

THÔNG BÁO KHOA HỌC

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC YẾU TỐ ĐẾN QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN PROTEIN TỪ PHỤ PHẨM CÁ LƯỠI TRÂU BẰNG ENZYME ALCALASE

EFFECTS OF FACTORS ON PROTEIN HYDROLYSIS OF TONGUEFISH PROCESSING BY-PRODUCTS BY ENZYME ALCALASE

Nguyễn Chí Thanh^{1,2*}, Nguyễn Ngọc Hà^{2,3}, Nguyễn Phúc Cẩm Tú^{3,2}

Ngày nhận bài: 29/07/2019; Ngày phản biện thông qua: 23/11/2019; Ngày duyệt đăng: 16/12/2019

TÓM TẮT

Thủy phân phụ phẩm thủy sản bằng phương pháp hóa học/enzyme để tận dụng protein là một hướng nghiên cứu đang được nhiều nhà khoa học quan tâm. Trong đó nghiên cứu, xác định các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân là việc quan trọng để thu được kết quả tối ưu nhất. Một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá hiệu quả của quá trình thủy phân là độ thủy phân (DH). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, tỷ lệ enzyme/cơ chất và thời gian thủy phân lên quá trình thủy phân phụ phẩm cá lười trâu bằng enzyme Alcalase. Phụ phẩm được thủy phân bằng enzyme Alcalase 2L ở ba mức nhiệt độ (50°C, 55°C và 60°C), ba mức pH (7, 8 và 9), ba tỷ lệ enzyme/cơ chất (0,05%, 0,1% và 0,2%) và tiến hành xác định DH tại các thời điểm 0h, 2h, 4h và 6h. Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng protein trong phụ phẩm chế biến cá lười trâu là 18,74%. Đây là nguồn nguyên liệu có tiềm năng dùng trong sản xuất thủy phân/cô đặc. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân phụ phẩm cá lười trâu bằng enzyme Alcalase 2L là ở nhiệt độ 60°C, pH 8 và tỷ lệ enzyme/cơ chất 0,2% và cho mức DH cao nhất là 33,42%.

Từ khóa: độ thủy phân, nhiệt độ, pH, tỷ lệ enzyme/cơ chất.

ABSTRACT

Enzymatic or chemical hydrolysis of by-products from aquatic product processing is one of science's most promising fields. Of which, a determination of effects of factors on hydrolysis plays an important role in optimizing hydrolysis. The objective of this study was to evaluate effects of temperature, pH value, enzyme/substance ratios and time on hydrolysis of tonguefish processing by-products by enzyme Alcalase. The tonguefish by-product was hydrolyzed by Alcalase 2L in turn at three temperature (50°C, 55°C and 60°C), three pH values (7, 8 and 9) and three enzyme/substance ratios (0.05%, 0.1% and 0.2%) and degree of hydrolysis was determined at 0, 2, 4 and 6 h. The results showed that protein content in tonguefish by-product was 18.74%, suggesting that this is a potential material in protein hydrolysate/concentrate production. A temperature of 60°C, pH of 8.0 and enzyme to substrate level of 0.2% were found to be the optimum conditions to obtain the highest degree of hydrolysis (33.42%) using Alcalase 2L for hydrolysis of tonguefish by-product.

Keywords: degree of hydrolysis, enzyme/substance ratios, pH, temperature.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy Sản Việt Nam (VASEP), kim ngạch xuất khẩu thủy sản năm 2018 ước đạt 9 tỷ USD, tăng

8,4% so với năm 2017, đóng góp quan trọng vào tăng trưởng của toàn ngành nông nghiệp (Nguyễn Kiểm, 2019); trong đó cá lười trâu (thòn bon, *Cynoglossus* sp.) là một trong những mặt hàng xuất khẩu quan trọng. Cá lười trâu thường được chế biến thành các sản phẩm đông lạnh như nguyên con, philê thanh, philê ống,

¹ Viện Công nghệ Nano, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

² Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông lâm Tp. Hồ Chí Minh

³ Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường,

Trường Đại học Nông lâm Tp. Hồ Chí Minh

philê ghép miếng,... Định mức thu hồi của sản phẩm cá lườn phi lê đông lạnh là 2,85, như vậy chỉ có khoảng 35% khối lượng sản phẩm thu được so với nguyên liệu ban đầu; còn lại là phụ phẩm bao gồm đầu, xương, nội tạng, da (chiếm 65%) (Lê Hoàng Trí, 2014). Trong phụ phẩm chế biến thủy sản nói chung và cá lườn nói riêng có rất nhiều thành phần có giá trị như protein, gelatin, collagen,... Thông thường, các loại phụ phẩm này được chế biến thành các sản phẩm có giá trị gia tăng thấp như phân bón, bột cá,... Tuy nhiên, các loại phụ phẩm này rất giàu protein có thể dùng để sản xuất protein thủy phân/cô đặc. Nhiều nghiên cứu khoa học trên thế giới đã chỉ ra rằng dịch thủy phân protein từ phụ phẩm thủy sản có chứa hàm lượng acid amin khá cao và có giá trị về mặt sinh học (Hoyle và Merritt, 1994; Lian và *ctv*, 2005; Kechaou và *ctv*, 2009; Herpandi và *ctv*, 2012). Thủy phân protein từ phụ phẩm thủy sản thường được thực hiện bằng các phương pháp sinh học, đặc biệt là bằng enzyme thương mại. Alcalase, protease kiềm được sản xuất từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis*, được xem là một trong những loại enzyme tốt nhất dùng trong quá trình sản xuất dịch thủy phân cá (Guérard và *ctv*, 2001; Klompong và *ctv*, 2008; Ovissipour và *ctv*, 2009b; Ovissipour và *ctv*, 2010). Tuy nhiên, đối với mỗi loại phụ phẩm khác nhau, chúng ta cần phải xác định các điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân bằng enzyme Alcalase. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của ba yếu tố nhiệt độ, pH và tỷ lệ enzyme/cơ chất lên hiệu quả của quá trình thủy phân phụ phẩm cá lườn trâu bằng enzyme Alcalase thông qua các chỉ tiêu đạm formol (N_{formol}), đạm ammonia (N_{ammonia}), đạm amin (N_{amin}) và độ thủy phân (DH).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên vật liệu

Phụ phẩm cá lườn trâu (*Cynoglossus* sp.) dùng trong nghiên cứu thủy phân được thu nhận từ quy trình phi lê cá lườn trâu của Công ty Thủy sản số 5, Khu Công nghiệp Vĩnh Lộc, Q. Bình Tân, Thành phố Hồ Chí Minh (Tp. HCM). Thành phần phụ phẩm bao gồm đầu, xương, da, nội tạng của cá. Nguyên liệu được thu nhận trực tiếp từ xưởng chế biến và được vận chuyển ngay bằng thùng xốp cách nhiệt có bảo quản nước đá ở nhiệt độ $< 5^{\circ}\text{C}$ về phòng thí nghiệm Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM. Nguyên liệu được loại bỏ các tạp chất, rửa sạch, để ráo nước và được chuẩn bị một lần để sử dụng trong suốt quá trình nghiên cứu. Nguyên liệu được xay nhuyễn, chia thành các gói nhỏ 200 g và đem bảo quản đông ở nhiệt độ là $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Enzyme protease sử dụng để thủy phân là enzyme Alcalase hoạt độ 2 AU/g và được bảo quản ở nhiệt độ 5°C .

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm gồm ba yếu tố là nhiệt độ, pH và tỷ lệ enzyme/cơ chất và được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức (NT) lặp lại ba lần. Mỗi mẫu chứa 8 g protein được xay nhuyễn trong 200 mL dung dịch đệm borat (với các giá trị pH khác nhau), bổ sung thêm enzyme (theo tỷ lệ) và tiến hành thủy phân ở các mức nhiệt độ khác nhau theo các điều kiện như trong Bảng 1. Tiến hành lấy mẫu lúc thời gian thủy phân là 0h, 2h, 4h và 6h. Sau khi lấy mẫu, bất hoạt enzyme ở nhiệt độ 85°C trong 15 phút và tiến hành xác định thành phần đạm trong dịch thủy phân (N_{amin} , N_{ammonia} và N_{formol}) và độ thủy phân và thu được ở mỗi thời điểm.

Bảng 1. Các điều kiện thủy phân trong thí nghiệm

Enzyme	Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Tỷ lệ enzyme/cơ chất (%)
Alcalase	50	7	0,05
	55	8	0,10
	60	9	0,20

2.2. Phương pháp xác định hàm lượng protein

Xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Kjeldah. Phương pháp Kjeldahl dựa trên nguyên lý chuyển toàn bộ N hữu cơ thành muối ammonium bằng cách công phá bằng H₂SO₄ đậm đặc (xúc tác bằng hỗn hợp CuSO₄ và K₂SO₄). Xác định hàm lượng NH₄⁺ bằng thiết bị Kjeldahl khi cho muối ammonium tác dụng với dung dịch NaOH, thu được NH₃ bằng dung dịch acid boric (H₃BO₃) và chuẩn độ amon borat bằng H₂SO₄ 0,05N. Sử dụng hỗn hợp chỉ thị màu methyl đỏ với bromocresol để mở rộng khoảng đổi màu và phối hợp màu để nhận biết sự đổi màu rõ rệt hơn.

Hàm lượng Nitơ tổng số trong dung dịch thủy phân được tính theo công thức:

$$N\% = ((V_s - V_B) \times N_{H_2SO_4} \times 14,01) / (V \times 10) \text{ (g/L)}$$

$$\text{Protein} = N\% \times 6,25 \text{ (g/L)}$$

Trong đó:

V: Thể tích mẫu mang đi phân tích (mL)

V_s: Thể tích dung dịch acid sử dụng để chuẩn độ mẫu (mL)

V_B: Thể tích dung dịch acid sử dụng để chuẩn độ mẫu trắng (mL)

N: Nồng độ đương lượng của H₂SO₄.

2.3. Phương pháp xác định đạm ammonia

Do hàm lượng đạm ammonia trong dịch thủy phân không cao, nên N_{ammonia} được xác định bằng phương pháp so màu. Quá trình chưng cất được tiến hành như sau: 5 mL dịch mẫu thủy phân được cho vào ống chưng cất + 0,5 gam (MgCO₃)₄ × Mg(OH)₂ · 5H₂O + 5 giọt phenolphthalein pH = 8,1 với mục đích ổn định pH của dịch thủy phân. Trong môi trường kiềm yếu, đạm ammonia có trong dịch thủy phân sẽ giải phóng khí NH₃ được hấp thụ bởi H₂SO₄ 0,02N. Hỗn hợp dung dịch thu được sau quá trình chưng cất sẽ được định mức thành 200 mL và tiến hành phân tích bằng phương pháp phenate để xác định lượng N_{ammonia} có trong dịch thủy phân.

2.4. Phương pháp xác định độ thủy phân phụ phẩm cá

Mẫu được thu ở từng thời điểm khác nhau

của quá trình thủy phân. Do đặc tính của mẫu là phế phẩm cho nên phương pháp xác định DH được dùng là phương pháp chuẩn độ formol. Xác định đạm formol trong dịch thủy phân bằng cách lấy 2 mL dịch thủy phân được cho vào ống ly tâm 50 mL và được định mức thành 5 mL, chỉnh pH = 8,1 bằng NaOH 0,25N. Sau đó, thêm 5 mL formaldehyde 35% đã được điều chỉnh pH = 8,1 vào dịch mẫu và ủ ở nhiệt độ phòng trong vòng 1 phút. Tiến hành chuẩn độ lại với NaOH 0,25N và ghi nhận lại thể tích NaOH sử dụng.

$$N_{\text{formol}} = (V_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}} \times 14,01) / (V_{\text{mẫu}} \times 1000) \text{ (mg/L)}$$

$$N_{\text{amin}} = N_{\text{formol}} - N_{\text{ammonia}} \text{ (mg/L)}$$

$$DH (\%) = \frac{N_{\text{amin}}}{N_{\text{tổng}}} \times 100$$

Trong đó:

N_{formol}: Hàm lượng đạm formol có trong mẫu (mg/L)

V_{NaOH}: Thể tích NaOH chuẩn độ 0,25N (mL)

N_{NaOH}: Nồng độ đương lượng của NaOH

V_{mẫu}: Thể tích mẫu chuẩn độ formol (mL)

2.5. Các phương pháp xử lý số liệu

Các chỉ tiêu đạm formol, đạm ammonia, đạm amin và độ thủy phân được phân tích bằng phân tích phương sai ba yếu tố mẫu đo lường lặp lại (repeated measures ANOVA) với các yếu tố nhiệt độ, pH, tỷ lệ enzyme/cơ chất là yếu tố chính và thời điểm lấy mẫu là đo lường lặp lại. Mức xác suất p < 0,05 được chấp nhận như tiêu chuẩn đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tất cả các phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm IBM SPSS version 19.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả khảo sát hàm lượng đạm tổng trong mẫu phụ phẩm

Hàm lượng protein trong phụ phẩm cá lưỡi trâu được thể hiện trong Bảng 2. Hàm lượng protein trong phụ phẩm cá lưỡi trâu tương tự hoặc cao hơn các loại phụ phẩm của các loài cá khác như: cá capelin là 13,9% (Shahidi và ctv, 1995), cá tầm là 15,48% (Ovissipour và ctv, 2009a), cá ngừ là 20% (Ovissipour và ctv, 2010).

Bảng 2. Hàm lượng protein tổng số trong mẫu phụ phẩm cá lười trâu

Nitrogen tổng số (%)	Protein thô (%)
3,00 ± 0,11 [†]	18,75 ± 0,65
2,91 – 3,17 [‡]	18,2 – 19,8

[†] trung bình ± độ lệch chuẩn; [‡] khoảng biến thiên.

Phụ phẩm cá lười trâu có chứa lượng đạm với tỷ lệ tương đối cao 18,75% cùng với lượng phụ phẩm tương đối nhiều nên việc thu hồi lượng đạm này để nâng cao hiệu quả kinh tế là điều cần thiết.

2. Xác định điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân phụ phẩm cá lười trâu

Trong nghiên cứu này, phản ứng thủy phân phụ phẩm cá lười trâu bằng enzyme sẽ được tiến hành trong các điều kiện khác nhau để đánh giá hiệu quả phản ứng thủy phân bằng cách xác định hàm lượng đạm formol, đạm ammonia, đạm amin và độ thủy phân để lựa chọn điều kiện tối ưu nhất.

2.1. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân

Theo Bảng 3, giá trị N_{formol} , $N_{ammonia}$, N_{amin} và DH trung bình giữa các NT khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong đó, hàm lượng N_{formol} , $N_{ammonia}$, N_{amin} và DH thủy phân ở nhiệt độ 60°C là cao nhất, tiếp theo là ở 55°C và thấp nhất là ở. Ngoài ra, giá trị N_{formol} , $N_{ammonia}$, N_{amin} và DH trung bình ở tất cả NT tăng theo thời gian thủy phân ($p < 0,05$) (Bảng 3 và Hình 1). Tốc độ thủy phân thấp nhất là ở nhiệt độ 50°C và cao nhất là ở nhiệt độ 60°C và tốc độ cao nhất là trong 4 giờ đầu của quá trình thủy phân (Hình 1).

Trong quá trình thủy phân, N_{formol} , $N_{ammonia}$, N_{amin} và DH ở hai mức nhiệt độ 50°C và 55°C luôn thấp hơn nghiệm thức mức 60°C là do tốc độ phản ứng tỷ lệ thuận với nhiệt độ phản ứng. Các tác giả khác cũng báo cáo các kết quả tương tự cũng (Shahidi và ctv, 1995; Benjakul và Morrissey, 1997; Lian và ctv, 2005; Ovissipour và ctv, 2009a). Shahidi và ctv (1995) cũng báo cáo ở nhiệt độ cao hơn thì tốc độ thủy phân cao hơn. Theo các tác giả này độ thủy phân protein của cá capelin

dùng Alcalase đạt 22% ở 65°C. Trong khi đó, khi thủy phân phụ phẩm cá thu Thái Bình Dương (*Merluccius productus*) bằng enzyme Alcalase ở các mức nhiệt độ khác nhau, Benjakul và Morrissey (1997) ghi nhận hoạt độ của Alcalase cao ở khoảng nhiệt độ cao và tối ưu ở nhiệt độ 60°C. Lian và ctv (2005) đã kết luận rằng thủy phân protein có nguồn gốc sản phẩm từ cá bằng cách bổ sung Alcalase thì có hàm lượng đạm cao và hoạt động tốt trong khoảng (50°C – 60°C). Tương tự, nghiên cứu thủy phân phụ phẩm cá tầm bằng enzyme Alcalase ở ba mức nhiệt độ 35, 45 và 55°C, Ovissipour và ctv (2009a) ghi nhận tốc độ thủy phân thấp nhất là ở nhiệt độ 35°C và cao nhất là ở nhiệt độ 55°C. Độ thủy phân cao nhất là 46,13% đạt được ở 55°C trong 205 phút; trong khi đó, tốc độ thủy phân gần như không thay đổi ở nhiệt độ 35°C (DH đạt 15%).

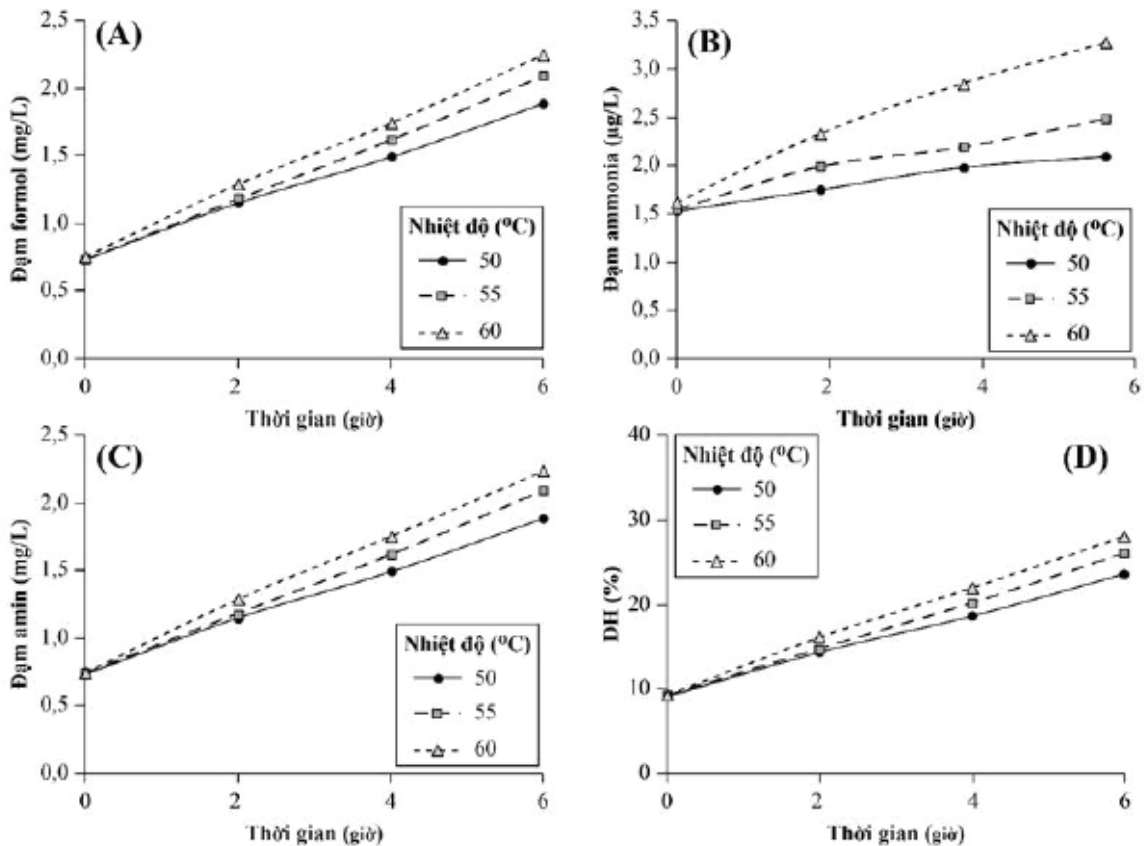
Điều này được giải thích dựa vào cơ chế hoạt động của Alcalase là một endopeptidase xúc tác sự phân cắt của các liên kết nội bộ trong một polypeptide hoặc protein. Khi nhiệt độ tăng, làm tăng năng lượng động học và tần số phức hợp enzyme - cơ chất phát triển trên một đơn vị thời gian do đó tốc độ phản ứng và sản phẩm tăng theo. Vì thế, hoạt độ enzyme càng cao thì sau quá trình thủy phân các protein được phân cắt thành các acid amin nhiều nên DH tăng tỉ lệ thuận với nhiệt độ 60°C > 55°C > 50°C. Theo Shahidi và ctv (1995), nhiệt độ tối ưu cho quá trình thủy phân phụ phẩm bằng enzyme Alcalase phụ thuộc vào thời gian thủy phân. Nhiệt độ tối ưu để thủy phân trong 60 phút là 60°C; trong khi đó thủy phân trong 120 phút thì nhiệt độ là 55°C.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hàm lượng N_{formol} , $N_{ammonia}$, N_{amin} và độ thủy phân

Chỉ tiêu	Nhiệt độ (°C)			Mức ý nghĩa [#]		
	50	55	60	Nhiệt độ	Thời điểm	Tương tác
Đạm formol (mg/L)	1,31 ^a ± 0,01	1,41 ^b ± 0,01	1,50 ^c ± 0,02	**	**	ns
	1,310 – 1,316 [‡]	1,404 – 1,406	1,485 – 1,506			
Đạm ammonia (mg/L)	0,18 ^a ± 0,02	0,21 ^b ± 0,03	0,25 ^c ± 0,03	**	**	ns
	0,183 – 0,184	0,204 – 0,260	0,246 – 0,251			
Đạm amin (mg/L)	1,31 ^a ± 0,01	1,40 ^b ± 0,01	1,51 ^c ± 0,01	**	**	ns
	1,308 – 1,313	1,402 – 1,405	1,483 – 1,507			
Độ thủy phân DH (%)	16,4 ^a ± 0,00	17,5 ^b ± 0,00	18,8 ^c ± 0,00	**	**	ns
	16,4 – 16,4	17,5 – 17,5	18,5 – 18,8			

[†] trung bình ± độ lệch chuẩn; [‡] khoảng biến thiên.

[#] kết quả từ phân tích phương sai một yếu tố đo lường lặp lại: Nhiệt độ = ba mức nhiệt độ; Thời điểm = các thời điểm thu mẫu; Tương tác = Nhiệt độ × Thời điểm. Các giá trị trung bình trong cùng hàng có cùng ký tự chỉ sự khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$); *, ** và *** chỉ mức ý nghĩa ở $p < 0,05$, $< 0,01$ và $< 0,001$; ns: khác biệt không ý nghĩa ($p > 0,05$).



Hình 1. Biến động của hàm lượng N_{formol} (A), $N_{ammonia}$ (B), N_{amin} (C) và DH (D) trung bình theo thời gian thủy phân ở các mức nhiệt độ khác nhau.

2.2. Sự ảnh hưởng của pH đến quá trình thủy phân

Độ pH có ảnh hưởng đến mức độ ion hóa cơ chất và độ bền của enzyme nên có tác động đến khả năng hoạt động của enzyme. Ảnh hưởng

của pH lên hàm lượng N_{formol} , $N_{ammonia}$, N_{amin} và độ thủy phân trong nghiên cứu này được trình bày ở Bảng 4 và Hình 2. Kết quả cho thấy có sự ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê của các mức pH khác nhau đến phản ứng thủy phân phụ phẩm

cá thông qua hàm lượng N_{formol} , N_{ammonia} , N_{amin} và độ thủy phân ($p < 0,05$). Hàm lượng N_{formol} , N_{amin} và độ thủy phân đạt cao nhất ở pH = 8, tiếp theo là ở pH = 9 và thấp nhất là ở pH = 7. Trong khi đó, hàm lượng N_{ammonia} ở hai NT pH = 8 và pH = 9 cao hơn có ý nghĩa so với ở

pH = 7 (Bảng 4). Ngoài ra, hàm lượng N_{formol} , N_{ammonia} , N_{amin} và độ thủy phân ở tất cả NT có xu hướng tăng theo thời gian thí nghiệm ($p < 0,05$); chỉ trừ NT pH = 7 ở thời điểm sau 4 giờ thủy phân, các chỉ tiêu này có xu hướng giảm (Hình 2).

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH lên hàm lượng N_{formol} , N_{ammonia} , N_{amin} và độ thủy phân

Chỉ tiêu	pH			Mức ý nghĩa [#]		
	7	8	9	pH	Thời điểm	Tương tác
Đạm formol (mg/L)	1,30 ^a ± 0,01 [†]	1,51 ^b ± 0,02	1,41 ^c ± 0,01	**	**	ns
	1,299 – 1,302 [‡]	1,499 – 1,519	1,404 – 1,409			
Đạm ammonia (mg/L)	0,20 ^a ± 0,03	0,22 ^b ± 0,02	0,22 ^b ± 0,03	**	**	ns
	0,194 – 0,197	0,222 – 0,224	0,218 – 0,220			
Đạm amin (mg/L)	1,30 ^a ± 0,01	1,51 ^b ± 0,01	1,41 ^c ± 0,01	**	**	ns
	1,296 – 1,300	1,510 – 1,516	1,405 – 1,410			
Độ thủy phân DH (%)	16,2 ^a ± 0,00	18,9 ^b ± 0,00	17,6 ^c ± 0,00	**	**	ns
	16,2 – 16,2	18,8 – 18,9	17,5 – 17,6			

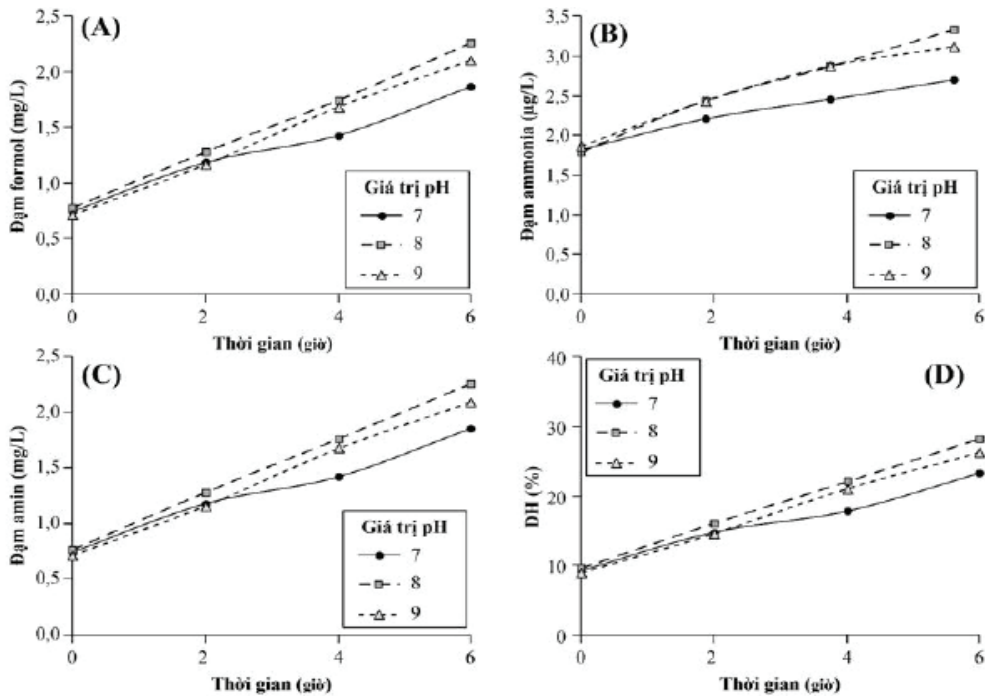
[†] trung bình ± độ lệch chuẩn; [‡] khoảng biến thiên.

[#] kết quả từ phân tích phương sai một yếu tố đo lường lặp lại: pH = ba mức pH; Thời điểm = các thời điểm thu mẫu; Tương tác = pH × Thời điểm. Các giá trị trung bình trong cùng một hàng có cùng ký tự chỉ sự khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$); *, ** và *** chỉ mức ý nghĩa ở $p < 0,05$, $< 0,01$ và $< 0,001$; ns: khác biệt không ý nghĩa ($p > 0,05$).

Khi so sánh với các loại enzyme có nguồn gốc động – thực vật và đứng trên quan điểm kỹ thuật và kinh tế, đa số các tác giả đều công nhận việc sử dụng các loại enzyme có nguồn gốc vi khuẩn đem lại nhiều thuận lợi như có hoạt độ xúc tác phản ứng rộng, bền ở pH và nhiệt độ cao (Hoyle và Merritt, 1994; Guérard và ctv, 2001; Ovissipour và ctv, 2009a). Trong đó, enzyme Alcalase được xem là một trong những loại enzyme thủy phân phụ phẩm thủy sản hiệu quả nhất do đạt được độ thủy phân cao trong một thời gian tương đối ngắn. Các nghiên cứu đều cho rằng enzyme Alcalase là loại enzyme hoạt động tốt nhất trong môi trường kiềm nhẹ (pH = 8,0 – 8,5). Thủy phân cá trích (*Clupea harengus*) ở điều kiện nhiệt độ và pH tối ưu (50 – 55°C và pH = 8,0 – 8,5) bằng Alcalase, Hoyle và Merritt (1994) thu được giá trị DH là 44,7% chỉ trong 60 phút. Trong một nghiên cứu tương tự, thủy phân phụ phẩm cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*) bằng Alcalase ở nhiệt độ và pH tối

ưu (50°C và pH = 8,0), Guérard và ctv (2001) ghi nhận giá trị DH cao nhất là 23% ở nồng độ enzyme 85 AU/kg sau 5,5 giờ. Ovissipour và ctv (2009a) cũng báo cáo độ thủy phân đạt 46,13% khi thủy phân phụ phẩm cá tầm bằng enzyme Alcalase ở pH = 8,5 và nhiệt độ 55°C trong 205 phút.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến hiệu quả quá trình thủy phân (Hình 2) cho thấy, thời gian thủy phân càng dài thì càng tạo ra nhiều sản phẩm. Trong quá trình thủy phân các liên kết peptit nhạy cảm sẽ được phân cắt trước với tốc độ nhanh, sau đó các liên kết ít nhạy cảm hơn sẽ được phân cắt với tốc độ chậm hơn. Thời gian thủy phân càng dài thì lượng đạm formol sinh ra càng nhiều do các mạch protein đã được phân cắt thành các acid amin càng tăng từ 0, 2, 4 và 6 giờ thủy phân (Nguyễn Trọng Căn và ctv, 1998). Thời gian thủy phân còn ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình thủy phân, thời gian thủy phân càng dài thì protease càng có điều kiện thủy phân cơ chất triệt để.



Hình 2. Biến động của hàm lượng N_{formol} (A), N_{ammonia} (B), N_{amin} (C) và DH (D) trung bình theo thời gian thủy phân ở các mức pH khác nhau.

2.3. Sự ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme/cơ chất đến quá trình thủy phân

Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme/cơ chất đến quá trình thủy phân được trình bày ở Bảng 5 và Hình 3. Kết quả cho thấy tỷ lệ enzyme/cơ chất ảnh hưởng có ý nghĩa lên hàm lượng N_{formol} , N_{ammonia} , N_{amin} và độ thủy phân

($p < 0,05$) và giá trị của các chỉ tiêu này có khuynh hướng tăng theo thời gian thí nghiệm ($p < 0,05$) (Bảng 5 và Hình 3). Khi tỷ lệ enzym/cơ chất tăng, hàm lượng N_{formol} , N_{ammonia} , N_{amin} và độ thủy phân tăng; cao nhất là ở tỷ lệ enzym/cơ chất 0,20%, tiếp theo là ở 0,10% và thấp nhất là ở 0,05%.

Bảng 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme/cơ chất lên hàm lượng N_{formol} , N_{ammonia} , N_{amin} và độ thủy phân

Chỉ tiêu	Tỷ lệ enzyme/cơ chất (%)			Mức ý nghĩa [#]		
	0,05	0,10	0,20	Enzyme/Cơ chất	Thời điểm	Tương tác
Đạm formol (mg/L)	1,19 ^a ± 0,02 [†]	1,45 ^b ± 0,01	1,59 ^c ± 0,01	**	**	ns
	1,181 – 1,193 [‡]	1,442 – 1,449	1,583 – 1,586			
Đạm ammonia (mg/L)	0,18 ^a ± 0,02	0,21 ^b ± 0,02	0,24 ^c ± 0,03	**	**	ns
	0,184 – 0,185	0,214 – 0,215	0,240 – 0,240			
Đạm amin (mg/L)	1,19 ^a ± 0,01	1,44 ^b ± 0,01	1,58 ^c ± 0,01	**	**	ns
	1,187 – 1,195	1,439 – 1,444	1,583 – 1,585			
Độ thủy phân DH (%)	14,9 ^a ± 0,00	18,0 ^b ± 0,00	19,8 ^c ± 0,00	**	**	ns
	14,8 – 14,9	18,0 – 18,1	19,7 – 19,8			

[†]trung bình ± độ lệch chuẩn; [‡] khoảng biến thiên.

[#]kết quả từ phân tích phương sai một yếu tố đo lường lặp lại: Enzyme/Cơ chất = ba tỷ lệ Enzyme/Cơ chất; Thời điểm = các thời điểm thu mẫu;

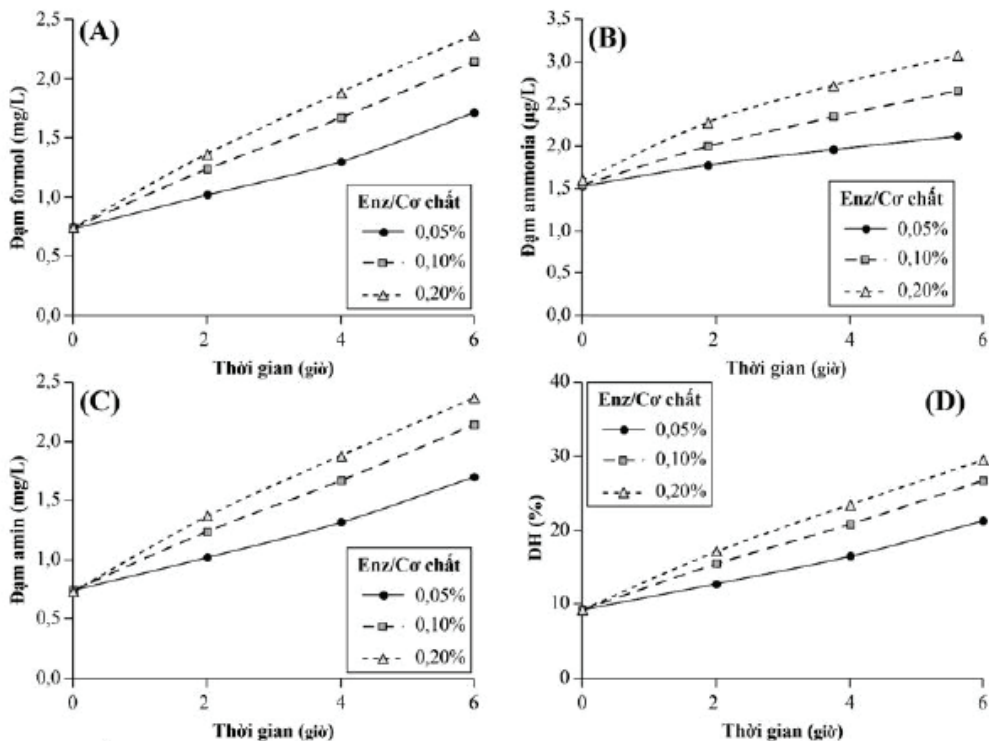
Tương tác = Enzyme/Cơ chất × Thời điểm. Các giá trị trung bình trong cùng một hàng có cùng ký tự chỉ sự khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$);

*, ** và *** chỉ mức ý nghĩa ở $p < 0,05$, $< 0,01$ và $< 0,001$; ns: khác biệt không ý nghĩa ($p > 0,05$).

Các kết quả tương tự cũng được ghi nhận bởi các tác giả khác (Benjakul và Morrissey, 1997; Guérard và ctv, 2001; Salwanee và ctv, 2013): độ thủy phân tăng khi tăng nồng độ enzyme. Khi thủy phân phụ phẩm cá thu Thái Bình Dương (*M. productus*) bằng enzyme Alcalase, Benjakul và Morrissey (1997) ghi nhận khi tăng nồng độ enzyme thì Dh cũng tăng. Tuy nhiên, sự thay đổi DH chỉ có ý nghĩa ở khoảng nồng độ 0 – 34 AU/kg, ở nồng độ > 57 AU/kg, sự gia tăng DH không có ý nghĩa. Trong một nghiên cứu tương tự, thủy phân phụ phẩm cá ngừ vây vàng (*T. albacares*) bằng Alcalase ở nhiệt độ và pH tối ưu (50°C và pH = 8,0) và các nồng độ enzyme Alcalase khác nhau, Guérard và ctv (2001) nhận thấy khi tăng nồng độ enzyme từ 0 – 85 AU/kg thì giá trị DH tăng từ khoảng 10% đến 23% sau 5,5 giờ thủy phân. Tương tự, khi thủy phân phụ phẩm cá ngừ (*Euthynnus affinis*) bằng enzyme Alcalase, Salwanee và ctv (2013) báo cáo độ thủy phân

tăng có ý nghĩa khi tăng nồng độ enzyme từ 1,0% đến 1,5%, nhưng DH không tăng nữa khi nồng độ enzyme > 1,5%. Theo các tác giả này khi enzyme được thêm vào cơ chất, enzyme sẽ hấp phụ trên bề mặt các hạt cơ chất tại đó sẽ xảy ra phản ứng thủy phân các liên kết peptide dễ bị thủy phân bởi enzyme. Sau giai đoạn thủy phân nhanh ban đầu, tốc độ thủy phân có khuynh hướng giảm, đi vào giai đoạn ổn định. Tại thời điểm này, việc tăng nồng độ enzyme sẽ không làm tăng độ thủy phân vì nồng độ của các liên kết peptide dùng cho quá trình thủy phân trở nên giới hạn.

Với cùng một lượng nguyên liệu, tiến hành phản ứng thủy phân với Alcalase ở các tỷ lệ enzym/cơ chất khác nhau, kết quả thu được như ở Bảng 5 cho thấy N_{formol} , $N_{ammonia}$, N_{amin} và DH của NT tỷ lệ enzyme/cơ chất 0,2% khác biệt không đáng kể so với ở tỷ lệ enzyme/cơ chất 0,1%. Vì vậy, chúng tôi kiến nghị sử dụng tỷ lệ enzyme/cơ chất 0,1% để nâng cao hiệu quả kinh tế.



Hình 3. Biến động của hàm lượng N_{formol} (A), $N_{ammonia}$ (B), N_{amin} (C) và DH (D) trung bình theo thời gian thủy phân ở các tỷ lệ enzyme/cơ chất khác nhau.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Phụ phẩm cá lườn trâu có thể sử dụng làm dịch thủy phân protein do có hàm lượng

protein tương đối cao (18,75%). Kết quả cho thấy nhiệt độ, pH và tỷ lệ enzyme/cơ chất có ảnh hưởng có ý nghĩa lên thành phần đạm của

dịch thủy phân và DH. Ngoài ra, hàm lượng N_{formol} , N_{ammonia} , N_{amin} và DH trung bình ở các nghiệm thức tăng dần theo thời gian: thời gian thủy phân càng dài thì hàm lượng đạm của dịch thủy phân và DH sinh ra càng nhiều do các mạch protein đã được phân cắt thành các acid amin. Dựa trên các kết quả của nghiên cứu này, chúng tôi rút ra kết luận điều kiện tối ưu

cho quá trình thủy phân phụ phẩm cá lười trâu khi sử dụng enzyme Alcalase là: pH, nhiệt độ và tỷ lệ enzyme/cơ chất lần lượt là 8,0, 60°C và 0,2% trong thời gian 6h. Ở điều kiện này, sau 6h thủy phân, giá trị DH của dịch thủy phân dao động trong khoảng từ $18,8 \pm 0,00\%$ đến $19,8 \pm 0,00\%$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Benjakul S., Morrissey M.T., 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (9): 3423-3430.
2. Guérard F., Dufosse L., De La Broise D., Binet A., 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11 (4-6): 1051-1059.
3. Herpandi, Huda N., Rosma A., 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.
4. Hoyle N.T., Merritt J.H., 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science* 59 (1): 76-79.
5. Kechaou E.S., Dumay J., Donnay-Moreno C., Jaouen P., Gouygou J.-P., Bergé J.-P., Amar R.B., 2009. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107 (2): 158-164.
6. Klompong V., Benjakul S., Kantachote D., Hayes K.D., Shahidi F., 2008. Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. *International Journal of Food Science & Technology* 43 (6): 1019-1026.
7. Lê Hoàng Trí, 2014. Khảo sát qui trình công nghệ và hiệu suất thu hồi cá lười trâu fillet đông lạnh tại Công ty TNHH Thủy sản Minh Khuê, Kiên Giang. Trường Đại học Cần Thơ, 60 trang.
8. Lian P.Z., Lee C.M., Park E., 2005. Characterization of squid-processing byproduct hydrolysate and its potential as aquaculture feed ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (14): 5587-5592.
9. Nguyễn Kiêm, 2019. Triển vọng mới cho xuất khẩu thủy sản Việt Nam năm 2019. Báo Quân đội Nhân dân <<https://www.qdnd.vn/kinh-te/cac-van-de/trien-vong-moi-cho-xuat-khau-thuy-san-viet-nam-nam-2019-562923>> (Truy cập Ngày 18/06/2019).
10. Nguyễn Trọng Cần, Nguyễn Thị Hiền, Đỗ Thị Giang, Trần Thị Luyến, 1998. *Công nghệ enzyme*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh trang.
11. Ovissipour M., Abedian A., Motamedzadegan A., Rasco B., Safari R., Shahiri H., 2009a. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry* 115 (1): 238-242.
12. Ovissipour M., Taghiof M., Motamedzadegan A., Rasco B., Molla A.E., 2009b. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeon *Huso huso* using Alcalase. *International Aquatic Research* 1: 31-38.
13. Ovissipour M., Benjakul S., Safari R., Motamedzadegan A., 2010. Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna *Thunnus albacares* head using Alcalase and Protamex. *International Aquatic Research* 2 (2): 87-95.
14. Salwanee S., Wan Aida W.M., Mamot S., Maskat M.Y., 2013. Effects of enzyme concentration, temperature, pH and time on the degree of hydrolysis of protein extract from viscera of tuna (*Euthynnus affinis*) by using alcalase. *Sains Malaysiana* 42 (3): 279-287.
15. Shahidi F., Han X.-Q., Synowiecki J., 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry* 53 (3): 285-293.