2.

Hình 2 cho thấy, ảnh hưởng của pH đến tăng trưởng sinh khối và hàm lượng protein của các vi tảo *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo là tương đối giống nhau. Đối với tăng trưởng sinh khối, sinh khối khô của *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo tăng tương ứng từ 0,89 lên 3,97 g/L; 0,61 lên 2,56 g/L; 1,05 lên 4,50 g/L khi pH ban đầu của môi trường nuôi tăng từ 5 lên 7. Tuy nhiên, tăng pH ban đầu lên mức 8 - 9 làm giảm nhẹ sinh khối khô của *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo về mức

tương ứng 3,54; 2,43 - 2,51; 4,19 - 4,22 g/L. Tác động của độ pH lên sinh khối tảo rất đáng kể. Tảo có phạm vi độ pH cụ thể để tăng trưởng tối ưu và sự tăng giảm pH có thể dẫn đến giảm năng suất sinh khối hoặc thậm chí là phân hủy tế bào [13]. Độ pH cũng ảnh hưởng đến tính khả dụng của các chất dinh dưỡng, đặc biệt là nitơ và quá trình trao đổi chất của tế bào. Các loài vi tảo khác nhau có độ pH tối ưu khác nhau, nhưng hầu hết thích điều kiện trung tính đến hơi kiềm (pH 6,5 - 8,0) [14]. Giá trị pH rất thấp hoặc rất cao có thể gây hại, gây ra tình trạng phân hủy tế bào hoặc ức chế sự phát triển. Ví dụ, một số loại tảo có thể phát triển trong điều kiện axit (pH < 5) hoặc điều kiện kiềm (pH > 9), trong khi những loại khác nhạy cảm hơn [13].



Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến tăng trưởng sinh khối (A) và hàm lượng protein tích lũy trong sinh khối của vi tảo *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo (B)

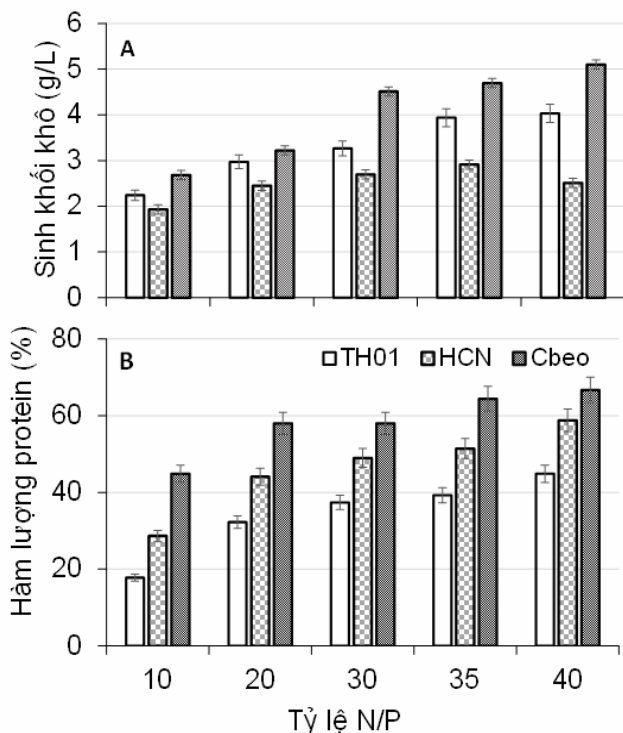
Cũng tương tự như vậy, tác động của độ pH lên sự tích tụ protein trong vi tảo là rất lớn và thay đổi tùy theo loài và điều kiện tăng trưởng cụ thể. Nhìn chung, việc tăng độ pH có thể dẫn đến sự gia tăng hàm lượng protein trong sinh khối vi tảo. Tuy nhiên, một số chủng vi tảo có thể biểu hiện sự tích tụ protein tăng lên ở mức độ pH có tính axit, chứng minh phản ứng đa dạng đối với những thay đổi về độ pH của thể giới vi tảo [15]. Đối với *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo, xu hướng chung là tăng pH ban đầu của môi trường nuôi làm tăng hàm lượng protein tích lũy trong sinh khối vi tảo. Cụ thể, ở pH

= 5, *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo chỉ đạt hàm lượng protein tương ứng 18,70; 30,15; 47,27%. Mức này tăng liên tục lên 37,41; 49,05; 65,09% khi pH tăng lên mức 8,0; sau đó, giảm xuống tương ứng 29,7; 38,6; 61; 76% khi pH tiếp tục tăng lên mức 9,0.

3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ N/P

Thừa hoặc thiếu nitơ hoặc photpho có thể ảnh hưởng tiêu cực đến sự tăng trưởng và thành phần tế bào của tảo. Tỷ lệ N/P (nitơ so với photpho) trong môi trường tăng trưởng ảnh hưởng lớn đến quá trình sản xuất protein của tảo vi mô. Thông thường, tỷ lệ N/P cao thúc đẩy quá trình tổng hợp protein, trong khi nếu N/P quá thấp so với tỷ lệ tối ưu có thể dẫn đến giảm hàm lượng protein và thay đổi các thành phần tế bào khác như carbohydrate và lipid [16].

Tăng trưởng sinh khối và hàm lượng protein tích lũy trong sinh khối vi tảo *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo dưới các điều kiện N/P ban đầu khác nhau được thể hiện trong hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ N/P đến tăng trưởng sinh khối (A) và hàm lượng protein tích lũy trong sinh khối của vi tảo *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo (B)

Hình 3 cho thấy, ảnh hưởng của N/P đến tăng trưởng sinh khối và hàm lượng protein của các vi tảo *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo là tương đối giống khác nhau. Đối tăng trưởng sinh khối, sinh khối khô của *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo tăng tương ứng từ 2,24 lên 4,03 g/L; 1,93 lên 2,91 g/L; 2,69 lên 5,10 g/L khi pH ban đầu của môi trường nuôi tăng từ 10/1 lên tương ứng 40/1, 35/1 và 40/1.

Trong khi đó, sinh khối khô của *C. sorokiniana* HCN giảm còn 2,51 g/L khi N/P tăng từ 35 lên 40. Kết quả nghiên cứu của Magyar và cs (2024) [17] cho thấy, tăng trưởng của vi tảo trong dung dịch dinh dưỡng được pha chế với nồng độ nitrat tăng (T1 - N: P = 55: 1 và T3 - N: P = 28: 1) thúc đẩy quá trình hình thành diệp lục và vượt trội về sinh khối so với mẫu đối chứng (BG-11 - N: P = 35: 1) là 192% và 183%, dẫn đến năng suất sinh khối cao hơn với lần lượt là 1,160 mg/L và 1,103 mg/L.

Tác động của độ N/P lên sự tích tụ protein trong vi tảo là rất lớn, thay đổi tùy theo loài và điều kiện tăng trưởng cụ thể. Nhìn chung, việc tăng tỷ lệ N/P có thể dẫn đến sự gia tăng hàm lượng protein trong sinh khối vi tảo [16]. Đối với *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo, xu hướng chung là tăng N/P ban đầu của môi trường nuôi làm tăng hàm lượng protein tích lũy trong sinh khối vi tảo. Cụ thể, ở N/P = 10/1, *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo chỉ đạt hàm lượng protein tương ứng 17,77; 28,64; 44,89%. Mức này tăng liên tục lên 44,88; 58,82; 66,70% khi N/P tăng lên mức 40/1. Tỷ lệ N/P tối ưu rất quan trọng để tối đa hóa sản xuất protein ở vi tảo. Ví dụ, tỷ lệ N/P = 10/1 đã được chứng minh là thúc đẩy sự tăng trưởng và tổng hợp protein ở vi tảo trong hệ thống nuôi bám giá thể [18].

Kết quả nghiên cứu cho thấy, *Chlorella* trên thị trường cũng có hàm lượng protein cao (khoảng 59% dựa trên khối lượng khô), trùng khớp với dữ liệu phân tích về hàm lượng protein của *C. pyrenoidosa* (57%) [19] và *C. vulgaris* (51 - 58%) [3]. Hàm lượng protein này cao hơn hàm lượng protein của đậu nành (khoảng 33%, khối lượng khô). Theo Canelli và cs (2020) [20], các chủng

Chlorella và *Auxenochlorella*, *Chlorella vulgaris* được nuôi cấy dị dưỡng trong phòng thí nghiệm cho kết quả protein chiếm $65 \pm 3\%$ vật chất khô (DM) trong tất cả các sinh khối.

Như vậy, thông qua khảo sát ảnh hưởng của 3 yếu tố: Ánh sáng, pH và tỷ lệ N/P đến sinh trưởng và hàm lượng protein tích lũy trong *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo cho thấy, các vi tảo đều có thể sản xuất trên 40%

khối lượng khô tế bào là protein. Trong điều kiện kiểm soát ánh sáng 9.000 lux, pH trên 7 và tỷ lệ N/P trên 35/1, *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo có thể đạt hàm lượng protein tương ứng 44,88; 58,82; 66,70%. Riêng *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo đạt trên 55% và tương đương với chất lượng *Chlorella* cung cấp trên thị trường hiện nay với hàm lượng protein trên 55%.

Bảng 1. Hàm lượng các amino axit trong protein của *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo so với một số *Chlorella* thương mại

Hàm lượng các amino axit (mg/100 g chất khô)	<i>Chlorella</i> product C [5]	<i>Chlorella</i> product M [5]	<i>C. sorokiniana</i> TH01	<i>C. sorokiniana</i> HCN	<i>C. sorokiniana</i> Cbeo
Axit amin cần thiết					
Isoleucine	1.820	2.030	1.929	2.132	2.335
Leucine	4.180	4.480	4.256	4.704	5.152
Lysine	4.659	3.140	2.983	3.297	3.611
Methionine	1.009	1.240	1.178	1.302	1.426
Phenylalanine	2.230	2.580	2.451	2.709	2.967
Threonine	2.209	2.490	2.366	2.615	2.864
Tryptophan	1.030	1.090	1.036	1.145	1.254
Valine	2.780	3.090	2.936	3.245	3.554
Histidine	1.141	1.040	988	1.092	1.196
Axit amin không cần thiết					
Tyrosine	1.720	1.940	2.037	1.843	1.746
Cystine	659	650	683	618	585
Aspartic axit	4.469	4.710	4.946	4.475	4.239

Serine	1.930	2.120	2.226	2.014	1.908
Glutamic axit	6.209	6.030	6.332	5.729	5.427
Proline	2.320	2.560	2.688	2.432	2.304
Glycine	2.859	2.990	3.140	2.841	2.691
Alanine	4.009	4.170	4.379	3.962	3.753
Arginine	3.109	3.260	3.423	3.097	2.934

Phân tích làm lượng các axit amin trong nhóm cần thiết và ít cần thiết cho thấy, *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo đều chứa các axit amin cần thiết với hàm lượng cao hơn hoặc tương đương với chúng trong các sản phẩm *Chlorella* thương mại. Trong khi đó, hàm lượng các axit amin ít cần thiết phân tích trong sinh khối *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo có hàm lượng thấp hơn hoặc tương đương với chúng trong 2 sản phẩm *Chlorella* product C và *Chlorella* product M [5] (Bảng 1). Kết quả cho thấy, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo là tiềm năng trong sản xuất protein làm nguồn dinh dưỡng thay thế cho protein từ động vật trên thị trường [21].

4. KẾT LUẬN

Sinh khối khô sản xuất bởi 3 chủng: *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo sau quá trình khảo sát và tối ưu đều đạt trên 2,5 g/L, các vi tảo đều có thể sản xuất trên 40% khối lượng khô tế bào là protein. Trong điều kiện kiểm soát ánh sáng 9.000 lux, pH trên 7 và tỷ lệ N/P trên 35/1, *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo đạt hàm lượng protein tương ứng 58,82 và 66,70%. Riêng *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo đạt trên 55% và tương đương với chất lượng *Chlorella* cung cấp trên thị trường hiện nay với hàm lượng protein trên 55%. Kết quả nghiên cứu cho thấy, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo là 2 chủng tiềm năng để sản xuất protein.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. Guccione, N. Biondi, G. Sampietro, L. Rodolfi, N. Bassi, M. R. Tredici (2014). *Chlorella* for protein and biofuels: From strain selection to outdoor cultivation in a Green wall panel photobioreactor. *Biotechnology for Biofuels*, 7: 84.
2. P. Bhatnagar, P. Gururani, A. Parveen, P. Gautam, N. Chandra Joshi, M. S. Tomar, M. Nanda, M. S. Vlaskin, V. Kumar, Algae (2024). A promising and sustainable protein-rich food ingredient for bakery and dairy products. *Food Chemistry*, 441: 138322.
3. E. W. Becker (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25: 207 - 210.
4. J. Rumin, E. Nicolau, R. G. O. Junior, C. Fuentes-Grünewald, L. Picot (2020). Analysis of scientific research driving microalgae market opportunities in europe. *Mar Drugs*, 18(5), 264.
5. T. Bito, E. Okumura, M. Fujishima, F. Watanabe (2020). Potential of *chlorella* as a dietary supplement to promote human health. *Nutrients*, 12(9), 2524.
6. J. Espinosa-Ramírez, A. C. Mondragón-Portocarrero, J. A. Rodríguez, J. M. Lorenzo, E. M. Santos (2023). Algae as a potential source of protein meat alternatives. *Frontiers in Nutrition*. Volume 10, DOI: 10.3389/fnut.2023.1254300.

7. C. -Y. Chen, P. -J. Lee, C. H. Tan, Y. -C. Lo, C. -C. Huang, P. L. Show, C. -H. Lin, J. -S. Chang (2015). Improving protein production of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E by photobioreactor design and cultivation strategies. *Biotechnology Journal*, 10: 905 - 914.
8. A. Josephine, T. S. Kumar, B. Surendran, S. Rajakumar, R. Kirubakaran, G. Dharani (2022). Evaluating the effect of various environmental factors on the growth of the marine microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Frontiers in Marine Science*. Volume 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.954622>.
9. T. D. C. Van, C. T. Dinh, M. T. Dang, T. Dang Tran, T. Giang Le (2022). A novel flat-panel photobioreactor for simultaneous production of lutein and carbon sequestration by *Chlorella sorokiniana* TH01. *Bioresour Technol*, 345: 126552.
10. H. Cuchiaro, L. M. L. Laurens (2019). Total protein analysis in algae via bulk amino acid detection: Optimization of amino acid derivatization after hydrolysis with o-phthalaldehyde 3-mercaptopropionic acid (opa-3mpa). *Journal of agricultural and food chemistry*, 67: 5672 - 5679.
11. S. M. Tibbetts, S. J. J. Patelakis, C. G. Whitney-Lalonde, L. L. Garrison, C. L. Wall, S. P. MacQuarrie (2020). Nutrient composition and protein quality of microalgae meals produced from the marine prymnesiophyte *Pavlova* sp. 459 mass-cultivated in enclosed photobioreactors for potential use in salmonid aquafeeds. *Journal of Applied Phycology*, 32: 299 - 318.
12. E. A. Chunzhuk, A. V. Grigorenko, S. V. Kiseleva, N. I. Chernova, M. S. Vlaskin, K. G. Ryndin, A. V. Butyrin, G. N. Ambaryan, A. O. Dudoladov (2023). Effects of light intensity on the growth and biochemical composition in various microalgae grown at high CO₂ concentrations. *Plants*, 12: 3876.
13. Y. A. Alkhamis, R. T. Mathew, G. Nagarajan, S. M. Rahman, M. M. Rahman (2022). pH induced stress enhances lipid accumulation in microalgae grown under mixotrophic and autotrophic condition. *Frontiers in Energy Research*, 10, 1033068.
14. M. Sakarika, M. Kornaros (2016). Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation. *Bioresource Technology*, 219: 694 - 701.
15. S. Abinandan, K. Venkateswarlu, M. Megharaj (2021). Phenotypic changes in microalgae at acidic pH mediate their tolerance to higher concentrations of transition metals. *Current research in microbial sciences*, 2: 100081.
16. S. A. Sousa, C. A. Machado, A. F. Esteves, E. M. Salgado, J. M. Dias, J. S. Vilaça, J. C. M. Pires (2025). Microalgae-based wastewater remediation: Linking N:P ratio and nitrogen sources to treatment performance by *Chlorella vulgaris* and biomass valorisation. *Chemical Engineering Journal*, 518: 164701.
17. T. Magyar, B. Németh, J. Tamás, P. T. Nagy (2024). Improvement of N and P ratio for enhanced biomass productivity and sustainable cultivation of *Chlorella vulgaris* microalgae. *Heliyon*. 10: e23238.
18. W. Qian, Y. Yang, S. Chou, S. Ge, P. Li, X. Wang, L.-L. Zhuang, J. Zhang (2024). Effect of N/P ratio on attached microalgae growth and the differentiated metabolism along the depth of biofilm. *Environmental research*, 240: 117428.
19. Y. Chisti (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25: 294 - 306.
20. G. Canelli, C. Tarnutzer, R. Carpine, L. Neutsch, C. J. Bolten, F. Dionisi, A. Mathys (2020). Biochemical and nutritional evaluation of chlorella and auxenochlorella biomasses relevant for food application. *Frontiers in nutrition*, 7, 565996.
21. X. Guo, Q. Wang, Y. Wu, X. Liu, Z. Gong (2024). Comprehensive insights into microalgae proteins: Nutritional profiles and innovative applications as sustainable alternative proteins in health and food sciences. *Food Hydrocolloids*, 154: 110112.

RESEARCH ON SCREENING HIGH-PROTEIN CHLORELLA STRAINS

Do Thi Cam Van¹, Bui Thị Thu Uyen², Nguyen Thị Ngoan², Ba Thi Duong²,
Nguyen Thi Phuong Dung³, Luu Ngọc Sinh⁴, Tran Dang Thuan³, Pham Anh Tuan⁵

¹*HaUI Institute of Technology, Hanoi University of Industry (HaUI)*

²*Institute of Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

³*Department of Applied Science, University of Transport Technology*

⁴*Faculty of Environmental Engineering, Hanoi Metropolitan University*

⁵*Vietnam Institute of Agricultural Engineering and Post-Harvest Technology*

Abstract

Chlorella is considered a sustainable protein source for the global market, alternatively replacing traditional proteins. Studies on protein production by *Chlorella* microalgae mainly optimize the influencing factors including light, temperature, carbon source, nitrogen source, phosphorus source, pH, agitation mode, culture method on biomass yield and accumulated protein content. This study used some newly isolated strains including *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo to investigate the effects of three factors: Light, pH, N/P ratio on dry biomass growth and protein content. The results showed that the dry biomass produced by three strains *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo after the investigation and optimization process reached over 2.5 g/L, with over 40% of the cell dry weight as protein. Under controlled conditions of light of 9,000 lux, pH above 7 and N/P ratio above 35/1, *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo could achieve protein content of 58.82 and 66.70%, respectively. *C. sorokiniana* HCN and *C. sorokiniana* Cbeo alone achieved over 55% and were equivalent to the quality of *Chlorella* currently supplied in the market with a protein content of over 55%. The results demonstrated that *C. sorokiniana* HCN and *C. sorokiniana* Cbeo are two potential strains for protein production.

Keywords: *C. sorokiniana* TH01, *C. sorokiniana* HCN, *C. sorokiniana* Cbeo, phototrophic, protein.

Ngày nhận bài: 16/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 14/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 4/8/2025

Ngày duyệt đăng: 15/8/2025

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ LÊN MEN NƯỚC CHANH DÂY CÓ ĐỘ CỒN THẤP TỪ QUẢ CHANH DÂY THU HOẠCH TẠI TỈNH ĐẮK NÔNG

Đặng Hồng Anh^{1,*}, Phạm Hoài Thu¹,

Phạm Thị Thu¹, Trần Bảo Trâm², Vũ Xuân Tạo²

¹ Bộ môn Công nghệ chế biến Nông sản và Đồ uống, Viện Công nghiệp Thực phẩm

² Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng công nghệ

*Email: anhhdh@firi.vn

TÓM TẮT

Đắk Nông là tỉnh có điều kiện thổ nhưỡng thích hợp cho phát triển trồng chanh dây. Quả chanh dây tại đây có vị ngọt dịu, chua nhẹ nên thích hợp để chế biến các loại nước giải khát, trong đó có nước chanh dây có độ cồn thấp. Trong quy trình sản xuất nước chanh dây có độ cồn thấp, việc xử lý quả trước khi lên men có thể ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi, thành phần các chất hòa tan có trong dịch quả và mức độ ổn định độ trong, màu sắc của sản phẩm. Nghiên cứu được thực hiện nhằm lựa chọn loại enzyme, nồng độ, ngưỡng nhiệt độ và thời gian xử lý phù hợp đến quá trình thu hồi, làm trong, chống biến màu dịch quả và các điều kiện thực hiện quá trình lên men dịch quả chanh dây. Kết hợp sử dụng các loại enzyme với nồng độ sử dụng tương ứng như: Pectinase Pectinex Ultra SP-L 0,02%, cellulase Viscozyme Cassava C 0,3% để hỗ trợ tách hạt và tăng hiệu suất trích ly dịch quả, pectinase Pectinex Ultra Clear 0,2% giúp làm trong dịch quả và glucose oxidase Hyderase 0,3% hỗ trợ chống biến màu dịch quả, thời gian xử lý là 90 phút tại nhiệt độ lựa chọn là 40°C để hạn chế biến đổi chất lượng cảm quan dịch quả. Để đảm bảo pH thích hợp cho quá trình lên men, dịch chanh dây được pha loãng với nước theo tỷ lệ 60%, bổ sung đường saccharose để thu được dịch đường ban đầu 14%. Điều kiện lên men được thực hiện với mật độ men giống ban đầu của chủng *Saccharomyces cerevisiae* SLS là 10^6 CFU/ml, nhiệt độ lên men 22°C trong 5 ngày thu được dịch lên men đạt độ rượu 5,1% Vol., cảm quan sản phẩm sau lên men có hương thơm mạnh đặc trưng của chanh dây, vị hài hòa êm dịu.

Từ khóa: Chanh dây, lên men, độ cồn thấp, enzyme, pectinase, cellulase, glucose oxidase.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chanh dây (*Passiflora edulis*), thuộc họ Passifloraceae, bộ Violales, chi *Passiflora*. Do điều kiện khí hậu và thổ nhưỡng thích hợp nên chanh dây được trồng rộng rãi tại các tỉnh Tây Nguyên, trong đó có tỉnh Đắk Nông. Theo báo cáo của Sở Nông nghiệp và PTNT tỉnh Đắk Nông (2020) [1], diện tích trồng chanh dây là 1.788 ha với sản lượng khoảng 33.042 tấn. Quả chanh dây chủ yếu được bán tươi hoặc cấp đông nguyên quả, cấp đông dịch mức để xuất khẩu. Tuy nhiên, việc chế biến sâu còn hạn chế nên ảnh hưởng lớn đến hiệu quả kinh tế của việc trồng chanh dây, do đó, cần thiết đa dạng hóa sản phẩm chế biến từ chanh dây, một

trong số đó là sản phẩm nước chanh dây có độ cồn thấp.

Xử lý dịch với các chế phẩm enzyme thích hợp là một trong những phương pháp được sử dụng phổ biến trong chế biến nước trái cây [2]. Các enzyme được sử dụng trong chế biến nước trái cây nhằm hỗ trợ trong việc tách dịch từ các tế bào quả và làm trong nước trái cây bằng cách thủy phân các pectin tự nhiên, góp phần làm giảm độ nhớt, lọc dịch một cách dễ dàng [3]. Việc sử dụng enzyme còn góp phần làm tăng khả năng trích ly các hợp chất hòa tan góp phần nâng cao chất lượng cảm quan về màu sắc, hương vị và đặc biệt là giúp ổn định độ bền keo của sản phẩm [4 -

6]. Bên cạnh đó, việc sử dụng enzyme glucose oxidase còn có tác dụng chống biến màu nước quả [7].

Ngoài ra, điều kiện lên men cũng cần lựa chọn để thu được sản phẩm có chất lượng cảm quan tốt nhất. Một số nghiên cứu về nước giải khát lên men đã được thực hiện tại Việt Nam như: Nước sô ri lên men [8], nước táo mèo có độ cồn thấp [9], nước chanh dây độ cồn thấp bổ sung probiotic [10], tối ưu hóa điều kiện lên men cider từ chanh dây bằng mô hình phức hợp trung tâm [11], các nghiên cứu này đều tập trung vào việc nghiên cứu chuẩn hóa quá trình lên men rượu với các thông số như: Tỷ lệ pha loãng dịch quả, nồng độ chất khô ban đầu, mật độ tế bào nấm men, pH, thời gian lên men...

Chính vì vậy, nghiên cứu quy trình công nghệ lên men nước chanh dây có độ cồn thấp từ quả chanh dây thu hoạch tại tỉnh Đắk Nông là cần thiết nhằm tạo được sản phẩm nước chanh dây độ cồn thấp có chất lượng cảm quan tốt về màu sắc, độ trong và hương vị.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

2.1.1. Chanh dây

Quả chanh dây được thu hái tại tỉnh Đắk Nông. Quả có kích thước quả đạt tiêu chuẩn (khoảng 70 - 90 g/quả). Vỏ quả khi chín màu tím đậm bóng nhẹ, không bị dập nát, độ chín vừa phải đem rửa sạch và để ráo nước sau đó được thu hồi phần ruột quả gồm cả hạt. Giống chanh dây có độ Brix (độ ngọt) khoảng 16,9% và độ chua (axit) khoảng 2,59%, dịch quả có màu cam đậm, sáng, mùi thơm đặc trưng.

2.1.2. Enzyme

Pectinex Ultra SP-L là một phức hệ enzyme gồm enzyme polygalacturonase và pectinase vừa góp phần phá vỡ thành tế bào, đồng thời, thủy phân pectin làm giảm độ nhớt. Nhiệt độ hoạt động tối ưu là 25 - 40°C.

Pectinex Ultra Clear gồm Enzyme Polygalacturonase và 1 số loại enzyme khác dùng nhằm phân hủy pectin, làm giảm độ nhớt và tăng độ trong. Nhiệt độ hoạt động tối ưu là 40 - 50°C.

Viscozyme Cassava C là sản phẩm của hãng Novozym (Đan Mạch). Thành phần chủ yếu cellulase, hemicellulase và beta-glucanase giúp tăng hiệu suất trích ly, làm mềm nguyên liệu hoặc chuyển hóa thành đường để lên men của 3 loại enzyme lần lượt là pectinesterase, polygalacturonase và cellulase và có khoảng nhiệt độ hoạt động tối ưu là 40 - 50°C.

Chế phẩm Hyderase là enzyme glucose oxidase của hãng Amano Enzyme (Nhật Bản) được sử dụng để loại bỏ oxy, giúp kéo dài thời gian bảo quản và ổn định màu sắc, hương vị có khoảng nhiệt độ hoạt động tối ưu 40 - 50°C.

2.1.3. Nấm men

Chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* SLS đã được dùng nhiều trong nghiên cứu và thực tiễn sản xuất rượu vang và nước quả lên men đã được lựa chọn cho nghiên cứu vì hoàn toàn phù hợp với lên men dịch chanh dây. Chủng nấm men được nhân giống trong môi trường lỏng YPD trong 16 giờ, sau đó, được ly tâm thu sinh khối và bổ sung vào dịch lên men chanh dây sao cho mật độ tế bào ban đầu quá trình lên men đạt 10^6 CFU/ml.

2.2. Bố trí thí nghiệm và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Đối với phần trích ly dịch quả chanh dây do có nhiều chất xơ trạng thái nhầy bám vào hạt nên để tách phần dịch quả khỏi hạt dễ dàng, ngoài việc sử dụng enzyme pectinase còn cần phải kết hợp với enzyme cellulase. Do 2 loại enzyme có khoảng nhiệt độ hoạt động tối ưu khá khác nhau nên cần quan tâm đến yếu tố nhiệt độ khi kết hợp xử lý. Ngoài ra, cũng cần đánh giá thêm tác dụng của việc sử dụng 2 loại enzyme còn lại trong làm trong và chống biến màu sản phẩm. Nồng độ các enzyme được căn cứ vào nồng độ khuyến cáo của nhà sản xuất nhưng cũng cần được xác định lại để đảm bảo hiệu quả xử lý là tốt nhất.

Do vậy, trong phần nội dung về xử lý dịch quả sẽ tập trung vào các nội dung:

- Nghiên cứu lựa chọn loại enzyme và nhiệt độ, thời gian xử lý phù hợp: CT1: Mẫu không xử lý enzyme; CT2: Sử dụng Pectinex Ultra SP-L 0,02% xử

lý ở 40°C; CT3: Sử dụng Viscozyme Cassava C 0,3% ở 40°C; CT4, CT5, CT6, CT7: Kết hợp 2 enzyme với tỷ lệ sử dụng như trên thay đổi nhiệt độ xử lý lần lượt 35°C; 40°C; 45°C; 50°C và thời gian xử lý từ 30 - 120 phút.

- Nghiên cứu lựa chọn tỷ lệ kết hợp 2 enzyme và thời gian xử lý thích hợp: Các thí nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ và thời gian lựa chọn từ nghiên cứu trên. CT8, CT9, CT10, CT11: Thay đổi Pectinex Ultra SP-L 0,01%; 0,02%; 0,03%; 0,04% và giữ nguyên Viscozyme Cassava C 0,3%. CT12, CT13, CT14, CT15: Sử dụng nồng độ enzyme Pectinex Ultra SP-L chọn từ thí nghiệm trên và thay đổi Viscozyme Cassava C từ 0,1 - 0,4%.

- Nghiên cứu làm trong dịch chanh dây bằng cách kết hợp xử lý với enzyme Pectinex Ultra Clear: CT16, CT17, CT18, CT19, CT20 với nồng độ enzyme từ 0,1 - 0,5%.

- Nghiên cứu chống biến màu dịch chanh dây bằng cách kết hợp xử lý với enzyme Hyderase: CT21, CT22, CT23, CT24, CT25, CT26 với mẫu đối chứng không xử lý và nồng độ enzyme từ 0,1 - 0,5%.

Đối với quá trình lên men dịch chanh dây, cần nghiên cứu xác định được tỷ lệ dịch quả thích hợp cho quá trình lên men (thay đổi các tỷ lệ dịch quả 40, 50, 60, 70%), nồng độ đường ban đầu (12, 14, 16%), nhiệt độ lên men (20, 22, 24°C), thực hiện quá trình lên men với mật độ tế bào nấm men ban đầu là 10^6 CFU/ml. Dịch sau lên men được thanh trùng ở 80°C trong 30 phút và theo dõi chất lượng trong thời gian bảo quản 6 tháng.

2.2.2. Phương pháp phân tích

- Chất khô hoà tan ($^{\circ}\text{Bx}$): Đo bằng máy chiết quang kế điện tử (Nhật Bản).

- pH: Đo bằng máy đo pH (Đức).

- OD_{420} , OD_{620} : Máy đo quang phổ (Anh) tại bước sóng 420, 620 nm, trong đó, OD_{420} thể hiện mức độ nâu hoá của màu sắc dịch quả, OD_{620} thể hiện độ đục của dịch quả.

- Xác định độ nhớt (cp): Bằng máy đo độ nhớt (Mỹ).

- Xác định độ rượu: Sử dụng bộ cất cồn Dujardin Salleron (Pháp): Đưa dịch lên men vào trong thiết bị và đốt đến khi nhiệt độ sôi không

thay đổi thì đọc kết quả và tra bảng thực nghiệm để biết được độ cồn trong dịch lên men theo % thể tích.

- Đường tổng (%): Bằng phương pháp Graxianop.

- Axit (g/l tính theo hệ số axit H_2SO_4): Phương pháp chuẩn độ với NaOH 0,1N, axit sulfuric $k = 0,0049$ g/l.

- Phương pháp đếm tế bào nấm men dưới kính hiển vi (Nhật Bản), sử dụng buồng đếm hồng cầu.

- Phương pháp cảm quan: Được đánh giá bằng phương pháp cảm quan mô tả. Hội đồng cảm quan gồm 8 - 12 thành viên đã được huấn luyện được gọi là "hội đồng cảm quan", được đào tạo để nhận biết, mô tả chính xác các đặc điểm của sản phẩm, có khả năng lặp lại kết quả một cách nhất quán và trả lời vào phiếu đã được người thực hiện thí nghiệm xây dựng.

- Hiệu suất thu hồi dịch quả (%): Khối lượng dịch quả thu được so với khối lượng nguyên liệu ban đầu khi quy về cùng nồng độ chất khô.

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sử dụng phần mềm Microsoft Office Excel để xử lý số liệu.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu xử lý dịch quả chanh dây với một số loại enzyme

3.1.1. Nghiên cứu lựa chọn loại enzyme và nhiệt độ xử lý phù hợp với việc trích ly dịch quả chanh dây

Thí nghiệm được thực hiện theo mục 2.2.1. Các mẫu được xác định chất khô hoà tan, pH, độ nhớt, hiệu suất trích ly. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1 cho thấy, khi sử dụng đơn lẻ các loại enzyme pectinase và cellulase, hiệu quả trích ly đã tăng lên so với mẫu không sử dụng enzyme đặc biệt là việc tách khối dịch quả khỏi hạt đã dễ dàng hơn, tuy nhiên, phần hạt tách ra vẫn còn sợi nhầy bám nên hiệu suất trích ly chưa cao, độ nhớt có sự thay đổi đáng kể so với mẫu đối chứng không được xử lý enzyme. Khi kết hợp sử dụng cả 2 loại enzyme ở các khoảng nhiệt độ xử lý

khảo sát cho thấy, hiệu quả xử lý đã được tăng lên rõ rệt thể hiện qua độ nhớt giảm, chất khô hoà tan và pH tăng nhẹ, đặc biệt là hiệu suất trích ly được cải thiện do hạt được tách hoàn toàn khỏi khối dịch quả dễ dàng. Trong các nhiệt độ xử lý cho thấy, ở 40°C hiệu suất trích ly cao nhất đạt 69%, trong khi ở nhiệt độ còn lại có sự giảm rõ rệt về hiệu suất trích ly, điều này hoàn toàn phù hợp với khoảng nhiệt độ hoạt động tối ưu của 2

enzyme mà nhà sản xuất công bố là 25 - 40°C và 40 - 50°C. Kết quả nghiên cứu cho thấy, thời gian xử lý enzyme thích hợp là 90 phút vì khi tăng thêm hiệu quả xử lý không tăng đáng kể. Như vậy, việc kết hợp 2 loại enzyme Pectinex Ultra SP-L và Viscozyme Cassava C với điều kiện xử lý ở 40°C trong 90 phút rất phù hợp cho trích ly dịch quả chanh dây và việc tách hoàn toàn dịch khỏi hạt được thực hiện dễ dàng.

Bảng 1. Ảnh hưởng của loại enzyme và nhiệt độ, thời gian xử lý đến quá trình trích ly dịch quả chanh dây

Mẫu	Thời gian xử lý (phút)			
	30	60	90	120
CT1				
Chất khô hòa tan (°Bx)	16,1 ± 0,5	16,1 ± 0,2	16,1 ± 0,3	16,1 ± 0,7
pH	2,48 ± 0,0	2,48 ± 0,1	2,48 ± 0,1	2,48 ± 0,0
Độ nhớt (cp)	105 ± 1,3	105 ± 1,1	105 ± 2,6	105 ± 1,1
Hiệu suất trích ly (%)	28,0 ± 0,5	28,0 ± 0,5	28,0 ± 0,8	28,0 ± 0,6
CT2				
Chất khô hòa tan (°Bx)	16,9 ± 0,7	17,1 ± 0,4	17,9 ± 0,4	17,9 ± 0,2
pH	2,48 ± 0,1	2,52 ± 0,1	2,53 ± 0,1	2,53 ± 0,0
Độ nhớt (cp)	87,5 ± 1,7	55,0 ± 1,3	35,0 ± 0,8	34,5 ± 0,8
Hiệu suất trích ly (%)	45,2 ± 1,0	49,8 ± 1,1	54,1 ± 0,6	54,2 ± 1,3
CT3				
Chất khô hòa tan (°Bx)	16,5 ± 0,2	16,8 ± 0,6	17,7 ± 0,8	17,8 ± 0,5
pH	2,57 ± 0,1	2,59 ± 0,0	2,60 ± 0,1	2,59 ± 0,1
Độ nhớt (cp)	97,5 ± 1,8	60,0 ± 1,3	44,5 ± 0,5	42,5 ± 0,5
Hiệu suất trích ly (%)	28,0 ± 0,6	35,1 ± 1,1	40,5 ± 0,6	40,6 ± 0,6
CT4				
Chất khô hòa tan (°Bx)	16,7 ± 0,1	17,1 ± 0,4	17,9 ± 0,6	18,0 ± 0,2
pH	2,50 ± 0,1	2,53 ± 0,0	2,53 ± 0,1	2,55 ± 0,0
Độ nhớt (cp)	85,0 ± 1,9	60,0 ± 1,1	32,5 ± 1,0	30 ± 0,6
Hiệu suất trích ly (%)	50,1 ± 1,0	55,0 ± 1,1	60,0 ± 0,8	60,1 ± 1,2
CT5				
Chất khô hòa tan (°Bx)	16,8 ± 0,5	17,5 ± 0,2	18,2 ± 0,3	18,3 ± 0,6
pH	2,49 ± 0,0	2,52 ± 0,1	2,53 ± 0,1	2,55 ± 0,0
Độ nhớt (cp)	77,5 ± 1,8	52,5 ± 0,3	25,0 ± 0,6	25,0 ± 0,8
Hiệu suất trích ly (%)	55,2 ± 1,1	62,5 ± 2,4	69,0 ± 0,9	69,0 ± 1,7
CT6				

Mẫu	Thời gian xử lý (phút)			
	30	60	90	120
Chất khô hòa tan (°Bx)	16,8 ± 0,2	17,4 ± 0,1	18,2 ± 0,7	18,2 ± 0,3
pH	2,50 ± 0,1	2,51 ± 0,1	2,53 ± 0,0	2,55 ± 0,1
Độ nhớt (cp)	80,0 ± 1,2	57,5 ± 2,3	27,5 ± 0,5	27,0 ± 0,6
Hiệu suất trích ly (%)	52,0 ± 1,1	56,8 ± 1,0	62,5 ± 1,0	62,5 ± 2,5
CT7				
Chất khô hòa tan (°Bx)	16,7 ± 0,3	17,0 ± 0,2	18,0 ± 0,4	18,1 ± 0,4
pH	2,49 ± 0,1	2,50 ± 0,1	2,52 ± 0,1	2,52 ± 0,1
Độ nhớt (cp)	82,5 ± 2,1	60,0 ± 0,6	30,0 ± 0,7	30,0 ± 0,7
Hiệu suất trích ly (%)	50,0 ± 1,1	54,6 ± 1,0	59,1 ± 0,5	59,0 ± 1,2

3.1.2. Nghiên cứu lựa chọn nồng độ enzyme Pectinex Ultra SP-L và Viscozyme Cassava C

Thí nghiệm được thực hiện theo các công thức thay đổi nồng độ enzyme như mục 2.2.1 với

thời gian xử lý là 90 phút ở 40°C. Kết quả được đánh giá thông qua các chỉ tiêu chất khô hoà tan, pH, độ nhớt, hiệu suất trích ly và thể hiện trong bảng 2 và 3.

Bảng 2. Nghiên cứu lựa chọn nồng độ enzyme Pectinex Ultra SP-L

Mẫu	Chất khô hòa tan (°Bx)	pH	Độ nhớt (cp)	Hiệu suất trích ly (%)
CT8	17,6 ± 0,77	2,50 ± 0,06	28,0 ± 0,6	63,0 ± 2,1
CT9	18,3 ± 0,37	2,52 ± 0,06	25,5 ± 0,3	68,5 ± 3,1
CT10	18,3 ± 0,21	2,53 ± 0,06	25,0 ± 0,6	68,5 ± 2,0
CT11	18,4 ± 0,36	2,53 ± 0,05	25,0 ± 0,4	69,0 ± 2,8

Bảng 2 cho thấy, khi tăng nồng độ enzyme Pectinex Ultra SP-L thì hàm lượng chất khô và hiệu suất thu hồi tăng, nhưng khi tăng đến nồng độ lên trên 0,02% thì hiệu suất thu hồi dịch quả không thay đổi, điều này cho thấy, lượng enzyme sử dụng dư thừa gây lãng phí mà không mang lại hiệu quả. Do vậy, lựa chọn nồng độ enzyme

Pectinex Ultra SP-L là 0,02% khi kết hợp với Viscozyme Cassava C.

Tiếp tục lựa chọn tỷ lệ sử dụng enzyme Viscozyme Cassava C theo bố trí các công thức từ CT12 - CT15 trong đó, sử dụng Pectinex Ultra SP-L 0,02%.

Bảng 3. Nghiên cứu lựa chọn nồng độ enzyme Viscozyme Cassava C

Mẫu	Chất khô hòa tan (°Bx)	pH	Độ nhớt (cp)	Hiệu suất trích ly (%)
CT12	17,8 ± 0,84	2,49 ± 0,03	35,0 ± 0,6	60,2 ± 1,4
CT13	18,0 ± 0,56	2,51 ± 0,06	26,5 ± 0,8	64,7 ± 1,3
CT14	18,3 ± 0,34	2,54 ± 0,03	25,0 ± 0,6	69,0 ± 0,9
CT15	18,2 ± 0,22	2,53 ± 0,05	25,0 ± 1,1	68,7 ± 1,5

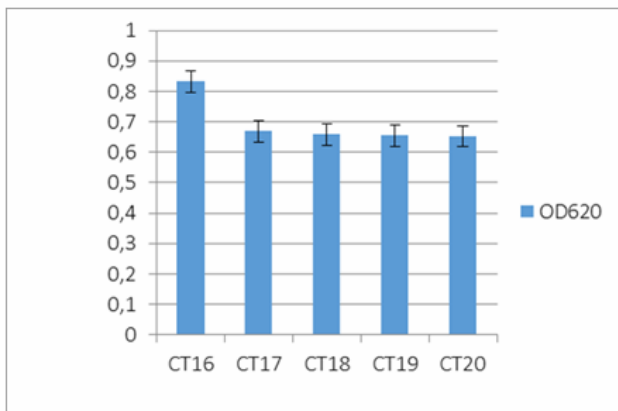
Bảng 3 cho thấy, khi sử dụng Viscozyme Cassava C với nồng độ 0,3% thì hiệu suất thu hồi

dịch quả cao nhất, nếu tăng nồng độ enzyme lên 0,4% thì hiệu suất thu hồi không tăng thêm. Như

vậy, sử dụng enzyme Pectinex Ultra SP-L 0,02% kết hợp với Viscozyme Cassava C với nồng độ 0,3% phù hợp cho quá trình trích ly dịch chanh dây.

3.1.3. Nghiên cứu sử dụng enzyme để làm trong dịch quả

Dịch quả sau khi trích ly nhờ xúc tác của 2 enzyme tuy độ nhớt đã giảm nhưng vẫn đục, khó lọc trong nên nếu dùng để lên men thì sản phẩm nước chanh dây độ cồn thấp, sẽ khó lọc tách bã nấm men và ổn định được độ bền keo theo thời gian. Để tăng cường độ trong cho dịch quả chanh dây, cần sử dụng Pectinex Ultra Clear như các công thức sau: CT16, CT17, CT18, CT19, CT20. Khoảng nhiệt độ tối ưu của enzyme này từ 40 - 50°C và do nước quả nhạy cảm với nhiệt, dễ có mùi nấu chín kém tươi nên nhiệt độ 40°C và thời gian 90 phút được lựa chọn để thuận lợi cho việc thực hiện phản ứng enzyme đồng thời với 2 enzyme trích ly trên. Độ trong của dịch nước quả được thể hiện qua giá trị OD₆₂₀, kết quả chỉ ra trong hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme Pectinex Ultra Clear đến độ trong dịch quả chanh dây

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme Hyderase đến màu sắc của dịch chanh dây theo thời gian bảo quản

Mẫu	OD ₄₂₀ Sau xử lý enzyme	OD ₄₂₀ Sau 1 tháng	OD ₄₂₀ Sau 3 tháng	OD ₄₂₀ Sau 6 tháng
CT21	0,675 ± 0,005	0,705 ± 0,028	0,882 ± 0,022	0,936 ± 0,013
CT22	0,648 ± 0,017	0,653 ± 0,017	0,679 ± 0,023	0,702 ± 0,026
CT23	0,626 ± 0,012	0,627 ± 0,012	0,655 ± 0,018	0,683 ± 0,014
CT24	0,602 ± 0,012	0,605 ± 0,010	0,614 ± 0,013	0,629 ± 0,005
CT25	0,598 ± 0,016	0,605 ± 0,014	0,617 ± 0,017	0,631 ± 0,012
CT26	0,596 ± 0,004	0,602 ± 0,009	0,620 ± 0,019	0,633 ± 0,010

Nhìn chung, việc xử lý với enzyme Pectinex Ultra Clear đã mang lại sự cải thiện đáng kể về độ trong của dịch chanh dây, theo tỷ lệ enzyme tăng dần thì giá trị OD₆₂₀ giảm. Tuy nhiên, ở CT17 với nồng độ enzyme sử dụng là 0,2% thì hiệu quả làm trong đạt gần tối đa vì tăng thêm enzyme cũng không tăng độ trong nên xét về hiệu quả kinh tế thì sử dụng tỷ lệ enzyme cao hơn là gây lãng phí.

3.1.4. Nghiên cứu sử dụng enzyme chống biến màu dịch quả

Trong quá trình xử lý chanh dây và quá trình tồn trữ nguyên liệu dịch quả dùng cho chế biến thường xảy ra hiện tượng oxy hóa ảnh hưởng lớn đến màu sắc dịch quả nên nghiên cứu sử dụng glucose oxidase Hyderase nhằm hạn chế hiện tượng biến màu do quá trình oxy hóa. Enzyme này xúc tác phản ứng oxy hóa glucose thành gluconic axit và hydrogen peroxide, đồng thời, tiêu thụ oxy hòa tan - yếu tố chính gây suy giảm màu sắc thông qua quá trình oxy hóa các hợp chất phenolic và pigment tự nhiên. Việc giảm nồng độ oxy giúp ổn định màu sắc sản phẩm, hạn chế sự hoạt động của enzyme polyphenol oxidase (PPO), đồng thời, cải thiện độ bền cảm quan và kéo dài thời gian bảo quản. Nồng độ của enzyme glucose oxidase ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả chống oxy hóa và khả năng ổn định màu sắc trong nước chanh dây lên men nên lựa chọn nồng độ phù hợp là yếu tố quan trọng, điều đó được thể hiện trong bố trí thí nghiệm theo CT21 - CT24 với thời gian xử lý là 90 phút ở nhiệt độ 40°C. Giá trị OD₄₂₀ thể hiện mức độ bị nâu hoá dịch chanh dây theo thời gian bảo quản, kết quả chỉ ra trong bảng 4.

Nghiên cứu cho thấy, việc xử lý dịch quả với enzyme glucose oxidase đã mang lại những tác động rất tích cực đều màu sắc của dịch quả theo thời gian bảo quản. Đối với mẫu CT21 là mẫu đối chứng thì theo thời gian màu sắc dịch quả thể hiện qua giá trị OD₄₂₀ đã tăng đáng kể thể hiện mẫu đã bị nâu hoá theo thời gian bảo quản. Trong đó, các mẫu có xử lý ở nồng độ thấp nhất là 0,1% cho thấy tác dụng ổn định màu sắc rất rõ rệt. Nồng độ enzyme Hyderase 0,3% cho thấy, dịch quả sau xử lý đã đạt mức độ ổn định màu sắc cao nhất theo thời gian bảo quản, ở các nồng độ enzyme cao thì hiệu quả cũng không tăng thêm. Do đó, nồng độ enzyme glucose oxidase phù hợp nhất trong điều kiện thử nghiệm là 0,3%, giúp hạn chế biến màu hiệu quả theo thời gian.

Như vậy, trong nghiên cứu này, nhiệt độ 40°C là thích hợp cho hoạt động của tất cả các loại enzyme để hạn chế thời gian xử lý nhiệt kéo dài ảnh hưởng đến chất lượng cảm quan và dinh dưỡng của dịch quả, có thể kết hợp xử lý dịch

chanh dây đồng thời với các tỷ lệ sử dụng đã được lựa chọn.

3.2. Nghiên cứu điều kiện lên men đồ uống chanh dây có độ cồn thấp

3.2.1. Nghiên cứu tỷ lệ dịch cốt chanh dây trong môi trường lên men đồ uống chanh dây có độ cồn thấp

Kết quả phân tích dịch chanh dây thu được sau trích ly dịch quả cho thấy, pH của chanh dây trong khoảng 2,4 - 2,8 với pH thấp này sẽ ảnh hưởng nhất định đến nấm men *Saccharomyces cerevisiae* trong quá trình lên men, nên để đảm bảo quá trình lên men dịch chanh dây được thực hiện tốt nhất nghiên cứu tiến hành pha loãng dịch chanh dây để đưa về pH tối ưu cho nấm men trong khoảng pH 4 - 5 nhưng vẫn đảm bảo tỷ lệ dịch cốt chanh dây là cao nhất. Kết thúc quá trình lên men xác định độ cồn, đường sót, đánh giá cảm quan. Kết quả được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ cốt dịch quả chanh dây đến quá trình lên men

Tỷ lệ dịch cốt (%)	Độ cồn (% Vol.)	Đường sót (%)	pH	Cảm quan
40	4,5 ± 0,04	6,8 ± 0,21	4,7 ± 0,03	Vị chanh dây chưa đặc trưng, hương thơm yếu
50	5,2 ± 0,06	5,7 ± 0,08	4,4 ± 0,17	Vị chanh dây khá rõ, hương thơm nhẹ
60	5,1 ± 0,16	5,9 ± 0,08	4,1 ± 0,07	Vị chanh dây rất đặc trưng, hương thơm mạnh
70	3,6 ± 0,05	8,1 ± 0,19	3,4 ± 0,05	Hương vị chanh dây rất đặc trưng, mùi thơm mạnh

Bảng 5 cho thấy, khi tỷ lệ dịch quả thấp thì quá trình lên men cũng bị ảnh hưởng do thành phần dinh dưỡng như các loại vitamin, khoáng chất có trong dịch lên men thấp sẽ ảnh hưởng đến hoạt động của nấm men. Tuy nhiên, khi tỷ lệ dịch quả từ 70% cũng gây những ảnh hưởng nhất định do pH của dịch lên men thấp nên chưa phải khoảng pH tối ưu cho nấm men hoạt động. Hai tỷ lệ dịch quả 50 và 60% quá trình lên men diễn ra tương đương nhau cho thấy, đây là tỷ lệ dịch quả phù hợp cho quá trình lên men diễn ra bình thường. Tuy nhiên, với mong muốn tạo được sản

phẩm nước chanh dây độ cồn thấp có giá trị cảm quan cao và hương vị đặc trưng cho chanh dây, nghiên cứu lựa chọn mẫu có tỷ lệ dịch cốt chanh dây cao hơn, chính vì vậy, tỷ lệ dịch cốt chanh dây được sử dụng trong lên men là 60%.

3.2.2. Nghiên cứu lựa chọn hàm lượng đường ban đầu thích hợp cho đồ uống chanh dây lên men có độ cồn thấp

Độ đường ban đầu là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men. Tuy nhiên, khi sử dụng tỷ lệ dịch cốt chanh dây 60% và bổ sung thêm nước thì cần thiết phải bổ sung thêm đường

saccharose để thu được nồng độ đường ban đầu thích hợp cho quá trình lên men và sản phẩm tạo ra phù hợp với định hướng chất lượng sản phẩm. Bố trí thí nghiệm theo mục 2.2.1, kết quả được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của nồng độ đường ban đầu đến quá trình lên men

Ngày	12%		14%		16%	
	Độ cồn (% Vol.)	Đường tổng (%)	Độ cồn (% Vol.)	Đường tổng (%)	Độ cồn (% Vol.)	Đường tổng (%)
1	1,0 ± 0,03	10,0 ± 0,1	1,5 ± 0,03	12,0 ± 0,1	2,1 ± 0,04	13,2 ± 0,4
2	2,1 ± 0,06	8,6 ± 0,23	3,7 ± 0,07	9,5 ± 0,12	3,9 ± 0,09	10,8 ± 0,1
3	3,1 ± 0,08	6,8 ± 0,15	4,5 ± 0,05	7,9 ± 0,16	4,8 ± 0,01	8,3 ± 0,7
4	3,8 ± 0,03	5,6 ± 0,26	4,9 ± 0,09	6,5 ± 0,17	5,7 ± 0,10	7,2 ± 0,18
5	3,9 ± 0,09	5,4 ± 0,09	5,1 ± 0,12	5,8 ± 0,15	6,2 ± 0,07	6,0 ± 0,18

Bảng 6 cho thấy, khi thay đổi nồng độ đường ban đầu của môi trường lên men hầu như không ảnh hưởng đến quá trình lên men rượu vì đây là các nồng độ đường nằm trong khoảng phát triển tốt của nấm men. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ đường ban đầu lên 16% thì nồng độ rượu có trong sản phẩm sẽ vượt trên 6% Vol. Với định hướng sản phẩm đồ uống chanh dây có độ cồn thấp có độ rượu dưới 5% Vol. nên nồng độ đường ban đầu 14% được lựa chọn.

3.2.3. Nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ và thời gian lên men thích hợp cho nước chanh dây có độ cồn thấp

Nhiệt độ là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình lên men bao gồm thời gian lên men và chất lượng dịch lên men. Đối với sản phẩm đồ uống lên men thì nhiệt độ lên men tương đối thấp sẽ cho chất lượng cảm quan tốt hơn khi lên men ở nhiệt độ cao, tuy nhiên, nhiệt độ thấp quá sẽ làm quá trình lên men bị kéo dài mang lại nhiều nguy cơ nhiễm tạp các vi sinh vật khác. Đối với chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* SLS thì nhiệt độ hoạt động tối ưu là khoảng 25 - 30°C, tuy nhiên, đối với sản phẩm đồ uống lên men độ cồn thấp, nghiên cứu thực hiện lên men tại nhiệt độ thấp hơn để đảm bảo chất lượng cảm quan dịch lên men là tốt nhất. Kết quả được thể hiện ở bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình lên men

Thời gian lên men (ngày)	20°C		22°C		24°C	
	Độ cồn (% Vol.)	Đường tổng (%)	Độ cồn (% Vol.)	Đường tổng (%)	Độ cồn (% Vol.)	Đường tổng (%)
1	0,8 ± 0,01	12,8 ± 0,3	1,5 ± 0,04	12,0 ± 0,3	2,1 ± 0,05	10,7 ± 0,3
2	1,7 ± 0,05	11,5 ± 0,3	3,7 ± 0,04	9,5 ± 0,20	3,9 ± 0,00	9,4 ± 0,04
3	2,8 ± 0,06	10,2 ± 0,3	4,5 ± 0,12	7,2 ± 0,14	4,8 ± 0,07	6,7 ± 0,10
4	3,6 ± 0,06	9,7 ± 0,28	4,9 ± 0,10	6,5 ± 0,07	5,2 ± 0,08	5,7 ± 0,15
5	4,1 ± 0,06	8,0 ± 0,37	5,1 ± 0,11	5,9 ± 0,06	5,3 ± 0,15	5,2 ± 0,12
6	4,4 ± 0,12	7,3 ± 0,21	5,2 ± 0,13	5,6 ± 0,10	5,3 ± 0,11	5,2 ± 0,12

Bảng 7 cho thấy, nhiệt độ lên men ảnh hưởng tới thời gian lên men. Nhiệt độ 24°C thì quá trình lên men diễn ra nhanh nhất chỉ sau 4 ngày quá trình lên men kết thúc. Tuy nhiên, khi cảm quan chất lượng dịch lên men có hương thơm kém và vị sốc. Khi lên men ở nhiệt độ thấp 20°C kết hợp pH môi trường dịch lên men chanh dây chỉ khoảng 4 nên quá trình lên men bị kéo dài gây tổn năng lượng và nguy cơ tạp nhiễm cao. Tại nhiệt độ lên men 22°C thì quá trình lên men diễn ra trong khoảng 5 ngày, chất lượng cảm quan dịch lên men có vị êm hài hoà, hương thơm tốt nên được lựa chọn là nhiệt độ phù hợp cho quá trình lên men.

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được quy trình công nghệ lên men nước chanh dây có độ cồn thấp từ quả chanh dây thu hái tại tỉnh Đắk Nông gồm công đoạn xử lý thu dịch quả và thực hiện quá trình lên men với các kết quả như sau:

Để trích ly, làm trong và chống biến màu dịch chanh dây đã kết hợp xử lý đồng thời 4 loại enzyme với tỷ lệ tương ứng: Pectinex Ultra SP-L 0,02%, Viscozyme Cassava C 0,3%, Pectinex Ultra Clear 0,2% và Hyderase 0,3% được thực hiện tại 40°C trong thời gian 90 phút không ảnh hưởng đến chất lượng cảm quan của dịch quả. Sau xử lý enzyme có thể dễ dàng tách hạt hoàn toàn, hiệu suất trích ly đạt 69%, dịch quả có độ trong ổn định và giữ được màu sắc không thay đổi sau 6 tháng theo dõi.

Đối với quá trình lên men, môi trường lên men có tỷ lệ dịch cốt chanh dây là 60%, hàm lượng đường ban đầu là 14%, nhiệt độ lên men là 22°C thực hiện lên men trong 5 ngày tạo được dịch lên men có nồng độ cồn 5,1% Vol. và cảm quan sản phẩm sau lên men có hương thơm mạnh đặc trưng của chanh dây, vị hài hoà êm dịu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sở Nông nghiệp và PTNT tỉnh Đắk Nông (2020). *Báo cáo tình hình sản xuất, tiêu thụ chanh dây*.
2. Mohamed Fawzy Ramadan J. T. M. (2007). Impact of enzymatic treatment on chemical composition, physicochemical properties and radical scavenging activity of goldenberry

(*Physalis peruviana* L.) juice. *J. Sci. Food Agric.*, 87: 452 - 460, doi: 10.1002/jsfa.2728.

3. Tapre A. R. and Jain R. K. (2014). Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *Int. Food Res. J.*, 21(2): 447 - 453.

4. Trần Thị Châu (2016). Ứng dụng công nghệ enzyme trong chế biến một số sản phẩm từ quả dâu tằm và chanh leo. *Báo cáo tổng hợp đề tài cấp Bộ Công thương*.

5. Nguyễn Thị Thu Sang, Nguyễn Phạm Khải Tú (2007). Nghiên cứu các phương pháp thu nhận hiệu quả dịch quả trái chanh dây tím *Passiflora edulis*. *Báo cáo Hội nghị khoa học lần thứ 1 - Tiểu ban CNSH*: 194 - 199.

6. Châu Trần Diễm Ái, Nguyễn Nhật Minh Phương, Chế Văn Hoàng, Lý Nguyễn Bình (2011). Tác động enzyme pectinase đến khả năng trích ly dịch quả và các điều kiện lên men đến chất lượng rượu vang xoài sau thời gian lên men chính. *Tạp chí Khoa học*, Đại học Cần Thơ, 20a: 127 - 136.

7. Hoàng Thị Lệ Hằng, Nguyễn Đức Hạnh (2019). Nghiên cứu sử dụng enzyme glucose oxidase trong chế biến nước ổi probiotic. *Tạp chí Thử nghiệm ngày nay*, 22: 6 - 11.

8. Trần Thị Ngọc Mai (2020). Nghiên cứu chế biến nước giải khát lên men từ quả sơ-ri. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 19(2): 100 - 105.

9. Nguyễn Đức Hạnh, Hoàng Thị Lệ Hằng, Hoàng Thị Tuyết Mai, Nguyễn Văn Lợi (2016). Nghiên cứu sử dụng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* trong chế biến nước quả táo mèo (*Docynia indica*) lên men có độ cồn thấp. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 8(69): 89 - 93.

10. Huỳnh Phan Phương Trang (2018). Thử nghiệm nước chanh dây độ cồn thấp bổ sung probiotic từ vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* LY-78. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 16(1): 56 - 66.

11. Nguyễn Thị Kiều Diễm, Lê Hoàng Thanh, Châu Văn Đan, Trần Bạch Long, Trần Chí Nhân (2024). Tối ưu hóa điều kiện lên men cider từ

chanh dây (*Passiflora edulis* Sims) bằng mô hình nghệ, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, 7, 5: 119
phức hợp trung tâm. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* - 130.

STUDY ON THE FERMENTATION PROCESS FOR PRODUCING LOW - ALCOHOL PASSION FRUIT BEVERAGE FROM PASSION FRUIT HARVESTED IN DAK NONG PROVINCE

Dang Hong Anh¹, Pham Hoai Thu¹,

Pham Thi Thu¹, Tran Bao Tram², Vu Xuan Tao²

¹Food Industries Research Institute

²National Center for Technological Progress

Abstract

Dak Nong province has favorable soil conditions for the cultivation of passion fruit. The passion fruit grown in Dak Nong province has a mildly sweet and slightly tart flavor, making it suitable for processing into various beverages, including low - alcohol passion fruit drinks. In the production process of low - alcohol passion fruit juice, the pre - fermentation treatment of the fruit can significantly affect the recovery efficiency, the composition of soluble compounds in the juice and the stability of the product's clarity and colour. This study was conducted to select appropriate enzyme types, concentrations, temperature thresholds, and treatment durations for optimizing juice recovery, clarification and prevention of discoloration, as well as to determine the optimal conditions for fermenting passion fruit juice. The combination of enzymes used included: Pectinex Ultra SP-L pectinase at 0.02% and Viscozyme Cassava C cellulase at 0.3% to support seed separation and increase juice extraction efficiency; Pectinex Ultra Clear pectinase at 0.2% for juice clarification and Hyderase gluco oxidase at 0.3% to prevent juice discoloration. The treatment duration was 90 minutes at a selected temperature of 40°C to limit undesirable sensory changes in the juice. To ensure an appropriate pH for fermentation, the passion fruit juice was diluted with water at a 60% ratio and sucrose was added to obtain an initial sugar concentration of 14%. Fermentation was carried out using a starter inoculum of *Saccharomyces cerevisiae* SLS at an initial density of 10⁶ CFU/mL, at 22°C for 5 days. The resulting fermented juice had an alcohol content of 5.1% Vol. and exhibited a strong characteristic passion fruit aroma with a pleasantly balanced flavour profile.

Keywords: *Passion fruit, fermentation, low alcohol, enzyme, pectinase, cellulase, glucose oxidase.*

Ngày nhận bài: 20/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 8/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 25/7/2025

Ngày duyệt đăng: 6/8/2025

NGHIÊN CỨU TẠO CHẾ PHẨM ENZYME TỪ NẤM MỐC *Aspergillus oryzae* ỨNG DỤNG TRONG THỦY PHÂN DỊCH ĐU ĐỦ LÊN MEN

Nguyễn Thị Trang^{1,*}, Nguyễn Thị Minh Khanh¹, Lê Hồng Quang²

¹ Trung tâm Hóa Sinh thực phẩm, Viện Công nghiệp Thực phẩm

² Công ty Cổ phần sữa Ba Vi

*Email: trangvan@firi.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu tập trung tạo chế phẩm enzyme từ nấm mốc *Aspergillus oryzae* ứng dụng trong quá trình thủy phân dịch đu đủ lên men. Mục tiêu chính là khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh enzyme protease của chủng nấm mốc *A. oryzae* CNTP 5043 trong môi trường cơ chất đu đủ, nhằm tối ưu hóa các điều kiện môi trường, cơ chất để tạo ra chế phẩm enzyme có hoạt tính cao. Các yếu tố khảo sát bao gồm: Tỷ lệ bột mỳ bổ sung, độ ẩm môi trường, thời gian nuôi cấy và nhiệt độ sấy chế phẩm nấm mốc. Ngoài ra, nghiên cứu đã đánh giá ảnh hưởng của tỷ lệ chế phẩm enzyme thô và các điều kiện cho quá trình thủy phân như pH, nhiệt độ và thời gian đến hiệu quả thủy phân dịch đu đủ sau lên men. Kết quả cho thấy, chế phẩm enzyme thô có hoạt tính protease cao nhất khi bổ sung 20% bột mỳ, điều kiện độ ẩm môi trường nuôi cấy là 60%, thời gian nuôi cấy là 48 giờ và nhiệt độ sấy chế phẩm là 45°C. Trong quá trình thủy phân, tỷ lệ chế phẩm nấm mốc 3% và nhiệt độ 50°C với pH 5,5 đạt hiệu quả tối ưu, mang lại hàm lượng nitơ amin và polyphenol cao trong dịch đu đủ lên men sau thủy phân. Kết quả có ý nghĩa trong việc tạo ra sản phẩm đu đủ lên men có hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính sinh học cao ứng dụng trong tạo sản phẩm chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

Từ khóa: Đu đủ lên men, *koji*, *Aspergillus oryzae*, thủy phân.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đu đủ (*Carica papaya* L.) được dùng trong rất nhiều bài thuốc y học cổ truyền nhờ thành phần có chứa nhiều hợp chất chống oxy hóa, kháng viêm... Nghiên cứu cho thấy, đu đủ được lên men bởi chủng *S. cerevisiae* và bổ sung chế phẩm *A. oryzae* đã làm thay đổi đáng kể thành phần hóa học trong quả. Cụ thể, tỉ lệ giữa carbohydrat và protein trong quả trước lên men đã tăng gấp 3 lần sau lên men. Đồng thời, xuất hiện thêm nhiều lớp oligosaccharit khối lượng phân tử thấp, monosaccharit và các cấu trúc tương tự như β 1-3 D-glucan... những chất có hoạt tính sinh học tiềm năng. Đặc biệt, *A. oryzae* là loài nấm mốc nổi bật trong sản xuất enzyme nhờ khả năng sinh tổng hợp các enzyme quan trọng như: Amylase, protease, invertase... Các enzyme này kết hợp với hệ enzyme nội tại của đu đủ xanh như papain,

tham gia phân cắt các hợp chất cao phân tử như protein và polysaccharide thành các phân tử nhỏ hơn, dễ hấp thu hơn. Sản phẩm sau lên men mặc dù không còn chứa papain nhưng lại giàu axit amin thiết yếu, polyphenol làm tăng hoạt tính chống oxy của sản phẩm cuối cùng [1, 2].

Nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả tạo chế phẩm enzyme từ *A. oryzae*, trong đó, đáng chú ý là tỷ lệ bổ sung bột mì, độ ẩm cơ chất, thời gian và điều kiện nhiệt độ sấy [3, 4, 5]. Kết quả nghiên cứu lên men đu đủ bằng nấm men *S. cerevisiae* CNTP 4087 trong sưu tập giống của Viện Công nghiệp Thực phẩm bước đầu thu được dịch lên men giàu polyphenol. Tuy nhiên, sản phẩm sau lên men vẫn chứa hàm lượng đáng kể các hợp chất cao phân tử như polysaccharide, protein từ cơ chất đu đủ được làm giàu bởi sinh khối nấm men... Chính vì vậy, nghiên cứu tạo chế phẩm enzyme từ

nấm mốc *Aspergillus oryzae* ứng dụng trong thủy phân dịch đu đủ lên men là cần thiết nhằm tạo sản phẩm đu đủ lên men giàu các hợp chất có hoạt tính sinh học.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp tạo chế phẩm nấm mốc

Lựa chọn thành phần môi trường nuôi chế phẩm nấm mốc: Nguyên liệu đu đủ giống Đài Loan loại quả chín mủ vệt được rửa sạch, bỏ hạt và bào dạng sợi với kích thước từ 5 - 7 cm x 1 - 2 mm. Nguyên liệu đu đủ được mang đi sấy khi đạt độ ẩm khoảng 70 - 75%. Sau đó, bột mỳ được trộn với nguyên liệu theo tỷ lệ lần lượt là: 5; 10; 15; 20; 25; 30%. Khối nguyên liệu sau khi trộn kiểm soát độ ẩm và điều chỉnh về khoảng 55%. Nguyên liệu được đựng trong túi nylon kín chất liệu polypropylene để đảm bảo không làm ướt nguyên liệu sau khi hấp. Quá trình hấp được thực hiện ở 110°C trong thời gian 10 phút. Nguyên liệu sau hấp được để nguội rồi bổ sung thêm 1% chủng giống nấm mốc đã được chuẩn bị sẵn, nuôi cấy ở 28 - 30°C, trong thời gian 48 giờ.

Lựa chọn độ ẩm cho môi trường nuôi chế phẩm nấm mốc: Nguyên liệu được sơ chế và chuẩn bị như trên, bột mỳ được bổ sung là 20% và các mẫu nguyên liệu được chia ra các bình tam giác khác nhau và điều chỉnh độ ẩm thay đổi ở các mức: 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70%. Các mẫu được mang đi hấp ở 110°C trong thời gian 10 phút, sau khi để nguội bổ sung thêm 1% chủng giống nấm mốc đã được chuẩn bị sẵn và nuôi cấy ở 28 - 30°C, trong thời gian 48 giờ.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy nấm mốc: Nguyên liệu được sơ chế và chuẩn bị như trên, bột mỳ được bổ sung là 20%, điều chỉnh độ ẩm về 60% và được đựng trong túi nylon kín chất liệu polypropylene để đảm bảo không làm ướt nguyên liệu sau khi hấp. Quá trình hấp được thực hiện ở 110°C trong thời gian 10 phút, để nguội rồi bổ sung thêm 1% chủng giống nấm mốc đã được chuẩn bị sẵn và nuôi cấy ở 28 - 30°C, mẫu được nuôi cấy từ 0 - 120 giờ. Sau mỗi 12 giờ mẫu nấm mốc được mang đi đánh giá hoạt độ protease.

Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian sấy nấm mốc: Chế phẩm nấm mốc sau khi thu nhận được

từ quá trình nuôi cấy, được mang đi sấy ở các mức nhiệt độ khác nhau: 40; 45; 50; 55; 60°C với thời gian sấy là 6 giờ.

2.2. Lựa chọn điều kiện phù hợp cho quá trình thủy phân dịch đu đủ sau lên men

Ảnh hưởng của tỷ lệ chế phẩm nấm mốc cho quá trình thủy phân: Dịch đu đủ sau khi lên men được gia nhiệt làm bất hoạt nấm men. Sau đó, bổ sung tỷ lệ chế phẩm nấm mốc đã chuẩn bị trên với các tỷ lệ khác nhau: 1; 2; 3; 4% theo khối lượng. Dịch được giữ duy trì ở nhiệt độ 50°C và tiến hành thủy phân trong thời gian 48 giờ, sau mỗi 8 giờ các mẫu thủy phân lại được kiểm tra lấy mẫu phân tích 1 lần.

Lựa chọn nhiệt độ thủy phân phù hợp cho quá trình thủy phân: Dịch sau đu đủ khi lên men được gia nhiệt làm bất hoạt nấm men. Sau đó, bổ sung tỷ lệ chế phẩm nấm mốc là 3%, các mẫu được thủy phân ở các mức nhiệt độ khác nhau: 40; 45; 50; 55; 60°C và tiến hành thủy phân trong thời gian 32 giờ.

Lựa chọn giá trị pH dịch thủy phân: Dịch sau đu đủ sau khi lên men được gia nhiệt làm bất hoạt nấm men. Sau đó, bổ sung tỷ lệ chế phẩm nấm mốc là 3%, các mẫu được thủy phân ở 50°C và tiến hành thủy phân ở các giá trị pH khác nhau: 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5. Giá trị pH được điều chỉnh với NaOH 1N và HCl 1N.

2.3. Xác định hoạt tính protease của các chủng nấm mốc

Hoạt độ enzyme được xác định dựa trên khả năng thủy phân casein natri bởi enzyme có trong chế phẩm nghiên cứu. Hoạt độ protease được xác định dựa theo phương pháp Anson (1938) [6], Folin và Ciocattau (1929) [7] với cơ chất là casein.

2.4. Phương pháp xác định polyphenol tổng số

Hàm lượng polyphenol tổng được xác định dựa trên phương pháp Folin - Ciocattau theo TCVN 9745-1:2013 [8] có hiệu chỉnh bằng cách sử dụng gallic axit làm hợp chất polyphenol chuẩn, dung môi là methanol. Sự hấp thụ của dung dịch màu xanh được ghi nhận thông qua kết quả đo OD ở bước sóng $\lambda = 765$ nm.

2.5. Xác định hàm lượng nitơ amin tự do bằng phương pháp chuẩn độ N-formol

Phương pháp chuẩn độ N-formol được sử dụng để xác định hàm lượng nitơ amin tự do (amino nitrogen) trong các mẫu dịch quả, dịch lên men hoặc các sản phẩm thực phẩm dạng lỏng như rượu vang. Khi thêm formaldehyde vào mẫu, các nhóm amin tự do phản ứng tạo thành dẫn xuất methylene, làm mất tính bazơ. Phần còn lại của phân tử, chủ yếu là nhóm carboxyl trở nên có tính axit mạnh hơn và có thể được chuẩn độ bằng dung dịch kiềm. Lượng dung dịch NaOH tiêu thụ phản ánh hàm lượng nitơ amin tự do trong mẫu.

Lấy chính xác từ 10 - 100 ml dịch quả cho vào bình tam giác 250 ml, dùng NaOH 1N chuẩn đến pH = 8,0 có sử dụng pH met. Thêm 10 ml dung dịch BaCl₂. Sau 15 phút chuyển toàn bộ hỗn hợp sang bình định mức 200 ml và thêm nước chất định mức đến gần bình. Lắc đều và lọc qua giấy lọc. Cho 25 ml dung dịch formaldehyde, lắc đều và để yên trong khoảng 2 phút. Sau đó, đem chuẩn bằng dung dịch NaOH 0,1 N nhờ pH mét đến pH 8. Hàm lượng nitơ amin (N₂) được xác định theo công thức sau: $N_2 = (n \times 0,0014) \times 1.000/V$ (g/l). Trong đó: n là số ml dung dịch NaOH 0,1 m tiêu hao ở mẫu thí nghiệm; m là số g dịch quả lấy phân tích; 0,0014 - Số g N₂ tương ứng với 1 ml dung dịch NaOH 0,1 N.

2.6. Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa bằng DPPH

Được tiến hành theo phương pháp của Abramović và cs (2018) [9] có chỉnh sửa cho phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm, cụ thể như sau:

Mẫu thử được pha dung dịch gốc trong methanol, sau đó được pha thành dải nồng độ thử mẫu với nước cất khử ion. Ascorbic axit được sử dụng như đối chứng tham khảo và được pha thành dải nồng độ với nước cất khử ion. DPPH pha trong methanol (100%) nồng độ 0,25 µM hút mẫu nghiên cứu đã pha ở các nồng độ vào đĩa 96. Thêm dung dịch DPPH đã chuẩn bị ở trên vào các giếng đã có sẵn mẫu nghiên cứu (tỉ lệ 1: 1). Ống không có mẫu thử chỉ có 100 µl nước và 100 µl DPPH. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Xác định độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng tại bước sóng 517 nm.

Khả năng trung hòa gốc oxy hóa tự do (Scavenging Activities - SA) sinh ra từ DPPH của mẫu thử được tính theo công thức sau: % SA = $(OD_{\text{đối chứng}} - OD_{\text{mẫu thử}}) \times 100 / OD_{\text{đối chứng}}$ (%).

Trong đó: OD_{đối chứng} là độ hấp thụ tại giếng không chứa chất thử, OD_{mẫu thử} là độ hấp thụ tại giếng chứa chất thử, giá trị SC₅₀ (Scavenging Concentration at 50% - nồng độ trung hòa được 50% gốc tự do của DPPH) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4. Đối với các mẫu dịch sau lên men và dịch sau thủy phân. Mẫu dịch được mang đi sấy khô tới độ ẩm không đổi. Sau đó, mẫu thử được pha bằng dung dịch methanol đảm bảo nồng độ 1 mg/1 ml.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu khảo sát các điều kiện phù hợp để tạo chế phẩm enzyme thô trên môi trường đủ đủ

3.1.1. Ảnh hưởng của thành phần bột mỳ bổ sung đến quá trình tạo chế phẩm enzyme thô trên cơ chất đủ đủ

Để nấm mốc *Aspergillus oryzae* phát triển tốt trong quá trình tạo chế phẩm enzyme thô trên cơ chất đủ đủ, bột mỳ được lựa chọn bổ sung vào môi trường. Nghiên cứu thiết kế dựa trên các kết quả nghiên cứu của Nguyễn Hiền Trang, Dương Thị Hương (2018) [10], Nguyễn Thị Ngọc Giang, Nguyễn Minh Thủy (2016) [11]. Trong nghiên cứu này, bột mỳ được bổ sung với các nồng độ lần lượt là 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% và 30%. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

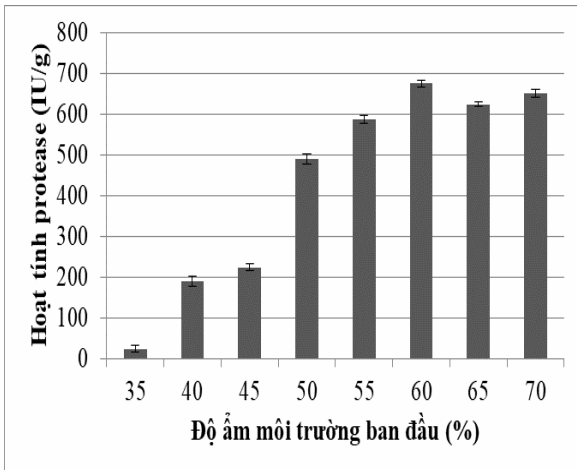
Bảng 1. Ảnh hưởng của thành phần môi trường (bột mỳ) đến hoạt độ protease của chế phẩm

STT	Tỷ lệ bột mỳ (%)	Hoạt tính protease (IU/g)
1	0	215,6 ± 12,5
2	5	321,8 ± 7,8
3	10	523,7 ± 9,0
4	15	589,9 ± 10,4
5	20	623,7 ± 9,5
6	25	589,3 ± 6,8
7	30	586,7 ± 8,2

Bảng 1 cho thấy, khi tăng dần tỷ lệ bột mỳ bổ sung vào môi trường 5 - 20% thì hoạt tính protease cũng tăng theo. Điều này chứng tỏ hàm lượng bột mỳ trong môi trường có ảnh hưởng tích cực đến sự phát triển của nấm mốc và khả năng sinh hoạt tính protease trong chế phẩm thô. Tuy nhiên, khi hàm lượng bột mỳ vượt quá 20%, hoạt tính protease bắt đầu giảm. Hiện tượng này có thể giải thích, bởi lượng bột mỳ quá lớn, khi trộn với nguyên liệu đù đủ sau khi hấp tạo thành khối môi trường bán rắn có tính chất kết dính và không thoáng khí, gây ảnh hưởng tiêu cực đến sự phát triển của nấm mốc và làm giảm khả năng sinh protease.

Nghiên cứu của Dương Thị Hương, Nguyễn Hiền Trang (2018) [4] đã sử dụng môi trường kết hợp giữa bột mỳ và ngô mảnh để tạo chế phẩm nấm mốc, trong đó, tỷ lệ ngô mảnh: Bột mỳ được ghi nhận là 30%. Điều này cho thấy, tỷ lệ bột mỳ cần bổ sung vào môi trường còn phụ thuộc vào loại nguyên liệu chính được sử dụng để nuôi nấm mốc. Hoạt tính protease cao nhất được ghi nhận ở mẫu môi trường bổ sung 20% bột mỳ. Vì vậy, nồng độ bổ sung cơ chất bột mỳ này được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp sau.

3.1.2. Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường ban đầu đến quá trình tạo chế phẩm trên cơ chất đù đủ



Hình 1. Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường đến hoạt tính protease của chế phẩm.

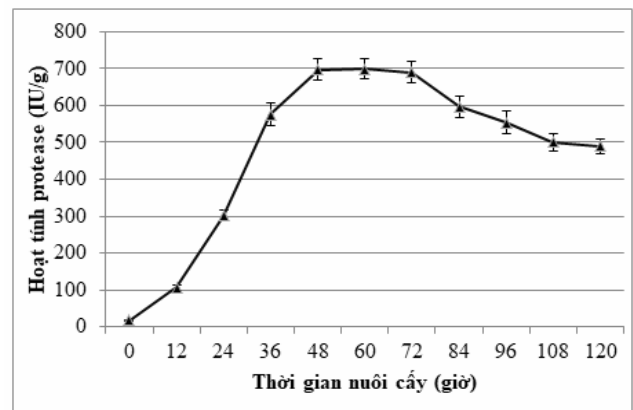
Độ ẩm là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy nấm mốc trên môi trường cơ chất bán rắn. Độ ẩm tác động trực tiếp đến các tính chất hóa lý của cơ chất, từ đó ảnh hưởng đến sự phát triển của nấm mốc cũng như quá trình

sinh tổng hợp các chất, bao gồm enzyme của nấm [3]. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của độ ẩm môi trường đến hoạt tính protease của chế phẩm được thể hiện ở hình 1.

Hình 1 cho thấy, hoạt tính protease của nấm mốc chịu ảnh hưởng rõ rệt từ hàm lượng ẩm trong môi trường cơ chất đù đủ và bột mì. Cụ thể, khi độ ẩm môi trường ban đầu ở mức 35%, hoạt tính protease không đáng kể. Tuy nhiên, khi độ ẩm tăng từ 40% lên đến 60%, hoạt tính protease tăng dần theo. Khi tiếp tục tăng độ ẩm của môi trường bán rắn lên trên mức 60%, hoạt tính protease lại có xu hướng giảm xuống. Mức độ hoạt tính protease cao nhất được ghi nhận ở môi trường có độ ẩm 60% (674,9 IU/g). Điều này có thể giải thích, độ ẩm môi trường cơ chất có ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sinh trưởng và sản sinh enzyme của chủng nấm mốc *A. oryzae*.

3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình tạo chế phẩm nấm mốc trên cơ chất đù đủ

Để xác định thời gian phù hợp cho quá trình nuôi chế phẩm nấm mốc trên cơ chất đù đủ, nghiên cứu tiến hành thí nghiệm nuôi nấm mốc chủng *A. oryzae* CNTP 5043 lấy mẫu ở các thời điểm 24; 48; 72; 96; 120 giờ. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở hình 2.

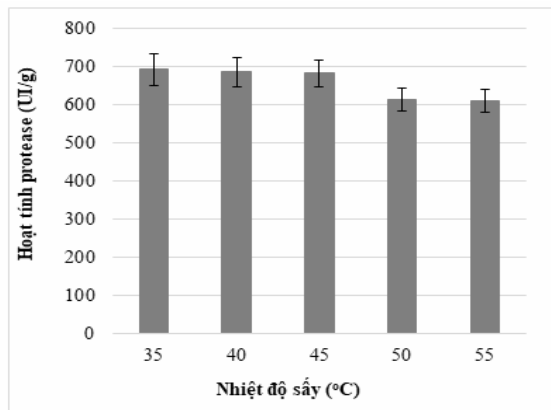


Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt độ protease của chế phẩm nấm mốc

Hình 2 cho thấy, hoạt tính protease có sự thay đổi theo thời gian. Hoạt tính protease tăng rõ rệt sau khoảng 24 giờ nuôi cấy và đạt mức cao nhất vào 48 giờ nuôi cấy (696,7 IU/g). Sau thời gian này, nếu tiếp tục duy trì khối koji, hoạt tính protease bắt đầu có xu hướng giảm dần. Sự giảm

hoạt độ enzyme và mật độ chế phẩm có thể là do hàm lượng chất dinh dưỡng trong môi trường giảm dần theo thời gian nuôi cấy, đồng thời, sự gia tăng các sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật có thể gây bất hoạt enzyme, dẫn đến sự giảm hoạt tính protease [3, 12]. Như vậy, thời gian phù hợp để nuôi cấy *A. oryzae* CNTP 5043 là 48 giờ, do vậy, thông số này được lựa chọn là thời gian để thu hoạch chế phẩm enzyme.

3.1.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian sấy đến chất lượng của chế phẩm nấm mốc trong quá trình bảo quản



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính protease của chế phẩm nấm mốc

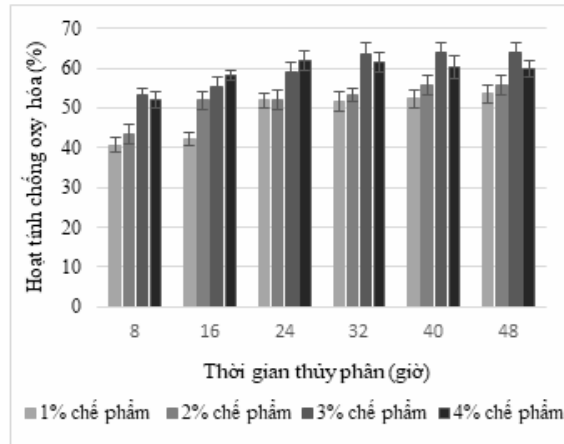
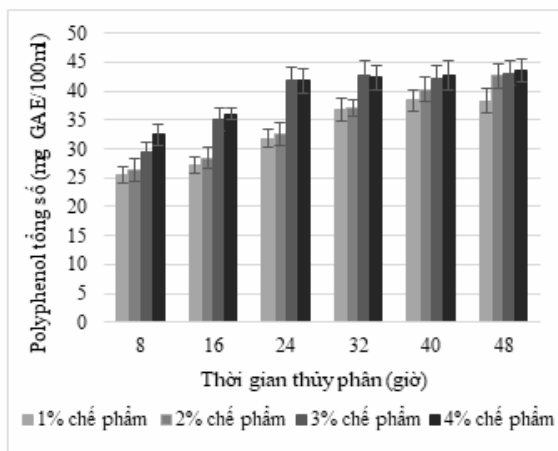
Để thuận lợi cho việc bảo quản cũng như sử dụng chế phẩm nấm mốc cho những giai đoạn sau này, chế phẩm nấm mốc được xử lý qua giai đoạn sấy ở nhiệt độ thấp. Nhiệt độ sấy được khảo sát ở các mức 40; 45; 50; 55; 60°C. Các mốc nấm mốc được kiểm tra hàm ẩm và hoạt độ protease. Kết quả được thể hiện ở hình 3.

Hình 3 cho thấy, hoạt tính protease giảm dần ở các mức nhiệt độ sấy tăng cao, đặc biệt là giảm mạnh khi nhiệt độ vượt quá 45°C. Cụ thể, hoạt tính protease của chế phẩm mốc ở mức nhiệt độ sấy là 35°C đạt giá trị 692,1 UI/g, ở mức nhiệt 45°C đạt giá trị 682,9 UI/g nhưng với mức nhiệt 50°C hoạt tính protease giảm chỉ còn 613,7 UI/g. Như vậy, nhiệt độ có ảnh hưởng tới hoạt tính của enzyme protease của khối koji. Để đảm bảo chất lượng chế phẩm enzyme thô trong quá trình bảo quản mà vẫn duy trì được hoạt tính protease cao, nghiên cứu đã chọn nhiệt độ sấy 45°C. Với nhiệt độ này, độ ẩm của khối koji đạt 7,4% với mức hoạt tính protease đạt 682,9 IU/g. Kết quả đạt yêu cầu về độ ẩm chế phẩm enzyme thô sau quá trình sấy cần ở mức dưới 10%, tương đồng với kết quả nghiên cứu về chế độ sấy chế phẩm tương tự của Nguyễn Hiền Trang, Dương Thị Hương (2018) [10]. Do đó, nhiệt độ sấy 45°C là nhiệt độ thích hợp được lựa chọn để sấy chế phẩm nấm mốc *A. oryzae* CNTP 5043.

3.2. Khảo sát các điều kiện phù hợp cho quá trình thủy phân sản phẩm sau lên men

Dịch đủ sau khi lên men với chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* CNTP 4.087 được tiếp tục bổ sung chế phẩm enzyme thô của chủng *Aspergillus oryzae* CNTP 5043 và đánh giá các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng dịch sau khi thủy phân.

3.2.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ chế phẩm nấm mốc và thời gian đến khả năng thủy phân dịch sau lên men



Hình 4. Hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxy hóa của sản phẩm thủy phân

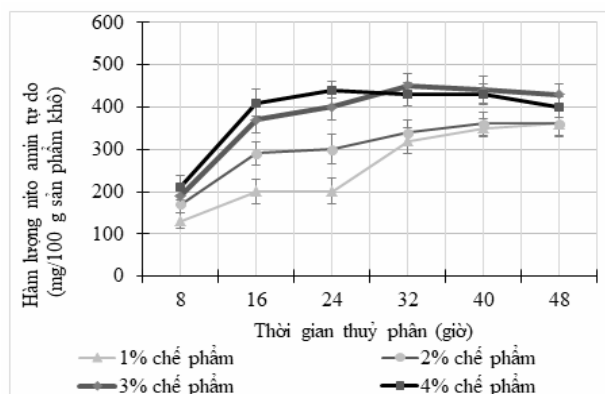
Chế phẩm nấm mốc *A.oryzae* CNTP 5043 có khả năng sinh protease cao nhất được lựa chọn từ 10 chủng nấm mốc được khảo sát. Lượng chế phẩm nấm mốc bổ sung vào để tiến hành thủy phân dịch lên men phải phù hợp thì mới mang lại hiệu quả thủy phân cao nhất. Trong thí nghiệm này, tỷ lệ chế phẩm được bổ sung với hàm lượng khác nhau. Kết quả được thể hiện ở hình 4.

Hình 4 cho thấy, trong quá trình thủy phân theo thời gian, ở tất cả các mẫu bổ sung chế phẩm nấm mốc từ 1 - 4%, hàm lượng polyphenol không có sự thay đổi. Tuy nhiên, khi tỷ lệ chế phẩm nấm mốc bổ sung tăng lên, hàm lượng polyphenol cũng tăng dần, đặc biệt ở các tỷ lệ bổ sung nấm mốc 3% và 4%. Điều này có thể giải thích, bản thân chế phẩm nấm mốc được sinh trưởng trên sinh khối đủ đã mang một lượng polyphenol đáng kể để bổ sung vào dịch đủ lên men sau thủy phân.

Ngược lại, hoạt tính chống oxy hóa DPPH tăng dần ở các mẫu theo thời gian thủy phân và đạt giá trị cao nhất tại thời điểm 32 giờ. Sau khoảng thời gian này, chỉ tiêu này không có sự gia tăng. Điều này có thể giải thích, tuy hàm lượng polyphenol tổng số của sản phẩm sau thủy phân không tăng nhưng khi bổ sung chế phẩm nấm mốc với hệ enzyme đa dạng như: Amylase, invertase, maltose, protease... chúng sẽ phân cắt protein thành các axit amin tự do, phân cắt các hợp chất cao phân tử thành các hợp chất phân tử nhỏ có hoạt tính sinh học khác cho khả năng chống oxy hóa của dịch sau thủy phân cao hơn.

Trong các nghiên cứu trước, hỗn dịch đủ đã được lên men bởi chủng nấm men *S. cerevisiae*. Do vậy, kết thúc quá trình, hàm lượng protein sẽ được làm giàu bởi 2 nguồn gốc là protein trong bản thân đủ và protein tăng cường thêm bởi chính sinh khối nấm men. Trong nghiên cứu này, hỗn dịch sau lên men bởi nấm men lại được thủy phân bằng chế phẩm nấm mốc để phân cắt các hợp chất cao phân tử như protein, polysacchride thành các hợp chất có khối lượng phân tử nhỏ có hoạt tính sinh học cao hơn. Trong thí nghiệm này, sản phẩm sau thủy phân cũng được đánh giá về hàm lượng axit amin thông qua phép phân tích gián tiếp lượng nitơ amin tự do bằng phương pháp

chuẩn độ N-formol, với kết quả được trình bày trong hình 5. Nghiên cứu cho thấy, hiệu quả của quá trình thủy phân chế phẩm nấm mốc thể hiện qua sự gia tăng hàm lượng nitơ amin trong sản phẩm sau thủy phân. Khi tỷ lệ chế phẩm nấm mốc tăng từ 1 - 3%, hàm lượng nitơ amin cũng tăng dần theo thời gian thủy phân. Tuy nhiên, khi tỷ lệ chế phẩm nấm mốc tăng lên 4%, tốc độ tăng hàm lượng nitơ amin chậm lại và không có sự khác biệt đáng kể so với các mẫu trước đó.



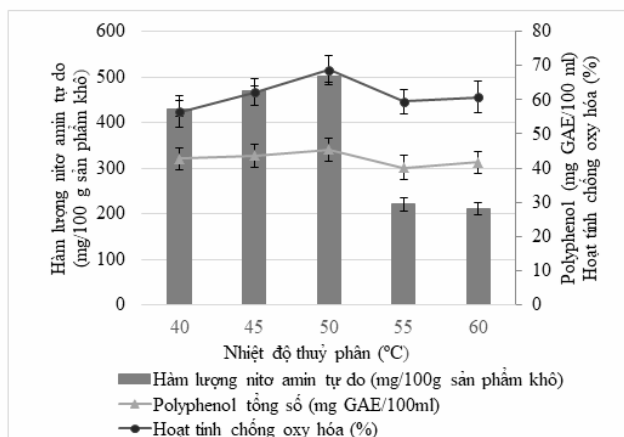
Hình 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ chế phẩm enzyme thô đến hàm lượng nitơ amin sau thủy phân

Hình 5 cho thấy, ở các nồng độ bổ sung chế phẩm enzyme thô từ 1 - 4%, tại thời điểm 24 giờ của quá trình thủy phân dịch đủ sau lên men, nồng độ chế phẩm enzyme bổ sung càng cao thì hàm lượng nitơ amin của dịch thủy phân càng nhiều. Tuy nhiên, khi kéo dài thời gian thủy phân lên 32 giờ thì nồng độ bổ sung chế phẩm enzyme thô là 3% lại cho hàm lượng nitơ amin thu được cao nhất. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Hiền Trang, Dương Thị Hương (2018) [10, 13]. Theo đó, khi bổ sung chế phẩm enzyme thô ở nồng độ từ 3 - 4%, lượng nitơ amin thu được đạt giá trị cực đại. Tuy nhiên, khi nồng độ enzyme thô tăng lên 5%, hàm lượng nitơ amin lại giảm. Như vậy, trong nghiên cứu nồng độ chế phẩm enzyme thô thích hợp cần bổ sung là 3% và thời gian thủy phân là 32 giờ được lựa chọn là thông số cho quá trình thủy phân dịch đủ lên men.

3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng thủy phân dịch đủ lên men

Nhiệt độ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến các phản ứng enzyme trong quá trình thủy phân.

Mỗi loại enzyme hoặc chế phẩm enzyme sẽ có một dải nhiệt độ tối ưu để quá trình thủy phân diễn ra với hiệu suất cao nhất. Để khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân khi sử dụng chế phẩm enzyme từ nấm mốc *A. oryzae* CNTP 5043, phản ứng thủy phân đã được thực hiện ở các mức nhiệt độ khác nhau: 40°C, 45°C, 55°C và 60°C. Kết quả được thể hiện ở hình 6.



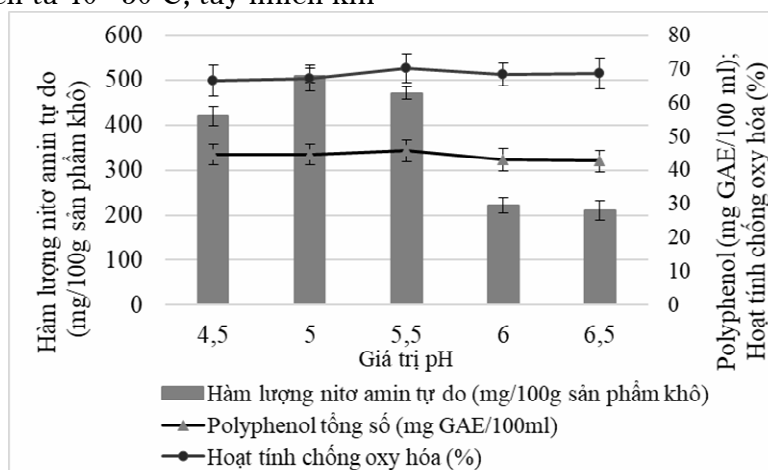
Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng thủy phân dịch lên men

Kết quả ở hình 6 cho thấy, hàm lượng axit amin và khả năng chống oxy hóa tăng dần khi tăng nhiệt độ thủy phân lên từ 40 - 50°C, tuy nhiên khi

tăng nhiệt độ thủy phân lên 55°C thì hàm lượng nitơ amin thu được giảm mạnh. Điều này cho thấy, nhiệt độ 50°C là nhiệt độ thích hợp cho hoạt động của hệ enzyme trong chế phẩm. Trong khi đó, hàm lượng polyphenol được ghi nhận là ổn định ở tất cả các mức nhiệt độ nghiên cứu. Khả năng thủy phân tăng khi nhiệt độ tăng và đạt giá trị cực đại ở 50°C với hàm lượng nitơ amin đạt 500,6 mg/g; hàm lượng polyphenol đạt 44,2 mg GAE/100 ml và hoạt tính chống oxy hóa đạt 68,7%. Chính vì vậy, mức nhiệt tại 50°C là mức nhiệt được lựa chọn cho quá trình thủy phân dịch đủ đủ lên men ở các thí nghiệm sau.

3.2.3. Ảnh hưởng của pH tới khả năng thủy phân dịch lên men

Đối với chế phẩm enzyme thô hay các enzyme thương mại, chúng đều rất nhạy cảm với sự thay đổi pH trong môi trường thủy phân. Mỗi loại enzyme có một dải pH tối ưu mà tại đó hoạt động hiệu quả nhất. Vì vậy, nghiên cứu đã tìm kiếm dải pH phù hợp nhất cho chế phẩm enzyme của chủng *A. oryzae* CNTP 5043. Kết quả được thể hiện ở hình 7.



Hình 7. Ảnh hưởng của pH lên quá trình thủy phân dịch lên men

Kết quả nghiên cứu cho thấy, giá trị pH có ảnh hưởng rõ rệt đến hàm lượng nitơ amin thu được. Khi tăng pH từ 4,5 lên 5,5, hàm lượng nitơ amin tăng đáng kể, đạt giá trị cao nhất tại pH 5,5 với giá trị 510,02 mg/100 g sản phẩm khô. Sau đó, khi tiếp tục tăng pH lên 6,0 và 6,5, hàm lượng nitơ amin giảm mạnh, chứng tỏ enzym hoạt động hiệu quả nhất trong khoảng pH axit yếu, đặc biệt tại pH 5,5. Tương tự, hàm lượng polyphenol tổng số cũng

đạt giá trị cao nhất tại pH 5,5 cho thấy, khả năng giải phóng các hợp chất có hoạt tính sinh học tốt nhất tại pH này. Khi pH tăng vượt mức tối ưu, hàm lượng polyphenol có xu hướng giảm nhẹ, cho thấy enzyme có thể bị giảm hoạt tính hoặc cấu trúc tế bào nguyên liệu không còn thuận lợi cho việc giải phóng hợp chất. Hoạt tính chống oxy hóa (%) cũng thể hiện xu hướng tương tự: Tăng nhẹ từ pH 4,5 - 5,5 và đạt giá trị cao nhất ở pH 5,5, sau đó giảm

dẫn. Điều này cho thấy, pH 5,5 không chỉ tối ưu hóa hiệu suất thủy phân protein mà còn thúc đẩy giải phóng các hợp chất chống oxy hóa có lợi. Như vậy, pH 5,5 là điều kiện thích hợp để đạt hiệu quả tối đa trong quá trình thủy phân dịch đu đủ lên men, cả về hàm lượng axit amin, polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa. Thông số này được lựa chọn cho quá trình thủy phân dịch đu đủ sau lên men.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã lựa chọn ra các thông số cho các quá trình tạo chế phẩm nấm mốc như sau: Tỷ lệ bột mỳ bổ sung là 20%; độ ẩm để nuôi chế phẩm nấm mốc là 60%; thời gian nuôi nấm mốc là 48 giờ, chế phẩm nấm mốc được sấy ở 45°C, trong thời gian 6 giờ. Quá trình thủy phân dịch đu đủ sau lên men được bổ sung 3% chế phẩm nấm mốc và thủy phân trong thời gian 32 giờ; nhiệt độ thủy phân là 50°C và pH thủy phân là 5,5.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fujita Y, Tsuno H, Nakayama J. (2017). Fermented papaya preparation restores age-related reductions in peripheral blood mononuclear cell cytolytic activity in tubefed patients, *Plos one*, 12 (1) e0169240.
2. You Z, Sun J, Xie F, Chen Z, Zhang S, Chen H, Liu F, Lili Li L, Guocan Chen G, Yisheng Song Y, Yaoxian Xuan Y, Gaoli Zheng G, Yanfei Xin Y. (2017). Modulatory effect of fermented papaya extracts on mammary gland hyperplasia induced by estrogen and progestin in female rats, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 8235069. doi: 10.1155/2017/8235069.
3. Wang R., Law R. C. S. & Webb C. (2005) Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation, *Process Biochemistry*, 40: 217 - 227.
4. Dương Thị Hương, Nguyễn Hiền Trang (2018). Sản xuất chế phẩm *Aspergillus oryzae* KZ3 kết hợp *Aspergillus awamori* HK1 có khả năng sinh protease cao trên môi trường bán rắn (ngô mảnh - bột mỳ). *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế: Kỹ thuật và Công nghệ*, 127(2A): 55 - 68.
5. Chutmanop J., Chuichlcherm, S., Yusuf, C. & Penjit, S. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in soil-state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 102: 1012 - 1018.
6. Anson M. L (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with heloglobin. *Journal of General Physiology*, 22: 79 - 89.
7. Folin O., V. Ciocattéu. (1929). On tyrosine and tryptophan determination in protein. *Journal of Biological Chemistry*, 73: 627.
8. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 9745-1:2013 (ISO 14502-1:2005). Chè - Xác định các chất đặc trưng của chè xanh và chè đen - Phần 1: Hàm lượng polyphenol tổng số trong chè - Phương pháp đo màu dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu.
9. Abramović H, Grobin B, Poklar Ulrih N, Cigić B. (2018). Relevance and Standardization of *in vitro* antioxidant assays: ABTS, DPPH and Folin-Ciocalteu. *Journal of Chemistry*, 2: 1 - 9.
10. Nguyễn Hiền Trang, Dương Thị Hương (2018). Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng thủy phân khô dầu lạc trong sản xuất nước tương bởi chế phẩm hỗn hợp *Aspergillus oryzae* KZ3 và *Aspergillus awamori* HK1. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp*, 2(3): 977 - 985.
11. Nguyễn Thị Ngọc Giang, Nguyễn Minh Thủy (2016). Ảnh hưởng của điều kiện xử lý đến khả năng sinh enzyme amylase và protease từ *Aspergillus oryzae* trên koji nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.). *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 1: 147 - 155.
12. Sankeerthana C., Sankeerthana Ca, Shabana Pinjara, Rizwana Tabassum Jambagia, Shamala Bhavimania, Anupama, Sarovar Ba and Shashikala R. Inamdar (2013). Production and partial characterization of protease from *Aspergillus flavus* using rice mill waste as a substrate and its comparison with *Aspergillus niger* protease. *International Journal of Current Engineering and Technology*, 143 - 147.
13. Nguyễn Hiền Trang, Phạm Trần Thủy Hương, Nguyễn Thị Thủy Tiên (2013). Ảnh hưởng của một số yếu tố tới sự thu nhận protease ngoại bào từ chủng *Aspergillus oryzae* N2 nuôi cấy trên môi trường bán rắn trong quá trình sản xuất koji tương. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 24: 65 - 65.

**STUDY ON THE PRODUCTION OF ENZYME PREPARATION FROM *Aspergillus oryzae*
FOR APPLICATION IN THE HYDROLYSIS OF FERMENTED PAPAYA EXTRACT**

Nguyen Thi Trang¹, Nguyen Thi Minh Khanh¹, Le Hong Quang²

¹ *Food Biochemistry Research Center*

² *Ba Vi Dairy Processing Joint Stock Company*

Abstract

This study focuses on producing an enzyme preparation from *Aspergillus oryzae* for use in the hydrolysis of the whole fermented papaya suspension. The primary objective was to investigate the factors influencing protease production by the *A. oryzae* CNTP 5043 strain when cultivated on a papaya-based substrate, with the aim of optimizing environmental and substrate conditions to obtain an enzyme preparation with high proteolytic activity. The investigated factors included wheat flour supplementation ratio, substrate moisture content, cultivation time and drying temperature of the fungal biomass. Additionally, the study evaluated the effects of crude enzyme dosage and hydrolysis conditions-namely pH, temperature and reaction time-on the efficiency of hydrolyzing the fermented papaya extract. The results revealed that the highest protease activity was achieved when 20% wheat flour was added to the substrate, with a moisture content of 60%, a cultivation time of 48 hours, a drying temperature of 45°C. During the hydrolysis process, optimal efficiency was observed using 3% crude fungal enzyme at 50°C and pH 5.5, resulting in a high yield of amino acids and polyphenols in the fermented papaya suspension. These findings are significant for the production of fermented papaya products with enhanced antioxidant capacity and bioactivity, contributing to the development of functional foods for community health promotion.

Keywords: *Fermented papaya, koji, Aspergillus oryzae, hydrolysis, enzyme preparation.*

Ngày nhận bài: 16/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 8/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 25/7/2025

Ngày duyệt đăng: 5/8/2025

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM ENZYME β -GLUCOSIDASE CHUYỂN HOÁ ISOFLAVONE TỪ DẠNG GLUCOSIDE SANG DẠNG AGLYCONE TRONG DỊCH SỮA ĐẬU TƯƠNG NẤY MẦM CÔ ĐẶC

Trương Hương Lan^{1*}, Nguyễn Thị Việt Hà¹, Dương Đức Hạnh²

¹Bộ môn Công nghệ thực phẩm và Dinh dưỡng, Viện Công nghiệp Thực phẩm

²Công ty TNHH Dược phẩm Nasaki

*Email: lanth@firi.vn

TÓM TẮT

Isoflavone là một hợp chất thuộc nhóm phytoestrogen, có cấu trúc tương tự hormone estrogen trong cơ thể người. Isoflavone đậu tương được quan tâm rộng rãi trên toàn thế giới bởi các nghiên cứu cho thấy sự tiêu thụ isoflavone đậu tương có liên quan đến việc mắc tỷ lệ thấp hơn một số loại bệnh ung thư và giảm nguy cơ mắc nhiều bệnh khác bao gồm các vấn đề về tim mạch, loãng xương và các triệu chứng mãn kinh. Trong hạt đậu tương, phần lớn isoflavone tồn tại ở dạng glucoside trong khi chỉ có một tỷ lệ nhỏ (2 - 5%) ở dạng aglycone - dạng tự do không liên quan với đường, dễ hấp thu và có hoạt tính sinh học cao hơn. Enzyme β -glucosidase có khả năng xúc tác hiệu quả phản ứng thủy phân liên kết β -1-6-glycosidic, cắt phân tử đường ra khỏi isoflavone glucoside, từ đó giải phóng isoflavone dưới dạng aglycone. Nghiên cứu xác định được điều kiện công nghệ tối ưu cho quá trình thủy phân dịch sữa đậu tương nẩy mầm cô đặc sử dụng chế phẩm enzyme β -glucosidase thương mại, gồm: Nồng độ enzyme 5 mL/L, pH 5, nhiệt độ 50°C và thời gian 180 phút. Kết quả cho thấy, ở điều kiện tối ưu, hiệu suất chuyển hóa isoflavone rất cao, lên tới $95,65 \pm 0,29\%$. Hàm lượng isoflavone tổng số trong dịch sữa đậu tương nẩy mầm cô đặc sau thủy phân đạt $115,90 \pm 1,48$ mg/100 g, trong đó isoflavone dạng aglycone chiếm ưu thế với $110,82 \pm 1,07$ mg/100 g (tỷ lệ đạt 95,61%). Kết quả nghiên cứu không chỉ khẳng định hiệu quả vượt trội của chế phẩm enzym β -glucosidase thương mại trong việc nâng cao hàm lượng và tỷ lệ isoflavone aglycone có hoạt tính sinh học mà còn mở ra triển vọng ứng dụng rộng rãi của dịch sữa đậu tương nẩy mầm cô đặc trong phát triển các sản phẩm thực phẩm chức năng chất lượng cao.

Từ khoá: *Đậu tương nẩy mầm, isoflavone, aglycone, β -glucosidase.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Isoflavone là một hợp chất thuộc nhóm phytoestrogen, có cấu trúc tương tự hormone estrogen trong cơ thể người. Nguồn isoflavone chính trong chế độ ăn uống chủ yếu đến từ đậu tương và các sản phẩm từ đậu tương. Các chế phẩm chiết xuất từ đậu tương chứa isoflavone đã được nhiều nghiên cứu chứng minh là có tác dụng làm giảm triệu chứng ở phụ nữ thời kỳ mãn kinh như bốc hỏa, đổ mồ hôi đêm [1, 2]. Ngoài ra, isoflavone còn được chứng minh có khả năng hỗ trợ sức khỏe tim mạch bằng cách giảm cholesterol

LDL, cải thiện mật độ xương cũng như có thể góp phần vào việc phòng ngừa một số bệnh ung thư liên quan đến hormone nhờ vào cơ chế điều hòa hoạt động của thụ thể estrogen trong cơ thể [3, 4, 5, 6]. Tác dụng chống oxy hoá, chống viêm của isoflavone cũng đã được công bố trong nhiều nghiên cứu [3, 5, 7, 8].

Trong đậu tương, isoflavone có 12 đồng phân, chủ yếu tồn tại dưới dạng các hợp chất isoflavone glucoside (IG) như: β -glucoside, acetylglucoside, malonylglucoside và chỉ một phần nhỏ ở dạng isoflavone aglycone (IA). Tuy nhiên, nghiên cứu

cho thấy rằng, IA có khả năng hấp thu sinh học cao hơn so với IG nhờ vào cấu trúc phân tử nhỏ gọn và khả năng khuếch tán thụ động qua thành ruột [9]. Các đồng phân aglycone của isoflavone như: Daidzein, genistein và glycitein có khả năng liên kết với các thụ thể estrogen trong cơ thể, từ đó bắt chước chức năng của estrogen, đặc biệt là estradiol. Do vậy, việc tiêu thụ thực phẩm đậu tương giàu IA có thể mang lại nhiều lợi ích vượt trội đối với sức khỏe người sử dụng.

Hiện nay, có 3 phương pháp chính để chuyển hóa isoflavone từ dạng glucoside sang dạng aglycone, bao gồm: (+) Phương pháp hóa học: Sử dụng các chất hóa học mạnh, như axit hoặc kiềm để cắt đứt liên kết glucoside, giải phóng isoflavone aglycone. Tuy nhiên, các điều kiện ăn mòn và độc hại, cùng với việc thiếu tính đặc hiệu cho một mục tiêu cụ thể, dẫn đến các sản phẩm phân hủy không mong muốn; (+) Phương pháp lên men: Quá trình chuyển hóa IG thành IA được tiến hành bởi enzyme β -glucosidase của các vi sinh vật. Việc lên men sữa đậu tương bằng các chủng vi khuẩn có hoạt tính β -glucosidase, đặc biệt là các chủng *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* đã được sử dụng thành công để sản xuất các aglycone có hoạt tính sinh học thông qua thủy phân đường glucose của IG [4, 10, 11, 12]; (+) Phương pháp sử dụng chế phẩm enzyme: Một số nghiên cứu cho thấy, enzyme β -glucosidase có hiệu quả cao trong việc chuyển hóa IG thành IA, giúp gia tăng đáng kể hàm lượng IA trong các sản phẩm từ đậu tương. Kết quả nghiên cứu của Tsangalis và cs (2002) cho thấy, enzyme β -glucosidase có thể đạt hiệu suất trên 90% [13]. Theo Thụy và cs (2009) [14], hiệu suất chuyển hóa isoflavone đạt 86,6% sau 240 phút ở nhiệt độ 37°C khi sử dụng enzyme β -glucosidase tinh khiết. Kết quả nghiên cứu của Fang và cs (2014) [15] cho thấy, enzyme β -glucosidase từ chủng *Gongronella* sp. W5 có khả năng thủy phân isoflavone glucoside với tỷ lệ chuyển hóa đạt 96,2% đối với daidzin và 96,7% đối

với genistin. Nghiên cứu của de Queirós và cs (2016) [16] đã sử dụng chế phẩm enzyme tannase để làm tăng hàm lượng IA đáng kể trong dịch sữa đậu tương. Phương pháp sử dụng chế phẩm enzyme là phương pháp phổ biến trong sản xuất công nghiệp nhờ vào khả năng kiểm soát quá trình chuyển hóa isoflavone một cách chính xác và hiệu quả. Các chế phẩm enzyme có thể được chiết xuất từ nhiều nguồn tự nhiên khác nhau, nhưng chủ yếu là các enzyme có hoạt tính β -glucosidase thu nhận từ vi sinh vật. Do vậy, nghiên cứu ứng dụng chế phẩm enzyme β -glucosidase chuyển hoá isoflavone từ dạng glucoside sang dạng alycone trong dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc là cần thiết nhằm thu được hiệu suất chuyển hoá isoflavone cao nhất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và hoá chất

Hạt đậu tương khô DT 84 thu mua từ huyện Chương Mỹ, thành phố Hà Nội; chế phẩm enzyme thương mại β -glucosidase (Shanghai Ruizheng, Trung Quốc) có hoạt tính enzyme 1.100 U/mL, tỷ trọng 1,25 g/mL; các chất chuẩn isoflavone (12 đồng phân isoflavone chuẩn) của Merck và Fujifilm Wako được sử dụng cho phân tích HPLC và một số hoá chất đạt tiêu chuẩn phân tích khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc: Đậu tương được ủ nảy mầm trong 36 giờ, sau đó rửa sạch, xay mịn cùng với nước theo tỷ lệ 1: 5 (w/w). Tăng nhiệt lên 90°C, bổ sung enzyme α -amylase 0,1% trong thời gian 30 phút. Lọc tách bã để thu nhận dịch sữa. Tiếp tục đun sôi, sau đó cô đặc chân không ở 60°C, thu được dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc có nồng độ chất khô hoà tan 18°Bx, pH 5,5. Bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ -18°C để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Thành phần isoflavone trong dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần isoflavone (mg/100 g) trong dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc

Thành phần	Hàm lượng	Thành phần	Hàm lượng
Daidzin	36,41 $\pm$ 0,57	Acetylglycitin	8,63 $\pm$ 0,07
Glycitin	4,42 $\pm$ 0,10	Acetylgenistin	3,12 $\pm$ 0,08

Genistin	50,52 ± 0,62	Daidzein	18,20 ± 0,13
Malonyldaidzin	8,33 ± 0,12	Glycitein	1,25 ± 0,06
Malonylglycitin	0,71 ± 0,04	Genistein	10,65 ± 0,30
Malonylgenistin	5,39 ± 0,17	Glucoside tổng số	117,97 ± 1,80
Acetyldaidzin	0,44 ± 0,03	Aglycone tổng số	30,09 ± 0,49

Phương pháp xác định các điều kiện thích hợp cho quá trình thủy phân dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc bằng chế phẩm enzyme β -glucosidase: Các yếu tố ảnh hưởng cần xác định cho quá trình thủy phân bao gồm: Tỷ lệ enzyme (thay đổi từ 0 - 6 mL/L tương đương với hoạt tính enzyme β - glucosidase từ 0 - 6,6 U/mL dịch đậu tương cô đặc), nhiệt độ thủy phân (thay đổi từ 40 - 50°C), pH của dịch sữa ban đầu (thay đổi từ 4 - 6) và thời gian thủy phân (thay đổi từ 60 - 240 phút). Tiến hành thay đổi một yếu tố trong khi các yếu tố khác được cố định. Kết thúc mỗi thí nghiệm, xác định hàm lượng 12 đồng phân isoflavone và hiệu suất chuyển hoá isoflavone trong dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc. Kết quả thu được sau mỗi thí nghiệm được sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo. Điều kiện thủy phân ban đầu là nhiệt độ 50°C, thời gian 120 phút.

Phương pháp đo pH: Giá trị pH được xác định trực tiếp bằng máy đo pH meter.

Xác định nồng độ chất khô hoà tan: Đo trực tiếp bằng khúc xạ kế Optika HR-130N.

Xác định hàm lượng isoflavone bằng HPLC theo phương pháp của Wang và cs (1990) [17] trên hệ thống sắc ký lỏng Empower của Water (Mỹ), bao gồm: Bơm dung môi 2690 có bộ phận bơm mẫu tự động; detector PDA 2996 ở bước sóng 260 nm, chế độ Gradient; cột sắc ký Luna (2) C18 (250 x 3,9 mm, 5 μ m (Phenomenex, Mỹ). Pha động cho

HPLC bao gồm: Pha động A: Axit acetic 0,1%; pha động B: Acetonitril 80% trong axit acetic 0,1%.

Hiệu suất chuyển hoá isoflavone từ dạng glucoside (IG) sang aglycone (IA) được tính theo công thức:

$$H = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100(\%)$$

Trong đó: H là hiệu suất chuyển hóa isoflavone từ dạng glucoside sang aglycone (%); m_1 là hàm lượng isoflavone glucoside trước khi thủy phân bằng enzyme (mg/100 g); m_2 là hàm lượng isoflavone glucoside sau khi thủy phân bằng enzyme (mg/100 g).

Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần. Kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (mean $\pm$ SD). Đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu được thực hiện bằng phương pháp thống kê ANOVA One Way (α = 5%) trên phần mềm SPSS.20.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu xác định tỷ lệ enzyme β -glucosidase thích hợp cho quá trình thủy phân dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc

Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme đến quá trình chuyển hoá glucoside thành aglycone trong dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc được thể hiện ở bảng 2 và hình 1.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme β -glucosidase đến hàm lượng isoflavone (mg/100 g) trong dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc

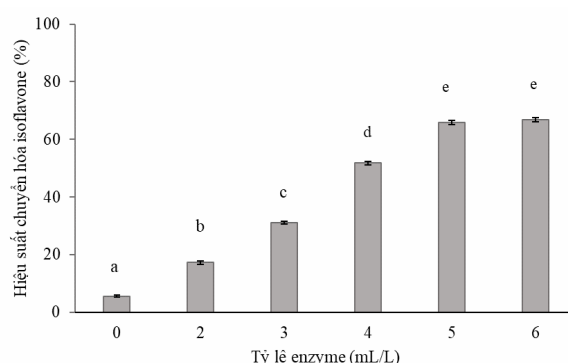
Thành phần	Tỷ lệ enzyme (mL/L)					
	0	2	3	4	5	6
Daidzin	33,02 ± 0,21	26,56 ± 0,45	17,56 ± 0,25	8,22 ± 0,22	3,25 ± 0,20	2,85 ± 0,11
Glycitin	4,50 ± 0,45	4,47 ± 0,50	4,90 ± 0,10	4,46 ± 0,16	4,23 ± 0,16	4,38 ± 0,39
Genistin	46,55 ± 0,24	39,58 ± 0,51	34,35 ± 0,57	23,12 ± 0,65	14,86 ± 0,83	13,88 ± 0,56
Malonyldaidzin	8,21 ± 0,07	8,20 ± 0,11	7,62 ± 0,14	6,48 ± 0,23	6,30 ± 0,12	6,24 ± 0,04

Malonylglycitin	0,75 ± 0,04	0,70 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,45 ± 0,05	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,02
Malonylgenistin	5,30 ± 0,06	5,28 ± 0,13	5,31 ± 0,25	4,79 ± 0,11	3,64 ± 0,17	3,74 ± 0,03
Acetyldaidzin	0,46 ± 0,04	0,45 ± 0,04	0,45 ± 0,05	0,33 ± 0,05	0,28 ± 0,05	0,33 ± 0,02
Acetylglycitin	8,49 ± 0,05	8,40 ± 0,13	7,19 ± 0,11	6,69 ± 0,12	5,90 ± 0,10	5,84 ± 0,03
Acetylgenistin	3,16 ± 0,12	3,11 ± 0,10	2,48 ± 0,09	1,83 ± 0,09	1,26 ± 0,03	1,25 ± 0,03
Glucoside tổng số	110,43 ± 1,29	96,75 ± 1,99	80,54 ± 1,60	56,37 ± 1,69	39,86 ± 1,70	38,68 ± 1,23
Daidzein	18,40 ± 0,11	25,51 ± 0,20	31,82 ± 0,23	36,27 ± 0,38	37,56 ± 0,46	37,76 ± 0,24
Glycitein	1,25 ± 0,03	1,24 ± 0,05	1,30 ± 0,09	1,79 ± 0,11	1,79 ± 0,10	1,95 ± 0,17
Genistein	14,38 ± 0,13	18,51 ± 0,11	25,16 ± 0,41	31,14 ± 0,15	36,21 ± 0,29	38,98 ± 0,51
Aglycone tổng số	34,02 ± 0,27	45,26 ± 0,36	58,28 ± 0,73	69,20 ± 0,64	75,56 ± 0,85	78,69 ± 0,92

Bảng 2 cho thấy, có sự thay đổi về thành phần isoflavone trong dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc sau quá trình thủy phân. Hàm lượng của các isoflavone glucoside có xu hướng giảm xuống ở tất cả các mẫu thí nghiệm so với trước khi thủy phân và mức độ giảm tỷ lệ thuận với tỷ lệ enzyme bổ sung. Hàm lượng các glucoside chính như daizin, glycitin và genistin giảm xuống thấp nhất là $2,85 \pm 0,11$ mg/100 g, $4,18 \pm 0,39$ mg/100 g và $13,88 \pm 0,56$ mg/100 g tương ứng trong mẫu sữa đậu thủy phân với tỷ lệ enzyme 6 mL/L. Ngược lại, hàm lượng của các isoflavone aglycone có xu hướng tăng lên tương ứng. Hàm lượng aglycone cao nhất đạt được khi bổ sung enzyme theo tỷ lệ 6 mL/L với các giá trị daidzein là $2,85 \pm 0,11$ mg/100 g, glycitein là $4,38 \pm 0,39$ mg và genistein là $13,88 \pm 0,56$ mg/100 g. Kết quả này có được là do vai trò xúc tác của enzyme β -glucosidase trong phản ứng thủy phân liên kết β -1-6-glycosidic, tách các nhóm đường khỏi phân tử glucoside, từ đó giải phóng aglycone [14, 15]. Ngoài ra, các acetylglucoside và malonylglucoside có thể được khử este để hình thành các glucoside và tiếp tục được thủy phân hiệu quả bởi enzyme β -glucosidase tạo ra các aglycone tương ứng, nhờ đó góp phần gia tăng hàm lượng aglycone trong dịch sữa đậu tương nảy mầm sau thủy phân [18].

Hiệu quả xúc tác phản ứng của enzyme β -glucosidase cũng được đánh giá thông qua giá trị hiệu suất chuyển hóa isoflavone (Hình 1). So sánh giữa các mẫu sữa đậu cô đặc bổ sung enzyme với tỷ lệ khác nhau cho thấy, hiệu suất chuyển hóa isoflavone tăng có ý nghĩa thống kê theo chiều tăng của tỷ lệ enzyme sử dụng. Ở mẫu thí nghiệm không bổ sung enzyme, phản ứng thủy phân

isoflavone vẫn xảy ra với hiệu suất chuyển hóa thấp nhất, chỉ đạt $5,53 \pm 0,38\%$ nhờ nguồn enzyme β -glucosidase nội sinh có sẵn trong đậu tương nảy mầm. Tại nồng độ enzyme 5 mL/L và 6 mL/L, hiệu suất chuyển hóa isoflavone đạt hiệu suất cao, tương ứng $65,90 \pm 0,69\%$ và $66,91 \pm 0,72\%$. Tuy nhiên, không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) về hiệu suất chuyển hóa isoflavone giữa tỷ lệ enzyme 5 mL/L và 6 mL/L. Do vậy, tỷ lệ enzyme 5 mL/L được xác định là thích hợp cho quá trình thủy phân dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc.



Hình 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme β -glucosidase đến hiệu suất chuyển hóa isoflavone từ glucoside sang aglycone

Ghi chú: Các cột đồ thị không có cùng chữ cái in thường giống nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) theo kiểm định Tukey.

3.2. Nghiên cứu xác định nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc

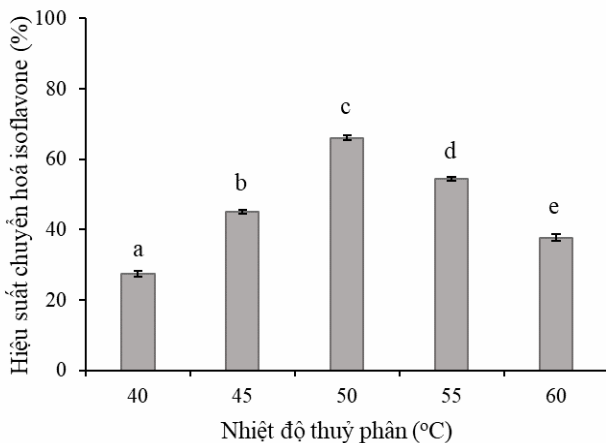
Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến thành phần isoflavone cũng như hiệu suất chuyển hóa isoflavone trong dịch sữa đậu tương nảy mầm được thể hiện ở bảng 3 và hình 2.

Sự thay đổi về thành phần isoflavone (hàm lượng isoflavone glucoside giảm xuống trong khi hàm lượng aglycone tăng lên) được quan sát thấy ở tất cả các mẫu sữa đậu tương thủy phân tại nhiệt độ 40, 45, 50, 55 và 60°C (Bảng 3). Khi so sánh với dịch sữa trước thủy phân, hàm lượng daidzin giảm từ $36,41 \pm 0,57$ mg/100 g xuống $3,34 \pm 0,34$ mg/100 g, genistin giảm từ $50,52 \pm 0,62$ mg/100 g

xuống $14,49 \pm 0,30$ mg/100 g. Ngược lại, hàm lượng daidzein tăng từ $18,20 \pm 0,13$ mg/100 g lên $37,35 \pm 0,16$ mg/100 g, glycitein tăng từ $1,25 \pm 0,06$ mg/100 g lên $1,83 \pm 0,18$ mg/100 g và genistein tăng từ $10,65 \pm 0,30$ mg/100 g lên $36,16 \pm 0,22$ mg/100 g. Tuy nhiên, mức độ thay đổi khác nhau giữa các điều kiện nhiệt độ thủy phân khác nhau.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến hàm lượng isoflavone (mg/100 g) trong dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc

Thành phần	Nhiệt độ (°C)				
	40	45	50	55	60
Daidzin	$21,55 \pm 0,45$	$9,47 \pm 0,33$	$3,34 \pm 0,34$	$8,42 \pm 0,41$	$24,66 \pm 0,45$
Glycitin	$4,63 \pm 0,15$	$4,50 \pm 0,10$	$4,46 \pm 0,17$	$4,62 \pm 0,22$	$4,73 \pm 0,21$
Genistin	$35,99 \pm 0,29$	$19,54 \pm 0,39$	$14,49 \pm 0,30$	$17,72 \pm 0,63$	$28,12 \pm 0,35$
Malonyldaidzin	$8,20 \pm 0,18$	$17,54 \pm 0,20$	$6,29 \pm 0,10$	$7,33 \pm 0,15$	$2,26 \pm 0,06$
Malonylglycitin	$0,53 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,12$	$0,16 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,04$
Malonylgenistin	$4,24 \pm 0,10$	$3,66 \pm 0,15$	$3,59 \pm 0,18$	$3,54 \pm 0,46$	$4,68 \pm 0,12$
Acetyldaidzin	$0,44 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,06$	$0,40 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,05$	$0,25 \pm 0,05$
Acetylglycitin	$6,77 \pm 0,12$	$6,26 \pm 0,11$	$5,76 \pm 0,10$	$8,14 \pm 0,14$	$6,14 \pm 0,14$
Acetylgenistin	$2,50 \pm 0,09$	$2,40 \pm 0,10$	$1,20 \pm 0,11$	$2,83 \pm 0,09$	$1,69 \pm 0,11$
Glucoside tổng số	$84,86 \pm 1,46$	$64,23 \pm 1,57$	$39,68 \pm 1,37$	$53,29 \pm 2,19$	$72,88 \pm 1,52$
Daidzein	$27,40 \pm 0,19$	$33,58 \pm 0,09$	$37,35 \pm 0,16$	$29,75 \pm 0,26$	$23,84 \pm 0,13$
Glycitein	$1,56 \pm 0,17$	$1,83 \pm 0,18$	$1,79 \pm 0,11$	$1,74 \pm 0,05$	$1,35 \pm 0,03$
Genistein	$21,14 \pm 0,15$	$31,41 \pm 0,18$	$36,16 \pm 0,22$	$32,69 \pm 0,17$	$25,66 \pm 0,20$
Aglycone tổng số	$50,10 \pm 0,51$	$66,82 \pm 0,45$	$75,30 \pm 0,49$	$64,18 \pm 0,47$	$50,85 \pm 0,37$



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến hiệu suất chuyển hoá isoflavone từ glucoside sang aglycone

Ghi chú: Các cột đồ thị không có cùng chữ cái in thường giống nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) theo kiểm định Tukey.

Tương ứng với sự thay đổi về thành phần các đồng phân, hiệu suất chuyển hoá isoflavone cũng được xác định (Hình 2). Hiệu suất chuyển hóa isoflavone tại các nhiệt độ thủy phân khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,05$). Trong khoảng nhiệt độ khảo sát từ 40 - 50°C, hiệu suất chuyển hóa isoflavone tăng lên theo chiều tăng của nhiệt độ và đạt giá trị cao nhất là $66,06 \pm 0,71\%$ tại 50°C. Tuy nhiên, tại các điều kiện nhiệt độ thủy phân cao hơn là 55°C và 60°C, hiệu suất chuyển hóa isoflavone lại giảm xuống, chỉ còn $54,41 \pm 0,51\%$ và $37,66 \pm 0,96\%$ tương ứng. Nguyên nhân có thể do một phần enzyme đã bị mất hoạt tính khi thủy phân ở nhiệt độ cao. Do vậy, nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân isoflavone trong dịch sữa đậu tương nảy mầm được xác định là 50°C, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Xie và cs (2003) [18], Pandjaitan và cs (2000) [19]. Trong cả 2

nguyên cứu này, enzyme β -glycosidase hoạt động tối ưu tại nhiệt độ 50°C.

3.3. Nghiên cứu xác định pH thích hợp cho quá trình thủy phân dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc

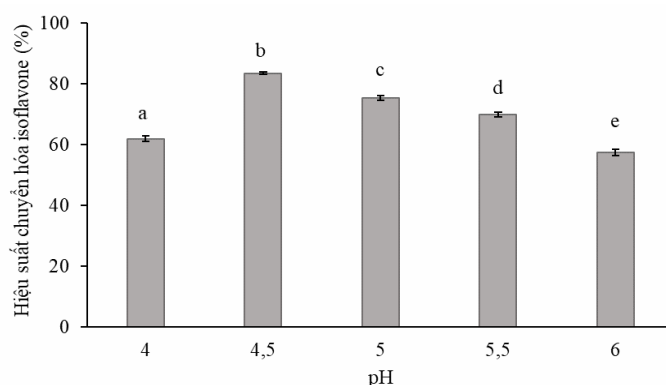
Ảnh hưởng của điều kiện pH (4; 4,5; 5; 5,5; 6) đến quá trình chuyển hoá isoflavone từ dạng glucoside sang aglycone trong dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc được thể hiện ở bảng 4 và hình 3.

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng isoflavone (mg/100 g) trong dịch sữa đậu tương nảy mầm thủy phân cô đặc

Thành phần	pH				
	4	4,5	5	5,5	6
Daidzin	11,05 $\pm$ 0,41	0,58 $\pm$ 0,03	1,60 $\pm$ 0,47	1,90 $\pm$ 0,06	7,74 $\pm$ 0,25
Glycitin	3,89 $\pm$ 0,11	3,65 $\pm$ 0,05	3,70 $\pm$ 0,11	3,83 $\pm$ 0,15	4,22 $\pm$ 0,15
Genistin	10,45 $\pm$ 0,27	1,81 $\pm$ 0,04	5,81 $\pm$ 0,03	9,08 $\pm$ 0,55	13,71 $\pm$ 0,09
Malonyldaidzin	6,02 $\pm$ 0,24	4,30 $\pm$ 0,02	5,52 $\pm$ 0,18	6,81 $\pm$ 0,10	8,17 $\pm$ 0,46
Malonylglycitin	0,66 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,02	0,73 $\pm$ 0,02
Malonylgenistin	3,85 $\pm$ 0,18	2,65 $\pm$ 0,02	3,27 $\pm$ 0,05	3,48 $\pm$ 0,03	4,66 $\pm$ 0,05
Acetyldaidzin	0,34 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,04
Acetylglycitin	5,81 $\pm$ 0,12	4,35 $\pm$ 0,02	5,71 $\pm$ 0,05	6,85 $\pm$ 0,04	7,21 $\pm$ 0,07
Acetylgenistin	2,41 $\pm$ 0,19	1,42 $\pm$ 0,18	2,20 $\pm$ 0,05	2,30 $\pm$ 0,03	2,82 $\pm$ 0,03
Glucoside tổng số	44,47 $\pm$ 1,61	19,26 $\pm$ 0,38	28,76 $\pm$ 1,01	35,22 $\pm$ 1,01	49,71 $\pm$ 1,15
Daidzein	38,63 $\pm$ 0,12	43,76 $\pm$ 0,22	41,97 $\pm$ 0,48	39,28 $\pm$ 0,25	36,32 $\pm$ 0,13
Glycitein	1,24 $\pm$ 0,04	1,27 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,01	1,26 $\pm$ 0,03	1,39 $\pm$ 0,04
Genistein	36,35 $\pm$ 0,26	41,76 $\pm$ 0,31	39,77 $\pm$ 0,21	37,28 $\pm$ 0,05	33,28 $\pm$ 0,10
Aglycone tổng số	76,21 $\pm$ 0,42	86,79 $\pm$ 0,55	83,0 $\pm$ 0,71	77,82 $\pm$ 0,33	71,0 $\pm$ 0,26

Bảng 4 cho thấy, có sự thay đổi thành phần isoflavone trong các mẫu dịch sữa đậu tương nảy mầm thủy phân tại các điều kiện pH khác nhau với hàm lượng glucoside giảm xuống đồng thời hàm lượng aglycone tăng lên so với mẫu dịch sữa ban đầu (trước khi thủy phân). Hàm lượng daidzein và genistein cao nhất được tạo ra tại pH 4,5 với giá trị lần lượt là 43,76 $\pm$ 0,22 mg/100 g và 41,76 $\pm$ 0,31 mg/100 g tương ứng. Trong khi hàm lượng glycitein lại khác nhau giữa các giá trị pH, dao động từ 1,24 $\pm$ 0,05 mg/100 g đến 1,39 $\pm$ 0,04 mg/100 g.

Phụ thuộc vào giá trị pH của dịch sữa đậu tương, hiệu suất chuyển hoá isoflavone thay đổi khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,05$). Hiệu suất chuyển hóa đạt giá trị cao nhất là 83,53 $\pm$ 0,47% tại pH = 4,5. Tại giá trị pH 4; 5; 5,5; 6, hiệu suất chuyển hóa isoflavone có xu hướng giảm xuống tương ứng là 61,96 $\pm$ 0,82%, 75,40 $\pm$ 0,72%, 69,87 $\pm$ 0,86% và 57,48 $\pm$ 0,98%. Kết quả nghiên cứu cho thấy, điều kiện pH thích hợp cho quá trình thủy phân dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc bằng enzyme β -glucosidase là 4,5.



Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến hiệu suất chuyển hoá isoflavone từ glucoside sang aglycone

Ghi chú: Các cột đồ thị không có cùng chữ cái in thường giống nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) theo kiểm định Tukey

3.4. Nghiên cứu xác định thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc

Tiến hành thủy phân dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc tại các điều kiện thích hợp đã xác

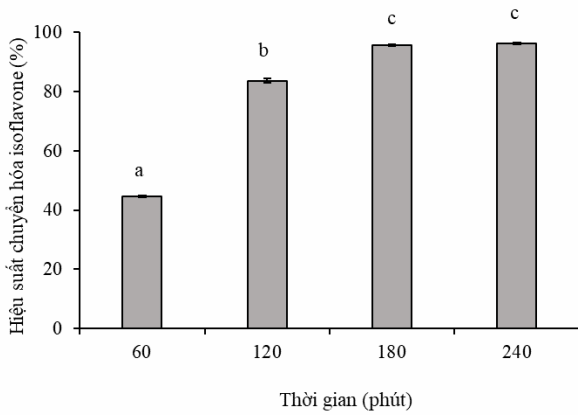
định được trong thời gian 240 phút. Thành phần isoflavone trong dịch sữa đậu tương và hiệu suất chuyển hoá isoflavone được thể hiện ở bảng 5 và hình 4.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng isoflavone (mg/100 g) trong dịch sữa đậu tương nảy mầm cô đặc

Thành phần	Thời gian (phút)				
	0	60	120	180	240
Daidzin	36,10 ± 0,14	12,50 ± 0,47	0,58 ± 0,06	-	-
Glycitin	4,37 ± 0,03	3,50 ± 0,10	3,51 ± 0,30	-	-
Genistin	50,12 ± 0,04	28,08 ± 0,48	1,83 ± 0,04	1,50 ± 0,04	1,35 ± 0,17
Malonyldaidzin	8,27 ± 0,04	6,57 ± 0,06	4,24 ± 0,03	0,65 ± 0,03	0,44 ± 0,05
Malonylglycitin	0,76 ± 0,03	0,68 ± 0,05	0,36 ± 0,03	-	-
Malonylgenistin	5,25 ± 0,03	3,21 ± 0,09	2,45 ± 0,24	2,12 ± 0,29	1,82 ± 0,13
Acetyldaidzin	0,44 ± 0,02	0,36 ± 0,05	0,15 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,13 ± 0,01
Acetylglycitin	8,66 ± 0,05	7,18 ± 0,07	4,35 ± 0,04	-	-
Acetylgenistin	3,11 ± 0,06	2,66 ± 0,04	1,65 ± 0,05	0,58 ± 0,02	0,56 ± 0,03
Glucoside tổng số	117,97 ± 1,80	64,75 ± 1,40	19,12 ± 0,81	5,09 ± 0,41	4,30 ± 0,38
Daidzein	18,26 ± 0,22	26,97 ± 0,50	43,64 ± 0,60	44,37 ± 0,20	44,62 ± 0,16
Glycitein	1,22 ± 0,02	1,26 ± 0,03	1,26 ± 0,03	10,53 ± 0,24	10,64 ± 0,16
Genistein	10,75 ± 0,15	18,09 ± 0,23	41,75 ± 0,65	55,91 ± 0,62	58,80 ± 0,11
Aglycone tổng số	30,09 ± 0,49	46,33 ± 0,74	86,66 ± 1,28	110,82 ± 1,07	112,06 ± 0,42

Ghi chú: - : Không phát hiện.

Bảng 5 cho thấy, thời gian thủy phân càng kéo dài thì hàm lượng glucoside giảm xuống càng thấp, đồng thời, hàm lượng aglycone tăng lên tương ứng. Hàm lượng glucoside giảm nhanh trong 120 phút đầu tiên và sau đó giảm chậm. Do đó, hàm lượng aglycone tạo thành trở lên ổn định sau 120 phút. Tiếp tục kéo dài thời gian đến 180 phút, hàm lượng glucoside chỉ còn lại rất thấp, thậm chí không phát hiện thành phần daidzin, glycitin, malonylglycitin và acetylglycitin trong dịch sữa đậu tương do các chất này đã được thủy phân hoàn toàn.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất chuyển hóa isoflavone từ glucoside sang aglycone

Ghi chú: Các cột đồ thị không có cùng chữ cái in thường giống nhau là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) theo kiểm định Tukey

Hình 4 thể hiện sự tăng lên tương ứng của hiệu suất chuyển hóa isoflavone theo thời gian thủy phân và hiệu suất chuyển hóa đạt giá trị khá cao tại thời điểm 180 phút ($95,65 \pm 0,29\%$). Không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) về hiệu suất chuyển hóa isoflavone giữa thời điểm 180 phút và 240 phút. Ngoài ra, việc kéo dài thời gian thủy phân tại nhiệt độ 50°C không được khuyến khích vì dịch đậu tương rất giàu dinh dưỡng, dễ bị hư hỏng. Chính vì vậy, thời gian thủy phân dừng lại ở thời điểm 180 phút là thích hợp để đảm bảo chất lượng dịch đậu tương, tránh rủi ro nhiễm vi sinh vật. Dịch sữa đậu tương sau thủy phân có hàm lượng isoflavone tổng số đạt $115,90 \pm 1,48 \text{ mg}/100 \text{ g}$, trong đó hàm lượng aglycone đạt tới $110,82 \pm 1,07 \text{ mg}/100 \text{ g}$, chiếm $95,61\%$

isoflavone tổng số. Kết quả cho thấy, so với các nghiên cứu lên men sữa đậu nành bằng vi sinh vật đã được công bố, quá trình chuyển hóa isoflavone từ dạng glucoside sang dạng aglycone bằng chế phẩm enzyme β -glucosidase thương mại diễn ra tương tự, thậm chí còn hiệu quả hơn và trong thời gian ngắn hơn. Theo Lee và cs (2016) [12], khi lên men sữa đậu tương với 3 chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, hàm lượng aglycone tăng lên ở tất cả các mẫu, với mức tăng cao nhất là 2,6 lần (chủng HJ18-9), nhưng hàm lượng isoflavone aglycone chỉ đạt 25% sau 36 giờ lên men ở 37°C . Izaguirre và cs (2021) [20] công bố chủng vi khuẩn lactic *Lactobacillus plantarum* 128/2 có khả năng chuyển hóa isoflavone glucoside gần như hoàn toàn sau 48 giờ lên men ở nhiệt độ 25°C . Theo de Queirós (2020) [21], sử dụng tannase để thủy phân isoflavone sau quá trình lên men sữa đậu tương với các chủng vi khuẩn lactic và bifidobacteria đã làm tăng hàm lượng daidzein từ 58 - 72%, genistein từ 67 - 76% và glycitein từ 17 - 63%, so với các mẫu sữa đậu nành đã lên men trước đó.

4. KẾT LUẬN

Chế phẩm enzyme β -glucosidase thương mại có khả năng chuyển hóa $95,65 \pm 0,29\%$ isoflavone từ dạng glucoside sang dạng aglycone trong dịch sữa đậu tương này mầm cô đặc ở điều kiện tỷ lệ enzyme 5 mL/L, pH 4,5 tại 50°C trong thời gian 180 phút. Sau khi thủy phân chuyển hóa bởi chế phẩm enzyme β -glucosidase, dịch sữa đậu tương này mầm cô đặc có hàm lượng isoflavone aglycone đạt tới $110,82 \pm 1,07 \text{ mg}/100 \text{ g}$, chiếm $95,61\%$ isoflavone tổng số ($115,90 \pm 1,48 \text{ mg}/100 \text{ g}$). Nhằm phát triển và ứng dụng chế phẩm enzyme β -glucosidase trong thực tiễn sản xuất, cần thực hiện các thử nghiệm ở quy mô lớn hơn (pilot-scale) để xác định tính ổn định và khả thi của quy trình khi áp dụng vào sản xuất công nghiệp, đồng thời tiếp tục nghiên cứu ứng dụng dịch sữa đậu tương giàu IA trong sản xuất thực phẩm chức năng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Guojun Cheng, Brigitte Wilczek, Margaret Warner, Jan-Ake Gustafsson and Britth-Marie Landgren (2007). Isoflavone treatment for acute menopausal symptoms. *Menopause: The Journal*

of *The North American Menopause Society*, 14(3): 468 - 473.

2. Asuka Hirose, Masakazu Terauchi, Mihoko Akiyoshi, Yoko Owa, Kiyoko Kato, Toshiro Kubota (2016). Low-dose isoflavone aglycone alleviates psychological symptoms of menopause in Japanese women: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arch Gynecol Obstet*, 293: 609 - 615.

3. Kao TH, Wu WM, Hung CF, Wu WB and Chen BH (2007). Anti inflammatory effects of isoflavone powder produced from soybean cake. *J Agric Food Chem*, 55: 11068 – 11079.

4. Angelotti JAF, Dias FFG, Sato HH, Fernandes P, Nakajima VM, Macedo J (2020). Improvement of aglycone content in soy isoflavones extract by free and immobilized β -glucosidase and their effects in lipid accumulation. *Appl Biochem Biotechnol*, 192: 734 - 750.

5. Hiramatsu EY, de Ávila ARA, Gênova VM, de Queirós LD, Macedo GA, Martins IM, Macedo JA (2020). Biotransformation processes in soymilk isoflavones to enhance anti-inflammatory potential in intestinal cellular model. *J Food Biochem*, 44: 1 - 10.

6. Ma, D. F., Qin, L. Q., Wang, P. Y., Katoh, R. (2008). Soy isoflavone intake increases bone mineral density in the spine of menopausal women: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical Nutrition*, 27(1): 57 - 64.

7. Ali MW, Kim ID, Bilal S, Shahzad R, Saeed MT, Adhikari B, Nabi RBS, Kyo JR, Shin DH (2017). Effects of bacterial fermentation on the biochemical constituents and antioxidant potential of fermented and unfermented soybeans using probiotic *Bacillus subtilis* (KCTC13241). *Molecules*, 22: 2200.

8. de Ávila ARA, de Queirós LD, Ueta TM, Macedo GA, Macedo JA (2019). Exploring *in vitro* effects of biotransformed isoflavones extracts: Antioxidant, anti-inflammatory and antilipogenic. *J Food Biochem*, 43: 1 – 9.

9. Setchell KD, Brown NM & Lydeking-Olsen E (2002). The clinical importance of the metabolite equol - a clue to the effectiveness of soy and its Isoflavones. *The Journal of Nutrition*, 132, 3577 - 3584.

10. Chien HL, Huang HY, Chou CC (2006). Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol*, 23: 772 - 778.

11. Peirotén Á, Gaya P, Álvarez I, Ma Landete J (2020). Production of Odesmethylangolensin, tetrahydrodaidzein, 6'-hydroxy-Odesmethylangolensin and 2-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid in fermented soy beverage by lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* strains. *Food Chem*, 318: 126521.

12. Lee Kyung Ha, Kim Sae Hun, Woo Koan Sik, Kim Hyun Joo, Choi Hye Sun Kim Young Hoon, Song Jin (2016). Functional beverage from fermented soymilk with improved amino nitrogen, β -glucosidase activity and aglycone content using *Bacillus subtilis* starter. *Food Sci. Biotechnol*, 25(5): 1399 - 1405.

13. Tsangalis, D., Ashton, J. F., McGill, A. E. J., and Shah, N. P. (2002). Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by beta-glucosidase producing *Bifidobacteria*. *Journal of Food Science*, 67: 3104 – 3113.

14. Thuy T. Pham, Nagendra P. Shah (2009). Hydrolysis of isoflavone glycosides in soy milk by beta galactosidase and beta glucosidase. *Journal of Food Biochemistry*, 33: 38 - 60.

15. Fang, W., Song, R., Zhang, X., Zhang, X., Zhang, X., Wang, X., Fang, Z. & Xiao, Y. (2014). Characterization of a novel β -glucosidase from *Gongronella* sp. W5 and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(48): 11688 - 11695.

16. de Queirós LD, Macedo JA, Macedo GA. (2016). A new biotechnological process to enhance the soymilk bioactivity. *Food Sci Biotechnol*, 25: 763 - 770.

17. Wang G, Kuan SS, Francis OJ, Ware GM, Carman AS (1990). Simplified HPLC method for determination of phytoestrogens in soybean and its processed product. *J. Agr. Food Chem*, 38: 185 - 190.

18. Xie L, Hettiarachchy NS, Cai R, Tsuruhami K, Koikeda S. (2003). Conversion of isoflavone

glycosides to aglycones in SoyLife and soy meal using β -glucosidase. *J Food Sci*, 68(2): 427 - 430.

19. Pandjaitan N., Hettiarachchy N., Ju Z. Y. (2000). Enrichment of genistein in soy protein concentrate with β -glucosidase. *Food Chemistry and Toxicology*, 65(3): 403 - 407.

20. Izaguirre JK, Barañano L, Castañón S, Alkorta I, M. Quirós L & Garbisu C (2021).

Optimization of the bioactivation of isoflavones in soymilk by lactic acid bacteria. *Processes*, 9: 963.

21. de Queirós, L. D. (2020). Combined isoflavones biotransformation increases the bioactive and antioxidant capacity of soymilk. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104: 10019 - 10031.

RESEARCH ON THE APPLICATION OF β -GLUCOSIDASE ENZYME PREPARATION FOR THE CONVERSION OF ISOFLAVONES FROM GLUCOSIDE TO AGLYCONE FORM IN CONCENTRATED GERMINATED SOY MILK

Truong Huong Lan¹, Nguyen Thi Viet Ha¹, Duong Duc Hanh²

¹*Department of Food Technology and Nutrition, Food Industries Research Institute*

²*Nasaki Pharmaceutical Co., Ltd*

Abstract

Isoflavones are compounds belonging to the phytoestrogen group, with a structure similar to that of human estrogen. Soy isoflavones have received worldwide attention due to studies showing that their consumption is associated with lower incidence of certain types of cancer and a reduced risk of various other diseases, including cardiovascular issues, osteoporosis and menopausal symptoms. In soybeans, most isoflavones exist in the glucoside form, while only a small proportion (2 - 5%) exists in the aglycone form - the free, sugar - unbound form that is more easily absorbed and exhibits higher biological activity. The enzyme β -glucosidase effectively catalyzes the hydrolysis of β -1,6-glycosidic bonds, removing the sugar moiety from isoflavone glucosides and thereby releasing the aglycone form. This study identified optimal technological conditions for the hydrolysis of concentrated germinated soybean milk using a commercial β -glucosidase enzyme preparation: Enzyme concentration of 5 mL/L, pH 5, temperature of 50°C and reaction time of 180 minutes. Results showed that under these optimal conditions, the conversion efficiency of isoflavones was very high, reaching $95.65 \pm 0.29\%$. The total isoflavone content in the hydrolyzed concentrated germinated soybean milk reached 115.90 ± 1.48 mg/100 g, with aglycone isoflavones being predominant at 110.82 ± 1.07 mg/100 g (accounting for 95.61%). These findings not only confirm the superior effectiveness of the commercial β -glucosidase preparation in enhancing the content and proportion of bioactive aglycone isoflavones but also open up promising applications of concentrated germinated soybean milk in the development of high-quality functional food products.

Keywords: *Germinated soybean, isoflavones, aglycones, β -glucosidase.*

Ngày nhận bài: 20/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 11/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 25/7/2025

Ngày duyệt đăng: 5/8/2025

NGHIÊN CỨU CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN CHẤT LƯỢNG CỦA NƯỚC ÉP HOÀNG SIN CÔ - DỨA ĐÓNG CHAI

Nguyễn Thị Hồng Lĩnh^{1*}, Nguyễn Mạnh Đạt¹,

Đỗ Thị Thanh Huyền¹, Chu Thắng¹, Nguyễn Thị Thu¹

¹Bộ môn Công nghệ Enzyme & Protein, Viện Công nghiệp thực phẩm

*Email: linhnth@firi.vn

TÓM TẮT

Cây Hoàng sin cô có nguồn gốc từ Tây Tạng, Trung Quốc, du nhập vào Việt Nam từ những năm 1990. Củ Hoàng sin cô có tính hàn, vị ngọt mát, chứa nhiều thành phần có hoạt tính sinh học quý do vậy đã được nghiên cứu làm nguyên liệu sản xuất một số loại thực phẩm như miến, kẹo, trà, thạch rau câu. Dứa có tên khoa học là *Ananas Comosus* Merr hay *Ananas Sativus* sehult - là một đặc sản nhiệt đới, tuy đứng hàng thứ 10 trên thế giới về sản lượng trong các loại cây ăn quả nhưng về chất lượng, hương vị lại đứng hàng đầu và được mệnh danh là “vua hoa quả”. Trong nghiên cứu này, nước ép củ Hoàng sin cô và dịch ép dứa (Hoàng sin cô - dứa) được sản xuất theo công thức sau: Tỷ lệ phối chế dịch ép củ Hoàng sin cô: dịch ép dứa là 50: 50, dịch ép nước hoàng sin cô - dứa được pha loãng với nước theo tỷ lệ là 50: 50, phối chế với sucrose tới 14°Brix (Bx), tỷ lệ bổ sung axit citric 0,05%, pectin là 0,05%. Chế độ thanh trùng ở nhiệt độ 90°C trong 10 phút có hiệu quả trong việc tiêu diệt vi sinh vật giúp sản phẩm có thể giữ ở nhiệt độ thường trong ít nhất 4 tuần mà không cần bổ sung chất bảo quản. Tổng điểm đánh giá cảm quan sản phẩm đạt hơn 18 điểm, hàm lượng đường FOS và vitamin C cao cho thấy mẫu nước ép củ Hoàng sin cô - dứa đóng chai thanh trùng có phạm vi thương mại tốt để sản xuất nước ép bổ dưỡng tốt cho sức khỏe người tiêu dùng.

Từ khóa: Củ Hoàng sin cô, quả dứa, nước ép Hoàng sin cô - dứa, phối chế.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Hoàng sin cô có danh pháp khoa học là *Smallanthus sonchifolius*, là một loài thực vật có hoa trong họ Cúc. Các nghiên cứu đã chỉ ra trong củ Hoàng sin cô (còn có tên gọi là củ sâm đất hay khoai sâm) chứa đến 70 - 80% fructooligosaccharide (FOS) [1] là nguồn chất chống oxy hóa tự nhiên, giúp hạ đường huyết, cải thiện hoạt động của các loại vi khuẩn đường ruột có lợi và các tác dụng tốt khác trên đường tiêu hóa, chống lại sự suy giảm testosterone. Ngoài ra, trong củ còn có 15 - 40% các loại đường: Sucrose, fructose và glucose [2], các hợp chất phenolic có tác dụng trong việc phòng ngừa nhiều bệnh mãn tính như: Đái tháo đường, ung thư và tim mạch, kiểm soát cholesterol trong máu, giảm căng thẳng, mệt mỏi [3]. Loại củ này chỉ sinh trưởng ở những

nơi có khí hậu lạnh với độ cao gần 2.000 m so với mực nước biển và được trồng chủ yếu ở xã Y Tý, huyện Bát Xát, tỉnh Lào Cai. Năm 2025, xã Y Tý thực hiện kế hoạch trồng 50 ha cây sâm đất (Hoàng sin cô). Từ đầu năm 2025 đến nay, người dân trên địa bàn xã Y Tý trồng được 73,6 ha cây Hoàng sin cô, tăng gần 24 ha, đạt 147,3% kế hoạch. So với năm 2024, diện tích cây Hoàng sin cô của xã Y Tý năm 2025 tăng 49,3 ha (tăng gấp 2,7 lần so với năm trước).

Dứa là một loại cây nhiệt đới có quả lâu năm được biết đến trên toàn thế giới, là thành viên của họ Dứa với hơn 2.500 loài. Ban đầu, dứa được trồng ở Nam Mỹ, sau đó lan rộng sang nhiều quốc gia khác trên thế giới thông qua các nhà thám hiểm và nhà sử học đến thăm Nam Mỹ. Hiện nay, sản lượng dứa trên toàn thế giới đạt khoảng 25

triệu tấn mỗi năm, là loại trái cây được tiêu thụ nhiều thứ ba sau chuối và trái cây có múi. Dứa là nguồn thu nhập quan trọng cho nhiều quốc gia sản xuất dứa hàng đầu thế giới. Hương vị đặc biệt của nó làm cho dứa trở nên quan trọng trong ngành công nghiệp thực phẩm, là thành phần không thể thiếu trong nhiều công thức nấu ăn. Dứa được trồng rộng rãi ở Việt Nam là loại trái cây có nhiều lợi ích sức khỏe đã được nghiên cứu về mặt sinh học. Quả dứa chứa nhiều vitamin (vitamin A, C, B3, B6 và B12), enzyme và chất chống oxy hóa, cũng như tanin, cardenolides, dienolides, glycoside, phenol và flavonoid. Đặc biệt, dứa được chứng minh là có hiệu quả trong việc chống đông máu, giảm đau, tim mạch, tăng cường hệ thống miễn dịch, giảm các biến chứng dạ dày, hỗ trợ thai kỳ và ức chế khối u. Ngoài ra, dứa còn có tác dụng chống viêm, ngăn ngừa ung thư ruột kết, thoái hóa điểm vàng và viêm khớp. Bromelain là một enzyme quan trọng có trong dứa, có hoạt động chống viêm và chống ung thư, cũng như gây chết tế bào apoptotic [4, 5].

Dự kiến, sản lượng dứa của Việt Nam sẽ đạt 807.000 tấn vào năm 2026. Con số này tăng so với mức 726.000 tấn vào năm 2021, tốc độ tăng trưởng trung bình 1,8% mỗi năm. Kể từ năm 1966, nguồn cung của Việt Nam đã tăng 5,5% so với cùng kỳ năm trước. Với sản lượng lớn như vậy, nhưng củ Hoàng sin cô và dứa lại thu hoạch theo mùa vụ và trong 1 khoảng thời gian nhất định trong năm. Tuy nhiên thực tế cho thấy, các cơ sở xử lý, chế biến và bảo quản sau thu hoạch không đủ và đúng cách, mỗi năm một lượng đáng kể bị lãng phí [6].

Việc kết hợp nước ép củ Hoàng sin cô và nước ép dứa là một giải pháp tiềm năng và hiệu quả. Quả dứa chứa hàm lượng cao các vitamin, đặc biệt là vitamin C thay đổi tùy thuộc vào giống và thời điểm thu hoạch, dao động từ 28,2 - 52,4 mg/100 g dứa tươi [7], sẽ là một chất chống oxy hóa giúp cho nước ép củ Hoàng sin cô không bị oxy hóa và sẽ có màu sắc vàng sáng đẹp mắt. Việc lựa chọn và kết hợp giữa củ Hoàng sin cô - dứa không chỉ tận dụng thế mạnh dinh dưỡng của củ Hoàng sin cô mà còn mang lại màu sắc tự nhiên hấp dẫn từ quả dứa, đáp ứng được yêu cầu về cảm quan. Sản phẩm phù hợp với xu hướng tiêu dùng hiện đại, chú trọng thực phẩm chức năng giàu dinh dưỡng và có nguồn gốc

tự nhiên. Hơn thế nữa việc nghiên cứu và đưa ra công thức pha chế nước uống từ củ Hoàng sin cô – dứa nhằm quảng bá và đa dạng hóa sản phẩm của vùng miền, giúp giải quyết nguồn nguyên liệu và tạo công ăn việc làm cho người dân trong vùng trồng nguyên liệu, gia tăng giá trị kinh tế cho ngành nông nghiệp và công nghiệp chế biến thực phẩm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Củ Hoàng sin cô được lấy tại xã Y Tý, huyện Bát Xát, tỉnh Lào Cai 11 tháng sau khi trồng, có khối lượng từ 200 - 500 g, dài khoảng 10 - 15 cm, vỏ màu nâu vàng, ruột màu vàng, sáng củ mọng nước, bề mặt củ căng.



Hình 1. Củ Hoàng sin cô

- Dứa hoa (*Ananas comosus* Queen) được trồng tại xã Bảo Sơn, huyện Lục Nam, tỉnh Bắc Giang. Khối lượng từ 0,6 - 1,3 kg/trái, dạng trụ tròn đều, thịt màu vàng đậm. Trái chín độ 3 (75 - 100%), vỏ quả có màu vàng tươi, khoảng 4 hàng mở mắt.



Hình 2. Quả dứa hoa

- Đường sucrose: Đáp ứng theo TCVN 6958:2023 [8].

- Axit citric: Đáp ứng theo TCVN 5516:2010 về chất lượng [9].

- Pectin: Dạng bột, màu trắng ngà, mùi đặc trưng.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nghiên cứu xác định công thức phối chế

- Củ Hoàng sin cô thu hái về rửa sạch, gọt vỏ; dứa được gọt vỏ, cắt mắt. Sau đó, nguyên liệu được rửa lại bằng nước sạch, cắt thành lát mỏng và ép, lọc lấy dịch củ, quả. Sau mỗi thí nghiệm xác định tỷ lệ phối chế, thành phần phối chế. Nước ép sau khi phối chế được đóng chai, ghép nắp và thanh trùng ở nhiệt độ 90°C trong 10 phút rồi tiến hành đánh giá cảm quan. Chỉ tiêu đánh giá: Màu sắc, mùi vị, trạng thái để chọn ra tỷ lệ phối chế thích hợp cho nước ép củ Hoàng sin cô: dứa.

- Xác định tỷ lệ phối chế nước Hoàng sin cô - dứa, dịch ép Hoàng sin cô - dứa được tiến hành phối chế theo các tỷ lệ 30: 70, 40: 60, 50: 50 và 60: 40%.

- Xác định tỷ lệ nước pha loãng: Dịch ép củ Hoàng sin cô- dứa được đem đi pha loãng với nước theo các tỷ lệ 30: 70, 40: 60, 50: 50 và 60: 40%.

- Thí nghiệm xác định tỷ lệ đường bổ sung: Hàm lượng đường bổ sung để đạt được độ Bx theo mong muốn được tính toán theo công thức:

$$\frac{Y}{100} = \frac{(a+X)}{(100+X)}$$

- Trong đó: Y là °Bx.

Bx cần đạt được; a là Bx của dịch ép sau khi lọc, pha loãng; X là hàm lượng đường bổ sung cho 100 g dịch ép.

- Dịch ép sau khi chọn được tỷ lệ pha loãng, tiến hành thí nghiệm xác định tỷ lệ đường phối chế để đạt được nồng độ 13; 14; 15; 16°Bx.

- Thí nghiệm xác định tỷ lệ axit citric cho vào hỗn hợp: Khi xác định được tỷ lệ pha loãng, tỷ lệ đường bổ sung, tiến hành thí nghiệm xác định tỷ lệ axit citric bổ sung lần lượt là: 0,03; 0,05; 0,07; 0,1% (w/v).

- Thí nghiệm xác định tỷ lệ pectin cho vào hỗn hợp: Sau khi chọn được tỷ lệ pha loãng, hàm lượng đường bổ sung vào hỗn hợp, tỷ lệ axit citric, tiến hành thí nghiệm xác định tỷ lệ pectin bổ sung theo các tỷ lệ: 0,03; 0,05; 0,07; 0,1% (w/v).

- Khảo sát nhiệt độ và thời gian thanh trùng cho sản phẩm nước ép Hoàng sin cô - dứa: Hỗn

hợp nước ép Hoàng sin cô - dứa sau khi được pha loãng theo tỷ lệ thích hợp, được bổ sung thêm đường, axit citric, pectin sẽ được tiến hành khảo sát thanh trùng ở dải nhiệt độ 80 ÷ 90°C trong khoảng thời gian 5 - 15 phút. Sau thanh trùng sản phẩm, tiến hành đánh giá cảm quan, chỉ tiêu hóa lý và vi sinh vật.

2.2.2. Phương pháp phân tích

- Xác định hàm lượng tro bằng phương pháp AOAC 940.26:1940 [10].

- Xác định hàm lượng nước theo TCVN 4326:2001 [11].

- Xác định pH của dịch nước ép củ, quả bằng máy đo pH (Hanna, Mỹ).

- Xác định nồng độ chất khô hòa tan (°Bx) bằng chiết quang kế (ATAGO, 0- 33°Brix, Pháp).

- Xác định hàm lượng đường theo TCVN 4594:1988 [12].

- Xác định hàm lượng vitamin C theo TCVN 8977:2011 [13].

- Xác định hàm lượng fructooligosaccharide (FOS).

Hàm lượng FOS được phân tích bằng phương pháp quang phổ sử dụng Kit fructan thương mại K-FRUC Kit, hãng Megazyme - Ireland. 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 (% ck) hoặc số mg trong 100 ml dịch lỏng.

- Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Bradford (1976) [14].

- Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí theo TCVN 4884 -1:2015 [15].

- Xác định số lượng *Escherichia coli* theo TCVN 6846:2007 [16].

- Xác định số lượng Coliforms theo TCVN 6848:2007 [17].

- Xác định tổng số nấm men và nấm mốc theo TCVN 8275-1:2010 [18].

- Đánh giá cảm quan theo TCVN 3215-79 [19].

- Xử lý số liệu bằng phần mềm Excel và SPSS.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát thành phần nguyên liệu

Xác định thành phần hóa học của củ Hoàng sin cô tươi sau khi thu hoạch được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hóa học củ Hoàng sin cô tươi, quả dứa

Chỉ tiêu	Hoàng sin cô	Dứa
Độ ẩm (%)	83,18 ± 0,15	81,32 ± 0,06
Tro (%)	2,36 ± 0,05	0,76 ± 0,03
Hàm lượng chất khô (°Bx)	6,15 ± 0,26	15,32 ± 0,12
pH	6,25 ± 0,32	3,68 ± 0,15
Vitamin C (%)	0,005 ± 0,001	0,068 ± 0,002
Hàm lượng protein (%)	1,73 ± 0,05	0,38 ± 0,03
Hàm lượng đường FOS (% chất khô)	56,6 ± 0,3	

Kết quả cho thấy, củ Hoàng sin cô và quả dứa có hàm lượng nước lớn khả năng thu hồi dịch củ, quả sẽ cao nên rất thuận lợi cho công nghệ sản xuất nước giải khát. Hàm lượng vitamin C cao có trong quả dứa và hàm lượng đường FOS có trong củ Hoàng sin cô sẽ kết hợp tạo ra một sản phẩm nước ép có giá trị dinh dưỡng tốt cho sức khỏe người dùng. Hàm lượng vitamin C trong dứa nguyên liệu đạt được $0,068 \pm 0,002\%$ phù hợp với kết quả nghiên cứu của Vũ Kim Dung và cs (2020) [20]. Hàm lượng đường FOS đạt $56,6 \pm 0,3$ (% chất khô) phù hợp với kết quả nghiên cứu của Campos và cs (2016) [21], hàm lượng FOS dao động từ 6,4 - 70% chất khô, hàm lượng FOS thay đổi có thể do giống cây trồng, thời gian thu hoạch và điều kiện bảo quản sau thu hoạch.

3.2. Kết quả lựa chọn tỷ lệ phối chế nước ép hoàng sin cô: dứa thích hợp

Kết quả ảnh hưởng của tỷ lệ phối chế dịch ép được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ phối chế

Tỷ lệ phối chế hoàng sin cô: dứa (% v/v)	Điểm cảm quan có trọng lượng
30: 70	15,68 ^a
40: 60	16,87 ^b
50: 50	18,68 ^c
60: 40	16,75 ^b

Ghi chú: Các giá trị cùng một cột có chữ cái trên đầu khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, sản phẩm nước ép phối trộn được đánh giá cao nhất khi tỷ lệ phối trộn nước ép Hoàng sin cô - dứa là 50: 50%, sản phẩm có điểm cảm quan (màu sắc, mùi, vị, trạng thái) vượt trội hơn các tỷ lệ 30: 70, 40: 60 và 60: 40%. Với tỷ lệ phối trộn Hoàng sin cô - dứa 50: 50%, mẫu có màu sắc, mùi, vị chua ngọt hài hòa nhất, cho sản phẩm có mùi, vị thơm ngon của dứa nhưng không mất đi đặc tính riêng của củ Hoàng sin cô. Bên cạnh việc tạo hương vị chua ngọt dịu, nước dứa còn tạo cho sản phẩm có màu vàng sáng đẹp mắt do trong dứa có chứa hàm lượng vitamin C cao đã giúp hạn chế quá trình oxi hóa nước ép củ Hoàng sin cô, điều này được khẳng định trong các nghiên cứu trước đây của Manrique và cs (2005) [22], theo đó việc bổ sung các chất chống oxi hóa như vitamin C sẽ giúp hạn chế quá trình oxi hóa xảy ra với nước ép củ Hoàng sin cô. Với tỷ lệ phối chế Hoàng sin cô - dứa là 30: 70, 40: 60, sản phẩm có màu vàng sáng đẹp nhưng vị chua mạnh không hài hòa, trong khi đó với tỷ lệ 60: 40 sản phẩm lại có màu sắc không đẹp và sẽ bị biến đổi theo thời gian bảo quản do quá trình oxi hóa nước quả xảy ra. Do vậy, đã lựa chọn tỷ lệ phối chế dịch ép Hoàng sin cô - dứa là 50: 50 cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Khảo sát tỷ lệ pha loãng hỗn hợp dịch ép với nước

Một sản phẩm khi đưa ra ngoài thị trường để được đánh giá cao và thu hút được lượng lớn người tiêu dùng thì phải có sự kết hợp hài hòa giữa giá trị cảm quan, giá trị dinh dưỡng và giá thành của sản

phẩm. Do vậy, pha loãng dịch ép với nước trong quá trình sản xuất vừa phải đáp ứng được bài toán giá thành nhưng lại phải đáp ứng được bài toán về dinh dưỡng.

Kết quả đánh giá cảm quan ở bảng 3 cho thấy, với các tỷ lệ pha loãng 60: 40 và 50: 50 là các tỷ lệ mà sản phẩm có mùi thơm, màu sắc, vị rất hài hòa. Với tỷ lệ pha loãng 40: 60 và 30: 70 thì dịch pha chế không còn giữ được mùi vị đặc trưng của dịch ép, hơn nữa khi tăng tỷ lệ pha loãng thì làm giảm giá trị dinh dưỡng của sản phẩm. Đối với dịch ép pha loãng tỷ lệ 60: 40 được đánh giá cao hơn, màu sắc, mùi vị rất thơm ngon, nhưng giá thành sản phẩm cuối cùng lại cao, khi ứng dụng vào sản xuất để đưa ra thị trường sẽ khó cạnh tranh về giá cả sản phẩm. Do vậy, lựa chọn tỷ lệ pha loãng dịch ép với nước là 50: 50 vừa đảm bảo giá trị dinh dưỡng, cảm quan và giá thành cuối của sản phẩm. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Le My Hong và cs (2009) [23], Phan Vinh Hung (2021) [24].

Bảng 3. Ảnh hưởng tỷ lệ pha loãng hỗn hợp dịch ép: nước

Tỷ lệ phối chế Hoàng sin cô/dứa: nước (% v/v)	Điểm cảm quan có trọng lượng
60: 40	18,55 ^c
50: 50	18,28 ^c
40: 60	15,28 ^b
30: 70	14,23 ^a

Ghi chú: Các giá trị cùng một cột có chữ cái trên đầu khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$).

3.4. Khảo sát tỷ lệ đường bổ sung vào nước ép

Theo Dissanayake (2017) [25], tính axit và hàm lượng đường càng cao trong sản phẩm sẽ được ưa chuộng hơn bởi người tiêu dùng. Đường được bổ sung vào dịch ép để đạt được các tỷ lệ 12; 13; 14; 15; 16°Bx. Theo khảo sát đánh giá cảm quan của các thành viên trong tổ chuyên gia, đối với tỷ lệ 15, 16°Bx, sản phẩm có vị ngọt đậm, hơi có mùi đường nên khó được thị trường chấp nhận. Đối với tỷ lệ 12, 13°Bx, sản phẩm ít ngọt, vị chua nhạt không hài hòa nên không được đánh giá cao.

Đối với tỷ lệ 14°Bx, được đánh giá cao về độ hài hòa mùi vị của sản phẩm. Do vậy, lựa chọn phối chế bổ sung sucrose vào dịch ép đến 14°Bx cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.5. Xác định tỷ lệ axit citric bổ sung vào nước ép

Axit citric đóng một vai trò quan trọng trong việc tăng cường hương vị, đặc biệt là trong ngành công nghiệp đồ uống, vì nó cung cấp một hương vị chua và điều chỉnh vị ngọt của nhiều thức uống.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ citric bổ sung đến chất lượng sản phẩm

Tỷ lệ bổ sung citric (%)	Điểm cảm quan có trọng lượng	pH của sản phẩm
0	14,23 ^a	5,23
0,03	16,53 ^c	4,36
0,05	17,69 ^d	4,25
0,07	15,23 ^b	4,18
0,1	14,16 ^a	4,09

Ghi chú: Các giá trị cùng một cột có chữ cái trên đầu khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Kết quả cho thấy, bổ sung axit citric không những ảnh hưởng nhiều đến màu sắc, mùi và trạng thái mà còn ảnh hưởng nhiều đến vị của sản phẩm. Axit citric có hoạt tính khá cao nên chỉ cần bổ sung một lượng nhỏ cũng ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm. Nếu bổ sung quá ít, sản phẩm sẽ không hài hòa giữa vị chua và ngọt, ngược lại nếu bổ sung quá nhiều sẽ làm cho sản phẩm có vị chua gắt, khó uống. Mặt khác, bổ sung axit citric sẽ giúp giảm pH của nước ép, tạo ra môi trường có pH thấp, hạn chế sự phát triển của vi sinh vật, giảm nhiệt độ thanh trùng và kéo dài thời gian bảo quản. Tuy nhiên, điều này cũng đặt ra một vấn đề, vì tính axit tăng lên làm tăng đáng kể tốc độ FOS chuyển hóa thành đường đơn. Ví dụ, một sản phẩm có pH = 4 sẽ chuyển hóa khoảng 25% FOS của nó thành đường đơn sau 6 tháng bảo quản, nếu pH = 3 thì 45% FOS sẽ bị biến đổi trong cùng một khoảng thời gian [22]. Do vậy, lựa chọn được tỷ lệ axit citric thích hợp là một yếu tố khá quan

trọng, vì nó không những ảnh hưởng đến giá trị cảm quan mà còn ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, điểm cảm quan tăng dần từ 14,23 - 17,69 khi bổ sung lượng axit citric từ 0 - 0,05%, sau đó điểm cảm quan giảm dần đạt giá trị nhỏ nhất là 14,16 điểm với lượng axit citric bổ sung là 0,1%, tại tỷ lệ này sản phẩm có màu vàng tươi sáng nhưng vị chua không hài hòa. Với tỉ lệ bổ sung 0,05%, cho điểm cảm quan cao nhất là 17,69 điểm và giá trị pH phù hợp để bảo quản sản phẩm. Vì vậy, đã lựa chọn tỉ lệ axit citric bổ sung là 0,05% để cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ pectin bổ sung vào nước ép

Trong sản xuất đồ hộp nước uống, pectin, đường, axit làm cho nước ép đồng nhất, hạn chế việc tách lớp, phân tầng. Nếu cho pectin với tỷ lệ không thích hợp (quá nhiều) sẽ làm cho sản phẩm có độ sánh lớn, làm giảm giá trị cảm quan của sản phẩm. Việc lựa chọn pectin bổ sung vào quá trình sản xuất nước quả ép trong kết quả nghiên cứu của Vũ Kim Dung và cs (2020) [20] cho thấy, bổ sung pectin với tỷ lệ 0,1% vào nước ép dứa - bí đao giúp nước ép đồng nhất và ổn định sau 8 tuần bảo quản.

Bảng 5. Ảnh hưởng hàm lượng pectin đến chất lượng sản phẩm

Hàm lượng pectin (%)	Cảm quan sản phẩm
0,03	Sản phẩm có màu vàng sáng tươi, mịn, có hiện tượng lắng đáy.
0,05	Sản phẩm có màu vàng sáng tươi, trạng thái đồng nhất, mịn.
0,07	Sản phẩm có màu vàng sáng tươi, trạng thái đồng nhất, sánh, mịn.
0,1	Sản phẩm có màu vàng sáng, trạng thái đồng nhất, sánh đặc, mịn.

Kết quả đánh giá cảm quan cho thấy, với tỷ lệ 0,03%, chỉ sau thời gian khoảng 15 giờ là sản phẩm bắt đầu xuất hiện lắng cặn, tách lớp. Với tỷ lệ bổ sung 0,07 - 0,1%, sản phẩm có độ sánh tương đối lớn, khi uống sản phẩm tạo cảm giác nhót, khó chịu. Tỷ lệ bổ sung 0,05%, sản phẩm tạo trạng thái đồng nhất khối dịch, khi uống tạo cảm giác ngon hơn, đặc hơn. Do vậy, đã lựa chọn tỷ lệ bổ sung pectin là 0,05% vào trong dịch ép để tiến hành các thí nghiệm tiếp.

3.6. Kết quả khảo sát nhiệt độ và thời gian thanh trùng sản phẩm đến chất lượng sản phẩm

Một bước không thể thiếu trong quá trình sản xuất nước ép trái cây là quá trình thanh trùng bằng nhiệt nhằm ngăn chặn sự phát triển của vi sinh vật bề mặt, giúp bảo quản sản phẩm trong thời gian lâu hơn. Thanh trùng là quá trình sử dụng nhiệt thấp hơn 100°C để khử trùng các vi

sinh vật không cần thiết, đây là 1 phương pháp được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm. Đường FOS có độ bền nhiệt được chứng minh cao hơn so với sucrose, đường FOS bền trong dải pH 4,0 - 7,0 và nhiệt độ cao tới 140°C [26], do vậy hàm lượng đường FOS ít bị biến đổi qua các công đoạn chế biến. Tuy nhiên, trong dịch nước ép này còn rất nhiều các hợp chất sinh học có lợi cho sức khỏe con người như: Axit ascorbic, carotene và polyphenol..., các hợp chất này là các chất chống oxy hóa tự nhiên ức chế các phản ứng oxy hóa trong cơ thể người [27 - 29]. Do đó, các hợp chất này cần được bảo vệ tối đa trong quá trình chế biến. Bên cạnh đó quá trình thanh trùng cũng làm thay đổi mùi, màu sắc hay trạng thái của sản phẩm nếu sử dụng nhiệt độ không phù hợp hoặc thanh trùng trong thời gian quá lâu.

Bảng 6. Các chỉ tiêu sản phẩm trước khi thanh trùng

TT	Chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả
1	pH		4,31
2	Hàm lượng đường FOS	(mg/100 ml)	168,00 ± 0,02
3	Hàm lượng vitamin C	mg/100 ml	34,36 ± 0,05

Bảng 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian thanh trùng đến chất lượng sản phẩm

Nhiệt độ thanh trùng (°C)	Thời gian thanh trùng (phút)	Hàm lượng vitamin C (mg/100 ml)	Tổng số vi sinh vật hiếu khí CFU/ml	Điểm cảm quan sản phẩm có trọng lượng
80	5	30,13 ± 0,01	15 x10 ²	
80	10	25,16 ± 0,03	16 x 10 ¹	
80	15	15,36 ± 0,02	10 x 10 ¹	
85	5	29,21 ± 0,04	11 x10 ²	
85	10	19,15 ± 0,02	12 x10 ¹	
85	15	13,22 ± 0,01	1,8 x 10 ¹	17,5
90	5	26,32 ± 0,03	1,1 x 10 ²	
90	10	18,36 ± 0,04	0	18,2
90	15	2,13 ± 0,02	0	

Bảng 7 cho thấy, với nhiệt độ thanh trùng 80°C trong khoảng thời gian từ 5 - 15 phút, nhiệt độ thanh trùng 85°C trong thời gian 5 -10 phút và nhiệt độ thanh trùng 90°C trong khoảng thời gian 5 phút, mặc dù hàm lượng vitamin C còn lại tương đối cao nhưng chỉ tiêu tổng vi sinh vật hiếu khí lại nằm ngoài giới hạn cho phép của QCVN 6-2:2010/BYT [30] đối với các sản phẩm đồ uống không cồn là 10² CFU/ml, do vậy sản phẩm không đạt chất lượng an toàn vệ sinh thực phẩm. Đối với nhiệt độ thanh trùng 90°C trong 15 phút cũng

không được lựa chọn, vì tại nhiệt độ này mặc dù không phát hiện vi sinh vật tổng số nhưng hàm lượng vitamin C còn lại rất thấp sẽ không đáp ứng được chỉ tiêu dinh dưỡng của sản phẩm mong muốn. Như vậy, với thông số thanh trùng ở 85°C trong 15 phút và 90°C trong 10 phút đều có thể được lựa chọn do đáp ứng được các chỉ tiêu cảm quan, chất lượng và vệ sinh an toàn thực phẩm, tuy nhiên đã lựa chọn thanh trùng 90°C trong 10 phút để mang lại giá trị dinh dưỡng và cảm quan tốt hơn.

Bảng 8. Chỉ tiêu chất lượng sản phẩm nước ép Hoàng sin cô - dứa

TT	Chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả
1	pH		4,25
2	Nồng độ chất khô hòa tan	%	14,08 ± 0,12
3	Hàm lượng đường tổng	g/ 100 ml	12,26 ± 0,25
4	Hàm lượng vitamin C	mg/ 100 ml	18,36 ± 0,01
5	Hàm lượng đường FOS	(mg/ 100 ml)	166,00 ± 0,02
6	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	CFU/ml	0
7	Coliforms	CFU/ml	KPH
8	<i>E. coli</i>	CFU/ml	KPH
9	Tổng số nấm men và nấm mốc	CFU/ml	0

Ghi chú: KPH là Không phát hiện.

Sau khi hoàn thành sản phẩm, tiến hành theo dõi thời gian bảo quản, đánh giá tổng vi sinh vật và pH.

Kết quả ở bảng 9 cho thấy, sau 4 tuần, sản phẩm có sự biến đổi về chất lượng, nước ép củ Hoàng sin cô - dứa chịu sự lên men lactic tự phát trong điều kiện yếm khí nên pH của sản phẩm giảm xuống. Giá trị pH của sản phẩm thay đổi trong quá trình bảo quản cũng đã được Vandana và cs (2012) [31] chỉ ra trong quá trình nghiên cứu nước ép quả lý gai và nho sau 2 tháng bảo quản, pH giảm xuống có thể là do sự hình thành các axit axetic và axit lactic trong quá trình bảo quản, sự phân hủy carbohydrate có trong nước ép dịch củ do tác động của vi sinh vật. Hàm lượng vitamin C không chỉ giảm trong quá trình chế biến mà trong quá trình bảo quản hàm lượng vitamin C cũng thay đổi, do trong quá trình bài khí đóng chai lượng một lượng nhỏ oxy vẫn còn tồn tại trong chai nước

ép sẽ tiếp tục oxy hóa vitamin C làm cho lượng vitamin C giảm mạnh trong thời gian đầu, sau đó lượng oxy này giảm đi, nên tốc độ oxy hóa chậm lại, tuy nhiên sau 4 tuần bảo quản hàm lượng vitamin C trong nước ép vẫn cao. Hàm lượng đường FOS thu được trong sản phẩm nước uống là 166,00 mg/100 ml, đường FOS bền trong dải pH 4,0 - 7,0 và nhiệt độ cao tới 140°C, điều đó giải thích là hàm lượng đường FOS ít bị biến đổi qua các công đoạn chế biến và sau thời gian bảo quản. Qua đó cho thấy, sản phẩm nước uống từ củ Hoàng sin cô - dứa có tiềm năng để sản xuất ở quy mô công nghiệp. Đối chiếu kết quả trong bảng 9 với QCVN 6-2:2010/BYT [30] đối với các sản phẩm đồ uống không cồn cho thấy, tổng số vi sinh vật hiếu khí phát hiện được không lớn hơn 100 CFU/ml. Như vậy, sản phẩm vẫn đạt chỉ tiêu vi sinh vật, đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm sau 4 tuần bảo quản ở nhiệt độ thường.

Bảng 9. Ảnh hưởng thời gian bảo quản đến chất lượng sản phẩm

Thời gian (tuần)	Tổng số vi sinh vật hiếu khí (CFU/ ml)	Hàm lượng vitamin C (mg/100 ml)	Hàm lượng FOS (mg/100 ml)	pH
0	0	18,36 ± 0,02 ^d	166,00 ± 0,01	4,25
1	0	17,58 ± 0,01 ^c	163,00 ± 0,02	4,20
2	0	16,42 ± 0,02 ^b	164,00 ± 0,02	4,15
3	10	15,92 ± 0,01 ^a	162,00 ± 0,03	4,10
4	5 x 10 ¹	15,38 ± 0,03 ^a	163,00 ± 0,03	4,08

Ghi chú: Các giá trị cùng một cột có chữ cái trên đầu khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa (p < 0,05).

4. KẾT LUẬN

Sản phẩm nước ép Hoàng sin cô - dứa đóng chai đạt chất lượng cao về giá trị dinh dưỡng và cảm quan, hài hòa về mùi vị, được sản xuất bằng công nghệ pha chế với các thông số kỹ thuật như sau: Tỷ lệ phối chế dịch ép củ Hoàng sin cô - dứa là 50: 50, dịch ép nước Hoàng sin cô - dứa được pha loãng với nước theo tỷ lệ là 50: 50, phối chế với sucrose tới 14°Brix, tỷ lệ bổ sung axit citric 0,05%, pectin là 0,05%. Chế độ thanh trùng ở nhiệt độ 90°C trong 10 phút có hiệu quả trong việc tiêu diệt vi sinh vật, giúp sản phẩm có thể giữ ở nhiệt độ thường trong ít nhất 4 tuần mà không cần bổ sung chất bảo quản, vẫn đảm bảo chỉ tiêu an toàn thực

phẩm theo QCVN 6-2:2010/BYT đối với các sản phẩm đồ uống không cồn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện bằng nguồn kinh phí từ đề tài nghiên cứu khoa học cấp tỉnh: “Nghiên cứu thử nghiệm cây Hoàng sin cô (Smallanthus sonchifolius) phục vụ sản xuất hàng hóa tại tỉnh Lai Châu” thuộc Sở khoa học và Công nghệ tỉnh Lai Châu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lachman J, Fernández E, Orsák M (2003). Yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use-a

review, *Plant, Soil and Environment* 49(6), 283 - 290.

2. Ojansivu I, Ferreira CL, 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. Lobo AR, Colli C, Alvares EP, Filisetti TM (2007) Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. *British Journal of Nutrition*, 97(4), 776 - 785.

4. Võ Văn Chi (2021). Từ điển Cây thuốc Việt Nam. Nxb Y học.

5. Niaz Wali (2019). Pineapple (*Ananas comosus*). Science Direct. Truy cập ngày 20 tháng 03 năm 2025 (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00050-3>).

6. S. Begum, *et al.* (2018). Processing of mixed fruit juice from mango, orange and pineapple. *Fundam Appl. Agric.* 3(2), 440 - 445.

7. Nguyễn Văn Tiếp, Quách Tĩnh, Nguyễn Văn Thoa (2008). *Bảo quản và chế biến rau quả*. Nxb Khoa học và Kỹ thuật.

8. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 6958:2023. Đường tinh luyện.

9. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 5516:2010. Phụ gia thực phẩm - Axit citric.

10. AOAC 940.26:1940. Tro của trái cây và sản phẩm trái cây.

11. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 4326: 2001 (ISO 6496:1999). Thức ăn chăn nuôi - Xác định độ ẩm và hàm lượng chất bay hơi khác.

12. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 4594:1988. Đồ hộp - Phương pháp xác định đường tổng số, đường khử và tinh bột.

13. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 8977:2011. Thực phẩm - Xác định vitamin C bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

14. Phương pháp Bradford (1976). Phân tích protein: Phân tích quang phổ nhanh.

15. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 4884-1:2015. Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - Phương pháp

định lượng vi sinh vật - Phần 1: Đếm khuẩn lạc ở 30°C bằng kỹ thuật đổ đĩa.

16. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 6846:2007. Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp phát hiện và định lượng *Escherichia coli* giả định - Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất.

17. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 6848:2007. Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp định lượng *Coliform* - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.

18. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 8275-1:2010. Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc - Phần 1: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước lớn hơn 0,95.

19. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 3215-79. Sản phẩm thực phẩm - Phân tích cảm quan - Phương pháp cho điểm.

20. Vũ Kim Dung, Phan Thị Hòa, Nguyễn Thị Hồng Nhung (2020). Nghiên cứu sản xuất nước ép dứa (*Ananas comosus*) - Bí đao (*Benincasa hispida*) đóng chai. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 62(8), 59 - 64.

21. Campos D, Aguilar-Galvez A, Pedreschi R (2016). Stability of fructooligosaccharides, sugars and colour of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots during blanching and drying, *International Journal of Food Science & Technology*, 51(5), 1177 - 1185.

22. Manrique, I., A. Parraga and M. Hermann (2005). Yacon syrup: Principles and processing. Michael Hermann, The authors authorize the total or partial reproduction of this publication, giving the corresponding credit to the authors/institutions and including the correct citation of this publication. ISBN: 92-9060-250-3.

23. Le My Hong, Minh NT, Thuy VN, Hanh NTH (2009). Studying on the mixed fruit juice processing, *CTU Journal of Science*, (11b), 235 - 244.

24. Phan Vinh Hung (2021). A study on the production of coconut nectar beverage from

coconut nectar. *Industry and Trade Magazine*, 10, 76 - 811.

25. Dissanayake, D. M. L. N. K (2017). Effect of increasing acidity on shelf-life of bottled mixed fruit juice drink. *International Journal of Life Sciences Research*, 5(3), 121 – 127.

26. Oku T, Tokunaga T, Hosoya N 1984). Nondigestibility of a new sweetener, “Neosugar, in the rat,” *The Journal of Nutrition*, 114(9), 1574 - 1581.

27. Jiuxu Zhang (2007). Flavonoids in grapefruit and commercial grapefruit juices: Concentration, distribution and potential health benefits, *Proc. Fla. State Hort.* 120, 288 - 294.

28. Guimarães, R., Barros, L., Barreira, J. C. M., Sousa, M. J., Carvalho, A. M. & Ferreira, I. C. F. R (2010). Trgeting excessive free radicals with

peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 99 - 106.

29. Yu Qiu Liu, Emily Heying and Sherry A. Tanumihardjo (2012). History, global distribution and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviewsin Food Scienceand Food Safety*, 11, 530 - 545.

30. Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia QCVN 6-2:2010/BYT. Đối với các sản phẩm đồ uống không cồn.

31. Vandana Mishra, Vinita Puranik, Vinti Singh, Mudita Verma, Neelam Yadav and G.K. Rai (2012). Development of Vitamin C Rich Value Added Beverage, *American Journal of Food Technology*, 7, 222 - 229.

STUDY OF FACTORS AFFECTING THE QUALITY OF YACON WITH PINEAPPLE JUICE PROCESS

Nguyen Thi Hong Linh¹, Nguyen Manh Dat¹,

Do Thi Thanh Huyen¹, Chu Thang¹, Nguyen Thi Thu¹

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

Abstract

Yacon plant originates from Tibet, China and was introduced to Vietnam in the 1990s. Yacon is cool in nature, has a sweet and refreshing taste and contains many valuable bioactive components. Therefore, it has been studied as a raw material for producing various foods such as vermicelli, candy, tea and jelly. Pineapple, scientifically known as *Ananas Comosus* Merr or *Ananas Sativus* Sehult, is a tropical specialty. Although it ranks 10th in the world in terms of fruit production, it is considered the best in terms of quality and flavor, earning the title "king of fruits". In this study, Yacon juice and pineapple juice were produced according to the following formula: the mixing ratio of Yacon juice to pineapple juice is 50: 50; the combined juice is diluted with water at a ratio of 50: 50; sucrose is added to reach 14°Brix (Bx); citric acid is added at 0.05%, and pectin at 0.05%. Pasteurization at 90°C for 10 minutes is effective in eliminating microorganisms, allowing the product to be stored at room temperature for at least 4 weeks without the need for preservatives. The total sensory evaluation score of the product exceeded 18 points, and the high content of FOS sugar and vitamin C indicates that the pasteurized bottled Yacon - Pineapple juice sample has good commercial potential for producing nutritious juice beneficial to consumer health.

Keywords: *Yacon, Pineapple, Yacon - Pineapple juice, blend.*

Ngày nhận bài: 16/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 7/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 22/7/2025

Ngày duyệt đăng: 6/8/2025

TỐI ƯU HOÁ QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN TINH BỘT ĐỂ SẢN XUẤT CHẤT XƠ KHÔNG HOÀ TAN TỪ CÁM GẠO SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP BỀ MẶT ĐÁP ỨNG

Võ Tấn Hậu^{1,*}, Hồ Kim Vĩnh Nghi¹, Nguyễn Thị Thà¹

¹ Phòng Chế biến và Bảo quản nông sản thực phẩm,
Phân viện Công nghiệp thực phẩm tại thành phố Hồ Chí Minh

*Email: hauvt@firi.vn

TÓM TẮT

Chất xơ thức ăn là thuật ngữ chung dùng chỉ các polysaccharide và lignin không bị thủy phân bởi các enzyme sinh học và không được hấp thụ trong ruột non người. Tương tự như cám của một số loại ngũ cốc khác, cám gạo là nguồn giàu chất xơ với hàm lượng chất xơ không hòa tan cao đã được chứng minh là có đặc tính hạ đường huyết và hạ lipid máu trong các thử nghiệm *in vitro*. Nghiên cứu này nhằm tối ưu hóa quá trình thủy phân tinh bột có trong cám gạo đã tách dầu và protein để sản xuất chất xơ không hòa tan, sử dụng thiết kế Box-Behnken dựa trên phương pháp bề mặt đáp ứng với enzyme α -amylase thương mại, Termamyl SC. Các biến khảo sát, gồm: pH (5,0 - 6,0; X_1), nồng độ enzyme (0,45 - 0,85% tinh bột; X_2) và thời gian thủy phân (90 - 180 phút; X_3), trong khi nhiệt độ thủy phân cố định ở 95°C. Kết quả cho thấy, các điều kiện tối ưu: pH = 6,0; nồng độ enzyme = 0,82% tinh bột và thời gian thủy phân là 167 phút với hiệu suất thủy phân tinh bột đạt 82,7%. Ngoài ra, thành phần hóa học và một số tính chất chức năng kỹ thuật của chế phẩm chất xơ không hòa tan cũng được xác định.

Từ khóa: *Cám gạo, cám gạo tách dầu và protein, chất xơ không hòa tan (IDF), thiết kế Box-Behnken, hiệu suất thủy phân tinh bột, bề mặt đáp ứng, tối ưu hóa.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chất xơ thức ăn (Dietary fiber; DF), là thuật ngữ chung dùng chỉ các polysaccharide và lignin không bị thủy phân bởi các enzyme sinh học và không được hấp thụ trong ruột non người [1], nhưng mang lại nhiều lợi ích sinh lý, bao gồm: Kiểm soát cân nặng cơ thể, giảm lipid và cholesterol huyết, kiểm soát đáp ứng glucose sau ăn và ngăn ngừa ung thư ruột kết [2]. Dựa trên các tính chất lý hóa và chức năng, DF có thể được chia thành hai nhóm tổng quát: DF hòa tan (SDF) và DF không hòa tan (IDF). Theo Tổ chức Y tế Thế giới, lượng DF khuyến nghị hàng ngày ít nhất là 15 - 30 g/ngày, tùy theo độ tuổi. Với vai trò trong việc ngăn ngừa và điều trị một số bệnh, DF tinh khiết đã được bổ sung, chế biến vào các thực phẩm ngày một trở nên phổ biến.

Lúa là loại cây lương thực được trồng phổ biến, đứng hàng thứ hai trên thế giới, với sản lượng toàn cầu khoảng 800 triệu tấn vào năm 2023 [3], trong đó sản lượng lúa thu hoạch ở nước ta

đạt 43 triệu tấn. Cám gạo là phụ phẩm chính của quá trình xay xát, chiếm khoảng 8 - 10% khối lượng hạt, là nguồn nguyên liệu giàu chất dinh dưỡng với thành phần chất xơ chiếm 7 - 11%, trong đó IDF chiếm khoảng 90%, có thành phần chủ yếu là cellulose, hemicellulose và lignin [4]. Kết quả nghiên cứu về hemicellulose từ cám gạo cho thấy, thành phần chủ yếu là arabinoxylan có mức độ phân nhánh cao và xyloglucan với hoạt tính sinh học, đáng chú ý như: Cải thiện tình trạng bệnh viêm ruột, làm dịu hội chứng ruột kích thích, hạ đường huyết sau ăn và hạ lipid máu [5 - 8]. Ngoài hoạt tính sinh học, IDF cám gạo còn có những tính chất quan trọng và hiện đã được sử dụng như một chất phụ gia điều chỉnh cấu trúc và tăng cường độ ổn định của thực phẩm trong quá trình sản xuất và bảo quản [9, 10].

Đến nay, đã có một số công trình nghiên cứu về trích ly chất xơ từ nguồn nguyên liệu cám gạo được công bố, nhưng các nghiên cứu này chủ yếu được thực hiện cho SDF [11, 12], chỉ có một công

bổ gần đây về trích ly IDF từ cám gạo loại béo sử dụng enzyme thương mại là Cellulase-AC ở nồng độ 50 $\mu\text{L/g}$ với hàm lượng chất xơ IDF thu được đạt 59,5% ở nhiệt độ và thời gian xử lý lần lượt là 60°C và 24 giờ [13]. Tuy nhiên, các thông số quy trình công bố chưa được tối ưu bằng phương pháp thống kê toán học.

Phương pháp bề mặt đáp ứng (Response surface methodology, RSM) là một kỹ thuật thống kê, được sử dụng để thiết kế các thí nghiệm và phân tích mối tương tác giữa các yếu tố đầu vào và các đáp ứng đầu ra. RSM nhằm tìm ra sự kết hợp tối ưu của các yếu tố đầu vào để đáp ứng đầu ra mong muốn. RSM giúp giảm số lượng các thí nghiệm cần thiết so với thực nghiệm một nhân tố tại một thời điểm (One factor at a time) và thường sử dụng với thiết kế thực nghiệm như: Box-Behnken hoặc thiết kế thành phần trung tâm [14, 15]. Để nâng cao độ tinh khiết của chất xơ IDF từ cám gạo tách dầu và protein, việc tách tinh bột qua phản ứng thủy phân là cần thiết.

Hiện nay, trong lĩnh vực thực phẩm, các phương pháp thủy phân tinh bột bằng biện pháp enzyme đã được sử dụng để thay thế phương pháp thủy phân bằng hóa chất do có nhiều ưu điểm như: Phản ứng xảy ra nhanh trong điều kiện ôn hòa, đặc hiệu cao với cơ chất và sản phẩm cũng như sử dụng ít năng lượng hơn. Hiệu quả thủy phân tinh bột sử dụng enzyme phụ thuộc vào nhiều yếu tố, như: Nồng độ enzyme sử dụng thủy phân, pH dung dịch và thời gian thủy phân. Kết quả tối ưu quá trình thủy phân tinh bột có trong nguyên liệu hạt bở để sản xuất maltodextrin sử dụng enzyme α -amylase chịu nhiệt (Termamyl SC), ở nhiệt độ 95°C, tại nồng độ enzyme 0,12%, pH = 5,5 và 165 phút với hiệu suất thủy phân đạt 79,8% [16]. Kết quả nghiên cứu của Serrano-Febles và cs (2025) [17] cho thấy, quá trình dịch hoá tinh bột bắp khi sử dụng enzyme α -amylase chịu nhiệt đạt tối ưu ở nhiệt độ 92°C ở pH = 6, nồng độ α -amylase là 1,5 mg enzyme/g tinh bột và thời gian thủy phân 60 phút. Theo Soto và cs (2012) [18], thời gian quá trình thủy phân tinh bột phụ thuộc vào mức độ tinh khiết của nguyên liệu tinh bột sử dụng cũng như các thành phần khác được liên kết với phân tử tinh bột. Thường nguyên liệu có hàm lượng tinh

bột cao, ít chất xơ sẽ có thời gian thủy phân ngắn hơn.

Từ thực tiễn trên, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu: (1) tối ưu hóa các điều kiện thủy phân tinh bột sử dụng enzyme α -amylase chịu nhiệt để sản xuất chất xơ từ cám gạo đã tách dầu và protein sử dụng RSM; (2) xác định thành phần hóa học và một số tính chất chức năng kỹ thuật của chế phẩm IDF cám gạo thu được.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cám gạo tách dầu và protein (DoDp-RB) được điều chế từ khô cám gạo, do Công ty Wilmar Agro Vietnam Co. Ltd sản xuất theo quy trình đã công bố [19]. Cho 1 kg cám đã tách béo bằng *n*-hexan vào bồn dung tích 10 L. Thêm 7,85 L nước vào rồi điều chỉnh pH đến 8 bằng dung dịch NaOH 1N, khuấy đều. Tiếp tục thêm 11,3 ml enzyme alcalase 2.4 L vào, khuấy đều rồi tiến hành xử lý ở 55°C trong 3 giờ 8 phút. Sau xử lý, ly tâm hỗn hợp 3.000 vòng/phút trong 30 phút để thu hồi phần bã rắn DoDp-RB để làm nguyên liệu thủy phân tinh bột. Kết quả phân tích thành phần hoá học của DoDp-RB: Hàm lượng nước 76,67%; protein 1,1%; tinh bột 6,19% và tro tổng 3,3%. Hàm lượng tinh bột sử dụng để tính hiệu suất thủy phân tinh bột.

Enzyme sử dụng xác định hàm lượng tinh bột và chất xơ: α -amylase chịu nhiệt (A3306), amyloglucosidase (A9913) và protease (P3910) có nguồn gốc từ Công ty Sigma, Mỹ. Sử dụng cho nghiên cứu thủy phân tinh bột là enzyme α -amylase chịu nhiệt (Termamyl SC; pH = 5 - 6; nhiệt độ 85 - 95°C và hoạt tính 120 KNU-S/g) từ Công ty Novozyme, Đan Mạch.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Kế hoạch thực nghiệm đa yếu tố quá trình thủy phân tinh bột

Kế hoạch thực nghiệm đa yếu tố để thủy phân tinh bột từ nguyên liệu DoDp-RB được thực hiện dựa trên cơ sở thiết kế Box-Behnken với 3 yếu tố, gồm: pH dung dịch thủy phân (X_1), nồng độ enzyme (X_2 , % tinh bột có trong DoDp-RB) và thời gian thủy phân (X_3 , phút), trong khi nhiệt độ cố

định ở 95°C và tỷ lệ nước: DoDp-RB là 1: 1,75 (Bảng 1).

Bảng 1. Các mức yếu tố sử dụng trong thiết kế nhân tố hai mức

Yếu tố	Ký hiệu	Mức yếu tố		
		- 1	0	+ 1
pH dung dịch	X ₁	5	5,5	6
Nồng độ enzyme (%)	X ₂	0,45	0,65	0,85
Thời gian trích (phút)	X ₃	90	135	180

Lấy 50 g DoDp-RB cho vào bình cầu 2 L, sau đó thêm 700 ml nước cất và khuấy liên tục ở tốc độ 200 vòng/phút. Sau khi pH của dung dịch được điều chỉnh bằng HCl 1N, enzyme Termamyl SC sẽ được thêm vào rồi tiến hành thủy phân ở 95°C trong khoảng thời gian đã chọn. Vào cuối quá trình thủy phân, bất hoạt enzyme bằng cách thêm HCl 1N đến pH = 4,5. Ly tâm ở tốc độ 3.500 vòng/phút trong 15 phút để thu phần dịch trong dùng xác định lượng tinh bột đã thủy phân. Các giá trị pH dung dịch, nồng độ enzyme (%) và thời gian thủy phân (phút) tại mỗi điểm thí nghiệm theo bảng 2. Hiệu suất thủy phân tinh bột (HSTPTB) được tính theo phương trình sau:

$$HSTPTB (\%) = \frac{\text{Tinh bột dịch trong}}{\text{Tinh bột nguyên liệu}} \times 100$$

2.2.2. Xác định hàm lượng DF

Xác định hàm lượng DF tổng (total dietary fiber), SDF và IDF theo AOAC 991.43:1995 [20].

2.2.3. Xác định hàm lượng tinh bột

Hàm lượng tinh bột của nguyên liệu DoDp-RB được xác định theo phương pháp thủy phân enzyme [21]. Định lượng đường khử trong dịch thủy phân bằng phương pháp Bertrand. Hàm lượng tinh bột được tính bằng hàm lượng đường khử nhân cho hệ số quy đổi 0,9.

2.2.4. Xác định tính chất chức năng của chất xơ thu được

- Khả năng trương nở (swelling capacity, SC)

Được đo bằng kỹ thuật thể tích nền [22]. Lấy 200 mg IDF khô vào ống thủy tinh chia độ 10 mL và để 12 giờ ở nhiệt độ phòng trong 10 mL nước

cát 2 lần. SC được biểu thị là số cm³ mẫu trương nở trên một g mẫu khô ban đầu.

- Khả năng liên kết nước (Water binding capacity, WBC)

Lấy 1 g IDF khô vào ống ly tâm, thêm 30 ml nước cất 2 lần và để yên trong 18 giờ ở 25°C. Ly tâm hỗn hợp trong 20 phút ở 3.500 g. Chất gạn, loại bỏ phần dịch nổi và phần cặn được cân. WBC được tính bằng g nước trên g mẫu khô ban đầu [23].

- Khả năng liên kết chất béo (Fat binding capacity, FBC)

Được ước tính bằng phương pháp của Raghavendra và cs (2004) [23]. Mẫu IDF (500 mg) được thêm vào 10 mL dầu hướng dương tinh luyện trong ống ly tâm. Để cân bằng 12 giờ ở nhiệt độ 25°C rồi ly tâm ở 10.000 g trong 30 phút. Sau đó, dầu tự do được gạn ra và phần còn lại được cân. FBC được biểu thị là lượng dầu hấp thụ trên 1 g mẫu.

2.2.5. Thiết kế thực nghiệm và phân tích thống kê

Để tối ưu hoá quy trình thủy phân tinh bột từ nguyên liệu DoDp-RB với 3 yếu tố công nghệ đã sử dụng thiết kế Box-Behnken gồm 12 thí nghiệm ngẫu nhiên và 3 thí nghiệm tại tâm phương án (Bảng 2) sử dụng phần mềm thiết kế thực nghiệm Design-Expert v13 (Minneapolis, Mỹ). Để mô tả ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ đến đáp ứng HSTPTB, đã chọn mô hình hồi quy đa thức bậc 2 tổng quát như phương trình 1.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (1).$$

Trong đó: X₁, X₂, X₃ là các biến độc lập; β₀ là hệ số mô hình hồi quy; β₁, β₂, β₃ là các hệ số tuyến tính; β₁₂, β₁₃, β₂₃ là các hệ số tương tác và β₁₁, β₂₂, β₃₃ là các hệ số bậc hai. Phần mềm Design-Expert v13 được sử dụng để ước tính các hệ số trong mô hình hồi quy (1) và các điều kiện tối ưu. Sự tương thích của mô hình với các giá trị thực nghiệm được thể hiện qua hệ số xác định R², hệ số xác định điều chỉnh R²_{adj} cũng như hệ số xác định dự đoán R²_{pred} và ý nghĩa thống kê của mô hình được xác định bằng kiểm định F.

Tại mỗi điểm thí nghiệm thực hiện 3 lần và kết quả là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Standard deviation, SD). Phân tích phương sai một nhân tố (ANOVA) thực hiện ở mức $p \leq 0,05$ để xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kế hoạch thực nghiệm đa yếu tố và tối ưu hoá quá trình thủy phân tinh bột

Quá trình thủy phân tinh bột từ DoDp-RB được thực hiện dựa trên khả năng thủy phân ngẫu

nhiên các liên kết 1,4-glycosis trong phân tử tinh bột của enzyme α -amylase. Trong nghiên cứu này, việc xây dựng mô hình dự đoán cho 3 yếu tố, gồm: pH dung dịch thủy phân (X_1), nồng độ enzyme (X_2 , % tinh bột trong DoDp-RB) và thời gian thủy phân (X_3 , phút) cho đáp ứng HSTPTB theo phương pháp RSM. Điều kiện thí nghiệm và kết quả được thể hiện như ở bảng 2 với 12 thí nghiệm và 3 lần lặp lại tại tâm phương án.

Bảng 2. Ma trận thiết kế Box-Behnken và giá trị đáp ứng HSTPTB

TN	Biến mã hoá			Biến tự nhiên			HSTPTB (%)
	x_1	x_2	x_3	X_1	X_2	X_3	Y
1	0	1	-1	5,5	0,85	90	64,49
2	0	-1	1	5,5	0,45	180	59,67
3	0	-1	-1	5,5	0,45	90	63,80
4	1	0	1	6,0	0,65	180	77,20
5	0	0	0	5,5	0,65	135	58,10
6	-1	0	1	5,0	0,65	180	47,06
7	1	-1	0	6,0	0,45	135	76,12
8	0	1	1	5,5	0,85	180	67,10
9	0	0	0	5,5	0,65	135	58,65
10	1	1	0	6,0	0,85	135	82,60
11	-1	0	-1	5,0	0,65	90	50,10
12	0	0	0	5,5	0,65	135	59,10
13	-1	1	0	5,0	0,85	135	52,61
14	1	0	-1	6,0	0,65	90	75,44
15	-1	0	0	5,0	0,45	135	48,36

Ghi chú: X_1 : pH; X_2 : Nồng độ enzyme (% tinh bột trong DoDp-RB), X_3 : Thời gian thủy phân (phút).

Từ số liệu thực nghiệm trong bảng 2, HSTPTB có giá trị thấp nhất 47,06% tại thí nghiệm thứ 6 (pH = 5,0; nồng độ enzyme = 0,65 và thời gian thủy phân = 180 phút) và đạt giá trị cao nhất 82,6% tại thí nghiệm thứ 10 (pH = 6,0; nồng độ enzyme = 0,85 và thời gian thủy phân = 135 phút). Từ đây có thể thấy, yếu tố pH có tác dụng mạnh nhất lên đáp ứng HSTHTB, tiếp đến là yếu tố nồng độ enzyme

và khi tăng pH hoặc nồng độ enzyme sẽ làm tăng HSTPTN. Ngược lại, yếu tố thời gian thủy phân có tác dụng không đáng kể đến đáp ứng HSTHTB.

Để kiểm tra ý nghĩa và sự tương thích của mô hình, đã chọn tiến hành phân tích phương sai (ANOVA) bằng chương trình Design-Expert trên các số liệu thực nghiệm cho đáp ứng HSTHTB. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Phân tích phương sai (ANOVA) cho mô hình hồi quy đa thức bậc 2 đối với các đáp ứng

Nguồn	Tổng bình các phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị p (Prob > F)	Mức ý nghĩa thống kê
Mô hình	1.740,95	9	193,44	482,51	< 0,0001	***
X_1	1.602,63	1	1.602,63	3997,59	< 0,0001	***

X_2	44,42	1	44,42	110,79	0,0001	***
X_3	0,98	1	0,98	2,44	0,1787	-
X_1X_2	1,24	1	1,24	3,10	0,1385	-
X_1X_3	5,76	1	5,76	14,37	0,0128	**
X_2X_3	11,36	1	11,36	28,33	0,0031	***
X_1^2	22,99	1	22,99	57,35	0,0006	***
X_2^2	53,61	1	53,61	133,72	< 0,0001	***
X_3^2	6,61	1	6,61	16,49	0,0097	**
Phần dư	2,00	5	0,40			
- Không tương thích	1,50	3	0,51	2,00	0,3508	-
- Sai số thuần	0,50	2	0,25			
Tổng tương quan	1.742,95	14				
$R^2 = 0,9988; R^2_{adj} = 0,9968; R^2_{prep} = 0,9856$						

Ghi chú: **: $p < 0,01$; ***: $< 0,001$; -: Không có ý nghĩa thống kê.

Việc kiểm định sự không phù hợp (Lack of fit test) sẽ xác định mô hình được chọn của đáp ứng HSTHTB có thích hợp để giải thích các dữ liệu thực nghiệm hay không và nếu không thì một mô hình khác sẽ được chọn lại để phân tích số liệu thực nghiệm và mức độ phù hợp của mô hình được đánh giá thông qua giá trị F của Lack of fit. Mô hình tương quan tốt cần sự phù hợp giữa số liệu thực tế và lý thuyết, vì vậy mô hình thu được với kiểm định Lack of fit không có ý nghĩa thống kê là điều mong muốn. Bảng 3 cho thấy, kiểm định sự thiếu phù hợp không có ý nghĩa liên quan tới sai số thuần ($F = 2,00$ và $p = 0,35$) và giá trị F của mô hình là 482,51, chỉ ra mô hình này có ý nghĩa và tương thích với các số liệu thực nghiệm. Kết quả phân tích ANOVA cũng đã đưa ra các hệ số xác

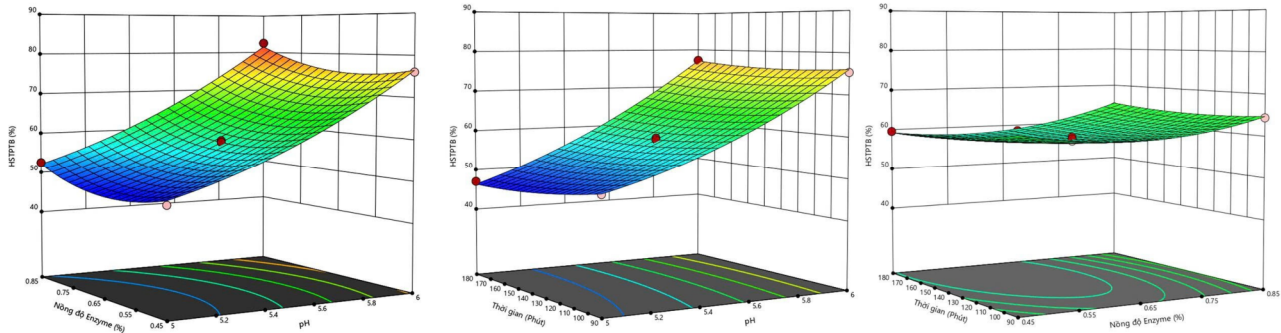
định (determination coefficient) cho mô hình như trong bảng 3 và giá trị các hệ số này sẽ cho biết độ chính xác của mô hình. Theo Lundstedt và cs (1998) [24], một mô hình có sự tương thích tốt với giá trị thực nghiệm và có thể sử dụng để dự đoán sự thay đổi của biến đáp ứng khi thay đổi các yếu tố phụ thuộc khi hệ số xác định $R^2 \geq 0,8$ và hệ số xác định hiệu chỉnh $R^2_{adj} \geq 0,5$. Do vậy, mô hình tương quan thu được từ thí nghiệm đã thỏa mãn các điều kiện trên nên mô hình đủ độ chính xác để sử dụng dự đoán biến phụ thuộc HSTPTB trong quá trình thủy phân.

Thực hiện phân tích hồi quy đa biến trên các dữ liệu thực nghiệm ở bảng 2, mô hình đáp ứng HSTHTB được thể hiện dưới dạng các giá trị được mã hóa theo phương trình đa thức bậc hai như sau:

$$Y = 58,62 + 14,15X_1 + 2,36X_2 - 0,35X_3 + 0,56X_1X_2 + 1,20X_1X_3 + 0,68X_2X_3 + 2,50X_1^2 + 3,81X_2^2 + 1,34X_3^2 \quad (2)$$

Từ các lý luận trên cho thấy, phương trình này phù hợp để dự đoán giá trị của hàm đáp ứng HSTHTB trong khoảng giá trị thực nghiệm đã chọn và có thể sử dụng để khảo sát không gian

thiết kế. Bề mặt đáp ứng 3D biểu diễn tương tác giữa các yếu tố khảo sát đến đáp ứng HSTHTB được biểu diễn ở hình 1.



Hình 1. Bề mặt đáp ứng mô tả tác động giữa pH và nồng độ enzyme (a); pH và thời gian (b); thời gian và nồng độ enzyme (c) đến đáp ứng HSTHTB

Từ mô hình thu được, phân tích tối ưu hóa nhằm xác định điều kiện thủy phân để HSTPTB đạt giá trị cực đại trong khoảng 47,6 - 82,06. Kết quả quá trình tối ưu hóa bằng chương trình Design-Expert cho thấy đáp ứng HSTPTB đạt cực đại tại pH = 6; tỷ lệ enzyme/tinh bột = 0,82% và thời gian xử lý enzyme = 167 phút, trong khi nhiệt độ cố định ở 95°C và tỷ lệ nước: DoDp-RB là 1: 1,75. Khi đó, HSTPTB từ DoDp-RB đạt giá trị 82,7%. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nguyen, T. V và cs (2018) [16] khi thủy phân tinh bột trong hạt bọ để sản xuất maltodextrin sử dụng α -amylase Termamyl SC ngoại trừ nồng độ enzyme sử dụng thấp hơn. Sự khác biệt này có thể là do hàm lượng tinh bột cũng như hàm lượng các chất khác hiện diện trong 2 loại nguyên liệu và cách chúng liên kết với các phân tử tinh bột là khác nhau [18].

Để kiểm định giá trị HSTPTB tối ưu thu được từ mô hình đã xây dựng, các thí nghiệm được thực hiện theo phương án tối ưu đã đề ra. Kết quả thực nghiệm 3 lần tại điểm tối ưu này cho HSTPTB là $82,07 \pm 0,23\%$, hoàn toàn phù hợp với kết quả tối ưu.

3.2. Thành phần hoá học IDF và tính chất chức năng kỹ thuật

IDF từ DoDp-RB sau khi tách tinh bột theo quy trình tối ưu trên sẽ được sấy đối lưu bằng không khí nóng ở nhiệt độ 100°C đến độ ẩm $\leq 5\%$. Chất xơ sau khi sấy sẽ được nghiền bằng máy nghiền búa qua rây 300 mesh để thu sản phẩm bột IDF. Kết quả xác định thành phần chất xơ thu được từ quy trình trên được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Thành phần bột IDF từ DoDp-RB

Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Giá trị
Độ ẩm	%	$4,80 \pm 0,13$
Chất xơ không hòa tan	%	$70,10 \pm 0,18$
Protein thô	%	$9,86 \pm 0,15$
Tinh bột	%	$4,65 \pm 0,09$
Tro tổng	%	$10,13 \pm 0,16$

Bảng 4 cho thấy, hàm lượng chất xơ trong sản phẩm từ quy trình trên đạt 70,1%, cao hơn công bố của Shaikh và cs (2024) [13] thực hiện từ cám gạo loại béo sử dụng enzyme Cellulase-AC. Như đã biết, việc sử dụng chất xơ trong công nghiệp thực phẩm hiện nay chủ yếu ở dạng bổ sung vào các sản phẩm thực phẩm chế biến sẵn như: Bánh mì, ngũ cốc ăn sáng, thực phẩm trẻ em, sản phẩm chế biến từ thịt, mì ống, kem và đồ ngọt. Do vậy, hàm lượng chất xơ trong thành phần nguyên liệu phối trộn càng cao sẽ làm giảm lượng nguyên liệu chất xơ bổ sung, hạn chế làm thay đổi cấu trúc và một số đặc tính cảm quan của sản phẩm sau bổ sung. Với hàm lượng chất xơ 70,1%, chế phẩm IDF từ DoDp-RB thu được từ quá trình trên trở thành nguyên liệu bổ sung IDF lý tưởng cho các ứng dụng thực phẩm, góp phần gia tăng tiêu thụ chất xơ của người tiêu dùng.

Như đã đề cập trên, DF không những có nhiều lợi ích cho sức khỏe con người mà chúng còn có khả năng cải thiện nhiều đặc tính chức năng khác nhau của sản phẩm thực phẩm nhờ vào khả năng giữ nước, khả năng trương nở và khả năng liên kết

chất béo. Kết quả xác định tính chất chức năng kỹ thuật của bột IDF thu được được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Tính chất chức năng kỹ thuật của bột IDF từ DoDp-RB

Tính chất chức năng	Đơn vị tính	Giá trị
SC	cm ³	4,98 ± 0,38
WBC	g nước/g IDF	5,12 ± 0,12
FBC	g dầu/g IDF	3,31 ± 0,16

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, SC và WBC của IDF từ DoDp-RB do nghiên cứu sản xuất lần lượt là 4,98 cm³/g IDF và 5,12 g nước/g IDF; các giá trị này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Zhao và cs (2018) [25], trong khi đó khả năng liên kết chất béo (3,31 g dầu/g IDF) lại cao hơn. Ngoài ra giá trị SC từ DoDp-RB cũng cao hơn IDF từ cám yến mạch và cám lúa mì [22]. Theo Karim và cs (2023) [26], tính chất chức năng của DF chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, bao gồm nguồn gốc thực vật của chất xơ, tỷ lệ chất xơ không hòa tan và chất xơ hòa tan, thành phần hóa học, phương pháp chế biến, kích thước hạt cũng như sự tương tác giữa thành phần của chúng. WBC và SC của IDF có thể có lợi ích về mặt công nghệ cũng như về mặt dinh dưỡng như làm tăng khả năng giữ nước có liên quan đến việc giảm thời gian vận chuyển phân, giảm táo bón và giúp cải thiện cấu trúc thực phẩm. Ví dụ, trong sản xuất bánh mì, chất xơ giúp bánh không bị khô và giữ được độ ẩm lâu hơn. Ngoài ra, tính chất FBC cũng được khai thác trong công nghiệp thực phẩm để tăng cường khả năng giữ lại chất béo thường bị mất trong quá trình nấu sản phẩm. Điều này có lợi cho việc giữ lại hương vị và tăng hiệu suất thu hồi sản phẩm.

4. KẾT LUẬN

RSM với thiết kế Box-Behnken đã được áp dụng thành công nhằm tối ưu hoá quy trình thủy phân tinh bột để sản xuất IDF từ nguyên liệu DoDp-RB sử dụng phần mềm thiết kế thực nghiệm và tối ưu Design-Expert. Kết quả cho thấy, HSTPTB đạt giá trị cực đại 82,7% tại pH = 6; tỷ lệ enzyme/tinh bột = 0,82% và thời gian xử lý enzyme = 167 phút. Sấy IDF thu được sau khi tách tinh bột ở nhiệt độ 100°C có độ ẩm 4,8%; 70,1% IDF; 9,86%

protein; 4,65% tinh bột và tro tổng là 10,13%. Tính chất chức năng kỹ thuật của bột chất xơ như SC, WBC và FBC có giá trị lần lượt là 4,98 cm³/g IDF; 5,12 g nước/g IDF và 3,31 g dầu/g IDF.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lattimer, J. M. & Haub, M. D. (2010). Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*, 2(12), 1266 - 1289.
2. Chater, P. I., Wilcox, M. D., Pearson, J. P., Brownlee, I. A. (2015). The impact of dietary fibres on the physiological processes governing small intestinal digestive processes. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 6(2), 117 - 132.
3. FAO (2024). *Agricultural production statistics 2010 - 2023*. FAOSTAT Analytical Briefs, No. 96. Rome.
4. Sapwarobol, S., Saphyakhajorn, W & Astina, J. (2021). Biological functions and activities of rice bran as a functional ingredient: A review. *Nutrition and Metabolic insights*, 14, 1 - 11.
5. Scheller, H. V. & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61(1), 263 - 289.
6. Yao, W., Gong, Y., Li, L., Hu, X. & You, L. (2022). The effects of dietary fibers from rice bran and wheat bran on gut microbiota: An overview. *Food Chemistry X*, 13, 100252-100262.
7. Seki, T., Nagase, R., Torimitsu, M., Yanagi, M., Ito, Y., Kise, M... & Ariga, T. (2005). Insoluble fiber is a major constituent responsible for lowering the post-prandial blood glucose concentration in the pre-germinated brown rice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(8), 1539 - 1541.
8. Zhu, R., Tan, S., Wang, Y., Zhang, L. & Huang, L. (2023). Physicochemical properties and hypolipidemic activity of dietary fiber from rice bran meal obtained by three oil-production methods. *Foods*, 12(19), 3695 - 3711.
9. Choi, Y. S., Choi, J. H., Han, D. J., Kim, H. Y., Lee, M. A., Kim, H. W... & Kim, C. J. (2011). Effects of rice bran fiber on heat-induced gel prepared with pork salt-soluble meat proteins in model system. *Meat science*, 88(1), 59 - 66.

10. Sagar, M., Habib, M., Hashem, M., Azad, M., Rahman, M. & Ali, M. (2024). Development of dietary fiber enriched sausage using rice bran. *Meat research*, 4(2), 1 - 7.
11. Aoe, S., Oda, T., Tatsumi, K., Yamauchi, M. & Ayano, Y. (1993). Extraction of soluble dietary fibers from defatted rice bran. *Cereal chemistry*, 70, 423 - 423.
12. Dang, T. T. & Vasanathan, T. (2019). Modification of rice bran dietary fiber concentrates using enzyme and extrusion cooking. *Food hydrocolloids*, 89, 773 - 782.
13. Shaikh, J. R., Chakraborty, S., Odaneth, A. & Annapure, U. S. (2024). A sequential approach of alkalienzymatic extraction of dietary fiber from rice bran: Effects on structural, thermal, crystalline properties and food application. *Food Research International*, 193, 114847.
14. Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965 - 977.
15. Baş, D. & Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food engineering*, 78(3), 836 - 845.
16. Nguyen, T. V., Ma, T. H. N., Nguyen, T. T., Ho, V. N. K. & Vo, H. T. (2018). Optimization of maltodextrin production from avocado seed starch by response surface methodology. In *AIP Conference Proceedings*, 1954, 040004. AIP Publishing LLC.
17. Serrano-Febles, J., Luis-Orozco, J., Luis Ramírez, H., Gómez-Brizuela, L., Martín, C. & García-Cruz, A. (2025). Optimization of enzymatic hydrolysis of corn starch to obtain glucose syrups by genetic algorithm: Optimización de la hidrólisis enzimática del almidón de maíz para obtener siropes de glucosa mediante algoritmos genéticos. *Dyna*, 92(235), 83 - 91.
18. Soto, J. L. M., García, L. M., González, J. V., Nicanor, A. B. & Cruz, L. G. (2012). Influence of starch source in the required hydrolysis time for the production of maltodextrins with different dextrose equivalent. *African Journal of Biotechnology*, 11(69), 13428 - 13435.
19. Vo, H. T., Nguyen, T. T., Ho, V. N. K. & Le, M. D. (2017). Optimization of protein hydrolysate production from defatted rice bran and refining process, proceedings of the 15th ASEAN Conference on Food science and Technology, 2, 64 - 69.
20. AOAC Official Methods of Analysis (1995). AOAC Official Method 991.43 Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber in Foods, chapter 32, AOAC INTERNATIONAL, 7 - 9.
21. Fabian, C., Ayucitra, A., Ismadji, S. & Ju, Y. H. (2011). Isolation and characterization of starch from defatted rice bran. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(1), 86 - 91.
22. Auffret, A., Ralet, M. C., Guillon, F., Barry, J. L. & Thibault, J. F. (1994). Effect of grinding and experimental conditions on the measurement of hydration properties of dietary fibres. *LWT-Food Science and Technology*, 27(2), 166 - 172.
23. Raghavendra, S. N., Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S. & Tharanathan, R. N. (2004). Dietary fiber from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties. *European Food Research and Technology*, 218, 563 - 567.
24. Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J & Bergman, R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 42(1 - 2), 3 - 40.
25. Zhao, G., Zhang, R., Dong, L., Huang, F., Tang, X., Wei, Z. & Zhang, M. (2018). Particle size of insoluble dietary fiber from rice bran affects its phenolic profile, bioaccessibility and functional properties. *Lwt*, 87, 450 - 456.
26. Karim, A., Z. Raji, A. Karam and S. Khalloufi (2023). Valorization of fibrous plant-based food waste as biosorbents for remediation of heavy metals from wastewater - A review. *Molecules*, 28(10), 4205 - 4225.

OPTIMIZATION OF STARCH HYDROLYSIS CONDITIONS FOR INSOLUBLE DIETARY FIBER PRODUCTION FROM RICE BRAN USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Vo Tan Hau¹, Ho Kim Vinh Nghi¹, Nguyen Thi Tha¹

*¹ Department of Food Processing and Preservation,
Food Industry Research Institute, Branch in Ho Chi Minh city*

Abstract

Dietary fiber (DF) is the general term for polysaccharide and lignin that cannot be digested and absorbed by biological enzymes in human small intestine. Similar to bran of some other cereals, rice bran is a rich source in dietary fiber with a high content of insoluble fiber which has been shown to possess *in vitro* hypoglycemic and hypolipidemic properties. This study is designed to optimize starch hydrolysis conditions for dietary fiber production from deoiled-deproteinized rice bran using Box-Behnken design based on response surface methodology with commercial α -amylase enzyme, Termamyl SC. These variables included pH (5.0 - 6.0; X_1), enzyme concentration (0.45 - 0.85% starch; X_2) and hydrolysis time (90 - 180 min; X_3), while the temperature fixed at 95°C. The result showed that the optimum conditions were using pH at 6.0, enzyme concentration at 0.82% and 167 min of the hydrolysis time. Under the optimum conditions, the starch hydrolysis yield was 82.7%. In addition, chemical composition and some functional properties of the insoluble dietary fiber preparation were also determined.

Keywords: *Rice brain, deoiled-deproteinized rice bran, Insoluble dietary fiber (IDF), Box-Behnken design, starch hydrolysis yield, response surface methodology, optimization.*

Ngày nhận bài: 23/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 8/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 28/7/2025

Ngày duyệt đăng: 7/8/2025

BƯỚC ĐẦU XÂY DỰNG CÁC DẤU HIỆU NHẬN DIỆN VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA HẠT TIÊU ĐEN Ở MỘT SỐ VÙNG TRỒNG TIÊU CHÍNH TẠI VIỆT NAM

Lê Tuấn Phúc¹, Bùi Uyển Diễm¹, Hoàng Quốc Tuấn¹, Phạm Ngọc Hưng¹,

Lại Quốc Đạt², Nguyễn Hoàng Dũng², Cung Thị Tố Quỳnh^{1,*}

¹ Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách Khoa Hà Nội

² Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

*Email: cungtoquynh1@gmail.com

TÓM TẮT

Nghiên cứu này phân tích các đặc điểm lý hóa của hạt tiêu đen thu thập từ sáu vùng trồng chính tại Việt Nam, gồm các tỉnh: Quảng Trị, Đắk Lắk, Đắk Nông, Gia Lai, Đồng Nai và Bà Rịa - Vũng Tàu. Phân tích phương sai (ANOVA) ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các vùng về độ ẩm, tro tổng số, hàm lượng piperine và tinh dầu. Độ ẩm dao động từ $10,64 \pm 1,40\%$ đến $14,41 \pm 0,60\%$, trong đó một số mẫu vượt giới hạn cho phép theo tiêu chuẩn quốc tế. Hàm lượng piperine nằm trong khoảng từ $4,13 \pm 0,55\%$ đến $5,07 \pm 0,51\%$, đáp ứng yêu cầu chất lượng toàn cầu. Hàm lượng tro không tan trong axit dao động từ $0,10 \pm 0,12\%$ đến $0,22 \pm 0,12\%$. Tinh dầu bay hơi dao động từ $2,65 \pm 0,35$ đến $3,27 \pm 0,51$ ml/100 g. Phân tích thành phần chính (PCA) cho thấy sự khác biệt đặc trưng giữa các vùng: Mẫu từ tỉnh Quảng Trị liên kết chặt chẽ với hàm lượng piperine và tro cao; mẫu từ tỉnh Đắk Lắk nổi bật với hàm lượng tinh dầu lớn; trong khi các vùng còn lại có đặc tính tương đối đồng nhất và phân bố chồng lấn nhau. Kết quả này khẳng định, ảnh hưởng của vùng địa lý đến đặc tính lý hóa của hạt tiêu và gợi mở khả năng ứng dụng trong truy xuất nguồn gốc và kiểm soát chất lượng sản phẩm.

Từ khóa: Hạt tiêu đen, đặc tính lý hóa, Quảng Trị, Đắk Lắk, Bà Rịa - Vũng Tàu, chỉ dẫn địa lý.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam là quốc gia sản xuất và xuất khẩu tiêu lớn nhất trên thế giới và giữ vị trí này gần 20 năm nay. Theo số liệu thống kê của Cục Hải quan, xuất khẩu hạt tiêu của Việt Nam năm 2024 đạt 249,38 nghìn tấn, trị giá 1,31 tỷ USD, giảm 6,2% về lượng, nhưng tăng 44,4% về giá trị so với năm 2023. Năm 2024, giá hạt tiêu xuất khẩu của Việt Nam đã đạt đến mức cao kỷ lục từ trước tới nay, với giá bình quân xuất khẩu đạt 5.280 USD/tấn; trong đó, giá hạt tiêu đen đạt 5.269 USD/tấn, tăng 51,4% và tiêu trắng đạt 6.503 USD/tấn, tăng 29,9% so với năm 2023. Theo số liệu của Hiệp hội Hồ tiêu và Cây gia vị Việt Nam (VPSA), nước ta đã nhập khẩu 4.746 tấn hồ tiêu các loại trong 2 tháng đầu năm 2025, tổng kim ngạch nhập khẩu đạt 26,8 triệu USD. So với cùng kỳ năm 2024, lượng nhập khẩu tăng 11,4%, kim ngạch tăng 74,1%. Ở chiều ngược lại, 2 tháng đầu năm, xuất khẩu mặt hàng này đạt

27.274 tấn, trị giá 184,4 triệu USD, giảm 11,6% về lượng nhưng tăng 48,5% về trị giá so với cùng kỳ năm 2024. Giá xuất khẩu bình quân hồ tiêu trong 2 tháng đạt 6.763 USD/tấn, tăng 68% so với cùng kỳ năm 2024 [1, 2].

Trong các sản phẩm hạt tiêu xuất khẩu, hạt tiêu đen chiếm trên 85% sản lượng, còn lại là hạt tiêu trắng (tiêu sọ) và tiêu đỏ. Thị trường xuất khẩu tiêu chủ yếu hiện nay của Việt Nam là: Châu Âu, Mỹ, Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc, Trung Đông... Trong năm 2024, Việt Nam xuất khẩu chủ yếu chủng loại hạt tiêu đen, tỷ trọng chiếm 68,08% tổng lượng và 68,06% tổng kim ngạch; tiếp theo là hạt tiêu đen xay, tỷ trọng chiếm 14,83% tổng lượng và 16,07% tổng kim ngạch... Tổng diện tích canh tác hồ tiêu là khoảng 145.000 ha, chủ yếu ở các tỉnh thuộc khu vực Tây Nguyên, Đông Nam bộ, tỉnh Quảng Trị, tỉnh Kiên Giang (thành phố Phú Quốc). Về giống tiêu hiện nay, ở Việt Nam có một

số loại, cơ bản là tiêu Vĩnh Linh, tiêu sẻ, tiêu Ấn Độ. Ngoài ra, còn có một số giống tiêu khác được trồng với diện tích nhỏ như tiêu Phú Quốc, tiêu Trâu... Hiện nay, một số địa phương đã được cấp chứng chỉ địa lý về tiêu như các tỉnh: Quảng Trị, Bà Rịa - Vũng Tàu [1, 2]. Những thông tin trên cho thấy, tiêu là một trong những sản phẩm tiềm năng và có giá trị kinh tế cao của Việt Nam, tuy nhiên, ngành tiêu Việt Nam cũng đang đối mặt với thách thức rất lớn do sự phát triển ngành tiêu tại một số quốc gia mới nổi, như: Brazil, Indonesia, Malaysia, Ấn Độ, Sri Lanka, Trung Quốc. Các nước này bước đầu đã thiết lập các hệ thống quản lý chất lượng, truy xuất nguồn gốc và xây dựng thương hiệu để xuất vào các thị trường truyền thống của Việt Nam.

Theo Hiệp hội Hồ tiêu và Cây gia vị Việt Nam, chất lượng hạt tiêu được quy định bởi các tính chất vật lý như: Dung trọng, kích thước, màu sắc; các thành phần hóa học chính là piperine và tinh dầu bay hơi. Bên cạnh đó, các tính chất cảm quan cũng là những tiêu chí quan trọng để đánh giá chất lượng cũng như nhận diện tiêu. Để thực hiện việc xác thực nguồn gốc, các dấu hiệu nhận diện chất lượng liên quan đến các tính chất vật lý, cảm quan, hóa học sẽ được xây dựng đầu tiên. Theo Hiệp hội Hồ tiêu quốc tế (IPC) [3], ISO 959-1:1998 tiêu chuẩn quy định các yêu cầu đối với tiêu đen [4], Hiệp hội Thương mại Gia vị Mỹ (ASTA) [5] và TCVN 7036:2008 [6] có quy định về ngưỡng của một số chỉ tiêu chất lượng hạt tiêu như sau: Độ ẩm không vượt quá 13% tổng chất khô (< 12,5% theo TCVN 7036:2008 [6]); tro tổng số (% khối lượng tính theo chất khô), không quá 7%; hàm lượng tinh dầu (dầu bay hơi) tối thiểu đạt 2 ml/100 g tính theo chất khô; hàm lượng piperine tối thiểu đạt 4% tính theo chất khô (3% theo IPC [3]). Riêng hàm lượng tro không tan trong axit thì TCVN 7036:2008 [6] và IPC [3] không có quy định, tuy vậy theo ASTA [5], hàm lượng này cần nhỏ hơn 1% khối lượng tính theo chất khô. Nghiên cứu này tập trung vào việc phân tích các chỉ tiêu liên quan đến độ ẩm, tro tổng số, hàm lượng tinh dầu bay hơi, hàm lượng piperine và hàm lượng tro không tan trong axit của các mẫu tiêu giống Vĩnh Linh, được thu mua từ các vùng trồng tiêu chính tại Việt Nam

nhằm tìm ra các dấu hiệu nhận diện về một số chỉ tiêu chất lượng của tiêu tại các vùng trồng này. Điểm mới của nghiên cứu là việc đề xuất một phương pháp tiếp cận đơn giản, dễ áp dụng, không đòi hỏi kỹ thuật cao, giúp phân biệt nguồn gốc vùng trồng dựa trên các chỉ tiêu phân tích chất lượng. Đặc biệt, phương pháp phân cụm HCPC (Hierarchical Clustering on Principal Components) được sử dụng như một công cụ hỗ trợ hữu hiệu trong việc phân tích và nhận diện sự khác biệt giữa các vùng trồng tiêu, tạo cơ sở khoa học cho việc truy xuất nguồn gốc và phát triển thương hiệu hồ tiêu Việt Nam theo hướng bền vững.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Các mẫu hạt tiêu đen giống Vĩnh Linh được thu mua tại vườn trồng ở các tỉnh: Quảng Trị (34 mẫu), Bà Rịa - Vũng Tàu (23 mẫu), Đắk Nông (11 mẫu), Đồng Nai (8 mẫu), Gia Lai (11 mẫu) và Đắk Lắk (18 mẫu). Các mẫu được lấy đại diện theo TCVN 4889:1989 [7], bảo quản trong túi zip và chuyển về phòng thí nghiệm tại Khoa Kỹ thuật Thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội. Trước khi tiến hành phân tích, mẫu được làm sạch sơ bộ, loại bỏ tạp chất (nếu có). Các thí nghiệm được tiến hành trong khoảng thời gian từ tháng 12/2023 đến tháng 6/2025.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định các chỉ tiêu hóa lý

- Độ ẩm được xác định theo TCVN 7035:2002 [8].

- Hàm lượng tro tổng số được xác định theo TCVN 7038:2002 [9].

- Hàm lượng piperine được xác định theo TCVN 9683:2013 [10].

- Hàm lượng tinh dầu được xác định theo TCVN 7039:2013 [11].

2.2.2. Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần. Các kết quả thu được được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Standard Deviation - SD). Phân tích phương sai một chiều (ANOVA) và

kiểm định hậu nghiệm Tukey được thực hiện bằng các gói aov và multcompView. Phân tích thành phần chính (PCA) và phân cụm thứ bậc trên các thành phần chính (HCPC) được áp dụng cho các biến hóa lý được thực hiện bằng các gói FactoMineR. Toàn bộ quá trình xử lý và phân tích số liệu thống kê được thực hiện bằng phần mềm R, phiên bản 3.1.2.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chỉ tiêu chất lượng của các mẫu tiêu đen từ các vùng trồng khác nhau

Kết quả phân tích độ ẩm, hàm lượng tro tổng số, hàm lượng tro không tan trong axit, hàm lượng tinh dầu và hàm lượng piperine được thể hiện bằng giá trị trung bình $\pm$ SD, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Một số chỉ tiêu chất lượng của các mẫu tiêu đen nghiên cứu

Mẫu tiêu đen theo tỉnh	Độ ẩm (%)	Tro tổng số (%)	Hàm lượng piperine (%)	Hàm lượng tinh dầu (ml/100 g)	Tro không tan trong axit (%)
Quảng Trị	11,79 $\pm$ 0,79 ^b	4,34 $\pm$ 0,24 ^b	5,07 $\pm$ 0,51 ^c	3,23 $\pm$ 0,41 ^b	0,22 $\pm$ 0,12 ^a
Đắk Nông	13,90 $\pm$ 0,81 ^c	3,68 $\pm$ 0,22 ^a	4,53 $\pm$ 0,30 ^{ab}	2,86 $\pm$ 0,38 ^{ab}	0,22 $\pm$ 0,11 ^a
Gia Lai	14,41 $\pm$ 0,60 ^c	3,79 $\pm$ 0,30 ^a	4,55 $\pm$ 0,57 ^{ab}	3,04 $\pm$ 0,32 ^{ab}	0,21 $\pm$ 0,07 ^a
Bà Rịa - Vũng Tàu	10,94 $\pm$ 0,97 ^a	3,81 $\pm$ 0,35 ^a	4,13 $\pm$ 0,55 ^a	2,80 $\pm$ 0,30 ^a	0,17 $\pm$ 0,10 ^a
Đồng Nai	10,64 $\pm$ 1,40 ^a	3,64 $\pm$ 0,33 ^a	4,24 $\pm$ 0,39 ^a	2,65 $\pm$ 0,35 ^a	0,1 $\pm$ 0,12 ^a
Đắk Lắk	13,69 $\pm$ 1,08 ^c	3,86 $\pm$ 0,38 ^a	4,85 $\pm$ 0,45 ^{bc}	3,27 $\pm$ 0,51 ^b	0,17 $\pm$ 0,10 ^a
p-value	2 x 10 ⁻¹⁶	1,28 x 10 ⁻¹¹	4,55 x 10 ⁻⁹	2,53 x 10 ⁻⁵	0,27

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị có cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% () theo kiểm định Tukey. Các giá trị p-value được phân tích theo phân tích phương sai một chiều.*

Hàm lượng ẩm là một chỉ tiêu quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng, khả năng bảo quản và thời gian sử dụng của hạt tiêu. Kết quả phân tích cho thấy, độ ẩm trong các mẫu khảo sát dao động đáng kể theo vùng địa lý. Cụ thể, giá trị độ ẩm trung bình thấp nhất được ghi nhận tại tỉnh Đồng Nai là 10,64 $\pm$ 1,40%, trong khi giá trị cao nhất được ghi nhận tại tỉnh Gia Lai với mức 14,41 $\pm$ 0,60% (trung bình $\pm$ SD). So sánh với các giới hạn tối đa được quy định trong: TCVN 7036:2008 [6], IPC (13%) [3], ASTA (12,5%) [5], có thể thấy, một số mẫu từ tỉnh Gia Lai vượt ngưỡng cho phép, tiềm ẩn nguy cơ ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm và độ ổn định trong quá trình bảo quản. Do đó, việc kiểm soát chặt chẽ độ ẩm trong quá trình thu hoạch và bảo quản là cần thiết để đảm bảo chất lượng hạt tiêu theo tiêu chuẩn quốc tế.

Tương tự như độ ẩm, hàm lượng tro tổng số là một chỉ tiêu quan trọng phản ánh chất lượng của hạt tiêu. Tro tổng số còn lại sau khi mẫu được đốt cháy hoàn toàn, phản ánh mức độ tinh khiết cũng như mức độ lẫn tạp chất vô cơ trong sản phẩm. Hàm lượng tro cao bất thường có thể là dấu hiệu

của sự pha trộn với tạp chất như đất, cát hoặc các vật liệu vô cơ khác trong quá trình thu hoạch, chế biến hoặc bảo quản. Trong nghiên cứu này, hàm lượng tro tổng số trung bình thấp nhất được ghi nhận ở mẫu hạt tiêu từ khu vực tỉnh Đồng Nai (3,64 $\pm$ 0,33%), trong khi giá trị trung bình cao nhất được ghi nhận ở tỉnh Quảng Trị (4,34 $\pm$ 0,24%). Các giá trị này đều nằm trong giới hạn cho phép theo TCVN 7036:2008 [6], ASTA [5], IPC [3], trong đó quy định mức tối đa cho hàm lượng tro tổng số không vượt quá 7,0%. So sánh với kết quả nghiên cứu của Singh và cs (2007), mức tro trung bình trong hạt tiêu Ấn Độ dao động từ 3,5 - 4,8%, các mẫu Việt Nam cũng đạt tiêu chuẩn tương đương và không có dấu hiệu pha tạp [12]. Điều này cho thấy, các mẫu hạt tiêu khảo sát đều đạt yêu cầu về chất lượng khoáng chất và không có dấu hiệu rõ ràng của sự pha tạp.

Piperine là một trong những hợp chất đặc trưng có mặt trong hạt tiêu, đóng vai trò quan trọng trong việc xác định chất lượng và đem lại vị cay đặc trưng của sản phẩm. Dựa trên giá trị trung bình tại các khu vực khảo sát, mẫu hạt tiêu thu thập từ tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu ghi nhận hàm lượng

piperine trung bình thấp nhất ($4,13 \pm 0,55\%$), trong khi mẫu từ tỉnh Quảng Trị có hàm lượng trung bình cao nhất ($5,07 \pm 0,51\%$). Theo tiêu chuẩn do ASTA [5] đề xuất, hàm lượng piperine tối thiểu được chấp nhận là $\geq 4,0\%$, trong khi IPC [3] quy định mức tối thiểu là $\geq 3,0\%$. Kết quả phân tích cho thấy, tất cả các mẫu trong nghiên cứu hiện tại đều đạt hoặc vượt ngưỡng tối thiểu theo quy định. So với kết quả nghiên cứu của Parthasarathy và cs (2008), hàm lượng piperine trung bình của hạt tiêu đen đạt khoảng 4,2 - 5,2%, kết quả hiện tại cho thấy, chất lượng piperine của hạt tiêu Việt Nam hoàn toàn cạnh tranh với các quốc gia sản xuất lớn khác như Ấn Độ hay Sri Lanka [13].

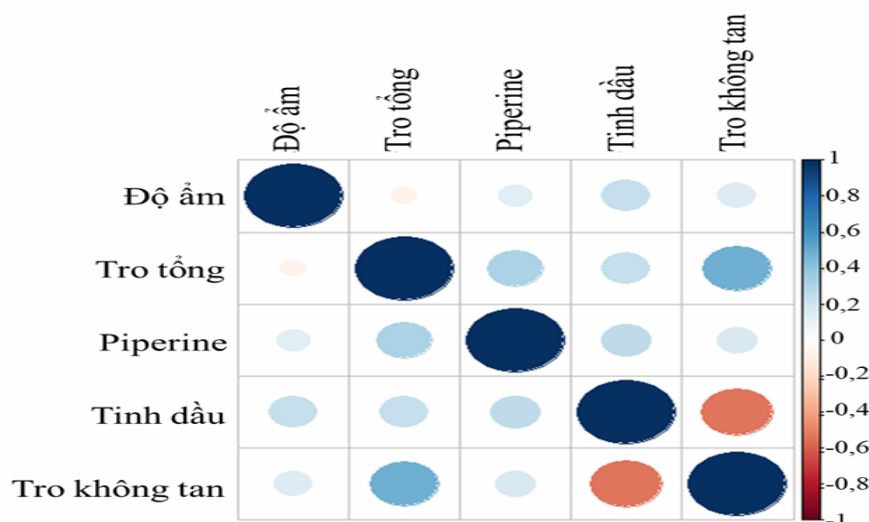
Hàm lượng tinh dầu bay hơi trong hạt tiêu có liên quan chặt chẽ đến các yếu tố như điều kiện sinh thái, giống trồng và phương pháp canh tác. Đây là chỉ tiêu quan trọng phản ánh chất lượng và giá trị cảm quan của sản phẩm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng tinh dầu bay hơi trong mẫu hạt tiêu thu thập tại các khu vực tỉnh Đồng Nai và tỉnh Đắk Lắk dao động từ $2,65 \pm 0,35$ đến $3,27 \pm 0,51$ ml/100 g tương ứng. Những giá trị này nằm trong giới hạn cho phép (lớn hơn 2,0 ml/100 g) theo các tiêu chuẩn như: TCVN 7036:2008 [6], ASTA [5], IPC [3], cho thấy chất lượng tinh dầu trong các mẫu khảo sát đạt mức tốt và phù hợp cho mục đích thương mại và chế biến thực phẩm.

Hàm lượng tro không tan trong axit là chỉ tiêu phản ánh mức độ tạp chất khoáng không hòa tan trong sản phẩm, thường có nguồn gốc từ đất cát hoặc bụi bặm bám vào trong quá trình thu hoạch, sơ chế và chế biến. Kết quả phân tích cho thấy, giá trị trung bình tro không tan trong axit của mẫu hạt tiêu thu thập tại tỉnh Đồng Nai là $0,10 \pm 0,12\%$, trong khi tại tỉnh Quảng Trị là $0,22 \pm 0,12\%$. Nhìn chung, các giá trị trung bình giữa các vùng dao động không đáng kể, cho thấy mức độ nhiễm tạp chất vô cơ tương đối thấp. Tất cả các mẫu khảo sát đều có giá trị thấp hơn giới hạn tối đa cho phép là 1,0% theo tiêu chuẩn của ASTA [5], cho thấy sản phẩm đạt yêu cầu về mặt chất lượng và vệ sinh an toàn thực phẩm.

3.2. Kết quả phân tích các dấu hiệu nhận diện về thành phần hóa lý của các mẫu tiêu nghiên cứu

3.2.1. Tương quan các thành phần hóa lý

Mối tương quan giữa các thông số hóa lý được trình bày ở hình 1. Hình 1 cho thấy, một số biến có mối tương quan nghịch, điển hình là giữa tro không tan và hàm lượng tinh dầu. Ngược lại, phần lớn các biến thể hiện mối tương quan thuận, chẳng hạn như giữa tro tổng số với piperine và tinh dầu. Đáng chú ý, có mối tương quan thuận mạnh giữa tro tổng số và tro không tan, trong khi mối tương quan nghịch mạnh được ghi nhận giữa tro không tan và tinh dầu. Các mối tương quan còn lại có mức độ yếu hơn.



Hình 1. Biểu đồ tương quan các thành phần hóa lý của các mẫu tiêu trong nghiên cứu

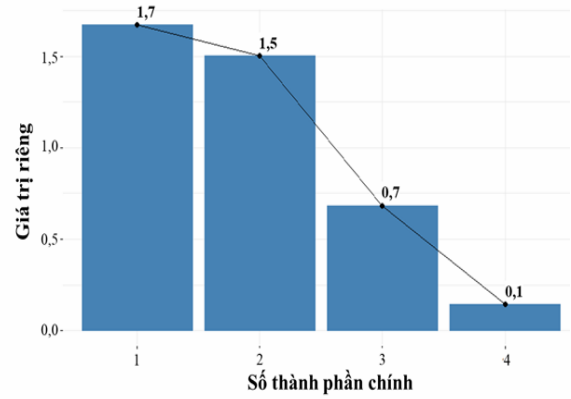
Bên cạnh việc phân tích tương quan, ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình đối với từng thông số hóa lý giữa các tỉnh đã được đánh giá

thông qua phép phân tích phương sai một chiều (one-way ANOVA), được trình bày tại mục 3.1. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy, các thông số như:

Độ ẩm, hàm lượng piperine, tinh dầu và tro tổng số có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các vùng địa lý ($p < 0,05$). Trong khi đó, sự khác biệt về hàm lượng tro không tan giữa các mẫu từ các tỉnh khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

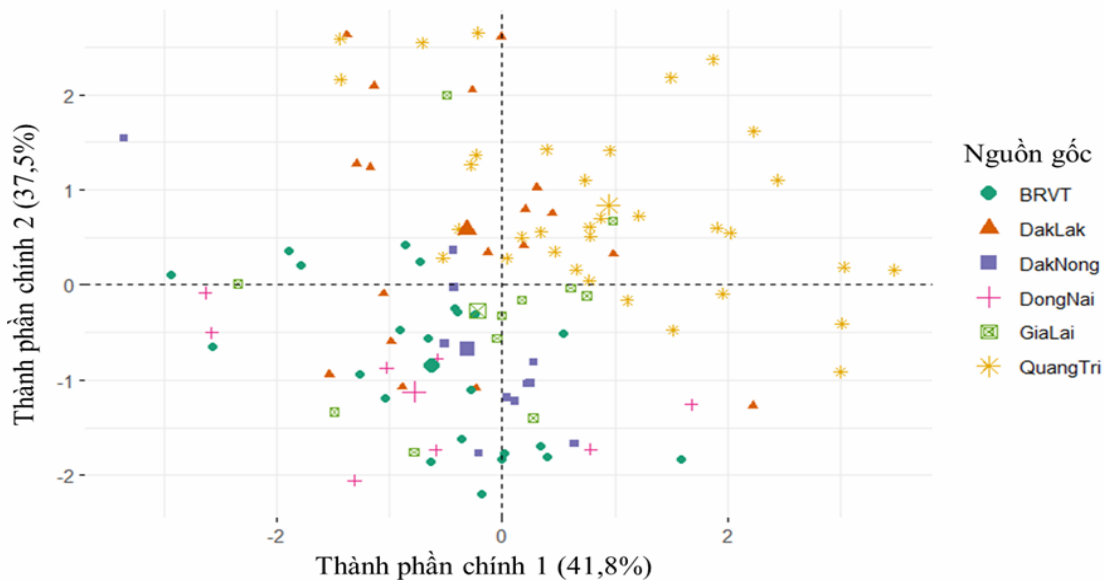
3.2.2. Phân tích thành phần chính (PCA)

Phân tích thành phần chính (Principal Component Analysis - PCA) đã được áp dụng cho tập dữ liệu gồm 105 mẫu hạt tiêu, nhằm mục tiêu giảm chiều không gian của dữ liệu đa biến và khám phá các cấu trúc tiềm ẩn giữa các biến số thành phần hóa học. Phương pháp này giúp cô đọng thông tin và dễ dàng trực quan hóa dữ liệu bằng cách chuyển dữ liệu từ không gian nhiều chiều về một không gian ít chiều hơn, trong khi vẫn giữ lại phần lớn phương sai của dữ liệu ban đầu. Các biến đầu vào cho PCA bao gồm các thông số hóa học đặc trưng: Hàm lượng piperine, hàm lượng tinh dầu, tro tổng số và tro không tan. Lưu ý, thông số độ ẩm đã được loại trừ khỏi phân tích, do đây không phải là đặc tính hóa lý cố hữu của hạt tiêu mà phụ thuộc nhiều vào các yếu tố ngoại sinh như phương pháp sơ chế, điều kiện bảo quản và thời gian thu mẫu. Việc loại bỏ độ ẩm giúp đảm bảo tính khách quan và loại trừ nhiễu trong đánh giá các đặc trưng địa lý.



Hình 2. Biểu đồ Scree thể hiện giá trị riêng (eigenvalue) của các thành phần chính trong PCA

PCA được thực hiện trên ma trận tương quan giữa các biến nhằm xác định các vector riêng (eigenvectors) tương ứng với các phương sai lớn nhất trong dữ liệu. Phân tích cho thấy, hai thành phần chính đầu tiên (PC1 - PC2) đều có giá trị riêng lớn hơn 1, lần lượt giải thích 41,79% và 37,52% phương sai, cộng lại chiếm 79,3% tổng phương sai của toàn bộ tập dữ liệu (Hình 2). Điều này cho thấy, gần 80% thông tin ban đầu có thể được biểu diễn trên mặt phẳng hai chiều tạo bởi PC1 - PC2, cho phép trực quan hóa mối quan hệ giữa các mẫu và các biến một cách hiệu quả mà không làm mất nhiều thông tin.

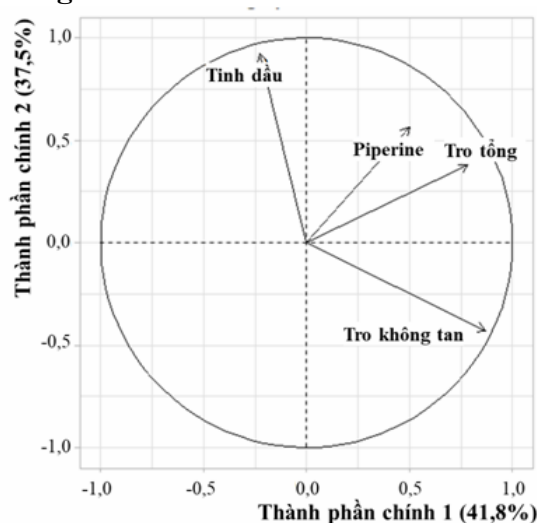


Hình 3. Biểu đồ điểm số (Score plot) của các mẫu hạt tiêu theo thành phần chính PC1 và PC2 từ phân tích PCA

Biểu đồ điểm số (Score plot) thể hiện sự phân bố của các mẫu trên mặt phẳng PC1 - PC2 (Hình 5) cho thấy, xu hướng hình thành cụm phân biệt

tương ứng với nguồn gốc địa lý của các mẫu tiêu. Các mẫu từ tỉnh Quảng Trị tập trung chủ yếu ở phía phải của trục PC1 (giá trị dương) và phía trên

của trục PC2 (giá trị dương), thể hiện đặc trưng thành phần hóa học nổi bật ở cả hai thành phần chính. Mẫu từ tỉnh Đắk Lắk có xu hướng phân bố cao trên PC2 (giá trị dương), nhưng thấp trên PC1 (giá trị âm), phản ánh mối liên hệ mạnh với thông số hàm lượng tinh dầu (Hình 4). Mẫu từ các tỉnh: Đắk Nông, Gia Lai, Bà Rịa - Vũng Tàu, Đồng Nai có phân bố xen kẽ và khá gần nhau, tập trung ở vùng giá trị âm của cả PC1 - PC2. Nhóm này cho thấy sự tương đồng về đặc tính hóa học giữa các tỉnh trong nhóm.



Hình 4. Biểu đồ tải (loading plot) của các biến trong phân tích PCA

Biểu đồ tải cũng cho thấy, PC1 chịu ảnh hưởng đồng thời của ba thành phần chính: Tinh dầu, piperine và tro tổng số, thể hiện vai trò tổng hợp của trục này trong phản ánh đặc điểm thành phần hóa học tổng quát của hạt tiêu. PC2 thì ngược lại, chịu ảnh hưởng mạnh mẽ hơn từ tinh dầu. Điều này lý giải cho việc các mẫu tỉnh Đắk Lắk (nổi bật về tinh dầu) phân bố cao hơn trên PC2, còn mẫu tỉnh Quảng Trị (nổi bật về piperine và tro tổng số). Mẫu còn lại ở các tỉnh: Đắk Nông, Gia Lai, Bà Rịa - Vũng Tàu, Đồng Nai, tập trung chủ yếu ở phía âm của trục PC1 - PC2. Điều này cho thấy, các mẫu này có xu hướng chứa hàm lượng các thành phần hóa học chính thấp hơn so với ở tỉnh Quảng Trị và tỉnh Đắk Lắk. Sự tập trung của các mẫu trong nhóm này cũng thể hiện tính đồng nhất cao, ít biến thiên giữa các tỉnh.

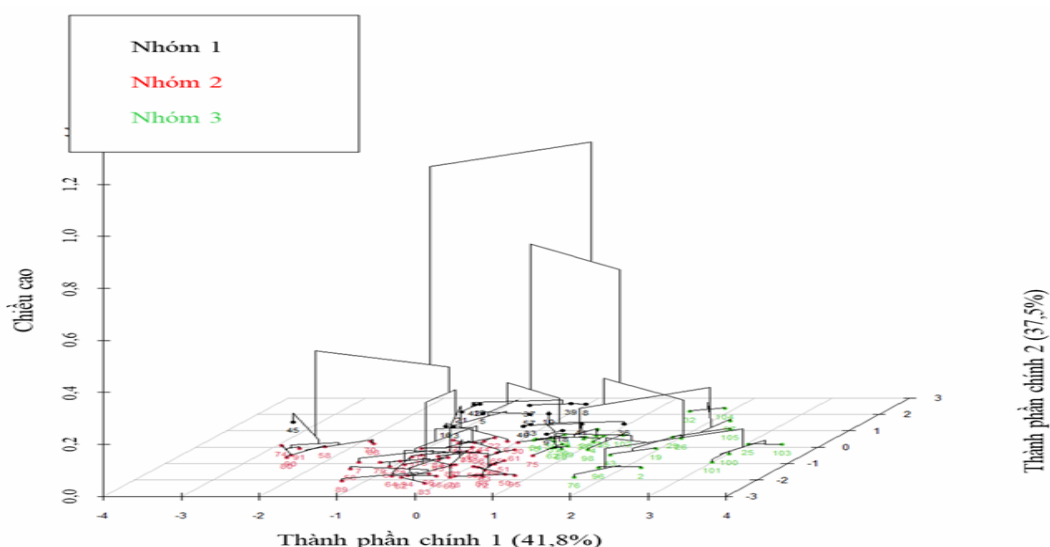
Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Rivera-Pérez và cs (2022), khi sử dụng PCA để phân biệt tiêu theo xuất xứ địa lý của hạt

tiêu, cho thấy piperine và tinh dầu là những biến đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành các cụm trên mặt phẳng PC1 - PC2 [14]. Nghiên cứu hiện tại sử dụng các chỉ tiêu hóa học định lượng phổ biến, dễ triển khai như: Tinh dầu, piperine, tro tổng số, tro không tan, thay vì các kỹ thuật phức tạp và tốn kém như $^1\text{H-NMR}$. Điều này giúp mô hình phân tích có tính ứng dụng thực tế cao, đặc biệt phù hợp với điều kiện kiểm nghiệm, giám sát chất lượng hoặc truy xuất nguồn gốc trong thực tế sản xuất hồ tiêu hay sản phẩm nông nghiệp tại Việt Nam.

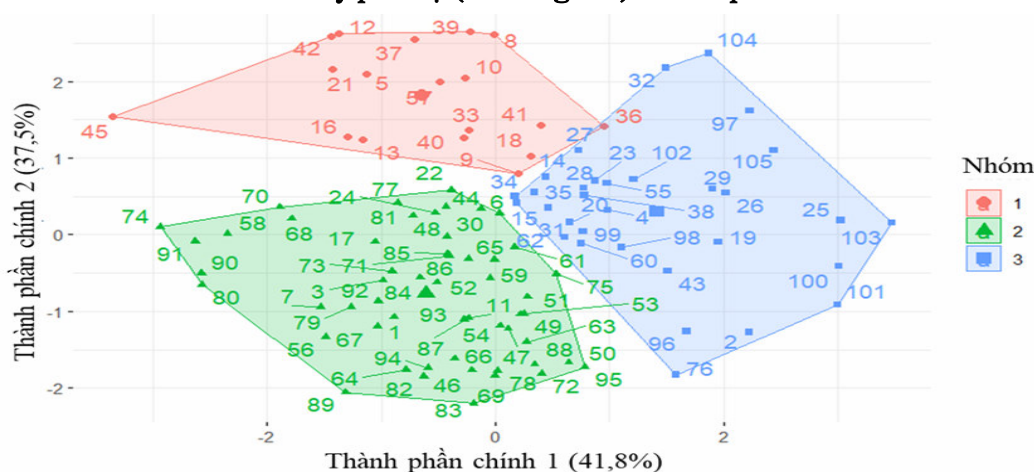
3.2.3. Phân cụm thứ bậc trên các thành phần chính (HCPC)

Phân tích phân cụm theo thành phần chính (HCPC) là một phương pháp kết hợp giữa phân tích thành phần chính (PCA), phân cụm phân cấp (Hierarchical clustering) và phân cụm k-means. Phương pháp này cho phép xác định và mô tả các nhóm quan sát đồng nhất dựa trên nhiều biến số. Đầu tiên, PCA được sử dụng để giảm chiều dữ liệu, giữ lại các thành phần chính quan trọng nhất. Sau đó, phân cụm phân cấp được áp dụng trên không gian thành phần chính nhằm phát hiện cấu trúc cụm tiềm ẩn.

HCPC được áp dụng nhằm khám phá các cấu trúc nhóm tự nhiên (hoặc cụm) trong dữ liệu dựa trên sự khác biệt về đặc tính giữa các quan sát. Sơ đồ cây phân cấp (cây phả hệ) đóng vai trò như một công cụ trực quan để thể hiện mức độ tương đồng hoặc khác biệt giữa các mẫu. Để giảm tính chủ quan trong việc xác định số cụm, tham số $\text{nb.clust} = -1$ trong hàm HCPC cho phép hệ thống tự động lựa chọn số lượng cụm tối ưu. Thuật toán đầu tiên xây dựng một cây phân cấp trên không gian PCA, sau đó tính mức quán tính nội cụm tại mỗi mức phân cụm. Số cụm được đề xuất tại thời điểm có mất mát tương đối lớn nhất, tức là khi việc tăng thêm cụm không còn giúp giảm đáng kể phương sai nội cụm - hay còn gọi là điểm khuỷu tay. Quá trình này được minh họa trực quan bằng sơ đồ cây phả hệ và biểu đồ biểu đồ mất mát quán tính. Việc áp dụng quy trình này giúp giảm thiểu ảnh hưởng của cảm tính chủ quan trong lựa chọn số lượng cụm và đảm bảo rằng các nhóm thu được có sự khác biệt rõ ràng về cấu trúc bên trong.



Hình 5. Sơ đồ cây phả hệ (dendrogram) từ kết quả HCPC



Hình 6. Bản đồ nhân tố minh họa cấu trúc nhóm của các mẫu hạt tiêu dựa trên phân tích phân cụm dựa trên thành phần chính HCPC

Kết quả phân tích phân cụm HCPC từ đặc điểm thành phần hóa học cho thấy, các mẫu tiêu từ các vùng địa lý khác nhau hình thành ba cụm phân biệt như sau:

Cụm 1: Gồm các mẫu tiêu có nguồn gốc chủ yếu từ tỉnh Đắk Lắk, có đặc trưng nổi trội do hàm lượng tinh dầu vượt trội. Nhóm này tách biệt rõ ràng so với hai cụm còn lại trên sơ đồ phân cấp, phản ánh tính đồng nhất nội tại cao và khác biệt rõ về đặc tính hóa học.

Cụm 2: Gồm các mẫu từ các tỉnh: Đắk Nông, Gia Lai, Bà Rịa - Vũng Tàu và Đồng Nai. Nhóm này không thể hiện đặc tính hóa học nổi bật nào và được xem là cụm tương đối trung tính. Đây là cụm có sự pha trộn về địa lý, cho thấy đặc tính hóa học của tiêu tại các khu vực này không đủ mạnh để hình thành cụm riêng biệt, đồng thời cũng không bị đẩy ra thành nhóm khác biệt như cụm 1.

Cụm 3: Gồm các mẫu tiêu đến từ tỉnh Quảng Trị, có đặc trưng nổi bật là hàm lượng piperine, tro tổng số và tro không tan cao.

So với kết quả nghiên cứu của Rivera Pérez và cs (2022), kết quả nghiên cứu hiện tại có nhiều điểm khác biệt rõ rệt về kỹ thuật. Rivera Pérez và cs (2012) sử dụng phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton ($^1\text{H-NMR}$) kết hợp với PCA và OPLS-DA. Nghiên cứu phân biệt tiêu đen dựa trên nguồn gốc địa lý và quy trình xử lý chất lượng. Tập trung vào phân tích dấu vân tay phân tử từ dữ liệu NMR. OPLS-DA là mô hình có giám sát, được dùng để phân loại mẫu đã dán nhãn trước [14]. Tuy nhiên, phương pháp này yêu cầu thiết bị hiện đại và quy trình phân tích phức tạp. Do đó, khó áp dụng đại trà trong điều kiện sản xuất và giám sát chất lượng ở quy mô lớn. Ngược lại, nghiên cứu hiện tại sử dụng các chỉ tiêu hóa học định lượng phổ biến

như: Tinh dầu, piperine, tro tổng số và tro không tan. Đây là các chỉ số đã được tiêu chuẩn hóa trong kiểm nghiệm chất lượng hạt tiêu. Dữ liệu sau đó được phân tích bằng phương pháp HCPC, một kỹ thuật không giám sát. Phương pháp này giúp giảm tính chủ quan trong phân loại. Đồng thời, hỗ trợ phát hiện cấu trúc tiềm ẩn trong dữ liệu. Tuy không có khả năng dự đoán như OPLS-DA, HCPC lại có ưu điểm về tính trực quan, chi phí thấp và khả năng ứng dụng thực tế cao. Phương pháp này phù hợp với truy xuất nguồn gốc và kiểm soát chất lượng tiêu thương phẩm tại Việt Nam.

Cách tiếp cận trong nghiên cứu này có tính thực tiễn cao, phương pháp dễ triển khai tại các phòng thí nghiệm tiêu chuẩn. Nghiên cứu cũng hỗ trợ hiệu quả cho việc phân vùng địa lý, xây dựng chỉ dẫn địa lý (GI) và phát triển sản phẩm theo mục tiêu sử dụng như ẩm thực, dược liệu hoặc xuất khẩu theo phân khúc cao cấp.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy sự khác biệt đáng kể về hàm lượng các thành phần hóa học giữa các vùng, phản ánh ảnh hưởng của yếu tố địa lý đến chất lượng sản phẩm. Cụ thể, hàm lượng tro tổng số nằm trong giới hạn cho phép, cao nhất tại tỉnh Quảng Trị ($4,34 \pm 0,24\%$). Hàm lượng piperine dao động từ $4,13 \pm 0,55\%$ tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu đến $5,07 \pm 0,51\%$ tại tỉnh Quảng Trị. Tinh dầu bay hơi đạt mức tốt, dao động từ $2,65 \pm 0,35$ đến $3,27 \pm 0,51$ ml/100 g tại tất cả vùng khảo sát, trong khi tro không tan trong axit đều dưới ngưỡng giới hạn, thấp nhất $0,10 \pm 0,12\%$.

Phân tích PCA cho thấy, mẫu tại tỉnh Quảng Trị liên quan mạnh đến hàm lượng piperine, tro tổng số và tro không tan; tỉnh Đắk Lắk nổi trội với hàm lượng tinh dầu; các tỉnh: Gia Lai, Đắk Nông, Bà Rịa - Vũng Tàu, Đồng Nai tương đối trung tính. Kết quả này làm rõ đặc điểm về chất lượng, góp phần xây dựng công cụ truy xuất nguồn gốc, hỗ trợ định danh và phát triển thương hiệu địa phương cho sản phẩm hồ tiêu Việt Nam.

Tuy nhiên, nghiên cứu vẫn còn tồn tại một số hạn chế, gồm: Số lượng mẫu có giới hạn, chưa phản ánh được hết sự đa dạng nội vùng và biến động theo thời vụ. Chỉ tiêu phân tích còn tập trung vào các yếu tố cơ bản, chưa mở rộng đến các hợp chất thứ cấp (alkaloids, polyphenol, flavonoid...),

hay chỉ số sinh học khác, vốn cũng có vai trò quan trọng trong giá trị dược liệu và cảm quan. Trong tương lai, cần mở rộng nghiên cứu sang nhiều vùng trồng khác và phân tích thêm các chỉ tiêu hóa học chuyên sâu. Việc kết hợp với dữ liệu môi trường và giống cây sẽ giúp hiểu rõ hơn sự khác biệt giữa các vùng, từ đó có thể xây dựng hệ thống phân hạng chất lượng hồ tiêu theo vùng. Đây sẽ là nền tảng để phát triển thương hiệu và nâng cao sức cạnh tranh trên thị trường quốc tế.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Khoa học và Công nghệ trong Đề tài “Nghiên cứu và ứng dụng công nghệ Blockchain vào quản lý chuỗi sản xuất và tiêu thụ hạt tiêu Việt Nam” (Số: KC-4.0-24/19-25).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. VietnamBiz (2025). Báo cáo thị trường hồ tiêu, tháng 2/2025. Báo cáo tại Hội nghị Quốc tế Ngành Hồ tiêu và Gia vị Việt Nam 2025 (VIPO 2025).
2. Trung tâm WTO và Hội nhập Liên đoàn Thương mại và Công nghiệp Việt Nam (2024). Xuất khẩu hồ tiêu năm 2024 sẽ lập kỷ lục 1,3 tỷ USD. <https://trungtamwto.vn/hiep-dinh-khac/27678-xuat-khau-ho-tieu-nam-2024-se-lap-ky-luc-13-ty-usd/>. Ngày truy cập: 7/6/2025.
3. IPC Standard Specifications for Black/White pepper (Whole and Ground) and Whole dehydrated green pepper, International pepper community, 12/2015.
4. ISO 959-1:1998. Pepper (*Piper nigrum* L.), whole or ground - Specification - Part 1: Black pepper.
5. American Spice Trade Association (ASTA), Washington, D.C, p12. www.astaspice.org
6. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7036:2008. Hạt tiêu đen (*Piper nigrum* L.) - Qui định kỹ thuật.
7. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4889:1989 (ISO 948:1988). Gia vị - Lấy mẫu.
8. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7035:2002. Cà phê bột - Xác định độ ẩm - Phương pháp xác định sự hao hụt khối lượng ở 103°C (phương pháp thông thường).
9. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7038:2002 (ISO 928:1997). Gia vị - Xác định tro tổng số.

10. Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 9683:2013 (ISO 5564:1982). Hạt tiêu đen và hạt tiêu trắng nguyên hạt hoặc dạng bột - Xác định hàm lượng piperin - Phương pháp đo quang phổ.
11. Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 7039:2013 (ISO 6571:2008). Gia vị và thảo mộc - Xác định hàm lượng dầu dễ bay hơi (phương pháp chưng cất bằng hơi nước).
12. Singh, G., Marimuthu, P., Heluani, C. S. de. & Catalan, C. A. N (2007). Chemical constituents, antioxidative and antimicrobial activities of essential oil and oleoresin of tailed pepper (*Piper cubeba* L). *International Journal of Food engineering*, 3(6), 11. <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1154>
13. Parthasarathy, V. A., Chempakam, B. & Zachariah, T. J (2008). *Chemistry of Spices*. CABI Pub. <https://books.google.com.vn/books?id=5WY08iuJyawC>.
14. Rivera-Pérez, A., Romero-González, R. & Garrido Frenich, A (2022). A metabolomics approach based on 1H NMR fingerprinting and chemometrics for quality control and geographical discrimination of black pepper. *Journal of Food Composition and Analysis*. 105, 104235. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104235>.

INITIAL DEVELOPMENT OF CHEMICAL MARKERS FOR BLACK PEPPER (*Piper nigrum* L.) FROM MAJOR GROWING REGIONS IN VIETNAM

Le Tuan Phuc¹, Bui Uyen Diem¹, Hoang Quoc Tuan¹,
Pham Ngoc Hung¹, Lai Quoc Dat²,
Nguyen Hoang Dung², Cung Thi To Quynh¹

¹ School of Chemical and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology

² Ho Chi Minh city University of Technology, Vietnam National University Ho Chi Minh city

Abstract

The present study examined the physicochemical characteristics of black pepper samples collected from six primary growing regions in Vietnam: Quang Tri, Dak Lak, Gia Lai, Dak Nong, Dong Nai and Ba Ria - Vung Tau. A one-way analysis of variance (ANOVA) at a significance level of $\alpha = 0.05$ was conducted, which revealed statistically significant differences among the regions in terms of moisture content, total ash, piperine content and essential oil content. The moisture content of the samples ranged from $10.64 \pm 1.40\%$ to $14.41 \pm 0.60\%$. The piperine content exhibited a range from $4.13 \pm 0.55\%$ to $5.07 \pm 0.51\%$, meeting the global quality requirements. The total ash content, which is insoluble to acids, ranged from $0.10 \pm 0.12\%$ to $0.22 \pm 0.12\%$. The essential oil content varied between 2.65 ± 0.35 to 3.27 ± 0.51 ml/100 g of 100 grams of the sample. Principal Component Analysis (PCA) highlighted distinct regional characteristics: Quang Tri samples were closely associated with high levels of piperine and total ash, Dak Lak samples were distinguished by elevated essential oil content, whereas other regions showed overlapping profiles. These findings confirm the influence of geographical origin on the physicochemical properties of black pepper and suggest potential applications in product traceability and quality control.

Keywords: Black pepper, physicochemical, Quang Tri, Dak Lak, Ba Ria - Vung Tau, geographical indication.

Ngày nhận bài: 25/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 10/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 28/7/2025

Ngày duyệt đăng: 8/8/2025

NGHIÊN CỨU MÔ HÌNH HÓA QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN TINH BỘT VÀ ĐƯỜNG HÓA TRONG CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT BIA

Nguyễn Đặng Bình Thành^{1,*}, Trần Thị Thu Hằng¹, Tống Thị Hoàng Dương¹

¹Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

*Email: thanh.nguyendangbinh@hust.edu.vn

TÓM TẮT

Thủy phân và đường hóa tinh bột trong malt và gạo là một bước cơ bản và then chốt trong nhiều quá trình chuyển hóa các sản phẩm nông nghiệp thành thực phẩm, đồ uống và các loại hóa chất cơ bản. Nghiên cứu này hướng đến xây dựng một mô hình toán học tổng quát mô tả động học quá trình thủy phân và đường hóa tinh bột dưới tác dụng của α - và β -amylaza. Mô hình động học này không chỉ cho phép đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu quả của quá trình mà còn cho phép đánh giá ảnh hưởng của tỷ lệ nước sử dụng và tỷ lệ ngũ cốc (gạo hoặc ngô) nhằm tối ưu hóa năng lượng và nguồn nguyên liệu trong sản xuất bia.

Từ khóa: Mô hình hóa, tối ưu hóa, đường hóa, thủy phân, bia và đồ uống.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thủy phân và đường hóa tinh bột là một bước then chốt trong quy trình sản xuất bia. Trong quá trình này, các polysaccharide có trong mạch nha sẽ được thủy phân giải bằng các enzyme. Ở đó, các carbohydrate có khả năng lên men sẽ được tạo ra từ sự phân giải của tinh bột polysaccharide. Những carbohydrate này sẽ được chuyển hóa thành cồn trong bước lên men của quá trình sản xuất bia.

Phản ứng quan trọng nhất trong quá trình đường hóa là quá trình thủy phân tinh bột đã hồ hóa dưới tác dụng của các enzyme, vì nó quyết định lượng carbohydrate có khả năng lên men được tạo ra và gián tiếp ảnh hưởng đến hàm lượng cồn của sản phẩm. Do đó, một trong những mục đích then chốt của quá trình đường hóa là tối ưu hóa quá trình tạo ra các hợp chất có khả năng lên men này. Tuy nhiên, các carbohydrate không có khả năng lên men như dextrin cũng được tạo ra trong quá trình thủy phân tinh bột và hàm lượng của chúng trong quá trình đường hóa cũng gây ra những ảnh hưởng không nhỏ đến chất lượng sản phẩm. Vì vậy, việc kiểm soát sự hình thành các sản phẩm phụ không mong muốn là cần thiết để ngăn ngừa những tác động tiêu cực đến các công đoạn sản xuất tiếp theo.

Các phản ứng chính diễn ra trong quá trình đường hóa là các phản ứng xúc tác bởi các loại enzyme khác nhau, chủ yếu là α - và β -amylaza. Vì hoạt tính của các enzyme này phụ thuộc rất nhiều vào nhiệt độ, nên việc điều chỉnh thông số này được xem là một yếu tố quan trọng đối với quá trình đường hóa. Khi nhiệt độ tăng, tốc độ phản ứng cũng tăng nhanh, nhưng đồng thời các enzyme cũng bị biến tính nhanh hơn [1, 2]. Thông thường, quá trình đường hóa được thực hiện trong các thiết bị phản ứng (thùng) dạng mẻ ở đó nhiệt độ của khối phản ứng ở mỗi giai đoạn khác nhau cần được điều chỉnh phù hợp nhằm tối ưu phạm vi nhiệt độ hoạt động của từng enzyme.

Do tầm quan trọng của ngành công nghiệp bia, việc xây dựng mô hình toán học quá trình đường hóa đang được quan tâm rộng rãi. Một số công bố đã xây dựng các mô hình toán học cho quá trình thủy phân và đường hóa tinh bột có tính đến sự phân giải của các sản phẩm phụ không mong muốn như: β -glucan và arabinoxylan [3 - 6]. Ngoài ra, các nghiên cứu liên quan đến ảnh hưởng của một số thông số khác trong quá trình đường hóa như: Chương trình nhiệt độ, độ đặc của dịch nha, độ mịn của nguyên liệu cũng đã được thực hiện nhằm mục đích kiểm soát tốt hơn chất lượng sản phẩm [7, 8].

Trên cơ sở đó, mục tiêu của nghiên cứu này là xây dựng một mô hình toán học tổng quát cho quá trình đường hóa và đánh giá ảnh hưởng của một số thông số chính nhằm nâng cao hiệu quả tổng thể của quá trình này trong công nghệ sản xuất bia.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu sử dụng là một số loại malt thương mại có tên “Kymppi, Ingrid và Kustaa” với các kết quả phân tích thành phần của carbohydrate và enzyme đã được công bố bởi Durand và cs (2009) [9]. Kết quả phân tích thành phần các loại carbohydrates và enzyme của malt sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần của enzyme và carbohydrates sử dụng để thực hiện mô hình hóa [9]

Thành phần	Giá trị	Đơn vị
Glucose	3,6	g/L
Maltose	8,9	g/L
Maltotriose	1,3	g/L
Fructose	2	g/L
Dextrins	26,5	g/L
Starch	95,7	g/L
α -amylase	$4,37 \times 10^5$	U/L
β -amylase	$1,05 \times 10^6$	U/L

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, các mô hình động học chi tiết của các quá trình hòa tan vật lý và các quá trình phản ứng sinh hóa được xây dựng và ứng dụng để phân tích, đánh giá tốc độ và hiệu quả của quá trình đường hóa malt trong sản xuất bia. Mô hình được xây dựng trên cơ sở các phương trình vi phân thường mô tả vận tốc của các quá trình có liên quan đến giai đoạn đường hóa. Hệ phương trình vi phân mô tả toàn bộ giai đoạn đường hóa sau đó được giải trên nền tảng mã nguồn mở Python bằng thuật toán Runge-Kutta.

3. ĐỘNG HỌC QUÁ TRÌNH ĐƯỜNG HÓA

Mô hình bao gồm các hiện tượng vật lý và hóa học chính quyết định tốc độ thủy phân và đường hóa tinh bột. Các yếu tố ảnh hưởng chính là sự hòa tan của carbohydrate thủy phân có trong dịch nha, sự hòa tan ban đầu của các enzyme, nhiệt độ hồ hóa và biến tính nhiệt của enzyme. Mô hình cũng kể đến tác động cụ thể của hai enzyme chính, ở đó α -amylaza tác động lên cả tinh bột không hòa tan và hòa tan để tạo ra chủ yếu dextrin và maltotriose, còn β -amylaza sau đó thủy phân dextrin thành glucose, maltose, maltotriose và dextrin giới hạn. Quá trình thủy phân saccharose bởi invertase thành glucose và fructose cũng được xét đến trong mô hình.

3.1. Động học quá trình hòa tan của carbohydrate thủy phân

Tốc độ hòa tan của carbohydrate thủy phân (glucose, maltose, maltotriose, fructose, saccharose và dextrin) trong một vài phút đầu tiên được xem là tỷ lệ thuận với lượng carbohydrate trong mạch nha và được mô tả trong các phương trình từ (1) - (6).

$$r_{diss}^{gl} = k_{diss} \cdot (I_{gl}) \quad (1)$$

$$r_{diss}^{mal} = k_{diss} \cdot (I_{mal}) \quad (2)$$

$$r_{diss}^{mlt} = k_{diss} \cdot (I_{mlt}) \quad (3)$$

$$r_{diss}^{fr} = k_{diss} \cdot (I_{fr}) \quad (4)$$

$$r_{diss}^{sac} = k_{diss} \cdot (I_{sac}) \quad (5)$$

$$r_{diss}^{dex} = k_{diss} \cdot (I_{dex}) \quad (6)$$

3.2. Động học quá trình hòa tan enzyme

Tốc độ hòa tan của hai enzyme thông thường xảy ra trong khoảng 20 phút đầu tiên của quá trình đường hóa được xem là bị giới hạn bởi tốc độ chuyển hóa enzyme và được biểu diễn bởi hai phương trình (7) và (8).

$$r_{diss}^{\alpha} = H \cdot (malt) \cdot ([\alpha]_g - [\alpha]) \quad (7)$$

$$r_{diss}^{\beta} = H \cdot (malt) \cdot ([\beta]_g - [\beta]) \quad (8)$$

3.3. Động học quá trình chuyển hóa dextrans và maltotrioses

Thủy phân tinh bột không hòa tan và hòa tan bởi α -amylaza thành dextrin và maltotriose được giả định là phản ứng bậc một đối với enzyme và tinh bột, tuy nhiên, với hằng số tốc độ khác nhau trước và sau khi hồ hóa. Không có sự phân biệt giữa các thành phần amylose và amylopectin của tinh bột. Động học quá trình này được biểu diễn theo các phương trình từ (9) - (11).

$$r_{dex}^{\alpha} = A_{diss}^{\alpha} \cdot [\alpha] [I]_{starch} \quad (9)$$

$$r_{dex}^{\alpha} = A_{diss}^s \cdot [\alpha] [starch] \quad (10)$$

$$r_{mlt}^{\alpha} = A_{mlt}^s \cdot [\alpha] [starch] \quad (11)$$

Các phản ứng đối với β -amylaza và dextrin cũng được xem là phản ứng bậc một cho quá trình thủy phân dextrin bởi β -amylaza thành glucose, maltotriose và dextrin giới hạn, chúng được mô tả theo các phương trình từ (12) - (15).

$$r_{gl}^{\beta} = B_{gl} \cdot [\beta] [dex] \quad (12)$$

$$r_{mal}^{\beta} = \frac{B_{mal} \cdot [\beta] [dex]}{K_m + [dex]} \quad (13)$$

$$r_{mlt}^{\beta} = B_{mlt} \cdot [\beta] [dex] \quad (14)$$

$$r_{Ldex}^{\beta} = B_{Ldex} \cdot [\beta] [dex] \quad (15)$$

3.4. Động học quá trình thủy phân saccharose

Quá trình thủy phân saccharose là một quá trình nhỏ trong công đoạn đường hóa, được giả định là quá trình bậc nhất, tuy nhiên invertase bị biến tính hoàn toàn ở nhiệt độ trên 55°C. Động học quá trình này được biểu diễn qua các phương trình từ (16) - (18).

$$r_{gl}^{inv} = C[sac] \text{ ở nhiệt độ } \leq 55^{\circ}\text{C} \quad (16)$$

$$r_{fr}^{inv} = C[sac] \text{ ở nhiệt độ } \leq 55^{\circ}\text{C} \quad (17)$$

$$r_{gl}^{inv} = r_{fr}^{inv} = 0 \text{ ở nhiệt độ } \geq 55^{\circ}\text{C} \quad (18)$$

Được biết đến trong mô tả động học của quá trình thủy phân bằng enzyme, sự biến tính nhiệt của α -amylaza và β -amylaza được biểu diễn bằng

$$\frac{d(I_{gl})}{dt} = \frac{k_{diss}}{V} (I_{gl}) + \frac{C}{1.9} [sac] + B_{gl} [\beta] [dex] \quad (33)$$

các quá trình phản ứng bậc nhất theo các phương trình từ (19) - (24).

$$r_d^{\alpha} = k_d^{\alpha} [\alpha] \quad (19)$$

$$r_d^{\beta} = k_d^{\beta} [\beta] \quad (20)$$

$$A_j = A_j^0 \exp(-E_j^{\alpha} / RT) \quad (21)$$

$$B_j = B_j^0 \exp(-E_j^{\beta} / RT) \quad (22)$$

$$k_d^{\alpha} = k_{d,0}^{\alpha} \exp(-E_j^{\alpha} / RT) \quad (23)$$

$$k_d^{\beta} = k_{d,0}^{\beta} \exp(-E_j^{\beta} / RT) \quad (24)$$

3.5. Hệ phương trình vi phân cân bằng vật chất và năng lượng

Sự biến đổi theo thời gian của các loại hợp chất khác nhau trong dịch nha ban đầu chỉ tính đến sự hòa tan của chúng trong pha lỏng và quá trình này được biểu thị thông qua các phương trình vi phân bậc nhất từ (25) - (32).

$$\frac{d(I_{gl})}{dt} = -k_{diss}(I_{gl}) \quad (25)$$

$$\frac{d(I_{mal})}{dt} = -k_{diss}(I_{mal}) \quad (26)$$

$$\frac{d(I_{mlt})}{dt} = -k_{diss}(I_{mlt}) \quad (27)$$

$$\frac{d(I_{dex})}{dt} = -k_{diss}(I_{dex}) \quad (28)$$

$$\frac{d(I_{sac})}{dt} = -k_{diss}(I_{sac}) \quad (29)$$

$$\frac{d(I_{fr})}{dt} = -k_{diss}(I_{fr}) \quad (30)$$

$$\frac{d([\alpha]_g)}{dt} = -\frac{H}{v_h} (malt)([\alpha]_g - [\alpha]) \quad (31)$$

$$\frac{d([\beta]_g)}{dt} = -\frac{H}{v_h} (malt)([\beta]_g - [\beta]) \quad (32)$$

Tiếp theo đó, sự biến đổi theo thời gian của các loại hợp chất trong dung dịch phụ thuộc vào cả sự hòa tan ban đầu trong chất lỏng và hoạt tính thủy phân của các enzyme. Quá trình này được mô tả thông qua các phương trình vi phân từ (33) - (42) [5].

$$\frac{d(I_{mal})}{dt} = \frac{k_{diss}}{V} (I_{mal}) + \frac{B_{mal}[\beta][dex]}{k_m + [dex]} \quad (34)$$

$$\frac{d(I_{mlt})}{dt} = \frac{k_{diss}}{V} (I_{mlt}) + A_{mlt}^s[\alpha][starch] + B_{mlt}[\beta][dex] \quad (35)$$

$$\frac{d(I_{Ldex})}{dt} = B_{Ldex}[\beta][dex] \quad (36)$$

$$\frac{d[starch]}{dt} = -[\alpha][starch] (0,964 A_{mlt} + A_{dex}^i) \quad (37)$$

$$\frac{d(I_{dex})}{dt} = \frac{k_{diss}}{V} (I_{dex}) + A_{dex}^i[\alpha][starch] - [\beta][dex](0,9B_{gl} + 0,947B_{mal} + 0,946B_{mlt} + B_{Ldex}) \quad (38)$$

$$\frac{d(I_{sac})}{dt} = \frac{k_{diss}}{V} (I_{sac}) - c(sac) \quad (39)$$

$$\frac{d(I_{fr})}{dt} = \frac{k_{diss}}{V} (I_{fr}) + \frac{c}{1,9} (sac) \quad (40)$$

$$\frac{d([\alpha])}{dt} = -\frac{H}{v_h} (malt)([\alpha]_g - [\alpha] - k_d^\alpha[\alpha]) \quad (41)$$

$$\frac{d([\beta])}{dt} = -\frac{H}{v_h} (malt)([\beta]_g - [\beta] - k_d^\beta[\beta]) \quad (42)$$

Trong các phương trình trên, các mối quan hệ Arrhenius của các phương trình (21) - (24) được sử dụng để tính toán các hằng số tốc độ $A_{dex}^i, A_{dex}^s, A_{mal}^s, B_{gl}, B_{mlt}, B_{Ldex}, k_d^\alpha, k_d^\beta$ ở các nhiệt độ khác nhau.

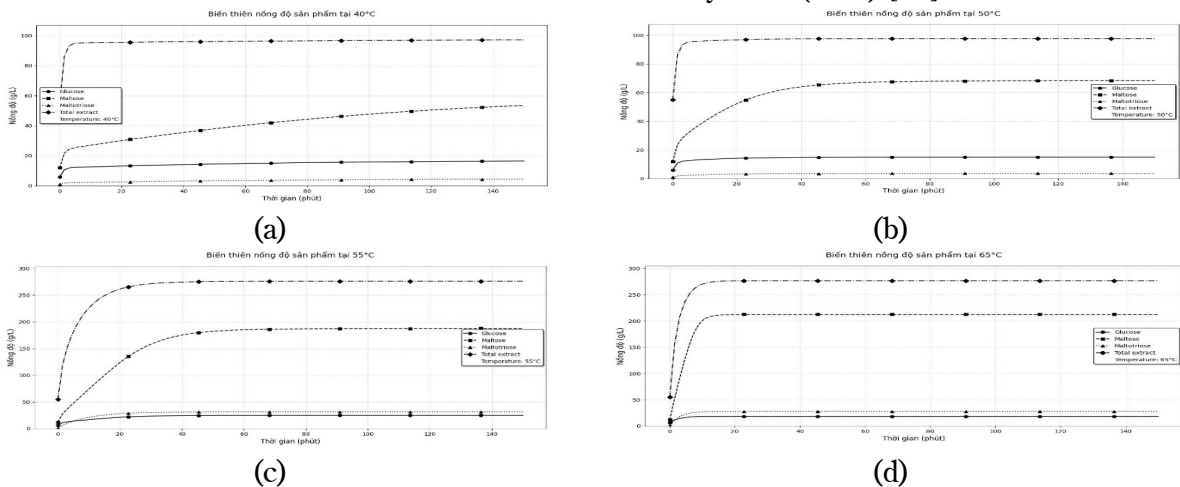
Hệ phương trình vi phân cân bằng vật chất và năng lượng như mô tả trong các phương trình từ (25) - (42) được xem là mô hình toán học tổng quát mô tả quá trình đường hóa trong nghiên cứu này. Hệ phương trình này được giải bằng công cụ mã nguồn mở Python để phân tích và đánh giá các yếu tố ảnh hưởng của các thông số chính đến hiệu quả của quá trình đường hóa.

4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

4.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả tính toán từ mô hình đã được xây dựng (hệ các phương trình từ (25) - (42)) cho quy mô phòng thí nghiệm với bột malt có kích thước 250 μm , tỷ lệ malt nước 1: 3. Quá trình đường hóa được thực hiện trong thiết bị phản ứng có thể tích 7 lít ở các nhiệt độ lần lượt là 40, 50, 55, 65°C. Kết quả mô hình được thể hiện ở hình 1.

Kết quả ở hình 1 cho thấy khi nhiệt độ tăng từ 40 lên 50°C, hàm lượng các sản phẩm thu được tăng lên không đáng kể. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ lên 55°C, 65°C hàm lượng các sản phẩm tăng lên đáng kể. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Kettunen và cs (1996) [4] và Sadosky và cs (2002) [10].

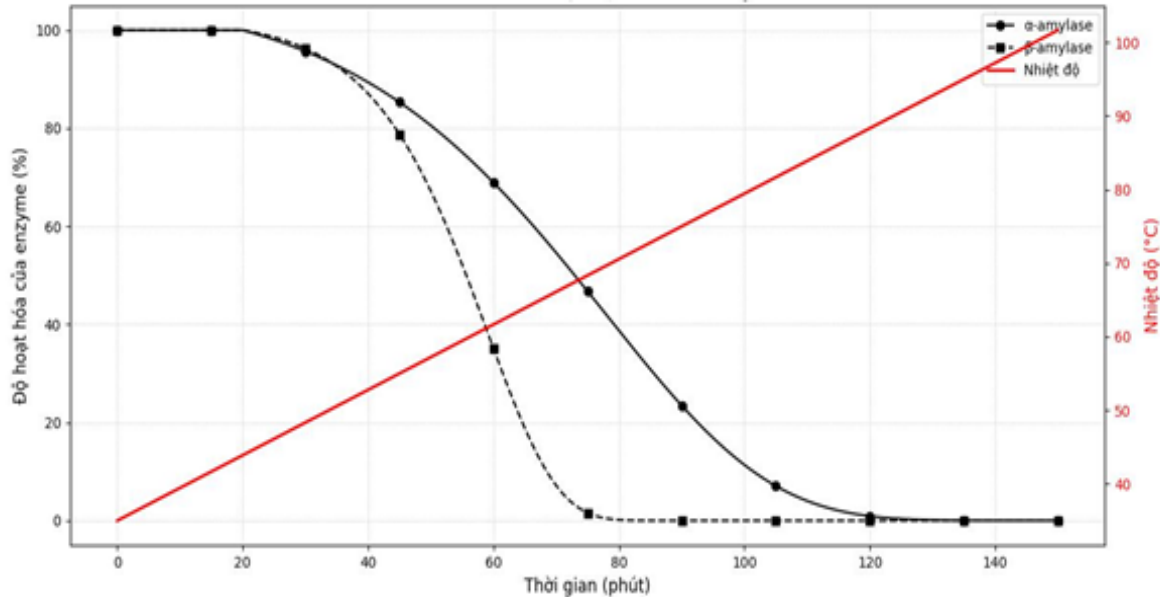


Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình đường hóa: (a) - 40°C, (b) - 50°C, (c) - 55°C, (d) 65°C

4.2. Ảnh hưởng của chương trình nhiệt độ

Ảnh hưởng của chương trình nhiệt độ đến quá trình thủy phân enzyme và quá trình hình thành các carbohydrate có thể lên men được phân tích và đánh giá với 3 chế độ khác nhau bao gồm: (1)

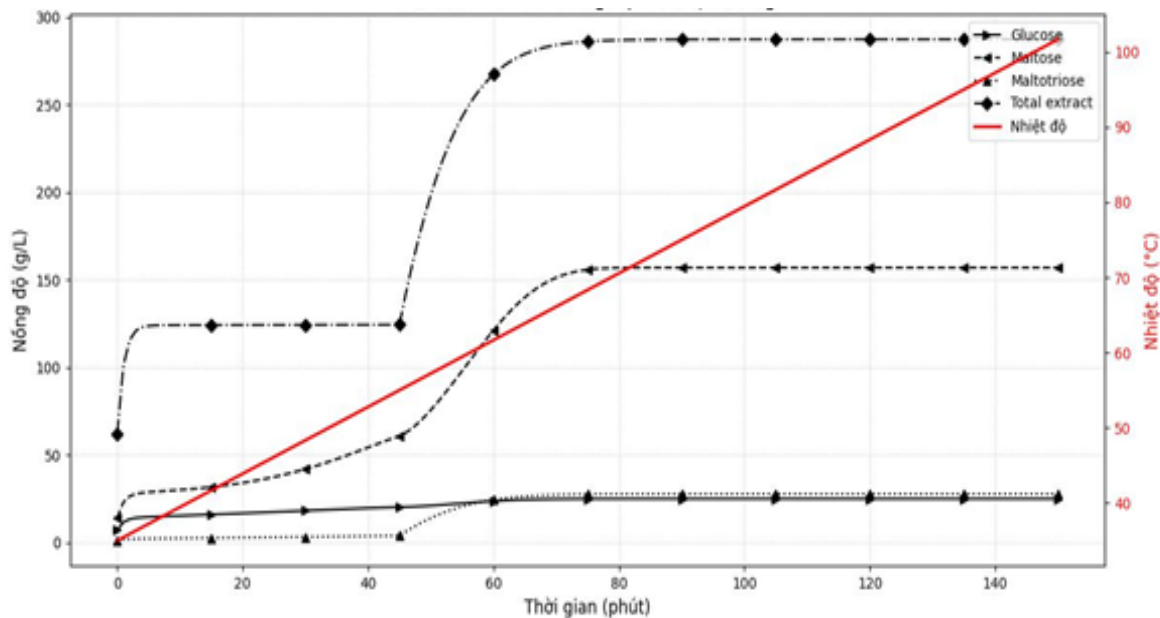
Biến thiên tuyến tính từ 35 -75°C; (2) Biến thiên hai giai đoạn từ 35 - 65°C; (3) Biến thiên ba giai đoạn từ 52 - 67°C. Các kết quả mô phỏng được thể hiện ở các hình 2, 3, 4, 5, 6, 7.



Hình 2. Biến thiên hàm lượng của các enzyme theo chương trình nhiệt tuyến tính

Kết quả mô phỏng cho thấy tốc độ phân hủy của β-amylaza nhanh hơn α-amylaza. Để phân hủy hết α-amylaza cần khoảng thời gian lên đến 140

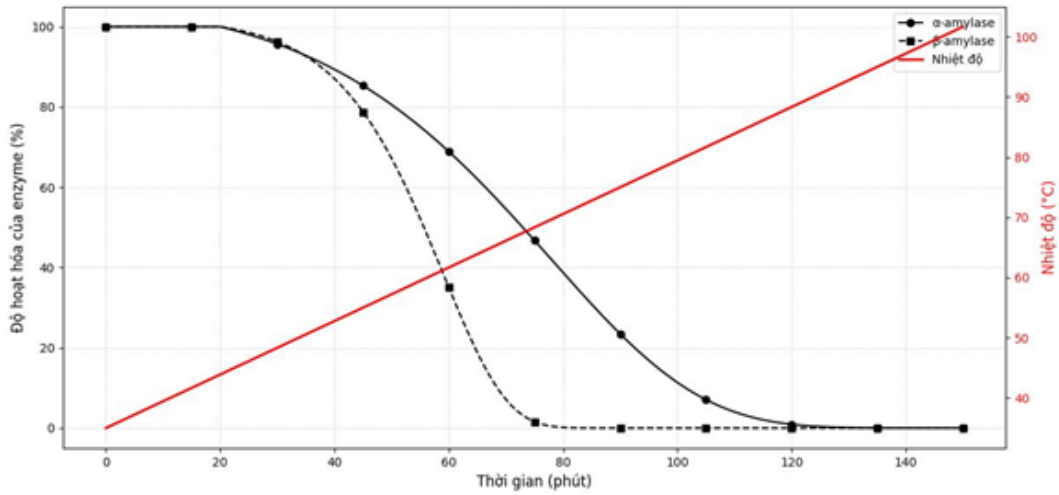
phút, trong khi chỉ với khoảng gần 80 phút lượng β-amylaza đã phân hủy hết.



Hình 3. Ảnh hưởng của chương trình nhiệt tuyến tính đến làm lượng các sản phẩm

Tổng lượng sản phẩm hữu ích đối với chương trình tuyến tính đạt được khá cao, tuy nhiên giải nhiệt độ của quá trình đường hóa thông thường chỉ giới hạn đến 75°C. Do đó, từ kết quả tính toán

của mô hình cho thấy, chương trình nhiệt độ một giai đoạn được đánh giá là không phù hợp với quá trình đường hóa.

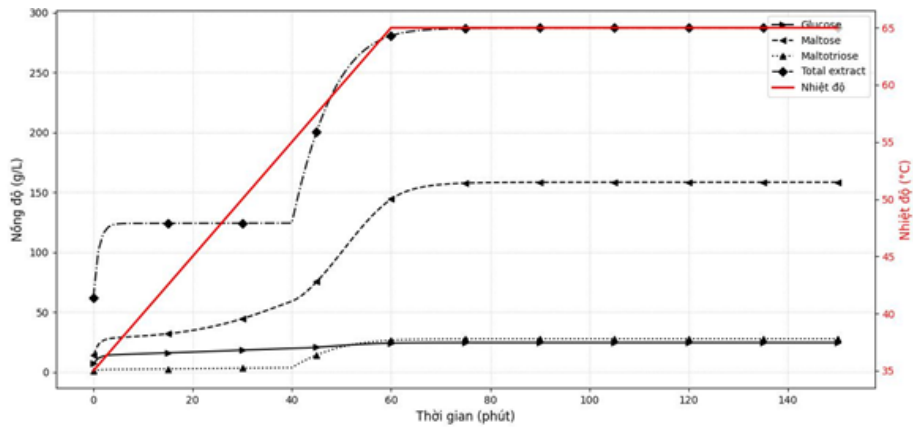


Hình 4. Biến thiên hàm lượng các enzyme đến chương trình nhiệt hai giai đoạn

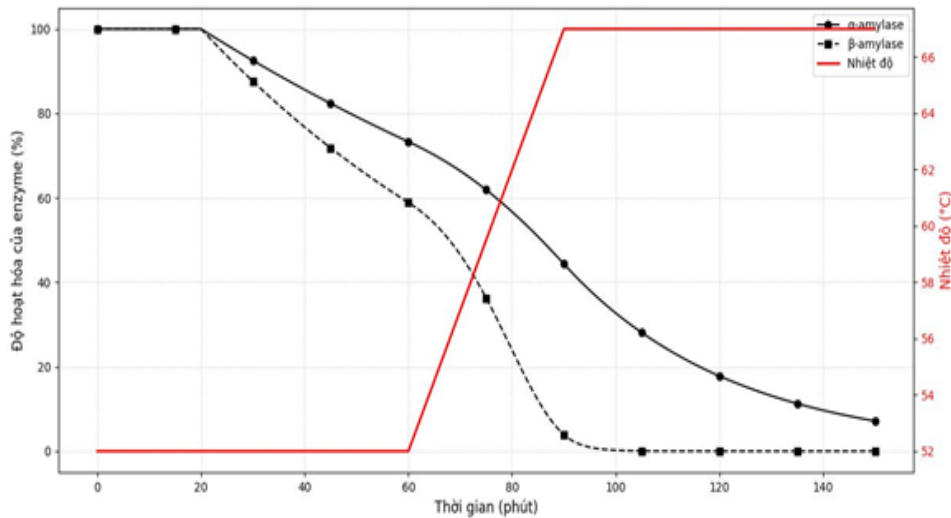
Ở chương trình nhiệt hai giai đoạn, nhiệt độ khối phản ứng tăng dần từ 35 - 65°C trong vòng 60 phút, sau đó duy trì ở nhiệt độ này trong vòng 80 phút như mô tả ở hình 4. Kết quả cho thấy, giải nhiệt độ này phù hợp với nhiều quá trình đường

hóa trong thực tiễn, tuy nhiên các enzyme chưa bị phân hủy hoàn toàn.

Tổng sản phẩm ở chương trình nhiệt hai giai đoạn (Hình 5) cũng đạt mức tối đa như đối với chương trình một giai đoạn (Hình 2).



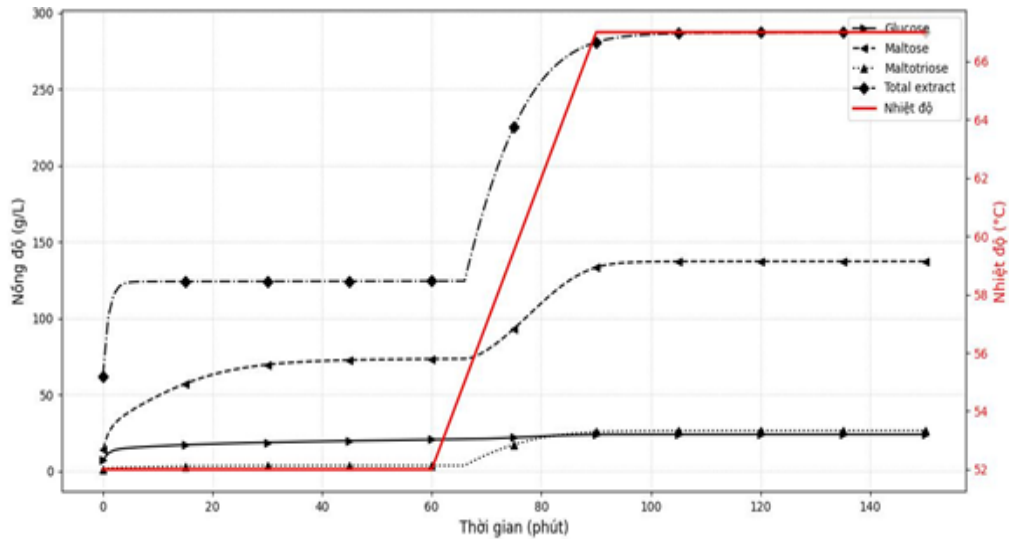
Hình 5. Ảnh hưởng của chương trình nhiệt hai giai đoạn đến hàm lượng sản phẩm



Hình 6. Biến thiên hàm lượng các enzyme theo chương trình nhiệt ba giai đoạn

Chương trình nhiệt ba giai đoạn được xem là một trong những chương trình nhiệt phổ biến nhất đối với quá trình đường hóa. Khối phản ứng ban đầu được duy trì ở 52°C trong vòng 60 phút, sau đó nhiệt độ khối phản ứng được nâng lên đến 67°C trong vòng 30 phút, tiếp đó nhiệt độ được duy trì và quá trình kết thúc sau tổng thời gian 150 phút. Với chế độ nhiệt phổ biến này, kết quả mô hình như mô tả ở hình 6 vẫn cho thấy các enzyme đều

không phân hủy hoàn toàn. Tuy nhiên, kết quả này được đánh giá là phù hợp với thực tế sản xuất trong công nghiệp. Đặc biệt ở chương trình nhiệt này, thành phần của maltose giảm xuống so với hai chương trình nhiệt độ đã khảo sát ở trên (Hình 3, 5, 7), dẫn đến giai đoạn lên men sau đường hóa đủ dài để không tạo ra các sản phẩm phụ không mong muốn, đồng thời cải thiện được độ ngọt và độ khô của bia.

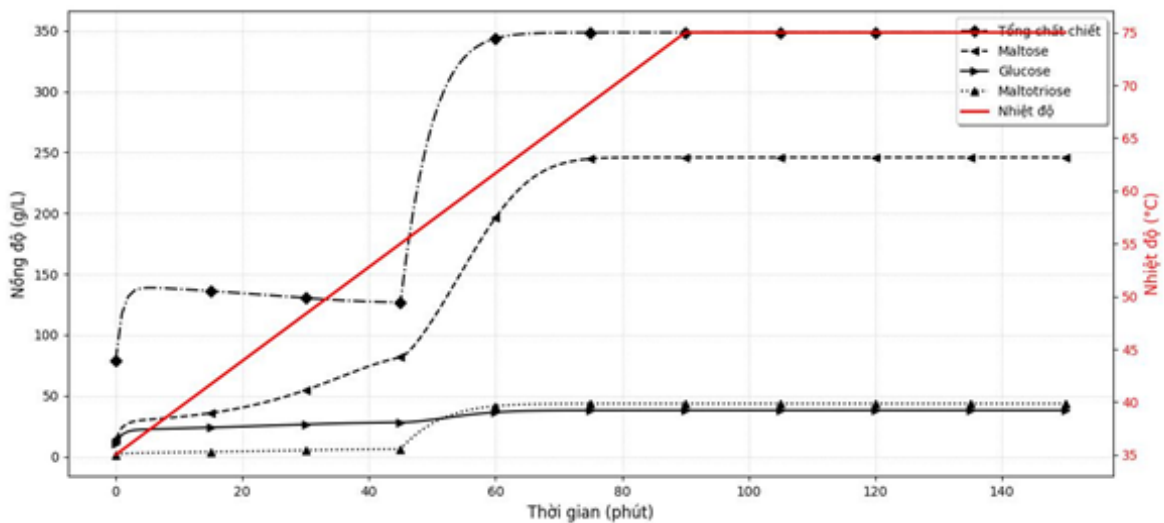


Hình 7. Ảnh hưởng của chương trình nhiệt ba giai đoạn đến hàm lượng các sản phẩm

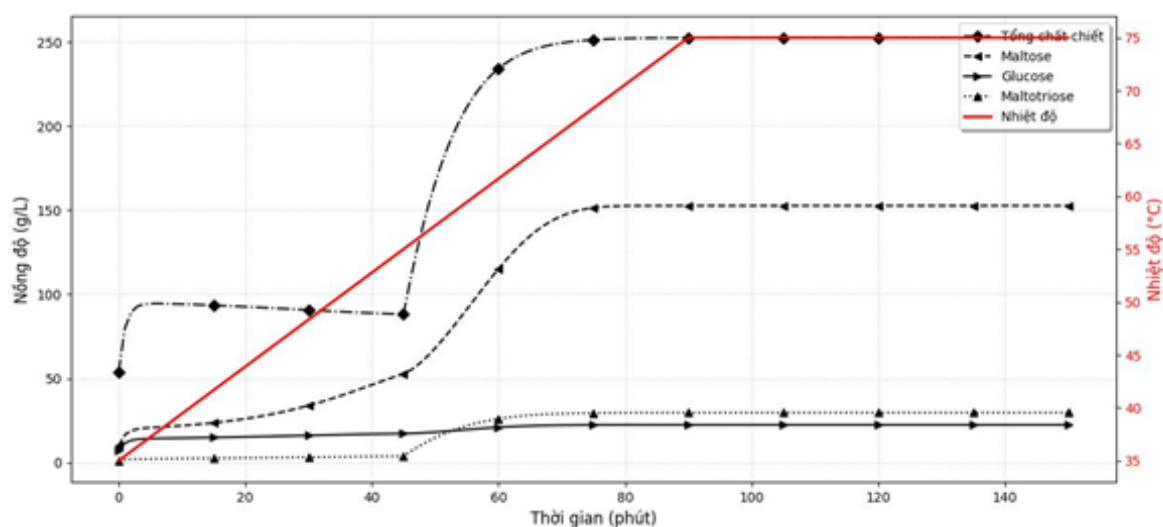
Về tổng lượng sản phẩm, kết quả mô phỏng trên hình 7 cho thấy, tổng lượng sản phẩm cũng đạt mức tối đa như các chương trình nhiệt tuyến tính cũng như chương trình nhiệt hai giai đoạn. Điều đó cho thấy, vấn đề quan trọng trong quá trình đường hóa là cần tăng tối đa khả năng phân hủy các enzyme.

4.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ malt - nước

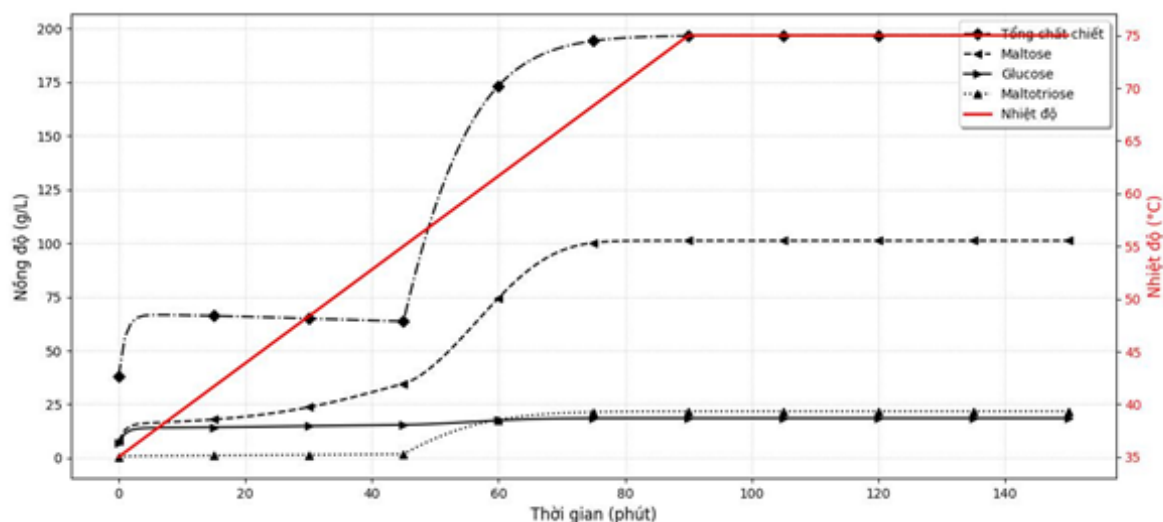
Cũng ở quy mô phòng thí nghiệm như đã nêu trên, trong phần này, ảnh hưởng của tỷ lệ malt - nước được phân tích và đánh giá dựa trên mô hình toán học tổng quát đã được xây dựng. Tỷ lệ malt-nước khảo sát trong phần này bao gồm 1: 2, 1: 3, 1: 4. Kết quả tính toán được thể hiện ở hình 8, 9, 10.



Hình 8. Hàm lượng các sản phẩm với tỷ lệ malt - nước 1: 2 với chương trình nhiệt hai giai đoạn



Hình 9. Hàm lượng các sản phẩm với tỷ lệ malt - nước 1: 3 với chương trình nhiệt hai giai đoạn



Hình 10. Hàm lượng các sản phẩm với tỷ lệ malt - nước 1: 4 với chương trình nhiệt hai giai đoạn

Kết quả mô phỏng với các tỷ lệ malt nước khác nhau cho thấy, khi tăng lượng nước, hàm lượng các sản phẩm thu được giảm xuống. Đây được xem là một hiện tượng pha loãng vật lý thông thường. Điều đó cho thấy, mô hình toán học tổng quát xây dựng trong nghiên cứu này không những phù hợp cho việc đánh giá tốc độ các phản ứng thủy phân, đường hóa mà còn mô tả được các hiện tượng vật lý diễn ra trong quá trình đường hóa. Mặc dù vậy, nếu lượng nước quá thấp, khả năng hòa trộn của malt sẽ không đạt yêu cầu gây thất thoát nguyên liệu. Ngược lại, nếu sử dụng nhiều nước sẽ ảnh hưởng đến hàm lượng cồn, các sản phẩm lên men sau này và gián tiếp ảnh hưởng đến chất lượng bia. Trên thực tế, tỷ lệ malt-nước thường nằm trong dải từ 1: 2 đến 1: 4.

5. KẾT LUẬN

Kiểm soát tốt quá trình thủy phân và đường hóa bằng cả lý thuyết và thực nghiệm được xem là quan trọng và then chốt, đặc biệt trong công nghệ sản xuất bia vì qua đó có thể kiểm soát tốt quá trình chuyển hóa tinh bột và các carbonhydrates. Ở phương diện lý thuyết, việc xây dựng mô hình toán học quá trình đường hóa để thuận tiện trong tính toán và tối ưu hóa quá trình đường hóa, theo đó có nhiều đóng góp hữu ích. Nghiên cứu này đã xây dựng được mô hình toán học tổng quát mô tả quá trình thủy phân và đường hóa tinh bột có trong malt và ngũ cốc. Mô hình tổng quát cho phép phân tích và đánh giá các thông số chính nhằm tối ưu và nâng cao hiệu quả quá trình đường hóa trong công nghệ sản xuất bia.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hardwick, W. S. (1995). Handbook of brewing. New York: Marcel Dekker Inc.
2. Hough, J. S. (1990). Biotecnologia de la cerveza y de la malta. Ed. Acribia. Zaragoza, Spain.
3. Brandam, C. Meyer, X. M., Proth, J., Strehaiano, P. & Pingaud, H. (2003). An original kinetic model for the enzymatic hydrolysis of starch during mashing. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 43 - 52.
4. Kettunen, A., Hamalainen, J. J., Stenholm, K., & Pietila, K. (1996). A model for the prediction of beta-glucanase activity and beta-glucan concentration during mashing. *Journal of Food Engineering*, 29, 185 - 200.
5. Koljonen, T., Hamalainen, J. J., Sjöholm, K. & Pietila, K. (1995). A model for the prediction of fermentable sugar concentration during mashing. *Journal of Food Engineering*, 26, 329 - 350.
6. Li, Y., Lu, J., Gu, G., Shi, Z. & Mao, Z. (2004). Mathematical modeling for prediction of endo-xylanase activity and arabinolyans concentration during mashing of barley malts for brewing. *Biotechnology Letters*, 26, 779 - 785.
7. Home, S., Pietila, K., & Sjöholm, K. (1993). Control of glucanolytic activity in mashing. *ASBC Journal*, 51(3), 108 - 113.
8. Li, Y., Yu, J. & Gu, G. (2005). Control of arabinolyans solubilization and hydrolysis in mashing. *Food Chemistry*, 90, 101 - 108.
9. Durand, G. A., Corazza, M. L., Blanco A. M., Corazza, F. C. (2009). Dynamic optimization of the mashing process. *Food Control*, 20, 1127 - 1140.
10. Sadosky, P., Swarz, P. & Horsley, R. D. (2002). Effect of Arabinolyans, beta - glucans and Dextrins on the viscosity and membrane filterability of a beer model solution. *ASBC Journal*, 60(1), 153 - 161.

MODELING OF MASHING PROCESS IN BREWING ENGINEERING

Nguyen Dang Binh Thanh¹, Tran Thi Thu Hang¹, Tong Thi Hoang Duong¹

¹*School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology*

Abstract

Hydrolysis and saccharification of starch in malt and rice are fundamental and crucial steps in many processes that convert agricultural products into food, beverages and basic chemicals. This research aims to develop a generalized mathematical model describing the kinetics of starch hydrolysis and saccharification under the action of alpha- and beta-amylase. This kinetic model will not only allow for the evaluation of temperature's effect on process efficiency but also enable the assessment of the influence of water-to-grist ratio and adjunct grain ratio (rice or corn). The important goal of the work is to optimize energy and raw material consumption in beer production.

Keywords: *Modeling, optimization, mashing, hydrolysis, brewing.*

Ngày nhận bài: 25/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 10/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 28/7/2025

Ngày duyệt đăng: 8/8/2025

ĐÁNH GIÁ VÒNG ĐỜI SẢN PHẨM (LCA) CỦA QUY TRÌNH SẢN XUẤT CỒN THỰC PHẨM TỪ GẠO THEO CÔNG NGHỆ KHÔNG GIA NHIỆT Ở QUY MÔ 1 TẤN NGUYÊN LIỆU/MÊ

Phạm Ngọc Hưng^{1,*}, Nguyễn Chính Nghĩa¹, Chu Kỳ Sơn¹

¹*Khoa Kỹ thuật Thực phẩm, Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội*

**Email: hung.phamngoc@hust.edu.vn*

TÓM TẮT

Sản xuất cồn (ethanol) thực phẩm từ gạo thường tiêu tốn nhiều năng lượng và gây ra các tác động đáng kể đến môi trường. Nghiên cứu này áp dụng phương pháp đánh giá vòng đời sản phẩm (Life Cycle Assessment - LCA) để phân tích và so sánh các tác động môi trường của quy trình sản xuất ethanol từ gạo bằng công nghệ không gia nhiệt theo quy trình: Dịch hóa - đường hóa - lên men đồng thời (Simultaneous Liquefaction, Saccharification and Fermentation - SLSF) với quy trình truyền thống tại nhà máy (bao gồm các bước: Dịch hóa, đường hóa và lên men riêng biệt). Các thí nghiệm được thực hiện ở quy mô thử nghiệm 1 tấn gạo/mẻ, tại một nhà máy ở tỉnh Hòa Bình. Kết quả cho thấy, quy trình SLSF đã cho nồng độ ethanol trong dịch lên men cao hơn (10,1% so với 9,5% v/v) và tăng hiệu suất thu hồi ethanol tổng thể (465 L so với 438 L ethanol 96%/tấn gạo) so với quy trình truyền thống. Về mặt năng lượng, quy trình SLSF giúp giảm 25% lượng than tiêu thụ nhưng làm tăng 31% lượng điện sử dụng. Về kinh tế, chi phí sản xuất cho 1.000 L ethanol thành phẩm đã giảm 1.307.256 VNĐ. Về môi trường, quy trình SLSF góp phần làm giảm phát thải khí nhà kính (GHG) từ 1,81 xuống còn 1,36 kg CO₂-eq/L ethanol thành phẩm. Những kết quả này khẳng định, công nghệ SLSF không gia nhiệt là một giải pháp bền vững, mang lại lợi ích kép về kinh tế và môi trường cho ngành sản xuất ethanol tại Việt Nam.

Từ khóa: *Đánh giá vòng đời sản phẩm (LCA), ethanol, gạo, công nghệ không gia nhiệt (SLSF).*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngành công nghiệp sản xuất ethanol thực phẩm có vai trò thiết yếu trong việc cung cấp nguyên liệu cho sản xuất đồ uống có cồn và một số ngành sản xuất khác. Tại Việt Nam, gạo là một nguyên liệu giàu tinh bột, là nguồn cung chủ yếu cho ngành công nghiệp này, góp phần vào việc ổn định và nâng cao giá trị cho chuỗi sản xuất trong nông nghiệp lúa gạo.

Quy trình sản xuất ethanol truyền thống từ gạo thường bao gồm: Dịch hóa, đường hóa và lên men. Trong đó, công đoạn dịch hóa đòi hỏi phải gia nhiệt khối dịch lên nhiệt độ cao (95 - 100°C), tiếp theo, công đoạn đường hóa luôn duy trì nhiệt độ khối dịch trên 60°C trong vòng 1 giờ. Quá trình này tiêu tốn một lượng năng lượng nhiệt rất lớn, nên thường đốt các nhiên liệu hóa thạch như than

đá, dẫn đến chi phí vận hành cao và phát thải một lượng khí nhà kính (GHG) đáng kể [1].

Hiện nay, có một số nghiên cứu và ứng dụng các enzyme trong quá trình dịch hóa ít gia nhiệt (chỉ cần gia nhiệt đến 70 - 80°C thay vì gia nhiệt đến nhiệt độ sôi) kết hợp với quá trình đường hóa và lên men đồng thời đã được áp dụng thành công trong sản xuất cồn từ ngô và sắn [2]. Nghiên cứu của Wang và cs (2007) đã sử dụng chế phẩm enzyme thủy phân và đường hóa tinh bột sống chứa hỗn hợp alpha-amylase, glucoamylase để thủy phân tinh bột ngô ở nhiệt độ 48°C trong 2 giờ, thực hiện công đoạn đường hóa và lên men đồng thời để thu được nồng độ cồn tương đương với phương pháp truyền thống [3].

Trong vài năm gần đây, nhiều công nghệ tiên tiến đã được nghiên cứu và phát triển giúp giảm chi phí năng lượng trong nhà máy, nhất là trong

bối cảnh Việt Nam đang tiến tới Net Zero vào năm 2050. Trong đó, nổi bật là quy trình SLSF không gia nhiệt. Công nghệ này sử dụng các hệ enzyme thế hệ mới có khả năng thủy phân tinh bột sống ở nhiệt độ thường, cho phép tích hợp cả ba quá trình dịch hóa, đường hóa và lên men vào trong cùng một thiết bị và thực hiện ở nhiệt độ thấp (~ 30°C). Về lý thuyết, quy trình SLSF mang lại nhiều ưu điểm vượt trội: (i) tiết kiệm đáng kể năng lượng do loại bỏ hoàn toàn công đoạn gia nhiệt và làm nguội khi dịch hóa và đường hóa [4]; (ii) giảm ảnh hưởng áp suất thẩm thấu lên tế bào nấm men do đường glucose được tạo ra và tiêu thụ ngay lập tức, có khả năng làm tăng hiệu suất lên men; (iii) hạn chế nguy cơ phát triển của các vi sinh vật nhiễm tạp trong công đoạn lên men nhờ duy trì nồng độ đường trong dịch ở mức thấp. Tại Việt Nam, quy trình SLSF đã được thử nghiệm trên các nguyên liệu gạo, sắn và đã chứng minh được hiệu quả của quy trình ở quy mô phòng thí nghiệm và pilot [5 - 7].

Tuy nhiên, để đánh giá một công nghệ có thực sự "bền vững" hay không, việc chỉ xem xét hiệu suất kỹ thuật hay chi phí năng lượng là chưa đủ mà cần có một phương pháp đánh giá tác động môi trường toàn diện. Đánh giá vòng đời sản phẩm (LCA) được chuẩn hóa theo bộ tiêu chuẩn quốc tế ISO 14040:2006 và ISO 14044:2006, là một công cụ mạnh và được công nhận rộng rãi cho mục đích này [8, 9]. LCA cho phép định lượng một cách hệ thống các tác động môi trường tiềm tàng của một quy trình sản xuất bằng cách kiểm kê rõ ràng và phân tích tất cả các dòng vật chất và năng lượng từ đầu vào đến đầu ra. Các hướng dẫn thực hành chi tiết như ILCD Handbook của Ủy ban châu Âu cũng cung cấp một khuôn khổ vững chắc để đảm bảo tính nhất quán và chất lượng của các nghiên cứu LCA [10].

Trên thế giới, phương pháp LCA đã được áp dụng rộng rãi để đánh giá quá trình sản xuất ethanol từ nhiều nguồn nguyên liệu khác nhau, như: Ngô ở Mỹ [11], mía ở Brazil [12], sắn ở Thái Lan [13]. Các nghiên cứu gần đây tiếp tục nhấn mạnh tầm quan trọng của việc tối ưu hóa quy trình để giảm tác động môi trường, chẳng hạn nghiên cứu của Tsolakakis và cs (2020) về việc cải thiện hiệu quả sử dụng nước [14], hay nghiên cứu của Sun và

cs (2019) về các hệ enzyme mới [15]. Tuy nhiên, một nghiên cứu LCA chi tiết, so sánh trực tiếp quy trình SLSF không gia nhiệt với quy trình truyền thống sử dụng nguyên liệu gạo trên quy mô công nghiệp trong điều kiện sản xuất của Việt Nam thì vẫn còn hạn chế.

Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm áp dụng phương pháp luận LCA để so sánh và đánh giá một cách hệ thống hai quy trình sản xuất ethanol thực phẩm từ gạo ở quy mô công nghiệp. Mục tiêu của nghiên cứu là cung cấp một đầy đủ thông tin và đánh giá về hiệu quả kỹ thuật, kinh tế và đặc biệt là các tác động môi trường, tập trung vào chỉ số tiềm năng nóng lên toàn cầu (GWP), qua đó xác định quy trình công nghệ bền vững hơn cho ngành sản xuất ethanol tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Nguyên liệu chính được sử dụng để sản xuất ethanol trong nghiên cứu này là gạo tám đông xuân, được thu mua tại xã Yên Mỹ, huyện Nông Cống, tỉnh Thanh Hóa. Gạo có hàm lượng tinh bột từ 76 - 77% và độ ẩm 11 - 12%. Nước sử dụng cho các quá trình được lấy từ nguồn đã qua xử lý tại nhà máy, có pH 6,5. Các chế phẩm nấm men thương mại được sử dụng bao gồm: Ethanol red (*Saccharomyces cerevisiae*) (Fermentis, Pháp) và mauripan (*Saccharomyces cerevisiae*) (Mauripan, Pháp). Các chế phẩm enzyme thương mại bao gồm: Stargen 002, fermgen (IFF) amigase mega L (DSM), termamyl SC và glucoamylase (Novozymes).

2.2. Thiết bị nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên hệ thống thiết bị của Công ty Cổ phần Việt Pháp - Victory, xã Tân Vinh, huyện Lương Sơn, tỉnh Hòa Bình (nay là xã Lương Sơn, tỉnh Phú Thọ). Các phân tích được thực hiện bằng các thiết bị phòng thí nghiệm chuyên dụng, bao gồm: Hệ thống cất rượu mẫu, cồn kế điểm sôi (Ethanol ebulliometer, Dujardin-Salleron, Pháp) và máy đo độ Brix.

2.3. Bố trí thí nghiệm

Nghiên cứu được thiết kế để so sánh hiệu quả của hai quy trình sản xuất ethanol từ gạo: (1) quy trình dịch hóa - đường hóa - lên men đồng thời,

không gia nhiệt (SLSF); (2) quy trình truyền thống (dịch hóa, đường hóa và lên men riêng biệt). Mỗi quy trình được thực hiện lặp lại hai lần trên quy mô 1 tấn gạo nguyên liệu/mẻ để đảm bảo độ tin cậy. Hệ thống thiết bị của Công ty bao gồm: 01 thiết bị nghiền búa (công suất 1 tấn/giờ), 02 thiết bị nấu (công suất 8 m³/mẻ), 01 thiết bị đường hóa (công suất 8 m³/mẻ), 10 tank lên men (10 m³/mẻ), 01 hệ thống chưng cất 5 tháp (công suất 1.500 L cồn/ngày).

Thí nghiệm ở quy trình SLSF: 1 tấn gạo được nghiền mịn (đường kính mắt lưới 0,3 mm) và hòa trộn trong 4 m³ nước trong tank chứa có thể tích 10 m³. Hỗn hợp enzyme (1,26 L stargen 002; 0,4 L fermgen; 0,3 L amigase mega L), 0,99 kg nấm men ethanol red (hoạt hóa trong nước ở 35°C trong vòng 15 phút) và 1,9 kg urê được bổ sung đồng thời vào dịch. pH của dịch được điều chỉnh về 4,5 bằng axit sulfuric đậm đặc. Quá trình đường hóa, dịch hóa, lên men đồng thời được diễn ra cùng trong 72 giờ, ở nhiệt độ 30°C.

Thí nghiệm ở quy trình truyền thống: 1 tấn gạo được nghiền thô (đường kính mắt lưới 1 mm). Quá trình dịch hóa bắt đầu bằng việc hòa bột vào 4 m³ nước ở nhiệt độ khoảng 40 - 45°C, khuấy với tốc độ 30 vòng/phút và thực hiện trong tank chứa có thể tích 10 m³; bổ sung 400 mL enzyme termamyl SC, điều chỉnh pH 5,0 và gia nhiệt lên 92 - 93°C. Dịch cháo được ủ trong khoảng 20 phút và không sử dụng cánh khuấy. Dịch cháo tiếp tục được đun sôi và ủ trong 2 giờ. Tiếp theo, dịch cháo được làm nguội xuống 65°C, bổ sung 2,0 kg urê và 0,7 L enzyme glucoamylase để thực hiện quá trình đường hóa trong vòng 1 giờ. Dịch tiếp tục được làm nguội về 30°C, bổ sung 1,9 kg nấm men La Ngà (hoạt hóa trong nước ở 35°C trong vòng 15 phút) và lên men trong 72 giờ.

Sau khi kết thúc lên men, dịch của cả hai quy trình đều được đưa đi lọc và chưng cất để thu hồi ethanol thành phẩm.

2.4. Xác định năng lượng và tài nguyên sử dụng

Điện năng tiêu thụ được tính toán dựa trên công suất (kW) và thời gian vận hành của từng thiết bị, động cơ. Lượng than sử dụng được ước

tính dựa trên tổng lượng than cung cấp cho lò hơi để tạo hơi phục vụ cho quá trình dịch hóa và đường hóa (với quy trình truyền thống) và quá trình chưng cất. Lượng nước được tính bằng tổng của lượng nước sử dụng cho các công đoạn hòa bột, làm mát, cấp nước cho lò hơi và vệ sinh thiết bị.

2.5. Phương pháp đánh giá vòng đời sản phẩm (LCA)

Phương pháp LCA được áp dụng theo ISO 14040:2006 [8] và ISO 14044:2006 [9]. Mục tiêu và phạm vi của nghiên cứu là áp dụng cách tiếp cận “gate-to-gate” để so sánh các tác động môi trường của hai quy trình sản xuất tại nhà máy. Trong đó, các quá trình vận chuyển nguyên vật liệu, năng lượng, sản phẩm được giả thiết là như nhau cho cả hai quy trình và không được xem xét trong phạm vi nghiên cứu này. Nghiên cứu tập trung vào loại tác động tiềm năng nóng lên toàn cầu (Global Warming Potential - GWP). Các khí nhà kính phát thải (GHG) được quy đổi về đơn vị kg CO₂ tương đương kg CO₂-eq. Lượng phát thải được tính toán dựa trên tổng năng lượng điện và than tiêu thụ trong mỗi quy trình. Các hệ số phát thải được tham chiếu từ cơ sở dữ liệu Ecoinvent, từ các báo cáo của IPCC, UNEP và các cơ quan quản lý tại Việt Nam.

2.6. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại nhà máy của Công ty Cổ phần Việt Pháp - Victory, xã Lương Sơn, tỉnh Phú Thọ.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. So sánh lượng ethanol giữa quy trình SLSF với quy trình truyền thống

Hiệu quả chuyển hóa tinh bột thành ethanol là một chỉ tiêu kỹ thuật quan trọng, cốt lõi để đánh giá một công nghệ sản xuất. Các thông số thực nghiệm của quy trình SLSF và quy trình truyền thống được mô tả tại bảng 1. Dữ liệu cho thấy, quy trình SLSF cho kết quả nồng độ ethanol sau lên men cao hơn so với quy trình truyền thống. Cụ thể, nồng độ ethanol trong dịch lên men cuối (còn gọi là "giấm chín") của quy trình SLSF đạt 10,1% v/v, cao hơn mức 9,5% v/v của quy trình truyền thống. Sự chênh lệch 0,6% v/v này là kết quả trực

tiếp của các ưu điểm trong cơ chế của công nghệ SLSF. Trong nghiên cứu về quy trình SLSF ở nồng độ chất khô cao, Tien Tien Nam và cs (2023) [6] đã nghiên cứu khả năng lên men trên 5 loại gạo với các chế phẩm nấm men và enzyme khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chế phẩm nấm men ethanol red và sử dụng enzyme amigase mega L sẽ giúp quy trình lên men không gia nhiệt đạt hiệu suất cao nhất là 85,6%, với nồng độ cồn trong dịch giấm chín đạt 17,23% v/v sau 120 giờ [6]. Ở quy mô pilot, quy trình SLSF cũng cho thấy hiệu quả cao khi nồng độ cồn sau 120 giờ lên men có thể đạt 17% v/v, tương ứng với hiệu suất 83,2% [5].

Trong quy trình SLSF, quá trình dịch hóa, đường hóa và lên men diễn ra đồng thời giúp duy trì nồng độ đường glucose trong dịch ở mức thấp, qua đó làm giảm áp suất thẩm thấu lên tế bào nấm men và hạn chế nguy cơ ức chế cơ chất, giúp nấm men hoạt động hiệu quả hơn. Đồng thời, để đảm bảo quá trình dịch hóa và đường hóa hiệu quả ở nhiệt độ thấp, nguyên liệu gạo cho quy trình SLSF được nghiền mịn hơn (đường kính mắt lưới 0,3 mm so với 1,0 mm của quy trình truyền thống).

Bảng 1. Các thông số thực nghiệm của quy trình SLSF và quy trình truyền thống, tính trên 1 tấn gạo nguyên liệu

Thông số	Đơn vị	Quy trình SLSF	Quy trình truyền thống
Lượng gạo	kg	1.000	1.000
Hàm lượng tinh bột của gạo	%	76	76
Tổng thể tích dịch	L	4.700	4.700
Thể tích giấm chín	L	4.500	4.550
Độ chua khi kết thúc lên men	g H ₂ SO ₄ /L	1,57	
Nồng độ ethanol của giấm chín	%	10,1	9,5
Hiệu suất chưng cất	%	98	98
Lượng ethanol thành phẩm (96% v/v)	L	465	438

3.2. So sánh năng lượng tiêu hao của quy trình SLSF với quy trình truyền thống

Quy trình SLSF có ưu điểm cơ bản là quá trình dịch hóa, đường hóa và lên men diễn ra đồng thời. Chính vì ưu điểm này, quy trình SLSF sử dụng năng lượng và tài nguyên thấp hơn so với quy trình truyền thống. Số liệu thống kê trong các đợt thí nghiệm được thể hiện ở bảng 2.

Về lượng than tiêu thụ, quy trình SLSF giúp giảm 25%, từ 240 kg ở quy trình truyền thống xuống còn 180 kg cho mỗi một tấn gạo. Với quy

Kích thước hạt nhỏ hơn làm tăng diện tích bề mặt tiếp xúc, cho phép enzyme dễ dàng tấn công và phá vỡ cấu trúc tinh bột. Ngoài ra, trong suốt quá trình lên men, độ chua của dịch giấm chín duy trì ở mức thấp (1,41 - 1,57 g H₂SO₄/L), chứng tỏ vấn đề nhiễm tạp không xảy ra trong quá trình lên men. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong nghiên cứu với quy trình SLSF ở nồng độ chất khô cao của Chu Ky Son và cs (2016), ở quy mô 25 lít, khi hàm lượng axit lactic và axit acetic trong dịch giấm chín duy trì nhỏ hơn 1 g/L, chứng tỏ vấn đề nhiễm tạp đã được kiểm soát tốt [5]. Những ưu điểm công nghệ này đã giúp quy trình SLSF đạt được nồng độ ethanol trong giấm chín cao hơn quy trình truyền thống.

Nồng độ ethanol cao hơn đã trực tiếp chuyển hóa thành hiệu suất thu hồi sản phẩm cuối cùng cao hơn. Từ 1 tấn gạo nguyên liệu, quy trình SLSF thu được 465 L ethanol 96%, trong khi quy trình truyền thống chỉ thu được 438 L. Điều này tương đương với việc năng suất đã tăng 6,2%, một con số có ý nghĩa lớn ở quy mô công nghiệp, khẳng định ưu thế rõ rệt về mặt kỹ thuật của quy trình SLSF.

trình SLSF, lượng than tiêu thụ chỉ sử dụng cho quá trình chưng cất, tương đương với quy trình truyền thống.

Về năng lượng điện, quy trình SLSF lại có yêu cầu điện năng cao hơn 31% so với quy trình truyền thống, từ 151 kWh so với 115 kWh, tương ứng. Phân tích chi tiết cho thấy, nguyên nhân chính là do yêu cầu nghiền nguyên liệu mịn hơn, tiêu tốn 88 kWh so với chỉ 44 kWh của quy trình truyền thống. Quy trình truyền thống cần khoảng 10 kWh cho các quá trình khuấy trong dịch hóa. Bên cạnh

đó, trong quá trình lọc, SLSF cần 6 kWh còn quy trình truyền thống cần 2 Kwh để bơm dịch vì lý do bột của quy trình SLSF mịn hơn. Quá trình chưng cất cần 37 kWh điện. Các thiết bị khác như đèn, bơm, quạt tiêu thụ khoảng 20 kWh điện trong mỗi quy trình. Lượng điện năng tăng thêm này là một sự đánh đổi kỹ thuật cần thiết để loại bỏ nhu cầu về năng lượng nhiệt từ than.

Nước là tài nguyên nên cần được tính đến trong các quá trình sản xuất trong công nghiệp. Ưu điểm nổi bật của quy trình SLSF so với quy trình truyền thống là việc cắt giảm tới 62% lượng nước sử dụng, từ 21 m³ xuống chỉ còn 8 m³. Nước giảm do không dùng để làm mát cho các công đoạn hạ nhiệt dịch từ nhiệt độ sôi trong công đoạn hồ hóa, dịch hóa và đường hóa.

Phân tích này cho thấy, quy trình SLSF không chỉ đơn thuần là giảm được năng lượng tiêu hao, mà là một sự thay đổi cấu trúc mô hình sử dụng năng lượng: Chuyển từ phụ thuộc vào năng lượng nhiệt (đốt than) sang sử dụng năng lượng điện một cách hiệu quả hơn, đồng thời giảm đáng kể tải nguyên nước.

Bảng 2. Tổng hợp lượng điện, than và nước tiêu hao trong quy trình SLSF và quy trình truyền thống, tính trên 1 mẻ thí nghiệm với 1 tấn gạo nguyên liệu

Nhiên liệu	Đơn vị	Quy trình SLSF	Quy trình truyền thống
Than	kg	180	240
Điện	kWh	151	115
Nước	m ³	8	21

3.3. So sánh chi phí sản xuất của quy trình SLSF với quy trình truyền thống

Hiệu quả kinh tế được đánh giá dựa trên chi phí sản xuất và lợi nhuận thu được từ 1 tấn gạo nguyên liệu (Bảng 3). Tổng chi phí sản xuất trên mỗi tấn gạo của hai quy trình gần như tương đương (10.877.000 VNĐ cho SLSF so với 10.920.200 VNĐ cho quy trình truyền thống). Tuy nhiên, cơ cấu chi phí và lợi nhuận của hai quy trình có sự khác biệt.

Bảng 3. Tổng hợp chi phí nguyên vật liệu sản xuất ethanol theo quy trình SLSF và quy trình truyền thống tính cho 1 tấn gạo nguyên liệu

Nguyên/nhiên liệu	Đơn giá (VNĐ)	Quy trình SLSF		Quy trình truyền thống	
		Số lượng	Thành tiền (VNĐ)	Số lượng	Thành tiền (VNĐ)
Gạo tấm (kg)	8.800	1000	8.800.000	1.000	8.800.000
Than (kg)	4.200	180	756.000	240	1.008.000
Điện (Kwh)	3.400	151	513.400	115	391.000
Nước (m ³)	7.200	8	57.600	21	151.200
Enzyme, nấm men, ure, axit			750.000		570.000
Tổng cộng			10.877.000		10.920.200
Ethanol 96% (m ³)	45.000	465	20.925.000	438	19.710.000
Chênh lệch			10.048.000		8.789.800
Tỉ lệ tăng (%)			114.3%		100%

Đối với chi phí đầu vào, SLSF có sự dịch chuyển so với quy trình truyền thống: Chi phí cho enzyme, nấm men, ure, axit cao hơn 180.000 VNĐ

và chi phí điện tăng 122.400 VNĐ. Nhưng quy trình SLSF đã tiết kiệm được 252.000 VNĐ tiền than và 93.600 VNĐ tiền nước.

Nghiên cứu của Tien Tien Nam và cs (2023) [6] không tính đến chi phí năng lượng, nhân công mà chỉ tính chi phí nguyên vật liệu để so sánh tính kinh tế của quy trình SLSF với các nguyên liệu gạo khác nhau. Kết quả thu được cho thấy, chi phí sản xuất 1 L cồn tuyệt đối với các loại gạo dao động từ 22.449 - 28.754 VNĐ [6].

Lợi thế kinh tế cho quy trình SLSF không nằm ở chi phí đầu vào, mà ở hiệu suất đầu ra. Với cùng 1 tấn gạo, quy trình SLSF sản xuất được nhiều hơn 27 L ethanol so với quy trình truyền thống, dẫn đến tổng doanh thu của quy trình SLSF cao hơn, lợi nhuận chênh lệch đạt 10.048.000 VNĐ, cao hơn 1.258.200 VNĐ (tương đương 14,3%) so với mức 8.789.800 VNĐ của quy trình truyền thống.

Bảng 4. Tổng hợp chi phí sản xuất ethanol tính cho 1.000 L thành phẩm theo quy trình SLSF

Nguyên/nhiên vật liệu	Đơn vị tính	Số lượng	Đơn giá (VNĐ)	Thành tiền (VNĐ)
Gạo tám	Kg	2.150	8.800	18.920.000
Nấm men (Red Ethanol)	Kg	2,13	280.000	596.400
Alpha, glucoamylase - (Stargen, Dupont)	L	2,71	205.000	555.550
Glucoamylase (Amigase Mega L - DSM)	L	0,65	180.000	117.000
Protease (Fermgen - Dupont)	L	0,86	230.000	197.800
Than	Kg	387,1	4.200	1.625.806
Điện	KW	324,7	3.400	1.104.086
Nước	m ³	17,2	7.200	123.871
Nhân công	Công	40	190.769	7.630.769
Chi phí khác và khấu hao				2.550.000
Tổng cộng				33.421.283

Hiệu quả này được khẳng định khi quy đổi chi phí trên mỗi đơn vị sản phẩm. Để sản xuất 1.000 L ethanol thành phẩm, quy trình SLSF có tổng chi phí là 33.421.283 VNĐ (Bảng 4), trong khi quy trình truyền thống là 34.728.539 VNĐ (Bảng 5). Như vậy, quy trình SLSF giúp tiết kiệm được

1.307.256 VNĐ chi phí sản xuất cho mỗi 1.000 L ethanol. Điều này chứng tỏ, mặc dù yêu cầu đầu tư ban đầu cho enzyme chuyên dụng cao hơn, quy trình SLSF mang lại lợi nhuận bền vững và hiệu quả hơn nhờ tối ưu hóa quá trình chuyển hóa nguyên liệu.

Bảng 5. Tổng hợp chi phí sản xuất ethanol tính cho 1.000 L thành phẩm theo quy trình truyền thống

Nguyên vật liệu	Đơn vị tính	Số lượng	Đơn giá (VNĐ)	Thành tiền (VNĐ)
Gạo tám	Kg	2.280	8.800	20.064.000
Nấm men (La Ngà)	Kg	4,3	110.000	473.000
Glucoamylase GA (Novozymes)	L	1,61	210.000	338.100
Termamyl SC (Novozymes)	L	0,92	145.000	133.400
Than	Kg	547,9	4.200	2.301.370
Điện	KW	262,6	3.400	892.694

Nước	m ³	47,9	7.200	345.205
Nhân công	Công	40	190.769	7.630.769
Chi phí khác và khấu hao				2.550.000
Tổng cộng				34.728.539

3.4. Đánh giá tác động môi trường theo vòng đời sản phẩm (LCA)

Tại Việt Nam, hiện nay chưa có nghiên cứu nào đánh giá các chỉ số tác động môi trường đối với cồn thực phẩm, chỉ có đánh giá trên cồn nhiên liệu. Đối với cồn nhiên liệu sản xuất từ sắn theo quy trình truyền thống, lượng phát thải là 1,252 kg CO₂-eq/L hoặc 59 g CO₂-eq/MJ [16]. Tại Hoa Kỳ, đối với nguyên liệu ngô, lượng phát thải tính trung bình là 51,4 g CO₂-eq/MJ (dao động từ 37,6 - 65,1 CO₂-eq/MJ) [17].

Trong nghiên cứu này, kết quả đánh giá tác động môi trường theo vòng đời sản phẩm, tập trung vào chỉ số GWP được trình bày trong bảng 6. Phân tích các nguồn phát thải cho thấy, điểm ảnh hưởng lớn nhất đến môi trường của quy trình truyền thống nằm ở công đoạn sản xuất hơi nước từ than, chiếm tới 91,8% tổng lượng phát thải (1.810 kg CO₂-eq cho 1 m³ ethanol thành phẩm).

Tổng lượng phát thải GHG của quy trình SLSF thấp hơn 162 kg CO₂-eq/tấn gạo so với quy trình truyền thống (giảm 20%). Phân tích cho thấy, việc giảm sử dụng than đã giúp cắt giảm 182 kg CO₂-eq/tấn gạo. Mặc dù việc tăng sử dụng điện làm phát sinh thêm 20 kg CO₂-eq, nhưng mức tăng này là không đáng kể so với lợi ích thu được từ việc giảm đốt than.

Khi xét trên đơn vị sản phẩm, hiệu quả môi trường trở nên rõ rệt hơn. Quy trình SLSF chỉ phát thải 1,36 kg CO₂-eq để sản xuất ra 1 L ethanol, trong khi quy trình truyền thống cần tới 1,81 kg CO₂-eq/L. Ngoài ra, việc giảm 62% lượng nước tiêu thụ cũng là một lợi ích môi trường quan trọng khác của quy trình SLSF. Những số liệu này minh chứng quy trình SLSF không chỉ hiệu quả về kinh tế mà còn là một lựa chọn công nghệ sạch hơn, phù hợp với các định hướng phát triển bền vững.

Bảng 6. Lượng khí thải các - bon do sử dụng điện và than trong quy trình SLSF và quy trình truyền thống

Nhiên liệu	Đơn vị	Quy trình SLSF	Quy trình truyền thống
Than	kg CO ₂ eq/tấn gạo nguyên liệu	546	728
Điện	kg CO ₂ eq/tấn gạo nguyên liệu	85	64,7
Than	kg CO ₂ eq/m ³ ethanol	1.174,2	1.662,1
Điện	kg CO ₂ eq/ m ³ ethanol	182,8	147,7

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã áp dụng thành công phương pháp đánh giá vòng đời sản phẩm (LCA) theo cách tiếp cận gate - to - gate để so sánh quy trình sản xuất ethanol không gia nhiệt (SLSF) và quy trình sản xuất truyền thống từ gạo. Quy trình sản xuất SLSF đã và đang chứng minh là một giải pháp công nghệ mang nhiều ưu điểm so với quy trình truyền thống khi áp dụng trên quy mô công nghiệp tại Việt Nam. Quy trình SLSF không chỉ làm tăng hiệu suất thu hồi ethanol lên 6,2% mà còn mang lại lợi ích kinh tế đáng kể, với chi phí sản xuất giảm 1.307.256 VNĐ cho mỗi 1.000 L ethanol thành phẩm. Đồng thời, những tác động tích cực đến môi trường cũng rất rõ rệt, thể hiện qua việc giảm 25% lượng than, 62% lượng nước tiêu thụ và cắt giảm tới 25% lượng phát thải khí nhà kính trên mỗi lít sản phẩm. Kết quả nghiên cứu cung cấp cơ sở khoa học và thực tiễn vững chắc, khẳng định SLSF là một công nghệ sản xuất ethanol hiệu quả, bền vững và phù hợp với định hướng phát triển của ngành công nghiệp tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bentsen, N. S. & Felby, C (2012). Biomass for energy in the European Union-a review of bio-

economy scenarios. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(4), 386 - 401.

2. Nguyen T-C, Chu-Ky S (2013). Simultaneous liquefaction, saccharification and fermentation for ethanol production from rice, 95 - 98, National Conference of Biotechnology 2013. *Vietnam Academy of Science and Technology*, Hanoi.

3. Wang, P., Singh, V. Xu, H., Johnston, D. B. Rausch, K. D. & Tumbleson, M. E (2007). Comparison of raw starch hydrolyzing enzyme with conventional liquefaction and saccharification enzymes in dry-grind corn processing. *Cereal chemistry*, 84(1), 10 - 14.

4. Tien Tien Nam, Nguyen Tien Cuong, Nguyen Chinh Nghia, Nguyen Tien Thanh, Pham Tuan Anh, Pham Ngoc Hung, Chu Ky Son (2022). Protease increases ethanol yield and decreases fermentation time in no-cook process during very-high-gravity ethanol production from rice. *Process Biochemistry*, 117, 10 - 18.

5. Chu Kỳ Sơn, Phạm Thị Hoàn, Bùi Thị Kim Liên, Nguyễn Tiến Thành, Phạm Kim Đăng, Nguyễn Thị Hoài Đức, Lương Hồng Nga, Từ Việt Phú, Nguyễn Thanh Hằng, Hồ Phú Hà, Lê Thanh Mai (2016). Simultaneous liquefaction, saccharification and fermentation at very high gravity of rice at pilot scale for potable ethanol production and distillers dried grains composition. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 79 - 85.

6. Tien Tien Nam, Nguyễn Tiến Cường, Nguyễn Chinh Nghia, Phạm Tuấn Anh, Chu Kỳ Sơn (2023). Nghiên cứu ảnh hưởng của nguyên liệu gạo, nấm men và enzym đường hóa đến hiệu suất lên men trong quy trình sản xuất cồn không gia nhiệt ở nồng độ chất khô cao. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 1, 46 - 56.

7. Nguyễn Chính Nghĩa, Nguyễn Tiến Cường, Trần Thị Mơ, Chu Kỳ Sơn (2023). Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố dinh dưỡng tới quy trình sản xuất cồn không gia nhiệt ở nồng độ chất khô cao từ sắn. *Tạp chí Công thương*, 7, 458 - 463.

8. ISO 14040:2006. Environmental management - Life cycle assessment - Principles

and framework. International Organization for Standardization.

9. ISO 14044:2006. Environmental management - Life cycle assessment - Requirements and guidelines. International organization for standardization.

10. European Commission, Joint Research Centre (2010). *ILCD Handbook: General guide for Life Cycle Assessment - Detailed guidance*.

11. Kim, S., Dale, B. E (2005). Life cycle assessment of various cropping systems utilized for producing biofuels: Bioethanol and bio-diesel. *Biomass and Bioenergy*, 29(6), 426 - 439.

12. Luo, L., Van der Voet, E, Huppes, G (2009). Life cycle assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(6 - 7), 1613 - 1619.

13. Nguyen, T. L. T, Gheewala, S. H. & Garivait, S (2007). Full chain energy analysis of fuel ethanol from cassava in Thailand. *Environmental Science & Technology*, 41(11), 4135 - 4142.

14. Tsolakis, N, *et al.* (2020). A circular economy-driven approach for the design of a bio-based supply chain for the production of ethanol. *Production planning & Control*, 31(6), 498 - 517.

15. Sun, S, *et al.* (2019). Improvement of ethanol production from raw corn starch by a novel raw starch-digesting glucoamylase from *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1 - 12.

16. Do Xuan Truong, Vu Anh Tuan (2024). Enhancing sustainable ethanol fuel production from cassava in Vietnam. *Energy and Climate Change*, 5, 100136.

17. Scully, M. J., Norris, G. A., Alarcon Falconi, T. M & MacIntosh, D. L (2021). Carbon intensity of corn ethanol in the United States: State of the science. *Environmental Research Letters*, 16(4), 043001.

LIFE CYCLE ASSESSMENT (LCA) OF A NO-COOK PROCESS FOR ETHANOL PRODUCTION FROM RICE AT AN PILOT SCALE OF 1-TON PER BATCH**Pham Ngoc Hung¹, Nguyen Chinh Nghia¹, Chu Ky Son¹***¹Department of Food Engineering, School of Chemistry and Life Sciences,
Hanoi University of Science and Technology***Abstract**

Ethanol production from rice is often energy-intensive and causes significant environmental impacts. This study applies the Life Cycle Assessment (LCA) methodology to analyze and compare the environmental impacts of a no-cook Simultaneous Liquefaction, Saccharification and Fermentation (SLSF) technology with a conventional process for ethanol production from rice, focusing on the gate-to-gate manufacturing processes. Experiments were conducted at an industrial scale of 1-ton of rice per batch at a factory in Hoa Binh province, Vietnam. The results showed that the SLSF process, despite operating at a low temperature (approximately 30°C), yielded a higher ethanol concentration in the final fermentation broth (10.1% vs. 9.5% v/v) and increased the overall ethanol recovery (465 L vs. 438 L of 96% ethanol per ton of rice) compared to the conventional process. In terms of energy, the SLSF process reduced coal consumption by 25% while increasing electricity usage by 31%. Economically, the production cost per 1000 L of finished ethanol was reduced by 1.307.256 VND. Environmentally, the SLSF process contributed to a reduction in greenhouse gas (GHG) emissions from 1.81 to 1.36 kg CO₂-eq per liter of finished ethanol. These findings confirm that the no-cook SLSF technology is a sustainable solution, offering dual economic and environmental benefits for the ethanol production industry in Vietnam.

Keywords: *Life Cycle Assessment (LCA), ethanol, rice, no-cook technology (SLSF).***Ngày nhận bài:** 25/6/2025**Ngày chuyển phản biện:** 15/7/2025**Ngày thông qua phản biện:** 01/8/2025**Ngày duyệt đăng:** 8/8/2025

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH PROBIOTIC CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ PHÂN CHỒN

Đàm Thúy Hằng¹, Vũ Nhật Minh¹, Phạm Tuấn Anh^{1,*}

¹Khoa Kỹ thuật Sinh học, Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

* Email: anh.phamtuan2@hust.edu.vn

TÓM TẮT

Trong những năm gần đây, probiotic đã trở thành một chủ đề thu hút sự quan tâm lớn trong nghiên cứu vi sinh vật, nhờ vào vai trò quan trọng của chúng trong cải thiện sức khỏe con người và động vật. Các vi khuẩn probiotic, đặc biệt là các vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* và *Bacillus* đã được chứng minh có khả năng hỗ trợ hệ tiêu hóa, tăng cường hệ miễn dịch và bảo vệ cơ thể khỏi sự xâm nhập của các vi sinh vật gây bệnh. Tuy nhiên, việc khám phá các nguồn vi sinh vật mới với đặc tính probiotic vẫn là một lĩnh vực đầy triển vọng và thách thức. Phân chồn, một nguồn sinh học tự nhiên, chứa nhiều vi sinh vật có tiềm năng probiotic nhờ môi trường giàu chất dinh dưỡng và đặc tính tiêu hóa độc đáo của chồn. Dựa trên những nghiên cứu trước đây, các vi khuẩn phân lập từ phân động vật đã chứng minh tiềm năng ứng dụng cao trong ngành công nghiệp thực phẩm, y học và nông nghiệp. Tuy nhiên, nghiên cứu về vi khuẩn phân lập từ phân chồn vẫn còn hạn chế. Nghiên cứu này đã phân lập và tuyển chọn được hai chủng vi khuẩn có khả năng tạo bào tử và sinh axit, bao gồm: *Paenibacillus* sp. CP2 và *Bacillus licheniformis* CP3. Hai chủng này có khả năng chịu được điều kiện trong hệ tiêu hóa giả lập, mật độ của tế bào sinh dưỡng và bào tử của hai chủng được duy trì ở mức không nhỏ hơn 5,5 log CFU/mL sau 6 giờ. Hai chủng CP2 và CP3 có khả năng sinh enzyme ngoại bào amylase và protease tương đương với chủng vi khuẩn *Bacillus clausii*, một chủng probiotic được sử dụng phổ biến.

Từ khóa: Probiotic, bào tử, vi khuẩn sinh axit.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Probiotic là chế phẩm chứa các vi sinh vật được chứng minh mang lại nhiều lợi ích sức khỏe, đặc biệt trong việc quản lý và phòng ngừa các rối loạn tiêu hóa. Chúng có hiệu quả trong việc giảm tiêu chảy do kháng sinh, thức ăn lạ, cũng như tiêu chảy ở trẻ em, thông qua việc phục hồi sự cân bằng hệ vi sinh đường ruột. Probiotic cũng có tác dụng điều trị đối với các tình trạng như táo bón và viêm đại tràng, bằng cách tăng cường động lực đường tiêu hóa và điều chỉnh tình trạng viêm trong ruột. Ngoài ra, probiotic còn có khả năng ức chế sự phát triển của các tác nhân gây bệnh như *Salmonella* và *Shigella*, giúp giảm nguy cơ nhiễm trùng do các vi khuẩn này. Chúng cũng đã được chứng minh là cải thiện các triệu chứng không dung nạp lactose và giảm chướng bụng, qua đó

thúc đẩy sức khỏe tiêu hóa tổng thể. Trong các nghiên cứu trên động vật, probiotic đã được chứng minh là làm tăng cân trong quá trình phát triển, cho thấy tiềm năng của chúng trong việc thúc đẩy tăng trưởng trong chăn nuôi động vật [1]. Những lợi ích khác của probiotic phải kể đến như điều chỉnh khả năng miễn dịch của vật chủ [2], sản xuất các chất dẫn truyền thần kinh trong ruột thông qua trục ruột - não [3 - 6], sinh ra các chất chuyển hóa có lợi như axit béo chuỗi ngắn (SCFA), enzyme ngoại bào giúp hỗ trợ tiêu hóa [6], các chất kháng khuẩn Bacteriocin [7], exopolysaccharides (EPS) và vitamin [8].

Các sản phẩm probiotic thương mại có mặt nhiều loại vi sinh vật thuộc các nhóm phân loại khác nhau như vi khuẩn lactic với các đại diện thuộc chi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* và *Enterococcus* [9], vi khuẩn thuộc

chi *Bifidobacterium* [10, 11], nấm men *Saccharomyces boulardii*, *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, *K. lactis*, *Candida saitoana* và *C. pintolopesii* [12]. *Bacillus* là một nhóm vi khuẩn Gram dương, có thể sống trong môi trường hiếu khí hoặc kỵ khí tùy tiện và nổi bật với khả năng sinh bào tử. Điều này giúp chúng tồn tại lâu dài trong các điều kiện khắc nghiệt, như nhiệt độ cao và pH thấp, những yếu tố có thể tiêu diệt các vi khuẩn sinh dưỡng. Cả dạng bào tử và sinh dưỡng của *Bacillus* đều được sử dụng làm men vi sinh và có độ ổn định cao với các điều kiện môi trường xung quanh. Các chế phẩm sinh học *Bacillus* thương mại phổ biến bao gồm các loài như: *B. subtilis*, *B. polyfermenticus*, *B. clausii*, một số chủng *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. pumilus* và *B. licheniformis* [13]. Các loài thuộc chi *Paenibacillus* sản xuất các tác nhân kháng khuẩn như: Bacteriocin và peptide kháng khuẩn, cùng với các enzyme như: Glucan, chitinase, cellulase và protease, không chỉ giúp kiểm soát vi sinh vật gây bệnh mà còn hỗ trợ duy trì cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột. Những đặc tính này mở ra tiềm năng ứng dụng *Paenibacillus* như một probiotic trong nông nghiệp và chăn nuôi, thay thế các hóa chất diệt khuẩn và cải thiện sức khỏe tổng thể của vật nuôi thông qua việc tối ưu hóa quá trình tiêu hóa và tăng cường miễn dịch.

Tiềm năng của những vi khuẩn sinh bào tử thuộc chi *Bacillus* và *Paenibacillus* còn chưa được khai thác hiệu quả, những nghiên cứu tập trung vào tìm kiếm các chủng về các chủng vi khuẩn có đặc tính probiotic này còn chưa nhiều. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh bào tử và có đặc tính probiotic.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập vi khuẩn tạo bào tử và có khả năng sinh axit

Mẫu phân chôn thu thập tại thôn 1, xã Eo Kpam, huyện Cư M'gar, tỉnh Đắk Lắk trước đây và vận chuyển về phòng thí nghiệm để phân lập vi sinh vật. 5 g mẫu được hòa trong 30 mL NaCl 0,9%

và được lắc trong 15 phút. Sau đó, 0,6 mL huyền phù mẫu được hút vào ống eppendorf, ủ ở 85°C trong 20 phút. Sau đó mẫu được làm nguội đến nhiệt độ phòng và lần lượt được pha loãng tới các độ pha loãng 10^{-1} và 10^{-2} và được cấy lên môi trường DPA (peptone 10 g/L, D-Glucose 5 g/L, bromocresol purple 0,04 g/L, agar-agar 12 g/L, pH 7,0) [14]. Mẫu sau đó được nuôi ở 37°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc phát triển trên môi trường DPA được quan sát, những khuẩn lạc riêng biệt có vùng môi trường xung quanh khuẩn lạc màu vàng chứng tỏ có khả năng sinh axit được cấy chuyển sang môi trường dinh dưỡng mới để làm sạch và thu nhận chủng thuần khiết. Các chủng phân lập thành công được bảo quản trong môi trường LB bổ sung 20% (v/v) glycerol ở -80°C.

2.2. Đánh giá khả năng hình thành nội bào tử

Khả năng hình thành bào tử của các chủng phân lập được đánh giá bằng phương pháp nhuộm bào tử với biến đổi nhỏ từ Schaeffer và Fulton (1933) [15]. Các chủng được nuôi trong môi trường bào tử hóa Difco Sporulation Medium (DMS) ở 34°C, tốc độ lắc 150 rpm trong 2 ngày. Sau đó, huyền phù tế bào được ủ trong bể ổn nhiệt ở 85°C trong 20 phút trước khi được cố định trên phiến kính. Một miếng giấy hình vuông cắt vừa với phiến kính và được làm ướt bằng dung dịch xanh malachite. Phiến kính được để trên hơi nước sôi trong thời gian 30 phút. Trong quá trình nhuộm, thuốc nhuộm xanh malachite có thể được bổ sung nếu cần. Sau đó, phiến kính được rửa và nhuộm tiếp bằng safranin trong 2 phút trước khi được rửa sạch bằng nước và thấm khô. Tiêu bản được quan sát dưới vật kính 100X để kiểm tra sự có mặt của nội bào tử được thể hiện bằng màu xanh lá cây sáng và tế bào sinh dưỡng có màu hồng.

2.3. Định danh vi khuẩn bằng xác định trình tự gen mã hóa 16S rRNA

Các chủng vi khuẩn tạo bào tử và sinh axit được định danh dựa vào phân tích trình tự gen mã hóa 16S rRNA. Toàn bộ vùng gen mã hóa 16S rRNA được khuếch đại sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTAGGACTT-3') [16] từ khuẩn lạc

riêng biệt của chủng vi khuẩn nghiên cứu. Phản ứng PCR được thực hiện trong 20 μ L chứa 1 μ M mỗi 27F, 1 μ M mỗi 1492R, 12,5 μ L Greentag 2x Mastermix và 10,5 μ L nước. Quá trình khuếch đại được thực hiện với chu trình nhiệt như sau: Biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút, sau đó là 35 chu kỳ gồm 3 bước: 95°C trong 45 giây, 57°C trong 45 giây và 72°C trong 90 giây, quá trình kéo dài cuối cùng được thực hiện ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% (bổ sung thuốc nhuộm ADN Redsafe) ở điện thế 50V trong 90 phút. Sản phẩm PCR đoạn gen mã hóa 16S rRNA của các chủng được xác định trình tự hai chiều bằng phương pháp Sanger tại Công ty 1st Base (Singapore). Trình tự thô mỗi chiều được cắt bỏ đoạn có tín hiệu nhiễu ở hai đầu bằng công cụ MEGA11 để thu được trình tự mỗi chiều khoảng 800 bp và căn chỉnh với nhau bằng công cụ Geneious Prime để tạo một đoạn trình tự hoàn chỉnh. Đoạn trình tự này được so sánh với các trình tự trong cơ sở dữ liệu gồm các trình tự mã hóa 16S rRNA của prokaryote của NCBI bằng công cụ BLAST để tìm ra loài có quan hệ phân loại gần gũi nhất.

2.4. Khảo sát một số tính chất probiotic của các chủng probiotic tiềm năng

2.4.1. Khả năng sinh axit

Hàm lượng axit tạo thành được xác định bằng phương pháp chuẩn độ [17]. Hai chủng CP2 và CP3 được nuôi trong 50 mL môi trường MRS lỏng, ở 37°C. Sau đó, mẫu được lấy tại các thời điểm 12 giờ; 24 giờ; 48 giờ, được ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C để loại bỏ sinh khối. Dịch nổi không chứa tế bào (5 mL) được bổ sung thêm 2 giọt phenolphthalein 1% và được chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1 N cho đến khi xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 30 giây thì dừng lại. Thể tích NaOH 0,1 N đã dùng được ghi lại. Hàm lượng axit trong dung dịch thử nghiệm được tính quy đổi về axit lactic theo công thức sau:

$$m = \frac{V_{NaOH} \cdot 0,009 \cdot 1000}{V_{dịch}}$$

Trong đó: m là hàm lượng axit lactic trong dung dịch (mg/mL); V_{NaOH} là thể tích NaOH 0,1 N dung để chuẩn độ (mL); $V_{dịch}$ là thể tích dịch chuẩn độ; 0,009 là 1 mL dung dịch NaOH 0,1 N tương đương với 0,009 g axit lactic.

2.4.2. Khả năng kháng các điều kiện trong hệ tiêu hóa giả lập của bào tử và tế bào sinh dưỡng

Dịch mô phỏng dạ dày (SGF) và dịch mô phỏng ruột (SIF) được chuẩn bị theo phương pháp được mô tả bởi Brodtkorb và cs (2019) [18] với các thành phần cụ thể được trình bày trong bảng 1. pH của dung dịch được điều chỉnh bằng dung dịch đệm Tris 1 M pH 7,4 và HCl 0,06 N.

Bảng 1. Thành phần hóa học của dịch mô phỏng dạ dày và dịch mô phỏng ruột

Thành phần	Nồng độ dung dịch gốc (M)	SGF (pH 7)	SIF (pH 3)
		Nồng độ (mM)	Nồng độ (mM)
KCl	0,5	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	0,5	0,9	0,8
NaHCO ₃	1	25	91
NaCl	2	47,2	38,4
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,15	0,12	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,5	0,5	-

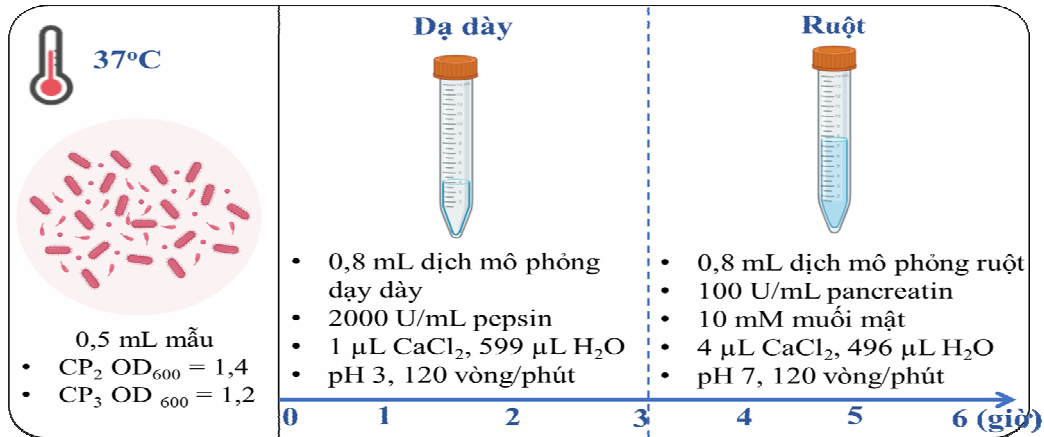
Mô phỏng dạ dày

Quá trình giả lập điều kiện dạ dày được tiến hành như sau: 0,5 mL dịch chứa 10⁸ – 10⁹ CFU/mL vi khuẩn (khoảng OD600 = 1,4 đối với CP2 và OD600 = 1,2 đối với CP3) được trộn với 0,8 mL dịch SGF. Sau đó, 100 μ L pepsin và 1 μ L CaCl₂ 0,3 M được bổ sung và trộn đều với dịch SGF trên. Cuối cùng, pH được điều chỉnh đến 3 bằng dung dịch HCl và thể tích của SGF được điều chỉnh đến thể tích 2 mL. Dung dịch được giữ trong tủ lắc ở tốc độ 120 rpm ở 37°C trong 3 giờ.

Mô phỏng ruột

Sau 3 giờ, SGF được bổ sung 0,8 mL dịch SIF, 500 μ L pancreatin, 500 μ L muối mật và 4 μ L CaCl₂. pH của hỗn hợp được điều chỉnh đến 7,0 bằng dung dịch đệm Tris 1 M và thể tích dung dịch

được điều chỉnh đến đạt 4 mL. Hệ mô phỏng ruột trong 3 giờ.
được giữ trong tủ lắc ở tốc độ 120 rpm ở 37°C



Hình 1. Quá trình giả lập điều kiện hệ tiêu hóa

2.4.3. Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào

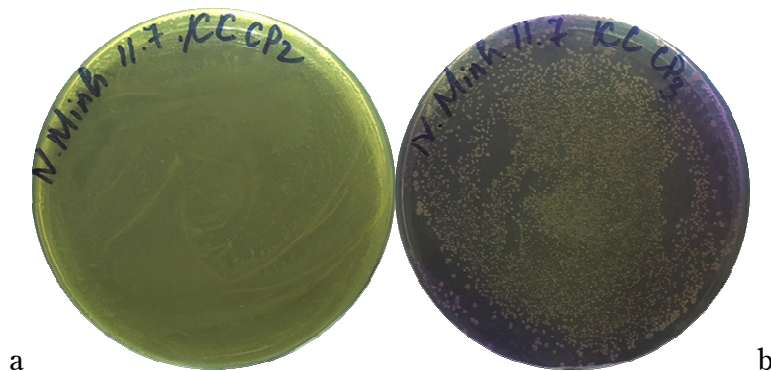
Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng phân lập được xác định dựa vào khả năng tạo vòng phân giải cơ chất theo mô tả bởi Atlas và cs (1995) [19]. Đối với hoạt động phân giải tinh bột, các chủng phân lập được nuôi trong môi trường lỏng LB có bổ sung tinh bột. Để đánh giá khả năng sinh enzyme protease ngoại bào, các chủng được nuôi trên môi trường LB. Sau 24 giờ nuôi ở 37°C trong điều kiện lắc 150 rpm, dịch nuôi được ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu phần dịch trong. Phần dịch trong này (50 µL) được chuyển vào các lỗ có đường kính 6 mm được khoan trước vào đĩa thạch chứa 1% tinh bột hoặc 1% casein. Sau 48 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C để enzyme hoạt động. Dung dịch Lugol được đổ vào

các đĩa chứa tinh bột, vùng trong suốt hình thành do tinh bột bị thủy phân được ghi lại. Đối với các đĩa casein, hoạt động của enzyme protease được ghi nhận bằng sự xuất hiện của vùng trong suốt xung quanh lỗ thạch.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi sinh vật có khả năng tạo bào tử và sinh axit từ phân chồn

Mẫu phân chồn sau khi đưa về phòng thí nghiệm được xử lý nhiệt ở 85°C trong 20 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng trước khi được cấy lên môi trường DPA và nuôi trong 48 giờ. Hai chủng vi khuẩn CP2 và CP3 có khuẩn lạc tạo vòng halo màu vàng xung quanh khuẩn lạc có khả năng sinh axit làm đổi màu của chỉ thị pH Bromocresol purple (Hình 2) được chọn để tiếp tục làm sạch thu canh trường thuần khiết.



Hình 2. Khả năng sinh axit của hai chủng vi khuẩn CP2 (a) và CP3 (b) trên môi trường DPA trong đĩa petri đường kính 9 mm sau 1 ngày nuôi cấy

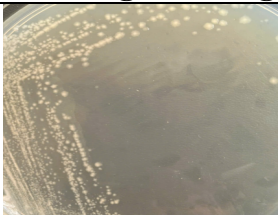
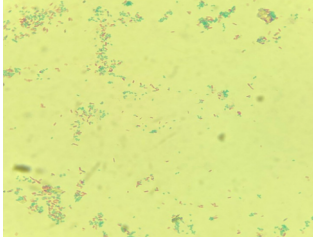
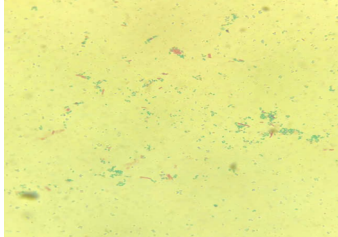
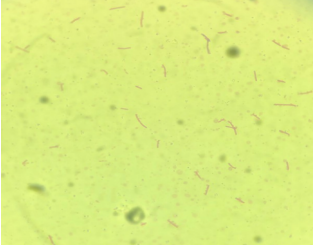
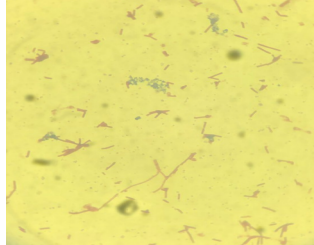
Các tế bào sinh dưỡng của hai chủng phân lập là các tế bào hình que, Gram dương, kỵ khí tùy

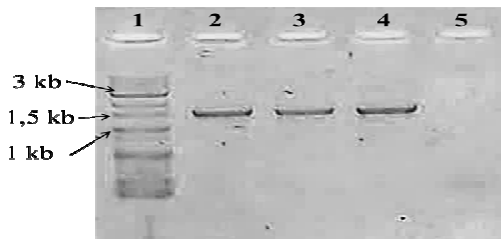
tiện và có khả năng sinh bào tử ở bảng 2. Các khuẩn lạc của chủng CP2 trên đĩa thạch LB có

đường kính từ 1 - 2 mm, lồi thấp, hình tròn với các mép không đều, có màu trắng trong, bề mặt khuẩn lạc trơn bóng. Trong khi đó, chủng CP3 tạo ra các khuẩn lạc có hình dạng bất định, hơi tròn, đường kính khoảng 2 - 4 mm. Các khuẩn lạc của chủng

CP3 có bề mặt thay đổi theo thời gian nuôi, từ bề mặt ẩm, nhầy đến dạng màng, với lớp nền nhầy có các hạt nhầy trên bề mặt và trở nên thô ráp và khô. Rìa khuẩn lạc có thể thay đổi từ dạng lượn sóng đến dạng tua chỉ ở băng 2.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái của hai chủng vi khuẩn CP2 và CP3

Đặc điểm	Chủng phân lập	
	CP2	CP3
Hình thái khuẩn lạc sau 2 ngày nuôi cấy ở 37°C	Tròn với mép không đều; bề mặt lồi thấp, bóng; có màu trắng kem trong 	Tròn to, nhỏ; bề mặt hơi lồi, ẩm, nhầy đến dạng màng; có màu trắng kem đục 
Hình thái bào tử	Oval 	Oval 
Tính chất nhuộm Gram của tế bào	Hình que, Gram dương 	Hình que, Gram dương 



Hình 3. Sản phẩm khuếch đại vùng gen mã hóa 16S rRNA của các chủng phân lập

Ghi chú: Thứ tự load mẫu: Giếng 1: ADN ladder 1 kb Plus (Biofact - Hàn Quốc), giếng 2 - 3: Sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen mã hóa 16S rRNA của chủng CP2, CP3, giếng 4: Đối chứng dương sử dụng ADN của E. coli, giếng 5: Đối chứng âm - Sản phẩm PCR không có ADN khuôn.

Việc định danh của các chủng phân lập được thực hiện dựa vào trình tự gen mã hóa 16S rRNA. Sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen mã hóa 16S rRNA từ ADN tổng số của chủng có kích thước 1.500 bp, phù hợp với tính toán lý thuyết, được xác định trình tự bằng phương pháp giải trình tự Sanger ở hình 3.

Trình tự gen mã hóa 16S rRNA gần như hoàn chỉnh của hai chủng được so sánh với trình tự gen mã hóa 16S rRNA của các chủng tham chiếu trên cơ sở dữ liệu Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (NCBI). Kết quả cho thấy, trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng CP3 có độ tương đồng cao, dao động từ 99,34 - 99,49% so với

trình tự tương ứng của loại vi khuẩn *Bacillus licheniformis* (mã hiệu trình tự gen mã hóa 16S rRNA của các chủng *Bacillus licheniformis* tham chiếu lần lượt là NR_118996.1, NR_116023.1, NR_074923.1). Trong các nghiên cứu trước đây, *B. licheniformis* đã được chứng minh là ứng viên tiềm năng để ứng dụng làm chế phẩm probiotic trong lĩnh vực chăn nuôi và hỗ trợ nâng cao sức khỏe con người [20, 21]. *B. licheniformis* là một trong các loài đã được phân lập với số lượng từ 5,103 - 5,106 CFU.g⁻¹ trong phân người [21], điều này chứng tỏ *B. licheniformis* có khả năng tồn tại trong đường tiêu hóa của động vật máu nóng. Bên cạnh đó, kết quả so sánh trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng CP2 với trình tự gen tương ứng

của các chủng tham chiếu được lưu giữ trong ngân hàng gen cho thấy, chủng này có quan hệ gần gũi với các thành viên của họ *Paenibacillaceae*. Dữ liệu thu được cho thấy, chủng này có trình tự gen mã hóa 16S rRNA có độ tương đồng tới 99,71% với *P. cineris* (NR_042189.1), 99,71% với *P. favisporus* (NR_029071.1), 99,71% với *P. rhizosphaerae* (NR_043166.1), 99,27% *P. cellulositrophicus* (NR_116564.1) và 97,61% *P. azoreducens* (NR_025391.1). Để nhận diện được chủng CP2, đặc điểm hóa sinh của chủng CP2 được so sánh với chủng thuộc các loài trên để làm đối chứng. Bảng 3 cho thấy các đặc điểm kiểu hình riêng biệt của loài mới CP2 cũng như các loài có quan hệ gần gũi thuộc chi *Paenibacillus*.

Bảng 3. Một số đặc tính sinh hóa của chủng CP2 và một số loài có quan hệ họ hàng trong chi *Paenibacillus*

Đặc điểm	1	2	3	4	5	6
Bào tử	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval
Yếm khí	+	+	-	-	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	-	+
Voges-Proskauer	w	-	+	+	nd	+
Thủy phân:						
Gelatin	-	+	-	-	+	-
Tinh bột	nd	+	-	+	+	+
Phát triển ở điều kiện:						
50°C	+	-	-	-	+	+
NaCl 5%	-	+(w)	+	-	-	+
Lên men						
L-Arabinose	+	nd	+	+	-	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	nd	nd	nd	+	+
D-Mannitol	+	+	+	-	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	+

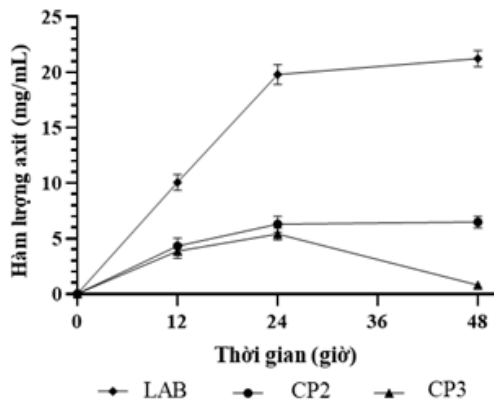
Ghi chú: Ký hiệu: 1. P. cineris, 2. P. favisporus, 3. P. rhizosphaerae, 4. P. cellulositrophicus, 5. P. azoreducens, 6. CP2. (+) dương tính; (-) âm tính; (w) có thể dương tính, phản ứng yếu; (nd) không có dữ liệu; dữ liệu của 1, 2, 3, 4, 5 lấy từ Bergey's manual of Systematic Bacteriology.

Chủng CP2 khác với *P. ciners* về khả năng phát triển trong môi trường có 5% NaCl, khác với *P. favisporus*, *P. rhizosphaerae* và *P. cellulositrophicus* về khả năng phát triển ở 50°C, khác với *P. azoreducens* về khả năng thủy phân gelatin, CP2 không có khả năng thủy phân gelatin trái ngược với *P. azoreducens* (Bảng 3). Chủng

CP2 có nhiều điểm khác biệt so với loài có độ tương đồng cao về trình tự gen mã hóa 16S rRNA thuộc chi *Paenibacillus*. Chủng CP2 chưa có đủ dữ liệu để định danh đến loài và được kết luận là vi khuẩn thuộc chi *Paenibacillus*. Theo một số nghiên cứu trước đây, chi *Paenibacillus* có rất nhiều loài được ứng dụng làm probiotic [22 - 25].

3.2. Khảo sát các đặc tính probiotic của các chủng phân lập

3.2.1. Khả năng sinh axit



Hình 4. Động học sinh axit của các chủng phân lập CP2 và CP3. LAB: Chủng đối chứng là vi khuẩn lactic thuộc loài *Lactobacillus plantarum*

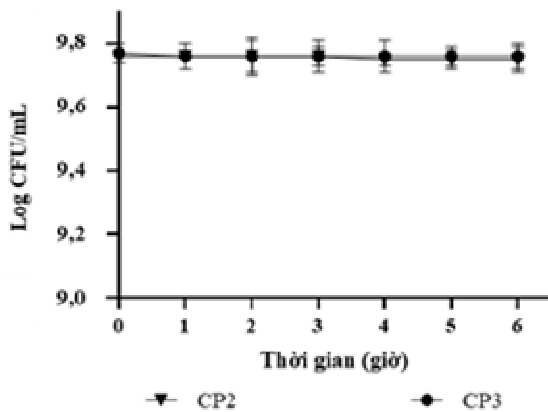
Khả năng sinh axit là một trong những tiêu chí để phân lập được hai chủng CP2 và CP3. Trong nghiên cứu này, động học quá trình sinh axit của hai chủng CP2 và CP3 được xác định trên môi trường MRS trong 48 giờ nuôi cấy. Dịch nuôi vi khuẩn được loại bỏ sinh khối và lượng axit được

định lượng bằng phương pháp chuẩn độ với NaOH 0,1 N.

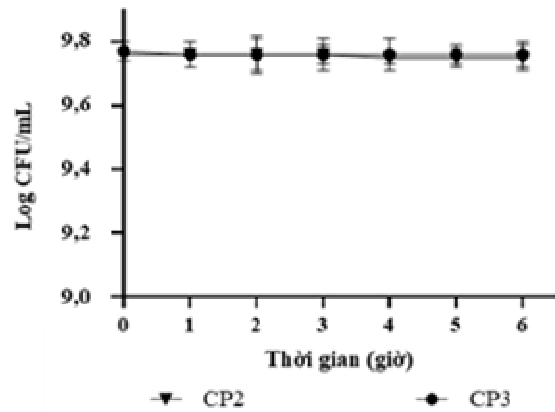
Chủng CP2 sinh axit đạt mức xấp xỉ 6 mg/mL sau 24 giờ và duy trì ổn định. Trong khi đó, chủng CP3 có mức sinh axit thấp hơn, đạt khoảng 5 mg/mL vào giờ thứ 24 và sau đó giảm mạnh về gần giá trị 0 mg/mL sau 48 giờ. Cả hai chủng đều sinh ra lượng axit thấp hơn đáng kể so với vi khuẩn lactic *Lactobacillus plantarum* (Hình 4).

3.2.2. Khả năng kháng một số điều kiện trong hệ tiêu hóa giả lập

Một trong những đặc điểm quan trọng nhất cần có đối với những chủng được ứng dụng làm probiotic là khả năng sống sót của chúng khi đi qua đường tiêu hóa trên để đến ruột già - nơi chúng thực hiện các chức năng hữu ích. Các điều kiện axit cao của dạ dày và muối mật trong ruột non là những rào cản khó khăn nhất liên qua đến sự sống sót của probiotic. Trong nghiên cứu này, khả năng sống sót của hai chủng đã được khảo sát ở cả hai dạng tồn tại là bào tử và tế bào sinh dưỡng trong điều kiện mô phỏng dạ dày và ruột.



(A)



(B)

Hình 5. Mật độ tế bào sinh dưỡng (A) và bào tử (B) của hai chủng CP2 và CP3 khi tiếp xúc lần lượt với dịch mô phỏng dạ dày (SGF) trong 3 giờ và dịch mô phỏng ruột (SIF) trong 3 giờ

Ghi chú: Mỗi giá trị trong biểu đồ biểu thị giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD). Mỗi điểm dữ liệu là giá trị trung bình của 2 phép đo lặp lại từ thí nghiệm được làm độc lập.

Bào tử của hai chủng CP2 và CP3 bền trong điều kiện dịch mô phỏng dạ dày (SGF) và ruột, mật độ bào tử không giảm và duy trì ở giá trị xấp xỉ 9,6 log CFU/mL sau 6 giờ (Hình 5B). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu về bào tử *Bacillus*. Bào tử, bao gồm nhiều lớp bảo vệ, rất bền với các điều kiện vật lý và hóa học khác nhau và chúng đã

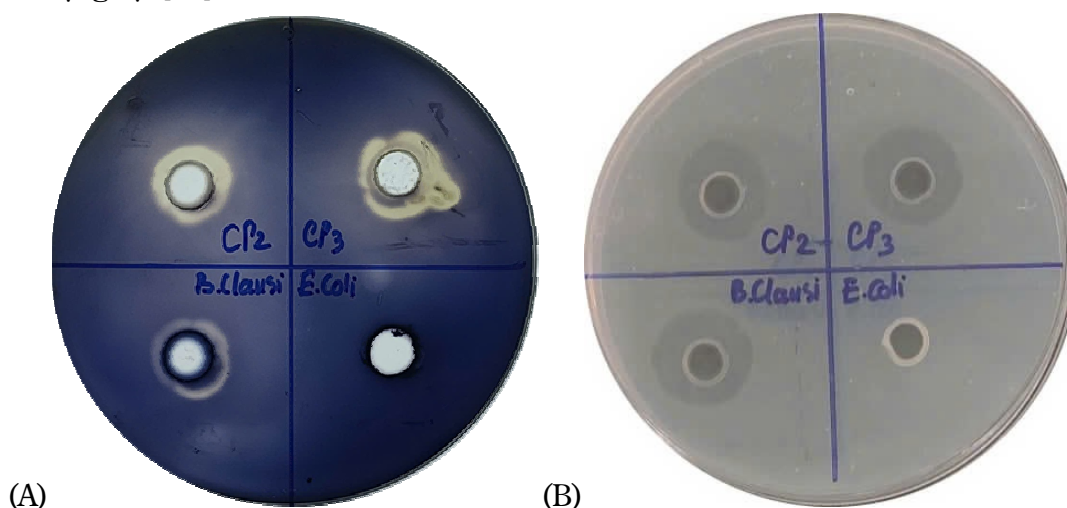
được chứng minh có thể sống trong điều kiện axit cao, chịu được muối mật và các điều kiện bất lợi khác của đường tiêu hóa động vật [26, 27].

Bên cạnh đó, tế bào sinh dưỡng của hai chủng CP2 và CP3 mất dần khả năng sống sót khi tiếp xúc với dịch mô phỏng với sự nhạy cảm của 2 chủng khá khác nhau. Trong khi các tế bào sinh

đường của chủng CP2 giảm mật độ đáng kể sau 1 giờ đầu tiên tiếp xúc với dịch mô phỏng dạ dày (SGF) (giảm ~ 3 log CFU/mL) và sau 3 giờ tiếp xúc đã giảm từ 9,7 log CFU/mL xuống 5,5 log CFU/mL (giảm ~ 4 log CFU/mL), các tế bào sinh dưỡng của chủng CP3 cho thấy sức sống tốt hơn. Sau giờ đầu tiên tiếp xúc, mật độ chủng CP3 giảm khoảng 0,6 log CFU/mL, số lượng giảm này ít hơn 5 lần so với chủng CP2. Sau 3 giờ tiếp xúc, mật độ tế bào sinh dưỡng giảm từ 9,6 log CFU/mL xuống 7,3 log CFU/mL (giảm ~ 2 log CFU/mL), ít hơn 2 lần so với chủng CP2. Trong dịch mô phỏng dạ dày, số lượng tế bào giảm do độ pH thấp của dạ dày và sự có mặt của pepsin - có tác dụng phân hủy protein trong dạ dày [28], do đó làm hạn chế khả năng sống của tế bào sinh dưỡng. Kết quả nghiên cứu của Clavel và cs (2004) cho thấy, mức giảm của tế bào sinh dưỡng luôn cao hơn 3 log CFU/mL trong 2 giờ ở pH thấp hơn 3,5 và độ giảm sẽ cao hơn 4,0 log CFU/mL trong khoảng từ 0 – 5 giờ trong nhiều trường hợp [26]. Trong dịch mô phỏng ruột, số lượng tế bào của hai chủng giảm không đáng kể. Điều này có thể được giải thích, là do chủng có khả năng sinh các enzyme thủy phân muối giúp làm giảm tác dụng độc hại của nó. Hoạt động của enzyme thủy phân muối mật thường được tìm thấy ở các vi sinh vật được phân lập từ ruột hoặc phân động vật [27].

3.2.3. Khả năng sinh enzyme ngoại bào

Các enzyme ngoại bào sinh ra bởi hệ vi sinh vật tại đường ruột của động vật đóng vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ tiêu hóa thức ăn chưa bị tiêu hóa ở dạ dày và ruột non và giúp thức ăn dễ dàng hấp thụ. Trong nghiên cứu này, khảo sát khả năng sinh enzyme amylase và protease ngoại bào của hai chủng phân lập bằng cách nuôi các chủng trên môi trường cảm ứng sinh enzyme và chuyển dịch nuôi cấy sau khi loại bỏ tế bào vào lỗ thạch được đục trên môi trường thạch thử nghiệm có chứa cơ chất tương ứng của enzyme cần kiểm tra. Hình 6 cho thấy, xung quanh lỗ thạch có chứa dịch nổi không tế bào của chủng CP2 và CP3 đều xuất hiện vòng phân giải tinh bột và protein, chứng tỏ cả 2 chủng này đều có khả năng sinh enzyme amylase và protease ngoại bào. Đường kính vòng thủy phân tinh bột của chủng CP2 và CP3 lần lượt là 15 mm và 16 mm, lớn hơn không đáng kể so với đường kính vòng thủy phân tinh bột của chủng probiotic *B. clausii* (14 mm). Đối với khả năng thủy phân cơ chất casein, đường kính vòng thủy phân của chủng CP3 tương đương với chủng *B. clausii*, đạt 18 mm, trong khi chủng CP2 thể hiện khả năng sinh protease thấp hơn không đáng kể, với đường kính vòng thủy phân là 17 mm (Hình 6).



Hình 6. Khả năng sinh enzyme amylase (A) và protease (B) ngoại bào của các chủng phân lập CP2 và CP3

Ghi chú: *Bacillus clausii* và *E. coli* được sử dụng như các chủng so sánh để so sánh, lần lượt đại diện cho chủng probiotic và vi sinh vật bản địa trong hệ tiêu hóa động vật. Thí nghiệm được tiến hành trên đĩa petri đường kính 9 mm có chứa 1% tinh bột tan (A) và 1% casein (B).

Vì vậy, hai chủng CP2 và CP3 khi ứng dụng làm probiotic đều có khả năng hỗ trợ phân giải các hợp chất cao phân tử trong hệ tiêu hóa như tinh bột, protein. Điều này hoàn toàn phù hợp với các đặc tính sinh học của vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* và *Paenibacillus* [29, 30] có thể tăng cường khả năng tiêu hóa chất dinh dưỡng dẫn đến cải thiện chuyển đổi thức ăn ở lợn thịt [30].

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, hai chủng vi khuẩn có khả năng tạo bào tử và sinh axit đã được phân lập thành công từ mẫu phân chồn. Các phương pháp hóa sinh và sinh học phân tử dựa vào trình tự gen mã hóa 16S rRNA đã xác định hai chủng CP2 và CP3 lần lượt là *Bacillus licheniformis* và *Paenibacillus* spp. Bào tử của hai chủng nghiên cứu đã thể hiện khả năng chịu đựng tốt trong điều kiện khắc nghiệt mô phỏng dạ dày và ruột. Tuy nhiên, tế bào sinh dưỡng của 2 chủng nhạy cảm hơn với điều kiện khắc nghiệt này. Tế bào sinh dưỡng hai chủng CP2 và CP3 lần lượt giảm 4 log CFU/mL và 2 log CFU/mL sau 3 giờ tiếp xúc với pH thấp (pH 3) và enzyme pepsin của dịch dạ dày trong môi trường mô phỏng. Bên cạnh đó, khi tiếp xúc với điều kiện ruột, hai chủng nghiên cứu cho thấy khả năng chịu muối mật tốt, số lượng tế bào của hai chủng giảm không đáng kể (~0,3 - 0,4 log CFU/mL). Điều này chỉ ra rằng, tế bào sinh dưỡng của hai chủng có khả năng chịu đựng muối mật tốt. Hai chủng này đều có khả năng sinh enzyme ngoại bào amylase và protease, có thể giúp hỗ trợ tiêu hóa khi sử dụng như hai chủng probiotic tiềm năng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4745 - 4767.
<https://doi.org/10.3390/IJERPH110504745>.
2. Petruzzello, C., Saviano, A & Ojetti, V. (2023). Probiotics, the immune response and acute appendicitis: A review. *Vaccines*, 11(7), 1170.
<https://doi.org/10.3390/vaccines11071170>.
3. Srivastav, S., Neupane, S., Bhurtel, S., Katila, N., Maharjan, S., Choi, H., ... Choi, D. Y. (2019). Probiotics mixture increases butyrate, and subsequently rescues the nigral dopaminergic neurons from MPTP and rotenone-induced neurotoxicity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 69, 73 - 86.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.03.021>.
4. Sajedi, D., Shabani, R. & Elmieh, A. (2021). Changes in leptin, serotonin and cortisol after eight weeks of aerobic exercise with probiotic intake in a cuprizone-induced demyelination mouse model of multiple sclerosis. *Cytokine*, 144, 155590.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155590>.
5. Gangaraju, D., Raghu, A. V., & Siddalingaiya Gurudutt, P. (2022). Green synthesis of γ -aminobutyric acid using permeabilized probiotic *Enterococcus faecium* for biocatalytic application. *Nano Select*, 3(10), 1436 - 1447.
<https://doi.org/10.1002/nano.202200059>.
6. Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M. & Gil, A. (2019). Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*, 10, S49 - S66.
<https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>.
7. Gillor, O., Etzion, A. & Riley, M. A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 591 - 606.
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1726-5>.
8. Vera Santander, V. E., Hernández Figueroa, R. H., Jiménez Munguía, M. T., Mani López, E. & López Malo, A. (2023). Health Benefits of consuming foods with bacterial probiotics, postbiotics and their metabolites: A review. *Molecules*, 28(3), 1230.
<https://doi.org/10.3390/molecules28031230>.
9. Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., ... Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15611 - 15616.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>.

10. Walter, J. (2008). Ecological role of *Lactobacilli* in the gastrointestinal tract: Implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 4985. <https://doi.org/10.1128/AEM.00753-08>.
11. Sharma, M., Wasan, A. & Sharma, R. K. (2021). Recent developments in probiotics: An emphasis on Bifidobacterium. *Food Bioscience*, 41, 100993. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2021.100993>.
12. Elghandour, M. M. Y., Tan, Z. L., Abu Hafsa, S. H., Adegbeye, M. J., Greiner, R., Ugbogu, E. A., ... Salem, A. Z. M. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic feed additive to non and pseudo-ruminant feeding: A review. *Journal of Applied Microbiology*, 128(3), 658 - 674. <https://doi.org/10.1111/jam.14416>.
13. Lee, N. K., Kim, W. S & Paik, H. D. (2019). *Bacillus* strains as human probiotics: Characterization, safety, microbiome and probiotic carrier. *Food Science and Biotechnology*, 28(5), 1297 - 1305. <https://doi.org/10.1007/S10068-019-00691-9>.
14. Konuray Altun, G & Erginkaya, Z. (2021). Identification and characterization of *Bacillus coagulans* strains for probiotic activity and safety. *LWT*, 151, 112233. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112233>.
15. Schaeffer, A. B. & Fulton, M. D. (1933). A simplified method of staining endospores. *Science*, 77(1990), 194. <https://doi.org/10.1126/science.77.1990.194>.
16. Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. In E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in Bacterial Systematic* (pp. 115 - 175). New York: John Wiley and Sons.
17. Emanuel, V., Adrian, V., Popa, O & Gheorghe, C. (2005). Isolation of a *Lactobacillus plantarum* strain used for obtaining a product for the preservation of fodders. *African Journal of Biotechnology*, 4(5), 403 - 408.
18. Brodtkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols* 14(4), 991 - 1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.
19. Atlas, R. M. ., Brown, A. E. & Parks, L. C. (1995). Experimental microbiology: *Laboratory manual*, 565.
20. Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28(2), 214 - 220. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>.
21. Hong, H. A., Le, H. D & Cutting, S. M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 813 - 835. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSRE.2004.12.001>.
22. Naghmouchi, K., Baah, J., Cudennec, B. & Drider, D. (2013). Required characteristics of *Paenibacillus polymyxa* JB-0501 as potential probiotic. *Archives of Microbiology*, 195(8), 537 - 543. <https://doi.org/10.1007/S00203-013-0905-7>.
23. Dhawan, S., Singh, R., Kaur, R & Kaur, J. (2016). A β -mannanase from *Paenibacillus* sp.: Optimization of production and its possible prebiotic potential. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63(5), 669 - 678. <https://doi.org/10.1002/BAB.1419>.
24. Soni, R., Nanjani, S & Keharia, H. (2021). Genome analysis reveals probiotic propensities of *Paenibacillus polymyxa* HK4. *Genomics*, 113(1), 861 - 873. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2020.10.017>.
25. Wang, W., Liu, W & Chu, W. (2020). Isolation and preliminary screening of potentially probiotic *Weissella confusa* strains from healthy human feces by culturomics. *Microbial Pathogenesis*, 147, 104356. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104356>.
26. Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C & Schmitt, P. (2004). Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1), 214 - 219. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2004.02292.X>.

27. Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T & Mierau, I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal of Dairy Science*, 82(12), 2530 - 2535. [HTTPS://DOI.ORG/10.3168/JDS.S0022-0302\(99\)75506-2](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(99)75506-2).
28. Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162(1), 56 - 67. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2012.06.003>.
29. Priest, F. G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*, 41(3), 711 - 753.
30. Davis, M. E., Parrott, T., Brown, D. C., De Rodas, B. Z., Johnson, Z. B., Maxwell, C. V & Rehberger, T. (2008). Effect of a *Bacillus*-based direct-fed microbial feed supplement on growth performance and pen cleaning characteristics of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 86(6), 1459 - 1467. <https://doi.org/10.2527/JAS.2007-0603>.

ISOLATION AND EVALUATION OF PROBIOTIC PROPERTIES OF TWO BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM CIVET FECES

Dam Thuy Hang¹, Vu Nhat Minh¹, Pham Tuan Anh¹

¹*Department of Bioengineering, School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology*

Abstract

In recent years, probiotic have become a topic of great interest in microbiology research, due to their important role in improving human and animal health. Probiotics, especially bacteria belonging to the genera *Lactobacillus* and *Bacillus*, have been shown to support the digestive system, enhance the immune system and protect human and animal from detrimental effects of pathogenic microorganisms. Nevertheless, unraveling new microbial resources with probiotic properties remains a promising and challenging field. Civet feces, a natural biological source, contain many microorganisms with probiotic potential due to the nutrient-rich environment and unique digestive properties of the civets. Previous studies have shown that bacteria isolated from these animals' feces exhibited high potential for application in the food industry, medicine and agriculture. However, studies on bacteria isolated from civet feces are still limited. In this study, we isolated and selected two spore forming, acid producing bacterial strains, including *Paenibacillus* sp. CP2 and *Bacillus licheniformis* CP3. These two strains were able to withstand the conditions in the simulated digestive system, the density of vegetative cells and spores of the two strains was maintained at a level of not less than 5.5 log CFU/mL after 6 hours. The two strains CP2 and CP3 had the ability to produce extracellular enzymes, amylase and protease equivalent to a probiotic strain that belongs to the species *Bacillus clausii*.

Keywords: *Probiotic, spore, acid producing bacteria.*

Ngày nhận bài: 20/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 19/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 01/8/2025

Ngày duyệt đăng: 15/8/2025

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH THỦY PHÂN KẾT HỢP SIÊU ÂM VÀ ENZYME NHẪM NÂNG CAO HIỆU SUẤT THU NHẬN PEPTIDE CHỐNG OXY HÓA TỪ PHỤ PHẨM CÁ NGỪ

Nguyễn Hà Trung¹, Nguyễn Thị Tâm Thư¹, Phạm Nguyễn Tuấn Kiệt¹,
Phạm Kiên Cường^{1,*}, Chu Kỳ Sơn²

¹*Viện Vật liệu, Sinh học và Môi trường, Viện Khoa học và Công nghệ quân sự*

²*Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội*

* Email: phamkiencuong83@gmail.com

TÓM TẮT

Cá ngừ (*Thunnus* spp.) và họ cá ngừ là nguồn thực phẩm đóng vai trò rất quan trọng đối với nền kinh tế Việt Nam. Quá trình chế biến cá ngừ tạo ra lượng lớn phụ phẩm thịt sẫm màu ra ngoài môi trường. Dịch thủy phân được chế biến từ phụ phẩm cá ngừ, là nguồn thu nhận peptide có hoạt tính sinh học tốt ứng dụng cho các thực phẩm bảo vệ sức khỏe, dược phẩm hay mỹ phẩm. Mục tiêu của nghiên cứu này là nghiên cứu xác định vai trò của siêu âm trong việc cải thiện hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân thu được từ thịt đỏ cá ngừ. Đã xác định được điều kiện thích hợp cho quá trình thủy phân protein cơ thịt đỏ cá ngừ là tiền xử lý bằng siêu âm công suất 600 W trong 2 giờ, sau đó thủy phân bằng papain 4% ở pH 7,0; nhiệt độ 50°C trong 2 giờ. Dịch thủy phân thu được có hàm lượng peptide đạt 1,80 mg/ml và có hoạt tính chống oxy hóa đo qua khả năng quét gốc tự do DPPH là 73,46%.

Từ khóa: *Phụ phẩm cá ngừ, thủy phân protein, peptide chống oxy hóa, siêu âm, papain.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Stress oxy hóa là hiện tượng mất cân bằng giữa các gốc tự do và các chất chống oxy hóa trong cơ thể. Chất chống oxy hóa có vai trò quan trọng trong bảo vệ sức khỏe con người khỏi hiện tượng stress oxy hóa nêu trên. Tuy nhiên, các chất chống oxy hóa tổng hợp lại có nhiều tác hại cho sức khỏe khi sử dụng lâu dài. Các chất chống oxy hóa tự nhiên bao gồm: Các hợp chất polyphenol, terpen, carotenoid, vitamin, một số peptide có hoạt tính sinh học... Trong đó, peptide có hoạt tính sinh học (chống oxy hóa) được cấu tạo từ các chuỗi axit amin có thành phần như Ala, Gly, Tyr, Phe, Ser, Asp [1].

Cá ngừ là loài thủy sản có giá trị kinh tế cao, phân bố rộng ở các vùng biển Việt Nam. Hiện tại, sản lượng chế biến và tiêu thụ cá ngừ hàng năm đạt khoảng trên 200 nghìn tấn. Trong đó phế phụ phẩm thịt đỏ (thịt sẫm màu) cá ngừ chiếm từ 7 - 12%. Đây được xem là thành phần có giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế cao nhất [2]. Trong nhiều

năm qua, phụ phẩm thịt đỏ cá ngừ thường được dùng làm thức ăn chăn nuôi hoặc các sản phẩm giá trị thấp khác... Gần đây, việc thủy phân bằng enzyme để thu hồi protein từ phụ phẩm cá là một cách tiếp cận hiệu quả và đã được ứng dụng rộng rãi do tạo ra sản phẩm giá trị dinh dưỡng và hoạt tính sinh học cao.

Các nghiên cứu gần đây có xu hướng ứng dụng các công nghệ xử lý mới như: Siêu âm, trường điện xung và áp suất thủy tĩnh cao, để thu nhận các peptide có hoạt tính sinh học trong đó siêu âm là một công nghệ xử lý phi nhiệt được quan tâm nhiều nhất [3]. Sử dụng siêu âm như một bước tiền xử lý trước khi thủy phân bằng enzyme có thể tăng hiệu suất thu hồi và giảm thời gian, năng lượng. Tuy nhiên, các thông tin về hiệu quả hỗ trợ quá trình thủy phân phụ phẩm thịt đỏ cá ngừ để thu nhận peptide chống oxy hóa vẫn còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, tiến hành xác định điều kiện thủy phân phụ phẩm cá ngừ bằng enzyme và xác định khả năng kết hợp siêu âm với

thủy phân bằng enzyme để thu nhận được peptide mạch ngắn có hoạt tính chống oxy hóa.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Phụ phẩm vụn thịt trong quá trình chế biến cá ngừ của Công ty Carafood (Khánh Hòa). Phụ phẩm được rửa sạch, cắt nhỏ kích thước khoảng 1 × 1 cm, xay nhuyễn chia thành nhiều phần đều nhau cho mỗi lần thí nghiệm, bảo quản -20°C cho đến khi sử dụng.

Các enzyme sử dụng trong nghiên cứu là các enzyme thương mại Bromelain (10.000 UI/g), papain (50.000 UI/g), neutral protease (10.000 UI/g) (hãng Novozymes) mua từ Công ty Cổ phần Dược phẩm Novaco - Việt Nam. Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều đạt độ tinh sạch PA, có nguồn gốc từ Merck, Sigma Aldrich và Trung Quốc.

2.2. Thiết bị

Tủ ấm của hãng Memmert (Đức), máy khuấy từ gia nhiệt của hãng Cole Palmer (Mỹ), máy vortex (Mỹ), máy short spin của hãng Hermle (Mỹ), máy ly tâm lạnh của hãng Orto lresa (Tây Ban Nha), bể siêu âm Elma S100 H (Đức), máy quang phổ UV-VIS SHIMADZU UV-1900i (Nhật Bản).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Bố trí thí nghiệm

Bảng 1. Điều kiện khuyến cáo của các enzyme thương mại

Enzyme	pH	Nhiệt độ (°C)
Neutral protease	7,0	55
Bromelain	6,5	55
Papain	6,5	55

Cân 30 g thịt vụn, bổ sung nước với tỷ lệ 1: 1 (w: w). Bổ sung một trong các chế phẩm enzyme thương mại là papain, bromelain, neutral protease và tiến hành thủy phân với điều kiện nhiệt độ và pH được khuyến cáo cho mỗi enzyme (Bảng 1), tỷ lệ enzyme/cơ chất là 2% trong thời gian 2 giờ. Đun sôi hỗn hợp trong 10 phút để bất hoạt enzyme. Ly tâm hỗn hợp với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Sau ly tâm, sản phẩm được tách thành 3 lớp: Lớp lipid phía trên cùng, lớp dịch đậm thủy phân ở giữa và lớp rắn dưới đáy. Lọc phần dịch nổi qua giấy lọc thu phần dịch thủy phân để phân tích

các chỉ tiêu hàm lượng peptide và tỷ lệ quét gốc tự do DPPH. Enzyme cho kết quả tốt nhất sẽ được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Sau khi lựa chọn được enzyme; các yếu tố tỷ lệ enzyme/cơ chất, giá trị pH, nhiệt độ môi trường và thời gian thủy phân tiếp tục được khảo sát lựa chọn. Trong nghiên cứu này, các yếu tố được nghiên cứu bằng phương pháp đơn yếu tố. Cụ thể, các yếu tố được lần lượt khảo sát độc lập. Khi một yếu tố được khảo sát thì các yếu tố còn lại sẽ được cố định ở một mức đã được lựa chọn. Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần, kết quả thí nghiệm là trung bình của 3 lần thực nghiệm. Các yếu tố khảo sát gồm: pH môi trường (5, 6, 7, 8, 9); nhiệt độ (45, 50, 55, 60, 65°C). Tỷ lệ enzyme/cơ chất (0, 2, 3, 4, 5, 6,0% (w/w)), thời gian thủy phân (1, 2, 4, 6, 8 giờ). Ảnh hưởng của các yếu tố được đánh giá thông qua hàm lượng peptide và tỷ lệ quét gốc tự do DPPH.

Để đánh giá khả năng hỗ trợ quá trình thủy phân bằng enzyme của công đoạn siêu âm, so sánh hàm lượng peptide thu được và tỷ lệ quét gốc tự do DPPH gồm: (+) Mẫu siêu âm 1 giờ sau đó thủy phân bằng enzyme; (+) Mẫu siêu âm 1 giờ; (+) Mẫu thủy phân bằng enzyme. Hỗn hợp thu được ly tâm 6.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, lọc phần dịch nổi qua giấy lọc thu dịch trong. Siêu âm hỗn hợp bằng bể siêu âm tần số 37 kHz, công suất tối đa 600 W.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến hiệu suất thủy phân và hàm lượng peptide thu được. Thịt vụn sau khi bổ sung nước với tỷ lệ 1: 1, tiến hành siêu âm (1, 2, 3 giờ). Mẫu đối chứng là mẫu không siêu âm. Mẫu sau siêu âm được thủy phân enzyme theo điều kiện đã được lựa chọn, ly tâm với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, lọc phần dịch nổi qua giấy lọc thu dịch trong.

2.3.2. Phương pháp định lượng peptide bằng phương pháp OPA [1]

- Chuẩn bị dung dịch OPA: 50 ml dung dịch OPA gồm 25 ml sodium tetraborate 100 mM; 2,5 ml SDS 20% (w/w); 40 mg OPA (hòa tan trong 1 ml methanol); 100 µl β-mercaptoethanol và 21,4 ml nước cất.

- Pha loãng dịch thủy phân đến nồng độ thích hợp, lấy 50 µl dung dịch mẫu, bổ sung thêm 2 ml dung dịch OPA, trộn đều và để trong 2 phút. Đo

quang trong cuvet thạch anh ở bước sóng 340 nm. Hàm lượng được tính dựa trên đường chuẩn glycine.

- Dung đường chuẩn glycine: Pha dung dịch glycine ở các nồng độ khác nhau. Với mỗi dung dịch trên: lấy 50 µl cho vào ống nghiệm, thêm 2 ml

dung dịch OPA trộn đều và để yên trong 2 phút. Sau đó, đo giá trị OD trên máy so màu ở bước sóng 340 nm. Lấy số liệu trung bình của 3 ống nghiệm tại mỗi nồng độ đo để dựng đường chuẩn Glycine với trục hoành là nồng độ glycine tính theo µg/µl và trục tung là mật độ quang OD 340 nm.

Bảng 2. Mật độ quang OD 340 nm tại các nồng độ glycine

Nồng độ glycine	2,0	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0
OD 340 nm	0,163	0,326	0,636	0,94	1,305	1,57

Ghi chú: Phương trình đường chuẩn glycine: $y = 0,079x + 0,067$; $R^2 = 0,9989$.

2.3.3. Xác định hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân bằng 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Xác định hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân bằng DPPH thực hiện theo mô tả của Liu J và cs (2015) [4] có thay đổi cho phù hợp.

- Chuẩn bị dung dịch DPPH 62,5 µM: Cân 2,5 mg bột DPPH vào bình thủy tinh tối màu có nắp. Hòa tan DPPH bằng dung dịch methanol và định mức đến 100 ml bằng methanol.

- Pha loãng dịch thủy phân đến nồng độ thích hợp, cho 100 µl dịch thủy phân vào ống fancel 50 ml và sấy khô ở 90°C trong 30 phút. Thêm 0,1 ml methanol, lắc nhẹ trong 1 phút tại nhiệt độ phòng. Thêm 1,9 ml dung dịch DPPH, lắc đều, để yên trong 10 phút. Đo màu bằng máy so màu ở bước sóng 517 nm. Mẫu kiểm chứng gồm 0,1 ml methanol và 1,9 ml dung dịch DPPH. Lấy số liệu trung bình 3 lần tại cùng một nồng độ.

- Tính tỷ lệ quét gốc tự do DPPH theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ quét gốc DPPH} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100\% \quad (1)$$

Trong đó: A_{blank} là giá trị OD của mẫu kiểm chứng; A_{sample} là giá trị OD của mẫu cần đo.

2.3.4. Phương pháp xác định thành phần hóa học

- Độ ẩm: Được đánh giá bằng phương pháp sấy khô ở 105°C cho đến khi có khối lượng không đổi [5];

- Hàm lượng protein: Được xác định bằng phương pháp Kjeldahl [6];

- Hàm lượng lipid: Được xác định bằng phương pháp Soxhlet [5].

2.3.5. Xử lý số liệu

Số liệu thu thập được tính trung bình, độ lệch chuẩn sử dụng Microsoft Excel 2021. Sự khác biệt của các nhân tố giữa các nghiệm thức được phân tích bằng ANOVA hai nhân tố với mức ý nghĩa 95% và phép thử Duncan ($p < 0,05$) bằng chương trình Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 16.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần hóa học của phụ phẩm cá ngừ

Kết quả xác định một số thành phần hóa học của nguyên liệu phụ phẩm cá ngừ được thể hiện ở bảng 3 cho thấy, đây là một nguồn giàu protein thô với hàm lượng protein tổng số lên đến 29,21%; hàm lượng lipid và độ ẩm lần lượt là 0,74% và 68,45%. Như vậy, phụ phẩm cá ngừ là một nguồn thu protein tiềm năng.

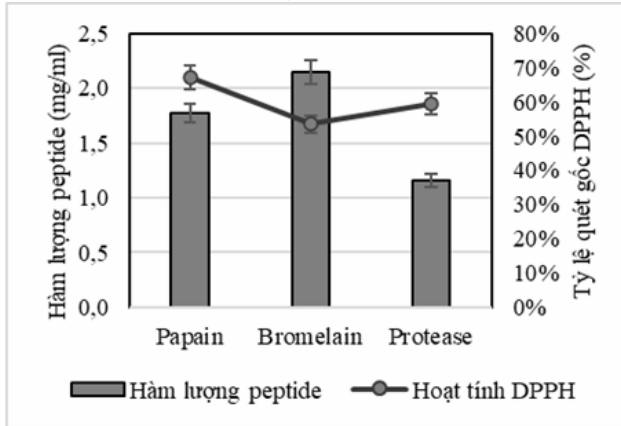
Bảng 3. Thành phần hóa học của phụ phẩm cá ngừ

Thành phần	Hàm lượng (%)
Độ ẩm	68,45
Hàm lượng protein tổng số	29,21
Hàm lượng lipid	0,74

3.2. Xác định điều kiện thủy phân phụ phẩm cá ngừ nhằm thu nhận peptide

Trong nghiên cứu này, phản ứng thủy phân phụ phẩm cá ngừ bằng enzyme sẽ được tiến hành trong các điều kiện khác nhau, đánh giá hiệu quả phản ứng thủy phân bằng cách định lượng hàm lượng peptide và khả năng bắt gốc tự do DPPH để lựa chọn điều kiện thích hợp nhất.

3.2.1. Lựa chọn enzyme

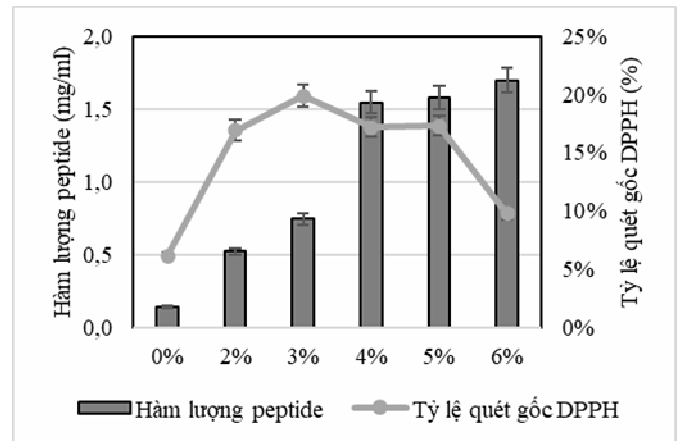


Hình 1. Lựa chọn enzyme thủy phân

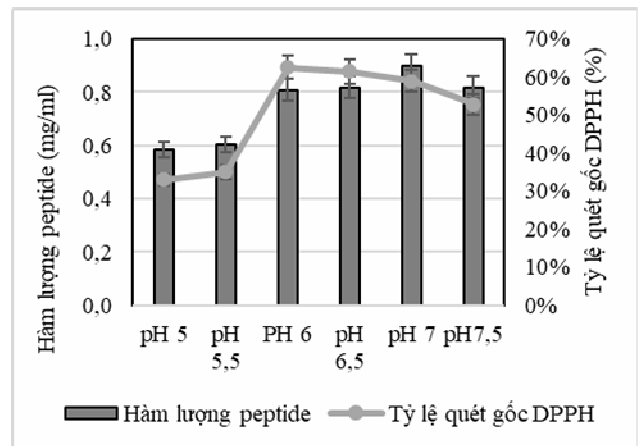
Tiến hành thủy phân phụ phẩm cá ngừ sau khi đã sơ chế với 3 loại chế phẩm enzyme thương mại. Kết quả ở hình 1 cho thấy, enzyme bromelain cho hàm lượng peptide thu được đạt cao nhất trong 3 enzyme khảo sát (2,14 mg/ml). Enzyme papain cho kết quả về hàm lượng peptide thu được cao thứ 2 (1,77 mg/ml), khác biệt không quá lớn so với bromelain. Tuy nhiên, tỷ lệ quét gốc tự do DPPH của papain lại tốt hơn bromelain (67,18% so với 53,46%). Papain thương mại là enzyme được tách chiết từ đu đủ (*Carica papaya* L.), là nguồn nguyên liệu truyền thống được sử dụng nhiều trong chế biến thực phẩm. Papain được ứng dụng để thủy phân nhiều loại phụ phẩm từ cá và cho thấy độ thủy phân cao. Nghiên cứu của Noman và cs (2020) đã thủy phân cá tầm Trung Quốc bằng papain cho độ thủy phân lên tới 20,62% [7].

Papain thuộc nhóm “cysteine endopeptidase”, chủ yếu tác động vào các liên kết peptide, phân cắt chuỗi protein từ bên trong nên dễ dàng tạo thành các đoạn peptide mạch ngắn. Papain ưu tiên phân cắt các liên kết peptide có liên quan đến các axit amin cơ bản, chẳng hạn như arginine hoặc lysine, có chuỗi bên kỵ nước lớn tại vị trí P2 [8]. Do đó, sản phẩm thủy phân của papain thể hiện nhiều hoạt tính sinh học như: Chống oxy hóa, kháng viêm, chống cholesterol... Kết quả thu được cho thấy, có sự tương đồng với kết quả nghiên cứu của Qiu và cs (2019) khi thủy phân gelatin từ vây cá ngừ vạch (*Katsuwonus pelamis*) bằng năm loại protease (pepsin, papain, trypsin, neutrase và alcalase). Sản phẩm thủy phân từ papain đã cho thấy, hoạt tính quét gốc hydroxide (HO.) là cao

nhất ($16,58 \pm 0,93$ %) [9]. Như vậy, enzyme papain được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ E/S



Hình 3. Ảnh hưởng của pH

3.2.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme: Cơ chất

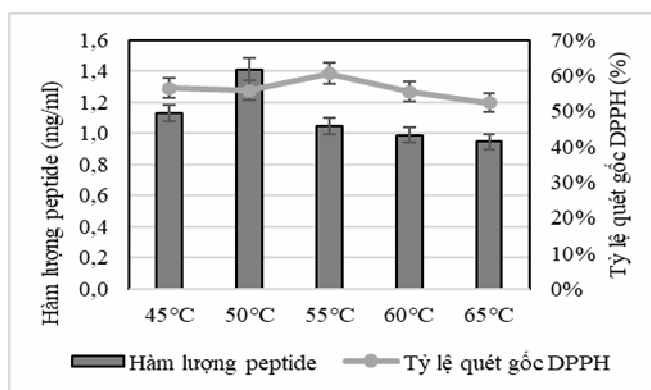
Hàm lượng peptide thu được và tỷ lệ quét gốc tự do DPPH của dịch thủy phân phụ phẩm thịt cá ngừ bằng enzyme papain với các tỷ lệ khác nhau được thể hiện ở hình 2. Giá trị của các chỉ tiêu hàm lượng peptide, tỷ lệ quét gốc tự do DPPH có xu hướng tăng khi nồng độ enzyme tăng lên. Tuy nhiên, khi tỷ lệ enzyme cao hơn 4% thì hàm lượng peptide thu được là 1,54 mg/ml và sau đó có xu hướng không tăng lên nữa, ở tỷ lệ 6% hàm lượng peptide thu được chỉ là 1,69 mg/ml. Đồng thời, hoạt tính quét gốc tự do DPPH cũng có xu hướng giảm dần sau khi đạt cao nhất ở tỷ lệ enzyme 3% (đạt 19,87%). Tỷ lệ enzyme/cơ chất càng lớn thì tốc độ thủy phân càng lớn do càng có nhiều enzyme được tiếp xúc với cơ chất, nhưng khi phản ứng thủy phân diễn ra quá mạnh, các peptide có hoạt tính sinh học có thể tiếp tục bị cắt nhỏ

thành các đoạn quá ngắn hoặc các axit amin tự do. Các phân tử này không giữ được cấu trúc cần thiết để tương tác hiệu quả với gốc tự do, dẫn đến suy giảm hoạt tính chống oxy hoá. Nồng độ enzyme cao có thể xảy ra hiện tượng cạnh tranh giữa các phân tử enzyme cho cùng một vị trí hoạt động trên cơ chất làm giảm đi hiệu quả xúc tác thực tế của mỗi enzyme. Do đó, tỷ lệ enzyme/cơ chất là 4% được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.3. Ảnh hưởng của pH môi trường đến hiệu quả phản ứng thủy phân

pH ảnh hưởng đến mức độ ion hóa cơ chất và độ bền của enzyme nên ảnh hưởng rất lớn đến khả

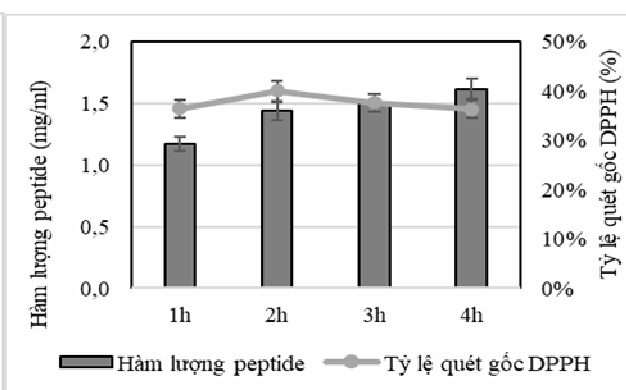
năng hoạt động của enzyme. Papain là enzyme có phạm vi pH hoạt động rộng (pH 3,0 - 9,0 tùy thuộc vào cơ chất, thường hoạt động tốt nhất trong khoảng 6,0 - 7,5) [8], có ứng dụng rộng rãi trong các quá trình chế biến thực phẩm. Trong nghiên cứu này, kết quả ảnh hưởng của pH đến phản ứng thủy phân phụ phẩm thịt vụn cá ngừ (Hình 3) cho thấy, tại pH 7,0 cho hàm lượng peptide thu được trong dịch thủy phân là cao nhất: 0,89 mg/ml. Hoạt tính chống oxy hóa tại pH 7,0 là 58,97%, thấp hơn không đáng kể với giá trị cao nhất đạt tại pH 6,0 (62,56%). Vì vậy, pH 7,0 với được sử dụng để thủy phân phụ phẩm cá ngừ.



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ

3.2.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến phản ứng thủy phân

Thông thường, khi nhiệt độ tăng sẽ làm tăng vận tốc của phản ứng và hoạt tính enzyme tăng theo, tuy nhiên đến nhiệt độ tới hạn sẽ làm biến tính protein, bất hoạt enzyme và phản ứng thủy phân bị ngừng lại. Trong nghiên cứu này, kết quả ở hình 4 cho thấy, tại 50°C, hàm lượng peptide thu được là cao nhất (1,41 mg/ml), trong khi hoạt tính chống oxy hóa thông qua khả năng quét gốc tự do DPPH cũng đạt mức tương đối cao (55,77%), chỉ thấp hơn một chút so với giá trị cao nhất tại 55°C (60,64%). Tuy nhiên, tại 55°C, hàm lượng peptide lại giảm hơn 30% so với giá trị tại 50°C (1,04 mg/ml so với 1,41 mg/ml), nguyên cơ enzyme bị mất hoạt tính có thể xảy ra khi kéo dài thời gian phản ứng hoặc tiến hành trên quy mô lớn. Do đó, để đảm bảo cả về hiệu suất thủy phân lẫn tính ổn định của quy trình, nhiệt độ 50°C được lựa chọn là điều kiện phù hợp cho các khảo sát tiếp theo.



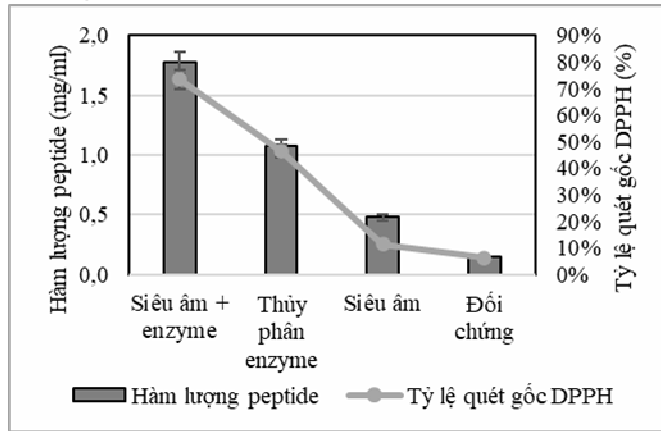
Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân

3.2.5. Ảnh hưởng của thời gian đến phản ứng thủy phân

Trong quá trình thủy phân các liên kết peptide kém bền sẽ được phân cắt trước với tốc độ nhanh hơn [10]. Mặt khác, ở giai đoạn sau của quá trình thủy phân, các sản phẩm sẽ cạnh tranh với cơ chất còn lại ở vị trí bám dính của protease, làm ức chế phản ứng thủy phân [11]. Kết quả là khi kéo dài thời gian phản ứng lượng sản phẩm mới tăng không nhiều.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến hiệu quả quá trình thủy phân (Hình 5) cho thấy, sau 4 giờ thủy phân lượng peptide tạo thành đạt cao nhất là 32,31 mg/ml, hoạt tính quét gốc tự do DPPH đạt 36,28%. Hoạt tính quét gốc DPPH đạt cao nhất tại thời điểm sau 2 giờ thủy phân (40,00%), hàm lượng peptide tạo thành đạt 28,75 mg/ml, thấp hơn so với sau 4 giờ thủy phân, nhưng sẽ tiết kiệm được thời gian và năng lượng. Do đó, lựa chọn thời gian thủy phân là 2 giờ. Kết

quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Yang và cs (2008) khi thủy phân phụ phẩm cá bớp (*Rachycentron canadum*) bằng enzyme để thu nhận gelatin [12].



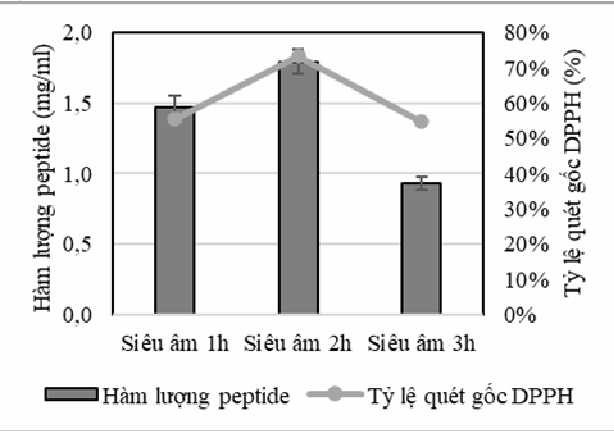
Hình 6. So sánh hiệu quả các quá trình tách chiết

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của siêu âm đến hiệu quả thu nhận peptide có hoạt tính sinh học

Hàm lượng peptide và tỷ lệ quét gốc tự do DPPH tăng đáng kể ở tất cả các mẫu được xử lý bằng siêu âm so với mẫu đối chứng (không bổ sung enzyme, không xử lý siêu âm) (Hình 6). Khi chỉ xử lý siêu âm, hàm lượng peptide đạt 0,48 mg/ml, hoạt tính quét gốc tự do DPPH đạt 11,28, thấp hơn khi so với mẫu được thủy phân enzyme (hàm lượng peptide 1,07 mg/ml và hoạt tính quét gốc DPPH 46,41%). Khi kết hợp siêu âm với thủy phân enzyme cho thấy hiệu quả được cải thiện rõ rệt khi tăng 39% hàm lượng peptide thu được, tăng 36% tỷ lệ quét gốc DPPH so với chỉ thủy phân bằng enzyme.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian siêu âm tới hiệu quả thủy phân trình bày ở hình 7. Phụ phẩm thịt vụn cá ngừ được siêu âm với công suất 600 W trong 1 giờ, 2 giờ và 3 giờ, sau đó bổ sung enzyme và thủy phân theo các điều kiện đã được lựa chọn cho thấy, khi thời gian siêu âm tăng từ 1 - 2 giờ thì hàm lượng peptide thu được tăng từ 1,47 - 1,80 mg/ml; hoạt tính quét gốc DPPH cũng tăng từ 55,38 - 73,46%. Tuy nhiên, khi siêu âm 3 giờ thì cả hàm lượng peptide lẫn hoạt tính quét gốc DPPH đều giảm (tương ứng 0,93 mg/ml và 54,74%). Hiện tượng này có thể là do thời gian siêu âm quá dài khiến các protein bị biến tính. Siêu âm tạo ra các

Như vậy, điều kiện thích hợp cho phản ứng thủy phân phụ phẩm cá ngừ bằng papain thương mại là 4% enzyme (w/w), tại 50°C, pH 7,0, trong 2 giờ.



Hình 7. Ảnh hưởng thời gian siêu âm

bong bóng khí, khi các bong bóng khí vỡ tạo ra nhiệt độ, áp suất cao và các gốc H^+ và OH^- tại vị trí đó trong khoảng thời gian ngắn. Protein có thể bị mất ổn định ở bề mặt pha không khí - chất lỏng, khiến các phản ứng oxy hóa nhiều gốc khác nhau trong protein, phản ứng chuỗi, phản ứng chéo và phản ứng phân hủy xảy ra [13]. Kết quả là lượng protein bị giảm xuống và hiệu suất thu hồi giảm. Như vậy, lựa chọn thời gian xử lý siêu âm trước khi thủy phân bằng enzyme là 2 giờ.

Kết quả này cũng tương đồng với hiệu quả hỗ trợ quá trình thủy phân cá thu Đại Tây Dương (*Scomber scombrus*) bằng sóng siêu âm công suất cao (450 W và 600 W) của Cropotova và cs (2024), làm tăng đáng kể hiệu quả thủy phân. Đồng thời, sản phẩm thu được thể hiện các hoạt tính như chống oxy hóa (DPPH, FRAP và ABTS) [3]. Tương tự, nghiên cứu của Lee và cs (2022) sử dụng siêu âm kết hợp thủy phân enzyme da cá Alaska (*Theragra chalcogramma*) để thu nhận collagen, cho sự hiệu quả của quá trình kết hợp này, từ đó cho thấy tiềm năng của ứng dụng công nghệ siêu âm để hỗ trợ thủy phân enzyme thu nhận hoạt chất sinh học từ thủy sản [14].

4. KẾT LUẬN

Phụ phẩm thịt đỏ cá ngừ có hàm lượng protein tổng số cao nên là một nguồn protein tiềm năng. Kết quả nghiên cứu đã xác định được điều kiện

thủy phân phụ phẩm cá ngừ để thu nhận peptide có hoạt tính chống oxy hóa như sau: Phụ phẩm thịt đỏ cá ngừ được thêm nước tỷ lệ 1: 1 (w: w), tiền xử lý bằng siêu âm công suất 600 W trong 2 giờ, sau đó tiến hành thủy phân bằng papain 4% ở pH 7,0; nhiệt độ 50°C trong 2 giờ. Dịch thủy phân thu được có hàm lượng peptide đạt 1,80 mg/ml và có hoạt tính chống oxy hóa đo qua khả năng quét gốc tự do DPPH là 73,46%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Minh Ngọc, Quản Lê Hà (2024). Khảo sát quy trình tách chiết peptide có hoạt tính chống oxy hóa từ đậu nành và bã đậu nành. *Tạp chí Y học Quân sự*, 372: 9 - 14.
2. Nguyễn Hồng Ngân, Nguyễn Thế Nguyên, Đinh Văn Hiện, Nguyễn Trọng Bách (2024). Ảnh hưởng của phụ gia đến sự thay đổi tính chất hóa lý thịt cá xay từ cơ thịt sẫm cá ngừ (*Thunnus Albacares*) theo thời gian bảo quản ở 0°C ± 1. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 59(3B): 142 - 148.
3. Cropotova J., Kvangarsnes K., Rustad T., Stangeland J., Roda G., Fanzaga M., Bartolomei M and Lammi C. (2024). Effect of ultrasound treatment on quality parameters and health promoting activity of fish protein hydrolysates extracted from side streams of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Front Nutr*, 11: 1446485. doi: 10.3389/fnut.2024.1446485.
4. Liu J., Jin Y., Lin S., Jones G.S and Chen F. (2015). Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. *Food Chem*, 175: 258 - 266.
5. Lê Thị Mùi (2009). *Giáo trình kiểm nghiệm và phân tích thực phẩm*. Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng.
6. Anal A. and Koirala S. (2018). *Protein quantification by kjeldahl and bradford assay methods*. School of Environment, Resources and Development Asian Institute of Technology.
7. Noman A., Ali A. H., AL - Bukhaiti W. Q., Mahdi A. A and Xia W. (2020). Structural and physicochemical characteristics of lyophilized Chinese sturgeon protein hydrolysates prepared by using two different enzymes. *J Food Sci*. 85(10): 3313 - 3322.
8. Tacias - Pascacio V. G., Castañeda - Valbuena D., Morellon - Sterling R., Tavano O., Berenguer-Murcia Á., Vela - Gutiérrez G., Rather I. A. and Fernandez - Lafuente R. (2021). Bioactive peptides from fisheries residues: A review of use of papain in proteolysis reactions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 184: 415 - 428.
9. Qiu Y. T., Wang Y. M., Yang X. R., Zhao Y. Q., Chi C. F and Wang B. (2019). Gelatin and antioxidant peptides from gelatin hydrolysate of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) Scales: Preparation, identification and activity evaluation. *Mar Drugs*, 17(10): 565. <https://doi.org/10.3390/md17100565>.
10. O'Meara G. and Munro P. (1984). Effects of reaction variables on the hydrolysis of lean beef tissue by alcalase. *Meat science*. 11(3): 227 - 238.
11. Adler - Nissen J. (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. *Elsevier applied science publishers*.
12. Yang J. I., Ho H. Y., Chu Y. J and Chow C. J. (2008). Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chemistry*. 110(1): 128 - 136.
13. Phạm Thị Thùy Dương, Nguyễn Đức Vạn Bửu, Vũ Thị Hương (2020). Ảnh hưởng của xử lý siêu âm tới quá trình thu nhận chế phẩm giàu protein trong bã nắm men bia. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 20(2): 131 - 141.
14. Lee J. E., Noh S. - K and Kim M. J. (2022). Effects of enzymatic - and ultrasound-assisted extraction on physicochemical and antioxidant properties of collagen hydrolysate fractions from alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) Skin. *Antioxidants*, 11(11): 2112.

**RESEARCH ON THE HYDROLYSIS PROCESS COMBINED WITH ULTRASOUND AND
ENZYMES TO ENHANCE THE EFFICIENCY OF OBTAINING ANTIOXIDANT
PEPTIDES FROM TUNA BYPRODUCTS**

**Nguyen Ha Trung¹, Nguyen Thi Tam Thu¹,
Pham Nguyen Tuan Kiet¹, Pham Kien Cuong¹, Chu Ky Son²**

¹ Institute of Materials, Biological and Environmental, Academy of Military Science and Technology

² School of Chemistry and Life sciences, Hanoi University of Science and Technology

Abstract

Tuna (*Thunnus* spp.) and the tuna family represent a significant food source that plays a crucial role in the food industry in Vietnam. The processing of tuna generates substantial amounts of by-products, specifically tunas' red muscles, which have been released into the environment. Hydrolyzed protein extract derived from tuna by-products serves as a source of bioactive peptides that can be applied in functional foods, pharmaceuticals and cosmetics. The objective of this study was to investigate the role of ultrasound in enhancing the hydrolysis efficiency and antioxidant activity of the hydrolysate obtained from tunas' red muscles. The optimal conditions for the hydrolysis process of tunas' red muscles protein were determined to be a pre - treatment using ultrasound at a power of 600 W for 2 hours, followed by hydrolysis with 4% papain at pH 7.0 and a temperature of 50°C for 2 hours. The resulting hydrolysate exhibited a peptide concentration of 1.80 mg/ml and demonstrated an antioxidant activity, as measured by its ability to scavenge DPPH free radicals, of 73.46%.

Keywords: *Tuna waste, hydrolysis, peptide antioxidant, ultrasound, papain.*

Ngày nhận bài: 25/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 10/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 28/7/2025

Ngày duyệt đăng: 18/8/2025

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG NANOCHITIN ĐỂ GIẢM MUỐI CHO SẢN PHẨM GIÒ LỤA

Nguyễn Thị Chà^{1,2}, Nguyễn Tiến Thành¹, Hồ Phú Hà^{1,*}

¹Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

²Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Kinh tế Kỹ thuật Công nghiệp

*Email: ha.hophu@hust.edu.vn

TÓM TẮT

Chitin là một polysaccharide có rất nhiều trong tự nhiên. Công nghệ chế biến thủy sản thuộc loài giáp xác như tôm, cua đã tạo ra phế thải là nguồn chitin rất lớn. Gần đây, đã có nhiều nghiên cứu về chế biến chitin thành nanochitin có khả năng ứng dụng nhiều hơn so với chitin gốc. Với một số đặc tính mới như độ hòa tan, có khả năng tích điện trong dung dịch, nanochitin có thể ứng dụng trong một số ngành như công nghệ thực phẩm, xử lý môi trường, y tế... Mục đích của nghiên cứu này là chứng minh khả năng ứng dụng nanochitin nhằm tăng cường vị mặn, giảm sử dụng muối ăn trong sản xuất thực phẩm. Nghiên cứu sử dụng nanochitin được tạo ra theo phương pháp thủy phân kết hợp siêu âm. Nanochitin có kích thước trung bình 248 nm. Kết quả cho thấy, với nồng độ 90 µg/ml nanochitin có tác dụng tăng cảm giác mặn cho dung dịch NaCl 0,65% và đạt vị mặn tương đương dung dịch NaCl 0,69%. Thử nghiệm trên sản phẩm giò lụa, với lượng nanochitin 0,123 g/kg thịt, có thể giảm được 0,54 g tương ứng 5,74% trong tổng lượng muối mà sản phẩm vẫn đạt vị mặn như mẫu đối chứng, các tính chất cảm quan khác không nhận thấy có thay đổi. Kết quả này mở ra hướng ứng dụng cho việc giảm tỷ lệ muối trong khẩu phần ăn của con người để khắc phục tình trạng ăn dư quá nhiều muối hiện nay.

Từ khóa: *Nanochitin, giảm muối, giò lụa.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chitin là một polysaccharide được tạo thành từ các đơn phân N - acetyl - D-glucosamine liên kết nhau bằng β -(1-4) glycoside. Chitin là thành phần chính của vỏ tôm, cua. Chitin không hòa tan trong nước nên rất ít được ứng dụng.

Gần đây có nhiều nghiên cứu tạo nanochitin từ chitin, sản phẩm có kích thước dưới 500 nm. Nanochitin có kích thước cỡ nanomet nên có độ hòa tan cao hơn chitin rất nhiều. Nó có khả năng tích điện dương nên có thể tương tác với ion âm như Cl⁻. Vì vậy, trong dung dịch NaCl, sự tương tác của nanochitin với Cl⁻ khiến độ linh động của ion Na⁺ tăng lên, do đó làm tăng cảm nhận vị mặn. Từ đó, nanochitin có thể được dùng như một chất làm tăng vị mặn [1 - 3].

Xã hội hiện đại với sự tiến bộ của khoa học công nghệ, năng suất cây trồng, vật nuôi tăng cao khiến cho nguồn thực phẩm dồi dào. Việc sử dụng lương thực nhiều cùng với khẩu vị quen thuộc đã khiến một bộ phận rất lớn người dân tiêu thụ quá

nhiều muối trong khẩu phần ăn, dẫn đến nhiều nguy cơ mắc bệnh tim mạch, huyết áp cao... Hiện trạng này đã được nghiên cứu, tổng kết và báo cáo ở nhiều quốc gia trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Lượng muối ăn trung bình của người Việt Nam là 9,4 g/ngày/người, gần gấp đôi mức khuyến cáo của WHO [4, 5].

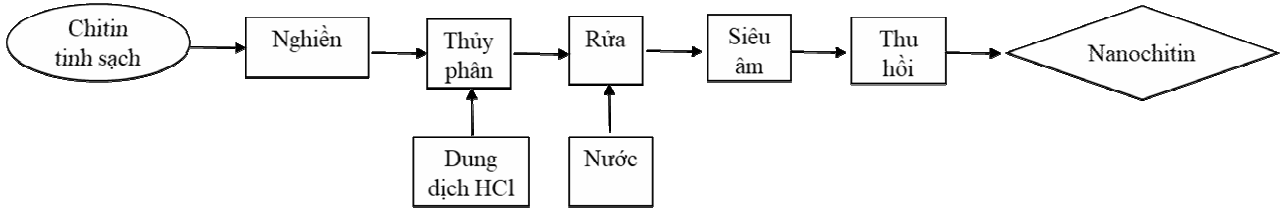
Việc giảm muối trong khẩu phần ăn sẽ làm thay đổi khẩu vị. Vì liên quan đến khẩu vị, thói quen nên việc giảm muối không thể thực hiện trong thời gian ngắn. Trong bối cảnh đó, việc tìm kiếm một “chất” thay thế, có tác dụng “đánh lừa” cảm giác, làm giảm lượng muối ăn hàng ngày sẽ có ý nghĩa rất lớn. Xét theo vai trò này thì nanochitin là sự lựa chọn phù hợp.

Với mong muốn sử dụng nanochitin để giảm muối cho thực phẩm, nghiên cứu đã khảo sát, đánh giá khả năng giảm muối của nanochitin trên sản phẩm giò lụa. Kết quả là cơ sở để áp dụng giảm muối cho một số loại thực phẩm khác, từng bước khắc phục tình trạng ăn quá nhiều muối, góp

phần phòng, tránh bệnh tật, nâng cao sức khỏe cộng đồng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu



Hình 1. Sơ đồ quy trình tạo nanochitin

Theo quy trình ở hình 1, chitin tinh sạch được nghiền thành bột đến kích thước yêu cầu. Phối trộn bột với dung dịch xúc tác HCl theo tỷ lệ, nồng độ của mẫu thí nghiệm rồi thực hiện quá trình thủy phân. Hỗn hợp sau thủy phân được làm sạch, loại bỏ dung môi và tiến hành siêu âm. Kết thúc siêu âm, tiến hành thu sản phẩm bằng phương pháp đông khô. Sản phẩm nanochitin thu được có kích thước trung bình 248 nm, độ hòa tan là 73,1%.

Các nguyên liệu thử nghiệm cho sản phẩm giò, gồm: Thịt nạc, mỡ phần, muối, nước mắm... sử dụng từ nguồn của nhà cung cấp theo tiêu chuẩn của cơ quan quản lý về thực phẩm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định ngưỡng cảm nhận tăng vị mặn của nanochitin

Để xác định ngưỡng cảm nhận tăng vị mặn, nghiên cứu lựa chọn dung dịch NaCl với nồng độ 0,65%, đây là nồng độ mong muốn giảm mặn cho đối tượng ăn mặn phổ biến. Mẫu thí nghiệm sẽ được bổ sung nanochitin với 3 nồng độ được lấy từ kết quả xác định thế zeta của dung dịch nanochitin ở mục 3.1.1 (80; 90; 110 $\mu\text{g/ml}$).

Các mẫu thí nghiệm và các mẫu đối chứng được chuẩn bị như sau:

H₀: Dung dịch NaCl 0,65%.

H₁: Dung dịch NaCl 0,65% + nanochitin 80 $\mu\text{g/ml}$.

H₂: Dung dịch NaCl 0,65% + nanochitin 90 $\mu\text{g/ml}$.

H₃: Dung dịch NaCl 0,65% + nanochitin 110 $\mu\text{g/ml}$.

Nanochitin dùng trong nghiên cứu được tạo ra từ chitin thu nhận từ tôm thẻ chân trắng theo quy trình sau:

Độ mặn được đánh giá theo phương pháp cảm quan bằng phép thử so hàng. Các điểm số được chuyển đổi, phân tích phương sai và so sánh.

2.2.2. Xác định mức độ tăng vị mặn cho dung dịch NaCl

Để xác định ngưỡng cảm nhận tăng vị mặn, nghiên cứu lựa chọn dung dịch NaCl với hai nồng độ 0,65% và 0,61%, đây là nồng độ mong muốn giảm mặn cho đối tượng ăn mặn và ăn hơi mặn. Mẫu thí nghiệm 0,65% sẽ được bổ sung nanochitin với nồng độ được lấy từ kết quả xác định ngưỡng cảm nhận tăng vị mặn của nanochitin ở mục 3.1.2 (90; 120 $\mu\text{g/ml}$); mẫu 0,61% NaCl, tính theo tỷ lệ tương ứng.

Các mẫu thí nghiệm và các mẫu đối chứng được chuẩn bị như sau:

Mẫu P₁: NaCl 0,61%.

Mẫu P₂: NaCl 0,65%.

Mẫu P₃: NaCl 0,69%.

Mẫu P₄: NaCl 0,65% + nanochitin 90 $\mu\text{g/ml}$.

Mẫu P₅: NaCl 0,65% + nanochitin 120 $\mu\text{g/ml}$.

Mẫu P₆: NaCl 0,61% + nanochitin 84 $\mu\text{g/ml}$.

Độ mặn được đánh giá theo phương pháp cảm quan bằng phép thử so hàng. Các điểm số được chuyển đổi, phân tích phương sai.

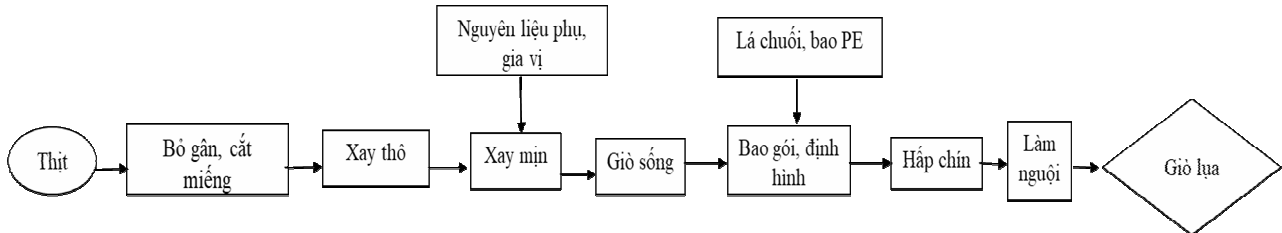
2.2.3. Nghiên cứu, ứng dụng giảm muối cho sản phẩm giò

Việc nghiên cứu giảm muối cho sản phẩm giò được thực hiện trên quy trình công nghệ của cơ sở sản xuất giò lụa truyền thống như sau: Theo hình 2, thịt nạc tươi được thái thành miếng, chuẩn bị khoảng 15% mỡ phần. Sau khi cắt miếng, thịt

được xay thô, sau đó bổ sung các loại nguyên liệu phụ, gia vị như nước mắm, muối... và tiến hành xay mịn. Kết thúc giai đoạn này, tất cả nguyên liệu được trộn đều, khối thịt nghiền trở nên nhuyễn, mịn, dẻo và gọi là giò sống. Định lượng giò sống theo yêu cầu, sau đó gói giò sống bằng lá chuối, túi PE để tạo khối hình trụ tròn có đường kính khoảng 12 x 13 cm. Tiến hành hấp chín khối giò ở nhiệt độ sôi

trong khoảng 50 - 60 phút rồi vớt ra, làm nguội thu sản phẩm giò lụa.

Mẫu thí nghiệm được giảm một phần muối NaCl và bổ sung nanochitin. Các mẫu thí nghiệm và mẫu đối chứng sẽ được đánh giá vị mặn và các tính chất khác bằng phương pháp cho điểm.



Hình 2. Sơ đồ quy trình sản xuất giò lụa

2.3. Các phương pháp phân tích

- Xác định kích thước bằng phương pháp nhiễu xạ laser [6].

- Xác định thế zeta bằng thiết bị Zetasize nano ZS90 [7].

- Đánh giá cảm quan: Các mẫu được thực hiện đánh giá bởi hội đồng chuyên gia, gồm 10 người, đã được huấn luyện và thường xuyên thực hiện các phép thử liên quan.

+ Đánh giá cảm quan bằng phép thử so hàng: Nguyên tắc của phương pháp này là sắp xếp người thử mẫu theo cường độ mặn từ nhạt nhất (vị trí số 1) đến mặn nhất (vị trí 4 hoặc 6 tùy vào số mẫu thí nghiệm). Kết quả thứ tự xếp hạng của các mẫu được chuyển sang điểm tương ứng theo phương pháp của Fisher và Yates (1942) thể hiện trong tài liệu của Hà Duyên Tư (2006) [8]. Phân tích phương sai, so sánh và đưa ra kết luận về mức độ mặn của các mẫu trong số mẫu thử [8].

+ Đánh giá cảm quan bằng phép thử cho điểm: Nguyên tắc của phương pháp này là người thử được

mời thử nếm và đánh giá cường độ tính chất cảm quan của sản phẩm thông qua điểm số tương ứng với thuật ngữ mô tả cường độ tính chất đã được quy định ở bảng 1.

Bảng 1. Thang điểm đánh giá cường độ vị mặn

Cường độ vị mặn	Điểm	Cường độ vị mặn	Điểm
Không có vị mặn	0	Mặn vừa ăn	3
Rất nhạt	1	Hơi mặn	4
Hơi nhạt	2	Rất mặn	5

Kết quả được phân tích phương sai, so sánh và đưa ra kết luận về tính chất cảm quan của mẫu thử [8].

+ Đánh giá cảm quan bằng phép thử cho điểm thị hiếu: Nguyên tắc của phương pháp là người thử được mời thử nếm các mẫu sản phẩm và đánh giá mức độ ưa thích, các tính chất cảm quan của sản phẩm bằng cách cho điểm tương ứng với thang điểm quy định trong bảng 2.

Bảng 2. Thang điểm đánh giá các tính chất màu sắc, hương vị và cấu trúc

Tính chất cảm quan	Điểm	Tính chất cảm quan	Điểm
Cực kỳ không thích	1	Tương đối thích	6
Rất không thích	2	Thích	7
Không thích	3	Rất thích	8
Tương đối không thích	4	Cực kỳ thích	9
Không thích cũng không ghét	5		

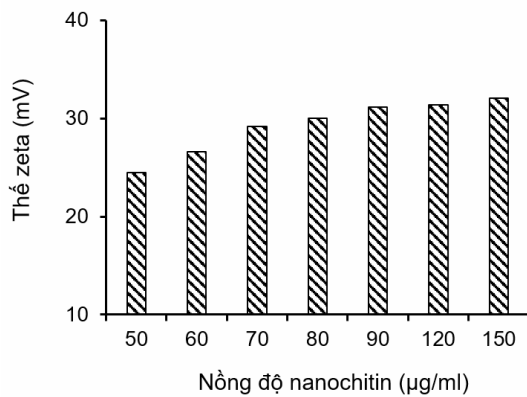
Kết quả được phân tích phương sai, so sánh và đưa ra kết luận về tính chất cảm quan của các mẫu thử [8].

- Phương pháp thống kê: Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu thí nghiệm được phân tích phương sai.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định thế zeta của dung dịch nanochitin

Trước hết, nghiên cứu xác định thế zeta của dung dịch nanochitin ở các nồng độ khác nhau. Kết quả được mô tả trong hình 3.

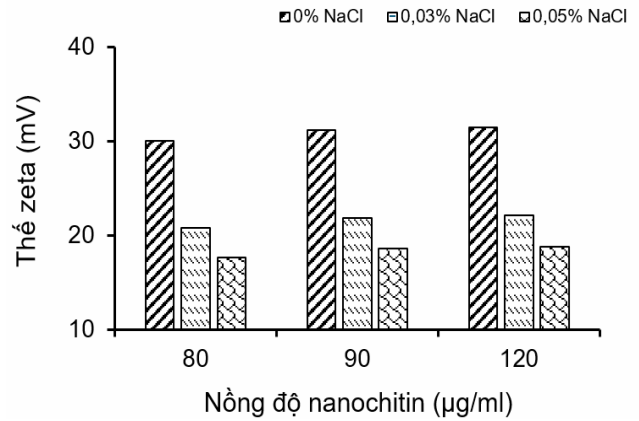


Hình 3. Thế zeta của các dung dịch nanochitin ở nồng độ khác nhau

Hình 3 cho thấy, thế zeta của dung dịch nanochitin tăng mạnh theo nồng độ từ 50 - 80 µg/mL. Từ 80 - 150 µg/mL, thế zeta đạt giá trị lớn và tăng rất ít. Điều này có thể giải thích, nanochitin khi tan trong nước, có khả năng tích điện dương. Khi nồng độ tăng, mật độ các nhóm chức tạo khả năng tích điện tăng nên thế zeta tăng. Tuy nhiên, khi tăng đến một mức nhất định, các nhóm chức này lại tương tác với một số nhóm chức ngược dấu, lúc này mật độ đã đủ lớn, nên thế zeta tăng rất chậm. Kết quả nồng độ từ 80 - 150 µg/mL phù hợp để chọn nghiên cứu sự thay đổi thế zeta khi NaCl thêm dung dịch nanochitin.

3.1.1. Xác định thế zeta của hỗn hợp dung dịch nanochitin - NaCl

Dung dịch NaCl với nồng độ khác nhau được thêm vào dung dịch nanochitin tinh khiết, rồi xác định thế zeta. Kết quả được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Thế zeta của hỗn hợp nanochitin và dung dịch muối ở các nồng độ khác nhau

Kết quả cho thấy, khi NaCl 0,03% được thêm vào dung dịch nanochitin, thế zeta của hỗn hợp giảm so với dung dịch nanochitin. Bổ sung NaCl với nồng độ lớn hơn (0,05%) thế zeta giảm nhiều hơn. Thế zeta giảm chứng tỏ rằng nanochitin đã tương tác với các ion âm. Ion âm này chính là Cl^- . Trong hỗn hợp dung dịch, việc Cl^- bị “thu hút” bởi nanochitin sẽ khiến Na^+ tự do hơn, linh động hơn. Trong khi đó, Na^+ lại đóng vai trò chính trong sự tạo cảm nhận vị mặn cho cơ quan vị giác. Vì thế, hỗn hợp này được dự báo có tiềm năng tăng vị mặn so với dung dịch NaCl gốc. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Jiang và cs (2017) [2], Wan - Chen Tsai và cs (2019) [9], theo đó, bổ sung NaCl có làm giảm thế zeta của nanochitin.

3.1.2. Xác định ngưỡng cảm nhận tăng vị mặn của nanochitin

Dung dịch NaCl 0,65% được sử dụng làm nền để bổ sung nanochitin với các nồng độ khác nhau, sau đó so sánh cảm nhận vị mặn giữa các mẫu. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Mức độ mặn của các mẫu

Mẫu	H_0	H_1	H_2	H_3
Trung bình	0,57 ^a	0,76 ^a	-0,67 ^b	-0,67 ^b

Ghi chú: H_0 : Dung dịch NaCl 0,65%; H_1 : Dung dịch NaCl 0,65% + nanochitin 80 µg/ml; H_2 : Dung dịch NaCl 0,65% + nanochitin 90 µg/ml; H_3 : Dung dịch NaCl 0,65% + nanochitin 110 µg/ml. Các mẫu có số mũ ký hiệu khác nhau biểu thị sự khác nhau có nghĩa ở mức $\alpha = 5\%$.

Bảng 3 cho thấy, mẫu H_0 , H_1 không khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 5\%$. Mẫu H_2 , H_3 không khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 5\%$. Mẫu H_2 , H_3 mặn hơn mẫu H_1 , H_0 . Kết quả cho thấy: Nanochitin ở nồng độ 80 $\mu\text{g/ml}$ chưa nhận thấy tác dụng tăng cường vị mặn cho dung dịch NaCl 0,65%. Với nồng độ nanochitin 90 $\mu\text{g/ml}$, tác dụng tăng cường vị mặn tương tự như tại nồng độ 110 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Jiang và cs (2017) [2], Hsueh và cs (2017) [10], Wan - Chen Tsai và cs (2019) [9], theo đó, nanochitin có khả năng tăng cường

độ mặn. Ở nồng độ 80 $\mu\text{g/ml}$, nanochitin tăng cường độ mặn cho dung dịch NaCl 0,3%.

3.1.3. Xác định mức độ tăng vị mặn cho dung dịch NaCl

Các mẫu thí nghiệm là dung dịch NaCl ở nồng độ khác nhau được bổ sung nanochitin được chuẩn bị như mô tả ở phần 2.2.2. Độ mặn được đánh giá theo phương pháp cảm quan bằng phép thử so hàng. Các điểm số được chuyển đổi, phân tích phương sai cho kết quả được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Mức độ mặn của các mẫu

Mẫu	P_1 (NaCl 0,61%)	P_2 (NaCl 0,65%)	P_3 (NaCl 0,69%)	P_4 (NaCl 0,65% + nanochitin 90 $\mu\text{g/ml}$)	P_5 (NaCl 0,65% + nanochitin 120 $\mu\text{g/ml}$)	P_6 (NaCl 0,61% + nanochitin 84 $\mu\text{g/ml}$)
Trung bình	1,27 ^c	0,48 ^c	-0,55 ^d	-0,69 ^d	-0,87 ^d	0,37 ^c

Ghi chú: Các mẫu có số mũ ký hiệu khác nhau biểu thị sự khác nhau có nghĩa ở mức $\alpha = 5\%$.

Bảng 4 cho thấy, mẫu P_1 là nhạt nhất, mẫu P_2 , P_6 không khác nhau ở mức có ý nghĩa. Mẫu P_3 , P_4 , P_5 không khác nhau ở mức có ý nghĩa. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, ở nồng độ 90 $\mu\text{g/ml}$, nanochitin tăng cường vị mặn cho dung dịch NaCl 0,65% lên mức tương đương với dung dịch NaCl 0,69%. Tăng nồng độ nanochitin lên 120 $\mu\text{g/mL}$ không làm tăng thêm cảm nhận vị mặn. Ở nồng độ 84 $\mu\text{g/mL}$, nanochitin tăng cường vị mặn của dung dịch NaCl 0,61% lên mức tương đương với dung dịch NaCl 0,65%. Nghiên cứu của Hsueh và cs (2017) [10], Wan - Chen Tsai và cs (2019) [9] đã xác định được ở nồng độ 80 $\mu\text{g/ml}$ nanochitin làm tăng vị mặn cho dung dịch muối NaCl 0,3%. Cùng với sự phù hợp đó, trong nghiên cứu đã xác định được khả năng tăng vị mặn của nanochitin ở nồng độ 0,65% NaCl. Đây là sự khác biệt rất có ý nghĩa về khả năng ứng dụng, do 0,65% NaCl là nồng độ phổ biến trong nhiều loại thực phẩm sử dụng hàng ngày của người dân... [11, 12]. Kết quả này được dùng làm cơ sở để tính

tỷ lệ thay thế NaCl trong thí nghiệm ứng dụng giảm muối tiếp theo cho giò lụa.

3.2. Ứng dụng giảm muối cho sản phẩm giò

Mẫu giò được chuẩn bị theo quy trình tại mục 2.2. Trong đó, mẫu thí nghiệm được giảm muối theo tỷ lệ dựa trên kết quả thí nghiệm 3.1.3, cụ thể như sau:

Mẫu I_0 : 3 g muối NaCl.

Mẫu I_1 : 2,46 g muối NaCl.

Mẫu I_2 : 2,46 g muối NaCl + 0,123 g nanochitin.

Các thành phần khác của cả 3 mẫu theo đúng đơn công nghệ.

Sản phẩm giò được đánh giá chất lượng bằng phương pháp cảm quan. Trong đó, vị mặn sử dụng phép thử cho điểm; tính chất màu sắc, hương vị, cấu trúc sử dụng phép thử cho điểm thị hiếu. Điểm cho tính chất vị mặn của các mẫu được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5. Điểm của các thành viên cho tính chất vị mặn của mẫu thí nghiệm

Thành viên	Mẫu I ₀ (3 g NaCl)	Mẫu I ₁ (2,46 g NaCl)	Mẫu I ₂ (2,46 g NaCl + 0,123 g nanochitin)	Tổng	Trung bình
1	4	3	4	11	3,67
2	3	2	3	8	2,67
3	3	2	2	7	2,33
4	4	3	4	11	3,67
5	3	2	3	8	2,67
6	3	2	3	8	2,67
7	3	2	2	7	2,33
8	4	3	4	11	3,67
9	3	2	3	8	2,67
10	3	2	3	8	2,67
Tổng	33	23	31	87	
Trung bình	3,30	2,30	3,10		

Bảng 6. Điểm trung bình cường độ vị mặn của các mẫu thí nghiệm

Mẫu	I ₀ (3 g NaCl)	I ₁ (2,46 g NaCl)	I ₂ (2,46 g NaCl + 0,123 g nanochitin)
Vị mặn	3,30 ^a	2,30 ^b	3,10 ^a

Điểm đánh giá của hội đồng cảm quan được phân tích phương sai và kết quả thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6 cho thấy, mẫu bổ sung 2,46 g muối có cường độ vị mặn kém hơn so với mẫu bổ sung 3 g NaCl. Khi bổ sung thêm 0,123 g nanochitin vào mẫu có 2,46 g muối, cảm nhận vị mặn đã tăng lên

rõ rệt, có điểm tương đương đối với mẫu chỉ có 3 g NaCl.

Điểm đánh giá của hội đồng cảm quan cho các tính chất màu sắc, hương vị và cấu trúc được thể hiện trong bảng 7, 8, 9.

Bảng 7. Điểm của các thành viên cho tính chất màu sắc của mẫu thí nghiệm

Thành viên	Mẫu I ₀ (3 g NaCl)	Mẫu I ₁ (2,46 g NaCl)	Mẫu I ₂ (2,46 g NaCl + 0,123 g nanochitin)	Tổng	Trung bình
1	7	7	7	21	7,00
2	7	7	7	21	7,00
3	6	7	6	19	6,33
4	6	6	6	18	6,00
5	8	8	8	24	8,00
6	7	8	8	23	7,67
7	7	7	7	21	7,00
8	8	7	7	22	7,33
9	7	7	7	21	7,00

Thành viên	Mẫu I ₀ (3 g NaCl)	Mẫu I ₁ (2,46 g NaCl)	Mẫu I ₂ (2,46 g NaCl + 0,123 g nanochitin)	Tổng	Trung bình
10	8	8	7	23	7,67
Tổng	71	72	70	213	
Trung bình	7,10	7,20	7,00		

Bảng 8. Điểm của các thành viên cho tính chất hương vị của mẫu thí nghiệm

Thành viên	Mẫu I ₀ (3 g NaCl)	Mẫu I ₁ (2,46 g NaCl)	Mẫu I ₂ (2,46 g NaCl + 0,123 g nanochitin)	Tổng	Trung bình
1	7	7	7	21	7,00
2	8	7	8	23	7,67
3	7	7	7	21	7,00
4	7	7	7	21	7,00
5	8	7	7	22	7,33
6	7	7	7	21	7,00
7	7	7	7	21	7,00
8	7	7	7	21	7,00
9	8	8	8	24	8,00
10	8	7	8	23	7,67
Tổng	74	71	73	218	
Trung bình	7,40	7,10	7,30		

Bảng 9. Điểm của các thành viên cho tính chất cấu trúc của mẫu thí nghiệm

Thành viên	Mẫu I ₀ (3 g NaCl)	Mẫu I ₁ (2,46 g NaCl)	Mẫu I ₂ (2,46 g NaCl + 0,123 g nanochitin)	Tổng	Trung bình
1	6	6	7	19	6,33
2	7	7	7	21	7,00
3	7	7	7	21	7,00
4	7	7	7	21	7,00
5	7	7	8	22	7,33
6	8	8	8	24	8,00
7	6	6	6	18	6,00
8	7	6	7	20	6,67
9	7	7	7	21	7,00
10	8	8	8	24	8,00
Tổng	70	69	72	211	
Trung bình	7,00	6,90	7,20		

Bảng 10. Điểm trung bình mức độ ưa thích các tính chất cảm quan của các mẫu thí nghiệm

Mẫu	I ₀ (3 g NaCl)	I ₁ (2,46 g NaCl)	I ₂ (2,46 g NaCl + 0,123 g nanochitin)
Màu sắc	7,10 ^c	7,20 ^c	7,00 ^c
Hương vị	7,40 ^d	7,10 ^d	7,30 ^d
Cấu trúc	7,00 ^g	6,90 ^g	7,20 ^g

Ghi chú: Các mẫu có số mũ ký hiệu khác nhau biểu thị sự khác nhau có nghĩa ở mức $\alpha = 5\%$.

Điểm đánh giá của hội đồng cảm quan được tổng hợp, phân tích phương sai và kết quả được thể hiện trong bảng 10.

Kết quả mô tả trong các bảng trên cho thấy: Bổ sung 0,123 g nanochitin (1,3% so với tổng lượng muối NaCl cần dùng cho 1 kg thịt) vào đơn công nghệ của sản phẩm giò (mẫu I₂), có thể giảm được 0,54 g (5,74% so với tổng lượng muối NaCl cần dùng cho 1 kg thịt) muối NaCl, sản phẩm vẫn cho vị mặn tương đương như mẫu đối chứng (mẫu I₀). Các tính chất cảm quan khác như: Màu sắc, hương vị, cấu trúc của mẫu thí nghiệm không thay đổi so với mẫu đối chứng. Kết quả thử nghiệm trên sản phẩm giò của Việt Nam cũng đã chứng minh tính khả thi của việc sử dụng nanochitin để giảm muối cho thực phẩm.

4. KẾT LUẬN

Sử dụng nanochitin tạo ra bằng phương pháp thủy phân kết hợp siêu âm, với kích thước trung bình 248 nm, độ hòa tan là 73,1%, đã tăng cảm giác mặn cho dung dịch NaCl 0,65% và đạt vị mặn tương đương dung dịch NaCl 0,69%. Thử nghiệm trên sản phẩm giò lụa với lượng nanochitin 0,123 g/kg thịt, có thể giảm được 0,54 g tương ứng 5,74% trong tổng lượng muối mà sản phẩm vẫn đạt vị mặn như mẫu đối chứng. Các tính chất cảm quan khác không nhận thấy có thay đổi. Kết quả này mở ra hướng ứng dụng giảm tỷ lệ muối trong các sản phẩm tương tự như surimi, xúc xích và các thực phẩm khác. Kết quả nghiên cứu cũng mở ra khả năng trở thành biện pháp hữu hiệu để cải thiện tình trạng ăn thừa muối trong cộng đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Azuma K., Ifuku S. (2016). Nanofibers based on chitin: A new functional food. *Pure Appl. Chem*, 88(6), 605 - 619.

2. Jiang W. J., Tsai M. L., Liu T. (2017). Chitin nanofiber as a promising candidate for improved salty taste. *LWT-Food Sci. Technol*, 75, 65 - 71.

3. Ngasotter S., Sampath L., Xavier K. M. (2022). Nanochitin: An update review on advances in preparation methods and food applications. *Carbohydr. Polym*, 119627.

4. Taylor C., Hoek A. C., Deltetto I., Peacock A., Ha D. T. P., Sieburg M., Hoang D., Trieu K., Cobb L. K., Jan S. (2021). The cost-effectiveness of government actions to reduce sodium intake through salt substitutes in Vietnam. *Arch. Public Health*, 79, 1 - 13.

5. WHO, Sodium reduction. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sodium-reduction>.

6. Naiu A. S., Berhimpon S., Montolalu R. I., Kawung N. J., Suptijah P. (2020). The effect of hcl-thermal pressure hydrolysis and high-speed destruction of chitin on particle size distribution and functional group of nano-chitin compound. *Curr Res Nutr Food Sci Jour*, 8(1), 197 - 205.

7. Tsai W. C., Wang S. T., Chang K. L. B., Tsai M. (2019). Enhancing saltiness perception using chitin nanomaterials. *Polymers*, 11(4).

8. Hà Duyên Tư (2006). *Kỹ thuật phân tích cảm quan*. Nxb Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

9. Wan-Chen Tsai, Shang-Ta Wang, Ke-Liang Bruce Chang, Min-Lang Tsai (2019). Enhancing saltiness perception using chitin nanomaterials. *Polymers*, 11(4), 719.

10. Hsueh C. Y., Tsai M. L., Liu T. (2017). Enhancing saltiness perception using chitin nanofibers when curing tilapia fillets. *LWT-Food Sci. Technol*, 86, 93 - 98.

11. Minh Nhật, Hồng Nhung (2024). Người Việt mê phở, ăn bao nhiêu là phù hợp. *Báo Dân trí*. <https://dantri.com.vn/suc-khoe/nguoi-viet-me-pho-an-bao-nhieu-la-phu-hop-20240815080344013.htm>. Ngày truy cập: 01/6/2025

12. D. Thu (2017). Ăn một bát phở, đủ muối cả ngày. *Báo Người lao động*. <https://nld.com.vn/suc-khoe/an-mot-bat-pho-du-muoi-ca-ngay-20171225203716059.htm>. Ngày truy cập: 01/6/2025.

APPLICATION OF NANOCHITIN IN SALT REDUCTION IN VIETNAMESE PORK SAUSAGE (GIO LUA)

Nguyen Thi Cha^{1, 2}, Nguyen Tien Thanh¹, Ho Phu Ha¹

¹School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology

²Faculty of Food Technology, University of Economics - Technology for Industries

Abstract

Chitin is a naturally abundant polysaccharide, primarily found in the exoskeletons of crustaceans such as shrimp and crabs. Processing these seafoods generates a large amount of waste, which serves as a rich source of chitin. In recent years, numerous studies have focused on converting chitin into nanochitin, which offers broader application potential than bulk chitin. With novel properties such as improved solubility and surface charge in solution, nanochitin can be applied in various fields, including food technology, environmental treatment, and medicine. This study presents the application of nanochitin for salt reduction in Vietnamese pork paste (gio lua). The nanochitin was prepared via acid hydrolysis combined with ultrasonication, yielding particles of an average size of 248 nm. At a concentration of 90 µg/mL, nanochitin enhanced the saltiness perception of a 0.65% NaCl solution to a level comparable with a 0.69% NaCl solution. When applied to gio lua at a dosage of 0.123 g of nanochitin per kilogram of meat, it enabled a reduction of 0.54 g of saltequivalent to 5.74% of total salt content - while maintaining equivalent saltiness perception and no detectable changes in other sensory attributes. These findings suggest a promising approach for reducing dietary salt intake, addressing the growing concern over excessive salt consumption in modern diets..

Keywords: *Nanochitin, salt reduction, Vietnamese pork sausage.*

Ngày nhận bài: 25/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 10/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 28/7/2025

Ngày duyệt đăng: 18/8/2025

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH LÊN MEN NƯỚC DỨA SỬ DỤNG KẾT HỢP NẤM MEN *SACCHAROMYCES* VÀ VI KHUẨN *KOMAGATAEIBACTER* NHẪM TẠO SẢN PHẨM ĐỒ UỐNG CÓ ĐỘ CỒN THẤP

Lê Tuấn¹, Lê Thị Ngọc Anh¹,

Trần Thị Thảo Nguyên¹, Nguyễn Chính Nghĩa^{1,*}

¹Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

* Email: ngheia.nguyenchinh@hust.edu.vn

TÓM TẮT

Hiện nay, sự gia tăng nhu cầu đối với các loại đồ uống có cồn thấp hoặc không cồn phản ánh xu hướng tiêu dùng hiện đại chú trọng sức khỏe và an toàn thực phẩm. Nghiên cứu này nhằm phát triển sản phẩm đồ uống lên men có độ cồn thấp từ giống dứa Queen, kết hợp nấm men (*Saccharomyces cerevisiae* CO - 16 và *Saccharomyces bayanus* FD - 3) và vi khuẩn axit axetic (*Komagataeibacter intermedius* K7). Sản phẩm lên men được đánh giá dựa trên các chỉ tiêu cơ lý, hóa lý (chỉ số pH, nồng độ chất khô hòa tan, hàm lượng axit, hàm lượng đường khử, hàm lượng đường tổng) và cảm quan của người dùng. Kết quả cho thấy, sự kết hợp *S. bayanus* và *K. intermedius* K7 mang lại sản phẩm lên men tốt nhất theo đánh giá cảm quan. Ngoài ra, quá trình lên men chính bằng nấm men và lên men phụ bằng vi khuẩn ở nhiệt độ 15°C trong 72 giờ đã tạo ra sản phẩm có nồng độ cồn 1,8 - 2,2% (v/v). Thông số này đáp ứng phân loại rượu nhẹ theo quy định tại Nghị định số 105/2017/NĐ-CP. Nghiên cứu này đã đề xuất thông số quá trình lên men tạo sản phẩm đồ uống độ cồn thấp từ nước dứa có chất lượng cảm quan cao, góp phần mở rộng tiềm năng ứng dụng trái cây nhiệt đới trong ngành đồ uống lên men.

Từ khóa: Dứa Queen, *Komagataeibacter intermedius* K7, *Saccharomyces bayanus* FD-3, đồ uống có độ cồn thấp, lên men đa chủng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dứa (*Ananascomosus* L. Merr., Bromeliaceae) là cây thân thảo lâu năm, quả chứa nhiều dưỡng chất có lợi cho sức khỏe như đường tự nhiên, vitamin C, mangan, một số hợp chất chống oxy hóa như: phenolic và flavonoid [1]. Đặc biệt, quả dứa còn chứa hàm lượng bromelain cao - là một protease có tác dụng hỗ trợ tiêu hóa, tạo ra phản ứng chống viêm và tăng cường hệ miễn dịch [2], [3]. Nhờ những đặc tính sinh học này, dứa không chỉ được sử dụng phổ biến dưới dạng quả tươi mà còn có tiềm năng lớn trong sản xuất các loại thực phẩm chức năng và đồ uống lên men tự nhiên. Theo số liệu từ FAO, sản lượng dứa tại Việt Nam đạt khoảng 705.460 tấn vào năm 2022, đứng thứ 12 trên thế giới [4]. Trong đó, giống dứa Queen chiếm tỷ lệ gần 90% tổng diện tích đất trồng dứa. Nhằm đa

dạng hóa các sản phẩm từ dứa, việc nghiên cứu cider từ dứa là một hướng đi phù hợp với xu thế.

Lên men kết hợp giữa nấm men và vi khuẩn là một quá trình sinh học được ứng dụng phổ biến trong sản xuất thực phẩm chức năng và đồ uống lên men. Một ví dụ điển hình là trà Kombucha - sản phẩm thu được từ quá trình lên men trà đường nhờ cộng sinh giữa vi khuẩn sinh axit axetic (AAB) và nấm men. Quá trình lên men cộng sinh tạo ra đa dạng các axit hữu cơ trong sản phẩm, đem lại các hoạt tính sinh học như giải độc gan, tăng cường miễn dịch và hỗ trợ điều hòa lipid máu. Theo Khanh và cs (2001) [5], chủng vi sinh vật *Komagataeibacter intermedius* K7 được phân lập từ Kombucha tại Việt Nam thể hiện khả năng sinh tổng hợp axit glucuronic cao, có tiềm năng ứng dụng lên men đồ uống.

Nghiên cứu này khảo sát quá trình lên men nước dừa tạo sản phẩm đồ uống có độ cồn thấp. Quá trình lên men được thực hiện với các chủng vi sinh vật gồm nấm men (*Saccharomyces cerevisiae* CO - 16, *Saccharomyces bayanus* FD - 3) và vi khuẩn sinh axit axetic (*Komagataeibacter intermedius* K7) nhằm tạo ra sản phẩm phù hợp với thị hiếu người tiêu dùng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Dứa Queen (*Ananas comosus* L. Merr.) thu mua tại chợ đầu mối phía Nam, thành phố Hà Nội, với khối lượng quả từ 500 - 900 g. Dứa nguyên liệu được đánh giá các chỉ tiêu cơ lý và hóa lý bao gồm: Tỷ lệ vỏ, chồi, thịt quả. Nước ép dứa được phân tích độ Bx, độ axit tổng số, hàm lượng đường tổng số và hàm lượng đường khử.

Các chủng nấm men thương mại *Saccharomyces cerevisiae* CO-16 và *Saccharomyces bayanus* FD - 3 (Fermentis, Pháp). Trong đó, *S. cerevisiae* có khoảng nhiệt độ lên men 17 - 35°C (tối ưu 20 - 27°C), pH tối ưu 4,5, tạo nhiều este thơm; *S. bayanus* hoạt động trong khoảng 15 - 32°C. Chủng vi khuẩn axetic *Komagataeibacter intermedius* K7 phân lập từ sản phẩm Kombucha [5]. Enzyme pectinase (ICFOOD Việt Nam) có hoạt lực 60.000 U/g, hoạt động tối ưu ở pH 4,5 và 40 - 50°C, được sử dụng để hỗ trợ quá trình thu dịch quả.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác các thông số của dịch quả lên men

Giá trị pH của dịch quả trong quá trình lên men được đánh giá bằng máy đo pH để bàn (HI 2211 pH/ORP Meter, Hanna Instruments). Độ axit của dịch dừa lên men được xác định bằng phương pháp chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1 N sử dụng chất chỉ thị phenolphthalein 1%. Hàm lượng đường khử được xác định bằng phương pháp dinitrosalicylic axit (DNS) với glucose là chất chuẩn [6]. Đối với chỉ tiêu đường tổng, mẫu được thủy phân bằng HCl để chuyển hóa các disaccharide và polysaccharide thành đường khử trước khi thực hiện phân tích đường khử bằng cùng phương pháp.

2.2.2. Xác định nồng độ cồn

Mẫu dịch lên men được cân chính xác và chưng cất bằng thiết bị chưng cất đơn giản. Nhiệt độ sôi ổn định của dịch cất được phân tích bằng thiết bị đo điểm sôi (Dujardin Salleron, CH Pháp). Dựa vào đồ thị nhiệt độ - thành phần của hỗn hợp ethanol - nước ở áp suất khí quyển, hàm lượng ethanol được xác định bằng cách đối chiếu nhiệt độ sôi với tỷ lệ ethanol tương ứng trong đồ thị.

2.2.3. Đánh giá cảm quan

Phương pháp đánh giá cảm quan được thực hiện theo phép thử cho điểm thị hiếu (hedonic test), nhằm xác định mức độ ưa thích của người tiêu dùng đối với các mẫu đồ uống lên men [7]. Trong nghiên cứu, hội đồng cảm quan gồm 60 người trong độ tuổi từ 20 - 23 được tuyển chọn để tham gia đánh giá. Các mẫu đồ uống được mã hóa ngẫu nhiên bằng ba chữ số.

2.2.4. Định lượng nấm men

Định lượng trực tiếp nấm men được thực hiện bằng phương pháp đếm tế bào dưới kính hiển vi quang học sử dụng buồng đếm hồng cầu (hemocytometer). Mẫu được pha loãng thích hợp, nhuộm bằng xanh methylen để phân biệt tế bào sống và chết. Kết quả được tính toán và quy đổi ra số tế bào/mL [8].

2.2.5. Thu hồi dịch quả

Giá trị pH của dịch quả được điều chỉnh về 4,5 bằng NaHCO_3 trước khi bổ sung enzyme pectinase. Các thông số khảo sát bao gồm với liều lượng enzyme (0 g/L; 0,2 g/L; 0,3 g/L; 0,4 g/L), thời gian thủy phân (30, 35, 40, 45, 50 phút). Quá trình thủy phân được thực hiện ở 40°C trong 30 phút. Hiệu suất thu hồi được xác định dựa trên tỷ lệ % khối lượng của dịch quả sau lọc so với khối lượng quả đã loại bỏ vỏ, chồi.

2.2.6. Lên men dịch quả

Thí nghiệm lên men dịch quả được thiết kế theo bảng 1 nhằm đánh giá ảnh hưởng của chủng nấm men, vi khuẩn và phương thức lên men đến hiệu quả và chất lượng sản phẩm nước dừa lên men. Các chỉ tiêu được đánh giá bao gồm: Hàm lượng đường tổng (g/L), hàm lượng đường khử (g/L), độ cồn (v/v) và hàm lượng axit tổng (g/L).

Bảng 1. Thiết kế thí nghiệm lên men dịch quả dưa

Mẫu	Chủng vi sinh vật	Phương thức lên men
M1	<i>S. cerecevi</i> es CO-16	Lên men đơn chủng, yếm khí
M2	<i>S. bayanes</i> FD-3	Lên men đơn chủng, yếm khí
M3	<i>S. cerecevi</i> es CO-16 và <i>K. intermedius</i> K7	Lên men đồng thời, vi hiếu khí
M4	<i>S. bayanes</i> FD-3 và <i>K. intermedius</i> K7	Lên men đồng thời, vi hiếu khí
M5	<i>S. cerecevi</i> es CO-16 và <i>K. intermedius</i> K7	Lên men chính yếm khí bằng nấm men, lên men phụ vi hiếu khí với vi khuẩn
M6	<i>S. bayanes</i> FD-3 và <i>K. intermedius</i> K7	Lên men chính yếm khí bằng nấm men, lên men phụ vi hiếu khí với vi khuẩn

Tất cả các mẫu thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện giống nhau về nền môi trường và mật độ vi sinh vật: Tổng chất khô hòa tan 16°Bx, hàm lượng đường tổng 157,59 g/L, đường khử 81,54 g/L, pH 4,5, axit tổng số (tính theo axit axetic) 1,68 g/L, nấm men bổ sung với mật độ 2×10^6 tế bào/mL và *K. intermedius* K7 mật độ tương đương 2×10^6 CFU/mL. Riêng với mẫu M5 và M6, sau 48 giờ lên men bằng nấm men, dịch lên men được ly tâm loại bỏ sinh khối nấm men và tiếp tục lên men hiếu khí với *K. intermedius* K7 trong 24 giờ kế tiếp. Các quá trình lên men diễn ra ở nhiệt độ phòng (25 - 30°C).

2.2.7. Khảo sát động học quá trình lên men ở nhiệt độ thấp

Sau khi lựa chọn được chủng giống và phương án lên men phù hợp nhất, quá trình lên men được tiến hành trong 72 giờ ở các điều kiện 15°C và 20°C với mật độ chủng như đã trình bày. Kết quả lên men được đánh giá qua các chỉ số đường khử, đường tổng, nồng độ axit tổng và cồn.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá chỉ tiêu cơ lý và hóa lý của nguyên liệu

Nguyên liệu dưa sử dụng trong thí nghiệm đều là những quả đạt chất lượng tốt, không có dấu hiệu dập nát hay hư hỏng, đảm bảo yêu cầu làm nguyên liệu đầu vào cho quá trình lên men. Kết quả đánh giá chỉ tiêu cơ lý cho thấy, tỷ lệ vỏ và chồi chiếm khoảng $25,2 \pm 0,05\%$, trong khi phần thịt quả chiếm $74,8 \pm 0,04\%$. Hiệu suất thu hồi dịch

quả tính theo khối lượng thịt quả đạt mức ổn định, dao động trong khoảng $\pm 0,1\%$. Những thông số này cho thấy nguyên liệu có chất lượng phù hợp, đảm bảo hiệu quả trong các bước xử lý và lên men tiếp theo.

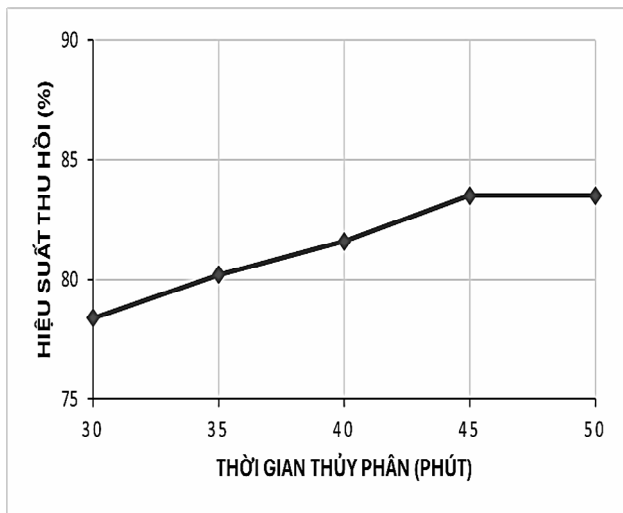
Dịch ép dưa Queen có độ Brix trung bình đạt $13,2 \pm 0,1^\circ\text{Bx}$, nằm trong khoảng lý tưởng 13 - 15°Bx, điều này thể hiện hàm lượng chất khô tổng số cao - đặc biệt là đường, rất thích hợp làm nguyên liệu cho quá trình lên men rượu. Phân tích thành phần hóa học cho thấy dịch ép có hàm lượng đường tổng đạt $126,14 \pm 0,64$ g/L, trong đó đường khử chiếm $85,25 \pm 0,86$ g/L. Bên cạnh đó, hàm lượng vitamin C tương đối cao, khoảng $65 \pm 0,2$ mg/L, góp phần nâng cao giá trị dinh dưỡng của sản phẩm sau lên men. Tuy nhiên, do đặc tính chung của các loại trái cây nhiệt đới như dưa, dịch ép có độ pH khá thấp ($3,29 \pm 0,05$) và hàm lượng axit tổng số ở mức cao ($4,6 \pm 0,12$ g/L, tính theo axit axetic), có thể dẫn đến vị chua gắt trong sản phẩm cuối nếu không được điều chỉnh phù hợp. Do đó, để cân bằng lại hương vị và đảm bảo điều kiện tối ưu cho quá trình lên men, dịch ép thường có thể sẽ được pha loãng bằng nước trước khi điều chỉnh lại hàm lượng đường mục tiêu.

3.2. Vai trò của pectinase trong thu hồi dịch quả

Kết quả cho thấy, hiệu suất thu hồi dịch quả tăng theo hàm lượng enzyme. Mẫu đối chứng không sử dụng enzyme cho hiệu suất thu hồi là 65,2%. Khi bổ sung 0,2 g/L enzyme, hiệu suất tăng nhẹ, do lượng enzyme còn thấp so với cơ chất. Ở

nồng độ 0,3 g/L, hiệu suất đạt 78,4%. Tuy nhiên, khi tăng lên 0,4 g/L, hiệu suất không tăng đáng kể, cho thấy enzyme đã đạt ngưỡng bão hòa với cơ chất. Do đó, nồng độ 0,3 g/L được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo vì đảm bảo cả hiệu quả thủy phân và tính kinh tế.

Tại nồng độ enzyme pectinase 0,3 g/L, hiệu quả thu hồi dịch quả theo thời gian thủy phân ở 40°C được trình bày trên hình 1. Kết quả cho thấy, hiệu suất thu hồi tăng từ 78,4% (30 phút) lên 83,5% (45 phút), nhưng không tiếp tục tăng khi kéo dài đến 50 phút. Điều này cho thấy phản ứng thủy phân đạt ngưỡng ổn định sau 45 phút, việc kéo dài thời gian thêm không mang lại hiệu quả rõ rệt. Vì vậy, điều kiện thu dịch quả tối ưu được xác định là 0,3 g/L enzyme pectinase và thời gian thủy phân 45 phút.



Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất thu hồi dịch quả

3.3. Lựa chọn chủng nấm men và phương thức lên men

3.3.1. Động học quá trình lên men

Chủng nấm men đóng vai trò then chốt trong quá trình lên men đồ uống có cồn, vì chúng chuyển hóa đường thành ethanol và các hợp chất phụ như: Este, aldehyde, rượu bậc cao - những chất này tạo nên hương vị và đặc tính cảm quan đặc trưng cho sản phẩm [9]. Do đó, việc lựa chọn chủng nấm men phù hợp là yếu tố quan trọng trong thiết kế sản phẩm. Các tiêu chí lựa chọn bao gồm: Tốc độ lên men nhanh nhưng ổn định, khả năng sử dụng đường hiệu quả để đạt độ cồn mong

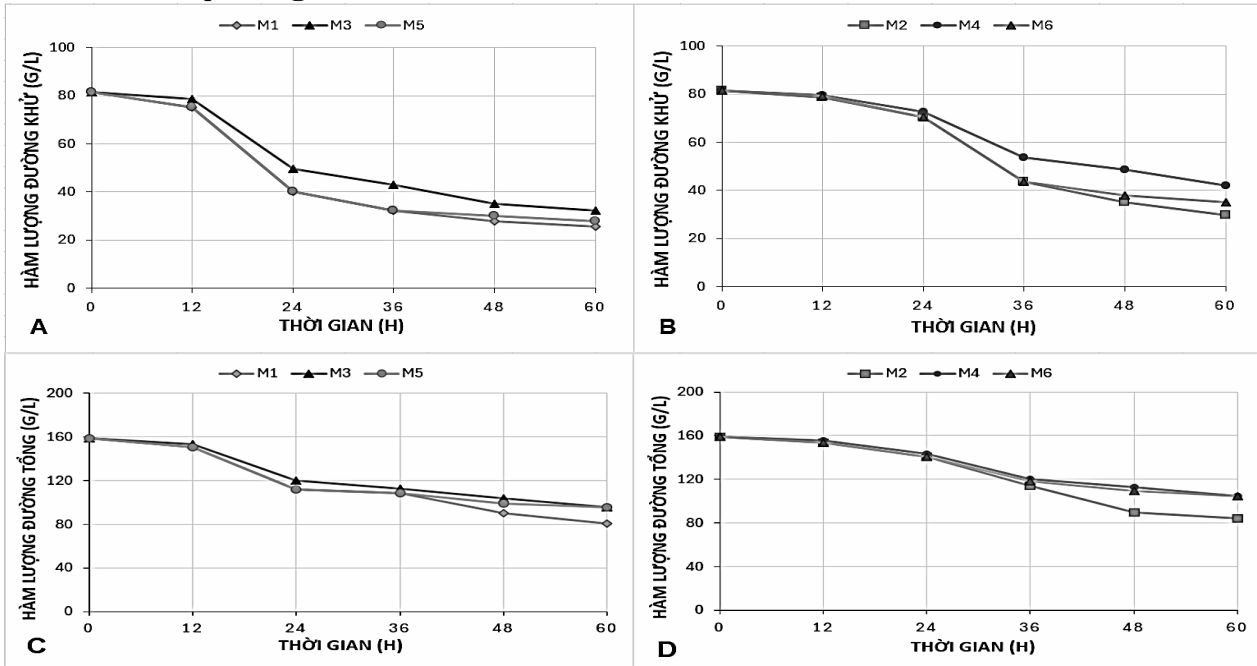
muốn, khả năng chịu axit (pH thấp), khả năng kết lắng tốt và đặc biệt là khả năng tạo ra các hợp chất hương thơm đặc trưng [10]. Trong nghiên cứu sản xuất nước dừa lên men với độ cồn thấp (2 - 3% v/v), chủng nấm men được lựa chọn không cần sinh nhiều cồn hay lên men quá nhanh, mà ưu tiên khả năng tạo hương tốt và tương thích với nền nguyên liệu. Ngoài ra, thứ tự bổ sung cũng ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển hệ vi sinh và hương vị cuối cùng của sản phẩm [11].

Hình 2A và 2B thể hiện sự thay đổi hàm lượng đường khử (g/L) của các mẫu trong quá trình lên men từ 0 - 60 giờ. Xu hướng chung của các mẫu lên men có chủng *S. cerevisiae* CO - 16 là hàm lượng đường khử giảm mạnh trong khoảng thời gian từ 12 - 24 giờ. Với các mẫu lên men có sử dụng chủng *S. bayanus* FD - 3, sự sụt giảm mạnh về hàm lượng đường khử được ghi nhận ở khoảng thời gian từ 24 - 36 giờ. Biến đổi hàm lượng đường tổng (Hình 2C và 2D) thể hiện xu hướng tương đồng với biến đổi hàm lượng đường khử. Mẫu M5 và M6 lên men hai giai đoạn cho thấy hiệu quả chuyển hóa đường vượt trội, với nồng độ đường khử chỉ còn 29,88 g/L (M5) và 35,07 g/L (M6) sau 60 giờ. Các mẫu chỉ lên men đơn chủng bằng nấm men (M1, M2) tiêu thụ đường tốt nhất, sau 60 giờ lên men chỉ còn lại lần lượt 25,62 g/L và 29,62 g/L đường khử. Kết quả này cho thấy, chủng vi khuẩn K7 không chỉ chuyển hóa cồn được sinh ra bởi nấm men thành các axit hữu cơ mà còn sử dụng cả đường khử trong dịch nước ép dừa là nguồn cơ chất.

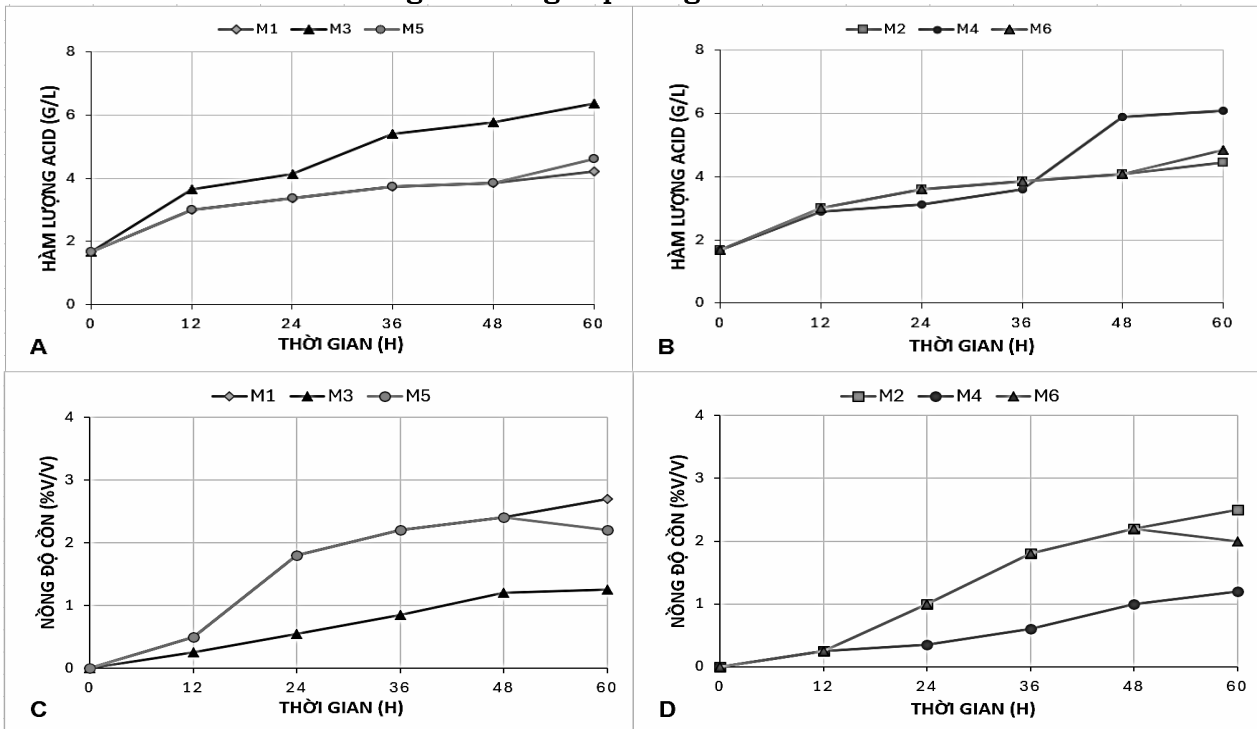
Các mẫu lên men cộng sinh (M3 và M4) có xu hướng tiêu thụ đường chậm nhất. Như vậy, có thể đặt ra giả thuyết giữa chủng K7 và CO - 16 có sự cạnh tranh dẫn đến giảm khả năng sử dụng cơ chất. Hình 3A thể hiện sự thay đổi hàm lượng axit tổng (g/L) trong quá trình lên men sử dụng *S. cerevisiae* CO - 16 theo các phương thức khác nhau. Mẫu M1 lên men đơn chủng *S. cerevisiae* CO - 16 cho giá trị hàm lượng axit tổng đạt xấp xỉ 4,2 g/L. Như vậy, chủng nấm men CO - 16 có khả năng sinh axit hữu cơ nhẹ, điều này có thể lý giải vì trong quá trình lên men, nấm men ngoài sử dụng đường tạo ra cồn, còn tạo ra các sản phẩm phụ khác như rượu bậc cao, axit hữu cơ [12]. Mẫu M5 lên men hai giai đoạn với *S. cerevisiae* CO - 16

và sau đó bổ sung *K. intermedius* K7 cho thấy, khả năng sinh axit vượt trội, với hàm lượng axit tăng liên tục từ 1,68 g/L (0 h) lên 4,6 g/L tại 60 giờ. Trong khi đó, mẫu M3 bổ sung đồng thời CO - 16 và K7 đạt 5,4 g/L sau 60 giờ. Kết quả phản ánh xu hướng hoạt động tốt hơn của chủng vi khuẩn K7 khi lên men nối tiếp chủng nấm men CO - 16. Hình

3B cho thấy, mẫu M4 lên men đồng thời *S. bayanus* FD - 3 và K7 cũng có xu hướng tích lũy axit cao nhất, đạt 6,08 g/L tại 60 giờ. Mẫu M6 lên men hai giai đoạn FD - 3 và K7 đạt 4,84 g/L, còn M2 (chỉ dùng FD - 3) là thấp nhất, với khoảng 4,44 g/L.



Hình 2. Biến đổi về hàm lượng đường khử (A, B) và đường tổng (C, D) trong quá trình lên men nước dừa bằng các chủng và phương thức khác nhau



Hình 3. Biến đổi hàm lượng axit tổng số (A, B) và nồng độ cồn (C, D) trong quá trình lên men nước dừa bằng các chủng khác nhau

Nồng độ axit trong các mẫu lên men đồng thời (M3 và M4) đều cao hơn so với mẫu lên men lần lượt nấm men - vi khuẩn (M5 và M6) trong khi kết quả phân tích cồn (Hình 3C và 3D) cho thấy, các mẫu lên men cộng sinh (M3 và M4) có giá trị hàm lượng cồn thấp hơn đáng kể so với các mẫu lên men lần lượt. Kết quả có thể được giải thích do cồn sinh ra bởi nấm men được vi khuẩn sử dụng và chuyển hóa thành axit axetic trong toàn bộ thời gian lên men dẫn đến giảm cồn và tăng tích lũy các axit hữu cơ. Mặt khác, cũng có thể tồn tại giải thuyết chủng vi khuẩn K7 cạnh tranh và lấn át chủng nấm men CO - 16 dẫn đến giảm khả năng sinh tổng hợp cồn của nấm men nhưng vẫn duy trì khả năng sinh tổng hợp axit tốt. Điều này cũng phù hợp với kết quả phân tích đường khử và đường tổng (Hình 2) cho thấy, mức độ tiêu thụ cơ chất kém nhất của các mẫu lên men đồng thời (M3 và M4). Trong các nghiên cứu tiếp theo, mật độ tế bào nấm men và mật độ CFU của vi khuẩn cần được phân tích chi tiết để khẳng định cơ chế lên men cộng sinh giữa 2 chủng.

Điều đáng lưu ý với các mẫu lên men lần lượt M5 và M6 là hàm lượng cồn thể hiện xu hướng giảm từ thời điểm 48 giờ là khi bắt đầu bổ sung vi khuẩn *K. intermedius* K7, đồng thời với xu hướng tăng nhẹ của hàm lượng axit hữu cơ. Như vậy, vi khuẩn đã chuyển hóa cồn thành axit theo đúng như mong đợi, giúp tạo sản phẩm có độ cồn thấp hơn. Dựa vào thời gian lên men phụ với vi khuẩn, có thể linh hoạt kiểm soát nồng độ cồn và axit trong sản phẩm lên men cuối cùng.

3.3.2. Đánh giá cảm quan sản phẩm

Về cảm quan, điểm màu sắc giữa các mẫu thể hiện sự khác biệt rõ rệt trong đó mẫu M3 và M4 được đánh giá thấp nhất với điểm trung bình chỉ đạt 2,86 và 2,85. Mẫu M6 được đánh giá điểm màu sắc cao nhất và cũng là mẫu nổi bật với điểm mùi cao nhất (6,0), nhờ hương thơm dứa đặc trưng, ít mùi rượu và mùi lên men. Trong khi đó, M3 và M4 có điểm mùi thấp do xuất hiện mùi chua gắt, đặc trưng của axit axetic. Về vị, mẫu M6 tiếp tục được đánh giá cao nhất (6,5) nhờ sự hài hòa giữa vị chua và ngọt.

Từ các kết quả phân tích hóa lý, vi sinh và cảm quan, có thể kết luận rằng *S. cerevisiae* không phù hợp trong lên men nước dứa để tạo sản phẩm có độ cồn thấp. Ngược lại, *S. bayanus* cho kết quả tối ưu hơn về cả nồng độ cồn và hương vị. Đặc biệt, khi kết hợp *S. bayanus* với *K. intermedius* theo phương pháp lên men tuần tự - lên men với *S. bayanus* trong 48 giờ, sau đó lọc bỏ nấm men và bổ sung *K. intermedius* để tiếp tục lên men trong 24 giờ - sản phẩm thu được có hương dứa thơm tự nhiên, vị chua ngọt hài hòa, ít đắng, ít mùi lên men, đáp ứng tốt tiêu chí chất lượng cảm quan. Như vậy, quy trình lên men phối hợp giữa nấm men *S. bayanus* FD - 3 và vi khuẩn *K. intermedius* K7 theo công thức M6 được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Kết quả đánh giá cảm quan các mẫu nước dứa lên men

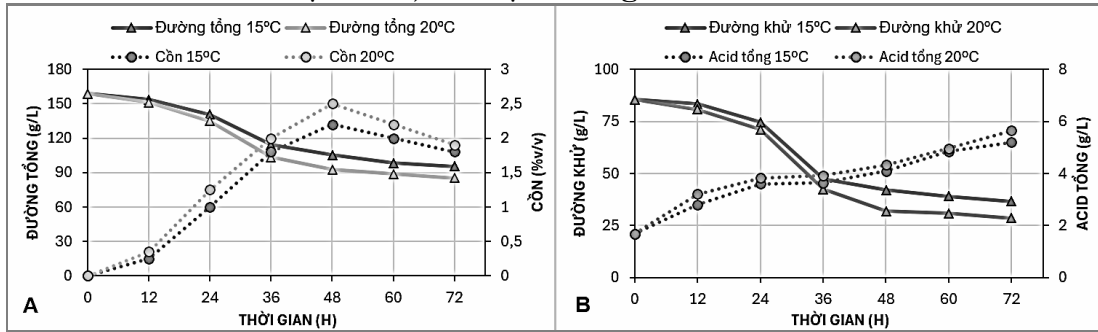
Mẫu	Màu sắc	Mùi	Vị
M1	4,42	3,00	3,14
M2	4,71	4,29	4,14
M3	2,86	2,29	3,71
M4	2,85	2,50	3,75
M5	5,75	5,00	6,25
M6	6,50	6,00	6,50

3.4. Khảo sát nhiệt độ lên men kết hợp *S. bayanus* FD - 3 và *K. intermedius* K7

Trong quá trình lên men, một số chủng nấm men có thể tổng hợp các hợp chất tạo mùi thơm và hương vị. Quá trình này có thể bị tác động bởi các yếu tố liên quan đến điều kiện lên men như nhiệt độ, pH, cơ chất,... Kết quả phân tích hàm lượng đường, hàm lượng axit tổng và độ cồn được trình bày trên hình 4. Ở cả hai nhiệt độ 15°C và 20°C, hàm lượng đường tổng và đường khử đều giảm mạnh hơn trong giai đoạn lên men chính bởi nấm men, giảm nhẹ trong giai đoạn lên men phụ với vi khuẩn. Nồng độ axit tổng có sự tăng đáng kể trong 1 ngày đầu lên men với chủng nấm men, sau đó chậm dần. Khi vi khuẩn được bổ sung tại thời điểm 48 giờ, nồng độ axit tổng số thể hiện xu hướng tăng trong khi nồng độ cồn giảm đáng kể. Sự giảm nồng độ cồn sau 48 giờ là phù hợp với hoạt động trao đổi chất chung của vi khuẩn thuộc loài *K. intermedius*, vốn có khả năng chuyển hóa cồn thành axit axetic và các axit hữu cơ khác trong

điều kiện hiếu khí (ref). Nhìn chung, quá trình lên men ở 20°C diễn ra nhanh và mạnh hơn, thể hiện

qua tốc độ tiêu hao đường cao hơn và nồng độ axit cũng như cồn cao hơn so với mẫu lên men ở 15°C.



Hình 4. Động học quá trình lên men kết hợp *S. bayanus* FD - 3 và *K. intermedius* K7 theo công thức M6 tại 15°C và 20°C

Trong quá trình lên men, kết quả cho thấy các mẫu đều duy trì ổn định pH quanh mốc 4,5 trong khoảng thời gian 12 - 24 giờ. Từ 24 giờ trở đi, pH bắt đầu xu hướng giảm phản ánh sự hình thành axit hữu cơ trong quá trình lên men. Kết thúc ở 72 giờ, pH đạt 3,56 ở 15°C và 3,54 ở 20°C là các giá trị phù hợp cho sản phẩm đồ uống lên men.

Bảng 3. Đánh giá cảm quan các mẫu nước dừa lên men ở nhiệt độ khác nhau

Mẫu	Màu sắc	Mùi	Vị
15°C	5,62	6,02	6,53
20°C	5,60	5,48	5,86

Kết quả đánh giá cảm quan các mẫu nước dừa lên men (Bảng 3) cho thấy, nhiệt độ lên men ảnh hưởng đáng kể đến chất lượng cảm quan của sản phẩm. Mẫu lên men ở 15°C đạt điểm cảm quan cao hơn ở tất cả các chỉ tiêu, đặc biệt là mùi (6,02) và vị (6,53), so với mẫu 20°C chỉ đạt lần lượt 5,48 và 5,86. Điều này cho thấy lên men ở nhiệt độ thấp giúp cải thiện hương vị và các tính chất cảm quan của sản phẩm. Điều này có thể được lý giải do sự tạo thành một hỗn hợp cân bằng hơn của các hợp chất bay hơi và axit hữu cơ ở điều kiện lên men nhiệt độ thấp [9].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đề xuất quy trình sản xuất đồ uống lên men độ cồn thấp từ nước ép dừa, kết hợp ứng dụng enzyme thủy phân pectin và vi sinh vật chọn lọc nhằm nâng cao hiệu quả công nghệ và chất lượng cảm quan sản phẩm. Qua khảo sát, nồng độ enzyme pectinase 0,3% trong thời gian xử lý 45 phút được xác định là tối ưu, giúp phá vỡ cấu trúc pectin trong nước ép, góp phần cải thiện độ trong, hỗ trợ quá trình lên men và nâng cao tính

ổn định của sản phẩm. Quy trình lên men được đề xuất sử dụng chủng *Saccharomyces bayanus* FD - 3 phối hợp với *Komagataeibacter intermedius* K7, thực hiện lên men ở nhiệt độ 15°C trong vòng 72 giờ. Đây là điều kiện phù hợp giúp tối ưu hóa quá trình chuyển hóa đường thành ethanol và các axit hữu cơ, đồng thời hạn chế sự phát sinh các hợp chất ảnh hưởng tiêu cực đến mùi vị và cảm quan. Sản phẩm sau lên men đạt các chỉ tiêu lý hóa phù hợp với định hướng phát triển đồ uống có độ cồn thấp: 1,8% (v/v) ethanol, độ Brix cuối 11°Bx, pH đạt 3,56 và tổng axit hữu cơ là 5,28 g/L. Đặc biệt, sản phẩm có độ trong cao, màu vàng sáng, giữ được hương thơm đặc trưng của dừa và đạt mức độ ưa thích cao trong đánh giá cảm quan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Q. V. Vuong, S. Hirun, P. D. Roach, M. C. Bowyer, P. A. Phillips and C. J. Scarlett (2013). Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of Carica papaya leaf aqueous extracts. *J Herb Med.* 3(3): 104 - 111. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2013.04.004>.
2. L. P. Hale, P. K. Greer, C. T. Trinh and C. L. James (2005). Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *Int Immunopharmacol.* 5(4): 783 - 793. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.12.007>.
3. K. Chobotova, A. B. Vernallis and F. A. A. Majid (Apr. 2010). Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Letters.* 290(2): 148 - 156. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.08.001>

4. FAO (2024). List of countries by pineapple production. "FAOSTAT". www.fao.org. Retrieved 27 March 2024.
5. T. Khanh Linh, N. Thu Trang, C. Xuan Bach, N. Truong Giang, T. Quoc Phong and L. Tuan (2021). Isolation and selection of acetic acid bacteria producing glucuronic acid from Kombucha. *Vietnam National Conference on Biotechnology*, Thai Nguyen: Thai Nguyen University Publisher, pp. 1013 - 1018.
6. G. L. Miller (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3): 426 - 428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
7. Stone & Sidel (2004). Sensory evaluation practices Third Edition. Elsevier Inc.
8. Chris. Boulton and David. Quain (2001). Brewing yeast and fermentation. Blackwell Science; Iowa State University Press.
9. G. H. Fleet (Sep.2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*. 86(1 - 2): 11- 22.
10. F. F. Bauer and I. S. Pretorius (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine - A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 21(1): 27 - 57. <https://doi.org/10.21548/21-1-3557>.
11. M. Ciani, F. Comitini, I. Mannazzu, and P. Domizio (Mar. 2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 21(1): 1-10. <https://doi.org/10.21548/21-1-3557>.
12. E. C. Udeagha, C. N. Ishiwu, C. U. Obiora, and J. O. Iwouno (2020). Effects of yeast concentration and total soluble solids on the quality of wine produced from pineapple. *Current Journal of Applied Science and Technology*. 39(30): 28 - 42. <https://doi.org/10.9734/cjast/2020/v39i3030968>.

RESEARCH ON FERMENTATION OF PINEAPPLE JUICE USING SACCHAROMYCES AND KOMAGATAEIBACTER STRAINS FOR LOW ALCOHOL BEVERAGE PRODUCTION

Le Tuan¹, Le Thi Ngoc Anh¹, Tran Thi Thao Nguyen¹, Nguyen Chinh Nghia¹

¹*School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology*

Abstract

Currently, the increase in demand for low – alcohol or non – alcoholic beverages reflects modern consumer trends towards food health and safety. This study aims to develop a low – alcohol fermented product from the Queen pineapple variety, combining yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CO-16 and *Saccharomyces bayanus* FD-3) and acetic acid bacteria (*Komagataeibacter intermedius* K7). The fermented juice was evaluated based on physiological, physicochemical indicators (pH index, dissolved dry matter concentration, total acid content, reduced and total sugar content) and hedonic test. The result showed that the combination of *S. bayanus* FD-3 and *K. intermedius* K7 provided the best fermented product according to sensorial criteria. It was also concluded that main fermentation using yeast then secondary fermentation by bacteria at 15°C for 72 hours has produced the juice having 1.8 to 2.2 % (v/v) of alcohol. This fulfill the classification of light liquor according to the provisions of Decree No. 105/2017/ND-CP of the Government of Vietnam and user senses, contributing to expanding the potential for tropical fruit application in the fermented beverage industry.

Keyword: *Queen pineapple, Komagataeibacter intermedius K7, Saccharomyces bayanus FD-3, low alcohol beverage, mixed culture fermentation.*

Ngày nhận bài: 25/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 10/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 28/7/2025

Ngày duyệt đăng: 8/8/2025

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ TÁC NHÂN ĐẾN CHẤT LƯỢNG CỦA ĐẬU PHỤ

Lương Hồng Nga^{1*}, Lê Thị Nguyệt¹, Nguyễn Quang Đức²,
Phạm Thị Quỳnh¹, Phùng Thị Thủy¹, Phùng Thị Anh Minh¹, Vũ Hồng Sơn¹

¹Đại học Bách khoa Hà Nội

²Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch

*Email: nga.luonghong@hust.edu.vn

TÓM TẮT

Đậu phụ là thức ăn hàng ngày của người Việt Nam và trên thế giới. Ngày nay, đậu phụ càng trở nên phổ biến do có hương vị và các thành phần dinh dưỡng mà đậu phụ mang lại. Đậu phụ được làm bằng cách đông tụ protein của đậu nành, giá thành phải chăng với người tiêu dùng hiện nay. Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu ảnh hưởng của tác nhân đông tụ ảnh hưởng đến chất lượng đậu phụ, trong đó nhiều nhất là 6 tác nhân đơn lẻ và một số nghiên cứu về tác nhân kết hợp. Trong nghiên cứu này lựa chọn 12 tác nhân và hỗn hợp: MgSO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{MgCl}_2 + \text{a. lactic}$, $\text{MgCl}_2 + \text{a. axetic}$, $\text{MgCl}_2 + \text{GDL}$, $\text{MgSO}_4 + \text{a. lactic}$, $\text{MgSO}_4 + \text{a. axetic}$, $\text{MgSO}_4 + \text{GDL}$, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{a. lactic}$, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{a. axetic}$, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{GDL}$ dựa trên các chỉ tiêu độ cứng, độ kết dính, độ đàn hồi, độ dẻo, độ dai và khả năng giữ nước, từ đó chọn được tác nhân cho sản phẩm đậu có chất lượng tốt nhất. Muối $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ cho đậu phụ có cấu trúc và hương vị ngon nhất.

Từ khóa: Đậu phụ, tác nhân đông tụ, độ cứng, độ co kết, độ nhai.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu phụ có nguồn gốc từ Trung Quốc, là sản phẩm được sản xuất từ đậu nành, một sản phẩm quen thuộc đối với các nước Đông Nam Á, như: Việt Nam, Trung Quốc, Nhật Bản. Hiện nay, đậu phụ ngày càng được ưa chuộng, trở thành món ăn phổ biến trong bữa ăn hàng ngày vì giá thành rẻ và giá trị dinh dưỡng cao. Trong đậu phụ, hàm lượng protein chiếm 8 - 10% tổng số, lipid chiếm 4 - 5%, ngoài ra còn chứa 8 loại axit amin, khoáng chất và các hoạt chất chống oxy hóa như isoflavon, lecithin... có lợi cho sức khỏe con người và giúp trẻ hóa làn da. Đậu phụ là món ăn có thể giúp phòng chống xơ vữa động mạch, thường được làm món ăn chay...

Theo Qiao và cs (2010) [1], trong quy trình làm đậu phụ, đông tụ protein luôn được coi là giai đoạn quan trọng nhất, vì nó có ảnh hưởng lớn tới chất lượng và hiệu suất thu hồi đậu phụ. Tác nhân đông tụ là các chất có khả năng đông tụ protein đậu nành để tạo gel hoặc làm đông tụ đậu nành.

Mục đích của quá trình đông tụ là kết tủa protein và lipid trong sữa đậu tương tạo ra mạng lưới hình thành đậu phụ. Quá trình đông tụ được thực hiện bằng nhiều tác nhân đông tụ khác nhau, các tác nhân được thêm vào trong khi khuấy dịch sữa đậu ở nhiệt độ cao từ 70 - 90°C [2]. Hai nhóm tác nhân thường được sử dụng đông tụ đậu phụ gồm:

Kim loại kiềm thổ (CaSO_4 , CaCl_2) và các axit hữu cơ (Axit axetic, axit lactic, hay glucono-delta-lactone (GDL)). Các ion kim loại kiềm thổ khi sử dụng làm tác nhân đông tụ cho hiệu suất thu hồi cao nên thường được dùng để sản xuất đậu phụ theo quy mô công nghiệp. Glucono-delta-lactone là tác nhân đông tụ được sử dụng nhiều ở Nhật Bản tạo ra đậu phụ có cấu trúc rất mềm mịn. Tuy nhiên, ở Indonesia, đậu phụ được sản xuất bởi axit axetic. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu so sánh sự khác biệt chất lượng đậu phụ bằng các tác nhân khác nhau như: Nghiên cứu của Wang và cs (2018) [3] so sánh MgCl_2 , MgSO_4 , CaSO_4 ; Zheng và cs (2020) [4] so sánh canxi sunfat, magie

clorua; Yanti và cs (2022) [5] so sánh GDL và nigari; Yiqiang và cs (2021) [6] so sánh $MgCl_2$, $CaSO_4$, axit lactic, axit axetic, GDL và fermented soy whey (FSW)... Tuy nhiên, các nghiên cứu trên chỉ tập trung vào tác nhân đơn lẻ hoặc một số sự kết hợp, nhiều nhất là 6 tác nhân [6]. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này nhằm so sánh 12 tác nhân và hỗn hợp tác nhân để tìm tác nhân có thể tạo ra đậu phụ ngon, nhằm thay thế tác nhân nước chua đang được sử dụng phổ biến để sản xuất đậu phụ tại các cơ sở sản xuất ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Đậu tương được cung cấp từ Công ty TNHH Phú Đạt, phường Trần Hưng Đạo, tỉnh Hưng Yên. Giống đậu tương với tên giao dịch là BT 84 được canh tác và nhập khẩu trực tiếp từ Canada.

2.2. Phương pháp sản xuất đậu phụ

Nguyên liệu đậu được ngâm trong nhiệt độ ở 20 - 25°C trong 6 - 8 giờ, với tỉ lệ nước: đậu = 1: 2,5. Sau đó, mang đậu đi nghiền với tỉ lệ nước: đậu = 6/1. Tiếp tục lọc loại bã và gia nhiệt đến 85°C và giữ trong 5 phút. Dịch sữa đậu nành sau gia nhiệt được đông tụ bằng tác nhân đông tụ ($MgSO_4$, $Mg(CH_3COO)_2$, $MgCl_2$ + a. lactic, $MgCl_2$ + a. axetic, $MgCl_2$ + GDL, $MgSO_4$ + a. lactic, $MgSO_4$ + a. lactic, $MgSO_4$ + a. axetic, $MgSO_4$ + GDL, $Mg(CH_3COO)_2$ + a. lactic, $Mg(CH_3COO)_2$ + a. axetic, $Mg(CH_3COO)_2$ + GDL) với cùng tỷ lệ 0,3 g/ml ở nhiệt độ 85°C. Kết tủa được để ổn định trong 5 phút, sau đó được gạn bớt nước và tiếp theo đổ vào khuôn và ép khuôn với kích thước khuôn là 30 x 4 x 4 cm, lực ép 6 kg trong 10 phút [7, 8].

2.3. Phương pháp xác định khả năng giữ nước của đậu phụ [3]

Phương pháp ly tâm được sử dụng để đánh giá khả năng giữ nước của đậu phụ. Dựa trên việc sử dụng lực ly tâm để tách nước ra khỏi đậu phụ, từ đó đánh giá được lượng nước trong đậu phụ. Chuẩn bị mẫu đậu phụ được cắt thành những miếng đồng đều. Sau đó cân từ 5 - 7 g đậu phụ mang đi ly tâm với tốc độ 3.500 vòng/phút trong 15 phút. Sau khi ly tâm, thấm nước bằng giấy hoặc vải rồi cân lại lượng đậu để xác định khối lượng cuối cùng.

Khả năng giữ nước của đậu phụ = $\frac{w_2}{w_1} \times 100\%$ (g nước/g protein).

Trong đó: w_1 là lượng nước còn lại của mẫu đậu phụ (g); w_2 là tổng lượng nước trong đậu phụ (g).

2.4. Phương pháp xác định đặc tính cơ lý của đậu phụ [3]

Phương pháp đo cấu trúc của đậu phụ là phương pháp TPA (Texture Profile Analysis), sử dụng máy đo cấu trúc TA.TXPlus với đầu đo P/100 theo Wang và cs (2018) [3] và Nguyễn Quang Đức (2022) [9]. Kích thước miếng đậu: 20 x 20 x 20 mm, độ nén: 75%, tốc độ đầu nén: 1,67 mm/s, từ đó đánh giá nhiều thuộc tính cấu trúc của đậu phụ như: Độ cứng (N), độ cố kết, độ đàn hồi, độ dẻo (N.mm/mm), độ nhai (N). Các phép đo được lặp lại 8 lần trên tất cả các mẫu.

2.5. Phương pháp cảm quan

Xác định mức độ ưa thích với các chỉ tiêu của đậu phụ bằng phép thử thị hiếu theo Hà Duyên Tư (2010) [10], Yanti và cs (2022) [5]. Nguyên tắc của phép thử này là người thử sẽ được thử nếm sản phẩm, sau đó đánh giá mức độ ưa thích về một tính chất cảm quan bằng thang điểm mô tả cấp độ ưa thích: 1. Cực kì không thích, 2. Rất không thích, 3. Không thích, 4. Tương đối không thích, 5. Không thích cũng không ghét, 6. Tương đối thích, 7. Thích, 8. Rất thích, 9. Cực kì thích.

2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Sự khác biệt đáng kể của tất cả dữ liệu thực nghiệm được đánh giá bằng phần mềm SPSS 22.0 trên phân tích phương sai (ANOVA) với kiểm định bội số Duncan ($p < 0,05$).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

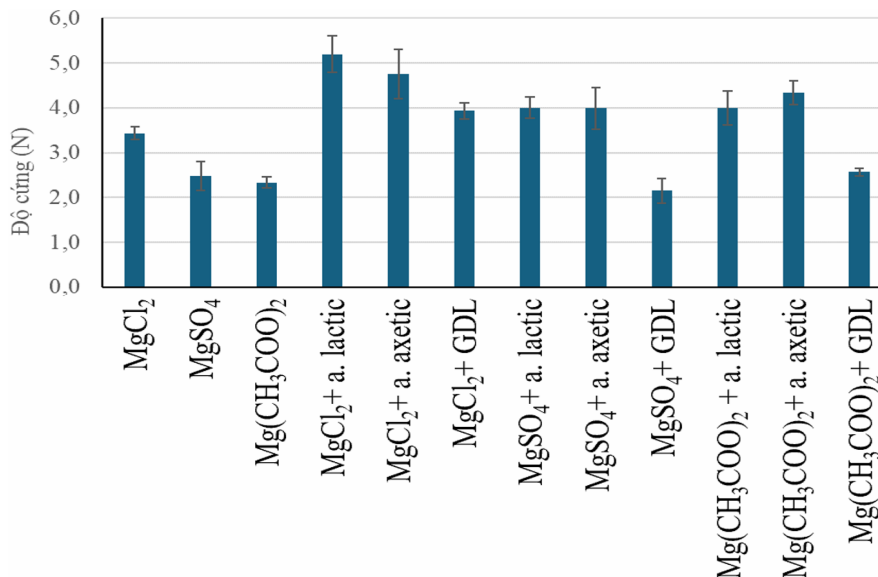
3.1. Ảnh hưởng của một số tác nhân đông tụ đến độ cứng của đậu phụ

Ảnh hưởng của các tác nhân đến chất lượng đậu phụ được thể hiện ở hình 1.

Hình 1 cho thấy, độ cứng của các sản phẩm đậu phụ làm từ các tác nhân khác nhau dao động từ 2,15 - 5,20 N. Trong đó, đậu phụ được làm từ tác nhân đông tụ $MgCl_2$ kết hợp với axit lactic có độ cứng lớn nhất là $5,20 \pm 0,40$ N và đậu phụ được làm

từ MgSO_4 kết hợp với GDL có độ cứng bé nhất là $2,15 \pm 0,27$ N. Kết quả được giải thích là do bản chất của muối MgCl_2 là muối ion mạnh phân ly hoàn toàn trong dung dịch tạo ra ion magie (Mg^{2+}) và ion clorua (Cl^-). Trong khi đó, muối $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ phân ly thành ion magie (Mg^{2+}) và ion axetat (CH_3COO^-). Muối MgSO_4 phân ly thành ion magie (Mg^{2+}) và ion sunfat (SO_4^{2-}). Ion sunfat kém hiệu quả hơn trong việc thúc đẩy tương tác protein so với ion clorua. Các ion clorua không can thiệp vào quá trình kết tụ protein, cho phép có cấu trúc chắc hơn. Trong khi đó, các ion sunfat có thể cản trở mạng lưới protein, làm cho cấu trúc mềm hơn so với MgCl_2 và các ion axetat dẫn đến tương tác protein yếu hơn, tạo ra cấu trúc sữa đông mềm hơn [3]. Hình 1 cũng cho thấy,

$\text{MgCl}_2 > \text{MgSO}_4$ ($3,43 \pm 0,14 > 2,48 \pm 0,32$ N). Ngoài ra, kết quả ở hình 1 thể hiện độ cứng của đậu phụ được làm từ các chất đông tụ khác nhau được sắp xếp như sau: $\text{MgCl}_2 + \text{axit lactic} > \text{MgCl}_2 + \text{axit axetic} > \text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{axit axetic} > \text{MgSO}_4 + \text{a. lactic} > \text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{a. lactic} > \text{MgSO}_4 + \text{a. axetic} > \text{MgCl}_2 + \text{GDL} > \text{MgCl}_2 > \text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{GDL} > \text{MgSO}_4 > \text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 > \text{MgSO}_4 + \text{GDL}$. Kết quả tương đồng với kết quả nghiên cứu của Wang và cs (2018) [3] theo đó, một số tác nhân đông tụ ảnh hưởng đến độ cứng của đậu phụ theo thứ tự sau: $\text{MgCl}_2 > \text{MgSO}_4 > \text{CaSO}_4$. Nguyên nhân là do các ion magie (Mg^{2+}) thúc đẩy tương tác protein mạnh hơn, tạo ra cấu trúc gel đặc và cứng hơn [3].



Hình 1. Ảnh hưởng của các tác nhân đông tụ đến độ cứng của đậu phụ

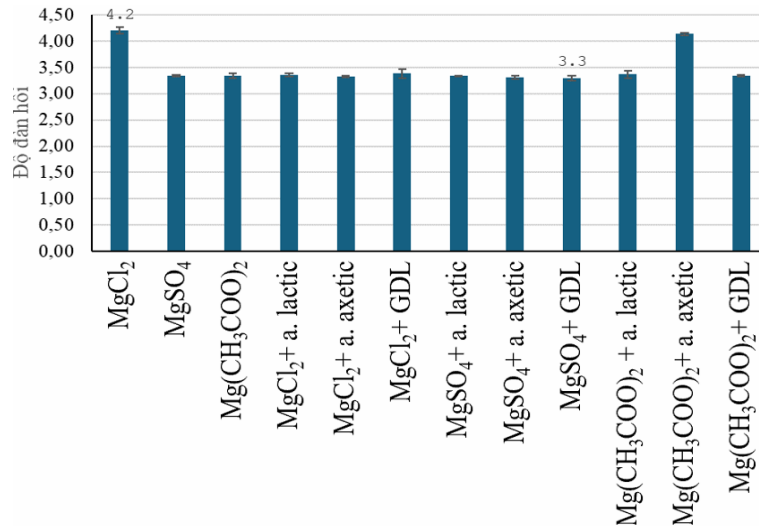
3.2. Ảnh hưởng của một số tác nhân đông tụ đến độ đàn hồi của đậu phụ

Ảnh hưởng của một số tác nhân đông tụ đến độ đàn hồi của đậu phụ được thể hiện ở hình 2.

Hình 2 cho thấy, mỗi tác nhân đông tụ tạo ra đậu phụ có độ đàn hồi khác nhau. Đậu phụ có độ đàn hồi lớn nhất khi được làm bởi tác nhân đông tụ MgCl_2 (4,20) và đậu phụ có độ đàn hồi bé nhất là MgCl_2 kết hợp với axit lactic (3,35). Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Zheng và cs (2020) [4], Yanti và cs (2022) [5], theo đó các chất đông tụ khác nhau (canxi sunfat, magie clorua) có thể ảnh hưởng đến cấu trúc protein và độ đàn hồi

của sản phẩm cuối cùng.

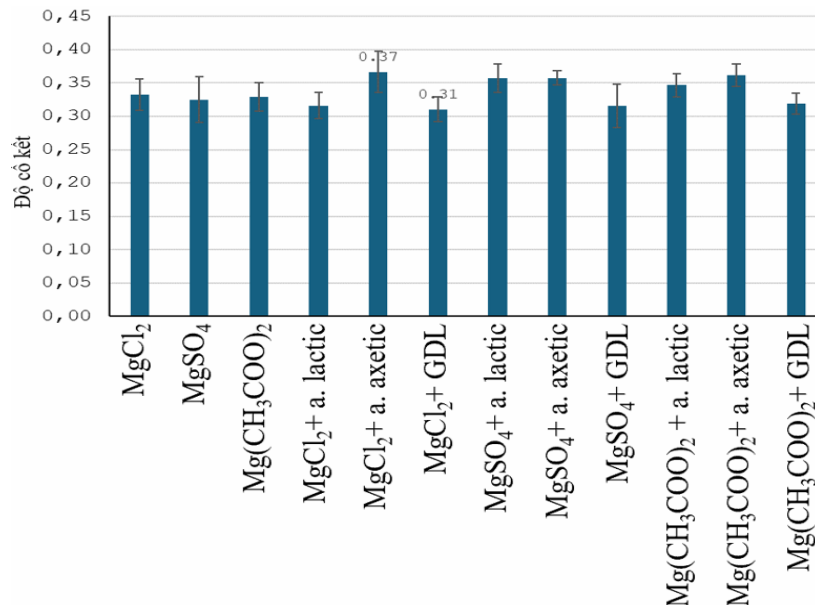
Đậu phụ được làm từ các chất đông tụ ảnh hưởng đến độ đàn hồi theo thứ tự sau: $\text{MgCl}_2 > \text{MgCl}_2 + \text{GDL} > \text{MgCl}_2 + \text{axit lactic}$. Bên cạnh đó, độ đàn hồi của đậu phụ còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như độ ẩm và phương pháp chế biến đậu phụ. Kết quả tương đồng với kết quả nghiên cứu của Yanti và cs (2022) [5], theo đó đậu phụ làm từ GDL cứng hơn, có cấu trúc đặc hơn, do đó không biến dạng đáng kể, dẫn đến độ đàn hồi thấp hơn và đậu phụ làm từ MgCl_2 mềm hơn (độ cứng thấp hơn), thường có cấu trúc xốp hơn, cho phép đậu phụ biến dạng dễ dàng hơn và có độ đàn hồi cao hơn.



Hình 2. Ảnh hưởng của các tác nhân đông tụ đến độ đàn hồi của đậu phụ

3.3. Ảnh hưởng của một số tác nhân đông tụ đến độ cố kết của đậu phụ

Ảnh hưởng của một số tác nhân đông tụ đến độ cố kết của đậu phụ được thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng của các tác nhân đông tụ đến độ cố kết của đậu phụ

Từ hình 3, có thể nhận thấy, đậu phụ được làm từ các tác nhân đông tụ có độ cố kết theo thứ tự sau: MgCl₂ + axit axetic > Mg(CH₃COO)₂ + axit axetic > MgSO₄ + a. axetic > Mg(CH₃COO)₂ + GDL > MgSO₄ + GDL.

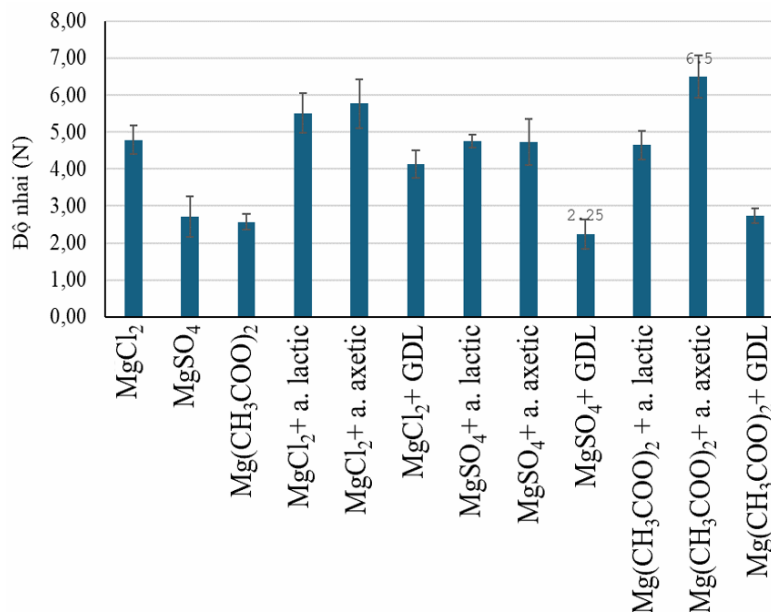
Zheng và cs (2020) [4] đã chỉ ra rằng độ kết dính cao hơn thường tạo ra sản phẩm đậu phụ cứng hơn và ổn định hơn. Trong sản xuất đậu phụ, hạt đậu tương được ngâm, nghiền rồi gia nhiệt trước khi đông tụ. Quá trình gia nhiệt là bước cần thiết cho quá trình hình thành gel protein trong đậu phụ do làm biến tính các hợp chất phản dinh dưỡng và biến đổi cấu trúc hạt sữa đậu nành nhằm

tăng khả năng ổn định chất keo và giảm phân bố kích thước xuống vài nanometer [9, 11]. Trong quá trình gia nhiệt, các protein hòa tan tập hợp lại, gồm các polypeptide axit và bazơ của glycinin và 1 lượng nhỏ các đơn phân α , α' của β -conglycinin liên kết với nhau thông qua liên kết disulfite. Khi tập hợp, các hạt có kích thước nhỏ liên kết nhau bằng liên kết kỵ nước và liên kết hydro sao cho các đơn phân của glycin nằm ở bên trong và đơn phân axit của glycin, các đơn phân α , α' của β -conglycinin nằm ở bên ngoài. Khi pH của huyền phù protein đậu nành giảm xuống khoảng 6, các tiểu đơn vị bazơ của glycin và tiểu đơn vị β của β -

conglycinin là những tiểu đơn vị mất ổn định đầu tiên. Khi hệ thống đạt đến điện tích trung tính của mạng, các tiểu đơn vị axit của glycinin cùng các tiểu đơn vị α và α' của β -conglycinin cũng bắt đầu tham gia quá trình hình thành mạng lưới gel [11, 12]. Sự sắp xếp lại protein lâu hơn có thể ảnh hưởng đến quá trình tạo gel của sữa đậu nành, nhờ đó tạo ra đậu phụ có tính chất khác biệt. Axit lactic làm protein của đậu tương đông tụ chậm hơn so với GDL. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Zheng và cs (2024) [13]. Bên cạnh đó, độ cố kết của đậu phụ còn phụ thuộc các yếu tố khác bao gồm: Loại và nồng độ chất đông tụ, chất lượng đậu nành, hàm lượng nước, điều kiện chế biến, kỹ thuật ép, nhiệt độ, mức độ pH.

3.4. Ảnh hưởng của một số tác nhân đông tụ đến độ nhai của đậu phụ

Ảnh hưởng của một số tác nhân đông tụ đến độ nhai của đậu phụ được thể hiện ở hình 4. Kết quả cho thấy, độ nhai của đậu phụ dao động từ 2,25 - 6,49. Đậu phụ có độ nhai lớn nhất sử dụng tác nhân đông tụ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{a. axetic}$ và đậu phụ có độ nhai bé nhất sử dụng tác nhân đông tụ $\text{MgSO}_4 + \text{GDL}$. Nguyên nhân có thể giải thích là do GDL là một loại axit làm giảm dần độ pH của sữa đậu nành, dẫn đến sự hình thành váng sữa mềm hơn, trong khi đó các ion acetat cũng có thể giúp ổn định cấu trúc, dẫn đến cấu trúc đàn hồi và dai hơn [14]. Yiqiang và cs (2021) [6] đã chỉ ra rằng tác động của MgCl_2 , CaSO_4 , axit lactic, axit axetic, GDL và váng sữa đậu nành lên men (FSW), đậu phụ làm bằng magie sunfat thường có độ cứng và độ nhai thấp hơn so với MgCl_2 . Độ cứng của $\text{MgCl}_2 > \text{MgSO}_4$ ($3,431 \pm 0,139 > 2,478 \pm 0,320$) và độ nhai của 2 muối cũng tỉ lệ thuận với độ cứng $\text{MgCl}_2 > \text{MgSO}_4$ ($4,79 \pm 0,39 > 2,71 \pm 0,56$).

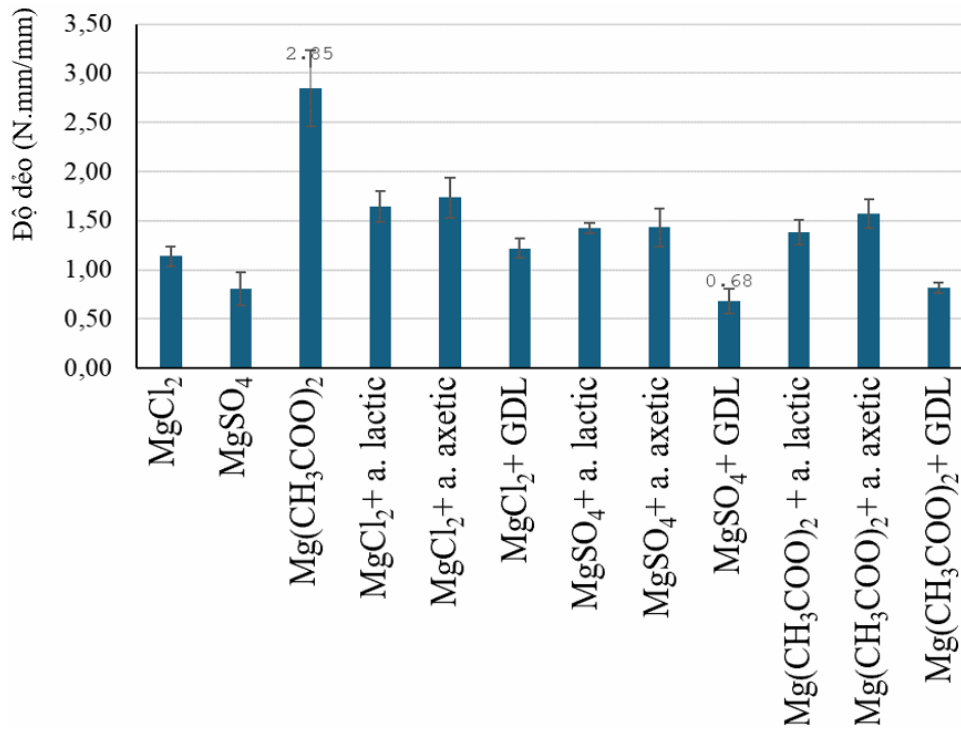


Hình 4. Ảnh hưởng của các tác nhân đông tụ đến độ nhai của đậu phụ

3.5. Ảnh hưởng của một số tác nhân đông tụ đến độ dẻo của đậu phụ

Ảnh hưởng của một số tác nhân đông tụ đến độ dẻo của đậu phụ được thể hiện ở hình 5. Độ dẻo của đậu phụ làm từ các tác nhân đông tụ khác nhau dao động từ 0,68 - 2,85. Trong đó, đậu phụ có độ dẻo lớn nhất được làm từ tác nhân đông tụ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ($2,85 \pm 0,39$) và đậu phụ có độ dẻo bé nhất là $\text{MgSO}_4 + \text{GDL}$ ($0,68 \pm 0,12$). Magie axetat thúc đẩy tổng hợp protein hiệu quả do sự

hiện diện của cả ion magie (Mg^{2+}) và ion axetat (CH_3COO^-). Các ion axetat giúp ổn định cấu trúc protein và tăng cường khả năng liên kết của protein, dẫn đến mạng lưới protein gắn kết hơn [15, 16]. GDL là chất đông tụ tác dụng chậm, làm giảm dần độ pH của sữa đậu nành. Mặc dù điều này có thể dẫn đến mạng lưới protein mịn, nhưng quá trình đông tụ chậm hơn có thể không thúc đẩy cùng mức độ đông tụ protein ngay lập tức như $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ [15, 16].

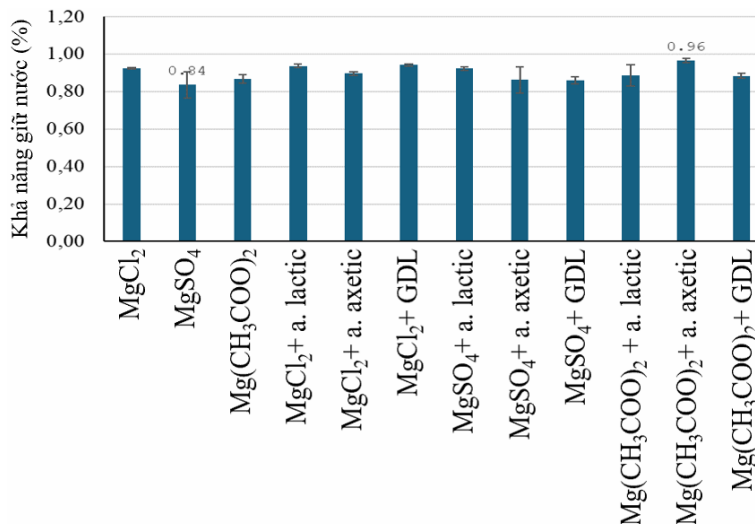


Hình 5. Ảnh hưởng của các tác nhân đông tụ đến độ dẻo của đậu phụ

3.6. Ảnh hưởng của một số tác nhân đông tụ đến khả năng giữ nước

Ảnh hưởng của một số tác nhân đông tụ đến khả năng giữ nước của đậu phụ được thể hiện ở hình 6. Kết quả cho thấy, khả năng giữ nước của đậu phụ được làm từ các tác nhân đông tụ dao động từ 0,84 - 0,97. Trong đó, khả năng giữ nước lớn nhất là đậu phụ làm từ tác nhân đông tụ Mg(CH₃COO)₂ + axit axetic (0,96 ± 0,01) và khả năng giữ nước bé nhất là đậu phụ làm từ tác nhân đông tụ Mg(CH₃COO)₂. Kết quả nghiên cứu của

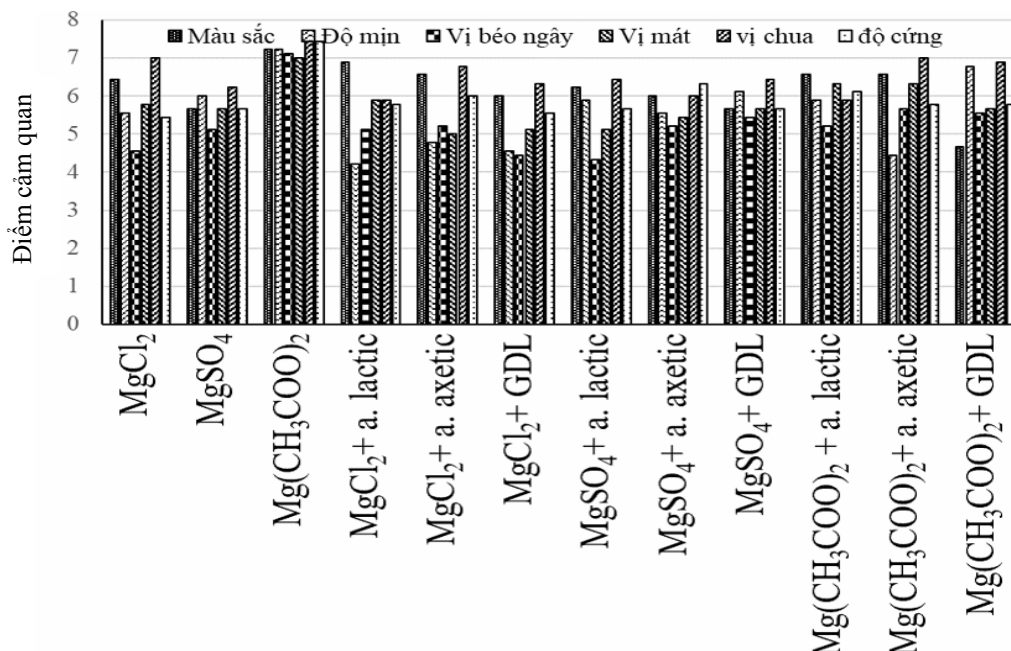
Zheng và cs (2020) [4] đã chỉ ra rằng các chất đông tụ khác nhau (canxi sunfat, magie clorua) có thể ảnh hưởng đến cấu trúc mạng lưới protein, do đó ảnh hưởng đến khả năng giữ nước. Đậu phụ có khả năng giữ nước cao hơn có xu hướng thể hiện độ cứng hơn, vì mạng protein giữ nhiều nước hơn, dẫn đến cấu trúc đặc hơn. Một mạng lưới protein ngậm nước tốt có thể chống biến dạng tốt hơn, tạo ra sản phẩm không chỉ chắc hơn mà còn có khả năng phục hồi tốt hơn trước ứng suất cơ học [4].



Hình 6. Ảnh hưởng của các tác nhân đông tụ đến khả năng giữ nước

3.7. Ảnh hưởng các tác nhân đông tụ đến chất lượng cảm quan của đậu phụ

Đối với sản phẩm đậu phụ, đánh giá cảm quan dựa trên mức độ ưa thích được tiến hành trên các tiêu chí sau: Màu sắc, độ mịn, vị béo ngậy, vị mát, vị chua và độ cứng, với mức độ ưa thích từ 1 - 9. Kết quả được thể hiện ở hình 7.



Hình 7. Ảnh hưởng các tác nhân đông tụ đến chất lượng cảm quan đậu phụ

Về vị chua và vị mát, GDL và axit lactic mang lại vị chua nhẹ cho các sản phẩm đậu phụ và axit axetic (CH₃COOH) có vị chua rõ rệt và thường được biết đến trong giấm, khi kết hợp với muối sẽ làm giảm bớt độ chua. Tuy nhiên, axit lactic gây ra chua nhẹ, vì vậy điểm ưa thích của muối Mg(CH₃COO)₂ + a. lactic và muối MgCl₂ + a. lactic có điểm thấp. Cảm nhận về vị chua của đậu phụ có thể bị ảnh hưởng bởi độ pH, từ đó ảnh hưởng đến hương vị tổng thể

Về độ mịn, GDL cho sản phẩm đậu phụ mịn màng, bắt mắt, không bị nát, do đó GDL là tác nhân phổ biến để làm tào phớ. Khi sử dụng axit axetic (giấm) để làm đông tụ đậu nành, quá trình đông tụ diễn ra nhanh chóng và mạnh mẽ. Điều này có thể dẫn đến cấu trúc đậu phụ mềm và ít mịn. Axit lactic tạo ra một quá trình đông tụ nhẹ nhàng hơn, thường tạo ra cấu trúc đậu phụ mềm mại và mịn màng hơn. Vì vậy, điểm ưa thích của MgCl₂ + a. lactic > MgSO₄ + a. axetic, Mg(CH₃COO)₂ + a. lactic > Mg(CH₃COO)₂ + a.

Hình 7 cho thấy, đậu phụ làm từ tác nhân Mg(CH₃COO)₂ vượt trội hơn về các chỉ tiêu so với đậu phụ làm từ các tác nhân khác. Về màu sắc, đậu phụ được làm từ tác nhân MgSO₄ + GDL có màu sắc kém nhất và làm từ tác nhân MgSO₄ có màu tối hơn so với các đậu phụ khác.

axetic. Độ mịn được cảm nhận liên quan đến độ kết dính và độ đàn hồi của đậu phụ, trong đó, độ kết dính liên quan đến độ mạnh yếu của liên kết bên trong, ảnh hưởng đến cách đậu phụ phân hủy trong quá trình nhai nuốt trong miệng và họng và trong đường tiêu hóa [17]

Về độ cứng, điểm kém ưa thích nhất là MgCl₂, ưa thích nhất là Mg(CH₃COO)₂. Độ cứng có liên quan trực tiếp đến hàm lượng chất rắn trong sữa đậu nành; hàm lượng chất rắn càng cao thì đậu phụ càng cứng. Có sự tương quan yếu giữa độ cứng đo được bằng máy đo cấu trúc và độ cứng ưa thích của người tiêu dùng. Điều này được giải thích rằng đậu phụ càng cứng không phải người tiêu dùng càng ưa thích. Bên cạnh đó, nồng độ ion magie thấp có lợi cho việc hình thành các tập hợp protein dày đặc và thúc đẩy tính đồng nhất, khả năng chống biến dạng của gel [18].

4. KẾT LUẬN

Các tác nhân khác nhau ảnh hưởng khác nhau đến chất lượng của đậu phụ về đặc tính cơ lý, khả

năng giữ nước và đánh giá cảm quan. Các ion magie có vai trò quan trọng ổn định cấu trúc mạng gel protein. Trong số các tác nhân: MgSO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 + a. lactic, MgCl_2 + a. axetic, MgCl_2 + GDL, MgSO_4 + a. lactic, MgSO_4 + a. lactic, MgSO_4 + a. axetic, MgSO_4 + GDL, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ + a. lactic, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ + a. axetic, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ + GDL, tác nhân đông tụ có khả năng phù hợp nhất để sản xuất đậu phụ ngon, có đặc tính cơ lý và cảm quan được nhiều người tiêu dùng ưa chuộng là $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Qiao, Z., Chen, X. D., Cheng, Y., Liu, H., Liu, Y. & Li, L (2010). Microbiological and chemical changes during the production of acidic whey, a traditional chinese tofu - coagulant. *International Journal of Food Properties*, 13, 90 - 104.
2. Tara McHugh (2016). How tofu is processed. *Food Technology*, 72 - 74.
3. Wang, X., Luo, K., Liu, S., Adhikari, B. & Chen, J (2018). Improvement of gelation properties of soy protein isolate emulsion induced by calcium cooperated with magnesium. *Journal of food engineering*, 244, 32 - 39.
4. Zheng, L., Regenstein, J. M., Teng, F. & Li, Y (2020). Tofu products: A review of their raw materials, processing conditions and packaging. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 1 - 32
5. Yanti, R., Setyaningsih, W., Priyanto, T., Yuniansyah, R. & Admi, E. S. M (2022). Effect of different coagulants and various concentrations on quality of jack bean tofu. *Journal of Applied Agricultural Science and Technology*, 6(1): 1- 10.
6. Yiqiang D. *et al.* (2021). Effects of different coagulants on quality characteristics and flavor components of tofu. *Scien and Technology of Food Industry*, 42(15): 17- 26.
7. Wang Y., Yang X & Li. L. (2020). A new style of fermented tofu by *Lactobacillus casei* combined with salt coagulant. *3 Biotech*, 10(2): 81.
8. Tripathi, M. & Mangaraj, S (2013). Effect of coagulants on nutrient and antinutrient parameters of soy tofu. *Trends in biosciences*, 6 (2), 158 - 160.
9. Nguyễn Quang Đức (2022). Nghiên cứu các yếu tố công nghệ ảnh hưởng đến quá trình đông tụ protein và chất lượng đậu phụ mơ thành phố Hà Nội định hướng sản xuất quy mô công nghiệp. Luận án tiến sỹ kỹ thuật - ngành Công nghệ Thực phẩm, Đại học Bách Khoa Hà nội.
10. Hà Duyên Tư (2010). *Phương pháp phân tích cảm quan thực phẩm*. NXB Khoa học Kỹ thuật
11. Grygorczyk A. *et al.* (2013). Acid induced gelation of soymilk, comparison between gels prepared with lactic acid bacteria and glucono- δ -lactone. *Food Chemistry*, 141, 1716 - 1721.
12. Ringgenberg E. (2011). The physico-chemical characterization of soymilk particles and gelation properties of acid-induced soymilk gels, as a function of soymilk protein concentration. Master thesis of Science in Food Science, The University of Guelph, Canada
13. Zheng, L., Regenstein, J. M., Wang, Z. (2024). Effect of high-pressure homogenization on the properties and structure of cold-induced chiba tofu gel in soy protein isolate. *Gels*, 10 (2), 99.
14. Toda K., Ono T, Kitamura K., Hajika M., Takahashi K. Nakamura Y (2003). Seed protein content and consistency of tofu prepared with different magnesium chloride concentrations in six Japanese soybean varieties. *Breeding Science*, 53(3): 217- 223.
15. Li Z. *et al.* (2025). Compound salt-based coagulants for tofu gel production: Balancing quality and protein digestibility. *Gels*. 11 (7): 524
16. Geng Y *et al.* (2024). Research progress on tofu coagulants and their coagulation mechanisms. *Foods*. 13 (21): 3475.
17. Kim Y-N *et al.* (2019). Tailoring Physical and Sensory Properties of Tofu by the Addition of Jet-Milled, Superfine, Defatted Soybean Flour. *Foods*, 8 (12): 617.
18. Guan, X. Zhong, X. Lu, Y. Du, X. Jia, R. Li, H. Zhang, M. (2021). Changes of Soybean Protein during Tofu Processing. *Foods*, 10 (7), 1594.

EFFECTS OF VARIOUS COAGULANTING AGENTS ON SOME TOFU QUALITIES

**Luong Hong Nga¹, Le Thi Nguyet¹, Nguyen Quang Duc²,
Pham Thi Quynh¹, Phung Thi Thuy¹, Phung Thi Anh Minh¹, Vu Hong Son¹**

¹ *Hanoi University of Science and Technology, Vietnam*

² *Vietnam Institute of Agricultural Engineering and Post Harvest Technology, Vietnam*

Abstract

Tofu is a common daily food for Vietnamese people as well as for the people around the world. Nowadays, tofu has become increasingly popular because it is widely used in the preparation of vegetarian foods based on its flavors and nutritions. Tofu is made by coagulation of soybean protein at a reasonable price for consumers. There was many research on the effects of coagulants on tofu qualities, however, the research was conducted with maximum 6 single coagulants and few with combinations. This research studied 12 available coagulants and mixtures were selected: MgSO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 + lactic acid, MgCl_2 + acetic acid, MgCl_2 + GDL, MgSO_4 + lactic acid, MgSO_4 + acetic acid, MgSO_4 + GDL, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ + lactic acid, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ + acetic acid and $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ + GDL based on tofu's hardness, cohesiveness, springiness, chewiness and water holding capacity. The aim of the research is to identify the coagulant that could produce tofu with the best quality. Among them, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (magnesium acetate) resulted in tofu with the best texture and flavor.

Keywords: *Tofu, coagulants, hardness, chewiness, cohesiveness.*

Ngày nhận bài: 15/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 7/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 23/7/2025

Ngày duyệt đăng: 13/8/2025

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH TÍNH CHẤT ĐẶC TRƯNG CỦA ĐẬU PHỤ SẢN XUẤT BẰNG NƯỚC CHUA TẠI MỘT SỐ QUẬN, HUYỆN TRÊN ĐỊA BÀN THÀNH PHỐ HÀ NỘI

Nguyễn Hải Vân^{1*}, Lương Hồng Nga¹,

Vũ Hồng Sơn¹, Nguyễn Thị Hằng¹, Phạm Văn Bắc¹,

Nghiêm Thị Hoài Thương¹, Nguyễn Hà Anh¹, Hồ Phú Hà¹

¹*Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội*

**Email: van.nguyenhai@hust.edu.vn*

TÓM TẮT

Đậu phụ là sản phẩm truyền thống có giá trị dinh dưỡng cao, được tiêu thụ rộng rãi trong khẩu phần ăn của người Việt Nam. Trong quy trình sản xuất thủ công tại thành phố Hà Nội, nước chua thường được sử dụng làm chất đông tụ thay cho các phụ gia hóa học. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định các tính chất đặc trưng của đậu phụ sản xuất bằng nước chua, được thu thập từ một số cơ sở sản xuất truyền thống tại một số quận và huyện ngoại thành của thành phố Hà Nội. Kết quả phân tích cơ lý cho thấy, sản phẩm đậu phụ sử dụng nước chua có đặc tính đặc cơ lý đặc trưng với kết cấu mềm mại, độ đàn hồi tốt. Cụ thể, độ cứng dao động 0,60 - 1,73 kg, khả năng giữ nước 0,17 - 8,09%, độ nhai đạt 9,43 - 35,14%, độ cố kết 0,23 - 0,30 và độ đàn hồi 3,29 - 3,39. Các tính chất cơ lý có xu hướng thay đổi khác nhau trong thời gian bảo quản ngoại trừ sự duy trì về độ nhai và độ đàn hồi. Kết quả phân tích vi sinh cho thấy, 11/18 mẫu tương đương 61,1% mẫu không đạt chuẩn theo Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT (phần 6.5) với tỷ lệ vượt ngưỡng cao ở TVC, nấm men, nấm mốc, *Coliforms*, *E. coli*, *S. aureus*, không phát hiện *B. cereus* và *C. perfringens*; cùng sự chênh lệch rõ giữa mẫu sản xuất, bán tại chỗ (60% đạt) và mẫu chuyển đến chợ (12,5% đạt). Tuy nhiên, sự dao động về chất lượng giữa các mẫu phản ánh tính không đồng nhất trong điều kiện và kỹ thuật sản xuất đã được chỉ ra trong kết quả phân nhóm HCA/PCA. Kết quả thu nhận được của nghiên cứu một lần nữa chứng minh tầm quan trọng của việc chuẩn hóa công nghệ sản xuất đậu phụ.

Từ khóa: *Đậu phụ, độ cứng, độ đàn hồi, vi sinh vật.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu phụ là một sản phẩm thực phẩm truyền thống được chế biến từ hạt đậu nành. Đây là một trong những nguồn protein thực vật tốt nhất, đồng thời cung cấp lipid có lợi, vitamin và khoáng chất và các hợp chất hoạt tính sinh học khác, chẳng hạn như: Isoflavone, soyasaponin. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng, tiêu thụ đậu phụ có thể làm giảm nguy cơ mắc các bệnh mãn tính như: Tăng huyết áp, rối loạn lipid máu, bệnh tim, mạch vành và ung thư vú [1, 2, 3].

Quy trình sản xuất đậu phụ thường bao gồm: Ngâm, nghiền ướt, lọc, đun sôi, đông tụ sữa đậu nành, tạo hình và ép. Nhiều chất đông tụ khác nhau được sử dụng trong quá trình chế biến đậu phụ, mỗi chất đông tụ tạo ra một sản phẩm có đặc

điểm khác nhau. Phương pháp sản xuất đậu phụ truyền thống tại Việt Nam thường sử dụng nước chua - một loại dịch đã được lên men tự nhiên - làm tác nhân đông tụ protein đậu nành, tạo nên cấu trúc và hương vị đặc trưng.

Tại thành phố Hà Nội, nhiều làng nghề vẫn duy trì phương pháp sản xuất đậu phụ sử dụng nước chua. Tiêu biểu là làng Vồng La, xã Vồng La, huyện Đông Anh, nơi có hơn 80% số hộ dân tham gia sản xuất với sản lượng trung bình 1,5 tạ đậu tương mỗi ngày [4]. Làng Đại Cát, phường Liên Mạc, quận Bắc Từ Liêm (BTL) từng có đến 300 hộ làm đậu phụ, nhưng do tác động của đô thị hóa và môi trường, hiện chỉ còn khoảng 40 hộ theo nghề [5]. Phường Mai Động, quận Hoàng Mai (HM)

cũng từng là trung tâm sản xuất đậu phụ lớn, nhưng hiện nay chỉ duy trì khoảng 25 hộ sản xuất nhỏ lẻ. Các hộ sản xuất chủ yếu theo phương pháp thủ công, xưởng đậu với sản lượng lớn nhất là khoảng 1,5 - 2 tạ đậu tương/ngày, cho ra 5.000 - 6.000 bìa đậu [6]. Mặc dù, các làng nghề này có truyền thống lâu đời và sản phẩm khi đưa ra thị trường được ưa chuộng, xong quá trình sản xuất vẫn gặp nhiều thách thức như: Chất lượng chưa đồng đều, thiếu đầu ra ổn định, khối lượng công việc lớn, vấn đề ô nhiễm môi trường từ nước thải chưa qua xử lý và thiếu sự hỗ trợ về công nghệ cũng như chính sách phát triển.

Nghiên cứu này thực hiện nhằm xác định đặc điểm, tính chất đặc trưng của đậu phụ sản xuất thủ công bằng nước chua ở một số quận, huyện tại thành phố Hà Nội, từ đó có thể góp phần cải tiến công nghệ để có thể sản xuất quy mô công nghiệp.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu nghiên cứu

Các mẫu đậu phụ được thu thập tại thành phố Hà Nội, bao gồm: 18 địa điểm lấy mẫu tại các chợ truyền thống (trong đó 12 địa điểm thuộc các quận nội thành: Hai Bà Trưng (HBT), Hoàng Mai (HM), Cầu Giấy (CG), Đống Đa (ĐĐ), Thanh Xuân (TX), Hoàn Kiếm (HK), Ba Đình (BD), Tây Hồ (TH), Nam Từ Liêm (NTL), Hà Đông (HD), Long Biên (LB) và Bắc Từ Liêm (BTL) và 6 địa điểm thuộc các huyện của Hà Nội: Hoài Đức (H.HĐ), Đan Phượng (H.ĐP), Gia Lâm (H.GL), Thanh Trì (H.TT), Sơn Tây (H.ST), Mê Linh (H.ML) được sản xuất bằng phương pháp sử dụng tác nhân đông tụ là nước chua, mỗi địa điểm có 7 mẫu. Thời điểm 0 giờ tính từ khi mẫu được đưa về phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp lấy mẫu và xử lý mẫu

Lấy mẫu và xử lý mẫu được thực hiện theo TCVN 11923:2017 [7]. Sau khi lấy, mẫu được đặt vào hộp kín vô trùng và bảo quản trong điều kiện nhiệt độ từ 0 - 6°C nhằm hạn chế sự phát triển của vi sinh vật trong quá trình vận chuyển và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Mẫu được bảo quản qua ba khung giờ: 0 giờ, 2,5 giờ, 5 giờ trong tủ mát.

2.3. Phương pháp đo đặc tính cơ lý của đậu phụ

Đặc tính cơ lý của đậu phụ được xác định thông qua phương pháp TPA (Texture Profile

Analysis), sử dụng máy đo cấu trúc TAXTPlus với đầu đo P/100 theo Wang và cs (2019) [8]. Trong quá trình đo, mẫu đậu phụ được nén đến 75% chiều cao ban đầu với tốc độ nén 100 mm/phút (tương đương 1,67 mm/s). Dữ liệu thu được từ các biểu đồ lực - thời gian và lực - khoảng cách giúp xác định các chỉ tiêu kết cấu như: Độ cứng, độ cố kết, độ đàn hồi và độ nhai. Mẫu thử là đậu phụ tươi được cắt thành khối lập phương kích thước $2 \times 2 \times 2$ cm. Các phép đo được thực hiện trong cùng điều kiện để đảm bảo tính lặp lại và độ chính xác của kết quả thu được [9].

2.4. Phương pháp xác định khả năng giữ nước của đậu phụ

Khả năng giữ nước của đậu phụ được xác định theo phương pháp của Li và cs (2014) [10], được tính theo công thức:

$$\text{Khả năng giữ nước} = \frac{m_1 - m_{H_2O}}{m_1} \times 100\%$$

Trong đó: m_1 là khối lượng mẫu ban đầu (g), m_{H_2O} là khối lượng nước tách ra sau khi ly tâm (g).

2.5. Phương pháp xác định chỉ tiêu vi sinh vật

Mẫu đậu phụ được cân chính xác $10,0 \pm 0,1$ g và chuyển vào bình vô trùng chứa 90 mL nước muối sinh lý 0,85% đã tiệt trùng. Hỗn hợp được đồng nhất bằng máy vortex trong 1 phút để thu dịch huyền phù có độ pha loãng 10^{-1} . Từ dung dịch này, tiến hành pha loãng thập phân liên tiếp bằng cách chuyển 1 mL vào ống nghiệm chứa 9 mL nước muối sinh lý tiệt trùng, lần lượt thu được các nồng độ 10^{-2} và 10^{-3} . Từ mỗi mức pha loãng, lấy 0,1 mL dịch mẫu nhỏ lên bề mặt thạch của các đĩa petri. Các đĩa sau khi cấy được ủ ngược trong tủ ấm ở các điều kiện nhiệt độ và thời gian phù hợp tùy theo chỉ tiêu vi sinh cần xác định, cụ thể: Tổng số vi sinh vật hiếu khí theo TCVN 4881:1-2015 [11]; nấm men và nấm mốc theo TCVN 8275-2:2010 [12]; *Coliforms* theo TCVN 6848:2007 [13]; *E. coli* theo hướng dẫn phân lập và phân biệt với *Coliforms* theo TCVN 1687-1:2009 [14]; *Staphylococcus aureus* theo TCVN 11039-6:2015 [15]; *Clostridium perfringens* theo TCVN 4991:2005 [16]; *Bacillus cereus* theo TCVN 4992:2005 [17].

Số lượng vi sinh vật trong 1 g mẫu (N, CFU/g) được tính toán dựa trên công thức:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \cdot f_1 \cdot V} \left(\frac{CFU}{g} \right)$$

Trong đó: C là tổng số khuẩn lạc vi khuẩn được đếm trên tất cả các đĩa; n_1 là số đĩa đếm được ở mức pha loãng đầu tiên; n_2 là số đĩa đếm được ở mức pha loãng thứ hai; f_1 là hệ số pha loãng của các đĩa được đếm với mức pha loãng thấp hơn. V là thể tích mẫu cấy vào mỗi đĩa petri.

2.6. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

Dữ liệu thu được từ các thí nghiệm được xử lý bằng phương pháp phân tích phương sai một yếu tố (One-way ANOVA) và phân nhóm thứ bậc (HCA) chạy trên phần mềm R nhằm xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm. Các giá trị có mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ được tiếp tục phân tích bằng kiểm định đa biến Duncan để xác định cụ thể các nhóm khác biệt. Việc xử lý và phân tích dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm thống kê SPSS phiên bản 27.

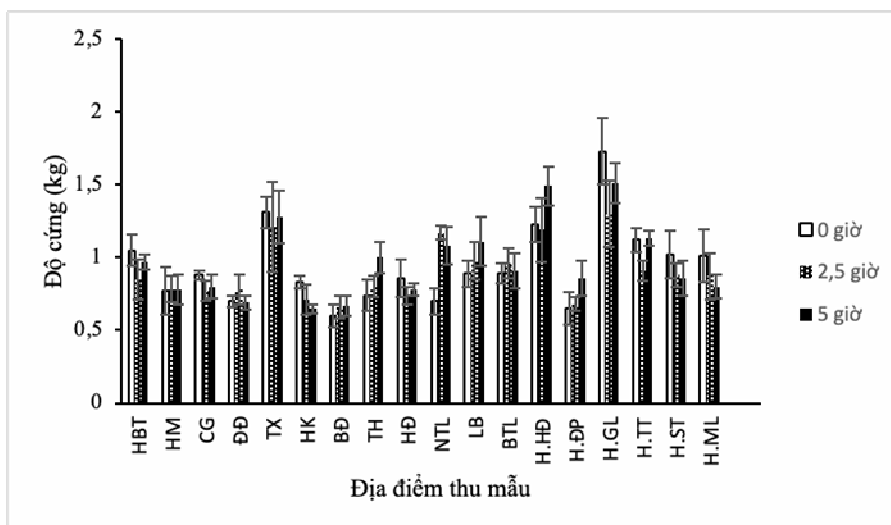
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá sự biến đổi độ cứng của đậu phụ tại một số quận, huyện trên địa bàn thành phố Hà Nội theo thời gian bảo quản

Hình 1 cho thấy, tất cả các mẫu đậu phụ đều có sự khác nhau về độ cứng và đều có sự thay đổi qua từng khung giờ bảo quản. Tại thời điểm đầu (0 giờ), các mẫu đậu phụ ở 18 địa điểm có độ cứng dao động từ $0,60 \pm 0,08$ kg đến $1,73 \pm 0,23$ kg,

trong đó đậu phụ ở BD là mẫu có độ cứng thấp nhất và cao nhất là đậu phụ ở GL. Khi bảo quản 5 giờ, các mẫu đậu phụ ở 18 địa điểm có độ cứng dao động từ $0,65 \pm 0,03$ kg đến $1,51 \pm 0,14$ kg tương ứng với các mẫu đậu phụ ở HK có độ cứng thấp nhất và các mẫu đậu phụ ở GL có độ cứng cao nhất. Trong đó, 12 quận, các mẫu đậu phụ ở HK có độ cứng nhỏ nhất và các mẫu đậu phụ ở TX có độ cứng cao nhất. Trong 6 huyện, các mẫu đậu phụ ở H. ML có độ cứng nhỏ nhất và các mẫu đậu phụ ở H. GL có độ cứng cao nhất.

Các mẫu đa số sẽ có xu hướng tăng độ cứng qua thời gian bảo quản, một số có xu hướng giảm hoặc có sự biến động không đồng nhất. Trong đó, mẫu đậu phụ ở NTL có độ cứng tăng nhiều nhất qua thời gian bảo quản (54,29%), mẫu đậu phụ ở HĐ có độ cứng tăng ít nhất (21,14%). Đa số các mẫu đậu phụ giảm độ cứng từ 1,43 - 21,69%. Nhận thấy độ cứng trung bình đậu phụ một số quận, huyện ở thành phố Hà Nội có độ cứng lớn hơn với đậu phụ Mơ theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Quang Đức (2022) [9] là $0,75 \pm 0,09$ kg. Điều này có thể lý giải cho việc đậu phụ ở các huyện so với đậu phụ Mơ cứng hơn là do lực ép của quá trình ép đậu phụ, nước chua lên men đậu phụ, giống đậu tương của từng vùng sử dụng có hàm lượng protein lớn hơn giống đậu tương của đậu phụ Mơ dẫn đến đậu phụ cứng và chắc hơn. Ngoài ra, nguồn nước sử dụng của các vùng miền có thể còn có nước cứng chứa ion Mg^{2+} , Ca^{2+} làm ảnh hưởng tới quá trình đông tụ đậu phụ [9].

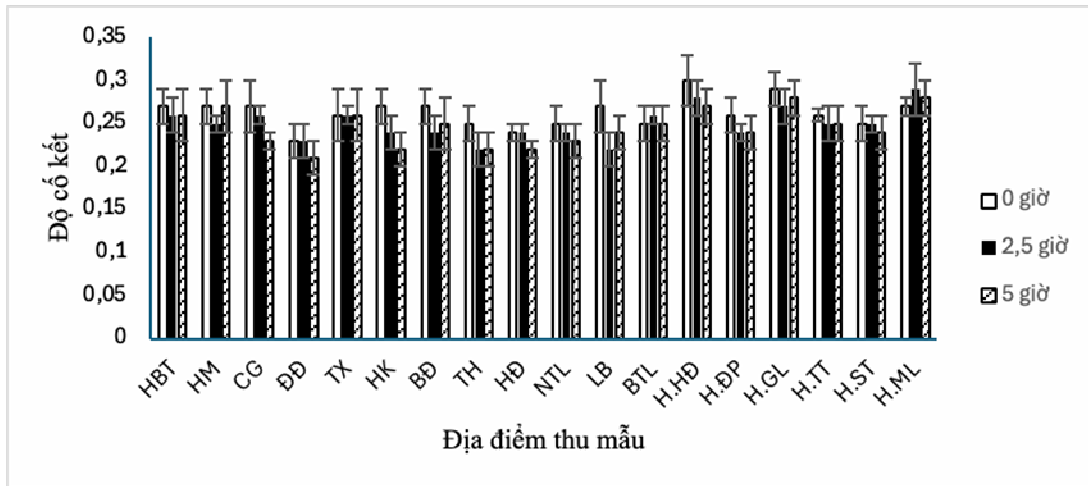


Hình 1. Sự thay đổi độ cứng (kg) của các mẫu đậu phụ theo thời gian bảo quản

3.2. Đánh giá sự biến đổi cơ kết của đậu phụ tại một số quận, huyện trên địa bàn thành phố Hà Nội theo thời gian bảo quản

Sự thay đổi về độ cơ kết của đậu phụ được trình bày ở hình 2. Kết quả ở hình 2 cho thấy, tất cả các mẫu đậu phụ đều có sự khác nhau về độ cơ kết và đa số không có sự thay đổi nhiều qua từng khung giờ bảo quản. Tại thời điểm đầu (0 giờ), các

mẫu đậu phụ ở 18 địa điểm có độ cơ kết dao động từ $0,23 \pm 0,02$ đến $0,30 \pm 0,03$, trong đó các mẫu đậu phụ ở ĐĐ có độ cơ kết thấp nhất và cao nhất là các mẫu đậu phụ ở HĐ. Trong 12 quận, các mẫu đậu phụ ở CG có độ cơ kết lớn nhất và các mẫu đậu phụ ở ĐĐ có độ cơ kết thấp nhất. Trong 6 huyện, các mẫu đậu phụ ở H.HĐ có độ cơ kết lớn nhất và ở H.ST có độ cơ kết thấp nhất.



Hình 2. Sự thay đổi độ cơ kết của các mẫu đậu phụ theo thời gian bảo quản

Sau khi bảo quản 5 giờ, các mẫu đậu phụ ở một số quận, huyện trong nghiên cứu có độ cơ kết dao động từ $0,21 \pm 0,02$ đến $0,28 \pm 0,02$, trong đó, các mẫu đậu phụ ở ĐĐ có độ cơ kết thấp nhất và ở H.GL là mẫu có độ cơ kết cao nhất. Bên cạnh đó, ở 12 quận, các mẫu đậu phụ ở ĐĐ là mẫu có độ cơ kết nhỏ nhất và ở HM có độ cơ kết cao nhất. Trong 6 huyện, các mẫu đậu phụ ở H.ĐP và ở H.ST đều có độ cơ kết bằng nhau và thấp nhất, các mẫu đậu phụ ở H.GL có độ cơ kết cao nhất.

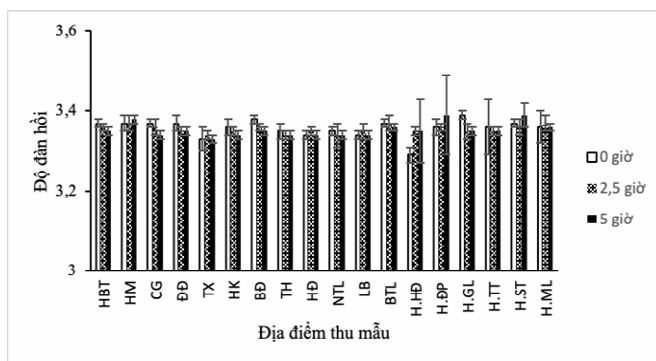
Sự khác nhau về độ cơ kết đậu phụ giữa một số quận huyện có thể một phần nằm ở giống đậu tương. Kết quả nghiên cứu của Onodera và cs (2009) [18] đã nghiên cứu về các thành phần trong đậu nành ảnh hưởng đến độ cơ kết của đậu phụ cho thấy, protein 7S và 11S trong đậu nành ảnh hưởng nhỏ đến kết cấu của đậu phụ, nhưng một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến độ cơ kết của đậu phụ là lượng ion canxi làm chất đông tụ. Do vậy, có thể giải thích sự khác nhau về độ cơ kết của đậu phụ tại từng quận, huyện có thể là do sự thay đổi nguồn nước được cung cấp còn có chứa lượng nước cứng.

Bên cạnh đó, hình 2 cũng cho thấy, trong thời gian bảo quản, độ cơ kết của các mẫu đậu phụ sẽ không đổi hoặc giảm dần qua thời gian. Trong đó nhiều nhất là mẫu đậu phụ CG giảm 20,69%, tiếp đó là mẫu ở HK giảm 18,52% và mẫu ở TH cũng giảm mạnh 12%. Tất cả các mẫu đậu phụ còn lại đa số là không đổi và giảm nhẹ từ 3 - 7%. Sự giảm độ cơ kết đến từ việc thất thoát nước trong mạng lưới cấu trúc của đậu phụ, làm cho cấu trúc gel co lại và làm giảm độ đặc của đậu phụ. Trong quá trình ép đậu phụ, lực ép và thời gian ép cũng ảnh hưởng đến độ đặc của đậu phụ. Nếu như không đủ lực hoặc thừa lực sẽ ảnh hưởng đến chất lượng cảm quan của đậu phụ.

3.3. Đánh giá sự biến đổi độ đàn hồi của đậu phụ tại một số quận, huyện trên địa bàn thành phố Hà Nội theo thời gian bảo quản

Độ đàn hồi của các mẫu đậu phụ tại một số quận, huyện trên địa bàn thành phố Hà Nội được thể hiện ở hình 3. Tại thời điểm đầu (0 giờ), các mẫu đậu phụ ở 18 địa điểm có độ đàn hồi dao động từ $3,29 \pm 0,02$ đến $3,39 \pm 0,07$, trong đó, các mẫu đậu phụ ở H.HĐ có độ đàn hồi thấp nhất và cao nhất là các mẫu đậu phụ ở H.TT. Khi bảo quản 2,5

giờ, 18 mẫu có độ đàn hồi dao động từ $3,34 \pm 0,01$ đến $3,37 \pm 0,02$, trong đó mẫu ở TX tiếp tục là mẫu có độ đàn hồi thấp nhất và mẫu ở HM có độ đàn hồi cao nhất. Khi bảo quản 5 giờ, các mẫu đậu phụ ở một số quận huyện có độ đàn hồi dao động từ $3,33 \pm 0,01$ đến $3,39 \pm 0,03$, trong đó các mẫu đậu phụ ở TX có độ đàn hồi thấp nhất và các mẫu đậu phụ ở H.ST và H.ĐP có độ đàn hồi cao nhất. Trong 12 quận, các mẫu đậu phụ ở TX có độ đàn hồi nhỏ nhất và ở HM có độ đàn hồi cao nhất. Trong 6 huyện, các mẫu đậu phụ ở H. HĐ và H.TT là mẫu có độ đàn hồi nhỏ nhất và các mẫu đậu phụ ở H. ST, mẫu H.ĐP có độ đàn hồi cao nhất.



Hình 3. Sự thay đổi độ đàn hồi của các mẫu đậu phụ theo thời gian bảo quản

Hình 3 cho thấy, trong thời gian bảo quản, độ đàn hồi của các mẫu đậu phụ không biến đổi nhiều, đa số các mẫu có độ đàn hồi không thay đổi, chỉ một vài mẫu giảm rất ít độ đàn hồi trong quá trình bảo quản, ví dụ: Đậu phụ ở TT giảm 1,19%, BLT, HK giảm 0,6%, BD giảm 0,89%, ĐĐ giảm 0,59%.

Bảng 1. Sự thay đổi độ nhai của các mẫu đậu phụ theo thời gian bảo quản

Mẫu	0 giờ	2,5 giờ	5 giờ
HBT	$0,95^{bcB} \pm 0,09$	$0,75^{bcA} \pm 0,15$	$0,83^{bcdAB} \pm 0,07$
HM	$0,71^{cdA} \pm 0,12$	$0,67^{cdA} \pm 0,08$	$0,70^{cdA} \pm 0,13$
CG	$0,85^{bcB} \pm 0,11$	$0,67^{cdA} \pm 0,05$	$0,60^{cdA} \pm 0,07$
ĐĐ	$0,53^{eB} \pm 0,01$	$0,61^{cdB} \pm 0,12$	$0,48^{eA} \pm 0,04$
TX	$1,14^{abA} \pm 0,16$	$1,06^{abA} \pm 0,31$	$1,00^{abA} \pm 0,22$
HK	$0,74^{cdC} \pm 0,07$	$0,57^{deB} \pm 0,09$	$0,48^{eA} \pm 0,05$
BD	$0,53^A \pm 0,07$	$0,54^{eA} \pm 0,08$	$0,56^{abA} \pm 0,08$
TH	$0,61^{deA} \pm 0,09$	$0,60^{cdA} \pm 0,09$	$0,73^{cdA} \pm 0,11$
HĐ	$0,70^{cdB} \pm 0,09$	$0,60^{cdA} \pm 0,06$	$0,58^{eA} \pm 0,06$

Sự khác nhau về độ đàn hồi của đậu phụ giữa các huyện một phần nằm ở giống đậu tương. Theo Yookyung Kim và Louise Wicker (2005) [19], độ đàn hồi của đậu phụ chịu ảnh hưởng trực tiếp từ các yếu tố như: Giống đậu nành, hàm lượng protein và tỷ lệ các phân đoạn protein (11S và 7S). Trong đó, giống đậu nành với tỷ lệ 11S globulin cao hơn, điển hình như giống Danbaekkong, có khả năng tạo ra đậu phụ với độ đàn hồi vượt trội và kết cấu chắc chắn hơn. Điều này là do 11S globulin chứa nhiều nhóm -SH và liên kết disulfide (S-S), giúp hình thành mạng lưới gel protein bền vững, mang lại khả năng phục hồi hình dạng tốt sau khi chịu lực nén. Ngược lại, các giống đậu nành có tỷ lệ 7S globulin cao hơn thường tạo ra đậu phụ mềm hơn với độ đàn hồi kém hơn, do 7S chủ yếu dựa vào liên kết hydro yếu hơn. Vì vậy, việc lựa chọn giống đậu nành giàu protein và có tỷ lệ 11S/7S cao đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao chất lượng và tính chất đàn hồi của đậu phụ [18]. Trong khi sự giảm độ liên kết đến từ việc thất thoát nước trong mạng lưới cấu trúc của đậu phụ, thì độ đàn hồi cũng giảm một phần do quá trình khuấy. Tăng tốc độ khuấy (từ 207 rpm lên 285 rpm) làm tăng độ đàn hồi của đậu phụ. Thời gian khuấy lâu hơn có thể phá vỡ cấu trúc gel, làm giảm độ đàn hồi. Sự giảm độ đàn hồi qua thời gian nằm ở việc lượng nước trong đậu phụ bị tách ra trong quá trình bảo quản đậu phụ làm suy giảm mạng lưới gel, dẫn đến không thể phục hồi hình dạng [18].

NTL	0,59 ^{deA} ± 0,10	0,93 ^{bcC} ± 0,06	0,83 ^{bcB} ± 0,12
LB	0,79 ^{cdA} ± 0,08	0,73 ^{cdAB} ± 0,14	0,90 ^{bcB} ± 0,15
BTL	0,75 ^{cdA} ± 0,05	0,84 ^{bcA} ± 0,08	0,76 ^{cdA} ± 0,12
H. HĐ	1,20 ^{abA} ± 0,16	1,13 ^{abA} ± 0,28	1,23 ^{abA} ± 0,42
H. ĐP	0,58 ^{deAB} ± 0,14	0,55 ^{eA} ± 0,04	0,58 ^{cdB} ± 0,05
H.GL	1,66 ^{aAB} ± 0,15	1,16 ^{abA} ± 0,23	1,41 ^{aAB} ± 0,20
H.TT	0,98 ^{bcC} ± 0,10	0,75 ^{bcA} ± 0,09	0,96 ^{bcB} ± 0,09
H. ST	0,86 ^{bcB} ± 0,08	0,74 ^{bcA} ± 0,06	0,70 ^{aA} ± 0,13
H.ML	0,92 ^{bcA} ± 0,18	0,85 ^{bcA} ± 0,22	0,83 ^{bcA} ± 0,25

Ghi chú: Biểu diễn giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của các lần lặp. Các giá trị trong cùng một cột có các chữ cái khác nhau (chữ cái thường) thì khác nhau, các giá trị trong cùng một hàng có các chữ cái khác nhau (chữ cái viết hoa) thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.4. Đánh giá sự biến đổi độ nhai của đậu phụ tại một số quận, huyện trên địa bàn thành phố Hà Nội theo thời gian bảo quản

Sự thay đổi độ nhai của đậu phụ theo thời gian bảo quản thể hiện ở bảng 1. Bảng 1 cho thấy tất cả các mẫu đậu phụ đều có sự khác nhau về độ nhai và đa số không có sự thay đổi nhiều qua từng khung giờ bảo quản. Tại thời điểm đầu (0 giờ), các mẫu đậu phụ có độ nhai dao động từ $0,53 \pm 0,07$ kg đến $1,66 \pm 0,15$ kg. Khi bảo quản 2,5 giờ, mẫu đậu phụ ở ĐĐ vẫn là mẫu độ nhai thấp nhất và ở GL có độ nhai cao nhất. Khi bảo quản 5 giờ, các mẫu đậu phụ có độ nhai dao động từ $0,48 \pm 0,04$ kg đến $1,41 \pm 0,20$ kg, trong đó các mẫu đậu phụ ở ĐĐ có độ nhai thấp nhất và ở GL có độ nhai cao nhất. Đối với 12 quận, các mẫu đậu phụ ở ĐĐ và HK có độ nhai

nhỏ nhất và ở TX có độ nhai cao nhất. Trong 6 huyện, các mẫu đậu phụ ở ĐP có độ nhai thấp nhất và ở GL có độ nhai cao nhất. Bảng 1 cũng cho thấy, khi thời gian bảo quản kéo dài đến 5 giờ, độ nhai của các mẫu CG, ĐĐ, HK, HĐ, TT, ST giảm từ 9,43% (ĐĐ) đến 35,14% (HK), các mẫu còn lại gần như không đổi.

3.5. Đánh giá sự biến đổi khả năng giữ nước của đậu phụ tại một số quận, huyện trên địa bàn thành phố Hà Nội theo thời gian bảo quản

Sự biến đổi khả năng giữ nước của đậu phụ tại một số quận, huyện của thành phố Hà Nội được thể hiện ở bảng 2. Khả năng giữ nước của các mẫu đậu phụ đa số có xu hướng giảm dần theo thời gian và cũng không có sự chênh lệch quá lớn so với nhau (Bảng 2).

Bảng 2. Khả năng giữ nước của các mẫu đậu phụ theo thời gian bảo quản

Mẫu	Khả năng giữ nước (%)		
	0 giờ	2,5 giờ	5 giờ
HBT	81,16 ^{bcdEFA} ± 0,004	81,52 ^{cdefA} ± 0,003	81,02 ^{efgA} ± 0,005
HM	81,84 ^{bcdEFA} ± 0,014	76,80 ^{abB} ± 0,009	75,87 ^{bcB} ± 0,003
CG	82,76 ^{cdefgA} ± 0,008	83,30 ^{efghA} ± 0,005	81,88 ^{efghA} ± 0,005
ĐĐ	80,11 ^{bcdA} ± 0,002	79,50 ^{bcdA} ± 0,005	77,56 ^{bcdB} ± 0,002
TX	78,70 ^{ba} ± 0,002	75,11 ^{aB} ± 0,005	74,84 ^{abB} ± 0,006
HK	80,96 ^{bcdEFA} ± 0,003	80,15 ^{bcdEFA} ± 0,004	79,15 ^{cdefC} ± 0,004

BĐ	83,14 ^{defg} ± 0,002	80,92 ^{cdef} ± 0,0005	77,41 ^{bc} ± 0,003
TH	79,33 ^{ba} ± 0,005	78,74 ^{bcdA} ± 0,009	77,03 ^{bcB} ± 0,002
HĐ	80,98 ^{bcdA} ± 0,003	78,07 ^{abcB} ± 0,009	77,02 ^{bcB} ± 0,002
NTL	82,57 ^{cdefgA} ± 0,003	76,96 ^{abB} ± 0,003	76,23 ^{bcB} ± 0,003
LB	88,95 ^{ha} ± 0,023	85,61 ^{ghB} ± 0,004	81,75 ^{efghC} ± 0,003
BTL	74,92 ^{aa} ± 0,004	75,18 ^{aa} ± 0,003	71,37 ^{aB} ± 0,010
H.HĐ	82,99 ^{defgA} ± 0,012	82,43 ^{defgAB} ± 0,005	81,02 ^{defgC} ± 0,008
H.ĐP	79,76 ^{bcA} ± 0,007	80,52 ^{cdefA} ± 0,004	78,52 ^{cdeA} ± 0,019
H.GL	84,90 ^{gA} ± 0,001	81,99 ^{defA} ± 0,028	82,01 ^{efghA} ± 0,027
H.TT	82,72 ^{cdefgAB} ± 0,003	86,03 ^{hB} ± 0,025	82,28 ^{fghA} ± 0,012
H.ST	83,27 ^{efgA} ± 0,028	83,90 ^{fghA} ± 0,019	84,91 ^{hA} ± 0,007
H.ML	84,48 ^{fghA} ± 0,003	82,81 ^{efghA} ± 0,012	84,30 ^{ghA} ± 0,011

Ghi chú: Biểu diễn giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của các lần lặp. Các giá trị trong cùng một cột có các chữ cái khác nhau (chữ cái thường) thì khác nhau, các giá trị trong cùng một hàng có các chữ cái khác nhau (chữ cái viết hoa) thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Tại thời điểm đầu (0 giờ), khả năng giữ nước của các mẫu đậu phụ dao động từ $74,92 \pm 0,004\%$ đến $88,95 \pm 0,023\%$. Khi bảo quản sau 2,5 giờ khả năng giữ nước của các mẫu đậu phụ dao động từ $75,11 \pm 0,005\%$ đến $86,03 \pm 0,025\%$. Khi bảo quản sau 5 giờ, khả năng giữ nước của các mẫu đậu phụ dao động từ $71,37 \pm 0,010\%$ đến $84,91 \pm 0,007\%$ tương ứng với các mẫu đậu phụ ở BTL có khả năng giữ nước thấp nhất và ở H.ST có khả năng giữ nước cao nhất. Bảng 2 cũng cho thấy, khi bảo quản đến 5 giờ ở tủ mát 13 - 15°C, khả năng giữ nước của đậu phụ giảm, dao động từ 0,17 - 8,09%, trong đó mẫu đậu phụ ở LB giảm 8,09%, mẫu đậu phụ ở NTL giảm 7,68%, mẫu đậu phụ ở HM giảm 7,2%. Riêng mẫu đậu phụ ở H.ST là có khả năng giữ nước tăng (tăng 1,97%). Như vậy, thời gian bảo quản tăng, đậu phụ càng bị tách nước. Lý do đậu phụ có xu hướng giảm giữ nước, tách nước tăng dần có thể giải thích bởi mạng lưới gel protein trong đậu phụ giữ nước qua các liên kết yếu như: Hydro và ion, theo thời gian các liên kết này bị suy yếu hoặc bị phá vỡ nên nước thoát ra khỏi mạng

lưới gel. Trong đậu phụ cũng chứa rất nhiều nước tự do không liên kết chặt chẽ với protein sẽ thoát ra ngoài gây nên hiện tượng tách nước theo thời gian.

3.6. Đánh giá chất lượng vi sinh vật của đậu phụ tại một số quận, huyện trên địa bàn thành phố Hà Nội

Bảng 3 cho thấy, *Bacillus cereus* và *Clostridium perfringens* không được phát hiện trong bất kỳ mẫu nào, chứng tỏ quy trình gia nhiệt trong quá trình chế biến tại một số quận huyện của thành phố Hà Nội đã đạt hiệu quả trong việc loại bỏ hai loại vi khuẩn này. Tổng số vi khuẩn hiếu khí (TVC) dao động từ 1×10^3 đến $7,1 \times 10^6$ CFU/g. Nấm men và nấm mốc có mặt trên đậu phụ ở các quận, huyện của thành phố Hà Nội với mật độ từ $0 - 1,4 \times 10^4$ CFU/g. Số lượng vi khuẩn *Coliforms* dao động từ $0 - 5,5 \times 10^5$ CFU/g. Số lượng vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus* lần lượt dao động từ $0 - 7,8 \times 10^3$ CFU/g và từ $0 - 1,2 \times 10^5$ CFU/g.

Bảng 3. Chất lượng vi sinh của các mẫu đậu phụ tại một số quận, huyện của thành phố Hà Nội (CFU/g)

	VSV tổng số	Nấm men nấm mốc	<i>Coliform</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>B. cereus</i>
Theo quy định (*)	10 ⁶	10 ³	10 ³	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²
LB	2,7 x 10 ⁵	1,8 x 10 ²	1,4 x 10 ²	< 10	< 10	< 10	< 10
ĐĐ	1,3 x 10 ⁵	9,0 x 10 ¹	1,8 x 10 ²	< 10	< 10	< 10	< 10
TX	8,3 x 10 ⁴	< 10	9,1 x 10 ¹	< 10	< 10	< 10	< 10
HK	8,2 x 10 ³	9,0 x 10 ¹	7,3 x 10 ²	< 10	< 10	< 10	< 10
HM	3,9 x 10 ⁴	4,5 x 10 ¹	4,0 x 10 ³	< 10	< 10	< 10	< 10
CG	2,6 x 10 ⁵	1,0 x 10 ³	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
GL	3,5 x 10 ⁵	1,7 x 10 ³	1,4 x 10 ²	< 10	2,5 x 10 ³	< 10	< 10
HĐ	1,7 x 10 ⁵	3,2 x 10 ²	7,9 x 10 ³	< 10	< 10	< 10	< 10
TH	3,8 x 10 ⁵	< 10	7,3 x 10 ²	< 10	< 10	< 10	< 10
BĐ	1,7 x 10 ⁶	6,8 x 10 ²	9,3 x 10 ³	4,5 x 10 ¹	5,8 x 10 ⁴	< 10	< 10
NTL	6,1 x 10 ⁶	5,4 x 10 ²	2,7 x 10 ³	< 10	4,0 x 10 ⁴	< 10	< 10
HBT	6,4 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁴	5,5 x 10 ⁵	< 10	1,2 x 10 ⁵	< 10	< 10
BTL	6,3 x 10 ⁶	3,6 x 10 ²	1,5 x 10 ⁴	4,5 x 10 ¹	6,0 x 10 ⁴	< 10	< 10
H.TT	6,6 x 10 ⁴	< 10	9,1 x 10 ¹	< 10	< 10	< 10	< 10
H.ML	3,5 x 10 ⁵	4,2 x 10 ³	2,3 x 10 ²	< 10	< 10	< 10	< 10
H.ST	1,2 x 10 ⁶	3,9 x 10 ³	2,9 x 10 ⁴	3,5 x 10 ³	1,4 x 10 ⁴		
H.ĐP	1,2 x 10 ⁶	8,2 x 10 ²	3,8 x 10 ⁴	7,8 x 10 ³	5,2 x 10 ⁴	< 10	< 10
H.HĐ	7,1 x 10 ⁶	4,5 x 10 ³	7,8 x 10 ⁴	3,1 x 10 ³	7,1 x 10 ⁴	< 10	< 10

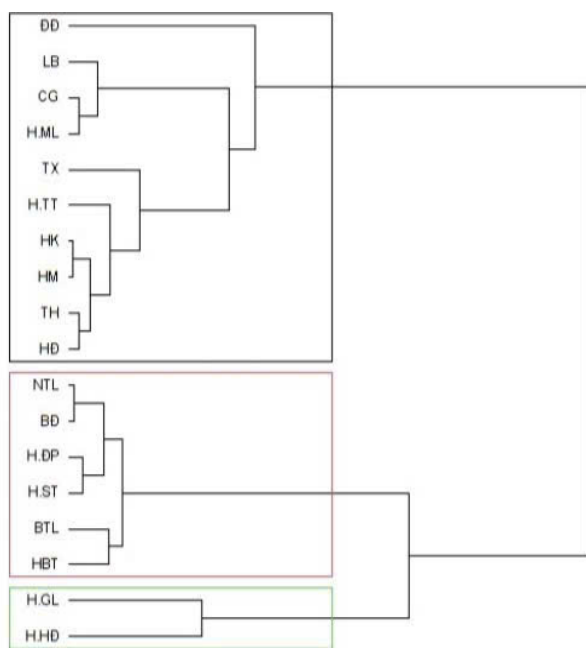
Ghi chú: (*): Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT, phần 6.5 của Bộ Y tế về giới hạn cho phép vi sinh vật trong sản phẩm chế biến từ ngũ cốc, khoai củ, đậu đỗ, bột, miến, mỳ sợi (có xử lý nhiệt trước khi sử dụng)[20].

Trên cơ sở kết quả nghiên cứu chất lượng vi sinh các mẫu đậu phụ tại thành phố Hà Nội, trong số 18 mẫu đậu phụ tại các chợ truyền thống trên địa bàn thì có 11 mẫu không đạt tiêu chuẩn chất lượng vi sinh, chiếm 61,1% tổng số mẫu. Chỉ có 7/18 mẫu đạt yêu cầu, chiếm 38,9% tổng số mẫu. Trong đó 60% mẫu đậu phụ sản xuất và bán tại chỗ (6/10 mẫu) đạt chuẩn, chỉ 12,5% mẫu đậu phụ từ nơi khác chuyển đến chợ (1/8 mẫu) đạt yêu cầu. Kết quả này cho thấy, phương thức sản xuất, vận chuyển, bày bán đóng vai trò quan trọng trong chất lượng vi sinh của đậu phụ, vì mẫu lấy tại chỗ luôn cho thấy sự tuân thủ các tiêu chuẩn vi sinh cao hơn so với mẫu lấy từ nơi khác. Điều này nhấn mạnh tầm quan trọng của điều kiện vận chuyển, thời gian bảo quản để duy trì chất lượng và an toàn vi sinh của đậu phụ. Do đó, việc mua đậu phụ sớm, ngay sau khi sản xuất hoặc lựa chọn các cửa hàng sản xuất và bán đậu phụ trực tiếp sẽ giúp đảm bảo chất lượng tốt hơn

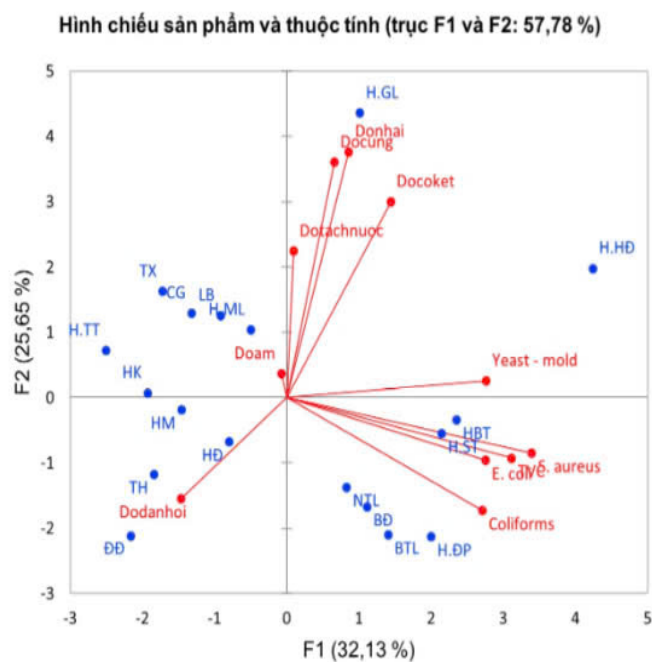
so với mẫu lấy từ nơi khác. Thêm vào đó, cần đẩy mạnh tăng cường kiểm soát vệ sinh tại cơ sở sản xuất, trong chuỗi cung ứng và tại điểm bán. Điều này giúp đảm bảo chất lượng sản phẩm và đảm bảo an toàn cho người tiêu dùng. Như vậy, có thể kết luận rằng, chất lượng vi sinh các mẫu đậu phụ tại chợ truyền thống chưa đạt yêu cầu theo quyết định số 46/2007/QĐ-BYT [20].

3.7. Phân nhóm HCA và PCA chất lượng đậu phụ tại một số quận, huyện trên địa bàn thành phố Hà Nội theo đặc tính cơ lý và chỉ tiêu vi sinh

Hình 4 thể hiện kết quả phân nhóm HCA và PCA dựa trên đặc tính cơ lý (độ cứng, độ cố kết, độ đàn hồi, độ nhai) và vi sinh của các mẫu đậu phụ ở một số quận, huyện tại thành phố Hà Nội. Hình 4a, 4b cho thấy, các mẫu đậu phụ được chia thành ba cụm riêng biệt phản ánh sự không đồng nhất trong sản xuất thủ công.



a)



b)

Hình 4. Phân nhóm HCA (a) và PCA (b) đặc tính cơ lý và vi sinh của đậu phụ ở một số quận, huyện tại thành phố Hà Nội

Nhóm thứ nhất: Các mẫu đậu phụ ở ĐĐ, LB, CG, H.ML, TX, H.TT, HK, HM, TH, HĐ được chia thành một cụm, đặc trưng bởi độ ẩm và độ đàn hồi. Đây là cụm có sự tương đồng cao, chủ yếu là các huyện ngoại thành hoặc các quận trung tâm và gần trung tâm. Sự tương đồng này có thể do tay nghề cũng như phương pháp làm đậu của các hộ gia đình khá giống nhau, hoặc cũng có thể các cơ sở sản xuất nhập cùng một nguồn nguyên liệu đậu tương (có nguồn gốc cũng như chất lượng tương tự nhau).

Nhóm thứ hai: Bao gồm các mẫu đậu phụ ở NTL, BĐ, H.ĐP, H.ST, BTL, HBT. Kết quả cho thấy, dù địa lý khác nhau, sản phẩm truyền thống vẫn hình thành nhóm có đặc điểm đặc tính cơ lý gần nhau. Điều này khẳng định kỹ thuật làm đậu phụ truyền thống ở thành phố Hà Nội đã đạt độ ổn định cao, hợp lý vì đây là các mẫu đều được sản xuất theo phương pháp truyền thống qua nhiều năm. Mặt khác, không có sự biến động lớn trong chất lượng về kết cấu, điều này tốt cho người tiêu dùng và thuận lợi cho việc xây dựng thương hiệu truyền thống.

Nhóm thứ ba: Gồm hai mẫu đậu phụ ở H.GL, H.HĐ đặc trưng bởi độ tách nước, độ nhai, độ cứng, độ cố kết. Đây là cụm có độ tương đồng thấp nhất, cho thấy các mẫu trong cụm này có đặc tính cơ lý khác biệt rõ rệt so với các mẫu của hai nhóm trên. Có thể giải thích rằng dù cùng là phương pháp truyền thống, nhưng kỹ thuật tay nghề của các cơ sở là khác nhau, có thể thay đổi tỉ lệ hoặc thời gian trong quy trình sản xuất: Thay đổi tỉ lệ đậu/nước làm ảnh hưởng đến hàm lượng protein và kết cấu gel; thời gian ép ngắn hoặc kỹ thuật ép thủ công kém nhất quán làm ảnh hưởng đến độ chắc và độ đàn hồi; sử dụng khuôn ép có kích thước và vật liệu khác nhau (gỗ, inox) dẫn đến thay đổi lực ép và thoát nước khác nhau...

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được đặc tính cơ lý đặc trưng của đậu phụ sản xuất bằng nước chua tại một số địa bàn tại thành phố Hà Nội. Các tính chất

cơ lý của các mẫu đậu phụ có đều sự biến đổi riêng biệt theo thời gian bảo quản. Trong 5 giờ bảo quản ở 13 - 15°C, độ cứng của đậu phụ tăng, độ nhai, độ giữ nước giảm, độ đàn hồi không biến đổi nhiều. Thêm vào đó, 61,1% mẫu không đạt chuẩn về chất lượng vi sinh theo Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT với tỷ lệ vượt ngưỡng cao ở các chỉ tiêu: TVC, nấm men, nấm mốc, *Coliforms*, *E. coli*, *S. aureus*. Tỷ lệ đạt chuẩn quy định vi sinh có sự chênh lệch rõ giữa mẫu sản xuất và bán tại chỗ (60% đạt) và mẫu chuyển đến chợ (12,5% đạt). Các mẫu đậu phụ có thể phân thành 3 nhóm riêng biệt. Nhóm thứ nhất: Các mẫu đậu phụ ở ĐĐ, LB, CG, H.ML, TX, H.TT, HK, HM, TH, HĐ. Nhóm thứ hai: Các mẫu đậu phụ ở NTL, BĐ, H.ĐP, H.ST, BTL, HBT. Nhóm thứ ba: Gồm hai mẫu đậu phụ ở H.GL, H.HĐ. Các kết quả thu được của nghiên cứu này là tiền đề cho việc cải tiến công nghệ sản xuất quy mô công nghiệp nhằm mục đích phát huy các đặc tính tốt của chất lượng đậu phụ sản xuất bằng nước chua truyền thống, ổn định chất lượng và đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học Công nghệ Hà Nội, đề tài mã số CT03/08-2024-3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zhang, M., Yang, H. & Holman, C. D. J (2009). Dietary intake of isoflavones and breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status. *Breast Cancer Research and Treatment*, 118(3), 553 - 563.
2. Takahashi, Y. & Konishi, T. (2011). Tofu (soybean curd) lowers serum lipid levels and modulates hepatic gene expression involved in lipogenesis primarily through its protein, not isoflavone, component in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(16), 8976 - 8984. <https://doi.org/10.1021/jf201403u>
3. Messina, M., Barnes, S. & Setchell, K. D. R. (2025). Perspective: Isoflavones - intriguing molecules but much remains to be learned about

these soybean constituents. *American Society for Nutrition*, 16(5), 100418. <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2025.100418>

4. Đỗ Minh (2018). Đậu làng Chài Vồng La. <https://hanoimoi.vn/dau-lang-chai-vong-la-553965.html>. Truy cập ngày 10/6/2025.

5. Hiến Nguyễn (2015). Làng nghề Đậu Kê (Hà Nội): Cải tạo môi trường, vực lại sản xuất. <https://vnbusiness.vn/kinh-doanh-xanh/lang-nghe-dau-ke-ha-noi-cai-tao-moi-truong-vuc-lai-san-xuat-1004852.html>. Truy cập 10/6/2025.

6. Dương Đình Tường (2023). Bài 1: Chuyện quanh bia đậu phụ Mơ. <https://nongnghiepmoitruong.vn/bai-1-chuyen-quanh-bia-dau-phu-mo-d354711.html>. Truy cập ngày 10/6/2025.

7. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 11923:2017. Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - Kỹ thuật lấy mẫu để phân tích vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi.

8. Wang, X., Luo, K., Liu, S., Adhikari, B. & Chen, J (2019). Improvement of Gelation Properties of Soy Protein Isolate Emulsion Induced by Calcium Cooperated with Magnesium. *Journal of Food Engineering*, 244: 32 - 39. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.025>

9. Nguyễn Quang Đức (2022). Nghiên cứu các yếu tố công nghệ ảnh hưởng đến quá trình đông tụ protein và chất lượng đậu phụ mơ Hà Nội định hướng sản xuất quy mô công nghiệp. Luận án Tiến sĩ chuyên ngành Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

10. Li, T., Rui, X., Li, W., Chen, X., Jiang, M. & Dong, M. (2014). Water distribution in tofu and application of T2 relaxation measurements in determination of tofu's water-holding capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(34): 8594 - 8601. <https://doi.org/10.1021/jf503427m>

11. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 4881-1:2015. Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm. Phương pháp định lượng vi sinh vật - Phần 1: Đếm khuẩn lạc ở 30°C bằng kỹ thuật đổ đĩa.

12. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 8275-2:2010. Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc - Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,95.

13. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 6848:2007. Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp định lượng coliform. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.

14. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 6187-1:2009. Chất lượng nước - Phát hiện và đếm *Escherichia coli* và vi khuẩn *coliform* - Phần 1: Phương pháp lọc màng.

15. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 11039-6:2015. Phụ gia thực phẩm - Phương pháp phân tích vi sinh vật - Phần 6: Phát hiện và định lượng *Staphylococcus aureus* bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc.

16. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4991:2005. Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Phương pháp định lượng *Clostridium perfringens* trên đĩa thạch - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.

17. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4992:2005. Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Phương pháp định lượng *Bacillus cereus* giả định trên đĩa thạch - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C.

18. Onodera, Y., Ono, T., Nakasato, K. & Toda, K. (2009). Homogeneity and microstructure of tofu depends on 11S/7S globulin ratio in soymilk and coagulant concentration. *Food Science and Technology Research*, 15(3), 265 - 274. <https://doi.org/10.3136/fstr.15.265>

19. Yookyung Kim và Louise Wicker (2005). Soybean cultivars impact quality and function of soymilk and tofu. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(15), 2514 - 2518. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2287>

20. Bộ Y tế (2007). Quyết định số 46/2007/BYT, ngày 19 tháng 12 năm 2007 về việc ban hành “Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm”.

IDENTIFICATION SOME CHARACTERISTICS OF TOFU PRODUCED BY FERMENTED TOFU WHEY IN VARIOUS DISTRICTS OF HA NOI CITY**Nguyen Hai Van¹, Luong Hong Nga¹,****Vu Hong Son¹, Nguyen Thi Hang¹, Pham Van Bac¹,****Nghiem Thi Hoai Thuong¹, Nguyen Ha Anh¹, Ho Phu Ha¹***¹School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Sciences and Technology***Abstract**

Tofu is a traditional product with high nutritional value and is widely consumed in the diets of Vietnamese people. In the craft production process in Ha Noi city, fermented whey is often used as a coagulant instead of chemical additives. This study was carried out to identify the specific characteristics of tofu produced using fermented whey, with samples collected from several traditional production small scale in some districts and suburban areas of Ha Noi city. The analysis of physical properties indicated that tofu produced with fermented whey in some districts and suburban areas of Ha Noi city exhibited distinctive textural characteristics, including a soft structure, good springiness. Specifically, hardness ranged from 0.60 to 1.73 kg, water holding capacity from 0.17 to 8.09%, chewiness from 9.43 to 35.14%, cohesiveness from 0.23 to 0.30 and springiness from 3.29 to 3.39. These physical properties tend to change differently during storage, except for the maintenance of chewiness and springiness. Microbiological analysis results indicated that 11 out of 18 samples, equivalent to 61.1%, did not meet the standards according to Decision 46/2007/BYT, with high exceedance rates in TVC, yeast, mold, *coliforms*, *E. coli* and *S. aureus*. *B. cereus* and *C. perfringens* were not detected. There was a significant difference between on-site tofu samples (60% met standards) and off-site tofu samples (12.5% met standards). However, the variation in quality among samples reflects inconsistency in production conditions and techniques, as shown in the HCA/PCA results. The findings of this study highlight the importance of standardizing tofu production technology.

Keywords: *Tofu, hardness, springiness, microorganism.***Ngày nhận bài:** 23/6/2025**Ngày chuyển phản biện:** 11/7/2025**Ngày thông qua phản biện:** 25/7/2025**Ngày duyệt đăng:** 8/8/2025

TUYỂN CHỌN CHỦNG *Lactobacillus fermentum* CÓ TIỀM NĂNG PROBIOTIC VÀ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP GAMMA AMINOBUTYRIC AXIT (GABA) CAO NHẪM ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT THỰC PHẨM CHỨC NĂNG

Trần Thanh Quỳnh Anh¹, Võ Văn Quốc Bảo¹, Đỗ Thị Bích Thủy^{2,*}

¹Khoa Cơ khí và Công nghệ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

²Trường Kỹ thuật và Công nghệ, Đại học Duy Tân

*Email: dotbichthuy@duytan.edu.vn

TÓM TẮT

Hiện nay, người tiêu dùng có xu hướng quan tâm đến thực phẩm tự nhiên có lợi cho sức khỏe. Trong đó, vai trò vi khuẩn lactic (LAB) với tính chất probiotic và khả năng sinh tổng hợp GABA là rất quan trọng. Trong nghiên cứu này, ba chủng *Lactobacillus fermentum* phân lập từ mắm rò được khảo sát tiềm năng probiotic và khả năng sinh tổng hợp GABA. Kết quả cho thấy, ba chủng có khả năng sống sót cao trong điều kiện môi trường mô phỏng đường tiêu hóa (khả năng chịu axit, chịu pepsin, muối mật và dịch tụy). Bên cạnh đó, chúng có khả năng tự kết dính trong khoảng từ $5,209 \pm 0,510\%$ đến $83,691 \pm 3,336\%$, khả năng đồng kết dính với vi khuẩn gây bệnh (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và *Salmonella typhimurium*) và bám dính với dung môi (chloroform, ethyl acetate và xylene) lần lượt là: $1,587 \pm 0,388\%$ đến $18,974 \pm 0,349\%$ và $3,104 \pm 0,563\%$ đến $17,179 \pm 2,308\%$. Trong số 10 kháng sinh thử nghiệm, cả ba chủng đều nhạy cảm với chloramphenicol và erythromycin. Trong khi đó, tetracycline không kháng bởi hai chủng *L. fermentum* M25 và *L. fermentum* M38. Ampicillin và penicillin không kháng bởi *L. fermentum* M25, đối với clindamycin chỉ kháng bởi *L. fermentum* M38. Kết quả này cho thấy, cả ba chủng đều là các ứng cử viên probiotic đầy hứa hẹn. Nếu xét chung tất cả các chỉ tiêu về probiotic, chủng *L. fermentum* M38 có tiềm năng này tương đối cao hơn so với hai chủng còn lại. Hơn nữa, nó có khả năng sinh tổng hợp GABA cao nhất ($5,076 \pm 0,294$ mM). Vì vậy, chủng *L. fermentum* M38 được đề xuất làm giống khởi động để lên men *in situ* sản xuất sản phẩm thực phẩm vừa có chức năng probiotic vừa giàu GABA.

Từ khóa: Vi khuẩn lactic, probiotic, tự kết dính, đồng kết dính, kháng kháng sinh.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự quan tâm của người tiêu dùng đối với các loại thực phẩm chức năng ngày càng tăng bởi ý thức về khả năng phòng ngừa bệnh tật và nâng cao sức khỏe [1]. Thực phẩm lên men được biết đến với nhiều lợi ích sức khỏe như: Giảm nguy cơ mắc bệnh tim mạch, đái tháo đường type 2 và béo phì [2], [3]. Những tác dụng tích cực này chủ yếu đến từ các lợi khuẩn trong thực phẩm lên men.

Theo Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hợp Quốc (FAO) và Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), probiotic là vi sinh vật sống (vi khuẩn hoặc nấm men) mang lại lợi ích sức khỏe khi dùng

với liều lượng phù hợp [4]. Các chủng probiotic dùng trong lên men thực phẩm có thể giúp giảm cholesterol, cải thiện dung nạp lactose, điều hòa miễn dịch và cân bằng hệ vi sinh đường ruột [5]. Để được chọn làm probiotic, chúng cần có khả năng chịu điều kiện của đường tiêu hóa, bám dính tốt và có hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh [6].

Thực phẩm lên men truyền thống ở Đông Nam Á là nguồn dồi dào vi khuẩn lactic (LAB) có tiềm năng probiotic và khả năng sinh tổng hợp GABA [7]. *Levilactobacillus brevis* F064A đã được công bố sinh tổng hợp GABA cao nhất ($4,18 \pm 0,07$ mg/mL) khi nuôi cấy ở pH 5,5, trong môi trường

chứa 2% glutamate và 2% glucose, ở 37°C trong 48 giờ [8]. Bên cạnh đó, theo Devi và cs (2023) [9], chủng *Weissella confusa* G2, phân lập từ thực phẩm lên men của Ấn Độ cũng có khả năng sinh GABA cao (246,2 mg/L), đồng thời chịu được pH thấp, muối và muối mật. Chủng này có khả năng tự kết dính mạnh (83%), độ kỵ nước cao và đặc tính kháng khuẩn tốt, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong phát triển thực phẩm chức năng chứa GABA.

Mắm rò là thực phẩm lên men truyền thống từ cá rò ở thành phố Huế, lên men tự nhiên với muối và tạo hương vị đặc trưng nhờ LAB. Tuy nhiên, hiểu biết về LAB trong mắm rò còn hạn chế. Nghiên cứu này đánh giá tiềm năng probiotic và khả năng sinh GABA của LAB phân lập từ mắm rò, làm cơ sở phát triển thực phẩm lên men chức năng hỗ trợ sức khỏe.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Ba chủng *Lactobacillus fermentum* M25, *Lactobacillus fermentum* M38 và *Lactobacillus fermentum* M44 được sử dụng trong nghiên cứu này được phân lập từ mắm rò và định danh bằng phương pháp MALDI TOF MS và giải trình tự *PheS* gene, hiện đang được bảo quản tại Trung tâm Lưu trữ vi khuẩn BCCM/LMG, Đại học Ghent, Vương quốc Bỉ. Tại đây, các chủng trên được ký hiệu theo Research number (R-number R-66890 để lưu trữ lần lượt là R-66877, R-66890 và R-66896). Các chủng kiểm định sử dụng trong phương pháp khảo sát ức chế vi khuẩn gây bệnh được cung cấp bởi Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, gồm: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus typhimurium*.

Môi trường dùng để nuôi cấy LAB và các chủng vi khuẩn gây bệnh lần lượt là môi trường MRS: de Man, Rogosa và Sharpe (MRS agar/broth) - thành phần cơ bản: Peptone 10 g/L, thịt bò (Beef extract) (10 g/L), men bia (yeast extract) 5 g/L, glucose 20 g/L, sodium acetate 5 g/L, triammonium citrate (2 g/L), magnesium sulfate $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 g/L), manganese sulfate $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,05 g/L, dipotassium phosphate K_2HPO_4 2 g/L, tween 80 polyoxyethylene sorbitan monooleate) 1 g/L, agar (nếu là môi trường rắn)

(15 g/L); môi trường LB: Luria-Bertani - thành phần cơ bản: Tryptone (peptone từ casein) 10 g/L, yeast extract (dịch chiết nấm men) 5 g/L, NaCl (muối ăn) 10 g/L, agar (nếu là môi trường rắn) 15 g/L.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khả năng chịu pH thấp

Các chủng LAB được nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ, sau đó ly tâm bằng máy DLAB - Mỹ ở tốc độ 5.000 g trong 10 phút. Kết tủa tế bào thu được huyền phù trong dung dịch đệm phosphate-saline (PBS, GIBCO - Mỹ) có chứa 9 g/L NaCl (Sigma-Aldrich, Hàn Quốc), 9 g/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ và 1,5 g/L KH_2PO_4 , với pH được điều chỉnh xuống 2,5. Hỗn hợp này tiếp tục được ủ ở 37°C trong 4 giờ. Mẫu được lấy tại thời điểm ban đầu (0 giờ) và sau 4 giờ. Mật độ quang của huyền phù sinh khối được xác định ở bước sóng 600 nm (A_{600}) với hai mốc thời gian là 0 giờ (A_{T_0}) và 4 giờ (A_{T_4}) [10]. Tỷ lệ sống sót của vi khuẩn được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống sót (H\%)} = (A_{T_4}/A_{T_0}) \times 100 (\%)$$

2.2.2. Khả năng tự kết dính và đồng kết dính

- Khả năng tự kết dính của vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ, sau đó ly tâm (máy DLAB - Mỹ) ở tốc độ 5.000 g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng và rửa lại bằng dung dịch đệm PBS. Kết tủa tế bào được huyền phù trong PBS ở nồng độ 10^8 CFU/ml. Một phần huyền phù vi khuẩn (3 mL) được vortex trong 10 giây và đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 600 nm (A_0). Hỗn hợp sau đó được ủ ở 37°C trong 20 giờ và độ hấp thụ quang của dịch nổi được đo tại bước sóng 600 nm (A_{20}) [11]. Tỷ lệ tự kết dính được tính theo công thức:

$$\text{Tự kết dính (\%)} = [(A_0 - A_{20}) / A_0] \times 100$$

- Khả năng đồng kết dính của vi khuẩn:

Khả năng đồng kết dính giữa các chủng LAB và vi khuẩn gây bệnh được khảo sát dựa trên phương pháp của Oh và cs (2018) [11]. Dịch nuôi cấy qua đêm của chủng probiotic và vi khuẩn gây bệnh được trộn đều, vortex trong 10 giây và ủ ở 37°C trong 5 giờ. Độ hấp thụ quang của dịch nổi được đo tại bước sóng 600 nm. Tỷ lệ đồng kết dính được tính theo công thức:

Đồng kết dính (%) = $[1 - \text{Amix}/(\text{Aprobiotic} + \text{Apathogens})/2] \times 100$

2.2.3. Tính kỵ nước của bề mặt tế bào

Tính kỵ nước của bề mặt tế bào vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đo khả năng bám dính của vi sinh vật vào dung môi xylene, chloroform và ethyl acetate [12]. Các tế bào LAB ở pha tĩnh được ly tâm (máy ly tâm DLAB - Mỹ) ở tốc độ 5.000 g trong 10 phút, sau đó rửa hai lần bằng dung dịch KNO_3 0,1 M. Kết tủa tế bào được tái huyền phù trong KNO_3 0,1 M. Tỷ lệ giữa dung môi và dung dịch huyền phù được duy trì ở mức 1: 2 (v/v) và giá trị độ hấp thụ quang ban đầu (A_0) được đo tại bước sóng 600 nm. Hỗn hợp sau đó được để yên trong 10 phút, lắc đều trong 2 phút và để lắng trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Phần dung dịch lỏng phía trên được lấy ra và đo lại độ hấp thụ quang (A_1) ở bước sóng 600 nm. Tỷ lệ kỵ nước được tính theo công thức:

$$H(\%) = (A_0 - A_1/A_0) \times 100$$

2.2.4. Khả năng chịu pepsin

Để kiểm tra khả năng sống sót của vi khuẩn trong môi trường có chứa pepsin, dịch dạ dày mô phỏng (*in vitro*) được chuẩn bị bằng cách hòa tan pepsin (3 mg/ml, Sigma-Aldrich, Hàn Quốc) trong dung dịch muối sinh lý vô trùng (0,85% NaCl, w/v) và điều chỉnh pH xuống 2,5. Sau đó, huyền phù LAB có mật độ tế bào 10^7 CFU/mL được bổ sung vào dịch với tỷ lệ 1% (v/v) và ủ ở 37°C trong 4 giờ. Hỗn hợp được đo độ hấp thụ ở bước sóng 600 nm (T_0) rồi tiến hành ủ ở 37°C trong 4 giờ và xác định mật độ tế bào ở bước sóng 600 nm (T_4) [10]. Tỷ lệ sống sót (%) được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống sót (\%)} = (T_4/T_0) \times 100$$

2.2.5. Khả năng chịu muối mật và dịch tụy

Khả năng chịu muối mật và dịch tụy được khảo sát theo phương pháp của Tokatlı và cs (2015) [10]. Môi trường tá tràng được mô phỏng bằng cách cho 0,3% (w/v) muối mật (Sigma-Aldrich, Hàn Quốc) và 1 mg/ml dịch tụy (Sigma-Aldrich, Hàn Quốc) hòa tan trong dung dịch muối sinh lý vô trùng (0,85% NaCl, w/v) đã được điều chỉnh pH lên 8,0. Sau đó, bổ sung 1 mL huyền phù LAB có mật độ tế bào 10^7 CFU/mL và ủ ở 37°C trong 6 giờ. Tiến hành đo

mật độ quang với bước sóng 600 nm ở thời điểm ban đầu (AT_0) và sau 6 giờ ủ (AT_6). Tỷ lệ sống sót của vi khuẩn được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống sót (H\%)} = (AT_6/AT_0) \times 100 (\%)$$

2.2.6. Khả năng kháng kháng sinh

Khả năng nhạy cảm với kháng sinh của các chủng LAB được kiểm tra theo phương pháp của Das và cs (2016) [13]. Tất cả các loại kháng sinh đều được mua từ Công ty Gold Biotechnology, Inc. - Mỹ. Các chủng LAB được kiểm tra khả năng kháng với các kháng sinh: Erythromycin (15 µg), streptomycin (10 µg), clindamycin (2 µg), ampicillin (10 µg), kanamycin (30 µg), vancomycin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), tetracycline (30 µg), penicillin (10 µg) và gentamicin (10 µg) bằng phương pháp khuếch tán đĩa. Các đĩa thạch được quan sát sự xuất hiện hoặc không có vùng ức chế sau khi ủ ở 37°C trong 24 giờ.

2.2.7. Khả năng kháng khuẩn

Tính kháng khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp “agar spot” (nhỏ giọt) của Hernández và cs (2005) [14]. Vi khuẩn chỉ thị trong thí nghiệm này là *Samonella*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*. Các chủng LAB được hoạt hóa, nuôi tăng sinh để thu sinh khối và tái huyền phù bằng NaCl 0,85%, tiếp tục nuôi trong 5 mL MRS lỏng 10^7 CFU/mL ở 37°C trong 24 giờ. Lấy 5 µL dung dịch nhỏ giọt trên đĩa có chứa 10 mL MRS agar để khô. Tiến hành ủ các mẫu đã nhỏ giọt LAB ở 37°C trong 18 giờ. Trộn 10^5 CFU/mL vi khuẩn chỉ thị vào môi trường bán đặc (thạch 1%) phủ lên đĩa đã có chứa những dòng vi LAB phát triển. Những đĩa này được ủ trong 24 - 48 giờ ở 37°C tùy thuộc vào chủng chỉ thị và sự xuất hiện của vùng ức chế được quan sát. Quan sát và ghi nhận kích thước vùng sáng vô khuẩn xuất hiện quanh khuẩn lạc LAB.

2.2.8. Phương pháp phân tích hàm lượng GABA bằng sắc ký lỏng hiệu năng (HPLC)

Chuẩn bị mẫu và phân tích hàm lượng GABA bằng HPLC được thực hiện theo phương pháp của Thụy và cs (2022) [15]. GABA trong môi trường nuôi cấy được tinh sạch bằng cách ly tâm và loại bỏ protein bằng axit sulfosalicylic, sau đó thực hiện phản ứng dabsyl hóa bằng 4-dimethylaminoazobenzen-4-sulfonyl chloride. Hợp

chất Dab-syl-GABA sau đó được định lượng bằng phương pháp HPLC, sử dụng cột C18 (250 × 4,6 mm, kích thước hạt 5 µm), với bước sóng phát hiện 465 nm, chế độ rửa đẳng dòng và pha động gồm dung dịch đệm amoni axetat 25 mM có chứa 0,1% axit acetic: acetonitrile theo tỷ lệ 26: 74 (v/v). Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

2.2.9. Phương pháp xác định mật độ tế bào

Mật độ tế bào trong huyền phù sinh khối được xác định bằng phương pháp đo độ đục (đo mật độ quang (OD)) ở bước sóng 600 nm. OD = 1 tương đương với 8.10^8 CFU/mL. Từ đó tính toán lượng tế bào tiếp giống vào môi trường nuôi cấy [16].

2.2.10. Phương pháp phân tích số liệu

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD) của ba lần phân tích lặp lại. Phân tích phương sai một chiều (One-way ANOVA) kết hợp với kiểm định HSD Tukey's được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa các giá trị trung bình. Các khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê khi $p \leq 0,05$. Toàn bộ các phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm SPSS 20 (SPSS, Chicago, Mỹ).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát khả năng probiotic của các chủng LAB

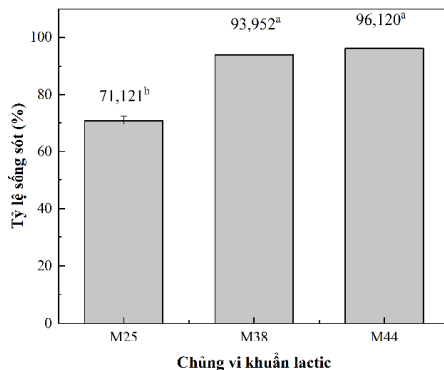
3.1.1. Khả năng sống sót của các chủng LAB qua đường tiêu hóa mô phỏng

Khả năng chịu pH thấp, pepsin, muối mật và dịch tụy trong đường tiêu hóa của các chủng *L. fermentum* M25, *L. fermentum* M38 và *L.*

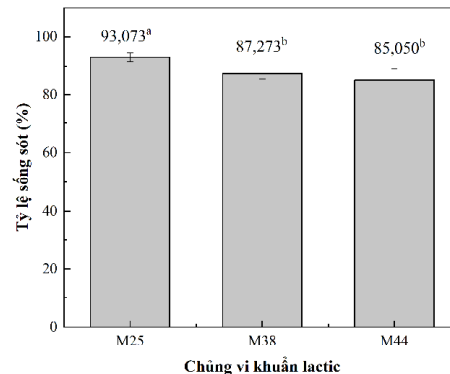
fermentum M44 được thể hiện ở hình 1. Tất cả các chủng đều có khả năng sống sót cao trong môi trường khắc nghiệt của đường tiêu hóa như chịu pepsin, chịu pH thấp khi dạ dày rỗng (pH 2 - 3). Kết quả cho thấy, sau 4 giờ, khả năng chịu pH thấp (pH 2,5) và chịu pepsin dao động lần lượt là $71,121 \pm 1,516\%$ đến $96,120 \pm 1,993\%$ và $85,050 \pm 3,816\%$ đến $93,073 \pm 1,535\%$. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Sabna và cs (2021) [17], theo đó chủng *Ent. faecium* BS phân lập từ các sản phẩm sữa có khả năng chịu đựng tốt với điều kiện pH thấp. Chủng *W. confusa* KR780676, phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống của Ấn Độ thể hiện khả năng tăng trưởng và sống sót tốt trong các điều kiện mô phỏng dạ dày - ruột [18].

Sau 6 giờ, khả năng sống sót trong dịch tụy và muối mật cao, từ $83,870 \pm 3,084\%$ đến $96,307 \pm 0,494\%$. Tương tự, các chủng *W. confusa* GCC_19R1 và *W. confusa* KR780676 được công bố là có khả năng sinh trưởng đáng kể trong môi trường có dịch vị nhân tạo, muối mật và dịch tụy [18], [19].

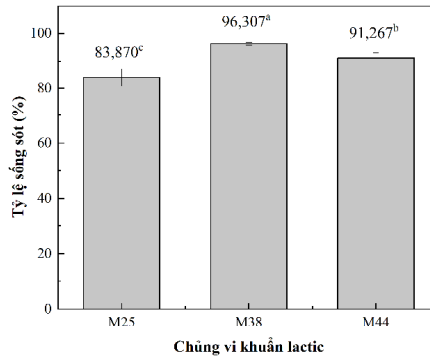
Như vậy, nhờ khả năng chịu đựng các điều kiện khắc nghiệt mô phỏng đường tiêu hóa người (Gastro Intestinal Tract, GIT), các chủng này có thể tồn tại và đi qua đường tiêu hóa với số lượng lớn, khi được sử dụng làm probiotic. Nếu xét cho tất cả 3 chỉ tiêu khảo sát gồm: Chịu pH, pepsin, muối mật và dịch tụy, chủng *L. fermentum* M38 là tương đối cao hơn so với hai chủng còn lại.



(a)



(b)



(c)

Hình 1. Khả năng sống sót của các chủng LAB qua đường tiêu hoá mô phỏng

Ghi chú: (a): Khả năng chịu pH thấp; (b): Khả năng chịu pepsin; (c): Khả năng chịu muối mật và dịch tụy. Số liệu là giá trị trung bình của ba lần phân tích lặp lại $\pm$ độ lệch chuẩn. Các giá trị trung bình trong mỗi biểu đồ không có cùng chữ cái thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,05$). (M25: *L. fermentum* M25; M38: *L. fermentum* M38; M44: *L. fermentum* M44).

3.1.2. Khả năng kết dính và bám dính

Bảng 1 thể hiện tính chất kết dính và bám dính dung môi của các chủng *L. fermentum* được thông qua các thử nghiệm tự kết dính, đồng kết dính và tính kỵ nước. Sau 20 giờ ủ, *L. fermentum* M38 có tỷ lệ tự kết dính cao nhất ($83,691 \pm 3,336\%$), tiếp theo là *L. fermentum* M44 ($74,054 \pm 2,172\%$) và thấp nhất là *L. fermentum* M25 ($5,209 \pm 0,510\%$). Tỷ lệ phần trăm đồng kết dính của các chủng *L. fermentum* được khảo sát với các chủng vi khuẩn *E. coli* từ $1,587 \pm 0,388\%$ đến $7,100 \pm 0,274\%$, với *S. aureus* từ $5,417 \pm 0,494\%$ đến $18,974 \pm 0,349\%$ (trong đó *L. fermentum* M25 là không có khả năng kết dính với *S. aureus*) và với *S. typhimurium* từ $5,891 \pm 0,559\%$ đến $12,671 \pm 0,729\%$ (trong đó *L. fermentum* M44 là không có khả năng kết dính với *S. typhimurium*).

Tương tự, *L. fermentum* M38 thể hiện tính kỵ nước cao nhất là đối với chloroform ($17,179 \pm 2,308\%$), với xylene. Trong khi đó, *L. fermentum* M44 có tính kỵ nước cao nhất là $4,676 \pm 0,410\%$ trong các chủng được thử nghiệm. Đối với dung

môi ethyl acetate, tính kỵ nước không thể hiện sự sai khác về ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,05$) giữa hai chủng *L. fermentum* M38 ($4,314 \pm 0,594\%$) và *L. fermentum* M44 ($3,104 \pm 0,563\%$).

Các thử nghiệm về khả năng tự kết dính và tính kỵ nước được thực hiện nhằm đánh giá mức độ bám dính và tiềm năng hiện diện của các chủng LAB trên tế bào biểu mô ruột. Tỷ lệ tự kết dính trên 50% được xem là cao. Trong ba chủng được thử nghiệm, hai chủng là *L. fermentum* M38 và *L. fermentum* M44 cho thấy khả năng tự kết dính vượt mức này ($83,691 \pm 3,336\%$ và $74,054 \pm 2,172\%$). Trong khi đó, chủng *Weissella confusa* KR780676 được phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống của Ấn Độ thể hiện tính kỵ nước rất cao (trên 90%), nhưng lại có khả năng tự kết dính ở mức thấp đến trung bình (9,6 - 36,6%) [18].

Nhìn chung, trong số ba chủng được nghiên cứu, khả năng kết dính và bám dính dung môi của chủng *L. fermentum* M38 là tương đối cao so với 2 chủng còn lại (Bảng 1).

Bảng 1. Khả năng tự kết dính, đồng kết dính và bám dính dung môi của các chủng LAB

STT	Tính chất probiotic		Chủng LAB		
			<i>L. fermentum</i> M25	<i>L. fermentum</i> M38	<i>L. fermentum</i> M44
1	Khả năng tự kết dính (%)		$5,209^c \pm 0,510$	$83,691^a \pm 3,336$	$74,054^b \pm 2,172$
2	Khả năng đồng kết	<i>E. coli</i>	$1,816^b \pm 0,176$	$7,100^a \pm 0,274$	$1,587^b \pm 0,388$
		<i>S. aureus</i>	-	$18,974^a \pm 0,349$	$5,417^b \pm 0,494$

	dính của vi khuẩn (%)	<i>S. typhymurium</i>	5,891 ^b ± 0,559	12,671 ^a ± 0,729	-
3	Tính kỵ nước của bề mặt tế bào (%)	Xylene	3,355 ^c ± 0,399	3,780 ^b ± 0,404	4,676 ^a ± 0,410
		Chloroform	6,293 ^b ± 0,304	17,179 ^a ± 2,308	-
		Ethyl acetate	-	4,314 ^a ± 0,594	3,104 ^a ± 0,563

Ghi chú: Số liệu là giá trị trung bình của ba lần phân tích lặp lại ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trung bình trong mỗi hàng không có cùng chữ cái thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,05$); (-): Thể hiện sự không kết dính và kỵ nước.

3.1.3. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng LAB

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, đa số các chủng LAB được khảo sát nhạy cảm (NR) đối với ampicillin (trừ *L. fermentum* M38 và *L. fermentum* M44), chloramphenicol, clindamycin (trừ *L. fermentum* M25 và *L. fermentum* M44), penicillin (trừ *L. fermentum* M38 và *L. fermentum* M44), tetracylin (trừ *L. fermentum* M44). Các chất kháng sinh (gentamycin, kanamycin, streptomycin, vancomycin) có khả năng kháng lại vi khuẩn là những chất ức chế protein. Trong khi đó, các chủng vi khuẩn có khả năng kháng lại kháng sinh thông qua trung gian glycopeptide [11].

Kết quả này khá phù hợp với các kết quả nghiên cứu về khả năng kháng kháng sinh của LAB. Theo Oh và cs (2018) [11], bảy chủng LAB

(*W. cibaria* SCCB 2306, *S. thermophilus* SCML 337, *E. faecium* SC 54, *S. thermophilus* SCML 300, *P. acidilactici* SDL 1402, *P. acidilactici* SDL1405, *P. acidilactici* SDL 1406) đều nhạy cảm với 10 loại kháng sinh là: Tetracycline, kanamycin, erythromycin, gentamicin, clindamycin, penicillin và chloramphenicol nhưng kháng với streptomycin và ampicillin.

Có 7 chủng trong số 9 chủng được nghiên cứu kháng ít nhất một loại kháng sinh và 6 chủng kháng đa kháng sinh. Tỷ lệ xuất hiện các chủng kháng vancomycin, neomycin, gentamycin và streptomycin lần lượt là 11,1%, 77,8%, 66,7% và 44,4% [20].

Từ kết quả này có thể thấy rằng, cả ba chủng LAB được phân lập từ mắ m rồ Huế có khả năng kháng kháng sinh, đáp ứng được tiêu chí tuyển chọn làm probiotic.

Bảng 2. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng LAB với các loại kháng sinh

STT	Loại kháng sinh	Chủng LAB		
		<i>L. fermentum</i> M25	<i>L. fermentum</i> M38	<i>L. fermentum</i> M44
1	Ampicillin (Am)	NR	R	R
2	Chloramphenicol (Cl)	NR	NR	NR
3	Clindamycin (cL)	R	NR	R
4	Erythromycin (Er)	NR	NR	NR
5	Gentamycin (Ge)	R	R	R
6	Kanamycin (Kn)	R	R	R
7	Penicillin (Pn)	NR	R	R
8	Streptomycin (Sm)	R	R	R
9	Tetracylin (Te)	NR	NR	R
10	Vancomycin (Va)	R	R	R

Ghi chú: Kháng: R (Resistant), không kháng: NR (Not Resistant).

3.1.4. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh

Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng có tiềm năng probiotic là một lợi thế để bổ sung vào thực phẩm. Thử nghiệm hoạt tính đối kháng nhằm kiểm tra khả năng ức chế các tác nhân gây bệnh có trong ruột (Bảng 3). Dựa trên vùng ức chế (mm), hoạt tính kháng khuẩn đáng kể đã được quan sát ở các chủng *L. fermentum* M25, *L. fermentum* M38 và *L. fermentum* M44 đối với các chủng gây bệnh được thử nghiệm (*E. coli*, *S. aureus* và *S. typhimurium*). *L. fermentum* M38 và *L. fermentum* M44 cho thấy hoạt tính tương đương, trong khi *L. fermentum* M25 cho thấy hoạt tính thấp nhất. Hoạt tính kháng khuẩn của chủng LAB có thể là do chúng có khả năng sản xuất bacteriocin [19]. Theo Islam và cs (2023) [21], chủng *L. plantarum* DMR14 thể hiện mức độ hoạt

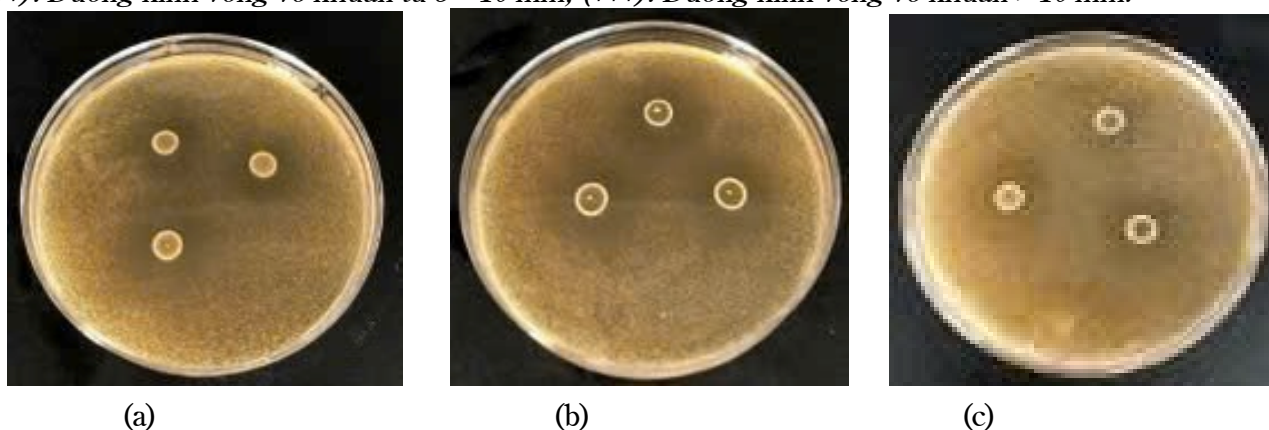
động kháng khuẩn khác nhau đối với sáu loại vi khuẩn gây bệnh. Kết quả cho thấy, tỷ lệ ức chế tương đối yếu hơn đối với *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *S. aureus* và không ức chế đáng kể nào đối với *E. coli* và *Bacillus cereus*. Bên cạnh đó, Falfán-Cortés và cs (2022) [22] cũng đã nghiên cứu khả năng ức chế *Escherichia coli* (O157:H7E09), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) và *Salmonella enterica* serotype typhimurium (ATCC 14028) của các chủng *Lactocaseibacillus paracasei* được phân lập từ phô mai Tenate.

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, tất cả các chủng LAB đều có hoạt tính kháng khuẩn. Vòng kháng khuẩn nằm trong khoảng 3,2 - 28 mm.

Bảng 3. Khả năng kháng khuẩn của các chủng LAB

STT	Chủng	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>
1	<i>L. fermentum</i> M25	++	++	++
2	<i>L. fermentum</i> M38	+++	+++	+
3	<i>L. fermentum</i> M44	+++	+++	++

Ghi chú: Mức độ xuất hiện khả năng tính kháng khuẩn: (+): Đường kính vòng vô khuẩn < 5 mm; (++) : Đường kính vòng vô khuẩn từ 5 – 10 mm; (+++) : Đường kính vòng vô khuẩn > 10 mm.



Hình 2. Vòng kháng khuẩn của chủng *L. fermentum* M38

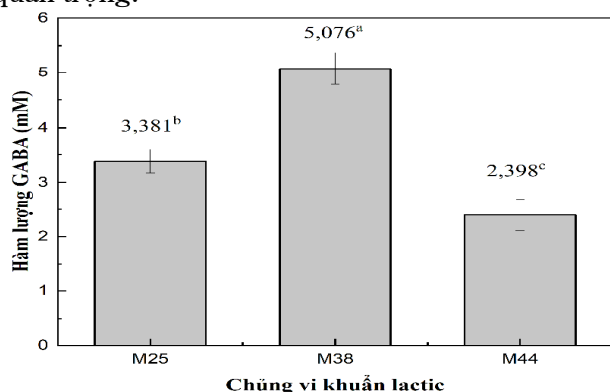
Ghi chú: (a): Vòng kháng *E. coli*; (b): Vòng kháng *S. aureus*; (c): Vòng kháng *S. typhimurium*

3.2. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp GABA cao của các chủng LAB.

Ba chủng *L. fermentum* M25, *L. fermentum* M38 và *L. fermentum* M44 đều có khả năng sinh tổng hợp GABA đáng kể (Hình 3). Trong đó, *L. fermentum* M38 cho hàm lượng GABA trong môi trường nuôi cấy cao nhất ($5,076 \pm 0,294$ mM).

Khả năng sản xuất GABA của các chủng LAB phụ thuộc vào hoạt tính của enzyme Glutamate decarboxylase (GAD) cũng như enzyme L-glutamate dehydrogenase (GDH) [23], [24]. Sự khác biệt về hoạt tính của các enzyme này dẫn đến sự khác biệt về sản lượng GABA của các chủng. Kết quả nghiên cứu của Siragusa và cs (2007) [25]

cho thấy, hàm lượng GABA khác nhau giữa các chủng *Lactobacillus paracasei* PF6, *L. plantarum* C48 và *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* PR1 phân lập từ pho mát. Do đó, việc sàng lọc các ứng cử viên LAB tiềm năng nhất để tăng cường hàm lượng GABA trong các sản phẩm thực phẩm cụ thể là rất quan trọng.



Hình 3. Khả năng sinh tổng hợp GABA của các chủng LAB

Ghi chú: Các tế bào được nuôi trong môi trường MRS ở mật độ tế bào ban đầu 10^7 CFU/mL có pH 6,2 ở 37°C trong 24 giờ. Số liệu là giá trị trung bình của ba lần phân tích lặp lại $\pm$ độ lệch chuẩn. Các giá trị trung bình trong biểu đồ không có cùng chữ cái thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,05$). (M25: *L. fermentum* M25; M38: *L. fermentum* M38; M44: *L. fermentum* M44).

Tóm lại, trong số ba chủng được khảo sát, dựa vào một số tính chất probiotic và khả năng sinh tổng hợp GABA, *L. fermentum* M38 là chủng có hứa hẹn nhất để làm giống khởi động trong lên men *in situ* sản xuất sản phẩm thực phẩm lên men có chức năng bảo vệ sức khỏe. Theo các nghiên cứu đã công bố, các chủng thuộc loài *L. fermentum* đã được sử dụng trong lên men thực phẩm làm tăng giá trị dinh dưỡng của sản phẩm [26], [27].

4. KẾT LUẬN

Cả ba chủng LAB có khả năng sống sót cao trong điều kiện mô phỏng hệ tiêu hóa (khả năng chịu axit, chịu pepsin, muối mật và dịch tụy). Chúng có khả năng tự kết dính trong khoảng từ $5,209 \pm 0,510\%$ đến $83,691 \pm 3,336\%$, khả năng đồng kết dính với vi khuẩn gây bệnh (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và *Salmonella typhimurium*) và bám dính với dung môi

(chloroform, ethyl acetate và xylene) lần lượt là: $1,587 \pm 0,388\%$ đến $18,974 \pm 0,349\%$ và $3,104 \pm 0,563\%$ đến $17,179 \pm 2,308\%$. Đối với 10 kháng sinh dùng trong nghiên cứu, chỉ có chloramphenicol và erythromycin là cả ba chủng đều nhạy cảm. Trong khi đó, tetracycline không kháng bởi hai chủng *L. fermentum* M25 và *L. fermentum* M38. Ampicillin và penicillin không kháng bởi *L. fermentum* M25, đối với clindamycin chỉ kháng bởi *L. fermentum* M38. Chủng *L. fermentum* M38 có tiềm năng probiotic tốt hơn so với hai chủng còn lại. Chủng này còn có khả năng sinh tổng hợp GABA cao nhất ($5,076 \pm 0,294$ mM) nên có thể được chọn để ứng dụng trong sản xuất thực phẩm lên men.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Daliri, E. B.-M. & Lee, B. H. (2015a). Current trends and future perspectives on functional foods and nutraceuticals. *Beneficial Microorganisms in Food and Nutraceuticals*, 27, 221 - 244.
2. Eussen, S. J., van Dongen, M. C., Wijckmans, N., den Biggelaar, L., Elferink, S. J. O., Singh-Povel, C. M., et al. (2016). Consumption of dairy foods in relation to impaired glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus: The maastricht study. *British Journal of Nutrition*, 115(08), 1453 - 1461.
3. Tapsell, L. C. (2015). Fermented dairy food and CVD risk. *British Journal of Nutrition*, 113(S2), S131 - S135.
4. Morelli, L. & Capurso, L. (2012). FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46, S1 - S2.
5. Daliri, E. B.-M. & Lee, B. H. (2015b). New perspectives on probiotics in health and disease. *Food Science and Human Wellness*, 4(2), 56 - 65.
6. Devi, S. M., Archer, A. C. & Halami, P. M. (2015). Screening, characterization and *in vitro* evaluation of probiotic properties among lactic acid bacteria through comparative analysis. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(3), 181 - 192.
7. Ilango, S. & Antony, U. (2021). Probiotic microorganisms from non-dairy traditional fermented foods. *Trends in Food Science and Technology*, 118, 617 - 638.

8. Kanklai, J., Thongwai, N., Rungsirivanich, P., Tragoolpua, Y. & Pekkoh, J. (2022). Optimization of GABA production and partial gad gene identification of potential probiotic *Levilactobacillus brevis* F064A isolated from Thai fermented sausage. *Chiang Mai Journal of Science*, 49(4), 1013 - 1027.
9. Devi, P. B., Rajapuram, D. R., Jayamanohar, J., Verma, M., Kavitha, D., Meenachi Avany, B. A., Rani, P. U., Ravi, R. & Shetty, P. H. (2023). Gamma-aminobutyric acid (GABA) production by potential probiotic strains of indigenous fermented foods origin and RSM based production optimization. *LWT - Food Science and Technology*, 176, 114511.
10. Tokath, M., Gu'lgö'r, G., Bağ' der Elmacı, S., Arslankoz Isleyen, N. & Ö'zcelik, F. (2015). *In vitro* properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *BioMed Research International*.
11. Oh, A., Daliri, E. B. M. & Oh, D. H. (2018). Screening for potential probiotic bacteria from Korean fermented soybean paste: *In vitro* and *Caenorhabditis elegans* model testing. *LWT- Food Science and Technology*, 88(August 2017), 132 - 138.
12. Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A. & Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50(1), 135 - 142.
13. Das, P., Khowala, S. & Biswas, S. (2016), *In vitro* probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 383 - 390.
14. Hernández, D., Cardell, E. & Zárate, V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: Initial characterization of *plantaricin* TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 77 - 84.
15. Thuy, D. T. B., Nguyen, T. A. & Vandamme, P. (2022). Isolation, screening, identification and optimization of culture parameters to produce γ -aminobutyric acid by *Lactiplantibacillus pentosus* R13, an isolate from Ruoc (fermented shrimp paste), *Applied Food Biotechnology*, 9(1), 1 - 8.
16. Beal, J., Farny, N. G., Haddock-Angelli, T., Selvarajah, V., Baldwin, G. S., Buckley-Taylor, R., Gershtater, M., Kiga, D., Marken, J., Sanchania, V., Sison, A. & Workman, C. T. (2020). Robust estimation of bacterial cell count from optical density, *Communications Biology*, 3(1), 512.
17. Sabna, B. S., Thankappan, B., Mahendran, R., Muthusamy, G. & Angayarkanni, J. (2021). Evaluation of GABA production and probiotic activities of *Enterococcus faecium* BS5. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13, 993 - 1004.
18. Sharma, S., Kandasamy, S., Kavitha, D. & Shetty, P. H. (2018). Probiotic characterization and antioxidant properties of *Weissella confusa* KR780676, isolated from an Indian fermented food. *LWT- Food Science and Technology*, 97, 53 - 60.
19. Nath, S., Roy, M., Sikidar, J., Deb, B., Sharma, I. & Guha, A. (2021). Characterization and *in-vitro* screening of probiotic potential of novel *Weissella confusa* strain GCC_ 19R1 isolated from fermented sour rice. *Current Research in Biotechnology*, 3, 99 - 108.
20. Wang, K., Zhang, H., Feng, J., Ma, L., Fuente-Núñez, C. de la, Wang, S. & Lu, X. (2019). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China. *Journal of Agriculture and Food Research*, 1, 100006.
21. Islam, S., Biswas, S., Jabin, T., Moniruzzaman, M., Biswas, J., Uddin, M. S., Akhtar- E-Ekram, M., Elgorban, A. M., Ghodake, G., Syed, A., Saleh, M. A. & Zaman, S. (2023). Probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* DMR14 for preserving and extending shelf life of fruits and fruit juice, *Heliyon*, 9(6), 1 - 13.
22. Falfán-Cortés, R. N., Mora-Peñaflor, N., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Acevedo-Sandoval, O. A., Franco-Fernández, M. J. & Castro-Rosas, J. (2022). Characterization and evaluation of the probiotic potential *in vitro* and *in situ* of *Lactocaseibacillus paracasei* Isolated from Tenate Cheese. *Journal of Food Protection*, 85(1), 112 - 121.
23. Rashmi, D. Zanan, R. John, S. Khandagale, K. & Nadaf, A. (2018). γ -aminobutyric acid (GABA):

Biosynthesis, role, commercial Production and applications. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier B. V. 1 (57), 413 - 452.

24. Cui, Y. Miao, K. Niyaphorn, S. Qu, X. (2020). Production of gamma - aminobutyric acid from lactic acid bacteria: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3): 1 - 21.

25. Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., Gobbetti, M. (2007). Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Appl Environ Microbiol*, 73(22), 7283 - 7290.

26. Meng, J., Wang, J. L., Hao, Y. P., Zhu, M. X. and Wang, J. (2023). Effects of *Lactobacillus fermentum* GD01 fermentation on the nutritional components and flavor substances of three kinds of bean milk. *LWT*, 184: 115006.

27. Zhang, Z., Wang, J. L., Hao, Y.P., Meng, Y., Meng, J., Chen, J. H., Ding, C. H. and Xi, J. (2025). Effects of *Lactobacillus fermentation* on the composition, existing forms, digestive characteristics and antioxidant activity of polyphenols in three kinds of bean milk. *Food Bioscience*, 68, 106482.

SCREENING OF PROBIOTIC AND GABA-PRODUCING POTENTIAL OF *Lactobacillus fermentum* M38 STRAINS, AIMING FOR APPLICATION IN FUNCTIONAL FOOD FERMENTATION

Tran Thanh Quynh Anh¹, Vo Van Quoc Bao¹, Do Thi Bich Thuy²

¹Faculty of Engineering and Food Technology,

University of Agriculture and Forestry, Hue University

²School of Engineering and Technology, Duy Tan University

Abstract

Currently, consumers tend to be interested in natural and healthy foods, with lactic acid bacteria (LAB) playing a very important role. In this study, *Lactobacillus fermentum* M38 was suggested as a starter culture for *in situ* fermentation to produce a probiotic and GABA-rich food, among three LAB strains isolated from "mam ro" (fermented fish paste). Therefore, all three strains were investigated for their probiotic potential and GABA biosynthesis capability. The results showed that all three LAB strains exhibited high survival rates under simulated gastrointestinal conditions and pancreatic juice). Additionally, they demonstrated autoaggregation abilities ranging from $5.209\% \pm 0.510\%$ to $83.691\% \pm 3.336\%$, coaggregation with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*) and adhesion to solvents (chloroform, ethyl acetate and xylene) of $1.587\% \pm 0.388\%$ to $18.974\% \pm 0.349\%$ and $3.104\% \pm 0.563\%$ to $17.179\% \pm 2.308\%$, respectively. Among the 10 antibiotics tested, only chloramphenicol and erythromycin showed sensitivity across all three strains. Meanwhile, tetracycline was not resisted by *L. fermentum* M25 and *L. fermentum* M38. Ampicillin and penicillin were not resisted by *L. fermentum* M25, while clindamycin was only resisted by *L. fermentum* M38. These findings suggest that these three LAB strains are promising probiotic candidates. Considering all probiotic properties, *L. fermentum* M38 showed relatively higher potential compared to the other two strains. Furthermore, it demonstrated the highest GABA biosynthesis capability (5.076 ± 0.294 mM). Therefore, this strain can be selected for application in fermented food production. The results of this study lay the groundwork for the application of beneficial microorganisms in food technology.

Keywords: Lactic acid bacteria, probiotic, autoaggregation, coaggregation, antibiotic resistance.

Ngày nhận bài: 24/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 3/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 24/7/2025

Ngày duyệt đăng: 5/8/2025

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN TRÍCH LY BẰNG ENZYME ĐẾN CHẤT LƯỢNG DẦU HẠT THANH LONG RUỘT ĐỎ (*Hylocereus polyrhizus*)

Mai Cát Duyên^{1,2}, Võ Huỳnh Như³, Lê Duy Nghĩa¹,

Dương Kim Thanh¹, Phan Thị Thanh Quế^{1,*}

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ

² Khoa Kỹ Thuật Công nghệ, Trường Đại học Nam Cần Thơ

³ Sinh viên ngành Công nghệ thực phẩm, Đại học Cần Thơ

* Email: pttque@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Hạt thanh long ruột đỏ là nguồn nguyên liệu giàu lipid và các hợp chất có hoạt tính sinh học, thích hợp cho quá trình trích ly dầu. Phương pháp enzyme được đánh giá là thân thiện với môi trường, hiệu quả cao và bảo toàn tốt các hợp chất hoạt tính sinh học so với các phương pháp trích ly truyền thống như: Dung môi hữu cơ hay ép cơ học. Mục đích của nghiên cứu nhằm xác định ảnh hưởng của điều kiện trích ly bao gồm nồng độ enzyme Viscozyme L (1,0; 1,5; 2,0; 2,5%) và pH dịch trích (3,5; 4,0; 4,5; 5,0) đến hiệu quả trích ly, hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học (vitamin E, TPC, DPPH), thành phần axit béo và các chỉ tiêu chất lượng (peroxide, axit) của dầu. Kết quả nghiên cứu cho thấy, dầu hạt thanh long ruột đỏ được trích ly bằng enzyme Viscozyme L với tỉ lệ bổ sung 1,5% và pH dịch trích 4,0 đạt hiệu suất thu hồi là 73,41%, đồng thời, hàm lượng TPC và vitamin E lần lượt là 0,35 mgGAE/g và 1.879,53 mg/kg. Dầu thu được chứa 80,41% axit béo chưa bão hòa, trong đó axit linoleic chiếm 55,31%. Ngoài ra, các chỉ tiêu chất lượng như: Chỉ số peroxide, chỉ số axit đều nằm trong giới hạn cho phép. Từ đó cho thấy, tiềm năng ứng dụng của dầu hạt thanh long trong thực phẩm, được phẩm do có chứa giá trị dinh dưỡng và khả năng chống oxy hóa tốt.

Từ khóa: Dầu hạt thanh long, enzyme, pH, trích ly.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thanh long được trồng phổ biến ở Việt Nam, cả nước có hơn 64 nghìn ha trồng cây thanh long tại 63/63 tỉnh [1]. Trong quả thanh long phần thịt quả chiếm khoảng 66,2 - 67,4%, phần vỏ chiếm khoảng 24,5 - 25,2% và hạt chiếm khoảng 7,9 - 8,6% [2]. Trong quá trình chế biến, một phần lớn các phụ phẩm như vỏ, hạt sẽ được thải ra. Nếu tận dụng được nguồn phụ phẩm này thì ngoài việc góp phần làm giảm ô nhiễm môi trường còn làm tăng giá trị kinh tế cho quả thanh long. Hạt thanh long có chứa hàm lượng dầu khá cao (31 - 34%) [3]. Dầu hạt thanh long là nguồn cung cấp nhiều hợp chất chức năng rất tốt đối với sức khỏe, dầu hạt thanh long có chứa lượng lớn axit béo thiết yếu, thậm chí cao hơn cả lượng axit béo trong dầu ô liu [4, 5] và dầu mè [6]. Đặc biệt, axit linoleic (C18: 2) chiếm

45 - 55% và axit oleic (C18: 1) chiếm 18 - 24% [7]. Axit linoleic có tác dụng chống ung thư tuyến tiền liệt, phòng tránh béo phì, chống lão hóa, chống tia tử ngoại và cải thiện sưng viêm. Axit oleic có tác dụng giảm huyết áp, cấu thành myelin trong hệ thần kinh, tốt cho hệ tiêu hóa [8]. Bên cạnh đó, dầu từ hạt thanh long có chứa lượng đáng kể hợp chất tocopherol [7]. Tocopherol được xem như là một chất chống oxy hóa tự nhiên, có thể được tìm thấy trong hầu hết các thực phẩm có nguồn gốc thực vật dưới các dạng cấu trúc khác nhau, phổ biến là dạng α - và γ -tocopherol [9]. Trong đó, α -tocopherol là chất chống oxy hóa tốt nhất trong cơ thể người và nó cũng là một hợp chất hữu cơ sinh học rất có lợi ích cho sức khỏe như giúp giảm nguy cơ bệnh mạch vành [10]. γ -tocopherol có những tác động tích cực đến sức khỏe như tính

khỏe như tính chống viêm và giảm nguy cơ bệnh tim mạch và ung thư [11].

Trong các phương pháp trích ly dầu từ thực vật, phương pháp trích ly bằng enzyme đang được chú ý nhờ khả năng cải thiện hiệu quả trích ly, bảo vệ được các dưỡng chất có trong dầu và giảm thiểu việc sử dụng các hóa chất độc hại. Phương pháp này sử dụng các enzyme để phân hủy tế bào trong hạt, giúp giải phóng dầu một cách tối ưu. Tuy nhiên, hiệu quả của quá trình trích ly phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm: Loại enzyme, nồng độ enzyme, pH dịch trích, nhiệt độ và thời gian trích ly. Mặc dù có nhiều nghiên cứu về việc sử dụng enzyme trong trích ly dầu từ các loại hạt khác, nhưng việc áp dụng phương pháp này đối với hạt thanh long ruột đỏ vẫn còn hạn chế. Thành phần và cấu trúc của hạt có dầu rất phức tạp, do đó việc sử dụng hỗn hợp của hai hoặc nhiều loại enzyme có tác dụng hiệp đồng có thể làm gia tăng hiệu quả của quá trình trích ly [12]. Viscozyme L. là một hỗn hợp enzyme tiết ra từ *Aspergillus aculeatus* với các hoạt tính của các enzyme như: Xylanase, arabanase, β -glucanase, hemicellulase và cellulase [13]. Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định ảnh hưởng của nồng độ enzyme Viscozyme L. và pH dịch trích đến hiệu quả trích ly dầu hạt thanh long ruột đỏ. Bên cạnh đó, các chỉ tiêu về hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học (vitamin E, TPC, DPPH), thành phần axit béo trong dầu và các chỉ tiêu chất lượng khác của dầu như màu sắc, chỉ số peroxide, chỉ số axit cũng được xác định.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hạt thanh long ruột đỏ được thu nhận từ Công ty chế biến nước thanh long tại huyện Phụng Hiệp, tỉnh Hậu Giang được vận chuyển về đến phòng thí nghiệm. Hạt thanh long được làm sạch, sấy khô ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 8 giờ, độ ẩm hạt < 5% và bảo quản ở nhiệt độ -20°C để sử dụng trong các thí nghiệm [3]. Chế phẩm enzyme sử dụng trong nghiên cứu là enzyme Viscozyme L. dạng dung dịch có màu nâu, được sản xuất từ nấm *Aspergillus aculeatus* với hoạt tính enzyme ban đầu là 100

FBG (Fungal Beta-Glucanase unit)/g (Novozyme, Đan Mạch).

2.2. Bố trí thí nghiệm

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme Viscozyme L. bổ sung đến hiệu quả trích ly và chất lượng dầu hạt thanh long

Cân chính xác 200 g hạt thanh long đã được nghiền cho vào cốc thủy tinh 1.000 mL, sau đó cho nước cất vào với tỉ lệ hạt thanh long/nước là 1/3. Enzyme Viscozyme L. được bổ sung với các tỉ lệ khác nhau là: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5% (w/w). Hỗn hợp sau khi bổ sung enzyme được khuấy đều và ủ ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 120 phút. Tiếp đó, hỗn hợp được nâng nhiệt đến nhiệt độ 90°C trong thời gian 5 phút để vô hoạt enzyme và làm nguội nhanh đến nhiệt độ môi trường. Tiếp theo, hỗn hợp được ly tâm với tốc độ 10.000 rpm trong 5 phút. Sau khi ly tâm, mẫu được tách thành 3 lớp: trên cùng là dầu hạt thanh long, giữa là nước, dưới cùng là xác hạt thanh long. Dầu được thu nhận, lọc chân không và sấy ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 3 giờ để loại nước còn sót lại. Xác định hiệu suất thu hồi dầu hạt thanh long và phân tích các chỉ tiêu chất lượng bao gồm hàm lượng polyphenol tổng số (TPC), khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH, chỉ số axit, chỉ số peroxide, màu sắc (hệ màu L*, a*, b*).

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng pH của dịch trích đến hiệu suất trích ly và chất lượng dầu hạt thanh long

Hạt thanh long được chuẩn bị tương tự như nội dung 2.2.1. pH dịch trích được điều chỉnh lần lượt với các mức: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 sử dụng HCl 1N và NaOH 1N. Enzyme Viscozyme L. được bổ sung với tỉ lệ thích hợp từ kết quả nội dung 2.2.1. Các công đoạn tiếp theo và chỉ tiêu theo dõi tương tự như nội dung 2.2.1.

2.3. Phương pháp phân tích

Hiệu suất thu hồi được tính bằng công thức: $\frac{m_d}{m_{cb}} \cdot 100$, trong đó: m_d là khối lượng dầu thu được, m_{cb} là khối lượng chất béo có trong nguyên liệu. Màu sắc được đo trực tiếp bằng máy đo màu Konica Minolta CR-410 với hệ màu Lab. Hàm

lượng polyphenol tổng số (TPC) được xác định dựa trên phản ứng khử của thuốc thử Folin-Ciocalteu hấp thụ ánh sáng cực đại ở bước sóng 765 nm [14]; khả năng loại gốc tự do DPPH được xác định bằng phản ứng tiếp xúc với các chất chống oxy hóa như hợp chất phenol, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) sẽ nhận hydro và bị khử làm chuyển màu dung dịch từ màu tím sang màu vàng sáng, và được đo quang phổ ở bước sóng 517 nm [15]; hàm lượng vitamin E được xác định dựa trên phản ứng lên màu của vitamin E với thuốc thử gồm FeCl_3 và 2,2-dipyridin (hoặc ophenantrolin), vitamin E sẽ khử Fe^{3+} thành Fe^{2+} và Fe^{2+} phản ứng với 2,2-dipyridin (hoặc ophenantrolin), tạo một hợp chất màu đỏ hấp thụ cực đại ở bước sóng 520 nm [16]. Chỉ số axit được xác định theo TCVN 6127:2010 [17]; chỉ số peroxide được xác định theo TCVN 6121:2018 [18].

Thành phần axit béo trong dầu hạt thanh long được xác định bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS), bao gồm 2 bước theo phương pháp của Liaotrakoon và cs (2012) [19], Phan Thị Thanh Quế và cs (2018) [3] có sự điều chỉnh:

Bước 1: Methyl ester hóa các triacylglycerol (TAG)

Các TAG trong dầu được chuyển thành các methyl ester của các axit béo (FAME) tương ứng bằng cách hòa tan 250 mg (cân chính xác đến 0,1 mg) trong 9 mL n-hexane và cho phản ứng với 1 mL dung dịch KOH 2N trong methanol. Hỗn hợp được lắc khoảng 30 giây, sau đó để ổn định. Lấy 1 mL lớp n-hexane phía trên cho vào lọ vial GC.

Bước 2: Xác định thành phần hỗn hợp methyl ester

Thành phần methyl ester của các axit béo được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí 8860 với đầu dò khối phổ MSD 5977B của hãng Agilent Technologies (Mỹ), với cột mao quản HP-5ms thành phần pha tĩnh 5% phenylmethylsiloxan (30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μm). Heli được sử dụng làm khí mang với tốc độ dòng 1 mL/phút, lượng mẫu bơm vào cột là 1 μL , tỉ lệ chia dòng 5: 1. Chương trình nhiệt độ như sau: Nhiệt độ đầu 60°C, tốc độ gia nhiệt 4°C/phút đến 250°C. Thành phần axit béo

được xác định thông qua các đỉnh của phổ đồ tương ứng với khối lượng phân tử có trong thư viện phổ NIST 20 đi kèm với hệ thống GC-MS.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thu nhận và xử lý thống kê thông qua phân tích phương sai ANOVA từ chương trình Statgraphics Centurion 15.1 để kiểm tra sự khác biệt ý nghĩa giữa các nghiệm thức thông qua LSD (Least Significant Difference). Kết quả nghiên cứu được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (mean $\pm$ SD).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các thành phần đặc tính cơ bản trong nguyên liệu hạt thanh long

Phân tích đặc điểm cơ bản của nguyên liệu là một trong những bước cơ bản và quan trọng trước khi thực hiện thí nghiệm. Theo kết quả nghiên cứu của Phan Thị Thanh Quế và cs (2024) [20] cho thấy, hạt thanh long sử dụng trong nghiên cứu có hàm lượng chất khô tổng số trong hạt đạt 95,70% và hàm lượng chất béo tổng số cao (31,82%), tương đồng với kết quả nghiên cứu của Liaotrakoon (2013) [7]. Bên cạnh đó, hạt thanh long ruột đỏ là nguồn giàu vitamin E và TPC cao, lần lượt là 2.918,72 mg/kg và 1,07 mgGAE/g chất khô. Đồng thời, hoạt tính chống oxy hóa của hạt thanh long ruột đỏ được đánh giá thông qua khả năng khử gốc tự do DPPH, ở mức rất cao (87,71%).

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme bổ sung đến hiệu suất trích ly và chất lượng dầu

Nồng độ enzyme bổ sung ảnh hưởng đến chất lượng của dầu hạt thanh long. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, khi tỷ lệ enzyme bổ sung tăng từ 1 - 2,5% thì chỉ số peroxide dao động trong khoảng 9,0 - 12,75 mEqO₂/kg, tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Kết quả này nằm trong giới hạn cho phép theo TCVN 7597:2018 quy định chỉ số peroxide tối đa đối với dầu chưa qua tinh luyện là 15 mEqO₂/kg dầu [21]. Nghiên cứu của Najafian và cs (2009) [22] đối với quá trình trích ly dầu ô liu bằng enzyme cũng có kết quả tương tự, nồng độ enzyme không ảnh hưởng đến hàm lượng peroxide của dầu. Kết quả này cao hơn so với dầu

trích ly bằng n-hexan (6,0 mEqO₂/kg dầu) và ethanol (3,8 mEqO₂/kg dầu) [20]. Nghiên cứu của Boyapati và cs (2023) [23] cũng có kết quả tương tự, chỉ số peroxide của dầu hạt thanh long ruột đỏ

trích ly bằng n-hexan là 3,16 mEqO₂/kg dầu. Điều này có thể do hoạt động của lipase trong hạt hoạt động ở giai đoạn gia nhiệt trong quy trình trích ly bằng enzyme [24].

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme bổ sung đến chỉ số peroxide và chỉ số axit của dầu hạt thanh long

Nồng độ enzyme (%)	Chỉ số peroxide (mEqO ₂ /kg)	Chỉ số axit (mgKOH/g)	TPC (mgGAE/g)	DPPH (%)	Vitamin E (mg/kg)
1,0	9,00 ± 2,12 ^{ns}	2,87 ± 0,08 ^a	0,17 ± 0,01 ^b	49,44 ± 1,54 ^{ns}	1.390,10 ± 8,19 ^b
1,5	13,00 ± 3,54 ^{ns}	2,72 ± 0,04 ^b	0,20 ± 0,00 ^{ab}	46,03 ± 1,06 ^{ns}	1.542,14 ± 10,24 ^a
2,0	12,75 ± 3,18 ^{ns}	2,75 ± 0,00 ^{ab}	0,21 ± 0,00 ^a	49,06 ± 2,93 ^{ns}	1.520,42 ± 16,38 ^a
2,5	12,75 ± 1,77 ^{ns}	2,67 ± 0,04 ^b	0,22 ± 0,02 ^a	51,05 ± 4,24 ^{ns}	1.516,36 ± 14,74 ^a

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%, ns: Không khác biệt.

Khi thay đổi nồng độ enzyme từ 1 - 2,5% thì chỉ số axit của dầu hạt thanh long thay đổi, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Chỉ số axit của dầu hạt thanh long có giá trị cao nhất ở nồng độ enzyme 1,0 - 2,87 mgKOH/g. Kết quả này nằm trong giới hạn cho phép theo TCVN 7597:2018 [21], quy định chỉ số axit tối đa đối với dầu chưa qua tinh luyện là 4 mgKOH/g. Kết quả này ngược lại so với kết quả nghiên cứu của Najafian và cs (2009) [22] cho thấy, khi thay đổi nồng độ enzyme đối với quá trình trích ly dầu ô liu bằng enzyme đã đưa ra kết luận không có sự khác biệt đáng kể nào được ghi nhận về chỉ số axit. Chỉ số axit giảm khi tăng nồng độ enzyme bổ sung có thể là do ở nồng độ enzyme cao sẽ giúp giải phóng nhiều các hợp chất chống oxy hóa có trong dầu như phenolic, vitamin E (Bảng 3 và 4). Những hợp chất này có tính chống oxy hóa cao làm cho chỉ số axit trong sản phẩm thấp.

Nồng độ enzyme có ảnh hưởng đến thành phần các hợp chất có hoạt tính sinh học và khả năng chống oxy hóa của dầu hạt thanh long. Khi nồng độ enzyme tăng từ 1,0 - 1,5% thì hàm lượng TPC và vitamin E có xu hướng tăng dần, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng tỉ lệ enzyme bổ sung thì không có sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức ($p > 0,05$). Hàm lượng TPC và vitamin E dao động lần lượt trong khoảng 0,17 - 0,22 mg GAE/g và 1.390,10 - 1.542,14 mg/kg. Kết quả này cho thấy, hàm lượng vitamin E trong dầu hạt thanh long trích ly bằng

enzyme cao hơn so với dầu hạt thanh long trích ly bằng dung môi n-hexane 892,44 mg/kg và dầu hạt thanh long trích ly có sự hỗ trợ của lò vi sóng 1.050,37 mg/kg [23]. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Latif và Anwar (2009) [25] khi sử dụng enzyme để trích ly dầu hạt hướng dương cho thấy, hàm lượng vitamin E (833 - 842 mg/kg) cao hơn so với trích ly bằng dung môi n-exane (799 mg/kg), do nhiệt độ cao hơn trong quá trình trích ly dầu bằng dung môi làm giảm hàm lượng tocopherol trong dầu. Ngược lại, kết quả nghiên cứu của Nyam và cs (2009) [26] cho thấy, hàm lượng vitamin E trong dầu dừa Kalahari thu được khi trích ly bằng enzyme thấp hơn so với phương pháp trích ly bằng dung môi. Kết quả khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) về khả năng loại gốc tự do DPPH ở các nồng độ enzyme khác nhau, khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH dao động trong khoảng 46,03 - 51,05%. Trong nghiên cứu của Boyapati và cs (2023) [23] thì khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH của dầu hạt thanh long trích ly bằng lò vi sóng có giá trị là 68,4% cao hơn so với trích ly dầu hạt thanh long bằng enzyme. Không có dữ liệu được báo cáo trước đây về các thông số DPPH của dầu hạt thanh long trích ly bằng enzyme để so sánh.

Thành tế bào thực vật bao gồm cellulose, hemicellulose và pectin ngăn cản quá trình giải phóng dầu cũng như sự xâm nhập của dung môi. Enzyme Viscozyme L. tác động lên các liên kết C, C-C và nhóm CH₂ ở cellulose; liên kết C-O, O-C-O

ở hemicellulose và các liên kết C-O và C-C ở pectin [27]. Xử lý enzyme làm tăng khả năng phá hủy tế bào, tăng khả năng hòa tan, giảm độ nhớt của dung dịch và giải phóng các hợp chất có hoạt tính sinh học [28, 29]. Khi cơ chất tiếp xúc với enzyme, phá vỡ thành tế bào sẽ phóng thích phenolic từ các hợp chất phenol ở dạng liên kết, có sự chuyển hóa các hợp chất phenolic ở dạng không hòa tan thành hòa tan, có sự phân hủy của lignin dẫn đến phóng thích dẫn xuất axit phenolic hoặc làm phát sinh thêm phenolic mới, làm tăng hàm lượng TPC trong dầu hạt thanh long [30]. Khi các điều kiện khác được giữ cân bằng, tốc độ phản ứng phụ thuộc vào nồng độ enzyme. Khi nồng độ enzyme tăng thì sẽ làm tăng phản ứng giữa enzyme và cơ

chất tăng giúp giải phóng các polyphenol, tocopherol có trong hạt thanh long. Nhưng khi tiếp tục gia tăng nồng độ enzyme thì hàm lượng TPC, vitamin E không thay đổi do nồng độ enzyme đã đạt mức bão hòa với nồng độ cơ chất [31]. Trong một số trường hợp, sự gia tăng lượng tocopherol và các thành phần hoạt tính sinh hoạt khác trong dầu trích ly bằng enzyme có thể là do giảm sự tạo phức của các hợp chất polysaccharide của hạt và do đó tăng cường phân chia thành pha dầu [27].

Bên cạnh các chỉ tiêu hóa học thì màu sắc và hiệu suất thu hồi cũng được đánh giá. Kết quả thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme bổ sung đến hiệu suất thu hồi và màu sắc của dầu

Nồng độ enzyme (%)	L*	a*	b*	Hiệu suất thu hồi trên hàm lượng chất béo tổng số (%)
1,0	51,54 ± 0,43 ^{ns}	2,70 ± 0,79 ^{ns}	9,42 ± 1,59 ^{ns}	55,11 ± 0,44 ^b
1,5	52,15 ± 0,20 ^{ns}	3,08 ± 0,22 ^{ns}	10,56 ± 1,08 ^{ns}	73,41 ± 5,42 ^a
2,0	50,43 ± 2,18 ^{ns}	2,87 ± 0,57 ^{ns}	9,86 ± 0,08 ^{ns}	68,14 ± 2,15 ^a
2,5	47,92 ± 4,32 ^{ns}	2,43 ± 0,53 ^{ns}	10,42 ± 3,16 ^{ns}	53,64 ± 0,18 ^b

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%, ns: Không khác biệt.

Màu sắc của sản phẩm được thể hiện qua giá trị độ sáng L*, độ màu a* (từ màu xanh lá (-) đến đỏ (+)) và b* (từ xanh dương (-) đến vàng (+)). Kết quả bảng 2 cho thấy, nồng độ enzyme bổ sung không ảnh hưởng đến giá trị L*, a*, b*, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Màu sắc của dầu chỉ bị ảnh hưởng bởi phương pháp trích ly. Theo Sonawane và Arya (2017) [32] thì dầu hạt thanh long trích ly theo tất cả các phương pháp đều có màu vàng, nhưng dầu thu được từ trích ly bằng chất lỏng siêu tới hạn có màu nhạt hơn nhiều. Trong nghiên cứu của Latif và Anwar (2009) [25] màu sắc (đơn vị màu đỏ, màu vàng) trích ly dầu hạt hướng dương bằng enzyme thấp hơn so với trích ly bằng dung môi. Giá trị màu cao hơn trong các loại dầu được trích ly bằng dung môi có thể là do khả năng hòa tan các sắc tố trong dung môi tốt hơn như caroten và diệp lục. Cường độ màu thấp của các mẫu trích ly bằng enzyme là thuận lợi vì việc tẩy trắng dầu trong quá trình tinh luyện có thể không cần thiết, giúp làm giảm chi phí [26].

Hiệu suất thu hồi dầu tăng từ 55,11 - 73,41% khi nồng độ enzyme tăng từ 1,0 - 1,15%, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ enzyme bổ sung đến 2,5% thì hiệu suất trích ly dầu hạt thanh long giảm, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), không có khác biệt ý nghĩa thống kê giữa nồng độ enzyme bổ sung 2% và 2,5%. Điều này có thể do nồng độ enzyme cao có thể dẫn đến việc trích ly các thành phần không mong muốn như đường hòa tan, do đó hạn chế giải phóng dầu [33]. Có thể giải thích theo phương trình Michaelis-Menten, khi nồng độ enzyme càng tăng thì tốc độ phản ứng của enzyme cũng tăng, nếu lượng enzyme ít chưa đủ để thủy phân toàn bộ cơ chất dẫn đến hiệu suất thu hồi thấp và tốc độ phản ứng đạt tối đa khi tất cả enzyme đều kết hợp với cơ chất. Bên cạnh đó, khi tốc độ thủy phân đạt cực đại nếu tăng lượng enzyme thì sẽ có tác dụng ngược, bởi vì khi nồng độ enzyme lớn làm cho dung dịch thủy phân bị đặc lại sẽ gây cản trở enzyme tiếp xúc với cơ chất

dẫn đến quá trình thủy phân diễn ra chậm nên tạo sản phẩm ít hơn [34].

3.3. Ảnh hưởng của pH dịch trích đến hiệu quả trích ly dầu hạt thanh long và chất lượng dầu

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH dịch trích đến chỉ số peroxide và chỉ số axit của dầu hạt thanh long

pH	Chỉ số peroxide (mEqO ₂ /kg)	Chỉ số axit (mgKOH/g)	TPC (mg GAE/g)	DPPH (%)	Vitamin E (mg/kg)
3,5	14,12 ± 0,18 ^a	3,03 ± 0,19 ^{ns}	0,20 ± 0,01 ^c	48,71 ± 1,51 ^{ns}	1.436,43 ± 4,10 ^c
4,0	12,23 ± 0,32 ^{ab}	2,75 ± 0,11 ^{ns}	0,27 ± 0,03 ^b	48,63 ± 1,83 ^{ns}	1.642,05 ± 4,10 ^b
4,5	10,57 ± 0,04 ^b	2,88 ± 0,26 ^{ns}	0,35 ± 0,06 ^a	50,67 ± 1,04 ^{ns}	1.879,53 ± 8,19 ^a
5,0	10,65 ± 0,05 ^b	2,67 ± 0,35 ^{ns}	0,18 ± 0,02 ^c	49,81 ± 0,16 ^{ns}	1.463,94 ± 10,24 ^c

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%, ns: Không khác biệt.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, pH dịch trích có ảnh hưởng đến hàm lượng TPC và hàm lượng vitamin E của dầu hạt thanh long. Hàm lượng TPC tăng lên cùng với sự tăng pH dịch trích từ 3,5 - 4,5 tương ứng với giá trị hàm lượng TPC thu được tăng từ 0,20 mgGAE/g lên 0,35 mgGAE/g. Tuy nhiên, khi pH dịch trích tiếp tục tăng lên 5,0 thì hàm lượng TPC thu được giảm 0,18 mgGAE/g, khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với pH 3,5 và pH 4,0. Hàm lượng vitamin E trong dầu hạt cũng có xu hướng tăng dần và đạt cao nhất ở giá trị pH 4,5 (1.879,53 mg/kg). Bản chất của enzyme là một protein nên pH ảnh hưởng đến khả năng tích điện từ đó dẫn đến mức độ hoạt động của enzyme. Kết quả này cho thấy ở pH 4,5 enzyme hoạt động mạnh phân hủy tế bào nhiều giúp giải phóng nhiều TPC và vitamin E. Hợp chất polyphenol là những chất chống oxy hóa mạnh nên dễ oxy ở pH cao, pH thấp ức chế quá trình oxy hóa của hợp chất polyphenol và hàm lượng thu được cao hơn. Polyphenol phân cực mạnh, càng không bền trong môi trường axit mạnh. Do đó, khả năng kháng oxy tăng lên là do tăng hàm lượng axit phenolic và giảm hàm lượng polyphenol không bền trong axit [35].

Khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH phụ thuộc vào hàm lượng các chất chống oxy hóa có trong sản phẩm như TPC và vitamin E. Khi thay đổi pH dịch trích nhận thấy khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH dao động trong khoảng 48,63 - 50,67%, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Kết quả

Kết quả ảnh hưởng của pH dịch trích đến chỉ số peroxide, chỉ số axit và hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học cũng như khả năng chống oxy hóa của dầu hạt thanh long được trình bày ở bảng 3.

nghiên cứu này thấp hơn so với dầu hạt bí ngô (52,21%) được trích ly bằng phương pháp ép lạnh [36].

Chỉ số peroxide của dầu hạt thanh long có xu hướng giảm khi pH tăng dần từ 3,5 - 5,0, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Điều này có thể được giải thích, khi ta tăng pH dịch trích lên đến khoảng pH tối thích của enzyme Viscozyme L. thì sẽ giúp giải phóng các hợp chất phenolic, tocopherol là những hợp chất chống oxy hóa. Tuy nhiên, kết quả này vẫn nằm trong giới hạn cho phép của TCVN 7597:2018 [21]. Đồng thời, chỉ số peroxide của dầu hạt thanh long thu được từ kết quả nghiên cứu này thấp hơn so với chỉ số peroxide trong dầu ô liu (8 - 15 mEqO₂/kg dầu), dầu hạt đậu tây và dầu hạt quả mâm xôi đỏ (26 - 43 mEqO₂/kg dầu) [37]. Tuy nhiên, chỉ số peroxide của dầu hạt thanh long lại cao hơn so với dầu hạt quả mâm xôi đen (0,6 mEqO₂/kg dầu).

Chỉ số axit dao động trong khoảng 2,67 - 3,03 mgKOH/g, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Kết quả này nằm trong giới hạn cho phép theo TCVN 7597:2018 [21]. Từ đó có thể khẳng định, hạt thanh long là một loại nguyên liệu tốt, chỉ số axit thấp chứng tỏ trong dầu hầu như không có mặt của các axit béo tự do phân tử nhỏ dễ gây ôi hỏng dầu.

pH dịch trích ảnh hưởng đến màu sắc (L^* , a^* , b^*) và hiệu suất thu hồi của dầu. Kết quả được trình bày ở bảng 4 và hình 1.

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH dịch trích đến màu sắc (L^* , a^* , b^*) và hiệu suất thu hồi của dầu

pH	L^*	a^*	b^*	Hiệu suất thu hồi trên hàm lượng chất béo tổng số (%)
3,5	$47,72 \pm 0,12^c$	$3,70 \pm 1,58^{ns}$	$11,81 \pm 1,10^a$	$60,73 \pm 2,37^b$
4,0	$52,57 \pm 0,80^a$	$3,24 \pm 0,45^{ns}$	$10,55 \pm 1,08^a$	$73,41 \pm 5,42^a$
4,5	$51,48 \pm 0,23^a$	$1,86 \pm 0,32^{ns}$	$10,66 \pm 0,39^a$	$66,53 \pm 0,93^{ab}$
5,0	$49,69 \pm 0,30^b$	$2,18 \pm 0,06^{ns}$	$8,26 \pm 0,01^b$	$49,16 \pm 0,40^c$

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%, ns: Không khác biệt.



Hình 1. Hình ảnh minh họa dầu hạt thanh long với pH dịch trích thay đổi từ trái sang phải lần lượt là: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0

Kết quả thống kê ở bảng 4 và hình 1 cho thấy pH dịch trích có ảnh hưởng đến giá trị L^* và b^* của dầu hạt thanh long sau khi trích ly, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Cụ thể, khi pH dịch trích của dầu hạt thanh long từ 4,0 - 4,5 đều cho giá trị độ sáng L^* và giá trị b^* cao, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), cho dầu có màu vàng sáng, đây là màu sắc cơ bản của dầu. Có thể nói ở pH từ 4 - 4,5 thích hợp cho enzyme Viscozyme L. hoạt động giúp giải phóng các lipochrom màu vàng và xanh lục (caroten và chất diệp lục) từ mô thực vật, do đó làm tăng khả năng hòa tan và hàm lượng của chúng trong dầu.

Hiệu suất thu hồi tăng khi pH của dịch trích ly tăng từ 3,5 - 4,0; tuy nhiên, khi pH tiếp tục tăng thì hiệu suất có xu hướng giảm. pH môi trường có ảnh hưởng đến mức độ ion hóa của cơ chất và độ bền của enzyme. Trung tâm hoạt động của enzyme được hình thành từ những nhóm chức có khả năng ion hóa. Khi pH quá thấp hoặc quá cao làm thay đổi sự tích điện của phân tử enzyme và cả cơ chất. Sự thay đổi điện tích này có thể làm biến tính các

cấu trúc không gian của protein cấu tạo nên enzyme, làm mất hoạt tính của chúng [26]. pH là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng của enzyme, mỗi enzyme chỉ hoạt động nhất định ở pH xác định gọi là pH hoạt động tối ưu của enzyme. Nếu quá trình trích ly dầu thực hiện tại điểm đẳng điện của protein, thì quá trình này có thể bị cản trở vì protein có xu hướng không hòa tan ở giá trị pH này, do đó quá trình giải phóng dầu bị ức chế. Trong hầu hết các loại dầu, các phân tử lipid được gắn với các phân tử protein. Do đó, giá trị pH sử dụng không những thuận lợi cho hoạt động của enzyme mà còn phải xa điểm đẳng điện protein [38, 39]. Điều này cho thấy, pH trong khoảng 4,0 - 4,5 phù hợp cho hoạt động của enzyme Viscozyme L., gây phá vỡ màng tế bào, giúp cho các túi dầu tách ra khỏi màng một cách dễ dàng hơn. Khi pH càng tăng thì hoạt lực của enzyme Viscozyme L càng giảm và làm cho quá trình thủy phân hỗn hợp dịch thanh long giảm. Do đó, khả năng giải phóng các túi dầu càng khó khăn hơn nên hiệu suất trích ly dầu có xu hướng giảm.

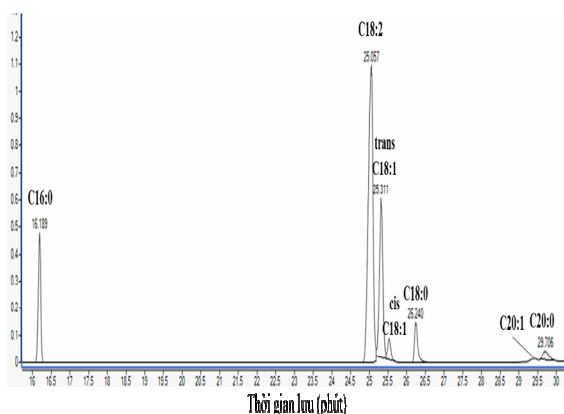
3.4. Thành phần các axit béo trong dầu hạt thanh long ruột đỏ

Bảng 5. Thành phần axit béo của dầu hạt thanh long ruột đỏ

STT	Tên thành phần	Hàm lượng (%)
1	Axit palmitic (C16:0)	12,26
2	Axit stearic (C18:0)	5,26
3	Axit oleic (C18:1 cis)	2,69
4	Axit oleic (C18:1 trans)	21,72
5	Axit linoleic (C18:2)	55,31
6	Axit eicosanoic (C20:0)	2,07
7	Axit eicosenoic (C20:1)	0,69
Tổng axit béo chưa bão hòa		80,41
Tổng axit béo bão hòa		19,59

Dầu hạt thanh long ruột đỏ trích ly bằng enzyme Viscozyme tỉ lệ 1%, pH dịch trích 4.0 được sử dụng để phân tích hàm lượng các axit béo bằng phương pháp GC-MS. Kết quả sắc ký đồ và thành phần các axit béo được thể hiện hình 2 và bảng 5.

Từ kết quả trên cho thấy, dầu hạt thanh long ruột đỏ có hàm lượng axit béo chưa bão hòa trên 80%, đồng thời hàm lượng axit linoleic chiếm tỉ lệ lớn nhất, đạt 55,31%. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Phan Thị Thanh Quế và cs (2018) [3] về tổng hàm lượng axit béo bão hòa. Tuy nhiên, hàm lượng axit linoleic trong nghiên cứu này cao hơn trong nghiên cứu của Phan Thị Thanh Quế và cs (2018) [3] là 49,30%. Trong nghiên cứu của Elleuch và cs (2007) [6] thì dầu hạt mè có 81,50% axit béo không bão hòa và axit



Hình 2. Sắc ký đồ thành phần axit béo dầu hạt thanh long ruột đỏ

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu sử dụng enzyme Viscozyme L ở nồng độ 1,5% và pH dịch trích khoảng 4,0 - 4,5 là điều kiện thích hợp cho quá trình trích ly dầu hạt thanh long ruột đỏ, giúp đạt hiệu suất thu hồi cao, duy trì chất lượng dầu với hàm lượng vitamin E và polyphenol tổng số cao, lần lượt là 0,35 mgGAE/g và 1.879,53 mg/kg. Chỉ số peroxide và axit trong tất cả các điều kiện trích ly đều trong giới hạn cho phép theo tiêu chuẩn TCVN 7597:2018, chứng tỏ dầu có chất lượng tốt và khả năng chống oxy hóa ổn định. Màu sắc dầu (L^* , a^* , b^*) ở pH 4,0 - 4,5 cũng đạt độ sáng và màu vàng đặc trưng của dầu thực vật. Bên cạnh đó, dầu hạt thanh long ruột đỏ chứa đến 80,41% axit béo chưa bão hòa, trong đó axit linoleic chiếm 55,31% cho thấy đây là loại dầu

có chất lượng tốt, có tiềm năng ứng dụng trong các thực phẩm chức năng.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Trường Đại học Cần Thơ, Mã số: CTC2025-04-02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hai, L. T. T., Linh, L. T., Nga, H. & Quintela-Alonso, P. (2021). Dragon fruit: A review of health benefits and nutrients and its sustainable development under climate changes in Vietnam. *Czech Journal of Food Sciences*, 39(2), 71 - 94.
- Wichienchot, S., Jatupornpipat, M. & Rastall, R. A. (2010). Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry*, 120(3), 850 - 857.
- Phan Thị Thanh Quế, Nguyễn Thị Thu Thủy, Tống Thị Ánh Ngọc (2018). Khảo sát đặc tính và sự ổn định của dầu hạt thanh long (*Hylocereus* spp.) ở các điều kiện bảo quản khác nhau. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 54(Nông nghiệp), 192 - 201.
- Krichene, D., Allalout, A., Mancebo-Campos, V., Salvador, M. D., Zarrouk, M. & Fregapane, G. (2010). Stability of virgin olive oil and behaviour of its natural antioxidants under medium temperature accelerated storage conditions. *Food Chemistry*, 121(1), 171 - 177.
- Gurdeniz, G., Ozen, B. & Tokatli, F. (2010). Comparison of fatty acid profiles and mid-infrared spectral data for classification of olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(2), 218 - 226.
- Elleuch, M., Besbes, S., Roiseux, O., Blecker, C. & Attia, H. (2007). Quality characteristics of sesame seeds and by-products. *Food Chemistry*, 103(2), 641 - 650.
- Liaotrakoon, W. (2013). Characterization of dragon fruit (*Hylocereus* spp.) components with valorization potential. (PhD Thesis). Ghent University, Belgium.

8. Ruiz-Rodriguez, A., Reglero, G. & Ibanez, E. (2010). Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 305 - 326.
9. Yoshida, Y., Niki, E. & Noguchi, N. (2003). Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chemistry and Physics of Lipids*, 123(1), 63 - 75.
10. Lemcke-Norojarvi, M., Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. A., Dimberg, L. H., Ohrvall, M. & Vessby, B. (2001). Corn and sesame oils increase serum gamma-tocopherol concentrations in healthy Swedish women. *The Journal of Nutrition*, 131(4), 1195 - 1201.
11. Es-Sai, B., Wahnou, H., Benayad, S., Rabbaa, S., Laaziouez, Y., El Kebba, R., Limami, Y. & Duval, R. E. (2025). Gamma-Tocopherol: A comprehensive review of its antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties. *Molecules*, 30(3), 653.
12. Hu, B., Wang, H., He, L., Li, Y., Li, C., Zhang, Z., Liu, Y., Zhou, K., Zhang, Q., Liu, A., Liu, S., Zhu, Y. & Luo, Q. (2019). A method for extracting oil from cherry seed by ultrasonic-microwave assisted aqueous enzymatic process and evaluation of its quality. *Journal of Chromatography A*, 1587, 50 - 60.
13. Nolasco-Arroyo, B. Y., Chacón, S. L. O., Tacias-Pascacio, V. G., Chacón, G. E. O., Canseco, C. V., Gordillo, R. M. & Quintero, A. R. (2019). Aqueous enzymatic extraction of oil from microwave-pretreated Jicaro seeds. *Current Biochemical Engineering*, 51(1), 42 - 49.
14. Göktürk Baydar, N., Özkan, G. & Yaşar, S. (2007). Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*, 18(9), 1131 - 1136.
15. Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitao, G. G., Reis, A. S., dos Santos, T. C., Coube, C. S. & Leitao, S. G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15(2), 127 - 130.
16. Ishaq, G. M., Saidu, Y., Bilbis, L. S., Muhammad, S. A., Jinjir, N. & Shehu, B. B. (2013). Effects of alpha-tocopherol and ascorbic acid in the severity and management of traumatic brain injury in albino rats. *Journal of Neurosciences in Rural Practice*, 4(3), 292 - 297.
17. Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 6127:2010. Dầu mỡ động vật và thực vật - Xác định trị số axit và độ axit.
18. Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 6121:2018. Dầu mỡ động vật và thực vật - Xác định trị số peroxit - Phương pháp xác định điểm kết thúc chuẩn độ iôt (quan sát bằng mắt).
19. Liaotrakoon, W., De Clercq, N., Van Hoed, V. & Dewettinck, K. (2012). Dragon fruit (*Hylocereus* spp.) seed oils: Their characterization and stability under storage conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(2), 207 - 215.
20. Phan Thị Thanh Quế, Đỗ Thảo Quyên, Lê Duy Nghĩa (2024). So sánh một số đặc điểm chất lượng của dầu hạt thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) trích ly bằng dung môi n-hexan và ethanol. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 60(SDMD), 70 - 77.
21. Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 7597:2018. Dầu thực vật.
22. Najafian, L., Ghodsvai, A., Haddad Khodaparast, M. H. & Diosady, L. L. (2009). Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes. *Food Research International*, 42(1), 171 - 175.
23. Boyapati, T., Rana, S. S. & Ghosh, P. (2023). Microwave-assisted extraction of dragon fruit seed oil: Fatty acid profile and functional

properties. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 22(3), 149 - 157.

24. Elfalleh, W., Tlili, N., Nasri, N., Yahia, Y., Hannachi, H., Chaira, N., Ying, M. & Ferchichi, A. (2011). Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from Tunisian pomegranate (*Punica granatum*) fruits. *Journal of Food Science*, 76(5), C707 - 713.

25. Latif, S. & Anwar, F. (2009). Physicochemical studies of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil using enzyme-assisted cold-pressing. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(10), 1042 - 1048.

26. Nyam, K. L., Tan, C. P., Lai, O. M., Long, K. & Man, Y. B. C. (2009). Enzyme-Assisted aqueous extraction of Kalahari Melon seed oil: Optimization using response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(12), 1235 - 1240.

27. Liu, C., Hao, L. H., Chen, F. S. & Zhu, T. W. (2020). The Mechanism of extraction of peanut protein and oil bodies by enzymatic hydrolysis of the cell wall. *Journal of Oleo Science*, 69(11), 1467 - 1479.

28. Sharma, B., Dangi, A. K. & Shukla, P. (2018). Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *Journal of Environmental Management*, 210, 10 - 22.

29. Vásquez-Caicedo, A. L., Neidhart, S. & Carle, R. (2004). Postharvest ripening behavior of nine Thai mango cultivars and their suitability for industrial applications. *Acta Horticulturae*, (645), 617 - 625.

30. Nhu, N. T. H., Ng Lee Chuen & Riddech, N. (2018). The effects bio-fertilizer and liquid organic fertilizer on the growth of vegetables in the pot experiment. *Chiang Mai Journal of Science*, 45(3), 1257 - 1273.

31. Barbosa, P. P. M., Ruviaro, A. R. & Macedo, G. A. (2021). Conditions of enzyme-

assisted extraction to increase the recovery of flavanone aglycones from pectin waste. *Journal of Food Science and Technology*, 58(11), 4303 - 4312.

32. Sonawane, S. K. & Arya, S. S. (2017). Citrullus lanatus protein hydrolysate optimization for antioxidant potential. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(4), 1834 - 1843.

33. Piseskul, J., Suttisansanee, U., Chupeerach, C., Khemthong, C., Thangsiri, S., Temviriyankul, P., Sahasakul, Y., Santivarangkna, C., Chamchan, R., Aursalung, A. & On-Nom, N. (2023). Optimization of enzyme-assisted mechanical extraction process of hodgsonia heteroclita oilseeds and physical, chemical, and nutritional properties of the oils. *Foods*, 12(2), 292.

34. Phan Thị Việt Hà (2021). Nghiên cứu thu nhận, đánh giá đặc tính của lipase thực vật và khả năng ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm. Luận án Tiến sĩ kỹ thuật ngành công nghệ thực phẩm. Đại học Đà Nẵng.

35. Nguyễn Thị Ngọc Thúy, Nguyễn Thị Thu Huyền, Trương Quang Duy, Phan Huỳnh Thúy Nga, Cao Thị Cẩm Tú (2018). Ảnh hưởng của dung môi và pH đến quá trình trích ly các hợp chất có khả năng kháng oxy hóa từ tía tô (*Perilla frutescens*). *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 14(1), 66 - 74.

36. Górnaś, P., Rudzińska, M. & Segliņa, D. (2014). Lipophilic composition of eleven apple seed oils: A promising source of unconventional oil from industry by-products. *Industrial Crops and Products*, 60, 86 - 91.

37. Sharmila, V., Ganesh, K. S. & Gunasekaran, M. (2007). Generation mean analysis for quantitative traits in sesame (*Sesamum indicum* L.) crosses. *Genetics and Molecular Biology*, 30(1), 80 - 84.

38. Yusoff, M. M., Gordon, M. H. & Niranjana, K. (2015). Aqueous enzyme assisted oil extraction from oilseeds and emulsion de-emulsifying

methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 41(1), 60 - 82.

39. Mwaurah, P. W., Kumar, S., Kumar, N., Panghal, A., Attkan, A. K., Singh, V. K. & Garg, M. K. (2020). Physicochemical characteristics,

bioactive compounds and industrial applications of mango kernel and its products: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(5), 2421 - 2446.

EFFECT OF ENZYME EXTRACTION CONDITIONS ON THE QUALITY OF RED-FLESHED DRAGON FRUIT SEED OIL (*Hylocereus polyrhizus*)

Mai Cat Duyen^{1,2}, Vo Huynh Nhu³, Le Duy Nghia¹,

Duong Kim Thanh¹, Phan Thi Thanh Que¹

¹Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University

²Faculty of Engineering and Technology, Nam Can Tho University

³Student of Food Technology, Can Tho University

Abstract

Red-fleshed dragon fruit seeds are a rich source of lipids and bioactive compounds, suitable for oil extraction. The enzymatic method is considered to be environmentally friendly, highly efficient and preserves bioactive compounds better than traditional extraction methods such as organic solvents or mechanical pressing. The purpose of the study was to determine the effects of extraction conditions including Viscozyme L. concentration (1.0; 1.5; 2.0; 2.5%) and pH of the extract (3.5; 4.0; 4.5; 5.0) on extraction efficiency, bioactive compound content (vitamin E, TPC, DPPH), fatty acid composition and quality indicators (peroxide, acid) of the oil. The research results showed that red-fleshed dragon fruit seed oil extracted by Viscozyme L. with an addition rate of 1.5% and an extract pH of 4.0 achieved a recovery efficiency of 73.41%, while the TPC and vitamin E contents were 0.35 mgGAE/g and 1,879.53 mg/kg, respectively. The obtained oil contained 80.41% unsaturated fatty acids, of which linoleic acid accounted for 55.31%. In addition, quality indicators such as peroxide index and acid index were all within the allowable limits. This showed the potential application of dragon fruit seed oil in food and pharmaceuticals due to its nutritional value and good antioxidant capacity.

Keywords: *Dragon fruit seed oil, enzyme, extraction, pH.*

Ngày nhận bài: 25/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 14/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 29/7/2025

Ngày duyệt đăng: 7/8/2025

PHÂN TÍCH CÁC AMIN SINH HỌC TRONG NEM CHUA BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS

Phạm Thị Diệu¹, Nguyễn Thị Hồng¹, Vũ Tuấn Dương¹,

Trần Thị Mai Hương¹, Nguyễn Thúy An¹,

Trịnh Thu Trang¹, Nguyễn Hoàng Anh¹,

Bùi Văn Hợi², Chu Đình Bình³, Phan Thị Phương Thảo^{1,*}

¹Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa nước - Môi trường - Hải dương học,

Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội

³Khoa Hóa học, Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

*Email: phanphuongthao@vnua.edu.vn

TÓM TẮT

Amin sinh học là chỉ thị quan trọng về chất lượng và độ an toàn của thực phẩm, đặc biệt trong các sản phẩm lên men. Trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký lỏng kết hợp khối phổ (LC-MS) với cột HILIC được sử dụng để phân tích trực tiếp 8 amin sinh học trong nem chua mà không qua dẫn xuất hóa học. Các amin sinh học được phân tích bao gồm: Histamine, 1,5-diaminopentane, ethanolamine, 5-hydroxytryptamine, tyramine, tryptamine, 2-phenylethylamine và putrescine dihydrochloride. Các thông số của phương pháp phân tích như: Điều kiện tách sắc ký, nhận biết bằng phổ khối lượng được tối ưu hóa nhằm đạt được độ nhạy và độ chọn lọc cao nhất. Khoảng tuyến tính của phương pháp đạt được từ 31 - 7.048 $\mu\text{g/L}$ ($R^2 > 0,995$), giới hạn phát hiện và định lượng dao động từ 12 - 30 $\mu\text{g/kg}$ và 35 - 90 $\mu\text{g/kg}$. Độ lặp lại và tái lập đạt yêu cầu với độ lệch chuẩn tương đối từ 1,1 - 3,6% và 2,1 - 8,1%; hiệu suất thu hồi trong khoảng 89,5 - 106,9%. Phương pháp được ứng dụng để phân tích 5 mẫu nem chua trên thị trường, với tổng hàm lượng amin sinh học dao động từ 22,22 - 51,09 mg/kg. Kết quả cho thấy, phương pháp LC-MS là công cụ hiệu quả và đáng tin cậy trong kiểm soát chất lượng và an toàn thực phẩm đối với sản phẩm nem chua hoặc các thực phẩm lên men có nền mẫu giống nó.

Từ khóa: Amin sinh học, nem chua, LC-MS, HILIC, xác nhận giá trị sử dụng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

An toàn thực phẩm là một trong những mối quan tâm hàng đầu hiện nay, đặc biệt đối với các sản phẩm thực phẩm truyền thống được chế biến theo phương pháp thủ công, trong đó có nem chua - một món ăn đặc trưng, phổ biến rộng rãi ở Việt Nam. Nem chua là một sản phẩm được lên men theo phương pháp truyền thống từ thịt lợn rất được ưa chuộng tại Việt Nam, thường xuất hiện trong những bữa ăn quan trọng như: Tết, lễ, kỷ niệm... cho đến những bữa cơm hàng ngày. Nem chua được lên men trong thời gian ngắn, chín sau 2 - 4 ngày lên men tùy theo điều kiện nhiệt độ môi

trường, thường có vị chua, ăn trực tiếp và bảo quản tối đa là 5 ngày ở nhiệt độ phòng hoặc 1 tháng trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4 - 8°C [1]. Quá trình lên men nem chua chủ yếu dựa vào hoạt động của vi khuẩn lactic, đặc biệt là nhóm *Lactobacillus* [2]. Những vi khuẩn này không chỉ tạo nên hương vị đặc trưng mà còn mang lại lợi ích cho sức khỏe người tiêu dùng như hỗ trợ tiêu hóa, cân bằng hệ vi sinh đường ruột [3]. Ngoài ra, do không trải qua xử lý nhiệt, nem chua vẫn giữ được nhiều dưỡng chất tự nhiên như axit amin, vitamin, đồng thời giảm thiểu quá trình oxy hóa chất béo không bão hòa [4]. Tuy nhiên, chính thành phần giàu axit

amin và quy trình lên men không kiểm soát nghiêm ngặt khiến nem chua dễ hình thành amin sinh học - các hợp chất có nguồn gốc từ sự khử nhóm chức carboxylic của axit amin.

Một số amin như: Histamine, tyramine, tryptamine, 2-phenylethylamine có thể gây các phản ứng bất lợi như: Đau đầu, nôn mửa, dị ứng, rối loạn huyết áp nếu vượt quá ngưỡng cho phép [5]. Việc hình thành các amin này là mối nguy tiềm ẩn trong an toàn thực phẩm [6], đặc biệt với nem chua, sản phẩm vẫn chủ yếu dựa vào vi sinh vật tự nhiên và quy trình sản xuất chưa đồng nhất [7].

Hiện nay, nhiều phương pháp phân tích amin sinh học đã được phát triển và áp dụng như: Quang phổ tử ngoại - khả kiến (UV-Vis), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký khí (GC)... Tuy nhiên, các phương pháp trên thường được thực hiện thông qua phản ứng dẫn xuất hóa hóa học, thường tốn thời gian và khó kiểm soát hiệu suất phản ứng, đặc biệt là đối với nền mẫu phức tạp. Một trong những nhược điểm lớn nhất của phương pháp phân tích có sử dụng dẫn xuất hóa là độ ổn định của sản phẩm dẫn xuất như đã được đề cập trong kết quả nghiên cứu của Anthony và cs (2014) [8]. Bên cạnh đó, chưa có nghiên cứu nào sử dụng sắc ký lỏng ghép nối với phổ khối lượng (LC-MS) với ưu điểm là độ nhạy cao, độ chọn lọc tốt và khả năng phân tích đồng thời nhiều chất để xác định amin sinh học trong mẫu thực phẩm nói chung và mẫu nem chua nói riêng. Do đó, trong nghiên cứu này phương pháp LC-MS sử dụng cột tách HILIC được giới thiệu và áp dụng để phân tích các amin sinh học trong mẫu nem chua. Các điều kiện về tách sắc ký và nhận biết bằng phổ khối lượng được khảo sát và tối ưu hóa nhằm đạt được độ nhạy, độ chính xác và độ chọn lọc cao nhất. Các đại lượng quan trọng của phương pháp phân tích như khoảng tuyến tính giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại và độ đúng... được khảo sát, đánh giá và xác nhận giá trị sử dụng. Để đánh giá tính ứng dụng thực tiễn, phương pháp LC-MS sau khi xác nhận giá trị sử dụng được áp dụng phân tích amin sinh học trong mẫu nem chua.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất

Các chất chuẩn amin sinh học, bao gồm: Histamine (HIS), 1,5-diaminopentane (DAP), ethanolamine (ETA), 5-hydroxytryptamine (5-HT), tyramine (TYR), tryptamine (TPA), 2-phenylethylamine (PHE), putrescine (PUT) và nội chuẩn histamine D₄ (IS-HIS), với độ tinh khiết từ 93,7 - 99,6%, được mua từ hãng CATO Research Chemicals (Trung Quốc). Dung dịch chuẩn gốc đơn được chuẩn bị trong dung dịch HCl 0,1M, bảo quản trong ống vial 2 ml màu nâu ở -35°C. Dung dịch chuẩn hỗn hợp được chuẩn bị bằng cách pha loãng các dung dịch chuẩn gốc đơn trong HCl 0,1M. Dung dịch làm việc được pha loãng hàng ngày bằng HCl 0,1M hoặc pha động gồm acetonitrile và nước deion. Các hóa chất khác như amoniac (28%), axit formic (98%) và amoni axetat (98%) loại tinh khiết dùng cho LC-MS được mua từ Sigma Aldrich, Singapore. Axit trichloroacetic, loại tinh khiết phân tích, được mua của hãng Merck, Singapore. Cột chiết pha rắn Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB), loại 100 mg/3 mL được mua của hãng Waters, Mỹ. Các dung môi sử dụng cho tách sắc ký bao gồm methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), loại tinh khiết dùng cho LC-MS, được mua từ Sigma Aldrich, Singapore. Nước deion được tinh chế sử dụng thiết bị siêu lọc, model Milli-Q Direct 8 của hãng Merck Milipore.

Pha động LC-MS gồm hai kênh: Kênh A là dung dịch amoni axetat trong nước deion (điều chỉnh pH bằng axit formic), kênh B là amoni axetat trong acetonitrile (ACN). Pha động được lọc qua màng lọc kính thước 0,22 µm và siêu âm loại khí trước khi sử dụng.

2.2. Mẫu phân tích

Mẫu phân tích: Mẫu nem chua được thu thập từ các siêu thị và các cơ sở bán lẻ trên địa bàn thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, thành phố Hà Nội. Các mẫu còn nguyên bao gói, chưa bóc vỏ và được mã hóa tương ứng là các mẫu: N1, N2, N3, N4 và N5. Mẫu sử dụng để phân tích ngay được bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Các mẫu chưa phân tích được bảo quản ở -35°C.

Xử lý mẫu: Sau khi đưa về phòng thí nghiệm, mẫu nem chua được xay nhuyễn và cho vào túi zip

polyethylene. Mẫu được bảo quản ở 4°C hoặc được bảo quản ở -35°C. Quá trình chiết các amin sinh học trong mẫu dựa theo phương pháp của Sirocchi và cs (2014) [9] với một số điều chỉnh: Cân 3 g mẫu vào ống falcon 15 mL, thêm nội chuẩn và để yên ở nhiệt độ phòng ít nhất 2 giờ. Sau đó mẫu được thêm 10 mL TCA 5%, lắc 2 phút ở 800 vòng/phút sử dụng máy lắc TX4- Velp/Ý. Mẫu được siêu âm 15 phút, ly tâm (4°C, 10.000 vòng/phút, 15 phút) tách pha và thu dung dịch phía trên. Dịch chiết được làm sạch bằng chiết pha rắn (SPE) sử dụng cột chiết HLB, loại 100 mg/3 mL của hãng Waters, Mỹ. Quy trình làm sạch có thể tóm tắt như sau: Cột SPE hoạt hóa cột với 5 mL MeOH, sau đó bằng 5 mL nước deion pH 3, mẫu phân tích sau đó được chuyển lên cột SPE và các chất gây ảnh hưởng được rửa bằng nước deion pH 3. Chất phân tích được rửa giải bằng 5 mL MeOH: NH₃ (95: 5), dung dịch rửa giải được thổi khô bằng dòng khí N₂, tái hòa tan trong 1 mL hỗn hợp ACN 70% + nước deion 30%. Cuối cùng, dung dịch mẫu

được ly tâm lạnh, lọc qua màng lọc 0,45 µm (Polytetrafluoroethylene) và chuyển vào ống vial 2 mL để đưa vào hệ thống LC-MS thông qua bộ bơm mẫu tự động. Mẫu trắng được chuẩn bị theo quy trình tương tự, nhưng thay thế mẫu nem chua bằng nước deion.

2.3. Phương pháp LC-MS

Hệ thống LC-MS model 8050 (Shimadzu, Nhật Bản) được sử dụng để phân tích amin sinh học, bao gồm: Bộ khử khí DGU-405, bơm cao áp bốn kênh LC-40D X3, bộ trộn dung môi, bơm mẫu tự động SIL40C X3, buồng ổn nhiệt cho cột tách CTO-40S và detector MS/MS với nguồn ion hóa phun điện. Cột sắc ký Xbridge HILIC (150 × 2,1 mm, kích thước hạt nhồi 3,5 µm; Waters, Mỹ) được dùng để tách các amin. Pha động gồm kênh A (40 mM amoni axetat trong nước deion, pH 4) và kênh B (acetonitrile). Điều kiện vận hành chi tiết được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Thông số sắc kí và điều kiện khối phổ

Dại lượng	Thông số
Các đại lượng sắc ký	
Cột tách	Waters HILIC Xbride (3,5 µm, 2,1 mm × 150 mm)
Nhiệt độ cột tách	40°C
Pha động	Kênh A: 40 mM amoni axetat trong nước deion, điều chỉnh pH 4 bằng axit formic, kênh B: 40 mM amoni axetat trong ACN
Chế độ rửa giải	Gradient pha động
Tốc độ pha động	0,3 mL/phút
Nhiệt độ buồng giữ mẫu	10°C
Thể tích bơm mẫu	3 µL
Các đại lượng MS	
Nguồn ion hóa	Phun điện ESI
Chế độ ion hóa	Dương (+ESI)
Nhiệt độ ion hóa	300°C
Thế ion hóa	+ 4 kV
Nhiệt độ loại dung môi	525°C
Tốc độ khí làm khô	10 L/phút
Tốc độ khí tạo sol	3 L/phút
Tốc độ khí gia nhiệt	10 L/phút
Chế độ ghi nhận tín hiệu	MRM (multiple reaction mornitoring)
Chế độ định lượng	Nội chuẩn (sử dụng tỷ lệ S_{pic} chất phân tích/ S_{pic} nội chuẩn)

Các amin sinh học được tách sử dụng chương trình thành phần pha động (gradient pha động). Chương trình này được cài đặt như sau: Bắt đầu

với 80% kênh B và 20% kênh A trong khoảng 0,5 phút, sau đó tăng lên 80% kênh A và 20% B trong 7 phút và giữ tại thành phần pha động này trong 2

phút. Pha động sau đó quay lại 80% kênh B và 20% kênh A và giữ ở điều kiện pha động này 8 phút để cân bằng và hoạt hóa cột tách sắc ký cho lần bơm mẫu tiếp theo.

2.4. Xử lý số liệu

Phần mềm LabSolution version 5.1.18 (Shimadzu, Nhật Bản) được sử dụng để tối ưu, điều khiển, thu nhận và xử lý tín hiệu. Diện tích peak được lấy tích phân kế và sử dụng để định lượng các amin sinh học trong mẫu theo phương pháp đường chuẩn. Sự có mặt của amin sinh học trong mẫu phân tích được xác định đồng thời bằng 3 thông số: Thời gian lưu trên cột tách HILIC, sự xuất hiện đồng thời của hai bước chuyển khối MS/MS và tỉ lệ tín hiệu tương đối (tỉ lệ ion) của hai bước chuyển khối này kèm theo độ không đảm bảo đo cho trước. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành lặp lại ít nhất ba lần và tính giá trị trung bình (diện tích peak, tỷ lệ diện tích peak của chất phân tích/điện tích peak của nội chuẩn, thời gian lưu) được sử dụng để đánh giá và biểu diễn thông qua độ lệch chuẩn tương đối. Mẫu trắng được sử dụng trong xử lý mẫu và bơm mẫu trên hệ LC-MS nhằm đánh giá nhiễm chéo trong quá trình chuẩn bị mẫu phân tích và phân tích mẫu. Bên cạnh đó, số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel 2025 (Microsoft, Mỹ) và Skyline MS (MacCross Lab, University of Washington, Mỹ).

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định dựa vào tỷ số tín hiệu (S, chiều cao peak sắc ký) chia cho nhiễu nền (N). Nhiễu nền được đo ở cả hai phía của pic chất phân tích, với mỗi bên có bề rộng tối thiểu gấp 10 lần chiều rộng của peak tại nửa chiều cao. LOD và LOQ được xác định là nồng độ nhỏ nhất tương ứng với tỷ lệ S/N bằng 3 và 10.

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ S/N được xác định dựa trên mẫu thêm chuẩn ở nồng độ thấp nhất trong đường chuẩn, sau khi xử lý mẫu và phân tích bằng LC-MS. Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá thông qua việc phân tích lặp lại một mẫu 6 lần; tỷ lệ diện tích pic được sử dụng để tính toán và biểu diễn dưới dạng độ lệch chuẩn tương đối (RSD). Độ tái lập được xác định bằng cách

phân tích mẫu lặp lại giữa các ngày khác nhau (thực hiện trong 2 ngày, mỗi ngày lặp lại 6 lần).

Hiệu ứng nền mẫu được đánh giá bằng cách so sánh hệ số góc của hai đường chuẩn: Một trong dung môi và một trong nền mẫu thực, với cùng một chất phân tích và trong cùng một khoảng nồng độ. Hiệu ứng nền được tính theo công thức:

$$ME (\%) = 100 \times a'/a,$$

Trong đó: a' và a là hệ số góc của đường chuẩn trong nền mẫu và trong dung môi, tương ứng. Nền mẫu được xem là có ảnh hưởng thấp khi giá trị ME nằm trong khoảng từ 80 - 120% [10]. Độ chọn lọc của phương pháp được đánh giá dựa trên điểm IPs, thông qua sự xuất hiện của pic chất phân tích tại cùng thời gian lưu trong mẫu thêm chuẩn, đồng thời không xuất hiện trong mẫu trắng. Hiệu suất thu hồi được xác định thông qua mẫu thêm chuẩn ở ba mức nồng độ: Tại giới hạn định lượng, gấp ba lần và gấp năm lần giới hạn định lượng. Hàm lượng các amin sinh học trong mẫu nem chua được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình của ba lần phân tích, với đơn vị tính là mg/kg.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu các điều kiện phân tích amin sinh học bằng LC-MS

Tối ưu hóa điều kiện MS: Phân tích amin sinh học được thực hiện bằng phương pháp LC-MS sử dụng kỹ thuật ion hóa phun điện ở chế độ dương (+ESI). Do đó, các thông số của nguồn ion hóa và chế độ MS/MS cần được tối ưu để đạt độ nhạy và độ chọn lọc cao nhất. Dung dịch chuẩn gồm 8 amin sinh học (5.000 µg/L trong acetonitrile/nước deion, 90: 10, v/v) và nội chuẩn được sử dụng cho quá trình khảo sát và tối ưu hóa, thực hiện bằng kỹ thuật bơm mẫu dòng chảy với pha động gồm 50% kênh A và 50% kênh B, tốc độ dòng 0,3 mL/phút.

Ion mẹ của các amin sinh học được xác định là phân tử amin bị proton hóa ($[M+H]^+$) trong pha động có tính axit và chế độ ion hóa dương. Ion con được tạo ra từ quá trình phân mảnh ion mẹ với năng lượng va chạm tối ưu, chọn các ion con có tín hiệu mạnh và đặc trưng cho từng amin. Ví dụ, histamine ($C_5H_9N_3$, $M = 111,15$ g/mol) tạo ion mẹ tại m/z 112 Da là $[C_5H_9N_3 + H]^+$, phân mảnh cho ra

hai ion con tại m/z 68 Da và 95 Da, tương ứng với $[C_4NH]^+$ và $[C_5H_7N_2]^+$. Các ion này được đối chiếu với thư viện phổ MS/MS NIST v2.0 và các nghiên cứu của Gianotti và cs (2008) [11]; Saccani và cs

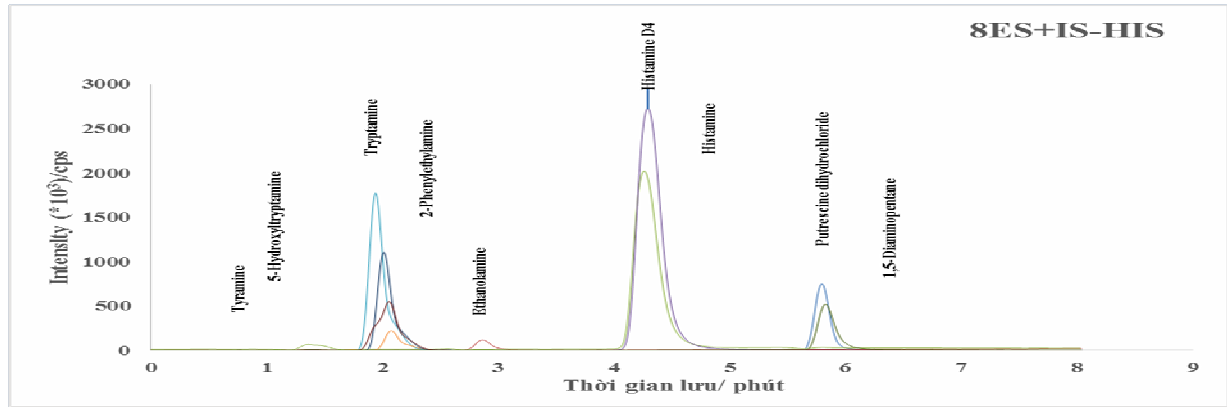
(2005) [12]. Thông tin chi tiết về ion mẹ, ion con của 8 amin sinh học và nội chuẩn (IS-HIS) và năng lượng va chạm tối ưu được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Công thức hóa học, khối lượng phân tử, ion mẹ và ion con của amin sinh học và các thông số tối ưu của phép đo MS/MS

Chất phân tích	Công thức phân tử	M (g/mol)	t _s (phút)	Chế độ ion hóa	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	CE (eV)	Dwell time (ms)	Tỉ lệ ion (%)
TPA	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	160,22	1,9	+ESI	161	144	-12	20	24,22
						117	-33	20	
PHE	C ₈ H ₁₁ N	121,18	2,0	+ESI	122	105	-10	20	36,92
						77	-35	20	
5-HT	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	176,22	2,1	+ESI	177	160,02	-8	20	98,61
						160,30	-17	20	
TYR	C ₈ H ₁₁ NO	137,18	2,1	+ESI	138	121	-10	20	30,55
						103	-28	20	
ETA	C ₂ H ₇ NO	61,08	2,8	+ESI	62	44	-15	20	20,57
						45	-15	20	
HIS	C ₆ H ₉ N ₃	111,15	4,3	+ESI	112	95	-18	20	27,61
						68	-23	20	
IS-HIS	C ₅ H ₅ N ₃ D ₄	115,17	4,3	+ESI	116	99	-16	20	
PUT	C ₄ H ₁₂ N ₂	88,15	5,8	+ESI	89	72	-8	20	10,12
						30	-31	20	
DAP	C ₅ H ₁₄ N ₂	102,18	6,1	+ESI	103	86	-10	20	9,23
						69	-22	20	

Tối ưu hóa điều kiện tách sắc ký: Dựa trên cấu trúc hóa học, các amin sinh học là các hợp chất có độ phân cực cao và dễ tồn tại dưới dạng ion trong môi trường axit. Do đó, nghiên cứu này sử dụng cột sắc ký XBridge HILIC để phân tích trực tiếp các amin sinh học. Với cột HILIC, pha động thường chứa dung môi hữu cơ ở tỷ lệ cao. Ngoài ra, các chất điện ly dễ bay hơi như: Amoni axetat, axit acetic hoặc axit formic được bổ sung vào pha động nhằm điều chỉnh lực rửa giải và pH của pha động, giúp tối ưu hiệu suất tách. Do đó, thành phần pha động dùng để tách các amin sinh học bao gồm: ACN, nước deion, amonium acetate, axit formic. Các đại lượng ảnh hưởng tới khả năng lưu

giữ và phân tách của các amin sinh học trên cột tách HILIC gồm: pH (pH 5,0, 4,5 và 4,0); thành phần pha động (2 chương trình pha động) được khảo sát và đánh giá để đạt được khả năng lưu giữ và độ phân giải sắc ký cao nhất. Bên cạnh đó, độ nhạy của phương pháp phân tích cũng là một tiêu chuẩn dùng để đánh giá và lựa chọn các điều kiện tách. Kết quả thực nghiệm chỉ ra, pH tối ưu cho tách các amin sinh học là 4,0 và gradient thành phần pha động tối ưu là gradient thành phần pha động đã trình bày trong mục 2.3. Sắc đồ LC-MS của 8 amin sinh học và nội chuẩn được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Sắc đồ LC-MS/MS của 8 amin sinh học trong dung dịch chuẩn ở điều kiện phân tích tối ưu và tên chất tương ứng được chèn trong hình

Hình 1 cho thấy, các amin sinh học được giữ và tách tốt trên cột HILIC, với các pic thu được có hình dạng đối xứng cao (hệ số bất đối xứng dao động từ 0,94 - 1,07). Điều này cho thấy, cột HILIC đáp ứng tốt yêu cầu phân tách các hợp chất amin sinh học khi sử dụng hệ pha động gồm kênh A là dung dịch amoni acetate 40 mM và 1% axit formic trong nước khử ion và kênh B là dung dịch amoni acetate 40 mM trong acetonitrile. Như trong hình 1, một số chất có hiện tượng bị rửa giải ra cột tách trùng nhau, tuy nhiên hiện tượng này không ảnh hưởng đến định lượng các chất này vì định lượng được thực hiện trên các bước chuyển khối MS/MS đặc trưng của chất phân tích. Ngoài ra, dung môi hòa tan mẫu trước khi tiêm vào hệ thống cũng ảnh hưởng đến hiệu quả tách. Hai dung môi nước và

acetonitrile (ACN) được so sánh dựa trên hình dạng của các pic sắc ký thu được. Kết quả cho thấy, sử dụng ACN làm dung môi hòa tan cho hình dạng pic sắc nét và rõ ràng hơn. Vì vậy, ACN được chọn làm dung môi hòa tan chất phân tích cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích

Khoảng tuyến tính: Khoảng tuyến tính được khảo sát trong khoảng nồng độ từ 31 - 7.048 µg/L đối với tất cả amin sinh học. Diện tích pic của chất phân tích được biểu diễn là một hàm tuyến tính theo nồng độ. Khoảng nồng độ, phương trình hồi quy tuyến tính và hệ số tương quan tuyến tính R^2 được liệt kê trong bảng 3.

Bảng 3. Các đại lượng đặc trưng của phương pháp phân tích các amin sinh học bằng LC-MS sử dụng cột tách HILIC

Chất phân tích	Phương trình hồi quy trong nền mẫu	Khoảng nồng độ (µg/L)	R^2	Độ lặp lại (RSD, %)	Độ tái lặp (RSD, %)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
TPA	$y = 8,2511x - 0,0059$	80 - 6.400	0,9995	2,7	4,8	27	80
PHE	$y = 8,9184x - 0,0036$	61 - 4.800	0,9969	1,1	2,1	22	65
5-HT	$y = 7,4632x - 0,0076$	88 - 7.048	0,9992	3,6	8,1	30	90
TYR	$y = 2,3027x - 0,0002$	69 - 5.487	0,9976	2,6	2,5	23	70
ETA	$y = 0,3408x - 0,0002$	31 - 2.443	0,9994	3	5,6	12	35
HIS	$y = 93,857x - 0,0063$	56 - 4.446	0,9975	2,2	4,3	20	60
DAP	$y = 10,594x - 0,0039$	51 - 4.087	0,9992	2,3	5,1	20	60
PUT	$y = 9,4942x + 0,0014$	44 - 3.526	0,9954	1,9	3,2	17	50

Ghi chú: Y là tỉ số diện tích pic, x là nồng độ amin sinh học (µg/l).

Bảng 3 cho thấy, mối tương quan cao giữa tỉ số diện tích peak và nồng độ chất phân tích, hệ số tương quan tuyến tính R^2 của tất cả các chất đều lớn hơn 0,997.

LOD và LOQ: Kết quả LOD và LOQ được trình bày trong bảng 3. Giới hạn của phương pháp LC-MS sử dụng cột tách HILIC nằm trong khoảng từ 35 - 90 µg/kg và có thể so sánh được với độ

nhạy của các phương pháp sắc ký pha đảo sử dụng kỹ thuật dẫn xuất hóa trước cột tách dùng cho phân tích amin sinh học của Straub và cs (1993) [13]; De Mey và cs (2012) [14]; Si-Jin Liu và cs (2018) [15]. Bên cạnh đó, LOD và LOQ này cũng đủ nhạy để phân tích các amin sinh học trong mẫu nem chua như các công bố của Sirocchi và cs (2014) [16].

Độ lặp lại: Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) được sử dụng để đánh giá độ lặp lại của phương pháp và có giá trị dao động từ 1,1 - 3,6% như trình bày trong bảng 3. Các giá trị này nằm trong giới hạn cho phép theo khuyến cáo của AOAC (2016) [17], cho thấy phương pháp LC-MS có độ lặp lại tốt và phù hợp để phân tích amin sinh học trong nem chua.

Độ tái lập: Độ tái lập của phương pháp dao động từ 2,1 - 8,1% (Bảng 3), đáp ứng yêu cầu theo AOAC (2016) [17] và cho thấy, phương pháp đủ tin cậy để phân tích amin sinh học trong nem chua.

Độ chọn lọc: Độ chọn lọc của phương pháp phân tích được đánh giá thông qua điểm nhận dạng IP. Điểm nhận dạng IP của tất cả các amin sinh học đều đạt được 5 theo khuyến cáo về xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích của Cộng đồng chung châu Âu năm 2021 [18]. Bên cạnh đó, không thấy xuất hiện peak tại thời gian lưu của amin sinh học trong mẫu trắng và peak xuất hiện rõ ràng trong mẫu thêm chuẩn.

Bảng 4. Hiệu suất thu hồi của amin sinh học

TT	Chất phân tích					Hiệu ứng nền mẫu (%)
		Thấp	Trung bình	Cao	HSTH trung bình	
1	TPA	95,0	88,8	109,2	97,7 ± 10,5	81,7
2	PHE	103,3	91,8	93,4	96,2 ± 6,3	81,2
3	5-HT	90,9	93,2	93,2	92,4 ± 1,3	117,0
4	TYR	102,9	104,4	107,3	106,9 ± 3,9	87,9
5	ETA	106,7	96,8	106,6	103,3 ± 5,7	85,9
6	HIS	100,0	83,9	84,7	89,5 ± 9,1	96,5
7	DAP	80,8	96,1	105,9	94,2 ± 6,3	82,8
8	PUT	96,3	93,8	90,7	93,6 ± 2,8	89,2

Hiệu ứng nền mẫu: Hiệu ứng nền được đánh giá thông qua việc so sánh hệ số góc của đường chuẩn thiết lập trong nền mẫu và trong dung môi ở cùng khoảng nồng độ. Kết quả cho thấy, các giá trị dao động từ 81,2% (PHE) - 117% (5-HT), nằm trong khoảng chấp nhận được từ 80 - 120%, chứng tỏ nền mẫu sau chiết pha rắn khá sạch và ít gây nhiễu đến tín hiệu phân tích. Vì vậy, đường chuẩn trên nền mẫu được sử dụng cho quá trình định lượng các amin sinh học nhằm giảm thiểu tác động của hiệu ứng nền mẫu.

Hiệu suất thu hồi: Mẫu được xử lý theo quy trình chiết pha rắn, phân tích bằng LC-MS với cột HILIC và định lượng dựa trên tỷ lệ diện tích pic theo đường chuẩn. Bảng 4 cho thấy, hiệu suất thu hồi của phương pháp tại nồng độ thấp nằm trong khoảng 80,8 - 106,7%, tại nồng độ trung bình nằm trong khoảng 83,9 - 104,4% và tại nồng độ cao nằm trong

khoảng 84,7 - 109,2%. Như vậy, hiệu suất thu hồi của phương pháp nằm trong khoảng (89,5 ± 9,1) - (106,9 ± 3,9)%. Giá trị này nằm trong khoảng chấp nhận được từ 80 - 110% tại ngưỡng hàm lượng 0,1 - 10 mg/kg theo AOAC (2016) [17]. Nghiên cứu của Shaodong và cs (2011) [19] phân tích 7 amin sinh học với hiệu suất thu hồi 80 - 120%. Như vậy, phương pháp có độ đúng đạt yêu cầu theo AOAC 2016 [17].

3.3. Amin sinh học trong một số mẫu nem chua phân tích

Mẫu nem chua được chuẩn bị và phân tích bằng phương pháp LC-MS sử dụng cột tách HILIC theo các điều kiện tối ưu ở trên. Tỷ lệ diện tích peak của chất phân tích/diện tích pic của nội chuẩn và đường chuẩn trong nền mẫu được sử dụng để định lượng các amin sinh học có trong mẫu. Hàm lượng 8 amin sinh học có trong 5 mẫu phân tích được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Hàm lượng amin sinh học trong các mẫu nem chua

STT	Tên chất	Hàm lượng trong mẫu nem chua (mg/kg)					Hàm lượng (cao nhất - thấp nhất)
		N1	N2	N3	N4	N5	(mg/kg)
1	TPA	0,50 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,66 ± 0,02	0,78 ± 0,02	0,45 - 0,78
2	PHE	0,69 ± 0,02	0,69 ± 0,02	0,57 ± 0,02	0,52 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,51 - 0,69
3	5-HT	< LOD	0,69 ± 0,02	< LOD	< LOD	3,18 ± 0,09	LOD - 3,18
4	TYR	13,81 ± 0,37	13,99 ± 0,38	24,37 ± 0,66	41,96 ± 1,13	23,07 ± 0,62	13,81 - 41,96
5	ETA	< LOD	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,37 ± 0,01	LOD - 0,37
6	HIS	6,54 ± 0,18	6,1 ± 0,16	13,65 ± 0,37	6,05 ± 0,16	14,43 ± 0,39	6,05 - 14,43
7	DAP	0,17 ± 0,00	< LOD	0,16 ± 0,00	1,31 ± 0,04	0,21 ± 0,01	LOD - 1,31
8	PUT	0,51 ± 0,01	0,23 ± 0,01	3,84 ± 0,1	0,33 ± 0,01	6,7 ± 0,18	0,23 - 6,70
Tổng		22,22 ± 0,60	22,52 ± 0,61	43,37 ± 1,17	51,09 ± 1,38	49,24 ± 1,33	0,16 - 41,96

Hàm lượng của TYR trong mẫu N4 là cao nhất ($41,96 \pm 1,13$) mg/kg và hàm lượng DAP trong mẫu N3 có hàm lượng thấp nhất ($0,16 \pm 0,00$) mg/kg. Kết quả phân tích cho thấy, tyramine và histamine là 2 amin sinh học có hàm lượng cao nhất trong các mẫu nem chua. Với hàm lượng tyramine cao nhất trong mẫu N4 là ($41,96 \pm 1,13$) mg/kg, thấp nhất trong mẫu N1 là ($13,99 \pm 0,38$) mg/kg; hàm lượng histamine cao nhất trong mẫu N5 là ($14,43 \pm 0,39$) mg/kg, thấp nhất trong mẫu N4 là ($6,05 \pm 0,16$) mg/kg. Tyramine được biết đến với độc tính gây tăng huyết áp ở người [20, 21] nhưng chưa có quy định ngưỡng cho tyramine trong nem chua nói riêng và trong thực phẩm lên men nói chung ở Việt Nam. Hàm lượng HIS, 5-HT, TYR và PUT cao nhất trong mẫu N5 lần lượt là: $14,43 \pm 0,39$ mg/kg; $3,18 \pm 0,09$ mg/kg; $23,07 \pm 0,62$ mg/kg và $6,7 \pm 0,18$ mg/kg. Tổng hàm lượng amin sinh học trong các mẫu: N1, N2, N3, N4 và N5 lần lượt là: $22,22 \pm 0,60$ mg/kg; $22,22 \pm 0,60$ mg/kg; $43,37 \pm 1,17$ mg/kg; $51,09 \pm 1,38$ mg/kg và $49,24 \pm 1,33$ mg/kg. Với kết quả trên, hàm lượng tyramine và histamine đều nằm trong ngưỡng an toàn theo Nout (1994) [22] (tối đa 100 mg/kg đối với histamine và 800 mg/kg đối với tyramine). Hơn nữa với tổng hàm lượng amin sinh học cao nhất là 51.092 ± 975 mg/kg thì 5 mẫu nem chua được nghiên cứu là nằm trong ngưỡng an toàn về amin sinh học <1.000 mg/kg theo Erdag và cs (2019) [23].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã tối ưu hóa thành công và xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích trực tiếp các amin sinh học bằng hệ LC-MS kết hợp cột HILIC. Các thông số đánh giá hiệu năng như khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại, độ tái lập và hiệu suất thu hồi đã được khảo sát đầy đủ. Phương pháp được xác nhận hiệu quả trên nền mẫu nem chua và chứng minh khả năng ứng dụng qua phân tích 8 amin sinh học trong 5 mẫu thực. Kết quả cho thấy tất cả mẫu đều chứa các amin sinh học khảo sát, trong đó histamine, tyramine xuất hiện phổ biến nhất. Qua đó, có thể kết luận, phương pháp LC-MS sử dụng cột HILIC phù hợp để phân tích trực tiếp amin sinh học trong mẫu nem chua.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Học viện Nông nghiệp Việt Nam thông qua đề tài “Nghiên cứu phát triển phương pháp phân tích và đánh giá hàm lượng amin sinh học trong một số thực phẩm lên men ở Việt Nam bằng LC-MS/MS” mã số T2024-08-15TD.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hanh Nguyen Thi Hong., Francisco B. Elegado., N T Librojo-Basilio., R C Mabesa (2010). Isolation and characterisation of selected lactic acid bacteria for improved processing of Nem chua, a traditional fermented meat from Vietnam. Beneficial Microbes, 1(1): 67 - 74

2. Ravyts, F., Vuyst, L. de & Leroy, F. (2012). Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 356 - 367.
3. Nguyễn Thị Lâm Đoàn, Van Hoorde Koenraad, Cnockaert Margo, Lê Thanh Bình và Vandamme Peter (2015). Nghiên cứu quần xã vi khuẩn trong nem chua bằng phương pháp không phụ thuộc vào nuôi cấy. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 53(2), 157 - 168
4. Kolożyn-Krajewska, D. & Dolatowski, Z. J. (2012). Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry*, 47(12), 1761 - 1772.
5. Alvarez, M. A. & Moreno-Arribas, M. V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science and Technology*, 39(2), 146 - 155.
6. Ferreira, I. M. P. L. V. O. & Pinho, O. (2006). Biogenic amines in Portuguese traditional foods and wines. *Journal of Food Protection*, 69(9), 2293 - 2303.
7. Dương Thị Hồng Nga, Mai Thanh Hải, Lư Bảo Hân, Lý Thị Xuân Mai và Bùi Thị Quỳnh Hoa (2023). Phân lập, tuyển chọn dòng vi khuẩn lactic trong nem chua thịt có tiềm năng ứng dụng làm vi khuẩn giống trong sản xuất nem chua. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 59(3), 86 - 93.
8. Anthony Quéro, Cyril Jousse, Michelle Lequart-Pillon, Eric Gontier, Xavier Guillot, Bernard Courtois, Josiane Courtois, Corinne Pau-Roblot (2014). Improved stability of TMS derivatives for the robust quantification of plant polar metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 970, 36 - 43.
9. Sirocchi V., Caprioli G., Ricciutelli M., Vittori S. & Sagratini G. (2014). Simultaneous determination of ten underivatized biogenic amines in meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry*, 49(9): 819 - 825.
10. Peters Frank T., Olaf H. Drummer & Frank Musshoff (2007). Validation of New Methods. *Forensic science international*, 165(2 - 3): 216 - 224.
11. Gianotti V., Chiuminatto U., Mazzucco E., Gosetti F., Bottaro M., Frascarolo P. & Gennaro M.C. (2008). A New Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Seven Biogenic Amines in Cheese. *Journal of Chromatography A*, 1185(2): 296 - 300.
12. Sacconi G., Tanzi E., Pastore P., Cavalli S. & Rey M (2005). Determination of Biogenic Amines in Fresh and Processed Meat by Suppressed Ion Chromatography-Mass Spectrometry Using a Cation-Exchange Column. *Journal of Chromatography A* 1082(1 SPEC. ISS.): 43 - 50
13. Straub, B., Schollenberger, M., Kicherer, M., Luckas, B., & Hammes, W. P. (1993). Extraction and determination of biogenic amines in fermented sausages and other meat products using reversed-phase-HPLC. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 197(3), 230 - 232.
14. De Mey, E., Drabik-Markiewicz, G., De Maere, H., Peeters, M.-C., Derdelinckx, G., Paelinck, H. & Kowalska, T. (2012). Dansyl derivatization as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 130(4), 1017 - 1023.
15. Si-Jin Liu, Juan-Juan Xu, Chang-Lu Ma và Chun-Feng Guo A. (2018). A comparative analysis of derivatization strategies for the determination of biogenic amines in fermented meat products by high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 266, 438 - 444.
16. Sirocchi, V., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Vittori, S. & Sagratini, G. (2014). Simultaneous determination of ten underivatized biogenic amines in meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry*, 49(9), 819 - 825.
17. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2016). Official methods of analysis. Guidelines for standard method performance requirements.

18. European Commission (2021). Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC (Text with EEA relevance).
19. Shaodong Jia, Yun, K. P., Jeong, P. H., Jeongmi, L. & Sung, W. K. (2011). Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(51), 9174 - 9182
20. Ruiz-Capillas C, Herrero AM. (2019). Impact of biogenic amines on food quality and safety. *Foods*, 8(2): 62.
21. Tabanelli G. (2020). Biogenic amines and food quality: emerging challenges and public health concerns. *Foods*, 9(7): 7 - 10.
22. Nout, M. J. R. (1994). Fermented foods and food safety. *Food Research International*, 27(3), 291 - 298
23. Erdag, D., Merhan, O. & Yildiz, B. (2019). Biochemical and pharmacological properties of biogenic amines. In *Biogenic Amines. IntechOpen* 1 - 14.

ANALYSIS OF BIOGENIC AMINES IN FERMENTED PORK SAUSAGE USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (LC-MS)

Pham Thi Diu ¹, Nguyen Thi Hong ¹, Vu Tuan Duong ¹, Tran Thi Mai Huong ¹, Nguyen Thuy An ¹,
Trinh Thu Trang ¹, Nguyen Hoang Anh ¹, Bui Van Hoi ², Chu Dinh Binh ³, Phan Thi Phuong Thao ¹

¹*Faculty of Food Science and Technology, Vietnam National University of Agriculture*

²*Faculty of Water-Environment-Oceanography, University of Science and Technology of Hanoi*

³*Faculty of Chemistry, School of Chemistry and Life Sciences,*

Hanoi University of Science and Technology

Abstract

Biogenic amines serve as critical indicators of food quality and safety, particularly in fermented foods. In this study, LC-MS method utilizing a HILIC column was developed for the direct analysis of eight biogenic amines in Vietnam fermented pork sausage ("nem chua" in Vietnamese) without chemical derivatization has been introduced. The analyzed amines include histamine, 1,5-diaminopentane, ethanolamine, 5-hydroxytryptamine, tyramine, tryptamine, 2-phenylethylamine, and putrescine. All parameters of the analytical method such as chromatographic separation conditions and mass spectrometry detection were optimized to achieve the highest sensitivity and selectivity. The linear range of from 31 - 7048 µg/L with correlation coefficients (R^2) above 0,995. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) ranged from 12 - 30 µg/kg and 35 - 90 µg/kg, respectively. Repeatability and reproducibility were satisfactory, with relative standard deviations (RSD) between 1.1 - 3.6% and 2.1 - 8.1%; recoveries ranged from 89.5 - 106.9%. The validated method was applied to analyze five commercially available Vietnamese fermented pork sausage samples, with total biogenic amine contents ranging from 22.22 - 51.09 mg/kg. The results demonstrated that the LC-MS method is an effective and reliable tool for quality control and food safety monitoring of fermented pork sausage and fermented meat products that are similar sample matrix.

Keywords: *Biogenic amines, fermented pork sausage, LC-MS, HILIC, validation.*

Ngày nhận bài: 26/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 14/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 4/8/2025

Ngày duyệt đăng: 8/8/2025

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA SÓNG SIÊU ÂM ĐẾN THU NHẬN CHIẾT XUẤT GIÀU POLYPHENOL VÀ SAPONIN TỪ CỦ VÀ HOA CÂY CHUỐI HỘT (*Musa balbisiana*)

Hoàng Thị Ngọc Nhon¹, Lưu Thị Quỳnh Hoa¹,

Ngô Thị Huyền Trang¹, Lê Thị Hồng Ánh^{1,*}

¹*Trường Đại học Công Thương thành phố Hồ Chí Minh*

* *Email: anhltth@huit.edu.vn*

TÓM TẮT

Củ và hoa chuối hột (*Musa balbisiana*) có chứa nhiều hoạt chất tốt cho sức khỏe như: Saponin và polyphenol. Nghiên cứu này được tiến hành để đánh giá hiệu quả của phương pháp trích ly có hỗ trợ của sóng siêu âm (UAE) đến hiệu quả thu nhận chiết xuất giàu polyphenol và saponin từ củ và hoa chuối hột, từ đó tối ưu quá trình trích ly. Kết quả nghiên cứu cho thấy, phương pháp siêu âm thu chiết xuất có hàm lượng polyphenol (TPC) lần lượt là 60,22 mgGAE/gCK (củ chuối) và 50,06 mgGAE/gCK (hoa chuối), saponin (TSC) đạt 51,11 mg/gCK (củ) và 54,12 mg/gCK (hoa). Ở điều kiện tối ưu với biên độ siêu âm 30,07% trong thời gian siêu âm 15,30 phút cho TPC và TSC đạt lần lượt 62,11 mgGAE/gCK và 54,08 mg/gCK (củ) và 52,94 mgGAE/gCK và 56,60 mg/gCK (hoa). Kết quả chụp SEM cũng cho thấy, hiệu quả của sóng siêu âm đã làm thay đổi cấu trúc tế bào của nguyên liệu ban đầu và nguyên liệu sau trích ly bằng siêu âm. Bên cạnh đó, kết quả sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS) cho thấy, dịch chiết từ củ và hoa chuối hột chứa chủ yếu 2 nhóm hợp chất sinh học chính là: Polyphenol (như quercetin, kaempferol glycoside, chlorogenic axit, procyanidin) và saponin (như ginsenoside F1, notoginsenoside, chikusetsusaponin). Kết quả nghiên cứu cho thấy, củ chuối giàu polyphenol hơn, còn hoa chuối có hàm lượng saponin cao hơn.

Từ khóa: Chuối hột, *Musa balbisiana*, saponin, polyphenol, siêu âm, tối ưu hóa.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Musa balbisiana là một loài chuối hoang dã, phổ biến ở vùng nhiệt đới Đông Nam Á, từ lâu đã được sử dụng trong y học cổ truyền để điều trị các bệnh như: Rối loạn tiêu hóa, sốt, hạ đường huyết... Các bộ phận của chuối hột chứa hàm lượng cao hợp chất hoạt tính sinh học. Trong khi hoa chuối thường dùng để ăn như một loại rau, củ chuối hột thường được coi là phụ phẩm của nông nghiệp [1]. Tuy vậy, chúng giàu chất chuyển hóa thứ cấp như: Polyphenol và saponin có tiềm năng dược lý và lợi ích sức khỏe [2]. Do đó, việc khai thác thu nhận chiết xuất giàu các hoạt chất từ nguyên liệu này có ý nghĩa nhất định.

Polyphenol và saponin là những hợp chất hoạt tính sinh học có nguồn gốc thực vật nổi bật bởi các đặc tính có lợi của chúng như chống oxy hóa

mạnh, có tác dụng kháng viêm, kháng khuẩn, hạ cholestrol, tăng cường miễn dịch, giúp ngăn ngừa các bệnh mãn tính như: Rối loạn tim mạch, đái tháo đường và ung thư... [3 - 5]. Với vai trò sinh học đa dạng, các chiết xuất từ thực vật giàu polyphenol và saponin ngày càng được quan tâm trong quá trình phát triển thực phẩm chức năng, thực phẩm bổ sung và dược phẩm.

Hiệu quả chiết xuất các hợp chất sinh học từ các bộ phận của thực vật ví dụ như từ củ và hoa chuối hột là yếu tố then chốt trong việc khai thác giá trị dược liệu của các loài thực vật. Vì vậy, hiệu quả của quá trình trích ly được các nhà nghiên cứu quan tâm. Tuy nhiên, các kỹ thuật chiết xuất truyền thống như ngâm và chiết xuất Soxhlet tốn nhiều thời gian, sử dụng nhiều dung môi và thường dẫn đến năng suất thấp hoặc phân hủy các

hợp chất không bền nhiệt. Việc trích ly hoạt chất có hỗ trợ của sóng siêu âm (UAE) là công nghệ xanh tiềm năng, thúc đẩy truyền khối, phá vỡ thành tế bào và tăng khả năng hòa tan hợp chất nhờ cơ chế tạo ra các chu kỳ nén và giãn trong dung môi, dẫn đến sự hình thành, phát triển và vỡ của các vi bong bóng trong dung dịch [6]. UAE đã chứng minh được những lợi thế đáng kể trong việc chiết xuất polyphenol và saponin từ nhiều nguồn thực vật khác nhau, bao gồm năng suất cao hơn, thời gian chiết xuất ngắn hơn và giảm lượng dung môi sử dụng so với các phương pháp thông thường [7]. Phương pháp này đã chứng tỏ hiệu quả tốt trích ly thu nhận chiết xuất giàu polyphenol và flavonoid từ hoa chuối hột [8], thu nhận chiết xuất giàu tannin từ vỏ quả chuối chưa chín thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa tốt [9] hay thu pectin từ phế phẩm công nghiệp của chuối hột [10]. Theo nghiên cứu của Putri và cs (2022), chiết xuất từ vỏ chuối hột thu được bằng UAE chứa alkaloid, saponin, tanin, glycoside steroid, polyphenol... thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa tốt theo phương pháp DPPH và FRAP với IC_{50} lần lượt là 143,97 mg/L và 151,08 mg/L và hoạt tính chống enzyme xanthanoxidase đạt 27,95% cao hơn đối chứng Alupurinol, thể hiện tiềm năng giảm nồng độ axit uric [11]. Tuy nhiên, chưa tìm thấy nghiên cứu nào xác định ảnh hưởng của sóng siêu âm đến thu nhận chiết xuất giàu polyphenol và saponin từ củ và hoa của chuối hột.

Chính vì vậy, nghiên cứu ảnh hưởng của sóng siêu âm đến thu nhận chiết xuất giàu polyphenol và saponin từ củ và hoa cây chuối hột (*Musa balbisiana*) nhằm mục đích tìm được điều kiện trích ly tối ưu thu nhận chiết xuất giàu polyphenol và saponin từ củ và hoa chuối hột, đồng thời đánh giá kết quả SEM của nguyên liệu trước và sau trích ly cũng như phổ LC-MS của dịch trích góp phần chứng minh hiệu quả của quá trình chiết xuất.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu: Củ và hoa chuối hột được thu nhận tại phường An Hòa, tỉnh Đồng Tháp. Hoa chuối hột được thu hoạch từ cây khi đang nở, cách nải chuối 15 cm. Củ và hoa sau khi thu hoạch sẽ

được vận chuyển đến phòng thí nghiệm. Nguyên liệu được lựa chọn, làm sạch nhằm loại bỏ tạp chất, sấy khô ở nhiệt độ 50 - 60°C cho đến < 10% ẩm. Sau quá trình sấy nguyên liệu được nghiền thành bột mịn, sàng qua rây 0,3 mm. Mẫu được bảo quản trong túi zip dày, được bảo quản ở điều kiện 4°C để dùng trong suốt quá trình thử nghiệm.

Hóa chất: Methanol (99,7%, Việt Nam), axit oleanolic (99%, Sigma), axit acetic (99,5%, Sigma), axit perchloric (70%, Merck), etyl acetate (99,5%, Merck), vanillin (99%, Merck).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của biên độ và thời gian siêu âm đến hàm lượng saponin

Cân 1 g bột nguyên liệu (theo khối lượng chất khô), bổ sung MeOH 50% với tỉ lệ là 1/25 w/v, khuấy đều. Biên độ siêu âm là độ lớn dao động của sóng siêu âm, được khảo sát ở các mức 20%, 25%, 30%, 35% và 40% so với công suất tối đa của thiết bị; thời gian xử lý siêu âm được khảo sát ở các mốc 5, 10, 15, 20 và 25 phút trong thiết bị siêu âm VC 750 Sonic (Mỹ) - công suất tối đa 750 W. Sau đó, các mẫu được ổn định nhiệt độ trong bể điều nhiệt Memmert WNB10 (Đức) ở 60°C trong 60 phút trước khi ly tâm ở 5.500 rpm trong 15 phút bằng máy Hermel Z206A (Mỹ) để thu phần dịch trong và định lượng hàm lượng polyphenol và saponin tổng bằng phương pháp đo quang phổ UV-Vis [12]. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.2. Tối ưu hóa trích ly bằng phương pháp bề mặt đáp ứng

Trong nghiên cứu này, điều kiện tối ưu trích ly thu nhận chiết xuất giàu polyphenol và saponin từ củ và hoa cây chuối hột sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng RSM theo mô hình Box Behnken (BBD). Hai thông số quan trọng là biên độ siêu âm X_1 (%), thời gian xử lý siêu âm X_2 (phút) với hàm mục tiêu là hàm lượng polyphenol tổng - TPC (mgGAE/gCK) và hàm lượng saponin tổng - TSC (mg/gCK). Phương trình hồi quy bậc hai được mô tả:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2.$$

Trong đó: b_0 , b_1 , b_2 , b_{11} , b_{22} , b_{12} , là hệ số tương ứng của biến X_1 , X_2 , X_{11} , X_{22} , X_1X_2 .

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Xác định hàm lượng saponin

TSC được xác định dựa theo mô tả của Chen và cs (2007) có điều chỉnh [13], được tính theo công thức: $TSC \text{ (mg/gCK)} = \frac{(C_x \times V \times N \times 1.000)}{m_{ck}}$ (Eq.1).

Trong đó: C_x là nồng độ saponin từ đường chuẩn; V là thể tích của dịch chiết (mL); F là hệ số pha loãng; m là khối lượng chất khô trong mẫu nguyên liệu (g).

2.3.2. Xác định hàm lượng polyphenol

TPC được xác định theo phương pháp Folin-Ciocalteu được mô tả bởi Feduraev và cs (2019) với một số hiệu chỉnh. Độ hấp thụ được ghi nhận ở bước sóng 765 nm [14], công thức tính: $TPC \text{ (mgGAE/gCK)} = a \times V/m$ (Eq.2).

Trong đó: TPC là hàm lượng polyphenol tổng (mg axit gallic/g); a là giá trị x từ đường chuẩn với axit gallic ($\mu\text{g/mL}$); V là thể tích dung dịch cao chiết (mL) và m là khối lượng cao chiết có trong thể tích V (g).

2.3.3. Phân tích SEM

Hình thái bề mặt được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscopy – SEM). Mẫu sau khi sấy khô được cố định lên bệ đỡ bằng băng dính dẫn điện, quá trình chụp ảnh được thực hiện trên thiết bị SEM tại Trung tâm phân tích Quốc tế, Trường Đại học Công thương thành phố Hồ Chí Minh.

2.3.4. Phân tích LC-MS

Dịch chiết ở điều kiện tối ưu của mẫu củ và mẫu hoa chuối hột được phân tích phổ LC/MS, sử dụng cột pha đảo C18, pha động bao gồm: Dung môi A là nước siêu tinh khiết chứa 0,1% axit formic và dung môi B là acetonitrile chứa 0,1% axit formic. Quá trình tách được thực hiện theo chương trình gradient (bắt đầu từ 5% B, tăng dần lên 95% B trong vòng 30 phút, sau đó duy trì 95% B trong 5 phút và trở về điều kiện ban đầu để cân bằng hệ thống). Tốc độ dòng là 0,3 mL/phút, nhiệt độ cột được duy trì ở 35 - 40°C và thể tích tiêm mẫu là 5 μL . Khối phổ được thu nhận ở cả 2 chế độ ion hóa âm $[M+H]^-$ và dương $[M+H]^+$.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD). Phân tích thống kê ANOVA được thực hiện bằng phần mềm Minitab 19 để xác định và làm rõ sự khác biệt giữa các mẫu. Các biểu đồ dựng bởi phần mềm Microsoft Excel 2019. Kết quả tối ưu hóa được xử lý bằng phần mềm JMP 10. Các thử nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến trích ly thu nhận chiết xuất giàu TPC và TSC từ củ và hoa chuối hột

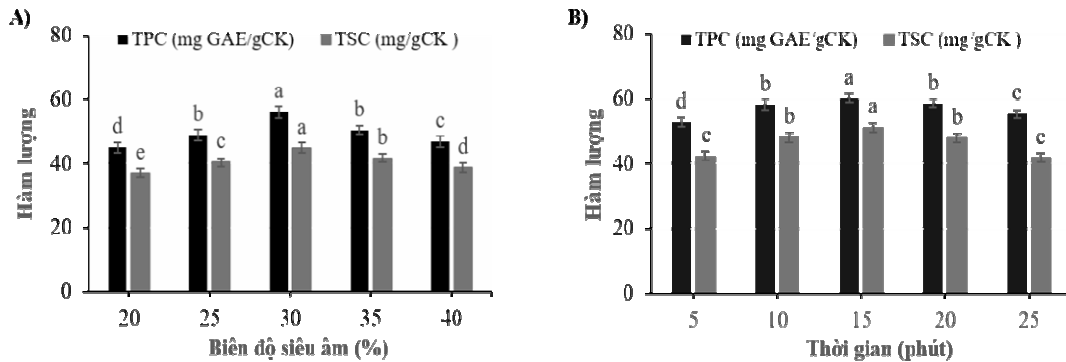
Việc cải thiện hiệu suất thu nhận các hợp chất hữu cơ bằng sóng siêu âm chủ yếu liên quan đến hiện tượng xâm thực khí diễn ra trong dung môi dưới tác động của sóng siêu âm [15]. Biên độ siêu âm có ảnh hưởng đáng kể lên hiệu suất thu nhận các hoạt chất như: Polyphenol và saponin. Biên độ siêu âm cao có khả năng thúc đẩy sự phá vỡ cấu trúc thực vật thông qua việc tạo ra lực cắt mạnh và gia tăng mức độ nhiễu loạn trong dung dịch, từ đó cải thiện hiệu suất trích ly các hợp chất sinh học tự nhiên như: Polyphenol và saponin. Ảnh hưởng của công suất siêu âm, thời gian xử lý siêu âm đến thu nhận TPC và TSC từ củ và hoa chuối hột được thể hiện trong hình 1 và 2.

Hình 1 cho thấy, biên độ siêu âm ảnh hưởng đáng kể đến TPC và TSC thu được từ 2 mẫu củ và hoa chuối hột. Cụ thể, TPC và TSC tăng khi biên độ siêu âm tăng từ 20% và đạt đỉnh tại biên độ 30% với giá trị lần lượt là $55,98 \pm 0,83 \text{ mgGAE/gCK}$, $44,77 \pm 0,58 \text{ mg/gCK}$ (củ chuối) và $43,98 \pm 0,52 \text{ mgGAE/gCK}$, $49,79 \pm 0,77 \text{ mg/gCK}$ (hoa chuối). Tuy nhiên, khi biên độ siêu vượt quá 30% thì hàm lượng các hoạt chất này giảm xuống. Hiện tượng này được giải thích bởi tác động phá hủy các hợp chất phenolic nhạy cảm bởi nhiệt độ khi sử dụng cường độ siêu âm quá cao, làm giảm hiệu quả trích ly [16].

TPC trong củ cao hơn đáng kể so với hoa chuối trong khi TSC từ hoa chuối lại cao hơn ở tất cả các biên độ siêu âm khảo sát. Điều này liên quan đến hàm lượng các hoạt chất trong các bộ

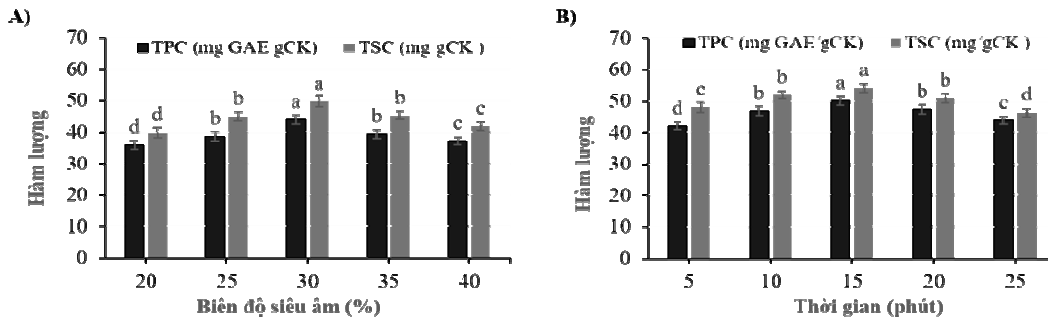
phận, cũng như cấu tạo của cấu trúc tế bào thực vật của chúng [17]. Việc lựa chọn công suất phù hợp không chỉ nâng cao hiệu suất mà còn hạn chế sự phân hủy các hợp chất quan trọng do tác động

quá mức của siêu âm, góp phần nâng cao chất lượng của chế phẩm trích ly [18]. Như vậy, biên độ 30% được lựa chọn làm thông số cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Ảnh hưởng của biên độ dao động siêu âm đến trích ly thu nhận chiết xuất từ củ (A) và hoa (B) chuối hột

Ghi chú: Trong từng yếu tố khảo sát, các chữ cái khác nhau trên các cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$, được xác định thông qua phân tích ANOVA.



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý siêu âm đến trích ly thu nhận chiết xuất từ củ (A) và hoa (B) chuối hột

Ghi chú: Trong từng yếu tố khảo sát, các chữ cái khác nhau trên các cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$, được xác định thông qua phân tích ANOVA.

Hình 2 cho thấy, thời gian siêu âm là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả thu nhận chiết xuất giàu polyphenol và saponin từ củ và hoa chuối hột. Giá trị TPC và TSC ở cả 2 mẫu đều tăng theo thời gian siêu âm từ 5 phút và đạt đỉnh ở mốc thời gian 15 phút. TPC đạt giá trị cao nhất với $60,22 \pm 0,46$ mgGAE/gCK (củ) và $50,06 \pm 0,33$ mgGAE/gCK (hoa). TSC cũng đạt đỉnh tại thời gian này với các giá trị tương ứng là $51,11 \pm 0,28$ mg/gCK (củ) và $54,12 \pm 0,36$ mg/gCK (hoa). Sóng siêu âm tạo ra các vi bong bóng trong dung môi, các bong bóng này khi vỡ tạo ra xung áp lực cục bộ lớn và trong thời gian ngắn gây hiện tượng phá vỡ cấu trúc mô tế bào thực vật. Nhờ đó, các hợp chất sinh học bên trong dễ dàng khuếch tán ra ngoài dung môi [16]. Tuy nhiên, khi thời gian siêu âm kéo dài đến 20 và 25 phút, TPC và TSC bắt đầu

giảm. Điều này có thể liên quan đến hiện tượng tái kết hợp các hợp chất phenolic hoặc sự phân hủy cấu trúc do tiếp xúc kéo dài với hiệu ứng cơ học và nhiệt sinh ra từ siêu âm. Ngoài ra, siêu âm trong thời gian dài có thể gây suy giảm hoạt tính của các hợp chất sinh học do phá vỡ liên kết hóa học hoặc biến đổi cấu trúc phân tử [16, 18]. Bên cạnh đó, các hợp chất polyphenol có cấu trúc vòng thơm dễ bị mất hoạt tính trong thời gian siêu âm kéo dài [19]. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Ivanova và cs (2010), việc ứng dụng sóng siêu âm trong quá trình chiết xuất saponin và rutin từ cây *Tribulus terrestris* L. đã mang lại hiệu quả cao hơn đáng kể so với phương pháp chiết ngâm tĩnh truyền thống, với hiệu suất thu hồi tăng gấp khoảng 1,64 lần. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cơ chế tác động của sóng siêu âm,

thông qua việc phá vỡ thành tế bào thực vật, đã hỗ trợ tích cực cho sự khuếch tán của các hợp chất sinh học ra môi trường dung môi, từ đó nâng cao hiệu quả trích ly [20].

Như vậy, biên độ siêu âm 30% và thời gian siêu âm 15 phút được xác định là mức thích hợp trong điều kiện nghiên cứu này.

3.2. Tối ưu hóa các thông số ảnh hưởng đến quá trình trích ly

Bảng 1. Quy hoạch thực nghiệm RSM-BBD tối ưu hàm lượng TPC và TSC

STT	Mã hóa		Củ		Hoa	
	X_1	X_2	TPC (Y_1)	TSC (Y_2)	TPC (Y_3)	TSC (Y_4)
1	-1	-1	44,27	36,55	35,47	39,09
2	-1	1	48,98	39,32	40,18	42,79
3	1	-1	46,39	41,26	39,34	41,57
4	1	1	47,33	37,17	36,98	39,68
5	0	-1	43,98	35,21	32,88	37,09
6	0	-1	44,94	36,72	35,71	38,45
7	0	1	46,87	41,91	40,09	43,01
8	0	1	50,82	39,22	42,41	46,19
9	-1	0	62,74	53,85	52,97	56,06
10	1	0	61,96	54,67	53,21	56,07
11	-1	0	61,29	54,12	53,11	57,36
12	1	0	62,34	53,74	52,36	56,82

Trong nghiên cứu này, 2 thông số khảo sát chính ảnh hưởng đến hàm lượng TPC và TSC bao gồm: Biên độ siêu âm (X_1 , W) và thời gian xử lý (X_2 , phút) đã được tối ưu hóa thông qua phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Việc áp dụng RSM giúp đánh giá không chỉ ảnh hưởng riêng lẻ của từng yếu tố mà còn cả sự tương tác giữa chúng đối với hiệu suất chiết xuất polyphenol và saponin. Mô hình hồi quy được xây dựng dựa trên dữ liệu thực nghiệm, từ đó tiến hành kiểm định độ phù hợp của mô hình với thực tế. Khi các giá trị p của các biến độc lập và toàn bộ mô hình đạt mức ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), mô hình được xem là có thể sử dụng để dự đoán và tối ưu quy trình chiết xuất trong các điều kiện cụ thể. Các hệ số hồi quy thu được từ mô hình được trình bày tại bảng 2. Loại bỏ tất cả các hệ số ảnh hưởng không đáng kể, các phương trình hồi quy được trình bày ở bảng 3. Theo Gabrielsson và cs (2002), hệ số R^2 là một chỉ số quan trọng phản ánh mức độ phù hợp của mô hình hồi quy, với giá trị thường nằm trong khoảng từ 0,8 - 0,9,

Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) đã được sử dụng nhằm tối ưu hóa quy trình chiết xuất polyphenol và saponin bằng kỹ thuật siêu âm. Thiết kế thí nghiệm được thực hiện dựa trên mô hình Box-Behnken nhằm khảo sát và phân tích tác động của các thông số đến hiệu quả thu nhận TPC và TSC. Kết quả thực nghiệm tương ứng được trình bày trong bảng 1.

cho thấy mô hình có khả năng giải thích phần lớn sự biến động của dữ liệu thực nghiệm [21]. Ngoài ra, hệ số R^2 hiệu chỉnh (R^2_{adj}) mang lại cái nhìn chính xác hơn về mức độ phù hợp của mô hình hồi quy đa biến.

Các yếu tố như biên độ siêu âm và thời gian xử lý siêu âm đóng vai trò quan trọng và ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu suất thu nhận TPC và TSC từ nguyên liệu củ và hoa chuối hột. Sự biến đổi của các thông số này tác động đến khả năng phá vỡ cấu trúc tế bào thực vật, từ đó ảnh hưởng đến mức độ giải phóng các hợp chất hoạt tính sinh học vào dung môi chiết. Từ kết quả của phương trình hồi quy có thể nhận thấy hầu hết các yếu tố đều ảnh hưởng nhất định đến hàm mục tiêu. Sau khi tiến hành phân tích ANOVA bằng JMP, thu được các điều kiện tối ưu cho quá trình chiết xuất với biên độ siêu âm ở mức 30,10% và thời gian xử lý là 15, 14 phút. Hàm lượng TPC và TSC trong chiết xuất củ chuối hột đạt lần lượt 62,11 mgGAE/gCK và 54,08 mg/gCK và mô hình bề mặt đáp ứng 3 chiều

(Hình 3A, 3B) minh họa rõ ràng mối tương tác giữa 2 biến số nghiên cứu. TPC và TSC trong dịch chiết hoa chuối hột đạt cực đại 52,94 mgGAE/gCK và 56,60 mg/gCK tại điều kiện tối ưu và mô hình

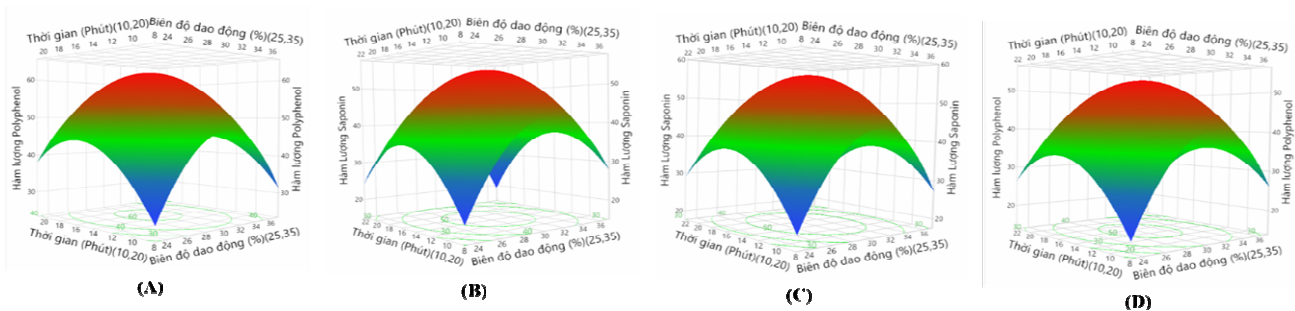
bề mặt đáp ứng thể hiện ảnh hưởng của các yếu tố khảo sát lên TPC và TSC được mô phỏng ở hình 3C, 3D.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các biến độc lập đến hàm lượng polyphenol và hàm lượng saponin

Hệ số	Củ				Hoa			
	TPC (Y ₁)		TSC (Y ₂)		TPC (Y ₃)		TSC (Y ₄)	
b ₀	62,08	<,0001*	54,1	<,0001*	52,91	<,0001*	56,58	<,0001*
b ₁	0,23	0,2077	0,59	0,0161*	0,58	0,0295*	0,16	0,5566
b ₂	1,41	0,0001*	-0,64	0,0111*	0,7	0,0141*	0,79	0,0229*
b ₁₂	-0,94	0,0062*	-1,72	0,0005*	-1,77	0,0009*	-1,4	0,0089*
b ₁₁	-8,79	<,0001*	-8,99	<,0001*	-9,25	<,0001*	-9,5	<,0001*
b ₂₂	-6,6	<,0001*	-6,69	<,0001*	-5,78	<,0001*	-6,09	<,0001*
	R ² =0,98	R ² _{adj} =0,96	R ² =0,97	R ² _{adj} =0,95	R ² =0,96	R ² _{adj} =0,94	R ² =0,95	R ² _{adj} =0,91

Bảng 3. Phương trình hồi quy theo các hàm mục tiêu TPC, TSC

Bộ phận	Hàm mục tiêu	Phương trình hồi quy
Củ	TPC	$Y_1 = 62,08 + 1,41X_2 - 0,94X_{12} - 8,79X_1 - 6,6X_2$
	TSC	$Y_2 = 54,1 + 0,59X_1 - 0,64X_2 - 1,72X_{12} - 8,99X_1 - 6,69X_2$
Hoa	TPC	$Y_3 = 52,91 + 0,58X_1 + 0,7X_2 - 1,77X_{12} - 9,25X_1 - 5,78X_2$
	TSC	$Y_4 = 56,58 + 0,79X_2 - 1,4X_{12} - 9,6X_1 - 6,09X_2$



Hình 3. Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện ảnh hưởng của các yếu tố (công suất siêu âm, X₁; thời gian siêu âm, X₂) đến hàm lượng TPC (A) và TSC (B) của củ chuối hột, TPC (C) và TSC (D) của hoa chuối hột

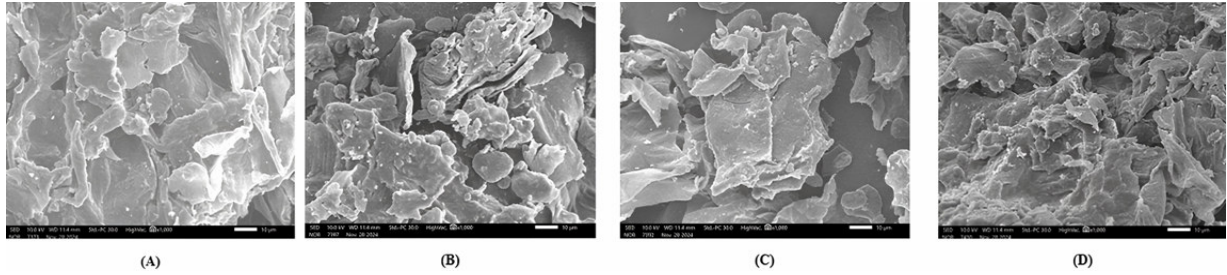
Trong vùng tối ưu, việc gia tăng đồng thời biên độ siêu âm và thời gian xử lý trong giới hạn hợp lý đã góp phần nâng cao hiệu suất thu nhận. Hình thái bề mặt của mô hình cũng phản ánh đặc điểm phi tuyến tính của từng yếu tố riêng lẻ cũng như tác động tương hỗ giữa chúng. Để đánh giá độ chính xác và khả năng dự đoán của mô hình xây dựng, nghiên cứu đã thực hiện 3 thí nghiệm lặp lại (n = 3) trong điều kiện tối ưu nói trên. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sự sai lệch giữa giá trị thực

nghiệm và giá trị dự đoán từ mô hình hồi quy đều dưới 5%, chứng tỏ mô hình có độ tin cậy cao và hoàn toàn có khả năng áp dụng trong việc dự đoán cũng như tối ưu hóa quá trình chiết xuất polyphenol và saponin.

3.3. Kết quả phân tích SEM và LC/MS

3.3.1. Kết quả phân tích SEM

Ảnh hưởng của siêu âm lên cấu trúc thành tế bào của chiết xuất từ củ và hoa chuối hột sau khi thủy phân được thể hiện ở hình 4.



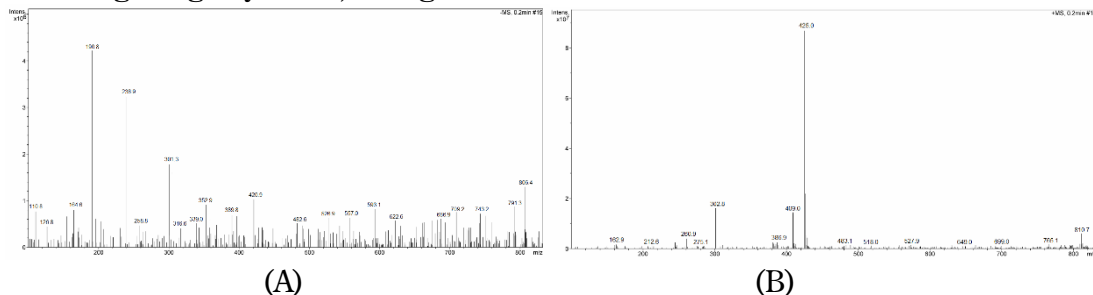
Hình 4. Hình thái của củ chuối hạt khi trích ly ngâm tĩnh (A), trích ly củ có hỗ trợ của siêu âm (B), hoa chuối hạt khi trích ly ngâm tĩnh (C) và trích ly hoa củ có hỗ trợ của siêu âm (D)

Sự khác biệt đáng kể trong hiệu suất trích ly có thể được lý giải bởi hiệu ứng cavitation (xâm thực khí) do sóng siêu âm tạo ra, dẫn đến biến dạng và phá vỡ cấu trúc thành tế bào thực vật. Cơ chế này làm tăng khả năng thẩm thấu của dung môi, thúc đẩy quá trình truyền khối các hoạt chất nội bào, từ đó hỗ trợ hiệu quả trong việc giải phóng saponin và polyphenol. Kết quả phân tích ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy, nếu mẫu sau khi chiết bằng phương pháp ngâm tĩnh (Hình 4A và 4C) vẫn giữ được cấu trúc nguyên vẹn của tế bào, thì mẫu đã qua xử lý bằng sóng siêu âm (Hình 4B và 4D) lại biểu hiện các dấu hiệu hư hại rõ rệt như tế bào bị nứt vỡ và biến dạng do tác động của sóng siêu âm tác động mạnh đến thành tế bào thực vật thông qua hiện tượng xâm thực khí, tạo ra các dao động cơ học và bong bóng khí trong dung dịch. Khi các bong bóng này nổ vỡ, chúng sinh ra

áp suất cục bộ rất lớn và nhiệt độ cao trong thời gian cực ngắn, gây ra sự phá vỡ cấu trúc cơ học của thành tế bào. Nhờ đó, các hợp chất nội bào như: Polyphenol và saponin được giải phóng dễ dàng vào dung môi. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu sử dụng sóng siêu âm trích ly polyphenol là trà đen của Both và cs (2014) [22] hay nghiên cứu trích ly rutin và quercetin từ *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb của Yang và Zhang (2008) [23].

3.3.2. Kết quả phân tích phổ LC-MS

Kết quả phân tích phổ LC-MS của chiết xuất củ ở điều kiện tối ưu được thể hiện ở hình 5. Phổ này cung cấp thông tin về các ion có mặt trong mẫu chiết. Trục hoành biểu thị tỷ lệ khối lượng trên điện tích (m/z), trong khi trục tung biểu thị cường độ tương đối của các ion.



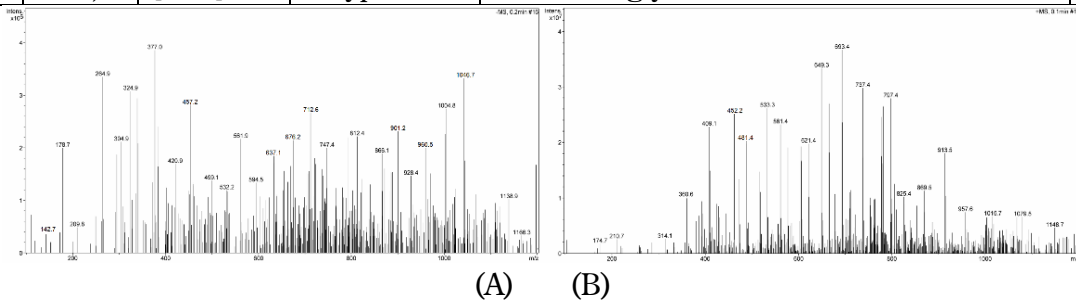
Hình 5. Phổ LCMS của chiết xuất củ chuối hạt chế độ $[M+H]^-$ (A) và $[M+H]^+$ (B)

Từ kết quả phổ chạy MS chế độ ion âm $[M+H]^-$ (Hình 5A) và chế độ ion dương $[M+H]^+$ (Hình 5B), tiến hành dự đoán các hợp chất và nhóm chất thuộc nhóm polyphenol và saponin, kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Dự đoán hợp chất trong phổ LC/MS của chiết xuất củ chuối hạt

STT	m/z	Chế độ ion	Dự đoán nhóm chất	Dự đoán hợp chất	Tham khảo
1	190,8	$[MH]^-$	Polyphenol	Có thể là một axit phenolic (ví dụ: dẫn xuất axit ferulic), chlorogenic axit (5-caffeoylquinic acid) hoặc một mảnh vỡ chính từ một flavonoid glycoside.	[24]
2	352,9	$[MH]^-$	Polyphenol		
3	190,8	$[MH]^+$	Polyphenol	Có thể là axit quinic và dẫn xuất	[25]

4	593,1	[MH] ⁻		Kaempferol-7-O-rhamnosyl-glucoside	[26]
5	727,2	[MH] ⁻	Polyphenol	Procyanidin dimer gallate	[27]
6	316,6	[MH] ⁻	Polyphenol	Dự đoán có thể là flavonoid nhỏ như rhamnetin, naringenin glycoside (sau mất nhóm đường) hoặc 3,4-dihydroxybenzoyl-glucoside	[28, 29]
7	164,6	[MH] ⁻	Polyphenol		
8	743,2	[MH] ⁻	Saponin	Timosaponin AIII có thể bị hydroxyl hóa	[30]
9	301,3	[MH] ⁻	Polyphenol	Quercetin	[31]
10	302,8	[MH] ⁺	Polyphenol		[32]
11	425,0	[MH] ⁺	Polyphenol	Có thể liên quan tới các flavonoid glycoside, đặc biệt là dẫn xuất của quercetin	[33]
12	238,9	[MH] ⁻	Phenolic	Có thể là axit phenolic glycoside sau khi mất đường (phân mảnh từ rutinoid)	[34]
13	258,8	[MH] ⁻	Phenolic	Có thể là axit feruloylquinic hoặc axit caffeic dẫn xuất	[35]
14	352,9	[MH] ⁻	Polyphenol	Có thể là axit feruloylquinic	[36]
15	659,9; 686,9; 709,2	[MH] ⁻	Polyphenol	Có thể là flavonoid glycoside nặng hoặc oligomer polyphenol	[37]
16	743,2	[MH] ⁻	Polyphenol	Dự đoán có thể là trimer hoặc glycoside của quercetin hoặc kaempferol	[38]
17	275,1	[MH] ⁺	Polyphenol	Có thể là kaempferol fragment hoặc axit phenolic glycoside	[39]
18	649,0	[MH] ⁺	Polyphenol	Flavonoid glycoside	[40]



Hình 6. Phổ LC/MS của chiết xuất hoa chuối ở chế độ [M+H]⁻ (A) và [M+H]⁺ (B)

Từ kết quả phổ LC/MS [M+H]⁻ (Hình 6A) và [M+H]⁺ (Hình 6B), tiến hành dự đoán các hợp chất và nhóm chất thuộc nhóm polyphenol và saponin, kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Dự đoán hợp chất trong phổ LCMS của chiết xuất hoa chuối

STT	m/z	Chế độ ion	Dự đoán nhóm chất	Dự đoán hợp chất	Tài liệu tham khảo
1	457,2	[MH] ⁻	Saponin	Axit oleanoic	[41]
2	676,2	[MH] ⁻	Polyphenol	3,4,5- tricafeoylquinic axit	[24]
3	637,1	[MH] ⁻	Saponin	Ginsenoside F ₁	[29]
4	1104,8	[MH] ⁻	Saponin	Didehydroginsenoside Rb ₁	[29]
5	901,2	[MH] ⁻	Saponin	Chikusetsusaponin L ₅	[29]
6	960,5	[MH] ⁻	Saponin	Notoginsenoside R ₃ /R ₆ /N/ 20-O-glucoginsenoside Rf	[29]
7	1046,7	[MH] ⁻	Saponin	Notoginsenoside O/P	[29]

8	452,2	[MH] ⁺	Polyphenol	Myricetin-3-O-xyl thuộc nhóm Flavonol là một loại flavonoid	[42]
9	481,4	[MH] ⁺	Polyphenol	Myricetin-3-o-Galactoside, thuộc nhóm flavonol, là một phân nhóm của flavonoid	[42]
10	360,6	[MH] ⁺	Polyphenol	3',4',5,7-tetramethylquercetin, thuộc nhóm flavonol, là một phân nhóm của flavonoid	[42]

Kết quả LC-MS của dịch chiết của củ và hoa chuối hột cho thấy, sự hiện diện nổi bật của 2 nhóm hoạt chất sinh học chính là polyphenol và saponin. Các polyphenol được phát hiện bao gồm nhiều flavonoid và axit phenolic như: Quercetin, kaempferol glycoside, chlorogenic axit và procyanidin. Đồng thời, nhiều saponin có m/z cao như: Ginsenoside F1, notoginsenoside và chikusetsusaponin cũng được ghi nhận. Ngoài ra, số lượng các nhóm chất polyphenol dự đoán được từ kết quả phổ (Hình 5, bảng 4) nhiều hơn so với số lượng nhóm chất saponin. Điều này cũng tương quan với hàm lượng TPC trong củ chuối cao hơn so với TSC. Bên cạnh đó, hàm lượng TSC trong hoa chuối cao hơn so với TPC và số lượng và cường độ các peak dự đoán thuộc nhóm saponin cũng cao hơn so với nhóm polyphenol (Hình 6, bảng 5).

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được điều kiện thu nhận chiết xuất giàu saponin và polyphenol từ củ và hoa của cây chuối hột bằng phương pháp trích UAE. Hiệu quả phá vỡ thành tế bào thực vật giúp giải phóng các chất ra dung môi được thể hiện qua kết quả chụp SEM của nguyên liệu trước và sau trích ly. Kết quả dự đoán từ phổ LC/MS chiết xuất chứa nhiều peak của các hợp chất thuộc nhóm saponin và polyphenol, góp phần khẳng định hiệu quả của quá trình trích ly thu nhận chiết xuất giàu hoạt chất từ các bộ phận củ và hoa chuối hột. Tuy vậy, cần có những nghiên cứu về phân đoạn, tinh sạch để xác định cấu trúc các hợp chất chính có trong các phân đoạn, làm cơ sở cho các nghiên cứu về hoạt tính sinh học cũng như ứng dụng trong các loại sản phẩm tốt cho sức khỏe.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. Swargiary, H. Boro, M. Kumar Roy, and M. Akram (2021). Phytochemistry and Pharmacological Property of *Musa balbisiana*

Colla: A Mini-Review. *Phcog Rev*, 15(29), 91 - 95. Doi:10.5530/phrev.2021.15.11.

2. F. Zahra, S. Khalid, M. Aslam, and Sharmeen (2021). Health benefits of banana (Musa)-A review study. *Int J Biosci*, 18(4), 189 - 199. Doi: 10.12692/ijb/18.4.189-8

3. F. Shahidi and J. Yeo (2018). Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review," *Int J Mol Sci*, 19(6), 1573. Doi: 10.3390/ijms19061573.

4. H. Rasouli, M. H. Farzaei, and R. Khodarahmi (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *Int J Food Prop*, 20(2), 1 - 42. Doi: 10.1080/10942912.2017.1354017.

5. K. Sharma, R. Kaur, S. Kumar, R. K. Saini, S. Sharma, S. V. Pawde, and V. Kumar (2023). Saponins: A concise review on food related aspects, applications and health implications. *Food Chem Adv*, 2, 100191. Doi: 10.1016/j.focha.2023.100191.

6. F. Chemat, H. Zill e and M. K. Khan (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason Sonochem*, 18(4), 813 - 35. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.11.023.

7. L. Wang and C. L. Weller (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol*, 17(6), 300 - 312. Doi: 10.1016/j.tifs.2005.12.004.

8. F. Dias Bertoco Júnior, É. Marusa Pergo Coelho, M. C. Feiten, and B. C. Bolanho Barros (2025). Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds and Flavonoids from Banana Inflorescence and Characterization of Its Fibrous Residue, *Separations*, 12(5), 109. Doi: 10.3390/separations12050109.

9. N. A. Ishak, N. A. A. Razak, M. S. P. Dek, and A. S. Baharuddin (2020). Production of high

tannin content and antioxidant activity extract from an unripe peel of *Musa acuminata* (Cavendish) using ultrasound-assisted extraction (UAE). *BioResources*, 15(1), 1877 - 1893.

10. J. P. Maran, B. Priya, N. A. Al-Dhabi, K. Ponmurugan, I. G. Moorthy, and N. Sivarajasekar (2017). Ultrasound assisted citric acid mediated pectin extraction from industrial waste of *Musa balbisiana*, *Ultrason Sonochem*, 35(Pt A), 204 - 209. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.09.019.

11. Putri, C. Irawan, M. Sukiman, L. Rahmatia, E. Styani, A. Novianti and A. Dewanta (2022). Application of Ultrasound Assisted Extraction on Ripe Banana Peels (*Musa balbisiana* Colla) and its Potential as an Antioxidant and Antigout Agent. *Res J Pharm Technol*, 15(2), 761 - 767. Doi: 10.52711/0974-360x.2022.00127.

12. B. Singh, N. Singh, S. Thakur, and A. Kaur (2016). Ultrasound assisted extraction of polyphenols and their distribution in whole mung bean, hull and cotyledon. *J Food Sci Technol*, 54(4). 921 - 932. Doi: 10.1007/s13197-016-2356-z.

13. Y. Chen, M. -Y. Xie and X. -F. Gong (2007). Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*, *J. food eng.*, 81(1), 162 - 170. Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2006.10.018.

14. P. Feduraev, G. Chupakhina, P. Maslennikov, N. Tacenko and L. Skrypnik (2019). Variation in phenolic compounds content and antioxidant activity of different plant organs from *Rumex crispus* L. and *Rumex obtusifolius* L. at different growth stages, *Antioxidants (Basel)*, 8(7). Doi: 10.3390/antiox8070237.

15. L. Paniwnyk, E. Beaufoy, J. P. Lorimer, and T. J. Mason (2001). The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. *Ultrason Sonochem*, 8(3), 299 - 301. Doi: 10.1016/s1350-4177(00)00075-4.

16. K. Vilku, R. Mawson, L. Simons, and D. Bates (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innov Food Sci Emerg*, 9(2), 161-169. Doi: 10.1016/j.ifset.2007.04.014.

17. Q. W. Zhang, L. G. Lin, and W. C. Ye (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med*, 13. 20. Doi: 10.1186/s13020-018-0177-x.

18. F. Chemat, N. Rombaut, A. G. Sicaire, A. Meullemiestre, A. S. Fabiano-Tixier, and M. Abert-Vian (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem*, 34, 540 - 560. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.

19. C. S. Dzah, Y. Duan, H. Zhang, C. Wen, J. Zhang, G. Chen, and H. Ma (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food biosci*, 35. 100547. Doi: 10.1016/j.fbio.2020.100547.

20. A. Ivanova, I. Lazarova, P. Mechkarova, and B. Tchobanov (2010). "HPLC method for screening of steroidal saponins and rutin as biologically active compounds in *Tribulus terrestris* L. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 24(1), 129 - 133. Doi: 10.1080/13102818.2010.10817826

21. J. Gabrielsson, N. O. Lindberg, and T. Lundstedt (2002). Multivariate methods in pharmaceutical applications. *J Chemo*, 16(3), 141 - 160. Doi: 10.1002/cem.697.

22. S. Both, F. Chemat and J. Strube (2014). Extraction of polyphenols from black tea-conventional and ultrasound assisted extraction. *Ultrason Sonochem*, 21(3), 1030 - 1034. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2013.11.005.

23. Y. Yang and F. Zhang (2008). Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrason Sonochem*, 15(4), 308 - 313. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2007.05.001.

24. A. Yougoubou, M. C. Dabire, K. R. Bationo, A. Ganame, A. Noba, M. Koala, and M. Nacro. Antioxidants activities, HPTLC and HPLC/MS characterization of some phenolic acids of *Grangea maderaspatana* roots extracts from Burkina Faso. *IJBSC*, 18(3), 1152 - 1165. Doi: 10.4314/ijbcs.v18i3.33.

25. Y. Zhang, H. Xiong, X. Xu, X. Xue, M. Liu, S. Xu and X. Li (2018). Compounds identification in semen cuscuteae by ultra-high-performance liquid chromatography (UPLCs) coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, 23(5), 1199. Doi: 10.3390/molecules23051199.
26. Abdulla, R., Mansur, S., Lai, H., Ubul, A., Sun, G., Huang, G., & Aisa, H. A. (2017). Qualitative analysis of polyphenols in macroporous resin pretreated pomegranate husk extract by HPLC - QTOF - MS. *Phytochem Anal*, 28(5), 465 - 473. Doi: 10.1002/pca.2695.
27. Y. Hassaan, H. Handoussa, A. H. El-Khatib, M. W. Linscheid, N. El Sayed, and N. Ayoub (2014). Evaluation of plant phenolic metabolites as a source of Alzheimer's drug leads, *Biomed Res Int*, 1014(1), 843263. Doi: 10.1155/2014/843263.
28. R. Jaiswal, H. Karakoşse, S. Rußmann, K. Goldner, M. Neumuüller, D. Treutter, and N. Kuhnert (2013). Identification of phenolic compounds in plum fruits (*Prunus salicina* L. and *Prunus domestica* L.) by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry and characterization of varieties by quantitative phenolic fingerprints. *J Agric Food Chem*, 61(49), 12020 - 31. Doi: 10.1021/jf402288j.
29. C. Jiang and P. J. Gates (2024). Systematic Characterisation of the Fragmentation of Flavonoids Using High-Resolution Accurate Mass Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *Molecules*, 29(22), 5246. Doi: 10.3390/molecules29225246.
30. Y. Sun, L. Liu, Y. Peng, B. Liu, D. Lin, L. Li, and S. Song (2015). Metabolites characterization of timosaponin AIII in vivo and in vitro by using liquid chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 997, 236 - 43. Doi: 10.1016/j.jchromb.2015.06.015.
31. A.F. Alves, A. Katchborian-Neto, P.C.P. Bueno, F. Carnevale-Neto, R. Casoti, M.S. Ferreira... and D. A. Chagas-Paula (2024). LC-MS/DIA-based strategy for comprehensive flavonoid profiling: an *Ocotea* spp. applicability case. *RSC advances*, 14(15), 10481-10498. Doi: 10.1039/D4RA01384K.
32. L. d. S. Farias and A. S. Mendez (2014). LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata* subsp. pruinosa," *Quimica Nova*, 37, 483-486. Doi: 10.5935/0100-4042.20140069.
33. J. Cao, C. Yin, Y. Qin, Z. Cheng, and D. Chen (2014). Approach to the study of flavone di - C - glycosides by high performance liquid chromatography - tandem ion trap mass spectrometry and its application to characterization of flavonoid composition in *Viola yedoensis*. *J Mass Spectrom*, 49(10), 1010-1024. Doi: 10.1002/jms.3413.
34. T. Du, Y. Wang, H. Xie, D. Liang, and S. Gao (2024). Fragmentation Patterns of Phenolic C-Glycosides in Mass Spectrometry Analysis. *Molecules*, 29(13), 2953. Doi: 10.3390/molecules29132953
35. M. A. Farag, A. Porzel, J. Schmidt, and L. A. Wessjohann (2012). Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L.(hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. *Metabolomics*, 8, 492 - 507. Doi: 10.1007/s11306-011-0335-y
36. X. Li, H. Liu, J. Li, X. Zhao, S. Wang, and X. Zheng (2009). Simultaneous determination of Berberine and Palmatine in rabbit plasma by LC-MS-MS and its application in pharmacokinetic study after oral administration of Coptidis and Coptidis-Gardeniae couple extract, *Chromatographia*, 70, 1113 - 1119. Doi: 10.1365/s10337-009-1308-4
37. D. Escobar-Avello, J. Lozano-Castellón, C. Mardones, A. J. Pérez, V. Saéz, S. Riquelme... and A. Vallverdú-Queralt (2019). Phenolic profile of grape canes: Novel compounds identified by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS, *Molecules*, 24(20), 3763.
38. N. Kuhnert, M. N. Clifford, and A. Müller (2010). Oxidative cascade reactions yielding polyhydroxy-theaflavins and theacitrins in the formation of black tea thearubigins: Evidence by

- tandem LC-MS. *Food & Function*, 1(2), 180 - 199. Doi: 1039/C0FO00066C.
39. C. E. Randolph, D. L. Marshall, S. J. Blanksby, and S. A. McLuckey (2020). Charge-switch derivatization of fatty acid esters of hydroxy fatty acids via gas-phase ion/ion reactions, *Anal chimica acta*, 1129, 31 - 39. Doi: 10.1016/j.aca.2020.07.005.
40. L. Zhao, R. S. Pei, B. P. Ji, Y. C. Luo, D. Zhang, Z. Y. Xu, and X. N. Jia (2010). Antioxidant activity of aqueous extract fractions of velvet antler (*Census elaphus Linnaeus*). *Journal of Food and Drug Analysis*, 18(5), 3.
41. S. Rodriguez, J.-L. Wolfender, J. Msonthi, and K. Hostettmann (1996). Quantitative and qualitative analysis of the saponins from berries of cultivated *Phytolacca dodecandra* by LC/UV and LC/MS. UZ Publications, 283 - 295.
42. J. Kaur, V. Dhiman, S. Bhadada, O. P. Katare and G. Ghoshal (2022). LC/MS guided identification of metabolites of different extracts of *Cissus quadrangularis*. *Food Chem Adv* 1, 100084. Doi: 10.1016/j.focha.2022.100084.

STUDYING THE EFFECT OF ULTRASOUND ON THE EXTRACTION OF POLYPHENOL AND SAPONIN FROM *Musa balbisiana* CORM AND INFLORESCENCE

Hoang Thi Ngoc Nhon¹, Luu Thi Quynh Hoa¹,

Ngo Thi Huyen Trang¹, Le Thi Hong Anh¹

¹*Ho Chi Minh city University of Industry and Trade*

Abstract

Musa balbisiana corm and inflorescence contain lots of health-promoting active ingredients such as saponins and polyphenols. This study aims to evaluate the effectiveness of ultrasound-assisted extraction (UAE) on the efficiency on extraction to obtain polyphenol- and saponin-rich extracts from corm and inflorescence of *M. balbisiana*, thereby optimizing the extraction process. The results showed that UAE resulted in total polyphenol content (TPC) of 60.22 mgGAE/gdm (corm) and 50.06 mg GAE/gdm (inflorescence), respectively and total saponin content (TSC) values of 51.11 mg/gdm (corm) and 54.12 mg/gdm (inflorescence). Under optimal conditions with 30.07% ultrasonic amplitude for 15.30 min of ultrasonic time, TPC and TSC contents reached 62.11 mg GAE/gdm and 54.08 mg/gdm (corm) and 52.94 mg GAE/gdm and 56.60 mg/gdm (inflorescence), respectively. The SEM results also showed that the effectiveness of ultrasound waves changed the cell structure of the raw materials and supported the extraction process. In addition, the liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) results showed that the extracts from *M. balbisiana* corm and inflorescence mainly contained two main groups of biological compounds: polyphenols (such as quercetin, kaempferol glycoside, chlorogenic acid, procyanidin) and saponins (such as ginsenoside F1, notoginsenoside, chikusetsusaponin). The results also showed that corm was richer in polyphenols, while inflorescence had a higher saponin content.

Keywords: *Musa balbisiana*, optimization, saponin, polyphenol, ultrasound.

Ngày nhận bài: 23/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 7/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 25/7/2025

Ngày duyệt đăng: 8/8/2025

ẢNH HƯỞNG CỦA QUÁ TRÌNH NGÂM VÀ NẤY MẦM ĐẾN HÀM LƯỢNG POLYPHENOL VÀ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HOÁ TRONG DỊCH CHIẾT HẠT MẦM ĐẬU ĐEN XANH LÒNG (*Vigna unguiculata*)

Phan Thị Bé¹, Đỗ Thị Bích Thủy^{2,*}, Võ Văn Quốc Bảo¹,
Nguyễn Văn Đức¹, Trần Bảo Khánh¹, Nguyễn Phan Hạ Vi³

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

² Trường Kỹ thuật và Công nghệ, Đại học Duy Tân

³ Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

*Email: dotbichthuy@duytan.edu.vn

TÓM TẮT

Đậu đen xanh lòng (*Vigna unguiculata*) là loại hạt giàu hợp chất polyphenol và flavonoid có hoạt tính chống oxy hoá mạnh. Nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của điều kiện ngâm và nảy mầm đến hàm lượng polyphenol, flavonoid và hoạt tính chống oxy hoá trong dịch chiết hạt đậu đen nảy mầm. Các chỉ tiêu được phân tích gồm: Polyphenol tổng số (TPC), flavonoid tổng số (TFC) và hoạt tính khử gốc tự do (DPPH, ABTS). Kết quả nghiên cứu cho thấy, điều kiện ngâm ở 35°C trong 6 giờ giúp đạt tỷ lệ nảy mầm cao nhất (96,3%). Trong giai đoạn nảy mầm, nhiệt độ và thời gian là yếu tố quyết định đến khả năng tích lũy hợp chất có hoạt tính sinh học. Khi nảy mầm ở 25 - 30°C trong 48 - 72 giờ, TPC tăng 60,3%, TFC tăng 154,5%, hoạt tính DPPH tăng 203,5% và ABTS tăng 73,3% so với hạt chưa nảy mầm ($p < 0,05$). Tối ưu hoá theo mô hình thiết kế thực nghiệm xác định điều kiện tối ưu là 28,79°C trong 54,06 giờ. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các chỉ tiêu đạt giá trị cực đại với độ tương thích cao giữa dự đoán và thực nghiệm. Kết quả nghiên cứu khẳng định, quá trình ngâm và nảy mầm là phương pháp sinh học hiệu quả nhằm nâng cao giá trị chức năng của hạt đậu đen, mở ra triển vọng ứng dụng trong sản xuất thực phẩm giàu chất chống oxy hoá từ nguyên liệu tự nhiên.

Từ khoá: Hoạt tính chống oxy hoá, nảy mầm, polyphenol, *Vigna unguiculata*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu đen xanh lòng (*Vigna unguiculata*) là giống đậu phổ biến ở miền Trung Việt Nam, giàu giá trị dinh dưỡng và chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như: Polyphenol, flavonoid [1 - 7]. Hàm lượng polyphenol tổng số trong giống đậu này dao động từ 15,20 - 19,99 mg GAE/g chất khô [8]. Nảy mầm được xem là phương pháp sinh học hiệu quả giúp cải thiện giá trị dinh dưỡng và tăng hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học [9]. Quá trình này kích hoạt các enzyme thủy phân như: Protease, amylase, cellulase..., thúc đẩy sự chuyển hóa và sinh tổng hợp polyphenol [10 - 12]. Chế độ ngâm và nảy mầm (thời gian và nhiệt độ) có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả của quá trình này [12 - 14]. Hạt đậu nành (*Glycine max* L.) sau 6

ngày nảy mầm, hàm lượng polyphenol tăng từ 548,0 lên 1.159,5 mg GAE/100 g chất khô [15]. Hàm lượng polyphenol lần lượt là 950 và 910 mg/100 g đối với mầm đậu nành vàng và xanh được nảy mầm ở 21°C trong 6 ngày [16]. Hàm lượng polyphenol của giống đậu nành Trung Quốc ZH13 khi được nảy mầm ở nhiệt độ 30°C chỉ đạt khoảng 35 mg/100 g [17]. Sau 6 ngày nảy mầm hạt đậu nành, hoạt tính chống oxy hoá được ông bố là tăng 188,03% so với mẫu chưa nảy mầm. Hạt djulis (*Chenopodium formosanum*) khi được nảy mầm ở 25°C trong 48 giờ cho thấy hiệu quả vượt trội về việc tăng hàm lượng TPC và khả năng khử gốc tự do DPPH [18]. Hơn nữa, các giống đậu khác nhau được công bố có hàm lượng polyphenol tổng số là không giống nhau [19 - 20]. Như vậy,

nảy mầm được ứng dụng như một phương pháp sinh học hiệu quả để tạo nguyên liệu thực phẩm giàu các hợp chất chống oxy hóa. Hiệu quả sinh tổng hợp các hợp chất này chịu ảnh hưởng bởi nhiệt độ, độ ẩm, thời gian nảy mầm và đặc điểm giống. Chính vì vậy, nghiên cứu ảnh hưởng của quá trình ngâm và nảy mầm đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hoá trong dịch chiết hạt mầm đậu đen xanh lòng (*Vigna unguiculata*) là cần thiết.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Hạt đậu đen xanh lòng (*Vigna unguiculata*) được thu hoạch trên địa bàn thành phố Huế.

Hoá chất sử dụng trong nghiên cứu: Thuốc thử Folin – Ciocalteu; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH); 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS); 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox); $AlCl_3$, gallic axit và catechin được mua từ Sigma-Aldrich (Steinheim, Đức).

2.2. Bố trí thí nghiệm để xác định nhiệt độ và thời gian ngâm thích hợp

Hạt đậu đen được ngâm trong nước vô trùng tại 3 mức nhiệt độ khác nhau: 25°C, 35°C và 45°C. Mẫu hạt được lấy định kỳ sau mỗi 2 giờ và sấy ở 105°C cho đến khi khối lượng không đổi, nhằm xác định thủy phần theo phương pháp khối lượng. Các mẫu hạt có giá trị thủy phần trong khoảng 40 - 50% được lựa chọn để tiến hành thí nghiệm nảy mầm.

2.3. Đánh giá tỷ lệ nảy mầm sau ngâm

Các mẫu hạt sau khi ngâm được nảy mầm ở 30°C trong 24 giờ. Hạt được trải đều trên khay chứa lớp bông ẩm vô trùng, phủ bằng hai lớp gạc, giữ ẩm bằng cách phun sương và nhằm hạn chế sự bốc hơi nước. Sau thời gian nảy mầm, tỷ lệ nảy mầm được xác định. Tiêu chí nảy mầm là quan sát được phần rễ mầm bắt đầu nhô ra khỏi vỏ hạt [21]. Tỷ lệ nảy mầm (%) được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ nảy mầm (\%)} = \left(\frac{\text{Số hạt nảy mầm}}{\text{Tổng số hạt}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Dựa vào kết quả tỷ lệ nảy mầm để xác định nhiệt độ và thời gian ngâm phù hợp.

2.4. Bố trí thí nghiệm xác định nhiệt độ và thời gian nảy mầm thích hợp

Các mẫu hạt sau ngâm ở nhiệt độ và thời gian thích hợp (kết quả của mục 2.3 và 2.4) được nảy mầm ở các nhiệt độ từ 20-35°C. Mẫu được lấy định kỳ sau mỗi 12 giờ, kéo dài đến 108 giờ (được ký hiệu từ G0, G12; G24; G36; G48; G60; G72; G84; G96; G108) và được sấy thăng hoa (freeze-dried). Sau đó, mẫu được nghiền mịn (<1 mm) bằng cối sứ trong điều kiện khô và bảo quản trong lọ kín ở -20°C cho đến khi xác định các chỉ tiêu (hàm lượng polyphenol, flavonoid và hoạt tính chống oxy hoá).

2.5. Xác định thủy phần

Mẫu thí nghiệm đã nghiền (<1 mm) (5 g) (W_1 , g)) được cho vào cốc sấy và tiến hành sấy ở nhiệt độ (105 - 106°C), trong 3 giờ $\pm$ 5 phút. Mẫu đã sấy được làm nguội trong bình hút ẩm 20 phút ở nhiệt độ phòng và xác định lại khối lượng mẫu sau sấy (W_2 , g). Thủy phần của mẫu (X%, w/w) được biểu thị theo phần trăm khối lượng, được tính theo công thức [22]:

$$X = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (2)$$

2.6. Chuẩn bị dịch chiết từ hạt mầm đậu đen xanh lòng

Mẫu hạt mầm đậu đen xanh lòng đã nghiền mịn (5 g) được chiết với ethanol 70% (50 mL) dưới tác động của siêu âm 40 kHz - 180 W (Jeken TUC-65) ở nhiệt độ 40°C trong 30 phút. Hỗn hợp sau chiết được ly tâm ở 10.000 vòng/phút, 4°C trong 10 phút, dịch nổi được lọc qua màng Biologix 0,45 μ m, cô đặc chân không ở 40°C, sau đó phần dịch cô đặc được điều chỉnh thể tích bằng ethanol 50% (v/v). Dịch chiết được bảo quản ở -20°C cho đến khi phân tích hàm lượng polyphenol tổng số (TPC), flavonoid tổng số (TFC) và hoạt tính chống oxy hóa bằng các phép thử DPPH và ABTS. Toàn bộ quy trình được lặp lại 3 lần [23, 24].

2.7. Xác định hàm lượng polyphenol tổng số

Dịch chiết chứa polyphenol đã pha loãng ở tỷ lệ thích hợp (200 μ L) được cho vào 1,5 mL polyphenol thuốc thử Folin-Ciocalteu 0,2 N. Hỗn hợp được vortex, để yên trong 5 phút và tiếp tục

trộn đều với 1,5 mL dung dịch natri carbonat (75 g/L). Hỗn hợp phản ứng để ở điều kiện tối, nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Tiếp đến, độ hấp thụ được đo tại bước sóng 765 nm bằng máy quang phổ (Ultrospec 1100 pro, Amersham Biosciences, Hoa Kỳ). Gallic axit được sử dụng làm chất chuẩn và kết quả được biểu thị dưới dạng miligam tương đương gallic axit trên mỗi gam chất khô (mg GAE/gDW) [25].

2.8. Xác định hàm lượng flavonoid tổng số

Dịch chiết đã pha loãng ở nồng độ thích hợp (1 mL) được cho vào 0,3 mL NaNO_2 (5%). Sau 5 phút, hỗn hợp được bổ sung 0,3 mL AlCl_3 (10%) và sau đó 1 phút, thêm vào 2 mL NaOH 1 M. Độ hấp thụ quang học được đo tại bước sóng 510 nm. Catechin được sử dụng làm chất chuẩn và kết quả hàm lượng flavonoid tổng số được biểu thị dưới dạng miligam catechin tương đương trên mỗi gam chất khô (mg CAE/g DW) [26].

2.9. Xác định hoạt tính khử gốc tự do DPPH

Dịch chiết (200 μL) đã pha loãng ở nồng độ thích hợp được bổ sung 3,8 mL dung dịch DPPH nồng độ 60 $\mu\text{mol/L}$ (trong methanol). Sau khi ủ trong 60 phút ở nhiệt độ phòng và tránh ánh sáng, độ hấp thụ được đo tại bước sóng 515 nm bằng máy quang phổ. Mối tương quan giữa nồng độ Trolox và hoạt tính khử DPPH được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Hoạt tính khử gốc tự do DPPH được biểu thị dưới dạng micromol Trolox tương đương trên mỗi gam chất khô ($\mu\text{mol TE/g DW}$) [27, 28].

2.10. Xác định hoạt tính khử gốc tự do ABTS

Tác nhân phản ứng ABTS^+ được chuẩn bị bằng cách trộn dung dịch ABTS 7 mmol/L với dung dịch kali persulfat 2,45 mmol/L theo tỉ lệ 1: 1 (v/v). Hỗn hợp được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng từ 12 – 16 giờ trước khi sử dụng. Sau đó, dung dịch ABTS^+ được pha loãng bằng methanol và điều chỉnh độ hấp thụ về $0,700 \pm 0,020$ tại bước sóng 734 nm. Tiếp theo, mẫu chiết (100 μL) đã pha loãng nồng độ thích hợp được thêm vào 3,0 mL dung dịch ABTS^+ . Sau khi ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng trong điều kiện tối, độ hấp thụ được đo tại 734 nm bằng máy quang phổ. Mối tương quan giữa nồng độ Trolox và hoạt tính khử gốc ABTS^+

được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Kết quả được biểu thị dưới dạng micromol Trolox tương đương trên mỗi gam chất khô ($\mu\text{mol TE/g DW}$) [29].

2.11. Phương pháp tối ưu hóa bằng quy hoạch thực nghiệm

Dựa vào kết quả phần 2.5 chọn mức thấp và cao của biến trong thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa bằng quy hoạch thực nghiệm. Theo đó, có 2 yếu tố đầu vào liên tục (nhiệt độ và thời gian) và tối ưu hóa 4 mục tiêu đầu ra là TPC, TFC, DPPH và ABTS. Ma trận quy hoạch thực nghiệm được thiết kế theo mô hình thí nghiệm trung tâm Central Composite Design (CCD), chọn face-centered CCD ($\alpha=1$).

Từ đó, có tất cả 13 thí nghiệm (4 thí nghiệm theo thiết kế toàn phần cho 2 yếu tố (2^2): $(-1,-1)$, $(1,-1)$, $(-1,1)$, $(1,1)$; 4 thí nghiệm điểm trục: $(-\alpha,0)$, $(\alpha,0)$, $(0,-\alpha)$, $(0,\alpha)$ ($\alpha=1$) và 5 thí nghiệm trung tâm $(0,0)$ (Bảng 4).

2.12. Phân tích thống kê

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các số liệu được phân tích phương sai (ANOVA), phần mềm Minitab phiên bản 20 với kiểm định Tukey ($p < 0,05$). Tất cả số liệu trình bày trong các bảng ở phần kết quả là giá trị trung bình của ba lần lặp lại cùng với độ lệch chuẩn (Standard Deviation, SD).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự thay đổi thủy phân hạt đậu đen xanh lòng trong quá trình ngâm ở các nhiệt độ khác nhau

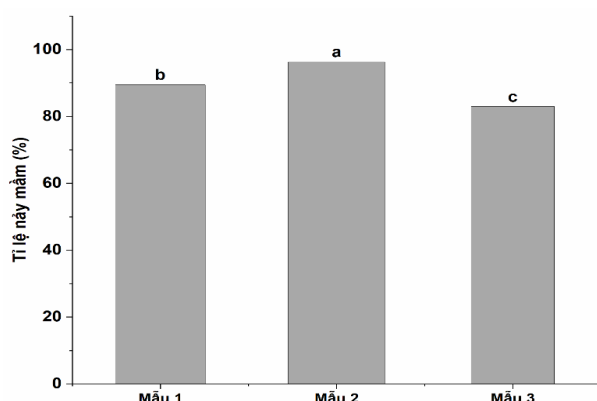
Kết quả cho thấy, thủy phân của hạt đậu đen xanh lòng tăng đáng kể theo thời gian và nhiệt độ ngâm (Bảng 1). Hạt ngâm ở nhiệt độ cao hấp thụ nước nhanh hơn. Ở cùng một thời điểm, hạt ngâm ở nhiệt độ cao hấp thụ nước nhanh hơn. Sau 8 giờ, thủy phân đạt 47,81% ở 25°C, 55,83% ở 35°C và 63,42% ở 45°C. Khi thủy phân của hạt đạt trong khoảng 40 – 50% sẽ phù hợp cho hạt nảy mầm [30]. Bảng 1 cho thấy, hạt đạt được mức thủy phân thích hợp là: (1) Mẫu 1: Hạt được ngâm ở 25°C trong 8 giờ, (2) Mẫu 2: Hạt được ngâm ở 35°C trong 6 giờ, (3) Mẫu 3: Hạt được ngâm ở 45°C trong 4 giờ. Các mẫu (Mẫu 1, 2 và 3) được dùng để khảo sát tỷ lệ nảy mầm nhằm chọn thời gian và nhiệt độ ngâm phù hợp.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian ngâm đến thủy phần (%) của hạt

Thời gian ngâm (giờ)	Nhiệt độ ngâm (°C)		
	25	35	45
2	12,96 ^j ± 0,23	16,57 ⁱ ± 0,36	29,06 ^g ± 0,32
4	18,76 ^h ± 0,07	32,37 ^f ± 0,55	46,68 ^{cd} ± 0,34
6	39,12 ^e ± 0,05	46,27 ^d ± 0,27	56,17 ^b ± 0,62
8	47,81 ^c ± 0,66	55,83 ^b ± 0,66	63,42 ^a ± 0,55

Ghi chú: Số liệu trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn ($n = 3$). Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các tổ hợp xử lý ($p < 0,05$), kiểm định Tukey HSD sau ANOVA hai nhân tố.

3.2. Ảnh hưởng của điều kiện ngâm đến tỉ lệ nảy mầm của hạt đậu đen xanh lòng



Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian ngâm đến tỉ lệ nảy mầm

Ghi chú: Các giá trị có chữ cái khác nhau cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). (Mẫu 1: Ngâm ở 25°C, 8 giờ; mẫu 2: Ngâm ở 35°C, 6 giờ; mẫu 3: Ngâm ở 45°C, 4 giờ).

Các mẫu hạt lựa chọn ở mục 3.1 được sử dụng để khảo sát tỉ lệ nảy mầm. Hình 1 cho thấy, mẫu 2 (ngâm ở 35°C trong 6 giờ đạt thủy phần 46,27 ± 0,27%) cho tỉ lệ nảy mầm cao nhất 96,3 ± 0,04%. Trong khi, mẫu 1 (ngâm ở 25°C, trong 8 giờ thủy phần đạt 47,81 ± 0,66%) có tỉ lệ nảy mầm chỉ đạt 89,43 ± 0,46%. Tương tự, mẫu 3 (ngâm ở 45°C trong 4 giờ, thủy phần đạt 46,68 ± 0,34%) có tỉ lệ nảy mầm thấp nhất 82,97 ± 0,32%. Điều này có thể là do nhiệt độ thấp làm chậm quá trình hoạt hoá enzyme và trao đổi chất, từ đó làm trì hoãn sự nảy mầm. Theo Szczerba và cs (2021), đối với 4 giống đậu nành (*Glycine max* L.), tại 10°C, không có giống nào nảy mầm sau 48 giờ, trong khi nhiệt độ nảy mầm tăng lên 25°C, hoạt động của enzyme α -amylase đã tăng lên đáng kể nên cải thiện rõ rệt

về tỉ lệ nảy mầm [31]. Sự suy giảm tỉ lệ nảy mầm trong điều kiện nhiệt độ quá cao (ở 45°C) có thể liên quan đến hiện tượng thoát ly các chất tan, phá vỡ cấu trúc tế bào hoặc làm giảm khả năng duy trì môi trường nội bào cần thiết cho mầm phát triển [32].

Như vậy, điều kiện thích hợp để ngâm hạt trước khi nảy mầm là ở 35°C trong khoảng thời gian 6 giờ.

3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian nảy mầm đến hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số trong hạt đậu đen xanh lòng

Nhiệt độ và thời gian nảy mầm ảnh hưởng rõ rệt đến hàm lượng TPC và TFC của hạt đậu đen (Bảng 2). Ở cùng một thời gian, giá trị TPC và TFC cao nhất đạt được ở 25°C và 30°C, khi tăng nhiệt độ lên 35°C, hàm lượng các hợp chất này có xu hướng giảm. Cả 2 chỉ tiêu này tăng dần theo thời gian nảy mầm và đạt cao nhất trong khoảng 36 – 72 giờ, sau đó giảm nhẹ. Tại 25°C sau 48 giờ, hàm lượng TPC và TFC đạt cực đại lần lượt là 17,63 ± 0,22 (mg GAE/g DW) và 2,75 ± 0,02 (mg CAE/g DW), tăng 60,3% và 154,5% so với hạt chưa nảy mầm.

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu trên hạt djlis (*Chenopodium formosanum*) ở Đài Loan [18], theo đó hạt được nảy mầm ở 25°C cho giá trị TPC cao hơn so với 30°C. Đồng thời, nó cũng tương đồng với xu hướng tăng TPC trong quá trình nảy mầm ở đậu nành (*Glycine max*), đậu xanh (*Vigna radiata*) và đậu đen (*Phaseolus vulgaris*) [33]. Tuy nhiên, mức TPC trong hạt đậu đen xanh lòng cao hơn nhiều, có thể do đặc điểm giống đậu đen xanh lòng và điều kiện sinh trưởng khác biệt.

Nhìn chung, TFC của hạt tăng đáng kể trong quá trình nảy mầm, tuy có sự khác biệt giữa các loại đậu. Ở đậu xanh, TFC đạt 5,58 mg RE/g FW (tính theo khối lượng tươi) vào ngày thứ năm, với tốc độ tăng trưởng nhanh nhất vào ngày thứ ba. Trong khi đó, đậu đen có tốc độ tăng chậm hơn nhưng ổn định, đạt đỉnh vào ngày thứ tư với mức 4,25 mg RE/g FW. TFC của đậu nành tương đối thấp hơn, chỉ đạt 2,81 mg RE/g FW vào ngày thứ 5 [33]. Nhiệt độ và thời gian nảy mầm thích hợp cho mỗi loại hạt cũng khác nhau và có vai trò quyết định trong việc kích hoạt quá trình sinh tổng hợp các hợp chất chống oxy hoá. Thời gian 36 – 72 giờ và nhiệt độ 25 – 30°C là điều kiện nảy mầm thích hợp để TPC và TFC trong hạt đậu đen xanh lòng đạt giá trị cao.

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian nảy mầm đến hoạt tính chống oxy hoá của hạt đậu đen

Kết quả phân tích khả năng chống oxy hoá bằng thử nghiệm với DPPH và ABTS (Bảng 3), chịu ảnh hưởng rõ rệt bởi điều kiện nảy mầm. Cả 2 chỉ tiêu này có giá trị khá cao ở nhiệt độ nảy mầm 25°C và 30°C trong khoảng thời gian 48 – 72 giờ, sau đó, suy giảm khi kéo dài thời gian nảy mầm.

Ở 25°C sau 48 giờ, hoạt tính DPPH và ABTS lần lượt đạt 34,48 $\mu\text{molTE/g DW}$ và 55,44 $\mu\text{molTE/g DW}$, gấp 203,5% và 73,3% so với hạt chưa nảy mầm. Hiệu quả này có thể do quá trình giải phóng các hợp chất polyphenol tự do dưới tác động của các enzyme nội sinh được hoạt hoá trong giai đoạn đầu của quá trình nảy mầm như esterase, protease, amylase và cellulase [15]. Nghiên cứu trên đậu đen và đậu Hà Lan cho thấy, hoạt tính chống oxy hoá tăng rõ rệt trong 6 - 7 ngày nảy mầm ở 25°C [34]. Lu và cs (2024) cũng ghi nhận hạt djulis (*Chenopodium formosanum*) nảy mầm ở 25°C có giá trị DPPH cao nhất, nhưng suy giảm khi nảy mầm ở 30°C [18].

Ngược lại ở 20°C, hoạt tính DPPH và ABTS trong hạt đậu đen xanh lòng chỉ tăng nhẹ trong suốt quá trình nảy mầm, có thể do điều kiện nhiệt độ thấp không đủ kích hoạt enzyme. Mức suy giảm rõ rệt ở 35°C, sau 108 giờ, giá trị DPPH chỉ còn 8,5 $\mu\text{molTE/g DW}$ và ABTS giảm còn 29,5 $\mu\text{molTE/g DW}$. Điều này có thể do stress nhiệt gây mất ổn định các enzyme tham gia vào sinh tổng hợp các hợp chất chống oxy hoá, đồng thời thúc đẩy các phản ứng oxy hoá ngược [18]. Xu hướng tăng hoạt tính chống oxy hoá theo thời gian nảy mầm đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu. Theo Chen và cs (2016), trong hạt kê (*Phalaris canariensis* L.) thử nghiệm với DPPH tăng gấp 7 - 10 lần sau 120 giờ nảy mầm [35]. Huang và cs (2014) đã ghi nhận hoạt tính chống oxy hoá cao nhất trong đậu nành và đậu xanh đạt được sau 72 giờ nảy mầm. Điều này cho thấy, giai đoạn đầu nảy mầm là thời điểm tích lũy mạnh các hợp chất chống oxy hoá trong cây họ đậu [36]. Ngoài ra, mối tương quan giữa TPC, TFC và hoạt tính chống oxy hoá cũng được thể hiện rõ. Điều đó có nghĩa là khi TPC, TFC tăng, hoạt tính chống oxy hoá cũng tăng theo. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra mối tương quan tỷ lệ thuận giữa TPC và hoạt tính chống oxy hoá. Trong hạt kê, hệ số tương quan này đạt tới $r = 0,99$ [35], trong hạt djulis (*Chenopodium formosanum*) là $r = 0,98$ [18]. Theo Mbaïogaou và cs (2022), hệ số xác định $R^2 > 0,97$ giữa TPC và hoạt tính DPPH, cho thấy TPC là yếu tố chính chi phối khả năng khử gốc tự do của đậu đen [37].

Như vậy, điều kiện nảy mầm thích hợp để tăng hoạt tính chống oxy hoá trong hạt đậu đen là 25°C - 30°C trong 48 - 72 giờ. Do đó, phạm vi nhiệt độ và thời gian này được chọn mức cao và thấp cho thiết kế thực nghiệm tối ưu hóa với 4 mục tiêu là TPC, TFC, khả năng chống oxy hoá theo DPPH và ABTS ở phần tiếp theo.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên hàm lượng TPC và TFC

Mẫu	Hàm lượng TPC (mg GAE/g DW)				Hàm lượng TFC (mg CAE/g DW)			
	20°C	25°C	30°C	35°C	20°C	25°C	30°C	35°C
Hạt chưa nảy mầm	11,00 [±] ± 0,05				1,09 ⁿ ± 0,01			
G0	10,12 ^p ± 0,07				0,93 ^o ± 0,02			
G12	9,47 ^{qr} ± 0,01	9,31 ^r ± 0,22	12,04 ^m ± 0,11	13,53 ^k ± 0,12	0,69 ^r ± 0,01	1,16 ⁿ ± 0,04	0,80 ^q ± 0,03	1,29 ^m ± 0,04

G24	9,51 ^{qr} ± 0,15	14,41 ^j ± 0,27	15,63 ^h ± 0,29	15,74 ^{gh} ± 0,07	0,88 ^{op} ± 0,02	1,92 ^{hi} ± 0,02	1,99 ^{gh} ± 0,02	1,92 ^{hi} ± 0,02
G36	9,83 ^{pq} ± 0,08	16,19 ^{stg} ± 0,05	17,29 ^{abc} ± 0,06	17,03 ^{bc} ± 0,09	0,85 ^{pq} ± 0,01	2,14 ^f ± 0,02	2,51 ^c ± 0,02	2,29 ^d ± 0,04
G48	11,31 ^{no} ± 0,18	17,63 ^a ± 0,22	17,26 ^{abc} ± 0,08	16,98 ^{bc} ± 0,13	1,61 ⁱ ± 0,02	2,75 ^a ± 0,02	2,70 ^{ab} ± 0,02	2,21 ^{ef} ± 0,00
G60	11,72 ^{mn} ± 0,44	17,59 ^a ± 0,04	17,17 ^{abc} ± 0,02	16,94 ^{cd} ± 0,02	1,62 ⁱ ± 0,01	2,77 ^a ± 0,03	2,62 ^b ± 0,02	2,21 ^{def} ± 0,02
G72	12,63 ⁱ ± 0,06	17,36 ^{ab} ± 0,09	17,03 ^{bc} ± 0,08	16,88 ^{cd} ± 0,09	1,61 ⁱ ± 0,01	2,76 ^a ± 0,01	2,64 ^b ± 0,01	1,85 ^j ± 0,02
G84	12,64 ⁱ ± 0,09	17,19 ^{abc} ± 0,17	16,47 ^{de} ± 0,17	16,24 ^{ef} ± 0,28	1,71 ^k ± 0,02	2,67 ^b ± 0,03	2,26 ^{de} ± 0,02	1,83 ^j ± 0,01
G96	12,86 ⁱ ± 0,01	16,30 ^{ef} ± 0,09	14,91 ⁱ ± 0,01	13,37 ^k ± 0,04	1,81 ^j ± 0,03	2,51 ^c ± 0,05	2,03 ^g ± 0,01	1,66 ^{kl} ± 0,03
G108	12,86 ⁱ ± 0,19	15,84 ^{gh} ± 0,13	14,37 ^j ± 0,13	12,65 ^j ± 0,13	1,81 ^j ± 0,05	2,04 ^g ± 0,03	1,87 ^{ij} ± 0,02	1,61 ^l ± 0,01

Ghi chú: Số liệu trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các tổ hợp xử lý (p < 0,05), kiểm định Tukey HSD sau ANOVA hai nhân tố.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên hoạt tính chống oxy hoá ABTS và DPPH

Mẫu	Giá trị hoạt tính chống oxy hoá ABTS (μmolTE/g DW)				Giá trị hoạt tính chống oxy hoá DPPH (μmolTE/g DW)			
	20°C	25°C	30°C	35°C	20°C	25°C	30°C	35°C
Hạt chưa nảy mầm	31,99 ^{op} ± 0,13				11,36 ^r ± 0,04			
G0	28,60 ^r ± 0,43				9,07 st ± 0,05			
G12	28,93 ^r ± 0,31	39,39 ^{kl} ± 0,61	40,47 ^k ± 1,23	42,18 ^j ± 0,61	9,06 st ± 0,10	14,23 ^o ± 0,12	15,04 ⁿ ± 0,17	18,48 ^m ± 0,11
G24	32,00 ^{op} ± 0,22	47,12 ^h ± 0,19	48,71 ^g ± 0,43	49,77 ^{fg} ± 0,24	9,15 st ± 0,10	24,00 ^l ± 0,33	25,08 ^k ± 0,12	27,03 ^{hij} ± 0,49
G36	32,26 ^o ± 0,35	53,29 ^{bc} ± 0,71	52,04 ^{cd} ± 0,21	49,99 ^{efg} ± 0,20	9,14 st ± 0,02	26,74 ^{ij} ± 0,18	26,36 ^j ± 0,34	28,88 ^f ± 0,59
G48	35,00 ⁿ ± 0,87	55,44 ^a ± 0,65	53,83 ^b ± 0,28	51,36 ^{de} ± 0,32	9,73 ^s ± 0,03	34,48 ^a ± 0,05	33,00 ^b ± 0,08	30,12 ^e ± 0,16
G60	37,25 ^m ± 0,66	53,55 ^b ± 0,51	53,28 ^{bc} ± 0,51	51,25 ^{def} ± 0,11	11,81 ^{qr} ± 0,13	33,86 ^a ± 0,30	32,79 ^{bc} ± 0,00	29,33 ^f ± 0,08
G72	38,59 ^{lm} ± 0,75	52,53 ^{bcd} ± 0,34	51,98 ^{cd} ± 0,24	47,12 ^h ± 0,27	11,62 ^{qr} ± 0,03	33,92 ^a ± 0,28	32,26 ^{cd} ± 0,14	27,72 ^g ± 0,37
G84	42,81 ^j ± 0,14	49,14 ^g ± 0,16	51,21 ^{def} ± 0,13	39,84 ^{kl} ± 0,13	12,17 ^{pq} ± 0,19	32,81 ^{bc} ± 0,24	31,81 ^d ± 0,10	27,30 ^{ghi} ± 0,37
G96	43,37 ^j ± 0,55	45,01 ⁱ ± 0,50	43,55 ^{ij} ± 0,43	30,60 ^{pq} ± 0,42	12,52 ^p ± 0,23	30,45 ^e ± 0,25	29,04 ^f ± 0,24	13,77 ^o ± 0,14
G108	42,79 ^j ± 0,18	43,44 ^j ± 0,39	42,48 ^j ± 0,48	29,46 ^{qr} ± 0,13	12,57 ^p ± 0,14	27,60 ^{gh} ± 0,09	25,31 ^k ± 0,12	8,51 ^l ± 0,13

Ghi chú: Số liệu trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các tổ hợp xử lý (p < 0,05), kiểm định Tukey HSD sau ANOVA hai nhân tố.

3.5. Kết quả tối ưu hoá chế độ nảy mầm

Để tối ưu hóa chế độ nảy mầm, hai yếu tố đầu vào là nhiệt độ và thời gian được chọn trong

khoảng 20 - 35°C và 24 - 72 giờ (Bảng 4). Việc thiết lập ma trận thực nghiệm được trình bày ở phần 2.11.

Bảng 4. Ma trận quy hoạch thực nghiệm và kết quả thí nghiệm

TT	Yếu tố ảnh hưởng				Kết quả đầu ra			
	Mã hóa		Giá trị thực		TPC (Y ₁)	TFC (Y ₂)	DPPH (Y ₃)	ABTS (Y ₄)
	X ₁	X ₂	Nhiệt độ nảy mầm (°C)	Thời gian nảy mầm (giờ)				
1	-1	0	20,0	48	11,31	1,61	9,73	35,00
2	0	-1	27,5	24	15,01	1,96	24,49	48,12
3	-1	-1	20,0	24	9,51	0,88	9,15	32,00
4	1	-1	35,0	24	15,74	1,92	27,03	49,77
5	1	0	35,0	48	16,98	2,21	30,12	51,36
6	0	0	27,5	48	17,42	2,73	33,75	54,44
7	0	1	27,5	72	17,30	2,74	33,09	52,13
8	-1	1	20,0	72	12,63	1,61	11,62	38,59
9	0	0	27,5	48	17,41	2,71	33,75	54,50
10	1	1	35,0	72	16,88	1,85	27,72	47,12
11	0	0	27,5	48	17,45	2,71	33,78	54,37
12	0	0	27,5	48	17,39	2,70	33,69	53,90
13	0	0	27,5	48	17,37	2,72	33,72	54,20

Ghi chú: Mã hóa (X₁, X₂) tương ứng với hai yếu tố đầu vào: X₁ – nhiệt độ nảy mầm (°C), X₂ – thời gian nảy mầm (giờ), với ba mức mã hóa -1, 0 và +1.

Từ kết quả đầu ra của 13 thí nghiệm (Bảng 4), phương trình hồi quy của các hàm mục tiêu sau khi loại bỏ những hệ số có giá trị p > 0,05 được thiết lập với R² tương ứng và kết quả tối ưu hóa (Bảng 5). Bảng 5 cho thấy: (1) Tất cả các mô hình đều là mô hình bậc hai, cho phép mô tả mối quan hệ phi tuyến tính giữa các yếu tố và kết quả. (2) Các hệ số R² rất cao cho tất cả các mô hình (trên 97%) cho thấy các mô hình này rất đáng tin cậy trong việc dự đoán các chỉ số TPC, TFC, DPPH và

ABTS dựa trên nhiệt độ và thời gian nảy mầm. (3) Sự hiện diện của các hệ số bậc hai (X₁², X₂²) âm trong tất cả các phương trình cho thấy rằng tất cả các hàm mục tiêu đều có một điểm cực đại (tối ưu) trong khoảng nghiên cứu, không phải là mối quan hệ tuyến tính đơn thuần. (4) Sự có mặt của hệ số tương tác (X₁*X₂) trong các phương trình TPC, TFC và ABTS cho thấy rằng ảnh hưởng của một yếu tố lên kết quả phụ thuộc vào mức độ của yếu tố còn lại.

Bảng 5. Phương trình hồi quy và kết quả tối ưu hóa

Hàm mục tiêu	Phương trình hồi quy	R ²	Giá trị cực đại (nhiệt độ nảy mầm tối ưu (28,79°C) và thời gian nảy mầm tối ưu (54,06 giờ))	Kết quả thí nghiệm kiểm chứng
TPC	$Y_1 = -40,55 + 3,305 X_1 + 0,2657 X_2 - 0,05116 X_1^2 - 0,001507 X_2^2 - 0,002750 X_1 * X_2$	99,41%	17,87 (mg GAE/g DW)	17,92 ± 0,13
TFC	$Y_2 = -12,490 + 0,8723 X_1 + 0,0997 X_2 - 0,01413 X_1^2 - 0,000616 X_2^2 - 0,001111 X_1 * X_2$	98,40%	2,77 (mg CAE/g DW)	2,75 ± 0,02
DPPH	$Y_3 = -179,8 + 12,99 X_1 - 0,2121 X_1^2 - 0,00532 X_2^2$	97,27%	34,68 (μmolTE/g DW)	34,81 ± 0,37

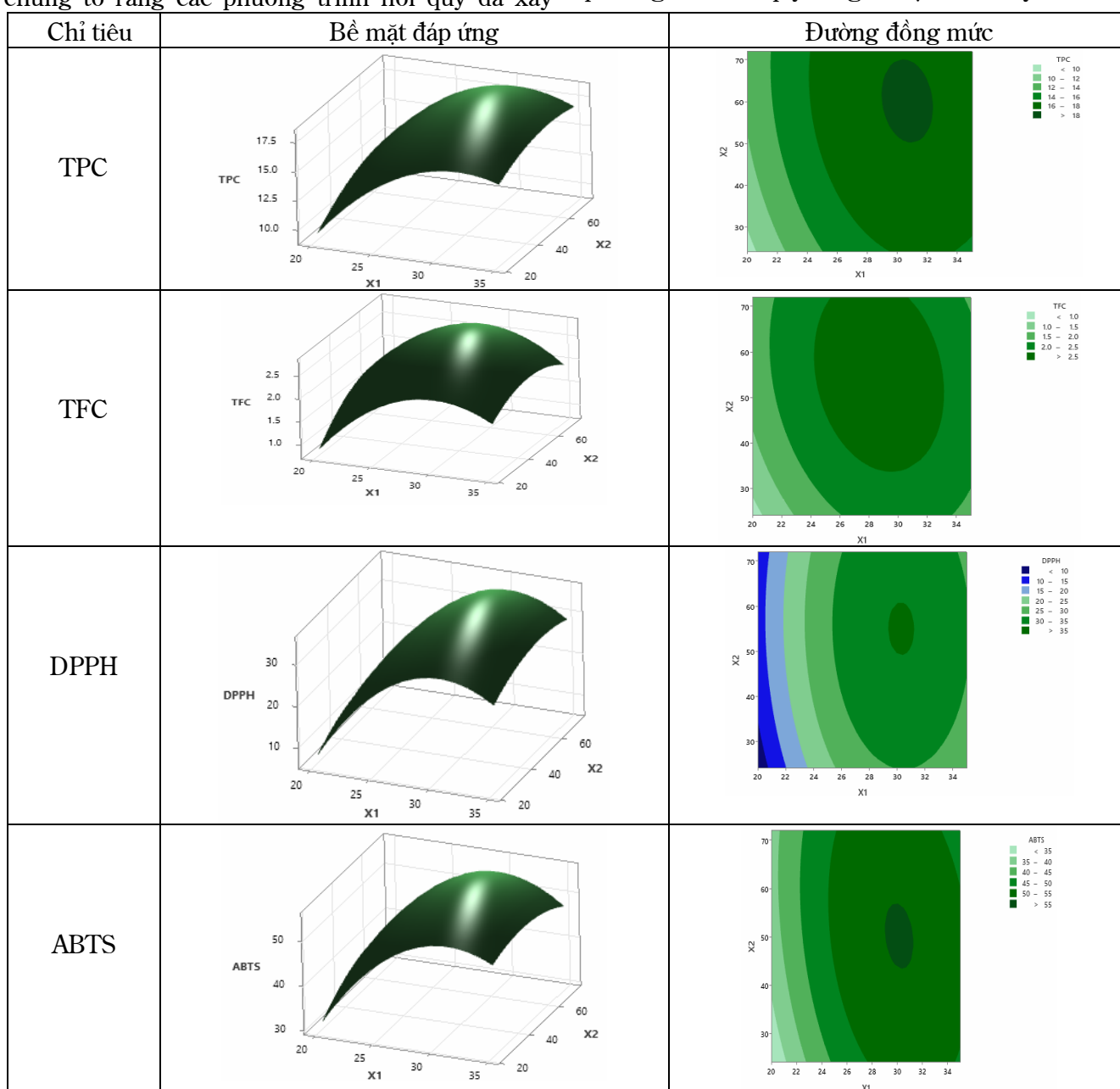
ABTS	$Y_4 = -133,7 + 11,075 X_1 + 0,872 X_2 - 0,1729 X_1^2 - 0,00483 X_2^2 - 0,01283 X_1 * X_2$	98,57%	54,88 (μmolTE/g DW)	55,01 ± 0,30
------	--	--------	---------------------	--------------

Bảng 5 cho thấy, nhiệt độ nảy mầm tối ưu và thời gian nảy mầm tối ưu là 28,79°C và 54,06 giờ. Tại nhiệt độ và thời gian nảy mầm tối ưu giá trị cực đại của hàm tối ưu là TPC: 17,87 mg GAE/g DW, TFC: 2,77 mg CAE/g DW, DPPH: 34,68 μmolTE/g DW và ABTS: 54,88 μmolTE/g DW.

So sánh kết quả tối ưu theo dự đoán của mô hình với kết quả thí nghiệm kiểm chứng cho thấy, các giá trị này khá gần nhau (Bảng 5). Điều này chứng tỏ rằng các phương trình hồi quy đã xây

dựng có khả năng dự đoán chính xác các giá trị tối ưu và các điều kiện tối ưu tìm được là đáng tin cậy nên cung cấp cơ sở vững chắc cho việc áp dụng các điều kiện này trong thực tế để đạt được hiệu quả mong muốn.

Để thể hiện một cách trực quan về kết quả tối ưu hóa, các bề mặt đáp ứng, biểu đồ 3D cho thấy, mối quan hệ giữa hai yếu tố đầu vào (trục X và Y) và một đáp ứng đầu ra (trục Z), tương ứng với các phương trình hồi quy bảng 5 được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Biểu đồ bề mặt đáp ứng, đường đồng mức thể hiện trực quan về kết quả tối ưu hóa

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chứng minh rằng điều kiện ngâm và nảy mầm ảnh hưởng rõ rệt đến hàm lượng polyphenol, flavonoid và hoạt tính chống oxy hoá của hạt đậu đen xanh lòng. Quá trình ngâm ở nhiệt độ 35°C trong 6 giờ giúp hạt đạt độ thủy phần lý tưởng cho nảy mầm, trong khi giai đoạn nảy mầm ở 25 - 30°C trong 48 - 72 giờ là điều kiện tối ưu để gia tăng tích lũy hợp chất có hoạt tính sinh học. Phân tích tối ưu hóa cho thấy điều kiện tối ưu đạt được tại 28,79°C và 54,06 giờ, với các chỉ tiêu TPC, TFC, DPPH và ABTS đều đạt mức cao nhất, khẳng định tính hiệu quả và độ tin cậy của mô hình dự đoán.

Những kết quả này không chỉ góp phần làm sáng tỏ cơ chế sinh hóa trong quá trình nảy mầm của hạt đậu đen, mà còn đặt nền móng cho việc ứng dụng trong chế biến các sản phẩm thực phẩm chức năng tự nhiên, hướng đến giá trị dinh dưỡng cao và an toàn cho sức khỏe người tiêu dùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. FAO (2010). Production Statistics: Dry cowpea. Rome: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
2. Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 52(4), 673 - 751.
3. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933 - 956.
4. Tsamo, C. V. P., Herent, M. F., Tomekpe, K., Rogez, H., Larondelle, Y., Andre, C. M. (2019). Phenolic profiling in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) reveals primary and secondary metabolites affected by storage and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(8), 2191 - 2200.
5. Lee, C. Y., Mitchell, A. E., Shibamoto, T. (2000). Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables and their health benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(8), 1113 - 1117.
6. Krygier, K., Sosulski, F. W., Hogge, L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. Extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 330 - 334.
7. Tsamo, M. H., Mohammed, M., Papoh Nidibewu, P., Dakora, F. D. (2019). Seed coat metabolite profiling of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) accessions from Ghana using UPLC-PDA-QTOF-MS and chemometrics. *Natural Product Research*, 1 - 5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1701964>.
8. Yusnawan, E., Inayati, A., Baliadi, Y. (2021). Total phenolic content and antioxidant activity in eight cowpea (*Vigna unguiculata*) genotypes. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 924(1), 012047. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/924/1/012047>.
9. Guzmán-Ortiz FA, Robles-Ramírez MD, Sánchez-Pardo B, Berrios J, Mora-Escobedo R. (2014). Changes in nutritional and bioactive components of germinated soybean. *Plant Foods Hum Nutr*. 69(2): 131 - 137
10. Robles-Ramírez, M. D., Mora-Escobedo, R., Ramón-Gallegos, E., Torres-Torres, N. (2012). Cytotoxic effect of protein hydrolysates from germinated soybeans on human cancer cells. *Food Chemistry*, 132(4), 1955 - 1960.
11. Ojwang, L. O., Dykes, L., Glover, D., Awika, J. M. (2013). Proanthocyanidin profile of cowpea (*Vigna unguiculata*) reveals catechin-O-glucoside as the dominant compound. *Food Research International*, 52(1), 119 - 125.
12. Xu, B., Chang, S. K. C. (2008). Total phenolic content and antioxidant properties of germinated food legumes. *Food Chemistry*, 110(1), 1 - 13.
13. Dueñas, M., Hernández, T., Estrella, I., Fernández, D. (2009). Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of legumes. *Food Chemistry*, 113(4), 980 - 987.
14. Chauhan, D., Kumar, K., Ahmed, N., Thakur, P., Rizvi, Q. U. E. H., Jan, S., Yadav, A. N. (2022). Impact of soaking, germination, fermentation, and roasting treatments on nutritional, anti-nutritional, and bioactive composition of black soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 10(5), 186 - 192.

15. Guzmán-Ortiz, F., Martín-Martínez, E., Valverde, M., Rodríguez-Aza, Y., Berrios, J., Mora-Escobedo, R. (2017). Profile analysis and correlation across phenolic compounds, isoflavones and antioxidant capacity during germination of soybeans (*Glycine max* L.). *CyTA – Journal of Food*, 15(1), 1 - 9. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1302995>.
16. Chen, Y., Sam, K. C., Chang, S. (2015). Macronutrients, phytochemicals, and antioxidant activity of soybean sprout germinated with or without light exposure. *Journal of Food Science*, 80(S1), S1-S8. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12868>.
17. Wang, F., Wang, H., Wang, D., Fang, F., Lai, J., Wu, T., Tsao, R. (2015). Isoflavone, γ -aminobutyric acid contents and antioxidant activities are significantly increased during germination of three Chinese soybean cultivars. *Journal of Functional Foods*, 14, 596–604. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.016>.
18. Lu, W. C., Cheng, Y. T., Chan, Y. J., Yan, J., Li, P. H. (2024). Effects of different soaking and germinating conditions on γ -aminobutyric acid, antioxidant activity, and chemical composition of djulis (*Chenopodium formosanum*). *Journal of Agriculture and Food Research*, 17, 101162. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101162>.
19. Dwiyantri, M. S., Nurhayati, S., Andarwulan, N. (2020). Total phenolic content and antioxidant activity in eight cowpea (*Vigna unguiculata* L.) genotypes. *Journal of Food Science and Technology*, 57(2), 449 - 457.
20. Chung, I. M., Seo, S. H., Ahn, J. K., Kim, S. H. (2011). Effect of processing, fermentation, and aging treatment to content and profile of phenolic compounds in soybean seed, soy curd and soy paste. *Food Chemistry*, 127(3), 960 - 967. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.065>.
21. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 8548:2011. Hạt giống cây trồng - Phương pháp kiểm nghiệm
22. International Seed Testing Association - ISTA (2023). *International Rules for Seed Testing*. Bassersdorf, Switzerland: International Seed Testing Association.
23. Qiu, Y., Liu, Q., Beta, T. (2010). Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids. *Food Chemistry*, 121(1), 140 - 147.
24. Alonso-Salces, R. M., Cuadrado, A., Guillamón, E., & Ruiz, N. (2023). Development of an ultrasound-assisted extraction procedure for the simultaneous determination of anthocyanins and phenolic acids in black beans. *Foods*, 12(19), 3566. <https://doi.org/10.3390/foods12193566>.
25. Singleton, V. L., Rossi, J. A. Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144 - 158.
26. Xu, B. J., Chang, S. K. C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72(S1), S159 - S166.
27. Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28(1), 25 - 30.
28. Hao, M., Beta, T. (2012). Development of Chinese steamed bread enriched in bioactive compounds from barley hull and flaxseed hull extracts. *Food Chemistry*, 133(4), 1320 - 1325.
29. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231 - 1237.
30. Đỗ Thị Bích Thủy, Huỳnh Thị Diễm Uyên, Nguyễn Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Thủy Tiên, Trần Thanh Quỳnh Anh, Nguyễn Thị Đan Huyền (2020). *Công nghệ sản xuất và kiểm soát chất lượng đồ uống*. Nxb Đại Học Huế, trang 17.
31. Szczerba N, Janowiak F, Gondek K, Kołodziej B, Szczerba M. (2021). Effect of low temperature on germination, growth, and seed yield of four soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *Agronomy*, 11(4): 800. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040800>.
32. Dong, L., Yang, Y., Zhao, Y., Liu, Z., Li, C., He, L., Liu, L. (2024). Effect of different conditions on the germination of coix seed and its characteristics analysis. *Food Chemistry X*, 22, 101332. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101332>.
33. Kou, X., Zhou, F. (2016). Bioactive compounds and antioxidant activity of mung bean (*Vigna radiata* L.), soybean (*Glycine max* L.) and

black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during the germination process. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(1), 68 - 78.

34. Borges-Martínez, E., Gallardo-Velázquez, T., Cardador-Martínez, A., et al. (2022). Phenolic compounds profile and antioxidant activity of pea (*Pisum sativum* L.) and black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) sprouts. *Food Science and Technology*, 42, e45920. <https://doi.org/10.1590/fst.45920>.

35. Chen, Z., Yu, L., Wang, X., Gu, Z., & Beta, T. (2016). Changes of phenolic profiles and antioxidant activity in canaryseed (*Phalaris canariensis* L.) during germination. *Food*

Chemistry, 194, 608 - 618. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.060>.

36. Huang, X., Cai, W., & Xu, B. (2014). Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*Glycine max* L.) and mung bean (*Vigna radiata* L.) with germination time. *Food Chemistry*, 143, 268 - 276. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.080>.

37. Mbaïogaou, A., Mbaïhougadobe, S., Madjitouloum-Betouloum, S., Naitormbaide, M., Djadda, M. A. (2022). Phenolic compound content of a plant of the genus *Vigna* from Chad: *Vigna unguiculata* (Fabaceae). *British Journal of Healthcare and Medical Research*, 9(2), 98 - 107. <https://doi.org/10.14738/jbemi.92.11955>.

EFFECTS OF SOAKING AND GERMINATION ON POLYPHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN BLACK BEAN (*Vigna unguiculata*) SEEDS

Phan Thị Be¹, Do Thi Bich Thuy², Vo Van Quoc Bao¹,

Nguyen Van Duc¹, Tran Bao Khanh¹, Nguyen Phan Ha Vi³

¹ University of Agriculture and Forestry, Hue University, Hue, Vietnam

² Faculty of Environmental and Natural Sciences, Duy Tan University, Da Nang, Vietnam

³ School of Biotechnology, International University - Vietnam National University Ho Chi Minh city

Abstract

The green-kernel black bean (*Vigna unguiculata*) is rich in polyphenols and flavonoids, which exhibit strong antioxidant activity. This study examined how soaking and germination affect the accumulation of total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), and free radical scavenging activity in seed extracts. Antioxidant capacity was assessed using DPPH and ABTS assays. Soaking at 35°C for 6 hours resulted in the highest germination rate (96.3%). Germination at 25 - 30°C for 48 - 72 hours significantly increased TPC (60.3%), TFC (154.5%), DPPH activity (203.5%), and ABTS activity (73.3%) compared to ungerminated seeds ($p < 0.05$). Response surface methodology identified 28.79°C for 54.06 hours as the optimal condition. Under this condition, all biological parameters reached their highest values, with strong agreement between predicted and observed results. These findings suggest that soaking and germination are effective bioprocesses for enhancing the functional and antioxidant properties of *V. unguiculata* seeds. This supports their potential use in developing functional foods enriched with natural antioxidants.

Keywords: Antioxidant activity, germination, polyphenols, *Vigna unguiculata*.

Ngày nhận bài: 16/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 8/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 25/7/2025

Ngày duyệt đăng: 5/8/2025

ẢNH HƯỞNG CỦA PHƯƠNG PHÁP SẤY LÊN TÍNH CHẤT HÓA LÝ, THÀNH PHẦN GINSENOSE VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA DỊCH CHIẾT LÁ SÂM NGỌC LINH

Nguyễn Thị Thùy Dung¹, Lê Cẩm Thi¹, Nguyễn Quốc Duy¹, Trần Thị Tường Vi¹,
Huỳnh Quốc Trung¹, Lương Trọng Khoa², Nguyễn Duy Lâm¹, Nguyễn Thị Vân Linh^{1,*}

¹ Khoa Khoa học Ứng dụng và Công nghệ, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

² Công ty Cổ phần Sâm Việt Nam VINAPANAX

* Email: ntvlinh@ntt.edu.vn

TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là một loại cây thuốc quý đặc hữu của Việt Nam, với lá chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học như ginsenoside có tiềm năng điều trị ung thư. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tác động của các phương pháp sấy khác nhau, cụ thể là sấy không khí nóng (HAD), sấy thăng hoa (FD) và sấy hỗ trợ hồng ngoại (IRD) lên hàm lượng phenolic và saponin tổng, hoạt tính chống oxy hóa (DPPH, ABTS, FRAP) và thành phần ginsenoside của dịch chiết từ lá sâm Ngọc Linh. Kết quả cho thấy, phương pháp HAD thu được dịch chiết lá sâm Ngọc Linh có hàm lượng phenolic tổng cao nhất (264,9 mg GAE/L), trong khi FD lại cho thấy, hàm lượng saponin tổng (1.690,8 mg GE/L) cao hơn đáng kể so với hai phương pháp còn lại (1.504,7 - 1.539,5 mg GE/L). Có thể nhận thấy, sự tương quan lẫn lộn giữa hàm lượng phenolic và saponin với hoạt tính chống oxy hóa FRAP và DPPH/ABTS của dịch chiết lá sâm Ngọc Linh với hoạt tính FRAP cao nhất của mẫu HAD (362,6 mg TE/L) và hoạt tính khử gốc tự do DPPH/ABTS cao nhất của mẫu FD (116,3 và 542,2 mg TE/L). Về thành phần ginsenoside, ginsenoside Re, Rc, Rb2 và Rd là các ginsenoside chính có mặt trong dịch chiết lá sâm Ngọc Linh. Ngoài ra, mẫu FD có hàm lượng ginsenoside cao hơn vượt trội (540,0 mg/L) so với hai mẫu còn lại (103,4 - 118,0 mg/L), đặc biệt là Rc (217,9 mg/L), Rb2 (255,5 mg/L) và Rd (45,7 mg/L). Những phát hiện này cung cấp các kiến thức quan trọng cho việc phát triển các quy trình chế biến chuẩn hóa nhằm tối đa hóa giá trị dược tính của loại sâm đặc hữu của Việt Nam.

Từ khóa: Hoạt tính sinh học, lá sâm Ngọc Linh, phương pháp sấy, thành phần ginsenoside.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv), một loại cây thuốc đặc hữu và rất được ưa chuộng của Việt Nam, nổi tiếng với thành phần phong phú các hợp chất hoạt tính sinh học, đặc biệt là saponin, flavonoid và axit phenolic, góp phần tạo nên đặc tính chống oxy hóa đáng kể của nó [1, 2]. Các chất chống oxy hóa này đóng vai trò quan trọng trong việc giảm thiểu stress oxy hóa bằng cách trung hòa các gốc tự do, từ đó mang lại lợi ích sức khỏe tiềm năng từ tác dụng chống viêm đến chống ung thư [3]. Việc bảo quản các hợp chất hoạt tính sinh học kém bền này rất quan trọng trong quá trình chế biến sau thu hoạch, vì

tính ổn định của chúng có thể rất dễ bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường.

Sấy là một công đoạn quan trọng trong quá trình sản xuất chiết xuất thảo dược, chủ yếu nhằm mục đích giảm độ ẩm để ngăn ngừa sự phát triển của vi khuẩn và sự suy giảm chất lượng do enzyme, kéo dài thời hạn sử dụng và tạo điều kiện thuận lợi cho các quá trình chiết xuất tiếp theo [4]. Tuy nhiên, việc lựa chọn phương pháp sấy ảnh hưởng đáng kể đến khả năng lưu giữ và hoạt tính sinh học của các hợp chất không bền nhiệt.

Sấy không khí nóng là một kỹ thuật thường được sử dụng rộng rãi có bản chất dựa vào sự truyền nhiệt đối lưu do vật liệu tiếp xúc với nhiệt độ cao và thời gian sấy kéo dài, do đó có khả năng

dẫn đến sự phân hủy các chất chống oxy hóa nhạy cảm với nhiệt [5]. Sấy hồng ngoại là một giải pháp thay thế sử dụng bức xạ điện từ để truyền nhiệt trực tiếp và hiệu quả hơn, có khả năng giảm thời gian sấy và bảo quản nhiều hợp chất hoạt tính hơn so với sấy không khí nóng [6]. Ngược lại, sấy thăng hoa là một quá trình tách nước ở nhiệt độ thấp có liên quan đến quá trình thăng hoa của nước đá trong điều kiện chân không nên giảm thiểu sự phân hủy nhiệt và bảo toàn tính toàn vẹn về cấu trúc và sinh hóa của các vật liệu nhạy cảm với nhiệt [7].

Với giá trị kinh tế và dược tính của sâm Ngọc Linh, việc hiểu biết toàn diện về cơ chế, trong đó các phương pháp sấy riêng biệt này ảnh hưởng đến đặc tính chống oxy hóa của chiết xuất lá là điều cần thiết để tối ưu hóa các quy trình chế biến nhằm tối đa hóa việc giữ lại các hóa chất thực vật có lợi và đảm bảo hiệu quả của các sản phẩm có nguồn gốc từ thực vật. Các phương pháp sấy sau thu hoạch ảnh hưởng đáng kể đến việc lưu giữ và chuyển đổi các hợp chất này; tuy nhiên, việc đánh giá có hệ thống các tác động của quá trình sấy đối với dịch chiết lá sâm Ngọc Linh vẫn còn hạn chế. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả của các phương pháp sấy khác nhau bao gồm sấy đối lưu, sấy hồng ngoại và sấy thăng hoa lên khả năng chống oxy hóa và thành phần ginsenoside của dịch chiết từ lá sâm Ngọc Linh.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Lá sâm Ngọc Linh 6 năm tuổi được thu hoạch ở huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam. Thuốc thử Folin-Ciocalteu, 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), axit gallic, Trolox, chuẩn ginsenoside (Rg1, Re, Rf, Rb1, Rc, Rb2, Rd, Rg3 và Mr2) được mua từ Sigma-Aldrich (Singapore). Các hóa chất khác sử dụng trong nghiên cứu đều đạt chuẩn phân tích.

2.2. Quy trình sấy lá sâm Ngọc Linh

Sau khi thu nhận, lá sâm Ngọc Linh được sấy bằng ba phương pháp khác nhau bao gồm sấy đối lưu, sấy thăng hoa và sấy hồng ngoại nhằm đánh giá ảnh hưởng của chúng đến chất lượng dịch

chiết dựa trên quy trình xử lý mẫu tham khảo bởi Nhu-Trang và cs (2022) [8]. Đối với sấy đối lưu, lá được trải thành lớp mỏng 5 mm trên các khay và sấy ở nhiệt độ 60°C trong 4 giờ, sử dụng thiết bị sấy GE60 (Spring Green Evolution, Thái Lan). Đối với sấy hồng ngoại, lá cũng được sấy lớp mỏng trong điều kiện tương tự sấy đối lưu và có sự hỗ trợ của hồng ngoại ở công suất 3 kW, sử dụng thiết bị sấy hồng ngoại 0001 (E-mart, Việt Nam). Cuối cùng, lá được sấy thăng hoa ở -60°C sử dụng thiết bị sấy thăng hoa Alpha 1-2 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Đức) cho đến khi đạt được khối lượng không đổi. Lá khô thu nhận được nghiền mịn và bảo quản đông ở -20°C cho tới khi phân tích.

2.3. Quy trình thu nhận dịch chiết lá sâm Ngọc Linh

Quá trình chiết xuất các hợp chất từ lá sâm Ngọc Linh được thực hiện bằng phương pháp chiết rần lỏng trong điều kiện kiểm soát chặt chẽ nhằm tối ưu hóa hiệu suất thu hồi và bảo toàn hoạt tính sinh học dựa trên quy trình được đề xuất bởi Nhu-Trang và cs (2023) [9]. Cụ thể, nguyên liệu lá được chiết với dung môi ethanol 70% (v/v) theo tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1:10 (g/mL). Hỗn hợp này sau đó được gia nhiệt và duy trì ở nhiệt độ 60°C trong khoảng thời gian 30 phút. Cuối cùng, dịch chiết được thu nhận bằng cách ly tâm ở 7.000 vòng/phút trong 10 phút, sử dụng thiết bị ly tâm tốc độ cao TG16 (Changsha Yingtai Instrument Co., Ltd., Trung Quốc). Dịch chiết cũng được bảo quản đông ở 20°C cho tới khi phân tích.

2.4. Phương pháp phân tích

2.4.1. Hàm lượng phenolic tổng

Hàm lượng phenolic tổng được đo bằng phương pháp Folin-Ciocalteu với một số sửa đổi [10]. Đầu tiên, dịch phân tích pha loãng (0,6 mL) được trộn với 1,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu (pha loãng 10 lần). Sau khi ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng, 1,2 mL dung dịch Na_2CO_3 7,5% được thêm vào và hỗn hợp được ủ trong bóng tối 30 phút. Độ hấp thụ của hỗn hợp được đo ở 765 nm bằng máy đo quang phổ UV2.600 (Shimadzu, Kyoto, Nhật Bản). Hàm lượng phenolic tổng được tính toán dựa trên đường chuẩn axit gallic và được biểu thị bằng

mg đương lượng axit gallic trong 1 L dịch (mg GAE/L).

2.4.2. Hàm lượng saponin tổng

Hàm lượng saponin tổng số được xác định bằng phương pháp quang phổ sử dụng thuốc thử p-anisaldehyde [11]. Cụ thể, 100 μ L dịch phân tích được chuyển vào ống nghiệm có nắp đậy với 100 μ L dung dịch p-anisaldehyde 50% pha trong methanol (v/v) và 2 mL dung dịch sulfuric 50% (v/v). Sau bước này, dung dịch được đun nóng ngay lập tức ở 60°C trong 20 phút. Cuối cùng, phản ứng tạo màu được dừng lại bằng cách chuyển ống nghiệm có nắp đậy vào bồn nước đá trong 10 phút. Độ hấp thụ của dung dịch phản ứng được đo ở bước sóng 600 nm. Hàm lượng saponin tổng được tính toán dựa trên đường chuẩn ginsenoside và được biểu thị bằng mg đương lượng ginsenoside trong 1 L dịch (mg GE/L).

2.4.3. Hoạt tính khử gốc tự do DPPH

Hoạt tính khử gốc tự do DPPH được đánh giá dựa trên quy trình được mô tả bởi Nguyen và cs (2022) với một vài thay đổi nhỏ [10]. Để tiến hành đo hoạt tính DPPH, dịch chiết mẫu được chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau. Sau đó, 0,2 mL dịch phân tích được trộn với 2,8 mL dung dịch thuốc thử DPPH được hiệu chỉnh về độ hấp thụ 1,1 ở bước sóng 515 nm. Hỗn hợp phản ứng sau đó được ủ trong điều kiện tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút để đảm bảo phản ứng xảy ra hoàn toàn. Sau thời gian ủ, độ hấp thụ của từng mẫu được đo ở bước sóng 515 nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Hoạt tính chống oxy hóa DPPH được tính toán dựa trên đường chuẩn Trolox và được biểu thị bằng mg đương lượng Trolox trong 1 L dịch (mg TE/L).

2.4.4. Hoạt tính khử gốc tự do ABTS

Hoạt tính chống oxy hóa ABTS được xác định theo phương pháp được mô tả bởi Nguyen và cs (2022) với một vài thay đổi nhỏ [10]. Để tiến hành đo hoạt tính ABTS, dịch chiết mẫu được chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau. Sau đó, 0,2 mL dịch phân tích được trộn với 2,8 mL dung dịch thuốc thử ABTS được hiệu chỉnh về độ hấp thụ 1,1 ở bước sóng 734 nm. Hỗn hợp phản ứng sau đó được ủ trong điều kiện tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút để đảm bảo phản ứng xảy ra hoàn toàn. Sau

thời gian ủ, độ hấp thụ của từng mẫu được đo ở bước sóng 734 nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Hoạt tính chống oxy hóa ABTS được tính toán dựa trên đường chuẩn Trolox và được biểu thị bằng mg đương lượng Trolox trong 1 L dịch (mg TE/L).

2.4.5. Hoạt tính khử sắt FRAP

Hoạt tính khử sắt FRAP được thực hiện theo phương pháp của Nguyen và cs (2022) với một số thay đổi nhỏ [10]. Thuốc thử FRAP được chuẩn bị bằng cách trộn dung dịch đệm acetate (0,3 M ở pH 3,6), dung dịch TPTZ (10 mM) pha trong HCl 40 mM và dung dịch FeCl_3 (20 mM) theo tỉ lệ 10: 1: 1 về thể tích. Sau đó, dịch phân tích (0,2 mL) được phản ứng với 2,8 mL dung dịch thuốc thử FRAP. Hỗn hợp phản ứng sau đó được ủ trong điều kiện tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút để đảm bảo phản ứng xảy ra hoàn toàn. Sau thời gian ủ, độ hấp thụ của từng mẫu được đo ở bước sóng 593 nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Hoạt tính chống oxy hóa FRAP được tính toán dựa trên đường chuẩn Trolox và được biểu thị bằng mg đương lượng Trolox trong 1 L dịch (mg TE/L).

2.4.6. Thành phần ginsenoside

Thành phần ginsenoside được định lượng theo phương pháp được mô tả bởi Nguyen và cs (2025) [12] sử dụng hệ thống sắc ký lỏng Shimadzu LC-40D (Shimadzu, Kyoto, Nhật Bản) kết hợp với cột phenyl (250 mm $\times$ 4,6 mm; 5,0 μ m), đầu dò UV SPD-20 A và bơm LC-40D. Bột được chiết xuất bằng methanol và siêu âm ở 45°C trong 15 phút trước khi được lọc qua màng PTFE 0,45 μ m. Pha động bao gồm nước (dung môi A) và acetonitril (dung môi B) với gradient rửa giải sau: 80% A trong 5 phút, 77% A trong 5 - 20 phút, 70% A trong 20 - 25 phút, 60% A trong 25 - 32 phút, 50% A trong 32 - 38 phút, 15% A trong 38 - 52 phút và 80% A trong 52 - 61 phút. Tốc độ dòng chảy được cố định ở mức 1 mL/phút và nhiệt độ cột được duy trì ở 35°C. Phân tích khối phổ (MS) được thực hiện bằng phương pháp ion hóa phun điện (ESI) ở cả chế độ dương (3,5 kV) và chế độ âm (- 2,5 kV) với phạm vi MS từ 100 - 1.500. Một số thông số khác được thiết lập như sau: Khí sheath 40 L/phút, khí phụ trợ 12 L/phút, khí quét 1 L/phút, nhiệt độ ống truyền ion 333°C và nhiệt độ máy hóa hơi 317°C.

Bước sóng UV dùng để phát hiện hợp chất là 203 nm và thể tích tiêm là 10 μ L. Các chuẩn ginsenoside bao gồm: Rg1, Re, Rf, Rb1, Rc, Rb2, Rd, Rg3 và Mr2.

2.5. Phương pháp xử lý thống kê

Dữ liệu thực nghiệm được phân tích bằng phần mềm R version 4.4.2 sử dụng những kỹ thuật thống kê cơ bản. Ngoài ra, phân tích phương sai một nhân tố được áp dụng để xác định sự khác nhau giữa các phương pháp sấy và kiểm định Tukey được áp dụng để xác định sự khác biệt có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình ở mức ý nghĩa 5%.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

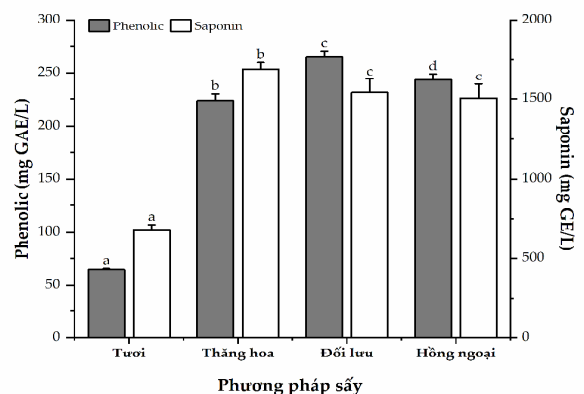
3.1. Ảnh hưởng của phương pháp sấy lên hàm lượng phenolic và saponin

Ảnh hưởng của phương pháp sấy lên hàm lượng phenolic và saponin của dịch chiết lá sâm Ngọc Linh được trình bày ở hình 1 cho thấy, các phương pháp sấy có tác động khác nhau lên việc lưu giữ hàm lượng các hợp chất sinh học hoạt tính trong lá sâm Ngọc Linh ở mẫu tươi ban đầu. Đối với hàm lượng phenolic tổng, phương pháp sấy đối lưu thể hiện hiệu quả bảo vệ tốt hơn với 264,86 mg GAE/L, cao hơn 18,6% so với sấy thăng hoa (223,30 mg GAE/L) và 9,1% so với sấy hồng ngoại (242,76 mg GAE/L). Sự gia tăng này có thể được giải thích, bởi quá trình sấy tạo điều kiện thuận lợi cho việc phá vỡ cấu trúc tế bào, giải phóng các hợp chất phenolic liên kết và có thể kích hoạt một số phản ứng do enzyme xúc tác để tạo ra các hợp chất phenolic mới [13].

Ngược lại, hàm lượng saponin tổng thể hiện xu hướng hoàn toàn trái ngược, với phương pháp sấy thăng hoa cho kết quả cao nhất (1.690,8 mg GE/L), cao hơn 9,8% so với sấy đối lưu (1.539,5 mg GE/L) và 12,4% so với sấy hồng ngoại (1.504,7 mg GE/L). Điều này phù hợp với đặc tính nhạy cảm nhiệt của các saponin, đặc biệt là ginsenoside, trong đó quá trình thăng hoa ở nhiệt độ và áp suất thấp giúp ngăn chặn sự phân hủy nhiệt và chuyển đổi cấu trúc của các hợp chất này [14]. Các nghiên cứu cũng đã chứng minh rằng, sấy hồng ngoại có thể làm tăng đáng kể hoạt động chống oxy hóa của lá nhân sâm bằng cách phá vỡ các phenolic có khối lượng phân tử lớn để giải phóng chất chống

oxy hóa có kích thước phân tử nhỏ hơn [15, 16]. Điều này cho thấy, các điều kiện xử lý nhiệt có thể thúc đẩy sự chuyển đổi hoặc hình thành các hợp chất phenolic nhưng đồng thời có thể gây tổn thất một phần saponin do sự phân hủy nhiệt, trong khi điều kiện nhẹ nhàng của sấy thăng hoa lưu giữ được tính toàn vẹn cấu trúc của các saponin phức tạp.

Sấy không khí nóng mặc dù thường được sử dụng, có xu hướng dẫn đến thời gian sấy dài hơn và tiêu thụ nhiều năng lượng hơn so với các phương pháp sấy hồng ngoại. Nó cũng dẫn đến những thay đổi màu sắc đáng kể hơn và khả năng phân hủy các hợp chất hoạt tính sinh học, chẳng hạn như saponin và polyphenol, vốn rất quan trọng đối với hoạt động chống oxy hóa [17]. Sấy hồng ngoại đã được chứng minh là tiết kiệm năng lượng hơn và hiệu quả hơn trong việc bảo quản chất lượng của nhân sâm, bao gồm làm giảm thời gian sấy và tăng cường khả năng giữ lại polyphenol và ginsenoside, vốn rất quan trọng đối với đặc tính chống oxy hóa [18]. Mặt khác, sấy thăng hoa được biết đến với khả năng bảo toàn tính toàn vẹn về mặt cấu trúc và các hợp chất hoạt tính sinh học của vật liệu thực vật nhờ quy trình ở nhiệt độ thấp. Phương pháp này đặc biệt hiệu quả trong việc duy trì khả năng chống oxy hóa của các loại thảo mộc, vì nó giảm thiểu sự phân hủy nhiệt của các hợp chất nhạy cảm [19, 20].



Hình 1. Ảnh hưởng của phương pháp sấy lên hàm lượng phenolic (mg GAE/L) và saponin (mg GE/L) của dịch chiết lá sâm Ngọc Linh

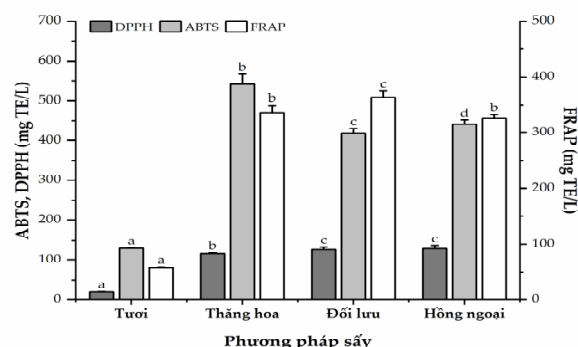
Chú thích: Mẫu tươi là mẫu đối chứng không sấy.

3.2. Ảnh hưởng của phương pháp sấy lên hoạt tính chống oxy hóa

Tác động của các phương pháp sấy khác nhau đến đặc tính chống oxy hóa của chiết xuất lá sâm Ngọc Linh được trình bày trong hình 2. Kết quả cho thấy, sự khác biệt đáng kể giữa các phương pháp sấy, với mỗi phương pháp thể hiện ưu thế riêng biệt đối với các cơ chế chống oxy hóa khác nhau. Đối với hoạt tính khử gốc tự do DPPH, phương pháp sấy hồng ngoại và sấy đối lưu thể hiện hiệu quả cao nhất (126,8 - 129,0 mg TE/L), cao hơn 11,3% so với sấy thăng hoa (115,9 mg TE/L). Tuy nhiên, xu hướng này hoàn toàn ngược chiều đối với hoạt tính ABTS, trong đó sấy thăng hoa cho kết quả vượt trội với 542,2 mg TE/L, cao hơn 29,6% so với sấy hồng ngoại (441,1 mg TE/L) và 23,0% so với sấy đối lưu (418,4 mg TE/L). Trong khi đó, hoạt tính FRAP lại thể hiện xu hướng khác biệt, với sấy đối lưu đạt giá trị cao nhất (362,6 mg TE/L), cao hơn so với sấy thăng hoa và sấy hồng ngoại (326,5 - 336,3 mg TE/L). Sự phân hóa này có thể được giải thích bởi các cơ chế tác động khác nhau của từng phương pháp sấy lên cấu trúc và hoạt tính của các hợp chất chống oxy hóa. Sấy thăng hoa, với điều kiện nhiệt độ và áp suất thấp, có thể bảo tồn tối ưu các hợp chất có khả năng tương tác với cation $ABTS^{\bullet+}$, trong khi các phương pháp sấy nhiệt có thể tạo điều kiện thuận lợi cho sự chuyển đổi hoặc hình thành các hợp chất phenolic có hoạt tính khử ion Fe^{3+} và gốc tự do DPPH. Kết quả này cho thấy, việc lựa chọn phương pháp sấy cần được cân nhắc dựa trên mục tiêu ứng dụng cụ thể và loại hoạt tính chống oxy hóa mong muốn tối ưu hóa.

Ngoài ra, mối tương quan phức tạp và có tính chọn lọc giữa hàm lượng phenolic, saponin và các loại hoạt tính chống oxy hóa khác nhau trong dịch chiết lá sâm Ngọc Linh cũng được phân tích. Hoạt tính FRAP cho thấy, mối tương quan thuận rõ rệt với hàm lượng phenolic tổng, trong đó mẫu sấy đối lưu có hàm lượng phenolic cao nhất tương ứng với hoạt tính FRAP cao nhất. Điều này cho thấy, hợp chất phenolic đóng vai trò chủ đạo trong việc khử ion Fe^{3+} thành Fe^{2+} , cơ chế phản ứng chính của phương pháp FRAP [21]. Ngược lại, hoạt tính ABTS thể hiện mối tương quan mạnh mẽ với hàm

lượng saponin tổng, đặc biệt rõ nét ở mẫu sấy thăng hoa với hàm lượng saponin cao nhất, tương ứng với hoạt tính ABTS vượt trội. Điều này gợi ý rằng các ginsenoside và saponin khác trong lá sâm Ngọc Linh có khả năng tương tác hiệu quả với cation $ABTS^{\bullet+}$ thông qua cơ chế chuyển electron đơn. Trong khi đó, hoạt tính DPPH thể hiện xu hướng tương quan với hàm lượng phenolic nhưng không rõ ràng như FRAP, với mẫu sấy hồng ngoại và đối lưu có hoạt tính DPPH cao và tương đương nhau (128,97 và 126,78 mg TE/L), mặc dù hàm lượng phenolic khác biệt đáng kể. Sự phân biệt này cho thấy, hoạt tính DPPH có thể chịu ảnh hưởng bởi cả hai nhóm hợp chất phenolic và saponin, tạo nên hiệu ứng hiệp đồng trong việc khử gốc tự do DPPH $^{\bullet}$. Những phát hiện này khẳng định tầm quan trọng của việc đánh giá đa chiều hoạt tính chống oxy hóa để hiểu rõ vai trò của từng nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học trong dịch chiết lá sâm Ngọc Linh.



Hình 2. Ảnh hưởng của phương pháp sấy lên hoạt tính chống oxy hóa DPPH, ABTS và FRAP (mg TE/L) của dịch chiết lá sâm Ngọc Linh

Chú thích: Mẫu tươi là mẫu đối chứng không sấy.

3.3. Ảnh hưởng của phương pháp sấy lên thành phần ginsenoside

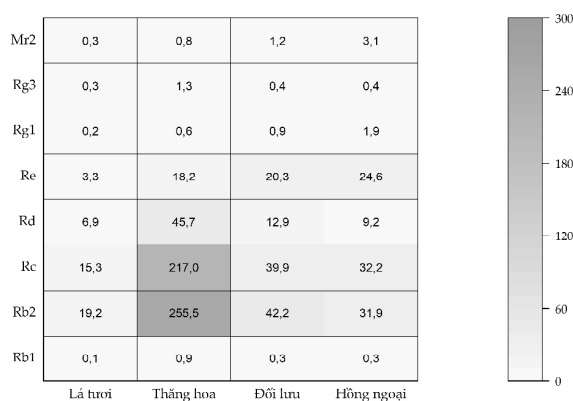
Kết quả phân tích định lượng các ginsenoside trong hình 3 cho thấy, phương pháp sấy có ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học này trong dịch chiết lá sâm Ngọc Linh. Có thể nhận thấy rằng, phương pháp sấy thăng hoa thể hiện khả năng bảo vệ nhóm hợp chất ginsenoside vượt trội so với các phương pháp nhiệt khác, với tổng hàm lượng ginsenoside đạt

540,0 mg/L so với hai phương pháp còn lại (103,4 - 118,0 mg/L). Điều này có thể được giải thích bởi quá trình thăng hoa diễn ra ở nhiệt độ và áp suất thấp, giúp ngăn chặn sự phân hủy nhiệt của các ginsenoside đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho việc giải phóng các hợp chất này từ tế bào thực vật [19, 20]. Ngược lại, phương pháp sấy đối lưu và hồng ngoại hiệu quả bảo vệ ginsenoside thấp hơn đáng kể, cho thấy sự mất mát do tác động của nhiệt độ cao trong quá trình sấy có sự tham gia của nhiệt. Đặc biệt, ginsenoside Rb1 thể hiện độ nhạy cảm cao với nhiệt độ, với hàm lượng trong các mẫu sấy nhiệt chỉ tăng 2,4 - 2,7 lần so với mẫu tươi, trong khi mẫu sấy thăng hoa tăng 8,5 lần.

Một điểm đáng chú ý là sự khác biệt trong sự phân bố ginsenoside giữa các phương pháp sấy. Ginsenoside Re và Rg1 cho thấy xu hướng tăng cao hơn trong các mẫu sấy hồng ngoại (24,60 và 1,92 mg/L) so với sấy đối lưu (20,30 và 0,85 mg/L), gợi ý rằng cơ chế truyền nhiệt trực tiếp của hồng ngoại có thể tạo điều kiện thuận lợi hơn cho việc bảo tồn một số ginsenoside nhất định. Tuy nhiên, phương pháp sấy thăng hoa vẫn thể hiện ưu thế vượt trội trong việc bảo tồn tổng hàm lượng ginsenoside, khẳng định tầm quan trọng của việc kiểm soát nhiệt độ trong quá trình chế biến dược liệu sâm Ngọc Linh.

Ginsenosides là các hợp chất thực vật chính trong nhân sâm thuộc nhóm saponin steroid đã được chứng minh là mang lại nhiều lợi ích dược lý, bao gồm tác dụng chống ung thư, chống viêm và bảo vệ thần kinh [22]. Nhóm hợp chất này bao gồm: Ginsenoside Rb1, Rd, Re và Rg1 là những hợp chất được xác định đóng góp đáng kể vào lợi ích sức khỏe liên quan đến việc tiêu thụ nhân sâm [23]. Sâm Ngọc Linh nói riêng đã thu hút sự chú ý vì đặc tính ginsenoside độc đáo của nó, bao gồm sự hiện diện đáng chú ý của majonoside Mr2, một hợp chất được cho là có hiệu quả tăng cường [24]. Nhiều nghiên cứu cho thấy, phương pháp sấy ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng và khả năng lưu giữ ginsenoside; trong đó sấy thăng hoa và sấy chân không giữ lại lượng ginsenoside tương tự nhau và hiệu quả hơn sấy không khí nóng [18, 25]. Kết quả nghiên cứu của Guo và cs (2022) nhấn mạnh rằng, malonyl - ginsenosides, vốn nhạy cảm với nhiệt,

được bảo quản tốt khi chế biến bằng kỹ thuật thăng hoa chân không, dẫn đến hàm lượng các hợp chất hoạt tính sinh học cao hơn [26]. Hơn nữa, sấy thăng hoa giúp bảo quản các ginsenosides cụ thể và hỗ trợ tính ổn định lâu dài, khiến phương pháp này trở thành lựa chọn hàng đầu trong chế biến các sản phẩm nhân sâm [27]. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu đánh giá về thành phần hóa học và sự biến đổi của thành phần ginsenoside của lá sâm Ngọc Linh, một dược liệu có tiềm năng bên cạnh củ sâm vốn được biết đến từ lâu với dược tính nổi trội.



Hình 3. Ảnh hưởng của phương pháp sấy lên thành phần ginsenoside (mg/L) của dịch chiết lá sâm Ngọc Linh

Chú thích: Mẫu tươi là mẫu đối chứng không sấy.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chứng minh rằng, phương pháp sấy có ảnh hưởng quyết định đến chất lượng và hoạt tính sinh học của dịch chiết lá sâm Ngọc Linh. Kết quả cho thấy, sấy thăng hoa thể hiện ưu thế vượt trội trong việc bảo tồn các hợp chất ginsenoside quý, với tổng hàm lượng ginsenoside cao gấp 4 - 5 lần so với các phương pháp sấy nhiệt truyền thống, đồng thời duy trì hoạt tính chống oxy hóa cao thông qua cơ chế khử gốc tự do DPPH và ABTS. Mặc dù sấy không khí nóng cho thấy khả năng bảo tồn phenolic tổng và hoạt tính FRAP tối ưu, nhưng sấy thăng hoa vẫn là phương pháp được khuyến nghị cho việc chế biến lá sâm Ngọc Linh nhằm tối đa hóa giá trị dược liệu thông qua việc bảo tồn các ginsenoside sinh học hoạt tính cao. Những phát hiện này đóng góp quan trọng vào việc thiết lập quy trình sản xuất tiêu

chuẩn cho ngành công nghiệp dược phẩm từ nguồn tài nguyên sâm đặc hữu quý của Việt Nam, đồng thời mở ra hướng nghiên cứu sâu hơn về tối ưu hóa các thông số kỹ thuật trong quá trình sấy thăng hoa để nâng cao hiệu quả kinh tế của phương pháp này.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, đã hỗ trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nhung, Nguyen Thanh, Khuat Huu Trung, and Tran Dang Khanh (2024). Current advances in tissue culture of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv). *Natural product communications*, 19(8), 1 - 12. Doi:1934578X241279712.
2. Le, Quang - Ung, Horng - Liang Lay, Ming - Chang Wu, Thi Hong-Hanh Nguyen and Duy - Lam Nguyen (2018). Phytoconstituents and biological activities of *Panax vietnamensis* (Vietnamese Ginseng): A precious ginseng and call for further research-a systematic review. *Natural Product Communications*, 13(10), 1381 - 1384. Doi: 1934578X1801301036.
3. Wijesekara, Tharuka, Jinhai Luo and Baojun Xu (2024). Critical review on anti-inflammation effects of saponins and their molecular mechanisms. *Phytotherapy Research*, 38(4), 2007 - 2022.
4. Lee, Sin Yee, Vincent Ferdinand, and Lee Fong Siow (2022). Effect of drying methods on yield, physicochemical properties and total polyphenol content of chamomile extract powder. *Frontiers in Pharmacology*, 2:13: 1003209. DOI: 10.3389/fphar.2022.1003209.
5. Li, Qiang, Xiaoli Pan, Wenyan Fan, Ying Zhou, Yongfu Liu, Wangxin Yu, Dongyu Li, Wenye Li and Weibin Li (2024). Drying kinetics and quality characteristics of exocarpium citreic grandis slices with hot air, vacuum and microwave vacuum dryers. *Journal of Computational Methods in Science and Engineering*, 24(3), 1363 - 1377.
6. Xu, Huihuang, Min Wu, Yong Wang, Wenguang Wei, Dongyu Sun, Dong Li, Zhian Zheng and Fei Gao (2022). Effect of combined infrared and hot air drying strategies on the quality of Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) cakes: Drying behavior, aroma profiles and phenolic compounds. *Foods*, 11(15), 2240.
7. Nwankwo, Chibuzo Stanley, Endurance Oghogho Okpomor, Nesa Dibagar, Marta Wodecki, Wiktor Zwierz and Adam Figiel (2023). Recent developments in the hybridization of the freeze-drying technique in food dehydration: A review on chemical and sensory qualities. *Foods*, 12(18), 3437.
8. Nhu-Trang, Tran-Thi, Thi-Kim-Thanh Phan, Thi-My-Trinh Lam, Phuoc-Bao-Duy Nguyen and Thi-Van-Linh Nguyen (2022). Drying kinetics and energy consumption in hot-air and microwave drying of *Polyscias fruticosa* (L.) harms leaves. In *AIP Conference Proceedings*, 2610, 70004. AIP Publishing.
9. Nhu-Trang, Tran-Thi, Quoc-Duy Nguyen, Nguyen Cong-Hau, Le-Thi Anh - Dao and Philippe Behra (2023). Characteristics and relationships between total polyphenol and flavonoid contents, antioxidant capacities and the content of caffeine, gallic acid and major catechins in wild/ancient and cultivated teas in Vietnam. *Molecules*, 28(8), 3470. <https://doi.org/10.3390/molecules28083470>
10. Nguyen, Quoc-Duy, Thanh - Thuy Dang, Thi-Van-Linh Nguyen, Thi-Thuy-Dung Nguyen, and Nhu-Ngoc Nguyen (2022). Microencapsulation of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) anthocyanins: Effects of different carriers on selected physicochemical properties and antioxidant activities of spray - dried and freeze-dried powder. *International Journal of Food Properties*, 25(1), 359 - 374.
11. Le Bot, Maxime, Juliette Thibault, Quentin Pottier, Séverine Boisard and David Guilet (2022). An accurate, cost-effective and simple colorimetric method for the quantification of total triterpenoid and steroidal saponins from plant materials. *Food*

- Chemistry*, 30: 383, 132597. doi 10.1016/j.foodchem.2022.132597
12. Nguyen, Quoc - Duy, Thi Tuong Vi Tran, Ngoc - Han Ngo - Thi, Hong - Tham Truong - Thi, Vinh - Lam Nguyen, Trong Khoa Luong, and Anh Duy Do (2025). Fermentation of Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) root extract using *Levilactobacillus brevis* QD - 1: Changes in majonoside R2 content and pharmacological activities. *Food Research International*, 208, 116275. Doi.org/10.1016/j.foodres.2025.116275
 13. Shu, Bin, Junmin Wang, Guangxu Wu, Xuejiao Cao, Fei Huang, Lihong Dong, Ruifen Zhang, Hesheng Liu and Dongxiao Su (2022). Newly generated and increased bound phenolic in lychee pulp during heat-pump drying detected by UPLC-ESI-triple-TOF-MS/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(4), 1381 - 1390.
 14. Vo, Hoang Tung, Jae Youl Cho, Yong-Eui Choi, Yong - Soon Choi and Yeon-Ho Jeong (2015). Kinetic study for the optimization of ginsenoside Rg3 production by heat treatment of ginsenoside Rb1. *Journal of Ginseng Research*, 39(4), 304 - 313.
 15. Wang, Xuan, Myungjin Kim, Ruoqi Han, Jiarui Liu, Xuemei Sun, Shuyang Sun, Chengwu Jin and Dongha Cho (2024). Increasing the amounts of bioactive components in American ginseng (*Panax quinquefolium* L.) leaves using far-infrared irradiation. *Foods*, 13(4), 607.
 16. Duan, Shucheng, Jia Rui Liu, Xin Wang, Xue Mei Sun, Han Sheng Gong, Cheng Wu Jin, and Seok Hyun Eom (2022). Thermal control using far - infrared irradiation for producing deglycosylated bioactive compounds from Korean ginseng leaves. *Molecules*, 27(15), 4782.
 17. Ning, Xiaofeng and Chungsu Han (2013). Drying characteristics and quality of taeguik ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer) using far - infrared rays. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(3), 477 - 483.
 18. Popovich, David G., Chun Hu, Timothy D. Durance and David D. Kitts (2005). Retention of ginsenosides in dried ginseng root: Comparison of drying methods. *Journal of Food science*, 70(6), 355 - 358.
 19. Hu, Yunfei, Hui Zhang, Yan Lu, Donghui Ao, Zhengwei Liang, Ming Zhao, Shengchao Yang, and Qingyan Tang (2024). Microencapsulation of total saponins from stem and leaf of *Panax notoginseng* by freeze and spray drying: Process optimization, physicochemical properties, structure, antioxidant activity, and stability. *Journal of Food Science*, 89(11), 7888 - 7906.
 20. Garcia, Leani Martinez, Costanza Ceccanti, Carmine Negro, Luigi De Bellis, Luca Incrocci, Alberto Pardossi and Lucia Guidi (2021). Effect of drying methods on phenolic compounds and antioxidant activity of *Urtica dioica* L. leaves. *Horticulturae*, 7(1), 10. DOI: 10.3390/horticulturae 7010010.
 21. Prastiwi, Rini, Berna Elya, Muhammad Hanafi, Yesi Desmiaty and Rani Sauriasari (2020). The antioxidant activity of *Sterculia stipulata* Korth woods and leaves by FRAP method. *Pharmacognosy Journal*, 12(2), 236 - 239.
 22. Zhang, Tao, Mei Han, Limin Yang, Zhongming Han, Lin Cheng, Zhuo Sun, and Linlin Yang (2018). The effects of environmental factors on ginsenoside biosynthetic enzyme gene expression and saponin abundance. *Molecules*, 24(1), 14. <https://doi.org/10.3390/molecules24010014>.
 23. Kim, Ji Hye, Young - Su Yi, Mi - Yeon Kim and Jae Youl Cho (2017). Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases. *Journal of ginseng research*, 4(4), 435 - 443.
 24. Chaingam, Jiranan, Kanta Noguchi, Poomraphie Nuntawong, Sornkanok Vimolmangkang, Varalee Yodsurang, Gorawit Yusakul, Satoshi Morimoto, and Seiichi Sakamoto (2024). Monoclonal antibody - based enzyme - linked immunosorbent assay for quantification of majonoside R2 as an authentication marker for Ngoc Linh and Lai Chau ginsengs. *Journal of Ginseng Research*, 48, 474 - 480.
 25. Purnama, Monica, Parastoo Yaghmaee, Tim D. Durance and David D. Kitts (2010). Porosity changes and retention of ginsenosides in

North American ginseng root using different dehydration processes. *Journal of Food science*, 75(7), 487 - 492.

26. Guo, Na, Yuxin Bai, Xin Huang, Xiaokang Liu, Guangzhi Cai, Shuying Liu, Yunlong Guo and Jiyu Gong (2022). Comparison of the saponins in three processed american ginseng products by ultra-high performance liquid chromatography - quadrupole orbitrap tandem mass spectrometry and multivariate statistical analysis. *International*

Journal of Analytical Chemistry, 3, 1 - 10. Doi:10.1155/2022/6721937.

27. Liang, Qi, Lin He, Qingqing Tian, Dong Ran, Hua Tao, Qinwan Huang, Qing Zhang, Chunjie Wu and Wei Peng (2024). Comparison of freeze-drying and hot-air drying on the appearance, microscopic characterization and Ginsenosides contents of the American ginseng. *Chinese medicine and Natural products*, 4(2), 66 - 75.

EFFECTS OF DRYING METHODS ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES, GINSENOSE PROFILES AND BIOACTIVITIES OF EXTRACTS FROM NGOC LINH GINSENG LEAVES

Nguyen Thi Thuy Dung¹, Le Cam Thi¹, Nguyen Quoc Duy¹, Tran Thi Tuong Vi¹,
Huynh Quoc Trung¹, Luong Trong Khoa², Nguyen Duy Lam¹, Nguyen Thi Van Linh¹

¹ Faculty of Applied Science and Technology (FAST), Nguyen Tat Thanh University

² VINAPANAX Company

Abstract

Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) is a valuable medicinal plant endemic to Vietnam, with leaves containing bioactive ginsenosides that possess therapeutic potential. This study investigated the effects of different drying methods, namely, hot air drying (HAD), freeze drying (FD) and infrared-assisted drying (IRD), on total phenolic and saponin contents, antioxidant activity (DPPH, ABTS and FRAP assays) and ginsenoside profiles of extracts from Ngoc Linh ginseng leaves. The results showed that HAD resulted in extracts with the highest total phenolic content (264.9 mg GAE/L) while FD sample demonstrated a markedly elevated total saponin concentration (1690.8 mg GE/L) compared to the other samples (1504.7 - 1539.5 mg GE/L). Apparently, a correlation was observed between the phenolic and saponin content with the FRAP and DPPH/ABTS antioxidant activities of Ngoc Linh ginseng leaf extract, the HAD sample exhibiting the highest FRAP activity (362.6 mg TE/L) and the FD sample demonstrating the highest DPPH/ABTS free radical scavenging activity (116.3 and 542.2 mg TE/L). Regarding the ginsenoside profile, Re, Rc, Rb2 and Rd were the predominant ginsenosides present in the Ngoc Linh ginseng leaf extract. In addition, the FD sample had a significantly higher ginsenoside content (540.0 mg/L) compared to the other two samples (103.4 - 118.0 mg/L), particularly Rc (217.9 mg/L), Rb2 (255.5 mg/L) and Rd (45.7 mg/L). These findings provide crucial guidance for developing standardized processing protocols to maximize the therapeutic value of this endemic Vietnamese ginseng species.

Keywords: Bioactivity, drying method, ginsenoside profile, Ngoc Linh ginseng leaf.

Ngày nhận bài: 16/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 25/6/2025

Ngày thông qua phản biện: 16/7/2025

Ngày duyệt đăng: 8/8/2025

THỂ LỆ VIẾT VÀ GỬI BÀI

1. Tạp chí Nông nghiệp và Môi trường đăng tải các bài báo khoa học công bố các công trình nghiên cứu khoa học có nội dung khoa học mới, các bài tổng quan về ngành nông nghiệp và môi trường chưa gửi đăng ở bất kỳ loại hình báo chí nào.

2. Bài báo có thể viết bằng tiếng Việt (đăng trên Tạp chí bằng ngôn ngữ tiếng Việt) hoặc tiếng Anh (đăng trên Tạp chí bằng ngôn ngữ tiếng Anh), soạn thảo trên máy vi tính, các dòng cách nhau bằng 1,2 (Paragraph/Line spacing Multiple at 1,2), sử dụng font chữ Times New Roman, cỡ chữ 12, có độ dài không quá 10 trang giấy khổ A4 bao gồm cả tài liệu tham khảo.

3. Từ khóa được trình bày theo thứ tự alphabet, từ 3 - 5 từ. Từ khóa bằng tiếng Việt và tiếng Anh phải cùng nội dung, ý nghĩa của từ. Phần tóm tắt có độ dài không quá 350 từ viết liền, không xuống dòng, cỡ chữ 10, bao gồm: Nêu ngắn gọn về mục đích, phương pháp nghiên cứu, kết quả nghiên cứu chính. Bài báo viết bằng tiếng Việt phải có tóm tắt bằng cả tiếng Anh, tiếng Việt và không khác biệt về nội dung, ý nghĩa.

4. Bài báo phải được trình bày theo thứ tự sau: Tên bài báo bằng tiếng Việt và tiếng Anh, (các) tác giả, tên cơ quan của (các) tác giả, tóm tắt, từ khóa, nội dung của bài báo, lời cảm ơn (nếu có), tài liệu tham khảo. Tác giả liên hệ phải được chỉ rõ cùng với địa chỉ cơ quan, Email, số điện thoại trên trang nhất của bản thảo. Tên riêng tiếng Việt phải có đủ dấu thanh kể cả các bài viết bằng tiếng Anh.

5. Tài liệu tham khảo được trình bày theo thứ tự trích dẫn và đánh số đặt trong ngoặc vuông theo thứ tự xuất hiện trong bài báo và trong danh mục tài liệu tham khảo.

+ *Đối với các tài liệu là bài báo trong Tạp chí ghi đầy đủ theo thứ tự:* Tên tác giả, năm xuất bản, tên bài báo, tên tạp chí, tập, số, trang.

+ *Đối với các tài liệu là sách ghi đầy đủ theo thứ tự:* Tên tác giả, năm xuất bản, tên sách, nhà xuất bản, nơi xuất bản.

Nếu bài viết bằng tiếng Anh, tài liệu tham khảo nào không phải bằng tiếng Anh thì phải dịch ra tiếng Anh và chú thích ngôn ngữ gốc trong ngoặc đơn.

6. Tạp chí Nông nghiệp và Môi trường thực hiện quy trình gửi bài, quy trình phản biện online trên hệ thống phần mềm của Tạp chí và sử dụng cơ sở dữ liệu các số Tạp chí đã xuất bản, đề nghị các cộng tác viên, phản biện bài báo và bạn đọc truy cập vào website: <http://tapchikhoahoc.nnmt.net.vn> và thực hiện các thủ tục theo hướng dẫn.

7. Chi tiết xin liên hệ: Tạp chí Nông nghiệp và Môi trường; Số 10 Nguyễn Công Hoan, phường Giảng Võ, Hà Nội; Điện thoại: 024.37711070; 024.38345457; 024.37716634. Email: bbtnongnghiep@gmail.com.

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

872

873

874

875

876

877

878

879

880

881

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904

905

906

907

908

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

971

972

973

974

975

976

977

978

979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997

998

999

1000