

NGHIÊN CỨU THU NHẬN XYLOOLIGOSACCHARIDE (XOS) TỪ CÁM GẠO BẰNG CÔNG NGHỆ ENZYME

Trần Thị Nhung¹, Phạm Thị Thu Phương¹, Nguyễn Thúy Hương², Nguyễn Thị Mai Phương^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *phuong_nguyen_99@ yahoo.com

²Viện Công nghệ thực phẩm

TÓM TẮT: Cám gạo là phụ phẩm của quá trình xay xát gạo và rất giàu hydratcarbon, đặc biệt là xylan. Vì thế, nguồn nguyên liệu này đã và đang được sử dụng để sản xuất chất xơ hòa tan Xylooligosaccharide (XOS). Một số vi khuẩn phổ biến trong ruột kết như *Bifidobacteria* và *Lactobacillus* có thể sử dụng XOS như nguồn cơ chất. Thị trường cho XOS đang ngày càng hấp dẫn do những lợi thế về các tính chất sinh học và công nghệ so với các oligosaccharide phổ biến khác như fructooligosaccharide (FOS) hay galactooligosaccharide (GOS). XOS có thể sản xuất từ cám gạo sử dụng công nghệ hóa học hoặc công nghệ enzyme. Thủy phân cám gạo sử dụng β -1,4-xylanase là phương pháp thường được lựa chọn để sản xuất XOS từ cám gạo. Hiện tại, Việt Nam vẫn đang thiếu một công nghệ sản xuất XOS từ cám gạo có độ sạch cao và an toàn thực phẩm. Bài báo này trình bày những kết quả nghiên cứu mới về thu nhận XOS từ cám gạo sử dụng công nghệ đa enzyme thân thiện với môi trường. Chế phẩm XOS có độ sạch tới 81,4% đã được thu nhận bằng cách thủy phân cám gạo đã tiền xử lý với Ultraflo L xylanase 0,6% của hãng Novozyme ở pH 7,0 tại 50°C trong đệm phosphate buffer 100 mM trong 15 giờ. Đây là một công nghệ thích hợp để sản xuất XOS từ cám gạo ở Việt Nam.

Từ khóa: *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, cám gạo, xylanase, xylooligosaccharide (XOS).

MỞ ĐẦU

Việt Nam là một trong những nước xuất khẩu gạo lớn nhất thế giới. Theo Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, lượng gạo xuất khẩu năm 2011 đạt khoảng 7,5 triệu tấn. Vì thế lượng cám gạo, phụ phẩm của quá trình xay xát gạo cũng rất lớn. Cám gạo có giá trị dinh dưỡng cao với thành phần hydratcarbon chiếm từ 38,7-44,3%, trong đó, chủ yếu là xylan nên cũng là một nguồn nguyên liệu tốt cho sản xuất chất xơ hòa tan xylooligosaccharide (XOS).

XOS là các oligomer chứa từ 2-7 gốc đường xylose. XOS có thể được sử dụng bởi cả vi khuẩn *Bifidobacteria* và một số *Lactobacillus*, là những vi khuẩn phổ biến trong ruột kết của người [4, 6, 8, 11, 14]. XOS có nhiều ưu việt hơn các oligosaccharide khác như fructooligosaccharide (FOS) hay galactooligosaccharide (GOS) ở cả khía cạnh lợi ích sức khỏe và các đặc tính liên quan đến công nghệ [1]. Vì thế, thị trường thương mại cho sản phẩm này là rất triển vọng [1, 3, 7, 9].

Hiện nay, có hai hướng công nghệ chính để thu nhận XOS từ cám gạo là sử dụng công nghệ hóa học hoặc công nghệ enzyme [2, 10, 15].

Hướng thu nhận XOS bằng công nghệ enzyme được quan tâm nhiều do tính chất thân thiện môi trường và độ an toàn sản phẩm của nó. Quá trình thủy phân cám gạo tạo XOS bằng enzyme được thực hiện bởi endo β -1-4 xylanase.

Ở Việt Nam, việc nghiên cứu sản xuất các oligosaccharide từ cám gạo gần như chưa được nghiên cứu. Có thể nói rằng mặc dù cám gạo là nguồn nguyên liệu giàu xylan nhưng đến nay chúng ta vẫn chưa có công nghệ phù hợp và hiệu quả để thu được XOS có chất lượng cao.

Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu mới của chúng tôi về thu nhận XOS từ cám gạo sử dụng công nghệ enzyme thân thiện với môi trường.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Cám gạo được thu mua từ các nhà máy và cơ sở xay xát gạo có uy tín của Hà Nội. Cám gạo sau đó được xử lý làm giàu xylan bằng các enzyme protease và α -amylase.

Enzyme Ultraflo L (xylanase) mua từ hãng Novozyme (Đan Mạch). Các hóa chất còn lại đều đạt mức tinh sạch phân tích

Định lượng xylose và XOS

Dựa vào phương pháp quang phổ để định lượng xylose tổng số có trong mẫu nghiên cứu sau khi xử lý với axit HCl, từ đó tính được hàm lượng XOS dựa vào chất chuẩn (Wako). XOS được xử lý với HCl 1,3 M trong 1 giờ ở 100°C để thủy phân hoàn toàn xylan thành xylose. Sau khi trung hòa với NaOH 1,3 M, mẫu nghiên cứu được ly tâm và thu dịch nổi. Hàm lượng xylose trong dung dịch được xác định bằng Kit D-xylose (Megazyme).

Sắc ký lớp mỏng định tính đường XOS

XOS được định tính trên bản sắc ký lớp mỏng (TLC) silicagel 60 F254 (Merck 1.05554; 20 × 20 cm) sử dụng hệ dung môi phân tách n-butanol:axit acetic: H₂O với tỷ lệ 3:1:1. Bản sắc ký được hiện màu bằng aniline trong hỗn hợp axit phthalic và n-butanol bão hòa. Các vạch đường hiện màu nâu sau khi chạy sắc ký khoảng 90 phút và phun thuốc hiện màu.

Xác định hoạt tính xylanase (Endo-1,4-β-xylanase - EC 3.2.1.8)

Hoạt tính enzyme được xác định dựa trên việc đo sản phẩm xylose tạo thành khi thủy phân 1% xylan oat-spelts (Sigma) trong đệm phosphate natri pH 7,0 ở 50°C trong 30 phút. Một đơn vị hoạt tính enzyme là số μmol xylose được giải phóng trong điều kiện phản ứng. Xylose tạo thành được định lượng bằng Kit đo D-xylose. Hoạt tính riêng của chế phẩm enzyme là số đơn vị enzyme/mg protein chế phẩm.

Xác định protein

Hàm lượng protein trong mẫu nghiên cứu được xác định thông qua phản ứng màu với thuốc thử Bradford sử dụng albumin huyết thanh bò (BSA) làm chất chuẩn.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu điều kiện tối ưu cho thủy phân cám gạo của xylanase

Hiện nay, trên thị trường đang thương mại một số sản phẩm enzyme xylanase công nghiệp khác nhau có nguồn gốc vi sinh vật để phục vụ cho công nghiệp chế biến thực phẩm như sản

xuất bia, bánh mì hay cho chăn nuôi. Ví dụ, các chế phẩm Ultraflo L (Novozyme, Đan Mạch), Porzyme (Canada) hay của một số công ty hóa chất Trung Quốc. Kết quả phân tích hoạt độ của 6 mẫu enzyme công nghiệp gồm Porzyme (dạng bột, Canada), Pentopan (dạng bột, Trung Quốc), Trichoderma (dạng bột, Trung quốc), Ultraflo L (dạng dịch, Novozyme) và Aspergillus (dạng bột, Trung quốc) cho thấy rằng hoạt độ riêng của Ultraflo L (Novozyme) là cao nhất, đạt 12,68 U/mg protein, cao hơn khoảng 10 lần so với enzyme Aspergillus và cao hơn nhiều lần so với các enzyme còn lại (số liệu không trình bày ở đây). Trong số các enzyme công nghiệp có hoạt tính thủy phân malt để sản xuất bia, Ultraflo L có hàm lượng xylanase cao và không chứa beta-glucanase. Vì thế, chúng tôi đã sử dụng Ultraflo L là nguồn xylanase cho quá trình sản xuất XOS từ cám gạo. Để thu nhận được XOS có hiệu suất cao, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu các điều kiện tối thích cho quá trình thủy phân này.

Ảnh hưởng của pH đến khả năng thủy phân cám gạo của xylanase

Dung dịch cám gạo trong đệm phosphate natri 100 mM, ở các pH 5,0; 6,0; 7,0 được bổ sung xylanase với nồng độ 0,3% và tiến hành thủy phân ở 50°C trong khoảng thời gian 21 giờ. Hàm lượng đường xylose sau thủy phân được kiểm tra để đánh giá khả năng thủy phân của enzyme. Kết quả thu được cho thấy, sau khi thủy phân ở pH 7,0 trong 21 giờ, hàm lượng đường xylose đạt giá trị ΔA₃₄₀ bằng 0,660, tương ứng với hàm lượng XOS là 6,8%, cao hơn đáng kể so với giá trị này thu được khi thủy phân tại điều kiện pH 6,0 (5,46%) và cao hơn tới gần 50% so với thủy phân tại điều kiện pH 5,0 (4,9%) (bảng 1). Kết quả này cũng có thể lý giải được là do xylanase trong Ultraflo L là enzyme có nguồn gốc từ vi khuẩn (*Bacillus*) nên vùng pH tối thích cho hoạt động của nó ở gần các giá trị pH trung tính, khác với các xylanase có nguồn gốc từ nấm (*Aspergillus*), thường có pH tối thích cho hoạt động ở vùng axit (pH 5,0) [12].

Bảng 1. Ảnh hưởng của pH đến khả năng thủy phân cám gạo của xylanase

Thời gian (giờ)	XOS (%)		
	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
0	0,007	0,007	0,005
3	4,59	5,05	5,46
21	4,90	5,46	6,80

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng thủy phân cám gạo của xylanase

Thời gian (giờ)	XOS (%)			
	37°C	45 °C	50 °C	55 °C
0	0,002	0,004	0,005	0,003
3	1,71	1,96	4,03	4,22
21	2,93	3,40	5,46	5,00

Ảnh hưởng của của nhiệt độ đến khả năng thủy phân cám gạo của xylanase

Dung dịch cám gạo trong đệm phosphate natri 100 mM, pH 7,0 được bổ sung xylanase với nồng độ 0,3% và tiến hành thủy phân ở các nhiệt độ 37°C; 45°C; 50°C; 55°C trong khoảng thời gian 21 giờ. Hàm lượng xylose trong sản phẩm thủy phân sau đó được định lượng để đánh giá hiệu quả thủy phân.

Kết quả thu được ở bảng 2 cho thấy, hàm lượng XOS tại nhiệt độ thủy phân 50°C sau 21 giờ là cao hơn đáng kể so với ở các nhiệt độ khác. Dựa trên các số liệu thu được có thể thấy, hàm lượng chất này cao hơn gấp 2 lần so với thủy phân ở nhiệt độ 37°C trong 21 giờ (5,46% so với 2,93%) và cao hơn khoảng 70% so với

thủy phân ở nhiệt độ 45°C (3,4%). Ở nhiệt độ cao hơn 50°C, khả năng thủy phân của enzyme bị giảm đi. Các số liệu thu được đã cho thấy nhiệt độ 50°C là tối thích cho xylanase Ultraflo L thủy phân cám gạo.

Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến khả năng thủy phân cám gạo của xylanase

Dung dịch cám gạo trong đệm phosphate natri 100 mM, pH 7,0 được bổ sung xylanase với các nồng độ khác nhau là 0,15%; 0,3%; 0,6%; 0,9%. Quá trình thủy phân được thực hiện ở 50°C trong 21 giờ. Kết quả thủy phân được trình bày ở bảng 3. Số liệu thu được cho thấy sử dụng xylanase ở nồng độ 0,6% là thích hợp nhất để thủy phân cám gạo thu XOS.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến khả năng thủy phân cám gạo của xylanase

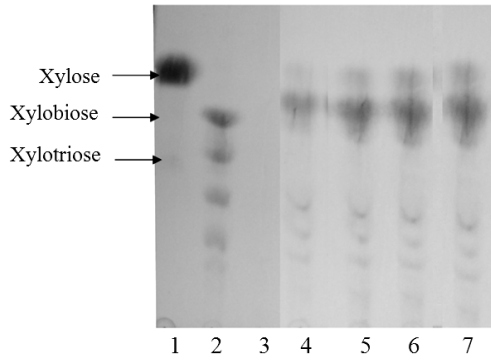
Thời gian (giờ)	XOS (%)				
	Nồng độ enzyme				
	0	0,15%	0,3%	0,6%	0,9%
0	0,008	0,008	0,007	0,005	0,006
21	4,21	5,05	5,06	6,49	5,79

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng thủy phân cám gạo của xylanase

Thời gian (giờ)	XOS (%)
0	0,009
5	3,06
10	3,98
15	5,12
21	5,32

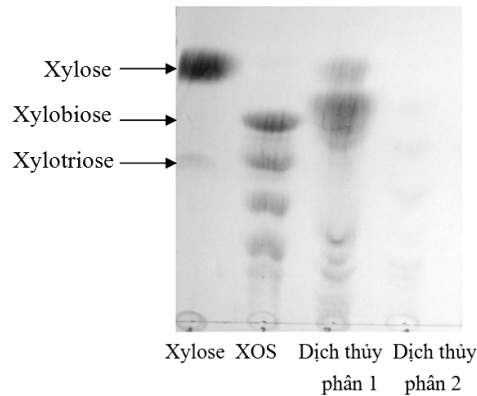
Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng thủy phân cám gạo của xylanase

Dung dịch cám gạo trong đệm phosphate natri 100 mM, pH 7,0 được bổ sung xylanase với nồng độ 0,3% và tiến hành thủy phân ở nhiệt độ 50°C trong các khoảng thời gian 0; 5; 10; 15 và 21 giờ. Kết quả xác định hàm lượng

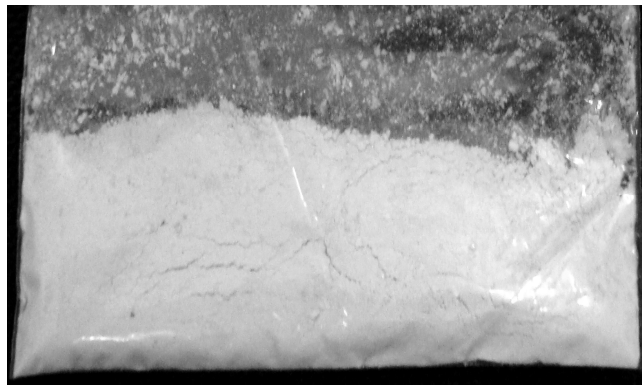


Hình 1. Sắc ký đồ TLC dịch thủy phân cám gạo sử dụng quá trình ở hình 5
1. Xylose; 2. XOS; 3. 0 giờ; 4. 5 giờ; 5. 10 giờ; 6. 15 giờ; 7. 21 giờ.

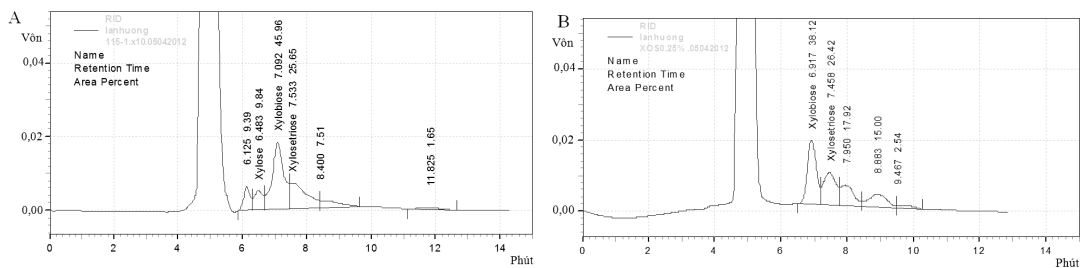
XOS trong dịch thủy phân cám gạo được trình bày ở bảng 4. Số liệu ở bảng 4 và hình 1 cho thấy, tại thời điểm thủy phân 15 giờ, hàm lượng XOS đạt cao nhất (5,32%). Sau thời điểm này, hàm lượng XOS cũng tăng nhưng không đáng kể. Như vậy, thời gian thủy phân 15 giờ là thích hợp để thu được XOS có hàm lượng cao nhất.



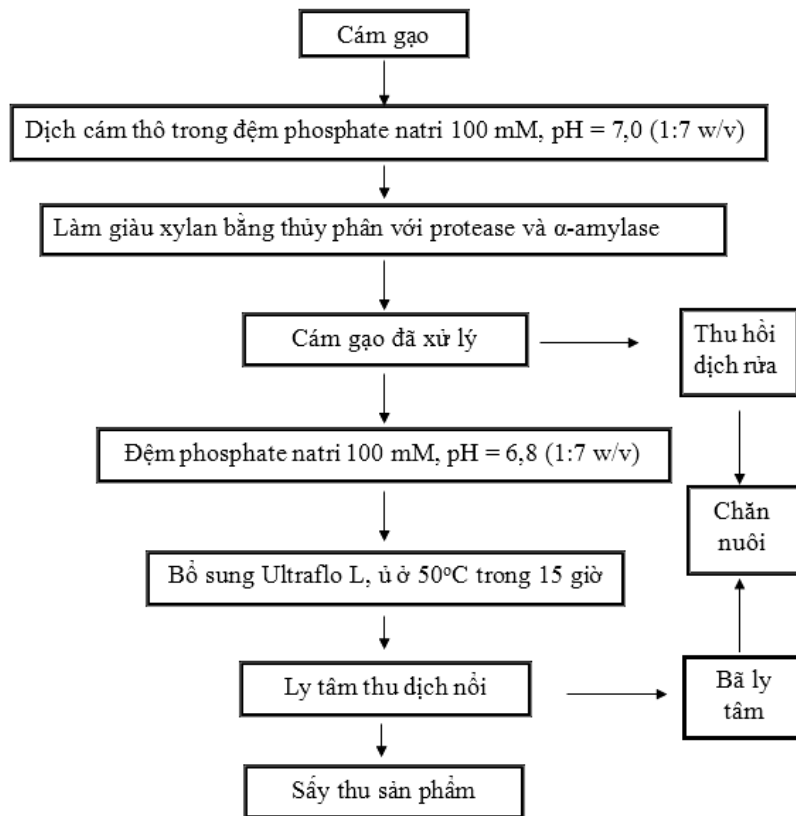
Hình 2. So sánh các sản phẩm thủy phân cám gạo theo các quá trình khác nhau



Hình 3. Sản phẩm XOS sau sấy phun



Hình 4. Phân tích thành phần dịch thủy phân cám gạo với xylanase bằng HPLC. A. Dịch thủy phân cám gạo sau khi loại tinh bột và protein được xử lý với xylanase; B. XOS chuẩn 0,25%.



Hình 5. Sơ đồ quá trình sản xuất XOS từ cám gạo sử dụng công nghệ đa enzyme

Kiểm tra sản phẩm thủy phân cám gạo với xylanase bằng TLC (hình 1) cho thấy, sản phẩm chính của quá trình thủy phân này là xylobiose. Đây là nguồn XOS đã được chứng minh là thích hợp cho các vi khuẩn *Bifidobacteria* và một số *Lactobacillus* trong ruột kết đồng hóa [6, 11].

Như vậy, điều kiện thích hợp cho thủy phân cám gạo để thu XOS là pH 7,0 ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 15 giờ với nồng độ enzyme 0,6%. Sản phẩm của quá trình thủy phân cám gạo với điều kiện lựa chọn này chủ yếu là xylobiose, tiếp theo là xylose và một số XOS mạch ngắn khác như xylotriose, xylotetraose.

Xác định độ sạch của chế phẩm XOS sau khi thủy phân

Sản phẩm XOS thu được sau khi sấy phun dịch thủy phân (hình 3) được xác định độ sạch trên máy phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Kết quả thu được ở hình 4A và 4B cho thấy, chế phẩm sau khi thủy phân chứa phần lớn

là xylobiose, xylotriose và một phần xylose, phù hợp với kết quả phân tích TLC ở trên. Sản phẩm XOS thu được có độ sạch đạt 81,4%.

Toàn bộ quá trình thu nhận XOS sử dụng công nghệ đa enzyme được tóm tắt trong sơ đồ ở hình 5. Hiệu suất sản phẩm được tính dựa trên hàm lượng chất khô thu được/trọng lượng nguyên liệu đầu vào. Hiệu suất thu hồi XOS sau khi thủy phân cám gạo sử dụng quá trình nêu trên đạt 13,2% (13,2 gram XOS trên 100 gram cám gạo đã xử lý) với độ sạch đạt 81,4%. Có thể thấy rằng, quá trình thu nhận XOS của chúng tôi đưa ra ở đây đơn giản, thân thiện với môi trường và hiệu quả hơn các quá trình XOS đã được công bố trước đây với cám gạo và lõi ngô [4, 5, 10, 13, 15]. Cụ thể là: i) Không sử dụng hóa chất để xử lý nguyên liệu làm giàu xylan nên đảm bảo an toàn thực phẩm; ii) Không có sản phẩm phụ thải ra môi trường nên không phải xử lý môi trường; iii) Các enzyme sử dụng để sản xuất XOS đều phổ biến trong

chế biến thực phẩm và giá thành thấp; iv) Sản phẩm thu được có độ sạch tương đối cao. Chính những yếu tố này sẽ góp phần làm giảm giá thành sản phẩm XOS thu được và nhờ đó có tính cạnh tranh cao với các sản phẩm XOS thương mại khác trên thị trường.

KẾT LUẬN

Đã thu nhận được XOS từ cám gạo ở qui mô phòng thí nghiệm có độ sạch đạt 81,4% bằng qui trình thủy phân cám gạo đã xử lý loại bỏ protein và tinh bột với enzyme xylanase (Ultraflo L, Novozyme) ở nhiệt độ 50°C tại pH 7,0 với nồng độ enzyme 0,6% trong thời gian 15 giờ.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài KC.04.TN01/11-15, Bộ Khoa học và Công nghệ, 2012.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Achary A., Prapulla S., 2011. Xylooligosaccharide (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties and applications. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety.*, 10: 2-16.
2. Akpınar O., Erdogan K., Bostancı S., 2009. Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. *Food Biop. Pro.*, 87: 145-151.
3. De Vrese M., Schrezenmeir J., 2008. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 111: 1-66.
4. Gullón P., Moura P., Esteves M. P., Gírio F. M., Domínguez H., Parajó J. C., 2008. Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks by probiotic bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 56(16): 7482-7487.
5. Hamid A. A., Luan Y. S., 2000. Functional properties of dietary fiber prepared from defatted rice bran. *Food Chem.*, 68(1): 15-19.
6. Hsu C. K., Liao J. W., Chung Y. C., Hsieh C. Y., Chan Y. C., 2004. Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. *J. Nutr.*, 134(6): 1523-1528.
7. Menrad K., 2003. Market and marketing of functional food in Europe. *J. Food Engin.*, 56: 181-188.
8. Moura P., Barata R., Carvalheiro F., Gírio F., Loureiro-Dias M., Esteves P., 2007. *In vitro* fermentation of xylooligosaccharide from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *LWT - Food Sci. Technol.*, 40(6): 963-972.
9. Nakakuki T., 2003. Development of functional oligosaccharide in Japan. *Trends Glycosci. Glyc.*, 15(82): 57-64.
10. Nicole G., 2009. Methods for optimizing enzymatic hydrolysis of xylan to improve xylooligosaccharide yield. *MMG 445 Biotechnology*, 5: 31-36.
11. Palframan R. J., Gibson G. R., Robert A., Rastall R. A., 2003. Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human Gut. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 4: 71-75.
12. Polizeli M. L. T. M., Rizzatti A. C. S., Monti R., Terenzi H. F., Jorge J. A., Amorim D. S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial application. *Appl. Microbiol. Biot.*, 67(5): 577-591.
13. Teng C., Yan Q., Jiang Z., Fan G., Shi B., 2010. Production of xylooligosaccharide from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase. *Bioresour Technol.*, 101(19): 7679-82
14. Vignæs L. K., Holck J., Meyer A. S., Licht T. R., 2011. *In Vitro* Fermentation of sugar beet arabino-oligosaccharides by fecal microbiota obtained from patients with ulcerative colitis to selectively stimulate the growth of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microb.*, 77(23): 8336-8344.
15. Yang R. X. S., Wang Z. Y. W., 2005. Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharide. *LWT- Food Sci. Technol.*, 38: 677-682.

OPTIMISATION OF RICE BRAN HYDROLYZATION BY XYLANASE FOR XYLOOLIGOSACCHARIDE PRODUCTION

Tran Thi Nhung¹, Pham Thi Thu Phuong¹, Nguyen Thuy Huong², Nguyen Thi Mai Phuong^{1*}

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Food Industries and Research Institute

SUMMARY

Rice bran is a subsidy product of rice processing. It is rich in carbohydrate, especially xylan therefore, has been used for production of soluble fiber oligosaccharide including xylooligosaccharides (XOS). XOS has been proven to be fermented by beneficial bacteria *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* in colon. The market for XOS is increasing rapidly due to its advantages in biological and technological properties compared to other common oligosaccharides, such as fructooligosaccharide (FOS) or galactooligosaccharide (GOS).

XOS can be produced from rice bran by using either chemical or enzymatic hydrolyzation technologies. The hydrolyzation using β -1,4-xylanase is commonly used to produce XOS from rice bran. However, an appropriate technology for XOS production from rice bran with high purity and food safe in Vietnam is still badly needed.

This paper presents new research results on XOS production from rice bran by using a multienzymatic and environmental friendly technology. A XOS preparation with purity level of 81.4% has been obtained by hydrolyzing protease and α -amylase pretreated rice bran with 0.6% commercial Ultraflo L xylanase from Novozyme at pH 7.0 and 50°C in 100 mM phosphate buffer for 15 hours. This is an appropriate technology for XOS production from rice bran in Vietnam.

Keywords: *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, rice bran, xylanase, xylooligosaccharide (XOS).

Ngày nhận bài: 9-5-2012