



NGHIÊN CỨU THU HỒI DỊCH THỦY PHÂN TỪ ĐẦU CÁ LÓC (*Channa striata*) BẰNG ENZYME ALCALASE VÀ FLAVOURZYME

Trương Thị Mộng Thu^{1*}, Mai Thị Ngọc Thúy², Lê Thị Minh Thủy³ và Trần Thanh Trúc⁴

¹Nghiên cứu sinh Ngành Công nghệ Thực phẩm Khóa 2020, Trường Đại học Cần Thơ

²Học viên cao học Ngành Công nghệ Thực phẩm Khóa 26, Trường Đại học Cần Thơ

³Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

⁴Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trương Thị Mộng Thu (email: ttmthu@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

The study was conducted to determine the hydrolysis conditions on the recovery of fish protein hydrolysate from snakehead fish head by using alcalase in the first stage and flavourzyme in the second stage. The research included four experiments: (i) the effects of the ratio of alcalase to material, (ii) the hydrolysis time by alcalase enzyme, (iii) the ratio of flavourzyme to material, and (iv) the hydrolysis time by flavourzyme enzyme. Fish head was hydrolyzed at 50°C, pH 8.0, and the ratio of material: ethanol 20° solution was 1:1. The results showed that fish head was hydrolyzed with 0.2% alcalase for 12 hours in the first stage and continued with 0.4% flavourzyme for 9 hours in the second stage to obtain the fish protein hydrolysate with the highest amino acid content, nitrogen recovery and degree of hydrolysis were 6.58 g/L, 44.6% and 38.0%, respectively whereas ammonia content was low at 0.269 g/L.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định chế độ thủy phân đầu cá lóc thu hồi dịch đậm bằng enzyme alcalase ở giai đoạn 1 và flavourzyme ở giai đoạn 2 trong quá trình thủy phân hai giai đoạn. Nghiên cứu bao gồm 4 thí nghiệm: (i) ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme alcalase so với nguyên liệu, (ii) thời gian thủy phân bằng enzyme alcalase, (iii) tỷ lệ enzyme flavourzyme so với nguyên liệu và (iv) thời gian thủy phân bằng enzyme flavourzyme. Đầu cá được thủy phân với các thông số cố định là nhiệt độ 50°C, pH 8,0 và tỷ lệ nguyên liệu: dung dịch ethanol 20° là 1: 1. Kết quả cho thấy đầu cá lóc được thủy phân với 0,2% alcalase trong 12 giờ ở giai đoạn 1 và tiếp tục thủy phân với 0,4% flavourzyme trong 9 giờ giai đoạn 2 thu được dịch đậm có hàm lượng đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân cao nhất lần lượt là 6,58 g/L; 44,6% và 38,0%, trong khi hàm lượng đạm ammoniac thấp là 0,269 g/L.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 23/02/2021

Ngày nhận bài sửa: 15/03/2021

Ngày duyệt đăng: 28/04/2021

Title:

The study on the recovery of fish protein hydrolysate from snakehead fish (*Channa striata*) head by using alcalase and flavourzyme

Từ khóa:

Alcalase, đầu cá lóc, dịch đậm thủy phân, flavourzyme

Keywords:

Alcalase, fish protein hydrolysate, flavourzyme, snakehead fish head

1. GIỚI THIỆU

Cá lóc (*Channa striata*) là loài cá nước ngọt có chất lượng thịt ngon, giá trị dinh dưỡng cao và giá thành tương đối ổn định nên được nhiều người tiêu dùng ưa chuộng (Trần Minh Phú và ctv., 2018). Vì

vậy, sản lượng cá lóc nuôi ngày càng tăng ở nhiều tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long như Đồng Tháp, Vĩnh Long, Trà Vinh và An Giang. Việc phát triển mạnh mẽ nghề nuôi cá lóc thúc đẩy sự phát triển các sản phẩm chế biến từ cá lóc như mắm, khô, chà bông

và chả cá lóc. Bên cạnh đó, cuộc sống hiện đại với các sản phẩm sơ chế sẵn ngày càng tăng là nguyên nhân dẫn đến việc loại bỏ một lượng rất lớn phụ phẩm cá lóc và được bán với giá thấp trực tiếp tại các cơ sở sản xuất, các chợ (Trần Thanh Trúc & Nguyễn Văn Mười, 2019). Trong quá trình chế biến sản phẩm khô cá lóc, hiệu suất thu hồi thịt cá chỉ xấp xỉ 60%, như vậy lượng phụ phẩm thải ra chiếm khoảng 40% tổng khối lượng nguyên liệu (Nguyễn Văn Mười & Trần Thanh Trúc, 2016). Hơn nữa, Ung Minh Anh Thư (2018) cũng đã chỉ ra rằng phụ phẩm cá lóc (đầu, xương, vây, vảy, da và nội tạng) chứa hàm lượng protein, lipid và tro tương đối cao lần lượt là 13,85%; 12,4% và 7,53%. Nhằm giải quyết vấn đề môi trường và tận dụng nguồn phụ phẩm này thì các phương pháp xử lý khác nhau được áp dụng như ủ, lên men, sản xuất đầu cá và thủy phân (Rebah & Miled, 2013). Trong đó, sử dụng enzyme để thủy phân là một trong những phương pháp được ứng dụng rộng rãi nhất hiện nay vì hiệu quả thủy phân cao và không ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm cuối cùng (Trần Kiều Anh và ctv., 2017). Quá trình thủy phân bằng enzyme protease có thể được thực hiện bởi enzyme riêng lẻ, kết hợp hoặc bổ sung. Các enzyme thủy phân được sử dụng phổ biến là alcalase, flavourzyme, neutrase, protamex và kojizyme (Nguyen et al., 2011). Trong đó, alcalase có hoạt tính endoprotease có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis* (Liaset et al., 2002), nhờ vào hoạt tính endoprotease của alcalase thủy phân liên kết peptide chủ yếu tại các nhóm –COOH kỵ nước bên trong phân tử protein đem lại hiệu quả thủy phân cao (Chiang et al., 2019). Flavourzyme có cả hoạt tính endoprotease và exoprotease nhưng chủ yếu là exoprotease, có nguồn gốc từ *Aspergillus oryzae*. Nhờ vào hoạt tính exoprotease của flavourzyme, thủy phân từ đầu-C hoặc đầu-N của các amino acid kỵ nước cuối cùng của phân tử protein dẫn đến giảm vị đắng của dịch đậm thu được (Chiang et al., 2019). Đã có một số nghiên cứu sử dụng kết hợp cả endoprotease và exoprotease nhằm tăng hiệu quả của quá trình thủy phân. Cụ thể, nghiên cứu ứng dụng hỗn hợp alcalase và flavourzyme để thủy phân thu hồi dịch đậm từ cá nục gai (*Decapterus russelli*) (Đỗ Thị Thanh Thủy & Nguyễn Anh Tuấn, 2017); thịt cá lóc (Trương Thị Mộng Thu & Lê Thị Minh Thủy, 2020a) và thịt cá tra (Trương Thị Mộng Thu & Lê Thị Minh Thủy, 2020b). Tuy nhiên, sử dụng kết hợp hai loại enzyme có thể dẫn đến enzyme này là cơ chất của enzyme kia và ngược lại. Vì vậy, sử dụng enzyme alcalase trong giai đoạn 1, sau đó tiếp tục thủy phân bằng flavourzyme ở giai đoạn 2 trong nghiên cứu thu hồi dịch đậm thủy phân từ đầu cá lóc bằng enzyme

alcalase và flavourzyme nhằm xác định các thông số của quá trình thủy phân như tỷ lệ enzyme so với nguyên liệu và thời gian thủy phân của enzyme alcalase và flavourzyme đến hiệu suất thủy phân và chất lượng dịch đậm là cần thiết.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đầu cá lóc được mua tại cơ sở khô cá lóc 7 Chóp (Thoại Sơn, An Giang). Đầu cá lóc được thu gom tại cơ sở, cho vào tủ đông ở nhiệt độ $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ít nhất 6 giờ để đảm bảo nguyên liệu đông lại và đóng thùng chuyển về phòng thí nghiệm Bộ môn Chế biến Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ không quá 6 giờ.

Alcalase và flavourzyme là các enzyme protease được sản xuất bởi Công ty Novozyme của Đan Mạch, được nhập khẩu và cung cấp bởi Công Ty TNHH TM Nông sản và Hóa chất Phương Trâm (Thành phố Hồ Chí Minh). Alcalase 2.5 L, điều kiện hoạt động thích hợp là nhiệt độ $50\pm 70^{\circ}\text{C}$, pH 6,5÷8,5 tùy thuộc vào cơ chất. Flavourzyme > 3500 LAPU/g (leucine aminopeptidase units)/g, điều kiện hoạt động thích hợp là $50\pm 55^{\circ}\text{C}$, pH 5,0÷7,0 tùy thuộc vào cơ chất.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Cách chuẩn bị mẫu

Đầu cá lóc được rửa sạch nhớt, máu bằng nước muối loãng, loại bỏ mắt, nắp mang, mang, răng miệng và bông nhớt. Đầu cá lóc được bảo quản đông ở nhiệt độ $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Khi tiến hành thí nghiệm, đầu cá được rã đông, cắt nhỏ và xay nhuyễn trong 10 giây, xay 5 lần bằng máy xay sinh tố Bluestone BLB-5329, xay ở mức cao nhất của máy (mức 2).

2.2.2. Xác định thành phần hóa học của nguyên liệu ban đầu

Đầu cá được xử lý theo mục 2.2.1 được xay nhuyễn và tiến hành phân tích thành phần hóa học như độ ẩm, protein, lipid và khoáng.

2.2.3. Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme alcalase so với nguyên liệu trong giai đoạn 1 của quá trình thủy phân 2 giai đoạn

Đầu cá lóc được xử lý theo mục 2.2.1 và tiến hành thí nghiệm với 6 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, tổng số mẫu thí nghiệm là 18 và 40 g đầu cá xay/mẫu. Đầu cá lóc xay được thủy phân ở giai đoạn 1 bằng enzyme alcalase với tỷ lệ enzyme so với nguyên liệu thay đổi lần lượt là 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5

và 0,6%. Điều kiện thủy phân cố định ở giai đoạn 1 là nhiệt độ 50°C, thời gian 12 giờ, pH 8,0 và tỷ lệ nguyên liệu: dung dịch ethanol 20° là 1: 1.

Sau khi thủy phân bằng enzyme alcalase, tất cả các mẫu được tiếp tục thủy phân ở giai đoạn 2 bằng enzyme flavourzyme với tỷ lệ enzyme flavourzyme so với nguyên liệu là 0,3%, nhiệt độ 50°C, thời gian 12 giờ. Sau khi kết thúc quá trình thủy phân, bất hoạt enzyme ở nhiệt độ 95°C trong 10 phút, lọc qua rây để loại bã đầu, thu phần dịch lọc. Dịch lọc được ly tâm với tốc độ 7.500 vòng/phút ở 4°C trong 30 phút để tách thành 3 lớp: lớp trên cùng là lipid, lớp ở giữa là dịch đậm và lớp cặn dưới đáy.

Chỉ tiêu phân tích: Xác định hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân trong phân dịch đậm.

2.2.4. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng enzyme alcalase trong giai đoạn 1 của quá trình thủy phân 2 giai đoạn

Thí nghiệm 2 được thực hiện kế thừa quy trình và kết quả thí nghiệm 1. Thí nghiệm được tiến hành bằng enzyme alcalase với thời gian thủy phân thay đổi lần lượt là 6, 9, 12, 15 và 18 giờ; 5 nghiệm thức với 3 lần lặp lại, tổng số mẫu thí nghiệm là 15 và 40 g đầu cá xay/mẫu. Các bước thực hiện sau khi thủy phân bằng enzyme alcalase tiếp tục thủy phân bằng enzyme flavourzyme tương tự như thí nghiệm 1. Các chỉ tiêu phân tích phân dịch đậm như thí nghiệm 1.

2.2.5. Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme flavourzyme so với nguyên liệu trong giai đoạn 2 của quá trình thủy phân 2 giai đoạn

Thí nghiệm 3 được thực hiện kế thừa quy trình và kết quả thí nghiệm 1 và 2. Sau khi thủy phân bằng enzyme alcalase tiếp tục thủy phân bằng enzyme flavourzyme với tỷ lệ enzyme flavourzyme thay đổi lần lượt là 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 và 0,6%; 6 nghiệm thức với 3 lần lặp lại, tổng số mẫu thí nghiệm là 18 và 40 g đầu cá xay/mẫu. Các chỉ tiêu phân tích phân dịch đậm như thí nghiệm 1.

2.2.6. Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng enzyme flavourzyme trong giai đoạn 2 của quá trình thủy phân 2 giai đoạn

Thí nghiệm 4 được thực hiện kế thừa quy trình và kết quả thí nghiệm 1, 2 và 3. Tiến hành thủy phân bằng enzyme flavourzyme với thời gian thủy phân thay đổi lần lượt là 3, 6, 9, 12 và 15 giờ; 5 nghiệm

thức với 3 lần lặp lại, tổng số mẫu thí nghiệm là 15 và 40 g đầu cá xay/mẫu. Các chỉ tiêu phân tích dịch đậm như thí nghiệm 1.

2.3. Phương pháp phân tích

Thành phần hóa học của đầu cá lóc như độ ẩm, protein, lipid và khoáng được xác định theo AOAC (2016). Xác định hàm lượng đạm amino acid theo Bộ Khoa học và Công nghệ (1990). Xác định hàm lượng đạm ammonia theo Bộ Khoa học và Công nghệ (1990). Hoạt tính enzyme alcalase và flavourzyme ban đầu được xác định theo phương pháp của Cupp-Enyard (2008).

Độ thủy phân (DH %) được xác định bằng phương pháp OPA (o-phthalaldehyde), dựa trên nguyên tắc các nhóm amin của amino acid hoặc peptide phản ứng với Ortho-phthaldialdehyde với sự có mặt của -SH của dithiothreitol hoặc mercaptoethanol sẽ tạo ra hợp chất có khả năng hấp thụ ở bước sóng 340 nm (Nielsen et al., 2001).

Hiệu suất thu hồi nitrogen (NR %) được xác định theo phương pháp của Wang et al. (2018) với công thức tính như sau:

$$NR (\%) = \frac{\text{Hàm lượng nitrogen tổng số trong dịch thủy phân}}{\text{Hàm lượng nitrogen tổng số trong nguyên liệu}} \times 100$$

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập được tính trung bình, độ lệch chuẩn sử dụng chương trình Microsoft Excel 2010. Kết quả được tính toán thống kê, phương pháp phân tích phương sai ANOVA theo kiểm định Duncan để kết luận về sự khác biệt giữa trung bình các nghiệm thức với độ tin cậy 95% bằng phần mềm SPSS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần hóa học của đầu cá lóc

Các thành phần hóa học cơ bản của đầu cá lóc như độ ẩm, protein, lipid và khoáng được phân tích làm cơ sở để có biện pháp xử lý để thu hồi dịch đậm có chất lượng tốt và hiệu suất thu hồi cao. Kết quả phân tích thành phần hóa học của đầu cá lóc được thể hiện trong Bảng 1.

Đầu cá lóc chứa hàm lượng protein tổng số và khoáng tương đối cao lần lượt là 16,4% và 15,8%, trong khi hàm lượng lipid chiếm tỷ lệ thấp 6,5%. Hàm lượng protein trong nghiên cứu này cao hơn phụ phẩm cá lóc là 13,85% (Ung Minh Anh Thu, 2018) và phụ phẩm của các loài cá khác như cá trắm là 13,9% (Shahidi et al., 1995) và cá tầm là 15,5% (Ovissipour et al., 2009), nhưng thấp hơn cá lười

trâu là 18,8% (Nguyễn Chí Thanh và ctv., 2019) và cá ngừ là 20% (Ovissipour et al., 2010). Nguyên nhân sự khác nhau về hàm lượng protein có thể là do loại nguyên liệu, vị trí lấy mẫu, kích cỡ cá, giống loài, thời gian thu hoạch khác nhau (Ghaly et al., 2013). Đầu cá lóc có hàm lượng protein tương đối cao và hàm lượng lipid chiếm tỷ lệ thấp rất thích hợp cho việc sản xuất dịch đạm thủy phân (Siddik et al., 2020).

Bảng 1. Thành phần hóa học của đầu cá lóc (% khối lượng ướt)

Chỉ tiêu	Hàm lượng ¹ (%)
Độ ẩm	57,1±0,49
Protein	16,4±0,31
Lipid	6,5±0,83
Khoáng	15,8±0,05

¹Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn, n=5

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme alcalase so với nguyên liệu (E/S) đến hàm lượng đạm ammonia (N_{NH3}), đạm amino acid (Naa), hiệu suất thu hồi nitrogen (NR) và độ thủy phân (DH)

E/S (%)	N _{NH3} (g/L)	Naa (g/L)	NR (%)	DH (%)
0,1	0,128±0,012 ^{ns}	6,02±0,14 ^b	38,1±1,14 ^{bc}	32,6±1,86 ^{bc}
0,2	0,122±0,010 ^{ns}	6,39±0,16 ^a	42,7±1,44 ^a	36,1±1,04 ^a
0,3	0,123±0,011 ^{ns}	6,25±0,08 ^{ab}	40,1±1,33 ^b	35,4±1,22 ^{ab}
0,4	0,128±0,021 ^{ns}	6,21±0,16 ^{ab}	37,5±1,31 ^c	33,8±1,54 ^{abc}
0,5	0,120±0,012 ^{ns}	6,21±0,16 ^{ab}	37,7±1,03 ^c	32,1±1,62 ^c
0,6	0,114±0,015 ^{ns}	6,25±0,08 ^{ab}	37,9±1,38 ^c	30,9±1,58 ^c
Giá trị P	0,801	0,158	0,001	0,018

Trong cùng một cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn, n=3

Tỷ lệ enzyme alcalase so với nguyên liệu thay đổi từ 0,1 đến 0,6% thì hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân thay đổi và khác biệt có ý nghĩa với giá trị *p* tương ứng lần lượt là 0,001 và 0,018. Tuy nhiên hàm lượng đạm ammonia và đạm amino acid khác biệt không đáng kể (*p* = 0,801 và 0,158) được thể hiện trên Bảng 2. Khi tỷ lệ enzyme alcalase tăng từ 0,1 lên 0,2% thì hàm lượng đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân tăng tương ứng từ 6,02 g/L; 38,1% và 32,6% lên 6,39 g/L; 42,7% và 36,1%. Nguyên nhân là do tỷ lệ enzyme tăng thì quá trình cắt mạch polypeptide trong phân tử protein xảy ra mãnh liệt hơn dẫn đến độ thủy phân tăng, đồng thời quá trình thủy phân sinh ra một lượng lớn sản phẩm, nên hàm lượng đạm amino acid và hiệu suất thu hồi nitrogen tăng (Trần Thị Bích Thủy & Đỗ Thị Thanh Thủy, 2016). Tuy nhiên, tiếp tục tăng tỷ lệ enzyme alcalase so với nguyên liệu từ 0,2% lên 0,6% thì hàm lượng đạm amino acid thay đổi không

3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme alcalase so với nguyên liệu (E/S) trong giai đoạn 1 của quá trình thủy phân 2 giai đoạn

Bột đạm thủy phân protein từ đầu và xương cá chêm có giá trị dinh dưỡng cao, giàu amino acid không thay thế chiếm khoảng 31,2% trên tổng lượng amino acid (Nguyễn Thị Mỹ Hương, 2014). Trong các chỉ tiêu theo dõi của quá trình thủy phân thì hiệu suất thu hồi nitrogen, độ thủy phân và hàm lượng amino acid là những chỉ tiêu quan trọng vì nó trực tiếp ảnh hưởng đến giá trị dinh dưỡng và các tính chất cảm quan của sản phẩm thủy phân. Ngoài ra, hàm lượng đạm ammonia cũng khá quan trọng vì chúng cung cấp thông tin hữu ích về sản phẩm thủy phân, chất lượng sản phẩm tỷ lệ nghịch với hàm lượng đạm ammonia (Trần Thị Bích Thủy & Đỗ Thị Thanh Thủy, 2016). Hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân của dịch đạm theo tỷ lệ enzyme alcalase so với nguyên liệu được thể hiện trong Bảng 2.

đáng kể, nhưng hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân giảm từ 42,7% và 36,1% xuống 37,9% và 30,9%, tương ứng. Điều này được giải thích như sau: trong thời gian đầu quá trình thủy phân xảy ra mạnh sẽ có một lượng lớn liên kết peptide bị phân cắt sinh ra các peptide mạch ngắn có thể đóng vai trò như chất kim hãm không cạnh tranh khi enzyme có ái lực với cả các sản phẩm tạo thành của quá trình thủy phân, nên độ thủy phân giảm và hiệu suất thu hồi nitrogen giảm (Copeland, 2000). Hàm lượng đạm ammonia không khác biệt có ý nghĩa (*p*=0,801) khi tỷ lệ enzyme alcalase tăng từ 0,1% lên 0,6%. Độ thủy phân (36,1%) khi thủy phân đầu cá lóc với 0,2% alcalase trong nghiên cứu này cao hơn kết quả nghiên cứu của Lê Trung Thiên và ctv. (2018) khi thủy phân thịt vụn cá tra bằng enzyme alcalase với nồng độ 1% có độ thủy phân là 21,6%. Điều này có thể là do phương pháp bổ sung enzyme 2 hai giai đoạn trong nghiên cứu này: alcalase là endoprotease

thủy phân cả cấu trúc bậc hai và bậc ba của phân tử protein tạo nhiều đoạn peptide, sau đó exoprotease của flavourzyme tiếp tục cắt mạch peptide từ đầu-C và đầu-N giải phóng amino acid tự do, dipeptide hoặc tripeptide (Chiang et al., 2019). Như vậy, tỷ lệ enzyme alcalase so với nguyên liệu thích hợp được chọn là 0,2%.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân enzyme alcalase trong giai đoạn 1 của quá trình thủy phân 2 giai đoạn

Thời gian thủy phân là một trong những yếu tố có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả thủy phân, thời gian quá dài hay quá ngắn sẽ ảnh hưởng đến hiệu suất

thủy phân và chất lượng sản phẩm (Copeland, 2000). Hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân theo thời gian thủy phân bằng enzyme alcalase được thể hiện ở Bảng 3.

Xét về ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng enzyme alcalase thì hàm lượng đạm ammonia, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân thay đổi và khác biệt có ý nghĩa với giá trị *p* tương ứng lần lượt là 0,000; 0,000 và 0,011. Tuy nhiên đạm amino acid không khác biệt có ý nghĩa (*p*=2,000) khi thời gian thay đổi từ 6 đến 18 giờ (Bảng 3).

Bảng 3. Kết quả ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng enzyme alcalase đến hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân

Thời gian (giờ)	N _{NH3} (g/L)	Naa (g/L)	NR (%)	DH (%)
6	0,158±0,014 ^c	6,11±0,21 ^{ns}	34,5±1,30 ^c	30,7±0,74 ^c
9	0,168±0,010 ^{bc}	6,30±0,24 ^{ns}	40,7±1,07 ^b	32,4±1,93 ^{bc}
12	0,176±0,011 ^{bc}	6,44±0,14 ^{ns}	44,1±1,35 ^a	36,5±1,71 ^a
15	0,182±0,012 ^b	6,49±0,08 ^{ns}	41,9±1,40 ^{ab}	35,3±1,02 ^{ab}
18	0,205±0,012 ^a	6,25±0,16 ^{ns}	36,5±1,28 ^c	32,7±1,26 ^{bc}
Giá trị P	0,000	2,000	0,000	0,011

Trong cùng một cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn, n=3

Khi tăng thời gian thủy phân bằng enzyme alcalase từ 6 lên 12 giờ thì hiệu suất thu hồi nitrogen tăng từ 34,5 lên 44,1% và độ thủy phân tăng từ 30,7 lên 36,5%. Nguyên nhân là do thời gian thủy phân càng dài thì các liên kết peptide trong phân tử protein bị cắt mạch càng nhiều, tạo nhiều sản phẩm dẫn đến hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân tăng (Trần Thị Bích Thủy & Đỗ Thị Thanh Thủy, 2016). Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng thời gian thủy phân từ 12 lên 18 giờ thì hiệu suất thu hồi nitrogen giảm từ 44,1% xuống 36,5% và độ thủy phân giảm từ 36,5% xuống 32,7%. Thời gian thủy phân tăng quá mức thì lượng cơ chất đã được thủy phân gần hết, càng kéo dài thời gian thủy phân thì quá trình thủy phân diễn ra chậm, các peptide mạch ngắn trong dịch thủy phân có thể làm ức chế phần nào tác dụng thủy phân của enzyme, làm giảm độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitrogen (Copeland, 2000). Thời gian thủy phân tăng từ 6 đến 18 giờ thì hàm lượng đạm ammonia tăng từ 0,158 lên 0,205 g/L và khác biệt có ý nghĩa, hàm lượng đạm amino acid giảm không đáng kể (*p*=2,000). Một lượng amino acid bị vi sinh vật gây thối sử dụng tạo thành các sản phẩm

cấp thấp như NH₃, H₂S...nên hàm lượng đạm ammonia tăng (Trần Thị Bích Thủy & Đỗ Thị Thanh Thủy, 2016). Độ thủy phân (36,5%) và đạm amino acid (6,44 g/L) trong nghiên cứu này cao hơn kết quả nghiên cứu của Nguyễn Chí Thanh và ctv. (2019) khi thủy phân phụ phẩm cá lười trâu bằng enzyme alcalase trong 6 giờ có độ thủy phân là 19,8% và hàm lượng đạm amino acid là 1,59 g/L. Nguyên nhân có thể do thời gian thủy phân dài hơn và cũng có thể do loại nguyên liệu, loại enzyme sử dụng và phương pháp bổ sung enzyme khác nhau. Chọn thời gian thủy phân bằng enzyme alcalase thích hợp là 12 giờ để đảm bảo hiệu suất thủy phân cao và chất lượng dịch đậm tốt.

3.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme flavourzyme so với nguyên liệu (E/S) trong giai đoạn 2 của quá trình thủy phân 2 giai đoạn

Hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân của dịch đậm được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme flavourzyme so với nguyên liệu đến hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân

E/S (%)	N _{NH3} (g/L)	Naa (g/L)	NR (%)	DH (%)
0,1	0,137±0,015 ^{ab}	5,97±0,08 ^c	35,9±1,44 ^b	26,6±1,58 ^d
0,2	0,129±0,010 ^b	5,93±0,21 ^c	38,0±2,42 ^b	30,4±1,82 ^c
0,3	0,142±0,013 ^{ab}	6,16±0,14 ^{bc}	42,0±1,68 ^a	32,5±1,12 ^{bc}
0,4	0,136±0,011 ^{ab}	6,35±0,16 ^{ab}	43,2±2,87 ^a	36,5±1,18 ^a
0,5	0,138±0,016 ^{ab}	6,53±0,08 ^a	42,3±1,09 ^a	36,8±1,50 ^a
0,6	0,158±0,014 ^a	6,25±0,16 ^b	37,1±2,36 ^b	35,4±1,75 ^{ab}
Giá trị P	0,194	0,003	0,006	0,000

Trong cùng một cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn, n=3

Khi nồng độ enzyme flavourzyme tăng từ 0,1 lên 0,4% ở giai đoạn 2 của quá trình thủy phân thì đạm amino acid tăng từ 5,97 lên 6,35 g/L, hiệu suất thu hồi nitrogen tăng từ 35,9 lên 43,2% và độ thủy phân tăng từ 26,6 lên 36,5%. Điều này được lý giải như sau: các đoạn peptide được tạo thành từ quá trình thủy phân bằng alcalase, tiếp tục được phân cắt tạo thành peptide ngắn hơn và amino acid dưới tác dụng của flavourzyme có cả hai hoạt tính endoprotease và exoprotease (Chiang et al., 2019). Tuy nhiên khi tỷ lệ enzyme flavourzyme tiếp tục tăng từ 0,4 lên 0,6% thì hiệu suất thu hồi nitrogen giảm từ 43,2 còn 37,1% và khác biệt có ý nghĩa; đạm amino acid giảm từ 6,35 còn 6,25 g/L; nhưng độ thủy phân giảm không đáng kể. Khi tỷ lệ enzyme tăng thì tốc độ phản ứng thủy phân tăng đến một giá trị nhất định, nếu tiếp tục tăng tỷ lệ enzyme thì tốc độ phản ứng thủy phân bởi enzyme rất ít thay đổi vì nồng độ enzyme bão hòa với nồng độ cơ chất và các peptide

mạch ngắn tạo thành có thể tác dụng ngược lại với enzyme, dẫn đến hiệu suất thu hồi nitrogen giảm (Copeland, 2000). Hàm lượng đạm ammonia thay đổi không đáng kể (p=0,194) khi tỷ lệ enzyme flavourzyme tăng từ 0,1 lên 0,6%. Độ thủy phân (36,5%) trong nghiên cứu này cao hơn kết quả nghiên cứu của Đỗ Trọng Sơn và ctv. (2013) khi thủy phân đầu cá chêm với 0,5% enzyme flavourzyme có độ thủy phân là 29,1%. Như vậy, tỷ lệ enzyme flavourzyme thích hợp trong nghiên cứu này là 0,4%.

3.5. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân enzyme flavourzyme trong giai đoạn 2 trong quá trình thủy phân 2 giai đoạn

Hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân theo thời gian thủy phân enzyme flavourzyme được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng enzyme flavourzyme đến hàm lượng đạm ammoniac, đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân

Thời gian (giờ)	N _{NH3} (g/L)	Naa (g/L)	NR (%)	DH (%)
3	0,231±0,012 ^b	5,46±0,14 ^b	37,7±1,23 ^c	31,8±1,22 ^c
6	0,235±0,015 ^b	6,44±0,24 ^a	41,7±1,07 ^b	33,5±1,38 ^{bc}
9	0,269±0,027^b	6,58±0,14^a	44,6±1,11^a	38,0±1,22^a
12	0,262±0,027 ^b	6,53±0,08 ^a	43,8±1,08 ^{ab}	36,3±1,32 ^a
15	0,310±0,012 ^a	6,35±0,16 ^a	42,9±1,36 ^{ab}	35,7±1,22 ^{ab}
Giá trị P	0,011	0,000	0,001	0,005

Trong cùng một cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn, n=3

Đối với ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng enzyme flavourzyme (Bảng 5), kết quả nghiên cứu cho thấy đạm ammonia, đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân thay đổi và khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị p tương ứng lần lượt là 0,011; 0,000; 0,001 và 0,005 khi thời gian thủy phân thay đổi từ 3 đến 15 giờ.

Kết quả cho thấy khi thời gian thủy phân bằng enzyme flavourzyme tăng từ 3 giờ lên 9 giờ thì đạm amino acid tăng từ 5,46 g/L lên 6,58 g/L; hiệu suất thu hồi nitrogen tăng từ 37,7 lên 44,6% và độ thủy phân tăng từ 31,8% lên 38,0%, tuy nhiên hàm lượng đạm ammonia thay đổi không đáng kể. Kết quả này cũng phù hợp với các công trình nghiên cứu trước đây cũng đã chỉ ra rằng hiệu suất thủy phân tăng theo thời gian thủy phân (Aspmo et al., 2005; Liaset et al., 2002). Tuy nhiên, khi thời gian thủy phân tiếp tục tăng từ 9 giờ lên 15 giờ thì hàm lượng đạm

amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân thay đổi không đáng kể, nhưng hàm lượng đạm ammonia tăng từ 0,269 lên 0,310 g/L. Do đó, thời gian thủy phân bằng enzyme flavourzyme được chọn là 9 giờ.

4. KẾT LUẬN

Chế độ thủy phân đầu cá lóc thích hợp thu hồi dịch đậm bằng phương pháp thủy phân hai giai đoạn là giai đoạn 1 thủy phân với tỷ lệ enzyme alcalase so với nguyên liệu là 0,2% trong 12 giờ và tiếp tục giai đoạn 2 thủy phân với tỷ lệ enzyme flavourzyme so với nguyên liệu là 0,4% trong 9 giờ. Chế độ thủy phân đạt hiệu quả cao với hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân lần lượt là 44,6% và 38,0%. Dịch đậm thu được có giá trị dinh dưỡng cao với hàm lượng đạm amino acid là 6,58 g/L và chất lượng tốt vì hàm lượng đạm ammonia thấp là 0,269 g/L.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện thông qua sự tài trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ (Bộ Giáo dục và Đào tạo), mã số: CT2020.01.TCT.03 thuộc Chương trình KH&CN “Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ tiên tiến trong bảo quản, chế biến nông thủy sản vùng Đồng bằng Sông Cửu Long”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

AOAC (2016). *The official methods of analysis of AOAC International* (20th ed.). George W. Latimer. [http:// www.eoma.aoac.org](http://www.eoma.aoac.org).

Aspmo, S.I., Horn, S. J., & Eijnsink, V. G. (2005). Enzymatic hydrolysis of atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochem*, 40(5), 1957-1966.

Bộ Khoa học và Công nghệ. (1990). Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3708: 1990 về “Thủy sản - Phương pháp xác định hàm lượng nitrogen axit amin” do Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành. <https://vanbanphapluat.co/tcvn-3708-1990-thuy-san-phuong-phap-xac-dinh-ham-luong-nito-axit-amin>

Bộ Khoa học và Công nghệ. (1990). Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3707: 1990 về “Thủy sản - Phương pháp xác định hàm lượng nitrogen amin-ammonia” do Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành. <https://vanbanphapluat.co/tcvn-3707-1990-thuy-san-phuong-phap-xac-dinh-ham-luong-nito-amin-ammonia>

Chiang, J.H., Loveday, S.M., Hardacre1, A.K., & Parker, M.E. (2019). Effects of enzymatic hydrolysis treatments on the physicochemical properties of beef bone extract using endo- and

exoproteases. *International Journal of Food Science and Technology*, 54, 111-120.

Copeland, R. A. (2000). *A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis* (2nd ed.) Wiley-VCH, Inc New York. New York, 412 pages.

Cupp-Enyard, C. (2008). Sigma's non-specific protease activity assay - casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*, 19, 899-900.

Đỗ Thị Thanh Thủy & Nguyễn Anh Tuấn. (2017). Nghiên cứu ứng dụng hỗn hợp alcalase và flavourzyme để thủy phân cá nục gai (*Decapterus ruselli*) thu hồi dịch đậm thủy phân. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ thủy sản Trường Đại học Nha Trang*, 3, 73-79.

Đỗ Trọng Sơn, Nguyễn Xuân Duy & Nguyễn Thị Mỹ Hương. (2013). Nghiên cứu thủy phân đầu cá chêm (*Lates calcarifer*) bằng enzyme flavourzyme. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản Trường Đại học Nha Trang*, 1, 138-144.

Ghaly, A.E., Ramakrishnan, V.V., Brooks, M.S., Budge, S.M., & Dave, D. (2013). Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins. Amino acids and oils: a critical review. *J Microb Biochem Technol*, 5(4), 107-129.

Lê Trung Thiên, Bùi Thanh Thủy & Trịnh Ngọc Thảo Ngân. (2018). Nghiên cứu thủy phân thịt vụn cá tra. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Trường Đại học Nông lâm thành phố Hồ Chí Minh*, 17(4), 112-117.

Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., & Espe, M. (2002). Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by protamex protease. *Process Biochemistry*, 37(11), 1263-1269.

Nguyễn Chí Thanh, Nguyễn Ngọc Hà & Nguyễn Phúc Cẩm Tú. (2019). Ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình thủy phân protein từ phụ phẩm cá lưỡi trâu bằng enzyme alcalase. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản Trường Đại học Nha Trang*, 4, 106-114.

Nguyễn Thị Mỹ Hương. (2014). Thành phần dinh dưỡng của các sản phẩm thủy phân từ đầu và xương cá Chêm (*Lates calcarifer*) bằng enzyme flavourzyme. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản Trường Đại học Nha Trang*, 1, 49-53.

Nguyễn Văn Mươi & Trần Thanh Trúc. (2016). Ảnh hưởng của việc điều khiển độ hoạt động của nước đến chất lượng khô từ cá lóc nuôi tại tỉnh Đồng Tháp. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 1, 92-97.

Nguyen, H. T. M., Sylla, K. S. B., Randriamahatody, Z., Donnay-Moreno C., Moreau, J., Tran, L. T., & Bergé, J. P. (2011). Enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by-products using protamex protease. *Food Technology and Biotechnology*, 49(1), 48-55.

- Nielsen, P., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642–646.
- Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., & Shahiri, H. (2009). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115(1), 238-242.
- Ovissipour, M., Benjakul, S., Safari, R., & Motamedzadegan, A. (2010). Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna *Thunnus albacares* head using alcalase and protamex. *International Aquatic Research*, 2(2), 87-95.
- Rebah, F.B., & Miled, N. (2013). Fish processing wastes for microbial enzyme production: a review. *Journal of Food Science*, 3(4), 255 – 265.
- Shahidi, F., Han, X. Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53(3), 285-293.
- Siddik, M.A., Howieson, J., Fotedar, R., & Partridge, G.J. (2020). Enzymatic fish protein hydrolysates in finfish aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 13, 406-430.
- Trần Kiều Anh, Nguyễn Hà Trung, Nguyễn Khánh Hoàng Việt, Nguyễn Thị Hồng Loan & Phạm Kiên Cường (2017). Nghiên cứu các điều kiện thủy phân phụ phẩm cá hồi (*Salmo salar*) nhằm thu nhận peptide mạch ngắn. *Tạp chí Khoa Học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Quốc gia Hà Nội*, 33(1S), 7-13.
- Trần Minh Phú, Đào Thị Mộng Trinh, Lê Thị Minh Thủy & Nguyễn Quốc Thịnh. (2018). Bảo quản lạnh cá lóc phi lê (*Channa striata*) kết hợp xử lý acid acetic. *Tạp chí Khoa Học Trường Đại học Cần Thơ*, 54(3B), 147-155.
- Trần Thanh Trúc & Nguyễn Văn Mười. (2019). Nghiên cứu trích ly lipase (EC 3.1.1.3) từ nội tạng cá lóc nuôi. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55(2), 174-184.
- Trần Thị Bích Thủy & Đỗ Thị Thanh Thủy. (2016). Nghiên cứu ứng dụng enzyme protamex để thủy phân cá trích (*Sardinella gibbosa*) thu dịch đậm. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản Trường Đại học Nha Trang*, 2, 93-100.
- Trương Thị Mộng Thu & Lê Thị Minh Thủy. (2020a). Sản xuất bột nêm từ thịt cá lóc (*Channa striata*) bằng phương pháp ứng dụng hỗn hợp enzyme alcalase và flavourzyme. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Trường Đại học Nông lâm Thành phố Hồ Chí Minh*, 19(2), 43-49.
- Trương Thị Mộng Thu & Lê Thị Minh Thủy. (2020b). Nghiên cứu thủy phân protein từ thịt cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng enzyme thương phẩm và ứng dụng chế biến bột nêm. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56(3B), 160-167.
- Ung Minh Anh Thư. (2018). Nghiên cứu thủy phân protein từ phụ phẩm cá lóc bằng enzyme Alcalase. *Tạp chí Khoa học Công nghệ - Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 2, 78-84.
- Wang, X., Yu, H., Xing, R., Chen, X., Liu, S., & Li, P. (2018). Optimization of antioxidative peptides from mackerel (*Pneumatophorus japonicus*) viscera. *Peer Journal*, 6, 1-21.