

KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM ENZYME PROTEASE THỊT ĐẦU TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) SAU QUÁ TRÌNH TINH SẠCH SƠ BỘ

Hà Thị Thụy Vy^{1*}, Trần Thanh Trúc² và Nguyễn Văn Mười²

¹Nghiên cứu sinh ngành Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Hà Thị Thụy Vy (vyp1114009@gstudent.ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 02/08/2017

Ngày nhận bài sửa: 17/10/2017

Ngày duyệt đăng: 27/02/2018

Title:

Characterization of endogenous proteases in the head meat of *Litopenaeus vannamei* after preliminary purification

Từ khóa:

Nhiệt độ, pH, protease, thịt đầu tôm

Keywords:

pH, protease, shrimp head meat, temperature

ABSTRACT

Characterization of endogenous protease from head meat of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was investigated. The aims of this study were to determine the effect of temperature (30 ÷ 80°C) and pH (5 ÷ 11) on the protease enzyme activity. Protease activity have been optimized with 2 factors temperature and pH including 11 experimental units. Besides, the thermal stability of protease was evaluated at different temperatures (30 ÷ 80°C) for 60 minutes and kinetic parameters such as K_m , V_{max} of intrinsic protease enzymes also were surveyed. The results showed that the highest activity for maximum protease production was found at temperature of 60°C and pH 7.0. Results of optimization protease activity is based on two factors temperature and pH at 54.40°C and pH = 6.96. The enzymes were found to be stable at 55°C and enzyme activity increased with an increasing substrate concentration of shrimp head meat from 0 ÷ 0.6 (g/mL), reaching V_{max} value of 11.70 U/min and K_m value of 0.0795 g/mL.

TÓM TẮT

Nghiên cứu khảo sát đặc tính của enzyme protease nội tại từ thịt đầu của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Mục đích của nghiên cứu là xác định tác động của nhiệt độ (30 ÷ 80°C) và pH (5 ÷ 11) đến hoạt động của enzyme protease. Tối ưu hóa theo phương pháp bề mặt đáp ứng với 2 thừa số nhiệt độ và pH bao gồm 11 đơn vị nghiệm thức. Bên cạnh đó, độ bền nhiệt của protease được đánh giá ở các mức nhiệt độ khác nhau (30 ÷ 80°C) trong 60 phút và các thông số động học K_m , V_{max} của enzyme protease nội tại cũng được khảo sát. Kết quả nghiên cứu cho thấy, điều kiện nhiệt độ và pH thích hợp cho hoạt động enzyme protease tương ứng 60°C và 7,0. Kết quả tối ưu hóa hoạt động protease dựa trên hai nhân tố nhiệt độ và pH là 54,40°C và pH 6,96. Enzyme protease được tìm thấy bền nhiệt ở 55°C và hoạt động của enzyme tăng khi tăng nồng độ cơ chất thịt đầu tôm thẻ từ 0 ÷ 0,6 (g/mL), V_{max} đạt trị giá 11,70 U/phút và giá trị K_m là 0,0795 g/mL.

Trích dẫn: Hà Thị Thụy Vy, Trần Thanh Trúc và Nguyễn Văn Mười, 2018. Khảo sát đặc điểm enzyme protease thịt đầu tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) sau quá trình tinh sạch sơ bộ. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(1B): 28-36.

1 TỔNG QUAN

Enzyme là chất xúc tác sinh học có khả năng thúc đẩy nhanh các phản ứng hóa học và là những công cụ sinh học để nâng cao chất lượng thực phẩm, hoạt động chế biến thực phẩm. Sử dụng enzyme như một công cụ hỗ trợ có nhiều ưu điểm so với sử dụng hóa chất, trong đó có độ đặc hiệu cao, hiệu quả của xúc tác ở nhiệt độ vừa phải và thân thiện với môi trường. Trong nhóm enzyme thủy phân, protease hay còn được gọi là enzyme phân giải protein, là hệ enzyme thủy phân đứng thứ 2 (sau carbohydrases). Enzyme protease được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như công nghệ sữa, công nghệ chế biến thịt, công nghệ da, công nghệ tằm, hương phẩm, mỹ phẩm, y học và trong sản xuất nước mắm ngăn ngày (Nguyễn Công Hà và Lê Nguyễn Đoàn Duy, 2011). Protease chiếm khoảng 60% giá trị thương mại trên thị trường enzyme thế giới (Joo and Chang, 2006). Từ trước đến nay, enzyme protease được sản xuất chủ yếu từ vi khuẩn và nấm mốc do hoạt tính và hiệu suất thu hồi cao, chỉ một số ít được thu hồi từ động vật và thực vật. Tuy nhiên, hiện nay khi vấn đề an toàn vệ sinh thực phẩm và ô nhiễm môi trường đặc biệt được quan tâm, các nhà nghiên cứu, nhà sản xuất và người tiêu dùng ngày càng chú trọng đến protease từ các nguồn ăn được của động vật và thực vật, nhất là các phụ phẩm trong sản xuất. Trong các phụ phẩm chứa enzyme protease dồi dào, dễ tìm và rẻ tiền phải kể đến là phụ phẩm đầu tôm được thải ra từ các nhà máy chế biến thủy sản xuất khẩu. Chỉ tính riêng ở Việt Nam hàng năm có khoảng 200 ngàn tấn (Trang Sĩ Trung, 2012) đầu và vỏ tôm được thải ra từ các nhà máy chế biến tôm đông lạnh. Các nghiên cứu ứng dụng protease gần đây đã chỉ ra vai trò tích cực của việc sử dụng các protease trong việc kiểm soát các bệnh liên quan đến sự nghẽn mạch do sự đông tụ của fibrin, khử protein trong phụ phẩm tôm, giúp quá trình chiết tách chitin, chitosan đạt hiệu quả tốt (Ali *et al.*, 2011). Chính vì thế, khảo sát đặc điểm enzyme protease làm cơ sở để sử dụng nguồn enzyme này, góp phần nâng cao khả năng tận dụng nguồn phụ phẩm đầu tôm là hướng đi đầy hứa hẹn.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu và thiết bị

Nguyên liệu thịt đầu tôm thể sau khi phân tách (loại bỏ vỏ, chân hàm, râu) tại nhà máy Chế biến thủy sản xuất nhập khẩu Hòa Trung (huyện Cái Nước, tỉnh Cà Mau) được xử lý sơ bộ và làm ráo nước trước khi phân chia thành các mẫu có khối lượng xác định, bao gói trong bao bì PA và cấp đông ở nhiệt độ -35°C đến -40°C cho đến khi nhiệt

độ tâm đạt -18°C , tiến hành trữ đông ở nhiệt độ $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Hóa chất: Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 (Merck, Đức); Ethanol (Merck, Đức); Tyrosine; HCl 0,2N; NaOH 0,5N; Trichloacetic acid (TCA); Folin; casein dạng bột (Merck, Đức)...

Dụng cụ - thiết bị: máy quang phổ so màu (Model 722, Trung Quốc); thiết bị ly tâm nhiệt độ thấp (Rotana 46 R, Đức; Herlme Z323K); Máy đo pH 2 số lẻ, độ chính xác 0,01 (HANA pH 212, Trung Quốc); máy khuấy từ Toshiba (Magnestir MG-10, Nhật); bộ điều nhiệt (Memmert, Đức, điều chỉnh đến cận 100°C , độ chính xác $0,1^{\circ}\text{C}$); cân điện tử (Ohaus, USA, độ chính xác 0,0001 g và 0,01 g).

2.2 Phương pháp trích ly và tinh sạch sơ bộ enzyme protease

Sau khi nghiền, mẫu được cân định lượng rồi tiến hành trích ly bằng dung môi glycine-NaOH pH = 9,0; nhiệt độ 50°C với tỷ lệ mẫu: dung môi là 1: 4 (w/v) trong thời gian 40 phút để rút chiết enzyme (Trần Thanh Trúc và *ctv.*, 2014). Quá trình trích ly enzyme được thực hiện bằng máy khuấy từ liên tục với tốc độ 200 rpm nhằm làm tăng khả năng trích ly. Sau quá trình trích ly, mẫu được ly tâm ở tốc độ 6.000 rpm trong thời gian 20 phút, sau đó loại bỏ phần cặn, thu nhận phần dịch trong, gọi là dịch chiết enzyme protease thô (Castillo-Yaneza *et al.*, 2004). Tiến hành kết tủa bằng ethanol 99,5% và được làm lạnh đến nhiệt độ -18°C . Dung môi ethanol được cho chậm chậm vào các cốc thủy tinh chứa enzyme thô theo các tỷ lệ giữa dịch trích protease thô và dung môi ethanol sử dụng tinh sạch sơ bộ bằng phương pháp kết tủa là 1:3 (v/v), lắc nhẹ và để ổn định ở $0 \div 4^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 30 phút (Hà Thị Thụy Vy và *ctv.*, 2016). Sau khi kết tủa, hỗn hợp được ly tâm 6.000 rpm trong 20 phút ở 4°C , thu được phần kết tủa. Phần kết tủa được hòa tan bằng dung dịch đệm phosphate pH 7,6; nhiệt độ 30°C , với thể tích dung dịch đệm bổ sung vào tủa sao cho bằng thể tích dịch trích sử dụng để kết tủa (Trần Thanh Trúc và *ctv.*, 2014). Xác định hoạt tính enzyme protease sau tinh sạch sơ bộ.

2.3 Phương pháp phân tích và đo đặc các chỉ tiêu

Các chỉ tiêu cơ bản được phân tích và đo đặc theo các phương pháp tiêu chuẩn:

Hoạt tính protease: Theo phương pháp Anson cải tiến (1938) sử dụng casein như cơ chất. 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 chuẩn (30°C ; pH 7,6).

Hoạt tính tương đối được tính dựa trên so sánh % sự thay đổi hoạt tính ở các mức nghiệm thức của các nhân tố (nhiệt độ, pH) phản ứng khác nhau.

Protein hòa tan (mg%): Phương pháp Bradford (1976), sử dụng bovine serum albumin (BSA) làm đường chuẩn, với chỉ thị màu Coomassie Brilliant Blue và đo độ hấp thụ ở bước sóng 595 nm.

2.4 Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, lặp lại ít nhất 3 lần. 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.

2.5 Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.5.1 Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của enzyme protease sau tinh sạch sơ bộ

Enzyme protease từ thịt đầu tôm được trích ly và tinh sạch sơ bộ theo phương pháp ở mục 2.2. Protease sau tinh sạch sơ bộ hòa tan vào trong dung dịch đệm phosphate pH 7,6 (1 mg/mL) và ủ ở 6 mức nhiệt độ khác nhau, từ 30 đến 80°C (khoảng cách 10°C) trong thời gian 10 phút. Xác định hoạt tính của protease tại các nhiệt độ trên. Thí nghiệm được thực hiện nhằm tìm ra nhiệt độ tốt nhất cho hoạt động của enzyme protease .

2.5.2 Thí nghiệm 2: Xác định độ bền nhiệt của enzyme protease thu nhận.

Thí nghiệm được tiến hành tương tự thí nghiệm 1, enzyme protease xử lý ở các mức nhiệt độ từ 30 đến 80°C (bước nhảy 5°C) theo thời gian từ 60 phút. Sau khi xử lý, các mẫu enzyme được làm nguội nhanh và xác định hoạt tính còn lại của protease trong từng mẫu còn lại. Kết quả thu nhận được là hoạt tính protease còn lại (hoạt tính tương quan, %) của các mẫu khảo sát so với điều kiện đối

chứng (không ủ), từ đó xác định mức độ bền nhiệt của enzyme.

2.5.3 Thí nghiệm 3: Xác định pH thích hợp cho hoạt động enzyme protease

Thí nghiệm được tiến hành tương tự như thí nghiệm 1 với nhiệt độ thích hợp được lựa chọn từ thí nghiệm trước. Ủ enzyme protease với casein 1% thay đổi pH từ 5 đến 11 (khoảng cách 1, pH 5 - sử dụng đệm citrate; pH 6,7 và 8 - sử dụng đệm phosphat; pH 9, 10 và 11 - sử dụng đệm glycine NaOH) và xác định hoạt tính protease theo phương pháp Anson cải tiến.

2.5.4 Thí nghiệm 4: Xác định tương tác của nhiệt độ và pH đến hoạt tính protease

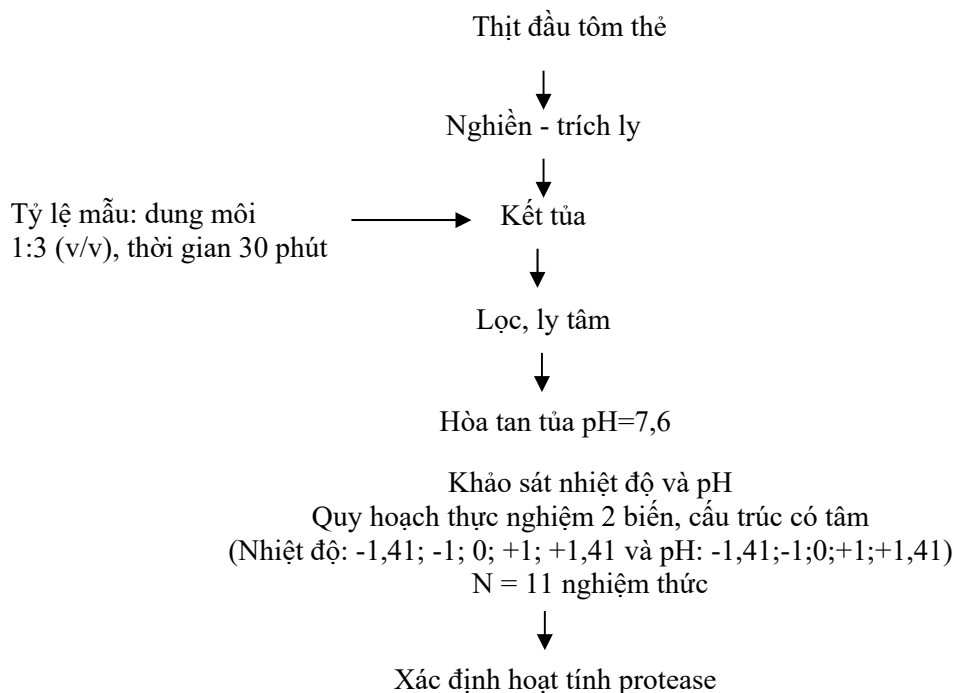
Thí nghiệm tiến hành với 2 nhân tố X₁- nhiệt độ thích hợp cho hoạt động protease (thay đổi từ 50 đến 60°C) và X₂ – pH (thay đổi từ 6,5 đến 7,5). Sử dụng phương án trực giao cấp 2 với số nghiệm thức tối ưu: N = 2² + star = 9, trong đó có 2 nghiệm thức ở tâm phương án. Bổ sung thêm 2 thí nghiệm ở tâm để cải thiện sai số thí nghiệm. Thí nghiệm được thực hiện dựa trên quy trình trích ly và tinh sạch sơ bộ ở mục 2.2.

Mẫu sau khi nghiền được ủ theo 11 nghiệm thức được trình bày ở Bảng 1. Tương ứng với từng điều kiện khảo sát, lọc và ly tâm, thu tủa và xác định hoạt tính. Dựa trên hoạt tính trung bình của protease thu được tương ứng với 11 nghiệm thức, 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: Hoạt tính enzyme protease (U/g protein); X₁: nhiệt độ (°C) và X₂: pH. 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 qui với thực nghiệm theo tiêu chuẩn Fisher, đảm bảo F < F_{0,95} (9-2,3-1).

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

TT mẫu	Giá trị mã hóa		Giá trị thực nghiệm	
	X ₁	X ₂	Nhiệt độ (°C)	pH
1	0	0	55,0	7,00
2	0	0	55,0	7,00
3	-1	1	50,0	7,50
4	-1,41	0	47,9	7,00
5	1	1	60,0	7,50
6	0	0	55,0	7,00
7	1	-1	60,0	6,50
8	1,41	0	62,1	7,00
9	-1	-1	50,0	6,50
10	0	1,41	55,0	7,71
11	0	-1,41	55,0	6,29

Mỗi nhân tố có 5 mức khảo sát -1,41; -1; 0; 1 và 1,41



Hình 1: Sơ đồ bố trí thí nghiệm tối ưu hóa nhiệt độ và pH protease tinh sạch sơ bộ từ thịt đầu tôm thẻ

Vẽ đồ thị bề mặt đáp ứng và xác định điều kiện nhiệt độ và pH tối ưu cho hoạt động của enzyme protease. Hoạt tính của enzyme protease (U/g protein) sau tinh sạch sơ bộ tương ứng với 11 nghiệm thức. Kết quả thu nhận là điều kiện nhiệt độ và pH tối ưu giúp hoạt động enzyme protease đạt hiệu quả cao nhất.

2.5.5 Thí nghiệm 5: Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất (thịt đầu tôm thẻ) đến hoạt tính enzyme protease

Thí nghiệm được thực hiện tương tự như thí nghiệm trước với nhiệt độ và pH thích hợp được lựa chọn từ thí nghiệm 1 và thí nghiệm 2. Xác định hoạt tính của chế phẩm enzyme protease thô bằng cơ chất thịt đầu tôm ở các nồng độ thay đổi từ 0 đến 0,6 g/mL trong dung dịch đệm có pH và nhiệt độ phản ứng tối ưu được lựa chọn từ thí nghiệm 4. Sử dụng phương trình Michaelis-Menten, $V_{max} = f(S)$ để xác định K_m (g/mL) và V_{max} (U/phút) của enzyme protease.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của enzyme protease sau tinh sạch sơ bộ

Nhiệt độ là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng rất lớn đến tốc độ phản ứng của enzyme. Kết quả khảo sát được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến phản ứng của protease

Nhiệt độ khảo sát (°C)	Hoạt tính tương đối (%)
30	68,85±1,19 ^b
40	77,75±1,42 ^d
50	88,16±1,22 ^e
60	100,00±0,87 ^f
70	73,92±0,83 ^c
80	45,25±1,09 ^a

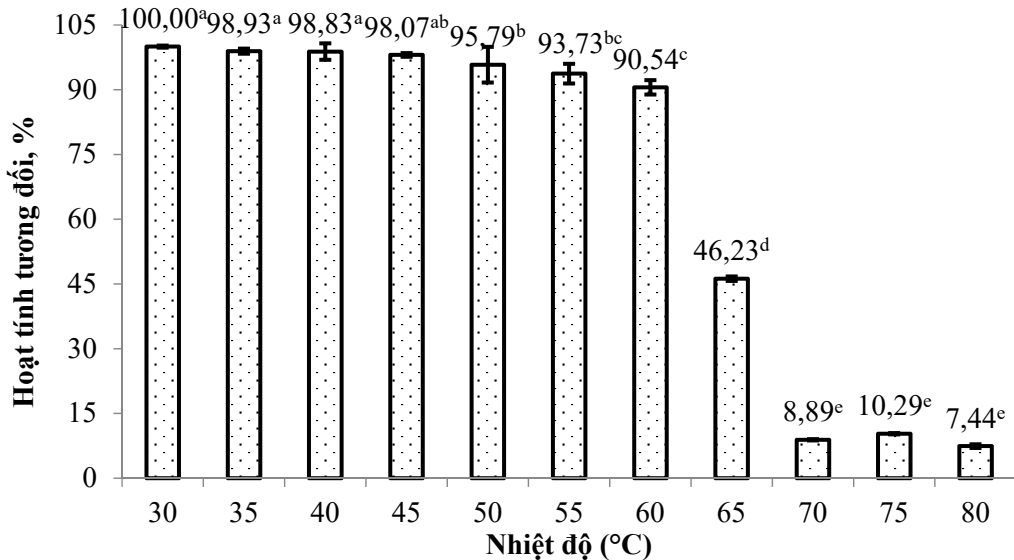
(Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%)

Kết quả thí nghiệm từ Bảng 2 cho thấy, ở giai đoạn đầu của quá trình gia tăng nhiệt độ (30÷40°C), hiệu quả hoạt động của enzyme cũng tăng dần với hoạt tính tương đối khoảng 68,85÷88,16% (so với điểm nhiệt độ đạt cao nhất, trường hợp này là 60°C). Ở giai đoạn cuối của quá trình gia tăng nhiệt độ (70÷80°C), hoạt tính enzyme bắt đầu giảm dần, hoạt tính tương đối vào khoảng 73,92÷45,25%. Sự giảm hoạt tính này có thể được giải thích do sự biến tính nhiệt phá hủy các hoạt động của các phân tử enzyme. Khi enzyme được gia nhiệt, các phân tử đóng vai trò trung tâm hoạt động của enzyme bị phá vỡ, trung tâm hoạt động bị bất hoạt, enzyme bị biến đổi và

mất đi vai trò xúc tác (Alyward *et al.*, 1969). Enzyme protease hoạt động tốt trong khoảng nhiệt độ 40÷60°C và thể hiện hoạt tính cao nhất ở 60°C, thấp hơn so với protease từ gan tụy và đầu tôm sú (Nguyễn Lệ Hà, 2011) là 62 °C hay nội tạng tôm *P. orientalis* (Oh *et al.*, 2000) là 70°C và cao hơn so với tôm *P. kerathurus* và *P. japonicus* là 50°C (Galgani *et al.*, 1984) hay protease của tôm Bốp và tương đồng với tôm Ráo là 60 °C (Nguyễn Văn Lê, 1996).

3.2 Độ bền nhiệt của protease từ thịt đầu tôm thẻ

Kết quả từ đồ thị ở Hình 2 cho thấy sự vô hoạt nhiệt protease từ thịt đầu tôm thẻ phụ thuộc lớn vào nhiệt độ xử lý. Quá trình xử lý nhiệt càng cao thì enzyme bị vô hoạt càng nhiều. Tốc độ vô hoạt nhiệt tăng khi tăng nhiệt độ xử lý từ 60 đến 70°C. Hoạt tính enzyme khi tăng nhiệt độ lên 65°C giảm chỉ còn 46, 23% so với hoạt tính ban đầu và gần như hoàn toàn mất hoạt tính ở 80°C chỉ còn 7,44% so với hoạt tính ban đầu.



Hình 2: Độ bền nhiệt của protease từ thịt đầu tôm thẻ

Kết quả này trùng hợp với nghiên cứu Nguyễn Lệ Hà (2011), hoạt tính enzyme hoạt động tốt trong khoảng nhiệt độ từ 37÷57°C, hoạt tính bắt đầu giảm và gần như hoàn toàn mất hoạt tính ở 77°C. Mặc dù vậy, kết quả khảo sát cũng cho thấy, chế phẩm protease khảo sát khá bền nhiệt khi so sánh với các protease khác. Nghiên cứu của Oh *et al.* (2000) cho thấy, mặc protease từ gan tụy của tôm *Penaeus orientalis* có nhiệt độ hoạt động tối ưu ở 70°C nhưng lại mất hoạt tính đáng kể ở chính nhiệt độ này khi thời gian ủ dài (30 phút). Nhìn chung, hầu hết các protease bền nhiệt ở khoảng nhiệt độ 50÷60°C và giảm hoạt tính đáng kể ở nhiệt độ cao hơn và thời gian ủ kéo dài (Dendinger and O'Connor, 1990). Đặc tính ổn định nhiệt cao của chế phẩm protease khảo sát thật sự là lợi thế đáng kể khi áp dụng vào thủy phân protein và chế biến thực phẩm nói chung để điều khiển phản ứng thuận lợi nhất; bởi vì hầu hết các vi sinh vật gây thối không phát triển tốt ở khoảng nhiệt độ cao mà ở đó protease tôm thẻ vẫn hoạt động tốt 37÷55°C, thậm chí ở 60°C.

3.3 Điều kiện pH thích hợp cho hoạt động của enzyme protease

Mỗi enzyme đều có một trị số pH thích hợp cho hoạt động của nó và tại đó tốc độ phản ứng xảy ra nhanh nhất. Khảo sát mức độ ảnh hưởng pH đến hoạt tính của enzyme protease từ thịt đầu tôm thẻ ở khoảng pH 5÷11, kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3: Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính protease từ thịt đầu tôm thẻ

pH khảo sát	Hoạt tính tương đối (%)
5	52,96±1,94 ^b
6	82,30±0,72 ^d
7	100,00±1,27 ^f
8	87,02±1,29 ^c
9	73,30±1,07 ^c
10	52,62±1,83 ^b
11	44,82±1,32 ^a

(Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%)

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy ngoài ảnh hưởng của nhiệt độ, enzyme cũng rất nhạy cảm với sự thay đổi pH của môi trường, hoạt tính enzyme protease có giá trị thay đổi theo các giá trị pH đã khảo sát và hoạt tính cao nhất đạt được ở pH 7. Trong điều kiện khảo sát, khi pH của môi trường tăng từ giá trị 5 đến 6, hoạt tính protease có xu hướng tăng với hoạt tính tương đối tăng từ 52,96÷82,30% khi so sánh với hoạt tính enzyme ở pH 7. Trong khi đó, nghiên cứu tiếp tục tiến hành ở khoảng pH cao hơn, vượt qua khỏi điểm pH tối ưu, hoạt tính enzyme giảm dần và giảm rất đáng kể ở khoảng pH 8÷11, hoạt tính tương đối chỉ còn 87,02% ở pH 9 và 44,82% ở pH 11 so với hoạt tính của protease ở điểm pH 7. Kết quả này tương ứng với khảo sát của Nguyễn Việt Dũng (1994) trên đối tượng cơ thịt tôm sú, protease hoạt động rất tốt ở

pH 6,6÷7,0 và giảm mạnh hoạt tính khi pH biến đổi về cả hai phía acid và kiềm, thấp hơn so với protease từ gan tụy và đầu tôm sú (Nguyễn Lê Hà, 2011) pH tốt nhất là 7,5 hay pH tối ưu CPE protease từ đầu tôm biển là pH 8,5 (Phạm Thị Trân Châu, 2013).

Tóm lại, trong phạm vi khảo sát cho thấy, chế phẩm protease được từ thịt đầu tôm thể hoạt động ở pH trung tính với hoạt động tốt nhất ở pH 7.

3.4 Ảnh hưởng của tương tác nhiệt độ và pH đến hoạt động của enzyme protease

Ma trận qui hoạch thực nghiệm hoạt động protease từ thịt đầu tôm thể được trình bày ở Bảng 4.

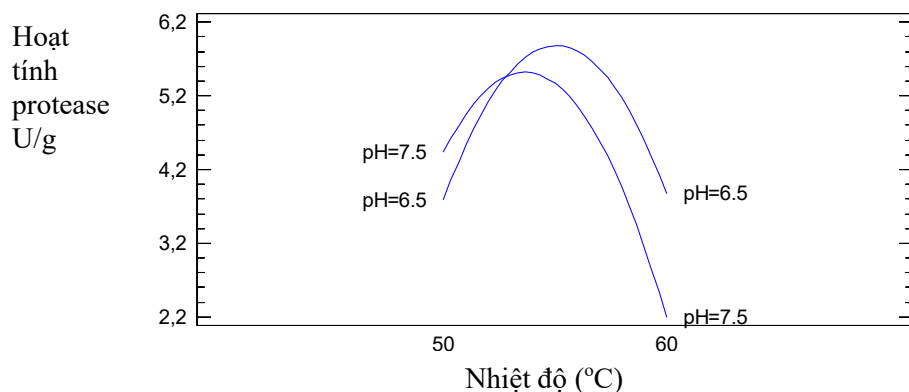
Bảng 4: Ảnh hưởng của các nhân tố mã hóa đối với phương trình hồi quy

Nhân tố	Tổng bình phương	Bậc tự do	Phương sai	Tỷ số F	Giá trị P
X ₁ : Nhiệt độ	6,92258	1	6,92258	21,46	0,0001
X ₂ : pH	1,56476	1	1,56476	4,85	0,0371
X ₁ X ₁	71,2274	1	71,2274	220,80	0,0000
X ₁ X ₂	4,06018	1	4,06018	12,59	0,0016
X ₂ X ₂	25,9161	1	25,9161	80,34	0,0000
Blocks	0,00704529	2	0,00352264	0,01	0,9891
Sai số	8,06475	25	0,32259		

Kết quả cho thấy giá trị P của các lần lặp lại của thí nghiệm (block) có giá trị P = 0,9891 (gần bằng 1), chứng tỏ độ tin cậy của kết quả đo đặc giá trị protease tương ứng với điều kiện pH và nhiệt độ khác nhau. Đồng thời, tất cả giá trị P của các thừa số khảo sát đều nhỏ hơn 0,05 đã chứng tỏ các nhân tố khảo sát đều ảnh hưởng đến hoạt động protease sau tinh sạch sơ bộ từ thịt đầu tôm thể. Hệ số hồi

quy bậc một của X₁, X₂ cũng như hệ số tương tác của X₁X₂ đều khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%, đồng thời hệ số hồi quy bậc hai của X₁² và X₂² cũng khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê.

Sự tương tác của nhiệt độ và pH được thấy rõ qua biểu đồ ở Hình 3.



Hình 3: Đồ thị biểu diễn sự tương tác của nhiệt độ và pH đến hoạt tính của enzyme protease sau tinh sạch sơ bộ

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 3 cho thấy hai nhân tố này thật sự có sự ảnh hưởng đồng thời đến hoạt động enzyme

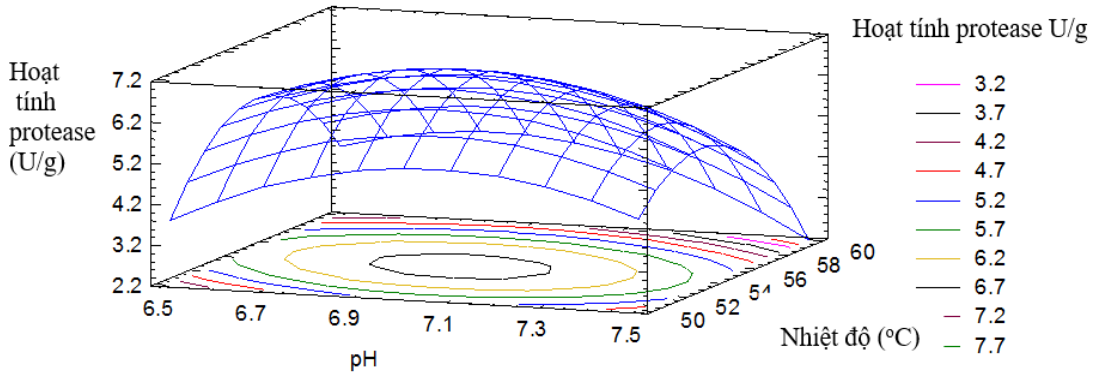
protease. Với nhiệt độ thấp và pH thấp hoạt động của enzyme protease tăng cao, trong khi đó, nếu nâng nhiệt độ và pH lên cao sẽ cho hoạt tính enzyme protease kém. Đồ thị bề mặt đáp ứng và đồ

thị đường đồng điểm được thể hiện đồng thời ở Hình 4 một lần nữa khẳng định cả hai yếu tố pH và nhiệt độ đều ảnh hưởng đến hoạt động protease từ thịt đầu tôm thẻ. Giá trị cao nhất của hàm mục tiêu Y (hoạt tính protease) khi X_1 có giá trị trong khoảng từ -1 đến 0 (50°C đến 55°C) và X_2 có giá trị pH trong khoảng từ -1 đến 0 (6,5 đến 7,0 phút). Phương trình thực nghiệm tối ưu hóa hai nhân tố nhiệt độ và pH đối với hoạt động của enzyme protease thông qua kết quả thí nghiệm có được là:

$$Y = -563,758 + 10,5433X_1 + 81,5488X_2 - 0,082018X_1^2 - 0,232671X_1X_2 - 4,94732X_2^2 \quad (1)$$

với $R^2 = 0,9188$.

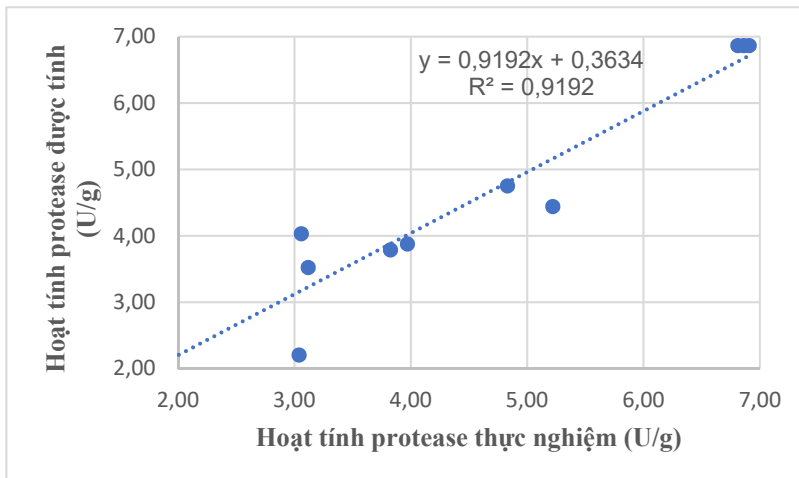
Giải phương trình (1) thu được giá trị pH và nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của enzyme sau tinh sạch sơ bộ từ thịt đầu tôm thẻ tương ứng với X_1 (nhiệt độ) = 54,40°C và X_2 (pH)= 6,96.



Hình 4: Đồ thị biểu diễn sự tương tác của nhiệt độ và pH đến hoạt tính của enzyme protease sau tinh sạch sơ bộ

Dựa theo kết quả thu được trên Hình 4, hoạt tính protease trong thịt đầu tôm thẻ tăng đều ở pH 6,5 đến 7,0 với điều kiện nhiệt độ 50 và 55°C và giảm dần theo pH acid và pH kiềm ở các nhiệt độ cao hơn. Nhiệt độ có ảnh hưởng đến hoạt tính protease khá rõ, khi nhiệt độ tăng từ 55°C lên thành

60°C thì hoạt tính protease bắt đầu giảm mạnh. Hoạt tính protease thu được từ thực nghiệm và tính toán theo phương trình có độ tương thích cao ở giá trị $R^2 = 0,9192$ (Hình 5).



Hình 5: Đồ thị tương quan giữa hoạt tính protease xác định bằng thực nghiệm và tính toán theo phương trình hồi quy

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 91,92% sự biến đổi hoạt tính

protease là do ảnh hưởng của các biến độc lập X_1 , X_2 và chỉ có 8,08 % sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được gây ra.

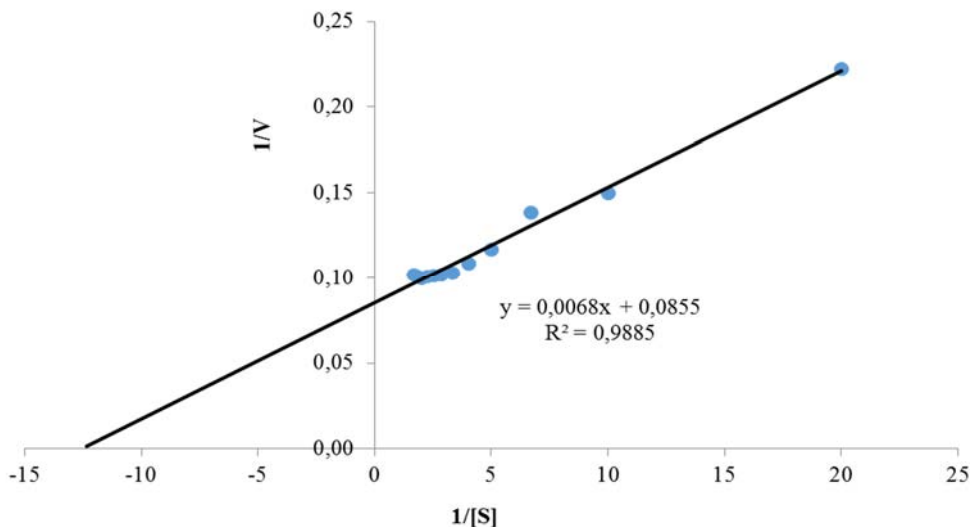
Kết quả thực nghiệm cho thấy hoạt tính protease trong thịt đầu tôm thể sau tinh sạch sơ bộ tăng đều từ nhiệt độ 50 đến 55°C đối với điều kiện pH 6,5 đến 7,0 và giảm dần khi tăng từ pH 7 đến pH 7,5. Hoạt tính đạt tối ưu với nhiệt độ ở 54,40°C và pH 6,96.

3.5 Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến hoạt tính enzyme protease

Bên cạnh nhiệt độ, pH thì hằng số tốc độ phản ứng K_m và tốc độ phản ứng cực đại V_{max} là hai thông số đặc biệt quan trọng trong nghiên cứu và

ứng dụng enzyme. Cố định các yếu tố hóa học và vật lý có thể tác động đến phản ứng enzyme thì tốc độ phản ứng chỉ phụ thuộc vào nồng độ cơ chất. Giá trị V_{max} có vai trò quan trọng trong việc lựa chọn nồng độ enzyme và cơ chất thích hợp trong các quá trình ứng dụng.

Các thông số động học K_m , V_{max} được xác định theo phương pháp Lineweaver – Burk (1934) bằng cách lập đồ thị $1/V = f(1/[S])$, dựa trên các giá trị nghịch đảo $1/V$ và $1/[S]$ được thể hiện trong Hình 6.



Hình 6: Phương trình Lineweaver- Burk của protease trên cơ chất thịt đầu tôm

Từ kết quả thí nghiệm cho thấy nồng độ cơ chất có ảnh hưởng quan trọng đến hoạt tính của enzyme protease. Nhìn chung, khi nồng độ cơ chất gia tăng sẽ thúc đẩy sự gia tăng tốc độ phản ứng của enzyme. Điều này có thể giải thích là do khi tăng nồng độ cơ chất, cơ hội enzyme gặp được cơ chất và tạo thành phức hợp enzyme - cơ chất cũng tăng dẫn đến gia tăng tốc độ phản ứng. Tuy nhiên, sự liên hệ này chỉ giới hạn đến một nồng độ nhất định nào đó và ở các nồng độ cơ chất cao hơn thì hoạt tính protease hầu như không có sự thay đổi. Murray *et al.* (1990) đã chứng minh rằng sự tăng nồng độ cơ chất vượt qua nồng độ tối ưu sẽ không làm tăng hoạt tính enzyme.

Thông qua phương trình Lineweaver-Burk

$$y = 0,0068x + 0,0855(R^2 = 0,9885) \text{ hay } 1/v = 0,0068 (1/[S]) + 0,0855$$

Giá trị K_m và V_{max} của protease khảo sát được tính toán như sau:

$$1/ V_{max} = 0,0855;$$

$$K_m/V_{max} = 0,0068$$

Như vậy, enzyme protease nội tại từ thịt đầu tôm thể có giá trị V_{max} đạt 11,70 U/phút và K_m là 0,0795 g/mL. Giá trị K_m là hằng số Michaelis-Menten đặc trưng cho ái lực giữa enzyme và cơ chất, giá trị K_m càng nhỏ cho thấy ái lực giữa enzyme và cơ chất càng lớn nên tốc độ xúc tác enzyme càng cao và ngược lại (Banu *et al.*, 2010). Nghiên cứu của Oh *et al.* (2000) cũng cho kết quả giá trị K_m của protease từ gan tụy của tôm *Penaeus orientalis* là 0,51% hay 0,0098 M trên cơ chất casein. Trong khi đó, giá trị K_m đối với cơ chất casein của trypsin trích ly từ gan tụy của một giống tôm nằm trong khoảng 0,17÷0,40% hay 0,003÷0,0076M (Kim *et al.* 1996). Theo nghiên cứu của Vương Bảo Thy (2014), giá trị K_m và V_{max} của protease tinh sạch khi thủy phân cơ chất BSA được xác định với K_m đạt 897 mg/L và V_{max} là 15,7 mg/L.phút. Thông số K_m , V_{max} của protease tinh sạch từ vi khuẩn *B. subtilis* DKMNR đạt giá trị lần lượt là 0,7614 mg.mL⁻¹; 2582 U.phút⁻¹ (Kezia *et al.*, 2011). Điều này cho thấy các thông số động học của enzyme protease phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nguồn gốc enzyme, cơ chất và nồng độ phản ứng (Banu *et al.*, 2010).

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt tính của protease thể hiện cao nhất ở nhiệt độ 60°C, pH môi trường 7,0, enzyme protease bền ở nhiệt độ 55°C. Hoạt động protease đạt tối ưu ở điều kiện nhiệt độ 54,40 °C và pH = 6,96. Sự tăng nồng độ cơ chất thịt đầu tôm sẽ thúc đẩy sự gia tăng hoạt tính enzyme. Hoạt tính tăng nhanh khi tăng nồng độ cơ chất từ 0=0,6 (g/mL), khi đó vận tốc cực đại V_{max} đạt 11,70 U/phút và hằng số $K_m = 0,0795$ g/mL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ali, N.E.H.A., Hmidet, N., Olfa, G., Nahed, F.Z., Ali, B., Nasri, M., 2011. Solvent-Stable Digestive Alkaline Proteinases from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*). *Applied Biochem Biotechnol*, 164 (7): 1096-1110.
- Alyward, F., Haisian, D.R., 1969. Oxidation system in fruits and vegetables their relation to the quality of pressured products. *Advances in Food Research*, 17: 1-76.
- Banu, A.R., Devi, M.K., Gnanaprabhal, G.R., Pradeep, B.V., Palaniswamy, M., 2010. Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chysogenum*. *Indian Journal of Science and Technology*, 3(4): 377-381.
- Castillo-Yanez, F.J., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreño, F.L. and de Los Angeles Navarrete-Del, M., 2004. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chemistry*, 85(3): 343-350.
- Dendinger, J.E. and O'Connor, K.L., 1990. Purification and characterization of a trypsin-like enzyme from the midgut gland of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol*, 95B: 525- 530.
- Galgani, M.L., Benyamin, Y., Ceccaldi, H.J., 1984. Identification of digestive proteinases of *Penaeus kerathurus* (Forskål): a comparison with *Penaeus japonicus*. *Comp.Biochem. Physiol*, 78B: 355-361.
- Hà Thị Thụy Vy, Trần Thanh Trúc và Nguyễn Văn Mươi, 2016. Ảnh hưởng của dung môi và thời gian kết tủa đến hiệu quả tinh sạch sơ bộ enzyme protease trích ly từ thịt đầu tôm. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Số chuyên đề: Nông nghiệp (1): 9-17.
- Joo, H.S. and Chang, C.S., 2006. Production of an oxidant and SDS - Stable alkaline protease from an alkalophilic *Bacillus clausii* 1-52 submerged fermentation, feasibility as a laundry detergent additive. *Enzyme and Microbial Technology*. 38(1): 176-183.
- Kezia, D., Chandrakala, G., Prasanthi, V., Naidu, S.V., Rao, M.N., 2011. Influence of different factors on production of purified protease by *Bacillus subtilis* DKMNR. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(3): 178-182.
- Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon. I., Lee, S., 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7): 2482-2488.
- Murray, K.J., England, P.J., Lynham, J.A., Mills, D., Schmitz-Peiffer, C., Reeves, M.L., 1990. Use of a synthetic dodecapeptide (malantide) to measure the cyclic AMP-dependent protein kinase activity ratio in a variety of tissues. *Biochemical Journal*, 267(3): 703-708.
- Nguyễn Công Hà và Lê Nguyễn Đoàn Duy, 2011. Giáo trình Kỹ thuật thực phẩm 3 (Quá trình sinh hóa trong chế biến thực phẩm). *Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ*, 94 trang.
- 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. Nha Trang.
- Nguyễn Văn Lê, 1996. Nghiên cứu sử dụng protease đầu tôm trong chế biến thủy sản, Luận án phó tiến sỹ Khoa học sinh học. Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Hà Nội.
- Nguyễn Việt Dũng, 1999. Nghiên cứu sự biến đổi của tôm sau khi chết và phương pháp bảo quản nguyên liệu. Luận án Tiến sĩ Kỹ thuật, Đại học Thủy sản Nha Trang. Nha Trang.
- Oh, Y.S., Shih, I.L., Tzeng, Y.M., Wang, S.L., 2000. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1,2): 3-10.
- Phạm Thị Trân Châu, 1993. Công nghệ enzyme và ứng dụng protease trong công nghệ chế biến. *Tạp chí Thủy sản*, 1: 9-15
- Trần Thanh Trúc, Trần Bạch Long, Phan Thị Bích Ngọc, Hà Thị Thụy Vy và Nguyễn Văn Mươi, 2014. Nghiên cứu trích ly enzyme protease từ thịt đầu tôm sú (*Penaeus monodon*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. Số chuyên đề: Thủy sản (1): 8-14.
- Trang Sĩ Trung, 2012. Nghiên cứu qui trình công nghệ sản xuất chitin chất lượng cao, giảm thiểu ô nhiễm môi trường, đáp ứng nhu cầu thị trường Nhật để sản xuất glucosamine. Đề tài Khoa học và Công nghệ cấp bộ mã số B2010-13-58, Trường Đại học Nha Trang, Bộ Giáo dục và Đào tạo.
- Vương Bảo Thy, Trần Bích Lam và Lưu Duẩn, 2014. Nghiên cứu thu nhận chế phẩm enzyme từ gan và tụy cá Tra (*Pangasius hypophthalmus*) bằng phương pháp kết tủa. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 52(5C): 244-252.