

Tối ưu hóa quá trình thủy phân Chitosan bằng Enzyme Cellulase để tạo Chitoooligosaccharide

Bùi Văn Hoài, Đào An Quang và Ngô Đại Nghiệp

Tóm tắt— Nhằm tăng độ hòa tan trong nước của chitosan và tiềm năng ứng dụng cho các sản phẩm tốt cho sức khỏe con người, chúng tôi thực hiện nghiên cứu tối ưu quá trình thủy phân bằng enzyme cellulase để tạo Chitoooligosaccharide (COS). Chitosan có độ deacetyl lớn hơn 80% và enzyme cellulase được sử dụng trong nghiên cứu này. Phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) – phương án cấu trúc có tâm (CCD) được sử dụng để tối ưu quá trình thủy phân. Kết quả nghiên cứu đã tìm được các giá trị tối ưu cho quá trình thủy phân như nhiệt độ 49 °C; pH 5,9; nồng độ cơ chất 0,76 %; nồng độ enzyme 8,97 U/g; thời gian thủy phân 180 phút. COS được tạo ra có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 10 kDa chiếm hơn 90%. Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho tạo bột COS tan trong nước.

Từ khóa— Chitosan, Chitoooligosaccharide, Cellulase, RSM – CCD

1 GIỚI THIỆU

Chitin là một polymer của *N*-Acetylglucosamine có nhiều trong lớp vỏ các loài giáp xác, thành tế bào của nấm và côn trùng. Chitosan là dẫn xuất của chitin là một polysaccharide mạch thẳng, được cấu tạo từ các đơn phân D-Glucosamine liên kết với nhau qua

các liên kết beta-1,4-glucoside, vì vậy chitosan còn được gọi là poly-1,4-Glucosamine [1].

Chitosan được sử dụng làm nguyên liệu sinh hóa bởi những hoạt tính kháng khuẩn, giảm cholesterol, giảm huyết áp, kháng viêm, kháng oxy hóa, v.v.. Ngoài ra, chitosan là nguyên liệu rẻ tiền, dễ phân hủy sinh học và không độc vì vậy được ứng dụng rất nhiều và đa dạng trong công nghiệp thực phẩm [2]. Mặc dù, chitosan có nhiều chức năng hiệu quả trong nhiều lĩnh vực, nhưng chúng có trọng lượng phân tử lớn và độ nhớt cao nên khó ứng dụng trong cơ thể. Hơn nữa, chitosan không được ruột non hấp thu vì hệ tiêu hóa của động vật, đặc biệt là hệ tiêu hóa của cơ thể người không có hệ enzyme chitinase và chitosanase để thủy phân chúng thành những chất có trọng lượng phân tử thấp dễ cơ thể hấp thu. Vì vậy, ảnh hưởng của chitosan trong cơ thể vẫn chưa rõ ràng. Tuy nhiên, trong những năm gần đây đã có nhiều nghiên cứu chuyển chitosan thành dẫn xuất của chúng [1].

Chitoooligosaccharide (COS) là dạng oligomer của chitosan nên nó mang được hầu hết những hoạt tính sinh học của chitosan như kháng oxy hóa, kháng nấm, kháng khuẩn, kháng ung thư, tăng cường miễn dịch, v.v.. Các tính chất này phụ thuộc rất nhiều vào độ polymer hóa, độ deacetyl hóa, sự phân bố điện tích và bản chất các biến đổi hóa học trên phân tử của COS. Với hoạt tính vốn có và khả năng hòa tan trong nước, COS tiềm năng ứng dụng vào sản phẩm thực phẩm nhằm mang lại lợi ích sức khỏe con người [3].

COS có thể được thu nhận bằng hai phương pháp: hóa học và enzyme. Trường hợp thủy phân chitosan để thu COS bằng phương pháp hóa học thường độc cho cơ thể. Trong khi đó, thủy phân chitosan để thu COS bằng enzyme sẽ an toàn, không độc và thân thiện môi trường [1].

COS được sản xuất từ chitosan bởi enzyme đặc hiệu như chitosanase và không đặc hiệu như cellulase, lipase, papain, lysozyme, hemicellulase, pectinase, pepsin, v.v.. Hạn chế khi sử dụng

Bài báo đã nhận vào ngày 15 tháng 3 năm 2017, đã được phân biện chỉnh sửa vào ngày 01 tháng 11 năm 2017.

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.02-2014.87.

Bùi Văn Hoài, Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học-Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM. Số 227, Nguyễn Văn Cừ, P.4, Quận 5, Tp.HCM. và Trung tâm Thí nghiệm thực hành, Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp Hồ Chí Minh. (email: hoaibv@cntp.edu.vn)

Đào An Quang, Trung tâm Thí nghiệm thực hành, Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp Hồ Chí Minh. Số 140, Lê Trọng Tấn, P.Tây Thạnh, Q. Tân Phú, Tp.HCM. (email: quangda@cntp.edu.vn)

Ngô Đại Nghiệp, Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học-Công nghệ sinh học và Phòng thí nghiệm Công nghệ Enzyme, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM. Số 227, Nguyễn Văn Cừ, P.4, Quận 5, Tp.HCM. (email: ndnghep@hcmus.edu.vn)

enzyme đặc hiệu là giá thành cao và sự thiếu hụt về số lượng khi sử dụng quy mô lớn. Vì lý do này, các nhà nghiên cứu và sản xuất thường nghiên cứu và lựa chọn loại enzyme không đặc hiệu thương mại, những enzyme không đặc hiệu này cho hiệu quả tạo COS tương tự như enzyme đặc hiệu trong khi giá thành lại thấp [4].

Cellulase là enzyme không đặc hiệu có khả năng thủy phân chitosan để tạo COS. Sản phẩm tạo ra có trọng lượng phân tử thấp, hòa tan tốt trong nước và không có sự thay đổi về cấu trúc của sản phẩm. Cellulase là loại enzyme có nhiều trong tự nhiên, được thu nhận từ các nguồn như vi khuẩn, nấm và thực vật [5].

Cellulase là nhóm enzyme thủy phân có khả năng cắt mỗi liên kết β -1,4-O-glycoside trong phân tử cellulose. Cellulase là phức gồm nhiều enzyme khác nhau và được xếp thành ba nhóm cơ bản endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-glucanase và β -glucosidase. Mỗi loại enzyme xúc tác phản ứng thủy phân cơ chất theo cơ chế nhất định và nhờ sự phối hợp của các enzyme đó mà cơ chất được thủy phân tạo các cơ chất thấp phân tử hơn [6].

Phương pháp thủy phân chitosan bằng enzyme là phương pháp cho hiệu suất thu hồi các phân đoạn có hoạt tính cao. Điều kiện diễn ra phản ứng thủy phân nhẹ nhàng, nhiệt độ thấp, pH trung tính nên chi phí thiết bị thấp, không gây ô nhiễm môi trường và sản phẩm tạo ra được sử dụng an toàn hơn cho con người, hơn nữa việc sử dụng enzyme không đặc hiệu cellulase có giá thành thấp góp phần tăng hiệu quả kinh tế. Vì những lý do nêu trên chúng tôi chọn enzyme không đặc hiệu cellulase cho nghiên cứu này [6].

Để tiết kiệm chi phí trong sản xuất COS cũng như thu nhận hiệu suất thu hồi sản phẩm là cao nhất, tối ưu hóa quá trình thủy phân chitosan thu nhận COS là rất cần thiết để ứng dụng trong sản xuất công nghiệp. Tối ưu hóa đơn yếu tố không đánh giá được sự tương tác giữa các yếu tố. Để khắc phục vấn đề này, chúng tôi chọn phương pháp đáp ứng bề mặt để tối ưu các giá trị của các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân chitosan. Phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) là phương pháp được áp dụng rộng rãi để tối ưu các yếu tố của quá trình trong sinh học, thực phẩm, hóa học, v.v..

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Chitosan (mức độ deacetyl > 80%) được cung cấp bởi công ty Chitosan Việt Nam, Số 23/6 Ngõ Thời Nhiệm, Rạch Giá, Kiên Giang. Cellulase (Fungal cellulase, 4000 UI/g, *Trichoderma viride*) được cung cấp bởi hãng Zeon-Health (India). Acid lactic 88% dùng trong thực phẩm (India), NaHCO₃ (India), Acid-3,5-dinitrosalicylic [DNS] (Merck).

2.2 Chuẩn bị dung dịch chitosan

Dung dịch chitosan (0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2%, w/v) được chuẩn bị theo mô tả của Jeon và Kim (2000) với vài thay đổi nhỏ. Quy trình cụ thể như sau: chitosan hòa tan trong acid lactic (0,8%; v/v), khuấy liên tục trong 1 giờ, chỉnh pH bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa.

2.3 Phương pháp tối ưu hóa thủy phân chitosan bằng enzyme cellulase.

2.3.1 Khảo sát các thí nghiệm tại tâm của các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân chitosan tạo COS.

Khảo sát các thí nghiệm tại tâm của các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân chitosan tạo COS dựa theo nghiên cứu trước đó của Jeon và Kim (2000) với vài thay đổi nhỏ. Cụ thể như sau:

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Các yếu tố được cố định: nồng độ enzyme: 5 UI/g; pH: 5,5; nồng độ cơ chất: 1%; thời gian thủy phân: 60 phút.

Các mức nhiệt độ khảo sát: 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C.

Cách tiến hành: 10 ml dung dịch chitosan 1% đã được chỉnh pH 5,5 bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa. Lượng enzyme được lấy theo nồng độ trên. Gia nhiệt chitosan và enzyme bằng nhiệt độ khảo sát. Trộn enzyme và chitosan, ủ hỗn hợp tại các mức nhiệt độ khảo sát, tính thời gian thủy phân. Mẫu sau khi thủy phân được đun sôi 10 phút để dừng quá trình thủy phân. Xác định hàm lượng đường khử tạo ra bằng phương pháp có sử dụng DNS. Kết quả thu được giữ cho thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của pH

Các yếu tố được cố định: nồng độ enzyme 5 UI/g, nồng độ cơ chất 1%, thời gian thủy phân 60 phút, nhiệt độ được chọn từ thí nghiệm khảo sát nhiệt độ.

Các mức pH khảo sát: 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5.

10 ml dung dịch chitosan 1% đã được chỉnh pH theo các mức khảo sát bằng dung dịch NaHCO₃

bão hòa. Lượng enzyme được lấy theo nồng độ cố định trên. Gia nhiệt chitosan và enzyme đến nhiệt độ đã được chọn trước đó. Trộn enzyme và chitosan, ủ hỗn hợp, tính thời gian thủy phân. Mẫu sau thủy phân được đun sôi 10 phút để dừng quá trình thủy phân. Xác định hàm lượng đường khử tạo ra bằng phương pháp có sử dụng DNS. Kết quả thu được giữ cho thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất.

Các yếu tố được cố định: nồng độ enzyme: 5 UI/g, thời gian thủy phân: 60 phút, nhiệt độ được chọn từ thí nghiệm khảo sát nhiệt độ, pH được chọn từ thí nghiệm khảo sát pH.

Các mức nồng độ cơ chất thay đổi 0,6%; 0,8%, 1%; 1,2%; 1,4%.

10 ml dung dịch chitosan được pha theo các mức nồng độ cơ chất khảo sát và đã được chỉnh pH đến pH đã được chọn trước đó bằng dung dịch NaHCO_3 bão hòa. Lượng enzyme được lấy theo nồng độ cố định trên. Gia nhiệt chitosan và enzyme đến nhiệt độ đã được chọn trước đó. Trộn enzyme và chitosan, ủ hỗn hợp, tính thời gian thủy phân. Mẫu sau thủy phân được đun sôi 10 phút để dừng quá trình thủy phân. Xác định hàm lượng đường khử tạo ra bằng phương pháp có sử dụng DNS. Kết quả thu được giữ cho thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của nồng độ enzyme.

Các yếu tố được cố định: thời gian thủy phân: 60 phút, nhiệt độ được chọn từ thí nghiệm khảo sát nhiệt độ, pH được chọn từ thí nghiệm khảo sát pH, nồng độ cơ chất được chọn từ thí nghiệm khảo sát cơ chất.

Các mức nồng độ enzyme thay đổi: 1 UI/g, 3 UI/g, 5 UI/g, 7 UI/g, 9 UI/g.

10 ml dung dịch chitosan được pha theo nồng độ và được chỉnh pH đến pH đã được chọn từ thí nghiệm khảo sát trước đó. Lượng enzyme được lấy theo các mức nồng độ trên. Gia nhiệt chitosan và enzyme đến nhiệt độ đã được chọn trước đó. Trộn enzyme và chitosan, ủ hỗn hợp, tính thời gian thủy phân. Mẫu sau thủy phân được đun sôi 10 phút để dừng quá trình thủy phân. Xác định hàm lượng đường khử tạo ra bằng phương pháp có sử dụng DNS. Kết quả thu được giữ cho thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của thời gian thủy phân.

Các yếu tố được cố định: nhiệt độ được chọn từ thí nghiệm khảo sát nhiệt độ, pH được chọn từ thí nghiệm khảo sát pH, nồng độ cơ chất được chọn từ thí nghiệm khảo sát cơ chất, nồng độ enzyme được chọn từ thí nghiệm khảo sát nồng độ enzyme.

Các mức thời gian hay đổi: 30 phút, 60 phút, 90 phút, 120 phút, 150 phút, 180 phút.

10 ml dung dịch chitosan được pha theo nồng độ và được chỉnh pH đến pH đã được chọn từ thí nghiệm khảo sát trước đó. Lượng enzyme được lấy theo nồng độ đã được chọn từ thí nghiệm khảo sát trước đó. Gia nhiệt chitosan và enzyme đến nhiệt độ đã được chọn trước đó. Trộn enzyme và chitosan, ủ hỗn hợp, tính thời gian thủy phân theo các mức thời gian thay đổi. Mẫu sau thủy phân được đun sôi 10 phút để dừng quá trình thủy phân. Xác định hàm lượng đường khử tạo ra bằng phương pháp có sử dụng DNS.

2.3.2 Phương pháp tối ưu hóa.

Phương pháp quy hoạch thực nghiệm (QHTN) với phương án cấu trúc có tâm (CCD) và nghiên cứu bề mặt đáp ứng (RSM) được biểu diễn dưới dạng đa thức bậc hai được áp dụng để tối ưu hóa quá trình thủy phân chitosan thu nhận COS [7].

Nội dung cụ thể các bước như sau:

Bước 1: Thông số tối ưu hóa cho điều kiện thủy phân là hàm lượng đường khử. Các yếu tố được lựa chọn sẽ ảnh hưởng đến quá trình thủy phân là: nhiệt độ, pH, nồng độ cơ chất, nồng độ enzyme, thời gian thủy phân.

Bước 2: Dùng phương pháp cổ điển khảo sát các mức cơ sở, khoảng biến thiên và mức biến thiên của các yếu tố.

Bước 3: Ma trận thực nghiệm để tối ưu các yếu tố.

Ma trận thực nghiệm để tối ưu các yếu tố được thiết kế theo mô hình CCD với nhân phương án là yếu tố từng phần 2^{5-1} , được nghiên cứu tại 5 mức (- α , -1, 0, +1, + α) với ($\alpha = 2$). Số thí nghiệm được thiết kế là 29 thí nghiệm trong đó số thí nghiệm tại tâm là 3 (Bảng 1).

BẢNG 1
MA TRẬN QHTN TỐI ƯU 5 YẾU TỐ THEO PHƯƠNG AN TUNG PHẦN

STT TN	X1	X2	X3	X4	X5
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1

11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	1
17	-2	0	0	0	0
18	2	0	0	0	0
19	0	-2	0	0	0
20	0	2	0	0	0
21	0	0	-2	0	0
22	0	0	2	0	0
23	0	0	0	-2	0
24	0	0	0	2	0
25	0	0	0	0	-2
26	0	0	0	0	2
27	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0

Bước 4: Tiến hành thí nghiệm và thu nhận các giá trị thực nghiệm.

Bước 5: Xây dựng phương trình quy hoạch thực nghiệm.

Hàm đáp ứng được lựa chọn là lượng đường khử (Y, mg/g) mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc 2:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_5X_5 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{15}X_1X_5 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{25}X_2X_5 + b_{34}X_3X_4 + b_{35}X_3X_5 + b_{45}X_4X_5 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{44}X_4^2 + b_{55}X_5^2. \quad (1)$$

Phương trình (1) [7] là cơ sở để xác định các giá trị tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng nói trên.

Trong đó: x_1, x_2, x_3, x_4, x_5 lần lượt là các yếu tố nhiệt độ, pH, nồng độ cơ chất, hoạt tính enzyme, thời gian; b_1, b_2, b_3, b_4, b_5 là các hệ số bậc 1; $b_{11}, b_{22}, b_{33}, b_{44}, b_{55}$ là các hệ số bậc 2; $b_{12}, b_{13}, b_{14}, b_{15}, b_{23}, b_{24}, b_{25}, b_{34}, b_{35}, b_{45}$ là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; $x_1, x_2, x_3, x_4, x_5, x_{11}, x_{22}, x_{33}, x_{44}, x_{55}, x_{12}, x_{13}, x_{14}, x_{15}, x_{23}, x_{24}, x_{25}, x_{34}, x_{35}, x_{45}$ là các biến độc lập.

Bước 6: Phân tích số liệu bằng phần mềm MODDE 5.

Từ kết quả phân tích, xác định mức tối ưu của các yếu tố cho lượng đường khử là cực đại.

2.3.3Thí nghiệm xác minh điểm tối ưu

Điểm tối ưu dự đoán bởi phương trình hồi qui được tiến hành xác nhận lại bằng thực nghiệm.

Kết quả thực nghiệm sẽ được so sánh với kết quả dự đoán để kiểm tra sự khác biệt về mật thống kê với $P < 0.05$.

2.4 Phương pháp xác định hàm lượng đường khử (D-Glucosamine) theo phương pháp có sử dụng DNS (Dinitrosalicylic).

2.4.1Nguyên tắc

Phương pháp này dựa vào phản ứng tạo màu giữa đường khử với thuốc thử DNS trong môi trường kiềm nóng. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỷ lệ thuận với nồng độ đường khử. Dựa vào đồ thị đường chuẩn của D-Glucosamine tinh khiết với thuốc thử DNS để tính hàm lượng đường khử của mẫu nghiên cứu [8].

2.4.2Tiến hành

Đường khử được xác định theo mô tả của Wood and Bhat (1988). Cụ thể như sau, trộn đều 1 ml dung dịch đường cần được phân tích và 3 ml thuốc thử DNS trong ống nghiệm ($\phi=18\text{mm}$). Đặt ống nghiệm vào bể cách thủy đang đun sôi, sau 5 phút lấy ống nghiệm ra làm nguội nhanh đến nhiệt độ phòng. Đo mật đo quang ở bước sóng 540 nm. Mẫu đối chứng được tiến hành tương tự nhưng dung dịch đường được thay thế bằng nước cất 1 lần. Đường chuẩn được xây dựng trước đó với nồng độ D-Glucosamine chuẩn thay đổi từ 0,1-0,5 mg/ml. Hàm lượng đường khử có trong mẫu phân tích được tính từ mối tương quan giữa mật độ quang và hàm lượng đường khử đã dựng trước đó.

2.5 Phương pháp phân tích COS bằng sắc ký gel thẩm qua.

Trọng lượng phân tử của COS sau quá trình tối ưu được phân tích bằng sắc ký gel thẩm qua [Gel Permeation Chromatography]. Thiết bị phân tích sắc ký gel thẩm qua: Sử dụng máy HPLC 1100 của hãng Agilent, Cột Ultrahydrogel 500, 10 μm (300 mm x 7,8 mm). Thông số phân tích mẫu: Pha động: Đệm $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$, Nhiệt độ lò cột: 40 $^\circ\text{C}$, tốc độ dòng pha động: 1 ml/phút, Thể tích mẫu tiêm: 20 μl [1]

2.6 Phân tích thống kê

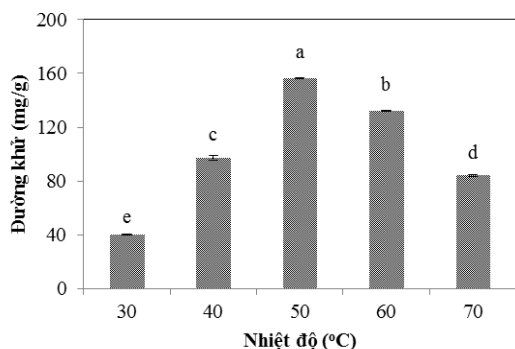
Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, thực hiện theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên. Kết quả thu được xử lý bằng phần mềm thống kê Statgraphic với độ tin cậy 95%. Sử dụng phương pháp xử lý phân tích ANOVA, so sánh sự khác biệt các giá trị trung bình dựa trên kiểm định LSD. Phần mềm Modde 5.0 được ứng dụng để quy hoạch thực nghiệm thu nhận COS.

3 KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1 Khảo sát các thí nghiệm tại tâm của các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân chitosan tạo COS.

Ảnh hưởng của nhiệt độ

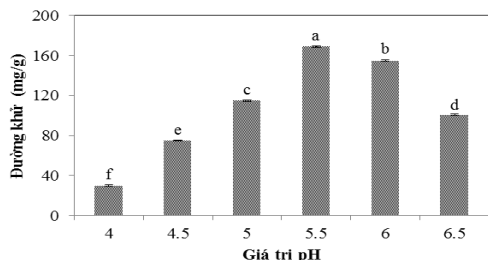
Kết quả khảo sát ở Hình 1 cho thấy, khi thủy phân tại nhiệt độ 50 °C, hàm lượng đường khử đạt cao nhất là 156 mg/g. Các khảo sát tại nhiệt độ 30, 40, 60, 70 °C hàm lượng đường khử thu được lần lượt là 40, 97, 132, 84 mg/g. Nhiệt độ 50 °C được chọn làm thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Thể hiện sự thay đổi hàm lượng đường khử theo nhiệt độ. Điều kiện tiến hành thí nghiệm: Các yếu tố được cố định: nồng độ enzyme: 5 UI/g; pH: 5,5; nồng độ cơ chất: 1%; thời gian thủy phân: 60 phút. Các mức nhiệt độ khảo sát: 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C. Kết quả được tính dựa trên giá trị trung bình với độ lệch chuẩn n=3, abcde là các ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$).

Ảnh hưởng của pH

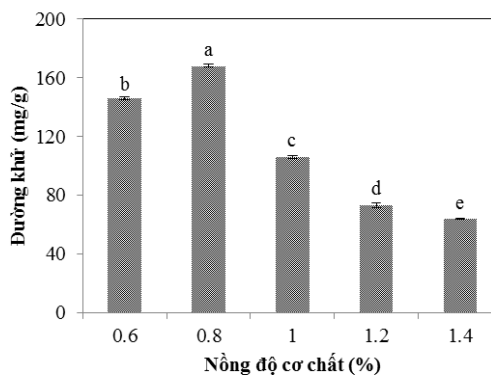
Kết quả khảo sát ở Hình 2 cho thấy, khi thủy phân tại pH 5,5 hàm lượng đường khử đạt cao nhất là 169 mg/g. Các khảo sát tại pH 4; 4,5; 5; 6; 6,5 hàm lượng đường khử thu được lần lượt là 30, 75, 115, 155, 101 mg/g. pH 5,5 được chọn làm thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2. Thể hiện sự thay đổi hàm lượng đường khử theo PH. Điều kiện tiến hành thí nghiệm: Các yếu tố được cố định: nồng độ enzyme 5 UI/g, nồng độ cơ chất 1%, thời gian thủy phân 60 phút, nhiệt độ: 50°C. Các mức pH khảo sát: 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5. Kết quả được tính dựa trên giá trị trung bình với độ lệch chuẩn n=3, abcd là các ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$).

Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất

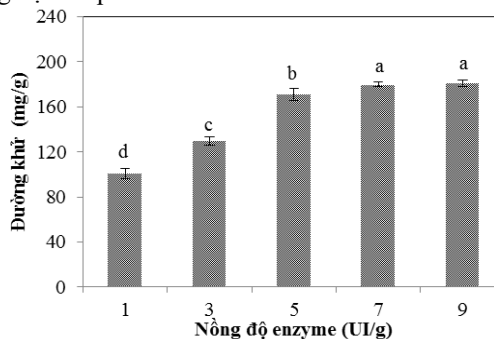
Kết quả khảo sát cho thấy, khi thủy phân tại nồng độ cơ chất 0,8 %, hàm lượng đường khử đạt cao nhất là 168 mg/g. Các khảo sát tại nồng độ cơ chất 0,6; 1; 1,2; 1,4 % hàm lượng đường khử thu được lần lượt là 146, 106, 73, 64 mg/g. Nồng độ cơ chất 0,8% được chọn làm thí nghiệm tiếp theo. Kết quả khảo sát được trình bày ở Hình 3.



Hình 3. Thể hiện sự thay đổi hàm lượng đường khử theo cơ chất. Điều kiện tiến hành thí nghiệm: Các yếu tố được cố định: nồng độ enzyme: 5 UI/g, thời gian thủy phân: 60 phút, nhiệt độ: 50°C, pH: 5,5. Các mức nồng độ cơ chất thay đổi 0,6%; 0,8%, 1%; 1,2%; 1,4%. Kết quả được tính dựa trên giá trị trung bình với độ lệch chuẩn n=3, abcde là các ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$).

Ảnh hưởng của nồng độ enzyme

Kết quả khảo sát ở Hình 4 cho thấy, khi thủy phân tại nồng độ enzyme 9 UI/g, hàm lượng đường khử đạt cao nhất là 181 mg/g. Tuy nhiên không có sự khác biệt tại nồng độ enzyme 7 UI/g với hàm lượng đường khử là 180 mg/g. Các khảo sát tại nồng độ enzyme 1, 3, 5 UI/g hàm lượng đường khử thu được lần lượt là 101, 129, 171 mg/g. Nồng độ enzyme 7 UI/g được chọn làm thí nghiệm tiếp theo.

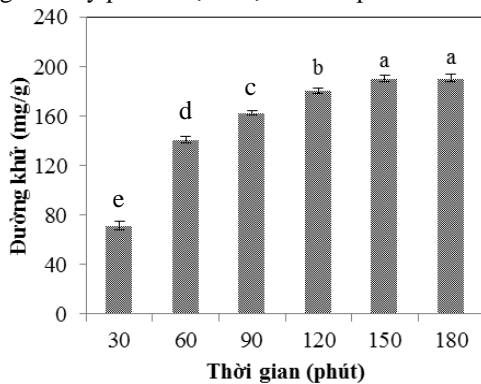


Hình 4. Thể hiện sự thay đổi hàm lượng đường khử theo nồng độ enzyme. Điều kiện tiến hành thí nghiệm: Các yếu tố được

cố định: thời gian thủy phân: 60 phút, nhiệt độ: 50°C, pH: 5,5, nồng độ cơ chất: 0,8%. Các mức nồng độ enzyme thay đổi: 1 UI/g, 3 UI/g, 5 UI/g, 7 UI/g, 9 UI/g. Kết quả được tính dựa trên giá trị trung bình với độ lệch chuẩn n=3, abcd là các ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê (p<0,05).

Ảnh hưởng của thời gian thủy phân

Kết quả khảo sát ở Hình 5 cho thấy, khi thủy phân dừng tại thời điểm 180 phút, hàm lượng đường khử đạt cao nhất là 191 mg/g. Tuy nhiên không có sự khác biệt khi thủy phân dừng tại thời điểm 150 phút với hàm lượng đường khử là 190 mg/g. Các khảo sát khi thủy phân dừng tại thời điểm 30, 60, 90, 120 phút hàm lượng đường khử thu được lần lượt là 71, 140, 162, 181 mg/g. Thời gian thủy phân được chọn là 150 phút.



Hình 5. Thể hiện sự thay đổi hàm lượng đường khử theo thời gian. Điều kiện tiến hành thí nghiệm: Các yếu tố được cố định: nồng độ enzyme: 7 UI/g, nhiệt độ: 50°C, pH: 5,5, nồng độ cơ chất: 0,8%. Các mức thời gian thay đổi: 30 phút, 60 phút, 90 phút, 120 phút, 150 phút, 180 phút. Kết quả được tính dựa trên giá trị trung bình với độ lệch chuẩn n=3, abcde là các ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê (p<0,05).

3.2 Kết quả tối ưu hóa

Để xây dựng mô tả toán học dưới dạng phương trình hồi qui, cần phải tiến hành xác định các hệ số của phương trình. Kết quả tính toán và kiểm tra ý nghĩa các hệ số của phương trình hồi qui được thể hiện ở bảng 2. Kết quả xử lý số liệu cho thấy tất cả các hệ số đều có ý nghĩa thống kê (P < 0,05). Phương trình hồi qui thực nghiệm có dạng như sau:

$$Y = 182,553 + 18,129X_1 + 34,211X_2 + 9,983X_4 - 15,889X_1X_2 - 10,9X_1X_5 + 11,075X_4X_5 - 24,527X_1^2 - 24,804X_2^2 - 11,429X_3^2 - 10,321 X_4^2$$

Kết quả kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi qui với thực nghiệm (bảng 3) cho thấy các yếu tố thí nghiệm có ảnh hưởng mạnh lên hiệu quả thu nhận đường khử (P < 0,05). Tính tương thích của phương trình hồi qui (lack of fit) được kiểm tra với sự hỗ trợ của phần mềm Modde 5.0.

Phương trình hồi qui sẽ tương thích với thực nghiệm nếu kết quả phân tích “lack of fit” là không có ý nghĩa thống kê [9]. Kết quả ở bảng 3 cho thấy kiểm định “lack of fit” là không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05); như vậy, phương trình hồi qui có sự tương thích cao với thực nghiệm. Như vậy, mô hình thống kê này có thể được sử dụng để dự đoán điều kiện tối ưu của quá trình thủy phân. Bề mặt đáp ứng và đường đồng mức mô tả cho phương trình hồi qui thực nghiệm được thể hiện ở Hình 6.

BẢNG 2
KẾT QUẢ TÍNH TOÁN VÀ KIỂM TRA Ý NGHĨA CÁC HỆ SỐ CỦA PHƯƠNG TRÌNH HỒI QUI

Hệ số	Giá trị ước lượng	Giá trị P
b ₀	182,553	< 0,0001
b ₁	18,129	< 0,0001
b ₂	34,211	< 0,0001
b ₄	9,983	< 0,0001
b ₁₂	-15,889	< 0,01
b ₁₅	-10,9	< 0,01
b ₄₅	11,075	< 0,0001
b ₁₁	-24,527	< 0,0001
b ₂₂	-24,804	< 0,05
b ₃₃	-11,429	< 0,001
b ₄₄	-10,321	< 0,001

BẢNG 3
KẾT QUẢ KIỂM TRA TÍNH TƯƠNG THÍCH CỦA PHƯƠNG TRÌNH HỒI QUI

Nguồn	Bậc tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Mô hình	20	73268,4	3663,42	28,9033	0,000
Phần dư	8	1013,98	126,747		
Sự thiếu phù hợp	6	994,539	165,756	17,0531	0,056

Hiệu quả thu nhận đường khử tốt nhất được tìm ra thông qua quá trình tối ưu hóa bằng phần mềm Modde 5.0 (Umetrics AB). Kết quả tối ưu hóa cho thấy, khi tổ hợp cả 5 yếu tố thí nghiệm, lượng đường khử thu được cao nhất là 206,201 mg/g với điều kiện thủy phân như sau: nhiệt độ 49 °C, pH là 5,9; nồng độ cơ chất 0,76%; hoạt tính enzyme 8,97 UI/g thời gian thủy phân 180 phút.

3.3 Kết quả xác minh điểm tối ưu

Điều kiện tối ưu dự đoán bằng phần mềm Mode 5.0 được xác minh lại bằng thực nghiệm. Kết quả được trình bày tại bảng 4.

BẢNG 4
KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM XÁC MINH ĐIỂM TỐI ƯU

Lặp lại	Đường khử (mg/g)
1	205,04
2	206,07
3	207,05

Kết quả xử lý số liệu cho thấy không có sự khác biệt về thống kê giữa kết quả từ điều kiện tối ưu dự đoán từ mô hình và kết quả thí nghiệm xác minh với $P > 0,05$.

3.4 Kết quả phân tích COS

Kết quả phân tích COS sau khi thực hiện quá trình thủy phân ở điều kiện tối ưu, cho thấy COS có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 10 kDa chiếm 90% từ chitosan có trọng lượng phân tử ban đầu lớn hơn 40 kDa. Theo Xia (2011) COS tan trong nước khi trọng lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng 10 kDa. Qua phân tích kết quả COS cũng cho thấy việc ứng dụng mô hình tối ưu hóa cho hiệu quả thu nhận COS cao hơn 10% so với khảo sát đơn lẻ các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân của tác giả Jeon và Kim (2000). Kết quả phân tích COS trình bày ở bảng 5.

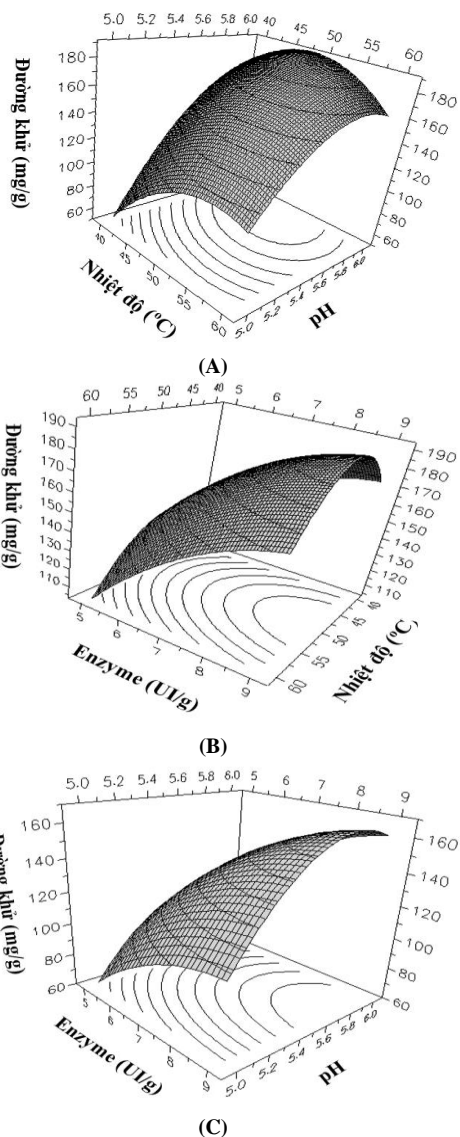
BẢNG 5
KẾT QUẢ PHÂN TÍCH SẮC KÝ GEL THÂM QUÁ CỦA MẪU CHITOSAN VÀ COS

Mẫu	M_w (g/mol)
Chitosan	$4,3313 \times 10^4$
COS	$4,2890 \times 10^3$

Mw: trọng lượng phân tử trung bình theo khối lượng

4 KẾT LUẬN

Qua áp dụng phương pháp mô hình hóa RSM-CCD và kiểm tra bằng thực nghiệm, đã xác định được điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân chitosan như sau: nhiệt độ 49 °C; pH là 5,9; nồng độ cơ chất 0,76%; hoạt tính enzyme 8,97 UI/g; thời gian thủy phân 180 phút. COS có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 10 kDa chiếm hơn 90%. Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho tạo bột COS tan trong nước với các phân đoạn khác nhau, để hướng tới tạo bột thực phẩm chức năng COS hoặc các sản phẩm thực phẩm có chứa bột COS nhằm đem lại lợi ích sức khỏe cho con người.



Hình 6: Bề mặt đáp ứng và đường đồng mức mô tả cho phương trình hồi qui thực nghiệm. 6A: Biểu diễn sự phụ thuộc của lượng đường khử (mg/g) tạo thành vào nhiệt độ (°C) và pH khi cố định các yếu tố: cơ chất (1%), thời gian (180 phút), hoạt tính Enzyme (9UI/g). 6B: Biểu diễn sự phụ thuộc của lượng đường khử (mg/g) tạo thành vào hoạt tính enzyme (UI/g) và nhiệt độ (°C) khi cố định các yếu tố: cơ chất (1%), thời gian (180 phút), pH (6). 6C: Biểu diễn sự phụ thuộc của lượng đường khử (mg/g) tạo thành vào hoạt tính enzyme (UI/g) và pH khi cố định các yếu tố: cơ chất (1%), thời gian (180 phút), nhiệt độ (60°C).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Y. J. Jeon and S. K. Kim, "Continuous production of chitoooligosaccharides using a dual reactor system," *J. Process Biochemistry*, vol. 35, pp. 623-632, Jan. 2000.
- [2]. L. Lillo, "Antibacterial Activity of Chitoooligosaccharides," *J. Carbohydr Polym*, vol.63, pp. 644-648, May. 2008.

- [3]. S. K. Kim and N. Rajapakse, "Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review," *J. Carbohydrate Polymers*, vol. 62, pp. 357–368, Dec. 2005.
- [4]. Y. Xie, J. Hu, Y. Wei and X. Hong, "Preparation of chitooligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan," *J. Polymer Degradation and Stability*, vol. 94, pp. 1895–1899, Oct. 2009.
- [5]. W. Xia, P. Liu and J. Liu, "Advance in chitosan hydrolysis by non-specific cellulases," *J. Bioresource Technology*, vol. 99, pp. 6751–6762, Oct. 2008.
- [6]. J. C. Cabrera and P. V. Cutsem, "Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan," *Biochem. Eng. J.*, vol. 25, pp. 165–172, Sep. 2005.
- [7]. D. C. Montgomery, "Design and analysis of experiments". 5th ed., New York, United States, New York: Wiley, 2001, pp. 455–492.
- [8]. T. M. Wood and K. M. Bhat, "Methods for measuring cellulose activities," in *Methods in enzymology*, vol. 160, London, UK, London: Academic Press, Inc., 1988, p. 87–112.
- [9]. K. N. Chen and M. J. Chen, "Statistical Optimization: Response Surface Methodology," in *Optimization in Food Engineering*, CRC Press, UK, 2008, pp. 140 – 165.
- [10]. W. Xia, P. Liu, J. Zhang, J. Chen, "Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides," *Food Hydrocoll.*, vol. 25, pp. 170-179, Mar. 2011.
- [11]. Y. J. Jeon and S. K. Kim, "Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity," *Carbohydr. Polym.*, vol. 41, iss. 2, pp.133-141, Feb. 2000.

Bùi Văn Hoài: sinh năm 1983 tại Long An, Việt Nam. Tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Thực phẩm tại trường Đại học Công nghệ TP.HCM năm 2010. Tốt nghiệp Thạc sĩ ngành Công nghệ Sinh học tại Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM năm 2015. Năm 2017 làm Giảng viên trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM. Năm 2014-2016 nghiên cứu vi gói bảo vệ vi khuẩn probiotic, có 3 công trình nghiên cứu đăng tạp chí chuyên ngành. Năm 2016 làm nghiên cứu sinh tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM với định hướng nghiên cứu cơ bản ứng dụng hóa sinh vào lĩnh vực công nghiệp thực phẩm.

Đào An Quang: sinh năm 1985 tại Thái Nguyên, Việt Nam. Tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Thực phẩm tại Đại học Công nghiệp TP.HCM năm 2009 và tốt nghiệp Thạc sĩ ngành công nghệ thực phẩm và đồ uống tại Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM năm 2014. Từ năm 2009 đến 2017 làm việc tại Trung tâm Thí Nghiệm – Thực hành của trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM. Đã có 1 bài báo khoa học đăng trên tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn năm 2013. Hướng nghiên cứu chính tập trung vào enzyme và công nghệ lên men.

Ngô Đại Nghiệp: sinh năm 1975 tại Bạc Liêu, Việt Nam. Tốt nghiệp Đại học ngành Sinh học tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM năm 1998. Tốt nghiệp Thạc sĩ ngành Hóa sinh tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM năm 2002. Tốt nghiệp Tiến sĩ ngành Hóa học (Hóa sinh) tại Trường Đại học Quốc gia Pukyong, Busan, Hàn Quốc năm 2008. Năm 2002-2016 làm Giảng viên, 2012-2017 là Phó Trưởng khoa Sinh học-Công nghệ sinh học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM. Năm 2014 là Phó Giáo sư, Trưởng Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học-Công nghệ sinh học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM, Việt Nam. Xuất bản 5 chương sách quốc tế, 1 sách tham khảo và 3 giáo trình, 16 bài tạp chí ISI, 6 bài tạp quốc tế, 18 bài tạp chí Quốc gia uy tín. Định hướng nghiên cứu chuyên sâu vào lĩnh vực Các hợp chất có hoạt tính sinh học cơ bản và ứng dụng.

Optimization of Chitosan hydrolysis by Cellulase Enzyme to produce Chitooligosaccharide

Bui Van Hoai, Dao An Quang and Ngo Dai Nghiep

Abstract— In order to increase the water solubility of chitosan and potential application to products that is good for human health. Chitosan was carried out the optimization of hydrolysis by cellulase to produce chitooligosaccharide. Chitosan with degree of deacetyl more than 80% and cellulase used in this study. Surface Response Method (RSM) - Central Composite Design (CCD) option is used to optimize the hydrolysis. Results of the study showed optimal values for hydrolysis such as 49 °C temperature, 5.9 pH, 0.76% substrate concentration, and 8.97 U/g enzyme concentration, 180 minutes hydrolysis time. More than 90% of the oligosaccharides produced were in the range less than 10 kDa. The research results are the premise for production of COS powder to water-soluble.

Index Terms— chitosan, chitoogligosaccharide, cellulase, RSM – CCD.