

KHẢO SÁT QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT PEPTIDE CÓ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA TỪ ĐẬU NÀNH VÀ BÃ ĐẬU NÀNH

Ngô Minh Ngọc^{1*}, Quàn Lê Hà²

TÓM TẮT

Mục tiêu: Khảo sát quy trình tách chiết các peptide có hoạt tính sinh học từ đậu nành và bã đậu nành, hướng tới xây dựng quy trình chuẩn hóa trong sản xuất thực phẩm phục vụ sức khỏe.

Vật liệu, phương pháp: Mẫu nguyên liệu gồm hạt đậu nành (đạt tiêu chuẩn TCVN 4849:1989) và bã đậu nành (sau bước ép lấy sữa đậu nành) từ Công ty Sữa đậu nành Việt Nam Vinasoy. Tác nhân xúc tác gồm các enzym Protease (Neutrase và Flavourzyme); các chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae* (A1 và A2). Nghiên cứu thực nghiệm bằng phương pháp công nghệ và phương pháp phân tích, có so sánh với mẫu đối chứng.

Kết quả: Quy trình tách chiết bước đầu lựa chọn gồm tác nhân thủy phân là enzym Neutrase và chủng nấm mốc A1; chế độ thủy phân 1 giờ, khuấy chậm 1 phút, ở nhiệt độ xử lý mẫu sau thủy phân thấp hơn 121°C và thời gian ít hơn 20 phút. Quy trình này thu nhận các peptide có kích thước dưới 3 kDa, có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn các phân đoạn peptide kích thước lớn hơn.

Từ khóa: Quy trình, tách chiết peptide, hoạt tính sinh học, chống oxy hóa, thủy phân đậu nành.

ABSTRACT

Objectives: To investigate the process of extracting bioactive peptides from soybeans and okara, aiming to establish a standardized process for food production that serves health purposes.

Material and methods: The raw material sample consists of soybeans (meeting the TCVN 4849:1989), okara obtained after the extraction of soy milk from Vinasoy company. The catalytic agents include protease enzymes (Neutrase, Flavourzyme) and *Aspergillus oryzae* strains (A1 and A2). The experimental study was conducted using technological methods and analytical methods, with a comparison to a control sample.

Results: The initial selection extraction process is effective, using the hydrolyzing agent Neutrase enzyme and the A1 mold strain; the hydrolysis conditions are 1 hour of slow stirring for 1 minute, with the sample treatment temperature after hydrolysis being below 121°C and the time being less than 20 minutes. This process yields peptides with a size of under 3 kDa, which have higher antioxidant activity than larger peptide fragments.

Keywords: Process, peptide extraction, biological activity, antioxidant, soybean hydrolysis.

Chịu trách nhiệm nội dung: Ngô Minh Ngọc, Email: letridung2009@gmail.com

Ngày nhận bài: 10/8/2024; mời phản biện khoa học: 8/2024; chấp nhận đăng: 4/10/2024.

¹Viện Nghiên cứu Quân nhu, Cục Quân nhu.

²Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách Khoa Hà Nội.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Stress oxy hóa là hiện tượng mất cân bằng giữa các gốc tự do và các chất chống oxy hóa trong cơ thể. Sự mất cân bằng này sẽ gây tổn thương các DNA, lâu dần gây ra các bệnh lí như đái tháo đường, bệnh tim mạch, tăng huyết áp, xơ vữa động mạch, viêm nhiễm, Parkinson, Alzheimer, ung thư... Chất chống oxy hóa có vai trò quan trọng trong bảo vệ sức khỏe con người khỏi hiện tượng stress oxy hóa nêu trên. Tuy nhiên, so với các chất chống oxy hóa tự nhiên, các chất chống oxy hóa tổng hợp lại có nhiều tác hại cho sức khỏe khi sử dụng lâu dài [4]. Trong tự nhiên,

có thể kể đến các chất chống oxy hóa như các hợp chất polyphenol, sulfid hữu cơ, terpen, carotenoid, vitamin C, vitamin E, một số peptide có hoạt tính sinh học... [6]. Trong đó, peptide có hoạt tính sinh học (chống oxy hóa) được cấu tạo từ các chuỗi acid amin có thành phần như Ala, Gly, Tyr, Phe, Ser, Asp [3].

Đậu nành là nguồn nguyên liệu phổ biến ở nước ta, được ứng dụng trong chế biến nhiều món ăn truyền thống, như đậu phụ, sữa đậu nành, tào phớ, váng đậu... Bã đậu nành là phụ phẩm của công nghiệp sản xuất sữa đậu nành. Bã đậu thô chứa

protein lên đến 25,4-28,4% (chất khô), nhưng phần lớn không hòa tan. Bã đậu nành chứa 27% protein chất khô [7] và có hàm lượng các acid amin như methionine, cysteine, valine, tyrosine, threonine, histidine và glycine không kém trong đậu nành [8]. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy có thể tách chiết các peptide có hoạt tính sinh học từ protein đậu nành [5] hay đậu nành thủy phân. Các peptide có hoạt tính sinh học nêu trên có thể được thu nhận từ các đoạn protein (trong đậu nành hoặc bã đậu nành) bằng cách sử dụng các enzyme protease trong hệ tiêu hóa, các enzyme vi sinh vật hay thực vật hoặc quá trình lên men [9].

Thủy phân hạt đậu nành và bã đậu thành các phân đoạn peptide mang hoạt tính chống oxy hóa vừa góp phần nâng cao giá trị sử dụng nguyên liệu, vừa tạo ra sản phẩm dạng thực phẩm chức năng hay phụ gia thực phẩm có nguồn gốc tự nhiên (bảo quản thực phẩm khỏi quá trình oxy hóa) có ý nghĩa trong việc chăm sóc sức khỏe. Để có thể tạo thành sản phẩm có giá trị, việc nghiên cứu tách chiết và tinh sạch các peptide có hoạt tính chống oxy hóa từ sản phẩm đậu nành thủy phân là cần thiết, tạo ra quy trình phù hợp để thu nhận được các peptide có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất.

Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm bước đầu khảo sát quy trình tách chiết các peptide có hoạt tính sinh học từ đậu nành và bã đậu nành, hướng tới xây dựng quy trình chuẩn hóa trong sản xuất thực phẩm phục vụ sức khỏe bộ đội và nhân dân.

2. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu nguyên liệu: hạt đậu nành (đạt tiêu chuẩn TCVN 4849:1989 về đỗ tương - yêu cầu kĩ thuật), khai thác từ Trung tâm nghiên cứu ứng dụng đậu nành Vinasoy (VSAC) và bã đậu nành, khai thác sau bước thu nhận sữa đậu nành từ Công ty Sữa đậu nành Việt Nam Vinasoy. Qua quá trình nghiền thô và nghiền tinh với nước nóng, hạt đậu nành chuyển sang dạng dịch và các chất dinh dưỡng được hòa tan. Hệ thống li tâm sẽ trích li phần lớn các tinh chất có trong đậu nành và tách riêng phần bã (là bã đậu nành được sử dụng để nghiên cứu).

- Tác nhân xúc tác: Neutrased 0.8L (Novozyme - Đan Mạch) có nguồn gốc từ *Bacillus amyloliquefaciens*, nhiệt độ thích hợp 45-55°C, pH 5.5-7.5 và Flavourzyme 500 MG (Novozyme - Đan Mạch) có nguồn gốc từ *Aspergillus oryzae*, nhiệt độ thích hợp 50-55°C, pH 5.0-7.0. Hai chế phẩm đều ở dạng bột màu nâu, được bảo quản ở nhiệt độ 4°C; các chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae* (A1 và A2) lấy từ bộ sưu tập giống của Khoa Kỹ thuật sinh học, Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách Khoa Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng các phương pháp công nghệ và các phương pháp phân tích.

- Phương pháp thủy phân bã đậu bằng chế phẩm enzyme: 30g bã đậu có bổ sung 240 ml nước cất tiệt trùng; bổ sung chế phẩm enzyme (neutrased hoặc flavourzyme) với tỉ lệ 0,8% khối lượng, giữ ổn nhiệt ở 50°C trong 6 giờ. Sau mỗi giờ (chế độ thủy phân 1) hay 30 phút (chế độ thủy phân 2), khuấy chậm 1 phút với tốc độ 30 vòng/phút [16].

- Phương pháp thủy phân đậu nành, bã đậu bằng chủng nấm mốc *A. oryzae* A1 và *A. oryzae* A2: 25g nguyên liệu (bã đậu hoặc hạt đậu nành bóc vỏ) đã tiệt trùng, bổ sung các bào tử nấm mốc mật độ 10⁶CFU/ml; ủ nuôi ở 30°C trong 36 giờ. Bổ sung nước cất với tỉ lệ nguyên liệu:nước là 1:4. Ủ ở 55°C trong 48 giờ.

Bào tử nấm mốc được nuôi cấy và thu nhận theo các bước sau: chủng A1 và A2 được nuôi cấy trên môi trường Czapek ở 30°C trong 72 giờ. Tiến hành thu nhận bào tử nấm bằng cách bổ sung nước cất tiệt trùng ngập bề mặt nuôi cấy, lắc đều, thu huyền dịch có bào tử nấm mốc và pha loãng trong nước cất tiệt trùng đạt mật độ bào tử cần thiết. Mật độ bào tử được xác định bằng buồng đếm hồng cầu.

Trộn đều hỗn hợp nguyên liệu đã thủy phân bằng máy vortex trong 30 giây, đun cách thủy tới nhiệt độ sôi trong 3 phút để bất hoạt enzyme, sau đó li tâm tốc độ 6.000 vòng/phút trong 20 phút, thu được dịch li tâm lần một. Dịch này được lọc qua giấy lọc Whatman No1, thu được dịch chiết chứa các peptide có hoạt tính chống oxy hóa và được sử dụng để xác định hoạt tính chống oxy hóa [10]. Mẫu thủy phân có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất được lựa chọn để nghiên cứu tính chất.

- Phương pháp chuẩn bị dịch chiết các chất chống oxy hóa: dịch thủy phân được chuẩn bị theo phương pháp mô tả của Mai M.M Naeem và cộng sự (2015) [10] có thay đổi một phần. 25g nguyên liệu (bã đậu hoặc hạt đậu nành) đã thủy phân trộn với 25 ml nước cất, hỗn hợp được trộn đều bằng máy vortex trong 30 giây. Đun sôi hỗn hợp trong 3 phút để bất hoạt enzyme. Siêu âm hỗn hợp trong 15 phút, sau đó li tâm hỗn hợp với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 20 phút, thu được dịch li tâm lần một. Phần cặn lắng được rửa lại bằng 10 ml nước cất và li tâm với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 20 phút thu dịch li tâm lần hai. Tất cả dịch li tâm được trộn đều sau đó lọc qua giấy lọc Whatman No1 thu được dịch chiết có chứa các chất chống oxy hóa. Dịch chiết này được sử dụng cho các bước phân tích tiếp theo.

- Phương pháp tách các phân đoạn peptide có hoạt tính chống oxy hóa: các phân đoạn peptide có hoạt tính chống oxy hóa được tách qua màng cut-off theo phương pháp mô tả của Gongming Yang

(2014) [11] và P-J Park (2001) [12], có thay đổi một phần cho phù hợp. Dịch chiết các chất chống oxy hóa được lọc qua màng lọc kích thước 0,2 μm. Dịch thu được sau lọc tiếp tục được lọc qua màng cut-off 10 kDa, thu được dịch chứa các peptide có kích thước > 10kDa và dịch chứa các peptide có kích thước < 10 kDa. Dịch chứa các peptide có kích thước < 10 kDa tiếp tục được lọc qua màng cut-off 3 kDa, thu được dịch chứa các peptide có kích thước > 3 kDa và dịch chứa các peptide có kích thước < 3 kDa. Tất cả các dịch có chứa các phân đoạn peptide có kích thước khác nhau như trên được bảo quản lạnh ở âm 20°C cho tới khi sử dụng để phân tích tiếp theo. Màng cut-off của hãng Millipore, USA. Thí nghiệm được tiến hành tại labo có nhiệt độ ổn định không quá 25°C.

- Phương pháp xác định hàm lượng peptide (phương pháp OPA- o-phthalaldehyde) [2]:

a) Chuẩn bị dung dịch OPA: 50 ml dung dịch OPA gồm 25 ml sodium tetraborate 100 mM; 2,5 ml SDS 20% (w/w); 40 mg OPA (hòa tan trong 1 ml

methanol); 100μl β-mercaptoethanol và 21,4 ml nước cất.

b) Lấy 50 ml dung dịch mẫu, bổ sung thêm 2 ml dung dịch OPA, trộn đều và để trong 2 phút. Đo quang trong cuvet thạch anh ở bước sóng 340 nm bằng máy so màu quang phổ UV-VIS (Genesy 20, USA). Hàm lượng được tính dựa trên đường chuẩn L-glutathion (dạng khử).

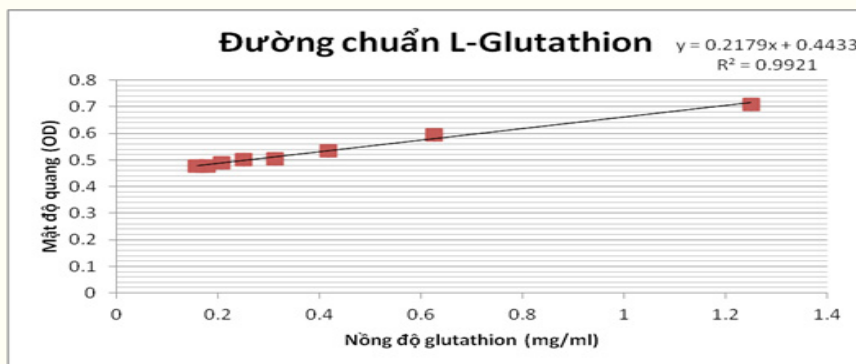
c) Dụng đường chuẩn L-glutathion: pha ống chất chuẩn vào 1ml nước cất được dung dịch L-glutathion. Pha dung dịch L-glutathion ở các nồng độ khác nhau.

Với mỗi dung dịch trên: lấy 50 μl cho vào ống nghiệm, thêm 2 ml dung dịch OPA trộn đều và để yên trong 2 phút. Sau đó, đo giá trị OD trên máy so màu ở bước sóng 340 nm. Lấy số liệu trung bình của 3 ống nghiệm tại mỗi nồng độ đo để dựng đường chuẩn glutathione với trục hoành là nồng độ glutathion tính theo μg/μl và trục tung là mật độ quang OD 340 nm.

Bảng 1. Mật độ quang OD tại các nồng độ L-Glutathion

Nồng độ L-Glutathion (mg/ml)	1,25	0,625	0,417	0,313	0,25	0,208	0,179	0,158
Mật độ quang đo được (OD340nm)	0,71	0,595	0,533	0,505	0,501	0,489	0,477	0,477

Phương trình đường chuẩn glutathion: $y = 0,2179x + 0,4433$; $R^2 = 0,9921$.



Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa bằng 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl (DPPH).

- Hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân và các phân đoạn peptide tách ra từ nó được xác định bằng khả năng loại bỏ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl) theo phương pháp mô tả của W Samrua và cộng sự (2012) [13] có thay đổi cho phù hợp:

a) Chuẩn bị dung dịch DPPH 62,5 μM: cân 2,5 mg bột DPPH vào cốc thủy tinh có nắp. Hòa tan DPPH bằng dung dịch methanol và định mức đến 100 ml bằng methanol.

b) Cho một lượng 60-150 μl dịch thủy phân vào ống fancel 50 và sấy khô ở 90°C trong 30 phút. Thêm 0,1 ml methanol, lắc nhẹ trong 1 phút tại nhiệt độ phòng. Thêm 1,9 ml dung dịch DPPH, lắc đều, để yên trong 10 phút. Đo màu bằng máy so màu ở bước sóng 515 nm.

Mẫu kiểm chứng gồm 0,1 ml methanol và 1,9ml dung dịch DPPH. Lấy số liệu trung bình của 3 ống nghiệm tại cùng một nồng độ. Giá trị IC (inhibition concentration) được tính dựa vào đường chuẩn butylated hydroxyanisole (BHA).

c) Dụng đường chuẩn BHA và tính giá trị IC theo công thức:

$$IC\% = [(A_{blank} - A_{sample})/A_{blank}] \times 100\%$$

Trong đó: A_{blank} là giá trị OD của mẫu kiểm chứng; A_{sample} là giá trị OD của mẫu cần đo.

Bảng 2. Mật độ quang OD và hoạt tính chống oxy hóa của BHA

Nồng độ BHA (µg/ml)		50	25	12,5	6,25	3,125	Kiểm chứng
Giá trị OD tại các lần đo	Lần 1	0,103	0,275	0,340	0,390	0,409	0,548
	Lần 2	0,106	0,277	0,350	0,392	0,411	0,550
	Lần 3	0,119	0,279	0,346	0,394	0,416	0,552
	Trung bình	0,108	0,277	0,345	0,392	0,412	0,550
Khả năng quét gốc DPPH (%)		80,3	49,6	37,3	28,7	25,1	
Phương trình đường chuẩn BHA		$y = -181,59x + 99,907; R^2 = 1$					

d) Cách tính giá trị IC50: IC50 là nồng độ peptide có khả năng quét được 50% gốc DPPH. Đậu nành có chứa một vài hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa khác nhau như các hợp chất isoflavone, saponin, oligosaccharide, phenol và các chất ức chế trypsin. Các peptide có hoạt tính chống oxy hóa thường chứa các axit amin có vòng phenol, indole và benzene như Trp, Phe, Tyr, His, Pro [16]. Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết các peptide từ bã đậu thủy phân chỉ được đánh giá dựa trên các peptide chứ không bao gồm các thành phần có hoạt tính chống oxy hóa kể trên. Hoạt tính chống oxy hóa được đánh giá dựa trên nồng độ peptide có khả năng quét được 50% gốc DPPH, ký hiệu là IC50 (mg peptide/ml).

Tại nồng độ peptide của dịch chiết, xác định được khả năng quét gốc DPPH thông qua đường chuẩn BHA. Xác định giá trị IC50 của dịch chiết bằng cách ngoại suy theo công thức:

$$IC50 = (C \times 50\%) / y$$

Trong đó: C là nồng độ peptide của mẫu phản ứng (mg/ml), nồng độ này được xác định bằng phương pháp OPA; y là khả năng quét gốc DPPH của mẫu phản ứng (%), khả năng quét gốc DPPH được xác định bằng đường chuẩn BHA.

- Phương pháp xác định nồng độ chất khô [2]: nồng độ chất khô trong dung dịch được xác định

bằng phương pháp sấy ở nhiệt độ cao (105°C) tới khối lượng không đổi. Sấy khô hộp đựng mẫu và nắp hộp tới khối lượng không đổi. Dùng pipet lấy dịch phân tích cho vào hộp đựng mẫu đã sấy khô. Cân xác định khối lượng của hộp và mẫu. Sấy ở 105°C tới khối lượng không đổi (đậy nắp hộp và để trong bình hút ẩm để ổn định nhiệt độ sau đó mới tiến hành cân).

Nồng độ chất khô được tính theo công thức: $Cck = (G1 - G2) / V$ (µg/µl)

Trong đó: G1 là khối lượng của hộp và mẫu ban đầu; G2 là khối lượng của hộp và mẫu sau khi sấy; V là lượng dịch mẫu ban đầu đem sấy.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Lựa chọn tác nhân thủy phân và chế độ thủy phân

- Ảnh hưởng của chủng *A. oryzae* A1 và A2 đến hoạt tính chống oxy hóa của sản phẩm thủy phân: sử dụng hai chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae* A1 và A2 thủy phân hai loại nguyên liệu bã đậu và hạt đậu nành ở cùng chế độ (nhiệt độ, thời gian, pH, tỉ lệ nguyên liệu:nước). Sau đó thu dịch chiết chứa peptide chống oxy hóa và xác định hoạt tính chống oxy hóa của chúng (kết quả thể hiện ở bảng 3).

Bảng 3. Hoạt tính chống oxy hóa của peptide khi sử dụng chủng A1 và A2

Nồng độ peptide	Bã đậu nành		Hạt đậu nành	
	Chủng A1	Chủng A2	Chủng A1	Chủng A2
Nồng độ peptide (µg/µl)	3,774	2,147	8,899	8,908
Nồng độ peptide đạt IC50 (mg/ml)	0,285	0,995	3,35	3,95

Bảng 3 cho thấy nồng độ peptide đạt IC50 của mẫu bã đậu nành được thủy phân bằng chủng A1 thấp hơn chủng A2. Điều này cũng tương tự như ở mẫu hạt đậu nành. Như vậy, chủng A1 tạo ra peptide có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn so với chủng A2.

- Ảnh hưởng của xử lý nhiệt tới khả năng chống oxy hóa của dịch thủy phân đậu nành bằng nấm mốc: sau khi hạt đậu nành được thủy phân bằng hai chủng A1 và A2, các mẫu được xử lý nhiệt ở 121°C trong 20 phút rồi thu dịch chiết và xác định hoạt tính chống oxy hóa.

Bảng 4 cho thấy khi xử lý ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút, nồng độ peptide trong các mẫu tăng từ 2-3 lần so với mẫu không gia nhiệt. Điều này có thể do nhiệt độ cao đã "cắt" các phân tử protein thành các đoạn peptide ngắn hơn. Tuy nhiên, ở nhiệt độ này, nồng độ peptide đạt IC50 của cả 2 mẫu được thủy phân bởi các chủng A1 và A2 đều giảm. Như vậy, hoạt tính chống oxy hóa của các mẫu thủy phân có xử lý nhiệt

giảm so với các mẫu không xử lí nhiệt. Điều này có thể thấy chế độ tiệt trùng sản phẩm có làm ảnh hưởng tới hoạt tính chống oxy hóa trong sản phẩm thu được.

Bảng 4. Hoạt tính chống oxy hóa của peptide khi sử dụng chủng A1 và A2 trong các điều kiện nhiệt

Nồng độ peptide	Chủng A1		Chủng A2	
	Không gia nhiệt	Gia nhiệt	Không gia nhiệt	Gia nhiệt
Nồng độ peptide (µg/µl)	8,908	20,568	8,899	27,934
Nồng độ peptide đạt IC50 (mg/ml)	3,95	7,76	3,35	48,8

- Ảnh hưởng của loại chế phẩm và chế độ thủy phân đến hoạt tính chống oxy hóa:

Thủy phân mẫu bã đậu bằng Neutrase và Flavourzyme với hai chế độ thủy phân giống nhau về tỉ lệ nguyên liệu: nước (là 1:8), nhiệt độ (ở 50°C), thời gian (6 giờ), tỉ lệ enzyme bổ sung (0,8% khối lượng); khác nhau về chế độ khuấy.

Bảng 5. Ảnh hưởng của loại chế phẩm và chế độ thủy phân đến hoạt tính chống oxy hóa

Nồng độ peptide	Chế phẩm Neutrase		Chế phẩm Flavourzyme	
	Chế độ TP 1	Chế độ TP 2	Chế độ TP 1	Chế độ TP 2
Nồng độ peptide (µg/µl)	0,197	0,289	0,343	0,916
Nồng độ peptide đạt IC50 (mg/ml)	0,200	0,242	0,407	0,829

Bảng 5 cho thấy mẫu bã đậu thủy phân bằng Neutrase có nồng độ peptide thấp hơn, nhưng nồng độ peptide đạt IC50 cao hơn so với mẫu thủy phân bằng Flavourzyme. Mặc dù Flavourzyme cắt protein đậu nành thành nhiều phân đoạn peptide hơn, nhưng nồng độ peptide đạt IC50 lại thấp hơn so với các mẫu thủy phân bằng Neutrase. Điều này cho thấy các peptide có hoạt tính chống oxy hóa được tạo thành từ quá trình thủy phân bởi Neutrase tốt hơn. Chế độ thủy phân 1 giờ khuấy chậm 1 phút tốt hơn chế độ thủy phân 30 phút khuấy chậm 1 phút khi xét về hoạt tính chống oxy hóa của peptide thu được. Nghiên cứu của Atsushi Yokomizo (2002) [3] cũng chỉ ra dịch thủy phân bã đậu từ protease N lấy từ *Bacillus subtilis* có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn so với các mẫu bã đậu thủy phân từ protease A (lấy từ *Aspergillus oryzae* 10.000 U/g), protease M (lấy từ *Aspergillus oryzae* 150.000 U/g), protease P (lấy từ *Aspergillus melleus* 30.000 U/g).

3.2. Lựa chọn phân đoạn peptide có hoạt tính sinh học

Dịch chiết từ mẫu bã đậu thủy phân bằng Neutrase được tách thành các phân đoạn peptide có kích thước khác nhau. Mỗi phân đoạn được xác định hoạt tính chống oxy hóa.

Bảng 6. Hoạt tính chống oxy hóa của các sản phẩm phân đoạn peptide

Nồng độ peptide	Kích thước phân đoạn peptide					
	< 2 µm	< 2 µm (không thủy phân)	2 µm đến 10 kDa	< 10 kDa	10 kDa đến 3 kDa	< 3 kDa
Nồng độ (mg/ml) tính theo chất khô	7,7	6,4	6,0	3,3	7,6	2,5
Nồng độ (mg/ml) đạt IC50 tính theo chất khô	5,1	45,1	10,4	3,9	2,1	1,8

Mẫu thủy phân bằng Neutrase tạo peptide có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn nhiều so với mẫu không thủy phân, giá trị nồng độ đạt IC50 tính theo chất khô lần lượt là 5,1 mg/ml và 45,1 mg/ml. Để đạt IC50, mẫu < 3 kDa có nồng độ chất khô phản ứng thấp nhất là 1,8 mg/ml. Mẫu < 3 kDa có giá trị IC50 ở nồng độ 1,8 mg/ml, trong khi mẫu < 10 kDa có giá trị IC50 ở nồng độ 3,9 mg/ml. Như vậy, mẫu < 3 kDa có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn so với mẫu < 10 kDa. Trong khi mẫu < 3 kDa chỉ bao gồm các phân đoạn peptide có kích thước < 3 kDa, còn mẫu < 10 kDa bao gồm cả các phân đoạn peptide <

3 kDa và các phân đoạn peptide có kích thước trong khoảng từ 10 kDa đến 3 kDa. Điều này chứng tỏ các phân đoạn peptide kích thước < 3 kDa có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn các phân đoạn peptide > 3 kDa. Mẫu peptide kích thước từ 10 kDa đến 3 kDa có giá trị IC50 ở nồng độ 2,1 mg/ml gần tương đương với mẫu < 3 kDa. Mẫu này là dịch thu được phía trên màng cut-off 3 kDa, bao gồm các phân đoạn peptide có kích thước nằm trong khoảng từ 10 kDa đến 3 kDa. Tuy nhiên, trong kĩ thuật cut-off, các phân tử lớn hơn kích thước lỗ màng lọc thường nằm lại dịch phía trên màng và tại màng.

Dưới tác dụng của lực li tâm, các phân tử này bị hút về phía màng, nên dịch thu được chủ yếu là các phân đoạn peptide < 3 kDa (không qua được lỗ màng lọc do bị lớp các phân đoạn peptide kích thước > 3 kDa cản trở trên màng). Như vậy, những phân đoạn peptide < 3 kDa có hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính này cao hơn hẳn các phân đoạn peptide > 3 kDa. Điều này phù hợp với các nghiên cứu của Tang-Bin Zou 2016 [14] và Ferial M Abu-Salem 2013 [15].

Nguyên liệu đậu nành và bã đậu nành tự nhiên có hoạt tính chống oxy hóa rất thấp. Với quy trình tách chiết trên có thể thu nhận được các peptide có nhiều phân đoạn khác nhau và có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn. Trong đó, các peptide kích thước < 3 kDa có hoạt tính sinh học cao nhất. Có thể tiếp tục tách chiết các phân đoạn peptide này và tinh chế thành dạng bột hoặc dạng sệt để nghiên cứu ứng dụng làm thực phẩm chức năng hay phụ gia thực phẩm có nguồn gốc tự nhiên. Có thể bổ sung các peptide này vào một số thực phẩm cung cấp cho bộ đội hiện nay như lương khô, khẩu phần ăn chế biến sẵn... Tuy nhiên, để thu nhận sản phẩm tốt hơn cần có thêm những nghiên cứu sâu hơn với quy mô lớn hơn về các yếu tố tác động đến quy trình tách chiết các peptide có hoạt tính sinh học từ đậu nành và bã đậu nành này.

4. KẾT LUẬN

Bước đầu khảo sát quy trình tách chiết các peptide có hoạt tính sinh học từ đậu nành và bã đậu nành, hướng tới xây dựng quy trình chuẩn hóa trong sản xuất thực phẩm phục vụ sức khỏe, chúng tôi có một số kết luận sau:

- Quy trình tách chiết nên lựa chọn tác nhân thủy phân là enzyme Neutralse và chủng nấm mốc A1; chế độ thủy phân 1 giờ khuấy chậm 1 phút, ở nhiệt độ xử lý mẫu sau thủy phân phải thấp hơn 121°C và thời gian ít hơn 20 phút.

- Bước thu nhận các phân đoạn peptide được tạo thành sau quá trình thủy phân cho thấy các peptide kích thước < 3 kDa có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn các phân đoạn peptide kích thước lớn hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Đáng (2022), *Gốc tự do và sức khỏe*, Hiệp hội Thực phẩm chức năng Việt Nam, Nhà xuất bản Y học, 2022.
2. Lê Thị Mùi (2009), *Kiểm nghiệm và phân tích thực phẩm*, Đại học Đà Nẵng, Trường Đại học Sư phạm, 2009.
3. Atsushi Yokomyzo et al. (2002), "Antioxidative Activity of Peptides Prepared from Okara Protein", *Food Sci. Technol. Res*, 8(4)(2002), p. 357-359.

4. Imaida et al. (1983), "Promoting activities of butylated hydroxyanisole and inhibition of γ -glutamyl transpeptidase-positive foci development in the liver of rats", *Carcinogenesis*, 4(1983), p. 885-889.
5. Yu et al. (2008), "Scavenging and anti-fatigue activity of fermented defatted soybean peptides", *Eur. Food Res. Technol*, 226(3) (2008), p. 415-421.
6. Inoune et al. (2011), "Screening of soy protein-derived hyotriglycedemic di-peptides in vitro and in vivo", *Lipids Health Dis*, 10(1) (2011), p. 85.
7. O'Toole (1999), "Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production: A review", *J. Agric. Food Chem*, 47 (1999), p. 363-371.
8. Sarwa et al. (1983), "Inter-and intra- laboratory variation in amino acid analysis of food proteins", *J. Food Sci*, 48 (1983), p. 526-531.
9. Wang et al. (2010), "Effect of enzyme type and hydrolysis conditions on the in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and ash content of hydrolysed whey protein isolate", *Int. J. Food Sci. Tech*, 45(4) (2010), p. 807-812.
10. Mai M.M Naeem et al. (2015), "Production of antioxidant by fungi using soybean milk residue (okara)", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Vol. 4, No. 2 (2015) p. 847-866.
11. Yinchen Hou et al. (2014), "Preparation and Characterization of Antioxidant Peptides from Fermented Goat Placenta", *Korean J. Food Sci. An*, Vol. 34, No.6 (2014), p. 769-776.
12. Pyo-Jam Park et al. (2001), "Purification and Characterization of Antioxidative Peptides from Protein Hydrolysate of Lecithin-Free Egg Yolk", *JAOCS*, Vol. 78, no.6 (2001), p.651-656.
13. WSamuruanetal.(2012), "Soybean and Fermented Soybean Extract Antioxidant Activities", *Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* Vol.6, No. 12(2012).
14. Tang-Bin Zou et al. (2016), "The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins", *Molecules*, (2016)21, p. 72.
15. Ferial M Abu-Salem et al. (2013), "Characterization of Antioxidant Peptides of Soybean Protein Hydrolysate", *Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* Vol.7, No. 7 (2013).
16. Yokomyzo A, Yoko Takenaka, Tetsuo takenaka (2002), "Antioxidative Activity of Peptides Prepared from Okara Protein", *Food Sci. Technol. Res*, 8 (4),357-359. □