Khảo sát hoạt tính kháng oxi hóa của chitooligosacchride bằng phổ hấp thụ UV-VIS

Bùi Văn Hoài1,3\*, Trần Thế Lâm2, Hồ Ngọc Yến2, Đào An Quang3, Nguyễn Thị Nam Phương3, Hoàng Văn Thảnh3, Ngô Đại Nghiệp1,4

1Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học-Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp Hồ Chí Minh. Số 227, Nguyễn Văn Cừ, Phường 4, Quận 5, Tp.HCM.

2Khoa Công nghệ sinh học & Kỹ thuật môi trường, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp.HCM. 140 Lê Trọng Tấn, P.Tây Thạnh, Q.Tân Phú, Tp.HCM.

3Trung tâm Thí nghiệm Thực hành, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp.HCM. 140 Lê Trọng Tấn, P.Tây Thạnh, Q.Tân Phú, Tp.HCM.

4Phòng Thí nghiệm Công nghệ Enzyme, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp Hồ Chí Minh. Số 227, Nguyễn Văn Cừ, P.4 , Quận 5, Tp.HCM.

*\* Corresponding author. Tel.: 84-0914639462*

*Email: hoai.hufi@gmail.com , hoaibv@cntp.edu.vn*

Received
Revised ; Accepted

**Tóm tắt**: Khả năng kháng oxi hóa của Chitooligosaccharide hòa tan trong nước được làm rõ trong nghiên cứu này bởi phân tích năng lực khử và khả năng bắt gốc tự do DPPH. Kết quả nghiên cứu cho thấy phân đoạn COS I (1000-3000 Da) và COS II (3000-10.000 Da) có khả năng kháng oxi hóa. Khả năng kháng oxi hóa tăng khi nồng độ tăng và phụ thuộc vào trọng lượng phân tử.

*Từ khoá: Chitoolligosaccharide, kháng oxi hóa, DPPH, năng lực khử, UV-VIS*

1. Đặt vấn đề

Chitosan là một dẫn xuất của chitin, được cấu tạo từ hai loại đơn phân là N- acetylglucosamine và glucosamine. Chitosan là vật liệu polymer có nguồn gốc tự nhiên thu nhận từ vỏ tôm, cua, phế phụ phẩm của công nghiệp chế biến thủy sản, không độc, dễ phân hủy, có tính tương thích sinh học cùng nhiều loại họat tính sinh học khác như kháng khuẩn, kháng nấm, u bướu và tăng cường miễn dịch [1]

Mặc dù chitosan có nhiều chức năng hiệu quả trong nhiều lĩnh vực, nhưng chúng có trọng lượng phân tử lớn và độ nhớt cao nên khó ứng dụng trong cơ thể. Hơn nữa, chitosan không được ruột non hấp thu vì hệ tiêu hóa của động vật, đặc biệt là hệ tiêu hóa của cơ thể người không có hệ enzyme chitinase và chitosanase để thủy phân chúng thành những chất có trọng lượng phân tử thấp để cơ thể hấp thu. Vì vậy, ảnh hưởng của chitosan trong cơ thể vẫn chưa rõ ràng. Tuy nhiên, trong những năm gần đây đã có nhiều nghiên cứu chuyển chitosan thành dẫn xuất nhằm nâng cao khả năng ứng dụng của chúng [2].

Chitooligosaccharide (COS) là dạng oligomer của chitosan nên nó mang được hầu hết những hoạt tính sinh học của chitosan như kháng oxi hóa, kháng nấm, kháng khuẩn, kháng ung thư, tăng cường miễn dịch, v.v. [1]. Để làm rõ hoạt tính sinh học của COS nhằm tới ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm, chúng tôi thực hiện khảo sát hoạt tính kháng oxi hóa của COS bằng phổ hấp thụ UV-VIS.

2. Phương pháp nghiên cứu

*2.1. Vật liệu*

Chitosan (Degree of deacetyl > 80%) được cung cấp bởi công ty Chitosan Việt Nam, Số 23/6 Ngô Thời Nhiệm, Rạch Giá, Kiên Giang. Cellulase (Fungal cellulase) được cung cấp bởi hãng Zeon-Health. Số 101, Sai Siddhi Bldg, Sector-3, Near Airoli Bus Depot,Airoli, Navi Mumbai-400708, Maharashtra India. Acid lactic 88% dùng trong thực phẩm (India), NaHCO3 (India), [DPPH] 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (sigma), [BHT] butylated hydroxytoluene và ascorbic acid (India).

*2.2. Phương pháp*

*2.2.1. Phương pháp tạo COS phân đoạn thấp phân tử*

Dung dịch COS được tạo ra từ nghiên cứu trước đó bởi nghiên cứu của chúng tôi. Quy trình được tóm tắt như sau: Dung dịch chitosan 0,8% pha trong acid lactic 0,8%, dung dịch được thủy phân bằng cellulase với các thông số thích hợp như nhiệt độ 50 oC; pH 5,5; nồng độ enzyme 7 UI; thời gian thủy phân là 180 phút. Sau khi thủy phân chúng tôi thu được dung dịch COS hòa tan trong nước. Dung dịch COS được lọc qua màng siêu lọc UF (Ultrafiltration) có kích thước 1 kDa, 3kDa, 10 kDa.

*2.2.2. Phương pháp xác định khả năng bắt gốc tự do DPPH∙*

Nguyên tắc

Cơ chế của hoạt động quét gốc tự do DPPH là sự ghép đôi hydro và đình chỉ quá trình oxi-hóa bằng sự chuyển các gốc tự do sang trạng thái ổn định hơn. Như vậy, khi có mặt của chất chống oxi hóa nó sẽ khử gốc tự do DPPH và làm cho dung dịch bị giảm màu sắc, do đó độ hấp thụ của dung dịch sẽ giảm đi [3].

**Z. +** AH = ZH + A**.**

Trong đó:  Z**.**: là gốc tự do DPPH, AH là chất chống oxi hóa

Tiến hành

Khả năng bắt gốc tự do DPPH của COS và dẫn xuất được xác định theo phương pháp của Blois (1958) và được mô tả lại bởi Matute và cộng sự (2013). Cụ thể như sau, trộn COS hoặc dẫn xuất (2,85 mL, nồng độ thay đổi µg/mL, pha trong nước cất) với DPPH (0,15 mL, 20 µg/mL, pha trong ethanol tinh khiết), vortex hỗn hợp 10 giây. Ủ hỗn hợp trong tối 30 phút. Mẫu control được chuẩn bị tương tự nhưng thay mẫu bằng nước cất. Đo độ hấp thu tại bước sóng 517 nm. BHT và ascorbic acid (Vit C) được sử dụng làm mẫu đối chứng dương.

Khả năng bắt gốc tự do được tính theo công thức theo sau:

Khả năng bắt gốc tự do DPPH (%) = (1 – Amẫu/Acontrol)\*100

Trong đó: Amẫu là độ hấp thu của mẫu có chất thử nghiệm, Acontrol là độ hấp thu mà mẫu có chất thử được thay bằng nước cất.

Giá trị IC50 được xác định tại nồng độ nhỏ nhất của chất thử nghiệm có hiệu suất bắt gốc tự do DPPH là 50%. Giá trị IC50 càng nhỏ thì chất thử nghiệm có hoạt tính càng cao [4].

*2.2.3. Phương pháp năng lực khử*

Nguyên tắc

Năng lực khử được sử dụng để xác định khả năng cho electron của các chất kháng oxi hóa tự nhiên. Khả năng khử của một hợp chất có thể đóng vai trò như một nhân tố chỉ thị cho khả năng kháng oxi hóa của hợp chất đó. Chất thử nghiệm phản ứng với potassium ferricyanide (Fe3+) để tạo thành potassium ferrocyanide (Fe2+), sau đó Fe2+ phản ứng với ferric chloride để hình thành nên phức ferric ferrous hấp thụ cực đại tại bước sóng 700 nm [5,6].

Tiến hành

Xác định năng lực khử của COS và dẫn xuất được xác định theo phương pháp của Yen và Chen (1995). Cụ thể như sau, trộn COS hoặc dẫn xuất (1 mL, nồng độ thay đổi µg/mL, pha trong nước cất) với đệm phosphate (2,5 mL; 0,2 M ; pH 6,6) và potassium ferricyanide [K3Fe(CN)6] (2,5 mL; 1% w/v), ủ hỗn hợp tại 50 oC trong 20 phút. TCA (2,5 mL; 10% w/v) được cho vào hỗn hợp để dừng phản ứng, ly tâm hỗn hợp tại 3000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch nổi. Trộn dịch nổi (2,5 mL) với nước cất (2,5 mL) và ferric chloric [FeCl3] (0,5 mL; 0,1% w/v), mẫu blank được chuẩn bị tương tự nhưng thay dịch nổi bằng nước cất. Đo độ hấp thu của dung dịch tại bước sóng 700 nm. Độ hấp thu tăng cho thấy năng lực khử tăng. Butylated hydroxytoluene (BHT) và ascorbic acid được sử dụng làm đối chứng dương [7].

*2.2.4. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu*

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, thực hiện theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên. Kết quả thu được xử lý bằng phần mềm thống kê Statgraphic với độ tin cậy 95%. Sử dụng phương pháp xử lý phân tích ANOVA, so sánh sự khác biệt các giá trị trung bình dựa trên kiểm định LSD.

3. Kết quả nghiên cứu

*3.1. Kết quả tạo COS phân đoạn thấp phân tử*

COS có trọng lượng phân tử thấp được thu nhận từ những thông số thích hợp trong quá trình thủy phân chitosan được khảo sát trước đó bởi nhóm nghiên cứu của chúng tôi. Dung dịch COS sau thủy phân được phân tích trọng lượng phân tử bằng sắc ký gel thấm qua GPC [Gel Permeation Chromatography] tại Phòng Thí nghiệm Phân tích Trung tâm Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG TPHCM. Kết quả phân tích được thể hiện qua bảng 1 và hình 1. Kết quả phân tích cho thấy COS có trọng lượng phân tử trung bình 4289 Da. Theo Nguyễn Anh Dũng (2012), chito- oligosaccharide hòa tan được trong nước có Mw nhỏ hơn 10.000 Da [8]. Kết quả nghiên cứu cho thấy dung dịch COS sau thủy phân có thể hòa tan trong nước. Sau khi thu được COS hòa tan trong nước chúng tôi tiến hành lọc qua màng siêu lọc và thu được hai phân đoạn COS hòa tan trong nước là COS I (Mw từ 1000 – 3000 Da) và COS II (Mw từ 3000 – 10.000 Da). Hai phân đoạn được kiểm tra khả năng kháng oxi hóa thông qua năng lực khử và khả năng bắt gốc tự do DPPH bằng phổ hấp thụ UV-VIS.

Bảng 1.Kết quả phân tích sắc ký gel thấm qua [GPC] của mẫu chitosan và COS

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Mẫu | Mv (g/mol) | Mn (g/mol) | Mw (g/mol) | D ($\frac{Mw}{Mn}$) |
| Chitosan | 2,4291 x 104 | 1,8656 x 104 | 2,4291 x 104 | 1,3021 |
| COS | 4,2890 x 103 | 4,0401 x 103 | 4,2890 x 103 | 1,0616 |

**Mv:** Phân tử lượng trung bình nhớt

**Mn:** Phân tử lượng trung bình số

**Mw:** Phân tử lượng trung bình khối

**D:** Chỉ số phân tán





Hình 1. Sắc ký đồ của chitosan (A) và COS (B)

*3.2. Kết quả xác định khả năng bắt gốc tự do DPPH∙*

Dung dịch COS sau thủy phân được pha loãng thành dãy nồng độ 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL và xác định khả năng bắt gốc tự do DPPH. Đồ thị hình 2 và bảng 2 thể hiện khả năng bắt gốc tự do của COS I và COS II.



Hình 2. Khả năng bắt gốc DPPH của COS I và COS II

Bảng 2. Khả năng bắt gốc DPPH của COS I và COS II

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Nồng độ mg/mL | COS I | COS II |
| 1 | 38,32 ± 1,12a | 35,12 ± 1,51b |
| 2 | 42,25 ± 1,51a | 39,91 ± 1,09b |
| 3 | **53,57 ± 1,73a** | **51,43 ± 1,4b** |
| 4 | 60,8 ± 1,23a | 58,24 ± 1,58b |
| 5 | 68,5 ± 1,32a | 64,78 ± 1,02b |

*\* kết quả được tính dựa trên giá trị trung bình với độ lệch chuẩn n=3.*

*\*ab là giá trị trung bình hàng, sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê (p<0,05).*

 Kết quả bảng 2 cho thấy COS I và COS II đều có khả năng bắt gốc tự do DPPH và hoạt tính tăng dần theo nồng độ. Khả năng bắt gốc DPPH của COS I cao hơn COS II. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu Park và cộng sự (2003) [9]. Giá trị IC50 của COS I và COS II là 3 mg/mL trong khi IC 50 của Vit C và BHT là 0,025 mg/mL. Khả năng bắt gốc DPPH của Vit C và BHT được thể hiện ở bảng 3. Kết quả này cho thấy khả năng kháng oxi hóa của COS I và COS II còn thấp hơn nhiều so với Vit C và BHT.

Bảng 3. Khả năng bắt gốc DPPH của Vit C và BHT

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Nồng độ µg/mL  | Vit C | BHT |
| 1000 | 97,18 ± 1,67 a | 79,56 ± 1,06 b |
| 500 | 94,23 ± 1,34 a | 76,81 ± 1,10 b |
| 250 | 89,03 ± 1,42 a | 72,98 ± 1,07 b |
| 100 | 85,09 ± 1,24 a | 69,56 ± 1,05 b |
| 50 | 76,78 ± 1,29 a | 65,34 ± 1,39 b |
| 25 | **62,45 ± 1,02 a** | **56,23 ± 1,33 b** |
| 12.5 | 46,35 ± 1,05 a | 40,12 ± 1,22 b |

*\* kết quả được tính dựa trên giá trị trung bình với độ lệch chuẩn n=3.*

*\*ab là giá trị trung bình hàng, sự sai khác ký tự có ý nghĩa sai biệt về mặt thống kê (p<0,05).*

*3.3. Phương pháp năng lực khử*

Dung dịch COS sau thủy phân được pha loãng thành dãy nồng độ khác nhau và xác định năng lực khử. Kết quả năng lực khử của COS I, COS II và hai chứng dương là Vit C, BHT được thể hiện qua hình 3 và hình 4. Kết quả nghiên cứu cho thấy cả hai phân đoạn COS tan trong nước đều cho năng lực khử. COS I có năng lực khử cao hơn COS II và tăng dần theo nồng độ. Tuy nhiên khả năng khử của hai phân đoạn COS vẫn còn thấp so với Vit C và BHT từ 20 – 25 lần. Giá trị hấp thu của COS có nồng độ thay đổi từ 1-5 mg/mL lần lượt là COS I: 0,13; 0,22; 0,3; 0,38; 0,43 và COS II: 0,09; 0,16; 0,21; 0,27; 0,33. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu Park và cộng sự (2003) [9].

Hình 3. Đồ thị thể hiện năng lực khử của COS I và COS II.

Hình 4. Đồ thị thể hiện năng lực khử của Vit C và BHT

4. Kết luận và khuyến nghị

Từ kết quả nghiên cứu chúng tôi nhận thấy các phân đoạn COS sau khi thủy phân từ chitosan đều có khả năng kháng oxi hóa. Khả năng kháng oxi hóa phụ thuộc vào trọng lượng phân tử. Qua nghiên cứu chúng tôi khuyến nghị cần tiếp tục nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn, kháng viêm của COS nhằm làm rõ thêm về hoạt tính của COS. Từ đó cho thấy COS hòa tan trong nước có khả năng ứng dụng vào trong các sản phẩm thực phẩm nhằm phục vụ lợc ích sức khỏe con người.

Lời cảm ơn

*Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.02-2014.87.*

5. Tài lệu tham khảo

1. Kim S. K and Rajapakse N, “Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review,” *Carbohydrate Polymers*. 62 (2005), 357.
2. Jeon Y. J and Kim S. K, “Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system,” *Process Biochemistry*. 35 (2000), 623.
3. Blois M. S, "Antioxidant determination by the use of a stable free radical," *Nature*, 181, (1958), 1199.
4. Matute A. I. R., Cardelle-Cobas. A., García-Bermejo A. B, Montilla A, Olano A, and Corzo N, "Synthesis, characterization and functional properties of galactosylated derivatives of chitosan through amide formation," *Food Hydrocolloids*, 33, (2013), 245.
5. Oyaizu M, "Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine," *Jpn. J. Nutr,* 44, (1986), 307.
6. Jayanthi P., and Lalitha P, "Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (mart.) solms," *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,* 3(3), (2011), 126.
7. Yen G. C, and Chen H. Y, "Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimut agenicity," *J. Agric. Food Chem,* 43, (1995), 27.
8. Nguyễn Anh Dũng và cộng sự. (2012). Chitin, chitosan và các dẫn xuất: hoạt tính sinh học và ứng dụng: NXB giáo dục Việt nam, (2012).
9. Park P. J, Je J. Y, and Kim S. K, "Free radical scavenging activity of chitooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry," *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 51, (2003), 4624

**Abstract:**

Survey the antioxidant activity of chitooligosacchride by UV-VIS absorption spectrocopy

Bùi Văn Hoài1,3\*, Trần Thế Lâm2, Hồ Ngọc Yến2, Đào An Quang3, Nguyễn Thị Nam Phương3, Hoàng Văn Thảnh3, Ngô Đại Nghiệp1,4

1 Biochemistry, Faculty of Biology-Biotechnology, University of Natural Science, Viet Nam National University-Ho Chi Minh City (VNU-HCM). No 227, Nguyen Van Cu Street, Ward 4 , District 5, Ho Chi Minh City

2 Faculty of Biotechnology & Environmental Engineering, Ho Chi Minh City University of Food Industry (HUFI). No 140, Le Trong Tan Street, Tay Thanh Ward, Tan Phu District, Ho Chi Minh City..

3Center of Experiment and Practice, Ho Chi Minh City University of Food Industry (HUFI). No 140, Le Trong Tan Street, Tay Thanh Ward, Tan Phu District, Ho Chi Minh City.

4Lab of Enzyme technology, University of Natural Science, Viet Nam National University-Ho Chi Minh City (VNU-HCM). No 227, Nguyen Van Cu Street, Ward 4 , District 5, Ho Chi Minh City

The antioxidant capacity of the water-soluble chitooligosaccharide was clarified in this study by reducing power and scavenging ability on DPPH radicals assay. The results show that the COS I (1000-3000 Da) and COS II (3000-10,000 Da) segments have antioxidant properties. The antioxidant activity of COSs increased with increment of concentration, and it was also dependent on molecular weight.

*Từ khoá: Chitoolligosaccharide, antioxidant, DPPH, reducing power, UV-VIS*