

*Phạm Thị Trân Châu, Phan Thị Hà,
Nguyễn Tuyết Mai, Nguyễn Cẩm Vân,
Nguyễn Lâm Dũng*

NGHIÊN CỨU ENZIM, CHẤT ỨC CHẾ TRIPXIN NHẪM NÂNG CAO CHẤT LƯỢNG BỘT DINH DƯỠNG CHO TRẺ EM

I. MỞ ĐẦU

Nghiên cứu enzym và các chất ức chế enzym không chỉ có ý nghĩa về mặt lý thuyết như tìm hiểu liên quan giữa cấu trúc chức năng của phân tử, cơ chế điều hòa các quá trình sống v.v.. [6, 7, 8, 10] mà còn có ý nghĩa lớn trong thực tế, ví dụ nâng cao chất lượng bột dinh dưỡng.

Bột dinh dưỡng (BDD) dùng cho trẻ ăn thêm nhằm đáp ứng nhu cầu phát triển của trẻ và giúp cho trẻ làm quen dần với thức ăn của người lớn [12]. Do đó, ngoài yêu cầu chung như phải đủ năng lượng, đủ chất, bảo đảm tỉ lệ cân đối giữa các chất dinh dưỡng, BDD còn phải mịn, dễ tiêu hóa, không chứa (hoặc có rất ít) các chất kháng dinh dưỡng, các protein ức chế tripxin v.v..

Các nguyên liệu thường dùng để phối chế BDD ở nước ta là bột ngũ cốc, bột các loại đậu đỗ, thịt, trứng v.v.. Các loại đậu đỗ, đặc biệt là đỗ tương có hàm lượng các chất ức chế tripxin khá cao. Theo một số tác giả [3], các chất này có tác dụng kìm hãm sinh trưởng, ảnh hưởng lớn đến quá trình tiêu hóa protein, vì tripxin là enzym có vai trò chìa khóa trong quá trình này. Mặt khác, các polime phân tử lớn như tinh bột, protein mô cơ động vật (actin, miozin v.v...) có đặc trưng cấu trúc khác với các chất trong sữa, vì vậy chúng là những chất "lạ" đối với hệ tiêu hóa của trẻ. Tuy nhiên khi bị thủy phân đến một giới hạn xác định nào đó, chúng sẽ mất dần những đặc trưng cấu trúc ban đầu.

Vì vậy, sử dụng enzym để thủy phân các polime và loại bỏ tác dụng của các chất ức chế tripxin sẽ cải tiến và nâng cao chất lượng BDD. Sử dụng enzym làm tăng hiệu quả sử dụng, tận dụng được triệt để các chất dinh dưỡng trong khẩu phần ăn. Ngoài ra, sử dụng enzym còn cho phép khai thác các nguồn nguyên liệu giàu protein khác chưa được tận dụng để bổ sung vào khẩu phần ăn.

Trong bài này giới thiệu một số kết quả nghiên cứu sinh hóa, sử dụng enzym làm cơ sở để nâng cao chất lượng BDD.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Sephadex - G - 75 của hãng Pharmacia Fine chemicals (Thụy điển). Tripsin tụy tạng bò của Viện sinh hóa ĐHTH Ba Lan sản xuất. Chế phẩm PROZIMA do chúng tôi sản xuất (đề tài 52 03 10, chủ trì Phạm Thị Trân Châu).

Các hóa chất khác đều có độ sạch cho phân tích.

Đỗ xanh nảy mầm: đỗ xanh sát sạch, ngâm 1 giờ, làm giữa 2 lớp lá chuối tươi, cài que tre chĩa hàng ngày tưới nước 3 lần, mỗi lần từ 30 đến 60 phút sau đó loại bỏ nước thừa. Ở các thời điểm xác định lấy mẫu phân tích. Để tiện so sánh, các kết quả được tính trên 100 hạt (hoặc cây mầm sau đó tính tỉ lệ phần trăm so với hạt trước khi ngâm nước).

Xác định nitơ tổng số theo phương pháp Kjeldahl. Hàm lượng protein thô được tính từ nitơ tổng số nhân với hệ số 6,25. Xác định protein tan trong nước theo phương pháp Lowry [5]. Xác định peptit bằng cách dùng axit tricloaxetic (TCA) để loại bỏ protein, peptit hòa tan trong TCA được xác định theo cường độ màu với thuốc thử Folin - Ciocalteu. Xác định hoạt độ proteolitic bằng phương pháp Anson cải tiến [15]. Một đơn vị hoạt động là lượng enzym có khả năng phá giải protein tạo thành các sản phẩm hòa tan trong TCA cho phản ứng màu với thuốc thử Folin Ciocalteu tương ứng với 1 micromol tirozin trong 1 phút ở điều kiện chuẩn.

Xác định hoạt độ amilolitic theo phương pháp Wolhgemuth, 1 đơn vị là lượng enzym ít nhất mà sau 30 phút ở 30°C khi có ion clo có thể phân giải 1 mg tinh bột đến các sản phẩm không tạo màu với iot [11].

Xác định hoạt độ ức chế tripsin (TIA) bằng cách ủ tripsin với chất ức chế trước rồi mới cho tác dụng với cơ chất. Một đơn vị (IU) là lượng chất ức chế làm giảm 50% hoạt độ của 2 n tripxin.

Sắc ký qua cột Sephadex G-75: cột có kích thước 1,5 × 90 cm, thu mỗi phân đoạn 3 ml, tốc độ chảy 20ml/giờ. Dịch rút là dung dịch đệm Sorensen pH 7,0.

Điện di trên gel poliacrilamit phát hiện trực tiếp bằng TI theo phương pháp đã mô tả trước đây [6].

III. KẾT QUẢ

1. Kết quả xử lý thịt bò, bột đậu xanh bằng chế phẩm PROZIMA

Trong số các chế phẩm proteinaza chúng tôi đã sản xuất (trong khuôn khổ đề tài nhà nước 52DO3-10), chế phẩm PROZIMA có chứa bromelin (proteinaza tách từ đọt dứa) hoạt động mạnh ở pH trung tính, nhiệt độ 50-60°C [9] có tính đặc hiệu rộng, thích hợp cho việc sử dụng trong sản xuất BDD.

Để đánh giá tác dụng của enzym lên protein có trong nguyên liệu, chúng tôi đã tiến hành xác định protein tan trong nước và so sánh tỉ lệ giữa các dạng sản phẩm có khối lượng phân tử thấp và khối lượng phân tử lớn bằng phương pháp sắc ký qua cột Sephadex G-75.

Sự biến đổi hàm lượng protein tan trong nước của thịt bò và bột đậu sau khi xử lý với PROZIMA.

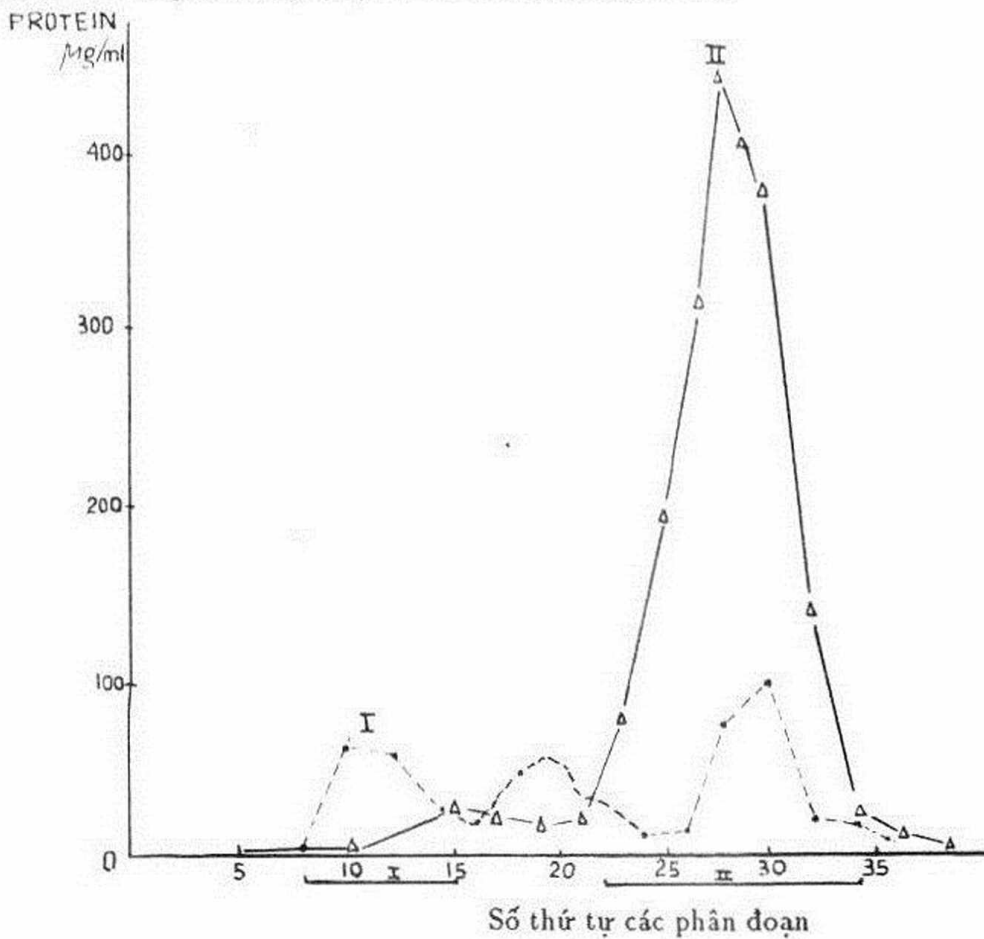
Qua bảng 1 ta thấy rõ sau khi xử lý thịt hoặc bột đậu xanh bằng "PROZIMA"; lượng protein tan trong nước tăng lên rõ rệt: 1,73 lần đối với bột đậu xanh và 3,43 lần với thịt bò.

Hiện tượng này có thể giải thích là do enzym đã phân giải các protein vốn không tan trong nước thành dạng phân tử thấp hơn đến mức có thể tan trong nước.

Bảng 1. Hàm lượng protein tan trong nước ở các mẫu trước và sau khi xử lý với enzym

Mẫu	mg protein 100g	% so với trước khi thủy phân
Thịt bò	31,2	100
Thịt bò sau thủy phân	107,2	343,6
Bột đậu xanh	62,8	100
Bột đậu xanh sau thủy phân	108,8	173,2

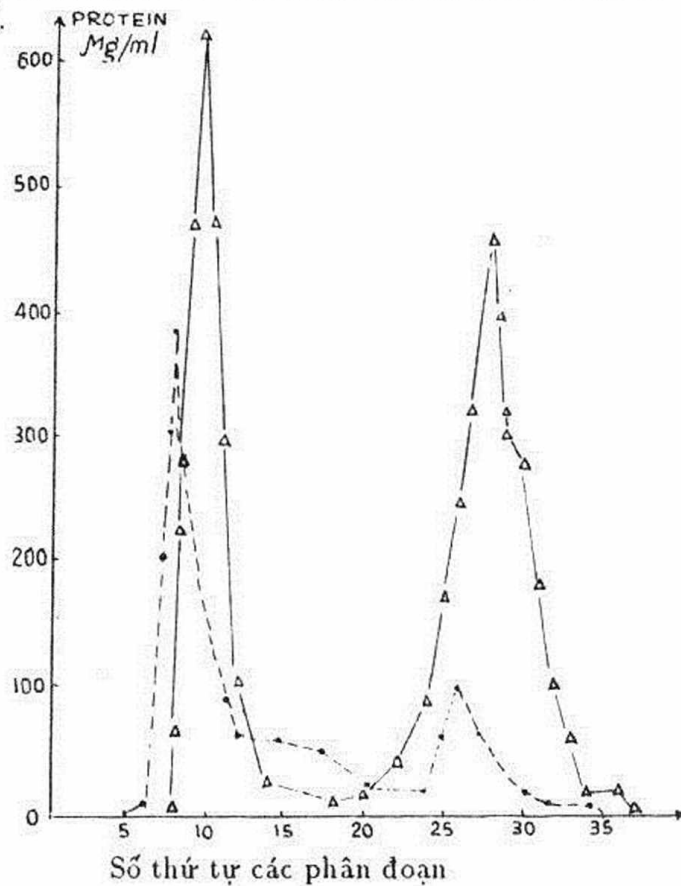
Tuy nhiên kết quả trên chưa nói lên được hàm lượng polipeptit phân tử thấp và polipeptit phân tử lớn trong mẫu nghiên cứu. Để tìm hiểu vấn đề này chúng tôi đã tiến hành sắc ký qua cột Sephadex G-75 kết quả sắc ký được biểu diễn trên hình 1 và 2.



Hình 1. Sắc ký đồ qua cột Sephadex G-75 các mẫu thịt. Cột có kích thước $90 \times 1,5$ cm, thu mỗi phân đoạn 3 ml, tốc độ chảy 18-20 ml/giờ. Dịch rút: đệm photphat M/15 pH 7,0. Các mẫu đều lấy 5g đưa đến thể tích 20ml, lọc lên cột 2,5 ml.

- △——△ Thịt sau khi thủy phân
- Thịt trước khi thủy phân

Khi sắc ký qua Sephadex các chất phân tử thấp được rút xuống sau. Trên sắc ký đồ cả polipeptit được rút xuống cột phân bố ở 2 đỉnh chính: đỉnh I ở các phân đoạn trước 15, đỉnh II ở các phân đoạn sau 20. Phần được rút xuống đỉnh I có khối lượng phân tử (M_r) lớn hơn cả polipeptit được rút xuống ở đỉnh II.



Hình 2. Sắc ký đồ qua cột Sephadex G-75 protein ở các mẫu đậu xanh

Điều kiện giống ở hình 1

đậu xanh thủy phân Δ——Δ
 đậu xanh chưa thủy phân •- - - -•

Trên cả 2 hình 1, 2 và bảng 2 ta đều thấy sau khi xử lý với enzym tỉ lệ đỉnh II/đỉnh I tăng lên. Hơn nữa protein ở mỗi đỉnh của mẫu xử lý với enzym tăng lên rõ rệt so với các đỉnh tương ứng ở mẫu chưa xử lý (bảng 3).

Bảng 2. Tỉ lệ protein giữa đỉnh II so với đỉnh I nhận được trên mỗi hình (1 và 2)

Mẫu	Protein đỉnh II so với đỉnh I (%)
Thịt bò	78
Thịt bò xử lý enzym	190
Bột đậu xanh	40
Bột đậu xanh xử lý enzym	184

Bảng 3. Tỷ lệ protein giữa các đỉnh tương ứng của mẫu đã xử lý với mẫu chưa xử lý. (% so với mẫu chưa xử lý)

Mẫu	Đỉnh I	Đỉnh II
Thịt bò	4,6	11,2
Đậu xanh	1,6	7,5

Tuy nhiên tỷ lệ này ở đỉnh II luôn cao hơn ở đỉnh I.

2. Hàm lượng các chất ức chế tripxin (TL) trong một số nguyên liệu thường dùng để phối chế BDD.

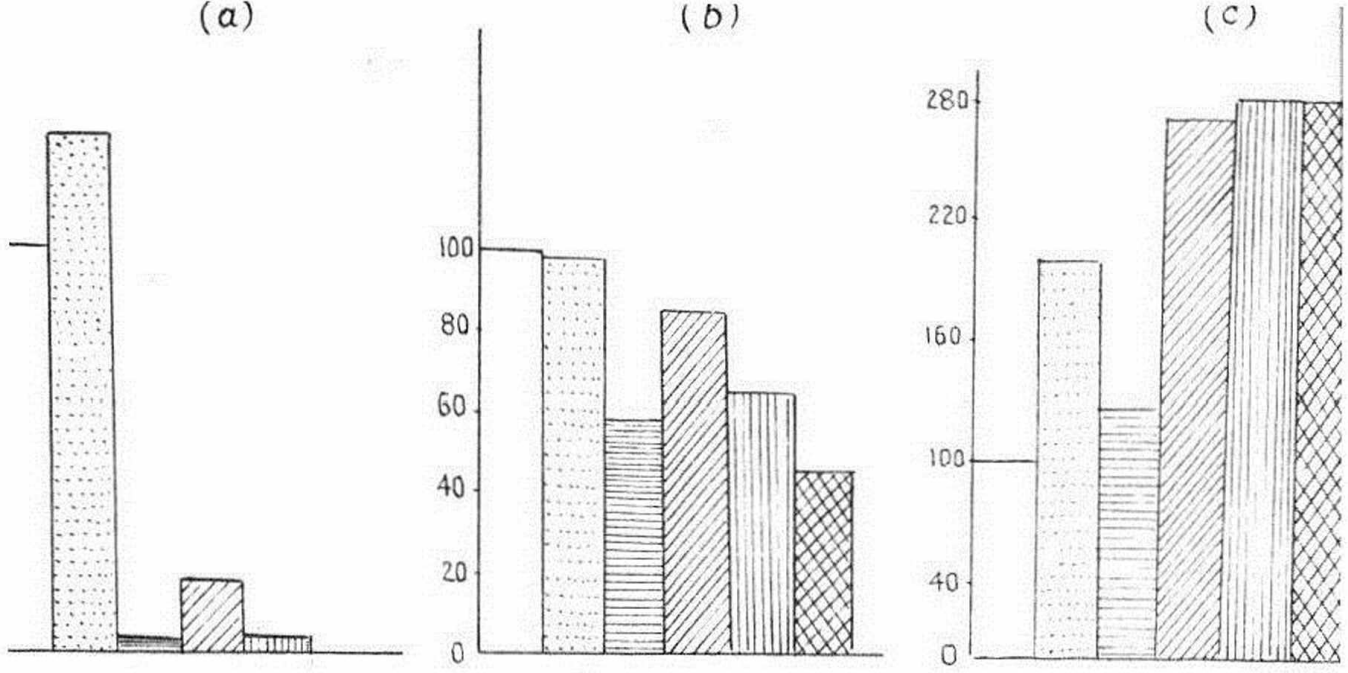
Kết quả phân tích trên bảng 4 cho thấy hoạt độ ức chế tripxin (TIA) của đỗ tương là lớn nhất, gấp khoảng 1,5 lần TIA ở đỗ xanh, đỗ đen, gấp 9 lần lạc nhân tươi và 32 lần khoai lang tươi.

Bảng 4. Hoạt độ ức chế tripxin (TIA) của một số nông sản

	(IU/100g)
Đỗ tương	130
Đỗ đen	88
Đỗ xanh	81
Lạc nhân *	14
Khoai lang tươi *	4

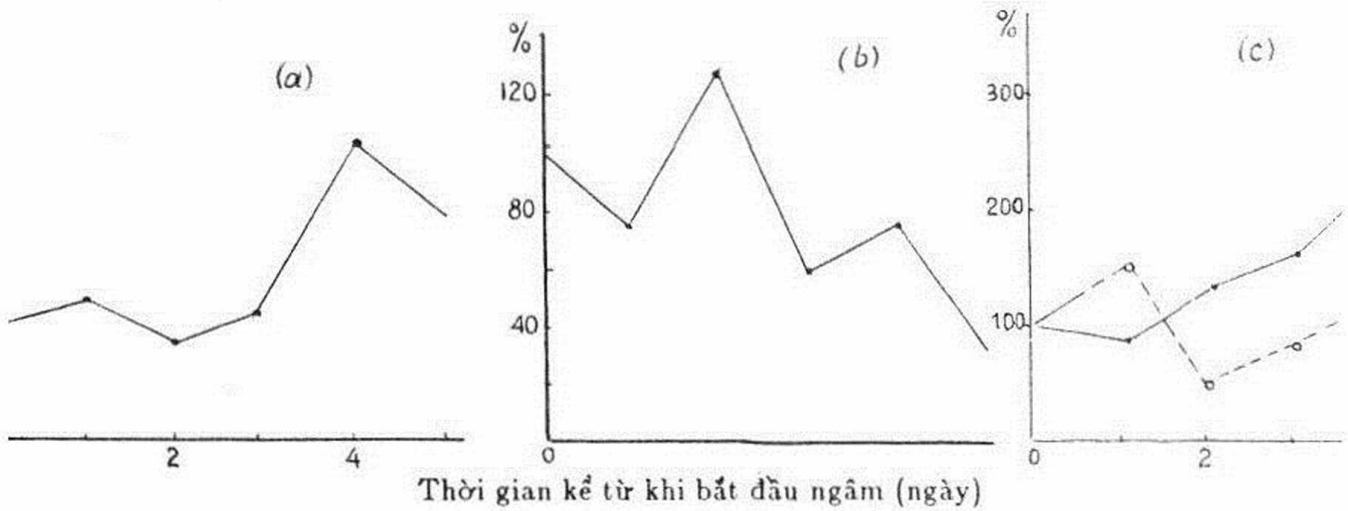
Ghi chú * - Tính trên trọng lượng tươi, còn đối với các loại hạt khác tính trên trọng lượng khô không khí.

Trong hạt đỗ tương có 2 loại chất ức chế proteinaza khác nhau: chất ức chế Kunitz (chỉ ức chế tripxin và chất ức chế Bowman-Birk (BBI) ức chế cả tripxin và kimotripxin [3, 1, 2, 4] và bền với nhiệt và axit. Vì vậy khi sử dụng đậu tương làm thực phẩm nhiều tác giả đã dùng nhiệt độ cao để làm bất hoạt các chất ức chế này. Tuy nhiên, kết quả xử lý phụ thuộc nhiều vào điều kiện và phương pháp xử lý là vấn đề còn ít được nói đến trong các tài liệu. Vì vậy chúng tôi đã thăm dò một số điều kiện và phương pháp xử lý nhiệt khác nhau. Trong 5 cách đã thử nghiệm có lẽ cách 1 (cho vào nước đun đến sôi và giữ ở nhiệt độ này 5 phút) và 4 (rang, ch hợp hơn cả (hình 3)). Ở những điều kiện này TIA chỉ còn ít hơn 5% TIA ban đầu (hình 3a), với lượng này theo Aurella và cộng sự [3] sẽ không còn tác dụng kìm hãm sinh trưởng và làm tăng kích thước tụy. Ở những điều kiện đã nêu trên, protein tan trong nước bị giảm 40% (hình 3b), có lẽ một phần do nhiệt độ cao đã làm biến tính protein và một phần bị thủy phân dưới tác dụng proteinaza có trong hạt do đó hàm lượng paptit tăng (hình 3c).



Hình 3. Sự biến đổi TIA(a), protein (b) và peptit (c) ở hạt đỗ tương (tính trên 100 hạt) trong quá trình xử lý (% so với ban đầu).

- Hạt khô
- Sau khi ngâm 1 đêm
- Hạt sau khi ngâm:
- cho vào nước đun đến sôi và giữ sôi 5 phút
- rang 10 phút
- rang 20 phút
- rang 30 phút



Hình 4. Sự biến đổi hoạt độ amilaza (a), TIA (b), protein và peptit (c) ở hạt đỗ xanh trong quá trình nảy mầm.

(Tính theo % so với hạt khô trước khi ngâm).

3. Sự biến đổi một số chỉ tiêu sinh hóa của hạt đỗ xanh trong quá trình nảy mầm.

Kết quả trên hình 4b cho thấy đến ngày thứ 5 kể từ khi bắt đầu ngâm hạt (chiều dài thân rễ mầm khoảng 4,5cm), hoạt độ ức chế triplexin (TIA) đã bị giảm mạnh, chỉ còn 20% TIA ở hạt khô. Dùng phương pháp điện di trên gel poliaorilamit chứa edestin ở pH 8,3 theo chiều từ (-) đi (+) cho thấy dịch chiết hạt đỗ xanh khô có chứa 4 băng TI với các giá trị Rf là 0,37; 0,60; 0,75; và 0,85. Trong quá trình nảy mầm băng TI-0,37 giảm mạnh, từ ngày thứ 5 trở đi chỉ có thể ph

tiện được 2 băng TI-0,60 và TI-0,70. Vào ngày thứ 5 hàm lượng protein tan trong nước vẫn còn đến 70% và hàm lượng peptit (hình 4c) đã tăng lên gấp 3 lần.

Hoạt độ amilaza cũng đạt cực đại vào ngày thứ 5 (hình 4a) ở thời điểm này lượng amilaza của 100 cây giá (31,5 g) đủ để phân giải 12,8 gam tinh bột trong 30 phút đến các sản phẩm không cho màu với iot. Như vậy, vào thời điểm này giá đỗ xanh là nguồn amilaza khá tốt. Kết quả này ủng hộ cho sáng kiến của Viện dinh dưỡng bổ sung giá đỗ xanh khi khuấy bột cho trẻ em. Chúng tôi cũng đã xác định hoạt độ của lipaza và proteinaza, kết quả cho thấy hoạt độ của 2 enzym này khá thấp. Hoạt độ proteinaza đạt cực đại vào ngày thứ 3 nhưng hoạt độ của 100 cây giá vẫn chưa được 0,5 đơn vị. Như vậy giá đỗ xanh không phải là nguồn proteinaza.

1. Sử dụng kỹ thuật enzym trong sản xuất "Bột dinh dưỡng cao cấp" cho trẻ em.

Từ các kết quả nghiên cứu cơ bản trên đây, chúng tôi đã sử dụng chế phẩm PROZIMA trong sản xuất các bột protein thủy phân, sản xuất "Bột dinh dưỡng cao cấp" [12]. Kết quả các đợt sản xuất thử nghiệm tại nhà máy bột dinh dưỡng trẻ em UNICEF Hà Nam Ninh cho thấy tính khả thi của qui trình, sản phẩm được thị trường chấp nhận. Về tiêu chuẩn chất lượng (Bảng 5), có hàm lượng protein cao hơn công thức của Benanh 1986 (là công thức được dùng nhiều ở các nước đang phát triển, % protein là 12,7) và năng lượng tương đương. Hàm lượng các chất ức chế tripsin chỉ còn dạng vết.

Bảng 5. Tiêu chuẩn chỉ tiêu chất lượng
"Bột dinh dưỡng cao cấp" (g/100g)

Công thức bột	Nước	Nitơ amin	Protein	Lipit	Xacarit	Năng lượng (Kcal/100g)
Công thức 1	8,6-9,0	0,7	15,4	2,3	67,5	361,8
Công thức 2*	8,6 -9,0	0,7	17,6	4,4	59,5	373,0

Ghi chú: * trong công thức 2 bột bột gạo, thêm bột đậu tương.
Công thức 1 không có đậu tương.

Sử dụng "bột protein thủy phân", (do chúng tôi sản xuất) trong khẩu phần ăn điều trị trẻ suy dinh dưỡng cho thấy kết quả tốt, cải thiện tình trạng thiếu máu, nhanh chóng giảm rối loạn tiêu hóa.

III. KẾT LUẬN

1. Sử dụng chế phẩm proteinaza "PROZIMA" cải biến rõ rệt đặc tính kích thước phân tử protein của thịt, đỗ xanh. Sinh phẩm protein bổ sung vào khẩu phần điều trị trẻ suy dinh dưỡng cho kết quả tốt. Qui trình sử dụng PROZIMA để sản xuất sinh phẩm protein, "Bột dinh dưỡng cao cấp" có thể triển khai sản xuất ở qui mô lớn tại nhà máy.

2. Giá đỗ xanh là nguồn amilaza tốt nhưng không phải là nguồn proteinaza; Nên chọn giá có chiều dài khoảng 4,5 cm là lúc hoạt độ amilaza đạt cực đại và TI chỉ còn rất ít.

3. Để làm bất hoạt TI ở hạt đỗ tương cần ngâm 1 đêm sau đó đun sôi 5 phút hoặc rang 20 phút.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bowman D. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 63, 547-550, (1944)
2. Birk Y., Gertler A., Khalef S. ; Biochim. Biophys. Acta 147, 402-404, (1967).
3. Churella H. R., Yao B. C., Thomson W. A.: J. Agr. Food Chem. 24: 393-397, (1976).
4. Kunita M., J. Gen. Physiol. 29: 149-154, (1946).
5. Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. C. Farr, R. J. Randall, J. Biol. Chem. 193: 265-275, (1951)
6. Phạm Thị Trân Châu, 1985. Luận án tiến sĩ. NXB Trường ĐHTH Wrocław 1987. (Acta Universitatis Wratislaviensis No 912).
7. Phạm Thị Trân Châu, J. Leluk, A. Polanowaki, T. Wilusz: Biol. Chem. Hoppe. Seyle's 366 939-946, (1985).
8. Phạm Thị Trân Châu, L. Konopska, J. Leluk. Biochem. Physiol. Pflanzen 181: 565-569 (1986).
9. Phạm Thị Trân Châu, Phan Tiến Hòa, Nguyễn Thị Bảo. Tạp chí Sinh học 9(4): 3-9, (1987)
10. Phan Tuấn Nghĩa, Phạm Thị Trân Châu. Proceedings of the NCSR of Vietnam 2: 129-135 (1990).
11. Nguyễn Lân Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mười, Phạm Văn Ty. NXB Khoa học và kỹ thuật, tr. 133-134, Hà Nội 1978.
12. Từ Giáy - Hà Huy Khôi. Một số vấn đề dinh dưỡng thực hành. NXB Y học, Hà nội 1988.
13. И. С. Петрова, М. М. Винцюнайте, Приклад. Биохим. и Микробиол. 2, 232-238, (1966)

Pham Thi Tran Chau et al.

INVESTIGATION OF ENZYMES, TRYPSIN INHIBITORS FOR IMPROVING QUALITY OF NUTRITIOUS FLOUR FEEDING INFANTS

The aim of this work was study on processing trypsin inhibitor - free and hydrolysed protein - rich products for children.

Different methods such as column chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis etc were employed in the research. It was found that:

- Trypsin inhibitors in soya-bean were almost inactivated after soaking the seeds overnight then boiling 5 min, or roasting for 20 min.

- During germination of mung bean seeds, at the 5th - day after imbibition, the amylolytic activity was highest while the TIA was at rather low level. However, the lipolytic and proteolytic activity showed only a minute values.

- The percentage ratio of water soluble and small size polypeptides in beef and mung bean flour treated with PROZIMA (proteases produced by the authors) were remarkably increased.

Moreover, the chemical components of the "Bột dinh dưỡng cao cấp" (high quality nutritious flour) the positive effects on improving the health of malnourished children supplemented by the diet fortified with the hydrolysed beef were also mentioned.

Khoa Sinh - ĐHTH Hà Nội