

## THU NHẬN VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA MANNOOLIGOSACCHARIT CAO ĐỘ TỬ BÃ CƠM DỪA (PRODUCTION AND BIOACTIVITIES RESEARCH OF HIGH-PURITY MANNOOLIGOSACCHARIDES FROM RESIDUAL COPRA PULP)

**Đỗ Biên Cương<sup>1</sup>, Hoàng Thị Loan<sup>2</sup>, Lê Thị Huyền<sup>1</sup>, Vũ Kim Dung<sup>1</sup>, Đặng Thị Thu<sup>1</sup>**  
*<sup>1</sup>Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, <sup>2</sup>Viện Đại học Mỏ Hà Nội, <sup>1</sup>Trường Đại học Lâm nghiệp Hà Nội*  
Nhận ngày 29 tháng 11 năm 2011, chấp nhận đăng ngày 9 tháng 5 năm 2012

### TÓM TẮT

*Mannooligosaccharit (MOS) được cho là prebiotic tốt, có nhiều tác dụng có lợi cho sức khỏe con người và vật nuôi. Việc thu nhận MOS có độ tinh khiết cao đòi hỏi phải tiến hành qua nhiều bước, chi phí cao, hạn chế khả năng ứng dụng của MOS. Trong nghiên cứu này, mannanase tái tổ hợp từ *Aspergillus niger* BK01 đã được sử dụng để thủy phân bã cơm dừa. Các điều kiện tối ưu để tạo MOS (pH 3.5, nhiệt độ 70°C, tỷ lệ enzyme/bã cơm dừa 40 U/g, thời gian thủy phân 20 giờ) đã được xác định. Trong các điều kiện này, hiệu suất tạo MOS ước tính đạt 38%. Sản phẩm MOS thu được có độ tinh khiết cao, không lẫn mannose, có hoạt tính chống oxy hóa và có khả năng tăng sinh các vi khuẩn probiotic *Lactobacillus* spp. MOS thu nhận từ bã cơm dừa có tiềm năng sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, thực ăn chăn nuôi.*

### ABSTRACT

*Mannooligosaccharides are considered as potential prebiotics that have health benefits. Production of high-purity mannoooligosaccharides acquires expensive multiple purification steps, so limits application capability of these products. In this research, a recombinant *Aspergillus niger* BK01 mannanase was used to hydrolyze residual copra pulp. The optimal MOS-producing conditions (pH of 3.5, temperature of 70°C, enzyme/substrate ratio of 40 U/g, and hydrolysis time of 20 hours) were determined. Under these conditions, MOS yield reached approximately 38%. The product was rich in mannoooligosaccharides and contained no mannose. It had antioxidant activity and ability to increase the growth of probiotics *Lactobacillus* spp. MOS derived from copra could be a potential benefit additive for food and feed productions.*

Keyword: mannoooligosaccharides, copra, bioactivity, mannanase, probiotics.

### 1. MỞ ĐẦU

$\beta$ -Mannooligosaccharit (MOS) được cho là prebiotic tiềm năng, không những có khả năng tăng sinh chọn lọc các chủng vi khuẩn có lợi (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) mà còn ức chế các tác nhân gây bệnh (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*), giảm sự khu trú của *Salmonella enteritidis*, tạo ra những thay đổi đặc biệt về thành phần và hoạt tính của hệ vi sinh vật đường ruột theo hướng có lợi cho sức khỏe đối tượng sử dụng như tăng cường sức đề kháng, khả năng phòng, chống các bệnh tiêu hóa, phòng chống ung thư trực tràng... [1]-[3],[7],[8]. Do đó, MOS được quan tâm khai thác làm phụ gia gia tăng giá trị của nhiều loại sản phẩm thực phẩm khác nhau.

Để sản xuất MOS có thể sử dụng các phương pháp vật lý, hóa học và sinh học, trong đó phương pháp thủy phân giới hạn các nguyên liệu giàu mannan nhờ mannanase được quan tâm hơn ca. Bối phương pháp này có ưu điểm sử dụng nguồn nguyên liệu rẻ tiền, quá trình sản xuất đơn giản, không đòi hỏi điều kiện phản ứng khắt khe. Theo phương pháp này, trước đây chúng tôi sử dụng mannanase từ *A. niger* BK01 để chuyển hóa bã cơm dừa (phụ phẩm của công nghiệp chế biến các sản phẩm từ cơm dừa tươi, rất giàu mannan mạch thẳng) tạo MOS [5]. Tuy nhiên, do chế phẩm enzyme tự nhiên còn lẫn các enzyme khác như  $\beta$ -mannosidase, nên trong sản phẩm MOS thu được còn chứa nhiều đường đơn mannose, đòi hỏi phải tách tinh chế khá phức tạp, tốn kém, hạn chế việc ứng dụng chế phẩm MOS. Sử dụng enzyme tái tổ hợp để chuyển hóa bã cơm dừa (BCD) có tiềm năng cho

ché phẩm MOS với độ tinh khiết và hiệu suất cao hơn [4],[5]. Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu các điều kiện thủy phân BCD tạo MOS nhờ mannanase tái tổ hợp và một số hoạt tính sinh học của MOS.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

Mannanase tái tổ hợp (470 U/mg) được thu nhận từ *Pichia pastoris* mang gen mannanase từ *A. niger* BK01 [4].

BCD sau ép lấy từ cơ sở sản xuất kem Ngọc Ngà (Quy Nhơn, Bình Định).

Mannobiose (M2), mannotriose (M3), mannotetraose (M4), mannopentose (M5) và mannohexose (M6) mua từ hãng Megazyme; D-mannose (M1), locust bean gum (LBG), axit 3,5-dinitro salicylic (DNS) từ hãng Sigma.

Các chủng vi sinh vật: từ bộ sưu tập của bộ môn Vi sinh-Hóa sinh-Sinh học Phân tử, trường ĐH Bách khoa Hà Nội.

### 2.2. Phương pháp

Thủy phân BCD bằng enzym [5].

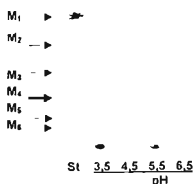
Xác định hoạt độ endo- $\beta$ -1,4-mannanase theo phương pháp DNS [4].

Xác định thành phần oligosaccharit bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) [5].

Xác định hàm lượng MOS bằng HPLC [5].

Kiểm tra khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh đường ruột theo phương pháp khuếch tán đĩa.

Xác định khả năng tăng sinh vi khuẩn có lợi: cấy 1% (v/v) canh trường vi khuẩn đã hoạt



Hình 1. Sắc ký đồ sản phẩm thủy phân bã cơm dừa tại các pH khác nhau. St: Hỗn hợp đường chuẩn từ mannose đến mannohexose.

hóa ( $OD_{600} \sim 0,5$ ) vào bình thủy tinh cỡ 100 ml chứa 99 ml môi trường MRS có hoặc không bổ sung 1% (w/v) prebiotic và nuôi yếm khí ở 37°C. Sau 0h, 24h, lấy mẫu đo  $OD_{600}$ . Tính mức tăng sinh của vi khuẩn nuôi trong môi trường MRS bổ sung thêm prebiotic so với mức tăng trong môi trường MRS sau 24 giờ nuôi cấy.

Xác định hoạt tính chống oxy hóa theo khả năng ức chế peroxidase.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

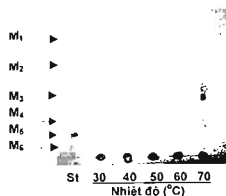
### 3.1. Điều kiện thủy phân bã cơm dừa tạo MOS nhờ endo- $\beta$ -1,4-mannanase tái tổ hợp

#### 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH

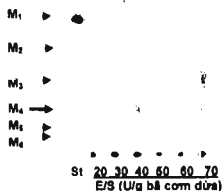
pH của phản ứng có ảnh hưởng đến thành phần oligosaccharit của sản phẩm thủy phân (hình 1). Ở pH 3,5, khi nhiệt độ thủy phân tăng trong khoảng bền nhiệt của mannanase tái tổ hợp [4], hàm lượng oligosaccharit (bao gồm mannotetraose và hỗn hợp MOS đồng thể và dị thể khác) trong sản phẩm tăng và đạt nhiều nhất ở 70°C (hình 2). Tại nhiệt độ khá cao này, sự phát triển của các vi sinh vật nhiễm tạp nếu có cũng được hạn chế một phần.

#### 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzym và cơ chất

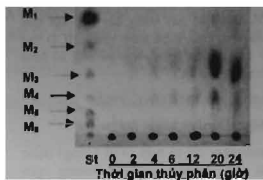
Kết quả hình 3 cho thấy khả năng chuyển hóa tạo MOS của enzym tái tổ hợp tăng nhanh khi tỉ lệ endo- $\beta$ -1,4-mannanase và cơ chất BCD (E/S) tăng từ 20 đến 40 U/g. Khi tỉ lệ E/S lớn hơn 40 U/g, khả năng chuyển hóa BCD tăng không đáng kể. Việc tăng tỉ lệ E/S lên là không cần thiết. Tỉ lệ E/S 40 (U/g) được chọn là tỉ lệ tối thích để chuyển hóa BCD tạo MOS



Hình 2. Sắc ký đồ sản phẩm thủy phân bã cơm dừa tại các nhiệt độ khác nhau. St: Hỗn hợp đường chuẩn từ mannose đến mannohexose



Hình 3. Sắc ký đồ sản phẩm thủy phân BCD với tỉ lệ enzym/cơ chất khác nhau. St: Hỗn hợp đường chuẩn từ mannose đến mannohexose.



Hình 4. Sắc ký đồ sản phẩm thủy phân bã com dừa với thời gian khác nhau. St: Hỗn hợp đường chuẩn từ mannose đến mannohexose

Bảng 1. Hoạt tính phi kháng sinh của MOS từ bã com dừa

Vi sinh vật	D <sub>không sinh</sub> (mm)	D <sub>40%</sub> (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	CF-30 (S)	0 (R)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 2592	CF-28 (S)	0 (R)
<i>Candida albicans</i>	NS-24 (S)	0 (R)
<i>Samonella typhi</i>	GM-20 (S)	0 (R)
<i>Klebsiella</i> sp.	CF-26 (S)	0 (R)

D: đường kính vòng không khuẩn; CF: Cephalothine 25 µg/ đĩa, NS: Nystatine 10 µg/đĩa, GM: Gentamycine 30 µg/đĩa. S: Nhạy cảm, R: Kháng. Số lần thí nghiệm lặp lại: 12.

### 3. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân

Hàm lượng MOS trong sản phẩm thủy phân BCD tăng tỷ lệ thuận với thời gian phản ứng và đạt cực đại sau 20 giờ thủy phân (hình 4). Khi thời gian phản ứng tiếp tục tăng, lượng cơ chất mannan trong BCD mà enzym có khả năng phân cắt có thể đã được thủy phân hết, do đó hàm lượng MOS không tăng (hình 4, mẫu 24 giờ thủy phân).

Kết quả phân tích HPLC (không được trình bày ở đây) cho thấy sau 20 giờ thủy phân, sản phẩm không chứa mannose, nồng độ mannobiose đạt 11,4 g/l. Với hàm lượng mannan trong bã com dừa thường chiếm trung bình khoảng 30% w/w, hiệu suất thủy phân mannan tính riêng cho mannobiose đạt 38% (w/w). Trong khi đó, hiệu suất thủy phân mannan tinh sạch từ bã com dừa tạo mannobiose, mannotriose, mannotetraose và galactosylmannotetraose bằng β-mannanase từ *B. subtilis* WY-45 đạt được lần lượt là 10,5%, 7,7%, 1,2% và 2,6% (w/w) [8].

### 3.2. Thẩm dò một số hoạt tính sinh học của MOS

#### 1. Khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh đường ruột

Hoạt tính phi kháng sinh là một tiêu chuẩn của prebiotic theo hướng dẫn của FAO (2007). Kết quả kiểm tra khả năng ức chế một số vi sinh vật gây bệnh đường ruột theo phương pháp khuếch tán đĩa cho thấy các thành phần trong hỗn hợp MOS không có khả năng kháng các vi sinh vật này (bảng 1).

#### 2. Khả năng tăng sinh vi khuẩn có lợi

MOS thể hiện khả năng tăng sinh khá mạnh với các chủng probiotic và có tiềm năng probiotic (hình 5). Sau 24 giờ nuôi trong môi trường MRS có bổ sung 1% MOS (w/v), *Lactobacillus plantarum* WCFS1 tăng sinh mạnh gần gấp đôi so với trong môi trường MRS (tăng 194%) và mạnh hơn so với sự tăng sinh của chúng này trong các môi trường MRS có bổ sung các fructan thương mại như FOS50 (Viện Công nghiệp Thực phẩm), Hermeset (Hermes Sweetener, Thụy Điển) hoặc trong môi trường

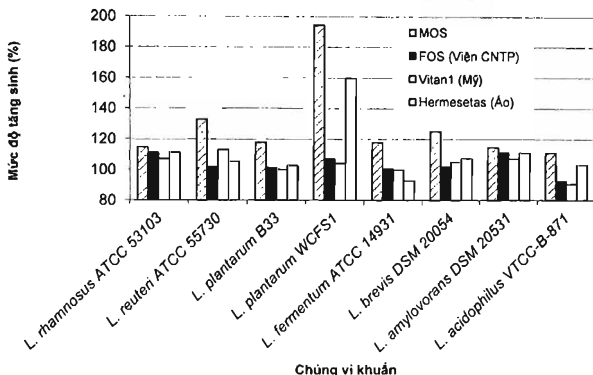
MRS có bổ sung polydextrose (Vitan 1 của Danisco, Mỹ).

3. Khả năng chống oxy hóa

Kết quả bảng 2 cho thấy ở nồng độ lớn hơn 40 µg/ml, MOS thể hiện khả năng chống oxy hóa. Với nồng độ 640 µg/ml, MOS ức chế 42% hoạt tính peroxidase, mạnh hơn 1,45 lần so với khả năng của chế phẩm MOS (tinh khiết 99%) được thu nhận từ quá trình thủy phân konjac của công ty Dược phẩm Chengu Yongan (Trung Quốc).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ đến hoạt tính chống oxy hóa của MOS từ bã cơm dừa

Nồng độ phản ứng (µg/ml)	% ức chế peroxidase	
	MOS	MOS (Trung Quốc)
640	42	29
160	31	26
40	17	12
8	0	0
2	0	0



Hình 5. Ảnh hưởng của MOS từ bã cơm dừa và một số sản phẩm đường chức năng thương mại đến sự tăng sinh của các vi khuẩn có lợi.

4. KẾT LUẬN

Đã tìm được điều kiện thích hợp tạo MOS từ bã cơm dừa theo phương pháp thủy phân bằng endo-β-1,4-mannanase tái tổ hợp: nhiệt độ 70°C, pH 3,5, tỷ lệ enzym/cơ chất 40U/g bã dừa, thời gian thủy phân 20 giờ. Trong điều kiện này, hiệu suất tạo MOS theo tính toán đạt 38%. Sản phẩm thu được có độ tinh khiết cao, không có hoạt tính kháng sinh, có khả năng tăng số lượng vi khuẩn có lợi và có hoạt tính chống oxy hóa.

MOS thu nhận từ quá trình thủy phân bã cơm dừa có tiềm năng sử dụng bổ sung vào thực phẩm, thức ăn chăn nuôi.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài B2009-280, B2011-01-18-CT. Xin chân thành cảm ơn TS Nguyễn Tiến Thành, TS Hồ Phú Hà, Ths Lê Lan Chi (ĐH Bách khoa Hà Nội), KS Nguyễn Tuấn Anh, KS Phan Thành Trung (Viện Đại học Mở HN), TS Phạm Thị Linh, Ths Vũ Kim Châm (Viện Hoá học, Viện KH Công nghệ Việt Nam) đã hỗ trợ trong quá trình thực hiện đề tài.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Al-Ghazzewi F.H., Khanna S., Tester R.F., Piggot J. - The potential use of hydrolysed konjac glucomannan as a prebiotic. *J Sci Food Arg* **87** (9) 1758 - 1766 (2007).
2. Asano I., Hanaguchi K., Fujii S., Inio H. - Invitro digestibility and fermentation of mannoooligosaccharides from coffee mannan. *Food Sci Technol Res* **9** (1): 62-66 (2003).
3. Asano I., Umemura M., Fujii S., Hoshino H., Iino H. - Effects of mannoooligosaccharides from coffee mannan on fecal microflora and defecation in healthy volunteers. *Food Sci Technol Res* **10** (1) 93-97 (2004).
4. Do B.C, Dang T.T., Berrin J.G., Dietmar H., To K.A., Sigoillot J.C., Montarop Y. - Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. *Microbial Cell Factories* Nov 13: **8** (1) 59 (2009).
5. Đỗ Biên Cương, Nguyễn Thị Hoa, Lê Thị Huyền, Đặng Thị Thu. - Nghiên cứu chuyển hóa bã cốm dừa tạo prebiotic mannoooligosaccharide bằng endo-1,4- $\beta$ -mannosidase từ *Aspergillus niger* BK01. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* **48** (3) 43-49 (2010).
6. Gibson G.B. - *Handbook of Prebiotics*. CRC Press (2008).
7. Gullón P., Gullón B.; Moure A., Alonso J.L., Domínguez H., Parajó J.C. - Manufacture of prebiotics from biomass sources. *Springer Science and Business Media*. 535- 564 (2009).
8. Li Y., Jiang Z., Wei Y., Li L., Kusakabe I. - Preparation of mannoooligosaccharides by enzymatic method and its separation as well as crystallization. *Food Sci* **26** (z1) 58-60 (2005).

*Địa chỉ liên hệ:* Đỗ Biên Cương-Tel: (+84)163971512-E-mail: dobiancuong-ibf@mail.hut.edu.vn  
Trường Đại học Bách khoa Hà Nội  
Số 1 - Đại Cồ Việt - Hai Bà Trưng - Hà Nội