

NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN THÍCH HỢP CHO QUÁ TRÌNH CHUYỂN HÓA VÀ TỔNG HỢP TREHALOSE TỪ TINH BỘT SẮN BẰNG PHƯƠNG PHÁP ENZYME

*Đỗ Thị Thanh Huyền¹, Nguyễn Mạnh Đạt², Bùi Thị Hồng Phương³,
Đỗ Thị Thủy Lê⁴, Lê Đức Mạnh⁵*

Phương pháp sản xuất trehalose từ tinh bột sắn bằng cách sử dụng hệ enzyme maltooligosyl trehalose synthase (MTSase) và maltooligosyl trehalose trehalohydrolase (MTHase) mang lại hiệu quả cao và có khả năng sản xuất qui mô lớn. Trong nghiên cứu này, sử dụng chế phẩm enzyme từ chủng *Saccharolobus solfataricus* DSM 1616 có hoạt tính enzyme MTSase và MTHase để chuyển hóa và tổng hợp trehalose từ tinh bột sắn. Dịch thủy phân tinh bột sắn chứa maltooligosaccharit được phản ứng ở điều kiện thích hợp: pH 6,0 và nhiệt độ tối ưu là 55⁰C; MTSase-MTHase ở nồng độ 300 U/g tinh bột; thời điểm bổ sung CGTase sau 8 giờ phản ứng, thời gian 24 giờ. Để nâng cao hiệu suất chuyển hóa tinh bột thành trehalose, sử dụng enzyme thủy phân isoamylase (1000 U/g tinh bột) và enzyme CGTase (20 U/g tinh bột) vào hỗn hợp phản ứng đã làm tăng hàm lượng trehalose. Kết quả cho thấy, sau quá trình thủy phân và chuyển hóa tinh bột sắn bằng phương pháp enzyme hàm lượng trehalose đạt 86,2% (so với đường tổng). Như vậy, có thể sử dụng enzyme maltooligosyl trehalose synthase, maltooligosyl trehalose trehalohydrolase để sản xuất trehalose từ nguồn tinh bột sắn sẵn có tại Việt Nam.

Từ khóa: *Maltooligosyl trehalose synthase, maltooligosyl trehalose trehalohydrolase, maltooligosaccharit, tinh bột sắn.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trehalose (α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside) là một đường không khử được cấu tạo từ hai phân tử glucoza liên kết với nhau theo liên kết α -1,1-glycosit. Trehalose có tính chất ổn định và là chất bảo vệ chống lại hiện tượng sốc nhiệt biến tính protein trong quá trình sấy khô/làm lạnh hoặc chức năng bảo vệ tế bào chống lại các gốc

oxy hóa tự do...do đó, được sử dụng nhiều là thành phần phụ gia thực phẩm, dược phẩm...[9].

Trong công nghệ sản xuất trehalose biến đổi sinh học bằng phương pháp enzyme được coi là phương pháp tiếp cận mới được ưu tiên sử dụng hơn so với phương pháp chiết xuất từ sinh khối vi sinh vật

¹ThS. Viện Công nghiệp Thực phẩm
Email: huyenfiri@gmail.com

²TS - Viện Công nghiệp Thực phẩm

³ThS. Viện Công nghiệp Thực phẩm

⁴TS - Viện Công nghiệp Thực phẩm

⁵TS. Viện Công nghiệp Thực phẩm

Ngày gửi bài: 1/9/2019

Ngày phản biện đánh giá: 20/11/2019

Ngày đăng bài: 30/12/2019

hay thực vật. Một trong những enzyme dùng để sản xuất trehalose quy mô lớn là hệ enzyme gồm maltooligosyl trehalose synthase (MTSase, EC 5.4.99.15) và maltooligosyl trehalose trehalohydrolase (MTHase, EC 3.2.1.141). MTSase xúc tác cho phản ứng thủy phân maltooligosaccharit (mức độ trùng hợp phân tử glucoza >3) thành maltooligosyl trehalose bằng chuyển đổi glycosyl hóa nội phân tử, sau đó MTHase thủy phân đặc hiệu maltooligosyl trehalose thành trehalose [9].

Enzyme MTSase và MTHase xúc tác lặp lại trên liên kết-1,4-glucozit và bị dùng lại ở các vị trí mạch nhánh tinh bột (liên kết α -1,6), do đó để phản ứng xảy ra hoàn toàn với tinh bột, cần thiết phải bổ sung enzyme thủy phân cấu trúc phân nhánh của tinh bột vào giai đoạn đường hóa như isoamylase hay pullulanase [5]. Mặt khác, trong giai đoạn cuối của phản ứng, một số oligosaccharit có trọng lượng phân tử thấp như glucoza, maltose, maltotriose và các dextrin mạch ngắn luôn được tích lũy, bổ sung cyclomaltodextrin glucanotransferase (CGTase) nhằm trùng hợp các oligosaccharit có trọng lượng phân tử thấp thành oligosaccharit có trọng lượng phân tử cao bởi phản ứng thuận nghịch CGTase, sản phẩm là cơ chất cho MTSase và MTHase hoạt động [10]. Do đó, để tăng hiệu suất quá trình chuyển hóa, cần bổ sung enzyme phân cắt mạch nhánh của tinh bột và enzyme tổng hợp các oligosaccharit có trọng lượng phân tử thấp thành hợp chất có trọng lượng phân tử cao, từ đó enzyme MTSase và MTHase có thể dễ dàng để chuyển hóa, tổng hợp trehalose [10].

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Enzyme và cơ chất và nguyên liệu

2.1.1. Enzyme: Enzyme MTSase-MTHase từ chủng *Saccharolobus solfataricus* DSM 1616 (DSMZ-Đức), đã được tinh sạch (báo cáo kết quả đề tài nghiên cứu chưa công bố), hoạt lực enzyme đạt ≥ 35000 U/ml, pH tối ưu 5,5, nhiệt độ tối ưu 55-60°C.

Enzyme thương mại: SEBrew HT chứa α -amylase 120 KNS/g từ *Bacillus* sp. (Ấn Độ); Gluco-amylase chứa β -amylase ≥ 260 U/ml từ *Aspergillus niger* (Novozyme); Isoamylase chứa β -amylase $\geq 3,000,000$ U/ml từ *Pseudomonas* sp. (Novozyme); Toruzyme 3.0L chứa cyclomaltooligosaccharit glucanotransferase ≥ 3 KNU/g từ *Bacillus licheniformis* (Novozyme).

2.1.2. Tinh bột: Tinh bột sản mua trên thị trường, bột có màu trắng, nhỏ mịn, mùi thơm, không có mùi, vị lạ, hàm lượng tinh bột đạt $\geq 80\%$, độ ẩm 12-14%.

2.2. Phương pháp công nghệ

2.2.1. Phương pháp thủy phân tinh bột sản thành đường maltooligosaccharit

Xử lý nguyên liệu: Phối trộn tinh bột sẵn hòa với nước theo tỷ lệ 1:4, khuấy đảo liên tục, khuấy mạnh để nước hòa tan dịch tinh bột rồi để yên. Đến khi tinh bột đã lắng gần hết xuống đáy thành một lớp thì ta gạn bỏ phần nước phía trên, thêm nước mới sạch, khuấy mạnh và để yên, quá trình xử lý lặp lại 4 lần [1].

Quá trình dịch hoá: Nồng độ tinh bột: 25%, nồng độ enzyme SEBrew HT 6 KNS/g tinh bột (tương đương 0,05%), pH = 6,5, nhiệt độ: 80°C, thời gian: 30 phút. Kết thúc phản ứng bằng cách nâng

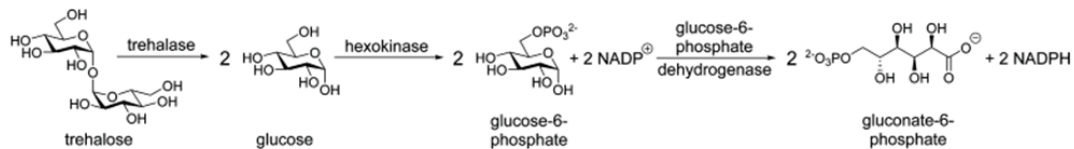
nhệt lên 1000C trong 15 phút [1].

Quá trình đường hoá: Nồng độ dịch thủy phân: 220Bx, sử dụng Isoamylase ở nồng độ thích hợp và thời gian phản ứng 16 giờ, nhiệt độ: 55⁰C, pH = 6,0 [3, 6].

2.2.2. Phương pháp chuyển hóa, tổng hợp đường trehalose

Dịch tinh bột sắn sau quá trình dịch hóa, được ổn định ở pH, nhiệt độ thích hợp, tiến hành quá trình đường hóa và bổ sung MTSase -MTHase và phản ứng ở các điều kiện xác định [5, 6]. Kết thúc toàn bộ quá trình, nâng nhiệt độ 95⁰C trong 10 phút để bất hoạt enzyme. Phân tích hàm lượng đường trehalose tạo thành.

2.3. Phương pháp phân tích



Hình 2.1. Quá trình thủy phân trehalose theo phương pháp Kit-Trehalose (Megazyme)

2.3.2. Phương pháp xác định hàm lượng đường khử và đường tổng

Xác định hàm lượng đường khử, đường tổng theo phương pháp Miller, 1959 [8]. Lấy 5ml dịch mẫu bổ sung H₂SO₄ 6,5%, thủy phân 1 giờ ở 1000C. Trung hoà về pH 6,0 bằng Na₂CO₃ tinh thể. Lấy 0,5ml dịch mẫu bổ sung 0,5ml dung dịch DNS (6,5g 3,5 – dinitrosalicylic axit + 325ml dung dịch 2M NaOH + 45g glycerol hòa tan và định mức với nước cất thành 1000 ml) thủy phân ở 100⁰C trong thời gian 5 phút, kết thúc phản ứng làm nguội nhanh và đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 575nm.

2.3.1. Phương pháp xác định hàm lượng trehalose

Xác định hàm lượng trehalose theo phương pháp Kit-Trehalose K-TREH07/17 [7], trehalose được thủy phân và chuyển hóa bởi một loạt phản ứng enzyme (hình 2.1), sản phẩm cuối cùng là gluconate-6-phosphate và nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dạng khử (NADPH). Lượng NADPH hình thành trong phản ứng này có hệ số tỉ lệ bằng lượng D-glucoza và gấp hai lần lượng trehalose. NADPH hấp thụ ánh sáng cực tím và xác định hàm lượng trehalose thông qua lượng NADPH bằng đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 340nm.

Lượng đường khử có trong dịch sau đó được xác định nhờ đường chuẩn glucoza. Lượng đường tổng được tính theo công thức sau:

$$TS = RS \times 0,88$$

Trong đó: TS: đường tổng; RS: lượng đường khử có trong dịch phân tích.

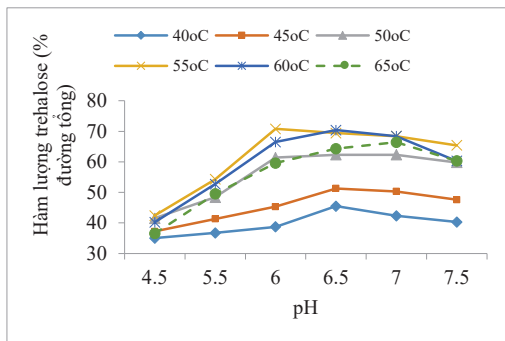
III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Nghiên cứu điều kiện chuyển tinh bột sắn thành trehalose

3.1.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH

Tinh bột sắn sau khi thủy phân (qua các giai đoạn: xử lý tinh bột, dịch hóa, đường

hóa) thu dịch thủy phân chứa maltooligosaccharit. Để xác định khoảng pH thích hợp cho quá trình chuyển hóa dịch thủy phân tinh bột sản thành trehalose, tiến hành ở điều kiện: nồng độ MTSase-MTHase là 200 U/g cơ chất, nồng độ tinh bột sản ban đầu là 20 g/l, nhiệt độ từ 45 – 65⁰C, pH từ 4,5 - 7,5, thời gian 24 giờ, khuấy 100 vòng/phút, bất hoạt enzyme ở 100⁰C trong 15 phút. Chỉ tiêu đánh giá là hàm lượng đường trehalose



Hình 1. Đồ thị miêu tả ảnh hưởng của nhiệt độ và pH tới quá trình chuyển hóa tinh bột sản thành trehalose

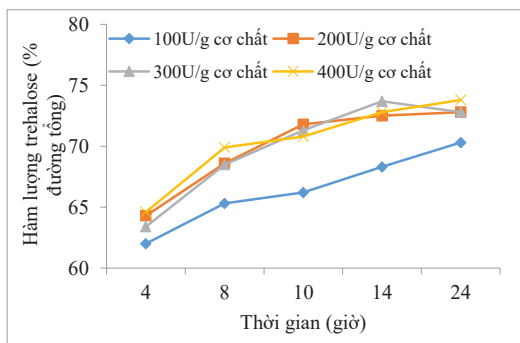
3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme MTSase -MTHase

Để xác định được một nồng độ enzyme thích hợp, tiến hành thí nghiệm với các điều kiện: nồng độ tinh bột 20 g/l, nhiệt độ 50⁰C, pH 6,0, thời gian 24 giờ. Bổ sung enzyme với tỷ lệ khác nhau từ 100 đến 400 U/g cơ chất, khuấy 100 vòng/phút.

Qua hình 2 thấy rằng: Khi tăng MTSase-MTHase từ 100 U/g đến 300 U/g cơ chất, hiệu suất chuyển hóa trehalose tăng, khi tăng nồng độ enzyme lớn hơn 300 U/g cơ chất hàm lượng trehalose giảm nhiều. Có thể do nồng độ cơ

so với đường tổng, kết quả được miêu tả tại hình 1.

Qua đồ thị hình 1 thấy rằng, khi nhiệt độ tăng 40-55⁰C tốc độ phản ứng tăng đạt cực đại tại 55⁰C, sau đó nhiệt độ tăng 60 – 66⁰C lại kìm hãm quá trình chuyển hóa trehalose; pH thích hợp trong khoảng 6,0-6,5. Như vậy, tại nhiệt độ 55⁰C và pH 6,0 lượng trehalose đạt cao nhất khoảng 70,8% so với đường tổng.



Hình 2. Đồ thị miêu tả ảnh hưởng của nồng độ enzyme MTHase-MTSase tới quá trình chuyển hóa tinh bột sản thành trehalose

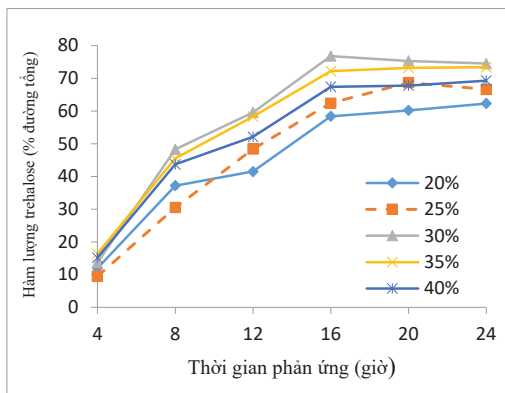
chất tăng đến mức bão hòa thì lúc này tốc độ của phản ứng không phụ thuộc vào nồng độ cơ chất, chất ức chế hoặc chất cảm ứng hoạt động của enzyme. Qua hình 2 thấy rằng việc sử dụng enzyme MTSase-MTHase thích hợp ở nồng độ 300 U/g cơ chất. Hàm lượng trehalose được tạo thành đạt 73,7% so với đường tổng.

3.1.3. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất

Theo tài liệu của các nghiên cứu trước cho thấy, enzyme MTSase-MTHase hoạt động đồng thời để chuyển hoá đường trehalose và chịu ảnh hưởng rất lớn của nồng độ cơ chất [2, 4]. Để xác

định nồng độ cơ chất thích hợp, thí nghiệm được tiến hành với dịch thủy phân tinh bột sắn nồng độ cơ chất ban đầu khác nhau từ 20% đến 40%, phản ứng ở điều kiện pH 6,0, nhiệt độ 55⁰C, bổ sung enzyme với tỷ lệ MTSase-MTHase 300 U/g cơ chất, khuấy 100 vòng/phút, thời gian 24 giờ. Sau mỗi 4 tiếng mỗi lần lấy mẫu để phân tích hàm lượng đường trehalose và đường tổng.

Hiệu suất chuyển hoá đường trehalose tăng nhanh theo sự tăng của nồng độ cơ chất từ 10-30%, tuy nhiên khi nồng độ cơ chất tăng lên 35% sẽ làm cho môi trường chuyển hoá có độ nhớt quá lớn,



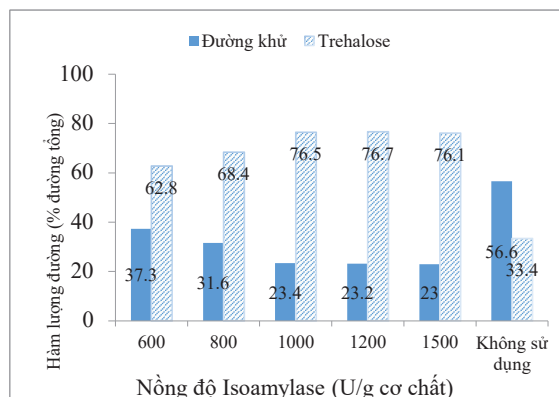
Hình 3. Đồ thị miêu tả ảnh hưởng của nồng độ cơ chất tới quá trình chuyển hóa trehalose

3.2. Nghiên cứu nâng cao hiệu suất chuyển hóa tinh bột sắn thành trehalose

3.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ enzyme isoamylase

Tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ enzyme isoamylase từ 600-1500 U/g tinh bột, nhiệt độ 55⁰C, pH = 6,0, thời gian 16 giờ. Kết thúc phản ứng xác định trehalose và đường khử tổng. Kết quả phân tích được thể hiện ở hình 3.

hạn chế sự khuếch tán trong dịch, hạn chế sự liên kết giữa cơ chất và enzyme, do đó làm giảm khả năng xúc tác của enzyme. Từ kết quả nghiên cứu ta nhận thấy, nồng độ cơ chất của phản ứng thích hợp nhất 30%, hàm lượng trehalose đạt 76,8% so với đường tổng. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu Iturriaga cho rằng enzyme xúc tác chuyển hóa maltooligosacharit thành trehalose trong điều kiện nồng độ cơ chất đậm đặc, nếu nồng độ cơ chất thấp, hoạt tính của enzyme sẽ chuyển sang hướng thủy phân, sản phẩm thu được khi đó chủ yếu là glucoza và oligosacharit khác [4].



Hình 4. Biểu đồ minh họa ảnh hưởng của nồng độ Isoamylase

Đối với sản xuất trehalose thì isoamylase được ưu tiên sử dụng hơn pullulanase do sự hình thành maltose và maltotriose hạn chế, sản phẩm chủ yếu gồm các maltooligosacharit có mức độ trùng hợp phân tử glucoza lớn hơn 3 sẽ thuận lợi cho quá trình chuyển hóa thành trehalose [9]. Kết quả ở hình 4 cũng thấy rằng khi sử dụng enzyme isoamylase cho quá trình đường hóa đã tăng hàm lượng maltooligosacharit, là

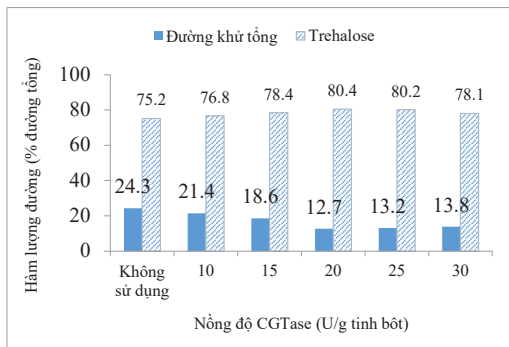
cơ chất để MTSase - MTHase chuyển hóa thành trehalose (mẫu đối chứng không sử dụng có kết quả khác biệt). Mặt khác, với nồng độ enzyme isoamylase từ 1000-1500 U/g tinh bột, hiệu quả thủy phân cao hơn tương ứng với các chuỗi glucoza dài hơn trong cơ chất và hàm lượng trehalose thu được đạt >76%, xét về mặt kinh tế chúng tôi lựa chọn sử dụng isoamylase ở nồng độ 1000 U/g tinh bột, hàm lượng trehalose đạt 76,5%.

3.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ enzyme cyclodextrin glycanotransferase

CGTase đã được áp dụng cho quá trình sản xuất để tăng sản lượng của tre-

halose. Enzyme được bổ sung cùng giai đoạn với quá trình chuyển hóa trehalose. Tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ enzyme CGTase ở nồng độ 10 U, 15 U, 20 U, 25 U, 30 U/g tinh bột, quá trình dịch hóa, đường hóa và chuyển hóa trehalose ở các điều kiện đã xác định. Kết quả xác định hàm lượng trehalose và đường khử tổng được thể hiện ở hình 5.

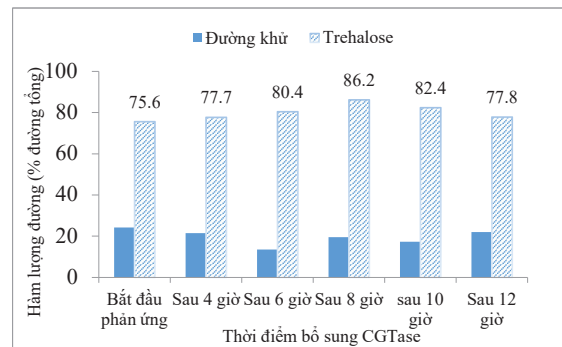
Như thể hiện trong hình 5, việc bổ sung CGTase vào hỗn hợp phản ứng đã giảm lượng đường khử và tăng hàm lượng trehalose tạo thành. Ở nồng độ enzyme CGTase 20 U/g tinh bột, hàm lượng trehalose đạt cao nhất 80,4% sau 24 giờ phản ứng.



Hình 5. Biểu đồ minh họa ảnh hưởng của nồng độ CGTase

3.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời điểm bổ sung enzyme cyclodextrin glycanotransferase

Thời điểm bổ sung CGTase có ảnh hưởng nhiều tới việc tăng năng suất thu nhận trehalose, tiến hành nghiên cứu thời điểm bổ sung CGTase tại 0,4,6,8,10 giờ sau khi phản ứng chuyển hóa trahalose bắt đầu, kết quả phân tích hàm lượng trehalose được trình bày tại hình 6.



Hình 6. Biểu đồ minh họa ảnh hưởng của thời điểm bổ sung CGTase

Qua hình 6 thấy rằng, thời điểm bổ sung CGTase trong giai đoạn đầu phản ứng không có sự khác biệt nhiều, sau 4-6 giờ phản ứng trehalose tạo thành có tăng so với thời điểm bổ sung ngay ban đầu phản ứng, sau 4 giờ, 6 giờ phản ứng (tăng 2% và 6% tương ứng). Tại thời điểm bổ sung CGTase sau 8 giờ phản ứng hàm lượng trehalose đạt cao nhất là 86,2% (tăng 14% so với so với thời điểm bổ sung ngay ban đầu phản ứng).

Theo các tác giả thì thời điểm bổ sung CGTase phù hợp trong khoảng từ 6-10 giờ sau khi phản ứng chuyển hóa trehalose bắt đầu, thời điểm bổ sung CGTase phụ thuộc vào mức độ thủy phân của giai đoạn đường hóa, phụ thuộc vào nồng độ enzyme và cơ chất chuyển hóa trehalose [5, 9].

IV. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy sử dụng kết hợp enzyme MTSase-MTHase cùng với isoamylase và CGTase đã tăng hiệu quả tổng hợp trehalose từ tinh bột sắn. Các điều kiện thích hợp: giai đoạn đường hóa (isoamylase nồng độ 1000 U/g tinh bột; nhiệt độ 55⁰C; pH 6,0; thời gian 16 giờ, khuấy 100 rpm); giai đoạn chuyển hóa tổng hợp trehalose (MTSase-MTHase nồng độ 300 U/g tinh bột; nhiệt độ 55⁰C; pH 6,0, bổ sung CGTase sau 8 giờ phản ứng, thời gian 24 giờ). Kết thúc quá trình chuyển hóa hàm lượng trehalose đạt 86,2% so với đường tổng.

Lời cảm ơn: Kết quả thực hiện là một phần kết quả của đề tài ĐT. 03.17/ CNSH CB, kinh phí tài trợ bởi Đề án phát triển và ứng dụng CNSH trong lĩnh vực CN chế biến đến năm 2020.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Minh Hạnh and cộng sự (2006). Báo cáo tổng kết đề tài Nghiên cứu xây dựng công nghệ sản xuất các loại đường chức năng dùng trong công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm. Mã số KC.04.28. Chương trình KH&CN trọng điểm giai đoạn 2005-2010.
2. Burek, M., et al. (2015). *Trehalose – properties, biosynthesis and applications*. *Chemilk*. 69(8): p. 469–476.
3. Higashiyama, T. (2002). *Novel functions and applications of trehalose*. *Pure Appl Chem*. 74: p. 1263-1269.
4. Iturriaga, G., R. Suárez, and B. Nova-Franco (2009). *Trehalose Metabolism: From Osmoprotection to Signaling*. *International Journal of Molecular Sciences*. 10: p. 3793-3810.
5. Kubota, M., et al. (2004). *The Development of α , α -Trehalose Production and Its Applications*. *J. Appl. Glycosci*. 51: p. 63-70.
6. Maruta, K., et al. (1995). *Formation of trehalose from maltooligosaccharides by a novel enzymatic system*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 59: p. 1829-1834.
7. Megazyme https://secure.megazyme.com/files/BOOKLET/K-TREH_DATA.pdf.
8. Miller, G.L. (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars*. *Analytical Chemistry*. 31: p. 326–328.
9. Schiraldi, C., I.D. Lernia, and M.D. Rosa (2002). *Review: Trehalose production: exploiting novel approaches*. *Trends in Biotechnology*. 20(10): p. 420-425.
10. Teramoto, N., N.D. Sachinvala, and M. Shibata (2008). *Review Trehalose and Trehalose-based Polymers for Environmentally Benign, Biocompatible and Bioactive Materials*. *Molecules* 13: p. 1773-1816.

Summary**RESEARCH ON OPTIMAL CONDITIONS FOR THE CONVERSION AND SYNTHESIS OF TREHALOSE FROM CASSAVA STARCH BY ENZYMEATIC METHOD**

The method of producing trehalose from cassava starch using maltooligosyl trehalose synthase (MTSase) and maltooligosyl trehalose trehalohydrolase (MTHase) was highly effective and could be applied in large-scale production. This research used MTSase and MTHase enzymes obtained from *Saccharolobus solfataricus* DSM 1616 strain to convert and synthesize trehalose from cassava starch. Cassava starch solution containing maltooligosaccharide was hydrolyzed under appropriate conditions: optimum pH of 6.0 and temperature of 55°C; MTSase-MTHase at 300U / g starch; adding CGTase after 8 hours of reaction, time of metabolism 24 hours. To improve the conversion efficiency of starch into trehalose, hydrolytic enzyme as isoamylase (1000U / g starch) and CGTase enzyme (20U / g starch) were added. The results showed that, after the hydrolysis and conversion of cassava starch by enzyme method, the content of trehalose reached 86.2% of the total sugar. In conclusion, maltooligosyl trehalose synthase and maltooligosyl trehalose trehalohydrolase could be used to produce trehalose from available cassava starch sources in Vietnam.

Keywords: *Maltooligosyl trehalose synthase, maltooligosyl trehalose trehalohydrolase, maltooligosaccharit, cassava starch.*

