

# NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG ENZIM PAPAIN THÔ TỪ NHỰA ĐU ĐỦ ĐỂ THỦY PHÂN PROTEIN TRONG BÁNH DẦU ĐẬU NÀNH

*Dương Thị Hương Giang<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Xuân Dung<sup>1</sup> và Phan Thị Bích Trâm<sup>2</sup>*

## ABSTRACT

*The aim of this research is to study appropriate conditions for hydrolyzing proteins in soybean meal by using crude enzym extract from papaya latex. The obtained protein hydrolysate with high nutritional quality can be applied in husbandry. The results showed that crude papain extract has strong activities towards soybean meal at optimum conditions pH 7.0 and temperature 55°C. There was almost no difference between the two experiments with or without interaction of these two parameters. Yielding effect was maximum at 11.8% corresponding with the ratio of enzym:substrate 0.75:100(w/w), enzym specific activity 91.12TU/m and time course 24 hours. SDS-PAGE analysis revealed that soybean meal contained proteins in a range from 14.4-80kDa. These proteins were diminished during the course of hydrolysis, and after 24 hours the remaining proteins of the hydrolysate, except amino acids, composed of fractions of about 14.4-25.0 kDa.*

**Keywords:** *papain, soybean meal, protein hydrolysate*

**Title:** *Studying on hydrolysis conditions of soybean meal proteins by using crude enzym extract from papaya latex*

## TÓM TẮT

*Đề tài nghiên cứu sử dụng enzym papain thô trích ly trực tiếp từ mủ đu đủ để thủy phân bánh dầu đậu nành tạo sản phẩm có giá trị dinh dưỡng cao ứng dụng trong chăn nuôi. Kết quả thí nghiệm cho thấy điều kiện tối ưu cho enzym papain trên cơ chất bánh dầu đậu nành là nhiệt độ 55°C và pH 7,0. Bố trí tương tác 2 nhân tố nhiệt độ và pH cũng cho kết quả tương tự như riêng từng nhân tố. Với tỉ lệ enzym:cơ chất là 0,75:100 (w:w), hoạt tính đặc hiệu của enzym là 91,12 TU/mg, thời gian thủy phân là 24 giờ cho hiệu suất thủy phân cao nhất 11,8%. Điện di trên gel SDS-PAGE cho thấy thành phần protein trong bánh dầu đậu nành có trọng lượng phân tử trong khoảng từ 14,4-80 kDa. Sau 24 giờ hầu hết các protein có trọng lượng phân tử cao đều bị thủy phân và thành phần trong dịch thủy phân nhận được ngoài axit amin là các polypeptid có trọng lượng phân tử từ 14,4-25,0 kDa.*

**Từ khóa:** *papain, bánh dầu đậu nành, dịch thủy phân protein*

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Một trong các enzym có nguồn gốc thực vật là papain được ly trích từ mủ trái đu đủ và được ứng dụng rộng rãi trong công nghệ chế biến thực phẩm, trong công nghiệp hóa chất, bảo chế dược phẩm ... Với điều kiện khí hậu ở Việt Nam thì ở đâu cũng trồng được đu đủ, hàm lượng mủ trong trái còn xanh rất nhiều, vì vậy việc thu nhận papain rất dễ dàng, papain với hoạt tính cao có thể thủy phân protein

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học

<sup>2</sup> Bộ môn Sinh lý – Sinh Hóa, Khoa Nông Nghiệp & Sinh học ứng dụng

thành những peptid ngắn và axit amin nên đây sẽ là nguồn enzym proteaz phong phú và rẻ tiền. Bên cạnh đó, trên thị trường thức ăn gia súc, bánh dầu đậu nành đang là nguồn đạm rất được quan tâm do có hàm lượng protein cao khoảng 41-50%, nhưng do trong thành phần bánh dầu đậu nành ngoài protein còn có các yếu tố kháng dinh dưỡng như chất ức chế hoạt động enzym trypsin, các chất saponin v.v..., làm ảnh hưởng đến khả năng tiêu hóa cho gia súc nhất là các động vật non. Vì vậy, nhằm làm gia tăng giá trị dinh dưỡng của bánh dầu đậu nành với nguồn enzym papain sẵn có, chúng tôi thực hiện đề tài: "Nghiên cứu sử dụng enzym papain thô từ nhựa đu đủ để thủy phân protein trong bánh dầu đậu nành" với mục tiêu của đề tài: Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng lên hoạt tính của enzym papain trong quá trình thủy phân bánh dầu đậu nành để xác định hiệu suất thủy phân tối ưu.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Phương tiện thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành tại phòng Công nghệ Enzim, Viện Nghiên Cứu và Phát Triển Công Nghệ Sinh Học trường Đại Học Cần Thơ.

#### 2.1.1 Vật liệu thí nghiệm

Bánh dầu đậu nành ly trích (Ấn Độ) mua tại các cửa hàng thức ăn gia súc, nghiền mịn bằng máy nghiền mẫu Retch (Đức), trữ ở  $-20^{\circ}\text{C}$ . Trước khi thủy phân bột bánh dầu đậu nành được xử lý sơ bộ bằng cách thêm nước với tỉ lệ 1:3; đun nóng ở  $95 - 100^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút để bất hoạt các chất ức chế proteaz trong bột.

Mủ đu đủ được thu nhận từ một số nhà vườn ở Trà Vinh bằng cách dùng dao vạch từ 5- 7 rãnh, chiều sâu 1- 2 mm lên bề mặt dọc trái đu đủ, thu mủ vào ống nhựa, trữ lạnh. Sau đó sấy khô trong tủ sấy ở  $55^{\circ}\text{C}$  đến ẩm độ của nhựa khô đạt  $< 8\%$ , nghiền mịn, rồi trữ mẫu ở  $- 20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.1.2 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức 1 hoặc 2 nhân tố hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần cho mỗi nghiệm thức khảo sát các yếu tố ảnh hưởng của enzym papain lên quá trình thủy phân bánh dầu đậu nành bao gồm pH, nhiệt độ, nồng độ cơ chất và thời gian thủy phân. Ở mỗi nghiệm thức có 1 đối chứng (enzim bất hoạt) và mẫu có enzym được lặp lại 3 lần, lấy kết quả trung bình.

- TN1: Khảo sát pH tối ưu của enzym papain từ 4-10
- TN2: Khảo sát nhiệt độ tối ưu của enzym papain ở 8 mức độ:  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $35^{\circ}\text{C}$ ,  $45^{\circ}\text{C}$ ,  $55^{\circ}\text{C}$ ,  $65^{\circ}\text{C}$ ,  $75^{\circ}\text{C}$ ,  $85^{\circ}\text{C}$ .
- TN3: Khảo sát tương tác giữa nhiệt độ và pH lên quá trình thủy phân với tổng số nghiệm thức là 9, nhân tố nhiệt độ thủy phân có 3 mức độ  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $55^{\circ}\text{C}$ ,  $85^{\circ}\text{C}$ ; nhân tố pH có 3 mức độ pH= 5; pH=7 và pH=9
- TN4: Khảo sát tương tác giữa nồng độ cơ chất và thời gian lên quá trình thủy phân với tổng nghiệm thức là 20 với thời gian thủy phân 4 mức độ: 1 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ và nồng độ cơ chất có 5 mức độ: 1 gam, 2 gam, 4 gam, 6 gam, 8 gam

- TN5: Khảo sát ảnh hưởng việc bổ sung enzym vào các giai đoạn khác nhau lên hiệu suất thủy phân.

Chỉ tiêu đánh giá hiệu quả dịch thủy phân ở các thí nghiệm là xác định hàm lượng đạm amin sinh ra ở mỗi nghiệm thức. Riêng thí nghiệm cuối cùng để đánh giá khả năng thủy phân với các điều kiện tối ưu đã chọn ở các thí nghiệm trước, ngoài chỉ tiêu trên còn kiểm tra phần trăm thu hồi vật chất khô và trọng lượng phân tử của sản phẩm thủy phân bằng điện di trên gel SDS-PAGE.

## 2.2 Phương pháp phân tích

Khảo sát hàm lượng đạm tổng số trong nguyên liệu bánh dầu đậu nành ly trích bằng phương pháp Kjeldahl. Hoạt tính của enzym papain tại thời điểm khảo sát bằng phương pháp Kunitz cải tiến, hàm lượng protein hòa tan bằng phương pháp Bradford (1976). Hàm lượng đạm amin bằng phương pháp OPA (Nielsen, 2001). Phần trăm thu hồi vật chất khô được tính là tỉ lệ % vật chất khô (%DM) của dịch thủy phân chia cho % vật chất khô của dịch thủy phân chưa ly tâm nhân 100. Kỹ thuật điện di trên gel SDS-PAGE (Hames, P.D, 1998). Phương pháp xác định trọng lượng phân tử của protein dựa trên thang protein chuẩn của Biorad, vẽ đường logM của protein chuẩn (low range của Bio Rad). Từ phương trình đường chuẩn ta có thể tính được trọng lượng phân tử của sản phẩm thủy phân.

## 2.3 Xử lý thống kê

Số liệu được xử lý theo chương trình thống kê Statgraphics và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Excel

# 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

## 3.1 Thành phần nguyên liệu

Hàm lượng đạm tổng số chiếm 7,4% tương ứng với hàm lượng protein trong bánh dầu đậu nành khoảng 44,03%. Đây là nguồn nguyên liệu chứa lượng đạm khá cao, kết quả tương đối phù hợp với các kết quả của Kellems và Church (1998), nên có thể xem đây là nguồn đạm phong phú để tiến hành thủy phân.

Hàm lượng protein của dịch chiết mù đu đủ tương đối cao (2,565mg/ml), do đây là enzym thô nên còn lẫn những protein tạp khác. Tuy nhiên hoạt tính đặc hiệu của papain thô khá cao 233,71 TU/ml, tương ứng với hoạt tính đặc hiệu riêng là 91,12 TU/mg protein, điều này cho thấy enzym papain thô ly trích trực tiếp từ mù đu đủ rất mạnh.

## 3.2 Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng lên quá trình thủy phân protein bánh dầu đậu nành với papain

### 3.2.1 Kết quả khảo sát pH tối ưu của enzym

Do phản ứng thủy phân diễn ra trong thời gian khá dài (trên 24 giờ) để có được hiệu suất thủy phân cao, nên việc khảo sát độ bền nhiệt hay độ bền pH của enzym là điều cần quan tâm. Các kết quả nhận được như sau:

**Bảng 1: Hàm lượng đạm amin sinh ra trong quá trình thủy phân và hiệu suất thủy phân ở các pH khác nhau**

| pH                         | 4                 | 5                 | 6                  | 7                  | 8                 | 9                 | 10                |
|----------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Hàm lượng đạm amin (mgN/g) | 5,83              | 4,23              | 9,80               | 11,60              | 5,63              | 6,15              | 6,48              |
| Hiệu suất thủy phân (N%)   | 7,88 <sup>a</sup> | 5,72 <sup>a</sup> | 13,24 <sup>b</sup> | 15,67 <sup>b</sup> | 7,60 <sup>a</sup> | 8,31 <sup>a</sup> | 8,75 <sup>a</sup> |

(\*) Các giá trị trung bình có cùng chữ thì không khác biệt có ý nghĩa, mức độ ý nghĩa 5%.

Tuỳ thuộc vào bản chất của cơ chất mà pH tối ưu sẽ khác nhau. Chẳng hạn papain phản ứng với casein ở pH tối ưu là 7-7,5 với albumin ở pH tối ưu 4,5-7,1 và với gelatin lại có pH tối ưu 5,2-6,4 (Nguyễn Đức Lượng, 2004). Kết quả phân tích thống kê cho thấy với cơ chất bánh dầu đậu nành papain hoạt động mạnh trong khoảng pH 6-7, thể hiện hoạt tính thủy phân mạnh nhất ở pH 7,0, tương ứng với hàm lượng đạm amin và hiệu suất thủy phân nhận được là 11,60 mgN/g và 15,67 %N. Hoạt tính của enzym thấp ở các pH 4, 5, 8, 9, 10. Như vậy có thể xem pH tối thích cho hoạt động của papain trên cơ chất bánh dầu đậu nành là 7,0 tương tự như trên casein.

### 3.2.2 Kết quả khảo sát nhiệt độ tối ưu của enzym

Với tỉ lệ enzym : cơ chất, pH tối thích đã chọn từ thí nghiệm trên, trong thí nghiệm này phản ứng thủy phân được tiến hành ở các nhiệt độ khác nhau. Kết quả nhận được ở Bảng 2

**Bảng 2: Hàm lượng đạm amin sinh ra và hiệu suất thủy phân ở các nhiệt độ khác nhau**

| Nhiệt độ °C                | 4                 | 25                 | 35                 | 45                 | 55                 | 65                 | 75                 | 85                 |
|----------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Hàm lượng đạm amin (mgN/g) | 8,30              | 11,45              | 14,30              | 15,99              | 16,56              | 16,42              | 13,42              | 13,15              |
| Hiệu suất thủy phân (N%)   | 11,2 <sup>a</sup> | 15,48 <sup>b</sup> | 19,33 <sup>c</sup> | 21,61 <sup>d</sup> | 22,38 <sup>d</sup> | 22,18 <sup>d</sup> | 18,14 <sup>c</sup> | 17,77 <sup>c</sup> |

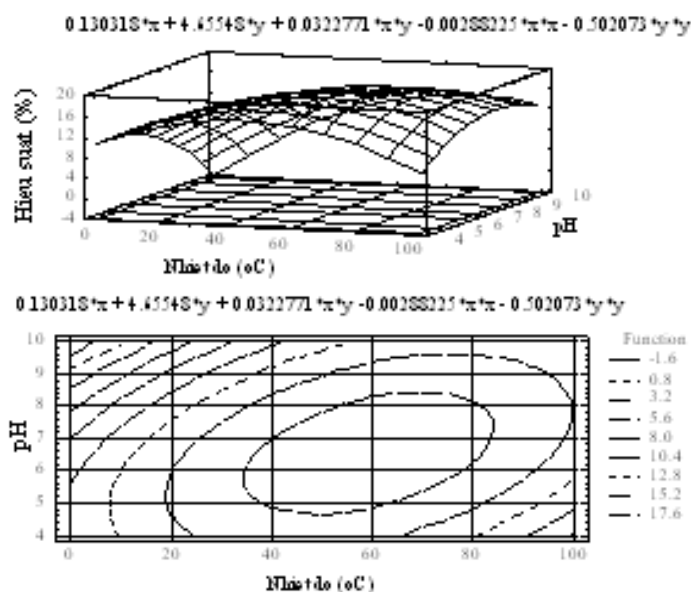
(\*) Các giá trị trung bình có cùng chữ thì không khác biệt có ý nghĩa, mức độ ý nghĩa 5%

Kết quả thống kê cho thấy độ bền nhiệt của enzym papain khá rộng trong khoảng 45°C - 65°C, hiệu suất thủy phân cao và khác biệt không ý nghĩa giữa các nhiệt độ này. Ở các nhiệt độ thấp 4°C và 25°C enzym hoạt động yếu hơn so với ở 75°C và 85°C. Điều này cho thấy papain là enzym rất bền nhiệt.

Dựa theo số liệu trong bảng 2 có thể chọn nhiệt độ 55°C là nhiệt độ tối thích cho hoạt động thủy phân của papain trên protein bánh dầu đậu nành.

### 3.2.3 Kết quả khảo sát sự tương tác giữa pH và nhiệt độ lên hiệu suất thủy phân protein bánh dầu đậu nành

Sau khi đã khảo sát riêng từng nhân tố pH và nhiệt độ, và chọn ra được pH=7 và nhiệt độ 55°C là các điều kiện tối ưu cho phản ứng thủy phân. Khảo sát sự tương tác giữa hai nhân tố này cho kết quả theo phương trình ở hình 1 với hệ số tương quan  $R^2 = 99,0365\%$  :



**Hình 1 : Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hiệu suất thủy phân**

Kết quả trên đồ thị hình 1 cho thấy ở nhiệt độ 55°C và pH trong khoảng từ 6 đến 7 cho hiệu suất thủy phân cao nhất. Kết quả này phù hợp với thí nghiệm bố trí riêng cho từng nhân tố. Như vậy có thể khẳng định các điều kiện pH 7,0 và nhiệt độ 55°C là điều kiện tối thích cho hoạt động thủy phân của enzym papain lên protein trong bánh dầu đậu nành. Theo phân tích thống kê thì hai nhân tố nhiệt độ và pH tương tác ở mức ý nghĩa là 1%.

### 3.2.4 Kết quả khảo sát tương tác giữa cơ chất và thời gian lên quá trình thủy phân

Theo dõi ảnh hưởng của nồng độ cơ chất và thời gian lên phản ứng thủy phân được tiến hành ở các giá trị pH và nhiệt độ tối ưu chọn ra từ các thí nghiệm trên. Kết quả nhận được như sau :

Kết quả ở bảng 3 cho thấy cùng 1 lượng enzym nếu tăng cơ chất thì hoạt tính thủy phân tăng, điều này thể hiện qua lượng đạm amin sinh ra tăng (hình 2), ở 3 hàm lượng cơ chất thấp: 1, 2 và 4 gam hoạt tính thủy phân thấp và hầu như không tăng nữa sau 12 giờ, ở hàm lượng cơ chất 6 gam, sau 12 giờ đầu phản ứng thủy phân mạnh, lượng đạm amin sinh ra nhiều, sau đó vẫn còn tăng nhưng không cao lắm. Ở hàm lượng cơ chất là 8 gam, thì lượng đạm sinh ra trong 12 giờ đầu tương đương với 6 gam nhưng sau đó vẫn tiếp tục tăng. Điều này có thể là do khi nồng độ cơ chất tăng thì tốc độ thủy phân của enzym sẽ tăng và đạt cực đại sau 12 giờ khi enzym bão hòa cơ chất. Trong điều kiện thừa cơ chất và thời gian thủy phân kéo dài các enzym được giải phóng sẽ lại tiếp tục tham gia phản ứng thủy phân, do vậy tốc độ thủy phân vẫn tăng.

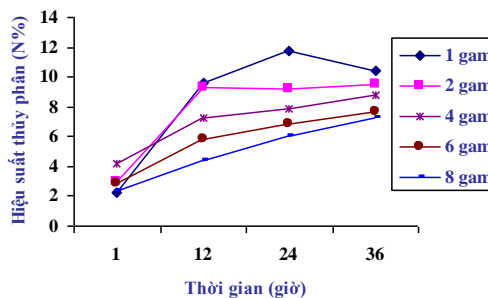
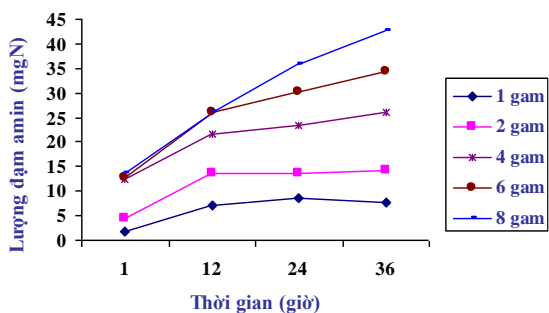
Tuy nhiên, theo tính toán về mặt hiệu suất, kết quả trên hình 3, thì khi tăng hàm lượng cơ chất, hiệu suất thủy phân lại giảm, do ta tính hiệu suất dựa trên lượng đạm amin sinh ra so với tổng lượng cơ chất sử dụng.

Về mặt kinh tế, dựa trên kết quả hiệu suất thủy phân ta có thể chọn điều kiện tỉ lệ nồng độ cơ chất:enzim là 100:0,75 (w:w) để tiến hành phản ứng thủy phân.

**Bảng 3: Ảnh hưởng chất cơ chất và thời gian lên hàm lượng đạm amin sinh ra và hiệu suất thủy phân**

| Thời gian (giờ) | Cơ chất (g) | Hàm lượng đạm amin (mgN) | Hiệu suất thủy phân (N%) |
|-----------------|-------------|--------------------------|--------------------------|
| 1               | 1           | 1,63 <sup>a</sup>        | 2,21 <sup>a</sup>        |
|                 | 2           | 4,39 <sup>ab</sup>       | 2,97 <sup>a</sup>        |
|                 | 4           | 12,40 <sup>de</sup>      | 4,19 <sup>b</sup>        |
|                 | 6           | 12,84 <sup>e</sup>       | 2,89 <sup>a</sup>        |
|                 | 8           | 13,67 <sup>e</sup>       | 2,31 <sup>a</sup>        |
| 12              | 1           | 7,10 <sup>bc</sup>       | 9,59 <sup>gh</sup>       |
|                 | 2           | 13,73 <sup>e</sup>       | 9,28 <sup>g</sup>        |
|                 | 4           | 21,52 <sup>f</sup>       | 7,27 <sup>de</sup>       |
|                 | 6           | 25,98 <sup>g</sup>       | 5,85 <sup>c</sup>        |
|                 | 8           | 26,07 <sup>g</sup>       | 4,40 <sup>b</sup>        |
| 24              | 1           | 8,73 <sup>cd</sup>       | 11,80 <sup>i</sup>       |
|                 | 2           | 13,57 <sup>e</sup>       | 9,17 <sup>g</sup>        |
|                 | 4           | 23,30 <sup>fg</sup>      | 7,89 <sup>ef</sup>       |
|                 | 6           | 30,19 <sup>h</sup>       | 6,80 <sup>cd</sup>       |
|                 | 8           | 35,77 <sup>i</sup>       | 6,04 <sup>c</sup>        |
| 36              | 1           | 7,69 <sup>c</sup>        | 10,40 <sup>h</sup>       |
|                 | 2           | 14,12 <sup>e</sup>       | 9,54 <sup>gh</sup>       |
|                 | 4           | 26,00 <sup>g</sup>       | 8,78 <sup>fg</sup>       |
|                 | 6           | 34,23 <sup>i</sup>       | 7,71 <sup>de</sup>       |
|                 | 8           | 42,71 <sup>j</sup>       | 7,22 <sup>de</sup>       |

(\*) Các giá trị trung bình có cùng chữ trong cùng một cột thì không khác biệt có ý nghĩa, mức độ ý nghĩa 5%



**Hình 2: Biểu đồ ảnh hưởng của hàm lượng cơ chất và thời gian thủy phân lên hàm lượng đạm amin**

**Hình 3: Biểu đồ ảnh hưởng của lượng cơ chất và thời gian lên hiệu suất thủy phân**

### 3.2.5 Kết quả khảo sát ảnh hưởng việc bổ sung enzym vào các thời điểm khác nhau lên hiệu suất thủy phân

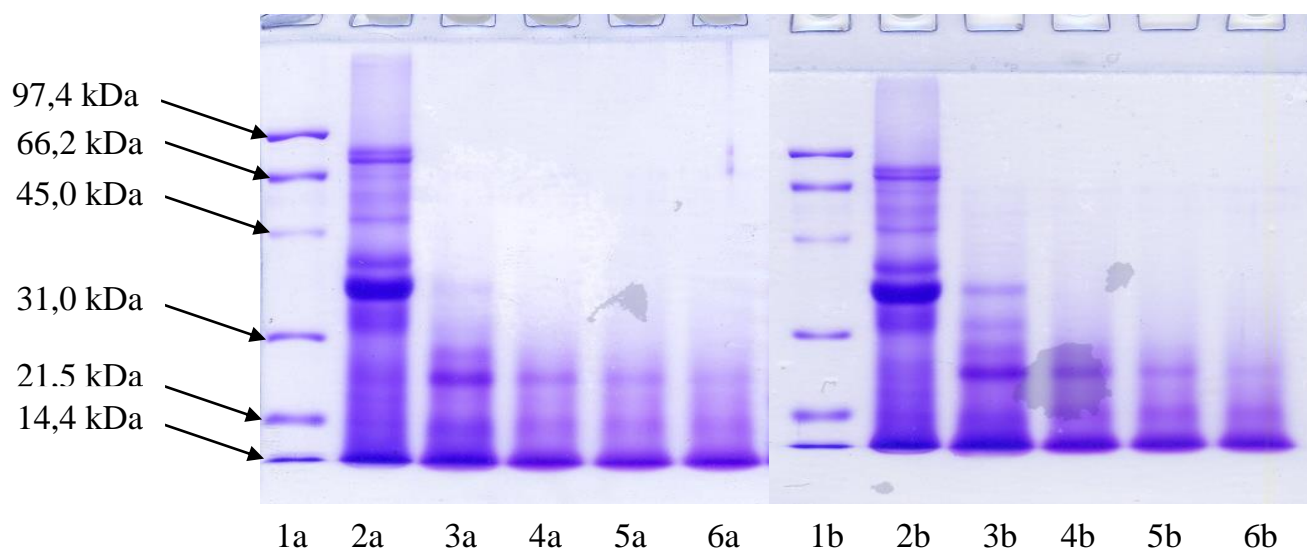
Theo một số kết quả nghiên cứu (Whitaker John R. *et al.*, 2003) thì hoạt tính của enzym có thể giảm dần theo thời gian trong quá trình thủy phân có thể do sự tự phân giải enzym, hay enzym bị biến tính và mất hoạt tính, sự giảm pH hoặc sản phẩm sinh ra cũng có thể ức chế hoạt động của enzym. Vì vậy thí nghiệm được thực hiện với hai nghiệm thức: đối chứng cho enzym vào cùng một lúc và nghiệm thức chia lượng

enzim thành ba phần bằng nhau, bổ sung vào từng giai đoạn 6 giờ, 21 giờ, 30 giờ, và theo dõi quá trình thủy phân đến 47 giờ. Kết quả nhận được như sau:

**Bảng 4: Ảnh hưởng việc bổ sung enzym vào các thời điểm khác nhau**

| Thời gian (giờ) | Hàm lượng đạm amin (mgN/g) |         | Hiệu suất thủy phân (N%) |         | % thu hồi vật chất khô |         |
|-----------------|----------------------------|---------|--------------------------|---------|------------------------|---------|
|                 | Đối chứng                  | Bổ sung | Đối chứng                | Bổ sung | Đối chứng              | Bổ sung |
| 0               | 0,00                       | 0,00    | 0,000                    | 0,000   | 36,180                 | 34,903  |
| 6               | 2,09                       | 2,01    | 2,830                    | 2,713   | 44,806                 | 41,531  |
| 21              | 2,46                       | 2,55    | 3,329                    | 3,446   | 42,256                 | 40,657  |
| 30              | 2,49                       | 2,89    | 3,363                    | 3,912   | 42,794                 | 41,266  |
| 47              | 3,22                       | 3,15    | 4,345                    | 4,262   | 42,209                 | 41,949  |

Kết quả nhận được ở bảng 4 cho thấy không có sự khác biệt giữa việc cho enzym vào cùng một lúc hay bổ sung enzym vào từng thời điểm khác nhau trong quá trình thủy phân. Hiệu suất thủy phân tính theo phần trăm thu hồi vật chất khô sau 6 gam không tăng nữa cho thấy phản ứng thủy phân đã kết thúc, tuy nhiên hàm lượng đạm amin vẫn còn tăng tuy không cao do các peptid hòa tan vẫn được tiếp tục thủy phân thành các acid amin nếu kéo dài thời gian, nhưng tổng phần trăm chất khô hòa tan nhìn chung là không đổi.



Giếng 1: Protein chuẩn (Bio Rad) ;

Giếng 2 : Dung dịch protein bánh đậu nành chưa thủy phân;

Giếng 3,4,5,6 : dịch thủy phân tương ứng sau 6, 21, 30, 47 giờ.

**Hình 4: Phổ điện di sự ảnh hưởng của việc bổ sung cùng 1 lượng enzym vào các giai đoạn khác nhau lên kết quả chạy điện di**

Phổ điện di cho ta thấy các protein trong bột đậu nành ly trích có trọng lượng phân tử trong khoảng từ 14,4-70 kDa. Kết quả điện di cũng cho thấy sau 6 giờ phản ứng thủy phân cũng diễn ra chậm hơn, ngoài băng protein có trọng lượng phân tử trên 22 kDa bị thủy phân hoàn toàn các băng còn lại sau 47 giờ vẫn chưa được thủy phân triệt để. Trong thí nghiệm đối chứng sau 6 giờ ta thấy hầu hết các băng protein có trọng lượng phân tử từ 31 kDa trở lên đều bị thủy phân (giếng 3a). Trong thí nghiệm bổ sung, ở giai đoạn đầu do lượng enzym ít hơn chỉ 1/3 so với đối chứng nên mức độ thủy phân cũng thấp hơn, các băng protein cao phân tử vẫn

còn (giếng 3b). Việc bổ sung enzym sau 6 giờ có tác dụng tương đương so với đối chứng (giếng 4a và 4b). Sau 21 giờ các băng protein có trọng lượng phân tử cao hơn 22 kDa đều bị thủy phân cho các polypeptid có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 22 kDa, 20 kDa với hàm lượng ít dần qua màu của các băng protein nhạt dần trên gel (giếng 5a, 6a), polypeptid có trọng lượng phân tử nhỏ nhất là 14,4 kDa chiếm hàm lượng cao nhất.

#### 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Qua quá trình khảo sát các yếu tố ảnh hưởng lên quá trình thủy phân của enzym papain lên cơ chất bánh dầu đậu nành chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

Papain thô hoạt động mạnh trên cơ chất bánh dầu đậu nành trích ly ở điều kiện tối ưu là nhiệt độ 55°C và pH 7,0. Với tỉ lệ enzym:cơ chất là 0,75:100(w:w), hoạt tính đặc hiệu của enzym là 91,12 TU/mg, thời gian thủy phân là 24 giờ cho hiệu suất thủy phân cao nhất.

Sản phẩm thủy phân nhận được ngoài các axit amin còn có các polypeptit có trọng lượng phân tử từ 14,4-25,0 kDa. Để thủy phân triệt để hơn các polypeptit còn lại cần khảo sát thêm các điều kiện như xử lý mẫu trong điều kiện acid hay kiềm hay bổ sung các enzym exoproteaz.

Có thể kết hợp sử dụng kỹ thuật điện di và sắc ký để theo dõi quá trình thủy phân và nhận diện các peptit có khối lượng phân tử thấp.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bradford, M.M, 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Hames, P.D., 1998. Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. 3<sup>th</sup> ed. Oxford
- Kellems, R.O and D.C. Church. 1998. Livestock Feeds and Feeding, 4<sup>th</sup> edition, Prentice Hall.
- Kjeldahl, J. Z, 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic bodies. *Analytical Chemistry* **22**:366.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* 30 (291): 310
- Kornegay, E.T. Qian, 1996. Replacement of inorganic phosphorus by microbial phytase for young pigs fed on a maize-soybean-meal diet. *British Journal of Nutrition* **76** (4): 563-578.
- Nielsen P. M., D. Petersen, and C. Dambmann, 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *In: Food Chemistry and Toxicology. Journal of Food Science* **66** (2): 642-646.
- Nguyễn Đức Lượng, 2004. Công Nghệ Enzim. Nhà xuất bản đại học quốc gia Thành Phố Hồ Chí Minh. pp. 534.
- Uhlig, Helmut, 1998. Industrial enzymes and their applications. John Wiley & Sons, Inc. pp. 147-150.
- Witaker, John R., Alphons G.J. Voragen, Dominic W.S.Wong, 2003. Handbook of food enzymology. Marcel Dekker, INC. New York. pp. 221-235.