

NGHIÊN CỨU CHUYỂN HOÁ BÃ CƠM DỪA TẠO PREBIOTIC MANNOLIGOSACCHARIT BẰNG ENDO- β -1,4-MANNANASE TỪ *ASPERGILLUS NIGER* BK 01

ĐỖ BIÊN CƯƠNG, NGUYỄN THỊ HOA, LÊ THỊ HUYỀN, ĐẶNG THỊ THU

1. MỞ ĐẦU

Prebiotic là một bộ phận quan trọng của thực phẩm chức năng được tập trung nghiên cứu nhiều trong những năm gần đây [1, 2]. Phần lớn các prebiotic là oligosaccharit, được chuyển hoá bởi một hoặc một số vi khuẩn có lợi trong đường ruột, làm thay đổi thành phần, hoạt tính của hệ vi sinh vật ruột kết theo hướng có lợi cho sức khoẻ vật chủ [4, 7]. Nhiều loại oligosaccharit đã được ứng dụng tạo thực phẩm chức năng ở Nhật Bản và châu Âu [4]. Ở Việt Nam, các nghiên cứu điều kiện sản xuất fructooligosaccharit, galactooligosaccharit cũng đã được tiến hành [1, 2], tuy nhiên chưa có công trình nào nghiên cứu sản xuất và ứng dụng manno oligosaccharit (mannan-oligosaccharit, MOS) mặc dù oligosaccharit này được cho là một loại prebiotic tốt, không những làm tăng số lượng các vi khuẩn có lợi mà còn có khả năng kết gán và ức chế trực tiếp các vi khuẩn có hại [5, 10].

Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu chọn lựa các điều kiện tối ưu cho endo- β -1,4-mannanase từ *Aspergillus niger* BK01 chuyển hóa bã cơm dừa (BCD), một sản phẩm phụ của công nghiệp sản xuất dầu và kem dừa, để tạo MOS.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Endo- β -1,4-mannanase (31 U/mg) được thu nhận từ *Aspergillus niger* BK01 bằng phương pháp kết tủa amoni sulfate 75% độ bão hòa [3].

Endo- β -1,4-mannanase tái tổ hợp (471 U/mg) được thu nhận từ canh trường *Pichia pastoris* mang gen mã hóa cho mannanase của *Aspergillus niger* BK01 [6].

Bã cơm dừa sau ép được thu thập từ các cơ sở chế biến dầu dừa (Hoài Nhơn, Bình Định).

Bản mỏng silicagel 60F 254 (Merck); mannobiose (M2), mannotriose (M3), mannotetraose (M4), mannopentose (M5), mannohexose (M6) (Megazyme); mannose (M1), 1-propanol, nitromethane và 3,5-dinitrosalisyllic (Sigma).

2.2. Phương pháp

Thủy phân bã cơm dừa bằng enzym: Bã dừa sau khi được thanh trùng ở 121°C, 30 phút, được trộn với nước cất, khuấy đều và điều chỉnh về pH nhất định. Sau đó bổ sung enzym cho đạt tỉ lệ enzym/bã cơ dừa (E/S) nhất định, khuấy 200 vòng/phút trong một thời gian thích hợp; Đun sôi 10 phút dừng phản ứng, lọc thu dịch đường.

Định lượng đường khử tổng theo phương pháp DNS: bổ sung 3 ml thuốc thử DNS vào 3 ml mẫu đường, đun sôi trong 10 phút, làm lạnh nhanh, đo độ hấp thụ ở bước sóng 575 nm, với đường chuẩn mannose [8].

Định lượng MOS bằng phương pháp sắc kí lỏng cao áp HPLC trên cột Supelcogel CA 30 cm × 7,8mm; rửa giải bằng dung dịch K₂HPO₄ 15 mM, pH 2,5, tốc độ 0,3 ml/phút; nhiệt độ cột: 80°C; detector RID (theo TCNB-001 của Viện CN Thực phẩm).

Xác định thành phần oligosaccharit bằng sắc kí lớp mỏng (TLC) sử dụng hệ dung môi 1-propanol-nitromethane-nước (7 : 1 : 2 v/v), và hiện màu bằng axit sulfuric 5% pha trong ethanol ở 110°C trong 5 phút.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

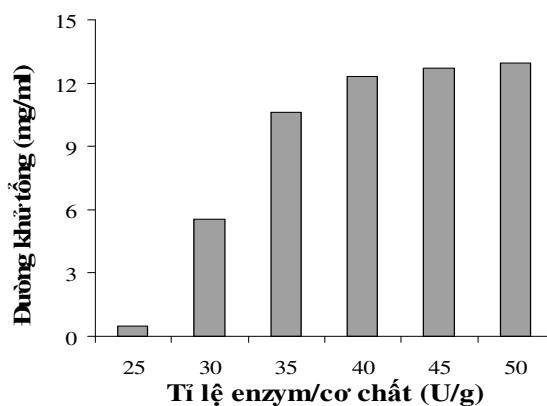
3.1. Xác định điều kiện thích hợp cho endo-β-1,4-mannanase chuyển hóa bã cơm dừa tạo MOS

3.1.1. Ảnh hưởng của tỉ lệ endo-β-1,4-mannanase và cơ chất

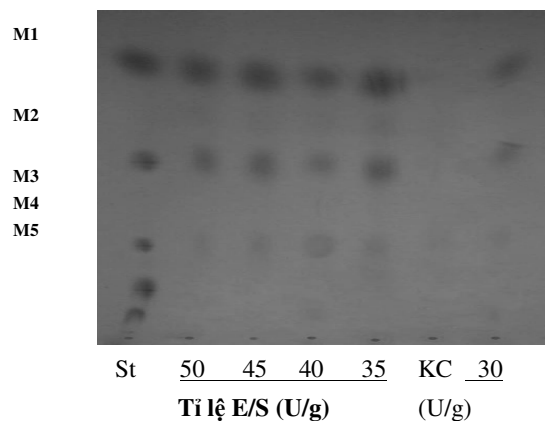
β-1,4-Mannooligosaccharit có tính khử, nên bên cạnh kết quả phân tích thành phần sản phẩm bằng TLC, khả năng chuyển hóa BCD tạo MOS của enzym còn được đánh giá trên cơ sở tổng lượng đường khử trong dịch thủy phân.

Kết quả hình 1 và 2 cho thấy khả năng chuyển hóa tạo MOS của enzym tăng nhanh khi tỉ lệ endo-β-1,4-mannanase và cơ chất BCD (E/S) tăng từ 25 đến 40 U/g. Khi tỉ lệ E/S lớn hơn 45 U/g, khả năng chuyển hóa BCD tăng chậm và không đáng kể (hình 1), lượng đường đơn được tạo thành tương đương với lượng MOS (M2) có trong hỗn hợp sản phẩm (hình 2). Việc tăng tỉ lệ E/S lên là không cần thiết, không những làm tăng chi phí enzym mà còn có thể làm giảm hiệu suất tạo MOS do sự thủy phân MOS được tạo thành bởi hoạt tính mannosidase lẫn trong chế phẩm enzym kĩ thuật. Tỉ lệ E/S = 40 (U/g) được chọn là tỉ lệ tối thích để chuyển hóa BCD tạo MOS.

Bên cạnh việc đảm bảo tỉ lệ E/S đạt tối thích, cũng cần phải lưu ý đến nồng độ cuối của BCD trong phản ứng. Khi nồng độ BCD tăng từ 6% - 11% (w/v), tổng lượng sản phẩm thu được từ quá trình chuyển hóa tăng (hình 3 và 4). Với nồng độ BCD cao hiệu suất chuyển hóa sẽ không tăng do enzym sẽ khó tiếp xúc đồng nhất với BCD [9]. Nồng độ BCD 10% (w/v) được chọn để tạo MOS.

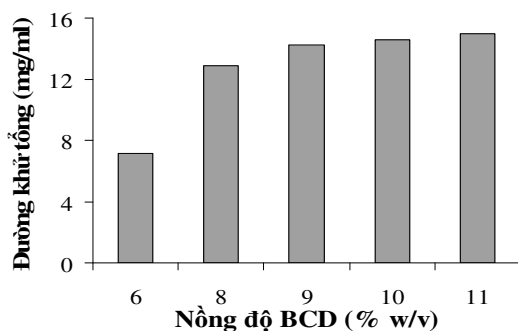


Hình 1. Ảnh hưởng tỉ lệ E/S đến tổng lượng đường trong sản phẩm thủy phân

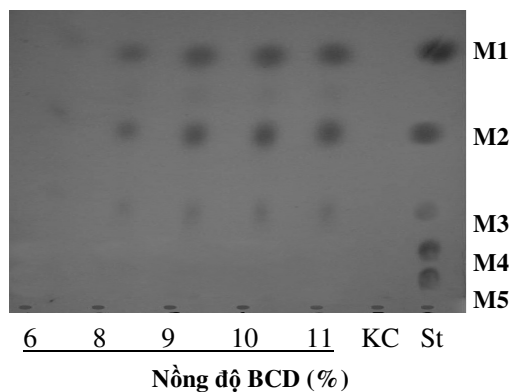


Hình 2. Sắc kí đồ thủy phân với các tỉ lệ E/S khác nhau

St: Hỗn hợp đường chuẩn; KC: dịch xử lí BCD bằng enzym vô hoạt

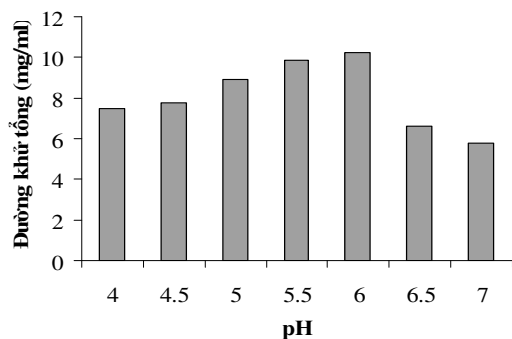


Hình 3. Ảnh hưởng nồng độ bã cơm dừa đến tổng lượng đường trong sản phẩm thủy phân

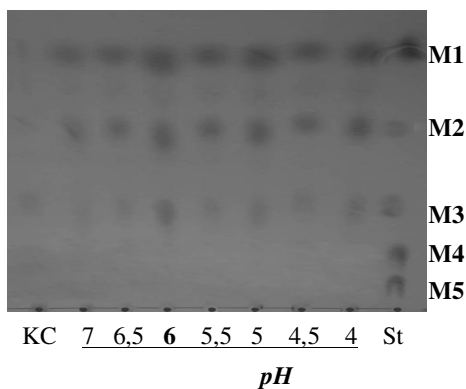


Hình 4. Sắc kí đồ thủy phân với các nồng độ bã cơm dừa khác nhau. St: Hỗn hợp đường chuẩn; KC: dịch xử lí BCD bằng enzym vô hoạt

3.1.2. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ phản ứng



Hình 5. Ảnh hưởng của pH đến tổng lượng đường trong sản phẩm thủy phân

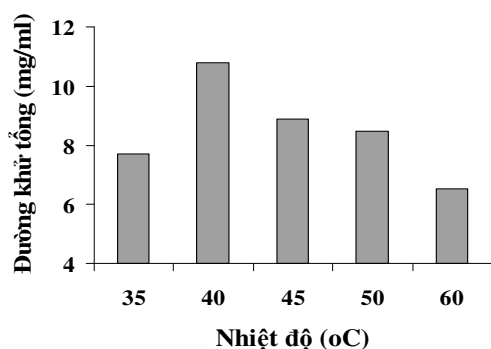


Hình 6. Sắc kí đồ sản phẩm thủy phân tại các giá trị pH khác nhau. St: Hỗn hợp đường chuẩn; KC: dịch xử lí BCD bằng enzym vô hoạt

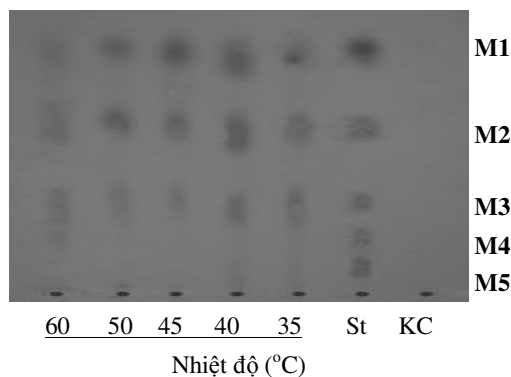
Đầu tiên, quá trình chuyển hóa BCD được tiến hành ở 40°C và các giá trị pH đầu khác nhau. Kết quả tổng lượng đường khử trong dịch thủy phân tăng khi pH tăng từ pH 4 đến pH 6 (hình 5). Tuy nhiên khả năng tạo MOS đạt được không khác biệt nhiều trong khoảng pH này (hình 6). Khả năng chuyển hóa BCD tạo đường đạt cao nhất khi pH ban đầu của hỗn dịch phản ứng được điều chỉnh về pH 6 (hình 5).

Với pH đầu = 6, nhiệt độ phản ứng tối thích là 40°C (hình 7 và 8). Ở nhiệt độ này, enzym bền và chuyển hóa BCD tốt, sự phát triển của các vi sinh vật nhiễm tạp nếu có cũng được hạn chế một phần [9]. Nhiệt độ cao hơn 45°C, trong điều kiện khảo sát, có thể làm bất hoạt enzym, nên hiệu suất chuyển hóa không cao.

Nhiệt độ và pH đầu tối thích cho quá trình chuyển hóa BCD tạo MOS bằng chế phẩm mannanase kĩ thuật là 40°C và pH 6,0.

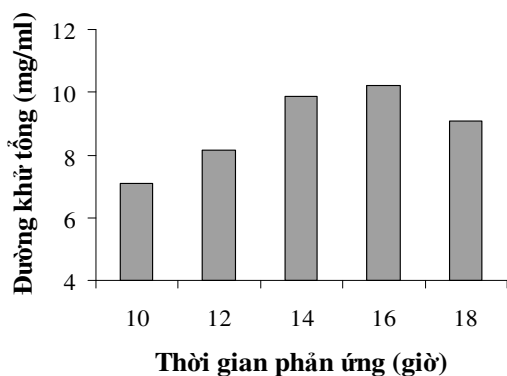


Hình 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến tổng lượng đường trong sản phẩm thủy phân

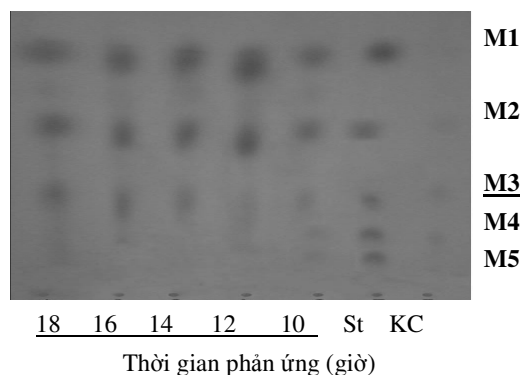


Hình 8. Sắc kí đồ sản phẩm thủy phân tại các nhiệt độ khác nhau. St: Hỗn hợp đường chuẩn; KC: dịch xử lí BCD bằng enzym vô hoạt

3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng



Hình 9. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến tổng lượng đường trong sản phẩm thủy phân

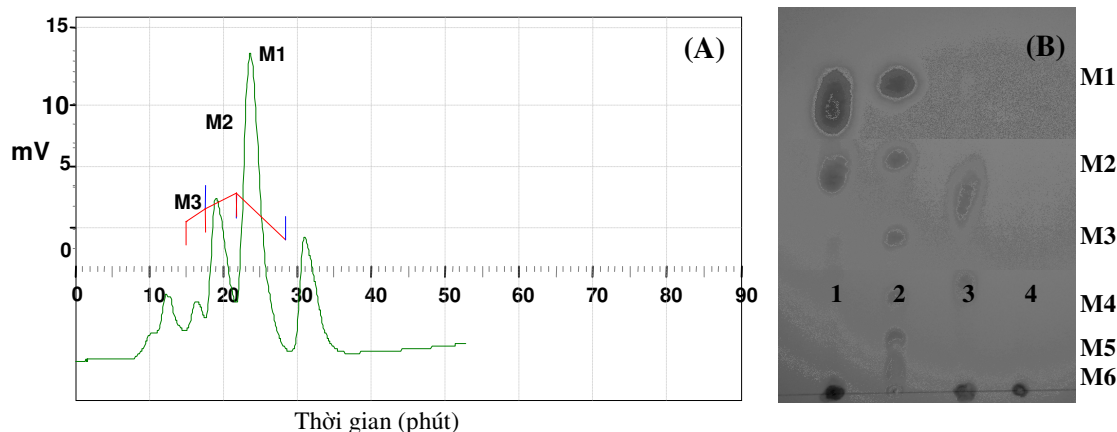


Hình 10. Sắc kí đồ sản phẩm thủy phân với các thời gian khác nhau. St: Hỗn hợp đường chuẩn; KC: dịch xử lí BCD bằng enzym vô hoạt

Kết quả hình 9 và 10 cho thấy, khả năng chuyển hóa BCD tăng rõ rệt khi thời gian phản ứng tăng từ 12 đến 18 giờ. Với thời gian phản ứng 16-18 giờ, khả năng chuyển hóa tạo MOS đạt cao nhất và khác biệt nhau không đáng kể. Do đó thời gian phản ứng thích hợp để chuyển hóa BCD tạo MOS được lựa chọn là 16 giờ.

3.2. Sản xuất thử nghiệm MOS quy mô phòng thí nghiệm và phân tích thành phần MOS

Dựa vào các kết quả nghiên cứu thu được tiến hành sản xuất thử nghiệm các mẫu đường MOS sử dụng các chế phẩm endo- β -1,4-mannanase tự nhiên (từ *A.niger* BK01) và endo- β -1,4-mannanase tái tổ hợp (từ *P. pastoris*). Kết quả sử dụng enzym tự nhiên cho sản phẩm thu được chứa trên 50% mannanooligosaccharit (sắc kí đồ HPLC hình 11-A), trong khi sử dụng enzym tái tổ hợp cho sản phẩm chứa chủ yếu là mannoooligosaccharit (hình 11- B).



Hình 11. Thành phần sản phẩm MOS trong dịch thủy phân bằng endo- β -1,4-mannanase tự nhiên và tái tổ hợp

- (A) Sắc kí đồ HPLC sản phẩm chuyển hóa BCD bằng enzym tự nhiên;
 (B) Sắc kí đồ TLC sản phẩm chuyển hóa BCD bằng enzym tự nhiên và tái tổ hợp;
 1: Sản phẩm thủy phân bằng enzym tự nhiên;
 2: Hỗn hợp đường chuẩn bao gồm mannose, mannotriose, mannotetrose, mannopentose, và mannohexose (tương ứng từ phía trên hình xuống);
 3: Sản phẩm thủy phân bằng enzym tái tổ hợp;
 4: dung dịch sau xử lí bã com dừa bằng enzym tái tổ hợp vô hoạt (kiểm chứng)

4. KẾT LUẬN

Điều kiện thích hợp để thu nhận mannoooligosaccharit từ bã com dừa bằng phương pháp thủy phân nhờ endo- β -1,4-mannanase là: Nồng độ BCD: 10%; Tỷ lệ enzym/cơ chất: 40 U/g; pH: 6; Nhiệt độ: 40°C; Thời gian thủy phân: 16 giờ.

Sản phẩm MOS được sản xuất thử nghiệm ở quy mô phòng thí nghiệm chứa trên 50% mannoooligosaccharit khi sử dụng enzym tự nhiên, và chứa xấp xỉ 90% MOS khi sử dụng enzym tái tổ hợp, bao gồm chủ yếu là mannotriose và mannotetrose.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Hoàng Anh, Ngô Xuân Mạnh, Nguyễn Hương Thuỳ, Ngô Xuân Trung - Chọn lựa các điều kiện hoạt động tối ưu của enzyme D-fructofuranosidase để sản xuất đường fructooligosaccharide (FOS) chức năng từ đường sucrose, Tạp chí Khoa học và Phát triển **4** (3) (2008) 289-294.
2. Bùi Thị Hải Hòa, Đặng Thị Thu, Nguyễn Văn Cách - Khảo sát các điều kiện thích hợp cho phản ứng transgalactosyl sử dụng β -galactosidaza từ *Aspergillus oryzae* 3 để sản xuất galactooligosaccharit (GOS) từ lactoza, Tạp chí Khoa học và Công nghệ **47** (2) (2009) 101-107.
3. Đặng Thị Thu, Đỗ Biên Cương - Tách, tinh sạch và một số đặc tính của endo- β 1,4 mananase từ *Aspergillus* sp. BK, Tạp chí Khoa học và Công nghệ **42** (5) (2004) 38-42.
4. A. R. Bodun, J. J. Andrew, R. G. Glenn, A. R. Robert - Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by β -Galactosidases from *Bifidobacterium* Species, Applied and Environmental Microbiology **67** (6) (2001) 2526-2530.
5. K. Chartchai, S. Chatchai, L. Saisamorn - Nutritive Quality of β -Mannanase Treated Copra Meal in Broiler Diets and Effectiveness on Some Fecal Bacteria, International Journal of Poultry Science **5** (11) (2006) 1087-1091.
6. B. C Do, T. T. Dang, J. G. Berrin, D. Haltrich, K. A. To, J. C. Sigoillot, M. Yamabhai - Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Aspergillus niger* BK01, Microbial Cell Factories **13** 8 (1) (2009) 59.
7. G. R. Gibson, M. B. Roberfroid - Handbook of Prebiotics. CRC Press, 2009.
8. G. L. Miller - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem. **31** (1959) 426.
9. G. Yoshikawa, A. Morimoto, M. Dombo - Mannose-containing feed and process for producing the same, United States Patent number 6,080,442, 2000.
10. T. Sudathip, K. Suttipun, H. Dietmar, N. Sunee - Selection and characterization of mannanase-producing bacteria useful for the formation of prebiotic manno-oligosaccharides from copra meal, World Journal of Microbiology and Biotechnology, **24** (2008) 1425-1433.

SUMMARY

BIOCONVERSION OF COPRA MEAL INTO PREBIOTIC MANNOOLIGOSACCHARIDES USING ENDO- β -1,4-MANNANASE PRODUCING BY *ASPERGILLUS NIGER* BK 01

Mannooligosaccharides (MOS) are among the excellent prebiotics which recently gained great interest. These compounds are produced from various raw materials based on hydrolysis action of mannanases. Our aim was to investigate appropriate conditions to bioconvert the copra

meal, a ground product of extraction residue of coconut oil harvested in Hoai Nhon (Binh Dinh, Vietnam) into MOS. A trial of MOS production was conducted at laboratory scale. The right conditions shown in this study were: substrate concentration, 10% (w/v); initial pH, 6.0; temperature, 40°C; reaction time, 16 h; native or recombinant *Aspergillus niger* BK01 endo- β -1,4-mannanase, 40 U/g-dry solid. Analysis of oligosaccharide products obtained during these enzymatic hydrolysis revealed that the raw recombinant mannanase from *A.niger* might yield MOS with higher purity than that of hydrolysis using native one. The hydrolysates contained mannobiose and mannotriose as main products.

Địa chỉ:

Viện CN Sinh học và CN Thực phẩm,
Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

Nhận bài ngày 2 tháng 10 năm 2009