

DOI:10.22144/ctu.jvn.2016.540

## MÔ HÌNH HÓA QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN VỎ KHOAI LANG TÍM NHẬT BẰNG ENZYME SỬ DỤNG MÔ HÌNH BỀ MẶT ĐÁP ỨNG

Nguyễn Minh Thủy, Nguyễn Ngọc Bảo Trân, Phạm Thị Mai Quế, Bùi Thị Phương Trang, Ngô Văn Tài và Nguyễn Thị Mỹ Tuyền

Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/01/2016

Ngày chấp nhận: 26/10/2016

### Title:

Modelling of the enzymatic hydrolysis of purple sweet potato peel using response surface methodology

### Từ khóa:

Thủy phân, Enzymes, Tối ưu hóa, Phương pháp bề mặt đáp ứng, Vỏ khoai lang tím

### Keywords:

Hydrolysis, Enzymes, Optimization, Response Surface Methodology, Purple sweet potato peel

### ABSTRACT

In this study, two-step enzymatic hydrolysis of purple sweet potato peel (as a waste product) was optimized. The effects of time, enzyme dose and temperature (starch liquefaction and saccharification) on soluble solid content (Brix degree) and glucose concentration were investigated. The Box-Behnken design was applied and a total of 18 treatments were generated for each step. For the liquefaction step, an ANOVA test showed the quadratic model obtained to be significant ( $p < 0.05$ ). The statistical model predicted the maximum Brix degree to be 4.9 at a temperature of 80°C,  $\alpha$ -amylase dose 0.22% (v/v) and time of 50 min. A quadratic model was also obtained for the saccharification step and the model was also significant ( $p < 0.05$ ). The statistical model for the second step predicted the maximum reduced sugar concentration to be 30 g/L, established at the temperature of 60°C, glucoamylase dose 0.074% (v/v) and time 134 min. The optimized liquefaction and saccharification conditions were validated.

### TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, hai bước thủy phân bằng enzyme đối với vỏ khoai lang tím (là phế phẩm của quá trình sản xuất) được tối ưu hóa. Ảnh hưởng của nhiệt độ, thời gian và liều lượng enzyme cho mỗi tiến trình thủy phân (dịch hóa và đường hóa) đến hàm lượng chất khô hòa tan và hàm lượng đường khử đã được nghiên cứu. Thiết kế thí nghiệm theo mô hình Box-Behnken đã được áp dụng và có tổng cộng 18 nghiệm thức đã được tạo ra cho mỗi bước. Đối với giai đoạn dịch hóa, phân tích ANOVA cho thấy mô hình bậc hai thu được có ý nghĩa ( $p < 0,01$ ). Các mô hình thống kê dự báo dịch thủy phân có độ Brix tối đa khoảng 4,9 ở nhiệt độ 80°C trong 50 phút với liều lượng enzyme  $\alpha$ -amylase 0,22% (v/v). Mô hình bậc hai cũng thu nhận từ giai đoạn đường hóa với mức độ ý nghĩa cao ( $p < 0,01$ ). Mô hình thống kê được thiết lập cho bước thứ hai dự đoán hàm lượng đường khử (glucose) tối đa là khoảng 30 g/L ở nhiệt độ thủy phân là 60°C, liều lượng enzyme glucoamylase 0,074% (v/v) và thời gian 134 phút. Các điều kiện tối ưu của quá trình dịch hóa và đường hóa đã được kiểm định.

Trích dẫn: Nguyễn Minh Thủy, Nguyễn Ngọc Bảo Trân, Phạm Thị Mai Quế, Bùi Thị Phương Trang, Ngô Văn Tài và Nguyễn Thị Mỹ Tuyền, 2016. Mô hình hóa quá trình thủy phân vỏ khoai lang tím nhật bằng enzyme sử dụng mô hình bề mặt đáp ứng. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 46b: 37-46.

## 1 GIỚI THIỆU

Khoai lang (*Ipomoea batatas* L.) được xếp hạng là cây lương thực quan trọng thứ bảy trong sản xuất nông nghiệp toàn cầu. Trong hầu hết các ngành công nghiệp, các nhà hàng và trong các hộ gia đình, khoai lang được ăn bằng nhiều cách khác nhau hoặc được chế biến thành nhiều sản phẩm có giá trị gia tăng. Trong quá trình sử dụng khoai lang, vỏ khoai thường bị loại bỏ và tạo nên nguồn chất thải lớn, vì vậy cần có biện pháp xử lý để giải quyết các vấn đề đặt ra trong chế biến các sản phẩm từ chúng. Do đó, để giảm tình trạng ô nhiễm môi trường và cũng có thể tìm được nguồn carbon hữu dụng có thể sử dụng cho các mục đích khác nhau, vỏ khoai khi thải ra có thể được tận dụng cho quá trình thủy phân để tạo dung dịch đường, sau đó có thể là nguồn nguyên liệu cho quá trình sản xuất các sản phẩm có giá trị như dịch đường glucose, acid citric, acid gluconic, acid oxalic và ethanol.

Thông thường, tinh bột được thủy phân bằng acid, tuy nhiên do quá trình này đòi hỏi sử dụng vật liệu chống ăn mòn, làm tăng độ màu và hàm lượng muối khoáng của sản phẩm (sau khi trung hòa), sử dụng nhiều năng lượng trong quá trình gia nhiệt và tương đối khó kiểm soát quá trình nên phương pháp này hiện đã phần lớn được thay thế bởi các quá trình enzyme (Chaplin và Bucke, 1990). Nhằm chọn lựa phương tiện hữu ích trong xử lý vỏ khoai lang, quá trình tối ưu hóa của hai bước thủy phân bằng enzyme để thu nhận dịch đường glucose cho ngành công nghiệp thực phẩm và dược phẩm cần được thực hiện. Hai bước có liên quan trong quá trình thủy phân bằng enzyme là dịch hóa và đường hóa (Blanco *et al.*, 2000). Trong bước đầu tiên, enzyme  $\alpha$ -amylase phân cắt các liên kết  $\alpha$ -1,4-glycoside của cơ chất một cách ngẫu nhiên để tạo thành chuỗi ngắn của dextrin hòa tan. Trong bước thứ hai, enzyme glucoamylase thủy phân liên kết  $\alpha$ -1,4-glucan trong polysaccharide, tách tuần tự từng gốc glucose khỏi đầu không khử của mạch và cho sản phẩm là glucose, ngoài ra glucoamylase còn có thể thủy phân liên kết  $\alpha$ -1,6 glycoside ở mạch nhánh của phân tử amylopectin nhưng tốc độ chậm hơn so với thủy phân liên kết  $\alpha$ -1,4 glycoside (Gomes *et al.*, 2005). Tuy nhiên, sự phân giải tinh bột để tạo thành glucose thường không bao giờ hoàn tất, vì vậy các sản phẩm cuối thường là hỗn hợp của glucose, maltose và các loại đường mạch dài. Các giá trị tối ưu về thời gian, pH, nhiệt độ và các điều kiện hoạt động khác thể hiện sự khác biệt giữa hai giai đoạn (Gerhartsz, 1990). Các nghiên cứu trước đây về quá trình thủy phân khoai lang bằng acid đã được thực hiện (Azhar và Hamdy, 1981; Kim và Hamdy, 1985), các nghiên cứu khác về quá trình thủy phân cũng được đề cập bởi một

vài tác giả (Azhar và Hamdy, 1981; Sawai *et al.*, 2004; Shariffa *et al.*, 2009). Tuy nhiên, tất cả các nghiên cứu này đều thực hiện đối với phần ăn được của củ khoai lang. Hơn nữa các nghiên cứu thực hiện thủy phân bằng enzyme cũng được thực hiện đối với các nguồn tinh bột khác như bắp (Kunamneni và Singh, 2005; Lê Thị Bích Phương và Nguyễn Minh Thủy, 2014), khoai tây (Vázquez *et al.*, 2009) và gạo (Đương Thị Ngọc Hạnh và Nguyễn Minh Thủy, 2014; Nguyễn Minh Thủy và *ctv.*, 2015) và một số trong các công trình nghiên cứu trên đã sử dụng phương pháp thiết kế thí nghiệm bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). RSM là một công cụ tối ưu hóa hữu ích đã được áp dụng trong nghiên cứu tác động của từng biến độc lập và sự tương tác của chúng (Box và Wilson, 1951). Bên cạnh đó, thực tế cho thấy RSM là một phương pháp hiệu quả với lao động và chi phí thấp, ít mất thời gian và có thể thu thập nhiều kết quả nghiên cứu hơn so với phương pháp cổ điển, lợi thế chính của phương pháp này là khả năng làm giảm số lần chạy thử nghiệm cần thiết để cung cấp thông tin đầy đủ về kết quả có thể chấp nhận được về mặt thống kê. RSM đã được áp dụng cho nhiều lĩnh vực nghiên cứu, nhưng chỉ một số ít đã báo cáo ứng dụng của phương pháp này trong quá trình thủy phân tinh bột khoai lang bằng enzyme (Betiku *et al.*, 2013; Huỳnh Văn Vũ và Nguyễn Minh Thủy, 2014).

Trong nghiên cứu này, vỏ khoai lang tím được tận dụng từ quá trình sản xuất để chuyển thành dịch đường glucose theo hai bước của quá trình thủy phân với hệ enzyme amylase được sử dụng. Ngoài ra, để tối ưu hóa quá trình, RSM đã được áp dụng để xác định ảnh hưởng của các yếu tố và sự tương tác lẫn nhau của chúng trong cả hai giai đoạn dịch hóa và đường hóa tinh bột từ vỏ khoai lang tím.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Chuẩn bị mẫu vỏ khoai lang

Vỏ khoai lang có độ dày 0,5-1 mm (gồm phần vỏ lụa và vỏ cùi) được thu nhận từ quá trình chế biến các sản phẩm khoai lang tím được loại bỏ phần không tốt (hư thối), rửa sạch để loại bỏ bụi bẩn và nhựa củ. Vỏ khoai lang được làm ráo sau khi rửa và cho vào bao bì polypropylene tồn trữ ở 4–5°C cho quá trình sử dụng (hoặc sử dụng ngay).

### 2.2 Chuẩn bị cho quá trình thủy phân bằng enzyme

Để chuẩn bị cho quá trình thủy phân, vỏ khoai lang tím được hấp ở 90°C trong 7 phút cho đến khi mềm rồi chuyển qua máy xay trong thời gian khoảng 90 giây (đến cấu trúc nát nhừ) với tỷ lệ vỏ khoai và nước là 1:2. Trong bước đầu tiên (dịch

hóa), enzyme  $\alpha$ -amylase (132,5 Unit/gram) được bổ sung vào khối khoai nghiền được chứa trong cốc có đậy kín bằng giấy nhôm và hỗn hợp được giữ ổn định nhiệt độ bằng bể điều nhiệt (Memmert, Đức). Ở bước thứ hai (đường hóa), enzyme glucoseamylase (amyloglucosidase 296,5 Unit/gram) được sử dụng. Các enzyme được mua từ Công ty Novozyme (Đan Mạch).

**2.3 Bố trí thí nghiệm**

Ở bước dịch hóa và đường hóa, thiết kế thử nghiệm Box-Behnken được áp dụng tạo ra 18

**Bảng 1: Nhân tố và các mức độ bố trí theo mô hình Box-Behnken (bước dịch hóa và đường hóa)**

Nhân tố (Biến)	Quá trình dịch hóa (mức độ các biến được mã hóa)			Quá trình đường hóa (mức độ các biến được mã hóa)				
	Ký hiệu	-1	0	+1	Ký hiệu	-1	0	+1
Nhiệt độ (°C)	X <sub>1</sub>	60	70	80	X <sub>4</sub>	50	60	70
Nồng độ enzyme (%)	X <sub>2</sub>	0,04	0,16	0,28	X <sub>5</sub>	0,03	0,06	0,09
Thời gian (phút)	X <sub>3</sub>	30	40	50	X <sub>6</sub>	60	120	180

**2.4 Thủy phân tinh bột vỏ khoai lang bằng enzyme theo hai bước**

Đề chuẩn bị cho quá trình sử dụng, 0,5 kg vỏ khoai lang được hấp ở 90°C trong 7 phút cho đến khi mềm rồi chuyển qua máy xay. Sử dụng tỷ lệ vỏ khoai và nước là 1:2 và xay trong thời gian 90 giây. Giá trị pH của dịch tinh bột khoảng 5,3. Nghiên cứu tối ưu hóa các bước dịch hóa dựa trên thiết kế Box-Behnken như được mô tả trong **Bảng 1 và 2**. Enzyme  $\alpha$ -amylase (Novozyme, 132,5 Unit/gram) được sử dụng cho quá trình dịch hóa theo các nồng độ khác nhau được bố trí trong thí nghiệm (**Mục 2.3**). Dịch tinh bột vỏ khoai lang sau khi đạt được các điều kiện tối ưu hóa ở giai đoạn dịch hóa được tiếp tục quá trình đường hóa theo mô hình Box Behnken đã được thiết lập. Hoạt động của enzyme được ngừng lại bằng cách gia nhiệt hỗn hợp ở nhiệt độ sôi. Hỗn hợp cuối được ly tâm ở 10752 g trong 15 phút và phần dịch trong được đo độ Brix (bước dịch hóa) hoặc phân tích hàm lượng đường khử (ở bước đường hóa).

**2.5 Các phương pháp phân tích**

**2.5.1 Phương pháp phân tích hàm lượng đường khử**

Hàm lượng đường khử được xác định bằng phương pháp DNS (3,5 dinitrosalicylic acid) (Miller, 1959). Cho 1 ml mẫu vào 3 ml dung dịch DNS, sau đó gia nhiệt ở 95°C trong 15 phút và làm nguội nhanh xuống nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ của mẫu thí nghiệm được đo ở bước sóng 540 nm. Tính toán lượng đường khử dựa trên đường chuẩn của glucose ( $y = 1,4293 x - 0,2744$ , với  $y$  là hàm lượng đường khử và  $x$  là độ hấp thụ).

thí nghiệm thực với các biến được lựa chọn và thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Trong quá trình dịch hóa, các nhân tố được khảo sát bao gồm nhiệt độ (X<sub>1</sub>), nồng độ enzyme  $\alpha$ -amylase sử dụng (X<sub>2</sub>) và thời gian thủy phân (X<sub>3</sub>). Ở bước đường hóa, các biến tương tự cũng được lựa chọn nhưng với mức độ và ký hiệu khác nhau, bao gồm nhiệt độ (X<sub>4</sub>), liều lượng glucoamylase (X<sub>5</sub>) và thời gian thủy phân (X<sub>6</sub>) với 3 mức độ. Mức các biến độc lập được mã hóa được thể hiện ở **Bảng 1**.

**2.5.2 Phương pháp xác định độ Brix**

Độ Brix của dịch tinh bột được đo bằng máy Brix kế được đo bằng chiết quang kế (0 – 32°Brix) (Atago, Nhật Bản).

**2.6 Phương pháp xử lý số liệu**

Các dữ liệu thu được từ các bước dịch hóa và đường hóa đã được phân tích thống kê bằng phương pháp bề mặt đáp ứng, trên cơ sở xây dựng mô hình toán học bậc hai phù hợp được đề xuất bằng sử dụng phần mềm STATGRAPHIC Centurion XVI (Mỹ). Để xây dựng tương quan giữa biến phụ thuộc với các biến độc lập, hồi quy đa thức được áp dụng để tạo sự tương thích của các hệ số của mô hình đa thức của mỗi biến trong từng trường hợp. Chất lượng về độ tương thích của mô hình được đánh giá bằng cách kiểm định mức độ ý nghĩa và phân tích phương sai (ANOVA). Mô hình toán học bậc hai được mô tả trong **phương trình 1**.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i X_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k b_{ij} X_i X_j + e \quad (1)$$

Trong đó: Y là biến phụ thuộc (Brix, hàm lượng đường khử),  $b_0$  là hệ số chặn,  $b_i$  ( $i = 1, 2, \dots, k$ ) là hệ số phương trình bậc 1,  $b_{ij}$  là hệ số tương tác,  $b_{ii}$  là hệ số phương trình bậc 2 của biến  $X_i$  và  $e$  là sai số ngẫu nhiên.

**3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

Thành phần nguyên liệu là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến việc trích ly dịch đường glucose. Trong vỏ khoai, hàm lượng nước chiếm khá cao (khoảng 81%), hàm lượng tinh bột của phần vỏ khoảng 11%, cũng được xem là nguồn cơ chất tốt cho quá trình thu nhận dịch đường.

**3.1 Tối ưu hóa quá trình dịch hóa tinh bột vỏ khoai lang tím bằng enzyme  $\alpha$ -amylase**

Quá trình dịch hóa tinh bột là quá trình phân cắt ngẫu nhiên tại vị trí liên kết  $\alpha$ -1,4 glycoside dưới tác dụng của enzyme  $\alpha$ -amylase. Ba yếu tố ảnh hưởng chủ yếu đến quá trình này là thời gian, nhiệt độ và liều lượng enzyme bổ sung đã được bố trí theo mô hình Box-Behnken với 3 lần lặp lại và độ Brix là chỉ tiêu được sử dụng để đánh giá hiệu quả của quá trình dịch hóa tinh bột được thể hiện ở Bảng 2.

Xử lý dữ liệu thu nhận bằng phần mềm thống kê STATGRAPHIC cho thấy các kết quả của thử nghiệm có ý nghĩa đối với mỗi hệ số hồi quy. Các thành phần tham gia vào mô hình đều thể hiện mức độ ý nghĩa cao (hầu hết giá trị  $p < 0,05$ ) (Bảng 3). Trong trường hợp này, ba nhân tố tuyến tính ( $X_1, X_2, X_3$ ), hai tương tác ( $X_1X_3, X_2X_3$ ) và ba giá trị bậc hai ( $X_1^2, X_2^2, X_3^2$ ) tham gia vào mô hình đều thể hiện rõ rệt ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%, ngoại trừ tương tác  $X_1X_2$ . Bảng 4 thể hiện các phân tích phương sai của các mô hình phương trình hồi quy.

Các giá trị của mô hình Fisher F-test 87,92 với giá trị xác suất P rất thấp ( $P = 0,0000$ ) đã chứng minh mô hình hồi quy được thiết lập có ý nghĩa cao (Kunamneni và Singh, 2005). Sự phù hợp của mô hình được kiểm tra qua hệ số xác định tương quan  $R^2$ . Guan và Yao (2008) báo cáo rằng  $R^2$  nên ít nhất là 80% để thể hiện được sự phù hợp của mô hình. Đối với bước dịch hóa,  $R^2$  của mô hình là 93,98%, trong khi adj.  $R^2$  đã được tìm thấy là

92,92% và tất cả các hệ số của giá trị  $p$  đều thể hiện mức độ ý nghĩa cao, ngoại trừ tương tác  $X_1X_2$  (Bảng 3). Điều này cũng ngụ ý rằng mô hình tỏ ra phù hợp với các đại diện đầy đủ của các mối quan hệ thực sự giữa các biến được lựa chọn (Vázquez et al., 2009).

**Bảng 2: Thử nghiệm được bố trí theo mô hình Box-Behnken và độ Brix của dung dịch sau khi dịch hóa vỏ khoai lang tím**

STT	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Độ Brix		
1	0	0	0	4,4	4,5	4,4
2	0	-1	-1	3,9	3,8	3,8
3	-1	0	1	4,4	4,4	4,4
4	-1	-1	0	4,8	4,8	4,7
5	0	0	0	4,2	4,2	4,2
6	1	1	0	4,4	4,4	4,4
7	1	-1	0	4,6	4,4	4,6
8	1	0	-1	4,6	4,4	4,5
9	0	0	0	4,4	4,6	4,6
10	0	0	0	4,6	4,4	4,6
11	1	0	1	4,4	4,4	4,6
12	0	0	0	3,9	4	3,9
13	-1	1	0	4,6	4,4	4,4
14	-1	0	-1	3,6	3,5	3,5
15	0	-1	1	3,6	3,8	3,6
16	0	1	-1	4	4	4
17	0	0	0	4,4	4,4	4,4
18	0	1	1	4,8	4,8	4,8

**Bảng 3: Kiểm tra mức độ ý nghĩa của các hệ số hồi quy cho bước dịch hóa (giá trị độ Brix)**

Nguồn	Tổng bình phương	Độ tự do	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
$X_1$	1,3067	1	1,3067	157,17	0,0000
$X_2$	2,3438	1	2,3438	281,92	0,0000
$X_3$	0,9204	1	0,9204	110,71	0,0000
$X_1^2$	0,1421	1	0,1420	17,09	0,0002
$X_1X_2$	0,0533	1	0,0533	6,42	0,0151
$X_1X_3$	0,0833	1	0,0833	10,02	0,0029
$X_2^2$	1,3475	1	1,3475	162,09	0,0000
$X_2X_3$	0,1008	1	0,1008	12,13	0,0012
$X_3^2$	0,1911	1	0,1911	22,99	0,0000

**Bảng 4: Phân tích phương sai (ANOVA) của phương trình hồi quy cho bước dịch hóa**

Nguồn	Tổng bình phương	Độ tự do	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Model	6,448	9	0,8059	87,92	0,0000
Residual	0,4125	44	0,0092		
Lack of fit	0,2475	27	0,0092	1,35	0,274
Pure error	0,1017	17	0,0068		
Total (corr.)	6,86	53			

$R^2 = 93,98\%$  Adjusted (Adj.)  $R^2 = 92,92\%$  Standard Error of Est. = 0,096

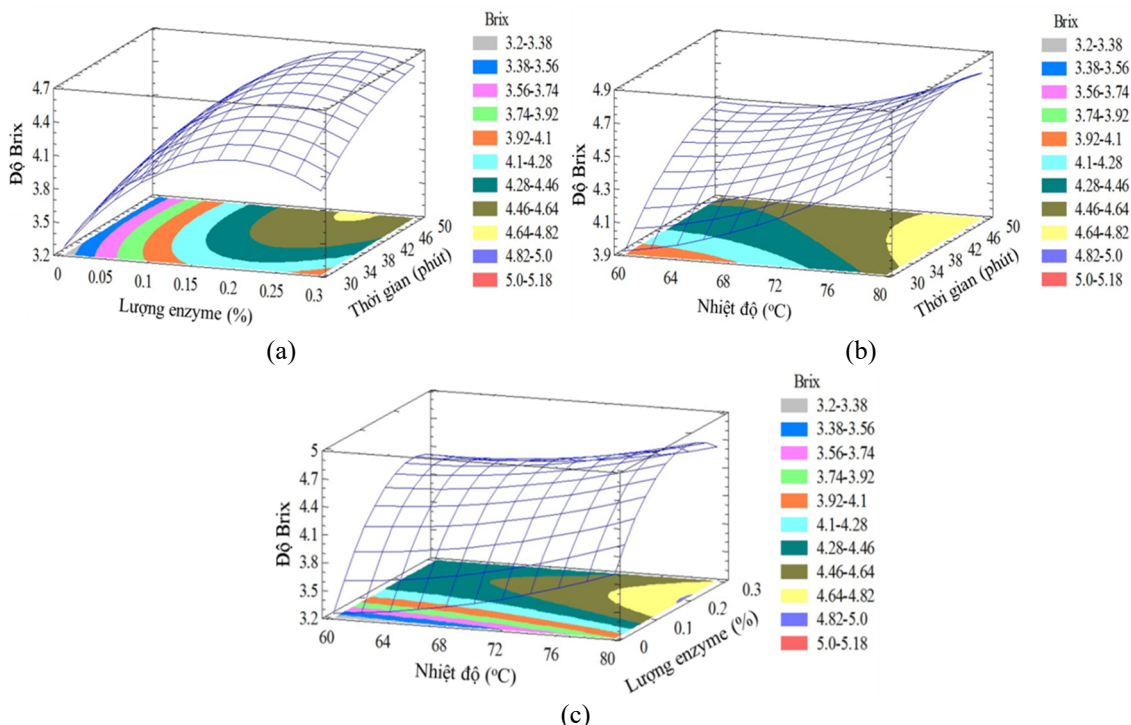
Những giá trị này đã chỉ ra rằng mô hình hồi quy có ý nghĩa thống kê; khoảng 6% của tổng số biến không được giải thích bằng mô hình hồi quy này. Hơn nữa, giá trị của  $R^2$  của mô hình cho thấy một sự tương thích khá cao giữa các giá trị thực nghiệm và các giá trị dự đoán.

Mức độ phù hợp của mô hình cũng được đánh giá thông qua giá trị F của Lack of fit. Giá trị Lack-of-fit được xây dựng để kiểm tra sự tương quan giữa giá trị thực nghiệm và giá trị dự đoán. Dữ liệu được phân tích thể hiện đồng thời ở Bảng 4 cho thấy các giá trị F (1,35) và p (0,274) không có ý nghĩa thống kê, vì vậy khả năng phù hợp của mô hình là rất cao. Trong trường hợp này, Lack-of-fit không có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ) cho thấy mô hình đã được thiết lập có chất lượng cao (Vázquez *et al.*, 2009). Do đó, có thể sử dụng phương trình hồi quy dự đoán lý thuyết giá trị độ Brix của dịch tinh bột vỏ khoai lang tím ở bước dịch hóa.

Phương trình hồi quy cuối cùng biểu diễn mối quan hệ giữa Brix và 8 các biến độc lập (theo các nhân tố được mã hóa) cho mô hình bậc hai bề mặt đáp ứng Box-Behnken cho bước dịch hóa được mô tả trong phương trình 2.

$$Y = 2,373 - 0,089 X_1 + 6,678 X_2 + 0,162 X_3 + 0,001 X_1^2 - 22,280 X_2^2 - 0,0012 X_3^2 - 0,0008 X_1 X_2 + 0,076 X_2 X_3 \quad (2)$$

Trong đó, Y là Độ Brix,  $X_1$  là nhiệt độ ( $^{\circ}C$ ),  $X_2$  là liều lượng enzyme (%) và  $X_3$  là thời gian (phút). Các giá trị sai số chuẩn (standard error) thấp được ghi nhận trong các hệ số chặn (intercept) và tất cả các thành phần tham gia vào mô hình (model terms) cho thấy sự tương thích cao của các mô hình. Đồ thị bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương tác giữa các yếu tố nhiệt độ, tỷ lệ enzyme và thời gian thủy phân đến độ Brix của dịch thủy phân được thể hiện ở Hình 1 (a, b và c). Hình 1a cho thấy mật độ đáp ứng đại diện cho các tác động của thời gian, liều lượng  $\alpha$ -amylase và tương tác lẫn nhau của chúng đến hiệu suất thủy phân (thông qua  $^{\circ}Brix$ ) ở nhiệt độ không đổi là  $70^{\circ}C$ . Kết quả thu nhận được cho thấy độ Brix của dịch thủy phân tăng trong khoảng thời gian thủy phân từ 30 đến 40 phút và liều lượng enzyme sử dụng từ 0,04 đến 0,16%. Nếu tiếp tục tăng lượng enzyme từ 0,16 đến 0,28% và thời gian từ 40 đến 50 phút thì độ Brix đạt được không thể hiện sự khác biệt ý nghĩa. Tăng lượng enzyme sử dụng và kéo dài thời gian thủy phân dài thì enzyme có cơ hội tiếp xúc với cơ chất nhiều hơn, quá trình thủy phân tốt hơn nên độ Brix có xu hướng tăng thêm. Tuy nhiên, quá trình thủy phân đã kết thúc và cơ chất cạn kiệt thì kéo dài thời gian không mang lại hiệu quả đáng kể (Yuan *et al.*, 2008).

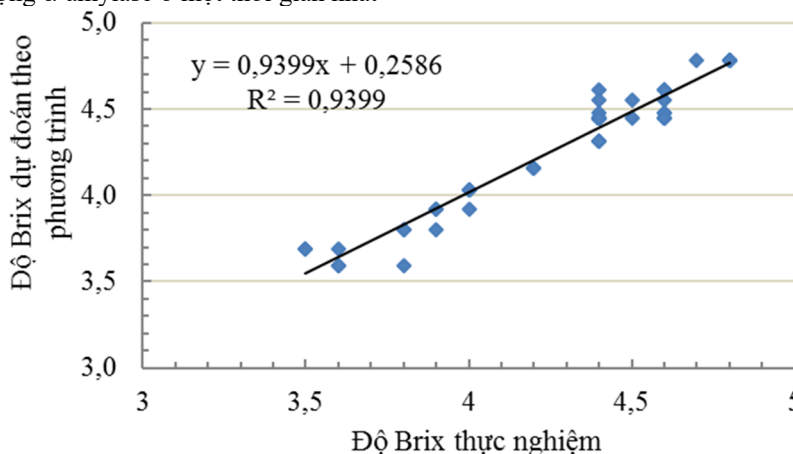


**Hình 1: Mô hình bề mặt đáp ứng cho bước dịch hóa tinh bột vỏ khoai lang tím (độ Brix của dịch thủy phân)**

(a) Ảnh hưởng của lượng  $\alpha$ -amylase, thời gian và tương tác của chúng (nhiệt độ thủy phân  $70^{\circ}C$ ); (b) Ảnh hưởng của nhiệt độ, thời gian và tương tác của chúng (lượng enzyme  $\alpha$ -amylase 0,16%); (c) Ảnh hưởng của nhiệt độ, lượng  $\alpha$ -amylase và tương tác của chúng (thời gian thủy phân 40 phút)

Mô hình bề mặt đáp ứng về ảnh hưởng của nhiệt độ, thời gian và tương tác lẫn nhau của chúng đến độ Brix của dịch thủy phân với liều lượng  $\alpha$ -amylase sử dụng là 0,16% được trình bày ở Hình 1b. Khi tăng nhiệt độ thủy phân từ 60 đến 80°C và thời gian từ 30 đến 40 phút thì hoạt động của enzyme tăng cường, quá trình dịch hóa diễn ra nhanh hơn và độ Brix đạt được trong dịch thủy phân cũng cao hơn. Tuy nhiên, nhiệt độ thủy phân có thể chỉ tăng đến mức giới hạn tối ưu cho quá trình dịch hóa, nếu vượt quá giá trị tối ưu sẽ làm giảm hoạt động enzyme và có thể dẫn đến ức chế hoạt động enzyme.

Hình 1c mô tả bề mặt đáp ứng cho tác động của nhiệt độ, liều lượng  $\alpha$ -amylase ở một thời gian nhất



**Hình 2: Tương thích giữa °Brix thực nghiệm và dự đoán theo phương trình hồi quy (2)**

Các giá trị tối ưu của các biến độc lập trong bước dịch hóa thu nhận được bằng phần mềm STATGRAPHIC. Các điều kiện tối ưu cho giai đoạn này được ước lượng là  $X_1 = 80^\circ\text{C}$ ,  $X_2 = 0,217\%$  (v/v) và  $X_3 = 50$  phút. Độ Brix dự đoán dưới các điều kiện nêu trên là  $Y = 4,9^\circ\text{Brix}$ . Để xác minh dự đoán của các mô hình, các điều kiện tối ưu được thực hiện với ba lần lặp lại độc lập và độ Brix trung bình thu được là  $4,95^\circ\text{Brix}$ , gần với giá trị ước tính của mô hình thu nhận được từ phương trình. Sự chênh lệch giữa độ Brix thực tế và dự đoán là do nguồn nguyên liệu không ổn định, tỷ lệ enzyme và thời gian tăng có thể dẫn đến sự chênh lệch. Nguyễn Đức Lương và *ctv.* (2004) cũng cho rằng enzyme có nguồn gốc từ vi khuẩn hoạt động mạnh ở nhiệt độ 75 đến 85°C. Nghiên cứu của Huỳnh Văn Vũ và Nguyễn Minh Thủy (2014) cũng cho kết quả sử dụng enzyme  $\alpha$ -amylase ở nhiệt độ 80°C, thời gian 40 phút và tỷ lệ enzyme sử dụng 0,05% thì quá trình thủy phân tinh bột khoai lang là tối ưu nhất.

định. Có thể thấy nhiệt độ cao và liều lượng  $\alpha$ -amylase tăng ban đầu có lợi cho quá trình thủy phân (độ Brix dịch thủy phân cao). Khi nhiệt độ tăng từ 60 đến 70°C và tỷ lệ enzyme từ 0,04 đến 0,16% thì có sự gia tăng độ Brix. Tuy nhiên, giá trị này không thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa khi tăng nồng độ enzyme sử dụng từ 0,16 đến 0,3%, các giá trị độ Brix thu được dao động từ 4,7 đến 4,9°Bx. Như vậy, khi lượng enzyme dư thừa và cơ chất còn lại rất ít thì phản ứng thủy phân gần như không diễn ra tiếp tục.

Sự tương thích cao của các giá trị thực nghiệm và dự đoán từ phương trình 2 cũng được thể hiện ở Hình 2.

### 3.2 Tối ưu hóa quá trình đường hóa dịch tinh bột vỏ khoai lang tím bằng enzyme glucoamylase

Tiếp theo bước dịch hóa dịch tinh bột từ vỏ khoai lang tím ở các điều kiện tối ưu, bước đường hóa được thực hiện với các mức độ nhiệt độ, tỷ lệ enzyme và thời gian khác nhau (đã được mã hóa). Hàm lượng đường khử là chỉ tiêu quan trọng chứng minh hiệu quả của enzyme glucoamylase sử dụng trong bước thủy phân này (Bảng 5). Glucoamylase phá vỡ liên kết  $\alpha$ -1,4-glucoside và tạo thành các phân tử glucose (Kennedy và White, 1985).

Kết quả kiểm tra mức độ ý nghĩa của các biến độc lập tham gia vào phương trình tối ưu hóa cho thấy các giá trị P của các nhân tố đều rất nhỏ ( $p < 0,000$ ) (Bảng 6), thể hiện mức độ ý nghĩa cao của các thành phần này tham gia vào phương trình. Phân tích phương sai (ANOVA) của phương trình hồi quy cho bước đường hóa cho giá trị F lớn (49,67), giá trị p của mô hình rất nhỏ ( $p < 0,0000$ ) cùng với  $R^2$  (92,8%) và Adj.  $R^2$  (91,33%) (Bảng 7) cho thấy mô hình có độ chính xác tương đối cao,

càng khẳng định mức độ ý nghĩa và độ tin cậy của mô hình hồi quy đa chiều được thiết lập.

**Bảng 5: Thí nghiệm được bố trí theo mô hình Box-Behnken và hàm lượng đường khử (%) của dung dịch sau quá trình đường hóa**

STT	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	Hàm lượng đường khử (%)
1	0	0	0	2,9995 2,9995 2,9995
2	0	1	1	2,9995 2,9995 2,8384
3	1	0	1	2,4449 2,3332 2,3332
4	-1	0	-1	2,2365 2,1469 2,0614
5	0	0	0	3,1807 3,1807 2,8384
6	0	0	0	2,9995 2,9995 2,9995
7	1	-1	0	2,5617 2,5617 2,4449
8	1	1	0	2,6875 2,6246 2,6246
9	1	0	-1	2,5617 2,4449 2,3332
10	0	-1	-1	2,2849 2,1469 2,1917
11	-1	-1	0	2,1469 2,1469 2,1469
12	0	-1	1	3,1416 3,0639 3,0639
13	-1	1	0	2,6875 2,5617 2,5617
14	0	0	0	2,9995 2,9995 2,9995
15	0	0	0	3,1807 2,9995 2,9995
16	0	1	-1	2,763 2,6875 2,6875
17	-1	0	1	2,5617 2,4449 2,4449
18	0	0	0	3,0901 2,9995 2,9995

Bên cạnh đó, kiểm tra độ phù hợp của mô hình thông qua kiểm tra giá trị Lack of fit cũng cho thấy không có ý nghĩa thống kê ( $p = 0,055$ ). Do đó, khả

năng phù hợp của mô hình tương đối cao. Các nhân tố tham gia vào phương trình đều có ảnh hưởng đến quá trình đường hóa vô khoai lang tím. Phương trình hồi quy thể hiện tương quan của điều kiện thủy phân đến hàm lượng đường khử thu nhận được thiết lập và sử dụng để dự đoán hàm lượng đường khử tạo thành từ quá trình đường hóa (Phương trình 3).

$$Y = -18,648 + 0,598X_4 + 42,717X_5 + 0,032 X_6 - 0,278 X_4X_5 - 0,00017X_4X_6 - 0,005 X_4^2 - 0,090X_5X_6 - 94,069X_5^2 - 0,00006 X_6^2 \quad (3)$$

Sự tương thích giữa hàm lượng đường khử dự đoán và thực nghiệm được tìm thấy (Hình 3).

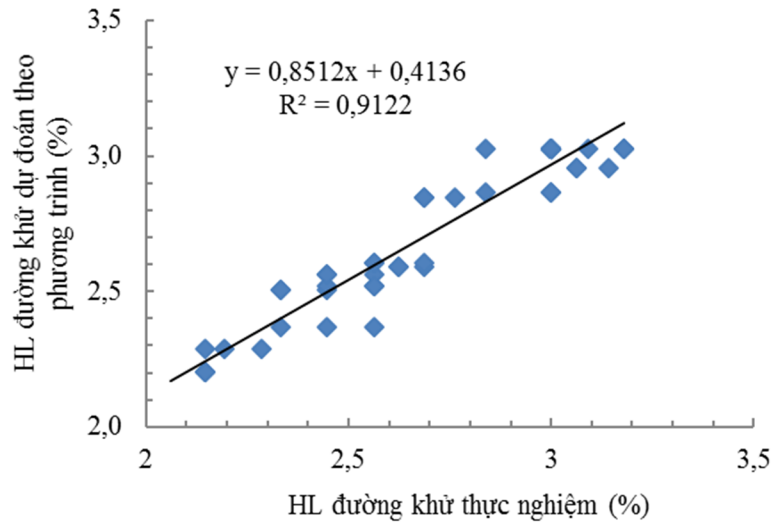
Các mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện tương quan giữa các nhân tố được biểu diễn ở đồ thị Hình 4 (a, b, c). Đồ thị Hình 4a cho thấy thời gian thủy phân ảnh hưởng đến hàm lượng đường khử tạo thành. Khi thực hiện quá trình thủy phân từ 60 đến 180 phút và nồng độ enzyme từ 0,03 đến 0,06% thì hàm lượng đường khử tăng lên liên tục và thu được lượng đường khử cao nhất (khoảng 3,0-3,1%). Tuy nhiên, nếu sử dụng lượng enzyme 0,09% và kéo dài thời gian từ 120 đến 180 phút thì hàm lượng đường khử thay đổi không đáng kể (dao động từ 2,9-3,1%). Thời gian thủy phân dài có thể tạo điều kiện tiếp xúc giữa cơ chất và enzyme làm cho quá trình thủy phân xảy ra tốt hơn, tạo ra nhiều sản phẩm. Sau đó, các sản phẩm sinh ra nhiều sẽ đóng vai trò như chất kìm hãm không cạnh tranh và kìm hãm hoạt động của enzyme (Nguyễn Đức Lượng và *ctv.*, 2004).

**Bảng 6: Kiểm tra mức độ ý nghĩa của các hệ số hồi quy cho bước đường hóa (hàm lượng đường khử)**

Nguồn	Tổng bình phương	Độ tự do	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
X <sub>4</sub>	0,1362	1	0,1362	49,67	0,0000
X <sub>5</sub>	0,3316	1	0,3316	23,05	0,0002
X <sub>6</sub>	0,7085	1	0,7085	56,10	0,0000
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	2,7870	1	2,7870	119,86	0,0000
X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>	0,0836	1	0,0836	471,50	0,0000
X <sub>4</sub> X <sub>6</sub>	0,1271	1	0,1271	14,15	0,0019
X <sub>5</sub> <sup>2</sup>	0,0938	1	0,0938	21,51	0,0003
X <sub>5</sub> X <sub>6</sub>	0,3157	1	0,3157	15,87	0,0012
X <sub>6</sub> <sup>2</sup>	0,5347	1	0,5347	53,42	0,0000

**Bảng 7: Phân tích phương sai (ANOVA) của phương trình hồi quy cho bước đường hóa**

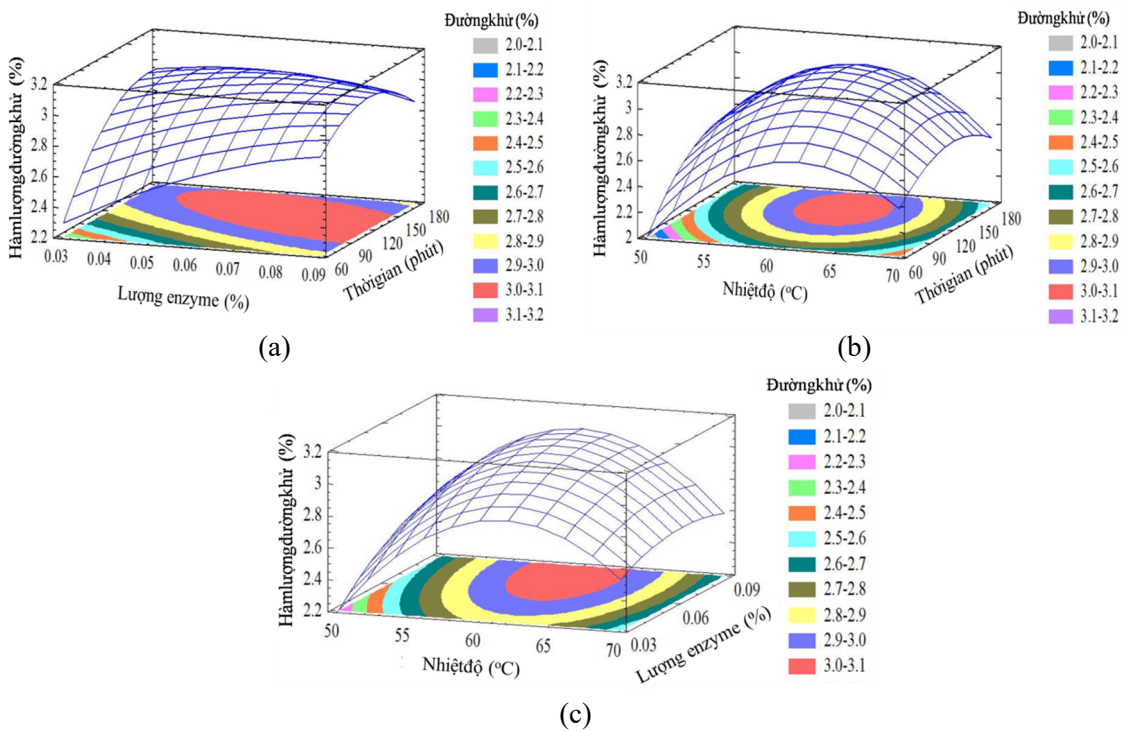
Nguồn	Tổng bình phương	Độ tự do	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Model	5,580	9	0,620	49,67	0,0000
Residual	0,549	44	0,012		
Lack-of-fit	0,352	27	0,013	2,21	0,0554
Pure error	0,089	17	0,006		
Total (corr.)	6,129	53			
R <sup>2</sup> = 92,80%		Adjusted (Adj.) R <sup>2</sup> = 91,33%		Standard Error of Est. = 0,076	



**Hình 3: Tương thích giữa hàm lượng (HL) đường khử thực nghiệm và dự đoán theo phương trình hồi quy (3)**

Mô hình bề mặt đáp ứng Hình 4b biểu diễn tương tác giữa nhiệt độ và thời gian đến quá trình đường hóa. Nhiệt độ và thời gian ảnh hưởng đồng thời đến hàm lượng đường khử tạo thành. Việc kéo dài thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân vỏ khoai lang tím hơn, tạo điều kiện cho cơ chất tiếp xúc với enzyme. Bên cạnh đó, nhiệt độ thủy phân tăng cũng hỗ trợ hoạt động của enzyme, càng gần đến nhiệt độ tối ưu thì khả năng hoạt động của

enzyme tăng cường. Tuy nhiên, nếu nhiệt độ càng lệch xa hơn tối ưu thì khả năng hoạt động của enzyme giảm dần. Mô hình cho thấy nhiệt độ thích hợp quá trình thủy phân khoảng 60-65°C. Nghiên cứu của Lê Thị Bích Phương và Nguyễn Minh Thủy (2014) cũng tìm ra nhiệt độ tối ưu cho quá trình thủy phân là khoảng 66,67°C. Sự chênh lệch nhiệt độ này là do quá trình thủy phân cũng phụ thuộc vào loại enzyme sử dụng.



**Hình 4: Mô hình bề mặt đáp ứng cho bước đường hóa dịch tinh bột vỏ khoai lang tím (hàm lượng đường khử)**



(a) Ảnh hưởng của lượng glucoamylase, thời gian và tương tác của chúng (nhiệt độ thủy phân 60°C); (b) Ảnh hưởng của nhiệt độ, thời gian và tương tác của chúng (lượng enzyme glucoamylase 0,06%); (c) Ảnh hưởng của nhiệt độ, lượng glucoamylase và tương tác của chúng (thời gian thủy phân 120 phút)

Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân và nồng độ enzyme glucoamylase sử dụng đến hàm lượng đường khử được thể hiện ở Hình 4c. Khi tăng nhiệt độ đến 60°C và nồng độ enzyme đến 0,06% thì hàm lượng đường khử cao hơn hẳn so với nhiệt độ 50°C và nồng độ enzyme 0,03%. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nhiệt độ đến 70°C và nồng độ enzyme đến 0,09% thì hàm lượng đường khử có xu hướng giảm, nguyên nhân của sự biến đổi là do mỗi enzyme chỉ có thể hoạt động tốt ở một trạng thái nhất định, trạng thái này phụ thuộc vào nhiệt độ, pH và sản phẩm của môi trường (Nguyễn Đình Thường và Nguyễn Thanh Hằng, 2005). Nhiệt độ thích hợp cho enzyme glucoamylase hoạt động tốt là khoảng 60°C.

Nồng độ enzyme sử dụng cũng ảnh hưởng đến hàm lượng đường khử, khi nồng độ cơ chất không đổi và tăng nồng độ sử dụng enzyme từ 0,03 đến 0,06% thì hàm lượng đường khử tăng do ban đầu vận tốc phản ứng tăng, tuy nhiên khi hệ thủy phân đã đạt được trạng thái cân bằng giữa cơ chất và nồng độ enzyme thì có tăng thêm nồng độ enzyme sử dụng cũng không làm tăng hàm lượng đường khử. Bên cạnh đó, khi sử dụng nồng độ enzyme 0,06%, thì lượng cơ chất cho phản ứng thủy phân có thể đã được sử dụng triệt để, vì vậy khi tăng lượng enzyme thì sản phẩm cũng không tăng thêm nữa.

Các giá trị tối ưu của các biến độc lập trong bước đường hóa cũng được xác định từ phần mềm STATGRAPHIC. Các điều kiện tối ưu cho giai đoạn này là  $X_4 = 60,13^\circ\text{C}$ ,  $X_5 = 0,0738\%$  (v/v) và  $X_6 = 134,12$  phút. Hàm lượng đường khử dự đoán theo các điều kiện nêu trên là  $Y = 3,07\%$ . Để kiểm định các giá trị dự đoán của mô hình, các điều kiện tối ưu được thực hiện độc lập với ba lần lặp lại và giá trị trung bình của hàm lượng đường khử đạt được là 3,248%, tương đương với giá trị ước tính của mô hình được thiết lập.

#### 4 KẾT LUẬN

Phương pháp bề mặt đáp ứng được áp dụng thành công cho hai bước thủy phân vỏ khoai lang bằng hệ enzyme  $\alpha$ -amylase. Độ Brix tối đa thu được cho bước dịch hóa là 4,9°Brix trong 50 phút thủy phân ở 80°C với liều lượng  $\alpha$ -amylase sử dụng là 0,22% (v/v). Các điều kiện tối ưu trong quá trình đường hóa cũng được xác lập. Trong bước này, nồng độ glucose đạt được 30 g/L ở nhiệt độ thủy phân tối ưu 60°C lúc 134 phút với liều lượng glucoamylase 0,074% (v/v). Các điều kiện tối ưu

của quá trình dịch hóa và đường hóa đã được kiểm định với độ Brix và nồng độ glucose thực tế 4,95°Brix và 30,7g/L, tương ứng. Dịch đường glucose thu được trong quá trình này có thể được sử dụng tiếp như là nguồn carbon và sau đó chuyển đổi sang sản phẩm hữu ích cho con người.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Azhar, A. and Hamdy, M.K., 1981. Alcohol fermentation of sweet potato. I. Acid hydrolysis and factors involved. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 879-886.
- Betiku, E., Akindolani O.O. and Ismaila A.R., 2013. Enzymatic hydrolysis optimization of sweet potato (*Ipomoea Batatas*) peel using a statistical approach. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30 (03), 467 – 476.
- Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspocho, S. and González Baño, R., 2000. On-line monitoring of starch enzymatic hydrolysis by near infrared spectroscopy. *Analyst*, 125, 749-752.
- Box, G.E.P. and Wilson, K.B., 1951. On the experimental attainment of optimum conditions (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 13, (1), 1-45.
- Chaplin, M. and Bucke, C., 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press.
- Dương Thị Ngọc Hạnh và Nguyễn Minh Thủy, 2014. Sử dụng enzyme  $\alpha$ -amylase trong thủy phân tinh bột từ gạo huyết rồng. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, số Chuyên đề Nông nghiệp, Tập 1*, 61-67.
- Gerhartsz, W., 1990. Enzymes in starch processing. In: Gerhartsz, W. (Ed.), *Enzymes in Industry Production and Applications*, VCH, Weinheim, Germany, 92-98.
- Gomes, E., Souza, S.R.D., Grandi, R.P., & Silva, R.D., 2005. Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* A 1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A 13.37. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(1), 75-82.
- Guan, X. and Yao, H., 2008. Optimization of viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 106, 345-351.
- Huỳnh Văn Vũ và Nguyễn Minh Thủy, 2014. Ảnh hưởng của tỷ lệ nước bổ sung và enzyme  $\alpha$ -amylase trong thủy phân tinh bột khoai lang tím Nhật. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, số Chuyên đề Nông nghiệp, 1*, 28-34.
- Kennedy, J.K and White, C.A., 1985. *Handbook of Enzyme Biotechnology* (ed. A. Wiseman). Chichester, UK: Ellis Horwood, 147 – 207.

- Kim, K. and Hamdy, M.K., 1985. Acid hydrolysis of sweet potato for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 316-320.
- Kunamneni, A. and Singh, S., 2005. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of maize starch for higher glucose production. *Biochemical Engineering Journal*, 27, 179-190.
- Lê Thị Bích Phương và Nguyễn Minh Thủy. 2014. Tối ưu hóa quá trình đường hóa tinh bột bắp nếp bằng enzyme glucoamylase. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, số Chuyên đề Nông nghiệp*, Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, 1, 84-91.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Nguyễn Đình Thương và Nguyễn Thanh Hằng, 2005. Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn etylic, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết, Lê Thị Thủy Tiên, Tạ Thu Hằng, Huỳnh Ngọc Oanh, Nguyễn Thúy Hương và Phan Thị Huyền, 2004. Công nghệ enzyme. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Minh Thủy, Đinh Công Dinh và Nguyễn Thị Mỹ Tuyên, 2015. Tối ưu hóa quá trình thủy phân tinh bột bằng enzyme amylase trong chế biến sữa gạo sử dụng mô hình phức hợp trung tâm và bề mặt đáp ứng. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ*, 37 (2), 30-38.
- Sawai, J., Nakai, T., Hashimoto, A. and Shimizu, M., 2004. A comparison of the hydrolysis of sweet potato starch with  $\alpha$ -amylase and infrared radiation allows prediction of reducing sugar production. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 967-974.
- Shariffa, Y.N., Karim, A.A., Fazilah, A. and Zaidul, I.S.M., 2009. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. *Food Hydrocolloids*, 23, (2), 434-440.
- Vázquez, M., Delgado, R. and Castro, A.J., 2009. Modelling of the enzymatic hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*) using response surface methodology. *Starch*, 61, (10), 601-609.
- Yuan, X., Liu, J., Zeng, G., Shi, J., Tong, J. and Huang, G., 2008. Optimization of conversion of waste rapeseed oil with high FFA to biodiesel using response surface methodology. *Renewable Energy*, 33, 1678-1684.