

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG VISCOZYME® L VÀ PECTINEX® ULTRA SP-L NHẪM GIA TĂNG HIỆU QUẢ CHUYỂN HÓA BÃ ĐẬU NÀNH

Mai Thị Vân Anh^{1,2,*}, Nguyễn Thị Xuân Sâm¹, Nguyễn Kim Loan¹, Nguyễn Thanh Hằng¹

TÓM TẮT

Bã đậu nành, một phụ phẩm của ngành công nghiệp chế biến sữa đậu nành, đã được xác nhận còn chứa một lượng đáng kể protein, chất béo, chất xơ và một phần các nguyên tố khoáng, các vitamin, isoflavone... Tận dụng được nguồn phụ phẩm này sẽ hứa hẹn đem lại nhiều lợi ích kinh tế, khả năng đa dạng hóa sản phẩm đồng thời giúp giảm nguy cơ ô nhiễm môi trường. Với mục đích gia tăng hiệu quả chuyển hóa bã đậu nành, thủy phân cho lên men làm đồ uống, nghiên cứu đã ứng dụng hai carbohydrase là Viscozyme® L và Pectinex® Ultra SP-L để chuyển hóa tiếp dịch bã đậu đã qua thủy phân sơ bộ bằng protease Alcalase® 2.4 L. Kết quả, đã chọn được nồng độ enzyme Viscozyme® L và Pectinex® Ultra SP-L là 10,5 U/g và 0,45 U/g chất khô tương ứng, pH thích hợp 4,5 trong 3 giờ, phản ứng enzyme được thực hiện ở nhiệt độ 50°C, dịch thủy phân thu được có hàm lượng chất xơ không tan giảm, các thành phần hòa tan trong dịch thủy phân đều tăng so với đối chứng, với hàm lượng các thành phần như sau (mg/100 ml): đường khử 960, protein 628; protein tan trong TCA 571; polyphenol (GAE) 31,4; isoflavone tổng số 7,2; tổng lượng chất khô hòa tan vào dịch thủy phân là 2.172.

Từ khóa: Bã đậu nành, thủy phân, Alcalase® 2.4 L, Viscozyme® L, Pectinex® Ultra SP-L.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bã đậu nành, phụ phẩm của sản xuất sữa đậu nành và đậu phụ, còn chứa nhiều thành phần giá trị có thể khai thác. Tận dụng nguồn phụ phẩm này hứa hẹn đem lại nhiều lợi ích kinh tế, khả năng đa dạng hóa sản phẩm và giúp giảm nguy cơ ô nhiễm môi trường.

Thủy phân bã đậu bằng enzyme là phương pháp tiềm năng để tận dụng các chất dinh dưỡng còn giá trị. Theo một số tác giả, sản phẩm thủy phân protein bã đậu thể hiện khả năng chống oxy hóa tăng (tùy mức độ và loại enzyme thủy phân) [1]; sản phẩm thủy phân bã bằng endoprotease có hàm lượng chất chống oxy hóa cao hơn khi sử dụng exoprotease [2]. Theo Kasai N và cs (2004), cellulase có thể dễ dàng thủy phân thành tế bào sơ cấp của bã đậu tuy nhiên khi có thêm pectinase thì thành tế bào thứ cấp mới bị phá hủy và sẽ phá vỡ hiệu quả các liên kết giữa cấu trúc polysaccharid giải phóng đường khử và protein nội bào vào dịch thủy phân [3]. Matsuo (2004) đã kết hợp pectinase, xylanase và cellulase nhằm tận dụng

hiệu quả chất xơ bã đậu nành [4]. Viscozyme® L được nhiều tác giả nghiên cứu sử dụng để chuyển hóa bã đậu nành, sản phẩm thủy phân đã được chứng minh có hiệu quả trên gốc tự do DPPH [5], [6]... Như vậy, nghiên cứu thủy phân bã đậu bằng đơn enzyme protease [1], [2]; hỗn hợp endo và exo peptidase [7]; thủy phân bằng một hoặc hỗn hợp carbohydrase... [3], [4] đã được báo cáo. Tuy nhiên chưa có nhiều công bố về hiệu quả thủy phân bã khi kết hợp hai nhóm enzyme protease và carbohydrase.

Trong nghiên cứu trước của nhóm [8], bã đậu nành hấp áp lực 15 phút ở 121°C đã được thủy phân bằng endoprotease Alcalase® 2.4 L trong 1 giờ ở 50°C, pH 7,0. Dịch sau thủy phân đã tăng được đáng kể hàm lượng các peptit mạch ngắn, axit amin và protein hòa tan so với đối chứng. Tuy nhiên, một lượng lớn xơ không tan vẫn nằm trong dịch sau thủy phân. Nhằm gia tăng hiệu quả chuyển hóa nguồn bã đậu thành các thành phần hòa tan có lợi cho lên men tạo đồ uống, nghiên cứu tiếp tục sử dụng Viscozyme® L và Pectinex® Ultra SP-L chuyển hóa chất xơ trong dịch bã đậu đã được xử lý bằng Alcalase® 2.4 L [8].

Theo khuyến cáo, điều kiện hoạt động của Viscozyme® L là pH 3,3-5,5; nhiệt độ 25 - 55°C (tối ưu là 40 - 50°C) [9]. Khoảng nhiệt độ tối ưu cho thủy

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội

² Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Kinh tế - Kỹ thuật Công nghiệp

*Email: maichipbong@gmail.com; mtvanh@uneti.edu.vn

phân chất xơ đậu nành của Viscozyme®L theo một số công bố từ 45 - 55°C [5], [6]. Do đó 50°C được chọn để thực hiện phản ứng enzym cho Viscozyme® L trong nghiên cứu này. Với Pectinex® Ultra SP-L, khuyến cáo của nhà sản xuất là pH 2,8-6,5; nhiệt độ 15-65°C [10] các điều kiện này phù hợp để thủy phân đồng thời enzym này cùng Viscozyme®L.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chế phẩm enzym (Novozymes): Alcalase® 2.4 L, Viscozyme® L, Pectinex® Ultra SP-L được bảo quản 4°C trong tủ lạnh.

Bã đậu nành: thu nhận từ nhà máy sữa đậu nành Vinasoy Bắc Ninh (độ ẩm $85,32 \pm 0,02\%$, protein $3,05 \pm 0,02\%$, xơ tổng $10,25 \pm 0,16\%$).

Bã tiền xử lý: hấp tiệt trùng ở 121°C, 15 phút sau đó làm nguội đến nhiệt độ phòng và bảo quản trong điều kiện lạnh đông.

Dịch bã được dùng nghiên cứu thực hiện như sau: 30 g mỗi mẫu bã đậu sau tiền xử lý, được bổ sung nước để đạt nồng độ chất khô 5% (tỷ lệ nguyên liệu: nước là 1/2), chỉnh pH về 7,0 bằng NaOH 1N sau đó được thủy phân bằng Alcalase® 2.4 L nồng độ enzym 32,5 U/g chất khô trong 1 giờ ở 50°C [9]. Dịch bã này sẽ được coi là mẫu đối chứng 1 cho các phân tích ở mục 2.2.1.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu xác định điều kiện thủy phân của Viscozyme® L

2.2.1.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của pH dịch thủy phân

Dịch bã được chuẩn bị như trên sẽ được chỉnh pH về các mốc 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 bằng H_3PO_4 10 %, bổ sung Viscozyme® L với nồng độ 10,5 U/g chất khô, thủy phân trong 3 giờ ở 50°C. (1 đơn vị hoạt độ Viscozyme® L (1U) được xác định bằng lượng enzym cần thiết để giải phóng 1 μmol glucose từ cơ chất CMC sau 1 phút ở 50°C, pH 4,8).

Dịch sau thủy phân được đun sôi cách thủy trong 20 phút để vô hoạt enzym, làm nguội đến nhiệt độ phòng, đưa về pH 7,0; sau đó định mức đến thể tích phù hợp, ly tâm thu dịch trong đem phân tích hàm lượng đường khử, hàm lượng chất khô hòa tan để xác định pH thích hợp.

2.2.1.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ enzym Viscozyme® L

Các mẫu thử nghiệm và phân tích kết quả được tiến hành tương tự 2.2.1.1 nhưng nồng độ enzym khảo sát ở 4 mức 7,0; 10,5; 14,0; 17,5 U/g chất khô ở cùng pH thủy phân thích hợp chọn ra ở 2.2.1.1.

2.2.1.3. Xác định thời gian thủy phân thích hợp cho Viscozyme® L

Các mẫu thử nghiệm và phân tích kết quả được tiến hành tương tự như 2.2.1.1 nhưng ở cùng pH và nồng độ enzym đã chọn ở mục 2.2.1.1 và 2.2.1.2 tương ứng. Thời gian thủy phân được khảo sát ở các mốc 1, 2, 3 và 4 giờ.

2.2.2. Nghiên cứu bổ sung Pectinex® Ultra SP-L vào hỗn dịch thủy phân

2.2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ enzym Pectinex® Ultra SP-L

Các mẫu thử nghiệm và phân tích kết quả được tiến hành tương tự như 2.2.1.1 nhưng ở cùng các điều kiện về pH, nồng độ enzym và thời gian thủy phân thích hợp tìm được cho Viscozyme® L ở mục 2.2.1. Pectinex® Ultra SP-L được bổ sung vào dịch bã đồng thời với Viscozyme® L và được khảo sát ở các mức nồng độ 0,3; 0,45; 0,6 U/g chất khô. (1 đơn vị hoạt độ Pectinex® Ultra SP-L (1 U) là lượng enzym cần thiết để giải phóng 1 μmol D-galacturonic từ cơ chất axit polygalacturonic sau 1 phút ở 35°C, pH 5,5).

Mẫu đối chứng ở mục này là mẫu dịch thủy phân bằng protease và Viscozyme® L (đối chứng 2).

2.2.2.2. Xác định thời gian thủy phân thích hợp khi bổ sung Pectinex® Ultra SP-L

Các thí nghiệm được thiết kế tương tự 2.2.2.1, nhưng ở cùng nồng độ Pectinex® Ultra SP-L chọn ra ở mục 2.2.2.1. Thời gian thủy phân được khảo sát ở các mốc 1, 2, 3 và 4 giờ.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Xác định hàm lượng đường khử

Hàm lượng đường khử được xác định bằng phương pháp DNS dựa trên cơ sở phản ứng tạo màu giữa đường khử trong dịch phân tích với thuốc thử axit dinitrosalicylic (DNS) [11]. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ đường khử trong một phạm vi nhất định. Lượng đường khử trong mẫu được xác định thông qua độ hấp thụ ở

bước sóng 540 nm của sản phẩm cuối cùng với thuốc thử DNS sử dụng đường chuẩn D-glucose.

2.3.2. Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein trong dịch phân tích được xác định bằng phương pháp Lowry, dựa trên cơ sở phản ứng tạo màu giữa protein trong dịch phân tích với thuốc thử Folin. Lượng protein trong mẫu được xác định thông qua độ hấp thụ ở bước sóng 750 nm của sản phẩm cuối cùng với thuốc thử Folin sử dụng đường chuẩn BSA [12], [13].

2.3.3. Xác định hàm lượng protein hòa tan trong TCA

Dịch bã đậu sau khi thủy phân được xử lý và ly tâm thu dịch trong, sau đó rửa với axit tricloaxetic (TCA) 20% (w/w) tỷ lệ 1 : 1. Phần dịch trong không bị kết tủa bởi TCA gồm các peptit có khối lượng phân tử thấp (từ 330 - 380 dalton) và các axit amin [14] được ly tâm tách riêng khỏi phần protein kết tủa và được đưa đi xác định hàm lượng bằng thuốc thử Folin theo Lowry [12], [13].

2.3.4. Xác định hàm lượng polyphenol

Dịch bã đậu sau khi thủy phân được xử lý và ly tâm thu dịch trong, sau đó rửa với ethanol tuyệt đối tỷ lệ 1 : 1 để loại protein, thu dịch trong đem đi phân tích. Hàm lượng polyphenol trong dịch thủy phân được xác định bằng phương pháp Folin - Ciocalteu. Nguyên tắc của phương pháp dựa vào phản ứng màu giữa các polyphenol trong dịch phân tích với thuốc thử Folin-Ciocalteu. Thuốc thử chứa chất oxy hóa là axit phospho-vanframíc, các nhóm hydroxy phenol dễ bị oxy hóa và chuyển màu xanh có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 765 nm [15]. Hàm lượng polyphenol trong mẫu được xác định dựa theo đường chuẩn axit gallic.

2.3.5. Xác định hàm lượng chất khô hòa tan vào dịch thủy phân

Dịch bã đậu sau khi thủy phân được xử lý và ly tâm. Phần bã sau ly tâm được đem sấy đến khối lượng không đổi để xác định hàm lượng chất khô của dịch sau thủy phân. Chênh lệch giữa hàm lượng chất khô của dịch trước và sau thủy phân cho biết hàm lượng chất khô đã hòa tan vào dịch.

2.3.6. Xác định hàm lượng chất xơ tổng số và xơ không tan

Dịch sau thủy phân được cô cạn và sấy đến khối lượng không đổi trước khi đem phân tích xơ. Hàm

lượng xơ tổng số và xơ không tan được xác định bằng bộ thử nghiệm chất xơ K-TDFR-100A của Megazyme dựa theo [16].

2.3.7. Xác định thành phần isoflavone

Dịch sau thủy phân được cô trên bếp cách thủy ở 80°C cho bay hơi nước đến dạng sệt, làm nguội đến nhiệt độ phòng, sau đó cân chính xác 2 g mẫu sệt (đã biết trước độ ẩm) vào ống falcon, thêm 10 ml acetonitril; 2 ml axit clohydric 0,1 M và 2 ml nước cất, trộn đều. Siêu âm 10 phút sau đó lắc 2 giờ ở nhiệt độ dưới 25°C. Ly tâm thu dịch chiết. Thổi khô 1 ml dịch chiết bằng khí nitơ. Hòa tan ngay mẫu trong ống nghiệm bằng 1 ml methanol, siêu âm 10 phút. Mẫu được lắc 1 phút, lọc qua màng PTFE 0,45 µm trước khi bơm vào máy sắc ký lỏng.

Thành phần các isoflavone của mẫu phân tích được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC, sử dụng hệ thống Alliance, Waters, Mĩ với cột Agilent HC-C18(2) 150 x 4,6 mm. Các điều kiện HPLC như sau: nhiệt độ cột là 35°C, detector PDA ở bước sóng 260 nm, dung môi pha động là A - axit axetic 0,1%; B - axit axetic/acetonitril 20/80, tốc độ dòng là 1,0 ml/phút.

2.3.8. Khảo sát khả năng chống oxy hóa

Dịch bã đậu sau khi thủy phân được xử lý và ly tâm thu dịch trong, sau đó rửa với methanol tuyệt đối tỷ lệ 1 : 1 để loại protein, thu dịch trong để thực hiện các phản ứng với DPPH (2,2 - Diphenyl - 1 - picrylhydrazyl). Các chất chống oxy hóa trong dịch phân tích sẽ trung hòa gốc DPPH bằng cách cho hydro, làm giảm độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và màu dung dịch nhạt dần, chuyển từ màu tím sang vàng nhạt. Giá trị OD càng thấp chứng tỏ khả năng quét gốc tự do càng cao [17]. 1 ml mẫu đã xử lý được cho phản ứng với 2 ml DPPH 0,1 mM trong 30 phút ở chỗ tối, đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm. Hàm lượng chất chống oxy hóa trong dịch được quy về hàm lượng tương đương vitamin C (mg AAE)/100 ml.

2.3.9. Phương pháp phân tích thống kê

Kiểm tra ý nghĩa đối với dữ liệu thí nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng phân tích phương sai một yếu tố (One - Way ANOVA) và kiểm định Turkey sử dụng SPSS® 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu xác định điều kiện thủy phân bằng Viscozyme® L

3.1.1. Ảnh hưởng của pH đến quá trình thủy phân của Viscozyme® L

Bảng 1. Ảnh hưởng của pH đến quá trình thủy phân của Viscozyme® L

Hàm lượng (mg/100 ml dịch sau thủy phân)	Đối chứng 1	pH dịch thủy phân			
		4,0	4,5	5,0	5,5
Đường khử	56,94 ^a ±1,36	842,73 ^b ±2,56	781,19 ^c ± 1,14	560,74 ^d ±1,40	330,52 ^e ± 2,35
Chất khô hòa tan	816,31 ^a ± 38,46	2.065,06 ^b ± 86,35	2.043,50 ^b ± 76,92	1.681,11 ^c ± 57,98	1.284,94 ^d ± 60,10
Tỷ lệ chất khô tan vào dịch (%)	16,33 ^a ±0,77	41,30 ^b ±1,73	41,31 ^b ±2,17	33,62 ^c ±1,16	25,70 ^d ±1,20

Bảng 1 cho thấy, bã đậu nành sau khi thủy phân bằng protease được xử lý tiếp bằng Viscozyme® L đã làm tăng các thành phần hòa tan vào trong dịch. Điều này có thể giải thích do Viscozyme® L là một phức hợp đa enzym bao gồm cellulase, hemicellulase, arabanase, beta-glucanase và xylanase, trong quá trình thủy phân, phức hợp enzym này đã làm giảm độ cứng của thành tế bào bã đậu, phá vỡ các cấu trúc bậc 1 của thành tế bào, làm tăng lượng đường khử, giảm hàm lượng xơ không tan, ngoài ra còn tạo điều kiện cải thiện khả năng chiết xuất các chất hòa tan vào dịch thủy phân.

Sự chênh lệch hàm lượng đường khử giữa các mẫu thủy phân đều có ý nghĩa thống kê. Hàm lượng

đường khử trong dịch sau 3 giờ thủy phân bằng Viscozyme® L thay đổi theo sự thay đổi pH. Giá trị pH thủy phân cho hàm lượng đường khử cao nhất nằm trong khoảng 4,0 - 4,5.

Hàm lượng chất khô hòa tan và tỷ lệ chất khô tan vào dịch của các mẫu cũng giảm dần khi pH tăng, mẫu thủy phân ở pH 4,0 và 4,5 cho hàm lượng chất khô hòa tan vào dịch cũng như tỷ lệ chất khô tan vào dịch là cao nhất, tuy nhiên chênh lệch giữa hai mẫu này không đáng kể ở mức ý nghĩa $p < 0,05$. Do đó pH 4,5 sẽ được chọn cho quá trình thủy phân bã đậu nành dưới tác dụng của Viscozyme® L.

3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ enzym Viscozyme® L

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ Viscozyme® L đến quá trình thủy phân

Hàm lượng (mg/100 ml dịch sau thủy phân)	Đối chứng 1	Nồng độ Viscozyme® L (U/g)			
		7,0	10,5	14,0	17,5
Đường khử	56,94 ^a ±1,36	522,91 ^b ±2,12	791,04 ^c ±11,08	897,68 ^d ± 1,75	934,75 ^e ± 2,27
Chất khô hòa tan	816,31 ^a ± 38,46	1.466,39 ^b ±61,99	2.040,89 ^c ± 80,61	2.046,72 ^c ±54,45	2.045,78 ^c ±50,91
Tỷ lệ chất khô tan vào dịch (%)	16,33 ^a ±0,77	29,33 ^b ±1,24	40,82 ^c ±1,61	40,93 ^c ±1,09	40,92 ^c ±1,02

Bảng 2 cho thấy, hàm lượng đường khử trong dịch sau thủy phân bằng Viscozyme® L tăng tỷ lệ thuận với nồng độ enzym và khác nhau đều có nghĩa. Sự chênh lệch hàm lượng chất khô hòa tan trong dịch sau thủy phân và tỷ lệ chất khô tan vào dịch cũng tăng khi tăng nồng độ Viscozyme® L tuy nhiên giữa các nồng độ 10,5; 14,0; 17,5 U/g sự chênh lệch này không đáng kể. Như vậy, để tiết kiệm enzym mà vẫn đạt hiệu quả thủy phân cao, nồng độ enzym là 10,5 U/g được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.3. Xác định thời gian thủy phân thích hợp cho Viscozyme® L

Bảng 3 cho thấy, ngay từ giờ thủy phân đầu tiên khi có mặt Viscozyme® L, hàm lượng đường khử đã tăng đáng kể (gấp 9 lần so với lượng đường khử trong dịch trước thủy phân). Hàm lượng đường khử trong dịch tăng dần khi kéo dài thời gian thủy phân và các khác biệt giữa các mẫu đều có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$. Thời gian càng kéo dài thì chênh lệch hàm lượng đường khử giữa các điều kiện càng

giảm. Từ 1 - 2 giờ lượng đường khử tăng khoảng 200 mg/100 ml dịch thủy phân, từ 2 - 4 giờ, mỗi giờ giải

phóng khoảng 100 mg đường khử, như vậy sự chênh lệch này giảm dần.

Bảng 3. Ảnh hưởng thời gian thủy phân của Viscozyme® L đến sự chuyển hóa bã đậu

Hàm lượng (mg/100 ml dịch sau thủy phân)	Đối chứng 1	Thời gian thủy phân (giờ)			
		1	2	3	4
Đường khử	56,94 ^a ±1,36	512,66 ^b ±3,28	729,05 ^c ±13,55	803,73 ^d ±4,70	908,68 ^e ±1,88
Chất khô hòa tan	816,31 ^a ± 38,46	1.272,77 ^b ±55,96	1.730,56 ^c ±45,88	2.031,00 ^d ±55,15	2.093,00 ^d ±42,58
Tỷ lệ chất khô tan vào dịch (%)	16,33 ^a ±0,77	25,46 ^b ±1,12	34,61 ^c ±0,92	40,62 ^d ±1,10	40,66 ^d ±0,85

Hàm lượng chất khô hòa tan trong dịch và tỷ lệ chất khô hòa tan vào dịch cũng tăng dần khi kéo dài thời gian thủy phân nhưng đến 3 giờ chênh lệch này không đáng kể (các khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa 3 và 4 giờ). Do vậy 3 giờ là thời gian được chọn để thủy phân bã bằng Viscozyme® L.

3.2. Nghiên cứu bổ sung Pectinex® Ultra SP-L vào hỗn dịch phản ứng

3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ Pectinex® Ultra SP-L bổ sung

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ Pectinex® Ultra SP-L bổ sung đến sự chuyển hóa bã đậu

Hàm lượng (tính cho dịch sau thủy phân)	Đối chứng 2	Nồng độ Pectinex® Ultra SP-L bổ sung (U/g)		
		0,3	0,45	0,6
Đường khử	803,73 ^b ±4,70	851,78 ^c ±6,08	958,27 ^d ± 4,27	1.072,35 ^e ± 6,09
Chất khô hòa tan	2.031,00 ^b ±55,15	2.051,39 ^b ±59,00	2.170,06 ^{b,c} ±72,88	2.209,86 ^c ± 46,70
Tỷ lệ chất khô tan vào dịch (%)	40,62 ^b ±1,10	41,03 ^b ±1,18	43,40 ^{b,c} ±1,46	44,20 ^c ±0,93

Bảng 4 cho thấy, kết hợp 2 carbohydrase tiếp tục làm tăng lượng chất hòa tan từ bã vào dịch. Do thành tế bào đậu nành được cấu tạo bởi cellulose, hemicellulose và lignin cùng với pectin [18], các enzym thủy phân như cellulase, hemicellulase và pectinase đóng một vai trò quan trọng trong việc phá vỡ cấu trúc của thành tế bào bã đậu, làm cho cấu trúc yếu hơn và tăng khả năng giải phóng các chất hòa tan vào dịch thủy phân. Chỉ pectinase mới phá vỡ được thành tế bào thứ cấp [3, 19]. Do vậy khi bổ sung pectinase của Pectinex® Ultra SP-L, hàm lượng

các chất hòa tan tăng đáng kể so với mẫu chỉ thủy phân bằng Alcalase® 2.4 L, Viscozyme® L.

So với hàm lượng đường khử trong trường hợp sử dụng một carbohydrase Viscozyme® L, khi bổ sung Pectinex® Ultra SP-L từ 0,3 - 0,6 U/g vào hỗn dịch thì lượng đường khử tiếp tục tăng tương ứng. Các chỉ tiêu trong dịch thủy phân của mẫu 0,45 U/g so với 0,6 U/g chênh lệch không đáng kể nên nồng độ enzym Pectinex® Ultra SP-L là 0,45 U/g được chọn để khảo sát các điều kiện tiếp theo.

3.2.2. Xác định thời gian thủy phân khi bổ sung Pectinex® Ultra SP-L vào dịch thủy phân

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân khi bổ sung Pectinex® Ultra SP-L vào hỗn dịch

Hàm lượng (mg/100 ml dịch sau thủy phân)	Thời gian thủy phân (giờ)			
	1	2	3	4
Đường khử	618,40 ^b ±0,86	790,35 ^c ±0,47	961,59 ^d ±0,78	981,53 ^e ±1,28
Chất khô hòa tan	1.635,28 ^b ±30,88	1.943,22 ^c ±42,90	2.175,06 ^d ±45,02	2.194 ^d ±52,88
Tỷ lệ chất khô tan vào dịch (%)	32,71 ^b ±0,62	38,86 ^c ±0,86	43,50 ^d ±0,90	43,89 ^d ±1,06

Bảng 5 cho thấy, do tác động hiệp đồng của 2 carbohydrase, lượng đường khử trong dịch tăng dần khi kéo dài thời gian thủy phân, các khác biệt giữa các mẫu đều có ý nghĩa thống kê (p<0,05). Thời gian thủy phân càng kéo dài thì tốc độ tăng càng chậm. Nếu từ 1 - 2 và 2 - 3 giờ thủy phân lượng đường khử

tăng khoảng 171 - 172 mg/100 ml dịch thì từ 3 - 4 giờ lượng này chỉ khoảng 20 mg/100 ml.

Bên cạnh đó, có sự tăng hàm lượng chất khô hòa tan trong dịch thủy phân khi thời gian thủy phân carbohydrase tăng dần từ 1 - 4 giờ. Từ sau thời điểm 3 giờ thủy phân với carbohydrase, các chỉ tiêu tăng

không đáng kể, do đó chọn 3 giờ làm thời gian thủy phân bã khi sử dụng phức hợp hai enzym Viscozyme® L và Pectinex® Ultra SP-L.

3.3. Đánh giá hiệu quả chuyển hóa bã đậu khi kết hợp các chế phẩm protease và carbohydrase

Kết quả phân tích thành phần của dịch bã đậu ở 3 chế độ thủy phân được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6. Thành phần của dịch bã đậu ở 3 chế độ thủy phân

Hàm lượng (tính cho dịch sau thủy phân)	Chế độ thủy phân		
	Alcalase® 2.4 L	Alcalase® 2.4 L Viscozyme® L	Alcalase® 2.4 L Viscozyme® L Pectinex® Ultra SP-L
Đường khử (mg/100 ml)	59,84±1,95	807,92±1,02	960,45±1,87
Chất khô hòa tan (mg/100 ml)	870,69± 38,46	2035,94±6,99	2172,56±3,54
Xơ tổng số (g/100 ml)	3,20	1,99	1,69
Xơ không tan (g/100 ml)	2,31	1,62	1,23
Polyphenol (mg GAE/100 ml)	21,15± 0,16	28,47±0,14	31,36± 0,08
Protein (mg/100 ml)	457,93± 2,73	586,03±2,55	628,14±2,00
Protein tan trong TCA (mg/100 ml)	356,28±1,56	487,10±7,39	571,36±2,59
Isoflavone tổng số (mg/100 ml)	4,45	6,54	7,18
Isoflavone glucoside (mg/100 ml)	0,43	0,79	1,33
Isoflavone aglycone (mg/100 ml)	4,03	5,76	5,85
Chất chống oxy hóa (mg AAE/100 ml)	0,42±0,01	0,49±0,01	0,60±0,04

Kết quả ở bảng 6 cho thấy, việc bổ sung các carbohydrase vào dịch bã đã xử lý trước bằng protease đã làm tăng được hiệu quả chuyển hóa nguồn bã đậu. Điều này có thể giải thích do phức hợp enzym trong Viscozyme® L đã thủy phân cấu trúc xơ, làm giảm độ cứng của thành tế bào bã đậu, nên đã làm tăng lượng đường khử, giảm hàm lượng xơ không tan, ngoài ra còn tạo điều kiện làm cải thiện khả năng chiết xuất các chất hòa tan như polyphenol, protein, peptit mạch ngắn và axit amin vào dịch thủy phân. Khi kết hợp với Pectinex® Ultra SP-L, thành tế bào thứ cấp của bã đậu được thủy phân tiếp, do đó tiếp tục làm tăng lượng chất hòa tan vào dịch thủy phân, hàm lượng xơ không tan tiếp tục giảm.

Việc sử dụng phức hợp carbohydrase còn tạo điều kiện giải phóng thêm các hợp chất isoflavone vào dịch thủy phân. So với thủy phân 1 enzym protease thì mẫu thủy phân bằng 2 và 3 enzym giải phóng vào dịch một lượng đáng kể isoflavone trong đó có cả aglycone và glucoside. Tổng lượng isoflavone aglycone (mg/100 ml) tăng từ 4,03 (khi thủy phân bằng 1 enzym Alcalase® 2.4 L) lên 5,76 (khi thủy phân bằng 2 enzym Alcalase® 2.4 L và Viscozyme® L) và đến 5,85 khi thủy phân bằng 3 enzym (Alcalase® 2.4 L, Viscozyme® L và Pectinex® Ultra SP-L). Như vậy có thể khẳng định quá trình

thủy phân kết hợp với 1 và 2 carbohydrase trên dịch đã thủy phân bằng protease tiếp tục làm tăng giá trị sinh học cho dịch bã đậu. Kết quả này phù hợp với công bố của Vong và cs (2017) [20].

Theo Vong và cs (2019), các hợp chất polyphenol là một trong những nguồn chất chống oxy hóa trong bã đậu. Các hợp chất này có thể được liên kết với thành phần của thành tế bào đậu nành bằng liên kết ester hoặc ete. Xử lý bã bằng carbohydrase có thể đã phá vỡ các liên kết này và dẫn đến sự gia tăng axit p-hydroxybenzoic và syringic [21]. Đây có thể là lý do làm tăng lượng polyphenol tổng số sau thủy phân 2 và 3 enzym so với trường hợp chỉ sử dụng protease.

Việc tăng hàm lượng protein tan trong TCA (chủ yếu là peptit mạch ngắn và axit amin), lượng isoflavone trong đó có isoflavone aglycone cũng góp phần vào tăng khả năng chống oxy hóa cho dịch thủy phân. Kết quả tăng hoạt độ quét gốc tự do DPPH tương ứng của dịch sau thủy phân bằng 2 và 3 enzym so với 1 enzym cũng một lần nữa khẳng định điều này.

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả thực nghiệm trên, có thể khẳng định thủy phân bã đậu nành bằng phức hợp carbohydrase trên dịch thủy phân 5% chất khô đã xử lý với protease Alcalase® 2.4 L tiếp tục làm tăng đáng

kể hàm lượng các chất hòa tan từ bã đậu, giảm hàm lượng chất xơ không tan, tăng lượng isoflavone đặc biệt là isoflavone aglycone và tăng khả năng chống oxy hóa cho dịch thủy phân. Các điều kiện thích hợp cho thủy phân với phức hợp carbohydrase đã chọn được trong nghiên cứu là nồng độ Viscozyme® L 10,5 U/g chất khô và Pectinex® Ultra SP-L 0,45 U/g chất khô, pH 4,5 trong thời gian thủy phân 3 giờ, phản ứng enzym thực hiện ở nhiệt độ 50°C. Qua một số khảo sát sơ bộ cho thấy dịch thủy phân thu được từ nghiên cứu này là môi trường thích hợp cho một số chủng nấm men phát triển, tạo độ cồn và hương thơm dễ chịu, quá trình lên men của dịch thủy phân sẽ được tiến hành trong các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Melissa Ferreira Sbroggio, Marina Silveira Montilha, Vitória Ribeiro Garcia de Figueiredo, Sandra Regina Georgetti, Louise Emy Kurozawa (2016). *Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates*. Food Science and Technology (Campinas). 36(2): p. 375-381.
2. Ngo Minh Ngoc, Quan Le Ha (2017). Antioxidant activities of hydrolysates originated from soybean and soy milk residue. *Vietnam Journal of Science and Technology*. 55(5A): p. 134.
3. Naoya Kasai, Aoi Murata, Hiroshi Inui, Tatsuji Sakamoto, Rokibul Isra Kahn (2004). Enzymatic High Digestion of Soybean Milk Residue (Okara). *J Agric Food Chem*. 52(18): p. 5709-5716.
4. Masako Matsuo (2004). Saccharification of Okara Fiber by Plant Dietary Fiber Hydrolases. *J Nutr Sci Vitaminol* 50: p. 291-294.
5. Michele Rosset, Sandra Helena Prudencio, Adelaide Del Pino Beléia (2012). *Viscozyme L action on soy slurry affects carbohydrates and antioxidant properties of silken tofu*. Food Science and Technology International. 18(6): p. 531-538.
6. Jinhong Wu, Yan Wu, Chunmei Yang, Zhengwu Wang (2012). *Enzymatic Preparation and Characterization of Soybean Oligosaccharides from Okara*. Procedia Engineering. 37: p. 186-191.
7. Dafne Garcia Pereira, Ariana Justus, Heloisa Gabriel Falcão, Thais de Souza Rocha, Elza Iouko Ida, Louise Emy Kurozawa (2019). *Enzymatic hydrolysis of okara protein concentrate by mixture of endo and exopeptidase*. Journal of Food Processing and Preservation. 43(10): p. e14134.
8. Mai Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Xuân Sâm, Nguyễn Kim Loan, Nguyễn Thanh Hằng (2021). Ứng dụng chế phẩm protease chuyển hóa bã đậu nành thu dịch thủy phân để lên men tạo đồ uống. *Tạp chí Nông nghiệp & PTNT*. 2.
9. Novozymes (2021). *Viscozyme® L* Available from: <https://biosolutions.novozymes.com/en/juice-fruit-vegetables/products/vegetables/viscozyme-l>.
10. Novozymes (2021). *Pectinex® Ultra SP-L* Available from: <https://biosolutions.novozymes.com/en/juice-fruit-vegetables/products/vegetables/pectinex-ultra-sp-l>
11. Gail Lorenz Miller (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical chemistry. 31(3): p. 426-428.
12. Oliver H Lowry, Nira J Rosebrough, A Lewis Farr, Rose J Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. 193: p. 265-275.
13. Jakob H Waterborg (2009). *The Lowry method for protein quantitation*, in *The protein protocols handbook*. Springer. p. 7-10.
14. Norman A Greenberg, WF Shipe (1979). Comparison of the abilities of trichloroacetic, picric, sulfosalicylic, and tungstic acids to precipitate protein hydrolysates and proteins. *Journal of Food Science*. 44(3): p. 735-737.
15. Andrew L Waterhouse (2002). *Determination of total phenolics*. Current protocols in food analytical chemistry. 6(1): p. I1. 1.1-I1. 1.8.
16. Leon Prosky, Nils-Georg Asp, Ivan Furda, Jonathan W Devries, Thomas F Schweizer, Barbara F Harland (1985). Determination of Total Dietary Fiber in Foods and Food Products: Collaborative Study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*. 68(4): p. 677-679.
17. Marsden S Blois (1958). *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical*. Nature. 181(4617): p. 1199.
18. KeShun Liu (1997). *Soybeans: chemistry, technology, and utilization*. Springer.
19. KasaiN., ImashiroY., N. Morita (2003). *Extraction of soybean oil from single cells*. Journal of agricultural and food chemistry. 51(21): p. 6217-6222.

20. Weng Chan Vong, Xin Ying Lim, Shao-Quan Liu (2017). *Biotransformation with cellulase, hemicellulase and Yarrowia lipolytica boosts health benefits of okara*. Appl Microbiol Biotechnol.

21. Weng Chan Vong, Shao-Quan Liu (2019). *The effects of carbohydrase, probiotic Lactobacillus paracasei and yeast Lindnera saturnus on the composition of a novel okara (soybean residue) functional beverage*. LWT. 100: p. 196-204.

STUDYING ON USING VISCOZYME® L AND PECTINEX® ULTRA SP-L TO INCREASE EFFICIENCY OF SOY BEAN CURD RESIDUE DIGESTION

Mai Thi Van Anh^{1,2,*}, Nguyen Thi Xuan Sam¹, Nguyen Kim Loan¹, Nguyen Thanh Hang¹

¹*School of Biotechnology and Food Technology, Hanoi University of Science and Technology*

²*Faculty of Food Technology, University of Economics-Technology for Industry*

**Email: maichipbong@gmail.com; mtvanh@uneti.edu.vn*

Summary

The soybean curd residue (SCR) from soy milk production, which is often regarded as waste, contains considerable amounts of proteins, fatty acids, mineral elements, fibers, vitamins, and isoflavones... Application of this by-product in other purposes could conduct diverse products, promote economic benefits, and also reduce the risk of environmental pollution. In the aim of increasing efficiency of soy bean curd residue digestion for making fermented beverage, Viscozyme® L and Pectinex® Ultra SP-L were used to convert the remained fibers and polysaccharides into oligosaccharides, disaccharides and monosaccharides. The selected hydrolysis conditions were pH at 4.5, with 10.5 U/g of Viscozyme® L and 0.45 U/g of Pectinex® Ultra SP-L in the 3 - hour time, the hydrolysis temperature was at 50°C. After enzymatic treatment, the insoluble fiber decreased considerably, hydrolysed compositions (mg/100 ml) were 960 of reductive sugar content, 628 of protein content; 571 of soluble protein in TCA content, 31.3 of phenolic content (GAE); 7.18 of total isoflavone, 2172 of total dissolved solid content.

Keywords: *Soy bean curd residue, hydrolysis, Alcalase® 2.4 L, Viscozyme® L, Pectinex® Ultra SP-L.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Việt Anh

Ngày nhận bài: 20/6/2022

Ngày thông qua phản biện: 20/7/2022

Ngày duyệt đăng: 27/7/2022