

SỬ DỤNG ENZYME ALPHA-AMYLASE VÀ GLUCOAMYLASE THƯƠNG MẠI THỦY PHÂN TINH BỘT CỦA THỊT CÚ ẬU

TRẦN NGỌC ĐIẾP¹*

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là tìm điều kiện thích hợp cho enzyme alpha-amylase, glucoamylase thương mại thủy phân tinh bột của thịt củ ấu. Trong quá trình thủy phân có nhiều yếu tố ảnh hưởng như nhiệt độ và pH, nồng độ enzyme và thời gian. Kết quả nghiên cứu cho thấy: nhiệt độ và pH thích hợp cho enzyme alpha-amylase dịch hóa tinh bột trong thịt củ ấu là 80°C và 6,0, nồng độ enzyme alpha-amylase và thời gian thích hợp để dịch hóa tinh bột trong thịt củ ấu là 0,02% và 20 phút, nhiệt độ và pH thích hợp cho enzyme glucoamylase đường hóa là 60°C và 4,0, nồng độ enzyme glucoamylase và thời gian đường hóa là 0,03% và 30 phút.

Từ khóa: củ ấu, thủy phân, alpha-amylase, glucoamylase.

ABSTRACT

The objectives of this study were to find suitable conditions for commercial alpha-amylase, glucoamylase to hydrolyze starch of water chestnut. In the process of using, there are many affecting factors such as temperature and pH, enzyme concentration and time. The results showed that the optimal temperature and pH for the alpha-amylase were 80°C and 6.0, the optimal concentration and time were 0.02% and 20 minutes. The optimal temperature and pH for glucoamylase were 60°C and 4.0, the optimal concentration and time were 0.03% and 30 minutes.

Keywords: water chestnut, hydrolyze, alpha-amylase, glucoamylase.

1. GIỚI THIỆU

Củ ấu có tên khoa học là *Trapa bicornis* L. Trong thịt củ ấu có chứa khoảng 49 % tinh bột, 10,3 % protid. Các chất khác chưa thấy nghiên cứu. Theo tài liệu Trung Quốc, trong 100 g thịt củ ấu chín có 4,5 g albumin; 0,1 g chất béo; 19,7 g chất đường các loại; 0,19 g vitamin B₁; 0,06 g B₂; 1,5 mg PP; 13 mg C; 7 mg Ca; 0,7 mg sắt; 19 mg Mn và 93 mg P.

¹ Viện Công nghệ sinh học - Thực phẩm, Trường Đại học Cửu Long

* Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Ngọc Điệp (tranngocdiep@mku.edu.vn)

Chất AH13 là chất được dùng hỗ trợ điều trị chống ung thư. Tuy nhiên để sử dụng thịt củ ấu lên men rượu thì cần chuyển hàm lượng tinh bột thành đường để làm cơ chất có nấm men sử dụng. Amylase là một enzyme xúc tác sự thủy phân tinh bột thành đường. Việc sử dụng enzyme để thủy phân tinh bột sẽ rất an toàn cho người sử dụng.

Củ ấu được trồng nhiều ở Vĩnh Long đặc biệt là khu vực ấp Tân Thuận, Tân Nhơn, Tân An và Tân Thạnh. Tuy nhiên, củ ấu ở đây chủ yếu được bán ở dạng nấu chín hoặc bán cho thị trường Trung Quốc dưới dạng tươi đã bóc

vỏ đông lạnh. Vì vậy, việc “Sử dụng enzyme amylase thương mại thủy phân tinh bột của thịt củ ấu” để làm cơ chất cho quá trình lên men rượu là điều rất có ý nghĩa.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Củ ấu (*Trapa bicornis L*) có nguồn gốc từ huyện Lấp Vò, tỉnh Đồng Tháp.

Enzyme alpha - amylase có nguồn gốc từ *Bacillus licheniformis* của công ty Angel, enzyme glucoamylase từ một chủng loại vi sinh vật chọn lọc là *Aspergillus niger* của công ty Angel.

2.2 Thủy phân tinh bột của thịt củ ấu

Củ ấu sau khi được bóc vỏ, bỏ vỏ lụa, nấu chín rồi xay nhuyễn, phối trộn với nước theo tỷ lệ 1:2, sau đó dịch hóa bằng enzyme alpha-amylase với các điều kiện nhiệt độ, pH, nồng độ enzyme và thời gian khảo sát. Sau đó, đường hóa tinh bột bằng enzyme glucoamylase với các điều kiện nhiệt độ, pH, nồng độ enzyme và thời gian khảo sát. Làm nguội dịch thủy phân đến nhiệt độ phòng và phân tích các chỉ tiêu như °Brix, hàm lượng đường khử và độ nhớt. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 2 nhân tố, 3 lần lặp lại.

2.3 Phương pháp phân tích

Hàm lượng đường khử (%): định lượng hàm lượng đường khử bằng phương pháp chuẩn độ oxy hóa khử với ferricyanure, sản phẩm được là ferrocyanure, việc chuẩn độ được tiến hành trong môi trường NaOH, đun nóng với chỉ thị methylen blue.

2.4 Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Excel và STATGRAPHICS Centurion XVI để tính toán, thống kê số liệu, kiểm định bằng LSD.

3. KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng nhiệt độ và pH đến khả năng dịch hóa tinh bột trong thịt củ ấu của enzyme alpha - amylase

Theo các nghiên cứu và lý thuyết về các yếu tố ảnh hưởng đến động học enzyme thì nhiệt độ, pH, nồng độ enzyme và thời gian là 4 nhân tố quan trọng ảnh hưởng lớn đến quá trình thủy phân. Trong phạm vi đề tài này, sử dụng chế phẩm alpha-amylase từ *Bacillus licheniformis* của công ty Angel để thực hiện quá trình dịch hóa tinh bột trong thịt củ ấu. Để quá trình dịch hóa tinh bột trong thịt củ ấu đạt hiệu quả cao, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt động của chế phẩm enzyme alpha-amylase trên cơ chất tinh bột của thịt củ ấu. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 1

Bảng 1. Hàm lượng đường tạo thành (%) sau quá trình dịch hóa tinh bột trong thịt củ ấu bằng alpha-amylase

Nhiệt độ (oC) - pH	Hàm lượng đường tạo thành (%)
75 - 5,5	0,23 ^{BCDEF}
75 - 6,0	0,25 ^{BCDE}
75 - 6,5	0,25 ^{BCDE}
75 - 7,0	0,23 ^{BCDEF}
75 - 7,5	0,20 ^{FGH}
80 - 5,5	0,27 ^{BC}
80 - 6,0	0,36^A
80 - 6,5	0,28 ^B
80 - 7,0	0,25
80 - 7,5	0,23 ^{CDEF}
85 - 5,5	0,28 ^B
85 - 6,0	0,35^A

85 - 6,5	0,26 ^{BCD}
85 - 7,0	0,25 ^{BCDE}
85 - 7,5	0,21 ^{EFG}
90 - 5,5	0,23 ^{BCDEF}
90 - 6,0	0,26 ^{BCD}
90 - 6,5	0,24 ^{BCDE}
90 - 7,0	0,22 ^{DÈG}
90 - 7,5	0,19 ^{GH}
95 - 5,5	0,21 ^{EFG}
95 - 6,0	0,24 ^{BCDE}
95 - 6,5	0,22 ^{DÈG}
95 - 7,0	0,19 ^{GH}
95 - 7,5	0,17 ^H

Các giá trị trung bình có cùng chữ cái A, B, C, D, ... đi kèm trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Các giá trị ghi trong bảng được tính bằng đơn vị % và là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại.

Quá trình dịch hóa tinh bột được thực hiện dựa trên khả năng thủy phân ngẫu nhiên các liên kết α -1,4-glycosid trong phân tử tinh bột của enzyme alpha-amylase. Kết quả phân tích thống kê cho thấy hai nhân tố nhiệt độ và pH ($p < 0,05$) có sự tương tác lẫn nhau. Đồng thời, nhân tố nhiệt độ có $p < 0,05$ và nhân tố pH có $p < 0,05$ nên có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Hai nhân tố nhiệt độ và pH có ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme alpha-amylase. Kết quả bảng 1 cho thấy, ở nhiệt độ 80°C, pH 6,0 và 85°C, pH 6,0 hàm lượng đường thu được cao hơn so với các mức còn lại. Nhiệt độ có ảnh hưởng rất lớn đến phản ứng của enzyme. Tốc độ enzyme chỉ tăng đến một giới hạn nhiệt độ nhất định, vượt quá giới

hạn đó tốc độ enzyme sẽ giảm và dẫn đến mức triệt tiêu (Nguyễn Đức Lượng, 2004). Vì vậy, quá trình dịch hóa tinh bột của thịt củ ấu của enzyme alpha-amylase được thực hiện tốt nhất ở nhiệt độ 80°C để tiết kiệm chi phí sản xuất, trong khi theo Nguyễn Minh Thủy và ctv (2015) thì enzyme alpha-amylase thực hiện quá trình dịch hóa tinh bột trong chế biến sữa gạo tối ưu ở nhiệt độ 74,71°C, theo Trần Ngọc Điệp (2008) quá trình dịch hóa tinh bột của nguyên liệu chuối xiêm tối ưu ở nhiệt độ 95°C, theo Trần Ngọc Điệp (2015) quá trình dịch hóa tinh bột khoai lang tím tối ưu ở nhiệt độ 90°C. Đối với ảnh hưởng của nhân tố pH thì ở pH bằng 6,0 hàm lượng đường thu được nhiều hơn so với các mức còn lại, trong khi theo Trần Ngọc Điệp (2008) thì giá trị pH tối ưu cho quá trình dịch hóa của enzyme alpha-amylase trên cơ chất chuối xiêm là pH bằng 6,5. Điều này chứng tỏ cùng một hệ enzyme nhưng trên những cơ chất khác nhau thì có các điều kiện hoạt động tối ưu khác nhau.

Tóm lại, sử dụng chế phẩm alpha-amylase từ *Bacillus licheniformis* của công ty Angel để thực hiện quá trình dịch hóa tinh bột trong thịt củ ấu tốt nhất là ở điều kiện nhiệt độ 80°C, pH 6,0 để tiết kiệm chi phí sản xuất.

3.2 Ảnh hưởng nồng độ và thời gian đến khả năng dịch hóa tinh bột trong thịt củ ấu của enzyme alpha - amylase

Ngoài hai yếu tố nhiệt độ và pH ảnh hưởng đến khả năng dịch hóa tinh bột trong thịt củ ấu thì hai yếu tố nồng độ enzyme và thời gian cũng có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng dịch hóa tinh bột của thịt củ ấu. Vì vậy, để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình dịch hóa, tiến hành thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme alpha-amylase và thời gian đến khả năng dịch hóa tinh bột của thịt củ ấu. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 2

Bảng 2: Hàm lượng đường thu được sau quá trình dịch hóa bằng enzyme alpha-amylase ở các mức nồng độ và thời gian

Nồng độ alpha-amylase (%) - Thời gian (phút)	Hàm lượng đường tạo thành (%)
0,01 - 10	0,20±0,00 ^D
0,01 - 20	0,24±0,00 ^C
0,01 - 30	0,24±0,00 ^C
0,02 - 10	0,25±0,01 ^B
0,02 - 20	0,33±0,00 ^A
0,02 - 30	0,33±0,00 ^A
0,03 - 10	0,25±0,01 ^B
0,03 - 20	0,32±0,00 ^A
0,03 - 30	0,32±0,00 ^A

Các giá trị trung bình có cùng chữ cái A, B, C, D đi kèm trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Các giá trị ghi trong bảng được tính bằng đơn vị % và là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại.

Trong điều kiện nồng độ cơ chất thích hợp thì vận tốc phản ứng tuyến tính với nồng độ enzyme. Tuy nhiên khi nồng độ enzyme tăng đến một giới hạn thì tốc độ phản ứng không tăng lên nữa (Nguyễn Trọng Cẩn, 1998). Giai đoạn đầu khi nồng độ cơ chất thừa, vận tốc phản ứng tỷ lệ thuận với nồng độ enzyme, hàm lượng chất khô hòa tan tăng. Càng về sau sản phẩm tạo thành tăng lên, vừa đóng vai trò chất ức chế không cạnh tranh, vừa làm cho lượng cơ chất trong môi trường giảm nên khi tiếp tục tăng nồng độ enzyme thì vận tốc phản ứng tăng không đáng kể. Kết quả phân tích thống kê cho thấy hai nhân tố nồng độ enzyme và thời gian ($p < 0,05$) có sự tương tác lẫn nhau. Đồng thời, nhân tố nồng độ có $p < 0,05$ và nhân tố thời gian có $p < 0,05$ nên có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Hai nhân tố nồng

độ và thời gian có ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme alpha-amylase. Kết quả bảng 2 cho thấy, ở nồng độ enzyme alpha-amylase 0,02% và thời gian 20 phút hàm lượng đường thu được cao hơn so với nồng độ 0,01% ở các mức thời gian 10, 20 và 30 phút nhưng khi tăng nồng độ lên 0,03% thì hàm lượng đường thu được sau quá trình dịch hóa không có sự khác biệt với 0,02%, phù hợp với nhận định của Nguyễn Trọng Cẩn (1998). Đối với ảnh hưởng của nhân tố thời gian, hàm lượng đường thu được sẽ tăng theo thời gian nhưng đến một thời gian nhất định nếu tiếp tục tăng thời gian thì hàm lượng đường thu được sẽ không tăng (Nguyễn Trọng Cẩn, 1998). Kết quả phù hợp với nhận định của Nguyễn Trọng Cẩn (1998).

Như vậy, khi sử dụng nồng độ enzyme alpha-amylase 0,02% và thời gian 20 phút thì quá trình dịch hóa tinh bột của thịt củ ấu là tốt nhất.

3.3 Ảnh hưởng nhiệt độ và pH đến khả năng đường hóa của enzyme glucoamylase có trong thịt củ ấu

Trong thí nghiệm này, sử dụng chế phẩm enzyme glucoamylase từ một chủng loại vi sinh vật chọn lọc là *Aspergillus niger* của công ty Angel để thực hiện quá trình đường hóa. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 3

Bảng 3. Hàm lượng đường thu được (%) sau quá trình đường hóa tinh bột trong thịt củ ấu ở các điều kiện nhiệt độ và pH

Nhiệt độ (oC) - pH	Hàm lượng đường tạo thành (%)
50 - 3,5	5,83 ^{GH}
50 - 4,0	5,87 ^{GH}
50 - 4,5	6,03 ^{EFG}
50 - 5,0	5,76 ^H
55 - 3,5	6,03 ^{EFG}
55 - 4,0	6,20 ^{DE}

55 - 4,5	6,23 ^{GH}
55 - 5,0	5,97 ^{FGH}
60 - 3,5	7,03 ^B
60 - 4,0	7,53 ^A
60 - 4,5	7,73 ^A
60 - 5,0	6,90 ^{BC}
65 - 3,5	6,27 ^D
65 - 4,0	6,80 ^C
65 - 4,5	6,80 ^C
65 - 5,0	6,13 ^{DEF}
70 - 3,5	6,03 ^{EFG}
70 - 4,0	6,20 ^{DE}
70 - 4,5	6,33 ^D
70 - 5,0	5,83 ^{GH}

Các giá trị trung bình có cùng chữ cái A, B, C, D, ... đi kèm trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Các giá trị ghi trong bảng được tính bằng đơn vị % và là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại.

Quá trình đường hóa tinh bột được thực hiện dựa trên khả năng thủy phân ngẫu nhiên các liên kết α -1,6-glycosid trong phân tử tinh bột của enzyme glucoamylase. Kết quả phân tích thống kê cho thấy hai nhân tố nhiệt độ và pH ($p < 0,05$) có sự tương tác lẫn nhau. Đồng thời, nhân tố nhiệt độ có $p < 0,05$ và nhân tố pH có $p < 0,05$ nên có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Hai nhân tố nhiệt độ và pH có ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme glucoamylase. Kết quả bảng 3 cho thấy, hai nhân tố nhiệt độ và pH của dịch thủy phân có ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme glucoamylase. Ở nhiệt độ 60°C và pH 4,0 và 4,5 thì hàm lượng đường tạo thành nhiều hơn so với các điều kiện còn lại.

Do vậy, khi sử dụng chế phẩm enzyme glucoamylase từ một chủng loại vi sinh vật chọn lọc là *Aspergillus niger* của công ty Angel

thực hiện quá trình đường hóa tốt ở điều kiện nhiệt độ 60°C, pH 4,5 để khi sử dụng cơ chất này lên men rượu được thuận lợi hơn.

3.4 Ảnh hưởng nồng độ và thời gian đến khả năng đường hóa tinh bột của thịt củ ấu của enzyme glucoamylase

Ngoài hai yếu tố nhiệt độ và pH ảnh hưởng đến khả năng đường hóa tinh bột của thịt củ ấu thì hai yếu tố nồng độ enzyme và thời gian cũng có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng đường hóa tinh bột của thịt củ ấu. Vì vậy, để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình đường hóa, tiến hành thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme glucoamylase và thời gian đến khả năng đường hóa tinh bột của thịt củ ấu. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 4

Bảng 4: Hàm lượng đường thu được (%) sau quá trình đường hóa tinh bột của thịt củ ấu bằng enzyme glucoamylase với các mức nồng độ và thời gian

Nồng độ glucoamylase (%) - Thời gian (phút)	Hàm lượng đường tạo thành (%)
0,01 - 20	5,80 $\pm$ 0,00 ^D
0,01 - 30	6,20 $\pm$ 0,00 ^C
0,01 - 40	6,20 $\pm$ 0,00 ^C
0,02 - 20	6,83 $\pm$ 0,01 ^B
0,02 - 30	7,63 $\pm$ 0,00 ^A
0,02 - 40	7,63 $\pm$ 0,00 ^A
0,03 - 20	6,83 $\pm$ 0,01 ^B
0,03 - 30	7,67 $\pm$ 0,00 ^A
0,03 - 40	7,67 $\pm$ 0,00 ^A

Các giá trị trung bình có cùng chữ cái A, B, C, D đi kèm trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Các giá trị ghi trong bảng được tính bằng đơn vị % và là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại.

Kết quả phân tích thống kê cho thấy hai nhân tố nồng độ enzyme và thời gian ($p < 0,05$) có sự tương tác lẫn nhau. Đồng thời, nhân tố nồng độ có $p < 0,05$ và nhân tố thời gian có $p < 0,05$ nên có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Hai nhân tố nồng độ và thời gian có ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme glucoamylase. Kết quả bảng 4 cho thấy, ở điều kiện nồng độ 0,02%, thời gian thủy phân 30 phút hàm lượng đường thu được nhiều hơn so với nồng độ 0,01%, thời gian thủy phân 20, 30 và 40 phút. Điều này chứng tỏ nồng độ enzyme 0,01% không đủ để thủy phân cơ chất tinh bột của thịt củ ấu, nhưng khi tăng nồng độ enzyme lên 0,03% thì hàm lượng đường thu được không có sự khác biệt so với nồng độ 0,02%, như vậy nồng độ 0,02% vừa đủ để thủy phân tinh bột trong thịt củ ấu. Đối với ảnh hưởng của nhân tố nồng độ thì ở 0,02% hàm lượng đường thu được cao hơn so với 0,01% nhưng khi tăng lên 0,03% thì hàm lượng đường thu được sau quá trình đường hóa không có sự khác biệt với 0,02%, phù hợp với nhận định của Nguyễn Trọng Cẩn (1998). Đối với ảnh hưởng của nhân tố thời gian, hàm lượng đường thu được sẽ tăng theo thời gian nhưng đến một thời gian nhất định nếu tiếp tục tăng thời gian thì hàm lượng đường thu được sẽ không tăng (Nguyễn Trọng Cẩn, 1998). Kết quả phù hợp với nhận định của Nguyễn Trọng Cẩn (1998).

Tóm lại, khi sử dụng nồng độ enzyme glucoamylase 0,02% và thời gian 30 phút thì quá trình đường hóa tinh bột của thịt củ ấu là tốt nhất.

4. KẾT LUẬN

Việc sử dụng enzyme alpha-amylase và

glucoamylase để chuyển hóa tinh bột củ ấu, một nguyên liệu khá mới ở Vĩnh Long để sử dụng chế biến thành sản phẩm mới như rượu không qua chưng cất. Quá trình thủy phân tinh bột củ ấu được thực hiện qua hai giai đoạn, giai đoạn dịch hóa bằng enzyme alpha - amylase ở điều kiện nhiệt độ 80°C, pH=6,0 với nồng độ 0,02% trong thời gian 20 phút, tiếp theo là giai đoạn đường hóa bằng enzyme glucoamylase ở nhiệt độ 60°C, pH=4,5, nồng độ enzyme 0,02% trong thời gian 30 phút.

5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Đức Lượng (2004), *Công nghệ vi sinh vật tập 1 - Cơ sở vi sinh học công nghiệp*, NXB Đại học quốc gia TP. Hồ Chí Minh.

Nguyễn Minh Thủy, Đinh Công Dinh và Nguyễn Thị Mỹ Tuyền (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.

Nguyễn Trọng Cẩn (1998), *Công nghệ enzyme*, Nhà xuất bản Nông nghiệp TP. Hồ Chí Minh.

Trần Ngọc Diệp (2008), *Ứng dụng chế phẩm sinh học cải tiến chất lượng rượu vang chuối xiêm*, Trường Đại học Cần Thơ.

Trần Ngọc Diệp (2015), *Nghiên cứu quy trình chế biến rượu vang khoai lang tím*, Trường Đại học Cửu Long.

Ngày nhận bài: 11/08/2023

Ngày gửi phản biện: 15/08/2023

Ngày duyệt đăng: 09/09/2023