

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN TINH BỘT GẠO LỨT HUYẾT RỒNG BẰNG ENZYM α -AMYLASE TRONG SẢN XUẤT NƯỚC GẠO LỨT HUYẾT RỒNG LÊN MEN

● NGUYỄN VĂN HIỆP - NGUYỄN HOÀNG ANH - LÊ THỊ NGỌC ÁI
- LÊ THỦY TIÊN - NGUYỄN LINH PHƯƠNG

TÓM TẮT:

Nghiên cứu nhằm xác định điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân tinh bột gạo lứt huyết rồng. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ gạo/nước 5 - 40%, pH 5 - 7, nhiệt độ 70 - 90°C, thời gian thủy phân 10 - 50 phút và nồng độ enzyme α -amylase 0,05 - 0,25% cho quá trình thủy phân đến hàm lượng đường khử đã được nghiên cứu. Thực hiện thiết kế thực nghiệm cấu trúc có tâm cho 4 nhân tố đã được áp dụng để tối ưu hóa quá trình thủy phân tinh bột, kết quả mô hình thống kê xác định dịch thủy phân có hàm lượng đường khử cao nhất là 12,861 g/l tại các điều kiện tối ưu: pH = 5,6, nhiệt độ 89°C, thời gian thủy phân 37 phút và nồng độ enzyme α -amylase 0,2%. Kết quả thực nghiệm tương thích cao với mô hình, số liệu nghiên cứu là tiền đề để xây dựng quy trình sản xuất nước gạo lứt huyết rồng lên men.

Từ khóa: alpha-amylase, gạo lứt huyết rồng, lên men, tối ưu hóa, thủy phân tinh bột.

1. Đặt vấn đề

Hiện tại, việc nghiên cứu về các sản phẩm từ gạo lứt huyết rồng còn hạn chế, đã có một số nghiên cứu về việc sử dụng enzyme để thủy phân tinh bột gạo lứt huyết rồng như của Dương Thị Ngọc Hạnh (2014) [1]. Tuy nhiên, nghiên cứu chưa tập trung nhiều vào khảo sát, tối ưu hóa các thông số tại công đoạn thủy phân, do đó các công đoạn đóng vai trò tiền đề cho lên men có thể kể đến như dịch hóa vẫn chưa được khảo sát đầy đủ. Vì thế, với mục tiêu hoàn thiện quy trình sản xuất nước gạo lứt huyết rồng lên men việc tối ưu hóa các yếu tố: tỷ lệ cơ chất, pH, nhiệt độ, nồng độ enzyme, thời gian thủy phân tinh bột tại công đoạn dịch hóa

là điều cần thiết. Ngoài ra, khi nói đến tính chất sản phẩm, đây cũng là yếu tố tạo nên sự khác biệt cho nghiên cứu, mang xu hướng nước giải khát lên men có độ cồn thấp và còn lại đường khử, kết hợp bổ sung CO₂ sẽ tạo nên sự đổi mới làm đa dạng hóa hơn dòng sản phẩm nước trái cây lên men trên thị trường hiện nay.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu, hóa chất

2.1.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu gạo lứt huyết rồng có tên khoa học là *Oryza sativa* L được mua tại hệ thống siêu thị Aeon TP. Hồ Chí Minh có nguồn gốc ấp Mỹ Thị B, xã Mỹ An, huyện Tháp Mười, tỉnh Đồng

Tháp. Chế phẩm enzyme α -amylase (từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis*, 120 KNU/g, tên thương mại là Termamyl 120L) của hãng Novozymes, Đan Mạch [2].

2.1.2. Hóa chất

Acid citric; sodium hydrogen carbonate; 3,5 dinitrosalicylic acid; potassium sodium tartrate; sodium hydroxide,...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chuẩn bị mẫu

Gạo lứt huyết rồng $\rightarrow$ Nghiền $\rightarrow$ Cân vào bình tam giác $\rightarrow$ Pha loãng $\rightarrow$ Điều chỉnh pH $\rightarrow$ Điều chỉnh nhiệt độ $\rightarrow$ Bổ sung enzyme $\rightarrow$ Ủ enzyme $\rightarrow$ Làm nguội $\rightarrow$ Xác định hàm lượng đường khử [3].

2.2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thực hiện lần lượt theo trình tự 5 thí nghiệm được bố trí gồm một nhân tố: tỉ lệ khối lượng gạo/khối lượng nước (5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%); pH (5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0); nồng độ enzyme α -amylase (0,05%, 0,10%, 0,15%, 0,20%, 0,25%) thời gian thủy phân (10 phút, 20 phút, 30 phút, 40 phút, 50 phút) và nhiệt độ (70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C) để xác định các thông số sơ bộ làm tiền đề thực hiện mô hình tối ưu hóa của các nhân tố ảnh hưởng đến hoạt động thủy phân của enzyme α -amylase trong sản xuất nước gạo lứt huyết rồng lên men.

2.2.3. Tối ưu hóa quá trình thủy phân tinh bột gạo lứt huyết rồng bằng enzyme α -amylase

Áp dụng thiết kế thực nghiệm cấu trúc có tâm (CCD: central composite design) để tối ưu hóa quá trình thủy phân tinh bột gạo lứt huyết rồng bằng enzyme α -amylase. Kết quả xác định được điều kiện tối ưu cho quá trình dịch hóa gạo lứt huyết rồng trên cơ sở mô hình thực nghiệm thống kê mô tả tương hợp kết quả thực nghiệm. Mô hình bậc 2 tổng quát để dự đoán các điều kiện tối ưu có dạng như sau:

$$Y_i = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{44}X_4^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{14}X_1X_4 + a_{23}X_2X_3 + a_{24}X_2X_4 + a_{34}X_3X_4$$

Trong đó:

Y_i là hàm lượng đường khử (g/l), X_1 : nhiệt độ (°C), X_2 : pH, X_3 : nồng độ enzyme (%), X_4 : thời gian

thủy phân (phút); a_0, a_{ii}, a_{ij} là các hệ số của phương trình hồi quy [4].

2.2.4. Phương pháp phân tích hóa lí

- Xác định hàm lượng tinh bột theo TCVN 4594: 1988 [5]: Tiến hành cân 5 - 20 g mẫu, chuyển toàn bộ vào bình tam giác dung tích 250 ml, tráng kỹ cốc cân bằng nước cất, lượng nước cho vào bình khoảng 100- 150 ml. Thêm 5 ml axit clohydric đặc vào bình khoảng 100 - 150 ml. Thêm 50 ml axit clohydric đặc vào bình mẫu, đậy nút cao su có cắm ống sinh hàn ngược và đun trên bếp cách thủy sôi trong 2 giờ. Lấy bình ra làm nguội, trung hòa mẫu bằng natri hydroxit 30%, khử protit, lọc, định mức. Hút 5 - 25 ml dịch lọc, chuyển vào bình tam giác dung tích 250 ml, thêm vào bình 50 ml hỗn hợp pheling A, B và tiếp tục đun, lọc, hòa tan và chuẩn độ. Ghi số ml kali pemanganat 0,1N đã dùng. Hàm lượng tinh bột (X) tính bằng % theo công thức: $X = (X_1 - X_2) \times 0,9$. Trong đó: X_1 là hàm lượng glucit tổng số và X_2 là hàm lượng đường tổng số xác định theo phương pháp Bertrand.

- Xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp đo quang phổ với thuốc thử DNS [3]: Tiến hành cân 1 gam dịch sau thủy phân cho vào bình định mức 100 ml, tiếp tục cho nước cất tới vạch định mức và lọc vào cốc. Hút 1 ml dịch lọc cho vào ống nghiệm, thêm vào mỗi ống nghiệm 0,5 ml thuốc thử DNS, lắc đều các ống nghiệm. Để các ống nghiệm vào nồi cách thủy đang sôi đúng 5 phút, lấy ra làm nguội đến nhiệt độ 25 - 30°C rồi đo mật độ quang ở bước sóng 540 nm. Tính kết quả dựa vào độ hấp thụ của dung dịch mẫu tính ra nồng độ glucose theo đường chuẩn: $y = 0,194x + 0,0254$ ($R^2 = 0,9988$). Hàm lượng đường khử được tính theo công thức:

$$\text{Glucose (g/kg)} = C_x \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{V_{dm}}{m}$$

Trong đó:

C_x : hàm lượng glucose tính theo đường chuẩn (g/kg); V_1, V_2, V_{dm} lần lượt là: thể tích mẫu lấy đi phân tích, thể tích bình định mức trong dãy chuẩn, thể tích bình định mức sau xử lí mẫu (ml); m: khối lượng mẫu (g).

2.3. Phương pháp xử lí số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình $\pm$ giá trị sai số.

Kết quả được tính toán bằng phần mềm Microft Office Excel 2010 và phần mềm thống kê IBM SPSS Statistics 2.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ gạo/nước đến hàm lượng đường khử

Thí nghiệm tiến hành dựa trên cơ chất là tinh bột trong nguyên liệu gạo lứt huyết rồng. Kết quả khảo sát lượng đường khử sinh ra khi dịch hóa tinh bột gạo với các mức tỷ lệ khối lượng gạo/khối lượng nước (5% - 40%) ở điều kiện pH 5,5; nhiệt độ 70°C; nồng độ enzyme 0,15% trong thời gian thủy phân 50 phút được trình bày ở Hình 1.

Kết quả nghiên cứu (Hình 1), cho thấy mức độ thủy phân thay đổi khi thay đổi tỷ lệ gạo/nước. Khi tăng tỷ lệ gạo/nước thì hàm lượng đường khử sinh ra cũng tăng, có 2 nghiệm thức cho kết quả hàm lượng đường khử ở mức trung bình và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ là 20% ($11,89 \pm 0,66$ g/l) và 25% ($13,01 \pm 0,68$ g/l). Như vậy, để đem lại hiệu quả kinh tế và phù hợp với mục tiêu đầu ra của sản phẩm thì tỷ lệ gạo/nước 20% là nghiệm thức được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng đường khử

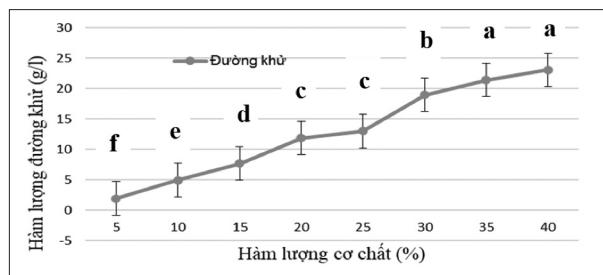
pH môi trường ảnh hưởng đến mức độ ion hóa cơ chất, enzyme và đặc biệt ảnh hưởng đến độ bền enzyme. Chính vì thế, pH có ảnh hưởng rất mạnh đến phản ứng của enzyme [6]. (Hình 2)

Kết quả phân tích thống kê cho thấy, hoạt động thủy phân của enzyme α -amylase tại các mức pH 5,5; 6,0 đều cho hàm lượng đường khử cao và có sự khác biệt có nghĩa, tại mức ý nghĩa 5%. Như vậy, có thể chọn giá trị pH = 5,5 là giá trị pH thích hợp nhằm tạo điều kiện cho enzyme α -amylase hoạt động tốt. Kết quả này phù hợp so với nghiên cứu trước đây của Jagatee S et al. (2015) [7].

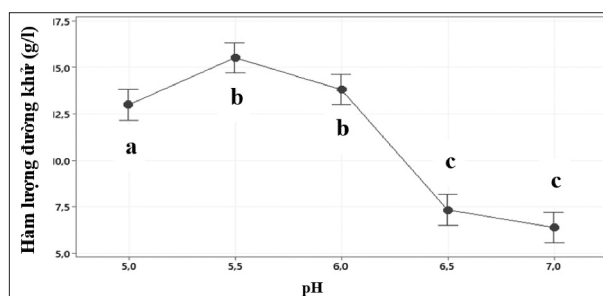
3.3. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme -amylase đến hàm lượng đường khử

Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở Hình 3 cho thấy, nồng độ enzyme α -amylase có ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme trong quá trình thủy phân gạo lứt huyết rồng tại mức ý nghĩa 5. Khi tăng nồng độ enzyme lên 0,20% và 0,25% thì hàm lượng

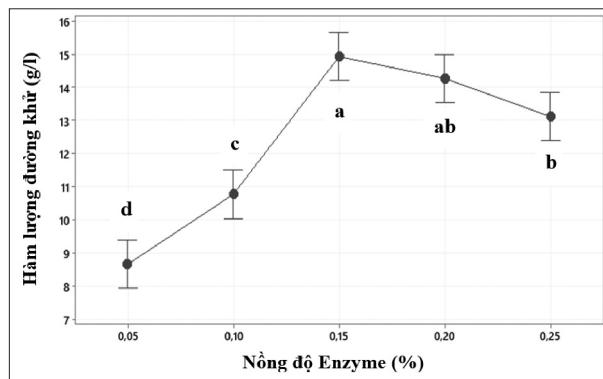
Hình 1: Ảnh hưởng của tỷ lệ gạo/nước đến hàm lượng đường khử



Hình 2: Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng đường khử



Hình 3: Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến hàm lượng đường khử



đường khử sinh ra không có sự khác biệt có nghĩa so với nồng độ 0,15% do giai đoạn đầu khi thừa nồng độ cơ chất, vận tốc phản ứng phụ thuộc tuyến tính vào nồng độ enzyme, hàm lượng đường khử sinh ra tăng lên nhưng khi nồng độ enzyme tăng tới một mức độ nào đó thì vận tốc phản ứng tăng không đáng kể [9].

Trong nghiên cứu này, nồng độ enzyme α -amylase 0,15% được chọn là điều kiện để thủy phân dịch gạo lứt huyết rồng và thu được dịch có hàm lượng đường khử cao nhất là $14,94 \pm 0,46$ g/l. Kết quả này phù hợp so với nghiên cứu trước đây

của Dương Thị Ngọc Hạnh và cs (2014) [1] nồng độ enzyme 0,15% được chọn là nghiệm thức thích hợp nhất cho quá trình dịch hóa.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng đường khử

Thời gian thủy phân được tiến hành khảo sát trong khoảng 10 - 50 phút, kết quả nghiên cứu được thể hiện ở Hình 4. Kết quả phân tích one-way ANOVA cho thấy, thời gian thủy phân có ảnh hưởng đến hàm lượng đường khử. Lượng đường tăng khi thời gian thủy phân từ 10 phút đến 40 phút. Thời gian thủy phân dài có thể tạo điều kiện tiếp xúc giữa cơ chất và enzyme làm cho quá trình thủy phân xảy ra tốt hơn, tạo ra nhiều sản phẩm. Sau đó, các sản phẩm sinh ra sẽ đóng vai trò như chất kìm hãm không cạnh tranh và kìm hãm hoạt động của enzyme nhiều [6].

Như vậy, thời gian thủy phân 40 phút (đường khử: $15,80 \pm 0,53$ g/l) là phù hợp cho nghiên cứu này nhằm tiết kiệm thời gian và đem lại hiệu quả kinh tế. So với nghiên cứu Jagatee S *et al.* (2015) [7].

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng đường khử

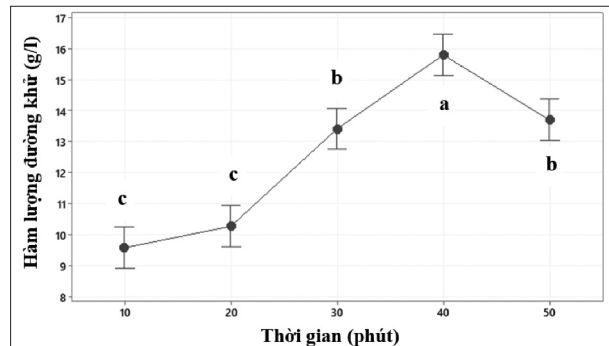
Tiến hành thủy phân với nhiệt độ thay đổi trong khoảng 70 - 90°C [10] và cố định 4 yếu tố tỷ lệ gạo/nước: 20% (mục 3.1), pH: 5,5 (mục 3.2), nồng độ enzyme 0,15% (mục 3.3) trong thời gian 40 phút (mục 3.4). Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở Hình 5.

Kết quả nghiên cứu thu được (Hình 5) cho thấy, hàm lượng đường khử tăng dần khi nhiệt độ tăng từ 70°C đến 85°C. Khi tiếp tục tăng nhiệt độ trên 70°C, hàm lượng đường khử có xu hướng giảm do tốc độ phản ứng enzyme chỉ tăng đến một giới hạn nhiệt độ nhất định, vượt quá giới hạn đó tốc độ phản ứng enzyme sẽ giảm và dẫn đến mức triệt tiêu [6]. Tại nhiệt độ 85°C, hàm lượng đường khử tạo thành sau thủy phân đạt cao nhất $15,43 \pm 0,89$ g/l và có sự khác biệt có nghĩa so với khi dịch hóa ở 80°C và 90°C. Như vậy, ở điều kiện 85°C là nhiệt độ thích hợp cho hoạt động enzyme α -amylase.

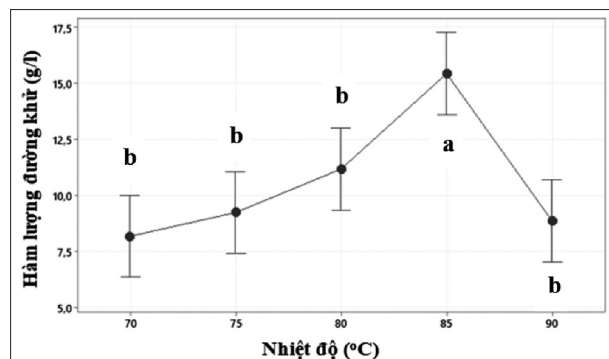
3.6. Tối ưu hóa quá trình thủy phân tinh bột gạo lứt huyết rồng bằng enzyme α -amylase

Dựa vào kết quả của các thí nghiệm trên chọn cố định tỷ lệ gạo/nước là 20%. Kết quả thực

Hình 4: Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng đường khử



Hình 5: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng đường khử



thí nghiệm tối ưu hóa với hàm mục tiêu là hàm lượng đường khử, giá trị các hệ số hồi quy và ($\alpha = 0,05$) được trình bày trong Bảng 1.

Phương trình hồi quy thể hiện tương quan của điều kiện thủy phân đến hàm lượng đường khử thu nhận được thiết lập và sử dụng để dự đoán hàm lượng đường khử tạo thành từ quá trình dịch hóa:

$$Y = -277,9 + 5,25 X_1 + 13,3 X_2 + 184,1 X_3 + 0,079 X_4 - 0,03352 X_1^2 - 2,197 X_2^2 - 279,4 X_3^2 - 0,00468 X_4^2 + 0,1188 X_1 X_2 - 0,032 X_1 X_3 + 0,00057 X_1 X_4 - 6,9 X_2 X_3 + 0,0739 X_2 X_4 - 0,692 X_3 X_4$$

Các giá trị tối ưu của các biến độc lập trong bước đường hóa cũng được xác định từ phần mềm MINITAB. Các điều kiện tối ưu cho giai đoạn này là X_1 : 89°C; X_2 : 5,6; X_3 : 0,2% và X_4 : 37 phút. Hàm lượng đường khử dự đoán theo các điều kiện nêu trên là Y : 12,8611 g/l.

Để kiểm định các giá trị dự đoán của mô hình, các điều kiện tối ưu được thực hiện độc lập với 3 lần

Bảng 1. Thiết kế thực nghiệm và giá trị hàm mục tiêu theo mô hình CCD

STT	Biến mã hóa				Biến thực				Hàm lượng đường khử (g/l)	
	X1	X2	X3	X4	Nhiệt độ (°C)	pH	Nồng độ Enzyme (%)	Thời gian (phút)	Dự đoán	Thực nghiệm
1	-2	0	0	0	75	5,5	0,2	40	6,96	6,46
2	-1	-1	1	1	80	5,0	0,25	50	8,04	8,21
3	-1	1	-1	-1	80	6,0	0,15	30	8,38	7,79
4	-1	-1	-1	-1	80	5,0	0,15	30	8,57	8,41
5	-1	1	1	-1	80	6,0	0,25	30	9,15	8,80
6	-1	1	-1	1	80	6,0	0,15	50	9,27	8,82
7	-1	-1	1	-1	80	5,0	0,25	30	10,02	9,08
8	-1	1	1	1	80	6,0	0,25	50	8,65	8,98
9	-1	-1	-1	1	80	5,0	0,15	50	7,97	7,69
10	0	0	0	-2	85	5,5	0,2	20	10,98	10,72
11	0	2	0	0	85	6,5	0,2	40	10,91	10,73
12	0	0	0	0	85	5,5	0,2	40	12,30	12,35
13	0	0	0	0	85	5,5	0,2	40	12,30	11,56
14	0	0	-2	0	85	5,5	0,1	40	9,11	9,51
15	0	0	0	0	85	5,5	0,2	40	12,30	11,87
16	0	0	2	0	85	5,5	0,3	40	9,91	8,88
17	0	0	0	0	85	5,5	0,2	40	12,30	12,15
18	0	0	0	0	85	5,5	0,2	40	12,30	12,07
19	0	0	0	0	85	5,5	0,2	40	12,30	12,05
20	0	-2	0	0	85	4,5	0,2	40	9,30	12,28
21	0	0	0	2	85	5,5	0,2	60	9,88	10,23
22	0	0	0	0	85	5,5	0,2	40	12,30	11,56
23	1	-1	-1	-1	90	5,0	0,15	30	9,97	8,57
24	1	1	1	-1	90	6,0	0,25	30	11,71	11,67
25	1	-1	-1	1	90	5,0	0,15	50	9,38	8,80
26	1	1	1	1	90	6,0	0,25	50	11,21	11,63
27	1	1	-1	-1	90	6,0	0,15	30	10,98	10,48
28	1	-1	1	-1	90	5,0	0,25	30	11,39	11,02
29	1	1	-1	1	90	6,0	0,15	50	11,86	11,22
30	1	-1	1	1	90	5,0	0,25	50	9,42	9,32
31	2	0	0	0	95	5,5	0,2	40	10,94	11,30

lập lại và giá trị trung bình của hàm lượng đường khử đạt được là $12,8611 \pm 0,337$ g/l, tương đương với giá trị ước tính của mô hình được thiết lập. Đồng thời tiến hành đối sánh kết quả phân tích hàm lượng tinh bột ban đầu trong nguyên liệu gạo lứt huyết rồng là 67,5 g/100 g và hàm lượng tinh bột còn lại trong dịch gạo lứt huyết

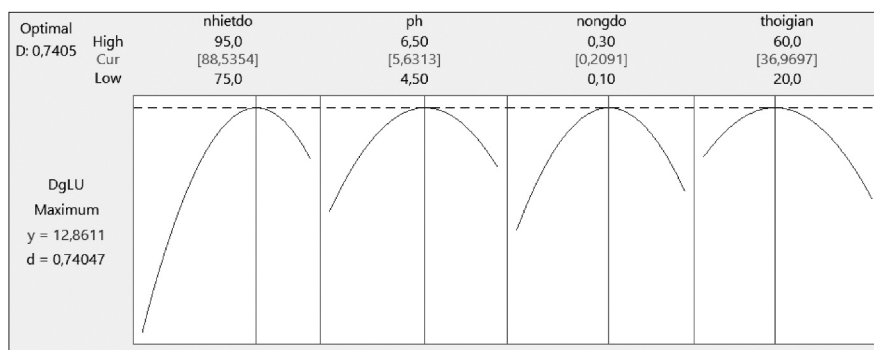
rồng sau thủy phân bằng enzyme α -amylase (giai đoạn dịch hóa) với các thông số tối ưu là 7,75 g/100g, cho thấy hiệu suất đạt khá cao (88,52%). (Hình 6)

4. Kết luận

Từ kết quả mô hình tối ưu hóa quá trình thủy phân tinh bột gạo lứt huyết rồng bằng enzyme α -amylase trong sản xuất nước gạo lứt huyết rồng lên men ghi nhận tại điều kiện với các thông số nhiệt độ: 89°C, pH: 5,6; nồng độ enzyme α -

amylase: 0,2% và thời gian: 37 phút cho dịch thủy phân đạt hàm lượng đường khử cao nhất dự đoán là 12,684 g/l. Đồng thời, kết quả thực nghiệm ở các điều kiện tối ưu được thực hiện độc lập, ba lần lặp lại, với giá trị trung bình của hàm lượng đường khử đạt được là $12,861 \pm 0,337$ g/l cho thấy sự tương thích rất cao với mô hình. Vì thế, việc nghiên cứu thủy phân tinh bột bằng enzyme α -amylase có thể là ứng dụng bền vững cho sản xuất các sản phẩm từ nguyên liệu gạo lứt huyết rồng ■

Hình 6: Mô hình tối ưu hóa



TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. N. M. T. Dương Thị Ngọc Hạnh (2014). Sử dụng enzyme α -amylase trong thủy phân tinh bột từ gạo huyết rồng. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, số Chuyên đề Nông nghiệp, 1, 61-67.
2. A. B. Res (2018). Production of Glucoamylase by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. *Advances in Biological Research*, 12(1), 07-11.
3. Lê Thị Hồng Ánh, Nguyễn Thị Hải Hòa, Phạm Thị Cẩm Hoa, Nguyễn Cẩm Hường, Vũ Hoàng Yến (2017). *Giáo trình phân tích hóa lý thực phẩm 1*. NXB Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 103 - 108.
4. A. Dargahi, M. R. Samarghandi, A. Shabanloo, M. M. Mahmoudi (2021). Statistical modeling of phenolic compounds adsorption onto low-cost adsorbent prepared from aloe vera leaves wastes using CCD-RSM optimization: effect of parameters, isotherm, and kinetic studies. *Biomass Conversion and Biorefinery*.
5. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4594: 1988 (ST SEV 3450 - 81) (1988). *Đồ hộp. Phương pháp xác định đường tổng số, đường khử và tinh bột*.
6. Nguyễn Đức Lương, Cao Cường, Nguyễn Thị Ánh Tuyết, Lê Thị Thủy Tiên, Tạ Thu Hằng, Huỳnh Ngọc Oanh, Nguyễn Thúy Hương, Phan Thị Huyền (2004). *Công nghệ enzyme*. NXB Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
7. Jagatee S, Pradhan C, Dash PK, Sahoo S, Mohanty RC. (2015). Optimization for saccharification of sweet potato (*Ipomoea batatas* L) flour for enhanced ethanol production. *International Journal of Technology Management*, 67-76.
8. MU Li-ping, LEI Ji, LI Bo, LI Xiao-jian. (2010). Development of a Purple Sweet Potato Beverage. Chengdu 610039, China: School of Bioengineering, Xihua University.

9. Đào Thị Mỹ Linh, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Vy Ngọc Huyền, Lê Thị Hồng Phượng, Nguyễn Thị Hoàng Mai (2017). Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men acid citric của chủng *Aspergillus niger* từ dịch thủy phân bã mía bằng enzyme cellulase. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học An Giang*, số 13 (1), 109 - 119.

10. Hoàng Thị Lệ Hằng, Nguyễn Thị Thu Hường (2018). Nghiên cứu chế biến nước uống lên men lactic từ củ khoai lang tím Nhật Bản (giống Murasakimasari). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 60(12).

Ngày nhận bài: 17/1/2022

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 17/2/2022

Ngày chấp nhận đăng bài: 27/2/2022

Thông tin tác giả:

1. NGUYỄN VĂN HIỆP¹

2. NGUYỄN HOÀNG ANH^{1,*}

3. LÊ THỊ NGỌC ÁI¹

4. LÊ THUY TIÊN¹

5. NGUYỄN LINH PHƯƠNG¹

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

*Email: anhnh@hufi.edu.vn

OPTIMIZING THE HYDROLYSIS OF RED RICE BY USING α -AMYLASE FOR THE PRODUCTION OF FERMENTED RED RICE BEVERAGE

● NGUYEN VAN HIEP¹

● NGUYEN HOANG ANH^{1,*}

● LE THI NGOC AI¹

● LE THUY TIEN¹

● NGUYEN LINH PHUONG¹

¹Ho Chi Minh City University of Food Industry

*Email: anhnh@hufi.edu.vn

ABSTRACT:

This study is to determine the optimal conditions for the hydrolysis of red rice. The 5-factor central composite design (CCD) was used to study effects of sweet rice/water ratio 5 - 40%, pH 5.0-7.0, temperature at 70-90°C, hydrolysis time from 10 to 50 minutes and α -amylase concentration of 0.05 - 0.25% on the sugars content and hydrolysis yield. At optimized conditions of pH 5.6, 89°C, 0.2% α -amylase and 37 minutes, the sugar content was maximized and the hydrolysis yield was 12,861g/l. The determined model was highly compatible with experimental results and it would be applied for red rice fermented beverages production.

Keywords: alpha-amylase, fermentation, red rice, optimize, starch hydrolysis.

TỔNG HỢP NHỰA BAKELITE TỪ DẦU VỎ HẠT ĐIỀU ỨNG DỤNG PHỦ TRÊN BỀ MẶT VẬT LIỆU SHEET MOLDING COMPOUND (SMC)

● HUỖNH THÀNH CÔNG - NGUYỄN THỊ THU THẢO - ĐOÀN NGỌC GIANG
- HUỖNH HOÀNG HẠNH - TRƯƠNG THANH NGỌC

TÓM TẮT:

Bài viết tập trung nghiên cứu quá trình tổng hợp nhựa bakelite từ dầu vỏ hạt điều (DVHĐ) ứng dụng phủ trên bề mặt vật liệu sheet molding compound (SMC). Kết quả cho thấy, vật liệu Bakelite tổng hợp có độ bền nhiệt cao lên đến 425,39°C được xác định bằng phương pháp nhiệt vi sai, bên cạnh đó khi phủ vật liệu Bakelite tổng hợp lên bề mặt SMC với tỷ lệ thích hợp (3%) thì nhận được vật liệu có độ mài mòn thấp (độ giảm khối lượng ít) chứng tỏ hiệu quả mang lại của vật liệu Bakelite tổng hợp có nguồn gốc từ DVHĐ.

Từ khóa: dầu vỏ hạt điều, bakelite, SMC, composite.

1. Đặt vấn đề

Những năm gần đây, sự tiến bộ của khoa học công nghệ cùng với những yêu cầu kỹ thuật khắc khe đã giúp ngành khoa học vật liệu ngày càng phát triển. Trong đó, việc nghiên cứu vật liệu composite ngày càng mở rộng, điển hình là vật liệu SMC (sheet molding compound), là hợp chất được gia cố bằng sợi thủy tinh trên nền nhựa nhiệt rắn, với các chất độn khoáng và các chất phụ gia khác nhau, các chất nền hữu cơ thường được sử dụng là polyester không bão hòa nhiệt rắn hoặc vinylester.

Với mục đích nâng cao đặc tính và cải thiện sự biến đổi của vật liệu, các thành phần khác cũng được thêm vào: chất xúc tác, chất ức chế, phụ gia nhựa nhiệt dẻo, chất khử khuôn, chất làm đặc, chất màu và gần đây phụ gia gia cường bề mặt vật liệu

từ DVHĐ được nghiên cứu nhằm cải thiện tính mài mòn của vật liệu.

DVHĐ là một phụ phẩm của ngành Điều Việt Nam [1-4], phần lớn được dùng làm chất đốt hay xuất thô cho các nước khác trên thế giới [3-4]. Đây là một nguồn nguyên liệu tái sinh và được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực công nghiệp để tạo bột ma sát, sơn, keo dán...[8-10]. Hàm lượng dầu có trong vỏ hạt điều chiếm khoảng 10-15% trọng lượng hạt [1] Dầu vỏ hạt điều là chất lỏng có màu nâu đen được chiết tách từ vỏ của hạt điều, mùi hăng tan trong dung môi như xylene, n-hexane và không tan trong ethanol, nước Thành phần chính của DVHĐ là 70% acid anacardic, 5% carnadol và 18% cardol [4-8]. Thành phần của DVHĐ thay đổi dựa trên phương pháp chiết xuất của nó, do đó thành phần hóa học

của chúng khác nhau. DVHĐ được phân thành hai loại chính là DVHĐ thương phẩm và DVHĐ tự nhiên. Trong đó DVHĐ thương phẩm rẻ, dễ tìm kiếm trên thị trường và thường được ép nhiệt, nên có thành phần chủ yếu là carnadol [8-10V] vậy, tác giả chọn sử dụng dầu thương phẩm để tiến hành tổng hợp nhựa Bakelite.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu chính là DVHĐ thương phẩm trên thị trường Việt Nam, được cung cấp từ Công ty Dầu điều Cát Lợi, các chỉ tiêu hóa lý được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Các thông số hóa lý của DVHĐ

TT	Các chỉ tiêu	Đơn vị	Giá trị	Phương pháp thử
1	Màu sắc	-	Nâu sẫm	
2	Tỷ trọng	g/mL	0.93	ASTM D4052-18a
3	Độ nhớt	mm ² /s	55.48	ASTM D445-18
4	Trị số acid mgKOH/g	-	0.7	ASTM D664-18c2
5	Chỉ số iod	wijs	236	TCVN 7869:2008
6	Hàm lượng nước	% (v/v)	0.1	ASTM D95-13(2018)
7	Hàm lượng tro	% (m/m)	0.015	ASTM D482-13

Các nguyên liệu khác bao gồm: acid sulfuric kỹ thuật (H₂SO₄ đậm đặc 98%), base kỹ thuật (NaOH 98%), Formaldehyde (FM 37%), SMC được nhập từ Trung Quốc với hàm lượng sợi thủy tinh là 16%.

2.2. Các phương pháp phân tích

Phân tích phổ hồng ngoại (FT-IR) và phân tích nhiệt trọng lượng (TGA) được tiến hành ở trung tâm phân tích hóa sinh lý của Viện Khoa học vật liệu ứng dụng.

Độ mài mòn của vật liệu được đo theo tiêu chuẩn ASTM - D4060 tại trung tâm Nghiên cứu Vật liệu Polymer.

2.3. Quy trình biến tính DVHĐ

Đầu tiên cho lượng DVHĐ và dung dịch Formaldehyde (FM) (37%) vào thiết bị phản ứng. Tiến hành khuấy trộn, lượng xúc tác acid sulfuric theo tính toán được cho từ từ, hỗn hợp được khuấy trộn tại 40°C trong thời gian 30 phút.

Sau đó gia nhiệt phản ứng, sau thời gian 4h phản ứng, lượng chất trong thiết bị phản ứng vẫn đục và tách lớp, điều chỉnh pH từ 8.0 đến 8.5 bằng dung dịch NaOH loãng, để lắng qua đêm. Phần nước được tách ra, rửa sản phẩm với nước cất đưa về môi trường trung tính.

Nhựa Bakelite thu được được hòa tan trong hỗn hợp dung môi xylene/butanol với tỷ lệ 1:1, tiến hành chưng cất với áp suất chân không để loại hết lượng nhỏ nước còn nằm lại và lượng DVHĐ không phản ứng ra. Sản phẩm thu được được bảo quản trong bình hút ẩm ở nhiệt độ phòng.

2.4. Quy trình gia công tạo mẫu liên kết bề mặt giữa SMC và Bakelite

Vì quá trình liên kết giữa polyester chưa bão hòa trong SMC và nhựa Bakelite xảy ra trong quá trình nóng chảy, do đó chọn phương pháp phủ Bakelite trên nền vật liệu SMC là ép nhiệt thủy lực. Các điều kiện thí nghiệm ép:

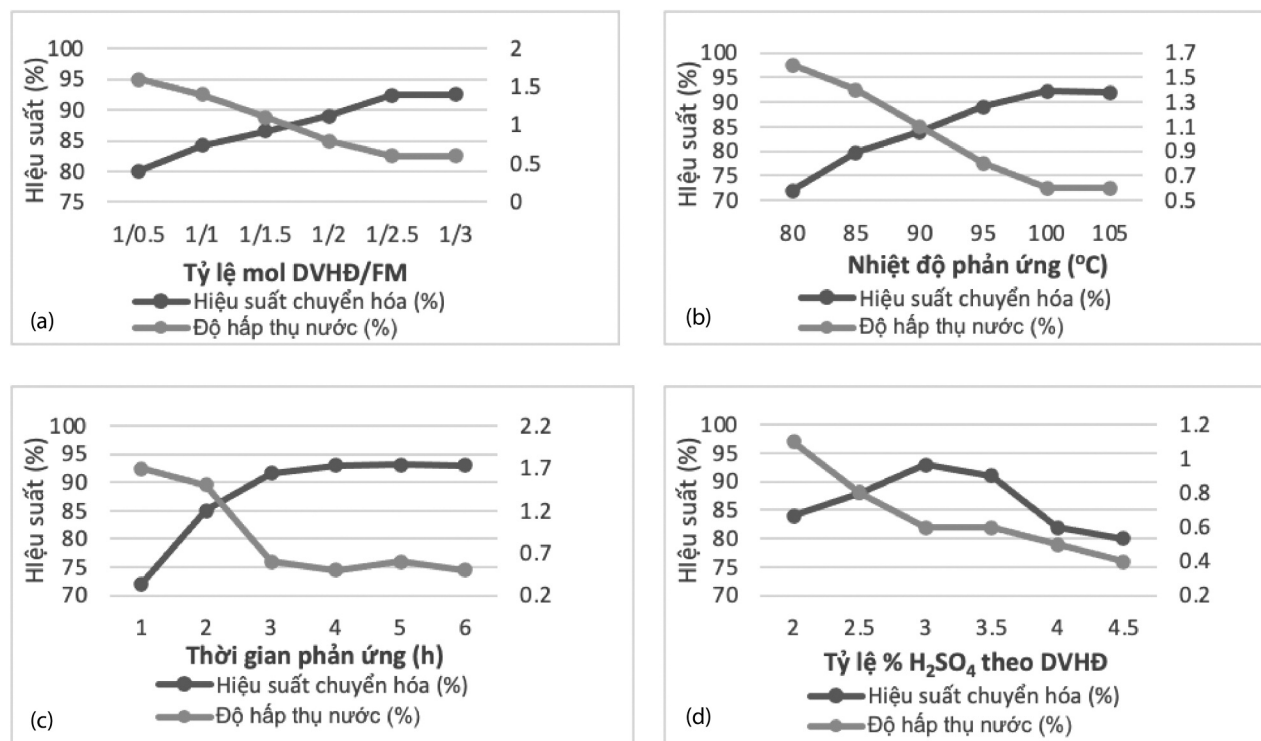
- Khuôn ép có kích thước: 100x100x10 mm.
- Lực ép: 500 kg/cm².
- Nhiệt độ ép: 180°C.
- Thời gian ép: 15 phút.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả khảo sát các điều kiện tổng hợp nhựa Bakelite từ DVHĐ (Hình 1)

Hình 1a cho thấy, phản ứng đa tụ giữa DVHĐ và FM cho một hiệu suất chuyển hóa cao (80 - 92,5%). Với hàm lượng FM tăng, sản phẩm có khả năng liên kết mạng không gian tăng theo, thể hiện ở độ

Hình 1: Đồ thị biểu diễn sự ảnh hưởng tỷ lệ mol (a), nhiệt độ (b), thời gian phản ứng (c) và tỷ lệ xúc tác (d) đến độ chuyển hóa



rắn và khả năng ngăn cản hấp thụ nước sau 24h của sản phẩm sau sấy khô, chứng tỏ các nhóm methylol (-CH₂OH) được hình thành và liên kết với vòng thơm của DVHĐ. Điều đó cho thấy, cấu trúc mạng lưới của nhựa khi đóng rắn đã được ổn định dần trong trường hợp hàm lượng FM tăng.

Từ Hình 1b cho thấy, khi nhiệt độ tăng, tốc độ phản ứng đa tụ tăng theo, đồng thời hiệu suất chuyển hóa tăng từ 72% đến 92,2%. Khi hiệu suất phản ứng tăng, sản phẩm Bakelite thu được có khả năng hấp thụ nước sau 24h giảm. Khi nhiệt độ tăng tiếp đến 100°C và 105°C, hiệu suất chuyển hóa không thay đổi (92,2% và 92%). Do đó, chọn nhiệt độ đa tụ tại 100°C là thích hợp nhất.

Hình 1c cho thấy, hiệu suất chuyển hóa tạo thành nhựa tăng theo thời gian phản ứng đa tụ. Khi thời gian phản ứng kéo dài đến 5h và 6h, hiệu suất chuyển hóa không thay đổi (93,1% và 93%) đồng thời kéo theo độ hấp thụ nước sau 24h cũng giảm nhưng không đáng kể.

Trong Hình 1d, ta thấy với hàm lượng chất xúc tác là 2%, hiệu suất chuyển hóa đạt 84%. Hiệu suất

chuyển hóa tăng dần với chiều tăng của hàm lượng chất xúc tác và đạt cao nhất (93%) tại hàm lượng xúc tác là 3%; có dấu hiệu giảm hiệu suất 91% khi xúc tác tăng lên 3,5%. Khi hàm lượng xúc tác tăng trên 3,5%, hiệu suất chuyển hóa giảm nhanh xuống 82% và 80%. Nguyên nhân có thể do việc hình thành nhiều tâm phản ứng carbonium -ion (-CH₂⁺-OH) đồng thời cùng một thời điểm, tạo ra nhiều sản phẩm trung gian trong khi đó sản phẩm Bakelite chưa được tạo thành. Hiện tượng này làm giảm hiệu suất tạo thành nhựa Bakelite. Trong khi độ hấp thụ nước sản phẩm Bakelite sau 24h giảm tịnh tiến, tỷ lệ xúc tác tăng do khả năng đóng mạch polymer nhanh.

Trên các cơ sở trên, tác giả chọn điều kiện tổng hợp Bakelite là tỷ lệ mol DVHĐ/ FM là 1/1.25, nhiệt độ phản ứng là 100°C, thời gian là 4h với xúc tác acid.

3.2. Bakelite sau tổng hợp

3.2.1. Kết quả FT-IR (Hình 2)

Phổ FT-IR của Bakelite tổng hợp được xuất hiện peak đặc trưng ở vùng 3.300, đặc trưng cho nhóm -OH của nhóm phenolic. Peak tại 3.020 cm⁻¹

đặc trưng cho liên kết -CH của vòng thơm, ở peak 2.928 cm^{-1} đặc trưng dao động -CH của các nhóm methylen, dải dao động ở vùng 1.039 cm^{-1} là dải hấp thụ điển hình của $\text{Ar-CH}_2\text{-OH}$. Ngoài ra, xuất hiện thêm hai peak tại 798 cm^{-1} và 1.018 cm^{-1} . Điều này xác nhận có sự thay thế trong nhân benzen và đặc trưng cho liên kết của -C-O-C-. Như vậy có thể khẳng định, đã có phản ứng giữa nhóm FM và nhóm hydroxyl của cardanol. Kết quả này phù hợp với sự hình thành Bakelite từ DVHĐ và FM với hiệu suất phản ứng 92,5%.

3.2.2. Kết quả TGA (Hình 3)

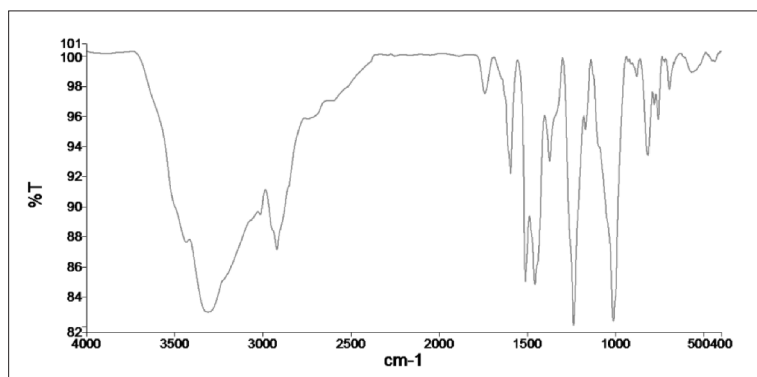
Độ bền nhiệt của vật liệu là một trong những thông số hóa - lý quan trọng trong việc đánh giá độ bền và khả năng ứng dụng của vật liệu đó. Kết quả phân tích TGA cho thấy vật liệu bền nhiệt đến $415,27^\circ\text{C}$. Có khoảng 17,97% khối lượng bị mất ở nhiệt độ $106,4^\circ\text{C}$, tương ứng lượng nước và lượng tác chất còn lại chưa phản ứng. Khi đạt đến nhiệt độ $296,9^\circ\text{C}$, vật liệu có biến đổi khối lượng thêm khoảng 14,94%, lúc này vật liệu bắt đầu phân hủy do các cầu nối liên kết hữu cơ bị phân hủy. Tiếp theo có sự giảm khối lượng đáng kể 45,72%, khối lượng vật liệu bị mất đi khi nhiệt độ đạt đến $425,39^\circ\text{C}$ chứng tỏ vật liệu bị phá hủy hoàn. Kết thúc quá trình phân hủy từ nhiệt độ $425,39^\circ\text{C}$ đến 900°C , chứng tỏ vật liệu có độ bền nhiệt khá cao.

3.2.3. Kết quả khảo sát độ mài mòn

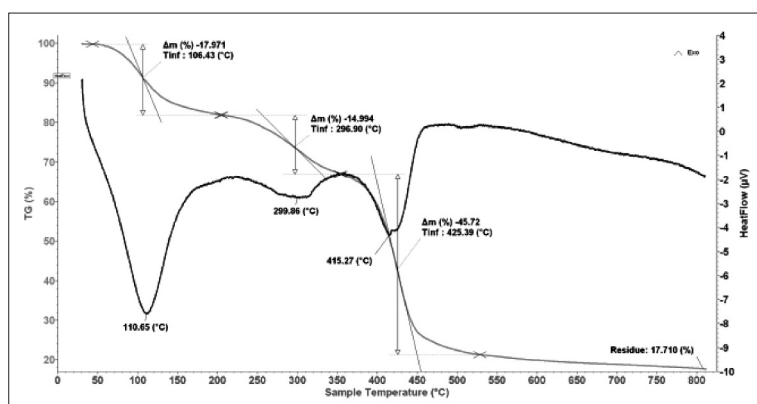
a. Kết quả phân tích bề mặt bằng kính hiển vi soi nổi (Hình 4)

Từ Hình 4 cho thấy, với các tỷ lệ Bakelite từ 1% - 7% về mặt khối lượng so với vật liệu SMC, qua quan sát bằng kính hiển vi soi nổi bề mặt vật liệu kiểm tra sự kết dính giữa 2 vật liệu cho thấy từ 1% - 3% Bakelite thì bề mặt vật liệu vẫn đồng nhất, không thấy hiện tượng nứt gãy. Khi tiếp tục tăng đến 5% Bakelite, bề mặt vật liệu khi quan sát bằng kính hiển vi soi nổi bắt đầu có hiện tượng nứt gãy

Hình 2: Phổ FT-IR của Bakelite tổng hợp từ acid H_2SO_4



Hình 3: Kết quả phân tích nhiệt trọng lượng của vật liệu Bakelite

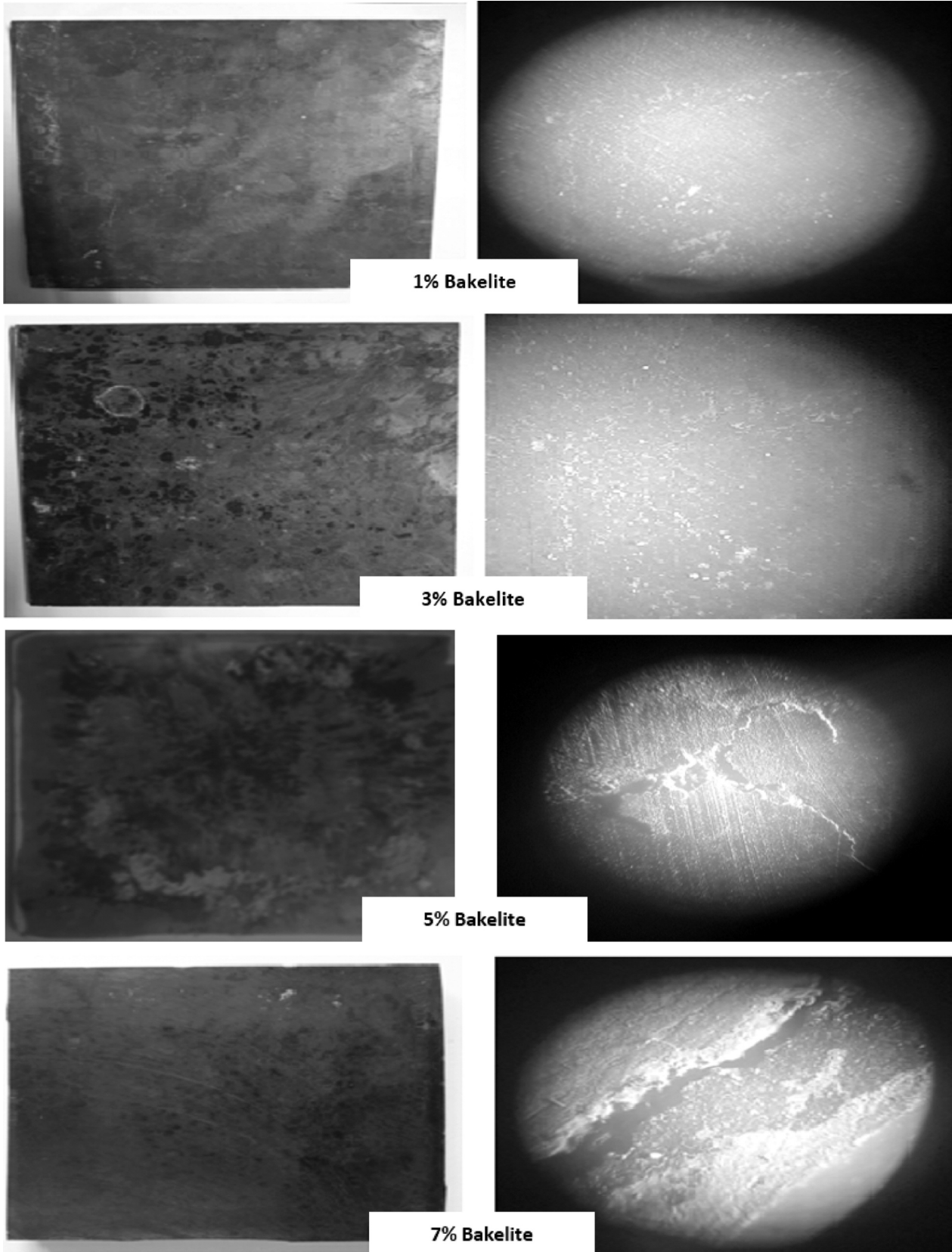


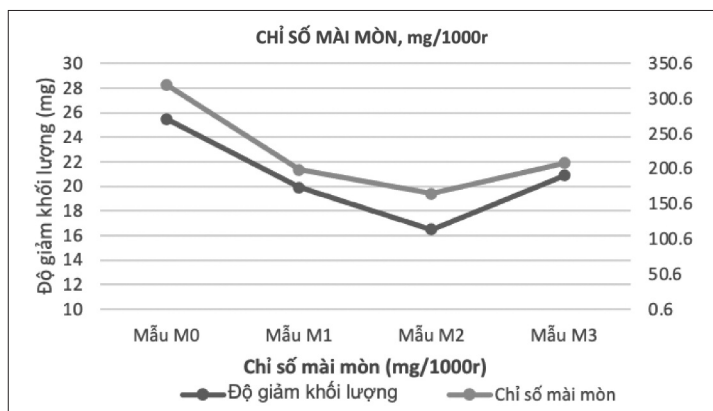
giữa 2 vật liệu, và hiện tượng nứt gãy được thể hiện rõ ở tỷ lệ 7% Bakelite. Sự nứt gãy vật liệu xảy ra là do hiện tượng co ngót của 2 dòng polymer khác nhau dẫn đến hiện tượng vật liệu không thể kết dính với nhau. Do đó, tỷ lệ tối đa mà vật liệu Bakelite dùng với vật liệu SMC không vượt quá 5% khối lượng.

b. Kết quả phân tích chỉ số mài mòn vật liệu (Hình 5)

Khi vật liệu càng ít mất khối lượng càng chứng tỏ vật liệu có độ kháng mài mòn cao. Qua kết quả khảo sát, chỉ số mài mòn của vật liệu theo tiêu chuẩn ASTM D4060 - 2010 (Hình 5) cho thấy, khi vật liệu từ 0% Bakelite (M0) đến mẫu 5% Bakelite (M3) thì vật liệu có sự giảm khối lượng thấp nhất ở vị trí mẫu M2 (3% Bakelite) chỉ giảm 16.5 mg so với vật liệu không phủ Bakelite (M0) - 100% SMC là 25.5 mg. Điều này chứng tỏ, khi vật liệu SMC được phủ 1 lớp Bakelite 3% (M2) thì vật liệu đạt

Hình 4: Bề mặt vật liệu dưới kính hiển vi soi nổi



Hình 5: Độ chịu mài mòn của lớp phủ Bakelite/SMC

được chỉ số mài mòn 165.0 thấp hơn các tỷ lệ phủ còn lại, nhưng khi đến mẫu 5% Bakelite (M3), vật liệu giảm khối lượng nhanh 20.9 mg. Điều này phù hợp với kết quả phân tích bằng kính hiển vi soi nổi ở vật liệu phủ 5% Bakelite bắt đầu có sự nứt gãy

vật liệu, dẫn đến độ giảm khối lượng tăng lên kèm theo chỉ số mài mòn cao hơn.

4. Kết luận

Từ các kết quả thực nghiệm thu được, nhựa Bakelite được tổng hợp thành công với hiệu suất 92% từ DVHĐ và Formaldehyde ở các điều kiện tối ưu là: tỷ lệ DVHĐ/FM = 1: 2.5, nhiệt độ phản ứng 100°C, thời gian phản ứng 4h, tỷ lệ xúc tác $H_2SO_4/DVHĐ = 1:3,5\%$ kh.l. Vật liệu Bakelite tổng hợp có độ bền nhiệt cao, lên đến 425,39°C được xác định bằng phương pháp nhiệt vi sai. Bên cạnh đó, khi phủ vật liệu Bakelite tổng hợp lên bề mặt SMC với tỷ lệ thích hợp (3%) thì nhận được vật liệu có độ mài mòn thấp (độ giảm khối lượng ít), chứng tỏ hiệu quả mang lại của vật liệu Bakelite tổng hợp có nguồn gốc từ DVHĐ ■

Lời cảm ơn:

Nhóm tác giả cảm ơn các đồng nghiệp tại Trung tâm Tiêu chuẩn và Đo lường chất lượng 3, Trung tâm Nghiên cứu Vật liệu polymer Đại học Bách khoa Thành phố Hồ Chí Minh, Trung tâm Phân tích hóa sinh lý của Viện Khoa học vật liệu ứng dụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

- Phan Hữu Trinh (1988). *Cây Điều: Gieo trồng, chăm sóc, chế biến*. TP. Hồ Chí Minh: NXB tổng hợp Phú Khánh.
- Nguyễn Bội Quỳnh, Phạm Đình Thanh (1983). *Cây đào lộn hột: cây Điều*. Hà Nội: NXB Nông nghiệp.
- Mazzetto SE, Lomonaco D, Mele G. (2009). Cashew nut oil: opportunities and challenges in the context of sustainable industrial. *Quim Nova*, 32, 732–41.
- Tyman JH, Kiong LS. Long chain phenols: Part X.Y. (1978). Composition of natural cashew nutshell liquid (*Anacardium occidentale*) from various sources. *Lipids*, 13, 525-32.
- Francisco H. A. Rodrigues; Francisco C. F. França; José R. R. Souza; Nágila M. P. S. Ricardo; Judith P. A. Feitosa. (2011). Comparison between physico-chemical properties of the technical Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) and those natural extracted from solvent and pressing. *Polímeros*, 21, 156-60.
- Akinhanmi T.F., Atasié V.N. (2008). Chemical composition and physicochemical properties of cashew nut (*Anacardium occidentale*) oil and cashew nut shell liquid. *J. Agric. Food Environ. Sci.*, 2, 1-10.
- Chaudhari A.P., Thakor N.J., Mahale D.M., Haldankar P.M., Sonawane S.P. (2012). Physical properties of cashew nut shell. *Int. J. Innov. Eng. Res. Manag.*, 1, 172-5.
- Trịnh Văn Dũng (2007). Nghiên cứu công nghệ sản xuất bột má phanh từ dầu vỏ hạt điều. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 10(6), 59-65.
- Bùi Văn Ái, Nguyễn Thị Bích Ngọc (2010). Kết quả nghiên cứu sử dụng dầu vỏ hạt Điều tạo chế phẩm bảo quản lâm sản. Truy cập tại http://vaf.gov.vn/wp-content/uploads/sites/2/2010/10/64BVAi_TBQ.pdf
- Clegg, Brian. (2014). *Chemistry in its element - bakelite*, Royal Society of Chemistry - RSC.org. Archived from the original on May 4, 2014.

11. Percy Reboul, Rob Perree. (1997). *Bakelite: The material of a thousand uses (Advertisement)*. USA: Snoeck-Ducaju & Zoon.
12. Meikle, Jeffrey L. (1995). *American Plastic: A Cultural History*. New Brunswick, NJ: Rutgers University Press.

Ngày nhận bài: 22/1/2022

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 25/2/2022

Ngày chấp nhận đăng bài: 15/3/2022

Thông tin tác giả:

1. HUỲNH THÀNH CÔNG^{1(*)}

2. NGUYỄN THỊ THU THẢO¹

3. ĐOÀN NGỌC GIANG¹

4. HUỲNH HOÀNG HẠNH¹

5. TRƯƠNG THANH NGỌC¹

¹**Viện Khoa học vật liệu ứng dụng - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam**

SYNTHESIZING BAKELITE RESIN FROM CASHEW NUT SHELL LIQUID APPLIED TO THE SURFACE OF SHEET MOLDING COMPOUND (SMC)

- HUYNH THANH CONG¹
- NGUYEN THI THU THAO¹
- DOAN NGOC GIANG¹
- HUYNH HOANG HANH¹
- TRUONG THANH NGOC¹

¹Institute of Applied Materials Science
Vietnam Academy of Science and Technology

ABSTRACT:

This study examines the process of synthesizing bakelite resin from cashew nut shell liquid applied to the surface of sheet molding compound (SMC). This study's results show that the synthetic Bakelite material has a high thermal stability up to 425.39°C. This thermal stability was determined by the differential heat method. In addition, when the synthetic Bakelite material was coated on the surface of SMC with an appropriate ratio (3%), a material with low abrasion (low mass loss) was obtained. It demonstrates the effectiveness of synthetic Bakelite materials made from cashew nut shell liquid.

Keywords: cashew nut shell liquid, bakelite, SMC, composite.

THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP VÀ ỨNG DỤNG PHÂN TÍCH ĐỘC TỐ ACRYLAMIDE TRONG MẪU CÀ PHÊ BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC-MS/MS

● NGUYỄN THỊ BÍCH PHƯƠNG - VÕ THỊ MỘNG TRINH - LÊ ĐÌNH VŨ*

TÓM TẮT:

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép 2 lần khối phổ (HPLC-MS/MS) đã được thẩm định và áp dụng để phân tích hàm lượng độc tố acrylamide trong mẫu cà phê. Dưới điều kiện tối ưu của thực nghiệm, khoảng tuyến tính phân tích acrylamide từ 100-1000 $\mu\text{g/L}$ với giới hạn phát hiện của phương pháp đạt 30 $\mu\text{g/L}$. Hiệu suất thu hồi đạt từ 87,1 % tới 99,4%. Ở các mức nồng độ khác nhau của acrylamide, độ lặp lại của phương pháp cao thể hiện qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) từ sáu lần thí nghiệm lặp lại nhỏ hơn 3,54 %. Phương pháp được áp dụng để phân tích một số mẫu cà phê hạt rang trên thị trường Thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả thu được cho thấy, có 74,19% số mẫu cà phê chứa acrylamide với nồng độ từ 97,33-560,48 $\mu\text{g/kg}$, trong đó số mẫu vượt ngưỡng tối đa cho phép chiếm 19,35%. Kết quả còn cho thấy mức độ ô nhiễm acrylamide của cà phê có mức độ rang đậm cao hơn nhiều so với rang vừa. 100% các mẫu cà phê với mức độ rang đậm đều phát hiện acrylamide với 35,71% số mẫu vượt quá ngưỡng tối đa cho phép. Điều này cho thấy mức độ ô nhiễm acrylamide trong cà phê rang xay trên thị trường là đáng báo động và cần có các biện pháp kiểm soát an toàn vệ sinh thực phẩm đối với cà phê.

Từ khóa: acrylamide, coffee, độc tố, HPLC-MS/MS.

1. Đặt vấn đề

Acrylamide là một độc tố có khả năng gây ung thư và ức chế thần kinh^[1]. Acrylamide là nguyên liệu chính để tạo ra các polymer và copolymer được sử dụng nhiều trong công nghiệp như sản xuất giấy, thuốc nhuộm, chất dẻo, xử lý nước thải và nước sinh hoạt. Trong thực phẩm, acrylamide được tìm thấy với các mức độ ô nhiễm khác nhau tùy thuộc vào chủng loại, phương pháp chế biến, thời gian và nhiệt độ của quá trình chế biến. Các thực phẩm có chứa hàm lượng đường khử và axit amin khi chế biến ở nhiệt độ trên 120°C, như chiên, nướng hay rang thường sinh ra độc tố acrylamide theo cơ chế của phản ứng

Maillard^[2,3]. Do vậy, độc tố acrylamide thường có mặt trong các sản phẩm cà phê.

Theo báo cáo của FAO và WHO, acrylamide cũng được phát hiện trong các sản phẩm ca cao và cà phê ở mức lên đến 909 - 4948 $\mu\text{g/kg}$ ^[4,7]. Một báo cáo khác của EFSA, hàm lượng acrylamide được tìm thấy ở mức cao nhất trong cà phê hòa tan với hàm lượng trung bình khoảng 1499 $\mu\text{g/kg}$ và đối với cà phê hạt rang là 522 $\mu\text{g/kg}$ ^[5,6]. Ở Việt Nam, hiện chưa có số liệu thống kê về mức ô nhiễm độc tố acrylamide trong thực phẩm nói chung và sản phẩm cà phê nói riêng. Việc đánh giá hàm lượng độc tố acrylamide trong sản phẩm cà phê trên thị trường cung cấp dữ liệu quan trọng trong lĩnh vực

an toàn thực phẩm, từ đó có thể đưa ra cảnh báo về đảm bảo chất lượng, an toàn vệ sinh thực phẩm và sức khỏe người tiêu dùng.

Có nhiều phương pháp phân tích được đề xuất và ứng dụng phân tích hàm lượng acrylamide trong thực phẩm nói chung và cà phê nói riêng. Phương pháp phân tích đầu tiên được sử dụng để phân tích acrylamide trong thức ăn chăn nuôi dựa trên sự tạo dẫn xuất của acrylamide bằng cách brom hóa [6,8]. Sau đó có nhiều kỹ thuật phân tích được phát triển để khắc phục những khó khăn trong quá trình tạo dẫn xuất và ứng dụng được trên nhiều nền mẫu hơn. Hiện nay, phương pháp phân tích acrylamide trong các sản phẩm thực phẩm ở phần lớn các phòng thí nghiệm là sử dụng sắc ký lỏng hoặc sắc ký khí ghép khối phổ để phân tích acrylamide với ưu điểm cho độ chính xác cao mà không cần phải tạo dẫn xuất trong quy trình phân tích [7,9]. Do đặc thù phức tạp của nền mẫu cà phê rang, ở Việt Nam hiện chưa có khuyến nghị chính thức về phương pháp áp dụng để định lượng acrylamide trong cà phê cũng như các nền mẫu thực phẩm khác. Những nỗ lực về tiêu chuẩn hóa các phương pháp được sử dụng để phát hiện và định lượng acrylamide trong các nền mẫu khác nhau vẫn đang được tiếp tục nghiên cứu nhằm đáp ứng các đợt thử nghiệm thành thạo trên chất chuẩn tham chiếu, từ đó đánh giá độ chính xác kết quả phân tích và xác nhận phương pháp acrylamide đạt công nhận theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025 [8,10]. Mục tiêu của nghiên cứu này là cải tiến và thẩm định một phương pháp HPLC-MS/MS có độ nhạy cao xác định hàm lượng độc tố acrylamide trong mẫu cà phê, từ đó áp dụng phân tích acrylamide trong các mẫu thực. Bằng cách sử dụng tích hợp nhiều kỹ thuật tách chiết nhằm loại bỏ các tạp chất và làm giàu mẫu trong quy trình phân tích đảm bảo độ nhạy cao của phép phân tích. Bên cạnh đó, phương pháp sử dụng chất nội chuẩn là đồng phân chứa đồng vị deuterium (acrylamide-d₃) với 2 lần khối phổ, phương pháp này hứa hẹn tính đặc hiệu và độ chính xác cao khi định lượng hàm lượng của acrylamide trong cà phê.

2. Thực nghiệm

2.1. Hóa chất và thiết bị

Tất cả các hóa chất được sử dụng trong đề tài này đều đạt độ tinh khiết dùng trong Hóa phân tích (PA). Acrylamide (AA) ($\geq 99\%$) của Sigma-Aldrich. Nội chuẩn acrylamide-d₃ (AAD₃) ($\geq 99\%$) của TRC. Acetonitrile, methanol, ethyl acetate,

acid formic mua từ hãng Merck (Merck, Darmstadt, Germany). Potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate (độ tinh khiết $\geq 99\%$) và zinc sulfate heptahydrate solution (độ tinh khiết $\geq 99\%$) của Sigma-Aldrich. Cột Bond elut C18 (500mg/6 mL) của Agilent. Tất cả các dung dịch được pha trong nước siêu tinh khiết (có điện trở $>18,3 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) được cất bộ cất nước Millipore Milli Q system (Billerica, MA, USA). Dung dịch chuẩn, nội chuẩn và chuẩn làm việc (100 mg/L) được pha từ chuẩn gốc có nồng độ 1000 mg/L. Những dung dịch này được lưu trữ ở 4°C và được sử dụng trong 3 tháng.

2.2. Phương pháp xử lý mẫu và phân tích mẫu cà phê bằng UPLC-MS/MS

Mẫu được xử lý theo các quy trình đã công bố trước đây [9, 10, 11, 12] với một số thay đổi như được mô tả sau đây: Mẫu cà phê được nghiền mịn có kích thước hạt nhỏ hơn 1 mm để nâng cao năng suất chiết. Đồng nhất và cân chính xác 1g mẫu nghiền cho vào ống ly tâm dung tích 50 mL, thêm 0.1 mL nội chuẩn 5ppm, thêm tiếp 10 mL nước cất. Đánh siêu âm và lắc 30 phút, sau đó thêm tiếp 1 mL dung dịch Carrez I (10,6g Potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate định mức thành 100 mL bằng nước cất) và 1 mL dung dịch Carrez II (21,9 g Zinc sulfate heptahydrate định mức thành 100 mL bằng nước cất) để kết tủa protein. Ly tâm hỗn hợp với tốc độ 8000 vòng/phút trong 5 phút ở 20°C, sau đó lọc qua giấy lọc phần dung dịch để loại bỏ tủa protein. Thêm 10 mL ethyl acetate vào phần dung dịch lọc thu được, lắc trong 30 phút và tiếp tục ly tâm với tốc độ 8000 vòng/phút trong 5 phút ở 20°C. Thực hiện lặp lại thêm 10 mL ethyl acetate 1 lần đối với phần dung dịch sau khi gạn bỏ chất rắn để loại bỏ hoàn toàn tạp chất rắn. Thổi khô phần dung dịch chiết bằng dòng khí nitơ đến khi còn lại khoảng 2 mL. Tiếp tục làm sạch dịch chiết bằng cách chạy qua cột C18 đã được hoạt hóa bằng 6 mL ethyl acetate, 6 mL MeOH và 6 mL nước cất khử ion. Thu hồi dung dịch sau khi qua cột vào ống thủy tinh 20 mL và thổi khô dung môi dưới dòng khí nitơ, sau đó hòa tan các chất còn lại bằng 1 mL dung môi ACN/HCOOH 0,2% (1/1, v/v). Dung dịch cuối cùng được phân tích bằng hệ thống HPLC-MS/MS dưới các điều kiện tối ưu được trình bày như trong Bảng 1.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tính đặc hiệu của phương pháp

Độ chính xác của phương pháp phân tích acrylamide trong mẫu cà phê được đánh giá qua

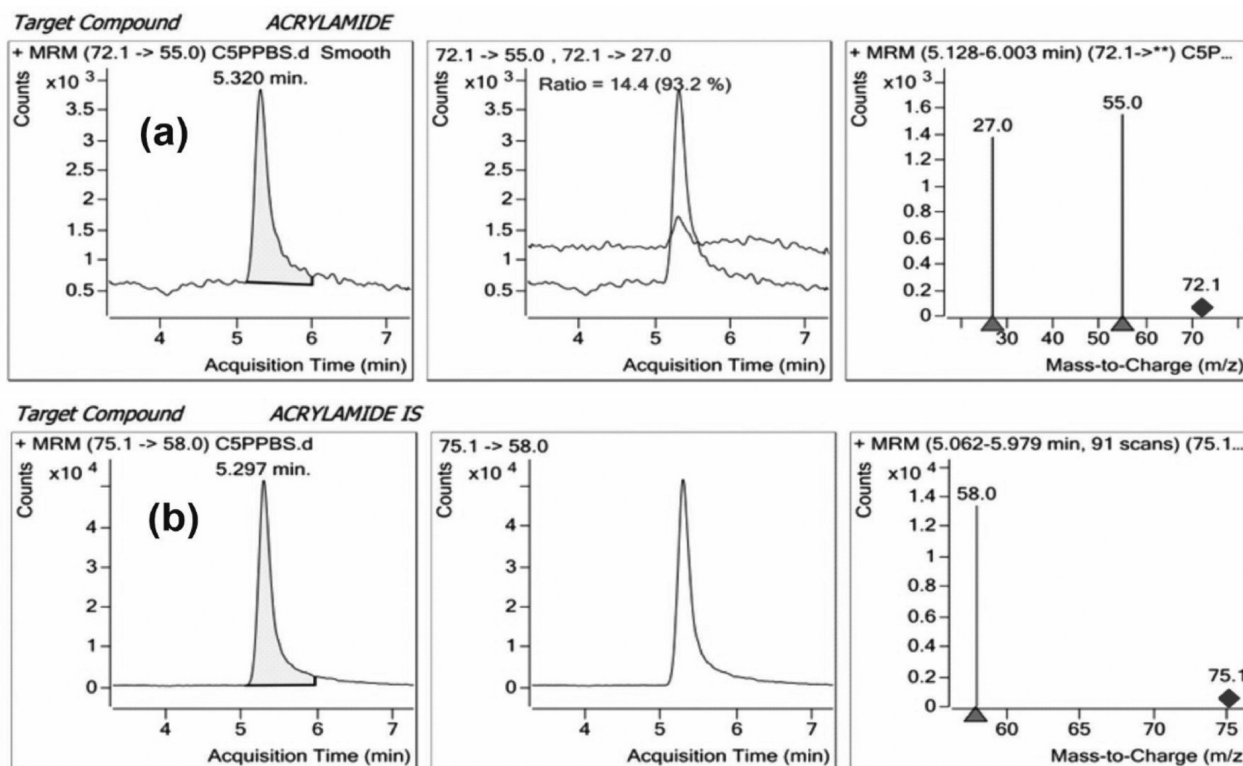
Bảng 1. Thông số vận hành của hệ thống HPLC-MS/MS phân tích acrylamide trong mẫu cà phê

Thông số	
HPLC- Agilent 1290 Infinity	
Cột tách	Cột Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,8 μm) và inest sustaint C18 (50mm x 50 mm, 4,6 μm)
Nhiệt độ tách	30°C
Tốc độ dòng	0,4 mL / min
Pha động	Nước cất chứa 0,1% formic acid (A), methanol (B)
Chương trình dung môi (%B, min)	initial, 20%; 100%; 3 phút, 100%; 6 phút, 80%; 9 phút
Thể tích mẫu tiêm	2 μL
MS- Agilent 6490 Triple Quad	
Capillary (Vcap)	3500 V (Positive)
Nhiệt độ khí mang	350°C
Tốc độ khí mang	He, 11 L/min
Nebulizer	35 psi
Thế Nozzle	1500 V (Positive)
Thế RF	110-200 V (Positive)

các thông số như tính đặc hiệu, độ tuyến tính, giới hạn phát hiện, độ đúng và độ lặp theo hướng dẫn được quy định trong các tài liệu ISO 17025: 2017, EC/657/2002, AOAC 2016, SANTE/11945/2015 [8, 11-13]. Phổ sắc ký được khảo sát ở chế độ MRM với tín hiệu mảnh phổ thứ cấp (ion con) của acrylamide và acrylamide-d3 lần lượt là 55 và 58. Tín hiệu các mảnh ion thứ cấp này có tín hiệu cao nhất và được dùng để định lượng acrylamide và acrylamide-d3 được thể hiện trong Hình 1.

Mảnh ion thứ cấp dùng để xác nhận tính đặc hiệu của acrylamide là mảnh ion 27 với tỷ lệ tín hiệu của mảnh định tính (27) trên mảnh định lượng (58) là 14,4%. Thông tin về mảnh các mảnh ion thứ cấp và năng lượng của quá trình phân mảnh được trình bày trong Bảng 2.

Tính đặc hiệu của phương pháp được xác định bằng cách phân tích

Hình 1: Mảnh phổ ion thứ cấp trong khối phổ của acrylamide (a) và chất nội chuẩn acrylamide-d3 (b).

Bảng 2. Thông số vận hành của hệ thống HPLC-MS/MS phân tích acrylamide trong mẫu cà phê

Chất phân tích	Dwell (ms)	Fragmentor (V)	Ion sơ cấp (m/z)	Chuyển MRM (m/z)	CE (V)	CAV (V)
AA	100	60	72,1	72,1 > 55	9	7
AA	100	60	72,1	72,1 > 27	17	7
AAD3	100	60	75,1	75,1 > 58	5	7

mẫu trắng và các mẫu thêm chuẩn ở nồng độ 100 µg/kg. Tín hiệu các ion thứ cấp tương ứng thu được cho thấy sự thay đổi rất rõ ràng khi có và không có chất chuẩn (Hình 2).

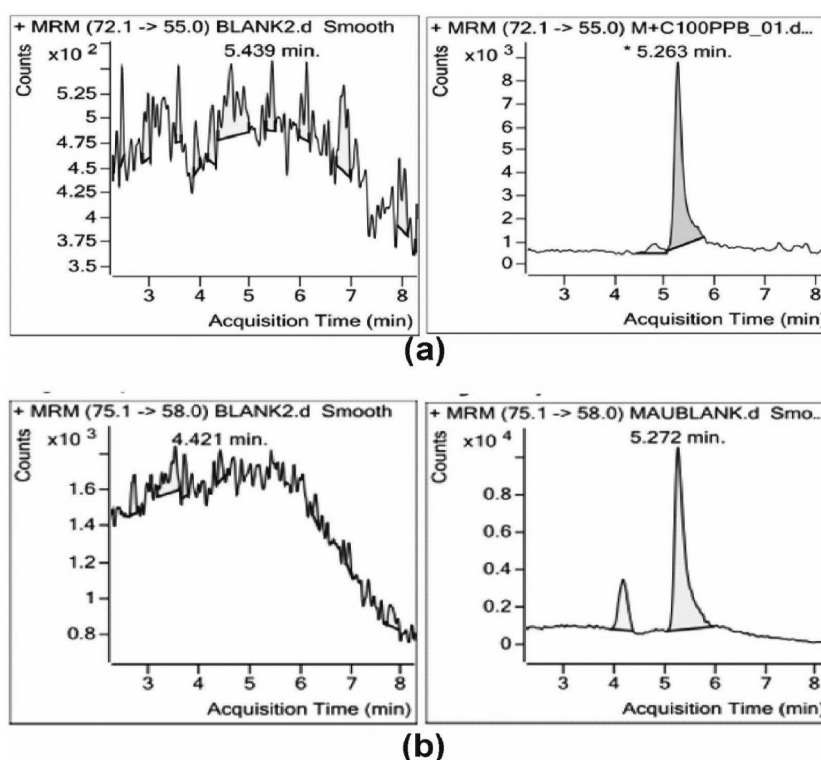
Như kết quả thu được trong Hình 2, mẫu trắng không cho tín hiệu tại thời gian $t = 5,26$ phút đối với mảnh ion 55 trong khi tín hiệu này thu được peak đơn rõ ràng với tại thời gian lưu này đối với mẫu trắng thêm chuẩn acrylamide (Hình 2a). Kết quả tương tự thu được đối với chất nội chuẩn acrylamide-d3, sự khác biệt là rõ ràng giữa mẫu trắng và mẫu thêm chuẩn khi bắt tín hiệu cho mảnh ion thứ cấp có khối lượng 58 (Hình 2b). Những kết quả thu được trên đây chứng tỏ một cách chắc chắn về tính đặc hiệu cao trong phép định lượng acrylamide trong cà phê bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ.

3.2. Giới hạn phát hiện và khoảng nồng độ tuyến tính định lượng acrylamide trong mẫu cà phê

Giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL) được xác định bằng cách phân tích lặp lại 6 lần mẫu trắng thêm chuẩn ở nồng độ thấp khi còn xuất hiện tín hiệu của chất phân tích với tỷ lệ tín hiệu chia trên nhiễu nền $S/N = 3$ [13]. Kết quả thí nghiệm thực tế (Hình 3), giới hạn phát hiện của acrylamide là $MDL = 30 \mu\text{g/kg}$ và $MQL = 100 \mu\text{g/kg}$

Kiểm tra hiệu suất thu hồi tại giá trị của giới hạn định lượng phương pháp (MQL) trong xác định acrylamide trong mẫu cà phê, kết quả thu được hiệu suất thu hồi tại MQL cho kết quả từ 87,1-97,8% với độ tái lặp $RSDr \leq 3,53\%$, chứng tỏ giá trị MQL thu được là tin cậy đối với phép phân tích định lượng (theo AOAC 2016) [11].

Hình 2: Khối phổ trong xác định độ đặc hiệu của phương pháp: (a) Tín hiệu mảnh phổ 55 của mẫu trắng (trái) và mẫu trắng thêm 100 µg/kg acrylamide (phải); (b) Tín hiệu mảnh phổ 58 của mẫu trắng (trái) và mẫu trắng thêm 100 µg/kg acrylamide-d3 (phải)

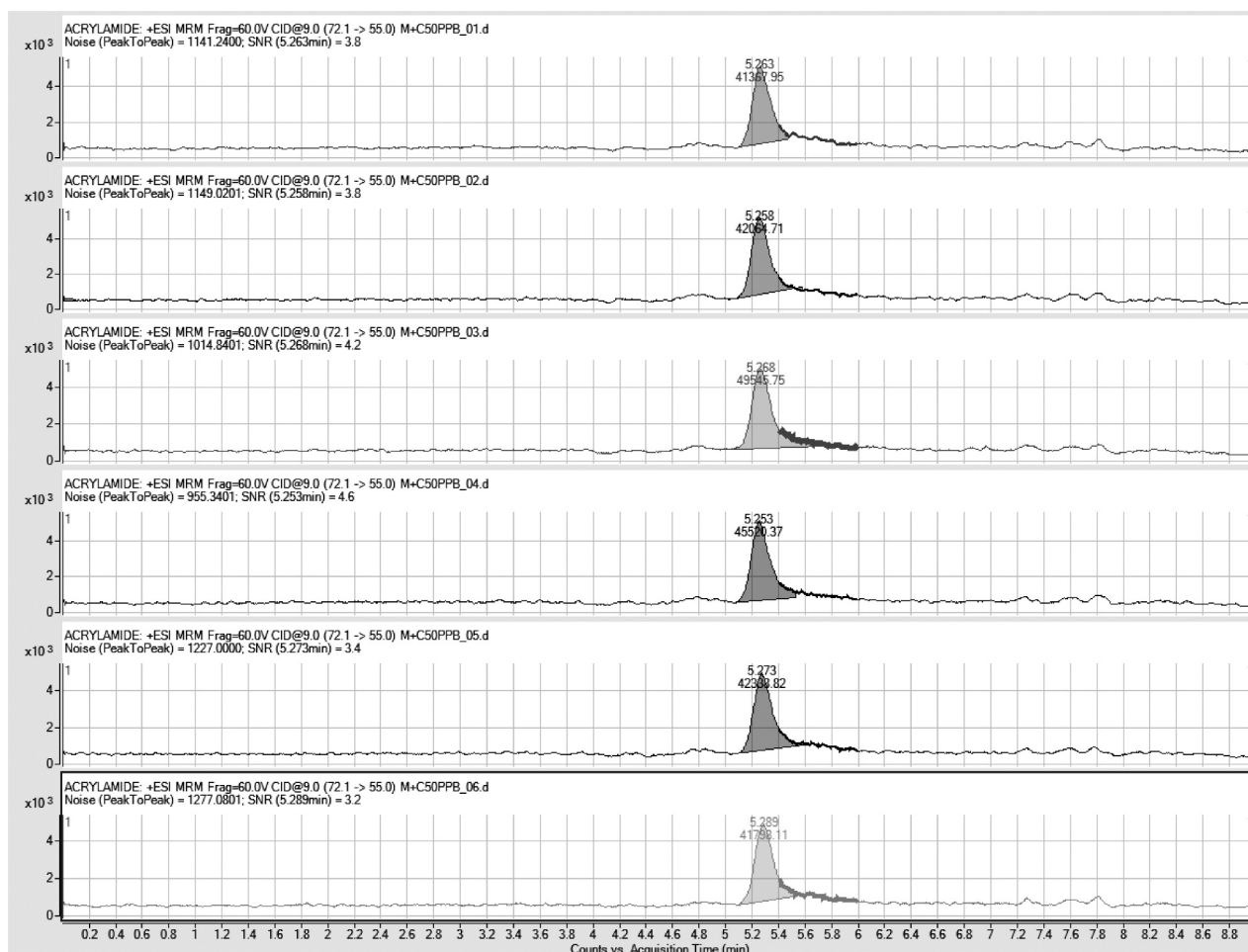


Khoảng tuyến tính dùng để định lượng độc tố acrylamide trong mẫu cà phê được khảo sát dựa trên phương pháp nội chuẩn. Phương trình hồi quy được xây dựng là tương quan giữa tỷ lệ diện tích peak của acrylamide so với diện tích peak của chất nội chuẩn acrylamide-d3 với tỷ lệ nồng độ tương ứng. Kết quả thu được về khoảng tuyến tính 100 đến 1000 µg/kg với hệ số tương quan (R^2) là 0,999.

3.3. Hiệu suất thu hồi, độ lặp và độ tái lặp của phương pháp

Độ thu hồi và độ lặp lại của phương pháp được xác nhận dựa trên phân tích các mẫu thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ thấp, trung bình và cao. Hiệu suất thu hồi ở các mức nồng độ 100, 400, 800 µg/kg

Hình 3: Tín hiệu của mảnh ion thứ cấp 55 trong xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp



tương ứng thu được là 87,1, 94,9 và 95,4% (Bảng 3).

Hiệu suất thu hồi cho tất cả các mức nồng độ thu được cho giá trị từ 87,1-99,4%, các giá trị này đáp ứng tốt đối với quy định của một phương pháp định lượng tương ứng với khoảng nồng độ từ 100 µg/kg-1000 µg/kg (80-110%). Độ lặp lại của phương pháp được xác định khi phân tích lặp sáu trên ba mẫu trắng thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ 100, 400, 800 µg/kg. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) quan sát được tương ứng là 3,45%, 1,11%, 1,57%. Kết quả thu được tốt hơn nhiều so với quy định của AOAC 2016 ($RSD \leq 11\%$).

3.4. Ứng dụng phương pháp trên phân tích mẫu thật

Phương pháp được ứng dụng để phân tích 31 mẫu cà phê thực tế. Các mẫu cà phê rang xay được lấy mẫu thành 2 nhóm với mức độ rang vừa phải và

Bảng 3. Kết quả khảo sát hiệu suất thu hồi, độ lặp lại, độ tái lập của phân tích acrylamide trong cà phê

Nồng độ thêm chuẩn	H (%)	RSDr (%) (n=6)	RSDR (%) (n=12)
100 µg/kg	87,1-97,8	3,45	3,54
400 µg/kg	94,9-98,6	1,11	1,21
800 µg/kg	95,4-99,4	1,57	1,70

rang đậm để đánh giá mức độ hình thành acrylamide theo mức độ rang. Các mẫu này được mua trên thị trường với các nhà sản xuất khác nhau được đóng gói đúng quy cách sản phẩm có thông tin như loại cà phê rang, mức rang, kiểu sơ chế từ nhà sản xuất.

Kết quả phân tích thu được cho thấy 23/31 mẫu (74,19%) có chứa acrylamide với nồng độ từ 97,33-560,48 µg/kg trong đó 6/31 mẫu vượt

ngưỡng tối đa cho phép ($\leq 400 \mu\text{g/kg}$) chiếm 19,35%. Số mẫu phát hiện acrylamide đối với cà phê rang vừa là 9/17 mẫu chiếm 52,94%, trong đó chỉ có 1/17 mẫu vượt ngưỡng tối đa cho phép chiếm 5,88 %. 100% các mẫu cà phê với mức độ rang đậm (14/14) đều phát hiện acrylamide với 35,71% số mẫu vượt quá ngưỡng tối đa cho phép. Điều này cho thấy mức độ rang ảnh hưởng trực tiếp đến hàm lượng độc tố acrylamide trong cà phê.

4. Kết luận

Phương pháp phân tích định lượng có độ chính xác cao đã được thẩm định và ứng dụng để phân tích acrylamide trong các mẫu cà phê bằng

HPLC-MS/MS với chất nội chuẩn là đồng phân deuterium hóa của acrylamide. Đường hiệu chuẩn thu được trong khoảng định lượng rộng từ 100-1000 $\mu\text{g/kg}$ có hệ số tương quan rất cao ($R^2 = 0,999$) với giới hạn phát hiện phương pháp 30 $\mu\text{g/kg}$. Những thông số này cho phép phương pháp ứng dụng trong phạm vi nồng độ rộng và độ nhạy cao. Độ đúng và độ tái lặp của phương pháp tốt hơn nhiều so với yêu cầu cần thiết đối với một phương pháp định lượng ở nồng độ ppb. Phương pháp đã được ứng dụng để phân tích acrylamide trong các mẫu thực tế và có thể áp dụng trong nghiên cứu, đánh giá chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm đối với các sản phẩm cà phê ■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. International Agency for Research on Cancer (IARC). (1994). Acrylamide, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some industrial chemicals. Lyon: IARC Vol. 60, pp. 389–433. Available: <https://inchem.org/documents/iarc/vol60/m60-11.ht mL>.
2. M Muzaiifa, D, et al., (2021, June) Composition of amino acids and fatty acids on Luwak coffee processing, *Food Research*, 5(3), pp 60 - 64. Available: [https://doi.org/10.26656/fr.2017.5\(3\).637](https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(3).637).
3. Sune Eriksson. (2005). Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology. Doctoral Thesis, Department of Environmental Chemistry Stockholm University SE-106 91 Stockholm, Sweden, Available: <https://www.divaportal.org/smash/get/diva2:197454/FULLTEXT01.pdf>.
4. Food and Agriculture Organization / World Health Organization of the United Nations. Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on food additives and contaminants; Discussion paper on acrylamide. CX/FAC 06/38/35. Available: <https://www.fda.gov/media/78056/download>.
5. EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA J.* 13, 4104. Available: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4104>.
6. Tareke, E., et al. (2002, July). Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50(No. 17). Available: <https://doi.org/10.1021/jf020302f>.
7. Clarke, D., et al., (2002, Nov). Assessment of performance of laboratories in determining acrylamide in crisp brea. *Journal of AOAC International*, Vol.85(No.6), pp.1370-1373. Availble: DOI: 10.1093/jaoac/85.6.1370.
8. International Standard. (2017). *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. ISO/IEC 17025.
9. Thierry Delatour, Adrienne Perisset, Till Goldmann, Sonja Riediker and Richard H. Stadler. (2004). Improved sample preparation to determine Acrylamide in difficult matrixes such as chocolate powder, cocoa, and coffee by liquid chromatography tandem mass spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52(No. 15), pp 4625-4631. Available: <https://doi.org/10.1021/jf0498362>.
10. EN 16618.(2015). *Food Analysis Determination of Acrylamide in Food by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS)*. Brussel, Belgium: Comite Europeen de Normalisation.
11. European Commission. (2002). Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. (2002/657/EC). *Official Journal of the European Communities*, L221, 8-36.
12. AOAC International. (2016). Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. *Journal of AOAC International*.

13. Tuija Pihlström, et. al. (2015). *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed European Commission*. SANTE/11945/2015.

Ngày nhận bài: 15/1/2022

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 15/2/2022

Ngày chấp nhận đăng bài: 25/2/2022

Thông tin tác giả:

1. NGUYỄN THỊ BÍCH PHƯƠNG

Trung tâm Dịch vụ phân tích thí nghiệm Thành phố Hồ Chí Minh, CASE

2. VÕ THỊ MỘNG TRINH

Trung tâm Dịch vụ phân tích thí nghiệm Thành phố Hồ Chí Minh, CASE

3. LÊ ĐÌNH VŨ

Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

VALIDATING AND USING THE HPLC-MS/MS METHOD TO DETERMINE ACRYLAMIDE IN COFFEE

● BSc. **NGUYEN THI BICH PHUONG**¹

● BSc. **VO THI MONG TRINH**¹

● Dr. **LE DINH VU**²

¹Forensic medicine centre of Ho Chi Minh City, CASE

²Industrial University of Ho Chi Minh City

ABSTRACT:

In this study, the liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method was validated and applied to determine acrylamide in the coffee sample. Under the optimal experimental conditions, the linear ranged from 1000 µg/L to 1000 µg/L with the method detection limit (MDL) of 30 µg/L and the method recovery was from 87.1 % tới 99.4%. The relative standard deviations (RSD) for six repetitive experiments are lower than 3.54 % at different acrylamide concentrations. These merits show that the method is well adapted for quantitative analysis at trace concentration. This method was used to analyze some coffee samples collected from Ho Chi Minh City. Results showed that 74.19% of samples were presented with acrylamide in the concentration range from 97.33 to 560.48 µg/kg. 19.35% of samples were over the maximum permission level of acrylamide in coffee. The observation also showed that the deeper roasted coffee samples resulted in a higher contamination level of acrylamide. 100% of sample coffee with deep roasted were detected acrylamide, and 35.71% of samples exceeded the maximum permission level. This study shows that acrylamide contamination in roasted coffee is severe and it is an urgent task to control the food safety of coffee.

Keywords: acrylamide, coffee, toxicology, HPLC-MS/MS.

TÍNH CHẤT CHỨC NĂNG VÀ CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CỦA HMO

● MÃ BÍCH NHƯ

TÓM TẮT:

Sữa mẹ là nguồn dinh dưỡng tốt nhất để đảm bảo sức khỏe cho trẻ sơ sinh vì có đầy đủ dinh dưỡng cũng như tất cả các thành phần hoạt tính sinh học cần thiết cho sự phát triển tối ưu trong những tháng đầu đời. Sữa mẹ chủ yếu bao gồm nước, lactose, lipid và protein sữa, trong đó đặc biệt giàu carbohydrate phức tạp, được gọi chung là oligosaccharides trong sữa mẹ (HMO). Bài viết nhằm trình bày về tính chất, chức năng của HMO và quy trình công nghệ để sản xuất HMO.

Từ khóa: HMOs, oligosaccharides trong sữa mẹ, carbohydrate phức tạp.

1. Giới thiệu về HMO và vai trò của HMO

Các oligosaccharide trong sữa mẹ (HMO) là loại đường phức hợp có tự nhiên trong sữa mẹ và cung cấp nhiều chức năng có lợi cho trẻ sơ sinh. Sữa mẹ chứa hơn 150 HMO khác biệt về cấu trúc, được chia thành 3 loại, như: trung tính fucosyl hóa, trung tính không fucosyl hóa và có tính acid hoặc sialyl hóa. Các HMO sialyl hóa và 2-fucosyllactose (2-FL) có tác động đến sự phát triển của não và năng lực học tập của trẻ. Các HMO khác không được acid hóa là chất nền ưu tiên cho các vi khuẩn *bifidobacteria* và HMO hoạt động như một nhử để ngăn chặn sự bám dính của các mầm bệnh vi rút hoặc vi khuẩn vào các thụ thể trên tế bào [1].

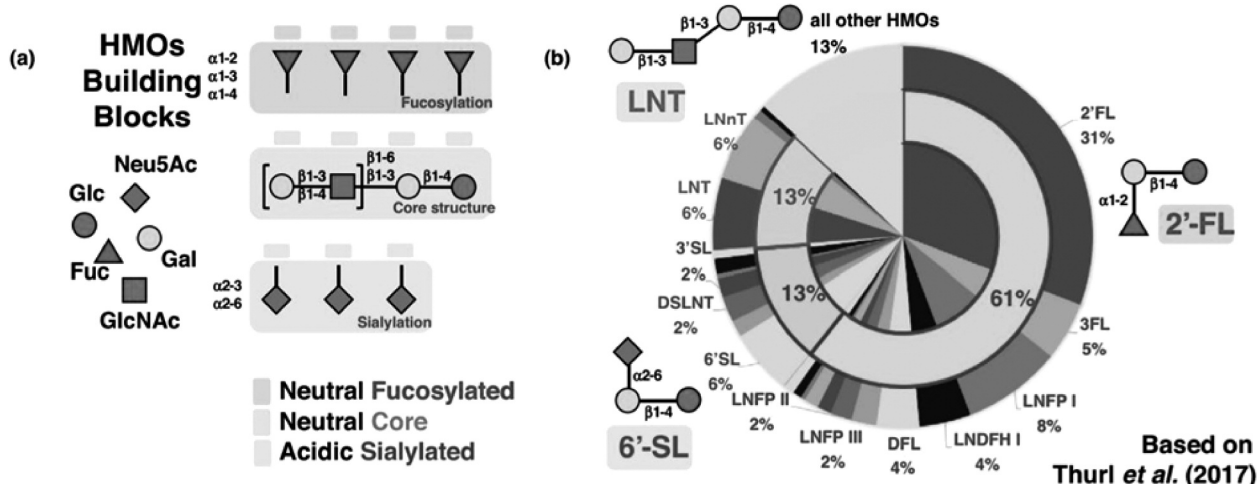
HMO chủ yếu được xây dựng từ 5 loại monosaccharide (Hình 1): D-glucose (Glc), D-galactose (Gal), N-acetylglucosamine (GlcNAc), L-fucose (Fuc), Acid sialic (N-acetylneuraminic acid; Neu5Ac). Biểu đồ của monosaccharide theo quy ước quốc tế công nhận và được biểu diễn như sau: HMO có chứa lactose (Galb 1-4Glc) gắn gốc fucose và/hoặc acid sialic [2]. Một phần lớn HMO được hình thành là do sự kéo dài của lactose theo

kiểu mạch thẳng hoặc phân nhánh bởi 2 loại disaccharide: lacto-N-biose (Galb1-3GlcNAc) (Loại I) hoặc N-acetyllactosamine (Galb1-4GlcNAc) (Loại II), các cấu trúc xương sống cốt lõi này được gắn với fucose và/hoặc acid sialic - vị trí fucosyl hóa thay đổi giữa các vị trí 2, 3 hoặc 4 trong khi sialyl hóa xảy ra ở vị trí 3 hoặc 6 [3]. Ngày nay, HMO được sản xuất thương mại ngày càng trở nên phổ biến, các chức năng của HMO khiến chúng trở nên có tiềm năng để cải thiện sức khỏe và giải quyết tình trạng chức năng của trẻ sơ sinh.

1.1. HMO là một prebiotic trong sữa mẹ

HMO đóng vai trò là chất nền trao đổi chất cho các vi khuẩn chuyên biệt như *Bifidobacterium longum subsp.* ở trẻ sơ sinh. Hệ quả là những vi khuẩn này có lợi thế sinh trưởng và phát triển mạnh. Các vi khuẩn khác không thể sử dụng HMO được do đó chúng không phát triển tốt hoặc ngừng phát triển. Nguyên nhân là để sử dụng được HMO, vi khuẩn đòi hỏi cần có một lượng lớn enzyme, chất vận chuyển và các phân tử khác. Một số nghiên cứu cho thấy, những HMO khác nhau được chuyển hóa bởi các vi khuẩn khác nhau.

Hình 1: (a) Cấu trúc chung và các kiểu liên kết trong HMO (b) Độ phong phú tương đối (biểu thị bằng tỷ lệ mol) của HMO trong sữa mẹ.



Nói cách khác, không phải tất cả HMO đều có những sự thay đổi giống nhau về thành phần hay hoạt động trong hệ vi sinh vật tiêu hóa. Các hiệu ứng tiền sinh học có thể là cấu trúc cụ thể và HMO là một nhóm glycan đa dạng về cấu trúc [4]. Sữa mẹ chứa glycoconjugates trong đó các cấu trúc carbohydrate phức tạp gắn ở đầu khử để tạo thành glycolipids, hoặc được gắn vào glycopeptides, glycoproteins, glycosaminoglycans và mucins. Các chất này đều là glycan [4]. Vì thành phần HMO khác nhau giữa các phụ nữ, nên người ta có thể đưa ra giả thuyết sữa của những phụ nữ khác nhau ảnh hưởng khác nhau đến hệ microbiome đường ruột của trẻ sơ sinh. Điều này cho thấy, ảnh hưởng đến kết quả sức khỏe ngắn hạn của trẻ sơ sinh, nhưng cũng có hậu quả lâu dài đối với tình trạng sức khỏe và nguy cơ gây bệnh sau này.

1.2. HMO đóng vai trò như chất chống dính

Nhiều mầm bệnh do virus, vi khuẩn hoặc ký sinh trùng đơn bào cần bám vào bề mặt tế bào biểu mô để sinh sôi nảy nở, trong một số trường hợp có thể xâm nhập và gây bệnh. Thông thường, chất gắn ban đầu là trên bề mặt tế bào biểu mô (glycans) còn được gọi là glycocalyx. Trong khi những glycan này được liên hợp với protein hoặc lipid và HMO giống với một số cấu trúc glycan và đóng vai trò như các thụ thể có thể hòa tan đứng ra trước (môi nhử) ngăn chặn sự liên kết của mầm bệnh với các tế bào biểu mô [1]. Các mầm bệnh không còn khả năng bám trên bề mặt tế bào được

nữa và sẽ bị rửa trôi ra ngoài mà không gây bệnh cho trẻ sơ sinh [5].

1.3. HMO hoạt động như chất chống vi khuẩn

HMO có thể bảo vệ trẻ sơ sinh khỏi các tác nhân gây bệnh bằng cách hoạt động như prebiotics cung cấp cho vi khuẩn có lợi một lợi thế phát triển và bằng cách đóng vai trò như chất chống ăn mòn ở phương diện tương tác giữa vi sinh vật và vật chủ [5]. Ngoài ra, HMO có thể có một cách trực tiếp hơn để kiểm soát mầm bệnh. Một số nghiên cứu đã đưa ra kết luận *Streptococcus agalacticae* không còn khả năng sinh sôi khi có HMO. Một ví dụ điển hình, GBS là một trong những tác nhân gây bệnh ở trẻ sơ sinh hàng đầu ảnh hưởng đến khoảng 1/2000 trẻ sơ sinh ở Mỹ [4]. GBS khu trú ở đường sinh dục cũng làm tăng xác suất nhiễm trùng đường tiết niệu (UTIs) ở phụ nữ mang thai.

Một số nghiên cứu khi đưa GBS sử dụng glycosyltransferase để kết hợp các HMO cụ thể vào màng tế bào của chúng, sau đó ngăn chặn sự tăng sinh GBS giống như một số kháng sinh bán trên thị trường. HMO không chỉ có thể bảo vệ khỏi các mầm bệnh do vi rút, vi khuẩn hoặc động vật nguyên sinh. Hầu hết các nghiên cứu gần đây cho thấy HMO cũng ảnh hưởng đến tương tác giữa nấm và vật chủ. Một thí dụ điển hình, *Candida albicans* là một loại nấm phổ biến ở ruột trẻ sơ sinh, gây ra phần lớn các bệnh nấm xâm nhập ở trẻ sinh non và có liên quan nhiều đến các rối loạn đường ruột, đe dọa tính mạng như viêm ruột hoại tử và thủng ruột

[6]. Điều trị bằng HMO làm giảm đáng kể sự xâm nhập của các tế bào biểu mô ruột non ở người (pIEC) của *C. albicans* theo cách phụ thuộc vào liều lượng.

1.4. HMO làm thay đổi phản ứng của biểu mô và tế bào miễn dịch

HMO có thể không chỉ tác động trực tiếp đến vi khuẩn mà còn gián tiếp bằng cách thay đổi phản ứng của tế bào chủ. Một số nghiên cứu đã đưa ra kết luận: “HMO có thể điều chỉnh quá trình chết rụng, tăng sinh và biệt hóa của tế bào biểu mô ruột” [6], [7], “HMO cũng được chứng minh là làm thay đổi biểu hiện gen của tế bào biểu mô ruột dẫn đến thay đổi glycocalyx bề mặt tế bào [7]. Do đó, HMO không chỉ ảnh hưởng đến sự gắn kết của vi khuẩn - vật chủ bằng cách đóng vai trò là các thụ thể hòa tan, mà còn thay đổi sự biểu hiện của các thụ thể glycocalyx bằng cách lập trình lại tế bào biểu mô.

2. Quy trình công nghệ sản xuất HMO

Ngày nay có nhiều phương pháp để sản xuất HMO. Tuy nhiên, phương pháp tổng hợp hóa học đang dần được chuyển sang sản xuất công nghệ sinh học do chúng giúp sản xuất số lượng lớn và giá cả phù hợp để bổ sung vào các sản phẩm thương mại như sữa bột và bột dinh dưỡng dành cho trẻ sơ sinh. Chính vì vậy, việc thiết kế và tối ưu hóa nhà máy sản xuất tế bào vi sinh vật và sản xuất HMO trong quá trình lên men công nghiệp đến quá trình tinh chế cần thiết để thu được sản phẩm cuối cùng đang rất được quan tâm. Các phương pháp sản xuất HMO như sau:

- Phân lập từ sữa mẹ để xác định cấu trúc và cho

các ứng dụng R&D cơ bản. Tuy nhiên, cách tiếp cận này không phù hợp để sản xuất HMO thương mại.

- Tổng hợp hóa học cho các chương trình tiền lâm sàng và lâm sàng để sản xuất 2-FL và lacto-N-neotetraose (LNnT) trên quy mô lớn. Tuy nhiên, phương pháp này có quy trình phức tạp, nguyên liệu thô bị hạn chế và có chi phí cao. Điều này đã làm cho quá trình tổng hợp hóa học HMO trở nên đắt đỏ đối với các ứng dụng sữa và dinh dưỡng.

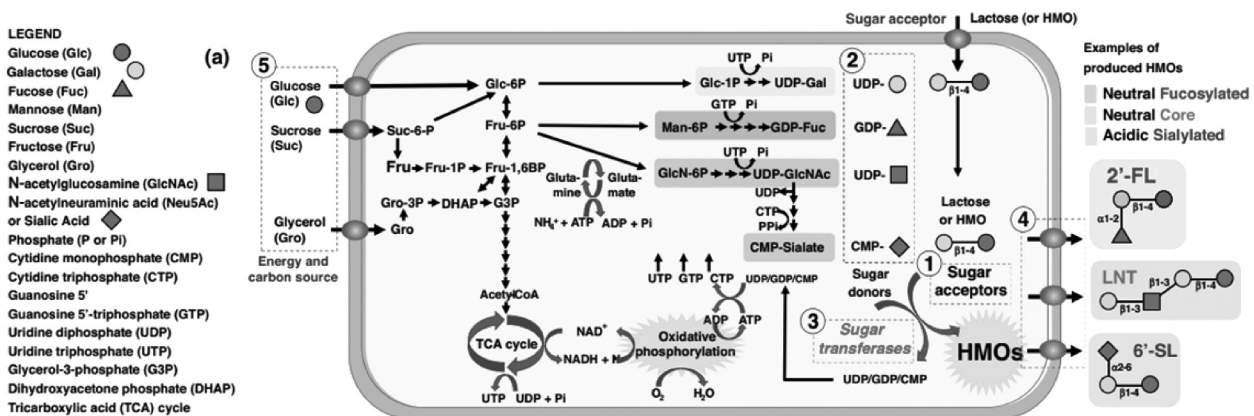
- Phương pháp sinh tổng hợp của tế bào vi sinh vật bằng cách ghép hai hoặc nhiều chất đồng nhất của tế bào khác nhau, do đó sản xuất thành công số lượng lớn hơn LNnT và oligosaccharide fucosyl hóa.

- Phương pháp tổng hợp chemoenzym, trong đó glycosyltransferase được biểu hiện tái tổ hợp và được sử dụng cùng với các chất nhận và cơ chất cho được kích hoạt nucleotide phù hợp. Nó đã được áp dụng để tạo ra các thư viện của HMOs cho mục đích nghiên cứu và đa dạng về cấu trúc. Tuy nhiên, tổng hợp hóa chất không thể cung cấp khối lượng thương mại của HMO phức tạp.

2.1. Quy trình sản xuất HMO từ *E. coli* [8]

Sản xuất HMO thông qua quá trình lên men vi sinh vật đã được chứng minh là một con đường khả thi vào cuối những năm 90. *Escherichia coli* là vi khuẩn được sử dụng phổ biến như một công cụ nghiên cứu, nhân bản và tính phù hợp rõ ràng nên được nghiên cứu để thực hiện sản xuất HMO trong thương mại. Dưới đây là sơ đồ vi khuẩn *E. coli* sản xuất HMOs 2-FL và difucosyllactose (DFL) từ sucrose và lactose. (Hình 2)

Hình 2: Sơ đồ vi khuẩn *E. coli* sản xuất HMOs 2-FL và difucosyllactose (DFL) từ sucrose và lactose



Nguồn: Tác giả tổng hợp

• Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp HMO từ vi sinh vật

+ Các nguyên liệu thô ở đầu vào được chuẩn bị và khử trùng ở quy mô công nghiệp. Sugar nguồn bổ sung ngoại sinh là lactose: sử dụng lactose như là cơ chất cho việc sản sinh HMO. Hiện nay, quá trình lên men để sản xuất HMO nhờ nguồn lactose từ bên ngoài cung cấp. Lactose bị phân cắt α -galactosidase được mã hóa bởi gen *lacZ* ở vi khuẩn *E.coli*, không sinh ra sản phẩm phụ difucosyllactose (DFL), tính ổn định cao.

+ Các yếu tố bên trong nội bào liên quan sự hoạt động của sugar-nucleotide donor. Các sugar-nucleotide donor, giúp vi sinh vật hấp thu hiệu quả lactose để sản xuất HMO.

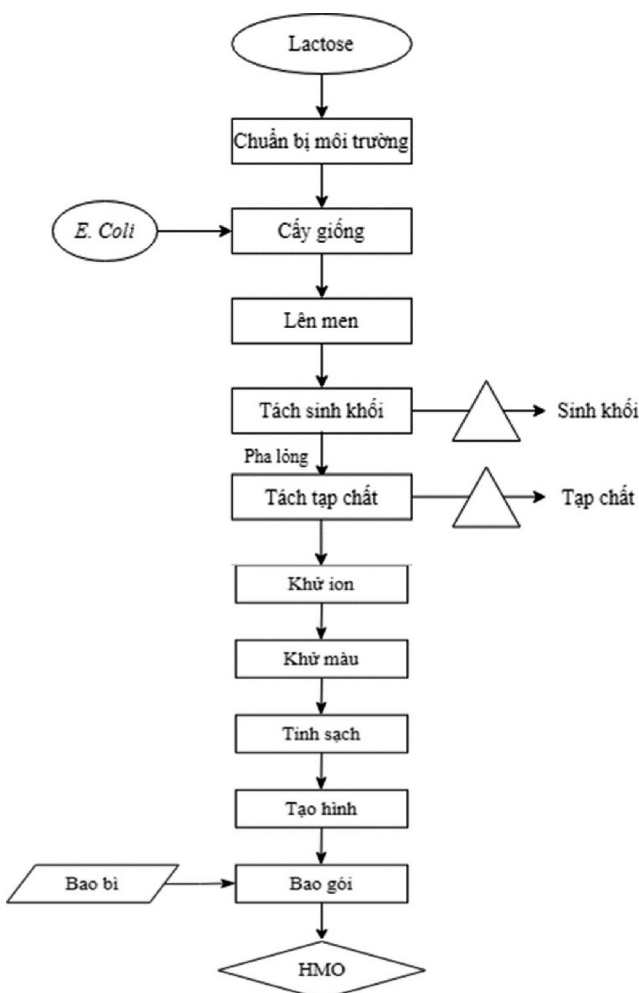
+ Hoạt động và tính đặc hiệu của sugar transferases. Những core enzymes của HMO là ở giai đoạn này. Chuyển từ sugar nucleotide thành lactose hoặc HMO. Những phản ứng được xúc tác bởi enzyme cho phép vi sinh vật tăng trưởng và sinh sản, duy trì cấu trúc bản thân và đáp ứng môi trường xung quanh.

+ Nguồn carbohydrate được thêm vào được chuẩn bị và khử trùng ở quy mô công nghiệp để tránh tạp nhiễm cho chủng vi sinh vật. Trong quá trình sản xuất HMO mỗi nguồn carbon có ưu nhược điểm riêng. Sucrose là lựa chọn tốt về giá, khả năng hòa tan, tính ổn định hóa học, tuy nhiên *E.coli* phải tái tạo lại con đường trao đổi chất. Glucose và glycerol dễ dàng chuyển hóa bởi *E. Coli* nhưng glucose tạo ra sản phẩm phụ không mong muốn trong quá trình khử trùng bằng nhiệt. Giá thành glycerol đắt so với glucose. Nguồn carbon đầu vào cũng phải đáp ứng sự phù hợp của chủng vi sinh vật, nguồn oxy bị vận chuyển trong quá trình lên men cũng gây bất lợi cho chuyển hóa kỵ khí. Ở giai đoạn này, năng lượng từ các hợp chất hữu cơ, glucose, fructose sau khi tham gia đường phân sẽ được chuyển hóa thành acetyl coA thông qua quá trình hiếu khí và đi vào chu trình acid citric, sản phẩm quan trọng của chu trình này là NADH được tạo thành NAD⁺ để tiếp tục sử dụng cho lần đường phân tiếp theo.

2.2. Sơ đồ khối (Hình 3)

Ở giai đoạn môi trường cần được tiệt trùng và hòa tan trực tiếp vào lactose, bởi lactose có độ hòa tan thấp và dễ bị đông hóa thành lactulose. Các thông số công nghệ như pH, nhiệt độ, nồng độ O₂,

Hình 3: Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất HMO từ *E.coli*



Nguồn: Tác giả tổng hợp

nồng độ cơ chất cho tối ưu vi sinh vật cần được quan tâm. Bước kế tiếp, quá trình lên men lactose để sản xuất ra HMO sử dụng *E.Coli*. *E.Coli* có thể đồng hóa lactose thông qua các enzyme lactose permease (*lac Y*) và β -galactosidase (*lacZ*), nhưng trong sản xuất HMO sự thủy phân nội bào của lactose thành glucose và galactose bởi β -galactosidase cần được giảm tối thiểu để đạt hiệu quả trong tổng hợp 2-FL và các HMO khác. Sự biểu hiện của transferase và kỹ thuật enzyme trong quá trình lên men là nhờ sự biểu hiện của transferase và kỹ thuật enzyme. Enzyme chuyển hóa các nucleotide đường thành 2-FL là α -1,2-fucosyltransferase *wcfB*. Enzyme cho tốc độ hình thành 2-FL cao và không sinh ra sản phẩm phụ difucosyllactose (DFL).

Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men như: tốc độ O_2 , nguồn carbon, độ pH, sự hình thành và tái đồng hóa các sản phẩm chuyển hóa, môi trường thay đổi nhanh, nồng độ cơ chất giảm nhanh, tính ổn định của vi sinh vật, tốc độ bổ sung nguồn carbon phải phù hợp với tính chất sinh lý của vi sinh vật, khả năng cung cấp O_2 của thiết bị lên men cần phải kiểm soát để tránh hiện tượng chuyển hóa ngược và lên men kỵ khí có hại, thành phần yếu tố vi lượng của môi trường giúp phân hủy các chất chuyển hóa gây ức chế như acid formic [9]. Bước tiếp theo, tách sinh khối và tạp chất. Tách sinh khối để thu pha lỏng và tách các cấu tử lơ lửng trong pha lỏng như protein, lipopolysaccharide, acid nucleic và các phân tử khác. Phương pháp sử dụng ở giai đoạn này là ly tâm, vi lọc, siêu lọc và lọc nano. Ngoài ra, cần loại bỏ ion ra khỏi pha lỏng bằng phương pháp điện phân và nhựa trao đổi ion. Khử màu sử dụng phương pháp thang hoạt tính và chất hấp phụ tổng hợp. Sau đó, tinh sạch sản phẩm bằng sử dụng phương pháp sắc ký và kết tinh. Tiếp theo, tạo hình sản phẩm, sử dụng các phương pháp như sấy, sấy phun và tạo hạt. Giai đoạn cuối cùng, là đóng gói và bảo quản sản phẩm.

3. Những thách thức trong sản xuất HMO hiện nay

Nhờ sự phát triển lĩnh vực công nghệ sinh học, kỹ thuật enzyme đã giải quyết được bài toán kinh tế trong việc sản xuất HMO, so sánh với phương pháp

tổng hợp bằng hóa học hoặc chemoenzymatic. Phương pháp lên men ít tốn kém và có thể mở rộng quy mô sản xuất HMO vì số lượng lớn bổ sung vào sữa công thức trẻ nhỏ. Tuy nhiên, trong quá trình sản xuất HMO thương mại, đòi hỏi phải xử lý nghiêm ngặt từ quá trình đầu vào của nguồn dinh dưỡng và quy trình tinh sạch HMO. Ngày nay, các HMO được sản xuất theo phương pháp hóa học và lên men như tổng hợp 2-FL, LNnT được sự giám sát của cơ quan thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ. Đặc điểm nổi bật của chế phẩm lên men vi sinh là tính khả thi của việc mở rộng về quy mô kinh tế và sản xuất với quy mô lớn. Mặc dù tinh sạch, nhưng HMO từ khối lượng lớn có thể sẽ thách thức nhà sản xuất nếu nồng độ HMO quá thấp. Vì vậy, năng suất HMO phải đạt được chỉ tiêu cao hơn, phù hợp sản xuất ở quy mô công nghiệp.

4. Kết luận

Những tiến bộ trong công nghệ sản xuất oligosaccharide, tách chiết và tinh sạch đã cung cấp cơ hội cho nghiên cứu lợi ích tiềm năng của HMO. Hỗn hợp HMO được phân tách từ sữa mẹ có công thức 2-FL và tổng hợp HMO bằng phương pháp lên men thông qua quá trình kỹ thuật sinh học đã tổng hợp và phân tách sản xuất HMO tương tự sữa mẹ, với quy mô lớn được sản xuất trong công nghiệp. Điều này đã mở đường cho việc phát triển các sản phẩm bổ sung có chứa 2-FL vào sản phẩm sữa công thức của trẻ nhỏ và cải thiện tình trạng dinh dưỡng cho trẻ sơ sinh ■

Lời cảm ơn:

Nghiên cứu được tài trợ bởi Tập đoàn Vingroup - Công ty Cổ phần và hỗ trợ bởi Chương trình học bổng Thạc sĩ, Tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn, mã số [VINIF.202.TS130. Mã Bích Như].

Tác giả trân trọng gửi lời cảm ơn đến Trường Đại học Văn Lang đã cung cấp ngân sách cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Goto, K., et al. (2010). Chemical characterization of oligosaccharides in the milk of six species of New and Old World monkeys. *Glycoconjugate Journal*, 27(7), 703-715.
2. Dotz, V., et al. (2014). ^{13}C -labeled oligosaccharides in breastfed infants' urine: individual-, structure- and time-dependent differences in the excretion. *Glycobiology*, 24(2), 185-194.
3. Fong, B., K. Ma, and P. McJarrow. (2011). Quantification of bovine milk oligosaccharides using liquid chromatography-selected reaction monitoring-mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(18): p. 9788-9795.

4. Newburg, D.S., G.M. Ruiz-Palacios, and A.L. Morrow. (2005). Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annual Review of Nutrition*, 25, 37-58.
5. Morrow, A.L., et al. (2005). Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *The Journal of Nutrition*, 135(5), 1304-1307.
6. Ross, S.A., et al. (2016). The role of oligosaccharides in host-microbial interactions for human health. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50, S131-S132.
7. Marcobal, A. and J. Sonnenburg. (2012). Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 12-15.
8. Pérez-Escalante, E., et al. (2020). Human milk oligosaccharides as bioactive compounds in infant formula: recent advances and trends in synthetic methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-34.
9. Baumgärtner, F., et al. (2013). Construction of *Escherichia coli* strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 1-13.

Ngày nhận bài: 25/1/2021

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 24/2/2022

Ngày chấp nhận đăng bài: 18/3/2022

Thông tin tác giả:

MÃ BÍCH NHƯ

**Khoa Công nghệ Ứng dụng, Trường Kỹ thuật và Công nghệ Văn Lang,
Trường Đại học Văn Lang**

FUNCTIONAL CHARACTERISTICS AND HMO PRODUCTION TECHNOLOGY

● **MA BICH NHU**

Faculty of Applied Technology, School of Engineering and Technology,
Van Lang University

ABSTRACT:

Breast milk is the best nourishment source for an infant because it provides full nutrition as well as all of the bioactive compounds needed for healthy growth throughout the first few months of life. Breast milk is primarily made up of water, lactose, lipids, and milk proteins, with a high concentration of complex carbohydrates known as human milk oligosaccharides (HMO). HMO serves a variety of biological functions in the body. This paper is to present the function of HMOs and the technological process to produce HMO in dairy products.

Keywords: HMO, human milk oligosaccharides, complex carbohydrates.