

THỦY PHÂN TINH BỘT BÍ ĐỎ (*CUCURBITA MOSCHATA*) BẰNG ENZYME TẠO ĐƯỜNG KHỦ CAO NHẤT BẰNG MÔ HÌNH CCD

● VÔ MINH HOÀNG - NGUYỄN THỊ HỒNG THẨM

TÓM TẮT:

Nghiên cứu nhằm xác định các thông số của quá trình thủy phân tinh bột bí đỏ bằng enzyme α -amylase và glucoamylase nhằm tạo hàm lượng đường khử cao nhất. Giai đoạn dịch hóa được bố trí hai nhân tố là các tỷ lệ cơ chất: nồng độ α -amylase và thời gian thủy phân: nồng độ α -amylase khác nhau. Thí nghiệm đường hóa được thực hiện dựa trên mô hình đa biến CCD. Kết quả, tỷ lệ cơ chất 1:4, nồng độ α -amylase 11 U/g và thời gian thủy phân 50 phút được chọn làm cơ sở cho thí nghiệm tiếp theo. Ở nồng độ glucoamylase 104,093U/ml, nhiệt độ 54,410°C và thời gian 130,670 phút cho hàm lượng DE cao nhất 24,179% so với phương pháp không dùng enzyme $2,64 \pm 0,25$. Phân tích phương sai trong mô hình hồi cho thấy mô hình bậc hai có ý nghĩa ($p < 0,05$), độ tin cậy của mô hình $R^2 = 0,9989$, Lack of fit ($p > 0,05$) cho thấy mô hình hồi quy đã xây dựng phù hợp.

Từ khóa: α -amylase, glucoamylase, tinh bột, tinh bột bí đỏ, thủy phân.

1. Đặt vấn đề

Quả bí đỏ có tên khoa học là *Cucurbita moschata*. Ở Việt Nam, bí đỏ được trồng ở nhiều nơi từ đồng bằng đến Tây Nguyên. Bí đỏ là nguồn tinh bột tiềm năng vì chúng chứa trên 60% tinh bột ở dạng chất khô [1]. Bí đỏ là một loại quả có nhiều giá trị dinh dưỡng và lợi ích cho sức khỏe, thành phần dinh dưỡng của bí đỏ cho thấy sự hiện diện vitamin, axit amin, carbohydrate, khoáng chất, năng lượng thấp, β -caroten và là một nguồn cung cấp vitamin A tuyệt vời có thể giúp bảo vệ thị lực hiệu quả [2-3]. Bí đỏ giàu chất physterol và các axit béo omega 3, omega 6 tốt cho sức khỏe, chứa lượng chất chống oxy hóa và β -carotene rất cao, những chất này làm giảm lượng cholesterol

xấu nên có tác dụng tăng cường hệ miễn dịch, điều hòa huyết áp và chống lại bệnh tiểu đường [4-6]. Một số nghiên cứu cho thấy rằng bí đỏ có tác dụng chống viêm, ngăn ngừa một số ung thư ở đường tiêu hóa [7-9]. Bí đỏ cũng là một nguồn chất xơ tốt, giúp cải thiện hoạt động tiêu hóa và làm giảm cân [6-7].

Tuy nhiên, ở Việt Nam việc nghiên cứu tận dụng nguồn nguyên liệu này để chế biến thành sản phẩm mang giá trị cao vẫn chưa được quan tâm khai thác. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục đích tìm các điều kiện thủy phân tinh bột bí đỏ ứng dụng trong chế biến sữa bí đỏ tạo ra những sản phẩm có lợi cho sức khỏe con người. Có nhiều phương pháp thủy phân tinh bột,

trong đó phương pháp dùng enzyme được sử dụng rộng rãi được ứng dụng để nâng cao hiệu suất trích ly dịch thủy phân, góp phần giảm độ nhớt, dễ lọc dung dịch, cải thiện màu sắc dịch chiết và chất lượng dịch chiết (độ kết lắng, mùi vị cường độ) trong quá trình sản xuất [10].

Hiệu suất thủy phân tinh bột phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nồng độ cơ chất: nước, nhiệt độ, thời gian, nồng độ enzyme,... Trong nghiên cứu này, tác giả tiến hành thủy phân tinh bột bí đỏ qua 2 giai đoạn dịch hóa và đường hóa. Do chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố trong quá trình thủy phân nên nếu bố trí thí nghiệm đầy đủ các yếu tố sẽ tốn kém chi phí và thời gian. Vì vậy, tác giả sử dụng mô hình Central Composite Design (CCD) trong thiết kế thí nghiệm đường hóa, mô hình này có ưu điểm là giảm số lượng đơn vị thí nghiệm nhưng kết quả vẫn có ý nghĩa thống kê.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Chọn quả bí đỏ có vỏ màu vàng cam, đường kính quả 10-15cm, thịt dày khoảng 3,5cm, khối lượng 2,2-2,5kg được mua từ đại lý Ba Thu ở chợ Trà Vinh. α -amylase (thermostable α -amylase), hãng Novozyme, hoạt tính công bố 120 KNU-S/g (KNU là lượng enzyme phân giải 5,26g tinh bột), dạng lỏng, độ nhớt 1-25(cPs), nguồn *bacillus licheniformis*. Glucoamylase, từ Ấn Độ, dạng lỏng, pH 3.0-5.0, hoạt tính công bố 300U/ml, nguồn *Aspergillus sp.* Axit 3,5-dinitrosalixylic từ Ấn Độ, D-glucose, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu bí đỏ sẽ được tách chiết bằng cách gọt vỏ, rửa sạch, xay nhuyễn, lắng, lọc, sấy khô rồi nghiền mịn để thu được tinh bột bí đỏ.

(1) - Giai đoạn dịch hóa được tiến hành thí

nghiệm theo hai nhân tố tỷ lệ cơ chất: nước - nồng độ enzyme và nồng độ enzyme - thời gian thủy phân.

(2) - Giai đoạn đường hóa được thực hiện bằng mô hình đa biến CCD với 3 yếu tố, 5 mức độ cho mỗi yếu tố. Các đơn vị thí nghiệm ở các nghiệm thức thừa và trực được lặp lại 2 lần và 4 nghiệm thức trung tâm, 16 điểm thừa, 12 điểm trực với $\alpha = \pm 1,5$ (Bảng 1).

Dữ liệu được mã hóa cho 3 yếu tố như sau: nồng độ enzyme glucoamylase (A), nhiệt độ thủy phân (B) và thời gian thủy phân (C) là các biến độc lập và hàm lượng DE ($Y_{\max}$) là đáp ứng phụ thuộc, phương trình hồi quy đa thức được áp dụng để xuất như phương trình (1):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^n \sum_{j=1}^n \beta_{ij} X_i X_j + e \quad (1)$$

Trong đó:

Y là biến phụ thuộc, β_0 là hệ số chặn; β_i là hệ số phương trình bậc 1, β_{ii} là hệ số phương trình bậc 2 của biến X_i , β_{ij} là hệ số tương tác và e là sai số ngẫu nhiên.

Từ mô hình toán học tính toán được thông số tối ưu cho điều kiện thủy phân. Mẫu tinh bột tối ưu sau đó sẽ được đánh giá hàm lượng DE và so sánh với mẫu thực tế trong cùng điều kiện.

2.3. Phân tích thống kê

Kết quả được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS Statistics 20 IBM, thí nghiệm tối ưu hóa được xử lý bằng phần mềm Design-Expert 11.0.4.0 from Stat-Ease.

Bảng 1. Mã hóa dữ liệu đường hóa theo mô hình Central composite design

Ký hiệu	Biến	Đơn vị	Mức độ				
			-1,5	-1	0	1	+1,5
A	Nồng độ enzyme	U/ml	45	60	90	120	135
B	Nhiệt độ	°C	35	40	50	60	65
C	Thời gian	Phút	30	60	120	180	210

3. Kết quả thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ α -amylase và tỷ lệ cơ chất đến DE

Dựa vào kiểm định ANOVA cho chúng ta thấy rằng có sự ảnh hưởng giữa tỷ lệ cơ chất và nồng độ enzyme đến đường khử tạo thành ($p < 0,05$). Khi thay đổi tỷ lệ cơ chất từ 1:5 đến 1:2 và tăng dần nồng độ enzyme từ 7U/g lên 13U/g thì hàm lượng DE tăng dần. Kiểm định sau ANOVA bằng phương pháp Duncan cho thấy ở tỷ lệ cơ chất 1:5 giá trị trung bình DE thấp nhất 3,81% so với các tỷ lệ còn lại, trong khi đó ở tỷ lệ 1:4 giá trị trung bình DE cao nhất 5,87% và khác biệt so với các tỷ lệ còn lại và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức 95%. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Huanxin Zhang et al., 2011 [11]. Khi tăng nồng độ enzyme từ 7U/g lên 13U/g thì giá trị trung bình DE tăng dần tương ứng.

Bảng 2 cho thấy ở nồng độ enzyme 11U/g và 13U/g thì DE đạt giá trị cao nhất tương ứng là 6,78% và 6,87%. Tuy nhiên, giữa 2 giá trị DE này không có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$). Trong khi đó, ở nồng độ enzyme 11U/g có thể tiết kiệm được một lượng enzyme cho quá trình sản xuất nhưng vẫn đạt được hàm lượng DE mong muốn. Vì vậy, tác giả chọn nồng độ enzyme α -amylase 11U/g với tỷ lệ cơ chất 1:4 để làm cơ sở cho thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Tác động của nồng độ α -amylase và thời gian thủy phân đến DE

Kết quả cho thấy có sự tương tác giữa nồng độ α -amylase và thời gian thủy phân đến hàm lượng đường khử ($p < 0,05$), khi nồng độ α -amylase tăng

từ 7U/g đến 13U/g với thời thủy phân 30 và 50 phút hàm lượng DE tăng dần. Nếu kéo dài thời gian 60 và 70 phút đường khử giảm xuống. Ở nồng độ α -amylase 11U/g sau 50 phút lượng đường khử đạt mức cao nhất 14,92%, nếu tăng nồng độ α -amylase thì lượng đường khử khuynh hướng giảm, trong điều kiện nồng độ cơ chất thích hợp thì vận tốc phản ứng tuyến tính với nồng độ enzyme. (Bảng 3)

Tuy nhiên, khi nồng độ enzyme tăng đến một giới hạn thì tốc độ phản ứng không tăng lên nữa, do cơ chất bị phân giải dần trong phản ứng. Kết quả này phù hợp với lý thuyết của Nguyễn Đức Lương và cộng sự., 2004 [12].

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ glucoamylase, nhiệt độ và thời gian thủy phân đến DE

Hiệu quả thủy phân tinh bột của enzyme phụ thuộc vào nhiều điều kiện, đặc biệt là nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân. Kết quả cho thấy sự phân tán của dữ liệu như Hình 1 thỏa các điều kiện để tiến hành chạy mô hình tối ưu hóa. Kết quả phân tích ANOVA Bảng 4 có thể thấy rằng mô hình có ý nghĩa với $p < 0,05$. Lack of fit ($p > 0,05$, điều này chỉ ra rằng mô hình phù hợp cho tất cả dữ liệu.

Độ tin cậy của mô hình $R^2 = 0,9989$ mô hình xây dựng phù hợp. Kết quả của phương trình hồi quy có dạng:

$$Y = 23,74 + 3,28A + 0,184B + 1,69C - 1,56AB + 1,72AC + 1,35BC - 4,87A^2 - 1,52B^2 - 1,22C^2$$

Kết quả của phương trình hồi quy được tìm ra từ việc giải phương trình trong mô hình chỉ là các biến mã hóa nhận giá trị khi $p < 0,05$, do đó cần chuyển

Bảng 2. Tác động của nồng độ α -amylase và tỷ lệ cơ chất khác nhau đến DE

Tỷ lệ cơ chất:nước	Nồng độ α -amylase (U/g)				
	7	9	11	13	Trung bình
1:2	3,28±0,24	4,12±0,22	4,43±0,52	5,00±0,46	4,21*±0,72
1:3	4,27±0,71	4,74±0,43	5,48±0,75	5,83±0,63	5,08*±0,84
1:4	4,06±0,51	5,77±0,40	6,78±0,14	6,87±0,36	5,87*±1,22
1:5	2,76±0,05	3,54±0,09	4,75±0,24	4,19±0,18	3,81*±0,78
Trung bình	3,59*±0,74	4,54*±0,90	5,36 ±1,03	5,47±1,07	

* thể hiện sự khác biệt ý nghĩa ở mức độ 5%

Bảng 3. Ảnh hưởng α -amylase và thời gian khác nhau đến DE

Nồng độ α -amylase (U/g)	Thời gian (phút)					
	30	40	50	60	70	Trung bình
7	3,74 $\pm$ 0,07	4,40 $\pm$ 0,07	8,94 $\pm$ 0,12	9,14 $\pm$ 0,07	7,10 $\pm$ 0,07	6,66* $\pm$ 2,32
9	4,40 $\pm$ 0,07	7,61 $\pm$ 0,07	12,38 $\pm$ 0,07	9,25 $\pm$ 0,07	8,51 $\pm$ 0,07	8,43* $\pm$ 2,67
11	12,30 $\pm$ 0,18	12,62 $\pm$ 0,07	14,92 $\pm$ 0,23	13,30 $\pm$ 0,18	10,71 $\pm$ 0,18	12,74* $\pm$ 1,44
13	12,46 $\pm$ 0,20	13,94 $\pm$ 0,18	14,67 $\pm$ 0,12	13,28 $\pm$ 0,20	10,11 $\pm$ 0,18	13,22* $\pm$ 1,09
Trung bình	6,77* $\pm$ 4,89	8,1* $\pm$ 4,78	10,64* $\pm$ 4,88	9,69* $\pm$ 3,68	7,68* $\pm$ 3,96	

* thể hiện sự khác biệt ý nghĩa ở mức độ 5%.

Bảng 4. Phân tích ANOVA

Nguồn	SSa	dfb	MSc	F-value	p-value	
Model	810,42	9	90,05	2161,24	< 0,0001	Ý nghĩa
A-enzyme	269,14	1	269,14	6459,71	< 0,0001	
B-nhiệt độ	0,8460	1	0,8460	20,30	0,0002	
C-thời gian	71,66	1	71,66	1720,06	< 0,0001	
AB	38,95	1	38,95	934,92	< 0,0001	
AC	47,58	1	47,58	1142,10	< 0,0001	
BC	29,12	1	29,12	698,98	< 0,0001	
A ²	352,13	1	352,13	8451,73	< 0,0001	
B ²	34,05	1	34,05	817,28	< 0,0001	
C ²	22,19	1	22,19	532,68	< 0,0001	
Residual	0,9166	22	0,0417			
Lack of Fit	0,1591	5	0,0318	0,7141	0,6214	Không ý nghĩa
Pure Error	0,7575	17	0,0446			
R ²	0,9989					
Adjusted R ²	0,9984					
Predicted R ²	0,9974					

^a tổng bình phương, ^b bậc tự do, ^c trung bình bình phương.

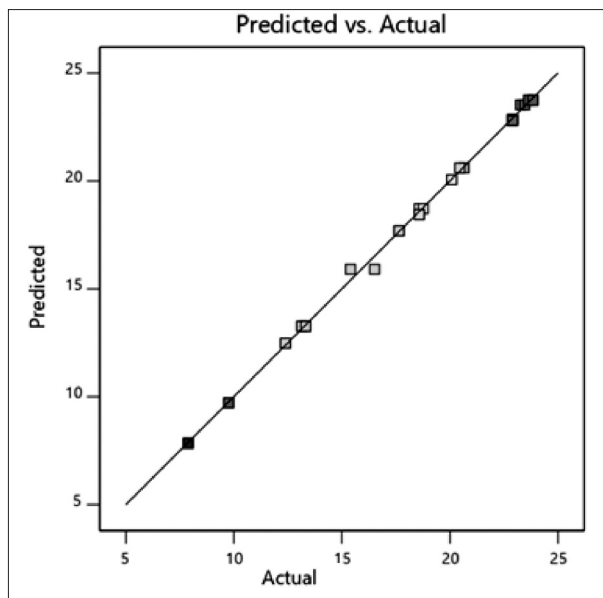
sang biến số thực. Phương trình hồi quy theo biến số thực có dạng:

$$\begin{aligned} DE = & -76,6155 + 1,229X_1 + 1,7321X_2 \\ & - 0,0888X_3 - 0,0052X_1X_2 \\ & + 0,00096X_1X_3 + 0,00225X_2X_3 \\ & - 0,0054X_1^2 - 0,01515X_2^2 - 0,00034X_3^2 \end{aligned}$$

Trong đó: X_1 (U/g) là biến thực của giá trị enzyme; X_2 (°C) là biến thực của giá trị nhiệt độ; X_3 (phút) là biến thực của giá trị thời gian.

Từ thực nghiệm cho thấy, nhờ vào việc bố trí thí nghiệm theo mô hình đa biến, chúng tôi xác định được chính xác nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời

Hình 1: Phân bố của giá trị thực và dự đoán

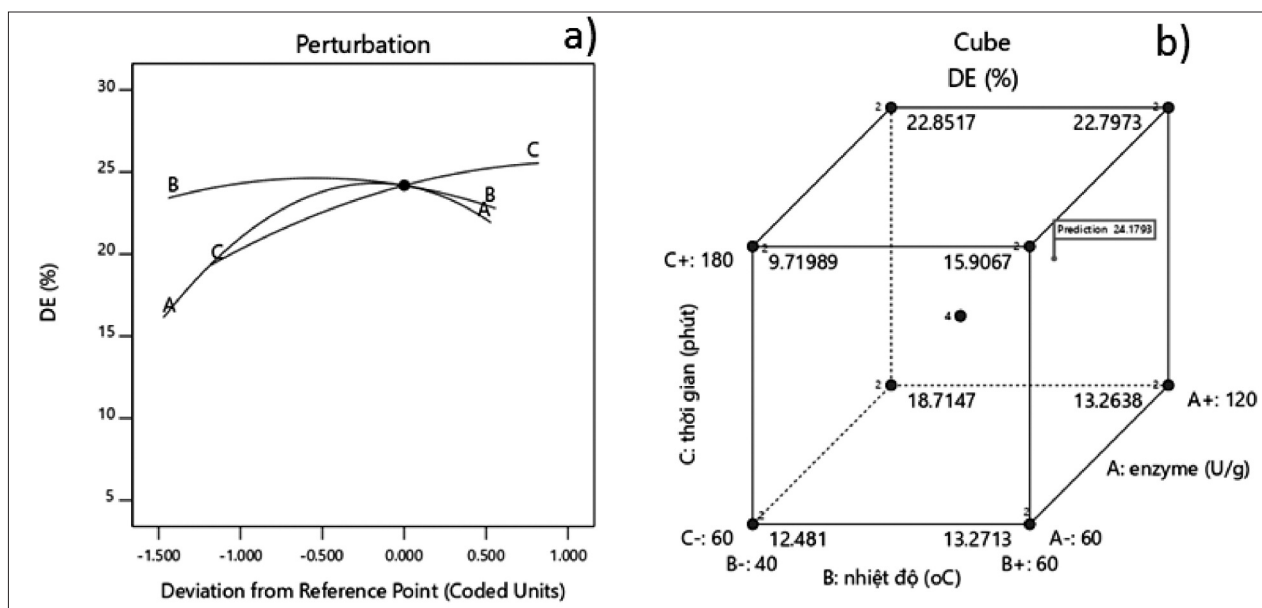


nếu tăng thời gian và nồng độ enzyme thì không đủ cơ chất cho phản ứng. Vì vậy, khi tăng nồng độ glucoamylase 104,093U/ml, thời gian 130,670 phút và nhiệt độ ở 54,410°C thì hàm lượng DE sẽ đạt cao nhất là 24,179%. (Hình 2)

Thí nghiệm kiểm chứng: Để kiểm chứng tính chính xác của giá trị nhận được từ phương trình hồi quy, ba thí nghiệm được tiến hành lặp lại độc lập ở điều kiện nồng độ glucoamylase = 105U/ml, nhiệt độ 55°C và thời gian thủy phân 130 phút.

Bảng 6 cho thấy hàm lượng DE ở thí nghiệm kiểm chứng là 23,838% tương đương với kết quả tối ưu hóa theo mô hình lý thuyết là 24,179% ở cùng điều kiện và không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ tin cậy là 95%. Như vậy, kết quả kiểm định đã khẳng định tính chính xác cao của mô hình đã được xây dựng.

Hình 2: a) độ lệch so với các điểm tham chiếu b) khối lập phương tương tác của 3 yếu tố



gian xử lý mà tại đó cho kết quả hàm lượng DE là cao nhất theo mong đợi. (Bảng 5)

Do mỗi enzyme chỉ hoạt động tốt nhất ở một điều kiện nhất định, điều kiện này phụ thuộc vào nhiệt độ, thời gian, pH, nồng độ enzyme [12]. Thời gian thủy phân ngắn và nồng độ enzyme thấp thì không đủ điều kiện tiếp xúc giữa cơ chất và enzyme làm cho hàm lượng đường khử sinh ra ít,

4. Kết luận

Quá trình dịch hóa bằng α -amylase theo tỷ lệ tinh bột:nước 1:4 cho hàm lượng đường khử cao nhất là 14,92% với nồng độ α -amylase 11U/g và thời gian dịch hoá 50 phút. Giai đoạn đường hoá cho kết quả là nồng độ glucoamylase 104,093U/ml, nhiệt độ 54,410°C và thời gian thủy phân 130,670 phút cho hàm lượng DE cao nhất 24,179% ■

Bảng 5. Kết quả tối ưu hóa 3 yếu tố nhiệt độ, thời gian và glucoamylase

Điều kiện tối ưu			Hàm lượng DE (%)
Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Glucoamylase (U/ml)	
54,410	130,670	104,093	24,179

Bảng 6. Kết quả Y từ phương trình hồi quy và thực nghiệm

		Mô hình lí thuyết	Mô hình thực tế	Mẫu tự nhiên
Biến	Glucoamylase (U/ml)	104,093	105	
	Nhiệt độ, °C	54,410	55	
	Thời gian xử lý, phút	130,670	130	
Đáp ứng Y	Hàm lượng DE, %	24,179 ^a ± 0,000	23,838 ^a ± 0,187	15,704b ± 0,286

Ghi chú: Các ký tự trong cùng một dòng giống nhau không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở 95%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. D. G. Stevenson, S. H. Yoo, P. L. Hurst et al (2005). Structural and physicochemical characteristics of winter squash (*Cucurbita maxima* D.) fruit starches at harvest. *Carbohydr. Polym.*, 59(2), 153-163.
2. T. Rakcejeva, R. Galoburda, L. Cude et al (2011). Use of dried pumpkins in wheat bread production. *Procedia Food Sci.*, 1, 441-447.
3. B. D. Smith (2016). The Initial Domestication of *Cucurbita pepo* in the Americas. *Am. Assoc. Adv. Sci.*, 276(5314), 932-934.
4. M. Yadav, S. Jain, R. Tomar et al (2010). Medicinal and biological potential of pumpkin: An updated review. *Nutr. Res. Rev.*, 23(2), 184-190.
5. T. X. and Q. Wang (2007). Hypoglycaemic role of *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Sci. Food Agric.*, 87, 1753-1757.
6. Y. I. Kwon, E. Apostolidis, Y. C. Kim et al (2007). Health benefits of traditional corn, beans, and pumpkin: In vitro studies for hyperglycemia and hypertension management. *J. Med. Food*, 10(2), 266-275.
7. S. E. A. Badr et al., (2011). Chemical composition and biological activity of ripe pumpkin fruits (*Cucurbita pepo* L.) cultivated in Egyptian habitats. *Nat. Prod. Res.*, 25(16), 1524-1539.
8. Lê Văn Việt Mẫn và cộng sự (2011). *Công nghệ chế biến thực phẩm*. TP. Hồ Chí Minh: NXB Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
9. Phan Thị Kiều Nhi và cộng sự (2015). Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian sấy đến chất lượng bột bí đỏ *Cucurbita Pepo*. *Tạp chí Đại học Công nghiệp*, 2(19), 101-107.
10. J. Krisch and B. Szajáni (1997). Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*. *Biotechnology letters*, 19(6), 525-528.
11. H. Zhang and Z. Jin (2011). Preparation of products rich in resistant starch from maize starch by an enzymatic method. *Carbohydr. Polym.*, 86(4), 1610-1614.
12. Nguyễn Đức Lượng (2004). *Công nghệ enzym*. TP. Hồ Chí Minh: NXB Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.

Ngày nhận bài: 8/2/2023

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 8/3/2023

Ngày chấp nhận đăng bài: 23/3/2023

Thông tin tác giả:

1. VÕ MINH HOÀNG*

2. NGUYỄN THỊ HỒNG THẨM

Trung tâm Công nghệ Sau thu hoạch, Khoa Nông nghiệp - Thủy sản

Trường Đại học Trà Vinh

**HYDROLYZING PUMPKIN STARCH
(*CUCURBITA MOSCHATA*) BY USING ENZYMES TO REACH
THE HIGHEST REDUCING SUGAR CONTENT WITH
THE CENTRAL COMPOSITE DESIGN METHOD**

● VO MINH HOANG¹

● NGUYEN THI HONG THAM¹

¹Center for Post-Harvest Technology

Faculty of Agriculture and Fisheries, Tra Vinh University

ABSTRACT:

This study aims to determine the conditions of pumpkin starch hydrolysis by α -amylase and glucoamylase enzymes in order to find out the optimal conditions to gain the highest reducing sugar content. The saccharification experiment is carried out based on a multivariate model according to the Central Composite Design method. The study finds out that the optimal conditions for the hydrolysis of glucoamylase are the concentration of 104.093U/ml, temperature of 54.410°C and hydrolysis time of 130,670 minutes to reach the highest DE content at 24.179 percent compared to the non-enzymatic method 2.64 ± 0.25 . The analysis of variance in the regression model shows that the quadratic model is significant ($p < 0.05$), the reliability of the model $R^2 = 0.9989$, and Lack of fit ($p > 0.05$). It shows that the built regression model fits.

Keywords: α -amylase, glucoamylase, starch, pumpkin starch, hydrolyze.