



ỨNG DỤNG BROMELAIN ĐỂ SẢN XUẤT BỘT GIÀU ĐẠM AMIN TỪ VỎ ĐẦU TÔM (*Litopenaeus vannamei*)

Võ Văn Song Toàn, Nguyễn Việt Hưng, Võ Trung Nghĩa và Trần Nhân Dũng

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 25/12/2015

Ngày chấp nhận: 30/08/2016

Title:

Application of bromelain for amino-rich powder production from shell of shrimp's head (*Litopenaeus vannamei*)

Từ khóa:

Bromelain, đạm amin, đạm ammoniac, *Litopenaeus vannamei*, thủy phân

Keywords:

Amino protein, ammonia protein, bromelain, hydrolysis, *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT

The study "Application of bromelain for amino-rich powder production from shell of shrimp's head (*Litopenaeus vannamei*)" was carried out with the aim of producing amino-rich powder from protein of shell of shrimp's head. The evaluated result of initial raw materials showed that the total protein and the humidity of shell of shrimp's head were 15.31% and 74.78%, respectively, and the specific activity of bromelain extracted from pineapple shell was 10.68 U.mg⁻¹. The investigation of the effect of concentration, temperature, time and pH on the shell of shrimp's head protein hydrolysis process indicated that the appropriate conditions for hydrolyzing two gram of shell of shrimp's head by bromelain (with 10.68 U.mg⁻¹ specific activity) were conducted in buffer phosphate pH 8, at temperature 45°C for 4 hours with the produced amount of highest amino content (4.679 ± 0,101 mgN/mL) and lowest ammonia content (0.256 mgN/m), respectively. The analytical result of molecular weight protein by the method of sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE) also showed that the majority of protein from shell of shrimp's head was hydrolyzed effectively by bromelain of pineapple shell juice and created into short sequences of polypeptide which are mostly smaller than 14.4 kDa.

TÓM TẮT

Đề tài nghiên cứu "Ứng dụng bromelain để sản xuất bột giàu đạm amin từ vỏ đầu tôm thẻ *Litopenaeus vannamei*" được thực hiện nhằm sản xuất bột giàu đạm amin từ protein vỏ đầu tôm. Kết quả khảo sát (nguyên liệu thô ban đầu cho thấy hàm lượng protein tổng số và ẩm độ của vỏ đầu tôm thẻ nguyên liệu lần lượt là 15,31% và 74,78%, và dịch trích bromelain từ vỏ khóm có hoạt tính đặc hiệu là 10,68 U.mg⁻¹. Việc khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ, nhiệt độ, thời gian và pH đến quá trình thủy phân protein vỏ đầu tôm cho thấy rằng 2 gram cơ chất vỏ đầu tôm được thủy phân bằng bromelain (10,68 U.mg⁻¹) từ vỏ khóm trong môi trường dung dịch đệm phosphate pH 8, nhiệt độ 45°C trong 4 giờ là điều kiện thích hợp với hàm lượng đạm amin và đạm ammoniac sinh ra lần lượt là 4,679 ± 0,101 mgN/mL và 0,256 mgN/mL. Kết quả phân tích khối lượng phân tử protein bằng phương pháp điện di SDS - PAGE cũng cho thấy phần lớn protein vỏ đầu tôm được thủy phân hiệu quả bởi bromelain vỏ khóm và tạo ra sản phẩm thủy phân với những đoạn polypeptide ngắn có khối lượng phân tử phần lớn nhỏ hơn 14,4 kDa.

Trích dẫn: Võ Văn Song Toàn, Nguyễn Việt Hưng, Võ Trung Nghĩa và Trần Nhân Dũng, 2016. Ứng dụng bromelain để sản xuất bột giàu đạm amin từ vỏ đầu tôm (*Litopenaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 45b: 7-15.

1 GIỚI THIỆU

Tôm thẻ chân trắng là mặt hàng chế biến xuất khẩu chủ lực của nước ta có hiệu quả kinh tế cao, ổn định. Sản lượng tôm Việt Nam đạt từ 500.000 - 600.000 tấn/năm trong đó sản lượng tôm thẻ chân trắng của năm 2014 đạt khoảng 400.000 tấn/năm (Trương Đình Hòe và *ctv.*, 2014). Song song đó, các nhà máy chế biến thủy hải sản hằng năm thải ra một lượng phụ phế phẩm tôm khá lớn chiếm khoảng 70 nghìn tấn (Trần Thị Luyến, 2001). Đối với tôm được nuôi tại vùng khí hậu nhiệt đới thì đầu tôm thường chiếm khoảng từ 34 - 45% trong đó vỏ chiếm 10 - 15% (Barratt và Montano, 1986). Trong khi đó, ước tính khoảng 30 - 40% phụ phẩm khóm trong quá trình chế biến được thải ra môi trường (Bartholomew, 2003) trong đó vỏ (trái) khóm chiếm từ 30 - 40% (Ketnawa *et al.*, 2010). Tuy nhiên, đây lại là nguồn enzym bromelain dồi dào có thể được tận dụng để thủy phân protein vỏ đầu tôm tạo ra sản phẩm giàu đạm amin có giá trị.

Do đó, việc kết hợp giữa hai nguồn phụ phế phẩm từ vỏ đầu tôm thẻ và dịch trích bromelain từ vỏ khóm để sản xuất bột giàu đạm amin phục vụ nhu cầu thức ăn con giống trong chăn nuôi thủy sản, vật nuôi; đồng thời, góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường, chi phí sản xuất và nâng cao chất lượng sản phẩm. Vì thế, đề tài “Ứng dụng bromelain để sản xuất bột giàu đạm amin từ vỏ đầu tôm thẻ (*Litopenaeus vannamei*)” đã được thực hiện.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Vỏ đầu tôm thẻ thu tại Công ty Cổ Phần Thủy Sản Cafatex, Quốc lộ 1A, Huyện Châu Thành A, Hậu Giang và được bảo quản lạnh trong thời gian chuyển về phòng thí nghiệm. Vỏ đầu tôm được rửa nhanh và để ráo trước khi được nghiền bằng máy nghiền mẫu Retsch Miihle; mẫu được chia nhỏ và trữ ở -20°C ngay sau đó.

Vỏ khóm được thu tại chợ Hưng Lợi, Quốc lộ 91B, P. Hưng Lợi, Q. Ninh Kiều, Cần Thơ và được nghiền ép bằng máy xay sinh tố để lấy dịch; sau đó dịch khóm được ly tâm lạnh 6.000 vòng/phút trong 15 phút để thu dịch enzym bromelain dùng cho thí nghiệm.

Thiết bị và dụng cụ: Quang phổ kế (Hitachi U1500, Nhật), pH kế (Inolab - Đức), bồn ổn nhiệt TW20 (Julabo, Đức), bộ micropipette (BioRad, Mỹ)...

Hóa chất: Sodium hydroxide (NaOH, TQ), disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄, Merck), dodium dihydrogen phosphate (NH₂PO₄, Merck),

Sulfuric acid (H₂SO₄, TQ), sodium lauryl sulphate neutral (C₁₂H₂₅NaO₄S, Merck, Đức), Tris-HCl (Merck, Đức)...

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của hoạt tính đặc hiệu bromelain vỏ khóm đến quá trình thủy phân protein đầu tôm: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Thủy phân 2 gram cơ chất đầu tôm bằng lượng hoạt tính đặc hiệu bromelain 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30 U.mg⁻¹ bromelain vỏ khóm ở nhiệt độ 38°C trong 4 giờ. Sản phẩm thủy phân được ly tâm 3500 vòng/phút trong 15 phút, dịch sau ly tâm dùng để xác định hàm lượng đạm ammoniac, đạm amin.

Ảnh hưởng của nhiệt độ, thời gian và pH đến quá trình thủy phân protein đầu tôm bằng bromelain vỏ khóm: Thí nghiệm được bố trí tương tự như trên nhưng đối với các nhân tố lần lượt có các mức độ tương ứng là nhiệt độ phòng, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C (nhân tố nhiệt độ); 0, 4, 8, 12 và 16 giờ (nhân tố thời gian); 4, 5, 6, 7, 8, 9 và 10 (nhân tố pH).

Phương pháp phân tích: Hàm lượng nitơ tổng được khảo sát bằng phương pháp Kjeldahl (1883); hàm lượng đạm ammoniac được phân tích theo phương pháp của Peter (2003), hàm lượng đạm amin được xác định bằng phương pháp O-Phthalaldehyde - OPA (2003). Số liệu được nhập liệu, lưu trữ, xử lý, vẽ hình bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, sai số chuẩn được tính toán bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV. Trung bình các số liệu giữa các nghiệm thức thí nghiệm được so sánh bằng phân tích phương sai một nhân tố ANOVA (One Way Anova).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thành phần hóa học vỏ đầu tôm

Bảng 1: Thành phần cơ bản của vỏ đầu tôm thẻ chân trắng

Thành phần	Hàm lượng
Protein tổng số (%)	15,31 ± 0,438
Âm độ (%)	74,78 ± 0,249

Kết quả khảo sát nguyên liệu vỏ đầu tôm cho thấy, hàm lượng âm độ là 74,78% thấp hơn so với các nghiên cứu của Gonçalves và Ribeiro (2009), Gunalan *et al.* (2013) với kết quả lần lượt là 75,8%, 76,2%. Bên cạnh đó, hàm lượng protein trong vỏ đầu tôm của nghiên cứu là 15,31% cao hơn so với các nghiên cứu về protein vỏ đầu tôm của Teerasuntonwat và Raksakuithai (1995); Salim (2011); Brasileiro *et al.* (2012) tương ứng là 13,6%; 11,59%; 12,43%. Kết quả cho thấy phụ phế

phẩm vỏ đầu tôm có nguồn protein dồi dào thích hợp làm nguyên liệu cho quá trình thủy phân.

Hàm lượng protein và hoạt tính bromelain vỏ khóm

Hoạt tính đặc hiệu của dịch trích vỏ khóm phân ứng trên cơ chất casein là 10,68 (U.mg⁻¹). Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của Lại Thị Ngọc

Hà (2009) và Nguyễn Huỳnh Quang Diệu (2013) lần lượt là 4,236 (U.mg⁻¹) và 6,342 (U.mg⁻¹), và phù hợp với hoạt tính đặc hiệu của một số sản phẩm enzym thương mại bromelain của Sigma Aldrich - USA (5 - 15 U.mg⁻¹). Như vậy, có thể ứng dụng bromelain vỏ khóm thủy phân protein vỏ đầu tôm để sản xuất bột giàu đạm amin.

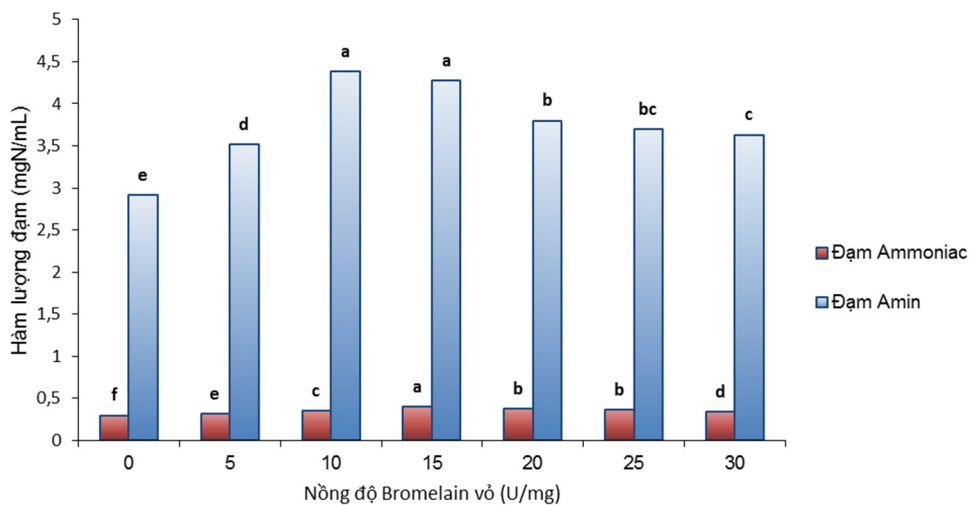
Bảng 2: Hàm lượng protein và hoạt tính tổng bromelain vỏ khóm

Mẫu	Protein tổng (mg/mL)	Hoạt tính tổng (U/mL)	Hoạt tính đặc hiệu (U.mg ⁻¹)
Dịch trích vỏ khóm	1,340 ± 0,060	14,31 ± 1,458	10,68 ± 1,553

3.1.1 Ảnh hưởng của hoạt tính đặc hiệu bromelain vỏ khóm đến quá trình thủy phân protein vỏ đầu tôm

Đạm amin được xác định trên cơ sở phản ứng của nhóm amin đầu mút với Ortho-phthalaldehyde. Bên cạnh đó, Ortho-phthalaldehyde cũng được ứng dụng trong phản ứng tạo vòng với ammonia (Kulla và Zuman, 2008). Kết quả phân tích (Hình 1) cho thấy trong giai đoạn đầu, đạm amin tăng lên rất nhanh ở nồng độ từ 0 đến 10 U.mg⁻¹ (đạm amin từ 2,911 ± 0,163 đến 4,381 ± 0,013 mgN/mL). Trong khi đó, ở nồng độ enzyme từ 15 đến 30 U.mg⁻¹ thì hàm lượng đạm

amin có xu hướng giảm dần từ 4,271 ± 0,031 mgN/mL đến 3,630 ± 0,029 mgN/mL. Thống kê số liệu cho thấy hàm lượng đạm amin ở hai nghiệm thức bổ sung 15 và 10 U.mg⁻¹ là cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung enzym. Tuy nhiên, giữa hai nghiệm thức có bổ sung 10 và 15 U.mg⁻¹ thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p < 0,05). Điều này cho thấy khi nồng độ enzym bromelain tăng lên thì vận tốc phản ứng thủy phân cũng tăng theo và đạt vận tốc cực đại ở nghiệm thức 10 U.mg⁻¹ và duy trì tốc độ phản ứng cực đại ở nghiệm thức 15 U.mg⁻¹.



Hình 1: Ảnh hưởng của hoạt tính đặc hiệu bromelain đến hàm lượng đạm trong dịch thủy phân

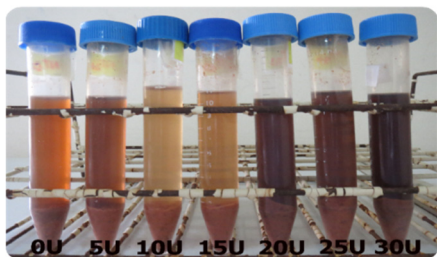
CV_{đạm ammoniac} = 1,76%; CV_{đạm amin} = 2,33%.

Các giá trị có cùng ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) và là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại

Khi nồng độ enzym thấp thì hàm lượng đạm amin thấp là do lượng cơ chất cao đã kìm hãm hoạt động của enzym hoặc enzym có thể liên kết với nhiều cơ chất tạo thành phức hợp enzym - cơ chất không hoạt động (Phan Thị Trân Châu và Nguyễn Thị Ánh, 2000). Khi tăng nồng độ enzym đến một

giá trị thích hợp sẽ xúc tác quá trình thủy phân protein đầu tôm diễn ra mạnh nhất, sản phẩm sinh ra đạt cực đại. Nhưng khi nồng độ enzym quá cao, sản phẩm sinh ra có xu hướng giảm dần là do sự bão hòa cơ chất làm cho sản phẩm sinh ra không tăng tuyến tính theo nồng độ enzym.

Kết quả phân tích (Hình 1) cũng cho thấy hàm lượng ammoniac sinh ra ở nghiệm thức bổ sung 15 U.mg⁻¹ bromelain (0,396 ± 0,008) cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức bổ sung 10 U.mg⁻¹ bromelain (0,35 ± 0,000). Điều này là do nghiệm thức bổ sung 15 U.mg⁻¹ bromelain có nồng độ đường cao sẽ tạo ra nhiều sản phẩm melanoidin, và kết quả kèm theo là hàm lượng NH₃ tăng lên nhiều hơn so với nghiệm thức chỉ bổ sung 10 U.mg⁻¹ bromelain.



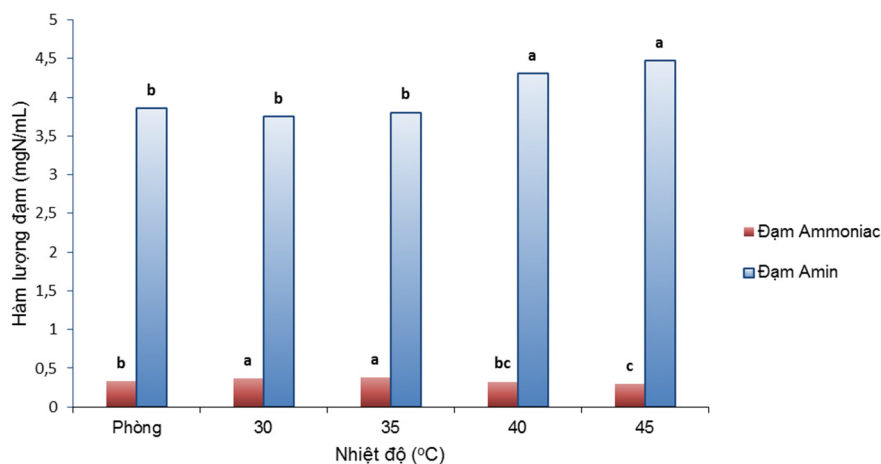
Hình 2: Ảnh hưởng của nồng độ bromelain đến màu sắc của dịch thủy phân

Kết quả quan sát màu của các nghiệm thức (Hình 2) cho thấy màu sắc của dịch thủy phân giữa các nồng độ bromelain có sự thay đổi rõ rệt. Cụ thể, ở nồng độ bromelain 0 U.mg⁻¹, khi không có sự hiện diện của dịch trích bromelain từ vỏ khóm nhưng dịch thủy phân vẫn có màu đỏ - nâu. Nguyên nhân là do enzym phenoloxidase (PO) hoặc polyphenoloxidase (PPO) có trong đầu tôm phản ứng với các axit amin tự do làm sản phẩm sinh ra có sắc tố màu nâu (Whitaker, 1995; Montero *et al.*, 2001) hoặc có sự hiện diện của anion phosphate trong dung dịch đệm phosphate của quá trình thủy phân làm tăng sắc tố nâu trong phản ứng Maillard

(Bell, 1997a). Song song đó, sự tương tác giữa nhiệt độ với vỏ đầu tôm dễ dàng hình thành sắc tố màu đỏ do sự biến tính của carotenoprotein dẫn đến phóng thích nhóm prosthetic (Teruhisa, 1972). Bên cạnh đó, hợp chất malanoidin còn được biết là có hoạt tính chống oxy hóa và chất chống ung thư nhờ khả năng loại bỏ những gốc oxy tự do (Aeschbacher, 1990).

3.1.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân protein vỏ đầu tôm

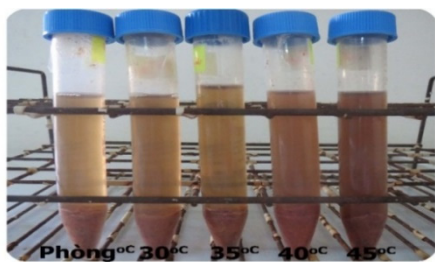
Kết quả (Hình 3) cho thấy hàm lượng đạm amin giảm nhẹ từ nhiệt độ phòng, trung bình khoảng 32 ± 2°C (nhiệt độ được theo dõi ở 3 mốc thời gian 7 giờ 30, 11 giờ và 17 giờ tại phòng thí nghiệm trong lúc bố trí thí nghiệm) đến 35°C (từ 3,854 ± 0,096 mgN/mL đến 3,804 ± 0,022 mgN/mL) nhưng sự khác biệt ở 3 nghiệm thức này không có ý nghĩa thống kê. Nhưng khi tăng nhiệt độ lên 40 và 45°C thì quá trình thủy phân tăng lên và hàm lượng đạm amin đạt cực đại lần lượt là 4,305 ± 0,170 mgN/mL và 4,472 ± 0,216 mgN/mL. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Điều này có thể giải thích rằng khi tăng nhiệt độ đến một giá trị thích hợp thì động năng của enzym và cơ chất tăng, sự chuyển động và va chạm diễn ra nhiều hơn dẫn đến các phân tử chuyển động nhanh hơn (Reece *et al.*, 2011), do đó phản ứng xảy ra nhanh hơn. Nhưng khi tăng nhiệt độ quá cao có thể sẽ phá vỡ các liên kết trong phân tử enzym, làm biến đổi tâm hoạt động dẫn đến enzym không kết hợp được với cơ chất (Phạm Thu Cúc, 1999) làm cho hoạt động của enzym không hiệu quả. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Mohapatra *et al.* (2013), ghi nhận hoạt tính của bromelain vỏ khóm ở nhiệt độ 45°C là cao nhất.



Hình 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng đạm trong dịch thủy phân

$CV_{đạm\ ammoniac} = 4,97\%$; $CV_{đạm\ amin} = 4,15\%$.

Các giá trị có cùng ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) và là kết quả của trung bình 3 lần lặp lại

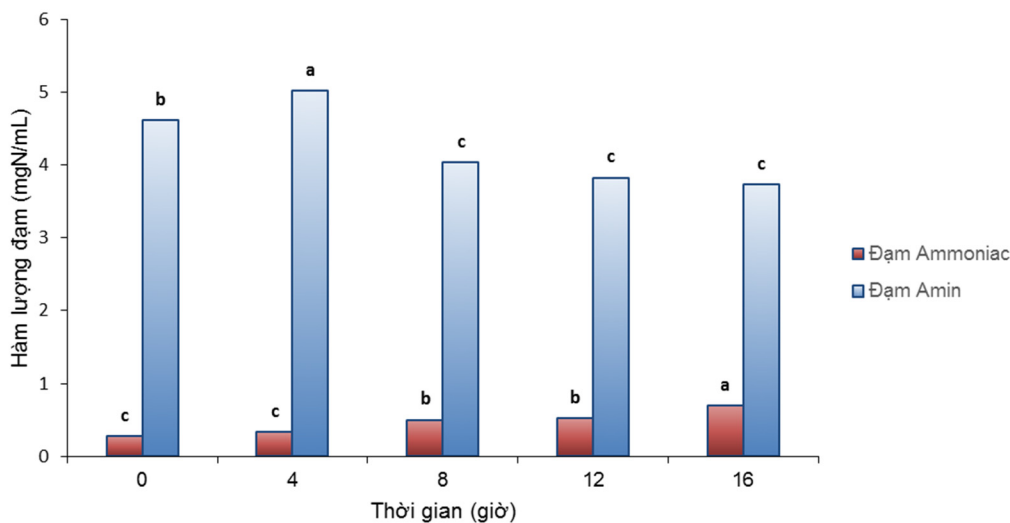


Hình 4: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến màu sắc của dịch thủy phân

Khi nhiệt độ của phản ứng tăng từ nhiệt độ phòng đến 35°C thì màu sắc của dịch thủy phân chủ yếu là màu nâu nhạt. Nhưng khi nhiệt độ tăng lên đến 40°C và 45°C thì lúc này có sự xuất hiện màu nâu sậm (Hình 4). Khi nhiệt độ càng cao thì tốc độ phản ứng giữa đường khử và các nhóm axit amin càng tăng (Martins, 2003; Billaud *et al.*, 2004), đồng nghĩa là sản phẩm sinh ra làm tăng mạnh sắc tố nâu. Mặt khác, Simpson *et al.* (1987) đã báo cáo rằng hoạt động của phenoloxidase ở tôm thẻ chân trắng (*Penaeus setiferus*) đạt cực đại ở nhiệt độ 45°C và giảm xuống khi tăng nhiệt độ lên 50°C. Điều này đồng nghĩa là tại nhiệt độ 45°C thì sản phẩm màu nâu cuối cùng là sự kết hợp màu của phản ứng Mailard và phản ứng oxy hóa phenol của enzym phenoloxidase.

3.1.3 Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình thủy phân protein vỏ đầu tôm

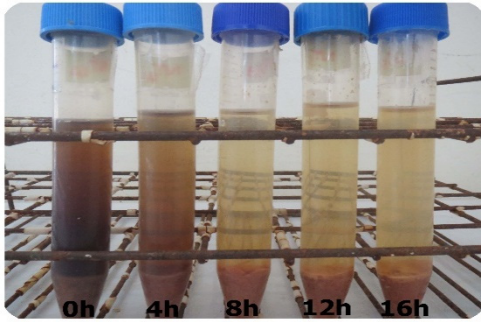
Kết quả (Hình 5) cho thấy, hàm lượng đạm amin thu được sau quá trình thủy phân, tăng lên từ 0 đến 4 giờ (từ $4,612 \pm 0,175$ mgN/mL đến $5,021 \pm 0,060$ mgN/mL), sau đó giảm dần từ 4 đến 16 giờ (từ $5,021 \pm 0,060$ mgN/mL đến $3,728 \pm 0,101$ mgN/mL). Trong khi đó, giá trị đạm ammoniac tăng lên qua các mốc thời gian từ 0 đến 16 giờ (từ $0,270 \pm 0,016$ mgN/mL đến $0,690 \pm 0,080$ mgN/mL). Theo Nguyễn Thành Đạt (1999), một số vi sinh vật ưa nhiệt vẫn có khả năng phát triển ở nhiệt độ 45°C và sử dụng nguồn axit amin tự do như nguồn chất dinh dưỡng trong quá trình amon hóa. Vì vậy, khi protein vỏ đầu tôm được ủ trong thời gian dài thì quá trình chuyển hóa axit amin thành ammoniac diễn ra càng mạnh. Bên cạnh đó, hàm lượng đạm amin giữa hai nghiệm thức 0 giờ và 4 giờ ù là khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại. Điều này được giải thích là do bản thân trong mẫu cơ chất đầu tôm ban đầu luôn có sẵn một hàm lượng đạm amin cùng với quá trình tự thủy phân protein bởi enzym nội tại trong đầu tôm hoạt động khi mẫu cơ chất bị lưu một khoảng thời gian bên ngoài điều kiện nhiệt độ phòng trước khi enzym được bổ sung vào.



Hình 5: Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng đạm trong dịch thủy phân

$CV_{đạm\ ammoniac} = 8,92\%$; $CV_{đạm\ amin} = 5,26\%$

Các giá trị có cùng ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) và là kết quả của trung bình của 3 lần lặp lại



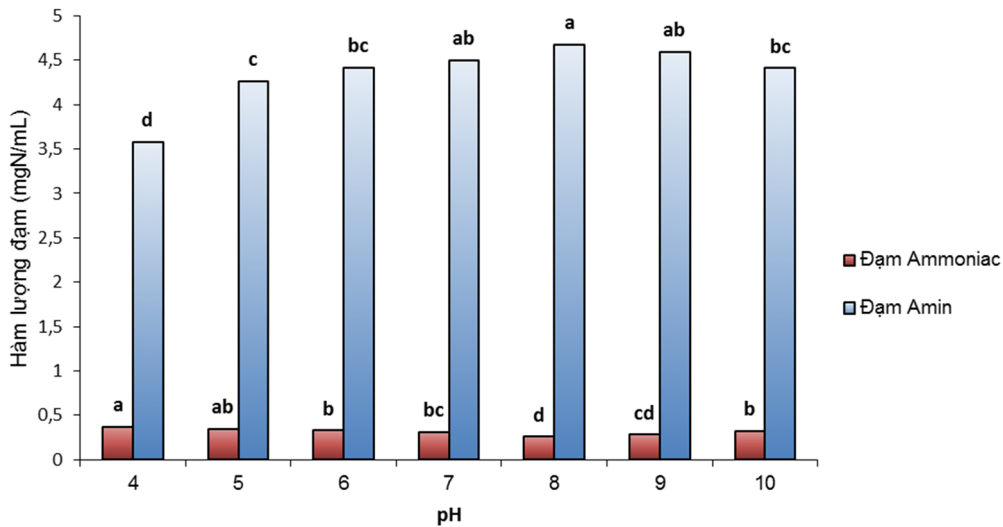
Hình 6: Ảnh hưởng của thời gian đến màu sắc dịch thủy phân vỏ đầu tôm

Bên cạnh sự ảnh hưởng của nồng độ, nhiệt độ đến màu sắc của dịch thủy phân protein vỏ đầu tôm thì thời gian cũng là một trong những nguyên nhân dẫn đến sự thay đổi màu sắc sản phẩm. Kết quả (Hình 6) cho thấy, thời gian ủ càng lâu thì cường độ màu sắc của dịch thủy phân protein càng giảm. Theo đó, dịch thủy phân từ màu nâu tại thời điểm 0 giờ và 4 giờ chuyển sang màu nâu rất nhạt tại thời điểm từ 8 đến 16 giờ. Theo Nguyễn Lâm Dũng và Bùi Thị Việt Hà (2009), kéo dài thời gian thủy phân càng lâu trong môi trường thuận lợi cũng chính là điều kiện để cho vi sinh vật tăng mật số và dễ dàng tiết nhiều protease chuyển hóa axit amin thành ammoniac. Điều này đồng nghĩa thời gian ủ

càng lâu thì cường độ màu sắc dịch thủy phân có xu hướng chuyển sang màu nâu nhạt dần đồng thời hàm lượng ammoniac tăng lên lần lượt tương ứng với kết quả của từng nghiệm thức là $0,270 \pm 0,016$; $0,331 \pm 0,035$; $0,499 \pm 0,016$; $0,518 \pm 0,014$ và $0,690 \pm 0,080$ mgN/mL. Bên cạnh đó, Godfrey và Reichelt (1983) cũng cho rằng khi enzym bromelain phản ứng ở nhiệt độ tối đa là 50°C và thời gian thủy phân được chấp nhận cho các sản phẩm công nghiệp là ít hơn 4 giờ.

3.1.4 Ảnh hưởng của pH đến quá trình thủy phân protein vỏ đầu tôm

Kết quả cho thấy hàm lượng đạm amin tăng lên từ môi trường có giá trị pH 4 ($3,583 \pm 0,198$ mgN/mL) và đạt cực đại ở môi trường pH 8 ($4,679 \pm 0,101$ mgN/mL), sau đó có sự giảm nhẹ ở điều kiện pH 9 ($4,593 \pm 0,101$ mgN/mL) và pH 10 ($4,412 \pm 0,046$ mgN/mL). Tuy nhiên, sự khác biệt giữa hai nghiệm thức pH 8 và pH 9 không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), nhưng có sự khác biệt về hàm lượng đạm amin giữa hai nghiệm thức pH 8 và pH 10 (Hình 7). Trong khi đó, hàm lượng đạm ammoniac sinh ra là thấp nhất ($0,256 \pm 0,029$ mgN/mL) ở điều kiện dung dịch đệm phosphate 0,1M, pH 8 và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại.



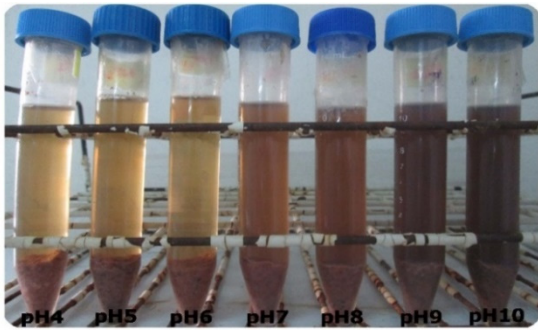
Hình 7: Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng đạm trong dịch thủy phân

$CV_{\text{đạm ammoniac}} = 6,04\%$; $CV_{\text{đạm amin}} = 2,93\%$.

Các giá trị có cùng ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) và là kết quả của trung bình 3 lần lặp lại

Khi thay đổi giá trị pH môi trường thủy phân thì trạng thái ion hóa của phức enzym - cơ chất bị ảnh hưởng dẫn đến việc thay đổi vận tốc phản ứng (Lê Thị Anh Thư, 2008). Nghiên cứu của Ketnawa *et al.* (2011a) cũng chứng minh rằng trong môi trường đệm phosphate pH 8 thì hoạt tính của

bromelain vỏ khóm đạt cực đại. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Liang *et al.* (1999) cho rằng khi bromelain tạo phức với polyphenol có trong trà thì khoảng pH thích hợp cho hoạt động của enzym đã thu hẹp lại trong khoảng từ 6,8 - 9,0 xuống còn 7,8.

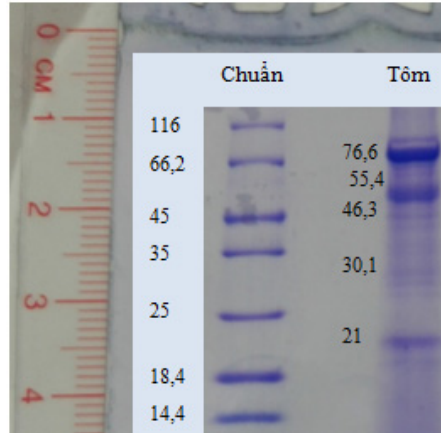


Hình 8: Ảnh hưởng của pH đến màu sắc của dịch thủy phân

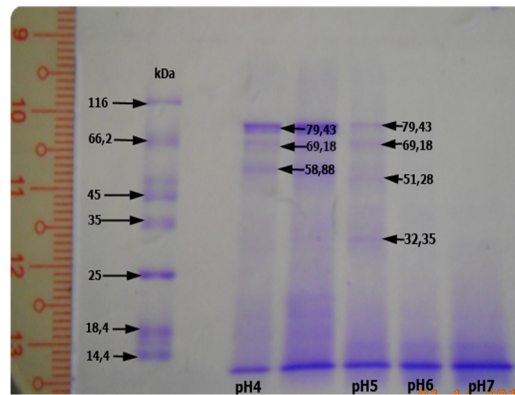
Nhìn chung, màu sắc của dịch thủy phân được tạo ra bởi kết quả của phản ứng Maillard từ phản ứng giữa đường khử và axit amin không chỉ bị ảnh hưởng bởi nồng độ đường (từ nồng độ enzym được sử dụng bổ sung), nhiệt độ và thời gian mà giá trị pH môi trường còn cho thấy màu sắc của dịch thủy phân cũng bị ảnh hưởng mạnh (Hình 8). Khi môi trường pH trong khoảng từ 4 đến 6 thì dịch thủy phân có màu nâu nhạt. Nhưng khi pH tăng từ 7 đến 10, lúc này dịch thủy phân chuyển dần sang màu nâu sẫm. Kết quả này phù hợp với nhận định của Shen và Wu (2004) cho rằng, khi môi trường pH thấp thì tốc độ phản ứng giữa đường khử và axit amin sẽ bị hạn chế và ngược lại, môi trường pH càng cao thì tốc độ của phản ứng Maillard càng tăng và sản phẩm tăng mạnh sắc tố nâu (melanoidins). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Ashoor và Zent (1984) cho rằng, sự nâu hóa tối đa của phản ứng Maillard ghi nhận được ở giá trị pH 10.

Kết quả điện di protein (Hình 9) cho thấy mẫu nguyên liệu đầu tôm có 3 loại polypeptides chủ yếu là 76,6 kDa, 55,4 kDa và 20 kDa. Ngoài ra, còn có những protein có khối lượng phân tử trung bình trong khoảng 46,3 đến 30,1 kDa và những protein có khối lượng phân tử nhỏ hơn 21 kDa. Từ kết quả điện di mẫu thủy phân (Hình 10 và 11) cho thấy, sản phẩm dịch thủy phân vỏ đầu tôm ở môi trường pH 4 vẫn còn xuất hiện những phân tử protein có trọng lượng phân tử cao từ 79,43 kDa đến 58,88 kDa (Hình 9), tương tự dịch thủy phân protein vỏ đầu tôm ở pH 5 xuất hiện 4 băng với khối lượng phân tử từ 79,43 kDa đến 32,35 kDa (Hình 10). Tuy nhiên, màu sắc của các băng protein của nghiệm thức pH 5 nhạt hơn so với pH 4. Điều đó cho thấy một phần protein đã bị phân cắt bởi enzym bromelain trong quá trình thủy phân protein vỏ đầu tôm ở pH 5. Bên cạnh đó, dịch thủy phân vỏ đầu tôm từ pH 6 đến 10 (Hình 10 và 11) hầu như còn rất ít các protein có khối lượng phân tử cao mà thay vào đó là các đoạn peptide có khối lượng phân tử dưới 14,4 kDa. Điều này chứng tỏ các phân tử

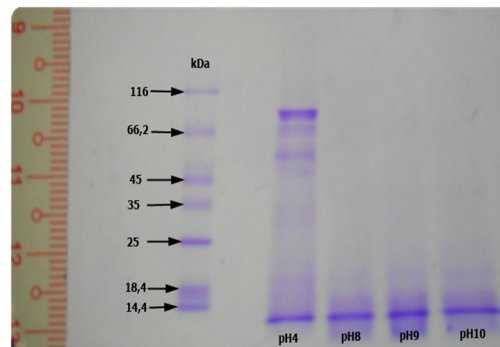
protein gần như được thủy phân thành các đoạn peptide có khối lượng phân tử thấp, cho thấy quá trình thủy phân vỏ đầu tôm bằng enzym bromelain đạt hiệu quả cao. Kết quả này cũng phù hợp với nhận định của Rao *et al.* (2000) và Bhaskar *et al.* (2007), cho rằng trong quá trình lên men chất thải vỏ đầu tôm, sự hòa tan protein tăng mạnh khi ở nồng độ pH cao. Khi nồng độ pH càng tăng thì quá trình phân cắt protein vỏ đầu tôm của enzym bromelain càng mạnh.



Hình 9: Điện di đồ dịch protein vỏ đầu tôm



Hình 10: Điện di đồ dịch thủy phân protein vỏ đầu tôm



Hình 11: Điện di đồ của dịch thủy phân protein vỏ đầu tôm

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Với 10 U.mg⁻¹ bromelain từ vỏ khóm đã thủy phân trên 2 gram cơ chất vỏ đầu tôm ở nhiệt độ 45°C bằng môi trường đệm phosphate pH 8 trong 4 giờ thì hàm lượng đạm amin sinh ra là 4,679 mgN/mL cùng với hàm lượng đạm ammoniac sinh ra thấp nhất (0,256 ± 0,029 mgN/mL). Kết quả phân tích điện di SDS - PAGE cũng cho thấy, protein của đầu tôm đã được thủy phân thành những sản phẩm, trong đó phần lớn có khối lượng phân tử nhỏ hơn 14,4 kDa.

Đề nghị tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của một số ion kim loại đến hoạt động của bromelain trong quá trình thủy phân protein đầu tôm.

LỜI CẢM Ạ

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến lãnh đạo Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử, các phòng ban chức năng và lãnh đạo Trường Đại học Cần Thơ đã hỗ trợ kinh phí để nhóm nghiên cứu có điều kiện thuận lợi triển khai đề tài đúng tiến độ; cũng như cán bộ phân biện đã góp ý cho bài báo được hoàn thiện hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aeschbacher, H.U., 1990. Anticarcinogenic effect of browning reaction products. In *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*, ed. Finot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrell, R.F., Liardon, R. Birkhäuser, Basel, pp. 335-348.

Ashoor, S.H., Zent, J.B., 1984. The Maillard browning of common amino acids and sugars. *Journal of Food Science*. 49: 1206-1207.

Barratt, A., Montano, R., 1986. Shrimp heads - a new source of protein. *Infish Marketing Digest*; 4(86): 21-22.

Bartholomew, D.P., Paull, R.E., Rohrbach, K.G., 2003. *The pineapple: botany, production and uses*. 1st ed. Wallingford - UK: CABI Publishing.

Bell, L.N., 1997a. Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration. *Food Chemistry*. 59: 143-147.

Billaud, C., Araschin, C.M., Nicolas, J., 2004. Inhibition of polyphenoloxidase from apple by Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with L - cysteine under various conditions of pH and temperature. *Lebensm - Wiss U - Technol*. 37: 69-78.

Brasileiro, O.L., Cavalheiro, J.M.O., Prado, J.P., de S., dos Anjos, A.G., Cavalheiro, T.T.B., 2012. Determination of the chemical composition and functional properties of shrimp waste protein concentrate and lyophilized flour. *Ciênc. agrotec. Lavras*. 36: 189-194.

Godfrey, T., Reichelt, J., 1983. *Industrial enzymology: The application of enzymes in industry*. Macmillan Publishers, Surrey (U.K.).

Goncalves, A.A., Ribeiro, J.L.D., 2009. Effects of phosphate treatment on quality of red shrimp (*Pleoticus muelleri*) processed with cryomechanical freezing. *LWT - Food Science and Technology*. 42: 1435-1438.

Gunalan, B., Tabitha, S., Soundarapandian, P., Anand, T., 2013. Nutritive value of cultured white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*. 5(7): 166-171.

Ketnawa, S., Chaiwit, P., Rawdkuen, S., 2011a. Aqueous Two - phase Extraction of Bromelain from Pineapple Peels (Phu Lae' cultiv.) and Its Biochemical Properties. *Food Science Biotechnology*. 20(5): 1219-1226.

Ketnawa, S., Rawdkuen, S., Chaiwit, P., 2010. Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar. *Biochemical Engineering Journal*. 52(2-3): 205-211.

Kulla, E. and Petr Zuman, 2008. Reactions of orthophthalaldehyde with ammonia and 2-aminoethanol. *Organic Biomolecular Chemistry*. 6: 3771-3780.

Lại Thị Ngọc Hà, 2009. Nghiên cứu tách và tạo chế phẩm bromelain từ phế phụ phẩm dứa. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 2: 203 - 211.

Lê Thị Anh Thư, 2008. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên hoạt tính xúc tác của enzym papin trong ứ. Luận văn tốt nghiệp đại học, Khoa Nông nghiệp & SHƯD, Trường Đại học Cần Thơ.

Liang, H.H., Huang, H.H., Kwok, K.C., 1999. Properties of tea - polyphenol complexed bromelain. *Food Research International Journal*. 32: 545-551.

Martins, S.I.F.S., 2003. Unravelling the Maillard reaction network by multiresponse kinetic modeling. Ph. D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands. pp. 1-170.

Mohapatra, A., Rao, M.V., Ranjan, M., 2013. Comparative study of increased production and characterization of Bromelain from the peel, pulp and stem pineapple (*Anannus commas*). *International Journal of Advancements in Research & Technology*. 2(8): 249-279.

Montero, P., Avolos, A., Perez - Matoes, M., 2001. Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Peneaus japonicas*). Alternative to inhibition: additives and high pressure treatment. *Food Chemical*. 75: 317-324.

Nguyễn Huỳnh Quang Diệu, 2013. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân protein đầu tôm thẻ (*Litopenaeus vannamei*). Luận văn tốt nghiệp đại học, Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ.

- Nguyễn Lâm Dũng và Bùi Thị Việt Hà, 2009. Sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Thành Đạt, 1999. Cơ sở sinh học vi sinh vật tập 1. Nhà Xuất Bản Giáo Dục.
- Peters, J., Wolf, A., Wolf, N., 2003. Recommended Method of Manure Analysis. University of Wiscinsin-Extension.
- Phạm Thị Trân Châu và Trần Thị Áng, 2000. Hóa sinh học. Nhà xuất bản Giáo dục Hà Nội, trang 110-140.
- Phạm Thu Cúc, 1999. Giáo Trình Sinh Hóa I. Tủ Sách Đại học Cần Thơ.
- Reece, Jane, B., Lisa, A., Urry, Michael, L., Cain, Steven, A., Wasserman, Peter, V., Minorsky, Robert, B., Jackson, 2011. Campbell Biology. 9th edition. Boston: Benjamin Cummings. 1465 pages.
- Salim, J., 2011. Bachelor thesis: Production of protein concentrate enzymatic hydrolysis of shrimp (*L. vannamei*) head. Department of Food Technology. Swiss German University.
- Shen, S.C., Wu, J.S.B., 2004. Maillard Browning in Ethanol Solution. Food Chemistry and Toxicology. 69: 273-279.
- Simpson, B.K., Marshall, M.R., Otwell, W.S., 1987. Phenol oxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): purification and some properties. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 35(6): 918-921.
- Teerasuntonwat, P., Raksakulthai, N., 1985. Production of Flavouring Agent from Shrimp Heads. Asean Food Journal. 2: 4.
- Teruhisa, K., Tadashi, K., 1972. The biosynthesis of astaxanthin. VI. The carotenoids in prawn, *Penaeus japonicus* bate (part II). International Journal of Biochemistry. 3(15): 363-368.
- Trần Thị Luyến, 2001. Báo cáo khoa học đề tài cấp bộ: “Nghiên cứu hoàn thiện quy trình sản xuất chitosan và chế biến một số sản phẩm công nghiệp từ phế liệu vỏ tôm, vỏ cua.
- Whitaker, J.R., 1995. Polyphenoloxidase. In Food Enzims, Structure and Mechanism. D.W.S. Wong ed. Marcel Dekker. New York. 571-582.
- Trương Đình Hòa, Nguyễn Hoài Nam, Lê Hằng, Nguyễn Thu Trang, 2014. Báo cáo xuất khẩu thủy sản Việt Nam quý I/2014. Vasep, 77 trang.