

Đánh giá khả năng thủy phân protein đậu nành tinh chế bằng dịch chiết gừng và một số hoạt tính sinh học của sản phẩm thủy phân

Lê Thái Quang^{1*}, Mai Thùy Linh², Nguyễn Thị Phương¹, Bùi Công Chính¹, Nguyễn Kim Trúc¹, Nguyễn Thị Khoa¹

¹Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành
quanglethai000@gmail.com

Tóm tắt

Sản phẩm thủy phân protein đậu nành tinh chế đang được quan tâm do có thể nâng cao hoạt tính sinh học và cải thiện khả năng khó tiêu hóa của sản phẩm chưa được thủy phân. Trong bài báo này, khảo sát khả năng thủy phân protein đậu nành tinh chế của dịch chiết tự nhiên, đồng thời đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa và làm lành tổn thương trên nguyên bào sợi của sản phẩm thủy phân. Gừng được chọn làm nguồn nguyên liệu cho nghiên cứu vì dịch chiết gừng chứa nhiều enzyme thủy phân protein. Kết quả nghiên cứu cho thấy sự thủy phân protein đậu nành tinh chế phụ thuộc nồng độ, thời gian và nhiệt độ xử lý. Các sản phẩm protein đậu nành tinh chế sau thủy phân có khả năng khử gốc tự do cao hơn từ (7-31) % và thu hẹp diện tích vết thương trên nguyên bào sợi hơn 2 lần so với protein đậu nành tinh chế chưa thủy phân. Kết quả này tạo cơ sở cho những nghiên cứu sâu hơn về hoạt tính sinh học và khả năng ứng dụng của các sản phẩm thủy phân vào sản xuất thực phẩm chức năng.

Nhận 04/11/2022
Được duyệt 03/03/2023
Công bố 30/03/2023

Từ khóa

gừng, kháng oxy hóa, làm lành vết thương, protein đậu nành tinh chế, thủy phân

© 2022 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Protein đậu nành tinh chế (soy protein isolate - SPI) chứa đến hơn 90 % hàm lượng protein, được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm như các sản phẩm sữa bột cho trẻ em, đồ uống dinh dưỡng và thanh dinh dưỡng [1]. Tuy nhiên, protein từ đậu nành có tỷ lệ tiêu hóa thấp hơn so với protein động vật, điều này hạn chế ứng dụng của chế phẩm chứa protein đậu nành [2]. Phương pháp thủy phân SPI bằng enzyme nhằm tạo các đoạn peptide kích thích ngăn đang được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm. Phương pháp này không những cải thiện khả năng hấp thu mà còn tạo các peptide có hoạt tính sinh học tốt hơn so với SPI chưa được thủy phân. Sản phẩm SPI thủy phân bằng flavourzyme có khả năng ức chế hoạt động của glycerol-3-phosphate dehydrogenase, do đó làm giảm sự tích tụ lipid dẫn đến ngăn chặn biệt hóa tế bào 3T3-L1 cao hơn SPI chưa thủy phân [3]. Kết quả này cho thấy tiềm năng của sản

phẩm SPI thủy phân trong ngăn ngừa các bệnh liên quan đến tăng lipid và béo phì.

Tuy nhiên, đa phần các protease thủy phân SPI đều là enzyme tinh chế như flavourzyme, corolase, papain hoặc bromelain [3,4]. Việc sử dụng dịch chiết tự nhiên từ thực vật trong thủy phân SPI vẫn chưa được nghiên cứu kỹ lưỡng. Nghiên cứu trước đây đã tiến hành thử nghiệm dịch chiết từ đu đủ và dứa để thủy phân SPI. Kết quả cho thấy mức độ thủy phân khi sử dụng các dịch chiết tự nhiên này tương đối cao, các peptide được giải phóng dưới 800 Da và sản phẩm thủy phân không có vị đắng [4]. Tuy chưa đề cập đến hoạt tính sinh học của các sản phẩm thủy phân SPI nhưng nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng và phát triển dịch chiết thực vật để thủy phân SPI, nhằm mang lại những sản phẩm có giá trị cao.

Gừng (*Zingiber officinale* Rosc.) được trồng nhiều nơi trên thế giới và đây là một nguồn dịch chiết chứa enzyme



thủy phân protein tiềm năng, trong đó có zingibain đã được nghiên cứu kỹ lưỡng [5]. Tuy nhiên, chưa có báo cáo về việc sử dụng dịch chiết gừng (DCG) để thủy phân SPI nhằm tạo sản phẩm có hoạt tính sinh học. Do vậy, các điều kiện thủy phân SPI bằng DCG đã được tiến hành khảo sát ở các nồng độ dịch chiết, nhiệt độ, thời gian khác nhau. Sản phẩm thủy phân SPI bằng protease từ DCG sẽ được kiểm tra khả năng kháng oxy hóa *in vitro* và làm lành vết thương trên nguyên bào sợi ở người.

2 Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên liệu nghiên cứu

SPI được mua từ Công ty Shiv Health Foods LLP (Ấn Độ). Gừng tươi mua ở chợ truyền thống có nguồn gốc từ Việt Nam.

Nguyên bào sợi người (fibroblast) trong thử nghiệm làm lành vết thương được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. HCM.

2.2 Khảo sát điều kiện thủy phân SPI bằng DCG

Dịch chiết từ củ gừng được thu nhận bằng máy ép. Phần dịch chiết sau đó được ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 10 phút ở 10 °C. SPI 2 % được thủy phân với DCG ở các nồng độ (2,5; 5; 10 và 20) % (thể tích/thể tích, v/v) (nồng độ cuối cùng trong hỗn hợp) trong thời gian (1, 2 và 4) giờ, ở nhiệt độ phản ứng 25 °C và 60 °C. Sau thời gian thủy phân, protease trong gừng bị bất hoạt ở nhiệt độ 90 °C trong 15 phút. Tiếp đó, mẫu được ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 10 phút để thu nhận phần dịch nổi chứa protein tan. Kết quả khảo sát sự phân cắt SPI tại các điều kiện khảo sát được kiểm tra thông qua điện di protein SDS-PAGE (sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Gel được nhuộm bằng thuốc nhuộm Coomassie brilliant blue và được quét hình bằng máy quét (LaserJet Pro M125a, Korea).

2.3 Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa

Hoạt tính kháng oxy hóa được tiến hành bằng thử nghiệm sử dụng ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) (Sigma Aldrich, Germany) nhằm xác định hoạt tính khử gốc tự do ABTS^{•+} của các sản phẩm SPI thủy phân bằng DCG. Thử nghiệm sử dụng ABTS được thực hiện tương tự như ở trước đây [6]. Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng oxy hóa của các sản phẩm SPI thủy phân bằng DCG ở các nồng độ (2,5; 5; 10 và 20) %, ở 60 °C trong 4 giờ được tính toán so với mẫu SPI chứa DCG với nồng độ

tương ứng. Hoạt tính kháng oxy hóa của các mẫu thí nghiệm được đo bằng độ hấp phụ của mẫu ở bước sóng 734 nm (máy đo quang phổ Genway, USA). Tỷ lệ ức chế gốc tự do ABTS^{•+} của các mẫu thí nghiệm được tính toán theo công thức sau:

$$I (\%) = [1 - (A_2 - A_3)/A_1] \times 100$$

Trong đó,

I: Tỷ lệ ức chế gốc tự do ABTS^{•+}

A₁: Giá trị mật độ quang ở bước sóng 734 nm của đối chứng âm (chỉ chứa ABTS^{•+})

A₂: Giá trị mật độ quang ở bước sóng 734 nm của mẫu thử sau phản ứng với ABTS^{•+}

A₃: Giá trị mật độ quang ở bước sóng 734 nm của đối chứng trắng (mẫu thử nghiệm không chứa ABTS^{•+})

2.4 Hoạt tính làm lành vết thương *in vitro*

Phương pháp xác định hoạt tính làm lành vết thương trên mô hình nguyên bào sợi (fibroblast) của các sản phẩm thủy phân SPI bằng DCG được tiến hành tương tự như ở báo cáo trước đó với một số thay đổi nhỏ [7]. Cụ thể, sau khi tạo ra vết thương bằng tip 10 μL, môi trường cũ được thay thế bằng môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM high glucose) (Cytiva, USA) chứa 5 % (v/v) các mẫu thí nghiệm bao gồm SPI 2 %, các mẫu DCG ở nồng độ (2,5 và 5) % và các mẫu SPI thủy phân bằng DCG nồng độ (2,5 và 5) % ở 60 °C trong 4 giờ. Đối chứng là nguyên bào sợi được nuôi trong môi trường DMEM high glucose và nước với tỷ lệ 5 % (v/v). Hình ảnh vết thương được quan sát trên kính hiển vi (Euromex, Netherlands) sau (0, 12 và 24) giờ. Tỷ lệ làm lành vết thương được tiến hành tương tự như báo cáo trước đây [7].

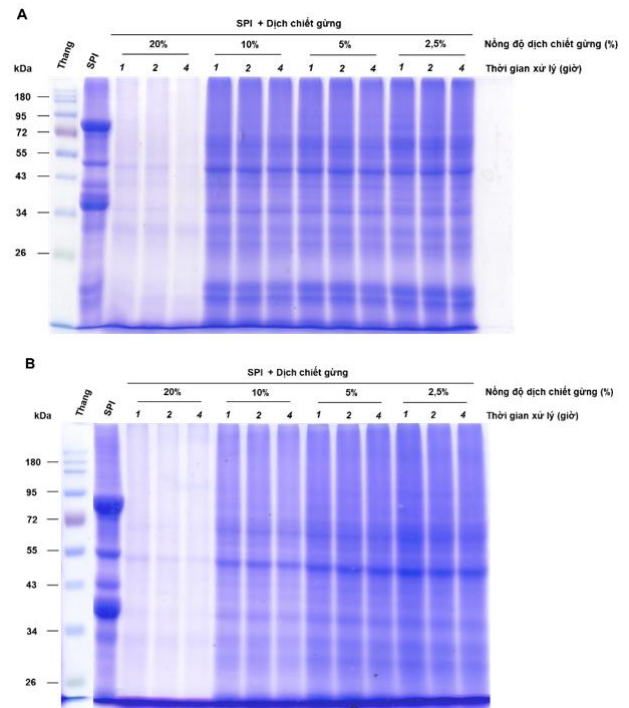
3 Kết quả và thảo luận

3.1 Khả năng thủy phân SPI của DCG ở các điều kiện nồng độ dịch chiết, thời gian và nhiệt độ khác nhau
Để tìm ra điều kiện thủy phân thích hợp cho những thí nghiệm tiếp theo, nghiên cứu tiến hành khảo sát khả năng thủy phân SPI bằng DCG ở các nồng độ (2,5; 5; 10 và 20) % (v/v), tại các khoảng thời gian (1, 2 và 4) giờ ở nhiệt độ 25 °C (nhiệt độ phòng) và 60 °C (nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của một số protease). Kết quả điện di của thử nghiệm đánh giá ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết, nhiệt độ, thời gian lên sự thủy phân SPI bằng DCG cho thấy ở 25 °C, ảnh hưởng của nồng độ DCG lên quá trình thủy phân SPI thể hiện rõ ràng ở nồng độ 20 % so với các nồng độ khác. Ở nồng độ 20 %, SPI bị phân cắt gần như hoàn toàn thành các đoạn

có kích thước nhỏ. Khả năng thủy phân SPI tương tự ở các nồng độ (2,5; 5 và 10) % và kém hơn so với nồng độ 20 %. Thời gian không ảnh hưởng nhiều tới sự thủy phân SPI bằng DCG, sự sai khác về khả năng thủy phân SPI chỉ quan sát được ở mức 4 giờ so với (1, 2) giờ với nồng độ dịch chiết 20 % (Hình 1A).

Để tìm ra điều kiện thủy phân thích hợp cho những thí nghiệm tiếp theo, nghiên cứu tiến hành khảo sát khả năng thủy phân SPI bằng DCG ở các nồng độ (2,5; 5; 10 và 20) % (v/v), tại các khoảng thời gian (1, 2 và 4) giờ ở nhiệt độ 25 °C (nhiệt độ phòng) và 60 °C (nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của một số protease). Kết quả điện di của thử nghiệm đánh giá ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết, nhiệt độ, thời gian lên sự thủy phân SPI bằng DCG cho thấy ở 25 °C, ảnh hưởng của nồng độ DCG lên quá trình thủy phân SPI thể hiện rõ ràng ở nồng độ 20 % so với các nồng độ khác. Ở nồng độ 20 %, hai protein phổ biến có kích thước lớn trong SPI (tại vị trí (72-95) kDa và (34-43) kDa) bị phân cắt gần như hoàn toàn. Khả năng thủy phân SPI tương tự ở các nồng độ (2,5; 5 và 10) % và kém hơn so với nồng độ 20 %. Thời gian không ảnh hưởng nhiều tới sự thủy phân SPI bằng DCG, sự sai khác về khả năng thủy phân SPI chỉ quan sát được ở mức 4 giờ so với (1 và 2) giờ với nồng độ dịch chiết 20 % (Hình 1A).

Khi tăng nhiệt độ lên 60 °C, SPI bị thủy phân mạnh hơn, sự sai khác được quan sát rõ nhất ở nồng độ 10 % và 20 % trong các điều kiện thời gian được khảo sát. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với dự đoán protease có trong DCG hoạt động tốt hơn ở nhiệt độ 60 °C và phù hợp với các kết quả nghiên cứu trước đây về zingibain tách từ gừng hoạt động tối ưu khoảng (50-60) °C [8]. Khả năng thủy phân SPI giảm dần khi nồng độ DCG giảm từ 20 % xuống (10; 5 và 2,5) % (Hình 1B). Ngoài ra, mức độ thủy phân SPI thay đổi khi tăng thời gian xử lý lên 4 giờ với nồng độ DCG sử dụng là (10 và 20) %. Như vậy, các yếu tố nồng độ DCG, thời gian và nhiệt độ xử lý đều ảnh hưởng tới sự thủy phân SPI ở các mức độ khác nhau. Do SPI bị thủy phân khác nhau với các nồng độ dịch chiết khảo sát ở nhiệt độ 60 °C và thời gian xử lý 4 giờ nên các điều kiện nhiệt độ và thời gian xử lý này sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1 Khả năng thủy phân SPI của DCG ở các điều kiện nồng độ dịch chiết, nhiệt độ và thời gian xử lý khác nhau. SPI được xử lý với DCG ở các nồng độ (2,5; 5; 10 và 20) % tại nhiệt độ 25 °C (A) và 60 °C (B) trong thời gian (1, 2 và 4) giờ.

3.2 Khả năng khử gốc tự do ABTS^{•+} của sản phẩm SPI thủy phân bằng DCG

Nghiên cứu trước đây cho thấy sản phẩm SPI bị thủy phân thường có hoạt tính kháng oxi hóa cao hơn sản phẩm chưa bị thủy phân [9]. Điều này có thể là do một số amino acid có tính kháng oxi hóa như histidine, methionine, tryptophan, tyrosine cysteine, lysine và arginine bị giấu trong cấu trúc không gian của protein sẽ lộ ra ngoài khi protein bị phân cắt thành các polypeptide hoặc peptide có kích thước nhỏ. Vì vậy, nghiên cứu cũng tiến hành đánh giá khả năng kháng oxi hóa của sản phẩm SPI thủy phân bằng dịch chiết gừng. Kết quả cho thấy khả năng khử gốc tự do ABTS^{•+} của SPI đều thấp hơn so với sản phẩm SPI thủy phân bằng DCG ở các nồng độ (2,5; 5; 10 và 20) % sau 4 giờ thủy phân ở nhiệt độ 60 °C (Bảng 1). Sự tăng cường khả năng khử gốc tự do ABTS^{•+} của sản phẩm SPI thủy phân có thể do các polypeptide/peptide tạo ra có hoạt tính kháng oxi hóa mạnh hơn so với SPI ban đầu. Kết quả này sẽ tạo cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trên mô hình *in vivo*.

Bảng 1 Khả năng khử gốc tự do ABTS⁺⁺ của sản phẩm SPI được thủy phân bằng dịch chiết gừng.

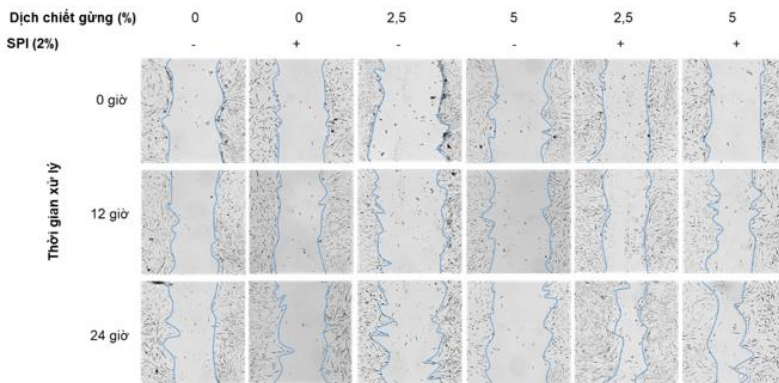
DCG (%)	2,5	5	10	20
SPI	51,62 ± 2,83	28,41 ± 1,24	14,18 ± 0,49	5,16 ± 0,36
SPI sau thủy phân	76,01 ± 2,35**	59,49 ± 8,07***	31,01 ± 1,73**	12,36 ± 2,77*

Sự sai khác thống kê giữa các mẫu SPI và gừng so với SPI được thủy phân bằng DCG ở cùng một nồng độ được kiểm tra bằng phép thử t-test, trong đó *: p<0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001.

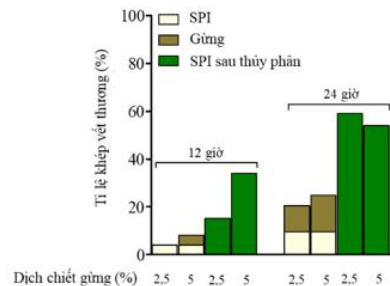
3.3 Khả năng làm lành vết thương trên nguyên bào sợi ở người của sản phẩm SPI thủy phân bằng DCG
 Báo cáo trước đây cho thấy peptide có thể có hoạt tính làm lành vết thương [10]. Do đó, nghiên cứu tiến hành thử nghiệm đánh giá khả năng của sản phẩm SPI thủy phân bằng DCG trong làm lành vết thương trên mô hình nguyên bào sợi ở người. DCG ở nồng độ (10 và 20) % ức chế sự phát triển của tế bào nên nồng độ dịch chiết (2,5 và 5) % được sử dụng trong thí nghiệm. Trên mô hình nguyên bào sợi người, độ rộng vết thương ở mẫu xử lý bằng SPI và DCG ở nồng độ 2,5 % tương tự so với mẫu đối chứng (nước) sau (12 và 24) giờ. Kết quả này cho thấy SPI và DCG 2,5 % không có khả năng làm lành vết thương trên nguyên bào sợi. Ở mẫu đối chứng, vết thương được thu hẹp một phần sau 24 giờ trong khi đó ở DCG nồng độ 5 %, vết thương không

thu hẹp lại sau 24 giờ. Điều này chứng tỏ nồng độ DCG 5 % làm giảm khả năng làm lành vết thương trên mô hình nguyên bào sợi. Khi bổ sung sản phẩm SPI được thủy phân bằng DCG nồng độ (2,5 và 5) % vào tế bào, độ rộng vết thương được thu hẹp hơn rất nhiều so với mẫu đối chứng, SPI và DCG ở nồng độ tương ứng sau (12 và 24) giờ (Hình 2). Kết quả này cho thấy khả năng làm lành vết thương của SPI được tăng cường khi SPI bị thủy phân bằng DCG ở nồng độ (2,5 và 5) %. Điều này có thể là do sản phẩm SPI thủy phân có chứa các peptide có hoạt tính làm lành vết thương trên nguyên bào sợi. Cần có các nghiên cứu sâu hơn về khả năng làm lành vết thương của sản phẩm SPI thủy phân bằng DCG trên mô hình *in vivo* và các peptide trong sản phẩm thủy phân thể hiện hoạt tính này.

A



B



Hình 2 Khả năng làm lành vết thương trên mô hình nguyên bào sợi người của SPI, DCG và SPI thủy phân bằng DCG. (A) Hình ảnh vết thương tại các thời điểm (0, 12 và 24) giờ trên mô hình nguyên bào sợi người sau khi được xử lý với SPI, DCG (2,5 và 5) % và SPI thủy phân bằng DCG (2,5 và 5) % tại nhiệt độ 60 °C trong thời gian 4 giờ. (B) Tỉ lệ khép vết thương (%) tại các thời điểm (12 và 24) giờ của SPI, DCG và SPI thủy phân bằng DCG.

4 Kết luận

Nghiên cứu cho thấy DCG có khả năng thủy phân SPI và sự thủy phân phụ thuộc vào nồng độ dịch chiết, thời gian và nhiệt độ xử lý. Đồng thời, sản phẩm SPI thủy phân có hoạt tính kháng oxi hóa và làm lành vết thương trên mô hình nguyên bào sợi tốt hơn so với cả SPI chưa thủy phân và DCG. Kết quả của nghiên cứu đã tìm ra điều kiện thủy phân thích hợp để tạo sản phẩm SPI thủy phân bằng DCG có hoạt tính kháng oxi hóa và làm lành

vết thương *in vitro* cao. Kết quả này sẽ tạo cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo về tách chiết các peptide có hoạt tính sinh học tạo ra từ sự thủy phân SPI bằng DCG cũng như ứng dụng sản xuất đồ uống SPI thủy phân có hoạt tính sinh học được tăng cường.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ – Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2022.01.133/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Quin, P., Wang, T., and Luo, Y. (2022). *A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development*. J Agric Food Res 7, 100265.
2. Liener, I. E. (1994). *Implications of antinutritional components in soybean foods*. Crit Rev Food Sci Nutr 34, 31-67.
3. Tsou, M. J., Kao, F. J., Tseng, C. K., and Chiang W. D. (2010). *Enhancing the anti-adipogenic activity of soy protein by limited hydrolysis with Flavourzyme and ultrafiltration*. Food Chem 122, 243-248.
4. Marinova, M., Cuc, N. T. K., and Tchobanov, B. (2008). *Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by food grade proteinases and aminopeptidases of plant origin*. Biotechnol & Biotechnol Equip 22, 835-838.
5. Thompson, E. H., Wolf, I. D., and Allen, C. E. (1973). *Ginger rhizome: a new source of proteolytic enzyme*. J Food Sci 38, 652-655.
6. Rajurkar, N. S., Hande, S. M. (2011). *Estimation of phytochemical content and antioxidant activity of some selected traditional Indian medicinal plants*. Indian J Pharm Sci 73:146-51.
7. Nguyen, T. P., Phan, N. H., Ngo, H. L., Do, D. T., Do, D. G., and Nguyen, K. T. (2022). *Nghiên cứu hoạt tính làm lành vết thương và kháng viêm của Lan Gấm (Anoectochilus formosanus Hayata) nuôi cấy mô*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Nguyễn Tất Thành, số 16.
8. Gagaoua, M., Hoggas, N., and Hafid, K. (2015). *Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from Zingiber officinale Roscoe rhizomes*. Int J Biol Macromol 73: 245-252.
9. Lermen, A. M., Clerici, N. J., and Daroit, D. J. (2020). *Biochemical properties of a partially purified protease from Bacillus sp. CL18 and its use to obtain bioactive soy protein hydrolysates*. Appl Biochem Biotechnol 192: 643-664.
10. Mangoni, M. L., McDermott, A. M., and Zasloff, M. (2016). *Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations*. Exp Dermatol 25: 167-173.

A study to evaluate soy protein isolate hydrolysis by ginger extract and bioactivities of the hydrolysate

Quang Thai Le¹, Linh Thuy Mai², Thi-Phuong Nguyen¹, Chinh Cong Bui¹, Truc Kim Nguyen¹, Khoa Thi Nguyen¹

¹NTT Hi-tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

²VNUHCM-University of Science

quanglethai000@gmail.com

Abstract Hydrolysates from soybean protein isolate (SPI) have attracted great attention due to the enhancement of digestion and biological activities. Here, our study investigated the hydrolysis of SPI by ginger extract since ginger root provides a potent protease source. The in vitro antioxidant and wound-healing activities of the hydrolysate was also evaluated in the study. Our data showed that the hydrolysis levels were influenced by the concentrations of ginger extract, temperature and time duration. The highest level of SPI hydrolysis was achieved upon the treatment with 20 % of ginger extract for 4 hours at 60 °C. The SPI hydrolysates produced by ginger extracts at the concentrations of (2.5, 5, 10 and 20) % exhibited the ability to scavenge free radicals (7-31) % higher than raw SPI. In addition, wound recovery in the human fibroblast model was improved more than 2 folds upon the treatment with SPI hydrolyzed by ginger extracts at the concentration of (2.5 and 5) %. These results suggest further studies on the bioactivities and the application of SPI hydrolysate produced by ginger extract.

Keywords ginger, antioxidant, wound healing, soy protein isolate, hydrolysis

