

ẢNH HƯỞNG CỦA PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ KHỬ TRÙNG HẠT GIỐNG ĐẾN TỶ LỆ NẤY MẦM VÀ HOẠT ĐỘNG PHÂN HỦY HISTAMINE CỦA GIÁ ĐẬU

Judit Costa-Catala^{1,2}, Jaume Bori³, M. Teresa Veciana-Nogués^{1,2},
M. Luz Latorre-Moratalla^{1,2}, M. Carmen Vidal-Carou^{1,2} và Oriol Comas-Basté^{1,2}

1. Khoa Dinh dưỡng, Khoa học Thực phẩm và Ẩm thực, Cơ sở Thực phẩm Torribera, Đại học Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Tây Ban Nha
2. Viện Nghiên cứu Dinh dưỡng và An toàn Thực phẩm (INSA UB), Đại học Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Tây Ban Nha
3. Hiệp hội Thành phần Thực phẩm Anh (ABFI), Escoles Pies 49, 08017 Barcelona, Tây Ban Nha

TÓM TẮT

Giá đậu để ăn được đề xuất là nguồn thực vật đầy hứa hẹn của enzyme diamine oxidase (DAO), đóng vai trò quan trọng trong việc phân hủy histamine ở đường ruột và ngăn ngừa sự phát triển của các triệu chứng không dung nạp histamine. Tuy nhiên, điều kiện nhiệt độ và độ ẩm cần thiết cho quá trình nảy mầm của hạt cũng có thể thúc đẩy sự phát triển nhanh chóng của nấm men và nấm mốc, có khả năng ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng giá đậu. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của các phương pháp xử lý khử trùng hạt khác nhau đối với cả tỷ lệ nảy mầm và hoạt động của enzyme DAO trong giá đậu của bốn loài *Leguminosae*. Khử trùng hạt bằng 70% ethanol trong 5 hoặc 15 phút làm tăng nhẹ tỷ lệ nảy mầm của giá đậu gà và giá đậu nành mà không ảnh hưởng đến hoạt động của DAO, bất kể thời gian xử lý. Tuy nhiên, đối với giá đậu đậu lăng và đậu xanh, khử trùng bằng ethanol làm giảm đáng kể khả năng phân hủy histamine theo thống kê. Ngược lại, xử lý hạt bằng natri hypoclorit trong 15 phút làm tăng tỷ lệ nảy mầm lên tới 14% và duy trì hoạt động của DAO trong tất cả các giá đậu được thử nghiệm. Những kết quả này chỉ ra rằng việc kết hợp bước khử trùng hạt giống trong quá trình nảy mầm của cây họ đậu có thể ảnh hưởng đến cả hoạt động của enzym DAO và tỷ lệ nảy mầm.

Từ khóa: enzym diamine oxidase (DAO); histamine; không dung nạp histamine; giá đậu; khử trùng hạt giống; tỷ lệ nảy mầm; enzym catalase

1. GIỚI THIỆU

Diamine oxidase (DAO, EC 1.4.3.22), còn được gọi là histaminase, là một enzym chứa đồng xúc tác quá trình khử amin oxy hóa nhóm amino chính của histamine (2-(1*H*-imidazol-4-yl) ethanamine) và các diamine khác, chuyển chúng thành các aldehyde tương ứng và tạo ra lượng amoniac và hydro peroxide theo tỷ lệ thành phần [1]. DAO phân bố rộng rãi trong các vi sinh vật, thực vật và động vật có vú [2] và đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy các diamine từ thức ăn trong ruột người [3].

Không dung nạp histamine, một rối loạn liên quan đến thực phẩm, xảy ra khi quá trình phân hủy histamine trong ruột bị suy yếu do hoạt động DAO giảm, dẫn đến tích tụ trong huyết tương và sau đó là khởi phát các tác dụng phụ đối với sức khỏe [4]. Các biểu hiện lâm sàng của chứng không dung nạp histamine bao gồm nhiều triệu chứng không đặc hiệu ở đường tiêu hóa và ngoài ruột và thường xuất hiện ở những người dễ bị tổn thương sau khi tiêu thụ thực phẩm có chứa lượng histamine vừa phải hoặc thậm chí nhỏ và/hoặc các amin sinh học khác [5, 6].

Ngoài việc tuân theo chế độ ăn ít histamine, các chiến lược hiện tại để ngăn ngừa các triệu chứng liên quan đến histamine bao gồm tăng cường quá trình phân hủy histamine ở ruột thông qua việc bổ sung chế độ ăn uống bằng viên nén đường tiêu hóa có chứa DAO ngoại sinh [7]. Các chất bổ sung DAO thương mại này chủ yếu được bào chế bằng chiết xuất protein thận lợn, một thành phần hoạt tính chứa DAO đã được Ủy ban Châu Âu chấp thuận là thực phẩm bổ sung và thực phẩm cho mục đích y tế đặc biệt vào năm 2017 [8, 9].

Gần đây, DAO có nguồn gốc thực vật đã nổi lên như một phương pháp thay thế đầy hứa hẹn cho DAO động vật để điều trị các rối loạn liên quan đến histamine [10, 11]. Hạt nảy mầm từ một số loài *Leguminosae* đã được xác định là nguồn DAO quan trọng, cho thấy hoạt động phân hủy histamine trong ống nghiệm tương tự hoặc thậm chí cao hơn so với DAO có nguồn gốc từ động vật [10, 12, 13]. Sự nảy mầm của hạt làm tăng đáng kể hoạt động DAO, có thể là do vai trò của enzyme trong việc điều chỉnh cấu trúc thành tế bào trong quá trình phát triển của cây và chống lại mầm bệnh [14, 15].

Các báo cáo trong tài liệu chỉ ra rằng nhiều điều kiện nảy mầm khác nhau, chẳng hạn như nhiệt độ, thời gian và mức độ tiếp xúc với ánh sáng, có thể ảnh hưởng đáng kể đến hoạt động DAO của giá đậu [10, 12, 15]. Ví dụ, Comas-Basté và cs [10] đã chứng minh rằng giá đậu bị úa vàng (nảy mầm trong bóng tối) thể hiện hoạt động xúc tác histamine cao hơn so với giá đậu được trồng trong điều kiện có ánh sáng.

Tuy nhiên, nhiệt độ và độ ẩm cần thiết để hạt nảy mầm tối ưu cũng có thể tạo ra điều kiện thuận lợi cho nấm men và nấm mốc phát triển nhanh, có khả năng ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng giá đậu. Để giải quyết vấn đề này, các phương pháp xử lý khử trùng hạt giống trước khi nảy mầm thường được sử dụng trong ngành nông sản thực phẩm nảy mầm. Tuy nhiên, hiện tại không có dữ liệu nào về tác động của các phương pháp xử lý vệ sinh này đối với hoạt động của enzym DAO của giá đậu.

Như đã đề cập, hoạt động phân hủy histamine của DAO tạo ra hydrogen peroxide như một sản phẩm phụ, nếu dư thừa có thể dẫn đến tổn thương oxy hóa đối với cấu trúc tế bào [1, 16, 17]. Catalase phân hủy hydrogen peroxide thành nước và oxy, có khả năng làm giảm stress oxy hóa. Trong bối cảnh này, một số nhà nghiên cứu đã đề xuất rằng sự hiện diện đồng thời của catalase và hoạt động DAO trong các thành phần hoạt tính có nguồn gốc thực vật có thể giúp làm giảm sự tích tụ dần dần của hydrogen peroxide ở mức độ ruột [1].

Mục tiêu chính của nghiên cứu này là đánh giá tác động của các phương pháp khử trùng khác nhau đối với cả hoạt động của enzym DAO và tỷ lệ nảy mầm ở mầm của bốn loài *Leguminosae*. Ngoài ra, hoạt động catalase của mầm đậu đông khô cũng được đánh giá.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Hóa chất

Axit hydroclorua 0,1 M, dung dịch brij® L23 và phthaldialdehyde (OPA) được lấy từ Merck (Darmstadt, Đức). Natri di-hydro phosphat khan, di-natri hydro phosphat khan, natri hypoclorit, etanol, hydro peroxide 30%, natri axetat khan và axit perchloric được lấy từ PanReac Química (Castellar del Vallès, Tây Ban Nha). Kali hydroxit, 2-mercaptoethanol, muối natri của axit 1-octanesulfonic, axit axetic, axit boric, histamine dihydrochloride, methanol và acetonitril được mua từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Mỹ). Nước siêu tinh khiết (18,2 MΩcm) được tạo ra bằng Hệ thống LaboStar từ Evoqua Water Technologies (Warrendale, PA, Mỹ).

2.2. Các loài cây họ đậu

Bốn loài thực vật ăn được thuộc họ *Leguminosae* được bao gồm: đậu gà (*Cicer arietinum* L.), đậu lăng (*Lens culinaris* Medik.), đậu nành (*Glycine max* (L.) Merr.) và đậu xanh (*Pisum sativum* L.). Những hạt giống cây họ đậu này được mua từ các nhà cung cấp địa phương và được bảo quản trong buồng lạnh khô mát ở nhiệt độ $5 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm tương đối là $55 \pm 2\%$ (Coref, Montgat, Barcelona), tránh thay đổi nhiệt độ đột ngột. Hạt giống được giữ bên trong thùng chứa nguyên bản không trong suốt, được đậy kín đúng cách để bảo vệ chúng khỏi độ ẩm và ánh sáng. Thời gian bảo quản tối đa từ khi mua hạt giống đến khi nảy mầm là một tháng.

2.3. Xử lý khử trùng hạt giống

Tổng cộng 250g hạt giống từ mỗi loài họ đậu được khử trùng trong 500 mL dung dịch nước chứa (a) 70% ethanol hoặc (b) natri hypoclorit ở hai nồng độ khác nhau (70 và 100 mg/L). Một lô đối chứng được xử lý bằng nước cất theo cùng quy trình. Mỗi lần xử lý khử trùng được áp dụng trong hai khoảng thời gian (5 và 15 phút). Hạt giống được đặt trong cốc thủy tinh và liên tục khuấy trong dung dịch khử trùng, sau đó được lọc và rửa sạch năm lần bằng nước cất trước khi nảy mầm.

2.4. Nảy mầm của hạt giống

Sau khi trải qua các lần xử lý khử trùng khác nhau (Mục 2.2), hạt giống được ngâm qua đêm trong nước cất ở nhiệt độ phòng trong bóng tối. Sau khi ngâm, hạt giống được rửa sạch, lọc và đặt trong giá thể cotton trợ để nảy mầm trong buồng có kiểm soát khí hậu (Memmert®, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Đức). Các điều kiện nảy mầm như sau: 5 ngày ở 30°C , độ ẩm tương đối 70% và bóng tối [10]. Trong quá trình nảy mầm, hạt giống được phun nước cất hai lần một ngày. Sau năm ngày, mầm được thu hoạch và sau đó đông lạnh ở -80°C trong tủ đông nhiệt độ cực thấp (NU-99728J, NuAire, Plymouth, MN, Mỹ). Tiếp theo, mầm được sấy đông ở áp suất buồng là 0,22 mbar, với nhiệt độ tăng từ -85°C đến 22°C trong 48 giờ (Cryodos-50, Telstar, Terrassa, Tây Ban Nha). Sau đó, mầm đông khô được nghiền trong cối để thu được sản phẩm đồng nhất.

Để xác định tỷ lệ nảy mầm cho từng điều kiện thí nghiệm, tỷ lệ (tính theo phần trăm) được tính giữa trọng lượng mầm tươi thu được sau khi nảy mầm và trọng lượng hạt khô được sử dụng làm nguyên liệu.

2.5. Xác định hoạt động DAO

Hoạt động DAO của enzym trong ống nghiệm được đo theo giao thức do Comas-Basté và cs vạch ra [18]. Quy trình này đánh giá sự phân hủy histamine trong quá trình khử amin oxy hóa do enzym DAO làm trung gian, sử dụng xét nghiệm enzym kết hợp với sắc ký lỏng hiệu suất cực cao và phát hiện huỳnh quang (UHPLC-FL).

Đối với xét nghiệm, 10 mg giá đậu đông khô được trộn với 20 mL dung dịch đệm phosphat 50mM (pH 7,2) và ủ trong máy lắc (NB-T205, N-BIOTEK, Inc., Bucheon-si, Hàn Quốc) ở 37°C và 200 vòng/phút trong 30 phút. Phản ứng được bắt đầu bằng cách thêm $45\mu\text{M}$ dung dịch chuẩn histamine và hỗn hợp được ủ liên tục (37°C , 200 vòng/phút). Các phần $500\mu\text{L}$ được chiết xuất mỗi 60 phút trong bốn giờ đầu tiên để theo dõi quá trình phân hủy histamine trong suốt phản ứng. Tại mỗi điểm phân tích, $15\mu\text{L}$ dung dịch axit perchloric 2N được thêm vào để dừng phản ứng enzym và mẫu được đồng nhất hóa và ly tâm trong 5 phút (15.000 vòng/phút, 4°C). Phần chất lỏng trong được đưa qua bộ lọc GHP $0,22\mu\text{m}$ và giữ ở 4°C cho đến khi phân tích UHPLC-FL.

Phân tích UHPLC-FL

Xác định histamine được thực hiện bằng cách sử dụng UHPLC-FL pha đảo ngược cặp ion, kết hợp dẫn xuất hóa sau cột trực tuyến với OPA theo phương pháp do Latorre-Moratalla và cs mô tả [19]. UHPLC-FL được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị sắc ký lỏng hiệu suất cực cao Waters Acquity™ được trang bị bơm bậc bốn, bộ lấy mẫu tự động và đầu dò huỳnh quang. Đối với quá trình dẫn xuất histamine sau cột, một máy bơm bổ sung được kết nối với bộ trộn thể tích chết bằng OT được đặt giữa đầu ra của cột và máy dò huỳnh quang. Quá trình tách sắc ký được thực hiện trên cột Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μ m, 2,1mm \times 50mm) (Waters Corp., Milford, MA, Mỹ), được giữ trong lò để duy trì nhiệt độ ổn định (42°C). Thu thập và xử lý dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm Empower™ 3 (Waters Corp., Milford, MA, Mỹ).

Các điều kiện sắc ký như sau: pha động được cung cấp với tốc độ dòng chảy là 0,8 mL/phút, trong khi thuốc thử dẫn xuất được bơm với tốc độ 0,4 mL/phút. Thành phần cụ thể của pha động và thuốc thử dẫn xuất OPA đã được Latorre-Moratalla và cs tìm ra [19]. Đã thực hiện tiêm tự động 1 μ L dung dịch chuẩn và mẫu. Phát hiện huỳnh quang được tiến hành với bước sóng kích thích là 340 nm và bước sóng phát xạ là 445 nm. Một ví dụ về sắc ký đồ UHPLC-FL được cung cấp trong Tài liệu bổ sung (Hình bổ sung S1).

Hoạt động của enzym DAO tương ứng với độ dốc của đường thu được bằng cách vẽ biểu đồ diễn biến của lượng histamine còn lại (tính bằng nmol) theo các thời điểm lấy mẫu khác nhau (tính bằng phút). Hoạt động DAO này được chia cho lượng mẫu giá đậu đông khô để thu được hoạt động của enzym cụ thể, được biểu thị bằng mU/mg, tương ứng với lượng histamine bị phân hủy bởi một miligam giá đậu đông khô mỗi phút (nmol histamine bị phân hủy mỗi phút/mg mẫu).

2.6. Xác định hoạt động của Catalase

Phân tích hoạt động của catalase được thực hiện bằng cách theo dõi tốc độ biến mất của một lượng hydrogen peroxide đã biết theo phương pháp do Leonida và cs phát triển [17]. Tóm lại, 10mg mẫu được đồng nhất hóa với 500 μ L dung dịch đệm phosphat 0,05M (pH 7,2) bằng máy lắc xoay trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các mẫu được ly tâm trong 20 phút ở tốc độ 14.000 vòng/phút và 20°C. Thử nghiệm hoạt động catalase được thực hiện bằng cách trộn 10 μ L hỗn hợp mẫu này với 2,99mL dung dịch phản ứng catalase bao gồm 15mM hydrogen peroxide (30%) trong đệm kali phosphat 50mM (pH 7,2). Sự biến mất của hydrogen peroxide được theo dõi bằng cách đo độ hấp thụ ở 240nm trong 10 phút, sử dụng đệm phosphat 0,05M làm mẫu trắng. Hoạt động catalase được biểu thị bằng nmol/phút/mg.

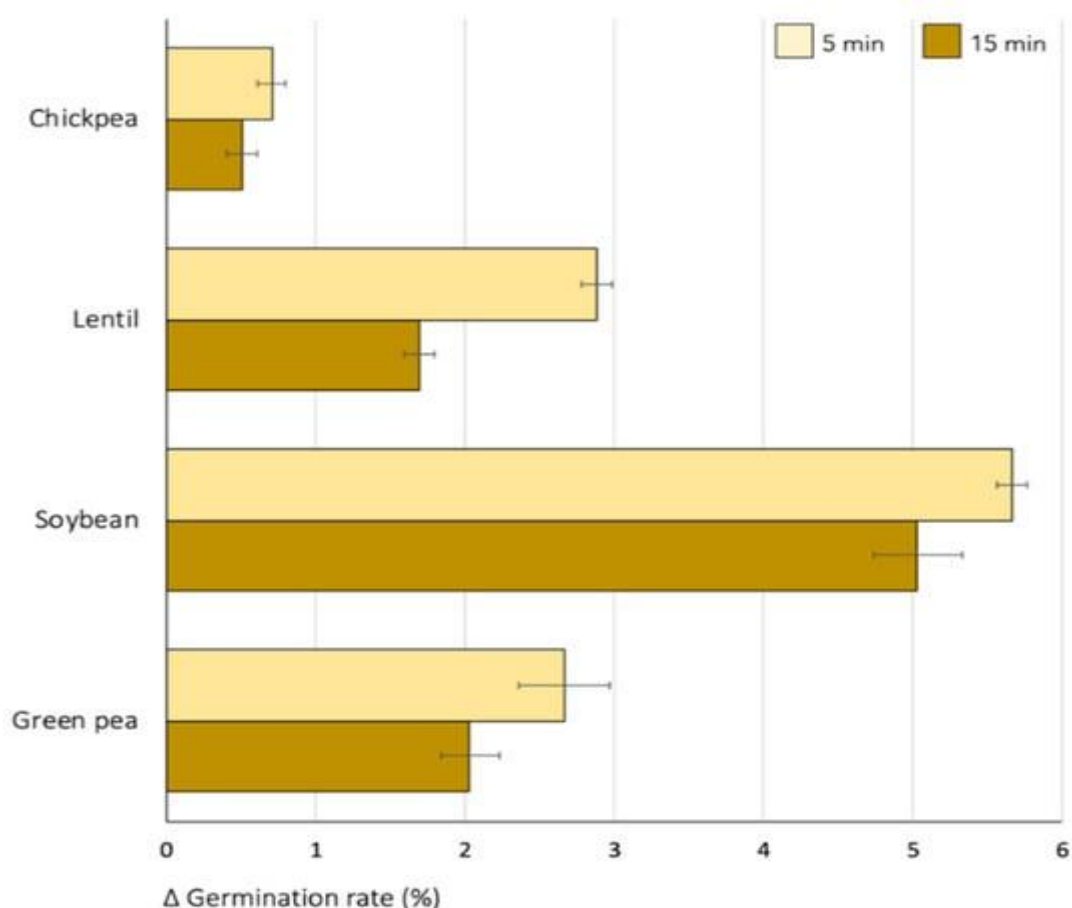
2.7. Phân tích thống kê

Phân tích dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm IBM SPSS Statistics 27.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, Mỹ). Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (trung bình \pm SD) từ hai thí nghiệm độc lập được thực hiện theo cặp. Để đánh giá ý nghĩa thống kê của những thay đổi trong hoạt động của enzym trong các điều kiện khác nhau, kiểm định Mann-Whitney U phi tham số đã được sử dụng. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của các phương pháp khử trùng hạt giống khác nhau

Khử trùng hạt giống bằng 70% ethanol dẫn đến tỷ lệ nảy mầm tăng nhẹ. Hình 1 cho thấy những thay đổi về tỷ lệ nảy mầm của hạt giống sau khi áp dụng phương pháp xử lý này trong 5 hoặc 15 phút so với hạt giống không được xử lý. Tác động đến tỷ lệ nảy mầm thay đổi tùy thuộc vào loài được trồng, với sự cải thiện đáng kể nhất được quan sát thấy ở hạt đậu nành được xử lý bằng ethanol, cho thấy trọng lượng giá tươi tăng 6%. Ngược lại, giá đậu lăng và giá đậu xanh chỉ cho thấy tỷ lệ nảy mầm tăng 2–3% so với hạt không được xử lý, thậm chí còn thấp hơn ở đậu gà (khoảng 0,5%).

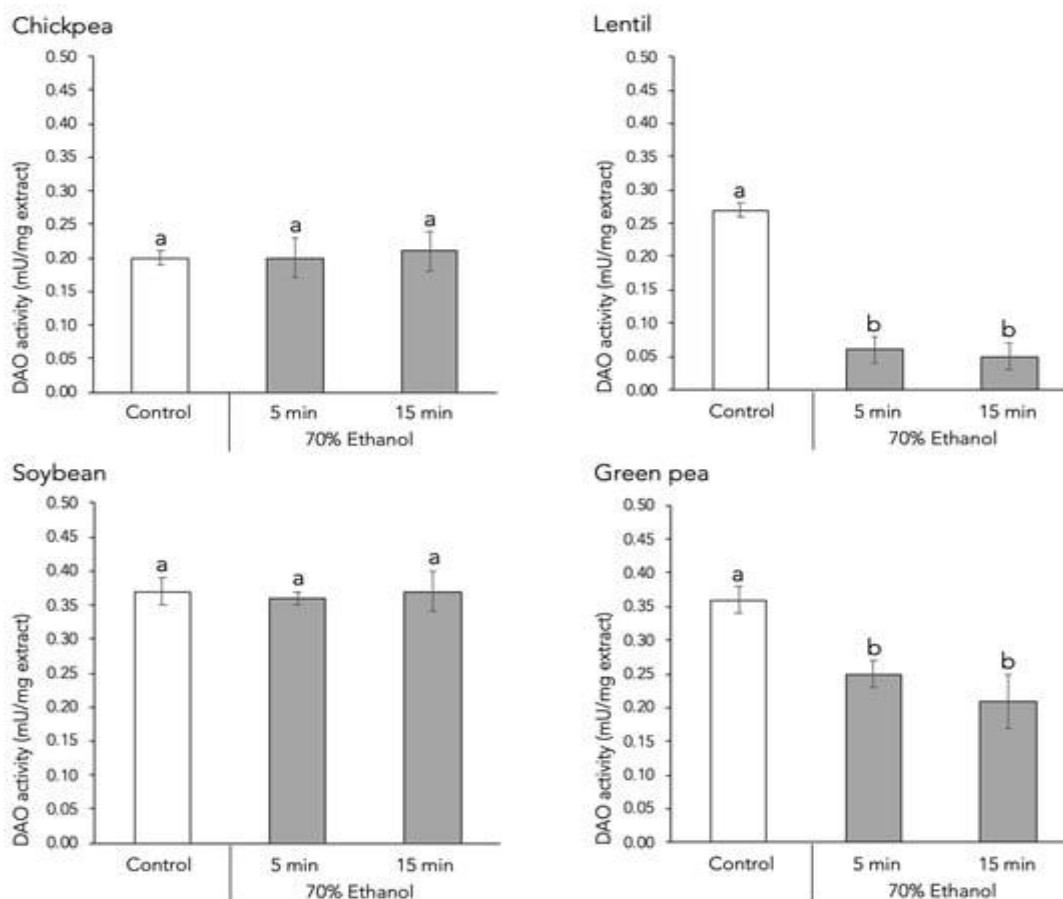


Hình 1. Ảnh hưởng của việc khử trùng hạt giống bằng 70% ethanol lên tỷ lệ nảy mầm của bốn loài giá đậu đông khô. Trục ngang cho thấy sự thay đổi về tỷ lệ nảy mầm sau khi khử trùng hạt giống so với giá đậu thu được từ hạt chưa qua xử lý.

Thời gian xử lý khử trùng là một biến quan trọng khác. Trong mọi trường hợp, thời gian áp dụng dài hơn có liên quan đến sự gia tăng nhỏ hơn về tỷ lệ nảy mầm, đây là một mô hình được quan sát thấy trong các nghiên cứu khác. Ví dụ, S. Santos và cs [20] đã thu được tỷ lệ nảy mầm thỏa đáng ở các giống đậu lăng khác nhau khi sử dụng 70% ethanol trong 5 phút. Ngược lại, Afzal và cs [21] đã báo cáo các tác động độc hại tiềm ẩn của việc tiếp xúc lâu dài với ethanol ở hạt cà chua, trong đó chiều dài giá đậu giảm sau 24 giờ xử lý, ngay cả ở nồng độ thấp hơn.

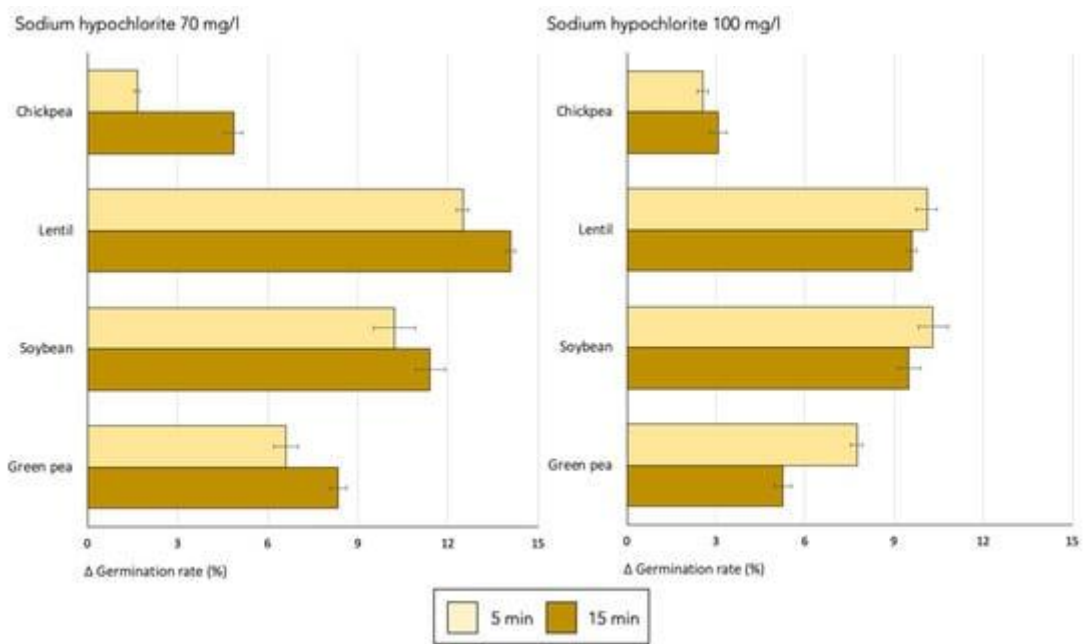
Về hoạt động phân hủy histamine trong ống nghiệm, xử lý ethanol không có tác dụng quan sát được, dù là tích cực hay tiêu cực, đối với giá đậu gà và giá đậu tương bất kể thời gian áp dụng (Hình 2). Tuy nhiên, khử trùng hạt bằng ethanol dẫn đến giảm đáng kể về mật thống kê ($p < 0,05$) hoạt động DAO trong giá đậu lăng và giá đậu xanh khi áp dụng trong 5 hoặc 15 phút, không có sự khác biệt đáng kể về mật thống kê giữa hai khoảng thời gian này. Tác động tiêu cực của ethanol đặc biệt rõ rệt ở giá đậu lăng, trong đó hoạt động DAO giảm khoảng 80% so với lô đối chứng. Phản ứng khác nhau của các loài thực

vật đối với khử trùng ethanol có thể là do sự thay đổi về kích thước hạt và diện tích tiếp xúc bề mặt, trong đó các hạt nhỏ hơn như đậu lăng bị ảnh hưởng nhiều nhất do tỷ lệ diện tích bề mặt trên thể tích cao hơn. Cho đến nay, có rất ít nghiên cứu khám phá tác động của khử trùng hạt bằng ethanol đối với hoạt động của enzyme trong giá đậu và không có nghiên cứu nào tập trung vào DAO. Năm 2013, Afzal và cs [21] đã báo cáo rằng việc sử dụng 6% ethanol trong 24 giờ làm giảm cả hoạt động của catalase và peroxide dismutase trong hạt cà chua.



Hình 2. Tác động của xử lý khử trùng hạt bằng ethanol 70% lên hoạt động của enzyme DAO ở bốn loài giá đậu đông khô. Các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức khử trùng.

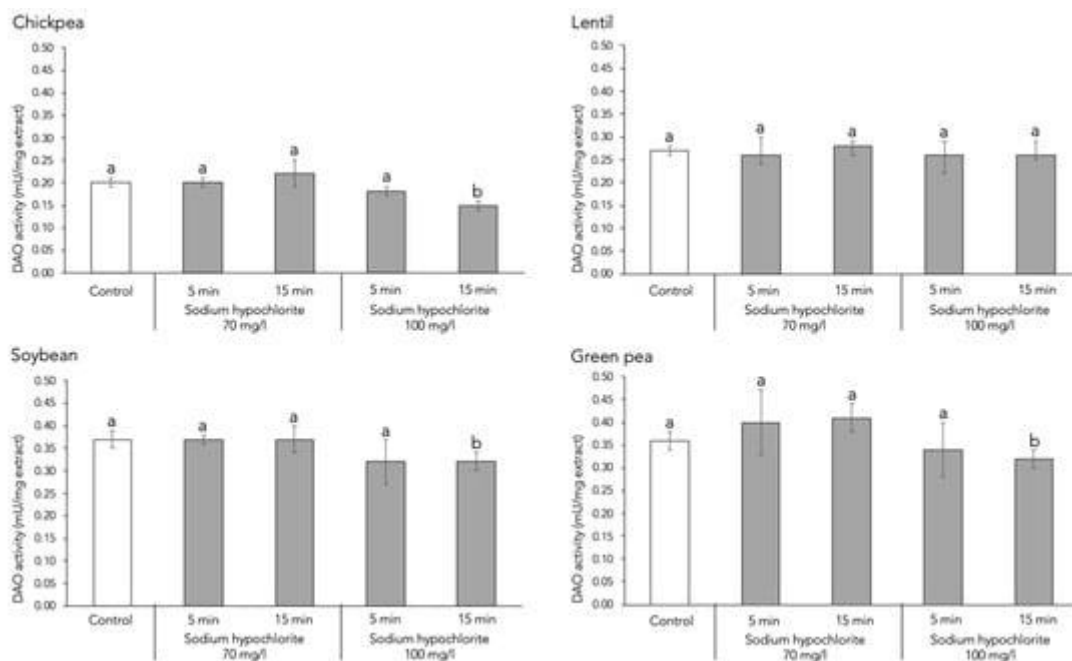
Việc khử trùng hạt trước đó bằng natri hypoclorit làm tăng tỷ lệ nảy mầm ở tất cả các loài đậu được nghiên cứu (Hình 3). Tương tự như xử lý bằng ethanol, tác động thay đổi tùy thuộc vào loại hạt và thời gian khử trùng; tuy nhiên, trong trường hợp này, nồng độ chất khử trùng cũng là một yếu tố có ảnh hưởng. Ở tất cả các loài, natri hypoclorit có tác động rõ rệt hơn đến tỷ lệ nảy mầm so với ethanol 70%. Giống như trong xử lý bằng ethanol, tỷ lệ nảy mầm tăng nhỏ nhất được quan sát thấy ở đậu gà và đậu xanh với mức tăng lần lượt là 5% và 8%, so với 11% và 14% ở hạt đậu nành và hạt đậu lăng.



Hình 3. Tác động của việc khử trùng hạt giống bằng natri hypoclorit ở hai nồng độ, 70 mg/L và 100 mg/L, lên tỷ lệ nảy mầm của bốn loài giá đậu đông khô. Trục ngang cho thấy sự thay đổi về tỷ lệ nảy mầm sau khi khử trùng so với hạt giống không qua xử lý.

Khi so sánh hai nồng độ natri hypoclorit, 70 mg/L thường cho hiệu suất nảy mầm tốt hơn so với đối chứng. Ở nồng độ này, thời gian xử lý dài hơn dẫn đến tỷ lệ nảy mầm tăng cao hơn, đặc biệt là ở đậu gà và đậu xanh ($p < 0,05$). Ở nồng độ cao hơn là 100 mg/L, việc kéo dài thời gian xử lý không ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ nảy mầm, ngoại trừ ở đậu xanh, tỷ lệ này giảm đáng kể (lên đến 32%). Cũng giống như trường hợp của etanol, có rất ít nghiên cứu trong tài liệu khoa học điều tra ảnh hưởng của natri hypoclorit lên tỷ lệ nảy mầm của giá đậu. Tornuk và cs [22] đã báo cáo sự cải thiện về tỷ lệ nảy mầm của hạt lúa mì (*Triticum aestivum*) sau 30 phút khử trùng bằng natri hypoclorit ở nồng độ 100 mg/L và 200 mg/L. Tuy nhiên, tác dụng tích cực này đã mất đi khi nồng độ tăng lên 400 mg/L.

Về hoạt động DAO, xử lý hạt bằng natri hypoclorit ở nồng độ 70 mg/L trong 5 hoặc 15 phút không ảnh hưởng đến khả năng phân hủy histamine trong ống nghiệm của bất kỳ mầm cây họ đậu nào được nghiên cứu (Hình 4). Tương tự như vậy, việc sử dụng 100 mg/L natri hypoclorit trong 5 phút không ảnh hưởng đến hoạt động DAO. Tuy nhiên, khi thời gian khử trùng được kéo dài đến 15 phút ở nồng độ cao hơn này, hoạt động DAO không những không tăng mà thậm chí còn giảm ở ba trong số bốn loài họ đậu ($p < 0,05$). Có khả năng natri hypoclorit, ở một số nồng độ và thời gian tiếp xúc nhất định, làm thay đổi các đặc tính của màng tế bào, có thể ảnh hưởng xấu đến các hoạt động trao đổi chất của tế bào [23]. Tuy nhiên, người ta biết rất ít về tác động sinh hóa của natri hypoclorit lên hoạt động của enzym. Một kịch bản khác đã được Kaneko và Morohashi quan sát, họ đã báo cáo về việc kích hoạt hoạt động α -amylase trong lá mầm của đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) và đậu xanh sau khi khử trùng hạt trong 8 phút bằng natri hypoclorit ở nồng độ cao hơn tới 25 lần so với nồng độ trong nghiên cứu hiện tại [23]. Đáng chú ý là các nồng độ này vượt xa mức tối đa được phép sử dụng natri hypoclorit làm chất khử trùng trong thực phẩm có nguồn gốc thực vật [24].



Hình 4. Tác dụng của việc khử trùng hạt bằng natri hypoclorit đối với hoạt động của enzym DAO trong bốn loài giá đậu đông khô. Các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức khử trùng.

Trong quá trình sản xuất giá đậu ăn được, việc lựa chọn chất khử trùng hiệu quả cùng với các thông số xử lý thích hợp (thời gian và nồng độ) là điều cần thiết để đảm bảo cây trồng phát triển tối ưu, tỷ lệ nảy mầm cao và kiểm soát lượng vi khuẩn. Không có phương pháp khử trùng nào phù hợp với tất cả các loại cây [25]. Một số nghiên cứu đã sử dụng dung dịch nước có 70% ethanol và nhiều nồng độ natri hypoclorit khác nhau làm chất khử trùng bề mặt để hạt nảy mầm [21,22,26]. Cả ethanol và natri hypoclorit không chỉ ức chế sự phát triển của nấm mốc trong quá trình nảy mầm mà còn được cho là có tác dụng kích thích nảy mầm hoặc phá vỡ trạng thái ngủ đông của hạt giống. Ví dụ, Kaneko và Morohashi [23] phát hiện ra rằng natri hypoclorit có thể làm mòn một phần lớp vỏ hạt, do đó tăng khả năng thẩm oxy của nó. Các kết quả thu được trong nghiên cứu hiện tại chứng minh tiềm năng của ethanol và natri hypoclorit trong việc kích thích nảy mầm của hạt giống bốn loài họ đậu được thử nghiệm.

Nhìn chung, quá trình khử trùng có thể có tác động đáng kể đến hiệu suất nảy mầm và thậm chí cả quá trình trao đổi chất của hạt. Do đó, việc lựa chọn phương pháp xử lý vệ sinh hạt giống phù hợp nhất là điều cần thiết để tối đa hóa tỷ lệ nảy mầm trong khi vẫn bảo toàn chức năng enzym của mầm thu được. Theo kết quả nghiên cứu này, khử trùng hạt giống bằng 70 mg/L natri hypoclorit trong 15 phút đã làm tăng tỷ lệ nảy mầm của giá cây họ đậu mà không ảnh hưởng tiêu cực đến hoạt động của enzym DAO.

3.2. Hoạt động của Catalase

Trong nghiên cứu này, hoạt động catalase được đo trong giá đông khô của bốn loài cây họ đậu thu được sau khi nảy mầm, sau khi khử trùng trước bằng 70 mg/L natri hypoclorit trong 15 phút. Phương pháp xử lý này được lựa chọn vì nó mang lại tỷ lệ nảy mầm cao hơn mà không ảnh hưởng xấu đến hoạt động DAO của giá.

Tất cả các loại giá đậu đông khô được thử nghiệm đều thể hiện hoạt tính catalase, với sự khác biệt được quan sát thấy giữa bốn loài. Giá đậu xanh cho thấy hoạt tính catalase cao nhất, cao gấp 4 lần so với các loài khác. Phát hiện này phù hợp với nghiên cứu trước đây của Luhová và cs [27], người đã quan sát thấy mức độ hoạt động catalase tương tự trong

giá đậu từ 13 giống đậu xanh khác nhau nảy mầm trong bóng tối. Hơn nữa, Luhová và cs lưu ý rằng hoạt động của enzyme này tăng gấp 1 – 3 lần khi hạt nảy mầm trong điều kiện quang kỳ 12 giờ [27]. Mẫu này trái ngược với hành vi của enzyme DAO, được chứng minh là hoạt động mạnh hơn đáng kể trên giá nảy mầm trong bóng tối [10]. Về tác động của việc khử trùng hạt giống, xử lý bằng dung dịch nước có chứa 70 mg/L natri hypoclorit trong 15 phút không ảnh hưởng đến hoạt động catalase của mầm đông khô (Bảng 1) ($p > 0,05$).

Bảng 1. Hoạt động catalase (trung bình \pm độ lệch chuẩn) của giá đậu đông khô thu được có và không có xử lý khử trùng hạt giống trước đó bằng natri hypoclorit ở nồng độ 70 mg/L trong 15 phút.

	Hoạt động của Catalas (nmol/min/mg)		Giá trị p
	Không xử lý	Xử lý 70 mg/L natri hypoclorit trong 15 phút	
Đậu gà	15.14 \pm 6.30	15.37 \pm 2.61	$p = 0.928$
Đậu lăng	37.84 \pm 0.97	35.09 \pm 3.83	$p = 0.106$
Đậu nành	30.98 \pm 2.43	31.19 \pm 4.88	$p = 0.805$
Đậu xanh	65.02 \pm 2.10	56.65 \pm 11.43	$p = 0.153$

4. KẾT LUẬN

Nhìn chung, những kết quả này chứng minh rằng việc kết hợp bước xử lý khử trùng hạt giống trong quá trình nảy mầm của giá đậu ăn được có thể ảnh hưởng đáng kể đến cả tỷ lệ nảy mầm và hoạt động của enzyme DAO. Cụ thể, trong khi khử trùng hạt giống trước đó bằng 70% ethanol trong 5 hoặc 15 phút ảnh hưởng tiêu cực đến hoạt động phân hủy histamine của một số giá đậu, thì việc xử lý bằng dung dịch nước có 70 mg/L natri hypoclorit trong 15 phút đã làm tăng năng suất nảy mầm mà không làm suy yếu hoạt động của DAO. Ngoài ra, phương pháp vệ sinh này bảo toàn hoạt động của catalase trong tất cả các giá đậu đông khô đã thử nghiệm, với hoạt động cao đáng chú ý được quan sát thấy ở giá đậu xanh. Những phát hiện mới này liên quan đến tác động của việc khử trùng hạt giống đối với hoạt động của DAO trong các loại đậu ăn được đặc biệt có giá trị đối với việc sản xuất DAO có nguồn gốc thực vật. Enzyme này là một thành phần hoạt tính đầy hứa hẹn để tạo thành các chất bổ sung thực phẩm nhằm mục đích kiểm soát chế độ ăn uống của chúng không dung nạp histamine. Hơn nữa, việc bảo toàn hoạt động của catalase cho thấy những lợi ích bổ sung tiềm năng, vì catalase được biết đến với vai trò bảo vệ tế bào khỏi tổn thương oxy hóa. Do đó, việc thực hiện một quy trình khử trùng hạt giống hiệu quả bằng natri hypoclorit (70 mg/L) không chỉ giúp tăng tỷ lệ nảy mầm mà còn duy trì hoạt động phân hủy histamine của giá đậu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chomdom Kounga, P.; Tchoumi Neree, A.; Pietrangeli, P.; Marcocci, L.; Mateescu, M.A. Faster and Sensitive Zymographic Detection of Oxidases Generating Hydrogen Peroxide. The Case of Diamine Oxidase. *Anal. Biochem.* **2022**, *648*, 114676. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Strnad, J.; Soral, M.; Šebela, M. A New Activity Assay Method for Diamine Oxidase Based on Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Molecules* **2024**, *29*, 4878. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hrubisko, M.; Danis, R.; Huorka, M.; Wawruch, M. Histamine Intolerance – The More We Know the Less We Know. A Review. *Nutrients* **2021**, *13*, 2228. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Schnedl, W.J.; Enko, D. Histamine Intolerance Originates in the Gut. *Nutrients* **2021**, *13*, 1262. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
5. Jochum, C. Histamine Intolerance: Symptoms, Diagnosis, and Beyond. *Nutrients* **2024**, *16*, 1219. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
6. Zhao, Y.; Zhang, X.; Jin, H.; Chen, L.; Ji, J.; Zhang, Z. Histamine Intolerance—A Kind of Pseudoallergic Reaction. *Biomolecules* **2022**, *12*, 454. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
7. Comas-Basté, O.; Sánchez-Pérez, S.; Veciana-Nogués, M.T.; Latorre-Moratalla, M.; Vidal-Carou, M.d.C. Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1181. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. European Union. Commission Implementing Regulation (EU) 2017/2470—Of 20 December 2017—Establishing the Union List of Novel Foods in Accordance with Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council on Novel Foods. *Off. J. Eur. Union* **2017**, *L 351*, 72–201. [[Google Scholar](#)]
9. Costa-Catala, J.; Pellicer-Roca, S.; Iduriaga-Platero, I.; Sánchez-Pérez, S.; Veciana-Nogués, M.T.; Latorre-Moratalla, M.L.; Vidal-Carou, M.C.; Comas-Basté, O. Impact of Technological Factors on Diamine Oxidase (DAO) Activity in Porcine Kidney Extracts as Active Ingredient for the Dietary Management of Histamine Intolerance. *Appl. Food Res.* **2024**, *4*, 100592. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
10. Comas-Basté, O.; Latorre-Moratalla, M.L.; Rabell-González, J.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C. Lyophilised Legume Sprouts as a Functional Ingredient for Diamine Oxidase Enzyme Supplementation in Histamine Intolerance. *LWT* **2020**, *125*, 109201. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
11. Megoura, M.; Ispas-Szabo, P.; Mateescu, M.A. Enhanced Stability of Vegetal Diamine Oxidase with Trehalose and Sucrose as Cryoprotectants: Mechanistic Insights. *Molecules* **2023**, *28*, 992. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Boulfekhar, R.; Ohlund, L.; Kumaresan, K.M.; Megoura, M.; Warkentin, T.D.; Ispas-Szabo, P.; Sleno, L.; Mateescu, M.A. Diamine Oxidase as a Therapeutic Enzyme: Study of Germination from Vegetal Sources and Investigation of the Presence of β -N-Oxalyl-L- α,β -Diaminopropionic Acid (β -ODAP) Using LC-MS/MS. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4625. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Neree, A.T.; Pietrangeli, P.; Szabo, P.I.; Mateescu, M.A.; Marcocci, L. Stability of Vegetal Diamine Oxidase in Simulated Intestinal Media: Protective Role of Cholic Acids. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 12657–12665. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Yang, R.; Chen, H.; Gu, Z. Factors Influencing Diamine Oxidase Activity and γ -Aminobutyric Acid Content of Fava Bean (*Vicia faba* L.) during Germination. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 11616–11620. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
15. Laurenzi, M.; Tipping, A.J.; Marcus, S.E.; Knox, P.J.; Federico, R.; Angelini, R.; McPherson, M.J. Analysis of the Distribution of Copper Amine Oxidase in Cell Walls of Legume Seedlings. *Planta* **2001**, *214*, 37–45. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
16. Calinescu, C.; Mondovi, B.; Federico, R.; Ispas-Szabo, P.; Mateescu, M.A. Carboxymethyl Starch: Chitosan Monolithic Matrices Containing Diamine Oxidase and Catalase for Intestinal Delivery. *Int. J. Pharm.* **2012**, *428*, 48–56. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
17. Leonida, M.; Belbekhouche, S.; Adams, F.; Bijja, U.K.; Choudhary, D.-A.; Kumar, I. Enzyme Nanovehicles: Histaminase and Catalase Delivered in Nanoparticulate Chitosan. *Int. J. Pharm.* **2019**, *557*, 145–153. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
18. Comas-Basté, O.; Latorre-Moratalla, M.L.; Sánchez-Pérez, S.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C. In Vitro Determination of Diamine Oxidase Activity in Food Matrices by an Enzymatic Assay Coupled to UHPLC-FL. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 7595–7602. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
19. Latorre-Moratalla, M.L.; Bosch-Fusté, J.; Lavizzari, T.; Bover-Cid, S.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C. Validation of an Ultra High Pressure Liquid Chromatographic Method for the Determination of Biologically Active Amines in Food. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7715–7720. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
20. S. Santos, C.; Silva, B.; M.P. Valente, L.; Gruber, S.; W. Vasconcelos, M. The Effect of Sprouting in Lentil (*Lens culinaris*) Nutritional and Microbiological Profile. *Foods* **2020**, *9*, 400. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Afzal, I.; Munir, F.; Ayub, C.M.; Basra, S.M.A.; Hameed, A.; Shah, F. Ethanol Priming: An Effective Approach to Enhance Germination and Seedling Development by Improving Antioxidant System in Tomato Seeds. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* **2013**, *12*, 129–137. [[Google Scholar](#)]
22. Tornuk, F.; Ozturk, I.; Sagdic, O.; Yetim, H. Determination and Improvement of Microbial Safety of Wheat Sprouts with Chemical Sanitizers. *Foodborne Pathog. Dis.* **2011**, *8*, 503–508. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kaneko, Y.; Morohashi, Y. The Effect of Sodium Hypochlorite Treatment on the Development of α -Amylase Activity in Mung Bean Cotyledons. *Plant Sci.* **2003**, *164*, 287–292. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
24. BOE-A-2023-20563 Real Decreto 773/2023, de 3 de Octubre, Por El Que Se Regulan Los Coadyuvantes Tecnológicos Utilizados En Los Procesos de Elaboración y Obtención de Alimentos. Available online: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2023-20563> (accessed on 30 September 2024).
25. Davoudpour, Y.; Schmidt, M.; Calabrese, F.; Richnow, H.H.; Musat, N. High Resolution Microscopy to Evaluate the Efficiency of Surface Sterilization of *Zea mays* Seeds. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0242247. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Guidance for Industry: Reducing Microbial Food Safety Hazards in the Production of Seed for Sprouting. Available online: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-reducing-microbial-food-safety-hazards-production-seed-sprouting> (accessed on 16 May 2024).
27. Luhová, L.; Lebeda, A.; Hedererová, D.; Peč, P. Activities of Amine Oxidase, Peroxidase and Catalase in Seedlings of *Pisum sativum* L. under Different Light Conditions. *Plant Soil Environ.* **2003**, *49*, 151–157. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]