

CHỌN LỰA ĐIỀU KIỆN HOẠT ĐỘNG TỐI ƯU CỦA ENZYME CHITOSANASE THU NHẬN TỪ STREPTOMYCES GRICEUS (CHŨNG NN2) ĐỂ THU NHẬN CHITOSANOLIGOSACCHARIDE (COS)

Selecting Optimal Conditions for the Chitosanase Isolated from *Streptomyces griceus* (Strain NN2) to Produce Chitosan oligosaccharide (COS)

Ngô Xuân Mạnh¹, Nguyễn Thị Thắm²

¹Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

²Học viên cao học K17, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Địa chỉ email tác giả liên lạc: nxmanh@hva.edu.vn

Ngày gửi đăng: 25.04.2011; Ngày chấp nhận: 15.06.2011

TÓM TẮT

Chitosan oligosaccharide (COS) có nhiều chức năng sinh lý, được ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp, công nghệ thực phẩm, y tế. Bằng phương pháp thực nghiệm đã xác định được các điều kiện tối ưu để thu nhận COS: pH = 6,5; nhiệt độ 60°C, tỷ lệ E : S = 0,12 và thời gian phản ứng 10 h.

Từ khóa: Chitosan oligosaccharide, chitosanase, pH, nhiệt độ, tỷ lệ E : S, thời gian tối ưu.

SUMMARY

Chitosan oligosaccharides (COS) have many physiological functions and are used widely in the agriculture, food industry and medicine. Optimal conditions for COS production were determined by experimental method: pH = 6,5, temperature 60°C, ratio E : S = 0,12 and reaction time 10 h.

Key words: Chitosan oligosaccharide, chitosanase, optimal reaction time, pH, ratio E:S, temperature.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chitosan oligosaccharide (COS) - sản phẩm thủy phân của chitosan có hoạt tính sinh học là khả năng kháng nấm, kháng khuẩn, tăng cường khả năng miễn dịch, tăng cường khả năng bảo vệ chống nhiễm trùng (Vũ Công Phong, 2007). Những lợi ích của COS mang lại rất to lớn như gắn chất béo dư thừa và ức chế sự hấp thụ chất béo (Okamoto và cs., 2003), chống ung thư và kích thích khả năng miễn dịch (Gama và cs., 1991).

COS có thể được thu nhận bằng phương pháp hoá học. Tuy nhiên, phương pháp hiệu quả nhất để sản xuất sản phẩm này là phương pháp công nghệ sinh học sử dụng enzyme chitosanase.

Bài báo này trình bày các kết quả chọn lựa các điều kiện hoạt động tối ưu của enzyme chitosanase (pH, nhiệt độ, tỷ lệ E : S, thời gian thủy phân) để xây dựng quy trình sản xuất COS bằng enzyme chitosanase.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và hóa chất

Enzyme chitosanase sử dụng là chế phẩm enzyme chitosanase kỹ thuật thu nhận theo quy trình được Ngô Xuân Mạnh và Nguyễn Thị Phương Nhung (2009) mô tả. Chế phẩm enzyme chitosanase kỹ thuật có hoạt tính 0,73 U/ml.

Chitosan, các hóa chất sử dụng có độ sạch phân tích, AR (Trung Quốc).

2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Sử dụng phương pháp thực nghiệm để xác định điều kiện tối ưu để thu nhận COS. Thí nghiệm xác định các yếu tố pH môi trường, nhiệt độ, tỷ lệ E: S và thời gian phản ứng được bố trí lần lượt.

- **Thí nghiệm 1:** Xác định pH tối ưu để thu nhận COS được tiến hành như sau.

Nồng độ cơ chất (chitosan 2%) ($V = 5$ ml)

Tỷ lệ E/S: 0.04 ($V_{\text{enzyme}} = 0,2$ ml)

Nhiệt độ: 50°C

Thời gian phản ứng: 10 giờ

- **Thí nghiệm 2:** Xác định nhiệt độ tối ưu để thu nhận COS được tiến hành như sau:

pH được xác định ở thí nghiệm 1. Nồng độ cơ chất (chitosan 2%) ($V = 5$ ml). Tỷ lệ E/S: 0,04 ($V_{\text{enzyme}} = 0,2$ ml), Nhiệt độ thay đổi từ 45°C đến 65°C . Thời gian phản ứng: 10 giờ.

- **Thí nghiệm 3:** Xác định tỷ lệ enzyme: cơ chất (E:S) tối ưu để thu nhận COS

Thí nghiệm được tiến hành ở pH, nhiệt độ đã xác định ở thí nghiệm 1 và 2. Nồng độ cơ chất (chitosan 2%) ($V = 5$ ml). Tỷ lệ E:S thay đổi từ 0,02 đến 0,14 ($V_{\text{enzyme}} = 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8$ ml). Thời gian phản ứng: 10 giờ.

- **Thí nghiệm 4:** Xác định thời gian phản ứng để thu nhận COS.

Thí nghiệm được tiến hành ở pH, nhiệt độ và tỷ lệ E:S được xác định ở thí nghiệm 1, 2 và 3. Thời gian phản ứng: 8h, 9h, 10h, 11h, 12h.

2.3. Phương pháp xác định đường COS

Xác định hàm lượng đường khử COS dựa vào số gốc đường khử giải phóng bằng phương pháp quang phổ, sử dụng acid dinitrosalicylic (DNS) (Miller, 1959).

Số liệu thí nghiệm được tính toán và xử lý theo chương trình Excel.

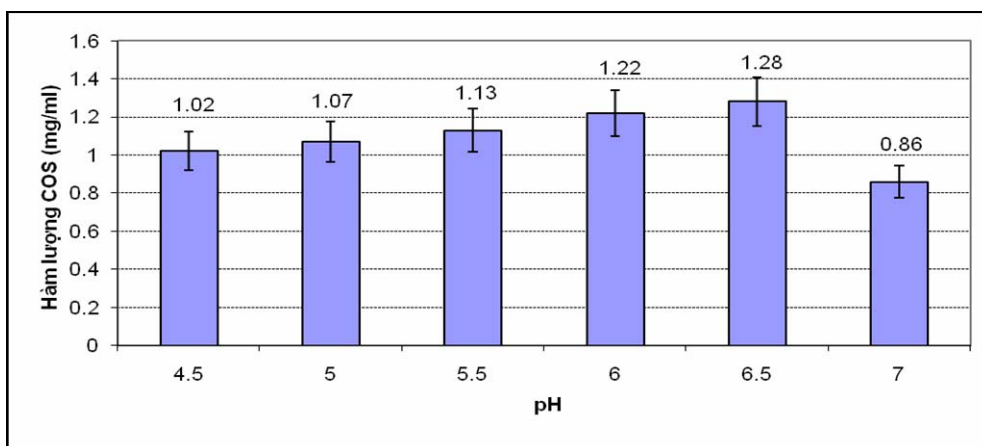
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định pH tối ưu để thu nhận COS

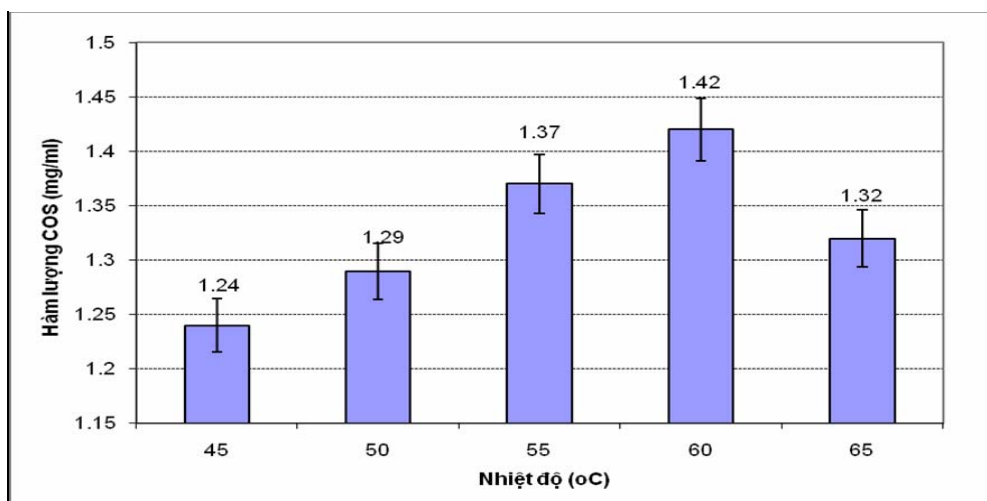
Kết quả thu được của thí nghiệm 1 (Hình 1) cho thấy rằng pH khác nhau có ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme chitosanase. Khi pH tăng từ 4,5 đến 6,5 hàm lượng COS hình thành tăng, sau đó giảm ở pH = 7. Như vậy ở pH = 6,5 thì enzyme hoạt động tốt nhất và hàm lượng đường cao nhất.

3.2. Xác định nhiệt độ tối ưu để thu nhận đường COS

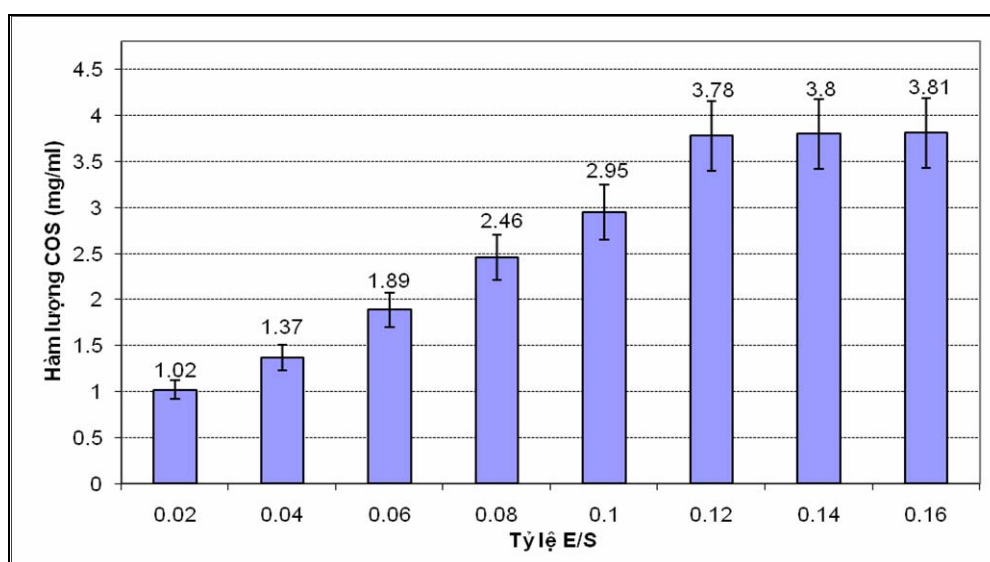
Tiến hành thí nghiệm ở pH = 6,5 như được xác định ở thí nghiệm 1, các khoảng nhiệt độ thay đổi từ 45°C đến 65°C , tỷ lệ E/S: 0,04 ($V_{\text{enzyme}} = 0,2$ ml, $V_{\text{chitosan}} = 5$ ml), phản ứng xảy ra trong 10 giờ (Hình 2).



Hình 1. Ảnh hưởng pH đến sự hình thành đường COS



Hình 2. Ảnh hưởng nhiệt độ đến sự hình thành đường COS



Hình 3. Ảnh hưởng tỷ lệ E:S đến sự thu nhận đường COS

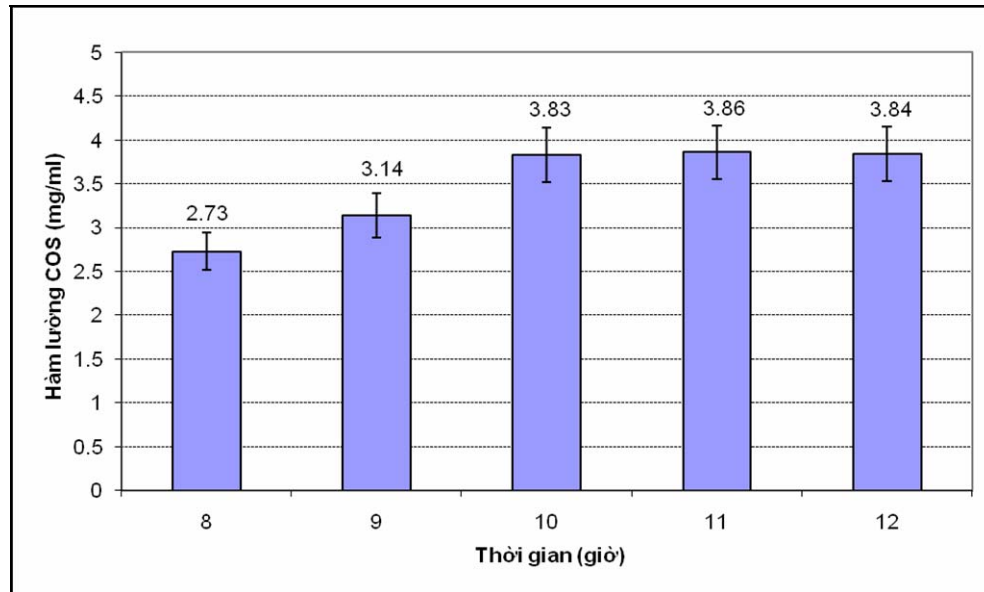
Kết quả ở hình 2 cho thấy khi nhiệt độ phản ứng tăng từ 45°C đến 60°C, hàm lượng COS thu được tăng và đạt cao nhất ở 60°C. Ở nhiệt độ cao hơn (65°C) hàm lượng COS thu được giảm. Dựa vào kết quả thu được, 60°C là nhiệt độ tối thích để thu nhận COS.

3.3. Xác định tỷ lệ E: S tối ưu để thu nhận COS

Tiến hành thí nghiệm ở pH = 6, nhiệt độ 60°C đã xác định, thời gian phản ứng 10 giờ

với các tỷ lệ E:S thay đổi từ 0,02 đến 0,14 ($V_{\text{enzyme}} = 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8$ ml, $V_{\text{chitosan}} = 5$ ml) (Hình 3).

Kết quả hình 3 cho thấy khi tăng lượng enzyme so với cơ chất (tỷ lệ enzyme: cơ chất tăng từ 0,02 đến 0,12), hàm lượng đường COS thu được tăng, sau đó ở các tỷ lệ 0,14; 0,16 lượng COS thu được không tăng. Kết quả thu được cho phép chọn tỷ lệ E:S = 0,12 là tỷ lệ tối thích để thu nhận COS.



Hình 4. Ảnh hưởng thời gian đến sự thu nhận đường COS

3.4. Xác định thời gian phản ứng để thu nhận đường COS.

Thí nghiệm được tiến hành ở pH = 6,5, nhiệt độ 60°C, tỷ lệ E:S = 0,12 ($V_{\text{enzyme}} = 0,6$ ml, $V_{\text{chitosan}} = 5$ ml) với thời gian phản ứng: 8h, 9h, 10h, 11h, 12h (Hình 4).

Kết quả ở hình 4 cho thấy khi tăng thời gian phản ứng từ 8 h đến 10 h, lượng đường COS thu được tăng. Khi tiếp tục tăng thời gian phản ứng lên 11 h, 12 h thì lượng đường COS tăng không đáng kể. Trong sản xuất việc kéo dài thời gian phản ứng thêm làm tăng chi phí sản xuất, tăng nguy cơ nhiễm vi sinh không có lợi, do đó 10 giờ là thời gian đủ để thu nhận đường COS.

4. KẾT LUẬN

Đã xác định điều kiện tối ưu để sản xuất đường chitosan oligosaccharide COS theo phương pháp thực nghiệm. Nồng độ chitosan 2%; pH môi trường 6,5; nhiệt độ 60°C; tỷ lệ E:S = 0,12 và thời gian phản ứng 10 giờ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ngô Xuân Mạnh, Nguyễn Thị Phương Nhung

(2009). Lựa chọn điều kiện tối ưu để sản xuất chitosanase từ *Streptomyces griceus* (chủng NN2). *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, No6, tr.780 - 787.

Vũ Công Phong (2007). Những đặc điểm của Chitin, Chitosan và dẫn xuất. <http://www.hoahocvietnam.com/Home/Moi-tuan-mot-hoa-chat/Nhung-dac-diem-cua-Chitin-Chitosan-va-dan-1.html> ngày truy cập

Gama S., M.A., Fazely, F., Koch, J.A., Vercellotti, S.V., Ruprecht, R.M. (1991). N-carboxymethyl chitosan-N, O-sulfate as an anti-HIV-1 agent, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 174, 489-496.

Miller, G.L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Anal. Chem.*, 31, 426.

Okamoto, Y., Inoue, A., Miyatake, K., Ogihara, K., Shigemasa, Y., Minami, S. (2003). Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on migrations of macrophages, *Macromolecular Bioscience*, 3, 587-590.