

KHẢO SÁT CÁC ĐIỀU KIỆN THÍCH HỢP CHO PHẢN ỨNG TRANSGALACTOSYL SỬ DỤNG β -GALACTOSIDASE *ASPERGILLUS ORYZAE* 3 ĐỂ SẢN XUẤT GALACTOOLIGOSACCHARID (GOS) TỪ LACTOSE

BÙI THỊ HẢI HÒA, NGUYỄN VĂN CÁCH, ĐẶNG THỊ THU

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, các nghiên cứu thu nhận và sử dụng các oligosaccharid còn gọi là prebiotic đang được triển khai mạnh mẽ ở một số nước công nghiệp phát triển như Hoa Kỳ, Nhật Bản, Đức, Áo... Nhu cầu về các loại prebiotic trong đó có galactooligosaccharid (GOS) đang ngày càng tăng trên thị trường thế giới [3, 8]. Tại Nhật Bản, đường GOS được dùng để thay thế đường saccharose cho các đối tượng mắc bệnh béo phì và tiểu đường. Ngoài ra một lượng lớn đường GOS cũng được dùng như một chất ngọt bổ sung. Người ta đã tìm ra trên 500 loại sản phẩm thực phẩm có sử dụng đường GOS như bánh quy, các sản phẩm sữa, bột dinh dưỡng trẻ em, nhiều loại thực phẩm chức năng, thực phẩm điếm tâm, kẹo, bánh [1]...

GOS được tạo ra bởi phản ứng transgalactosyl lactose dưới sự xúc tác của β -galactosidase. Với ưu điểm có cường lực xúc tác mạnh, β -galactosidase có thể dễ dàng và nhanh chóng thủy phân lactose cũng như xúc tác phản ứng liên kết galactose và glucose vào lactose tạo galactooligosaccharid với hiệu suất cao [6, 7].

Đường GOS được nghiên cứu và sản xuất ở qui mô công nghiệp ở nhiều nước trên thế giới, đặc biệt tại Nhật Bản, Trung Quốc ... Ở Việt Nam việc nghiên cứu về vấn đề này đang được bắt đầu. Xuất phát từ mối quan tâm này chúng tôi tiến hành khảo sát các điều kiện thích hợp cho phản ứng transgalactosyl lactose để tạo GOS khi sử dụng β -galactosidase từ chủng *Aspergillus oryzae* 3..

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Enzim: Chế phẩm β -galactosidase thu nhận từ *Aspergillus oryzae* 3 của Bộ môn Hóa sinh, Viện Công nghệ sinh học và Công nghiệp thực phẩm, trường đại học Bách Khoa Hà Nội được sử dụng trong nghiên cứu.

Các hóa chất tinh khiết của Merck, Sigma Aldrich... sử dụng cho phương pháp sắc kí định tính và định lượng sản phẩm GOS tạo thành: đường chuẩn glucose, galactose, lactose, galactotetraose, các dung môi hữu cơ tinh khiết sử dụng trong sắc kí bản mỏng và HPLC.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp khảo sát phản ứng transgalactosyl lactose sử dụng β -galactosidase từ *A.oryzae* 3

Cho enzym tác dụng với cơ chất lactose, sau một thời gian nhất định đun cách thủy ở 90°C trong 5 phút làm ngừng phản ứng, định tính thành phần của sản phẩm thu được bằng phương pháp sắc kí bản mỏng. Ở thí nghiệm khảo sát đầu tiên, các thông số được áp dụng là nồng độ cơ chất lactose 80% (w/v), pH 5,0; 55°C, thời gian phản ứng 4 giờ. Các thông số kĩ thuật được lựa chọn cho nghiên cứu lần lượt được nghiên cứu, khi xác định được điều kiện phù hợp nhất, thông số đó được giữ nguyên để áp dụng cho các phản ứng tiếp theo.

- Nồng độ enzym: 4, 7, 10, 13, 16 U/ml;
- Nồng độ cơ chất lactose: 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%;
- pH môi trường: 4,5 ; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,5;
- Nhiệt độ phản ứng: 45 ; 50; 55; 60; 65°C;
- Thời gian phản ứng: 9; 8; 7; 6; 5; 4; 3 giờ.

2.2.2. Phương pháp sắc kí bản mỏng định tính thành phần của sản phẩm thu được (theo phương pháp của hãng Megazyme)

Dùng micropipet Hamilton chấm 5 microlit mẫu lên bản sắc kí lớp mỏng. Tiến hành chạy sắc kí trong hệ dung môi n-butanol: ethanol: nước (5 : 3 : 2) cho đến khi vết dung môi cách mép trên của bản sắc kí 1 cm, lấy bản sắc kí sấy khô ở 80°C, rồi nhúng vào trong dung dịch hiện màu (H₂SO₄ 20% pha trong ethanol), sấy ở 110°C trong 5 phút. Thành phần trong sản phẩm được định tính bằng cách so với các đường chuẩn glucose, galactose, lactose, galactotetraose.

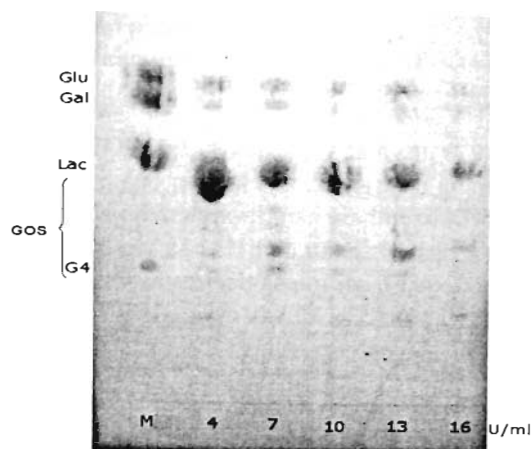
2.2.3. Định lượng GOS bằng phương pháp sắc kí lỏng cao áp HPLC

Dịch GOS được pha loãng bằng nước khử ion, định mức và lọc qua màng có kích thước 0,2 µm. Dung dịch đường chuẩn glucose, galactose, lactose, galactotetraose được pha từ 1, 2, 5 mg/ml. 20 µl mẫu được sử dụng chạy sắc kí trên cột NH₂ (4,6 cm × 15 cm) và cột Pb (4,6 cm × 30 cm). Dung dịch đệm chạy được sử dụng là acetone nitrin: H₂O (tỉ lệ 75:25). Các điều kiện: tốc độ chạy 0,8 ml/phút, nhiệt độ cột: cột NH₂ 40°C, cột Pb 80°C, detector RID.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

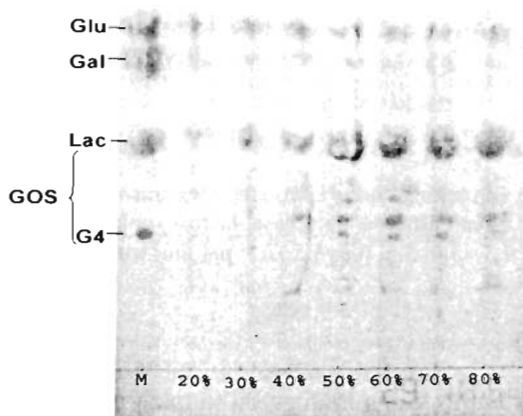
3.1. Ảnh hưởng của nồng độ β-galactosidase

Sau khi tiến hành phản ứng transgalactosyl lactose sử dụng β-galactosidase từ *A. oryzae* 3 với các nồng độ khác nhau, tiến hành sắc kí và thu được kết quả trình bày tại hình 1. Với nồng độ enzym 4U/ml cơ chất lactose, hàm lượng lactose chuyển tạo thành GOS không nhiều, các băng thể hiện sản phẩm GOS khá mờ trong khi băng thể hiện hàm lượng lactose còn rất đậm, khi nồng độ enzym tăng (7 – 13/ml cơ chất) hàm lượng lactose được chuyển tạo thành GOS cũng tăng lên rõ rệt thể hiện ở các băng sản phẩm đậm màu, tuy nhiên khi hàm lượng enzym cao (13 U/ml), lượng đường đơn tạo thành cũng tương đương với lượng GOS có trong hỗn hợp sản phẩm. Kết quả định tính cho thấy ở nồng độ enzym 7U/ ml cơ chất, sản phẩm GOS thu được khá đậm màu và sản phẩm đường đơn không nhiều so với các sản phẩm của nồng độ enzym cao hơn, do vậy nồng độ enzym 7 U/ml cơ chất được lựa chọn trong các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Sắc kí đồ ảnh hưởng của nồng độ β -galactosidase đến khả năng transgalactosyl tạo GOS
 - M: chất chuẩn glucose, galactose, lactose, galactotetraose
 - 4; 7; 10; 13; 16: Nồng độ enzym phản ứng (U/ml cơ chất)

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất lactose



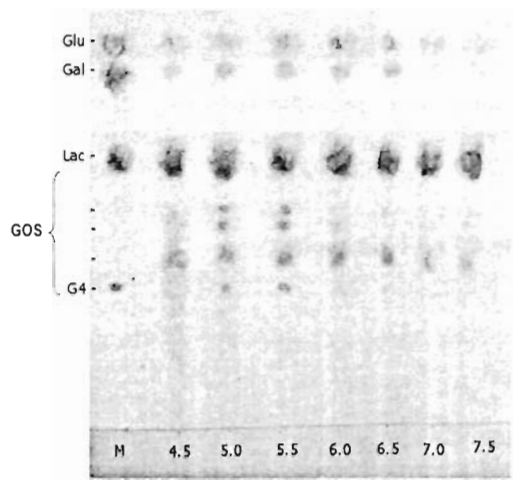
Hình 2. Sắc kí đồ ảnh hưởng của nồng độ cơ chất lactose đến khả năng transgalactosyl tạo GOS
 - M: chất chuẩn glucose, galactose, lactose, galactotetraose
 - 20 ; 30; 40; 50; 60; 70; 80: Nồng độ cơ chất phản ứng (% w/v)

Tiến hành phản ứng transgalactosyl lactose ở các nồng độ lactose khác nhau (từ 20% - 80%). Dịch được bổ sung β -galactosidase với nồng độ 7 U/ml cơ chất. Quá trình phản ứng được thực hiện ở 55°C trong thời gian 4 giờ. Kết thúc quá trình, dịch phản ứng được phân tích bằng sắc kí bản mỏng. Kết quả thể hiện ở hình 2 cho thấy khi nồng độ cơ chất lactose thấp (20% - 40%), hàm lượng đường đơn và GOS tạo thành không nhiều, khi nồng độ lactose tăng, hàm lượng GOS tạo thành tăng thể hiện ở những băng màu đậm dần. Khi nồng độ cơ chất nằm trong khoảng từ 60 - 80 %, các sản phẩm GOS thu được cho dải phân tích định tính đậm màu hơn hẳn

và hầu như không khác nhau nhiều, như vậy, để tiết kiệm chi phí sản xuất nồng độ lactose được chọn là 60%.

3.3. Ảnh hưởng của pH

Để đảm bảo hiệu suất transgalactosyl lactose tạo GOS, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng pH của dịch cơ chất đến khả năng transgalactosyl lactose của β -galactosidase. Dịch cơ chất nồng độ 60% được chỉnh đến các pH khác nhau, hàm lượng enzym bổ sung là 7 U/ml, thời gian phản ứng 4 giờ, khi kết thúc quá trình phản ứng thu dịch để phân tích định tính bằng sắc kí bản mỏng. Kết quả cho thấy tại pH từ 5 - 6, quá trình transgalactosyl lactose cho sản phẩm GOS khá đậm nét, tuy nhiên tốt nhất tại pH là 5,5 (hình 3). Vì vậy chọn pH 5,5 cho quá trình transgalactosyl lactose tạo GOS.



Hình 3. Sắc kí đồ ảnh hưởng của pH đến khả năng transgalactosyl tạo GOS
- M: chất chuẩn glucose, galactose, lactose, galactotetraose
- 4,5 ; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,5: pH môi trường

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ

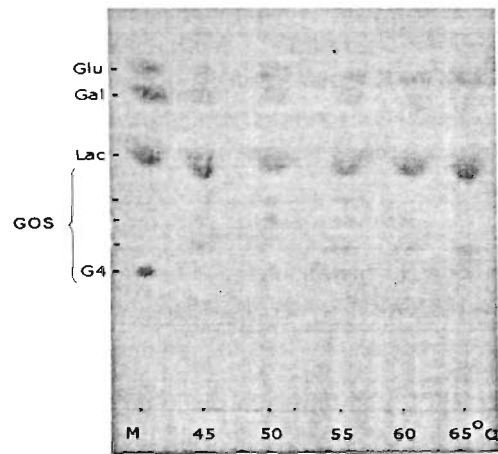
Trong sản xuất, nhiệt độ là một trong những yếu tố quan trọng, bởi nó ảnh hưởng tới chất lượng sản phẩm và giá thành sản xuất, do vậy, tiến hành khảo sát nhiệt độ thích hợp cho β -galactosidase trong phản ứng tạo GOS. Phản ứng được thực hiện ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau, sau khi kết thúc phản ứng, phân tích định tính bằng sắc kí bản mỏng. Kết quả thể hiện ở hình 4 cho thấy tại dải nhiệt độ lớn hơn 50°C, hàm lượng GOS tạo thành đậm nét hơn hẳn và thể hiện rõ nhất ở nhiệt độ 55°C. Như vậy, nhiệt độ thích hợp cho phản ứng transgalactosyl lactose thu GOS là 55°C.

3.5. Khảo sát thời gian transgalactosyl lactose tạo GOS của β -galactosidase từ *A.oryzae* 3

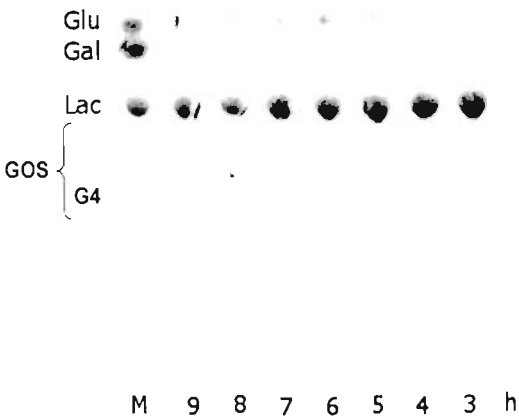
Để xác định thời gian tối ưu cho quá trình tạo GOS, tiến hành khảo sát phản ứng với các mốc thời gian: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 giờ. Mẫu phản ứng được chuẩn bị có nồng độ cơ chất lactose là 60 %, nồng độ β -galactosidase là 7U/ml cơ chất, pH 5,5, nhiệt độ phản ứng là 55°C. Kết quả cho

thấy ở khoảng thời gian từ 3 – 5 giờ, sản phẩm GOS tạo thành không nhiều so với khoảng thời gian từ 6 – 9 giờ. ở thời điểm 8 giờ sản phẩm GOS thu được những băng màu đậm và rõ nét nhất (hình 5), như vậy thời gian thích hợp cho phản ứng transgalactosyl lactose tạo GOS là 8 giờ.

Từ các kết quả trên, đưa ra điều kiện thích hợp cho phản ứng transgalactosyl lactose tạo GOS sử dụng β -galactosidase *A. oryzae* 3 là 60% cơ chất, enzym 7 U/ml cơ chất, thời gian phản ứng 8 giờ tại 55°C.

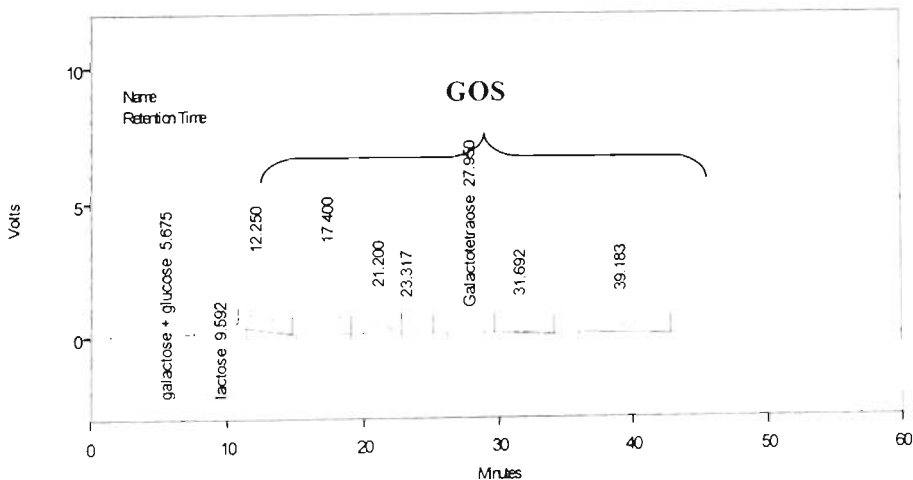


Hình 4. Sắc kí đồ ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng transgalactosyl tạo GOS
 - M: chất chuẩn glucose, galactose, lactose, galactotetraose
 - 45 ; 50; 55; 60; 65: nhiệt độ phản ứng (°C)



Hình 5. Sắc kí đồ ảnh hưởng của thời gian đến khả năng transgalactosyl tạo GOS
 - M: chất chuẩn glucose, galactose, lactose, galactotetraose
 - 9; 8; 7; 6; 5; 4; 3: thời gian phản ứng (giờ)

3.6. Phân tích thành phần và hàm lượng oligosaccharid trong sản phẩm GOS



Hình 6. Sắc kí đồ của GOS và các đường thành phần khác trong sản phẩm thu nhận với β -galactosidase từ *A. oryzae* 3

Nghiên cứu xác định thành phần và hàm lượng oligosaccharid trong sản phẩm GOS thu được là rất cần thiết, bởi đây là một trong những tiêu chí đánh giá chất lượng sản phẩm GOS thu được. Để xác định thành phần sản phẩm GOS thu được, chúng tôi tiến hành phân tích định lượng bằng HPLC.

Bảng 1. Định lượng thành phần galactooligosaccharid trong GOS thành phẩm bằng HPLC

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả	Phương pháp xác định
1	Hàm lượng lactose	%	20,12	HPLC
2	Hàm lượng galactose	%	8,50	HPLC
3	Hàm lượng galactotetraose	%	1,20	HPLC

Kết quả phân tích định lượng chế phẩm GOS bằng HPLC cho thấy trên sắc kí đồ xuất hiện 9 peak, các sản phẩm được định tên dựa trên cơ sở phân tích chất chuẩn và so sánh thời gian lưu mẫu với chất chuẩn là glucose, galactose, lactose, galactotetraose (công thức α -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Gal). Trong đó, peak 1 là sản phẩm glucose và galactose trùng nhau bởi có độ hấp phụ và phân tách trên cột NH₂ chưa tốt, peak 2 là lactose, peak 7 là galactotetraose. Ngoài các sản phẩm đường đã được định tên trên, chúng tôi nhận thấy trên sắc kí đồ xuất hiện rất nhiều peak với thời gian lưu khác nhau, dự đoán đó là các sản phẩm galactobiose, galactotriose, galactopentanose và có thể cả galactohexanose...

Kết quả phân tích định lượng bằng HPLC thành phần của các loại đường trong sản phẩm GOS như sau: lactose 20,12%; galactose 8,5%; galactotetraose 1,20%. Với hàm lượng cơ chất lactose ban đầu của phản ứng là 60%, sau phản ứng, hàm lượng lactose còn lại được định lượng là 20,12% (bảng 1). Như vậy, hiệu suất chuyển hóa của lactose thành các đường đơn và oligosaccharid là hơn 70%. Galactose được định lượng là 8,5%, do trên cột NH₂ glucose và galactose không phân tách nên chúng tôi dự kiến hàm lượng glucose là xấp xỉ galactose, tổng sản phẩm glucose, galactose và lactose sẽ chiếm 35 – 40% trong chế phẩm GOS, còn lại khoảng 60% là các sản phẩm mới tạo thành là galactobiose, galactotriose, galactotetraose, galactopentanose và galactohexanose...

So sánh với thành phần sản phẩm GOS sản xuất từ β -galactosidase *A. oryzae* của Matsumoto và cộng sự (1988) là: galactose 8,7%; lactose 43,6%; galactooligosaccharide 24,2% [2] hiệu suất phản ứng transgalactosyl lactose sử dụng β -galactosidase *A. oryzae* 3 là tương đối tốt. Kết quả này tương ứng với thành phần lactose ~ 20% của chế phẩm GOS thương mại hiện nay của Nhật Bản [5].

4. KẾT LUẬN

Trên cơ sở các nghiên cứu trên, kết luận đã nghiên cứu đưa ra được điều kiện thích hợp cho phản ứng transgalactosyl lactose tạo galactooligosaccharid sử dụng β -galactosidase *A. oryzae* 3 là lactose 60%; enzym 7U/ml; pH 5,5; nhiệt độ 55°C; 8 giờ; thu chế phẩm GOS dạng lỏng, sấy

phun, thu chế phẩm GOS dạng bột và đánh giá chế phẩm thu được có hàm lượng oligosaccharid đạt trên 50%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gibson G. R., and Rastall R. A. - Prebiotic: Development and application. John Willey and Sons, Ltd., 2006.
2. Matsumoto K., Natsuko T., Kabushiki K. - Method for producing galactooligosaccharides. European patent, Free patent online, N°0272095, 1988.
3. Playne M. J., Bennett L. E., Smithers G. W. - Functional dairy foods and ingredients. The Australian Journal of Dairy Technology **58** (3) (2003) 242–264.
4. Tatsuhiko K., Kobayashi Y. - Method for producing oligosaccharides, Free patent online. N° 4895801, 1990).
5. Tomoyuki S., Keisuke M., Ryuichiro T. - Recent progress on research and applications of non – digestible galactooligosaccharid, International Dairy Journal **9** (1999) 69-80.
6. Raymond R. M. - Galactosyl oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review, Food Chem **63** (2) (1998) 147-154.
7. Ruchi G., Hema P., Ruchi J., Khare S. K. - Galactooligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase, Food Chemistry **97** (2006) 426-430.
8. Robert A. R., and Vatsala M. - Prebiotic and synbiotics: towards the next generation, Food Biotechnology **13** (2002) 490-496.

SUMMARY

DETERMINING OPTIMAL CONDITIONS TO FORMING GALACTOOLIGOSACCHARIDES (GOS) BY TRANSGALACTOSYL REACTION USING β -GALACTOSIDASE PRODUCED BY *ASPERGILLUS ORYZAE* 3

In the present paper, enzyme β -galactosidase from *A.oryzae* 3 was used for the production GOS from lactose. The optimal conditions to forming GOS by transgalactosyl reaction using this enzyme were determined, such as 8 hours at 55°C with 60% of lactose concentration (w/v), 7 U/ml of enzyme concentration and pH 5.5. The GOS production process was established and the total GOS yield (%) determined by HPLC were more than 50%.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 22 tháng 4 năm 2008

Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm,
Trường ĐH Bách Khoa HN