

DOI:10.22144/ctu.jsi.2018.077

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN HOẠT ĐỘNG TỐI ƯU CỦA ENZYME ALCALASE THỦY PHÂN PROTEIN TỪ THỊT ĐẦU TÔM THẺ CHÂN TRẮNG

Nguyễn Văn Mười^{1*} và Hà Thị Thụy Vy²

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

²Nghiên cứu sinh ngành Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Văn Mười (email: nvmuoi@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 04/07/2018

Ngày duyệt đăng: 03/08/2018

Title:

Study on the optimal conditions for protein hydrolysis of white shrimp head meat (*Litopenaeus vannamei*) by alcalase enzyme

Từ khóa:

Alcalase, chống oxy hóa, phương pháp bề mặt đáp ứng, thịt đầu tôm, thủy phân

Keywords:

Alcalase, antioxidant, hydrolysis, response surface methodology, white shrimp head meat

ABSTRACT

The purpose of this study is to investigate optimal conditions for proteins' hydrolysis of white shrimp head meat (*Litopenaeus vannamei*) by using alcalase enzyme. The response surface methodology with two factors: pH (6.5-8.0) and temperature (50-70°C) which included 11 experiments was used to optimize the hydrolysis process. Meanwhile, the effect of the alcalase enzyme concentrations on degree of hydrolysis (%DH) and antioxidant activity (%DPPH) was evaluated at 5 values: (10, 20, 30, 40, 50 UI/g) with 6 different reaction times (1, 2, 3, 4, 5, 6 hours). Consequently, the following conditions including alcalase enzyme concentrations (20 UI/g), pH (7.65), temperature (58.78°C), and hydrolysis time (4 hours) were found optimal to hydrolyze the proteins in white shrimp head meat with a high degree of hydrolysis (37.6%) and good antioxidant activity (31.57%).

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục đích khảo sát điều kiện thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) thích hợp bằng enzyme alcalase. Quá trình thủy phân được tối ưu hóa theo phương pháp bề mặt đáp ứng với 2 nhân tố pH (6,5÷8,5) và nhiệt độ (50÷70 °C), bao gồm 11 đơn vị thí nghiệm, đồng thời, khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme alcalase được thay đổi ở 5 giá trị (10, 20, 30, 40, 50 UI/g) và 6 mức thời gian (1, 2, 3, 4, 5, 6 giờ) đến hiệu suất thủy phân (DH%) và hoạt tính chống oxy hóa (% DPPH) của dịch thủy phân. Kết quả cho thấy, sử dụng nồng độ enzyme alcalase 20 UI/g trong thời gian thủy phân 4 giờ ở pH 7,65 và nhiệt độ 58,78 °C là điều kiện thích hợp để hiệu suất thủy phân cao (37,6%) và hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân tốt (31,57%).

Trích dẫn: Nguyễn Văn Mười và Hà Thị Thụy Vy, 2018. Khảo sát điều kiện hoạt động tối ưu của enzyme alcalase thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ chân trắng. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Nông nghiệp): 148-156.

1 TỔNG QUAN

Nghiên cứu ứng dụng enzyme thương mại đóng vai trò quan trọng trong sản xuất thực phẩm; đặc biệt protease là enzyme thủy phân có giá trị thương mại rất lớn, chiếm khoảng 60% tổng lượng enzyme công

nh nghiệp được cung cấp trên thị trường thế giới (Joo and Chang, 2006) với nhiều ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực như: công nghiệp, nông nghiệp, mỹ phẩm, y học hiện đại (Nedra *et al.*, 2011; Nguyễn Công Hà và Lê Nguyễn Đoàn Duy, 2011). Có rất nhiều protease thương mại được sử dụng như:

alcalase, pancreatin, trypsin, pepsin, papain, neutrase, protamex, flavourzyme,...(Shahidi *et al.*, 1995; Nilsang *et al.*, 2005; Slizyte *et al.*, 2005; Randriamahatody *et al.*, 2011; Dey and Dora, 2011; Gunasekaran *et al.*, 2015) để thủy phân protein nhằm làm giảm kích thước các peptit, tạo ra dịch thủy phân là nguồn acid amin có sẵn cho sinh tổng hợp protein (Gildberg and Stenberg, 2001), đồng thời hoạt tính sinh học của các phân đoạn peptit cũng được quan tâm. Việc thu hồi một phân protein từ phụ phẩm tôm bằng enzyme thủy phân cũng đã được nghiên cứu rộng rãi (Haard and Simpson, 2000; Gildberg and Stenberg, 2001; Mizani *et al.*, 2005). Đặc biệt, alcalase thường được sử dụng để thủy phân protein từ phụ phẩm tôm (Synowiecki *et al.*, 2000; Guerard *et al.*, 2007). Holanda and Netto (2006) nghiên cứu thu hồi 3 thành phần chính của phế liệu tôm, protein, chitin, astaxanthin bằng việc sử dụng enzyme alcalase và pancreatin. Bên cạnh vai trò dinh dưỡng, sản phẩm thủy phân protein còn là nguồn peptit có hoạt tính sinh học mang đến tiềm năng đáng kể trong dược phẩm như: khả năng chống oxy hóa, khả năng kiểm soát enzyme gây cao huyết áp (Holanda *et al.*, 2006; Ganugula *et al.*, 2008; Dey and Dora., 2011;), khả năng chống đột biến gen có khả năng gây ung thư (Babu *et al.*, 2008; Wilson-Sanchez *et al.*, 2010; López-Saiz *et al.*, 2016). Ở Việt Nam, Bùi Thị Hồng Thanh (2012) tiến hành nghiên cứu thu nhận dịch đậm thủy phân từ vỏ đầu tôm bằng enzyme alcalase cố định ở điều kiện nhiệt độ, pH môi trường, tỉ lệ enzyme và cơ chất, thời gian phản ứng enzyme lần lượt là 56 °C, tự nhiên, 0,42% và thời gian 8,8 giờ thu được hàm lượng DDPH bị khử 0,4794 mM/g. Nguyễn Thị Ngọc Hoài và *ctv.* (2013) sử dụng tối ưu hóa quá trình thủy phân protein từ đầu tôm thẻ chân trắng bằng alcalase theo phương pháp bề mặt đáp ứng, tuy nhiên lại cố định pH thủy phân của alcalase là 6,5. Vì thế, sử dụng enzyme thủy phân là một hướng tốt vì có thể dễ dàng kiểm soát quá trình thủy phân, tối ưu hoạt động của alcalase trong khoảng pH và nhiệt độ tạo ra sản phẩm thủy phân có các peptit ngắn có giá trị dinh dưỡng, tốt cho tiêu hóa đồng thời thu được dịch thủy phân có hoạt tính chống oxy hóa tốt.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Nguyên liệu thịt đầu tôm được 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 để 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. Sau khi đạt nhiệt độ tâm -18°C, tiến hành trữ đông ở -20±2°C.

Alcalase® là enzyme có đặc tính thủy phân protein, được sản xuất từ quá trình lên men chìm (SmF) *Bacillus lichenniformis*, hiệu quả nhất để sản xuất các loại protein thủy phân (Kristinsson and Rasco, 2000). Enzyme alcalase® 2.4 L của hãng Novozyme – Đan Mạch và được phân phối bởi Công ty TNHH TM Nông sản và Hóa chất Phương Trâm. Hoạt tính enzyme alcalase được xác định trước khi sử dụng bằng phương pháp Anson cải tiến (1938). Một đơn vị hoạt độ của enzyme 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).

Dụng cụ - thiết bị sử dụng trong nghiên cứu: 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°C); cân điện tử (Ohaus, USA, độ chính xác 0,0001 g và 0,01 g).

2.2 Phương pháp phân tích và đo đạc các chỉ tiêu

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

Hiệu suất thủy phân (%) được 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 -SH của dithiothreitol hoặc - mercaptoethanol sẽ tạo ra hợp chất có khả năng hấp thụ ở bước sóng 340 nm.

Hoạt tính chống oxy hóa (% DPPH) đo theo phương pháp của Wu *et al.* (2003) và được cải tiến một số bởi Zhao *et al.* (2011). Các thử nghiệm được tiến hành dựa trên nồng độ dung dịch thủy phân. Cho 0,375 mL dung dịch thủy phân vào các ống thử nghiệm bổ sung thêm 2 mL 1, 1- diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) nồng độ 0,1 mmol L-1 DPPH được pha trong dung dịch methanol. Hỗn hợp được lắc đều và đặt trong một phòng tối 30 phút và xác định bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng 517 nm. Dung dịch methanol của DPPH được sử dụng làm dung dịch trắng. Hoạt tính chống oxy hóa (% DPPH) được tính theo công thức sau:

$$\%DDPH(DSA) = 1 - \frac{(A_s - A_0)}{A_{DPPH}} * 100$$

Trong đó, DSA: DPPH Radical Scavenging Activity; A₀: là độ hấp thụ của mẫu trắng;

A_S: là độ hấp thụ của mẫu phản ứng; A_{DPPH}: là độ hấp thụ của mẫu đối chứng.

2.3 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 (Least-Significant Difference) để kết luận về sự sai khác giữa trung bình các nghiệm thức.

2.4 Phương pháp thủy phân protein

Sau khi nghiền, mẫu được cân định lượng rồi tiến hành thủy phân bằng dung môi là nước với tỷ lệ 1:1. Nhiệt độ, pH, nồng độ và thời gian thủy phân bằng enzyme alcalase được điều chỉnh tùy theo điều kiện khảo sát. Quá trình thủy phân được thực hiện bằng máy khuấy từ liên tục, tốc độ 200 rpm nhằm tăng khả năng thủy phân. Sau quá trình thủy phân, mẫu được ly tâm ở tốc độ 6.000 rpm trong thời gian 20 phút, loại bỏ phần cặn, thu nhận phần dịch trong, gọi là dịch thủy phân protein. Tiến hành xác định mức độ thủy phân (DH%) và hoạt tính chống oxy hóa (DPPH%) nhằm chọn được điều kiện thủy phân protein từ thịt đầu tôm tốt nhất

2.5 Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.5.1 Thí nghiệm 1: Khảo sát tương tác của pH và nhiệt độ đến hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa

Thí nghiệm tiến hành với 2 nhân tố X_1 – pH (thay đổi từ 6,5 ÷ 8,5) và X_2 nhiệt độ (50 ÷ 70°C) thích hợp cho hoạt động thủy phân. Sử dụng phương án trực giao cấp 2 với số nghiệm thức tối ưu: $N = 3^2$, trong đó có 3 nghiệm thức ở tâm phương án. Mẫu sau khi nghiền được ủ theo 12 nghiệm thức được trình bày ở Bảng 1. Tương ứng với từng điều kiện khảo sát, lọc và ly tâm, thu dịch thủy phân để xác định hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa. Dựa vào kết quả thu được của hàm mục tiêu, Y_1 : hiệu suất thủy phân (%); Y_2 : hoạt tính chống oxy hóa (%). 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

STT	Giá trị mã hóa		Giá trị thực nghiệm	
	X_1	X_2	pH thủy phân	Nhiệt độ (°C)
1	0	+1	7,5	70
2	-1	0	6,5	60
3	0	0	7,5	60
4	-1	+1	6,5	70
5	+1	0	8,5	60
6	+1	+1	8,5	70
7	0	0	7,5	60
8	0	0	7,5	60
9	-1	-1	6,5	50
10	1	-1	8,5	50
11	0	0	7,5	60
12	0	-1	7,5	50

(Ghi chú: Giá trị mã hóa -1, 0, +1 thể hiện 3 mức độ khảo sát tương ứng với pH 6,5; 7,5; 8,5 và nhiệt độ 50,60,70°C tương ứng với các giá trị mã hóa -1, 0, +1)

Vẽ đồ thị bề mặt đáp ứng và xác định điều kiện nhiệt độ và pH tối ưu cho hoạt động của enzyme thương mại. Kết quả thu nhận là điều kiện nhiệt độ và pH tối ưu giúp hoạt động enzyme đạt hiệu quả cao nhất.

2.5.2 Thí nghiệm 2: Khảo sát nồng độ enzyme alcalase

Thí nghiệm tiến hành khảo sát tỷ lệ sử dụng của enzyme thương mại (10, 20, 30, 40, 50 UI/g) thích hợp nhằm đạt hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân từ thịt đầu tôm tốt nhất.

2.5.3 Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa

Thí nghiệm được thực hiện tương tự như thí nghiệm 1 và 2 với điều kiện thủy phân được lựa chọn từ thí nghiệm 1 hoặc 2. Thời gian kết tủa thay đổi ở 5 mức khảo sát khác nhau từ 1÷6 giờ. Xác định hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa dịch thủy phân thu được.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Xác định thành phần của nguyên liệu

Kết quả thành phần hóa lý cơ bản của thịt đầu tôm thể được trình bày Bảng 2.

Bảng 2: Thành phần nguyên liệu thịt đầu tôm thể

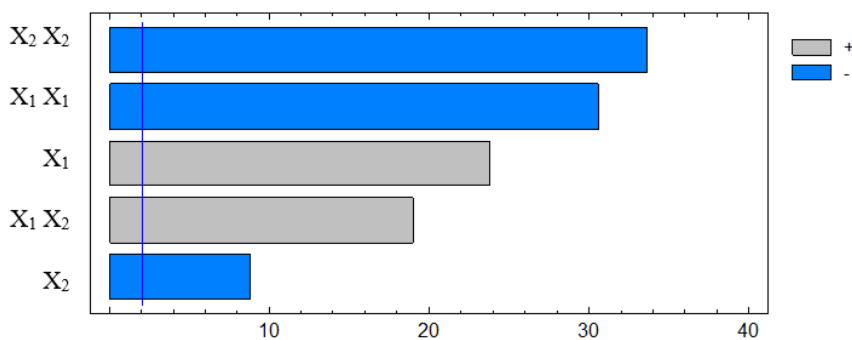
Chỉ tiêu	Giá trị
Độ ẩm (%)	83,24±0,68
pH	7,78±0,02
Protein tổng (%)	12,80±0,25
Lipide (%)*	0,82±0,02

Kết quả từ Bảng 2 cho thấy, hàm lượng protein tổng số trong thịt đầu tôm thể khá cao (trung bình 12,80%) và pH hơi kiềm (7,78), đây là điều kiện

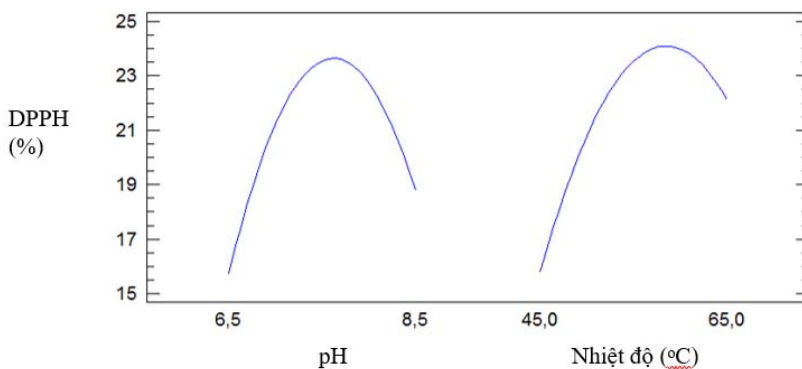
thích hợp cho vi sinh vật gây hư hỏng phát triển và cũng là điều kiện thúc đẩy quá trình hoạt động của các enzyme. Điều này chứng tỏ tiềm năng có thể khai thác nguồn nguyên liệu này cho quá trình thủy phân protein từ thịt đầu tôm thể. Do đó, việc thu hồi dịch thủy phân protein cần rút ngắn thời gian xử lý, nghiên cứu bổ sung enzyme thương mại để đảm bảo chất lượng dịch thủy phân thu nhận được.

3.2 Xác định pH và nhiệt độ hoạt động của enzyme alcalase ảnh hưởng đến hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa

Kết quả phân tích ảnh hưởng của các nhân tố mã hóa đối với phương trình hồi quy được trình bày ở Hình 1 và Hình 2.



Hình 1: Đồ thị biểu diễn sự tương tác của pH và nhiệt độ đến quá trình thủy phân protein bằng enzyme alcalase

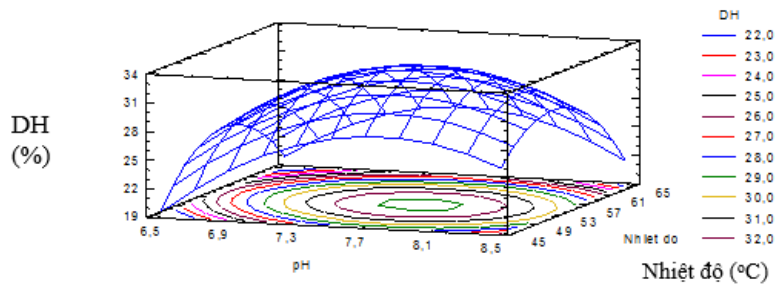


Hình 2: Đồ thị biểu diễn sự tương tác của pH và nhiệt độ đến DPPH (%) của dịch thủy phân thu được từ quá trình thủy phân protein bằng enzyme alcalase

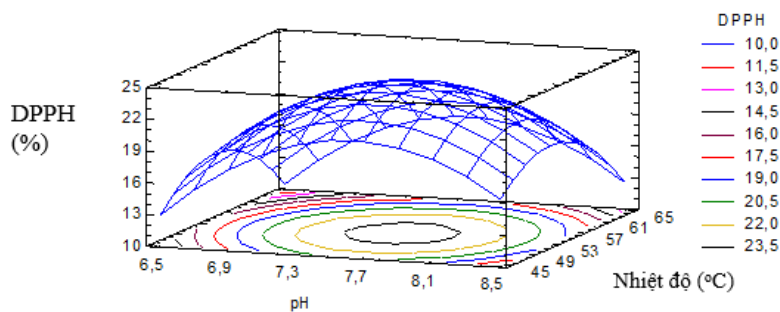
Hình 1 và Hình 2 cho thấy pH và nhiệt độ có sự ảnh hưởng đồng thời đến quá trình thủy phân. Hệ số hồi quy bậc một của X₁, X₂ và hệ số tương tác X₁ X₂ (đối với chỉ tiêu DH) khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%, đồng thời hệ số hồi quy bậc hai của các hệ số này cũng khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê. Phương trình hồi quy thể hiện sự tương quan của điều kiện thủy phân:

$$Y_1 - DH (\%) = -552,328 + 8,00772X_1 + 90,7747X_2 - 0,0595288 X_1^2 - 0,127144 X_1X_2 - 5,41016 X_2^2 \quad (1).$$

$$Y_2 - DPPH(\%) = -511,237 + 5,60728X_1 + 97,6543X_2 - 0,0458047X_1^2 - 0,033903X_1X_2 - 6,28411X_2^2 \quad (2).$$



Hình 3: Đồ thị bề mặt đáp ứng và đồng điểm tương tác nhiệt độ và pH đến hiệu suất thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ chân trắng



Hình 4: Đồ thị bề mặt đáp ứng và đồng điểm tương tác nhiệt độ và pH đến hoạt tính chống oxy hóa dịch thủy phân protein

Kết quả thu nhận ở Hình 3 và Hình 4 cho thấy, hai nhân tố này thật sự có sự ảnh hưởng đồng thời đến quá trình thủy phân của enzyme alcalase. Nhiệt độ thủy phân thấp và pH thấp cho hiệu quả thủy phân kém, trong khi đó, nếu nâng nhiệt độ tiền xử lý nhiệt lên mức cao hơn 60°C, vượt qua khỏi ngưỡng nhiệt độ thích hợp của enzyme alcalase thì hiệu suất thủy phân sẽ giảm do alcalase bị mất hoạt tính. Tương tự, hoạt tính chống oxy hóa tỷ lệ thuận với hiệu suất thủy phân, hiệu suất thủy phân càng cao thì hoạt tính chống oxy hóa càng lớn. Rõ ràng trình tự và thành phần acid amin cấu tạo nên peptit là nhân

tố quan trọng đối với hoạt động chống oxy hóa (Kim and Wijesekara, 2010; Chalamaiah, 2012). Đồ thị Hình 3 và Hình 4 một lần nữa khẳng định hai nhân tố nhiệt độ và pH có tương tác với nhau, ảnh hưởng đến quá trình thủy phân protein từ thịt đầu tôm. Giá trị cao nhất của hàm mục tiêu Y_1 và Y_2 khi X_1 có giá trị trong khoảng từ 0 đến 1 (pH từ 7,5 ÷ 8,5) và X_2 có giá trị trong khoảng từ -1 đến 0 (60°C đến 70°C). Giá trị pH và nhiệt độ tối ưu cho quá trình thủy phân thịt đầu tôm thẻ bằng enzyme alcalase khi giải phương trình hồi quy (1) và (2) và Hình 3 cho với hàm mục tiêu Y_1 và Y_2 được thể hiện ở Bảng 3.

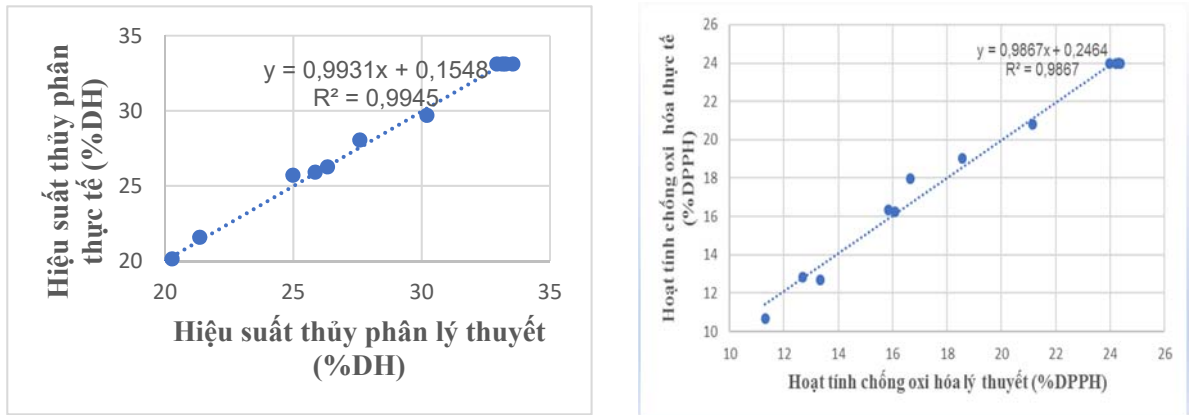
Bảng 3: Kết quả tối ưu hóa điều kiện thủy phân với hàm mục tiêu Y_3 và Y_4

Nhân tố	Chế độ		Chế độ tối ưu		Giá trị tối ưu	
	Thấp	Cao	Y_1	Y_2	DH%	DPPH%
X_1	6,5	8,5	7,7	7,61	33,34	24,16(*)
X_2	50	70	59,04	58,39		

X_1 : pH; X_2 : nhiệt độ (°C); (*) hoạt tính chống oxy hóa được tính sau khi pha loãng 20 lần

Hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa thu được từ thực nghiệm và tính toán theo phương trình có độ tương thích cao ở giá trị $R^2 = 0,9945$ và $R^2 = 0,9867$ (Hình 5). Như vậy, có thể kết luận rằng phương trình hồi quy đã mô tả đúng các kết quả thực

thực nghiệm. Hệ số tương quan 99,45% và 98,67% sự thay đổi hiệu suất thủy phân protein là do ảnh hưởng các biến độc lập X_1 , X_2 và chỉ có 0,55% và 1,12% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định gây ra tương ứng với hàm mục tiêu Y_1 và Y_2 (Hình 5).

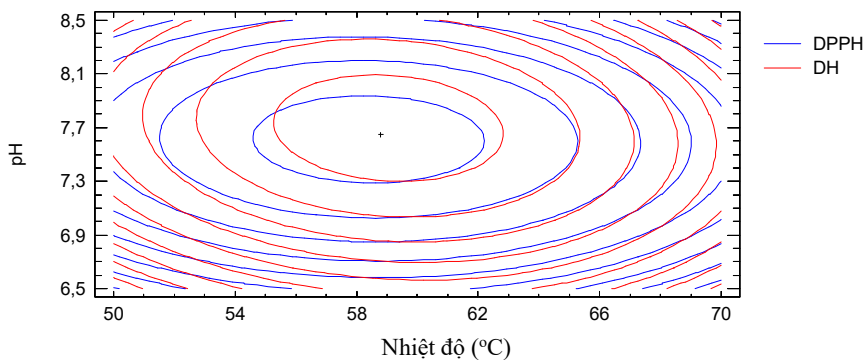


Hình 5: Tương quan giữa hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa dịch thủy phân xác định bằng thực nghiệm và tính toán

Dịch thủy phân đáp ứng đồng thời cả hai hàm mục tiêu hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa thể hiện ở đồ thị (Hình 6).

Kết quả thí nghiệm xác định giá trị nhiệt độ và pH tối ưu tương ứng là 58,78°C và pH 7,65 đáp ứng đồng thời cả hai hàm mục tiêu DH đạt 33,33% và DPPH 24,14% phù hợp với kết quả của Dey and Dora (2014) khi sử dụng mô hình bề mặt đáp ứng RSM (response surface methodology) để tối ưu hóa điều kiện thủy phân phụ phẩm tôm *Penaeus monodon* bằng enzyme alcalase thương mại, hiệu suất thủy phân đạt 33,13% ở điều kiện ở 59,37°C và

pH 8,25. Synowiecki and Khateeb (2000) khi nghiên cứu ứng dụng enzyme thương mại alcalase ở 55°C và pH 8,5 để khử protein của phế liệu vỏ tôm *Crangon crangon* đã được khử khoáng sơ bộ bằng dung dịch HCl 10% ở 20°C trong 30 phút nhằm thu hồi chitin và protein, hiệu suất thủy phân cao nhất là 30%. Holanda and Netto (2006) tiến hành thủy phân phế liệu tôm *Xiphopenaeus kroyeri* bằng enzyme alcalase hiệu suất thủy phân (DH) từ 6% tăng lên 12%, hiệu suất thu hồi protein tăng từ 26% đến 28%. Kết quả thu được tương đồng với hàm lượng DPPH bị khử 0,4794 mM/g khi sử dụng nhiệt độ để thủy phân alcalase là 56°C trong thời gian 8,8 giờ.



Hình 6: Đồ thị bề mặt đáp ứng và đồng điểm tương tác của nhiệt độ và pH đến hiệu suất thủy phân protein và hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân

3.3 Xác định tỷ lệ enzyme alcalase đến hiệu quả thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa của quá trình thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ

Kết quả thống kê ở Bảng 3 cho thấy, có sự khác biệt ý nghĩa thống kê khi tiến hành thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ bằng alcalase thương mại ở các nồng độ khác nhau.

Hiệu suất thủy phân tăng khoảng 12,5% khi hoạt tính enzyme tăng từ 0÷20 UI/g. Hiệu suất thủy phân

đạt cực đại 35,05% tại nồng độ 20 UI/g, sau đó giảm xuống 33,23% ở 50 UI/g. Tương tự, hoạt tính chống oxy hóa đạt cực đại ở nồng độ enzyme 20 UI/g, dịch thủy phân thu được ở các nồng độ enzyme có hoạt tính 10, 30, 40 và 50 UI/g là không có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê. Rõ ràng hoạt tính chống oxy hóa tăng tỷ lệ thuận với hiệu suất thủy phân. Kết quả nghiên cứu tương đồng với kết quả nghiên cứu của Saidi *et al.* (2013) khi thủy phân cá ngừ và nghiên cứu của Võ Thị Anh Minh (2014) khi thủy phân thịt

đầu tôm sú với tỷ lệ alcalase bổ sung thích hợp là 1%, hiệu suất thủy phân đạt 24,55%. Trong khi đó, nghiên cứu của Janarthanan *et al.* (2015) cho thấy tỷ lệ alcalase bổ sung đến 1,8% khi thủy phân phụ phẩm tôm *Metapenaeus dobsoni* đạt DH 40.31%, DPPH 38.93% và nghiên cứu của và Herpandi *et al.* (2012) là 1,5%, 240 phút DH tương ứng 25% tương ứng cho quá trình thủy phân phần mô cơ sẫm màu ở cá ngừ. Nghiên cứu của See *et al.* (2011) lại đề xuất tỷ lệ alcalase lên đến 2,5% để giúp quá trình thủy phân da cá hồi đạt hiệu quả, nghiên cứu này cũng

cho thấy việc gia tăng hàm lượng alcalase lên mức cao hơn còn cho hiệu quả ngược, hiệu quả thủy phân giảm. Rõ ràng tỷ lệ enzyme bổ sung phù hợp giúp protein được phân cắt làm thay đổi đáng kể trình tự các mạch peptit và mức độ hình thành các acid amin (Liu *et al.*, 2013), ảnh hưởng quan trọng đến khả năng chống oxy hóa bởi vì hoạt tính chống oxy hóa phụ thuộc rất lớn vào trình tự và thành phần acid amin được hình thành từ quá trình thủy phân (Moure *et al.*, 2006).

Bảng 3: Kết quả biểu diễn sự thay đổi hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa theo tỷ lệ enzyme alcalase (UI/g) bổ sung

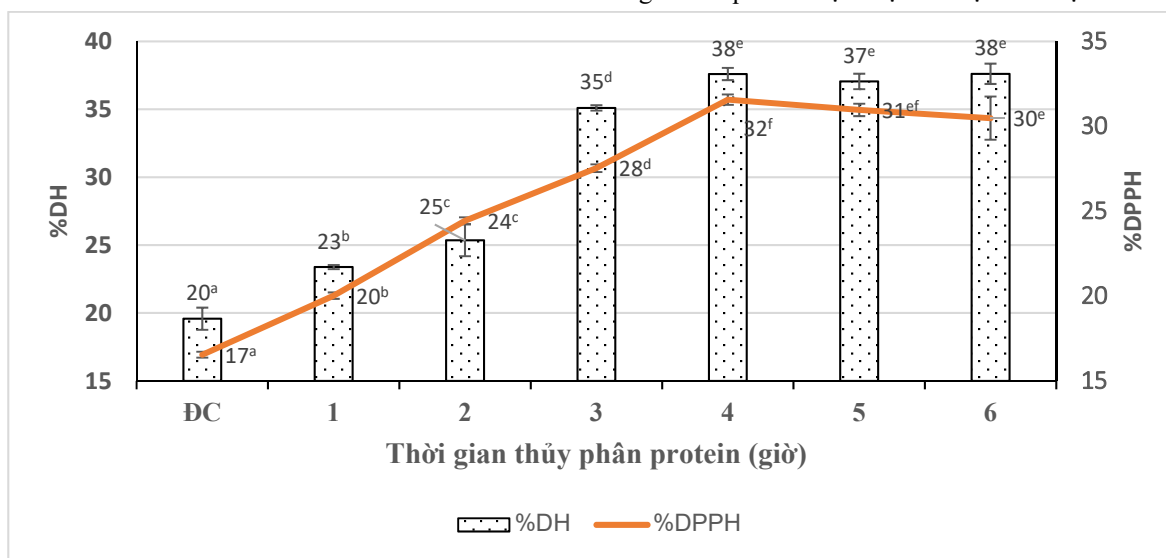
Nồng độ enzyme alcalase (UI/g)	Hiệu suất thủy phân DH (%)	Hoạt tính chống oxy hóa DPPH (%) ^(*)
Đối chứng	21,67 ^a ±0,94	16,32 ^a ±0,33
10	33,59 ^b ±0,24	23,81 ^b ±0,73
20	35,05 ^c ±0,11	32,72 ^c ±0,39
30	33,46 ^b ±0,29	32,66 ^c ±0,87
40	33,33 ^b ±0,35	32,06 ^c ±0,99
50	33,23 ^b ±1,09	31,61 ^c ±1,39

(*) hoạt tính chống oxy hóa được tính sau khi pha loãng 20 lần

Điều này cho thấy, việc bổ sung tỷ lệ enzyme thích hợp giúp gia tăng hiệu quả thủy phân protein còn tùy thuộc vào đặc điểm từng loại nguyên liệu. Trong trường hợp khảo sát, alcalase ở 20 UI/g giúp quá trình thủy phân protease đạt hiệu quả tốt nhất.

3.4 Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa của quá trình thủy phân protein từ thịt đầu tôm

Khi cố định các điều kiện pH, nhiệt độ và tỷ lệ enzyme 20 UI/g thu được từ các thí nghiệm 1 và 2 thì yếu tố thời gian được tiến hành khảo sát từ 1 đến 6 giờ. Kết quả thu nhận được thể hiện ở đồ thị Hình 7



Hình 7: Đồ thị ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân thịt đầu tôm thể bằng enzyme alcalase

Đồ thị Hình 7 thể hiện sự phụ thuộc đáng kể của thời gian thủy phân đến hiệu suất thủy phân protein và hoạt tính chống oxy hóa từ dịch thủy phân. Khi thời gian thủy phân tăng từ 1 đến 4 giờ, hiệu suất thủy phân tăng từ 19,58% lên 37,60% và hoạt tính

chống oxy hóa tăng từ 16,54% lên 31,57%. Khi kéo dài thời gian thủy phân đến 5 và 6 giờ, hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa đều giảm dần. Thời gian thủy phân cần đủ dài để enzyme phân cắt các liên kết trong cơ chất tạo thành các sản phẩm cần

thiết của quá trình thủy phân. Khi cơ chất cần thủy phân đã thủy phân hết, quá trình thủy phân kết thúc. Tuy nhiên, thời gian thủy phân càng kéo dài khi cơ chất đã hết thì các sản phẩm của quá trình thủy phân tiếp tục phân cắt làm giảm hiệu suất thủy phân (See *et al.*, 2011). Muzaiifa *et al.* (2011) cũng đề nghị nhiệt độ 50°C và thời gian 4 giờ cho quá trình thủy phân dịch protein từ phụ phẩm các loại cá tạp trong dây chuyền chế biến thủy sản ở Indonesia. Nghiên cứu của Dey and Dora (2014) tiến hành thủy phân phụ phẩm tôm *Penaeus monodon* bằng enzyme alcalase thương mại ở 59,37°C, pH 8,25, nồng độ enzyme/cơ chất 1,84% chỉ 84,42 phút với DH đạt 33,13%. Tương tự hiệu suất thủy phân, hoạt tính chống oxy hóa tăng trong 4 giờ đầu tiên và không có sự khác biệt trong các giờ tiếp theo. Kết quả này phù hợp với khả năng kháng gốc tự do khi thủy phân cá thu tăng nhẹ trong 5 giờ đầu và sau đó không khác biệt ý nghĩa thống kê (Wu *et al.*, 2003) và kết quả thu được khả năng khử gốc tự do 45,7±3,09 µM/mg protein hòa tan (Nguyễn Thị Ngọc Hoài và *ctv.*, 2013) khi thủy phân đầu tôm thẻ chân trắng bằng enzyme alcalase.

4 KẾT LUẬN

Tóm lại, ở điều kiện khảo sát, khi thủy phân thịt đầu tôm bằng enzyme alcalase, hiệu suất thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa thích hợp ở pH 7,65, nhiệt độ 58,78°C, thời gian thủy phân 4 giờ, kết hợp bổ sung alcalase thương mại với tỷ lệ 20 UI/g giúp hiệu quả thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ đạt cao nhất là 37,6% và DPPH% đạt 31,57%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Babu, C.M., Chakrabarti, R. and Sambasivarao, K.R.S., 2008. Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. *LWT - Food Science and Technology*. 41(2): 227-235

Bùi Thị Hồng Thanh, 2012. Nghiên cứu thu hồi dịch protein từ dịch thủy phân đầu tôm thẻ chân trắng bằng alcalase và đánh giá một số tính chất chức năng của sản phẩm. Luận văn tốt nghiệp đại học của Đại học Nha Trang.

Chalamaiah, M., Dinesh kumar, B., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications. *Food Chem*. 135(4): 3020-3038.

Dey, S. and Dora, K.C., 2011. Optimization of the production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*. 51(1): 16-24.

Dey, S.S. and Dora, K.C., 2014. Antioxidative activity of protein hydrolysate produced by alcalase hydrolysis from shrimp waste (*Penaeus*

monodon and *Penaeus indicus*). *Journal of Food Science and Technology*. 51(3): 449-457.

Guerard, F., Sunaya – Martinez, M.T., Laroque, D., Chabeaud, A. and Dufosse, L., 2007. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Processing Biotechnology*. 42(11): 1426-1491.

Janarthanan, G., Nagalakshmi, K., Sathishkumar, K., Rupshankar, C. and Venkateshwarlu, G., 2015. Protein hydrolysates from Shrimp (*Metapenaeus dobsoni*) head waste: Optimization of extraction conditions by response surface methodology. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 24: 429-442.

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: 176-183.

Ganugula, R., Chakrabarti, R., and Rao, K.R.S.S. 2008. Distribution of Proteolytic Activity in the Different Protein Fractions of Tropical Shrimp Head Waste. *Food Biotechnology*. 22(1): 18-30.

Gildberg, A. and Stenberg, E., 2001. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*. 36: 809-812.

Gunasekaran, J., Kannuchamy, N., Kannaiyan, S., Chakrabarti, R. and Gudipati, V., 2015. Protein Hydrolysates from Shrimp (*Metapenaeus dobsoni*) Head Waste: Optimization of Extraction Conditions by Response Surface Methodology. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 24(5): 429-442.

Haard, N.F. and Simpson, B.K. (Eds.), 2000. *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. Marcel Dekker Inc, New York, USA.

Herpandi, Huda, N., Rosma, A. and Wan Nadiah, W.A., 2012. Degree of hydrolysis and free tryptophan content of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) protein hydrolysates produced with different type of industrial proteases. *International Food Research Journal*. 19(3): 863-867.

Holanda, H.D. and Netto, F.M., 2006. Recovery of Components from Shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) Processing Waste by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Food Science*. 71(5): C298-C303.

Kim, S. K. and Wijesekara, I., 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. *Journal of Functional Foods*. 2(1): 1–9.

Liu, L., Wang, Y., Peng, C. and Zhang, J., 2013. Optimizarion of the preparation of fish poetin anti – obesity hydrolysate using response surface

- methodology. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(2): 3124-3139.
- López-Saiz, C.M., Hernández, J., Cinco-Moroyoqui, F.J., *et al.*, 2016. Antimutagenic Compounds of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Isolation and Structural Elucidation. *Hindawi Publishing Corporation*. Article ID 8148215, 7 pages.
- Mizani, M., Aminlari, M. and Khodabandeh, M., 2005. An Effective Method for Producing a Nutritive Protein Extract Powder from Shrimp-head Waste. *Food Sci. Technol. Int.*, 11: 49-54.
- Moure, T., Dominguez, H. and Parajo, J.C., 2006. Antioxydant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from Industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochem.*, 41: 447-456.
- Muzaifa, M., Safriani, N. and Zakaria, F., 2012. Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis. *Int J Bioflux Soc*, 5: 36-39.
- Nedra, E.H.A., Hmidet, N., Olfa, G., Nahed, F.Z., Ali, B., and Nasri, M., 2011. Solvent-Stable Digestive Alkaline Proteinases from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*) Viscera: Characteristics, Application in the Deproteinization of Shrimp Waste, and Evaluation in Laundry Commercial Detergents. 7: 1096-1110.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., and Assavanig, A., 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *J. Food Eng.* 70: 571-578.
- Nguyễn Thị Ngọc Hoài, Ngô Thị Hoài Dương và Ngô Đăng Nghĩa, 2013. Tối ưu hóa quá trình thủy phân protein từ đầu tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) bằng alcalase theo phương pháp mặt đáp ứng. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*.
- Nguyễn Công Hà và Lê Nguyễn Đoàn Duy, 2011. Giáo trình kỹ thuật thực phẩm 3. *Nhà xuất bản Trường Đại học Cần Thơ*.
- Randriamahatody, Z., Sylla, K. S. B., Nguyen, H. T. M., Donnay-Moreno, C., Azanamparany, L.R. and Bourgognon, N., 2011. Proteolysis of shrimp by-products (*Penaeus monodon*) from Madagascar. *CyTA - Journal of Food*. 9(3): 220-228.
- Saidi, S., Belleville, M.P., Deratani, A. and Amar, R.B., 2013. Optimization of peptide production by enzymatic hydrolysis of tuna dark muscle by-product using commercial proteases. *African Journal of Biotechnology*. 12(13): 1533-1547.
- Shahidi, F., Han, X.Q. and Synowiecki, J., 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.*, 53:285-293.
- See, S.F., Hoo, L.L. and Babji, A.S., 2011. Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase. *International Food Research Journal*. 18(4): 1359-1365.
- Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storro, I. and Rustad, T., 2005. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem*. 40: 2021-2033.
- Synowiecki, J. and Al-Khateeb, N.A.A.Q., 2000. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards. *Food Chemistry*. 68: 147-152.
- Võ Thị Anh Minh, 2014. Ảnh hưởng của tiền xử lý nguyên liệu đến hiệu quả thủy phân thịt đầu tôm sú bằng enzyme protease. *Luận văn cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ*.
- Wilson-Sanchez, G., Moreno-Félix, C., Velazquez, C., *et al.*, 2010. Antimutagenicity and Antiproliferative Studies of Lipidic Extracts from White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Mar. Drugs*. 8: 2795-2809.
- Wu, C. H., Chen, H.M. and Shiau, C.Y., 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxydant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*. 36(9-10): 949-957.
- Zhao, J., Huang, G.R., Zhang, M.N., Chen, W.W. and Jiang, J.X., 2011. Acid amin composition, molecular weight distribution and antioxydant stability of shrimp processing byproduct hydrolysate. *American Journal of Food technology*. 6(10): 904-913.