

NGHIÊN CỨU TRÍCH LY ENZYME PROTEASE TỪ THỊT ĐẦU TÔM SÚ (*Penaeus monodon*)

Trần Thanh Trúc¹, Trần Bạch Long², Phan Thị Bích Ngọc³, Hà Thị Thụy Vy⁴ và Nguyễn Văn Mười¹

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

² Học viên Cao học Công nghệ Sinh học Khóa 19, Trường Đại học Cần Thơ

³ Sinh viên lớp Công nghệ Thực phẩm Khóa 36, Trường Đại học Cần Thơ

⁴ Giảng viên Trường Trung cấp Kinh tế Kỹ thuật Cà Mau

Thông tin chung:

Ngày nhận: 10/6/2014

Ngày chấp nhận: 04/8/2014

Title:

Extraction of protease from
meat of tiger shrimp head
(*Penaeus monodon*)

Từ khóa:

Nhiệt độ, pH, protease, thịt
đầu tôm sú, thời gian, trích
ly, trữ đông, tỷ lệ dung môi

Keywords:

Black tiger shrimp head
meat, extraction, frozen, pH,
protease, temperature,
stored, time, , solvent

ABSTRACT

Utilizing fishery by-products to process into food and bioactivity products will bring economic benefits and reduce waste into the environment. This study focused on investigating the effect of storage time in frozen black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) head meat on the protease enzyme extracted from the flesh shrimp head meat as well as the optimum extraction conditions of protease enzyme. The result showed that the enzyme activity did not affect the protease extraction during 8 weeks frozen storage. Alkaline protease extract obtained from shrimp head meat have the highest overall activity was 13.48 U/g dry material in the ratio of sample and solvent ratio was 1: 4 (w/ v) at pH 9.0, 50°C during 40 minutes.

TÓM TẮT

Chế biến phụ phẩm của ngành thủy sản thành những sản phẩm có giá trị gia tăng sẽ mang lại hiệu quả kinh tế cao cho nhà sản xuất và tận dụng triệt để lượng phụ phẩm từ quá trình chế biến thủy sản gây ô nhiễm môi trường. Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của thời gian trữ đông của thịt đầu tôm sú đến quá trình trích ly enzyme protease từ thịt đầu tôm sú (*Penaeus monodon*) và các điều kiện tối ưu trích ly enzyme protease. Kết quả khảo sát cho thấy, việc trữ đông nguyên liệu đến 8 tuần vẫn giúp duy trì ổn định hoạt tính enzyme protease có trong thịt đầu tôm. Dịch chiết protease kiếm thu được từ thịt đầu tôm sú có tổng hoạt tính cao nhất là 13,48 U/g CKNL (chất khô nguyên liệu) với tỷ lệ mẫu: dung môi là 1: 4 (w/v); pH 9,0; nhiệt độ 50°C; thời gian trích ly 40 phút.

1 MỞ ĐẦU

Nhiều năm qua, Việt Nam luôn là nước có thể mạnh về xuất khẩu thủy sản, trong đó tôm sú là một trong những mặt hàng chủ lực có tỷ trọng xuất khẩu đang chiếm vị trí cao nhất. Tỷ lệ đầu tôm được loại bỏ trong quá trình chế biến khoảng 34% khối lượng ban đầu (Tran *et al.*, 2011) và chủ yếu được dùng làm phân bón, thức ăn gia súc, thủy sản

nhưng giá trị thành phẩm của các sản phẩm này chưa cao. Việc nghiên cứu sản xuất chitosan từ vỏ đầu tôm trong thời gian gần đây là một hướng mới nhằm sử dụng có hiệu quả nguồn đầu tôm phụ phẩm (Trung *et al.*, 2003). Tuy nhiên, việc sản xuất chitosan đòi hỏi phải loại bỏ lượng thịt trong đầu tôm (chiếm đến 15,25% khối lượng đầu tôm và 5,5% so với nguyên liệu tôm sú tươi), tạo ảnh

hưởng tiêu cực đến môi trường. Chính vì thế, yêu cầu đặt ra là nghiên cứu biện pháp sử dụng nguồn nguyên liệu giàu protein và enzyme nhằm nâng cao giá trị thương phẩm của tôm sú, đồng thời làm giảm tác động ô nhiễm môi trường do quá trình xử lý đầu tôm là vấn đề có tính cấp thiết.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Thịt đầu tôm sú (đã được tách sẵn phần thịt ở vị trí ngay đỉnh đầu, bỏ phần chân hàm, chân ngực, râu và vỏ đầu ngực, chùy) được cung cấp từ ấp Bung Cốc, xã Phú Mỹ, huyện Thạnh Trị, tỉnh Sóc Trăng. Mẫu được giữ lạnh trong thùng xốp bằng nước đá, nhiệt độ bảo đảm dưới 4°C, thời gian vận chuyển về phòng thí nghiệm tối đa 2 giờ. Thịt đầu tôm sú sau khi đưa về phòng thí nghiệm được rửa sơ bộ với tỷ lệ đầu tôm và nước là 1: 2 (w/v), loại bỏ các chất bẩn và phần râu, chân tôm còn sót lại (phần nổi trên mặt nước). Sau đó nguyên liệu được để ráo nước trước khi phân chia thành các mẫu có khối lượng xác định (khối lượng mẫu sử dụng cho một đơn vị thí nghiệm (100 g/mẫu), bao gói trong bao bì PA và trữ đông ở -18 ± 2°C.

2.2 Hóa chất

Hóa chất sử dụng để trích ly enzyme (các dung dịch đệm): tris HCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, Glycine, NaOH (Merck, Đức).

Hóa chất để xác định hoạt tính enzyme: tyrosine; HCl 0,2 N; NaOH 0,5 N; Trichloacetic acid (TCA); Folin; casein dạng bột (Merck, Đức).

2.3 Phương pháp trích ly enzyme protease từ thịt đầu tôm sú

Thịt đầu tôm sú đông lạnh được phối trộn với dung môi theo tỷ lệ khảo sát. Nhiệt độ dung môi trước khi phối trộn là 2 ÷ 4°C. Tiếp theo, hỗn hợp được nghiền bằng máy quay sinh tố (tốc độ quay của motor ở mức 2, 3000 rpm) trong thời gian 3 phút trước khi quá trình trích ly enzyme bắt đầu. Trong quá trình nghiền, nhiệt độ không vượt quá 5°C (Trần Quốc Hiền và Lê Văn Việt Mẫn, 2006).

Sau khi nghiền, mẫu được đổ vào cốc thủy tinh, ủ ở điều kiện nhiệt độ và thời gian khác nhau để ly trích enzyme. Chú ý khuấy đảo mẫu 5 phút/lần. Sau đó mẫu được lọc qua vải lọc để loại bỏ tạp chất rắn. Dịch lọc được ly tâm ở tốc độ 6000 rpm trong thời gian 20 phút để loại bỏ phần cặn, thu dịch chiết, gọi là dịch chiết protease thô (Yaneza *et al.*, 2004). Tiến hành xác định hoạt tính protease trong dịch chiết enzyme thô nhằm chọn được điều kiện trích ly protease tốt nhất.

2.4 Phương pháp xác định hoạt tính enzyme protease

Theo phương pháp Anson cải tiến (Anson, 1938) sử dụng casein (1%) như cơ chất. Cho protease tác dụng với cơ chất là casein, sản phẩm tạo thành là các peptide ngắn hay acid amin, trong các loại acid amin, tyrosine chiếm đa số. Xác định tyrosine bằng phản ứng màu với thuốc thử Folin, từ đó xác định hoạt độ protease theo định nghĩa. Một đơn vị hoạt độ của protease được biểu thị là số micromole tyrosine sinh ra do thủy phân casein bởi 1 mL dung dịch hay 1 mg chế phẩm protease trong thời gian 1 phút ở điều kiện (30°C, pH 7,6). Hoạt tính enzyme được khảo sát ở nhiệt độ 30°C và pH = 7,6.

2.5 Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.5.1 Phương pháp xác định thành phần cơ bản của thịt đầu tôm sú

Nguyên liệu thịt đầu tôm ở mỗi đợt thu mẫu (lấy ngẫu nhiên 200 g/mẫu, ít nhất 3 mẫu trong một đợt khảo sát) được xay nhuyễn và sử dụng để tiến hành phân tích các thành phần cơ bản như: độ ẩm, protein tổng số, lipid, pH.

2.5.2 Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của thời gian trữ đông thịt đầu tôm sú đến sự thay đổi hoạt tính của enzyme protease

Thí nghiệm tiến hành nhằm mục tiêu đánh giá hiệu quả trữ đông đến sự ổn định hoạt tính protease trong thịt đầu tôm sú. Thịt đầu tôm sú sau xử lý sơ bộ và cân theo khối lượng mẫu khảo sát trước khi bảo quản lạnh đông ở -18°C. Ứng với từng thời gian bảo quản (1 đến 8 tuần), trích ly và xác định hoạt tính enzyme protease. Việc trích ly protease được thực hiện theo phương pháp được trình bày ở mục 2.4. Ở thí nghiệm này, sử dụng dung môi trích ly là nước cất với tỷ lệ mẫu và dung môi là 1: 2 (w/v, g/mL), tiến hành trích ly ở nhiệt độ phòng (30 ± 2°C) trong thời gian 20 phút (Nguyễn Lê Hà, 2011). Dịch trích protease được xác định hoạt tính theo phương pháp Anson cải tiến (mục 2.5).

2.5.3 Thí nghiệm 2: Xác định tỷ lệ mẫu và dung môi trích ly protease

Thí nghiệm tiến hành khảo sát với nhân tố tỷ lệ mẫu và dung môi dùng để trích ly enzyme protease từ thịt đầu tôm sú. Tiến hành trích ly enzyme protease như mục 2.4, thịt đầu tôm sú xay nhuyễn được sử dụng để trích ly protease bằng nước cất ở nhiệt độ cố định (nhiệt độ phòng, khoảng 32 ± 2°C) trong thời gian cố định 20 phút, tỷ lệ mẫu và nước cất (w/v) được thay đổi lần lượt từ 1: 1 đến 1:

6. Chọn lựa tỷ lệ mẫu và dung môi phù hợp dựa trên hoạt tính protease đạt cao nhất.

2.5.4 Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của sự thay đổi pH dung môi đến hiệu quả trích ly protease từ thịt đầu tôm sú

Thí nghiệm khảo sát với mục đích xác định được khoảng pH thích hợp (điều chỉnh bằng dung dịch đệm khác nhau) giúp thu được protease từ mẫu thịt đầu tôm nguyên liệu có hoạt tính cao nhất. Quá trình trích ly protease từ thịt đầu tôm được thực hiện tương tự như thí nghiệm 2. Thay thế dung môi trích ly là nước cất bằng các dung dịch đệm có giá trị pH khác nhau, bao gồm dung dịch đệm phosphate (pH 7), đệm Tris-HCl (pH 8, 9) và đệm Glycine - NaOH (pH 10 ÷ 12). Tỷ lệ mẫu và dung môi được sử dụng dựa trên kết quả của thí nghiệm 2. Điều kiện ủ và phương pháp tách chiết giữ cố định.

Dựa trên kết quả thống kê sự thay đổi hoạt tính protease, chọn lựa pH dung môi sử dụng để trích ly protease từ thịt đầu tôm sú.

2.5.5 Thí nghiệm 4: Xác định tương tác của nhiệt độ và thời gian ủ đến hiệu quả trích ly protease

Thí nghiệm tiến hành với 2 nhân tố X_1 - nhiệt độ ủ (thay đổi từ 30 đến 70°C) và X_2 -thời gian ủ (3 mức độ: 20, 40 và 60 phút). Sử dụng phương án trực giao cấp 2 với số nghiệm thức tối ưu: $N = 3 \times 5 = 15$, trong đó có một thí nghiệm ở tâm để kiểm tra ý nghĩa các hệ số của phương trình hồi quy. Thí nghiệm được thực hiện dựa trên quy trình trích ly ở mục 3.2.3 và các thông số thích hợp đã được lựa chọn từ thí nghiệm 2, 3). Mẫu sau khi nghiền được ủ theo 18 đvtn được trình bày ở Bảng 1. Tương ứng với từng điều kiện khảo sát, lọc và ly tâm, thu dịch chiết enzyme và xác định hoạt tính.

Dựa trên hoạt tính trung bình của protease thu được tương ứng với 18 đơn vị thí nghiệm, sử dụng chương trình Statgraphics Centurion 16.1 để giải bài toán qui hoạch thực nghiệm và tính các hệ số phương trình hồi quy, trong đó hàm mục tiêu Y: Tổng hoạt tính protease có trong dịch chiết enzyme (U/g CKTĐT); X_1 : nhiệt độ trích ly (°C) và X_2 : thời gian trích ly, phút. Ý nghĩa của các hệ số được kiểm tra theo tiêu chuẩn Student với $p = 0,05$, số bậc tự do $f = 3-1= 2$. Kiểm tra sự tương thích phương trình hồi quy với thực nghiệm theo tiêu

chuẩn Fisher, đảm bảo $F < F_{0,95}(9-2, 3-1)$.

Vẽ đồ thị bề mặt đáp ứng và xác định điều kiện nhiệt độ và thời gian trích ly tối ưu.

Bảng 1: Ma trận quy hoạch thực nghiệm quá trình trích ly protease từ thịt đầu tôm sú

TT	Giá trị mã hóa		Giá trị thực nghiệm	
	X_1	X_2	Nhiệt độ ủ (°C)	Thời gian ủ (phút)
1	-2	-1	30	20
2	-1	0	40	40
3	0	+1	50	60
4	+1	+1	60	60
5	+2	0	70	40
6	+2	-1	70	20
7	+1	0	60	40
8	0	0	50	40
9	-1	-1	40	20
10	-2	+1	30	60
11	-2	0	30	40
12	-1	+1	40	60
13	0	-1	50	20
14	+1	-1	60	20
15	+2	+1	70	60
16	0	0	50	40
17	0	0	50	40
18	0	0	50	40

Ghi chú: Giá trị mã hóa -2, -1, 0, +1, +2 thể hiện 5 mức độ khảo sát tương ứng với nhiệt độ từ 30 đến 70°C và thời gian ủ thay đổi ở 3 mức độ 20, 40 và 60 phút tương ứng các giá trị mã hóa -1, 0, +1

2.6 Phương pháp thu thập và xử lý kết quả

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, lặp lại ít nhất 3 lần. Thông số tương ứng với kết quả khảo sát đã lựa chọn từ thí nghiệm trước được sử dụng làm nhân tố cố định cho thí nghiệm kế tiếp. Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion 16.1, phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định LSD để kết luận về sự sai khác giữa trung bình các nghiệm thức.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thành phần cơ bản thịt đầu tôm sú

Việc xác định thành phần hóa lý cơ bản và hoạt tính protease ban đầu của thịt tôm sú là việc cần thiết và cần phải quan tâm đầu tiên trước khi tiến hành các thí nghiệm khảo sát tiếp theo. Kết quả thí nghiệm được trình bày Bảng 2.

Bảng 2: Thành phần hóa lý cơ bản của thịt đầu tôm sú

Thành phần	Giá trị
Độ ẩm(%)	83,84 ± 1,41
Đạm tổng số (%)	12,85 ± 0,06
Giá trị pH	7,87 ± 0,16
Hoạt tính protease (U/g CKNL) (*)	0,79 ± 0,02

Hoạt tính protease (U/g) (*) – Là kết quả của quá trình trích ly protease từ thịt đầu tôm sú ban đầu trước khi cho vào bảo quản lạnh đông trong điều kiện: tỷ lệ mẫu: dung môi là 1: 2; dung môi ngâm trích ly được sử dụng là nước cất hai lần (pH = 7); nhiệt độ phòng 30°C và kết hợp thời gian ngâm 20 phút.

Kết quả khảo sát cho thấy, hàm lượng đạm tổng số trong thịt đầu tôm khá cao (12,85 ± 0,06%), đây là điều kiện thích hợp cho vi sinh vật gây hư hỏng phát triển và cũng là điều kiện thúc đẩy quá trình hoạt động của các enzyme. Trong quá trình sản xuất thịt đầu tôm sú là phụ phẩm – thường được xem phế liệu của quá trình xử lý đầu tôm chuẩn bị cho việc chế biến chitosan. Nói cách khác, thịt đầu tôm chính là phụ phẩm của phụ phẩm, trong thời gian dài, phần lớn các cơ sở sản xuất chitosan đều chỉ nghiên cứu tìm giải pháp phân hủy thịt đầu tôm để thu nhận vỏ tôm (Ngô Thị Hoài Dương *et al.*, 2008). Trong thời gian gần đây, một số nhà máy chế biến phụ phẩm thủy sản đã tiến hành tách riêng thịt đầu tôm để bán cho các cơ sở chế biến thức ăn gia súc, tuy nhiên phương thức bảo quản chưa được kiểm soát và thời gian chờ tách thịt đầu tôm ở một số cơ sở còn kéo dài, điều này dẫn đến sự biến đổi chất lượng thịt đầu tôm và là nguyên nhân pH tăng cao (7,87). Áp dụng biện pháp trích ly protease theo các thông số từ khảo sát của Nguyễn Lệ Hà (2011), tuy nhiên sử dụng dung môi là nước cất, hoạt tính protease có trong thịt đầu tôm khoảng 1,19 U/g CKNL.

3.2 Ảnh hưởng của thời gian trữ đông đến hoạt tính protease từ thịt đầu tôm sú

Kết quả khảo sát được trình bày ở Bảng 3 cho thấy hoạt tính enzyme protease từ thịt đầu tôm sú khá ổn định trong suốt thời gian trữ đông gần như không khác biệt, dao động từ 0,782 đến 0,752 U/g.

Kết quả thí nghiệm cho thấy tính khả thi của việc trữ đông thịt đầu tôm sú đối với việc ổn định hoạt tính protease, tạo điều kiện thuận lợi hơn trong quá trình trích ly enzyme. Tuy nhiên, hoạt tính enzyme thu được còn khá thấp, điều này cho

thấy việc nghiên cứu tìm ra điều kiện trích ly enzyme phù hợp, trước hết là tỷ lệ dung môi và nguyên liệu, tính chất của dung môi là các điều kiện cơ bản cần được quan tâm.

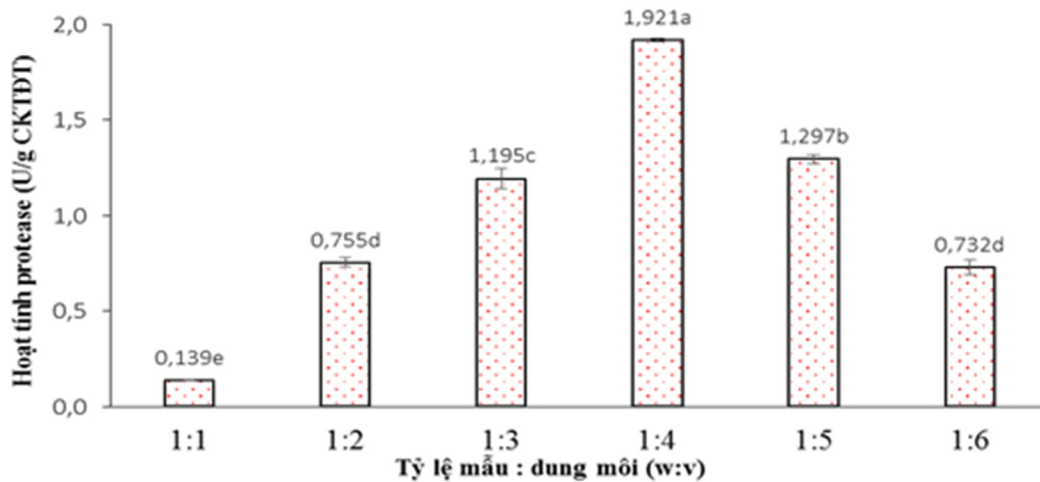
Bảng 3: Ảnh hưởng của việc bảo quản lạnh đông nguyên liệu đến sự ổn định hoạt tính protease từ thịt đầu tôm sú

Thời gian trữ đông (tuần)	Hoạt tính protease (U/g)
1	0,782 ^{ab} ± 0,0285
2	0,774 ^{ab} ± 0,0176
3	0,769 ^{ab} ± 0,0233
4	0,765 ^{ab} ± 0,0255
5	0,763 ^{ab} ± 0,0236
6	0,759 ^{ab} ± 0,0195
7	0,755 ^b ± 0,0224
8	0,752 ^b ± 0,0214

3.3 Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu và dung môi đến quá trình trích ly enzyme protease từ thịt đầu tôm sú

Ở khảo sát này, thịt đầu tôm sú đã xay nhuyễn được sử dụng để trích ly protease bằng nước cất ở nhiệt độ cố định (nhiệt độ phòng, khoảng 30°C) trong thời gian cố định 20 phút, tỷ lệ mẫu và nước cất (w/v) được thay đổi lần lượt từ 1: 1 đến 1: 6. Tác động của tỷ lệ dung môi bổ sung vào nguyên liệu đến hiệu quả của quá trình trích ly – thể hiện qua sự thay đổi hoạt tính protease tương ứng được thể hiện ở Hình 1.

Theo lý thuyết, khi tăng thể tích dung môi so với khối lượng mẫu thì quá trình trích ly enzyme từ nguyên liệu vào dung môi sẽ trở nên dễ dàng hơn. Điều này đúng với kết quả thí nghiệm (thể hiện ở Hình 1) là hoạt tính dịch chiết enzyme protease thô tăng rõ rệt và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê. Ở tỷ lệ 1: 1, hoạt tính thu được tương ứng là 0,139 (U/g); tỷ lệ 1: 2 là 0,755 (U/g), 1: 3 là 1,195 (U/g), 1: 4 là 1,921 (U/g). Tuy nhiên, việc thay đổi tỷ lệ mẫu và nước cất trong quá trình trích ly cũng làm giá trị pH dịch trích thay đổi, ảnh hưởng đến độ hòa tan và khả năng khuếch tán của các protein từ thịt đầu tôm sú vào dịch trích. Khi thay đổi tỷ lệ mẫu và dung môi lớn hơn tỷ lệ 1: 4 (w/v) thì tổng hoạt tính protease của dịch trích ly sẽ giảm cụ thể: ở tỷ lệ trích ly 1: 5 là 1,297 (U/g) và 1: 6 là 0,732 (U/g). Tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là 1: 4 (w/v) được sử dụng để nghiên cứu các điều kiện trích ly tiếp theo.



Hình 1: Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu và dung môi trích ly đến hoạt tính protease từ thịt đầu tôm sú

3.4 Ảnh hưởng của pH dung môi đến hiệu quả trích ly protease

Theo nghiên cứu của Trần Quốc Hiền và Lê Văn Việt Mẫn (2006), hệ enzyme protease trong ruột nhóm cá da trơn hoạt động tối ưu trong vùng pH kiềm. Tham khảo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Lệ Hà (2011) xác định được protease tôm sú thuộc nhóm protease serine hoạt động tốt trong môi trường từ trung tính đến kiềm. Chính vì vậy, nghiên cứu tiến hành trích ly protease từ thịt đầu tôm sú, sử dụng các dung dịch đệm có giá trị pH khác nhau như sau: dung dịch đệm phosphate (pH 7,0 và 8,0), đệm Glycine-NaOH (pH 9,0 ÷ 11,0). Nước cất hai lần được chọn làm dung môi đối chứng (pH = 7). Chọn tỷ lệ mẫu và dung môi là 1: 4 (w/v) dựa trên kết quả thí nghiệm 1, nhiệt độ và thời gian trích ly được cố định lần lượt là 30°C và 20 phút. Kết quả được trình bày ở **Bảng 4**.

Bảng 4: Ảnh hưởng của pH dung môi đến hiệu quả trích ly protease

pH của dung môi	Hoạt tính protease (U/g)
Nước cất (đối chứng)	1,921 ^c ± 0,062
7	2,426 ^c ± 0,419
8	2,426 ^c ± 0,355
9	3,823 ^a ± 0,380
11	3,757 ^{ab} ± 0,210
10	3,227 ^{ab} ± 0,176

Các giá trị có mẫu tự đi kèm giống nhau trong cùng một cột khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê theo phép thử LSD độ tin cậy 95%.

Thông qua kết quả thu nhận ở **Bảng 4**, nhận thấy rằng hoạt tính protease của dịch chiết thu

được sẽ thay đổi khi sử dụng các dung dịch đệm có giá trị pH khác nhau để trích ly enzyme. Đồng thời, sự điều chỉnh pH đến mức giá trị phù hợp giúp cải thiện đáng kể hoạt tính protease thu được khi so sánh với mẫu đối chứng là nước cất (không điều chỉnh pH). Dịch trích ly từ thịt đầu tôm sú có tổng hoạt tính protease cao nhất (3,823 U/g CKNL) khi sử dụng dung dịch đệm có giá trị pH = 9,0. Khi tăng pH từ 7,0 đến 9,0, tổng hoạt tính protease của dịch trích ly enzyme thu được tăng từ 2,426 đến 3,823 U/g CKNL, tức tăng khoảng 1,6 lần. Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng giá trị pH từ 9,0 đến 11,0 thì tổng hoạt tính protease của dịch trích ly enzyme thu được sẽ giảm khoảng 1,18 lần. So với mẫu đối chứng sử dụng dung môi là nước cất, khi sử dụng dung dịch đệm pH 9,0 để trích ly enzyme từ thịt đầu tôm sú thì tổng hoạt tính protease thu được cao hơn khoảng 2 lần.

3.5 Ảnh hưởng của tương tác nhiệt độ và thời gian trích ly đến hiệu quả thu nhận protease từ thịt đầu tôm sú

Ma trận qui hoạch thực nghiệm quá trình trích ly protease từ thịt đầu tôm sú được trình bày ở **Bảng 5**.

Giá trị P của các lần lặp lại của thí nghiệm (block) có giá trị P = 0,2323 > 0,05, chứng tỏ độ tin cậy của kết quả đo đặc giá trị protease tương ứng với các mẫu trích ly ở các lần khảo sát khác nhau. Đồng thời, tất cả giá trị P của các thừa số khảo sát đều nhỏ hơn 0,05 và giá trị F lớn hơn 10 đã chứng tỏ các nhân tố khảo sát đều ảnh hưởng đến quá trình trích ly protease từ thịt đầu tôm sú.

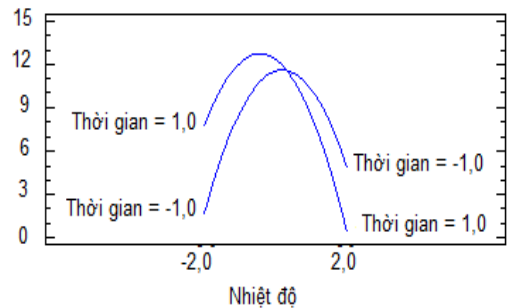
Bảng 5: Ảnh hưởng của các nhân tố mã hóa đối với phương trình hồi quy

Nhân tố	Tổng bình phương	Bậc tự do	Phương sai	Tỷ số F	Giá trị P
X ₁ :Nhiệt độ+block	23,9419	1	23,9419	50,10	0,0000
X ₂ :Thời gian+ block	4,83025	1	4,83025	10,11	0,0260
X ₁ ² +block	636,607	1	636,607	1332,22	0,0000
X ₁ X ₂ +block	104,835	1	104,835	219,39	0,0000
X ₂ ² +block	26,0273	1	26,0273	54,47	0,0000
Blocks	1,44018	2	0,720092	1,51	0,2323
Sai số	21,9813	46	0,477853		

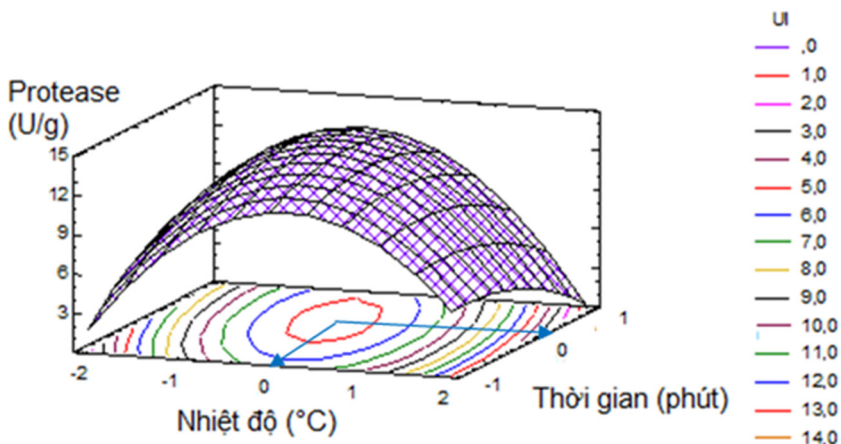
Sự tương tác của thời gian và nhiệt độ được thấy rõ qua biểu đồ ở Hình 2. Từ đồ thị tổng quát biểu diễn sự tương tác của cặp nhân tố nhiệt độ và pH đến hoạt tính protease thu nhận ở Hình 2 cho thấy, hai nhân tố này thật sự có sự ảnh hưởng đồng thời đến quá trình trích ly enzyme protease. Với nhiệt độ trích ly thấp và thời gian ly trích ngắn cho hiệu quả ly trích kém, trong khi đó, nếu nâng nhiệt độ ly trích lên mức cao nhất và thời gian ly trích kéo dài, protease bị mất hoạt tính.

Đồ thị bề mặt đáp ứng và đồ thị đường đồng điểm được thể hiện đồng thời ở Hình 3 một lần nữa khẳng định cả hai yếu tố pH và nhiệt độ đều ảnh hưởng đến quá trình trích ly protease từ thịt đầu tôm sú.

Hoạt tính protease (U/g)



Hình 2: Đồ thị biểu diễn sự tương tác của nhiệt độ và thời gian đến hoạt tính của enzyme protease được chiết tách



Hình 3: Đồ thị biểu diễn sự tương tác của nhiệt độ và thời gian trích ly đến hoạt tính của enzyme protease được chiết tách

Giá trị cao nhất của hàm mục tiêu Y khi X₁ có giá trị trong khoảng từ -1 đến 0 (40°C đến 50°C) và X₂ có giá trị trong khoảng từ 0 đến +1 (40 đến 60 phút). Phương trình thực nghiệm tối ưu hóa hai nhân tố thời gian và nhiệt độ đối với quá trình trích ly thông qua kết quả thí nghiệm có được là:

$$Y = 13,3812 - 0,515772 \cdot X_1 + 0,401258 \cdot X_2 - 2,07049 \cdot X_1^2 - 1,32184 \cdot X_1 \cdot X_2 - 1,432 \cdot X_2^2 \text{ với } R^2 = 0,9752 \text{ (1)}.$$

Giá trị pH và nhiệt độ tối ưu cho quá trình trích ly enzyme từ thịt đầu tôm sú khi giải phương trình hồi quy (1). Dựa theo kết quả thu được trên Hình 3, điều kiện thích hợp để chiết enzyme từ thịt đầu tôm sú cho những thí nghiệm tiếp theo tương ứng với X₁ = -0,2 và X₂ = + 0,23.

Nhiệt độ và thời gian trích ly tối ưu được tính theo công thức

$$x_j = \frac{(X_j - X_j^0)}{\Delta X_j} = \frac{2(X_j - X_j^0)}{(X_{j\max} - X_{j\min})}$$

Kết quả xác định thu được giá trị nhiệt độ trích ly tối ưu là 46°C và thời gian tương ứng là 44,6 phút. Trong khảo sát thực tế, chọn lựa mức nhiệt độ 4°C và thời gian ủ là 50 phút, hoạt tính protease đạt được ở điều kiện ly trích tối ưu là 13,48 U/g. Hoạt tính protease thu được từ thực nghiệm và tính toán theo phương trình có độ tương thích cao ở giá trị $R^2 = 0,9752$. Như vậy có thể kết luận rằng phương trình hồi quy đã mô tả đúng các kết quả thực nghiệm. Hệ số tương quan cho biết 97,5% sự biến đổi hoạt tính protease là do ảnh hưởng của các biến độc lập X_1 , X_2 và chỉ có 2,5% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được gây ra.

Kết quả thực nghiệm cho thấy hoạt tính protease trong thịt đầu tôm sú tăng đều từ 20 đến 60 phút đối với điều kiện nhiệt độ 30 và 40°C, và giảm dần theo thời gian 20, 40, 60 phút ở các nhiệt độ cao hơn. Hoạt tính cao trong khoảng 40 ÷ 60 phút với thời gian tối ưu là 44,6 phút ở 46°C.

4 KẾT LUẬN

Thịt đầu tôm sú là nguồn nguyên liệu thích hợp cho quá trình trích ly protease. Dịch trích ly enzyme protease thu được từ thịt đầu tôm sú có tổng hoạt tính cao nhất là 13,48 (U/g CKNT) khi tiến hành trích ly bằng dung môi là đệm Glycine – NaOH có pH 9,0 và tỷ lệ mẫu và dung môi 1: 4 (w/v), sử dụng nhiệt độ trích ly 50°C và thời gian ủ 40 phút. Từ kết quả thu được, các tính chất và thông số động học của chế phẩm protease thu được từ thịt đầu tôm sú và thử ứng dụng chế phẩm để thủy phân protein trong công nghệ thực phẩm sẽ được khảo sát tiếp tục.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal Physiol.* 22: 79-89.
2. Ngô Thị Hoài Dương, Trang Sĩ Trung, Phạm Thị Đan Phượng, 2008. Kết hợp xử lý sơ bộ bằng acid formic trong qui trình chế biến phở liệu tôm để nâng cao chất lượng chitin-chitosan, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Thủy sản* 4: 24 - 28.
3. Nguyễn Lệ Hà, 2011. Nghiên cứu tách chiết và ứng dụng enzyme protease từ tôm sú *Penaeus monodon* vào chế biến thủy sản. Luận án Tiến sĩ, Đại học Thủy sản Nha Trang.
4. Trần Quốc Hiền, Lê Văn Việt Mẫn, 2006. Nghiên cứu ứng dụng enzyme protease từ ruột cá Basa. *Tạp Chí Phát Triển KH&CN*, 11: 27 – 42.
5. Tran T.T., V.N. Huynh & V.M. Nguyen, 2011. Evaluation the ability to recover and use the meat of Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) head. *The abstract proceedings of The 2nd conference of Food Safety and Food Quality in South-East Asia. Challenges for the next decade*, 9-12 November 2011, Vietnam, 43 pp.
6. Trung T.S., C-H. Ng, and W.F. Stevens, 2003. Preparation of decrystallized chitosan from shrimp shell waste and its application in the decolorization of textile waste water. *Proceedings National Chitosan Conference Chulalongkorn University Thailand.* pp. 92-95.
7. Yaneza F., R. Castillo, R. Pacheco-Aguilar, F.L. Garcia-Carreno and M. de Los Angeles Navarrete-Del Toro, 2004. Characterization of Acidic Proteolytic Enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagas caeruleae*) viscera. *Journal Food Chem* 85: 343-350.