

# MỞ ĐẦU

## 1. Tính cấp thiết của đề tài nghiên cứu

Tôm sú là mặt hàng chế biến xuất khẩu chủ lực của ngành chế biến thủy sản Việt nam. Đồng thời với khối lượng lớn tôm xuất khẩu hàng năm thì phế liệu của nó là đầu và vỏ tôm cũng chiếm lượng rất lớn. Trong đầu tôm chứa một lượng lớn protein, chitin, chất màu astaxanthin và nhiều hợp chất sinh học khác, đặc biệt là hệ enzyme trong đầu tôm có hoạt độ khá cao.

Đề tài “ Nghiên cứu tách chiết và ứng dụng enzyme protease từ tôm sú *Penaeus monodon* vào chế biến thủy sản” được tiến hành với mong muốn kiểm tìm những hiểu biết đầy đủ về enzyme protease trong tôm nhằm đáp ứng các nhu cầu thông tin về mặt hàng nuôi trồng và chế biến chủ lực của ngành thủy sản đất nước, giúp chúng ta hiểu và lý giải được các biến đổi của tôm sau khi thu hoạch, trong quá trình chế biến cũng như bảo quản, từ đó đề ra những biện pháp hữu hiệu gìn giữ chất lượng tôm. Đề tài cũng hướng tới thu nhận protease từ nguồn phế liệu dồi dào này để ứng dụng trong thủy phân một vài đối tượng phế liệu chế biến thủy sản nhằm nâng cao hiệu quả tận dụng của các phế liệu thải ra và góp phần nhỏ bảo vệ môi trường.

## 2. Mục đích nghiên cứu của luận án

Mục đích chung của đề tài là nghiên cứu tách chiết protease từ tôm sú nuôi *Penaeus monodon* và tính chất của nó, nghiên cứu ứng dụng enzyme này trong thủy phân protein ở một vài phế liệu chế biến thủy sản (máu và gan cá basa *Pangasiadon hypophthanus*, phế liệu đầu vỏ tôm) để thu nhận các sản phẩm có giá trị kinh tế cao hơn.

## 3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Đề tài tập trung vào đối tượng nghiên cứu là tôm sú nuôi ở vùng biển Cần Giờ, thành phố Hồ Chí Minh. Phế liệu chế biến thủy sản được nghiên cứu tận dụng gồm hai nguồn: hỗn hợp máu và gan cá basa *Pangasiadon hypophthanus* nuôi ở Tiền giang; hỗn hợp phế liệu đầu và vỏ tôm sú thải ra từ qui trình sản xuất tôm sú đông lạnh xuất khẩu với nguồn tôm được nuôi ở Cần giờ.

#### **4. Phương pháp nghiên cứu**

Phương pháp nghiên cứu của đề tài là nghiên cứu thực nghiệm và xử lý số liệu dựa trên hỗ trợ của toán học và phần mềm *STATGRAPHIC Plus* để tối ưu hóa quá trình.

#### **5. Những đóng góp mới của luận án**

Kết quả nghiên cứu là dẫn liệu đầu tiên ở Việt nam về các thông tin khoa học của hệ protease trong đầu, gan tụy tôm sú nuôi thương phẩm ở Việt nam.

Đã tìm chọn được các thông số tối ưu cho quá trình tách chiết và tinh sạch enzyme protease từ đầu và gan tụy tôm sú có độ tinh khiết tăng lên lần lượt là 18,03 và 16,27 lần.

Xác định được protease tôm sú thuộc nhóm protease serine, thành phần bao gồm ít nhất năm loại protease (ở gan tụy tôm) và bảy loại (ở đầu tôm), trong đó ba loại có hoạt tính rất mạnh quyết định hầu như toàn bộ hoạt tính với phân tử lượng từ 20.200 đến 25.000Da.

Đã xác định các tính chất cơ bản và động học của protease tách chiết từ đầu và gan tụy tôm.

Kết quả nghiên cứu của luận án cũng còn là những dẫn liệu đầu tiên về việc sử dụng enzyme này cho việc thủy phân thu chế phẩm có giá trị carotenoprotein từ đầu, vỏ tôm và thủy phân hỗn hợp máu và gan cá basa, thu dịch thủy phân phục vụ cho sản xuất thức ăn chăn nuôi. Đã đưa ra các quy trình công nghệ với các thông số được tối ưu hóa để thực hiện thủy phân hai loại phế liệu của ngành chế biến thủy sản, đạt được những kết quả bước đầu, có thể hoàn thiện để áp dụng cho thực tế.

#### **6. Kết cấu của Luận án:**

Luận án gồm 163 trang nội dung, 50 trang phụ lục, 16 trang tài liệu tham khảo (172 tài liệu). Nội dung luận án gồm ba chương, trong đó có 70 hình ảnh và đồ thị, 17 bảng và 13 sơ đồ.

## CHƯƠNG 1

# **TỔNG QUAN VỀ PROTEASE TRONG TÔM VÀ CÁC LOÀI THỦY SẢN, CÁC ỨNG DỤNG CỦA CHÚNG**

### **1.1. Protease trong tôm và các loài thủy sản**

Protease của tôm cũng như của các loài động vật thủy sinh khác là các protease nội bào, nó tập trung nhiều nhất ở cơ quan tiêu hoá, gan tụy và sau đó đến cơ thịt. Đặc biệt ở tôm do đặc điểm hệ tiêu hoá gan tụy nằm ở phần đầu nên hệ enzyme sẽ tập trung nhiều nhất ở phần đầu sau đó đến các cơ quan khác. Protease ở tôm không có dạng pepsin, chủ yếu ở dạng trypsin hoặc protease serin tựa trypsin và có khả năng hoạt động rất cao. Ngoài ra, còn có enzyme chymotrypsin, astacine, collagenase...

Các ưu điểm vượt trội của enzyme từ động vật thủy sản khi ứng dụng vào sản xuất thực phẩm là chúng có thể cho hiệu quả tốt hơn so với phương pháp cơ học hay hóa học thông thường. Việc sử dụng các enzyme này cũng không đòi hỏi phải kiểm tra độ an toàn vì chúng được tách chiết từ các phần ăn được của nguyên liệu. Enzyme từ thủy sản thường thể hiện hoạt tính cao ở nhiệt độ thấp hoặc không cao lắm, vì vậy nhà sản xuất có thể thực hiện phản ứng ở nhiệt độ thấp, giúp tiết kiệm năng lượng, phản ứng này cũng dễ dàng ngừng lại khi nâng nhiệt độ lên không quá cao và nhờ đó giảm được nguy cơ hư hỏng do vi sinh vật.

### **1.2. Những ứng dụng của enzyme từ thủy sản vào mục đích thực phẩm**

Do bản chất sinh hóa khác nhau giữa các bộ phận hình thái học của động vật thủy sản, người ta có thể sử dụng enzyme để thực hiện quá trình phân giải một cách có định hướng vào những mục đích như loại da cá đuối, cá trích, các loại cá da trơn, cá ngừ đại dương, cá hồi, tách vỏ hào, hến, tôm, mực, nghêu... Phương pháp cho hiệu suất cao hơn nhiều lần so với thực hiện thủ công hay hóa học. Các protease cũng tỏ ra hữu dụng trong việc làm sạch vảy cá hay sản xuất cốt ngọc trai, bóc tách màng và cơ quan nội tạng thủy sản. Quy trình thu nhận chitin và protein từ phế liệu chế biến tôm có sử dụng protease giúp giảm thiểu lượng hóa chất sử dụng, đồng thời thu nhận chitin có tính chất bền vì ít

bị deacetyl hay thủy phân mạch polymer. Protease từ cá và một số loại thủy sản khác còn được sử dụng thay thế rennet trong sản xuất phomai cho kết quả rất tốt, đặc biệt khi ứng dụng trong sản xuất dịch cá (nước mắm) hay bột đậm cá thủy phân, thời gian thực hiện được rút ngắn đáng kể. Sử dụng enzyme protease trong chiết rút carotenoprotein từ phế liệu của quá trình chế biến các loài giáp xác là một hướng nghiên cứu đang rất được chú ý hiện nay vì giúp nâng cao lợi nhuận sản xuất nhờ tạo ra sản phẩm giá trị gia tăng và giảm thiểu ô nhiễm môi trường. Các carotenoprotein, thường được sử dụng như chất bổ sung cho sản xuất thức ăn chăn nuôi hoặc chất tạo màu trong công nghệ thực phẩm, có tính chất bền vững và dễ bảo quản hơn nhiều so với carotenoid riêng lẻ. Carotenoprotein từ đầu, vỏ tôm hiện đang rất được quan tâm để sử dụng làm thực phẩm chức năng cho người vì thành phần carotenoid chủ yếu là astaxanthin, một hợp chất chống oxy hóa thiên nhiên với các lợi ích kỳ diệu cho sức khỏe đang được phát hiện và khẳng định.

### **1.3. Các nghiên cứu trong nước về protease từ động vật thủy sản và ứng dụng của chúng**

Ở Việt nam, các nghiên cứu về hệ protease từ động vật thủy sản được thực hiện chủ yếu trên đối tượng tôm biển, các loại cá như thu, ngừ và mực ống. Các ứng dụng của protease tập trung vào việc tận dụng enzyme protease có sẵn trong nguyên liệu để chế biến nước mắm, mắm cá, mắm tôm chua... Các ứng dụng khác như thu nhận enzyme và dùng vào công nghệ chế biến mới chỉ dừng ở một số rất ít nghiên cứu với qui mô phòng thí nghiệm như dùng protease để tăng nhanh quá trình chế biến cá, sử dụng cho quá trình thủy phân protein thịt cá mới để sản xuất dịch đậm cá đậm đặc.

Nghiên cứu này hướng vào sử dụng phế liệu đầu tôm sú để tận thu chế phẩm enzyme protease và ứng dụng nó trong thủy phân hai đối tượng cũng là phế liệu chế biến thủy sản là hỗn hợp máu, gan cá basa và đầu, vỏ tôm. Các sản phẩm của nghiên cứu gồm dịch đậm thủy phân từ máu, gan cá, và bột carotenoprotein sẽ không chỉ phù hợp dùng làm thức ăn vật nuôi mà còn có thể là thực phẩm chức năng hữu dụng cho con người.

## CHƯƠNG 2

# NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Nguyên liệu để tách chiết và tinh sạch enzyme là đầu (bao gồm gan tụy) và gan tụy tôm sú *Penaeus monodon* được phân tách từ tôm sú sống, loại 40-50 con/kg được nuôi ở Cần Giờ.

Mẫu đầu tôm sú để thu nhận CPE và ứng dụng vào thủy phân được phân tách tại công ty Cổ Phần Thủy Sản Số 1, đóng gói và bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$  trước khi sử dụng. Phế liệu đầu, vỏ tôm ứng dụng vào thủy phân cũng được thu nhận và bảo quản tương tự.

Mẫu máu và gan cá basa *Pangasiadon hypophthanus* được phân tách và đóng gói bảo quản đông lạnh tại công ty cổ phần thủy sản Hùng Vương, TP Mỹ Tho, Tỉnh Tiền Giang. Tiến trình lấy máu cá được thực hiện bằng cách cắt tiết cá và thả vào bồn chứa nước với tỉ lệ cá: nước là 5:1(v/w).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thu nhận protease tinh sạch:

Toàn bộ quá trình tách chiết enzyme được thực hiện ở  $0-4^{\circ}\text{C}$ . Hoạt tính protease và hàm lượng protein hòa tan của dịch chiết DC và chế phẩm enzyme CPE được xác định để lựa chọn thông số cho quá trình tách chiết CPE. Dung môi chiết thử nghiệm là nước cất, nước muối sinh lý, đệm phosphat và Tris-HCl pH7,5, tác nhân rửa nghiên cứu là ethanol, acetone và  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Quá trình tinh sạch sau đó được thực hiện bằng sắc ký lọc gel trên hệ thống sắc ký cột áp suất thấp Bio-Rad sử dụng Bio-Gel P-100, kích thước cột: 50cmx1,5 cm. Flow adaptor: 1,5 cm, tốc độ dòng 0,14 ml/phút, thể tích mẫu đem phân tích : 1ml, dung dịch đệm Tris-HCl pH 7,5. Hàm lượng protein trong mỗi phân đoạn enzyme sau tinh sạch (2ml) được đo tự động ở bước sóng 280 nm và ghi nhận trên sắc ký đồ nhờ phần mềm Data View. Hoạt độ protease của các phân đoạn được xác định bằng phương pháp Amano.

2.2.2. Nghiên cứu tính chất của protease tôm sú: Trọng lượng phân tử protease được xác định bằng điện di cơ chất Zymogram và Substrate Gel trên

điện di đứng Bio-Rad với gel gom 4%, gel phân tán 12% ở hiệu điện thế 110V, cường độ dòng điện 30A trong hai giờ. Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ muối ăn đến hoạt độ protease xác định bằng cách cho enzyme tác dụng với cơ chất casein ở các pH, nhiệt độ, nồng độ muối ăn quan tâm khi xác định hoạt độ. Độ bền nhiệt của protease: khảo sát bằng cách ủ enzyme ở nhiệt độ quan tâm 30 phút, sau đó đo hoạt tính còn lại bằng phương pháp Amano. Ảnh hưởng của một số ion kim loại đến hoạt độ protease nghiên cứu bằng cách bổ sung chất định thử với nồng độ 0,001M vào phản ứng xác định hoạt độ enzyme. Ảnh hưởng của một số chất ức chế đặc hiệu đến hoạt độ protease xác định bằng cách ủ chất định thử với cùng thể tích enzyme sao cho đảm bảo đúng nồng độ thích hợp cần thiết, giữ ở 25°C trong 15 phút, sau đó đo hoạt tính protease còn lại. Các thông số động học của protease xác định nhờ phương trình động học Hill trên cơ sở phân tích số liệu thu được về nồng độ và vận tốc phản ứng.

### **2.2.3. Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm enzyme CPE thu nhận từ đầu tôm sú vào thủy phân protein từ hỗn hợp máu và gan cá basa thu dịch đậm:**

Hỗn hợp máu và gan cá basa được bổ sung CPE để thực hiện thủy phân thu dịch đậm. Quá trình thủy phân hỗn hợp máu và gan cá basa tươi và đã gia nhiệt được so sánh để rút ra kết luận loại nào phù hợp hơn cho thủy phân thu dịch đậm. Nghiên cứu sau đó xác định ảnh hưởng của nồng độ CPE bổ sung, nhiệt độ và thời gian ủ đến hàm lượng peptid mạch ngắn và acid amin tạo thành trong dịch đậm thủy phân để đánh giá quá trình.

### **2.2.4. Tối ưu hóa quá trình thủy phân hỗn hợp máu và gan cá basa:**

Các số liệu về quá trình thủy phân ở phần trên được xem xét và phân tích để lựa chọn khoảng biến thiên thích hợp sử dụng cho tối ưu hóa, sau đó dùng phần mềm *STATGRAPHICS Plus* tìm phương trình hồi qui. Thông số tối ưu hóa của quá trình được suy ra từ những phân tích bề mặt đáp ứng thu được sao cho hàm lượng peptid mạch ngắn và acid amin đạt được cao nhất. Kết quả tối ưu sau đó được kiểm tra lại bằng thực nghiệm nhằm đảm bảo sự thống nhất

giữa lý thuyết tối ưu và thực tế trước khi rút ra kết luận cuối cùng về thông số tối ưu của quá trình thủy phân.

### **2.2.5. Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm enzyme CPE thu nhận từ đầu tôm sú vào thủy phân phế liệu đầu và vỏ tôm thu nhận carotenoprotein**

Hỗn hợp đầu, vỏ tôm được thủy phân bằng CPE trong môi trường Na<sub>2</sub>-EDTA sau đó lọc qua nhiều lớp vải thô để thu dịch, kết tủa đẳng điện với chitosan trợ lắng rồi ly tâm thu bột nhão, đông khô thu bột carotenoprotein thành phẩm. Nghiên cứu so sánh quá trình thủy phân đầu, vỏ tôm tươi và đã gia nhiệt chín để lựa chọn phương pháp xử lý sơ bộ thích hợp, sau đó thực hiện thủy phân với các nồng độ CPE bổ sung, nhiệt độ và thời gian khác nhau, đánh giá quá trình bằng hàm lượng protein hòa tan và carotenoid trong sản phẩm bột carotenoprotein.

### **2.2.6. Tối ưu hóa quá trình thủy phân hỗn hợp đầu, vỏ tôm:**

Thực hiện tương tự phần 2.2.4 với trợ giúp của phần mềm *STATGRAPHIC Plus* trên hai hàm mục tiêu là hàm lượng protein và carotenoid trong sản phẩm bột carotenoprotein, trong đó hàm ưu tiên là hàm lượng carotenoid vì đây chính là thành phần tạo nên giá trị kinh tế vượt trội của sản phẩm.

## **2.3. Các phương pháp phân tích đã áp dụng:**

Hoạt độ protease xác định theo phương pháp Amano dùng casein từ sữa làm cơ chất. Hàm lượng protein hòa tan xác định theo phương pháp Bradford dùng albumine huyết thanh bò làm chất chuẩn. Hàm lượng carotenoid xác định bằng phương pháp Tolasa. Hàm lượng peptid mạch ngắn và acid amin xác định bằng so màu theo Amano. Hàm lượng nitơ tổng số xác định bằng phương pháp Kjeldahl, nitơ amoniac bằng chưng cất, nitơ formon bằng phương pháp Sorensen. Xác định hàm lượng chất béo bằng phương pháp Soxhlet, hàm lượng tro bằng phương pháp nung ở 600°C, độ ẩm bằng cách sấy đến khối lượng không đổi ở 105°C và hàm lượng chitin bằng phương pháp Chakrabati.

## **2.4. Phương pháp xử lý số liệu:**

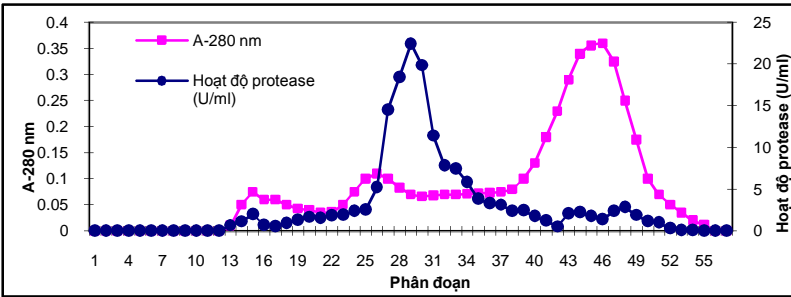
Số liệu thực nghiệm được xử lý theo phương pháp thống kê toán học dựa trên các phần mềm Excel và *STATGRAPHIC Plus*.

### CHƯƠNG 3

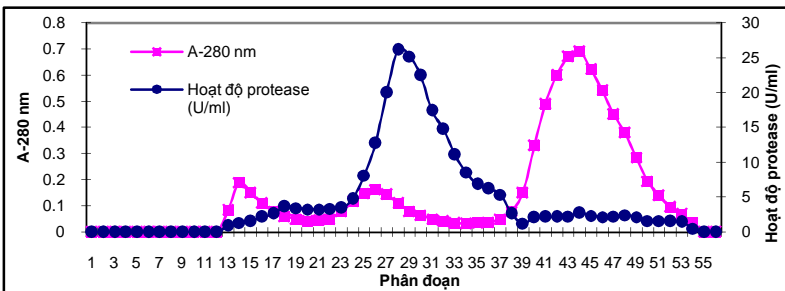
## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Thu nhận protease tinh sạch:

Chế phẩm enzyme CPE protease từ đầu (hoặc gan tụy) tôm sú có thể thu nhận được qua các bước cơ bản: chiết rút enzyme từ nguyên liệu đã nghiền nhỏ bằng Tris-HCl 0,05M pH7,5 với tỉ lệ 1:3 (w/v), thời gian chiết 40 phút (đối với đầu tôm) và 60 phút (đối với gan tụy). Dịch chiết DC thu được bằng cách cho qua rây có lỗ với kích thước 1mm\*1mm để loại lượng lớn vỏ tôm, sau đó ly tâm 6000 vòng/ph, 15 phút, loại cặn đem làm thức ăn gia súc. Kết tủa DC bằng ethanol với nồng độ 80%, 50 phút để điều chế CPE từ đầu tôm hoặc bằng  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  70%, 70 phút để thu CPE từ gan tụy tôm. Công đoạn ly tâm thu CPE cũng được thực hiện ở 6000 vòng/ph trong 15 phút.



Hình 1. Sắc ký đồ lọc gel chế phẩm protease tủa bằng ethanol từ đầu tôm



Hình 2. Sắc ký đồ lọc gel chế phẩm protease tủa bằng  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  từ gan tụy tôm

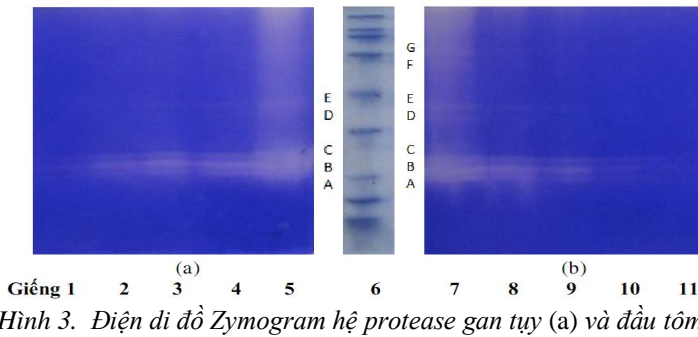


Chế phẩm enzyme CPE thu từ quá trình tách chiết protease từ đầu và gan tụy tôm sú được đem tách trên sắc ký lọc gel Bio-Gel P-100. Độ sạch của protease sau sắc ký tăng lên 16,27 lần đối với mẫu từ gan tụy và 18,03 lần đối với mẫu từ đầu tôm.

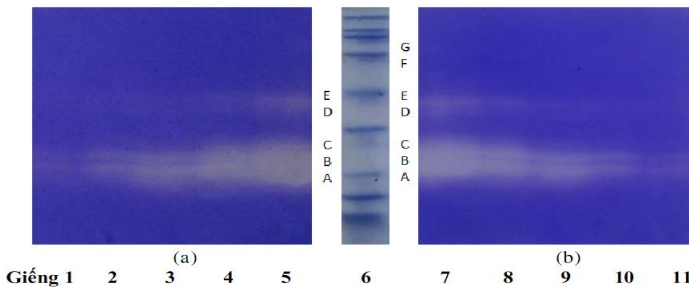
### 3.2. Tính chất của protease tôm sú

#### 3.2.1. Trọng lượng phân tử của protease gan tụy và đầu tôm

Trọng lượng phân tử của protease tôm sú được xác định bằng phương pháp điện di Zymogram và Substrate-Gel Electrophoresis. Phân tích các bản kết quả điện di cho biết, hệ protease ở gan tụy và đầu tôm sú *P. monodon* đều bao gồm ba protease chủ yếu A, B, C với phân tử lượng lần lượt là 20.200, 22.000, 25.000 Da và hai protease ít hoạt tính hơn là D, E (phân tử lượng theo thứ tự là 35.300, 40.200 Da). Riêng đầu tôm còn có thêm hai protease nữa với hoạt tính rất bé là F và G (với trọng lượng phân tử 49.200 và 76.000 Da).



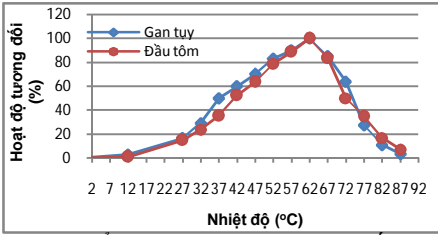
Hình 3. Điện di đồ Zymogram hệ protease gan tụy (a) và đầu tôm sú (b)



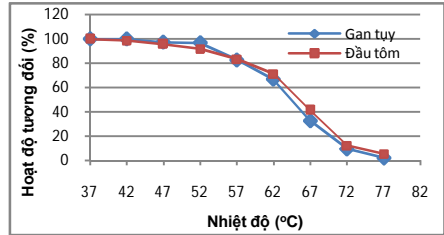
Hình 4. Điện di đồ Substrate-Gel hệ protease gan tụy (a) và đầu tôm sú (b)

- **Chú thích hình 3, 4:** Độ pha loãng protease sau tinh sạch đưa vào giếng 1, 11:5 lần, giếng 2, 10: 25 lần, giếng 3, 9: 50 lần, giếng 4, 8: 100 lần, giếng 5, 7: 500 lần, giếng 6: thang protein chuẩn

### 3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ protease tôm sú sau tinh sạch và độ bền nhiệt của nó



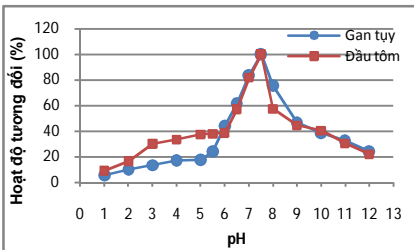
Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ tương đối của protease gan tụy và đầu tôm



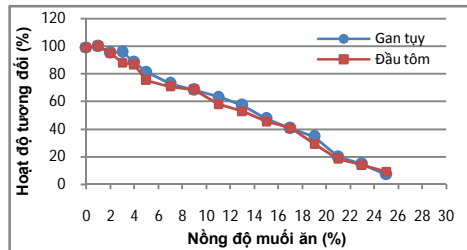
Hình 6. Độ bền nhiệt của protease gan tụy và đầu tôm ở các nhiệt độ khác nhau

Kết quả thực nghiệm cho thấy protease trong gan tụy và đầu tôm hoạt động tốt trong khoảng 52-67°C với nhiệt độ tối ưu là 62°C. Chúng cũng có độ bền nhiệt rất tốt so với các loại thủy sản khác đã được nghiên cứu. Chúng giữ hoạt tính tốt ở khoảng nhiệt độ khá cao 37-57°C, thậm chí khi tăng lên thành 62°C thì enzyme này vẫn còn hoạt động tốt. Đây thật sự là lợi thế đáng kể khi áp dụng vào thủy phân protein và chế biến thực phẩm nói chung để điều khiển phản ứng thuận lợi nhất, bởi vì hầu hết các vi sinh vật gây thối không phát triển tốt ở khoảng nhiệt độ cao mà ở đó protease tôm sú vẫn hoạt động tốt 37-57°C, thậm chí 62°C.

### 3.2.3. Ảnh hưởng của pH và nồng độ muối ăn đến hoạt độ protease tôm sú



Hình 7. Ảnh hưởng của pH đến độ hoạt động của protease thu nhận từ gan tụy và đầu tôm sú



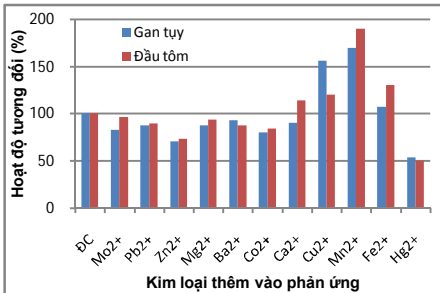
Hình 8. Ảnh hưởng của nồng độ muối ăn đến độ hoạt động của protease từ gan tụy và đầu tôm

Kết quả nghiên cứu cho thấy protease từ gan tụy và đầu tôm đều thể hiện hoạt tính rất yếu ở vùng axit pH từ 1 đến 5, tăng nhanh ở pH 6 trở lên, đạt cực

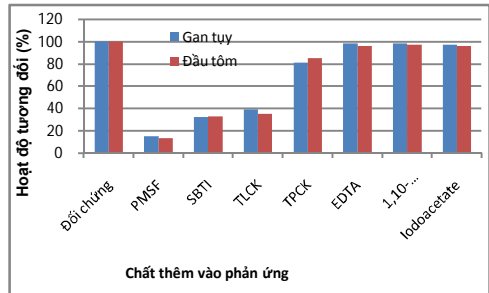
đạt tại pH 7,5 rồi giảm nhanh khi pH tăng trong vùng kiềm. Hai hệ protease này tỏ ra rất nhạy cảm với pH trong môi trường gần trung tính đến kiềm pH 6-9, việc tăng hoặc giảm nhẹ pH từ giá trị tối ưu có tác dụng làm hoạt tính protease giảm đáng kể, điều này sẽ là lưu ý cần ghi nhớ khi ứng dụng enzyme này vào quá trình thủy phân protein để tạo ra điều kiện thuận lợi nhất và đạt kết quả mong muốn nhất.

Kết quả thực nghiệm cũng cho thấy, nồng độ muối ăn ảnh hưởng lớn đến hoạt tính protease của tôm. Nồng độ muối 0-1% cho kết quả hoạt tính protease tôm đạt cực đại. Hoạt tính này giảm khá đều khi nồng độ muối tiếp tục tăng lên. Protease của gan tụy và đầu tôm chịu muối tốt hơn nhiều so với các protease từ thực vật và động vật như protease nội tạng cá và gan mực.

### 3.2.4 Ảnh hưởng của một số kim loại và chất ức chế đến hoạt độ protease tôm sú sau tinh sạch



Hình 9. Ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt độ protease tôm sú



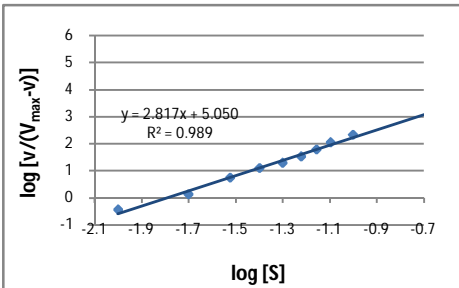
Hình 10 Ảnh hưởng của một số chất kìm hãm đến hoạt độ của protease tôm sú

Các ion kim loại  $\text{Mo}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  hầu như không gây ảnh hưởng đến hoạt độ protease.  $\text{Hg}^{2+}$  thì lại có tác dụng ức chế protease đáng kể, sau đó là  $\text{Zn}^{2+}$ . Các kim loại có tác dụng hoạt hóa protease là  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  và  $\text{Fe}^{2+}$ , trong đó đáng kể nhất là  $\text{Mn}^{2+}$ , kế tiếp là  $\text{Cu}^{2+}$ , sau nữa là  $\text{Fe}^{2+}$ .

Hoạt tính protease tôm sú bị giảm mạnh (chỉ còn 13-15%) khi có mặt PMSF, chất ức chế đặc hiệu của nhóm protease serin, là bằng chứng cho biết protease tôm sú là thành viên của nhóm này. Đây là điều được khẳng định lại qua kết quả xác định hoạt độ khi thêm SBTI vào phản ứng, hoạt độ còn lại lần

lượng là 32 và 33% đối với gan tụy và đầu tôm. SBTI là chất ức chế các protease serin, nó kìm hãm trypsin, ít nhạy hơn một chút với chymotrypsin. Khi có mặt TLCK (chất ức chế trypsin), hoạt độ protease còn lại chỉ đạt con số 39 và 35% ở gan tụy và đầu tôm, như vậy, các protease chủ yếu trong tôm sú thuộc về loại enzyme tựa trypsin. Ngoài ra, trong tôm sú còn các enzyme tựa chymotrypsin vì TPCCK có tác dụng giảm nhẹ hoạt tính protease, hoạt tính còn lại khoảng 80%. EDTA (chất kìm hãm các metalloprotease), 1, 10-phenanthroline (đặc hiệu cao đối với kẽm trong trung tâm hoạt động của metalloprotease) và iodoacetic acid hầu như không ảnh hưởng đến hoạt tính protease, cho thấy rằng, trong gan tụy và đầu tôm sú có lẽ không có metalloprotease (như collagenase chẳng hạn) hoặc tồn tại nhưng với hoạt tính rất thấp.

### 3.2.5. Động học của protease gan tụy tôm sau tinh sạch



Hình 11 Đồ thị Hill

Phương trình động học của protease:

$$\log \left( \frac{v}{V_{max}-v} \right) = 2,8174 \log [S] + 5,0508 \quad (3.1)$$

hệ số Hill  $h = 2,8174$

$$K' = 8,9 \times 10^{-6}$$

Giá trị hệ số Hill  $h$  và hằng số  $K'$  cho phép suy ra, ái lực giữa protease tôm sú với cơ chất có thể coi là rất tốt, và hợp tác tương hỗ giữa các trung tâm hoạt động của enzyme này là dạng tích cực, sự gắn kết của một cơ chất vào trung tâm hoạt động này sẽ thúc đẩy, tạo điều kiện thuận lợi cho cơ chất gắn vào trung tâm hoạt động khác.

### 3.3. Nghiên cứu quá trình thủy phân hỗn hợp máu và gan cá basa bằng chế phẩm enzyme protease tách chiết từ đầu tôm sú

Hỗn hợp máu và gan cá basa được thủy phân bằng chế phẩm enzyme protease tôm sú với các thông số ban đầu như sau:

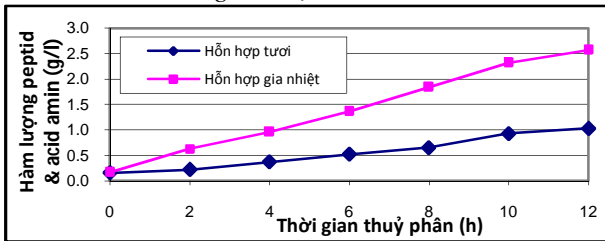
Tỉ lệ máu và gan cá: 80% máu và 20% gan cá

pH hỗn hợp thủy phân: 7, điều chỉnh lúc bắt đầu thủy phân bằng cách dùng acid axetic điều chỉnh

Lượng muối bổ sung: 1% (w/v)

Dịch thủy phân được khuấy trộn đều sau mỗi nửa giờ

### 3.3.1 So sánh quá trình thủy phân bằng CPE protease đầu tôm trên hỗn hợp máu và gan cá basa tươi và đã gia nhiệt



Hình 12 Biến động hàm lượng peptid và acid amin của quá trình thủy phân hỗn hợp máu và gan cá basa tươi và đã gia nhiệt

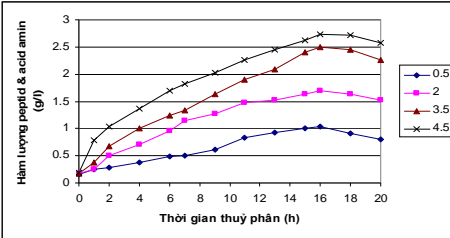
Theo thời gian thủy phân, hàm lượng peptid và acid amin cao hơn và tăng nhanh hơn ở mẫu hỗn hợp gia nhiệt. Cảm quan cho thấy sau 6 giờ, hỗn hợp máu và gan cá tươi bắt đầu có mùi hôi nồng khác với mùi tanh đặc trưng của máu, thời gian càng tăng mùi hôi càng nồng. Đối với hỗn hợp máu và gan cá đã qua gia nhiệt thì thời gian càng tăng mùi tanh càng giảm. Tại thời điểm 12 giờ, cảm quan được mùi tanh đã giảm nhiều.

Như vậy, dùng hỗn hợp máu và gan cá tươi cho thủy phân là không phù hợp để thu thành phẩm, trong phần tiếp theo, đề tài sử dụng hỗn hợp máu và gan cá đã qua gia nhiệt để thủy phân nhằm hạn chế được ảnh hưởng của các vi sinh vật gây phân hủy nguyên liệu, thu được HL peptid mạch ngắn và acid amin cao hơn, có chỉ tiêu cảm quan tốt hơn.

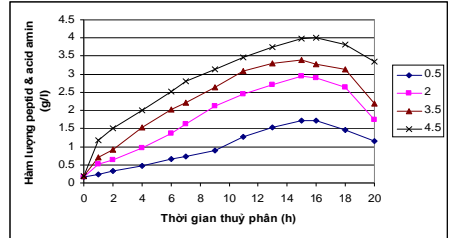
### 3.3.2 Ảnh hưởng của nồng độ CPE protease đến quá trình thủy phân hỗn hợp máu và gan cá basa gia nhiệt

Khi tăng nồng độ enzyme thì hàm lượng peptid và acid amin tạo thành cũng tăng. Nồng độ CPE sử dụng 0,5% dường như hơi thấp nên sản phẩm tạo

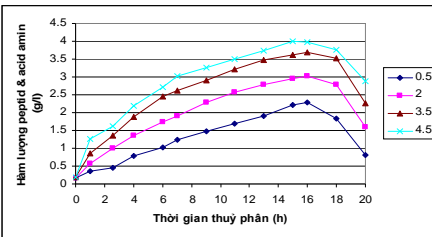
thành không nhiều, và khi nâng lên trên 2,5% thì lượng sản phẩm tăng, tuy nhiên ảnh hưởng của nồng độ đến lượng sản phẩm tạo thành không còn rất rõ rệt như trước. Việc tăng nồng độ enzyme và nhiệt độ đồng thời trong khoảng khảo sát sẽ có tác dụng tăng tốt hàm lượng peptid và acid amin tạo thành.



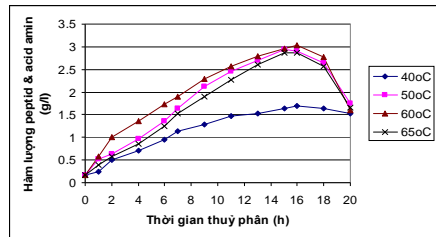
Hình 13 Ảnh hưởng của nồng độ CPE đến biến đổi hàm lượng peptid và acid amin trong dịch thủy phân ở 40°C



Hình 14 Ảnh hưởng của nồng độ CPE đến biến đổi hàm lượng peptid và acid amin trong dịch thủy phân ở 50°C



Hình 15 Ảnh hưởng của nồng độ CPE đến biến đổi hàm lượng peptid và acid amin trong dịch thủy phân ở 60°C



Hình 16 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến biến đổi hàm lượng peptid và acid amin trong dịch thủy phân khi nồng độ CPE bổ sung là 2%

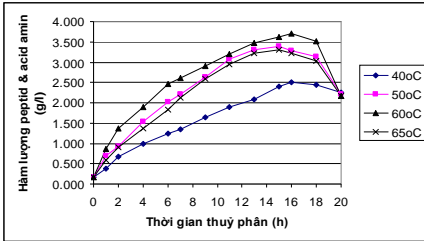
### 3.3.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ ủ tới quá trình thủy phân hỗn hợp máu và gan cá gia nhiệt

Nhiệt độ có ảnh hưởng đến quá trình thủy phân khá rõ, khi nhiệt độ tăng từ 40°C lên thành 50°C thì hàm lượng peptid và acid amin tạo thành tăng mạnh. Tuy nhiên khi nhiệt độ tiếp tục tăng từ 50°C thành 60°C thì hàm lượng peptid và acid amin lại tăng không đáng kể và giảm hẳn khi thủy phân ở nhiệt độ 65°C. Phân tích cảm quan mẫu thủy phân ở 40°C cho thấy, từ 8 giờ trở đi, dịch thủy phân có màu nâu sẫm, mùi hơi nặng hơn so với các mẫu ủ ở 50, 60, 65°C vào cùng thời điểm lấy mẫu và bắt đầu xuất hiện mùi hôi khó chịu sau 16

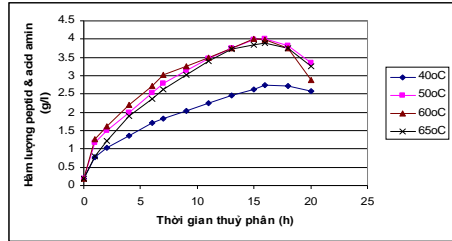
giờ thủy phân. Đối với các mẫu thủy phân ở nhiệt độ 50, 60, 65°C, vào thời điểm 18 giờ, dịch có màu nâu vàng, loãng hơn, mùi tanh giảm nhiều.

Như vậy, không nên áp dụng nhiệt độ thủy phân dưới 40°C, và việc tăng nhiệt độ lên trên 65°C cũng là điều không cần thiết.

### 3.3.4 Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình thủy phân hỗn hợp máu và gan cá gia nhiệt



Hình 17 Biến đổi hàm lượng peptid và acid amin trong dịch thủy phân theo thời gian ở nồng độ CPE bổ sung 3,5%



Hình 18 Biến đổi hàm lượng peptid và acid amin trong dịch thủy phân theo thời gian ở nồng độ CPE bổ sung 4,5%

Thời gian thủy phân càng dài, lượng peptid và acid amin tạo nên càng lớn, đạt cực đại, sau đó giảm dần. Sự giảm hàm lượng peptid và acid amin khi thủy phân kéo dài có lẽ do một lượng acid amin đã bị sử dụng để tạo thành các sản phẩm cấp thấp như  $\text{NH}_3$  hay các hợp chất dễ bay hơi, và cũng vì thế mà ở giai đoạn cuối, sản phẩm thủy phân bắt đầu có mùi nặng, ít hấp dẫn hơn.

## 3.4 Tối ưu hóa quá trình thủy phân hỗn hợp máu và gan cá basa bằng CPE từ đầu tôm sú

Dựa trên các phân tích số liệu của quá trình thủy phân ở trên, việc tối ưu hóa quá trình được xem xét trong khoảng biến thiên: Nhiệt độ: 40-65°C, nồng độ CPE sử dụng: 2-4,5% và thời gian thủy phân 9-20 giờ. Hàm mục tiêu của quá trình thủy phân là HL (hàm lượng peptid mạch ngắn và acid amin): HL → max. Quá trình thủy phân được dừng ngay khi có dấu hiệu của sự hư hỏng.

Phần mềm *STATGRAPHICS Plus* được sử dụng để xử lý số liệu. Với các biến độc lập là T, tg, C, T\*tg, T\*C, tg\*C, các phép phân tích hồi qui bậc một và hai đã được thực hiện. Kết quả hồi qui được đánh giá qua giá trị  $R^2$ , mức độ

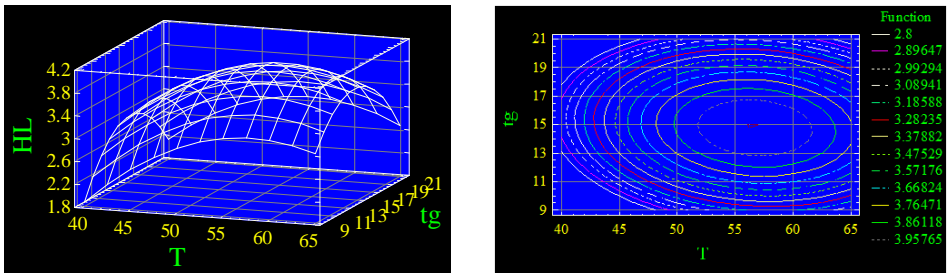
đáng tin cậy của phương trình hồi qui và của từng biến số thể hiện qua giá trị  $p$ -value. Phương trình được chấp nhận có dạng như sau:

$$HL = -17,0127 + 0,487788 T + 0,81786 tg + 0,0390555 C^2 - 0,00403577T^2 - 0,0255576 tg^2 + 0,0118836 Ctg - 0,00202781 Ttg \quad (3.2)$$

Trong đó:

$HL$	Hàm lượng peptid và acid amin tạo thành của quá trình thủy phân (g/l)
$T$	Nhiệt độ quá trình thủy phân ( $^{\circ}C$ )
$tg$	Thời gian thủy phân (giờ)
$C$	Nồng độ CPE sử dụng (%)

Phân tích các hệ số của phương trình hồi qui và mặt đáp ứng cho các thông số tối ưu của quá trình thủy phân: Nhiệt độ  $57^{\circ}C$ , thời gian 14,5 giờ. Để xác định nồng độ CPE cần sử dụng cho thủy phân, nghiên cứu đã thực hiện thêm một số thí nghiệm bằng cách áp dụng các nồng độ enzyme khác nhau cho thủy phân ở nhiệt độ và thời gian vừa tối ưu. Xét cả đến lợi ích về mặt kinh tế, nồng độ CPE tối ưu được chọn là 4%.



Hình 19 Bề mặt đáp ứng phương trình hồi qui HL ở nồng độ CPE 4% (T- Nhiệt độ ( $^{\circ}C$ ); tg - Thời gian (giờ))

Dịch thủy phân thu nhận được theo chế độ tối ưu hóa và sau lọc có màu nâu vàng, trong, không có bọt khí, thoảng mùi tanh nhẹ và mùi thơm của cá, vị ngọt nhạt, có hàm lượng nitơ tổng là 9,8g/l, nitơ acid amin là 3,4g/l và ammoniac 2,7g/l. Sản phẩm phù hợp cho ứng dụng trong sản xuất thức ăn gia súc hay thức ăn cho tôm, cá hoặc thay nước muối cho lợi qua bã chượp để làm nước mắm.



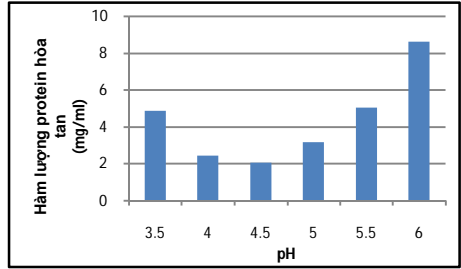
### 3.5. Nghiên cứu quá trình thủy phân thu nhận bột carotenoprotein từ đầu và vỏ tôm bằng chế phẩm enzyme protease tách chiết từ đầu tôm sú

Hỗn hợp đầu, vỏ tôm xay nhỏ 2-5 mm được thủy phân bằng chế phẩm enzyme protease tôm sú trong môi trường  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  với các thông số ban đầu: Tỷ lệ phế liệu: dung dịch  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  0,5M pH 7 là 1:3; lượng muối ăn bổ sung: 1% (w/v); dịch thủy phân được khuấy trộn đều sau mỗi nửa giờ.

Bảng 3.10 Thành phần cơ bản của phế liệu đầu, vỏ tôm *P. monodon*

Chỉ tiêu	Hàm lượng
Độ ẩm	76,96 ± 3,42 %
Protein*	34,28 ± 1,34 %
Chất béo*	4,88 ± 0,92 %
Tro*	22,37 ± 0,77 %
Chitin*	17,11 ± 0,28 %
Carotenoid*	133,56 ± 5,36 µg/g

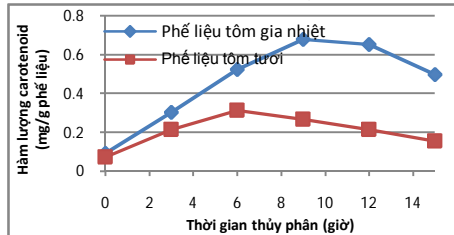
\*Hàm lượng tính trên nguyên liệu khô



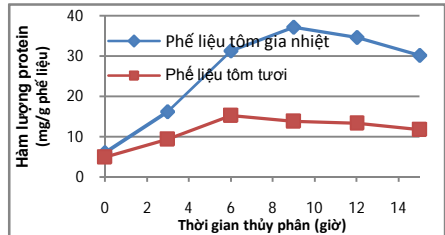
Hình 20. Độ hòa tan của protein ở dịch trong sau kết tủa thu carotenoprotein

Việc thu nhận carotenoprotein từ dịch thủy phân phế liệu đầu, vỏ tôm được thực hiện bằng cách kết tủa đẳng điện dịch lọc ở pH 4,5 (độ hòa tan protein của dịch thủy phân nhỏ nhất (hình 20) bằng dung dịch HCl 10% với chất trợ lắng chitosan 100ppm ở điều kiện lạnh 4°C trong 2 giờ.

#### 3.5.1. So sánh quá trình thủy phân bằng CPE protease đầu tôm trên phế liệu đầu và vỏ tôm tươi và đã gia nhiệt



Hình 21. Biến đổi hàm lượng carotenoid trong sản phẩm carotenoprotein thu nhận từ quá trình thủy phân phế liệu tôm tươi và đã gia nhiệt



Hình 22. Biến đổi hàm lượng protein hòa tan trong sản phẩm carotenoprotein thu nhận từ quá trình thủy phân phế liệu tôm tươi và đã gia nhiệt

Vỏ tôm đã gia nhiệt chín và phế liệu tôm tươi được đem thủy phân ở nhiệt độ 50°C, nồng độ CPE bổ sung 3,5%. Việc thủy phân phế liệu tôm đã gia

nhệt tỏ ra thuận lợi hơn nhiều, hàm lượng carotenoid và protein hòa tan đều cao gấp đôi, thậm chí hơn gấp đôi so với mẫu tươi đem thủy phân, bột carotenoprotein thu nhận từ thủy phân đầu vỏ tôm chín cũng có màu vàng cam sáng đẹp hơn nhiều so với màu nâu đen khi thủy phân nguyên liệu tươi. Vì vậy, trong nghiên cứu tiếp theo, đề tài sử dụng CPE protease để thủy phân phế liệu đầu vỏ tôm đã chín nhằm hạn chế ảnh hưởng của polyphenoloxydase, hạn chế hoạt động của các vi sinh vật gây thối, thu được sản phẩm carotenoprotein giàu carotenoid, giàu protein và có màu sắc, mùi tốt hơn.

### 3.5.2 Phân tích ảnh hưởng của nhiệt độ, thời gian thủy phân và nồng độ CPE sử dụng tới hàm lượng carotenoid và protein hòa tan của sản phẩm carotenoprotein

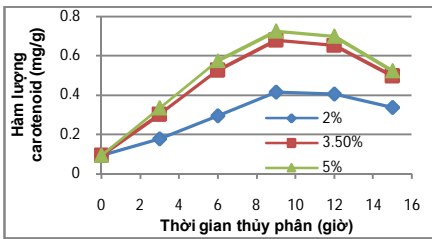
Quá trình thủy phân phế liệu đầu và vỏ tôm đã gia nhiệt chín để thu bột carotenoprotein được thực hiện với ba nồng độ CPE là 2; 3,5 và 5% ở các nhiệt độ 40, 50, 60 và 65°C theo thời gian.

Khi xem xét số liệu phân tích thống kê về hàm lượng carotenoid, qua giá trị của trung bình bình phương (*Mean square*), ta thấy ảnh hưởng của thời gian thủy phân lớn hơn ảnh hưởng của hàm lượng CPE sử dụng và nhiệt độ có vai trò thấp hơn cả. Khi xét về ảnh hưởng của các tương tác đôi thì thứ tự gây ảnh hưởng theo trình tự: nồng độ CPE-thời gian, nhiệt độ-thời gian và cuối cùng là nồng độ CPE-nhiệt độ. Điều này có hơi khác so với kết quả phân tích yếu tố ảnh hưởng hàm lượng protein hòa tan, theo đó thời gian thủy phân gây ảnh hưởng lớn nhất, sau đó đến nhiệt độ, và cuối cùng là hàm lượng CPE sử dụng, mức độ ảnh hưởng của các tương tác đôi đến hàm lượng protein hòa tan tuân theo thứ tự: nhiệt độ-thời gian, nồng độ CPE-thời gian và cuối cùng là nồng độ CPE-nhiệt độ. Tuy nhiên tất cả ảnh hưởng này đều có ý nghĩa thống kê, vì trị số *p* rất thấp ( $< 0,001$ ). *Multiple Range Test* cũng được thực hiện để so sánh sự khác biệt giữa các chế độ thủy phân khi thực hiện ở các khoảng hàm lượng CPE, nhiệt độ và thời gian khác nhau, kết quả phân tích cho thấy, mỗi biến đổi của từng yếu tố *C*, *T* hay *tg* đều ảnh hưởng có ý nghĩa và tạo nên sự khác biệt

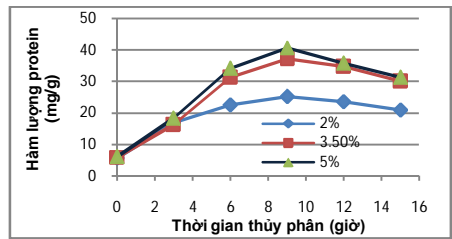
đáng kể đến hàm lượng carotenoid và protein hòa tan thu nhận được trong quá trình thủy phân.

- **Ảnh hưởng của nồng độ CPE sử dụng tới hàm lượng carotenoid và protein thu nhận từ quá trình thủy phân:**

Ở tất cả các nhiệt độ thủy phân, hàm lượng CPE sử dụng càng cao thì hàm lượng carotenoid thu nhận được cũng tăng tương ứng. Nồng độ CPE sử dụng 2% cho kết quả sản phẩm tạo thành không nhiều, và khi nâng lên 3,5% thì hàm lượng carotenoid và protein tăng lên rất đáng kể, việc tăng CPE sử dụng cho thủy phân sau đó thành 5% cũng có tác dụng tăng sản phẩm tạo thành nhưng hiệu quả đạt được không còn rõ rệt như trước.

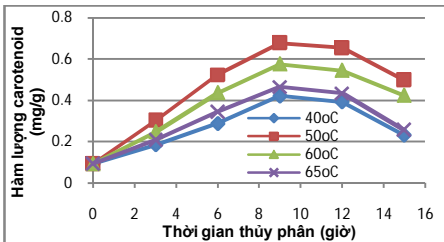


Hình 23. Ảnh hưởng của nồng độ CPE đến hàm lượng carotenoid thu nhận khi thủy phân phế liệu tôm ở 50°C

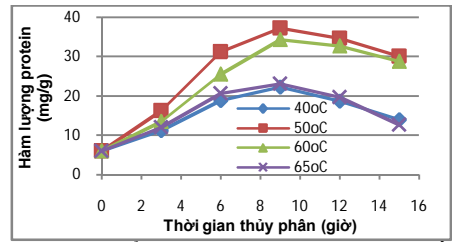


Hình 24. Ảnh hưởng của nồng độ CPE đến hàm lượng protein thu nhận khi thủy phân phế liệu tôm ở 50°C

- **Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hàm lượng carotenoid và protein thu nhận từ quá trình thủy phân:**



Hình 25. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng carotenoid thu nhận khi thủy phân phế liệu tôm với nồng độ CPE 3,5%



Hình 26. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng protein thu nhận khi thủy phân phế liệu tôm với nồng độ CPE 3,5%

Khi nhiệt độ thủy phân tăng lên, hàm lượng carotenoid và protein thu nhận cũng tăng rõ rệt. Để thấy rằng, giá trị hàm lượng carotenoid cực đại ở

cùng nồng độ CPE sử dụng luôn cao hơn khi nhiệt độ tăng từ 40° lên thành 50°C, sau đó giảm nhẹ xuống khi tiếp tục tăng thành 60° và giảm đáng kể ở nhiệt độ thủy phân 65°C.

- **Ảnh hưởng của thời gian thủy phân tới việc thu nhận carotenoid**

Thời gian thủy phân càng dài, lượng carotenoid và protein thu được càng lớn, đạt cực đại sau đó giảm dần. Các số liệu thực nghiệm cho phép dự đoán thời gian cần thiết là khoảng 9-10 giờ.

### **3.6 Tối ưu hóa quá trình thủy phân phế liệu đầu, vỏ tôm thu sản phẩm bột carotenoprotein**

Quá trình thủy phân nhằm tới mục tiêu là thu nhận tối đa lượng carotenoid  $CP \rightarrow max$  và protein hòa tan  $AP \rightarrow max$ , trong đó, chỉ số được chú trọng nhiều hơn là carotenoid-astaxanthin vì chính chất màu này đem lại hiệu quả kinh tế cao cho sản phẩm carotenoprotein.

Qua phân phân tích các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân đầu, vỏ tôm ở trên, suy ra khoảng khảo sát để tìm thông số tối ưu của quá trình thủy phân sẽ là: nhiệt độ thủy phân: 40-65°C, thời gian thủy phân: 6-15 giờ, nồng độ CPE sử dụng: 2-5%. Phần mềm *STATGRAPHIC Plus* được sử dụng để phân tích số liệu, đưa ra phương trình hồi qui cho hàm mục tiêu  $CP$ ,  $AP$ .

#### *3.6.1. Phương trình hồi qui của hàm lượng carotenoid CP và thông số tối ưu của quá trình thủy phân thu nhận carotenoprotein giàu carotenoid*

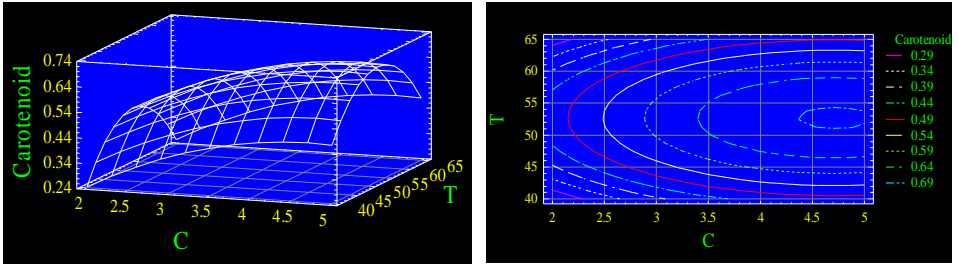
Theo các phân tích thống kê, phương trình hồi qui của hàm lượng carotenoid  $CP$  có dạng:

$$CP = -4,46088 + 0,290656 C + 0,144341 T + 0,130811 tg - 0,0307762 C^2 - 0,00136915 T^2 - 0,00643203 tg^2 \quad (3.3)$$

Trong đó:

$CP$	Hàm lượng carotenoid trong sản phẩm carotenoprotein của quá trình thủy phân (mg/g)
$T$	Nhiệt độ quá trình thủy phân (°C)
$tg$	Thời gian thủy phân (giờ)
$C$	Nồng độ CPE sử dụng (%)

Phân tích bề mặt đáp ứng của hàm  $CP$  ở các nồng độ CPE khác nhau 2; 3,5 và 5% đều cho kết quả hàm mục tiêu  $CP$  đạt tối đa khi nhiệt độ thủy phân là  $53^{\circ}\text{C}$  sau thời gian 10 giờ, từ đó suy ra nồng độ CPE tối ưu là 4,5%



Hình 27 Bề mặt đáp ứng hàm carotenoid  $CP$  sau 10 giờ thủy phân  
Carotenoid- Hàm lượng carotenoid (mg/g);  $T$ - Nhiệt độ ( $^{\circ}\text{C}$ );  $C$ - Nồng độ CPE (%)

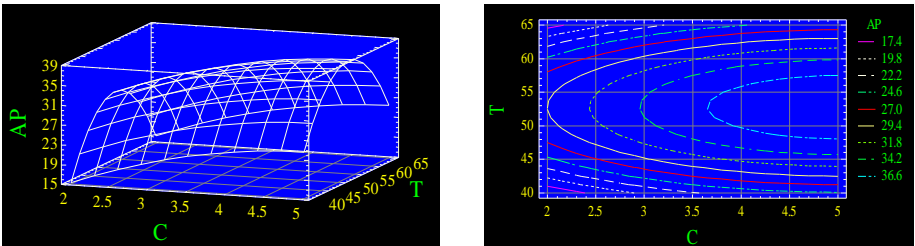
### 3.6.2 Phương trình hồi qui của hàm lượng protein $AP$ và thông số tối ưu của quá trình thủy phân thu nhận carotenoprotein giàu protein

Theo kết quả phân tích thống kê, phương trình hồi qui  $AP$  chấp nhận được có dạng:

$$AP = -250.373 + 9.81032 * C + 9.15861 * T + 4.60104 * tg - 0.966014 * C * C - 0.0867718 * T * T - 0.236527 * tg * tg \quad (3.4)$$

Trong đó:

- $AP$  Hàm lượng protein trong sản phẩm của quá trình thủy phân (mg/g)
- $T$  Nhiệt độ quá trình thủy phân ( $^{\circ}\text{C}$ )
- $tg$  Thời gian thủy phân (giờ)
- $C$  Nồng độ CPE sử dụng (%)



Hình 28 Bề mặt đáp ứng hàm protein  $AP$  sau khi thủy phân 9,5 giờ  
 $AP$ - Hàm lượng protein (mg/g);  $T$ - Nhiệt độ ( $^{\circ}\text{C}$ );  $C$ - Nồng độ CPE bổ sung (%)

Các bề mặt đáp ứng thể hiện phụ thuộc của hàm mục tiêu  $AP$  vào nhiệt độ  $T$  và thời gian  $tg$  ở các nồng độ CPE khác nhau 2; 3,5 và 5% đều cho kết

quả *AP* đạt tối đa khi nhiệt độ thủy phân là 53°C sau thời gian 9,5 giờ. Xét bề mặt đáp ứng *AP* sau 9,5 giờ, có thể dự đoán khi tăng *C* từ giá trị 3,5 đến 4% thì *AP* tăng nhưng không đáng kể, và khoảng tăng nồng độ *CPE* từ 4 lên 5% sẽ còn ít có tác dụng tăng *AP* hơn nữa. Nồng độ tối ưu  $C=4,5-5\%$  được chấp nhận một cách gần đúng.

### 3.6.3. Thông số tối ưu chung của quá trình thủy phân thu nhận carotenoprotein

Mục tiêu cần đạt của quá trình thủy phân là  $CP \rightarrow \max$  và  $AP \rightarrow \max$ , trong đó *CP* được ưu tiên vì chính hàm lượng carotenoid là thành phần quyết định giá trị kinh tế của bột carotenoprotein thành phẩm, do đó, nghiên cứu này chấp nhận các thông số tối ưu để đạt được *CP* lớn nhất, nghĩa là thủy phân đầu vỏ tôm ở **nhiệt độ 53°C, thời gian 10 giờ ở nồng độ CPE 4,5%**. Các thông số tối ưu này đã được áp dụng vào thủy phân để kiểm tra lại tính tương thích với thực tế. Sản phẩm carotenoprotein thu được có dạng bột màu vàng cam sáng đẹp, thơm mùi thịt tôm nấu chín, vị ngọt nhẹ dễ chịu, giàu đạm và acid amin, phù hợp cho sử dụng làm thức ăn cho vật nuôi hoặc thực phẩm chức năng cho người.

*Bảng 3.1 Thành phần hóa học cơ bản của bột carotenoprotein*

Thành phần	Hàm lượng
Protein thô	70,68 ± 0,36 %
Lipid	16,89 ± 0,23 %
Tro	6,37 ± 0,18 %
Chitin	3,25 ± 0,11 %
Carotenoid	0,7056 ± 0,0257 mg/g

*Bảng 3.2 Thành phần acid amin của bột carotenoprotein*

Thành phần	Hàm lượng (%)	Thành phần	Hàm lượng (%)
Alanin	0,95	Methionin	1,04
Glycine	2,12	4-hydroxyproline	0,77
Valine	1,26	Glutamine	3,51
Leucine	0,72	Phenylalanine	2,66
Isoleucine	1,71	Lysine	0,86
Threonine	0,39	Histidine	2,79
Serine	0,5	Tyrosine	3,38
Proline	1,13	Asparagine	1,40

## KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT Ý KIẾN

1. Đã xác lập được qui trình tách chiết chế phẩm enzyme CPE protease từ gan tụy và đầu tôm sú. Protease từ gan tụy và đầu tôm có thể tinh sạch bằng sắc ký lọc gel sử dụng Bio-Gel P-100. Độ sạch của protease sau sắc ký tăng lên 16,27 lần đối với gan tụy và 18,03 lần đối với đầu tôm.

2. Đã xác định được thành phần và tính chất của protease tôm sú như sau:

- Protease từ gan tụy và đầu tôm sú gồm ít nhất năm loại protease khác nhau với phân tử lượng từ 20.200 đến 40.200 Da, riêng đầu tôm còn có thêm hai protease với phân tử lượng là 49.200 và 76.000 Da. Ba protease chiếm vai trò hoạt động chủ đạo có phân tử lượng 20.200 đến 25.000 Da.
- Protease gan tụy và đầu tôm sú bền nhiệt, có nhiệt độ tối thích là 62°C, pH hoạt động tối ưu là 7,5 với nồng độ muối ăn NaCl thích hợp cho hoạt động là 1%. Hoạt độ của protease gan tụy và đầu tôm giảm khi có mặt của một số ion kim loại, đặc biệt là  $Hg^{2+}$ . Ion  $Mn^{2+}$  làm tăng hoạt tính của protease tôm sú.
- Protease gan tụy và đầu tôm thuộc nhóm protease serine, trong đó các enzyme tựa trypsin đóng vai trò chủ đạo hoạt động.
- Protease tôm sú có ái lực với cơ chất tốt, hợp tác tương hỗ giữa các trung tâm hoạt động của enzyme này là dạng tích cực, sự gắn kết một cơ chất vào trung tâm hoạt động sẽ thúc đẩy, tạo điều kiện thuận lợi cho cơ chất gắn kết vào trung tâm hoạt động khác.

3. Đã sử dụng chế phẩm enzyme CPE từ đầu tôm vào thủy phân hỗn hợp máu và gan cá basa thu dịch đậm có hàm lượng nitơ tổng là 9,8 g/l, nitơ acid amin là 3,4 g/l. Điều kiện thủy phân tối ưu như sau: Nhiệt độ: 57°C, thời gian 14,5 giờ, nồng độ CPE bổ sung: 4% so với hỗn hợp, nồng độ muối ăn bổ sung 1%, pH hỗn hợp lúc bắt đầu thủy phân là 7

4. Đã sử dụng CPE đầu tôm để thủy phân đầu, vỏ tôm và thu nhận bột carotenoprotein với hàm lượng carotenoid cao 0,706 mg/g; hàm lượng protein cao 70,68%, rất giàu acid amin (26,99%) phù hợp dùng cho vật nuôi và thực phẩm chức năng cho người. Thông số thủy phân tối ưu như sau: Nhiệt độ:

53°C, thời gian thủy phân 10 giờ, nồng độ CPE bổ sung: 4,5% so với nguyên liệu đầu, vỏ tôm; tỉ lệ phế liệu đầu, vỏ tôm so với dung dịch Na<sub>2</sub>-EDTA0,5M pH7 bổ sung vào để thủy phân: 1:3 (w/v), nồng độ muối ăn bổ sung 1%, pH lúc bắt đầu thủy phân: 7

### **Đề xuất cho các nghiên cứu tiếp theo**

1. Tiếp tục nghiên cứu ứng dụng sản xuất CPE từ đầu tôm ở qui mô lớn hơn để áp dụng vào sản xuất nhằm nâng cao giá trị sử dụng của đầu tôm
2. Sử dụng phụ phẩm của quá trình sản xuất CPE và bột carotenoprotein là vỏ tôm đã loại phần lớn protein làm đối tượng nghiên cứu để xác định qui trình sản xuất chitin thích hợp cho nó, nhằm có chế độ xử lý thích đáng ít hao phí hóa chất, mang lại lợi ích kinh tế và tác dụng bảo vệ môi trường.
3. Tiếp tục nghiên cứu các ứng dụng sản phẩm dịch thủy phân từ hỗn hợp máu và gan cá để áp dụng vào sản xuất, ví dụ, sử dụng làm thức ăn thay thế sữa cho vật nuôi, bổ sung vào thức ăn gia súc hoặc dùng nó thay cho nước muối để lộn qua bã chượp sau khi rút nước mắm cốt.
4. Thử nghiệm sử dụng một số chất phòng thối vào thủy phân dịch hỗn hợp máu và gan cá basa, hỗn hợp đầu, vỏ tôm nhằm tạo điều kiện thuận lợi để thu dịch đậm thủy phân với hàm lượng acid amin được nâng cao hơn.
5. Thử nghiệm thủy phân phế liệu đầu vỏ tôm trong các môi trường đệm khác như đệm citrate-phosphat hoặc ủ lên men phế liệu trước khi thủy phân bằng CPE protease đầu tôm nhằm ức chế sự thối rữa do vi sinh vật gây ra.
6. Thử nghiệm loại chất béo trước khi tiến hành thủy phân đối với cả hai đối tượng máu và gan cá basa thu dịch đậm thủy phân, phế liệu đầu, vỏ tôm sử dụng nhận bột carotenoprotein.
7. Khảo sát tác dụng trợ lắng của chitosan khi kết tủa thu bột nhão carotenoprotein với các nồng độ chitosan sử dụng khác nhau. Thử nghiệm thu bột nhão carotenoprotein với thời gian lắng lạnh khác nhau.
8. Thử nghiệm sử dụng các loại protease khác vào thủy phân đầu, vỏ tôm, so sánh hiệu quả với enzyme protease thu nhận từ tôm sú.