

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ISOMALTULOSE TỪ SUCROSE SỬ DỤNG VI KHUẨN *ENTEROBACTER* SP. ISB-25

Nguyễn Thanh Thủy, Nguyễn Thị Hoa Mai, Đinh Thị Mỹ Hằng, Vũ Nguyên Thành*

Viện Công nghiệp Thực phẩm, Địa chỉ?

*Email: thanh@firi.ac.vn

Đến Tòa soạn: 3/1/2012; Chấp nhận đăng: 3/6/2013

TÓM TẮT

Với những đặc tính như chống sâu răng, phù hợp với bệnh nhân đái tháo đường, trẻ nhỏ, vận động viên thể thao, đường chức năng isomaltulose được coi là có thể thay thế đường mía. Isomaltulose được sản xuất thương mại từ sucrose bằng công nghệ lên men vi sinh. Trong quá trình tìm kiếm vi sinh vật sinh isomaltulose, chủng vi khuẩn *Enterobacter* sp. ISB-25 được phân lập. *Enterobacter* sp. ISB-25 sinh tổng hợp sucrose isomerase với hoạt lực 55 IU/ml trên môi trường SPY ở điều kiện nhiệt độ 30 °C, lắc 150 vòng/phút và lượng giống tiếp 10 %. Hiệu suất chuyển hóa sucrose thành isomaltulose đạt 85 % sau 12 giờ với nồng độ sucrose ban đầu 20 % và mật độ tế bào 60 % so với mật độ trên môi trường SPY. Sản phẩm chuyển hóa sau khi cô đặc và kết tinh một bước có độ tinh khiết 97 %. Chủng *Enterobacter* sp. ISB-25 có năng lực chuyển hóa tương đương chủng công nghiệp hiện hành. Quy trình sản xuất isomaltulose từ sucrose sử dụng *Enterobacter* sp. ISB-25 được đề xuất và thử nghiệm ở quy mô 300 lít.

Từ khóa: sucrose, isomaltulose, đường chức năng, *Enterobacter*, chuyển hóa, sản xuất.

1. MỞ ĐẦU

Hiện nay nhu cầu thay thế việc sử dụng sucrose (đường mía) bằng một loại đường khác ngày càng gia tăng do những ảnh hưởng không tốt của nó tới sức khỏe con người như: góp phần gây béo phì, sâu răng, tiểu đường và loãng xương. Isomaltulose là một đồng phân của sucrose và được sản xuất từ sucrose thông qua chuyển hóa enzyme trong đó liên kết 1,2-glycosid giữa glucose và fructose được thay thế bằng liên kết 1,6-glycosid. Isomaltulose có tính chất vật lý và cảm quan gần giống với sucrose và có giá trị năng lượng như sucrose. Isomaltulose được đánh giá là một sự thay thế hợp lý cho sucrose bởi rất nhiều ưu điểm [1]: (i) Không gây sâu răng do các liên cầu khuẩn trong răng miệng không có khả năng sử dụng isomaltulose; (ii) Được cơ thể tiêu hoá và hấp thụ chậm hơn rất nhiều so với sucrose, gây ra ảnh hưởng không đáng kể tới nồng độ đường và insulin trong máu; (iii) Không bị lên men bởi phần lớn các vi khuẩn và nấm men, bền trong axit và invertase, không hút ẩm, do vậy thực phẩm chứa isomaltulose bền và ổn định hơn. Gần đây người ta đã chứng minh rằng isomaltulose còn tốt cho chức năng của não, tăng bộ nhớ.

Enzyme sucrose isomerase (SI) (EC5.4.99.11) (còn gọi là isomaltulose synthase) chịu trách nhiệm chuyển hóa sucrose thành isomaltulose lần đầu tiên được tách chiết từ *Protaminobacter rubrum* bởi Weidenhagen và Lorenz năm 1957 [2]. Sucrose isomerase ngoài ra còn được tìm thấy ở nhiều vi sinh vật khác, trong đó có *Serratia plymuthica* NCIB 8285 [3], *Erwinia rhapontici* NCPPB 1579 [4], *Klebsiella* sp. LX3 [5], *K. planticola* CCRC 19112 [6], *Pantoea dispersa* [7], *Agrobacterium radiobacter* MX-332 [8], *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 [9], *Enterobacter* sp. FMB-1 [10]. Trong thiên nhiên, isomaltulose có lẽ đóng vai trò giúp vật chủ cạnh tranh giành nguồn dinh dưỡng với các vi sinh vật khác trong môi trường giàu sucrose bởi phần lớn vi sinh vật không có khả năng sử dụng isomaltulose [7].

Hiện nay, isomaltulose đã được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất thực phẩm và dược phẩm. Đi đầu trong sản xuất những sản phẩm này là Tập đoàn Südzucker của Đức cũng là nhà sản xuất đường lớn nhất của châu Âu. Ngoài ra, Cerestar (thuộc Tập đoàn Cargill) và Shin Mitsui (Nhật) cũng là các công ty lớn sản xuất isomaltulose. Isomaltulose công nghiệp được sản xuất từ sucrose qua phản ứng đồng phân hoá bởi enzyme sucrose isomerase. Công nghệ sản xuất isomaltulose phổ biến nhất hiện nay trên thế giới là sử dụng tế bào cố định của *Protaminobacter rubrum* [11].

Việt Nam là một trong những quốc gia có nguồn nguyên liệu đường sucrose dồi dào. Việc chuyển hóa đường sucrose thành isomaltulose với giá trị cao (gấp 10 lần so với nguyên liệu ban đầu) sẽ tạo giá trị gia tăng cho sản xuất nông nghiệp, cung cấp sản phẩm phục vụ tiêu dùng trong nước và xuất khẩu. Trong nghiên cứu này chúng tôi thử nghiệm sản xuất isomaltulose từ đường mía sử dụng chủng *Enterobacter* sp. ISB-25 phân lập từ Việt Nam.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Chủng vi sinh vật

Chủng vi khuẩn *Enterobacter* sp. ISB-25 sử dụng trong nghiên cứu được tiếp nhận từ Bảo tồn gen Vi sinh vật công nghiệp thực phẩm, Viện Công nghiệp Thực phẩm (Bộ Công Thương). *Enterobacter* sp. ISB-25 trước đó được phân lập từ phân giun thu thập tại Vườn Bách thảo (Ba Đình, Hà Nội). ISB-25 được xếp vào chi *Enterobacter* dựa trên độ tương đồng 1439/1450 (99 %) của rDNA so với trình tự HM172500 của *Enterobacter hormaechei* RCPS-3. *Enterobacter* sp. ISB-25 được bảo quản trong ống thạch nghiêng chứa môi trường LB agar (bacto-tryptone 1 %, cao nấm men 0,5 %, NaCl 1 %, agar 1,5 %, pH 7.5).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Kiểm tra khả năng sinh isomaltulose

Enterobacter sp. ISB-25 được nuôi cấy lắc 150 vòng/phút qua đêm trong bình tam giác 250 ml chứa 50 ml môi trường SPY (sucrose 4 %, peptone 1 %, cao nấm men 0,4 %, pH 6,5) [12] ở 30 °C. Dịch nuôi cấy được loại bỏ tế bào bằng li tâm ở 16000 g trong 10 phút ở 4 °C. Canh trường được nhỏ lên bản sắc kí (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck) và chạy bằng hệ dung môi chứa ethylacetate - acetic acid - nước (4 : 3 : 1, v/v). Isomaltulose (Wako, Japan), sucrose (Sigma), glucose (Sigma) được sử dụng làm chuẩn. Bản sắc kí được nhuộm bằng cách phun lên bề mặt

hỗn hợp diphenylamine - aniline – axit phosphoric - acetone (0,15 : 0,18 : 11 : 100, w/v/v/v), và sấy ở 115 °C trong 10 phút [133].

2.2.2. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên hoạt lực sucrose isomerase

Các yếu tố công nghệ như nhiệt độ nuôi cấy, lượng giống tiếp, chế độ thông khí lên khả năng sinh sucrose isomerase của *Enterobacter* sp. ISB-25 được xác định. Chung nghiên cứu trước tiên được nuôi cấy lắc trong bình tam giác 250 ml chứa 50 ml môi trường LB ở 30 °C trong điều kiện lắc 150 vòng/phút (môi trường LB không chứa sucrose nên không kích hoạt sự biểu hiện của sucrose isomerase). Sau 24 giờ, sinh khối được thu hồi và loại bỏ canh trường bằng li tâm ở 16000 g trong 10 phút ở 4 °C. Sinh khối *Enterobacter* sp. ISB-25 sau đó được sử dụng cho nghiên cứu điều kiện sinh tổng hợp enzyme.

Để xác định điều kiện nhiệt độ thích hợp cho sinh tổng hợp sucrose isomerase, sinh khối thu được từ 5 ml canh trường LB được bổ sung vào bình tam giác 250 ml chứa 50 ml môi trường SPY và nuôi cấy ở các nhiệt độ 20, 25, 30, 35, 40, 45 °C ở chế độ lắc 150 vòng/phút. Tương tự như vậy, để khảo sát ảnh hưởng của tốc độ lắc, sinh khối từ 5 ml canh trường LB được bổ sung vào bình tam giác 250 ml chứa 50 ml môi trường SPY và nuôi cấy ở 30 °C với tốc độ lắc 50, 100, 150, 200, 250 vòng/phút. Ảnh hưởng của lượng giống tiếp được xác định bằng cách chuyển sinh khối thu được từ 2.5, 5.0, 12.5, 15.0 ml canh trường LB vào bình tam giác 250 ml chứa 50 ml môi trường SPY và nuôi cấy ở 30 °C với tốc độ lắc 150 vòng/phút.

Sau 24 giờ, 1 ml sinh khối được thu nhận bằng li tâm ở 16000 g trong 10 phút ở 4 °C và rửa 2 lần bằng đệm phosphate 100 mM, pH 7.0 đã làm lạnh. Hoạt tính sucrose isomerase được xác định bằng cách bổ sung 450 µl sucrose 4 % trong đệm phosphate 100 mM, pH 7,0 và ủ ở 37 °C trong 15 phút trên thiết bị Thermocomfort (Eppendorf) ở chế độ lắc 600 vòng/phút. Lượng đường khử sinh ra được xác định bằng phương pháp Somogyi [14] với đường chuẩn là isomaltulose (sucrose không phải là đường khử). Một đơn vị hoạt tính isomaltulose synthase được xác định là lượng enzyme chuyển hóa sucrose thành 1 µmol đường khử trong một phút ở điều kiện phân tích.

2.2.3. Điều kiện chuyển hóa sucrose thành isomaltulose

Enterobacter ISB-25 được nuôi cấy lắc 150 vòng/phút trong bình tam giác 250 ml chứa 50 ml môi trường SPY, pH 6.5. Sau 24 giờ, sinh khối được thu hồi bằng li tâm ở 16000 g, nhiệt độ 4 °C trong 10 phút. Sinh khối được rửa 3 lần bằng đệm phosphate 50 mM, pH 6.5. Quá trình chuyển hóa sucrose thành isomaltulose được thực hiện trong dung dịch đường sucrose pha trong đệm phosphate 50 mM, pH 6.5 sử dụng sinh khối *Enterobacter* ISB-25 làm xúc tác.

Để xác định ảnh hưởng của mật độ tế bào lên hiệu suất chuyển hóa, sinh khối thu được từ 10, 20, 30, 40, 50 ml canh trường SPY (tương ứng với mật độ 20, 40, 60, 80, 100 %) được bổ sung vào 50 ml dung dịch sucrose 20 % pha trong đệm phosphate 50 mM, pH 6.5 và lắc 150 vòng/phút ở 40 °C. Sau 24 giờ, sinh khối được loại bỏ bằng li tâm ở 16000 g trong 10 phút và thành phần dịch chuyển hóa được phân tích bằng sắc ký lỏng cao áp. Tương tự như vậy, ảnh hưởng của nồng độ cơ chất lên sinh chuyển hóa sucrose thành isomaltulose được xác định bằng việc sử dụng nồng độ sucrose 10, 20, 30, 40 % với mật độ tế bào là 60 %. Động học chuyển hóa sucrose thành isomaltulose được xác định bằng việc sử dụng mật độ tế bào 60 %, nồng độ sucrose 20 %. Mẫu được lấy ra theo giờ và phân tích thành phần chuyển hóa như đã nêu ở trên.

2.2.4. Thu hồi và kết tinh sản phẩm

Dịch đường sau chuyển hóa được li tâm ở 16000 g trong 10 phút nhằm loại sinh khối vi sinh vật. Dịch đường được tiếp tục xử lý bằng cách bổ sung 0,5 % than hoạt tính, khuấy ở 50 vòng/phút trong 30 phút ở 80 °C nhằm loại nhiễm tạp từ môi trường nuôi cấy cũng như các thành phần sinh khối tự phân. Than hoạt tính được lọc bằng giấy lọc sau đó dịch được cô về 70° Bx bằng thiết bị cô chân không gia nhiệt ở 80 °C. Ngay sau khi bổ sung một lượng nhỏ tinh thể mầm isomaltulose trong điều kiện có khuấy quá trình kết tinh diễn ra và được duy trì trong 24 giờ (hình 7). Isomaltulose tinh thể được thu hồi bằng li tâm vắt.

2.2.5. Phân tích hóa học

Để phân tích hóa học, hỗn hợp sau chuyển hóa được li tâm và lọc qua màng 0,2 µm nhằm loại sinh khối và các hạt lơ lửng. Thành phần dịch chuyển hóa và sản phẩm isomaltulose được phân tích bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC, Shimadzu) sử dụng cột C18 (250 × 4,6 mm, Alltech), nhiệt độ cột 40 °C, với pha động là nước, tốc độ dòng 0,2 ml/phút và detector RID.

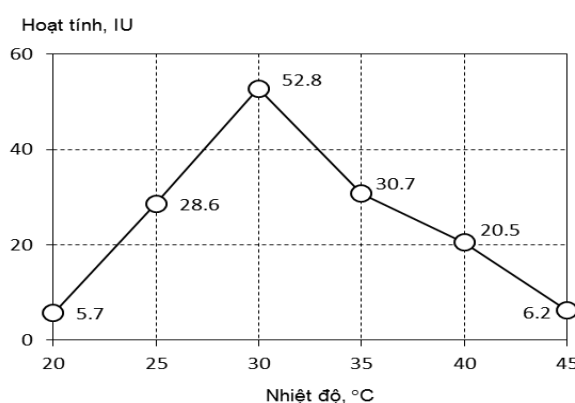
3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kiểm tra khả năng sinh isomaltulose

Thử nghiệm với các đường chuẩn cho thấy kỹ thuật TLC sử dụng cho phép phân tách sucrose, isomaltulose, glucose/fructose. Các vết sau khi nhuộm có màu xám nâu. Phân tích canh trường của *Enterobacter* ISB-25 trên môi trường SPY cho thấy chủng có khả năng chuyển hóa rất mạnh sucrose thành isomaltulose. Trong hỗn hợp tạo thành, isomaltulose là thành phần chiếm tỉ trọng áp đảo, ngoài ra còn có một lượng nhỏ sucrose chưa chuyển hóa. Kết quả thể hiện rõ hơn khi phân tích bằng HPLC (hình 8).

3.2. Các yếu tố ảnh hưởng lên sinh tổng hợp sucrose isomerase

3.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

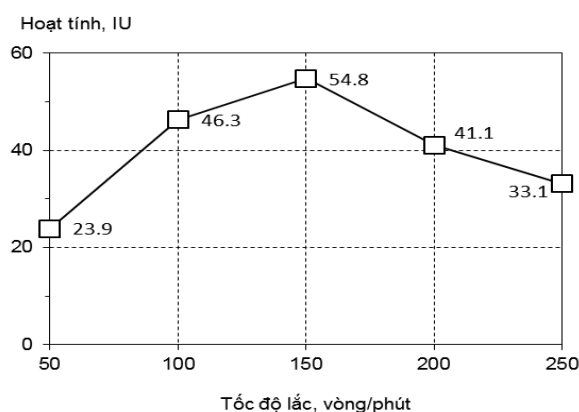


Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sinh tổng hợp sucrose isomerase bởi *Enterobacter* sp. ISB-25.

Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng rất lớn tới khả năng sinh tổng hợp enzyme. Hoạt lực sucrose isomerase của *Enterobacter* sp. ISB-25 cao nhất khi nuôi ở nhiệt độ 30 °C (đạt 52,8 IU/ml). Ở các nhiệt độ lân cận như 25 °C hay 35 °C hoạt tính enzyme chỉ còn khoảng một nửa, tương ứng với 28,6 và 30,7 IU/ml (hình 1). Ở các nhiệt độ 20 °C hay 45 °C hoạt tính sucrose isomerase thu được là rất thấp (8,0 và 6,1 IU/ml).

3.2.2. Ảnh hưởng của chế độ thông khí

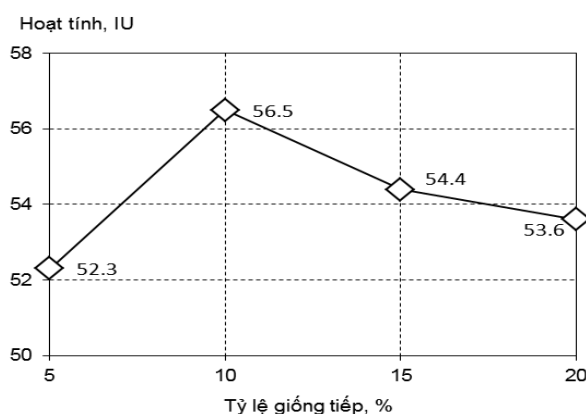
Enterobacter là vi sinh vật thuộc nhóm vi hiếu khí và độ thoáng khí có ảnh hưởng lớn tới sinh trưởng, phát triển. Với tốc độ lắc 150 vòng/phút, hoạt tính enzyme sucrose isomerase đạt được cao nhất (54,8 IU/ml) (hình 2). Lắc với tốc độ lớn hơn hoặc nhỏ hơn đều dẫn tới sự thay đổi lớn về hoạt lực sucrose isomerase. Ở tốc độ lắc 50 vòng/phút và 250 vòng/phút hoạt lực enzyme thu được lần lượt là 23,9 và 33,1 IU/ml, tức là khoảng một nửa so với điều kiện tối ưu.



Hình 2. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến tới sinh tổng hợp sucrose isomerase bởi *Enterobacter* sp. ISB-25.

3.2.3. Ảnh hưởng của lượng giống tiếp

Trong sản xuất, tỉ lệ tiếp giống là một trong những yếu tố công nghệ quan trọng. Thông thường nhà sản xuất mong muốn giảm tỉ lệ tiếp giống để hạn chế đầu tư về trang thiết bị cho các mức lên men trung gian. Tuy nhiên, tỉ lệ tiếp giống nhỏ tiềm ẩn rủi ro về khả năng tạp nhiễm cũng như hiệu suất lên men. Nghiên cứu ở quy mô phòng thí nghiệm với *Enterobacter* sp. ISB-25 cho thấy tỉ lệ giống tiếp 10 % là thích hợp nhất (hình 3). Tăng hoặc giảm tỉ lệ tiếp giống đều dẫn tới sự giảm sút hoạt lực sucrose isomerase trong dịch lên men. Sự giảm sút về hoạt lực enzyme khi sử dụng tỉ lệ giống tiếp lớn hơn 10 % có thể lí giải là do môi trường trong pha khởi động không chứa sucrose và vi sinh vật không sinh sucrose isomerase. Tuy nhiên, cũng cần lưu ý ảnh hưởng của lượng giống tiếp là tương đối nhỏ (thay đổi < 10 %) khi so sánh với các yếu tố khác như nhiệt độ và độ thông khí.

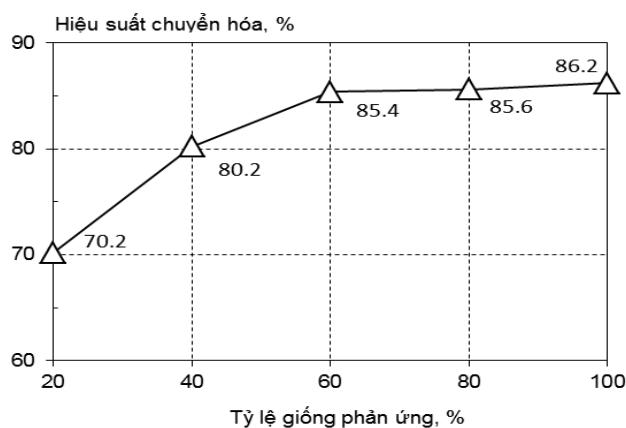


Hình 3. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống tiếp tới sinh tổng hợp sucrose isomerase bởi *Enterobacter* sp. ISB-25.

3.3. Các yếu tố ảnh hưởng lên hiệu suất chuyển hóa sucrose thành isomaltulose

3.3.1. Ảnh hưởng của mật độ tế bào

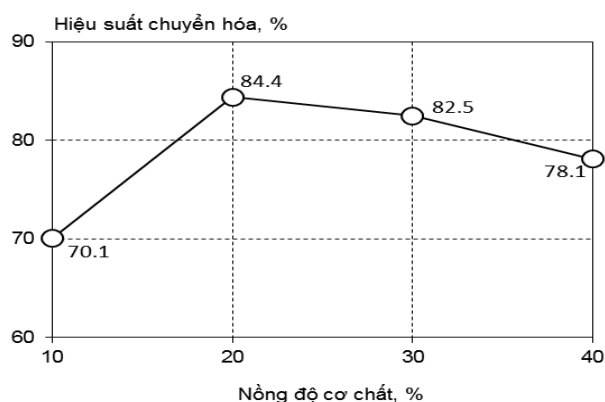
Một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn tới giá thành sản xuất isomaltulose là lượng sinh khối cần thiết để thực hiện phản ứng chuyển hóa. Hiệu suất chuyển hóa dung dịch sucrose 20 % thành isomaltulose với các mật độ tế bào khác nhau từ 20 % tới 100 % được khảo sát (mật độ 100 % tương ứng với mật độ tế bào tạo được trên môi trường nuôi cấy SPY). Kết quả cho thấy sau 24 giờ phản ứng, với mật độ tế bào 20 % hiệu suất chuyển hóa sucrose thành isomaltulose đạt 70,1 % (hình 4). Hiệu suất chuyển hóa tăng dần tới 85,4 % khi mật độ tế bào sử dụng ở mức 60 %. Việc sử dụng mật độ tế bào lớn hơn không đem lại thay đổi đáng kể về hiệu suất chuyển hóa. Điều này cho thấy hiệu suất chuyển hóa 85 – 86 % là hiệu suất ngưỡng của sucrose isomerase tạo bởi *Enterobacter* sp. ISB-25. Hiệu suất này cũng tương đương với các công bố gần đây [10, 15, 4, 116] và nhỉnh hơn so với *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77, chủng công nghiệp hiện hành [11].



Hình 4. Ảnh hưởng của tỉ lệ sinh khối *Enterobacter* sp. ISB 25 tới hiệu suất chuyển hóa sucrose thành isomaltulose.

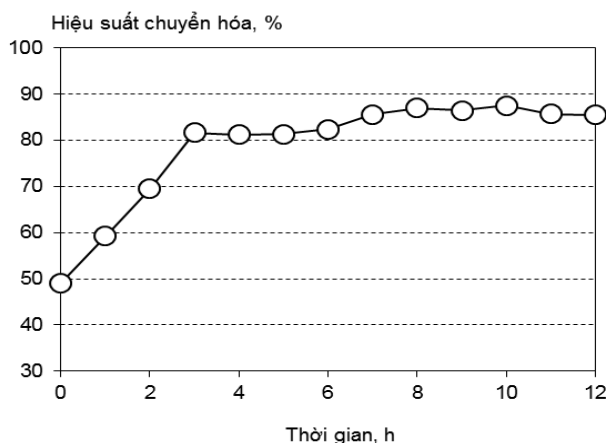
3.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất

Trong công nghệ chuyển hóa đường, việc sử dụng nồng độ cơ chất cao sẽ giúp giảm chi phí cho các công đoạn cô đặc và kết tinh sau này. Hiệu suất chuyển hóa sucrose thành isomaltulose được khảo sát với các nồng độ cơ chất từ 10 % đến 40 % sử dụng mật độ tế bào 60 %. Kết quả chuyển hóa sau 24 giờ cho thấy hiệu suất cao nhất 84,4 % đạt được khi dung dịch sucrose 20 % được sử dụng (hình 5). Ở nồng độ sucrose 10 %, hiệu suất chuyển hóa là thấp nhất và chỉ đạt 70 %. Có thể nồng độ đường 10 % không tạo áp suất thẩm thấu đủ lớn để ức chế sinh trưởng của *Enterobacter sp. ISB 25* và một phần cơ chất được sử dụng. Với nồng độ đường 40 %, hiệu suất chuyển hóa tuy giảm nhưng vẫn ở mức khá cao (78,1 %). Trong thực tế sản xuất, mặc dù mức chuyển hóa này thấp hơn so với mức đạt được ở nồng độ sucrose 20 %, khả năng sử dụng dung dịch cơ chất 40 % cần được xem xét do những ưu thế trong công đoạn cô đặc và kết tinh sản phẩm.



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất tới hiệu suất chuyển hóa sucrose thành isomaltulose bởi *Enterobacter sp. ISB 25*.

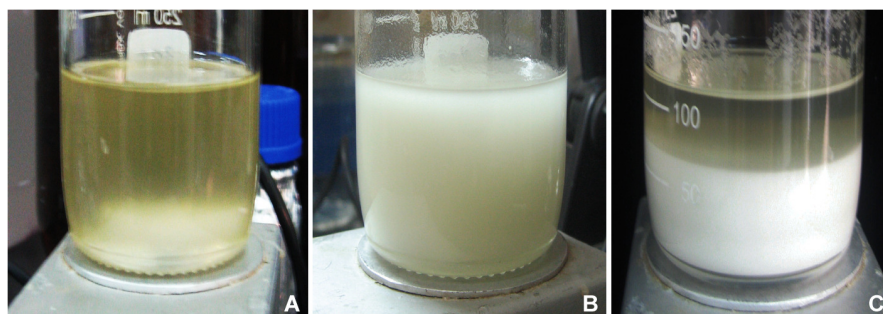
3.3.3. Thời gian phản ứng và hiệu suất chuyển hóa



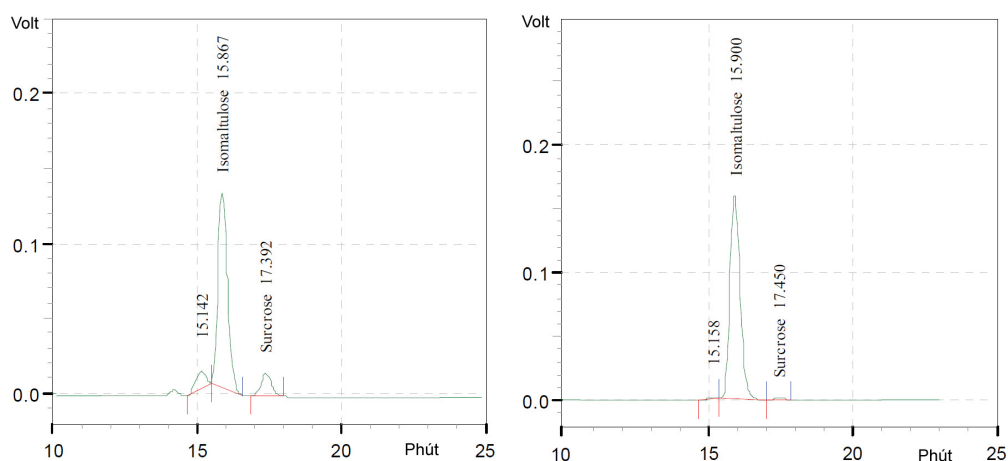
Hình 6. Động học của phản ứng chuyển hóa sucrose thành isomaltulose xúc tác bởi *Enterobacter sp. ISB 25*.

Nhằm xác định thời gian phản ứng phù hợp, động học của quá trình chuyển hóa sucrose thành isomaltulose được xác định sử dụng mật độ tế bào 60 % với nồng độ cơ chất ban đầu là 20 %. Kết quả cho thấy phản ứng chuyển hóa diễn ra nhanh chóng với trên 80 % sucrose được chuyển thành isomaltulose trong vòng 3 giờ đầu (hình 6). Trong những giờ sau, phản ứng diễn ra chậm và thành phần hỗn hợp phản ứng duy trì ở mức ổn định 3.4. Cô đặc và kết tinh isomaltulose.

Để có thể kết tinh isomaltulose một cách hiệu quả, thành phần dịch chuyển hóa phải đủ sạch. Các thí nghiệm thăm dò cho thấy lượng tạp chất không được quá 25 %. Như vậy, với hiệu suất chuyển hóa đạt được trên 80 %, việc kết tinh sản phẩm để tạo isomaltulose tinh khiết là khả thi. Dịch trước hết được li tâm nhằm loại sinh khối vi sinh vật sau đó xử lý bằng than hoạt tính nhằm loại nhiễm tạp từ môi trường nuôi cấy cũng như các thành phần sinh khối tự phân. Dịch đã làm sạch được cô đặc về 70 °Bx và một lượng nhỏ tinh thể mầm isomaltulose được bổ sung trong điều kiện có khuấy. Quá trình kết tinh diễn ra nhanh chóng và sự thay đổi độ đục của dung dịch có thể quan sát bằng mắt thường (hình 7). Quá trình kết tinh được duy trì trong 24 giờ nhằm tận thu isomaltulose. Sau khi loại bỏ phần dịch lỏng bằng li tâm vắt, phần tinh thể được hòa tan trong nước để xác định thành phần. Kết quả cho thấy, với quy trình kết tinh một bước, đường isomaltulose thu nhận được có độ tinh khiết 97 % (hình 8).

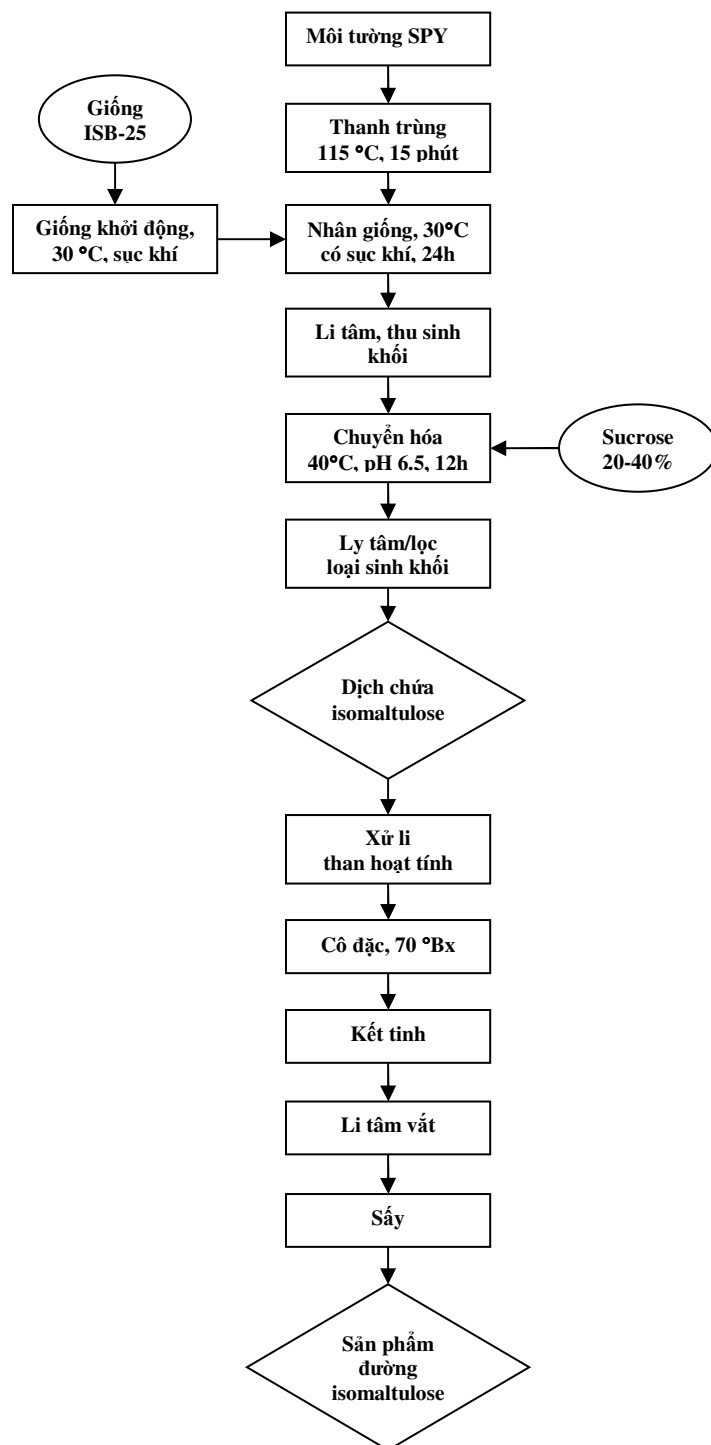


Hình 7. Các bước trong công đoạn kết tinh sản phẩm chuyển hóa. (A) – dịch chuyển hóa sau khi cô về 70 °Bx và bổ sung mầm isomaltulose; (B) - sau 1 giờ kết tinh; (C) – sau 24 giờ kết tinh, các tinh thể isomaltulose tạo thành kết lắng dưới đáy.



Hình 8. Sắc ký đồ HPLC của sản phẩm chuyển hóa sucrose bởi *Enterobacter* ISB-25 (hình trái) và sản phẩm sau khi kết tinh (hình phải).

3.5. Quy trình sản xuất isomaltulose



Hình 9. Quy trình công nghệ sản xuất isomaltulose từ sucrose sử dụng chủng *Enterobacter* sp. ISB-25.

Dựa trên những kết quả đạt được, quy trình công nghệ sản xuất isomaltulose được đề xuất như trong hình 9. Theo đó, chủng *Enterobacter* sp. ISB-25 được hoạt hóa trên môi trường thạch LB ở 30 °C trong 24 giờ và nhân giống trong nồi lên men chứa môi trường dịch LB ở chế độ khuấy 150 vòng/phút, sục khí 0,5 v/v/phút ở 30 °C trong 24 giờ. Giống được tiếp vào môi trường SPY vô trùng theo tỉ lệ thể tích 1 : 9 và lên men tiếp ở 30 °C, khuấy 150 vòng/phút, sục khí 0,5 v/v/phút trong 24 giờ. Sinh khối được thu hồi bằng li tâm liên tục ở 16000 g và chuyển vào nồi phản ứng chứa dung dịch đường sucrose 20 %, pH 6,5. Phản ứng chuyển hóa được thực hiện ở 40 °C với tốc độ khuấy 50 vòng/phút trong 12 giờ. Dịch được loại bỏ sinh khối bằng li tâm liên tục ở 16000 g. Phần dịch trong được bổ sung 0,5 % than hoạt tính, nâng nhiệt lên 80 °C và khuấy ở 50 vòng/phút trong 30 phút. Dịch được loại than hoạt tính bằng máy lọc khung bản và cô đặc tới nồng độ 70 °Bx sử dụng thiết bị cô chân không. Để kết tinh, 0,01 % tinh thể isomaltulose được bổ sung và khuấy đảo ở 50 vòng/phút trong 12 giờ. Hỗn hợp được li tâm rỗ để thu hồi tinh thể. Trong trường hợp cần thiết, tinh thể có thể được hòa lại trong nước về nồng độ 70 °Bx và tiến hành kết tinh lần 2. Sản phẩm được sấy ở 55 °C trong thiết bị sấy tang trống. Quy trình công nghệ đã được thử nghiệm tại Viện Công nghiệp thực phẩm ở quy mô nồi lên men 300 lít với các trang thiết bị có sẵn. Hiệu suất chuyển hóa sucrose thành isomaltulose đạt 85 %. Sản phẩm thực nghiệm sau kết tinh lần 1 có độ tinh khiết 89,6 % và đạt 97,0 % sau lần kết tinh thứ 2.

4. KẾT LUẬN

Chủng *Enterobacter* sp. ISB-25 phân lập tại Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp sucrose isomerase với hoạt lực 55 IU/ml trên môi trường SPY ở điều kiện nhiệt độ 30 °C, lắc 150 vòng/phút và lượng giống tiếp 10 %. Hiệu suất chuyển hóa sucrose thành isomaltulose đạt 85 % sau 12 giờ với nồng độ sucrose ban đầu 20 % và mật độ tế bào 60 % so với mật độ trên môi trường SPY. Sản phẩm chuyển hóa sau khi cô đặc và kết tinh một bước ở quy mô phòng thí nghiệm có độ tinh khiết 97 %. Chủng *Enterobacter* sp. ISB-25 có năng lực chuyển hóa tương đương chủng công nghiệp hiện hành. Quy trình sản xuất isomaltulose từ sucrose sử dụng *Enterobacter* sp. ISB-25 được đề xuất và thử nghiệm ở quy mô nồi lên men 300 lít. Hiệu suất chuyển hóa sucrose thành isomaltulose đạt 85 %. Sản phẩm thực nghiệm sau kết tinh lần 1 có độ tinh khiết 89,6 % và đạt 97,0 % sau lần kết tinh thứ 2.

Lời cảm ơn. Nghiên cứu này được thực hiện bằng kinh phí tài trợ từ Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội. Các tác giả ghi nhận đóng góp của các sinh viên Bùi Thị Quỳnh Anh và Đinh Đức Hiền trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lina B. A., Jonker D., Koziarowski G. - Isomaltulose (Palatinose): a review of biological and toxicological studies, Food. Chem. Toxicol. **40** (2002) 1375-1381.
2. Weidenhagen R., Lorenz S.- German Patent DE1049800 (1957).
3. Veronese T., Perlot P. - Proposition for the biochemical mechanism occurring in the sucrose isomerase active site, FEBS Lett. **441** (1998) 348-352.
4. Cheetham P. S. J. - The extraction and mechanism of a novel isomaltulose- synthesizing enzyme from *Erwinia rhapontici*, Biochem. J. **220** (1984) 213-220.

5. Zhang D., Li N., Lok S. M., Zhang L. H., Swaminathan K. - Isomaltulose synthase (PalI) of *Klebsiella* sp. LX3.- Crystal structure and implication of mechanism, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 35428-35434.
6. Huang J. H., Hsu L. H., Su Y. C. - Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112, *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **21** (1998) 22-27.
7. Wu L., Birch R. G.- Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene, *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (2005) 1581-1590.
8. Nagai-Miyata J., Tsuyuki K., Sugitani T., Ebashi T., Nakajima Y. - Isolation and Characterization of a Trehalulose-producing Strain of *Agrobacterium*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57** (1993) 2049-2053.
9. Nagai Y., Sugitani T., Tsuyuki K. - Characterization of alpha-glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58** (1994) 1789-1793.
10. Cho M. H., Park S. E., Lim J. K., Kim J. S., Kim J. H., Kwon D. Y., Park C. S. - Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp. FMB1, an isomaltulose-producing microorganism isolated from traditional Korean food, *Biotechnol. Lett.* **29** (2007) 453-458.
11. Frenzel S., Peters S., Rose T., Kunz M. Industrial sucrose. R. Hofer (ed.) Sustainable solutions for modern economies, RSC Publishing, Cambridge, 2009, pp. 264-299.
12. Li X., Zhao C., An Q., Zhang D. - Substrate induction of isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella* sp. LX3. *J Appl Microbiol* **95** (2003) 521-527.
13. Anderson K., Li S. C., Li Y. T. - Diphenylamine-Aniline-Phosphoric acid reagent, a versatile spray reagent for revealing glycoconjugates on thin-layer chromatography plates, *Anal. Biochem.* **287** (2000) 337-339.
14. Somogyi M.- Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.* **195** (1952) 19-23.
15. Lund B. M., Wyatt G. M. - Nature of reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var *atroseptica*, *J. Gen. Microbiol.* **78** (1973) 331-336.
16. Li X., Zhang D., Chen F., Ma J., Dong Y., Zhang L. - *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54** (2004) 2131-2136.

ABSTRACT

TECHNOLOGY FOR ISOMALTULOSE PRODUCTION FROM SUCROSE USING *ENTEROBACTER* SP. ISB-25

Nguyen Thanh Thuy, Nguyen Thi Hoa Mai, Dinh Thi My Hang, Vu Nguyen Thanh*

Food Industries Research Institute, Address?

*Email: thanh@firi.ac.vn

Thanks to healthy effects against dental diseases and suitability for diabetic patients, children, physically active peoples, isomaltulose is considered as a promising sucrose

replacement. Commercially, isomaltulose is produced from sucrose by bacterial fermentation. During a screening program for isomaltulose producer, strain ISB-25 identified as *Enterobacter* sp. was isolated. *Enterobacter* sp. ISB-25 sucrose isomerase activity reached 55 IU/ml in SPY medium after 12 hours of incubation at 30 °C with shaking speed of 150 rpm and with seed culture ratio of 10 %. By using *Enterobacter* sp. ISB-25 cells at the density equal to 60 % of that obtained in SPY broth as biocatalyst, 85 % of sucrose was converted to isomaltulose in a 20 % sucrose solution at 40 °C after 12 hours. Conversion product after concentration and one step crystallization has the purity of 97 %. Isomaltulose production activity of *Enterobacter* sp. ISB-25 is slightly higher than current industrial strain *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77. Technology for isomaltulose production from sucrose using *Enterobacter* sp. ISB-25 was proposed and tested in a 300 liter fermentor.

Keywords: sucrose, isomaltulose, functional sugar production, *Enterobacter*, conversion.

Ý kiến Tổng biên tập:

Đề nghị tác giả bổ sung địa chỉ cơ quan
