

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN THỦY PHÂN PROTEIN TỪ RONG *Lagarosiphon major* BẰNG ENZYME ALCALASE

Hồ Thị Giang, Nguyễn Thị Thu Trang, Lê Tuấn Anh,

Giang Nhật Anh, Hoàng Thị Ngọc Nhon*

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: nhonhtn@huit.edu.vn

Ngày nhận bài: 11/6/2024; Ngày nhận bài sửa: 16/7/2024; Ngày chấp nhận đăng: 19/7/2024

TÓM TẮT

Lagarosiphon major chứa hàm lượng protein cao nên có thể được coi là một nguồn thu nhận peptide có hoạt tính sinh học. Nghiên cứu này chủ yếu khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân protein từ *L. major* nhằm thu nhận peptide có hoạt tính sinh học, khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme Alcalase đến mức độ thủy phân (%DH), khả năng bắt gốc tự do (DPPH) được đánh giá ở các giá trị lần lượt là (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1%), với pH (4, 5, 6, 7, 8), nhiệt độ (40, 50, 60, 70, 80 °C) và thời gian thủy phân (30, 60, 90, 120, 150 phút). Với sự hỗ trợ của enzyme Alcalase và các điều kiện như: tỉ lệ enzyme/cơ chất (0,8%); nhiệt độ (50 °C), pH (7,0); thời gian (120 phút), mức độ thủy phân (%DH) là 54,87% và khả năng bắt gốc tự do DPPH là $75,11 \pm 0,3\%$. Ngoài ra, dựa trên khả năng bắt gốc tự do ABTS⁺ và khả năng khử (RP) để đánh giá các hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro* khác. Kết quả trên cũng đã cho thấy dịch chiết protein sau khi thủy phân có khả năng kháng oxy hóa lần lượt tương ứng với các giá trị IC₅₀ là 67,33 µg/mL và 462,63 µg/mL.

Từ khóa: Alcalase, kháng oxy hóa, *Lagarosiphon major*, peptide.

1. GIỚI THIỆU

Rong *Lagarosiphon major* là một loài thực vật thủy sinh mọc nổi thuộc họ Hydrocharitaceae [1]. Rong đạt mức sinh trưởng tối đa ở vùng nước trong đến độ sâu 6,5 m, phát triển tốt nhất trong nước ngọt trong, tĩnh lặng hoặc chảy chậm với đáy bùn hoặc cát [2]. Lá rong thường có màu xanh mọc xen kẽ theo hình xoắn ốc và đi dọc theo chiều dài của thân cây, dài 5-20 mm, rộng 2-3 mm và thường có đầu lá cong về phía thân, mặc dù trong nước có độ kiềm thấp. Ở các tỉnh miền Trung, rong *L. major* có ở tự nhiên với sinh lượng rất cao trong các thủy vực nước lợ ở Phú Yên, Khánh Hòa. Rong *L. major* có giá trị cao về mặt dinh dưỡng, được sử dụng làm thức ăn cho gia súc và làm cây cảnh cho hồ cá [3]. Nghiên cứu của Rosebery và cộng sự cũng chỉ ra rằng *L. major* có chứa terpenoids (23%), acid béo (22%), ancaloit (18%), acid amin và peptide (17%) và nhiều hợp chất khác [4].

Peptide hoạt tính sinh học hay peptide có hoạt tính sinh học là những protein có cấu trúc ngắn đoạn với khối lượng phân tử dưới 6000 Da, được cấu tạo từ 2 đến 20 acid amin nối với nhau bằng liên kết peptide, là các đoạn protein có tác động tích cực đến các chức năng hoặc điều kiện của cơ thể và ảnh hưởng đến sức khỏe con người [5]. Có thể hiểu peptide hoạt tính sinh học là các đoạn protein ngắn đặc hiệu, có các nhóm chức khác nhau và mỗi nhóm chức đặc trưng cho một hoạt tính nhất định. Hoạt tính của peptide còn phụ thuộc vào các cấu trúc của nó, tức là thành phần acid amin, loại acid amin đầu C và N, độ dài chuỗi peptide, ví dụ như các peptide có hoạt tính ức chế enzyme chuyển đổi Angiotensin cao thường có acid amin cơ bản hoặc thơm ở đầu N, số lượng acid amin kỵ nước và tích điện dương cao hơn ở đầu C [6]. Tison-Rosebery và cộng sự thực hiện khảo sát về ảnh hưởng của *L. major* đến quá trình trao đổi chất và quang hợp của vi khuẩn lam *Microcystis aeruginosa*. Kết quả đã chứng minh đặc tính kháng khuẩn của rong *L. major* và hơn thế nữa báo cáo đã cho thấy rằng chất chiết xuất từ *L. major* đã ức chế quá trình quang hợp của *M. aeruginosa*, ảnh hưởng đến quá trình sản sinh các loại chất chuyển hóa khác nhau và các con đường chủ yếu liên quan đến quá trình chuyển hóa thứ cấp của vi khuẩn lam [4]. Martínez-Palma và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu thủy phân protein trên hai mẫu

là *Spirulina* đã giảm polyphenol (SpRPh) và *Spirulina* chiết xuất phycobiliproteins (PCBEx) với tuần tự enzyme pepsin và pancreatin. Mức độ thủy phân của pepsin ở mẫu tảo SpRPh đạt 11,2% và ở mẫu tảo PCBEx đạt 17,1% [7]. Như vậy, khác với protein, peptide có cấu trúc ngắn hơn nên linh hoạt hơn và thể hiện được nhiều hoạt tính sinh học có giá trị. Do đó, xu hướng thu nhận các peptide sinh học là điều rất được quan tâm hiện nay. Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu nào được thực hiện về việc thu nhận peptide có hoạt tính sinh học từ rong *L. major* mà loại rong này thì lại rất phổ biến ở các thủy vực Việt Nam, có thể dễ dàng tìm kiếm và mua được trong nước nên được xem là nguồn nguyên liệu dồi dào để nghiên cứu. Để thu nhận chế phẩm peptide từ protein, enzyme Alcalase thường được sử dụng phổ biến. Đây là một serine endopeptidase có khả năng thủy phân các liên kết peptide bên trong chuỗi polypeptide, với đặc hiệu rộng ưu tiên cho các acid amin không tích điện có kích thước lớn tại vị trí P1, từ đó tạo ra hỗn hợp peptide có kích thước nhỏ với mức độ thủy phân cao và tiềm năng hoạt tính chống oxy hóa đáng kể [8]. Và đó là cơ sở để nghiên cứu về ảnh hưởng của enzyme Alcalase đến điều kiện thủy phân protein thu nhận peptide từ rong *L. major* đồng thời đánh giá khả năng kháng oxy hóa của peptide thu nhận được.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Rong *L. major* được thu nhận chủ yếu ở khe suối thuộc địa phận Thị xã Đông Hòa, Phú Yên. Sau thu nhận, rong được vận chuyển ngay trong ngày đến phòng thí nghiệm tại Trung tâm Thí nghiệm thực hành (trường Đại học Công Thương TP. HCM), tại đây nguyên liệu được rửa bằng nước máy và loại bỏ tạp chất (rác, vỏ ốc, các hạt sạn nhỏ, đá...). Tiếp tục sấy ở nhiệt độ 60 °C trong 12 giờ ở thiết bị Memmert cho tới khi hàm ẩm đạt $\leq 10\%$. Tiếp đến, mẫu được nghiền nhỏ bằng cối xay cơ học. Thu nhận bột mẫu, tiến hành thực hiện sàng lọc loại bỏ tạp chất, nguyên liệu có kích thước từ 0,5 - 1 mm được thu nhận và dùng cho toàn bộ thí nghiệm.

Enzyme Alcalase của hãng Novozyme - Đan Mạch, được phân phối bởi Công ty TNHH TM Nông sản và Hóa chất Phương Trâm. Hoạt lực của enzyme 700 U/mL, giá trị pH tối thích khoảng 7-9, nhiệt độ hoạt động ở 35-65 °C. Methanol được nhập khẩu hóa chất Việt Mỹ - VMCGROUP; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) - Mỹ; 2,2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonate (ABTS), Ascorbic acid (vitamin C) - Việt Nam, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ và $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - Trung Quốc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thực hiện thu nhận protein từ rong *L. major*

Mục đích: thu nhận protein từ rong *L. major*

Cách tiến hành

Chuẩn bị cốc 1000 mL, cho vào cốc 50 g bột rong và 5 g enzyme cellulase với 500 mL nước cất 1 lần (tỉ lệ NL/DM là 1/10 (v/w)), tiếp theo được ủ 50 °C trong 90 phút ở bể ổn nhiệt. Tiếp theo bổ sung thêm 50 mL dung dịch NaOH 1% ở trong bể ổn nhiệt tại 50 °C thêm 60 phút, sau đó ly tâm 5000 vòng/phút, 20 phút rồi lọc qua giấy lọc $\phi 110$ mm. Tiến hành rửa bằng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20% trong 2 giờ (trong 1 giờ đầu cách 15 phút lắc 1 lần, 1 giờ sau để yên), sau khi kết rửa tiến hành ly tâm 5000 vòng/phút, 20 phút rồi thu nhận phần dịch nổi, tiếp tục lọc qua giấy lọc $\phi 110$ mm. Rửa phân đoạn 2, đông lại thể tích thực hiện rửa muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80% (lắc nhẹ cho muối tan hết sau đó để yên) rửa trong 2 giờ, sau khi kết rửa tiến hành ly tâm 5000 vòng/phút trong 20 phút rồi thu rửa [9]. Sau đó đông khô thành dạng bột và được lưu trữ để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme Alcalase đến thủy phân protein thu nhận peptide

Quá trình thủy phân protein bằng enzyme được thực hiện bằng cách sử dụng chế phẩm enzyme Alcalase. Các thí nghiệm được thực hiện cân 0,5 g protein cho vào 5 cốc thủy tinh 250 mL khác nhau, sau đó thêm 100 mL đệm phosphat pH 7,4; Khuấy đều để protein và đệm trộn vào nhau, thêm enzyme vào các cốc với tỉ lệ enzyme khảo sát lần lượt là: 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1% (v/w) so với khối lượng protein, giữ ổn nhiệt các mẫu trên ở 50 °C trong thời gian 1 giờ. Ly tâm 5000 rpm trong 20 phút sau khi ủ ở bể ổn nhiệt và tiến hành lọc phần dịch trong để thu được dịch thủy phân.

Khảo sát điều kiện thủy phân protein từ rong *Lagarosiphon major* bằng enzyme alcalase

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến mức độ thủy phân protein thu nhận peptide

Cân vào 5 cốc thủy tinh 250 mL khác nhau với mỗi cốc 0,5 g protein và 100 mL đệm phosphat pH 7,4. Khuấy đều để protein và đệm trộn vào nhau, thêm enzyme vào các cốc với nồng độ enzyme là kết quả thí nghiệm trên so với khối lượng protein, giữ ổn nhiệt các mẫu trên ở nhiệt độ khảo sát lần lượt là: 40, 50, 60, 70, 80 °C trong thời gian 1 giờ. Sau đó hỗn hợp dung dịch được ly tâm 5000 rpm trong 20 phút, tiến hành lọc thu được dịch thủy phân và đo các chỉ tiêu như mức độ thủy phân (DH), khả năng bắt gốc tự do (DPPH).

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của pH đến mức độ thủy phân protein thu nhận peptide

Lấy 5 cốc thủy tinh 250 mL khác nhau và cho vào 0,5 g protein, sau đó thêm 100 mL đệm phosphat với pH là yếu tố khảo sát (4, 5, 6, 7, 8). Khuấy đều để protein và đệm trộn vào nhau, thêm enzyme vào các cốc với tỉ lệ enzyme là kết quả của khảo sát trên, giữ ổn nhiệt các mẫu trên ở nhiệt độ kết quả thí nghiệm trên trong thời gian 1 giờ. Sau khi ổn nhiệt, mẫu khảo sát được ly tâm trong 20 phút ở điều kiện 5000 rpm, tiến hành lọc để thu được dịch thủy phân và đo các chỉ tiêu như mức độ thủy phân (DH), khả năng bắt gốc tự do (DPPH).

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến mức độ thủy phân protein thu nhận peptide

Cho 0,5 g protein và 100 mL đệm với pH lấy từ kết quả của khảo sát trên vào 5 cốc thủy tinh 250 mL khác nhau. Khuấy đều để protein và đệm trộn vào nhau, thêm enzyme vào các cốc với nồng độ enzyme là kết quả ở khảo sát trên, giữ ổn nhiệt các mẫu trên ở nhiệt độ kết quả thí nghiệm trong thời gian khảo sát là 30, 60, 90, 120, 150 phút. Sau đó ly tâm 5000 rpm trong 20 phút, tiến hành lọc để thu được dịch thủy phân và đo các chỉ tiêu như mức độ thủy phân (DH), khả năng bắt gốc tự do (DPPH).

2.2.6. Xác định mức độ thủy phân

Các bước tiến hành

Protein đã thủy phân (5 mL) thêm 20 mL nước và chuẩn độ đến pH 8,2 với NaOH 0,5 M trước khi thêm 10 mL dung dịch formalin (37%). Sau đó, các mẫu này được tiếp tục chuẩn độ đến pH 9,2 bằng NaOH 0,05 M. Thể tích NaOH dùng để điều chỉnh pH 8,2 đến 9,2 được ghi lại [10].

Công thức tính toán

$$DH(\%) = \frac{N_{\alpha \text{ amin}}}{N_{\text{tổng}}} \times 100$$

Trong đó: DH: mức độ thủy phân (%); $N_{\alpha \text{ amin}}$: hàm lượng đạm amin (mg N/g); $N_{\text{tổng}}$: hàm lượng đạm tổng số (mg N/g)

2.2.7. Xác định hoạt tính kháng oxy hóa

Phương pháp bắt gốc tự do DPPH

Dung dịch DPPH được chuẩn bị trong cốc 250 mL với nồng độ 0,1 mM. Các mẫu cao chiết và mẫu đối chứng dương (vitamin C) ở những nồng độ khác nhau được pha loãng bằng methanol trong bình định mức 10 mL. Sau đó, dùng pipet hút 2 mL dung dịch mẫu cho vào ống nghiệm, tiếp theo thêm 2 mL dung dịch DPPH 0,1 mM. Đối với mẫu đối chứng, dung dịch thử được thay bằng methanol, trong khi mẫu trắng chỉ chứa methanol. Tất cả các ống nghiệm được ủ trong điều kiện tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, rồi tiến hành đo độ hấp thụ quang tại bước sóng 517 nm [11].

$$DPPH(\%) = \frac{OD_c - OD_m}{OD_c} \times 100$$

Phương pháp bắt gốc tự do ABTS

Phương pháp ABTS: Gốc tự do ABTS⁺ [2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] là một hợp chất bền, có màu xanh đặc trưng và hấp thụ mạnh tại bước sóng 734 nm. Khi có mặt các chất có khả năng kháng oxy hóa, ABTS⁺ sẽ bị khử về dạng không màu, làm giảm giá trị hấp thụ quang tại bước sóng này. Quy trình được thực hiện dựa theo phương pháp của Re R. và cộng sự [12]. Cụ thể, gốc ABTS⁺ được tạo ra bằng cách ủ trong dung dịch ABTS 2 mM với dung dịch K₂S₂O₈ 2,45 mM theo tỉ lệ 1:1 trong đệm phosphate pH 7,4, trong điều kiện tối từ 12–16 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, dung dịch ABTS⁺ được điều chỉnh về giá trị độ hấp thụ (OD) 0,70 ± 0,02. Phản ứng được tiến hành bằng cách

thêm 100 μL dung dịch cao chiết ở các nồng độ khác nhau vào 3 mL dung dịch ABTS⁺. Hỗn hợp được ủ trong tối ở 25°C trong 30 phút, sau đó đo độ hấp thụ tại bước sóng 734 nm bằng máy UV-Vis. Phần trăm khả năng bắt gốc tự do được xác định theo công thức:

$$\% = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Với A là giá trị OD₇₃₄ của mẫu đối chứng (thay mẫu bằng dung dịch đệm); B là giá trị OD₇₃₄ của mẫu.

Phương pháp xác định năng lực khử RP (Reducing power)

Khả năng khử sắt của peptide sau quá trình thủy phân được đánh giá theo phương pháp của Zhu và cộng sự [13]. Hỗn hợp phản ứng bao gồm 0,5 mL mẫu chiết ở các nồng độ khảo sát từ 0–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,5 mL dung dịch đệm phosphate (0,2 M, pH 6,6) và 0,5 mL dung dịch K₃Fe(CN)₆ 1%. Sau khi trộn, hỗn hợp được ủ ở 50°C trong 20 phút. Tiếp đó, bổ sung 0,5 mL dung dịch CCl₃COOH 10% rồi tiến hành ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi sau ly tâm được lấy 0,5 mL, trộn với 0,5 mL nước và 0,1 mL dung dịch FeCl₃ 0,1%, sau đó lắc đều. Cuối cùng, độ hấp thụ của hỗn hợp được đo tại bước sóng 700 nm. Giá trị phần trăm khả năng khử (hoặc hoạt tính) được tính theo công thức sau:

$$\% = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Trong đó: A là giá trị độ hấp phụ quang ở 700 nm của mẫu; B là giá trị độ hấp phụ quang ở 700 nm của mẫu đối chứng

Thông số khảo sát: Nồng độ: 0, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Thông số theo dõi: Giá trị IC₅₀.

2.3. Phương pháp chuẩn độ formol

Các bước tiến hành

Hút 20 mL dung dịch cần được xác định cho vào bình tam giác 250 mL. Thêm vào đó 20 mL dung dịch formol trung tính, chỉ thị phenolphthalein 1% 5 giọt. Dùng NaOH 0,2 N để chuẩn độ cho đến màu đỏ tươi. Chuẩn độ dung dịch bằng NaOH 0,2 N từ màu hồng sang màu đỏ thắm (pH = 9,6) [10].

Công thức tính toán

$$X \text{ (g/l)} = \frac{0,0028 \times V \times f}{V_m} \times 1000$$

Trong đó: 0,0028: lượng N tương ứng với 1 mL NaOH 0,2 N; V: thể tích NaOH 0,2 N tiêu tốn; F (V_{dm} / V_{xd}): hệ số pha loãng; M hay V_m: số gam hay số mililit mẫu thử

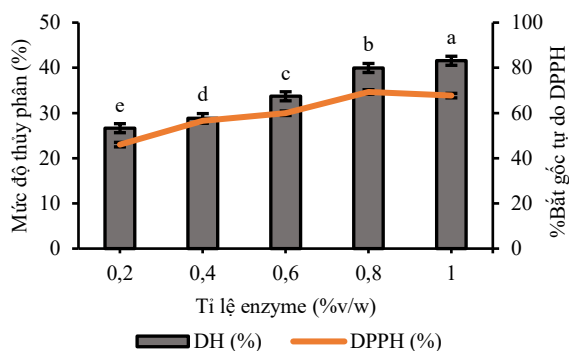
2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu nhận được từ các khảo sát sẽ phân tích SPSS bằng phần mềm xử lý số liệu thống kê chuyên dụng JMP 10.0. Thực hiện kiểm định Student's để đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa giữa các giá trị với mức ý nghĩa p < 0,05.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng tỉ lệ enzyme Alcalase đến thủy phân thu nhận peptide

Cơ chất sau khi được thêm enzyme vào sẽ bị hấp thụ trên bề mặt, tại đó sẽ xảy ra phản ứng thủy phân làm phá hủy các liên kết peptide. Vì vậy tốc độ phản ứng đạt mức tối đa khi tất cả các enzyme đều kết hợp với cơ chất. Tiến hành khảo sát tỉ lệ enzyme ở các mức (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1%) nhằm đánh giá ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme đến mức độ thủy phân protein. Dựa vào kết quả xử lý ANOVA cho thấy mức độ thủy phân tăng khi tỉ lệ enzyme Alcalase tăng. Nồng độ tăng từ 0,2% lên 1%, mức độ thủy phân tăng lên rõ rệt (Hình 1).

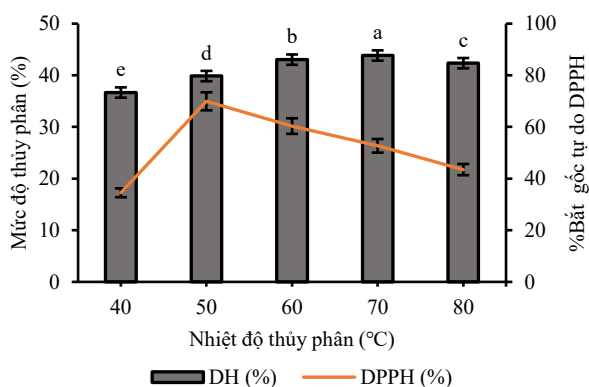


Hình 1. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme đến mức độ thủy phân và khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch thủy phân

Thông qua phân tích ANOVA nhận thấy rằng ở tỉ lệ enzyme 0,8% so với cơ chất (69,29%) khả năng bắt gốc tự do cao nhất, dễ thấy sự khác biệt với các nồng độ còn lại 0,2% (46,00%), 0,4% (56,46%), 0,6% (59,89%), 1% (67,69%) với mức ý nghĩa là 5%. Nhìn vào kết quả của khảo sát thấy khi thủy phân protein bằng các enzyme với các nồng độ khác nhau thì mức độ thủy phân cũng có sự thay đổi. Khi tăng tỉ lệ enzyme từ 0 lên 0,8% thì khả năng bắt gốc tự do của dịch sau thủy phân tăng. Kết quả này phù hợp khi có cùng quy luật với các nghiên cứu khác của một số tác giả khi thủy phân protein từ cá rô phi, cá nư [14]. Do mục tiêu là thu được dịch thủy phân enzyme có khả năng bắt gốc tự do tốt nhất nên nồng độ enzyme thích hợp được chọn để thủy phân là 0,8% (v/w).

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến thủy phân thu nhận peptide bằng enzyme Alcalase

Nhiệt độ tăng sẽ làm tăng tốc độ thủy phân trong quá trình thủy phân diễn ra. Nhưng, các phản ứng enzyme xúc tác bị ảnh hưởng khi nhiệt độ cao hơn nhiệt độ hoạt động của enzyme do sự biến tính của phân tử protein và enzyme. Nhiệt độ hoạt động tối đa của enzyme là ở 70 °C [8]. Ảnh hưởng của các mốc nhiệt độ (40, 50, 60, 70, 80 °C) đến quá trình thủy phân protein sẽ được khảo sát và đánh giá. Dựa vào kết quả phân tích ANOVA cho thấy mức độ thủy phân có sự thay đổi tăng khi nhiệt độ tăng (Hình 2).

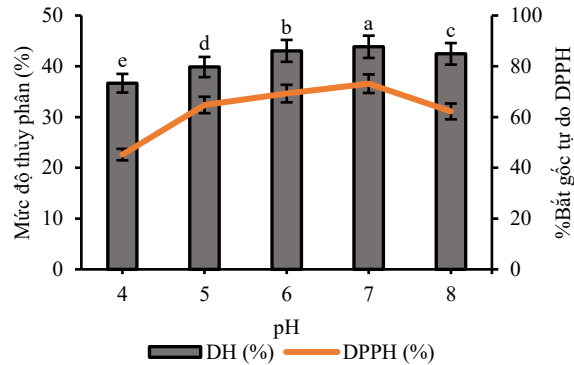


Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến mức độ thủy phân và khả năng bắt gốc tự do của dịch thủy phân

Dựa vào kết quả phân tích ANOVA dễ thấy mức độ thủy phân đạt được giá trị cao hơn các mức nhiệt độ thủy phân còn lại khi ở nhiệt độ 70 °C là $43,83 \pm 0,1\%$, và có sự khác biệt rõ rệt so với ở nhiệt độ 40 °C, 50 °C, 60 °C, 80 °C với mức ý nghĩa là 5%. Tuy nhiên, nhiệt độ thủy phân cũng ảnh hưởng đến khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch thủy phân. Khi thủy phân ở 50 °C thì khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch thủy phân là $69,93 \pm 0,2\%$. Vì vậy nhiệt độ lựa chọn để thủy phân là 50 °C.

3.3. Ảnh hưởng của pH đến thủy phân thu nhận peptide bằng enzyme Alcalase

Tại các giá trị pH khác nhau của một số phân tử protein làm thay đổi tính chất của các liên kết cơ chất và hoạt động ở phân tử enzyme. Do đó, giá trị pH khác nhau sẽ dẫn đến giá trị xúc tác khác nhau. Vì vậy, thay đổi môi trường pH làm cho enzyme nhạy cảm. Ở vùng pH xác định thì môi trường enzyme sẽ hoạt động mạnh nhất đó được gọi là pH tối thích, pH tối thích của enzyme không cố định có thể thay đổi tùy theo tính chất và nồng độ của cơ chất và nhiệt độ. Tiến hành khảo sát với các pH (4, 5, 6, 7, 8) ảnh hưởng đến quá trình thủy phân protein. Dựa vào kết quả phân tích ANOVA cho thấy mức độ thủy phân có sự thay đổi tăng lên khi pH tăng dần.

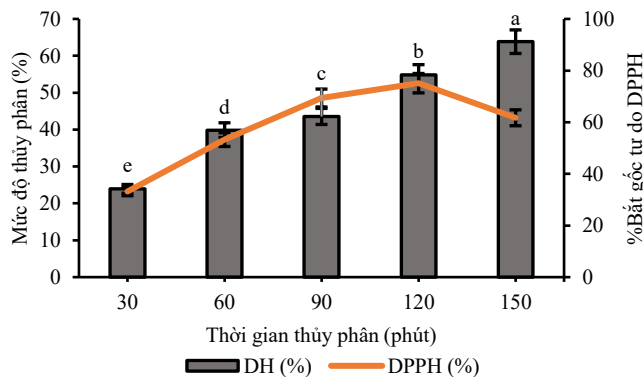


Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến mức độ thủy phân và khả năng bắt gốc tự do của dịch thủy phân

Dựa vào kết quả phân tích ANOVA cho thấy mức độ thủy phân đạt giá trị cao nhất trong khoảng pH = 6, pH = 7 và có sự khác biệt với mức ý nghĩa là 5%. Enzyme Alcalase với pH = 6 thì mức độ thủy phân cao nhất là $43,03 \pm 0,1\%$ so với khi ở pH = 7 là $43,83 \pm 0,2\%$. Tuy nhiên, khi thủy phân ở pH = 7 ($73,13 \pm 0,5\%$) thì khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch thủy phân cao hơn so với khi thủy phân ở pH = 6 ($69,24 \pm 0,2\%$). Cụ thể là trong nghiên cứu của Charoenphun N. và cộng sự khi các tác giả thủy phân casein bằng Alcalase thì nhận thấy rằng mức độ thủy phân đạt giá trị cao nhất khi pH = 7 [15]. Vì vậy pH thích hợp sử dụng để thủy phân và cho khả năng bắt gốc tự do DPPH tốt nhất là pH = 7.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian đến thủy phân thu nhận peptide bằng enzyme Alcalase

Tiến hành khảo sát với các thời gian (30, 60, 90, 120, 150 phút) ảnh hưởng đến mức độ thủy phân và khả năng bắt gốc tự do DPPH. Dựa vào kết quả phân tích ANOVA cho thấy mức độ thủy phân có sự thay đổi tăng lên khi thời gian tăng dần (Hình 4).



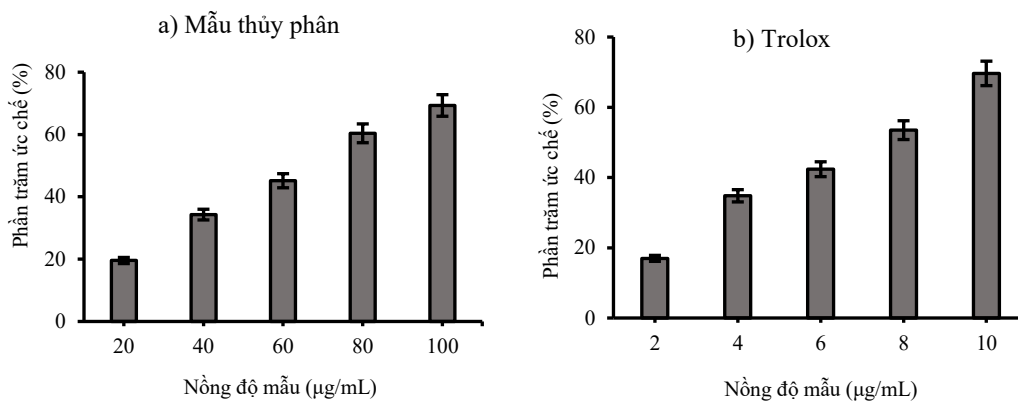
Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến mức độ thủy phân và khả năng bắt gốc tự do của dịch thủy phân

Dựa vào kết quả phân tích ANOVA cho thấy mức độ thủy phân đạt giá trị cao nhất trong khoảng thời gian 120 phút và 150 phút và khác biệt có ý nghĩa ở khoảng thời gian thủy phân khác với mức ý nghĩa là 5%. Có thể thấy khi thủy phân trong 120 phút và 150 phút thì mức độ thủy phân ở 2 thông số khảo sát này có sự khác biệt đáng kể ($54,87 \pm 0,2\%$ và $63,83 \pm 0,2\%$). Tuy nhiên khi thủy phân trong

120 phút thì khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch thủy phân đạt cao nhất là $75,11 \pm 0,3\%$. Vì vậy thời gian thủy phân thích hợp để thủy phân và cho khả năng bắt gốc tự do DPPH tốt nhất là 120 phút. Khả năng oxy hóa giảm mạnh tại 150 phút, kết quả tương tự như nghiên cứu của Je J. và cộng sự [16]. Thời gian thủy phân 120 phút có thể thúc đẩy sự hình thành các peptide hoạt tính sinh học, góp phần nâng cao khả năng bắt gốc tự do DPPH. Tuy nhiên, kéo dài đến 150 phút có thể gây thủy phân quá mức, làm giảm hoạt tính kháng oxy hóa. Kết quả này cho thấy thời gian thủy phân tối ưu phụ thuộc vào sự hình thành peptide hoạt tính hơn là chỉ mức độ thủy phân cao nhất [17].

3.5. Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS

Đánh giá khả năng bắt gốc ABTS là một trong những phương pháp chính xác, hiệu quả. Thí nghiệm đánh giá khả năng bắt gốc tự do ABTS của dịch thủy phân với đối chứng được sử dụng là chất chuẩn Trolox, hoạt tính kháng oxy hóa bắt gốc tự do ABTS của dịch sau thủy phân thu được trình bày trong Hình 5.

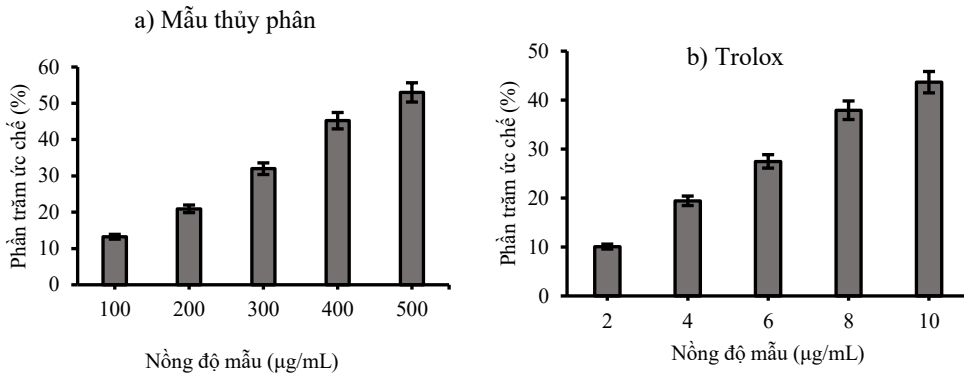


Hình 5. Kết quả khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp ABTS

Hiệu quả kháng oxy hóa bằng phương pháp ABTS: Sự giảm độ hấp thụ của dung dịch ABTS⁺ ở bước sóng 734 nm phản ánh khả năng kháng oxy hóa của chất khảo sát khi không có và có sự hiện diện của dịch sau thủy phân ở các nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy, hiệu suất loại bỏ gốc tự do của dịch sau thủy phân, khi nồng độ cao tăng từ 20 µg/mL đến 100 µg/mL, hiệu suất loại bỏ gốc tự do cũng tăng dần từ $19,57 \pm 1,45\%$ đến $69,32 \pm 1,51\%$ (Hình 5). Giá trị IC₅₀ được xác định trong phương pháp này là 67,33 µg/mL, cao hơn 8,97 lần so với Trolox (IC₅₀ = 7,51 µg/mL), đồng nghĩa dịch sau thủy phân có khả năng kháng oxy hóa kém hơn chất chuẩn Trolox. Tuy nhiên, chất chuẩn là Trolox có độ tinh sạch cao. Dịch sau thủy phân còn có thể chứa một số hợp chất không có khả năng kháng oxy hóa khác nên giá trị IC₅₀ cao hơn khá nhiều so với với chuẩn Trolox. Aursuwanna và cộng sự (2022) đã tiến hành nghiên cứu tác dụng kháng oxy hóa khả năng trung hòa gốc tự do ABTS các peptide cho ra giá trị IC₅₀ là $30,63 \pm 1,11$ µg/mL [18]. Ding và cộng sự (2019) đã tiến hành phân lập và xác định hoạt tính kháng oxy hóa trung hòa gốc tự do ABTS kết quả giá trị IC₅₀ = 94,89 µg/mL [19]. Gốc ABTS thể hiện sự tiện lợi hơn so với DPPH, do đặc tính có thể hòa tan trong đệm cũng như nước cất, tuy nhiên cản trở phổ biến của phương pháp này thời gian ủ hỗn hợp tương đối lâu (12-16 giờ). Đồng thời, khi thử nghiệm khả năng kháng oxy hóa sử dụng gốc ABTS, các chất có khối lượng phân tử nhỏ và các chất có nhóm phenol đơn giản khi thực hiện ở nồng độ càng cao, phản ứng ngày càng bị cản trở vì độ phức tạp và số lượng các nhóm phenol tăng lên gây cản trở việc tiếp cận của từng nhóm phenol cụ thể với ABTS⁺, dẫn đến tốc độ phản ứng chậm và giảm độ chính xác [20].

3.6. Hiệu quả xác định năng lực khử (Reducing power)

Hiệu quả khử sắt của peptide dựa trên khả năng khử sắt, khử Fe³⁺ thành Fe²⁺. Độ hấp thụ của hỗn hợp các chất phản ứng càng tăng chứng tỏ được năng lực khử càng mạnh [21]. Kết quả nghiên cứu về hiệu quả trung hòa dựa trên năng lực khử sắt của peptide sau thủy phân được thể hiện ở Hình 6.



Hình 6. Kết quả trung hòa dựa trên năng lực khử (RP)

Hiệu quả kháng oxy hóa của peptide ở các dãy nồng độ khác nhau khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Kết quả này cho thấy rằng hiệu quả kháng oxy hóa của dịch sau thủy phân phần trăm ức chế đạt $53,00 \pm 0,24\%$ tại nồng độ $500 \mu\text{g/mL}$, giá trị ($IC_{50} = 462,63 \mu\text{g/mL}$) cao hơn gấp 41,76 lần so với chất chuẩn là Trolox ($IC_{50} = 11,077 \mu\text{g/mL}$). Kết quả cho thấy là dịch sau thủy phân có khả năng khử ion Fe^{3+} thành ion Fe^{2+} kém hơn chất chuẩn Trolox rất nhiều. Hu và cộng sự (2019), đã tiến hành tinh chế và xác định các peptide kháng oxy hóa bằng phương pháp lực khử $IC_{50} = 284 \mu\text{g/mL}$ [22]. Năng lực khử là một phương pháp hiệu quả để đánh giá khả năng của chất kháng oxy hóa trong việc cho điện tử, từ nghiên cứu của Camila và cộng sự (2019) khả năng khử của protein thủy phân ở hầu hết các nồng độ được phân tích, cao hơn hoặc bằng khi so sánh với phân peptide nhỏ hơn 1 kDa, cho thấy nó là chất kháng oxy hóa tốt hơn [23]. Các mức giảm công suất khác nhau được trình bày của các mẫu có thể liên quan đến sự sẵn có ngày càng tăng của các ion hydro được tạo ra trong quá trình thủy phân protein [24]. Theo Jemil và cộng sự (2017), khả năng giảm thiểu của một hợp chất có thể được sử dụng để đo khả năng kháng oxy hóa của nó, bởi vì sự có mặt của chất khử các hợp chất dẫn đến sự khử phức $\text{Fe}^{3+}/\text{ferricyanide}$ thành sắt (Fe^{2+}) thông qua điện tử đóng góp làm tăng độ hấp thụ của phản ứng [25]. Vì vậy, giá trị hấp thụ càng cao thì khả năng khử của mẫu càng lớn, điều này được quan sát thấy trong nghiên cứu này ở mẫu cao hơn nồng độ.

4. KẾT LUẬN

Chế phẩm thủy phân rong *L. major* bằng enzyme Alcalase thể hiện khả năng bắt gốc tự do DPPH cao nhất khi đạt điều kiện thủy phân ở tỉ lệ enzyme 0,8% (v/w), nhiệt độ 50°C , pH 7, trong 120 phút. Nghiên cứu đánh giá khả năng kháng oxy hóa *in vitro* được xác định dựa trên khả năng trung hòa gốc tự do ABTS^+ và năng lực khử (RP) tương ứng với giá trị IC_{50} lần lượt là $67,33 \mu\text{g/mL}$ và $462,63 \mu\text{g/mL}$. Kết quả cho thấy dịch peptide từ rong *L. major* có tiềm năng kháng oxy hóa cao. Các nghiên cứu sâu hơn về kết hợp các điều kiện thủy phân cũng như đánh giá thêm các hoạt tính sinh học và các trình tự acid amin của các chuỗi peptide trong dịch thủy phân cần được thực hiện để cung cấp các thông tin cơ bản cho các nghiên cứu ứng dụng của peptide từ rong *L. major*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Mangan R., et al, "Use of life table statistics and degree day values to predict the colonisation success of *Hydrellia lagarosiphon* Deeming (Diptera: Ephydriidae), a leaf mining fly of *Lagarosiphon major* (Ridley) Moss (Hydrocharitaceae), in Ireland and the rest of Europe," *Biological control*, vol. 64, pp. 143-151, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.013>
- [2] Stiers I., et al, "Competitive abilities of invasive *Lagarosiphon major* and native *Ceratophyllum demersum* in monocultures and mixed cultures in relation to experimental sediment dredging," *Aquatic Botany*, vol. 95, pp. 161-166, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2011.05.011>

- [3] Coughlan N., "*Lagarosiphon major* (African elodea)," *Cabi Digital Library*, vol. pp. 6, 2022, doi: <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.30548>.
- [4] Tison-Rosebery J., *et al*, "Effects of *Lagarosiphon major* extracts on the metabolome and photosynthesis of *Microcystis aeruginosa*," *Comptes Rendus. Chimie*, vol. 26, pp. 67-81, 2023, doi: <https://doi.org/10.5802/crchim.250>.
- [5] Kitts D. D., *et al*, "Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery," *Current pharmaceutical design*, vol. 9, pp. 1309-1323, 2003, doi: <https://doi.org/10.2174/1381612033454883>
- [6] Li Y., *et al*, "Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides," *Journal of medicinal food*, vol. 18, pp. 147-156, 2015, doi: <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0028>.
- [7] Martínez-Palma N., *et al*, "Determination of antioxidant and chelating activity of protein hydrolysates from spirulina (*Arthrospira maxima*) obtained by simulated gastrointestinal digestion," *Revista mexicana de ingeniería química*, vol. 14, pp. 25-34, 2015.
- [8] Tacias-Pascacio V. G., *et al*, "Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review," *International journal of biological macromolecules*, vol. 165, pp. 2143-2196, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060>.
- [9] Green A. A., *et al*, "Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents," *Methods in Enzymology*, vol. 1, pp. 67-90, 1955, doi: [doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01014-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01014-8).
- [10] Rutherford S. M., "Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: a review," *Journal of AOAC International*, vol. 93, pp. 1515-1522, 2010, doi: <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1515>.
- [11] Marxen K., *et al*, "Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements," *Sensors*, vol. 7, pp. 2080-2095, 2007, doi: <https://doi.org/10.3390/s7102080>.
- [12] Re R., *et al*, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free radical biology and medicine*, vol. 26, pp. 1231-1237, 1999, doi: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- [13] Zhu Q. Y., *et al*, "Antioxidative activities of oolong tea," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, pp. 6929-6934, 2002, doi: <https://doi.org/10.1021/jf0206163>.
- [14] Liaset B., *et al*, "Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease," *Process Biochemistry*, vol. 37, pp. 1263-1269, 2002, doi: [doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00003-1).
- [15] Charoenphun N., *et al*, "Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate," *European Food Research and Technology*, vol. 236, pp. 57-63, 2013, doi: <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1860-2>.
- [16] Je J.-Y., *et al*, "Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis," *Process Biochemistry*, vol. 42, pp. 840-846, 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.02.006>.
- [17] Nikhita, R., & Sachindra, N. M., "Optimization of chemical and enzymatic hydrolysis for production of chicken blood protein hydrolysate rich in angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity," *Poultry Science*, vol. 100 (5), 101047, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101047>
- [18] Aursuwanna T., *et al*, "Investigating the cellular antioxidant and anti-inflammatory effects of the novel peptides in lingzhi mushrooms," *Heliyon*, vol. 8, pp. e11067, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11067>.
- [19] Ding D., *et al*, "Isolation and identification of an antioxidant collagen peptide from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) bone," *RSC advances*, vol. 9, pp. 27032-27041, 2019, doi: <https://doi.org/10.1039/C9RA04665H>.

- [20] Schaich K., *et al*, "Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays," *Journal of Functional Foods*, vol. 14, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.01.043>
- [21] Judis M., "Assessment of the quality and shelf-life in enriched n3 PUFA raw beef patties using dry soybean sprouts as antioxidant," *Food and Nutrition Sciences*, vol. 5, pp. 658, 2014, doi: <https://doi.org/10.4236/fns.2014.57077>.
- [22] Hu X., *et al*, "Purification and identification of antioxidant peptides from *Schizochytrium limacinum* hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry," *Molecules*, vol. 24, pp. 3004, 2019, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24163004>
- [23] De Quadros C. D. C., *et al*, "Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity of protein hydrolysates and peptide fractions derived from *Colossoma macropomum* and their effect on ground beef lipid oxidation," *Journal of Aquatic Food Product Technology*, vol. 28, pp. 677-688, 2019, doi: <https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1628152>.
- [24] Kong B., *et al*, "Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 54, pp. 6059-6068, 2006, doi: <https://doi.org/10.1021/jf060632q>.
- [25] Jemil I., *et al*, "Novel bioactive peptides from enzymatic hydrolysate of Sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle proteins hydrolysed by *Bacillus subtilis* A26 proteases," *Food Research International*, vol. 100, pp. 121-133, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.018>.

ABSTRACT

EFFECTS OF ALCALASE ENZYME ON HYDROLYSIS OF PROTEIN FROM *Lagarosiphon major* ALGAE

Ho Thi Giang, Nguyen Thi Thu Trang, Le Tuan Anh,

Giang Nhat Anh, Hoang Thi Ngoc Nhon*

Ho Chi Minh University of Industry and Trade

*Email: nhonhtn@huit.edu.vn

Lagarosiphon major contains high protein content, so it can be considered a source of biologically active peptides. This study investigates factors affecting protein hydrolysis from *L. major* to obtain biologically active peptides. The effects of Alcalase enzyme ratio on degree of hydrolysis (%DH) and antioxidant activity (%DPPH) was evaluated at investigated enzyme concentrations (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1%v/w), pH (4, 5, 6, 7, 8), temperatures (40, 50, 60, 70, 80 °C) and hydrolysis times (30, 60, 90, 120, 150 minutes). The results showed that the hydrolysis conditions were enzyme ratio (0.8%); temperature (50 °C), pH (7.0); time (120 minutes), the hydrolysis efficiency (%DH) was $54.87 \pm 0.2\%$ and antioxidant ability by DPPH free radical scavenging activity was $75.11 \pm 0.3\%$. Additionally, this study also evaluates others *in vitro* antioxidant activities that based on the ability to neutralize ABTS⁺ free radicals and reducing power (RP). The results showed that the hydrolyzed solution has the antioxidant ability correspond to IC₅₀ values of 67.33 µg/mL and 462.63 µg/mL.

Keywords: Alcalase, Antioxidant, *Lagarosiphon major*, peptide.