

## Tối ưu hóa quy trình thủy phân bột chuối xanh bằng enzyme pullulanase để sản xuất tinh bột kháng

Optimization of the hydrolysis process of green banana flour using pullulanase enzyme for resistant starch production

Trần Thị Phương Nhi<sup>a</sup>, Nguyễn Thị Liễu<sup>a</sup>, Nguyễn Thị Nữ Trinh<sup>a</sup>, Võ Nguyễn Thanh Thảo<sup>a</sup>,  
Nguyễn Thị Dung<sup>a</sup>, Bùi Bảo Thịnh<sup>a\*</sup>  
Tran Thi Phuong Nhi<sup>a</sup>, Nguyen Thi Lieu<sup>a</sup>, Nguyen Thi Nu Trinh<sup>a</sup>, Vo Nguyen Thanh Thao<sup>a</sup>,  
Nguyen Thi Dung<sup>a</sup>, Bui Bao Thinh<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>a</sup>Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam

(Ngày nhận bài: 05/08/2024, ngày phản biện xong: 07/10/2024, ngày chấp nhận đăng: 14/10/2024)

### Tóm tắt

Tinh bột kháng là loại tinh bột không bị tiêu hóa ở ruột non mà được lên men bởi vi khuẩn ở ruột già, giúp cải thiện hệ vi sinh đường ruột và kiểm soát đường huyết. Chuối xanh là nguồn cung cấp tinh bột tự nhiên dồi dào, giàu chất xơ và các dưỡng chất, được biết đến với nhiều lợi ích cho sức khỏe. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định các điều kiện tối ưu để tăng hàm lượng tinh bột kháng trong bột chuối xanh bằng enzyme pullulanase, sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt với mô hình Box-Behnken. Các điều kiện tối ưu được xác định là thời gian thủy phân 16 giờ, tỉ lệ bột:nước 1:19, nồng độ enzyme pullulanase 8 U/g, nhiệt độ 50°C và pH 5, với hàm lượng tinh bột kháng đạt 52,47% trong các điều kiện này. Phân tích SEM cho thấy sau khi xử lý với enzyme pullulanase, kích thước hạt tinh bột chuối xanh giảm từ khoảng 25  $\mu\text{m}$  xuống còn từ 8,70 đến 11,85  $\mu\text{m}$ . Bề mặt hạt trở nên gồ ghề hơn và các hạt tinh bột kết dính với nhau, chứng tỏ sự xoắn của các mạch amylose, dẫn đến sự gia tăng tinh bột kháng. Khả năng trương nở của bột chuối xanh sau khi làm giàu tinh bột kháng cũng giảm đáng kể, chứng tỏ sự gia tăng hàm lượng amylose. Tóm lại, nghiên cứu này đã thành công trong việc tối ưu hóa các điều kiện để tăng hàm lượng tinh bột kháng trong bột chuối xanh, mở ra triển vọng ứng dụng trong các sản phẩm thực phẩm chức năng và dinh dưỡng.

*Từ khóa:* bột chuối xanh; enzyme pullulanase; phương pháp đáp ứng bề mặt; tinh bột kháng; tối ưu hóa.

### Abstract

Resistant starch (RS) is a type of starch that is not digested in the small intestine but is fermented by bacteria in the large intestine, thereby improving gut microbiota and controlling blood glucose levels. Green bananas are a rich natural source of starch, fiber, and nutrients, known for their numerous health benefits. This study aims to determine the optimal conditions to increase the resistant starch content in green banana flour using pullulanase enzyme, employing the response surface methodology with a Box-Behnken design. The optimal conditions identified were a hydrolysis time of 16 hours, a flour-to-water ratio of 1:19, a pullulanase enzyme concentration of 8 U/g, a temperature of 50°C, and a pH of 5, resulting in a resistant starch content of 52.47%. SEM analysis revealed that after treatment with pullulanase enzyme, the size of the green banana starch granules decreased from approximately 25  $\mu\text{m}$  to between 8.70 and 11.85  $\mu\text{m}$ . The surface of the granules became rougher, and the starch granules adhered to each other, indicating the twisting of amylose chains, leading

\*Tác giả liên hệ: Bùi Bảo Thịnh

Email: buibaosthinh9595@gmail.com

to increased resistant starch. The swelling power of green banana flour enriched with resistant starch also significantly decreased, indicating an increase in amylose content. In conclusion, this study successfully optimized the conditions to increase the resistant starch content in green banana flour, opening up prospects for its application in functional and nutritional food products.

*Keywords:* green banana flour; pullulanase enzyme; response surface methodology; resistant starch; optimization.

## 1. Giới thiệu

Tinh bột kháng (resistant starch, RS) là loại tinh bột không bị phân giải bởi các enzyme tiêu hóa trong ruột non và do đó đi vào ruột già mà không bị tiêu hóa [1]. Các lợi ích sức khỏe của tinh bột kháng bao gồm việc làm giảm nguy cơ mắc các bệnh mãn tính như tiểu đường, bệnh tim mạch và bệnh lý về tiêu hóa. Tinh bột kháng còn có khả năng cải thiện sức khỏe đường ruột, đặc biệt là đại tràng, bằng cách tăng cường sản xuất các acid béo chuỗi ngắn thông qua quá trình lên men trong ruột già, từ đó tạo môi trường thuận lợi cho vi khuẩn có lợi phát triển [1, 2].

Tinh bột kháng được chia thành bốn loại chính: RS1, RS2, RS3 và RS4 [1]. RS1 là dạng tinh bột kháng do cấu trúc vật lý của thực phẩm ngăn cản enzyme tiếp cận; RS2 là tinh bột kháng tự nhiên có cấu trúc hạt tinh bột chặt chẽ, không dễ bị phân giải bởi enzyme tiêu hóa; RS3 là tinh bột kháng hình thành từ quá trình làm lạnh hoặc xử lý nhiệt; và RS4 là tinh bột kháng được tạo ra bằng cách biến đổi hóa học. Trong đó, RS3 được quan tâm nhiều nhất do khả năng chịu nhiệt và ổn định trong quá trình chế biến thực phẩm [3].

Chuối xanh (*Musa* spp.) là một nguồn cung cấp tinh bột kháng phong phú, đặc biệt là tinh bột giàu amylose. Nghiên cứu của Jiang và cộng sự [4] cho thấy tinh bột chuối xanh có hàm lượng amylose cao nhất lên tới 30% ở một số giống như *Musa coccinea* và *Williams Banana*. Hàm lượng amylose cao này góp phần vào việc hình thành các cấu trúc tinh thể chặt chẽ sau khi tinh bột được xử lý bằng enzyme, từ đó tạo ra tinh bột kháng loại 3 (RS3) có khả năng chịu được sự phân giải của enzyme tiêu hóa [3].

Pullulanase là enzyme có khả năng phân giải mạch nhánh của amylopectin trong tinh bột, từ đó giải phóng các mạch amylose tự do [5]. Sự

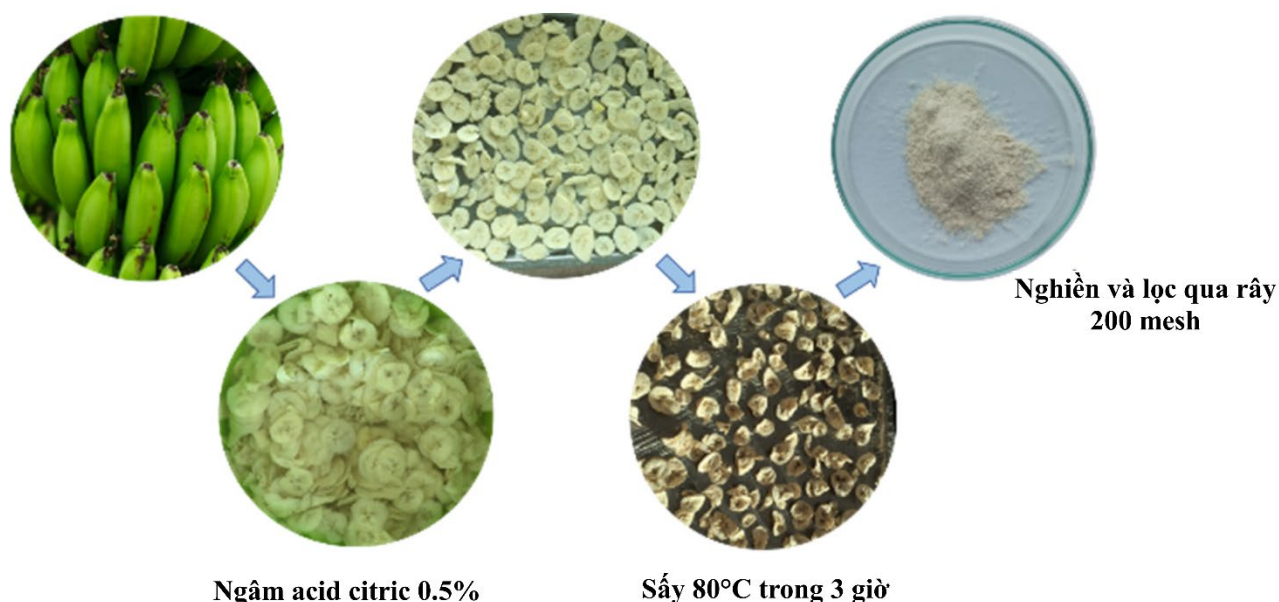
phân giải này tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tái cấu trúc tinh bột khi làm lạnh, giúp hình thành các tinh thể RS3. Nghiên cứu của Leong và cộng sự [6] đã chỉ ra rằng việc sử dụng enzyme pullulanase tinh khiết có thể tạo ra tinh bột kháng với hiệu suất cao. Tuy nhiên, enzyme pullulanase tinh khiết có giá thành cao, điều này hạn chế việc ứng dụng vào quy mô công nghiệp.

Việc sử dụng enzyme pullulanase công nghiệp thay thế cho enzyme tinh khiết có thể là một giải pháp kinh tế hơn để sản xuất tinh bột kháng từ chuối xanh. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng enzyme pullulanase công nghiệp có thể được sử dụng hiệu quả trong việc thủy phân tinh bột từ sắn, ngô và khoai tây để sản xuất RS3 [7-9]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về ứng dụng enzyme pullulanase công nghiệp đối với tinh bột chuối xanh vẫn còn hạn chế, và cần thiết phải tiến hành các nghiên cứu đánh giá hiệu quả và tối ưu hóa quy trình này. Mục tiêu của nghiên cứu này là tối ưu hóa quy trình thủy phân tinh bột từ chuối xanh bằng enzyme pullulanase công nghiệp để sản xuất tinh bột kháng.

## 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên liệu

Chuối già Nam Mỹ (*Musa* aaa Cavendish cv Nanica) 3 tháng tuổi được mua trực tiếp từ công ty Thạch Thành Công, Thành phố Hồ Chí Minh. Những quả chuối xanh đạt kích thước từ 15 - 22 cm, đường kính từ 3 - 3,8 cm, không bị dập nát, sâu bệnh hoặc nhiễm nấm mốc. Sau khi mua, chuối được bóc vỏ và thái lát dày 2 - 3 mm, ngâm trong dung dịch acid citric 0,5% trong 20 phút. Các lát chuối sau đó được vớt ra để ráo, rồi sấy ở nhiệt độ 80°C trong 3 giờ (UF450plus, Memmert, Đức). Cuối cùng, mẫu chuối được nghiền mịn và sàng qua rây 200 mesh để tạo thành bột chuối xanh. Quy trình này được tóm tắt trong Hình 1.



Hình 1. Quy trình thu nhận bột chuối xanh

Ngoài ra, enzyme pullulanase đã được thu nhận từ chủng *Bacillus licheniformis* của Biozyme (Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam). Các hóa chất gồm amyloglucosidase,  $\alpha$ -amylase, glucose oxidase plus peroxidase (GOPOD), D-glucose, sodium hydroxide (NaOH), calcium chloride dihydrate ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), potassium hydroxide (KOH), sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) và acetic acid ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) đã được mua từ Merck (Darmstadt, Đức).

## 2.2. Thủy phân bột chuối xanh bằng enzyme pullulanase

Mẫu bột chuối xanh được bổ sung nước cất với tỷ lệ bột : nước (w/w) là 1:10, 1:15 và 1:20. Sau đó các mẫu được hồ hóa ở  $100^\circ\text{C}$  trong 10 phút. Để nguội ở nhiệt độ phòng, điều chỉnh pH về 5,0. Sau đó, bổ sung enzyme pullulanase (2, 6 và 10 U/g) và duy trì ở nhiệt độ  $50^\circ\text{C}$  trong thời gian thủy phân (8, 16 và 24 giờ). Bất hoạt enzyme pullulanase ở nhiệt độ  $90^\circ\text{C}$  trong thời gian 5 phút. Sau đó, mẫu được làm lạnh và bảo quản ở nhiệt độ  $-18^\circ\text{C}$  trong 24 giờ để thực hiện

việc thoái hóa tinh bột. Sau khi kết thúc quá trình thoái hóa, mẫu được rã đông ở nhiệt độ phòng và sấy khô ở nhiệt độ  $80^\circ\text{C}$  trong 3 giờ để thu lại bột. Lưu trữ mẫu bột trong bao bì polyethylene (PE) và đem đi phân tích.

## 2.3. Thiết kế thí nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt

Phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology - RMS) đã được sử dụng để dự đoán các điều kiện tối ưu của việc tạo ra bột chuối xanh giàu tinh bột kháng. Thiết kế thí nghiệm và phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm Design-Expert (phiên bản 11.0.4.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA). Trong nghiên cứu này, bố trí thí nghiệm mô hình hóa được thực hiện dựa theo mô hình Box-Behnken (BBD) với ba thông số thời gian ( $X_1$ ), tỉ lệ bột : nước ( $X_2$ ) và nồng độ enzyme pullulanase ( $X_3$ ) là các biến độc lập và hàm lượng tinh bột kháng ( $Y$ ) là đáp ứng phụ thuộc, phương trình hồi quy đa thức được áp dụng để xuất như sau:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j + e$$

Trong đó:  $Y$  là biến phụ thuộc,  $\beta_0$  là hệ số chặn;  $\beta_i$  là hệ số phương trình bậc 1,  $\beta_{ii}$  là hệ số phương trình bậc 2 của biến  $X_i$ ,  $\beta_{ij}$  là hệ số tương tác và  $e$  là sai số ngẫu nhiên. Phân tích phương sai (ANOVA) đã được thực hiện để đánh giá hiệu quả của hệ thống mô hình hóa.

#### **2.4. Phương pháp phân tích hàm lượng tinh bột kháng**

Hàm lượng tinh bột kháng trong bột chuối xanh được tiến hành theo phương pháp AOAC 2002.02 [10]. Mẫu bột để khô ở nhiệt độ phòng, cân chính xác  $100 \pm 5$  mg. Bổ sung 4 mL enzyme gồm  $\alpha$ -amylase (nồng độ 10 U/mL) và amyloglucosidase (nồng độ 3 U/mL, thủy phân trong 16 giờ ở  $37^\circ\text{C}$  trong tủ lắc (200 vòng/phút). Thêm 4 mL ethanol 99% và lắc mạnh, ly tâm 1500 vòng/phút trong 10 phút (lặp lại 2 lần). Tách bỏ phần dịch nổi, bổ sung 2 mL dung dịch KOH 2M vào phần cặn, lắc đều trong 20 phút, thêm 8 mL đệm natri acetate 1,2 M (pH 3,8) và 0,1 mL enzyme amyloglucosidase (nồng độ 300 U/mL), sau đó ủ ở  $50^\circ\text{C}$  trong 30 phút. Định mức hỗn hợp tới 100 mL. Hút 0,1 mL từ bình định mức vào ống nghiệm, bổ sung thêm 3 mL thuốc thử glucose oxidase/peeroxidase (GOPOD) và ủ ở  $50^\circ\text{C}$  trong 20 phút. Đem hỗn hợp đo OD ở bước sóng 510 nm. Hàm lượng tinh bột kháng được tính theo công thức:

$$\text{Tinh bột kháng} = \Delta E \times F \times 100 / 0,1 \times 1 / 1000 \times 1 / W \times 162 / 180 = \Delta E \times 90$$

Trong đó:  $\Delta E$ : là độ hấp thụ của mẫu

$F$ : là giá trị của chuyển đổi giá trị hấp thụ từ 1  $\mu\text{g}$  glucose

$$F = 100 \mu\text{g glucose} / \text{giá trị hấp thụ cho } 100 \mu\text{g}$$

100/0,1: hiệu chỉnh thể tích (0,1 mL lấy ra từ 100 mL)

1/1000: chuyển đổi từ microgram sang miligram

$W$ : là khối lượng khô của mẫu,  $W = \text{khối lượng} \times [(100 - \text{độ ẩm}) / 100]$

100/ $W$ : chỉ số biểu thị phần trăm tinh bột kháng trong khối lượng của mẫu thử

162/180: hệ số chuyển đổi từ glucoza thành tinh bột

#### **2.5. Phương pháp xác định hình dạng cấu trúc của bột chuối xanh**

Hình thái bột chuối xanh được xác định bằng kỹ thuật kính hiển vi điện tử quét (SEM, Zeiss, Oberkochen, Đức). Mẫu bột chuối xanh được phân tán đều trên tape cacbon. Tiếp theo, mẫu được phủ lớp dẫn điện lên vật liệu bằng thiết bị phủ mẫu SC7620 (Quorum, Anh) trong thời gian 15 giây. Sau đó, mẫu được chuyển vào buồng phân tích chân không và tiến hành phân tích trên thiết bị kính hiển vi điện tử quét (Zeiss, Đức), sử dụng đầu dò điện tử thứ cấp (SE) với độ phóng đại 10x - 1000000x và thế gia tốc từ 5 - 30 kV.

#### **2.6. Phương pháp xác định khả năng trương nở của bột chuối xanh**

Khả năng trương nở của bột chuối xanh được xác định theo phương pháp được mô tả bởi Izidoro và cộng sự [11] với một vài điều chỉnh. Cho 0,2 g bột được chuẩn bị trong ống nghiệm. 5 mL dung dịch  $\text{AgNO}_3$  0,1% được thêm vào thay cho nước cất để vô hoạt enzyme  $\alpha$ -amylase. Sau đó, hỗn hợp được đun trong 10 phút ở các nhiệt độ  $50^\circ\text{C}$ ,  $60^\circ\text{C}$ ,  $70^\circ\text{C}$ ,  $80^\circ\text{C}$  và  $90^\circ\text{C}$ . Tiếp theo, hỗn hợp được ly tâm tách nước trong 4 phút ở tốc độ 1700 vòng/phút. Cuối cùng, cân khối lượng phần lắng trong ống ly tâm, khả năng trương nở được xác định là phần lắng đọng còn lại so với mẫu ban đầu (g/g).

### **3. Kết quả và thảo luận**

#### **3.1. Tác động và mô hình hóa các điều kiện thủy phân bột chuối xanh bằng enzyme pullulanase đến hàm lượng tinh bột kháng**

Điều kiện tối ưu của các yếu tố tác động đến hàm lượng tinh bột kháng trong bột chuối xanh được xác định bằng phương pháp RSM-BBD với ba biến bao gồm thời gian thủy phân, tỉ lệ bột : nước và nồng độ enzyme pullulanase lần lượt là  $X_1$ ,  $X_2$  và  $X_3$ . Thí nghiệm được bố trí với 17 thí nghiệm thức có 5 thí nghiệm thức trung tâm, hàm mục tiêu là hàm lượng tinh bột kháng thu được

(Y, %). Trong nghiên cứu này, khoảng tối ưu được thực hiện là  $X_1$  (8 - 24 giờ),  $X_2$  (1:10 - 1:20, w/w),  $X_3$  (2 - 10 U/g), kết quả các nghiệm thức được trình bày chi tiết trong Bảng 1. Dựa trên

hàm lượng tinh bột kháng thu được từ các thí nghiệm, cho thấy hàm lượng tinh bột kháng trong bột chuối xanh cao nhất đạt 58,09% và thấp nhất đạt 31,45%.

Bảng 1. Kết quả tối ưu hóa quá trình thu nhận bột chuối xanh giàu hàm lượng tinh bột kháng bằng enzyme pullulanase

Mẫu	Các yếu tố khảo sát						Hàm lượng tinh bột kháng (%)	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Thời gian (giờ)	Tỉ lệ bột:nước (w/w)	Nồng độ enzyme (U/g)	Thực tế	Dự đoán
1	0	1	1	16	1:20	10	56,10 <sup>b</sup>	53.37
2	0	-1	-1	16	1:10	2	31,45 <sup>q</sup>	34.18
3	0	0	0	16	1:15	6	49,82 <sup>g</sup>	50.99
4	-1	-1	0	8	1:10	6	32,84 <sup>p</sup>	30.48
5	0	0	0	16	1:15	6	50,17 <sup>f</sup>	50.99
6	0	0	0	16	1:15	6	48,34 <sup>i</sup>	50.99
7	1	0	1	24	1:15	10	58,09 <sup>a</sup>	58.46
8	-1	1	0	8	1:20	6	39,19 <sup>m</sup>	39.72
9	1	-1	0	24	1:10	6	43,00 <sup>k</sup>	42.47
10	0	1	-1	16	1:20	2	48,56 <sup>h</sup>	48.4
11	-1	0	1	8	1:15	10	33,13 <sup>o</sup>	35.33
12	0	-1	1	16	1:10	10	42,25 <sup>l</sup>	42.41
13	-1	0	-1	8	1:15	2	36,90 <sup>n</sup>	36.53
14	0	0	0	16	1:15	6	52,36 <sup>e</sup>	50.99
15	1	0	-1	24	1:15	2	46,29 <sup>j</sup>	44.08
16	1	1	0	24	1:20	6	56,05 <sup>c</sup>	58.41
17	0	0	0	16	1:15	6	54,28 <sup>d</sup>	50.99

Các giá trị có chữ cái khác nhau trong cột hàm lượng tinh bột kháng thực tế biểu thị sự khác biệt đáng kể ở mức ý nghĩa  $p < 0.05$ .

Kết quả phân tích phương sai, được trình bày trong Bảng 2, cho thấy mô hình này có ý nghĩa với hệ số xác định tương quan  $R^2 = 0,9815$ . Điều này cho thấy 98,15% phương sai của hàm lượng tinh bột kháng có thể được giải thích bởi các yếu tố khảo sát, chứng tỏ số liệu thực nghiệm phù hợp với số liệu mô hình. Độ chính xác đầy đủ

(Adeq Precision) thể hiện một tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu với giá trị mong muốn lớn hơn 4, tỷ lệ 20,72 của khảo sát cho thấy một tín hiệu thích hợp. Mô hình này có thể được sử dụng để điều hướng không gian thiết kế và có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy trên 95% (Bảng 2).

Bảng 2. Thống kê mức độ phù hợp của thí nghiệm tối ưu hóa

Std. Dev.	Mean	C.V. %	$R^2$	Adeq Precision
2,89	45,81	10,55	0,9815	20,72

Hệ số hồi quy của từng biến, hiệu quả tương tác tuyến tính giữa các yếu tố và giá trị bậc hai, cùng với các giá trị F và p, được trình bày trong

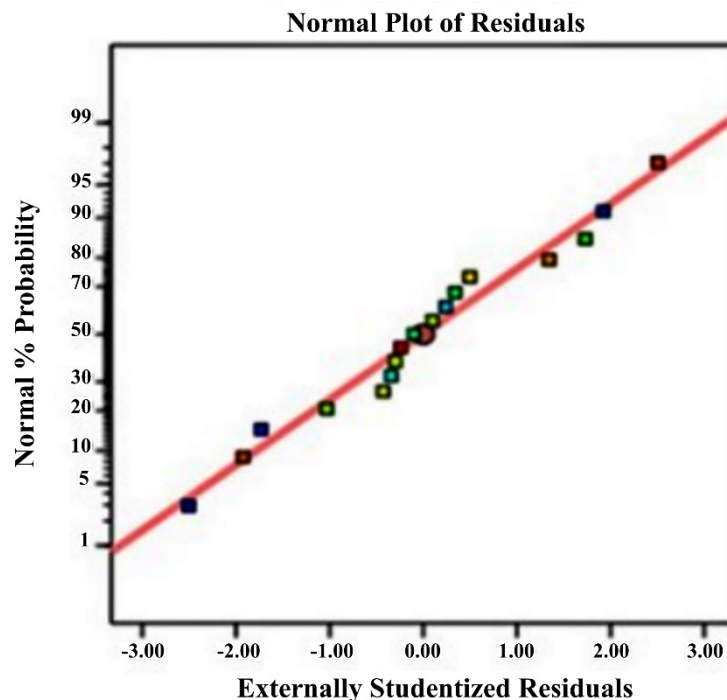
Bảng 3. Kết quả phân tích ANOVA của mô hình hàm mục tiêu được đánh giá bằng các giá trị F = 15,25 và  $p < 0,05$  ( $< 0,0001$ ), cho thấy mô hình

có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 99,99%. Mức độ không tương thích (LOF) của mô hình là 2,25 ( $p = 0,2248 > 0,05$ ), cho thấy sự không tương thích không đáng kể và có thể xảy ra hiện tượng gây nhiễu kết quả phân tích ở mức 22,48%. Dựa vào hệ số hồi quy của các yếu tố tối ưu lên quá

trình thu nhận tinh bột kháng, yếu tố có mức độ ảnh hưởng giảm dần theo thứ tự thời gian ( $X_1$ ), tỉ lệ bột : nước ( $X_2$ ) và nồng độ enzyme pullulanase ( $X_3$ ) với hệ số hồi quy lần lượt là 6,14; 5,46 và 1,35.

Bảng 3. Phân tích ANOVA cho mô hình hồi quy

Giá trị	Hệ số hồi quy	Bậc tự do	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị p
Model		9	127,35	15,25	<0,0001
$X_1$ -Thời gian	6,14	1	415,79	49,80	<0,0001
$X_2$ -Tỉ lệ bột:nước	5,46	1	158,90	19,03	<0,0001
$X_3$ -Nồng độ enzyme	1,35	1	9,74	1,17	0,0035
$X_1X_2$	0,8362	1	11,19	1,34	0,0105
$X_1X_3$	1,95	1	60,62	7,26	0,0221
$X_2X_3$	-0,8161	1	2,66	0,3191	0,5280
$X_1^2$	-1,15	1	89,31	10,70	0,0020
$X_2^2$	-3,62	1	55,24	6,62	0,0055
$X_3^2$	-2,79	1	32,67	3,91	0,0307
Số dư		7	8,35		
Không tương thích		3	12,33	2,25	0,2248
Sai số		4	2,12		



Hình 2. Đồ thị của các giá trị thực tế so với mô hình

Bên cạnh đó, biểu đồ thực nghiệm - dự đoán được sử dụng để đánh giá sự tương thích của mô hình với kết quả thực nghiệm. Các kết quả khảo

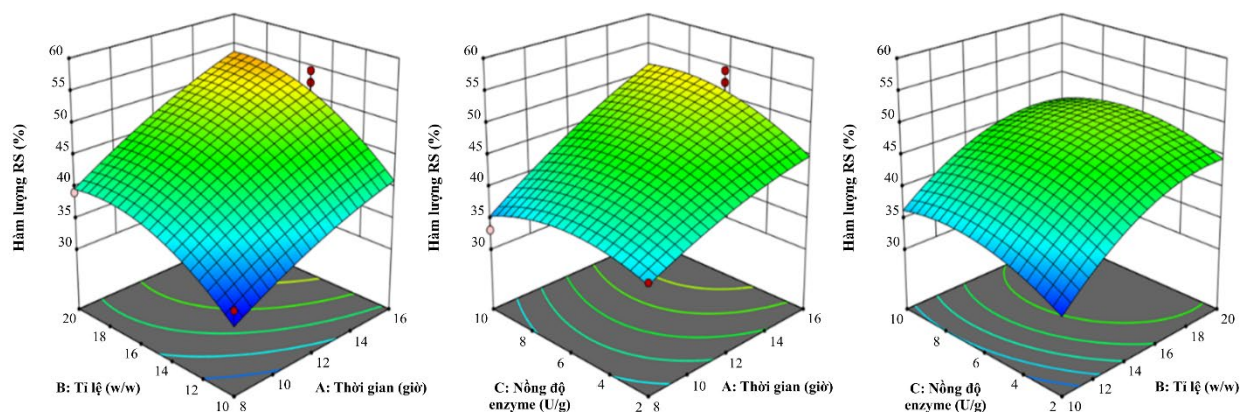
sát của các nghiệm thức được biểu diễn ở Hình 2 các giá trị mô hình dự kiến so với thực tế của hàm lượng tinh bột kháng, chứng minh tầm quan



trọng của mô hình khi toàn bộ các điểm khảo sát hầu như tập trung xung quanh các đường chéo.

Mức độ ảnh hưởng của các yếu tố khảo sát đối với quá trình tổng hợp hàm lượng tinh bột kháng (hàm mục tiêu Y) trong bột chuối xanh được thể hiện qua tương tác qua lại của từng cặp yếu tố qua biểu đồ 3D (Hình 3). Biểu đồ 3D cho

thấy yếu tố thời gian có độ dốc rộng và có đỉnh đạt hàm lượng tinh bột kháng cao nhất tương ứng với mức độ và hệ số hồi quy lớn nhất (6,14), tiếp đến là yếu tố tỉ lệ nguyên liệu và nước do yếu tố tỉ lệ có độ cong và độ dốc nhiều hơn so với yếu tố nồng độ enzyme sử dụng với hệ số hồi quy lần lượt là 5,46 và 1,35 với độ tin cậy trên 95% ( $p < 0,05$ ).



Hình 3. Mô hình hóa kết quả tối ưu hóa thực nghiệm quá trình làm giàu hàm lượng tinh bột kháng trong bột chuối xanh

Phương trình hồi quy bậc hai được tính toán cho hàm lượng tinh bột kháng tối đa trong bột chuối xanh thu nhận, với các yếu tố thời gian, tỉ lệ bột : nước và nồng độ enzyme pullulanase lần

$$Y (\%) = 46,01 + 6,14X_1 + 5,46X_2 + 1,35X_3 + 0,8362X_1X_2 + 1,95X_1X_3 - 1,15X_1^2 - 3,62X_2^2 - 2,79X_3^2$$

Kết quả thí nghiệm dự đoán giá trị tối ưu của nghiên cứu được xác định với thời gian thủy phân là 16 giờ, tỉ lệ bột : nước là 1:19,08 và nồng độ enzyme pullulanase là 7,89 U/g. Hàm lượng tinh bột kháng tối đa mà mô hình dự đoán được tính toán là 54,34%. Để xác thực kết quả dự đoán và xác thực phương trình hồi quy thu được, các

thí nghiệm sử dụng điều kiện tối ưu đã được thực hiện và thu được giá trị hàm lượng tinh bột kháng là 52,47% (Bảng 4). Có thể thấy giá trị hàm lượng tinh bột kháng của thực tế và dự đoán là khá giống nhau ( $p < 0,05$ ). Như vậy, các thông số kĩ thuật tối ưu của mô hình là tương thích với các điều kiện thí nghiệm thực tế.

Bảng 4. Điều kiện tối ưu của mô hình thực nghiệm

Điều kiện cố định		Điều kiện tối ưu			Hàm lượng tinh bột kháng (%)	
pH	Nhiệt độ thủy phân	Thời gian	Tỉ lệ bột:nước	Nồng độ enzyme	Giá trị dự đoán	Giá trị thực tế
	°C				giờ	w/w
5,0	50	16	1:19	8	54,34	52,47

Sở dĩ quá trình thủy phân bột chuối làm tăng hàm lượng tinh bột kháng là do thời gian thủy phân pullulan. Nhiều nghiên cứu cho thấy, thời

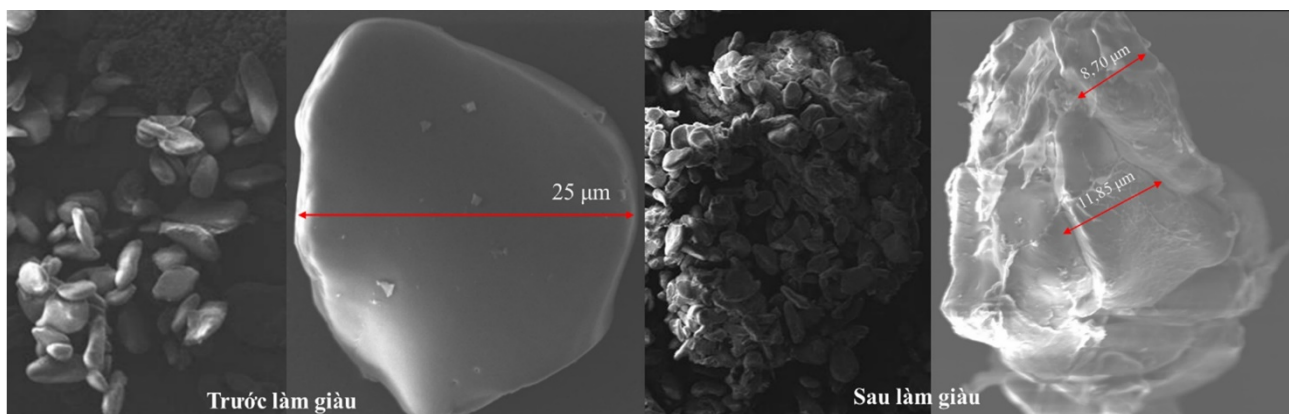
gian thủy phân tối ưu phụ thuộc vào từng loại cơ chất, nguồn gốc enzyme sử dụng và tỉ lệ giữa hàm lượng enzyme và cơ chất. González-Soto và

cộng sự [12] đã báo cáo, thời gian thủy phân tinh bột chuối bằng Promozyme D2, một loại pullulanase ổn định nhiệt, chỉ trong 5 giờ là đủ để thu nhận hàm lượng tinh bột kháng cao nhất (49,5%). Trong khi nghiên cứu của Setiarto và cộng sự [13] đã công bố cần đến 24 giờ phản ứng để thu hàm lượng tinh bột kháng cao đối với bột ngô. Tiếp đến là yếu tố tỉ lệ nguyên liệu và nước, lượng nước cho vào đủ để tinh bột hút nước, trương nở và làm lộ ra các liên kết, nhờ đó làm tăng khả năng tiếp xúc của các phân tử enzyme pullulanase đến các liên kết mạch nhánh trong tinh bột chuối xanh để thực hiện quá trình phân giải một cách dễ dàng hơn [14]. Ngược lại, lượng nước cho vào không đủ cho các hạt tinh bột trương nở sẽ gây ra quá trình hồ hóa không hoàn toàn làm ảnh hưởng đến hàm lượng tinh bột kháng. Ngoài ra, khi tăng nồng độ enzyme pullulanase, số lượng phân tử enzyme gia tăng khả năng tiếp xúc cắt mạch nhánh làm tăng hàm lượng tinh bột kháng [14]. Nhìn chung, quá trình thủy phân bằng enzyme pullulanase là một phương pháp hiệu quả để tăng hàm lượng tinh

bột kháng trong bột chuối xanh, với các điều kiện tối ưu đã được xác định trong nghiên cứu này.

### 3.2. Hình thái cấu trúc của bột chuối xanh

Kết quả phân tích ảnh chụp hiển vi điện tử quét (SEM) của hạt tinh bột chuối xanh sau xử lý bằng enzyme pullulanase dưới các điều kiện tối ưu được trình bày trong Hình 4. Trước khi xử lý, tinh bột chuối xanh có hình dạng đa dạng với kích thước trung bình khoảng 25  $\mu\text{m}$  và bề mặt nhẵn. Sau khi thủy phân bằng pullulanase, các liên kết nhánh amylopectin bị phá vỡ, dẫn đến sự biến đổi cấu trúc tinh bột, chuyển amylopectin thành các phân tử amylose mạch thẳng. Kích thước hạt tinh bột giảm xuống còn khoảng 8,70-11,85  $\mu\text{m}$ , đồng thời bề mặt hạt trở nên gồ ghề hơn. Các hạt nhỏ hơn có xu hướng kết dính, tạo thành các khối kết tụ. Hiện tượng này có thể xuất phát từ sự xoắn lại và tương tác mạnh hơn giữa các mạch amylose sau khi thủy phân, tạo nên các cấu trúc bền vững hơn và gia tăng khả năng kháng tiêu hóa của tinh bột [15, 16].



Hình 4. Kết quả chụp SEM hạt tinh bột chuối xanh trước và sau làm giàu tinh bột kháng

Sự thay đổi này không chỉ là kết quả của quá trình thủy phân, mà còn liên quan đến sự sắp xếp lại cấu trúc tinh thể của tinh bột. Vùng vô định hình trong cấu trúc ban đầu đã được chuyển hóa thành vùng kết tinh, làm tăng mức độ kết tinh của mẫu tinh bột [15]. Quá trình này tạo ra các cấu trúc bền vững hơn, làm tăng khả năng chống chịu của tinh bột đối với enzyme tiêu hóa. Hình ảnh SEM cũng phản ánh rõ sự xuất hiện của các

cấu trúc xoắn kép và sự tái tổ chức phân tử sau xử lý. Việc tăng tính kháng tiêu hóa của tinh bột có thể được lý giải bởi sự sắp xếp lại của các phân tử amylose, tạo thành các liên kết khó bị phá vỡ trong quá trình tiêu hóa [15, 16]. Kết quả này khẳng định rằng quá trình thủy phân không chỉ làm giảm kích thước và thay đổi hình thái bề mặt hạt tinh bột, mà còn ảnh hưởng sâu sắc đến cấu trúc vi mô và tính chất vật lý của tinh bột,

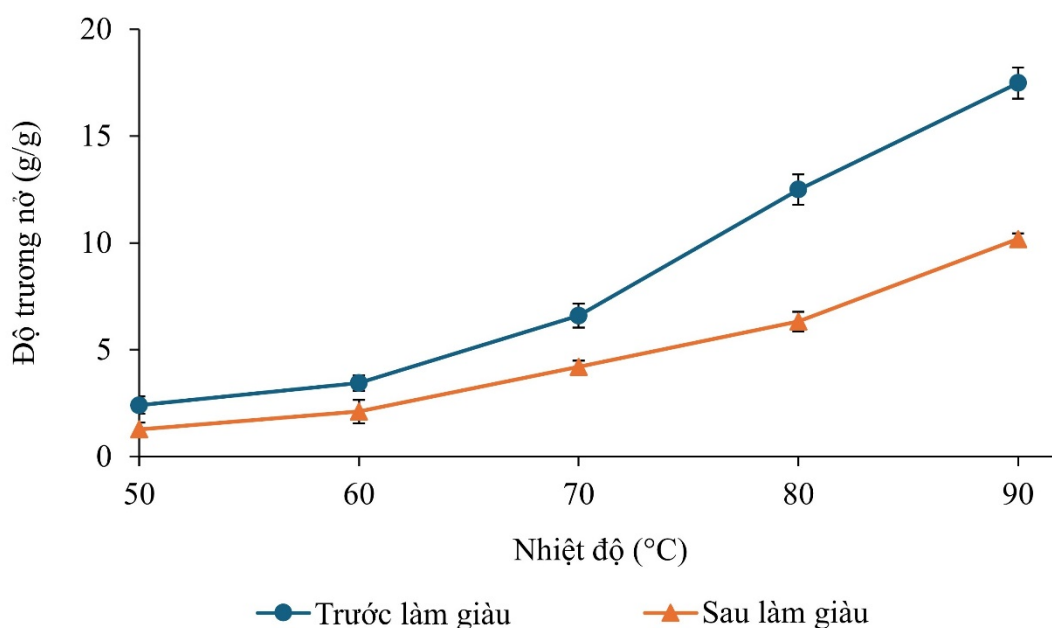


dẫn đến việc tăng đáng kể hàm lượng tinh bột kháng trong sản phẩm sau xử lý.

### 3.3. Khả năng trương nở của bột chuối xanh

Kết quả phân tích khả năng trương nở của tinh bột chuối xanh, đã được làm giàu tinh bột kháng bằng enzyme pullulanase dưới điều kiện tối ưu, được thể hiện trong Hình 5. Sau khi làm giàu, khả năng trương nở của tinh bột giảm đáng kể so với trước khi xử lý. Cụ thể, tại 90°C, tinh bột chuối xanh trước khi làm giàu đạt độ trương nở 17,48 g/g, nhưng sau quá trình làm giàu, giá trị này giảm xuống còn 10,19 g/g. Sự suy giảm này có thể do hàm lượng amylose tăng lên đáng kể

sau quá trình xử lý với enzyme pullulanase. Khi các liên kết nhánh trong amylopectin bị thủy phân, các amylose mạch thẳng được tạo ra, góp phần tái sắp xếp cấu trúc tinh bột và hình thành các vùng kết tinh chặt chẽ hơn. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Schirmer và cộng sự [17], trong đó khẳng định rằng các hạt tinh bột giàu amylose có khả năng trương nở kém hơn so với các hạt giàu amylopectin. Điều này là do cấu trúc phân nhánh của amylopectin giúp nó hút nước và trương nở nhanh chóng, trong khi amylose mạch thẳng khó hút nước hơn và dễ hình thành các vùng kết tinh bền vững.



Hình 5. Khả năng trương nở của bột chuối xanh trước và sau làm giàu tinh bột kháng

Ngoài ra, quá trình trương nở của tinh bột sau khi làm giàu cũng cho thấy hai pha rõ rệt hơn so với trước khi xử lý. Pha đầu tiên có thể phản ánh quá trình hút nước và trương nở ban đầu của các hạt tinh bột, trong khi pha thứ hai liên quan đến sự hòa tan và gel hóa khi nhiệt độ tăng. Sự thay đổi này có thể được giải thích bởi cấu trúc và thành phần của tinh bột đã thay đổi sau xử lý enzyme, khi các liên kết bền vững của amylose làm chậm quá trình trương nở và hút nước [18]. Như vậy, quá trình xử lý bằng enzyme pullulanase không chỉ tác động lên cấu trúc vi

mô của tinh bột, mà còn ảnh hưởng đáng kể đến khả năng trương nở của nó. Sự suy giảm khả năng trương nở sau xử lý cho thấy sự gia tăng hàm lượng tinh bột kháng, đồng thời nhấn mạnh vai trò của amylose trong việc làm giảm khả năng trương nở của tinh bột sau xử lý.

### 4. Kết luận

Nghiên cứu này tối ưu hóa quá trình sử dụng enzyme pullulanase để tăng hàm lượng tinh bột kháng trong bột chuối xanh. Kết quả cho thấy, dưới điều kiện thủy phân 16 giờ, tỉ lệ bột:nước

1:19, nồng độ enzyme pullulanase 8 U/g, nhiệt độ 50°C, và pH 5, hàm lượng tinh bột kháng đạt 52,47%. Sau xử lý, kích thước hạt tinh bột giảm đáng kể và bề mặt hạt trở nên gồ ghề, cho thấy sự xoắn kết của các mạch amylose. Ngoài ra, khả năng trương nở của tinh bột sau xử lý giảm, chứng tỏ sự gia tăng amylose. Kết quả này có thể hỗ trợ các ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này đã được hỗ trợ kinh phí bởi Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

### Tài liệu tham khảo

- [1] Raigond, P., Ezekiel, R., & Raigond, B. (2015). Resistant starch in food: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(10), 1968-1978.
- [2] Faisant, N., Buleon, A., Colonna, P., Molis, C., Lartigue, S., Galmiche, J. P., & Champ, M. (1995). Digestion of raw banana starch in the small intestine of healthy humans: structural features of resistant starch. *British Journal of Nutrition*, 73(1), 111-123.
- [3] Haralampu, S. G. (2000). Resistant starch-a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydrate polymers*, 41(3), 285-292.
- [4] Jiang, H., Zhang, Y., Hong, Y., Bi, Y., Gu, Z., Cheng, L., Li, Z., & Li, C. (2015). Digestibility and changes to structural characteristics of green banana starch during in vitro digestion. *Food Hydrocolloids*, 49, 192-199.
- [5] Basumallick, S. (2020). Pullulan-degrading enzymes and their biochemical features. In: *Pullulan*. Jenny Stanford Publishing, 149-166.
- [6] Leong, Y. H., Karim, A. A., & Norziah, M. H. (2007). Effect of pullulanase debranching of sago (*Metroxylon sagu*) starch at subgelatinization temperature on the yield of resistant starch. *Starch-Stärke*, 59(1), 21-32.
- [7] Xu, P., Zhang, S. Y., Luo, Z. G., Zong, M. H., Li, X. X., & Lou, W. Y. (2021). Biotechnology and bioengineering of pullulanase: state of the art and perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37, 1-10.
- [8] Saeid, A., Akter, F., Ali, M. A., & Rahman, M. H. (2024). Enzymatic modification of starch: amylases and pullulanase. In: *Advanced Research in Starch*. Singapore: Springer Nature Singapore, 95-115.
- [9] Hii, S. L., Tan, J. S., Ling, T. C., & Ariff, A. B. (2012). Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications. *Enzyme Research*, 2012(1), 921362.
- [10] McCleary, B. V., & Monaghan, D. A. (2002). Measurement of resistant starch. *Journal of AOAC International*, 85(3), 665-675.
- [11] Izidoro, D. R., Sierakowski, M. R., Haminiuk, C. W. I., De Souza, C. F., & de Paula Scheer, A. (2011). Physical and chemical properties of ultrasonically, spray-dried green banana (*Musa cavendish*) starch. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 639-648.
- [12] González-Soto, R. A., Agama-Acevedo, E., Solorza-Feria, J., Rendón-Villalobos, R., & Bello-Pérez, L. A. (2004). Resistant starch made from banana starch by autoclaving and debranching. *Starch-Stärke*, 56(10), 495-499.
- [13] Setiarto, R. H. B., Isra, M., Andrianto, D., & Widhyastuti, N. (2023). Improvement of prebiotic properties and resistant starch content of corn flour (*Zea mays* L.) Momala Gorontalo using physical, chemical and enzymatic modification. *Tropical Life Sciences Research*, 34(2), 255-278.
- [14] Oktaviani, S. R., Faridah, D. N., Wulandari, N., Afandi, F. A., & Jayanegara, A. (2023). Resistant starch content of dual modification autoclaving-cooling and pullulanase debranching on various carbohydrate sources: a systematic review. *International Journal of Food Science & Technology*, 58(12), 6890-6901.
- [15] Kaur, B., Venkatrao, K. B., Panesar, P. S., Chopra, H. K., & Anal, A. K. (2022). Optimization of ultrasound-assisted enzymatic extraction of resistant starch from green banana peels and its structural characterization. *Journal of Food Science and Technology*, 59(12), 4663-4672.
- [16] Ouyang, Q., Wang, X., Xiao, Y., Luo, F., Lin, Q., & Ding, Y. (2021). Structural changes of A-, B- and C-type starches of corn, potato and pea as influenced by sonication temperature and their relationships with digestibility. *Food Chemistry*, 358, 129858.
- [17] Schirmer, M., Höchstötter, A., Jekle, M., Arendt, E., & Becker, T. (2013). Physicochemical and morphological characterization of different starches with variable amylose/amylopectin ratio. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 52-63.
- [18] Jia, R., Cui, C., Gao, L., Qin, Y., Ji, N., Dai, L., Wang, Y., Xiong, L., Shi, R., & Sun, Q. (2023). A review of starch swelling behavior: Its mechanism, determination methods, influencing factors, and influence on food quality. *Carbohydrate Polymers*, 321, 121260.