

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN PROTEIN NỘI TẠNG HẢI SÂM BẰNG PAPAIN

OPTIMIZATION OF PROTEIN HYDROLYSIS FROM SEA CUCUMBER INNARDS BY PAPAIN

Tạ Ngọc Ly^{1*}, Đặng Minh Nhật¹

¹Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng

*Tác giả liên hệ: tnly@dut.udn.vn

(Nhận bài: 15/10/2020; Chấp nhận đăng: 10/01/2021)

Tóm tắt - Nội tạng hải sâm, chiếm khoảng 40÷45% trọng lượng toàn bộ hải sâm, là phế phẩm chính của ngành chế biến hải sâm. Phế phẩm này chứa protein, chất béo và khoáng chất phong phú, tuy vậy chưa có nghiên cứu để chế biến thành các sản phẩm có ích. Nghiên cứu này nhằm tối ưu hóa quá trình thủy phân protein nội tạng hải sâm bằng Papain. Quá trình thủy phân được tối ưu hóa theo phương pháp bề mặt đáp ứng với 3 nhân tố pH (4÷8), nhiệt độ (30÷90°C) và nồng độ Papain (0,001÷0,1g/ml), đồng thời mức độ thủy phân protein theo thời gian cũng được xác định. Kết quả cho thấy hiệu suất thủy phân thu được cao nhất (47,8%) sau 3h thủy phân bằng papain nồng độ 0,061 g/ml ở nhiệt độ 62°C và pH= 8. Kết quả này là cơ sở để xây dựng quy trình công nghệ thủy phân nội tạng hải sâm bằng papain và cho các nghiên cứu trong tương lai về các ứng dụng tiềm năng của dịch thủy phân protein nội tạng hải sâm làm thực phẩm chức năng hoặc phân bón giàu đạm.

Từ khóa - Nội tạng hải sâm; papain; enzyme nội tại; đáp ứng bề mặt; thủy phân; tối ưu hóa

1. Đặt vấn đề

Hải sâm còn gọi là dưa biển, sâm biển, đĩa biển, thuộc lớp *Holothuroidea*, ngành *Echinodermata*, là động vật không xương sống ở biển được tìm thấy ở các khu vực đáy và biển sâu. Hải sâm là một trong những loài động vật biển quý chứa nhiều chất dinh dưỡng và dược tính quý, được sử dụng trong thực phẩm và y học dân gian châu Á [1, 2]. Về mặt dinh dưỡng hải sâm chứa các chất dinh dưỡng quý giá như vitamin A, B1, B2, B3, magiê, canxi, kẽm, sắt [3]. Theo y học cổ truyền, hải sâm được sử dụng như một loại thuốc truyền thống để điều trị hen suyễn, tăng huyết áp, thấp khớp, thiếu máu và tắc nghẽn xoang. Giá trị y học của hải sâm là do sự hiện diện của các hoạt chất sinh học như glycoside triterpene (saponin, sti-choposides, frondoside A, cucumariosides, Ds-echinoside A) [4, 5], fucoidan [6, 7], triterpenoid aglycones (phillinopgenin) [8, 9], sphingoid [10, 11], và chondroitin sulfat [12]. Các hoạt chất này với các đặc tính sinh học và dược lý học đầy hứa hẹn bao gồm hoạt tính gây độc tế bào, cảm ứng quá trình chết, dừng chu kỳ tế bào, ức chế sự phát triển của khối u, đặc tính chống di căn và chống tạo mạch, và ức chế kháng thuốc [17]... Ngoài ra, dịch chiết hải sâm được sử dụng có hiệu quả trong việc chữa lành các vết thương bên ngoài và bên trong, đặc biệt là sau khi phẫu thuật lâm sàng và chấn thương.

Nghề khai thác hải sâm đã mở rộng trên toàn thế giới về sản lượng và giá trị trong hai đến ba thập kỷ qua [13].

Abstract - Sea cucumber innards (SCI), accounting for about 40-45% of the total weight of sea cucumbers, are the main waste products of the sea cucumber processing industry. This product contains abundant protein, fat, and minerals, but there has been no research to process it into useful products. This study aims to optimize the hydrolytic condition of SCI protein by Papain. The hydrolysis process is optimized by the Surface Response Method with 3 factors of pH (4÷8), temperature (30÷90°C), and Papain concentration (0.001÷0.1 g/ml), and the level of amino acid releasing at different time points are also identified. The results showed that the highest hydrolytic efficiency (47.8%) after 3 hours of hydrolysis with Papain concentration of 0.061g/ml at 62°C and pH = 8. This result is useful for proposing the technical processing hydrolyzed SCI by Papain and future study about the application of SCI hydrolyzed to produce functional food or nitrogen-rich fertilizer.

Key words - Sea cucumber innards; papain; internal enzyme; hydrolysis; response surface method; optimization

Tuy nhiên, do sự khai thác quá mức, sản lượng và chất lượng hải sâm tự nhiên đang bị sụt giảm nghiêm trọng. Mức độ suy giảm nghề khai thác hải sâm lên đến 81%, kích thước cơ thể thu hoạch trung bình giảm 35%, người thu hoạch chuyển từ vùng ven bờ ra xa bờ là 51% và từ các loài có giá trị cao đến giá trị thấp là 76%. Với nhu cầu tăng cao nghề nuôi hải sâm có tiềm năng trở thành một ngành có lợi nhuận và góp phần bổ sung nguồn hải sâm tự nhiên.

Tại Việt Nam, hải sâm là một trong những nhóm nguồn lợi hải sản quan trọng, có mức độ phong phú về thành phần loài, trong đó có nhiều loài có giá trị thương mại cao. Hải sâm được khai thác và chế biến thành hải sâm khô, xuất khẩu sang các thị trường Trung Quốc, Hồng Kông, Nhật Bản, Singapore và Đài Loan. Ngoài việc đánh bắt tự nhiên, hiện nay, đã có một số vùng nuôi hải sâm để thu hoạch và chế biến xuất khẩu tại Khánh Hòa, Quảng Ninh.

Trong quá trình chế biến hải sâm, phần nội tạng hải sâm được loại bỏ, chỉ giữ lại phần thịt. Theo ước tính, phần nội tạng chiếm 40÷45% khối lượng của hải sâm. Phần nội tạng này chứa một lượng protein, chất béo,... khá lớn. Tuy nhiên, nội tạng hải sâm đang được xem là phế phẩm và bị vứt bỏ, gây lãng phí và ô nhiễm môi trường. Vì vậy, việc tận dụng nguồn phế phẩm này để chế biến thành sản phẩm có ích mang lại lợi ích kinh tế, sử dụng bền vững tài nguyên thiên nhiên và góp phần bảo vệ môi trường.

¹ The University of Danang - University of Science and Technology (Ta Ngọc Ly, Dang Minh Nhat)

Hiện tại, chưa có công nghệ nào chế biến phế phẩm nội tạng hải sâm. Với thành phần giàu protein thì việc thủy phân nội tạng hải sâm thu thành dịch đậm là một hướng xử lý phù hợp. Trong các phương án để thủy phân nguồn phế phẩm này, việc sử dụng enzyme thủy phân để thu được hàm lượng đậm amin cao, chất lượng tốt là phương pháp có tiềm năng nhờ tính đặc hiệu cao và thân thiện với môi trường của enzyme. Quá trình thủy phân bằng enzyme có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các enzyme phân giải protein đã có trong nội tạng của hải sâm (protease nội sinh) hoặc bởi các enzyme ngoại sinh. Quá trình tự phân bằng enzyme nội sinh rất khó kiểm soát. Nguyên nhân là do một số yếu tố bao gồm loài hải sâm, thời vụ, cũng như loại và lượng enzym. Ngoài ra, những thay đổi phụ thuộc vào tuổi tác có thể dẫn đến sự biến đổi của các enzyme nội sinh có trong hải sâm gây khó khăn cho việc sản xuất các sản phẩm thủy phân protein có cùng chất lượng và đặc tính. Phương pháp này cũng ảnh hưởng xấu đến các đặc tính chức năng, cảm quan của các chất thủy phân protein và có thể tạo ra các sản phẩm phụ độc hại. Các hạn chế của phương pháp tự phân có thể được khắc phục bằng phương pháp bổ sung enzyme ngoại sinh. Các enzyme thường được sử dụng là các protease phổ lớn như Alcalase, Neutrase, Protamex [14–16]. Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng protease ngoại sinh để thủy phân các phụ phẩm ngành chế biến thủy hải sản như đầu cá hồi [17], nội tạng và đầu cá mè [18], cá tuyết [19], và cá ngừ [20]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào sử dụng enzyme ngoại sinh để thủy phân nội tạng hải sâm. Nghiên cứu này nhằm mục đích tối ưu hóa điều kiện thủy phân nội tạng hải sâm bằng Papain để sản xuất dịch đậm thủy phân. Các điều kiện thủy phân tối ưu, cũng như ảnh hưởng của từng yếu tố nhiệt độ và pH được báo cáo.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Papain (Novaca), hoạt lực 2.245 UI/g. Nội tạng hải sâm được công ty TNHH Việt Trường cung cấp và được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.



Hình 1. Nội tạng Hải sâm

2.2. Phương pháp

2.2.1. Xác định điều kiện thủy phân nội tạng hải sâm

Nội tạng hải sâm rửa đông, bổ sung nước cất với tỷ lệ 1:1 (khối lượng/thể tích), xay nhuyễn cho đồng nhất. Hỗn hợp

nội tạng hải sâm đồng nhất được đưa vào bình tam giác và trộn với dung dịch đệm phosphate theo tỷ lệ 2:1 (w/v). Quá trình thủy phân được khảo sát với các mức nhiệt độ, thời gian, nồng độ enzyme khác nhau. Hoạt động của enzyme sau đó được kết thúc bằng cách sử dụng TCA. Hiệu quả của quá trình thủy phân được đánh giá bằng hiệu suất thủy phân với hàm lượng đậm được xác định bằng phương pháp ortho-phthalaldedyde (OPA).

Hàm lượng đậm amin được tính theo công thức:

$$M_N = C_s \frac{V_s}{1000} \frac{14}{m} 100 \text{ (mgN/g)}$$

Trong đó:

M_N : Hàm lượng đậm amin (mgN/g);

V_s : Thể tích dịch thủy phân;

m : Khối lượng mẫu (g);

C_s : Nồng độ mmol/ml N có trong mẫu được tính theo công thức

$$C_s = \frac{OD_s - OD_0}{0.0195 \times 181.19} \text{ (mmol/ml)}$$

OD_s : Độ hấp thụ ở bước sóng 340nm mẫu thật;

OD_0 : Độ hấp thụ ở bước sóng 340nm mẫu trắng;

0.0195: Là hệ số lấy từ đường chuẩn Tyrosine $y = 0.0195x - 0.0181$;

181.19: Khối lượng mol Tyrosine.

Hiệu suất thủy phân (DH) được xác định theo công thức:

$$DH\% = \frac{M_N}{M_N \text{ tổng số}} \times 100$$

Trong đó:

DH: Hiệu suất thủy phân (%);

M_N : Đạm amin trong dịch thủy phân (mgN/g);

$M_N \text{ tổng số}$: Đạm amin tổng số (hàm lượng nitơ tổng số mgN/g theo phương pháp Kjeldahl).

Quá trình thủy phân được thực hiện trong 6 giờ ở điều kiện tối ưu: pH 8 và nhiệt độ 62°C . Sau đó, các phần nhỏ của hỗn hợp thủy phân được thu thập cứ sau 60 phút và khử hoạt tính của enzyme bằng TCA. Hỗn hợp thủy phân sau đó được làm lạnh đến nhiệt độ phòng và ly tâm ở 10000 g trong 20 phút ở 4°C để thu phần nổi phía trên. Thời gian có % DH cao nhất được coi là thời gian tối ưu. Tất cả các thử nghiệm được thực hiện trong ba lần.

2.2.2. Tối ưu hóa quá trình thủy phân bằng qui hoạch thực nghiệm sử dụng phần mềm minitab

Xây dựng mô hình toán học và ma trận thí nghiệm

Quy hoạch trực giao cấp 2 với phương pháp đáp ứng bề mặt được sử dụng. Số lượng thí nghiệm cần thực hiện theo phương pháp đáp ứng bề mặt được tính theo công thức: $N = 2^k + 2k + n_0$. Trong đó, N là số thí nghiệm, k là số yếu tố ảnh hưởng và n_0 là số thí nghiệm ở nhân phương án. Nhóm tác giả sử dụng phương pháp Box-benken và phối hợp có tâm để xây dựng ma trận thí nghiệm qua phần mềm Minitab. Ma trận bố trí thí nghiệm tối ưu của quá trình thủy phân được thể hiện ở Bảng 1.

Mô hình toán học biểu diễn sự phụ thuộc của hiệu suất thủy phân và nhân tố mã hóa là một phương trình đa thức bậc hai có dạng:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + \dots + b_kX_k + \dots + b_{12}X_1X_2 + \dots + b_{11}X_1^2 + \dots + b_{kk}X_k^2$$

Trong đó:

Y: hiệu suất phản ứng thủy phân (%);

b_0 : hệ số hồi quy bậc 0;

X_k : nhân tố độc lập thứ k ảnh hưởng đến hàm mục tiêu;

b_k : hệ số hồi quy bậc 1 mô tả ảnh hưởng của nhân tố X_k đến Y.

Ý nghĩa của các hệ số được kiểm tra theo tiêu chuẩn Student với $p=0,05$, số bậc tự do $f=m-1$ (m: số lần lặp thí nghiệm). Kiểm tra sự tương thích của phương trình hồi quy với thực nghiệm theo kiểm định Fisher, đảm bảo $F < F_b$ (F_b tra theo bảng $f_b(p, f_1, f_2)$).

Trong đó: $p=0,05$, $f_1=m-1$ (m: số lần lặp thí nghiệm), $f_2=N-L$ (N: số thí nghiệm ở nhân phương án, L: số hệ số có nghĩa trong phương trình).

Bảng 1. Ma trận thí nghiệm theo mô hình Box-Behnken để xác định điều kiện tối ưu của enzyme papain

STT	Biến mã			Biến thực		
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
1	+1	-1	0	8	30	0,05
2	+1	0	-1	8	60	0,001
3	0	0	0	6	60	0,05
4	-1	-1	0	4	30	0,05
5	0	+1	-1	6	90	0,001
6	-1	+1	0	4	90	0,05
7	0	0	0	6	60	0,05
8	0	0	0	6	60	0,05
9	0	-1	-1	6	30	0,001
10	+1	0	+1	8	60	0,1
11	-1	0	-1	4	60	0,001
12	0	+1	+1	6	90	0,1
13	0	-1	+1	6	30	0,1
14	+1	+1	0	8	90	0,05
15	-1	0	+1	4	60	0,1

X_1 : pH, X_2 : nhiệt độ ($^{\circ}C$), X_3 : nồng độ enzyme (g/ml)

2.2.3. Phương pháp phân tích và đánh giá kết quả

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu được thu nhập và xử lý bằng phần mềm Excel, tối ưu điều kiện thủy phân của enzyme bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) sử dụng phần mềm Minitab.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Thành phần hóa học của nội tạng hải sâm

Thành phần hóa học của nội tạng hải sâm biểu thị bằng phần trăm trọng lượng được cho trong Bảng 2. Các giá trị lần lượt là $69,245 \pm 1$, $3,21 \pm 0,02$, $5,25 \pm 0,25$, $13 \pm 0,4$ và $3,65 \pm 0,24$ là độ ẩm, tro, pH, N tổng và lipid. Hàm lượng nitơ trong nội tạng hải sâm là thấp hơn so với các nguồn nguyên liệu khác như cá rô phi (28%) [21], cá tạp (72%, chất khô) [22]. Tuy nhiên, lượng nitơ này lại chiếm gần 50% so với tổng lượng chất khô có trong nội tạng hải sâm, vì vậy trong nghiên cứu này chúng tôi sẽ tập trung tìm

giải pháp thủy phân protein để thu hồi lượng nitơ này. Lượng lipid của nội tạng hải sâm thấp, không đáng kể nên sẽ được loại bỏ trong quá trình chế biến.

Bảng 2. Một số thành phần của nguyên liệu nội tạng hải sâm

Đại lượng	Tỉ lệ (%)
Độ ẩm	$69,245 \pm 1$
Tro	$3,21 \pm 0,02$
pH	$5,25 \pm 0,25$
N _{tổng}	$13 \pm 0,4$
Lipit	$3,65 \pm 0,24$

3.2. Tối ưu hóa quá trình thủy phân nội tạng hải sâm bằng Papain

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất thủy phân bao gồm nhiệt độ, pH, nồng độ enzyme, thời gian phản ứng... Để xác định được hiệu quả thủy phân cao nhất, phương pháp bề mặt đáp ứng thường được sử dụng. Bề mặt đáp ứng là một trong những công cụ hiệu quả nhất để tối ưu hóa trong điều kiện hàm mục tiêu ảnh hưởng bởi nhiều nhân tố và các nhân tố này tương tác với nhau. Ưu điểm chính của phương pháp này là giảm thiểu số thí nghiệm cần thực hiện để xác định điểm tối ưu. Bài toán tối ưu được lập dựa trên phương trình hồi quy xác định bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm là hàm mô tả sự phụ thuộc của hiệu suất thủy phân và các yếu tố pH, nhiệt độ và nồng độ enzyme. Điều kiện ràng buộc là giới hạn vùng nghiên cứu. Để xác định vùng nghiên cứu này, nhóm tác giả đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các đơn biến pH, nhiệt độ đến hiệu suất thủy phân. Từ kết quả khảo sát sơ bộ này, nhóm tác giả quyết định chọn vùng khảo sát pH trong khoảng 4-8, nhiệt độ từ 30- 90 $^{\circ}C$, nồng độ enzyme 0,001- 0,05 g/ml. Kết quả thực nghiệm tối ưu hóa với hàm mục tiêu là hiệu suất thủy phân được thể hiện ở Bảng 3 và giá trị phân tích vai trò của các biến được cho trong Bảng 4.

Bảng 3. Thực nghiệm khảo sát tối ưu hóa điều kiện thủy phân nội tạng hải sâm

STT	Biến khảo sát			DH (%)
	pH	T	CE	
				22,482
1	8	30	0,0505	23,050
2	8	60	0,001	21,881
3	6	60	0,0505	8,299
4	4	30	0,0505	11,752
5	6	90	0,001	12,326
6	4	90	0,0505	21,881
7	6	60	0,0505	21,881
8	6	60	0,0505	12,181
9	6	30	0,001	25,900
10	8	60	0,1	11,524
11	4	60	0,001	16,401
12	6	90	0,1	11,039
13	6	30	0,1	23,389
14	8	90	0,0505	12,180
15	4	60	0,1	22,482

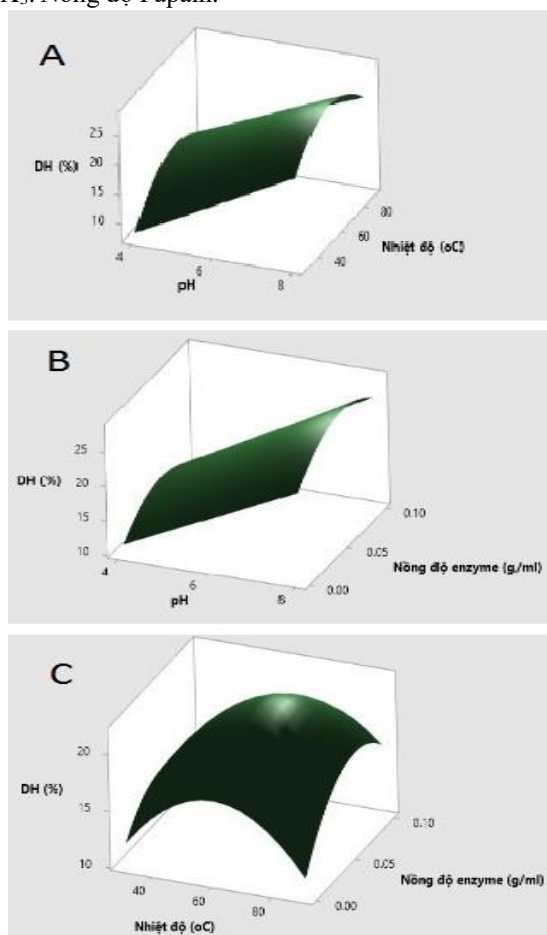
Bảng 4. Giá trị phân tích xác suất các biến

	Coef SE	Coef	T value	P value
pH	6,3	0,56	11,1	0,0000
Nhiệt độ (T)	1,25	0,56	2,2	0,079
Nồng độ Enzyme (C _E)	0,877	0,56	1,54	0,183
pH*pH	0,03	0,835	0,04	0,973
T*T	-5,288	0,835	-6,33	0,001
C _E *C _E	-3,74	0,835	-4,49	0,006
pH*T	-0,77	0,803	-0,97	0,377
pH*C _E	0,549	0,803	1,8	0,131

Kết quả phân tích cho thấy, yếu tố pH, cặp yếu tố nhiệt độ-nhiệt độ, nồng độ enzyme-nồng độ enzyme ảnh hưởng nhiều nhất tới hiệu suất thủy phân. Với $\alpha=0,05$, độ tin cậy bài toán 95%, mức ý nghĩa (P) phải có giá trị $P<0,05$ thì các hệ số b trong phương trình hồi quy mới có ý nghĩa, theo đó pH, cặp yếu tố nhiệt độ - nhiệt độ, nồng độ enzyme - nồng độ enzyme thỏa mãn điều kiện. Mô hình toán học mô tả mối quan hệ giữa hiệu suất thủy phân với các yếu tố ảnh hưởng như sau:

$$Y = -25,23 + 3,56X_1 + 0,775X_2 + 80,5X_3 + 0,008X_1^2 - 0,005876X_2^2 - 1530X_3^2 - 0,0130 X_1X_2 + 5,54X_1X_3 + 0,975X_2X_3$$

Với Y: Hiệu suất thủy phân (%); X₁: pH; X₂: Nhiệt độ và X₃: Nồng độ Papain.



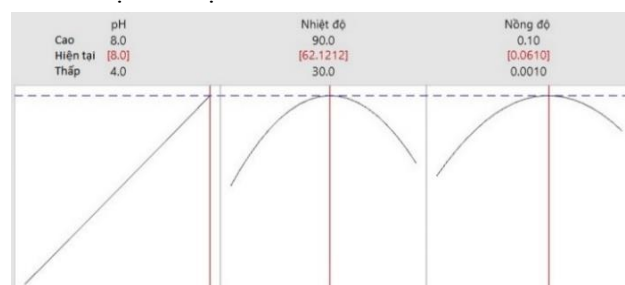
Hình 2. Đồ thị đáp ứng bề mặt thể hiện ảnh hưởng tương tác của các yếu tố khảo sát đến hiệu suất thủy phân. (A) Nhiệt độ và pH. (B) pH và nồng độ enzyme. (C) Nhiệt độ và nồng độ enzyme

Hệ số tương quan (R^2) của phương trình trên là 97,46% chứng tỏ phương trình hồi quy đã mô tả chính xác các số liệu thực nghiệm. Theo mô hình bài toán, ta có: $m=3$, $N=12$, $L=10$ tra bảng ta được giá trị $f_{b(0,05; 2; 2)}=19,2$, vậy $F_b=19,2$. Với các giá trị $F<19,2$ thì mới thỏa mãn để phương trình hồi quy phù hợp với thực nghiệm. Ảnh hưởng của các biến độc lập đến DH có thể được hình dung thông qua biểu đồ bề mặt (Hình 2).

Hình 2A cho thấy, ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến DH trong quá trình thủy phân của nội tạng hải sâm. Đặc biệt, DH đã tăng với sự gia tăng nhiệt độ và giá trị pH, DH đạt đến mức tối đa ở gần 60°C. Tuy nhiên, DH thể hiện một xu hướng giảm trên mức nhiệt độ tối ưu nguyên nhân có thể là do nhiệt độ cao dẫn đến việc Papain ngừng hoạt động hoàn toàn do bị biến tính. Theo nghiên cứu của Grzonka và cộng sự, nhiệt độ tối ưu cho Papain hoạt động trong khoảng 50-57°C [23]. Tuy nhiên, cũng có nghiên cứu cho thấy, Papain hoạt động ở nhiệt độ 65°C [24]. Kết quả của nhóm tác giả cho thấy, Papain hoạt động trong vùng 60°C phù hợp với các nghiên cứu trên. Hình 2B cho thấy, mức độ ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến hiệu quả thủy phân là tuyến tính, có nghĩa là khi tăng nồng độ enzyme thì hiệu suất cũng tăng. Trong 3 biến khảo sát, pH có ảnh hưởng lớn nhất đến DH. Các nghiên cứu về Papain cho biết Papain hoạt động trong dãy pH từ 5-8 [25] hoặc 5,8-7 [23]. Kết quả của nhóm tác giả cũng cho thấy, Papain hoạt động trong dãy pH trên, vượt quá giá trị pH 8, hiệu suất thủy phân giảm rõ rệt.

3.3. Kiểm tra điều kiện tối ưu của phản ứng thủy phân

Biểu đồ tối ưu hóa dự đoán ảnh hưởng của các biến đến hàm mục tiêu. Kết quả dự đoán được phần mềm minitab đưa ra được thể hiện ở Hình 3.



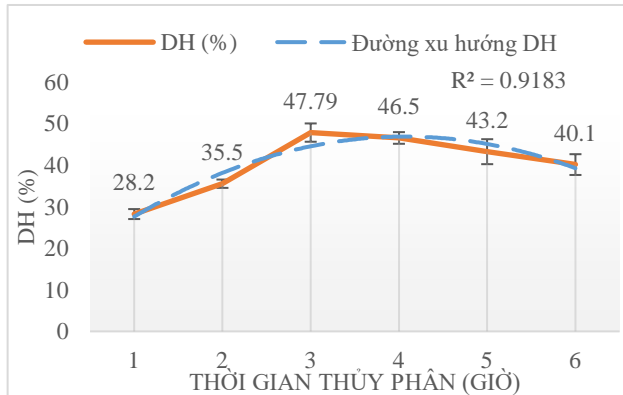
Hình 3. Dự đoán ảnh hưởng của các yếu tố đến hàm mục tiêu.

Các thiết lập biến hiện tại là pH 8, nhiệt độ 62,12°C, nồng độ Papain là 0,06 g/ml, tương đương 0,2% (w/w) thì giá trị DH dự đoán là 28,07. Tính phù hợp của phương trình mô hình để dự đoán giá trị tối ưu đã được kiểm tra bằng cách sử dụng điều kiện tối ưu như trên để tiến hành thí nghiệm kiểm chứng. Để xác nhận kết quả tính toán này, nhóm tác giả tiến hành thực nghiệm với các thông số nhiệt độ 62°C, pH=8 và Papain 0,06 g/ml. Kết quả khảo sát cho thấy hiệu suất thủy phân thực nghiệm tại điều kiện tối ưu là $27\pm 1\%$, tương đương với giá trị dự đoán, như vậy phương trình mô hình tối ưu hóa là phù hợp và tin cậy.

3.4. Xác định thời gian thủy phân tối ưu

Thời gian là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến quá trình thủy phân, thời gian quá ngắn thì sẽ không đủ để enzyme hoạt động, hiệu quả thủy phân thấp. Việc kéo dài thủy phân là nguyên nhân làm cho nguyên liệu chuyển sang

hiện tượng tự phân và có thể tạo mùi hôi và mất hoạt tính enzyme. Chính vì vậy, việc xác định thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân là cần thiết. Tiến hành thủy phân nội tạng hải sâm với các điều kiện tối ưu (nhiệt độ 62°C, pH=8 và Papain 0,06 g/ml) như trên trong khoảng thời gian 6h, hiệu suất thủy phân được xác định sau mỗi giờ. Kết quả cho thấy, hiệu suất thủy phân đạt cao nhất sau 3 giờ, với DH 47,79% (Hình 4).



Hình 4. Sự thay đổi hiệu suất thủy phân theo thời gian

Hiệu suất này là tương đối lớn, cao hơn nhiều so với nghiên cứu sử dụng Papain để thủy phân cá tuyết (11%) [26] nhưng thấp hơn một số nghiên cứu thủy phân cá bằng Alcalase (50%) [27, 28]. Sau 3h, DH có xu hướng giảm nhẹ, nguyên nhân có thể là do hoạt động tự phân hoặc sự hoạt động chuyển hóa của các vi sinh vật có sẵn trong nội tạng hải sâm. Điều này cũng gợi ý sự cần thiết phải thanh trùng dịch thủy phân để bảo tồn lượng đạm được tạo ra và bảo quản dịch thủy phân được lâu dài hơn.

4. Kết luận

Quá trình thủy phân bằng enzyme có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các protease nội sinh hoặc bởi các enzyme ngoại sinh. Quá trình tự phân bằng enzyme nội sinh rất khó kiểm soát, cho sản phẩm không đồng đều. Những thiếu sót của quá trình tự phân đã được khắc phục bằng các enzyme ngoại sinh. Việc bổ sung các enzyme ngoại sinh để thủy phân protein thực phẩm là một quá trình có tầm quan trọng đáng kể được sử dụng để cải thiện các đặc tính hóa lý, cảm quan và chức năng của các chất nền protein ban đầu. Trong nghiên cứu này, việc sản xuất dịch thủy phân protein nội tạng hải sâm đã được thực hiện thành công qua quá trình thủy phân bằng Papain. Các điều kiện thủy phân bằng enzyme được tối ưu hóa bằng cách sử dụng phương pháp RSM thông qua thiết kế Box-behnken. Kết quả đã chứng minh rằng quá trình thủy phân nội tạng hải sâm bị ảnh hưởng rất nhiều bởi pH, nhiệt độ và nồng độ enzyme để đạt được DH tối ưu. Giá trị DH tối đa đạt được là 47,79 % khi thủy phân ở pH 8, nhiệt độ 62°C và nồng độ papain 0,06g/ml, thời gian thủy phân 3h. Kết quả nghiên cứu này có thể dùng làm cơ sở cho các nghiên cứu trong tương lai về các ứng dụng tiềm năng của dịch thủy phân protein nội tạng hải sâm làm thực phẩm chức năng bổ sung dinh dưỡng cho người và động vật. Nghiên cứu đã đặt cơ sở để xây dựng qui trình công nghệ thủy phân nội tạng hải sâm nhằm thu dịch protein phục vụ các mục đích khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Bordbar, F. Anwar, N. Saari. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods - A review. *Marine Drugs* (2011). <https://doi.org/10.3390/md9101761>.
- [2] R. Pangestuti, Z. Arifin. Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.06.007>.
- [3] D.L. Aminin, E.S. Menchinskaya, E.A. Pisyagin, A.S. Silchenko, S.A. Avilov, V.I. Kalinin. Sea Cucumber Triterpene Glycosides as Anticancer Agents. in: *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63601-0.00002-8>.
- [4] Q. Zhao, Z.D. Liu, Y. Xue, J.F. Wang, H. Li, Q.J. Tang, Y.M. Wang, P. Dong, C.H. Xue. Ds-echinoside A, a new triterpene glycoside derived from sea cucumber, exhibits antimetastatic activity via the inhibition of NF-κB-dependent MMP-9 and VEGF expressions. *Journal of Zhejiang University: Science B* (2011). <https://doi.org/10.1631/jzus.B1000217>.
- [5] Q. Zhao, C.H. Xue, Y.C. Yang, P. Dong, Y.M. Wang, J.F. Wang. Echinoid A, A triterpene glycoside derived from sea cucumber, on anti-tumor metastasis via regulation of MMP-9 signal pathway. *Huadong Ligong Daxue Xuebao/Journal of East China University of Science and Technology* (2011).
- [6] Y. Chang, C. Xue, Q. Tang, D. Li, X. Wu, J. Wang. Isolation and characterization of a sea cucumber fucoidan-utilizing marine bacterium. *Letters in Applied Microbiology* (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02792.x>.
- [7] L. Yu, L. Ge, C. Xue, Y. Chang, C. Zhang, X. Xu, Y. Wang. Structural study of fucoidan from sea cucumber *acaudina molpadioides*: A fucoidan containing novel tetrafluoro repeating unit. *Food Chemistry* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.079>.
- [8] S.L. Zhang, Ling-Li, Y.H. Yi, Z.R. Zou, Peng-Sun. Philinopgenin A, B, and C, three new triterpenoid aglycones from the sea cucumber *pentacta quadrangulalis*. *Marine Drugs* (2004). <https://doi.org/10.3390/md204185>.
- [9] S.Y. Zhang, Y.H. Yi, H.F. Tang. Bioactive triterpene glycosides from the sea cucumber *Holothuria fuscocinerea*. *Journal of Natural Products* (2006). <https://doi.org/10.1021/np060106t>.
- [10] T. Sugawara, N. Zaima, A. Yamamoto, S. Sakai, R. Noguchi, T. Hirata. Isolation of sphingoid bases of sea cucumber cerebroside and their cytotoxicity against human colon cancer cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (2006). <https://doi.org/10.1271/bbb.60318>.
- [11] J. Xu, S. Guo, L. Du, Y.M. Wang, T. Sugawara, T. Hirata, C.H. Xue. Isolation of cytotoxic glucoerebrosides and long-chain bases from sea cucumber *Cucumaria frondosa* using high speed counter-current chromatography. *Journal of Oleo Science* (2013). <https://doi.org/10.5650/jos.62.133>.
- [12] C.G. Panagos, D.S. Thomson, C. Moss, A.D. Hughes, M.S. Kelly, Y. Liu, W. Chai, R. Venkatasamy, D. Spina, C.P. Page, J. Hogwood, R.J. Woods, B. Mulloy, C.D. Bavington, D. Uhrin. Fucosylated chondroitin sulfates from the body wall of the sea cucumber *Holothuria forskali*: Conformation, selectin binding, and biological activity. *Journal of Biological Chemistry* (2014). <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.572297>.
- [13] S.C. Anderson, J.M. Flemming, R. Watson, H.K. Lotze. Serial exploitation of global sea cucumber fisheries. *Fish and Fisheries* (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2010.00397.x>.
- [14] F. Guerard, L. Guimas, A. Binet. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2002). [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00203-5](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00203-5).
- [15] M. Muzaifa, N. Safriani, F. Zakaria. Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis. *AACL Bioflux* (2012).
- [16] S. Saidi, A. Deratani, M.P. Belleville, R. Ben Amar. Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. *Food Research International* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.026>.
- [17] G.A. Gbogouri, M. Linder, J. Fanni, M. Parmentier. Analysis of lipids extracted from salmon (*Salmo salar*) heads by commercial

- proteolytic enzymes. *European Journal of Lipid Science and Technology* (2006). <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600081>.
- [18] N. Souissi, A. Bougatef, Y. Triki-Ellouz, M. Nasri. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinetta aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology* (2007).
- [19] R. Šližyte, R. Mozuraityte, O. Martínez-Alvarez, E. Falch, M. Fouchereau-Peron, T. Rustad. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochemistry* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.02.010>.
- [20] Herpandi, N. Huda, A. Rosma, W.A. Wan Nadiah. The Tuna Fishing Industry: A New Outlook on Fish Protein Hydrolysates. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00155.x>.
- [21] J. Roslan, S.M. Mustapa Kamal, K.F. Md. Yunos, N. Abdullah. Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) byproduct using response surface methodology. *International Food Research Journal* (2015).
- [22] N. Wisuthiphaet, S. Kongruang, C. Chamcheun. Production of Fish Protein Hydrolysates by Acid and Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Medical and Bioengineering* (2015). <https://doi.org/10.12720/jomb.4.6.466-470>.
- [23] Z. Grzonka, F. Kasprzykowski, W. Wicz. Cysteine proteases. in: *Ind. Enzym. Struct. Funct. Appl.*, 2007. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_11.
- [24] A.C. Storer, R. Ménard. Papain. in: *Handb. Proteolytic Enzym.*, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00418-X>.
- [25] K. Konno, C. Hirayama, M. Nakamura, K. Tateishi, Y. Tamura, M. Hattori, K. Kohno. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: Role of cysteine proteases in latex. *Plant Journal* (2004). <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01968.x>.
- [26] A.T. Himonides, A.K.D. Taylor, A.J. Morris. A Study of the Enzymatic Hydrolysis of Fish Frames Using Model Systems. *Food and Nutrition Sciences* (2011). <https://doi.org/10.4236/fns.2011.26081>.
- [27] N. Bhaskar, T. Benila, C. Radha, R.G. Lalitha. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.015>.
- [28] S. Nilsang, S. Lertsiri, M. Suphantharika, A. Assavanig. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.011>.