

Tối ưu hóa một số yếu tố công nghệ tiền xử lý bằng thủy phân enzyme pullulanase kết hợp quá trình thủy nhiệt để sản xuất tinh bột kháng tiêu hóa RS3 từ nguyên liệu bột gạo

Phạm Cao Thăng*, Phạm Anh Tuấn, Nguyễn Duy Lâm

Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch, 60 Trung Kinh, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 27/3/2024; ngày chuyển phân biên 29/3/2024; ngày nhận phân biên 19/4/2024; ngày chấp nhận đăng 24/4/2024

Tóm tắt:

Mục đích của nghiên cứu này là thực hiện đa yếu tố và tối ưu hóa một số yếu tố công nghệ tiền xử lý thủy phân bằng enzyme pullulanase kết hợp quá trình thủy nhiệt để tạo tinh bột kháng tiêu hóa RS3 (tinh bột kháng RS3) từ bột gạo giống lúa IR50404. Kế hoạch thực nghiệm đa yếu tố sử dụng mô hình quy hoạch của Box-Behnken với 3 biến độc lập tương ứng miền biến thiên: nồng độ enzyme pullulanase (1,5-2,5%); nhiệt độ thủy phân (52-58°C); thời gian thủy phân (8-12 giờ). Các hàm mục tiêu gồm: hàm lượng tinh bột kháng RS3 (%), hàm lượng đường khử (%) và độ hòa tan (%). Các thí nghiệm được tiến hành trong cùng điều kiện với các thông số đã được xác định từ các thực nghiệm đơn yếu tố: chuẩn bị dịch thủy phân enzyme với hàm lượng tinh bột gạo/nước 15% ở pH 5,5; chế độ thủy nhiệt sau quá trình thủy phân bằng enzyme với 3 chu kỳ xử lý nhiệt/làm nguội: hấp nhiệt (130°C, 60 phút) → làm nguội và thời gian lưu trữ (4°C, 18 giờ). Xử lý số liệu và tối ưu hóa bằng phần mềm Design - Expert 7.1 có sử dụng thuật toán hàm mong đợi với mong muốn hàm lượng tinh bột kháng RS3, hàm lượng đường khử và độ hòa tan đạt giá trị lớn nhất, tương ứng hệ số quan trọng 5/5, 4/5 và 4/5. Kết quả của nghiên cứu đã xác định được chế độ tiền xử lý bằng thủy phân enzyme tối ưu với nồng độ enzyme pullulanase 2,2% ở nhiệt độ 54,4°C trong thời gian 10,4 giờ, tương ứng hàm lượng tinh bột kháng RS3 đạt 47,58±0,22%, hàm lượng đường khử đạt 14,12±0,08% và độ hòa tan đạt 68,52±0,18% sau quá trình thủy nhiệt.

Từ khóa: enzyme pullulanase, thủy phân, tinh bột gạo IR50404, tinh bột kháng tiêu hóa RS3, tối ưu hóa.

Chỉ số phân loại: 2.8, 2.10

Optimisation of some technological factors of pretreatment by pullulanase enzymatic hydrolysis combined with hydrothermal process to produce resistant starch RS3 from rice flour ingredients

Cao Thang Pham*, Anh Tuan Pham, Duy Lam Nguyen

Vietnam Institute of Agricultural Engineering and Post Harvest Technology, 60 Trung Kinh Street, Trung Hoa Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 27 March 2024; revised 19 April 2024; accepted 24 April 2024

Abstract:

The purpose of the study was to conduct a multi-factor experiment and optimise some technological factors of pretreatment by pullulanase enzymatic hydrolysis combined with hydrothermal process to produce resistant starch (RS3) from rice flour of IR50404 paddy variety. The multi-factor experimental plan used the Box-Behnken planning model with 3 independent variables corresponding to the variation range: pullulanase enzyme concentration (1.5-2.5%); hydrolysis temperature (52-58°C), hydrolysis time (8-12 hours). The objective functions include: RS3-resistant starch content (%), reducing sugar content (%), and solubility (%). The experiments were conducted under the same conditions with the parameters determined from single-factor experiments: Prepare enzymatic hydrolysis solution with rice starch/water concentration of 15% at pH 5.5; hydrothermal mode includes 3 heat treatment/cooling cycles: autoclaving (130°C, 60 minutes) → cooling and storage time (4°C, 18 hours). Experimental data processing and optimisation used Design - Expert 7.1 software with expected function algorithm with the desire that the RS3-resistant starch content, reducing sugar content and solubility reach their maximum values, corresponding to the important coefficients of 5/5, 4/5, and 4/5. The results were the determination of the optimal enzymatic hydrolysis pretreatment regime with pullulanase enzyme concentration of 2.2%, hydrolysis temperature of 54.4°C for 10.4 hours, corresponding to RS3 resistant starch content reached 47.58±0.22%, reducing sugar content reached 14.12±0.08%, and solubility reached 68.52±0.18% after hydrothermal process.

Keywords: digestive resistant starch RS3, hydrolysis, optimisation, pullulanase enzyme, rice starch IR50404.

Classification numbers: 2.8, 2.10

*Tác giả liên hệ: Email: phamcaothang2017@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Tinh bột là loại carbohydrate tự nhiên quan trọng và là polyme dự trữ của thực vật được tìm thấy nhiều trong lá, thân, quả, hạt, củ và rễ của các loại cây khác nhau. Tinh bột có ý nghĩa lớn về mặt dinh dưỡng, dược phẩm và công nghiệp do các đặc tính vật lý, hóa học và chức năng dinh dưỡng độc đáo của nó nhờ khả năng thủy phân thành glucose trong quá trình tiêu hóa bởi α -amylase. Quá trình oxy hóa trao đổi chất của glucose cung cấp năng lượng tức thời được sử dụng trong các hoạt động trao đổi chất và các hoạt động tế bào khác nhau [1]. Các loại tinh bột tự nhiên có cấu trúc dạng hạt và tinh thể phức tạp, kích thước khác nhau ở các loài thực vật khác nhau [2]. Tuy nhiên, mỗi loại tinh bột tự nhiên có nguồn gốc khác nhau cũng có những đặc tính khác biệt liên quan đến thuộc tính chức năng và phạm vi ứng dụng. Công nghệ biến tính tinh bột nhờ sự biến đổi vật lý, enzyme và hóa học thường được áp dụng để cải thiện đặc tính chức năng của tinh bột tự nhiên có nguồn gốc khác nhau. Trong đó phương pháp vật lý (thủy phân enzyme, nhiệt ẩm, hấp nhiệt/làm nguội, bức xạ, sóng siêu âm...) có thể tạo ra những thay đổi về hình thái, cấu trúc tinh thể và vùng vô định hình, làm tăng hàm lượng tinh bột kháng RS3, đây là phương pháp thân thiện với môi trường và có thể mang lại các đặc tính chức năng mong muốn [3].

Phương pháp tiền xử lý thủy phân bằng enzyme trong sản xuất tinh bột kháng nhằm cắt nhánh amylopectin mà không phải là amyloza, trong đó các enzyme pullulanase và isoamylase thường được sử dụng phổ biến. Quá trình thủy phân đồng thời enzyme pullulanase và isoamylase có thể tác động lên các liên kết α -(1,6)-glycosidic tại các điểm nhánh trên các phân tử amylopectin, từ đó loại bỏ các điểm nhánh và làm tăng tỷ lệ amylose so với amylopectin trong cấu trúc tinh bột dẫn đến làm tăng hàm lượng tinh bột kháng RS3 [4]. Nhiều nghiên cứu đã sử dụng enzyme pullulanase để thủy phân cắt mạch nhánh amylopectin với các loại nguyên liệu tinh bột khác nhau như ngô [5], gạo [6], đậu Hà Lan [7], sắn [8]... các kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng tinh bột kháng RS3, độ thủy phân, hàm lượng đường khử và các đặc tính chức năng như độ hòa tan, độ trương nở... phụ thuộc vào loại tinh bột, tỷ lệ tinh bột/ nước, nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân.

Trong khi biến tính tinh bột bằng phương pháp nhiệt ẩm (HMT) có khả năng chuyển hóa tinh bột tiêu hóa nhanh thành tinh bột tiêu hóa chậm và tinh bột kháng tiêu hóa. Cơ chế hình thành tinh bột kháng RS3 bằng HMT liên quan đến sự phá vỡ cấu trúc tinh thể của hạt tinh bột và sự phân ly cấu trúc xoắn kép, sau đó là sự sắp xếp lại các tinh thể bị phá vỡ. Sự trương nở ban đầu và khả năng di chuyển của vùng vô định hình do HMT gây ra thuận lợi cho việc sắp xếp chuỗi xoắn kép và do đó hình thành kháng RS3 [9]. Các phương pháp xử lý nhiệt để sản xuất tinh bột kháng RS3 hiện nay thuộc nhóm thủy nhiệt (xử lý nhiệt ẩm, ủ nhiệt, hấp nhiệt) [10]. Quá trình xử lý thủy nhiệt và sự hình thành RS3 phụ thuộc vào nồng độ tinh bột, độ thủy phân liên quan tới hàm lượng amylose, độ dài mạch amylose và chế độ nhiệt (nhiệt độ và thời gian gia nhiệt), số lần (chu kỳ) xử lý nhiệt/làm mát, thời gian và nhiệt độ lưu trữ [10-12].

Kết quả thực nghiệm đơn yếu tố quá trình thủy phân tinh bột gạo bằng enzyme pullulanase để sản xuất tinh bột kháng tiêu hóa RS3 đã xác định được: Cơ chất là tinh bột gạo hàm lượng cơ chất 15% (w/w); pH 5,5-6,0; nhiệt độ 55-57°C; thời gian thủy phân 10 giờ; nồng độ enzyme 20 NPUN/g (2,0%). Kết quả xác định được hàm lượng tinh bột kháng RS3 là 31,8%, amylose 49,56%, độ thủy phân 5,53, độ polyme hóa 343, độ hòa tan nước 28,7%, độ trương nở 8,93% [13]. Tiếp theo, nghiên cứu này đã khảo sát làm giàu hàm lượng RS3 sau quá trình thủy phân enzyme pullulanase bằng phương pháp hấp nhiệt/làm nguội 3 chu kỳ tương ứng chế độ hấp nhiệt (130°C, 60 phút)/làm nguội, lưu trữ (4°C, 18 giờ) và thu được hàm lượng RS3 trên 45%.

Mục tiêu của nghiên cứu này là thực nghiệm đa yếu tố và tối ưu hóa một số yếu tố công nghệ tiền xử lý tinh bột gạo bằng thủy phân enzyme pullulanase kết hợp quá trình hấp nhiệt/làm nguội 3 chu kỳ. Các yếu tố thực nghiệm gồm nồng độ enzyme pullulanase (1,5-2,5%); nhiệt độ thủy phân (52-58°C); thời gian thủy phân (8-12 giờ). Các hàm mục tiêu thực nghiệm gồm: hàm lượng tinh bột kháng RS3 (%), hàm lượng đường khử (%) và độ hòa tan (%).

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Nguyên liệu

Bột gạo giống IR50404 của Công ty TNHH Chế biến thực phẩm Hòa Phát (39/4F Bà Điểm 8, ấp Nam Lân, xã Bà Điểm, huyện Hóc Môn, TP Hồ Chí Minh). Tinh bột đã được tinh chế có hàm lượng carbohydrate tổng >90%, protein <0,5% và lipid <0,02%, hàm lượng amylose 29,14%, hàm lượng tinh bột kháng RS3 2,92%, độ ẩm 5% [14].

2.1.2. Vật liệu hóa chất sử dụng

Vật liệu hóa chất sử dụng: Enzym pullulanase (Promozyme®D2) từ *Bacillus acidopullulyicus* của Novozymes (Biotechnology, China), hoạt độ 1.000 NPUN/g. Bộ kit Megazyme (Ireland) với 3 loại enzyme: α -amylase bền nhiệt (Megazyme cat. no. E-BLAAM, 10.000 U/ml với cơ chất tinh bột tan), protease tinh khiết (Megazyme cat. no. E-BSPRT, 50 mg/ml, ~350 tyrosine U/ml), amyloglucosidase tinh khiết (Megazyme cat. no. E-AMGDF, 3.300 U/ml với cơ chất là tinh bột tan). Các hóa chất phân tích khác đều thuộc loại tinh khiết.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chuẩn bị mẫu và tiến hành thí nghiệm

+ Bước 1: Chuẩn bị mẫu thí nghiệm đa yếu tố quá trình tiền xử lý thủy phân bằng enzyme pullulanase với các điều kiện chung: 25g tinh bột gạo/mẫu với cùng hàm lượng cơ chất 15% (w/w), pH 5,5 được hồ hóa ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 30 phút trước khi tiến hành thủy phân bằng pullulanase [13]. Các thông số của quá trình thủy phân enzyme (nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân) được tiến hành theo quy hoạch thực nghiệm đa yếu tố. Kết thúc quá trình thủy phân được bất hoạt enzyme bằng hấp 130°C trong 30 phút.

+ Bước 2: Mẫu tinh bột sau quá trình thủy phân enzyme được tiến hành quá trình hấp nhiệt/làm nguội 3 chu kỳ: hấp nhiệt (130°C, 60 phút)/làm nguội và thời gian lưu trữ (4°C, 18 giờ).

Mục tiêu của các thí nghiệm đa yếu tố được phân tích từ các mẫu tinh bột sau quá trình biến tính (bước 1 và bước 2) với 03 chỉ tiêu đánh giá gồm hàm lượng tinh bột kháng RS3 (%), hàm lượng đường khử (%) và độ hòa tan (%).

2.2.2. Phương pháp quy hoạch thực nghiệm đa yếu tố

Cơ sở lập luận chọn biến và miền biến thiên của các yếu tố thực nghiệm từ kết quả thực nghiệm đơn yếu tố [13]. Kế hoạch thực nghiệm đa yếu tố quá trình tiền xử lý bằng thủy phân enzyme được tiến hành theo quy hoạch thực nghiệm của Box-Behnken với 3 biến độc lập được mã hóa (bảng 1) tương ứng miền biến thiên: Nồng độ enzyme pullulanase, ký hiệu X_1 (1,5-2,5%); Nhiệt độ thủy phân, ký hiệu X_2 (52-58°C); Thời gian thủy phân, ký hiệu X_3 (8-12 ngày). Các hàm mục tiêu thực nghiệm gồm: hàm lượng tinh bột kháng RS3 Y_1 (%), hàm lượng đường khử Y_2 (%) và độ hòa tan Y_3 (%). Giải bài toán tối ưu bằng phương pháp chập mục tiêu theo thuật toán “Hàm mong đợi” [15].

Bảng 1. Kế hoạch thực nghiệm theo biến mã hóa và biến thực.

Biến số	Ký hiệu	Đơn vị	Mức		
			-I	0	+I
Nồng độ enzyme pullulanase	X_1	%	1,5	2	2,5
Nhiệt độ thủy phân	X_2	°C	52	55	58
Thời gian thủy phân	X_3	giờ	8	10	12

2.2.3. Phương pháp xác định hàm lượng tinh bột RS

Xác định hàm lượng tinh bột kháng RS3 theo phương pháp AOAC Method 985.29 bằng bộ kit của Megazyme với 3 loại enzyme kèm theo. Trong đó, α -amylase và amyloglucosidase để thủy phân thành phần tinh bột tiêu hóa thành các phần hòa tan, protease để thủy phân 2 enzyme đã nêu. Tiến hành kết tủa bằng cồn và rửa để loại bỏ những thành phần hòa tan. Sản phẩm cuối được xác định hàm lượng tro và hàm lượng protein để hiệu chỉnh kết quả [16].

2.2.4. Phương pháp xác định hàm lượng đường khử

Thực hiện theo TCVN 13076:2014 [17].

2.2.5. Độ hòa tan

Mẫu tinh bột (khoảng 0,5 g bột khô) trộn trong 30 ml nước trong ống ly tâm và trộn kỹ bằng máy vortex. Sau khi làm nóng khoảng 30 phút trong nồi cách thủy 90°C rồi đem ly tâm 1.500 vòng/phút trong 30 phút. Rót phần dịch nổi vào một đĩa nhôm rồi sấy khô để xác định phần bột trên đĩa. Tính theo công thức sau:

$$\text{Độ hòa tan (\%)} = \frac{\text{Khối lượng tinh bột hòa tan sau sấy (g)}}{\text{Khối lượng mẫu ban đầu (g)}} \times 100 \quad [18]$$

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Excel SPSS 18 để phân tích và xử lý thống kê. Kết quả được xử lý số liệu thực nghiệm đa yếu tố và tối ưu hóa bằng phần mềm Design - Expert 7.1 [15, 19].

2.2.7. Thiết bị sử dụng

Cân phân tích (BP 211D, Sartorius, Đức); máy đo pH (Model C831, Turnhout, Bỉ); máy quang phổ (Thermo Scientific, Mỹ); tủ sấy (Mettler, Đức); bể ổn nhiệt thường JSRC-13C (JS Research, Hàn Quốc); bể ổn nhiệt có lắc JSSB-30T (JS Research, Hàn Quốc); nồi hấp tự động (Yuin, Việt Nam); máy khuấy từ gia nhiệt (IKA, Đức)...

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả thực nghiệm đa yếu tố

Số liệu thực nghiệm đa yếu tố được xử lý thống kê và tổng hợp ở bảng 2.

Bảng 2. Tổng hợp kết quả thực nghiệm đa yếu tố.

TT	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3
1	1,5	58	10	41,13	11,81	59,17
2	2	55	10	46,63	13,84	67,29
3	1,5	52	10	44,34	12,68	63,59
4	2	52	8	43,33	13,11	62,12
5	2	58	8	42,07	12,88	60,52
6	2	58	12	43,96	13,03	63,65
7	2	55	10	46,55	13,81	66,95
8	2	52	12	46,51	13,78	67,36
9	1,5	55	8	40,51	12,31	57,37
10	2,5	55	8	46,18	13,66	66,93
11	2,5	58	10	46,93	13,28	67,31
12	2	55	10	46,85	13,78	67,31
13	2,5	55	12	46,56	13,97	67,48
14	1,5	55	12	45,98	12,87	66,55
15	2,5	52	10	46,61	13,58	67,14

Tiến hành xử lý số liệu bằng phần mềm Design - Expert 7.1, phân tích ANOVA kiểm tra sự có nghĩa của các hệ số hồi quy và sự tương thích của các mô hình thực nghiệm tương ứng 3 hàm mục tiêu (Y_1, Y_2, Y_3) được tổng hợp ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phân tích hồi quy các hàm mục tiêu Y_1, Y_2, Y_3 .

Nguồn gốc	Hàm Y_1		Hàm Y_2		Hàm Y_3	
	Chuẩn F	Giá trị p	Chuẩn F	Giá trị p	Chuẩn F	Giá trị p
Mô hình	59,68	0,0001	421,63	<0,0001	144,42	<0,0001
A	198,96	<0,0001	1955,59	<0,0001	485,34	<0,0001
B	43,55	0,0012	389,10	<0,0001	90,16	0,0002
C	115,7	0,0001	240,41	<0,0001	323,21	<0,0001
AB	24,18	0,0044	54,70	0,0007	41,57	0,0013
AC	50,27	0,0009	10,52	0,0229	146,95	<0,0001
BC	3,23	0,1323	45,52	0,0011	8,78	0,0314
A ²	8,42	0,0337	584,86	<0,0001	21,32	0,0057
B ²	54,74	0,0007	590,91	<0,0001	119,55	0,0001
C ²	50,47	0,0009	37,31	0,0017	88,78	0,0002
Không tương thích	8,23	0,1103	2,08	0,3406	4,49	0,1874
Hệ số xác định R ²	0,9908		0,9987		0,9962	
Hệ số điều chỉnh R ² _{Adj}	0,9742		0,9963		0,9893	
Hệ số dự báo R ² _{Pred}	0,8619		0,9833		0,9455	

3.1.1. Khảo sát sự biến thiên của hàm Y_1

Kết quả phân tích hồi quy với F-value=59,68 ($p < 0,05$) cho thấy, mô hình là có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 99,99% ($p = 0,0001$). Sự có nghĩa của các hệ số hồi quy được kiểm định bởi chuẩn F, các giá trị $p < 0,05$ thể hiện các hệ số hồi quy A, B, C, AB, AC, A^2 , B^2 , C^2 là có ý nghĩa thống kê, trong khi hệ số BC ($p > 0,05$) là không có ý nghĩa, tuy vậy trong mô hình vẫn giữ lại hệ số BC để tiến hành tối ưu hóa. Mặt khác chuẩn F=8,23 ($p > 0,05$) cho thấy sự không tương thích của mô hình Y_1 là không có nghĩa. Hệ số xác định (R^2) của mô hình Y_1 là 0,9908 đã mô tả 99,08% sự thay đổi của hàm mục tiêu Y_1 phụ thuộc vào các biến độc lập. Trong khi hệ số dự báo (Pred R - Squared 0,8619) là tương thích với hệ số điều chỉnh (Adj R - Squared 0,9742).

Phương trình hồi quy hàm Y_1 theo biến coded được mã hóa (1a) và theo biến thực (1b)

$$Y_1 = 46,68 + 1,79A - 0,84B + 1,37C + 0,88AB - 1,27AC - 0,32BC - 0,54A^2 - 1,38B^2 - 1,33C^2 \quad (1a)$$

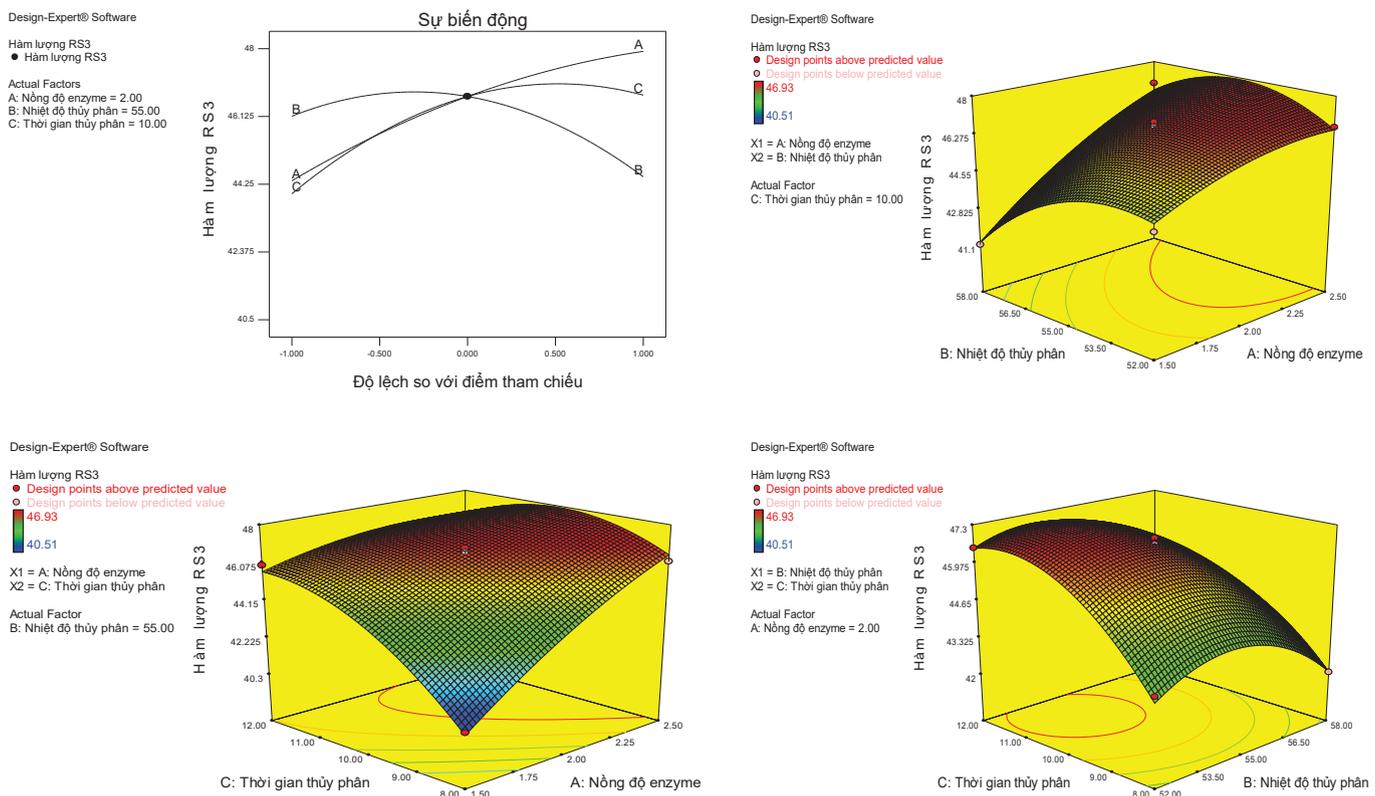
$$Y_1 = -448,634 - 7,38X_1 + 15,9738X_2 + 12,81917X_3 + 0,58833X_1X_2 - 1,2725X_1X_3 - 0,05375X_2X_3 - 2,16833X_1^2 - 0,15356X_2^2 - 0,33177X_3^2 \quad (1b)$$

Quan sát hình 1 (2D) và các hệ số hồi quy (1a) cho thấy, nồng độ enzyme là yếu tố có ảnh hưởng lớn nhất, tiếp theo là thời gian và nhiệt độ thủy phân đến hàm lượng tinh bột kháng RS3 trong khoảng biến thiên 40,51-46,93%. Khi nồng độ enzyme tăng trong khoảng 1,5-2% thì hàm lượng RS3 có xu hướng tăng mạnh và

tiếp tục tăng chậm dần trong khoảng 2-2,5%. Trong khi nhiệt độ thủy phân tăng trong khoảng 52-55°C thì hàm lượng RS3 tăng dần đều và có xu hướng giảm dần trong khoảng từ 55-58°C. Mặt khác thời gian thủy phân 8-10 giờ thì hàm lượng RS3 có xu hướng tăng mạnh, tốc độ tăng giảm dần trong khoảng 10-12 giờ tiếp theo. Theo nghiên cứu của K.Y. Lee và cs (2010) [6] thủy phân bằng enzyme pullulanase trên cơ chất tinh bột gạo hàm lượng 10% (w/v) nhiệt độ 57,5°C, nồng độ enzyme 0,9-4,8% cho thấy mức độ thủy phân đạt được thấp nhất là 0,24% ở nồng độ enzyme là 0,9% sau 8 giờ và cao nhất là 10,2% ở nồng độ enzyme 4,8% ở 24 giờ, sau 24 giờ mức độ thủy phân chững lại. Quá trình thủy phân làm giảm tỷ lệ tinh bột tiêu hóa nhanh (từ 78,31 xuống 44,65%), trong khi tăng tỷ lệ tinh bột tiêu hóa chậm (từ 0,8 lên 22,18%) và tinh bột kháng RS3 tăng từ 20,79 lên 34,43%. Điều này là phù hợp với kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của nồng độ enzyme và thời gian thủy phân đến hàm lượng RS3, điểm khác biệt về mức độ thủy phân là do miền thực nghiệm của nồng độ enzyme và tỷ lệ hàm lượng cơ chất khác nhau dẫn đến sự chênh lệch lớn về thời gian thủy phân.

3.1.2. Khảo sát sự biến thiên của hàm Y_2

Kết quả phân tích hồi quy với F-value=421,63 ($p < 0,05$) cho thấy, mô hình là có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 99,99% ($p < 0,0001$). Sự có nghĩa của các hệ số hồi quy được kiểm định bởi chuẩn F, các giá trị $p < 0,05$ thể hiện các hệ số hồi quy A, B, C, AB, AC, BC, A^2 , B^2 và C^2 đều có ý nghĩa thống kê. Mặt khác, chuẩn F=2,08 ($p > 0,05$) cho thấy sự không tương thích của mô hình Y_2 là không có nghĩa. Hệ số xác định (R^2) của mô hình Y_2 là 0,9987 đã



Hình 1. Biểu diễn 2D và 3D quan hệ giữa các yếu tố thực nghiệm đến hàm mục tiêu Y_1 .

mô tả 99,87% sự thay đổi của hàm mục tiêu Y_2 phụ thuộc vào các biến độc lập. Trong khi hệ số dự báo (Pred R - Squared 0,9833) là tương thích với hệ số điều chỉnh (Adj R - Squared 0,9963).

Phương trình hồi quy hàm Y_2 theo biến coded đã được mã hóa (2a) và theo biến thực (2b):

$$Y_2 = 13,81 + 0,6A - 0,27B + 0,21C + 0,14AB - 0,062AC - 0,13BC - 0,48A^2 - 0,49B^2 - 0,12C^2 \quad (2a)$$

$$Y_2 = -162,1225 + 4,365 X_1 + 5,89542 X_2 + 2,03479 X_3 + 0,095 X_1 X_2 - 0,0625 X_1 X_3 - 0,021667 X_2 X_3 - 1,194 X_1^2 - 0,054167 X_2^2 - 0,030625 X_3^2 \quad (2b)$$

Quan sát hình 2 (2D) và các hệ số hồi quy (2a) cho thấy, nồng độ enzyme là yếu tố có ảnh hưởng lớn nhất, tiếp theo là nhiệt độ và thời gian thủy phân đến hàm lượng đường khử biến thiên trong khoảng 12,31-13,98%. Khi nồng độ enzyme tăng trong khoảng 1,5-2% thì hàm lượng đường khử tăng mạnh và có xu hướng tăng chậm dần khi tăng nồng độ đến 2,2% và sau đó gần như hàm lượng đường khử không tăng trong khoảng 2,2-2,5%. Trong khi nhiệt độ thủy phân tăng trong khoảng 52-55°C thì hàm lượng đường khử tăng dần đều và có xu hướng giảm mạnh trong khoảng 55-58°C. Mặt khác hàm lượng đường khử tăng theo thời gian thủy phân với mức tăng dần đều 8-11 giờ và có xu hướng tăng chậm dần khi kéo dài thời gian thủy phân đến 12 giờ. Cũng theo nghiên cứu của K.Y. Lee và cs (2010) [6] cho thấy mức độ thủy phân đạt được thấp nhất là 0,24% ở nồng độ enzyme là 0,9% sau 8 giờ và cao nhất là 10,2% ở nồng độ enzyme 4,8%, điều này chứng tỏ nồng độ enzyme là yếu tố có ảnh hưởng mạnh nhất, trong khi mức độ thủy phân có quan hệ tỷ lệ thuận với hàm lượng đường khử.

3.1.3. Khảo sát sự biến thiên của hàm Y_3

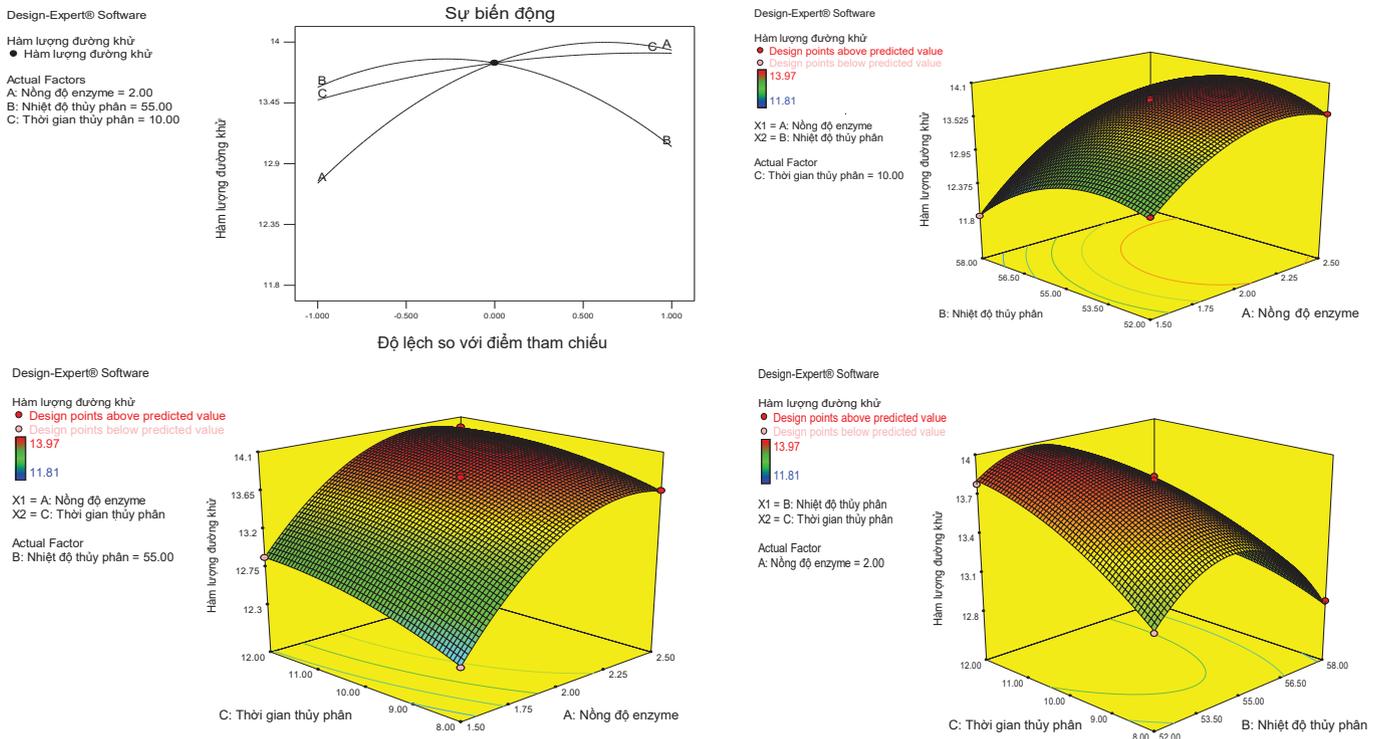
Kết quả phân tích hồi quy với F-value=144,42 ($p < 0,05$) cho thấy, mô hình là có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy trên 99,99% ($p < 0,0001$). Sự có nghĩa của các hệ số hồi quy được kiểm định bởi chuẩn F với các giá trị $p < 0,05$ thể hiện các hệ số hồi quy A, B, C, AB AC, BC, A^2 , B^2 , C^2 đều có ý nghĩa thống kê. Mặt khác chuẩn $F=4,49$ ($p > 0,05$) cho thấy, sự không tương thích của mô hình Y_3 là không có nghĩa. Hệ số xác định (R^2) của mô hình Y_3 là 0,9962 đã mô tả 99,62% sự thay đổi của hàm mục tiêu Y_3 phụ thuộc vào các biến độc lập. Trong khi hệ số dự báo (Pred R - Squared 0,9455) là tương thích với hệ số điều chỉnh (Adj R - Squared 0,9893).

Phương trình hồi quy Y_3 theo biến coded đã được mã hóa (3a) và theo biến thực (3b) như sau:

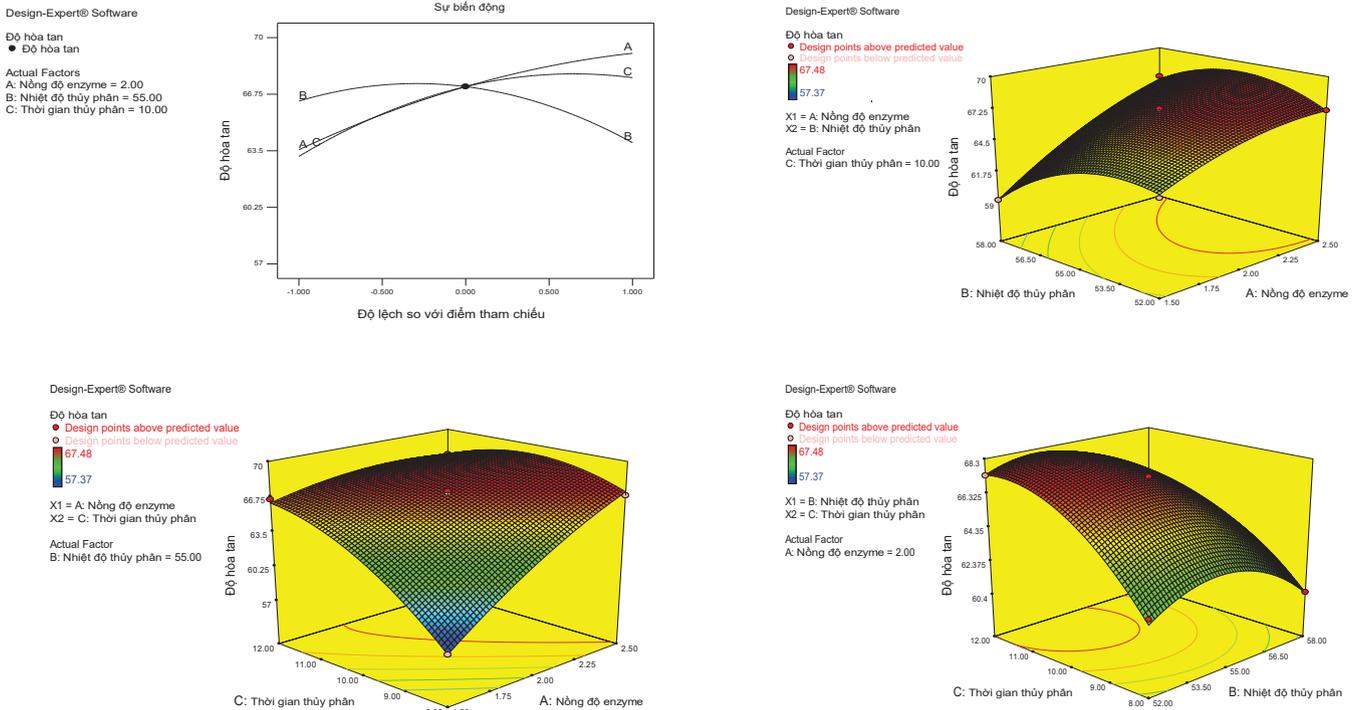
$$Y_3 = 67,18 + 2,77A - 1,19B + 2,26C + 1,15AB - 2,16AC - 0,53BC - 0,86A^2 - 2,03B^2 - 1,75 C^2 \quad (3a)$$

$$Y_3 = -678,75213 - 1,26833X_1 + 23,70593X_2 + 19,00875X_3 + 0,765 X_1 X_2 - 2,1575X_1 X_3 - 0,087917 X_2 X_3 - 3,42167 X_1^2 - 0,022505X_2^2 - 0,43635 X_3^2 \quad (3b)$$

Quan sát hình 3 (2D) và các hệ số hồi quy (3a) cho thấy, nồng độ enzyme là yếu tố có ảnh hưởng lớn nhất, tiếp theo là thời gian và nhiệt độ thủy phân đến độ hòa tan trong khoảng biến thiên 57,37-67,48%. Khi nồng độ enzyme tăng trong khoảng 1,5-2% thì độ hòa tan tăng mạnh và có xu hướng tăng chậm dần khi tăng nồng độ enzyme 2-2,5%. Trong khi nhiệt độ thủy phân tăng trong khoảng 52-55°C thì độ hòa tan tăng dần đều và có xu hướng giảm



Hình 2. Biểu diễn 2D và 3D quan hệ giữa các yếu tố thực nghiệm đến hàm mục tiêu Y_2 .



Hình 3. Biểu diễn 2D và 3D quan hệ giữa các yếu tố thực nghiệm đến hàm mục tiêu Y_3 .

manh trong khoảng từ 55-58°C. Mặt khác độ hòa tan tăng dần đều trong khoảng thời gian thủy phân từ 8-10 giờ, sau đó có xu hướng tăng chậm dần đến 11 giờ, sau 11-12 giờ độ hòa tan chững lại.

3.2. Tối ưu hóa quá trình thủy phân bằng enzyme

Kết quả khảo sát đa yếu tố cho thấy sự biến thiên của các yếu tố thực nghiệm thông qua sự thay đổi các thuộc tính có liên quan đến các hàm mục tiêu theo chiều hướng mong muốn và ngược lại là điều kiện ràng buộc trên cơ sở thương lượng được đưa ra ở bảng 4.

Bảng 4. Điều kiện ràng buộc của các yếu tố và mục tiêu thực nghiệm.

Yếu tố	Mục tiêu mong đợi	Hệ số quan trọng
Nồng độ enzyme pullulanase (%)	2,0-2,5%	Hệ số quan trọng 5/5
Nhiệt độ thủy phân (°C)	52-55°C	Hệ số quan trọng 4/5
Thời gian thủy phân (giờ)	10-12 giờ	Hệ số quan trọng 4/5
Hàm lượng tinh bột kháng RS3 (%)	Giá trị lớn nhất	Hệ số quan trọng 5/5
Hàm lượng đường khử (%)	Giá trị lớn nhất	Hệ số quan trọng 4/5
Độ hòa tan (%)	Giá trị lớn nhất	Hệ số quan trọng 4/5

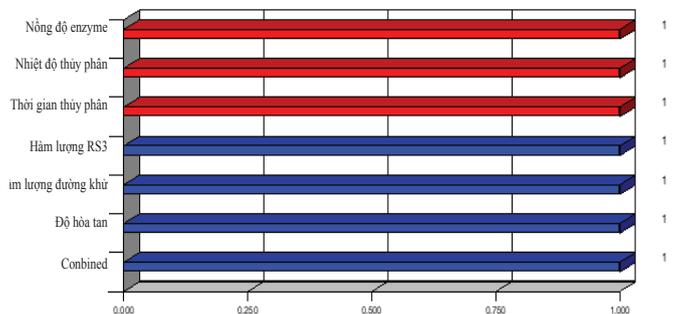
Thông qua hệ số quan trọng theo mức độ ảnh hưởng của các yếu tố thực nghiệm được lựa chọn ưu tiên: nồng độ enzyme pullulanase (5/5), nhiệt độ thủy phân (4/5) và thời gian thủy phân (4/5). Đối với các hàm mục tiêu thì ưu tiên hàm lượng tinh bột kháng RS3 (5/5), trong khi hàm lượng đường khử và độ hòa tan chọn mức ưu tiên thấp hơn (4/5), điều này đồng nghĩa với việc ưu tiên và mong đợi khả năng làm giàu tinh bột kháng RS3 cao nhất với chi phí sử dụng enzyme thấp nhất và chấp nhận các yếu tố nhiệt độ và thời gian xử lý.

Tiến hành xử lý số liệu tối ưu hóa bằng phần mềm Design - Expert 7, kết quả đã xác định được phương án tối ưu như sau (bảng 5):

Bảng 5. Các yếu tố thực nghiệm và các hàm mục tiêu đạt được.

Các yếu tố thực nghiệm	Các hàm mục tiêu đạt được
Nồng độ enzyme pullulanase: 2,22%	Hàm lượng tinh bột kháng RS3: 47,51%
Nhiệt độ thủy phân: 54,39°C	Hàm lượng đường khử: 14,04%
Thời gian thủy phân: 10,35 giờ	Độ hòa tan: 68,49%

Trong khi mục tiêu mong đợi của mô hình thực nghiệm thể hiện ở hình 4:



Hình 4. Mức độ đáp ứng sự mong đợi.

Với 3 yếu tố thực nghiệm gồm nồng độ enzyme pullulanase, nhiệt độ và thời gian thủy phân đáp ứng sự mong đợi tương ứng đạt được 100%, tương ứng các hàm mục tiêu hàm lượng tinh bột kháng RS3, hàm lượng đường khử và độ hòa tan đều đáp ứng 100% so với mong đợi, đồng nghĩa với mục tiêu chung của mô hình thực nghiệm đáp ứng 100% sự mong đợi.

Tiến hành thực nghiệm lại với các yếu tố thực nghiệm được lựa chọn lần cận điểm tối ưu với nồng độ enzyme pullulanase 2,2%, nhiệt độ thủy phân 54,4°C, thời gian thủy phân 10,4 giờ ở cùng điều kiện chung theo kế hoạch thực nghiệm đa yếu tố. Kết quả thực nghiệm với 3 lần lặp lại lấy giá trị trung bình tương ứng các hàm mục tiêu đạt được: Hàm lượng tinh bột kháng RS3 47,58±0,22%, hàm lượng đường khử 14,12±0,08% và độ hòa tan 68,52±0,18%. So sánh giá trị thực nghiệm với mô hình tối ưu thì 3 hàm mục tiêu đều có sự sai lệch có nghĩa thống kê ($p < 0,05$), điều này cho thấy, mô hình tối ưu là phù hợp với thực nghiệm.

Theo K.Y. Lee và cs (2010) [6] sử dụng phương pháp tiền xử lý bằng thủy enzyme pullulanase cũng với tinh bột gạo có hàm lượng 10% (w/v), nhiệt độ 57,5°C, nồng độ enzyme 0,9-4,8%, đã xác định được nồng độ enzyme 4,8% trong thời gian 24 giờ, tỷ lệ tinh bột tiêu hóa nhanh giảm (từ 78,31 xuống 44,65%), trong khi tăng tỷ lệ tinh bột tiêu hóa chậm (từ 0,8 lên 22,18%) và tinh bột kháng RS3 tăng từ 20,79 lên 34,43%. So với kết quả tối ưu hóa sử dụng nồng độ enzyme thấp hơn (2,2%) tuy vậy hàm lượng RS3 đạt cao hơn (47,58±0,22%), thời gian thủy phân ngắn hơn (10,4 giờ). Điều này cho thấy, sự khác biệt trong nghiên cứu tiền xử lý bằng enzyme pullulanase kết hợp quá trình hấp nhiệt/làm nguội 3 chu kỳ là có hiệu quả làm giàu hàm lượng RS3, mặt khác giảm chi phí sử dụng enzyme và tiết kiệm thời gian sản xuất.

Trong khi các nghiên cứu khác với cùng phương pháp tiền xử lý bằng thủy phân enzyme pullulanase cho các loại tinh bột khác nhau như H. Zhang và cs (2011) [5] thủy phân tinh bột ngô với hàm lượng cơ chất 5% (w/v), nồng độ enzyme 1,2%, pH 4-5,5, nhiệt độ 42-52°C thì hàm lượng RS3 tối đa đạt tối đa 40,2% ở nhiệt độ 46°C. Z.H. Lu và cs (2018) [7] thủy phân tinh bột đậu Hà Lan kết hợp xử lý siêu âm. Kết quả xác định được nồng độ enzyme 2,67%, nhiệt độ 50°C, pH 5,2 kết hợp với xử lý siêu âm trong 6 giờ đã tạo ra được 18% tinh bột tiêu hóa chậm và 26% tinh bột kháng RS3. Khi tăng nồng độ pullulanase lên 13,35% thì tinh bột kháng RS3 tăng nhẹ nhưng tinh bột tiêu hóa chậm giảm. N. Vatanasuchart và cs (2010) [8] thủy phân tinh bột sắn, kết quả xác định được ở pH 5,0, hàm lượng cơ chất 10%, nồng độ pullulanase 10% trong 8, 16 và 24 giờ cho thấy có sự gia tăng đáng kể hàm lượng RS3 lần lượt là 41,2, 45,8 và 42,5% so với tinh bột sắn hồ hóa (9,2%). Điều này cho thấy, phương pháp tiền xử lý thủy phân bằng enzyme pullulanase là có hiệu quả về khả năng cắt mạch nhánh amylopectin cho nhiều loại tinh bột tự nhiên khác nhau. Quá trình thủy phân có thể tác động lên các liên kết α -(1,6)-glycosidic tại các điểm nhánh trên các phân tử amylopectin, từ đó loại bỏ các điểm nhánh và làm tăng tỷ lệ amylose so với amylopectin trong cấu trúc tinh bột dẫn đến làm tăng hàm lượng tinh bột kháng RS3. Tuy vậy, để sử dụng có hiệu quả lượng enzyme pullulanase cho mỗi loại tinh bột cần thực nghiệm tối ưu hóa các thông số của quá trình thủy phân.

4. Kết luận

Kết quả thực nghiệm đa yếu tố và tối ưu hóa đã xác định được chế độ tối ưu tiền xử lý thủy phân bằng enzyme pullulanase ở điều kiện hàm lượng tinh bột/nước 15%, pH 5,5 trước quá trình thủy nhiệt bằng hấp nhiệt/làm nguội 3 chu kỳ, với nồng độ

enzyme 2,2% ở nhiệt độ 54,4°C trong thời gian 10,4 giờ, tương ứng hàm lượng tinh bột kháng RS3 đạt 47,58±0,22%, hàm lượng đường khử đạt 14,12±0,08% và độ hòa tan đạt 68,52±0,18% sau quá trình thủy nhiệt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] G. Annon, D.L. Topping (1994), "Nutritional role of resistant starch: Chemical structure vs physiological function (1994)", *Annual Review of Nutrition*, **14**, pp.297-320.
- [2] R.F. Tester, J. Karkalas, X. Qi (2004), "Starch-composition, fine structure and architecture", *Journal of Cereal Science*, **39**, pp.151-165.
- [3] S. Choton, J.D. Bandral, J. Singh, et al. (2024), "Enzymatic modification of starch: A review", *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, **10(1)**, DOI: 10.36348/sjmps.2024.v10i01.001.
- [4] C.W. Simons, C. Hall, S. Vatansever (2018), "Production of resistant starch (RS3) from edible bean starches", *Journal of Food Processing and Preservation*, **42(4)**, DOI: 10.1111/jfpp.13587.
- [5] H. Zhang, Z. Jin (2011), "Preparation of resistant starch by hydrolysis of maize starch with pullulanase", *Carbohydrate Polymers*, **83**, pp.865-867.
- [6] K.Y. Lee, S. Lee, H.G. Lee (2010), "Effect of the degree of enzymatic hydrolysis on the physicochemical properties and in vitro digestibility of rice starch", *Food Sci. Biotechnol.*, **19(5)**, pp.1333-1340.
- [7] Z.H. Lu, N. Belanger, E. Donner, et al. (2018), "Debranching of pea starch using pullulanase and ultrasonication synergistically to enhance slowly digestible and resistant starch", *Food Chemistry*, **268**, pp.533-541.
- [8] N. Vatanasuchart, P. Tungtrakul, K. Wongkrajang, et al. (2010), "Properties of pullulanase debranched cassava starch and type-III resistant starch", *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, **44**, pp.131-141.
- [9] M. Pratiwi, D.N. Faridah, H.N. Lioe (2017), "Structural changes to starch after acid hydrolysis, debranching, autoclaving-cooling cycles, and heat moisture treatment (HMT): A review", *Starch*, **70(1-2)**, DOI: 10.1002/star.201700028.
- [10] J.H. Dupuis, Q. Liu, R.Y. Yada (2014), "Methodologies for Increasing the resistant starch content of food starches: A review", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **13(6)**, pp.1219-1234, DOI: 10.1111/1541-4337.12104.
- [11] S. Li, R. Ward, Q. Gao (2011), "Effect of heat-moisture treatment on the formation and physicochemical properties of resistant starch from mung bean (*Phaseolus radiatus*) starch", *Food Hydrocolloids*, **25**, pp.1702-1709.
- [12] C. Onyango, T. Bley, A. Jacob, et al. (2006), "Influence of incubation temperature and time on resistant starch type III formation from autoclaved and acid-hydrolysed cassava starch", *Carbohydrate Polymers*, **66**, pp.494-499.
- [13] P.C. Thang, P.M. Tuan, B.K. Thuy, et al. (2019a), "Hydrolysis of rice starch by pullulanase enzyme for the production of resistant starch", *Vietnam Journal of Agriculture & Rural Development*, **1+2**, pp.104-112.
- [14] P.C. Thang, B.N. Trung, L.M. Tuan, et al. (2019b), "Selection of rice varieties with suitable amylose content for the production of resistant starch", *Vietnam Journal of Agriculture & Rural Development*, **2**, pp.55-63 (in Vietnamese).
- [15] G. Derringer, R. Suich (1980), "Simultaneous optimization of several responses variables", *Journal of Quality Technology*, **12(4)**, pp.214-219.
- [16] Megazyme (2017), *Total Dietary Fiber Assay Procedure*.
- [17] Ministry of Science and Technology (2014), *TCVN 10376:2014 (ISO 5377:1981) - Hydrolyzed Starch Products - Determination of Reducing Power and Dextrose Equivalent - Lane and Eynon Constant Titration Method* (in Vietnamese).
- [18] P.V. Hung, N.L. Vien, N.T.L. Phi (2016), "Resistant starch improvement of rice starches under a combination of acid and heat-moisture treatments", *Food Chemistry*, **191**, pp.67-73, DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.02.002.
- [19] Design - Expert version 7.1 (2007), *Software for Design of Experiment*, Stat - Ease, Inc., Minneapolis, USA.