

ẢNH HƯỞNG MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN LÊN MEN *Aspergillus Oryzae* T6 TỚI KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HOẠT CHẤT KÌM Hãm α - GLUCOSIDASE TRONG SẢN XUẤT THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHOẺ CHO NGƯỜI CÓ ĐƯỜNG HUYẾT CAO VÀ THỪA CÂN

Nguyễn Đức Tiến *, Nguyễn Thị Huyền

Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch

*Tác giả liên hệ: nguyenductienvcd@gmail.com

Ngày nhận bài: 05.10.2022

Ngày chấp nhận đăng: 20.12.2022

TÓM TẮT

Nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng một số điều kiện lên men tới khả năng sinh tổng hợp chất kìm hãm α -glucosidase (AGIs) của *Aspergillus oryzae* T6 (*A. oryzae* T6) nuôi cấy trên môi trường bán rắn từ đỗ đen trong quá trình sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người có đường huyết cao và người thừa cân. Bằng phương pháp xác định hoạt tính ức chế α -glucosidase kết quả cho thấy, quá trình sinh tổng hợp hoạt chất AGIs trên môi trường bán rắn từ đỗ đen (*Vigna cylindrica* Skeels) cho đạt hiệu quả tốt nhất ở độ dày của khối môi trường là 24cm, thời gian định kỳ đảo trộn khối môi trường là 12 giờ lên men đảo trộn một lần, độ ẩm môi trường bán rắn là 55% và thời gian lên men là 56 giờ. Chế phẩm AGIs tạo ra có IC_{50} đạt $0,202 \pm 0,006$ mg/ml được ứng dụng cho sản xuất thực phẩm giúp ổn định glucose trong máu ở người có glucose cao trong máu và người thừa cân.

Từ khóa: *Aspergillus oryzae*, đỗ đen, đường huyết, thừa cân, kìm hãm α -glucosidase.

Effects of some Fermentation Conditions of *Aspergillus oryzae* T6 on the Biosynthesis of α -Glucosidase inhibitors in the Production of Health Foods for People with High Blood Glucose and Overweight

ABSTRACT

This study evaluated the influence of some fermentation conditions on the biosynthesis of α -glucosidase inhibitors (AGIs) of *Aspergillus oryzae* T6 (*A. oryzae* T6) cultured on semi-solid medium from black beans in the production of health-protective foods for people with high blood glucose and overweight. By determining the inhibitory activity of α -glucosidase the results showed that the biosynthesis of AGIs on semi-solid medium from black beans (*Vigna cylindrica* Skeels) gave the best effect in terms of the thickness of the fermentation medium block (24cm). The periodic agitation of the semi-solid medium from black beans during fermentation was every 12 hours; humidity of semi-solid medium from black beans for fermentation was 55% and fermentation time was 56 hours. The resulting AGIs products with IC_{50} of 0.202 ± 0.006 mg/ml were applied to food production to help stabilize blood glucose in people with high blood sugar and overweight.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, blood glucose, α -glucosidase inhibitors, overweight, *Vigna cylindrica* Skeels.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đái tháo đường (ĐTĐ) và thừa cân đang trở thành một trong những vấn đề sức khỏe nghiêm trọng với tỷ lệ mắc bệnh gia tăng trên toàn thế giới. ĐTĐ và thừa cân không chỉ gây nhiều biến chứng nguy hiểm, đặc biệt tại các cơ quan mắt,

tim, thận, não và hệ thống mạch máu với các bệnh điển hình như bệnh thận do ĐTĐ và thừa cân, bệnh lý vòng mạc ĐTĐ, suy gan,... mà quá trình kiểm soát bệnh cũng gặp nhiều khó khăn. Trong khi đó, các thuốc điều trị ĐTĐ và thừa cân trên thị trường đang gặp phải một số tác dụng không mong muốn khi sử dụng. Chính vì

Ảnh hưởng một số điều kiện lên men *Aspergillus Oryzae* T6 Tới khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kim hãm α -glucosidase trong sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người có đường huyết cao và thừa cân

vậy việc tìm ra các loại thuốc mới để điều trị bệnh ĐTĐ và thừa cân luôn là chủ đề được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm, đặc biệt là các loại thuốc có nguồn gốc từ thiên nhiên, được liệu và nguồn vi sinh vật phong phú. Chất AGIs là một trong những chất thường sử dụng để ngừa bệnh ĐTĐ loại II và thừa cân béo phì. Hoạt chất AGIs có chức năng ngăn sự tạo thành monosacarit từ disaccarit làm cho quá trình sinh tổng hợp insulin diễn ra dễ dàng và hạn chế hấp thụ monosacarit ở ruột (Holman, 1998). Chất AGIs có thể tổng hợp theo con đường hóa học hoặc tự nhiên nhờ thực vật, động vật và vi sinh vật. Chất AGIs tổng hợp bằng hóa học hiện thường gây một số tác dụng phụ, như rối loạn chức năng gan và chứng đau dạ dày. Hoạt chất AGIs từ đậu đỏ lên men nhờ *Aspergillus oryzae* được đánh giá cao và ứng dụng hỗ trợ trị bệnh đái tháo đường, kiểm soát cân nặng ở người thừa cân, đang được quan tâm nghiên cứu và sản xuất do an toàn, không có tác dụng phụ (Fujita & cs., 2001). Hiện nay trên thế giới cũng như ở trong nước đã có một số công trình nghiên cứu khai thác và thu nhận AGIs bằng các phương pháp lên men đậu đỏ (Nguyễn Đức Tiến, 2018). Đã có nghiên cứu thu nhận hoạt chất AGIs, đã xác định được môi trường đậu đen và nhiệt độ lên men của chủng *A. oryzae* T6 (Nguyễn Đức Tiến & cs., 2013; Nguyễn Đức Tiến, 2018), tuy nhiên để sản xuất AGIs từ *A. oryzae* T6 lên men trên môi trường bán rắn hiệu quả, cần xác định một số thông số lên men trong sản xuất. Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định độ dày của khối môi trường lên men trong sản xuất, thời gian định kỳ đảo trộn khối môi trường trong quá trình lên men, độ ẩm và thời gian lên men cho khả năng hình thành AGIs cao của nấm *A. oryzae* T6 được nghiên cứu.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Tất cả các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này đều được mua từ hãng Sigma-Aldrich: α -glucosidase từ ruột non chuột (rat intestinal acetone power), p-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside (PNP-G), NaCl, Tris Base, đệm phosphat 0,1M (Sigma Chemical Co, Mỹ); Chủng

giống *A.oryzae* T6 (phân lập từ mẫu mốc tương Bần - Yên Nhân - Hưng Yên) lưu trữ trong bộ sưu tập giống của Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch (Nguyễn Đức Tiến & Hoàng Đình Hòa, 2014); Đỗ đen xanh lòng (*Vigna cylindrica* Skeels): Thu mua đỗ đen xanh lòng sản xuất vụ đông xuân (thu hoạch tháng 4) ở xã Vĩnh Thuận, huyện Vĩnh Thạnh, tỉnh Bình Định có khối lượng 1.000 hạt là 118,85g; dung trọng $807,3 \pm 0,8$ g/l; độ ẩm $12,73 \pm 0,26\%$; Gluxit $52,16 \pm 0,21\%$; tro tổng số 3,35%; protein $23,55 \pm 0,2\%$ và thành phần axit amin g/100g là: 3,85g Threonin; 5,23g Valine; 1,52g Methionine; 1,46g Isoleucine; 1,14g Leucine; 1,25g Phenylalanine; 0,40g Tryptophan và 1,24g Lysine. Cám gạo dùng trong nghiên cứu được thu mua từ cơ sở xay xát gạo (ở Yên Mô - Ninh Bình), từ lúa gạo sau khi xay xát được diệt enzyme lipase bằng phương pháp sấy cám ở nhiệt độ 100-105°C/10 phút, thành phần: độ ẩm 7,2%, Protein (13,2%), Lipit (17,5%), Sợi thô (9,3%), carbohydrate (37,6%), Tro thô (7,2%), Canxi (0,74 mg/g), Magie (8,2mg/g), Photpho (15,4 mg/g), Phytin photpho (9,7 mg/g), Silica (8,7 mg/g), Kẽm (41 mg/g), Vitamin B1 (17,5 mg/g) và Vitamin B2 (3,8 mg/g).

Xử lý nguyên liệu chuẩn bị môi trường: Đỗ đen xanh lòng rửa sạch, ngâm nước 10 giờ ở nhiệt độ phòng, để ráo 5 phút, phối chế 10% cám gạo, điều chỉnh độ ẩm, đem hấp chín ở nhiệt độ 121°C trong vòng 60 phút.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định hoạt tính AGIs

- 10g môi trường sau lên men được nghiền nhỏ bằng cối sứ, bổ sung 90g nước cất, chiết ở 100°C trong 3 giờ. Lọc bằng ly tâm ở 3.800 vòng/phút trong 15 phút, thu dịch trong, xác định% hoạt tính AGIs và hoạt lực AGIs (giá trị IC_{50}).

- Xác định% hoạt tính AGIs bằng xác định sự tạo thành 4-nitrophenol ở bước sóng 405nm sau phản ứng xúc tác của α -glucosidase với cơ chất p-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside (pNPG) có tham gia của hoạt chất AGIs, điều kiện phản ứng ở nồng độ cơ chất 1 mg/ml, thời

gian phản ứng 30 phút và lượng α -glucosidase là 50 μ l (nồng độ 0,2 U/ml).

$$I(\%) = (A_{\text{đối chứng}} - A_{\text{mẫu}}) \times 100 / A_{\text{đối chứng}}$$

Trong đó I(%): % hoạt tính kìm hãm α -glucosidase; $A_{\text{đối chứng}}$: độ hấp thụ của mẫu phản ứng bao gồm cơ chất pNPG và α -glucosidase; $A_{\text{mẫu}}$: độ hấp thụ của mẫu phản ứng bao gồm cơ chất p NPG, α -glucosidase và dung dịch chứa hoạt chất AGIs (Tomoyuki & cs., 1999).

- Hoạt lực kìm hãm α -glucosidase IC_{50} (Inhibitory concentration) là nồng độ của hoạt chất mà có thể kìm hãm được 50% hoạt độ enzyme α -glucosidase (Chen & cs., 2007). IC_{50} được xác định bằng cách khảo sát hoạt tính kìm hãm của hoạt chất với enzyme ở các nồng độ khác nhau. Nếu hoạt lực kìm hãm enzyme của hoạt chất biến thiên tuyến tính với nồng độ, sẽ vẽ được một đường thẳng $y = ax + b$ (với y là% hoạt tính kìm hãm và x là nồng độ). Nếu hoạt lực kìm hãm enzyme của hoạt chất không biến thiên tuyến tính với nồng độ, một cách gần đúng, chọn hai nồng độ kìm hãm trên và dưới 50% và vẽ được đường thẳng $y = ax + b$. Thay $y = 50\%$ vào phương trình sẽ thu được giá trị x, đó là IC_{50} .

2.2.2. Xác định thời gian định kỳ đảo trộn môi trường đổ đen trong quá trình lên men *A. oryzae* T6 đến khả năng hình thành hoạt chất AGIs

Khảo sát thời gian định kỳ đảo trộn môi trường trong quá trình lên men ở mỗi mẫu công thức thực nghiệm khác nhau: không đảo trộn (đối chứng); 6; 8; 10; 12; 14 và 16 giờ lên men đảo trộn một lần. Các mẫu công thức thực nghiệm này có cùng điều kiện: Khay lên men (kích thước (cm): rộng $\times$ dài $\times$ cao = 40 $\times$ 60 $\times$ 35), độ dày khối môi trường đổ đen xanh lòng là 24cm, mật độ giống *A. oryzae* T6 ban đầu là 10⁶ CFU/g, lên men ở nhiệt độ 30 $\pm$ 2°C/ 60 giờ, thu môi trường sau lên men ở từng công thức thực nghiệm đem xác định hoạt tính AGIs.

2.2.3. Xác định ảnh hưởng độ dày khối môi trường lên men *A. oryzae* T6 đến khả năng hình thành hoạt chất AGIs

Khảo sát độ dày khối môi trường lên men ở mỗi mẫu công thức thực nghiệm khác nhau:

16,0; 18,0; 20,0; 22,0; 24,0; 26,0; 28,0 và 30,0cm. Các mẫu thực nghiệm này có cùng điều kiện: Khay lên men (kích thước (cm): rộng $\times$ dài $\times$ cao = 40 $\times$ 60 $\times$ 35), mật độ giống *A. oryzae* T6 ban đầu là 10⁶ CFU/g, lên men ở nhiệt độ 30 $\pm$ 2°C, 12 giờ lên men đảo trộn một lần, sau 60 giờ lên men, thu môi trường sau lên men ở từng công thức thực nghiệm đem xác định hoạt tính AGIs.

2.2.4. Xác định ảnh hưởng độ ẩm ban đầu ở môi trường đổ đen lên men *A. oryzae* T6 đến khả năng hình thành hoạt chất AGIs

Khảo sát độ ẩm ban đầu ở môi trường lên men, ở mỗi mẫu công thức thực nghiệm khác nhau: 45; 50; 55; 60 và 65%. Các mẫu công thức thực nghiệm này có cùng điều kiện: Khay lên men (kích thước (cm): rộng $\times$ dài $\times$ cao = 40 $\times$ 60 $\times$ 35), độ dày môi trường là 24cm, mật độ giống *A. oryzae* T6 ban đầu là 10⁶ CFU/g, lên men ở nhiệt độ 30 $\pm$ 2°C, 12 giờ lên men đảo trộn một lần, sau 60 giờ lên men, thu môi trường sau lên men ở từng công thức thực nghiệm đem xác định hoạt tính AGIs.

2.2.5. Xác định thời gian lên men đổ đen của *A. oryzae* T6 đến khả năng hình thành hoạt chất AGIs

Khảo sát thời gian lên men ở mỗi mẫu công thức thực nghiệm khác nhau: 24; 26; 28; 30; 32; 34; 36; 38; 40; 42; 44; 46; 48; 50; 52; 54; 56; 58; 60; 62; 64; 66 và 68 giờ. Các mẫu công thức thực nghiệm này có cùng điều kiện: Khay lên men (kích thước (cm): rộng $\times$ dài $\times$ cao = 40 $\times$ 60 $\times$ 35) chứa môi trường có tỷ lệ khối lượng đổ đen xanh lòng/cám gạo tương ứng: 9/1 (w/w); độ ẩm ban đầu là 60%; pH ban đầu là 5,5; mật độ giống *A. oryzae* T6 là 10⁶ CFU/g; độ dày khối môi trường là 24cm, lên men ở nhiệt độ 30 $\pm$ 2°C, 12 giờ lên men đảo trộn một lần, sau 60 giờ lên men, thu môi trường sau lên men ở từng công thức thực nghiệm đem xác định hoạt tính AGIs.

2.2.6. Chi tiêu chất lượng, cảm quan và an toàn thực phẩm của chế phẩm AGIs tạo ra từ *A. oryzae* T6

Môi trường đổ đen xanh lòng lên men của *A. oryzae* T6 trong 56 giờ được chiết xuất bằng

Ảnh hưởng một số điều kiện lên men *Aspergillus Oryzae* T6 Tới khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kim hãm α -glucosidase trong sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người có đường huyết cao và thừa cân

siêu âm cường độ $8W/cm^2$ /tần số $20kHz/10$ phút với tỷ lệ dung môi Ethanol 50%/đổ đen xanh lòng lên men là 10/1 (v/w) ở $60^\circ C$, thu dịch chiết đem cô sấy khô ở nhiệt độ $60^\circ C/-0,8atm$ thu được bột chế phẩm AGIs (Nguyễn Đức Tiến, 2018). Chế phẩm AGIs tạo ra được xác định hoạt tính AGIs; Xác định hàm lượng chì, theo AOAC 994.02; Xác định Asen, theo AOAC 952.13; Xác định hàm lượng cadimi, theo AOAC 2000; Xác định hàm lượng thủy ngân, theo AOAC 971.21; Xác định hàm lượng đồng, theo ISO 8294:1994; Xác định hàm lượng 3-MCPD, theo TCVN 7731: 2007; Xác định tổng số vi khuẩn yếu khí, nấm men, nấm mốc trong các sản phẩm thực phẩm theo TCVN 4886-89; Xác định *E.coli*, theo TCVN 6846:2007; Xác định *Salmonella*, theo TCVN 4829:2005; Xác định *Staphylococcus aureus*, theo TCVN 4830:2005; Xác định *Clostridium perfringens*, theo TCVN 4991:2005; Xác định *Bacillus cereus*, theo TCVN 4992:89; Xác định aflatoxin, theo TCVN 7596:2007; Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí, theo TCVN 4884:2005; Xác định tổng bào tử nấm men mốc theo TCVN 6265:2007; Xác định *Coliforms*, theo TCVN 4882:2007.

2.2.7. Xử lý số liệu

Các số liệu về thời gian đảo trộn, độ dày khối môi trường, độ ẩm, thời gian được tính toán giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và phân tích one-way ANOVA tìm sự khác biệt giữa các giá trị trung bình bằng so sánh LSD có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$. Sử dụng phần mềm Statgraphics Plus, version 5.1.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của thời gian định kỳ đảo trộn môi trường đổ đen trong quá trình lên men nhờ *A. oryzae* T6 đến khả năng hình thành hoạt chất AGIs

Kết quả hình 1 cho thấy hoạt tính AGIs tăng từ 57,03% (ở kỹ thuật lên men không đảo trộn) lên 71,01% ở kỹ thuật 16 giờ lên men đảo trộn một lần, 79,23% ở kỹ thuật sau 14 giờ lên men đảo trộn một lần, 83,07% ở kỹ thuật sau 12 giờ lên men đảo trộn một lần, 82,81% ở kỹ thuật

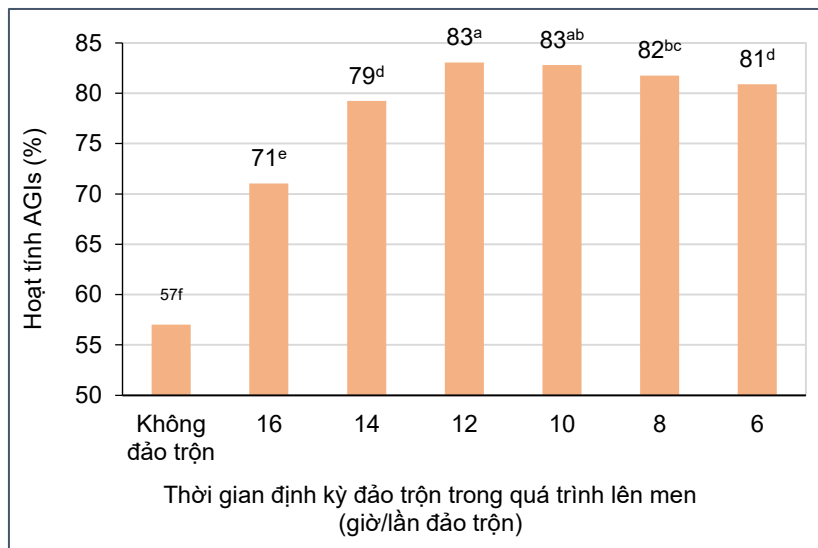
sau 10 giờ lên men đảo trộn một lần, 81,76% ở kỹ thuật sau 8 giờ lên men đảo trộn một lần và 80,91% ở kỹ thuật sau 6 giờ lên men đảo trộn một lần. Điều này cho thấy thời gian định kỳ đảo trộn môi trường trong quá trình lên men cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến sự sinh tổng hợp hoạt chất AGIs. Đảo trộn khối nguyên liệu lên men sẽ tạo điều kiện *A. oryzae* T6 tiếp xúc với không khí lớn do vậy *A. oryzae* phát triển tốt. Tuy nhiên khi thời gian đảo trộn nguyên liệu lên men định kỳ ngắn (nhiều lần) dễ bị khô, tốn chi phí cho quá trình lên men. Không đảo trộn môi trường lên men *A. oryzae* sẽ dẫn đến thiếu sự lưu thông oxy và carbon dioxit, nấm mốc chỉ phát triển ở bề mặt ngoài khối môi trường lên men do đó số nấm mốc chậm phát triển, dẫn đến khả năng hình thành hoạt tính AGIs của *A. oryzae* cũng giảm. Sau 12 giờ lên men đảo trộn một lần là phù hợp cho hình thành AGIs, sau 10 giờ, 8 giờ và 6 giờ lên men đảo trộn một lần cho hoạt tính AGIs của *A. oryzae* tăng không đáng kể. Vậy, lên men đảo trộn định kỳ sau 12 giờ lên men đảo trộn một lần được chọn cho lên men *A. oryzae* T6 sinh tổng hợp hoạt chất AGIs.

3.2. Ảnh hưởng độ dày khối môi trường lên men đổ đen của *A. oryzae* T6 đến khả năng hình thành hoạt chất AGIs

Thực nghiệm hình 2 cho thấy hoạt tính AGIs tăng từ 74,50% ở độ dày khối môi trường 16cm lên 76,42% ở độ dày khối môi trường 18cm; 78,90% ở độ dày khối môi trường 20cm; 81,41% ở độ dày khối môi trường 22cm và 82,70% ở độ dày khối môi trường 24cm và giảm hoạt tính AGIs từ 74,81% ở độ dày khối môi trường 26cm xuống 69,72% ở độ dày khối môi trường 28cm và thấp nhất là 60,20% ở độ dày khối môi trường 30cm. Độ dày khối nguyên liệu cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng, phát triển của nấm mốc. Nếu độ dày khối nguyên liệu lên men mỏng, diện tích tiếp xúc với không khí lớn do vậy *A. oryzae* phát triển tốt. Tuy nhiên khi độ dày khối nguyên liệu quá mỏng, bề mặt khối nguyên liệu lên men dễ bị khô, đồng thời tốn diện tích lên men. Còn độ dày khối môi trường lên men *A. oryzae* dày quá sẽ làm khối lên men thiếu oxy,

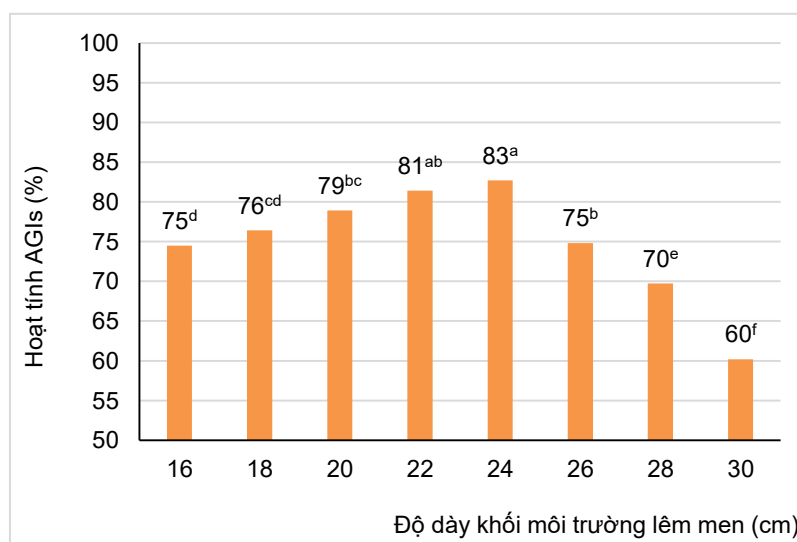
nấm mốc chỉ phát triển ở bề mặt ngoài khối môi trường lên men do đó sợi nấm mốc chậm phát triển, dẫn đến khả năng hình thành hoạt tính AGIs của *A. oryzae* cũng giảm. Hoạt tính AGIs ở các khối môi trường khác nhau có thể do *A. oryzae* hô hấp hiếu khí phát triển trong điều kiện thoáng khí, nếu bề mặt môi trường không

đảm bảo, độ dày khối môi trường mỏng sẽ làm thất thoát độ ẩm môi trường lên men nhanh dẫn đến nấm mốc không phát triển được, còn nếu khối môi trường dày lớn sẽ dẫn đến thiếu sự lưu thông oxy và carbon dioxide, nấm mốc phát triển cục bộ. Kết quả cho thấy độ dày khối môi trường lên men 24cm phù hợp cho lên men hình thành AGIs.



Ghi chú: Các ký tự khác nhau trong cùng một cột, biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức ($P < 0,05$)

Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian định kỳ đảo trộn môi trường đổ đen trong quá trình lên men *A. oryzae* T6 đến hoạt tính AGIs



Ghi chú: Các ký tự khác nhau trong cùng một cột, biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức ($P < 0,05$)

Hình 2. Ảnh hưởng độ dày khối môi trường lên men đổ đen của *A. oryzae* T6 đến hoạt tính AGIs

Ảnh hưởng một số điều kiện lên men *Aspergillus Oryzae* T6 tới khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kim hãm α -glucosidase trong sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người có đường huyết cao và thừa cân

3.3. Ảnh hưởng độ ẩm ban đầu ở môi trường đổ đen lên men của *A. oryzae* T6 đến khả năng hình thành hoạt chất AGIs

Kết quả ở hình 3 cho thấy độ ẩm ảnh hưởng nhiều tới khả năng hình thành AGIs của *A. oryzae* T6. Khả năng hình thành hoạt tính AGIs tăng từ độ ẩm ban đầu trong môi trường là 45, 40 và 55% tương ứng hoạt tính AGIs tăng lần lượt là 61,41%; 68,31% và 82,61%, khả năng hình thành AGIs giảm tương ứng với hoạt tính AGIs giảm khi độ ẩm môi trường ban đầu tăng tương ứng ở độ ẩm 60% là 77,63% và độ ẩm 65% là 66,21%. Có thể do môi trường quá khô hoặc quá ẩm kéo theo khả năng hình thành AGIs thấp. Độ ẩm 55% ban đầu môi trường lên men cho khả năng hình thành AGIs của *A. oryzae* T6 tăng cao nhất. Điều này có thể lý giải rằng trong môi trường lên men bán rắn, xấp xỉ lượng nước ảnh hưởng tới độ thoáng khí của cơ chất nên ảnh hưởng tới sinh trưởng của nấm sợi. Độ ẩm bên trong môi trường lên men là những yếu tố cần thiết cho sinh trưởng của vi sinh vật, độ ẩm thấp thường sẽ kìm hãm sự phát triển, còn độ ẩm cao quá sẽ làm giảm độ thoáng khí, sẽ ảnh hưởng tới sinh tổng hợp AGIs của *A. oryzae* T6, nên việc lựa chọn độ ẩm thích hợp cho quá trình lên men là cần thiết. Vậy độ ẩm 55% ban đầu ở môi trường rắn được chọn cho *A. oryzae* T6 lên men hình thành hoạt tính AGIs là cao nhất.

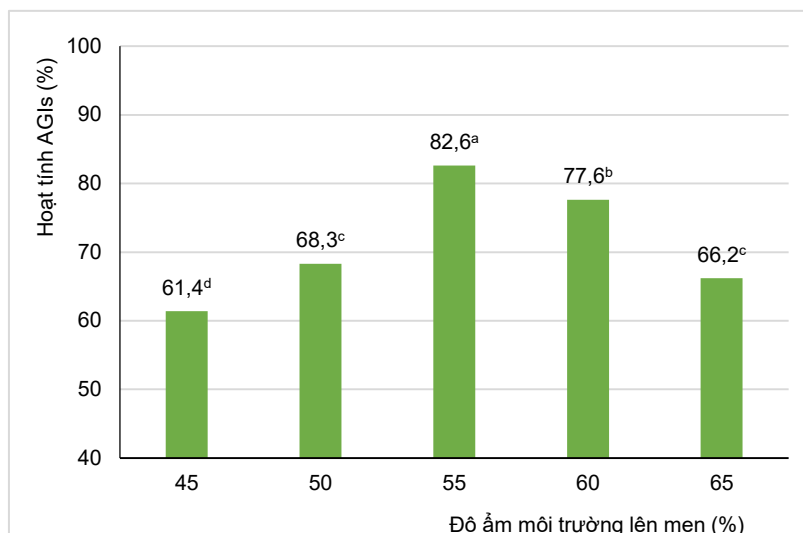
3.4. Ảnh hưởng thời gian lên men đổ đen của *A. oryzae* T6 đến khả năng hình thành hoạt chất AGIs

Kết quả nghiên cứu hình 4 cho thấy, ở các thời gian lên men khác nhau thì có hoạt tính AGIs khác nhau, thời gian tăng cũng cho khả năng hình thành hoạt tính AGIs tăng lần lượt ở 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 và 54 giờ lên men có hoạt tính AGIs tương ứng đạt 45,26%; 47,54%; 48,61%; 52,16%; 55,66%; 61,12%; 63,71%; 65,61%; 67,82%; 70,61%; 72,15%; 74,81%; 76,62%; 78,96%; 83,91% và 86,13% tăng lên đến ở 56 giờ hoạt tính AGIs đạt 93,18% là cao hơn cả. Sau 58, 60,

62, 64, 66 giờ và 68 giờ lên men hoạt tính AGIs không tăng mà có chiều hướng giảm tương ứng là 92,46%; 92,34%; 92,33%; 92,21%; 91,98% và 91,86%. Quá trình phát triển của nấm mốc có thể chia làm các giai đoạn: Tiềm phát, logarit, cân bằng và suy thoái. Giai đoạn tiềm phát và logarit nấm mốc phát triển rất nhanh, tuy nhiên ở giai đoạn cân bằng và suy thoái hầu như không tăng hoạt tính AGIs. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với công bố của Chen & cs. (2007), khi nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian lên men đến khả năng hình thành hoạt tính AGIs của *A. oryzae* 3.951. Kết quả trên cho thấy *A. oryzae* T6 sau 56 giờ lên men, đảo trộn định kỳ sau mỗi 12 giờ cho hình thành AGIs cao nhất.

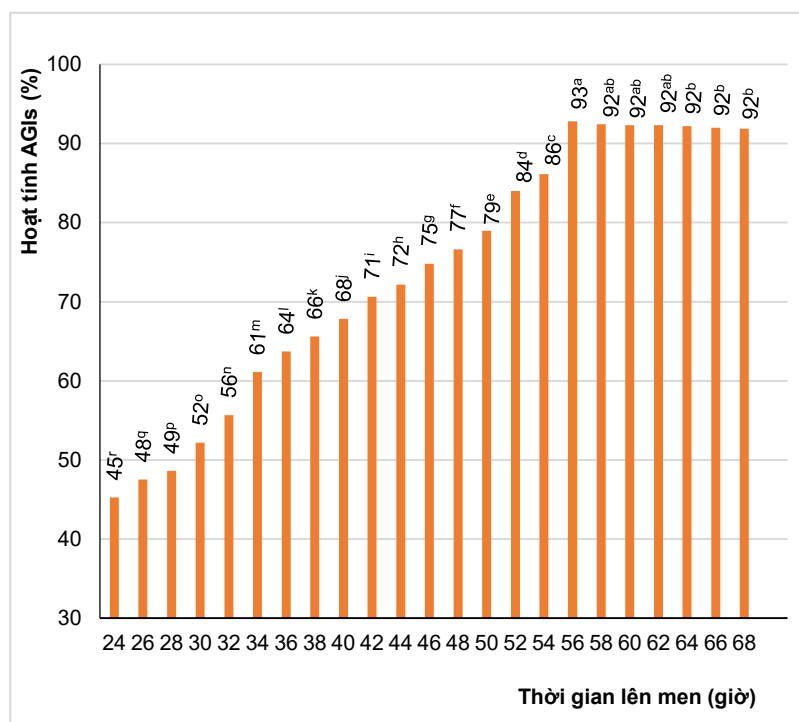
3.5. Đánh giá chất lượng, cảm quan, an toàn thực phẩm của chế phẩm AGIs và ứng dụng sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người bệnh đường huyết cao và thừa cân

Kết quả ở bảng 1 cho thấy chế phẩm AGIs tạo ra từ đổ đen lên men có hoạt lực AGIs với giá trị $IC_{50} = 0,202$ mg/ml, kết quả cũng phù hợp với một số nghiên cứu của các tác giả khác đã công bố ở các sản phẩm chế phẩm thương mại là có giá trị IC_{50} của chế phẩm thường dao động trong khoảng 0,05 đến 0,55 mg/ml, hàm lượng protein trong chế phẩm khoảng 55 đến 68%, lipid khoảng 0,1-1% (Bureau, 2009). Giá trị IC_{50} của chế phẩm AGIs từ đổ đen lên men thấp hơn so với giá trị IC_{50} của sản phẩm acarbose (Glucobay, 100mg) của Bayer Medical Co. (Leverkusen, Đức) với giá trị IC_{50} là 0,04 mg/ml, tuy nhiên hoạt tính AGIs của chế phẩm cao hơn gấp đôi so với hoạt tính AGIs của chất chiết touchi (từ đổ tương lên men rắn) được công bố với giá trị IC_{50} là 0,54 mg/ml (Kato & cs., 1991), cao hơn nhiều so với AGIs tinh chế là một tri-peptide từ môi trường lên men của *Aspergillus oryzae* N159-1 có IC_{50} là 3,1 mg/ml (Kang & cs., 2013), cao hơn so với hoạt lực AGIs của một số loại thực phẩm như dịch chiết trà xanh và trà ô long có hoạt lực AGIs với giá trị IC_{50} lần lượt là 73,5 và 134 mg/ml (Tomoyuki & cs., 1999).



Ghi chú: Các ký tự khác nhau trong cùng một cột, biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức ($P < 0,05$).

Hình 3. Ảnh hưởng độ ẩm ban đầu ở môi trường đổ đen lên men *A. oryzae* T6 đến hoạt tính AGIs



Ghi chú: Các ký tự khác nhau trong cùng một cột, biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức ($P < 0,05$).

Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian lên men đổ đen của *A. oryzae* T6 đến hoạt tính AGIs

Sản phẩm tạo ra được đánh giá một số các chỉ tiêu hàm ẩm và lượng tro tổng số cho thấy kết quả cũng tương tự so với chỉ tiêu về hàm

ẩm và lượng tro tổng số của chất chiết touchi (từ đổ tương lên men rắn) do Công ty CBC Co. Ltd (Trung Quốc) công bố. Kết quả phân tích

Ảnh hưởng một số điều kiện lên men *Aspergillus Oryzae* T6 Tới khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kim hãm α -glucosidase trong sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho người có đường huyết cao và thừa cân

kim loại nặng và vi sinh vật cho thấy sản phẩm chế phẩm AGIs có hoạt tính AGIs được tạo ra từ đồ đen lên men đã đáp ứng được các yêu cầu về giới hạn kim loại nặng và vi sinh vật cho phép trong thực phẩm (theo Quy định giới hạn tối đa nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm, QĐ số 46/2007/QĐ-BYT ngày 19/12/2007 của Bộ trưởng Bộ Y Tế). Chế phẩm AGIs

đã được ứng dụng cho sản xuất sản phẩm thực phẩm chức năng bảo vệ sức khỏe dạng viên (viên nang Touchi Diabet có IC_{50} đạt khoảng $0,45 \pm 0,05$ mg/ml), dạng bột (bột Touchi Diabet có IC_{50} đạt khoảng $0,45 \pm 0,04$ mg/ml) và siro (SiroTouchi Diabet có IC_{50} đạt khoảng $1,0 \pm 0,1$ mg/ml) cho người bệnh đường huyết cao và thừa cân.

Bảng 1. Kết quả hoạt tính AGIs, dinh dưỡng và các chỉ tiêu lý hóa của chế phẩm AGIs

Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả
Hoạt lực kim hãm α -glucosidase (IC_{50})	(mg/m)	$0,202 \pm 0,006$
Hàm lượng lipid	(%)	$0,15 \pm 0,03$
Hàm lượng protein	(%)	$63 \pm 0,61$
Độ ẩm	(%)	$2,5 \pm 0,31$
Hàm lượng tro tổng số	(%)	$0,43 \pm 0,04$
Cảm quan	Màu sắc	Màu be sáng
Cảm quan	Vị	Nhạt
Cảm quan	Mùi	Thơm nhẹ
Cảm quan	Khả năng hòa tan	Tan, có màu be

Bảng 2. Kết quả các chỉ tiêu vi sinh vật, kim loại nặng và các chất không mong muốn trong chế phẩm AGIs

Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả	Giới hạn nhiễm*
Tổng số vi khuẩn hiếu khí	cfu/g	KPH	10^4
Tổng số bào tử nấm men-mốc	cfu/g	KPH	10^2
<i>Coliforms</i> (37°C/48 giờ)	cfu/g	KPH	10
<i>E. Coli</i> (37°C/96 giờ)	cfu/g	KPH	0
<i>S. aureus</i> (37°C/48 giờ)	cfu/g	KPH	3
<i>Cl. Perfringens</i>	cfu/g	KPH	10
<i>Salmonella</i> (37°C/48 giờ)	cfu/25g	KPH	0
<i>B. cereus</i>	cfu/g	KPH	10
Hàm lượng chì	mg/kg	KPH	$\leq 10,0$
Hàm lượng Asen	mg/kg	KPH	$\leq 5,0$
Hàm lượng Cadimi	(mg/kg)	KPH	$\leq 0,3$
Hàm lượng thủy ngân	(mg/kg)	KPH	$\leq 0,5$
Hàm lượng đồng	(mg/kg)	KPH	$\leq 5,0$
Aflatoxin	μ g/kg	KPH	$\leq 5,0$
3-MCPD	μ g/kg	KPH	50

Ghi chú: KPH: Không phát hiện (nghĩa là dưới ngưỡng phát hiện của phương pháp ($0,002$ mg/kg));

* Quy định giới hạn tối đa nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm (dùng trực tiếp, không qua xử lý nhiệt trước khi sử dụng). (Ban hành kèm theo Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT ngày 19 tháng 12 năm 2007 của Bộ trưởng Bộ Y tế)



Hình 5. Sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe sản xuất từ đỗ đen lên men bằng *A. oryzae* T6

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được điều kiện thích hợp của công nghệ lên men đỗ đen bằng *A. oryzae* T6 cho hình thành hoạt chất AGIs đạt hiệu quả tốt nhất là lên men trên môi trường đỗ đen xanh lòng ở độ dày của khối môi trường lên men là 24cm, thời gian định kỳ đảo trộn khối môi trường lên men là 12 giờ đảo trộn một lần, môi trường đỗ đen lên men có độ ẩm ban đầu 55%, thời gian lên men 56 giờ. AGIs tạo ra được ứng dụng cho sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe giúp ổn định đường huyết ở người có đường huyết cao và thừa cân.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Benen J.A.E., Van Alebeek G.J.W.M., Voragen A.G. & Visser L. (2003). Pectin esterases. In: Handbook of Food Enzymology. Whitaker J.R., Voragen A.G. J. and D.W.S. Wong, Eds, Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 849-856.
- Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen (2009). Application for the approval of touchi extract under regulation (EC) no 258/97 of the European parliament and of the council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients.
- Chen J., Cheng Y.Q., Yamaki K. & Li L.T. (2007). Anti- α -glucosidase activity of Chinese traditionally fermented soybean (douchi). Food Chemistry. 103: 1091-1096.
- Fujita H., Yamagami T. & Ohshima K. (2005), "Effect of Touchi extract on blood lipids in hypertriglyceridemic subjects and Sprague-Dawley rats". Nutrition Research, 25: 681-692.
- Fujita H., Yamagami. & Ohshima K. (2001). Efficacy and safety of Touchi Extract, an α -glucosidase inhibitor derived from fermented soybeans, in non-insulin dependent diabetic mellitus. Journal of Nutritional Biochemistry. 12: 351-356.
- Holman R. (1998) Assessing the potential for α -glucosidase inhibitors in prediabetic states. Diabetes Research and Clinical Practice. 40: 21-25.
- Kang M., Yi S. & Lee J. (2013). Production and Characterization of A New Alpha-Glucosidase Inhibitory Peptide from *Aspergillus Oryzae* N159-1. Mycobiology. 41(3): 149-154.
- Kato A., Kanemitsu T. & Kobayashi K. (1991). Inhibitory Activity of ovomacroglobulin for pepsin and rennin. J. Agric. Food Chem. 39(1): 41-43.
- Lin S.J., Chen L.L., Wen C.Y. & Chu W.S. (2010). Extracellular leucine aminopeptidase produced by *Aspergillus oryzae* LL1 and LL2. African Journal of Microbiology Research. 4(3): 158-168.
- Nguyễn Đức Tiến (2018). Ảnh hưởng một số yếu tố tới khả năng chiết xuất hoạt chất kim hãm α -Glucosidase từ đỗ đen lên men của *Aspergillus oryzae* T6. Báo cáo Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ. tr. 1158-1163.
- Nguyễn Đức Tiến & Hoàng Đình Hòa (2014). Phân lập và tuyển chọn *Aspergillus oryzae* sinh tổng hợp hoạt chất ức chế α -glucosidase. Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn. 9: 46-51.
- Nguyễn Đức Tiến, Hoàng Đình Hòa & Quân Lê Hà (2013). Nghiên cứu sử dụng đỗ đen xanh lòng (*Vigna Cylindrica Skeels*) để sản xuất chế phẩm AGIs ức chế enzyme α -Glucosidase dùng cho bệnh nhân tiểu đường, thừa cân và béo phì. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. 24: 59-64.
- Tomoyuki O., Toshiro M. & Yukata O. (1999) Inhibitory effect of α -glucosidase inhibitors varies according to its origin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47(2): 550-553.