

TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN BIẾN TÍNH TINH BỘT GẠO TẠO TINH BỘT KHÔNG TIÊU HÓA BẰNG ENZYME

● VÔ MINH HOÀNG - NGUYỄN ĐỨC TOÀN

TÓM TẮT:

Bài viết nghiên cứu cách tối ưu hóa các thông số của quá trình thủy phân nhằm tạo hàm lượng tinh bột RS cao nhất bằng enzyme maltogenic amylase. Kết quả phân tích cho thấy, phương trình hồi quy đa thức bậc hai thu được có ý nghĩa ($p < 0,05$). Lack of fit p -value $> 0,05$ chỉ ra rằng, mô hình phù hợp cho tất cả dữ liệu. Độ tin cậy của mô hình $R^2 = 0,998$, độ tương thích của mô hình $Q^2 = 0,812$ cho thấy mô hình tương thích với kết quả thực nghiệm và có độ tin cậy cao. Điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân ở nhiệt độ $60,015^\circ\text{C}$, thời gian $6,679\text{h}$ và nồng độ enzyme $29,352\text{U/ml}$ cho hàm lượng tinh bột không tiêu hóa cao nhất là $6,04\%$.

Từ khóa: Biến tính tinh bột, tối ưu hóa, tinh bột không thủy phân (RS).

1. Đặt vấn đề

Tình trạng thừa cân và béo phì đang tăng lên với tốc độ báo động không những ở các quốc gia phát triển mà ở cả các quốc gia đang phát triển. Nguyên nhân cơ bản của thừa cân, béo phì là sự mất cân bằng năng lượng giữa lượng calo tiêu thụ và lượng calo tiêu hao. Mà khẩu phần ăn của chúng ta hàm lượng tinh bột tiêu hóa nhanh chiếm tỷ lệ quá cao, điều này dẫn đến một trong những nguyên nhân gây ra bệnh này.

Để giải quyết những vấn đề này, nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu tinh bột có tính chất hóa lý tốt hơn. Theo Englyst và các cộng sự (1992), đối với mục đích dinh dưỡng, tinh bột trong thực phẩm được phân loại thành tinh bột tiêu hóa nhanh (RDS - Rapidly Digestible Starch), tinh bột tiêu hóa chậm (SDS - Slowly Digestible Starch) và tinh bột không tiêu hóa (RS - Resistant Starch) dựa theo tốc độ giải phóng glucose và hấp thụ của nó trong

đường tiêu hóa. Và RS là tinh bột không bị thủy phân sau 120 phút xử lý với hệ enzyme amylase tuyến tụy nhưng bị lên men ít hoặc nhiều bởi hệ sinh vật đường ruột sản sinh ra các acid béo mạch ngắn có lợi cho đường ruột và góp phần bổ sung thêm nguồn năng lượng cho cơ thể. Do đó, nó đóng vai trò như chất xơ rút ngắn thời gian tiêu hóa của thực phẩm và giảm sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh đường ruột [2 - 6]. Về giá trị năng lượng của RS trong thực phẩm đã được tính toán khoảng $2,2\text{ kcal/g}$ [7]. Dựa trên năng lượng RS đã được xuất như một thành phần trong chế độ ăn có thể giúp giảm cân [8], phòng sự suy giảm lớp nhầy bảo vệ ruột kết, giảm nguy cơ mắc ung thư ruột kết, hỗ trợ kiểm soát bệnh đái tháo đường [6, 9 - 11], giảm cholesterol trong máu, giảm chỉ số đường huyết, tăng hấp thụ chất khoáng [5, 9, 12].

Mục đích sử dụng enzyme maltogenic amylase trong thủy phân tinh bột nhằm tạo ra loại tinh bột

biến tính có độ phân nhánh cao, cấu trúc tinh thể tăng để làm chậm khả năng tiêu hóa. Hiệu quả thủy phân tinh bột của enzyme phụ thuộc vào nhiều điều kiện, đặc biệt là nhiệt độ, thời gian và nồng độ enzyme thủy phân. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu tối ưu hóa các thông số của quá trình thủy phân nhằm tạo hàm lượng tinh bột RS cao nhất.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Bột gạo được làm từ lúa gạo (*Oryza sativa* L.) được mua từ cơ sở Lộ Sản, ấp Tân Mỹ, xã Tân Phú Trung, huyện Châu Thành - tỉnh Đồng Tháp. Độ ẩm 14,59%; protein 0,65%; lipid 0,3%; glucit 81,37%; tổng số vi sinh vật hiếu khí 5x101(vsv/g). Maltogenic amylase (TQ), α -amylase (hãng Novozymes), nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus subtilis*: soluble starch, maltose, D-glucose, 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Trong nghiên cứu này tác giả thực hiện 2 thí nghiệm chính: (1) thiết kế mô hình hóa, tối ưu hóa; (2) xác định hàm lượng RS tại điều kiện tối ưu.

2.2.1. Thiết kế thí nghiệm mô hình hóa và tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng

Mô hình hóa được thiết kế bởi phần mềm Design-Expert với 3 yếu tố: nhiệt độ, thời gian và nồng độ enzyme với hàm mục tiêu là đường khử đầu ra đạt thấp nhất theo mong đợi. (Bảng 1)

Bảng 1. Các mức độ được mã hóa của mỗi biến trong mô hình Box - Behnken

Biến	Kí hiệu	Mức độ		
		-1	0	1
Nhiệt độ, °C	X ₁	50	60	70
Thời gian, h	X ₂	3	6	9
Nồng độ enzyme, U/ml	X ₃	15	25	35

Trong nghiên cứu này, bố trí thí nghiệm mô hình hóa được thực hiện dựa theo mô hình Box-Behnken với 3 thông số nhiệt độ (X₁), thời gian (X₂) và nồng độ enzyme (X₃) là các biến độc lập và hàm lượng đường khử (Y_{min}) là đáp ứng phụ thuộc. phương trình hồi quy đa thức được áp dụng để xuất như phương trình:

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

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.

2.2.2. Xác định hàm lượng RS từ mẫu tối ưu

Từ mô hình toán học tính toán được thông số tối ưu cho điều kiện biến tính. Mẫu tinh bột tối ưu sau đó sẽ được đánh giá hàm lượng RS và so sánh với mẫu thực tế trong cùng điều kiện. Hàm lượng RS trong các mẫu nghiên cứu này được xác định dựa theo phương pháp Englyst et al. 1992 với một số điều chỉnh. Công thức xác định hàm lượng RS như sau:

$$TS = (TG - FG) * 0.9$$

$$RSD = (G20 - FG) * 0.9$$

$$SDS = (G120 - G20) * 0.9$$

$$RS = TS - (RSD + SDS)$$

Trong đó: FG là hàm lượng glucose thời gian bắt đầu thủy phân (0 phút); G20 là hàm lượng glucose sau thủy phân 20 phút; G120 là hàm lượng glucose sau thủy phân 120 phút; TG là hàm lượng glucose tổng.

2.2.3. Phân tích thống kê

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

3. Kết quả thảo luận

3.1. Mô hình hóa thực nghiệm

Mô tả quá trình xử lý bằng mô hình thực nghiệm bậc 2 Box-Behnken. Ma trận thực nghiệm và kết quả thực nghiệm như (Bảng 2).

Kết quả tại Bảng 3 cho thấy mô hình có ý nghĩa với p-value < 0.0001. Lack of fit p-value > 0.05 điều này chỉ ra rằng mô hình phù hợp cho tất cả dữ liệu. Độ tin cậy của mô hình R² = 0.998, đó tương thích của mô hình Q² = 0.812 cho thấy mô hình tương thích với kết quả thực nghiệm và có độ tin cậy cao. R² Adj. = 0.995 tương đương với R² cho thấy các yếu tố khảo sát đã giải thích phần lớn kết quả thí nghiệm. R² dự đoán là thước đo mức độ phù hợp của mô hình dự đoán, trong phạm vi 0,20 của R² Adj là phù hợp.

Bảng 2. Giá trị quan sát và giá trị dự đoán trong mô hình hóa

Mẫu	Thứ tự chạy mẫu	X1	X2	X3	Đường khử ($\mu\text{mol/ml}$)	
					Quan sát	Dự đoán
N1	6	1	0	-1	1,49	1,50
N2	9	0	1	-1	1,35	1,35
N3	14	0	0	0	1,10	1,09
N4	11	0	1	1	1,29	1,30
N5	4	1	1	0	1,42	1,42
N6	5	1	0	-1	1,37	1,37
N7	7	1	0	1	1,36	1,35
N8	13	0	0	0	1,09	1,09
N9	3	-1	1	0	1,34	1,34
N10	8	1	0	1	1,29	1,29
N11	15	0	0	0	1,08	1,09
N12	1	1	1	0	1,46	1,46
N13	10	0	1	-1	1,34	1,34
N14	12	0	1	1	1,15	1,16
N15	2	1	1	0	1,45	1,45

Bảng 3. Phân tích thống kê anova cho đường khử

Nguồn	SSa	df	MSc	F-value	p-value	Ý nghĩa
Model	0,2671	9	0,0297	329,78	< 0,0001	Ý nghĩa
X ₁	0,0018	1	0,0018	20,00	0,0066	
X ₂	0,0113	1	0,0113	125,00	< 0,0001	
X ₃	0,0265	1	0,0265	293,89	< 0,0001	
X ₁ X ₂	0,0020	1	0,0020	22,50	0,0051	
X ₁ X ₃	0,0090	1	0,0090	100,28	0,0002	
X ₂ X ₃	0,0042	1	0,0042	46,94	0,0010	
X ₁ ²	0,1648	1	0,1648	1830,83	< 0,0001	
X ₂ ²	0,0499	1	0,0499	554,42	< 0,0001	
X ₃ ²	0,0215	1	0,0215	238,53	< 0,0001	
Residual	0,0004	5	0,0001			
Lack of Fit	0,0002	3	0,0001	0,8333	0,5869	Không ý nghĩa

Nguồn	SSa	df	MSc	F-value	p-value
Pure Error	0.0002	2	0.0001		
R ²	0.9983				
Adjusted R ²	0.9953				
Predicted R ²	0.9834				
Adequate Precision	52.6080				

Ghi chú: ^a tổng bình phương, ^b bậc tự do, ^c trung bình bình phương

Phương trình hồi quy có dạng:

$$Y = 1.09 + 0.0151X_1 - 0.0375X_2 - 0.0575X_3 + 0.0225X_1X_2 - 0.0475X_1X_3 - 0.0325X_2X_3 + 0.2112X_1^2 + 0.1162X_2^2 + 0.0762X_3^2$$

Từ phương trình toán học, chúng tôi tối ưu hóa quá trình thủy phân mà tại đó lượng đường khử tạo thành là thấp nhất theo mong muốn. (Bảng 4).

3.2. Kiểm tra các điều kiện tối ưu

Mẫu sử dụng cho thí nghiệm kiểm tra tại điều kiện tối ưu: 100ml dung dịch hồ tinh bột 5%(w/v) tại nhiệt độ 60,015°C, thời gian 6,679h và nồng độ enzyme 29,352U/ml. Kết quả thu được như Bảng 5 với 3 lần lặp lại.

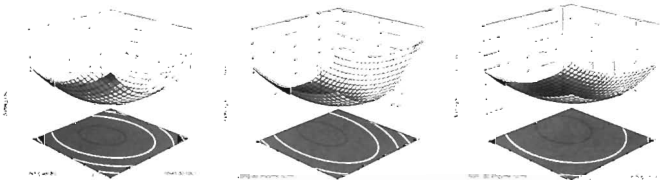
Theo Englyst et al. (1992) trong 20 phút đầu

(G20) tinh bột RDS được thủy phân trước. Qua Bảng 5 cho thấy lượng glucose được giải phóng tại thời điểm G20 ở mẫu tối ưu thấp hơn so mẫu tự nhiên. Điều này cho thấy có sự biến chuyển thành phần RDS trong tinh bột tự nhiên sang các dạng khác khó thủy phân hơn. Sau 120 phút tinh bột RDS và tinh bột SDS sẽ được thủy phân hoàn toàn thành glucose. Tại thời điểm G120 sự chênh lệch hàm lượng đường khử giải phóng giữa 2 mẫu chỉ vào khoảng 0,65μmol/ml thấp hơn 8 lần so với sự chênh lệch tại thời điểm G20. Như vậy, tinh bột tự nhiên sau khi xử lý bằng enzyme maltogenic amylase thì thành phần RDS chuyển hóa thành SDS và RS.

Bảng 4. Kết quả tối ưu hóa

	Điều kiện tối ưu			Nồng độ enzyme (U/ml)
	Hàm lượng đường khử (mmol/ml)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (h)	
Mẫu tối ưu	60,015	6,679	29,352	1,074

Hình 1: Đồ thị bề mặt đáp ứng của hàm lượng đường khử



- (a) Tác động của nhiệt độ với thời gian (tại giá trị nồng độ enzyme là 29,352U/ml)
- (b) Tác động của nhiệt độ với nồng độ enzyme (tại thời gian 6,679h)
- (c) Tác động của thời gian với nồng độ enzyme (tại một nhiệt độ 60,015 °C)

Kết quả tại Bảng 6 cho thấy giá trị trung bình của hàm lượng RS ở thí nghiệm kiểm chứng là 5,84%. Trong khi đó, kết quả tối ưu hóa cho hàm lượng RS đạt 6,04% ở cùng điều kiện. Qua kết quả trên cho thấy các thành phần RDS trong mẫu tinh bột tự nhiên sau khi được xử lý bằng maltogenic amylase thì chuyển hóa thành SDS và RS.

4. Kết luận

Tối ưu hóa điều kiện thủy phân tinh bột cho hàm lượng tinh bột RS cao nhất trong quá trình thủy phân tinh bột bằng enzyme maltogenic amylase được xây dựng dựa trên bố trí thí nghiệm theo phương pháp mô hình phức hợp trung tâm có độ chính xác cao. Kết quả tối ưu được xử lý ở điều kiện nhiệt độ 60,015°C, thời gian thủy phân 6,679h và nồng độ enzyme 29,352U/ml cho hàm lượng RS cao nhất là 6,04% ■

Bảng 5. Hàm lượng glucose ở các khoảng thời gian khác nhau

Mẫu	Glucose giải phóng (μmol/ml)			
	FG	G20	G120	TG
Tối ưu	0.13 ± 0.006	18,17 ± 0,258	25,66 ± 0,458	27,31 ± 0,5
Tự nhiên	0.06 ± 0.004	23,53 ± 0,341	26,31 ± 0,161	26,74 ± 0,1

Bảng 6. Bảng kết quả thí nghiệm kiểm chứng

	Mô hình tối ưu	Mô hình thực tế	Mẫu tự nhiên
Biến	Nhiệt độ xử lý, °C	60,015	60
	Thời gian, h	6,679	6,5
	Nồng độ enzyme, U/ml	29,352	30
Hàm lượng RS, % (w/w)	6,04 ^a ± 0,514	5,84 ^b ± 0,151	1,62 ^b ± 0,28

Ghi chú: a, b (p < 0,05); khác biệt có ý nghĩa, số liệu là trung bình của 3 lần lặp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. H. N. Englyst, S. M. Kingman, and J. H. Cummings (1992). Classification and measurement of nutritional important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 46(2), pp. S33-S50. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01627.x.
2. D. L. Topping and P. M. Clifton (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.*, 81(3), pp.1031-1064. DOI: 10.1152/physrev.2001.81.3.1031
3. D. Topping, M. Fukushima, & A. Bird, (2003). Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: State of the art. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), pp.171-176. DOI:10.1079/PNS2002224
4. M. Shmada, K. Mochizuki, and T. Goda (2008). Dietary Resistant Starch Reduces Levels of Glucocorticoid-Dependent Insulinotropic Polypeptide mRNA along the Jejunum-Ileum in Both Normal and Type 2 Diabetic Rats. *Biochem. Biotechnol.*, 72(8), pp. 2206-2209. DOI: 10.1271/abb.80185.
5. E. Fuentes-Zaragoza, E. Sánchez-Zapata, E. Sendra, E. Sayas, C. Navarro, J. Fernández-López, J. A. Pérez-Alvarez (2011). Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch/Stärke*, 63(7), pp. 406-415. DOI: 10.1002/star.201000099.
6. E. Sánchez-Zapata, M. V. Andújar-Martos, J. Fernández-López, and J. A. Pérez-Alvarez (2015). Resistant starch: functional ingredient. *Polysaccharides Bioactivity Biotechnol.*, pp.1911-1931. DOI: 10.1007/978-3-319-16290_34.
7. K. M. Behall and J. C. Howe (1996). Resistant starch as energy. *J. Am. Coll. Nutr.*, 15(3), pp. 248-254. DOI: 10.1080/07315724.1996.10718595

8. L. C. Tapsell (2004). Diet and metabolic syndrome - Where does resistant starch fit in?. *J. AOAC Int.*, 87(3), pp. 756-760. DOI: (nếu có)
9. A. P. Nugent (2005). Health properties of resistant starch. *Nutr. Bull.*, 30(1), pp. 27-54 DOI: 10.1111/j.1467-3010.2005.00481.x.
10. J. Nissar, T. Ahad, H. R. Naik, and S. Z. Hussain (2017). "Resistant Starch- Chemistry and Nutritional properties. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 2(6), pp. 95-108.
11. E. Jyoshna and T. V Hymavathi (2017). Review of studies on effect of resistant starch supplementation on glucose and insulin. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(3), pp.55-58
12. M. G. Sajilata, R. S. Singhal, and P. R. Kulkarni (2006). Resistant starch - A review. *Compr. Rev. Food Sci Food Saf.*, 5(1), pp. 1-17. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2006.tb00076.x.

Ngày nhận bài: 9/4/2020

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 19/4/2020

Ngày chấp nhận đăng bài: 29/4/2020

Thông tin tác giả:

VÔ MINH HOÀNG - NGUYỄN ĐỨC TOÀN

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

Trường Đại học Trà Vinh

OPTIMIZING MODIFICATION OF RICE STARCH WITH ENZYME TO CREATE RESISTANT STARCH

● VO MINH HOANG
● NGUYEN DUC TOAN

Center of Post-harvest Technology,
Department of Agriculture - Fisheries
Tra Vinh University

ABSTRACT:

This study is to find out how to optimize the condition of hydrolyzing rice starch with the enzyme maltogenic amylase to produce resistant starch. This study shows that the quadratic polynomial regression equation obtained is significant ($p < 0.05$). Lack of fit p -value > 0.05 indicates that the proposed model is suitable for all data. The reliability of the model $R^2 = 0.998$ and the compatibility of the model $Q^2 = 0.812$ show that the proposed model is compatible with experimental results and the model is highly reliable. Optimal conditions for the hydrolysis process are 6.679 hours and enzyme concentration of 29.352U/ml at 60.015°C, resulting in the highest resistant starch of 6.04%.

Keywords: Modification of rice starch, optimized, resistant starch (RS).