

## A. PHẦN MỞ ĐẦU

### 1. Tính cấp thiết của luận án

Quá trình thủy phân tinh bột được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm và công nghiệp lên men. Hiệu suất thủy phân tinh bột phụ thuộc chủ yếu vào giai đoạn phá vỡ hạt tinh bột để giải phóng các phân tử amylose và amylopectin, nhờ đó enzyme tiếp xúc được với cơ chất để chuyển hóa tinh bột thành đường. Giai đoạn này diễn ra chậm và tiêu tốn nhiều năng lượng. Hiện nay, các nhà sản xuất ở trong và ngoài nước đều sử dụng nhiệt kết hợp với chế phẩm  $\alpha$  – amylase để phá vỡ hạt tinh bột. Phương pháp này có nhược điểm là cần sử dụng chế phẩm enzyme với hàm lượng cao và thời gian xử lý dài.

Trong mười năm gần đây, nhiều giải pháp công nghệ mới đã được nghiên cứu nhằm giảm lượng chế phẩm enzyme cần dùng và rút ngắn thời gian thủy phân, từ đó làm tăng hiệu quả kinh tế của quy trình sản xuất. Trong số đó, sử dụng sóng siêu âm để hỗ trợ quá trình thủy phân tinh bột bước đầu mang lại một số kết quả tích cực. Những nghiên cứu này được thực hiện chủ yếu để tiền xử lý nguyên liệu, giúp giải phóng phân tử tinh bột, sau đó mới bổ sung chế phẩm enzyme để thực hiện quá trình thủy phân. Phương pháp này khó thực hiện với huyền phù tinh bột có hàm lượng cao do độ nhớt hỗn hợp làm giảm tác động phá vỡ hạt tinh bột của sóng siêu âm. Một trong số những giải pháp khắc phục các nhược điểm trên là sử dụng sóng siêu âm tác động vào huyền phù tinh bột trong giai đoạn dịch hóa. Bên cạnh đó, một số các kết quả công bố cho thấy sóng siêu âm có thể làm tăng hoạt độ enzyme khi được xử lý với các điều kiện thích hợp, chúng tôi thử nghiệm sử dụng sóng siêu âm làm tăng tính xúc tác của các chế phẩm amylase, qua đó làm giảm lượng enzyme sử dụng.

### 2. Mục tiêu của luận án

Mục tiêu của luận án là nâng cao hiệu quả kỹ thuật của quá trình thủy phân tinh bột khoai mì bằng giải pháp sử dụng sóng siêu âm, cụ thể là: xác định các điều kiện xử lý siêu âm để làm tăng hoạt tính xúc tác của các chế phẩm enzyme amylase, từ đó tiết kiệm được lượng enzyme cần dùng; đồng thời xác định điều

kiện siêu âm hỗn hợp huyền phù tinh bột khoai mì trong giai đoạn dịch hóa; từ đó rút ngắn thời gian hay nâng cao hiệu suất thủy phân tinh bột.

### **3. Những đóng góp mới của luận án**

- Xác định các thông số siêu âm thích hợp để tăng hoạt độ amylase của chế phẩm Termamyl 120L và Dextrozyme GA bằng phương pháp qui hoạch thực nghiệm.
- So sánh khả năng xúc tác của chế phẩm enzyme đã qua xử lý siêu âm với chế phẩm enzyme công nghiệp thông qua hoạt độ amylase ở các pH và nhiệt độ khác nhau; các thông số động học enzyme, các thông số nhiệt động học của phản ứng thủy phân tinh bột, các thông số động học của quá trình vô hoạt enzyme.
- Xác định các thông số siêu âm thích hợp để tăng độ thủy phân tinh bột khoai mì trong giai đoạn dịch hóa bằng phương pháp qui hoạch thực nghiệm.

### **4. Bố cục của luận án**

Luận án có 119 trang, 21 bảng, 58 hình và 170 tài liệu tham khảo, bao gồm các phần: Mở đầu; Chương 1: Tổng quan; Chương 2: Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu; Chương 3: Kết quả và bàn luận; Chương 4: Kết luận và kiến nghị; Tài liệu tham khảo; Các công trình đã công bố.

## **B. NỘI DUNG LUẬN ÁN**

### **CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN**

#### **1.1 Quá trình thủy phân tinh bột**

Về bản chất, quá trình thủy phân tinh bột là quá trình phân cắt mạch phân tử tinh bột có sự tham gia của nước. Xúc tác được sử dụng phổ biến hiện nay là các enzyme amylase. Quá trình thủy phân tinh bột thường được chia thành ba giai đoạn: hồ hóa dưới tác dụng của nhiệt, dịch hóa dưới tác dụng của nhiệt và enzyme  $\alpha$  – amylase và đường hóa dưới tác dụng của hệ các enzyme như  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase,  $\gamma$ -amylase, pullulanase. Nếu bổ sung  $\alpha$  – amylase chịu nhiệt vào huyền phù tinh bột từ đầu quá trình thủy phân, giai đoạn hồ hóa và dịch hóa xảy ra đồng

thời và được gọi chung là dịch hóa. Khi đó, quá trình thủy phân dưới xúc tác của hệ enzyme amylase chỉ được chia thành hai giai đoạn là dịch hóa và đường hóa.

## 1.2 Enzyme amylase

Amylase là enzyme thủy phân, xúc tác phân giải liên kết  $\alpha - 1,4$  hay  $1,6$  glucoside trong phân tử polysaccharide với sự tham gia của nước. Amylase là một trong những nhóm enzyme được ứng dụng rộng rãi nhất trong ngành công nghiệp thực phẩm; trong đó 2 enzyme được sử dụng nhiều nhất là glucoamylase (GA) chiếm 26% và  $\alpha$  - amylase chịu nhiệt chiếm 24% lượng amylase trên toàn thế giới.

## 1.3 Sóng siêu âm

Sóng siêu âm là tên gọi của sóng có tần số cao hơn tần số sóng âm mà con người nghe được (Tần số lớn hơn 20 kHz). Sóng siêu âm khi truyền qua chất lỏng sẽ làm xuất hiện hiện tượng “xâm thực”, các “vi dòng” (micro-streaming), “vi tia” (microjet), làm gia tăng nhiệt độ và tạo ra các vùng có áp lực cao.

## 1.4 Xử lý sóng siêu âm làm nâng cao hoạt độ enzyme

Sóng siêu âm có thể làm thay đổi cấu trúc tâm hoạt động trong phân tử enzyme, phản ứng nhờ đó enzyme dễ tiếp xúc với cơ chất hơn nên làm tăng hiệu suất.

## 1.5 Ứng dụng sóng siêu âm vào quá trình tiền xử lý tinh bột

Khi siêu âm huyền phù tinh bột, sóng siêu âm tác động làm phá vỡ cấu trúc hạt tinh bột và giải phóng các phân tử tinh bột, nhờ đó enzyme dễ tiếp xúc với cơ chất hơn nên làm tăng hiệu suất thủy phân.

# CHƯƠNG 2: NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

## 2.1. Nguyên liệu

- Chế phẩm enzyme  $\alpha$  – amylase có tên thương mại là Termamyl 120L; là chế phẩm chứa  $\alpha$  – amylase bền nhiệt được thu nhận từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis*. Chế phẩm enzyme glucoamylase có tên thương mại là Dextrozyme GA được thu nhận từ nấm mốc *Aspergillus niger*; là những chế phẩm thương mại do hãng Novozymes (Đan Mạch) sản xuất
- Tinh bột khoai mì được cung cấp bởi Công ty trách nhiệm hữu hạn khoai mì Tây Ninh. Tinh bột có độ ẩm nhỏ hơn 13%. Hàm lượng tinh bột lớn hơn 85%.

- Các hóa chất phân tích gồm tinh bột hòa tan, maltodextrin DE 20, thuốc thử 3,5 – dinitrosalicylic acid, thuốc thử Coomassie Brilliant Blue, hệ đệm natri phosphate và hệ đệm citrate phosphate do hãng Merck (Đức) sản xuất

## **2.2. Hoạch định thí nghiệm**

### **2.2.1. Phần 1: Xử lý siêu âm huyền phù tinh bột khoai mì – Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến giai đoạn hồ hóa**

Quy hoạch cổ điển: các thông số khảo sát thay đổi trong khoảng: hàm lượng tinh bột trong huyền phù ban đầu: 5–35%, siêu âm nhiệt độ siêu âm: 50–75°C, công suất siêu âm: 1,5–4,5W/g tinh bột, thời gian siêu âm: 5-25 phút; Sau khi xử lý siêu âm, huyền phù tinh bột được giữ ở nhiệt độ 90°C trong thời gian từ 55 – 35 phút để tổng thời gian xử lý là 60 phút. Xác định nồng độ tinh bột hòa tan từ đó tính ra độ hòa tan tinh bột trong giai đoạn hồ hóa; xác định giản đồ phân bố kích thước hạt và chụp hình bề mặt hạt tinh bột.

### **2.2.2. Phần 2: Xử lý siêu âm chế phẩm enzyme amylase**

#### **2.2.2.1. Phần 2.1. Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến chế phẩm Termamyl 120L**

##### **Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến hoạt độ $\alpha$ – amylase:**

- Quy hoạch cổ điển: các thông số siêu âm thay đổi trong khoảng: nhiệt độ: 20 – 60°C, công suất: 10 –35W/mL, thời gian: 30–150 giây; Xác định hoạt độ  $\alpha$  – amylase.
- Quy hoạch thực nghiệm theo phương án quay bậc hai của Box – Hunter, cấu trúc có tâm với ba yếu tố bao gồm nhiệt độ, công suất và thời gian siêu âm, hàm mục tiêu là hoạt độ  $\alpha$  – amylase,  $Y_1$  (%).
- Phân tích biến đổi hàm lượng, thành phần và cấu trúc protein enzyme: mẫu enzyme qua xử lý siêu âm có hoạt độ  $\alpha$  – amylase cao nhất (được gọi tắt là mẫu enzyme siêu âm) và mẫu enzyme đối chứng được xác định hàm lượng protein hòa tan, thành phần protein theo phân tử lượng, phổ UV, phổ hồng ngoại và phổ cộng hưởng từ hạt nhân.

##### **Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến tính chất $\alpha$ – amylase:**

Mẫu enzyme siêu âm và đối chứng được sử dụng để xúc tác phản ứng thủy phân với cơ chất là tinh bột hòa tan. Nồng độ cơ chất thay đổi từ 2–4g/L, giá trị pH

thay đổi từ 5,0 đến 9,0, (nhiệt độ ổn định ở 85°C); nhiệt độ thay đổi từ 50°C đến 95°C, (pH ổn định ở giá trị được chọn từ thí nghiệm trước). Giá trị cần xác định là hoạt độ  $\alpha$  – amylase, từ đó tính toán các thông số động học phản ứng theo phương pháp do Lineweaver và Burk đề xuất, thông số nhiệt động học phản ứng theo phương pháp do Eyring và Stearn đề xuất, thông số động học của quá trình vô hoạt enzyme được xác định theo phương pháp do Arrhenius đề xuất.

#### 2.2.2.2. Phần 2.2. Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến chế phẩm Dextrozyme GA

##### *Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến hoạt độ glucoamylase:*

- Quy hoạch cổ điển: Thay đổi thông số siêu âm trong khoảng nhiệt độ: 20–60°C, công suất: 10–35W/mL, thời gian: 15–150 giây; Xác định hoạt độ glucoamylase
- Quy hoạch thực nghiệm theo phương án quay bậc hai của Box – Hunter, cấu trúc có tâm với ba yếu tố bao gồm nhiệt độ, công suất và thời gian siêu âm, hàm mục tiêu là hoạt độ glucoamylase,  $Y_2$  (%).
- Phân tích biến đổi hàm lượng và thành phần protein enzyme: mẫu enzyme siêu âm có hoạt độ glucoamylase cao nhất (được gọi tắt là mẫu enzyme siêu âm) và mẫu enzyme đối chứng được đem đi xác định hàm lượng protein hòa tan, thành phần protein theo phân tử lượng.

##### *Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến tính chất glucoamylase:*

Mẫu enzyme siêu âm và đối chứng được sử dụng để xúc tác phản ứng thủy phân với cơ chất là với cơ chất là maltodextrin DE = 20. Nồng độ cơ chất thay đổi từ 0,1–0,2g/L, giá trị pH thay đổi từ 3,5 đến 5,5, (nhiệt độ ổn định ở 65°C); nhiệt độ thay đổi từ 55°C đến 75°C, (pH ổn định ở giá trị được chọn từ thí nghiệm trước). Giá trị cần xác định là hoạt độ glucoamylase.

#### 2.2.3. Phần 3: Xử lý siêu âm hỗn hợp huyền phù tinh bột khoai mì có chứa enzyme – Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến giai đoạn dịch hóa

- Quy hoạch cổ điển: các thông số siêu âm nghiên cứu thay đổi trong khoảng: hàm lượng tinh bột trong huyền phù ban đầu: 15–40%, nhiệt độ: 45–95°C, công suất: 1,5–4,5W/g tinh bột, thời gian: 5-20 phút; Sau khi xử lý siêu âm, huyền phù tinh bột được giữ ở nhiệt độ 90°C để tổng thời gian xử lý là 80 phút. Xác

định nồng độ đường khử từ đó tính ra độ thủy phân trong giai đoạn dịch hóa; xác định gián tiếp phân bố kích thước hạt và chụp hình bề mặt hạt tinh bột.

- Quy hoạch thực nghiệm theo phương án quay bậc hai của Box – Hunter, cấu trúc có tâm với ba yếu tố bao gồm nhiệt độ, công suất và thời gian siêu âm, hàm mục tiêu là độ thủy phân tinh bột,  $Y_3$  (%).

#### ***2.2.4. Phần 4: So sánh các giải pháp sử dụng sóng siêu âm để nâng cao hiệu quả thủy phân tinh bột khoai mì***

Khảo sát và so sánh độ thủy phân tinh bột của 6 mẫu thí nghiệm: Giải pháp 1: quy trình thủy phân tinh bột đang được sử dụng phổ biến hiện nay (sử dụng chế phẩm enzyme Termamyl 120L và Dextrozyme GA không qua xử lý siêu âm). Giải pháp 2: quy trình sử dụng chế phẩm enzyme Termamyl 120L không qua xử lý siêu âm và chế phẩm Dextrozyme 120L đã được siêu âm tăng hoạt tính. Giải pháp 3: quy trình sử dụng chế phẩm enzyme Termamyl 120L đã được siêu âm tăng hoạt tính và chế phẩm Dextrozyme GA không qua xử lý siêu âm. Giải pháp 4: trình sử dụng chế phẩm enzyme Termamyl 120L và Dextrozyme GA đã được siêu âm tăng hoạt tính. Giải pháp 5: quy trình xử lý siêu âm huyền phù tinh bột có chứa chế phẩm enzyme Termamyl 120L, sau đó sử dụng chế phẩm Dextrozyme GA không qua xử lý siêu âm. Giải pháp 6: quy trình xử lý siêu âm huyền phù tinh bột có chứa chế phẩm enzyme Termamyl 120L, sau đó sử dụng chế phẩm Dextrozyme GA đã được siêu âm tăng hoạt tính.

Với chế phẩm enzyme Termamyl 120L đã được siêu âm tăng hoạt tính theo điều kiện được xác định trong phần 2.1; chế phẩm Dextrozyme GA đã được siêu âm tăng hoạt tính theo điều kiện được xác định trong phần 2.2 và điều kiện siêu âm hỗn hợp huyền phù tinh bột khoai mì có bổ sung chế phẩm Termamyl 120L được xác định trong phần 3.

### **2.3. Phương pháp phân tích**

Quang phổ so màu UV - VIS (định lượng đường khử, protein), sắc ký điện di (thành phần protein hòa tan theo phân tử lượng), phổ hồng ngoại và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (nhóm cấu trúc protein), tán xạ laser - Laser Scattering Particle Size Distribution Analyze (xác định phân bố kích thước hạt).

## 2.4. Phương pháp xử lý số liệu

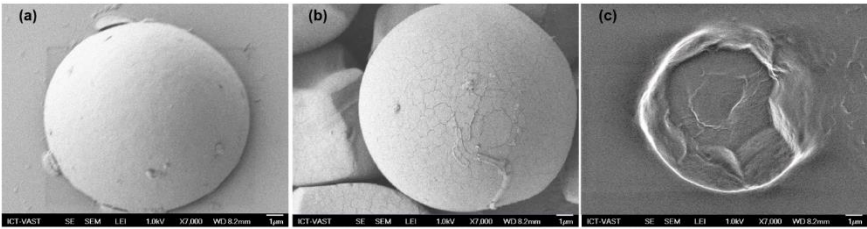
- Kết quả thí nghiệm là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại
- Phân tích thống kê kết quả thực nghiệm: ANOVA, Statgraphics plus 3.2
- Xử lý kết quả quy hoạch thực nghiệm: Modde 5.0

## CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Phần 1: Xử lý siêu âm huyền phù tinh bột khoai mì – Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến giai đoạn hồ hóa

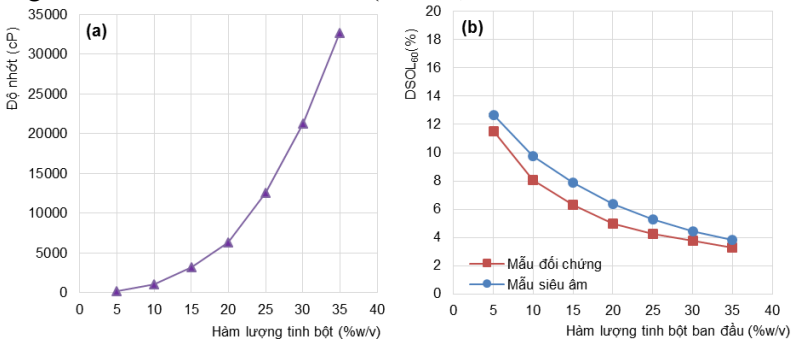
#### 3.1.1. Ảnh hưởng của hàm lượng tinh bột trong huyền phù ban đầu

Sóng siêu âm gây nứt nẻ (Hình 1b) hay bong tróc (Hình 1c) bề mặt hạt tinh bột nên làm tăng độ hòa tan tinh bột so với mẫu đối chứng có bề mặt hạt trơn láng (Hình 1a).



Hình 1 Hình chụp dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) hạt tinh bột khoai mì trong giai đoạn hồ hóa. (a) Mẫu đối chứng: huyền phù tinh bột 5%w/v sau 1 phút ủ ở 65°C (b) và (c) Mẫu siêu âm: huyền phù tinh bột 5%w/v và 20%w/v sau quá trình xử lý siêu âm. Nhiệt độ, công suất và thời gian siêu âm lần lượt là 65°C, 3W/g tinh bột, 1 phút.

Khi tăng hàm lượng tinh bột trong huyền phù ban đầu từ 5 lên 35%, độ nhớt tăng nên làm giảm độ hòa tan của tinh bột (Hình 2).

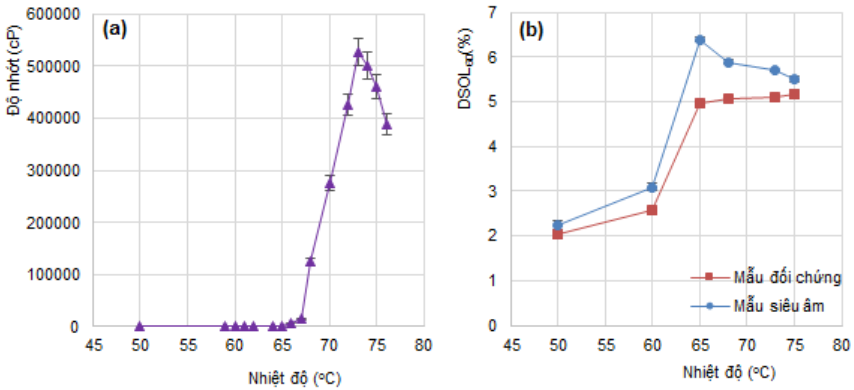


Hình 2 Ảnh hưởng của hàm lượng tinh bột trong huyền phù ban đầu đến (a) Độ nhớt huyền phù tinh bột khoai mì ở 65°C và (b) Độ hòa tan tinh bột của mẫu siêu âm và mẫu đối chứng sau 60 phút hồ hóa. Các mẫu siêu âm được xử lý với nhiệt độ, công suất và thời gian siêu âm lần lượt là 65°C, 3W/g tinh bột và 10 phút; sau đó ủ

mẫu ở 90°C trong 50 phút. Các mẫu đối chứng có cùng hàm lượng tinh bột ban đầu với mẫu siêu âm, và được ủ ở 65°C trong 10 phút; sau đó được ủ tiếp ở 90°C trong 50 phút.

**3.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm**

Huyền phù tinh bột 20% có nhiệt độ hồ hóa từ 65 – 73°C (Hình 3a). Khi nhiệt độ siêu âm thay đổi từ 50°C đến 65°C, độ nhớt tăng chậm nên tác động của sóng siêu âm đến hạt tinh bột nhiều, độ hòa tan tăng. Khi tăng nhiệt độ siêu âm trên 65°C, độ nhớt hỗn hợp tăng nên hiện tượng xâm thực giảm, độ hòa tan tinh bột cũng giảm. Độ hòa tan tinh bột tăng nhiều nhất khi siêu âm tại nhiệt độ bắt đầu hồ hóa T<sub>paste</sub> = 65°C (Hình 3b).

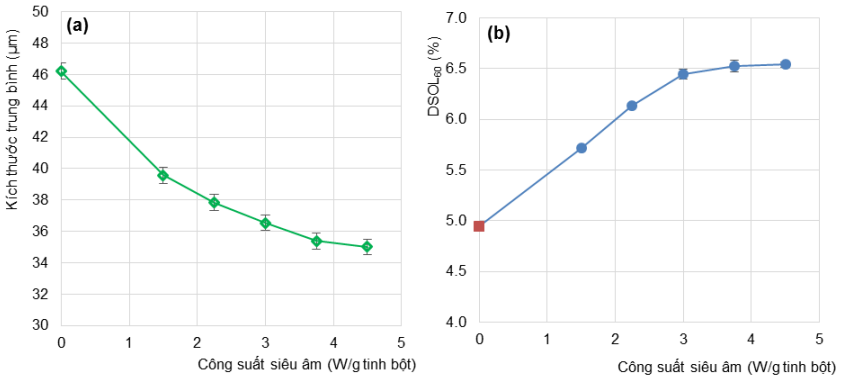


Hình 3 Ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm đến (a) Độ nhớt hỗn hợp và (b) Độ hòa tan tinh bột sau 60 phút hồ hóa. Các mẫu siêu âm có hàm lượng tinh bột ban đầu là 20%; được xử lý với công suất và thời gian siêu âm lần lượt là 3W/g tinh bột và 10 phút; sau đó ủ mẫu ở 90°C trong 50 phút. Các mẫu đối chứng có cùng hàm lượng tinh bột ban đầu với mẫu siêu âm, và được ủ lần lượt ở 50°C, 60°C, 65°C, 68°C, 73°C và 75°C trong 10 phút; sau đó được ủ tiếp ở 90°C trong 50 phút.

**3.1.3. Ảnh hưởng của công suất siêu âm:**

Khi tăng công suất siêu âm từ 1,5W/g lên 4,5W/g thì kích thước trung bình của hạt giảm (Hình 4a) và độ hòa tan tinh bột tăng (Hình 4b).

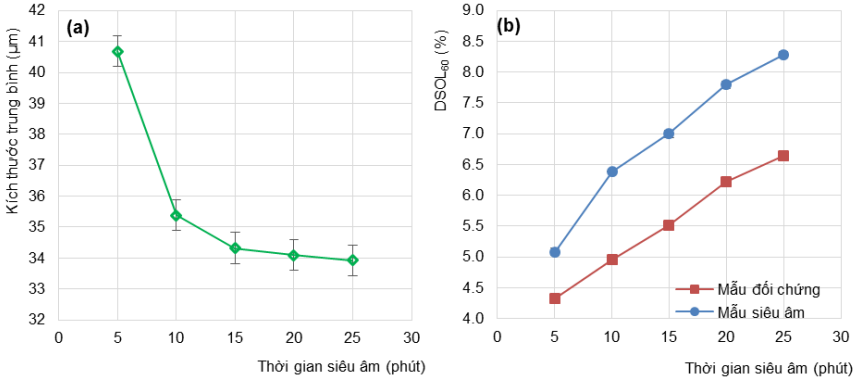




Hình 4 Ảnh hưởng của công suất siêu âm đến (a) Kích thước trung bình của hạt tinh bột sau xử lý siêu âm và (b) Độ hòa tan tinh bột sau 60 phút hồ hóa. Các mẫu siêu âm có hàm lượng tinh bột ban đầu là 20%; được xử lý với nhiệt độ và thời gian siêu âm lần lượt là 65°C và 10 phút; sau đó ủ mẫu ở 90°C trong 50 phút. Mẫu đối chứng có cùng hàm lượng tinh bột ban đầu với mẫu siêu âm, được ủ ở 65°C trong 10 phút; sau đó được ủ tiếp ở 90°C trong 50 phút.

### 3.1.4. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm:

Khi tăng thời gian siêu âm từ 5 phút lên 15 phút thì kích thước trung bình của hạt giảm (Hình 5a) và độ hòa tan tinh bột tăng (Hình 5b).



Hình 5 Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến (a) Kích thước trung bình của hạt tinh bột sau xử lý siêu âm và (b) Độ hòa tan tinh bột sau 60 phút hồ hóa

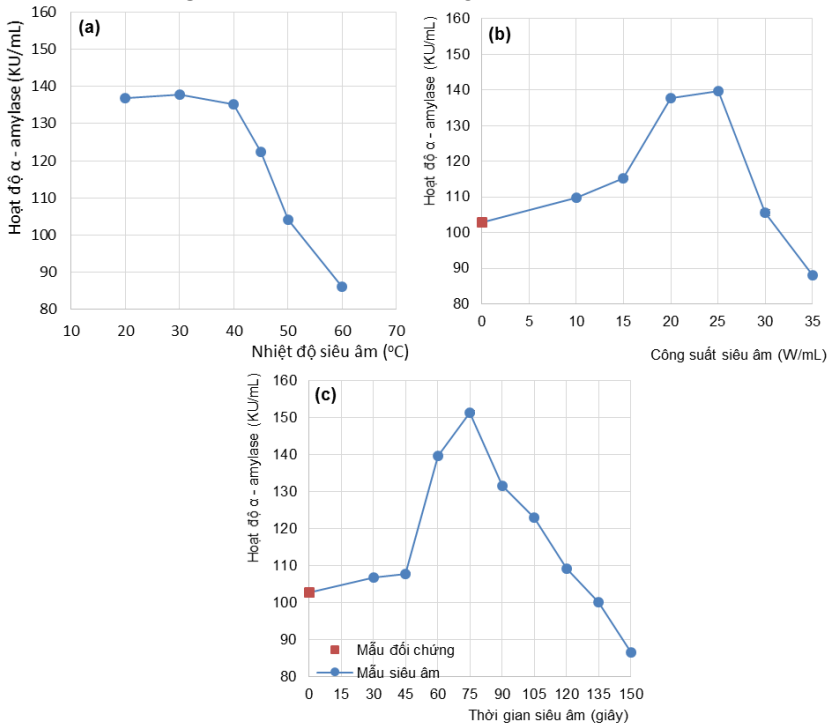
Các mẫu siêu âm có hàm lượng tinh bột ban đầu là 20%; được xử lý với nhiệt độ và công suất siêu âm lần lượt là 65°C và 3W/g tinh bột trong thời gian thay đổi từ 5 – 25 phút, sau đó ủ mẫu ở 90°C trong thời gian thay đổi tương ứng từ 55 đến 35 phút, sao cho tổng thời gian xử lý siêu âm kết hợp với nhiệt là 60 phút. Mẫu đối chứng được xử lý theo quy trình tương tự như mẫu siêu âm nhưng không siêu âm mà chỉ ủ ở 65°C.

## 3.2. Phần 2: Xử lý siêu âm chế phẩm enzyme amylase

### 3.2.1. Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến chế phẩm Termamyl 120L

Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến hoạt độ  $\alpha$  – amylase:

*Quy hoạch cổ điển:* chọn được các điều kiện bao gồm nhiệt độ siêu âm 30°C, công suất siêu âm 25W/mL, thời gian siêu âm: 75 giây; Hoạt độ  $\alpha$  – amylase là  $152 \pm 1$  KU/mL, tăng 47% so với mẫu không siêu âm (Hình 6).



Hình 6 Ảnh hưởng của (a) Nhiệt độ siêu âm, (b) Công suất siêu âm và (c) Thời gian siêu âm đến hoạt độ  $\alpha$  – amylase trong chế phẩm Termamyl 120L được xử lý siêu âm.

*Quy hoạch thực nghiệm:* phương pháp quay bậc hai của Box – Hunter, cấu trúc có tâm với hàm mục tiêu là hoạt độ  $\alpha$  – amylase,  $Y_1$  (%). Ba yếu tố khảo sát là:

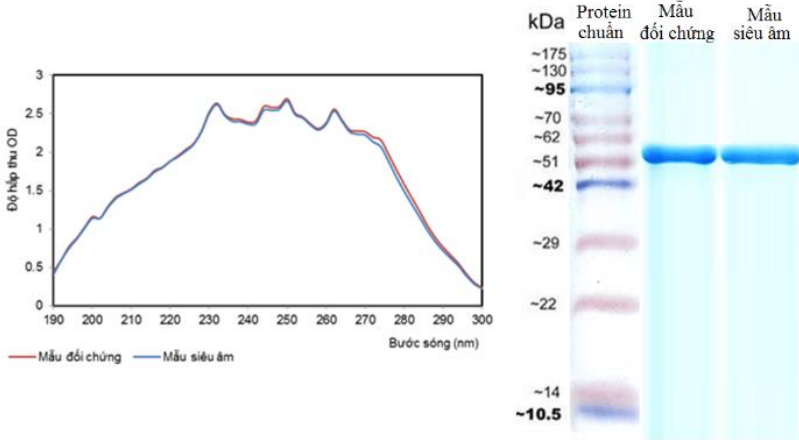
- Nhiệt độ siêu âm:  $X_1 \in [25; 35]$ ; tâm  $X_1 = 30^\circ\text{C}$
- Công suất siêu âm:  $X_2 \in [20; 30]$ ; tâm  $X_2 = 25\text{W/mL}$
- Thời gian siêu âm:  $X_3 \in [60; 90]$ ; tâm  $X_3 = 75$  giây

Phương trình hồi quy:

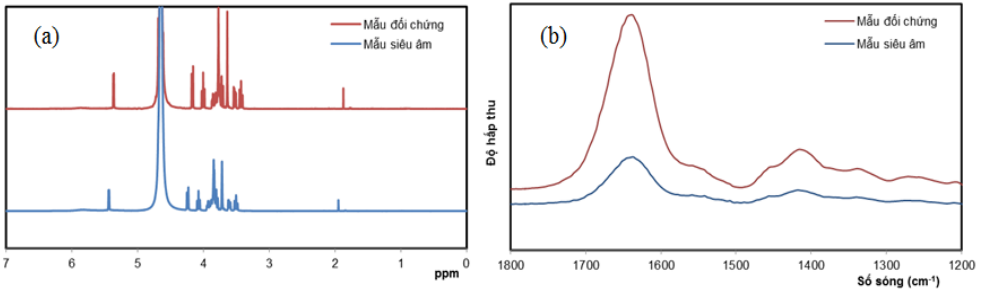
$$Y_1 = 151,63 - 1,48X_2 + 0,89X_3 - 0,97X_1^2 - 2,01X_2^2 - 1,50X_3^2 + 1,35X_2X_3$$

Giải bài toán tối ưu cho hoạt độ  $\alpha$  – amylase đạt giá trị cực đại là  $Y_1=151,7\text{KU/mL}$ . Thực hiện thí nghiệm tại điểm cực trị, hoạt độ  $\alpha$  – amylase là  $152 \pm 1\text{KU/mL}$ , xấp xỉ bằng giá trị lý thuyết tính từ phương trình hồi quy.

*Dự đoán ảnh hưởng của sóng siêu âm đến cấu trúc  $\alpha$  – amylase*: Phân tích hóa học và phổ UV cho thấy hàm lượng protein hòa tan không đổi. Phương pháp điện di cho thấy thành phần protein theo phân tử lượng không đổi (Hình 7). Từ đó có thể dự đoán sóng siêu âm không làm thay đổi cấu trúc bậc 1 của protein enzyme.



Hình 7 Phổ UV – VIS và kết quả điện di của mẫu chế phẩm Termamyl 120L siêu âm và đối chứng



Hình 8 Phổ H-NMR và IR của mẫu chế phẩm Termamyl 120L siêu âm và đối chứng

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cho thấy có sự dịch chuyển các peak và phổ hồng ngoại cho thấy cường độ peak tại số sóng cực đại ứng với amide I và amide II có thay đổi (Hình 8). Ở mẫu siêu âm với hoạt độ enzyme tăng cao hơn mẫu đối chứng thì tỷ lệ cấu trúc xoắn  $\alpha$  trong phân tử enzyme tăng lên và tỷ lệ cấu trúc gấp nếp  $\beta$  giảm xuống. Như vậy, đối với  $\alpha$  – amylase của chế phẩm Termamyl

120L, sóng siêu âm làm tăng hoạt tính xúc tác thông qua sự gia tăng tỷ lệ xoắn  $\alpha$ /gấp nếp  $\beta$  trong cấu trúc bậc hai của phân tử enzyme.

*Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến tính chất  $\alpha$  – amylase:*

Sóng siêu âm không làm thay đổi pH và nhiệt độ tối ưu của enzyme so với mẫu đối chứng.

Các thông số động học phản ứng theo của phương trình Michaelis-Menten của mẫu enzyme siêu âm cao hơn mẫu enzyme đối chứng; Hoạt độ tăng nhiều nhất được ghi nhận tại điểm pH và nhiệt độ tối thích.

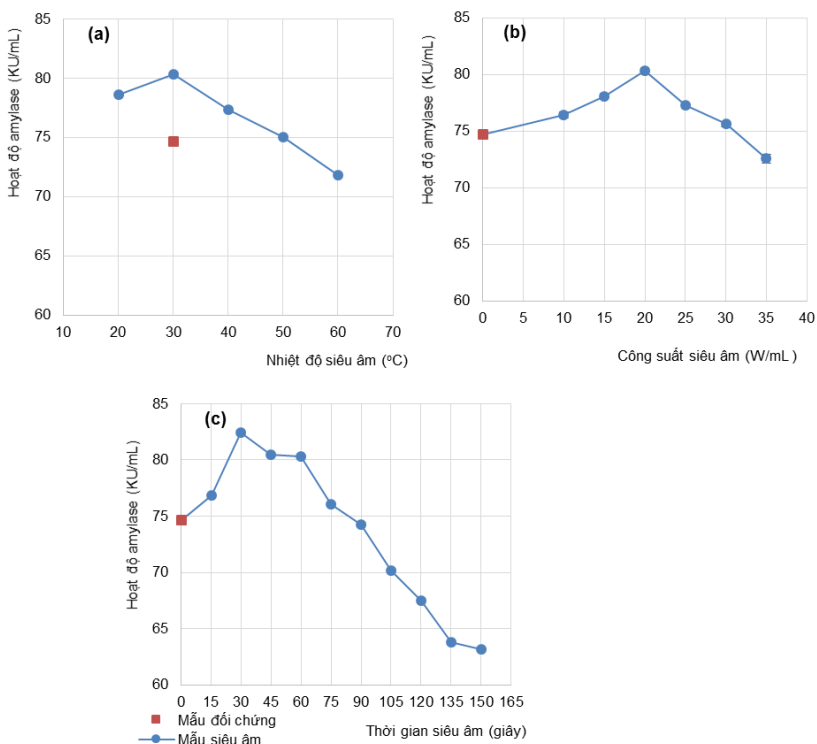
Các thông số nhiệt động học phản ứng của mẫu enzyme siêu âm thấp hơn mẫu enzyme đối chứng chứng tỏ rằng tác động thay đổi cấu trúc enzyme đã làm cho khả năng phản ứng xảy ra dễ dàng hơn, cần ít năng lượng hoạt hóa, enthalpy hơn nên hoạt độ  $\alpha$  – amylase tăng cao hơn.

Nếu bảo quản ở 30°C, hằng số tốc độ vô hoạt enzyme của mẫu enzyme siêu âm là 0,002 ngày<sup>-1</sup>, thấp hơn mẫu enzyme đối chứng 3% nên thời gian bán hủy của enzyme siêu âm là 347 ngày, thấp hơn 3% so với enzyme đối chứng. Nếu thực hiện phản ứng ở nhiệt độ tối ưu 85°C, hằng số tốc độ vô hoạt enzyme của mẫu enzyme siêu âm là 0,008 phút<sup>-1</sup>, thấp hơn mẫu enzyme đối chứng chỉ 0,5% và thời gian bán hủy của enzyme siêu âm là 91 phút, thấp hơn 0,5% so với enzyme đối chứng.

### ***3.2.2. Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến chế phẩm Dextrozyme GA***

*Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến hoạt độ glucoamylase:*

*Quy hoạch cổ điển:* chọn được các điều kiện bao gồm nhiệt độ siêu âm 30°C, công suất siêu âm 20W/mL, thời gian siêu âm: 30 giây; Hoạt độ glucoamylase là 83,2 ± 0,3 KU/mL và tăng 11,06% so với mẫu không siêu âm.



Hình 9 Ảnh hưởng của (a) Nhiệt độ siêu âm, (b) Công suất siêu âm và (c) Thời gian siêu âm đến hoạt độ glucoamylase trong chế phẩm Dextrozyme GA được xử lý siêu âm.

**Quy hoạch thực nghiệm:** phương pháp quay bậc hai của Box – Hunter, cấu trúc có tâm với hàm mục tiêu là hoạt độ glucoamylase,  $Y_2$  (%). Ba yếu tố khảo sát là:

- Nhiệt độ siêu âm:  $X_1 \in [25; 35]$ ; tâm  $X_1 = 30^\circ\text{C}$
- Công suất siêu âm:  $X_2 \in [15; 25]$ ; tâm  $X_2 = 20\text{W/mL}$
- Thời gian siêu âm:  $X_3 \in [15; 45]$ ; tâm  $X_3 = 30$  giây

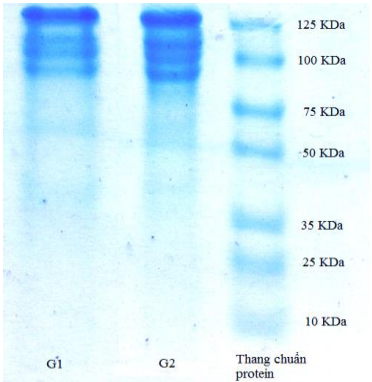
Phương trình hồi quy:

$$Y_2 = 83,26 - 0,16X_2 + 0,25X_3 - 0,72X_1^2 - 0,92X_2^2 - 0,69X_3^2 - 0,26X_1X_2 + 0,26X_1X_3 - 0,26X_2X_3$$

Giải bài toán tối ưu cho hoạt độ glucoamylase đạt giá trị cực đại là  $Y_2 = 83,4\text{KU/mL}$ . Thực hiện thí nghiệm tại điểm cực trị, hoạt độ gluco amylase là  $83,2 \pm 0,3\text{KU/mL}$ , xấp xỉ bằng giá trị lý thuyết tính từ phương trình hồi quy.

Phân tích hóa học cho thấy hàm lượng protein hòa tan trong mẫu chế phẩm enzyme siêu âm không đổi so với mẫu enzyme đối chứng. Phương pháp điện di

cho thấy thành phần protein theo phân tử lượng không đổi (Hình 10). Từ đó có thể dự đoán sóng siêu âm không làm thay đổi cấu trúc bậc 1 của protein enzyme. Tuy nhiên do kết quả phân tích điện di của mẫu chế phẩm enzyme siêu âm và đối chứng cho thấy rằng số vạch protein và vị trí các vạch ở hai mẫu là như nhau và đều có đến 4 vạch protein trong khoảng khối lượng phân tử từ 85 đến 125 kDa. Như vậy trong chế phẩm có thể có nhiều loại glucoamylase. Do đó, phần này chúng tôi chỉ quan tâm đến hoạt độ glucoamylase tổng của hỗn hợp các enzyme trong chế phẩm Dextrozyme GA.

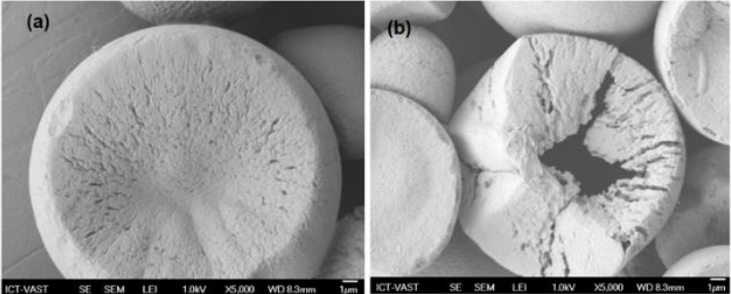


Hình 10 Kết quả sắc ký điện di của mẫu chế phẩm Termamyl 120L siêu âm và đối chứng

*Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến tính chất glucoamylase:* Sóng siêu âm không làm thay đổi pH và nhiệt độ tối ưu của enzyme siêu âm so với enzyme đối chứng.

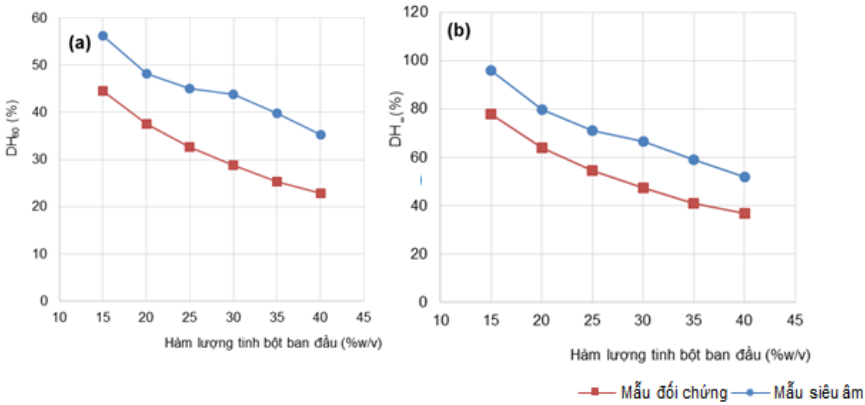
**3.3. Phần 3: Xử lý siêu âm hỗn hợp huyền phù tinh bột khoai mì có chứa enzyme – Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến giai đoạn dịch hóa**

**3.3.1. Ảnh hưởng của hàm lượng tinh bột trong huyền phù ban đầu:**



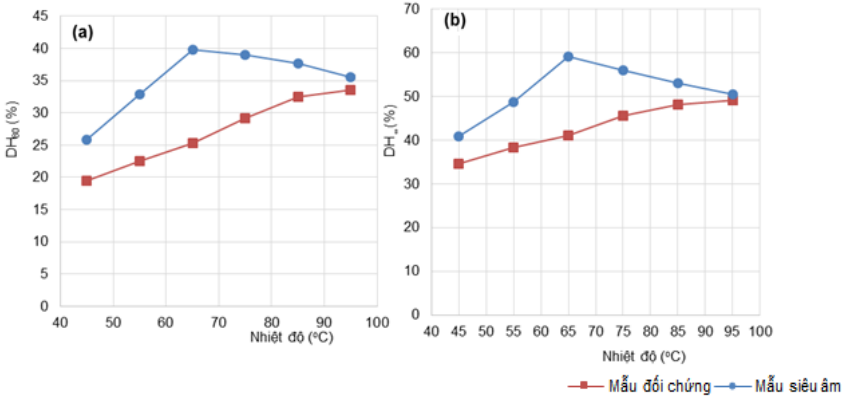
Hình 11 Hình chụp hạt tinh bột dưới kính hiển vi điện từ quét (SEM) (a) Mẫu đối chứng được xử lý với chế phẩm Termamyl 120L trong 1 phút ở nhiệt độ 65°C, (b) Mẫu siêu âm được xử lý kết hợp bởi enzyme Termamyl 120L và sóng siêu âm trong 1 phút ở nhiệt độ 65°C (Công suất siêu âm: 3.0 W/g tinh bột)

Sóng siêu âm kết hợp với enzyme làm cho cấu trúc hạt tinh bột bị gãy, vỡ (Hình 11) nhờ đó nước dễ khuếch tán vào bên trong hạt và các phân tử tinh bột dễ khuếch tán ra bên ngoài hạt, làm tăng độ thủy phân tinh bột so với mẫu đối chứng. Khi tăng hàm lượng tinh bột trong huyền phù ban đầu từ 15–45%, độ nhớt tăng nên làm giảm độ thủy phân của tinh bột (Hình 12).



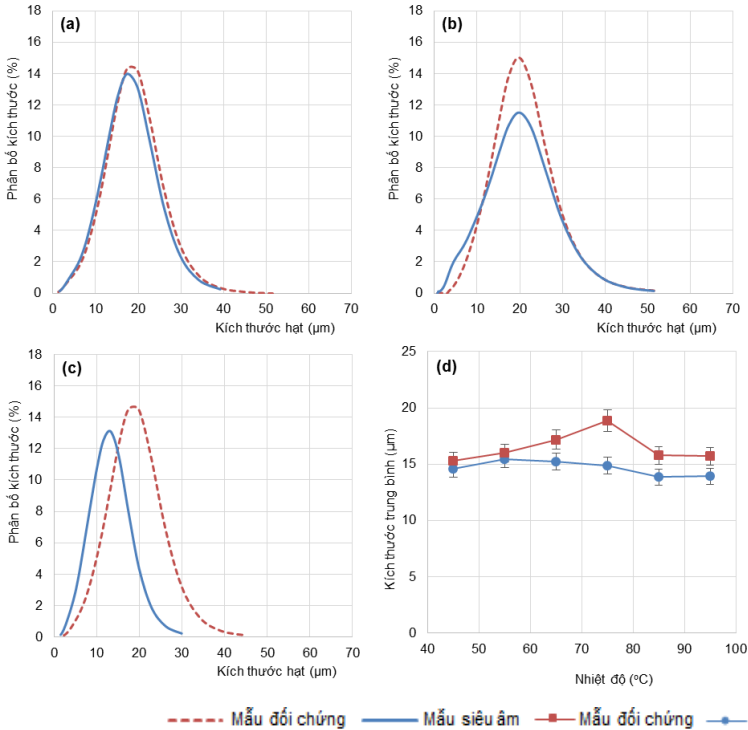
Hình 12 Ảnh hưởng của hàm lượng tinh bột trong huyền phù ban đầu đến (a) độ thủy phân tinh bột sau 80 phút dịch hóa (b) độ thủy phân tinh bột tại thời điểm cân bằng. Các mẫu siêu âm được xử lý với nhiệt độ, công suất và thời gian siêu âm lần lượt là 65°C, 3W/g tinh bột và 10 phút; sau đó ủ mẫu ở 90°C trong 50 phút. Các mẫu đối chứng có cùng hàm lượng tinh bột ban đầu với mẫu siêu âm, và được ủ ở 65°C trong 10 phút; sau đó được ủ tiếp ở 90°C trong 50 phút.

### 3.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm:



Hình 13 Ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm đến (a) Độ thủy phân tinh bột sau 80 phút dịch hóa (b) Độ thủy phân tinh bột tại thời điểm cân bằng. Các mẫu siêu âm có hàm lượng tinh bột ban đầu là 35%; được xử lý với công suất và thời gian siêu âm lần lượt là 3W/g tinh bột và 10 phút; sau đó ủ mẫu ở 90°C trong 70 phút. Các mẫu đối chứng có cùng hàm lượng tinh bột ban đầu với mẫu siêu âm, và được ủ lần lượt ở 45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C và 95°C trong 10 phút; sau đó được ủ tiếp ở 90°C trong 70 phút.

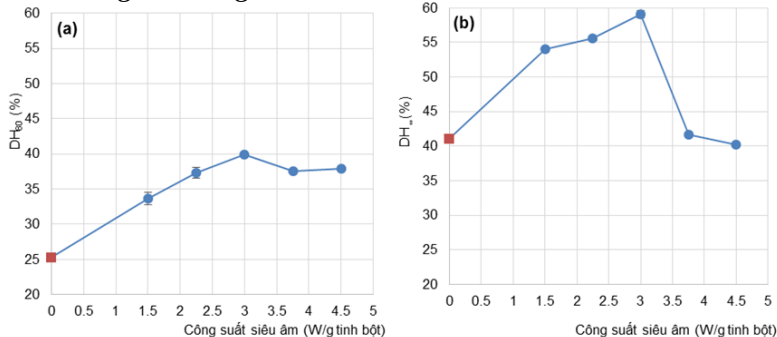
Hình 13 cho thấy những mẫu được qua xử lý siêu âm đều có độ thủy phân tinh bột cao hơn những mẫu đối chứng chỉ được xử lý nhiệt. Khi tăng nhiệt độ xử lý siêu âm huyền phù tinh bột từ 45 lên 65°C thì độ thủy phân tăng từ 25,8% lên đến giá trị cao nhất là 39,8%. Nguyên nhân sự gia tăng độ thủy phân có thể là do Termamyl 120L là chế phẩm  $\alpha$  – amylase có nhiệt độ xúc tác thích hợp trong khoảng giá trị từ 85°C đến 95°C; đồng thời, kết quả trong phần 3.1, chúng tôi nhận thấy khi nhiệt độ tăng từ 45°C đến 65°C ( $T_{paste}$ ), lượng tinh bột hòa tan sẽ tăng lên. Tuy nhiên, nếu nhiệt độ siêu âm tăng cao hơn giá trị  $T_{paste}$  thì độ thủy phân giảm xuống. Nguyên nhân có thể là do khi nhiệt độ siêu âm cao hơn 60°C, hoạt độ  $\alpha$  – amylase giảm (Phần 2.1). Nhìn chung, kích thước trung bình của hạt tinh bột trong mẫu siêu âm là tương đương hay nhỏ hơn so với các mẫu đối chứng (Hình 14)



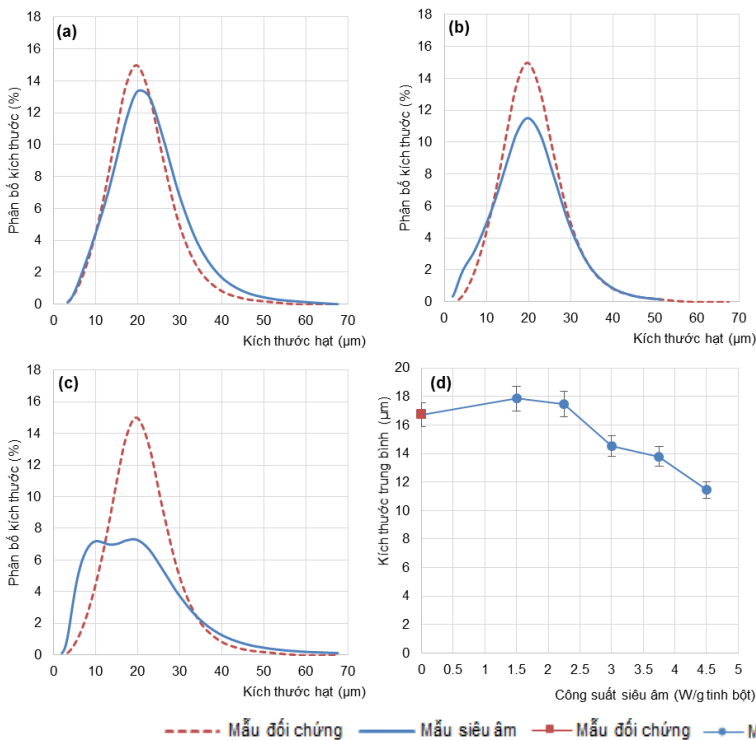
Hình 14 So sánh giản đồ phân bố kích thước hạt giữa mẫu siêu âm và mẫu đối chứng tại các nhiệt độ (a) 45°C, (b) 65°C, (c) 95°C và (d) đường kính trung bình hạt tinh bột ngay sau quá trình siêu âm. (Hàm lượng tinh bột trong huyền phù ban đầu: 35%, công suất siêu âm 3W/g tinh bột và thời gian siêu âm 10 phút).



### 3.3.3. Ảnh hưởng của công suất siêu âm:



Hình 15 Ảnh hưởng của công suất siêu âm đến (a) độ thủy phân tinh bột sau 80 phút dịch hóa (b) độ thủy phân tinh bột tại thời điểm cân bằng. Các mẫu siêu âm có hàm lượng tinh bột ban đầu là 30%; được xử lý với nhiệt độ và thời gian siêu âm lần lượt là 65°C và 10 phút; sau đó ủ mẫu ở 90°C trong 70 phút. Mẫu đối chứng có cùng hàm lượng tinh bột ban đầu với mẫu siêu âm, được ủ ở 65°C trong 10 phút; sau đó được ủ tiếp ở 90°C trong 70 phút.

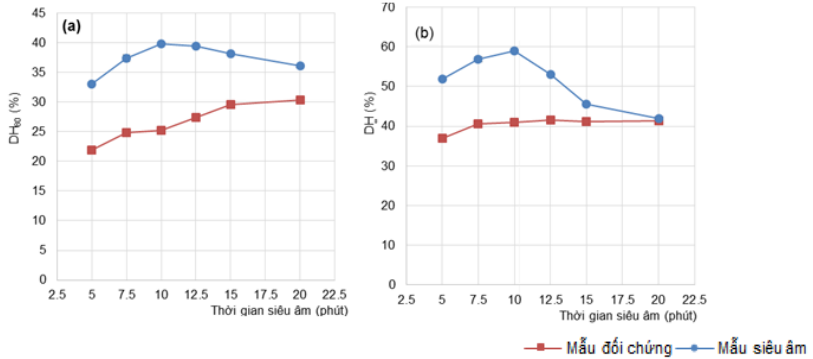


Hình 16 So sánh giản đồ phân bố kích thước hạt giữa mẫu siêu âm và mẫu đối chứng tại các công suất siêu âm (a) 2,25W/g tinh bột, (b) 3 W/g tinh bột, (c) 4,5W/ g tinh bột và (d) Đường kính trung bình hạt tinh bột ngay sau quá trình siêu âm. (Hàm lượng tinh bột trong huyền phù ban đầu: 35%, nhiệt độ và thời gian siêu âm lần lượt là 65°C và 10 phút. Mẫu đối chứng không qua xử lý siêu âm và được ủ ở 65°C trong 10 phút).

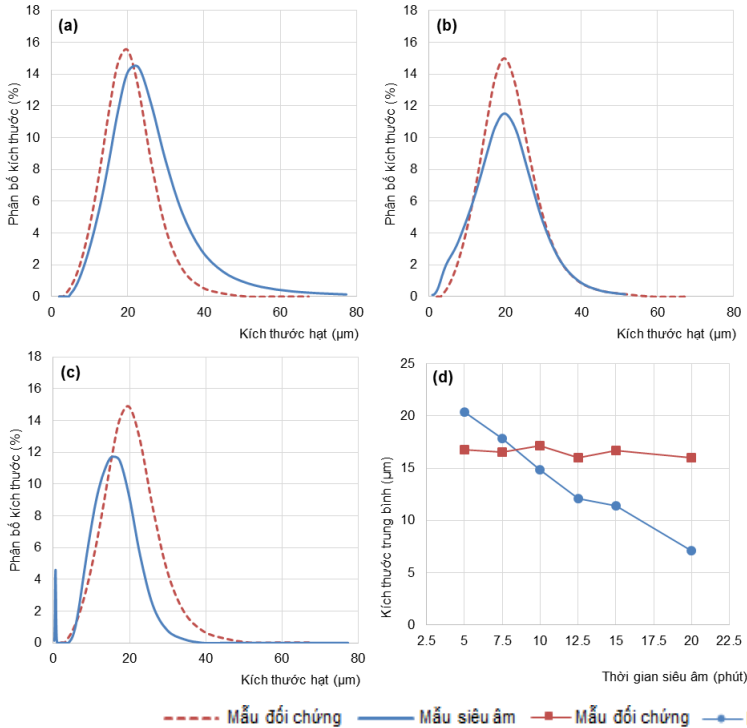
Khi tăng công suất siêu âm từ 1,5W/g lên 3,0W/g, độ thủy phân sau 80 phút dịch hóa ( $DH_{80}$ ) tăng từ 25,2% lên đến giá trị cực đại 39,8%. Nếu tiếp tục tăng công suất siêu âm từ 3,0W/g lên 4,5W/g, độ thủy phân giảm nhẹ (Hình 15a). Sau khi xây dựng phương trình động học mô tả độ thủy phân theo thời gian dịch hóa, chúng tôi nhận thấy giá trị độ thủy phân vô cùng ( $DH_{\infty}$ ), hay được hiểu là độ thủy phân tại thời điểm quá trình dịch hóa đạt cân bằng cũng biến đổi theo quy luật giống với  $DH_{80}$  (Hình 15b). Theo Hình 16, sau khi ủ mẫu đối chứng ở 65°C trong 10 phút, kích thước trung bình của hạt tinh bột là 17 $\mu$ m. Các mẫu xử lý siêu âm với công suất 1,5W/g và 2,25W/g có kích thước lớn hơn so với mẫu đối chứng; công suất siêu âm từ 3W/g sẽ làm kích thước hạt tinh bột nhỏ hơn so với mẫu đối chứng. Khi siêu âm với công suất thấp (1,5 và 2,25W/g tinh bột), đỉnh của đường cong phân bố thấp hơn và dịch chuyển về bên phải, nhưng đường kính trung bình của hạt tinh bột ở mẫu siêu âm và mẫu đối chứng là như nhau. Khi công suất siêu âm từ 3W/g đến 3,75 W/g tinh bột, đường cong phân bố kích thước hạt có đỉnh thấp xuống và số lượng hạt có kích thước nhỏ đang bắt đầu tăng cao hơn so với mẫu đối chứng. Khi công suất siêu âm là 4,5W/g tinh bột, đường cong phân bố kích thước hạt thấp hơn hẳn và xuất hiện thêm 1 vai bên trái, số lượng hạt kích thước nhỏ tăng trong khi số lượng hạt có kích thước lớn giảm nhiều so với mẫu đối chứng.

#### ***3.3.4. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm:***

Hình 17a cho thấy độ thủy phân tinh bột của mẫu siêu âm luôn cao hơn so với mẫu đối chứng. Khi tăng thời gian siêu âm từ 5 đến 10 phút, độ thủy phân tinh bột tăng từ 33,0% lên 39,8%. Khi thời gian siêu âm dài hơn 10 phút, độ thủy phân tinh bột có xu hướng giảm. Mẫu tinh bột xử lý siêu âm 20 phút có độ thủy phân là 36,1%. Thông số động học độ thủy phân tinh bột ở thời điểm cân bằng  $DH_{\infty}$  (Hình 17b) cũng có cùng quy luật biến đổi tương tự với độ thủy phân sau 80 phút dịch hóa.



Hình 17 Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến (a) Độ thủy phân tinh bột sau 80 phút dịch hóa (b) Độ thủy phân tinh bột tại thời điểm cân bằng. Các mẫu siêu âm có hàm lượng tinh bột ban đầu là 35%; được xử lý với nhiệt độ và công suất siêu âm lần lượt là 65°C và 3W/g tinh bột trong thời gian thay đổi từ 5 – 20 phút, sau đó ủ mẫu ở 90°C trong thời gian thay đổi tương ứng từ 75 đến 60 phút, sao cho tổng thời gian xử lý siêu âm kết hợp với nhiệt là 80 phút. Mẫu đối chứng được xử lý theo quy trình tương tự như mẫu siêu âm nhưng không siêu âm mà chỉ ủ nhiệt ở 65°C.



Hình 18 So sánh gián đồ phân bố kích thước hạt của các mẫu xử lý siêu âm trong thời gian (a) 5 phút, (b) 10 phút, (c) 15 phút và (d) Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến kích thước trung bình của hạt ngay sau quá trình siêu âm. (Hàm lượng tinh bột trong huyền phù ban đầu là 35%w/v, nhiệt độ bắt đầu siêu âm 65°C, công suất siêu âm 3W/g tinh bột. Thời gian xử lý siêu âm (mẫu siêu âm) và thời gian xử lý nhiệt ở 65°C (mẫu đối chứng) là tương đương nhau).

Khi khảo sát ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến giản đồ phân bố kích thước hạt tinh bột, chúng tôi nhận thấy có 3 trường hợp xảy ra: Thứ nhất là mẫu siêu âm (thời gian xử lý là 5 phút và 7,5 phút) có giản đồ với đỉnh lệch về bên phải so với mẫu xử lý nhiệt. Điều này chứng tỏ xử lý siêu âm kết hợp với enzyme sẽ làm cho hạt trương nở to hơn so với xử lý nhiệt (Hình 18a). Đối với dạng thứ hai, mẫu siêu âm (thời gian xử lý 10 phút) có giản đồ phân bố kích thước hạt với đỉnh lệch về bên trái so với mẫu đối chứng (Hình 18b). Chúng tôi cho rằng sóng siêu âm làm tăng số lượng hạt tinh bột ở mẫu siêu âm bị phá hủy lớp bên ngoài so với mẫu đối chứng. Dạng thứ ba ứng với các mẫu được xử lý siêu âm 12,5 phút, 15 phút và 20 phút. Giản đồ phân bố kích thước hạt của các mẫu này có đỉnh thấp, lệch nhiều về bên trái và xuất hiện thêm 1 peak mới trong khoảng nhỏ hơn  $2\mu\text{m}$  (Hình 18c). Điều này chứng tỏ nhiều hạt tinh bột ở mẫu siêu âm đã bị vỡ nhỏ. Hình 18d mô tả mối tương quan giữa thời gian siêu âm với kích thước trung bình của hạt tinh bột. Thời gian siêu âm càng dài, số lượng hạt với kích thước nhỏ sẽ càng tăng. Khi thời gian siêu âm kéo dài từ 5 phút lên 20 phút, kích thước hạt tinh bột giảm từ  $19\mu\text{m}$  xuống  $6\mu\text{m}$ . Đối với các mẫu đối chứng, quá trình xử lý nhiệt với các khoảng thời gian từ 5 phút đến 20 phút gần như không làm thay đổi kích thước hạt tinh bột. Kích thước trung bình hạt tinh bột dao động trong khoảng  $16\text{--}17\ \mu\text{m}$ .

### 3.3.5. Quy hoạch thực nghiệm:

Phương pháp quay bậc hai của Box – Hunter, cấu trúc có tâm với hàm mục tiêu là độ thủy phân tinh bột,  $Y_3$  (%). Ba yếu tố khảo sát là:

- Nhiệt độ siêu âm:  $X_1 \in [63; 67]$ ; tâm  $X_1 = 65^\circ\text{C}$
- Công suất siêu âm:  $X_2 \in [1,5; 4,5]$ ; tâm  $X_2 = 3\text{W/g}$  tinh bột
- Thời gian siêu âm:  $X_3 \in [5; 15]$ ; tâm  $X_3 = 10$  phút

Phương trình hồi quy:

$$Y_3 = 39,86 - 2,02X_1^2 - 1,81X_2^2 - 1,86X_3^2 + 0,88X_2X_3$$

Giải bài toán tối ưu cho độ thủy phân tinh bột đạt giá trị cực đại là  $Y_3 = 39,9\%$ .

Thực hiện thí nghiệm tại điểm cực trị, độ thủy phân tinh bột là  $39,9 \pm 0,5\%$ , xấp

xi bằng giá trị lý thuyết tính từ phương trình hồi quy và tăng 58% so với mẫu đối chứng.

### 3.4. Phần 4: So sánh hai giải pháp sử dụng sóng siêu âm để nâng cao hiệu quả thủy phân tinh bột khoai mì

Sau 24 giờ (1440 phút) thủy phân huyền phù tinh bột khoai mì có hàm lượng 35%, nồng độ enzyme sử dụng là 0,35mL Termamyl 120L/kg tinh bột và 0,7mL Dextrozyme GA/kg tinh bột, giải pháp đối chứng đạt được độ thủy phân (DH<sub>1440</sub>) là 86%. Xử lý siêu âm sẽ làm độ thủy phân tăng lên so với đối chứng và quá trình thủy phân diễn ra gần hoàn toàn. Giải pháp 6 có giá trị DH<sub>1440</sub> cao nhất, đạt 98,5% và tăng cao hơn đối chứng 14,5%. Giá trị DH<sub>1440</sub> cao thứ hai là ở giải pháp 4, đạt giá trị 96,8% và tăng cao hơn đối chứng 12,6%. Sự gia tăng độ thủy phân của mẫu siêu âm so với mẫu đối chứng xảy ra ở cả hai giai đoạn dịch hóa và đường hóa (Hình 19).

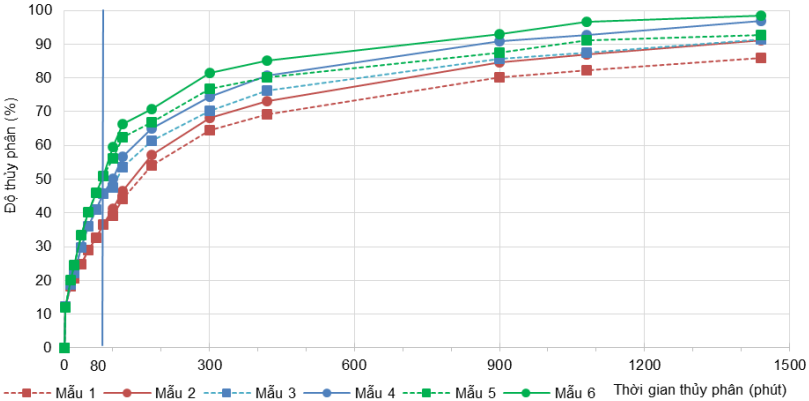
Bảng 1. Chi phí năng lượng siêu âm để tăng thêm 1g đường khử trong mẫu siêu âm so với mẫu đối chứng

Giải pháp khảo sát	Lượng đường khử tăng thêm (g/100g bột)	Năng lượng siêu âm trong giai đoạn dịch hóa (J/100g bột)	Năng lượng siêu âm trong giai đoạn đường hóa (J/100g bột)	Năng lượng siêu âm trong quá trình thủy phân (J/100g bột)	Năng lượng siêu âm cho 1 g đường khử tăng thêm (J/g)
Giải pháp 2	4,8	0	46	46	10
Giải pháp 3	5,1	66	0	66	13
<b>Giải pháp 4</b>	<b>10,2</b>	<b>66</b>	<b>46</b>	<b>112</b>	<b>11</b>
Giải pháp 5	6,4	180000	0	180000	28141
Giải pháp 6	11,8	180000	46	180046	15274

Kết quả tính tổng năng lượng siêu âm đã tiêu tốn để tăng thêm 1g đường khử trong dịch thủy phân của các giải pháp sử dụng siêu âm so với mẫu đối chứng được trình bày trong Bảng 1. Giải pháp 4 cho hiệu suất thấp hơn giải pháp 6 nhưng chi phí năng lượng siêu âm cho 1g đường khử tăng thêm rất thấp, chỉ cần tốn 11J/g. Với giải pháp 6, năng lượng siêu âm lên đến 15274J/g. Như vậy, giải pháp 4 tiêu tốn năng lượng ít hơn 1400 lần so với giải pháp 6.

Khi sử dụng cùng một lượng enzyme, để có được độ thủy phân tinh bột tương đương với độ thủy phân tinh bột ở mẫu đối chứng sau 24 giờ (DH<sub>1440</sub>), các giải pháp xử lý siêu âm tăng hoạt độ enzyme (giải pháp 2, 3, 4) hay xử lý siêu âm hỗn

hợp huyền phù tinh bột – enzyme (giải pháp 5, 6) đều cần một lượng thời gian ngắn hơn (Hình 19). Giải pháp 4 cần 680 phút, giảm 55% so với mẫu đối chứng. Giải pháp 6 chỉ cần 480 phút, giảm 69% lượng thời gian phản ứng.



Hình 19 Sự thay đổi độ thủy phân tinh bột khoai mì theo thời gian thủy phân

Điều kiện siêu âm tăng hoạt độ chế phẩm Termamyl 120L là: nhiệt độ, công suất và thời gian siêu âm lần lượt là 30°C, 25W/mL trong 75giây; điều kiện siêu âm tăng hoạt độ chế phẩm Dextrozyme GA là: nhiệt độ, công suất và thời gian siêu âm lần lượt là 30°C, 20W/mL trong 33giây; Điều kiện xử lý siêu âm huyền phù tinh bột có chứa chế phẩm enzyme Termamyl 120L là nhiệt độ, công suất và thời gian siêu âm lần lượt là 65°C, 3W/g trong 10 phút.

Giải pháp 1: Quy trình truyền thống sử dụng 2 chế phẩm enzyme Termamyl 120L và Dextrozyme GA không qua xử lý siêu âm và được xem là mẫu đối chứng.

Giải pháp 2: Quy trình sử dụng chế phẩm enzyme Termamyl 120L không qua xử lý siêu âm và chế phẩm Dextrozyme GA đã được siêu âm tăng hoạt độ.

Giải pháp 3: Quy trình sử dụng chế phẩm enzyme Termamyl 120L đã được siêu âm tăng hoạt độ và chế phẩm Dextrozyme GA không qua xử lý siêu âm

Giải pháp 4: Quy trình sử dụng chế phẩm enzyme Termamyl 120L và Dextrozyme GA đã được siêu âm tăng hoạt độ.

Giải pháp 5: Quy trình xử lý siêu âm huyền phù tinh bột có chứa chế phẩm enzyme Termamyl 120L, sau đó sử dụng chế phẩm Dextrozyme GA không qua xử lý siêu âm

Giải pháp 6: Quy trình xử lý siêu âm huyền phù tinh bột có chứa chế phẩm enzyme Termamyl 120L, sau đó sử dụng chế phẩm Dextrozyme GA đã được siêu âm tăng hoạt độ.

Để xác định lượng enzyme Termamyl 120L có thể tiết kiệm được sau khi tăng hoạt độ bằng sóng siêu âm, chúng tôi tiến hành dịch hóa huyền phù tinh bột với lượng chế phẩm enzyme giảm dần. Khi lượng enzyme siêu âm sử dụng là 25µL/100g tinh bột, độ thủy phân tinh bột sau 80 phút dịch hóa bằng với mẫu đối chứng. Nếu lượng enzyme siêu âm là 20µL/100g tinh bột, độ thủy phân tinh bột sau 80 phút dịch hóa chỉ còn bằng 86% so với mẫu đối chứng. Như vậy, khi siêu âm làm tăng hoạt tính enzyme, lượng enzyme có thể tiết kiệm được là 28,6% so với đối chứng.

## CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 4.1. Kết luận

#### 4.1.1. Về mặt học thuật

Quá trình xử lý siêu âm có thể làm thay đổi cấu trúc bậc hai của enzyme  $\alpha$  – amylase trong chế phẩm Termamyl 120L, cụ thể là tỷ lệ cấu trúc  $\alpha$  – helix và random coil tăng lần lượt 19,4% và 40,1%; ngược lại tỷ lệ cấu trúc  $\beta$  – sheet và  $\beta$  – turn giảm lần lượt là 4,2 và 11,8%. Sự thay đổi cấu trúc bậc hai sẽ làm tăng hoạt độ xúc tác của chế phẩm 47,3%. Quá trình xử lý siêu âm làm cho tốc độ phản ứng cực đại ( $v_{max}$ ), hằng số Michaelis – Menten ( $K_m$ ), hằng số tốc độ phản ứng ( $k_{cat}$ ) tăng lần lượt là 47,2%, 86,7% và 40,7%; Tuy nhiên năng lượng hoạt hóa ( $E_a$ ), enthalpy ( $\Delta H$ ), entropy ( $\Delta S$ ) và năng lượng tự do ( $\Delta G$ ) giảm lần lượt là 10,2%, 11,3%, 3,0% và 3,0%. Chế phẩm enzyme đã qua xử lý siêu âm có giá trị pH và nhiệt độ tối ưu không khác biệt với chế phẩm ban đầu nhưng kém bền nhiệt hơn và có thời gian bán hủy thấp hơn.

Quá trình xử lý siêu âm trong cả hai giai đoạn hồ hóa và dịch hóa huyền phù tinh bột khoai mì làm giảm kích thước hạt tinh bột, tăng lượng tinh bột hòa tan, từ đó làm tăng độ thủy phân tinh bột so với mẫu đối chứng. Xử lý siêu âm tại nhiệt độ bắt đầu hồ hóa ( $T_{paste} = 65^\circ C$ ) sẽ làm cho độ thủy phân tinh bột tăng cao nhất so với mẫu đối chứng.

#### 4.1.2. Về mặt ứng dụng

Luận án đã xác định được các thông số thích hợp cho quá trình xử lý siêu âm để làm tăng hoạt độ hai chế phẩm enzyme amylase:

- Với tần số 20 kHz, nhiệt độ siêu âm  $30^\circ C$ , công suất 25W/mL và thời gian 75 giây, chế phẩm Termamyl 120L có hoạt độ cao nhất là  $152 \pm 1$  KU/mL và giá trị này tăng 47,3% so với mẫu đối chứng.
- Với tần số 20 kHz, nhiệt độ siêu âm  $30^\circ C$ , công suất 20W/mL và thời gian 33 giây, chế phẩm Dextrozyme GA sẽ đạt hoạt độ cao nhất là  $83,2 \pm 0,3$  KU/mL và giá trị này tăng 11,06 % so với mẫu đối chứng.

Luận án đã xác định được các thông số thích hợp cho quá trình xử lý siêu âm huyền phù tinh bột khoai mì trong giai đoạn dịch hóa để làm tăng độ thủy phân.

Khi xử lý siêu âm huyền phù tinh bột khoai mì đã được bổ sung  $\alpha$  – amylase, độ thủy phân tinh bột khi kết thúc giai đoạn dịch hóa sẽ tăng 39,9% so với mẫu đối chứng khi hàm lượng tinh bột trong huyền phù ban đầu là 35%, mẫu được xử lý ở nhiệt độ bắt đầu hồ hóa ( $T_{paste}$ ), công suất siêu âm là 3W/g tinh bột và thời gian siêu âm là 10 phút.

Luận án đã so sánh 5 giải pháp làm tăng hiệu quả quá trình thủy phân tinh bột khoai mì có hàm lượng tinh bột trong huyền phù 35%. Các giải pháp này có thể giảm 28% lượng chế phẩm enzyme cần sử dụng hoặc giảm thời gian thủy phân 33-69% hoặc tăng độ thủy phân 12,6-14,5% so với giải pháp đối chứng đang được sử dụng trong sản xuất công nghiệp hiện nay. Trong số các giải pháp đã thử nghiệm, giải pháp xử lý siêu âm huyền phù tinh bột trong giai đoạn dịch hóa, sau đó sử dụng chế phẩm Dextrozyme GA đã qua xử lý siêu âm cho độ thủy phân tinh bột cao nhất (98,5%) và độ thủy phân tăng 14,5% so với mẫu đối chứng. Tuy nhiên, giải pháp này tốn nhiều năng lượng nhất. Giải pháp xử lý siêu âm 2 chế phẩm  $\alpha$  – amylase và glucoamylase trước khi sử dụng chúng trong quá trình thủy phân tinh bột cho độ thủy phân 96,8% và giá trị này tăng 12,6% so với mẫu đối chứng. Giải pháp này có tính khả thi cao vì không tiêu tốn nhiều năng lượng.

#### **4.2. Kiến nghị**

- Xác định và so sánh cấu hình không gian ba chiều của chế phẩm enzyme sau siêu âm để có thể hiểu rõ hơn nguyên nhân gây biến đổi hoạt tính enzyme
- Thử nghiệm sử dụng sóng siêu âm để tăng hoạt tính enzyme amylase và cải thiện quá trình thủy phân tinh bột khoai mì ở quy mô pilot.
- Khảo sát ảnh hưởng của sóng siêu âm đến hoạt độ xúc tác của các chế phẩm amylase khác đang có trên thị trường
- Khảo sát ảnh hưởng của sóng siêu âm đến hiệu suất thủy phân tinh bột huyền phù bột gạo, bột khoai mì...