

ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM PROTEASE CHUYỂN HÓA BÃ ĐẬU NÀNH THU DỊCH THỦY PHÂN ĐỂ LÊN MEN TẠO ĐỒ UỐNG

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 chuyển hóa nguồn protein bã đậu nành thành các peptit mạch ngắn và các axit amin làm nguồn dinh dưỡng và tăng hoạt tính chống oxy hóa cho dịch thủy phân sử dụng cho quá trình lên men của các thử nghiệm sau này, chế phẩm protease Alcalase[®] 2.4 L đã được nhóm nghiên cứu lựa chọn. Kết quả nghiên cứu đã xác định được chế độ tiền xử lý bã bằng hấp áp lực ở 121°C trong 15 phút. Thủy phân thích hợp nhất ở 50°C, pH 7, nồng độ bã đậu 4%, lượng enzyme 32,5 U/g chất khô trong thời gian 1 giờ thu được dịch thủy phân có hàm lượng protein 384,32 mg/100 ml; hàm lượng peptit mạch ngắn và axit amin 322,20 mg/100 ml; hàm lượng polyphenol tổng số 17,65 mg GAE/100 ml.

Từ khóa: Bã đậu nành, xử lý, thủy phân, enzyme, protease.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại Việt Nam, sản lượng sữa đậu nành tăng lên rất nhanh, từ 400 triệu lít năm 2010 lên 613 triệu lít năm 2014, tăng 53%. Trong đó, chỉ riêng Vinasoy, tổng năng suất 3 nhà máy đạt 390 triệu lít/năm đồng nghĩa với việc tạo ra khoảng hơn 40.000 tấn bã đậu nành mỗi năm chưa kể lượng bã tạo ra do các công ty sản xuất sữa đậu nành khác và các cơ sở nhỏ lẻ sản xuất các sản phẩm khác từ đậu nành [3].

Bã đậu nành còn được gọi là okara (Nhật Bản), biji (Hàn Quốc) hay douzha (Trung Quốc), là một phụ phẩm của ngành sản xuất sữa đậu nành và đậu phụ. Đây là một phụ phẩm chứa nhiều chất dinh dưỡng như protein, dầu béo, chất xơ, và thành phần khoáng cùng với các monosaccharide và các oligosaccharide. Ngoài ra, trong bã đậu nành vẫn còn một lượng nhỏ các thành phần chức năng có giá trị như isoflavone, soyasaponin và một số vitamin [10]. Bã đậu nành rất dễ bị phân hủy và thối rữa một cách tự nhiên nếu không được bảo quản tốt do nó chứa hàm lượng nước cao và hàm lượng dinh dưỡng lớn. Do vậy, 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.

Thủy phân protein trong bã đậu bằng protease là một phương pháp tiềm năng để tái sử dụng bã đậu, tận dụng các chất dinh dưỡng còn giá trị trong phụ phẩm. Theo Sbroggio và cs. (2016) sản phẩm thủy phân protein bã đậu nành tươi thể hiện các hoạt tính thu hẹp gốc tự do của ABTS và DPPH và khả năng chống oxy hóa mạnh hơn so với protein bã đậu nành không thủy phân, các khả năng này bị ảnh hưởng bởi mức độ thủy phân và loại enzym thủy phân [16]. Theo nhóm tác giả Ngô Minh Ngọc, Quản Lê Hà (2017), sản phẩm thủy phân bã đậu nành bằng endoprotease có hàm lượng chất chống oxy hóa cao hơn thủy phân bằng exoprotease [15]. Theo Montilha, M. S. và cs. (2017), điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân protein của bã đậu nành tươi với endopeptidase Alcalase[®] 2.4 L nhằm thu được hiệu suất thủy phân cao nhất là 55°C, tỷ lệ enzym: cơ chất 8,8% và pH 9, hiệu suất thủy phân (DH) xác định được là 37,3%. Nhóm tác giả khẳng định tiền xử lý bã đậu nành có thể tăng hiệu suất thủy phân [14].

Với mong muốn thu được dịch thủy phân từ bã đậu nành có hàm lượng các chất hòa tan cao, chứa các chất có hoạt tính sinh học tốt dùng cho các thử nghiệm tạo đồ uống lên men, nghiên cứu này nhằm

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

mục đích xác định điều kiện tiền xử lý bã đậu và thiết lập các thông số thích hợp cho quá trình thủy phân protein của bã bởi chế phẩm endopeptidase Alcalase® 2.4 L.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Bã đậu nành: thu nhận từ nhà máy sữa đậu nành Vinasoy Bắc Ninh có độ ẩm $85,32 \pm 0,02\%$, hàm lượng protein $3,05 \pm 0,02\%$ được bảo quản trong điều kiện lạnh đông.

Enzyme: Endopeptidase Alcalase® 2.4 L (Novozymes) được bảo quản 4°C trong tủ lạnh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu xác định điều kiện tiền xử lý bã đậu

Mẫu bã nguyên liệu được xử lý bằng cách hấp ở 2 chế độ sau:

Chế độ 1 (CD1): hấp ở 100°C, 30 phút.

Chế độ 2 (CD2): hấp ở 121°C, 15 phút.

2.2.1.1. Xác định ảnh hưởng của quá trình hấp đến khả năng thủy phân của enzyme

30 g mỗi mẫu bã đậu sau khi xử lý hấp bằng các chế độ tương ứng được bổ sung nước để đạt nồng độ chất khô khoảng 4% (tỷ lệ nguyên liệu: nước tương ứng là 1/2,75) sau đó chỉnh về pH 9 bằng NaOH 1N và thủy phân bằng enzyme Alcalase® 2.4 L (32,5 U/g chất khô), nhiệt độ thủy phân 50°C trong thời gian 1 giờ.

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 lên 250 ml bằng nước cất, ly tâm thu dịch trong để phân tích hàm lượng protein, hàm lượng axit amin và peptit mạch ngắn, hàm lượng polyphenol tổng số.

Song song làm mẫu kiểm chứng tương tự các bước trên với mẫu bã đậu để nguyên không qua hấp.

2.2.1.2. Xác định ảnh hưởng của quá trình hấp đến khả năng loại vi sinh vật tổng số

Các mẫu bã đậu sau hấp và mẫu không hấp được cân và pha loãng bằng nước muối vô trùng đến độ pha loãng phù hợp, sau đó được trang trên bề mặt thạch môi trường PCA (plate count agar), nuôi ở 30°C trong 48 giờ và đếm số khuẩn lạc để xác định hàm lượng vi sinh vật tổng số [2].

2.2.2. Nghiên cứu xác định điều kiện thủy phân của Alcalase® 2.4 L cho hàm lượng peptit mạch ngắn và axit amin cao

2.2.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân

Các mẫu bã đậu sau khi hấp ở chế độ thích hợp chọn được ở mục 2.2.1 được bổ sung nước và chỉnh pH về 9, nồng độ bã đậu (tính theo chất khô) 4%, tiếp đến bổ sung enzyme Alcalase® 2.4 L (32,5 U/g chất khô) và tiến hành khảo sát thủy phân ở 3 mức nhiệt độ khác nhau 45°C, 50°C và 55°C trong thời gian 1 giờ. Dịch sau thủy phân được xử lý và đem phân tích các chỉ tiêu như đã nêu ở mục 2.2.1.1 để xác định mức nhiệt độ thích hợp. Mẫu đối chứng được thực hiện tương tự mẫu thí nghiệm nhưng dịch enzyme được thay bằng nước (mẫu trước thủy phân).

2.2.2.2. Ảnh hưởng của pH thủy phân

Các mẫu thử nghiệm và phân tích kết quả được tiến hành tương tự như mục 2.2.2.1 nhưng pH thủy phân được khảo sát ở 3 giá trị 7, 8 và 9 ở cùng mức nhiệt độ thích hợp chọn ra được ở trên.

2.2.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ bã đậu

Từ các giá trị nhiệt độ, pH tìm được ở hai mục 2.2.2.1 và 2.2.2.2, bố trí các thí nghiệm và phân tích tương tự để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ bã đậu (tính theo chất khô) ở 3 mức 3, 4 và 5% (tương ứng với tỷ lệ bã ướt: nước là 1/4; 1/2,75 và 1/2) tới khả năng thủy phân của enzyme.

2.2.2.4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân

Các thí nghiệm được thiết kế tương tự các mục trên với các giá trị nhiệt độ, pH và nồng độ chất khô thích hợp đã tìm được ở trên để khảo sát với 3 khoảng thời gian thủy phân là 0,5; 1 và 2 giờ.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Xác định hàm lượng ẩm

Hàm lượng ẩm trong mẫu được xác định bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi theo AOAC 925.10 [4].

2.3.2. Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein 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

Ciocalteur [11], [17]. 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 nồng độ từ 0 - 100 mg/l.

Chuẩn bị dịch phân tích: chiết tối đa protein trong mẫu bã đậu phân tích bằng đun cách thủy trong 30 phút với NaOH 0,1N [13], [12] sau đó lọc thu dịch trong. Nếu là dịch thủy phân, cũng cần lọc thu dịch trong. Các dịch lọc được pha loãng đến nồng độ thích hợp trước khi thực hiện các phản ứng tạo màu với thuốc thử.

2.3.3. Xác định hàm lượng peptit mạch ngắn và axit amin

$$DH\% = \frac{[(\text{peptit+aa}) \text{ sau thủy phân} - (\text{peptit+aa}) \text{ trước thủy phân}] \times 100}{[\text{protein không tan trong TCA}] \text{ trước thủy phân}}$$

Trong đó: Hàm lượng peptit và axit amin trước và sau thủy phân được xác định theo mục 2.3.3. Hàm lượng protein không tan trong TCA được xác định bằng hiệu của [protein tổng có trong nguyên liệu khi chiết tối đa với NaOH 0,1N theo 2.3.2] trừ đi [peptit+aa] của dịch trước thủy phân.

2.3.5. Xác định hàm lượng polyphenol tổng số

Hàm lượng polyphenol trong dịch thủy phân được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu dựa trên cơ sở phản ứng tạo màu giữa các hợp chất polyphenol trong dịch lọc sau thủy phân với thuốc thử Folin-Ciocalteu [1], [18]. Hàm lượng polyphenol trong mẫu được xác định dựa theo đường chuẩn axit gallic nồng độ 0 - 100 mg/l.

2.3.6. Xác định hàm lượng vi sinh vật tổng số

Hàm lượng vi sinh vật tổng số trong bã nguyên liệu và bã sau các chế độ hấp khác nhau được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc theo TCVN 4884-2:2015 [2].

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

Mẫu bã đậu sau khi thủy phân được xử lý và ly tâm thu dịch trong phân tích như đã nêu ở mục 2.2.1.1. Phần bã còn lại sau ly tâm được đem sấy đến khối lượng không đổi và xác định hàm lượng chất khô 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.

Nguyên tắc: Các protein có khối lượng phân tử lớn thường bị kết tủa bởi dung dịch tricloacetic (TCA) 20% ở 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 [8] được ly tâm tách riêng khỏi phần protein kết tủa và được đưa đi xác định hàm lượng bằng thuốc thử Folin Ciocalteur theo Lowry [11], [17].

2.3.4. Xác định hiệu suất thủy phân protein

Hiệu suất thủy phân được xác định qua lượng peptit mạch ngắn và axit amin được tạo thành bởi sự phân cắt của enzyme lên các phân tử protein không tan trong TCA [9] và được xác định bằng công thức sau:

2.3.8. Phương pháp xác định hoạt độ protease

Hoạt độ protease được xác định theo Cupp-Enyard [6]. Dung dịch cơ chất casein (6,5 g/l), được pha trong đệm kali phosphate 50 mM với pH = 7,5, được trộn với một lượng enzym thích hợp và để ở 37°C trong 10 phút. Phản ứng kết thúc bằng cách bổ sung axit tricloacetic (TCA) 110 mM tỷ lệ 1:1, bổ sung Na₂CO₃ 500 mM, thuốc thử Folin – Ciocalteu, lọc và đo độ hấp thụ ở bước sóng λ = 660 nm đối ngược với mẫu trắng (là mẫu trong đó enzyme bị vô hoạt trước khi cho tiếp xúc với cơ chất). Dựa trên giá trị độ hấp thụ đo được và đường chuẩn tyrosine tính ra được hoạt độ enzyme.

Hoạt độ được biểu diễn theo số đơn vị hoạt độ (U)/ml chế phẩm enzyme. Trong đó: 1 đơn vị hoạt độ (U) là lượng enzyme cần thiết để chuyển hóa casein trong 1 phút ở pH 7,5 và nhiệt độ 37°C tạo thành một lượng sản phẩm không bị kết tủa bởi axit tricloacetic tương đương với 1 μmol tyrosine.

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® 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) ở mức ý nghĩa p < 0,05.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu xác định điều kiện tiền xử lý bã đậu

3.1.1. Ảnh hưởng của quá trình hấp đến khả năng thủy phân của enzyme

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, với các chế độ hấp nguyên liệu khác nhau, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về các chỉ tiêu của dịch sau thủy phân.

Xử lý bằng cách hấp bã ở CĐ1 và CĐ2 đều tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình thủy phân bã của

protease. Mẫu bã có xử lý hấp, sau khi thủy phân bằng enzyme giải phóng vào dịch lượng protein, peptit mạch ngắn và axit amin, polyphenol tổng số cao hơn so với mẫu thủy phân từ nguyên liệu ban đầu không hấp. Theo đó, mẫu bã đậu hấp ở 121°C trong 15 phút (CĐ2) cho hàm lượng protein, peptit & axit amin, polyphenol trong dịch thủy phân cao nhất.

Bảng 1. Ảnh hưởng của xử lý hấp nguyên liệu đến khả năng thủy phân của enzyme

Hàm lượng* (mg/100 ml)	Không hấp	Hấp CĐ1 (100°C/30')	Hấp CĐ2 (121°C/15')
Protein	345,06 ^a ± 2,46	375,43 ^b ± 1,81	399,36 ^c ± 3,81
Peptit mạch ngắn và axit amin	272,90 ^a ± 1,42	312,35 ^b ± 1,18	336,29 ^c ± 8,99
Polyphenol tổng số (GAE)	18,7 ^a ± 0,10	19,31 ^a ± 0,02	21,58 ^b ± 0,82

Ghi chú: *Chỉ tiêu của dịch sau thủy phân; các số liệu trong cùng một hàng các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả này phù hợp với công bố của Ngô Minh Ngọc, Quân Lê Hà (2017), xử lý bằng nồi hấp còn có thể làm tăng nồng độ peptit trong sản phẩm thủy phân protein bã đậu [15].

3.1.2. Xác định ảnh hưởng của quá trình hấp đến khả năng loại vi sinh vật tổng số

Hàm lượng vi sinh vật tổng số của bã đậu xử lý ở các chế độ khác nhau thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các chế độ hấp tới hàm lượng vi sinh vật tổng số của bã đậu

Mẫu	Hàm lượng VSV tổng số (CFU/g bã ướt)
Không hấp	(2,6 - 2,9) x 10 ⁵
Hấp CĐ1 (100°C/30')	(0,4 - 1,8) x 10 ²
Hấp CĐ2 (121°C/15')	0

Với hàm lượng dinh dưỡng khá phong phú và độ ẩm cao, bã đậu thường sẽ là môi trường lý tưởng cho vi sinh vật nhiễm tạp và phát triển. Kết quả phân tích

ở bảng 2 cho thấy bã đậu nguyên liệu (mẫu không hấp) có sẵn một lượng vi sinh vật đáng kể.

Xử lý bã bằng cách hấp ở 100°C trong 30 phút (CĐ 1) đã loại được một lượng lớn vi sinh vật tuy nhiên vẫn còn một lượng nhất định trong nguyên liệu.

Hấp bã ở 121°C trong 15 phút (CĐ 2) đã loại được hoàn toàn vi sinh vật. Mặt khác, các mẫu này được theo dõi và bảo quản ở điều kiện nhiệt độ thường, trong bình kín sau 3 ngày vẫn không thấy xuất hiện vi sinh vật (kết quả không chỉ ra ở đây).

Do đó chế độ hấp ở 121°C trong 15 phút được lựa chọn để tiến xử lý bã đậu cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Nghiên cứu xác định điều kiện thủy phân bã đậu nành của Alcalase® 2.4 L cho hàm lượng peptit mạch ngắn và axit amin cao

3.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân bã đậu

Hàm lượng*	Đối chứng	Nhiệt độ thủy phân (°C)		
		45	50	55
Protein (mg/100 ml)	189,20 ^a ± 3,24	356,82 ^b ± 1,48	402,78 ^c ± 1,23	397,68 ^c ± 7,07
Peptit mạch ngắn và axit amin (mg/100 ml)	11,97 ^a ± 0,14	315,65 ^b ± 1,38	344,45 ^c ± 1,04	343,93 ^c ± 5,59
Polyphenol tổng số (GAE) (mg/100 ml)	7,57 ^a ± 0,08	18,21 ^b ± 0,23	22,30 ^c ± 0,30	20,80 ^d ± 0,07
Hiệu suất thủy phân (%)	0,00 ^a ± 0,00	38,08 ^b ± 0,17	41,69 ^c ± 0,13	41,62 ^c ± 0,70

Kết quả phân tích dịch sau thủy phân ở các nhiệt độ khác nhau thể hiện ở bảng 3.

Trong kết quả này, cả 3 điều kiện thủy phân đều giải phóng lượng protein; peptit mạch ngắn và axit

amin; polyphenol tổng số trong dịch cao hơn so với mẫu đối chứng không thủy phân.

Lượng protein giải phóng vào dịch tăng gấp đôi hoặc nhiều hơn so với mẫu trước thủy phân chứng tỏ trong 1 giờ xúc tác, enzyme endopeptidase Alcalase® 2.4 L đã hoạt động khá hiệu quả và chuyển protein nằm trong bã vào dịch. Ở nhiệt độ 50°C và 55°C lượng protein giải phóng vào dịch cao hơn có ý nghĩa thống kê so với hàm lượng protein được giải phóng từ điều kiện thủy phân 45°C. Chênh lệch lượng protein trong dịch thủy phân ở 2 nhiệt độ này là không đáng kể.

** Chỉ tiêu của dịch sau thủy phân*

Tương tự như vậy, lượng peptit mạch ngắn và axit amin của cả 3 mẫu thủy phân đều cao hơn nhiều so với mẫu trước thủy phân. Hai mẫu thủy phân ở 50°C và 55°C có lượng peptit mạch ngắn và axit amin cao nhất nhưng chênh lệch giữa hai mẫu này là không đáng kể. Điều này cho thấy cả hai nhiệt độ đều phù hợp cho hoạt động của endopeptidase Alcalase® 2.4 L.

So với mẫu thủy phân ở 45°C cả 2 trường hợp thủy phân ở 50°C và 55°C đều cho hiệu suất thủy phân cao, nhưng chênh lệch giữa hai mẫu này là không đáng kể.

Cả 3 điều kiện thủy phân đều giải phóng thêm vào dịch một lượng polyphenol nhất định và đều lớn hơn từ 2,4 đến gần 3 lần so với mẫu trước thủy phân. Mẫu thủy phân ở 50°C tạo ra hàm lượng polyphenol trong dịch cao nhất. Kết quả cho thấy với cùng nồng độ bã đem thủy phân, hiệu suất thủy phân protein trong bã càng cao thì lượng polyphenol giải phóng càng nhiều, điều này khá hợp lý do các hợp chất polyphenol có liên kết với protein trong bã, khi protein bị phân cắt sẽ tạo điều kiện giải phóng polyphenol vào dịch thủy phân.

Như vậy 50°C là nhiệt độ phù hợp nhất cho quá trình thủy phân bã đậu nành bằng endopeptidase Alcalase® 2.4 L.

3.2.2. Ảnh hưởng của pH thủy phân

Kết quả phân tích các chỉ tiêu của dịch sau thủy phân ở các pH thủy phân khác nhau thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH đến quá trình thủy phân bã đậu

Hàm lượng*	Đối chứng	pH thủy phân		
		7	8	9
Protein (mg/100 ml)	189,20 ^a ± 3,24	382,65 ^b ± 4,42	390,60 ^b ± 8,25	404,74 ^c ± 2,12
Peptit mạch ngắn và axit amin (mg/100 ml)	11,97 ^a ± 0,14	321,48 ^b ± 1,08	331,51 ^c ± 6,74	347,99 ^d ± 3,64
Polyphenol tổng số (GAE) (mg/100 ml)	7,57 ^a ± 0,08	17,49 ^b ± 0,41	20,15 ^c ± 0,32	22,04 ^d ± 0,40
Hiệu suất thủy phân (%)	0,00 ^a ± 0,00	38,81 ^b ± 0,14	40,53 ^c ± 0,14	42,13 ^d ± 0,46

** Chỉ tiêu của dịch sau thủy phân*

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, với cùng điều kiện nhiệt độ và hàm lượng bã đậu, nồng độ enzyme như nhau, khi pH thủy phân tăng từ 7 đến 9, hàm lượng protein trong dịch thủy phân tăng theo và sau 1 giờ, lượng protein trong dịch thủy phân của cả 3 trường hợp đều tăng gấp đôi (hoặc hơn) so với mẫu đối chứng không thủy phân. Mẫu thủy phân ở pH 9 cho kết quả hàm lượng protein cao nhất, mẫu thủy phân ở pH 7 và 8 có hàm lượng protein thấp hơn mẫu thủy phân pH 9, nhưng chênh lệch giữa hai mẫu này là không đáng kể.

Khi pH thủy phân tăng dần từ 7 đến 9 hàm lượng polyphenol trong dịch sau thủy phân cũng tăng và lượng này đều cao gấp từ 2,3 đến 2,9 lần so với trước thủy phân. Số liệu ở bảng 4 cho thấy hiệu suất thủy

phân của các mẫu nằm trong khoảng từ 38 - 42% tùy vào pH thủy phân. Kết quả này cũng khẳng định một lần nữa là với cùng nồng độ bã đem thủy phân, hiệu suất thủy phân protein càng cao thì lượng polyphenol giải phóng vào dịch càng nhiều.

Kết quả nghiên cứu cho thấy pH 9 cho hiệu suất thủy phân cao nhất. Kết quả này khá tương đồng với trường hợp thủy phân trên bã tươi theo kết quả của Montilha và cs, 2017 [14]. Do đó pH 9 sẽ phù hợp cho các mục đích thủy phân nhằm đạt hiệu suất thủy phân cao.

Tuy nhiên, với tiêu chí của đề tài thì chỉ cần thủy phân hạn chế protein tạo ra các axit amin và peptit phân tử nhỏ làm thức ăn cho vi sinh vật trong quá trình lên men và có hoạt tính chống oxy hóa. Mặt khác, pH ban đầu của dịch bã đậu trước thủy phân

thường vào khoảng 6,7-6,8 gần với pH 7 khá dễ dàng cho việc ứng dụng vào thực tế sau này. Do vậy, giá trị pH 7 được ưu tiên lựa chọn cho các thử nghiệm tiếp theo.

3.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ bã đậu

Kết quả phân tích chỉ tiêu của dịch sau thủy phân tương ứng với các nồng độ bã khác nhau thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ bã đậu đến quá trình thủy phân của Alcalase® 2.4 L

Hàm lượng*	Nồng độ bã (%)		
	3	4	5
Protein (mg/100 ml)	268,31 ^a ± 1,39	383,14 ^b ± 1,34	462,14 ^c ± 18,73
Peptit mạch ngắn và axit amin (mg/100 ml)	242,91 ^a ± 4,75	320,29 ^b ± 3,26	357,75 ^c ± 2,88
Polyphenol tổng số (GAE) (mg/100 ml)	13,18 ^a ± 0,05	17,42 ^b ± 0,20	21,39 ^c ± 0,14
Hiệu suất thủy phân (%)	38,93 ^a ± 0,78	38,66^a ± 0,41	34,22 ^b ± 0,29

* Chỉ tiêu của dịch sau thủy phân

Kết quả phân tích ở bảng 5 cho thấy khi cố định tỷ lệ enzyme/cơ chất và các điều kiện thủy phân (pH, nhiệt độ, thời gian) như nhau, hàm lượng các chất hòa tan trong dịch sau thủy phân đều tăng lên tương đồng với việc tăng nồng độ bã đậu. Tuy nhiên, quan sát với mẫu ở nồng độ bã 5% (tính theo chất khô), dịch thủy phân bị sánh, đặc và nhớt, cánh khuấy hoạt động khá khó do vậy dẫn đến hiệu suất thủy phân của enzyme ở mẫu này thấp hơn so với hai mẫu ở nồng độ bã 3 và 4%.

Kết quả phân tích cũng cho thấy ở nồng độ bã 4%, hiệu suất thủy phân tương đương với mẫu 3% nhưng hàm lượng các chất hòa tan trong dịch đều cao hơn, đặc biệt hàm lượng peptit mạch ngắn và axit amin đạt cao gần bằng mẫu 5% do vậy nồng độ 4% được lựa chọn cho khảo sát tiếp theo.

3.2.4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân

Kết quả phân tích ở bảng 6 cho thấy khi tăng thời gian thủy phân từ 0,5 đến 2 giờ, hàm lượng protein, peptit mạch ngắn và axit amin cũng như hàm lượng polyphenol tổng số và hiệu suất thủy phân đều tăng.

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân

Hàm lượng*	Đối chứng	Thời gian-thủy phân (giờ)		
		0,5	1	2
Protein (mg/100 ml)	189,20 ^a ± 3,24	343,08 ^b ± 0,68	384,32 ^c ± 4,38	408,27 ^d ± 2,00
Peptit mạch ngắn và axit amin (mg/100 ml)	11,97 ^a ± 0,14	303,92 ^b ± 1,78	322,20 ^c ± 1,17	331,04 ^d ± 4,84
Polyphenol tổng số (mg/100 ml)	7,57 ^a ± 0,08	14,60 ^b ± 0,12	17,65 ^c ± 0,38	18,43 ^c ± 0,83
Hiệu suất thủy phân (%)	0,00 ^a ± 0,00	36,61 ^b ± 0,22	38,90 ^c ± 0,22	40,01 ^d ± 0,61

* Chỉ tiêu của dịch sau thủy phân

So với lượng protein trong mẫu đối chứng không thủy phân, sau 1 giờ, lượng protein giải phóng vào dịch tăng khoảng 2 lần, sau 2 giờ lượng này tăng 2,1 lần. Lượng peptit mạch ngắn và axit amin tăng tương ứng 26,9 lần sau 1 giờ và 27,8 lần sau 2 giờ thủy phân. Trong khi đó lượng polyphenol tổng số tăng 2,3 lần sau 1 giờ và 2,4 lần sau 2 giờ thủy phân.

Chênh lệch hiệu suất thủy phân protein giữa hai mẫu 1 giờ và 2 giờ mặc dù có ý nghĩa thống kê tuy nhiên không đáng kể so với sự tăng hiệu suất thủy phân protein trong 1 giờ đầu, ngoài ra trong nhiều

trường hợp việc kéo dài thêm 1 giờ thủy phân cần cân nhắc vì vừa tốn năng lượng vừa không hiệu quả so với 1 giờ thủy phân đầu tiên.

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả thực nghiệm trên, có thể khẳng định xử lý hấp bã đậu nành bằng hơi bão hòa ở 121°C trong 15 phút đã có tác dụng diệt vi sinh vật giúp kéo dài thời gian bảo quản nguyên liệu bã đậu, hỗ trợ cho các quá trình chế biến tiếp theo và tạo điều kiện cho quá trình thủy phân bã đậu bằng enzyme. Các điều kiện thích hợp cho thủy phân protein trong bã đã xử lý hấp bằng enzyme Alcalase® 2.4 L là nhiệt độ 50°C,

pH 7; nồng độ bã 4% (theo chất khô), thời gian thủy phân 1 giờ. Dịch thủy phân thu được có hàm lượng các chất hòa tan tăng đáng kể so với trước khi thủy phân. Qua một số khảo sát sơ bộ cho thấy dịch thủy phân thu được từ nghiên cứu này (không lọc bã) được xử lý tiếp với một số enzyme khác là môi trường thích hợp cho một số chủng nấm men phát triển, tạo độ cồn và hương thơm dễ chịu (kết quả không chỉ ra ở đây). Tuy nhiên các nghiên cứu về quá trình lên men của dịch thủy phân cần tiếp tục tiến hành trong các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. TCVN 9745-1:2013 (ISO 14502-1:2005). *Phần 1: Hàm lượng polyphenol tổng số trong chè - Phương pháp đo màu dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu*.
2. TCVN 4884-2:2015. *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - Phương pháp định lượng vi sinh vật - Phần 2: đếm khuẩn lạc ở 30 độ C bằng kỹ thuật cấy bề mặt*.
3. <http://www.vinasoycorp.vn>.
4. AOAC (1990). *Association of Official Agricultural Chemists. Methods of Analysis*, 15th edition, Washington, DC USA, 1990.
5. Colletti, A., et al. (2020). *Valorisation of By-Products from Soybean (Glycine max (L.) Merr.) Processing*. Molecules, 2020. **25**(9): p. 2129.
6. Cupp-Enyard, C. (2008). *Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2008(19): p. e899.
7. FAO (2019). *The State of Food and Agriculture 2019. Moving forward on food loss and waste reduction*. Rome. Available online: <http://www.fao.org/3/ca6030en/ca6030en.pdf>, 2019.
8. Greenberg, N. A. and W. Shipe (1979). *Comparison of the abilities of trichloroacetic, picric, sulfosalicylic, and tungstic acids to precipitate protein hydrolysates and proteins*. Journal of Food Science, 1979. **44**(3): p. 735-737.
9. Hariman A. Morais, M. P. C. S. (2013). Viviane D.M. Silva, Mauro R. Silva, Ana Cristina Simões e Silva and Josianne N. Silveira, *Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates: effect of the enzyme type and reaction time*. American Journal of Food Technology, 2013. **8**(1): p. 1-16.
10. Li, S., et al. (2013). *Soybean Curd Residue: Composition, Utilization, and Related Limiting Factors*. ISRN Industrial Engineering, 2013. **2013**: p. 1-8.
11. Lowry, O. H., et al. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. Journal of biological chemistry, 1951. **193**: p. 265-275.
12. Maehre, H. K., I.-J. Jensen and K.-E. Eilertsen (2016). *Enzymatic pre-treatment increases the protein bioaccessibility and extractability in Dulse (Palmaria palmata)*. Marine drugs, 2016. **14**(11): p. 196.
13. Maehre, H.K., et al. (2018). *Protein determination—method matters*. Foods, 2018. **7**(1): p. 5.
14. Montilha, M. S., et al. (2017). *Optimization of enzymatic protein hydrolysis conditions of okara with endopeptidase Alcalase*. International Food Research Journal 2017. **24**(3): p. 1067-1074.
15. Ngô Minh Ngọc (2017). *Antioxidant activities of hydrolysates originated from soybean and soy milk residue*. Vietnam Journal of Science and Technology, 2017. **55**(5A): p. 134.
16. Sbroggio, M. F., et al. (2016). *Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates*. Food Science and Technology (Campinas), 2016. **36**(2): p. 375-381.
17. Waterborg, J. H. (2009). *The Lowry method for protein quantitation*, in *The protein protocols handbook*. 2009, Springer. p. 7-10.
18. Waterhouse, A. L. (2002). *Determination of total phenolics*. Current protocols in food analytical chemistry, 2002. **6**(1): p. I1. 1.1-I1. 1.8.

**APPLICATION OF PROTEASE-TREATED PRODUCT FROM SOYBEAN CURD RESIDUE IN
FERMENTED BEVERAGE**

Mai Thi Van Anh^{1,2*}, Nguyen Thi Xuan Sam¹,

Nguyen Kim Loan¹, Nguyen Thanh Hang¹

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

²Faculty 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, consist of high amount of proteins, fatty acids, mineral elements, fibers, vitamins, and isoflavones... Application of this product in other purposes could conduct diverse products, promote economic benefits and reduce the risk of environmental pollution. In the aim of producing a high nutrient and antioxidant fermented beverage, we pretreated SCR into liquid hydrolysis protein by using Alcalase[®] 2.4 L protease which converted the remained proteins into short – chain peptides and amino acids. For a pretreatment, SCR was autoclaved for 15 minutes at 121°C prior to a hydrolysis processing. The optimal hydrolysis condition was selected such as temperature at 50°C, pH at 7, dry material of 4% with 32.5 U/g of Alcalase[®] 2.4 L protease and the treated time for 1 hour which got protein content of 384.32 mg/100 ml; short-chain peptides and amino acids content of 322.20 mg/100 ml; total polyphenol content of 17.65 mg GAE/100 ml.

Keywords: *Soy bean curd residue, treatment, hydrolysis, enzyme, protease.*

Người phản biện: TS. Trần Thị Mai

Ngày nhận bài: 14/5/2021

Ngày thông qua phản biện: 15/6/2021

Ngày duyệt đăng: 23/6/2021