

NGHIÊN CỨU CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG TỚI QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN PROTEIN TỪ LÁ CHÙM NGÂY BẰNG PHƯƠNG PHÁP ENZYME

Đỗ Thị Thanh Huyền¹, Nguyễn Mạnh Đạt², Đỗ Thị Thủy Lê², Bùi Thị Hồng Phương¹, Nguyễn Thị Hồng Linh¹, Chu Thắng³

Protein thủy phân từ thực vật ngày càng được quan tâm do quá trình thủy phân đã cải thiện được đặc tính mong muốn mà không ảnh hưởng đến giá trị dinh dưỡng ban đầu vốn có của nguyên liệu. Lá chùm ngây chứa nguồn protein phong phú được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu để thủy phân thành các thành phần có kích thước phân tử nhỏ hơn. Nghiên cứu tiền hành xác định một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân protein từ lá chùm ngây bằng phương pháp enzyme. Protein sau khi kết tủa được thủy phân ở điều kiện nồng độ enzyme nhiệt độ, pH và thời gian phản ứng thích hợp. Quá trình thủy phân được đánh giá thông qua chỉ số độ thủy phân (DH). Kết quả cho thấy sử dụng kết hợp enzyme endopeptidase (alcalase) và exopeptidase (flavourzyme) để thủy phân protein từ lá chùm ngây gồm hai giai đoạn (giai đoạn 1: nồng độ alcalase 0,6 AU/g protein; nhiệt độ 50°C; pH 8,0; thời gian 3 giờ; giai đoạn 2: nồng độ flavourzyme 15 LAU/g protein; nhiệt độ 50°C; pH 6,5; thời gian 4 giờ), độ thủy phân DH đạt 63,7%. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể sử dụng kết hợp alcalase và flavourzyme để thủy phân protein từ lá chùm ngây nhằm nâng cao khả năng dễ hấp thụ của protein hơn.

Từ khóa: Lá chùm ngây, thủy phân protein, alcalase, flavourzyme, chỉ số độ thủy phân.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chùm ngây (*Moringa oleifera* Lam.) thuộc họ Moringaceae, là một cây phát triển nhanh phổ biến rộng rãi ở các vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và có ứng dụng quan trọng trong ngành thực phẩm và ngành công nghiệp y tế. Lá chùm ngây có chứa nguồn protein chất lượng cao (12-22% protein), đặc biệt có chứa một lượng lớn các axit amin không thay thế như: isoleucine, leucine, lysine, tryptophan, threonine lần lượt là 4,44; 5,83; 3,31; 7,0; 3,28% [1]. Tuy nhiên, protein của chùm ngây được cho là khó tiêu hóa đối với người già, trẻ em, vì phần lớn protein từ chùm ngây khó hòa tan được bằng dung dịch nước bình thường do protein tồn tại dạng lectin được liên kết bởi các disulfide

chặt chẽ [2].

Thủy phân protein từ lá chùm ngây bằng phương pháp enzyme sẽ phân tách protein thành các polypeptide, peptide, axit amin cơ thể dễ dàng hấp thụ hơn, sử dụng cho các đối tượng ăn kiêng, kém tiêu hóa, khả năng hấp thụ chất đạm kém, dị ứng thực phẩm... Thành phần axit amin của protein thủy phân có thể được định lượng thông qua tỷ lệ các liên kết peptide bị phân tách bằng cách xác định độ thủy phân DH [3]. Một số enzyme thương phẩm thuộc nhóm enzyme endopeptidase và exopeptidase như alcalase, neutrase, flavourzyme, protamex... đã được sử dụng nhằm mở rộng phạm vi sử dụng protein thực vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày

¹ThS - Viện Công Nghiệp Thực Phẩm
Email: huyenfiri@gmail.com

²TS - Viện Công Nghiệp Thực Phẩm

³KS - Viện Công Nghiệp Thực Phẩm

Ngày nhận bài: 5/1/2018

Ngày phản biện đánh giá: 15/1/2018

Ngày đăng bài: 5/3/2018

các kết quả nghiên cứu xác định một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân protein từ lá chùm ngây bằng phương pháp enzyme.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Lá chùm ngây được thu mua tại Chương Mỹ, Hà Nội, rửa sạch phơi khô trong bóng mát và bảo quản trong tủ lạnh khi chưa sử dụng.

Enzyme (Novo-Đan Mạch): alcalase (endopeptidase) từ *Bacillus licheniformis* hoạt tính là $\geq 2,4$ AU/g và flavourzyme (exopeptidase) từ *Aspergillus oryzae* hoạt tính ≥ 1000 LAPU/g.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp công nghệ

2.2.1.1. Phương pháp thu nhận protein lá chùm ngây

Lá chùm ngây, ngâm nước và được nghiền nhỏ bằng máy xay, hỗn dịch được bổ sung NaOH 0,06M, tỉ lệ dung dịch kiềm/nguyên liệu 35:1, nhiệt độ 40°C và thời gian 60 phút, khuấy đều và ly tâm bỏ bã thu dịch. Dịch lọc có chứa protein được chỉnh về pH 4,5 bằng HCl 1M, khuấy đều trong 10 phút. Ly tâm, thu cặn và rửa lại nhiều lần bằng nước cất, thu protein thô [4].

2.2.1.2. Phương pháp làm sạch protein

Dịch protein sau quá trình trích ly tiến hành làm sạch protein bằng kết tủa với ammonium sulfate 70% độ bão hòa, để lắng qua đêm ở 4°C, tạo kết tủa hoàn toàn. Hỗn hợp sau kết tủa được ly tâm với tốc độ 10000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút. Kết tủa sau đó được hòa tan trở lại bằng dung dịch đệm Na-acetate pH 7,0 và thẩm tích trong thời gian 2 giờ để loại bỏ muối.

2.2.1.3. Phương pháp thủy phân protein chùm ngây

Sử dụng kết hợp hai enzyme endopeptidase và exopeptidase theo 2 giai đoạn thủy phân ở các điều kiện tỷ lệ enzyme nhiệt độ, thời gian, pH ban đầu thích hợp. Kết thúc quá trình thủy phân, bất hoạt enzyme ở 85°C trong 10 phút, sau đó làm mát, dịch sau quá trình thủy phân ly tâm 8000v/ph trong 10 phút. Dịch phía trên có chứa protein thủy phân sấy đông khô và được bảo quản trong 4°C [1].

2.2.2. Phương pháp phân tích

2.2.2.1. Phương pháp xác định hàm lượng protein theo Bradford (1976) [5]

2.2.2.2. Xác định hàm lượng chất béo theo AOAC 920.39 (2000) [6]

2.2.2.3. Phương pháp xác định mức độ thủy phân protein

Mức độ thủy phân protein được xác định bởi giá trị DH (%) theo phương pháp của Nielsen [3]. Phản ứng được tiến hành 0,4 ml mẫu hòa tan với 3ml dung dịch OPA (7,620g di-Na-tetraborate + 200mg SDS+ 176mg DTT+ 160mg OPA), phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 phút. Đo quang tại 340nm và giá trị DH được tính theo các bước sau:

$$\text{Serine-NH}_2 = \frac{[(\text{ODmẫu} - \text{ODblank}) / (\text{ODstandard} - \text{ODblank})] * 0,9516 \text{ meqv/L} * 0,1 * 100}{X * P}$$

Trong đó serine-NH₂ = meqv serine NH₂/g protein

X = g mẫu; P = protein % có trong mẫu; 0,1 là lượng mẫu/1lít

Giá trị h = (serine-NH₂-β)/αmeqv/g protein,

Đối với protein thực vật α = 0,970, β = 0,342, h_{tot} = 7,8. Giá trị DH được tính theo công thức DH (%) = h/h_{tot} * 100%.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Nghiên cứu thu nhận protein từ lá chùm ngây

Với mục đích trích ly thu protein có nồng độ cao và loại bỏ tạp chất, tiến hành trích ly bằng dung dịch NaOH, làm sạch protein bằng kết tủa với ammonium sulfate kết quả được trình bày ở bảng 1.

Kết quả bảng 1, sau quá trình kết tủa, dịch kết tủa có hàm lượng protein tăng từ 27,5% lên 68,34% và đặc biệt hàm lượng chất béo giảm nhiều (từ 2,5% còn 0,63%). Theo Slizyte, hàm lượng chất

béo cao sẽ tạo phức hợp protein-lipid gây ức chế quá trình thủy phân protein [7]. Sau quá trình kết tủa đã loại bỏ được chất béo và thu nhận protein cô đặc hơn. Hàm lượng chất béo giảm nhiều có ý nghĩa trong việc tạo ra nguồn protein tập trung và quá trình thủy phân protein sẽ được ổn định hơn. Như vậy, protein thô với hàm lượng protein đạt cao (68,3%) và hàm lượng chất béo thấp (0,6%) sẽ được sử dụng cho quá trình thủy phân thủy phân tiếp theo.

Bảng 1. Thành phần của dịch chiết lá chùm ngây và dịch kết tủa protein (trọng lượng khô)

Thành phần (%)	Dịch chiết lá chùm ngây	Protein sau quá trình thu nhận, làm sạch
Protein	27,5	68,3
Chất béo	2,5	0,6

3.2. Nghiên cứu điều kiện ảnh hưởng đến quá trình thủy phân protein từ lá chùm ngây bởi endopeptidase và exopeptidase

Sự kết hợp giữa endopeptidase và exopeptidase đã được nghiên cứu nhằm tăng hiệu quả thủy phân so với khi sử dụng riêng rẽ enzyme endopeptidase. Trong thí nghiệm này, chúng tôi chọn alcalase 2,4L (endopeptidase) kết hợp với flavourzyme 1000L (exopeptidase) để thủy phân protein từ lá chùm ngây. Phản ứng được thực hiện theo 2 giai đoạn: giai đoạn đầu thủy phân bởi alcalase, giai đoạn 2 thủy phân bởi flavourzyme.

3.2.1. Nghiên cứu điều kiện ảnh hưởng của enzyme endopeptidase

Quá trình thủy phân thứ nhất với alcalase ở điều kiện nồng độ, pH, nhiệt độ và thời gian thích hợp. Kết thúc giai đoạn 1pH được giảm xuống 7, giai đoạn 2 được thực hiện bởi flavourzyme ở nồng độ 1,0% (tương ứng với 10 LAU/g protein). Kết quả nghiên cứu điều kiện ảnh

hưởng đến quá trình thủy phân được trình bày ở hình 3.1 (a;b;c;d)

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ alcalase được thực hiện ở nồng độ enzyme 1,5; 2,0; 2,5; 3,0% (tương ứng với 0,36; 0,48; 0,6; 0,72 AU/g protein), cố định nhiệt độ 55°C, pH ban đầu 8,5, khuấy 100rpm. Kết quả hình 1a cho thấy giá trị DH tăng khi nồng độ alcalase tăng, giá trị DH tăng cao ở nồng độ alcalase 2,5-3,0%. Kết quả thu được có thể do một số peptide đã được thủy phân mạnh hơn khi nồng độ alcalase tăng lên dẫn đến hàm lượng axit amin và các peptide có trọng lượng nhỏ tăng trong dịch thủy phân. Tuy nhiên, độ thủy phân không có sự khác biệt nhiều giữa nồng độ alcalase 2,5 -3,0% do vậy chọn nồng độ alcalase là 2,5% cho thí nghiệm tiếp theo.

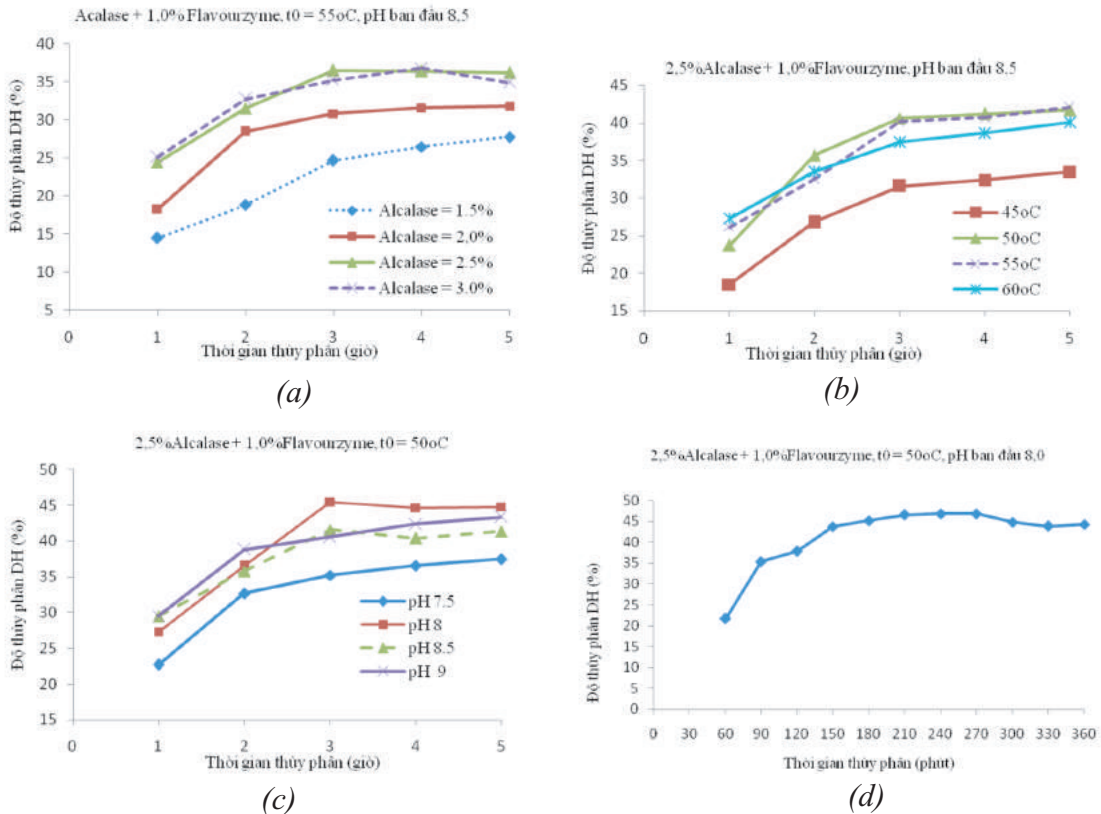
Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ khác nhau từ 45°C đến 60°C (cố định 2,5% alcalase, pH ban đầu 8,5, khuấy 100rpm). Kết quả ở hình 1b thấy rằng, giá trị DH tăng mạnh khi nhiệt độ tăng từ

45°C đến 55°C, giảm mạnh khi nhiệt độ tăng lên 60°C. Sự khác nhau giữa 50-55°C không nhiều, do vậy nhiệt độ thích hợp ở 50°C (giá trị DH đạt 40,2 % sau 3 giờ thủy phân).

Tiến hành xác định ảnh hưởng của pH đối với quá trình thủy phân protein chum ngây ở pH từ 7,5-9,0 (cố định nồng độ alcalase 2,5 % nhiệt độ 50°C, khuấy 100rpm). Kết quả hình 1c cho thấy pH tăng 7,5-8,0 giá trị DH cũng tăng theo, tuy nhiên pH 8,5-9,0 giá trị DH giảm rõ rệt. Khi pH 8,0 giá trị DH đạt cao nhất 45,6 % sau 3 giờ thủy phân. Nhiều tác giả đã báo cáo thủy phân protein thực vật hoặc động vật với alcalase ở pH 7,5-9,0.

Độ pH tối ưu có thể thay đổi theo cơ chất, nồng độ enzyme. Như vậy, trong nghiên cứu này, pH 8,0 được chọn để xác định ảnh hưởng của thời gian phản ứng.

Hình 3.1d thể hiện ảnh hưởng của thời gian thủy phân sử dụng alcalase cho thấy quá trình thủy phân xảy ra nhanh từ 60 phút đến 180 phút, từ 180 - 270 phút giá trị DH tăng chậm không có sự khác biệt so với 180 phút và giảm dần sau những thời gian tiếp theo. Giá trị DH đạt cao nhất (45,7 %) ở khoảng 180 phút (3,0 giờ). Như vậy chọn thời điểm kết thúc thủy phân giai đoạn 1 với alcalase tại 3,0 giờ.



Hình 1. Đồ thị miêu tả các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân protein lá chum ngây bởi alcalase (endopeptidase)

Như vậy, khi sử dụng kết hợp 2 enzyme với các điều kiện thích hợp cho giai đoạn 1 sử dụng endopeptidase: nồng độ alcalase 2,5 % (0,6AU/g protein), pH 8,0, 50°C, thời gian 3 giờ. Mức độ thủy phân lá chum ngây đạt 45,7 %.

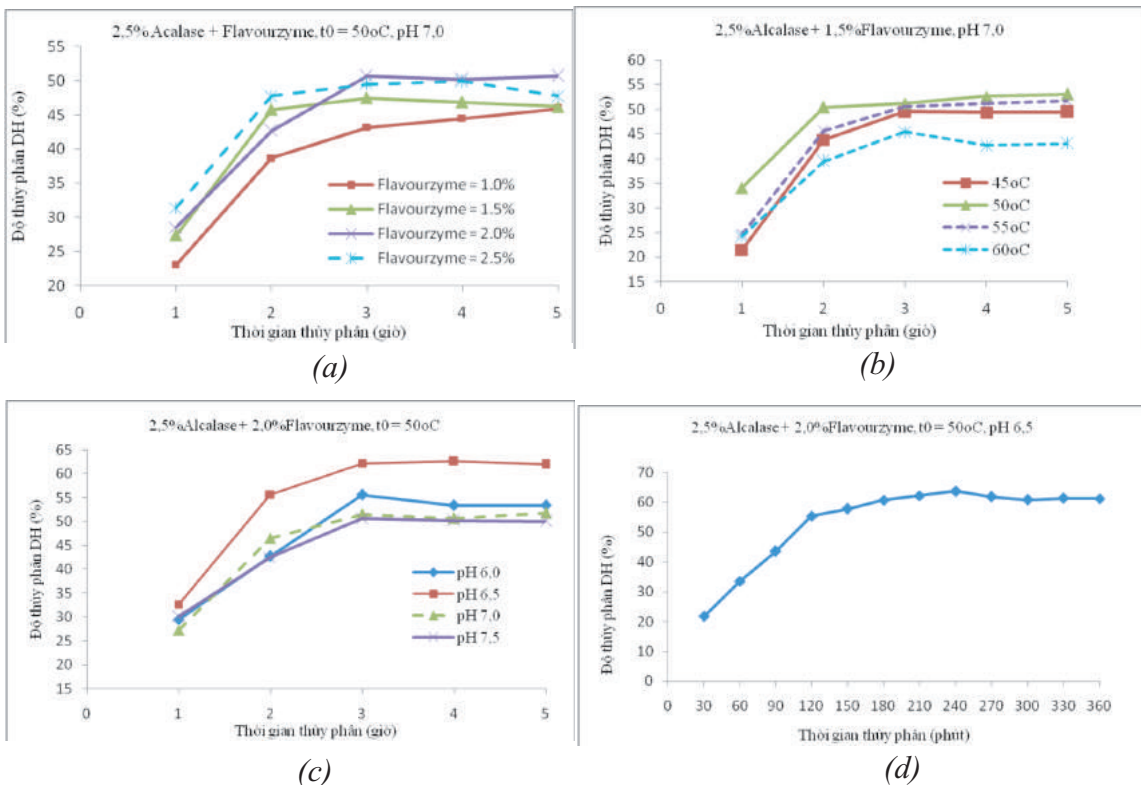
3.2.2. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng của enzyme exopeptidase

Quá trình thủy phân đầu tiên được thực hiện cố định 2,5% alcalase ở pH ban đầu 8,0 và 50°C, thời gian thủy phân 3,0 giờ. Flavourzyme được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng ở điều kiện pH, nhiệt độ, thời gian thay đổi để phù hợp cho quá trình thủy phân thứ hai. Kết quả thu được chỉ ra Hình 2. (a;b;c;d).

Đối với nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ flavourzyme được thực hiện ở 1,0; 1,5, 2,0 và 2,5 % (tương ứng với 10,15,20,25 LAU/g protein). Qua kết quả thấy rằng, khi tăng nồng độ flavourzyme 1-2 % giá trị DH tăng, tuy nhiên khi tăng nồng độ enzyme lên 2,5 % DH đạt 43-52,9 % sau 3-4 giờ thủy phân. Tuy nhiên, giá trị DH lại giảm nhiều ở nồng độ enzyme 2,5 % so với 2,0 %.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ

được thực hiện từ 45°C đến 60°C, các thông số khác được cố định. Kết quả được trình bày ở hình 2b thấy rằng giá trị DH tăng đáng kể khi nhiệt độ tăng từ 45°C đến 55°C và khi nhiệt độ tăng lên 60°C, giá trị DH giảm mạnh. Độ thủy phân đạt cao nhất tại nhiệt độ 50°C (DH= 51,2-52,7 % sau 3-4 giờ thủy phân). Đối với hầu hết các phản ứng, khi nhiệt độ thủy phân tăng các liên kết peptit sẽ bị phân tách dẫn đến tăng DH và ở nhiệt độ cao hơn hoạt tính của enzyme có thể giảm do sự biến đổi nhiệt dẫn đến sự giảm tốc độ thủy phân. Dựa trên kết quả, nhiệt độ 50°C được lựa chọn sử dụng để xác định điều kiện của pH. Một số tác giả khi thủy phân protein thực vật sử dụng kết hợp alcalase và flavourzyme như: thủy phân protein hạt hướng dương nhiệt độ tối ưu là 50°C, bột đậu tương 50-55°C, củ lạc, lá sắn, lá chè thì nhiệt độ thích hợp là 55°C.



Hình 2. Đồ thị miêu tả các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân protein lá chàm ngậy bởi flavourzyme (exopeptidase)

Đối với nghiên cứu ảnh hưởng của pH ở giai đoạn 2 (hình 2c) thấy rằng sự thay đổi pH từ 6,0-7,5 đã cho kết quả giá trị DH thay đổi rõ rệt, pH thích hợp nhất tại pH 6,5 (DH đạt 62,2 %) so với khi sử dụng pH 7,0 (51,3 %).

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian thủy phân thấy rằng DH tăng lên cùng với thời gian thủy phân do trong quá trình thủy phân protein đã phân tách các liên kết peptid. Giá trị DH tăng nhanh từ 0-120 phút, sau đó tăng nhẹ và đạt giá trị cao nhất 63,7 % sau 240 phút thủy phân, sau đó DH giảm đến giai đoạn tĩnh DH khoảng 60-61%. Vậy khi thủy phân giai đoạn 2 với flavourzyme chọn thời gian thích hợp là 240 phút (4 giờ). Như vậy, động học quá trình thủy phân phù hợp với quy luật khi nghiên cứu trên một số protein thực vật như đậu phộng, hạt hạch nhân, protein gạo, protein ngô. Bên cạnh đó, một số tác giả khi thủy phân protein thực vật như: đậu tương, ngô, khoai tây, lá sắn... sử dụng kết hợp alcalase và flavourzyme điều kiện tối ưu khi sử dụng alcalase ở 50-60°C, pH 8,0-8,5 và flavourzyme ở 50-55°C, pH 6,0-7,0. Sự khác nhau về điều kiện pH, nhiệt độ thủy phân có thể phụ thuộc nhiều vào nguồn protein ban đầu và nồng độ các liên kết peptide có sẵn trong protein thô.

IV. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy sử dụng hỗn hợp hai enzyme alcalase và flavourzyme đã làm tăng hiệu quả thủy phân protein từ lá chàm ngây. Với các điều kiện thích hợp giai đoạn thủy phân 1 sử dụng endopeptidase (nồng độ alcalase 0,6 AU/g protein; nhiệt độ 50°C; pH 8,0; thời gian 3 giờ, khuấy 100 rpm), và giai đoạn thủy phân 2 sử dụng exopeptidase (nồng độ flavourzyme 15 LAU/g protein; nhiệt độ 50°C; pH 6,5; gian 4 giờ, khuấy 100

rpm), độ thủy phân protein lá chàm ngây DH đạt 63,7%.

Lời cảm ơn: Kết quả nghiên cứu là một phần nội dung trong đề tài cấp Bộ Công Thương, mã số 142.16/ĐT KH-CN-HĐ-KH-CN (2016-2017). Xin chân thành cảm ơn Bộ Công Thương, Viện Công nghiệp thực phẩm đã cấp kinh phí, tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Olaofe O., Adeyeye E.I., and Ojugbo S. (2013). *Comparative study of proximate, amino acids and fatty acids of Moringa oleifera tree*. Appl. Chem. , 2013. 54: p. 12543-12554.
2. Katre U.V. (2008). *Structure and activity relationship of a hemagglutinin from Moringa oleifera seeds*. International Journal of Biological Macromolecules, 2008. 42(2): p. 203-207.
3. Nielsen P.M., Petersen D., and Dambmann C. (2001). *Degree of Hydrolysis (DH) of the protein hydrolyses the spectrophotometric Improved method for determining food protein degree of hydrolysis*. J. Food Sci. 2001, 2001. 66: p. 642-664.
4. Shen L. (2008). *Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods*. Food Chemistry, 2008. 107: p. 929-938.
5. Bradford M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding*. Anal. Biochem., 1976. 72: p. 248-254.
6. AOAC, Official Method 988.15. *Official Methods of Analysis*, USA: AOAC Inc. . 17th ed.
7. Slizyte R., Rustad T., and Storro I. (2005). *Enzymatic hydrolysis of cod (Gadus morhua) by-products: Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions*. Process Biochemistry 40, 2005. 40: p. 3680-3692.

Summary**RESEARCH ON SOME FACTORS AFFECTING THE ENZYMATIC HYDROLYZATION OF *MORINGA OLEIFERA* LEAVES**

Proteins hydrolyzed from plants are more and more attractive because the hydrolyzation improves desired characteristics while it doesn't affect the initial nutrition values of raw materials. *Moringa oleifera* leaves containing a wide variety of proteins were hydrolyzed to smaller molecules. The research determined some parameters affecting the protein hydrolyses of *Moringa oleifera* leaves by enzymatic methods. Precipitated proteins are hydrolyzed at a suitable condition of enzyme concentration, temperature, pH and time. The degree of hydrolysis was assessed by using DH value. It is shown that the combination of endopeptidase (alcalase) and exopeptidase (flavourzyme) for morigan leaf hydrolyses through two-steps method (Step 1: alcalase 0.6 AU/g protein, at 50°C, pH = 8.0, 3 hours; Step 2: flavourzyme 15 LAU/g protein; 50°C; 6.5; 4 hours) gave DH value of 63.7%. The result showed that the combination use of alcalase and flavourzyme for protein hydrolyses of *Moringa oleifera* leaves improved the metabolism of *Moringa oleifera* protein.

Keywords: *Moringa oleifera* Lam., Protein hydrolyses, Alcalase, Flavourzyme, Degree of hydrolyses (DH).

