

DOI:10.22144/ctu.jvn.2018.041

NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN HOẠT HÓA ENZYME PROTEASE NỘI TẠI TỪ THỊT ĐẦU TÔM THẺ (*Litopenaeus vannamei*)

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 và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Hà Thị Thụy Vy (email: vvp1114009@gstudent.ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 04/10/2017

Ngày nhận bài sửa: 15/12/2017

Ngày duyệt đăng: 26/04/2018

Title:

Study on the conditions for activation of intracellular protease from head meat of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Từ khóa:

Kích hoạt, phương pháp bề mặt đáp ứng, protease, thịt đầu tôm, thủy phân

Keywords:

Activation, head meat shrimp, hydrolysis, protease, response surface methodology (RSM)

ABSTRACT

The study was conducted to assess the impact on protein hydrolysis by the activity of intracellular protease from head meat of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The research's content includes the influence of freezing storage time on protein hydrolysis process. In addition, activation of the pre-treated intracellular protease enzyme was optimized by using a response surface methodology (RSM) with three factors: temperature, pH and time. Hydrolysis time of protein from shrimp head meat with the activated intracellular protease was also investigated. The results showed that the freezing storage time was maximum for 6 weeks. The optimal conditions for hydrolysis were found to be a pH of 6.95 combined with a pre-treatment at 57.5°C for 3.78 minutes. At the time, the yield of hydrolysis (DH%) increased up to 41.12%; the protein content reached 44.33 mg/100g after 6 hours of hydrolysis.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá tác động của enzyme protease nội tại đến khả năng thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ. Nội dung khảo sát bao gồm ảnh hưởng của thời gian trữ đông thịt đầu tôm thẻ đến quá trình thủy phân protein. Bên cạnh đó, quá trình tiền xử lý nhằm kích hoạt protease nội tại được tối ưu hóa theo phương pháp bề mặt đáp ứng với 3 thừa số nhiệt độ, pH và thời gian. Thời gian thủy phân protein thịt đầu tôm bằng protease nội tại sau khi hoạt hóa cũng được nghiên cứu. Kết quả khảo sát cho thấy thời gian trữ đông thịt đầu tôm thích hợp là 6 tuần. Điều kiện kích hoạt enzyme thủy phân đạt tốt nhất khi thịt đầu tôm thẻ được tiền xử lý nhiệt ở nhiệt độ 57,5°C, pH 6,95 và thời gian 3,78 phút. Khi đó, hiệu suất thủy phân (%DH) protein thịt đầu tôm thẻ tăng đến 41,12%, hàm lượng protein đạt 44,33 mg/100 g sau 6 giờ.

Trích dẫn: Hà Thị Thụy Vy, Trần Thanh Trúc và Nguyễn Văn Mười, 2018. Nghiên cứu điều kiện hoạt hóa enzyme protease nội tại từ thịt đầu tôm thẻ (*Litopenaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(3B): 67-74.

1 GIỚI THIỆU

Xu hướng sử dụng phụ phẩm tôm để chiết tách enzyme protease hay thu hồi protein nhằm nâng cao giá trị của các thành phần trong phụ phẩm đã và đang được các nhà khoa học quan tâm thực hiện.

Cavalheiro *et al.* (2007) nghiên cứu thu hồi protein theo hình thức thủy phân có thể được sử dụng làm chất mùi hoặc bổ sung vào các loại sản phẩm thức ăn có nguồn gốc từ cá, thức ăn cho nuôi trồng thủy sản hoặc nguồn nitơ trong môi trường nuôi cấy các vi sinh vật. Gildberg và Stenberg (2001) đã nghiên

cứu thu hồi sản phẩm thủy phân từ phụ phẩm tôm, là nguồn peptide có hoạt tính sinh học mang đến tiềm năng đáng kể trong dược phẩm. Kelly *et al.* (2006) thủy phân protein để sử dụng trong thực phẩm và thức ăn gia súc. He *et al.* (2006) nghiên cứu khả năng sản xuất các thành phần thực phẩm chức năng thông qua quá trình thủy phân phụ phẩm. Nguyễn Lệ Hà (2011) đã nghiên cứu tách chiết và ứng dụng enzyme protease từ gan tụy và đầu tôm sú vào chế biến thủy sản. Đầu tôm là nguồn nguyên liệu có hàm lượng protein tổng số cao, phong phú, rẻ tiền và dễ tìm; đặc biệt, không giống như các loài động vật thủy sản khác, đầu tôm là nơi tập trung cơ quan tiêu hoá, gan tụy được loại ra trong quá trình chế biến từ các nhà máy thủy sản (Heu *et al.*, 2003), do đó phần thịt đầu tôm là nơi có sự hiện diện của enzyme protease nội tại cao nhất. Đây chính là cơ sở cho việc kích hoạt enzyme protease nội tại từ thịt đầu tôm nhằm thu được chế phẩm thủy phân giàu protein.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Nguyên liệu thịt đầu tôm sẽ sau khi phân tách 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 polyamide 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 $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.2 Phương pháp thủy phân protein

Nguyên liệu thịt đầu tôm sẽ sau khi xử lý sơ bộ được nghiền nhỏ. Tiến hành bổ sung dung môi với tỉ lệ khối lượng nguyên liệu/dung môi là 1:1 và nhiệt độ thủy phân cố định là nhiệt độ phòng (30°C). Chỉ tiêu theo dõi là hiệu suất thủy phân protein do tác động của enzyme protease nội tại có trong mẫu thịt đầu tôm sau khi xử lý, hàm lượng protein hòa tan có trong dịch thủy phân và hàm lượng NH_3 sinh ra theo thời gian thủy phân.

2.3 Phương pháp phân tích

Các chỉ tiêu được phân tích và đo đạc theo các phương pháp tiêu chuẩn:

+ Độ ẩm nguyên liệu (%): Sấy ở 105°C đến khối lượng không đổi (Phạm Văn Sô và Bùi Thị Như Thuận, 1991).

+ Protein tổng số (%): Phương pháp Kjeldahl (TCVN: 3705-90)

+ Protein hòa tan (mg/100g): Phương pháp Bradford (1976), sử dụng bovine serum albumin (Merk) làm đường chuẩn, với chỉ thị màu Coomassie Brilliant Blue và đo ở bước sóng 595 nm.

+ Hoạt tính protease (UI/g): 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).

+ Hiệu suất thủy phân (%): Xác định bằng phương pháp OPA (o-phthalaldehyde), dựa trên nguyên tắc các nhóm amin của acid amin hoặc peptid phản ứng với Ortho-phthaldialdehyde với sự có mặt của $-\text{SH}$ của dithiothreitol hoặc mercaptoethanol sẽ tạo ra hợp chất có khả năng hấp thụ ở bước sóng 340 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 thí nghiệm.

2.5 Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.5.1 Xác định thành phần nguyên liệu thịt đầu tôm sẽ

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: Khảo sát ảnh hưởng của thời gian trữ đông đến hiệu suất thủy phân protein bằng enzyme protease nội bào

Thí nghiệm tiến hành nhằm mục tiêu đánh giá hiệu quả trữ đông đến hiệu suất thủy phân do tác động của enzyme nội tại có trong thịt đầu tôm và sự ổn định hoạt tính protease trong thịt đầu tôm sẽ. Nguyên liệu thịt đầu tôm sẽ trữ đông với các mức thời gian trữ đông tương ứng từ 1 đến 8 tuần, hiệu suất thủy phân protein từ thịt đầu tôm bằng enzyme protease nội tại được tiến hành theo mục 2.2 với nhiệt độ cố định là nhiệt độ phòng (30°C) và thời gian thủy phân cố định 4 giờ (Sowmya *et al.*, 2014). Ứng với từng thí nghiệm thức khảo sát, tiến hành xác định hiệu suất thủy phân protein và hoạt tính enzyme protease theo mục 2.3.

2.5.3 Thí nghiệm 2: Xác định tương tác của nhiệt độ, pH và thời gian tiền xử lý đến hiệu suất thủy phân protein từ thịt đầu tôm sẽ

Mục đích thí nghiệm để xác định được điều kiện tiền xử lý thích hợp nhất giúp cải thiện hiệu suất thủy phân protein từ thịt đầu tôm. Thí nghiệm tiến hành với 3 nhân tố X1- nhiệt độ tiền xử lý, X2 – pH và X3 -thời gian kích hoạt enzyme protease nội tại. Sử dụng phương án trực giao cấp 2 với 17 số thí nghiệm

thức (Bảng 1), trong đó có một thí nghiệm ở tâm phương án. Bổ sung thêm ba thí nghiệm ở tâm để kiểm tra ý nghĩa các hệ số của phương trình hồi quy.

Tương ứng với từng điều kiện khảo sát, lọc và ly tâm, thu dịch thủy phân và xác định hiệu suất thủy phân.

Bảng 1: Ma trận quy hoạch thực nghiệm quá trình thủy phân thịt đầu tôm

TT	Giá trị mã hóa			Giá trị thực nghiệm		
	X ₁	X ₂	X ₃	Nhiệt độ (°C)	pH	Thời gian (phút)
1	-1,68	0	0	43,18	7	4
2	0	0	0	60	7	4
3	0	0	1,68	60	7	5,68
4	0	-1,68	0	60	5,32	4
5	1,68	0	0	76,82	7	4
6	1	1	1	70	8	5
7	0	0	-1,68	60	7	2,32
8	1	-1	-1	70	6	3
9	1	-1	1	70	6	5
10	-1	-1	-1	50	6	3
11	-1	1	1	50	8	5
12	0	1,68	0	60	8,68	4
13	-1	1	-1	50	8	3
14	-1	-1	1	50	6	5
15	1	1	-1	70	8	3
16	0	0	0	60	7	4
17	0	0	0	60	7	4

Mỗi nhân tố có 5 mức khảo sát -1,68; -1; 0; tâm; +1 và +1,68

Dựa trên hiệu suất thủy phân trung bình của protein thu được tương ứng với 17 đơn vị thí nghiệm, sử dụng chương trình Statgraphics Centurion 16.1 để giải bài toán quy hoạch thực nghiệm và tính các hệ số phương trình hồi quy, trong đó hàm mục tiêu Y: Hiệu suất thủy phân protein (%DH). Ba yếu tố cần khảo sát ở các mức:

+ X₁: Nhiệt độ tiền xử lý với 5 mức khảo sát, mức thấp nhất (-1,68) tương ứng 43,18°C, mức -1 tương ứng nhiệt độ 50°C, tâm (mức 0) 60°C và hai mức nhiệt độ cao 70°C (+1) và 76,82°C (+1,68).

+ X₂: pH dung môi với 5 mức khảo sát, mức thấp nhất (-1,68) tương ứng pH 5,32; mức -1 tương ứng pH 6; tâm (mức 0) pH 7 và hai mức pH cao pH 8 (+1) và 8,68 (+1,68).

+ X₃: Thời gian kích hoạt enzyme protease nội bào, với 5 mức khảo sát, mức thấp nhất (-1,68) tương ứng 2,32 phút, mức -1 tương ứng thời gian 3 phút, tâm (mức 0) 4 phút và hai mức thời gian 5 (+1) và 5,68 phút (+1,68). 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.

Mẫu sau khi tiền xử lý được thủy phân trong thời gian 4 giờ. Vẽ đồ thị bề mặt đáp ứng và xác định điều kiện nhiệt độ, pH và thời gian hoạt hóa thích hợp enzyme protease nội tại giúp thu được hiệu suất thủy phân protein cao nhất.

2.5.4 Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của thời gian thủy phân protein của enzyme protease nội tại đến hiệu suất thủy phân

Thí nghiệm tiến hành với mục đích xác định thời gian thủy phân thích hợp nhất đạt hiệu suất thủy phân protein từ thịt đầu tôm thê cao. Mẫu thí nghiệm được tiến hành tương tự thí nghiệm 1 với các thông số tiền xử lý được xác định từ thí nghiệm 2. Tiến hành thủy phân ở nhiệt độ phòng (30°C) ở 8 mức thời gian thủy phân thay đổi từ 1 đến 8 giờ. Chỉ tiêu theo dõi là hiệu suất thủy phân protein do tác động của enzyme protease nội tại có trong mẫu thịt đầu tôm sau khi xử lý.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thành phần nguyên liệu thịt đầu tôm thê

Kết quả thành phần hóa lý cơ bản và hoạt tính protease ban đầu của thịt tôm được trình bày Bảng 2.

Bảng 2: Thành phần nguyên liệu thịt đầu tôm thê

Chỉ tiêu	Giá trị
Độ ẩm (%)	83,24±0,68
pH	7,78±0,02
Protein tổng (%)	12,80±0,25
Hoạt tính protease (UI/gCKNL) *	0,89±0,02

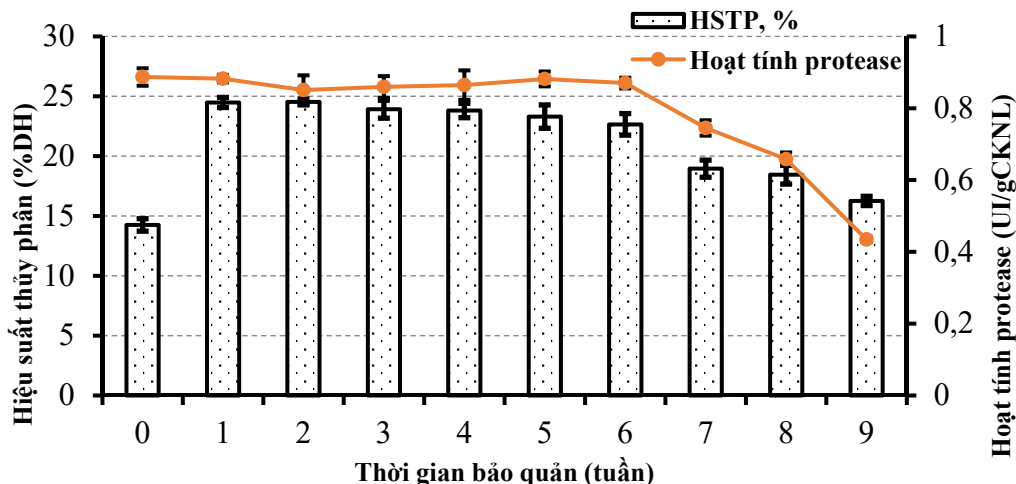
*Kết quả của 5 lần lấy mẫu, 3 lần lặp lại/mẫu; CKNL:chất khô nguyên liệu

Kết quả từ Bảng 2 cho thấy hàm lượng protein tổng số trong thịt đầu tôm thẻ khá cao (trung bình 12,80%) và pH hơi kiềm (7,78), 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. Điều này chứng tỏ tiềm năng có thể khai thác nguồn nguyên liệu này cho quá trình thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ. Trong quá trình sản xuất, thịt đầu tôm thẻ là phụ phẩm – thường được xem phế liệu của quá trình xử lý đầu tôm chuẩn bị cho việc chế biến chitosan (Ngô Thị Hoài Dương và *ctv.*, 2008). Các phụ phẩm như đầu tôm phần lớn chỉ được uớt đá, đồ xóa và sau mỗi ca sản xuất sẽ bán lại cho các thương lái. Chính thời gian xử lý dài (thịt đầu tôm chỉ được thu mua lại từ thương lái trong khoảng 12÷15 giờ) là nguyên nhân dẫn đến sự biến đổi sinh hóa sau khi chết của tôm. Bên cạnh đó, hoạt tính enzyme protease khá cao (0,89UI/gCKNL) sẽ thúc đẩy quá trình thủy phân protein. Khi khảo sát ảnh hưởng các loại dung môi trong tinh sạch sơ bộ enzyme protease nội tại từ thịt đầu tôm thẻ xác định

ở tỷ lệ mẫu với ethanol là 1: 3 (v/v), thời gian kết tủa 30 phút cho giá trị hoạt tính riêng là 2,04 U/mg protein (Hà Thị Thụy Vy và *ctv.*, 2016). Chính vì vậy, việc nghiên cứu thời gian trữ đông thịt đầu tôm cũng như xác định điều kiện thủy phân phù hợp tạo dịch thủy phân chưa có mùi lạ, có khả năng sử dụng trong chế biến thực phẩm là vấn đề đầu tiên cần được quan tâm.

3.2 Ảnh hưởng của thời gian trữ đông đến hiệu suất thủy phân protein bằng enzyme protease nội tại

Trữ đông là một giải pháp được sử dụng để bảo quản, giúp duy trì nguồn nguyên liệu ổn định cho quá trình xử lý tiếp theo. Tuy nhiên, sự hình thành tinh thể đá do quá trình trữ đông vẫn là nguyên nhân dẫn đến sự suy giảm hoạt tính enzyme và tác động đến hiệu quả thu nhận protein. Sự thay đổi hiệu suất thủy phân theo thời gian bảo quản lạnh đông ở nhiệt độ -18±2°C được xác định, thể hiện ở Hình 1.



Hình 1: Hiệu suất thủy phân protein từ enzyme protease nội tại theo thời gian bảo quản

Từ kết quả đồ thị Hình 1 cho thấy hoạt tính enzyme trong mẫu thịt đầu tôm thẻ ổn định ở điều kiện lạnh đông từ tuần 1 đến tuần 4, thể hiện qua hiệu suất thủy phân đạt 23,81% sau 4 tuần bảo quản và không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với tuần đầu tiên (hiệu suất thủy phân đạt 24,69%). Thịt đầu tôm sau khi bảo quản lạnh đông, từ tuần 6 hiệu suất thủy phân bắt đầu giảm nhẹ và giảm mạnh ở tuần bảo quản thứ 7 đến tuần thứ 9. Tương tự hiệu suất thủy phân, hoạt tính enzyme protease từ 0÷6 tuần ổn định, dao động từ 0,85÷0,89 UI/gCKNL và không có khác biệt ý nghĩa thống kê. Sang tuần thứ 7, hoạt tính enzyme nội tại bắt đầu giảm (0,73UI/gCKNL) và giảm mạnh ở tuần thứ 9 (0,43UI/gCKNL). Điều này cho thấy sự hình thành tinh thể đá trong quá trình lạnh đông có thể là nguyên nhân phá vỡ đặc tính cấu trúc của mô tế bào,

tác động một phần đến hoạt tính của enzyme (Asgeirsson *et al.*, 1995). Nghiên cứu của Baek và Cadwallader (1995) đã chứng minh dưới tác động của enzyme protease nội tại protein trong nguyên liệu bị thủy phân. Đây là một hệ tương đối phức tạp gồm nhiều cấu tử có tác động tương hỗ trong khung mạng protein và các thành phần khác. Hơn thế nữa, protease và các enzyme thủy phân khác được chứng tỏ là hệ enzyme có thể hoạt động trong suốt quá trình trữ đông, ngay cả ở nhiệt độ -29°C và gia tăng hiệu quả hoạt động ở điều kiện rã đông, do đó đẩy nhanh tốc độ thủy phân protein (Sista *et al.*, 1997). Nghiên cứu của Senthil *et al.* (1992) cũng cho thấy có sự giảm dần hoạt tính protease ở tất cả các bộ phận trong quá trình trữ đông cá sardine và cá hỏ và giảm đáng kể khi kéo dài thời gian bảo quản trên 3 tháng. Kết quả thí nghiệm cho thấy khả năng trữ đông thịt

đầu tôm thẻ giúp ổn định hoạt tính protease, hạn chế quá trình thủy phân protein, thời gian trữ đông tối đa là 6 tuần.

3.3 Tác động của nhiệt độ, pH và thời gian kích hoạt protease nội tại đến hiệu suất thủy phân protein từ thịt đầu tôm

Dựa trên các kết quả khảo sát thăm dò về tác

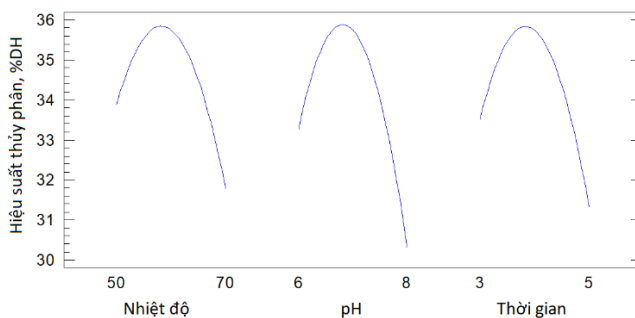
động riêng lẻ của yếu tố nhiệt độ, pH cho thấy các nhân tố này đều có sự chi phối đáng kể đến hoạt động của protease – điều này có thể là nguyên nhân chính ảnh hưởng đến hiệu quả thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ. Kết quả phân tích ảnh hưởng của các nhân tố mã hóa đối với phương trình hồi quy được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3: 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 (°C)	45,7727	1	45,7668	69,32	0,0000
X ₂ : pH dung môi	88,5828	1	88,5988	134,15	0,0000
X ₃ : Thời gian kích hoạt (phút)	47,6719	1	47,6916	72,19	0,0000
X ₁ ²	286,996	1	286,5	434,63	0,0000
X ₁ .X ₂	35,7216	1	35,7216	54,10	0,0000
X ₁ .X ₃	109,397	1	109,397	165,67	0,0000
X ₂ ²	530,056	1	530,096	803,48	0,0000
X ₂ .X ₃	313,348	1	313,348	474,53	0,0000
X ₃ ²	373,528	1	373,529	5656,43	0,0000
Số lần lặp lại	0,0267922	2	0,0133961	0,02	0,9799
Sai số	25,7529	39	0,658361		
	1430,21	50			

Bảng 3 cho thấy giá trị P của các lần lặp lại của thí nghiệm (block) có giá trị P = 0,9799 > 0,05 và gần bằng 1, chứng tỏ độ tin cậy của kết quả đo đặc giá trị hiệu suất thủy phân tương ứng với các chế độ tiền xử lý nhiệt 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 50 đã chứng tỏ các nhân

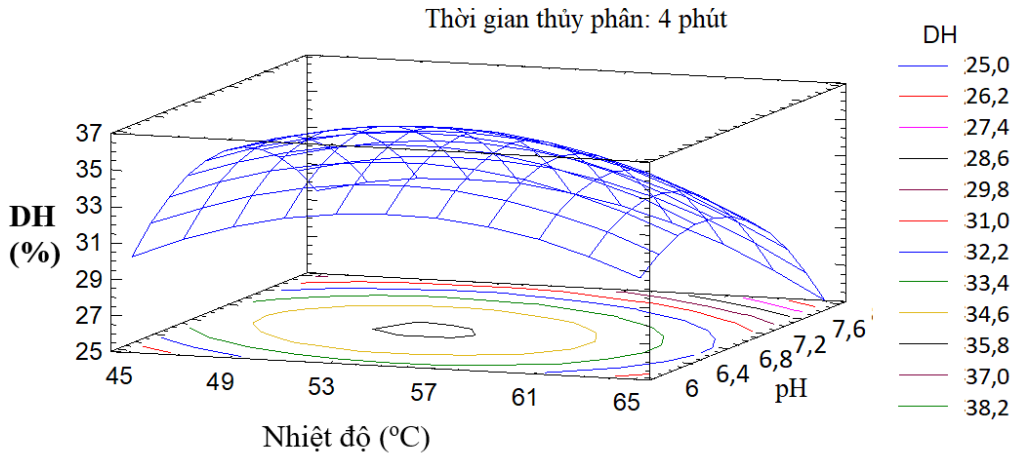
tố khảo sát đều ảnh hưởng đến quá trình thủy phân protein của protease từ thịt đầu tôm thẻ. Hệ số hồi quy bậc một của X₁, X₂ và X₃ cũng như hệ số tương tác của X₁X₂; X₁X₃ X₂X₃ đều khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%, đồng thời hệ số hồi quy bậc hai của các hệ số này cũng khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê.



Hình 2: Đồ thị biểu diễn sự tương tác của nhiệt độ, pH và thời gian đến quá trình thủy phân protein từ protease nội tại

Đồ thị thể hiện sự tương tác của các thừa số khảo sát ở Hình 2 cũng góp phần khẳng định mức độ ảnh hưởng của từng biến độc lập cũng như các tương tác có ý nghĩa đến quá trình thủy phân protein được khảo sát. Từ đồ thị Hình 3 cho thấy ba nhân tố này thật sự có sự ảnh hưởng đồng thời đến quá trình thủy phân của enzyme protease. Với nhiệt độ tiền xử lý thấp, pH cao và thời gian kích hoạt dài cho hiệu quả thủy phân kém, trong khi đó, nếu nâng nhiệt độ tiền xử lý nhiệt lên mức cao nhất và thời gian kích hoạt

kéo dài, protease bị mất hoạt tính dẫn đến hiệu suất thủy phân cũng giảm. 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 ba yếu tố nhiệt độ, pH và thời gian đều ảnh hưởng đến quá trình thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ. Giá trị cao nhất của hàm mục tiêu Y khi X₁ có giá trị trong khoảng từ -1 đến 0 (50°C đến 60°C); X₂ có giá trị trong khoảng từ -1 đến 0 (pH từ 6÷7) và X₃ cũng có giá trị trong khoảng từ -1 đến 0 (3÷4 phút).

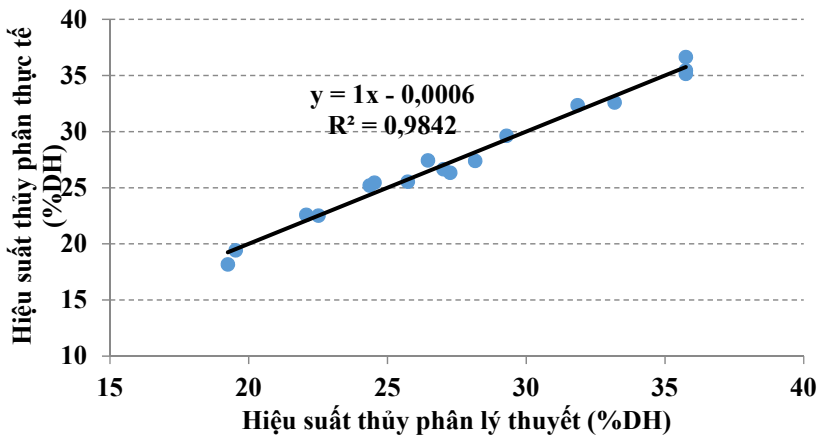


Hình 3: Tương tác của nhiệt độ, pH đến hiệu suất thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ bằng enzyme protease nội tại

Dựa trên kết quả phân tích ANOVA, phương trình hồi quy thể hiện sự tương quan của điều kiện tiền xử lý đến hiệu suất thủy phân được thiết lập và sử dụng để dự đoán hiệu quả việc thủy phân protein. Hiệu suất thủy phân mô phỏng (Y lý thuyết) được xác định bằng cách thay các biến với giá trị thực vào phương trình sau: $Y(\%DH) = -396,63 + 3,39.X_1 + 75,7535X_2 + 38,0091X_3 - 0,0291308 X_1^2 -$

$$0,122X_1X_2 + 0,2135 X_1X_3 - 3,9075X_2^2 - 3,61333X_2X_3 - 3,32556 X_3^2 \quad (1)$$

Giá trị pH và nhiệt độ tối ưu cho quá trình tiền xử lý thịt đầu tôm thẻ khi giải phương trình hồi quy (1). Dựa theo kết quả thu được trên Hình 3, điều kiện thích hợp để kích hoạt enzyme nội tại từ thịt đầu tôm thẻ tương ứng với $X_1 = -0,250$ (nhiệt độ 57,5°C); $X_2 = -0,048$ (pH 6,95) và $X_3 = -0,216$ (thời gian kích hoạt 3,78 phút).



Hình 4: Tương quan giữa hiệu suất thủy phân xác định bằng thực nghiệm và tính toán theo phương trình hồi quy

Hiệu suất thủy phân protein đạt được ở điều kiện kích hoạt tối ưu là 36,04%. Hiệu suất thủy phân thu được từ thực nghiệm và tính toán theo phương trình có sự tương thích giữa thực nghiệm và tính toán theo phương trình hồi quy ($R^2 = 0,9842$) (Hình 4). Hệ số tương quan cho biết 98,42% sự thay đổi hiệu suất thủy phân protein là do ảnh hưởng các biến độc lập X_1, X_2, X_3 và chỉ có 1,58% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định gây ra.

Nghiên cứu của Cao *et al.* (2008) là quá trình thủy phân protein từ phụ phẩm tôm thẻ chân trắng bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Phương trình đã cho thấy hiệu suất thủy phân protein đạt khoảng 45% khi đầu tôm được tiền xử lý ở nhiệt độ 50°C, pH 7,85 và nồng độ cơ chất thịt đầu tôm tối đa là 23%. Ngoài ra, Cao *et al.* (2009) cũng đề xuất điều kiện thủy phân và phương pháp thu hồi protein từ đầu tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) bằng

cách nâng dần nhiệt tiền xử lý (nhiệt độ tăng lên 5°C mỗi nửa giờ, từ 40°C đến 70°C), hiệu suất thủy phân cuối đạt đến 48,6%DH và hiệu quả thu hồi protein tăng từ 43,6 đến 87,4%. Điều này cho thấy quá trình thủy phân protein là một quá trình phức tạp và hiệu quả phụ thuộc vào nguyên liệu và điều kiện thủy phân khác nhau. Bên cạnh các yếu tố về nhiệt độ, pH và thời gian kích hoạt enzyme nội tại thì thời

gian thủy phân cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất thủy phân cần được khảo sát.

3.4 Xác định thời gian thủy phân protein thích hợp từ enzyme protease nội tại

Sự thay đổi hiệu suất thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ theo thời gian được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4: Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất thu hồi dịch thủy phân

Thời gian thủy phân (giờ)	Hiệu suất thủy phân, %DH	Protein hòa tan, g/100gcknl	Hàm lượng NH ₃ , mg/100g
0	2,69±0,73 ^a	2,90±0,78 ^a	7,93±0,60 ^a
1	13,61±1,22 ^b	14,67±1,31 ^b	10,75±0,49 ^b
2	18,55±1,40 ^c	19,67±1,53 ^c	14,33±1,04 ^c
3	24,24±1,09 ^d	26,14±1,18 ^d	17,50±0,55 ^d
4	36,08±0,81 ^e	38,89±0,87 ^f	22,97±0,74 ^e
5	38,81±0,55 ^f	41,84±0,60 ^g	24,78±0,57 ^f
6	41,12±0,63 ^g	44,33±0,98 ^h	30,08±0,88 ^g
7	41,48±1,34 ^{gh}	33,72±1,18 ^e	36,65±0,39 ^h
8	43,07±0,40 ^h	26,76±0,91 ^d	44,60±1,18 ⁱ

(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%)

Từ kết quả thể hiện ở Bảng 4 cho thấy thời gian thủy phân là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thu nhận protein. Thời gian quá ngắn không đủ để enzyme thực hiện quá trình xúc tác phân ứng, còn thời gian quá dài rất dễ làm cho protein chuyển sang hiện tượng tự phân tạo ra mùi hôi thối, không chấp nhận được. Hiệu suất thủy phân tăng từ 2,69 đến 43,07% khi tăng thời gian thủy phân từ 0 đến 8 giờ, hiệu suất thủy phân tăng nhanh ở giai đoạn đầu của quá trình thủy phân và tăng chậm sau 6 giờ. Tuy nhiên, hàm lượng protein hòa tan thu nhận được cũng gia tăng từ 0÷6 giờ đầu và giảm ở các thời gian thủy phân kế tiếp. Hàm lượng protein hòa tan đạt giá trị cao nhất sau 6 giờ thủy phân (44,33 mg/100g). Khi kéo dài thời gian thủy phân đến 8 giờ, hiệu suất thủy phân tăng mạnh (43,07%DH) và hàm lượng protein chỉ đạt 26,76 mg%. Bên cạnh đó, quá trình thủy phân càng kéo dài, hàm lượng NH₃ hiện diện trong dịch thủy phân càng cao. Về phương diện cảm quan, với thời gian thủy phân 6 giờ, dịch thủy phân chưa có mùi lạ nhưng nếu tiếp tục kéo dài thời gian thủy phân mặc dù hiệu suất vẫn tăng nhưng dịch thủy phân có mùi hôi và xuất hiện bọt khí. Điều này có lẽ là do các vi sinh vật hiếu khí phát triển sinh ra protease phân giải protein và sản phẩm của quá trình là hydro sulfua, methyl mercaptane và dimethylsulphide... tạo mùi vị xấu cho sản phẩm (Phan Thị Thanh Quế và Bùi Thị Quỳnh Hoa, 2017). Đó là hiện tượng thối rữa thịt, không đáp ứng mục đích sử dụng cho thực phẩm (Randriamahatody *et al.*, 2011).

Các nghiên cứu ứng dụng dịch thủy phân protein trong chế biến các sản phẩm thực phẩm, điển hình như nghiên cứu của Nilsang *et al.* (2005) đã đề xuất thời gian thủy phân phụ phẩm cá sardine (từ quá trình sản xuất cá đóng hộp) là 6 giờ để tạo dịch protein cá cô đặc (fish soluble concentrate) hay bột protein cá (fish protein hydrolase). Soufi-Kechaou *et al.* (2012) cũng đề xuất quá trình thủy phân protein từ nội tạng mực đạt hiệu quả cao nhất sau 6 giờ thủy phân, các peptide thu nhận được có trọng lượng phân tử thấp và có sự hiện diện của các acid amin với tỷ lệ cao. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Trần Thanh Trúc và *ctv.* (2015) cũng xác định thời gian thủy phân protein tốt nhất, dịch thủy phân không có mùi lạ là 8 giờ khi thủy phân protein bằng enzyme protease nội tại có trong thịt đầu tôm sú. Điều này cho thấy quá trình thủy phân protein của các nguyên liệu khác nhau là khác nhau (Lian *et al.*, 2005; Picot *et al.*, 2006).

Tóm lại, thời gian thủy phân là 6 giờ giúp tăng hiệu suất thủy phân đến 41,12%DH, hàm lượng protein đạt 44,33 mg/100g. Vì vậy, đây là thời gian thích hợp được lựa chọn nhằm nâng cao hiệu quả thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ

4 KẾT LUẬN

Quá trình tiền xử lý nhiệt nguyên liệu giúp kích hoạt protease nội tại và tăng hiệu suất thủy phân. Nhiệt độ, pH và thời gian tiền xử lý tối ưu lần lượt là 57,5°C; pH 6,95 và 3,78 phút. Thời gian thủy phân là 6 giờ là thời gian thích hợp giúp tăng hiệu

quả thủy phân đến 41,12%, hàm lượng protein đạt 44,33 mg/100g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Asgeirsson, B., Hartemink, R. and Chlebowski, J.F., 1995. Alkaline phosphatase from Atlantic cod (*Gadus morhua*)-Kinetic and structural properties which indicate adaptation to low temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology, Biochem Mol Biol* 110: 315-329.
- Baek, H.H. and Cadwallader, K.R., 1995. Enzymatic Hydrolysis of Crayfish Processing By-products. *Journal of Food Science*, 60(5): 929-935.
- Cao, W., Zhang, C., Hong, P. and Ji, H., 2008. Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis. *Food Chemistry*, 109(1): 176-183.
- Cao, W., Zhang, C., Hong, P., Ji, H., Hao, J. and Zhang, J., 2009. Autolysis of shrimp head by gradual temperature and nutritional quality of the resulting hydrolysate. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1): 244-249.
- Cavalheiro, J.M.O., de Oliveira, E.O. and Bora, P.S., 2007. Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) feed. *Bioresource Technology*, 98(3): 602-606.
- Gildberg, A. and Stenberg, E., 2001. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36: 809-812.
- Hà Thị Thụy Vy, Trần Thanh Trúc và Nguyễn Văn Mười, 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.
- He, H., Chen, X., Sun, C., Zhang, Y. and Gao, P., 2006. Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011. *Bioresource Technology*, 97: 385-390.
- Heu, M. S., Kim, J and Shahidi, F., 2003. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*. 82: 235-242.
- Kelly, C.G., Agbogbo, F.K. and Holtzapple, M.T., 2006. Lime treatment of shrimp head waste for the generation of highly digestible animal feed. *Bioresource Technology*, 97: 1515-1520.
- Lian, P.Z., Lee, C.M. and Park, E., 2005. Characterization of squid-processing by-product hydrolysate and its potential as aquaculture feed ingredient. *J. Agric. Food Chem.* 53(14): 5587-5592.
- Ngô Thị Hoài Dương, Trang Sĩ Trung và Phạm Thị Đan Phượng, 2008. Kết hợp xử lý sơ bộ bằng acid formic trong qui trình chế biến phế liệu tôm để nâng cao chất lượng chitin-chitosan. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Thủy sản số 04*: 25-29.
- Nguyễn Lê 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.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M. and Assavanig, A., 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*, 70: 571-578.
- Phạm Văn Sô và Bùi Thị Như Thuận (1991), Kiểm nghiệm lượng thực và thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.
- Phan Thị Thanh Quế và Bùi Thị Quỳnh Hoa, 2017. Giáo trình Công nghệ chế biến Thủy sản. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ.
- Picot, L., Bordenave, S., Didelot, S., Fruitier-Arnaudin, I., Sannier, F., Thorkelsson, G., Bergé, P., Guérard, F., Chabeaud, A. and Piot, J.M., 2006. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochem.* 41(5): 1217-1222.
- Randriamahatody, Z., Syllaa, K.S.B., Nguyen, H.T.M., Donnay-Morenoa, C., Razanamparany, L., Bourgougnonb, N. and Bergéa, J.P., 2011. Proteolysis of shrimp by-products (*Penaeus monodon*) from Madagascar. *CyTA - Journal of Food*, 9(3): 220-228.
- Senthil, A., Mamatha, B.S., Vishwanath, P., Bhat, K.K. and Ravishankar, G.A., 2010. Studies on development and storage stability of instant spice adjunct mix from seaweed (*Eucheuma*). *J Food Sci Technol.* 48(6): 712-717.
- Sista, R.V., Erickson, M.C. and Shewfelt, R.L., 1997. Quality deterioration in frozen food associated with hydrolytic enzyme activities. In: Erickson, M.C., Hung, Y. (Eds.) *Quality in frozen Food*, New York: Chapman & Hall, 101-110.
- Soufi-Kechaou, E., Jaouen, P., Amar, R.B. and Jean-Pascal, B., 2012. Influence of hydrolysis time on protein recovery and amino acid composition of hydrolysates. *Science Research Reporter*, 2(2): 115-129.
- Sowmya, R., Ravikumar, T.M., Vivek, R., Rathinaraj, K. and Sachindra, N.M., 2014. Optimization of enzymatic hydrolysis of shrimp waste for recovery of antioxidant activity rich protein isolate. *J Food Sci Technol.*, 51(11): 3199-3207.
- Trần Thanh Trúc, Vi Nhã Tuấn, Võ Thị Anh Minh và Nguyễn Văn Mười, 2015. Nghiên cứu khả năng thủy phân dịch protein của thịt đầu tôm sú bằng enzyme protease nội tại. *Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ. Phần B: Nông nghiệp, thủy sản và công nghệ sinh học*: 37; 39-46.