

THÔNG BÁO KHOA HỌC

NGHIÊN CỨU BẢO QUẢN HỖN HỢP CAROTEN-PROTEIN BẰNG CHITOSAN PHÂN TỬ LƯỢNG THẤP VÀ CHITOSAN CHLORIDE

PRESERVATION OF CAROTEN-PROTEIN USING LOW MOLECULAR WEIGHT CHITOSAN AND CHITOSAN CHLORIDE

Nguyễn Công Minh¹, Cao Thị Huyền Trang¹, Phạm Thị Đan Phượng², Phạm Thị Mai¹, Nguyễn Văn Hòa², Trang Sĩ Trung²

Ngày nhận bài: 3/9/2019; Ngày phân biện thông qua: 23/9/2019; Ngày duyệt đăng: 30/9/2019

TÓM TẮT

Chitosan khối lượng phân tử thấp (LMWC) và chitosan chloride (LMWC-HCl) được bổ sung vào hỗn hợp carotene-protein (C-P) với hàm lượng 50 – 200 ppm và bảo quản ở nhiệt độ phòng (25 – 27°C) trong 24 tuần. Kết quả cho thấy chất lượng hỗn hợp C-P tốt hơn nhiều khi được bổ sung 100 ppm LMWC hoặc 100 ppm LMWC-HCl so với mẫu đối chứng. Cụ thể, hàm lượng protein, astaxanthin, protein hòa tan và lipid của hỗn hợp C-P khi bổ sung 100 ppm LMWC/LMWC-HCl chỉ bị thất thoát từ 5 – 15%, TVB-N tăng 35 - 50% so với ban đầu sau 10 tuần bảo quản, trong khi đó các giá trị trên ở mẫu đối chứng lần lượt là 25 - 35% và 200 - 220%. Kết quả này chứng minh LMWC, LMWC-HCl có tiềm năng lớn trong ứng dụng bảo quản hỗn hợp C-P.

Từ khóa: Chitosan khối lượng phân tử thấp, chitosan chloride, hỗn hợp caroten-protein, phế liệu thủy sản

ABSTRACT

Low molecular weight chitosan (LMWC) and chitosan chloride (LMWC-HCl) was added caroten-protein (C-P) mixture with an amount of 50 - 200 ppm and kept at room temperature for 24 weeks. The results showed that both LMWC and LMWC-HCl could reduce the degradation of C-P at a loading of 100 ppm in compared to the control samples. The degraded contents of protein, astaxanthin, protein soluble and lipid was 5 – 10%, the TVB-N content was 15 – 20%, while those of blank sampes were 25 - 35% and 200 - 220%, respectively. However, the storage efficiency of LMWC and LMWC-HCl at room temperature was showed at 100 ppm for 10 weeks. The result suggests that LMWC and LMWC-HCl show potential applications for storage of the C-P mixture.

Keywords: Low molecular weight chitosan, chitosan chloride, caroten-protein mixture, seafood by-products

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Caroten-protein (C-P) là hỗn hợp chất hữu cơ chứa protein, carotenoid (95% là astaxanthin), lipid và được thu nhận chủ yếu từ phế liệu tôm [3, 18]. Hiện nay, C-P được xem là nguồn bổ sung protein và carotenoid vào thức ăn nuôi trồng thủy sản [2, 17, 20], đặc biệt thức ăn cho cá hồi [1, 2] hoặc sử dụng làm chất tạo mùi, tạo màu trong thực phẩm [4]. Tuy nhiên, C-P chứa astaxanthin, protein hoà tan dễ bị

phân hủy trong quá trình chế biến/bảo quản do các tác nhân vật lý (ánh sáng, nhiệt độ...), tác nhân hoá học (oxy, ion kim loại...), tác nhân sinh học (vi sinh vật, enzyme) [6, 8, 9]. Hơn nữa, tác động của các yếu tố trên cũng làm tăng các chỉ số như peroxide, nitơ bazơ bay hơi... do đó làm giảm chất lượng của C-P. Do đó, sử dụng các phương pháp bảo quản thích hợp đối với hỗn hợp C-P là rất cần thiết.

Chitosan là polyme sinh học, đang được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như nông nghiệp, thực phẩm, môi trường nhờ các thuộc tính tự nhiên như không độc, tính tương thích sinh học

¹ Viện Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nha Trang

² Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

³ Trung tâm Thí nghiệm-thực hành, Trường Đại học Nha Trang

cao, hoạt tính chống oxy hoá và kháng khuẩn mạnh [16]. Khả năng ứng dụng của chitosan phụ thuộc vào khối lượng phân tử (M_w) và độ deacetyl (DD). Hiện nay, có nhiều nghiên cứu ứng dụng chitosan trong bảo quản thực phẩm [16]. Theo Darmadji và cộng sự (1994), chitosan có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây thối trong thịt nên kéo dài được thời gian bảo quản thịt [6]. Chitosan có khả năng hạn chế quá trình hình thành TVB-N khi bảo quản tôm nguyên liệu, giúp kéo dài được thời gian bảo quản [20]. Kittikaiwan và cộng sự (2007) đã tiến hành kết hợp sử dụng chitosan và giảm ánh sáng trong quá trình bảo quản để hạn chế sự hư hỏng astaxanthin [9].

Trong nghiên cứu này, chitosan khối lượng phân tử thấp (LMWC) và chitosan chloride (LMWC-HCl) được sử dụng nhằm hạn chế quá trình phân hủy astaxanthin, protein hoà tan của hỗn hợp C-P trong quá trình bảo quản.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ

1. Nguyên vật liệu

1.1. Chitosan và C-P

Chitosan và C-P được thu nhận từ phế liệu tôm theo phương pháp của Phương và cộng sự [15], theo đó, phế liệu tôm thẻ chân trắng thu nhận từ Công ty Cổ phần Nha Trang Seafoods - F17 được ép tách phần bã ép và dịch ép. Phần bã ép được sử dụng để thu nhận chitosan khối lượng phân tử cao (HMWC). Phần dịch ép được lọc qua lưới 2 mm sau đó đồng hóa, lọc qua lưới 0,8mm và thủy phân bằng hỗn hợp acid hữu cơ (citric acid 5% + formic acid 1%) trong 24h ở nhiệt độ phòng (25 – 30°C). Hỗn hợp sau thủy phân được cô đặc chân không (680 mmHg, 60°C, 6h), đồng hóa và lọc qua lưới 0,2 mm để thu nhận C-P. Hỗn hợp C-P được bảo quản trong nghiên cứu này hướng đến sử dụng làm một thành phần bổ sung trong thức ăn thủy sản.

1.2. Điều chế LMWC

LMWC được sản xuất theo phương pháp của Minh và cộng sự [11]. HMWC (80 mesh) được xử lý trương nở với NaOH 0,2%, 8h và cắt mạch với H_2O_2 0,3%, 12h ở nhiệt độ phòng để thu nhận LMWC.

1.3. Điều chế LMWC-HCl

LMWC-HCl được sản xuất theo phương pháp của Minh và cộng sự [12]. LMWC được phản ứng với khí HCl trong 3h ở 4°C, sản phẩm sau phản ứng được rửa 3 lần với hỗn hợp C_2H_5OH/H_2O (9:1(v/v)) và sấy chân không ở 50°C trong 12h để thu nhận LMWC-HCl.

2. Bố trí thí nghiệm bảo quản hỗn hợp C-P

Hoà tan LMWC trong acid acetic 1%, LMWC-HCl trong nước cất thành dung dịch có nồng độ chitosan 2%. Bổ sung mỗi loại dung dịch trên vào C-P để tạo thành các hỗn hợp có nồng độ chitosan cuối là: 50; 100; 200 ppm. Hỗn hợp C-P + chitosan được đồng hoá 3 lần (30s/lần), sau đó cho 80g hỗn hợp trên vào các lọ nhựa HDPE (lọ 100 mL) có vỏ tối màu và bảo quản ở nhiệt độ phòng (25 – 30°C), tránh ánh sáng trực tiếp, mỗi nghiệm thức sử dụng 36 lọ thí nghiệm. Định kỳ 2 tuần, 3 lọ/nghiệm thức sẽ được sử dụng phân tích hàm lượng astaxanthin, protein hòa tan, TVB-N, lipid, peroxide và tổng vi sinh hiếu khí. Đối với các mẫu đối chứng, quy trình xử lý vẫn tương tự như trên nhưng không bổ sung chitosan mà chỉ gồm (i) 1 mL acid acetic 1%/100 mL hỗn hợp C-P (ký hiệu là control – A.A) và (ii) 1 mL H_2O /100 mL hỗn hợp C-P (ký hiệu là control - H_2O).

3. Các phương pháp phân tích

Hàm lượng astaxanthin xác định bằng quang phổ UV-Vis [17]. Protein hoà tan xác định bằng phương pháp Biuret [14]. Chỉ số peroxide (PV) xác định theo ISO 3960:2007. Tổng vi sinh vật hiếu khí xác định theo phương pháp cấy trang trên môi trường PAC. Hàm lượng khoáng, ẩm, protein tổng số, TVB-N, lipid tổng số xác định theo phương pháp AOAC, 1990 [8]. Thành phần acid amin được phân tích bằng phương pháp HPLC sử dụng hệ thống HPLC-UV, Agilent 1100 Series coupled to IR and UV detector với 21 acid amin chuẩn. Thành phần acid béo được phân tích theo phương pháp sắc ký khí sử dụng hệ thống GC 6890N Agilent Technologies coupled to FID and ECD detectors với 13 acid béo chuẩn.

4. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi nghiệm thức bảo quản được lặp lại ba lần do đó số liệu báo cáo là kết quả của 9 lần

phân tích (3 lần/lọ thí nghiệm). Các số liệu được xử lý thống kê mô tả và các đồ thị được vẽ bằng phần mềm OriginPro 8.0.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Tính chất của hỗn hợp C-P, LMWC và LMWC-HCl

Chất lượng của LMWC, LMWC-HCl và hỗn hợp C-P thu nhận từ phế liệu tôm được

trình bày trong Bảng 1. LMWC, LMWC-HCl đều có DD cao (>90%) và M_w thấp (<150 kDa). Theo Yin và cộng sự (2009), chitosan với DD cao và M_w thấp có hoạt tính kháng khuẩn, chống oxy hóa mạnh [21]. Với kết quả trong Bảng 1, LMWC và LMWC-HCl được kỳ vọng là các chất có hoạt tính kháng khuẩn và chống oxy hoá và có khả năng được sử dụng làm chất bảo quản hỗn hợp C-P đạt hiệu quả cao.

Bảng 1. Thành phần hóa học của C-P, LMWC và LMWC-HCl

Thông số	LMWC	LMWC-HCl	C-P
Độ ẩm (%)	9,5 ± 1,8	10,8 ± 1,7	62,9 ± 0,7
Khối lượng phân tử (kDa)	127 ± 5	94 ± 2,4	NA
Độ tan trong nước (%)	NA	99 ± 0,8	NA
Độ tan trong acid acetic (%)	99 ± 0,4	100	NA
Độ deacetyl (%)	92,5 ± 1,5	95,2 ± 1,3	NA
Hàm lượng khoáng (%)*	0,25 ± 0,05	0,11 ± 0,02	8,2 ± 0,7
Hàm lượng protein (%)*	0,2 ± 0,03	0,15 ± 0,01	72,2 ± 1,8
Protein hòa tan (mg/g protein)	NA	NA	272,5 ± 2,3
Protein (%)*	NA	NA	72,2 ± 1,8
Lipid (%)*	NA	NA	15,9 ± 0,5
TVB-N (mgN/5g mẫu tươi)	NA	NA	17,4 ± 0,2
Astaxanthin (ppm)*	NA	NA	182,8 ± 4,8
pH	NA	NA	3,8 ± 0,2

NA: Không phân tích; "*" Tính trên hàm lượng chất khô tuyệt đối.

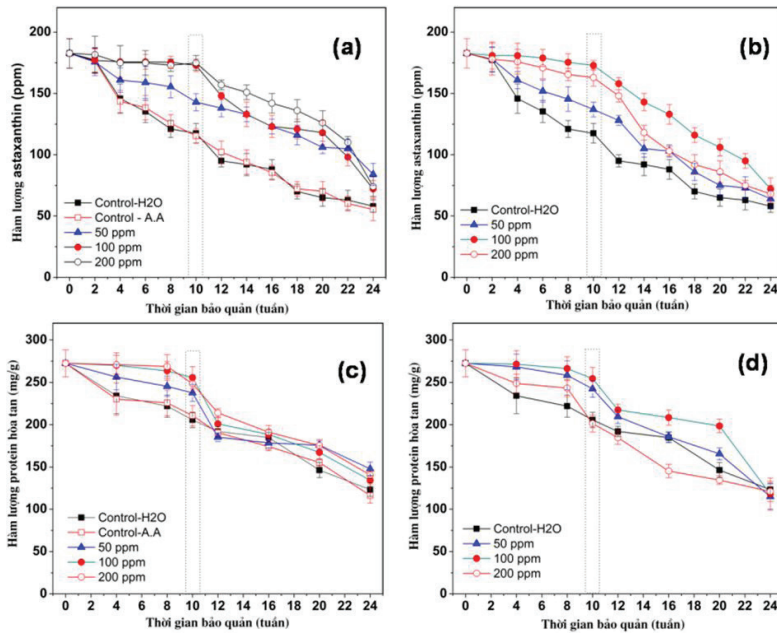
Hỗn hợp C-P chứa các thành phần chính như protein, khoáng, lipid với tỷ lệ tương ứng là 72,2; 8,2; 15,9%. Ngoài ra, C-P còn chứa protein hòa tan (272 mg/g protein) và astaxanthin (182 ppm) có giá trị dinh dưỡng cao [3]. C-P chứa protein và astaxanthin với hàm lượng cao do đó đây là chất tạo màu tự nhiên, an toàn cho thực phẩm đồng thời cũng là nguồn nguyên liệu để chế biến thức ăn thủy sản giàu chất dinh dưỡng [7]. Tuy nhiên, quá trình bảo quản dễ dàng làm suy giảm chất lượng của C-P. Vì vậy, việc nghiên cứu bảo quản hỗn hợp để hạn chế sự hư hỏng của các thành phần dinh dưỡng là rất cần thiết.

2. Hàm lượng astaxanthin, protein hòa tan trong hỗn hợp C-P sau 24 tuần bảo quản

Hình 1 biểu diễn sự thay đổi của hàm lượng astaxanthin, hàm lượng protein hoà tan trong

hỗn hợp C-P khi được bổ sung LMWC, LMWC-HCl với lượng 50 – 200 ppm và được đánh giá định kỳ 2 tuần/lần.

Hình 1 (a, b) cho thấy bổ sung chitosan có thể làm hạn chế sự hư hỏng astaxanthin so với mẫu đối chứng theo thời gian bảo quản tùy thuộc loại và lượng chitosan bổ sung. Với các mẫu bổ sung 50 ppm LMWC, LMWC-HCl, lượng astaxanthin giảm dần đều sau 24 tuần và không có sự khác biệt so với các mẫu đối chứng. Tuy nhiên, khi tăng lượng LMWC, LMWC-HCl bổ sung lên 100, 200 ppm hàm lượng astaxanthin trong C-P hầu như không giảm trong 10 tuần đầu và chỉ giảm nhanh kể từ tuần bảo quản thứ 12. Tỷ lệ tồn thất astaxanthin sau 10 tuần bảo quản đối với mẫu bổ sung 100 ppm (LMWC, LMWC-HCl), control-H₂O, control – A.A lần lượt là 5,4; 5,8, 35,7; 36,9% và mẫu bổ sung



Hình 1. Hàm lượng astaxanthin trong hỗn hợp C-P khi được bổ sung LMWC (a) hoặc LMWC-HCl (b) và hàm lượng protein hoà tan trong hỗn hợp C-P khi được bổ sung LMWC (c) hoặc LMWC-HCl (d) sau 24 tuần bảo quản.

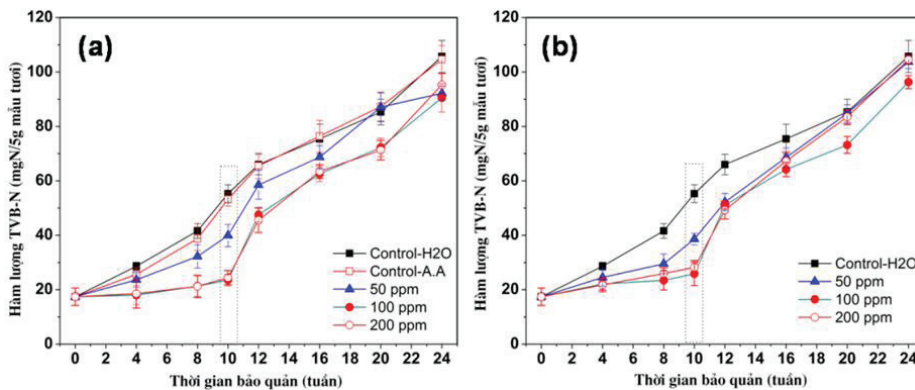
200 ppm (LMWC, LMWC-HCl) lần lượt là 5,2; 10,8%.

Tương tự, Hình 1 (c, d) cho thấy xu hướng thay đổi hàm lượng protein hoà tan trong quá trình bảo quản. Đối với các mẫu đối chứng, protein hoà tan giảm nhanh sau 2 tuần. Tuy nhiên, khi bổ sung LMWC, LMWC-HCl với nồng độ 50 – 200 ppm, lượng protein hoà tan được giữ ổn định trong 10 tuần đầu, sau đó giảm nhanh từ tuần bảo quản thứ 12. Hàm lượng protein hoà tan sau 10 tuần bảo quản bằng LMWC, LMWC-HCl lần lượt là 255,5; 248,5 mg/g protein. Nguyên nhân thất thoát

protein hoà tan có thể do lớp vỏ hydrate của protein bị phá hủy, làm cho các phân tử protein kết dính lại với nhau và tạo thành dạng kết tủa. Như vậy, bổ sung 100 ppm LMWC và LMWC-HCl vào C-P có khả năng hạn chế hư hỏng của protein hoà tan trong 10 tuần bảo quản, lượng protein bị thất thoát sau 10 tuần bảo quản đối với mẫu bổ sung LMWC, LMWC-HCl lần lượt là 6,3 và 5,8%.

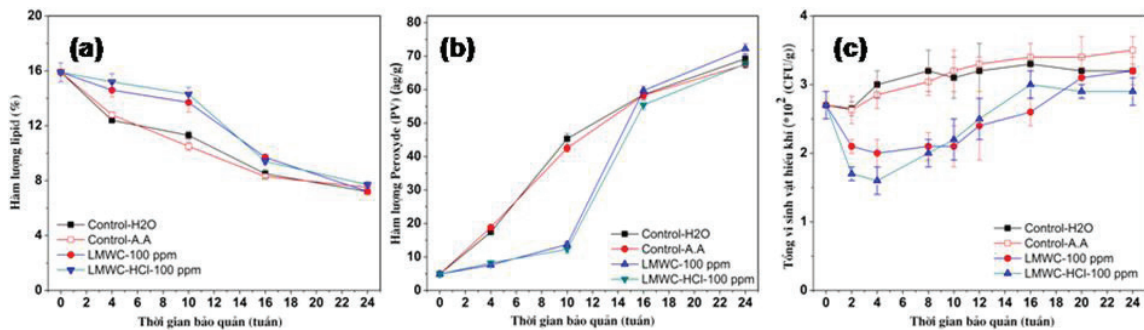
3. Hàm lượng TVB-N trong hỗn hợp C-P sau 24 tuần bảo quản

Kết quả phân tích TVB-N trong C-P sau 24 tuần bảo quản được trình bày trong Hình 2.



Hình 2. Hàm lượng TVB-N của hỗn hợp C-P khi bổ sung LMWC (a) hoặc LMWC – HCl (b) sau 24 tuần.

Hình 2 cho thấy các mẫu đối chứng (control – H₂O; control – A.A), lượng TVB – N luôn tăng trong thời gian bảo quản. Tuy nhiên, khi bổ sung 100 ppm LMWC, LMWC-HCl, mức độ tăng TVB-N trong 10 tuần đầu chậm, lần lượt là 23,5 và 25,8 mgN/5g mẫu tươi. Điều này có thể do chitosan bổ sung có khả năng ức chế hoạt động của vi sinh vật và hạn chế quá trình oxy hóa lipid, do đó ngăn cản quá trình oxy hóa các hợp chất dinh dưỡng như lipid, protein, sắc tố trong thời gian bảo quản. Như vậy, bổ sung 100 ppm LMWC, LMWC-HCl vào C-P có thể hạn chế sự hình thành TVB-N tốt trong 10 tuần đầu bảo quản.



Hình 3. Hàm lượng lipid (a), peroxide (b) và tổng vi sinh hiếu khí (c) trong hỗn hợp C-P sau 24 tuần.

Hình 3b cho thấy hàm lượng peroxide đều tăng khi bảo quản trong điều kiện có và không có bổ sung chitosan. Tuy nhiên, PV của các mẫu bổ sung chitosan tăng nhẹ trong 10 tuần đầu, sau đó tăng mạnh kể từ tuần thứ 12. Tuy nhiên, đối với những mẫu không bổ sung chitosan, chỉ số PV có xu hướng tăng nhanh từ những tuần đầu tiên của quá trình bảo quản.

Tổng vi sinh vật hiếu khí có biến động khác nhau ở mẫu có và không có bổ sung chitosan (Hình 3c). Đối với mẫu không bổ sung chitosan, mật độ vi sinh vật hiếu khí có xu hướng tăng sau 2 tuần bảo quản trong khi đó mẫu bổ sung LMWC, LMWC-HCl mật độ vi sinh vật hiếu khí có xu hướng giảm trong 4 tuần đầu và tăng chậm sau tuần thứ 4. Mặc dù chưa có một giải thích đầy đủ cho khả năng kháng khuẩn của chitosan nhưng hầu hết tác giả đều cho rằng khả năng kháng khuẩn liên quan đến mức độ hấp phụ chitosan lên bề mặt tế bào vi khuẩn [5, 10]. Trong quá trình tiếp xúc, nhóm tích điện dương (-NH₃⁺) của chitosan tương tác với

4. Hàm lượng lipid, peroxide và tổng vi sinh hiếu khí trong hỗn hợp C-P sau 24 tuần bảo quản

Hình 3 mô tả hàm lượng lipid, peroxide và tổng vi sinh hiếu khí trong hỗn hợp C-P sau 24 tuần bảo quản. Trong đó, Hình 3a cho thấy mẫu bổ sung LMWC, LMWC-HCl 100 ppm giảm lipid diễn ra chậm trong 10 tuần đầu và sau đó giảm nhanh. Có thể giải thích như sau: dưới tác động của ánh sáng, oxy và các gốc tự do thì lipid trong C-P bị oxy hóa tạo ra một số sản phẩm như peroxide và hydroperoxide. Hơn nữa, quá trình oxy hóa lipid có khả năng làm biến màu C-P khi kéo dài thời gian bảo quản.

nhóm tích điện âm trên màng tế bào vi khuẩn làm thay đổi mật độ điện tích màng [10], dẫn đến sự chết của tế bào vi sinh vật do không hấp thu được chất dinh dưỡng. Như vậy, bổ sung LMWC, LMWC-HCl có khả năng kìm hãm sự phát triển của vi sinh vật hiếu khí trong khoảng 10 tuần, điều này rất có ý nghĩa do vi sinh vật cũng là một trong những nguyên nhân gây hư hỏng các thành phần dinh dưỡng có giá trị của C-P trong quá trình bảo quản.

5. Chất lượng của hỗn hợp C-P trước và sau bảo quản

Số liệu về thành phần hóa học của C-P trước và sau 10 tuần bảo quản thể hiện trong Bảng 2. Sự thay đổi các thông số (astaxanthin, protein hòa tan, TVB-N...) là khác biệt giữa các mẫu đối chứng (control-H₂O, control-A.A) và mẫu có bổ sung chitosan. Cụ thể, lượng astaxanthin, protein hòa tan giảm khoảng 19; 36% ở mẫu control – H₂O; 20; 34% ở mẫu control – A.A; 6; 6,1% ở mẫu bổ sung 100 ppm LMWC và 5,3; 6,5% ở mẫu bổ sung 100 ppm LMWC-

HCl. Đối với lượng TVB-N, mức độ tăng lên giữa bốn mẫu trên lần lượt là 3,6; 3,5; 1,75; 1,9 lần so với ban đầu sau 10 tuần bảo quản. Kết

quả trên cho thấy LMWC, LMWC-HCl có khả năng sử dụng để bảo quản hỗn hợp C-P trong 10 tuần ở nhiệt độ môi trường.

Bảng 2. Thành phần hóa học của C-P sau 10 tuần bảo quản

Chỉ tiêu	Kết quả phân tích			
	Control – H ₂ O	Control – A.A	LMWC 100 ppm	LMWC 100 ppm
Âm (%)	62,9 ± 0,5	62,3 ± 0,4	63,3 ± 0,3	63,4 ± 0,5
Khoáng (%)*	8,5 ± 0,3	8,3 ± 0,6	8,8 ± 0,2	8,5 ± 0,5
Protein tổng số (%)*	65,5 ± 1,1	66,3 ± 1,7	71,4 ± 1,5	70,1 ± 1,3
Protein hòa tan (mg/g protein)	164,2 ± 0,9	173,1 ± 0,6	255,5 ± 3,3	248,7 ± 2,5
Lipid (%)*	8,8 ± 0,2	8,9 ± 0,4	13,5 ± 0,6	13,7 ± 0,8
TVB-N (mgN/5g mẫu tươi)	67,4 ± 2,3	55,1 ± 3,7	30,5 ± 3,1	33,3 ± 3,6
Astaxanthin (ppm)*	133,8 ± 7,4	147,4 ± 5,5	172,5 ± 6,4	175,7 ± 5,2
Tổng vi sinh vật hiếu khí (*10 ² CFU/g)	3,3*10 ²	3,1*10 ²	2,1*10 ²	2,2*10 ²

“*” Tính theo hàm lượng chất khô.

Bảng 3 cho thấy hỗn hợp C-P chứa nhiều acid béo không no quan trọng như acid oleic (19,53%), acid linolenic (21,01%), acid eicosapentaenoic (EPA) (7,46%) và acid docosahexaenoic (DHA) (15,09%). Sự có

mặt của các acid béo không bão hòa đặc biệt là các acid béo omega 3 cho thấy C-P có giá trị dinh dưỡng rất cao, có nhiều tiềm năng để sử dụng bổ sung vào thực phẩm và thức ăn thủy sản.

Bảng 3. Thành phần acid béo của C-P sau 10 tuần bảo quản

STT	Acid béo (mg/g)	C-P	Sau 10 tuần			
			Control H ₂ O	Control A.A	LMWC-HCl	LMWC
1	Capric acid (10:0)	0,09	0,02	ND	0,01	ND
2	Lauric acid (12:0)	0,08	0,01	ND	0,01	ND
3	Myristic acid (14:0)	0,79	0,45	0,04	0,43	0,51
4	Palmitic acid (16:0)	15,41	8,53	6,72	8,69	9,12
5	Palmitoleic acid (16:1 Δ ⁹)	2,08	1,13	0,20	1,09	1,32
6	Stearic acid (18:0)	6,00	3,72	2,12	3,50	3,70
7	Oleic acid (18:1 Δ ⁹)	13,20	1,75	1,60	3,31	3,87
8	Linoleic acid (18:2 Δ ^{9,12})	ND	8,75	0,64	10,00	10,75
9	Linolenic acid (18:3 Δ ^{9,12,15})	14,20	6,94	6,10	7,57	7,78
10	Arachidic acid (20:0)	0,49	0,24	ND	0,24	ND
11	Eicosapentaenoic acid (20:5 Δ ^{5,8,11,14,17})	5,04	ND	ND	4,46	4,81
12	Behenic Acid (22:0)	ND	ND	ND	0,10	0,23
13	Docosahexaenoic acid (22:6 Δ ^{4,7,10,13,16,19})	10,20	5,97	5,52	9,78	6,04

“ND”: Không phát hiện. Δ là ký hiệu về vị trí của liên kết đôi trên mạch acid béo.

Kết quả Bảng 3 cho thấy hầu hết acid béo no và không no đều bị biến đổi sau 10 tuần bảo quản. Tuy nhiên, mức độ biến đổi ở các mẫu đối chứng (control – H₂O, control – A.A) cao hơn so với các mẫu có bổ sung LMWC, LMWC-HCl (đặc biệt là các acid béo không no như linolenic acid, oleic acid, EPA, DHA). Ngoài ra, số liệu Bảng 3 cho thấy có sự hình thành các acid béo linolenic và behenic trong quá trình bảo quản, kết quả trên tương đồng với báo cáo của Ozden (2005) khi nghiên cứu sự biến đổi thành phần acid béo của cá tươi và cá ướp muối trong quá trình bảo quản [13]. Theo Yuan và cộng sự (1961), acid linoleic có thể tạo thành bằng quá trình chuyển hoá từ acid oleic dưới tác động của hệ enzyme vi sinh

vật [22] do đó nguyên nhân của việc xuất hiện các acid linoleic và behenic sau quá trình bảo quản có thể do các phản ứng tự chuyển hoá dưới tác động của các yếu tố môi trường như nhiệt độ, oxy và đặc biệt là hoạt động của vi sinh vật. Như vậy, bổ sung LMWC và LMWC-HCl có thể hạn chế phần lớn sự hư hỏng các acid béo đặc biệt là DHA, EPA trong 10 tuần bảo quản. Tuy nhiên, kết quả ở Bảng 3 cũng cho thấy hầu hết acid béo no và một số acid béo không no của các mẫu C – P bảo quản đều bị biến đổi khoảng 20 - 50% sau 10 tuần bảo quản. Do đó, hỗn hợp C-P được khuyến cáo sử dụng trước 10 tuần và cần có các nghiên cứu tiếp theo để nâng cao hiệu quả bảo quản hỗn hợp này.

Bảng 4. Thành phần acid amin của hỗn hợp C-P sau 10 tuần bảo quản

Sau 10 tuần						
STT	Acid amin (mg/g)	C-P	Control A.A	Control H ₂ O	LMWC 100	LMWC-HCl 100
1	Arginine	4,93	0,08	0,27	0,24	0,19
2	Serine	0,68	0,45	0,53	0,51	0,51
3	Aspartic	1,11	0,94	1,23	1,63	1,33
4	Glutamic	4,45	21,54	ND	ND	ND
5	Hydroxylproline	0,28	0,43	ND	ND	ND
6	Glycine	2,76	0,06	0,48	0,48	0,46
7	Threonine	1,60	0,08	0,56	0,65	0,72
8	Alanine	5,11	1,18	1,41	1,53	1,28
9	Aminobutyric acid	2,37	0,05	0,17	0,17	0,16
10	Proline	4,91	2,71	2,26	3,22	3,26
11	Methionine	0,46	0,11	0,33	0,31	0,34
12	Tryptophan	1,00	0,70	0,9	0,8	0,9
13	Valine	0,83	0,03	0,61	0,61	0,59
14	Phenylalanine	6,25	ND	0,73	2,78	2,78
15	Cysteine/Cystine	1,86	0,42	0,97	0,87	1,47
16	Iso Leucine	1,95	ND	0,32	1,47	1,64
17	Tyrosine	3,32	0,15	3,46	3,61	3,08
18	Leucine	42,38	ND	0,36	32,20	28,34
19	Ornithine	2,72	0,81	2,26	0,73	1,38
20	Lysine	0,17	0,08	ND	0,11	0,09
21	Histidine	0,78	0,36	0,16	0,19	0,07

"ND": Không phát hiện

Bảng 4 cho thấy C-P chứa 21 acid amin. Trong đó, có 7 acid amin không thay thế (Met, Phe, Val, Leu, Ile, Lys, Thr) và chiếm hơn 60% so với tổng lượng acid amin. Ba acid amin Phe, Ile, Leu là các acid amin thiết yếu chiếm tỷ lệ lớn, chứng tỏ C-P có giá trị dinh dưỡng cao. Kết quả phân tích cho thấy, đa số các acid amin đều bị mất sau 10 tuần bảo quản (trừ acid Glutamic và Hydroxyproline trong mẫu control – A.A). Sự tăng lên của Glutamic acid có thể do quá trình hoạt động của vi sinh vật thông qua quá trình chuyển hoá α -ketoglutaric acid trong chu trình TCA dưới tác động của hệ Glutamate dehydrogenase (GDH) [19]. Ngoài ra, proline và hydroxyproline cũng có thể là sản phẩm chuyển hoá từ Glutamic acid thông qua các enzyme Glutamate kinase và 5-Glutamil phosphate reductase [19]. Như vậy, đa số các acid amin bị biến đổi sau quá trình bảo quản tuy nhiên với các mẫu bổ sung LMWC, LMWC-HCl thì mức độ thất thoát thấp hơn so với các mẫu đối chứng, điều đó cho thấy hiệu quả bảo quản C-P của LMWC, LMWC-HCl.

IV. KẾT LUẬN

So với mẫu đối chứng và các nồng độ sử dụng khác nhau, khi bổ sung 100 ppm LMWC, LMWC-HCl vào hỗn hợp C-P thể hiện khả năng hạn chế tốt nhất sự phát triển của vi sinh vật hiếu khí, hình thành TVB-N, peroxide và giảm thất thoát astaxanthin, protein hòa tan, lipid trong 10 tuần bảo quản trong điều kiện tối, nhiệt độ môi trường. Sau 10 tuần bảo quản với LMWC, LMWC-HCl 100 ppm, astaxanthin bị mất 5,5 - 8,2%, protein hòa tan bị thất thoát 6,2; 6,7%, lipid bị thất thoát 5,5 và 6,2% và TVB-N tăng lên 1,7 và 1,9 lần so với đối chứng. Tuy nhiên, hầu hết acid béo no và một số acid béo không no của các mẫu đều bị biến đổi khoảng 20 - 50% sau 10 tuần bảo quản. Do đó, hỗn hợp C-P được khuyến cáo sử dụng trước 10 tuần và cần có các nghiên cứu tiếp theo để nâng cao hiệu quả bảo quản hỗn hợp này.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu thông qua đề tài Nghị Định Thư “04/2014/HĐ-NĐT”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Armenta R. E. and Legarreta I. G., 2009. Stability Studies on Astaxanthin Extracted from Fermented Shrimp Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6095-6100.
2. Babu C. M., Chakrabarti R. and Sambasivarao K. R., 2008. Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. *Journal of Food Science and Technology*, 41, 227-235.
3. Cahu T. B., Santos S. D., Mendes A., Córdula C. R., Chavante S. F., Carvalho Jr L. B., Nader H. B. and Bezerra R. S., 2012. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochemistry*, 47, 570-577.
4. Chakrabarti R., 2002. Carotenoprotein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process. *Food Biotechnol*, 16, 81-90.
5. Chung Y. C., Su Y. P., Chen C. C., Jia G., Wang H. L. and Wu J. C., 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 932-936.
6. Darmadji P. and Izumimoto M., 1994. Effect of chitosan in meat preservation. *Meat science*, 38, 243-254.

7. Higuera C. I., Felix V. L. and Goycoolea F. M., 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 185-196.
8. Kenneth H. (1990), Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, AOAC International.
9. Kittikaiwan P., Powthongsook S., Pavasant P. and Shotipruk A. J. C. p., 2007. Encapsulation of Haematococcus pluvialis using chitosan for astaxanthin stability enhancement. *Carbohydrate Polymers*, 70, 378-385.
10. Liu H., Du Y., Wang X. and Sun L., 2004. Chitosan kills bacterial through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 147-155.
11. Minh N. C., Cuong H. N., Phuong P. T. D., Schwarz S., Stevens W. F., Hoa N. V. and Trung T. S., 2017. Swelling-assisted reduction of chitosan molecular weight in the solid state using hydrogen peroxide. *Polymer Bulletin*, 74, 3077-3087.
12. Minh N. C., Hoa N. V., Schwarz S., Stevens W. F. and Trung T. S., 2019. Preparation of water soluble hydrochloric chitosan from low molecular weight chitosan in the solid state. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 718-726.
13. Özden Ö., 2005. Changes in amino acid and fatty acid composition during shelf-life of marinated fish. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 85, 2015-2020.
14. Parvin R., Pande S. and Venkitasubramanian T. J. A. b., 1965. On the colorimetric biuret method of protein determination. *Analytical Biochemistry*, 12, 219-229.
15. Phuong P. T. D., Minh N. C., Cuong H. N., Van Minh N., Van Hoa N., Yen H. T. H. and Trung T. S., 2017. Recovery of protein hydrolysate and chitosan from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) heads: approaching a zero waste process. *Journal of food science and technology*, 54, 1850-1856.
16. Rinaudo M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
17. Sachindra N. M., Bhaskar N. and Mahendrakar N. S., 2006. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*, 26, 1092-1098.
18. Senphan T., Benjakul S. and Kishimura H., 2014. Characteristics and antioxidative activity of carotenoprotein from shells of Pacific white shrimp extracted using hepatopancreas proteases. *Food Bioscience*, 5, 54-63.
19. Shimizu K., (2013), Main metabolism, In: Shimizu K. (ed) *Bacterial Cellular Metabolic Systems: Metabolic Regulation of a Cell System with 13C-Metabolic Flux Analysis*. Elsevier, Woodhead Publishing.
20. Simpson B. K. and Haard N. F., 1985. The use of enzymes to extract carotenoprotein from shrimp waste. *The Journal of Applied Biochemistry*, 7, 212-222.
21. Yin H., Du Y. and Zhang J., 2009. Low molecular weight and oligomeric chitosans and their bioactivities. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9, 1546-1559.
22. Yuan C. and Bloch K., 1961. Conversion of oleic acid to linoleic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 236, 1277.