NGHIÊN CỨU THU NHẬN INULO OLIGOSACCHARIDE BẰNG THỦY PHÂN INULIN THU NHẬN TỪ RAU DIẾP XOĂN (*Lactuca sativa)*

Bùi Thị Thu Hà[1], Nguyễn Vũ Minh Hạnh[2], Nguyễn Thị Tâm Thư[1],
Nguyễn Hà Trung[1], Phạm Kiên Cường[1*]

***Tóm tắt**: Inulo-oligosaccharide (IOS) là một các carbohydrate, được tạo thành từ một chuỗi ngắn các phân tử fructose, được phân loại như một oligosaccharide. IOS được sản xuất bởi quá trình thủy phân inulin sau khi chiết. Inulin được chia nhỏ bằng cách sử dụng enzyme inulinase thành chuỗi từ 2-10,với DP trung bình là 4. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết kế mô hình thí nghiệm nhằm xác định nồng độ cơ chất, enzyme, nhiệt độ, pH thích hợp cho quá trình thủy phân bột nulin từ rau diếp xoăn. Nồng độ enzym nghiên cứu từ 2,5 - 30U/g cơ chất, dải nhiệt độ 40^{o}C-60^{o}C, khoảng pH 4-7 trong thời gian 1-7 giờ. Nồng độ enzym và nhiệt độ là các yếu tố có ảnh hưởng nhiều đến quá trình thủy phân inulin thu nhận inulo-oligosaccharide bằng enzyme. Nồng độ cơ chất 50g/l, tỷ lệ enzyme/cơ chất 30U/g và nhiệt độ 60^{o}C hiệu suất thu nhận inulo oligosaccharide thu được đạt cao nhất là 68 đến 75%.*

Từ khóa: Enzyme; Inulin; Yếu tố ảnh hưởng.

1. MỞ ĐẦU

Inulin là carbohydrate dự trữ có nhiều trong các tế bào thực vật. Khối lượng phế thải từ thực vật là rất lớn và là nguồn thu nhận inulin. Inulin được thủy phân bằng enzyme endonulinase và exoinulinase từ vi sinh vật như nấm, nấm men, xạ khuẩn và vi khuẩn (Dong Hyun Kim, 1997; Mutanda T., 2014).

Inulo oligosacharide (IOS) là một prebiotic được sử dụng bổ sung vào các dạng đồ ăn như sữa chua, nước uống (Park J.P., 1999). IOS được cấu tạo từ 2-10 gốc fructose và được chứng minh là loại prebiotic có hoạt tính sinh học có lợi cho sức khỏe con người. IOS được thu nhận bằng cách thủy phân giới hạn inulin. Jin Zhengyu và cs, 2005 sử dụng enzyme endoinulinase từ *Aspergillus ficuum* 10U/g cơ chất inulin từ Jerusalem artichoke đạt 80% sau 72 giờ. Octavian và cs, 2013 sử dụng enzyme inulinase thương mại với nồng độ 0,55% thủy phân inulin diếp xoăn trong 96 giờ thu được 0,979g đường khử/g cơ chất ở điều kiện 65^{o}C và pH 5,25.

Kết quả nghiên cứu nhằm xác định các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng IOS trong dịch thủy phân như nguồn inulin nguyên liệu, điều kiện và thời gian phản ứng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Inulin, fructooligosaccharide (FOS), DNS, bản mỏng silica TLC, butanol, ethanol, enzyme endoinulinase có hoạt độ 2.10^4 U/g, chế phẩm inulin chiết từ rau diếp xoăn bằng enzyme cellulase và xylanase.

2.2. Phương pháp phân tích

2.2.1. Xác định hoạt độ enyme endoinulinase

Hoạt độ enzyme được xác định bằng cách ủ 0,1 ml emzyme với 0,4 ml 2% (w/v) inulin trong dung dịch đệm natri acetat 0,1M (pH5.0) ở 50^{o}C trong 30 phút. 1 đơn vị enzyme là lượng enzyme tạo ra 1µmol fructose trong 1 phút ở điều kiện xác định.

2.2.2. Xác định hàm lượng inulo oligosaccharide

Hàm lượng inulo oligosaccharide được xác định bằng hiệu số của lượng inulin ban đầu và lượng inulin còn lại trong dịch thủy phân. Hàm lượng inulin được đo trên hệ thống HPLC của Shimadzu với cột Shodex Sugar SP0810 (300 × 8mm x ×7µm), tốc độ dòng 1 ml/phút, thời gian

chạy 15 phút, nhiệt độ 80°C.

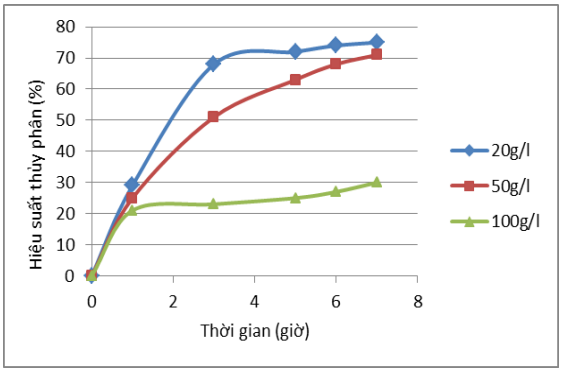
2.2.3. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình thủy phân giới hạn inulin

Ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình thủy phân được khảo sát với 10 ml dịch inulin với nồng độ 20, 50 và 100 g/l, tỷ lệ enzyme/cơ chất 2,5 - 30U/g, pH 4 - 7, nhiệt độ 40°C - 60°C, thời gian 1 - 7 giờ. Dịch sau thủy phân được phân tích hàm lượng IOS và phổ oligosaccharide bằng sắc ký lớp mỏng TLC với hệ dung môi butanol: ethanol: nước là 5:3:2 (v/v/v), hiện màu bằng dung dịch axit sulfuric 10% trong ethanol, sấy ở 120°C trong 5 phút.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất

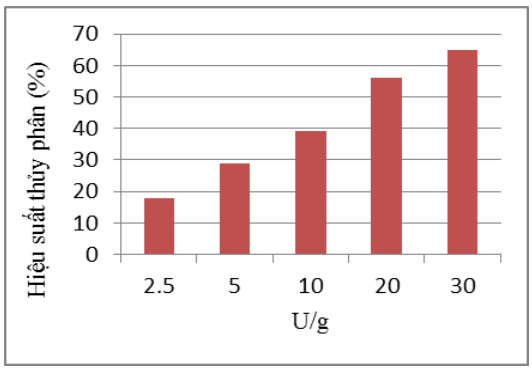
Trong dải nồng độ cơ chất inulin khảo sát 20, 50 và 100g/l, sử dụng với cùng một lượng enzyme, nhận thấy, ở các nồng độ cơ chất thấp, phản ứng xảy ra nhanh, sản phẩm đạt tối đa sau 3h. Với nồng độ cơ chất cao 100g/l lượng cơ chất bị thủy phân thấp, tốc độ phản ứng giảm, phản ứng có dấu hiệu cân bằng. Phổ TLC (hình 5) cho thấy, sản phẩm cuối còn nhiều inulin chưa thủy phân. Với nồng độ cơ chất 50g/l tốc độ phản ứng được duy trì và tăng dần trong 3 giờ. Như vậy, với nồng độ cơ chất 50g/L hiệu quả của quá trình thủy phân đạt tối ưu nhất. Nồng độ cơ chất 50g/l được lựa chọn để tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.



Hình 1. *Ảnh hưởng của nồng độ inulin đến hiệu suất thủy phân inulin tạo IOS.*

3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme/cơ chất

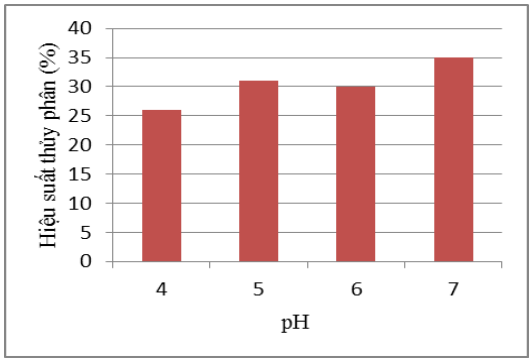
Thử nghiệm tỷ lệ enzyme và cơ chất trong khoảng 2,5U/g đến 30U/g, cho thấy, khi tăng tỷ lệ enzyme dẫn đến hiệu suất thủy phân inulin tăng. Với lượng enzyme /cơ chất 2,5; 5 và 10 U/g lượng enzyme ít nên sau thời gian phản ứng lượng inulin còn lại trong dich thủy phân khá lớn, Tuy nhiên, khi tăng tỷ lệ lên 20 và 30U/g quá trình thủy phân xảy ra mạnh hơn, phổ sản phẩm đường đơn nhiều và hiệu suất thủy phân đạt cao nhất.



Hình 2. *Ảnh hưởng của tỷ lệ E/S đến hiệu suất thủy phân inulin tạo IOS.*

3.3. Ảnh hưởng của pH

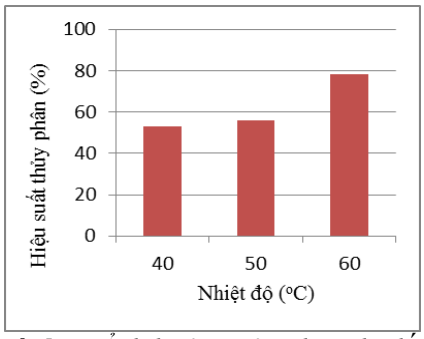
Tiến hành phản ứng thủy phân inulin trong dung dịch đệm có pH 4 đến pH7 nhận thấy ở pH5 và pH7 hiệu suất thủy phân inulin đạt cao hơn so với pH4 và pH6. Hiệu suất thủy phân đạt cao nhất tại pH7 là 35%. Tuy nhiên, trên sắc ký đồ cho thấy, ở pH4 sản phẩm thủy phân inulin tạo ra nhiều băng hơn nhưng ở pH5,pH6 và pH7 lại tạo ra các sản phẩm có kích thước nhỏ hơn. Như vậy, pH7 là giá trị phù hợp cho quá trình thủy phân inulin tạo ra các sản phẩm có kích thước nhỏ đồng thời đạt hiệu suất thủy phân cao nhất.



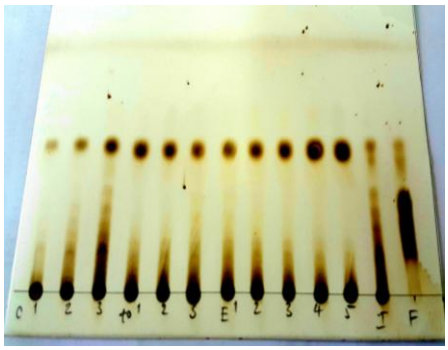
Hình 3. *Ảnh hưởng của pH đến hiệu suất thủy phân inulin tạo IOS.*

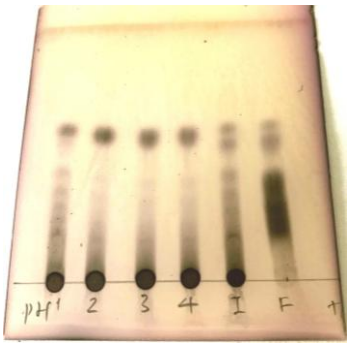
3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Khi tiến hành thử nghiệm phản ứng ở khoảng nhiệt độ 40^{o}C đến 60^{o}C hiệu suất thủy phân của inulin ở 40^{o}C và 50^{o}C diễn ra chậm, hiệu suất thủy phân thấp. Khi tăng nhiệt độ lên 60^{o}C có sự thay đổi đáng kể hiệu suất thủy phân, có thể đây là nhiệt độ thích hợp cho enzym hoạt động và hiệu suất của quá trình thủy phân đạt 78%. Đồng thời kết quả trên sắc ký đồ cho thấy, ở nhiệt độ 60^{o}C lượng inulin còn lại và lượng đường đơn tạo ra ít hơn.



Hình 4. *Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất thủy phân inulin tạo IOS.*


b


c

Hình 5. *Sắc ký đồ kết quả thủy phân inulin.*

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết kế thí nghiệm nhằm xác định nồng độ cơ chất, nồng độ enzym/cơ chất, nhiệt độ, pH thích hợp cho quá trình thủy phân bột inulin từ rau diếp xoăn. Kết quả

nghiên cứu cho thấy, nồng độ enzym và nhiệt độ là các yếu tố có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất thủy phân inulin thu nhận inulo oligosaccharide bằng enzym. Hiệu suất thủy phân cao nhất là 68 đến 75% với nồng độ cơ chất 50g/l, nồng độ enzym/cơ chất 30U/g, pH 7 và nhiệt độ 60^{o}C.

Lời cảm ơn: *Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài thuộc Đề án phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghiệp chế biến đến năm 2020 với mã số 09/HĐ-ĐT.09.19/CNSHCB*

Công trình này đã được báo cáo tại Hội thảo Quốc gia ***"Ứng dụng Công nghệ cao vào thực tiễn – 60 năm phát triển Viện KH-CN quân sự".***

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Adriana C. Flores, *"Inulin potential for enzymatic obtaining of prebiotic oligosaccharides"*, Food Science and Nutrition (56), 2016, 1893-1902.

[2]. Dong Hyun Kim, *"Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a Pseudomonas sp."*, Biotechmology Letters, Vol 19(4), 1997, 369-371.

[3]. Jin Zhengyu, *"Production of inulooligosaccharides by endoinulinase from Aspergillus ficuum"*, Food Research International (38), 2005, 301-308.

[4]. Mutanda T., *"Microbial enzymatic production and application of short-chain fructooligosaccharides and inolooligosacchrides: recent advances and curent perspecrives"*, Microbiol Biotechnol (41), 2014, 893-906.

[5]. Octavian Baston, *"Estabilishing the optimum conditions for inulin hydrolysis by using commercial inulinase"*, Rev. Chem., Vol 64(6), 2013, 649-653.

[6]. Park J.P., *"Production of inulooligosaccharides from inulin by a novel endoinulinase from Xanthomonas sp."*, Biotechmology Letters 21, 1999, 1043-1046.

[7]. Sebastien N. Ronkart, *"Isolation and indentification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis"*, Analytica Chimica Acta 604, 2007, 81-87.

[8]. Yun J.W., *"Production of high-content inulo-oligosaccharides from inulin by a purified endoinulinase"*, Biotechmology Letters, Vol 19(9), 1997, 935-938.

ABSTRACT

INULO ACCEPTANCE RESEARCH OLIGOSACCHARIDE BY INULIN DISTRIBUTION HYDROGENED FROM BAN VELVET VEGETABLES

Inulo oligosaccharide (IOS) is a carbohydrate, made up of a short chain of fructose molecules, classified as an oligosaccharide. IOS is produced by inulin hydrolysis after extraction. Inulin is broken down by using inulase enzymes into chains of 2-10, with an average DP of 4. In this study we designed an experimental model to determine the subtrate, enzyme concentration, temperature, and pH appropriate for inulin hydrolysis of powder from chicory. Concentration of studied enzyme is from 2.5 - 30U/g substrate, temperature range 40^{o}C - 60^{o}C and pH range 4-7. Enzyme concentration and temperature are the factors that greatly affect the inulin hydrolysis process of obtaining inulo-oligosaccharide by enzyme. The concentration of substrate 50g/l, concentration of enzyme 30U/g substrate and the temperature of 60^{o}C, the highest efficiency of inulo oligosaccharide acquisition was 68 to 75%.

Keywords: Enzyme; Inulin; Affecting factors.

Nhận bài ngày 02 tháng 8 năm 2020
Hoàn thiện ngày 02 tháng 12 năm 2020
Chấp nhận đăng ngày 14 tháng 12 năm 2020

Địa chỉ: [1]Viện Công nghệ mới/Viện Khoa học và Công nghệ quân sự;
[2]Trường Đại học khoa học Tự nhiên/Đại học QGHN.
[*]Email: phamkiencuong83@gmail.com.