

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG ENZYME ĐỂ CHIẾT XUẤT PECTIN TỪ VỎ CHANH LEO TÍM

Nguyễn Thị Hồng Hà¹, Nguyễn Ngọc Huyền¹, Nguyễn Thị Hương Trà¹,
Vũ Thu Diễm¹, Đỗ Thị Thu Hiền¹, Lê Khánh Linh²

TÓM TẮT

Pectin là một chất phụ gia thực phẩm sinh học an toàn và có cấu tạo gồm các polysaccharite dị thể, mạch thẳng, dẫn xuất methyl của axit pectic. So với polysaccharits khác, pectin có nhiều lợi thế như ổn định nhiệt và axit, điều chỉnh độ đàn hồi gel và độ cứng, độ trong suốt cao, giải phóng hương vị tốt. Nó được ứng dụng trong thực phẩm, dược phẩm và các ngành công nghiệp khác như một chất tạo độ đặc, ổn định, làm dày, chất nhũ hóa và chất tạo gel. Bài báo trình bày các kết quả nghiên cứu sử dụng enzyme để chiết xuất pectin từ vỏ chanh leo tím. Trong số các chế phẩm enzyme thử nghiệm (Celluclast[®] 1,5L và Viscozyme[®]) đã lựa chọn Celluclast[®] 1,5L là enzyme thích hợp cho quá trình thủy phân để thu hồi hàm lượng pectin từ vỏ chanh leo tím. Đã tìm được các thông số thích hợp cho quá trình thủy phân của enzyme: nồng độ enzyme 0,5%; pH 4,5 - 5,0; thời gian 120 phút, nhiệt độ 45°C - 50°C, tốc độ khuấy 150 vòng/phút. Ở điều kiện này, phương pháp sử dụng enzyme cho sản lượng pectin đạt 3,6 g/100 g nguyên liệu, cao hơn 27,65% so với phương pháp hóa học.

Từ khóa: Pectin, vỏ chanh leo tím, enzyme, Celluclast[®] 1,5L.

1. BẬT VẤN ĐỀ

Pectin được xem là một trong những phụ gia thực phẩm an toàn và được ứng dụng nhiều nhất (May, 1990). Các nghiên cứu đã chỉ ra tác dụng có lợi của pectin đến sức khỏe con người như giảm hàm lượng đường và cholesterol, đặc biệt là hoạt tính chống ung thư. Theo số liệu thống kê năm 2016, tổng tiêu thụ pectin trên toàn cầu là khoảng 60.000 tấn/năm với tỉ lệ tăng trưởng 6%. Ở Mỹ hàng năm sản xuất 2.500 tấn pectin bột, trong đó khoảng 80% là pectin từ cam chanh, còn lại là từ táo.

Ở Việt Nam các công trình nghiên cứu chiết tách pectin từ các loại vỏ quả mới chỉ mang tính chất thăm dò, từ những nguồn nguyên liệu chưa có tính tập trung nên chưa có sản phẩm pectin thương mại, lượng pectin được sử dụng trong nước vẫn phải nhập khẩu với số lượng lớn. Trong nước, các công trình nghiên cứu chiết xuất pectin từ vỏ quả chủ yếu bằng axit, chưa có công trình nào sử dụng enzyme trong tách chiết pectin. Phương pháp sử dụng axit để tách chiết pectin có một số nhược điểm như thời gian chiết xuất dài, nhiệt độ chiết cao dễ gây biến tính pectin đồng thời gây ô nhiễm môi trường. Phương

pháp sử dụng enzyme cho tách chiết pectin đã được thấy an toàn cho môi trường và tiêu hao nguồn năng lượng thấp do quá trình chiết xuất được thực hiện ở nhiệt độ trung bình (Zapata, 2009). Một vài nhà nghiên cứu đã sử dụng enzyme cellulases, hemicellulases, polygalacturonases và một số loại hỗn hợp enzyme cho tách chiết pectin (Contreras-Esquivel, 2006; Min, 2011). Enzyme cellulase có tác dụng thủy phân cellulose trên thành tế bào và giải phóng pectin. Enzyme polygalacturonase đã được sử dụng để chiết xuất pectin từ bã táo và lê. Hiệu suất chiết pectin trên bã táo và lê cao hơn 20% đến 40% so với phương pháp sử dụng hóa chất. Zapata và cộng sự (2009) đã nghiên cứu sử dụng enzyme PPase-SE cho tách chiết pectin từ vỏ chanh, sản lượng pectin thu được cao đạt 5,5 g/100g vỏ tươi, tương đương với 28g/100 g vỏ khô. Hay nghiên cứu gần đây Juliana Vasco-Correa và cộng sự năm 2017 đã tách chiết pectin từ vỏ chanh leo vàng sử dụng enzyme protopectinase- SE và so sánh với phương pháp hóa học truyền thống, kết quả cho thấy sản lượng pectin đạt 17- 26g/100 g vỏ khô, cao hơn 40% so với tách chiết bằng phương pháp hóa học (Juliana Vasco-Correa, 2017). Trên cơ sở các thông tin trong và ngoài nước, trong nghiên cứu này, đã tiến hành nghiên cứu lựa chọn enzyme và ảnh hưởng của một số yếu tố trong quá trình thủy phân của enzyme (tỷ lệ enzyme, nhiệt độ, thời gian thủy phân, pH dịch

¹ Viện Cơ điện Nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch

² Trường Đại học Curtin, Tây Úc

Email: ngthongha77@gmail.com

quả) đến hàm lượng thu hồi pectin chiết xuất từ vỏ quả chanh leo tươi.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng

Vỏ chanh leo tím do Công ty Cổ phần Thực phẩm xuất khẩu Đồng Giao tại Tam Điệp, Ninh Bình cung cấp. Thời gian cung cấp 5/2020 - 1/2021. Nguyên liệu sau khi tách dịch quả được đưa ngay về phòng thí nghiệm.

2.1.2. Hoá chất

- Chế phẩm enzyme Viscozyme®L (Novozymes, Đan Mạch): được sản xuất từ nấm *A. aculeatus*. Hoạt tính 100 FBG/g (FBG - Fungal Beta-Glucanase Units), enzyme hoạt động ở pH 3,3 - 5,5, nhiệt độ 25 - 55°C.

- Chế phẩm enzyme Celluclast® 1,5L (Novozymes, Đan Mạch): được sản xuất từ nấm *Trichoderma reesi*. Hoạt tính của chế phẩm là 700 EGU/g (EGU - Beta-glucanase Units). Enzyme hoạt động ở pH 4,5 - 6,0 nhiệt độ 40 - 60°C.

- Hóa chất khác như: aceton, ethanol, hexan (Sigma-Aldrich, Mỹ)... đều đạt tiêu chuẩn dùng trong phân tích; các hóa chất được giữ ở 4°C khoảng 1 giờ trước khi tiến hành thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu lựa chọn loại enzyme thích hợp cho trích ly pectin

Chế phẩm enzyme được lựa chọn cho thí nghiệm này là Celluclast 1,5L và chế phẩm Viscozyme L. Vỏ chanh leo tím được rửa sạch, cắt miếng 3 cm - 5 cm, sau đó được xử lý với chlorine 150 ppm, pH = 6, thời gian 6-8 phút. Xay nhuyễn, cân 100 g vỏ quả/mẫu hòa với 200 ml dung dịch đệm sodium citrate (25 mmol/L; pH 5.2). Sau đó bổ sung chế phẩm enzyme (Celluclast 1,5L, enzyme Viscozyme) với nồng độ 0,25%. Hỗn hợp được khuấy bằng máy khuấy cho đến khi đồng nhất. Quá trình thủy phân của enzyme được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ 40°C, pH 5,0, tốc độ khuấy 120 vòng/phút, thời gian thủy phân 60 phút. Sau đó, mẫu được gia nhiệt ở 90°C trong 10 phút để bất hoạt enzyme. Thu hồi pectin bằng cách, lọc hỗn dịch sơ bộ qua vải màn 5 lớp, thu dịch lọc, loại bã lọc. Dịch lọc tiếp tục được ly tâm ở 7000 vòng/phút trong 15 phút để loại phần cặn nhỏ còn sót lại. Dịch nổi chứa pectin được bổ sung ethanol theo tỉ lệ 1:3 (v/v), đảo đều, quá trình tủa

pectin ở nhiệt độ 4°C, thời gian khoảng 4 giờ, sau đó tiến hành ly tâm ở 4500 vòng/phút trong 15 phút để thu tủa pectin. Rửa và thu tủa pectin bằng ethanol được lặp lại lần 2. Tủa pectin được sấy khô ở nhiệt độ 65°C đến độ ẩm khoảng 7%. Xác định lượng pectin thu được ứng với mỗi loại enzyme khác nhau. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, kết quả lấy giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm.

* Hàm lượng của pectin từ vỏ quả được xác định là số gam sản phẩm thu được trên số gam mẫu đem phân tích (%):

$$\text{Hàm lượng pectin (\%)} = \frac{\text{Khối lượng sản phẩm thu được (g)}}{\text{Khối lượng mẫu đem chiết (g)}} \times 100\%$$

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng thu hồi hàm lượng pectin từ vỏ chanh leo tím bằng sử dụng enzyme

Vỏ chanh leo tím được rửa sạch, cắt miếng 3-5 cm, sau đó được xử lý với chlorine 150 ppm, pH = 6, thời gian 6-8 phút, sau đó được xay nhuyễn. Mỗi phương án thử nghiệm được tiến hành với 100 g vỏ quả/mẫu hòa với 200 ml dung dịch đệm sodium citrate (25 mmol/L; pH 5,2). Các thử nghiệm được khảo sát với 4 nồng độ enzyme (0,25, 0,5, 1,0, 1,5%), 4 tốc độ khuấy (120, 150, 180, 220) vòng/phút, 5 giá trị pH (4,0; 4,5, 5,0, 5,5 và 6,0), 6 giá trị nhiệt độ (35, 40, 45, 50, 55 và 60)°C; 4 mốc thời gian (60, 120, 180 và 240) phút. Sau thời gian trên, mẫu được gia nhiệt ở 90°C trong 10 phút để bất hoạt enzyme. Thu hồi pectin bằng cách, lọc hỗn dịch sơ bộ qua vải màn 5 lớp, thu dịch lọc, loại bã lọc. Dịch lọc tiếp tục được ly tâm ở 7000 vòng/phút trong 15 phút để loại phần cặn nhỏ còn sót lại. Dịch nổi chứa pectin được bổ sung ethanol theo tỉ lệ 1:3 (v/v), đảo đều, quá trình tủa pectin ở nhiệt độ 4°C, thời gian khoảng 4 giờ, sau đó tiến hành ly tâm ở 4500 vòng/phút trong 15 phút để thu tủa pectin. Rửa và thu tủa pectin bằng ethanol được lặp lại lần 2. Tủa pectin được sấy khô ở nhiệt độ 65°C đến độ ẩm khoảng 7%. Xác định lượng pectin thu được ứng với mỗi thực nghiệm khác nhau. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, kết quả lấy giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm.

2.3. So sánh các phương pháp trích ly

Trong phần này, tiến hành đánh giá hiệu quả trích ly pectin của phương pháp enzyme và axit:

(1) Phương pháp sử dụng chế phẩm enzyme thích hợp vừa tìm được cho trích ly pectin. Tiến hành

trương tự như mục 2.2.2, chỉ khác là quá trình thủy phân của enzyme được thực hiện ở nồng độ enzyme; điều kiện tốc độ khuấy; nhiệt độ; pH; thời gian thủy phân thích hợp vừa tìm được. Sau đó, xác định lượng pectin thu được. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, kết quả lấy giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm.

(2) Sử dụng axit HCl 0,1M: tiến hành theo phương pháp của Gusek và cộng sự (2006) có cải tiến: Vỏ chanh leo tím được rửa sạch, cắt miếng 3-5 cm, sau đó được xử lý với chlorine 150 ppm, pH = 6, thời gian 6-8 phút. Xay nhuyễn, cân 100 g vỏ quả/mẫu, bổ sung 300 ml nước cất. Điều chỉnh hỗn dịch đến pH = 2 bằng HCl 0,1M. Đun hỗn dịch ở nhiệt độ 90°C trong 45 phút, khuấy nhẹ. Thu hồi pectin bằng cách lọc hỗn dịch sơ bộ qua vải màn 5 lớp, thu dịch lọc, loại bã lọc. Dịch lọc tiếp tục được ly tâm ở 7000 vòng/phút trong 15 phút để loại phần cặn. Dịch nổi chứa pectin được bổ sung ethanol theo tỉ lệ 1:3 (v/v), đảo đều, quá trình tủa pectin ở nhiệt độ phòng, thời gian khoảng 12 giờ, tiếp đó tiến hành ly tâm ở 4500 vòng/phút trong 15 phút để thu tủa pectin. Rửa và thu tủa pectin bằng ethanol được lặp lại lần 2. Pectin được sấy khô ở nhiệt độ 65°C đến khối lượng không đổi. Đánh giá lượng pectin thu được. Thí nghiệm lặp lại 3 lần, kết quả lấy giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm.

2.4. Phương pháp thống kê

Số liệu thực nghiệm được xử lý theo Anova

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

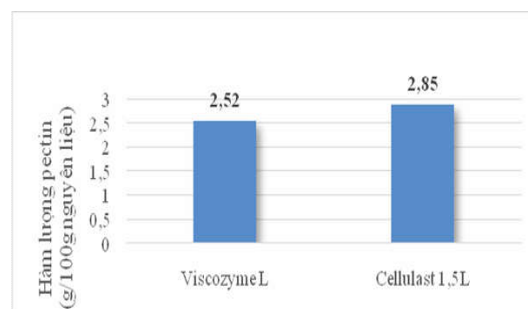
3.1. Nghiên cứu lựa chọn loại enzyme thích hợp cho trích ly pectin



Hình 2. Nguyên liệu vỏ chanh leo tím cho tách chiết pectin

Kết quả ở hình 1 cho thấy, hàm lượng pectin thu được cao nhất ở mẫu xử lý với chế phẩm enzyme Celluclast 1,5L đạt 2,85 g, sử dụng chế phẩm

Xử lý vỏ chanh leo tím bằng enzyme là một bước quan trọng trong quá trình thu nhận pectin. Theo Durán-Aranguren D và cộng sự (2019) nghiên cứu thành phần hóa học vỏ chanh leo tím cho thấy hàm lượng cellulose, hemicellulose và pectin khá cao so với các loại vỏ quả khác. Hàm lượng một số chất theo khối lượng chất khô là cellulose chiếm 34,1%, hemicellulose là 20,4% và pectin 14,9% (Durán-Aranguren D và cộng sự., 2019). Trong vỏ chanh leo tím, pectin có hai dạng pectin hòa tan và pectin không hòa tan gọi là protopectin. Pectin hòa tan chủ yếu có trong dịch tế bào. Protopectin ở trong màng tế bào và gian bào và chúng thường liên kết với cellulose để tạo thành pectinocellulose. Mục đích chủ yếu của việc sử dụng enzyme Celluclast và Viscozyme L là thủy phân cellulose, hemicellulose và pectinocellulose trong thành tế bào thực vật từ đó giải phóng pectin. Để lựa chọn loại enzyme thích hợp cho quá trình trích ly pectin từ vỏ chanh leo tím, thí nghiệm được tiến hành với hai loại chế phẩm enzyme Celluclast 1,5L và enzyme Viscozyme L như miêu tả ở mục 2.2.1. Kết quả được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Nghiên cứu lựa chọn loại enzyme thích hợp cho trích ly pectin



Hình 3. Pectin thu được khi xử lý với chế phẩm Celluclast 1,5L và Viscozyme L

Viscozyme L cho sản lượng pectin thấp hơn đạt 2,52 g. Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả của Olga G. Shkodina, 1998, tác giả đã sử dụng axit

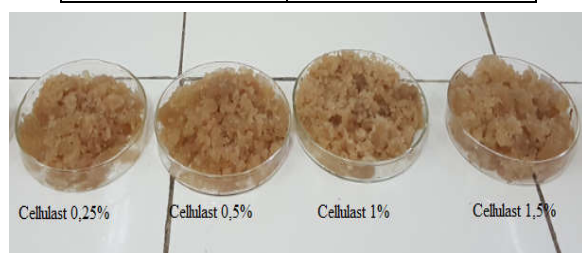
HCl 0,1M và 3 chế phẩm enzyme để tách chiết pectin từ bí ngô (cellulose từ *Trichoderma viride*, hemicellulose từ *A. niger* và phức hợp glycosidase từ *Xanthomonas campestris*). Kết quả cho thấy sử dụng enzyme Celluclast cho sản lượng pectin cao nhất với hàm lượng polygalacturonic acid (PGA) là 39%, tiếp đến là hemicellulose và glycoside, thấp nhất là axit HCl 0,1M. Từ kết quả nghiên cứu này đã lựa chọn chế phẩm Celluclast 1,5L cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme

Phản ứng enzyme là phản ứng thuận nghịch, phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó nồng độ enzyme có ảnh hưởng quan trọng tới khả năng phân giải cơ chất của enzyme. Để xác định được nồng độ chế phẩm enzyme Celluclast 1,5L thích hợp cho trích ly pectin từ vỏ chanh leo tím, thí nghiệm được tiến hành với các nồng độ enzyme khác nhau: 0,25%; 0,50%; 1,00% và 1,50%. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme bổ sung đến hàm lượng pectin thu được

Nồng độ Celluclast 1,5L (%)	Hàm lượng pectin (g/100 g nguyên liệu)
0,25	2,82 ± 0,12 ^b
0,50	3,15 ± 0,102 ^a
1,00	3,22 ± 0,125 ^a
1,50	3,27 ± 0,24 ^a



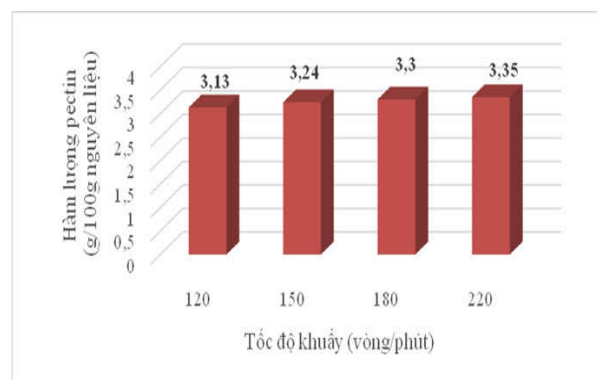
Hình 4. Khảo sát các nồng độ enzyme Celluclast 1,5L cho tách chiết pectin

Kết quả ở bảng 1 và hình 4 cho thấy, hàm lượng pectin thu được ứng với các mức nồng độ enzyme. Trong khoảng nồng độ enzyme từ 0,25 - 1,50%, hàm lượng pectin tăng từ 2,82 - 3,27 g. Hàm lượng pectin tăng theo mức tăng nồng độ enzyme, tuy nhiên khi tăng nồng độ enzyme từ 1,0 - 1,5% thì lượng pectin thu được có tăng nhưng không có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$. Điều này được giải thích là do khi tăng

nồng độ enzyme thì số phân tử enzyme trên một đơn vị diện tích tăng, do đó chúng sẽ xúc tác phân cắt được nhiều liên kết glycoside hơn. Tuy nhiên, khi đến một nồng độ nào đó đủ để enzyme phân cắt hầu hết liên kết glycoside, nếu tiếp tục tăng lượng enzyme sẽ thừa. Vì vậy, đã chọn 0,50% là tỷ lệ thích hợp nhất cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy

Trong quá trình thủy phân của enzyme, tốc độ khuấy là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả trích ly pectin từ vỏ quả. Do vậy, để xác định tốc độ khuấy thích hợp cho quá trình xử lý vỏ quả chanh leo tím bằng chế phẩm enzyme Celluclast 1,5L, thí nghiệm được tiến hành với các tốc độ khuấy khác nhau: 120 vòng/ phút, 150 vòng/ phút, 180 vòng/ phút và 220 vòng/ phút. Kết quả được trình bày ở hình 5.



Hình 5. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến hàm lượng pectin

Kết quả ở hình 5 cho thấy ở tốc độ khuấy 120 vòng/phút, hàm lượng pectin thu được thấp nhất. Khi tăng tốc độ khuấy lên 150 vòng/phút, lượng pectin gia tăng rõ rệt, đạt 3,24 g. Tốc độ khuấy tăng từ 180 - 220 vòng/phút, sản lượng pectin chỉ tăng nhẹ. Từ kết quả này, đã lựa chọn tốc độ khuấy 150 vòng/phút cho các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với Juliana Vasco-Correa và cộng sự năm 2017 đã tách chiết pectin từ vỏ chanh leo vàng, tác giả đã cho thấy, vì dung dịch trích ly có đặc tính nhầy nhót nên trong các thông số trích ly thì vận tốc khuấy có ảnh hưởng nhiều đến thu nhận hàm lượng pectin. Sản lượng tốt nhất thu được khi sử dụng enzyme trích ly protopectinase - SE 30U/ml ở pH 3 và nhiệt độ 37°C, thời gian thủy phân 120 phút với vận tốc khuấy 150 vòng/phút (Juliana Vasco-Correa, 2017).

3.4. Ảnh hưởng của pH trong quá trình thủy phân của enzyme

Sự thay đổi pH ảnh hưởng nhiều đến hoạt tính enzyme. Mỗi enzyme chỉ hoạt động mạnh nhất ở một pH xác định, gọi là pH tối ưu. Khi pH quá cao hay quá thấp đều ảnh hưởng đến hiệu suất thủy phân của enzyme. Vì vậy, việc xác định pH thích hợp cho quá trình thủy phân của enzyme đạt hiệu quả cao là cần thiết. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của pH trong quá trình thủy phân của enzyme đến thu nhận pectin từ vỏ chanh leo được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH trong quá trình thủy phân của enzyme đến lượng pectin

pH	Hàm lượng pectin (g/100 g nguyên liệu)
4,0	3,11± 0,1 ^c
4,5	3,31±0,08 ^a
5,0	3,28±0,05 ^a
5,5	3,17±0,073 ^{abc}
6,0	3,15±0,07 ^{bc}

Kết quả ở bảng 2 cho thấy khi pH dịch quả là 4,0, hàm lượng pectin thu được không cao, đạt 3,11 g. Khi tăng pH dịch quả từ 4,5 - 5,0 hàm lượng pectin tăng 3,31 g và 3,28 g. Tuy nhiên khi tăng pH lên 5,5 - 6,0 thì hàm lượng pectin có xu hướng giảm một chút. Điều này có thể, trong vỏ chanh leo tím còn có những hoạt chất khác đã ảnh hưởng đến sự hoạt động của enzyme. Như vậy đối với nguyên liệu vỏ chanh leo tím, enzyme Celluclast 1,5L hoạt động tốt nhất ở pH là 4,5 - 5,0. Giá trị này phù hợp với tài liệu kỹ thuật do hãng Novozym cung cấp (Celluclast 1,5L; Novozym, 2001).

3.5. Ảnh hưởng nhiệt độ thủy phân của enzyme

Bảng 3. Ảnh hưởng nhiệt độ thủy phân của enzyme đến hàm lượng pectin thu được

Nhiệt độ (°C)	Hàm lượng pectin (g/100 g nguyên liệu)
35	3,12±0,06 ^d
40	3,27±0,07b ^{cd}
45	3,41±0,11 ^{ab}
50	3,45±0,078 ^a
55	3,30±0,072 ^{abc}
60	3,21±0,12 ^{cd}

Trong hầu hết các phản ứng hóa học, khi nhiệt độ tăng sẽ làm tăng vận tốc của phản ứng và hoạt tính enzyme, tuy nhiên đến nhiệt độ tới hạn sẽ làm biến tính protein, bất hoạt enzyme và phản ứng thủy

phân bị ngừng lại. Theo tài liệu của hãng Novozyme cung cấp, chế phẩm enzyme Celluclast hoạt động ở dải nhiệt độ từ 40 - 60°C (www.ncbe.eading.ac.uk/aterials/enzymes/celluclast.html). Trong nghiên cứu này, để xác định nhiệt độ thích hợp cho enzyme hoạt động tối ưu, đã tiến hành khảo sát dải nhiệt độ từ 35-60°C. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, nhiệt độ có ảnh hưởng đến hàm lượng trích ly pectin từ vỏ chanh leo tím. Lượng pectin tăng dần từ nhiệt độ 35- 50°C và giảm dần khi nhiệt độ tăng cao hơn. Ở nhiệt độ 45°C-50°C, hàm lượng trích ly pectin đạt cao nhất là 3,41 g và 3,45 g, ở nhiệt độ này enzyme Celluclast hoạt động tối ưu nên khả năng phân cắt cellulose mạnh, lượng pectin thoát ra nhiều. Tuy nhiên khi tăng nhiệt độ lên 55°C-60°C thì lượng pectin giảm xuống còn 3,3 g và 3,21 g/100 g nguyên liệu. Điều này có thể được giải thích là ở nhiệt độ cao enzyme bị mất hoạt tính một phần, trong khi đó ở nhiệt độ thấp enzyme chưa được hoạt hóa dẫn đến hiệu suất thu hồi thấp. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của tác giả S.q. Liew (2015) và cộng sự khi ứng dụng enzyme Celluclast 1,5L để nâng cao hiệu suất trích ly pectin từ vỏ quả chanh leo.

3.6. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân của enzyme đến hàm lượng pectin

Thời gian là một trong những yếu tố ảnh hưởng nhiều đến quá trình thủy phân của enzyme. Để lựa chọn thời gian thích hợp cho hàm lượng trích ly pectin cao, tiến hành thí nghiệm ở các khoảng thời gian khác nhau: 60, 120, 180 và 240 phút; nồng độ enzyme 0,5%, nhiệt độ 50°C, pH 4,5, tốc độ khuấy 150 vòng/phút. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân của enzyme đến hàm lượng pectin

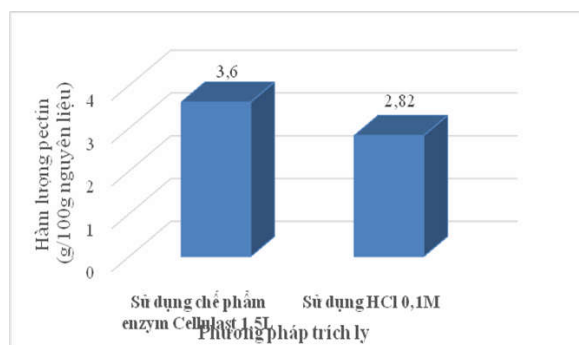
Thời gian (phút)	Hàm lượng pectin (g/100 g nguyên liệu)
60	3,41±0,078 ^b
120	3,62±0,1 ^a
180	3,65±0,12 ^a
240	3,66±0,16 ^a

Kết quả ở bảng 4 cho thấy thời gian có ảnh hưởng tới hàm lượng pectin thu được. Ở thời gian 60 phút cho hiệu quả thủy phân của enzyme thấp. Khi tăng thời gian lên 120 phút, lượng pectin tăng cao đạt 3,62 g. Tuy nhiên, tăng thời gian thủy phân lên 180-240 phút thì hàm lượng pectin không tăng đáng kể.

Điều này có thể thấy rằng hiệu suất của quá trình bị chi phối bởi thời gian thủy phân, với thời gian ngắn là không đủ để enzyme hoạt động, do vậy hiệu suất thủy phân thấp. Thời gian càng nhiều thì enzyme tiếp xúc với cơ chất càng nhiều, đến giai đoạn cơ chất không còn thì thời gian kéo dài không có tác dụng. Từ kết quả này, đã lựa chọn khoảng thời gian 120 phút là thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân của enzyme.

3.7. So sánh hiệu quả trích ly pectin của phương pháp enzyme và hóa học

Trong phần này, đã tiến hành đánh giá hiệu quả trích ly pectin của hai phương pháp: (1) sử dụng chế phẩm enzyme Celluclast 1,5L, (2) sử dụng axit HCl 0,1M, kết quả được thể hiện ở hình 6.



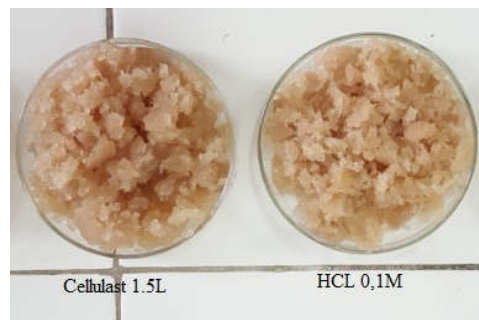
Hình 6. Đánh giá hiệu quả trích ly pectin của phương pháp enzyme và hóa học



Hình 7. Công đoạn rửa pectin bằng ethanol của phương pháp sử dụng axit HCl 0,1M và enzym Celluclast 1,5L

Hiệu quả trích ly của hai phương pháp đã được so sánh. Kết quả ở hình 6 cho thấy: phương pháp sử dụng chế phẩm enzyme Celluclast 1,5L cho hàm lượng pectin cao nhất đạt 3,60 g; sử dụng axit HCl 0,1M cho hàm lượng pectin đạt 2,82 g. Kết quả thí nghiệm cho thấy, sử dụng enzyme đã thu nhận lượng pectin cao hơn 27,65% so với phương pháp hóa học. Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Juliana Vasco-Correa và cộng sự năm 2017 đã tách chiết pectin từ vỏ chanh leo vàng sử dụng enzyme protopectinase- SE và so sánh với phương pháp hóa học truyền thống, kết quả cho thấy sản lượng pectin đạt 17- 26 g/100 g vỏ khô, cao hơn 40% so với tách chiết bằng phương pháp hóa học.

Từ hình 6 có thể thấy rằng, phương pháp truyền thống sử dụng một số loại hóa chất như axit hydrochloric, axit nitric, axit oxalic, axit phosphoric, axit sulfuric... để chiết xuất pectin dựa trên sự thủy phân axit, phương pháp này đòi hỏi điều kiện nhiệt độ cao (>80°C), thời gian dài cho quá trình trích ly và thải ra môi trường dòng chất thải nguy hại. Do vậy, kết quả thu được là thành công của đề tài, phương pháp sử dụng enzyme là xu hướng mới để thu được sản lượng pectin cao, tiêu hao nguồn năng lượng thấp do quá trình chiết xuất được thực hiện ở nhiệt độ trung bình, đồng thời an toàn cho con người và môi trường sinh thái.



Hình 8. Sản phẩm pectin sau rửa ethanol của phương pháp sử dụng axit HCl 0,1M và enzym Celluclast 1,5L

4. KẾT LUẬN

Đã xác định được loại chế phẩm enzyme và một số thông số thích hợp cho quá trình thủy phân của enzyme gồm:

+ Đã lựa chọn chế phẩm enzyme Celluclast 1,5L là thích hợp cho gia tăng hàm lượng trích ly pectin từ vỏ chanh leo tím.

+ Đã xác định được các thông số thích hợp cho quá trình trích ly pectin bằng enzyme Celluclast 1,5L:

- Nồng độ enzyme Celluclast 1,5L thích hợp là 0,5%.
- Tốc độ khuấy 150 vòng/phút.
- pH thích hợp cho chế phẩm enzyme Celluclast 1,5L hoạt động là 4,5-5,0.

- Nhiệt độ thủy phân của enzyme trong khoảng 45°C - 50°C.

- Thời gian thủy phân 120 phút.

Ở điều kiện tối ưu này, phương pháp sử dụng enzyme cho sản lượng pectin đạt 3,6 g/100 g nguyên liệu, cao hơn 27,65% so với phương pháp hóa học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Gia Hoàng Linh (2009). Nghiên cứu quy trình tách chiết pectin từ vỏ chanh dây. Trường Đại học Tôn Đức Thắng.

2. Lê Minh Thiện (2013). Nghiên cứu quá trình tách chiết pectin từ vỏ bưởi. NXB Đại học Quốc gia TP. HCM.

3. Castillo-Israel, K. A., Bagueio, S. F., Diasanta, M. D., Lizardo, R. C., Dizon, E. I. and Mejico, M. I. (2015). Extraction and characterization of pectin from Saba banana [Musa 'saba'(Musa acuminata x Musa balbisiana)] peel wastes: A preliminary study. International Food Research Journal 22(1):202-207.

4. Gusek, T. W., Zullo, L., Eyal, A. M. (2006). International Publication Number WO 2006/096884 A2 Process for obtaining pectin.

5. Juliana, V. C., Arley, D. Z. (2017). Enzymatic extraction of pectin from passion fruit peel

(Passiflora edulis f. flavicarpa) at laboratory and bench scale. LWT - Food Science and Technology.

6. Min, B.; Lim, J., KO, S., Lee, K. G., Lee, S. H. and Lee, S. (2011). Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural / rheological characterization. Bioresour Technol 102: 3855-3860.

7. Olga G. Shkodina, Olga A. Zeltser, Nikolai Yu. Selivanov, Vladimir V. Ignatov. (1998). Enzymic extraction of pectin preparations from pumpkin. Food Hydrocolloids 12 (1998) 313-316.

8. Liew S. Q., N. L. Chin, Y. A. Yusof and K. Sowndhararajan. (2015). Comparison of Acidic and Enzymatic Pectin Extraction from Passion Fruit Peels and Its Gel Properties. Journal of Food Process Engineering 39(5); 501-511.

9. Simmaky, S.; Jaanaki, G. (2014) Extraction and characterization of Pectin From Yellow Passion Fruit *Passiflora edulis f. flavicarpa* L.) Endocarp Peel SAITM Research Symposium on Engineering.

10. Zapata Zapata, A. D., Escobar, G. C. A., Cavalitto, S. F. & Hours, R. A. (2009). 470 Evaluation of pectin solubilization capability from lemon peel using protopectinase- SE. Vitae 16, 67-74.

STUDY ON USING ENZYMES FOR EXTRACTING PECTIN FROM PURPLE PASSION FRUIT PEELS

Nguyen Thi Hong Ha, Nguyen Ngoc Huyen, Nguyen Thi Huong Tra,

Vu Thu Diem, Do Thi Thu Hien, Le Khanh Linh

Summary

Pectin is a safe and bioavailable food additive which structure is heterogeneous, straight-chain polysaccharide, and methyl derivatives of pectic acid. Compared to other polysaccharides, pectin has more benefits such as temperature and acid stability, gel elasticity and rigidity adjustment, high transparency, good taste release. It is presently used in food, medicine and other industries as a thickener, stabilizer, thickener, emulsifier, and gelling agent. This report presents the results of using enzymes to extract pectin from purple passion fruit peels. In some tests of inoculant enzymes (Celluclast® 1,5L and Viscozyme®), Celluclast® 1,5L was selected as a suitable enzyme for hydrolysis process to recover the pectin content from purple passion fruit peels. Likewise, a parameter for enzyme hydrolysis is found: Enzyme proportion 0.5%; pH 4.5 - 5.0; time for 120 minutes, temperature at 45°C - 50°C, speed 150 rpm. In this condition, the method using enzymes yielded pectin results in 3.6 g/100 g of raw material, which is 27.65% higher than the chemical method.

Keywords: Pectin, purple passion fruit peels, enzyme, Celluclast® 1,5L.

Người phản biện: PGS.TS. Đỗ Văn Chương

Ngày nhận bài: 3/02/2021

Ngày thông qua phản biện: 3/3/2021

Ngày duyệt đăng: 10/3/2021