

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG ENZYME PHYTASE ĐỂ NÂNG CAO GIÁ TRỊ DINH DƯỠNG KHOÁNG TRONG SỮA YẾN MẠCH THANH TRÙNG PASTEUR

Trần Thị Thúy và Lê Thị Hồng

Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Tóm tắt. Sữa yến mạch là sản phẩm giàu dinh dưỡng, được các nước châu Âu sử dụng để bồi bổ sức khỏe cho mọi lứa tuổi. Tuy nhiên, hàm lượng chất kháng dinh dưỡng phytate trong hạt yến mạch cũng khá cao (1 - 3% hàm lượng chất khô của hạt), phytate tạo phức chất khó tan với các ion kim loại thiết yếu trong sữa yến mạch, do vậy làm giảm hiệu quả hấp thu khoáng trong sữa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn được enzyme phytase BacP (hàm lượng 40IU/l) để xử lý sữa yến mạch sau khi thanh trùng Pasteur để giải phóng 20-30% hàm lượng phốt pho vô cơ từ phytate trong sữa, làm tăng hàm lượng các khoáng dễ tiêu (Ca^{2+} : 27,0%; Fe^{2+} : 49,3%, Zn^{2+} : 63,3% và Mg^{2+} : 95,6%) so với sữa không được xử lý enzyme. Nghiên cứu này góp phần chứng minh vai trò của enzyme phytase trong việc xử lý sữa yến mạch, làm giảm hàm lượng chất kháng dinh dưỡng phytate, tăng giá trị dinh dưỡng khoáng trong sữa.

Từ khóa: hấp thu khoáng, phytase, phytate, phốt phát vô cơ, sữa yến mạch.

1. Mở đầu

Yến mạch và các sản phẩm từ yến mạch như: sữa yến mạch, cháo yến mạch, bột dinh dưỡng yến mạch là loại thực phẩm giàu dinh dưỡng có hàm lượng chất xơ hòa tan (β - glucan) cao; các nguyên tố khoáng vi lượng (Ca, Mn, K, Na, Mg, P, Cu...) đầy đủ. Ngoài ra, các sản phẩm từ yến mạch còn chứa các axit béo (Omega-3, Omega-6,...) rất tốt cho sức khỏe, tăng cường trí lực; các vitamin thiết yếu (B6, B12), cung cấp choline và đặc biệt là folate, rất cần thiết cho phụ nữ mang thai [1]. Sữa yến mạch cũng không chứa sterol, yếu tố gây mắc bệnh tim mạch. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng sử dụng các sản phẩm từ yến mạch làm giảm lượng cholesterol trong máu từ đó làm giảm nguy cơ mắc các bệnh về tim mạch [2].

Tuy nhiên, hàm lượng chất kháng dinh dưỡng phytate (*myo*-inositol hexakisphosphate) trong hạt yến mạch lại khá cao (1 - 3% hàm lượng chất khô của hạt) [3]. Chúng là nguồn dự trữ phốt phát chủ yếu trong hạt, chiếm hơn 80% tổng số phốt pho có trong hạt [4]. Phytate trong thực vật thường ở dạng muối của axit phytic liên kết chặt chẽ với các nguyên tố khoáng như: Ca, Mg, Fe và Zn,... [5, 6]; ngoài ra chúng cũng liên kết với các axit amin, và các protein, làm hạn chế quá trình tiêu hóa và hấp thu dinh dưỡng khoáng và protein từ thức ăn [3]. Do vậy, phytate được coi như một yếu tố kháng dinh dưỡng trong thực phẩm có nguồn gốc từ thực vật. Loại bỏ phytate trong sữa yến mạch là việc làm cần thiết nhằm nâng cao giá trị dinh dưỡng của sản phẩm này.

Phytase là enzyme thủy phân đặc hiệu đối với cơ chất phytate, được ứng dụng phổ biến

Ngày nhận bài: 15/3/2020. Ngày sửa bài: 23/3/2020. Ngày nhận đăng: 30/3/2020.

Tác giả liên hệ: Trần Thị Thúy. Địa chỉ e-mail: thuy_tt@hnue.edu.vn

trong chế biến thức ăn chăn nuôi và thực phẩm để loại bỏ chất kháng dinh dưỡng phytate, tăng hàm lượng phốt phát cũng như các khoáng chất dễ tiêu trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Loại bỏ phytate trong sữa đậu nành bằng cách bổ sung trực tiếp phytase từ lúa mì đã được Anno và cs tiến hành từ những năm 1985 [7]. Năm 1990, Simell và cs đã sử dụng Finase S, một phytase thương phẩm tách chiết từ *Aspergillus awamori*, để tạo ra loại protein đậu nành không chứa phytate [8]. Năm 2006 Greiner và Konietzny đã đề xuất việc sử dụng phytase hoặc các vi sinh vật sinh phytase (nấm men, vi khuẩn lactic) trong quá trình làm bánh mì, lên men thực phẩm để làm giảm hàm lượng phytate trong thực phẩm. Bổ sung phytase trong quá trình làm bánh mì không chỉ làm giảm hàm lượng phytate mà còn giúp giải phóng canxi từ phức chất IP₆-Ca cần cho hoạt động của α -amylase, do đó gián tiếp giúp cải thiện chất lượng bánh mì [9].

Nghiên cứu này góp phần chứng minh vai trò của enzyme phytase trong việc loại bỏ chất kháng dinh dưỡng phytate trong sữa yếm mạch, giúp giải phóng phốt phát vô cơ (P_{vc}) và các cation kim loại dễ tiêu trong sữa, góp phần nâng cao giá trị dinh dưỡng khoáng cho sữa yếm mạch.

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Nguyên vật liệu

Enzyme phytase BacP, được sản xuất từ chủng *Bacillus* sp. MD2, do Bộ môn Công nghệ sinh học – Vi sinh, trường Đại học Sư phạm Hà Nội cung cấp; Enzyme phytase EcoP, có nguồn gốc từ *Escherichia coli*, do công ty OptiPhos (JBS United, Indiana, Mỹ) sản xuất.

Hạt yếm mạch nguyên cám của công ty Johnny's Selected Seeds (Mỹ), được sử dụng để sản xuất sữa yếm mạch trong phòng thí nghiệm.

Các hóa chất phân tích: Natri-phytate (Sigma, P3168), ammonium molybdate (Merck), trichloroacetic acid (TCA - Trung Quốc); dung dịch chuẩn 1000 ppm Fe²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ và Ca²⁺ (Scharlau, Tây Ban Nha); và các hóa chất thông dụng khác được mua của Trung Quốc và Việt Nam: CH₃COOH, FeSO₄.7H₂O, CH₃COONa, NaOH, HCl, Na₂CO₃, C₂H₅OH, NH₄OH đều đạt độ tinh sạch ở mức phân tích.

2.1.2. Phương pháp nghiên cứu

* Chế biến sữa yếm mạch

Hạt yếm mạch (20 g) được ngâm trong nước khử ion ở 30 °C trong 5 giờ. Sau đó, bổ sung nước khử ion ở 80 °C vào các mẫu này cho đạt thể tích 200 ml và nghiền bằng máy nghiền đồng thể, lọc qua vải bông loại bỏ cặn thu được sữa yếm mạch thô. Sữa yếm mạch thô được thanh trùng Pasteur ở 90 - 95 °C trong 10 phút, sau đó được làm nguội đến nhiệt độ phòng và bảo quản ở 10 °C trong 7 - 10 ngày.

* Xác định hàm lượng phytate trong sữa yếm mạch

Căn cứ vào đặc tính kết tủa mạnh của phytate với ion Fe³⁺, người ta cho một lượng dư Fe³⁺ vào sữa yếm mạch để kết tủa toàn bộ phytate trong sữa. Sau đó, rửa sạch Fe³⁺ dư trong kết tủa Fe-phytate và xác định hàm lượng sắt có trong kết tủa. Từ hàm lượng sắt có trong kết tủa với phytate, ta có thể tính được hàm lượng của phytate trong sữa theo nguyên tắc: Một phân tử phytate liên kết với 4 phân tử sắt và khối lượng của phytate gấp 2,98 lần khối lượng của sắt [10]. Sữa yếm mạch được dùng để kết tủa phytate là sữa được chế biến cô đặc 2 lần (200 g hạt yếm mạch cho 1 lit sữa).

$$m_{\text{phytate trong sữa}} = 2,98 \times m_{\text{Fe}} \text{ trong kết tủa Fe-phytate}$$

Hàm lượng Fe³⁺ đã kết tủa với phytate được xác định bằng máy phân tích quang phổ hấp thụ nguyên tử NOVAA 350 (AnalytikJena, Đức), dựa trên đồ thị chuẩn tương quan giữa giá trị phổ

hấp thụ nguyên tử ở bước sóng 248,33 nm ($A_{248,33}$) và nồng độ Fe^{3+} trong dung dịch chuẩn (nồng độ: 0; 0,5; 1; 2; 3; 4 và 4,5 ppm pha bằng dung dịch đệm 1% HNO_3).

*** Xác định hàm lượng protein tổng số trong sữa yếm mạch**

Pha loãng sữa yếm mạch đến nồng độ thích hợp và tiến hành phản ứng màu với dung dịch Coomassie blue theo phương pháp Bradford [11] và đo quang phổ hấp phụ ánh sáng ở bước sóng 595nm. Tính toán hàm lượng protein theo phương trình đường chuẩn tương quan giữa hàm lượng BSA (Bovin Serum Albumin- Albumin huyết thanh bò) có nồng độ chuẩn 0, 2,5; 5; 10; 15; 20; 25 và 30 $\mu g/ml$ với độ hấp phụ quang ở bước sóng 595nm (A_{595}) trên máy đo quang phổ (UV-VIS – 1240 Shimadzu, Nhật).

*** Xác định hoạt tính enzyme phytase [12]**

Enzyme phytase BacP được pha trong dung dịch đệm 0,1 M Tris- HCl, pH = 7 có bổ sung 5 mM $CaCl_2$; enzyme phytase EcoP được pha trong dung dịch đệm 0,1 M CH_3COONa , pH = 5,5 chứa 1 mM $CaCl_2$. Enzyme được pha loãng đến nồng độ thích hợp và được phản ứng với dung dịch cơ chất (1,67 mM Natri-phytate) theo tỷ lệ 1:9 về thể tích. Phản ứng enzyme được diễn ra trong 10 phút ở nhiệt độ 55°C (đối với EcoP) và 70°C (đối với BacP) và dừng phản ứng bằng cách bổ sung 1 thể tích tương ứng dung dịch TCA 15% (Tri-chloro acetic acid). Sau đó dịch phản ứng được li tâm, thu dịch nổi và bổ sung dung dịch màu (chứa 4 lần thể tích dung dịch A (1,5% amoniummolybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$) trong 5,5% H_2SO_4) và 1 lần thể tích dung dịch B (2,7% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$)) theo tỷ lệ 1:1 về thể tích và đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 700nm. Phản ứng đối chứng âm (không chứa enzyme) được tiến hành tương tự nhưng dung dịch TCA 15% được bổ sung trước khi bổ sung dung dịch cơ chất. Hàm lượng photphat vô cơ (P_{vc}) được giải phóng từ phản ứng enzyme được tính toán dựa vào đồ thị tương quan giữa nồng độ P_{vc} chuẩn 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,5 và 0,6 mM của dung dịch NaH_2PO_4 với độ hấp thụ quang ở bước sóng 700nm (A_{700}) trên máy đo quang phổ (UV-VIS - 1240 Shimadzu, Nhật). Một đơn vị hoạt tính (IU) được quy định là lượng enzyme để giải phóng 1 μmol P_{vc} trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm [12].

*** Xác định động thái hoạt động của enzyme phytase trên cơ chất natri-phytate**

Enzyme BacP hoặc EcoP được pha loãng đến nồng độ thích hợp bằng dung dịch đệm, sau đó, bổ sung 0,15 ml enzyme vào 30 ml dung dịch cơ chất (10 mM natri-phytate) cho đạt nồng độ enzyme 20 - 40 IU/l. Thí nghiệm được tiến hành trong bể ổn nhiệt ở 70 °C (đối với enzyme phytase BacP) và bể ổn nhiệt 55 °C (đối với enzyme phytase EcoP). Mẫu được lấy ra từ phản ứng tại các thời điểm xác định, được bổ sung một thể tích tương ứng dung dịch 15% TCA để dừng phản ứng, xử lý mẫu và tiến hành phản ứng màu như thí nghiệm xác định hoạt tính phytase. Lượng P_{vc} tạo ra được xác định dựa trên đồ thị chuẩn P_{vc} (nêu trên).

*** Xác định động thái hoạt động của enzyme phytase trên cơ chất sữa yếm mạch**

Tiến hành tương tự như phương pháp xác định động thái enzyme trên cơ chất phytate chuẩn nhưng dung dịch cơ chất chuẩn được thay bằng sữa yếm mạch thô (chưa qua thanh trùng Pasteur).

*** Xác định hàm lượng kim loại hòa tan được giải phóng trong quá trình xử lý sữa yếm mạch bằng enzyme phytase**

Mẫu sữa dùng để xác định hàm lượng Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} được xử lý bằng dung dịch 2% HNO_3 , còn mẫu dùng để xác định Zn^{2+} được xử lý bằng dung dịch 1% HCl theo tỷ lệ thể tích 1:1 để nồng độ HNO_3 hoặc HCl của dung dịch sau cùng trước khi đi phân tích lần lượt là 1% và 0,5 %. Tiếp tục li tâm dịch sữa yếm mạch 8000 vòng/phút trong 5 phút để thu dịch nổi, các mẫu dịch nổi được lọc lại một lần nữa bằng giấy lọc trước khi bảo quản trong điều kiện - 20°C. Xác định hàm lượng các kim loại có trong dung dịch bằng máy phân tích quang phổ hấp thụ nguyên tử NOVAA 350 (Analytik Jena, Đức) ở bước sóng tương ứng với từng kim loại: đo Zn^{2+} ở bước

sóng 213,86 nm, đo Mg^{2+} ở bước sóng 285,51 nm, đo Ca^{2+} ở bước sóng 422,7 nm, đo Fe^{2+} ở bước sóng 248,33 nm [13]. Hàm lượng kim loại trong các mẫu sữa yến mạch được xác định dựa vào đồ thị tương quan giữa nồng độ chuẩn các ion kim loại (0 – 10ppm) với độ hấp thụ quang ở bước sóng tương ứng với từng kim loại.

*** Phân tích các kết quả thí nghiệm**

Các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần, kết quả thí nghiệm được tính giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

2.2. Kết quả và thảo luận

2.2.1. Đánh giá một số giá trị dinh dưỡng chính trong sữa yến mạch

*** Hàm lượng phytate trong sữa yến mạch**

Hàm lượng sắt trong kết tủa sắt-phytate trong mẫu sữa yến mạch thu được là 632,322 $\mu\text{g/ml}$, tương ứng với 0,942 mg/ml phytate trong sữa yến mạch. Theo kết quả này thì: lượng P_{vc} có thể giải phóng ra sau khi phân giải triệt để phytate trong sữa là 8,5651 mM. Kết quả này tương đồng với báo cáo của Hídvégi và cs (2002), theo đó, hàm lượng phytate có trong 100 g yến mạch khoảng 0,90 - 1,42 g [14].

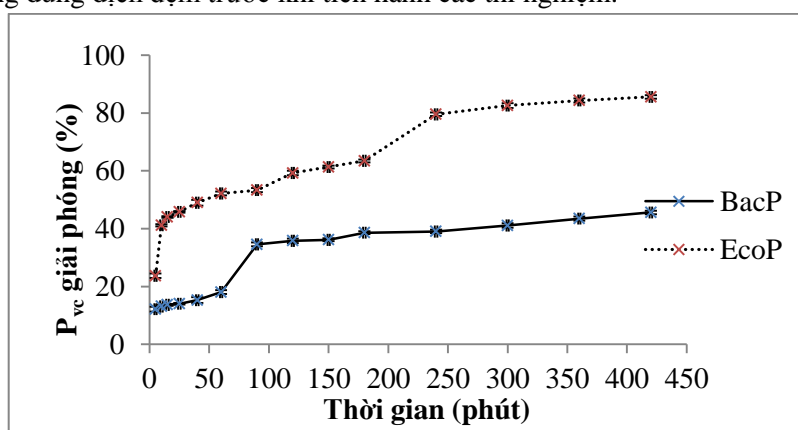
*** Hàm lượng protein trong sữa yến mạch**

Kết quả xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford cho thấy: trong 100 ml sữa yến mạch có 1,85 g protein. Theo báo cáo của Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ thì hàm lượng protein có trong 100 g hạt yến mạch là 17 g [15]. Như vậy, so với một số loại ngũ cốc thì hàm lượng protein trong hạt yến mạch là cao hơn (hàm lượng protein trong lúa gạo là 7,9 %, lúa mì là 16,8 %, ngô 10,6 %, cao lương 12,7 %, kê 11,3% tính theo hàm lượng chất khô) nhưng lại thấp hơn hẳn so với hạt đậu nành (37%) [16].

2.2.2. Lựa chọn enzyme phytase để phân giải phytate trong sữa

Hai loại phytase chính là phytase axit (EcoP) có nguồn gốc từ *E. coli* và phytase kiềm (BacP) có nguồn gốc từ *Bacillus subtilis* MD2 được đánh giá trên cơ chất chuẩn (natri-phytate) trong dung dịch đệm và cơ chất phytate trong sữa yến mạch.

Hoạt tính của chế phẩm enzyme BacP được xác định là: 263,5483 (IU/ml) và của chế phẩm enzyme EcoP là: 57,4549 (IU/ml). Các dịch enzyme phytase này được pha loãng đến nồng độ thích hợp bằng dung dịch đệm trước khi tiến hành các thí nghiệm.

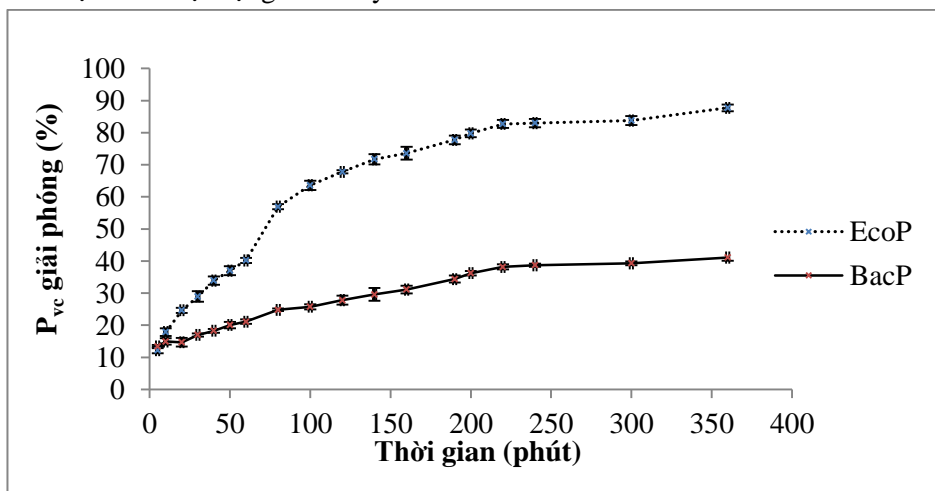


Hình 1. Khả năng xúc tác giải phóng P_{vc} của EcoP và BacP trên cơ chất natri-phytate

Đánh giá trên dung dịch cơ chất chuẩn (10 mM natri-phytate) EcoP hoạt động tốt ở 55 °C trong điều kiện axit (pH 5,5), xúc tác phân giải cơ chất natri-phytate rất hiệu quả, giải phóng tới 92,14% lượng P_{vc} sẵn có trong 10 mM natri-phytate sau 25 giờ phản ứng (Hình 1). Trong khi

đó, enzyme BacP hoạt động tốt ở 70 °C trong điều kiện trung tính, hơi kiềm (pH 7) [17], xúc tác phân giải cơ chất natri-phytate chuẩn chậm hơn, chỉ giải phóng được 64,33% lượng P_{vc} sẵn có trong 10 mM natri-phytate sau 52 giờ phản ứng (Hình 1). Kết quả này là hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu về cơ chế hoạt động của phytase kiềm và axit [18]. Theo đó, phytase axit (EcoP) hoạt động trong môi trường axit, thủy phân phytate, giải phóng 5 - 6 gốc P_{vc} , tạo ra sản phẩm cuối cùng là IP_1 hoặc inositol; còn phytase kiềm (BacP) hoạt động trong môi trường trung tính, hơi kiềm, thủy phân phytate và chỉ giải phóng 3 - 4 gốc P_{vc} , tạo ra sản phẩm cuối cùng là IP_3, IP_2 .

Đối với cơ chất phytate trong sữa yến mạch, sự xúc tác thủy phân phytate giải phóng P_{vc} của hai enzyme này tương đối khác nhau về thời gian. Sau 5 giờ phản ứng ở 55 °C, EcoP xúc tác giải phóng được lượng P_{vc} cực đại, đạt 83,88% lượng P_{vc} tổng số của phytate có trong sữa yến mạch; trong khi enzyme BacP chỉ xúc tác giải phóng được lượng P_{vc} cực đại là 39,29% từ phytate có trong sữa yến mạch, ở 70°C (Hình 2). Mặc dù pH của dịch sữa yến mạch thô cũng ở điều kiện trung tính nhưng rõ ràng là các yếu tố khác (hàm lượng tinh bột, khoáng...) trong sữa yến mạch đã hạn chế hoạt động của enzyme BacP.



Hình 2. Khả năng xúc tác giải phóng P_{vc} của EcoP và BacP trên cơ chất sữa yến mạch

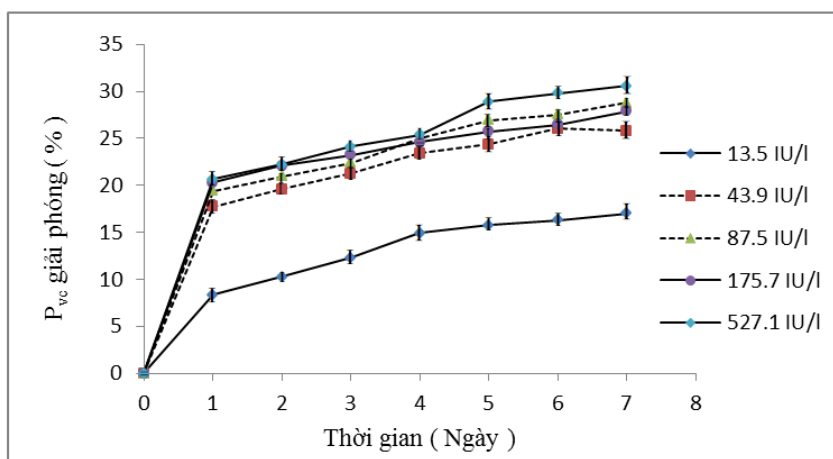
IP_6 và IP_5 được cho là có ái lực cao với protein và các cation kim loại nên làm giảm khả năng hấp thụ các nguyên tố khoáng và các loại protein. IP_1 chưa được báo cáo có giá trị gì trong quá trình chuyển hóa các chất trong cơ thể nhưng IP_2, IP_3 và IP_4 được báo cáo có vai trò nòng cốt trong việc truyền tín hiệu qua màng và huy động nguồn canxi dự trữ trong tế bào [3]. Các dẫn xuất IP_2, IP_3, IP_4 này lại ít có ái lực với các cation kim loại và các protein nên không ngăn cản khả năng hấp thụ khoáng và protein của cơ thể người và động vật. Một số đồng phân hình học của IP_3 được sử dụng để phòng tránh viêm khớp, bệnh hen, hoặc làm thuốc giảm đau [19]. Ester của inositol triphosphate được sử dụng làm chất ức chế chống lại sự lây nhiễm các bệnh do nhóm retrovirus gây ra bao gồm cả HIV [20]. Chính vì vậy để loại bỏ tính kháng dinh dưỡng của phytate nhưng vẫn thu được hàm lượng IP_2, IP_3, IP_4 cao nhất thì lượng P_{vc} được giải phóng nên trong khoảng 20% - 50% tổng lượng photpho có trong phytate. Vì những lí do vừa đề cập ở trên mà chúng tôi lựa chọn enzyme phytase BacP để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo trên cơ chất sữa yến mạch.

2.2.3. Lựa chọn nồng độ enzyme BacP để xử lý phytate trong sữa yến mạch ở điều kiện bảo quản

Tận dụng thời gian bảo quản sữa (từ khi xuất xưởng đến khi đến tay người sử dụng) ở 4 - 10 °C cho hoạt động của enzyme phytase phân giải phytate trong sữa yến mạch là một cách thức tiết kiệm thời gian và chi phí cho quy trình sản xuất sữa yến mạch thanh trùng. Trong các thí nghiệm trước đây (kết quả không công bố trong bài báo này), chúng tôi đã xác định được thời

gian bảo quản sữa yếm mạch ở nhiệt độ mát (10°C) là 7 - 10 ngày, do vậy các thí nghiệm xử lý phytase BacP trên cơ chất sữa yếm mạch được tiến hành ở 10 °C trong 7 ngày.

Trên cơ chất sữa yếm mạch, ở nhiệt độ bảo quản (10 °C), khả năng phân giải phytate của BacP là tương đối thấp và giống nhau ở các nồng độ enzyme từ 43,9 đến 527,1 IU/l (Hình 3). Kết quả này tương đồng với kết quả ở thí nghiệm xác định khả năng phân giải phytate trong sữa yếm mạch ở 70 °C với thời gian ngắn hơn (Hình 2). Do vậy, nồng độ enzyme phytase BacP 43,9 IU/l có thể được lựa chọn để xử lý phytate trong quá trình bảo quản sữa yếm mạch bởi các lí do sau: (1) hàm lượng P_{vc} được giải phóng từ ngày thứ 4 tới ngày thứ 7 nằm trong khoảng 20 - 50% tổng lượng P_{vc} có thể giải phóng, tương ứng với lượng dẫn xuất có ích IP_2 , IP_3 và IP_4 tạo ra nhiều nhất; (2) hàm lượng enzyme phytase BacP sử dụng ít, tiết kiệm chi phí cho enzyme.



Hình 3. Hoạt động của phytase BacP (ở các nồng độ khác nhau) trên cơ chất sữa yếm mạch bảo quản ở nhiệt độ 10 °C

2.2.4. Xử lý phytate trong sữa yếm mạch thô bằng enzyme BacP trong quy trình sản xuất sữa thanh trùng

Phytate trong sữa yếm mạch thô cũng có thể được xử lý trước khi thanh trùng sữa hoặc ngay sau quá trình thanh trùng sữa để tận dụng nhiệt độ của giai đoạn thanh trùng vì nhiệt độ thanh trùng sữa thường là 90 - 95 °C và enzyme phytase BacP có thể hoạt động tốt ở nhiệt độ 70 - 75 °C [21].

Thử nghiệm xử lý phytate trong sữa yếm mạch bằng enzyme phytase BacP (nồng độ 43,9 IU/l ở: (1) nhiệt độ phòng trong 30 phút trước khi thanh trùng; (2) 70 °C trong 10 phút sau thanh trùng; (3) 70 °C trong 20 phút sau thanh trùng và (4) bổ sung enzyme 43,9 IU/l ngay sau khi thanh trùng sữa ở 90°C cho thấy: sự khác biệt không lớn về hàm lượng P_{vc} giải phóng (nằm trong khoảng 20 - 30 % tổng lượng P_{vc} có trong phytate của sữa yếm mạch), kể cả trong thời gian bảo quản sữa yếm mạch thanh trùng (ở 10 °C trong 7 ngày). Như vậy, các phương án trên đều có thể được lựa chọn để xử lý phytate trong sữa yếm mạch thanh trùng. Phương án bổ sung enzyme ngay sau quá trình thanh trùng là phương án khả thi nhất bởi nhiệt độ cao ngay sau thời gian thanh trùng sẽ làm giảm thiểu tối đa khả năng nhiễm khuẩn cho sữa yếm mạch thành phẩm.

Theo dõi quá trình giải phóng P_{vc} trong 40 - 60 phút ở các điều kiện nhiệt độ và nồng độ enzyme BacP khác nhau trong cùng thể tích 30ml sữa yếm mạch thanh trùng, chúng tôi nhận thấy: (1) Khi bổ sung enzyme và giữ trong khoảng nhiệt độ 50 - 65°C trong 30 - 60 phút sẽ gây ra hiện tượng chín tinh bột và kết lắng dưới đáy bình, làm cho sữa không đồng nhất, giảm cảm quan cho sữa yếm mạch; (2) Nồng độ enzyme 30 IU/l là quá thấp để đạt được hàm lượng P_{vc} giải phóng nằm trong khoảng 20 - 30 % lượng phốt pho dự trữ trong phytate của sữa yếm mạch; (3) Các phương án bổ sung enzyme từ 40 - 45 IU/l đều có thể được sử dụng khi xử lý trên 40 phút ở

30°C và trên 20 phút ở trường hợp xử lý sữa yến mạch ở 80°C cho tự giảm xuống nhiệt độ phòng. Các thí nghiệm này (Bảng 1) đều cho kết quả đạt yêu cầu đề ra về hàm lượng P_{vc} giải phóng (nằm trong khoảng 20 - 30 % lượng phốt phát dự trữ trong phytate của sữa yến mạch).

Bảng 1. Tỷ lệ P_{vc} giải phóng (%) so với lượng P_{vc} vốn có của phytate trong sữa yến mạch khi xử lý sữa yến mạch thô bằng enzyme BacP ở các nồng độ, nhiệt độ và thời gian khác nhau

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Nồng độ BacP (IU/l)		
		30	40	45
30	40	15,403 ± 0,51	19,903 ± 0,92	20,073 ± 0,67
	60	16,817 ± 0,67	20,975 ± 0,87	21,566 ± 0,91
80°C giảm xuống nhiệt độ phòng	10	17,741 ± 0,80	18,551 ± 0,56	19,255 ± 0,81
	20	17,914 ± 0,73	20,805 ± 0,89	20,974 ± 1,15
	30	18,232 ± 0,41	21,087 ± 1,03	21,172 ± 0,93
	40	18,579 ± 0,56	21,989 ± 0,99	21,595 ± 1,21

Nhằm tiết kiệm enzyme BacP, tiết kiệm thời gian và năng lượng xử lý sữa yến mạch, chúng tôi đã lựa chọn phương án bổ 40 IU/l BacP ngay sau khi có được sữa yến mạch thô thanh trùng để nguội tới 80 °C và tiếp tục để nguội dần tới 30 °C trước khi đem bảo quản sữa ở 10 °C trong 7 ngày.

2.2.5. Khả năng giải phóng các kim loại tự do trong sữa yến mạch được xử lý bằng enzyme phytase

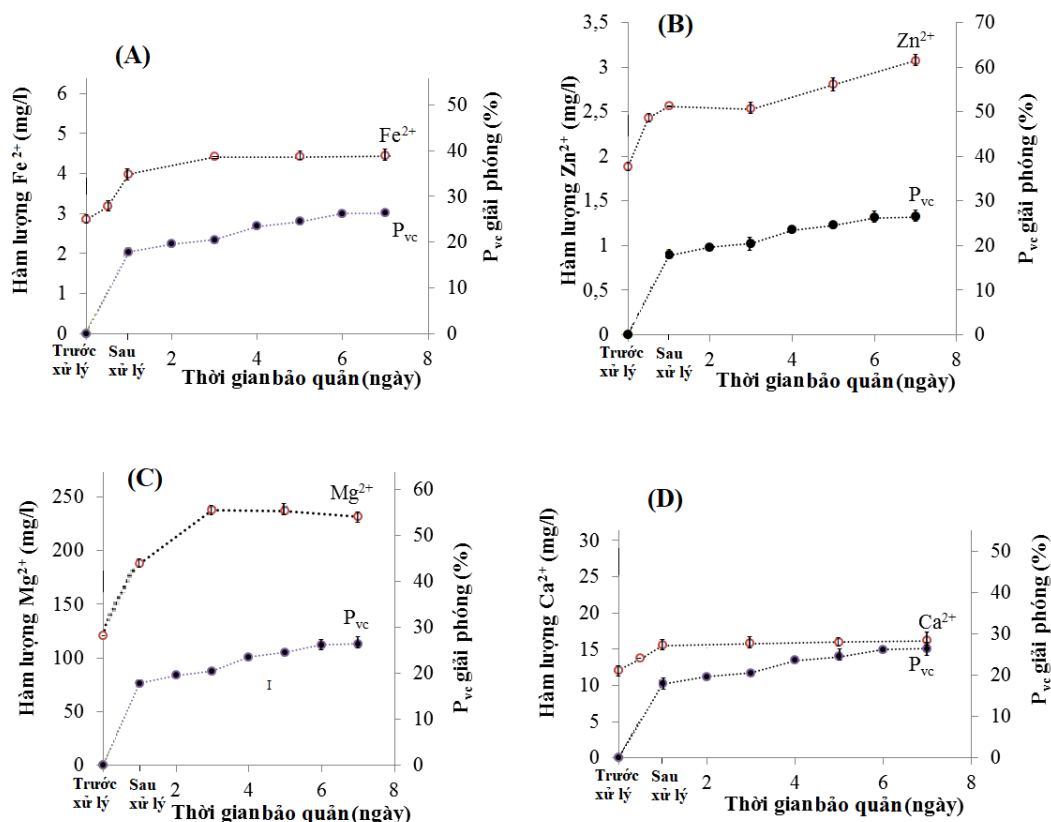
Phytate có ái lực cao đối với sắt, kẽm, canxi, magie và nhiều cation kim loại thiết yếu khác trong các loại hạt ngũ cốc, là nguyên nhân dẫn đến hiện tượng giảm khả năng hấp thụ khoáng chất trong đường tiêu hóa của người và động vật nuôi. Do vậy, việc loại bỏ phytate bằng enzyme BacP trong sữa yến mạch có thể làm giải phóng các ion kim loại thiết yếu này ra khỏi phức chất với phytate, làm tăng hàm lượng các ion này hòa tan trong dịch sữa.

Song song với các thí nghiệm kiểm tra hàm lượng P_{vc} giải phóng trong quá trình xử lý sữa yến mạch bằng enzyme BacP trong thời gian 7 ngày bảo quản sữa, chúng tôi bố trí kiểm chứng mối quan hệ giữa việc giải phóng P_{vc} từ phytate trong sữa yến mạch (do xử lý bằng enzyme phytase BacP) đến sự giải phóng các cation kim loại Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} và Ca^{2+} từ dạng liên kết với phytate sang dạng cation tự do trong dung dịch (Hình 4).

Kết quả cho thấy, cùng với việc giải phóng P_{vc} làm giảm hàm lượng phytate trong sữa yến mạch, hàm lượng kim loại thiết yếu Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} và Ca^{2+} trong sữa cũng tăng đáng kể. Cụ thể là: Hàm lượng Fe^{3+} trong dịch sữa trước khi xử lý là 2,84 mg/l, tăng lên 3,45 mg/l sau khi xử lý với enzyme và tiếp tục tăng lên 4,24 mg/l sau 7 ngày bảo quản ở 10°C, nghĩa là tăng 49,3% so với dịch sữa trước khi xử lý với enzyme BacP (Hình 4A). Hàm lượng Zn^{2+} trong dịch sữa trước khi xử lý enzyme BacP là 1,88 mg/l tăng lên 2,49 mg/l và tiếp tục tăng đến 3,07 mg/l sau 7 ngày bảo quản ở 10 °C (Hình 4B), nghĩa là tăng 63,3% so với dịch sữa trước khi xử lý với enzyme. Như vậy, sự giảm hàm lượng phytate trong dịch sữa yến mạch đã làm tăng sự giải phóng Fe^{2+} và Zn^{2+} hòa tan trong dịch sữa, qua đó tăng hàm lượng sắt và kẽm dễ tiêu. Kết quả này tương đồng với các báo cáo của Marine L và cộng sự (1996), báo cáo đã chứng minh rằng sự giảm phytate trong khẩu phần ăn có chứa hạt yến mạch nảy mầm làm tăng khả năng hấp thụ kẽm ở người và động vật [22].

Hàm lượng Mg^{2+} (Hình 4C) tăng từ 121,01 mg/l trong sữa yến mạch chưa xử lý BacP lên 187,69 mg/l sau khi xử lý bằng enzyme phytase BacP, sau đó, có xu hướng tăng nhẹ và duy trì ổn định ở mức 236,65 mg/l sau ngày thứ 5 và 7 bảo quản ở 10°C (tăng 95,56% so với dịch sữa

trước khi xử lí với enzyme). Trái với các ion kim loại trên, hàm lượng Ca^{2+} trong sữa yến mạch tăng không nhiều (Hình 4D): trước khi được xử lí bằng enzyme phytase là 12,25 mg/l, sau khi xử lí sữa bằng enzyme BacP đạt 15,56 mg/l (tăng 27%) và hầu như không tăng trong thời gian bảo quản sữa. So sánh hàm lượng canxi trong sữa sau khi được xử lí với hàm lượng canxi thành phần dinh dưỡng của sữa yến mạch “Organic Long Life Oat Milk” đã được công ty Pureharvest công bố thì hàm lượng canxi trong sản phẩm sữa đã được xử lí với enzyme BacP của chúng tôi đạt mức cao hơn [23].



Hình 4. Hàm lượng các cation kim loại hòa tan trong sữa yến mạch trước khi xử lí, ngay sau khi xử lí với enzyme BacP và trong thời gian bảo quản sữa: (A) Hàm lượng Fe^{2+} , (B) Hàm lượng Zn^{2+} ; (C) Hàm lượng Mg^{2+} và (D) Hàm lượng Ca^{2+}

Nhìn chung, hàm lượng Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} và Ca^{2+} hòa tan trong sữa yến mạch tăng chủ yếu trong giai đoạn xử lí sữa sau thanh trùng, đồng hành với sự giải phóng P_{vc} do enzyme phytase BacP thủy phân phytate trong sữa. Trong thời gian bảo quản sữa, hàm lượng các kim loại này cũng tăng lên đáng kể (trừ trường hợp của Ca^{2+}) nhưng thường ổn định, không tăng sau 3 ngày bảo quản ở 10°C (Hình 4). Sản phẩm sữa yến mạch được xử lí bằng enzyme phytase cho hàm lượng các ion kim loại thiết yếu, đặc biệt là canxi, sắt, kẽm tự do cao sẽ là cơ sở để tăng khả năng hấp thụ khoáng chất của cơ thể, góp phần ngăn ngừa một số bệnh lí về xương, răng cho những người sử dụng các sản phẩm sữa này.

3. Kết luận

Bổ sung enzyme BacP (nồng độ 40 IU/l) vào sữa yến mạch sau khi thanh trùng và để nguội sữa đến 80°C , rồi tiếp tục để nguội sữa đến 30°C trước khi bảo quản ở 10°C đã giúp giải

phóng 20 - 30% hàm lượng phốt phát vô cơ từ phytate trong sữa, đặc biệt làm tăng hàm lượng các khoáng dễ tiêu (Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} và Mg^{2+}) trong sữa từ 27 đến 95,56% so với sữa không được xử lý enzyme. Như vậy, bên cạnh việc làm giảm hàm lượng chất kháng dinh dưỡng phytate, việc sử dụng phytase để xử lý sữa cũng góp phần làm tăng giá trị dinh dưỡng khoáng trong sữa yến mạch.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Rasane P, Jha A, Sabikhi L, Kumar A & Unnikrishnan VS, 2013. Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review. *J. Food Sci. Technol*, 52(2), pp. 662-675.
- [2] Braaten T, Wood PJ, Scott FW, Wolynetz MS, Lowe MK, Bradley-White P, Collins MW, 1994 beta-glucan reduces blood cholesterol concentration in hypercholesterolemic subjects. Division of Endocrinology and Metabolism. *Eur. J. Clin Nutr.*, 48(7), pp. 465-474.
- [3] Cheryan M, 1980. Phytic acid interactions in food systems. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.*, 13, pp. 297-335.
- [4] Sajjadi M, Carter CG, 2004. Effect of phytic acid and phytase on feed intake, growth, digestibility and trypsin activity in Atlantic salmon. *L. Aquacult Nutr.*, 10, pp. 135-142.
- [5] Davies NT, 1982. *Effects of phytic acid on mineral availability*, In Dietary Fiber in Health and Disease, Vahoun G and Kritchevsky D, Eds, Plenum Press, New York. pp. 105-116.
- [6] Phillippy BQ, Wyatt CJ, 2001. Degradation of phytate in foods by phytases in fruits and vegetable extracts. *J. Food Sci.*, 66, pp. 535-539.
- [7] Anno T, Nakanishi K, Matsuno R and Kamikubo T, 1985. Enzymatic elimination of phytate in soybean milk. *J. Japan Soc. Food Sci. Technol*, 32, pp. 174-180.
- [8] Simell M, Elovainio M, Vaara M, Vaara T, 1990. *Novel method for production of phytate-free or low-phytate soy protein isolate and concentrate*. Patent WO 90/08476.
- [9] Greiner R, Konietzny U, 2006. Phytase for food application. *Food Technol Biotechnol*, 44, pp. 125-140.
- [10] Tsumura K, Saito T, Kugimiya W, 2004. Influence of phytase treatment on the gelation property of soymilk. *Food Sci Technol Res*, 10 (4), pp. 442-446.
- [11] Bradford M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. *Anal. Biochem*, 72, pp. 248-254.
- [12] Shimizu M, 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotechnol Biochem.*, 56(8), pp. 1266-1269.
- [13] Phạm Luận, 2009. *Phương pháp phân tích phổ nguyên tử*, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, tr. 38-49.
- [14] Hídvégi M, Lásztity R, 2002. Phytic acid content of cereals and legumes interaction with proteins. *Periodica Polytechnica Ser Chem Eng*, 46(1-2), pp. 59-64.
- [15] <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/1940?fg=&man=&lfacet=&format=&count=&max=25&offset=&sort=&qlookup=oat>.
- [16] Hà Thị Anh Đào, Nguyễn Công Khẩn, 2007. *Thành phần thực phẩm Việt Nam*, NXB Đại học Y, tr. 82, 93.
- [17] Tran TT, Mamo G, Mattiasson B and Hatti-Kaul R, 2010. A thermostable phytase from *Bacillus* sp. MD2: cloning, expression and high-level production in *Escherichia coli*. *J. Industrial Microbiol Biotechnol*, 37, pp. 279-287.

- [18] Oh BC, Choi WC, Park SC and Kim YO, 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phosphatase. *Appl Microb Biotechnol*, 63, pp. 362-372.
- [19] Siren M, 1995. Method of treating pain using inositol triphosphate. *U.S. Patent*, 5407924, pp. 23-28 pp.732-739.
- [20] Siren M, 1998. *Use of an ester of inositol triphosphate for preparing of medicaments*. US Patent 5846957.
- [21] Tran Thi Thuy and Dao Thi Nu, 2017. Synergic effect of different phytase preparations in feed. *Journal of Science of HNUE, Chemical and Biological Sciences* 9/2016, 62(10), pp.143-152.
- [22] Larsson M, Rossander-Hulthén L, Sandström B, Sandberg AS, 1996. Improved zinc and iron absorption from breakfast meals containing malted oats with reduced phytate content. *Brit. J. Nutr.*,76, pp.677-688.
- [23] <http://shop.coles.com.au/online/national/pureharvest-milk-long-life-oat-organic>.

ABSTRACT

Study on application of phytase enzyme to improve dissolution of minerals in pasteurized oat milk

Tran Thi Thuy and Le Thi Hong

Faculty of Biology, Hanoi National University of Education

Oat milk is a nutritious product which has been used as a nutritional supplement by European people of all ages. However, the concentration of phytate, an anti-nutritional compound, in oat seed is quite high (about 1 - 3% of seed dry weight). Phytate forms undissolved complexes with many vital metal ions in oat milk causing a reduction in the efficacy of mineral absorption. In this study, phytase enzyme BacP was chosen at the concentration of 40 IU/l to degrade phytate in pasteurized oat milk, whereupon 20 - 30% of the inorganic phosphate was released from phytate in oat milk, along with increases in the level of dissolved mineral ions (Ca²⁺: 27.0%; Fe²⁺: 49.3%, Zn²⁺: 63.3% and Mg²⁺: 95.6%) compared to untreated milk. This study proves the role of BacP in degrading phytate and improving the nutrition of eupeptic minerals in oat milk.

Keywords: mineral absorption, inorganic phosphate, oat milk, phytase, phytate.