

NGHIÊN CỨU CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG CỦA QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN BẰNG ENZYME PULLULANASE ĐỂ LÀM TĂNG HÀM LƯỢNG TINH BỘT KHÁNG TIÊU HÓA TỪ NGUYÊN LIỆU GẠO

Nguyễn Hoàng Anh^{1,*}, Nguyễn Thị Thanh Tú¹, Trần Võ Quốc Huy¹,
Cao Thị Như Ý¹, Đỗ Kinh Kha¹, Võ Trà My¹, Lê Nguyễn Đoàn Duy¹

¹ Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Công thương thành phố Hồ Chí Minh

*Email: duyln@huit.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác định các điều kiện tối ưu làm tăng hàm lượng tinh bột kháng tiêu hóa bằng phương pháp sinh học với ứng dụng enzyme pullulanase để thủy phân tinh bột gạo OM18. Thí nghiệm tiến hành lần lượt khảo sát của các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của enzym pullulanase: Nồng độ cơ chất (10 - 50%), hoạt độ enzym (10 - 50 U/g), thời gian thủy phân (2 - 10 giờ), pH (4,0 - 6,0) và nhiệt độ (45 - 65°C) đến hàm lượng tinh bột kháng tiêu hóa. Kết quả xác định được các điều kiện tối ưu cho hoạt động của enzym pullulanase: Nồng độ cơ chất (20%), hoạt độ enzym (30 U/g), thời gian thủy phân (6 giờ), pH (4,5), nhiệt độ (55°C). Kết quả nghiên cứu thu được sản phẩm tinh bột gạo OM18 đạt 12,2% hàm lượng tinh bột kháng tiêu hóa. Số liệu nghiên cứu là tiền đề để xây dựng quy trình sản xuất tinh bột gạo giàu hàm lượng tinh bột kháng hướng đến ứng dụng vào các quy trình chế biến những sản phẩm dạng thực phẩm bổ sung prebiotics.

Từ khoá: *Enzyme pullulanase, tinh bột gạo, tinh bột kháng.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tinh bột kháng (Resistant Starch - RS) được biết đến là loại tinh bột không được tiêu hóa ở ruột non và được lên men khi đến ruột già bởi hệ vi sinh vật đường ruột để tạo thành các axit béo mạch ngắn (SCFA), là năng lượng cho các tế bào ruột kết, xem như prebiotics thúc đẩy sự phát triển lợi khuẩn nhằm tăng sức đề kháng cho cơ thể [1]. Tinh bột kháng có ảnh hưởng tích cực đến hệ vi sinh vật đường ruột, đồng thời giúp ngăn ngừa bệnh ung thư ruột kết. Ngoài ra, tinh bột kháng giúp cân bằng đường huyết (GI), tăng độ nhạy insulin, giảm nguy cơ béo phì, bệnh đái tháo đường type 2 [2]. Đã có một số nghiên cứu về việc sử dụng enzym pullulanase để làm giàu hàm lượng tinh bột kháng từ nguyên liệu đậu xanh [3]. Tuy nhiên, các nghiên cứu vẫn có sự khác biệt về nguyên liệu đầu vào, phương pháp làm tăng hàm lượng tinh bột kháng. Với mục tiêu hoàn thiện quy

trình sản xuất tinh bột gạo OM18 giàu tinh bột kháng được nghiên cứu bằng ứng dụng enzym pullulanase là điều cần thiết. Các sản phẩm thực phẩm có nguồn gốc từ tinh bột gạo giàu tinh bột kháng là một hướng đi mới, có tiềm năng ứng dụng cao, mở ra xu thế cho dòng thực phẩm: Không chứa gluten, năng lượng thấp, thực phẩm bổ sung prebiotics từ nguồn nguyên liệu lúa dồi dào, sản lượng cao với giá thành thấp. Điều đó đã thúc đẩy, mở ra cơ hội không chỉ cho các nhà nghiên cứu mà cả các nhà sản xuất thực phẩm góp phần nâng cao giá trị hạt gạo.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu, hóa chất

2.1.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu lúa OM18 nghiên cứu được lấy từ xã Long Thạnh, huyện Giồng Riềng, tỉnh Kiên Giang. Chế phẩm enzym pullulanase (từ vi khuẩn

Bacillus licheniformis, hoạt độ enzym 3.000 U/ml) của Hãng Amano Enzyme, Nhật Bản.

2.1.2. Hóa chất

Axit acetic, sodium acetate, ethanol 99%, kit test RS, axit maleic, kali hydroxide.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chuẩn bị mẫu

Gạo tám OM18 → Xử lý, làm sạch → Ngâm → Nghiền → Sấy → Hồ hoá (70°C, 15 phút) → Thủy phân (enzym pullulanase) → Thoái hoá (4°C, 24 giờ) → Sấy → Nghiền → Xác định hàm lượng tinh bột kháng tiêu hoá.

Gạo tám OM18 được mang đi xử lý làm sạch, sau đó tiến hành cân 1.000 g gạo OM18 cùng 3.000 mL axit citric có nồng độ 0,15 M và ngâm trong bể ổn nhiệt Memmert (Đức) ở 55°C trong 2 giờ. Sau đó, đem đi nghiền bằng thiết bị xay bột ướt Goodfor (Việt Nam), thu được tinh bột gạo OM18. Mẫu tinh bột gạo được đem đi sấy ở nhiệt độ 40°C trong 2 giờ với mục đích làm ráo. Cân 50 g tinh bột gạo cho vào mỗi bình erlen cổ nhám 500 mL, tiếp theo thêm dung dịch đệm acetat 0,2 N rồi gia nhiệt trong bể ổn nhiệt ở 70°C trong 15 phút [4] và khuấy liên tục cho đến khi tinh bột được hồ hóa. Hỗn hợp tinh bột hồ hóa được làm nguội xuống 55°C và bổ sung enzym pullulanase rồi tiến hành khảo sát thí nghiệm 1, 2, 3, 4, 5. Sau khi hoàn tất thủy phân thì bất hoạt enzym pullulanase ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút [3]. Mẫu tinh bột sau thủy phân được thoái hóa ở 4°C trong 24 giờ [5]. Huyền phù tinh bột sau thoái hóa được rửa bằng nước cất và ly tâm thu cặn. Sau đó được sấy ở 45°C đến khi độ ẩm <13%. Tinh bột được nghiền qua rây 0,125 µm, đóng gói, bảo quản và phân tích các chỉ tiêu hóa lý.

2.2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thực hiện lần lượt các thí nghiệm khảo sát các yếu tố ảnh hưởng quá trình thủy phân bằng enzym pullulanase để làm tăng hàm lượng tinh bột kháng từ nguyên liệu gạo. Tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ cơ chất (10, 20, 30, 40 và 50%); hoạt độ enzym pullulanase (10, 20, 30, 40, 50 U/g); thời gian thủy phân (2, 4, 6, 8, 10 giờ); pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0); nhiệt độ (45, 50, 55, 60, 65°C) đến

hàm lượng tinh bột kháng tạo thành trong sản xuất tinh bột gạo giàu tinh bột kháng.

2.2.3. Phương pháp phân tích hóa lý

- *Xác định hàm lượng tinh bột kháng của tinh bột gạo*

Đánh giá bằng bộ xét nghiệm tinh bột kháng của Megazyme (Megazyme International, Wicklow, Ireland). Cân 100 mg tinh bột và trộn với 4 ml hỗn hợp enzym, bao gồm α - amylase tuyến tụy (10 mg/ml) và amyloglucosidase - AMG (3 U/ml), trong một ống nghiệm có nắp. Sau khi lắc, ống mẫu được thủy phân trong tủ ủ ổn nhiệt có lắc (200 lần/phút) trong 16 giờ ở nhiệt độ 37°C để thủy phân các tinh bột dễ tiêu hóa. Kết thúc quá trình thủy phân, huyền phù tinh bột được trộn với 4 ml ethanol tuyệt đối và được trộn mạnh bằng máy vortex để khử hoạt tính của các enzym. RS được thu hồi dưới dạng cục vón nhỏ bằng cách ly tâm ở 1.500 vòng trong 10 phút. Các cục vón tinh bột được rửa hai lần bằng ethanol 50% để loại bỏ tinh bột đã tiêu hóa và tiếp tục ly tâm. Cặn lắng thu được sẽ hòa tan trong 2 ml KOH 2 M bằng cách khuấy mạnh với thời gian 20 phút trong bể nước đá, sau đó được trung hòa bằng 8 ml đệm sodium acetate 1,2 M (pH 3,8). Sau khi trộn với 0,1 ml AMG (3.300 U/ml) trong bể ổn nhiệt 50°C, mẫu tiếp tục được trộn bằng máy vortex thêm 30 phút. Dung dịch sau đó được ly tâm ở 1.500 vòng trong 10 phút và phần nổi phía trên được thu hồi. Một phần dịch nổi phía trên (0,1 ml) được trộn với 3 ml glucose oxidase, peroxidase và 4 - aminoantipyrine (GOPOD), sau đó ủ ở 50°C trong 20 phút. Độ hấp thụ của các mẫu được đo ở bước sóng 510 nm bằng máy quang phổ. Mỗi mẫu được phân tích trong ba lần [6].

Lượng RS được tính bằng công thức sau:

$$RS (\%) = \Delta E \times F/W \times 90$$

Trong đó: ΔE là độ hấp thụ đã trừ mẫu trắng; F là hệ số chuyển đổi từ độ hấp thụ sang micrograms của mẫu tiêu chuẩn chia cho độ hấp thụ của mẫu GOPOD; W là khối lượng mẫu; 90 là kết quả của phép chia 162/180 (hệ số chuyển đổi từ D-glucose tự do sang dạng anhydro-D-glucose).

- *Xác định hình dạng hạt tinh bột bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM)*

Hạt tinh bột gạo OM18 trước và sau khi xử lý RS được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét theo quy trình của Hung và Morita (2005) [7]. Phân tán tinh bột trong dung dịch ethanol 95% trong vài phút và rắc lên băng dính hai mặt gắn trên thân nhôm, phủ Pt. Tiến hành chụp bằng thiết bị SEM (JSM - IT200, Tokyo, Nhật Bản) ở hiệu điện thế gia tốc 5 kV.

- *Xác định cấu trúc tinh bột bằng FTIR*

Phân tích phổ hồng ngoại biến đổi Fourier của tinh bột có thể cung cấp thông tin về những thay đổi trong trật tự phân tử và mức độ xoắn kép ở phạm vi tầm ngắn. Các dải hấp thụ IR ở 995 cm⁻¹ và 1.047 cm⁻¹ có liên quan đến cấu trúc có trật tự và tinh thể ngậm nước của tinh bột, trong khi ở đỉnh 1.022 cm⁻¹ liên quan đến cấu trúc vô định hình. Do vậy, tỷ lệ diện tích tích hợp của các dải hấp thụ ở 1.047/2.011 cm⁻¹ và 995/1.022 cm⁻¹ được sử dụng để định lượng các thay đổi bên trong về mức độ trật tự (DO) và mức độ xoắn kép (DD) của phân tử tinh bột. Hạt tinh bột gạo OM18 nguyên liệu và sau khi xử lý RS được phân tích cấu trúc tầm ngắn bằng máy quang phổ ATR PRO ONE X - JASCO FTIR - 6.600 thông lượng cao (Deutschland GmbH, Cộng hòa Liên bang Đức) [8].

- *Xác định cấu trúc kết tinh của tinh bột bằng XRD*

Dựa vào hiện tượng các tia X nhiễu xạ trên các mặt tinh thể chất rắn, tính tuần hoàn dẫn đến việc các mặt tinh thể đóng vai trò như một cách từ nhiễu xạ. Kết quả của thí nghiệm với X - ray sẽ cho biết cấu trúc kết tinh của nguyên liệu thuộc loại A, B hay C và % tinh thể có ở trong mẫu. Phân tích nhiễu xạ tia X được thực hiện bằng máy đo nhiễu xạ tia X (Rigaku Co., Ltd, loại Rint 2000, Tokyo, Nhật Bản), hoạt động từ 2 - 25° góc quét 2θ với tốc độ quét 8°/phút và bước quét 0,02° ở 40 kV và 80 mA [8]. Loại tinh thể được xác định dựa vào các peak đặc trưng. Mức độ kết tinh tương đối (%RC) được tính bằng tỷ số giữa diện tích các peak so với tổng diện tích nhiễu xạ [9].

- *Xác định màu sắc của tinh bột*

Màu sắc của mẫu tinh bột gạo OM18 trước và sau xử lý được đo bằng máy đo màu Minolta

CR410 (Konica Minolta Co., Nhật Bản) có tham chiếu đến đèn chiếu sáng tiêu chuẩn D65 và góc nhìn 10. (không gian màu của hệ thống CIELAB; L*, a*, b* là giá trị của mỗi điểm ảnh phản ánh màu sắc bề mặt mẫu). Giá trị L* biểu thị độ sáng; a* biểu thị màu đỏ/xanh lá cây; giá trị b* biểu thị màu vàng/xanh dương. Độ trắng (W) được tính bằng phương trình sau:

$$W = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

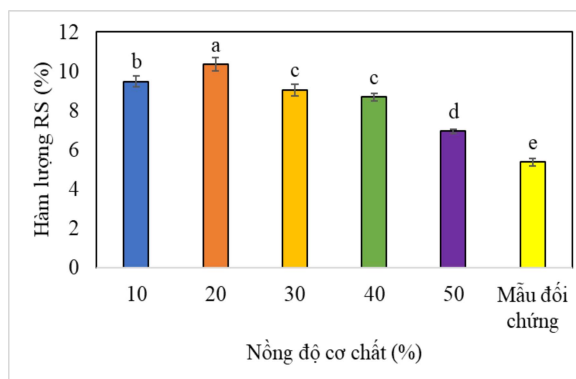
Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phân tích phương sai (ANOVA). Sự khác biệt giữa các giá trị (p < 0,05) được phân tích kiểm định Fisher's sử dụng phần mềm thống kê Minitab phiên bản 2022.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của enzym pullulanase đến hàm lượng tinh bột kháng

3.1.1. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến hàm lượng tinh bột kháng

Thí nghiệm tiến hành khảo sát chi tiết về ảnh hưởng của nồng độ cơ chất tinh bột đến mức độ thủy phân và hàm lượng tinh bột kháng hình thành (Hình 1).



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến hàm lượng tinh bột kháng

Ghi chú: Các chữ số khác nhau trên cùng một cột hay một hàng biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức, với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Hình 1 cho thấy, khi nồng độ tinh bột tăng từ 10% (w/v) lên 20% (w/v), hàm lượng RS tăng từ 9,49% lên mức cao nhất là 10,36%. Đây là nồng độ tối ưu, cho thấy tốc độ hoạt động của enzym tỷ lệ

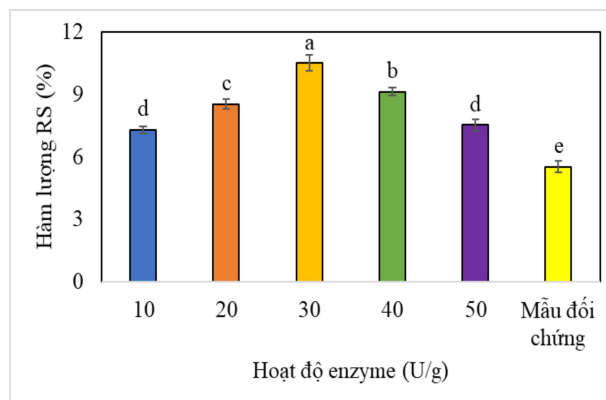
thuận với nồng độ cơ chất trong giai đoạn đầu của phản ứng thủy phân, do sự gia tăng số lượng phân tử cơ chất liên kết với enzym, dẫn đến tăng sản phẩm tạo thành. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Kuddus (2018) [10], Zeng và cs (2015) [11] thủy phân bằng enzym pullulanase trên tinh bột gạo nếp. Khi nồng độ tinh bột tiếp tục tăng lên 30 và 40% (w/v), hàm lượng RS giảm nhẹ và duy trì ở mức 9,05 và 8,68%. Sự ổn định này có thể được giải thích bởi hiện tượng bão hòa enzym, khi quá nhiều cơ chất không thể tiếp tục gia tăng hiệu quả hoạt động của enzym. Tại nồng độ 50% (w/v), hàm lượng RS giảm đáng kể, còn 6,95%, cho thấy sự suy giảm hiệu quả thủy phân. Sự giảm hiệu quả này được lý giải là do thiếu đệm trong môi trường phản ứng vì đệm không chỉ đóng vai trò làm môi trường phản ứng mà còn là phương tiện vận chuyển, tạo điều kiện thuận lợi cho sự khuếch tán và di chuyển của các phân tử tham gia phản ứng [12]. Khi nước không đủ, cơ chất và enzym không thể tiếp xúc đầy đủ, dẫn đến khả năng trương nở của tinh bột kém, làm giảm hiệu quả tiếp xúc giữa enzym và cơ chất. Điều này dẫn đến giảm hiệu suất hình thành RS do mạch tinh bột khó bị tác động bởi enzym. Nghiên cứu tối ưu hóa thủy phân pullulanase trước đây của Su (2010) [13] trên tinh bột ngô cũng chỉ ra rằng, khi nồng độ tinh bột cao, khả năng trương nở giảm, làm giảm sự tiếp xúc giữa enzym và cơ chất, dẫn đến hiệu suất thủy phân và hình thành RS kém.

Kết quả thí nghiệm 1 cho thấy, nồng độ cơ chất tinh bột 20% (w/v) mang lại hiệu quả hình thành RS cao nhất. Quá trình thủy phân bằng enzym pullulanase ở nồng độ này tạo điều kiện tối ưu cho sự tiếp xúc giữa enzym và cơ chất, dẫn đến sự gia tăng hàm lượng RS. Ngược lại, nồng độ cơ chất quá cao dẫn đến giảm hiệu quả thủy phân do sự thiếu nước và khả năng trương nở kém của tinh bột, làm giảm sự hình thành RS.

3.1.2. Ảnh hưởng của hoạt độ enzym pullulanase đến hàm lượng tinh bột kháng

Số liệu ở hình 2 cho thấy, có sự thay đổi hàm lượng RS của sản phẩm khi hoạt độ enzym pullulanase thay đổi. Cụ thể, hàm lượng RS tăng từ mẫu có hoạt độ enzym tăng từ 10 U/g (7,31%) đến 30 U/g (10,52%), sau đó giảm lần lượt ở các mẫu

có hoạt độ enzym 40 U/g (9,13%) và 50 U/g (7,54%). Sự có mặt của enzym pullulanase dẫn tới quá trình phân cắt mạch nhánh amylopectin của tinh bột, tạo nhiều mạch thẳng amylose. Các mạch nhánh sẽ được chuyển thành cấu trúc xoắn kép sau giai đoạn thoái hóa làm cấu trúc tinh bột vững chắc hơn, dẫn đến sự cản trở tác động thủy phân của enzym tiêu hóa. Tỷ lệ gia tăng RS phụ thuộc nhiều vào độ dài mạch xoắn kép và chế độ thoái hóa [14].



Hình 2. Ảnh hưởng của hoạt độ enzym đến hàm lượng tinh bột kháng

Ghi chú: Các chữ số khác nhau trên cùng một cột hay một hàng biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức, với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

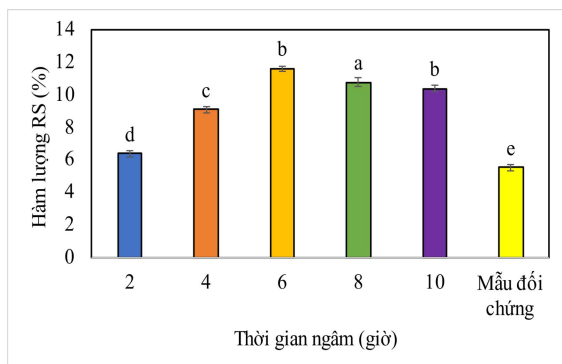
Do đó, hoạt độ enzym pullulanase tối ưu được lựa chọn là 30 U/g. Trong một số nghiên cứu trước đây, đã cho thấy hoạt độ enzym pullulanase thủy phân: Pullulan tối ưu 19 U/g [15], tinh bột ngô 23 U/g [16], điều này cho thấy cơ chất có thể là nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt.

Như vậy, hoạt độ enzym pullulanase được sử dụng trong quá trình thủy phân tinh bột gạo OM18 nhằm hình thành RS cao nhất là 30 U/g.

3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng tinh bột kháng

Thí nghiệm khảo sát thời gian thủy phân tinh bột trong khoảng 2 - 10 giờ (Hình 3). Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng RS tăng từ 6,53% ở 2 giờ lên đến mức cao nhất là 11,58% ở 6 giờ, trước khi giảm xuống 10,74% lúc 8 giờ và 10,37% ở 10 giờ. Điều này cho thấy, thời gian thủy phân khoảng 6 giờ là thời điểm tối ưu để đạt hiệu suất cao nhất trong sản xuất tinh bột kháng bằng

enzym pullulanase. Nghiên cứu của González (2004) [17] cho thấy, thời gian thủy phân tối ưu để đạt hàm lượng RS cao nhất trong tinh bột chuối là 5 giờ. Tương tự, cần 6 giờ để thủy phân với cơ chất pullulan [15].



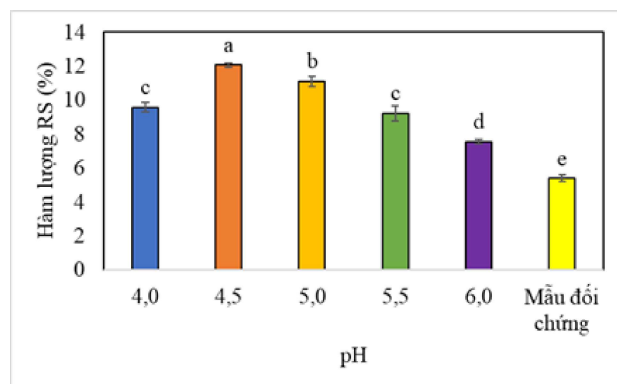
Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng tinh bột kháng

Ghi chú: Các chữ số khác nhau trên cùng một cột hay một hàng biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức, với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy, sau mức thời gian tối ưu, hiệu suất hình thành tinh bột kháng có xu hướng giảm do tác động của các sản phẩm thủy phân, điều này do tương tác giữa enzym và tinh bột trong quá trình thủy phân.

Nghiên cứu chỉ ra rằng, thời gian thủy phân tối ưu bằng enzym pullulanase là 6 giờ dẫn đến hình thành tinh bột kháng cao nhất, đạt 11,58%. Do đó, thời gian 6 giờ là lựa chọn hiệu quả để làm tăng tinh bột kháng.

3.1.4. Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng tinh bột kháng



Hình 4. Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng tinh bột kháng

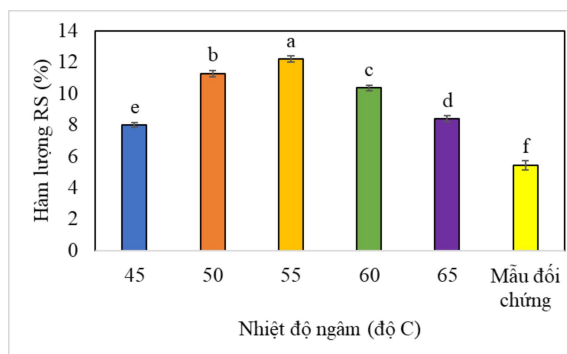
Ghi chú: Các chữ số khác nhau trên cùng một cột hay một hàng biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức, với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Nghiên cứu tập trung vào đánh giá tác động của pH môi trường thủy phân lên hoạt động của enzym pullulanase và hàm lượng tinh bột kháng (RS) trong sản phẩm. Kết quả cho thấy, điều chỉnh pH đóng vai trò quan trọng trong quá trình thủy phân, ảnh hưởng đến khả năng phân cắt và hình thành các sản phẩm có tính chất kháng tiêu hóa.

Hình 4 cho thấy, ở pH 4,5 được xác định là điều kiện tối ưu nhất cho enzym pullulanase, khi đó hàm lượng RS đạt cao nhất là 12,07%, khác biệt có ý nghĩa so với các mức pH khác (4,0; 5,0; 5,5; 6,0). Kết quả thí nghiệm phù hợp với thông tin từ nhà sản xuất Amano, pH tối ưu cho enzym pullulanase nằm trong khoảng từ 4,5 - 5,5. Mặc dù hàm lượng RS vẫn khá cao tại các mức pH 5,0 và 5,5 (11,1 và 9,22% tương ứng), nhưng khi pH đạt 6,0, hàm lượng RS giảm xuống còn 7,54%. Điều này cho thấy sự ảnh hưởng của pH đến quá trình thủy phân giúp hình thành tinh bột kháng.

Tóm lại, để tối ưu hóa quá trình thủy phân enzym pullulanase và sản xuất tinh bột kháng có hiệu quả cao cần chọn môi trường thủy phân với độ pH 4,5.

3.1.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến hàm lượng tinh bột kháng



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng tinh bột kháng

Ghi chú: Các chữ số khác nhau trên cùng một cột hay một hàng biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức, với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Thí nghiệm được thực hiện khảo sát ở các mức nhiệt độ 45, 50, 55, 60, 65°C và 4 thông số đã

được lựa chọn ở 4 thí nghiệm trên bao gồm: Nồng độ cơ chất tinh bột 20%, hoạt độ enzyme 30 U/g, thời gian ngâm 6 giờ và pH 4,5.

Kết quả nghiên cứu đã xác định sự ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đối với hoạt tính của enzyme pullulanase và hàm lượng tinh bột kháng hình thành trong sản phẩm. Hình 5 cho thấy, hàm lượng tinh bột kháng tăng dần từ 7,99% ở nhiệt độ 45°C lên 12,2% ở 55°C, điều này phù hợp với thông tin hướng dẫn của nhà sản xuất enzyme Amano về nhiệt độ tối ưu cho hoạt động enzyme là khoảng 55°C.

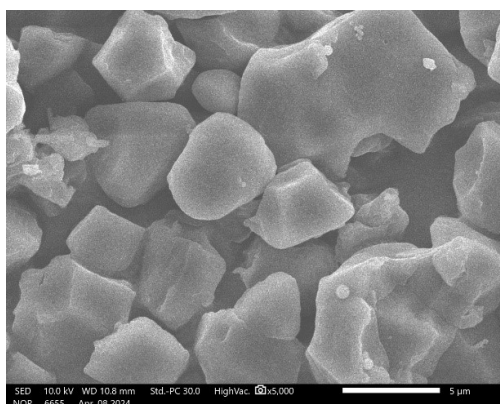
Tuy nhiên, khi nhiệt độ thủy phân tiếp tục tăng lên, hàm lượng tinh bột kháng đã giảm xuống, đạt 10,36% ở 60°C và 8,39% ở 65°C. Điều này cho thấy, sự giảm hiệu quả của quá trình thủy phân khi vượt quá nhiệt độ tối ưu. Kết quả thí

nghiệm tương đồng các nghiên cứu thực hiện quá trình thủy phân tinh bột ngô tối ưu tại nhiệt độ 50, 58°C [18], [19].

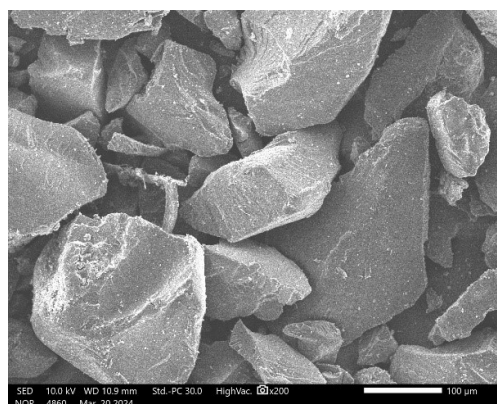
3.2. Đánh giá chất lượng sản phẩm bột gạo giàu hàm lượng tinh bột kháng

3.2.1. Kết quả SEM

Tinh bột gạo được chụp qua kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscopy - SEM) là một kỹ thuật hình ảnh dùng để quan sát bề mặt và cấu trúc của mẫu vật với độ phóng đại cao và độ phân giải tốt. SEM cho phép nghiên cứu chi tiết hình thái bề mặt, phân tích thành phần hóa học khi kết hợp với hệ thống phân tích tia X (EDS) và kiểm tra chất lượng cũng như xác định các khuyết tật của vật liệu [20].



(a)



(b)

Hình 6. Kết quả SEM của tinh bột trước khi xử lý (a) và sau khi xử lý (b)

Kết quả chụp SEM của 2 mẫu tinh bột gạo nguyên liệu cho thấy, có sự khác biệt rõ rệt về kích thước hạt và cấu trúc bề mặt, ảnh hưởng đến khả năng kháng tiêu hóa của chúng. Mẫu bột gạo nguyên liệu (6a) có kích thước hạt nhỏ và bề mặt trơn tạo ra diện tích bề mặt tiếp xúc lớn hơn, giúp enzyme tiêu hóa dễ dàng tấn công và phân giải tinh bột. Ngược lại, mẫu tinh bột gạo thành phẩm (6b) sau xử lý có kích thước hạt lớn và có hiện tượng bị

vỡ làm giảm diện tích bề mặt tiếp xúc hiệu quả với enzyme tiêu hóa, dẫn đến quá trình thủy phân diễn ra chậm hơn.

3.2.2. Kết quả đo màu sắc tinh bột

Để so sánh sự thay đổi màu sắc của hai mẫu tinh bột trong nguyên liệu trước và tinh bột thành phẩm sau khi xử lý được ghi nhận bởi sự thay đổi các giá trị L^* , a^* , b^* và được xác định bởi W.

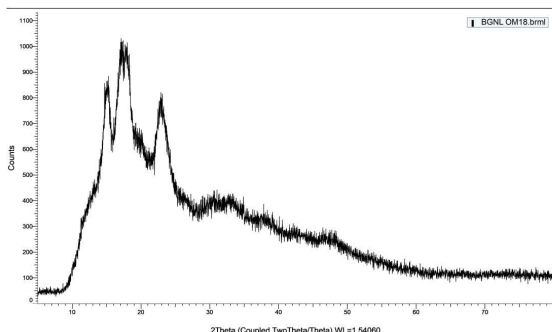
Bảng 1. Sự thay đổi màu sắc của tinh bột khi xử lý làm tăng tinh bột bền bằng enzyme pullulanase

Mẫu tinh bột gạo	Kết quả			
	L^*	a^*	b^*	W
Tinh bột nguyên liệu	$97,73 \pm 0,68^a$	$-4,60 \pm 0,07^a$	$10,67 \pm 0,47^a$	$88,30 \pm 0,30^a$
Tinh bột thành phẩm	$89,61 \pm 0,97^b$	$-4,52 \pm 0,09^a$	$10,84 \pm 0,16^a$	$84,32 \pm 0,64^b$

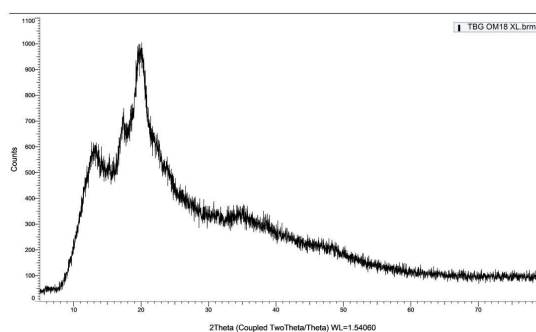
Kết quả này cho thấy, có sự khác biệt về màu sắc (W) giữa mẫu tinh bột gạo nguyên liệu và mẫu tinh bột gạo sau xử lý (có thể nhìn thấy bằng mắt thường). Cả hai giá trị a^* này đều âm, biểu thị độ lệch màu xanh lá cây. Giá trị b^* biểu thị giá trị dương nên chuyển sang màu vàng. Tuy nhiên, so với mẫu nguyên liệu thô, mẫu sau khi xử lý RS có chỉ số b^* cao hơn, điều này cho thấy thành phần RS sẽ tạo ra thành phẩm có màu vàng nhẹ.

3.2.3. Kết quả XRD

Phân tích XRD (X-ray diffraction) trong nghiên cứu tinh thể tinh bột giúp xác định cấu trúc tinh thể, đặc tính hình dạng và kích thước của các tinh thể, cũng như đánh giá sự thay đổi cấu trúc của tinh bột trong các điều kiện khác nhau như điều kiện xử lý enzyme hay nhiệt độ [9].



(a)



(b)

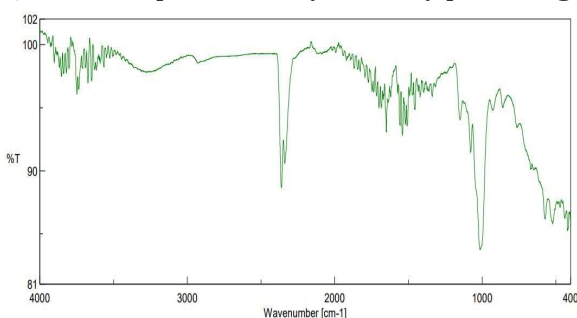
Hình 7. Kết quả XRD của tinh bột trước khi xử lý (a) và sau khi xử lý (b)

Dựa vào kết quả phân tích XRD, mẫu gạo OM18 trước và sau khi xử lý cho thấy, sự thay đổi rõ rệt trong cấu trúc tinh thể của tinh bột. Mẫu tinh bột gạo nguyên liệu ban đầu chưa xử lý (7a) thường có cấu trúc tinh thể loại A, được biểu hiện bằng các peak XRD tại các góc 15, 18, 23° (2 θ), điển hình cho tinh bột thông thường. Trong khi đó, tinh bột gạo sau khi xử lý bằng enzyme (7b) đã hình thành tinh thể dạng V, được chứng minh bởi sự xuất hiện của các đỉnh XRD tại các góc 13 và 20° (2 θ). Cấu trúc tinh thể dạng V này thường có tính chất kháng tiêu hóa hơn so với tinh thể loại V [21], có thể do quá trình xử lý như thủy phân bằng

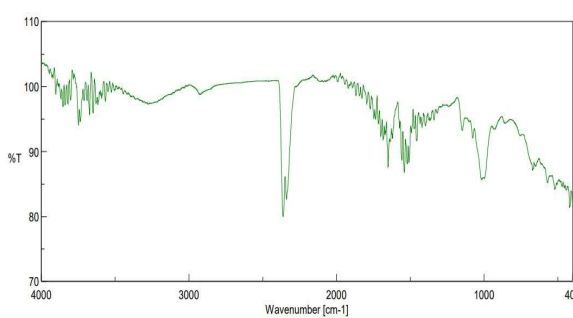
enzyme hoặc các biến đổi hóa học khác trong quá trình sản xuất.

3.2.4. Kết quả FTIR

FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) được sử dụng để phân tích khả năng kháng tiêu hóa của tinh bột bằng cách xác định cấu trúc hóa học và các nhóm chức hiện diện trong mẫu. Các dải hấp thụ trong phổ FTIR cung cấp thông tin về các liên kết hóa học, như O-H, C-H và C=O, từ đó giúp hiểu rõ hơn về cấu trúc vi mô và những thay đổi do quá trình xử lý [22].



(a)



(b)

Hình 8. Kết quả FTIR của tinh bột trước khi xử lý (a) và sau khi xử lý (b)

Phân tích phổ FTIR của hai mẫu tinh bột gạo OM18, mẫu nguyên liệu và mẫu sau xử lý cho thấy, sự khác biệt đáng kể về các dải hấp thụ trong vùng phổ từ 3.000 - 3.600 cm^{-1} . Mẫu nguyên liệu 8(a) thể hiện dải hấp thụ mạnh ở 3.400 cm^{-1} cho thấy, sự hiện diện của nước và O-H. Trong khi mẫu xử lý (8b) có sự thay đổi cường độ và vị trí của dải này cho thấy, cấu trúc O-H đã bị thay đổi. Vùng 2.800 - 3.000 cm^{-1} chỉ ra sự thay đổi nhỏ trong cấu trúc ở mẫu xử lý, trong khi vùng 1.600 - 1.800 cm^{-1} cho thấy sự hình thành các liên kết C=O mới, góp phần tăng khả năng kháng tiêu hóa của mẫu xử lý. Các thay đổi này cho thấy, sự biến đổi cấu trúc phân tử tinh bột, làm tăng khả năng kháng tiêu hóa so với mẫu nguyên liệu.

3.2.5. Đánh giá các chỉ tiêu chất lượng sản phẩm bột gạo giàu tinh bột kháng

Chất lượng sản phẩm tinh bột gạo RS sẽ được đánh giá thông qua các chỉ tiêu hóa lý, đây là yêu cầu rất quan trọng đối với nhà sản xuất, quyết định lựa chọn và ứng dụng vào quy trình chế biến thực phẩm (Bảng 2).

Bảng 2. Chỉ tiêu hóa lý sản phẩm tinh bột gạo RS

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả
1	Hàm lượng tinh bột	g/100 g	70,6
2	Hàm lượng protein	g/100 g	9,67
3	Hàm lượng lipit	g/100 g	1,14
4	Hàm lượng tro	g/100 g	0,46
5	Hàm lượng đường khử	g/100 g	0,23
6	Hàm lượng đường tổng số	g/100 g	0,23
7	Hàm lượng tinh bột kháng	g/100 g	12,2
8	Độ ẩm	g/100 g	11,50
9	Độ trắng		84,32

Dựa theo kết quả kiểm nghiệm sản phẩm, ngoài thành phần chính là RS đạt 12,2%, tinh bột gạo RS có chứa đầy đủ các thành phần dinh dưỡng là tinh bột, protein, lipit, khoáng chất. Đồng thời, độ ẩm sản phẩm sau khi sấy đạt 11,5%, dưới mức

cần thiết cho nấm mốc, vi sinh vật phát triển gây hư hỏng sản phẩm.

4. KẾT LUẬN

Sản phẩm tinh bột gạo OM18 giàu tinh bột kháng có thể được sản xuất bằng cách thủy phân cắt mạch nhánh với xúc tác của enzym pullulanase. Các thông số tối ưu đã được nghiên cứu và thiết lập dựa vào xác định hàm lượng RS hình thành. Nguyên liệu gạo tằm OM18 được thủy phân bằng enzym pullulanase với các thông số tối ưu lần lượt: Nồng độ cơ chất (20%), hoạt độ enzym (30 U/g), pH (4,5), nhiệt độ (55°C), thời gian thủy phân (6 giờ). Kết quả nghiên cứu thu được sản phẩm tinh bột gạo với hàm lượng tinh bột kháng đạt 12,2%. Từ những số liệu khảo sát, chứng tỏ việc sử dụng quá trình thủy phân bằng enzym pullulanase để làm tăng hàm lượng tinh bột kháng từ nguyên liệu gạo là phù hợp để sản xuất tinh bột gạo RS. Sản phẩm bột gạo thu được từ nghiên cứu sẽ là tiền đề cho các dự án phát triển các sản phẩm mới, giá trị gia tăng từ tinh bột gạo RS dạng “thực phẩm bổ sung prebiotics” đáp ứng nhu cầu của người sử dụng như ăn kiêng, bảo vệ sức khỏe, giảm cân và phòng ngừa bệnh đái tháo đường. Từ đó góp phần nâng cao giá trị hạt gạo, tăng thu nhập cho người trồng lúa, phát triển nền nông nghiệp bền vững.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. Bojarczuk, S. Skapska, A. Mousavi Khaneghah and K. Marszałek (2022). Health benefits of resistant starch: A review of the literature. *Journal of Functional Foods*, vol. 93(3). Elsevier Ltd. Doi: 10.1016/j.jff.105094.
2. D. F. Birt, T. Boylston, S. Hendrich, J.L. Jane, J. Hollis, L. Li, J. McClelland, S. Moore, G. J. Phillips, M. Rowling, K. Schalinske, S. M. Paul and M. W. Elizabeth (2013). Resistant starch: Promise for improving human health. *Advances in Nutrition*, Vol. 4, no. 6. American Society for Nutrition, pp. 587 - 601. Doi: 10.3945/an.113.004325.
3. Nguyễn Thị Mai Hương (2022). Nghiên cứu sản xuất tinh bột kháng tiêu hóa từ tinh bột đậu xanh và ứng dụng trong chế biến thực phẩm. Luận án Tiến sĩ chuyên ngành Công nghệ thực

phẩm. Trường Đại học Bách khoa thành phố Hồ Chí Minh.

4. S. U. Kadam, B. K. Tiwari and C. P. O'Donnell (2015). Improved thermal processing for food texture modification. *Modifying Food Texture: Novel Ingredients and Processing Techniques, Elsevier*. pp. 115 - 131. Doi: 10.1016/B978-1-78242-333-1.00006-1.

5. S. Sonia, F. Witjaksono and R. Ridwan (2015). Effect of cooling of cooked white rice on resistant starch content and glycemic response. *Asia Pac J Clin Nutr*, vol. 24, no. 4, pp. 620 - 625. Doi: 10.6133/apjcn.24.4.13.

6. Megazyme (2023). Resistant Starch: Assay Protocol.

7. P. V. Hung and N. Morita (2005). Physicochemical properties of hydroxypropylated and cross-linked starches from A-type and B-type wheat starch granules. *Carbohydrate Polymers*. Doi: 10.1016/j.carbpol.2004.09.016.

8. Z. Ma, X. Yin, X. Hu, X. Li, L. Liu and J. I. Boye (2018). Structural characterization of resistant starch isolated from Laird lentils (*Lens culinaris*) seeds subjected to different processing treatments. *Food Chem*, Vol. 263, pp. 163 - 170, Doi: 10.1016/j.foodchem.2018.04.122.

9. K. Dome, E. Podgorbunskikh, A. Bychkov and O. Lomovsky (2020). Changes in the crystallinity degree of starch having different types of crystal structure after mechanical pretreatment. *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 3. Doi: 10.3390/polym12030641.

10. M. Kuddus (2018). Introduction to food enzymes," *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects, Elsevier*. pp. 1 - 18. Doi: 10.1016/B978-0-12-813280-7.00001-3.

11. F. Zeng, F. Chen, F. Kong, Q. Gao, R. M. Aadil and S. Yu (2015). Structure and digestibility of debranched and repeatedly crystallized waxy rice starch. *Food Chem*, vol. 187, pp. 348 - 353. Doi: 10.1016/j.foodchem.04.033.

12. P. Tomasik and D. Horton (2012). Enzymatic conversions of starch. *Advances in*

Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 68, Academic Press Inc. pp. 59 - 436. doi: 10.1016/B978-0-12-396523-3.00001-4.

13. J. Su and J. Cheng (2010). Optimization of pullulanase hydrolysis technology in processing modified extrusion starch films. *Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, vol. 26, no. 12, pp. 367 - 372. Doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2010.12.062.

14. R. C. Eerlingen, M. Crombez and J. A. Delcour (1993). Enzyme - resistant starch: I. Quantitative and qualitative influence of incubation time and temperature of autoclaved starch on resistant starch formation, *Cereal Chem*. 70 (3):339 - 344.

15. S. Wu, H. Chen, Q. Tong, X. Xu and Z. Jin (2009). Preparation of maltotriose by hydrolyzing of pullulan with pullulanase. *European Food Research and Technology*, Vol. 229, no. 5, pp. 821 - 824. Doi: 10.1007/s00217-009-1118-9.

16. H. Zhang and Z. Jin (2011). Preparation of resistant starch by hydrolysis of maize starch with pullulanase. *Carbohydr Polym*, Vol. 83, no. 2, pp. 865 - 867. Doi: 10.1016/j.carbpol.2010.08.066.

17. R. A. González-Soto, E. Agama-Acevedo, J. Solorza-Feria, R. Rendón-Villalobos and L. A. Bello-Pérez (2004). Resistant starch made from banana starch by autoclaving and debranching. *Starch/Stärke*, vol. 56, no. 10, pp. 495 - 499. Doi: 10.1002/star.200400283.

18. H. Zhang, R. Wang, Z. Chen and Q. Zhong (2019). Enzymatically modified starch with low digestibility produced from amylopectin by sequential amylosucrase and pullulanase treatments. *Food Hydrocoll*, Vol. 95, pp. 195 - 202, Doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.04.036.

19. M. Miao, B. Jiang and T. Zhang (2009). Effect of pullulanase debranching and recrystallization on structure and digestibility of waxy maize starch. *Carbohydr Polym*, vol. 76, no. 2, pp. 214 - 221. Doi: 10.1016/j.carbpol.2008.10.007.

20. J. Huang, N. Wei, H. Li, S. Liu and D. Yang (2014). Outer shell, inner blocklets, and granule

architecture of potato starch. *Carbohydr Polym*, Vol. 103, no. 1, pp. 355 - 358. Doi: 10.1016/j.carbpol.2013.12.064.

21. R. C. Eerlingen and J. A. Delcour (1995). Formation, Analysis, Structure and Properties of

Type III Enzyme Resistant Starch. *Journal of Cereal Science*. Vol 22, issue 2, pp 129-138.

22. J. Singh, A. Dartois and L. Kaur (2010). Starch digestibility in food matrix: a review. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 21, no. 4. pp. 168 -180. Doi: 10.1016/j.tifs. 2009.12.001.

STUDY ON FACTORS AFFECTING THE PROCESS OF HYDROLYSIS BY ENZYME PULLULANASE TO INCREASE THE CONTENT OF RESISTANT STARCH FROM RICE

**Nguyen Hoang Anh¹, Nguyen Thi Thanh Tu¹, Tran Vo Quoc Huy¹,
Cao Thi Nhu Y¹, Do Kinh Kha¹, Vo Tra My¹, Le Nguyen Doan Duy¹**

¹*Faculty of food science and technology, Ho Chi Minh city University of Industry and Trade*

Summary

The study aimed to determine the optimal conditions to increase the content of digestive resistant starch by biological methods applying pullulanase enzyme to hydrolyze OM18 rice starch. The experiment was conducted to investigate the effects of factors affecting pullulanase enzyme activity: substrate concentration (10 - 50%), enzyme activity (10 - 50 U/g), hydrolysis time (2 - 10 hours), pH (4.0 - 6.0) and temperature (45 - 65°C) to resistant starch content. The results determined the optimal conditions for pullulanase enzyme activity: substrate concentration (20%), enzyme activity (30 U/g), time hydrolysis (6 hours), pH (4.5), temperature (55°C). The research results showed that the digestive resistant starch content of OM18 rice starch reached 12.2%. Research data is the premise for building a process to produce rice starch rich in digestive resistant starch content to apply to the processing of prebiotics food supplement products.

Keywords: *Pullulanase enzyme, rice starch, resistant starch.*

Ngày nhận bài: 24/4/2024

Ngày gửi phản biện: 28/5/2024

Ngày thông qua phản biện: 25/7/2024

Ngày duyệt đăng: 19/11/2024