

CHỌN LỰA CÁC ĐIỀU KIỆN HOẠT ĐỘNG TỐI ƯU CỦA ENZYME β -D-FRUCTOFURANOSIDASE ĐỂ SẢN XUẤT ĐƯỜNG FRUCTOOLIGOSACCHARIDE (FOS) CHỨC NĂNG TỪ ĐƯỜNG SUCROSE

Determining optimal conditions of β -D-fructofuranosidase activity for
production of functional Fructooligosaccharid (FOS) from sucrose

Nguyễn Hoàng Anh, Ngô Xuân Mạnh, Nguyễn Hương Thuý, Ngô Xuân Trung

Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chế phẩm enzyme β -D-fructofuranosidase do Viện Công nghiệp thực phẩm thu nhận và chế phẩm Pectinex Ultra SP-L của hãng Novozymes, Đan Mạch đã được sử dụng. Với kết quả thu được, điều kiện tối thích cho chế phẩm enzyme β -D-fructofuranosidase do Viện Công nghiệp thực phẩm thu nhận là ở thời gian 9 giờ, nhiệt độ 55°C, tỷ lệ E/S 0,02 và pH 6,0. Điều kiện tối thích cho enzyme Pectinex Ultra SP-L là ở thời gian 15 giờ, nhiệt độ 50°C, tỷ lệ E/S 0,02 và pH 5,5. Từ kết quả này, quy trình sản xuất siro FOS đã được xây dựng. Hàm lượng đường FOS được xác định bằng phương pháp HPLC với kết quả là 61,64% và 61,48% tương ứng với hai chế phẩm enzyme của Viện Công nghiệp thực phẩm và Pectinex Ultra SP-L.

Từ khóa: β -D-fructofuranosidase, fructooligosaccharide (FOS), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

SUMMARY

In the present research paper, two enzyme β -D-fructofuranosidase preparations, one produced by Food Industries Research Institute (FIRI) and Pectinex Ultra SP-L (Novozymes, Denmark) were used for to study the production of FOS from sucrose. The optimal conditions for each enzyme preparation were determined. For the enzyme β -D-fructofuranosidase preparation the best conditions were 9 hours at 55°C with E/S ratio of 0.02 and pH 6.0, while the optimal conditions for Pectinex Ultra SP-L were for 15 hours at 50°C, E/S ratio of 0.02 and pH 5.5. The FOS production process was established and the FOS syrup was on trial production. The total FOS yield (%) determined by HPLC were 61.64% and 61.48%.

Keywords: β -D-fructofuranosidase, fructooligosaccharide (FOS), HPLC.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, thực phẩm chức năng đang được con người đặc biệt quan tâm vì đây là những thực phẩm có giá trị dinh dưỡng và mức năng lượng thấp, nhưng trong đó lại có chứa các hoạt chất có nhiều tác dụng tốt đối với sức khoẻ con người. Trong nhóm thực phẩm chức năng, đường chức năng là một bộ phận quan trọng. Có nhiều loại đường chức năng như: đường paratinose, maltitol, sorbitol, lactitol, fructooligosaccharide (FOS), isomaltooligosaccharide (Nakakuki, 1993). Trong đó, đường FOS được chú ý hơn cả không chỉ bởi công nghệ sản xuất đơn giản, sản phẩm có hương vị thơm ngon mà quan trọng hơn là FOS có nhiều đặc tính có lợi cho sức khoẻ con

người như khả năng kích thích tiêu hoá, chống bệnh tiểu đường, béo phì... (Nguyễn Thiện Luân và cộng sự, 1997).

Đi liền với sự phát triển đó, công nghệ enzyme ngày càng được sử dụng rộng rãi. Ứng dụng enzyme β -D-fructofuranosidase trong sản xuất đường chức năng có nhiều ưu thế như hiệu suất chuyên hoá đường cao hơn, không gây ô nhiễm môi trường, chi phí sử dụng enzyme thấp hơn so với các phương pháp khác (Crittenden và Playne, 1996; Trịnh Thị Kim Vân và cộng sự, 2006). Do vậy, việc nghiên cứu chọn lựa các điều kiện tối ưu cho hoạt động của enzyme β -D-fructofuranosidase để sản xuất đường FOS chức năng từ đường sucrose là hết sức cần thiết.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Enzyme

Chế phẩm β -D-fructofuranosidase của Viện Công nghiệp thực phẩm thu nhận từ *Aspergillus niger* và chế phẩm pectinex Ultra SP-L của hãng Novozymes, Đan Mạch là hai enzyme được sử dụng trong nghiên cứu.

2.2. Xác định hoạt tính của enzyme β - D - fructofuranosidase

Hoạt tính của enzyme β -D-fructofuranosidase được xác định theo phương pháp Fehling - Lehmann - Schoorl cải tiến do hãng Sekagaku mô tả.

2.3. Xác định điều kiện tối thích cho enzyme β - D - fructofuranosidase hoạt động

Các điều kiện tối thích cho enzyme hoạt động lần lượt được xác định. Trước hết, căn cứ vào đặc điểm của enzyme và khuyến cáo của nhà sản xuất, xác định khoảng giá trị cụ thể là tối thích của các yếu tố ảnh hưởng. Khi xác định giá trị tối thích của một yếu tố, giữ cố định các yếu tố khác và thay đổi giá trị của yếu tố cần xác định trong khoảng giá trị đó xác định.

Thí nghiệm xác định nhiệt độ tối thích được tiến hành ở các điều kiện như sau: Nồng độ cơ chất (đường sucrose): 50% (V = 30ml); Các mẫu được ủ trong môi trường có nhiệt độ thay đổi 35°C đến 60°C với bước nhảy là 5°C; pH = 4,5 (dùng đệm acetate pH = 4,5 để pha cơ chất); Tỷ lệ enzyme/cơ chất (E/S): 0,01 ($V_{\text{enzyme}} = 0,3\text{ml}$); Thời gian phản ứng: 12 giờ. Sau 12 giờ, dùng phản ứng bằng cách đun sôi dịch chính xác trong 2 phút.

Thí nghiệm xác định pH tối thích được tiến hành ở điều kiện như trên nhưng giữ cố định nhiệt độ 55°C với chế phẩm Pectinex Ultra SP-L và 50°C với enzyme của Viện CNTP thu nhận. pH của dung dịch đệm acetate pha cơ chất thay đổi từ 4,0 đến 6,5 với bước nhảy là 0,5.

Thí nghiệm xác định tỷ lệ E/S tối thích được tiến hành tương tự các thí nghiệm trên, nhưng cố định pH = 6,0 và 5,0 lần lượt với enzyme Pectinex Ultra SP - L và chế phẩm của Viện CNTP thu nhận. Tỷ lệ E/S thay đổi với các giá trị

0,0025, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 ($V_{\text{enzyme}} = 0,075, 0,15, 0,3, 0,6, 0,9, 1,2\text{ ml}$).

Cũng tiến hành như các thí nghiệm trên, nhưng thí nghiệm xác định thời gian phản ứng tối thích đã cố định tỷ lệ E/S là 0,02. Thời gian phản ứng được thay đổi từ 3 giờ đến 18 giờ với bước nhảy là 3 giờ.

2.4. Xác định các đường thành phần

Giá trị DE (Dextrose Equivalent) được xác định theo phương pháp Lane-Eynone (Nguyễn Văn Mùi, 2001), với nguyên tắc đường khử trong mẫu cần xác định sẽ khử Cu^{2+} trong thuốc thử Fehling thành Cu^+ ở dạng Cu_2O kết tủa đỏ gạch (phản ứng xảy ra khi đun sôi Fehling), lượng Cu^{2+} trong dung dịch khi chuẩn độ bằng đường khử, dung dịch sẽ chuyển từ màu xanh dương (của Xanh methylen) sang màu đỏ (của Cu_2O). Đó là dấu hiệu để kết thúc chuẩn độ. Căn cứ số ml đường khử tiêu hao, tra bảng Lane-Eynone và tính toán được lượng đường khử quy ra glucose. Lượng đường khử tính theo glucose được tính theo % chất khô hòa tan gọi là DE.

$$DE = \frac{A.B}{C.1000} * 100\%$$

Trong đó:

A: giá trị tra từ bảng Lane-Eynone dựa vào số ml dung dịch đó chuẩn độ.

B: hệ số pha loãng.

C: nồng độ % chất khô hòa tan đo bằng chiết quang kế.

Hàm lượng fructose có trong sản phẩm được xác định theo nguyên tắc oxi hóa glucose và các đường khử khác bằng dung dịch I_2 trong môi trường kiềm. Trong điều kiện này, fructose không bị oxi hóa. Sau đó định lượng fructose trong dung dịch bằng phương pháp Lane-Eynone (Nguyễn Văn Mùi, 2001).

Thành phần đường trong hai sản phẩm thu được xác định bằng thiết bị sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo quy trình chuẩn với các điều kiện Detector: RID, cột phân chia: NH2-50, pha động: acetonitrile/ H_2O 65:35 (CH_3CN 65%), tốc độ dòng chảy: 0,8 ml/phút, nhiệt độ: 40°C, lượng mẫu bơm: 20 μL .

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Minitab 14.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định hoạt tính của β - D - fructofuranosidase

Số đơn vị hoạt tính của enzyme β -D-fructofuranosidase trong chế phẩm Pectinex

Ultra SP-L là 18,82 (U/ml), cao hơn khoảng 1,4 lần so với của chế phẩm enzyme β -D-fructofuranosidase của Viện CNTP thu nhận là 13,2 (U/ml) (Bảng 1). Do vậy, khi sử dụng hai chế phẩm này cần tính toán hệ số pha loãng cho thích hợp.

Bảng 1. Hoạt tính enzyme β -D-fructofuranosidase trong hai chế phẩm enzyme

Tên chế phẩm	V chuẩn độ TB (ml)	V đối chứng (ml)	ΔV (ml)	A (U/ml)
Pectinex Ultra SP-L	5,83	9,60	3,77	18,77
β -D-fructofuranosidase do Viện Công nghiệp thực phẩm thu nhận	6,67	9,40	2,73	13,60

$$(A = \Delta V \times 1.66 \times 3)$$

3.2. Xác định điều kiện tối thích cho enzyme β -D-Fructofuranosidase hoạt động

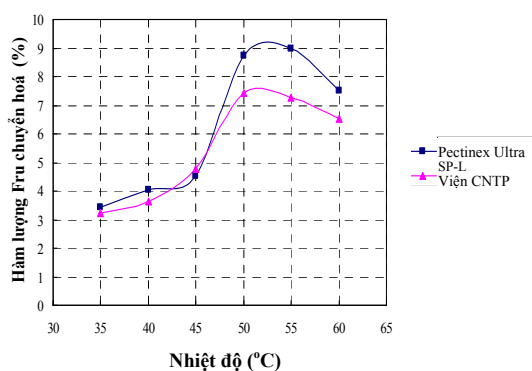
3.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của enzyme β -D-fructofuranosidase

Khả năng chuyển hóa fructose để tạo FOS của enzyme β -D-fructofuranosidase trong chế phẩm Pectinex Ultra SP-L tăng chậm trong khoảng nhiệt độ từ 35°C đến 45°C, sau đó tăng mạnh từ 45°C và đạt cực đại tại 55°C với hàm lượng fructose chuyển hóa là 8,96%. Từ 55°C, hoạt tính lại giảm dần. Trong khi đó, khả năng chuyển hóa fructose để tạo FOS của enzyme β -D-fructofuranosidase của Viện CNTP thu nhận cũng tăng dần từ 35°C đến 50°C và đạt cực đại

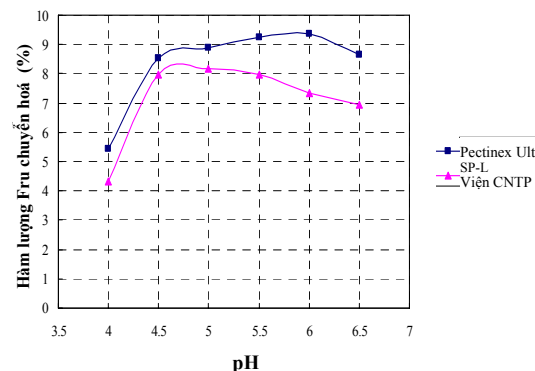
tại 50°C với hàm lượng fructose chuyển hóa là 7,43%. Từ 50°C hoạt tính xúc tác của enzyme giảm dần (Đồ thị 1).

Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước ghi nhận rằng enzyme β - D - fructofuranosidase có nguồn gốc vi sinh vật có nhiệt độ tối thích từ 50 - 55°C (Nguyễn Thị Hương Thơm, 2006; Nguyễn Hương Thủy, 2006).

Dựa vào phân tích trên, nhiệt độ 55°C và 50°C được chọn lần lượt là nhiệt độ tối ưu cho enzyme β -D-fructofuranosidase trong chế phẩm Ultra Pectinex SP-L và chế phẩm của Viện CNTP thu nhận hoạt động.



Đồ thị 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính enzyme β -D-fructofuranosidase trong chế phẩm Pectinex Ultra SP-L và của Viện CNTP thu nhận



Đồ thị 2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính enzyme β -D-fructofuranosidase trong chế phẩm Pectinex Ultra SP-L và của Viện CNTP thu nhận

3.2.2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của enzyme β -D-fructofuranosidase

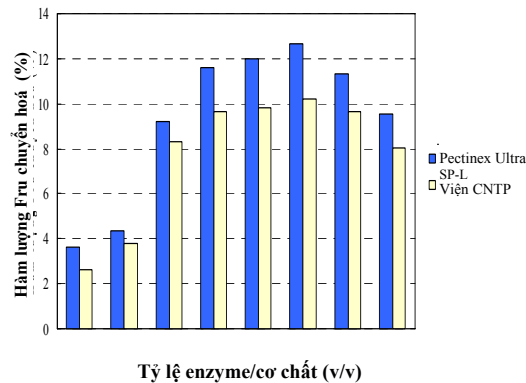
Trong chế phẩm Pectinex Ultra SP - L, hoạt tính chuyển hóa của enzyme β -D-fructofuranosidase tăng nhanh từ pH = 4,0 đến 4,5, sau đó thì hoạt tính khá ổn định trong dải pH từ 4,5 đến 6,5. Tuy nhiên, % fructose chuyển hóa cực đại đạt được khi pH= 6,0 với hàm lượng fructose chuyển hóa là 9,43% (Đồ thị 2).

Với enzyme do Viện CNTP thu nhận, hoạt tính của enzyme tăng nhanh từ pH = 4,0 đến 4,5 và đạt cực đại tại pH = 5,0 với hàm lượng fructose

chuyển hóa là 8,16%, sau đó thì hoạt tính giảm dần trong dải pH từ 5,5 đến 6,0. Kết quả này cũng phù hợp với các công bố rằng pH tối ưu cho β -D-fructofuranosidase nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,8 (Nguyễn Thị Hương Thơm, 2006).

Từ phân tích trên, pH 6,0 và 5.0 lần lượt được chọn là giá trị pH tối thích cho enzyme β -D-fructofuranosidase trong chế phẩm Pectinex Ultra SP-L và chế phẩm của Viện CNTP thu nhận hoạt động.

3.2.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ E/S đến hoạt tính của enzyme β -D-fructofuranosidase

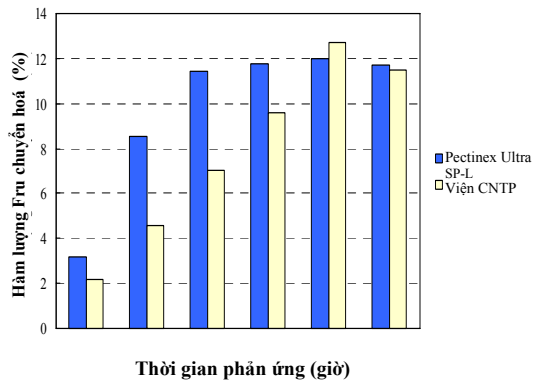


Đồ thị 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ E/S đến hoạt tính enzyme β -D-fructofuranosidase trong chế phẩm Pectinex Ultra SP-L và của Viện CNTP thu nhận

Theo đồ thị 3, hoạt tính chuyển hóa fructose của enzyme tăng nhanh khi tỷ lệ E/S tăng từ 0,0025 đến 0,02 đối với cả hai chế phẩm. Sau đó, hoạt tính tiếp tục tăng nhưng rất chậm và không đáng kể khi tỷ lệ E/S tiếp tục tăng đến 0,04, rồi giảm dần khi tăng tỷ lệ E/S đến 0,05 và 0,06. Việc tăng tỷ lệ E/S lên nhưng không làm thay đổi % fructose chuyển hóa là một sự lãng phí và không hiệu quả. Vì vậy tỷ lệ E/S = 0,02 được chọn là tỷ lệ tối thích cho enzyme β - D - fructofuranosidase trong cả hai loại chế phẩm hoạt động.

3.2.4. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến hoạt tính của enzyme β -D-fructofuranosidase

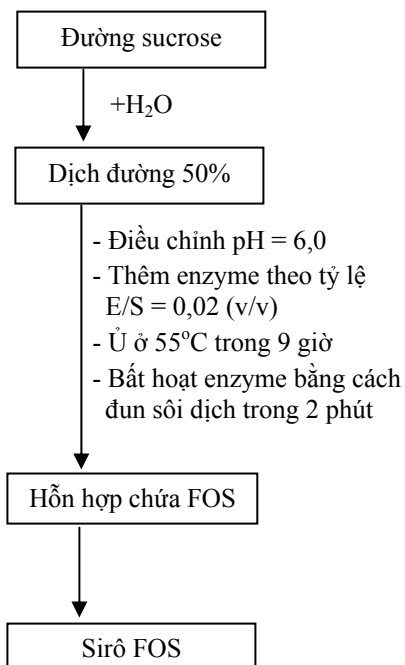
Đồ thị 4 cho thấy, hàm lượng fructose chuyển hóa tăng rõ rệt khi thời gian phản ứng tăng từ 3 giờ đến 9 giờ và đạt cực đại tại 9 giờ với hàm



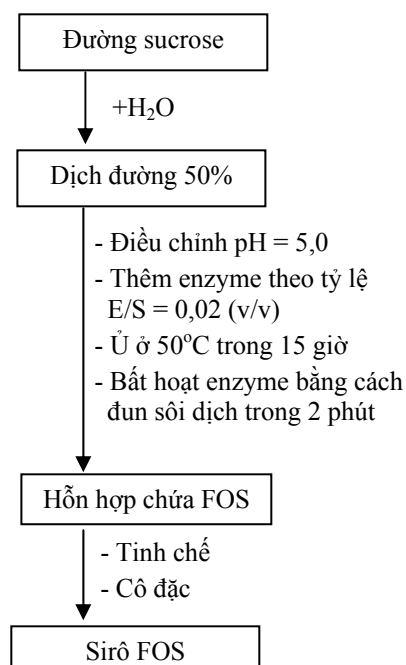
Đồ thị 4. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến hoạt tính enzyme β - D fructofuranosidase trong chế phẩm Pectinex Ultra SP-L và của Viện CNTP thu nhận

lượng fructose chuyển hóa đạt 11,43% đối với chế phẩm Pectinex Ultra SP-L. Sau đó hàm lượng fructose chuyển hóa tăng rất chậm, gần như không đáng kể và ổn định. Đối với chế phẩm enzyme của Viện CNTP thu nhận, hàm lượng fructose chuyển hóa tăng liên tục từ 3 giờ đến 15 giờ và đạt cực đại tại 15 giờ với giá trị 12,74%. Sau đó, hàm lượng fructose chuyển hóa giảm. Vì vậy, giá trị thời gian phản ứng là 9 giờ và 15 giờ lần lượt được chọn là thời gian thích hợp nhất cho enzyme β - D - fructofuranosidase trong chế phẩm Pectinex Ultra SP-L và của Viện CNTP thu nhận hoạt động.

3.3. Xây dựng quy trình sản xuất đường FOS từ đường sucrose sử dụng enzyme β - D - fructofuranosidase và xác định thành phần đường FOS có trong thành phẩm



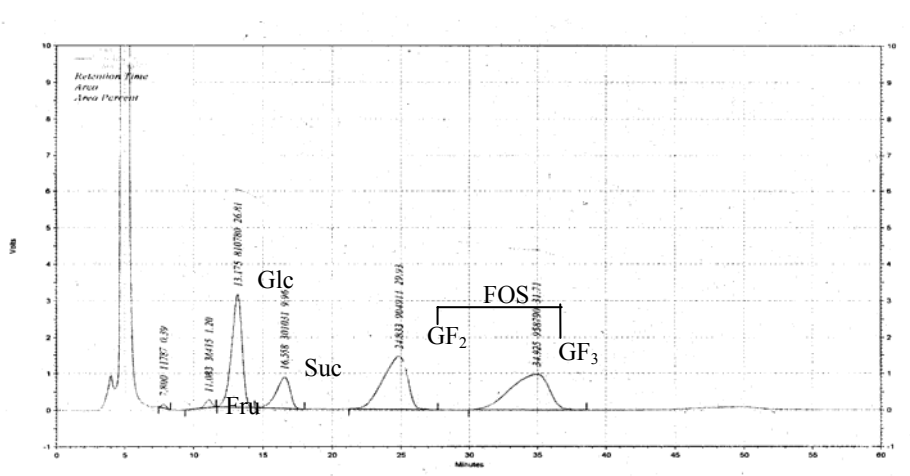
Sơ đồ 1a. Quy trình thu nhận đường FOS từ đường sucrose sử dụng enzyme β -D-fructofuranosidase trong chế phẩm Pectinex Ultra SP-L



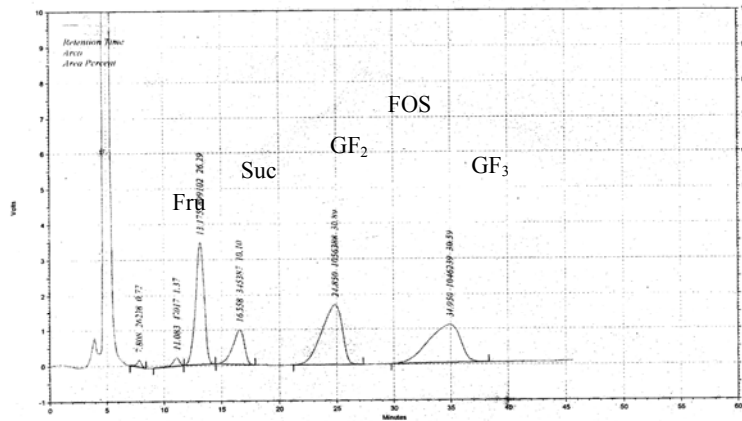
Sơ đồ 1b. Quy trình thu nhận đường FOS từ đường sucrose sử dụng enzyme β -D-fructofuranosidase của Viện CNTP thu nhận

Bảng 2. Kết quả phân tích thành phần đường bằng phương pháp HPLC

Loại chế phẩm	Fru (%)	Glc (%)	Suc (%)	FOS (%)
Pectinex Ultra SP - L	1,59	26,81	9,96	61,64
Viện CNTP	2,13	26,29	10,10	61,48



Hình 1. Sắc kí đồ của FOS và các đường thành phần khác trong sản phẩm thu nhận với enzyme -D-fructofuranosidase trong chế phẩm Pectinex Ultra SP-L



Hình 2. Sắc kí đồ của FOS và các đường thành phần khác trong sản phẩm thu nhận với β -D-fructofuranosidase của Viện CNTP thu nhận

4. KẾT LUẬN

Hoạt tính của enzyme β -D-fructofuranosidase trong chế phẩm Pectinex Ultra SP-L là 18,77 (U/ml), của enzyme β -D-fructofuranosidase do Viện CNTP thu nhận là 13,60 (U/ml).

Điều kiện tối thích cho enzyme β -D-fructofuranosidase trong chế phẩm Pectinex Ultra SP-hoạt động là: Nhiệt độ : 55°C; pH : 6,0; Tỷ lệ enzyme/cơ chất : 0,02; Thời gian phản ứng: 9 giờ. Enzyme β -D-fructofuranosidase của Viện CNTP thu nhận hoạt động tốt trong điều kiện: Nhiệt độ: 50°C; pH: 5,0; Tỷ lệ enzyme/cơ chất: 0,02; Thời gian phản ứng: 15 giờ.

Nghiên cứu đã đề xuất được quy trình sản xuất FOS từ đường sucrose sử dụng hai chế phẩm enzyme được đề xuất trên sơ đồ 1a và 1b.

Sản phẩm FOS thu nhận với chế phẩm Pectinex Ultra SP-L có thành phần các loại đường là: FOS: 61,64%; Sucrose: 9,96%; Glucose: 26,81%; Fructose: 1,59%. Sản phẩm thu nhận với β -D-fructofuranosidase của Viện CNTP thu nhận: FOS: 61,48%; Sucrose: 10,10%; Glucose: 26,29%; Fructose: 2,13%.

Trong tương lai, quy trình sản xuất đường FOS ở dạng sirô với nồng độ cao hơn và FOS ở dạng tinh thể cần được mở rộng nghiên cứu để ứng dụng quy trình sản xuất ở một quy mô sản xuất lớn hơn (nhà máy, công ty thực phẩm...).

5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

Crittenden, R.G., Playne, M. J. (1996). "Production, properties and applications of

food-grade oligosaccharide". Trends in Food Science & Technology November 1996., Vol.7, pp. 353-361.

Nguyễn Thiện Luân, Lê Doãn Diên, Phan Quốc Kinh (1997). *Các loại thực phẩm - thuốc và thực phẩm chức năng ở Việt Nam*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.

Nguyễn Văn Mùi (2001). *Thực hành hóa sinh học*. NXB Đại học Quốc gia, Hà Nội.

Nakakuki, T. (1993). *Oligosaccharides: Production, Properties and Applications*, Japanese Technology Reviews, Vol.3 (2), Gordon and Breach, Switzerland.

Nguyễn Thị Hương Thom (2006). *Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm enzyme Pectinex Ultra SP-L để sản xuất đường fructooligosaccharide*. Luận văn tốt nghiệp, Khoa Công nghệ thực phẩm - Trường ĐH Nông nghiệp I, Hà Nội.

Nguyễn Hương Thủy (2006). *Nghiên cứu sản xuất enzyme fructosyltransferase (FSTase) từ nấm mốc Aspergillus niger trên nguồn nguyên liệu thay thế là bột ngô và khô đậu tương trên quy mô 14 lít*. Luận văn tốt nghiệp, Khoa Công nghệ thực phẩm - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

Trịnh Thị Kim Vân, Trương Thị Hòa, Lê Đình Hùng, Hoàng Đình Hòa (2006). *Tối ưu hóa các điều kiện chuyển hóa đường chức năng fructo - oligosaccharit từ đường sacaroza*. Tạp chí Đồ uống Việt Nam.

Seikagaku Corporation.
<http://218.219.158.168/search/tenpu/100770.htm>.