

## NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ ENZYME, THỜI GIAN PHẢN ỨNG ĐẾN MỨC ĐỘ THỦY PHÂN PROTEIN VÀ TÍNH KHÁNG OXY HÓA CỦA SỮA ĐẬU NÀNH (*Glycine max.* L. Merr.) SỬ DỤNG *Bacillus* PROTEASE

Chu Thị Mỹ Duyên<sup>1</sup>, Nguyễn Tự Tân<sup>1</sup>, Võ Thị Bích Thủy<sup>2</sup>, Bùi Xuân Đông<sup>1,\*</sup>

**Tóm tắt:** Đậu nành là nguồn protein và peptide rất quan trọng cho hoạt động của con người và vật nuôi. Thủy phân protein đậu nành có thể làm gia tăng đặc tính tốt và cải thiện giá trị dinh dưỡng trong sản phẩm sữa đậu nành. Mức độ thủy phân (DH, %) phù hợp để tạo ra sản phẩm có giá trị sinh học cao thường nằm trong khoảng từ 1,0-39,5%. Nghiên cứu này đã xác định được điều kiện tối ưu để thu được dịch đậm thủy phân protein đậu nành (SPH) với DH = 31,6% là nồng độ [E] = 15 UI/g và thời gian phản ứng - 60 phút khi phản ứng thủy phân được thực hiện ở pH<sub>op</sub>, t<sub>op</sub> của *Bacillus* protease. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, sản phẩm SPH thu được có tính kháng oxy hóa thể hiện ở khả năng loại bỏ gốc 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

**Từ khóa:** *Bacillus* protease, dịch đậm đậu nành thủy phân (SPH), mức độ thủy phân (DH), protein đậu nành, sự thủy phân, tính kháng oxy hóa.

### 1. MỞ ĐẦU

Sữa đậu nành (soybean milk - SM) là một trong những thức uống phổ biến ở Việt Nam. Đậu nành có hàm lượng protein từ 38-47%, lipid từ 18-22%, carbohydrate từ 36-40%. Lipid đậu nành chứa các loại acid béo không no như acid oleic từ 30-35%, acid linoleic từ 45-55%,... có lợi cho sức khỏe người dùng (Nguyễn Văn Mạnh và ntk., 2016). Công ty Sữa đậu nành Việt Nam (Vinasoy) là công ty sản xuất sữa đậu nành lớn nhất Việt Nam với 05 nhà máy để đáp ứng nhu cầu trong nước, riêng nhà máy ở Quảng Ngãi sản xuất với năng suất 5 triệu L/năm. Vì thế, việc nghiên cứu nâng cao giá trị sữa đậu nành là vấn đề có tính thời sự. Thực phẩm và đồ uống chứa các peptide có hoạt tính sinh học (biactive peptide - BP) là trào lưu mới trong công nghệ sinh học thực phẩm được nhiều nhà khoa học quan tâm. Mặc dù một số BP tồn tại tự do trong nguồn tự nhiên và phần lớn BP được biết đến được mã hóa trong cấu trúc protein, chúng được giải phóng bởi các quá trình enzyme (Moller et al., 2008). Một số BP đã được điều chế bằng phương pháp hóa học. BP đóng vai trò quan trọng đối với sức khỏe con người nhờ các ảnh hưởng tích cực như: khả năng kháng khuẩn, điều hòa miễn dịch, chống oxy hóa, lão hóa, ung thư,... (Moller et al., 2008). Nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng các BP có nhiều hơn trong sữa động vật và đậu nành (Messina, 2000; Fedotova, 2016). Trung bình, đậu nành có chứa 40% protein, gồm nhiều loại protein (tổng cộng 1411 protein). Với hàm lượng protein dồi

<sup>1</sup>Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

<sup>2</sup>Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 2 (QUATEST 2)

\*Email: xdbui@dut.udn.vn

dào, có thể dùng để chế tạo ra các BP (Messina, 2000). Các nhà khoa học cũng chỉ ra rằng, các BP là những đoạn peptide có khối lượng phân tử 50 kDa, thường chứa 3-20 axit amin (Dominic, 2015). Đây chính là cách tiếp cận của nghiên cứu này để tạo ra các BP bằng phương pháp enzyme thủy phân.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu

- Đậu nành (*Glycine max.* L. Merr.) được thu mua tại Buôn Mê Thuật (Đắk Lắk).

- Enzyme protease được thu nhận từ vi khuẩn *Bacillus subtilis*, hoạt động tối thích ở  $t_{op}=50\text{ }^{\circ}\text{C}$  và  $\text{pH}_{op} = 7,5-8,5$ . Vi khuẩn *B. subtilis* được phân lập, bảo quản và lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học - Trường Đại học Bách khoa - ĐH Đà Nẵng. *B. subtilis* là trực khuẩn Gram (+) và không gây bệnh (Đỗ Thị Bích Thủy, Trần Thị Xô, 2006).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Chế tạo mẫu sữa đậu nành

Mẫu sữa đậu nành được tạo ra theo phương pháp của Arijit (2020) như sau: 50 g đậu nành khô được rửa sạch, sau đó ngâm trong 01 L nước trong 24 h ở nhiệt độ phòng ( $\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Sau khi ngâm cần để ráo nước. Để tạo mẫu sữa đậu nành, nghiền đậu nành đã ngâm với 1000 mL nước đã khử ion hóa, pH 7,0 trong máy xay trong 10 phút. Sau khi xay, sữa được lọc qua vải lọc để loại bỏ bã, tiến hành xác định  $N_{\text{Total}}$ ,  $N_{\text{Aa}}$  trong sữa đậu nành thu được. Hàm lượng protein trong sữa là  $5,6\pm 0,18\text{ g/L}$ . Mẫu sữa được bảo quản trong lọ thủy tinh có nắp đậy trong tủ lạnh ở nhiệt độ  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  phục vụ nghiên cứu.

#### 2.2.2. Các phương pháp vi sinh

Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu sử dụng chủng *B. subtilis* được phân lập bởi Đỗ Thị Bích Thủy và Trần Thị Xô (2004), cho nên các kỹ thuật phân tích vi sinh được sử dụng tương tự như trong các nghiên cứu của nhóm tác giả này để đảm bảo độ chính xác, cụ thể: *Phương pháp nhuộm Gram* (Hucker cải tiến) được áp dụng để quan sát hình thái khuẩn lạc sau khi nhuộm; *Đường cong sinh trưởng* của *B. subtilis* trong môi trường đặc hiệu bằng phương pháp gián tiếp đếm khuẩn lạc bằng phương pháp đo mật độ quang OD ở 600 nm, phương pháp này dựa trên sự tương quan tuyến tính giữa OD<sub>600</sub> và log (N/ml); *Khả năng sinh tổng hợp enzyme protease* của *B. subtilis* được đánh giá bằng kỹ thuật nuôi cấy chấm điểm trên đĩa thạch (phương pháp đục lỗ). Vi khuẩn được nuôi cấy trong tủ ấm  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong vòng 24 h, khuẩn lạc hình thành, enzyme protease được tổng hợp tiết ra ngoài môi trường sẽ thủy phân casein và tạo thành vòng thủy phân xung quanh khuẩn lạc. Để quan sát rõ vòng thủy phân, sử dụng thuốc nhuộm Amindo - Black, dựa vào việc có xuất hiện vòng thủy phân ta có thể xác định hoạt tính sinh enzyme protease.

#### 2.2.3. Thu nhận enzyme protease thô từ vi khuẩn *Bacillus subtilis*

Vi khuẩn *B. subtilis* được hoạt hóa trên đĩa thạch Petri và kiểm tra khuẩn lạc, hình thái vi khuẩn để đảm bảo giống gốc *B. subtilis* không bị nhiễm các vi khuẩn khác, sau đó

giống gốc được nuôi trong ống nghiệm. Nhân sinh khối trong môi trường lỏng (200 mL) để thu nhận enzyme. Môi trường dinh dưỡng gồm: cao thịt 0,3%; pepton 1,0%; cao nấm 1,0%; casein 0,05%; NaCl 0,5%. Tỷ lệ cấy giống vào môi trường nuôi cấy là 10%. Nuôi cấy vi khuẩn ở 35 °C, trên máy lắc với tốc độ 120 vòng/phút, thời gian nuôi cấy là 14,0 giờ. Sau khi nuôi cấy ly tâm 6000 vòng/phút, 10 phút, ở 4 °C để thu nhận dịch enzyme thô và loại bỏ sinh khối. Tiến hành xác định hoạt tính enzyme protease trong dịch chiết enzyme thô theo phương pháp Anson cải tiến (Đỗ Thị Bích Thủy, Trần Thị Xô, 2006).

#### **2.2.4. Bố trí thí nghiệm thủy phân để tạo BP trong sữa đậu nành**

- Xác định nồng độ enzyme thích hợp: 1000 mL sữa đậu nành nguyên liệu được điều chỉnh pH đến 7,5-8,0 bằng NaOH, sau đó được chia vào 5 bình tam giác loại 250 mL, mỗi bình 100 mL sữa đậu nành. Bổ sung thêm enzyme protease đã thu nhận được theo các nồng độ khác nhau, tỉ lệ enzyme: sữa đậu nành được tính theo UI/g với các mức 5 UI/g, 10 UI/g, 15 UI/g, 20 UI/g, 25 UI/g. Quá trình thủy phân được tiến hành ở 50 °C và trong 20 phút. Sau quá trình thủy phân, bất hoạt enzyme ở nhiệt độ 85-90 °C trong vòng 10 phút (Đỗ Thị Bích Thủy và Trần Thị Xô, 2006; Bùi Xuân Đông và nnk., 2018). Sau đó, để nguội và đem dịch đi phân tích hàm lượng nitơ axit amin và xác định mức độ thủy phân (DH). Từ đó lựa chọn nồng độ enzyme và thời gian thủy phân thích hợp để tạo ra các đoạn peptide.

- Xác định thời gian phản ứng thích hợp: cố định các thông số phản ứng  $t_{op} = 50$  °C và  $pH_{op} = 7,5-8,5$  và [E] đã xác định được. Tiến hành mẫu thí nghiệm với 01 mẫu (300 mL sữa/ mẫu) ở các khoảng thời gian là 20 phút, 40 phút, 60 phút, 120 phút, 180 phút. Tới mỗi mốc thời gian, từ các mẫu sẽ lấy ra 15 mL để đem đi bất hoạt và phân tích.

- Sau khi chọn được [E] và  $t_{op}$ , mẫu ở điều kiện tối ưu (300 mL) được điều chế để xác định khả năng kháng oxy hóa (khả năng bắt gốc oxy hóa).

#### **2.2.5. Các phương pháp phân tích**

- Hàm lượng nitơ axit amin trong dịch đậm thủy phân (soybean protein hydrolysate - SPH) được xác định theo phương pháp chuẩn độ Sorensen (AOAC, 1995) theo Silvestre et al., mô tả năm 2013.

- Mức độ thủy phân (Degree of Hydrolysis - DH, %) của dịch đậm thủy phân được tính theo công thức sau:

$$DH (\%) = [(N_{Aa\ stp} - N_{Aa\ ttp}) / (N_{Total\ ttp} - N_{Aa\ ttp})] \times 100$$

Trong đó:  $N_{Total\ ttp}$  - hàm lượng nitơ tổng trong mẫu trước phản ứng thủy phân (xác định theo TCVN 8099-1:2015);  $N_{Aa\ stp}$  - hàm lượng nitơ acid amin trong mẫu sau khi thủy phân;  $N_{Aa\ ttp}$  - Hàm lượng nitơ axit amin trong mẫu trước khi thủy phân (Silvestre et al., 2013; Bùi Xuân Đông và nnk., 2018; Gyula V. et al., 2019).

- Xác định khả năng kháng oxy hóa (bắt gốc DPPH): DPPH là một chất tạo ra gốc tự do có bước sóng hấp thụ cực đại ở 517 nm và có màu tím. Các chất có khả năng chống oxy hóa sẽ trung hòa gốc tự do bằng cách cho hydrogen, làm giảm độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và màu của dung dịch phản ứng sẽ nhạt dần, chuyển từ tím sang vàng nhạt.

Với mẫu đã thu nhận được từ quá trình thủy phân (đã xác định DH, %), tiến hành xác định khả năng bắt gốc DPPH song song với mẫu đối chứng (chưa thủy phân bằng enzyme) để đánh giá. Tiến hành: 2 mL mẫu thêm 2 mL 0,05 mM DPPH được pha trong ethanol 95%. Trộn đều, để phản ứng trong bóng tối trong 30 phút, ở nhiệt độ phòng, sự hấp thụ của dung dịch được đo ở bước sóng 517 nm. Xác định độ hấp thụ của hỗn hợp để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của mẫu thí nghiệm. Độ hấp thụ giảm càng mạnh thì hoạt tính chống oxy hóa của mẫu thí nghiệm thông qua khả năng nhường hydro càng lớn (Plank et al., 2012). Kết quả được tính theo công thức:

$$\text{DPPH (\%)} = [1 - (A_s - A_0)/A_c] \times 100$$

Trong đó,  $A_s$  - là độ hấp thụ của mẫu (SPH) cùng với DPPH;  $A_0$  - độ hấp thụ của mẫu (SPH) mà không có DPPH;  $A_c$  - độ hấp thụ của DPPH với mẫu đối chứng (SM chưa thủy phân)

### 2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được thực hiện song song ba lần, mỗi lần ba mẫu. Số liệu được xử lý và tính toán trên phần mềm Microsoft Office Excel 2010 (giá trị của  $p < 0.05$ ).

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kiểm tra, hoạt hóa giống *Bacillus subtilis* và thu nhận enzyme protease

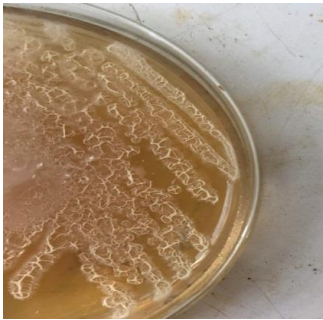
Kiểm tra độ thuần khiết của giống vi sinh vật sau quá trình bảo quản một thời gian là công việc cần thiết và thường kỳ, điều này đặc biệt quan trọng khi sử dụng để sản xuất các sản phẩm sơ cấp và thứ cấp. Dựa vào kết quả kiểm tra giống gốc sau khi được hoạt hóa và nuôi cấy nhận thấy, khuẩn lạc sau khi nuôi cấy từ ống giống gốc có một số đặc điểm hình thái như: khuẩn lạc có dạng hình tròn, có răng cưa, trên bề mặt nhẵn lại.

Đặc điểm khuẩn lạc (Hình 1) là phù hợp với khuẩn lạc vi khuẩn *B. subtilis* theo công bố của Đỗ Thị Bích Thủy và Trần Thị Xô vào năm 2004. Tiến hành nhuộm Gram để quan sát hình thái vi khuẩn, dưới kính hiển vi đầu 100, quan sát thấy trực khuẩn bắt màu tím của violet crystal (Hình 2). Đặc điểm này phù hợp với vi khuẩn *B. subtilis* là trực khuẩn và là trực khuẩn Gram (+). Đặc điểm này phù hợp với vi khuẩn *B. subtilis* theo nghiên cứu của Đỗ Thị Bích Thủy và Trần Thị Xô năm 2004. Nhóm nghiên cứu cũng đã thực hiện nuôi cấy chấm điểm xác định khả năng sinh tổng hợp enzyme protease và kết quả nhuộm màu vòng thủy phân như Hình 3, đường kính vòng thủy phân đo được vào khoảng 1,7-1,8 cm (Đỗ Thị Bích Thủy và Trần Thị Xô, 2004, 2006).

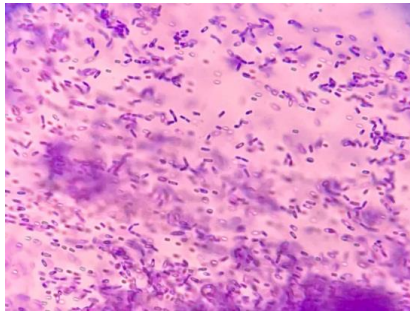
Để xác định thời điểm thu hoạch sinh khối và phân tách enzyme protease ra khỏi sinh khối, nhóm nghiên cứu đã tiến hành xây dựng đường cong sinh trưởng của vi khuẩn *B. subtilis*, kết quả thu được như trên Hình 4. Trong quá trình nuôi cấy, chúng tôi nhận thấy khả năng sinh trưởng của vi khuẩn *B. subtilis* tăng mạnh sau 10 giờ nuôi cấy, đạt cực đại ở 14 giờ sau đó giảm dần. Có thể lúc này, do hàm lượng chất dinh dưỡng trong môi trường dinh dưỡng giảm dần nên số lượng tế bào chết bắt đầu tăng lên. Bên cạnh đó, so sánh hoạt độ enzyme protease tại các mốc thời gian khảo sát, nhận thấy tại mốc thời gian nuôi cấy là 14 giờ hoạt độ enzyme protease là  $2,833 \pm 0,085$  UI/mL, đây là mức hoạt độ

enzyme cao nhất xác định được, có thể do lúc này lượng tế bào chết tăng lên, do đó, lượng enzyme tổng hợp mới cũng giảm dần, đồng thời lượng enzyme trong dịch cũng có xu hướng bị phân giải do sự tương tác giữa phân tử này với phân tử khác (Trần Thị Xô, 2006). Vì vậy, nhóm nghiên cứu chọn mốc thời gian 14,0 giờ để thu enzyme protease. Chế phẩm enzyme protease thô từ *B. subtilis* có màu sắc từ vàng tới nâu, dung dịch lỏng và đồng nhất (Hình 5) và có mùi đặc trưng của sản phẩm từ vi khuẩn *B. subtilis*. Hoạt độ enzyme xác định được là  $2,833 \pm 0,085$  UI/mL.

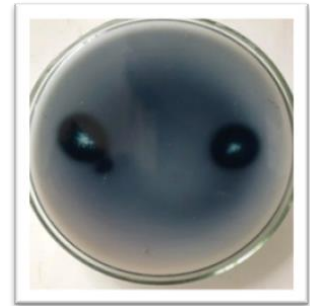
Trong các khảo sát tiếp theo chúng tôi sử dụng chế phẩm enzyme protease thô này để khảo sát quá trình thủy phân protein trong sữa đậu nành.



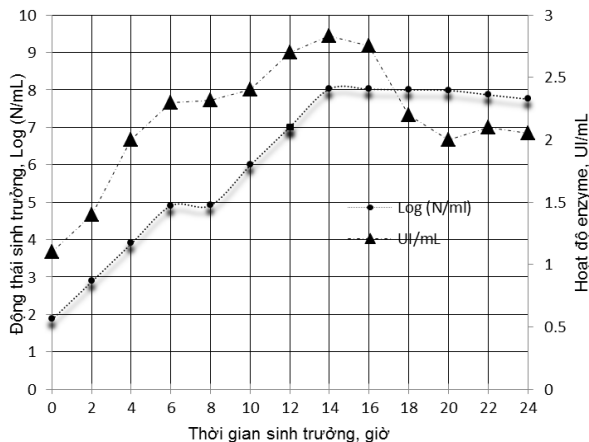
**Hình 1.** Khuẩn lạc *B. subtilis*



**Hình 2.** Hình thái *B. subtilis*



**Hình 3.** Khả năng sinh protease của *B. subtilis*



**Hình 4.** Đồ thị đường cong sinh trưởng của vi khuẩn *B. subtilis*



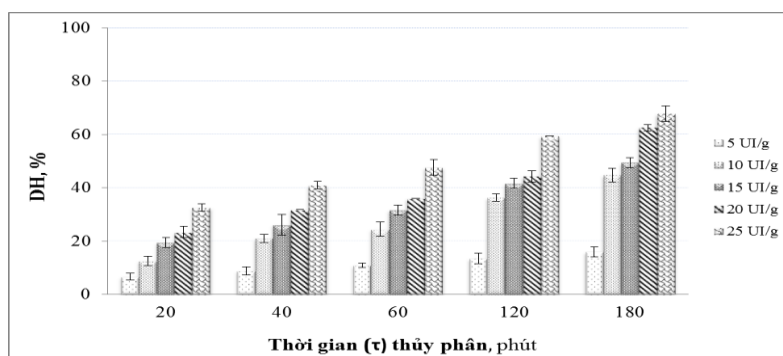
**Hình 5.** Dịch enzyme protease thô thu được sau quá trình nuôi cấy *B. subtilis*

### 3.2. Khảo sát sự phụ thuộc của mức độ thủy phân (DH, %) vào nồng độ enzyme [E] và thời gian thủy phân ( $\tau$ )

Kết quả nghiên cứu sự phụ thuộc của mức độ thủy phân (DH, %) vào nồng độ enzyme [E] và thời gian thủy phân ( $\tau$ ) được trình bày trên Hình 6. Phân tích kết quả nghiên cứu trên Hình 6 nhận thấy, DH tăng tuyến tính với nồng độ enzyme và thời gian phản ứng. Nồng độ enzyme càng cao và thời gian thủy phân càng dài thì DH càng cao và ngược lại, nồng độ thấp, thời gian thủy phân ngắn thì DH càng thấp, kết quả này là phù

hợp với động học của Michaelis-Menten. Tại điểm nồng độ enzyme thấp nhất là 5 UI/g có DH thấp nhất, DH cao nhất ở nồng độ enzyme này là 15,929% ở thời gian thủy phân là 180 phút. Nồng độ enzyme cao nhất là 25 UI/g thì có DH cao nhất, DH cao nhất là 67,729% ở thời gian thủy phân 180 phút.

Để chọn được nồng độ và thời gian thủy phân thích hợp nhằm thu được SPH với DH phù hợp chúng tôi xét cơ sở lý thuyết sau đây. Năm 2013, Silvestre et al., đã khảo sát sự phụ thuộc của độ lớn đoạn peptide vào DH và Fedotova (2016) đã chứng minh được sự phụ thuộc giữa DH và độ lớn peptide (tính theo Da) trong các sản phẩm sữa chế biến và đã chia ra làm 04 mức độ: DH thấp (<5%) thì SPH chứa các peptide > 8000 Da; DH trung bình (5-20%) thì SPH chứa các peptide có độ lớn 3000-10000 Da; DH sâu (20-50%) thì SPH chứa các peptide có độ lớn <3000 Da; DH cực sâu (>80%) thì SPH chứa các peptide có độ lớn <500 Da. Nghiên cứu của Fedotova (2016) chứng minh rằng, để thu nhận được BP, DH nên nằm ở phân khúc DH trung bình và thủy phân sâu. Các nhà khoa học cũng chỉ ra rằng, các BP là những đoạn peptide có khối lượng phân tử < 50kDa, thường chứa 3 -20 axit amin (Dominic, 2015; Silvestre et al., 2013).



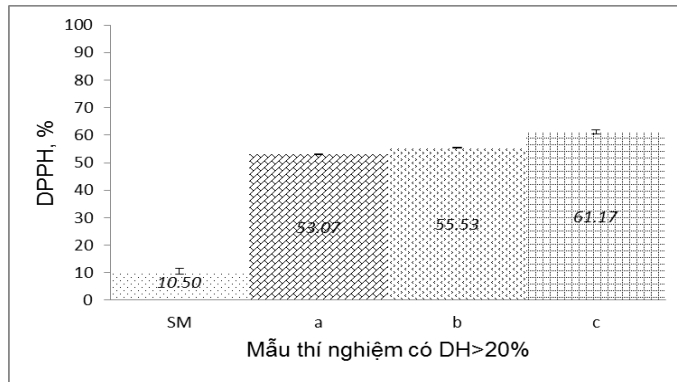
**Hình 6.** Sự phụ thuộc của DH vào nồng độ enzyme và thời gian phản ứng

Trong nghiên cứu này, hầu hết các mẫu thực hiện ở mốc thời gian từ 20 phút trở lên đều đạt, ngoại trừ mẫu với nồng độ enzyme là 5 UI/g. Các mốc thời gian 40 và 60 phút thủy phân có các mẫu với DH > 20% gồm mẫu 15 UI/g thủy phân trong 40 phút, mẫu 10UI/g thủy phân trong 60 phút và mẫu 15 UI/g, thủy phân trong 60 phút. Xét về mặt kinh tế (giá thành enzyme) và đảm bảo thời gian sản xuất ngắn, chúng tôi định hướng chọn mẫu với nồng độ enzyme 10 UI/g và 15 UI/g khi đó DH đạt 31,6%. Tuy nhiên, ở đây chúng tôi chưa đủ dữ liệu để đi tới lựa chọn, cho nên chúng tôi đã tiếp tục khảo sát khả năng kháng oxy hóa (bắt gốc DHHP) ở mục 3.3.

### 3.3. Xác định khả năng kháng oxy hóa (bắt gốc DPPH) của chế phẩm sữa đậu nành có mức độ thủy phân sâu

Các nghiên cứu này được tiến hành trên 4 mẫu khảo sát: SM - sữa đậu nành chưa bị thủy phân bởi enzyme (ĐC), a - mẫu SPH ([E] = 10 UI/g, τ = 60 p), b - mẫu SPH ([E] = 15 UI/g, τ = 40 p), c - mẫu SPH ([E] = 15 UI/g, τ = 60 p), kết quả nghiên cứu được trình bày trên Hình 7. Phân tích kết quả nghiên cứu cho thấy, mẫu c có khả năng bắt gốc oxy hóa cao hơn hẳn so với mẫu đối chứng, 61,17% so với 10,5%. Khả năng bắt gốc oxy hóa của các mẫu a và b cũng thấp hơn mẫu c. Vì vậy, nhóm nghiên cứu lựa chọn mẫu c - mẫu

SPH ( $[E] = 15 \text{ UI/g}$ ,  $\tau = 60 \text{ p}$ ) là mẫu có DH và khả năng bắt gốc oxy hóa tốt nhất. Năm 2013, Silvestre et al. đã nhận định có thể tạo ra các peptide mạch ngắn và các peptide có hoạt tính sinh học bằng cách kiểm soát DH trong quá trình thủy phân protein. Như vậy, kết quả nghiên cứu này phù hợp với nhận định trên đây.



**Hình 7.** Khả năng bắt gốc DPPH của sữa đậu nành (SM- mẫu chưa thủy phân, a - mẫu SPH (10 UI/g, 60 p), b - mẫu SPH (15 UI/g, 40 p), c - mẫu SPH (15 UI/g, 60 p)

#### 4. KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu có thể rút ra kết luận như sau: Có thể sử dụng chế phẩm enzyme protease thô từ vi khuẩn *B. subtilis* để thủy phân protein trong sữa đậu nành để tạo ra các peptide đoạn ngắn. Điều kiện tối ưu để thu được SPH với DH = 31,6% và khả năng chống oxy hóa là nồng độ  $[E] = 15 \text{ UI/g}$ ; thời gian phản ứng – 60 p khi phản ứng thủy phân được thực hiện ở  $\text{pH}_{\text{op}}$ ,  $t_{\text{op}}$  của *Bacillus protease*. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, sản phẩm SPH thu được có tính chống oxy hóa thể hiện ở khả năng loại bỏ gốc DPPH. Trong nghiên cứu tiếp theo chúng tôi sẽ phân tích độ lớn các đoạn peptide trong SPH bằng điện di SPS-PAGE để tiếp tục làm sáng tỏ kết quả của nghiên cứu này.

**Lời cảm ơn:** Bài báo này được tài trợ bởi Trường Đại học Bách khoa - ĐH Đà Nẵng với Đề tài có mã số T2020-02-26.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arijit N., Geremew G. K., Zsuzsanna M., Gabriella K., Barbara C., Klára P. H., Renáta G. B., Ildikó G., Emília P., Szilvia B., Gyula V., 2020. Antioxidant and antibacterial peptides from soybean milk through enzymatic- and membrane-based technologies. *Bioengineering*, 7(5). DOI: 10.3390/bioengineering7010005.
- Bùi Xuân Đông, Ngô Thị Ngọc Bích, Bùi Việt Cường, 2018. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân cơ thịt đỏ cá nưoc sọc dưa (*Sarda orientalis*) với xúc tác protamex để thu dịch protein thủy phân bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng*, số: 3(124): 13-19.
- Đỗ Thị Bích Thủy, Trần Thị Xô, 2004. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố lên khả năng sinh protease của *Bacillus subtilis*. *Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 12: 1667-68.
- Đỗ Thị Bích Thủy, Trần Thị Xô, 2006. Nghiên cứu quy trình thu nhận và khảo sát một số tính chất

- của chế phẩm protease *Bacillus subtilis*. Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 1: 41-43.
- Dominic A., 2015. Bioactive proteins and peptides from soybeans. Recent Pat. Food, Nutr. Agric., DOI: 10.2174/2212798407666150629134141.
- Fedotova O. B., 2016. Innovatsionnye technologyi obogasenya molochnoy productsyi (teory i praktika) - Moscow: Fratera - 110-140 (ISBN 978-5-94009-131-8).
- Messina M., 2000. Soyfoods, soybean isoflavones, and bone health: a brief overview, J. Renal Nutr. 10(2): 63-8.
- Moller N. P. and Scholz-Ahrens K. E., 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects, Eur.J. Nutr. 5: 696-705.
- Nguyễn Văn Mạnh, Lê Đức Thảo, Phạm Thị Bảo Chung, Lê Thị Ánh Hồng, Lê Huy Hàm, 2016. Kết quả nghiên cứu chọn giống Đậu tương đen DT2008ĐB. Kỷ yếu Hội thảo quốc gia về K khoa học Cây trồng lần thứ hai - Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam năm 2016, 488-493.
- Plank D. W., Szpylka J., Sapirstein H., Woollard D., Lee V., Chen, C. Y. O.; Liu R. H., Tsao R., Düsterloh A., Baugh S., 2012. Determination of Antioxidant Activity in Foods and Beverages by Reaction with 2,2'-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH). J. AOAC Intern. 95: 1562-1569.
- Silvestre M. P. C, Morais H. A. and Silva. V. D. M., 2013. Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin, J. Braz. Soc. Food. Nutr. 38(3): 278-290. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/nutrire.2013.026>.

## STUDY ON THE EFFECTS OF ENZYME CONCENTRATION AND REACTION TIME TO THE DEGREE OF HYDROLYSIS OF PROTEIN AND ANTIOXIDANT PROPERTY IN SOYBEAN MILK (*Glycine max. L. Merr.*) USING *Bacillus* PROTEASE

Chu Thi My Duyen<sup>1</sup>, Nguyen Tu Tan<sup>1</sup>, Vo Thi Bich Thuy<sup>2</sup>, Bui Xuan Dong<sup>1,\*</sup>

**Abstract:** Soybean is an important source of protein and active peptide for human being and livestock. Enzymatic hydrolysis of soybean protein affects its functional properties and improves its nutrititional value. Degrees of hydrolysis (DH) from 1% to 39.5% are analyzed for active peptide production. The results of this work indicated that optimal conditions for obtaining soybean protein hydrolysate with DH = 31,6% were [E] = 15 UI/g and  $\tau$  = 60 min while the hydrolysis reaction was performed at the optimal condition of pH and temperature for *Bacillus* protease. In addition, the soybean protein hydrolysate had a significant effect on the ability to scaveng the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical.

**Keywords:** Antioxidant, *Bacillus* protease, degree of hydrolysis (DH, %), hydrolysis, soybean protein; soybean protein hydrolysate (SPH).

<sup>1</sup>University of Science and Technology, The University of Da Nang

<sup>2</sup>Quality Assurance and Testing Center 2 (QUATEST 2)

\*Email: [xdbui@dut.udn.vn](mailto:xdbui@dut.udn.vn)